





**Entwicklung und Validierung chromatographischer  
bzw. elektrophoretischer Methoden zur  
Reinheitsprüfungen von Arzneistoffen**

Dissertation

zur Erlangung des

naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Diplom-Pharmazeut **Yaser Bitar**

aus

Aleppo-Syrien

Würzburg 2007

Eingereicht am: .....

**bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie**

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe
  2. Gutachter: Prof. Dr. Tanja Schirmeister
- der Dissertation

1. Prüfer: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe
  2. Prüfer: Prof. Dr. Tanja Schirmeister
  3. Prüfer: PD Dr. Darius Zlotos
- des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am .....





Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2004 bis Oktober 2007 erstellt am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie im Fachbereich Chemie und Pharmazie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der wissenschaftlichen Betreuung von

**Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe**

Bei Ihr möchte ich mich besonderes für die interessante Aufgabenstellung, ihr großes Engagement zur Schaffung guter Arbeitsbedingungen, die ständige Diskussionsbereitschaft und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Besonderes bedanken möchte ich mich bei:

Der Universität Aleppo - Syrien für mein vierjähriges Stipendium

Dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) und dem Boehringer Ingelheim für die Unterstützung beim Atropin-Projekt und den Stabilitätsmessungen.

Dr. Eberhard Heller für die Synthese von Apotropin und Atropasäure.

Dr. Björn Degel für die Synthese der Aziridin-Derivate

Frau Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die freundliche Übernahme und Erstellung des zweiten Gutachtens

Daniela Brinz und Claudia Borst, mit denen ich das einzige „**B**-Labor“ im Haus teilen durfte, für das angenehme Arbeitsklima und für die vielen wertvollen Diskussionen. Besonders Claudia gilt nochmals mein herzlicher Dank für die Korrektur der Arbeit.

Dr. Mohammed Attia für die Hilfe bei der Einführung in das EndNote-Programm.

Meinen Kolleginnen und Kollegen in unserem tollen Arbeitskreis für die freundliche und gutgelaunte Atmosphäre, die dafür gesorgt hat, dass ich mich am Institut wohl gefühlt und gern dort gearbeitet habe.

Meiner Frau Safaa und meinen Kindern Mohammed und Rula, mit denen das Lebensgefühl immer anders ist, für das Verständnis, das sie vor allem in der Schlussphase für mich aufgebracht haben.

Meinen Eltern und meinen Brüdern und Schwestern für die Freuden und Sorgen in den letzten Jahren. Besonders meinen Eltern für die Bittgebete für mich.

Ferner gilt mein Dank auch allen, die, ohne namentlich genannt zu sein, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

*für meine Familie*

*Safaa & Mohammed & Rula*

*für meinen Eltern*

*Mohammed Dib & Fadila*



## Teile der Arbeit sind bereits veröffentlicht in:

- 1) Christine Kirchhoff, Yaser Bitar, Siegfried Ebel und Ulrike Holzgrabe  
"Analysis of atropine, its degradation products and related substances of natural origin by means of reversed phase high performance liquid chromatography"  
*J. Chromatogr. A* **2004**, 1046, 115-120
- 2) Yaser Bitar, Björn Degel, Tanja Schirmeister und Ulrike Holzgrabe  
"Development and validation of a separation method for the diastereomers and enantiomers of aziridine-type protease inhibitors"  
*Electrophoresis* **2005**, 26 (12), 2313-2319
- 3) Yaser Bitar, Björn Degel, Tanja Schirmeister und Ulrike Holzgrabe  
"Comparison of the separation of aziridine isomers applying *heptakis*(2,3-di-O-methyl-6-sulfato) $\beta$ -CD and *heptakis*(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato) $\beta$ -CD in aqueous and nonaqueous systems"  
*Electrophoresis* **2005**, 26 (20), 3897-3903
- 4) Ulrike Holzgrabe, Daniela Brinz, Susanne Kopec, Christine Weber und Yaser Bitar  
"Why not using capillary electrophoresis in drug analysis"  
*Electrophoresis* **2006**, 27 (12), 2283-2292
- 5) Roland Djang'eing'a Marini, Carl Groom, François Doucet, Jalal Hawari, Yaser Bitar, Ulrike Holzgrabe, Roberto Gotti, Julie Schappler, Serge Rudaz, Jean-Luc Veuthey, Roelof Mol, Govert W. Somsen, Gerhardus J. de Jong, Ha Thi Thanh Pham, Jie Zhang, Anne Van Schepdael, Jos Hoogmartens, Attilio Ceccato, Bruno Boulanger, Mateo Pedrini, Anne-Catherine Servais, Marianne Fillet, Jacques Crommen, Eric Rozet und Philippe Hubert  
"Interlaboratory study of a NACE method for the determination of *R*-timolol content in *S*-timolol maleate: Assessment of uncertainty"  
*Electrophoresis* **2006**, 27 (12), 2386-2399
- 6) Yaser Bitar und Ulrike Holzgrabe  
"Impurity profiling of atropine sulfate by microemulsion electrokinetic chromatography"  
*J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 44, 623-633
- 7) Yaser bitar und Ulrike Holzgrabe  
"Enantioseparation of chiral tropane alkaloids by means of cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography"  
*Electrophoresis* **2007**, 28 (15), 2693-2700

## Abstracta:

- 1) Yaser Bitar, Björn Degel, Tanja Schirmeister und Ulrike Holzgrabe  
“Development and comparison of chiral separation methods of aziridine by negatively charged  $\beta$ -CDs in aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis”  
Für DPhG-Jahrestagung **2005**, Mainz.
- 2) Yaser Bitar, Björn Degel, Tanja Schirmeister und Ulrike Holzgrabe  
“Separation of the enantiomers and diastereomers of the aziridine derivatives in aqueous and non-aqueous chiral capillary electrophoresis”  
Für (MSB'2006) 20<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Bioseparations (formerly HPCE conference series) **2006**, Amsterdam, the Netherlands.
- 3) Yaser Bitar und Ulrike Holzgrabe  
“Impurity test of atropine sulfate by microemulsion electrokinetic capillary chromatography”  
Für Drug Analysis 2006 (the 8<sup>th</sup> International Symposium on Drug Analysis and the 17<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis) **2006**, Namur, Belgium.
- 4) Yaser Bitar und Ulrike Holzgrabe  
“Determination of atropine, its degradation products and related substances of by means of microemulsion electrokinetic capillary chromatography”  
Für DPhG-Jahrestagung **2006**, Marburg.

## Vortrag:

- 1) Yaser Bitar und Ulrike Holzgrabe  
“Chromatographic and electrophoretic methods for impurity tests of drugs for modern quality control”  
Für 23<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Arab Medical Union in Europe **2006**, Aleppo, Syrien.





# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<b>I</b>	<b>Theoretischer Teil</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Reinheit in der Qualitätskontrolle .....	1
1.2	Verunreinigungen und Fälschungen .....	2
1.3	Enantiomerenreinheit .....	4
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Flüssigchromatographie und Kapillarelektrophorese</b> .....	<b>9</b>
3.1	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) .....	9
3.1.1	Die Methode .....	9
3.1.2	Grundlagen .....	9
3.1.2.1	Geräteaufbau .....	9
3.1.2.2	Chromatographische Parameter der HPLC .....	9
3.1.3	Methodenentwicklung .....	12
3.1.3.1	Probenvorbereitung .....	13
3.1.3.2	Auswahl des Phasensystems .....	14
3.1.3.2.1	Stationäre Phase .....	14
3.1.3.2.2	Mobile Phase .....	16
3.1.3.3	Temperatur .....	18
3.1.3.4	Detektionsmöglichkeiten .....	18
3.2	Kapillarelektrophorese (CE) .....	21
3.2.1	Die Methode .....	21
3.2.2	Grundlagen .....	21
3.2.2.1	Geräteaufbau .....	21
3.2.2.2	Elektrophoretische Mobilität .....	23
3.2.2.3	Elektroosmotische Mobilität .....	24
3.2.2.4	Bruttomobilität .....	27
3.2.3	Trenntechniken in der Kapillarelektrophorese .....	28
3.2.3.1	Kapillar-Zonen-Elektrophorese (CZE) .....	28
3.2.3.2	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) .....	28
3.2.3.3	Elektrokinetische Chromatographie mit Mikroemulsionen (MEEKC) .....	29
3.2.3.4	Chirale Trennung in der CE .....	31
3.2.3.4.1	Chirale cyclodextrin-modifizierte MEEKC (CD-MEEKC) .....	37
<b>4</b>	<b>Validierung</b> .....	<b>38</b>
4.1	Definitionen und Regelwerke .....	38
4.2	Validierungsparameter .....	40
4.2.1	Spezifität/Selektivität .....	40
4.2.2	Arbeitsbereich .....	40
4.2.3	Linearität .....	41
4.2.4	Präzision .....	42
4.2.5	Richtigkeit .....	43
4.2.6	Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ) .....	44
4.2.7	Robustheit .....	44
4.2.8	Probenstabilität .....	45
4.3	Validierung von HPLC- und CE-Methoden .....	45

<b>II Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>1 Tropa-Alkaloide</b>	<b>48</b>
1.1 Übersicht	48
1.2 Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat	49
1.2.1 Verunreinigungen des Atropinsulfates	49
1.2.2 Problemstellung	51
1.2.3 Quantitative Reinheitsprüfung von Atropinsulfat mit HPLC	52
1.2.3.1 Methodenentwicklung	52
1.2.3.1.1 Gradientenentwicklung	53
1.2.3.2 Methodvalidierung	54
1.2.3.2.1 Spezifität/Selektivität	55
1.2.3.2.2 LOQ und LOD, Arbeitsbereich, Linearität und Responsefaktor	55
1.2.3.2.3 Präzision und Richtigkeit	59
1.2.3.2.4 Robustheit und Probelösungsstabilität	62
1.2.3.2.5 Systemeignungstest	66
1.2.4 Stabilitätsprüfung von Atropinsulfat-Augentropfen	67
1.2.4.1 Überblick	67
1.2.4.2 Stabilitätsbedingungen	67
1.2.4.3 Ergebnisse der Langzeitstabilitätsuntersuchungen	69
1.2.4.3.1 Gehaltsbestimmung	69
1.2.4.3.2 Reinheitsbestimmung	71
1.2.5 Quantitative Reinheitsprüfung von Atropinsulfat mit CE	77
1.2.5.1 Methodenentwicklung	77
1.2.5.2 Methodenoptimierung	78
1.2.5.2.1 Auswirkung der Trennungsspannung	78
1.2.5.2.2 Auswirkung des Zusatzes eines organischen Lösungsmittels	80
1.2.5.2.3 Auswirkung des Tensids	82
1.2.5.2.4 Auswirkung eines niedrigen pH-Wertes	84
1.2.5.2.5 Auswirkung des Öl- und Co-Tensidstyps	85
1.2.5.2.6 Optimierung der Analysenzeit	86
1.2.5.3 W/O-MEEKC-Methode	87
1.2.5.4 Methodvalidierung	88
1.2.5.4.1 Selektivität	88
1.2.5.4.2 LOQ und LOD, Arbeitsbereich, Linearität und Responsefaktor	89
1.2.5.4.3 Präzision und Richtigkeit	92
1.2.5.4.4 Robustheit	95
1.2.5.5 Methodenvergleich MEEKC und RP-HPLC	98
1.3 Chirale MEEKC-Trennung von Tropan-Alkaloiden	101
1.3.1 Einführung	101
1.3.2 Einfluss der Art der eingesetzte Cyclodextrine	101
1.3.2.1 Ungeladene Cyclodextrine	101
1.3.2.2 Negativ geladene Cyclodextrine	103
1.3.3 Zusatz von organischen Lösungsmittel	109
1.3.4 Methodenpräzision	110
1.3.5 Methodenvergleich CD-MEEKC und CD-modifizierte CE	111
<b>2 Chirale Trennung von Aziridin-Derivaten</b>	<b>113</b>
2.1 Übersicht	113
2.2 Aufgabenstellung	114
2.3 Methodenentwicklung	114
2.3.1 Wasserfreie CE-Methode	114
2.3.2 Wässrige CE-Methode	118
2.4 Methodvalidierung	122
2.4.1 Selektivität	122

2.4.2 LOQ, LOD, Arbeitsbereich und Linearität .....	123
2.4.3 Präzision und Richtigkeit .....	124
2.4.4 Robustheit .....	126
2.5 Bestimmung des Diastereomerenüberschusses .....	129
<b>3 Enantiomerenreinheit von Levodopa .....</b>	<b>131</b>
3.1 Übersicht .....	131
3.2 Problemstellung .....	131
3.3 CE-Methodenoptimierung .....	132
3.4 Methodvalidierung .....	134
3.4.1 Selektivität .....	135
3.4.2 LOQ, LOD, Arbeitsbereich und Linearität .....	135
3.4.3 Präzision und Richtigkeit .....	137
3.4.4 Robustheit .....	138
<b>4 Ringversuch von Timololmaleat .....</b>	<b>141</b>
4.1 Einleitung und Zielsitzung .....	141
4.2 Proben .....	142
4.3 NACE-Methode .....	142
4.4 Die Ergebnisse .....	142
4.4.1 Systemeignungstest .....	142
4.4.2 Enantiomerenreinheit von S-Timolol .....	144
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>147</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>152</b>
<b>III Experimenteller Teil .....</b>	<b>157</b>
<b>1 Reagenzien und Materialien .....</b>	<b>157</b>
1.1 Wirkstoffe und Verunreinigungen .....	157
1.2 Puffer- und Hintergrundelektrolytensubstanzen .....	158
1.3 Cyclodextrine .....	159
1.4 Lösungsmittel .....	159
<b>2 Geräte und Software .....</b>	<b>160</b>
2.1 HPLC .....	160
2.2 Kapillarelektrophorese .....	161
2.3 Sonstige Geräte und Laborbedarf .....	161
<b>3 Herstellung der Lösungen und Messbedingungen .....</b>	<b>162</b>
3.1 Quantitative Reinheitsprüfung von Atropinsulfat mittels HPLC .....	162
3.1.1 Puffer und Lösungsmittelmischung .....	162
3.1.2 Probenbereitung .....	162
3.1.3 Chromatographische Bedingungen .....	163
3.2 Langzeitstabilität von Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % .....	163
3.2.1 Zusammensetzung der Fertigarzneimittel Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % .....	163
3.2.2 Lösungen- und Probenbereitung .....	164
3.2.3 Chromatographische Bedingungen .....	165
3.3 Quantitative Reinheitsprüfung von Atropinsulfat mittels MEEKC .....	165
3.3.1 Mikroemulsionshintergrundelektrolyt .....	165
3.3.2 Probenvorbereitung .....	166
3.3.3 Elektrophoretische Bedingungen .....	167
3.4 Chirale MEEKC-Trennung von Tropan-Alkaloiden .....	168
3.4.1 Hintergrundelektrolyt .....	168
3.4.2 Probenvorbereitung .....	168
3.4.3 Elektrophoretische Bedingungen .....	169
3.5 Chirale Trennung von Aziridin-Derivaten .....	170

3.5.1 Wasserfreie CE-Methode (NACE-Methode) .....	170
3.5.1.1 Methanolischer Hintergrundelektrolyt (MeOH-HGE) .....	170
3.5.1.2 Probenvorbereitung .....	170
3.5.1.3 Elektrophoretische Bedingungen .....	171
3.5.2 Wässrige CE-Methode .....	172
3.5.2.1 Hintergrundelektrolyt .....	172
3.5.2.2 Probenvorbereitung .....	172
3.5.2.3 Elektrophoretische Bedingungen .....	173
3.6 Enantiomerenreinheit von Levodopa .....	174
3.6.1 Hintergrundelektrolyt .....	174
3.6.2 Probenvorbereitung .....	174
3.6.3 Elektrophoretische Bedingungen .....	175
3.7 Ringversuch von Timololmaleat .....	176
3.7.1 Methanolischer Hintergrundelektrolyt (MeOH-HGE) .....	176
3.7.2 Probenvorbereitung .....	176
3.6.3 Elektrophoretische Bedingungen .....	177
<b>IV Literatur .....</b>	<b>178</b>
<b>V Anhang .....</b>	<b>183</b>
<b>1 Stabilität von Atropinsulfat-Augentropfen .....</b>	<b>183</b>
1.1 Gehaltsbestimmung .....	184
1.2 Reinheitsbestimmung .....	188
<b>2 Chirale MEEKC-Trennung von Tropan-Alkaloiden .....</b>	<b>192</b>
<b>3 Chirale Trennung von Aziridin-Derivaten .....</b>	<b>194</b>
<b>4 Enantiomerenreinheit von Levodopa .....</b>	<b>196</b>

## Häufig verwendete Abkürzungen

ACN	Acetonitril
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
CD	Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese (engl. <u>c</u> apillary <u>e</u> lectrophoresis)
CRS	Chemische Referenzstandard
CZE	Kapillarzonenelektrophorese (engl. <u>c</u> apillary <u>z</u> one <u>e</u> lectrophoresis)
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnsichtchromatographie
DM- $\beta$ -CD	<i>Heptakis(2,6-di-O-methyl)-<math>\beta</math>-CD</i>
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FDA	(eng. Food and Drug Administration)
FM	Fließmittel
F-Test	Fisher-Test
GC	Gaschromatographie
HDAS- $\beta$ -CD	<i>Heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)-<math>\beta</math>-CD</i>
HDMS- $\beta$ -CD	<i>Heptakis(2,6-di-O-methyl-6-sulfato)-<math>\beta</math>-CD</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (eng. <u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
ICH	Internationale Konferenz für Harmonisierung (eng. <u>I</u> nternational <u>C</u> onference on <u>H</u> armonisation)
IPC	Ionenpaarchromatographie
k. PF	Korrigierte Peakfläche
LC	Flüssigchromatographie (eng. <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
LOD	Nachweisgrenze (eng. <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>d</u> etection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (eng. <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>q</u> uantification)
MEEKC	Elektrokinetische Chromatographie mit Mikroemulsionen (eng. <u>m</u> icro <u>e</u> mulsion <u>e</u> lectrokinetic <u>c</u> hromatography)
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MZ	Migrationszeit
NACE	Wasserfreie Kapillarelektrophorese (engl. <u>n</u> onaqueous <u>c</u> apillary <u>e</u> lectrophoresis)
NMR	Kernspinresonanz (eng. <u>n</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance)
Ph.Eur	Europäisches Arzneibuch (eng. <u>P</u> harmacopoeia <u>E</u> uropean)
PDA	Photodiodenarray-Detektor
R	Auflösung (eng. <u>r</u> esolution)
r	Korrelationskoeffizient
RP	Umgekehrte Phase (eng. <u>r</u> eversed <u>p</u> hase)
RMZ	Relative Migrationszeit
RSD	Relative Standardabweichung (eng. <u>r</u> elative <u>s</u> tandard <u>d</u> eviation)
TM- $\beta$ -CD	<i>Heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)-<math>\beta</math>-CD</i>
t-Test	Student-Test
SDS	Natriumlaurylsulfat (eng. <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
S/N	Signal/Rausch (eng. <u>s</u> ignal-to- <u>n</u> oise)
Sulf- $\beta$ -CD	Sulfatiertes $\beta$ -CD
UV	Ultraviolett
VT	Volumentteile



## **I Theoretischer Teil**

### **1 Einleitung**

#### **1.1 Reinheit in der Qualitätskontrolle**

Die wichtigsten Qualitätsmerkmale von Arzneimitteln sind Reinheit, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit. Verunreinigungen in Arzneistoffen sind unvermeidbar herstellungsbedingt in den Substanzen enthalten. Sie dürfen die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der fertigen pharmazeutischen Zubereitungen allerdings nicht beeinträchtigen.<sup>1</sup>

Der Parameter „Reinheit“ gehört zu den wesentlichen Aspekten der pharmazeutischen Qualität von Arzneistoffen. Diesbezügliche Anforderungen sind für viele Arzneistoffe in entsprechenden Arzneibuchmonographien beschrieben. Die Einhaltung der dort festgelegten Spezifikationen gewährleistet eine ausreichende Qualität der Substanzen für den medizinischen Gebrauch. Voraussetzung ist dabei allerdings, dass mit den monographierten Prüfmethode auch alle relevanten Verunreinigungen sicher erfasst werden.

Noch ein wichtiges Kriterium für die Arzneimittelqualität ist ihre stoffliche Reinheit. Tatsächlich sind sehr viele wichtige Arzneistoffe aus optischen Isomeren zusammengesetzt. Das heißt, sie bestehen aus Molekülgruppen, die zwar einen identischen Aufbau, aber zum Teil spiegelsymmetrische (chirale) Strukturen mit unterschiedlicher biologischer Aktivität besitzen.<sup>2,3</sup> Die Entdeckung der optischen Aktivität bestimmter Moleküle durch *Louis Pasteur* vor 150 Jahren war ein wichtiger Schritt zur Schaffung enantiomerenreiner Arzneistoffe. Dennoch werden bis heute chirale Substanzen häufig als Gemisch (Racemate) hergestellt, nur ein Drittel der Wirkstoffe mit Spiegelbildisomerie wird in enantiomerenreiner Form synthetisiert und auf den Markt gebracht.

Die Beurteilungsgrundsätze für die Reinheit von Arzneistoffen bzw. Arzneimitteln sind in nationalen und internationalen Regelwerken, bestehend aus Arzneibüchern, Richtlinien und behördlichen Empfehlungen, festgelegt. Die Forderungen der Behörden (wie BfArM und FDA) nach hoher Reinheit der Arzneistoffe werden in zunehmendem Maß international angeglichen (z.B. ICH und PhEur). Ziel von Behörden und Wirkstoffproduzenten ist die Herstellung von Substanzen, die aufgrund eines niedrigen über lange Zeit konstanten Nebenproduktspektrums eine hohe Arzneimittelsicherheit garantieren.<sup>4</sup> Die Forderungen nach Reinheit dieser Substanzen müssen sich vorzugsweise an pharmakologisch bzw. toxikologisch begründeten Fakten und nicht nur an den Nachweiskontrollen der analytischen Methode orientieren.

## 1.2 Verunreinigungen und Fälschungen

Die Herstellung von Arzneistoffen kann begrifflich in Stoff-Synthese und Stoff-Gewinnung (aus Pflanzen, Mikroorganismen, etc.) untergliedert werden. Bei der Synthese kann unterschieden werden zwischen Totalsynthese, Halbsynthese und biosynthetischen Verfahren. Aus der Synthese oder Gewinnung eines Arzneistoffes resultiert seine Reinheit.

Die Verunreinigungen werden bezüglich ihrer Definition nach International Conference on Harmonization ICH-Richtlinie Q6A<sup>5</sup> (Qualitätsrichtlinie Q6 wird die Spezifikationen behandelt) als

- organische Verunreinigungen (verwandte Substanzen), die aus der Synthese stammen (z.B. Ausgangsstoffe, Neben- und Abbauprodukte, Reagenzien, Katalysatoren) oder bei der Lagerung entstehen können (z.B. Hydrolyseprodukte, Oxidationsprodukte, Photoreaktionsprodukte) oder letztendlich aus der Extraktion der Pflanzenmaterialien stammen
- anorganische Verunreinigungen wie Schwermetalle, anorganische Salze, Reagenzien, Katalysatoren und andere Materialien, und
- Restlösungsmittel

klassifiziert.<sup>6</sup>

Für die Gestaltung des Prüfverfahrens der organischen Verunreinigungen sind folgende Fälle zu unterscheiden:

*Toxische Verunreinigungen* (toxic impurities) erfordern individuelle, selektive und quantitative Prüfungen. Zu den Verunreinigungen zählen in weitestem Sinne auch optische Isomere oder Bestandteile von Naturstoffgemischen z.B. Antibiotika, soweit ihnen eine unerwünschte Wirkung zukommt.

*Verwandte Substanzen* (related substances), also strukturverwandte Verunreinigungen aus Synthese, Gewinnung oder Zersetzung, werden zweckmäßigerweise durch selektive, meist chromatographische Verfahren identifiziert und quantifiziert.

*Unbekannte Verunreinigungen* (ordinary impurities), deren biologische Inaktivität in der vorliegenden Menge bekannt ist, können mit einer chromatographischen Gesamtbestimmung erfasst werden.<sup>5,7</sup>

Das Arzneimittel minderer Qualität sind die Arzneistoffe, die entweder mehr als die im Arzneibuch zulässige Menge an bekannten Verunreinigungen oder andere Verunreinigungen enthalten sind, d.h. in einer Qualität, die den Arzneibüchern, sei es dem Europäischen (PhEur) oder Amerikanischen Arzneibuch (USP) nicht entsprechen. Dies trifft häufig auf Arzneimittelfälschungen zu.

Die neu auftretenden Verunreinigungen eines Arzneistoffs sind zumeist die Folge der Änderungen seines Herstellungs- und/oder Reinigungsprozesses. Da sich die Reinheitsprüfung mittels

Arzneibuchmethode auf einen bestimmten Herstellungsweg, z.B. bestimmte Synthesen oder bekannte Gewinnung, bezieht, werden diese neuen Verunreinigungen nur selten richtig erfasst. Auf diesem Weg kamen Arzneimitteln mit schlechter Qualität an Arzneistoffen auf den Markt, die dann im schlimmsten Fall zum Tod führen können.

Ein solcher Fall wurde 1998 im Zentrallaboratorium der Deutschen Apotheker dokumentiert, als mehrere Chargen von Erythromycin verschiedener Hersteller auf Lösungsmittelrückstände untersucht wurden. Obwohl die ICH-Empfehlung<sup>8</sup> besagt, dass der Restlösungsmittelgehalt bestimmt und begründet werden sollte, waren diese Chargen von Erythromycin auf dem Markt, die hohe Konzentrationen an Lösungsmittelresten wie Chloroform, Dichlormethan, 1,2-Dichlorethan, Ethylbenzol und Xylol-Isomeren enthielten.<sup>9,10</sup>

Im Jahr 1998 ergab die Untersuchung von 22 Trimethoprim-Chargen<sup>11,12</sup> von fünf verschiedenen Herstellern aus drei verschiedenen Länder mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC), Kopplung der Flüssigchromatographie und Massenspektroskopie (LC-MS) und schließlich kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) zwei neue Verunreinigungen (in Konzentration zwischen 0,1 – 2,1%), die vorher mit der dünnenschichtchromatographischen (DC) Methode in der USP nicht nachgewiesen worden waren. Die Studie erklärt, dass die unselektiven und weniger empfindlichen DC-Methoden gegen RP-HPLC ausgetauscht werden müssen.<sup>10,13</sup>

Als Beispiele für tödliche Gefahr nach Abwandlung des Herstellungswegs können hier der Tryptophan- und der Gentamicin-Fall<sup>10</sup> aufgeführt werden. In den Jahren 1989/90 erkrankten in den USA Tausende von Menschen an dem sog. Eosinophilie-Myalgie-Syndrom (EMS). Als Folge davon starben 37 Personen, 1500 erlitten dauerhafte gesundheitliche Schäden mit Lähmungen, Hautbrennen und ständigen Schmerzen. Als Ursache der bis dahin unbekanntes Krankheit erwies sich eindeutig das Nahrungsergänzungsmittel L-Tryptophan. Dieser Stoff wurde bereits seit langem als stärkender Nahrungszusatz und als harmloses Schlafmittel verkauft. Ein Großlieferant für den US-Markt war ein japanischer Hersteller. Um die Herstellung zu optimieren, hatte der Hersteller das Produktionsverfahren von Synthese auf gentechnisch veränderte Bakterien umgestellt. Exakt nachdem diese Umstellung erfolgt war, traten die tödlich verlaufenden EMS-Nebenwirkungen auf.<sup>14,15</sup> Schnell konnten mit Hilfe der HPLC drei Verunreinigungen identifiziert werden und zwar das so genannte 1,1-Ethylidenbistryptophan („Peak E“)<sup>16</sup>, 3-Phenylaminoalanin („Peak-UV-5“)<sup>17</sup> und 2-(3-Indolylmethyl)-1-tryptophan.<sup>18</sup> Die geringe Menge an diesen Verunreinigungen (ppm-Bereich) konnte mit der damals im Arzneibuch vorgeschriebenen DC-Methode nicht identifiziert werden. Die aktuelle Monographie des PhEur 6.0 prüft heute mittels HPLC auf diese Verunreinigungen.<sup>19</sup>

Im Mai 2000 wurden in den USA nach intravenöser Anwendung von Gentamicin 17 Todesfälle beobachtet, die augenscheinlich auf Qualitätsmängel zurückzuführen waren. Eine weitere Veröffentlichung beschreibt den Tod von 66 Patienten durch Gentamicin.<sup>20</sup> Gentamicin, das ein Gemisch aus mindestens 4 Aminoglycosiden ist, und Substanzen wie Aminosäuren, die durch Fermentierung hergestellt werden können, erfordern besondere Maßnahmen bei der Herstellung und Reinigung, weil ansonsten toxische Verunreinigungen verbleiben können, die mit den üblichen analytischen Verfahren nicht entdeckt werden und ggf. zu Todesfällen führen können. Die Suche nach zusätzlichen Verunreinigungen z.B. von verschiedenen Gentamicin- und Aminosäuren-Proben erfolgt heute mit Hilfe moderner analytischer Methoden wie Kapillarelektrophorese (CE), Mizellarer Elektrokinetischer Chromatographie (MEKC) und NMR-Spektroskopie.<sup>21-24</sup>

Um solche Arzneimittelfälschungen, die wegen der Verunreinigungen nach Abwandlung des Herstellungswegs ihren Arzneistoffen verursacht haben, zu vermeiden, soll die Prüfung auf „verwandte Substanzen“ von Arzneistoffen verbessert werden.

Im Europäischen Arzneibuch wird für eine Reihe von Arzneistoffen die Prüfung auf verwandte Substanzen mittels Dünnschichtchromatographie (DC) durchgeführt. Bezüglich Selektivität, Empfindlichkeit (ab 0,5%) und Trennleistung entspricht diese Technik in vielen Fällen jedoch nicht mehr den heutigen Anforderungen. Als Alternativen bieten sich, je nach zu analysierendem Arzneistoff, die Gas- (GC) oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an.

Die Prüfung auf verwandte Substanzen soll aus den oben genannten Gründen auf die HPLC in zwei Beziehungen umgestellt werden. Einerseits sollen alle bekannten Verunreinigungen empfindlicher nachgewiesen werden, um sie auf dem im Arzneibuch üblichen Level ab 0,05 Prozent (bezogen auf ihre pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften) begrenzen zu können. Andererseits soll auf andere Verunreinigungen getestet werden, die z.B. durch Syntheseänderung oder Gewinnung aus Naturstoffen in die Substanz gelangen können.

### **1.3 Enantiomerenreinheit**

Racemate von Arzneistoffen stellen Kombinationspräparate dar, nämlich die Kombination aus zwei spiegelbildlichen, aber nicht identischen Stoffen (Enantiomere) im Verhältnis 1:1. Diese Enantiomere verhalten sich in achiralen Umgebung, beispielsweise in Wasser oder Methanol, oder bei achiralen Analysenmethode z.B. IR- und UV-Spektroskopie oder HPLC völlig identisch. In chiralen Umgebung unterscheiden sie sich dagegen deutlich. Der menschliche Organismus ist aus chiralen Makromolekülen wie Proteinen, Zuckern, etc. aufgebaut. Sobald die Arzneistoffe appliziert sind, treten sie mit diesen Strukturen in Wechselwirkung, was sowohl für die Pharmakodynamik als auch für die Pharmakokinetik eine wichtige Rolle spielt. Um einen Effekt auszulösen, müssen

Arzneistoffe mit den bestimmten chiralen Makromolekülen "Targets" des Organismus interagieren. Ob und wie diese Wechselwirkungen ablaufen, hängt entscheidend von der dreidimensionalen Struktur des Arzneistoffs und seines Targets (Rezeptor oder Enzym) ab. Es ist einleuchtend, dass bei chiralen Arzneistoffen eine Form, das Eutomer, gut zur Zielstruktur passt und die erwünschte pharmakologische Wirkung trägt, während der spiegelbildliche Enantiomer (Distomer) deutlich schlechter damit wechselwirken kann und schwächere oder gegebenenfalls sogar unerwünschte Wirkung aufweist.<sup>3</sup> Der Quotient aus der Aktivität des Eutomers und des Distomers ist das eudismische Verhältnis.

Der Contergan®-Skandal in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts änderte die Annahme, dass zwei Enantiomere eines Arzneistoffs identische pharmakologische Wirkung haben müssen. Dieses Medikament mit dem Wirkstoff Thalidomid wurde als Hypnotikum und auch gegen Übelkeit in der Schwangerschaft eingesetzt; später wurden viele Kinder mit fehlenden Gliedmaßen oder geschädigten Organen geboren. Danach wurden die Enantiomere von Thalidomid mittels chromatographischer Methode getrennt<sup>25</sup> und eine pharmakologische Testung durchgeführt. Dabei zeigt das (*R*)-Enantiomer die erwünschte schlafanstoßende Wirkung, während das (*S*)-Enantiomer für die teratogene Eigenschaften verantwortlich war.<sup>26</sup> In der Folgezeit verlangten die staatlichen Behörden wie FDA auch pharmakologische Untersuchung der einzelnen Enantiomere und des Racemats von neuen Arzneistoffen durchzuführen.<sup>27</sup>

Im Folgenden werden aus pharmazeutischer Sicht einige Beispiele für chirale Arzneistoffe vorgestellt, die ursprünglich als Racemate eingesetzt wurden, jedoch in den letzten Jahren durch enantiomerenreine Arzneistoffe ergänzt oder ersetzt wurden. Dies ist nicht in jedem Fall klinisch relevant, verbessert aber in der Regel die Qualität der Therapie, da eine unnötige Belastung des Organismus mit einem Fremdstoff vermieden wird.

- Affinität zu Rezeptoren

Cetirizin ist der aktive Metabolit des H<sub>1</sub>-Antihistaminikums Hydroxyzin, das als Tranquillizer eingesetzt wird (Elroquil N®). Die Affinität der beiden Cetirizin-Enantiomere zu den Histamin-H<sub>1</sub>-Rezeptoren ist deutlich unterschiedlich. Das (*R*)-Enantiomer, das als Levocetirizin bezeichnet wird, bindet etwa 33-mal stärker als (*S*)-Enantiomer. Levocetirizin wurde im 2001 in den Handel eingeführt (Xusal®). Durch das Weglassen des weniger aktiven (*S*)-Enantiomer kann die Dosis auf die Hälfte reduziert werden.<sup>28</sup>

- Affinität zu Enzymen

Die meisten Arzneistoffe, die die bakterielle Gyrase inhibieren, sind nicht chiral. Eine Ausnahme stellt Ofloxacin dar, das als Racemat eingesetzt wird (Tarivid®). Seit 1998 ist das (*S*)-Enantiomer als eingeständiger Arzneistoff zugelassen (Tavanic®) werden. Levofloxacin stellt das Eutomer dar, das die bakterielle Gyrase stärker inhibiert (von 8- bis 128-mal) und weniger toxisch ist als das (*R*)-

Enantiomer.<sup>29</sup> In der klinischen Praxis werden vergleichbare Dosierungen eingesetzt, um mehr Bakterienarten effektiver zu töten.

- Rezeptorselektivität

Die anästhetischen und analgetischen Wirkungen von Ketamin (Ketanest®) beruhen vornehmlich auf der Blockade von NMDA-Rezeptoren, die wie die GABA-Rezeptoren zur Gruppe der Ionenkanäle gehören. Ketamin besitzt mehrere Bindungsstellen, an denen Liganden den Öffnungszustand des Ionenkanals modulieren können. Das (S)-Enantiomer bindet an der Phencyclidin-Bindungsstelle in der Ionenkanalpore etwa 3-mal stärker als das (R)-Enantiomer. Das (S)-Enantiomer besitzt auch eine etwa dreifach höhere Affinität zu den  $\mu$ - und  $\kappa$ -Opioid-Rezeptoren und ist deshalb etwas stärker analgetisch wirksam auf. Das schwächer wirksame (R)-Enantiomer aktiviert die  $\sigma$ -Rezeptoren, mit denen die Nebenwirkungen wie die unangenehmen Träume während der Narkose und die fehlende Erinnerungsvermögen während der Aufwachphase in Zusammenhang gebracht werden, während das (S)-Enantiomer eine deutlich geringere Affinität zu diesem Rezeptor aufweist. Die stärkere anästhetische und analgetische Wirkung sowie das verbesserte Aufwachverhalten nach der Narkose erklären den Einsatz des reinen (S)-Enantiomers (Ketanest® S).<sup>30</sup>

- Unterschiedliche Pharmakokinetik

Analgetische und antiphlogistische Effekte von Ibuprofen und Ketoprofen lassen sich durch Hemmung der Cyclooxygenase erreichen. Die (S)-Enantiomere beider Verbindungen (Eutomere) inhibieren die Cyclooxygenase stärker als die (R)-Enantiomere (Distomere). Auf der anderen Seite muss die Pharmakokinetik dieser Verbindungen betrachtet werden, da das (R)-Enantiomer durch ein Enzymsystem unidirektional in das (S)-Enantiomer umwandelt wird. Es handelt sich um eine Inversion und nicht um eine Racemisierung, da das (S)-Ibuprofen oder –Ketoprofen nicht in das (R)-Enantiomer überföhren werden kann. In den letzten Jahren wurden jedoch die Eutomere beider Arzneistoffe (Dexibuprofen und Dexketoprofen) ebenfalls in den Markt eingeföhrt.<sup>31-33</sup>

Ein anderes Beispiel ist Omeprazol, das als Prototyp der Protonenpumpenblocker eingesetzt wird. Die Pharmakodynamik beider Omeprazol-Enantiomere ist identisch. Sie unterscheiden sich in der Pharmakokinetik, genauer in der stereoselektiven Biotransformation (Bioverfügbarkeit). Die Gesamtmenge der Metaboliten von Omeprazol ist beim (R)-Enantiomer etwa 3-mal so hoch wie beim (S)-Enantiomer (Esomeprazol), das insgesamt langsamer verstoffwechselt wird und deshalb den pH-Wert des Magens über einen längeren Zeitraum als Omeprazol-Racemat erhöhen soll.<sup>34</sup>

- Unterschiedliche Toxizität

Das Lokalanästhetikum Bupivacain unterbricht die Reizleitung in Nervenfasern. Es blockiert die  $\text{Na}^+$ -Kanäle, in höheren Konzentrationen auch  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Durch die Blockade kardialer  $\text{Na}^+$ -Kanäle hat Bupivacain eine negativ inotrope und negativ chronotrope Wirkung am Herzen, die bis zum Herzstillstand föhren kann. Das (R)-Enantiomer blockiert diese kardialen Ionenkanäle

länger und stärker als das (S)-Enantiomer. Die Einführung des enantiomerenreinen Arzneistoffs Levobupivacain hat nicht die Wirkung, sondern die Sicherheit verbessert.<sup>35</sup>

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde es bei chiralen Arzneistoffen erforderlich, den Enantiomerenanteil bestimmen zu können und ggf. den Gehalt an unerwünschtem Enantiomer zu begrenzen. Daher ist es nötig, analytische Methoden zur Enantiomerenreinheit, die ausreichend schnell und genau sind, zu entwickeln.

Seit 2001 ist die Kapillarelektrophorese (CE) als Methode im Europäischen Arzneibuch beschrieben. Doch obwohl kapillarelektrophoretische Methoden sich gerade auf dem Gebiet der Enantiomerentrennung bewährt haben und zu Bestimmung der Enantiomerenreinheit angewandt werden, wird im PhEur 6.0 noch überwiegend die Polarimetrie zur Kontrolle der Enantiomerenanteile eingesetzt.

Die chirale CE besitzt gegenüber der Polarimetrie jedoch verschiedene Vorteile. Dazu gehören eine höhere Empfindlichkeit, geringer Substanz- und Lösemittelverbrauch sowie die Möglichkeit auch andere, chirale wie achirale Verunreinigungen (verwandte Substanzen) abzutrennen und zu bestimmen.

Momentan sind etwa 465 chirale Arzneistoffe im PhEur 6.0 aufgeführt, wobei ca. 322 davon auf Enantiomerenreinheit geprüft werden. Neben der vorwiegend verwendeten Polarimetrie werden nur für 6 Arzneistoffe chirale chromatographische Methoden (HPLC oder GC) eingesetzt. Die chirale CE wird für diesen Zweck im PhEur 6.0 bisher nicht eingesetzt.

## 2 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und Validierung chromatographischen (HPLC) und kapillarelektrophoretischen (CE) Methoden zur Anwendung in verschiedenen Bereichen der Reinheitsanalytik von ausgewählten Arzneistoffen und Substanzen:

- Prüfung des Verunreinigungsprofils von Atropinsulfat, die sowohl die den Naturstoff begleitenden verwandte Substanzen als auch die Zersetzungsprodukte von Atropin selektiv und in den vorgeschriebenen Arzneibuch-Spezifikationsgrenzen limitieren kann.
- Chirale Trennungen von Tropan- bzw. Scopangerüst-Arzneistoffen mittels MEEKC (Elektrokinetische Chromatographie mit Mikroemulsionen) als neue CE-Trenntechnik unter Zusatz verschiedener Cyclodextrin-Derivate als chirale Selektoren.
- Enantiomeren- und Diastereomerentrennung von neu synthetisierten Aziridin-Typ Protease-Inhibitoren mittels Cyclodextrin-Derivate in wässrigen bzw. wasserfreien CE-Systemen sowie der Vergleich beider Systeme.
- Enantiomerenreinheit von Levodopa mittels CE als Alternative zur chiralen HPLC-Methode im Europäischen Arzneibuch.
- Ringversuch zur Timololmaleat im Rahmen einer internationalen Validierungs-Studie einer wasserfreien CE-Methode zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von Timololmaleat.

Die verschiedenen oben genannten chiralen CE-Methoden zur Analyse ausgewählter, im EuAB beschriebener Arzneistoffe z.B. Atropin, Hyoscyamin, Levodopa und Timololmaleat wurden entwickelt und/oder validiert, um die Polarimetrie, sowie chirale HPLC in den Fall Levodopa, als Methoden zur Prüfung der Enantiomerenreinheit durch die chirale CE ersetzen zu können.

Anschließend sollte mit der entwickelten und validierten HPLC-Methode zur Gehalts-<sup>36</sup> und Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat die 36-Monats-Stabilitätstestungen (Langzeitstabilität) von Atropinsulfat-Augentropfen 0,5% und 0,2% durchgeführt werden.

Des Weiteren wurde die entwickelte und validierte MEEKC-Methode zur qualitativen und quantitativen Reinheitsprüfung von Atropinsulfat mit der HPLC-Methode für die Stabilitätsuntersuchungen verglichen.

## 3 Flüssigchromatographie und Kapillarelektrophorese

### 3.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

#### 3.1.1 Die Methode

Die HPLC (engl. high performance liquid chromatography) ist ein chromatographisches Verfahren zur Trennung von chemischen Substanzen, das sich in der Qualitätskontrolle von Arzneistoffen und Arzneimitteln vor allem zur Reinheitskontrolle und Gehaltsbestimmung etabliert hat. Sie kann in verschiedenen Trennverfahren unterteilt werden wie Normalphasen, Umkehrphasen-HPLC, Ionenpaar-, Ionenaustausch- und Größenausschluss-chromatographie, von denen die Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC) das in der Qualitätskontrolle von Arzneistoffen und Arzneimitteln wichtigste Verfahren darstellt.

#### 3.1.2 Grundlagen

##### 3.1.2.1 Geräteaufbau

Ein modernes HPLC-System besteht aus ein oder zwei Pumpen, einem Gradientenmischer, einem Autosampler, einem Probeninjektionssystem, einer Trennsäule, einem Detektor und einem Rechner mit geeigneter Software zu Integration und Auswertung der Chromatogramme.

Die Pumpe ist üblicherweise eine Zweikolbenpumpe, damit ein gleichmäßiger, möglichst pulsationsarmer Fluss des Fließmittels gewährleistet werden kann. Unterschieden wird zwischen Pumpen für isokratische und Gradientenarbeitsweise. Bei letzterer wird die mobile Phase aus verschiedenen Lösungsmitteln gemischt und die Zusammensetzung wird während der Analyse verändert (Niederdruckgradient). Mit mindestens zwei Pumpen (binäre Pumpen) ist auch die Erzeugung eines Hochdruckgradienten möglich.<sup>37,38</sup>

##### 3.1.2.2 Chromatographische Parameter der HPLC

Aus dem Chromatogramm kann man verschiedene Angaben über die Güte und die Optimierung der Trennung und der Säule machen.

Neben den physikalischen Eigenschaften der Analyten hängt die **Retentionszeit** von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und der Länge der Trennsäule ab. Strömt die mobile Phase langsam oder ist die Säule lang, so ist  $t_M$  (Totzeit der Trennsäule) groß und damit auch  $t_R$  (Bruttoretentionszeit).  $t_R$  ist für die Charakterisierung einer Substanz deshalb nicht geeignet. Günstiger ist der **Retentionsfaktor** (früher Kapazitätsfaktor), auch  $k$ -Wert genannt:

Gleichung I.3-1 
$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

$t_R$ : Bruttoretentionszeit

$t_M$ : Totzeit der Trennsäule.

$k$  ist von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und der Länge der Trennsäule unabhängig und ist das Molverhältnis der Komponente in der stationären und mobilen Phase. Retentionsfaktoren zwischen 1 und 5 sind optimal. Sind die  $k$ -Werte zu klein, kann die Auftrennung ungenügend sein. Größere  $k$ -Werte bedeuten lange Analysenzeit.

Ein Maß für die **Selektivität** eines chromatographischen Systems ist der Trennfaktor  $\alpha$  (relative Retention). Er beschreibt die Lage eines Peaks in Bezug auf weitere Peaks und die Fähigkeit einer Methode, zwei Stoffe voneinander zu trennen.

Gleichung I.3-2 
$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{mit } k_2 > k_1.$$

$k_1$  und  $k_2$  sind dimensionslose Retentionsfaktoren, die das Retentionsverhalten der Substanzen beschreiben. Ist  $\alpha = 1$ , so werden die beiden Komponenten nicht getrennt, denn ihre Retentionzeiten sind gleich groß.  $\alpha$  lässt sich durch die Eigenschaften der stationären und mobilen Phase (Elutionskraft, pH- Wert, Ionenstärke) sowie der Temperatur und der Pumpendruck beeinflussen. Mit diesen Einflussgrößen auf die Selektivität kann man auch das auftretende Peak tailing bei der Trennung von basischen oder sauren Stoffen mit RP-Phasen vermeiden.<sup>39,40</sup>

Die **relative Retention**  $r$  beschreibt die Lage eines Peaks in Bezug auf einen Vergleichspeak.

Gleichung I.3-3 
$$r = \frac{t_R - t_M}{t_S - t_M}$$

$t_R$ : Retentionszeit des betrachteten Peaks

$t_S$ : Retentionszeit des Standardspeaks (im Allgemeinen der Peak der zu prüfenden Substanz).

Die theoretische **Trennstufenzahl (Bodenzahl)**  $N$  charakterisiert die Trennleistung einer gegebenen Säule. Je besser die Säule gepackt wurde und je kleiner die Teilchen und damit umso größer die Oberfläche der stationären Phase, je länger sie ist und je optimaler die Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase ist, desto größer ist die Trennstufenzahl der Säule. Eine Säule mit hoher Trennstufenzahl kann auch Gemische trennen, die sich in ihrer relativen Retention  $\alpha$  nur wenig unterscheiden.

Gleichung I.3-4 
$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{w} \right)^2$$

$w_h$ : Peakbreite in halber Peakhöhe

$w$ : Peakbreite auf der Basislinie

Beide Gleichungen geben nur dann korrekte Resultate, wenn der Peak eine Gauß-Form hat. Ungünstige Peakformen, z.B. Tailing oder Leading, führen zu niedrigen Werten.<sup>41,42</sup>

Aussagen über die Qualität der Trennung können jedoch erst mit der **Auflösung**  $R$ , dem Verhältnis von Abstand der Peakmaxima zur Summe der betreffenden Peakbreiten auf halben Höhen, gemacht werden. Die **Auflösung**  $R$  zweier Peaks lässt sich entweder durch die Auswertung von Chromatogrammen (Gl. 5a) oder mit den besprochenen Größen  $k$ ,  $\alpha$  und  $N$  in Beziehung setzen<sup>43</sup> (Gl. 5b):

$$\text{Gleichung I.3-5a} \quad R = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}}$$

$t_{R1}$  und  $t_{R2}$ : Retentionszeiten zweier benachbarter Peaks

$w_{h1}$  und  $w_{h2}$ : Peakbreiten in halber Peakhöhe

$$\text{Gleichung I.3-5b} \quad R = \frac{1}{4}(\alpha - 1)\sqrt{N}\left(\frac{k}{k+1}\right)$$

$\alpha$ : Trennfaktor

$N$ : Bodenzahl

$K$ : Mittelwert aus Retentionsfaktoren  $k_1$  und  $k_2$  zweier getrennter Substanzen.

Aus der Gleichung (5) kann man ersehen, dass die Auflösung durch verschiedene Faktoren verbessert wird:

- $k$  soll zwischen 1 und 5 liegen (möglichst nicht kleiner als 2).
- Möglichst große Trennstufenzahl (Optimierung der Säulenlänge und der Fließmittelgeschwindigkeit der mobilen Phase).
- Vergrößerung des Kapazitätsfaktors  $\alpha$  durch Wechsel der stationären Phase.

Für quantitative Bestimmungen sollte  $R$  mindestens 1,25 betragen. Erst bei einem Wert von  $R = 1,5$  sind zwei nacheinander eluierende Peaks basisliniengetrennt. Da bei Reinheitsanalysen die Verunreinigungen im Verhältnis zur Hauptsubstanz nur in sehr geringen Mengen zu erwarten sind, können für die Abtrennung vom Hauptpeak größere Auflösungen notwendig sein, um eine korrekte Quantifizierung erreichen zu können.<sup>37</sup>

Die quantitative Auswertung über die Peakhöhe ist bei sich nicht überlappenden Peaks unproblematischer, kann aber bei asymmetrischen Peakformen zu fehlerhaften Integrationen führen. Nach dem PhEur 6.0 dürfen nur Peaks mit einem Symmetriefaktor von  $0,8 < S < 1,2$  quantitativ über die Höhe ausgewertet werden. Der **Symmetriefaktor** (Tailingfaktor) wird im PhEur 6.0 nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gleichung I.3-6} \quad S = \frac{w_{0,05}}{2A}$$

$w_{0,05}$ : Peakbreite bei einem Zwanzigstel der Höhe

A: Abstand zwischen der durch das Peakmaximum gezogenen Senkrechten und der ansteigenden Flanke bei einem Zwanzigstel der Peakhöhe.

Bei der Bestimmung der Reinheit mittels HPLC können die Verunreinigungen mit Hilfe einer Referenzsubstanz definierten Gehaltes verglichen werden. Dazu müssen alle Verunreinigungen bekannt sein und isoliert vorliegen. Ist dies nicht der Fall, so kann ein Vergleich auch mit einer verdünnten Lösung der Hauptsubstanz erfolgen. Weisen die Hauptsubstanz und die Verunreinigungen keine Absorptionskoeffizienten in vergleichbarer Größe bei der UV-Detektion auf, so müssen entsprechende Korrekturfaktoren verwendet werden. Diese werden auch als **Responsefaktoren** in Form des reziproken Wertes des Korrekturfaktors dargestellt. Der „Technical Guide“ des Ph.Eur<sup>44</sup> schlägt für Verunreinigungen, deren Absorptionskoeffizienten um mehr als 20 % von der Hauptsubstanz abweichen, eigene Referenzsubstanzen vor.

### 3.1.3 Methodenentwicklung

Für die Auswahl einer chromatographischen Methode zur Reinheitsprüfung eines Arzneistoffs ist eine möglichst genaue Definition der Fragestellung erforderlich. So sollte die Menge der zu bestimmenden Verbindungen (Hauptkomponente, Nebenkomponekte, Spuren), ihre chemische Natur und physikalische Eigenschaften sowie die Art und Menge der Verunreinigungen bekannt sein.

Zur richtigen Auswahl einer Methode und zur Bewertung der Ergebnisse ist es erforderlich, so viele Informationen wie nur möglich über die Vorgeschichte einer Analysenprobe zu wissen, wie z.B. der chemische Herstellungsweg oder die Isolierung aus Pflanzenmaterial, bekannte Verunreinigungen, oder bereits erfolgte Probenvorbereitung. Schließlich sollte eine Reihe von physikalischen und chemischen Eigenschaften aller zu bestimmenden Substanzen bekannt oder messbar sein. Bei der Bestimmung von Nebenkomponekten und in der Spurenanalytik müssen auch Eigenschaften der Matrix berücksichtigt werden, um mögliche Störungen von Trennungen und Nachweis abschätzen zu können.

In Arzneistoffmonographien der Arzneibücher werden die Verunreinigungen beschrieben, die aufgrund der Herkunft des Stoffes (z.B. Syntheseweg, Rohextrakt aus Pflanzen) oder der chemischen Reaktivität (z.B. Hydrolyseempfindlichkeit, leichte Oxidierbarkeit) vorhanden sein können mit Angaben über den maximal zulässigen Gehalt. Sind die zu erwartenden Verunreinigungen bekannt und als Referenzsubstanzen verfügbar bzw. leicht synthetisierbar, ist die Entwicklung einer HPLC-Methode zur Reinheitsprüfung prinzipiell möglich.

Liegt ein Gemisch mit unbekannter Zusammensetzung vor, kann man sich in Vorversuchen der Dünnschichtchromatographie (DC) bedienen, um Informationen über die Vielfalt der vorhandenen Substanzen und deren Trennverhalten zu bekommen. Der Vorteil der DC liegt hier in der schnellen Handhabung, den zahlreichen Detektionsmöglichkeiten (z.B. Fluoreszenzlösungen,

Sprühreagenzien) und dem Überblick über die gesamte Trennstrecke. Beim Einsatz der HPLC besteht die Gefahr, dass bestimmte Verunreinigungen auf der Säule zurückgehalten werden und nie zur Detektion kommen.

Zur schnellen Methodenentwicklung ist ein HPLC-System notwendig, das einen zügigen Wechsel der Parameter: Flussrate, Temperatur, Fließmittelzusammensetzung und Detektionswellenlänge zulässt.<sup>38,45</sup> Bei der Planung, Entwicklung und Optimierung einer HPLC-Methode werden folgende Schritte zunächst getrennt behandelt und schließlich im Zusammenwirken untersucht:

- Probenvorbereitung
- Auswahl des Phasensystems
- Temperatureinflüsse
- Detektionsmöglichkeiten.

### 3.1.3.1 Probenvorbereitung

Für die Entwicklung einer HPLC-Methode zur Reinheitsbestimmung eines Arzneistoffs oder eines Fertigarzneimittels sollte eine Probe zur Verfügung stehen, die alle Arzneistoffe, Hilfsstoffe, Verunreinigungen sowie alle potentiellen Zersetzungsprodukte enthält.

Bei der Durchführung einer Analyse in der HPLC ist die Probenvorbereitung ein wichtiger Schritt. Unter Probenvorbereitung werden die Operationen verstanden, durch die das zu analysierende Gemisch in eine injizierbare Form gebracht wird. Folgende allgemeinen Regeln müssen beachtet werden:

- Man löse das Probengut (reine Proben, Gemische und aufgearbeitete Proben) möglichst im Eluenten, der für die Chromatographie ausgewählt wurde. Wenn die Probe sich schlecht im Eluenten löst, dann löst man die Substanzen im polarerer Lösungsmittel vor (als Lösungsvermittler) und verdünnt schließlich mit dem Eluenten. Dieser Lösungsvermittler darf keine Störungen der Basislinie und kein Ausfallen der Probesubstanz oder eine Trübung der Probelösung erzeugen. Der Lösungsmittelpeak darf nicht mit den anderen Peaks im Chromatogramm interferieren.
- Verwendung von Lösungsmittel bester Qualität.
- Beim Lösen der Probe ist darauf zu achten, dass die Probe klar gelöst wird.
- Die Konzentration bei Verwendung eines UV-Detektors sollte im Bereich von maximal 1 mg/ml liegen.
- Vor der Injektion auf die Säule filtriert man die Probelösung durch geeignete Membranfilter mit 0.22 - 0.45 µm Porenweite zur Entfernung von Partikel oder anderen Schwebeteilchen.

In der Chromatographie mit Kieselgel sollte man keine polarerer Lösungsvermittler als das verwendete Eluens zum Lösen der Probe einsetzen, da die Chromatographie durch das polarerer Lösungsmittel gestört wird und zu nicht reproduzierbaren Chromatogrammen führt. Wird Acetonitril, Methanol, Tetrahydrofuran oder Dimethylformamid als Lösungsvermittler eingesetzt

oder die Probe in einem deutlich schwächer eluierenden Lösungsmittel dosiert als die mobile Phase selbst darstellt, so werden die Komponenten am Säulenanfang konzentriert. Hat das Lösungsmittel für die Probe deutlich stärkere Elutionskraft als die mobile Phase, so kann dies zu deutlicher Bandenverbreiterung führen, unter Umständen sogar zu schlechten Peakformen.<sup>46</sup>

Bei der Auswahl des Lösungsmittels müssen die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen und deren Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel (Eluent) berücksichtigt werden. Die Komponenten können miteinander reagieren. Nicht nur das Lösungsmittel kann mit der Probesubstanz reagieren, sondern auch die im Lösungsmittel vorhandenen Verunreinigungen (z.B. Amine in Aceton oder Wasser in Acetonitril). Dies ist in der Regel nicht problematisch, wenn man die Probelösung sofort analysiert. Benutzt man einen Autosampler, in dem die Probe im ungünstigen Fall etwa 5-8 Stunden verbleibt, so kann in diesem Zeitraum eine chemische Reaktion erfolgen.

Bei der Filtration der Probelösung durch einen Kunststoffmembranfilter muss sichergestellt sein, dass die zu analysierende Substanz oder deren Nebenprodukte nicht irreversibel durch den Filter adsorbiert werden.

Das Probenvolumen sollte möglichst klein sein, um eine Bandenverbereiterung zu vermeiden. Andererseits kann es günstig sein, die Probe in einem größeren Volumen zu lösen, um lokale Überladungseffekte am Säulenanfang zu vermeiden. Es gibt eine obere Grenze für das Dosiervolumen, weil die Peakbreite beim Austritt aus der Säule mindestens so groß ist wie das Volumen beim Einspritzen. Das Dosiervolumen sollte also kleiner sein als die Bandenverbreiterung, die in der Säule auftritt, damit die Bodenzahl nicht rapide sinkt.<sup>37,38</sup>

### 3.1.3.2 Auswahl des Phasensystems

#### 3.1.3.2.1 Stationäre Phase

Bei der Entwicklung einer HPLC-Methode spielt die Wahl der Säule eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Selektivität des Trennsystems. Generell gibt es folgende Auswahlmöglichkeiten:

- die Säulendimensionen
- das Packungsmaterial
- die Teilchengröße

Für analytische Zwecke werden meist Säulen mit einem inneren Durchmesser von 2 bis 5 mm verwendet. Dickere Säulen dienen dem präparativen Arbeiten (>10 mm). Arbeitet man mit stationären Phasen von 5 oder 10 µm Partikeldurchmesser, so liegt die Länge der Säule üblicherweise zwischen 5 und 15 cm. Werden höhere Trennleistungen benötigt, so ist es meist besser, eine stationäre Phase mit kleinerem Partikeldurchmesser zu verwenden als längere Säule. Eine längere Säule erhöht das Retentionsvolumen und verringert dadurch die Konzentration der Peaks im Eluat, so dass die Nachweisgrenze schlechter wird. Dünne Säulen bieten zwei Vorteile

im Vergleich zu solchen mit größerem Durchmesser. Erstens geringerer Lösungsmittelverbrauch, weil das Retentionsvolumen proportional zum Quadrat des Säulendurchmessers ist. Zweitens besseres Verhältnis von Signalhöhe zu Probenmenge, weil die Peakmaximumkonzentration proportional zum reziproken Quadrat des Säulendurchmessers ist.<sup>45</sup>

Die Säulenfüllmaterialien sollten eine möglichst enge Korngrößenverteilung aufweisen (Durchmesserverhältnis des kleinsten zum größten Korn 1:1,5 oder 1:2). Dies ist nötig, weil die kleinsten vorkommenden Körner die Permeabilität der Säule bestimmen und die größten ihre Bodenzahl. Kleines Korn bedeutet hohem Strömungswiderstand, großes Korn starke Bandenverbreiterung. Deshalb ist auf manchen Produkten eine Korngrößenanalyse der betreffenden Charge angegeben.<sup>47</sup>

Kieselgel ist ein Adsorbens mit hervorragenden Eigenschaften. Es ist die Grundlage für zahlreiche chemisch modifizierte stationäre Phasen und ist an der Oberfläche mit OH-Gruppen, der so genannte Silanolgruppen versehen. Diese OH-Gruppen wirken als adsorptive Zentren und geben dem Kieselgel seine verschiedenen Eigenschaften; z.B. freie Silanole sind schwach sauer, geminale Silanole und assoziierte Silanole sind nicht saurer, Silanole neben Metallkationen sind stark sauer. Die Silanolgruppe lässt sich mit einem Alkylrest eines Alkohols verethern; diese Reaktion ist aus sterischen Gründen nur an der Oberfläche des Kieselgels möglich.<sup>48,49</sup> Bei der Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed-Phase-Chromatography) sind die stationären Phasen weniger polar als die mobile Phase. Die am häufigsten verwendete stationäre Phase weist chemisch gebundenes Octadecylsilan (ODS) auf, hier sind die Silanolgruppen mit einer C18-Alkylgruppe verknüpft. Es sind aber auch C8- und kürzere Alkylphasen in Gebrauch.

Gab es früher nur die Möglichkeit hydrophiles oder hydrophobes Material einzusetzen, stehen seit einiger Zeit sogenannte polar modifizierte HPLC-Phasen zur Verfügung. Diese ermöglichen es, polare, unpolare, saure und basische Komponenten nebeneinander mit ausreichender Selektivität zu trennen (Abb. I.3-1). Solche stationären Phasen erhalten ihren hydrophilen Charakter über die Einbettung polarer funktioneller Gruppen (z.B. Amidgruppen) in die Alkylkette oder durch polares "Endcapping". Ein Beispiel sind die sogenannten „Aquasäulen“, die mit einem polaren Endcapping ausgestattet sind und deshalb sowohl hydrophile als auch hydrophobe Selektivität aufweisen. Da dieser Säulentyp in nachstehenden Projekten (Gehalts- und Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat) eingesetzt wird, soll an dieser Stelle eine genaue Beschreibung erfolgen:

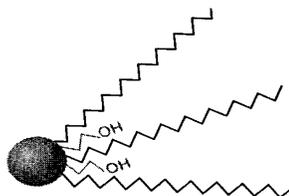


Abb. I.3-1: Schematische Darstellung eines polar modifizierten Kieselgelpartikels.

- Aquasil C18 basiert auf einem hochreinen, sphärischen Kieselgelmaterial mit einer Porenweite von 100 Å und ist basendeaktiviert.
- Die hydrophilen (polaren) OH-Gruppen des Endcappings werden solvatisiert und verhindern so den Phasenkollaps der C18-Alkylketten bei Verwendung rein wässriger Eluenten. Die OH-Gruppen führen zu Dipol-Dipol-Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbindungen mit polaren und ionischen organischen Substanzen.
- Die C18-Alkylketten verleihen Aquasil C18 den hydrophoben Charakter eines Reversed-Phase-Materials.

Aquasilsäulen wurden speziell für die RP-Trennung polarer Substanzen entwickelt. Die Phase verfügt über eine hohe Konzentration C18-Alkylketten sowie ein polares Endcapping. Beides trägt dazu bei, dass hochpolare, wasserlösliche Substanzen mit deutlicher Verzögerung (Retention) von der Säule eluieren. Der polare Charakter der Aquasil-C18-Phase erlaubt die Anwendung rein wässriger mobiler Phasen. Herkömmliche RP-Phasen mit hoher Kohlenstoffbelegung benötigen einen Anteil organischer Lösungsmittel von 5 % bis 15 %, um einen Phasenkollaps der Alkylgruppen zu vermeiden. Dieser äußert sich in Verlust von Retention und Selektivität und ist nur bedingt reversibel. Aquasilsäulen sind für diesen Phasenkollaps aufgrund des polaren Endcappings nicht anfällig.<sup>50</sup>

### 3.1.3.2.2 *Mobile Phase*

Die mobile Phase beeinflusst im Wechselspiel mit der stationären Phase die Trennung des gegebenen Analytengemisches. Meist stehen zur Lösung eines Trennproblems mehrere Elutionsmittel zur Verfügung, bei der Auswahl der mobilen Phase müssen folgende Kriterien beachtet werden:

- **Elutionskraft:** ist ein Parameter, der die Elutionsstärke des Lösungsmittels für eine bestimmte stationäre Phase beschreibt. Er ist ein Maß für die Adsorptionsenergie eines Lösungsmittelmoleküls pro Flächeneinheit des Adsorbens.
- **Viskosität:** Ein Lösungsmittel niedriger Viskosität gibt bei einem gegebenen Volumenstrom einen kleineren Druck als ein höher viskoses. Zudem erlaubt es eine schnellere Chromatographie, weil der Stoffaustausch rascher vor sich geht.
- **UV-Durchlässigkeit:** Bei Verwendung eines UV- oder Fluoreszenz-Detektors muss die mobile Phase bei der gewünschten Wellenlänge vollständig durchlässig sein.
- **Reinheit:** Dieses Kriterium bedeutet je nach Verwendungszweck etwas anderes: Abwesenheit von Stoffen, welche bei der gewählten Detektionsart stören würden; Abwesenheit von Stoffen, welche bei Gradientenelution stören würden, die zur Basisliniedrift führen können.

Als mobile Phase in der RP-HPLC verwendet man meist Gemische aus Wasser oder wässrigen Pufferlösungen mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln (insbesondere z.B. Methanol, Acetonitril).<sup>37,51</sup> Allerdings gewinnen nichtwässrige Eluenten allmählich Bedeutung für die RP-

Phasen von apolaren Arzneistoffen. Da bei RP-Phasen häufig mit Gradienten gearbeitet wird, müssen die verwendeten Lösungsmittel von hoher Reinheit sein.<sup>52</sup> Bei Trennproblemen bzw. mangelhaften Peakformen wird mit Zusätzen wie Essigsäure, Tetrahydrofuran oder Triethylamin gearbeitet.<sup>53</sup>

Bei der Analyse von Arzneistofflösungen mit ionisierbaren oder ionischen Analyten sollte die wässrige Lösung ein Puffersystem sein, das bei genauer Einhaltung eines definierten pH-Werts das Protonierungsgleichgewicht zu einer Seite verschiebt. Der gewählte pH-Wert des Puffers muss mindestens +/- zwei Einheiten vom  $pK_a$ -Werte der interessierenden Substanzen entfernt sein; dabei sind die Kenntnisse über die  $pK_a$ -Werte der zu trennenden Probenbestandteile hilfreich.

Die Auswahl der Puffersubstanz richtet sich nach dem erforderlichen pH-Wert. Für einen sauren pH-Bereich wird z.B. Kaliumdihydrogenphosphatpuffer, für einen schwach sauren bis neutralen Bereich z.B. Ammoniumacetatpuffer benutzt. Letzterer wird insbesondere dann eingesetzt, wenn es sich um die Bestimmung eines Analyten mit unbekanntem Verunreinigungsprofil handelt. Durch Einsatz von Puffern können saure und basische Substanzen mit guten Peakformen chromatographiert werden. Unbekannte Proben sollten einmal mit Wasser und dann mit sauren und neutralen Puffern analysiert werden. Dabei erkennt man saure und basische Substanzen durch Änderung der Retention.<sup>37,45</sup>

Als Startpunkt ist eine Ionenstärke von 20 bis 25 mM günstig. Eine zu kleine Ionenstärke zeigt kaum Wirkung, das heißt, die Pufferkapazität ist gering. Hohe Ionenstärke (z.B. 100 mM) können zu Löslichkeitsproblemen mit organischen Lösungsmitteln führen. Es ist zu empfehlen, die vollständige Mischbarkeit des gewählten Puffers mit dem gewählten organischen Lösungsmittel über den ganzen Bereich von 0 bis 100 % B (organischer Anteil) zu überprüfen.<sup>38</sup>

Bei komplexen Probengemischen sollten Gradientensysteme mit zunehmender Elutionskraft verwendet werden.<sup>54</sup> Zur Erstellung einer Analysenmethode durch RP-Phasen beginnt man mit einem linearen Gradienten von 90 bis 10 % Wasser oder Puffer in organischen Lösungsmitteln (Acetonitril). Unter diesen Bedingungen werden alle lipophilen Substanzen eluiert. Mit diesem Übersichtsgradienten kann eine Vielzahl verschiedenartiger Proben befriedigend aufgetrennt und analysiert werden, besonders dann, wenn die Proben sehr unterschiedliche Bestandteile enthalten. Mit der Gradientenelution kann man auch andere Trennprobleme lösen z.B. eine Verkürzung der Analysenzeit, Verbesserung der Auflösung und Erhöhung der Selektivität eines HPLC-Systems.<sup>37</sup>

Trotzdem ist es aus Gründen der Einfachheit und Reproduzierbarkeit anzustreben, unter isokratischen Bedingungen zu arbeiten, denn die Gradientenelution ist zwangsläufig fehleranfälliger. Sie stellt höhere Ansprüche an die Leistungsfähigkeit der HPLC-Anlage, an die Validierung des HPLC-Messplatzes und an die Methodvalidierung. Ein weiterer Nachteil ist eine vor allem beim Einsatz von „steilen Gradienten“ auftretende Basisliniendrift, die zu einer fehlerhaften Integration der Peaks führen kann. Beachten sollte man weiterhin den Aufwand der

Äquilibrierung, sowohl vor den Analysenläufen als auch die „Postrun“-Zeiten für das Einstellen der Anfangsbedingungen zwischen den Läufen.

### 3.1.3.3 Temperatur

Es ist nicht möglich, allgemein gültige Regeln für den Einfluss der Temperatur auf HPLC-Trennungen aufzustellen. Bei erhöhter Temperatur wird die Trennleistung einer Säule oft besser, weil die Viskosität der mobilen Phase abnimmt und dadurch der Stoffaustausch erleichtert wird. Es kann aber auch eine Abnahme der Trennleistung auftreten. Der Trennfaktor kann zu- oder abnehmen. Vorteilhaft ist die Verkürzung der Analysenzeit, weil dank größeren Diffusionskoeffizienten bei höherer linearer Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase gearbeitet werden kann. Wenn die mobile Phase oder die Probelösung hochviskos ist, muss bei höherer Temperatur gearbeitet werden. In diesem Fall benötigt man weniger Druck, um die mobile Phase zu pumpen bzw. die Probe lässt sich so erst einspritzen.

Zur Optimierung einer Trennung sollte immer auch abgeklärt werden, ob sie sich bei einer höheren oder tieferen Temperatur als üblich besser durchführen ließe. Selbst hohe Temperaturen, bis über 100 °C, lassen sich handhaben, obwohl einige Änderungen notwendig sind. Die Temperatur darf bei Kieselgelsäulen mit chemisch gebundenen Phasen maximal 80 °C betragen.<sup>55</sup> Für RP-Phasen sind die Temperaturgrenzen durch niedrige Siedepunkte der mobilen Phase (15 bis 100 °C) und die Wärmeempfindlichkeit der stationäre Phase gesetzt.<sup>56</sup>

### 3.1.3.4 Detektionsmöglichkeiten

Auch die Auswahl des Detektors richtet sich nach der vorliegenden Aufgabenstellung und den chemisch-physikalischen Eigenschaften der zu trennenden Komponenten.

Der Detektor soll erkennen, wann eine Substanzbande aus der Säule eluiert wird. Er muss die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase feststellen, diese in ein elektrisches Signal umwandeln und als Abweichung von der Basislinie aufzeichnen. Der ideale Detektor sollte bei der quantitativen Analyse:

- entweder alle eluierten Peaks gleich empfindlich registrieren oder aber nur die interessierenden Substanzen,
- gegenüber Temperaturänderungen und Änderungen der Zusammensetzung der mobilen Phase (z. B. Gradientenelution) unempfindlich sein,
- sehr kleine Substanzmengen noch erfassen können (Reinheitsprüfung),
- selektiv sein, d.h. nur Substanzen erfassen, welche bei der gewählten Wellenlänge eine Mindestabsorption von UV-Licht zeigen (bei UV-Detektor),
- nicht zur Bandenverbreiterung beitragen, also ein sehr kleines Zellvolumen besitzen,
- rasch reagieren, damit auch schmale Peaks, welche in kurzer Zeit durch die Zelle strömen, richtig erfasst werden, und

- über einen möglichst großen linearen Messbereich verfügen.<sup>57,58</sup>

In der HPLC-Routineanalytik wird häufig der UV-VIS-Detektor verwendet. Außerdem finden elektrochemische oder massenselektive Detektoren, Fluoreszenz-, Leitfähigkeits- oder Brechungsindexdetektoren Anwendung. Da die meisten pharmazeutischen Wirkstoffe UV-Chromophore besitzen, ist die UV-Detektion in diesem Bereich die Methode der Wahl. Die Proportionalität zwischen Signalstärke und Schichtdicke ist in dem Gesetz von Lambert-Beer (Gl. 3.1-7) ausgedrückt. Bei der HPLC ist die UV-VIS-Detektion wegen der größeren Schichtdicke in der Messzelle empfindlicher als bei der CE, wo die Detektion direkt in der Kapillare erfolgt und damit die Schichtdicke sehr gering ist.

$$\text{Gleichung I.3-7} \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$A$ : Absorption

$\varepsilon$ : Absorptionskoeffizient

$c$ : Konzentration

$d$ : Schichtdicke

Bei Reinheitsprüfungen, insbesondere bei Arzneistoffen mit unbekanntem Verunreinigungsprofil, ist die Wahl der Messwellenlänge kritisch. Sie sollte nicht nach der maximalen Selektivität für den Arzneistoff oder für ein bestimmtes Zersetzungsprodukt ausgewählt werden, sondern einen Kompromiss darstellen. Um möglichst alle potentiellen Verunreinigungen zu erfassen, ist es günstig, sich für einen bestimmten Wellenlängenbereich zu entscheiden. Allerdings darf hier das Phänomen des „UV-Cut-Off“ der mobilen Phase nicht unberücksichtigt bleiben. Der Begriff „UV-Cut-Off“ beschreibt diejenige Wellenlänge oberhalb der das genutzte Fließmittel keine Eigenabsorption mehr ausweist. Es liegt bei den meisten Fließmittelbestandteilen zwischen 190 und 215 nm. Optimal ist eine Wellenlänge, bei der die Hauptsubstanz und alle Verunreinigungen einen annähernd gleichen Absorptionskoeffizienten aufweisen. Kann dies nicht erfüllt werden, so resultieren für gleiche Konzentrationen unterschiedliche Signalintensitäten.<sup>37</sup>

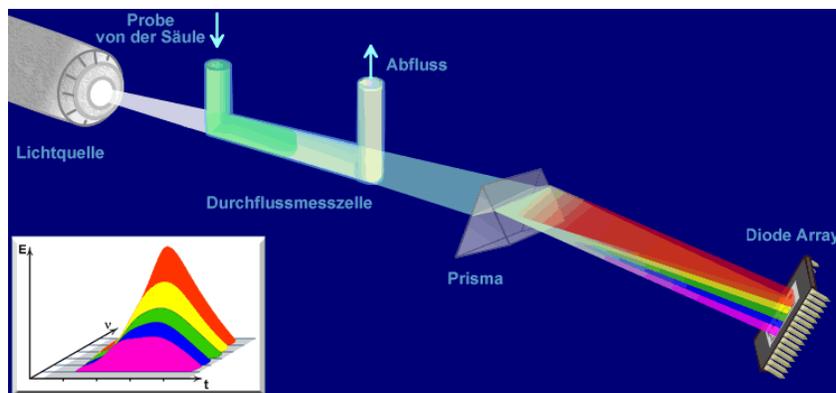


Abb. I.3-2: Prinzipieller Aufbau eines DAD-Detektors.

