

Trimebutin, Adenosin, Glutathion und Aminosäuren –
Beispiele für Reinheitsanalytik für das
Europäische Arzneibuch

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

vorgelegt von
Susanne Kopec
aus Düsseldorf

Würzburg 2008

Eingereicht am: 08.01.2008

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: 15.02.2008

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Sehr geringe Unterschiede begründen manchmal sehr große Verschiedenheiten.

Marie von Ebner-Eschenbach

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

Ihr möchte ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themengebietes, für vielseitige Anregungen, Förderung und Unterstützung sowie für die Möglichkeit zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten danken.

Dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die Bereitstellung der Aminosäure-Proben.

Bei den Mitarbeitern des EDQM Brigitte Jacquel, Dr. Michael Wierer und Stefan Almeling möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei den verschiedenen Projekten und die Bereitstellung von Proben und Referenzsubstanzen bedanken.

Dr. Eberhard Heller und Jens Schmitz danke ich für die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren.

Bei allen Kollegen, die ich während meiner Zeit am Institut kennengelernt habe, vor allen Dingen bei meinen Laborkollegen, möchte ich mich für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Sabine Niedermeier und Jens Schmitz danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung der Studenten.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht in:

Artikel

1. Kopec, S., Holzgrabe, U.
„Impurity Profile of Amino Acids?“
Pharmeuropa Scientific Notes 2005, 1, 39-45
2. Kopec, S., Almeling, S., Holzgrabe, U.
„Determination of the Impurity Profile of Adenosine by means of Ion-pair Reversed-phase Chromatography“
Pharmeuropa Scientific Notes 2006, 2, 1-5
3. Holzgrabe, U., Brinz, D., Kopec, S., Weber, C., Bitar, Y.
„Why not using capillary electrophoresis in drug analysis?“
Electrophoresis 2006, 27, 2283-2292
4. Kopec, S., Holzgrabe, U.
„Amino acids: Aspects of impurity profiling by means of CE“
Electrophoresis 2007, 28, 2153-2167

Abstracta und Kongressbeiträge

1. Kopec, S., Holzgrabe, U.
„Methods to evaluate the impurity profile of amino acids by means of CE“
DPhG-Jahrestagung 2004, Regensburg
2. Holzgrabe, U., Kopec, S., Wierer, M., Almeling, S.
„Influence of choice of column on the determination of impurity profile of adenosine by means of ion-pair reversed-phase chromatography“
Drug Analysis 2006, Namur
3. Kopec, S., Holzgrabe, U.
„Analysis of CBQCA labelled amino acids by means of CE“
DPhG-Doktorandentagung 2006, Heroldsberg
4. Kopec, S., Holzgrabe, U.
„Impurity profiling of amino acids by means of CE“
DPhG-Jahrestagung 2006, Marburg
5. Kopec, S., Holzgrabe, U.
„Amino acids: Putative impurities resulting from production pathway and their determination“
New Frontiers in the Quality of Medicines 2007, Straßburg
6. Kopec, S., Holzgrabe, U.
„Elaboration of a test for determination of related substances of trimebutine and trimebutine maleate by means of HPLC“
New Frontiers in the Quality of Medicines 2007, Straßburg

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Europäische Arzneibuch	1
1.1.1. Bedeutung des Arzneibuchs	1
1.1.2. Entwicklung des Europäischen Arzneibuchs	2
1.1.3. Erarbeitung des Europäischen Arzneibuchs	4
1.1.4. Aufbau des Europäischen Arzneibuchs	5
1.1.4.1. Band 1: Allgemeiner Teil und Monographiegruppen	5
1.1.4.2. Band 2: Monographien	7
1.1.5. Erarbeitung einer Monographie	8
1.2. Reinheitsanalytik von Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung	10
1.2.1. Klassifizierung von Verunreinigungen	10
1.2.2. Einfluss des Herstellungsprozesses auf das Verunreinigungsprofil	11
1.2.3. Limitierung von Verunreinigungen	12
1.2.4. Prüfung auf „Verwandte Substanzen“	14
1.2.5. Biotechnologisch hergestellte Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung	17
1.2.5.1. Biotransformation	17
1.2.5.2. Fermentation	18
1.2.5.3. Verunreinigungen in biotechnologisch hergestellten APIs	18
2. INSTRUMENTELLE METHODEN ZUR REINHEITSANALYTIK	20
2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)	20
2.1.1. Durchführung	20
2.1.2. DC zur Reinheitsprüfung	21
2.2. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	23
2.2.1. Trennverfahren	23
2.2.1.1. Umkehrphasenchromatographie	24
2.2.1.2. Ionenpaarchromatographie	24
2.2.2. Stationäre Phasen in der Umkehrphasenchromatographie	26
2.2.3. Detektoren	29
2.2.3.1. Absorptionsdetektoren	29
2.2.3.2. Verdampfungsstreulichtdetektor (ELSD)	30
2.2.4. HPLC zur Reinheitsprüfung	33
2.2.5. Prüfung der Systemeignung	34
2.2.6. Quantitative Auswertung der Chromatogramme	37
2.3. Kapillarelektrophorese (CE)	40
2.3.1. Trennverfahren	42
2.3.1.1. Kapillarzonenelektrophorese (CZE)	42
2.3.1.2. Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC)	43

2.3.2.	CE zur Reinheitsprüfung	44
2.3.3.	Prüfung der Systemeignung	46
2.3.4.	Quantitative Auswertung der Elektropherogramme	47
2.4.	Allgemeine Überlegungen zu Methoden zur Reinheitsprüfung	49
3.	REINHEITSPRÜFUNG VON TRIMEBUTIN UND TRIMEBUTIN-MALEAT MITTELS HPLC	51
3.1.	Aufgabenstellung	51
3.2.	Mögliche Verunreinigungen von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat	52
3.3.	Analytik von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat	53
3.4.	Ionenpaarchromatographie	54
3.5.	Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC)	57
3.5.1.	Methodenentwicklung	57
3.5.1.1.	Chromatographische Bedingungen	57
3.5.1.2.	Auswahl der Detektionswellenlänge	60
3.5.2.	Zuordnung einer unbekanntem Verunreinigung	61
3.6.	Validierung der RP-HPLC-Methode	63
3.6.1.	Selektivität	64
3.6.2.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	65
3.6.3.	Linearität	66
3.6.3.1.	Trimebutin-Maleat	66
3.6.3.2.	Trimebutin	68
3.6.4.	Präzision	69
3.6.4.1.	Systempräzision	69
3.6.4.2.	Methodenpräzision	70
3.6.5.	Richtigkeit	71
3.6.6.	Robustheit	72
3.6.6.1.	Variation der Säulentemperatur	72
3.6.6.2.	Variation des pH-Wertes des wässrigen Bestandteils der mobilen Phase	73
3.6.6.3.	Variation des Gradienten	74
3.6.6.4.	Variation des HPLC-Gerätes	76
3.6.7.	Systemeignung	77
3.7.	Untersuchung von Trimebutin- und Trimebutin-Maleat-Proben mit der RP-HPLC-Methode	78
3.7.1.	Respons- und Korrekturfaktoren	79
3.7.2.	Ergebnisse der Untersuchung von Trimebutin-Proben	80
3.7.3.	Ergebnisse der Untersuchung von Trimebutin-Maleat-Proben	80
3.8.	Diskussion zur Erarbeitung eines Monographievorschlags	82
3.9.	Zusammenfassung	85

4.	REINHEITSPRÜFUNG VON ADENOSIN MITTELS DC UND HPLC	86
4.1.	Aufgabenstellung	86
4.2.	Herstellung von Adenosin und mögliche Verunreinigungen	86
4.3.	Analytik von Nucleinsäure-Bausteinen	88
4.4.	Adenosin im Arzneibuch	88
4.5.	Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels DC nach Ph. Eur.	90
4.5.1.	Trennung der Substanzen	90
4.5.2.	Nachweisgrenze	91
4.5.3.	Untersuchung von Adenosin-Proben	92
4.6.	Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels HPLC	92
4.6.1.	Einfluss der stationären Phase auf die Trennung	93
4.6.1.1.	Hypersil-Gold-Säule	94
4.6.1.2.	Hypersil-ODS-Säule	97
4.6.2.	Untersuchung von Adenosin-Proben	100
4.6.2.1.	Respons- und Korrekturfaktoren	100
4.6.2.2.	Ergebnisse der Untersuchung von Adenosin-Proben	101
4.6.3.	Variation der HPLC-Bedingungen zum Nachweis der Nucleotide	102
4.7.	Zusammenfassung	104
5.	REINHEITSPRÜFUNG VON GLUTATHION MITTELS CE	107
5.1.	Aufgabenstellung	107
5.2.	Herstellung von Glutathion und mögliche Verunreinigungen	107
5.3.	Reinheitsanalytik von Glutathion	109
5.4.	Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels CE	110
5.4.1.	Systemeignung	110
5.4.1.1.	Migrationszeiten und relative Migration	110
5.4.1.2.	Einfluss des pH-Wertes der Elektrolytlösung	111
5.4.2.	Stabilität der Testlösung	112
5.4.3.	Untersuchung von Glutathion-Chargen	115
5.4.3.1.	Respons- und Korrekturfaktoren	115
5.4.3.2.	Ergebnisse der Untersuchung von Glutathion-Chargen	116
5.5.	Zusammenfassung	120
6.	REINHEITSPRÜFUNG VON AMINOSÄUREN MITTELS CE UND HPLC	122
6.1.	Aufgabenstellung	122
6.2.	Herstellung von Aminosäuren und mögliche Verunreinigungen	123
6.2.1.	Allgemeine Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren	123
6.2.2.	Herstellung der untersuchten Aminosäuren	124

6.2.3.	Mögliche Verunreinigungen von Aminosäuren	126
6.3.	Aminosäuren im Arzneibuch	127
6.4.	Untersuchung von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit FMOC-Cl	128
6.4.1.	FMOC-Cl als Derivatisierungsreagenz	128
6.4.2.	Untersuchungen zur Identifizierung eines unbekanntes Peaks	130
6.4.2.1.	CE-Untersuchungen	131
6.4.2.2.	Isolierung der Substanz mittels DC	136
6.4.2.3.	Untersuchung der isolierten Substanz mittels NMR-Spektroskopie	138
6.4.3.	Untersuchung von Aminosäure-Proben	141
6.4.3.1.	Ergebnisse der Untersuchung von Isoleucin-Proben	141
6.4.3.2.	Ergebnisse der Untersuchung von Phenylalanin-Proben	144
6.4.3.3.	Ergebnisse der Untersuchung von Serin-Proben	144
6.4.4.	Untersuchung von L-Ornithin-L-Aspartat	145
6.5.	Untersuchung von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit CBQCA	147
6.5.1.	CBQCA als Derivatisierungsreagenz	147
6.5.2.	CE-Bedingungen zur Detektion möglicher Verunreinigungen von Aminosäuren	149
6.5.3.	Untersuchung von Aminosäure-Proben	152
6.5.3.1.	Ergebnisse der Untersuchung von Histidin-Proben	153
6.5.3.2.	Ergebnisse der Untersuchung von Isoleucin-Proben	156
6.5.3.3.	Ergebnisse der Untersuchung von Phenylalanin-Proben	159
6.5.3.4.	Ergebnisse der Untersuchung von Serin-Proben	162
6.5.4.	Untersuchung von L-Ornithin-L-Aspartat	164
6.6.	Untersuchung von Aminosäuren mittels HPLC-ELSD	167
6.6.1.	Organische Säuren als mögliche Verunreinigungen	167
6.6.2.	Methodenentwicklung	168
6.6.2.1.	Auswahl der HPLC-Säule	168
6.6.2.2.	Auswahl der mobilen Phase	169
6.6.2.3.	Auswahl der ELSD-Bedingungen	172
6.6.3.	Schwierigkeiten der Methode	172
6.6.4.	Untersuchung von L-Ornithin-L-Aspartat	176
6.7.	Zusammenfassung	177
7.	ZUSAMMENFASSUNG	180
8.	SUMMARY	184
9.	EXPERIMENTALTEIL	187
9.1.	Reinheitsprüfung von Trimebutin und Trimebutin-Maleat mittels RP-HPLC	187
9.1.1.	Proben und Verunreinigungen	187
9.1.2.	Reagenzien	187

9.1.3.	RP-HPLC-Bedingungen	187
9.1.4.	Probelösungen	188
9.2.	Reinheitsprüfung von Adenosin mittels DC und HPLC	190
9.2.1.	Proben und Verunreinigungen	190
9.2.2.	Reagenzien	190
9.2.3.	Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels DC nach Ph. Eur.	190
9.2.3.1.	DC-Bedingungen	191
9.2.3.2.	Probelösungen	191
9.2.4.	Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels HPLC	191
9.2.4.1.	HPLC-Bedingungen	191
9.2.4.2.	Probelösungen	192
9.2.5.	Variation der HPLC-Bedingungen zum Nachweis der Nucleotide	192
9.2.5.1.	HPLC-Bedingungen	192
9.2.5.2.	Probelösungen	193
9.3.	Reinheitsprüfung von Glutathion mittels CE	194
9.3.1.	Proben und Verunreinigungen	194
9.3.2.	Reagenzien	194
9.3.3.	CE-Bedingungen	195
9.3.4.	Probelösungen	195
9.4.	Reinheitsprüfung von Aminosäuren mittels CE und HPLC	196
9.4.1.	Proben und Verunreinigungen	196
9.4.2.	Reagenzien	198
9.4.3.	Untersuchung von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit FMOC-Cl	198
9.4.3.1.	CE-Bedingungen	198
9.4.3.2.	Probelösungen	200
9.4.3.3.	Derivatisierung	200
9.4.4.	Untersuchung von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit CBQCA	201
9.4.4.1.	CE-Bedingungen	201
9.4.4.2.	Probelösungen	202
9.4.4.3.	Derivatisierung	203
9.4.5.	Untersuchung von Aminosäuren mittels HPLC-ELSD	203
9.4.5.1.	HPLC-Bedingungen	203
9.4.5.2.	Probelösungen	203
10.	LITERATURVERZEICHNIS	219

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3'-AMP	Adenosin-3'-monophosphat
5'-AMP	Adenosin-5'-monophosphat
5'-ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ACN	Acetonitril
AMG	Arzneimittelgesetz
ANM	Adaptation of National Monographs
API	Active pharmaceutical ingredient
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
CBQCA	3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd
CD	Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese
CRS	Chemische Referenzsubstanz
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector, Verdampfungsstreulichtdetektor
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FMOC-Cl	9-Fluorenylmethylchloroformat
GSH	Glutathion
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigchromatographie
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography, Hochleistungs-dünnschichtchromatographie
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IS	Interner Standard
JP	Japanese Pharmacopoeia
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
LOD	Limit of Detection, Nachweisgrenze

LOLA	L-Ornithin-L-Aspartat
LOQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
MP	Mobile Phase
MT	Migrationszeit
NMR	Nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz
PDA	Photodioden-Array
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea, Europäisches Arzneibuch
psi	Pound per square inch; 1 psi = 6.89 kPa
R _F -Wert	Retardationsfaktor
rMT	Relative Migration
RNA	Ribonucleinsäure
RP	Reversed phase
R _s	Auflösung
RSD	Relative Standardabweichung
RT	Retentionszeit
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBAH	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TMB	Trimebutin
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultraviolett
VU	Verunreinigung
λ _{em}	Emissionswellenlänge
λ _{ex}	Anregungswellenlänge

Alle Aminosäuren wurden nach dem 3-Buchstabencode abgekürzt.

1. EINLEITUNG

Im deutschen Arzneimittelgesetz (AMG) werden die Anforderungen an Arzneimittel festgelegt: Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit [1]. Dabei ist definiert, dass die Qualität eines Arzneimittels durch Identität, Reinheit und Gehalt bestimmt wird. Die Qualitätskontrolle der „active pharmaceutical ingredients“ (APIs) ist eine Voraussetzung für die sichere Verwendung von Arzneimitteln und ist eng mit der Bestimmung der Verunreinigungen einer Substanz im Rahmen der Reinheitsanalytik verknüpft. Denn die Sicherheit eines Arzneimittels ist nicht nur von den pharmakologisch-toxikologischen Eigenschaften des Arzneistoffs abhängig, sondern auch von denen der enthaltenen Verunreinigungen. Bereits sehr kleine Konzentrationen einer Verunreinigung können starke Nebenwirkungen hervorrufen. Zum Beispiel verursachte die Anwesenheit einer Verunreinigung auf 0.01 %-Niveau bei der präklinischen Prüfung einer antineoplastisch wirkenden Substanz an Hunden toxische Reaktionen [2]. Deshalb ist die Bestimmung des Verunreinigungsprofils nicht nur bei der Qualitätskontrolle von Bedeutung [3, 4, 5], sondern während aller Stadien der Arzneistoff- und Arzneimittel-Entwicklung, um die Sicherheit der klinischen Studien zu gewährleisten und sichere Daten bezüglich der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit zu erhalten [6]. Die Kontrolle von Verunreinigungen wird in zahlreichen Richtlinien reguliert, vor allen Dingen in den ICH-Richtlinien (u. a. Q3A, Q3B, Q6A) [7] sowie in den Arzneibüchern (u. a. Europäisches Arzneibuch [8], Arzneibuch der Vereinigten Staaten [9], Japanisches Arzneibuch [10]).

1.1. Das Europäische Arzneibuch

1.1.1. Bedeutung des Arzneibuchs

Im deutschen Recht ist das Arzneibuch in § 55 des Arzneimittelgesetzes [1] verankert. Es ist eine „vom Bundesministerium bekannt gemachte Sammlung anerkannter pharmazeutischer Regeln über die Qualität, Prüfung, Lagerung, Abgabe und Bezeichnung von Arzneimitteln und den bei der Herstellung verwendeten Stoffen“. Auch die Beschaffenheit von Behältnissen und Umhüllungen wird geregelt. Weiterhin wird festgestellt, dass die Herstellung und das Inverkehrbringen von Arzneimitteln nur erlaubt ist, wenn die „enthaltenen Stoffe und ihre

Darreichungsformen den anerkannten pharmazeutischen Regeln entsprechen“. Damit ist das Arzneibuch ein wichtiges Instrument für die Gewährleistung der Arzneimittelsicherheit und definiert die geforderte Qualität der medizinisch verwendeten Substanzen.

In Deutschland besteht das Arzneibuch aus drei Teilen: dem Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.), dem Deutschen Arzneibuch (DAB) und dem Homöopathischen Arzneibuch (HAB). Derzeit ist neben dem DAB 2006 und dem HAB 2006 die 5. Ausgabe des Ph. Eur. (Grundwerk und Nachträge) rechtskräftig.

Das Europäische Arzneibuch ist für alle Verantwortlichen im Gesundheitswesen, für die Hersteller von Rohstoffen und Arzneimitteln sowie für alle mit der Qualitätskontrolle betrauten Personen bindend [8].

Die europaweite Regelung durch das Ph. Eur. erleichtert den Warenverkehr von Arzneimitteln in Europa und sichert die Qualität der aus Europa exportierten Arzneimittel.

Für die Arzneimittelzulassung muss der pharmazeutische Unternehmer vorlegen, mit welchen Methoden und analytischen Prüfungen die Qualität des Produktes sichergestellt wird. Im Rahmen des Zulassungsdossiers kann er sich dabei auf das Ph. Eur. berufen. Für neue, noch patentrechtlich geschützte Arzneistoffe gibt es zwar in der Regel noch keine Monographien, aber die Qualität vieler Hilfsstoffe für die Herstellung eines Arzneimittels ist im Ph. Eur. festgelegt. Zudem gibt es auch einige allgemeine Prüfungen, die von einem Arzneimittel für eine Zulassung erfüllt werden müssen [11], z. B. Zerfallszeit von Tabletten und Wirkstofffreisetzung aus Arzneiformen.

1.1.2. Entwicklung des Europäischen Arzneibuchs

Die Grundlage für das Europäische Arzneibuch (Pharmacopoea Europaea, abgekürzt mit Ph. Eur.) wurde 1964 gelegt, als acht Mitgliedsstaaten des 1949 gegründeten Europarates, dessen Ziel unter anderem die Verbesserung der Lebensqualität der Europäer ist, ein „Übereinkommen über die Ausarbeitung eines Europäischen Arzneibuchs“ getroffen haben [12]. Nachdem alle Vertragsstaaten (Belgien, Bundesrepublik Deutschland, Frankreich, Italien, Luxemburg, Niederlande, Schweiz und Vereinigtes Königreich von Großbritannien und Nordirland) das Abkommen ratifiziert hatten, trat es am 08. Mai 1974 in Kraft.

Der 1. Band der 1. Ausgabe des Ph. Eur. wurde im selben Jahr in Deutschland

rechtlich bindend. Die insgesamt drei Bände und zwei Supplemente waren parallel zum DAB 7 und DAB 8 gültig. Die 2. Ausgabe des Ph. Eur. war in das DAB 9 bzw. DAB 10 integriert. Seit 1997 werden DAB und Ph. Eur. wieder getrennt veröffentlicht. Im Juli 2007 trat der 8. und letzte Nachtrag zur 5. Ausgabe des Ph. Eur. in Kraft, die im Januar 2008 durch die 6. Ausgabe des Europäischen Arzneibuchs abgelöst wird. Eine Übersicht über die Entwicklung des Ph. Eur. gibt der Artikel [13]. Das Ph. Eur. erscheint in den Sprachen des Europarates – Englisch und Französisch. In einigen Ländern, z. B. im deutschsprachigen Raum (Deutschland, Österreich, Schweiz) wird die Originalausgabe übersetzt.

Seit Inkrafttreten des „Übereinkommens über die Ausarbeitung eines Europäischen Arzneibuchs“ war es auch für andere Mitgliedsstaaten des Europarates sowie für europäische Nichtmitgliedsstaaten möglich, dem Abkommen beizutreten. Bis heute haben 36 Staaten sowie die Europäische Union den Vertrag unterzeichnet [14]. Neben den Mitgliedsstaaten gibt es noch 20 sogenannte Beobachter (19 Staaten und die Weltgesundheitsorganisation WHO), die an der wissenschaftlichen Arbeit teilnehmen können, aber bei Entscheidungen über kein Stimmrecht verfügen. Einige dieser Staaten haben das Ph. Eur. komplett oder in Teilen in ihre nationale Gesetzgebung integriert (z. B. Kanada, Australien, Marokko, Tunesien, Senegal) [14].

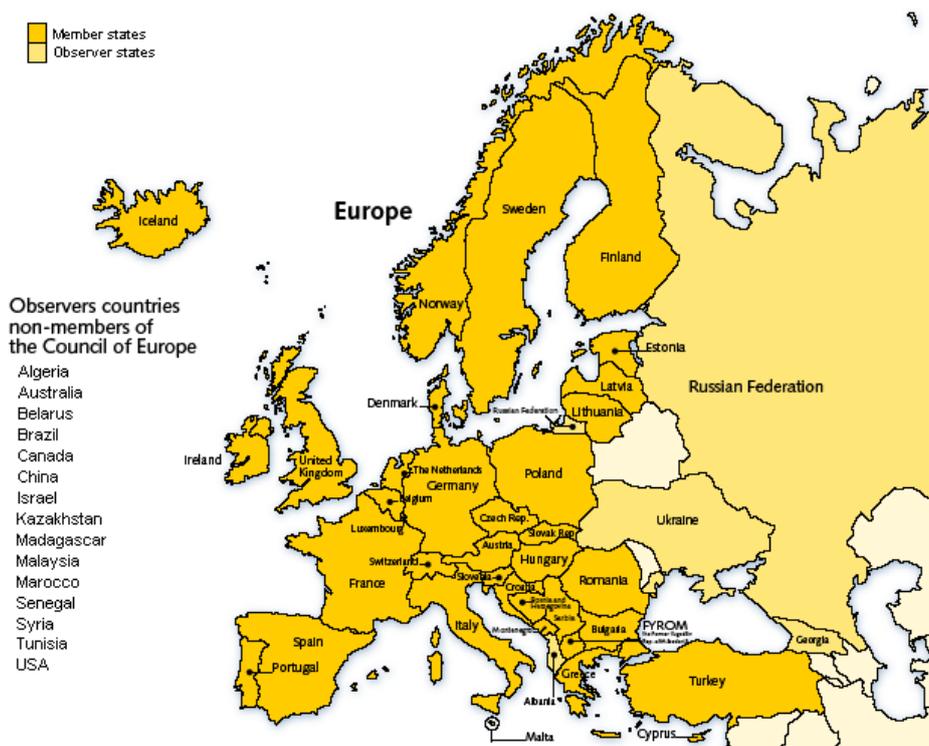


Abbildung 1-1: Übersicht über die Verbreitung des Ph. Eur. (Stand 2007) [aus 14].

Im Laufe der Jahre hat das Europäische Arzneibuch auch über die Grenzen Europas hinaus an Bedeutung gewonnen und hat sich neben der United States Pharmacopoeia (USP) und dem Japanischen Arzneibuch (JP) zu einem der verbreitetsten Arzneibücher entwickelt (Abbildung 1-1).

Zu Beginn der Arbeit am Ph. Eur. war die Harmonisierung der Monographien, die in den nationalen Arzneibüchern der europäischen Mitgliedsstaaten enthalten waren, von Bedeutung. Dadurch hat der Umfang des Europäischen Arzneibuchs mit der Zeit kontinuierlich zugenommen, so dass die 5. Ausgabe ungefähr 2000 Monographien und Texte umfasst [8]. Gleichzeitig haben die nationalen Arzneibücher, so auch das Deutsche Arzneibuch, an Umfang verloren, da die harmonisierten Monographien aus den nationalen Werken gestrichen wurden.

Seit 1990 wird vor dem Hintergrund eines weltweiten Arzneimittelmarktes auch eine internationale Harmonisierung mit der USP und dem Japanischen Arzneibuch angestrebt [8, 15]. Die Pharmacopoeial Discussion Group (PDG) koordiniert die Harmonisierung in Zusammenarbeit mit der „International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“ (ICH). Zurzeit werden vor allen Dingen Monographien zu Hilfsstoffen und allgemeine Methoden angeglichen [16].

1.1.3. Erarbeitung des Europäischen Arzneibuchs

Die Erarbeitung des Ph. Eur. obliegt entsprechend dem „Übereinkommen über die Ausarbeitung eines Europäischen Arzneibuchs“ dem Gesundheitsausschuss des Europarates und der von diesem eingerichteten Europäischen Arzneibuch-Kommission. Die Ph.-Eur.-Kommission setzt sich aus den Delegationen der Mitgliedsstaaten zusammen, wobei pro Staat maximal drei Mitglieder berufen werden dürfen. Die Kommission wählt für eine Amtszeit von drei Jahren einen Vorsitzenden. Zu den Aufgaben der Ph.-Eur.-Kommission zählen [12]:

- Bestimmung der allgemeinen Grundsätze für die Ausarbeitung des Ph. Eur.,
- Festlegung der jeweils geeigneten Untersuchungsmethoden,
- Festlegung des Arbeitsprogramms zur Erarbeitung und Revision von Monographien,
- Ausarbeitung der Monographien und deren Annahme,

- Empfehlung von Fristen für die Umsetzung der fachlichen Beschlüsse in den Mitgliedstaaten.

Der Gesundheitsausschuss beaufsichtigt die Tätigkeit der Ph.-Eur.-Kommission und legt die empfohlenen Fristen fest.

Vertreter aus der Industrie, von Universitäten und nationalen Kontrollgremien, organisiert in derzeit 17 von der Arzneibuchkommission beauftragten Expertengruppen, erarbeiten zusammen das Europäische Arzneibuch [14]. Das „European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care“ (EDQM) ist eine Institution des Europarates und unterstützt die Arbeit der Ph.-Eur.-Kommission. Zu den Aufgaben, die dem EDQM übertragen wurden, gehören:

- das Technische Sekretariat der Ph.-Eur.-Kommission, das für die Erstellung von Monographien mit den Expertengruppen verantwortlich ist,
- Publikation und Vertrieb des Europäischen Arzneibuchs,
- Publikation der Zeitschriften Pharmeuropa, Pharmeuropa Scientific Notes und Pharmeuropa Bio,
- Bereitstellung und Vertrieb von Referenzsubstanzen,
- Erteilung von Zertifikaten an Hersteller (Certificate of Suitability of Monographs of the European Pharmacopoeia), mit denen bestätigt wird, dass die Qualität eines Arzneistoffs mit der Monographie des Ph. Eur. geprüft werden kann,
- Organisation des Netzwerks der behördlichen europäischen Untersuchungslaboratorien.

1.1.4. Aufbau des Europäischen Arzneibuchs

Das Europäische Arzneibuch [8] erscheint in zwei Bänden, die der inhaltlichen Gliederung in einen allgemeinen Teil (Band 1) und einen speziellen Teil mit Monographien zu Einzelsubstanzen (Band 2) entsprechen. Das Grundwerk wird zur Zeit jedes Jahr um drei Nachträge ergänzt, wobei ein Gesamtregister am Ende des letzt erschienenen Nachtrags veröffentlicht wird.

1.1.4.1. Band 1: Allgemeiner Teil und Monographiegruppen

Der allgemeine Teil des Ph. Eur. untergliedert sich in fünf Kapitel:

1. Allgemeine Vorschriften

Hier finden sich allgemeine Angaben zur Benutzung des Ph. Eur., Begriffsdefinitionen, verwendete Abkürzungen und Einheiten.

2. Allgemeine Methoden

In dem umfangreichsten Kapitel des allgemeinen Teils werden fast 300 analytische Methoden und Verfahren beschrieben, die zur Durchführung der Prüfungen und Untersuchungen notwendig sind. Dazu zählen neben Identitätsreaktionen, Grenzprüfungen, Gehaltsbestimmungsmethoden und den Methoden der Biologie, Pharmakognosie und pharmazeutischen Technologie vor allen Dingen die für die vorliegende Arbeit wichtigen Methoden der Physik und physikalischen Chemie. In diesem Abschnitt des Ph. Eur. werden die Grundlagen der instrumentellen Methoden (DC, IR, UV-VIS, HPLC, CE etc.) vorgestellt sowie allgemeine Hinweise zur Durchführung gegeben.

3. Material zur Herstellung von Behältnissen, Behältnisse

4. Reagenzien

Für mehr als 2000 Reagenzien wird die Qualität, die für die Prüfungen nach Arzneibuch notwendig ist, beschrieben. Zu den Reagenzien gehören auch die „Chemischen Referenzsubstanzen“ (CRS). Dabei handelt es sich um qualifizierte Referenzsubstanzen (entweder einzelne Substanzen oder Substanzgemische), die von der Ph.-Eur.-Kommission etabliert und vom Labor des EDQM entsprechend der jeweiligen Monographie getestet werden. Sie können beim EDQM bezogen werden. In den meisten Monographien wird die Verwendung einer oder mehrerer Referenzsubstanzen bei Identitäts- und Reinheitsprüfungen (z. B. IR, DC, HPLC) zum Vergleich der Eigenschaften vorgeschrieben.

5. Allgemeine Texte

In diesem Abschnitt findet der Anwender Angaben zur Sterilität und mikrobiologischen Qualität sowie zu Impfstoffen. In die 5. Ausgabe des Ph. Eur. wurde das Kapitel 5.10 „Kontrolle von Verunreinigungen in Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung“ aufgenommen, in dem u. a. die Bewertung von Ergebnissen der Reinheitsprüfungen erklärt wird [17].

Neben den speziellen Monographien im 2. Band hat die Ph.-Eur.-Kommission einige Monographien erarbeitet, die bestimmte Substanzklassen und Zubereitungen sowie Darreichungsformen umfassen. Allgemeine Monographien wurden unter anderem für „Fermentationsprodukte“ [18] und „Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung“ [19] erstellt. Die dort festgelegten Anforderungen gelten für alle Substanzen der

entsprechenden Gruppe und werden durch die speziellen Anforderungen in den Einzelmonographien ergänzt. Auf diese Weise wird die Wiederholung von Informationen in den Einzelmonographien vermieden.

1.1.4.2. Band 2: Monographien

Der 2. Band des Ph. Eur. listet in alphabetischer Reihenfolge die Monographien zu den Einzelsubstanzen. Obwohl das Arzneibuch viele verschiedene Substanzklassen umfasst, u. a. organische und anorganische Substanzen, Drogen, Hilfsstoffe, biologische Produkte, Impfstoffe etc., haben alle Monographien die gleiche Gestaltung. Der „Style Guide“ [20], veröffentlicht vom EDQM, gibt die Form der Monographien vor.

Im Anschluss an die INN-Bezeichnung und den lateinischen Namen werden, falls möglich, die Strukturformel, Summenformel und molare Masse angegeben. Durch die Angabe des IUPAC-Namens und des Gehalts wird die Substanz eindeutig definiert.

Für bestimmte Substanzen, insbesondere Impfstoffe, Hormone und andere biologische Produkte, ist die Endkontrolle durch die Vorgaben der Monographie nicht immer ausreichend, um die Qualität zu gewährleisten. In diesen Fällen werden für den Hersteller relevante Informationen (u. a. zu Ausgangsstoffen, Herstellungsverfahren, In-Prozess-Kontrollen) im Abschnitt „Herstellung“ angegeben. Die unter Eigenschaften beschriebenen physikalischen Charakteristika (Aussehen, Löslichkeit, Polymorphie) dienen nur der Orientierung und sind nicht verbindlich.

Für die Qualitätskontrolle müssen Identität, Reinheit und Gehalt untersucht werden. Bei der „Prüfung auf Identität“ handelt es sich nicht um eine Identifizierung bzw. Strukturaufklärung im eigentlichen Sinne, sondern um die Feststellung, ob eine Substanz ihrer Deklaration entspricht. Wenn ein Stoff im Krankenhaus und in der öffentlichen Apotheke in der Rezeptur verarbeitet wird, gibt es in der Regel zwei Serien zur „Prüfung der Identität“: Die erste Serie verwendet komplexe instrumentelle Methoden (IR, GC, HPLC), während die zweite Serie ohne großen apparativen Aufwand auskommt (Schmelzpunkt, optische Drehung, Dichte, Brechungsindex, DC und vor allen Dingen nasschemische Nachweise). Nur wenn die untersuchte Substanz aus einer Charge stammt, die allen Anforderungen der Monographie entspricht, ist die Durchführung der zweiten Serie ausreichend [19].

Die im Abschnitt „Reinheit“ vorgeschriebenen Prüfungen sollen mögliche Verunreinigungen erfassen und limitieren. Mit Hilfe allgemeiner Prüfungen (pH-Wert,

Aussehen der Lösung, Trocknungsverlust, Sulfatasche) können Unregelmäßigkeiten erkannt werden. Chromatographische Trennmethode (DC, HPLC, GC) sowie auch Kapillarelektrophorese werden häufig eingesetzt, um „verwandte Substanzen“ zu erfassen.

Aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit und Genauigkeit sind Titrationsverfahren die Methode der Wahl für die Gehaltsbestimmung (in über 70 % der Monographien vorgeschrieben); bisher werden nur in 10 % der Monographien HPLC-Methoden verwendet [21].

Seit dem Ph. Eur. 1997 werden am Ende einer Monographie die kontrollierten und üblicherweise auftretenden Verunreinigungen in der so genannten Transparenzliste veröffentlicht. Die Verunreinigungen werden unterteilt in:

- spezifizierte Verunreinigungen, die einzeln aufgeführt und durch ein spezifisches Akzeptanzkriterium begrenzt werden, und
- andere bestimmbar Verunreinigungen, die mit den Reinheitsprüfungen nachgewiesen werden können, jedoch normalerweise nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen auftreten.

1.1.5. Erarbeitung einer Monographie

Die Ph.-Eur.-Kommission legt alle zwei Jahre ein Arbeitsprogramm für die Erarbeitung und Überarbeitung von Monographien fest. Prinzipiell gibt es vier Wege, nach denen Monographien erarbeitet werden:

Prozedur 1: Ein Mitglied einer Expertengruppe übernimmt die durchzuführenden Arbeiten und die Erstellung des Monographieentwurfs. Nach Möglichkeit wird versucht, die Hersteller in die Erarbeitung der Monographie einzubeziehen, da sie Informationen zur Herstellung und Reinigung sowie zu potenziellen Verunreinigungen zur Verfügung stellen können. Das EDQM unterstützt die Arbeit durch den Kontakt zu Herstellern bzw. Händlern und die Beschaffung von Referenzsubstanzen und Chargenmustern.