Noch weitgehender Möglichkeiten bietet der Einsatz eines Photodiodenarray-Detektors (DAD-Detektor) durch die Aufnahme von vollständigen Peakspektren (Abb. I.3-2). Zum einen wird dadurch die Auswahl der optimalen Wellenlänge erleichtert, zum anderen kann er zur Überprüfung der Peakreinheit genutzt werden. Dabei werden z.B. spektrale Informationen im auf- und absteigenden Teil des Peaks verwendet. Aufgrund der anfallenden Datenmenge und der etwas geringeren Empfindlichkeit wird der DAD meist nur zur Methodenentwicklung genutzt.<sup>38</sup>

## 3.2 Kapillarelektrophorese (CE)

### 3.2.1 Die Methode

Die CE (engl. capillary electrophoresis) ist der Überbegriff für eine Anzahl von Methoden, denen gemeinsam ist, dass durch Anlegen einer Spannung an eine mit Flüssigkeit gefüllte Kapillare eine Wanderung geladener Moleküle (Ionen) im elektrischen Feld stattfindet. Die verschiedenen Techniken der Kapillarelektrophorese haben sich in den letzten Jahren als sehr leistungsfähige Verfahren zur Analytik polarer sowie auch unpolarer Stoffe etabliert, die aufgrund der hohen Trennleistung die Bestimmung strukturell sehr ähnlicher Substanzen erlauben.<sup>59</sup> Die CE hat sich in der Umweltanalytik<sup>60</sup> (anorganische Ionen, organische Säuren), bei der Trennung biochemischer Makromoleküle<sup>61,62</sup> (DNA-Fragmente, Oligosaccharide, Proteine) und auch in der pharmazeutischen Analytik<sup>63,64</sup> (chirale Trennung, Reinheitsbestimmung, Vitaminanalytik) bewährt. Die Aufnahme in das Europäische Arzneibuch<sup>65</sup> und in die USP<sup>66</sup> belegt die allgemeine Akzeptanz der CE als analytisches Verfahren.

### 3.2.2 Grundlagen

#### 3.2.2.1 Geräteaufbau

Das Prinzip und der Aufbau einer CE-Apparatur sind in Abbildung I.3-3 dargestellt. Eine mit Elektrolyt (Trennpuffer) befüllte Kapillare, welche mit ihren beiden Enden in mit dem Elektrolyten gefüllten Gefäße (Vials) taucht, bildet den Hauptbestandteil des CE-Geräts. Über diese Elektrolytgefäße wird die Hochspannung für den Trennvorgang zugeführt. Durch eine Hochspannungsquelle kann eine Spannung bis zu 30 kV angelegt werden. Die Auswertung erfolgt bei den kommerziellen Geräten mit einem an das Gerät angeschlossenen Rechner mit geeigneter Software.

Die Standardkapillare besteht aus reinem amorphen Siliciumdioxid (engl. fused-silica)<sup>67</sup> und ist zur Erhöhung ihrer Flexibilität mit einer ca. 15 µm dicken Polyimidschicht umhüllt, so dass die Kapillaren bei ihrer Handhabung nicht leicht brechen. Bei den meisten Applikationen verwendet man Kapillaren mit einer Länge von 20-100 cm und einem Innendurchmesser von 50-100 µm. Der Einsatz von 50 µm-Kapillaren hat sich über die Jahre hinweg etabliert, da diese meist bessere Trennleistung bieten als 75 bzw. 100 µm Kapillaren, diese aber aufgrund des größeren Durchmessers wiederum empfindlicher Messungen zulassen als die engeren.

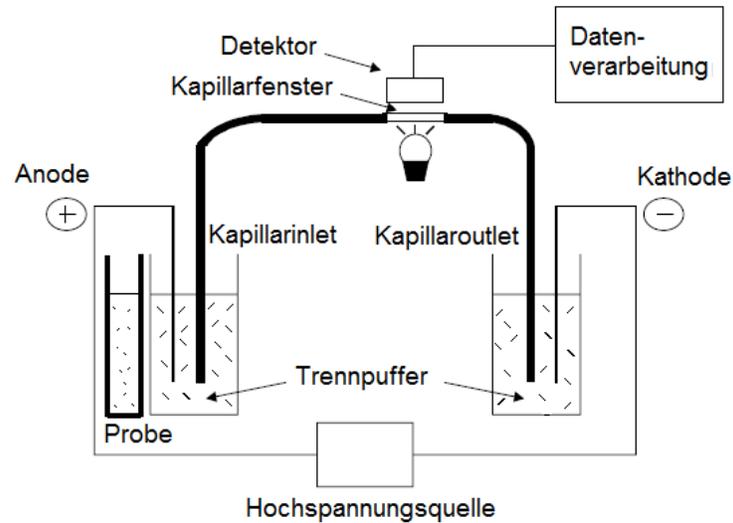


Abb. I.3-3: Schematische Darstellung der Grundbausteine einer CE.

Grundsätzlich ist die kapillarelektrophoretische Trennung sowohl entsprechend der Darstellung in Abb. I.3-3 im anodischen Modus möglich, bei der die Probenaufgabe auf Anodenseite und die Detektion auf Kathodenseite erfolgt, als auch bei umgekehrter Polarität im kathodischen Modus. Die Probenaufgabe kann hydrostatisch, hydrodynamisch oder elektrokinetisch erfolgen. Über den Druck und die Injektionszeit wird bei der häufig angewandten hydrodynamischen Injektion ein definiertes Probenvolumen injiziert. Es beträgt in der Regel wenige Nanoliter und kann experimentell bestimmt werden. Bei der elektrokinetischen Injektion wird für die Zeit der Injektion ein elektrisches Feld angelegt. Die Ionen der Probelösung reichern sich in Abhängigkeit von ihrer Ladung und ihrer elektrophoretischen Mobilität am Kapillareinlass an und migrieren in die Kapillare. Durch den Einsatz von Quarzkapillaren wird eine direkte Detektion in der Kapillare ermöglicht, jedoch muss vor dem Einsatz der Kapillare in den stark gefärbten Polyimidfilm ein Detektorfenster gekratzt oder gebrannt werden, so dass an dieser Stelle die Kapillare lichtdurchlässig ist. Die kommerziellen CE-Instrumente werden häufig mit UV/VIS-Detektoren ausgestattet. Auch Photodiodenarray-Detektoren (PDA) sind weit verbreitet. Neben den UV/VIS-Detektoren können laserinduzierte Fluoreszenzdetektoren (LIF), induktive Leitfähigkeitsdetektoren, elektrochemische oder radioaktive Detektoren oder die Kopplung mit Massenspektrometern (CE-MS) eingesetzt werden.<sup>68</sup>

Im Gegensatz zur HPLC oder GC, bei der die Detektion der Analyten nach der Säule erfolgt (end-column), findet in der CE die Detektion üblicherweise on-column statt, d.h. die Analyten werden noch während der Trennung durch das Detektionsfenster der Kapillare detektiert. Dies ist bei der CE von Vorteil, da somit die Hochspannung ohne Probleme geerdet werden kann. Nachteilig ist hingegen der Effekt, dass diejenigen Analyten, die nur langsam durch die Kapillare und somit auch durch das Detektionsfenster migrieren, schon allein deshalb bei der Detektion eine größere

Peakfläche (größere Peakbreite) ergeben als schneller migrierende Analyten, weil sie länger im Detektionsfenster verweilen. Daher müssen bei der On-column-Detektion die erhaltenen Peakflächen des entsprechenden Analyten korrigiert werden, um Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten.<sup>69</sup> Alle CE-Berechnungen der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung dieser korrigierten Peakflächen (Fläche/Migrationszeit) durchgeführt.

### 3.2.2.2 Elektrophoretische Mobilität

Beim Anlegen einer Spannung wandern elektrisch geladene Teilchen in Lösung zu der ihr entgegengesetzt geladenen Elektrode. Das Trennprinzip der Kapillarelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit der einzelnen Ionen im elektrischen Feld. Diese sind abhängig von ihrer Ladung und Größe und beruhen auf den im Folgenden beschriebenen physikalischen Gesetzmäßigkeiten.

Im elektrischen Feld unterliegt ein Teilchen der Beschleunigungskraft (elektrischen Kraft)  $F_{el}$ :

Gleichung I.3-8 
$$F_{el} = z \cdot e \cdot E$$

$z$ : Anzahl der Ladungen pro Teilchen

$e$ : Elementarladung [ $1,602 \cdot 10^{-19}$  C]

$E$ : elektrische Feldstärke [ $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

Neben der elektrischen Kraft  $F_{el}$  wirkt auf ein Teilchen, das sich in einem viskosen Medium bewegt, nach STOKES-Gesetz die Reibungskraft  $F_{re}$ :

Gleichung I.3-9 
$$F_{re} = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v$$

$r$ : Radius des Teilchens [cm]

$\eta$ : Viskosität des Mediums [ $\text{Pa} \cdot \text{s} = 10^3$  cP]

$v$ : Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens [ $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ]

Die Reibungskraft wirkt der beschleunigenden elektrischen Kraft entgegen. Eine konstante Wanderungsgeschwindigkeit  $v$  des Teilchens wird erreicht, wenn  $F_{re}$  und  $F_{el}$  im dynamischen Gleichgewicht sind:

Gleichung I.3-10 
$$v = \frac{F_{el}}{F_{re}} = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Die Konsequenz dieser Gleichung ist, dass die Wanderungsgeschwindigkeit  $v$  von  $z$  und  $r$  eines Teilchens in einem gegebenen System abhängt ( $v = z/r$ ), aber durch Solvatationseffekte der Unterschied der Teilchen relativiert wird (realer Radius der Teilchen).

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist also der elektrischen Feldstärke proportional, wobei der Proportionalitätsfaktor die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{ep}$  eines Teilchens (Ions) in einer bestimmten Umgebung beschreibt. Die Mobilität  $\mu_{ep}$  drückt die durchschnittliche elektrophoretische Geschwindigkeit  $v_{ep}$  eines geladenen Teilchens in Relation zur elektrischen Feldstärke aus:

Gleichung I.3-11 
$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E}$$

Die elektrophoretische Mobilität hängt sowohl von der effektiven Ladung und dem Radius des Teilchens als auch von der Viskosität des Medium ab. Diese ist von der Temperatur abhängig.<sup>70</sup> Zusätzlich wird die elektrophoretische Mobilität auch von anderen Faktoren, wie dem pH-Wert der Pufferlösung, beeinflusst. Somit können die unterschiedlichen pKa-Werte von Carbonsäuren und Aminhydrochloriden für eine Trennung ausgenutzt werden.

### 3.2.2.3 Elektroosmotische Mobilität

Im Unterschied zu anderen Elektrophoreseverfahren erfolgt die Trennung in der Kapillarelektrophorese in einer engen, mit Puffer gefüllten Glaskapillare. Dabei kommt das wichtigste Phänomen dieser Trennmethode, der elektroosmotische bzw. endoosmotische Fluss (EOF) zum Tragen. Dieser EOF ist für alle Teilchen gleich stark und gleich gerichtet und in der Kapillarelektrophorese häufig stärker als die elektrophoretische Wanderung. Der Massefluss des EOF wird durch an der Kapillarwandinnenoberfläche adsorbierte Kationen nach dem Anlegen des elektrischen Feldes hervorgerufen. Er tritt immer dann auf, wenn ein Flüssigkeitssystem in engem Kontakt zu einer geladenen Oberfläche steht und eine Spannung angelegt wird.<sup>71</sup> Bei einer unbeschichteten Silikatglaskapillare, wie sie in der CE meist benutzt werden, wird in Abhängigkeit vom pH-Wert des Laufpuffers, des so genannten Hintergrundelektrolyten (eng. background electrolyte, BGE), eine geladene Oberfläche erzeugt: Die Silanol-Gruppen (pKs  $\approx$  1,5) an der Oberfläche des Kieselglases können neutral oder deprotoniert vorliegen.<sup>67,72</sup> Wird ein wässriges Puffersystem mit einem pH-Wert größer als 2,0 gewählt, liegt der Großteil der Silanolgruppen deprotoniert vor; dann reichern sich Kationen an der anionischen Silikatwand an, die die Oberflächenladung ausgleichen. Da die Kationen im Vergleich zu den festsitzenden Silanolat-Gruppen einen größeren Radius besitzen, sind zum Ladungsausgleich mehrere Schichten von Ionen nötig. Die erste, festsitzende Doppelschicht (Helmholtz-Schicht) wird dabei nach Modellvorstellung von STERN einer diffusen Doppelschicht (Debye-Hückel-Schicht) überlagert, in der die Ladungen beweglich sind, d.h. Diffusion möglich ist. Dies kompensiert die restliche anionische Ladung (Abb. I.3-4).

Beim Anlegen einer elektrischen Spannung bildet sich ein Fluss (EOF) aus, der durch die größere Zahl an Kationen in der Außenschicht der Kapillare von der Kapillarwand ausgeht. So wandern die Kationen der diffusen Schicht in Richtung Kathode. Hierbei ziehen sie den gesamten Hintergrundelektrolyten inklusive gelöster Probenmoleküle mit zur Kathode.<sup>73</sup>

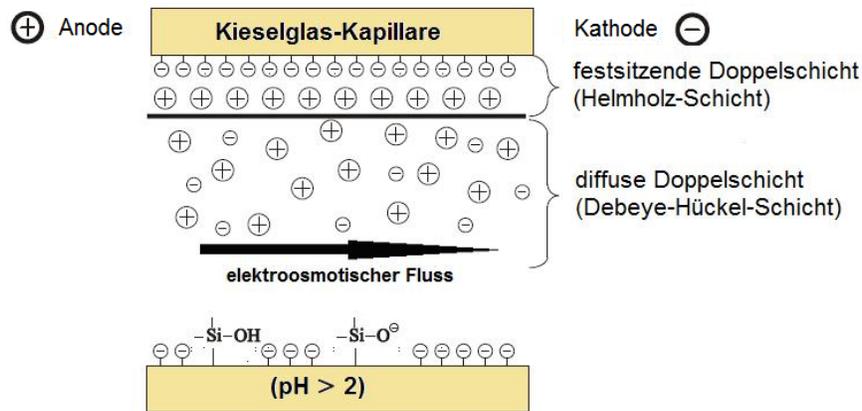


Abb. I.3-4: Schematischer Aufbau der Doppelschichten und Entstehung des EOF in der Kapillare.

Die gesamte Ladungspotentialkurve der anionischen Kapillarwand wird durch das Zeta-Potential  $\zeta$  beschrieben. Die Konzentrationen an Kationen im Bereich der Doppelschichten (B) nimmt mit dem Abstand von der Kapillarwand exponentiell ab, bis eine Zone erreicht ist (A), in der die Verteilung der Kationen zu den Anionen konstant bleibt (s. Abb. I.3-5).

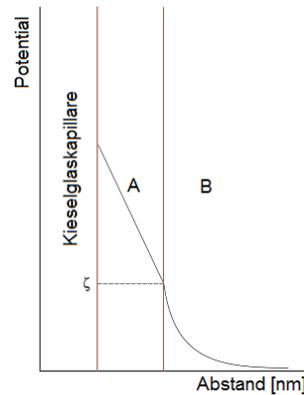


Abb. I.3-5: Verlauf des Zeta-Potentials an der Grenze der Doppelschichten.

Die elektroosmotische Mobilität  $\mu_{EOF}$  ist direkt proportional zu diesem Zeta-Potential und wird nach Gleichung I.3-12 berechnet<sup>74</sup>:

Gleichung I.3-12

$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta \cdot \varepsilon}{4 \cdot \pi \cdot \eta}$$

$\zeta$  : Zeta-Potential [V]

$\varepsilon$  : Dielektrizitätskonstante des Mediums [ $F \cdot m^{-1}$ ]

$\eta$  : dynamische Viskosität des Mediums [ $N \cdot s \cdot m^{-2}$ ].

Das  $\zeta$  -Potential steigt mit abnehmender Ionenstärke der Lösung und mit zunehmendem pH-Wert an. Eine Änderung des pH-Werts zwischen 4 und 8 wirkt sich am stärksten auf den EOF aus.<sup>73</sup>

Der EOF besitzt im Gegensatz zu einem mit Druck erzeugten Fluss, wie er bei der HPLC vorkommt, kein parabolisches, sondern ein annähernd stempelförmiges Strömungsprofil. In der CE entsteht beim Anlegen eines elektrischen Felds kurzfristig ein invers parabolisches Strömungsprofil (Abb. I.3-6a). Dieses zieht durch Wechselwirkung der Wasserstoffbrückenbindungen den inneren Flüssigkeitsbereich mit sich. Die Reibung durch die Kapillarwand und die Beschleunigung durch die angelegte Spannung ergeben nach kurzer Zeit ein flaches stempelförmiges Strömungsprofil (Abb. I.3-6b). In der HPLC liegt ein parabolisches Strömungsprofil vor. Die mit Druck durch die gepackte Säule gepresste Flüssigkeit erfährt an den Säulenwänden eine höhere Reibungskraft als in der Säulenmitte und wird dadurch außen stärker abgebremst als innen (Abb. I.3-6c). Das flache Strömungsprofil der CE wirkt sich günstig auf die Trennleistung aus, die a priori besser als die der HPLC ist. Insgesamt kommt in der CE die Zonenverbreiterung der Peaks nur durch Diffusion zustande.<sup>37,75</sup>

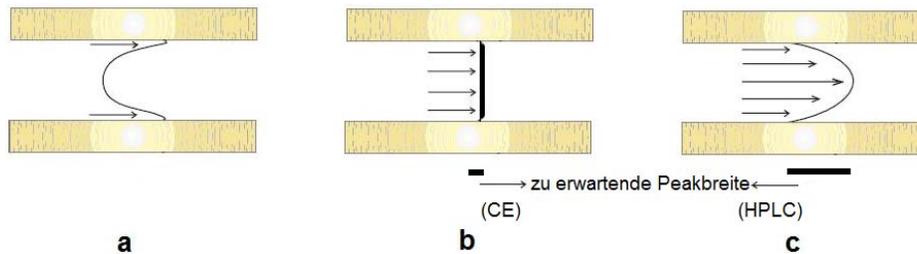


Abb. I.3-6: Verschiedene Strömungsprofile und daraus resultierende unterschiedliche Peakbreiten: a) invers parabolisches Strömungsprofil in der CE, das durch den EOF kurzfristig nach Anlegen einer Spannung entsteht, b) flaches Strömungsprofil in der CE und c) laminares Strömungsprofil eines druckbewegten System (HPLC).

Die Geschwindigkeit des EOF ist direkt proportional zum angelegten elektrischen Feld. Der Proportionalitätsfaktor entspricht der elektroosmotische Mobilität  $\mu_{EOF}$ , die aus der Gleichung (I.3-12) vom Zeta-Potential, der Dielektrizitätskonstante und der Viskosität des Medium abhängig ist.

Gleichung I.3-13 
$$v_{EOF} = \mu_{EOF} \cdot E$$

Gleichung I.3-14 
$$v_{EOF} = \frac{\zeta \cdot \varepsilon}{\eta} \cdot E$$

Die Geschwindigkeit des EOF kann durch den Quotienten aus der effektiven Kapillarlänge und der Migrationszeit des EOF ausgedrückt werden:

Gleichung I.3-15 
$$v_{EOF} = \frac{l}{t_{EOF}}$$

Die elektrische Feldstärke kann mit

Gleichung I.3-16 
$$E = \frac{U}{L}$$

berechnet werden.

Durch Einsetzen in die Gleichung I.3-15 kann der EOF berechnet werden:

$$\text{Gleichung I.3-17} \quad \mu_{EOF} = \frac{l \cdot L}{U \cdot t_{EOF}}$$

$\mu_{EOF}$ : die elektroosmotische Mobilität [ $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$l$ : effektive Länge der Kapillare bis zum Detektor [cm]

$L$ : Gesamtlänge der Kapillare [cm]

$U$ : angelegte Spannung [V]

$t_{EOF}$ : Migrationszeit des EOF [sec].

### 3.2.2.4 Bruttomobilität

Die Bruttomobilität  $\mu_{br}$  setzt sich nach Gleichung I.3-18 aus der elektrophoretische Mobilität  $\mu_{ep}$  des Teilchens (Ions) und der elektroosmotische Mobilität  $\mu_{EOF}$  des EOF zusammen:

$$\text{Gleichung I.3-18} \quad \mu_{br} = \mu_{ep} + \mu_{EOF} = \frac{l \cdot L}{U \cdot t_{br}} \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$$

$t_{br}$ : Migrationszeit der Substanz [sec]

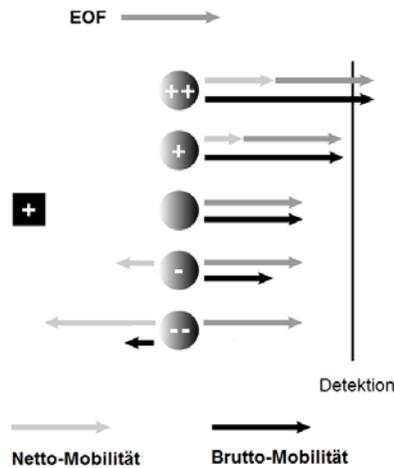


Abb. I.3-7: Einfluss des EOF auf die Mobilität der Ionen.

Die elektrophoretische Mobilität wird auch als „Nettomobilität“ bezeichnet und lässt sich mit der Gl. I.3-18 direkt aus den Elektropherogrammen ermitteln.

Wenn der Analyt positiv geladen ist, migriert er schneller als der EOF und erreicht zuerst das Detektorfenster. Ein ungeladener Analyt ( $\mu_{ep} = 0$ ) wandert mit dem EOF und muss gegebenenfalls mit Hilfe einer speziellen Technik, z.B. MEKC oder MEEKC, von anderen neutralen Analyten getrennt werden. Ist bei einer negativ geladenen Substanz  $\mu_{ep} > \mu_{EOF}$ , so wandert dieser nicht mehr in Richtung des Detektors. Durch eine Vergrößerung des EOF (durch pH-Wert-Erhöhung)

oder Umpolung der Elektroden kann solch ein Analyt trotzdem detektiert werden. Weitere Möglichkeiten werden in Abb. I.3-7 veranschaulicht.

### 3.2.3 Trenntechniken in der Kapillarelektrophorese

An dieser Stelle sollen die in der CE verwendeten Methoden kurz aufgezeigt werden. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den in dieser Arbeit angewendeten Methoden: Kapillarzonenelektrophorese (CZE), Elektrokinetische Chromatographie mit Microemulsionen (MEEKC), die als eine Sonderform der Mizellare Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) dargestellt wird, und Trennung von Enantiomeren mit beiden Techniken (CZE und MEEKC). Einführende Literatur lässt sich in eigenen Standardwerken nachschlagen.<sup>64,68,73,76,77</sup>

#### 3.2.3.1 Kapillar-Zonen-Elektrophorese (CZE)

Die CZE ist die am häufigsten angewendete Methode in der CE. Die Trennung beruht auf der Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit, also auf dem Vorzeichen der Ladung und der elektrophoretischen Mobilität einer Probenkomponente. Das aufgetragene Analytengemisch trennt sich nach Anlegen der Spannung in verschiedene Zonen, sofern sie aus verschiedenen Bestandteilen besteht.

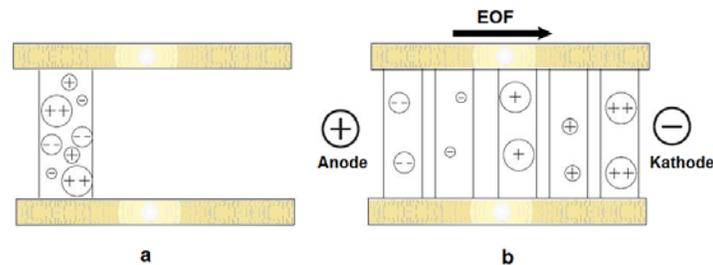


Abb. I.3-8: Trennprinzip in der CZE; a) Probenzone direkt nach der Injektion, b) Probenzonen durch Trennung.

Abbildung I.3-8 skizziert das Trennprinzip in der CZE. Wenn der EOF zu Kathode gerichtet ist ( $\text{pH} > 2$ ), wandern die Teilchen mit hoher Ladung und kleinem effektiven Solvatradius, also mit einem großen Ladungs/Radius-Verhältnis, schneller in Richtung Elektrode als Ionen mit einer kleinen Ladungsdichte. Neutralteilchen wandern immer mit dem EOF und können nicht voneinander getrennt werden.

#### 3.2.3.2 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Die MEKC versteht sich als Hybrid aus Elektrophorese und Chromatographie. Wie von TERABE<sup>78</sup> 1984 erstmalig beschrieben, können mit dieser Methode sowohl geladene als auch ungeladene (neutrale) Substanzen getrennt werden. Dem wässrigen Laufpuffer wird hierbei ein Detergens (Mizellbildner) zugesetzt. In einer Konzentration oberhalb der kritischen Mizellbildungs-

konzentration (CMC; z.B. ca. 9 mM bei Natriumdodecylsulfat<sup>79</sup> (SDS)) bilden Tenside aufgrund ihres hydrophoben Restes Mizellen aus, die eine pseudostationäre Phase darstellen (Abb. I.3-9). Diese Aggregate haben im Inneren hydrophoben Charakter und sind im Fall des Einsatzes von anionischen oder kationischen Tensiden nach außen hin geladen. Die neutralen Analyten verteilen sich zwischen wässrigen und pseudostationären Phase entsprechend ihrer Hydrophilie. Der Trennbereich liegt zwischen der Wanderung derjenigen (hydrophilen) Analyten, die sich nicht in der Mizelle aufhalten, also mit dem EOF wandern, und derjenigen (hydrophoben) Verbindungen, die permanent in der Mizelle eingeschlossen sind.

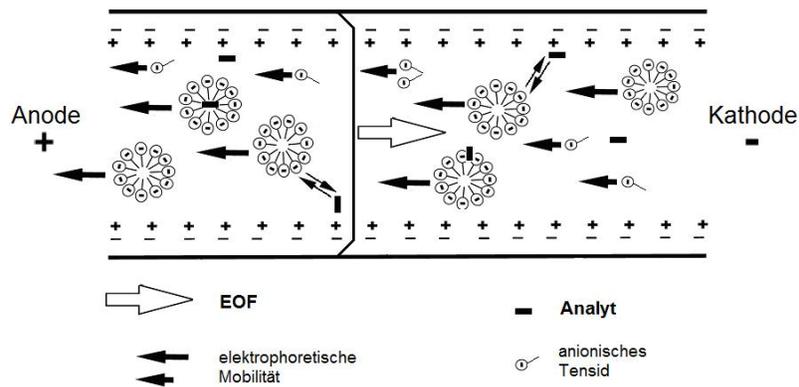


Abb. I.3-9: Trennprinzip der MEKC.

Abbildung I.3-9 veranschaulicht das Trennprinzip für ein anionisches Tensid wie z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS). Die Mizelle selbst wandert aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Diese Eigenbewegung wird jedoch im neutralen oder basischen Laufbuffer vom EOF überlagert. Es ergibt sich eine Gesamtwanderungsrichtung für die Mizelle in Richtung Kathode. Ein neutraler Analyt wandert, je nachdem in welcher Phase er sich aufhält, kurzfristig mit Geschwindigkeit des EOF oder der Mizelle. Daraus resultiert für jeden Analyten eine Eigenmigrationszeit. Werden kationische Tenside wie Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) verwendet, die von der Kathode angezogen werden, so ist es nötig, die Richtung des EOF durch inverse Polarisierung umzukehren.<sup>80</sup>

### 3.2.3.3 Elektrokinetische Chromatographie mit Mikroemulsionen (MEEKC)

Mikroemulsionen, die zum ersten Mal 1943 von HOAR beschrieben wurden,<sup>81</sup> sind klare bis opaleszente, dünnflüssige Mischungen aus wenigstens drei Bestandteilen. Zwei dieser Bestandteile sind charakteristischerweise nicht oder nur begrenzt miteinander mischbar. Es handelt sich in der Regel um eine sehr hydrophile Komponente (Wasser) und eine sehr lipophile Komponente, die meist als Öle bezeichnet wird.<sup>82</sup> Die dritte und wichtigste Komponente ist das

Tensid, dem häufig noch ein Co-Tensid hinzugefügt wird. Dieser nach Durchmischung aller Komponenten entstehende flüssige Aggregatzustand, die Mikroemulsion, ist thermodynamisch stabil. Jahre später wurde die Mikroemulsion in der Flüssig-Flüssig-Extraktion und in HPLC-<sup>83,84</sup> und CE-Trenntechniken<sup>85-89</sup> eingesetzt. Die MEEKC gehört zur Gruppe der Verfahren der Elektrokinetischen Chromatographie (EKC), zu denen auch die Mizellare-EKC, die Ionenaustausch-EKC und die Cyclodextrin-EKC gehören.

Mit dieser MEEKC-Trenntechnik, die WATARAI 1997 einführte,<sup>85</sup> ist es möglich im Gegensatz zur MEKC, neben geladenen und neutralen<sup>86-88</sup> auch sehr lipophile Substanzen<sup>89</sup> zu trennen. In der MEEKC werden entweder Öl-in-Wasser- (O/W) oder Wasser-in-Öl- (W/O) Emulsionen verwendet. Durch Zusatz eines anionischen Tensids wie SDS wird die hohe Oberflächenspannung zwischen Öl und Wasser reduziert. So wird im Fall der O/W-Mikroemulsionen die ölige Phase in der wässrigen Phase fein verteilt. Dabei bildet sich eine dispergierte Phase, in der Öltröpfchen mit einer Größe von 5 - 75 nm zu erkennen sind. Daher enthalten diese Öltröpfchen im Vergleich zur Mizellen eine sehr große Grenzfläche zu der wässrigen Phase. Zur Stabilisierung dieses Mikroemulsionssystems wird ein kurzkettiger Alkohol als Co-Tensid zugesetzt. Dabei bilden sich mehrere Brücken an der Grenzfläche zwischen der Öl- und Wasserphase aus und reduzieren dadurch die Oberflächenspannung auf nahe zu null.<sup>90</sup>

Die in der wässrigen Pufferphase vorhandenen Öltröpfchen bilden in der Kapillare nach Anlegen einer Spannung eine sog. pseudostationäre Phase, da sie als negativ geladene Partikel eine elektrophoretische Mobilität in Richtung Anode aufweisen, durch den EOF aber letztlich eine langsame Gesamtmobilität in Richtung Kathode (Detektionsfenster) erhalten. Das Trennprinzip in der MEEKC (Abb. 1.3-10) beruht auf der Kombination zwischen elektrophoretischen Mechanismen und der chromatographischen Verteilung mit den Mikroemulsionströpfchen. Neutrale, geladene wie auch sehr lipophile Moleküle erfahren nun, je nach ihrer Lipophilie, ein unterschiedliches Verteilungsverhalten zwischen den lipophilen Öltröpfchen und der umgebenden hydrophilen Pufferphase.<sup>91</sup>

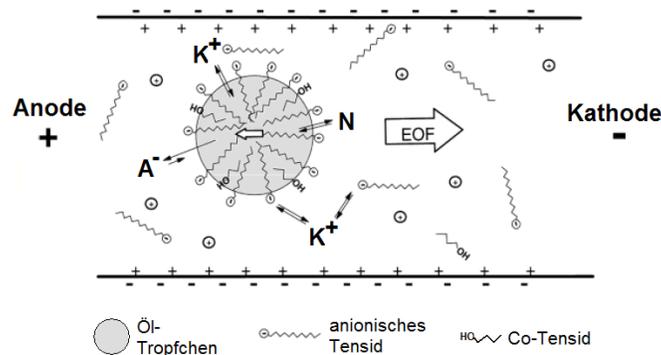


Abb. 1.3-10: Trennprinzip von anionischen ( $A^-$ ), kationischen ( $K^+$ ) oder neutralen ( $N$ ) Analyten in der MEEKC.

Neben unterschiedlichen  $pK_a$ -Werten sind hydrophobe Partialstrukturen sowie unterschiedliche Wasserstoffbrückenbildungs-Eigenschaften wichtige Parameter zur Selektivitätssteuerung in der MEEKC. Ein Zusatz von nativen oder neutralen Cyclodextrinen (z.B.  $\beta$ -Cyclodextrin, Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin) zum Mikroemulsionspuffer erhöht die Selektivität durch eine stärkere Differenzierung im Trennverhalten hydrophober Substanzen.<sup>92-94</sup> Eine Selektierung über unterschiedliche Ausbildungstendenzen von Wasserstoffbrücken kann über den Einsatz von organischem Lösemittel („Organic Modifier“) wie Methanol, Acetonitril oder Isopropanol erfolgen. Dieser organische Modifier verbessert auch die Löslichkeit der lipophilen Analyten in der Pufferphase und spielt daher eine wichtige Rolle für die Trennung.<sup>95</sup>

#### 3.2.3.4 Chirale Trennung in der CE

Von der Trennung von Enantiomeren mittels Kapillarzonenelektrophorese (CZE) berichtete erstmalig FANALI<sup>96</sup> und später mittels MEEKC AIKEN.<sup>97</sup> Die Trennung von Enantiomeren kann man nur durch Bildung von diastereomeren Komplexen mit einem chiralen Selektor erreichen. Dabei kommen neben Cyclodextrinen und ihren Derivaten, die häufig verwendet werden, auch chirale Metallkomplexe, Kronenether, Proteine, Saccharide und makrocyclische Antibiotika zur Anwendung als Selektoren in der CE.<sup>98,99</sup> Die freien Enantiomere besitzen dieselbe elektrophoretische Mobilität und somit dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit in der Kapillare. Werden Cyclodextrine zugesetzt, bilden sie mit den Enantiomeren Einschlussverbindungen. Da die zugesetzten Cyclodextrine selbst chiral sind, sind diese gebildeten Komplexe diastereomer. Die Enantiomerentrennung erfolgt entweder aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten dieser Diastereomerenkomplexen oder durch eine unterschiedliche Komplexstabilität, d.h. die unterschiedliche Verweilzeit des Enantiomers im Cyclodextrin.<sup>100</sup>

Cyclodextrine (CD) sind zyklische Oligosaccharide, die aus  $\alpha(1,4)$ -glykosidisch verknüpften *D*-Glucosemolekülen aufgebaut sind. Sie entstehen durch enzymatische Hydrolyse von Stärke mittels Glucosyltransferasen wie sie z.B. in *Bacillus macerans* vorkommen.<sup>101</sup> Dabei bilden sich Gemische aus Verbindungen mit 6, 7 oder 8 Glucoseeinheiten, die als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Cyclodextrin bezeichnet werden.<sup>102</sup> Die Abbildung I.3-11 (a) zeigt Struktur der drei häufigsten nativen CDs.

Die Anzahl der Glucoseeinheiten bestimmt die Größe der Kavität. Bedingt durch die C1-Sesselkonformation der Glucosemoleküle haben die Cyclodextrine die Form eines hohlen Kegelstumpfes (Abb. I.3-11 b). An der engeren Seite des Kegelstumpfes (Torus) befinden sich die primären Hydroxylgruppen in Position 6 und an der weiteren Seite die sekundären Hydroxylgruppen in Positionen 2 und 3. Diese sekundären Hydroxylgruppen stehen äquatorial, wobei die 2-OH-Gruppen nach innen und die 3-OH-Gruppen nach außen gerichtet sind. Der Innenraum der Kavität ist aufgrund der Protonen (H3 und H5) und der glykosidischen Sauerstoffbrückenether unpolar. Hingegen hat die Außenseite bedingt durch die Hydroxylgruppen

in Positionen 2, 3, und 6 polaren Charakter.<sup>103,104</sup> Diese Bauweise der Cyclodextrine gestattet es ihnen mit einer Vielzahl von Molekülen Einschlussverbindungen zu bilden, wodurch die meisten ihrer Einsatzgebiete bestimmt werden.

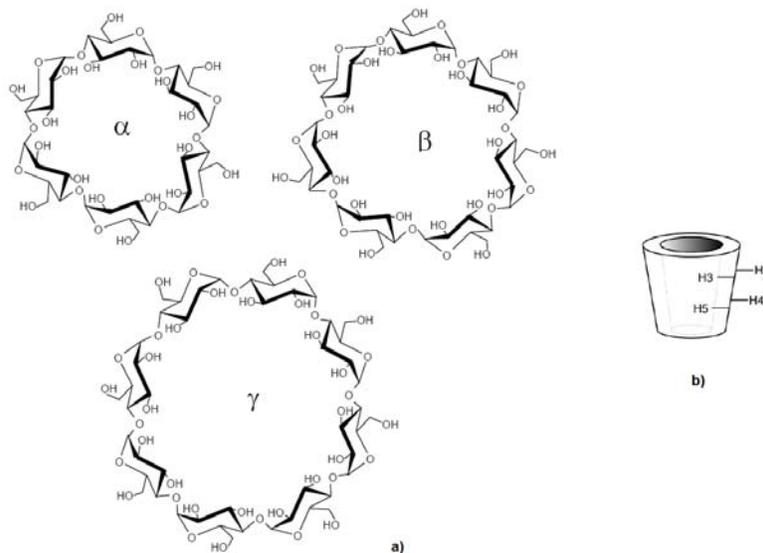


Abb. I.3-11: Struktur des nativen Cyclodextrins: a) Chemische Struktur  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD, b) Kegelstumpfform.

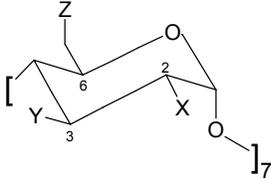
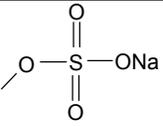
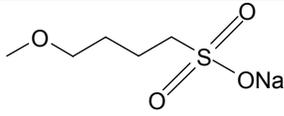
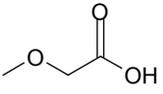
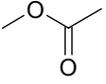
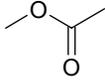
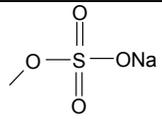
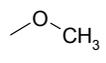
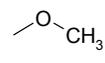
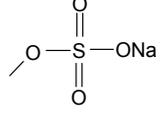
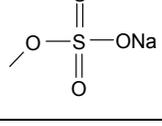
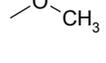
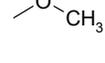
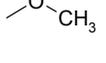
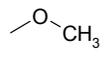
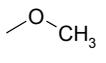
Einige wichtige chemische und physikalische Eigenschaften sind in Tabelle I.3-1 zusammengefasst.<sup>104,105</sup>

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Anzahl der Glucosemonomere	6	7	8
Molekulargewicht [g/mol]	972	1135	1297
Wasserlöslichkeit [g/100ml]	14.5	1.85	23.2
Kavitätsdurchmesser [nm]	0.47-0.53	0.60-0.65	0.75-0.83
Höhe des Torus [nm]	0.79	0.79	0.79
Außendurchmesser [nm]	$1.46 \pm 0.4$	$1.54 \pm 0.4$	$1.75 \pm 0.4$
Innenraumvolumen [nm <sup>3</sup> ]	0.174	0.262	0.427
$[\alpha]_D$ bei 25° C	150.0	162.5	177.4
pK <sub>a</sub> -Wert	12.33	12.20	12.08

Tab. I.3-1: Physikalische und chemische Eigenschaften von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD.

Durch Derivatisierungen der Hydroxylgruppen an der Positionen 2, 3 und 6 können die Eigenschaften der Cyclodextrine, insbesondere ihre Löslichkeit und ihr Komplexbildungsverhalten, verändert werden. Während früher vor allem zufällig substituierte (randomisierte) CDs hergestellt

wurden, liegt das Ziel heute im Bereich der isomerenreinen CDs, da diese zum einem besser reproduzierbare Resultate liefern und zum anderen auch mechanistische Studien zum Einschluss von Gastmoleküle erlauben.<sup>106</sup> Die Mehrzahl der verwendeten Substituenten stellen dabei Methyl-, Acetyl-, Hydroxylalkyl-, Amino- oder Sulfatreste dar, wobei geladene und ungeladene CDs entstehen. In Tabelle I.3-2 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten derivatisierten CDs zusammengestellt.

				
Verbindung	R = X, Y oder Z			Lit.
Sulfatiertes $\beta$ -CD				107
Sulfobutylether- $\beta$ -CD				108
Carboxymethyl- $\beta$ -CD				109
	X	Y	Z	
<i>Heptakis</i> (2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD				110, 111
<i>Heptakis</i> (2,3-di-O-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD				112
<i>Heptakis</i> (6-sulfato)- $\beta$ -CD				113
<i>Heptakis</i> (2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -CD				114
<i>Heptakis</i> (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -CD				115

Tab. I.3-2: Übersicht einiger  $\beta$ -CD Derivate; erster Teil nicht regioselektive Derivate, zweiter Teil isomerenreine Derivate.

Bilden die Enantiomere mit Cyclodextrinen - wie zuvor bereits erwähnt - Einschlussverbindungen, wird der weniger polare Molekülteil eines Gastes in die hydrophobe Kavität eingeschlossen, während der polare, je nach pH-Wert des Hintergrundelektrolyten oftmals geladene Molekülteil aus den Konus herausragt. Die molekulare Geometrie der Gastmoleküle spielt für die Einlagerung eine entscheidende Rolle.<sup>116</sup> Die dort angesprochenen Wechselwirkungen (WW) zwischen den Enantiomeren und Cyclodextrinen können unterschiedlicher Art sein. Sie reichen von Wasserstoffbrückenbindungen über Dipol-Dipol-WW, van-der-Waals-Kräften und hydrophoben bzw. hydrophilen An- und Einlagerung bis hin zu Kombinationen aus ihnen. Hydrophobe bzw. van-der-Waals-WW treten vor allem im Inneren der CD-Kavität auf. Alternativ kann man diese Wechselwirkungen, je nach Art der Substitution der OH-Gruppen an den Positionen 2 und 3 (größere organische Reste), auch zwischen den Substituenten und dem Gastmoleküle beobachten. Die Stabilität der gebildeten Einschlussverbindungen ist näherungsweise proportional zum hydrophoben Charakter des Gastmoleküls. In den meisten Fällen beträgt dieses Verhältnis von Gast zu Cyclodextrin 1:1, aber auch von 1:2, 2:1 oder 2:2 Komplexen ist schon berichtet worden.<sup>116</sup>

Wie bereits erwähnt kann die Enantiomerentrennung mit Cyclodextrinen auf verschiedene Weisen erfolgen: Das ist einerseits eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität der labilen diastereomeren Komplexe und andererseits eine unterschiedliche Komplexbildungskonstante der Enantiomeren mit dem CD, die meistens für die Trennung verantwortlich ist, oder eine Kombination aus beiden. Die Auflösung zweier Enantiomere ist umso kleiner, desto kleiner der Unterschied der Komplexbildungskonstante ist. Eine Trennung ist ausgeschlossen, wenn die Konstanten gleich groß sind. Ist die Differenz der elektrophoretischen Mobilität von freiem Enantiomer und Enantiomer-CD-Komplex ausreichend groß, so werden die Enantiomere nach unterschiedlichen Migrationszeiten detektiert.<sup>105,117</sup> Aus diesem Grund ist auch keine Trennung neutraler Enantiomere mit neutralen CDs möglich, da beide keine elektrophoretische Mobilität besitzen. Eine gute Trennung lässt sich bei Verwendung negativ geladener Cyclodextrine erhalten, wenn sich der Detektor auf der kathodischen Seite befindet. Da die CDs in die dem Analyten entgegengesetzte Richtung wandert, verlängert sich die Trennstrecke für die neutralen oder positiv geladenen Analyten. In diesem Fall steht zur Ausbildung des dynamischen Gleichgewichtes zwischen CD und komplexiertem Analyt eine lange Zeit zur Verfügung.<sup>105</sup>

In der CE gibt es je nach der Analytenbasizität und der Ladung des eingesetzten Cyclodextrins mehrere Messbedingungen, die zu einer erfolgreichen Enantiomerentrennung führen können. Im Folgenden werden einige davon erläutert.

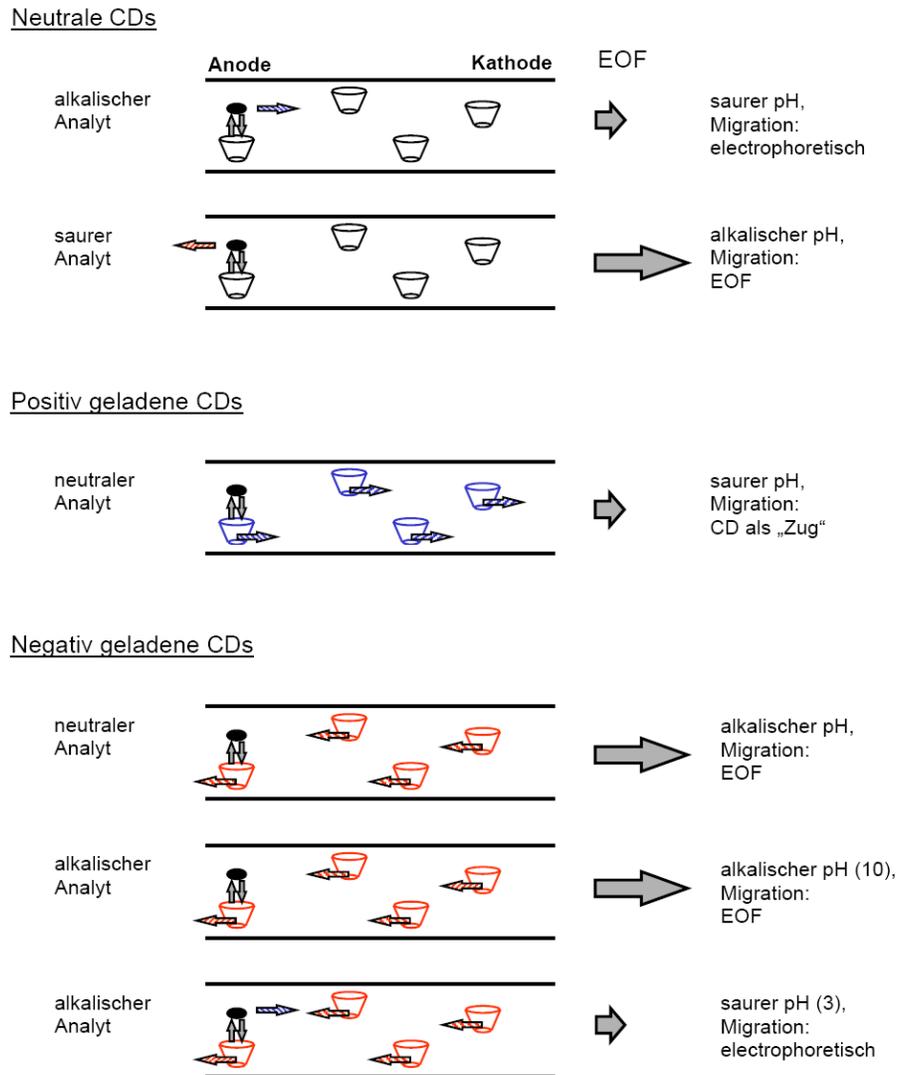


Abb. I.3-12: Migrationsverhalten nativer und geladener Cyclodextrine nach der Analytenbasizität unter häufig verwendeten Trennbedingungen in der CE.

Beim Einsatz von *neutralen* CDs werden sie selbst durch den EOF zum Detektor transportiert, da sie keine eigene elektrophoretische Mobilität besitzen und verhalten sich daher wie eine pseudostationäre Phase. Bei basischen Analyten wird ein saurer Puffer verwendet. Dadurch wird der EOF fast vollständig unterdrückt und die positiv geladenen Analyten wandern aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität zu Kathode. Bei sauren Analyten verwendet man einen basischen Puffer, so dass der Analyt als Anion vorliegt. Der hohe pH-Wert sorgt für einen starken EOF in Richtung Kathode, so dass auch der Analyt an der Kathode detektiert wird, obwohl er sich relativ zur Anode bewegt. Somit steht zur möglichen Enantiomerentrennung eine relativ lange Zeit zur Verfügung.

Sind die eingesetzten CDs *positiv geladen*, nimmt man hier einen stark sauren Puffer. Dadurch ist der EOF so klein, dass die neutralen Analyten kaum in Richtung Kathode befördert werden. Die

kationischen CDs wandern selbst zur Kathode und transportieren auch den Analyten durch Komplexierungsvorgänge in die gleiche Richtung. Es kommt zur Trennung, da nun die Enantiomere unterschiedliche Komplexbildungskonstante aufweisen. Diese Variante ist auch für negativ geladenen CDs geeignet, allerdings mit dem Unterschied, dass das CE-System umgepolt werden muss. Dadurch befindet sich der Detektor an der anodischen Seite der Kapillare und die Probe wird an der kathodischen Seite injiziert.

Werden die *negativ geladenen* CDs eingesetzt, wandern sie relativ aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität in Richtung Anode. Im basischen Puffer liegt jedoch ein starker EOF vor, so dass die neutralen Analyten zur Kathode gelangen. Ein basischer Analyt, der bei basischen pH-Werten - je nach pKa-Werten - partial ungeladen ist, wird genauso mit dem starken EOF zum Detektor wandern, obwohl er sich relativ entgegen bewegt. Wird bei basischen Analyten ein saurer Puffer verwendet, ist der EOF dadurch sehr gering und die Analyten wandern aufgrund ihrer positiven Ladung zum Detektor, was so zu einer noch besseren Trennungen führen kann.<sup>118,119</sup>

In den oben genannten Beispielen wurde immer ein CD-Typ allein eingesetzt. Natürlich ist es auch möglich, Kombinationen verschiedener neutraler oder geladener CDs zu verwenden. Durch die Wahl der CD-Typen, das Verhältnis der CD zueinander sowie die verwendeten Konzentrationen ergeben sich mehrere Möglichkeiten, die Selektivität zu beeinflussen, um eine optimale Trennung besonders bei der Bestimmung des Enantiomerenüberschusses zu erhalten.<sup>120</sup> Die Auflösung zwischen zwei Enantiomeren variiert mit der eingesetzten Konzentration an chiralen Selektoren. Die Auflösung wird null, wenn einerseits die CD-Konzentration null wird und nimmt andererseits bei großen CD-Konzentrationen ab. Sie durchläuft also ein Optimum mit maximaler Auflösung.<sup>121</sup> Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln „organic modifier“ wie Methanol (MeOH), Acetonitril (ACN) oder Isopropanol zum Hintergrundelektrolyt BGE lässt sich die Größe der Gleichgewichtskonstanten beeinflussen.<sup>122</sup>

Bei der Verwendung von geladenen, isomerenreinen Cyclodextrinen als chirale Selektoren in der CE wurde von VIGH<sup>123</sup> ein quantitativer Ansatz zur Optimierung der Trennleistung von Enantiomeren entwickelt, der so genannte „CHARM-Modell“ (charged resolving agent migration). Dieses Modell zeigt, dass bei gleicher enantioselektiven Wechselwirkung stark geladene CDs eine bessere Auflösung erzielen, als neutrale oder permanent geladene CDs. Bei schwachen Elektrolyten zeigt sich eine hohe Auflösung bei niedrigen pH-Werten für die ionenselektiven Trennungen von schwachen Basen und die nicht ionenselektiven Trennungen von schwachen Säuren. Hingegen findet man eine hohe Auflösung bei hohen pH-Werten für die ionenselektiven Trennungen von schwachen Säuren und die nicht ionenselektiven Trennungen von schwachen Basen. Daher es ist am besten bei der Methodenentwicklung, zur Testung geeigneter geladener CDs nur zwei Hintergrundelektrolyte zu verwenden, nämlich eine von niedrigem und eine von hohem pH-Wert ( $3 < \text{pH} < 9$ ).

#### 3.2.3.4.1 Chirale cyclodextrin-modifizierte MEEKC (CD-MEEKC)

Durch Zusatz von neutralen oder geladenen Cyclodextrinen zum Mikroemulsionspuffer in der MEEKC kann man in kurzer Analysenzeit Enantiomerentrennungen von neutralen bzw. extrem hydrophoben Substanzen erreichen. Chirale MEEKC wurde 1993 von AIKEN<sup>97</sup> für die Trennung von (1*S*, 2*R*)-Ephedrin-Isomere erstmalig beschrieben, wobei ein chirales Öl ((2*R*, 3*R*)-di-*n*-Butyltartrat) sowie ein achirales Tensid bzw. Co-Tensid als Mikroemulsionskomponenten verwendet wurden.

Cyclodextrine, die in dem O/W-Mikroemulsionspuffer gelöst werden, bilden in der Kapillare neben dem SDS eine zusätzliche pseudostationäre Phase. Die chirale Trennung in der CD-MEEKC beruht auf dem unterschiedlichen chromatographischen Verteilungsverhalten von gebildeten diastereomeren Komplexen (Komplex-CD-Enantiomer) zwischen dem lipophilen Öltröpfchen und der umgebenden hydrophilen Pufferphase.

Neben den Cyclodextrinen als chirale Selektoren in der MEEKC wurde von FOLEY<sup>124</sup> auch der Einsatz von sowohl chiralem Tensid (Dodecoxy-carbonylvaline DDCV) und achiralem Co-Tensid<sup>125</sup> als auch chiralen beiden Komponenten (Tensid DDCV und Co-Tensid *S*-2-Hexanol)<sup>126</sup> für die Enantiomerentrennungen von Ephedrin und seinen Derivaten entwickelt und optimiert.

## 4 Validierung

### 4.1 Definitionen und Regelwerke

Die Validierung analytischer Prüfverfahren muss als Teil eines umfassenden Konzeptes zur Sicherung der Qualität, Wirksamkeit und Sicherheit von Arzneistoffen bzw. –mitteln betrachtet werden. In der pharmazeutischen Analytik beinhaltet das Prüfverfahren oft, im Fall der Prüfung des Arzneistoffs fast immer, eine große Variabilität. Aus der Validierung können Spezifikationsgrenzen abgeleitet werden bzw. kann geschlussfolgert werden, ob notwendige Grenzen zuverlässig einzuhalten sind. Weiterhin können Bereiche definiert werden, innerhalb derer kritische Verfahrensparameter gehalten werden müssen, welche dann im Systemeignungstest die aktuelle Validität des analytischen Verfahrens belegen. Darüber hinaus spielen auch das gewählte Prüfverfahren (Analysemethoden, Probenvorbereitung, Auswertung usw.) und die Kombination der verschiedenen Prüfverfahren zur Gesamtspezifikation des Arzneistoffs bzw. -mittels eine wesentliche Rolle.<sup>127</sup> Aufgabe der Validierung einer analytischen Methode ist zu zeigen, dass sie dafür geeignet ist, den beabsichtigten Zweck zu erfüllen. Zur Methodvalidierung in der pharmazeutischen Analytik wurden die ICH-Richtlinien herausgegeben, auf denen die meisten qualitätssichernden Bestimmungen und Anforderungen der arzneimittelzulassenden Behörden (z.B. EDQM, BfArM, FDA) beruhen. In der ICH-Qualitätsrichtlinie Q2(R1) wird die analytische Validierung behandelt. Sie besteht aus zwei Teilen „Teil-I: Definitionen und Terminologie“ und „Teil-II: Methoden“. Nach der ICH-Richtlinie Q2(R1)<sup>128</sup> müssen für die Validierung analytischer Methoden die jeweiligen Einzelheiten einer Validierung immer mit Blick auf das Ziel gewählt werden, welches mit der Methode erreicht werden soll. Deshalb unterscheidet die ICH-Richtlinie in ihren Anforderungen bezüglich der Parameter, die für die Validierung einer Methode durchgeführt werden sollen, zwischen den verschiedenen Arten von Prüfungen wie Gehaltsbestimmung, Identitäts- und Reinheitsprüfungen. Die Reinheitsprüfungen werden dabei unterteilt in die im Europäischen Arzneibuch<sup>65</sup> häufig beschriebenen Grenzprüfungen (Limit-Tests) und quantitativen Reinheitsprüfungen (Tabelle I.4-1).

In der zweiten Teil der ICH-Richtlinie Q2(R1) sind die in der Tabelle I.4-1 aufgeführten Parameter näher beschrieben und deren Bestimmungsweisen festgelegt. Da es sich bei der ICH um ein internationales Gremium handelt, das mit den amerikanischen und europäischen Zulassungsbehörden und pharmazeutischen Unternehmen auf einer breiten Basis der sich mit Arzneimittelqualität befassenden Autoritäten und Marktteilnehmern steht, können die ICH-Richtlinien als allgemeingültige Regeln angesehen werden. Da es sich aber um Richtlinien mit empfehlendem Charakter handelt, welche im Detail nicht ausgestaltet sind, bedarf es bei jeder analytischen Aufgabenstellung eigenständiger Überlegungen über Einzelheiten der Wiederholungen und Festlegung der Spezifikationen. Solche Vorgaben werden häufig von den

Zulassungsbehörden und staatlichen Kontrolllaboratorien gemacht, und/oder sie orientieren sich am Stand der Wissenschaft für vergleichbare Methoden. Der gewählte Validierungsaufwand ist somit Ergebnis aus Überlegungen zum Ziel der Methode, staatlichen Vorgaben, wissenschaftlichen Anforderungen und praktischen Möglichkeiten zur Durchführbarkeit.

Mit anderen Worten: Vor dem routinemäßigen Einsatz einer analytischen Methode muss die Validierung erfolgt sein. Ausnahmen bilden die Arzneibuchmethoden, die im Rahmen der Aufnahme der jeweiligen Monographie einer Validierung unterzogen wurden und daher für den Anwender als validiert zu betrachten sind. Es muss nur die Systemeignung überprüft werden.

	Qualitative	Test auf Verunreinigungen		Quantitative
	Bestimmung	(Prüfung auf Reinheit)		Bestimmung
	(Identität)	Quantifizierung	Grenzttest	(Gehalt)
Richtigkeit	-	+	-	+
Präzision:				
-Wiederholbarkeit	-	+	-	+
-Vergleichbarkeit	-	+	-	+
(Labor/Ringversuche) <sup>1</sup>				
Spezifität <sup>2</sup> /Selektivität	+	+	+	+
Nachweisgrenze (LOD)	-	-	+	-
Bestimmungsgrenze (LOQ)	-	+	-	-
Linearität	-	+	-	+
Arbeitsbereich	-	+	-	+

+ erforderlich, - nicht erforderlich, <sup>1</sup> Laborversuche sind für die Zulassung ausreichend, <sup>2</sup> fehlende (eingeschränkte) Spezifität eines Analysenverfahren kann durch zusätzliches Verfahren kompensiert werden.

Tab. I.4-1: Validierungsanforderungen nach ICH-Richtlinien Q2(R1)<sup>128</sup>.

Der Validierungsparameter „Robustheit“ wird in dieser Tabelle nicht aufgelistet, aber eine Durchführung wird gemäß ICH-Richtlinien bei allen Prüfverfahren empfohlen.

Die FDA stellt Richtlinien<sup>129</sup> mit allgemeinen Definitionen in Bezug auf die Validierung analytischer Prozesse zur Verfügung. In ihren Definitionen sind sie den ICH-Richtlinien angeglichen. Auch der von der Arzneibuchkommission der EU herausgegebene „Technical Guide“<sup>44</sup> beinhaltet ein eigenes Kapitel zur Validierung analytischer Methoden, die den ICH-Richtlinien angeglichen sind. In den meisten „Guidelines“ werden keine Vorgaben zu Grenz- oder Richtwerten der einzelnen Validierungselemente oder zu statistischen Auswertung angegeben. Es wird deutlich gemacht,

dass der Umfang des Validierungsprozesses und die Beurteilung der Güte eines analytischen Verfahrens im Ermessen des Analytikers liegen.

## 4.2 Validierungsparameter

Die für eine Validierung nach ICH relevanten Parameter und ihre Bestimmungsweise sind im Folgenden aufgeführt:<sup>127,128,130</sup>

### 4.2.1 Spezifität/Selektivität

Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren. Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, eine Substanz oder eine Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen. In der Praxis wird in allen Richtlinien zwischen „Selektivität“ und „Spezifität“ nicht unterschieden. Beide Begriffe werden synonym verwendet. Eine 100%ige Selektivität (=Spezifität) einer analytischen Methode für einen Analyten wäre optimal, ist aber in der Praxis nicht zu erreichen. Nach ICH ist es bei geringer Selektivität einer Methode für die zu analysierende Substanz erlaubt, diesen Mangel durch Anwendung einer zweiten analytischen Methode auszugleichen. So sind Gehaltsbestimmungsmethoden im Ph. Eur. häufig nicht selektiv für den zu prüfenden Wirkstoff, geben aber dennoch den Gehalt der Substanz mit hinreichender Genauigkeit an, wenn vorher mit der vorgeschriebenen Reinheitsprüfung auf störende Verunreinigungen deren Anwesenheit in relevanten Mengen ausgeschlossen wurde.

Für HPLC- und CE-Methoden, bei denen die Gehaltsbestimmung des Arzneistoffs oder die Quantifizierung der Verunreinigungen erfolgen, ist die Selektivität eines der wichtigsten Kriterien für die Güte der Trennung; diesem Validierungselement muss besondere Beachtung geschenkt werden. Zur Überprüfung der Selektivität von HPLC- und CE-Methoden erfolgt eine Absicherung der Identität durch den Vergleich von Retentionszeiten bzw. Migrationszeiten auftretender Peaks mit denen von Vergleichssubstanzen. Zusätzlich können entweder die anderen chromatographische Parameter wie die Auflösung ( $R$ ) zweier kritischer Peakpaare, der Trennfaktor ( $\alpha$ ), die theoretische Bodenzahl ( $N$ ) der einzelnen Peaks herangezogen oder der Test auf Peakreinheit z.B. mittels Diodenarray-Detektor oder Massenspektrometrie durchgeführt werden.

### 4.2.2 Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich einer analytischen Methode ist das Intervall zwischen unterer und oberer Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, innerhalb dessen für die Analyten Linearität, Präzision und Richtigkeit nachgewiesen werden müssen. Er orientiert sich an der zu erwartenden

Konzentrationen der Untersuchungslösungen und umfasst damit den näheren Bereich um die Spezifikationsgrenzen.

Die Grenzen des Arbeitsbereiches werden durch die Anforderungen des Prüfverfahrens bestimmt und in der Regel aus der Linearität abgeleitet. Für die geforderten Minimalbereiche schlägt die ICH-Richtlinie Q2(R1) folgende Grenzen vor:

- Für eine Gehaltsbestimmung eines Arzneistoffes oder eines Fertigproduktes: 80-120% der zu erwartenden Konzentration.
- Für die Bestimmung der Gleichförmigkeit des Gehaltes: 70-130% der zu erwartenden Konzentration.
- Für die Bestimmung von Nebenprodukten: Von dem der Behörde zu meldenden Wert (nahe der Bestimmungsgrenze) bis 120% der in der Spezifikation geforderten Grenze. Die Berichtsgrenzen werden in der ICH-Richtlinie Q3A<sup>7</sup> angegeben und sind abhängig von der Tagesdosis des jeweiligen Arzneimittels.

Grundsätzlich gelten Analysenergebnisse nur als valide, wenn sie im bei der Validierung der Methode festgelegten Arbeitsbereich gemessen wurden.

#### 4.2.3 Linearität

Die Linearität einer analytischen Methode ist ihre Fähigkeit, innerhalb eines gewissen Arbeitsbereiches Messergebnisse zu erzielen, die der Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe direkt proportional sind. Mindestens fünf Analytkonzentrationen sollten über den gesamten Arbeitsbereich der analytischen Methode randomisiert vermessen werden. Neben einer visuellen Beurteilung des Analytensignals als Funktion der Konzentration wird eine geeignete statistische Auswertungsmethode empfohlen. Die Überprüfung der Linearität erfolgt nach der Modellgleichung (Gl. I.4-1) und Zielfunktion (Gl. I.4-2) einer linearen Regression und nutzt das Prinzip der Minimierung der Summe der quadratischen Abweichungen. Eine Validierung der Kalibrierung ist zwingend notwendig, da sonst erhebliche Fehler bei der Quantifizierung zu befürchten sind.

$$\text{Gleichung I.4-1} \quad y_i = b + ax_i + \varepsilon_i$$

$x_i$  : Messwert, unabhängige Variable

$y_i$  : Messsignal, abhängige Variable

$b$  : y-Achsenabschnitt

$a$  : Steigung

$\varepsilon_i$  : Fehlerterm, Residuen (Differenz zwischen Messwert und ausgeglichenem Wert).

$$\text{Gleichung I.4-2} \quad S = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - (b + ax_i))^2$$

$S$  : Summe der quadratischen Abweichungen.

Die Linearität muss in dem in der Prüfungsvorschrift festgelegten Arbeitsbereich gewährleistet sein (siehe Kapitel 4.2.2). Bei HPLC- und CE-Methoden zur Bestimmung von Neben- und Abbauprodukten (quantitative Reinheitsprüfung) sollte der Bereich von der Bestimmungsgrenze bis mindestens 120 % der Grenze der Spezifikation überprüft werden. Es werden mindestens fünf äquidistante Konzentrationen in diesem Bereich hergestellt und je mindestens dreimal vermessen. Die statistische Auswertung zur Bestimmung der Linearitätsgerade erfolgt anhand der Angabe des Korrelationskoeffizienten ( $r$ ), des  $y$ -Achsenabschnittes ( $b$ ), der Steigung der Regressionsgerade ( $a$ ), der Summe der quadratischen Abweichungen und der Abweichungen der Messwerte von der Regressionsgerade (Reststandardabweichung). Die ICH fordert in ihren Richtlinien einen Korrelationskoeffizienten bei Reinheitsprüfungen von  $r \geq 0,980$  als Maß für die Linearität. Der Korrelationskoeffizient  $r$  sagt allerdings über den Grad der Linearität nichts aus. Er zeigt nur, wie gut eine Korrelation zweier Werte durch ein mathematisches Modell beschrieben werden kann. Dieses Modell kann eine Gerade oder eine Kurve sein.

Um sicherzugehen, dass die Regression bzw. Kalibrierung richtige Ergebnisse liefert, reichen die von der ICH und FDA geforderten Daten nicht aus. Es müssen folgende Voraussetzungen erfüllt werden:

- Güte der Anpassung (Linearität)
- Normalverteilung der Stichproben
- Unkorreliertheit der Fehler (Vermeidung von Trends)
- Varianzenhomogenität im gesamten Arbeitsbereich (Homoskedasizität)
- Ermittlung einflussreicher Datenpunkte (Ausreißer)

Zur Überprüfung dieser Punkte stehen zahlreiche Tests zur Verfügung,<sup>128</sup> von denen jedoch keiner für jedes Problem optimal geeignet ist. Es ist daher anzuraten, jeweils mehrere Tests durchzuführen. Sind all diese Voraussetzungen erfüllt, ist die Quantifizierung der Reinheit (Neben- und Abbauprodukten) eines Arzneistoffes mit Hilfe eines externen oder internen Standards möglich.

#### 4.2.4 Präzision

Die Präzision einer analytischen Methode ist ein Maß für die Übereinstimmung (Streuung) der Messergebnisse bei wiederholten Messungen derselben homogenen Probe. In die Präzision gehen die zufälligen Fehler ein. Es sollten nach Möglichkeit homogene authentische Proben verwendet werden. Ausgedrückt werden die Standardabweichung, die relative Standardabweichung (RSD) und der Vertrauensbereich für jede Präzisionsart. Die Präzision unterteilt in die Wiederholbarkeit, die laborinterne (Intralaboratorium) Präzision und die Vergleichspräzision (Ringversuch).

Die Wiederholbarkeit in HPLC und CE erfolgt bei Wiederholung derselben Probeaufgabe unter gleichen Messbedingungen innerhalb eines kurzen Zeitraums.

Nur die Richtlinien der FDA<sup>129</sup> unterscheiden hier sinnvollerweise zwischen der Systempräzision (eine Lösung wird x-mal vermessen) und der Methodenpräzision (eine Lösung wird x-mal hergestellt und vermessen). Bei der Systempräzision überprüft man nur die Präzision des Gerätes, während die Methodenpräzision ein Maß für alle während der Herstellung und Messung der Probe auftretenden zufälligen Fehler ist. Das PhEur 6.0<sup>65</sup> bestimmt die Wiederholpräzision durch das „aufeinanderfolgende Einspritzen einer Referenzlösung“ und bestimmt somit nur die Systempräzision.

Die Systempräzision wird normalerweise mit den Rohdaten, die Methodenpräzision mit den ermittelten Gehaltswerten berechnet.

Die Ermittlung der laborinternen Präzision wird analog der Ermittlung der Methodenpräzision durchgeführt. Dabei soll der Einfluss von verschiedenen Geräten, verschiedenen Bearbeitern, verschiedenen Chargen von Reagenzien und unterschiedlichen Arbeitstagen auf die Ergebnisse geprüft werden. Die Art und der Umfang der Änderungen sind individuell je nach Aufgabenstellung vom Analytiker zu bestimmen. Meist liegen die ermittelten Daten um das ein- bis zweifache höher als bei den Wiederholmessungen.

Bei einer Methodenentwicklung für eine Reinheitsprüfung, die über einen Zeitraum von mehreren Jahren angewendet werden soll, ist es sicher sinnvoll Reagenzien auszutauschen, eine andere Säulencharge zu benutzen oder den Anwender zu wechseln. Ein Gerätewechsel ist nicht erforderlich.

#### 4.2.5 Richtigkeit

Die Richtigkeit einer analytischen Methode drückt die Übereinstimmung zwischen dem gefundenen Wert und einem entweder konventionell als wahr akzeptierten Wert oder einem akzeptierten Referenzwert aus. Mangelnde Übereinstimmung ist ein Hinweis auf systematische Fehler. Zur Beurteilung der Richtigkeit einer Methode zur Reinheitsprüfung (quantitativ) gibt es laut ICH-<sup>128</sup> und FDA-Richtlinien<sup>129</sup> zwei Möglichkeiten:

- ❖ Vergleich der Ergebnisse mit einem validierten, unabhängigen Verfahren bekannter Richtigkeit (z.B. Konventionsmethode). Die statistische Auswertung wird mit dem t-Test durchgeführt. Die Mittelwerte sollten nicht signifikant von einander abweichen, anderenfalls muss diese Abweichung schriftlich begründet werden.
- ❖ Wiederfindungsverfahren (Aufstockverfahren, Standardadditionsverfahren): Berechnung der Wiederfindungsquote nach Zusatz einer definierten Menge an Referenzsubstanzen zur Probenmatrix oder zur Probenlösung. Diese Methode wird häufig beim Vorliegen einer komplexen Matrix eingesetzt. Bei der statistischen Auswertung wird die Richtigkeit als

prozentuale Wiederfindung oder als Abweichung des bestimmten vom als wahr angesehenen Wert angegeben.

#### 4.2.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LOD und LOQ)

Die Nachweisgrenze einer analytischen Methode ist die geringste Analytmenge in einer Messprobe, die detektiert, aber nicht als quantitativer Wert bestimmt werden kann. Die Bestimmungsgrenze ist die geringste Analytmenge in einer Messprobe, die mit der notwendigen Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann. Bei der Limitierung einer Verunreinigung wird nach ICH die Nachweisgrenze, bei einer quantitativen Ermittlung der Verunreinigung die Bestimmungsgrenze gefordert. Der externe Standard kann entweder eine Verdünnung der zu untersuchenden Substanz selbst oder eine bekannte Verunreinigung sein.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze können z.B. visuell festgelegt, aus dem Signal/Rausch-Verhältnis, aus der Standardabweichung des Blindwertes oder aus der Kalibriergerade im Bereich der Bestimmungsgrenze berechnet werden. Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wird ein Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) von 3:1 und für die Bestimmungsgrenze von 10:1 empfohlen. Vorteil dieser praktischen Methode gegenüber theoretischen Berechnungsmethoden ist der experimentelle Nachweis, dass bei der ermittelten Konzentration noch ein Peak für die entsprechende Substanz zu erkennen ist, dessen Höhe in dem definierten Verhältnis zum Basislinienrauschen steht.

#### 4.2.7 Robustheit

Die Robustheit einer analytischen Methode ist ein Maß ihrer Kapazität, gegenüber geringen, aber überlegten Änderungen der Methodenparameter stabil zu bleiben. Sie ist ein Hinweis auf die Zuverlässigkeit im Routinebetrieb. Diese Elemente sollten während der Methodenentwicklung betrachtet werden. Bei HPLC- oder CE-Methoden können zu diesen Parametern gehören: Stabilität der Probelösungen, pH-Wert und Zusammensetzung der mobilen Phase bzw. des Hintergrundelektrolyts, Temperatur, Flussrate bei HPLC, Spannung bei CE usw.

In der USP<sup>66</sup> wird zwischen „Robustness“ und „Ruggedness“ unterschieden. „Ruggedness“ ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen, wiedergegeben im  $V_k$ -Wert, wenn spezifische Bedingungen variiert werden. „Variierende Bedingungen“ kann laut USP bedeuten: Wechsel des Labors, des Anwenders, des Gerätes, der Reagenzien, des Zeitpunkts der Analyse usw. Damit ist die „Ruggedness“ im Prinzip der in der ICH beschriebene laborinterne Präzision gleichzusetzen. Die Definition für „Robustness“ ist identisch mit den ICH-Richtlinien.