Prozedur 2: Im Rahmen der „Adaptation of National Monographs“ (ANM) werden nationale Monographien harmonisiert. Dieses Verfahren ist weitestgehend abgeschlossen und findet nur noch bei pflanzlichen Drogen und homöopathischen Zubereitungen Anwendung.

Prozedur 3: Der auf diesem Weg ausgearbeitete Monographieentwurf beruht auf einer freiwilligen Zusammenarbeit zwischen dem Originalhersteller einer

Substanz, deren Patent in naher Zukunft ausläuft, und der nationalen Zulassungsbehörde des europäischen Landes, in dem die Substanz hergestellt wird.

Prozedur 4: Seit 2002 besteht auch die Möglichkeit einer Zusammenarbeit zwischen dem EDQM und dem Originalhersteller.

Die allgemeinen Grundsätze und Richtlinien der Arzneibuchkommission für die Ausarbeitung von Monographien sind in einer Sonderausgabe von Pharmeuropa, dem „Technical Guide for the Elaboration of Monographs“ [22], festgehalten. Der in der entsprechenden Expertengruppe ausgearbeitete Monographieentwurf wird in Pharmeuropa publiziert und der Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Jeder potenzielle Anwender kann den Vorschlag prüfen und kommentieren. Die Stellungnahmen werden von den nationalen Arzneibuchbehörden zusammengefasst und der Expertengruppe vorgetragen. Nach der Überarbeitung muss der Monographieentwurf ggf. erneut in Pharmeuropa veröffentlicht werden oder er wird der Ph.-Eur.-Kommission zur Annahme vorgeschlagen. Nachdem eine Monographie von der Kommission angenommen wurde, wird sie durch die Veröffentlichung im Europäischen Arzneibuch rechtlich bindend.

Gleichwohl spiegeln die Monographien im Ph. Eur. immer den Wissensstand zum Zeitpunkt ihrer Erarbeitung wieder, so dass die Überarbeitung einer Monographie notwendig werden kann. Abbildung 1-2 gibt einen schematischen Überblick, wie ein Revisionsverfahren eingeleitet werden kann.

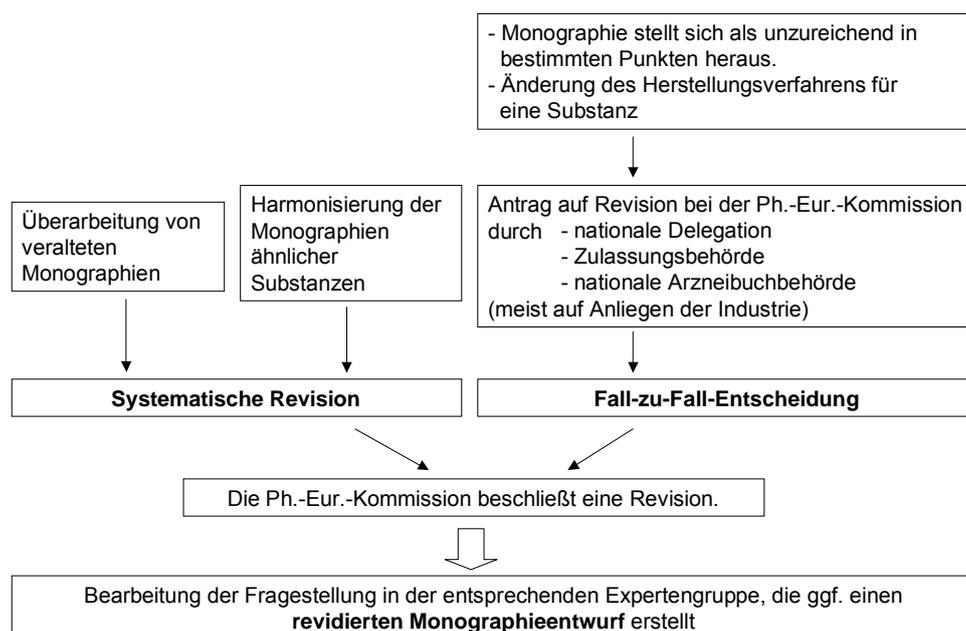


Abbildung 1-2: Einleitung eines Revisionsverfahrens.

Die Arzneibuchkommission hat es sich zum Ziel gesetzt, vor allen Dingen Monographien, in denen die Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ noch mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt wird, zu revidieren. Die DC-Methoden sollen durch HPLC- und GC-Verfahren ersetzt werden. Weiterhin soll eine Liste der spezifizierten und der anderen bestimmbaren Verunreinigungen in die Monographien aufgenommen werden. Die revidierten Monographien werden in Pharmeuropa veröffentlicht und durchlaufen die oben beschriebenen Stadien.

1.2. Reinheitsanalytik von Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung

1.2.1. Klassifizierung von Verunreinigungen

Eine Verunreinigung ist definiert als „jeder Bestandteil in einer Substanz zur pharmazeutischen Verwendung, mit Ausnahme der chemischen Verbindung, die die Substanz ist“ [17]. Das Verunreinigungsprofil beschreibt die identifizierten und nicht-identifizierten Verunreinigungen, die in einer Substanz anwesend sein können [23].

Die ICH-Richtlinie Q3A [23] reguliert die Anwesenheit von Verunreinigungen in chemisch hergestellten APIs, die bisher noch nicht zugelassen waren. Hiernach werden Verunreinigungen in drei Gruppen eingeteilt:

1. Organische Verunreinigungen, die aus der Herstellung, Reinigung oder Lagerung stammen können. Dazu gehören Edukte, Zwischen-, Neben- und Abbauprodukte sowie Reagenzien, Liganden und Katalysatoren. Edukte können ihrerseits Substanzen enthalten, die die Reinheit des API beeinflussen.
2. Anorganische Verunreinigungen, bei denen es sich um Reagenzien, Liganden, Katalysatoren, Schwermetalle und anorganische Salze sowie weitere Materialien (Filtrierhilfsmittel, Aktivkohle) aus dem Herstellungsprozess handeln kann.
3. Rückstände von Lösungsmitteln, die während der Synthese oder Reinigung verwendet wurden.

Ausdrücklich werden Verunreinigungen, die aufgrund von „Good Manufacturing Practice“ (GMP) nicht anwesend sein sollten, polymorphe Formen und Enantiomere als Verunreinigungen von der Richtlinie Q3A ausgenommen. Dabei ist für Enantiomere bekannt, dass sie unterschiedliche pharmakologisch-toxikologische Eigenschaften zeigen können. Beispielsweise ist eine Kontrolle der

Enantiomerenreinheit bei D-Penicillamin wegen der Toxizität von L-Penicillamin von großer Bedeutung [24, 25]. Deshalb sollte die Enantiomerenreinheit einer chiralen Substanz ebenso wie die Anwesenheit von organischen und anorganischen Verunreinigungen oder Lösungsmitteln überprüft werden. Grenzwerte für Enantiomere sind abhängig von den toxikologischen Untersuchungen und sollten das in den Studien enthaltene Niveau nicht überschreiten [26, 27].

1.2.2. Einfluss des Herstellungsprozesses auf das Verunreinigungsprofil

Das Antidepressivum Fluoxetin wurde 1987 zugelassen und wird mittlerweile von vielen Generikafirmen produziert. Mehrere Wege zur Herstellung des Arzneistoffs sind bekannt. Die Untersuchung von Proben aus verschiedenen Synthesewegen mit Hilfe einer Gradienten-HPLC-Methode zeigt deutliche Unterschiede im Verunreinigungsprofil des Arzneistoffs sowie des Arzneimittels [28, 29].

Im Fall der illegalen Droge Ecstasy kann die Analyse des Verunreinigungsprofils auch ausgenutzt werden, um Substanzen einer Quelle zuzuordnen und dadurch Produktionsstätten und Vertriebswege zu verfolgen [30, 31].

Die Beispiele verdeutlichen den großen Einfluss des Syntheseweges, der Reaktionsbedingungen und der Aufreinigung auf das Verunreinigungsprofil der Produkte [3]. Daneben spielen auch die verwendeten Reagenzien, Lösungsmittel und Edukte für die Reinheit der Produkte eine Rolle. Auf die Qualität der Ausgangsstoffe muss besonderes Augenmerk gerichtet werden, da sie ihrerseits Verunreinigungen enthalten können, die im Produkt wiedergefunden werden oder die mitreagieren und weitere Nebenprodukte bilden können [32, 33].

Das Verständnis des Herstellungsweges und der Stabilität der Substanzen ist notwendig, um die Struktur der möglichen Verunreinigungen vorhersagen zu können. Umgekehrt kann die Kenntnis von auftretenden Verunreinigungen auch dazu beitragen, die Reaktionsbedingungen so einzustellen, dass die Verunreinigungen nicht mehr entstehen bzw. ihr Anteil reduziert wird [3]. Derartige gezielte Änderungen im Syntheseweg können die Qualität des API verbessern. Jedoch können Modifikationen der Herstellung auch negative Auswirkungen haben, insbesondere wenn sie zum Auftreten neuer, bisher nicht bekannter Verunreinigungen führen, wie in Abbildung 1-3 gezeigt.

Im Rahmen der Qualitätskontrolle eines API ist die Kontrolle der Verunreinigungen ein guter Indikator für einen konstanten Herstellungsprozess, da bereits kleine

Abweichungen das Verunreinigungsprofil quantitativ oder qualitativ ändern können [3, 34].

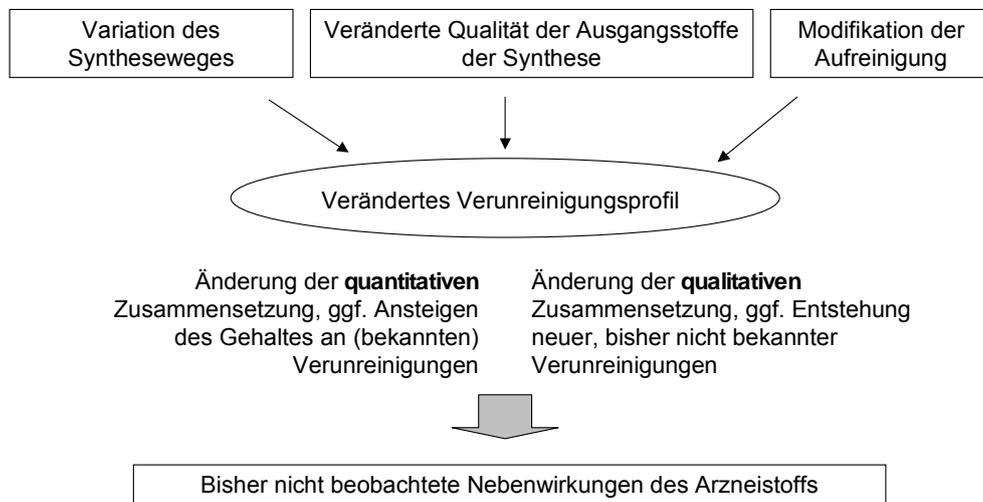


Abbildung 1-3: Modifikation der Herstellung von Arzneimitteln und die möglichen Folgen (aus [34]).

1.2.3. Limitierung von Verunreinigungen

Die Grundsätze des Ph. Eur. zur Kontrolle von Verunreinigungen sind in der allgemeinen Monographie „Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung“ [19] sowie in dem allgemeinen Text 5.10 „Kontrolle von Verunreinigungen in Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung“ [17] beschrieben. Die Anforderungen der ICH-Richtlinie Q3A für Verunreinigungen in neuen APIs wurden in das Ph. Eur. übernommen und dadurch auch auf monographierte, bekannte Stoffe ausgedehnt. Dementsprechend sind die Reinheitsprüfungen des Ph. Eur. darauf ausgelegt, die organischen und anorganischen Verunreinigungen zu erfassen. Rückstände von Lösungsmitteln werden entsprechend der allgemeinen Monographie „Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung“ und des allgemeinen Kapitels 5.4 [35] kontrolliert. Nahezu alle Monographien zu organisch-chemischen Substanzen enthalten eine Reinheitsprüfung auf „Verwandte Substanzen“, mit der die organischen Verunreinigungen erfasst werden.

Die Anforderungen zur Reinheitsprüfung von synthetisch hergestellten Substanzen sind in Tabelle 1-1 zusammengefasst. Die Vorgaben gelten nicht für biotechnologisch hergestellte Produkte, Fermentationsprodukte oder von diesen abgeleitete halbsynthetische Produkte.

Die vorgeschriebenen Grenzwerte sind von der maximalen täglichen Dosis abhängig:

Bei einer höheren täglichen Dosis sind die Anforderungen enger gesetzt, da man davon ausgeht, dass der Patient in diesem Fall einem höheren Level an Verunreinigungen ausgesetzt ist.

Tabelle 1-1: Berichten, Identifizieren und Qualifizieren von organischen Verunreinigungen in Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung [19, 23].

Anwendung	Maximale tägliche Dosis	Berichtsgrenzwert für eine Verunreinigung	Grenzwert für Identifizierung	Grenzwert für Qualifizierung
Anwendung am Menschen oder am Menschen und Tier	≤ 2 g je Tag	> 0.05 %	> 0.10 % oder tägl. Aufnahme von > 1.0 mg (stets der niedrigere Wert)	> 0.15 % oder tägl. Aufnahme von > 1.0 mg (stets der niedrigere Wert)
Anwendung am Menschen oder am Menschen und Tier	> 2 g je Tag	> 0.03 %	> 0.05 %	> 0.05 %
Ausschließliche Anwendung am Tier	nicht anwendbar	> 0.1 %	> 0.2 %	> 0.5 %

Verunreinigungen, deren Gehalt größer als der Berichtsgrenzwert ist, werden in die Berechnung der Summe aller Verunreinigungen eines API einbezogen. Dabei legt der Berichtsgrenzwert im Prinzip die Empfindlichkeit der Methode fest, denn die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification (LOQ), der kleinste Gehalt, der noch mit einer ausreichenden Präzision quantifizierbar ist) sollte kleiner als dieser Grenzwert sein [23].

Wenn möglich sollen Verunreinigungen > 0.10 % bzw. > 0.05 % hinsichtlich ihrer Struktur identifiziert werden.

Bei der Qualifizierung muss die biologische Unschädlichkeit einer speziellen Verunreinigung oder eines bekannten Verunreinigungsprofils für den erwarteten Gehalt belegt werden. Die Studien zur Qualifizierung können sehr aufwendig sein, so dass es in manchen Fällen einfacher ist, den Gehalt einer Verunreinigung auf einen Wert unterhalb der Qualifizierungsgrenze zu verringern. In Studien an Menschen oder Tieren festgestellte Metabolite gelten ohne weitere Nachweise durch Studien als qualifiziert. Das gleiche gilt für das Niveau einer Verunreinigung, das in den klinischen Studien in der Substanz enthalten war. Auch wissenschaftliche Literatur kann herangezogen werden, um die Unbedenklichkeit einer Substanz zu belegen [23, 36].

Falls eine Verunreinigung stark toxisch ist oder unerwartete pharmakologische Effekte hervorrufen kann, können engere Grenzwerte notwendig sein.

Im Ph. Eur. wird zwischen spezifizierten und nicht-spezifizierten Verunreinigungen unterschieden [17]. Erstere werden in der Reinheitsprüfung auf „Verwandte Substanzen“ durch ein spezifisches Akzeptanzkriterium limitiert, während Letztere durch den Grenzwert für die Identifizierung ($\leq 0.10\%$) begrenzt werden. Abbildung 1-4 gibt einen Überblick über die Einordnung von Verunreinigungen in einer Monographie. Unter die „anderen bestimmbar Verunreinigungen“ fallen solche Verunreinigungen, die mit den Reinheitsprüfungen nachgewiesen werden können, aber in der Regel nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen auftreten. Sie werden ebenso wie die spezifizierten Verunreinigungen in der Transparenzliste am Ende einer Monographie angegeben.

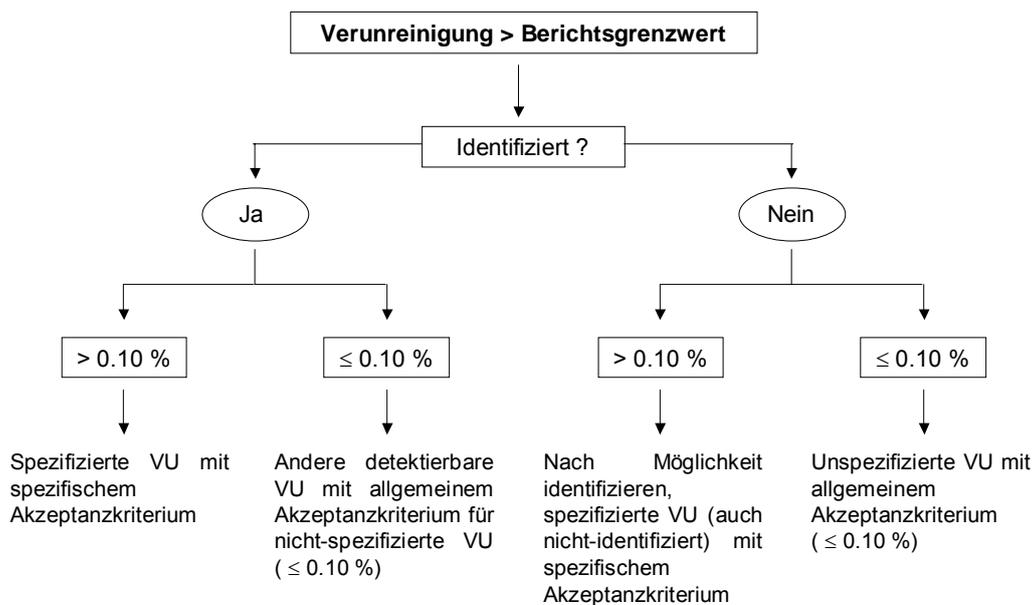


Abbildung 1-4: Einordnung von Verunreinigungen (VU) in einer Monographie.

1.2.4. Prüfung auf „Verwandte Substanzen“

Die Monographien des Ph. Eur. decken Substanzen zur Herstellung von Arzneimitteln ab, die in den Vertragsstaaten des Ph. Eur. zugelassen sind. Die Methoden zur Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ beruhen auf den zum Zeitpunkt der Erarbeitung der Monographie bekannten Synthesewegen und den daraus erwarteten Verunreinigungen [17]. Im Rahmen der Erstellung des Monographieentwurfs werden Chargen des API, die von den Herstellern zur

Verfügung gestellt werden, mit der vorgeschlagenen Methode analysiert. Die Einstufung der Verunreinigungen in spezifizierte oder andere detektierbare Verunreinigungen sowie die Festlegung der Grenzwerte basieren auf den Ergebnissen dieser Chargen-Untersuchungen [22]. Aus diesem Grund kann es vorkommen, dass APIs von Herstellern, die sich nicht an der Erarbeitung der Monographie beteiligt haben, die Akzeptanzkriterien der Monographie nicht erfüllen. Gerade wenn es sich um APIs handelt, die von vielen Generikafirmen vermarktet werden, können Synthesewege und Reinigung sehr unterschiedlich sein. Das kann zu Verunreinigungsprofilen führen, die bei der Erstellung der Monographie nicht berücksichtigt wurden und von der Methode im Arzneibuch nicht zwangsläufig abgedeckt werden [5, 17]. In ähnlicher Weise problematisch ist die Tendenz pharmazeutischer Unternehmen, aus Gründen der Kostenreduzierung APIs aus Ländern zu kaufen, die nicht im Geltungsbereich des Ph. Eur. liegen. Schätzungen zufolge werden 80 % der in Deutschland verwendeten Antibiotika in Asien (Indien, China) produziert, unter Umständen mit veränderten Herstellungswegen [37].

Dadurch kann es vorkommen, dass die APIs Verunreinigungen enthalten, die bei der routinemäßigen Qualitätskontrolle nach Ph. Eur. nicht erfasst werden. In der Literatur sind einige Fälle beschrieben. So deckt die für die Analyse von Fluoxetin entwickelte Gradienten-HPLC-Methode Verunreinigungen auf, die mit der isokratischen Methode des USP nicht gefunden werden [28]. Die Reinheit von Indometacin wird nach Ph. Eur. mittels DC kontrolliert und Verunreinigungen werden auf 0.5 % begrenzt. Hess *et al.* untersuchten 38 Proben, die alle die Spezifikationen der Monographie erfüllten, mittels HPLC-UV und NMR-Spektroskopie. Dabei wurden in 42 % der Proben Verunreinigungen mit einem Gehalt > 0.2 % gefunden, wodurch die Proben den allgemeinen Anforderungen nicht entsprachen [38]. Das unterschiedliche Verunreinigungsprofil der Muster legt nahe, dass die Hersteller verschiedene Synthesewege/Reinigungsschritte verwendet haben. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Untersuchung von Trimethoprim-Proben verschiedener Hersteller mittels HPLC [37]. Da die neu detektierten Verunreinigungen mit der offizinellen DC-Methode nicht nachweisbar waren, wurden in die Trimethoprim-Monographie im Ph. Eur. zwei HPLC-Methoden zur Kontrolle von 10 beschriebenen Verunreinigungen aufgenommen [39, 40].

Das Auftreten neuer Verunreinigungen ist immer ein Risiko für die Arzneimittelsicherheit, da die Verunreinigungen bisher nicht beobachtete

Nebenwirkungen auslösen können. Das bekannteste Beispiel ist die sogenannte Tryptophan-Affäre, bei der Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts viele Patienten am Eosinophilie-Myalgie-Syndrom (EMS) erkrankten und einige in der Folge verstarben [37, 41]. Die Untersuchung der Zwischenfälle ergab, dass alle Patienten Tryptophan eines bestimmten Herstellers eingenommen hatten. Dieser gewann die Aminosäure fermentativ und hatte das Aufreinigungsverfahren verändert. Offensichtlich sind dadurch neue Verunreinigungen in das Produkt gelangt, die mit der routinemäßigen Qualitätskontrolle nicht erkannt wurden. Die Verunreinigungen 1',1'-Ethylidenbistryptophan und 3-Phenylaminoalanin, die wohl erst während des Reinigungsprozesses entstehen [42], werden mit den Zwischenfällen in Zusammenhang gebracht. Bisher ist aber nicht geklärt, ob die beiden Substanzen für die Erkrankungen direkt verantwortlich sind oder als Marker für andere Verunreinigungen dienen, die EMS auslösen [41, 42]. Die Reinheitsprüfungen der Tryptophan-Monographie im Ph. Eur. wurden um eine HPLC-Methode ergänzt, die diese Verunreinigungen kontrolliert [43].

Prinzipiell ist es die Pflicht des Anwenders nachzuweisen, dass eine Monographie eine angemessene Kontrolle der Verunreinigungen für eine Substanz zur pharmazeutischen Verwendung bekannter Herkunft ermöglicht [17]. Da die meisten API-Hersteller ihre Herstellungsverfahren nicht offen legen wollen, wurde seit dem Ph. Eur. 1997 in die Monographien eine Transparenzliste aufgenommen, in der die mit den Methoden kontrollierten und üblicherweise auftretenden Verunreinigungen aufgelistet sind [44]. Dadurch kann indirekt auf die zugrunde liegenden Herstellungswege geschlossen werden. Bei einer Änderung der Synthese muss überprüft werden, ob die ggf. neu auftretenden Verunreinigungen mit den Methoden der Monographie nachgewiesen werden können. Wenn für eine Verunreinigung in der Einzelmonographie keine geeignete Prüfung angegeben ist, so muss eine geeignete Prüfung entwickelt werden. In diesem Fall wird die Revision der Monographie notwendig [17].

Hinweise auf neue Synthesewege und neue Verunreinigungen erhält das EDQM u. a. auch über das Zertifizierungsverfahren. Ein Hersteller reicht beim EDQM ein Dossier für eine Substanz ein, das die Herstellungsmethode und damit verbundene Verunreinigungen beschreibt. Das Dossier wird sorgfältig geprüft und bei positiver Bewertung wird ein „Certificate of Suitability of the Monographs of the European Pharmacopoeia“ vergeben. Dadurch wird bestätigt, dass eine Monographie zur

Beurteilung der Qualität der Substanz geeignet ist, d. h. dass alle herstellungsbedingten Verunreinigungen nachweisbar sind. Der Hersteller kann das Zertifikat im Zulassungsverfahren verwenden, um zu belegen, dass die Substanz den Anforderungen des Ph. Eur. entspricht. Falls neben den Vorgaben der Monographie zusätzliche Methoden notwendig sind, um die Qualität der Substanz zu belegen, kann, mit dem Einverständnis des Herstellers, eine Revision von der Zertifizierungsabteilung des EDQM angestoßen werden [45].

1.2.5. Biotechnologisch hergestellte Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung

Die Bedeutung der industriellen Biotechnologie für die Produktion von Antibiotika, Vitaminen und Aminosäuren/Peptiden nimmt seit einigen Jahren zu. Wurde der Markt für die zentralen Produktgruppen 1992 noch auf ca. 9.6 Mrd. € geschätzt, so geht man heute von 55 – 60 Mrd. € aus [46, 47]. Dabei nehmen Antibiotika den größten Anteil ein (Abbildung 1-5).

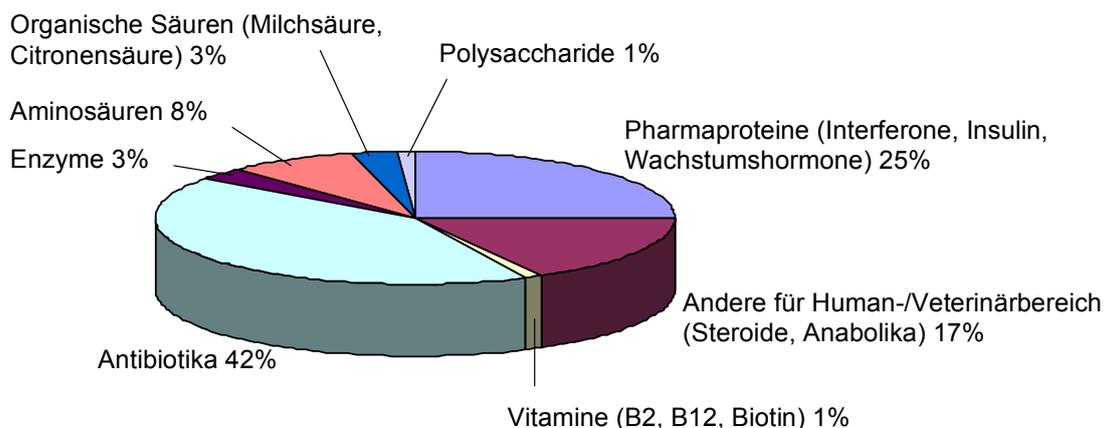


Abbildung 1-5: Weltmarkt biotechnologisch hergestellter Produkte (aus [47]).

Biotechnologische Methoden sind insbesondere interessant, um enantiomerenreine Produkte oder Zwischenprodukte zu gewinnen [47, 48, 49], da die enzymkatalysierten Reaktionen regio- und enantioselektiv sind. Die Verfahren lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Biotransformation und Fermentation.

1.2.5.1. Biotransformation

Bei der enzymatischen Synthese wird eine in der Regel einstufige Reaktion durch isolierte Enzyme oder metabolisch inaktive Zellen katalysiert. Als Weiterentwicklung konnten die Enzyme auf inerten Trägern immobilisiert werden. Dadurch wird die

Aufreinigung erleichtert und das Enzym kann ggf. sogar wiederverwendet werden [47].

1.2.5.2. Fermentation

Im Gegensatz zur Biotransformation wird bei der Fermentation die gesamte Enzymausstattung eines Mikroorganismus ausgenutzt. Die gewünschten Produkte werden von dem jeweiligen Mikroorganismus unter geeigneten Bedingungen bereits natürlicherweise gebildet. Allerdings sind Wildstämme für Produktionszwecke nicht geeignet, da sie über Regulationsmechanismen verfügen, die die Anhäufung von Metaboliten verhindern. Optimierte Stämme können durch Selektion natürlicher Mutanten, durch künstliche Mutationen von Wildstämmen oder gezielte Rekombinationstechniken erhalten werden [50]. Die Mikroorganismen werden unter Zufuhr geeigneter Nährstoffe (Kohlenstoffquellen, z. B. Melasse, Zucker, und Stickstoffquellen, z. B. Peptone, Hefeextrakt), Wachstumsfaktoren und weiterer Zusätze (z. B. Antibiotika, Vorstufen) kultiviert und reichern in Abhängigkeit von Luftzufuhr, Rührung, pH-Wert, Temperatur und Druck das gewünschte Produkt an. Nach der Fermentation wird das Produkt durch Zentrifugieren oder Filtrieren von der Biomasse abgetrennt. Bei der folgenden Aufreinigung kommen chromatographische Methoden, Konzentrierungs- und Kristallisationsschritte zum Einsatz.

Fermentationsprodukte werden im Ph. Eur. in einer allgemeinen Monographie behandelt. Hier werden allgemeine Vorschriften für die Entwicklung und Herstellung von Fermentationsprodukten gegeben. Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung, die durch Fermentationsverfahren hergestellt werden, müssen außer der Monographie „Fermentationsprodukte“ [18] auch die Anforderungen der Monographie „Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung“ [19] erfüllen. Eine Ausnahme bilden die Anforderungen zur Limitierung von Verunreinigungen.

1.2.5.3. Verunreinigungen in biotechnologisch hergestellten APIs

Gerade bei biotechnologisch hergestellten APIs ist die Qualitätskontrolle sehr wichtig. Durch den Herstellungsprozess können Verunreinigungen in die Substanz gelangen, die toxisch oder biologisch aktiv sein können, und dadurch unerwünschte immunologische Reaktionen auslösen können [51, 52, 53].

Mögliche Verunreinigungen sind:

1. Material, das nicht Teil des Herstellungsprozesses ist (Bakterien, Viren, Endotoxine)

Da jede Kontamination mit fremden Bakterien oder Viren den gesamten Herstellungsprozess stören kann, ist die Sterilität der Apparatur besonders wichtig [50].

2. Überreste von Mikroorganismen (Biomasse, DNA, Proteine)
3. Verunreinigungen aus dem Herstellungsprozess (Kulturmedium, Substrate, Vorläufersubstrate, Antibiotika)

Antibiotika dienen der Selektion gentechnisch veränderter Bakterien. Sie erlauben nur das Wachstum der Zellen, die das rekombinierte Plasmid und damit die gewünschten Gensequenzen und ein Resistenzgen gegen ein bestimmtes Antibiotikum aufgenommen haben. Ein weiterer Effekt des Antibiotikazusatzes ist die Sterilhaltung des Kulturmediums. Bei der Glutaminsäure-Produktion in biotinreichem Medium wird Penicillin zugegeben, um die Zellpermeabilität zu erhöhen und dadurch die Ausschleusung von Glutaminsäure zu verbessern [54]. Die Anwesenheit von Resten des Antibiotikums im Produkt ist besonders für Patienten mit Allergien gefährlich.

4. Neben- und Zwischenprodukte der Stoffwechselwege, unerwünschte Umwandlungsprodukte von Substraten und Vorläufersubstraten

Die Mikroorganismen sind sehr empfindlich gegenüber kleinen Änderungen, so dass eine genaue Einstellung und Kontrolle der Prozessparameter notwendig ist, um Chargeneinheitlichkeit zu erzielen [52]. Komplexe Nährstoffquellen, z. B. Melasse, Peptone oder Maisquellwasser, können in ihrer Zusammensetzung schwanken. Solche Unregelmäßigkeiten können ursächlich für schlechte Produktionsergebnisse sein [55]. Für Corynebakterien ist eine Ausscheidung von Overflow-Metaboliten wie Acetat, Lactat und Pyruvat bei ungünstiger Nährstoffzufuhr beschrieben [55].

Aus diesen Gründen ist es zur Sicherung der Qualität wichtig, die Herstellung genau zu überwachen und die Produkte sorgfältig aufzureinigen.

2. INSTRUMENTELLE METHODEN ZUR REINHEITSANALYTIK

Voraussetzung für die Bestimmung des Verunreinigungsprofils eines API ist die Untersuchung der Substanz mit einer Methode, die die Substanz von ihren Verunreinigungen unterscheiden kann. Bei den chromatographischen Methoden erfolgt die Trennung eines Stoffgemisches zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen durch Verteilungs-, Adsorptions- und/oder Ionenaustauschvorgänge. Die Trennung in der Kapillarelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld.

2.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

2.1.1. Durchführung

Genauere Vorgaben zur Durchführung der DC vom Auftragen der Probe über die Entwicklung bis zur Detektion und Auswertung findet man in der allgemeinen Methode 2.2.27 des Ph. Eur. [56].

Als stationäre Phase dienen Feststoffe oder an Feststoffen adsorbierte Flüssigkeiten. Am häufigsten wird Kieselgel als Sorbens verwendet, aber auch chemisch modifizierte Kieselgele (Umkehrphasen), Aluminiumoxid oder Cellulose kommen zum Einsatz. Kapillarkräfte bewirken den Transport der flüssigen mobilen Phase durch die stationäre Phase. Das Stoffgemisch wird aufgrund der unterschiedlichen physikalischen oder physikalisch-chemischen Eigenschaften der Komponenten getrennt. Wichtigstes Kriterium bei der Verwendung von Kieselgel-DC-Platten ist die Polarität der Substanzen. Durch die Zusammenstellung des Fließmittels aus Komponenten verschiedener Elutionskraft kann die Wanderungsstrecke der Analyten beeinflusst werden. Die Substanzen sollten während der Chromatographie undissoziiert vorliegen, da sonst Dissoziationsgleichgewichte ein Tailing der Flecken verursachen können. Als Fließmittel-Zusätze eignen sich Essigsäure oder Ameisensäure für saure Substanzen bzw. Ammoniak oder Diethylamin für Basen [57]. Vor allen Dingen die polaren Bestandteile des Fließmittels werden während der Chromatographie an der Kieselgel-DC-Platte adsorbiert, wodurch sich das Fließmittel laufend ändert. Die Vorbeladung des Sorbens mit Lösungsmitteldampf beeinflusst die Trennleistung, so dass für reproduzierbare Trennungen die Einstellung einer

Kammersättigung vor der Entwicklung der DC-Platte wichtig ist, d. h. der Kammerraum oberhalb des Flüssigkeitsspiegels wird mit Lösungsmitteldampf gesättigt [58]. Wenn nicht anders angegeben, wird die Chromatographie nach Ph. Eur. in einer gesättigten Kammer durchgeführt [56].

Der R_F -Wert, definiert als Quotient aus der Laufstrecke der Substanz (gemessen vom Auftragspunkt bis zum Mittelpunkt des Substanzflecks) zur Laufstrecke des Fließmittels (ebenfalls gemessen vom Auftragspunkt), beschreibt das Trennergebnis [56].

Viele Substanzen kann man indirekt auf der DC-Platte sichtbar machen: Dem Sorbens wird ein Lumineszenzindikator (mit Mangan aktivierte Zinksilicate oder Zink-Cadmiumsulfide) zugesetzt, der bei 254 nm anregbar ist und gelbgrün phosphoresziert [59]. Wenn der Analyt Licht dieser Wellenlänge absorbieren kann, wird die Phosphoreszenz des Indikators an dieser Stelle gemindert, und der Analyt erscheint als dunkler Fleck auf hell leuchtendem Untergrund. Daneben kann man auch Sprühreagenzien verwenden, um die Substanz durch Derivatisierung in farbige Produkte zu überführen.

Neben der visuellen Auswertung können die Chromatogramme direkt quantitativ photometrisch mit Hilfe eines Densitometers ausgewertet werden. Bei diesem Verfahren wird die DC-Platte mit monochromatischem Licht bestrahlt. Die Platte reflektiert die Strahlung. Wird der Lichtstrahl an einem Fleck einer Substanz vorbeigeführt, kann ein großer Teil der Strahlung absorbiert werden. Dadurch kommt es zu einer von der Menge der Substanz abhängigen Verminderung der Remission, was von einem Empfänger registriert wird [57, 58].

Eine Weiterentwicklung der DC stellt die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) dar. Durch die Verwendung von Sorbentien mit enger Korngrößenverteilung und kleiner Partikelgröße kann die Trennleistung und Reproduzierbarkeit verbessert werden. Für die Entwicklung wird weniger Lösungsmittel verbraucht, und durch die kürzere Trennstrecke kann die Analysenzeit reduziert werden [57, 58].

2.1.2. DC zur Reinheitsprüfung

Die Dünnschichtchromatographie ist ein einfach durchführbares Verfahren, das mit einem geringen apparativen Aufwand auskommt, und gleichzeitig sehr flexibel ist. Die Methoden eignen sich zur Prüfung der Identität, zur Verlaufskontrolle von chemischen Reaktionen und zur Reinheitsprüfung. Allerdings ist die

Reproduzierbarkeit und Trennleistung von vielen Faktoren abhängig (u. a. Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Korngröße des Sorbens) [58, 59, 60]. Deshalb wird bei einem Einsatz zur Reinheitsprüfung in der Regel ein Systemeignungstest vorgeschrieben, um das chromatographische System zu überprüfen [22]. Dazu wird meistens eine Lösung, die die zu analysierende Substanz sowie eine weitere Substanz enthält, verwendet. Das Chromatogramm dieser Lösung soll zwei getrennte Flecken zeigen. Parameter wie die Fließmittelzusammensetzung, das Auftragsvolumen oder die Trennstrecke können entsprechend dem Kapitel 2.2.46 „Chromatographische Trennmethode“ variiert werden, um die Anforderungen der Systemeignung zu erfüllen [61].

Zur Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ wurden früher im Ph. Eur. in vielen Fällen halbquantitative DC-Methoden verwendet [62]. Sie beruhen auf dem visuellen Vergleich der Größe bzw. Intensität der Flecken der Verunreinigungen im Chromatogramm der zu untersuchenden Substanz mit einem Fleck in einem zweiten Chromatogramm, der die Grenzkonzentration festlegt. Als Referenz kann die entsprechende Verunreinigung verwendet werden. Oft wird eine Verdünnung der Untersuchungslösung vorgeschrieben, so dass die zu untersuchende Substanz selbst als Referenz dient. Der Grad der Verdünnung legt den Grenzwert für die Verunreinigungen fest. Voraussetzung dabei ist, dass die Substanz und ihre Verunreinigungen ähnliche UV-Eigenschaften bzw. ähnliches Verhalten gegenüber Sprühreagenzien besitzen [21]. So werden zum Beispiel bei der Prüfung auf „Ninhydrin-positive Substanzen“ mittels DC, die in allen Aminosäure-Monographien vorgeschrieben ist, nur solche Verunreinigungen detektiert, die mit Ninhydrin zu gefärbten Produkten reagieren. Außerdem sollten die R_F -Werte der Verunreinigungen und der Substanz nicht zu unterschiedlich sein, da es sonst zu Verfälschungen durch die Diffusion der Substanzen während der Wanderung kommen kann [22]. Eine Begrenzung der Summe aller Verunreinigungen ist mit diesem Verfahren nicht möglich [58].

Die in den letzten Jahren veröffentlichten Methoden zur Reinheitsprüfung von Arzneistoffen oder Arzneimitteln verwenden häufig HPTLC in Kombination mit einer quantitativen Auswertung mittels Densitometer [63, 64, 65, 66]. Diese Weiterentwicklungen werden zwar in der allgemeinen Methode im Ph. Eur. beschrieben, werden aber in den Monographien kaum eingesetzt. Stattdessen bevorzugt die Ph.-Eur.-Kommission heute HPLC-Methoden zur Prüfung auf

„Verwandte Substanzen“. Zurzeit gibt es ein Programm zur systematischen Revision von ca. 140 Monographien mit dem Ziel, DC-Methoden gegen HPLC-Verfahren auszutauschen. Die DC soll nur noch für spezifische Verunreinigungen angewendet werden, die mittels HPLC, GC oder CE nicht kontrolliert werden können [22, 62].

2.2. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die ersten HPLC-Geräte waren in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts kommerziell erhältlich [57]. Im Gegensatz zur Säulenchromatographie, bei der sich die mobile Phase aufgrund der Schwerkraft durch eine mit der stationären Phase gefüllte Trennsäule bewegt, wird in der HPLC die mobile Phase durch die stationäre Phase gepumpt. Dadurch können als stationäre Phase auch Materialien mit kleiner Partikelgröße eingesetzt werden, woraus eine bessere Trennleistung resultiert. Vor der Trennsäule befindet sich ein Einlasssystem für die Probe. Die Substanzen werden nach der Trennung mit einem Detektor erfasst (Abbildung 2-1).

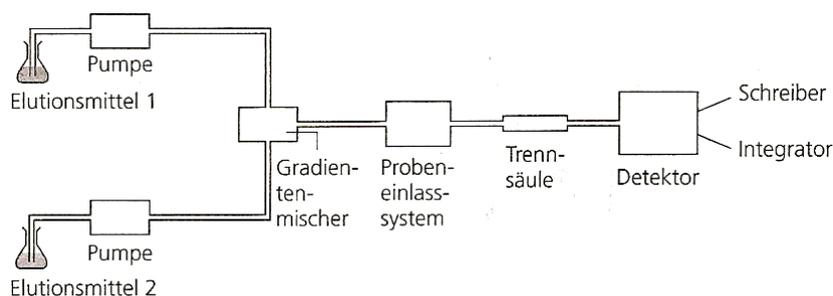


Abbildung 2-1: Schematischer Aufbau eines HPLC-Gerätes (aus [57]).

Seit ihrer Einführung in die Analytik wurden nicht nur die HPLC-Geräte hinsichtlich ihrer Ausstattung (u. a. Detektoren) weiterentwickelt. Heute stehen dem Anwender auch viele verschiedene Säulenmaterialien zur Verfügung.

2.2.1. Trennverfahren

Die Trennung von Substanzen beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Substanzen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen, einer flüssigen mobilen Phase und einer stationären Phase. Je nach Trennverfahren sind unterschiedliche Mechanismen für die Trennung verantwortlich. Eine Übersicht gibt Tabelle 2-1.

Tabelle 2-1: Einteilung der HPLC-Methoden nach dem Trennverfahren [67].

Trennverfahren	Stationäre Phase	Mechanismus
Normalphasenchromatographie	Siliciumdioxid, Aluminiumoxid, poröser Graphit	Adsorption und/oder Massenverteilung
Ionenaustauschchromatographie	Austauscherharze oder Polymere mit sauren oder alkalischen Gruppen	Verdrängungsgleichgewicht zwischen den aufzutrennenden Ionen und denen in der mobilen Phase
Ausschlusschromatographie	poröses Siliciumdioxid, poröse Polymere	Unterschiede des Molekülvolumens, d. h. räumlicher Ausschluss
Umkehrphasenchromatographie	chemisch modifizierte Trägermaterialien, hergestellt aus Polymeren, Siliciumdioxid oder porösem Graphit	Verteilung der Moleküle zwischen mobiler und stationären Phase; Adsorption
chirale Chromatographie	spezielle chemisch modifizierte stationäre Phasen	spezifische chirale Wechselwirkungen
Ionenpaarchromatographie	meist Umkehrphasen, selten Normalphasen	Wechselwirkung mit Ionenpaarreagenzien, die der mobilen Phase zugesetzt wurden

2.2.1.1. Umkehrphasenchromatographie

Die Umkehrphasenchromatographie (Reversed phase HPLC, RP-HPLC) überwiegt bei den im Ph. Eur. vorgeschriebenen Methoden. Die chemisch modifizierten Kieselgele sind weitestgehend apolar. Wasser bzw. wässrige Puffer haben die geringste Elutionskraft und werden häufig im Gemisch mit Methanol oder Acetonitril verwendet. Die Stofftrennung erfolgt hauptsächlich aufgrund von Löslichkeitsunterschieden der Substanzen in der stationären Phase [57]. Polare Analyten eluieren vor apolaren Verbindungen. Schwache Basen bzw. Säuren können mittels RP-HPLC getrennt werden, wenn der pH-Wert des Fließmittels so eingestellt werden kann, dass sie in ihrer undissoziierten Form vorliegen (Ionenunterdrückung). Die „neutrale“ Form ist in der stationären Phase besser löslich und wird daher später eluiert als die dissoziierte Form. Wenn der gewählte pH-Wert der mobilen Phase zwei pH-Einheiten oberhalb bzw. unterhalb des pK_a -Wertes der Substanz liegt, haben kleine Variationen des pH-Wertes keinen Einfluss auf das chromatographische Verhalten der Substanz. Durch kleine Änderungen des pH-Wertes in der Nähe des pK_a -Wertes kann sich das Trennverhalten jedoch stark ändern [68].

2.2.1.2. Ionenpaarchromatographie

Grenzen der konventionellen RP-HPLC zeigen sich bei der Analyse von starken Basen bzw. Säuren und bei Proben, die sowohl Basen und Säuren als auch neutrale

Moleküle enthalten [68, 69]. In diesen Fällen kann eine Trennung mit Hilfe der Ionenpaarchromatographie durchgeführt werden. Hierbei wird der mobilen Phase ein Ionenpaarreagenz zugesetzt, das eine dem Analyten entgegengesetzte Ladung trägt. Bei basischen Analyten werden in der Regel Alkylsulfonsäuren verwendet, bei Säuren Tetraalkylammoniumsalze. Bei der Verwendung von Ionenpaarreagenzien mit kurzen Alkylresten (C5 – C8) wird die Retention von neutralen Molekülen nicht beeinflusst [68]. Als stationäre Phase werden meistens Umkehrphasen eingesetzt. Der Mechanismus der Ionenpaarchromatographie ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In der Literatur werden verschiedene Theorien diskutiert [68, 70]. Dazu gehören:

- Ionenpaar-Modell

Hierbei geht man von der Bildung neutraler, nicht-ionischer Ionenpaare in der wässrigen mobilen Phase aus. Die Ionenpaare können mit der apolaren RP-Phase wechselwirken. Die Trennung erfolgt durch die unterschiedliche Affinität der Ionenpaare zur stationären Phase.

- Dynamischer Ionen-Austausch-Mechanismus

Es wird angenommen, dass zunächst das Ionenpaarreagenz mit seiner lipophilen Alkylkette an der unpolaren Oberfläche der stationären Phase adsorbiert, wodurch diese die Eigenschaften eines Ionenaustauschers erhält. Die Probemoleküle verteilen sich zwischen der mobilen Phase und der stationären Phase. Dabei werden Moleküle mit einer hohen Affinität zu dem Ionenpaarreagenz stärker retiniert als solche mit geringerer Affinität.

- Modell der Ionenwechselwirkung

Bidlingmeyer beschreibt eine Theorie, die auf der Bildung einer elektrischen Doppelschicht auf der Oberfläche der stationären Phase beruht. Durch die Adsorption des Ionenpaarreagenzes an der stationären Phase bildet sich eine primäre geladene Schicht aus. Die zweite diffuse Schicht besteht aus entgegengesetzt geladenen Ionen. Das Probemolekül tritt aufgrund von elektrostatischen Kräften mit der geladenen Oberfläche in Wechselwirkung und kann auch mit seinem lipophilen Ende an der stationären Phase adsorbieren. Um die Ladungsdifferenz auszugleichen, kann ein weiteres Ionenpaarreagenz-Molekül folgen. Auf diese Weise werden zwei entgegengesetzt geladene Ionen, aber nicht unbedingt ein Ionenpaar, an der stationären Phase adsorbiert.

Die Retention wird durch die Wahl des Ionenpaarreagenzes und dessen Konzentration beeinflusst. Ionenpaarreagenzien mit längerer Alkylkette führen ebenso zu einer Erhöhung der Retentionszeit wie eine Erhöhung der Konzentration des Reagenzes. Ob eine größere Konzentration auch die Selektivität der Trennung verändert, muss experimentell untersucht werden [68].

Viele Trennprobleme können mittels Ionenpaarchromatographie gelöst werden, so dass im Ph. Eur. einige Methoden zur Reinheitsanalytik beschrieben sind. Nachteilig sind allerdings die notwendigen, oft sehr langen Equilibrierungszeiten. Zudem können Trennsäulen, die für die Ionenpaarchromatographie verwendet wurden, in der Regel nicht mehr für andere Methoden eingesetzt werden [69]. Durch die Entwicklung neuer Säulenmaterialien mit anderen Trennselektivitäten kann heutzutage bei manchen Fragestellungen auf die Verwendung von Ionenpaarreagenzien verzichtet werden.

2.2.2. Stationäre Phasen in der Umkehrphasenchromatographie

Zur Säulenfüllung eignen sich poröse Materialien, z. B. Metalloxide (SiO_2 , Al_2O_3), Polymere (Styrol-Divinylbenzol-Polymer) und poröser Graphit. Im Ph. Eur. überwiegen die stationären Phasen aus Kieselgel, das in den meisten Fällen nur noch als mechanischer Träger für verschiedene, kovalent gebundene Gruppen dient [71]. Durch Umsetzung der Silanolgruppen des Kieselgels mit Alkylchlorsilanen werden Umkehrphasen hergestellt (Abbildung 2-2 A), wobei alkylierte Kieselgele mit Kettenlängen von 8 bzw. 18 Kohlenstoffatomen am häufigsten verwendet werden. Sie können bei unterschiedlichen Trennproblemen mit verschiedenen mobilen Phasen eingesetzt werden.

Allerdings kann schlechte und wenig reproduzierbare Retention der Analyten eintreten, wenn die mobile Phase weniger als 5 % organischen Anteil enthält. Dieser als „Phasenkollaps“ beschriebene Effekt beruht auf Problemen bei der Benetzbarkeit der stationären Phase. Wasser, das eine sehr hohe Oberflächenspannung hat, kann schlechter in die Poren des Kieselgels eindringen als organische Lösungsmittel und wird eventuell sogar aus diesen herausgedrängt. Dadurch hat der Analyt eine geringere Chance mit der stationären Phase zu interagieren, was sich in einer verminderten Retention zeigt [72, 73].

Weiterhin sind die RP-Phasen nur in einem pH-Bereich von 2 bis 8 stabil. Bei kleinerem pH-Wert wird die gebundene Alkylkette hydrolysiert, während sich bei

hohen pH-Werten das Kieselgel löst [74]. Eine höhere pH-Stabilität kann man z. B. erreichen, wenn die Methylgruppen im Alkylchlorsilan-Reagenz durch sterisch anspruchsvolle Isopropyl- oder Isobutyl-Reste ersetzt werden (Abbildung 2-2 B) [75]. Auch die Einführung polymer gebundener Reste schützt die Phase durch räumliche Abschirmung vor der Hydrolyse (Abbildung 2-2 C) [74].

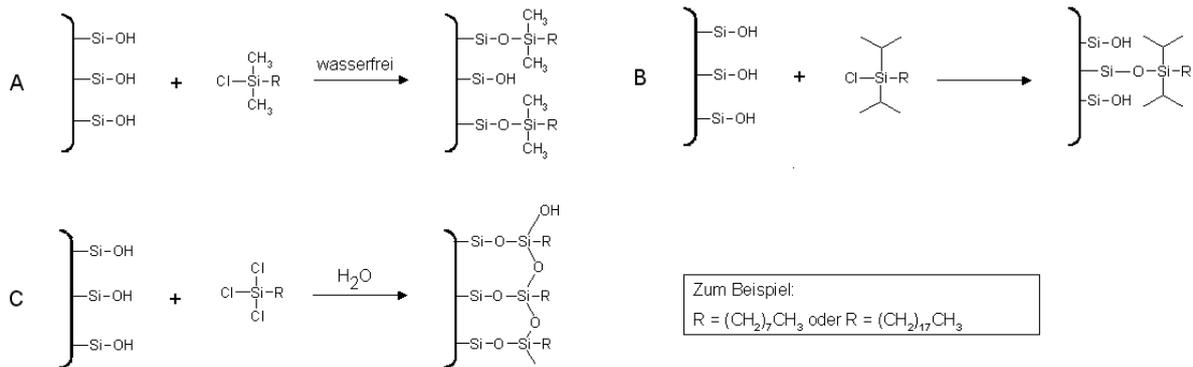


Abbildung 2-2: Chemische Modifizierung von Kieselgel. (A) Umsetzung mit Methylchlorsilanen zu monomeren RP-Phasen; (B) Einführung sterisch anspruchsvoller Alkylchlorsilane; (C) Umsetzung zu polymer gebundenen Resten [69, 74].

Bei der Derivatisierung mit Alkylchlorsilanen werden nur ca. 50 % der Silanolgruppen des Kieselgels umgesetzt, was sich je nach Fragestellung, z. B. bei der Untersuchung von basischen Analyten, störend auf die Trennung auswirken kann. Durch kurz-kettige Alkylchlorsilane (z. B. Trimethylchlorsilan) können viele Restsilanolgruppen, die sich an der äußeren Oberfläche des Kieselgels und in den Poren befinden, in einem zweiten Reaktionsschritt umgesetzt werden (Nachsilylierung, „Endcapping“; Abbildung 2-3 A) [57]. Eine Variation der stationären Phase wird durch so genanntes „hydrophiles Endcapping“ erreicht. Das bereits octadecylsilylierte Kieselgel wird mit Alkylresten mit polaren Endgruppen umgesetzt (Abbildung 2-3 B). Dadurch erhält man eine im Vergleich zur konventionellen RP18-Phase veränderte Trennselektivität, besonders für polare Substanzen. Ein Vorteil dieser Säulen ist ihre Beständigkeit unter wässrigen Bedingungen [76].

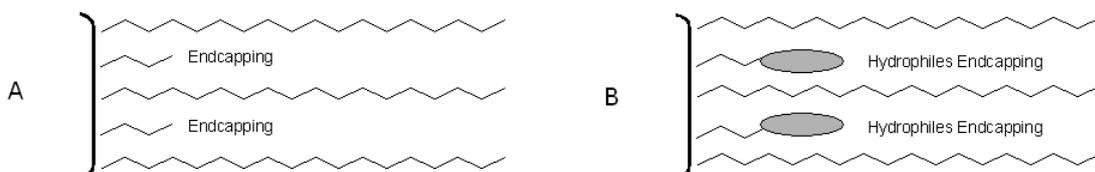


Abbildung 2-3: Modifizierung von RP18-Phasen. (A) Endcapping mit kurzen Alkylresten; (B) „Hydrophiles Endcapping“ mit Alkylresten mit polaren Endgruppen.

In den Monographien des Ph. Eur. werden keine Handelsnamen der verwendeten HPLC-Säulen genannt. Stattdessen werden eine allgemeine Beschreibung des Materials sowie die Säulendimensionen (Länge, Durchmesser, Partikelgröße) angegeben. Die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung sind für die Trennleistung einer Säule wichtig. Kleine Teilchendurchmesser und geringe Korngrößenunterschiede verringern die Diffusion der Analyten im chromatographischen System und erhöhen dadurch die Trennstufenzahl, ein Maß für die Trennleistung. Üblicherweise werden Materialien mit einem Partikeldurchmesser zwischen 3 μm und 5 μm verwendet. Die Trennleistung kann durch den Einsatz noch kleinerer Partikel („Sub-2- μm “) gesteigert werden. Allerdings verursachen die kleinen Partikel einen sehr großen Druck im chromatographischen System. Eine Verkürzung der Säulenlänge gleicht den Druckanstieg aus und verringert die Analysenzeit bei gleichzeitiger Beibehaltung der Auflösung im Vergleich zu größeren Partikeldurchmessern [77].

Die im Ph. Eur. eingesetzten Säulenmaterialien sind im allgemeinen Teil des Arzneibuchs im Abschnitt „Reagenzien“ beschrieben. Dem Anwender stehen jedoch ca. 600 RP18-Säulen verschiedener Hersteller zur Verfügung, die sich in ihrer Trennselektivität deutlich unterscheiden können [62].

Kieselgel wird mittels verschiedener Verfahren gewonnen, wobei die Eigenschaften des Produktes (z. B. pH-Wert, Form, Oberfläche) von dem Herstellungsweg abhängig sind [74]. Allgemein wird zwischen „Typ A“ und „Typ B“ Kieselgel unterschieden. Mit „Typ A“ werden Kieselgele bezeichnet, die einen hohen Metallgehalt (Na, Ca, Al, Mg etc.) aufweisen. Die Metall-Verunreinigungen üben indirekt einen Einfluss auf die Silanolgruppen aus, wodurch deren Acidität steigt. Dadurch beobachtet man bei der Analyse basischer Substanzen ein Tailing der Peaks. „Typ B“ Kieselgele stehen für hochreine Kieselgele, die nur mit einem geringen Gehalt an Metallen verunreinigt sind [74, 78]. Nicht nur das verwendete Kieselgel hat einen Einfluss auf die Trenneigenschaften der stationären Phase, sondern auch die Technik zur Oberflächenmodifizierung (z. B. monomer oder polymer gebundene Reste, Reaktionsbedingungen, verwendete Reagenzien) [79].

Die stationären Phasen können neben der Partikelgröße noch durch weitere physikalische Parameter charakterisiert werden: Form der Partikel, Oberfläche, Porengröße, Kohlenstoffbeladung. Bei manchen Materialien sind im Ph. Eur. hierzu Angaben gemacht. Die physikalischen Parameter sind nur bedingt zur Vorhersage

des chromatographischen Verhaltens von Substanzen geeignet. Deshalb beschäftigen sich mehrere Arbeitsgruppen mit der Klassifizierung von stationären Phasen auf der Grundlage chemischer Eigenschaften, die chromatographisch bestimmt werden. Dazu zählen die Hydrophobizität, Silanolaktivität, Effizienz, sterische Selektivität, Ionen-Austausch-Kapazität und Komplexierungskapazität (Metall-Verunreinigungen) [79, 80]. Prinzipiell werden speziell ausgewählte Testmischungen unter vorgegebenen Bedingungen mit verschiedenen Säulen analysiert. Die Ergebnisse ermöglichen eine Klassifizierung der HPLC-Säulen. Hoogmartens *et al.* haben ein System entwickelt, das auf der Untersuchung von vier Parametern beruht, die entsprechend ihrer Ähnlichkeit mit einer als Referenz gewählten Säule in einer Rangliste ausgewertet werden [81, 82, 83, 84]. So können einerseits Säulen, deren Selektivität mit der Referenz-Säule vergleichbar ist, ermittelt werden. Andererseits lassen sich auch Säulen mit anderer Trennselektivität finden, was z. B. bei der Methodenentwicklung von Interesse sein kann.

2.2.3. Detektoren

2.2.3.1. Absorptionsdetektoren

Der UV / VIS-Detektor wird wegen seiner hohen Empfindlichkeit und Stabilität am häufigsten eingesetzt. Monochromatisches Licht, im UV-Bereich meist durch eine Deuteriumlampe und einen Monochromator erzeugt, strahlt auf das Eluat aus der HPLC-Säule, und die Absorption wird gemessen. Die kleinste für eine Messung verwendbare Wellenlänge wird durch das sogenannte UV-cut-off der mobilen Phase bestimmt. Unterhalb des UV-cut-offs (200 nm für Wasser und Acetonitril, 220 nm für Methanol) absorbieren die Lösungsmittel so stark, dass eine Detektion nicht mehr möglich ist [57]. Zwischen dem detektierten Signal und der Konzentration einer Substanz besteht ein linearer Zusammenhang, der auf dem Lambert-Beer'schen-Gesetz beruht:

Formel 2-1: $A = \epsilon \cdot c \cdot d$

A: Absorption
 ϵ : molarer Absorptionskoeffizient
[L/mol•cm]
c: Konzentration [mol/L]
d: Schichtdicke [cm]

Um eine gute Empfindlichkeit zu erzielen, sollte der Lichtweg (Schichtdicke d)

möglichst groß sein. Allerdings führt ein zu großes Volumen der Detektorzelle zu einer unerwünschten Bandenverbreiterung, so dass in der Regel Z-Zellen mit einer Schichtdicke von 10 mm und einem Volumen von 8 μl verwendet werden [85].

Mit Hilfe eines PDA-Detektors können Chromatogramme bei verschiedenen Wellenlängen gleichzeitig aufgenommen werden. Außerdem ist es möglich, das Spektrum einzelner Peaks während der Chromatographie aufzuzeichnen. Das gesamte Licht durchstrahlt die Detektorzelle und wird danach an einem Polychromator gestreut. Die verschiedenen Wellenlängen treffen auf einzelne Photodioden, die deren Intensität erfassen [86].

Die mit den beiden vorgestellten Detektoren gemessene Absorption ist abhängig von den chromophoren Eigenschaften des Analyten. Substanzen mit wenig ausgeprägten UV-Eigenschaften werden durch dieses Detektionsprinzip nicht erkannt. Hier muss man auf andere Verfahren ausweichen, z. B. Refraktometrie, elektrochemische Detektion oder Verdampfungsstreuungsdetektion. HPLC gekoppelt mit Massenspektrometrie ist in der Methodenentwicklung zur Strukturaufklärung von Verunreinigungen von großer Bedeutung, wird jedoch zur routinemäßigen Qualitätskontrolle wegen der hohen Gerätekosten kaum eingesetzt.

2.2.3.2. Verdampfungsstreuungsdetektor (ELSD)

Seit etwa 10 Jahren findet der Verdampfungsstreuungsdetektor (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) in der Analytik vermehrt Anwendung [87, 88, 89]. ELSD-Detektoren von verschiedenen Herstellern unterscheiden sich in ihrer Bauweise. Abbildung 2-4 zeigt die Konstruktion der ELS-Detektoren von Sedere.

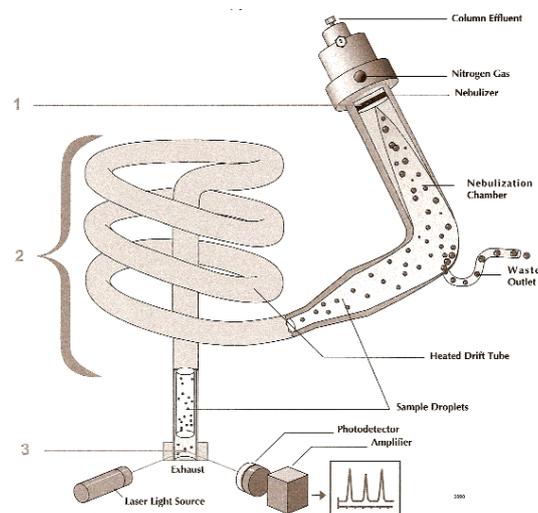


Abbildung 2-4: Aufbau der ELS-Detektoren von Sedere. Es laufen drei Prozesse ab: (1) Verneblung, (2) Verdampfung, (3) Messung der Lichtstreuung (aus [90]).

Das Prinzip der Methode beruht bei allen Modellen auf den gleichen drei Prozessen:

1. Verneblung

Das Eluat aus der Säule wird mittels eines Gases (Luft oder Stickstoff) zu einem Aerosol vernebelt. Der Durchmesser der entstehenden Tröpfchen ist entsprechend einer von Nukiyama und Tanasawa aufgestellten Formel nur von den Eigenschaften der mobilen Phase und der Flussrate abhängig [87].

$$\text{Formel 2-2: } D = \frac{585 \cdot \sqrt{\sigma}}{(v_g - v_l) \cdot \sqrt{\rho}} + 597 \cdot \left(\frac{\mu}{\sqrt{\sigma \cdot \rho}} \right)^{0.45} \cdot \left(\frac{1000 \cdot Q_l}{Q_g} \right)^{1.5}$$

D: durchschnittlicher Tröpfchendurchmesser
 v_l, v_g : Geschwindigkeit der mobilen Phase bzw. des Gases
 Q_l, Q_g : Flussrate der mobilen Phase bzw. des Gases
 σ : Oberflächenspannung
 μ : Viskosität
 ρ : Dichte

Der Vernebler ist entweder Teil des Verdampfers, oder es gibt, wie in Abbildung 2-4 gezeigt, eine Verneblungskammer. Der Vorteil einer Verneblungskammer ist, dass größere Tröpfchen durch Kondensation an der Glaswand entfernt werden, wodurch nur der feinverteilte Nebel den Verdampfer erreicht. Allerdings geht dadurch auch Analyt verloren. Die Verneblungskammer bei dem abgebildeten Modell (Abbildung 2-4) ist nicht temperierbar; andere Modelle ermöglichen eine vom Verdampfer unabhängige Temperierung des Verneblers.

2. Verdampfung

Die Tröpfchen gelangen in ein beheizbares Rohr, in dem die mobile Phase verdampft wird. Die Analyten bleiben als Partikel zurück.

Die Auswahl der Verdampfungstemperatur richtet sich nach der Zusammensetzung der mobilen Phase und der Konstruktion des ELSD. Prinzipiell sollte die kleinstmögliche Temperatur eingestellt werden, bei der die Basislinie nur ein geringes Rauschen zeigt, da bei höheren Temperaturen flüchtige Analyten mit der mobilen Phase aus dem System entfernt werden. Wenn der Nebel direkt in den Verdampfer gelangt, sind höhere Temperaturen notwendig, um die mobile Phase zu verdampfen. Für nicht-flüchtige Substanzen sind derartig gebaute Detektoren dennoch sehr empfindlich, da die gesamte Probe die Detektorzelle erreicht. Bei Detektoren, die mit einer

Verneblungskammer arbeiten, können niedrigere Temperaturen eingestellt werden. Auch ein längeres Verdampferrohr ermöglicht eine Reduzierung der Temperatur.

3. Messung der Lichtstreuung

In der Detektorzelle wird die Lichtstreuung aufgezeichnet, die die Partikel verursachen. Je höher die Konzentration des Analyten ist, desto größer sind die im Verdampfer erzeugten Partikel. Die Größe des detektierten Signals ist von der Partikelgröße abhängig [86, 89].

Durch dieses Prinzip können mittels ELSD alle Substanzen, die weniger flüchtig als die mobile Phase sind, unabhängig von ihren UV-Eigenschaften erfasst werden.

Eine weitere Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Methode ist die Flüchtigkeit der mobilen Phase. Deshalb dürfen nur flüchtige Zusätze wie Ameisensäure, Trifluoressigsäure, Triethylamin, Ammoniumacetat etc. zur Kontrolle des pH-Wertes der mobilen Phase eingesetzt werden [89].

Die unterschiedliche Konstruktion der Detektoren kann zu verschiedenen Ergebnissen bei der Untersuchung von Proben führen, wie z. B. Webster *et al.* bei einem Vergleich eines Polymer Labs ELSD 1000 mit einem Sedex 75 ELSD festgestellt haben [91].

Im Gegensatz zu den Absorptionsdetektoren besteht zwischen der Konzentration der Probe und dem Signal im ELSD kein linearer Zusammenhang, sondern ein exponentieller, der durch die Formel 2-3 beschrieben wird:

Formel 2-3: $A = a \cdot m^b$

A:	Peakfläche
m:	Masse des Analyten
a, b:	Koeffizienten

Die Koeffizienten a und b sind von den experimentellen Bedingungen (mobile Phase, Verdampfungstemperatur, Fluss) und dem Analyten (Partikelgröße, Konzentration) abhängig [89]. Das Signal einer Substanz erhöht sich mit einem steigenden organischen Anteil in der mobilen Phase. Vermutlich wird aufgrund der erhöhten Flüchtigkeit der mobilen Phase ein Substanzverlust, der durch die Kondensation großer Tröpfchen an der Wand der Verneblungskammer auftreten kann, vermindert [92]. Folglich ändern sich die Signale bei einer Gradientenelution, bei der sich die Zusammensetzung der mobilen Phase kontinuierlich ändert [93]. Wegen der vielen Faktoren, die die Peakgröße beeinflussen, muss bei der Quantifizierung in der Regel

eine Kalibrierung für jede zu bestimmende Komponente durchgeführt werden [87, 94].

In der Literatur werden Methoden mit ELS-Detektion im Rahmen der Reinheitsanalytik beschrieben [95, 96]. Der überwiegende Teil der Artikel beschäftigt sich mit der Untersuchung von Aminoglykosiden [97, 98, 99, 100].

2.2.4. HPLC zur Reinheitsprüfung

Die Hochleistungsflüssigchromatographie ist wegen ihrer guten Trennleistung, Flexibilität und Automatisierbarkeit aus der Qualitätskontrolle von APIs nicht mehr wegzudenken. Nach einer Literaturrecherche von Nageswara Rao und Nagaraju [101] wird die HPLC in 53 % aller im Zeitraum von 1995 bis 2001 veröffentlichten Methoden zur Reinheitsprüfung eingesetzt. Einen Überblick über die Literatur geben die Artikel [101, 102]. Die Ph.-Eur.-Kommission bevorzugt HPLC-Methoden zur Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ [22]. Dementsprechend wird die Reinheitsprüfung in vielen Monographien des Ph. Eur. mittels HPLC durchgeführt.

Die Methoden im Ph. Eur. sollen nach Möglichkeit isokratisch sein, d. h. dass sich die Fließmittelzusammensetzung während der Chromatographie nicht ändert. Allerdings erfordern die zum Teil komplexen Gemische von Verunreinigungen unterschiedlicher Polaritäten eine höhere Selektivität der Methoden, so dass mit einer Gradientenelution gearbeitet werden muss. Hierbei kann man zwischen einem Stufengradienten, bei dem die Fließmittelzusammensetzung in bestimmten Zeitabständen verändert wird, und einem linearen Gradienten, bei dem die Verhältnisse der Eluenten kontinuierlich verändert werden, unterscheiden [57]. Für manche Trennprobleme werden innerhalb einer Methode beide Varianten, Stufengradient und linearer Gradient, verwendet. Bei der Gradientenelution sind die Ergebnisse der Trennung stark von der Konstruktion der HPLC-Anlage abhängig, da durch die Erzeugung eines Niederdruck- bzw. Hochdruckgradienten die Zusammensetzung der mobilen Phase am Eingang der Säule variieren kann [71]. Besonders bei Niederdruckgradienten-Systemen spielt das Dwell-Volumen eine Rolle. Damit wird das Volumen zwischen der Stelle, an der die mobile Phase gemischt wird, und dem Eingang der Säule bezeichnet. Hochdruckgradienten-Systeme haben ein kleineres Dwell-Volumen und liefern exakter zusammengesetzte Gradienten. Unterschiede im Dwell-Volumen können die Retention und Trennung der

Analyten beeinflussen und sind deshalb mitverantwortlich für die Probleme bei der Übertragung einer Gradienten-Methode auf ein anderes HPLC-Gerät [103].

Die Methoden des Ph. Eur. sollen in Bezug auf Selektivität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Präzision und Linearität validiert werden [22]. Ferner ist die Robustheit, d. h. die Fähigkeit eines Verfahrens, ein Ergebnis zu liefern, das durch variierende Bedingungen nicht oder unwesentlich verfälscht wird, ein wichtiger Punkt [104]. Denn die im Ph. Eur. vorgeschriebenen Methoden sollen von verschiedenen Anwendern in Laboratorien mit verschiedener Ausstattung durchgeführt werden und vergleichbare Ergebnisse liefern. Die Schwierigkeiten bei der Übertragung von Methoden auf andere Geräte wurden oben bereits angesprochen. Kritische Parameter bei der RP-HPLC sind der pH-Wert der mobilen Phase (besonders bei ionisierbaren Analyten) sowie die stationäre Phase. Idealerweise sollte eine Methode so robust sein, dass jede Säule, die mit dem vorgeschriebenen Trennmaterial gepackt ist, eine gute Trennselektivität liefert [62]. Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, ist das aufgrund der Vielfalt an Säulen nicht der Fall. Deshalb sollten im Rahmen der Methodenentwicklung Säulen verschiedener Hersteller eingesetzt werden [22]. Die Säulen, die für eine Methode geeignet sind, werden in einer vom EDQM erstellten und gepflegten Datenbank („knowledge database“) veröffentlicht [105]. Bei einer Gradienten-Methode ist die Verwendung einer anderen Säule in der Regel nicht empfehlenswert. Hier ist die sehr genaue Beschreibung des Säulen-Packmaterials notwendig [22, 62].

2.2.5. Prüfung der Systemeignung

Die Festlegung von Systemeignungskriterien ist ein wichtiger Bestandteil der Methodenentwicklung. Dadurch ist es für jeden Anwender möglich zu überprüfen, ob eine Methode unter den gegebenen Bedingungen auswertbare Ergebnisse liefert [61, 106].

In dem Kapitel 2.2.46 „Chromatographische Trennmethoden“ [61] sind allgemeine Kriterien aufgeführt, die bei der Durchführung einer Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ erfüllt sein sollen. Dazu gehört ein Symmetriefaktor des Hauptpeaks zwischen 0.8 und 1.5 sowie eine Nachweisgrenze bzw. Bestimmungsgrenze unterhalb der Grenze, ab der Peaks nicht mehr berücksichtigt werden. Daneben gibt es spezielle Anforderungen in den Einzelmonographien. Häufig herangezogene

Kriterien zur Beurteilung der Systemeignung sind die Auflösung zwischen zwei Peaks und das Peak-Tal-Verhältnis.

Die einzelnen Parameter und ihre Bestimmung werden im Folgenden erläutert.