Zur Bestimmung der Robustheit werden realistisch vorkommende Abweichungen der Angaben der Methode bewusst dargestellt und ihre Auswirkungen auf das Ergebnis beurteilt. Die Abweichungen

sind abhängig von der jeweiligen Problemstellung. Nachfolgend sind einige mögliche Variationen aufgezeigt:

- Variation der mobilen Phase bzw. des Hintergrundelektrolyts (Zusammensetzung, pH-Wert, Charge und Molarität des Puffers),
- Abweichungen in der Flussrate der mobilen Phase bei HPLC bzw. in der angelegten Spannung bei CE,
- Abweichungen in der Detektionswellenlänge des UV-Detektors,
- Änderungen der Säulen- bzw. Kapillartemperatur.

Die Robustheit kann nicht exakt zahlenmäßig erfasst werden. Eine Beurteilung erfolgt durch verschiedene chromatographische Parameter wie z.B. die Auflösung eines kritischen Peakpaares. Ist die Auflösung größer fünf, so sollten andere Parameter wie z.B. der Trennfaktor zur Beurteilung der HPLC-Trennung zweier Peaks oder die korrigierten Peakfläche in der CE herangezogen werden. Auch die Bodenzahl oder der Symmetriefaktor dienen häufig als Beurteilungskriterium. Ein Hinweis auf korrekte Quantifizierung kann die Überprüfung der Integration der einzelnen Peaks bei definierten Variationen geben.

#### 4.2.8 Probenstabilität

Es können große Schwierigkeiten bei der Routineanalytik auftreten, wenn die zu bestimmende Arzneistoffkomponente und schon vorhandene Abbauprodukte unter den Bedingungen der Probenvorbereitung über den Zeitraum der Analysendauer nicht stabil sind. In solchen Fällen wird das reale Zersetzungsprofil eines Wirkstoffes bzw. der Gehalt einer Probe zu einem bestimmten Zeitpunkt vermessen. Beim Einsatz von „Autosamplern“ muss die Stabilität der Probelösungen über den Zeitraum der Messungen gewährleistet sein.

Die Stabilität der Untersuchungslösung wird über einen definierten Zeitraum durch Vergleich von Chromatogrammen bzw. Elektropherogrammen oder Vergleich von gemessenen Werten mittels F-Test und t-Test zum Messzeitpunkt 0 h und Messzeitpunkt x h (24-48 Stunden) untersucht.

### 4.3 Validierung von HPLC- und CE-Methoden

Die unter Kapitel 4.2 genannten Aspekte zur Validierung analytischer Methoden können auf HPLC- wie CE-Methoden angewendet werden. Es ergeben sich lediglich einige Besonderheiten für die genannten Methoden, die im Folgenden ausgeführt werden.

Gemein sind beiden Methoden, dass die Instrumente nach dem heutigen Stand der Technik mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) für die UV-Detektion ausgerüstet sind. Mit diesem besteht die Möglichkeit der Aufnahme von UV-Spektren des Peaks während der Trennung, was die

Möglichkeit der spektrenbezogenen Peakreinheitsprüfung zur Absicherung der Selektivität der Methoden schafft.

Einen wesentlichen Unterschied stellt das Injektionssystem dar. Während bei der HPLC die Probeninjektion über eine Volumendosierschleife erfolgt und in der Regel sehr gute Werte für die Wiederholpräzision gemessen werden, erfolgt die Probenaufgabe in der CE entweder hydrodynamisch, hydrostatisch oder elektrokinetisch. Die bei Anwendungen für die Routineanalytik am häufigsten angewendete Methode ist die hydrodynamische Aufgabe. Durch Anlegen eines Überdrucks auf das Probengefäß, in welches die Kapillare mit einem Ende taucht, kommt es zur Aufgabe eines von der Viskosität der Untersuchungslösung abhängigen Volumens, das experimentell bestimmbar ist. Bei lokalen Temperaturschwankungen im Bereich des Probengefäßes kommt es zu Viskositätsveränderungen der aufzugebenden Flüssigkeit und zu unterschiedlichen injizierten Probenvolumina. Somit kommt es vor, dass bei der CE manchmal stark erhöhte Werte für die Wiederholpräzision eines Analyten gemessen werden. Diese Schwankungen können aber durch Verwendung eines internen Standards fast vollständig kompensiert werden.<sup>131</sup> Nachteile der Verwendung des internen Standards im Vergleich zum externen Standard sind Volumenmessfehler bei der Zugabe und die Erhöhung des Integrationsfehlers.<sup>132</sup>

Ein weiterer Unterschied, der sich auf die Präzisionswerte auswirken kann, ist die Tatsache, dass bei der CE im Gegensatz zur HPLC die Geschwindigkeit, mit der Analyten das Detektorfenster passieren, je nach ihrer Eigenmobilität verschiedenen ist. Somit ändern sich die Peakflächen mit der Migrationszeit (siehe Kapitel 3.2.2.1). Um durch diesen Umstand hervorgerufene Verschlechterungen der Präzision zu vermeiden, stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Entweder wird die Peakfläche des Analyten durch die Migrationszeit dividiert und damit korrigiert; oder durch eine Prüfung auf Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten im Rahmen der Validierungsarbeiten wird gezeigt, dass sie hinreichend konstant sind. Zudem werden durch Bildung der Peakflächenverhältnisse mit dem internen bzw. externen Standard diejenigen Schwankungen korrigiert, die sowohl den Analyten als auch den Standard betreffen, was alle durch Veränderung des EOF verursachten Abweichungen einschließt. Somit kann im Regelfall von einer Korrektur der Peakflächen durch die Migrationszeiten abgesehen werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Kapillarkonditionierung wichtig, für die ein klares Procedere festgelegt werden sollte.

Bei der Robustheit von CE-Trennungen wichtige Parameter sind Charge, Hersteller, Stabilität von Puffer und Reagenzien, insbesondere der pH-Wert des Puffers,<sup>133</sup> der mindestens auf eine Nachkommastelle genau eingestellt werden sollte.

Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit gibt es bei der CE das Problem der Übertragbarkeit einer Methode auf das Gerät eines anderen Herstellers. Da die Instrumente in wesentlichen Elementen wie Abstand zwischen Detektor und Kapillarende sowie Höhe des Injektionsdrucks voneinander

abweichen, ist eine Übernahme aller Methodenparameter nicht möglich und eine Anpassung notwendig. Je nach Ausmaß der Änderungen sollte die Methode unter den veränderten Bedingungen revalidiert werden.

## II Ergebnisse und Diskussion

### 1 Tropa-Alkaloide

#### 1.1 Übersicht

Atropin und Scopolamin (Abb. II.1-1) sind Esteralkaloide und stellen chemisch gesehen den Tropasäureester mit 3- $\alpha$ -Tropanol (früher Tropin) bzw. 6,7-Epoxy-3- $\alpha$ -tropanol (Scopin) dar. Atropin ist ein racemisches Gemisch aus *S*- und *R*-Hyoscyamin (früher als *L*- und *D*-Hyoscyamin bezeichnet), während Scopolamin das enantiomerenreine *S*-Hyoscin darstellt. Die Pflanze selbst bildet nur die Hauptalkaloide *S*-Hyoscyamin und *S*-Hyoscin. Die Racemate Atropin und *S,R*-Hyoscin entstehen als Isolierungsartefakte bei der Aufarbeitung des Pflanzenmaterials von verschiedenen Solanaceen-Arten, wie z.B. *Atropa belladonna*, *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, durch Racemisierung von *S*-Hyoscyamin im Fall des Atropins bzw. von *S*-Hyoscin beim *S,R*-Hyoscin. Homatropin (Abb. II.1-1) ist ein halbsynthetisches Derivat des Atropins, in dem der Tropasäureanteil durch racemische Mandelsäure ersetzt wurde. Ipratropiumbromid entsteht durch die Quaternisierung des Stickstoff-Atropins, diese führt zu stabilen und wasserlöslichen Salzen.

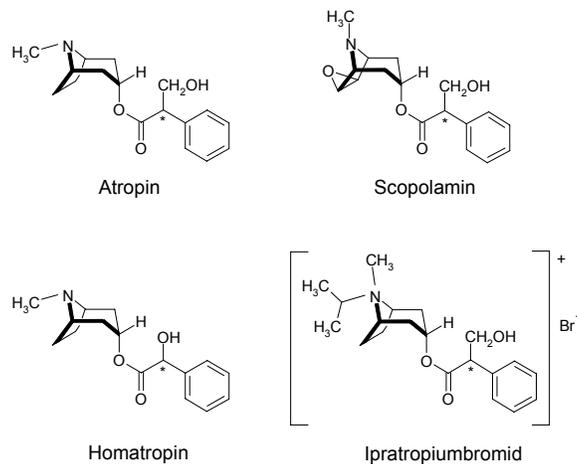


Abb. II.1-1: Strukturen der Racemate Atropin, Scopolamin, Homatropin und Ipratropiumbromid.

Pharmakologisch gesehen handelt es sich um Antagonisten an den Muscarinrezeptoren. Sie blockieren durch kompetitiven Antagonismus die Acetylcholin-vermittelte Erregungsübertragung und heben damit die Muscarinwirkung von Acetylcholin auf. Nur die Hauptalkaloide *S*-Hyoscyamin und *S*-Hyoscin tragen die antagonistische Wirkung. Heute werden Atropin, Scopolamin und Homatropin hauptsächlich in der Augenheilkunde als Mydriatikum angewandt. Ipratropiumbromid

wird als Spasmolytika, insbesondere bei obstruktiven Lungenerkrankungen, und ferner bei bradykarde Herzrhythmusstörungen eingesetzt.<sup>134</sup>

## 1.2 Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat

### 1.2.1 Verunreinigungen des Atropinsulfates

Das Verunreinigungsprofil des Atropinsulfates nach Europäischem Arzneibuch PhEur 6.0<sup>135</sup> beinhaltet sowohl die verwandten Alkaloide als auch die Abbauprodukte von Atropin, die aus der Extraktion der Pflanzenmaterialien bzw. durch die Lagerung stammen können.

Aufgrund des unselektiven Isolierungsverfahrens des Arzneistoffs (Atropin) aus Pflanzenmaterial können folgende Verunreinigungen vorkommen (Abb. II.1-2): Noratropin (**B**), 6-Hydroxyhyoscyamin (**D**), 7-Hydroxyhyoscyamin (**E**), Scopolamin (Hyoscin) (**F**) und Littorin (**G**), wobei die letztgenannte Verunreinigung fälschlicherweise im PhEur 6.0 als "Isolittorin" bezeichnet wurde.

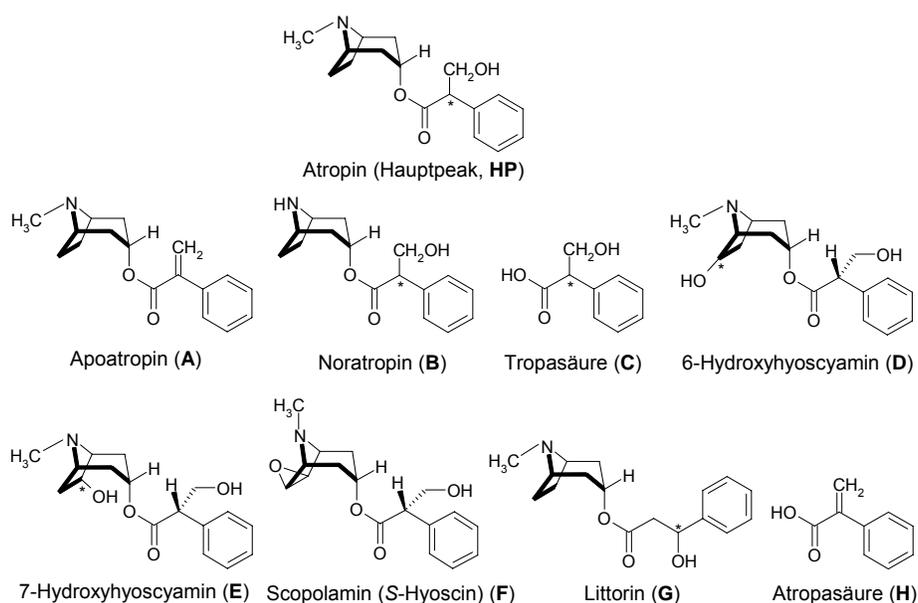


Abb. II.1-2: Strukturen des Atropins, verwandten Substanzen gemäß PhEur 6.0 und von Atropasäure.

In wässriger Lösung zersetzt sich Atropin durch saure bzw. basische Hydrolyse zu Tropin und Tropasäure (**C**). Außerdem kann sich durch Wasserabspaltung Apoatropin (**A**) bilden, das wiederum zu Tropin und Atropasäure hydrolysiert. Atropasäure kann auch durch Aufnahme von Wasser Tropasäure bilden. Eine Dimerisierung von Apoatropin zum Belladonnin, das in der *cis*- und *trans*-Form vorliegen kann, erfolgt nur spurensweise unter extremen Bedingungen wie hoher Temperatur oder langer Reaktionszeit. Die nachfolgende Hydrolyse von Belladonnin führt zu

Tropin und Isatropasäure, das ebenfalls in der *cis*- und *trans*-Form vorliegen kann. Die Hydrolysegeschwindigkeit des Atropins hat bei pH 3-4 ein Minimum; wegen der in diesem Bereich möglichen Dehydratisierung liegt aber das Stabilitätsoptimum wässriger Lösungen bei pH 4-4,5.<sup>136</sup> Folgende Abbildung II.1-3 fasst die Hydrolyse-, Dehydratisierungs- und Dimerisierungsreaktionen zusammen:

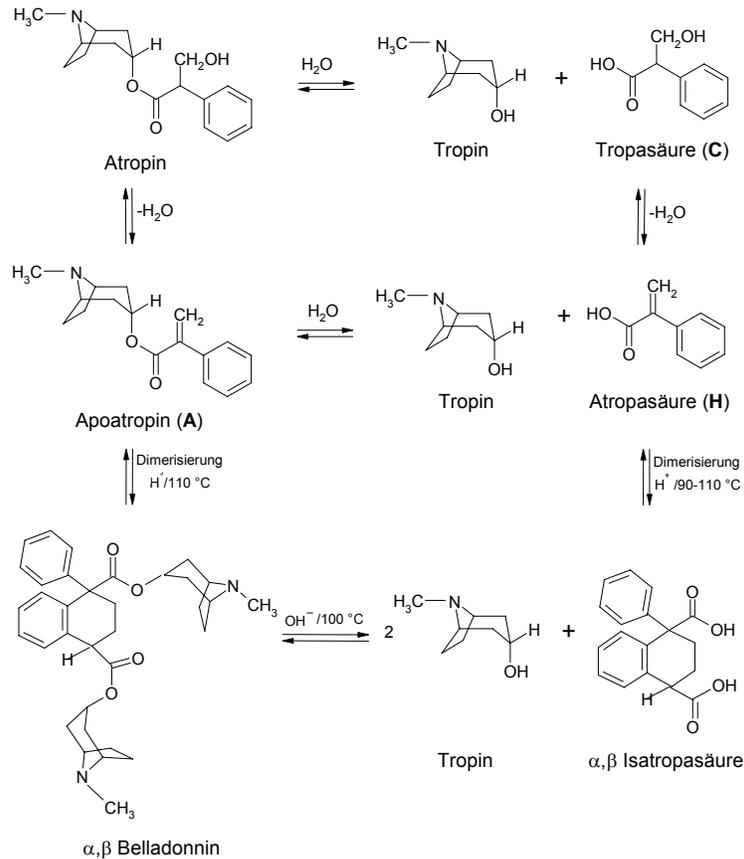


Abb. II.1-3: Zersetzungsschema von Atropin in wässriger Lösung nach Lit<sup>137</sup>.

Wie aus Abb. II.1-3 zusehen ist, fehlt Tropin als Hydrolyseprodukt ein chromophores System und wird daher mit UV/VIS-Detektoren nicht erfasst, könnte allerdings mit massenselektiven Detektoren nachgewiesen werden.<sup>138,139</sup>

Die zahlreichen Studien über die Stabilität von Atropinsulfat mittels DC zeigen,<sup>140</sup> dass bei allen Stressarten (z.B. verschiedene Lagerungsbedingungen wie UV-Licht, Temperatur, verschiedene pH-Einstellung der Lösungen und unterschiedliche Packungsmaterialien) vorwiegend Apoatropin (A) auftritt und so als empfindlicher Indikator für eine beginnende Zersetzung dienen kann.

Insgesamt sind Apoatropin (A), Tropasäure (C) und Atropasäure (H) die Hauptabbauprodukte von Atropinsulfatlösungen. Neben den verwandten Alkaloiden wurden nur die zwei erstgenannten Zersetzungsprodukte als Verunreinigungen in der Atropin-Monographie<sup>135</sup> aufgeführt, wobei die

Spezifikation der Reinheitsprüfung auf den Gehalt von Atropinsulfat bezogen wurde. Der Gehalt von Apoatropin (**A**) darf 0,4% nicht überschreiten, der Gehalt von Noratropin (**B**) darf maximal 0,3% betragen. Alle anderen Verunreinigungen (von **C** bis **G**) werden auf 0,2% begrenzt. Die Summe der Verunreinigungen darf 1,5% nicht überschreiten.

### 1.2.2 Problemstellung

Vor der letzten Revision der Monographie von Atropinsulfat wurden die fremden Alkaloide und Zersetzungsprodukte des Atropinsulfates mittels DC analysiert, und aufgrund der Methode auf je 0,5% begrenzt. Da die Verunreinigungen des Atropinsulfates ein Gemisch aus sauren (wie Atropasäure) und basischen (z.B. Noratropin, Apoatropin, usw.) Verbindungen sind, wurde die Reinheitsprüfung von Atropin nach PhEur 6.0<sup>135</sup> mittels Ionenpaarchromatographie (IPC) durchgeführt. Die IPC-Methode bedient sich eines RP-8-Materials als stationäre Phase, einer Gradientenelution mit einer Fließmittelmischung aus Phosphatpuffer pH 3,3, Natriumdodecylsulfat (SDS, Ionenpaarreagenz) und Acetonitril als mobile Phase A sowie Acetonitril als mobile Phase B. Allerdings zeigt diese IPC-Methode einige Nachteile. Da lange Äquilibrierungszeiten zur Einstellung des Gleichgewichtes benötigt werden, führt die Methode zu Zeitverlusten und hohem Fließmittelverbrauch. Aufgrund des Einsatzes von Ionenpaarreagenzien ist die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse häufig schwierig; außerdem ergab die Methode schlechte Robustheit gegenüber der Gradientenelution. Zusätzlich verwendet diese Methode ein teures Ionenpaarreagenz (SDS).

Daher wird als Alternative zur IPC-Arzneibuchmethode sowohl eine HPLC- als auch CE-Methode vorgestellt und validiert, die jeweils eine Trennung aller verwandten Alkaloide bzw. Hauptzersetzungsprodukte des Atropinsulfates gewährleistet und die Begrenzung dieser Verunreinigungen ermöglicht.

### 1.2.3 Quantitative Reinheitsprüfung von Atropinsulfat mittels HPLC

Aufgrund der oben angeführten Probleme bei der Trennung basischer und saurer Komponenten mittels IPC sollte eine HPLC-Methode ohne den Einsatz eines Ionenpaarreagenzes entwickelt werden, die in der Lage ist, innerhalb einer akzeptablen Elutionszeit das Atropin von allen Verunreinigungen (**A** bis **G**) und Atropasäure (**H**) sicher abzutrennen. Daher standen neben Atropinsulfat alle Verunreinigungen als Reinsubstanzen zur Verfügung. Apotropin wurde nach HESSE<sup>141</sup> aus Atropinsulfat und Atropasäure nach RAPER<sup>142</sup> aus Tropasäure synthetisiert.

#### 1.2.3.1 Methodenentwicklung

Als stationäre Phase wurde für das Trennproblem die in Kapitel I.3.1.3.2.1 vorgestellte Aquasäule (RP-18-Säule mit polarem Endcapping) gewählt. Durch ihre Fähigkeit, sowohl mit geladenen als auch mit neutralen Molekülen in Wechselwirkung treten zu können, kann der Einsatz eines Ionenpaarreagenzes vermieden werden.

Für die Trennung aller relevanten Komponenten ist ein pH-Bereich im Sauren (pH 2-3) günstig, so dass die Basen vollkommen protoniert und die Säuren neutral vorliegen. Zur Stabilisierung des pH-Wertes können Citrat- oder Phosphatpuffer eingesetzt werden, die in diesem pH-Bereich eine hohe Pufferkapazität zeigen. Deshalb wurde als mobile Phase ein Fließmittelsystem entwickelt, bei dem als organische Komponente Acetonitril und als Puffersubstanz Kaliumdihydrogenphosphat zum Einsatz kamen.

Atropinsulfat verfügt zwar über entsprechende Maxima bei 252 nm, 257 nm, 264 nm, aber zur Detektion wurde ein kurzwelliger Bereich von 215 nm ausgewählt, um Überladungseffekte auf der Säule bei der hohen Probenkonzentration zu vermeiden. Der UV-Cut-Off-Wert eines 20 mM-Citratpuffer liegt bei 250 nm, so dass dieser für eine Detektion bei 215 nm ungeeignet ist. Mit einem UV-Cut-off-Wert von 210 nm ist Kaliumdihydrogenphosphat die Puffersubstanz der Wahl.

Bei der Auswahl der Fließmittelzusammensetzung war ein wässriger Anteil von mindestens 75 VT vorgegeben, um die protonierten basischen Moleküle trotz polarem Endcapping der stationären Phase aus dem Einspritzpeak zu schieben. Die Säule wurde bei 25 °C temperiert.

In Vorversuchen konnte trotz verschiedener Fließmittelzusammensetzungen, pH-Werte der mobilen Phase und Flussraten keine isokratische Methode gefunden werden, mit der alle Komponenten getrennt werden konnten, da die Verunreinigungen **D**, **E** und **F** einerseits, und **G** und **C** andererseits zusammen eluieren. Apotropin **A** und Atropasäure **H** eluieren relativ spät, so dass sich unnötig lange Analysenzeiten und relativ breite Peakformen ergaben. Daher wurde ein Gradientensystem entwickelt.

### 1.2.3.1.1 Gradientenentwicklung

Im Jahr 2002 entwickelte KIRCHHOFF<sup>36</sup> eine RP-HPLC-Methode, die fast alle Hauptzersetzungsprodukte des Atropinsulfates trennte. Zuerst wurde die Gradientenelution dieser entwickelten HPLC-Methode als Ausgangspunkt für die Trennung aller "verwandten Substanzen" genutzt.

<b>Fließmittel:</b>	FM A: 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 2,5
	FM B: Acetonitril (ACN)
<b>Gradient:</b>	Zeit [min]      FM B [%]      Flussrate [ml/min]
	0-3              20              1.0
	3-5              40              1.0
	5-10             40              1.0
Postrun:	2 min          20              1.0

Abbildung II.1-4 zeigt das Chromatogramm dieser Trennung.

6-Hydroxyhyoscyamin (**D**) und Hyoscin (**F**) sowie Littorin (**G**) und Tropasäure (**C**) werden nicht getrennt; außerdem liegen die Peaks von Noratropin (**B**) und Littorin/Tropasäure (**G**, **C**) zu nahe am Hauptpeak des Atropinsulfates.

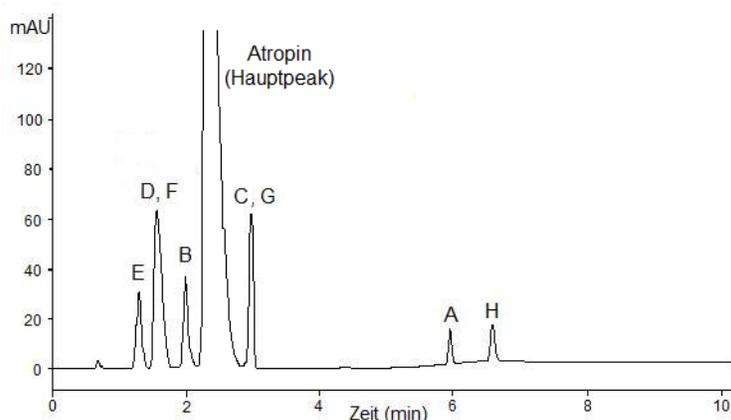


Abb. II.1-4: Chromatogramm der Gradienten-Ausgangsmethode; chromatographische Bedingungen: Säule: Thermo Hypersil Aquasil C18, 125 x 4,6 mm (5 µm); Fließmittel: (A:B) 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,5:ACN; Gradient (A:B %, v/v): 0-3 min (80:20), 3-5 min (60:40) und 5-10 (60:40); Flussrate: 1,0 ml/min; Detektion: 215 nm (UV); Temperatur: 25 °C; Injektionsvolumen: 100 µl. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

Um eine Basislinientrennung aller Verunreinigungen zu erzielen, wurden Variationen der Fließmittelzusammensetzung und der Flussrate durchgeführt. Atropinsulfat und alle Verunreinigungen eluieren so mit ausreichender Auflösung und günstiger Analysenzeit. Letztendlich resultiert folgende Gradientenelution:

<b>Fließmittel:</b>	FM A: 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 2,5		
	FM B: ACN		
<b>Gradient:</b>	Zeit [min]	FM B [%]	Flussrate [ml/min]
	0-4	25	0.6
	4-6	23	1.0
	6-12	45	1.0
Postrun:	2 min	25	1.0

Nachfolgende Abbildung II.1-5 zeigt ein Musterchromatogramm der Probelösung von Atropinsulfat und alle Verunreinigungen. Die Zuordnung der erhaltenen Peaks im Chromatogramm zu den einzelnen Verunreinigungen wurde durch „spiken“ mit Einzelsubstanzen zu der Probelösung von Atropinsulfat erzielt.

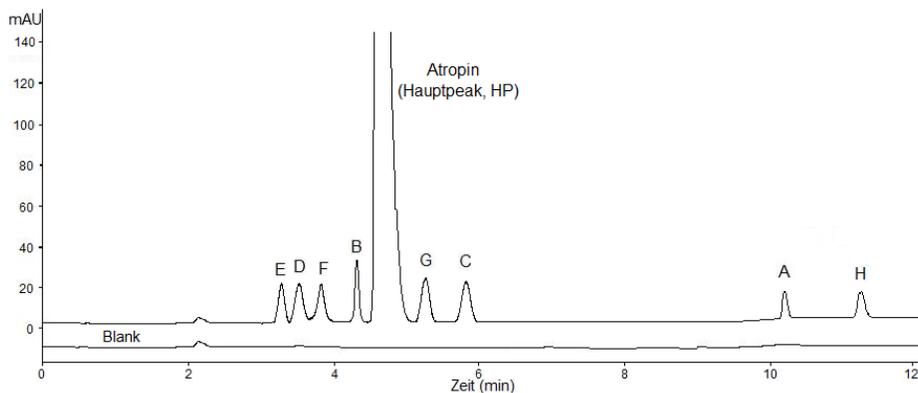


Abb. II.1-5: Chromatogramm des Atropinsulfat und der verwandten Substanzen unter den optimierten Bedingungen: Säule: Thermo Hypersil Aquasil C18, 125 x 4,6 mm (5 µm); Fließmittel: (A:B) 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,5:ACN; Gradient (A:B %, v/v): 0-4 min (75:25), 4-6 min (77:23) und 6-12 (55:45); Flussrate: 0-4 min (0,6 ml/min), 4-12 min (1,0 ml/min); Detektion: 215 nm (UV); Temperatur: 25 °C; Injektionsvolumen: 100 µl. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

Quantifiziert wurde der Gehalt jeder Verunreinigung mittels des externen Standards von Tropasäure (CRS-Substanz), und dann in Prozent bezüglich des Atropinsulfatgehalts wiedergegeben. Vor der Reinheitsbestimmung mittels externen Standards wurden die Responsefaktoren aller Verunreinigungen in Bezug auf Tropasäure ermittelt und die entwickelte HPLC-Methode validiert.

### 1.2.3.2 Methodvalidierung

Die hier vorgestellten Validierungsarbeiten wurden ausschließlich zur Überprüfung der Güte der Reinheitsbestimmungsmethode von Atropinsulfat mittels externen Standards von Tropasäure durchgeführt und erfolgen auf Basis der geltenden ICH-Richtlinie Q2(R1).<sup>128</sup>

### 1.2.3.2.1 Spezifität/Selektivität

Die Identifizierung des Peaks der Verunreinigungen wurde mittels Referenzsubstanzen überprüft und die Basislinientrennung aller Komponenten sichergestellt. Störungen der Bestimmung einzelner Verunreinigung durch andere Komponenten konnte nicht festgestellt werden. Mit der Peakreinheitsprüfung des DAD-Systems wurde die optische Peakreinheit überprüft. Zur Bewertung wurden die relative Retention ( $r$ ) der einzelnen Verunreinigungspeaks bezogen auf Atropinsulfat (Hauptpeak), die theoretische Bodenzahl ( $N$ ), sowie die Auflösung zweier kritischer Peakparre ( $R$ ) herangezogen. Tabelle II.1-1 fasst die Auswertung der Daten zusammen:

Verunreinigung/ Substanz	relative Retention $r$	Bodenzahl $N$	Auflösung $R$
E	0,68	8270	---
D	0,73	5463	1,26
F	0,78	5227	1,25
B	0,90	10801	2,80
Atropin (Hauptpeak)	1,00	7735	1,72
G	1,12	5931	2,14
C	1,27	11069	2,52
A	2,36	15839	27,41
H	2,60	8903	8,12

Tabelle II.1-1: Die Bewertung chromatographischer Größen.

### 1.2.3.2.2 LOQ und LOD, Arbeitsbereich, Linearität und Responsefaktor

Die Ermittlung der Bestimmungsgrenze (LOQ) ist nach ICH-Richtlinie Q2(R1) für quantitative Reinheitsprüfung vorgeschrieben. Sie wurde für jede Verunreinigung durch Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses ermittelt. Um die Möglichkeiten der HPLC-Methode mit Blick auf ihre Empfindlichkeit vollständig zu eruieren, wurde auf gleiche Weise zusätzlich die Nachweisgrenze (LOD) bestimmt. Es ergaben sich für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze die in Tabelle II.1-2 gezeigten Ergebnisse.

Die LOQ und LOD Werte in der Tab. II.1-2 sind zum einen in der Konzentrationseinheit (ng/ml) und zum anderen in (%) bezüglich der nominellen Atropinsulfat-Probenkonzentration von 10 mg/100ml angegeben.

Verunreinigung		E	D	F	B	G	C	A	H
LOQ	ng/ml	50	50	40	70	50	40	50	40
	%	0,05	0,05	0,04	0,07	0,05	0,04	0,05	0,04
LOD	ng/ml	30	30	20	30	30	20	20	20
	%	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02

*Tabelle II.1-2: LOQ und LOD für die Verunreinigungen des Atropinsulfates.*

Die Grenzwerte der Verunreinigungen sind in der Monographie des PhEur 6.0<sup>135</sup> zwischen 0,2-0,4 % festgelegt (siehe Kap. II.1.2.1) und liegen damit um über den Faktor 5 höher (0,04-0,07 %) als die Bestimmungsgrenze der vorher entwickelten RP-HPLC-Methode.

Die Linearität im Arbeitsbereich wird nahe der untersten validierbaren Substanzkonzentration (Bestimmungsgrenze LOQ) bis 120 % der Spezifikationsgrenze der Verunreinigungen überprüft (siehe Kapitel 4.2.2). Um gleichzeitig sehr geringe Mengen an Verunreinigungen zu bestimmen, die unter den Spezifikationsgrenzen liegen, und hohe, die weit darüber bis 120 % liegen, wurde ein Arbeitsbereich von 0,07 bis 0,50 % für Noratropin, von 0,05 bis 0,35 % für Apoatropin und von 0,05 bis 0,25 % für alle anderen Verunreinigungen festgelegt. Diese entsprach bei einer nominellen Probenkonzentration von 10 mg/100 ml einem Bereich von 70 bis 500 ng/ml für Noratropin, 50 bis 350 ng/ml für Apoatropin bzw. 50 bis 250 ng/ml für alle anderen Verunreinigungen. Tabelle II.1-3 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Linearitätsbestimmung; die entsprechenden Linearitätsgeraden sind in Abbildung II.1-6 dargestellt.

Verunreinigung	E	D	F	B	G	C	A	H
Arbeitsbereich [%]	0,05-0,25	0,05-0,25	0,05-0,25	0,07-0,50	0,05-0,25	0,05-0,25	0,05-0,35	0,05-0,25
Korrelationskoeffizient (r)	0,9993	0,9995	0,9997	0,9999	0,9998	0,9997	0,9998	0,9999
Wiederholpräzision RSD [%]	0,80-2,19	0,46-1,33	0,80-1,50	0,32-0,56	0,34-0,85	0,79-1,74	0,24-0,65	0,38-0,96

*Tabelle II.1-3: Ergebnisse der Linearitätsbestimmung im Überblick.*

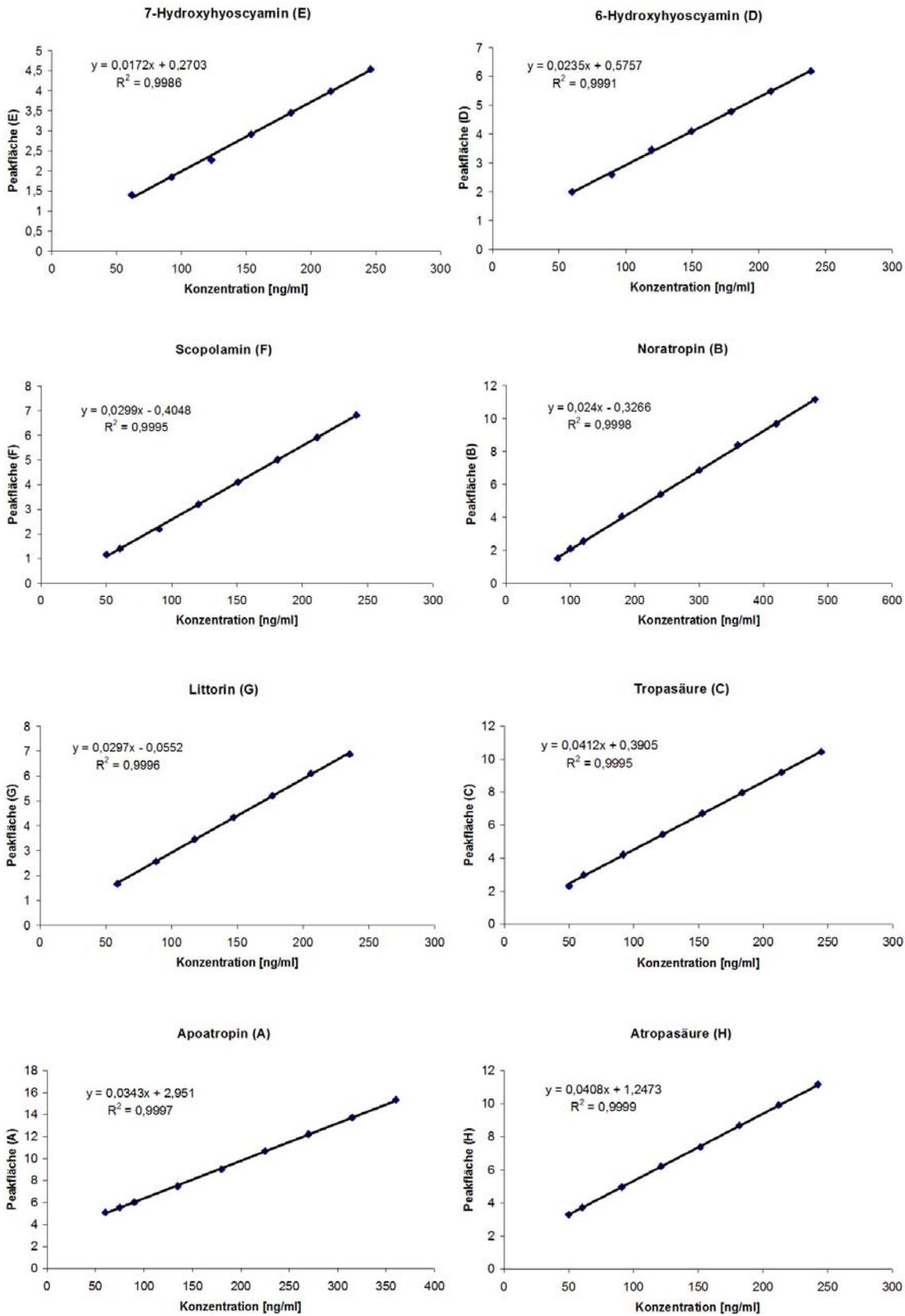


Abb. II.1-6: Linearitätsdiagramme für die Verunreinigungen.

Der Gehalt an jeder Verunreinigung wurde mit Hilfe eines externen Standards "Tropasäure" mit Konzentration von 1,0 µg/ml bestimmt. Die Linearität des externen Standards wurde auch in hohem Arbeitsbereich von 0,1 bis 3 % (0,1 bis 3 µg/ml) überprüft, damit auch sehr hohe Mengen an Verunreinigungen bestimmt werden können.

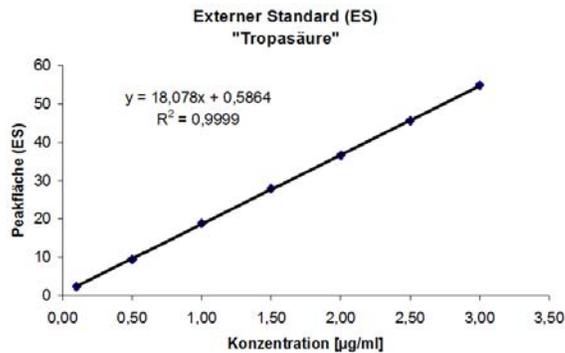


Abb. II.1-7: Linearitätsdiagramm von Tropasäure als externer Standard.

Abbildung II.1-7 stellt das Linearitätsdiagramm des externen Standards dar. Der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) beträgt 0,9999 und die Wiederholpräzision (RSD %) liegt zwischen 0,31 bis 1,04 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Voraussetzungen für eine lineare Regression erfüllt sind. Die Durchführung einer Reinheitsbestimmung, basierend auf einem Flächenvergleich des externen Standards, ist somit möglich.

Da die Bestimmung der Verunreinigungen auf einem Vergleich mit einer verdünnten Tropasäurelösung basieren, muss der Responsefaktor der bekannten Verunreinigungen in Bezug auf den externen Standard (ES) ermittelt werden. Der Responsefaktor ( $Rf$ ) stellt die relative Signalantwort der gleichen Masse einer Substanz zu der einer anderen unter den in der Prüfung vorgeschriebenen Bedingungen dar.

Die Ermittlung des Responsefaktors erfolgt mit Lösungen von 0,1 % Tropasäure bzw. Verunreinigungen. Bei einem Peakflächenvergleich jeder Verunreinigung mit der Peakfläche der Tropasäure (als Standard) wird der Responsefaktor durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Gleichung II.1-1} \quad Rf = \frac{\left(\frac{P}{P_s}\right) - y}{C}$$

$P$  : Peakfläche der Verunreinigung

$P_s$  : Peakfläche des Standards (Tropasäure)

$y$  : y-Achsenabschnitt

$C$  : Konzentration [mg/ml].

Wenn *Rf*-Werte außerhalb des Bereichs von 0,8 bis 1,2 liegen, muss die entsprechende Peakfläche mit einem Korrekturfaktor (*Kf*) multipliziert werden. Diese Korrekturfaktoren werden in Form des reziproken Wertes des Responsefaktors dargestellt.

Folgende Tabelle II.1-4 zeigt die Response- bzw. entsprechende Korrekturfaktoren in Bezug auf den externen Standard.

Verunreinigung	E	D	F	B	G	C (ES)	A	H
Responsefaktor ( <i>Rf</i> )	0,58	0,55	0,68	0,54	0,55	1,00	1,69	1,71
Korrekturfaktor ( <i>Kf</i> )	1,72	1,82	1,47	1,85	1,82	1,00	0,59	0,58

Tabelle II.1-4: Die Response- und Korrekturfaktoren aller Verunreinigungen.

#### 1.2.3.2.3 Präzision und Richtigkeit

Die Reproduzierbarkeit der Reinheitsbestimmung der Methode wurde als Wiederholstandardabweichung für Systempräzision und Methodenpräzision und als laborinterne Standardabweichung bestimmt. Bei der Reinheitsprüfung darf die relative Standardabweichung (RSD %) der Messungen nicht größer als 5 % sein, wenn die Summe aller Verunreinigungen zwischen 0,5 % und 5 % liegt.<sup>127</sup>

Zur Überprüfung der Systempräzision wurde eine Probelösung von Atropinsulfat (10 mg/100ml) und alle Verunreinigungen mit der Konzentration des Grenzwertes von 0,1 % (entspricht 100 ng/ml) hergestellt und sechsmal injiziert. Die statistische Auswertung erfolgt über die Rohwerte (Peakfläche einzelner Verunreinigung) und umfasst die relative Standardabweichung, die in Tabelle II.1-5 dargestellt werden.

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wurde die oben genannte Atropinsulfat-Probelösung mit 0,1 % Verunreinigungsgrenzwert dreimal hergestellt. Diese wurden je zweimal vermessen und der Gehalt der Verunreinigungen mittels ES errechnet. Die statistischen Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Methode wurden durch Ermittlung der RSD % der Daten getroffen (siehe Tab. II.1-5).

Die RSD%-Werte liegen zwischen 1,10 und 3,01 % deutlich höher als die Werte der Systempräzision zwischen 0,73 und 1,38 %. Durch die mehrmalige Herstellung bei der Methodenpräzision ist dies nicht verwunderlich. Alle Werte liegen jedoch weit unter dem noch zu akzeptierten Wert (5 %), so dass von einer reproduzierbaren Methode für die Reinheitsbestimmung ausgegangen werden kann.

Die Bestimmung der laborinternen Präzision über mehrere Tage erfolgt durch eine andere Messreihe. Dabei wurden spezifische Gegebenheiten im Rahmen der Analyse verändert. Die

Messreihe wurde an einem anderen Tag, mit einer anderen Säulencharge (Tag-2) oder anderen Fließmittelchargen wie z.B. Puffersubstanz, ACN (Tag-3) durchgeführt. Der Gehalt der Verunreinigungen wurde wie bei Methodenpräzision bestimmt und dann die RSD % ermittelt.

Um die Präzision an mehreren Tagen über deren Standardabweichungen (RSD) zu vergleichen, verwendet man den F-Test ( $T_F$ ). Die Testgröße  $T_F$  wird mit einem tabellierten Wert  $F_{n_1-1, n_2-1, \alpha}$  oder  $F_{tab}$  verglichen.<sup>127</sup> Ist  $T_F$  größer als der tabellierte Wert, liegt ein signifikanter Unterschied in der Präzision beider Messreihen vor. Der tabellierte Wert  $F_{tab}$  bei  $n=6$  Bestimmungen und  $1-\alpha = 0,95$  liegt bei 5,05. In der Tabelle II.1-6 sind die statistischen Parameter der jeweiligen Messtage (Tag-1/Tag-2 und Tag-1/Tag-3) zusammengestellt. Die Auswertung des F-Tests zeigt, dass die jeweiligen Messtage Varianzenhomogenität aufweisen, da die  $T_F$ -Werte kleiner als 5,05 sind.

Verunreinigung		E	D	F	B	G	C	A	H	
Konzentration 100 ng/ml										
System- präzision	RSD [%]	1,09	1,15	1,19	1,38	1,08	0,73	1,16	1,11	
	Peakflächen									
Methoden- präzision	Gehalt [%]	99,3	98,4	102,2	101,5	98,1	100,3	101,8	102,7	
	RSD [%]	1,10	2,62	2,89	3,01	2,29	2,11	1,97	2,23	
	Gehalt									
Laborinterne Präzision	Tag-1	Gehalt [%]	98,4	101,4	101,6	99,7	98,7	99,8	102,6	101,6
		RSD [%]	1,67	1,98	1,05	2,61	3,11	2,18	1,22	3,67
		Gehalt								
	Tag-2	Gehalt [%]	99,5	99,9	101,1	99,5	98,2	99,8	102,5	101,0
		RSD [%]	2,45	2,66	0,71	3,82	2,76	3,21	1,09	2,66
		Gehalt								
	Tag-3	Gehalt [%]	98,9	101,1	99,7	100,0	99,1	100,1	102,0	101,7
		RSD [%]	1,22	2,71	1,18	1,61	3,58	2,98	2,64	2,71
		Gehalt								

Tabelle II.1-5: Ergebnisse der Bestimmung der Präzisionsarten (Werte als Mittelwert aus  $n=6$  Messungen oder Bestimmungen mit  $n=6$  Injektionen).

Verunreinigung		E	D	F	B	G	C	A	H
$T_F$ -Wert	Tag-1/Tag-2	2,20	1,75	2,21	2,13	1,28	2,17	1,26	1,93
	Tag-1/Tag-3	1,85	1,86	1,22	2,61	1,34	1,88	4,63	1,83

Tabelle II.1-6: Ergebnisse des F-Tests für laborinterne Präzision.

Die Bestimmung der Richtigkeit erfolgt durch Vergleich der Ergebnisse der Methodenpräzision mit den Ergebnissen einer validierten, unabhängigen IPC-Methode bekannter Richtigkeit. Die IPC-Methode wird in der PhEur 6.0<sup>135</sup> beschrieben.

Die Bestimmung erfolgte mit der Probelösung von Atropinsulfat (10 mg/100ml) und alle Verunreinigungen mit der Konzentration des Grenzwertes von 0,2 % (entspricht 200 ng/ml). Die nachfolgende Tabelle II.1-7 gibt einen Überblick über die Ergebnisse beider Methoden.

Verunreinigung (0,2%) Konzentration 200 ng/ml		E	D	F	B	G	C	A	H
HPLC- Methode	Richtigkeit [%]	101,5	99,6	98,9	102,1	102,9	100,3	99,2	98,1
	RSD [%]	1,05	1,12	2,19	1,91	1,92	1,11	3,07	2,17
IPC- Methode	Richtigkeit [%]	101,4	99,1	98,2	101,9	103,4	100,1	98,7	97,6
	RSD [%]	2,01	2,02	1,90	1,38	2,12	1,71	2,87	3,22

Tabelle II.1-7: Ergebnisse der Richtigkeit der Methode (Werte als Mittelwert aus  $n=6$  Bestimmungen mit  $n=6$  Injektionen).

Für die statistische Beurteilung der Qualität einer Methode ist der Mittelwert, ein Lagemaß, ausschlaggebend. Um die Mittelwerte zweier Methoden (Messreihen) zu vergleichen, wird die Grundform des t-Tests ( $T_t$ ) verwendet. Dazu muss zunächst mit dem F-Test bewiesen werden, dass sich die Varianzen nicht signifikant unterscheiden und somit eine Homogenität der Streuung vorliegt. Wie beim F-Test wird die Testgröße  $T_t$  mit einem tabellierten Wert  $t_{tab}$  verglichen. Ist  $T_t$  kleiner als  $t_{tab}$ , wird der Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten als zufällig angesehen. Ein Unterschied zwischen den Mittelwerten ist also statistisch nicht nachweisbar. Der tabellierte Wert  $t_{tab}$  bei  $n = 6$  Bestimmungen und  $1-\alpha = 0,95$  liegt bei 2,23.<sup>127</sup>

Verunreinigung	E	D	F	B	G	C	A	H
F-Test ( $T_F$ )	3,66	3,22	1,35	1,92	1,23	2,36	1,16	2,18
t-Test ( $T_t$ )	0,11	0,53	0,60	0,20	0,42	0,24	0,29	0,32

Tabelle II.1-8: Ergebnisse der F-Test und t-Test für Richtigkeit der Methode.

Die statistischen Ergebnisse aus Tabelle II.1-7 zeigen eine Vergleichbarkeit der Mittelwerte der beiden Methoden. Eine Varianzenhomogenität als Voraussetzung für die Anwendung des t-Tests ist gegeben. So kann davon ausgegangen werden, dass die entwickelte HPLC-Methode richtige

Ergebnisse bei der Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat liefert. Die folgende Abbildung stellt das Chromatogramm einer Atropinsulfat-Probeflösung und aller verwandten Substanzen an ihrer Spezifikationsgrenze nach Atropin-Monographie dar.<sup>135</sup>

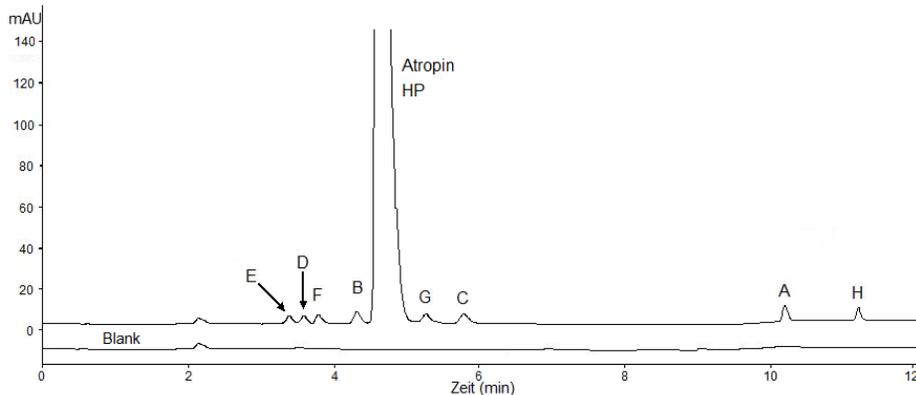


Abb. II.1-8: Chromatogramm der Atropinsulfat-Probeflösung 10 mg/100ml unter Zusatz aller Verunreinigungen an ihre Spezifikationsgrenze nach PhEur 6.0. Für die chromatographische Bedingungen siehe Abb. II.1-5. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

#### 1.2.3.2.4 Robustheit und Probeflösungsstabilität

Die Prüfung auf Robustheit der Methode wird mit einer für die Reinheitsbestimmung gegebenen Atropinsulfat-Probeflösung mit 0,2% Verunreinigungen durchgeführt. Für die entwickelte HPLC-Methode erwies sich die Variation der folgenden Parameter als sinnvoll.

- Konzentration ( $\pm 2$  mM) und pH des Puffers ( $\pm 0,1$  Einheit)
- Fließmittelzusammensetzung: Anteil ACN ( $\pm 2\%$  VT)
- Flussrate ( $\pm 0,1$  ml/min)
- Säulentemperatur ( $\pm 2$  °C)
- Detektionswellenlänge ( $\pm 2$  nm).

Als Kenngröße für die Beurteilung der Robustheit dient neben den Gesamtpeakflächen der Verunreinigungen die Auflösung  $R$  zwischen zwei nacheinander folgenden Peaks bis auf die Verunreinigungen **A** und **H**, da beide große Auflösungen aufweisen. Anzumerken ist hier, dass die Auflösung der benachbarten Peaks nicht kleiner als 1,2 sein soll, da in diesem Fall keine vollständige Basislinientrennung vorliegt. Die folgende Tabelle zeigt den Auswirkungen bei Veränderungen einzelner Parameter in den oben genannten Variationsbereichen. Die Flussrate und der ACN Anteil wurden wie in den Bedingungen der optimierten Methode variiert (siehe Abb. II.1-5), z.B. die Flussrate in den oberen Bereich wurde von 0,6 auf 0,7 ml/min im ersten Zeitraum (0-4 min) bzw. von 1,0 auf 1,1 ml/min im zweiten Zeitraum (4-12 min) angegeben.

Parameter	Variation	R1 ( $R_{E,D}$ )	R2 ( $R_{D,F}$ )	R3 ( $R_{F,B}$ )	R4 ( $R_{B,HP}$ )	R5 ( $R_{HP,G}$ )	R6 ( $R_{G,C}$ )	$\Sigma$ P.F.
Puffer-	18	1,22	1,23	2,77	1,72	2,15	2,55	70,09
Konzentration	20*	1,26	1,25	2,80	1,72	2,14	2,52	69,72
[mM]	22	1,23	1,25	2,78	1,70	2,14	2,55	69,51
Puffer-	2,4	1,28	1,25	2,78	1,72	2,09	2,52	69,21
pH	2,5*	1,26	1,25	2,80	1,72	2,14	2,52	69,72
	2,6	1,29	1,27	2,81	1,73	2,13	2,55	69,55
ACN-Anteil	23→21→43	1,20	1,21	2,77	1,71	2,14	2,50	68,87
[%]	25→23→45*	1,26	1,25	2,80	1,72	2,14	2,52	69,72
	27→25→47	1,28	1,27	2,85	1,72	2,15	2,58	70,79
Flussrate	0,5→0,9	1,21	1,22	2,72	1,70	2,08	2,45	69,22
[ml/min]	0,6→1,0*	1,26	1,25	2,80	1,72	2,14	2,52	69,72
	0,7→1,1	1,21	1,21	2,73	1,79	2,25	2,65	70,55
Säulen-	23	1,26	1,26	2,80	1,71	2,15	2,54	68,44
Temperatur	25*	1,26	1,25	2,80	1,72	2,14	2,52	69,72
[°C]	27	1,27	1,27	2,80	1,72	2,15	2,50	68,79
Detektion-	213	1,25	1,25	2,78	1,72	2,14	2,51	86,98
Wellenlänge	215*	1,26	1,25	2,80	1,72	2,14	2,52	69,72
[nm]	217	1,26	1,25	2,81	1,72	2,15	2,52	57,22

Tabelle II.1-9: Ergebnisse der Robustheit der Methode (\* Sollwerte beim Standardparameter, R1 Auflösung zwischen Verunreinigung E und D usw.,  $\Sigma$  P.F. Summe der Peakflächen aller Verunreinigungen).

Abbildung II.1-9 stellt prozentuale relative Änderungen der erhaltenen Werte bezogen auf die Sollwerte dar.

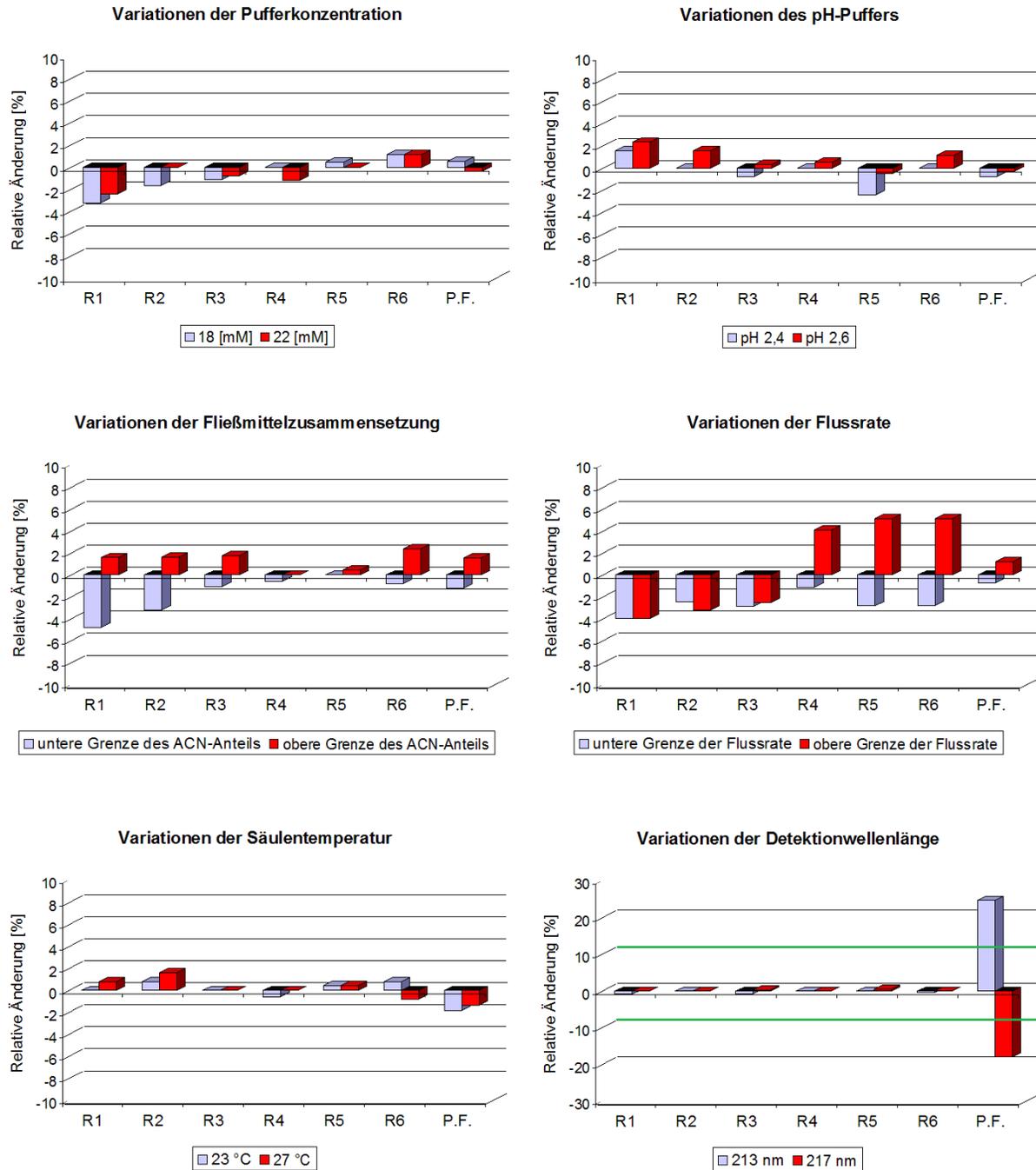


Abb. II.1-9: Relative Änderungen der Auflösungen bzw. Summe der Peakflächen bei Variationen der Methode-Parameter. Für die Definition der Baren siehe Tab. II.1-9.

Die Puffervariationen (Konzentration und pH) führen zu geringfügigen Änderungen in der Auflösung bzw. den Peakflächen. Bei der Methodenentwicklung wurde schon festgestellt, dass ein saurer pH-Bereich von 2-3 optimale Peakformen und Auflösungen ergab. Da alle Peaks voneinander basisliniengetrennt sind, kann die Methode in Bezug auf Variation der Konzentration und pH des Puffers als robust bezeichnet werden.

Für die Variationen in Bezug auf die Elutionskraft des Fließmittels zeigt Abbildung II.1-8, dass die größte Änderung innerhalb des Vertrauensbereichs der Robustheit von 10 %<sup>143</sup> liegt. Bei der Variation der Fließmittelzusammensetzung sind auch alle Komponenten stets basisliniengetrennt. Daher ist die Methode als robust gegen kleine Änderungen des Acetonitrilanteils anzusehen.

Variationen der Pumpleistung (Flussrate) führen, wie erwartet, zu großen Änderungen der Auflösung, aber die Peakflächen werden weniger tangiert. Bei einer Flussrate von 0,9 ml/min (von 4-12 min), sind die Retentionzeiten für Apoptropin und Atropasäure größer als 12 min.

Die Verunreinigungen sind bei allen Variationen der Flussrate in einem Bereich von  $\pm 0,1$  ml/min basisliniengetrennt, so dass die Methode in diesem Fall als robust angesehen werden kann.

Geringe Temperaturschwankungen besitzen ebenso wie die Änderungen der Konzentration oder pH des Puffers keinen signifikanten Einfluss auf die Auflösung bzw. die Peakflächen.

Da die Detektionswellenlänge von 215 nm im steil abfallenden Bereich der Spektren der Verunreinigungen liegt, führen beide Abweichungen von der Sollwellenlänge zu großen Änderungen in den Peakflächen. Beide relativen Änderungen liegen außerhalb des Vertrauensbereichs der Robustheit von 10 %. Die Methode kann hier nicht als robust bezeichnet werden. Somit muss eine Systemeignung vor der Prüfung auf Reinheit durchgeführt werden.

Die Stabilität der Probelösung während der Analysenzeit sollte gewährleistet sein. Die Prüfung erfolgte über 72 Stunden. Dazu wurde die Atropinsulfat-Probelösung an 0,2 % Verunreinigungen vermessen und der Gehalt der Verunreinigungen ermittelt. Die Lösung wurde im Probengefäß 72 Stunden gelagert und wiederum vermessen. Anschließend wurde die Methodenpräzision bestimmt. Ein Vergleich der RSD bzw. der errechneten Mittelwerte beider Messungen mittels F-Test und t-Test wurde durchgeführt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Daten und die statistische Auswertung der beiden Messreihen zusammengestellt.

Verunreinigungen 0,2 % (n=6)	E	D	F	B	G	C	A	H
Gehalt [%]	99,4	98,2	101,5	100,4	101,2	100,2	98,9	101,4
RSD [%]	2,15	1,77	3,09	2,11	1,22	0,91	1,17	1,29
Gehalt nach 72 h [%]	98,9	99,4	100,8	99,9	101,4	100,1	98,3	100,6
RSD [%]	1,91	2,12	1,49	1,79	2,03	1,21	2,15	1,22
F-Test ( $T_F < F_{tab} = 5,05$ )	1,28	1,47	4,36	1,40	2,78	1,76	3,34	1,14
t-Test ( $T_t < t_{tab} = 2,23$ )	0,43	1,08	0,49	0,44	0,20	0,16	0,61	1,09

Tabelle II.1-10: Daten und Auswertung von Stabilität der Probelösung.

Die statistischen Ergebnisse zeigen, dass Varianzenhomogenität vorliegt und sich die Mittelwerte der Messreihen nicht signifikant unterscheiden. Daher kann eine Reinheitsbestimmung des Atropinsulfates in der mobilen Phase im Zeitraum von 72 Stunden durchgeführt werden.

#### *1.2.3.2.5 Systemeignungstest*

Eine Absicherung der erforderlichen Selektivität des chromatographischen Systems ist ein wichtiges Kriterium. Nur wenn Verunreinigung und Arzneistoff (Atropinsulfat) ausreichend getrennt sind, kann eine Reinheitsprüfung richtige Ergebnisse liefern.

Mit zwei Referenzlösungen wird die Trennleistung des HPLC-Systems überprüft.

Referenzlösung a: Eine Lösung, die 0,1 mg/ml an Atropinsulfat und je 1,0 µg/ml an **B**, **G** und **A** enthält, wird sechsmal injiziert und folgende Parameter ermittelt:

- Die Auflösung des Hauptpeaks zum Noratropin **B** und Hauptpeaks zum Littorin **G** sollte  $> 1,5$  sein
- Die relative Retention des Peaks **A** in Bezug auf den Hauptpeak sollte ca. 2,35 sein
- Die relative Standardabweichung [RSD %] der Peakflächen einzelner Verunreinigung sollte bei sechs Messungen  $< 3,0$  % sein.

Referenzlösung b: Mit einer 1:25-Verdünnung der Tropasäurelösung 1,0 % wird die Wellenlängerichtigkeit überprüft. Das Signal-Rauch-Verhältnis bei dieser Referenzlösung sollte 9:1 oder 10:1 betragen.

Die Reinheitsbestimmung darf nur durchgeführt werden, wenn oben geführten Voraussetzungen erfüllt sind.

## 1.2.4 Stabilitätsprüfung von Atropinsulfat-Augentropfen

### 1.2.4.1 Überblick

Im Interesse einer hohen Arzneimittelsicherheit stellt die Stabilitätsprüfung einen wesentlichen Bestandteil der Arzneimittelqualität dar. Das Ziel der Untersuchungen zur Stabilität besteht darin festzustellen, ob und in wie weit sich die Qualität des Fertigarzneimittels im Laufe der Lagerung unter Einfluss von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und ggf. Lichteinfluss verändert, und die Dauer der Haltbarkeit sowie erforderliche Lagerhinweise abzuleiten. In den Stabilitätsuntersuchungen wird nach ICH die zeitliche Veränderung von Qualitätsparametern - insbesondere des Wirkstoffgehaltes und der Reinheit der Arzneiform, der organoleptisch wahrnehmbaren, physikalisch-chemische Veränderungen und der mikrobiologischen Veränderungen des Fertigarzneimittels geprüft.<sup>144,145</sup>

Die von behördlicher Seite geforderte Haltbarkeit bedeutet, dass bis zum Ende der vom Hersteller festgelegten Laufzeit eines Präparates die Ergebnisse der Stabilitätsprüfung innerhalb der Toleranzgrenzen der Prüfvorschriften liegen müssen. Beispielsweise soll der Wirkstoffgehalt unmittelbar nach Herstellung  $\pm 5\%$  der deklarierten Arzneiformmenge entsprechen und bis zum Ende der Laufzeit 95 % der Deklaration nicht unterschreiten. Zu den allgemeinen haltbarkeitsrelevanten Qualitätsmerkmalen eines Fertigarzneimittels gehören:

- der Wirkstoffgehalt (95 – 105 % der Deklaration),
- die Wirkstofffreisetzung (bei festen Arzneiformen),
- die chemischen Verunreinigungen bzw. Abbauprodukte,
- die mikrobiellen Verunreinigungen,
- der Gehalt an Konservierungsmitteln bzw. Antioxidantien.

### 1.2.4.2 Stabilitätsbedingungen

Arzneimittel stellen in der Regel keine thermodynamisch stabilen Systeme dar. Durch physikalische oder chemische Veränderungen kann es, z.B. bei Lagerung unter dem Einfluss von Temperatur und Feuchtigkeit, zu einer Abnahme des Wirkstoffgehaltes bzw. einer Zunahme des Gehalts an Zersetzungsprodukten kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für das untersuchte Fertigarzneimittel Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % die Langzeitstabilitätsuntersuchungen über einen Zeitraum von drei Jahren durchgeführt.

Der Nachweis der Stabilität eines Fertigarzneimittels ist von jedem Hersteller für jedes Produkt und die betreffenden Dosisstärken zu führen und den Zulassungsbehörden anzuzeigen. Um den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen in den verschiedenen Ländern der Erde gerecht zu werden, wurde diese in Fall der Atropinsulfat-Augentropfen in drei verschiedene Klimazonen mit definierter Temperatur und Feuchtigkeit eingeteilt (siehe Tab. II.1-11).

Klimazone	Lagerbedingungen für die Klimazonen		Lagerbedingungen für Fertigarzneimittel nach ICH-Richtlinie Q1A(R2) <sup>144</sup>		
	Temperatur	Luftfeuchtigkeit		Temperatur	Luftfeuchtigkeit
I. gekühlt	5 °C	---	Kühlschrank	5 ± 3 °C	---
II. gemäßigt	25 °C	60 % r. F.	normale Bedingungen	25 ± 2 °C	60 ± 5 % r. F.
III. feucht-heiß	40 °C	75 % r. F.	beschleunigte Bedingungen	40 ± 2 °C	75 ± 5 % r. F.

*Tabelle II.1-11: Lagerbedingungen für Stabilitätsuntersuchungen an Augentropfen in den drei Klimazonen und für ICH-Stabilitätsuntersuchungen.*

Für die Zulassung eines neuen Fertigarzneimittels sind Stabilitätsdaten nach Lagerung unter den Bedingungen der Klimazonen 1 oder 2 über mindestens 12 Monate vorzulegen. Die Langzeitstabilitätsprüfung eines Fertigarzneimittels unter "Kühlschrank" oder "normalen Bedingungen" ist bis zum Ablauf der Haltbarkeitsfrist fortzusetzen, die aufgrund der 36-Monatswerte vom Hersteller vorgeschlagen wurde. Die ICH-Stabilitätsprüfung unter "beschleunigten Bedingungen" (eng. accelerated condition), wie sie nach ICH Q1A für mindestens sechs Monate gefordert wird, soll den Effekt kurzzeitiger Exposition des Fertigarzneimittels oberhalb der normalen Lagertemperatur zu bewerten helfen. Aus den Ergebnissen der Haltbarkeitsprüfung soll hervorgehen, ob zur Gewährleistung der Haltbarkeit eines Arzneimittels definierte Lagerbedingungen notwendig sind.

Gegenwärtig wird vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM, Standardzulassung, Bonn) die Zusammensetzung der Atropin-Augentropfen geändert, da sowohl Thiomersal als auch Borsäure gegen Benzalkoniumchlorid als Konservierungsmittel ersetzt wurden. Für die Atropinsulfat-Augentropfen wurden drei Chargen (Ch. 103114, Ch. 104114 und Ch. 105114) pro Konzentration (0,5 % und 2,0 %) hergestellt und über einen Zeitraum von drei Jahren unter den Bedingungen der Klimazonen 1 und 2 bzw. von sechs Monaten unter den Bedingungen der Klimazone 3 gelagert (siehe Tab. II.1-11).

Die Augentropfenzusammensetzung des Fertigarzneimittels ist in Kap. III. 2.1 des Experimentellen Teils aufgeführt.

Als Prüfkriterien der Langzeitstabilität von Atropin-Augentropfen wurde sowohl der Gehalt an Wirkstoff (Atropinsulfat) als auch die Reinheit in bestimmten Prüfintervallen untersucht. Die von KIRCHHOFF<sup>36</sup> entwickelte HPLC-Methode zur Gehaltsbestimmung und die in dieser Arbeit bereits validierte RP-HPLC-Methode zur Reinheitsbestimmung (s. Kap. II. 1.2.3) wurden als Prüfmethode verwendet.

Die Prüfzeitpunkte lauteten alle 3-Monate im ersten Jahr, alle 6-Monate im zweiten Jahr und danach im Jahresabstand bzw. nach 3 und 6-Monaten für die Proben der Klimazone 3. Die Prüfzeit endet im Dezember des Jahres 2007.

### 1.2.4.3 Ergebnisse der Langzeitstabilitätsuntersuchungen

#### 1.2.4.3.1 Gehaltsbestimmung

Die ermittelten Werte der Reinheits- bzw. Gehaltsbestimmung von Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % und einige Beispiel-Chromatogramme befinden sich im Anhang dieser Arbeit (Kap. V. 1). Die Ergebnisse der Gehaltsprüfung am Fertigarzneimittel sind in Abb. II.1-10 für Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % bei Lagerung unter zwei verschiedenen Klimazonen über 24 Monate dargestellt.

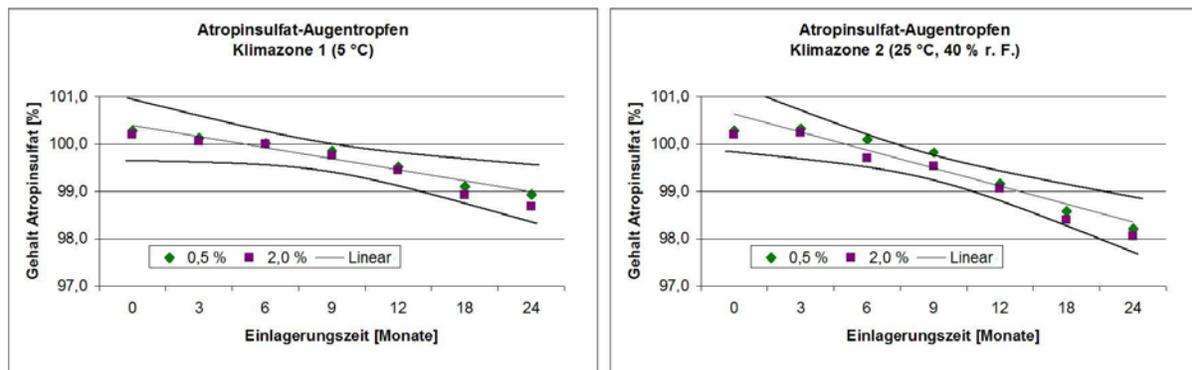


Abb. II.1-10: Ergebnisse der Gehaltsprüfung für Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % bei 24-monatiger Lagerung unter Klimazonen 1 und 2. Die Gehaltswerte sind Mittelwerte der drei Chargen pro Konzentration.

Mit den Ergebnissen der Gehaltsprüfungen zu den entsprechenden Prüfzeitpunkten wurde für jede Klimazone und Konzentration eine lineare Regression durchgeführt. Der in Abb. II.1-10 erkennbare Trend der Gehaltsabnahme für beide Konzentrationen 0,5 und 2,0 % wurde statistisch überprüft. Mit Hilfe des durchgeführten Trendtests nach Neumann ( $T_N$ ) wird die Streuung der Serie mit der Streuung zwischen aufeinander folgenden Serienpunkten verglichen. Der Prüfwert  $T_N$  wurde mit einem entsprechenden Neumann-Tabellenwert  $N_{tab}$  bei einem Signifikanzniveau von 95 % verglichen. War der Prüfwert  $T_N$  größer als der tabellierte Wert  $N_{tab}$ , dann liegt mit 95%iger Wahrscheinlichkeit kein Trend vor. Die Tabelle II. 1-12 zeigt die Ergebnisse des Trendtests nach Neumann für die Gehaltsprüfung bei 24-monatiger Lagerung unter entsprechenden Klimazonenbedingungen an jeweils zwei Konzentrationen.

Die Ergebnisse des Trendtests zeigen, dass für beide Augentropfenkonzentrationen 0,5 und 2,0 % ein Trend zur Gehaltsabnahme vorliegt. Der Gehalt des Wirkstoffs Atropinsulfat nimmt nach linearer Regression für die Augentropfen 0,5 oder 2,0 % bei Lagerung unter Klimazone 1 (5 °C,

Kühlschrank) um 0,72 % pro Jahr und bei Lagerung unter Klimazone 2 (25 °C und 60 % r. F.) um 1,05 % pro Jahr ab.

Klimazone	Konzentration	Messwerte	$T_N$	$N_{tab}$	Ergebnisse
1	0,5 %	7	0,23	0,94	Trend
	2,0 %	7	0,25	0,94	Trend
2	0,5 %	7	0,24	0,94	Trend
	2,0 %	7	0,49	0,94	Trend

Tabelle II.1-12: Ergebnisse des Trendtests nach Neumann für  $n = 7$  Gehaltsbestimmungen bei Lagerung des Fertigarzneimittels Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % unter Klimazone 1 oder 2.

Die Instabilität der Atropinsulfat-Augentropfen werden durch Ergebnisse der Gehaltsbestimmung evident, dass nach 24-monatiger Lagerung unter Klimazone 1 (5 °C, Kühlschrank) und Klimazone 2 (25 °C, 40 % r. F.) der Wirkstoffverlust um 1,35 % bzw. 2,06 % für die 0,5%ige Augentropfen und um 1,50 % bzw. 2,15 % für die 2,0%ige Augentropfen beträgt. Diese ermittelten Werte der Gehaltsabnahme der Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 % wiesen im Gegensatz zum Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 % keinen signifikanten Unterschied des Wirkstoffverlusts auf. Die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Stabilitätsbedingungen belegen, dass der Wirkstoffverlust nur von Lagerbedingungen abhängig ist.

Um den Einfluss der Lagerbedingungen auf die Stabilität des Fertigarzneimittels Atropinsulfat-Augentropfen noch deutlicher hervorzuheben, sind in der Abbildung II.1-11 die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung für Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % über 6-monatiger Lagerung unter beschleunigten Bedingungen (40 °C, 75 % r. F.) dargestellt.

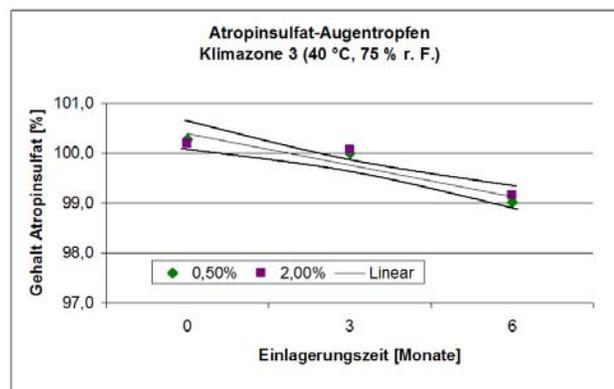


Abb. II.1-11: Ergebnisse der Gehaltsprüfung für Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % bei 6-monatiger Lagerung unter Klimazone 3. Die Gehaltswerte sind Mittelwerte der drei Chargen pro Konzentration.

Der mit Hilfe linearer Regression ermittelte Wirkstoffverlust der Atropinsulfat-Augentropfen betrug 1,15 % nach 6-Monaten (entspricht 2,30 % pro Jahr). Auch für die Gehaltsbestimmungen bei Lagerung unter Klimazone 3 wurde der Trendtest nach Neumann durchgeführt.

Konzentration	Messwerte	$T_N$	$N_{tab}$	Ergebnisse
0,5 %	3	0,76	> 0,78	Trend
2,0 %	3	1,33	> 0,78	Kein Trend

Tabelle II.1-13: Ergebnisse des Trendtests nach Neumann für  $n = 3$  Gehaltsbestimmungen bei Lagerung des Fertigarzneimittels Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % unter Klimazone 3.

Während die Atropin-Augentropfen 0,5 und 2,0 % eine deutliche Tendenz zur Gehaltsabnahme im zeitlichen Verlauf der Einlagerung unter Klimazone 1 oder 2 gezeigt wurde (siehe Tabelle II. 1-12), ist das Ergebnis des Trendtests für beide Konzentrationen unter den Bedingungen der Klimazone 3 uneinheitlich, wobei die geringe Anzahl der Gehaltsbestimmungen ( $n = 3$ ) zu berücksichtigen ist. Die ermittelten Werte der Gehaltsabnahme für die 0,5%ige Augentropfen beträgt 1,25 % und wiesen auch im Gegensatz zu den 2,0%ige Augentropfen (1,10 %) keinen signifikanten Unterschied des Wirkstoffverlusts auf.

Zusammenfassend können aus den Stabilitätsuntersuchungen des Fertigarzneimittels Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % folgende Aussagen getroffen werden:

Die Stabilität des Wirkstoffes Atropinsulfat in der Arzneiform Augentropfen ist nicht von der Dosierung (Konzentration) sondern von Lagerbedingungen abhängig. Diese Erkenntnis aus den Stabilitätsuntersuchungen zur Klimazonen 1 und 2 wird durch die Untersuchungsergebnisse der Arzneiform unter beschleunigten Bedingungen (Klimazone 3) bestätigt. Denen im Kühlschrank gelagerten Atropin-Augentropfen mit niedrigem Wirkstoffverlust von ca. 0,7 % pro Jahr stehen die Atropin-Augentropfen unter den Bedingungen der Klimazone 2 (25 °C, 60 % r. F.) gegenüber. Die Ergebnisse des Wirkstoffverlustes werden noch intensiv in den folgenden Kapiteln diskutiert.

#### 1.2.4.3.2 Reinheitsbestimmung

Für den Nachweis der Stabilität eines Fertigarzneimittels sollten aus den allgemeinen Qualitätsmerkmalen neben der Prüfung des Wirkstoffgehaltes der Arzneiform die Prüfung auf verwandte Substanzen und Abbauprodukte im Mittelpunkt der Stabilitätsuntersuchungen stehen. Beide Prüfungen sind Grundlage für die Aufstellung einer Massebilanz der Arzneiform. Massebilanz bedeutet, dass die Summe aus dem gemessenen Wirkstoffgehalt und dem ermittelten Gehalt an Neben- bzw. Abbauprodukten 100 % ergibt. Dabei muss die analytische Fehlergrenze berücksichtigt werden.<sup>144,146</sup>

Für die Bestimmung der verwandten Substanzen und Abbauprodukte wurde die neue entwickelte Reinheitsprüfung verwendet, die im Kap. II.1.2.3 ausführlich beschrieben wurde. Im Vordergrund stand die Quantifizierung der Neben- und Abbauprodukte, wobei eine Bestimmung der Summe der Verunreinigungen in Abhängigkeit von der Einlagerungszeit erfolgte. Die Ergebnisse der Reinheitsbestimmung sind in Kap. V. 1 des Anhangs dieser Arbeit aufgeführt. Insgesamt wurden vier verschiedene Verunreinigungen identifiziert und quantifiziert, drei davon sind Abbauprodukte; Tropasäure (**C**), Apotatropin (**A**), und Atropasäure (**H**).

In Abbildung II.1-12 ist graphisch die Massebilanz, d.h. die Summe aus Gehalt an Atropinsulfat und der Summe der Neben- bzw. Abbauprodukte für Atropin-Augentropfen 0,5 % vor Beginn der Stabilitätsprüfung und nach 2 Jahren Stabilitätstests unter Klimazonen 1 und 2 bzw. nach 6 Monaten unter Klimazone 3 dargestellt.

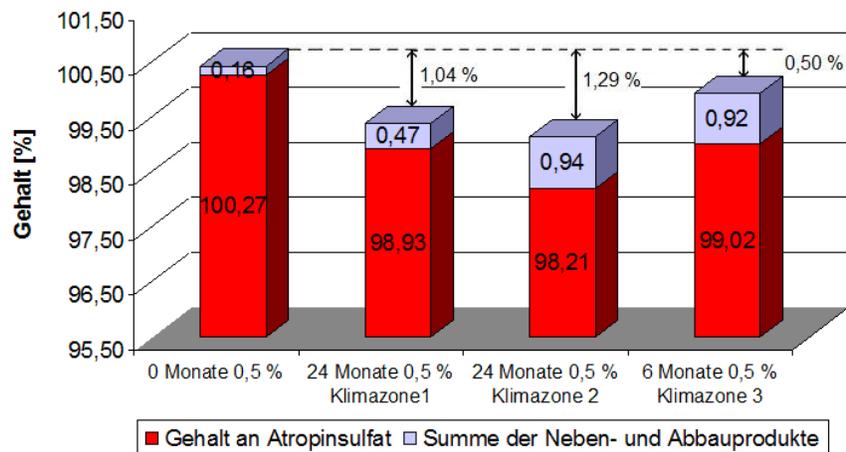


Abb. II.1-12: Massebilanz für Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 % bei Ausgangswerte und nach zwei Jahren Lagerung unter Klimazonen 1 und 2 bzw. nach sechs Monaten unter Klimazone 3. Für Lagerungsbedingungen siehe Tab. II.1-11.

Für die Massebilanz der 0,5%ige Augentropfen nach 24-Monaten Stabilitätseinlagerung unter Klimazonen 1 oder 2 ergab sich eine deutliche Lücke bezüglich auf die Massebilanz der Ausgangswerte. Die Lücke betrug 1,04 % bei Lagerung unter Klimazone 1, 1,29 % unter Klimazone 2 und 0,50 % nach 6-Monaten bei Lagerung unter Klimazone 3.

Der Wirkstoffverlust des gelagerten Fertigarzneimittels Atropin-Augentropfen 0,5 % von 1,35 % bei Lagerung unter Klimazone 1 und 2,06 % unter Klimazone 2 kann über die Summe der Neben- und Abbauprodukte nicht erklärt werden.

Als zu spezifizierende Abbauprodukte der Prüfung auf verwandte Substanzen und potenzielle Abbauprodukte nach PhEur 6.0<sup>135</sup> wird nur Apotatropin (**A**) und Tropasäure (**C**) genannt. Durch die entwickelte RP-HPLC-Methode wurde auch die Atropasäure (**H**) bestimmt. Aufgrund fehlenden Chromophors konnte Tropin als Zersetzungsprodukt des Atropins (siehe Abb. II.1-3) nicht detektiert

werden, da diese Methode einen UV-Detektor verwendet. Unter der Berücksichtigung des Gehalts an Tropin, der als 1:1 zur Tropasäure und Atropasäure abgeschätzt werden kann, betrug die Lücke in der Massebilanz 0,91 % bei Lagerung unter Klimazone 1, 0,80 % unter Klimazone 2 und -0,14 % nach 6-Monaten bei Lagerung unter Klimazone 3. Diese Werte können durch folgende analytische Fehler bei der Gehalts- bzw. Reinheitsprüfungsmethode erklärt werden. Erstens erfolgte die Bestimmung des Gehaltes an dem Wirkstoff bzw. an der Verunreinigungen mit zwei verschiedenen externen Standards; Atropinsulfat bei der Gehaltsbestimmung und Tropasäure bei der Reinheitsbestimmung. Dies führt zu Rechenfehlern der Flächenprozentage in der Massebilanz. Zweitens erfolgte die Quantifizierung der bekannten Verunreinigungen unter der Berücksichtigung der ermittelten Responsefaktoren (siehe Tab. II.1-4). Für eine unbekannte Verunreinigung wurde die gleiche Nachweisempfindlichkeit wie für den externen Standard, d.h. ein Responsefaktor von 1,0 angenommen. Dies führt auch zu kleinen Fehler bei der Bestimmung der unbekannt Verunreinigungen.

Für die Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 % betrug die Lücke in der Massebilanz 1,25 % bei Lagerung unter Klimazone 1, 1,45 % unter Klimazone 2 und 0,39 % nach 6-Monaten bei Lagerung unter Klimazone 3 (siehe Abb. II.1-13). Unter der Berücksichtigung des Gehaltes an Tropin sinken diese Werte auf 1,14 %, 1,04 % bzw. 0,18 % und liegen damit in den akzeptablen Bereich der Fehlergrenze einer HPLC-Methode  $\pm 2,0$  % vor.

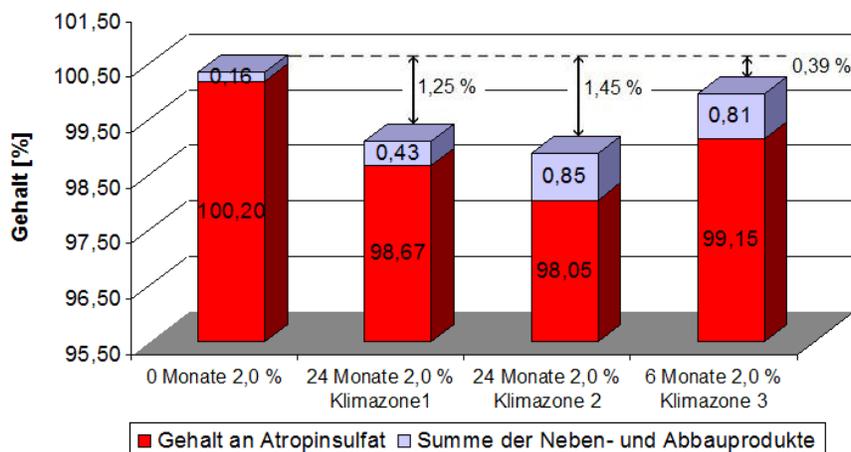


Abb. II.1-13: Massebilanz für Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 % bei Ausgangswerte und nach zwei Jahren Lagerung unter Klimazonen 1 und 2 bzw. nach sechs Monaten unter Klimazone 3. Für Lagerungsbedingungen siehe Tab. II.1-11.

Aus den Konzentrationen der in Tab. II. 1-14 aufgeführten Neben- und Abbauprodukte des Atropinsulfats wurde die Summe der Verunreinigungen gebildet.

Die Ergebnisse der Reinheitsbestimmung zeigen, dass die Zunahme des Gehalts an einzelnen Abbauprodukten (Apoatropin **A** und Tropasäure **C**) für die jeweiligen Lagerbedingungen

unterschiedlich ist. Das Verhältnis des Gehaltes an Tropasäure zu Apoatropin betrug ca. 1:1 bei Lagerung unter Klimazone 1 (5 °C), 2,5:1 unter Klimazone 2 (25 °C, 60 % r. F.) und 4,5:1 unter Klimazone 3 (40 °C, 75 % r. F.). Diese Verhältnisse der Gehaltszunahme der Abbauprodukte für die 0,5%igen Augentropfen wiesen im Gegensatz zu den 2,0%igen Augentropfen keinen signifikanten Unterschied auf. Die Konzentrationen der einzelner Verunreinigungen entsprechen den Grenzwerten nach PhEur 6.0<sup>135</sup> mit Ausnahme von Tropasäure bei Lagerung unter Klimazone 2 oder 3. Diese übersteigt die Spezifikationsgrenze von  $\leq 0,2$  %. Atropasäure entstand nach 24-Monaten nur bei Lagerung unter Klimazone 2.

Verunreinigung		24 Monaten		24 Monaten		6 Monaten	
		Lagerung unter Klimazone 1 (5 °C)		Lagerung unter Klimazone 2 (25 °C, 60 % r. F.)		Lagerung unter Klimazone 3 (40 °C, 75 % r. F.)	
Name	RZ [min]	0,5 %	2,0 %	0,5 %	2,0 %	0,5 %	2,0 %
Tropasäure (C)	5,6	0,125	0,112	0,483	0,411	0,669	0,575
unidentifizierte	8,1	0,061	0,064	0,080	0,084	0,072	0,075
Apoatropin (A)	10,2	0,130	0,124	0,190	0,163	0,144	0,136
unidentifizierte	4,1	0,062	0,056	0,055	0,072	0,037	0,032
Littorin (G)	5,2	0,088	0,077	0,094	0,085	---	---
Atropasäure (H)	11,2	---	---	0,035	0,032	---	---
Summe der Verunreinigungen [%]		<b>0,466</b>	<b>0,433</b>	<b>0,937</b>	<b>0,847</b>	<b>0,922</b>	<b>0,808</b>

*Tabelle II.1-14: Neben- und Abbauprodukte des Atropinsulfates, welche in der Summe der Verunreinigungen erfasst wurden, für die 0,5% und 2,0%ige Augentropfen. Die Gehaltswerte sind Mittelwerte der drei Chargen pro Konzentration (RZ, Retentionszeit der Verunreinigung).*

Der Verlauf der Summe aller Verunreinigungen über den Einlagerungszeitraum von zwei Jahren bei Lagerung unter Klimazone 1 oder 2 bzw. sechs Monaten unter Klimazone 3 für beide Konzentrationen 0,5 und 2,0 % wird in Abbildung II. 1-14 gezeigt.

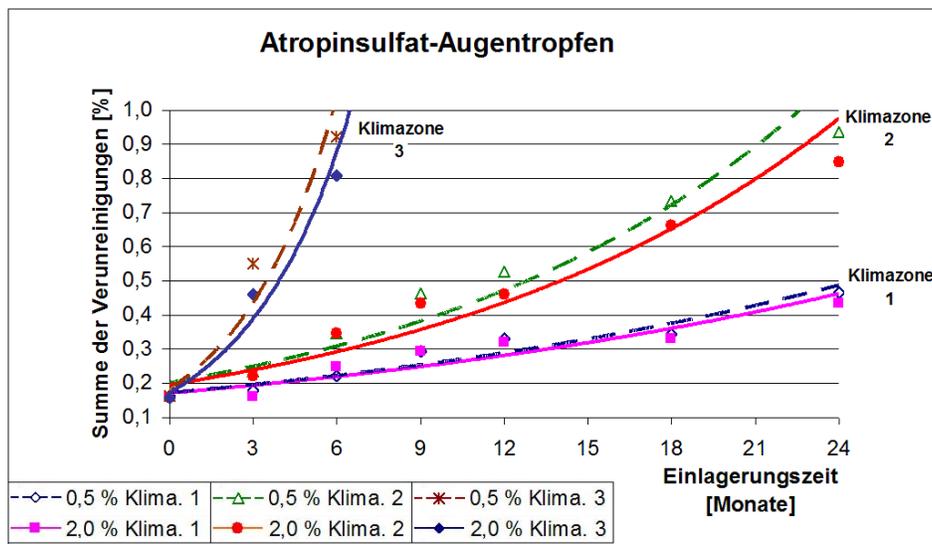


Abb. II.1-14: Summe der Verunreinigungen von Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % über 2-Jahren Lagerung unter Klimazone 1 und 2 bzw. 6-Monaten Lagerung unter Klimazone 3. Für Lagerungsbedingungen siehe Tabelle II.1-11.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, war unter allen Lagerbedingungen eine exponentielle Zunahme (mit positivem Exponent) der Summe der Verunreinigungen über die Einlagerungszeit festzustellen. Die Augentropfen unter Klimazone 1 zeigten eine geringere Zunahme der Summe an Verunreinigungen als die unter Klimazone 2.

Zusammenfassend betrug die Summe der Verunreinigungen ca. 0,45 % bei Lagerung der Atropin-Augentropfen über zwei Jahre unter Klimazone 1 (5 °C) und ca. 0,90 % unter Klimazone 2 (25 °C, 60 % r. F.). Die Werte in beiden Lagerbedingungen liegen unter dem Grenzwert der Summe aller Verunreinigungen ( $\leq 1,5$  % bezogen auf Atropinsulfatgehalt) nach PhEur 6.0 auf.<sup>135</sup>

Die folgenden neuen Erkenntnisse aus den Stabilitätsuntersuchungen von Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % unter drei verschiedenen Lagerbedingungen sollen hier noch einmal zusammengefasst werden:

1. Der Wirkstoffverlust bei den Gehaltsprüfungen bzw. die Zunahme der Neben- und Abbauprodukte bei den Reinheitsprüfungen sind nur von den Lagerbedingungen abhängig. Auch die Abnahmen des Wirkstoffgehaltes und die Verunreinigungssummen für die Augentropfen der verglichenen Konzentrationen (0,5 und 2,0 %) unterscheiden sich nach 2-jähriger Lagerung nicht.
2. Der Vergleich der drei hergestellten Chargen pro Konzentration zeigt für die Gehalts- bzw. Reinheitsprüfungen keinen signifikanten Unterschied im ermittelten Prüfungswert.

3. Das Verhältnis die beiden Abbauproduktkonzentrationen (Tropasäure und Apatropin) ist nach gegebenen Lagerungszeiten anscheinend von Stabilitätsbedingungen abhängig. Die Geschwindigkeit der Hydrolysereaktion im Vergleich zur Dehydratisierung nimmt mit zunehmender Temperatur bzw. relativer Feuchte zu. Daher liegt der Gehalt an Tropasäure (entstand durch Hydrolyse des Atropinsulfates) bei einer Lagerung unter Klimazone 2 oder 3 weit über ihrer Spezifikationsgrenze nach der Monographie.<sup>135</sup>
4. Das Defizit in der Massebilanz für die Augentropfen 0,5 und 2,0 % kann unter der Berücksichtigung sowohl des Gehaltes an "Tropin" als UV-undetektierbar Abbauprodukt als auch des analytischen Fehlers der Gehalts- und Reinheitsbestimmung erklärt werden.
5. Die im Kühlschrank (Klimazone 1, 5 °C) gelagerten Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % erfüllten über 24-Monaten alle Gehalts- und Reinheitsvoraussetzungen, die in der Atropin-Monographie aufgeführt sind z.B. Wirkstoffgehalt > 98 %, Limit an Tropasäure < 0,2 %, Apatropin < 0,3 %, andere unbekannte Verunreinigung < 0,1 % und Summe aller Verunreinigungen < 1,5 %.

### 1.2.5 Quantitative Reinheitsprüfung von Atropinsulfat mittels CE

Zur Reinheitsprüfung von Atropinsulfat sollte zusätzlich eine CE-Methode entwickelt werden, welche die Bestimmung möglichst aller Verunreinigungen erlaubt. Im Unterschied zu den im Europäischen Arzneibuch angewandten Grenzprüfungen (IPC-Methode) sollte hier wie bei der vorliegenden entwickelten RP-HPLC-Methode die quantitative Bestimmung der Verunreinigungen mittels eines externen Standards vorgenommen werden. Die elektrokinetische Chromatographie mit Mikroemulsionen (MEEKC) als eine CE-Trenntechnik, die in den letzten Jahren bereits in der Reinheitsanalytik der Arzneistoffen angewendet wurde,<sup>86,89,147,148</sup> sollte im Folgenden sowohl in O/W- (Öl in Wasser) als auch W/O- (Wasser in Öl) Mikroemulsionsform auf ihre Anwendbarkeit in der Reinheitsprüfung von Atropinsulfat getestet werden.

#### 1.2.5.1 Methodenentwicklung

Zur Entwicklung einer O/W-MEEKC-Methode lagen die Referenzsubstanzen aller Verunreinigungen vor. Ziel der Entwicklungsarbeiten war die Trennung aller Substanzen voneinander und von der Hauptkomponente Atropinsulfat sowie die präzise quantitative Bestimmung für alle Verunreinigungen im untersuchten Konzentrationsbereich.

Die allgemeine O/W-Mikroemulsionslösung, die von ALTRIA<sup>149</sup> beschrieben wurde, besteht aus 0,8 % (w/w) Octan als Ölphase, 6,6 % (w/w) Butanol als Co-Tensid, 3,3 % (w/w) SDS (Natriumlaurylsulfat) als Tensid und 89,3 % (w/w) Boratpuffer pH 9,0 als wässrige Phase. Ausgehend von dieser Mikroemulsion als Hintergrundelektrolyt wurde die Trennung mit einer Spannung von 18 kV getestet. Um die Voraussetzung für eine ausreichende Empfindlichkeit zu erfüllen, wurde eine Kapillare mit einer Länge von 40,0/48,5 cm und einem Innendurchmesser (ID) von 50 µm gewählt. Als Detektionswellenlänge wurde 195 nm (UV) verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Lage der UV-Maxima aller zu bestimmenden Substanzen wurde diese kurze Wellenlänge gewählt, da hier die Absorption aller Verunreinigungen groß genug ist, um die geforderte Empfindlichkeit zu erreichen.

Für die Wahl des pH-Wertes des Puffers waren mehrere Aspekte entscheidend. Wie bei der CE ist es auch in der MEEKC notwendig, alle zu bestimmenden Substanzen in die geladene Form zu überführen. Geladene und neutrale wie auch extrem lipophile Substanzen weisen je nach ihrer Lipophilie ein unterschiedliches Verteilungsverhalten zwischen den lipophilen Öltröpfchen und der umgebenden hydrophilen Pufferphase auf. Dabei kann der pH des Puffers so gewählt werden, dass sowohl die Säuren (Trospasäure **C** und Atropasäure **H**) als auch einige Basen mit pKa-Werten von ca. 7,5 wie z.B. Scopolamin **F**, 6-Hydroxyhyoscyamin **D** und 7-Hydroxyhyoscyamin **E** vollständig deprotoniert werden. Somit sollte der pH-Wert des Puffers über pH 7,5 liegen. Mit einem Tetraboratpuffer mit einem pH von 9,2 wird auch die schwächste Base im System zumindest teilweise deprotoniert. In diesem Falle handelt es sich um Atropinsulfat, Noratropin **B**,

Littorin **G** und Apoatropin **A**, die einen pKa-Werten von ca. 9,6 aufweisen und so von andern Basen-Peaks getrennt werden können. Da bei pH 9 und darüber der EOF aufgrund der fast vollständigen Dissoziation der Silanolgruppen an der Kapillareninnenwand sehr stark ist, werden die negativ geladenen Öltröpfchen schließlich in Richtung Kathode (Detektionsfenster) wandern. Verwendet wurde ein 10 mM Tetraboratpuffer, der bei pH 9,2 über eine ausreichende Pufferkapazität verfügt. In Abbildung II. 1-15 ist die kapillarelektrophoretische Trennung dargestellt.

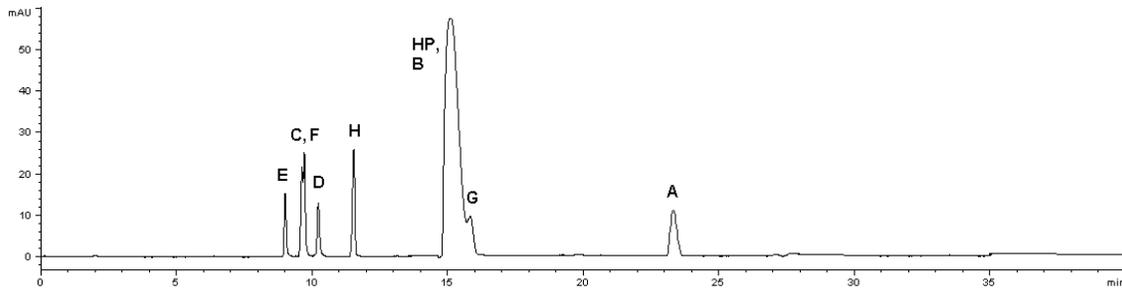


Abb. II.1-15: Elektropherogramm des Atropinsulfates und der verwandten Substanzen unter folgenden Bedingungen: Mikroemulsionshintergrundelektrolyt: 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 3,3 % (w/w) SDS und 89,3 % (w/w) 10 mM Na-Tetraboratpuffer pH 9,2; Kapillare: Quarzglas Kapillare 40,0/48,5 cm, 50  $\mu$ m ID; Spannung 18 kV; Injektion: 5 s mit 50 mbar; Temperatur: 30 °C; Detektion: 195 nm (UV). Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

Das Elektropherogramm in Abbildung II. 1-15 zeigt, dass Peak **C** und Peak **F** sowie Peak **B**, **G** und der Hauptpeak (**HP**) des Atropinsulfates komigriert. Um die Trennung zu verbessern, sollte die MEEKC-Methode in Bezug auf die Trennung aller Verunreinigungen von dem Hauptpeak weiter optimiert werden.

### 1.2.5.2 Methodenoptimierung

Folgende Aspekte wurden durch die Methodenoptimierung herangezogen (siehe Abb. II. 1-15):

- Die Auflösung zwischen Tropasäure und nachfolgenden Peak,
- die Auflösung zwischen Hauptpeak und Noratropin auf der einen Seite  $R_{HP,B}$  und Hauptpeak und Littorin auf der anderen Seite  $R_{G,HP}$  und
- die Verkürzung der Migrationszeit der letzten Verunreinigung (Apoatropin)  $MZ_A$ .

#### 1.2.5.2.1 Auswirkung der Trennungsspannung

Um die Methode zu verbessern, wurde die angelegte Trennungsspannung im Bereich zwischen 12-20 kV bei gleichzeitigem Konstanthalten der anderen Bedingungen variiert. Es wurden Versuche mit 12, 15, 18 und 20 kV durchgeführt. Bei 12 kV wurde eine Basislinientrennung zwischen Peak **C** und Peak **F** erzielt, aber gleichzeitig vergrößerte sich die Analysenzeit. Eine Spannung von 15 kV

erwies sich als geeignet, da höheren Spannungen 18 oder 20 kV keine vollständige Basislinientrennung ergaben (siehe Tab. II. 1-15).

Spannung [kV]	12	15	18	20
$R_{F,C}$	3.25	1.35	0.59	0
$R_{HP,B}$	0	0	0	0
$R_{G,HP}$	0.67	0.61	0.35	0
$MT_A$ [min]	33.45	28.86	23.32	22.64

*Tabelle II.1-15: Ergebnisse der Auflösung und Migrationszeit bei Variationen der angelegten Spannung.*

Wie im Abb. II. 1-16 ersichtlich, ist keine Trennung des Hauptpeaks von Peak **B** oder **G** zu sehen. Andererseits wurde Peak **C** bei einer Spannung von 15 kV von Peak **F** mit einer Auflösung  $R_{F,C}$  1,35 abgetrennt. Demzufolge wurden alle weiteren Versuche mit einer Spannung von 15 kV durchgeführt.

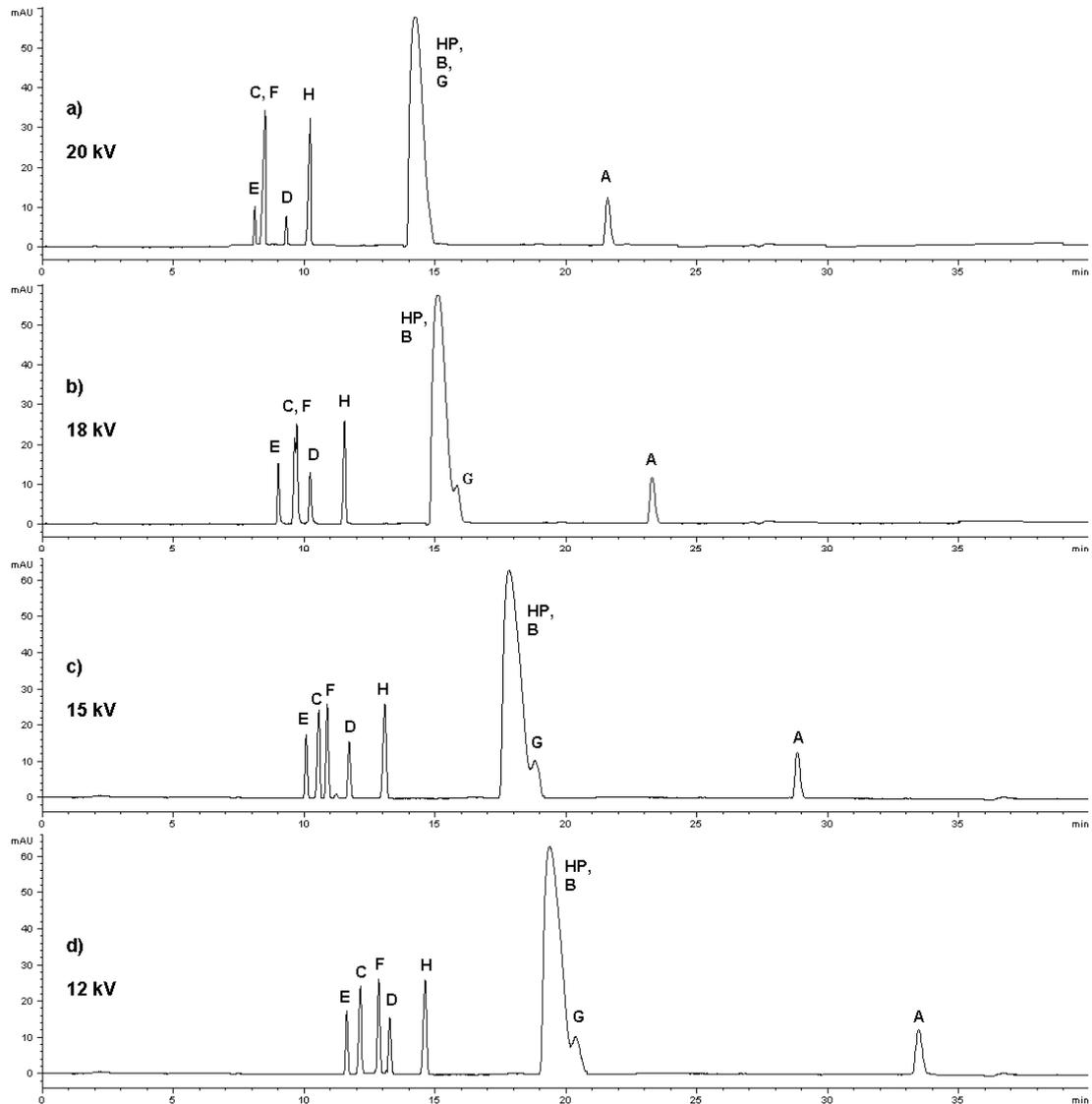


Abb. II.1-16: Elektropherogramme des Atropinsulfates und der verwandten Substanzen bei Variationen der angelegten Spannung: **a)** 20 kV, **b)** 18 kV, **c)** 15 kV und **d)** 12 kV. Für andere elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-15. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

#### 1.2.5.2.2 Auswirkung des Zusatzes eines organischen Lösungsmittels

Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln wie Methanol (MeOH) oder des weniger polaren Acetonitrils (ACN) oder Isopropanols zur Mikroemulsionshintergrundelektrolyten nimmt die Interaktion zwischen dem Analyt und der pseudostationären Phase ab. Infolgedessen steigt die Löslichkeit des Analyts in der wässrigen Phase, was die Selektivität einer Trennung verbessern kann.<sup>150,151</sup> Da Isopropanol ebenso das verwandte Co-Tensid Butanol als Stabilisator des Mikroemulsionssystems wirken wird, kann es in hohe Konzentration (bis zu 40 % (w/w)) zum Hintergrundelektrolyt ohne Zersetzung der Mikroemulsion im Vergleich zu Methanol oder

Acetonitril zugegeben werden. Die maximale Konzentration von MeOH oder ACN beträgt nur 15 bzw. 20 % (w/w).<sup>149,152</sup>

In diesen Untersuchungen wurden kleine Konzentrationen (0-5 %) von Isopropanol, Methanol und Acetonitril getestet, damit eine hohe hydrodynamische Stabilität der verwendeten Mikroemulsion gewährleistet werden konnte. Die Herstellung einer Mikroemulsion mit organischem Lösungsmittel, je nach Konzentration, erfolgte durch die Abnahme des Pufferanteils in der Zusammensetzung der Mikroemulsion (s. exp. Teil III.3.3). Daten der Variationen von Typ und Konzentration verwandter organischer Lösungsmittel (Isopropanol, MeOH und ACN) sind in Tab. II. 1-16 dargestellt.

	„organic modifier“ % (w/w)				
	0	1	2	3	5
Isopropanol					
$R_{D,C}$	--*	1.32	1.31	--	--
$R_{HP,B}$	0	0	0.2	0.4	0
$R_{G,HP}$	0.61	0.35	1.37	1.65	0.31
$MT_A$	28.86	30.05	30.81	31.46	34.54
Methanol (MeOH)					
$R_{E,C}$	--*	1.17	1.26	1.35	1.14
$R_{HP,B}$	0	0	0	0	0
$R_{G,HP}$	0.61	1.18	1.18	1.22	1.20
$MT_A$	28.86	29.21	30.25	32.45	37.76
Acetonitril (ACN)					
$R_{E,C}$	--*	0.89	1.05	2.32	2.08
$R_{HP,B}$	0	0	0	0.95	1.01
$R_{G,HP}$	0.61	1.28	1.39	1.96	1.95
$MT_A$	28.86	45.58	46.42	48.65	56.48

\* eine umkehrt Migrationsfolge bei Standardbedingungen siehe Tab. II. 1-15.

Tabelle II.1-16: Ergebnisse der Auflösung und Migrationszeit bei Zusatz von verschiedenen organischen Lösungsmitteln.

Durch die Zunahme der Konzentration von Isopropanol oder anderen Lösungsmitteln nahm die Polarität den Mikroemulsionshintergrundelektrolyten mit steigender Löslichkeit der polaren Komponenten in der wässrigen Phase ab. Da in dem Fall die eigene Mobilität dieser polaren Substanzen variiert wurde, wurde eine umgekehrte Migrationsfolge erzielt (siehe Abb. II. 1-17). Isopropanol führte einerseits zu einer umgekehrten Migrationsfolge von Scopolamin **F** und 6-Hydroxyhyoscamin **D** (1 und 2 % w/w), andererseits zu einer vollständigen Basislinientrennung zwischen dem Hauptpeak und Littorin **G** (2 und 3 % w/w). Methanol und Acetonitril führten im Vergleich zu Isopropanol zu einer umgekehrten Migrationsfolge zwischen Tropasäure **C** und 7-

Hydroxyhyoscamin **E**. Acetonitril verlängert zusätzlich die Migrationszeiten aller Komponenten. In Abbildung II. 1-17 stellt sich heraus, dass Isopropanol im Gegensatz zu den beiden anderen Lösungsmitteln die Trennung positiv beeinflusst. Somit wurde Isopropanol in einer Konzentration von 2 % (w/w) zur weiteren Methodenoptimierung verwendet.

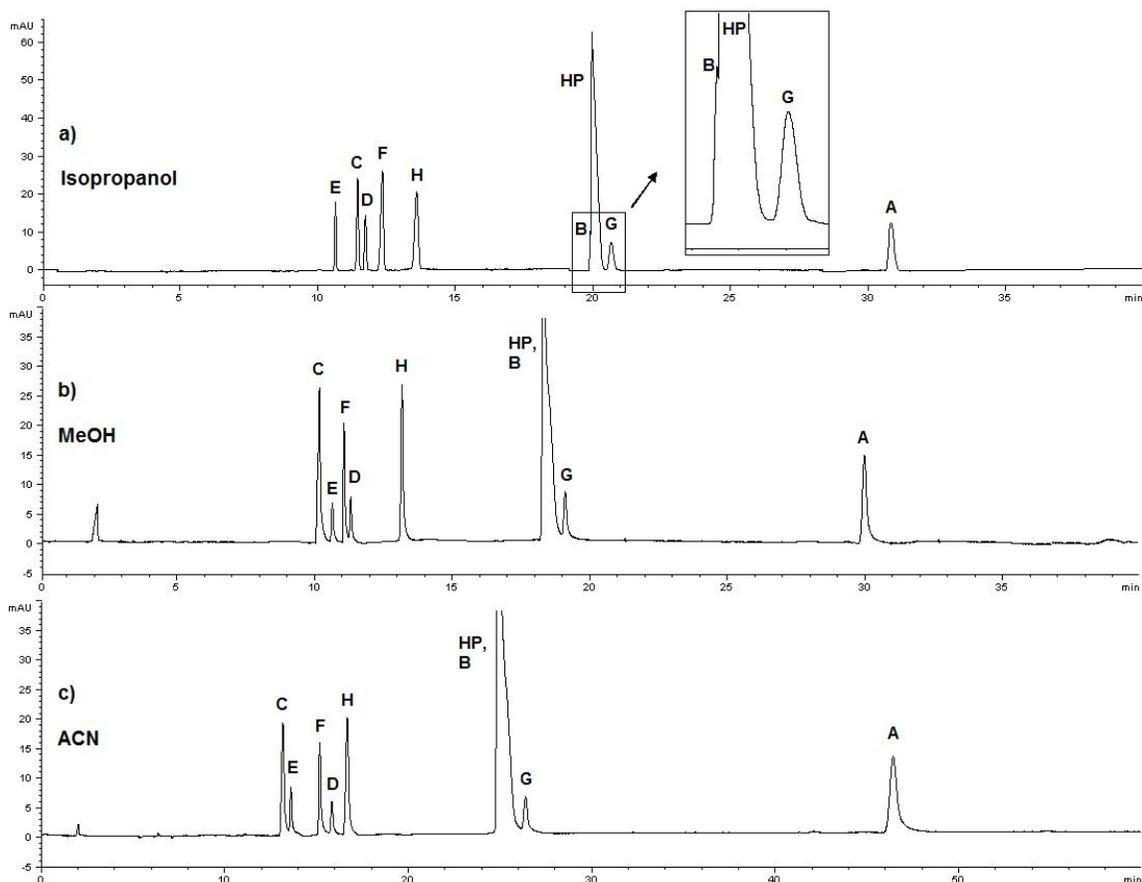


Abb. II.1-17: Elektropherogramme des Atropinsulfates und der verwandten Substanzen bei der Zusatz eines organischen Lösungsmittels unter folgenden Bedingungen: Mikroemulsionshintergrundelektrolyt: 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 2,0 % (w/w) organic modifier: **a)** Isopropanol; **b)** MeOH und **c)** ACN, 3,3 % (w/w) SDS und 87,3 % (w/w) 10 mM Na-Tetraboratpuffer pH 9,2; Spannung: 15 kV. Für andere elektroforetische Bedingungen siehe Abb. II.1-15. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

### 1.2.5.2.3 Auswirkung des Tensids

Der Einfluss der Konzentration des Tensids (insbesondere SDS) in Bezug auf eine MEEKC-Trennung wurde in einigen Veröffentlichungen allgemein beschrieben.<sup>153,154</sup> In diesen Untersuchungen wurde die SDS-Konzentration in der Mikroemulsion optimiert, dafür wurden die Trennungen mit 3,3, 3,9, 4,45 und 5,0 % (w/w) SDS durchgeführt. Durch die Zunahme der SDS-Konzentration verlängern sich die Migrationszeiten aller Komponenten je nach ihrer Lipophilie, da der EOF durch die Zunahme der Ionenstärke des Boratpuffers pH 9,2 weniger wird.<sup>147</sup> Andererseits verbessert die Zunahme der SDS-Konzentration die Auflösung zwischen den

neutralen Komponenten, da sie besser mit der pseudostationären Phase wechselwirken können und anschließend ein unterschiedliches chromatographisches Verteilungsverhalten mit den Öltröpfchen haben.<sup>155</sup> Durch dieses Phänomen wurde bei einer SDS-Konzentration von 4,45 % (w/w) eine vollständige Basislinientrennung zwischen dem Hauptpeak und Noratropin **B** erzielt. Zusätzlich führt die Zunahme der SDS-Konzentration zu einer umgekehrten Migrationsfolge zwischen 6-Hydroxyhyoscamin **D** und Scopolamin **F** (siehe Abb. II. 1-18). Demzufolge wurde zur weiteren Methodenoptimierung eine SDS-Konzentration von 4,45 % (w/w) verwendet.

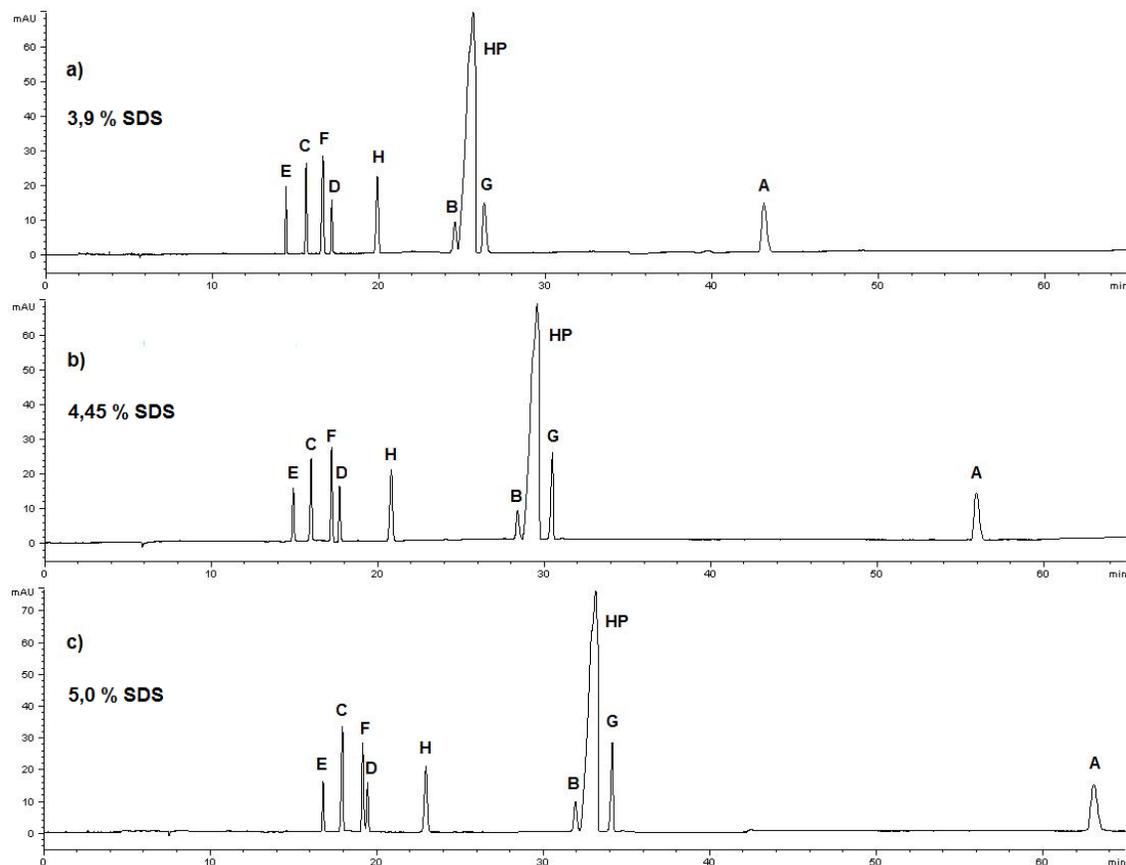


Abb. II.1-18: Elektropherogramme des Atropinsulfates und der verwandten Substanzen bei der Variation der SDS-Konzentration. Elektrophoretische Bedingungen: Mikroemulsionshintergrundelektrolyt: 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 2,0 % (w/w) Isopropanol,  $x = \text{a) } 3,9, \text{ b) } 4,45 \text{ und c) } 5,0$  % (w/w) SDS und  $90,6 - x$  % (w/w) 10 mM Na-Tetraboratpuffer pH 9,2; Spannung: 15 kV. Für andere elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-15. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des Tensidtyps in Bezug auf die MEEKC-Trennung beschrieben, da das verwendete Tensid eine wichtige Rolle für die Stärke und Richtung des EOF, für die Ladung und Größe der Öltröpfchen sowie für das chromatographische Verteilungsverhalten in dem Mikroemulsionssystem spielt. Zwei anionische Tenside Natriumcaprylat und Natriumdeoxycholot wurden in Konzentrationen von 3,3 % (w/w) zum Mikroemulsions-HGE

zugegeben. Die Elektropherogramme in Abb. II. 1-19 zeigen, dass bei der Verwendung von Natriumdeoxychololat keine Abtrennung zwischen dem Hauptpeak und Littorin **F** ergab. Zusätzlich führten die Trennungen mit beiden Tensiden zu signifikant unterschiedlichen Migrationsfolgen aller Komponenten bis auf Apoatropin **A**, das immer zuletzt kam.

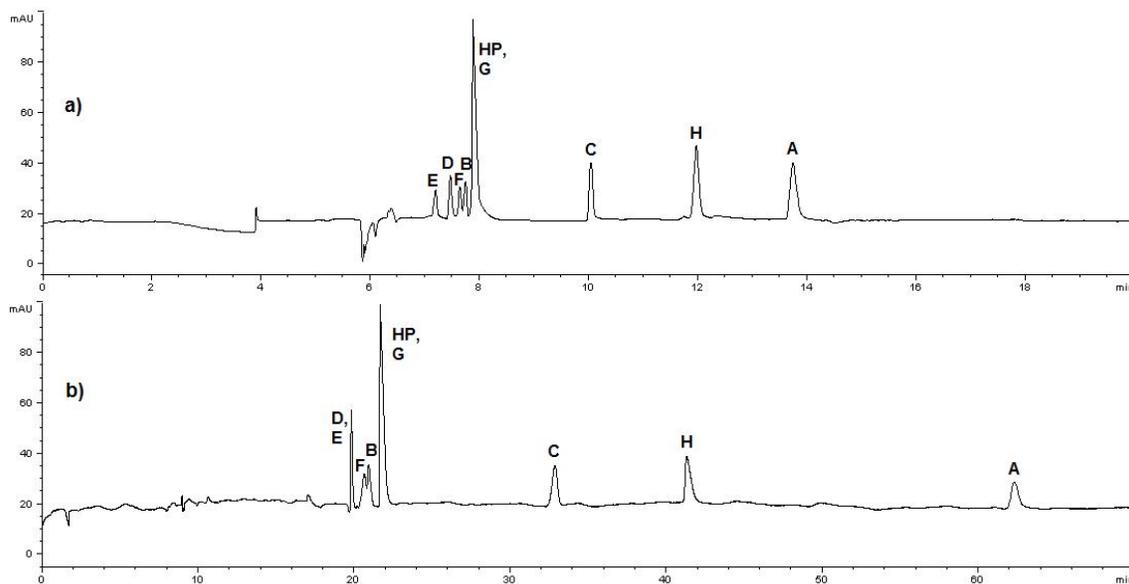


Abb. II.1-19: Elektropherogramme des Atropinsulfates und der verwandten Substanzen bei der Variation des verwendete Tensids. Elektrophoretische Bedingungen: Mikroemulsionshintergrundelektrolyt: 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 2,0 % (w/w) Isopropanol, 3,3 % (w/w) Tensid: **a)** Natriumdeoxychololat und **b)** Natriumcaprylat und 87,3 % (w/w) 10 mM Na-Tetraboratpuffer pH 9,2; Spannung: 15 kV. Für andere elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-15. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

Für die Trennung von Atropinsulfat und der Zersetzungsprodukte (**C**, **A** und **H**) erwies sich eine Mikroemulsion mit Natriumdeoxychololat unter den verwendeten Bedingungen als geeignet (siehe Abb. II. 1-19), da sich bei der Trennung mit Natriumdeoxychololat im Gegensatz zu Natriumcaprylat geringere Analysenzeit von ca. 14 min sowie die beste Auflösung erzielt. In Bezug auf die Trennung von Atropinsulfat und allen Verunreinigungen wurden die weiteren Versuche mit SDS fortgeführt, da die anderen Tenside schlechtere Trennergebnisse auch mit steigender Konzentration (bis zu 6,0 %) lieferten.

#### 1.2.5.2.4 Auswirkung eines niedrigen pH-Wertes

Die Wahl des richtigen pH-Wertes der Mikroemulsion ist entscheidend für eine gute MEEKC-Trennung, da dieser sowohl die eigene elektrophoretische Mobilität als auch den EOF stark beeinflusst.<sup>149,156</sup> In diesem Versuch wurde die MEEKC-Trennung im sauren pH-Bereich durchgeführt. Ein Phosphatpuffer (20 mM, pH 2,0) wurde als wässrige Phase bei der Herstellung der Mikroemulsion verwendet. Die Probe musste bei einer Spannung von -15 kV (Umkehrpolung)

vermessen werden, da der EOF bei einem pH 2,0 unterdrückt wird sowie die negativ geladenen Öltröpfchen in Richtung Anode migrieren. Das Elektropherogramm in Abb. II. 1-20 zeigt, dass bei der Verwendung von einer sauren Mikroemulsion zwei Peaks (**B** und **G**) nicht von dem Hauptpeak vollständig getrennt sind, obwohl eine hohe Konzentration an SDS (6,0 %) in der Mikroemulsion verwendet wurde.

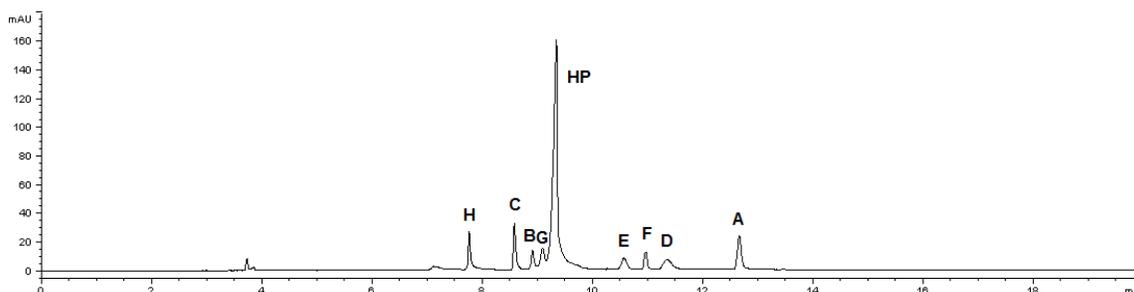


Abb. II.1-20: Elektropherogramm des Atropinsulfates und der verwandten Substanzen mit einer sauren Mikroemulsion pH 2,0. Elektrophoretische Bedingungen: Mikroemulsionshintergrundelektrolyt: 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 2,0 % (w/w) Isopropanol, 6,0 % (w/w) SDS und 84,6 % (w/w) 20 mM Phosphatpuffer pH 2,0; Spannung: -15 kV (Umkehrpolung). Für andere elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-15. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

Mit einem pH-Wert von 2,0 wurden fast alle basischen Verbindungen vollständig protoniert und bilden mit den negativ geladenen Öltröpfchen eine Art Ionenpaar. Somit wandern diese Öltröpfchen in Richtung Detektor langsamer als die, die mit der neutralen Komponente (Tropasäure **C** und Atropasäure **H**) wechselwirken. Aus diesem Grund kamen die Säuren (C und H) im Elektropherogramm vor allen basischen Verbindungen. Bei allen nachfolgenden Trennungen wurde einen Tetraboratpuffer pH 9,2 eingesetzt.

#### 1.2.5.2.5 Auswirkung des Öl- und Co-Tensidstyps

Im nächsten Schritt wurden drei verschiedene Öle, *n*-Hexan, *n*-Heptan und Ethylacetat in Konzentrationen von 0,8 % (w/w) zum Mikroemulsion-HGE gegeben. *n*-Hexan und *n*-Heptan lieferten gleiche Trennergebnisse in Bezug auf die Migrationszeiten und Migrationsfolgen. Die Verwendung von beiden Ölen im Vergleich zum Octan führte zu einer umgekehrten Migrationsfolge zwischen Scopolamin **F** und 6-Hydroxyhyoscamin **D**. Zusätzlich verringerte sich die Auflösung zwischen dem Hauptpeak und Noratropin **B**, sobald die Alkylkette des verwendeten Öls kürzer ist. Somit verkürzen sich durch die Verwendung von Ethylacetat die Migrationszeiten und gleichzeitig komigrierte Noratropin **B** mit dem Hauptpeak. Die beste Trennung ergab sich, wie unter vorherigen Bedingungen, bei der Verwendung von 0,8 % (w/w) Octan als Ölphase.

Pentanol wurde ebenfalls als Co-Tensid statt Butanol in einer Konzentration 6,6 % (w/w) getestet. Durch die Trennung nimmt der Strom mit steigender Viskosität des HGE ab, da Pentanol viskoser

als Butanol ist. Bei Verwendung von Pentanol wurden alle Peaks breit, und die Migrationszeit des Peaks **A** (Apoatropin) liegt über 65 Minuten. Butanol wurde als Co-Tensid der Mikroemulsion weiter verwendet.

#### 1.2.5.2.6 Optimierung der Analysenzeit

Die beste MEEKC-Trennung ergab sich bei der Verwendung von einer Mikroemulsion mit 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 2,0 % (w/w) Isopropanol, 4,45 % (w/w) SDS und 86,16 % (w/w) 10 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,2. Das Elektropherogramm in Abb. II. 1-21 zeigt die Trennung mit optimierter Mikroemulsion und bei einer Spannung von 15 kV. Nachteilig war allerdings, dass die Analysenzeit über 55 Minuten liegt, da das Apoatropin **A** langsam migriert. Dies konnte durch einen Spannungsgradienten optimiert werden.

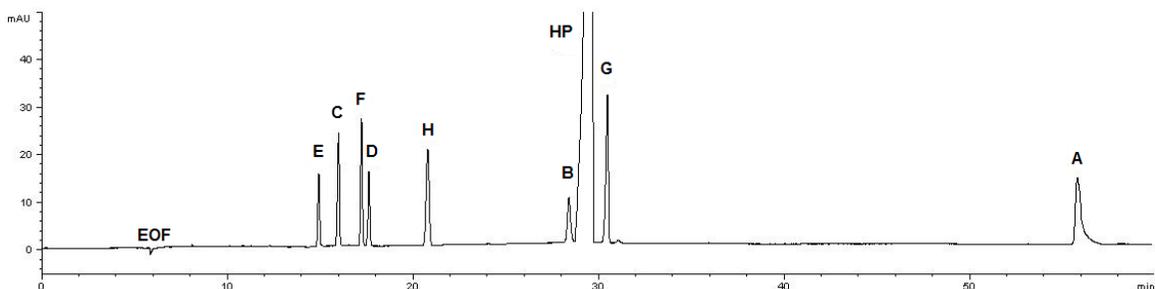


Abb. II.1-21: Elektropherogramm des Atropinsulfates und der verwandten Substanzen mit der optimierten Mikroemulsion. Elektrophoretische Bedingungen: Mikroemulsionshintergrundelektrolyt: 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 2,0 % (w/w) Isopropanol, 4,45 % (w/w) SDS und 86,15 % (w/w) 10 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,2; Spannung: 15 kV. Für andere elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-15. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

Um die Drift der Basislinie durch die Änderung der Spannung bzw. des fließenden Stroms zu vermeiden, wurde kein linearer Spannungsgradient gewählt. Eine konstante Spannung von 15 kV wurde bis zur Migrationszeit des Littorins **G** (ca. 31 min.) angelegt. In einer Minute wurde die angelegte Spannung von 15 kV auf 25 kV angehoben. Da Apoatropin mit einer resultierenden Stromstärke von 118  $\mu$ A (statt 56  $\mu$ A bei 15 kV) schneller migriert, konnte die Analysenzeit auf 35 min (statt 60 min) verkürzt werden. Folgendes Elektropherogramm stellt die MEEKC-Trennung von Atropinsulfat und allen Verunreinigungen unter optimierten Bedingungen dar.

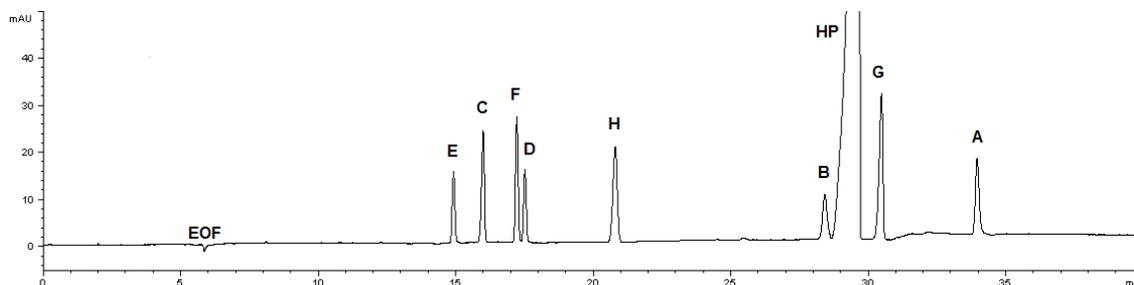


Abb. II.1-22: Elektropherogramm des Atropinsulfates und der verwandten Substanzen unter optimierten Bedingungen. Elektrophoretische Bedingungen: Mikroemulsionshintergrundelektrolyt: 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 2,0 % (w/w) Isopropanol, 4,45 % (w/w) SDS und 86,15 % (w/w) 10 mM Natriumtetraboratpuffer pH 9,2; Spannung: von 0-31 min 15 kV und von 32-40 min 25 kV. Für andere elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-15. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

Durch Zusatz der einzelnen Verunreinigungen (spiking), wie z.B. Tropasäure, Scopolamin, Littorin, usw., wurden die Peaks in den Elektropherogrammen den einzelnen Verunreinigungen zugeordnet.

Für die Quantifizierung wurde, wie bei der RP-HPLC-Methode, der Gehalt jeder Verunreinigung mit einem externen Standard von Tropasäure (CRS-Substanz) ermittelt, und dann in Prozent bezüglich des Atropinsulfatgehalts wiedergegeben. Bei der Auswertung der Elektropherogramme ist zu beachten, dass die korrigierten Peakflächen (Fläche/Migrationszeit) verwendet werden, da die integrierte Peakfläche eines Peak nicht direkt im Verhältnis zur Menge der Komponente im Analyten steht (siehe Kapitel I.3.2.2.1).

### 1.2.5.3 W/O-MEEKC-Methode

Wasser-in-Öl-Mikroemulsionen könnten mit ausreichender Leistungsfähigkeit für die Trennung der in Wasser unlöslichen Substanzen verwendet werden. ALTRIA et al. beschrieb in<sup>157</sup> die Entwicklung einer W/O-MEEKC-Methode zur Trennung von sauren, neutralen sowie wasserunlöslichen Substanzen. Ausgehend von dieser Methode wurde die Trennung von Atropinsulfat und allen Verunreinigungen getestet. Eine W/O-Mikroemulsion mit 2,0 % (w/w) Octan als Ölphase, 78,0 % (w/w) Butanol als Co-Tensid, 10,0 % (w/w) SDS als Tensid und 10,0 % (w/w) 70 mM Tris-Phosphatpuffer pH 8,0 wurde als Standardmikroemulsion verwendet. Für eine ausreichende Stromstärke während der Trennung mit einer Spannung von -30 kV wurde eine hohe Konzentration (70 mM) des Tris-Phosphatpuffers gewählt. So können vier Peaks (**C**, **H**, **F** und Doppelpeak von **D** und **E**) vom Hauptpeak größtenteils basisliniengetrennt werden. Die Trennung konnte nur durch Zusatz von organischem Lösungsmittel verbessert werden. 10 % (w/w) Methanol oder Acetonitril wurde zum Mikroemulsion-HGE hinzugegeben, damit Trennungen der Peaks **G**, **A** und **B** vom Hauptpeak erzielt wurden. Acetonitril im Gegensatz zum Methanol führte einerseits zur schlechten Peakschärfe der basischen Komponenten (Peakbreite), und zu einer etwas unruhigen

Basislinie. Von Nachteil war allerdings, dass eine Basislinientrennung zwischen **E** und **D** mit allen möglichen Optimierungsvorversuchen nicht erzielt werden konnte. Die Elektropherogramme in Abb. II. 1-23 stellen die Trennung von Atropinsulfat und allen Verunreinigungen mit W/O-Mikroemulsion dar.

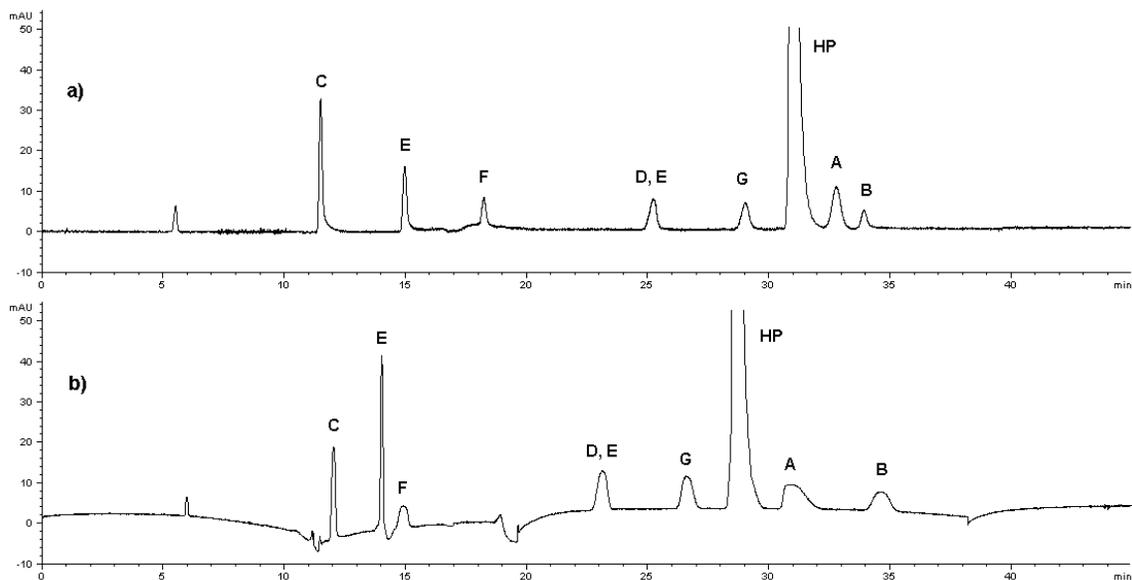


Abb. II.1-23: Elektropherogramme der W/O-MEEKC-Trennung von Atropinsulfates und der verwandten Substanzen unter folgenden Bedingungen: W/O-Mikroemulsion: 2,0 % (w/w) Octan, 78,0 % (w/w) Butanol, 10,0 % (w/w) SDS und 10,0 % (w/w) 70 mM Tris-Phosphatpuffer pH 8,0; HGE: 90 % (w/w) Mikroemulsion und 10 % (w/w) organisches Lösungsmittel **a)** MeOH, **b)** ACN; Kapillare: Quarzglas Kapillare 40,0/48,5 cm, 50  $\mu$ m ID; Spannung -30 kV; Injektion: 5 s mit 50 mbar; Temperatur: 25  $^{\circ}$ C; Detektion: 195 nm (UV). Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

#### 1.2.5.4 Methodvalidierung

Die in Kapitel 1.2.5.2 optimierte O/W-MEEKC-Methode wurde in Bezug auf die Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat mittels eines externen Standards validiert. Entsprechend der Vorschriften der ICH-Richtlinie Q2(R1)<sup>128</sup> wurde zur Validierung der MEEKC-Reinheitsprüfungsmethode die Parameter Selektivität, Arbeitsbereich und Linearität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Präzision, Richtigkeit und Robustheit bestimmt. Abbildung II. 1-22 zeigte die Abtrennung der Verunreinigungen von Atropinsulfat für die Reinheitsbestimmungsmethode, deren Validierungsergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

##### 1.2.5.4.1 Selektivität

Die Selektivität für die Peaks der Verunreinigungen wurde mittels Referenzsubstanzen überprüft und die Basislinientrennung aller Komponenten sichergestellt. Mit der Peakreinheitsprüfung des DAD-Systems wurden die optische Peakreinheit sowie die Abwesenheit von Substanzen mit

unterschiedlichem Chromophor für jeden Verunreinigungspeak ermittelt. In Tabelle II.1-17 wurden die Migrationszeiten (MZ), sowie die Auflösung zweier benachbarter Peakpaare (*R*) dokumentiert.

Verunreinigung/ Substanz	E	C	F	D	H	B	HP	G	A
Migrationzeit (MZ) [min]	14,9	16,0	17,2	17,6	20,8	28,4	29,6	30,5	34,0
Auflösung ( <i>R</i> )	---	2,95	3,31	1,66	13,90	25,51	1,56	1,74	14,8

Tabelle II.1-17: Die Migrationszeiten und die Bewertung der Auflösungsweite.

#### 1.2.5.4.2 LOQ und LOD, Arbeitsbereich, Linearität und Responsefaktor

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde für jede der acht Verunreinigungen (A-H) mittels des Signal-Rausch-Verhältnisses festgestellt. Um die Empfindlichkeit der MEEKC-Methode vollständig zu ermitteln, wurde auf die gleiche Weise auch die Nachweisgrenze (LOD) ermittelt. Es ergeben sich für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze die in Tabelle II.1-18 gezeigten Ergebnisse.

Verunreinigung		E	C	F	D	H	B	G	A
LOQ	µg/ml	0,20	0,15	0,30	0,20	0,15	0,35	0,30	0,35
	%	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,04
LOD	µg/ml	0,10	0,10	0,15	0,10	0,10	0,20	0,15	0,20
	%	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02

Tabelle II.1-18: LOQ und LOD für die acht zu bestimmenden Verunreinigungen von Atropinsulfat.

Die Werte in Tab. II.1-18 sind zum einen in der Konzentrationseinheit µg/ml und zum anderen in % bezüglich der für die Methode festgelegten Atropinsulfatgehalt von 1,0 mg/ml angegeben. Die Werte zeigen, dass sich die Bestimmungsgrenzen für alle Substanzen unterhalb der in der ICH-Richtlinie Q3A<sup>7</sup> festgelegten Grenze von 0,1 % befinden. Diese eigentlich für unbekannte Verunreinigungen in Wirkstoffen aufgestellte Grenze wurde für die Substanz Atropasäure in Atropinsulfat als Orientierung für die Entwicklung und Validierung der MEEKC-Methode genommen. Die Grenzwerte für alle Verunreinigungen sind in der Monographie des PhEur 6.0<sup>135</sup> allerdings auf 0,2-0,4 % festgelegt und liegen damit um eine Zehnerpotenz höher als die Bestimmungsgrenze (0,02-0,04 %) der MEEKC-Methode für diese Verunreinigungen. Interessant zu beachten, dass zwischen LOD und LOQ nicht der Faktor 3 festgestellt ist.

Der geforderte Konzentrationsbereich, innerhalb dessen die Verunreinigungen bestimmt werden und die Detektorsignale lineares Verhalten aufweisen müssen, wurde entsprechend der oben erwähnten Bestimmungsgrenzen für die Verunreinigungen festgelegt. Um gleichzeitig sehr geringe Mengen an Verunreinigungen zu bestimmen, die unter den Spezifikationsgrenzen liegen und sehr hohe, die weit darüber liegen, wurde ein Arbeitsbereich von 0,015-2,0 % für Tropasäure und Atropasäure, 0,02-2,5 % für 6- und 7-Hydroxyhyoscyamin, 0,03-3,5 % für Scopolamin und Littorin und 0,035-4,0 % für Noratropin und Apotropin gewählt. Diese entsprechen bei einer nominellen Probenkonzentration des Atropinsulfates von 1,0 mg/ml einem Bereich von 0,15-20 µg/ml, 0,2-25 µg/ml, 0,3-35 µg/ml bzw. 0,35-40 µg/ml. Tabelle II.1-19 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Linearitätsbestimmung, die entsprechenden Linearitätsgeraden sind in Abbildung II.1-24 dargestellt.

Verunreinigung	E	C	F	D	H	B	G	A
Arbeitsbereich [µg/ml]	0,20-25	0,15-20	0,30-35	0,20-25	0,15-25	0,35-40	0,30-35	0,35-40
Korrelations- koeffizient (r)	0,9992	0,9986	0,9981	0,9995	0,9982	0,9977	0,9974	0,9979
Wiederhol- präzision RSD [%]	0,72-1,04	0,44-0,95	0,83-2,10	0,38-0,88	0,55-0,99	0,83-1,44	0,67-0,95	0,49-1,06

*Tabelle II.1-19: Ergebnisse der Linearitätsbestimmung im Überblick.*

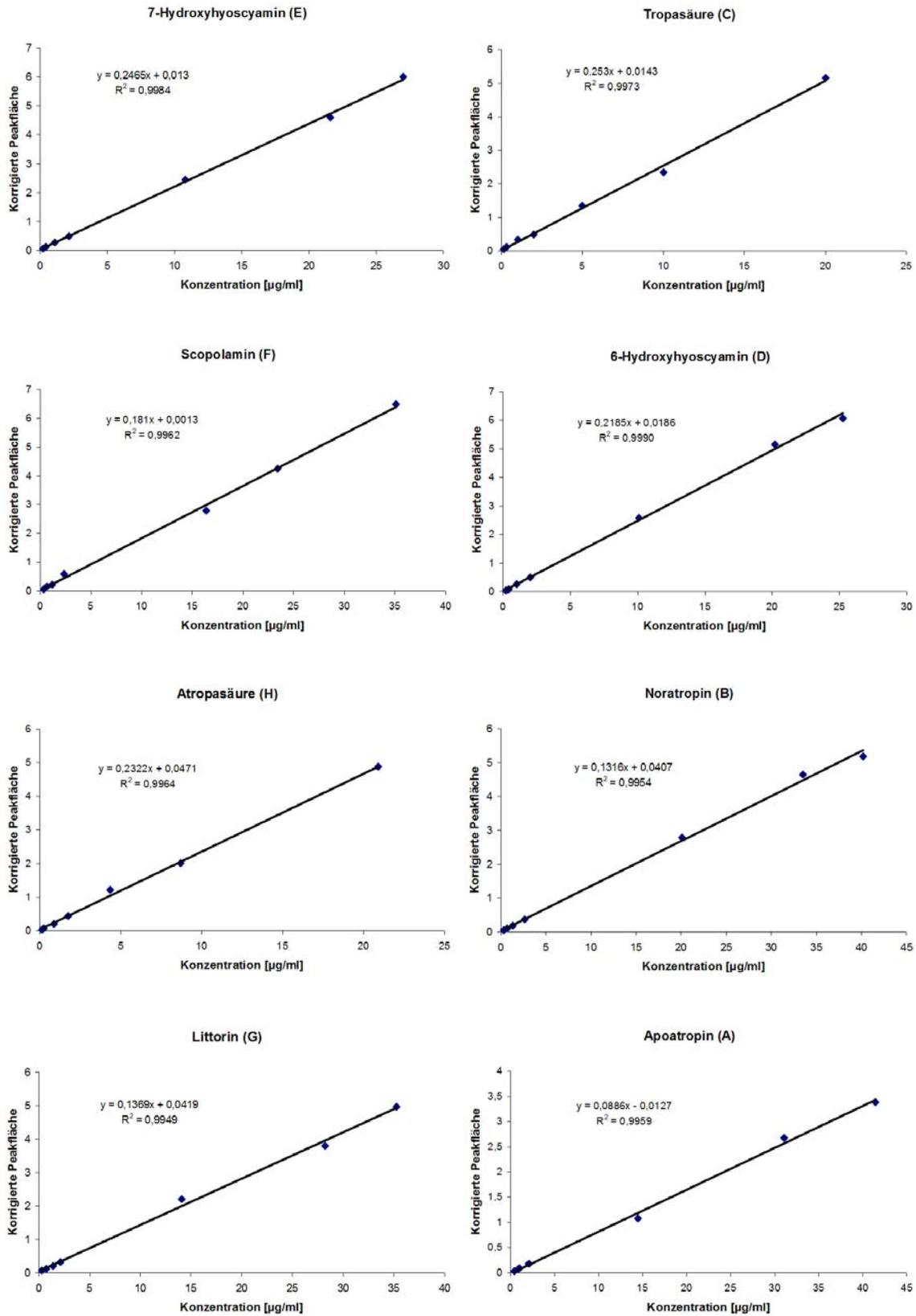


Abb. II.1-24: Linearitätsdiagramme für die Verunreinigungen des Tropinsulfates mit MEEKC.

Der Gehalt an jeder Verunreinigung wurde mit Hilfe eines externen Standards "Tropasäure" mit einer Konzentration von 5,0 µg/ml bestimmt. Diese Konzentration liegt in dem oben geprüften Arbeitsbereich der Tropasäure (0,15-20 µg/ml).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Voraussetzungen für eine lineare Regression erfüllt sind. Die Durchführung einer Reinheitsbestimmung, basierend auf einem korrigierten Flächenverhältnis der Verunreinigung zum externen Standard (ES), ist somit möglich unter der Berücksichtigung des entsprechenden Responsefaktors. Aus diesem Grund mussten die Responsefaktoren aller Verunreinigungen in Bezug auf den externen Standard (ES) ermittelt werden. Folgende Tabelle II.1-20 zeigt die Response- bzw. ausgerechneten Korrekturfaktoren der einzelnen Verunreinigungen.

Verunreinigung	E	C (ES)	F	D	H	B	G	A
Responsefaktor ( <i>Rf</i> )	0,96	1,00	0,71	0,85	0,87	0,48	0,50	0,43
Korrekturfaktor ( <i>Kf</i> )	---	1,00	1,40	---	---	2,08	2,00	2,30

Tabelle II.1-20: Die Response- und Korrekturfaktoren aller Verunreinigungen mit MEEKC.

Da die *Rf*-Werte der Verunreinigungen **E**, **D** und **H** innerhalb des Bereichs von 0,8 bis 1,2 lagen, mussten ihre Korrekturfaktoren nach PhEur 6.0<sup>65</sup> nicht ermittelt werden. Für diese Verunreinigungen wurde die gleiche Nachweisempfindlichkeit wie für den externen Standard (ES), d.h. ein Responsefaktor bzw. Korrekturfaktor von 1,0, angenommen.