– Symmetriefaktor

Der Symmetriefaktor A_s eines Peaks wird nach folgender Formel berechnet:

Formel 2-4:
$$A_s = \frac{w_{0.05}}{2d}$$

$w_{0.05}$: Peakbreite bei einem Zwanzigstel der Peakhöhe

d : Entfernung zwischen der durch das Maximum des Peaks gezogenen Senkrechten und dem aufsteigenden Kurvenast bei einem Zwanzigstel der Peakhöhe

Ideale, symmetrische Peaks haben einen Symmetriefaktor von 1.0.

Bei dem Prozess des Alterns von HPLC-Säulen kann es zur Hydrolyse von Siloxanen (-Si-O-Si-) kommen, wodurch Silanolreste entstehen [107, 108]. Gerade basische Analyten rufen durch Wechselwirkung mit Silanolgruppen tailende Peaks ($A_s > 1$) hervor. Deshalb kann ein sich verändernder Symmetriefaktor ein Hinweis auf ein Altern von stationären Phasen sein [106]. Für die Prüfung auf Reinheit wird das chromatographische System in den meisten Fällen mit der zu untersuchenden Substanz überladen, um die Verunreinigungen zu detektieren. Der Hauptpeak ist daher oft unsymmetrisch. Das Kapitel 2.2.46 des Ph. Eur. wird zurzeit von der Ph.-Eur.-Kommission überarbeitet. In dem veröffentlichten Vorschlag wurde die allgemeine Anforderung an den Symmetriefaktor dahingehend verändert, dass der Peak in der für die Quantifizierung verwendeten Referenzlösung einen Wert zwischen 0.8 und 1.5 zeigen soll [109].

– Auflösung

Für die Berechnung der Auflösung wird folgende Formel verwendet:

Formel 2-5:
$$R_s = \frac{1.18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

Für $t_{R2} > t_{R1}$
 t_{R1}, t_{R2} : Gesamtretentionszeiten
 w_{H1}, w_{H2} : Peakbreiten in halber Peakhöhe

Die Auflösung beschreibt, wie gut zwei Peaks voneinander getrennt sind. Eine Auflösung von 1.5 entspricht in etwa einer Basislinientrennung. Für die Überprüfung der Systemeignung sollte ein Peakpaar herangezogen werden, dessen Trennung sich als kritisch herausgestellt hat. In vielen Fällen wird die

Auflösung zwischen der zu untersuchenden Substanz und einer in der Nähe eluierenden Verunreinigung bestimmt. Die angegebene Formel gilt nur für etwa gleich große Peaks, die bis zur Basislinie getrennt sind, weil sonst die Halbwertsbreiten dem Chromatogramm nicht mehr entnommen werden können [110].

– Peak-Tal-Verhältnis

Für Peaks, die nicht vollständig getrennt sind und deren Konzentration sehr unterschiedlich ist (z. B. Hauptpeak und Verunreinigung), wird die Bestimmung des Peak-Tal-Verhältnisses bevorzugt.

Formel 2-6: $p/v = \frac{H_p}{H_v}$

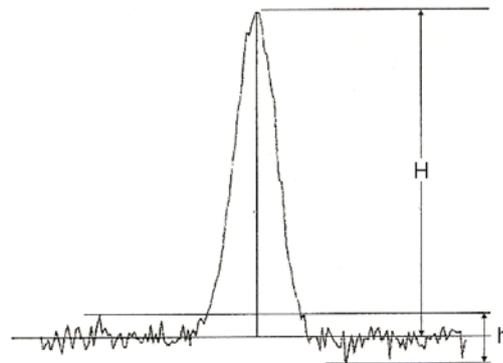
H_p : Höhe des kleineren Peaks über der extrapolierten Basislinie

H_v : Höhe des niedrigsten Punktes der Kurve zwischen dem kleineren und dem größeren Peak über der extrapolierten Basislinie

– Signal-Rausch-Verhältnis

Der Quotient aus der doppelten Peakhöhe eines Peaks und dem Rauschen der Basislinie, betrachtet über das 20-fache der Peakbreite in halber Peakhöhe im Chromatogramm eines Blindwertes, wird als Signal-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) beschrieben.

Formel 2-7: $S/N = \frac{2H}{h}$



Bestimmung des S/N-Verhältnisses nach Ph. Eur. (aus [61])

Das S/N-Verhältnis wird häufig herangezogen, um die kleinste Konzentration, die vom Detektor noch als eindeutig erkennbarer Peak aufgezeichnet wird, zu bestimmen. Für die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) wird ein S/N-Verhältnis von 3 gefordert. Die Konzentration, die mit einer ausreichenden Präzision quantifizierbar ist, wird als Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LOQ) mit einem S/N-Verhältnis von 10 beschrieben. Nachteilig bei der Ermittlung

des Signal-Rausch-Verhältnisses ohne Auswertungssoftware ist die subjektive Beurteilung, vor allen Dingen die Beurteilung des Rauschens.

Retentionszeiten unterliegen häufig Schwankungen. Deshalb wird in den Monographien meistens die relative Retention, d. h. das Verhältnis der Retentionszeiten einer Substanz zu einem Standard, zur Zuordnung der Peaks angegeben. Die relative Retention dient nur zur Orientierung und stellt kein Systemeignungskriterium dar.

Monographien schreiben zur Überprüfung der Systemeignung in der Regel eine Lösung vor, die die zu untersuchende Substanz gespickt mit Verunreinigung(en) enthält. Das mit dieser Referenzlösung erhaltene Chromatogramm wird im Hinblick auf die geforderten Kriterien ausgewertet. Falls die Anforderungen nicht erfüllt werden, ist die Änderung einzelner Parameter der Vorschrift möglich, ohne dass die Methode grundlegend geändert wird [61]. Innerhalb festgelegter Grenzen ist es erlaubt, die Zusammensetzung der mobilen Phase, den pH-Wert des wässrigen Bestandteils und die Salzkonzentration im Pufferbestandteil der mobilen Phase sowie die Dimensionen der stationären Phase zu variieren. Auch Änderungen der Flussrate, der Temperatur und des Injektionsvolumens sind zulässig. Modifikationen bei Gradienten-Methoden sind kritischer als bei isokratischen Methoden. Deshalb geht der Entwurf für das überarbeitete Kapitel 2.2.46 hierauf getrennt ein und erlaubt die Anpassung des Gradientenprogramms in Abhängigkeit vom Dwell-Volumen [109].

2.2.6. Quantitative Auswertung der Chromatogramme

Die Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels HPLC legt die Anforderungen an die Qualität der zu prüfenden Substanz durch die Limitierung des Gehaltes der spezifizierten, unspezifizierten und anderen detektierbaren Verunreinigungen fest. Im Gegensatz zur DC ist auch die Begrenzung des Gesamtgehaltes an Verunreinigungen möglich. In die Berechnung gehen alle Peaks ein, die größer als ein festgelegter Grenzwert sind, das ist in der Regel der Berichtsgrenzwert (Tabelle 1-1).

Um den Gehalt der Verunreinigungen in einer Probe zu ermitteln, ist die quantitative Auswertung der Chromatogramme notwendig. Entsprechend den Vorgaben der Ph.-Eur.-Kommission wird üblicherweise die „Externer-Standard“-Methode, seltener das Normalisierungsverfahren angewendet [22, 61].

– „Externer-Standard“-Methode

Es wird eine Referenzlösung, die eine Substanz in bekannter Konzentration enthält, und eine Untersuchungslösung der zu analysierenden Substanz hergestellt. Der Gehalt einer Verunreinigung wird berechnet durch den Vergleich der Fläche des Peaks in der Referenzlösung mit der Fläche des Peaks einer Verunreinigung in der Untersuchungslösung. Am einfachsten und im Ph. Eur. häufig eingesetzt ist die Herstellung der Referenzlösung durch Verdünnung der Untersuchungslösung, d. h. die zu analysierende Substanz selbst dient als externer Standard [22]. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Ein-Punkt-Kalibrierung. Für einen kleinen Konzentrationsbereich liefert die Methode bei UV-Detektion brauchbare Ergebnisse, ansonsten ist die Erstellung einer Kalibriergeraden vorzuziehen [69].

– Normalisierung

Die Flächen aller Peaks, die sich bei der Analyse einer Untersuchungslösung ergeben, werden addiert. Der prozentuale Gehalt einer Verunreinigung errechnet sich als prozentualer Anteil der Peakfläche an der Gesamtfläche aller Peaks. Nicht berücksichtigt werden Peaks, die durch das Lösungsmittel und zugesetzte Reagenzien, z. B. zur Derivatisierung, hervorgerufen werden, sowie solche Peaks, die unterhalb des Berichtsgrenzwertes liegen. Wichtig bei diesem Verfahren ist, dass alle Komponenten eluiert werden und dass das Signal der Hauptkomponente im linearen Bereich des Detektors liegt [22, 110].

Beide Methoden gehen davon aus, dass die Signale der Verunreinigungen denen der zu analysierenden Substanz ähnlich sind. Deshalb ist die Bestimmung der Responsfaktoren ein wichtiger Bestandteil der Methodenentwicklung [22]. Hierzu wird eine Lösung, die die Verunreinigung und die Substanz in der gleichen Massenkonzentration enthält, hergestellt und analysiert. Der Quotient des erhaltenen Signals der Verunreinigung zu dem der Substanz ergibt den Responsfaktor; der Kehrwert ist der Korrekturfaktor. Das Ph. Eur. definiert die Signale von zwei Substanzen als ähnlich, wenn der Responsfaktor zwischen 0.8 und 1.2 liegt [61]. Ist das nicht der Fall, muss das Signal der Verunreinigung mit einem in der Monographie angegebenen Korrekturfaktor multipliziert werden. Wenn mittels „Externer-Standard“-Methode quantifiziert wird, kann als Referenz auch eine Lösung der Verunreinigung dienen und dadurch auf die Verwendung des Korrekturfaktors verzichtet werden.

Der Gehalt an unbekanntem Verunreinigungen kann nicht exakt ermittelt werden, da die Responsfaktoren nicht bestimmbar sind. Hier muss man davon ausgehen, dass die angegebenen Gehalte für manche Verunreinigungen zu niedrig, für andere hingegen zu hoch sind. Für die Bewertung der Qualität des Produktes und der Kontinuität des Herstellungsprozesses ist es wichtig, dass die Quantifizierung der unbekanntem Verunreinigungen einheitlich gehandhabt wird [4].

Zur Auswertung eines Chromatogramms müssen die Peaks integriert werden. Dies ist ein sensibler Schritt, denn jeder Integrationsfehler wirkt sich auf die Ergebnisse der Quantifizierung aus. Problematisch ist vor allen Dingen die Integration von Peaks, die nicht vollständig voneinander getrennt sind [69]. Im Tal zwischen zwei nicht gut aufgelösten Peaks kann man das Lot auf die extrapolierte Basislinie fällen. Abbildung 2-5 A veranschaulicht den Fehler, der dabei gemacht wird. Bei etwa gleich großen Peaks ist die Abweichung vernachlässigbar [110]. Wenn sich die Peaks aber unterscheiden, können sehr große Differenzen zwischen dem wahren und dem ermittelten Wert entstehen. Das Ausmaß ist u. a. von der Elutionsreihenfolge, der Auflösung und der Symmetrie der Peaks abhängig und trifft den kleineren Peak stärker [74]. Das Ph. Eur. empfiehlt in diesem Fall die tangentielle Führung der Basislinie, wie in Abbildung 2-5 B zu sehen [61]. Die gesamte Fläche unter der Tangente wird dem Hauptpeak zugeordnet und die Fläche darüber dem kleineren Peak (Schulter). Dadurch wird der kleinere Peak systematisch zu klein geschätzt.

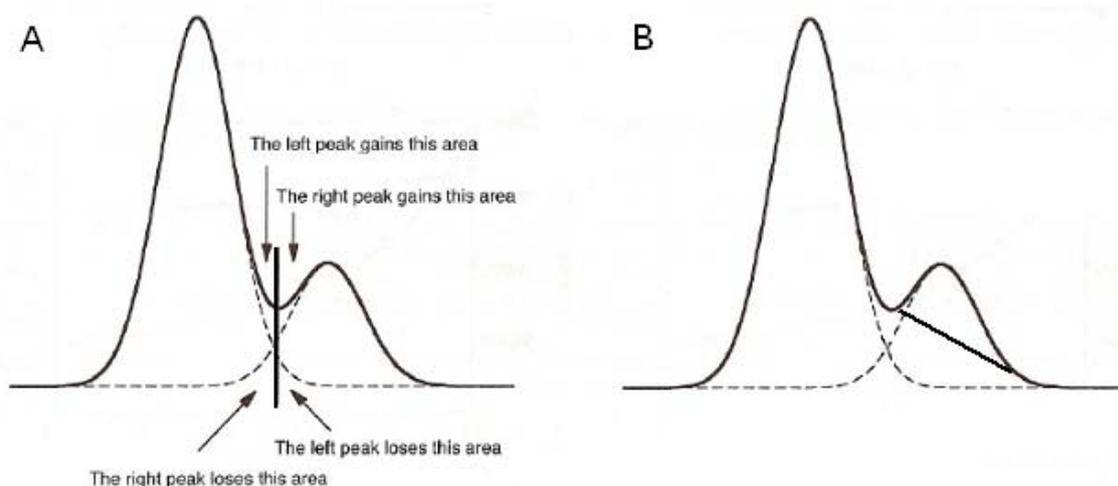


Abbildung 2-5: Integration von zwei nicht vollständig getrennten Peaks. (A) Fällung des Lots (aus [69]); (B) Tangentielle Führung der Basislinie.

Prinzipiell muss man davon ausgehen, dass der Gehalt von zwei nicht vollständig getrennten Peaks mit keinem Auswertungsverfahren richtig bestimmt werden kann. Systematische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Messung der Peakhöhe kleinere Fehler als die Messung der Peakfläche ergibt [111, 112, 113]. Man kann auch feststellen, dass das Ausmaß des Fehlers zunimmt, wenn die Auflösung kleiner als 1.5 wird. Deshalb ist eine Verbesserung der Trennung in diesen Fällen anzustreben [111, 112, 113].

2.3. Kapillarelektrophorese (CE)

Das Ph. Eur. beschreibt die Grundlagen der Kapillarelektrophorese in der allgemeinen Methode 2.2.47 „Kapillarelektrophorese“ [114]. Bei diesem Verfahren wird an eine Kapillare ein elektrisches Feld angelegt, unter dessen Einfluss geladene Moleküle wandern. Üblicherweise werden Quarzkapillaren verwendet, die aus geschmolzenem Siliciumdioxid hergestellt werden [115, 116]. Unterschiedliche Ladungs-Radius-Verhältnisse von Molekülen führen zu einer unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität (Formel 2-8) und ermöglichen die Trennung von Substanzen.

Formel 2-8:
$$v_s = \mu_s \cdot E = \frac{q}{6 \pi \eta r} \cdot E$$

v_s : Geschwindigkeit einer Substanz
 μ_s : elektrophoretische Mobilität einer Substanz
 E : elektrische Feldstärke
 q : effektive Ladung der Substanz
 η : Viskosität des Trennpuffers
 r : Radius der Substanz inklusive der Solvathülle

Die elektrophoretische Wanderung wird mehr oder weniger stark vom elektroosmotischen Fluss (EOF) überlagert. Bei pH-Werten größer als pH 2.5 liegen die Silanolgruppen der Kapillarwand teilweise dissoziiert vor [117]. An der negativ geladenen Kapillaroberfläche bildet sich eine Doppelschicht aus adsorbierten bzw. mobilen Gegenionen aus. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Gegenionen in der mobilen Schicht Richtung Kathode gezogen, wobei die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mitgerissen wird. Die elektroosmotische Mobilität ist von den Eigenschaften des Trennpuffers abhängig (Formel 2-9).

Formel 2-9:
$$v_{\text{EOF}} = \mu_{\text{EOF}} \cdot E = \frac{\epsilon \xi}{4 \pi \eta} \cdot E$$

v_{EOF} : Geschwindigkeit des EOF
 μ_{EOF} : elektroosmotische Mobilität
 E : elektrische Feldstärke
 ϵ : Dielektrizitätskonstante des Trennpuffers
 ξ : Zeta-Potenzial
 η : Viskosität des Trennpuffers

Eine Verringerung der Viskosität, z. B. durch Temperaturerhöhung, führt zu einer größeren Mobilität. Durch Erhöhung des pH-Wertes steigt die Zahl der dissoziierten Silanolgruppen und dadurch auch der EOF. Eine höhere Ionenstärke des Trennpuffers verringert den EOF. Der EOF trägt nicht zur Trennung von Substanzen sondern nur zum Transport der Probenzonen bei.

Seit 1988 sind CE-Geräte kommerziell erhältlich [118]. Der prinzipielle Aufbau ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Es werden etwa 1 nl bis 10 nl einer Probe in eine mit Trennpuffer gefüllte Kapillare injiziert. Danach wird die Kapillare in zwei Puffer-Vorratsgefäße getaucht, die bis zur gleichen Höhe mit dem Trennpuffer gefüllt sind [114]. Häufig wird die Probe auf der anodischen Seite injiziert und auf der Kathodenseite detektiert. Die Trennung erfolgt durch Anlegen einer Spannung (- 30 kV bis + 30 kV) an die Kapillare. Eine effektive Thermostatisierung der Kapillare ist zur Abführung der Jouleschen Wärme und zum Einhalten einer konstanten Temperatur notwendig.

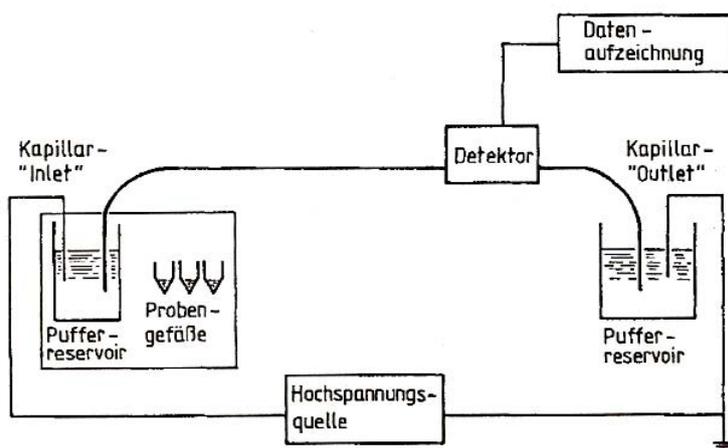


Abbildung 2-6: Schematischer Aufbau eines CE-Gerätes (aus [118]).

Zur Detektion der Substanzen wird in vielen Fällen ein UV-Detektor verwendet. Dabei ist die Empfindlichkeit der UV-Detektion bei der CE im Vergleich zur HPLC 30- bis 100-fach geringer [118], was zum einen durch die geringe Injektionsmenge der

Probe, zum anderen durch den kurzen Lichtweg bedingt ist. Letzterer beträgt in der CE aufgrund der geringen Durchmesser der Kapillaren (50 µm bis 100 µm) nur ungefähr 1 % der Schichtdicke in der HPLC. Die Nachweisgrenzen können durch eine Konzentrierung der Probenzone („sample stacking“) [116, 119] oder eine Verlängerung der Detektionsstrecke („bubble-Zelle“, „Z-Zelle“) verbessert werden [116, 119]. Daneben gibt es Fluoreszenz-Detektoren. Insbesondere Laser-induzierte Fluoreszenzsysteme sind sehr empfindlich (Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: Detektionsverfahren in der CE und Nachweisgrenzen (aus [116]).

Detektionsprinzip	Nachweisgrenzen	
	absolute Menge [mol]	Konzentration [mol/L]
UV-Absorption	10^{-15} bis 10^{-13}	10^{-7} bis 10^{-4}
Fluoreszenz	10^{-18} bis 10^{-13}	10^{-9} bis 10^{-4}
Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF)	10^{-21} bis 10^{-17}	10^{-13} bis 10^{-7}

Beim Einsatz der Fluoreszenz-Detektoren ist in der Regel eine Derivatisierung der Substanzen notwendig, da die meisten Proben keine Eigenfluoreszenz zeigen. So können z. B. primäre Amine (Aminozucker, kleine Peptide, Aminosäuren) mit 3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd (CBQCA) derivatisiert werden. Dadurch ist im Rahmen der Reinheitsanalytik von Aminosäuren eine Detektion der Verunreinigungen, die ein primäres Amin enthalten, mittels Argon-Ion-Laser (λ_{ex} 488 nm; λ_{em} 520 nm) auf 0.1 %-Niveau möglich [120].

2.3.1. Trennverfahren

Ein Vorteil der CE ist die Möglichkeit, zwischen verschiedenen Techniken zu wechseln. Am häufigsten wird Kapillaronenelektrophorese (CZE) und mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) eingesetzt.

2.3.1.1. Kapillaronenelektrophorese (CZE)

Bei diesem Verfahren wird als Puffer eine Elektrolytlösung ohne weitere Zusätze verwendet. Die Trennung beruht darauf, dass verschiedene Substanzen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Kapillare wandern. Die beobachtete Geschwindigkeit (v_{beob}) resultiert aus der Überlagerung der elektrophoretischen Geschwindigkeit der Substanz (v_{S}) mit dem EOF (v_{EOF}):

Formel 2-10:
$$v_{\text{beob}} = v_{\text{S}} + v_{\text{EOF}}$$

Die Kationen erreichen bei normaler Polung des Systems in der Reihenfolge ihres Ladungs-Größen-Verhältnisses das Detektionsfenster zuerst. Ungeladene Substanzen sind zwar von Kationen und Anionen abgetrennt, sind untereinander allerdings nicht getrennt. Sie werden ausschließlich durch den EOF Richtung Kathode transportiert. Üblicherweise ist die elektroosmotische Mobilität größer als die elektrophoretische Mobilität der Anionen. Deshalb können auch Anionen an der Kathodenseite detektiert werden.

Die Trennung wird von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst, u. a. von Geräteparametern wie Spannung, Kapillare oder Temperatur [114]. Daneben kann die Selektivität einer Trennung durch die Wahl der Elektrolytlösung (pH-Wert, Ionenstärke, Zusatz organischer Lösungsmittel) variiert werden [114, 116].

2.3.1.2. Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Ungeladene Moleküle werden mittels CZE nicht getrennt, sondern nur durch den EOF transportiert. Daneben stößt die CZE auch bei geladenen Substanzen, die eine sehr ähnliche elektrophoretische Mobilität haben, an ihre Grenzen. So wurde bei der Untersuchung eines Gemisches von 11 mit 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl) derivatisierten Aminosäuren mit einem 50 mM Boratpuffer pH 9.5 fast keine Auftrennung beobachtet [118].

Die von Terabe *et al.* 1984 eingeführte mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) ermöglicht die Trennung von Neutralstoffen, aber auch von geladenen Analyten, durch den Zusatz von Detergenzien zur Elektrolytlösung [121]. Oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) bilden die Detergenzien Mizellen aus. Häufig wird Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Bei Konzentrationen über 8.2 mM lagern sich 64 SDS-Moleküle zu einer Mizelle zusammen (gemessen in Wasser) [116]. Die Mizellen sind nach außen negativ geladen und haben eine elektrophoretische Mobilität in Richtung Anode. Sie werden aber durch den EOF langsam Richtung Kathode transportiert (Abbildung 2-7).

Die Trennung der Analyten erfolgt durch die unterschiedliche Affinität der Probemoleküle zu den Mizellen. Hydrophile wasserlösliche Moleküle, die keine Wechselwirkung mit den Mizellen zeigen, erreichen das Detektionsfenster mit dem EOF zur Zeit t_{EOF} , während solche Moleküle, die eine große Affinität zu den Mizellen

haben, mit deren Geschwindigkeit wandern und zur Zeit t_{mc} detektiert werden. Alle Analyten, die sich zwischen dem Puffer und der pseudostationären Phase verteilen, erscheinen zwischen t_{EOF} und t_{mc} am Detektionsfenster.

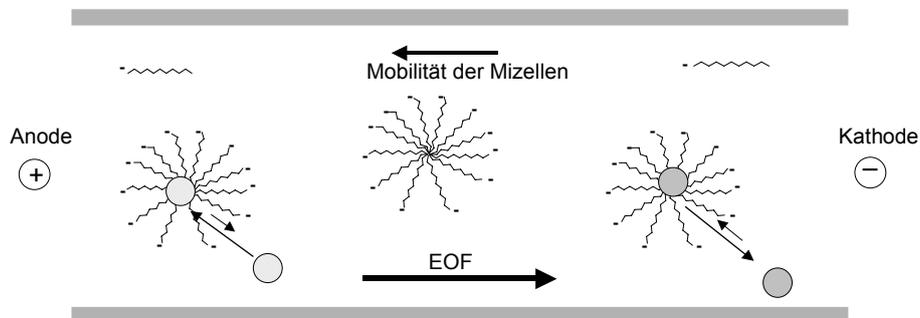


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung der Trennung in der MEKC.

Für geladene Moleküle hängt die Wanderungsgeschwindigkeit zusätzlich zur Verteilung auch von der eigenen elektrophoretischen Mobilität ab. Auf diese Weise kann durch den Zusatz von SDS zum Trennpuffer eine wesentlich bessere Auftrennung der FMOC-Aminosäuren erzielt werden [118].

Aggregation der Mizellbildner, CMC und Größe der Mizellen sind von der Konzentration des Detergens, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Trennpuffers, vom Zusatz organischer Lösungsmittel sowie von der Temperatur abhängig [122]. Durch Variation dieser Parameter kann die Selektivität eines Trennsystems beeinflusst werden. Daneben gibt es noch viele weitere Möglichkeiten zur Veränderung einer Trennung [116, 122, 123]. Die Auswahl des Mizellbildners (z. B. anionisch, kationisch, Gallensäuren) spielt eine große Rolle. Für Dodecylsulfat-Mizellen wurde berichtet, dass das Gegenion (Na^+ , K^+ , Li^+) die Trennung beeinflusst [124]. Der Zusatz eines Salzes zum Trennpuffer kann einen positiven Einfluss auf komplexe Trennungen haben, wie McLaren *et al.* am Beispiel der Trennung von mit CBQCA derivatisierten Aminosäuren gezeigt haben [125]. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Detergenzien entstehen gemischte Mizellen, die z. B. zur Trennung derivatisierter Aminosäuren eingesetzt wurden [126, 127, 128].

2.3.2. CE zur Reinheitsprüfung

Mehrere Übersichtsartikel beschreiben die Verwendung der CE in der pharmazeutischen Analytik [129, 130, 131, 132, 133, 134]. Die Vorteile der CE liegen

u. a. in der hohen Trenneffizienz, den geringen Kosten und einem geringen Lösungsmittelverbrauch. Wie die chromatographischen Methoden eignet sich die CE zur Reaktionskontrolle, für Stabilitäts- und Pharmakokinetik-Studien, Gehaltsbestimmungen und Reinheitsprüfungen [135]. Dabei hat die CE vor allen Dingen bei der Analytik von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen Bedeutung erlangt [131, 132, 136]. CE-Methoden wurden erfolgreich zur Bestimmung des Verunreinigungsprofils von 5-Aminosalicylsäure [137], N-Acetylcystein [138], Carbamazepin [139], Captopril [140] und rekombinantem Hirudin [141] eingesetzt.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Bestimmung der Enantiomerenreinheit von APIs [134, 142, 143]. Chirale Trennungen können durch den Zusatz chiraler Selektoren (z. B. Cyclodextrine, CD) zum Puffer erzielt werden [116]. Die Überprüfung der Enantiomerenreinheit ist bei D-Penicillamin wegen der Toxizität von L-Penicillamin wichtig. Das Ph. Eur. schreibt zu diesem Zweck die Bestimmung der spezifischen Drehung vor [144]. Allerdings ist diese Methode zur Erfassung kleiner Gehalte des toxischen Enantiomers nicht geeignet [25]. Gotti *et al.* schlagen eine CD-modifizierte CE-Methode vor, die nach Derivatisierung der Analyten mit 1,1'-[Ethylidenbis(sulfonyl)]bisbenzol eine Detektion von L-Penicillamin bis zu einem Verhältnis von 0.3:99.7 (L:D) erlaubt [24]. Im Rahmen der Reinheitsanalytik von D-Phenylalanin, einer Aminosäure, die vorwiegend als Nahrungsergänzungsmittel und Synthese-Zwischenprodukt eingesetzt wird, wurde mit einer CE-Methode die Bestimmung der Verunreinigungen aus der Synthese, einschließlich der Enantiomerenreinheit, erreicht [145].

Das Ph. Eur. beschreibt CE-Methoden u. a. zur Identitäts- oder Reinheitsprüfung von Levocabastin-Hydrochlorid, Glutathion, Somatotropin und Erythropoietin. Die Verwendung von CE im Ph. Eur. erfolgt nur zögerlich. HPLC-Methoden werden oft bevorzugt, auch in Fällen, in denen die CE-Methode der HPLC-Methode überlegen ist, wie z. B. bei der Untersuchung von Bacitracin oder Gentamicin [134]. Einem Einsatz der CE in der Routineanalytik stehen eine Vielzahl von Faktoren entgegen, die Reproduzierbarkeit und Präzision der Methoden beeinflussen [146, 147, 148]. Durch die sehr kleinen Probenvolumina, die in die Kapillare eingebracht werden, ist die Injektion ein Hauptgrund für mangelnde Präzision. Daneben spielt die Kapillare (Durchmesser, Kapillarenden, Konditionierung) eine Rolle. Eine effektive Thermostatisierung ist für die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten wichtig, da diese von der Viskosität des Puffers abhängen. Besonderes Augenmerk sollte auf

der Herstellung des Trennpuffers liegen: Schon kleine Änderungen des pH-Wertes oder der Zusammensetzung können zu Schwankungen der Migrationszeiten führen. Deshalb sollten insbesondere die verwendeten Reagenzien, der Zeitpunkt der pH-Wert-Einstellung und die Filtration sorgfältig beschrieben werden [148, 149]. Mayer gibt einige Empfehlungen zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit und Präzision von CE-Methoden [148, 150].

2.3.3. Prüfung der Systemeignung

Wie auch in der HPLC kann die Übertragung von Methoden zwischen verschiedenen CE-Geräten problematisch sein, da die Geräte nicht standardisiert sind. So variieren die verwendbaren Kapillarlängen (Gesamtlänge, effektive Länge), die Technik zur Thermostatisierung (Luftkühlung, Kühlflüssigkeit), der anlegbare Spüldruck und die Injektion [148]. Doch auch bei Geräten des gleichen Herstellers wurden Abweichungen der Migrationszeiten beobachtet [151].

Deshalb ist es wichtig, für Methoden, die im Ph. Eur. beschrieben werden, Systemeignungskriterien festzulegen, mit denen die Anwendbarkeit eines gegebenen Systems belegt werden kann. Als Parameter für die Systemeignung können aus den Elektropherogrammen die Anzahl der theoretischen Böden, die Auflösung, das Peak-Tal-Verhältnis und der Symmetriefaktor entnommen werden [114]. Zu ihrer Berechnung werden die aus der Chromatographie bekannten Gleichungen verwendet.

Zusätzlich wird die Prüfung der Wiederholpräzision in Bezug auf die Flächen und in Bezug auf die Wanderungszeiten vorgeschlagen [114]. Eine hohe Standardabweichung der Migrationszeiten bei wiederholten Injektionen deutet einen unzureichenden Waschvorgang der Kapillare an. Eine Optimierung der Konditionierung der Kapillare vor der ersten Injektion sowie der Spülbedingungen zwischen zwei Trennungen ist für reproduzierbare und präzise Methoden wichtig. Spülschritte mit Säure und/oder Lauge können eventuell an der Kapillarwand adsorbierte Substanzen entfernen [148]. Danach wird die Kapillare durch Spülen mit dem Trennpuffer equilibriert. Um die Wiederholpräzision der Migrationszeiten zu verbessern, kann die relative Wanderung bezogen auf einen internen Standard ermittelt werden [114].

Für chromatographische Methoden wird im Ph. Eur. vorgegeben, in welchem Ausmaß Parameter variiert werden dürfen, um die Kriterien der Systemeignung ohne

grundlegende Änderung der Methode zu erfüllen [61]. Diese Angaben fehlen für die CE [114]. Dadurch ist die Anpassung von CE-Methoden an die gegebenen instrumentellen Bedingungen für die Anwender schwierig. Grenzen, innerhalb derer die Variation von Methodenparametern erlaubt ist, um die in einer Monographie vorgeschriebenen Systemeignungskriterien zu erfüllen, wurden vorgeschlagen [134].

2.3.4. Quantitative Auswertung der Elektropherogramme

Wie auch bei der HPLC ist für die Bestimmung der Gehalte von Verunreinigungen eine quantitative Auswertung der Elektropherogramme notwendig. Über einen weiten Bereich besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration, weshalb die Auswertung über die Peakflächen gegenüber den Peakhöhen bevorzugt wird [116, 148].

Bei der HPLC erfolgt die Detektion außerhalb der Trennsäule. Daher werden alle Substanzen unabhängig von ihrer Retentionszeit mit gleicher Geschwindigkeit am Detektionsfenster vorbeitransportiert. Im Gegensatz dazu wird bei der CE online detektiert, d. h. das Detektionsfenster liegt innerhalb der Kapillare. Aufgrund der angelegten Spannung bewegen sich die Analyten mit ihrer individuellen Wanderungsgeschwindigkeit am Detektor vorbei. Als Folge erhält man für Substanzen mit gleichen molaren Absorptionskoeffizienten, die in gleicher Konzentration in einer Probe vorliegen, aber mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten in der Kapillare wandern, unterschiedliche Peakflächen (Abbildung 2-8).

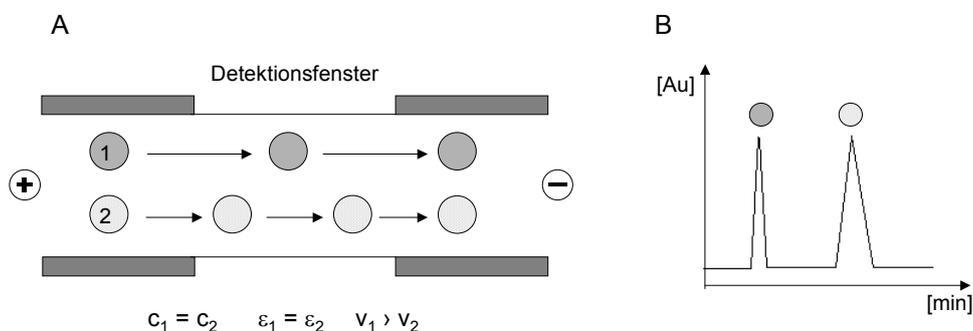


Abbildung 2-8: Schematische Darstellung (A) der Wanderung von zwei Analyten mit gleichen molaren Absorptionskoeffizienten, gleicher Konzentration und unterschiedlichen Geschwindigkeiten und (B) des aufgezeichneten Elektropherogramms.

Die zuerst am Detektor ankommende Substanz erscheint als schmaler Peak, während die langsamere Komponente eine längere Zeit im Detektionsbereich verweilt und dadurch als breiterer Peak aufgezeichnet wird. Durch diesen Zusammenhang beeinflussen Schwankungen der Migrationszeiten auch die Reproduzierbarkeit der quantitativen Analyse.

In der CE ist es deshalb üblich, mit korrigierten Peakflächen zu arbeiten, d. h. die Peakfläche wird durch die Migrationszeit dividiert [114]. Auf diese Weise werden nicht nur Schwankungen der Migrationszeiten, sondern vor allen Dingen die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Analyten ausgeglichen [114].

Zur Berechnung des Gehaltes wird in der allgemeinen Methode 2.2.47 des Ph. Eur. das Normalisierungsverfahren angegeben [114]. Der prozentuale Gehalt einer Komponente der Probe wird durch Bestimmung ihrer korrigierten Peakfläche als Prozentgehalt der Summe der korrigierten Peakflächen aller Peaks berechnet. Dabei werden Peaks durch das Lösungsmittel oder andere zugesetzte Reagenzien ausgenommen.

In der Literatur wird die Verwendung eines internen Standards beschrieben [148, 152, 153]. Der Vorteil eines Standards für die Präzision der Migrationszeiten wurde bereits erwähnt. Aber auch für die quantitative Auswertung ist ein interner Standard günstig, da viele Faktoren, die eine schlechte Präzision und Reproduzierbarkeit verursachen, ausgeglichen werden, z. B. Schwankungen der Injektion, Temperatur und Viskosität, Höhenunterschiede der Proben- und Puffergefäße, Verdampfung der Lösung [152, 153]. Deshalb empfiehlt auch der „Technical Guide for the Elaboration of Monographs“ bei der Kontrolle von Verunreinigungen die Verwendung eines internen Standards [22].