#### 1.2.5.4.3 Präzision und Richtigkeit

Die Reproduzierbarkeit der MEEKC-Methode wurde als Wiederholstandardabweichung für Intralaboratoriumspräzision an einem Tag (n = 6) und Interlaboratoriumspräzision an drei verschiedenen Tagen (n = 18) angegeben. Zur Bestimmung der Präzision über mehrere Tage wurden zwei reale Atropinsulfatproben (1,0 mg/ml) mit definierten Mengen der Referenzsubstanzen der Verunreinigungen (0,1 % und 0,2 %) versetzt. Die Bestimmungen erfolgten an jedem Tag mit zweifacher Aufarbeitung der Proben und sechsfacher Injektion für jede der zwei sich innerhalb des Arbeitsbereiches befindenden Konzentrationsstufe 0,1 und 0,2 % (entspricht 1,0 bzw. 2,0 µg/ml von jeder Verunreinigung). Das Verhältnis von Migrationszeiten (relative Migrationszeiten, RMZ) und korrigierten Peakflächen (V.k.PF) der einzelnen Peaks zum ES wurde errechnet und die RSD % der wiederholten Messungen wiedergegeben. Die gemittelten Ergebnisse sind in Tabelle II.1-21 dargestellt.

	Intralaboratoriumspräzision (n = 6)				Interlaboratoriumspräzision (n = 18)			
	V.k.PF	RSD [%]	RMZ	RSD [%]	V.k.PF	RSD [%]	RMZ	RSD [%]
Ver. Konz. 0,1 (%)								
<b>E</b>	0,183	1,29	0,94	0,12	0,189	1,78	0,92	1,05
<b>C</b>	0,242	2,45	1,01	0,78	0,254	2,45	1,00	1,54
<b>F</b>	0,155	1,19	1,08	0,91	0,151	0,98	1,10	2,64
<b>D</b>	0,200	1,98	1,11	1,09	0,204	2,68	1,15	1,98
<b>H</b>	0,177	2,08	1,31	0,15	0,185	3,15	1,33	3,46
<b>B</b>	0,110	2,73	1,79	1,06	0,113	2,79	1,69	2,67
<b>G</b>	0,130	1,66	1,92	0,77	0,139	1,65	1,91	3,89
<b>A</b>	0,062	2,23	2,14	1,19	0,069	3,41	2,16	3,42
Ver. Konz. 0,2 (%)								
<b>E</b>	0,361	1,17	0,96	0,54	0,372	2,14	0,91	2,17
<b>C</b>	0,364	1,92	1,01	0,60	0,361	2,69	1,05	1,96
<b>F</b>	0,256	0,58	1,09	0,36	0,259	3,04	1,14	1,54
<b>D</b>	0,356	0,25	1,11	1,56	0,366	1,65	1,18	0,96
<b>H</b>	0,396	0,96	1,31	1,15	0,401	1,25	1,36	2,69
<b>B</b>	0,220	1,44	1,80	0,89	0,218	2,56	1,75	3,45
<b>G</b>	0,236	1,29	1,92	1,22	0,231	2,78	1,98	2,09
<b>A</b>	0,129	2,74	2,15	1,15	0,136	2,91	2,19	4,02

Tabelle II.1-21: Ergebnisse der Bestimmung der Präzision der MEEKC-Methode.

Bei der Reinheitsprüfung darf die relative Standardabweichung (RSD %) der Messungen nicht größer als 5 % sein, wenn die Summe aller Verunreinigungen zwischen 0,5 % und 5 % liegt.<sup>127</sup> Die RSD%-Werte an einem Tag liegen zwischen 0,25 und 2,74 % für die korrigierte Peakfläche und zwischen 0,12 und 1,56 % für die relative Migrationszeit deutlich weniger als die Werte an mehreren Tagen zwischen 0,98 und 3,15 % für die korrigierte Peakfläche und zwischen 0,96 und 4,02 % für die relative Migrationszeit. Durch mehrmalige Herstellung der Proben sowie des externen Standards an verschiedenen Tagen konnten diese RSD-Werte erklärt werden. Alle Werte liegen jedoch deutlich unter dem noch akzeptierten Wert (5 %), so dass von einer reproduzierbaren Methode für die Reinheitsbestimmung ausgegangen werden kann.

Die Richtigkeitsbestimmung der MEEKC-Methode erfolgte auf gleichem Weg wie bei der Präzision an einem Tag als Intralaboratoriumsrichtigkeit bzw. an drei verschiedenen Tagen als Interlaboratoriumsrichtigkeit. Zur Bestimmung der Richtigkeit über mehrere Tage wurden zwei

reale Atropinsulfatproben (1,0 mg/ml) mit zwei verschiedenen Konzentrationsstufen für die Verunreinigungen 0,1 % und 0,2 % (entspricht 1,0 bzw. 2,0 µg/ml) vermessen. In diesem Fall war zu prüfen, inwiefern sich die Präsenz der großen Konzentrationen der Hauptsubstanz Atropinsulfat auf die Richtigkeit der Bestimmung aller definierten Verunreinigungen auswirkt. Die Gehalte der Verunreinigungen wurden mittels des ES Tropasäure mit einer Konzentration von 5,0 µg/ml bestimmt. Die nachfolgende Tabelle II.1-22 stellt die Ergebnisse der Richtigkeit dar.

	Intralaboratoriumsrichtigkeit ( <i>n</i> = 6)			Interlaboratoriumsrichtigkeit ( <i>n</i> = 18)		
	Konzentration	Richtigkeit	RSD	Konzentration	Richtigkeit	RSD
	[µg/ml]	[%]	[%]	[µg/ml]	[%]	[%]
Ver. Konz. 0,1 (%)						
<b>E</b>	1,01	102,4	1,08	1,04	101,5	2,03
<b>C</b>	1,00	99,6	2,36	0,99	99,1	1,65
<b>F</b>	1,17	98,2	2,22	1,11	98,9	0,99
<b>D</b>	1,08	101,6	1,15	1,12	102,1	2,07
<b>H</b>	1,01	103,7	0,98	0,97	102,9	1,54
<b>B</b>	1,10	100,1	1,19	1,12	100,3	3,69
<b>G</b>	0,98	98,7	1,02	1,00	99,2	2,66
<b>A</b>	1,04	97,9	1,94	1,02	97,2	2,81
Ver. Konz. 0,2 (%)						
<b>E</b>	2,02	101,3	1,69	2,00	102,1	2,92
<b>C</b>	2,00	100,6	0,78	2,01	104,6	2,54
<b>F</b>	1,90	104,8	2,15	1,96	104,9	1,69
<b>D</b>	2,16	99,6	1,10	2,15	100,1	3,12
<b>H</b>	2,10	102,6	2,09	2,06	101,6	1,56
<b>B</b>	1,95	98,1	1,32	1,99	98,5	2,91
<b>G</b>	2,12	98,5	1,12	2,09	98,3	2,14
<b>A</b>	2,07	99,4	2,07	2,09	98,1	1,17

Tabelle II.1-22: Ergebnisse der Bestimmung der Richtigkeit der MEEKC-Methode.

Die in Tab. II.1-22 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass unter den realen elektrophoretischen Bedingungen die quantitative Reinheitsprüfung aller Verunreinigungen im relevanten Konzentrationsbereich möglich ist. Die Werte sowohl für die Richtigkeit als auch für die Präzision sind gut, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass sich die geprüften

Konzentrationswerte nahe (0,2 %) oder unter (0,1 %) dem in der Monographie<sup>135</sup> geforderten Grenzwert der Verunreinigungen befinden.

In Abbildung II.1-25 sind die Elektropherogramme der MEEKC-Trennungen einer realen Atropinsulfatprobe (1,0 mg/ml) gespiket mit den zwei verschiedenen Konzentrationsstufen der Verunreinigungen 0,1 und 0,2 % dargestellt.

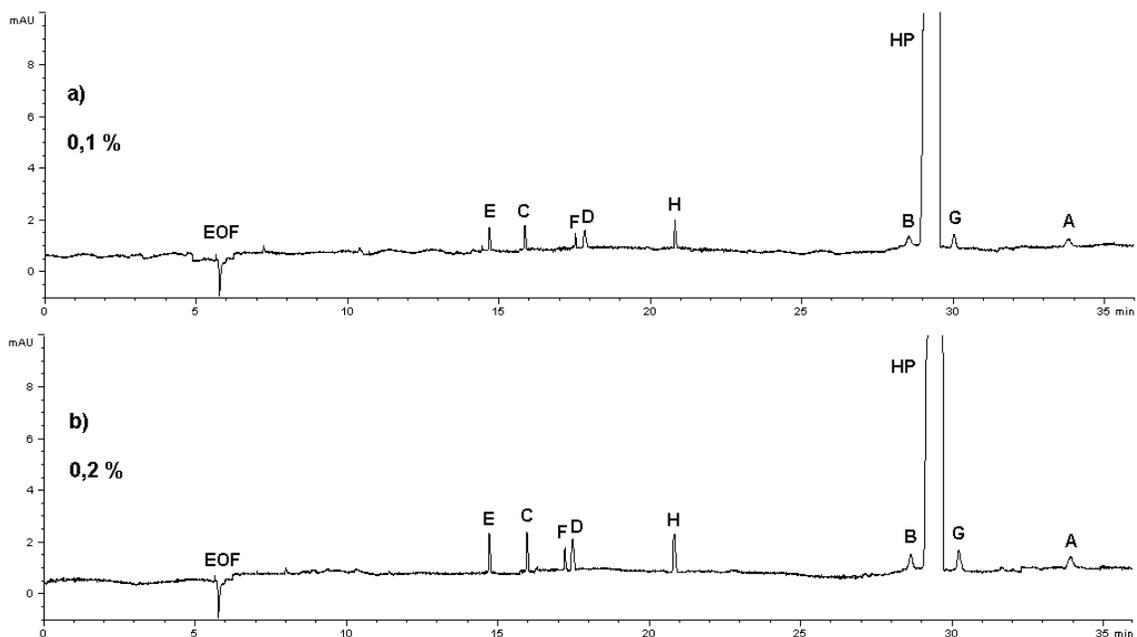


Abb. II.1-25: Elektropherogramme der Trennung von Atropinsulfates (1,0 mg/ml) und aller Verunreinigungen an Konzentrationsstufe a): 0,1 % und b): 0,2 %. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-22. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

#### 1.2.5.4.4 Robustheit

Für die entwickelte MEEKC-Methode erwies sich die Variation der folgenden elektrophoretischen Parameter als sinnvoll:

- Konzentration ( $\pm 1$  mM) und pH des Boratpuffers ( $\pm 0,1$  Einheit) der Mikroemulsion
- Trennungsspannung ( $\pm 1$  kV)
- Kapillartemperatur ( $\pm 1$  °C)
- Konzentration der Mikroemulsionskomponenten ( $\pm 0,1$  % (w/w)).

Die Untersuchungen wurden mit einer Probelösung von Atropinsulfat (1,0 mg/ml) unter Zusatz aller Verunreinigungen mit einer Konzentration von 0,1 % durchgeführt. Als Kenngröße für die Beurteilung der Robustheit dient neben der relativen Migrationszeit des letzten Peaks (RMZ<sub>A</sub>) die

Auflösung zwischen **F** und **D** ( $R_{D,F}$ ), **B** und **HP** ( $R_{HP,B}$ ) und **HP** und **G** ( $R_{G,HP}$ ). Die folgende Tabelle zeigt die Auswirkungen bei Veränderungen einzelner Parameter in den oben genannten Variationsbereichen. Die angelegte Spannung wurde wie in den optimierten Bedingungen der MEEKC-Methode variiert (siehe Abb. II.1-22) z.B. die Spannung in den oberen Bereich wurde von 15 auf 16 kV im ersten Zeitraum (0-31 min) bzw. von 25 auf 26 kV im zweiten Zeitraum (32-35 min) angegeben.

Parameter	Variation	$R_{D,F}$	$R_{HP,B}$	$R_{G,HP}$	$RMZ_A$
	Standardparameter*	1,61	1,44	1,65	2,13
Pufferkonzentration	9 mM	1,64	1,46	1,67	2,14
	11 mM	1,57	1,41	1,60	2,12
Puffer-pH	9,1	1,63	1,48	1,66	2,15
	9,3	1,58	1,40	1,62	2,12
Spannung	14→24 kV	1,70	1,51	1,78	2,23
	16→26 kV	1,51	1,38	1,55	2,03
Temperatur	29 °C	1,63	1,46	1,66	2,11
	31 °C	1,58	1,40	1,63	2,15
Octan	0,7 % (w/w)	1,58	1,39	1,61	2,12
	0,9 % (w/w)	1,65	1,47	1,67	2,14
Butanol	6,5 % (w/w)	1,49	1,36	1,58	2,16
	6,7 % (w/w)	1,71	1,52	1,73	2,09
SDS	4,4 % (w/w)	1,55	1,36	1,57	2,05
	4,6 % (w/w)	1,76	1,56	1,75	2,19
Isopropanol	1,9 % (w/w)	1,55	1,36	1,60	2,08
	2,1 % (w/w)	1,70	1,51	1,71	2,17
Boratpuffer	86,05 % (w/w)	1,63	1,45	1,68	2,11
	86,25 % (w/w)	1,60	1,43	1,64	2,13

Tabelle II.1-23: Ergebnisse der Robustheit der Methode (\* Sollwerte beim Standardparameter der MEEKC-Methode).

In Abbildung II.1-26 sind prozentuale relative Änderungen der erhaltenen Werte bezogen auf die Sollwerte dargestellt.

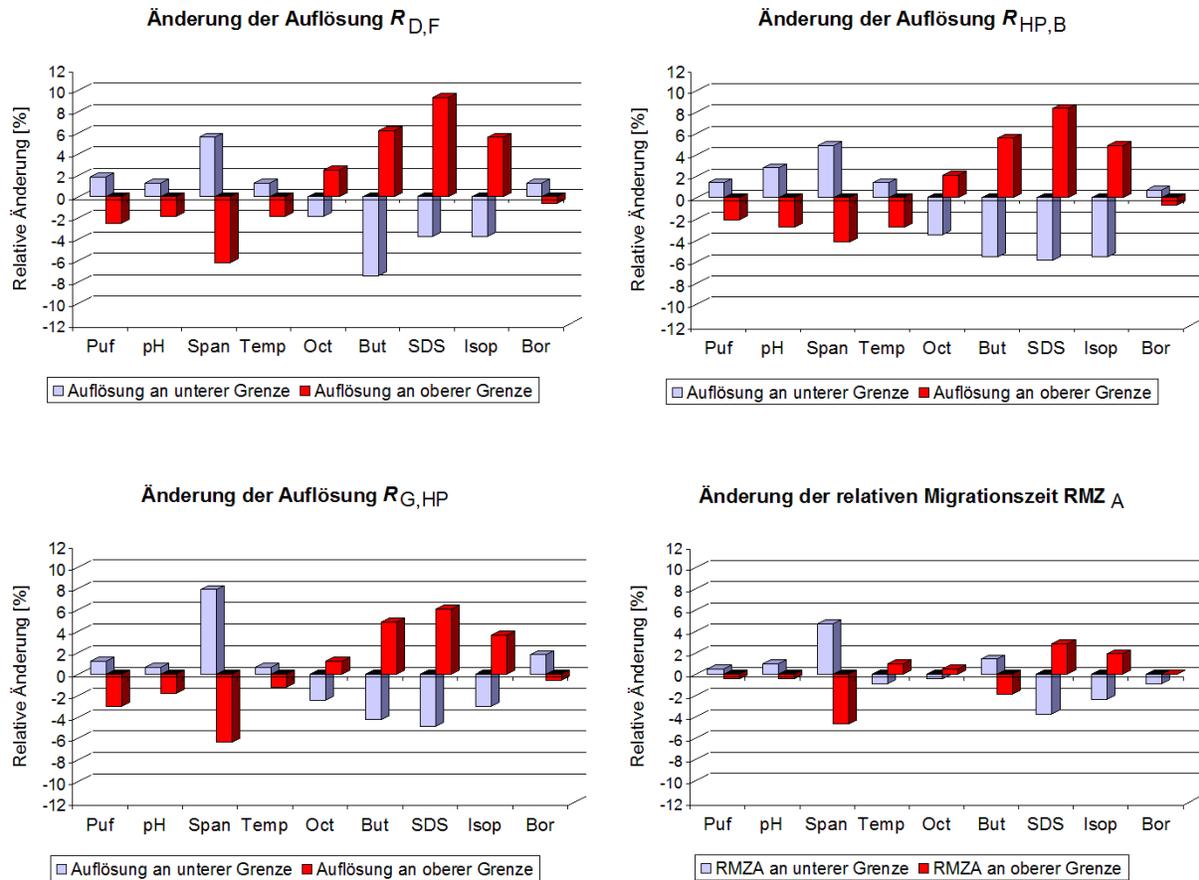


Abb. II.1-26: Relative Änderungen der Auflösung  $R_{D,F}$ ,  $R_{HP,B}$  und  $R_{G,HP}$  bzw. der relativen Migrationszeit des Peaks A ( $RMZ_A$ ). Die Definition der Säulen: Puf. Pufferkonzentration; pH. pH-Wert des Puffers; Span. Spannung; Temp. Temperatur; Oct. Octan-Anteil; But. Butanol-Anteil; SDS. SDS-Anteil; Isop. Isopropanol-Anteil; Bor. Boratpuffer-Anteil.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei allen Variationen eine vollständige Basislinientrennung erzielt wurde ( $R > 1,3$ ). Die Variationen der Konzentration und des pH des Puffers sowie der Kapillartemperatur führten zu geringfügigen Änderungen in der Auflösungen und der relativen Migrationszeit. Signifikante Abweichungen konnten sowohl durch Änderung der angelegten Spannung als auch durch Variationen der Zusammensetzung einer Mikroemulsion, insbesondere des Butanol-, SDS- und Isopropanol-Anteils, beobachtet werden. Insgesamt liegen alle relativen Änderungen innerhalb eines Vertrauensbereichs der Robustheit von 10 %, <sup>143</sup> so dass die MEEKC-Methode in diesem Fall als robust gegen kleine Änderungen der Standardparameter angesehen werden kann.

### 1.2.5.5 Methodenvergleich MEEKC und RP-HPLC

Auf Basis der in der Methodenentwicklung und Validierung gewonnenen Erkenntnisse über die Anwendbarkeit der MEEKC- und HPLC-Methode zur quantitativen Reinheitsprüfung von Atropinsulfat wurde ein Vergleich beider Methoden vorgenommen.

Hinsichtlich der Selektivität sind beide Methoden vergleichbar. Alle bekannten Verunreinigungen werden mit deutlicher Basislinientrennung voneinander und von der im hohen Überschuss vorliegenden Hauptsubstanz Atropinsulfat getrennt. Die MEEKC-Methode ergab im Gegensatz zur RP-HPLC-Methode deutlich bessere Peakformen und eine höhere Auflösung zwischen den Peaks **E**, **D** und **F**.

Ein Vorteil der HPLC-Methode liegt in ihrer hohen Empfindlichkeit, die sich in einer deutlich niedrigeren Bestimmungsgrenze ausdrückt. Dadurch war es möglich, eine gegenüber der CE-Methode geringere nominelle Probenkonzentration festzulegen. Bei der Durchführung der Validierungsarbeiten unter Verwendung einer realen Probe konnte aber gezeigt werden, dass die zehnfach höhere Probenkonzentration bei der MEEKC-Methode zu akzeptablen Werten für Präzision, Richtigkeit und Robustheit führt. Auch wird die Substanz Atropinsulfat in großen Konzentrationen eingesetzt und steht daher in ausreichender Menge für die Bestimmung zur Verfügung.

Ein Problem der HPLC-Methode stellt die geringe Robustheit bezüglich der Verwendung von Säulenmaterialien verschiedener Hersteller, insbesondere bei einem Fließmittelgradienten dar. Eine solche Veränderung kann, wenn sie zu einer geringeren Elutionskraft der mobilen Phase führt, die Bestimmung der Verunreinigungen durch Verschlechterung der Peakformen stören.

Gegenüber dieser Schwierigkeit sind die für die Robustheit kritischen Parameter der MEEKC-Methode wie die Konzentration oder der pH-Wert des Puffers und die Zusammensetzung der Mikroemulsion durch die genaue Herstellung oder Einstellung des pH-Wertes mit einem pH-Meter gut zu kontrollieren. Auch die bei dem Transfer der MEEKC-Methode auf Instrumente eines anderen Typs oder Herstellers häufig notwendige Anpassung der Trennungsspannung auf die veränderte Kapillarlänge ist ohne Probleme möglich.

Hinsichtlich der Analysenzeit und des Verbrauchs organischer Lösungsmittel ergeben sich die üblichen Vorteile kurzer Analysenzeiten bei der HPLC-Methode und geringeren Lösungsmittelverbrauchs bei der MEEKC-Methode.

Tabelle II.1-24 fasst die Ergebnisse der Reinheitsbestimmung einer jeweiligen Probelösung von Atropinsulfat und aller Verunreinigungen mit einer Konzentration von 0,2 % zusammen. Das Chromatogramm bzw. das Elektropherogramm sind in Abbildung II.1-27 dargestellt.

Verunreinigung 0,2 %	Konz. [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Gehalt nach MEEKC [%]	RSD [%]	Gehalt nach RP-HPLC [%]	RSD [%]
E	2.02	101.3	1.69	99.8	0.97
C	2.00	100.6	0.78	100.7	0.35
F	1.90	104.8	2.15	104.6	1.21
D	2.16	99.6	1.10	100.0	0.65
H	2.10	102.6	2.09	101.9	0.78
B	1.95	98.1	1.32	98.4	1.05
G	2.12	98.5	1.12	98.9	1.01
A	2.07	99.4	2,07	98.7	1.20

Tabelle II.1-24: Ergebnisse der Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat mit der optimierten MEEKC- bzw. RP-HPLC-Methode unter Zusatz aller Verunreinigungen an einer Konzentrationsstufe von 0,2 % (Werte als Mittelwert aus  $n = 6$  Bestimmungen mit  $n = 6$  Injektionen).

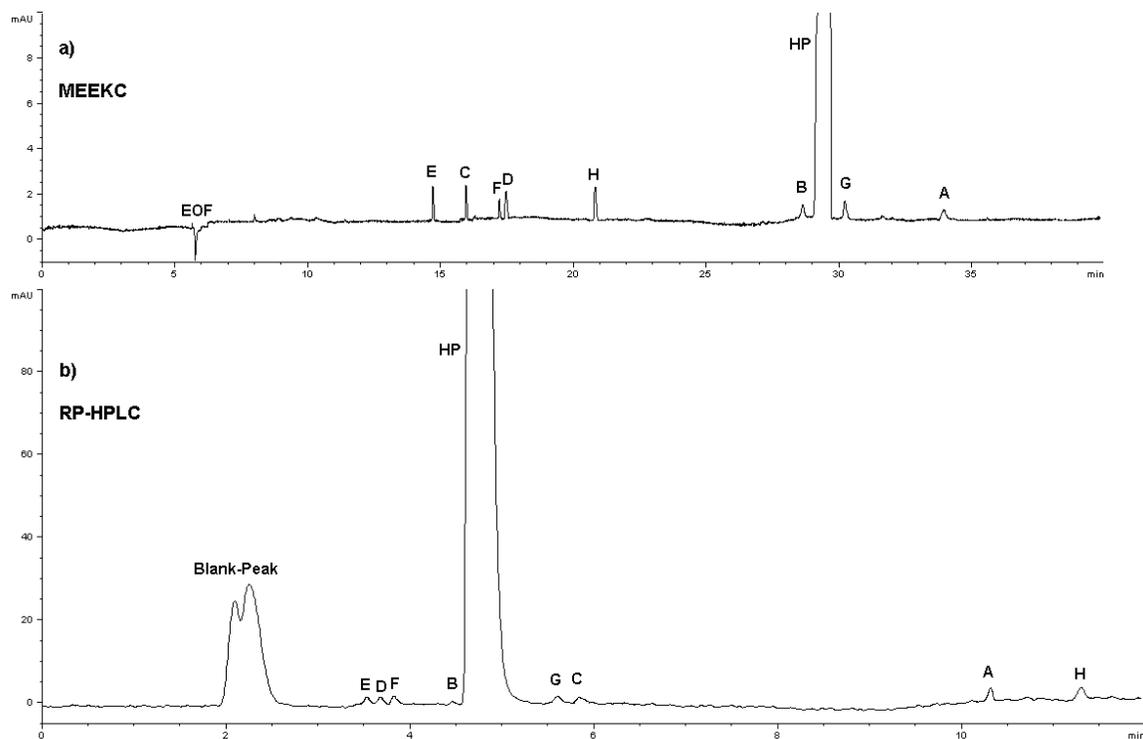


Abb. II.1-27: Elektropherogramm und Chromatogramm der a) MEEKC- und b) RP-HPLC-Trennung von Atropinsulfat und aller Verunreinigungen an Konzentrationsstufe 0,2 %. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-22. Für chromatographische Bedingungen siehe Abb. II.1-5. Für die Zuordnung der Substanzen siehe Abb. II.1-2.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Methoden richtige und nah beieinander liegende Gehaltswerte der Verunreinigungen liefern. Während sich bei der MEEKC-Methode deutlich höhere RSD %-Werte für die Reinheitsbestimmung ergaben, führte im Gegensatz dazu die RP-HPLC-Methode zur besseren Trennung in Bezug auf die Peakformen und Auflösungsfaktoren.

Beide robusten Methoden können mit ausreichender Präzision und Richtigkeit als Alternativen zur in der PhEur 6.0<sup>135</sup> vorgeschriebenen IPC-Methode zur Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat verwendet werden.

## 1.3 Chirale MEEKC-Trennung von Tropan-Alkaloiden

### 1.3.1 Einführung

Die Trennung von Enantiomeren mittels MEKC oder MEEKC kann entweder durch Zusatz verschiedener Cyclodextrine als chirale Selektoren<sup>124,158</sup> oder durch die Verwendung von chiralen Mizellen in der MEKC<sup>159</sup> bzw. einer chiralen Mikroemulsion<sup>160,161</sup> in der MEEKC erreicht werden.

Chirale cyclodextrin-modifizierte MEEKC (CD-MEEKC) wurde in dieser Arbeit für die Enantiomerentrennung von den in Abbildung II.1-1 aufgeführten Tropan-Alkaloiden (Atropin, Scopolamin, Homatropin und Ipratropium) verwendet. In der CD-MEEKC wirken Cyclodextrine mit einer hydrophoben Kavität als stereoselektive pseudostationäre Phase, die wie die Öltröpfchen eine eigene elektrophoretische Mobilität besitzen. So können Enantiomere von neutralen und sehr lipophilen Verbindungen getrennt werden.

Chirale Trennungen von Tropan-Alkaloiden wurden in den letzten Jahren in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben. Die Enantiomerentrennungen erfolgten sowohl in wässriger<sup>162,163</sup> als auch in wasserfreier<sup>164</sup> Kapillarzonenlektrophorese unter Zusatz von neutralen<sup>165-167</sup> oder geladenen<sup>163</sup> Cyclodextrin-Derivaten (CD-CZE).

Die Mikroemulsionskomponenten aus dem vorherigen Kapitel II.1.2.5 wurden zur Herstellung einer standardmäßig O/W-Mikroemulsion gewählt. 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 2,0 % SDS und 90,6 % 10 mM Tetraboratpuffer pH 9,2 erwiesen sich als geeignet. Während bei diesem pH-Wert alle Verbindungen bis auf Scopolamin neutral vorliegen ( $pK_a \approx 9,7-9,9$ ), wird Scopolamin mit einem  $pK_a$ -Wert von 7,6 deprotoniert. Unter Zusatz von nativen Cyclodextrinen sowie geladenen und ungeladenen Cyclodextrin-Derivaten zur achiralen SDS-Mikroemulsion wurde mit einer Kapillarlänge von 24,0/32,5 cm und einer Spannung von 15 kV gearbeitet. Zusätzlich wurde die Kapillare auf 30 °C temperiert. Alle ausgesuchten Alkaloide (siehe Abb. II.1-1) wurden unter den gleichen Bedingungen gemessen. Die verwendeten CDs und deren Konzentrationen sind in den jeweiligen Kapiteln angegeben. Der Einfluss eines organischen Modifiers Methanol, Acetonitril und Isopropanol in einem Konzentrationsbereich von 0-15 % wurde für alle Substanzen untersucht.

### 1.3.2 Einfluss der Art der eingesetzte Cyclodextrine

#### 1.3.2.1 Ungeladene Cyclodextrine

Unter der oben genannten elektrophoretischen Bedingungen wurden native  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD und  $\gamma$ -CD sowie deren neutrale Methyl-Derivate *Heptakis*(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -CD (DM- $\beta$ -CD) und *Heptakis*(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -CD (TM- $\beta$ -CD) in einem Konzentrationsbereich von 0-25 mM getestet. Da die eingesetzten neutralen Cyclodextrine keine Ladung tragen, wandern sie passiv mit der Geschwindigkeit des EOF, der bei einem 10 mM Tetraboratpuffer pH 9,2 stark genug ist. In

dem Mikroemulsionssystem wiesen die Enantiomer-CD-Komplexe sowie das freie Enantiomer verschiedene chromatographische Verteilungsverhalten zwischen Öltröpfchen und der Pufferphase auf. Der starke EOF sorgte auch dafür, dass die zur Anode wandernden Öltröpfchen zum kathodischen Ende (Detektor) transportiert werden konnten. Unter Zusatz von neutralen CDs zur Mikroemulsion wurden keine Trennungen der Racemate Atropin, Scopolamin und Ipratropium beobachtet. In Bezug auf Homatropin ergab sich nach Optimierung der Konzentration der jeweiligen CDs folgendes Ergebnis (siehe Abb. II.1-28). Nur bei der Verwendung der DM- und TM- $\beta$ -CD konnte eine Trennung des Homatropin-Racemats erzielt werden. Die Abhängigkeit der Auflösung  $R$  zwischen den Enantiomeren von der CD-Konzentration ist im Folgenden dargestellt.

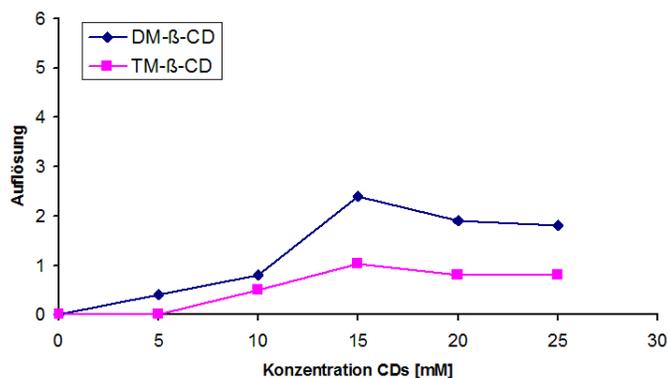


Abb. II.1-28: Auflösung von Homatropin in Abhängigkeit von der Konzentration an DM- und TM- $\beta$ -CD unter folgenden Bedingungen: Mikroemulsion: 0,8 % (w/w) Octan, 6,6 % (w/w) Butanol, 2,0 % (w/w) SDS und 90,6 % (w/w) 10 mM Na-Tetraboratpuffer pH 9,2; HGE: x mM  $\beta$ -CDs in der Mikroemulsion gelöst; Kapillare: Quarzglas Kapillare 24,0/32,5 cm, 50  $\mu$ m ID; Spannung 15 kV; Injektion: 5 s mit 50 mBar; Temperatur: 30 °C; Detektion: 195 nm (UV).

Bei Zunahme der  $\beta$ -CD-Konzentration von 0 auf 25 mM war ein schwach ausgeprägtes Maximum der Auflösung bei 15 mM zu beobachten. Der Zusatz der DM- $\beta$ -CD in Konzentrationen von 15-25 mM führte mit verlängerten Migrationszeiten zu einer vollständigen Basislinientrennung. Mit TM- $\beta$ -CD ergab sich mit 12 mM ein maximaler  $R$ -Wert von 1,04. Insgesamt waren die erhaltenen  $R$ -Werte sowie die Migrationszeiten bei der Verwendung von DM- $\beta$ -CD besser als die mit TM- $\beta$ -CD. Dies ist möglicherweise durch den unterschiedlichen Methyl-Substitutionsgrad der beiden  $\beta$ -CD-Derivate zu begründen.<sup>168</sup> Für diese Versuche konnten die in der Literatur<sup>163</sup> gefundenen Ergebnisse bestätigt werden, dass die Substitution des chiralen Zentrums in der Alkylseitenkette der Verbindungen für die Enantiomerentrennung von Bedeutung ist. Die Wasserstoffbindungen sind nur zwischen neutralem CD und hydroxysubstituiertem chiralem Zentrum möglich. Da dies bei Atropin, Scopolamin und Ipratropium nicht der Fall ist, konnten mit ungeladenen  $\beta$ -CDs keine Trennungen erzielt werden.

### 1.3.2.2 Negativ geladene Cyclodextrine

Aufgrund der verwendeten SDS-Mikroemulsion-HGE ist die Trennung der Enantiomere nur unter Zusatz von negativ geladenen CDs möglich. Für die Untersuchungen standen drei verschiedene CD-Derivate zur Verfügung. Dies waren sulfatiertes  $\beta$ -CD mit einem durchschnittlichen Substitutionsgrad von 7 bis 11 (Sulf- $\beta$ -CD) und zwei isomerenreine *Heptakis(2,6-di-O-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD* (HDMS- $\beta$ -CD) und *Heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD* (HDAS- $\beta$ -CD). Alle geladenen  $\beta$ -CDs wurden in einer Konzentration von 1 bis 10 mM dem SDS-Mikroemulsion-HGE einem Tetraboratpuffer von pH 9,2 zugesetzt. Der aus dem pH-Wert resultierende starke EOF sorgte für eine Beförderung der neutralen Verbindungen (Atropin, Homatropin und Ipratropium) in Richtung Kathode und damit zum Detektor. Sowohl die anionischen CDs und Öltröpfchen als auch deprotoniertes Scopolamin wanderten dem EOF und in Folge dessen auch den neutralen Verbindungen entgegen. Trotz der elektrophoretischen Mobilität der anionischen CDs und Öltröpfchen in Richtung Anode wurden diese letztlich vom starken EOF zur Kathode transportiert. Bei dieser Art der Trennung erreicht zuerst das Enantiomer den Detektor, das die geringere Komplexbildungskonstante zum CD und/oder zur CD/SDS hat und so bei der Beförderung zum Detektor weniger behindert wird. Nach Optimierung der Konzentration an negativ geladenen CDs konnten alle Tropan-Alkaloide getrennt werden. Andere Bedingungen wie z.B. Mikroemulsions-HGE, Temperatur und angelegte Spannung wurden konstant gehalten. Ein pH-Wert des Puffers von 9,2 erwies sich auch in Bezug auf das in Kap. I.3.2.3.4 erwähnte CHARM-Modell von VIGH als geeignet.

*HDMS- $\beta$ -CD*: Alle gegebenen  $\beta$ -CD-Derivate wurden in Konzentration von 1 bis 10 mM in der SDS-Mikroemulsion gelöst. Die Erhöhung der HDMS- $\beta$ -CD-Konzentration führte zu größeren Auflösungen aber auch zu längeren Migrationszeiten (Abb. II.1-29).

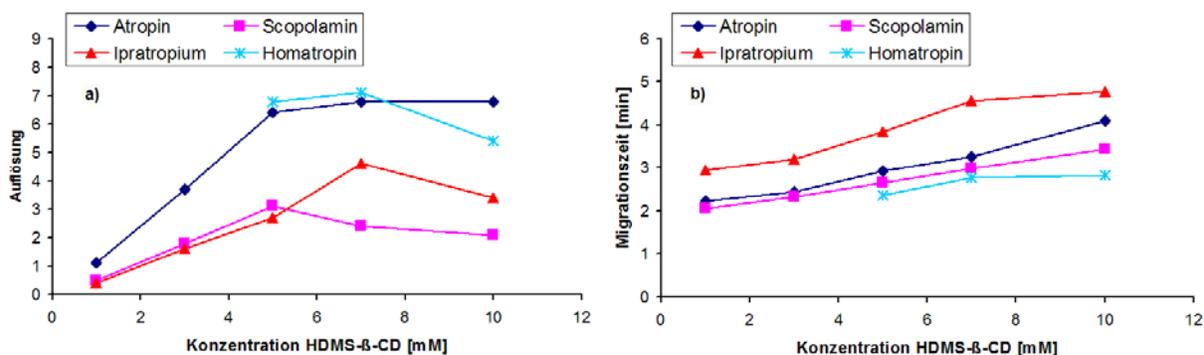


Abb. II.1-29: a) Auflösung der Enantiomere und b) Migrationszeit des jeweils zuerst detektierten Enantiomeres in Abhängigkeit von der Konzentration an HDMS- $\beta$ -CD. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-28.

Während für alle Verbindungen die Migrationszeiten mit steigender HDMS- $\beta$ -CD-Konzentration zunahm, stiegen die  $R$ -Werte für Atropin, Homatropin und Ipratropium bis zur Konzentration von 7 mM und für Scopolamin von 5 mM, wo sie ein Maximum erreichten, an. Die optimierten Trennungen für alle Verbindungen konnten mit einer HDMS- $\beta$ -CD-Konzentration von 5 mM erzielt werden (Abb. II.1-30). Dabei ergaben sich ausreichende  $R$ -Werte ( $R > 2,5$ ) mit geringeren Migrationszeiten. Eine Konzentration unterhalb 5 mM erwies sich für Homatropin als ungeeignet, da der Peak des ersten Enantiomers vom EOF überdeckt wurde.

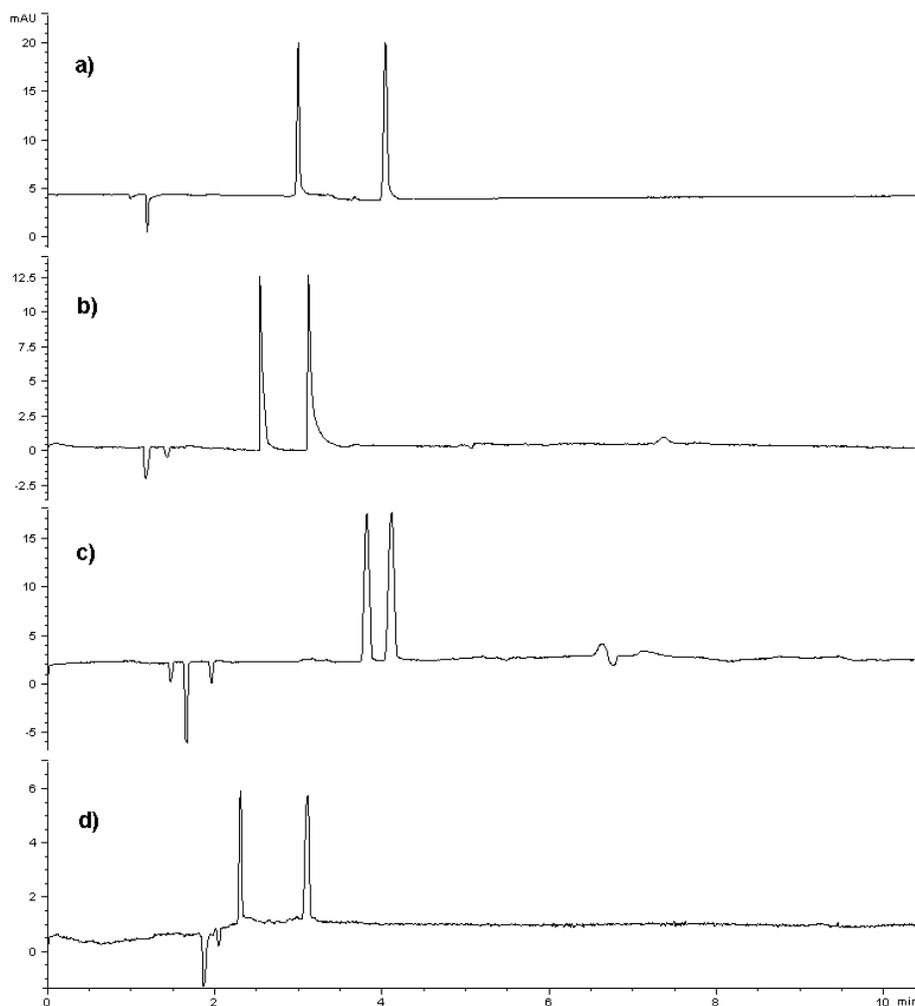


Abb. II.1-30: Chirale CD-MEEKC-Trennungen von a) Atropin, b) Scopolamin, c) Ipratropium und d) Homatropin unter Zusatz von 5 mM HDMS- $\beta$ -CD. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-28.

**HDAS- $\beta$ -CD:** Bei der Trennung der Verbindungen führten höhere Konzentrationen an HDAS- $\beta$ -CD zu unbefriedigenden Peakformen und längeren Migrationszeiten. Daher nahmen die  $R$ -Werte ab einer HDAS- $\beta$ -CD-Konzentration von 5 mM und darüber stark ab. Bei Erhöhung der HDAS- $\beta$ -CD-

Konzentration wurden die Peaks sehr breit und es ergab sich so ein kleinerer Wert für die Auflösung. Ergebnisse der Auflösung und Migrationszeit sind in Abbildung II.1-31 dargestellt.

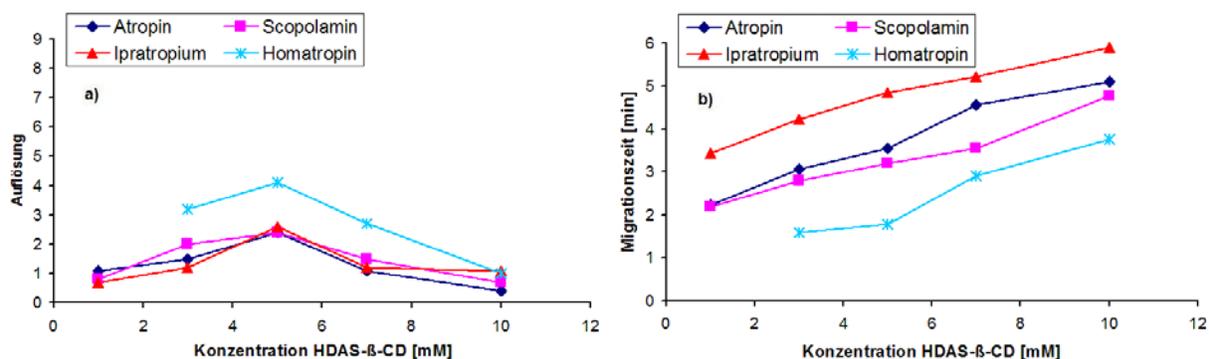


Abb. II.1-31: a) Auflösung der Enantiomere und b) Migrationszeit des jeweils zuerst detektierten Enantiomeres in Abhängigkeit von der Konzentration an HDAS-β-CD. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-28.

Abbildung II.1-31 zeigte, dass die erhaltenen *R*-Werte bei der Verwendung von HDAS-β-CD deutlich kleiner waren als die bei HDMS-β-CD. Erklären lässt sich dies mit der schwachen Komplexbildungskonstante zwischen Analyt und CD bei der Verwendung von HDAS-β-CD. Bessere Ergebnisse bei allen Verbindungen konnten mit einer HDAS-β-CD-Konzentration von 5 mM erhalten werden, die zugleich das Maximum der Auflösung darstellt (Abb. II.1-32).

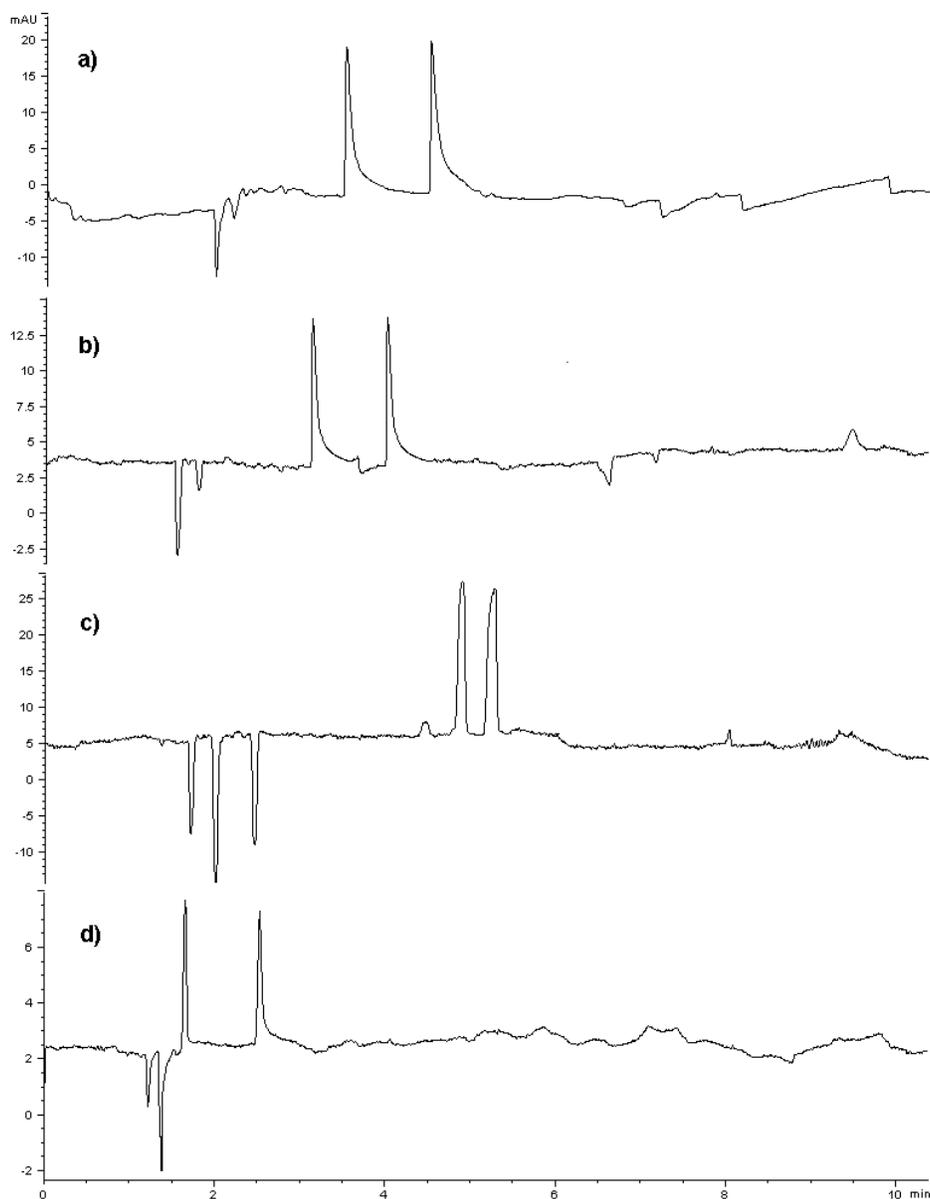


Abb. II.1-32: Chirale CD-MEEKC-Trennungen von a) Atropin, b) Scopolamin, c) Ipratropium und d) Homatropin unter Zusatz von 5 mM HDAS- $\beta$ -CD. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-28.

Insgesamt führten die Enantiomerentrennungen der Verbindungen mit HDAS- $\beta$ -CD einerseits zu breiten Peaks bis auf Ipratropium und andererseits zu sehr unruhiger Basislinie.

*Sulf*- $\beta$ -CD: Wie bei den HDMS- und HDAS- $\beta$ -CD wurde auch das ausgesuchte Sulf- $\beta$ -CD in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10 mM untersucht. Alle Tropan-Alkaloide zeigten längere Migrationszeiten, verbunden mit einer Zunahme der *R*-Werte bei Anstieg der Sulf- $\beta$ -CD-Konzentration (Abb. II.1-33)

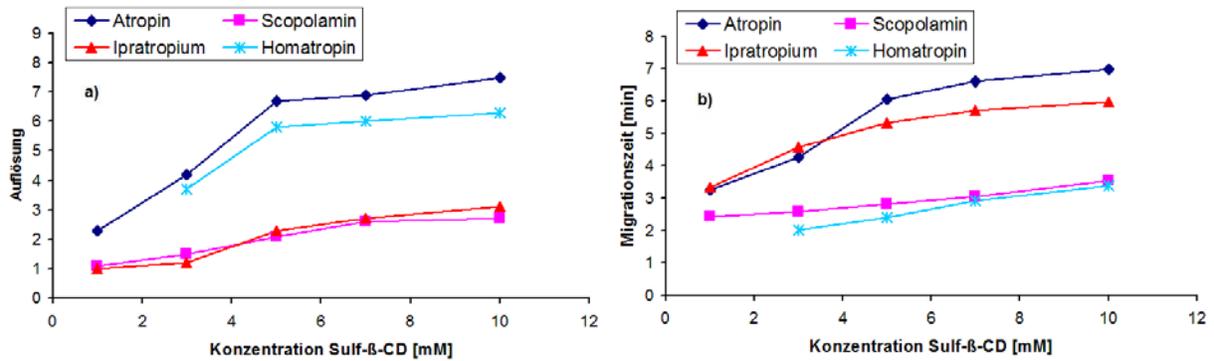


Abb. II.1-33: a) Auflösung der Enantiomere und b) Migrationszeit des jeweils zuerst detektierten Enantiomers in Abhängigkeit von der Konzentration an Sulf-β-CD. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-28.

Da die Racemate aller Verbindungen auch bei einer geringen Sulf-β-CD-Konzentration getrennt werden konnten, wurde bei den angewendeten Bedingungen ebenfalls eine Variation der Konzentration vorgenommen. Eine Sulf-β-CD-Konzentration von 3 mM führte zu größeren *R*-Werten in Bezug auf Atropin und Homatropin. Ab 5 mM zeigten auch Scopolamin und Ipratropium eine vollständige Basislinientrennung. Da bei einer Konzentration von 3 mM das erste Enantiomer des Homatropin-Racemats sehr nahe am EOF migrierte, wurde 5 mM als optimale Konzentration an Sulf-β-CD zur Trennung aller Verbindungen gewählt. Obwohl in dieser Konzentration Atropin einen *R*-Wert von 6,7 ergab, führte auch dies zur geringen Migrationszeit von 6,05 min (siehe Abb. II.1-34).

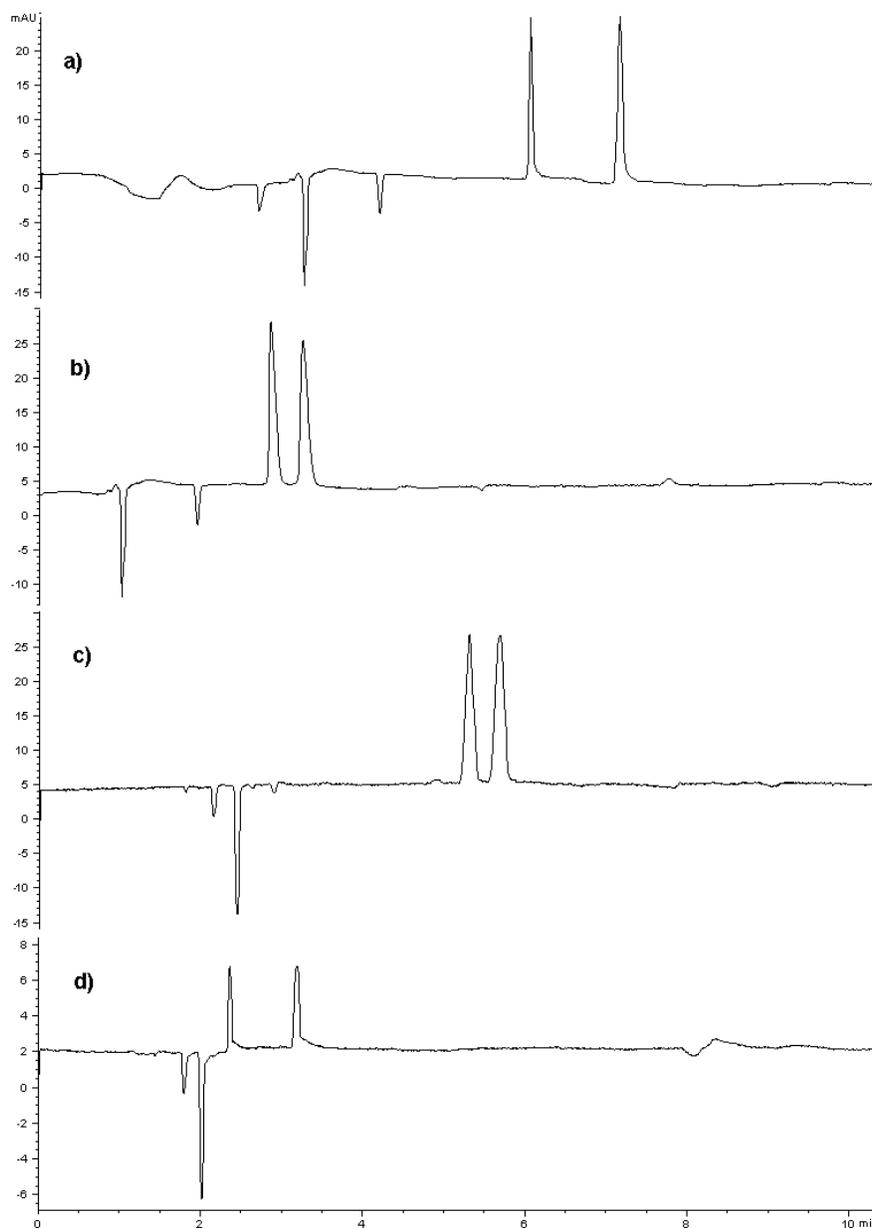


Abb. II.1-34: Chirale CD-MEEKC-Trennungen von a) Atropin, b) Scopolamin, c) Ipratropium und d) Homatropin unter Zusatz von 5 mM Sulf- $\beta$ -CD. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-28.

Im Vergleich zu HDAS- $\beta$ -CD zeigte das Sulf- $\beta$ -CD eine bessere Selektivität aller Verbindungen, die mit 5 mM an Sulf- $\beta$ -CD vollständig in ihre Enantiomere getrennt werden konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich mit den negativ geladenen  $\beta$ -CDs sehr gute Trennungen aller ausgesuchten Tropan-Alkaloide bei sehr geringeren Konzentrationen erreichen ließen. Die Trennungen mit jeweils 5 mM HDMS- und Sulf- $\beta$ -CD waren im Gegensatz zur HDAS- $\beta$ -CD viel besser in Bezug auf Selektivität bzw. Peakform. In allen Fällen waren die Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen CDs und den Verbindungen in der

Mikroemulsion demnach zu stark. Die Ursache hierfür könnten die sehr polaren Substituenten (Sulfat- und Acetylgruppen) an der weiteren Seite des  $\beta$ -CD-Torus sein. Denn ungeladene CDs, die fast keine Verbindungen bis auf Homatropin getrennt haben, tragen an dieser CD-Seite entweder unpolare (z.B. Methylgruppen bei den DM- und TM- $\beta$ -CD) oder weniger polare (Hydroxygruppen bei den nativen CDs) Substituenten, die für die Komplezierungen von Bedeutung sind.

### 1.3.3 Zusatz von organischen Lösungsmittel

Organische Modifizier wurden zur Mikroemulsion gegeben, um die Trennleistung des Systems durch Änderungen der Löslichkeit von Analyten und chiralen Selektoren sowie deren Komplexbildungskonstanten zu beeinflussen. Der Einfluss des organischen Modifiers, wie z.B. Methanol, Acetonitril und Isopropanol wurde ebenfalls auf die Auflösung und die Migrationszeiten beider Enantiomere untersucht. Hierzu wurden die bei Ipratropium erreichten Trennungen herangezogen. Da Ipratropium mit allen drei ausgesuchten geladenen  $\beta$ -CDs die kleinste Auflösung der Verbindungen ohne Modifier ergab (siehe Abb. von II.1-29 bis -34), wurde in diesem Versuch das Sulf- $\beta$ -CD in einer Konzentration von 5 mM eingesetzt. Um die Stabilität des CD-Mikroemulsionshintergrundelektrolyts zu gewährleisten,<sup>150</sup> wurde der Einfluss des organische Lösungsmittels im Konzentrationsbereich von 1-15 % für Isopropanol bzw. von 1-8 % für MeOH oder ACN getestet. Dazu wurde der entsprechende Teil des Boratpuffers in der Mikroemulsion durch den Modifier ersetzt. Die Änderungen der Auflösung bzw. der Migrationszeiten unter Zusatz des organischen Modifiers sind in Abbildung II.1-35 dargestellt.

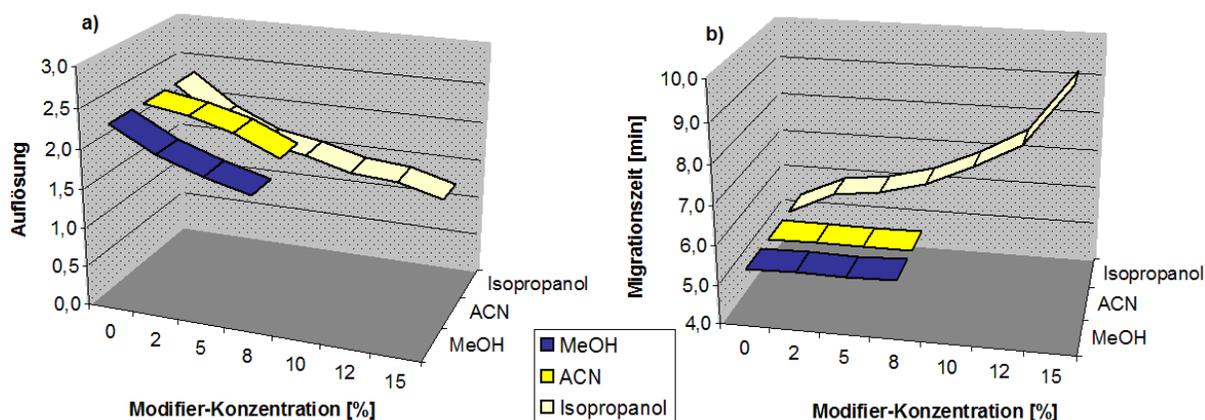


Abb. II.1-35: Änderung der a) Auflösung der Ipratropium-Enantiomere und b) Migrationszeit des zuerst detektierten Enantiomeres unter Zusatz von verschiedenen Modifiern in der Mikroemulsion mit 5 mM Sulf- $\beta$ -CD als chiraler Selektor. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.1-28.

Die Zugabe von MeOH oder ACN hatte keine signifikanten Änderungen der Migrationszeit, während Isopropanol zur Steigerung der Migrationszeit führte. Da Isopropanol weniger polar als MeOH oder ACN ist, reduziert es das Zeta-Potential an der Kapillarwand und die Stärke des EOF nimmt ab, was die Migrationszeiten verlängert.<sup>151</sup> Für die Auflösung führte die Zugabe des Modifiers zur Abnahme der *R*-Werte über den gesamten Konzentrationsbereich. Dies konnte durch die Theorie von WREN<sup>169</sup> bestätigt werden; die Zugabe von organischen Modifiern führte zur Verkleinerung der Komplexbildungskonstante zwischen den Enantiomeren und der CDs, indem sie mit den Enantiomeren um die Einlagerung in die Kavität konkurrieren. Da die verwendete Konzentration an Sulf- $\beta$ -CD (5 mM) unter dem Optimum für die maximale Auflösung der Ipratropium-Enantiomere lag (siehe Abb. II.1-33), kam es zur Abnahme der *R*-Werte. Insgesamt sank die Auflösung mit zunehmender Konzentration des Modifiers. Deshalb konnten optimale CD-MEEKC-Trennungen aller Tropan-Alkaloide ohne Einsatz eines organischen Modifiers erzielt werden.

#### 1.3.4 Methodenpräzision

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der chiralen CD-MEEKC-Trennung wurde die Methode für alle Verbindungen unter Zusatz von HDMS- $\beta$ -CD mit einer Konzentration von 5 mM durchgeführt. Die Migrationszeiten beider Enantiomere eines Racemates wurden bei 6 aufeinander folgenden Injektionen betrachtet und das Verhältnis von Migrationszeiten des zweiten Enantiomers zum ersten Enantiomer (Trennfaktor,  $\alpha$ ) errechnet. Die Ergebnisse wurden in Tabelle II.1-25 zusammengefasst.

Alkaloid	Trennfaktor $\alpha$ (n = 6)	RSD [%]
Atropin	1,36	0,87
Scopolamin	1,26	1,91
Ipratropium	1,09	1,37
Homatropin	1,36	1,86

Tab. II.1-25: Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten (Trennfaktor).

Die akzeptablen Werte der Standardabweichung (< 2 %) für den Trennfaktor aller Substanzen sind Anzeichen für eine hohe Stabilität des CD-MEEKC-Systems und gute Reproduzierbarkeit der chiralen Trennung.

### 1.3.5 Methodenvergleich CD-MEEKC und CD-modifizierte CE

Auf Basis der erhaltenen Erkenntnisse der optimierten CD-modifizierten MEEKC-Methode zur chiralen Trennung der Racemate von Atropin, Scopolamin, Ipratropium und Homatropin wurde ein Vergleich mit der von WEDIG<sup>163</sup> entwickelten CD-modifizierten CE-Methode derselben Racemate durchgeführt. Bei dieser CE-Methode konnte auch die chirale Trennung aller Racemate bis auf Scopolamin mit negativ geladenen  $\beta$ -CDs wie z.B. Sulfobutylether- $\beta$ -CD und Sulf- $\beta$ -CD erzielt werden. Somit wurde der Versuch mit Sulf- $\beta$ -CD als chiralen Selektor in einer Konzentration von 5 mM durchgeführt. Als Trennpuffer, in dem das Sulf- $\beta$ -CD gelöst wurde, erwies sich ein 50 mM TAPS-Puffer pH 10 als geeignet. Die Trennung erfolgte mit einer Spannung von 10 kV und die Kapillare wurde bei 25 °C temperiert. Tabelle II.1-26 fasst die erhaltenen Ergebnisse mit der CD-modifizierten CE-Methode sowie der CD-MEEKC-Methode in Bezug auf Enantiomerentrennung der Tropa-Alkaloide zusammen.

Alkaloid	CE-Methode					
	CD-modifizierte-CE			CD-modifizierte-MEEKC		
	MZ <sub>1</sub> [min]	MZ <sub>2</sub> [min]	R	MZ <sub>1</sub> [min]	MZ <sub>2</sub> [min]	R
Atropin	9,22	10,71	3,1	6,05	7,24	6,7
Homatropin	11,05	12,12	2,7	2,41	3,34	5,8
Ipratropium	13,51	14,62	2,1	5,32	5,72	2,3
Scopolamin	9,05	9,05	---	2,81	3,37	2,1

Tab. II.1-26: Vergleich der Enantiomerentrennung von Tropa-Alkaloiden mit der CD-modifizierten-CE- bzw. -MEEKC-Methode in Bezug auf die Migrationszeiten beider Enantiomere (MZ<sub>1</sub> und MZ<sub>2</sub>) sowie die Auflösung. Elektrophoretische Bedingungen der CE-Methode: HGE: 5 mM Sulf- $\beta$ -CDs in 50 mM TAPS Puffer pH 10 gelöst; Kapillare: Quarzglas Kapillare 40,0/48,5 cm, 75  $\mu$ m ID; Spannung 10 kV; Injektion: 5 s mit 50 mBar; Temperatur: 25 °C; Detektion: 195 nm (UV). Für elektrophoretische Bedingungen der MEEKC-Methode siehe Abb. II.1-28.

Die in dieser Arbeit entwickelte CD-MEEKC-Methode führte im Vergleich zur CD-CE-Methode zu kürzeren Migrationszeiten und besseren Auflösungen. Die geringeren R-Werte mit der CD-CE-Methode sind auf die breiten Peaks der Enantiomere zurückzuführen (siehe Abb. II.1-36). Somit zeigte die CD-MEEKC-Methode in Bezug auf die Peakformen eine bessere Trennung.

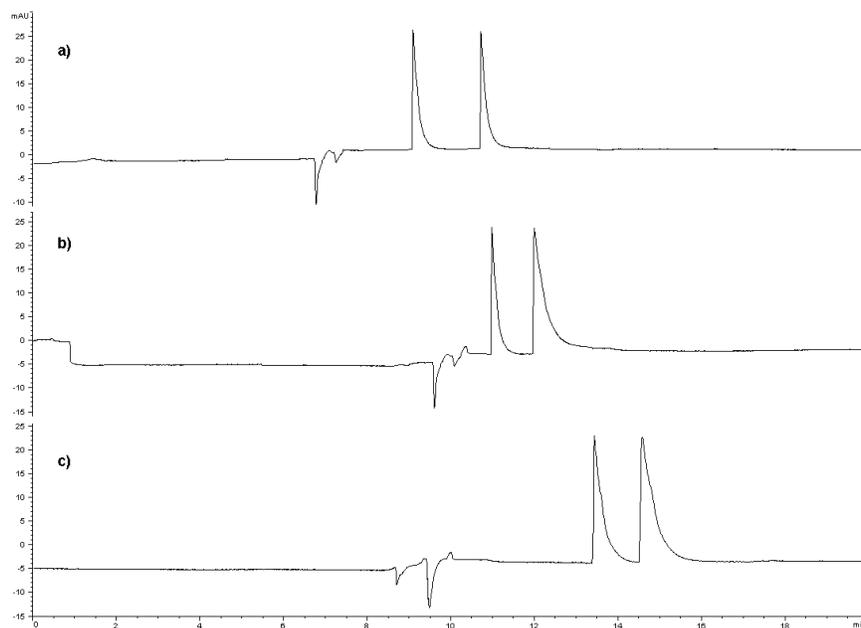


Abb. II.1-36: Elektropherogramme der Enantiomerentrennung der Racemate von a) Atropin, b) Homatropin und c) Ipratropium mit der CD-modifizierte CE-Methode. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Tab. II.1-26. Für andere Bedingungen siehe Lit<sup>163</sup>.

Bei diesen Versuchen wurde noch ein zusätzlicher Unterschied zwischen beiden Methoden beobachtet. Mit der CD-modifizierten CE-Methode wurde unter Zusatz verschiedener negativ geladener  $\beta$ -CD-Derivate keine Trennung des Racemates von Scopolamin erzielt, da der Epoxy-Ring eine Komplexbildung zwischen dem Scopolamin und dem CD verhindern konnte.<sup>163</sup> Diese Komplexbildung war mit Hilfe eines CD-MEEKC-Systems offensichtlich möglich, so dass es zu einer guten Enantiomerentrennung von Scopolamin kam. Es kann aber auch sein, dass beide Enantiomeren des Scopolamins so stark komplexieren, dass man im CD-CE-Modus keine Unterschiede sieht. Wenn man nun die Komplexbildung behindert, dann werden die Unterschiede deutlicher. Damit kann man eventuell alle besseren *R*-Werte mit der MEEKC-Methode begründen. Das ist in Analogie zum Gebrauch von organischen Modifiern, die ebenso eine zu starke Komplexbildung verhindern.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich mit sehr geringen Konzentrationen an negativ geladenen  $\beta$ -CDs (HDMS-, HDAS, und Sulf- $\beta$ -CD) gute Trennungen aller vier Tropan-Alkaloide erreichen ließen. Die erhaltene Auflösung sank mit zunehmender Konzentration des zugegebenen Modifiers. Eine Kombination zwischen CD und SDS-Mikroemulsion lässt gute Rückschlüsse auf die mögliche Komplexbildung zwischen dem Analyt und CD zu. Interessant ist, dass das Racemat von Scopolamin nicht mit der CD-modifizierten CE-Methode, sondern nur mit CD-MEEKC-Methode getrennt werden konnte.

## 2 Chirale Trennung von Aziridin-Derivaten

### 2.1 Übersicht

Aziridine sind gesättigte dreigliedrige Heterocyclen mit einem Stickstoffatom und gehören zu einer Gruppe irreversibler Inhibitoren sowohl von Cystein-<sup>170</sup> als auch von Aspartat-Proteasen.<sup>171</sup> Die Hemmwirkung der Aziridine geht zurück auf einen nucleophilen Angriff der HS-Cystein-Gruppe der Cystein-Proteasen bzw. des Wassers, das sich im aktiven Zentrum der Aspartat-Proteasen befindet, wodurch der Aziridinring geöffnet und dann eine kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Protease ausgebildet wird. Diese Ringöffnung führt letztlich zur irreversiblen Hemmung der Proteasen. Da die Proteasen an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen beteiligt sind, werden ihre Inhibitoren (Aziridine) bei entsprechenden Erkrankungen wie z. B. Alzheimer, Brustkrebs, AIDS und Malaria verwendet.<sup>172</sup>

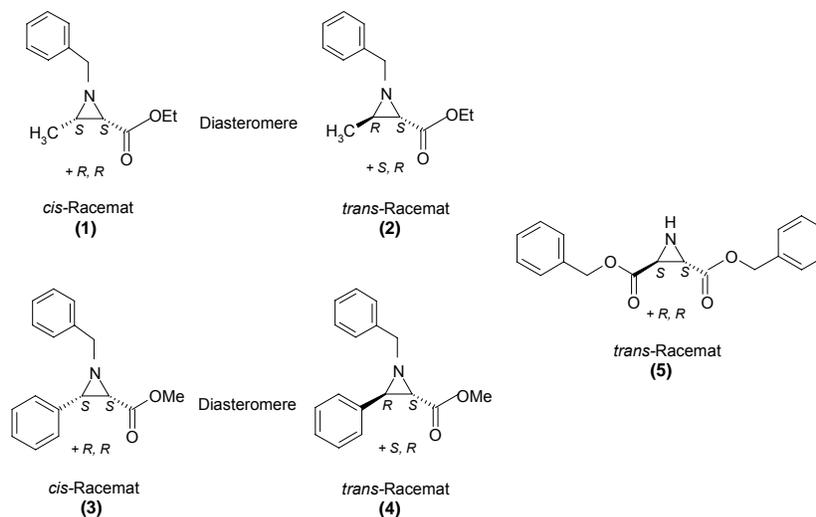


Abb. II.2-1: Strukturen der Aziridin-Derivate

Die Aziridin-Derivate (1-5) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schirmeister vom Institut für Pharmazie der Universität Würzburg synthetisiert. Die Verbindungen besitzen jeweils zwei Chiralitätszentren und können daher in *cis*- oder *trans*-Form vorliegen. Die Verbindungen gehören entweder zur Gruppe der *N*-Benzylaziridin-2-carboxylate (1-4) oder der Aziridin-2,3-dicarboxylate (5).

Bei der Hemmung der Cystein-Proteasen sind sowohl die *S,S*-Isomere als auch *R,R*-Isomere wirksam. Während die *trans*-Konfiguration für eine Hemmung von Cystein-Proteasen unerlässlich ist, sind *cis*-konfigurierte Aziridine Aspartat-Protease-Inhibitoren. Die Aziridin-2-carboxylate wurden jeweils (1/2 und 3/4) als ein Gemisch der *cis*- bzw. *trans*-Racemate synthetisiert. Die Diastereomeren dieser Verbindungen konnten mittels Säulenchromatographie an Kieselgel 60 als

Racemate (**1-4**) getrennt werden. Die Verbindungen **1** und **5** wurden durch stereoselektive Synthese als reine Enantiomere erhalten.<sup>173,174</sup> Zur Prüfung auf Enantionerenreinheit dieser Enantiomere wurde die unselektive Polarimetrie eingesetzt.

## 2.2 Aufgabenstellung

Wie bereits erwähnt, wurden für die biologische Testung von neuen Aziridin-Derivaten als potentielle neue Protease-Inhibitoren nur diastereomerenreine Verbindungen eingesetzt. Daher sollte die Diastereomerenreinheit der Aziridin-Derivate kontrolliert werden. Zu diesem Zweck wurde eine CD-modifizierte CE-Methode zur Enantiomeren- bzw. Diastereomerentrennung von Aziridin-Derivaten entwickelt. Wegen der zwei Phenylreste sind die Verbindungen **3**, **4** und **5** extrem lipophil, so wurden die Trennungen im wasserfreien sowie im wässrigen System durchgeführt. Zur chiralen Trennung der Aziridine wurden sowohl native CDs als auch negativ geladene  $\beta$ -CD-Derivaten als chirale Selektoren getestet. Ziel war es, ein CD als geeigneten chiralen Selektor für alle synthetisierten Aziridin-Derivate zu finden. Schlussendlich sollten die chirale Trennungen der Verbindungen in wässrigem mit denen in wasserfreiem Medium verglichen werden.

## 2.3 Methodenentwicklung

### 2.3.1 Wasserfreie CE-Methode

Die wasserfreie CE (NACE, nonaqueous capillary electrophoresis) dient unter Zusatz von Cyclodextrinen (CD-NACE) der Trennung schwer wasserlöslicher chiraler Substanzen.<sup>112,175</sup> Die Eigenschaften des Lösungsmittels wie z.B. Dielektrizitätskonstante und Viskosität haben einen unmittelbaren Effekt auf Analysenzeit, Peakeffizienz und Auflösung. Die  $pK_a$ -Werte der Analyten sind im Lösungsmittel gegenüber Wasser unterschiedlich, was direkten Einfluss auf die relative Mobilität der Substanzen hat. Im Gegensatz zur wässrigen CE, bei der chirale Trennungen überwiegend auf der Bildung von Cyclodextrin-Einschlussverbindungen beruhen, werden in der NACE vorwiegend Ion-Ion- oder Ion-Dipol-Wechselwirkung zwischen Analyt und chiralem Selektor genutzt. Die Bildung diastereomerer Komplexe zwischen positiv geladener Analyt und negativ geladenen CDs ist die wichtigste Wechselwirkung, die für chirale NACE-Trennungen genutzt wird.<sup>176</sup>

Die hier untersuchten Aziridin-Derivate (**1-5**) sind schwer löslich in Wasser, aber lösen sich leicht in Methanol oder Acetonitril. Obwohl ACN eine relativ höhere Dielektrizitätskonstante sowie eine niedrigere Viskosität in Vergleich zum MeOH hat, wurde MeOH bei der Methodenentwicklung als Lösungsmittel gewählt, da sich die verwendeten  $\beta$ -CD-Derivate darin gut lösen. Die chiralen Trennungen der Aziridin-Verbindungen erfolgten in einem sauren methanolischen Puffer unter

Zusatz von isomerenreinen HDMS- oder HDAS- $\beta$ -CD als chirale Selektoren des CD-NACE-Systems. Im Hinblick auf das CHARM-Modell von VIGH sollte der methanolische Puffer eine hohe Kapazität und einen niedrigen pH-Wert aufweisen.<sup>177</sup> Dabei wurde Methanol, je nach verwendetem CD, sowohl mit einer Säure (z.B. Phosphorsäure oder Chloressigsäure) als auch einer entsprechenden Base wie Natronlauge oder Triethylamin in einer Konzentration von 0,02 bzw. 0,01 M versetzt. In dem sauren methanolischen Puffer lagen die basischen Verbindungen (**1-5**) als Kationen vor und wandern durch ihre elektrophoretische Mobilität zum Detektor. Da die negativ geladenen  $\beta$ -CDs zur Anode wandern und damit den basischen Verbindungen entgegen, ist eine chirale Trennung sehr wahrscheinlich. Des weitern können sich unter diesen Bedingungen durch Ion-Ion- oder elektrostatische Wechselwirkung zwischen den kationischen Analyten und anionischen CD starke Komplexe ausbilden. Die Versuche wurden mit einer unbeschichteten Kapillare von 50  $\mu$ m Innendurchmesser und 29,0/39,0 cm Länge durchgeführt. Die Kapillare wurde auf 20 °C temperiert und eine Trennungsspannung von 10 kV angelegt. Alle Racemate konnten auf Grund der Phenyl-Reste bei 214 nm detektiert werden. Die Diastereomeren- bzw. Enantiomerentrennung aller Verbindungen (**1-5**) wurden durch Variationen der Konzentration an negativ geladenen  $\beta$ -CDs erzielt und optimiert.