Als interner Standard eignen sich Substanzen, die unter den gegebenen Bedingungen löslich und stabil sind und nicht mit den Analyten reagieren [61, 152]. Kein Peak der zu untersuchenden Substanz sollte durch den internen Standard überlagert werden [114]. Die Berechnung des Gehaltes erfolgt nach der „Interner-Standard“-Methode, wie sie in der allgemeinen Methode 2.2.46 „Chromatographische Trennmethode“ des Ph. Eur. beschrieben ist [61]. Gleiche Mengen des internen Standards werden in die Untersuchungslösung und in die Referenzlösung gegeben. Für die Berechnung des Gehaltes einer Verunreinigung wird das Verhältnis der korrigierten Peakfläche der Verunreinigung zur korrigierten Peakfläche des internen Standards in der Untersuchungslösung mit dem

entsprechenden Verhältnis aus der korrigierten Peakfläche der Substanz und der korrigierten Peakfläche des internen Standards in der Referenzlösung verglichen [61]. Dieses Verfahren wurde für die Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ von Glutathion im Ph. Eur. gewählt [154].

2.4. Allgemeine Überlegungen zu Methoden zur Reinheitsprüfung

Die Beurteilung der Reinheit eines API ist abhängig von der zur Untersuchung verwendeten analytischen Methode. Da sich die Verfahren weiterentwickeln, kann sich die Bewertung der Reinheit verändern: was heute als rein angesehen wird, kann in der Zukunft mit neueren instrumentellen Methoden als unrein bewertet werden [155, 156]. Neuerungen der analytischen Systeme betreffen in erster Linie die Trennleistung bzw. Trennselektivität sowie die Detektion immer kleinerer Analytkonzentrationen.

In der Literatur gibt es Vorschläge, wie man bei der Bestimmung der verwandten Substanzen eines API vorgehen kann [157, 158]. Zu Beginn steht die Trennung der Substanzen und deren Detektion. Als Screening-Methode wird in vielen Fällen HPLC eingesetzt. Die Verunreinigungen haben zum Teil sehr ähnliche Struktur bzw. Eigenschaften, weshalb sie überlagern oder schlecht vom Hauptpeak abgetrennt sein können [26, 157]. Deshalb ist es unabhängig vom eingesetzten analytischen Verfahren möglich, dass Verunreinigungen übersehen werden. Die Untersuchung einer Probe mit weiteren orthogonalen Methoden kann die Ergebnisse bestätigen oder neue Verunreinigungen aufdecken. Im engeren Sinn werden Methoden als orthogonal bezeichnet, wenn sie unabhängig voneinander sind, d. h. der zugrundeliegende physikalische Mechanismus ist verschieden. Barbas *et al.* haben eine CE-Methode verwendet, um die Identität eines mit einer HPLC-Methode detektierten Abbauproduktes zu überprüfen [159]. Die Untersuchung von Gentamicin-Proben hat gezeigt, dass CE und NMR als orthogonale Methoden übereinstimmende Ergebnisse liefern können [160].

Oft wird der Begriff Orthogonalität weniger streng aufgefasst und beschreibt Methoden mit sehr unterschiedlicher Selektivität [26, 161]. So können in der HPLC durch die Variation der stationären Phase, des pH-Wertes und des organischen Anteils der mobilen Phase große Änderungen der Trennselektivität erreicht werden [26, 161, 162]. Snyder *et al.* schlagen ein Schema vor, um eine „orthogonale“ Trennung in der RP-HPLC zu entwickeln und geben einige Beispiele [163].

Auch in der CE kann man durch die Auswahl verschiedener Modifikationen die Trennselektivität stark beeinflussen. Bei der Untersuchung von Nikotin und seinen Verunreinigungen zeigen CZE, nicht-wässrige CE und elektrokinetische Chromatographie an Mikroemulsionen (MEEKC) unterschiedliche Selektivität und können als orthogonale Methoden angesehen werden [164]. De Jong *et al.* haben ein allgemeines Verfahren zur Bestimmung von Verunreinigungen mittels MEKC entwickelt. Die Proben werden sowohl mit einem Puffer, der SDS enthält, als auch mit einem Puffer, der Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) enthält, untersucht. Durch die unterschiedliche Selektivität der beiden Methoden wird eine hohe Trenneffizienz erreicht [165].

Prinzipiell ist die Methodenentwicklung leichter, wenn die Herstellung der zu untersuchenden Substanz und die daraus zu erwartenden Verunreinigungen bekannt sind. Deshalb liegt es im Interesse der Ph.-Eur.-Kommission bei der Erstellung einer Monographie mit den Herstellern zusammenzuarbeiten [17].

Peaks können am einfachsten durch Spiken der Probe mit den möglichen Verunreinigungen (Edukte, Zwischen-, Neben- und Abbauprodukte) und Vergleich der Retentions- bzw. Migrationszeiten zugeordnet werden. Für eine Identifizierung wird die Zuordnung der Verunreinigung bei zwei oder drei Trennsystemen mit unterschiedlicher Selektivität empfohlen [157]. Ein Vergleich von UV-Spektren der Peaks mit denen der möglichen Verunreinigungen kann ebenfalls herangezogen werden [86]. Nicht alle Peaks können auf diese Weise zugeordnet werden, so dass eine Strukturaufklärung notwendig werden kann. Häufig wird dazu HPLC oder CE in Kombination mit Massenspektrometrie verwendet. Weitere Informationen erhält man durch NMR-Untersuchungen. Die Kopplung von HPLC und NMR-Spektroskopie ist zwar möglich, aber nicht weit verbreitet. Deshalb wird der interessierende Peak in der Regel präparativ per DC oder HPLC abgetrennt, und die gesammelte Fraktion mittels NMR-Spektroskopie analysiert [157].

3. REINHEITSPRÜFUNG VON TRIMEBUTIN UND TRIMEBUTIN-MALEAT MITTELS HPLC

3.1. Aufgabenstellung

Seit 1969 werden Trimebutin und Trimebutin-Maleat zur Behandlung von gastrointestinalen Störungen, u. a. Übelkeit, Erbrechen und Reizdarmsyndrom, in Dosierungen bis zu 600 mg täglich eingesetzt [166, 167, 168]. Abbildung 3-1 zeigt die Strukturformeln.

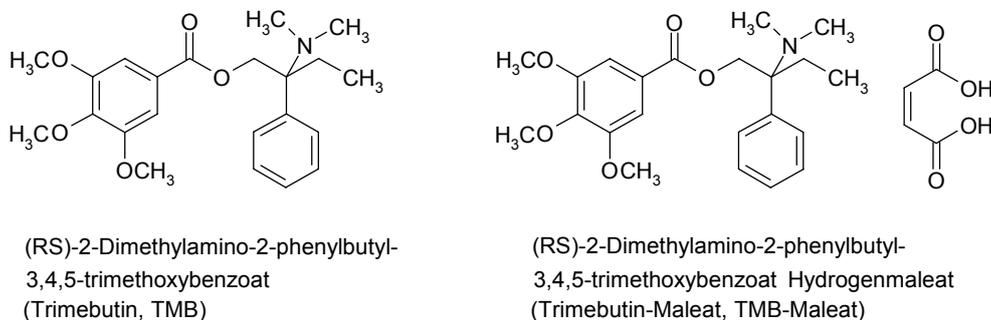


Abbildung 3-1: Strukturformeln von Trimebutin und Trimebutin-Maleat.

In Deutschland ist kein Präparat mit diesen Arzneistoffen zugelassen, aber in anderen Ländern im Geltungsbereich des Ph. Eur. sind Arzneimittel im Handel, z. B. Debridat[®] (Frankreich, Italien) oder Polibutine[®] (Spanien) [166].

Bisher gibt es im Ph. Eur. keine Monographien für Trimebutin und Trimebutin-Maleat. Beide Substanzen wurden mit dem Ziel der Erarbeitung einer Monographie in das Arbeitsprogramm der Ph.-Eur.-Kommission aufgenommen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine HPLC-Methode zur Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ entwickelt und ein entsprechender Monographievorschlag erarbeitet werden. Mehrere Hersteller haben zu diesem Zweck Chargen ihrer Substanz sowie Verunreinigungen bereit gestellt. Das Verunreinigungsprofil einiger Chargen von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat wurde mit der neu entwickelten Methode bestimmt, um Grenzwerte für die Limitierung der Verunreinigungen abschätzen zu können.

3.2. Mögliche Verunreinigungen von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat

Eine Synthese für Trimebutin wird von Rhee *et al.* beschrieben [169]. Das Hauptzwischenprodukt 2-Dimethylamino-2-phenylbutanol (Verunreinigung A) wird dabei aus Propiophenon über 1-Ethyl-1-phenyloxiran hergestellt, wie Abbildung 3-2 zeigt.

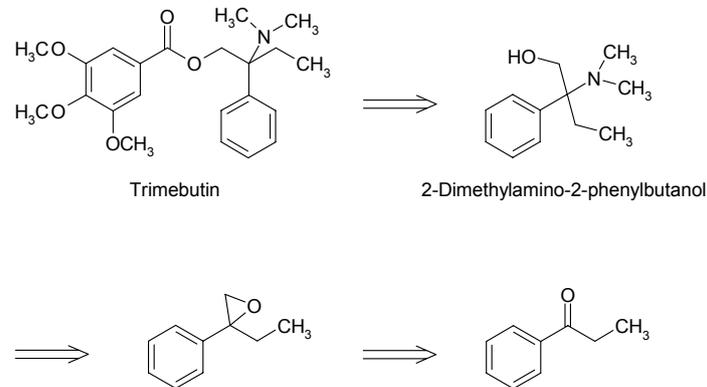


Abbildung 3-2: Synthese von Trimebutin (aus [169]).

Aufgrund der Esterstruktur ist Trimebutin anfällig für saure bzw. alkalische Hydrolyse, bei der Trimethoxybenzoesäure (Verunreinigung B) und Verunreinigung A entstehen [170]. Tabelle 3-1 zeigt die von den Herstellern angegebenen Verunreinigungen sowie ihre mögliche Herkunft.

Tabelle 3-1: Verunreinigungen von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat und ihre mögliche Herkunft.

Verunreinigung	Strukturformel	Bezeichnung	mögliche Herkunft
A		(2RS)-2-Dimethylamino-2-phenylbutanol	Zwischenprodukt der Synthese, Abbauprodukt
B		3,4,5-Trimethoxybenzoesäure	Abbauprodukt
C		Methyl-3,4,5-trimethoxybenzoat	Edukt der Synthese
D		(1RS)-1-[(Dimethylamino)methyl]-1-phenylpropyl-3,4,5-trimethoxybenzoat	Nebenprodukt der Synthese

Eine Methode zur Reinheitsprüfung von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat muss also die Bestimmung der Verunreinigungen A bis D ermöglichen.

3.3. Analytik von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat

Trimebutin bildet im Säuren mit entsprechenden Gegenionen Ionenpaare, die mit organischen Lösungsmitteln ausgeschüttelt werden können. In der Literatur ist die Ionenpaarbildung mit Bi(III)-Iodid [171], Co(II)-Thiocyanat oder Molybdän(V)-Thiocyanat [172] beschrieben. Diese Methoden können z. B. eingesetzt werden, um den Gehalt von Trimebutin in Arzneimitteln zu bestimmen. Durch Überführung der Ionenpaare in die organische Phase und anschließende UV-Messung ist es möglich, die Konzentration des Arzneistoffs ohne Störungen durch Hilfsstoffe, die bei der Formulierung verwendet wurden, zu ermitteln.

Trimebutin und Trimebutin-Maleat werden als Racemate eingesetzt. Über die chirale Trennung mittels CE unter Zusatz eines Glycosaminoglykans wurde berichtet [173]. CE-Methoden wurden auch eingesetzt, um Trimebutin-Maleat im Plasma und Gewebe von Ratten [174] bzw. im Plasma von Kaninchen [175] nachzuweisen.

Die in der Literatur veröffentlichten HPLC-Methoden zur Analytik von Trimebutin beschäftigen sich vorwiegend mit dem Nachweis der Substanz und ihrer Metabolite. Lavit *et al.* haben mit einer RP-HPLC-Methode Trimebutin und N-Desmethyltrimebutin in menschlichem Plasma bestimmt [176]. Das Verfahren wurde für eine Pharmakokinetik- und Bioäquivalenz-Studie verwendet [177]. Die Untersuchungen zeigen, dass Trimebutin nach oraler Gabe nur in geringen Mengen im Blut wiedergefunden wird, was durch einen hohen First-pass-Effekt bedingt ist. Es liegen hohe Konzentrationen des Hauptmetaboliten N-Desmethyltrimebutin (Abbildung 3-3) vor, der vermutlich für die Wirkung verantwortlich ist [168, 176, 177].

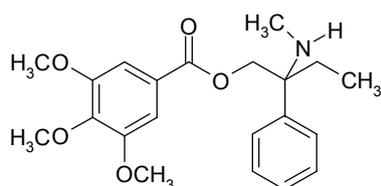


Abbildung 3-3: Strukturformel von N-Desmethyltrimebutin.

Der empfindliche Nachweis der Metabolite aus Plasma ist durch LC-MS-MS möglich.

Die Trennung von Trimebutin, Trimethoxybenzoesäure, N-Desmethyltrimebutin und N,N-Didesmethyltrimebutin wird mit einer mobilen Phase aus 2 mM Ammoniumacetatpuffer pH 6.5 und Methanol (20/80, v/v) und einer YMC-J'sphere-C18-Säule erreicht [178].

Bei Ionenpaarchromatographischen Methoden kann Natriumpentansulfonat als Ionenpaarreagenz eingesetzt werden. Dadurch ist eine Trennung von basischen und sauren Komponenten möglich, wie bei der HPLC-Analyse von Trimebutin in Gegenwart der Hydrolyseprodukte gezeigt wurde [170].

Zur Reinheitsprüfung von Trimebutin-Maleat wird im Japanischen Arzneibuch [179] eine Ionenpaarchromatographie vorgeschrieben. Die mobile Phase besteht aus Puffer (0.01 M Perchlorsäure, eingestellt mit 13 mM Ammoniumacetat-Lösung auf pH 3.0, 8.8 mM Natriumpentansulfonat) und Acetonitril im Verhältnis 65/35 (v/v). Für die Trennung wird eine RP18-Säule verwendet. Die Monographie enthält keine Angaben über die möglichen Verunreinigungen, die mit der Methode erfasst werden. Die Quantifizierung erfolgt mittels „Externer-Standard“-Methode, wobei Trimebutin als externer Standard dient. Der Gesamtgehalt an Verunreinigungen, ermittelt durch Summierung aller Peakflächen mit Ausnahme der Peaks von Maleinsäure und Trimebutin, wird durch den Vergleich mit der Peakfläche des Trimebutin-Peaks in der Referenzlösung auf 0.4 % begrenzt.

3.4. Ionenpaarchromatographie

Als Ausgangspunkt für eine Reinheitsprüfung von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat wurde in Anlehnung an die Monographie im Japanischen Arzneibuch zunächst eine HPLC-Methode mit Natriumpentansulfonat als Ionenpaarreagenz gewählt. Die Trennung von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat und den Verunreinigungen A bis D konnte unter Verwendung einer Nucleosil-C8-Säule (250 x 4.0 mm, 5 µm) erreicht werden, wie in Abbildung 3-4 zu sehen ist [180]. Die mobile Phase setzt sich aus Puffer (0.01 M Perchlorsäure, eingestellt mit Ammoniumacetat auf pH 3.0, 8.8 mM Natriumpentansulfonat) und Acetonitril im Verhältnis 80/20 (v/v) zusammen.

Zusätzlich zu den bekannten Verunreinigungen waren in den Trimebutin- und Trimebutin-Maleat-Proben bis zu drei Peaks durch unbekannte Verunreinigungen detektierbar. Dabei wurde der Gehalt von Verunreinigung 3 (Peak 3) auf bis zu 0.9 % geschätzt [181].

Abbildung 3-5 zeigt die Untersuchung von Modellmischungen, die 10 mg/ml Trimebutin und die Verunreinigungen A bis D im Konzentrationsbereich zwischen 0.05 % und 0.5 % enthalten. Die Verunreinigungen A und D sind auf 0.1 %-Niveau nicht mehr oder nur schwach zu detektieren.

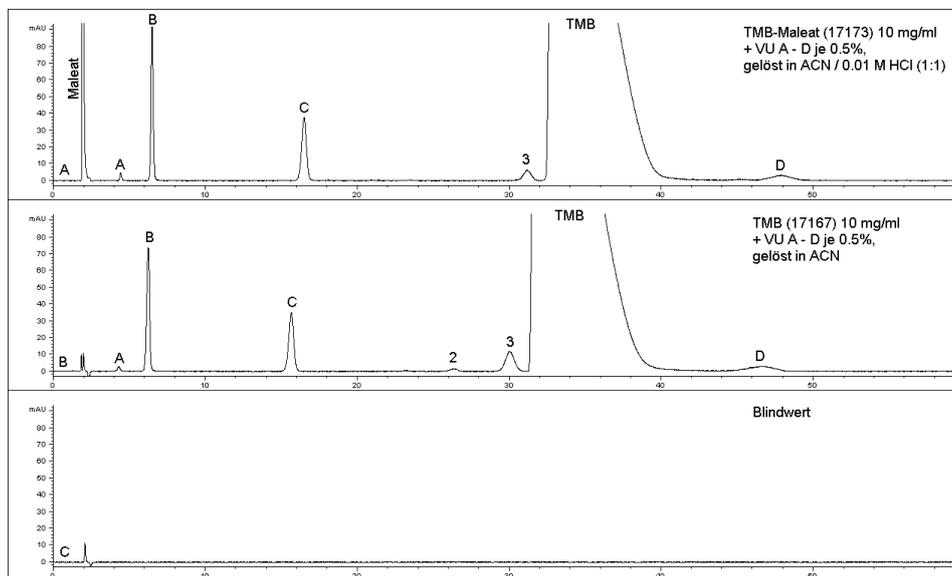


Abbildung 3-4: Trennung von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat und den Verunreinigungen A - D. HPLC-Bedingungen: Säule: Nucleosil C8 (250 x 4.0 mm, 5 μ m); Mobile Phase: Puffer (0.01 M Perchlorsäure, eingestellt mit Ammoniumacetat auf pH 3.0; 8.8 mM Natriumpentansulfonat) und Acetonitril (ACN) im Verhältnis 80/20 (v/v); Fluss: 1.2 ml/min; Injektion: 10 μ l; Detektion: 254 nm. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (2), (3) unbekannte Verunreinigungen.

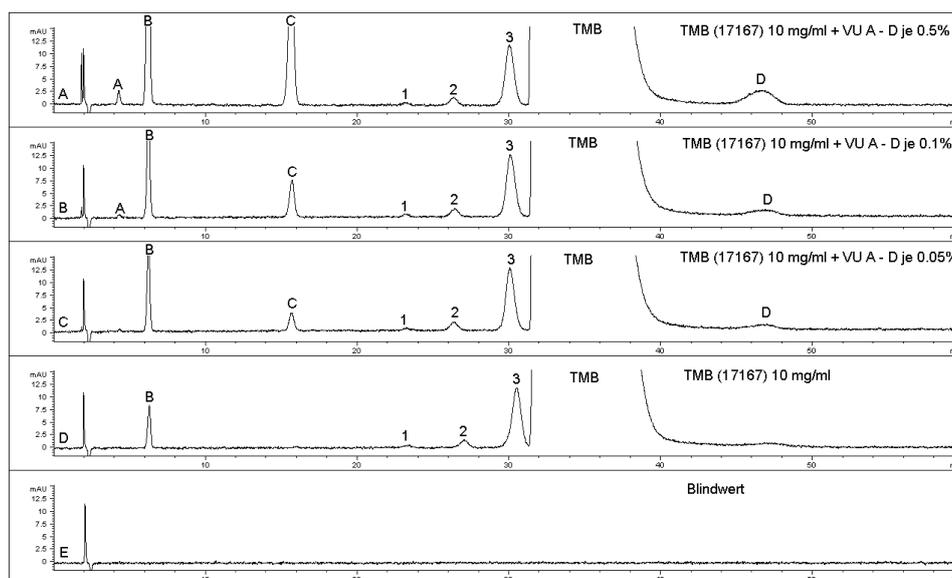


Abbildung 3-5: Chromatogramme von Modellmischungen aus TMB gespikt mit VU A – D. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-4. Proben (gelöst in ACN): wie beschrieben. Peakzuordnung A – D wie in Tabelle 3-1; (1), (2), (3) unbekannte Verunreinigungen.

Zur Simulierung realer Proben wurden Modellmischungen verwendet, um die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, bestimmt als S/N-Verhältnis von drei bzw. zehn, zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst. Wie dem Chromatogramm (D) in Abbildung 3-5 zu entnehmen ist, enthält die Trimebutin-Charge (17167) bereits die Verunreinigungen B und D, so dass die als LOD bzw. LOQ gefundenen Werte verfälscht sind.

Tabelle 3-2: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Verunreinigungen A – D, bestimmt mit Modellmischungen aus TMB (17167) 10 mg/ml gespikt mit Verunreinigungen A – D (aus [180]).

Verunreinigung	LOD [mg/ml]	LOD [%]	LOQ [mg/ml]	LOQ [%]
A	0.023	0.23	0.09	0.9
B	0.001	0.01	0.003	0.03
C	0.002	0.02	0.005	0.05
D	0.01	0.1	0.043	0.43

Als kritische Parameter der Methode stellten sich die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Verunreinigungen A und D heraus. Da Trimebutin in Dosierungen bis zu 600 mg täglich eingesetzt wird, muss der Berichtsgrenzwert entsprechend den Angaben in der allgemeinen Monographie „Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung“ [19] auf 0.05 % festgelegt werden (Tabelle 1-1). Weiterhin soll das LOD kleiner als der Grenzwert bzw. das LOQ kleiner gleich dem Grenzwert sein, ab dem Peaks nicht mehr berücksichtigt werden [61]. Das sind hier 0.05 %. Diese Vorgabe wird für die Verunreinigungen A und D nicht erfüllt.

Nachteilig auf eine empfindliche Detektion der Substanzen wirkt sich die Detektionswellenlänge aus. Zwar haben sowohl Trimebutin als auch die Verunreinigungen aufgrund des Benzolrings bei etwa 254 nm ein Absorptionsmaximum, aber dessen Intensität ist nur gering. Eine Erniedrigung der Detektionswellenlänge, z. B. auf 200 – 220 nm, kann die Sensitivität von Methoden erhöhen [182]. Allerdings rauscht die Basislinie, vermutlich verursacht durch den Puffer, in diesem Wellenlängenbereich so stark, dass eine Detektion nicht mehr möglich ist.

Deshalb ist die vorgestellte Ionenpaarchromatographische Methode zur Reinheitsanalytik von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat nicht geeignet. Eine neu zu entwickelnde HPLC-Methode sollte auf die Verwendung eines Ionenpaarreagens verzichten.

3.5. Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC)

3.5.1. Methodenentwicklung

3.5.1.1. Chromatographische Bedingungen

Zur Trennung von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat von den Verunreinigungen wurde eine RP18-Säule mit hydrophilem „Endcapping“ (Aquasil C18, 125 x 4.6 mm, 5 µm) ausgewählt, da sowohl Säuren als auch basische Substanzen neben Neutralstoffen analysiert werden müssen. Die polaren Endgruppen führen im Vergleich zu einer konventionellen Umkehrphase zu einer erhöhten Retention polarer Verbindungen, wodurch auch die Trennung basischer Substanzen im sauren Medium möglich wird [183]. Phosphatpuffer und Acetonitril wurden als Bestandteile der mobilen Phase verwendet. Der pH-Wert des Puffers wurde im Bereich zwischen pH 2.5 und pH 3.5 variiert (Abbildung 3-6).

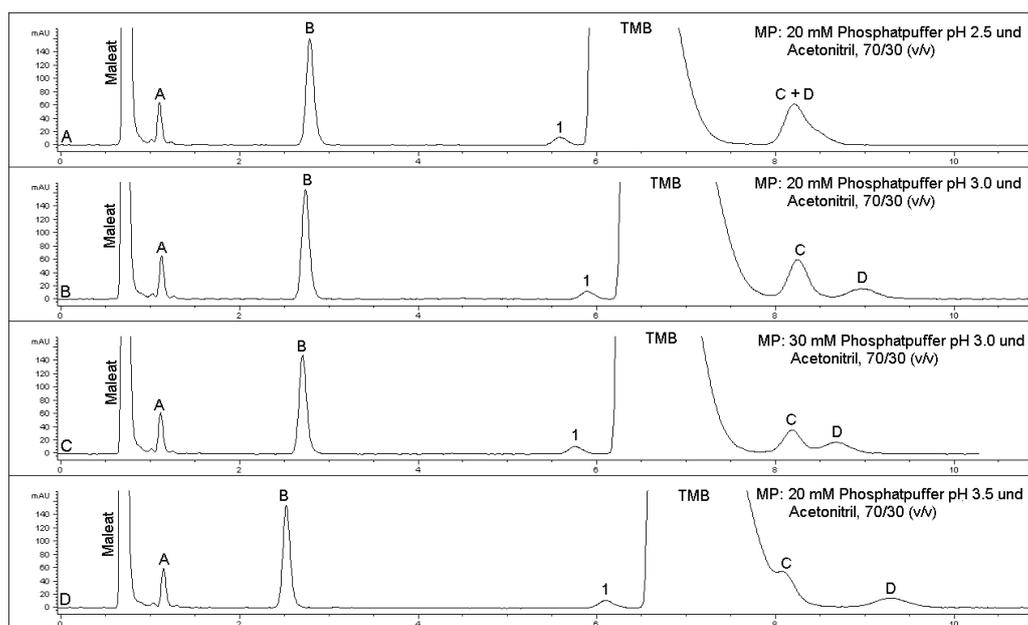


Abbildung 3-6: Trennung einer Modellmischung bei verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase. HPLC-Bedingungen: Säule: Aquasil C18 (125 x 4.6 mm, 5 µm); Mobile Phase (MP): wie beschrieben; Fluss: 2.0 ml/min; Temperatur: 25 °C; Injektion: 20 µl; Detektion: 215 nm. Probe: TMB-Maleat (17173) 1 mg/ml + VU A – D je 1 %. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (1) unbekannte Verunreinigung.

Da bei der Verwendung eines 30 mM Phosphatpuffers pH 3.0 eine Antrennung aller Verunreinigungen erreicht wurde, erschien dieser Puffer für weitere Versuche als günstig. Testmischungen aus Trimebutin-Maleat 1 mg/ml, versetzt mit je 1 % der

Verunreinigungen A bis D, wurden unter isokratischen Bedingungen analysiert (Abbildung 3-7).

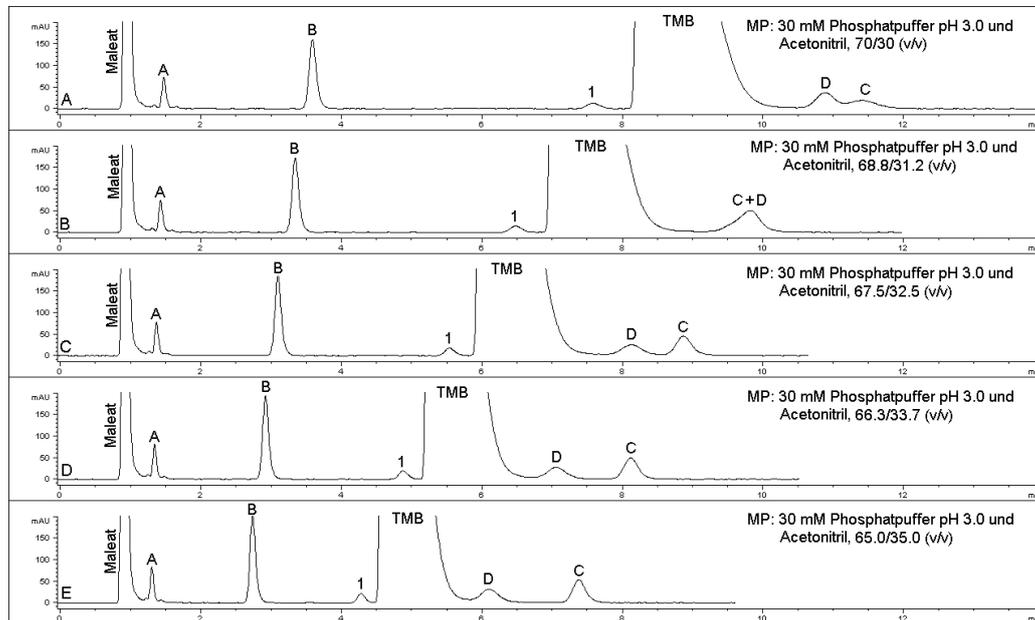


Abbildung 3-7: Trennung einer Modellmischung bei verschiedenem Acetonitril-Anteil in der mobilen Phase. HPLC-Bedingungen: Säule: Aquasil C18 (125 x 4.6 mm, 5 μ m); Mobile Phase (MP): wie beschrieben; Fluss: 1.5 ml/min; Temperatur: 25 $^{\circ}$ C; Injektion: 20 μ l; Detektion: 215 nm. Probe: TMB-Maleat (17173) 1 mg/ml + VU A – D je 1 %. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (1) unbekannte Verunreinigung.

Es zeigte sich, dass die Trennung von Maleat und Verunreinigung A bzw. der unbekanntem Verunreinigung und Trimebutin mit zunehmendem Acetonitril-Anteil im Fließmittel abnahm. Auch die Trennung der Verunreinigungen C und D war stark von der Höhe des organischen Anteils abhängig. Während bei 30 % Acetonitril Verunreinigung C vor Verunreinigung D eluierte, führten höhere Konzentrationen von Acetonitril zu einer Umkehr der Elutionsreihenfolge. Dabei nahm die Auflösung zwischen den Verunreinigungen C und D zu, je höher der Acetonitril-Anteil war. Gleichzeitig wurde allerdings eine schlechtere Auflösung zwischen Trimebutin und Verunreinigung D beobachtet.

Die Ergebnisse legten die Entwicklung einer Gradienten-Methode nahe, bei der eine niedrige Acetonitril-Konzentration zu Beginn der Methode zur Trennung von Maleat und Verunreinigung A und eine höhere Elutionskraft der mobilen Phase für die Trennung der Verunreinigungen C und D notwendig waren.

Abbildung 3-8 (Chromatogramm A) zeigt die Trennung von Trimebutin-Maleat und den Verunreinigungen bei Verwendung eines Fließmittelgradienten mit 20 mM Phosphatpuffer pH 2.5.

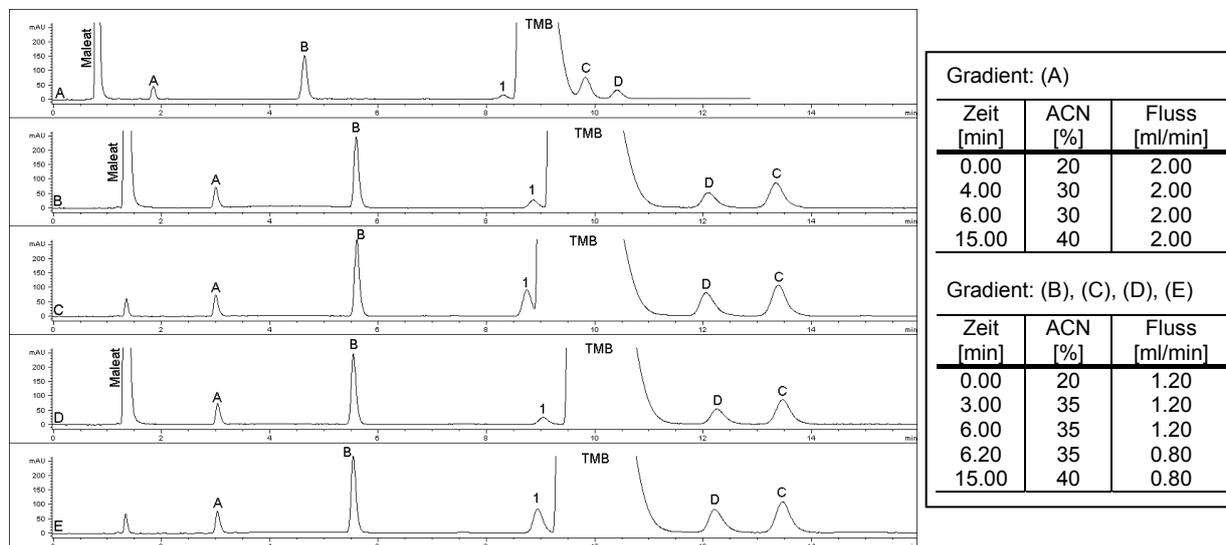


Abbildung 3-8: Trennung von Modellmischungen mit verschiedenen Gradienten. HPLC-Bedingungen: Säule: Aquasil C18 (125 x 4.6 mm, 5 µm); Mobile Phase: (A), (B), (C) 20 mM Phosphatpuffer pH 2.5 und Acetonitril (ACN); (D), (E) 30 mM Phosphatpuffer pH 3.0 und Acetonitril (ACN); Gradient: wie beschrieben; Temperatur: 25 °C; Injektion: 20 µl; Detektion: 215 nm. Proben: (A), (B), (D) TMB-Maleat (17173) 1 mg/ml + VU A – D je 1%; (C), (E) TMB (17168) 1 mg/ml + VU A – D je 1%. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (1) unbekannte Verunreinigung.

Durch die zusätzliche Änderung der Flussrate konnte eine Trennung der Komponenten innerhalb von 15 Minuten erzielt werden (Abbildung 3-8 Chromatogramme B und C). Auch hier zeigte die Verwendung eines 30 mM Phosphatpuffers pH 3.0 Vorteile, da die unbekannte Verunreinigung besser von Trimebutin getrennt wurde (Abbildung 3-8 D, E). Durch weitere kleine Änderungen wurde folgende Gradienten-Methode für die Reinheitsanalytik von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat gefunden:

Zeit [min]	Fließmittel B [%]	Fluss [ml/min]
0.0	22	1.2
3.0	35	1.2
6.0	35	1.2
6.5	35	0.8
15.0	40	0.8
16.0	40	0.8

Die erzielte Trennung zeigt Abbildung 3-9.

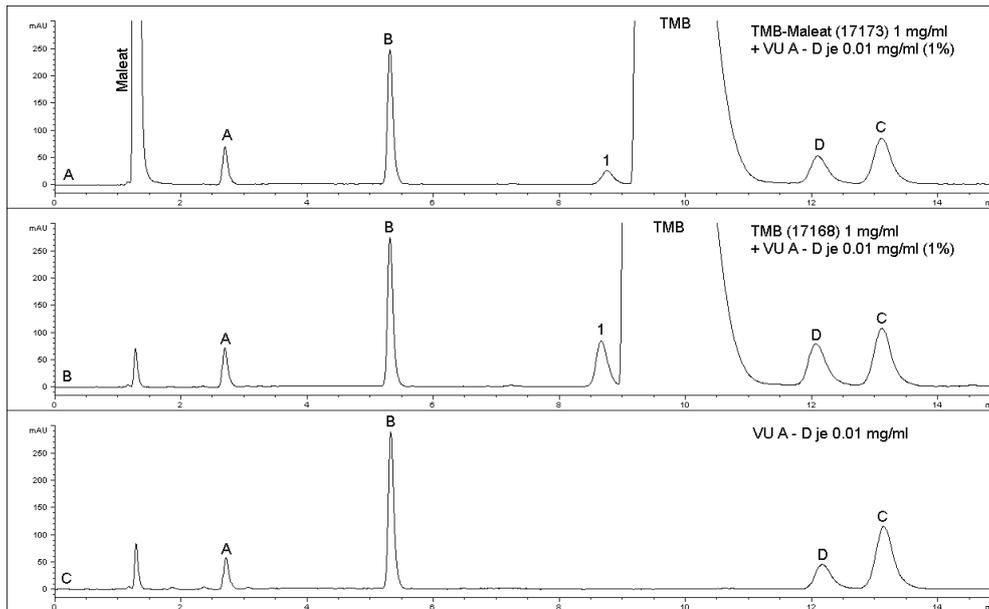


Abbildung 3-9: Trennung von Modellmischungen mit dem entwickelten Gradienten. HPLC-Bedingungen: Säule: Aquasil C18 (125 x 4.6 mm, 5 μ m); Mobile Phase: (A) 30 mM Phosphatpuffer pH 3.0, (B) Acetonitril; Gradient: 0 - 3 min 22 % - 35 % ACN 1.2 ml/min, 3 - 6 min 35 % ACN 1.2 ml/min, 6 - 6.5 min 35 % ACN 1.2 - 0.8 ml/min, 6.5 - 15 min 35 % - 40 % ACN 0.8 ml/min, 15 - 16 min 40 % ACN 0.8 ml/min; Temperatur: 25 $^{\circ}$ C; Injektion: 20 μ l; Detektion: 215 nm. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (1) unbekannte Verunreinigung.

3.5.1.2. Auswahl der Detektionswellenlänge

Durch die Verwendung eines PDA-Detektors war es möglich, die Absorptionsspektren der Peaks aufzunehmen. Die Spektren der Verunreinigungen A bis D zeigt Abbildung 3-10.

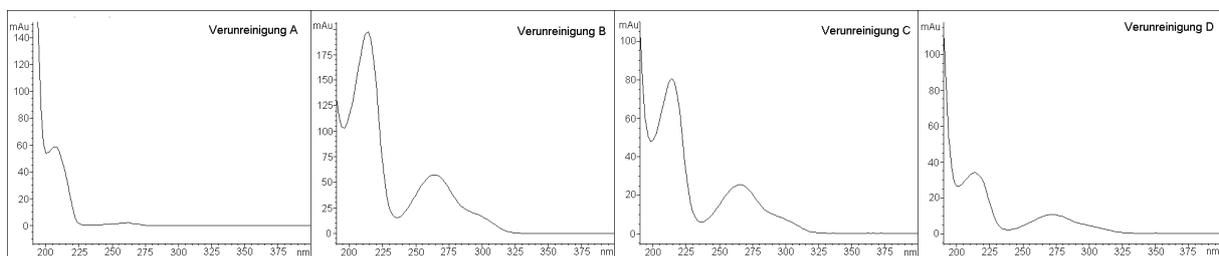


Abbildung 3-10: UV-Spektren (190 nm – 400 nm) der Verunreinigungen A – D, je 0.01 mg/ml.

Das Maximum der Substanzen bei ca. 254 nm hat nur eine geringe Intensität, was auch die schlechten Nachweisgrenzen, die bei der Ionenpaar-Methode gefunden wurden, erklärt. Durch die Verwendung einer mobilen Phase aus Phosphatpuffer und Acetonitril konnte bei einer Wellenlänge von 215 nm gemessen werden. Dadurch war ein empfindlicherer Nachweis der Verunreinigungen möglich (Abbildung 3-11).

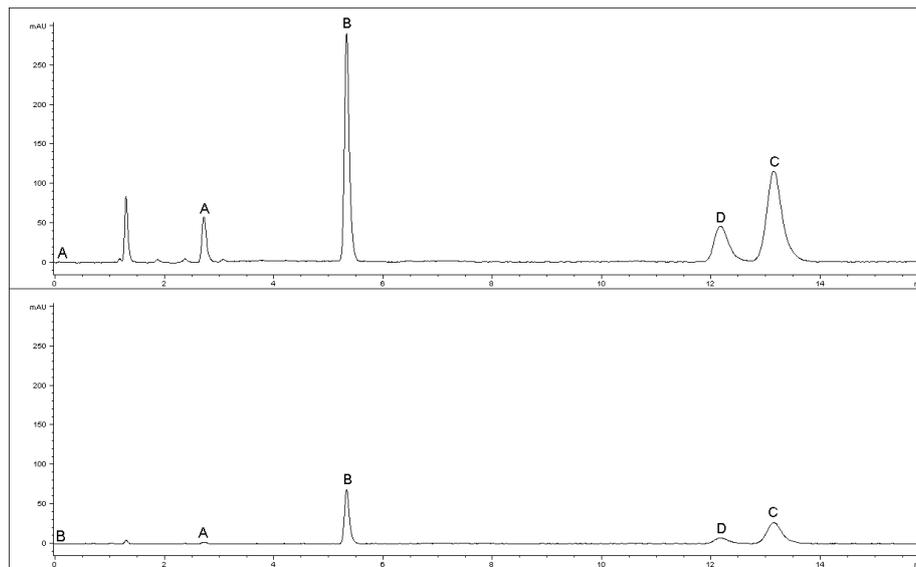


Abbildung 3-11: Detektion bei (A) 215 nm bzw. (B) 254 nm. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9. Probe: VU A – D je 0.01 mg/ml. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1.

3.5.2. Zuordnung einer unbekanntes Verunreinigung

Bei der Untersuchung von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat mit der beschriebenen RP-HPLC-Methode wurde neben den Peaks der bekannten Verunreinigungen A bis D ein zusätzlicher Peak (Peak 1) detektiert (Abbildung 3-9).

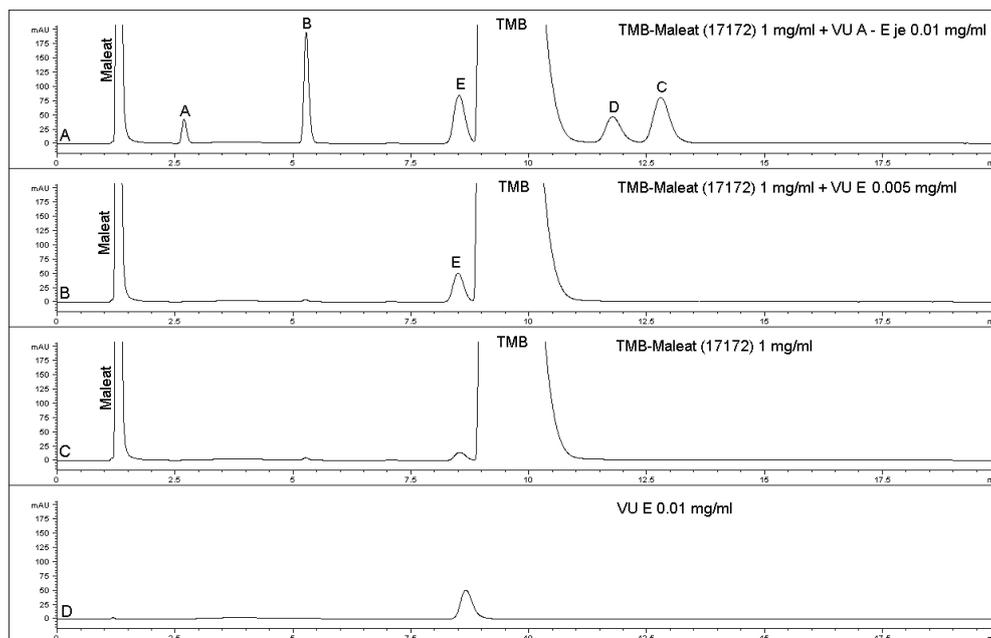


Abbildung 3-12: Zuordnung von N-Desmethyltrimebutin (VU E). HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin.

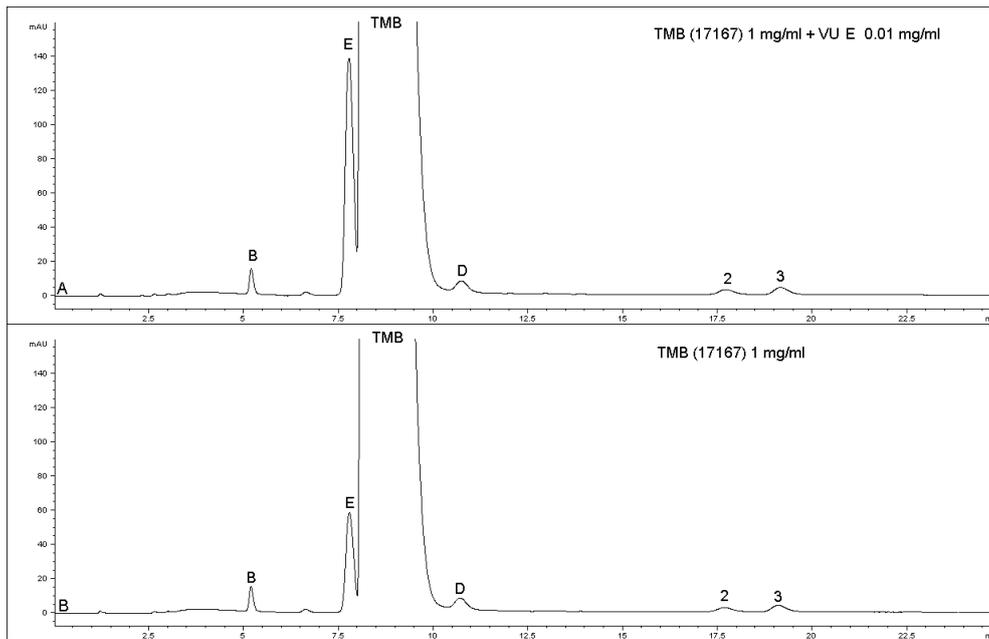


Abbildung 3-13: Zuordnung von N-Desmethyltrimebutin (VU E). HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin; (2), (3) unbekannte Verunreinigungen.

Bei Rückfragen an die Hersteller stellte sich N-Desmethyltrimebutin als weitere mögliche Verunreinigung heraus. Im Folgenden wird N-Desmethyltrimebutin als Verunreinigung E bezeichnet. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass es sich bei der unbekanntem Verunreinigung (Peak 1) sehr wahrscheinlich um den Hauptmetaboliten N-Desmethyltrimebutin handelt (Abbildung 3-12, Abbildung 3-13). Diese Annahme wurde durch den Vergleich der Absorptionsspektren bestätigt (Abbildung 3-14).

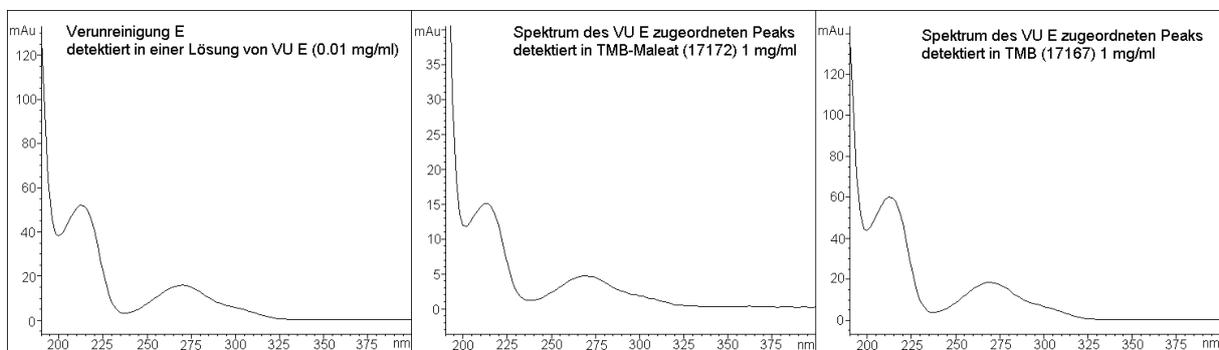


Abbildung 3-14: UV-Spektren (190 nm – 400 nm) der Verunreinigung E und der Peaks in TMB- bzw. TMB-Maleat-Proben, die Verunreinigung E zugeordnet wurden.

Weiterhin zeigten die UV-Spektren des Peaks in Trimebutin- bzw. Trimebutin-Maleat-Proben, die mit N-Desmethyltrimebutin versetzt wurden, keinen Hinweis darauf, dass zwei verschiedene Substanzen coeluierten (Abbildung 3-15).

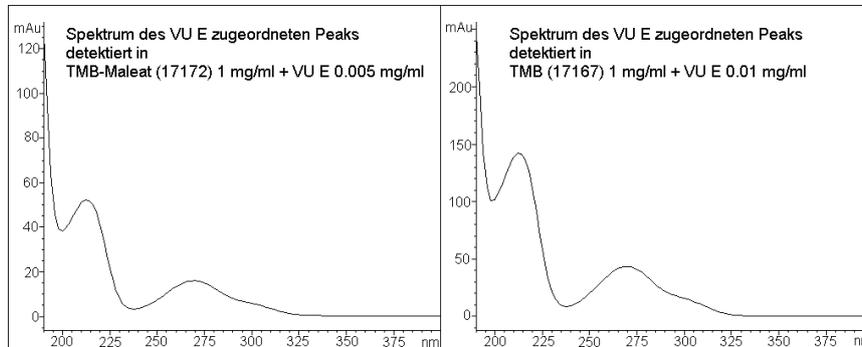


Abbildung 3-15: UV-Spektren (190 nm – 400 nm) des Peaks zur Retentionszeit von Verunreinigung E in TMB- bzw. TMB-Maleat-Proben, die mit N-Desmethyltrimebutin versetzt wurden.

Es liegt die Vermutung nahe, dass der unbekannte Peak (Peak 3), der mit der Ionenpaar-Methode detektiert wurde (Abbildung 3-4), ebenfalls N-Desmethyltrimebutin zugeordnet werden kann. Dies wurde zwar experimentell nicht überprüft, aber neben einer vergleichbaren Elutionsreihenfolge wurde auch eine ähnliche Konzentration in den Proben beobachtet.

3.6. Validierung der RP-HPLC-Methode

Richtlinien für eine Validierung wurden von verschiedenen Organisationen erarbeitet, u. a. United States Food and Drug Administration (FDA) und „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) [184]. Die Europäische Union, Japan und die USA haben sich im Rahmen der „International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use“ (ICH) auf gemeinsame Vorgaben geeinigt [62]. Entsprechend der ICH-Richtlinie Q2(R1) soll durch die Validierung gezeigt werden, dass eine analytische Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet ist [185]. Parameter zur Bewertung der Leistungsfähigkeit sind Selektivität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität, Präzision, Richtigkeit und Robustheit. Diese ICH-Richtlinie wurde von der Pharmacopoeial Discussion Group (PDG) angenommen und ist dadurch Grundlage für die Validierung von Methoden für das USP, JP und Ph. Eur. Für das Ph. Eur. sind die Vorgaben zur Validierung sowie zusätzliche spezielle Anleitungen für Methoden

des Ph. Eur. (z. B. Systemeignung und Responsfaktoren) im „Technical Guide for the Elaboration of Monographs“ zu finden [22].

Die Selektivität, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Linearität und Präzision der entwickelten RP-HPLC-Methode wurden bestimmt. Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden die Ergebnisse von Chargentestungen mit der Ionenpaar-Methode mit den Werten verglichen, die bei der Analyse von Chargen mit der RP-HPLC-Methode ermittelt wurden. Weiterhin wurde durch Variation verschiedener chromatographischer Parameter die Robustheit der Methode untersucht.

3.6.1. Selektivität

Unter Selektivität versteht man die Fähigkeit einer Methode, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren [104].

Die Untersuchung von Modellmischungen aus Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat versetzt mit den bekannten Verunreinigungen A bis E je 1 % zeigt, dass alle Verunreinigungen voneinander und vom Hauptpeak getrennt sind (Abbildung 3-16).

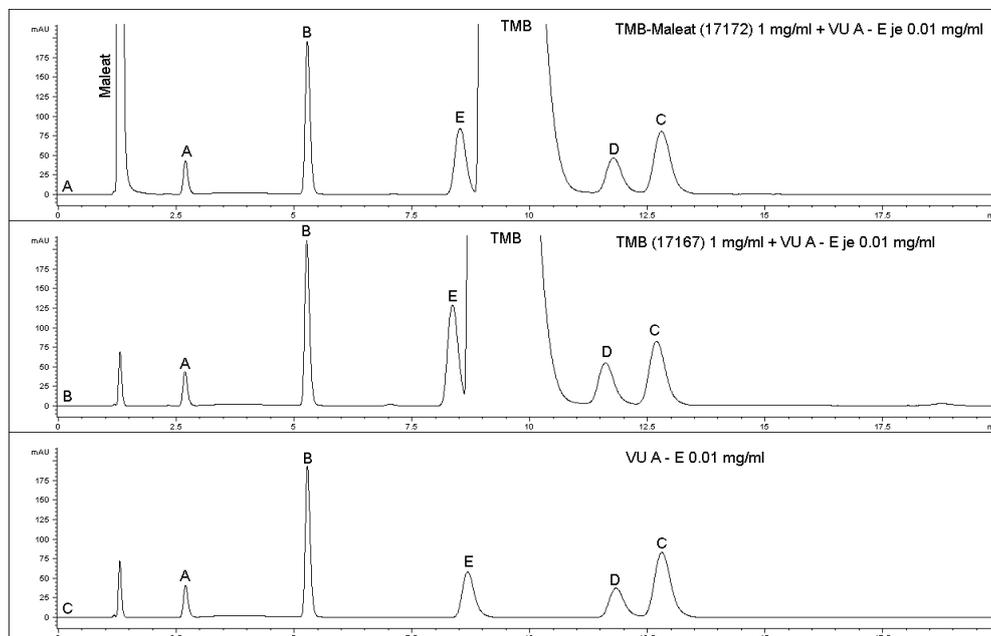


Abbildung 3-16: Selektivität. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin.

Die Retentionszeiten und Auflösungen fasst Tabelle 3-3 zusammen.

Tabelle 3-3: Retentionszeiten (RT) und Auflösungen (R_s), erhalten mit einer Lösung von TMB (A) bzw. TMB-Maleat (B) versetzt mit VU A – E je 1 %.

A	VU A	VU B	VU E	TMB	VU D	VU C
RT [min]	2.68	5.26	8.36	8.91	11.61	12.69
R_s		14.07	10.04	0.54	2.41	1.77

B	Maleat	VU A	VU B	VU E	TMB	VU D	VU C
RT [min]	1.29	2.69	5.28	8.52	9.16	11.78	12.79
R_s		8.06	14.00	10.21	0.68	2.55	1.65

3.6.2. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Verunreinigungen wurden durch das S/N-Verhältnis abgeschätzt.

Um reale Proben zu simulieren, wurden die Verunreinigungen A, C und D einzeln in absteigender Konzentration in Trimebutin-Maleat-Proben (Charge 16357) gespikt. Die S/N-Verhältnisse der Verunreinigungen B und E wurden in Abwesenheit der Hauptkomponente bestimmt, weil diese Trimebutin-Maleat-Probe bereits kleine Mengen beider Verunreinigungen enthält, was die Ergebnisse verfälschen würde. Zusätzlich wurde das S/N-Verhältnis von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat ermittelt. Die Nachweisgrenzen (LOD) bzw. Bestimmungsgrenzen (LOQ) der Substanzen, bestimmt als S/N-Verhältnis von 3 bzw. 10, sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Tabelle 3-4: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Verunreinigungen A – E, TMB und TMB-Maleat.

Verunreinigung	LOD [µg/ml]	LOD [%]	LOQ [µg/ml]	LOQ [%]
A	0.02	0.002	0.13	0.013
B	0.02	0.002	0.05	0.005
C	0.02	0.002	0.11	0.011
D	0.09	0.009	0.26	0.026
E	0.10	0.010	0.20	0.020
TMB-Maleat (16357)	0.80	0.080	1.00	0.100
TMB (17167)	0.70	0.070	0.90	0.090

Die Ergebnisse zeigen, dass die Bestimmung von Verunreinigungen auf 0.1 %-Niveau möglich ist. Die LOQs der Verunreinigungen sind kleiner als 0.05 %, d.h. kleiner als der Grenzwert, ab dem Peaks nicht mehr berücksichtigt werden sollen [19].

3.6.3. Linearität

Die ICH-Richtlinie Q2(R1) definiert Linearität als die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind [185]. Zur Bestimmung der Linearität und zum Ausschluss einer Krümmung sollen mindestens fünf Konzentrationsniveaus untersucht werden. Weil der Konzentrationsbereich im vorliegenden Fall breit ist, wurden sieben bzw. acht Konzentrationsniveaus für die Verunreinigungen bzw. die Hauptkomponente gewählt.

Die Auswertung erfolgte durch graphische Darstellung der gemessenen Flächen gegen die Konzentration und die Berechnung einer linearen Regressionsgeraden. Ein Korrelationskoeffizient $r \geq 0.98$ bzw. ein Bestimmtheitsmaß $r^2 \geq 0.96$ wird als Kriterium für einen linearen Zusammenhang bei der Prüfung auf Verunreinigungen vorgeschlagen [104].

3.6.3.1. Trimebutin-Maleat

Die Modellmischungen enthalten Trimebutin-Maleat (Charge 16357) 1 mg/ml und die Verunreinigungen A bis E auf sieben Konzentrationsniveaus zwischen 0.0001 mg/ml und 0.01 mg/ml (0.01 % – 1.0 %). Zu jeder der sieben Konzentrationen wurden drei Messwerte bestimmt, wobei die Messwerte für jede Konzentration möglichst unabhängig sein sollten. Deshalb wurden pro Verunreinigung drei Standardlösungen hergestellt. Für eine Konzentrationsreihe wurden Trimebutin-Maleat-Proben mit einem entsprechenden Volumen derselben Standardlösungen der Verunreinigungen versetzt. Auf diese Weise wurden drei Reihen mit jeweils sieben Konzentrationen erstellt, d. h. insgesamt 21 Modellmischungen. Abbildung 3-17 zeigt die graphische Darstellung der Peakflächen gegen die Konzentrationen für die Verunreinigungen A bis E.

Zusätzlich wurde die Linearität für Trimebutin-Maleat überprüft. Dazu wurden bei acht Konzentrationen zwischen 0.001 mg/ml und 0.02 mg/ml (0.1 % - 2.0 %) je drei Lösungen analysiert. Die Kalibriergerade ist in Abbildung 3-18 dargestellt.

Die ermittelten Kalibriergeraden und die dazugehörigen Bestimmtheitsmaße sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

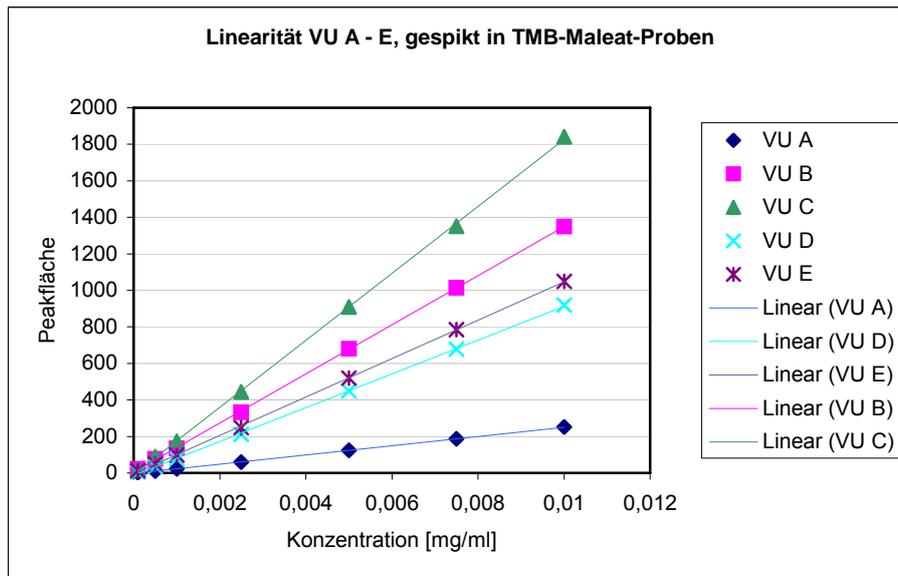


Abbildung 3-17: Graphische Darstellung der Peakfläche gegen die Konzentration für die VU A – E.

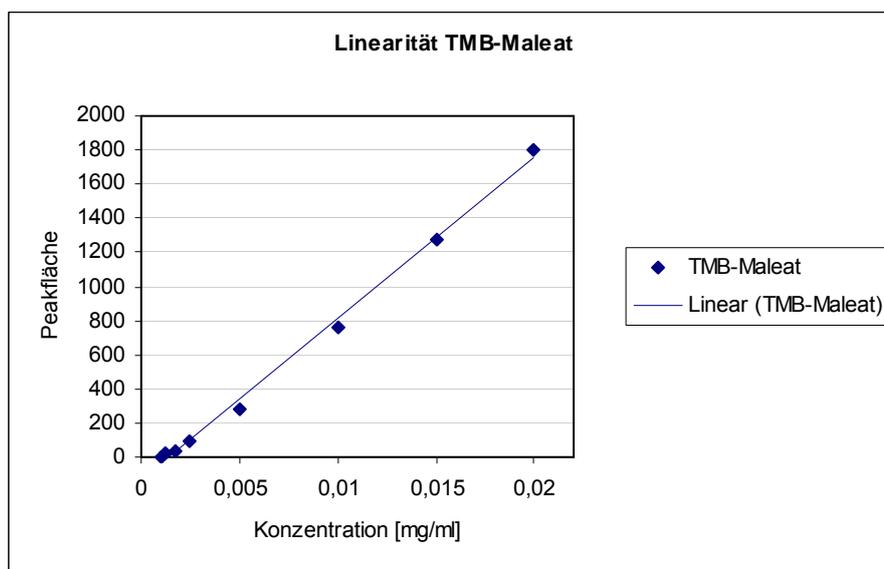


Abbildung 3-18: Graphische Darstellung der Peakfläche gegen die Konzentration für TMB-Maleat.

 Tabelle 3-5: Ergebnisse der Überprüfung der Linearität für die VU A – E und TMB-Maleat. Geradengleichung der allgemeinen Form $y = ax + b$.

	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß (r^2)
VU A	$y = 25278x - 1.9297$	0.9998
VU B	$y = 134463x + 4.7015$	0.9999
VU C	$y = 183388x - 7.4263$	0.9998
VU D	$y = 92486x - 11.877$	0.9998
VU E	$y = 105199x - 4.803$	0.9998
TMB-Maleat	$y = 94753x - 134.95$	0.9962

Für alle Substanzen erfüllt das Bestimmtheitsmaß die Forderung $r^2 \geq 0.96$. Für die Kalibriergerade von Trimebutin-Maleat fällt ein Achsenabschnitt $b = -134.95$ auf. Es konnte nicht geklärt werden, ob dies durch einen möglichen Messfehler hervorgerufen wurde. Allerdings wird ein y-Achsenabschnitt $\leq 10\%$ des Signals der Komponente bei 2.5 % (m/m, bezogen auf die Hauptkomponente) noch als zulässig angesehen [104]. Im vorliegenden Fall beträgt der y-Achsenabschnitt -7.5% , bezogen auf das Signal bei 2.0 %, und liegt damit noch in einem akzeptablen Bereich.

3.6.3.2. Trimebutin

Für die Verunreinigungen A bis E, gespikt in Trimebutin-Maleat-Proben, wurde ein linearer Zusammenhang gefunden. Deshalb wurde die Linearität der Verunreinigungen, gespikt in Trimebutin-Proben (Charge 17167), nur anhand einer Messreihe überprüft. Die graphische Darstellung zeigt Abbildung 3-19. Wie Abbildung 3-13 (Chromatogramm B) zu entnehmen ist, enthält die gewählte Trimebutin-Probe bereits die Verunreinigungen B, D und E. Deshalb ergeben sich für diese Verunreinigungen ins positive verschobene y-Achsenabschnitte. Es kann angenommen werden, dass die bei der Konzentration 0.001 mg/ml in der Messreihe der Verunreinigung E gefundene Peakfläche ein Ausreißer ist.

Zur Bestimmung der Linearität der Trimebutin-Signale wurden je zwei Lösungen bei acht Konzentrationsniveaus zwischen 0.001 mg/ml und 0.02 mg/ml untersucht (Abbildung 3-20). Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst.

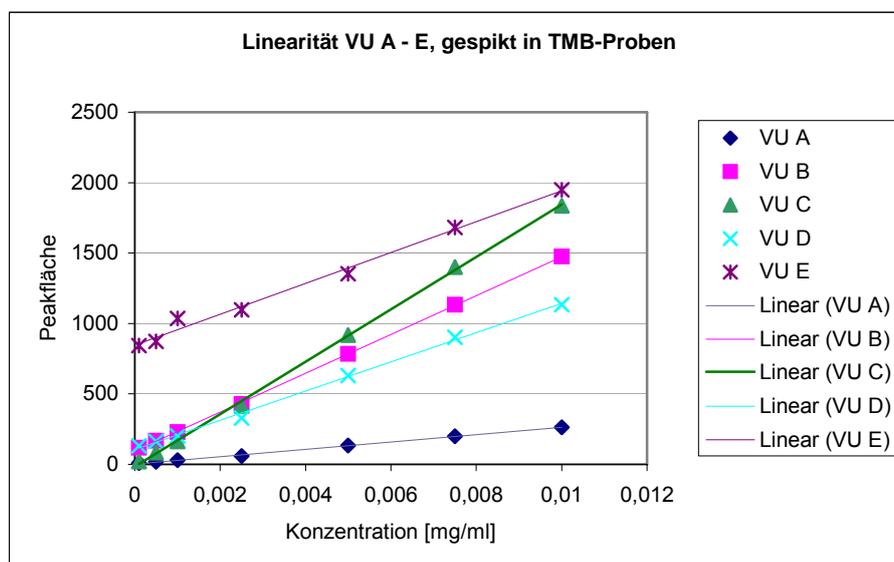


Abbildung 3-19: Graphische Darstellung der Peakfläche gegen die Konzentration für die VU A – E.

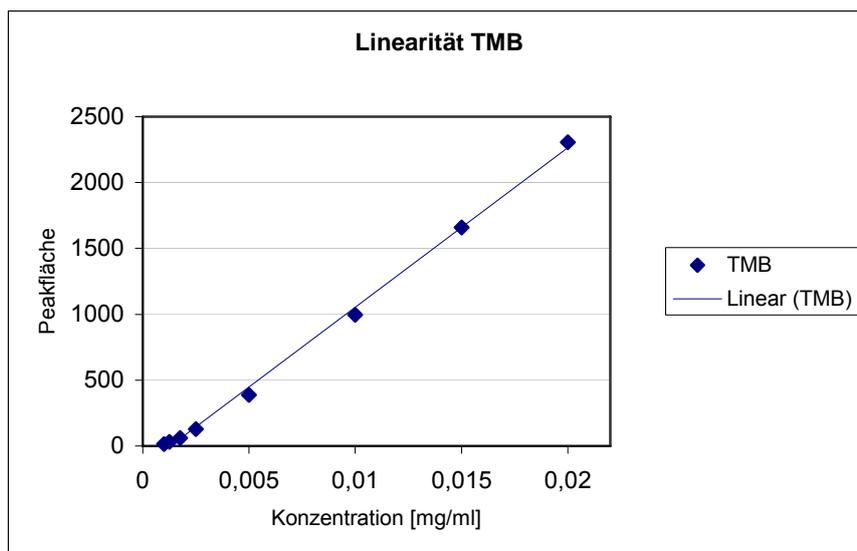


Abbildung 3-20: Graphische Darstellung der Peakfläche gegen die Konzentration von TMB.

Tabelle 3-6: Ergebnisse der Überprüfung der Linearität für die VU A – E und TMB. Geradengleichung der allgemeinen Form $y = ax + b$.

	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß (r^2)
VU A	$y = 25965x + 2.5052$	0.9986
VU B	$y = 137831x + 95.316$	0.9998
VU C	$y = 186070x - 16.101$	0.9993
VU D	$y = 103750x + 104.71$	0.9978
VU E	$y = 109600x + 845.63$	0.9908
TMB	$y = 121125x - 157.38$	0.9976

3.6.4. Präzision

Die Präzision beschreibt die Streuung von Analyseergebnissen. Im vorliegenden Fall wurden die System- und Methodenpräzision für die Verunreinigungen mit Modellmischungen, bestehend aus Trimebutin-Maleat (Charge 16357) 1 mg/ml und den Verunreinigungen A bis E auf drei Konzentrationsniveaus, bestimmt. Die gewählten Konzentrationen sind 0.05 % (vorgeschlagener Berichtsgrenzwert), 0.1% (Grenzwert für die Identifizierung) und 0.5 %. Zur Beurteilung der Präzision werden die Standardabweichungen sowie die relativen Standardabweichungen der Messwerte berechnet.

3.6.4.1. Systempräzision

Durch die Systempräzision werden Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden, erfasst, u. a. Injektion, Detektion, Trennung, Integration [104]. Dazu wurde eine Modellmischung sechs mal hintereinander injiziert. Tabelle

3-7 zeigt die Ergebnisse. Die erhaltenen Standardabweichungen lagen in einem akzeptablen Bereich. Für die Bestimmung von Verunreinigungen soll die relative Standardabweichung kleiner sein als ein Wert zwischen 2 % und 5 % [62]. Im vorliegenden Fall wurde sogar für die Werte auf 0.05 %-Niveau eine relative Standardabweichung kleiner als 2 % gefunden.

Tabelle 3-7: Systempräzision.

	Konzentration		Peakfläche Mittelwert 6 aufeinander folgender Injektionen	Standard- abweichung	relative Standard- abweichung [%]
	% (w/w)	mg/ml			
VU A	0.05%	0.0005	10.8970	0.1724	1.58
	0.1%	0.001	24.3163	0.0866	0.36
	0.5%	0.005	128.4386	0.1294	0.10
VU B	0.05%	0.0005	72.1388	0.6977	0.97
	0.1%	0.001	136.7046	0.4243	0.31
	0.5%	0.005	682.1253	0.7084	0.10
VU C	0.05%	0.0005	94.8695	0.6728	0.71
	0.1%	0.001	172.5193	0.6542	0.38
	0.5%	0.005	917.1802	0.9657	0.11
VU D	0.05%	0.0005	34.5691	0.6225	1.80
	0.1%	0.001	77.5730	0.8932	1.15
	0.5%	0.005	436.3759	0.3181	0.07
VU E	0.05%	0.0005	51.3877	0.1818	0.35
	0.1%	0.001	94.6158	0.4529	0.48
	0.5%	0.005	512.5601	0.4992	0.10

3.6.4.2. Methodenpräzision

Zusätzlich zu den Parametern, die bei der Systempräzision erfasst werden, geht in die Methodenpräzision der Einfluss der Probenherstellung (u. a. Wiegen, Verdünnen, Filtrieren) ein.

Tabelle 3-8: Methodenpräzision.

	Konzentration		Peakfläche Mittelwert 6 Injektionen unabhängiger Proben	Standard- abweichung	relative Standard- abweichung [%]
	% (w/w)	mg/ml			
VU A	0.05%	0.0005	10.7263	0.8888	8.29
	0.10%	0.001	23.6861	1.0543	4.45
	0.50%	0.005	125.8470	3.5299	2.80
VU B	0.05%	0.0005	75.9798	4.5467	5.98
	0.10%	0.001	136.7886	2.7424	2.00
	0.50%	0.005	685.2475	6.1606	0.90
VU C	0.05%	0.0005	89.7708	4.3775	4.88
	0.10%	0.001	173.3963	6.6429	3.83
	0.50%	0.005	902.6997	39.8381	4.41
VU D	0.05%	0.0005	35.2050	1.9785	5.62
	0.10%	0.001	78.7946	1.6687	2.12
	0.50%	0.005	449.1914	11.1229	2.48
VU E	0.05%	0.0005	50.9850	1.2631	2.48
	0.10%	0.001	98.2571	2.1180	2.16
	0.50%	0.005	520.7315	15.1649	2.91

Zur Bestimmung wurden bei jeder Konzentration sechs voneinander unabhängige Modellmischungen untersucht, die so hergestellt wurden wie in Kapitel 3.6.3.1 beschrieben (Tabelle 3-8).

Für die Bestimmung von Verunreinigungen im Bereich von 0.1 % bis 1.0 % liegt der Richtwert für eine zulässige relative Standardabweichung bei 10 % [104]. Im Hinblick auf diese Spezifikation sind die erzielten Ergebnisse zufriedenstellend.

3.6.5. Richtigkeit

Die Richtigkeit beschreibt die Übereinstimmung zwischen einem ermittelten Wert und einem als richtig angesehenen Wert [104]. Im vorliegenden Fall wurde die Richtigkeit durch den Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Trimebutin- bzw. Trimebutin-Maleat-Chargen mit der RP-HPLC-Methode und der Ionenpaarchromatographie abgeschätzt. Letztere Methode basiert, wie in Kapitel 3.4 erläutert, auf der Vorschrift in der Trimebutin-Maleat-Monographie im JP. Die Ermittlung der Daten mit der Ionenpaar-Methode ist im Bericht [181] beschrieben; das Vorgehen bei der RP-HPLC-Methode wird in Kapitel 3.7 erläutert. In Tabelle 3-9 sind die Mittelwerte des Gehaltes der Verunreinigungen für beide Methoden angegeben. Die Quantifizierung erfolgte in beiden Fällen mittels „Externer-Standard“-Methode unter Einbeziehung der entsprechenden Korrekturfaktoren.