*HDMS- $\beta$ -CD*: Ein methanolischer Puffer mit 20 mM Phosphorsäure und 10 mM Natriumhydroxid wurde als Hintergrundelektrolyt eingesetzt, in dem das HDMS- $\beta$ -CD in Konzentration von bis zu 10 mM bzw. 35 mM gelöst wurde. In Abhängigkeit von der Konzentration ergaben sich für das zuerst detektierte Enantiomer jeder Verbindung in Bezug auf die Auflösung und Migrationszeit folgende Ergebnisse.

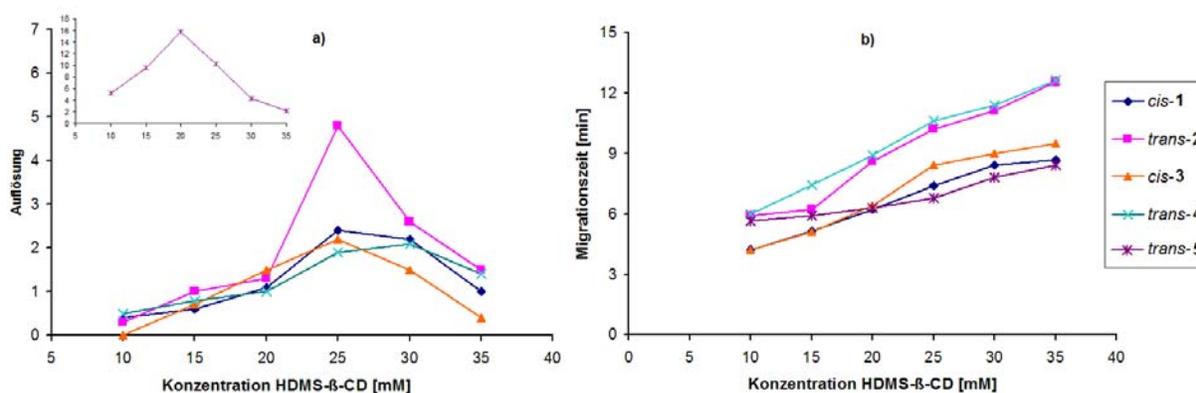


Abb. II.2-2: a) Auflösung der Enantiomere und b) Migrationszeit des jeweils zuerst detektierten Enantiomeres in Abhängigkeit von der Konzentration an HDMS- $\beta$ -CD unter NACE Bedingungen: MeOH-HGE: 20 mM  $H_3PO_4$ , 10 mM NaOH, x mM  $\beta$ -CDs; Kapillare: Quarzglas Kapillare 29,0/39,0 cm, 50  $\mu$ m ID; Spannung 10 kV; Injektion: 10 s mit 5 kV; Temperatur: 20 °C; Detektion: 214 nm (UV).

Die Enantiomere aller Verbindungen konnten getrennt werden. Generell stieg mit der HDMS- $\beta$ -CD-Konzentration die Auflösung zuerst, durchlief dann ein Maximum und nahm bei höheren Konzentrationen wieder ab; die Verbindungen **1-4** und **5** erreichten ihr Auflösungsmaximum bei Konzentration von 25 bzw. 20 mM. Betrachtet man die Strukturformeln (Abb. II.2-1), so ist auffällig, dass der Aziridin-Ring in allen Verbindungen ein verschiedenes Substitutionsmuster der Phenylgruppen aufzeigen. Diese Beobachtung führt zu dem Schluss, dass sein Substitutionsmuster für Qualität der Trennung (Auflösung) verantwortlich ist. Der unsubstituiert Stickstoff bei dem Racemat **5** führte zu extrem hoher Auflösung im Vergleich zu den Racematen **1-4**, die eine Benzyl-Gruppe am Stickstoff tragen. Alle Verbindungen zeigten auch eine Zunahme der Migrationszeiten (Abb. II.2-2) mit Anstieg der HDMS- $\beta$ -CD-Konzentration. Die *cis*-Racemate **1** und **3** hatten kürzere Migrationszeiten im Vergleich zu den *trans*-Racematen **2** und **4**, so konnten bei einer Konzentration von 25 mM eine Basislinientrennung des Diastereomerenpaars **1/2** sowie **3/4** erzielt werden.

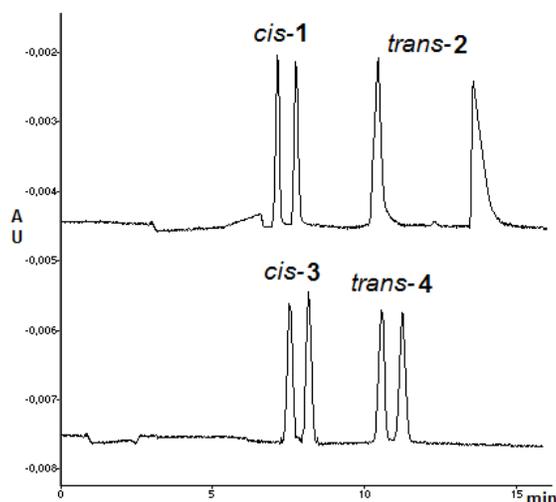


Abb. II.2-3: Diastereomerentrennung der Racemate **1/2** bzw. **3/4** unter Zusatz von 25 mM HDMS- $\beta$ -CD mittels CD-NACE. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.2-2. Für die Zuordnung der Racemate siehe Abb. II.2-1.

*HDAS- $\beta$ -CD*: Alle Verbindungen **1-5** wurden in gleicher Weise wie bei HDMS- $\beta$ -CD getestet. HDAS- $\beta$ -CD wurde in Konzentrationen von 2 bis 15 mM zum methanolischen Puffer zugesetzt, der mit 20 mM Chloressigsäure und 10 mM Triethylamin versetzt wurde, damit eine hohe Löslichkeit des HDAS- $\beta$ -CD in MeOH gewährleistet war. Die Enantiomere aller Racemate **1-5** konnten basisliniengetreunt werden (Abb. II.2-4).

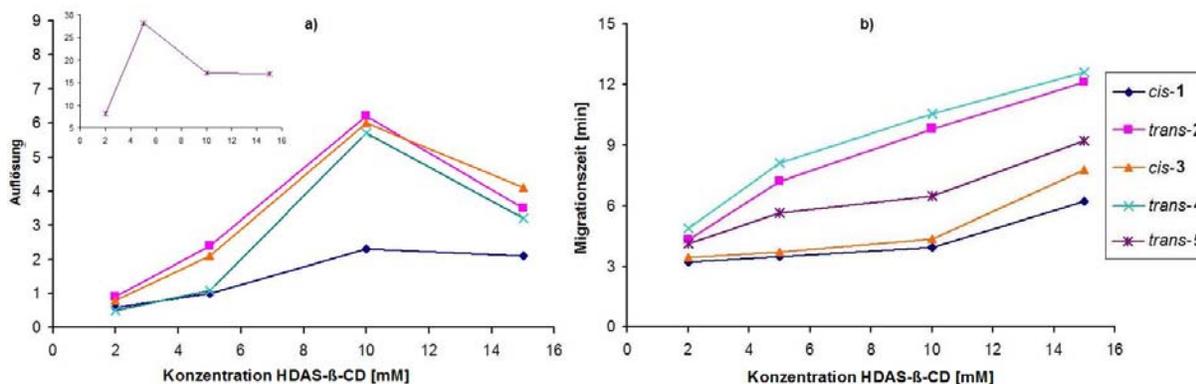


Abb. II.2-4: a) Auflösung der Enantiomere und b) Migrationszeit des jeweils zuerst detektierten Enantiomeres in Abhängigkeit von der Konzentration an HDAS-β-CD. Für NACE Bedingungen siehe Abb. II.2-2.

Für die Trennungen schienen wie bei HDMS-β-CD vor allem Komplexierungen mit den Benzylgruppen verantwortlich zu sein, die racemischen "N-Benzyl-Aziridine" zeigten ein ähnliches Trennverhalten. Im Gegensatz zu HDMS-β-CD erreichten die Racemate **1-4** und **5** ein Auflösungsmaximum bei geringen HDAS-β-CD-Konzentrationen von 10 bzw. 5 mM. Die Konzentration von 10 mM erwies sich für die Diastereomerentrennung der Racemate **1/2** sowie **3/4** als geeignet (siehe Abb. II.2-5).

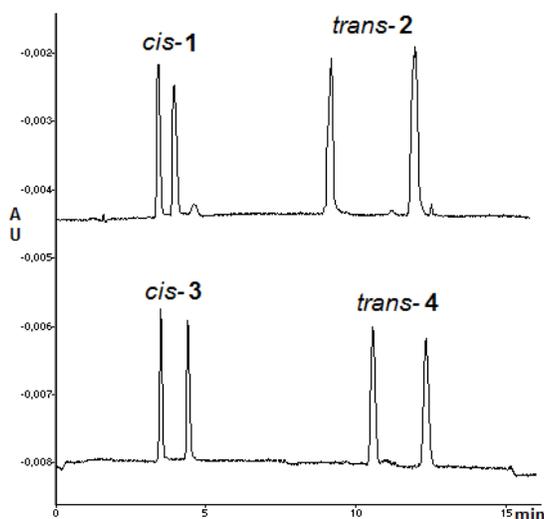


Abb. II.2-5: Diastereomerentrennung der Racemate **1/2** bzw. **3/4** unter Zusatz von 10 mM HDAS-β-CD mittels CD-NACE. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.2-2. Für die Zuordnung der Racemate siehe Abb. II.2-1.

Die Diastereomeren- bzw. Enantiomerentrennung mit HDAS-β-CD führte im Vergleich zu der mit HDMS-β-CD zu hohen Auflösungswerten und besseren Peakformen der einzelnen Enantiomere. Dies konnte über den erhaltenen korrigierten Strom in Bezug auf die Viskosität des

methanolischen HGE (siehe Anhang V.3.1) erklärt werden. Mit 10 mM HDAS- $\beta$ -CD betrug der korrigierte Stromwert 12,3  $\mu$ A und was damit doppelt so hoch wie der mit 25 mM HDMS- $\beta$ -CD von 6,5  $\mu$ A.

Zusammenfassung kann man sagen, dass mit NACE unter Zusatz von HDAS- und HDMS- $\beta$ -CD sehr gute Enantiomeren- und/oder Diastereomerentrennungen aller Aziridin-Racemate erzielt werden konnten. Das Trennverhalten und die Komplexbildung hängen von den Substituenten am Aziridin-Ring ab. HDAS- $\beta$ -CD konnte im sauren methanolischen Puffer als guter chiraler Selektor für die Serie der phenyl-substituierten Aziridin-Derivate eingesetzt werden.

### 2.3.2 Wässrige CE-Methode

Die Trennungsversuche der Enantiomere der Verbindungen **1-5** erfolgte zusätzlich unter Zusatz neutralen und negativ geladenen  $\beta$ -CD. Die Vorversuche mit nativen CDs ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD) sowie DM- und TM- $\beta$ -CD zeigten allerdings keine Basislinientrennung der Racemate über den gesamten pH-Bereich von 2 bis 10. Gemäß dem von VIGH<sup>123</sup> formulierten CHARM-Modell wurde für negativ geladene  $\beta$ -CD ein pH-Wert des Phosphatpuffers von 2,5 verwendet. Bei diesem pH-Wert lagen alle Verbindungen als Kationen vor und wandern aufgrund ihrer eigenen elektrophoretischen Mobilität zum Detektor. Da die anionischen  $\beta$ -CD-Derivate zur Anode wandern und damit den kationischen Racematen direkt entgegen, können sich häufig Komplexe zwischen den kationischen Verbindungen und anionischen  $\beta$ -CDs ausbilden, was eine Trennung ermöglicht.

Die verwendete Kapillare hatte eine Länge von 29,0/39,0 und einem Innendurchmesser von 50  $\mu$ m. Die Trennungen erfolgten bei einer Temperatur von 25 °C und einer Spannung von 15 kV. Drei verschiedene  $\beta$ -CD-Derivate (Sulf-, HDAS-, und HDMS- $\beta$ -CD) wurden dem 50 mM Phosphatpuffer pH 2,5 zugesetzt und ihr Einfluss auf die Trennung getestet.

*Sulf- $\beta$ -CD*: Da von geladenen CDs bekannt ist, dass sie bereits in geringeren Konzentrationen zu guten Trennungen führen, wird hier der Konzentrationsbereich von 0,5 bis 4 mM Sulf- $\beta$ -CD untersucht. Die Ergebnisse der Auflösung und Migrationszeiten sind in Abb. II.2-6 dargestellt.

Alle Racemate **1-5** konnten mit Sulf- $\beta$ -CD als chiraalem Selektor im wässrigen Puffer getrennt werden. Wie aus Abbildung II.2-6 zu erkennen ist, nahmen die *R*-Werte mit zunehmender Konzentration an Sulf- $\beta$ -CD deutlich zu bis zu einem Maximum zwischen 1,0 und 2,0 mM. Gleichzeitig verlängerten sich die Migrationszeiten durch die zunehmende Wanderung der CDs in Richtung der Anode.

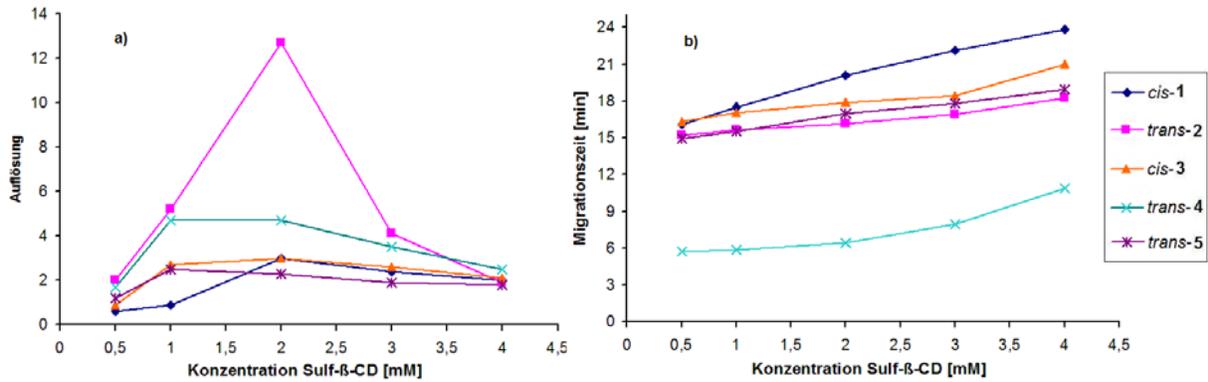


Abb. II.2-6: a) Auflösung der Enantiomere und b) Migrationszeit des jeweils zuerst detektierten Enantiomeres in Abhängigkeit von der Konzentration an Sulf-β-CD unter folgende Bedingungen: HGE: 50 mM Phosphatpuffer pH 2,5, x mM β-CDs; Kapillare: Quarzglas Kapillare 29,0/39,0 cm, 50 μm ID; Spannung 15 kV; Injektion: 10 s mit 0,5 psi; Temperatur: 25 °C; Detektion: 214 nm (UV).

Im Gegensatz zu NACE ergaben sich für die Trennungen in wässrigen Puffer mit Sulf-β-CD unbefriedigende Peakformen (breite Peaks). Die Probenvorbereitung hatte einen wichtigen Einfluss auf die Trennung sowie die Peakformen. Die Verwendung von Acetonitril zur Lösen der Aziridin-Derivate führte zur schlechten Peakformen und sehr großen Migrationszeiten. Erklären lässt sich dies mit den schwachen Wechselwirkungen zwischen Enantiomeren und CD in der ACN-Probezone in der Kapillare. Verbessert wurde diese durch die Verdünnung der ACN-Stammlösung durch tropfenweise Zugabe des verwendeten Puffers (siehe Abb. II.2-7). In der Art wurde fortgefahren, bis das zur Verdünnung notwendige Volumen erreicht war. Durch diese optimale Probenvorbereitung ergaben sich für die wässrigen Trennungen bessere Peakformen und kürze Migrationszeiten.

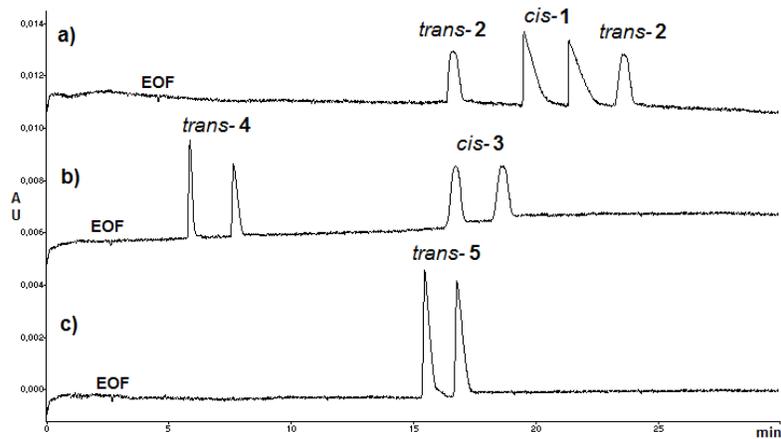


Abb. II.2-7: a), b) Diastereomerentrennung der Racemate 1/2 und 3/4 unter Zusatz von 2,0 bzw. 1,0 mM Sulf-β-CD und c) Enantiomerentrennung der Racemate 5 unter Zusatz von 1,0 mM Sulf-β-CD. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.2-6. Für die Zuordnung der Racemate siehe Abb. II.2-1.

Wie aus Abb. II.2-7 zu erkennen ist, konnten die Diastereomerentrennungen mit geringen Sulf- $\beta$ -CD-Konzentrationen erreicht werden. Diese betrug 2,0 und 1,0 mM für das Diastereomerpaar **1/2** bzw. **3/4**, da bei diesen Konzentrationswerten eine vollständige Basislinientrennung aller vier Isomere erzielt werden konnte.

Aus den Elektropherogrammen a und b wird die gegenüber der NACE-Methode umgekehrte Migrationsreihenfolge zwischen *cis*- und *trans*-Racemate ersichtlich (verg. Abb. II. 2-3, -5 und -7). Wahrscheinlich war die Komplexbildung im wässrigen Puffer zwischen Sulf- $\beta$ -CDs und *cis*-Racemat stärker als die mit dem *trans*-Racemat.

*HDAS*- $\beta$ -CD: Obwohl nur Konzentrationen von 1,0 bis 5 mM eingesetzt wurden, ergaben sich allgemein lange Migrationszeiten verbunden mit sehr breiten Peaks. Diese führten zu geringen *R*-Werte im Vergleich zu Trennungen mit Sulf- $\beta$ -CD.

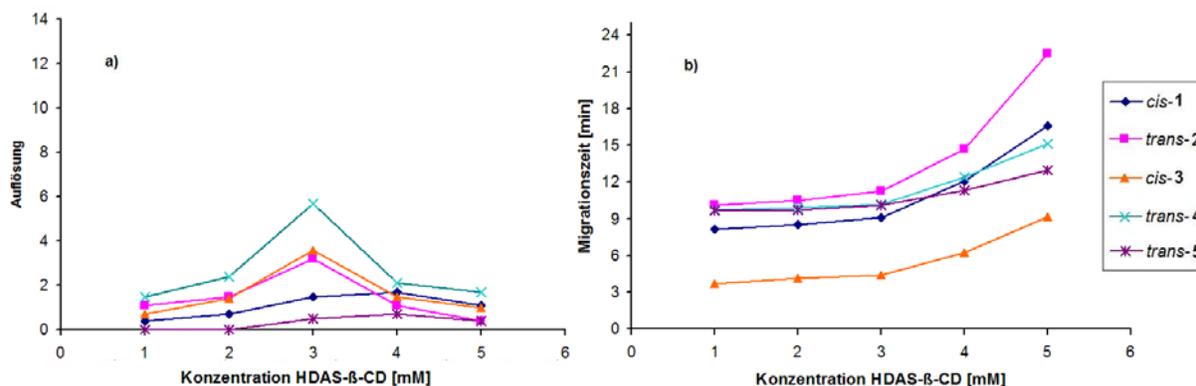


Abb. II.2-8: a) Auflösung der Enantiomere und b) Migrationszeit des jeweils zuerst detektierten Enantiomeres in Abhängigkeit von der Konzentration an HDAS- $\beta$ -CD. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.2-6.

Das Racemat **5** zeigte unter diesen Bedingungen über den gesamten Konzentrationsbereich von 1,0 bis 5,0 mM keine vollständige Basislinientrennung ( $R < 1,4$ ).

Außerdem wurden organische Modifiern wie MeOH oder ACN in Konzentration von 1,0 bis 10 % zum Phosphatpuffer pH 2,5 gegeben. Dadurch ließen sich die schlechten Peakformen allerdings nicht verbessern. Die Erhöhung der angelegten Spannung auf 20 kV führte zu einer unruhigen Basislinie. Aufgrund dieser nicht befriedigenden Ergebnisse kann festgestellt werden, dass HDAS- $\beta$ -CD in wässrigen Puffer nur eine schwache chirale Trennleistung besitzt.

*HDMS*- $\beta$ -CD: Wieder wurden Konzentrationen von 2,0 bis 8,0 mM getestet. Im Vergleich zu HDAS- $\beta$ -CD zeigte das HDMS- $\beta$ -CD eine bessere Selektivität (siehe Abb. II.2-9). Von den Aziridin-Racematen konnten nur *trans*-**2** und *cis*-**3** mit 7,0 bzw. 5,0 mM getrennt werden. Ein Anstieg der

HDMS- $\beta$ -CD-Konzentration bis zu 20 mM zeigte keine Basislinientrennung der anderen Racemate, die zusätzlich innerhalb von 45 Minuten den Detektor erreichten.

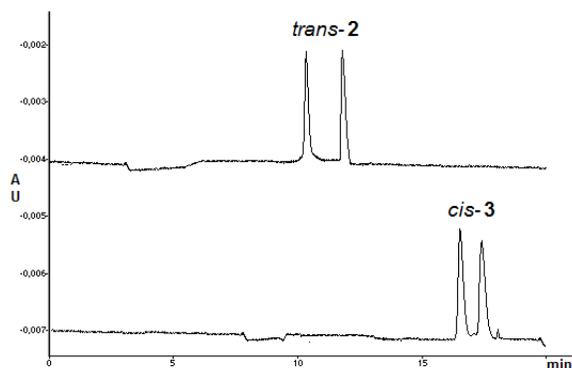


Abb. II.2-9: Enantiomerentrennung der Racemate **2** und **3** unter Zusatz von 7,0 bzw. 5,0 mM HDMS- $\beta$ -CD. Für elektropheretische Bedingungen siehe Abb. II.2-6. Für die Zuordnung der Racemate siehe Abb. II.2-1.

Eine Kombination von 7 mM HDMS- $\beta$ -CD mit 5 % (w/w) HDAS- $\beta$ -CD führte zur Trennung des Diastereomerenpaares **1/2** und **3/4**. Allerdings war die Migrationszeit des letzten Enantiomers mit etwa 48 bzw. 27 Minuten recht lang (siehe Anhang V.3.1). Des Weiteren waren die Peaks aufgrund der Verwendung von HDAS- $\beta$ -CD sehr breit und hatten infolgedessen geringere theoretische Bodenzahlen ( $N$ ). Die  $N$ -Werte betragen mit unter 5700 nur noch ein Zehntel bis Zwanzigstel des üblichen. Auf Diastereomerentrennungen mit der Kombination von HDMS- und HDAS- $\beta$ -CD wurden aufgrund der extrem langen Migrationszeiten verzichtet.

Im basischen Medium konnte nur das Racemat *trans-5* in 50 mM Phosphatpuffer pH 9,4 und mit einer HDMS- $\beta$ -CD-Konzentration von 1,0 mM getrennt werden. Die Enantiomerentrennung ergab eine hohe Auflösung mit kürzen Migrationszeiten, da bei diesem pH-Wert der EOF genügend stark ist, um die anionischen CD-Analyt-Komplexe zum Detektor zu transportieren.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich mit negativ geladenen  $\beta$ -CDs sehr gute bis gute Enantiomeren- und Diastereomerentrennungen der Aziridin-Derivate in NACE bzw. wässriger CE erreichen ließen. Während die Trennungen in NACE hohe Auflösungen und kurze Migrationszeiten ergaben, erfolgten die Trennungen in wässrigen Puffern mit geringeren Konzentrationen an  $\beta$ -CD-Derivaten, insbesondere mit Sulf- $\beta$ -CD (1,0-2,0 mM). HDAS- $\beta$ -CD in NACE und Sulf- $\beta$ -CD in wässriger CE erwiesen sich als gute chirale Selektoren für die Serie der Aziridin-Derivate, die mit mindestens einem Phenyl-Rest am Aziridin-Ring substituiert sind.

## 2.4 Methodvalidierung

Im Hinblick auf die Diastereomerenreinheit von *trans*-Racemat **2** im *cis*-Racemat **1** wurde die wässrige Methode mit Phosphatpuffer pH 2,5 und 2,0 mM Sulf- $\beta$ -CD zur Diastereomerentrennung des Gemisch **1/2** validiert.

Zur Validierung der CD-modifizierten CE-Methode zur Diastereomerenreinheitsbestimmung von Racemat-*cis*-**1** wurden unter Berücksichtigung der ICH-Richtlinie Q2(R1)<sup>128</sup> die Parameter Selektivität, Linearität, Arbeitsbereich, Präzision, Richtigkeit und Robustheit bestimmt. Zusätzlich wurde die Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt. Abbildung II.2-10 zeigt die Diastereomerentrennung mittels CD-modifizierter CE-Methode, deren Validierungsergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

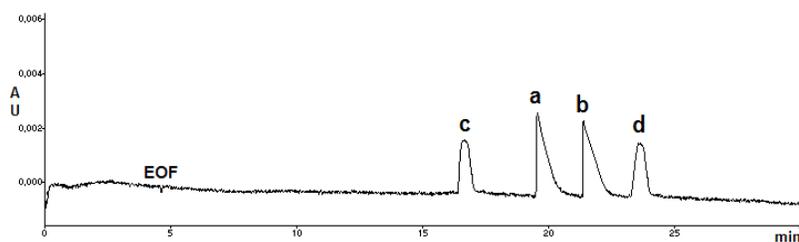


Abb. II.2-10: Chirale Trennung des Diastereomergemischs aus Racemat-*cis*-**1** (Peaks **a** und **b**) und Racemat-*trans*-**2** (Peaks **c** und **d**) unter optimalen wässrigen CE- Bedingungen: HGE: 50 mM Phosphatpuffer pH 2,5, 2 mM Sulf- $\beta$ -CD; Kapillare: Quarzglas kapillare 29,0/39,0 cm, 50  $\mu$ m ID; Spannung 15 kV; Injektion: 10 s mit 0,5 psi; Temperatur: 25  $^{\circ}$ C; Detektion: 214 nm (UV).

### 2.4.1 Selektivität

Mit der entwickelten CD-CE-Methode wurden die zwei Peaks des *trans*-**2**-Racemats von den zwei Hauptpeaks des *cis*-**1**-Racemats abgetrennt. Zur Identifizierung aller vier Peaks **a-d** wurde im Diastereomergemisch jeweils ein Racemat im Überschuss zugesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass die Peaks **a** und **b** zum *cis*-**1**- Racemat sowie Peak **c** und **d** zum *trans*-**2**-Racemat gehören. In der folgenden Tabelle sind die Auflösungsweite ( $R$ ) zwischen den aufeinander folgenden Peaks und die relative Migrationszeit (RMZ) der einzelnen Isomere in Bezug auf Peak **a** als erstes Enantiomer der Hauptkomponente (*cis*-**1**) aufgeführt.

Isomer	$R$	RMZ
<b>c</b>	---	0.803
<b>a</b>	$R_{a,c}$	6,21
<b>b</b>	$R_{b,a}$	2,90
<b>d</b>	$R_{d,b}$	2,48

Tab. II.2-1: Auflösungswerte und relative Migrationszeiten.

#### 2.4.2 LOQ, LOD, Arbeitsbereich und Linearität

In Hinblick auf die Diastereomerenreinheitsprüfung des *cis*-1-Racemats wurde die Bestimmung- und Nachweisgrenze der Verunreinigung (*trans*-2-Racemat) bei 15 kV in einem 50 mM Phosphatpuffer pH 2,5 ohne Zusatz des Sulf- $\beta$ -CD ermittelt. Die LOQ wurde mittels des Signal-Rausch-Verhältnisses bestimmt und betrug für das *trans*-Racemat 5,0  $\mu\text{g/ml}$ . Bei einer nominalen Probenkonzentration des *cis*-Racemates von 2,0 mg/ml entspricht der Wert einem Anteil von 0,25 % Verunreinigung für das *trans*-Racemat. Um die Empfindlichkeit der CE-Methode zu ermitteln, wurde auf gleiche Weise die LOD bestimmt. Es betrug 0,10 % (2,0  $\mu\text{g/ml}$ ) bezüglich der festgelegten Probekonzentration von 2,0 mg/ml.

Die Linearitätsüberprüfung wurde innerhalb des Arbeitsbereiches von 5,0  $\mu\text{g/ml}$  bis 50  $\mu\text{g/ml}$  durchgeführt, was einem prozentualen Anteil des *trans*-Racemates an der Probekonzentration des *cis*-Racemates (2,0 mg/ml) von 0,25 bis 2,5 % entspricht. Hierfür wurden 8 Standardlösungen dreifach vermessen. Um die Fehler sowohl durch Druck- und Temperaturschwankungen bei der hydrodynamischen Injektion der Probelösung (in diesem Fall 10 Sekunden) als auch durch Verdünnung der Probelösungen zu minimieren, wurde für die Diastereomerenreinheit das *cis*-Racemat als externer Standard (ES) in einer Konzentration von 2,0 mg/ml verwendet. Unter Berücksichtigung der korrigierten Peakflächen wurde aus dem Verhältnis von korrigierten Peakflächen beider Enantiomere des *trans*-Racemates zum *cis*-Racemat (ES) mittels linearer Regression eine Kalibriergerade erstellt.

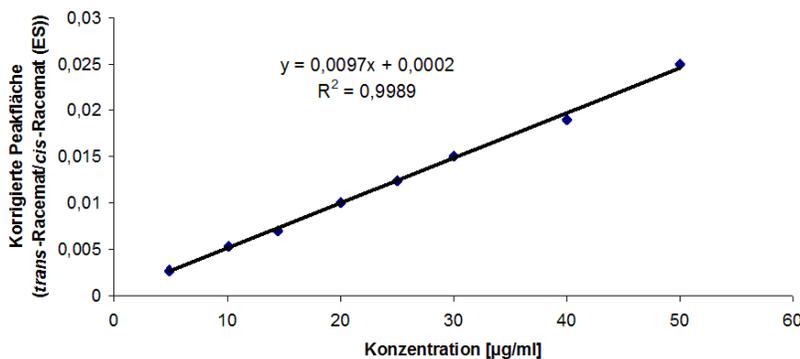


Abb. II.2-11: Linearitätsdiagramm für die Diastereomerenreinheit.

Der Auftragung, dem Korrelationskoeffizient ( $r = 0,9994$ ) und dem y-Achsenabschnitt in Verbindung mit der in Abbildung II.2-12 dargestellten Residualanalyse der Regressionskurve ist zu entnehmen, dass die Bedingungen für Linearität erfüllt sind sowie die Residuen um das Nullniveau normalverteilt sind und kein Trend der Residualanalyse (systematische Abweichung der Messwerte) zu erkennen ist.

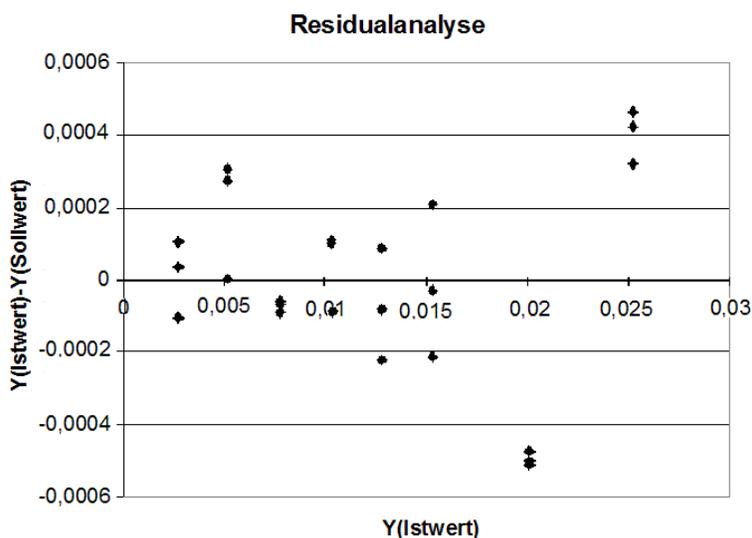


Abb. II.2-12: Residualanalyse der Linearität

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Durchführung einer Bestimmung der Diastereomerenreinheit des *cis*-1-Racemats möglich ist.

#### 2.4.3 Präzision und Richtigkeit

Die Reproduzierbarkeit der CD-modifizierten CE-Methode wurde als Wiederholstandardabweichung für Intralaboratoriumspräzision an einem Tag und Interlaboratoriumspräzision an drei verschiedenen Tagen mit einer anderen CE-Anlage (Tag-1), anderen Puffersubstanzchargen (Tag-2) und anderen Sulf- $\beta$ -CD-Chargen (Tag-3) angegeben. Zur Bestimmung der Präzision wurden drei Testlösungen des *cis*-Racemates (2,0 mg/ml) mit verschiedenen Konzentrationen des *trans*-Racemates von 10,0, 25,0 und 40  $\mu$ g/ml verwendet. Diese entsprechen 0,5, 1,25 bzw. 2,0 % bezüglich der Konzentration der Hauptkomponente. Die Bestimmungen erfolgten an jedem Tag mit sechsfacher Injektion jeder Testlösung. Die relative Migrationszeit RMZ des ersten Enantiomers jedes Racemates zum zweiten Enantiomer sowie das Verhältnis der korrigierten Peakflächen (V.k.PF) vom *cis*-Racemat zum *trans*-Racemat wurden errechnet und die RSD % der wiederholten Messungen wiedergegeben. Die gemittelten Ergebnisse sind in Tabelle II.2-2 dargestellt.

Präzision (n = 6)							
Tag	Konz. der Testlösung	V.k.PF	RSD (%)	RMZ-t	RSD (%)	RMZ-c	RSD (%)
1	0,5 %	0,0989	0,76	0,699	1,06	0,903	0,99
	1,25 %	0,2609	1,43	0,700	0,69	0,914	0,96
	2,0 %	0,4183	1,11	0,696	0,99	0,898	1,20
2	0,5 %	0,1013	2,99	0,703	1,15	0,915	0,99
	1,25 %	0,2619	0,57	0,696	2,05	0,903	1,01
	2,0 %	0,4244	1,90	0,706	0,49	0,907	0,74
3	0,5 %	0,1028	2,01	0,710	1,37	0,903	1,57
	1,25 %	0,2622	1,36	0,697	0,68	0,908	0,91
	2,0 %	0,4123	1,35	0,702	0,56	0,919	0,66
Interlaboratoriumspräzision (n = 18)							
	0,5 %	0,1010	2,73	0,697	1,72	0,907	0,76
	1,25 %	0,2617	1,42	0,698	0,41	0,909	0,71
	2,0 %	0,4183	3,06	0,699	1,40	0,908	1,12
Intralaboratoriumspräzision (n = 6)							
	0,5 %	0,1021	0,73	0,706	0,21	0,914	0,16
	1,25 %	0,2625	1,92	0,702	0,37	0,910	0,19
	2,0 %	0,4099	1,81	0,704	0,22	0,909	0,40

Tabelle II.2-2: Ergebnisse der Bestimmung der Präzision der Methode. RMZ-t, RMZ-c ist die relative Migrationszeit des ersten Enantiomers des trans- bzw. cis-Racemates zum zweiten Enantiomer.

Die RSD%-Werte der Intralaboratoriumspräzision an einem Tag lag zwischen 0,16 und 1,92 % und deutlich niedriger als die Werte der Interlaboratoriumspräzision an drei Tagen zwischen 0,41 und 3,06 %. Durch mehrmalige Herstellung der Proben an verschiedenen Tagen konnten diese RSD % Werte erklärt werden. Alle Werte liegen jedoch unter dem noch akzeptierten Wert (5 %) nach ICH-Richtlinie Q2(R1) gemäß einer Reinheitsbestimmung, so dass von einer reproduzierbaren Methode für die Bestimmung der Diastereomerenreinheit ausgegangen werden kann.

Die Richtigkeit der Methode wurde mit gleichen Proben und auf gleichem Weg wie bei der Präzision an einem Tag als Intralaboratoriumsrichtigkeit bzw. an drei verschiedenen Tagen als Interlaboratoriumsrichtigkeit bestimmt. Der Diastereomeregehalt wurde mittels des ES in einer Konzentration von 2,0 mg/ml bestimmt. Hier wurde gleichzeitig der Gehalt an cis-Racemat in den Testlösungen ermittelt. Die nachfolgende Tabelle II.2-3 stellt die Ergebnisse der Richtigkeit dar.

Richtigkeit (n = 6)							
Tag	Probe	Nominale Konz. <i>trans</i> -Racemat [µg/ml]	Richtigkeit (%)	RSD (%)	Nominale Konz. <i>cis</i> -Racemat [mg/ml]	Richtigkeit (%)	RSD (%)
1	0,5 %	10,5	99,06	0,79	2,01	101,00	1,58
	1,25 %	25,3	100,27	1,66	2,03	100,99	1,27
	2,0 %	41,4	102,64	0,70	2,01	101,60	0,55
2	0,5 %	10,2	101,61	0,47	2,00	100,47	0,46
	1,25 %	26,1	101,57	1,56	2,00	100,85	0,70
	2,0 %	41,3	102,51	1,32	2,02	100,88	1,03
3	0,5 %	10,4	99,61	3,15	2,01	101,91	1,46
	1,25 %	25,9	103,09	1,01	2,02	99,97	1,65
	2,0 %	41,3	102,55	2,65	2,00	101,33	2,05
Interlaboratoriumspräzision (n = 18)							
	0,5 %	10,4	100,09	1,29	2,01	101,13	1,81
	1,25 %	25,8	101,64	1,51	2,02	100,60	1,59
	2,0 %	41,3	102,57	3,03	2,01	101,27	1,26
Intralaboratoriumspräzision (n = 6)							
	0,5 %	10,3	99,59	0,60	2,00	100,50	0,25
	1,25 %	25,9	102,06	2,02	2,02	100,69	0,32
	2,0 %	41,3	100,04	2,10	2,01	100,79	0,48

Tabelle II.2-3: Ergebnisse der Bestimmung der Richtigkeit der Methode.

Die Ergebnisse für Richtigkeit und Präzision geben die Sicherheit der Gehaltsbestimmung des Diastereomerenmischungs wider. Als nicht korrigierbarer Fehler muss beachtet werden, dass der externe Standard (*cis*-Racemat) nicht als CRS-Substanz vorlag, sondern eine neue synthetisierte, nicht charakterisierte Substanz verwendet wurde (siehe Kap. II. 2.1).

#### 2.4.4 Robustheit

Die Prüfung auf Robustheit der Methode wurde mit einer für die Bestimmung der Diastereomerenreinheit gegebenen Testlösung von *cis*-Racemat (2,0 mg/ml) mit 1,5 % *trans*-Racemat durchgeführt. Für die entwickelte CD-modifizierte CE-Methode erwies sich die Variation der folgenden Parameter als sinnvoll.

- Trennungsspannung ( $\pm 1$  kV)
- Kapillartemperatur ( $\pm 1$  °C)
- Konzentration ( $\pm 2$  mM) und pH des Puffers ( $\pm 0,1$  Einheit)
- Sulf- $\beta$ -CD-Konzentration ( $\pm 0,1$  mM)

Als Kenngröße für die Beurteilung der Robustheit dient neben relativen Migrationszeiten (RMZ<sub>s</sub>) in Bezug auf Peak **a** sowohl die Auflösung zwischen den letzten Isomeren **b** und **d** ( $R_{b,d}$ ) als auch das Verhältnis der korrigierten Peakflächen von *trans*-Racemat zum ES (V.k.PF). Die Auswirkungen bei Veränderungen einzelner Parameter in den oben genannten Variationsbereichen sind in Tabelle II.2-4 zusammengefasst, und dann als prozentuale relative Änderungen bezüglich der Sollwerte in Abbildung II.2-13 dargestellt.

Parameter	Variation	RMZ <sub>b</sub>	RMZ <sub>c</sub>	RMZ <sub>d</sub>	$R_{b,d}$	V.k.PF
	Standardparameter*	1,098	0,843	1,195	2,48	0,3058
Spannung	14 kV	1,096	0,845	1,205	2,25	0,3047
	16 kV	1,086	0,853	1,160	2,66	0,3065
Temperatur	24 °C	1,111	0,829	1,209	2,60	0,3022
	26 °C	1,094	0,838	1,192	2,28	0,3071
Pufferkonzentration	48 mM	1,101	0,838	1,200	2,42	0,3078
	52 mM	1,089	0,840	1,190	2,67	0,3075
Puffer-pH	2,4	1,087	0,853	1,188	2,72	0,3175
	2,6	1,086	0,850	1,190	2,45	0,3007
Sulf- $\beta$ -CD-Konzentration	1,9 mM	1,094	0,842	1,181	2,37	0,3084
	2,1 mM	1,101	0,833	1,215	2,56	0,3062

Tabelle II.2-4: Ergebnisse der Überprüfung der Robustheit der Methode (\* Für Sollwerte beim Standardparameter der Methode siehe Abb. II.2-10).

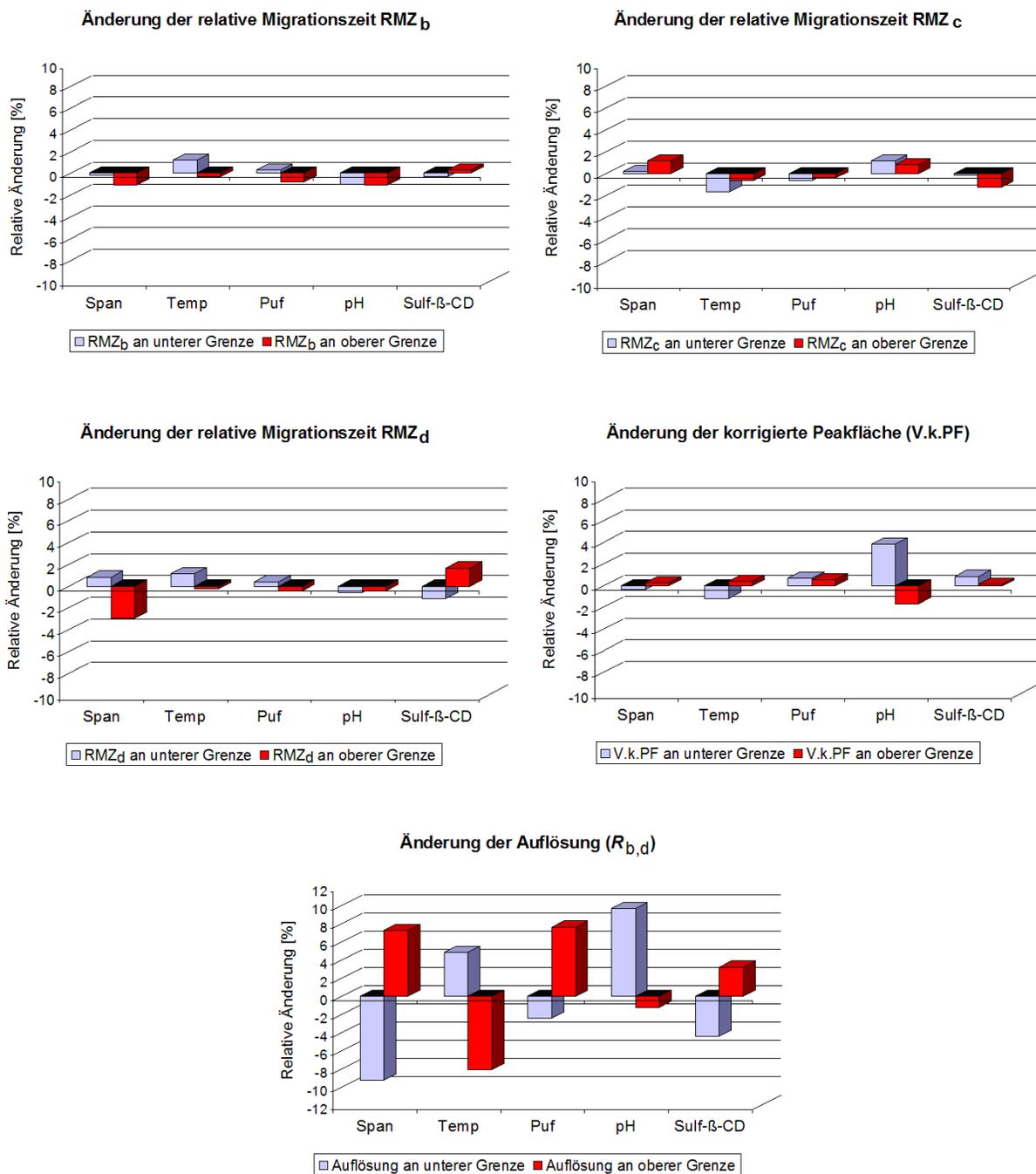


Abb. II.2-13: Relative Änderungen der relativen Migrationszeit  $RMZ_b$ ,  $RMZ_c$  und  $RMZ_d$ , der korrigierten Peakflächen (V.k.PF) des *trans*-Racemates zum ES und der Auflösung  $R_{b,d}$ . Die Definition der Säulen: Span. Spannung; Temp. Temperatur; Puf. Pufferkonzentration; pH. pH-Wert des Puffers; Sulf-β-CD. Konzentration des Sulf-β-CD.

Während die geringen Veränderungen der Standardbedingungen der Methode keinen signifikanten Einfluss auf die relativen Migrationszeiten aller Peaks sowie das Verhältnis der korrigierten Peakflächen zeigten, führten sie bei der Auflösung zu größeren Änderungen zwischen -9,27 %

und +9,68 %; es lag aber überall eine vollständig Basislinientrennung vor (siehe Tab. II.2-4). Somit konnte die Methode als robust gegen kleine Änderungen der Standardparameter angesehen werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Sulf- $\beta$ -CD-modifizierte CE-Methode in einem Phosphatpuffer pH 2,5 eine Bestimmung der Diastereomerenreinheit von *cis*-Racemat erlaubt. Die Bestimmung liefern mit Hilfe eines externen Standards präzise und richtige Ergebnisse.

## 2.5 Bestimmung des Diastereomerenüberschusses

Wie bereits in Kap. II. 2.2 erwähnt, sollte von den Aziridin-Derivaten (**1-2**) nur das reine *cis*-Racemat-1 einer pharmakologischen Untersuchung als Aspartat-Protease-Inhibitor zugeführt werden. Zu diesem Zweck wurde die entwickelte und validierte CD-CE-Methode zur Bestimmung des Diastereomerenüberschusses von drei verschiedenen Mischungen aus *cis*-1- und *trans*-2-Racemat eingesetzt. Die Formel zur Berechnung des Enantiomerenüberschusses<sup>178</sup>  $ee[\%]$  konnte in diesem Fall zur Angabe des Diastereomerenüberschusses  $de[\%]$  verwendet werden.

$$de[\%] = \frac{c[\%] - t[\%]}{c[\%] + t[\%]} \times 100$$

wobei  $c$  der Gehalt [%] des überschüssigen *cis*-Racemates und  $t$  der Gehalt des *trans*-Racemates ist. Die berechneten und durch die CD-modifizierte CE-Methode gefundenen  $de[\%]$  sind in Tabelle II. 2.2 dargestellt.

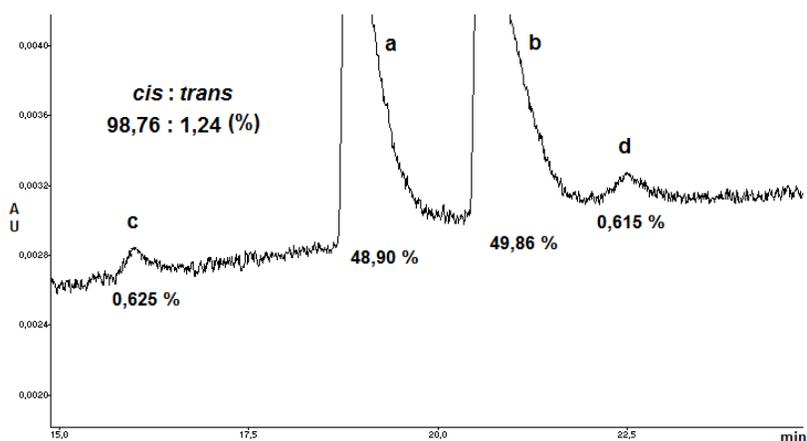


Abb. II.2-14: Diastereomerentrennung einer Mischung von 1,25 % *trans*-Racemat und 98,75 % *cis*-Racemat. Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.2-10.

Mischung		Daten aus CD-modifizierter CE-Methode		
<i>de</i> [%]	Verhältnis <i>cis</i> -Racemat: <i>trans</i> -Racemat	<i>de</i> [%]	Verhältnis <i>cis</i> -Racemat: <i>trans</i> -Racemat	RSD [%] (n = 4)
97,50	98,75:1,25	97,52	98,76:1,24	1,05
99,20	99,60:0,40	99,20	99,58:0,40	1,62
99,50	99,75:0,25	99,52	99,75:0,24	3,91

Tabelle II.2-5: Vergleich des berechneten und gefundenen Diastereomerenüberschusses für das *cis*-Racemat.

Die vierfache Bestimmung aller drei Proben ergab gute RSD%-Werte. Daher konnte mit der entwickelten CD-modifizierten CE-Methode das *trans*-Racemat in einer Konzentration bis zu 0,25 % bezogen auf das *cis*-Racemat quantifiziert werden, d.h. die Diastereomerenreinheit des *cis*-Racemats ermittelt werden.

### 3 Enantiomerenreinheit von Levodopa

#### 3.1 Übersicht

Levodopa ist eine Vorstufe des Neurotransmitters Dopamin. Levodopa (L-Dopa) ist eine physiologische Aminosäure, die im Gegensatz zu Dopamin die Bluthirnschranke mittels eines aktiven Aminosäure-Transport-Mechanismus gut passieren kann. Sobald die Substanz die Bluthirnschranke überwunden hat, wird sie von den noch vorhandenen dopaminergen Nervenendigungen aufgenommen und zu Dopamin decarboxyliert, welches die gewünschte pharmakologische Wirksamkeit entfaltet. Dopamin wirkt an den D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptoren der postsynaptischen Neuronen. So handelt es sich bei Levodopa um ein "Prodrug". Seit 1961<sup>179</sup> wurde Levodopa bei der Therapie der Parkinson-Krankheit eingesetzt. D-Dopa hat im Gegensatz zu L-Dopa (Abb. II. 3.1) keine biologische Aktivität.

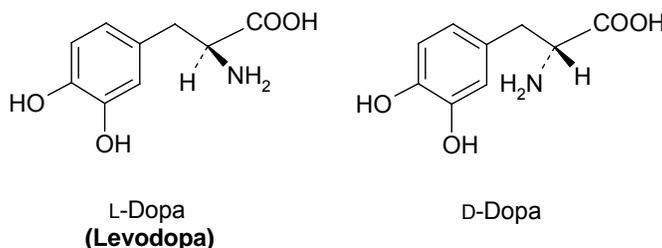


Abb. II.3-1: Strukturen von L- und D-Dopa.

#### 3.2 Problemstellung

In der Levodopa-Monographie im PhEur 6.0 wird die Polarimetrie zur Kontrolle der Enantiomerenanteile eingesetzt. Aufgrund der geringeren Empfindlichkeit dieser Methode wird in der Revision der Monographie (nach EDQM<sup>180</sup>) die Prüfung auf Enantiomerenreinheit von Levodopa mittels chiraler HPLC durchgeführt und der Gehalt an D-Dopa auf 0,5 % begrenzt. Diese Methode bedient sich eines RP-18-Materials als stationärer Phase (Symmetry<sup>®</sup> C18e-Säule; Korngröße 5 µm, Porengröße 10 nm, Länge der Säule 15 cm, Innendurchmesser 3,9 mm). Die mobile Phase besteht aus 5 % (v/v) Methanol und 95 % (v/v) einem Acetatpuffer (2,0 mM Kupferacetat, pH 4,0), der mit 387 mg/l *N,N*-Dimethyl-L-phenylalanin als optisch aktiver Substanz versetzt wird. Diese Substanz bildet zur Enantiomerentrennung mit den Enantiomeren diastereomere Kupfer-Komplexe aus. Das resultierende Chromatogramm dieser Methode zeigt einerseits eine unruhige Basislinie und andererseits eine schlechte Peakform der Hauptkomponente (siehe Abb. II. 3-2). Dies führt zu einem großen Fehler bei der Limitierung von D-Dopa durch Flächenvergleich.

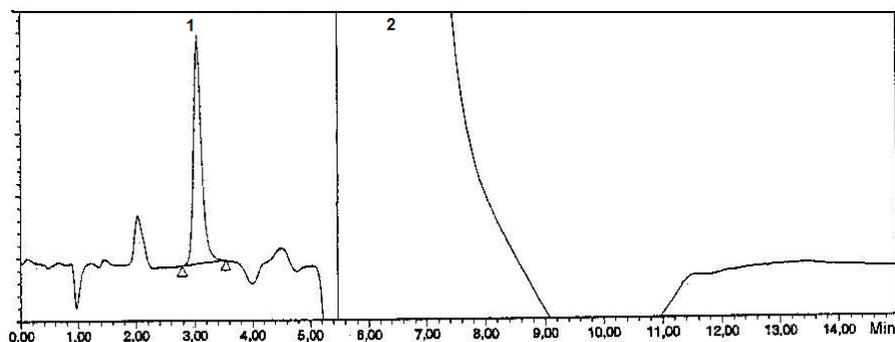


Abb. II.3-2: Chromatogramm der Prüfung auf Enantiomerenreinheit von Levodopa aus Lit.<sup>180</sup>. Peaks: 1 D-Dopa und 2 L-Dopa.

Da sich in der Literatur zahlreiche Studien der Enantiomertrennung von Levodopa mittels chiraler CE bewährt hatten und dabei Cyclodextrine als chirale Selektoren verwendet wurden,<sup>181-183</sup> wurde in diesem Projekt eine CD-modifizierte CE-Methode zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von Levodopa optimiert und validiert. Diese Methode sollte im Gegensatz zur chiralen HPLC-Arzneibuchmethode eine bessere Qualität der Trennung gewährleisten und geringe Konzentrationen an D-Dopa (< 0,5 %) quantifizieren.

### 3.3 CE-Methodenoptimierung

HOOGMARTENS *et al.*<sup>182</sup> beschrieben die Verwendung der hoch sulfatierten CD-Derivate ( $\alpha$ ,  $\beta$ - und  $\gamma$ -CD) sowie des HDAS- $\beta$ -CD zur Enantiomertrennung von Dopa und Carbidopa. Ausgehend von dieser Methode wurde mit einem Phosphatpuffer (20 mM, pH 2,5) gearbeitet, der mit dem sulfatierten  $\beta$ -CD (Sulf- $\beta$ -CD) als chiralen Selektor versetzt war. Die Kapillare hatte eine Gesamtlänge von 33,0 cm bzw. eine effektive Länge von 22,5 cm bis zum Detektor. Die Trennungen wurden bei einer Temperatur von 20 °C und einer Spannung von 15 kV durchgeführt. Die Trennung der Dopa-Enantiomere konnte mit zwei unterschiedlichen Messanordnungen erreicht werden, und zwar im Normal- und Umkehrpolungsmodus. Im Normalpolungsmodus (+15 kV) wurde Sulf- $\beta$ -CD in einer Konzentration von 0,5-4 mM getestet. Bei einem pH-Wert von 2,5 lag das Dopa-Racemat als Kationen vor. Da das anionische Sulf- $\beta$ -CD durch den fehlenden EOF zur Anode wandert und damit der kationischen Verbindung direkt entgegen, ist eine Trennung möglich. Obwohl nur geringe Konzentrationen von 0,5 bis 4 mM eingesetzt wurden, ergaben sich sehr lange Migrationszeiten für beide Enantiomere (siehe Abb. II. 3-3). Eine vollständige Basislinientrennung des Racemats konnte in Konzentrationsstufen von 1 und 2 mM erzielt werden, wobei die maximalen Auflösungsgrade ( $R$ ) zwischen 1,5 und 1,7 lagen.

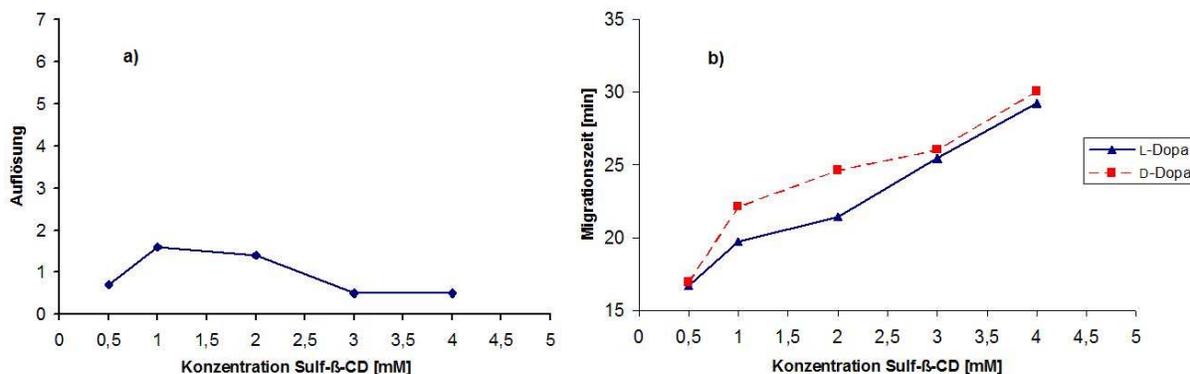


Abb. II.3-3: a) Auflösung und b) Migrationszeiten der Dopa-Enantiomere in Abhängigkeit von der Konzentration an Sulf-β-CD in Normalpolungsmodus unter folgende Bedingungen: HGE: 20 mM Phosphatpuffer pH 2,5, x mM Sulf-β-CD; Kapillare: Quarzglas Kapillare 22,5/33,0 cm, 50 μm ID; Spannung +15 kV; Injektion: 5 s mit 50 mBar; Temperatur: 20 °C; Detektion: 200 nm (UV).

Die langen Migrationszeiten, die wahrscheinlich durch starke Komplexbildung zwischen anionischem Sulf-β-CD und protoniertem Dopa-Racemat verursacht werden, führte zu breiten Peaks beider Enantiomere. Da das D-Dopa-Enantiomer durch das Detektionsfenster nach dem L-Dopa-Enantiomer wandert und von diesem teilweise überdeckt wurde, ergab sich bei einer Trennung mit hoher Konzentration an Levodopa (Hauptkomponente) eine schwache Trennleistung sowie geringere Empfindlichkeit für D-Dopa. Daher wurde die Trennung im Umkehrpolungsmodus mit einer Spannung von -15 kV optimiert. Dabei konnte die Sulf-β-CD-Konzentration bis auf 15 mM erhöht werden; damit ergaben sich bei der Trennung eine bessere Auflösung sowie kurze Migrationszeiten (Abb. II. 3-4). Durch die Umpolung befand sich der Detektor an der Anode, und die Probe wurde am kathodischen Ende der Kapillare injiziert. Die anionischen Sulf-β-CDs wanderten zur Anode und damit in Richtung Detektor. Die Analyten wurden durch Komplexbildung mit den CDs ebenfalls zur Anode transportiert. Die CDs fungieren hierbei als „Straßenbahn“ der eingelagerten Analyten. Somit verkürzten sich die Migrationszeiten mit zunehmender Sulf-β-CD-Konzentration, wobei natürlich weniger Zeit für die Trennung zur Verfügung stand.

Da die Enantiomerentrennung in beiden Modi möglich war, wurde die Migrationsreihenfolge der Enantiomere durch Moduswechseln umgekehrt (siehe Abb. II. 3-4). Dies war in diesem Fall von Vorteil, da bei der Bestimmung der Enantiomerenreinheit von Levodopa der Peak für das D-Dopa-Enantiomer im Gegensatz zur Normalpolung zuerst und weit genug vom Hauptpeak detektiert wurde.

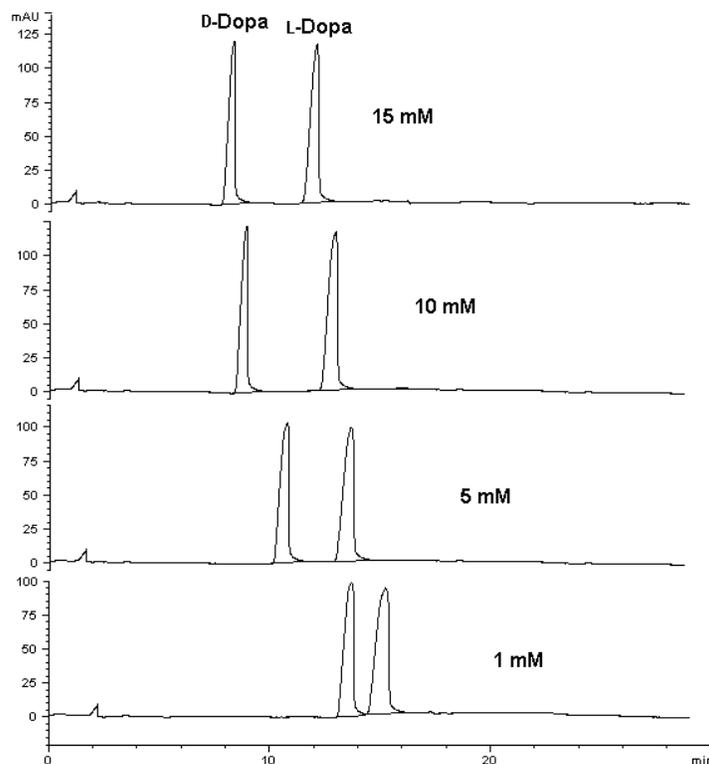


Abb. II.3-4: Einfluss der Sulf-β-CD-Konzentration auf die Auflösung und Migrationszeiten der Dopa-Enantiomere in Umkehrpolungsmodus (Spannung -15 kV). Für andere elektropheretische Bedingungen siehe Abb. II.3-3.

Die Elektropherogramme zeigen, dass eine optimale Enantiomerentrennung des Dopa-Racemates mit einer Sulf-β-CD-Konzentration von 10 mM und einer Spannung von -15 kV erfolgte und sich so ein größerer Wert für die Auflösung der Enantiomere ( $R > 7,0$ ) ergab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Validierungsarbeiten für diese Methode fortgeführt.

### 3.4 Methodvalidierung

Die neu entwickelte CD-CE-Methode zur Enantiomerentrennung von D,L-Dopa wurde auch in Hinblick auf die quantitative Bestimmung von D-Dopa in Levodopa mittels externen Standards von L-Dopa validiert. Entsprechend der Vorschriften der ICH-Richtlinie Q2(R1)<sup>128</sup> wurden zur Validierung der Reinheitsbestimmungsmethode die Parameter Selektivität, Linearität, Arbeitsbereich, LOQ, LOD, Präzision, Richtigkeit und Robustheit bestimmt. Abbildung II.3-5 zeigt das Elektropherogramm einer für Validierungsarbeiten hergestellten Testlösung von Levodopa und der Verunreinigung (D-Dopa) sowie das Elektropherogramm von L-Dopa als externen Standard.

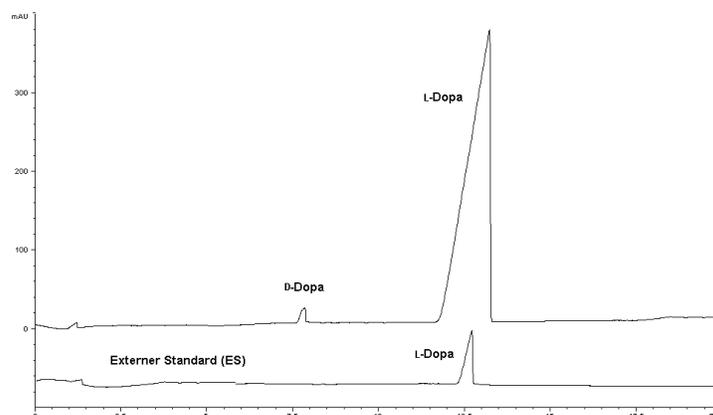


Abb. II.3-5: Enantiomerentrennung von Levodopa und der Verunreinigung (D-Dopa) unter optimalen Bedingungen: HGE: 20 mM Phosphatpuffer pH 2,5, 10 mM Sulf- $\beta$ -CD; Kapillare: Quarzglas kapillare 22,5/33,0 cm, 50  $\mu$ m ID; Spannung -15 kV; Injektion: 5 s mit 50 mBar; Temperatur: 20  $^{\circ}$ C; Detektion: 200 nm (UV).

### 3.4.1 Selektivität

Mit der optimierten chiralen CE-Methode wurde das zu bestimmende Enantiomer D-Dopa von der Hauptkomponente L-Dopa abgetrennt und die Identifizierung der Peaks wurde mittels einer Referenzsubstanz von Levodopa überprüft (siehe Abb. II. 3-5). Die Auflösung zwischen den beiden Enantiomeren  $R_{L,D}$  betrug 7,2 und die relative Migrationszeit von D-Dopa zu L-Dopa war ca. 0,65.

### 3.4.2 LOQ, LOD, Arbeitsbereich und Linearität

Die Bestimmungsgrenze LOQ wurde mit dem Signal-Rausch-Verhältnis festgestellt und betrug für D-Dopa und L-Dopa als externen Standard (ES) jeweils 0,40  $\mu$ g/ml. Bei einer nominalen Levodopa-Probenkonzentration von 1,0 mg/ml entsprechen die Werte einem Anteil von 0,04 % Verunreinigung (D-Dopa). Um die Empfindlichkeit der CD-modifizierten CE-Methode vollständig darzustellen, wurde zusätzlich die Nachweisgrenze LOD bestimmt. Mit 0,20 und 0,15  $\mu$ g/ml lag die Grenze für L-Dopa (ES) bzw. D-Dopa niedriger als in der HPLC-Methode des PhEur 6.0. Diese entsprechen einem Anteil von 0,02 % für L-Dopa und 0,015 % für D-Dopa.

Auf Grund der festgelegten Spezifikationsgrenze von D-Dopa auf 0,5 %<sup>180</sup> bezogen auf den Gehalt von Levodopa wurde die Linearitätsüberprüfung innerhalb des Arbeitsbereiches von 0,4 bis 6,0  $\mu$ g/ml durchgeführt, was einem prozentualen Anteil von D-Dopa in der Probe von 0,04 bis 0,6 % entspricht. Mit acht Kalibrierpunkten und jeweils dreifacher Bestimmung wurde die lineare Regression anhand der Konzentration von D-Dopa und das Verhältnis der korrigierten Peakflächen von D-Dopa zum externen Standard mit einer Konzentration von 8,0  $\mu$ g/ml festgelegt. Abbildung II.3-6 zeigt das Ergebnis der Linearitätsbestimmung.

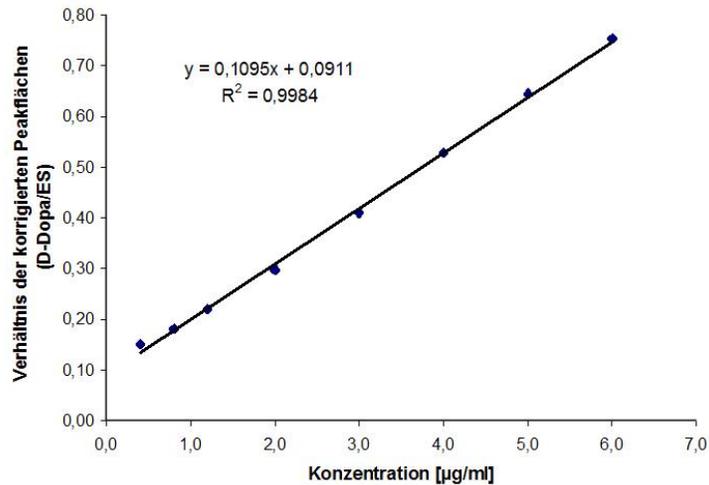


Abb. II. 3-6: Linearitätsdiagramm für die Enantiomerenreinheit von Levodopa.

Konzentration D-Dopa [µg/ml]	RSD [%] korrigierte Peakfläche D-Dopa	RSD [%] Verhältnis der korrigierten Peakflächen (D-Dopa/ES)
0,4	4,72	3,82
0,8	1,98	1,42
1,2	1,66	1,35
2,0	2,29	1,89
3,0	2,06	2,11
4,0	0,33	0,29
5,0	1,88	1,61
6,0	0,86	0,72

Tab. II. 3-1: Vergleich der Präzisionswerte der korrigierten Peakfläche von D-Dopa mit und ohne externem Standard ( $n = 3$  Bestimmungen pro Konzentrationsstufe).

Der Auftragung, dem Korrelationskoeffizienten und dem y-Achenabschnitt in Verbindung mit den in Tabelle II.3-1 dargestellten Präzisionswerten für jede Konzentrationsstufe ist zu entnehmen, dass die Bedingungen für die Linearität erfüllt sind und keine systematischen Abweichungen der Messwerte zu erkennen sind. Die mit dem externen Standard erhaltenen Werte für die Präzision sind in den meisten Fällen besser als die ohne externen Standard. Die Durchführung einer Prüfung auf Enantiomerenreinheit von Levodopa, basierend auf einem korrigierten Flächenverhältnis von D-Dopa zum externen Standard von L-Dopa (8,0 µg/ml), ist somit möglich.

## 3.4.3 Präzision und Richtigkeit

Zur Bestimmung der Präzision und Richtigkeit über mehrere Tage wurde eine Levodopa-Testlösung mit definierten Mengen der Referenzsubstanz D-Dopa versetzt. Zur Ermittlung der Interlaboratorium-Präzision oder -Richtigkeit wurden alle Bestimmungen jeweils an zwei verschiedenen Tagen, mit verschiedenen Chargen des Puffers (Tag 1) sowie des chiralen Selektors (Tag 2) durchgeführt. Die Intralaboratoriums- bzw. Interlaboratoriumsbestimmungen erfolgten an drei Tagen mit zweifacher Aufarbeitung der Proben und sechsfacher Injektion für jede der zwei sich innerhalb des Arbeitsbereiches befindenden Konzentrationsstufen von 0,12 und 0,40 %. Diese entsprechen jeweils 1,2 bzw. 4,0 µg/ml von D-Dopa in der Levodopa-Testlösung mit einer Konzentration von 1,0 mg/ml. Die gemittelten Ergebnisse sind in Tabelle II.3-2 zusammen gestellt.

Tag	Konz. D-Dopa [µg/ml]	Interlaboratoriumspräzision				Interlaboratoriumsrichtigkeit		
		V.k.PF	RSD [%]	RMZ	RSD [%]	Richtigkeit		RSD [%]
						[µg/ml]	[%]	
1	1,2	0,221	3,18	0,638	0,90	1,20	100,08	3,18
	4,0	0,503	1,75	0,638	0,53	4,02	100,62	1,75
2	1,2	0,223	2,52	0,629	0,78	1,21	101,15	2,52
	4,0	0,510	3,77	0,639	0,55	4,08	101,99	3,77
		Intralaboratoriumspräzision				Intralaboratoriumsrichtigkeit		
	1,2	0,218	0,85	0,623	0,84	1,18	98,64	0,85
	4,0	0,505	3,91	0,632	0,75	4,04	101,06	3,91

Tab. II. 3-2: Ergebnisse der Präzisions- und Richtigkeitsbestimmungen (Werte als Mittelwert aus  $n = 2$  Herstellungen mit  $n = 6$  Injektionen pro Tag und Konzentrationsstufe). V.k.PF ist das Verhältnis der korrigierten Peakflächen, RMZ ist die relative Migrationszeit von D-Dopa zum ES (L-Dopa).

Die in Tabelle II.3-2 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass unter den realen elektrophoretischen Bedingungen die quantitative Enantiomerenreinheitsprüfung der Verunreinigung "D-Dopa" im relevanten Konzentrationsbereich möglich war. Die RSD[%]-Werte lagen sowohl für die Präzision als auch für die Richtigkeit unter dem noch akzeptierten Wert von 5 %.<sup>127</sup>

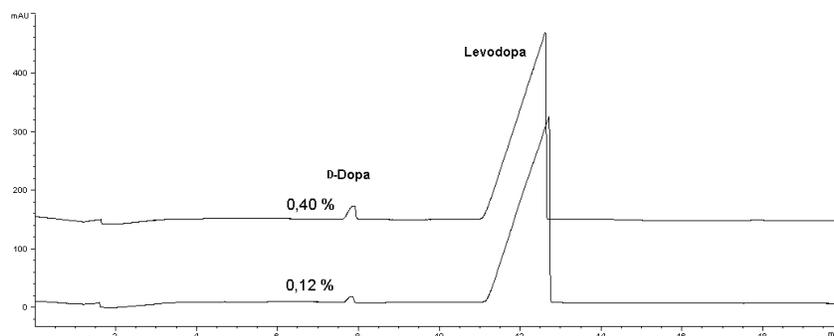


Abb. II.3-7: Elektropherogramm der Testlösung von Levodopa (1,0 mg/ml) und D-Dopa in einer Konzentration von 0,12 und 0,40 % zur Präzisions- und Richtigkeitsbestimmung.