Tabelle 3-9: Vergleich der Gehalte [%] der Verunreinigungen in TMB- bzw. TMB-Maleat-Proben, untersucht mittels RP-HPLC- und Ionenpaar-Methode.

	Charge	VU	RP-HPLC [%]	Ionenpaar-HPLC [%]
TMB	17167	B	0.080	0.084
		D	0.163	0.189
	17168	B	0.078	0.090
		C	0.023	0.026
		D	0.786	0.704
	17169	B	0.104	0.119
		C	0.040	0.047
		D	0.843	0.799
	17170	B	0.064	0.087
		C	0.031	0.034
		D	0.525	0.352
	TMB-Maleat	16351	B	0.019
16356		B	0.018	0.010
16357		B	0.009	0.006
17171		B	0.032	0.023
17172		B	0.021	0.014
17173		B	0.037	0.023
17174		B	0.038	0.020

Die mit den beiden Methoden für die Verunreinigungen B, C und D erhaltenen Werte sind vergleichbar. Die Ähnlichkeit dieser Gehalte wurde mittels Differenzen-t-Test belegt [104]. Die Ergebnisse fasst Tabelle 3-10 zusammen. Zur Berechnung des t-Wertes wurden die Differenzen der Gehalte für eine Verunreinigung in den verschiedenen Chargen herangezogen. Durch einen Mittelwert-t-Test und Prüfung der Varianzenhomogenität wurde überprüft, dass für den Differenzen-t-Test bezüglich Verunreinigung B die in den Trimebutin- und Trimebutin-Maleat-Chargen gefundenen Gehalte zusammengefasst werden dürfen. Der Wert für Verunreinigung B in Charge 17169 wurde als Ausreißer ausgenommen. Wenn der erhaltene t-Wert kleiner als der tabellierte t-Wert (95 %, $f = n - 1$) ist, so kann davon ausgegangen werden, dass die Methoden gleichwertig sind.

Tabelle 3-10: Ergebnis des Differenzen-t-Tests.

	Anzahl Messwerte n	t_{gefunden}	$t_{\text{Tabelle}}(95 \%, f = n-1)$
VU B	10	0.62	2.262
VU C	3	3.25	4.303
VU D	4	1.65	3.182

3.6.6. Robustheit

Die Robustheit beschreibt die Fähigkeit eines Verfahrens, ein Ergebnis zu liefern, das durch variierende Bedingungen nicht oder unwesentlich verfälscht wird [104]. Für die Untersuchung wurde eine Modellmischung aus Trimebutin-Maleat (Charge 16357) 1 mg/ml und den Verunreinigungen A bis E je 0.01 mg/ml (1 %) verwendet. Um eine Aussage über den Einfluss einzelner Variationen machen zu können, wurde nur ein Parameter geändert, während die anderen konstant gehalten wurden. Retentionszeit und Auflösung wurden zur Beurteilung der Änderungen herangezogen. Durch die Untersuchung der Robustheit können die kritischen Parameter einer Trennung erkannt werden. Auf dieser Grundlage lassen sich Kriterien für die Systemeignung festlegen.

3.6.6.1. Variation der Säulentemperatur

Für die Methodenentwicklung wurde eine Säulentemperatur von 25 °C eingestellt. Zur Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Trennung wurde die Temperatur um +/- 2.5 °C variiert (Abbildung 3-21).

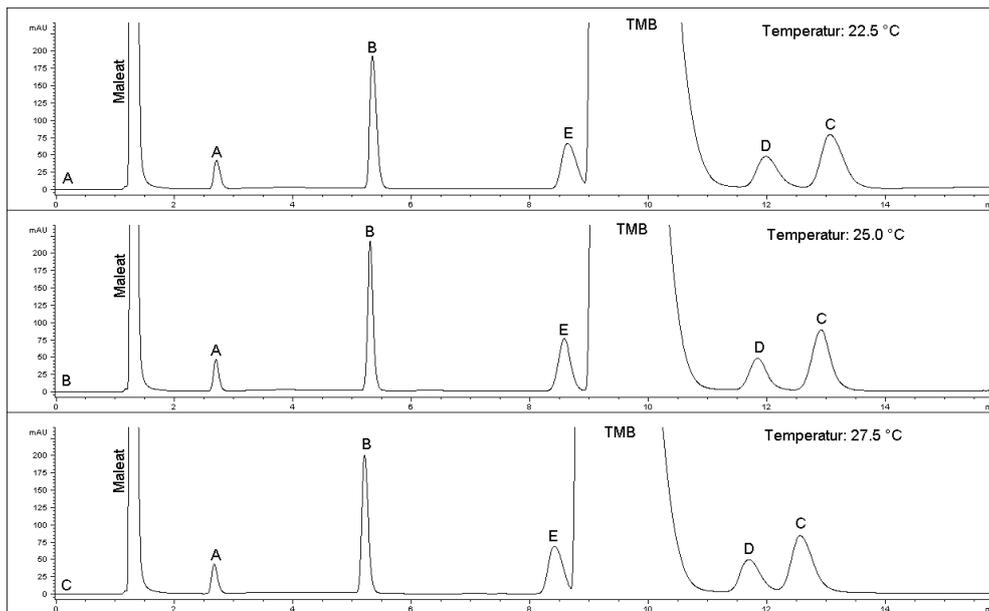


Abbildung 3-21: Trennung von TMB-Maleat und den VU A – E bei verschiedenen Säulentemperaturen. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9; Temperatur: wie beschrieben. Probe: TMB-Maleat (16357) 1 mg/ml + VU A – E je 0.01 mg/ml (1 %). Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin.

Mit steigender Temperatur konnten leicht verkürzte Retentionszeiten festgestellt werden. Bei 27.5 °C ist die Auflösung zwischen Verunreinigung D und C kleiner als 1.5, dem Wert, der für eine Basislinientrennung von zwei benachbarten Peaks angesetzt wird. Ebenso ist die Trennung von Verunreinigung E und dem Hauptpeak temperaturabhängig.

3.6.6.2. Variation des pH-Wertes des wässrigen Bestandteils der mobilen Phase

Insbesondere bei ionisierbaren Substanzen kann der Einfluss des pH-Wertes sehr groß sein. Bereits bei der Methodenentwicklung wurde ein Effekt des pH-Wertes des wässrigen Bestandteils der mobilen Phase auf die Trennung von Trimebutin und den Verunreinigungen festgestellt. Für die Untersuchung der Robustheit der Methode gegenüber Variationen des pH-Wertes wurde dieser um +/- 0.2 pH-Einheiten geändert (Abbildung 3-22).

Bei pH 2.8 wird die Trennung zwischen Verunreinigung E und dem Hauptpeak schlechter, während bei pH 3.2 die Auflösung zwischen den Verunreinigungen D und C deutlich abnimmt.

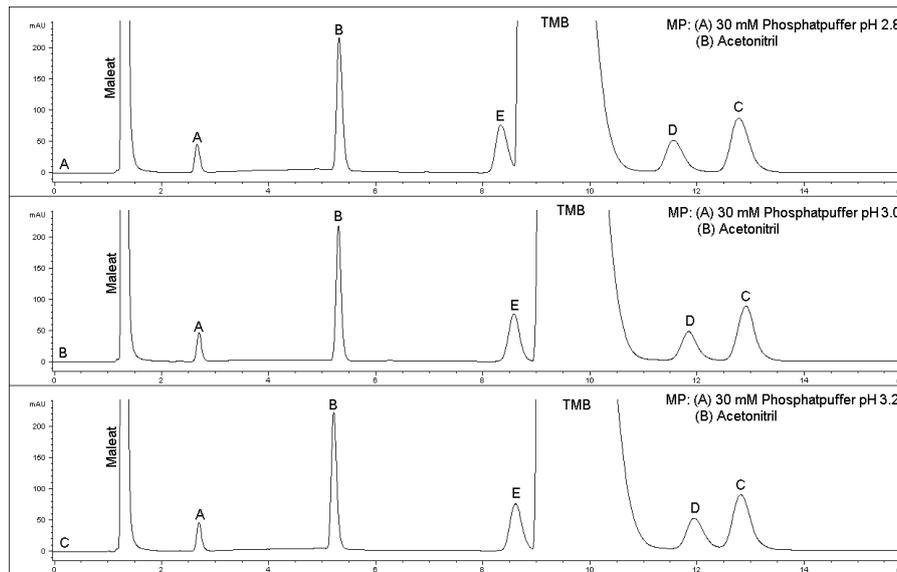


Abbildung 3-22: Trennung von TMB-Maleat und den VU A – E bei verschiedenen pH-Werten der mobilen Phase. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9; Mobile Phase (MP): wie beschrieben. Probe: TMB-Maleat (16357) 1 mg/ml + VU A – E je 0.01 mg/ml (1 %). Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin.

3.6.6.3. Variation des Gradienten

Es wurde untersucht, wie sich Variationen der Fließmittelzusammensetzung auswirken. Zu diesem Zweck wurde der Acetonitril-Anteil zu Beginn des Gradienten, in der Mitte und am Ende um jeweils +/- 2 % verändert.

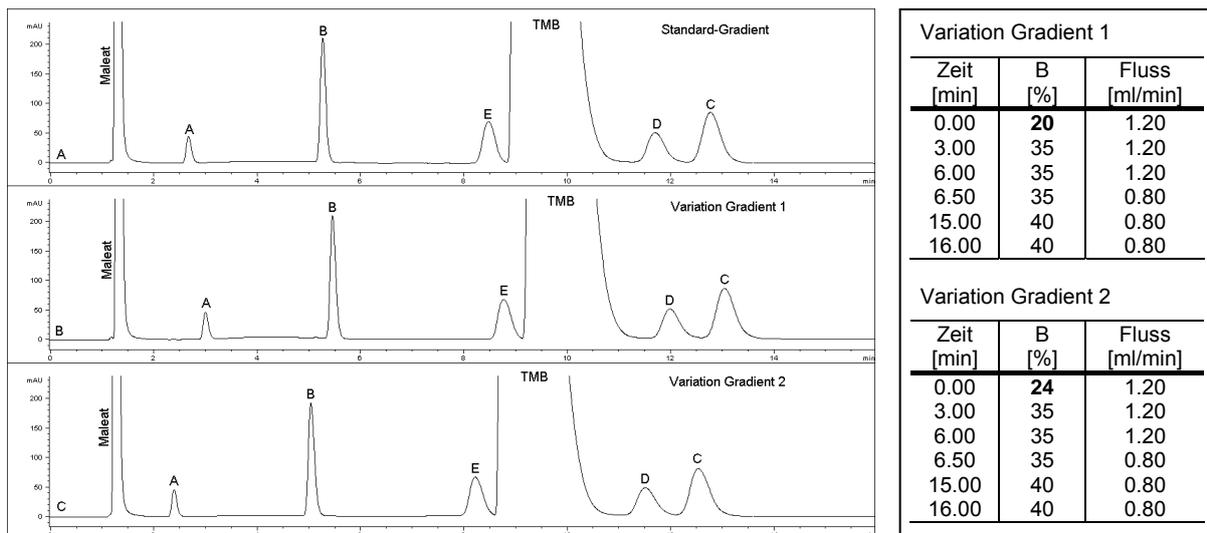


Abbildung 3-23: Trennung von TMB-Maleat und den VU A – E mit verschiedenen Gradienten. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9; Variierte Gradienten: wie beschrieben. Probe: TMB-Maleat (16357) 1 mg/ml + VU A – E je 0.01 mg/ml (1 %). Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin.

Abbildung 3-23 kann man entnehmen, dass die Zusammensetzung der mobilen Phase zu Beginn des Gradienten die Trennung kaum beeinflusste, nur die Retentionszeit von Verunreinigung A variierte mit der Acetonitril-Konzentration.

Die Acetonitril-Konzentration im mittleren Teil des Gradienten hatte hingegen einen großen Einfluss auf die Trennung von Trimebutin und den Verunreinigungen (Abbildung 3-24). Eine Erniedrigung des Acetonitril-Anteils von 35 % auf 33 % verbesserte zwar die Trennung von Verunreinigung E und Trimebutin, aber die Verunreinigungen D und C waren nicht mehr getrennt. Im Gegensatz dazu, führte eine Erhöhung des organischen Anteils zu einer schlechteren Trennung von Verunreinigung E und dem Hauptpeak, während die Auflösung zwischen den Verunreinigungen D und C stieg. Bereits während der Methodenentwicklung wurde eine bessere Trennung dieser beiden Verunreinigungen bei höherer Acetonitril-Konzentration beobachtet (Abbildung 3-7).

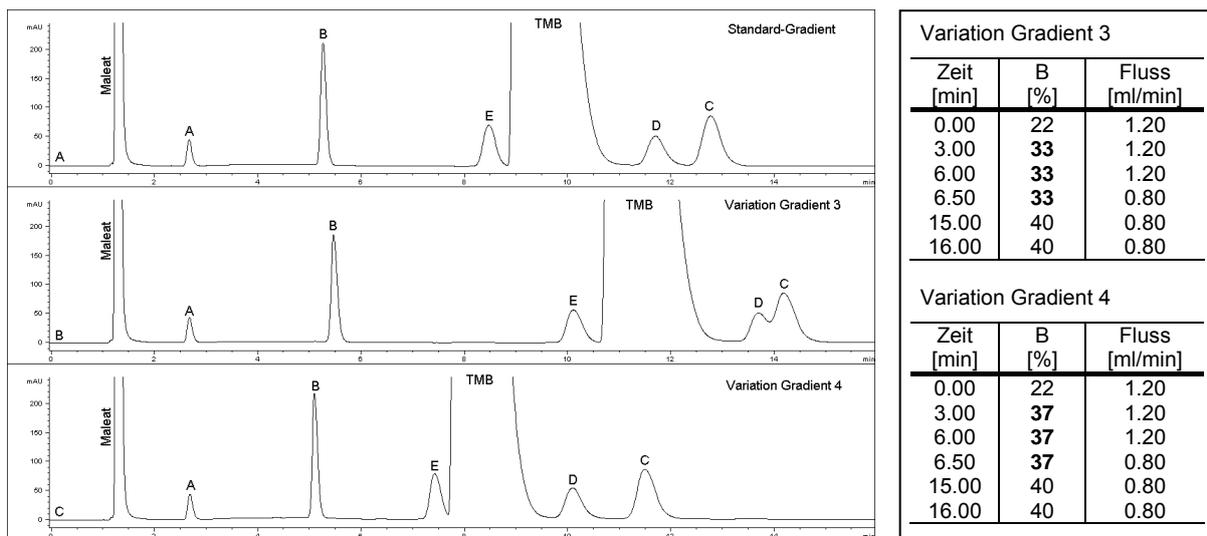


Abbildung 3-24: Trennung von TMB-Maleat und den VU A – E mit verschiedenen Gradienten. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9; Variierte Gradienten: wie beschrieben. Probe: TMB-Maleat (16357) 1 mg/ml + VU A – E je 0.01 mg/ml (1 %). Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin.

Ein höherer bzw. niedrigerer Acetonitril-Anteil am Ende des Gradienten hatte einen vernachlässigbaren Effekt auf die Trennung (Abbildung 3-25).

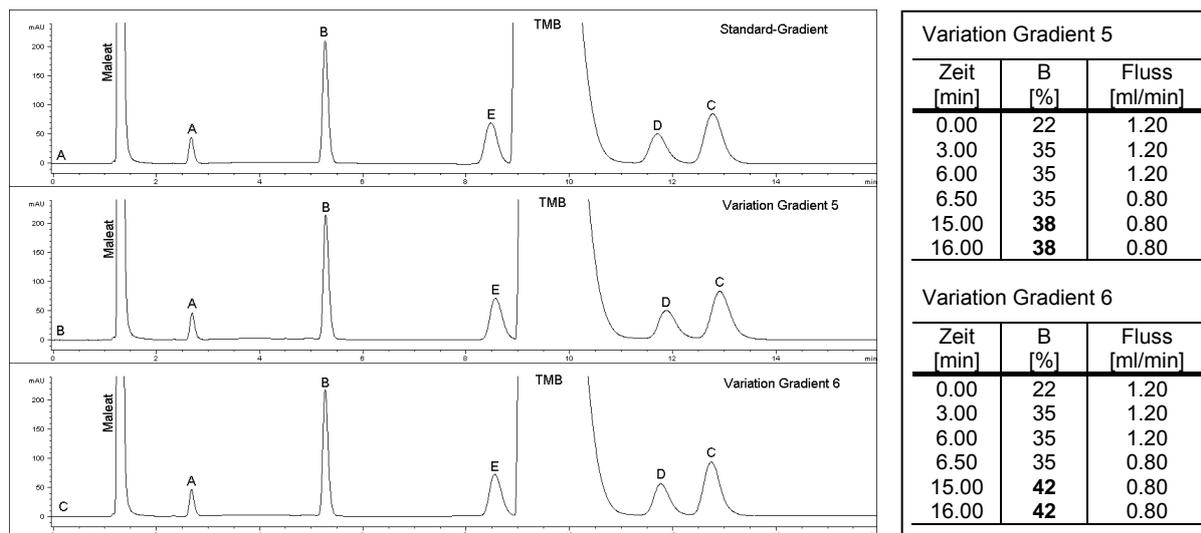


Abbildung 3-25: Trennung von TMB-Maleat und den VU A – E mit verschiedenen Gradienten. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9; Variierte Gradienten: wie beschrieben. Probe: TMB-Maleat (16357) 1 mg/ml + VU A – E je 0.01 mg/ml (1 %). Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin.

3.6.6.4. Variation des HPLC-Gerätes

Die entwickelte RP-HPLC-Methode wurde auf ein zweites HPLC-Gerät übertragen, das bis auf ein fehlendes Säulenthermostat eine dem für die Methodenentwicklung benutzten Gerät vergleichbare Ausstattung hatte. Die Raumtemperatur war < 25 °C. Alle weiteren Parameter (z. B. Säule, Puffer etc.) wurden konstant gehalten.

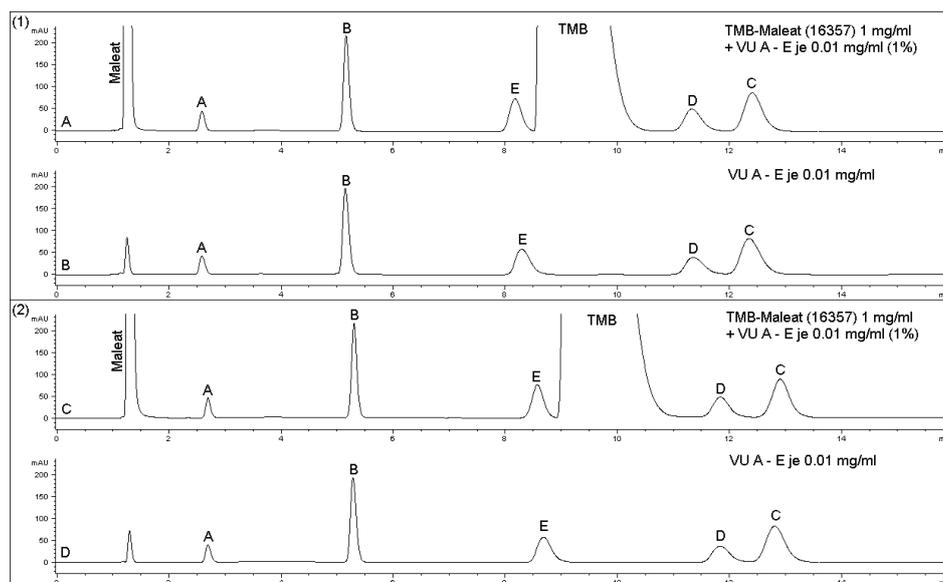


Abbildung 3-26: Trennung von TMB-Maleat und den VU A – E mit (1) einem zweiten HPLC-Gerät und (2) dem für die Methodenentwicklung verwendeten Instrument. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin.

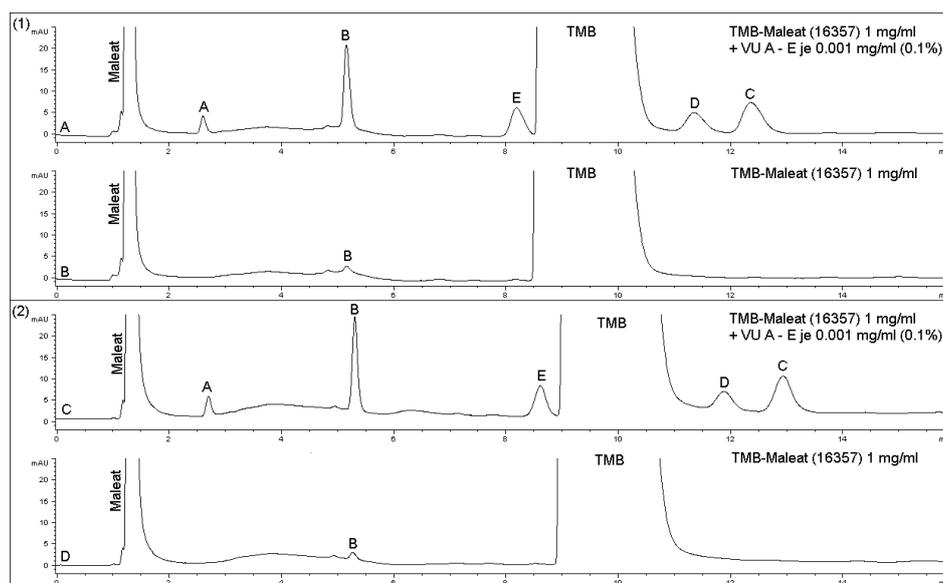


Abbildung 3-27: Trennung von TMB-Maleat und den VU A – E mit (1) einem zweiten HPLC-Gerät und (2) dem für die Methodenentwicklung verwendeten Instrument. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin.

Wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, kann die Übertragung einer Gradienten-Methode auf ein anderes HPLC-Gerät Probleme bereiten. Im vorliegenden Fall ergaben sich an beiden Geräten vergleichbare Chromatogramme (Abbildung 3-26, Abbildung 3-27). Ebenso ließen sich die Verunreinigungen mit dem zweiten Gerät auf 0.1 %-Niveau detektieren (Abbildung 3-27).

3.6.7. Systemeignung

Die Untersuchungen zur Robustheit der Methode haben gezeigt, dass kleine Schwankungen der chromatographischen Bedingungen die Auflösung zwischen Maleat und Verunreinigung A, die Auflösung zwischen den Verunreinigungen A und B sowie die Auflösung zwischen den Verunreinigungen B und E beeinflussen. Dieser Effekt ist aber ohne Bedeutung für deren Basislinientrennung. Im Gegensatz dazu stellten sich die Trennung von Verunreinigung E und dem Hauptpeak sowie die Trennung der Verunreinigungen D und C als kritische Parameter der Methode heraus. Abbildung 3-28 verdeutlicht den Einfluss der durchgeführten Variationen auf die Auflösung der Komponenten.

Die Trennleistung des chromatographischen Systems sollte durch die Analyse von Modellmischungen, die Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat 1 mg/ml versetzt mit den Verunreinigungen A bis E je 0.01 mg/ml (1 %) enthalten, überprüft werden.

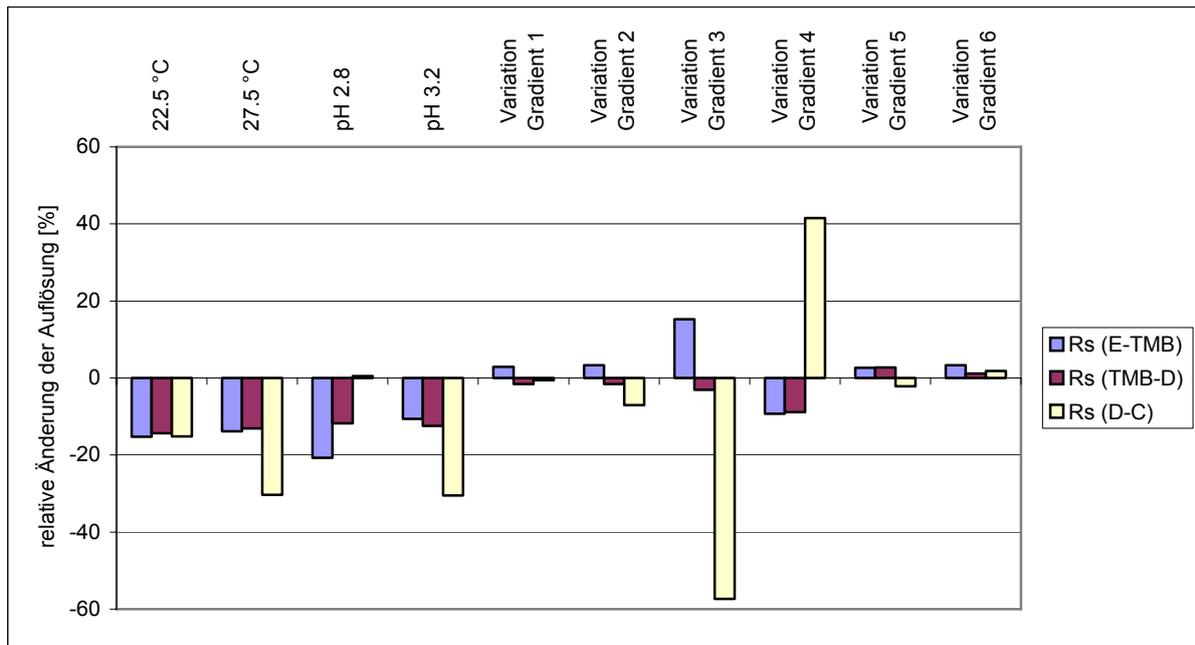


Abbildung 3-28: Relative Änderung (in %) der Auflösungen (R_s) zwischen Verunreinigung E und dem Hauptpeak, dem Hauptpeak und Verunreinigung D sowie den Verunreinigungen D und C, bezogen auf die Standard-HPLC-Bedingungen.

Als Systemeignungskriterium für die Trennung der Verunreinigungen D und C sollte eine Auflösung $R_s > 1.5$ angesetzt werden. Wegen der unterschiedlichen Peakhöhe ist die Auflösung kein geeigneter Parameter für die Trennung von Verunreinigung E und dem Hauptpeak. In diesem Fall ist die Angabe eines Peak-Tal-Verhältnisses (p/v) vorzuziehen, z. B. $p/v > 3$ für Trimebutin und $p/v > 15$ für Trimebutin-Maleat.

3.7. Untersuchung von Trimebutin- und Trimebutin-Maleat-Proben mit der RP-HPLC-Methode

Mehrere Hersteller haben Chargen ihrer Substanzen zur Verfügung gestellt, die mit der neu entwickelten Methode untersucht wurden. Eine Übersicht über die vorhandenen Chargen gibt Kapitel 9.1. Der Gehalt der Verunreinigungen in den Proben wurde mittels „Externer-Standard“-Methode quantifiziert. Von jeder Charge wurden zwei Untersuchungslösungen (1 mg/ml) hergestellt, die jeweils zweimal injiziert wurden. Jede Untersuchungslösung wurde so verdünnt, dass sich Referenzlösungen mit 0.01 mg/ml (1 %) der zu untersuchenden Substanz ergaben. Die Referenzlösungen wurden einmal injiziert.

Häufig wird im Ph. Eur. vorgeschrieben, dass die Laufzeit der Methode doppelt so lang sein soll, wie die Retentionszeit der Hauptkomponente. Die Retentionszeit von

Trimebutin beträgt ca. 10 Minuten, weshalb die Methode zunächst auf 20 Minuten verlängert wurde. Allerdings zeigte sich, dass nach 20 Minuten noch Peaks durch unbekannte Verunreinigungen detektiert wurden, so dass für die Untersuchung der Proben eine Laufzeit von 35 Minuten gewählt wurde. Nach Ende der Methode wurde die Säule für 6 Minuten (22 % Acetonitril, 1.2 ml/min) equilibriert.

Zeit [min]	Fließmittel B [%]	Fluss [ml/min]
0.0	22	1.2
3.0	35	1.2
6.0	35	1.2
6.5	35	0.8
15.0	40	0.8
35.0	40	0.8

3.7.1. Respons- und Korrekturfaktoren

Da zur Quantifizierung Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat als externer Standard verwendet wurde, mussten zunächst die Respons- und Korrekturfaktoren der bekannten Verunreinigungen bestimmt werden. Dazu wurden Lösungen, die 0.01 mg/ml Trimebutin-Maleat (Charge 16357) und 0.01 mg/ml der Verunreinigungen A, B, C, D oder E enthielten, vorbereitet. Ebenso wurden auch Lösungen mit 0.01 mg/ml Trimebutin (Charge 17167) und 0.01 mg/ml der Verunreinigungen A, B, C, D oder E hergestellt.

Tabelle 3-11 zeigt die Mittelwerte der Respons- bzw. Korrekturfaktoren von drei unabhängigen Messungen.

Tabelle 3-11: Respons- und Korrekturfaktoren für die VU A - E. Die durch Fettschrift markierten Korrekturfaktoren wurden in die Berechnung des Gehaltes der VU einbezogen.

Verunreinigung	Trimebutin		Trimebutin-Maleat	
	Responsfaktor	Korrekturfaktor	Responsfaktor	Korrekturfaktor
A	0.25	4.02	0.35	2.88
B	1.36	0.73	2.06	0.49
C	1.83	0.55	2.91	0.34
D	0.73	1.39	0.94	1.07
E	0.93	1.07	1.26	0.79

Wenn der Responsfaktor einer Verunreinigung < 0.8 oder > 1.2 ist, wird deren Peakfläche mit dem Korrekturfaktor multipliziert und dadurch korrigiert.

3.7.2. Ergebnisse der Untersuchung von Trimebutin-Proben

Es standen vier Trimebutin-Muster zur Verfügung (Abbildung 3-29).

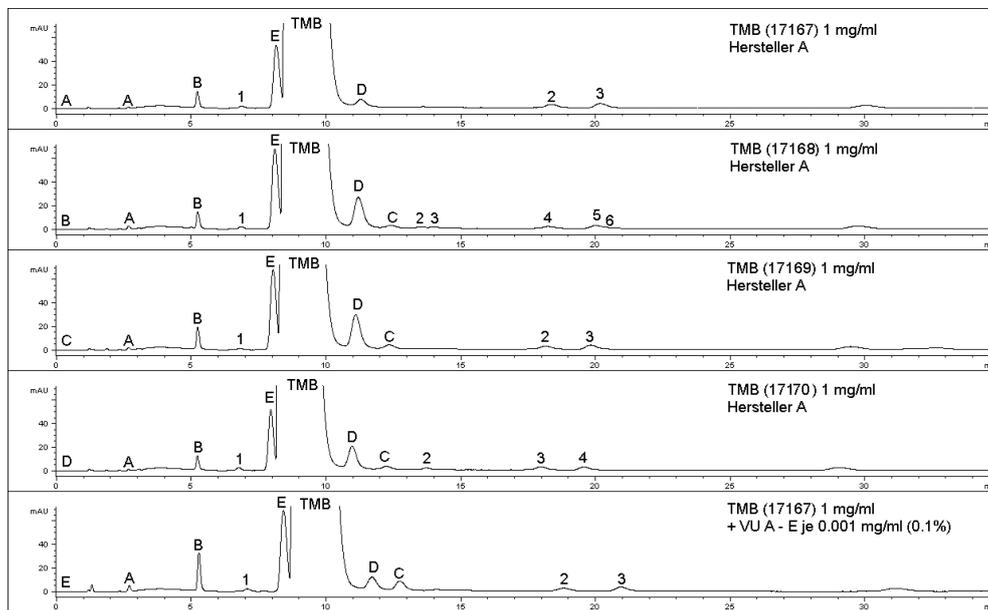


Abbildung 3-29: Untersuchung der Trimebutin-Chargen. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin; (1) – (6) unbekannte Verunreinigungen.

Die vier Chargen stammen vom selben Hersteller; dennoch fallen bei der Untersuchung Unterschiede zwischen den einzelnen Proben auf. So zeigt die Charge 17167 im Gegensatz zu den anderen Proben nur eine geringe Menge der Verunreinigung D und keine Verunreinigung C. In allen Mustern ist Verunreinigung E in hohen Konzentrationen feststellbar.

Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 3-12 zusammengestellt.

3.7.3. Ergebnisse der Untersuchung von Trimebutin-Maleat-Proben

Die sieben untersuchten Trimebutin-Maleat-Proben von drei Herstellern lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Während die Chargen der Hersteller B und C Verunreinigung E nur in Spuren enthalten, werden in den Chargen des Herstellers A größere Mengen der Verunreinigung E gefunden (Abbildung 3-30, Abbildung 3-31). Vermutlich führt die Kristallisation im Herstellungsprozess von Trimebutin-Maleat zu einer Aufreinigung des Trimebutins, denn die Trimebutin-Maleat-Proben zeigen deutlich weniger Verunreinigungen als die Trimebutin-Proben.

Die gefundenen Gehalte der Verunreinigungen in Trimebutin-Maleat zeigt Tabelle 3-12.

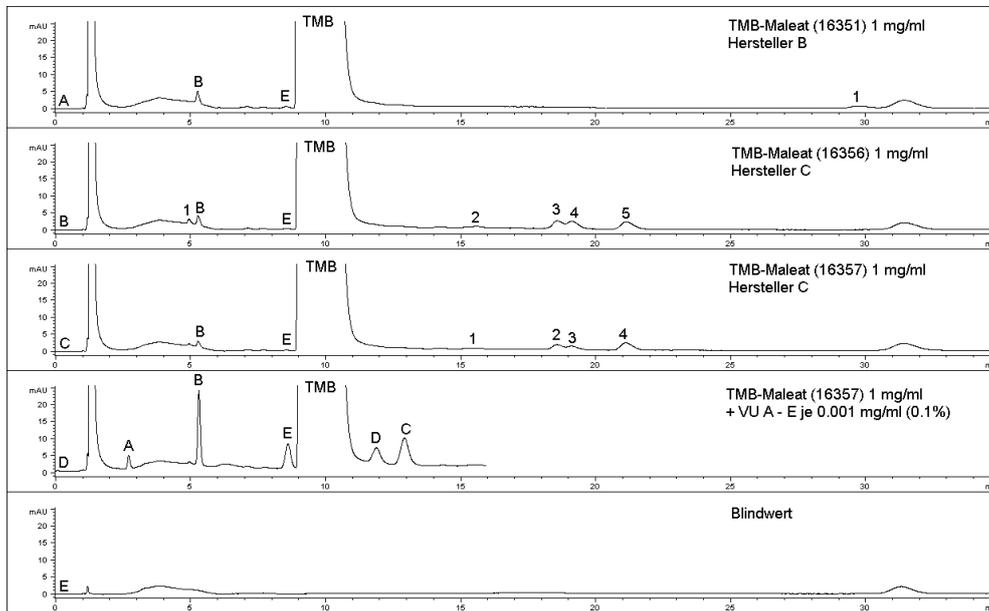


Abbildung 3-30: Untersuchung der Trimebutin-Maleat-Chargen. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin; (1) – (5) unbekannte Verunreinigungen.

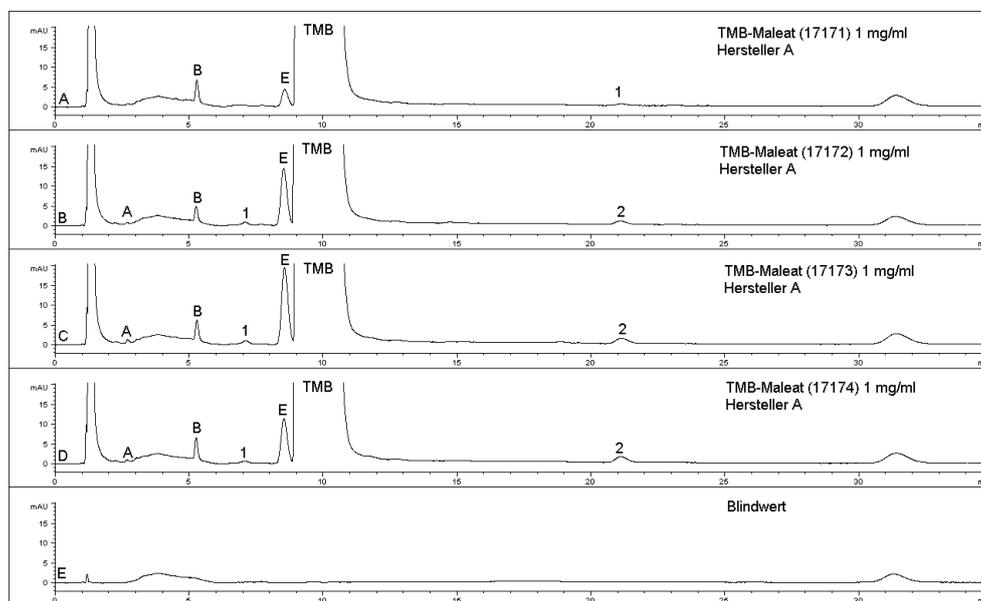


Abbildung 3-31: Untersuchung der Trimebutin-Maleat-Chargen. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 3-9. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: A – D wie in Tabelle 3-1; (E) N-Desmethyltrimebutin; (1), (2) unbekannte Verunreinigungen.