### 3.4.4 Robustheit

Es wurden folgende CE-Parameter in geringfügigem Maß variiert und die Veränderungen bezüglich des Verhältnisses der korrigierten Peakflächen (V.k.PF), der relativen Migrationszeit (RMZ) von D-Dopa zum ES und der Auflösung der Enantiomere ( $R_{L,D}$ ) dokumentiert.

- Konzentration ( $\pm 2$  mM) und pH des Puffers ( $\pm 0,1$  Einheit)
- Trennungsspannung ( $\pm 1$  kV)
- Kapillartemperatur ( $\pm 2$  °C)
- Sulf- $\beta$ -CD-Konzentration ( $\pm 0,1$  mM)

Parameter	Variation	V.k.PF (D-Dopa/ES)	RMZ (D-Dopa/ES)	$R_{L,D}$
	Standardparameter*	0,215	0,647	8,24
Puffer- Konzentration	18 mM	0,217	0,629	8,64
	22 mM	0,217	0,657	7,50
Puffer-pH	2,4	0,217	0,660	7,82
	2,6	0,217	0,643	8,70
Spannung	-14 kV	0,217	0,651	7,99
	-16 kV	0,216	0,629	8,57
Temperatur	18 °C	0,214	0,650	8,21
	22 °C	0,219	0,626	8,43
Sulf- $\beta$ -CD- Konzentration	9 mM	0,216	0,637	7,72
	11 mM	0,209	0,640	8,95

Tabelle II.3-3: Ergebnisse der Robustheit der Methode (\* für Sollwerte beim Standardparameter der Methode siehe Abb. II.3-5) Alle Werte sind Mittelwerte aus  $n = 6$  Injektionen.

Die Prüfung auf Robustheit der Methode wurde mit einer für die Bestimmung der Enantiomerenreinheit gegebenen Testlösung von Levodopa (1,0 mg/ml) mit 0,1 % D-Dopa durchgeführt. Die Auswirkungen bei den Veränderungen einzelner Parameter in den oben genannten Variationsbereichen sind in Tabelle II.3-3 zusammengefasst, und dann als prozentuale relative Änderungen bezüglich der Sollwerte in Abbildung II.3-8 dargestellt.

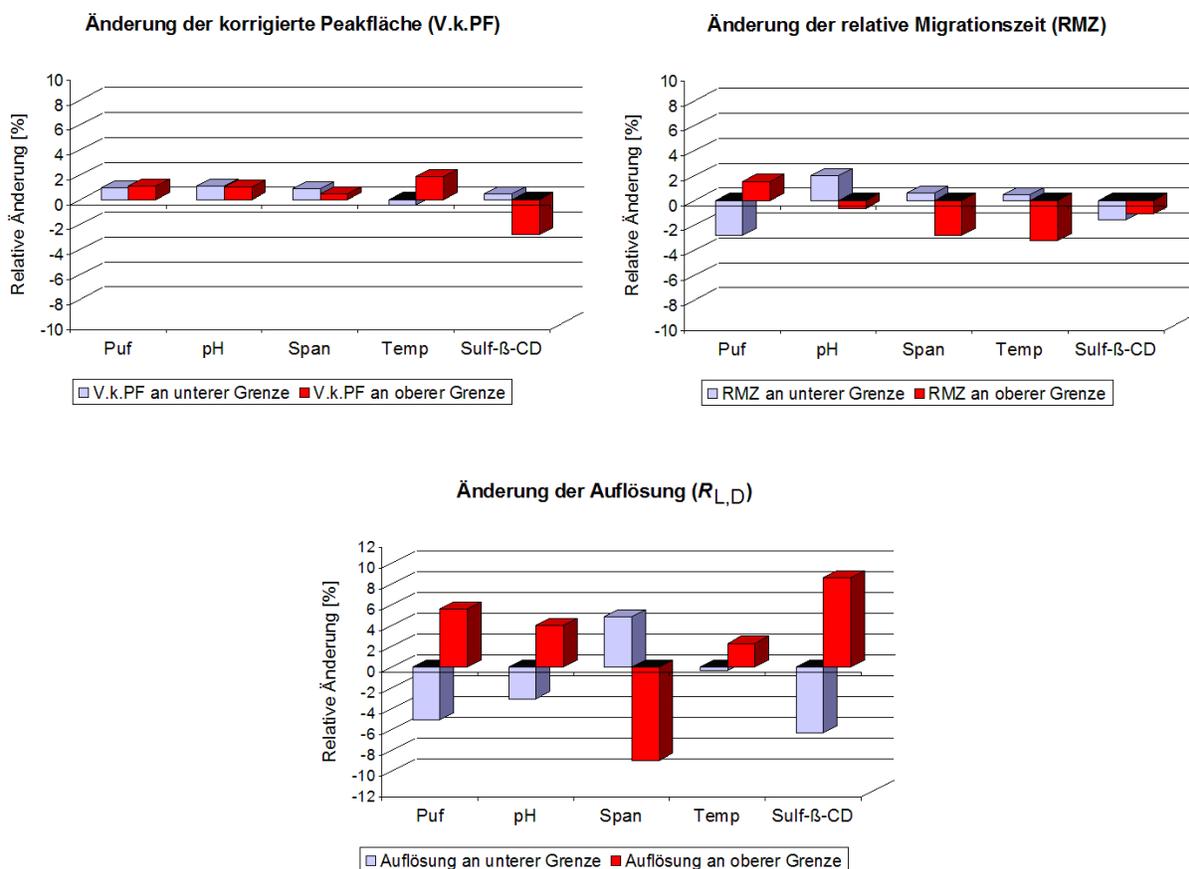


Abb. II.3-8: Relative Änderungen der korrigierten Peakflächen (V.k.PF), der relativen Migrationszeit (RMZ) von D-Dopa zum ES und der Auflösung der Enantiomere  $R_{L,D}$ . Die Definition der Säulen: Puf. Pufferkonzentration; pH. pH-Wert des Puffers; Span. Spannung; Temp. Temperatur; Sulf-β-CD. Konzentration des Sulf-β-CD.

In Abb. II.3-8 kann man sehen, dass die geringen Veränderungen der Standardbedingungen der Methode keinen signifikanten Einfluss auf das Verhältnis der korrigierten Peakflächen sowie die relativen Migrationszeiten zeigten. Die relative Änderung betrug für die Auflösung der Enantiomere zwischen -8,98 % und +8,62 %. Alle Werte der Änderungen lagen innerhalb des Vertrauensbereiches der Robustheit von  $\pm 10$  %.<sup>143</sup> Somit konnte die Methode als robust gegen kleine Änderungen der Standardparameter angesehen werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Hinblick auf die Enantiomerenreinheitsprüfung von Levodopa eine CD-modifizierte CE-Methode als Alternative zur schon bestehenden chiralen HPLC-Methode des EDQM optimiert und anschließend validiert wurde; die CD-modifizierte CE-Methode ist der HPLC-Methode in jeder Hinsicht überlegen. Diese CD-CE-Methode vermag aufgrund einer Basislinientrennung beider Enantiomere mit hoher Auflösung eine präzise und richtige Bestimmung der Enantiomerenanteile von D-Dopa in Levodopa (L-Dopa) zu gewährleisten.

## 4 Ringversuch von Timololmaleat

### 4.1 Einleitung und Zielsitzung

Der Ringversuch stellt in der Validierungspraxis eine Art der Präzisionsprüfung analytischer Methoden dar. Die Bestimmung der Vergleichspräzision ist nur in Sonderfällen, wie z.B. für die Aufnahme einer Methode in ein Arzneibuch, notwendig. Die Ergebnisse eines Analysenverfahrens mit einer Probe in mehreren Laboratorien werden statistisch verglichen (Ringversuch).

Timolol als unselektiver  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonist ( $\beta$ -Blocker) wird zur Glaukombehandlung in der Augenheilkunde eingesetzt. Das *S*-Timolol wirkt wie üblich bei  $\beta$ -Blockern etwa 100fach mehr  $\beta$ -blockierend als das *R*-Enantiomer (Abb. II.4-1). Der Vorteil der Verwendung des reinen *S*-Enantiomers (*S*-Timolol) ist klinisch nicht schlüssig gezeigt, doch ist die Substanzbelastung geringer.

Aufgrund geringerer Selektivität und Empfindlichkeit der Polarimetrie als Arzneibuchmethode ( $-11,7^\circ$  und  $-12,5^\circ$  nach USP) zur Prüfung der Enantiomerenreinheit von *S*-Timolol sollte sie durch eine chirale chromatographische Methode ersetzt werden. Die vorgeschriebene chirale HPLC-Methode im PhEur 6.0 zur Enantiomerenreinheit von *S*-Timolol wurde den Anteil von *R*-Timolol auf 1,0 % begrenzt. Da die chirale stationäre Phase instabil ist sowie die Säulentemperatur nicht gegeben wird, ergibt sich für diese chirale HPLC-Methode eine geringere Selektivität bezogen auf die Basislinientrennung.<sup>184</sup> Als Alternative zur chiralen HPLC-Methode wurde von den Arbeitsgruppen Prof. Crommen und Prof. Fillet am Institut für Pharmazie der Universität Liege in Belgien eine wasserfreie CE-Methode (NACE) zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von Timololmaleat entwickelt und validiert.<sup>185,186</sup> Des Weiteren wurde ein internationaler Ringversuch dieser Methode durchgeführt, wobei unser Labor eines von acht verschiedenen weltweiten Laboratorien war, das an dem Ringversuch teilnahm.

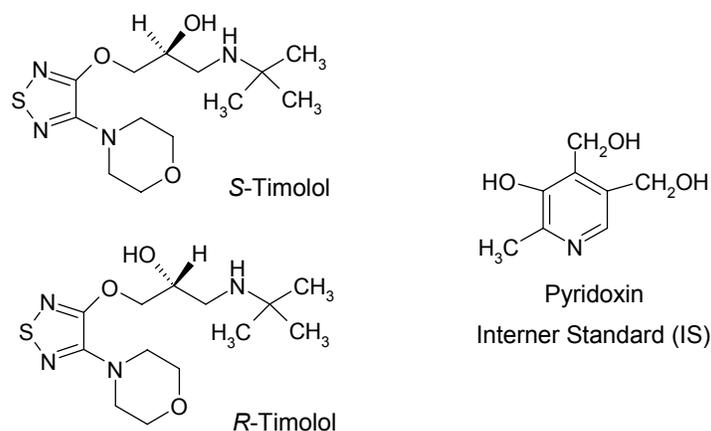


Abb. II.4-1: Strukturen der *S*- und *R*-Timolol sowie Pyrodoxin als interner Standard.

Ziel des Ringversuchs war es, die Übertragbarkeit der CD-modifizierten NACE-Methode zur quantitativen Bestimmung von *R*-Timolol in *S*-Timolol mit Hilfe des internen Standards Pyridoxin (Abb. II.4-1) auf andere Laboratorien zu testen. Gerade bei der Kapillarelektrophorese verdient der Methodentransfer zwischen Laboratorien aufgrund der in ihrem technischen Aufbau unterschiedlichen Instrumente verschiedener Hersteller sowie verschiedener eingesetzter Chargen des Puffers und Reagenzien besondere Aufmerksamkeit. Ein weiterer Aspekt bei der Durchführung der Studie war es, in den Laboratorien den Eignungstest für die validierte NACE-Methode zu prüfen. Zusätzlich wurde die laborinterne Vergleichspräzision beurteilt, daher erfolgten die Bestimmungen mit zweifacher Aufarbeitung der Proben an zwei verschiedenen Tagen sowie mit zweifacher Injektionen (Messungen) pro Tag.

## 4.2 Proben

Die den Teilnehmern zugesendeten vier Proben (**A-D**) *S*-Timolol enthielten verschiedene nominelle Konzentrationen an *R*-Timolol von 0,66 (**A**), 0,35 (**B**), 0,29 (**C**) und 0,10 % (**D**) bezogen auf *S*-Timolol.

## 4.3 NACE-Methode

Die in dem Ringversuchsprotokoll vorgeschriebene CD-modifizierte NACE-Methode<sup>186</sup> bedient sich eines methanolischen Hintergrundelektrolyts (MeOH-HGE), der mit jeweils 30 mM HDMS- $\beta$ -CD und 30 mM Kamphersulfonat als Ionenpaarreagenz versetzt wurde. Diese Kombination aus HDMS- $\beta$ -CD und Ionenpaarreagenz verbessert in der Regel sowohl die Auflösung als auch die Qualität der Enantiomertrennung von basischen Verbindungen.<sup>185,187</sup> Timolol liegt im sauren MeOH-HGE als Kation vor und bildet mit dem anionischen Kamphersulfonat ein Ionenpaar, das für die Komplexbildung mit dem HDMS- $\beta$ -CD zur Verfügung steht.

Die verwendete Kapillare hatte eine Gesamtlänge von 48,5 cm bzw. eine effektive Länge von 40 cm und einen Innendurchmesser von 50  $\mu$ m. Die Trennung erfolgte mit einer Spannung von 25 kV und bei einer Temperatur von 15 °C. Die Proben wurden an der anodischen Seite der Kapillare hydrodynamisch (50 mBar) für 8 Sekunden injiziert. Das Signal wurde im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 295 nm aufgenommen.

## 4.4 Die Ergebnisse

### 4.4.1 Systemeignungstest

Mit folgenden Referenzlösungen wurde der Systemeignungstest überprüft:

Referenzlösung-1: enthält 10,0 µg/ml S-Timolol, 5,0 µg/ml R-Timolol und 5,0 µg/ml Pyridoxin (IS) zur Bestimmung der Auflösung zwischen R-Timolol und S-Timolol ( $R_{R,S} > 5$ ) sowie zwischen S-Timolol und IS ( $R_{S,IS} > 8$ ).

Referenzlösung-2: enthält 20,0 µg/ml R-Timolol und 5,0 µg/ml Pyrosoxin (IS) zur Ermittlung der Wiederholpräzision in Bezug auf das Verhältnis der korrigierten Peakflächen von R-Timolol zu IS ( $RSD[\%] \leq 3\%$  bei  $n = 6$  Injektionen).

Referenzlösung-3: Eine 10:1-Verdünnung der Referenzlösung-2 zur Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses von R-Timolol ( $S/N \geq 10$ ).

Tabelle II.4-1 fasst die Ergebnisse des Systemeignungstestes zusammen.

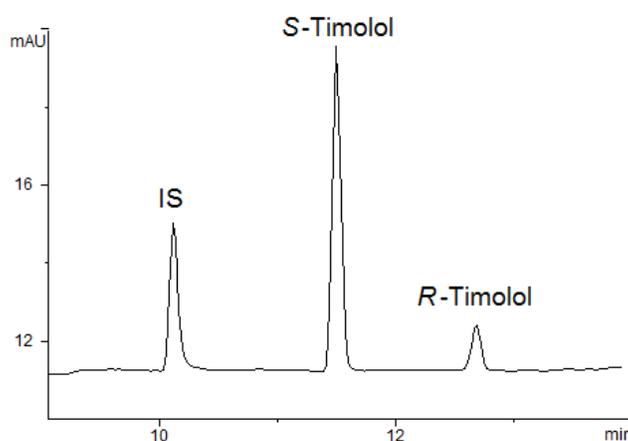


Abb. II.4-2: Elektropherogramm der Referenzlösung-1. Elektrophoretische Bedingungen: MeOH-HGE: 0,75 M Ameisensäure, 30 mM Kamphersulfonat und 30 mM HDMS- $\beta$ -CDs; Kapillare: Quarzglas Kapillare 40,0/48,5 cm, 50 µm ID; Spannung 25 kV; Injektion: 8 s mit 50 mBar; Temperatur: 15 °C; Detektion: 295 nm (UV).

Systemeignungstest		
Referenzlösung	Parameter	Wert
1	$R_{R,S}$	10,58
1	$R_{S,IS}$	8,60
2	RSD [%]	1,10
3	S/N	10

Tab. II.4-1: Ergebnisse des Systemeignungstests.

Da der Systemeignungstest vollständig positiv verlaufen war, konnte die Gehaltsprüfung von R-Timolol in den S-Timolol Proben durchgeführt werden.

## 4.4.2 Enantiomerenreinheit von S-Timolol

Der Gehalt an *R*-Timolol in vier ausgesuchten Proben von *S*-Timolol wurde mittels IS in einer Konzentration von 5,0 µg/ml durch die Normalisierungsverfahren bestimmt. Die Durchführung der Enantiomerenreinheitsprüfung erfolgte an zwei verschiedenen Tagen mit zweifacher Injektion der einzelnen Proben. In Tabelle II.4-2 und Abbildung II.4-3 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Enantiomerenreinheit dargestellt.

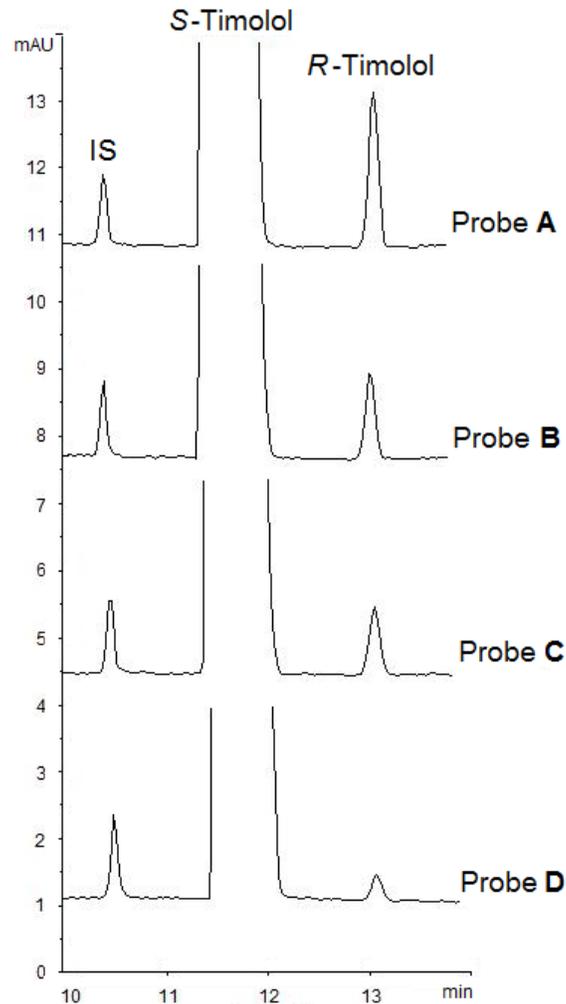


Abb. II.4-3: Elektropherogramme der Enantiomerenreinheitsbestimmung der vier verschiedenen Proben von *S*-Timolol (A-D). Für elektrophoretische Bedingungen siehe Abb. II.4-2.

Gehalt an <i>R</i> -Timolol								
Messung	S-Timolol-Probe <b>A</b>		S-Timolol-Probe <b>B</b>		S-Timolol-Probe <b>C</b>		S-Timolol-Probe <b>D</b>	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Tag-1	0,63	0,64	0,40	0,39	0,34	0,33	0,19	0,20
Tag-2	0,63	0,64	0,40	0,40	0,34	0,33	0,19	0,20

Tab. II.4-2: Ergebnisse der Enantiomerenreinheitsbestimmung von *S*-Timolol.

Die Ergebnisse zeigen, dass die entwickelte und validierte NACE-Methode eine quantitative sowie qualitative Bestimmung von *R*-Timolol in *S*-Timolol erlaubt.

Die erhaltenen Ergebnisse von acht verschiedenen Laboratorien wurden im Hauptlabor gesammelt und durch die Vergleich- bzw. Wiederholpräzision sowie ihre entsprechenden Varianzen zusammengefasst. Die Vergleichpräzision stellt die Summe der ermittelten Varianzen in den verschiedenen Laboratorien, Tagen und Messungen dar. Anschließend wurde das Verhältnis der Vergleichpräzision zur Wiederholpräzision bestimmt. Dieses Verhältnis soll gemäß Lit.<sup>188</sup> im Bereich zwischen 2 und 4 liegen. Folgende Tabelle II.4-3 fasst für jede Probe die Varianzwerte sowie auch die Wiederholpräzision und Vergleichpräzision zusammen.

Typ der Variation		Probe <b>A</b>	Probe <b>B</b>	Probe <b>C</b>	Probe <b>D</b>
Varianzkomponente	Laboratorien ( $S^2_{\text{Laboratorien}}$ )	36,11 $10^{-4}$	8,76 $10^{-4}$	13,27 $10^{-4}$	12,09 $10^{-4}$
	Tagen ( $S^2_{\text{Tagen}}$ )	7,64 $10^{-4}$	2,81 $10^{-4}$	0,47 $10^{-4}$	0,81 $10^{-4}$
	Messungen ( $S^2_{\text{Messungen}}$ )	20,04 $10^{-4}$	5,01 $10^{-4}$	4,09 $10^{-4}$	3,94 $10^{-4}$
Wiederholpräzisionsvarianzen ( $S^2_r$ )		20,04 $10^{-4}$	5,01 $10^{-4}$	4,09 $10^{-4}$	3,94 $10^{-4}$
Vergleichpräzisionsvarianzen ( $S^2_R$ )		63,78 $10^{-4}$	16,57 $10^{-4}$	17,83 $10^{-4}$	16,83 $10^{-4}$
Verhältnis Vergleichpräzision/Wiederholpräzision		<b>3.2</b>	<b>3.3</b>	<b>4.4</b>	<b>4.3</b>

Tab. II.4-3: Ergebnisse der Varianzkomponente des Ringversuchs nach Veröffentlichung 7.

Die Ergebnisse der Verhältnisse von Vergleich- zu Wiederholpräzision korrelieren mit einem Wert von 3,2 und 3,3 für die Probe **A** bzw. **B** gut. Dagegen liegen die ermittelten Werte um 4,4 und 4,3 für Probe **C** und **D** über dem üblichen Bereich, da die Laboratorienvarianz aufgrund unterschiedlicher Gehaltsbestimmungen der Proben **C** und **D** relativ groß war.

Allerdings fasst die Studie zusammen, dass der Ringversuch im Hinblick auf sowohl quantitative als auch qualitative Enantiomerenreinheitsbestimmung von S-Timolol mittels NACE-Methode gute Ergebnisse nach entsprechender Validierung liefert.

Nach Erfolg des internationalen Ringversuchs und der Prüfung der Robustheit der NACE-Methode<sup>189</sup> könnte die im Europäischen Arzneibuch angewandte chirale HPLC-Methode für die Enantiomerenreinheitsprüfung von S-Timolol durch die CD-modifizierte NACE-Methode ersetzt werden.



Als stationäre Phase wurde hier ein RP-18-Material mit polarem Endcapping verwendet, um die Zersetzungsprodukte und verwandte Alkaloide in einem kurzen Zeitraum von dem Arzneistoff Atropinsulfat zutrennen. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Acetonitril und Phosphatpuffer pH 2,5 eingesetzt. Die Nutzung eines Gradienten war trotz des polaren Endcappings nötig, um sowohl hinreichende Retentionen der protonierten basischen Komponenten zu erhalten als auch vollständige Basislinientrennung aller Verunreinigungen zu erzielen. Die HPLC-Methode wurde im Hinblick auf die Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat validiert. Die robuste Methode vermag eine präzise und richtige quantitative Bestimmung aller Verunreinigungen des Atropinsulfates mit Hilfe eines externen Standards von Tropasäure zu liefern.

Diese HPLC-Methode wurde gemäß Richtlinie Q1A(R2) der Internationalen Konferenz der Harmonisierung (ICH), zu den Stabilitätsuntersuchungen am Fertigarzneimittel Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 % eingesetzt. Diese Untersuchungen dienten der Aufklärung des durch den Wirkstoffabbau verursachten Defizits in der Massebilanz der Arzneiform zwischen dem Wirkstoff Atropinsulfat und seinen Neben- und Abbauprodukten im Verlauf der Stabilitätstests.

In Langzeitstabilitätsuntersuchungen unter verschiedenen klimatischen Bedingungen hat sich gezeigt, dass die Stabilität des Wirkstoffes Atropinsulfat in der Arzneiform Augentropfen nicht von der Dosierung des Atropinsulfates sondern von Lagerbedingungen abhängig ist. Der Wirkstoffverlust der Atropinsulfat-Augentropfen beträgt 0,7 % pro Jahr unter den Bedingungen der Klimazone 1 und 1,05 % pro Jahr unter der Klimazone 2. Die Summe der Verunreinigungen in beiden Lagerbedingungen liegen unter dem Grenzwert der Summe aller Verunreinigungen nach PhEur 6.0. Diese Erkenntnis aus den Stabilitätsuntersuchungen zur Klimazonen 1 und 2 wird durch die Untersuchungsergebnisse der Arzneiform unter Klimazone 3 bestätigt.

Die Studie zeigt, dass es für die Fertigarzneimittel "Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 %" Lagerhinweise auf der Verpackung geben muss.

Im letzten Abschnitt des ersten Teils wurde zusätzlich eine CE-Methode zur Reinheitsprüfung von Atropinsulfat entwickelt und validiert. Die elektrokinetische Chromatographie mit Mikroemulsionen (MEEKC) ist als CE-Trenntechnik in der Lage, nahezu alle Verunreinigungen von der Hauptkomponente Atropinsulfat zu trennen.

Die Trennung erfolgt in einer unbeschichteten Quarzglas Kapillare. Als Öl-in-Wasser Mikroemulsionshintergrundelektrolyt werden 0,8 % Octan als Ölphase, 6,6 % Butanol als Co-Tensid, 2,0 % Isopropanol als organischer Modifier, 4,45 % Natriumlaurylsulfat (SDS) als Tensid und 86,15 % Boratpuffer (10 mM, pH 9,0) als wässrige Phase verwendet. Die Proben werden hydrodynamisch injiziert. Um die Analysenzeit zu verkürzen, wird ein Spannungsgradient verwendet.

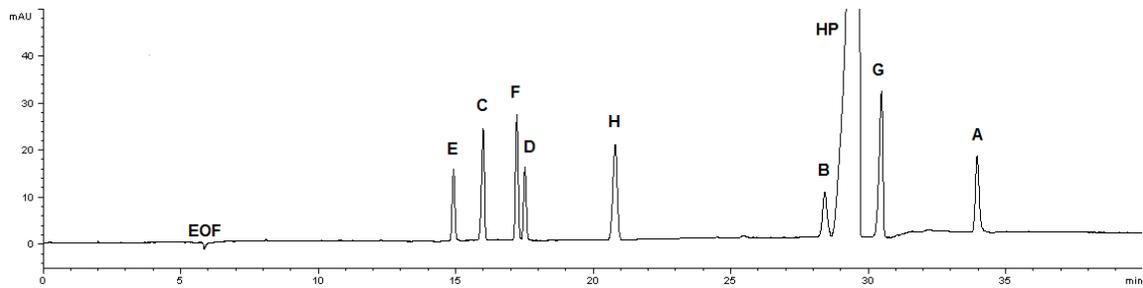


Abb. II.5-2: Elektropherogramm der MEEKC-Trennung von Atropin und allen Verunreinigungen.

Unter diesen optimierten elektrophoretischen Bedingungen sind die Verunreinigungen und Atropinsulfat basisliniengetrennt (Abb. II.5-2). Quantifiziert wird mittels des externen Standards Tropasäure. Die MEEKC-Methode wurde im Hinblick auf quantitative Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat validiert. Im Vergleich zur HPLC-Methode ergab die MEEKC-Methode deutlich bessere Peakformen und höhere Auflösungsfaktoren für die Peaks **E**, **D** und **F**, während sich bei der HPLC-Methode präzisere Reinheitsergebnisse bezogen auf ihre relativen Standardabweichungen ergab.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden analytische CE-Methoden zur Enantiomertrennung von einigen chiralen Arzneistoffen und Substanzen unter Zusatz von Cyclodextrinen (CDs) und ihren Derivaten als chirale Selektoren untersucht.

CD-modifizierte elektrokinetische Chromatographie mit Mikroemulsionen (CD-MEEKC) wurde zur Trennung der vier chiralen Tropa-Alkaloide Atropin, Scopolamin, Ipratropium und Homatropin verwendet.

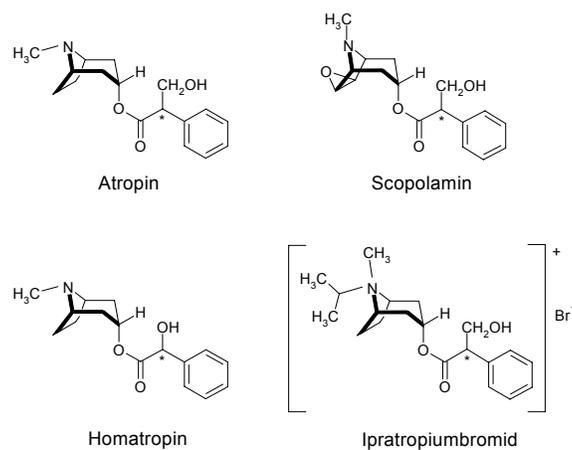


Abb. II.5-3: Atropin, Scopolamin, Homatropin und Ipratropiumbromid.

Der O/W-Mikroemulsion-HGE besteht aus 0,8 % Octan, 6,6 % Butanol, 2,0 % SDS und 90,6 % Boratpuffer (10 mM, pH 9,0). Enantiomerentrennung aller Tropan-Alkaloiden mit höherer Auflösung und kürzeren Migrationszeiten erfolgt durch Zugabe von *Heptakis*(2,6-di-O-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD oder sulfatiertem  $\beta$ -CD in einer Konzentration von 5 mM. Vorteil dieser CD-MEEKC-Methode im Vergleich zur CD-modifizierten CE-Methode war, dass die Scopolamin-Enantiomere aufgrund des verwendeten SDS-Mikroemulsion-HGEs getrennt werden konnte.

Aziridine (**1-5**) gehören zu einer pharmakologischen Gruppe irreversibler Protease-Inhibitoren. Die biologische Testung von potenziellen Protease-Inhibitoren wird nur für die diastereomerenreinen Derivate durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden CD-modifizierte CE-Methoden zur Enantiomeren- bzw. Diastereomerentrennung von Aziridin-Derivaten entwickelt.

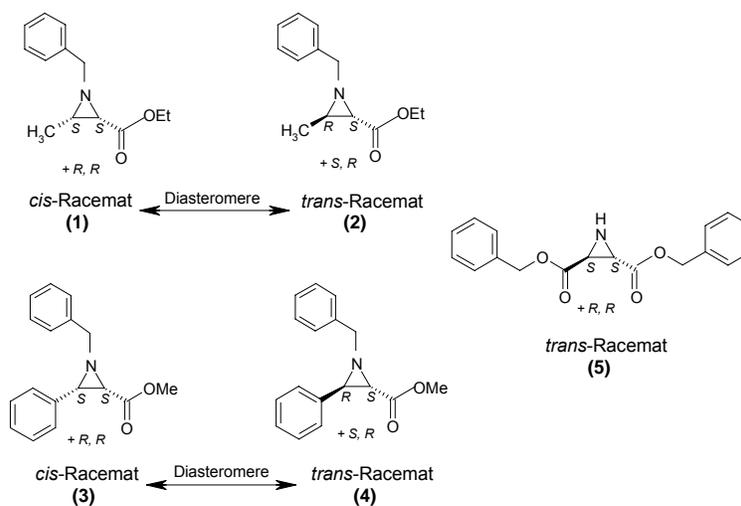


Abb. II.5-4: Aziridin-Derivate

Robuste Basislinientrennungen werden unter Zusatz von Sulf- $\beta$ -CD im wässrigen Phosphatpuffer oder HDAS- $\beta$ -CD im wasserfreien sauren methanolischen HGE erzielt. Die wässrige CE-Methode wird nach ICH-Richtlinie Q2(R1) in Bezug auf die Diastereomerenreinheit von *cis*-Racemat validiert.

Im Rahmen einer Überarbeitung der Monographie von Levodopa wurde die Polarimetrie zur Prüfung auf optische Drehung durch eine chirale HPLC-Methode ersetzt. Enantiomerentrennung erfolgt mit einer RP-18-Säule und einer Mischung aus Methanol und Wasser als mobile Phase, zu der Kupferacetat und *N,N*-Dimethyl-L-phenylalanin gegeben wird. Mit dieser Methode wurde D-Dopa auf 0,5 % begrenzt. Zusätzlich führt diese Methode zu einer schlechten Peakform der Hauptkomponente und so zu einer unsicheren Limitierung von D-Dopa in Levodopa durch den Flächenvergleich.

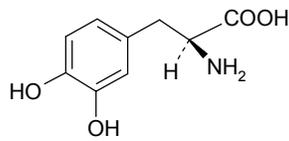


Abb. II.5-5: Levodopa

Eine CD-modifizierte CE-Methode von Hoogmartens *et al.*<sup>182</sup> wurde zur Enantiomerenreinheit von Levodopa optimiert und validiert. Mit Hilfe einer unbeschichteten Quarzglaskapillare und eines HGE von 20 mM Phosphatpuffer pH 2,5 und 10 mM Sulf- $\beta$ -CD konnte die Enantiomerentrennung mit höherer Auflösung im Umkehrpolungsmodus erzielt werden. Die Bestimmungsgrenze von D-Dopa betrug gemäß der ICH-Richtlinie Q2(R1) 0,04 % in Bezug auf den Gehalt von Levodopa.

Im letzten Abschnitt wurde an einem internationalen Ringversuch zur Enantiomerenreinheit von Timololmaleat mittels wasserfreier CE-Methode<sup>186</sup> (NACE) teilgenommen.

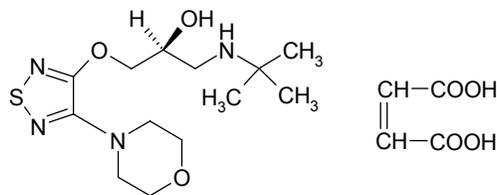


Abb. II.5-6: S-Timololmaleat

Die Durchführung erfolgt mit der Testung einer Systemeignung sowie mit der Bestimmung des Gehalts an *R*-Timolol in vier *S*-Timolol-Proben. Die Beurteilung der Präzision sowie die Ringversuchstudie erfolgt durch die Ermittlung der statistischen Varianzen zwischen verschiedenen Laboratorien, Messtagen und Bestimmungen

## 6 Summary

The purity of drugs and their preparations is one important aspect for the quality assessment. Aim of the present work was the development and validation of chromatographic and electrophoretic methods for impurity testing of drugs and their formulations. This thesis is divided in two main chapters. First, validated HPLC and CE methods for the impurity profiling of atropine sulfate were developed. Second, chiral separations and determination of enantiomeric impurity for various examples of chiral drugs by means of cyclodextrin-modified capillary electrophoresis are described.

The current test for related substances of atropine sulphate in European Pharmacopoeia is using ion pair chromatography. This IPC method especially in combination with gradient elution tends to be time-consuming due to long equilibration periods and it is often not very robust.

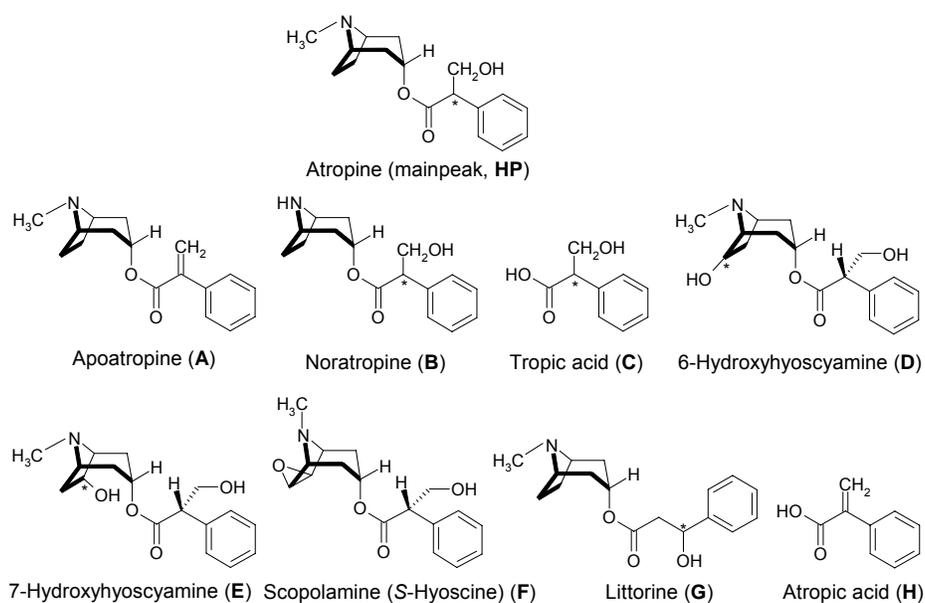


Fig. II.6-1: Atropine and related substances.

In order to separate atropine sulphate from the major degradation products (**A**, **C** and **H**) and other related alkaloids of natural origin (**B**, **D**, **E**, **F** and **G**) in short analysis time, a hydrophilic embedded RP 18 column was used. The mobile phase contained acetonitrile and phosphate buffer (pH 2.5). For a sufficient retentions of the positively charged basic components as well as for a completely baseline separation of all impurities, a gradient was applied. The method was validated with respect to a quantitative determination of all related substances of atropine sulfate by using the external standard tropic acid. This method was very robust and able to guarantee a precise and accurate determination of all impurities content.

This HPLC method has been successfully applied, according to the Guideline Q1A(R2) of the International Conference on Harmonization (ICH) for the long stability testing of the pharmaceutical products "Atropine sulfate-Eye drops 0.5 and 2.0 %". The loss of active substance as well as the level of degradation and related substances has been determined and the margin of analytical error characterized.

Stability studies of atropine sulfate eye drops have been evaluated under three different climatic zones 1-3, namely refrigerator, normal conditions and accelerated conditions. The data of long stability have shown that the loss of active substance atropine sulfate depended on the storage conditions. The loss of atropine sulfate was found to be 0.7 and 1.05 % per year for the climatic zone 1 and 2, respectively. No significant influences of these values were observed for different dosages of eye drops 0.5 and 2.0 %. The total limits of impurities for both storage conditions 1 and 2 were found to be 0.45 and 0.90 %, respectively, and thus were significant lower than the 1.5 % of the nominal limit according to the European Pharmacopoeia.

An additional CE method for impurity profiling of atropine sulphate based on microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) was developed and validated. This technique makes it possible to separate atropine sulfate, its degradation products and related substances.

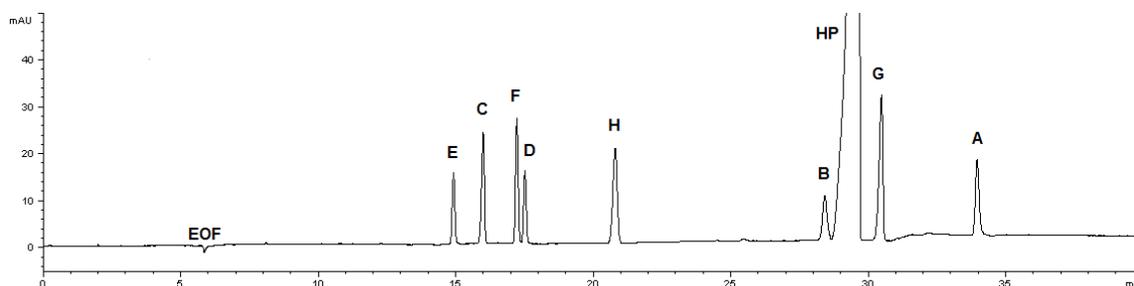


Fig. II.6-2: Elektropherogramm of MEEKC separation of atropine and its impurities.

The optimized oil-in-water microemulsion background electrolyte consists of 0.8 % octan as oil phase, 6.6 % butanol as co-surfactant, 2.0 % isopropanol as organic modifier, 4.45 % sodium dodecyl sulfate as surfactant and 86.15 % sodium tetraborate buffer (10 mM, pH 9.0) as aqueous phase. In order to shorten analysis time a voltage gradient was applied and the UV-detection is performed at 195 nm. Under these electrophoretic conditions a successful separation of atropine and all impurities was achieved (Fig. II.6-2).

The MEEKC method, which was employed to quantitative determine the related substances of atropine sulphate by using an external standard of tropic acid, was validated according to the ICH guidelines Q2(R1). The comparison to the HPLC method revealed the newly established MEEKC

method to be better than with HPLC with respect to peak forms and resolution values of peaks **E**, **D** and **F**. The precision and the relative standard deviations obtained with HPLC method were less than with MEEKC method.

The second part of the thesis describes analytical CE methods dealing with the enantioseparations of many chiral substances by using cyclodextrins (CDs) and their derivatives as chiral selectors. CD-modified microemulsion electrokinetic chromatography (CD-MEEKC) was applied to chiral separation of tropa alkaloids, namely atropine, scopolamine, ipratropium und homatropine.

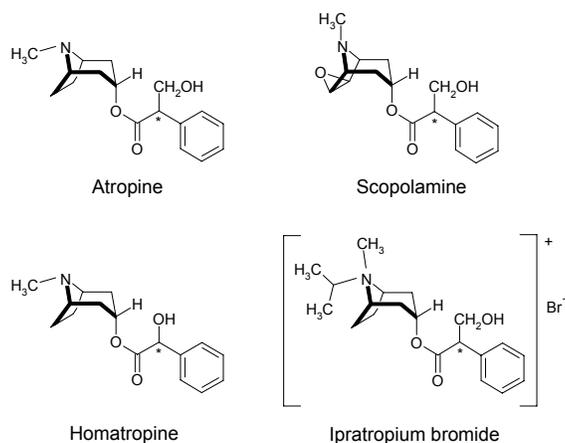


Fig. II.6-3: Atropine, scopolamine, homatropine and ibratropium bromide.

The standard O/W microemulsion BGE composed of 0.8 % octan, 6.6 % butanol, 2.0 % sodium dodecyl sulphate and 90.6 % sodium tetraborate buffer (10 mM, pH 9.0). Optimized enantioseparations with high resolution and short migration times of all tropa alkaloids were achieved by utilizing either *heptakis*(2,3-di-*O*-methyl-6-sulfo)- $\beta$ -CD (HDMS- $\beta$ -CD) or sulphated  $\beta$ -CD (Sulf- $\beta$ -CD) as chiral selector in a concentration of 5.0 mM. The CD-MEEKC method was superior to the CD-modified CE method with respect to the enantioseparation of scopolamine.

Aziridine derivatives (**1-5**) are attracting pharmacological interest as irreversible protease inhibitors. The diastereomeric purity of the potential protease inhibitors should be confirmed prior to the biological assay. The aim was to develop CD-modified CE methods for separation of the enantio- and diastereomers of aziridine derivatives.

Robust baseline separations were obtained using Sulf- $\beta$ -CD in aqueous phosphate buffer or HDAS- $\beta$ -CD in nonaqueous acidic methanolic BGE. The aqueous CE method intended as a diastereomeric impurity determination of racemic *cis*-aziridine was validated according to the ICH guideline Q2(R1).

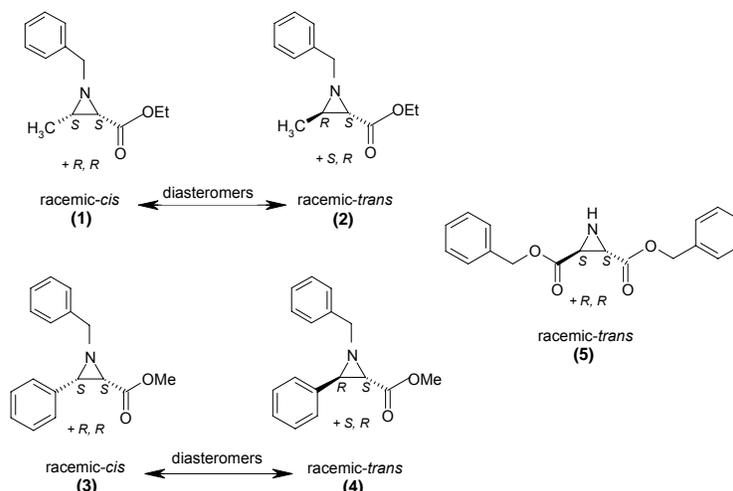


Fig. II.6-4: Aziridine derivatives.

The monograph of levodopa was recently revised in order to replace a poor optical rotation test with a better chiral HPLC method. Using an achiral RP-18 column the enantioseparation can be achieved using a mobile phase composed of copper acetate and *N,N*-dimethyl-L-phenylalanine in a water-methanol mixture. The method is able to limit the D-dopa to less than 0.5 % only and the peak shape of the uncertain major peak is rather poor which makes determination of the enantiomeric impurity difficult.

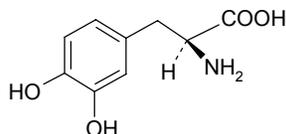


Fig. II.6-5: Levodopa

A CD-modified CE method of Hoogmartens *et al.*<sup>182</sup> was optimized and validated to evaluate the enantiomeric impurity of levodopa. Using an uncoated fused-silica capillary and a BGE composed of 10 mM Sulf- $\beta$ -CD in 20 mM phosphate buffer pH 2.5 in a reversed polarity mode the resolution between both enantiomers D,L-dopa was higher than 6. The limit of quantification of the D-dopa according to the ICH guideline Q2(R1) was found to be 0.04 % corresponding to the major peak (L-dopa).

The last chapter describes the participation in one international interlaboratory trial for the determination of enantiomeric impurity of *S*-timolol maleate using a nonaqueous CE method (NACE).<sup>186</sup>

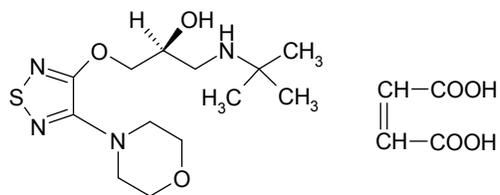


Fig. II.6-6: *S*-timolol maleate

The method performance was examined using a suitability test; subsequently the precision was evaluated by quantification of variances in the determination of *R*-timolol at four different impurity levels in *S*-timolol maleate samples. Different variances, between laboratories, days and replicates, were calculated for the judgment of the interlaboratory study.

### III Experimenteller Teil

#### 1 Reagenzien und Materialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Substanzen werden in tabellarischer Form aufgelistet:

##### 1.1 Wirkstoffe und Verunreinigungen

Tabelle III.1-1: Wirkstoffe und Verunreinigungen

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller / Lieferant
6-Hydroxyhyoscyamin	CRS	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, D
7-Hydroxyhyoscyamin	CRS	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, D
Apoatropin	synthetisiert	Institut für Pharmazie und LMC, Würzburg, D
Atropasäure	synthetisiert	Institut für Pharmazie und LMC, Würzburg, D
Atropinsulfat	CRS	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DL-Dopa	CRS (Racemat)	Fluka, Buchs, Schweiz
L-Dopa	CRS	Fluka, Buchs, Schweiz
Homatropin	CRS	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Ipratropium	CRS	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Littorin	CRS	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, D
Noratropin	CRS	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, D
Scopolamin (Hyoscin)	CRS (Racemat)	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tropasäure	CRS	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, D
S-Timololmaleat	Bulk (Ringversuch)	Institut für Pharmazie, Universität Liege, Belgien
R-Timololmaleat	CRS (Ringversuch)	Institut für Pharmazie, Universität Liege, Belgien
Pyridoxin	CRS (Ringversuch)	Institut für Pharmazie, Universität Liege, Belgien

## 1.2 Puffer- und Hintergrundelektrolytensubstanzen

Tabelle III.1-2: Puffer- und Hintergrundelektrolytensubstanzen

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller / Lieferant
Ameisensäure	99,6 %	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Ammoniumformiat	Ultra $\geq$ 99,0 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Borsäure	p.a. 99,5 %	Grüssing, Filsum, D
1-Butanol	> 99,7 %, GC	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Deoxycholsäure, Natrium Monohydrat	p.a. 99 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylacetat	99,98 %, GC	Fischer Scientific, Nidderau, D
<i>n</i> -Heptan	99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
<i>n</i> -Hexan	$\geq$ 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Kaliumformiat	Ultra $\geq$ 99,5 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a. 99,5 %	Riedel-de Haën <sup>®</sup> , Seelze, D
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a. 99,5 %	Grüssing, Filsum, D
(1S)-(+)-10 Kamphorsulfonsäure	99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Natriumdihydrogenphosphat	p.a. 99,5 %	Riedel-de Haën <sup>®</sup> , Seelze, D
Natriumdihydrogenphosphat	p.a. 99,5 %	Grüssing, Filsum, D
Natriumlaurylsulfat (SDS)	$\geq$ 99,0 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumoctanoat	99 %, GC	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumtetraborat Decahydrat	Ultra $\geq$ 99,5 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Natriumtetraborat Decahydrat	p.a. 99,5 %	Grüssing, Filsum, D
Natronlauge (0,1N) Lösung		VWR International GmbH, Darmstadt, D
N-tris[hydroxymethyl]-3- aminopropansulfonsäure (TAPS)	$\geq$ 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
<i>n</i> -Octan	98,0 %	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
1-Pentanol	$\geq$ 99,0 %	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen, D
Phosphorsäure	p.a. 85 %	Grüssing, Filsum, D
Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan (TRIS)	p.a. 99,5 %	Grüssing, Filsum, D

### 1.3 Cyclodextrine

Tabelle III.1-3: Cyclodextrine

Substanz	Abkürzung	Hersteller / Lieferant
$\alpha$ -CD		Wacker-Chemie, Burghausen, D
$\beta$ -CD		Wacker-Chemie, Burghausen, D
$\gamma$ -CD		Wacker-Chemie, Burghausen, D
<i>Heptakis</i> (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -CD	DM- $\beta$ -CD	Fluka, Buchs, Switzerland
<i>Heptakis</i> (2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -CD	TM- $\beta$ -CD	Fluka, Buchs, Switzerland
Sulfatiertes $\beta$ -CD	Sulf- $\beta$ -CD	Fluka, Buchs, Switzerland
Sulfatiertes $\beta$ -CD	Sulf- $\beta$ -CD	Aldrich, Milwaukee, WI, USA
<i>Heptakis</i> (2,6-di-O-methyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD	HDMS- $\beta$ -CD	Regis, ict Handels GmbH, Bad Homburg, D
<i>Heptakis</i> (2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)- $\beta$ -CD	HDAS- $\beta$ -CD	Regis, ict Handels GmbH, Bad Homburg, D

### 1.4 Lösungsmittel

Tabelle III.1-4: Lösungsmittel

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller / Lieferant
2-Propanol	HPLC Gradient grade 99,99 %	Fischer Scientific, Nidderau, D
Acetonitril	ROTISOLV <sup>®</sup> HPLC Gradient grade 99,95 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Acetonitril	HPLC Gradient grade 99,99 %	Fischer Scientific, Nidderau, D
Methanol	HPLC Gradient grade 99,99 %	Fischer Scientific, Nidderau, D
Wasser	Milli-Q-Wasser	Milli-Q, Millipore, Billerica, MA, USA

## 2 Geräte und Software

### 2.1 HPLC

Tabelle III.2-1: HPLC-Anlagen und Software

Geräte	Beschreibung / Hersteller	Sonstige Bemerkung
<i>HPLC-DAD:</i>	Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Böblingen, D	
Binäre Pumpe	G 1312 A, Agilent Technologies, Böblingen, D	
Vakuumentgaser	G 1322 A, Agilent Technologies, Böblingen, D	
Temperierter Säulenofen	G 1316 A, Agilent Technologies, Böblingen, D	
Autosamplere	G 1313 A, Agilent Technologies, Böblingen, D	
DAD-Detektor	G 1315 B, Dioden-Array Detektor, Agilent Technologies, Böblingen, D	
Software	ChemStation für LC-System und 3D Software (Version 8.04), Agilent Technologies, Böblingen, D	
<i>HPLC-UV:</i>	Varian ProStar 210, Varian Analytical Instruments, Walnut Creek, USA	Für die Bestimmung von laborinterner Präzision
Pumpe	M 210, Varian Instruments, Walnut Creek, USA	
Temperiertes Säulenofen	M 410, Varian Instruments, Walnut Creek, USA	
Autosamplere	M 410, Varian Instruments, Walnut Creek, USA	
UV-VIS-Detektor	M 320, Varian Instruments, Walnut Creek, USA	
Software	Star LC WorkStation Software (Version 6.0), Varian Instruments, Walnut Creek, USA	
HPLC-Säulen RP-18:	Aquasil <sup>®</sup> C18, 125 x 4,6 mm (5 µm), Batch Nr. P2J03, Thermo Hypersil-Keystone, Kleinostheim, D	
	Aquasil <sup>®</sup> C18, 125 x 4,6 mm (5 µm), Batch Nr. P4H02, Thermo Hypersil-Keystone, Kleinostheim, D	Für die Bestimmung von laborinterner Präzision
HPLC-Säule RP-8:	Superspher <sup>®</sup> 60 C8, 124 x 4,5 mm (5µm), Merck, Darmstadt, D	Für die Bestimmung der Richtigkeit

## 2.2 Kapillarelektrophorese

Tabelle III.2-2: CE-Anlagen und Software

Geräte	Beschreibung / Hersteller
HP <sup>3D</sup> -CE:	Agilent Technologies, Waldbronn, D
PDA-Detektor	Photo-Dioden-Array-Detektor, Agilent Technologies, Waldbronn, D
Software	ChemStation Rev. A 08.03, Agilent Technologies, Waldbronn, D
P/ACE System MDQ:	CE Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA
Detektor	UV / Photo-Dioden-Array (PDA), Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA
Software	P/ACE MDQ Version 2.3, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA
Kapillaren:	50 und 75 µm ID, 375 µm OD, Polymicro, BGB-Analytik, Schloßböckelheim, D

## 2.3 Sonstige Geräte und Laborbedarf

Tabelle III.2-3: Sonstige analytische Geräte und Laborbedarf

Geräte	Beschreibung / Hersteller
Waage	Sartorius Research R 160, P, Sartorius, Göttingen, D
pH-Meter	PHM 220, MeterLab, Lyon, Frankreich
Trockenschrank	Heraeus (Version T 20), Hanau, D
Eppendorf-Pipetten	Reference (10 - 100 µl, 100 - 1000µl, 500 - 5000µl), Eppendorf, Köln, D
Ultraschallbad	Sonorex RK 153, Bandelin, Berlin, D
CME-Filter (0,22 µm)	Zellulosemischester-Membran (Acetat und Nitrat, CME) Filter, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
PVDF-Filter (0,22 µm)	Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) Filter, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Das in den Messungen eingesetzte Wasser wurde von der Millipore-Anlage entnommen (Milli-Q, Millipore, Billerica, MA, USA). Alle Puffer und Hintergrundelektrolyte wurden vor der Nutzung durch einen Membranenfilter filtriert. CME-Filter mit der Porengröße 0,22 µm wurde für wässrige Lösungen bzw. PVDF-Filter mit der gleichen Porengröße für organische Lösungen verwendet.

### **3 Herstellung der Lösungen und Messbedingungen**

#### **3.1 Quantitative Reinheitsprüfung von Atropinsulfat mittels HPLC**

Folgende validierte HPLC-Methode wurde zur Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat eingesetzt:

##### **3.1.1 Puffer und Lösungsmittelmischung**

In der Standardmethode wird ein Phosphatpuffer (20 mM, pH 2,5) verwendet. 2,722 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in einen 1000 ml Messkolben eingewogen und mit Wasser auf ca. 950 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wird der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure (85 %) auf 2,5 eingestellt. Anschließend wird mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Vor dem Gebrauch an der Varian-Anlage wird der Puffer durch 20-minütige Ultraschallbehandlung entgast. Zur Herstellung der Lösungsmittelmischung (LM) werden in einen 1000 ml Messkolben 800 ml Phosphatpuffer pH 2,5 und 200 ml Acetonitril gemischt.

##### **3.1.2 Probenbereitung**

Zur Herstellung der Proben werden folgende Stammlösungen benötigt:

Stammlösung I: 100 mg Atropinsulfat CRS werden in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit der Lösungsmittelmischung auf 100,0 ml aufgefüllt.

Stammlösungen II: Jeweils 100 mg Verunreinigung werden in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit der LM auf 100,0 ml aufgefüllt. Wiederum jeweils 1 ml von jeder Lösung wird zu 100,0 ml mit der LM verdünnt.

Zur Herstellung der Untersuchungslösung während der Methodenentwicklung werden 10 ml Stammlösung I und jeweils 1 ml Stammlösung II in einen 100 ml Messkolben pipettiert und mit der LM auf 100,0 ml aufgefüllt. Die Kalibrierlösungen werden von Stammlösungen II in dem gegebenen Arbeitsbereich weiter verdünnt. Zur Herstellung der Proben von Atropinsulfat mit verschiedenen Grenzen an Verunreinigungen für die Validierung der Methode werden 10 ml Stammlösung I und je eine entsprechende Menge jeder Stammlösung II in einen 100 ml Messkolben gemischt und dann zu 100,0 ml mit der LM verdünnt.

Für die Herstellung des externen Standards von Tropasäure (1 µg/ml) werden 5 ml Tropasäure-Stammlösung II in einen 50 ml Messkolben pipettiert und mit der LM auf 50,0 ml aufgefüllt. Alle bekannten Verunreinigungen werden in Bezug auf Tropasäure (externer Standard) unter Berücksichtigung des Responsefaktors quantifiziert. Für unbekannte Verunreinigungen werden die gleiche Nachweisempfindlichkeit wie für die Tropasäure, d.h. ein Responsefaktor von 1,0 angenommen

### 3.1.3 Chromatographische Bedingungen

Geräte	Agilent 1100 LC 3D			
Trennsäule:	Thermo Hypersil Aquasil C18, 125x4,6 mm (5µm)			
Fließmittel (FM):	FM A:	20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,5		
	FM B:	ACN		
Gradient:	Zeit	FM A [%]	FM B [%]	Flussrate
	[min]	(V/V)	(V/V)	[ml/min]
	0-4	75	25	0,6
	4-6	77	23	1,0
	6-12	55	45	1,0
	Postrun: 2 min	75	25	1,0
Temperatur:	25 °C			
Injektionsvolumen:	100 µl			
Detektion:	215 nm (UV)			

### 3.2 Langzeitstabilität von Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 %

#### 3.2.1 Zusammensetzung der Fertigarzneimittel Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 und 2,0 %

Rezepturen der Augentropfen 0,5 und 2,0 %, die von BfArM hergestellt wurde.

Fertigarzneimittel	Atropinsulfat- Augentropfen 0,5 %	Atropinsulfat- Augentropfen 2,0 %
Zusammensetzung einer Lösung der Augentropfen:		
1. arzneilich wirksame Bestandteile:		
Atropinsulfat · 1H <sub>2</sub> O	0,513 g	2,053 g
2. sonstige Bestandteile:		
EDTA-haltige Benzalkonium	10 g	10 g
Natriumchlorid	0,833 g	0,633 g
Wasser Aqua ad injectabilia	ad 100 g	ad 100 g

### 3.2.2 Lösungen- und Probenbereitung

Für die Gehalts- und Reinheitsbestimmung wird sowohl ein Phosphatpuffer (20 mM, pH 2,5) als auch die LM verwendet. Die Herstellung ist unter 3.1.1 beschrieben.

Die Gehalts- und Reinheitsbestimmung erfolgt mit Hilfe der externen Standards Atropinsulfat bzw. Tropasäure.

Für die Gehaltsbestimmung werden 3-Kalibrierlösungen von Atropinsulfat in einem Arbeitsbereich von 8 bis 12 mg/100 ml hergestellt. Dazu werden jeweils in einen 100 ml Messkolben 80, 100 und 120 mg Atropinsulfat CRS eingewogen und mit Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt. Je 10 ml jeder Lösung werden zu 100,0 ml mit der LM verdünnt. Die Kalibrierlösungen werden 6-mal vermessen. Mit der erstellten linearen Regression wird der Gehalt an Atropinsulfat in den Proben ermittelt.

Für die Reinheitsbestimmung werden 8-Kalibrierlösungen (0,01, 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25 und 0,30 mg/100 ml) von Tropasäure hergestellt. Dazu werden in einen 100 ml Messkolben 100 mg Tropasäure CRS eingewogen und mit der LM auf 100,0 ml aufgefüllt. 1 ml von dieser Lösung wird zu 100,0 ml mit der LM verdünnt. Durch Verdünnung der entsprechenden Menge dieser Stammlösung werden die oben genannten Kalibrierlösungen zum Endvolumen mit der LM hergestellt. Die Kalibrierlösungen werden 5-mal vermessen. Mit der erstellten linearen Regression wird der Gehalt an Verunreinigungen -unter Berücksichtigung der entsprechende Responsefaktor- bestimmt.

Zur Stabilitätsmessung werden 3 Proben pro Charge hergestellt. Dazu werden in einen 50 ml Messkolben 5 ml Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 % mit Wasser auf 50,0 ml aufgefüllt und ein weiteres Mal 10:50 mit der LM verdünnt. Für 2,0%ige Proben werden in einen 100 ml Messkolben 5 ml Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 % mit Wasser auf 100,0 ml aufgefüllt und ein weiteres Mal 10:100 mit der LM verdünnt.

### 3.2.3 Chromatographische Bedingungen

Folgende validierte HPLC-Methode erwies sich zur Gehaltsbestimmung von Atropinsulfat als geeignet:<sup>36</sup>

Geräte	Agilent 1100 LC 3D
Trennsäule:	Thermo Hypersil Aquasil C18, 125x4,6 mm (5µm)
Fließmittel (FM):	FM A: 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,5 FM B: ACN
Zusammensetzung:	A:B 80:20 [%] (V/V)
Flussrate:	2,0 ml/min
Laufzeit	3 min
Temperatur:	25 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektion:	215 nm (UV)

Die HPLC-Methode zur Reinheitsbestimmung ist unter 3.1.3 beschrieben.

### 3.3 Quantitative Reinheitsprüfung von Atropinsulfat mittels MEEKC

Folgende validierte MEEKC-Methode wurde zur Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat eingesetzt:

#### 3.3.1 Mikroemulsionshintergrundelektrolyt

In der Standardmethode wird ein Natriumtetraboratpuffer (10 mM, pH 9,2) für die Herstellung der Mikroemulsion verwendet. 3,814 g Natriumtetraborat werden in einen 1000 ml Messkolben eingewogen und mit Wasser auf ca. 990 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad gestellt (pH-Wert dieser Lösung liegt zwischen 9,17 und 9,22). Danach wird der pH-Wert entweder mit 0,02 M Natronlauge oder mit 0,02 M Borsäure-Lösung genau auf 9,2 eingestellt. Anschließend wird mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Zur Herstellung der Mikroemulsion-HGE werden die definierten Mengen folgenden Substanzen in ein geeignetes Gefäß in folgender Reihenfolge gewogen:

- 0,8 g Octan
- 6,6 g Butanol
- 2,0 g Isopropanol
- 4,45 g SDS (Natriumlaurylsulfat)
- 86,15 g Natriumtetraboratpuffer (10 mM, pH 9,2)

Danach wird diese Matrix zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad für ca. 20 Minuten gestellt. Die Endlösung soll sichtbar klar sein. Alle anderen Mikroemulsionen der Methodenentwicklung mit verschiedenen Zusammensetzungen oder mit anderen Typen der aufgeführten Substanzen (z.B. anderes Tensid oder anderer organischer Modifier) werden auf gleichem Weg hergestellt. Bei der Herstellung einer W/O-Mikroemulsion wird der organische Modifier (MeOH oder ACN) in definierten Mengen zur fertig hergestellten W/O-Mikroemulsion gegeben, damit diese sich nicht zersetzt.

### 3.3.2 Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Proben werden folgende Stammlösungen benötigt:

Stammlösung I: 1,0 g Atropinsulfat CRS wird in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit der Mikroemulsion auf 100,0 ml aufgefüllt.

Stammlösungen II: Jeweils 20 mg Verunreinigung werden in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit der Mikroemulsion auf 100,0 ml aufgefüllt.

Stammlösungen III: Jeweils 1 ml von jeder Stammlösung II wird in einen 100 ml Messkolben pipettiert und mit der Mikroemulsion zu 100,0 ml verdünnt.

Zur Herstellung der Untersuchungslösung für die Methodenentwicklung werden 1 ml Stammlösung I und jeweils 0,5 ml Stammlösung II in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit der Mikroemulsion auf 10,0 ml aufgefüllt. Die Kalibrierlösungen aller Verunreinigungen werden von Stammlösungen III in dem gegebenen Arbeitsbereich weiter verdünnt. Zur Herstellung der Proben von Atropinsulfat mit verschiedenen Grenzen für die Verunreinigungen (Validierung der Methode) werden 1 ml Stammlösung I und je eine entsprechende Menge jeder Stammlösung III in einen 10 ml Messkolben gemischt und dann zu 10,0 ml mit der Mikroemulsion verdünnt.

Für die Herstellung des externen Standards von Tropasäure (5 µg/ml) werden 2,5 ml Tropasäure-Stammlösung II in einen 100 ml Messkolben pipettiert und mit der Mikroemulsion auf 100,0 ml aufgefüllt.

## Elektrophoretische Bedingungen

Geräte	Agilent HP <sup>3D</sup> -CE		
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, absolute Länge 48,5 cm, effektive Länge 40,0 cm, Innendurchmesser 50 µm, Außendurchmesser 375 µm		
Mikroemulsion-HGE	Octan	0,8 % (w/w)	
	Butanol	6,6 % (w/w)	
	Propanol	2,0 % (w/w)	
	SDS	4,45 % (w/w)	
	Natriumtetraboratpuffer	86,15 % (w/w)	
	(10 mM, pH 9,2)		
Injektion	Hydrodynamisch, 5 Sekunden mit 50 mBar		
Trennungsspannung	15 kV		
Temperatur	30 °C		
Detektion	195 nm (UV)		
Konditionierung	<i>Neue Kapillare: (40 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	10 min	2 Bar
	Wasser	5 min	2 Bar
	Phosphorsäure 0,1 M	10 min	2 Bar
	Wasser	5 min	2 Bar
	<i>Tageskonditionierung: (30 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	5 min	2 Bar
	Wasser	5 min	2 Bar
	Mikroemulsion-HGE	10 min	3 Bar
	<i>Zwischen den Läufen: (30 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	3 min	2 Bar
	Methanol	3 min	2 Bar
	Phosphorsäure 0,1 M	2 min	2 Bar
	Wasser	2 min	2 Bar
	Mikroemulsion-HGE	6 min	3 Bar
	<i>Am Ende der Messserie:</i>		
	Natronlauge 0,1 M	10 min	2 Bar
	Wasser	5 min	2 Bar
	Methanol	15 min	50 mBar

### 3.4 Chirale MEEKC-Trennung von Tropan-Alkaloiden

Folgende CD-modifizierte MEEKC-Methode wurde zur Enantiomerentrennung von Tropan-Alkaloiden eingesetzt:

#### 3.4.1 Hintergrundelektrolyt

Bei der CD-MEEKC-Methode wird eine Standard-SDS-Mikroemulsion verwendet. Die Herstellung eines Natriumtetraboratpuffers (10 mM, pH 9,2) ist unter 3.3.1 beschrieben. Zur Herstellung der Mikroemulsion wird die definierte Menge an folgenden Substanzen in ein geeignetes Gefäß in folgender Reihenfolge gewogen:

- 0,8 g Octan
- 6,6 g Butanol
- 2,0 g SDS (Natriumlaurylsulfat)
- 90,6 g Natriumtetraboratpuffer (10 mM, pH 9,2)

Danach wird dieses Gefäß zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad für ca. 20 Minuten gestellt. Die Endlösung soll sichtbar klar sein. Die Cyclodextrine werden direkt in der SDS-Mikroemulsion eingewogen und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad gestellt. Beim Einsatz der organischen Modifier Methanol, Acetonitril und Isopropanol ist ein Teil des Tetraboratpuffers in der Mikroemulsion durch sie ersetzt worden.

#### 3.4.2 Probenvorbereitung

Die Proben werden in einer Konzentration von 0,2 mg/ml injiziert. Dazu werden 20 mg Racemat in einen 100 ml Kolben eingewogen und mit der SDS-Mikroemulsion auf 100,0 ml aufgefüllt und in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten gestellt.

## 3.4.3 Elektrophoretische Bedingungen

Geräte	Agilent HP <sup>3D</sup> -CE		
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, absolute Länge 32,5 cm, effektive Länge 24,0 cm, Innendurchmesser 50 µm, Außendurchmesser 375 µm		
HGE	Mikroemulsion:		
	Octan	0,8 % (w/w)	
	Butanol	6,6 % (w/w)	
	SDS	2,0 % (w/w)	
	Natriumtetraboratpuffer (10 mM, pH 9,2)	90,6 % (w/w)	
	β-CD-Derivate	5 mM	
Injektion	Hydrodynamisch, 5 Sekunden mit 50 mBar		
Trennspannung	15 kV		
Temperatur	30 °C		
Detektion	195 nm (UV)		
Konditionierung	<i>Neue Kapillare:</i> (40 °C)		
	Natronlauge 0,1 M	5 min	2 Bar
	Wasser	3 min	2 Bar
	Phosphorsäure 0,1 M	5 min	2 Bar
	Wasser	3 min	2 Bar
	<i>Tageskonditionierung:</i> (30 °C)		
	Natronlauge 0,1 M	3 min	2 Bar
	Wasser	3 min	2 Bar
	CD-Mikroemulsion-HGE	10 min	3 Bar
	<i>Zwischen den Läufen:</i> (30 °C)		
	Natronlauge 0,1 M	3 min	2 Bar
	Methanol	3 min	2 Bar
	Phosphorsäure 0,1 M	2 min	2 Bar
	Wasser	2 min	2 Bar
	CD-Mikroemulsion-HGE	5 min	3 Bar
	<i>Am Ende der Messserie:</i>		
	Natronlauge 0,1 M	5 min	2 Bar
	Wasser	3 min	2 Bar
	Methanol	10 min	50 mBar

### 3.5 Chirale Trennung von Aziridin-Derivaten

Folgende CD-modifizierte CE-Methoden wurden zur Diastereomeren- bzw. Enantiomertrennung von Aziridin-Derivaten eingesetzt:

#### 3.5.1 Wasserfreie CE-Methode (NACE-Methode)

##### 3.5.1.1 Methanolischer Hintergrundelektrolyt (MeOH-HGE)

Bei der NACE-Methode wird entweder HDMS- $\beta$ -CD oder HDAS- $\beta$ -CD als chiraler Selektor eingesetzt. Zur Herstellung des MeOH-HGE mit 25 mM HDMS- $\beta$ -CD werden 40 mg Natriumhydroxid in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit Methanol (MeOH) auf ca. 90 ml aufgefüllt. 340  $\mu$ l Phosphorsäure werden tropfenweise unter Rühren zugegeben, dann mit MeOH auf 100,0 ml aufgefüllt. In diesem sauren methanolischen Puffer wird das HDMS- $\beta$ -CD gelöst. 0,256 g HDMS- $\beta$ -CD werden in einen 5 ml Messkolben eingewogen und mit saurem MeOH-Puffer auf 5,0 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten gestellt.

Für MeOH-HGE mit 10 mM HDAS- $\beta$ -CD werden 600  $\mu$ l Triethylamin und 1 ml Chloressigsäure in einen 100 ml Messkolben pipettiert, der mit 50 ml MeOH gefüllt wird. Anschließend wird mit MeOH auf 100,0 ml aufgefüllt (saurer MeOH-Puffer für HDAS- $\beta$ -CD). 0,122 g HDAS- $\beta$ -CD werden in einen 5 ml Messkolben eingewogen und mit dem sauren MeOH-Puffer auf 5,0 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten gestellt.

##### 3.5.1.2 Probenvorbereitung

10 mg Aziridin-Racemat werden in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit Acetonitril auf 10,0 ml aufgefüllt. 250  $\mu$ l dieser Lösung werden in einen 5 ml Messkolben pipettiert und mit entsprechendem saurem MeOH-Puffer, je nach verwendete  $\beta$ -CDs, zu 5,0 ml verdünnt.

## 3.5.1.3 Elektrophoretische Bedingungen

Geräte	CE Beckman P/ACE System MDQ		
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, absolute Länge 39,0 cm, effektive Länge 29,0 cm, Innendurchmesser 50 µm, Außendurchmesser 375 µm		
HDMS-MeOH-HGE	Phosphorsäure	20 mM	
	Natriumhydroxid	10 mM	
	HDMS-β-CD	25 mM	
HDAS-MeOH-HGE	Chloressigsäure	20 mM	
	Triethylamin	10 mM	
	HDAS-β-CD	10 mM	
Injektion	Elektrokinetisch, 10 Sekunden mit 5 kV		
Trennungsspannung	10 kV		
Temperatur	20 °C		
Detektion	214 nm (UV)		
Konditionierung	<i>Neue Kapillare: (25 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	5 min	20 Psi
	Wasser	5 min	20 Psi
	Phosphorsäure 0,1 M	5 min	20 Psi
	Wasser	5 min	20 Psi
	<i>Tageskonditionierung: (20 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	3 min	20 Psi
	Methanol	3 min	20 Psi
	Saures Methanol	10 min	20 Psi
	<i>Zwischen den Läufen: (20 °C)</i>		
	Methanol : Acetonitril (1:1)	2 min	20 Psi
	Saures Methanol	2 min	20 Psi
	MeOH-HGE	4 min	20 Psi
	<i>Am Ende der Messserie:</i>		
	Natronlauge 0,1 M	3 min	20 Psi
	Methanol	10 min	2 Psi

### 3.5.2 Wässrige CE-Methode

Folgende validierte CD-CE-Methode wurde zur Bestimmung der Diastereomerenreinheit des *cis-1*-Racemats eingesetzt:

#### 3.5.2.1 Hintergrundelektrolyt

In der Standardmethode wird ein Phosphatpuffer (50 mM pH 2,5) mit 2 mM Sulf- $\beta$ -CD verwendet. 6,0 g Natriumdihydrogenphosphat werden in einen 1000 ml Messkolben eingewogen und mit Wasser auf ca. 950 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wird der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure (85 %) auf 2,5 eingestellt. Anschließend wird mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. 20,5 mg Sulf- $\beta$ -CD werden in einen 5 ml Messkolben eingewogen und mit Phosphatpuffer pH 2,5 auf 5,0 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad für ca. 2 Minuten gestellt.

#### 3.5.2.2 Probenvorbereitung

800 mg *cis-1*-Racemat und 200 mg *trans-2*-Racemat werden jeweils in einen 100 ml Messkolben eingewogen und 20 ml Acetonitril zugegeben. Zur Beschleunigung dieser Stammlösungen werden sie in ein Ultraschallbad für 5 Minuten gestellt. Anschließend werden sie mit dem Phosphatpuffer pH 2,5 auf 100,0 ml aufgefüllt. Das *cis-1*-Racemat wird als Hauptkomponente aller Probelösungen in einer Konzentration von 2,0 mg/ml verwendet. Zur Herstellung der 9 Konzentrationsstufen des *trans-2*-Racemats (0,10, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,25, 1,50, 2,00 und 2,50 % bezogen auf die Hauptkomponente) werden jeweils in einen 10 ml Messkolben 2,5 ml Stammlösung-*cis-1* und die entsprechende Menge der Stammlösung-*trans-2* pipettiert und mit dem Phosphatpuffer pH 2,5 auf 10,0 ml aufgefüllt. 250  $\mu$ l dieser Lösung werden in einen 5 ml Messkolben pipettiert und mit entsprechendem sauren MeOH zu 5,0 ml verdünnt. Der externe Standard wird durch die Verdünnung von 2,5 ml Stammlösung-*cis-1* mit dem Phosphatpuffer zu 10,0 ml hergestellt.

## 3.5.2.3 Elektrophoretische Bedingungen

Geräte	CE Beckman P/ACE System MDQ		
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, absolute Länge 39,0 cm, effektive Länge 29,0 cm, Innendurchmesser 50 $\mu\text{m}$ , Außendurchmesser 375 $\mu\text{m}$		
HGE	Phosphatpuffer	50 mM, pH 2,5	
	Sulf- $\beta$ -CD	2 mM	
Injektion	Hydrodynamisch, 5 Sekunden mit 0,5 Psi		
Trennungsspannung	15 kV		
Temperatur	25 °C		
Detektion	214 nm (UV)		
Konditionierung	<i>Neue Kapillare: (25 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	5 min	20 Psi
	Wasser	5 min	20 Psi
	Phosphorsäure 0,1 M	5 min	20 Psi
	Wasser	5 min	20 Psi
	<i>Tageskonditionierung: (25 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	3 min	20 Psi
	Wasser	3 min	20 Psi
	Phosphatpuffer pH 2,5	10 min	20 Psi
	<i>Zwischen den Läufen: (25 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	2 min	20 Psi
	Wasser	2 min	20 Psi
	HGE	4 min	20 Psi
	<i>Am Ende der Messserie:</i>		
	Natronlauge 0,1 M	3 min	20 Psi
	Wasser	2 min	20 Psi
	Methanol	10 min	2 Psi

### 3.6 Enantiomerenreinheit von Levodopa

Folgende validierte CD-modifizierte CE-Methode wurde zur Prüfung auf Enantiomerenreinheit von Levodopa eingesetzt:

#### 3.6.1 Hintergrundelektrolyt

In der optimierten CE-Methode wird 10 mM Sulf- $\beta$ -CD in einem Phosphatpuffer (20 mM pH 2,5) verwendet. 2,4 g Natriumdihydrogenphosphat werden in einen 1000 ml Messkolben eingewogen und mit Wasser auf ca. 950 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wird der pH-Wert mit konzentrierter Phosphorsäure (85 %) auf 2,5 eingestellt. Anschließend wird mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. 102,7 mg Sulf- $\beta$ -CD werden in einen 5 ml Messkolben eingewogen und mit dem Phosphatpuffer pH 2,5 auf 5,0 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad für ca. 2 Minuten gestellt.

#### 3.6.2 Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Proben werden folgende Stammlösungen benötigt:

Stammlösung I: 20,0 mg DL-Dopa (Racemat) CRS werden in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit Salzsäure-Lösung (0,1 N) auf 10,0 ml aufgefüllt und in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten bis zur vollständigen Lösung gestellt. 5,0 ml von dieser Lösung werden in einen 50 ml Messkolben pipettiert und mit der HCl-Lösung auf 50,0 ml aufgefüllt.

Stammlösungen II: 100,0 mg L-Dopa CRS werden in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit der HCl-Lösung auf 10,0 ml aufgefüllt und in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten gestellt.

Zur Herstellung der Untersuchungslösung während der Methodenoptimierung wird 1 ml Stammlösung I (DL-Racemat) in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit der HCl-Lösung auf 10,0 ml aufgefüllt. Zur Herstellung der 9 Konzentrationsstufen von D-Dopa mit je 1,0 mg/ml L-Dopa als Hauptkomponente (0,4, 0,8, 1,0, 1,2, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 und 6,0  $\mu$ g/ml) werden jeweils in einen 10 ml Messkolben 1,0 ml Stammlösung-II und die entsprechende Menge der Stammlösung-I, je nach der D-Dopa-Konzentration, pipettiert und mit der HCl-Lösung auf 10,0 ml aufgefüllt.

Zur Herstellung des externen Standards werden 20,0 mg L-Dopa CRS in einen 50 ml Messkolben eingewogen, mit der HCl-Lösung auf 50,0 ml aufgefüllt und in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten gestellt. Ein weiteres Mal 1:50 wird mit der HCl-Lösung verdünnt.

## 3.6.3 Elektrophoretische Bedingungen

Geräte	Agilent HP <sup>3D</sup> -CE		
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, absolute Länge 31,0 cm, effektive Länge 22,5 cm, Innendurchmesser 50 µm, Außendurchmesser 375 µm		
HGE	Phosphatpuffer	20 mM, pH 2,5	
	Sulf-β-CD	10 mM	
Injektion	Hydrodynamisch, 5 Sekunden mit 50 mBar		
Trennungsspannung	-15 kV (Umkehrpolungsmodus)		
Temperatur	20 °C		
Detektion	200 nm (UV)		
Konditionierung	<i>Neue Kapillare: (25 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	10 min	2 Bar
	Wasser	5 min	2 Bar
	Phosphorsäure 0,1 M	10 min	2 Bar
	Wasser	5 min	2 Bar
	<i>Tageskonditionierung: (20 °C)</i>		
	Natronlauge 0,1 M	5 min	2 Bar
	Wasser	3 min	2 Bar
	Phosphatpuffer pH 2,5	6 min	2 bar
	<i>Zwischen den Läufen: (20 °C)</i>		
	Wasser	2 min	2 Bar
	HGE	5 min	2 Bar
	<i>Am Ende der Messserie:</i>		
	Natronlauge 0,1 M	10 min	2 Bar
	Wasser	5 min	2 Bar
	Methanol	10 min	50 mBar

### 3.7 Ringversuch von Timololmaleat

Folgende CD-modifizierte NACE-Methode wurde zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von S-Timolol-Proben eingesetzt:

#### 3.7.1 Methanolischer Hintergrundelektrolyt (MeOH-HGE)

252 mg Kaliumformiat und 697 mg Kamphersulfonsäure werden in einen 100 ml Messkolben eingewogen und mit Methanol (MeOH) auf ca. 50 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten gestellt. 2,76 ml Ameisensäure werden zugegeben und mit MeOH auf 100,0 ml aufgefüllt (saurer MeOH-Puffer). 0,123 g HDMS- $\beta$ -CD wird in einen 2 ml Messkolben eingewogen und mit dem sauren MeOH-Puffer auf 2,0 ml aufgefüllt und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten gestellt.

#### 3.7.2 Probenvorbereitung

Zur Herstellung des internen Standards werden 12,5 mg Pyridoxin in einen 25 ml Messkolben eingewogen und mit MeOH auf 25,0 ml aufgefüllt und in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten gestellt. 2 ml von dieser Lösung werden mit MeOH zu 100,0 ml verdünnt. Für die Aufarbeitung der Proben (**A-D**) werden jeweils 20 mg Substanz in einen 10 ml Messkolben eingewogen, 5 ml interner Standard zugegeben und in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten bis eine vollständige Lösung gestellt. Anschließend mit MeOH auf 10,0 ml aufgefüllt.

Folgende Referenzlösungen werden auch hergestellt:

Referenzlösungen-1: In einem Vial, das getrocknete methanolische Lösung von *R*-, *S*-Timolol und IS enthält, werden 1,5 ml MeOH gegeben und geschüttelt.

Referenzlösungen-2: 20,0 mg *R*-Timolol CRS werden in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit MeOH auf 10,0 ml aufgefüllt und in ein Ultraschallbad für ca. 5 Minuten gestellt. 5 ml von dieser Lösung werden mit MeOH zu 50,0 ml verdünnt. 1 ml von dieser verdünnten Lösung und 5 ml interner Standard werden in einen 10 ml Messkolben pipettiert und mit MeOH auf 10,0 ml aufgefüllt.

Referenzlösungen-3: 1:10-Verdünnung der Referenzlösungen-1 mit MeOH.

## 3.6.3 Elektrophoretische Bedingungen

Geräte	Agilent HP <sup>3D</sup> -CE		
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, absolute Länge 48,5 cm, effektive Länge 40,0 cm, Innendurchmesser 50 µm, Außendurchmesser 375 µm		
MeOH-HGE	Ameisensäure	0,75 M	
	Kamphorsulfonat	30 mM	
	HDMS-β-CD	30 mM	
Injektion	Hydrodynamisch, 8 Sekunden mit 50 mBar		
Trennungsspannung	25 kV		
Temperatur	15 °C		
Detektion	295 nm (UV)		
Konditionierung	<i>Neue Kapillare: (15 °C)</i>		
	Methanol	15 min	2 Bar
	<i>Tageskonditionierung: (15 °C)</i>		
	Saurer methanolischer Puffer	5 min	2 Bar
	MeOH-HGE	5 min	2 Bar
	<i>Zwischen den Läufen: (15 °C)</i>		
	Methanol	2 min	2 Bar
	MeOH-HGE	4 min	2 Bar
	<i>Am Ende der Messserie: (25 °C)</i>		
	Methanol	30 min	2 Bar
	Ammoniumformiat 0,02 M	20 min	2 Bar
	Methanol	30 min	2 Bar

**IV Literatur**

- (1) Nürnberg, E.; Surmann, P.; Bertram, J. (Hrsg), *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Bd. 2, 5. Auflag **1991**, 301-304.
- (2) Ariens, E. J. *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, *25*, 663-668.
- (3) Ariens, E. J. *Stereoselectivity of Bioactive Agents, General Aspects*, in: *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs* (Hrsg.: Ariens, E. J.; Soudijn, W.; Timmermans, P.), Blackwell Scientific Publications, Oxford **1983**, 11-22.
- (4) Imming, P. *Arzneibuchanalytik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart **2006**, 1-17.
- (5) International Conference on Harmonization, *ICH Harmonized Tripartite Guideline Q6A: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products*, May **2000**, <http://www.ich.org>.
- (6) Göber, B. *Pharma. i. u. Z.* **1997**, *26*, 88-97.
- (7) International Conference on Harmonization, *ICH Harmonized Tripartite Guideline Q3A(R2): Impurities In New Drug Substances*, October **2006**, <http://www.ich.org>.
- (8) International Conference on Harmonization, *ICH Harmonized Tripartite Guideline Q3C: Impurities: Guideline for Residual Solvents*, November **1996**, <http://www.ich.org>.
- (9) Ali, S. L. *Pharm. Ztg.* **1998**, *143*, 3694-3695.
- (10) Holzgrabe, U.; Deubner, R.; Novatchev, N.; Wienen, F. *Dtsch. Apo. Ztg.* **2003**, *143*, 3221-3228.
- (11) Hess, S.; Akermann, M.; Ropte, D.; Eger, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *25*, 531-538.
- (12) Hess, S.; Dolker, M.; Haferburg, D.; Kertscher, H. P.; Matysik, F. M.; Ortwein, J.; Teubert, U.; Zimmermann, W.; Eger, K. *Pharmazie* **2001**, *56*, 306-310.
- (13) Lehr, J. G.; Barry, L. T.; Petzinger, G.; Hanna, M. G.; Zito, W. S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, *19*, 373-389.
- (14) Roberts, L. *Science* **1990**, *249*, 988-990.
- (15) Belongia, E. A.; Hedberg, C. W.; Gleich, G. J.; White, K. L.; Mayeon, A. N.; Loegering, D. A.; Dunnette, S. L.; Pirie, P.-L.; MacDonald, K. L.; Osterholm, M. T. *N. Engl. J. Med.* **1990**, *323*, 357-365.
- (16) Mayeno, A. N.; Lin, F.; Foote, C. S.; Loegering, D. A.; Ames, M. M.; Hedberg, C. W.; Gleich, G. J. *Science* **1990**, *250*, 1707-1708.
- (17) Goda, Y.; Suzuki, J.; Maitani, T.; Yoshihira, K.; Takeda, M.; Uchiyama, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2236-2238.
- (18) Müller, A.; Busker, E.; Günther, K.; Hoppe, B. *Bioforum* **1991**, *14*, 350-354.
- (19) *Tryptophan Monographie, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe **2007**, DAV Stuttgart, Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag Eschborn.
- (20) Hildebrandt, J. R. *Pharm. Ind.* **2002**, *64*, 147-150.
- (21) Feng, L.; Johanson, M. E. *J. Chromatogr. A* **1999**, *832*, 211-224.
- (22) Novatchev, N.; Holzgrabe, U. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *28*, 475-486.
- (23) Wienen, F.; Deubner, R.; Holzgrabe, U. *Pharmeuropa* **2003**, *15*, 273-279.
- (24) Wienen, F.; Holzgrabe, U. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 2948-2957.
- (25) Blaschke, G. *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 14-25.
- (26) Blaschke, G.; Kraft, H. P.; Fichentscher, K.; Köhler, F. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* **1979**, *29*, 1640-1642.
- (27) FDA (Food and Drug Administration), *Chirality* **1992**, *4*, 338-340.
- (28) Gillard, M.; Preen, C. V. D.; Moguilevsky, N.; Massingham, R.; Chatelain, P. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 391-399.
- (29) Fujimoto, T.; Mitsunashi, T. *Chemother.* **1990**, *29*, 268-276.
- (30) Hustveit, O.; Maurset, A.; Oye, I. *Pharmacology & Toxicology* **1995**, *77*, 355-359.
- (31) Carabaza, A.; Cabre, F.; Rotllan, E.; Gomez, M.; Gutierrez, M.; Garcia, M. L.; Mauleon, D. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*, 505-512.

- (32) Suesa, N.; Fernandez, M. F.; Gutierrez, M.; Rufat, M. J.; Rotllan, E.; Calvo, L.; Mauleon, D.; Carganico, G. *Chirality* **1993**, *5*, 589-595.
- (33) Pasutto, F. M.; Russel, A. S.; Coutts, R. T.; Jamali, F.; Singh, N. N. *Pharm. Res.* **1988**, *5*, 40-43.
- (34) Andersson, T.; Alin, M. H.; Hasselgren, G.; Röhss, K.; Weidolf, L. *Clin. Pharmacokinet.* **2001**, *40*, 411-426.
- (35) Sorbera, L. A.; Graul, A.; Castaner, J. *Drug Fut.* **1998**, *23*, 838-842.
- (36) Kirchhoff, C. *Dissertation*, Würzburg **2002**, 93-115.
- (37) Mayer, V. R. *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*, 9. Auflage, Otto Salle-Verlag, Frankfurt **2004**.
- (38) Unger, K. K.; Weber, E. (Hrsg), *A Guide to Practical HPLC*, GIT Verlag GmbH, Darmstadt **1999**.
- (39) Ahuja, S. *J. Chromatogr.* **1990**, *499*, 489-498.
- (40) Leach, D. C.; Stadalius, M. A.; Beru, J. S.; Snyder, L. R. *J. Liq. Chromatogr.* **1998**, 135-142.
- (41) Bidlingmeyer, B. A.; Warren, F. V. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1538A-1587A.
- (42) Foley, J. P.; Dorsey, J. G. *Anal. Chem.* **1983**, *55*, 730-737.
- (43) Snyder, L. R. *J. Chromatogr. Sci.* **1972**, *10*, 200-212; 369-378.
- (44) European Pharmacopoeia Commission, Technical Guide for the Elaboration of Monographs, 2nd Ed., *Pharmeuropa - Special Issue* **1996**.
- (45) Lam, S. K.; Fong, G. W.; Fong, F. W. *HPLC in the Pharmaceutical Industry*, Wiely-VCH, Weinheim **1991**.
- (46) Naish, P. J.; Goulder, D. P.; Perkins, C. V. *Chromatographia* **1985**, *20*, 335-342.
- (47) Majors, R. E. *LC GC Int.* **1994**, *7*, 7-21.
- (48) Berthod, A. *J. Chromatogr.* **1991**, *549*, 1-28.
- (49) Buszewski, B.; Jezierska, M.; Welniak, M.; Berek, D. *J. High Resol. Chromatogr.* **1998**, *21*, 267-281.
- (50) Thermo Hypersil Chromatographieseminar, Die Auswahl der richtigen HPLC-Säule, Thermo Hypersil GmbH, Kleinostheim **2001**.
- (51) Seaver, C.; Sadek, P. *LC GC Int.* **1994**, *7*, 631-637.
- (52) Bristol, D. W. *J. Chromatogr.* **1980**, *188*, 193-204.
- (53) Dolan, J. *LC GC Int.* **1994**, *7*, 376-381.
- (54) Balke, S. T. *Quantitative Column Liquid Chromatography*, Elsevier, Amsterdam **1984**, 119-131.
- (55) Ooms, B. *LC GC Int.* **1996**, *9*, 574-581.
- (56) Colin, H.; Diez-Masa, J. C.; Guichon, J. *J. Chromatogr.* **1978**, *167*, 41-65.
- (57) Wolf, T.; Fritz, J. T.; Palmer, L. R. *J. Chromatogr. Sci.* **1981**, *19*, 387-391.
- (58) Fleming, L. H.; Milsap, J. P.; Reynolds, N. C. *LC GC Int.* **1989**, *2*, 3, 16-25.
- (59) Issaq, H. J. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2002**, *25*, 1153-1170.
- (60) Zlotorzynska, E. D.; Celo, V. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 304-322.
- (61) Campana, A. M. G.; Taverna, M.; Fabre, H. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 208-232.
- (62) Butler, M. J.; Buel, E.; Crivellente, F.; McCord, R. B. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1397-1412.
- (63) Morzunova, G. T. *Pharm. Chem. J.* **2006**, *40*, 158-170.
- (64) El Rassi, Z. *CE and CEC Reviews 2002*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim **2002**.
- (65) *Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe, Straßburg, Frankreich **2007**.
- (66) *United States Pharmacopeia 30*, USP Convention Inc., Rockville, USA **2007**.
- (67) Iler, R. K. *The Chemistry of Silica*, Wiley-Verlag, New York **1979**.
- (68) Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T. *Kapillarelektrophorese*, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin **1994**.
- (69) Swinney, K.; Bornhop, D. J. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1239-1250.
- (70) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1298-1302.
- (71) Rice, C. L.; Whitehead, R. *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 4017-4024.
- (72) Mazzeo, J. R.; Krull, I. S. *Bio Techniques* **1991**, *10*, 638-645.
- (73) Baker, D. R. *Capillary Electrophoresis*, John Wiley, New York **1995**.
- (74) Tsuda, T.; Nomura, K.; Nakagawa, G. *J. Chromatogr.* **1982**, *248*, 241-247.

- (75) Miyabe, K.; Guichon, G. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 889-896.
- (76) Altria, K. D. *The Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis*, 1. Auflage, Vieweg Verlag, Wiesbaden **1997**.
- (77) Böcker, J. *Chromatographie*, Vogel Verlag, Würzburg **1997**.
- (78) Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111-113.
- (79) Seifar, R. M.; Kraak, J. C.; Kok, W. T. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2772-2778.
- (80) Beckers, J. L.; Bocek, B. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1947-1952.
- (81) Hoar, T. P.; Schulman, J. H. *Nature* **1943**, *152*, 102-103.
- (82) Schulman, J. H.; Stoeckenius, W.; Prince, L. M. *J. Phys. Chem.* **1959**, *63*, 1677-1681.
- (83) Berthod, A.; Laserna, J. J.; Carretero, I. *J. Liq. Chromatogr.* **1992**, 3115-3127.
- (84) Marsh, A.; Altria, K. D.; Clark, B. J. *Chromatographia* **2004**, *59*, 531-542.
- (85) Watarai, H. *J. Chromatogr. A* **1997**, *780*, 93-102.
- (86) Hansen, S. H.; Gabel-Jensen, C.; El-Sherbiny, D. T. M.; Pedersen-Bjergaard, S. *Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 614-619.
- (87) Pyell, U. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 479-490.
- (88) Cherkaoui, S.; Veuthey, J. L. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 1073-1078.
- (89) Altria, K. D. *J. Chromatogr. A* **1999**, *844*, 371-386.
- (90) Altria, K. D.; Mahuzier, P. E.; Clark, B. J. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 315-324.
- (91) Huie, W. C. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 60-75.
- (92) Quirino, J. P.; Terabe, S.; Otsuka, K.; Vincent, J. B.; Vigh, G. *J. Chromatogr. A* **1999**, *838*, 3-10.
- (93) Okamoto, H.; Nakajima, T.; Ito, Y.; Aketo, T.; Shimada, K.; Yamato, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 517-528.
- (94) Pomponio, R.; Gotti, R.; Fiori, J.; Cavrini, V. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1081*, 24-30.
- (95) Marsh, A.; Clark, B. J.; Broderick, M.; Power, J.; Donegan, S.; Altria, K. D. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3970-3980.
- (96) Fanali, S. *J. Chromatogr. A* **1989**, *470*, 123-129.
- (97) Aiken, J. H.; Huie, C. W. *Chromatographia* **1993**, *35*, 448-450.
- (98) Terabe, S.; Otsuka, K.; Nishi, H. *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, 295-319.
- (99) D'Hulst, A.; Verbeke, N. *Electrophoresis* **1994**, *15*, 854-863.
- (100) Chankvetadze, B.; Blaschke, G. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2592-2604.
- (101) Bender, H. *Carbohydr. Res.* **1978**, *65*, 85-97.
- (102) Saenger, W. *Angew. Chem.* **1980**, *92*, 343-361.
- (103) Connors, K. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325-1357.
- (104) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743-1753.
- (105) Fanali, S. *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 89-122.
- (106) Branch, S. K.; Holzgrabe, U.; Jefferies, T. M.; Mallwitz, H.; Matchett, M. W. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1994**, *12*, 1507-1515.
- (107) Hamura, J.; Akiyama, H. *Chem. Abstr.* **1975**, *83*, 79544a.
- (108) Tait, R. J.; Thompson, D. O.; Stella, V. J.; Stobaugh, J. F. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4013-4018.
- (109) Andresz, H.; Richter, G. C.; Pfannemöller, B. *Makromol. Chem.* **1978**, *179*, 301-307.
- (110) Vincent, J. B.; Sokolowski, A. D.; Nguyen, T. V.; Vigh, G. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4226-4233.
- (111) Zhu, W.; Vigh, G. *J. Chromatogr. A* **2000**, *892*, 499-507.
- (112) Cai, H.; Nguyen, T. V.; Vigh, G. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 580-589.
- (113) Vincent, J. B.; Kirby, D. H.; Nguyen, T. V.; Vigh, G. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4419-4428.
- (114) Szejtli, J.; Liptak, A.; Jodal, I.; Fügedi, P.; Nanasi, P.; Neszmelyi, A. *Staerke* **1980**, *32*, 165.
- (115) Snopek, J.; Soini, H.; Novotny, M.; Smolkova-Keulemansova, E.; Jelinek, L. *J. Chromatogr.* **1991**, *559*, 215-222.
- (116) Li, S.; Purdy, W. C. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1457-1470.
- (117) Bressolle, F.; Audran, M.; Pham, T.-N.; Vallon, J.-J. *J. Chromatogr. B* **1996**, *687*, 303-336.
- (118) Rawjee, Y. Y.; Williams, R. L.; Vigh, G. *J. Chromatogr. A* **1993**, *652*, 233-245.
- (119) Ren, J.; Liu, H. *J. Chromatogr. A* **1996**, *732*, 175-181.

- (120) Assi, K. A.; Clark, B. J.; Altria, K. D. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2723-2725.
- (121) Wren, S. A. C.; Rowe, R. C. *J. Chromatogr.* **1992**, *603*, 235-241.
- (122) Van Eeckhaut, A.; Detaevernier, M. R.; J., C.; Michotte, Y. *J. Sep. Sci.* **2004**, *27*, 21-27.
- (123) Williams, B. A.; Vigh, G. *J. Chromatogr. A* **1997**, *777*, 295-309.
- (124) Mertzman, M. D.; Foley, J. P. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1188-1200.
- (125) Pascoe, R.; Foley, J. P. *Analyst* **2002**, *127*, 710-714.
- (126) Kahle, K. A.; Foley, J. P. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 896-904.
- (127) Kromidas, S. *Handbuch: Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH, Weinheim **1999**.
- (128) International Conference on Harmonization, *ICH Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text und Methodology* June **1995**, <http://www.ich.org>.
- (129) Center for Drug Evaluation and Research (CDER), *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods* **1994**.
- (130) Ebel, S. *Reihe Validierung, Teil 6.4: Validierung in der HPLC*, 2.Auflage, Würzburger Skripten zur Analytik, Würzburg **1996**.
- (131) Altria, K. D. *Chromatographia* **1995**, *40*, 313-320.
- (132) Dose, E. V.; Guiochon, G. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 123-128.
- (133) Janini, G. M.; Chan, K. C.; Muschik, G. M.; Issaq, H. J. *J. Liq. Chromatogr.* **1993**, *16*, 3591-2607.
- (134) Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Ruth, P.; Schäfer-Korting, M. *Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart **2005**.
- (135) *Atropin Monographie, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe **2007**, DAV Stuttgart, Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag Eschborn.
- (136) Bjerkelund, E.; Gram, F.; Waaler, T. *Pharm. Acta Hlev.* **1969**, *44*, 745-754.
- (137) Kreilgard, B. *Arch. Pharm. Chemie, Sci. Ed.* **1978**, *6*, 109-115.
- (138) Chen, H.; Chen, Y.; Du, P.; Han, F.; Wang, H.; Zhang, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 142-150.
- (139) Chen, X. H.; Chen, Y.; Du, P.; Han, M. F. *Chromatographia* **2007**, *65*, 413-418.
- (140) Jira, T.; Pohloudek-Fabini, R. *Pharmazie* **1982**, *37*, 645-650; **1983**, *38*, 390-392.
- (141) Hesse, O. *Annalen der Chemie* **1891**, *261*, 87-107.
- (142) Raper, H. S. *J. Chem. Soc.* **1923**.
- (143) Green, J. M. *A Practical Guide to Analytical Method Validation* **1996**, *68*, 305A-309A.
- (144) International Conference on Harmonization, *ICH Harmonized Tripartite Guideline Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products*, February **2003**, <http://www.ich.org>.
- (145) International Conference on Harmonization, *ICH Harmonized Tripartite Guideline Q1E: Evaluation For Stability Data*, February **2003**, <http://www.ich.org>.
- (146) *Guidance for Industry (Draft) Stability Testing of Drug Substances and Drug Products* **2003**.
- (147) Miola, M. F.; Snowden, M. J.; Altria, K. D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *18*, 785-797.
- (148) Marsh, A.; Altria, K. D.; Clark, B. J. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1270-1278.
- (149) Altria, K. D.; Clark, B. J.; Mahuzier, P.-E. *Chromatographia* **2000**, *52*, 758-768.
- (150) Rodriguez, M.; Sánchez, M.; González, V.; Garcia, F. *Anal. Chem. Acta* **1994**, *298*, 423-430.
- (151) Firas, S.; Sánchez, M.; Rodriguez, M. *Anal. Chem. Acta* **2004**, *503*, 271-278.
- (152) Pedersen-Bjergaard, S.; Naess, O.; Moestue, S.; Rasmussen, K. *J. Chromatogr. A* **2000**, *876*, 201-211.
- (153) Cherkaoui, S.; Veuthey, J. L.; Cahours, X. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 336-342.
- (154) Harang, V.; Eriksson, J.; Sängler-van-Griend, C. E.; Jacobsson, S. P.; Westerlund, D. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 80-93.
- (155) Siren, H.; Kartlunen, A. *J. Chromatogr. B* **2003**, *783*, 113-124.
- (156) Huang, H.; Lai, Y. C.; Chiu, C. W.; Yeh, J. M. *J. Chromatogr. A* **2003**, *993*, 153-164.
- (157) Altria, K. D.; Broderick, M. F.; Donegan, S.; Power, J. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 645-652.
- (158) Zhang, W.; Zhu, C. *Can. J. Anal. Sci. Spec.* **2004**, *49*, 277-281.
- (159) Hou, J.; Zheng, J.; Shamsi, S. A. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1159*, 208-216.
- (160) Mertzman, M. D.; Foley, J. P. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 723-732.
- (161) Zheng, Z.-X.; Lin, J.-M.; Chan, W. H.; Lee, A. W. M.; Huie, C. W. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3263-3269.

- (162) Cherkaoui, S.; Mateus, L.; Christen, P.; Veuthey, J. L. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 1167-1176.
- (163) Wedig, M.; Holzgrabe, U. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1555-1560.
- (164) Cherkaoui, S.; Mateus, L.; Christen, P.; Veuthey, J. L. *Chromatographia* **1999**, *49*, 54-60.
- (165) Blaschke, G.; Lamparter, E.; Schlüter, J. *Chirality* **1993**, *5*, 78-83.
- (166) Rawjee, Y. Y.; Williams, R. L.; Buckingham, L. A.; Vigh, G. *J. Chromatogr. A* **1994**, *688*, 273-282.
- (167) Koppenhoefer, B.; Epperlein, U.; Xiaofeng, Z.; Bingcheng, L. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 924-930.
- (168) Schmitt, U.; Ertan, M.; Holzgrabe, U. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2801-2807.
- (169) Wren, S. A. C.; Rowe, R. C. *J. Chromatogr. A* **1992**, *609*, 363-367.
- (170) Schirmeister, T.; Klockow, A. *Mini Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 585-596.
- (171) Ro, S.; Baek, S.-G.; Lee, B.; Ok, J. H. *J. Peptide Res.* **1999**, *54*, 242-248.
- (172) Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305-341.
- (173) Breuning, A.; Vicik, R.; Schirmeister, T. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14*, 3301-3312.
- (174) Degel, B. *Dissertation*, Würzburg **2006**.
- (175) Chankvetadze, B.; Blaschke, G. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 4159-4178.
- (176) Fillet, M.; Servais, A.-C.; Crommen, J. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 1499-1507.
- (177) Cai, H.; Vigh, G. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *18*, 615-621.
- (178) Schmitt, U.; Branch, S. K.; Holzgrabe, U. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*(15-17), 959-974.
- (179) Birkmayer, W.; Hornykiewicz, O. *Wien Klin. Wschr.* **1961**, *73*, 787-788.
- (180) *Levodopa Monographie, Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe **2007**, DAV Stuttgart, Govi-Verlag - Pharmazeutischer Verlag Eschborn.
- (181) Sarac, S.; Chankvetadze, B.; Blaschke, G. *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 379-387.
- (182) Thanh Ha, P. T.; Schepdael, A. V.; Hauta-aho, T.; Roets, E.; Hoogmartens, J. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3404-3409.
- (183) La, S.; Ahn, S.; Kim, J.; Goto, J.; Choi, O.; Kim, K. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4123-4131.
- (184) Marini, R. D.; Chiap, P.; Boulanger, B.; Dewé, W.; Hubert, P.; Crommen, J. *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 809-817.
- (185) Servais, A.-C.; Fillet, M.; Chiap, P.; Dewé, W.; Hubert, P.; Crommen, J. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2701-2710.
- (186) Marini, R. D.; Servais, A.-C.; Rozet, E.; Chiap, P.; Boulanger, B.; Rudaz, S.; Crommen, J.; Hubert, P.; Fillet, M. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1120*, 102-111.
- (187) Servais, A.-C.; Fillet, M.; Abushoffa, A. M.; Hubert, P.; Crommen, J. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 363-369.
- (188) Horwitz, W.; Kamps, L. R.; Boyer, K. W. *J. Assoc. off. Anal. Chem.* **1980**, *63*, 1344-1354.
- (189) Marini, R. D.; Rozet, E.; Vander, H. Y.; Ziemons, E.; Boulanger, B.; Bouklouze, A.; Servais, A.-C.; Fillet, M.; Crommen, J.; Hubert, P. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 640-651.

## V Anhang

### 1 Stabilität von Atropinsulfat-Augentropfen

Im Folgenden sind alle Daten der Langzeitstabilitätsuntersuchungen aufgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Atropinsulfat-Augentropfen ermittelt wurden. Anschließend sind auch Beispiel-Chromatogramme für Gehalts- und Reinheitsprüfung dargestellt.

Zeichenerklärung:

HP = Hauptpeak (Atropinsulfat)

V1 = Tropasäure (**C**)

V2 = unbekannte (nicht identifizierte) Verunreinigung

V3 = Apoatropin (**A**)

V4 = unbekannte Verunreinigung

V5 = Littorin (**G**)

V6 = Atropasäure (**H**)

B = Blankpeak

## 1.1 Gehaltsbestimmung

Tabelle V.1-1: Gehaltsbestimmung für Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 %.

Probe 0,5 %	Charge	Sollgehalt (g/100 ml)	Istgehalt (g/100 ml)	RSD (%)	Gehalt (%)	Mittelwerte des Gehaltes Pro Konzentration (%)
Ausgangswerte:						
-	103114	0,513	0,513	0,082	99,98	100,27
	104114	0,513	0,519	0,561	101,17	
	105114	0,513	0,511	0,255	99,67	
3-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	0,513	0,515	0,068	100,48	100,13
	104114	0,513	0,513	0,652	99,91	
	105114	0,513	0,513	0,437	99,99	
Klima zone 2	103114	0,513	0,518	0,513	101,02	100,32
	104114	0,513	0,511	0,857	99,64	
	105114	0,513	0,515	0,248	100,31	
Klimaz one 3	103114	0,513	0,515	0,203	100,32	99,99
	104114	0,513	0,513	0,129	100,05	
	105114	0,513	0,511	0,306	99,60	
6-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	0,513	0,515	0,259	100,32	100,02
	104114	0,513	0,512	0,392	99,89	
	105114	0,513	0,512	0,514	99,84	
Klima zone 2	103114	0,513	0,514	0,519	100,23	100,10
	104114	0,513	0,515	0,370	100,31	
	105114	0,513	0,512	0,141	99,76	
Klimaz one 3	103114	0,513	0,506	0,491	98,67	99,01
	104114	0,513	0,510	0,633	99,33	
	105114	0,513	0,508	0,966	99,05	
9-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	0,513	0,514	0,246	100,13	99,86
	104114	0,513	0,512	0,157	99,77	
	105114	0,513	0,511	0,694	99,68	
Klima zone 2	103114	0,513	0,513	0,065	100,05	99,82
	104114	0,513	0,512	0,507	99,85	
	105114	0,513	0,511	0,337	99,56	
12-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	0,513	0,510	0,162	99,46	99,12
	104114	0,513	0,510	0,485	99,37	
	105114	0,513	0,505	0,100	98,52	
Klima zone 2	103114	0,513	0,511	0,263	99,63	99,16
	104114	0,513	0,508	0,324	98,98	
	105114	0,513	0,507	0,200	98,86	
18-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	0,513	0,511	0,241	99,53	99,10
	104114	0,513	0,509	0,417	99,24	
	105114	0,513	0,506	0,329	98,55	
Klima zone 2	103114	0,513	0,506	0,389	98,57	98,58
	104114	0,513	0,505	0,579	98,49	
	105114	0,513	0,506	0,255	98,67	

24-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	0,513	0,508	0,328	99,09	98,93
	104114	0,513	0,508	0,528	98,96	
	105114	0,513	0,506	0,533	98,73	
Klima zone 2	103114	0,513	0,504	0,331	98,18	98,21
	104114	0,513	0,503	0,347	98,13	
	105114	0,513	0,504	0,249	98,32	

Tabelle V.1-2: Gehaltsbestimmung für Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 %.

Probe 2,0 %	Charge	Sollgehalt (g/100 ml)	Istgehalt (g/100 ml)	RSD (%)	Gehalt (%)	Mittelwerte des Gehaltes Pro Konzentration (%)
Ausgangswerte:						
:	103114	2,053	2,038	0,438	99,29	100,20
	104114	2,053	2,076	0,208	101,14	
	105114	2,053	2,056	0,331	100,16	
3-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	2,053	2,051	0,710	99,89	100,05
	104114	2,053	2,058	0,109	100,25	
	105114	2,053	2,053	0,356	100,00	
Klima zone 2	103114	2,053	2,054	0,509	100,03	100,23
	104114	2,053	2,059	0,229	100,28	
	105114	2,053	2,061	0,585	100,39	
Klimaz one 3	103114	2,053	2,048	0,302	99,76	100,07
	104114	2,053	2,059	0,243	100,31	
	105114	2,053	2,056	0,598	100,13	
6-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	2,053	2,054	0,282	100,05	100,00
	104114	2,053	2,048	0,736	99,76	
	105114	2,053	2,057	0,130	100,19	
Klima zone 2	103114	2,053	2,047	0,717	99,70	99,70
	104114	2,053	2,053	0,466	100,01	
	105114	2,053	2,040	0,305	99,38	
Klima zone 3	103114	2,053	2,037	0,311	99,24	99,16
	104114	2,053	2,035	0,344	99,14	
	105114	2,053	2,034	0,318	99,08	
9-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	2,053	2,051	0,084	99,88	99,75
	104114	2,053	2,045	0,229	99,61	
	105114	2,053	2,048	0,052	99,77	
Klima zone 2	103114	2,053	2,043	0,230	99,51	99,53
	104114	2,053	2,049	0,185	99,81	
	105114	2,053	2,038	0,247	99,26	
12-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	2,053	2,050	0,559	99,85	99,04
	104114	2,053	2,023	0,884	98,53	
	105114	2,053	2,027	0,345	98,73	
Klima zone 2	103114	2,053	2,033	0,212	99,05	99,06
	104114	2,053	2,039	0,261	99,34	
	105114	2,053	2,028	0,330	98,80	

18-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	2,053	2,041	0,292	99,42	98,92
	104114	2,053	2,024	0,552	98,60	
	105114	2,053	2,027	0,194	98,74	
Klima zone 2	103114	2,053	2,025	0,701	98,62	98,40
	104114	2,053	2,022	0,530	98,49	
	105114	2,053	2,013	0,729	98,07	
24-Monatswerte:						
Klima zone 1	103114	2,053	2,029	0,217	98,84	98,67
	104114	2,053	2,022	0,233	98,47	
	105114	2,053	2,027	0,269	98,71	
Klima zone 2	103114	2,053	2,014	0,161	98,10	98,05
	104114	2,053	2,013	0,139	98,05	
	105114	2,053	2,012	0,069	98,01	

Abb. V .1-1: Beispiel-Chromatogramme der Gehaltsprüfung für Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 % bei Lagerung unter Klimazone 1.

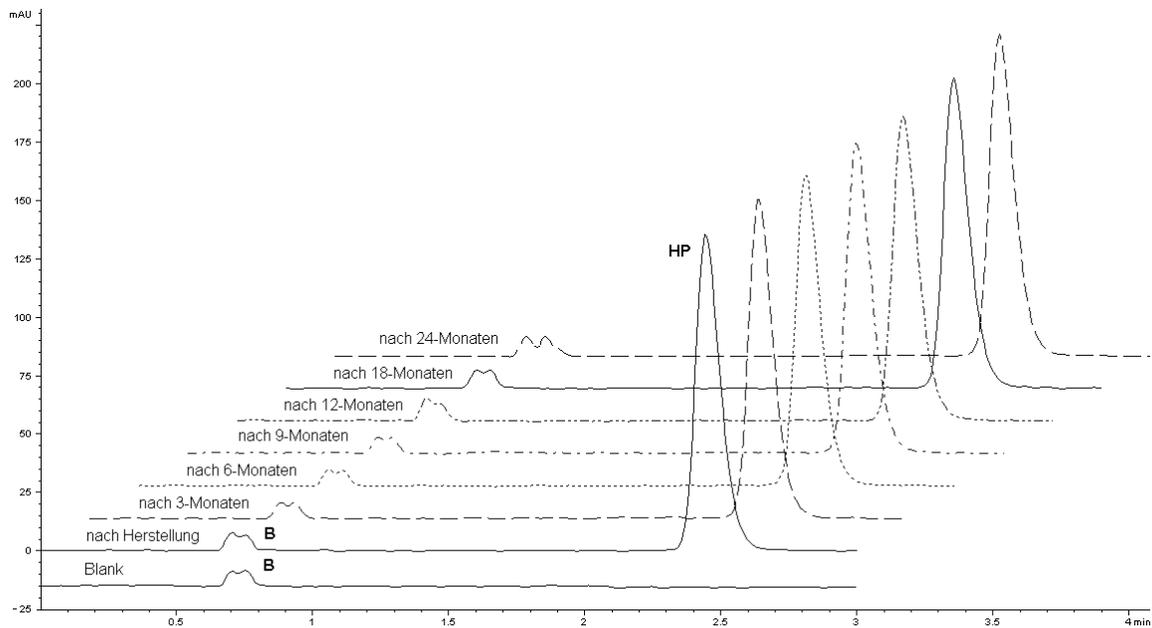


Abb. V .1-2: Beispiel-Chromatogramme der Gehaltsprüfung für Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 % bei Lagerung unter Klimazone 2.

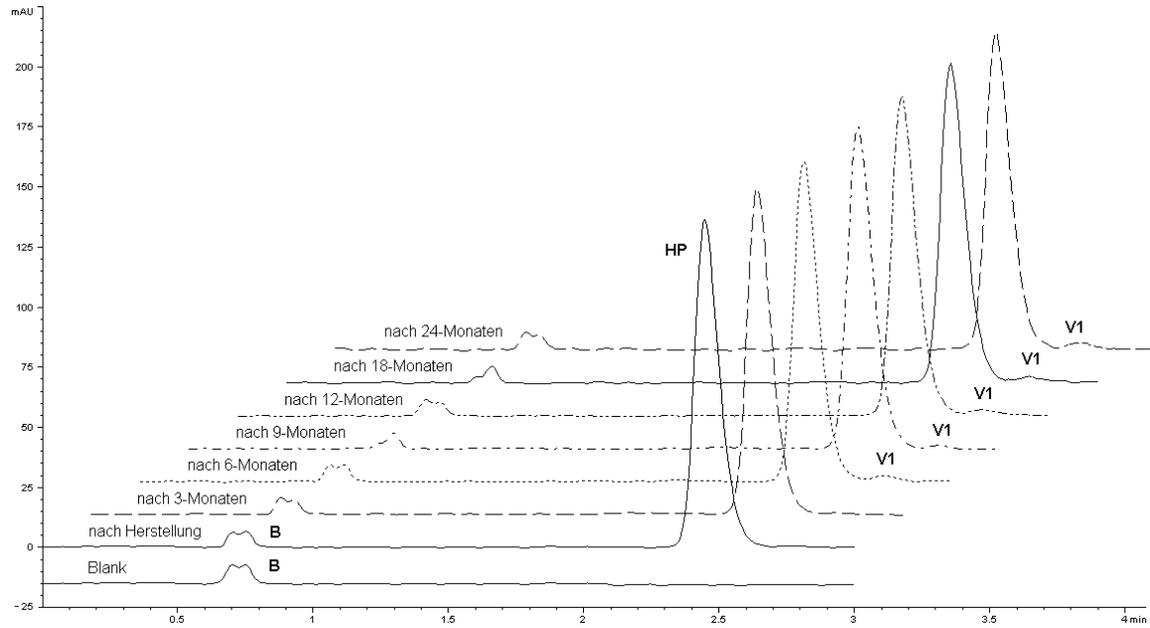
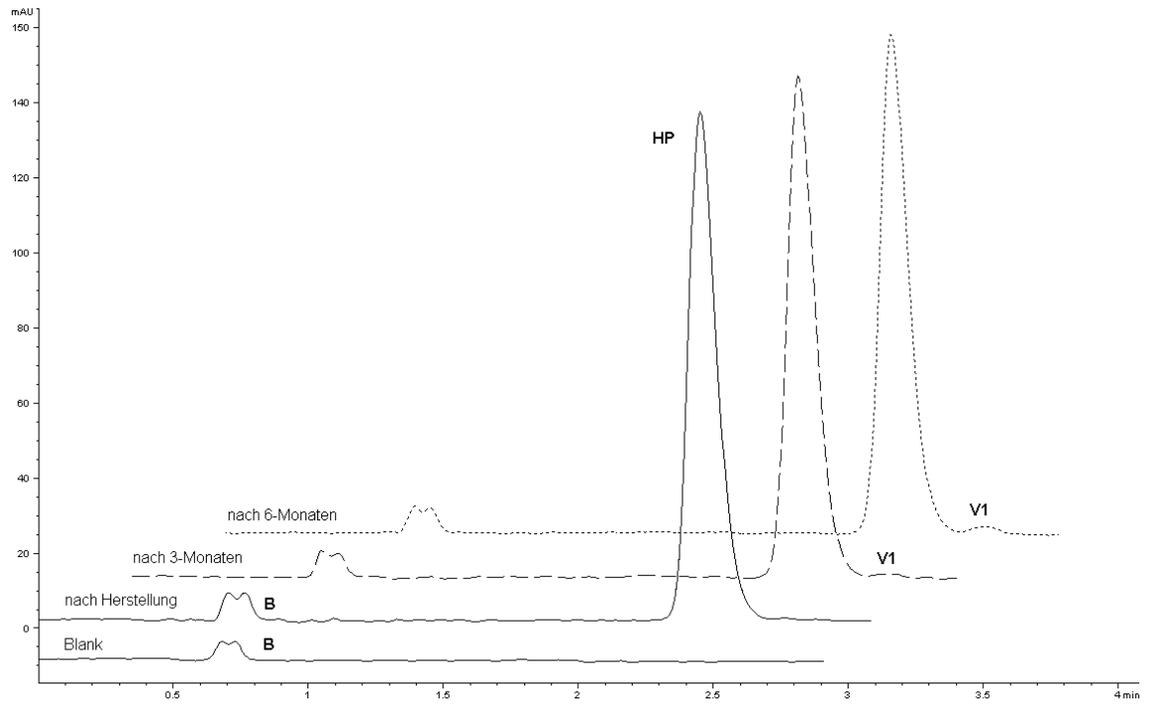


Abb. V .1-3: Beispiel-Chromatogramme der Gehaltsprüfung für Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 % bei Lagerung unter Klimazone 3.



## 1.2 Reinheitsbestimmung

Tabelle V.1-3: Reinheitsbestimmung für Atropinsulfat-Augentropfen 0,5 %.

Probe 0,5 %	Charge	V1 (%)	V2 (%)	V3 (%)	V4 (%)	V5 (%)	V6 (%)
<b>Ausgangswerte</b>							
---	103114	0,028	0,058	0,067	---	---	---
	104114	0,034	0,061	0,078	---	---	---
	105114	0,026	0,059	0,075	---	---	---
<b>3-Monateswerte</b>							
Klima zone 1	103114	0,033	0,065	0,084	0,009	---	---
	104114	0,027	0,062	0,082	0,005	---	---
	105114	0,025	0,061	0,084	0,005	---	---
Klima zone 2	103114	0,091	0,058	0,033	---	---	---
	104114	0,075	0,072	0,033	---	0,005	---
	105114	0,091	0,073	0,033	---	---	---
Klima zone 3	103114	0,365	0,082	0,117	---	---	---
	104114	0,362	0,085	0,119	---	---	---
	105114	0,326	0,073	0,122	---	---	---
<b>6-Monateswerte</b>							
Klima zone 1	103114	0,034	0,068	0,091	0,022	---	---
	104114	0,051	0,062	0,092	0,022	---	---
	105114	0,049	0,059	0,094	0,024	---	---
Klima zone 2	103114	0,159	0,078	0,092	0,025	---	---
	104114	0,154	0,073	0,094	0,026	---	---
	105114	0,161	0,060	0,088	0,031	---	---
Klima zone 3	103114	0,683	0,073	0,147	0,042	---	---
	104114	0,653	0,074	0,143	0,033	---	---
	105114	0,670	0,070	0,142	0,036	---	---
<b>9-Monateswerte</b>							
Klima zone 1	103114	0,075	0,064	0,096	0,052	---	---
	104114	0,079	0,073	0,095	0,052	---	---
	105114	0,075	0,071	0,098	0,050	---	---
Klima zone 2	103114	0,238	0,081	0,097	0,048	---	---
	104114	0,233	0,079	0,099	0,050	---	---
	105114	0,238	0,082	0,093	0,053	---	---
<b>12-Monateswerte</b>							
Klima zone 1	103114	0,091	0,068	0,099	0,062	---	---
	104114	0,105	0,075	0,098	0,062	---	---
	105114	0,104	0,072	0,101	0,057	---	---
Klima zone 2	103114	0,290	0,081	0,104	0,065	---	---
	104114	0,291	0,078	0,104	0,057	---	---
	105114	0,278	0,078	0,103	0,060	---	---
<b>18-Monateswerte</b>							
Klima zone 1	103114	0,108	0,076	0,102	0,058	---	---
	104114	0,109	0,063	0,105	0,067	---	---
	105114	0,110	0,076	0,102	0,062	---	---
Klima zone 2	103114	0,432	0,086	0,156	0,054	---	---
	104114	0,434	0,092	0,152	0,059	---	---
	105114	0,427	0,097	0,152	0,063	---	---

24-Monateswerte							
Klima zone 1	103114	0,122	0,061	0,132	0,059	0,089	---
	104114	0,126	0,061	0,129	0,062	0,089	---
	105114	0,125	0,060	0,128	0,064	0,088	---
Klima zone 2	103114	0,483	0,074	0,189	0,052	0,097	0,034
	104114	0,486	0,078	0,191	0,056	0,095	0,039
	105114	0,479	0,088	0,189	0,058	0,091	0,032

Tabelle V.1-4: Reinheitsbestimmung für Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 %.

Probe 2,0 %	Charge	V1 (%)	V2 (%)	V3 (%)	V4 (%)	V5 (%)	V6 (%)
Ausgangswerte							
--	103114	0,024	0,075	0,068	---	---	---
	104114	0,037	0,044	0,068	---	---	---
	105114	0,026	0,063	0,068	---	---	---
3-Monateswerte							
Klima zone 1	103114	0,023	0,062	0,077	0,008	---	---
	104114	0,024	0,068	0,071	---	---	---
	105114	0,040	0,055	0,062	0,005	---	---
Klima zone 2	103114	0,081	0,065	0,079	---	---	---
	104114	0,080	0,071	0,079	---	---	---
	105114	0,079	0,058	0,077	---	---	---
Klima zone 3	103114	0,266	0,065	0,116	---	---	---
	104114	0,268	0,071	0,117	---	---	---
	105114	0,277	0,081	0,121	---	---	---
6-Monateswerte							
Klima zone 1	103114	0,061	0,065	0,083	0,048	---	---
	104114	0,075	0,071	0,082	0,047	---	---
	105114	0,053	0,050	0,076	0,034	---	---
Klima zone 2	103114	0,136	0,067	0,086	0,034	---	---
	104114	0,155	0,068	0,098	0,038	---	---
	105114	0,149	0,068	0,094	0,040	---	---
Klima zone 3	103114	0,467	0,077	0,126	0,034	---	---
	104114	0,470	0,076	0,125	0,030	---	---
	105114	0,489	0,072	0,127	0,032	---	---
9-Monateswerte							
Klima zone 1	103114	0,078	0,075	0,090	0,048	---	---
	104114	0,082	0,077	0,092	0,054	---	---
	105114	0,076	0,072	0,081	0,056	---	---
Klima zone 2	103114	0,194	0,082	0,098	0,066	---	---
	104114	0,193	0,077	0,099	0,065	---	---
	105114	0,190	0,077	0,098	0,062	---	---
12-Monateswerte							
Klima zone 1	103114	0,096	0,073	0,092	0,053	---	---
	104114	0,100	0,075	0,095	0,057	---	---
	105114	0,098	0,073	0,089	0,058	---	---
Klima zone 2	103114	0,212	0,071	0,101	0,065	---	---
	104114	0,230	0,072	0,102	0,057	---	---
	105114	0,231	0,076	0,102	0,060	---	---

18-Monateswerte							
Klima zone 1	103114	0,105	0,062	0,098	0,059	---	---
	104114	0,106	0,070	0,098	0,062	---	---
	105114	0,104	0,067	0,094	0,064	---	---
Klima zone 2	103114	0,376	0,097	0,138	0,067	---	---
	104114	0,377	0,092	0,136	0,062	---	---
	105114	0,367	0,087	0,134	0,056	---	---
24-Monateswerte							
Klima zone 1	103114	0,109	0,063	0,126	0,058	0,079	---
	104114	0,115	0,063	0,124	0,055	0,074	---
	105114	0,112	0,065	0,122	0,055	0,078	---
Klima zone 2	103114	0,411	0,084	0,165	0,073	0,087	0,032
	104114	0,413	0,087	0,161	0,079	0,078	0,034
	105114	0,410	0,080	0,162	0,063	0,090	0,030

Abb. V .1-4: Beispiel-Chromatogramme der Reinheitsprüfung für Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 % bei Lagerung unter Klimazone 1.

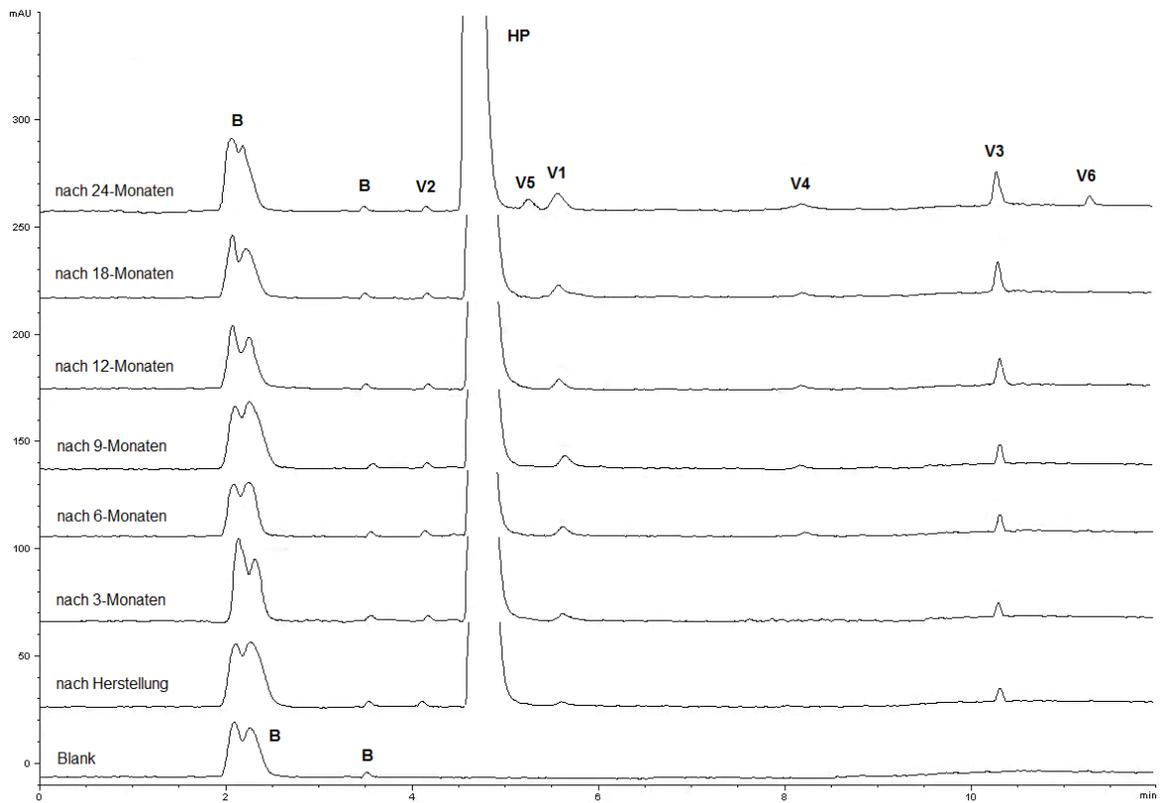


Abb. V .1-5: Beispiel-Chromatogramme der Reinheitsprüfung für Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 % bei Lagerung unter Klimazone 2.

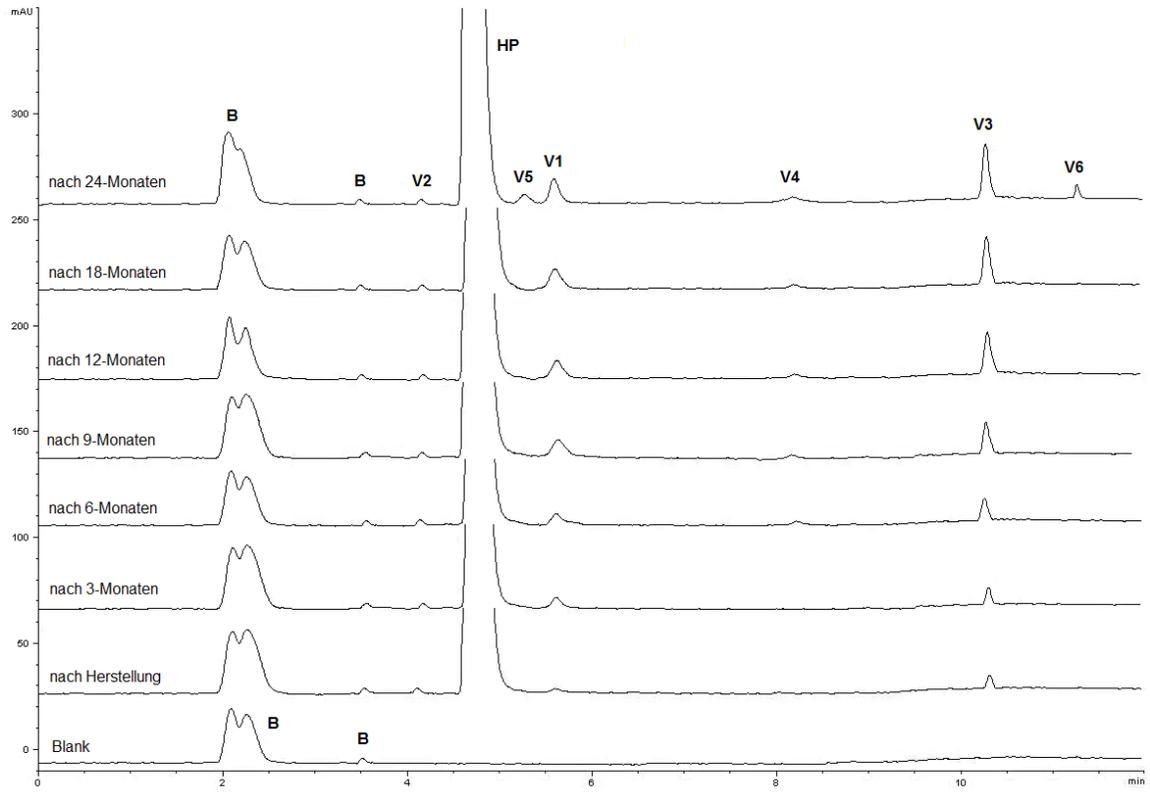
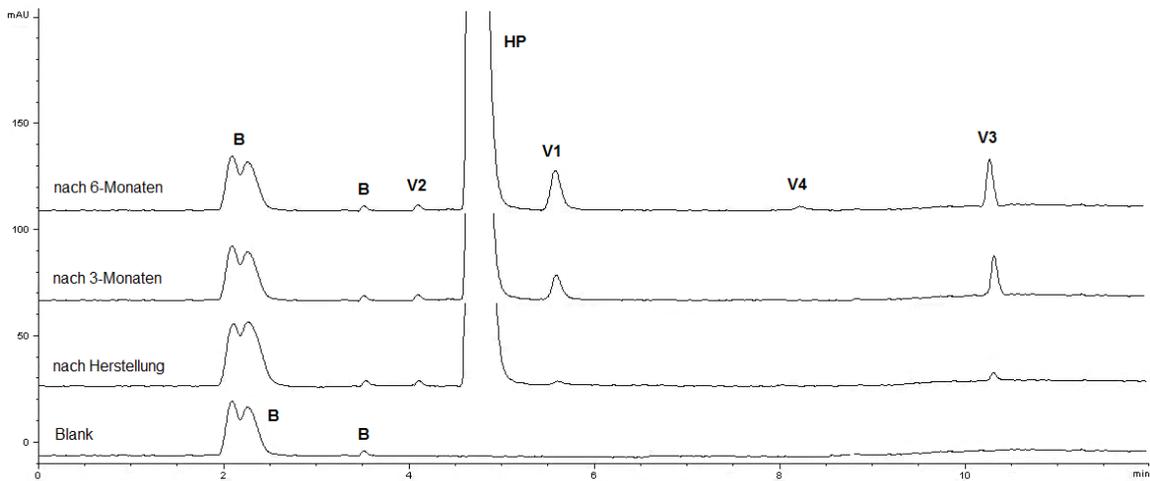


Abb. V .1-6: Beispiel-Chromatogramme der Reinheitsprüfung für Atropinsulfat-Augentropfen 2,0 % bei Lagerung unter Klimazone 3.



## 2 Chirale MEEKC-Trennung von Tropan-Alkaloiden

Im Folgenden sind alle Daten der Migrationszeiten (MZ) beider Enantiomere und die Auflösung ( $R$ ) aufgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Racemate der Tropan-Alkaloide ermittelt wurden. Alle Werte sind Mittelwert aus drei Bestimmungen ( $n = 3$  Injektionen).

Zeichenerklärung:

a = Atropinsulfat

b = Scopolamin

c = Ipratropium

d = Homatropin

Tab. V. 2-1: Migrationszeiten [min] und Auflösungswerte ( $R$ ) der Tropan-Alkaloide in Abhängigkeit von der DM- und TM- $\beta$ -CD-Konzentration.

DM- $\beta$ -CD		0 mM		5 mM		10 mM		15 mM		20 mM		25 mM	
a	MZ	3,31	---	3,52	---	3,77	---	3,99	---	4,04	---	4,27	---
	$R$	0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0	
b	MZ	3,20	---	3,31	---	3,52	---	3,79	---	3,90	---	4,09	---
	$R$	0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0	
c	MZ	3,92	---	4,12	---	4,47	---	4,71	---	4,93	---	5,01	---
	$R$	0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0	
d	MZ	2,81	---	2,94	2,98	3,05	3,11	3,50	3,79	3,49	3,65	3,91	4,05
	$R$	0,0		0,4		0,8		2,4		1,9		1,8	
TM- $\beta$ -CD													
a	MZ	3,31	---	3,82	---	4,05	---	4,44	---	4,68	---	4,82	---
	$R$	0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0	
b	MZ	3,20	---	3,71	---	3,94	---	4,04	---	4,14	---	4,17	---
	$R$	0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0	
c	MZ	3,92	---	4,62	---	4,91	---	5,19	---	5,46	---	5,92	---
	$R$	0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0	
d	MZ	2,81	---	3,22	---	3,90	3,94	4,05	4,14	4,21	4,15	4,33	4,26
	$R$	0,0		0,0		0,5		1,03		0,8		0,8	

Tab. V. 2-2: Migrationszeiten [min] und Auflösungswerte (R) der Tropan-Alkaloide in Abhängigkeit von der Konzentration der negativ geladenen  $\beta$ -CDs (\*Das Peak des erste Enantiomers wurde vom EOF überdeckt).

HDMS- $\beta$ -CD		0 mM		1 mM		3 mM		5 mM		7 mM		10 mM	
a	MZ	3,31	---	2,22	2,41	2,45	3,22	2,93	4,05	3,25	4,47	4,10	5,11
	R	0,0		1,1		3,7		6,4		6,8		6,8	
b	MZ	3,20	---	2,05	2,13	2,32	2,41	2,65	3,37	2,98	3,56	3,44	4,41
	R	0,0		0,5		1,8		3,1		2,4		2,1	
c	MZ	3,92	---	2,96	3,12	3,20	3,66	3,84	4,22	4,55	5,72	4,78	6,04
	R	0,0		0,4		1,6		2,7		4,6		3,4	
d	MZ	2,81	---	---	2,02	---	2,11	2,36	3,22	2,77	3,65	2,83	4,05
	R	0,0		---		---		6,8		7,1		5,4	
HDAS- $\beta$ -CD													
a	MZ	3,31	---	2,24	2,78	3,07	3,58	3,56	4,68	4,55	5,49	5,10	5,97
	R	0,0		1,1		1,5		2,4		1,1		0,4	
b	MZ	3,20	---	2,20	2,68	2,79	3,91	3,21	4,19	3,56	4,47	4,78	4,47
	R	0,0		0,8		2,0		2,4		1,5		0,7	
c	MZ	3,92	---	3,44	3,62	4,22	4,61	4,85	5,25	5,22	5,82	5,89	6,12
	R	0,0		0,7		1,2		2,6		1,2		1,1	
d	MZ	2,81	---	---	2,09	1,6	2,13	1,79	2,55	2,91	3,55	3,77	3,83
	R	0,0		---		3,2		4,1		2,7		1,0	
Sulf- $\beta$ -CD													
a	MZ	3,31	---	3,27	3,51	4,27	5,28	6,05	7,24	6,61	8,09	6,98	8,79
	R	0,0		2,3		4,2		6,7		6,9		7,5	
b	MZ	3,20	---	2,43	2,88	2,59	3,05	2,81	3,37	3,05	4,02	3,55	4,71
	R	0,0		1,1		1,5		2,1		2,6		2,7	
c	MZ	3,92	---	3,33	3,61	4,58	4,89	5,32	5,72	5,71	6,42	5,99	7,02
	R	0,0		1,0		1,2		2,3		2,7		3,1	
d	MZ	2,81	---	---	2,59	2,01	2,83	2,41	3,34	2,91	4,11	3,39	4,33
	R	0,0		---		3,7		5,8		6,0		6,3	

Tab. V. 2-3: Migrationszeiten [min] und Auflösungswerte (R) des Racemates von Ipratropium unter Zusatz von 5 mM Sulf- $\beta$ -CD in Abhängigkeit von der Zugabe des organischen Modifiers.

MeOH		2 %		5 %		8 %		10 %		12 %		15 %	
c	MZ	5,34	5,74	5,32	5,71	5,35	5,70						
	R	2,0		1,8		1,7							
ACN													
c	MZ	5,32	5,73	5,31	5,70	5,32	5,70						
	R	2,2		2,1		1,8							
Isopropanol													
c	MZ	5,88	6,01	6,03	6,21	6,35	6,64	6,88	7,01	7,55	7,70	9,15	9,25
	R	1,9		1,7		1,6		1,4		1,3		1,2	

### 3 Chirale Trennung von Aziridin-Derivaten

Im Folgenden sind zuerst die Ergebnisse der erhaltenen Viskosität und der korrigierte Strom bezogen auf die Viskosität bei den verschiedenen Konzentrationen der chiralen Selektoren dargestellt und dann alle Daten der Migrationszeiten (MZ) beider Enantiomere und die Auflösung (*R*) aufgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Aziridin-Racematen (**1-5**) der ermittelt wurden. Alle Werte sind Mittelwert aus drei Bestimmungen (*n* = 3 Injektionen).

Tab. V. 3-1: Viskosität bei 20 °C, Stromwerte und korrigierte Stromwerte des methanolischen HGE.

Chiral Selektor	Konzentration [mM]	Viskosität [cP]	Strom [μA]	Viskosität-korrigierter Strom [μA x cP]
HDAS-β-CD	0	0,609	5,4	3,29
	5	0,892	9,4	8,38
	10	1,107	11,1	12,29
HDMS-β-CD	0	0,611	4,1	2,51
	20	0,751	7,9	5,93
	25	0,788	8,2	6,46

Tab. V. 3-2: Viskosität bei 25 °C, Stromwerte und korrigierte Stromwerte des wässrigen HGE (pH 2,5).

Chiral Selektor	Konzentration [mM]	Viskosität [cP]	Strom [μA]	Viskosität-korrigierter Strom [μA x cP]
Sulf-β-CD	0	1,024	30,7	31,44
	1	1,029	45,2	46,51
	2	1,031	78,6	81,04
HDAS-β-CD	0	1,026	31,2	32,01
	3	1,037	66,9	69,38
HDMS-β-CD	0	1,025	31,0	31,78
	5	1,040	67,8	70,51
	7	1,067	98,2	106,45
HDMS-β-CD + HAAS-β-CD	7 5 % (w/w)	1,084	119,2	127,19

Tab. V. 3-3: Migrationszeiten [min] und Auflösungswerte (*R*) der Aziridin-Racemate in Abhängigkeit von der HDMS- und HDAS-β-CD-Konzentration mittels NACE-Methode.

HDMS-β-CD	10 mM		15 mM		20 mM		25 mM		30 mM		35 mM		
1	MZ	4,22	4,29	5,15	5,25	6,21	6,32	7,39	7,79	8,44	8,92	8,69	9,11
	<i>R</i>	0,4		0,6		1,1		2,4		2,2		1,0	
2	MZ	5,92	6,09	6,22	6,81	8,61	9,62	10,21	12,90	11,12	13,77	12,56	14,81
	<i>R</i>	0,3		1,0		1,3		4,8		2,6		1,5	
3	MZ	4,20	4,20	5,10	5,15	6,40	6,65	8,43	8,75	9,01	9,35	9,51	9,71
	<i>R</i>	0,0		0,7		1,5		2,2		1,5		0,4	
4	MZ	6,01	6,08	7,44	7,49	8,91	9,11	10,64	11,09	11,42	11,91	12,64	13,35
	<i>R</i>	0,5		0,8		1,0		1,9		2,1		1,4	
5	MZ	5,65	6,68	5,91	7,48	6,30	8,33	6,80	8,99	7,81	9,22	8,45	9,40
	<i>R</i>	5,2		9,6		15,7		10,2		4,3		2,1	

HDAS- $\beta$ -CD		2 mM		5 mM		10 mM		15 mM	
1	MZ	3,22	3,29	3,46	3,61	3,92	4,25	6,22	7,07
	R	0,6		1,0		2,3		2,1	
2	MZ	4,32	4,82	7,22	9,54	9,82	13,59	12,11	14,19
	R	0,9		2,4		6,2		3,5	
3	MZ	3,45	3,49	3,72	4,09	4,34	4,62	7,79	7,29
	R	0,8		2,1		6,0		4,1	
4	MZ	4,87	4,97	8,13	9,69	10,58	11,61	12,61	12,99
	R	0,5		1,1		5,7		3,2	
5	MZ	4,11	5,65	5,65	8,06	6,49	8,42	9,22	11,05
	R	8,2		28,1		17,1		17,0	

Tab. V. 3-4: Migrationszeiten [min] und Auflösungswerte (R) der Aziridin-Racemate in Abhängigkeit von der Sulf-, HDAS- und HDMS- $\beta$ -CD-Konzentration mittels wässriger CE-Methode.

Sulf- $\beta$ -CD		0,5 mM		1,0 mM		2,0 mM		3,0 mM		4,0 mM	
1	MZ	16,10	16,20	17,50	18,39	20,07	22,01	22,10	24,61	23,84	8,92
	R	0,6		0,9		3,0		2,4		2,0	
2	MZ	15,20	15,79	15,61	16,51	16,12	23,05	16,93	24,92	18,22	25,07
	R	2,0		5,2		12,7		4,1		1,9	
3	MZ	16,30	17,28	17,04	18,64	17,89	19,22	18,45	19,78	20,99	22,31
	R	0,9		2,7		3,0		2,6		2,1	
4	MZ	5,72	6,33	5,89	7,45	6,45	9,14	7,99	11,29	10,91	11,90
	R	1,7		4,7		4,7		3,5		2,5	
5	MZ	14,93	15,97	15,51	16,97	16,94	18,19	17,81	20,31	18,91	20,78
	R	1,2		2,5		2,3		1,9		1,8	

HDAS- $\beta$ -CD		1,0 mM		2,0 mM		3,0 mM		4,0 mM		5,0 mM	
1	MZ	8,12	8,15	8,55	9,12	9,09	9,53	12,11	14,18	16,58	18,22
	R	0,4		0,7		1,5		1,7		1,1	
2	MZ	10,10	11,50	10,50	12,10	11,25	13,68	14,70	16,21	22,50	24,70
	R	1,1		1,5		3,2		1,1		0,4	
3	MZ	3,70	3,89	4,15	4,64	4,42	5,03	6,25	8,32	9,17	11,51
	R	0,7		1,4		3,6		1,5		1,0	
4	MZ	9,70	10,87	9,91	12,96	10,17	14,07	12,41	16,71	15,11	18,91
	R	1,5		2,4		5,7		2,1		1,7	
5	MZ	9,66	9,66	9,71	9,71	10,09	10,20	11,34	11,95	12,99	13,79
	R	0,0		0,0		0,5		0,7		0,4	

HDMS- $\beta$ -CD		2,0 mM		5,0 mM		7,0 mM		8,0 mM		7,0 mM + 5 % HDAS (w/w)	
1	MZ	9,18	9,18	9,72	9,72	10,89	10,94	12,79	12,81	14,54	15,63
	R	0,0		0,0		0,3		0,0		10,6	
2	MZ	8,41	8,49	8,91	9,17	10,15	11,13	11,32	12,51	20,27	47,68
	R	0,5		1,1		5,6		2,7		16,1	
3	MZ	13,22	13,31	16,58	17,47	17,84	18,94	18,22	19,83	15,15	26,23
	R	0,9		2,6		1,2		0,4		10,8	
4	MZ	12,11	12,14	14,31	14,51	16,00	16,10	16,91	16,91	11,34	13,74
	R	0,0		0,5		0,4		0,0		6,4	
5	MZ	9,04	9,04	10,81	10,81	11,87	11,87	13,44	13,44	14,29	14,29
	R	0,0		0,0		0,0		0,0		0,0	

## 4 Enantiomerenreinheit von Levodopa

Im Folgenden sind alle Daten der Migrationszeiten (MZ) beider Enantiomere und die Auflösung ( $R$ ) aufgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an L- und D-Dopa (Racemat) ermittelt wurden. Alle Werte sind Mittelwert aus drei Bestimmungen ( $n = 3$  Injektionen).

Tab. V. 4-1: Migrationszeiten [min] und Auflösungswerte ( $R$ ) der DL-Dopa in Abhängigkeit von der Sulf- $\beta$ -CD-Konzentration mittels Normalpolungsmodus (+15 kV).

Sulf- $\beta$ -CD	0,5 mM		1,0 mM		2,0 mM		3,0 mM		4,0 mM	
MZ	16,71	16,91	19,71	22,11	21,44	24,61	25,44	26,01	29,21	30,03
$R$	0,7		1,6		1,4		0,5		0,5	

Tab. V. 4-2: Migrationszeiten [min] und Auflösungswerte ( $R$ ) der DL-Dopa in Abhängigkeit von der Sulf- $\beta$ -CD-Konzentration mittels Umkehrpolungsmodus (-15 kV).

Sulf- $\beta$ -CD	1 mM		5 mM		10 mM		15 mM	
MZ	13,91	14,81	10,21	13,61	8,51	12,50	8,30	11,94
$R$	1,4		3,4		7,2		7,7	