Tabelle 3-12: Ergebnisse der Quantifizierung der Verunreinigungen in TMB- bzw. TMB-Maleat-Proben mittels „Externer-Standard“-Methode und Korrekturfaktoren. Angabe des Mittelwertes (MW; in %) und der relativen Standardabweichung (RSD; in %) von vier Injektionen. In die Berechnung der Summe der Verunreinigungen wurden nur die Werte > 0.05 % (markiert) einbezogen. n. d. = nicht detektiert.

Charge	VU A		VU B		VU C		VU D		VU E		unbekannte VU		Summe		
	MW [%]	RSD [%]	MW [%]	RSD [%]	MW [%]	RSD [%]									
TMB															
17167	0.027	3.88	0.080	1.06	n. d.		0.163	4.73	0.862	1.70	1	0.024	4.75	1.296	1.44
			2				0.080		5.75						
			3				0.111		5.67						
17168	0.075	2.92	0.078	2.80	0.023	8.27	0.786	2.76	1.028	0.38	1	0.022	11.27	2.040	1.16
											2	0.017	33.95		
											3	0.016	12.29		
											4	0.041	4.77		
											5	0.074	1.81		
											6	0.021	10.01		
17169	0.056	3.13	0.104	2.56	0.040	4.61	0.843	4.09	1.012	1.19	1	0.015	5.24	2.198	2.44
											2	0.076	10.42		
											3	0.108	7.05		
17170	0.025	2.84	0.064	0.28	0.031	6.61	0.525	2.70	0.721	0.79	1	0.034	3.39	1.456	0.29
											2	0.031	2.14		
											3	0.072	12.89		
											4	0.075	5.99		
TMB-Maleat															
16351	n. d.		0.019	2.13	n. d.		n. d.		0.008	6.62	1	0.042	3.92	<0.05	
16356	n. d.		0.018	7.00	n. d.		n. d.		0.007	4.55	1	0.020	8.81	0.282	1.12
											2	0.024	7.50		
											3	0.086	2.04		
											4	0.092	3.40		
											5	0.104	1.26		
16357	n. d.		0.009	1.24	n. d.		n. d.		0.005	7.76	1	0.015	11.11	0.147	1.25
											2	0.050	2.59		
											3	0.040	3.54		
											4	0.096	2.05		
17171	n. d.		0.032	1.24	n. d.		n. d.		0.079	1.39	1	0.019	12.55	0.079	1.39
17172	0.010	9.49	0.021	1.66					0.269	1.02	1	0.016	10.01	0.269	1.02
											2	0.036	6.47		
17173	0.030	3.11	0.037	1.94	n. d.		n. d.		0.485	1.97	1	0.026	10.18	0.562	1.83
											2	0.077	3.14		
17174	0.015	7.03	0.038	1.82	n. d.		n. d.		0.263	0.86	1	0.012	8.87	0.346	2.27
											2	0.083	8.68		

3.8. Diskussion zur Erarbeitung eines Monographievorschlags

Die neu entwickelte RP-HPLC-Methode ermöglicht die Trennung von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat von seinen Verunreinigungen. Der Peak einer unbekanntes Verunreinigung konnte N-Desmethyltrimebutin, dem aktiven Hauptmetaboliten von Trimebutin, zugeordnet werden.

Die Methode wurde hinsichtlich Linearität und Präzision überprüft und lieferte zufriedenstellende Ergebnisse (Kapitel 3.6.3 und 3.6.4).

Im Vergleich zu einer ionenpaarchromatographischen Methode [180, 181] konnten die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Verunreinigungen A bis E auf < 0.05 %

gesenkt werden (Kapitel 3.6.2). Daher ist es möglich, in einer Monographie 0.05 % als Grenzwert, ab dem Peaks nicht mehr berücksichtigt werden, anzusetzen.

Die Untersuchungen zur Robustheit der Methode haben gezeigt, dass die Trennung von Verunreinigung E und dem Hauptpeak sowie die Trennung der Verunreinigungen D und C kritisch sind (Kapitel 3.6.6). Eine Auflösung $R_s > 1.5$ entspricht in etwa einer Basislinientrennung zwischen zwei Peaks und sollte als Systemeignungskriterium für die Trennung der Verunreinigungen D und C angesetzt werden. Die Trennung von Verunreinigung E und Trimebutin sollte durch die Festlegung eines Peak-Tal-Verhältnisses überprüft werden (Kapitel 3.6.7).

Einige Chargen von Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat wurden mit der RP-HPLC-Methode untersucht. Dabei zeigten die Trimebutin-Maleat-Proben im Vergleich zu den Trimebutin-Proben weniger Verunreinigungspeaks und einen geringeren Gehalt der Verunreinigungen (Tabelle 3-13).

Wenn der Responsfaktor einer Verunreinigung nicht zwischen 0.8 und 1.2 liegt, geht der Korrekturfaktor in die Berechnung des Gehaltes ein [22]. Für Verunreinigung A wurde ein sehr kleiner Responsfaktor gefunden. In diesem Fall empfiehlt die Ph.-Eur.-Kommission die Quantifizierung mit einer Referenzlösung der Verunreinigung selbst. Da die gefundenen Gehalte nicht größer als 0.1 % sind, kann zur Quantifizierung, wie für die anderen Verunreinigungen auch, die zu untersuchende Substanz als externer Standard herangezogen werden [22].

Tabelle 3-13: Übersicht des Gehaltes der Verunreinigungen in TMB- bzw. TMB-Maleat-Proben.

	Trimebutin	Trimebutin-Maleat
VU A	< 0.05 % bis 0.1 %	< 0.05 %
VU B	0.1 %	< 0.05 %
VU C	< 0.05 %	n. d.
VU D	0.2 % bis 0.8 %	n. d.
VU E	0.7 % bis 1.0 %	< 0.05 % oder 0.1 % bis 0.5 %
unbekannte VU	bis zu 2 > 0.05 %	bis zu 3 > 0.05 %
Summe	1.3 % bis 2.2 %	< 0.05 % bis 0.6 %

Die Akzeptanzkriterien, die in einer Monographie für die Limitierung der Verunreinigungen vorgeschrieben werden, orientieren sich an den Ergebnissen der Chargentestungen [22]. Dabei sollte der Grenzwert die analytische Unsicherheit der Methode berücksichtigen. Die Arbeitsgruppe Arzneimittelkontrolle/Pharmazeutische Analytik der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft hat vorgeschlagen, das Limit für eine einzelne Substanz SL nach folgender Formel festzulegen [186]:

Formel 3-1: $SL = \bar{x} + 3 \cdot \sigma$

SL: Limit für eine einzelne Substanz
 \bar{x} : Mittelwert
 σ : Standardabweichung

Der Mittelwert und die Standardabweichung sollen aus mindestens fünf Chargen aus den klinischen Phasen II und III bestimmt werden [186]. Im vorliegenden Fall lassen sich jedoch auch bei den Chargen des gleichen Herstellers starke Schwankungen der Gehalte der Verunreinigungen beobachten, woraus große Standardabweichungen resultieren. Daher wären die nach der Formel 3-1 berechneten Grenzwerte für die Verunreinigungen D und E in Trimebutin sowie Verunreinigung E in Trimebutin-Maleat sehr großzügig. Das kann dazu führen, dass Abweichungen im Herstellungsprozess nicht erkannt oder nicht verfolgt werden. In diesen Fällen könnten die Grenzwerte durch Anwendung der Formel 3-1 auf den höchsten gefundenen Gehalt einer Verunreinigung und dessen Standardabweichung abgeschätzt werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Festlegung der Spezifikationen ist die Anzahl der angegebenen Dezimalstellen des Grenzwertes. Eine Grenze $\leq 0.1 \%$ oder $\leq 0.10 \%$ kann für die Bewertung einer Substanz entscheidend sein. Im ersten Fall können alle gefundenen Werte bis 0.14% auf 0.1% abgerundet werden, während bei einer Grenze $\leq 0.10 \%$ nur eine Abrundung von Werten bis 0.104% erlaubt ist [187, 188]. Das kann insbesondere für unbekannte Verunreinigungen, die mit dem allgemeinen Grenzwert für die Identifizierung ($\leq 0.10 \%$) limitiert werden, kritisch sein, z. B. für die unbekannte Verunreinigung (3) in der Trimebutin-Charge 17167 (Tabelle 3-12).

Die bekannten Verunreinigungen in Trimebutin bzw. Trimebutin-Maleat werden entsprechend Abbildung 1-4 in spezifizierte und andere detektierbare Verunreinigungen eingeteilt. Die Verunreinigungen A, B, C und D wurden in den Trimebutin-Maleat-Proben gar nicht oder unterhalb des Berichtsgrenzwertes gefunden, so dass sie als andere bestimmbare Verunreinigungen mit einem Akzeptanzkriterium $\leq 0.10 \%$ angegeben werden. Im Fall von Verunreinigung B geht in die Berechnung des Gehaltes allerdings ein Korrekturfaktor von 0.49 ein, so dass die unkorrigierten Werte in der Nähe der 0.10% -Grenze liegen. Gleiches gilt für Verunreinigung C in den Trimebutin-Proben. Beide Verunreinigungen könnten deshalb als spezifizierte Verunreinigungen eingestuft und unter Angabe des Korrekturfaktors mit einem spezifischen Grenzwert belegt werden.

3.9. Zusammenfassung

Erste Versuche zur Entwicklung einer Reinheitsprüfung für Trimebutin und Trimebutin-Maleat auf Grundlage der Monographie zu Trimebutin-Maleat im JP waren nicht erfolgreich. Neben einer sehr langen Laufzeit der Methode waren vor allen Dingen die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Verunreinigungen A und D problematisch. Es wurde deshalb eine neue RP-HPLC-Methode unter Verwendung einer „hydrophil endcappten“ C18-Säule und Gradientenelution entwickelt, mit der die Verunreinigungen und die Hauptkomponente innerhalb von 15 Minuten getrennt werden können. Die Validierung dieser Methode hat gezeigt, dass sie für die Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ geeignet ist. Unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.8 diskutierten Aspekte wurden für Trimebutin und Trimebutin-Maleat Monographievorschläge erstellt und zur Kommentierung in Pharmeuropa veröffentlicht [189, 190]. Darin werden die in Tabelle 3-14 angegebenen Grenzwerte für die Verunreinigungen vorgeschlagen.

Tabelle 3-14: Akzeptanzkriterien für die Verunreinigungen A – E in den Monographie-Entwürfen zu Trimebutin [189] und Trimebutin-Maleat [190].

Trimebutin		Trimebutin-Maleat	
Spezifizierte VU	A, B, C, D, E	Spezifizierte VU	E
		Andere detektierbare VU	A, B, C, D
A, B, C	0.1 %	E	0.6 %
D	0.9 %	Unspezifizierte VU	0.10 %
E	1.0 %	Summe	1.0 %
Unspezifizierte VU	0.10 %	Berichtsgrenzwert	0.05 %
Summe	2.3 %		
Berichtsgrenzwert	0.05 %		

4. REINHEITSPRÜFUNG VON ADENOSIN MITTELS DC UND HPLC

4.1. Aufgabenstellung

Die Ph.-Eur.-Kommission hat die Monographie zu Adenosin [191] in das Revisionsprogramm mit dem Ziel aufgenommen, die DC-Methode zur Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ gegen eine HPLC-Methode auszutauschen.

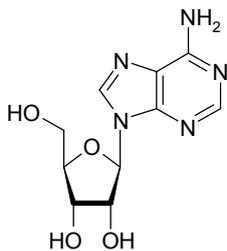


Abbildung 4-1: Strukturformel von Adenosin.

Ein Hersteller von Adenosin hat eine HPLC-Methode vorgeschlagen, die auf der Vorschrift in der Adenosin-Monographie in der USP [192] basiert. Diese Methode wurde im EDQM-Labor weiterentwickelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Anwendbarkeit der Methode für die Reinheitsanalytik von Adenosin überprüft werden. Dazu wurden drei Adenosin-Chargen analysiert. Außerdem wurde die Robustheit durch Variation der verwendeten HPLC-Säule untersucht.

Daneben sollte die DC-Methode des Ph. Eur. im Hinblick auf die Bestimmung der möglichen Verunreinigungen überprüft werden.

4.2. Herstellung von Adenosin und mögliche Verunreinigungen

Adenosin kann durch verschiedene Verfahren hergestellt werden [193, 194], u. a. Kondensation von Ribose und Adenin durch chemische oder biochemische Vorgänge. Daneben ist auch die fermentative Herstellung, hauptsächlich durch *Bacillus*-Mutanten, möglich [54]. Eine große Bedeutung hat die Hydrolyse von Hefe-Ribonucleinsäure. Bei der alkalischen Hydrolyse entstehen, nach dem in Abbildung 4-2 gezeigten Schema, Nucleosid-2'- und Nucleosid-3'-monophosphate [195].

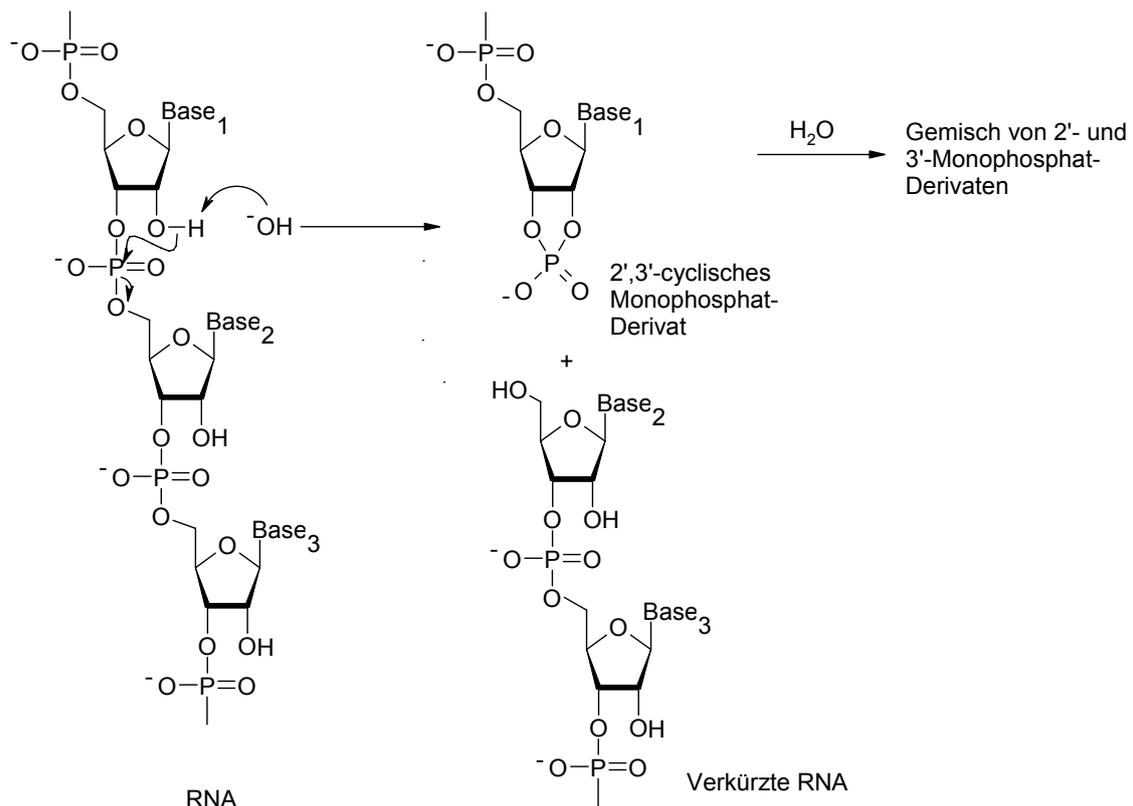


Abbildung 4-2: Hydrolyse von RNA unter alkalischen Bedingungen (aus [195]).

Die Gegenwart von Calcium- oder Bleiionen führt direkt zu einer Mischung der Nucleoside Adenosin, Cytidin, Guanosin und Uridin. Mit Hilfe chromatographischer Verfahren werden die Nucleoside getrennt, und Adenosin kann in kristalliner Form gewonnen werden [193, 194].

Zum Kreis der möglichen Verunreinigungen von Adenosin zählen somit andere Nucleoside, die bei der Hydrolyse der RNA entstehen, sowie Nucleotide. Durch Desaminierung von Adenosin entsteht Inosin als Zwischenprodukt des Nucleotid-Stoffwechsels. Inosin kommt in Fleisch, Fleischextrakt und Zuckerrüben, aber auch in Hefen frei vor. Bei der Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ wird Inosin als potenzielle Verunreinigung einbezogen.

Ribose und Adenin spielen nicht nur als Edukte einer Synthese eine Rolle, sondern auch als Hydrolyseprodukte von Adenosin, vor allen Dingen unter sauren und basischen Bedingungen. Adenosin wird zur kurzfristigen Blutdrucksenkung oder bei supraventrikulären Tachyarrhythmien ausschließlich intravenös angewendet [194]. Untersuchungen haben gezeigt, dass in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur keine Zersetzung eintritt [196]. Auch die Sterilisation von Infusionslösungen (121 °C, 20 Minuten) ist möglich [197].

4.3. Analytik von Nucleinsäure-Bausteinen

In der Literatur sind viele HPLC-Methoden zur Bestimmung von Nucleinsäure-Bausteinen beschrieben, vor allen Dingen in biologischem Material [198, 199, 200].

Nucleotide lassen sich mittels Anionen-Austausch-Chromatographie trennen. Für die Trennung von Nucleosiden und Nucleobasen eignet sich RP-HPLC. So wurden im Urin und Plasma von Krebs-Patienten und gesunden Probanden modifizierte Nucleoside als mögliche Tumormarker mittels RP-HPLC bestimmt [201].

Der Vorteil der Ionenpaar-RP-HPLC liegt in der Möglichkeit, Nucleotide, Nucleoside und Nucleobasen in einem Lauf zu analysieren [202, 203]. In dem in der RP-HPLC häufig eingesetzten pH-Bereich zwischen pH 2 und pH 8 liegen die Nucleotide ionisiert vor und werden deshalb schnell eluiert. Durch den Zusatz von Ionenpaar-reagenzien kann die Retention der Nucleotide verbessert werden. Gleichzeitig werden die nicht-ionischen Komponenten (z. B. Nucleoside und Nucleobasen) durch das Ionenpaarreagenz nicht beeinflusst [200]. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Tetrabutylammonium-Salze besser zur Trennung von Nucleotiden eignen als quartäre Ammoniumverbindungen mit kürzerer Kettenlänge der Alkylgruppen [204]. Auch die Verwendung von Triethylamin ist möglich [205, 206].

4.4. Adenosin im Arzneibuch

Eine nationale Monographie zu Adenosin findet sich im DAB 10, 1. Nachtrag 1992 [207]. Die Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ erfolgt mittels DC (Kieselgel GF₂₅₄) und einem Fließmittel aus Wasser/Ammoniak 26 %/1-Propanol im Verhältnis 10/30/60 (v/v/v) über eine Laufstrecke von 12 cm. Die Verunreinigungen werden durch den Vergleich der Nebenflecken in der Untersuchungslösung (40 mg/ml Adenosin) mit dem Adenosin-Fleck in einer Referenzlösung auf 2 % begrenzt. Entsprechend dem Kommentar zu dieser Monographie lassen sich mit dieser Prüfung Adenin und Ribose sowie Adenosinmonophosphat und Adenosintriphosphat, die aus der unvollständigen Abtrennung nach der Hydrolyse der RNA stammen können, als Verunreinigungen feststellen [208]. Die DC-Platten werden im UV-Licht bei 254 nm ausgewertet. Durch Besprühen der Platten mit alkalischer Kaliumpermanganat-Lösung kann auch die bei 254 nm nicht sichtbare Ribose nachgewiesen werden.

Im Rahmen der ANM-Prozedur wurde die DAB 10 Monographie in das Ph. Eur.

1997, 1. Nachtrag 2001 übernommen. Die DC-Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ wurde um einen Systemeignungstest ergänzt, bei dem die Trennung von Adenin und Adenosin gezeigt werden soll. Das Akzeptanzkriterium für Verunreinigungen wurde auf 1 % herabgesetzt. Weiterhin wurde die Monographie um eine Transparenzliste ergänzt, in die Adenin, Ribose, Adenosin-3'-monophosphat (3'-AMP), Adenosin-3'-diphosphat (3'-ADP) und Adenosin-3'-triphosphat (3'-ATP) aufgenommen wurden. Die Strukturformeln zeigt Abbildung 4-3.

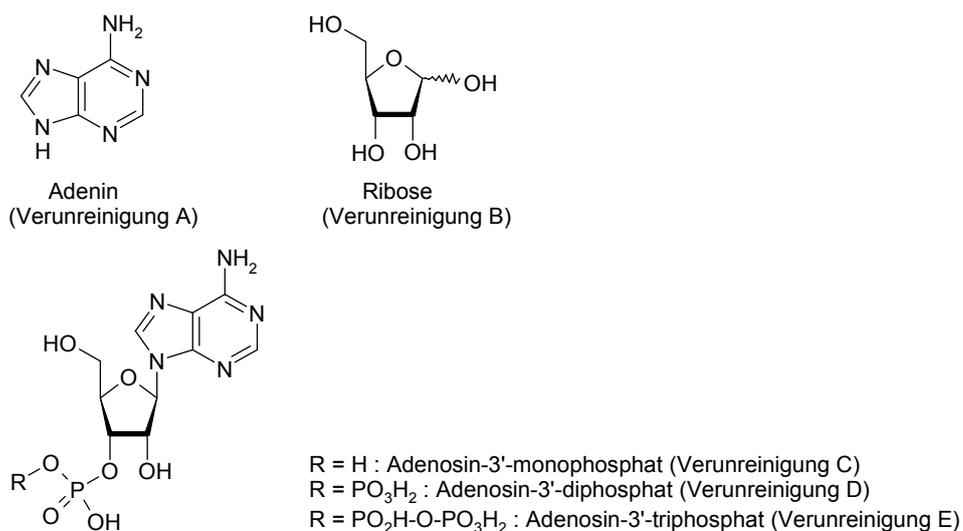


Abbildung 4-3: Strukturformeln der Verunreinigungen von Adenosin im Ph. Eur.

Diese DC-Methode ist auch im Ph. Eur. 5.0 zur Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ von Adenosin vorgeschrieben [191].

Im Gegensatz dazu erfolgt die Reinheitsprüfung nach USP 28 mittels Ionenpaar-HPLC, wobei Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAH) als Ionenpaarreagenz verwendet wird [192]. Unter isokratischen Bedingungen mit einem 100 % wässrigen Fließmittel werden die Substanzen auf einer RP18-Säule getrennt.

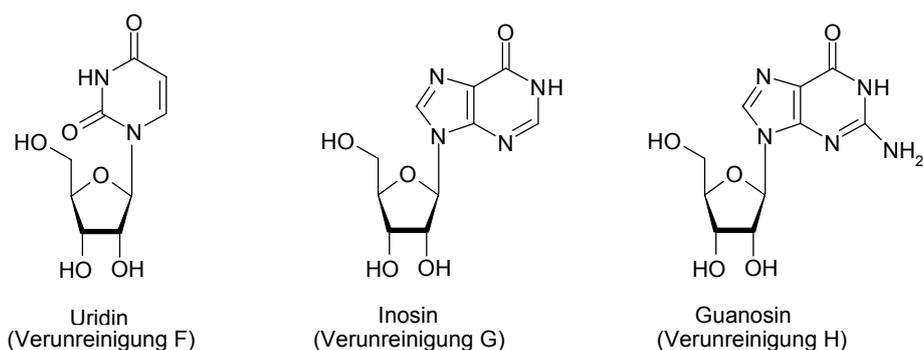


Abbildung 4-4: Strukturformeln der Verunreinigungen von Adenosin in der USP.

Die Quantifizierung erfolgt mittels Normalisierungsverfahren. Dabei werden die Nucleoside Guanosin, Inosin und Uridin (Abbildung 4-4) auf 0.1 % sowie Adenin auf 0.2 % begrenzt. Die Summe der Verunreinigungen soll ≤ 0.5 % sein.

4.5. Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels DC nach Ph. Eur.

4.5.1. Trennung der Substanzen

Mit der im Ph. Eur. vorgeschriebenen DC-Methode wird auf die Hydrolyseprodukte Adenin und Ribose sowie auf die Nebenprodukte 3'-AMP, 3'-ADP, 3'-ATP geprüft. 3'-ADP und 3'-ATP waren nicht verfügbar, so dass nur 3'-AMP in die durchgeführten Untersuchungen einbezogen wurde. Daneben wurden auch Adenosin-5'-monophosphat (5'-AMP) und Adenosin-5'-triphosphat (5'-ATP) für die Experimente verwendet. Weiterhin war das Trennverhalten der Nucleoside Inosin, Guanosin und Uridin von Interesse. Entsprechend der Vorschrift wurde zur Überprüfung des Trennsystems auf jede DC-Platte eine Lösung, die je 1 mg/ml Adenosin und Adenin enthält, aufgetragen. Das Systemeignungskriterium wurde bei allen entwickelten DC-Platten erfüllt (Abbildung 4-5).

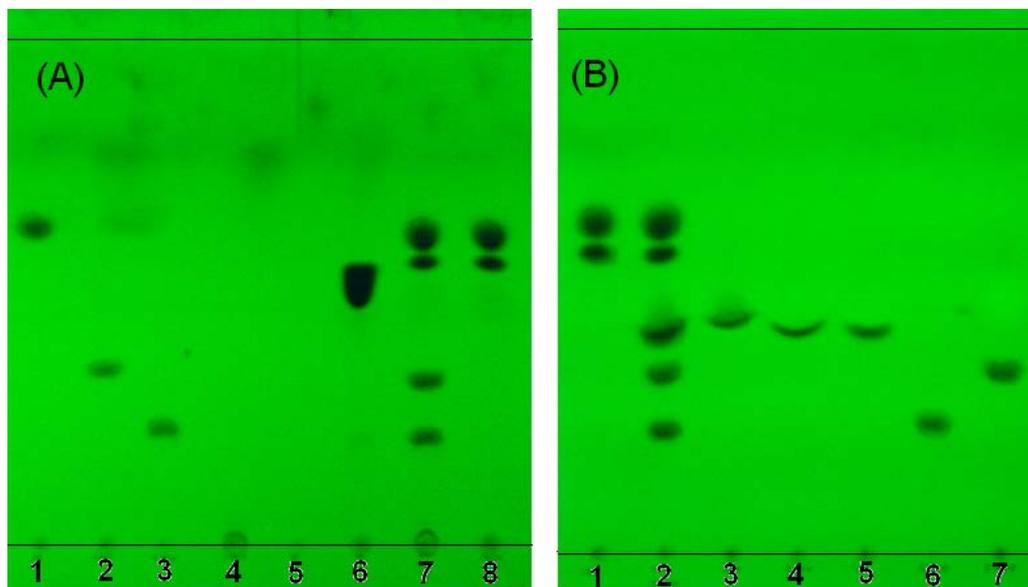


Abbildung 4-5: DC-Platten, ausgewertet bei 254 nm. DC-Bedingungen: wie in Ph. Eur. 5.0 beschrieben. Proben: **(A)**: (1) Adenin 0.4 mg/ml; (2) 3'-AMP 0.4 mg/ml; (3) 5'-AMP 0.4 mg/ml; (4) 5'-ATP 0.4 mg/ml; (5) Ribose 0.8 mg/ml; (6) Adenosin 40 mg/ml; (7) 5'-ATP, 5'-AMP, 3'-AMP, Ribose, Adenosin und Adenin je 1 mg/ml; (8) Adenin und Adenosin je 1 mg/ml; **(B)**: (1) Adenin und Adenosin je 1 mg/ml; (2) 5'-AMP, 3'-AMP, Guanosin, Inosin, Uridin, Adenosin und Adenin je 1 mg/ml; (3) Inosin 1 mg/ml; (4) Guanosin 1 mg/ml; (5) Uridin 1 mg/ml; (6) 5'-AMP 1 mg/ml; (7) 3'-AMP 1 mg/ml.

Unter den gegebenen, stark alkalischen Bedingungen liegt 5'-ATP mehrfach deprotoniert vor und zeigt keine Wanderung auf der DC-Platte. 5'-AMP und 3'-AMP sind voneinander und von Adenosin getrennt. Ribose wird erst nach Besprühen der Platte mit KMnO_4 -Lösung sichtbar und hat einen dem 3'-AMP ähnlichen R_F -Wert. Zusätzlich sind auch die Nucleoside Inosin, Guanosin und Uridin von Adenosin und den Nucleotiden abgetrennt. Allerdings sind Inosin, Guanosin und Uridin untereinander nicht getrennt. Tabelle 4-1 zeigt die gefundenen R_F -Werte.

Tabelle 4-1: R_F -Werte von Adenosin und den Verunreinigungen bestimmt mit Referenzlösungen aus (A) 5'-ATP, 5'-AMP, 3'-AMP, Ribose, Adenin und Adenosin je 1 mg/ml und (B) 5'-AMP, 3'-AMP, Guanosin, Inosin, Uridin, Adenin und Adenosin je 1 mg/ml.

A	Substanz	R_F-Wert	B	Substanz	R_F-Wert
	5'-ATP	0		-	
	5'-AMP	0.21		5'-AMP	0.24
	3'-AMP	0.32		3'-AMP	0.35
	Ribose	0.33		-	
	-			Guanosin, Inosin, Uridin	0.42
	Adenosin	0.56		Adenosin	0.57
	Adenin	0.63		Adenin	0.64

4.5.2. Nachweisgrenze

Beim Einsatz der DC zur Reinheitsprüfung wird vorgeschrieben, dass die Konzentration der Substanzen, die der Spezifikationsgrenze entspricht, als Fleck detektierbar sein muss [22]. Die Nachweisgrenze für Adenosin, Adenin, Ribose sowie 3'-AMP und 5'-AMP wurde bestimmt. Dazu wurden Lösungen mit absteigender Konzentration jeder einzelnen Komponente auf die DC-Platte aufgetragen. Die nach der Entwicklung der Platten erhaltenen Chromatogramme wurden visuell ausgewertet, wobei die Konzentration, bei der der Analyt noch eindeutig detektierbar war, als Nachweisgrenze festgesetzt wurde.

Für Adenosin, Adenin und 3'-AMP wurde 0.02 mg/ml (0.05 %, bezogen auf die Untersuchungslösung, die 40 mg/ml Adenosin enthält) und für 5'-AMP 0.04 mg/ml (0.1 %) als kleinste detektierbare Konzentration gefunden. Die Nachweisgrenze für Ribose wurde nach Besprühen mit KMnO_4 -Lösung bestimmt und auf 0.4 mg/ml (1 %) abgeschätzt. Da die Monographie eine Begrenzung der Verunreinigungen auf 1 % vorschreibt, entspricht das für Ribose gefundene LOD noch gerade den Anforderungen des „Technical Guide for the Elaboration of Monographs“ [22].

4.5.3. Untersuchung von Adenosin-Proben

Drei Adenosin-Chargen wurden mit der im Ph. Eur. vorgeschriebenen DC-Methode auf Reinheit untersucht.

Aus jeder Charge wurde eine Untersuchungslösung hergestellt, die 40 mg/ml Adenosin enthält. Die Limitierung der Verunreinigungen erfolgte über eine Referenzlösung mit 0.4 mg/ml der zu untersuchenden Substanz, die durch Verdünnung aus der Untersuchungslösung hergestellt wurde.

Bei 254 nm konnte in den Chromatogrammen der Untersuchungslösungen kein Fleck, der größer als der Fleck im Chromatogramm der Referenzlösungen war, festgestellt werden, d. h. es gab keine Verunreinigung > 1 % in den analysierten Proben. Jedoch ließ sich in allen Chargen ein schwacher Fleck auf der Höhe von 5'-AMP beobachten.

Das Besprühen der Platte mit KMnO_4 -Lösung ergab keinen Hinweis auf die Anwesenheit von Ribose in den untersuchten Adenosin-Chargen.

4.6. Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels HPLC

Die für die Adenosin-Monographie im Ph. Eur. vorgeschlagene HPLC-Methode basiert auf der ionenpaarchromatographischen Methode, die in der USP zur Reinheitsprüfung von Adenosin vorgeschrieben ist [192]. Die mobile Phase besteht aus einer Mischung aus Sulfatpuffer (50 mM Kaliumhydrogensulfat, 10 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, eingestellt mit einer 2 M Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 6.5) und einer 0.01 % Natriumazid-Lösung im Verhältnis 60/40 (v/v). Die Nucleoside Adenosin, Guanosin, Inosin und Uridin sowie Adenin werden bei einem Fluss von 1.5 ml/min mit einer RP18-Säule (250 x 4.6 mm, 5 μm) getrennt. Zur Prüfung der Systemeignung dient eine Lösung, die je 0.2 mg/ml Adenosin und Inosin enthält. Ein Symmetriefaktor ≤ 2.5 , eine Auflösung zwischen den beiden Peaks ≥ 9.0 und eine relative Standardabweichung ≤ 2.0 % für wiederholte Injektionen werden in der USP als Kriterien für die Eignung des Trennsystems angesetzt.

Untersuchungen im EDQM-Labor haben gezeigt, dass die Peaksymmetrie von Adenin sowie die Trennung von Adenin und Inosin kritische Parameter der Methode sind. Deshalb wurde eine Auflösung > 1.5 zwischen den Peaks durch Adenin und Inosin als Systemeignungskriterium vorgeschlagen [209].

4.6.1. Einfluss der stationären Phase auf die Trennung

Die Trennung von Analyten in der Ionenpaarchromatographie wird durch viele Faktoren beeinflusst, u. a. durch die Wahl des Ionenpaarreagenzes, durch die Wahl und Konzentration des organischen Lösungsmittels sowie durch den pH-Wert und die Ionenstärke der mobilen Phase [70].

Vor dem Hintergrund des großen Angebots an HPLC-Säulen ist gerade für eine offizielle Methode der Einfluss der stationären Phase auf die Trennung interessant. So ist bekannt, dass die Auflösung in der Ionenpaarchromatographie vom „Endcapping“ der stationären Phase abhängig sein kann [198]. Im Fall der für die Reinheitsprüfung von Adenosin vorgeschlagenen Methode muss noch ein zusätzlicher Faktor betrachtet werden: Die mobile Phase wird ohne den Zusatz eines organischen Lösungsmittels hergestellt. Im Allgemeinen werden bei RP-Phasen zur Vermeidung des sogenannten „Phasenkollapses“ mobile Phasen mit mindestens 5 % organischem Anteil verwendet (Kapitel 2.2.2). Durch verschiedene Modifikationen, z. B. „hydrophiles Endcapping“ oder Einbettung polarer Gruppen in die Kohlenstoffkette („polar embedded“ Phasen), kann eine H₂O-Beständigkeit erzielt werden. Jedoch sind in der Monographie in der USP keine Angaben zur Verwendung einer derartigen Säule enthalten.

Beim EDQM wurden verschiedene Säulen auf ihre Eignung für die vorgeschlagene Methode untersucht [210]. Dazu zählen folgende Säulen: YMC-Pack-ODS-AQ, Uptisphere-5-HDO, Symmetry-C18, Hypersil-ODS. Tabelle 4-2 gibt eine Übersicht über die Charakteristika der einzelnen Säulen. Eine gute Trennung der verwandten Substanzen und Adenosin wurde mit der Uptisphere-5-HDO-, der Symmetry-C18- und der Hypersil-ODS-Säule erzielt [210].

Tabelle 4-2: Charakteristika der HPLC-Säulen (250 x 4.6 mm, 5 µm). (?) nicht bekannt.

Stationäre Phase	Porengröße [Å]	Oberfläche [m ² /g]	Kohlenstoffbeladung [%]	„Endcapped“	Hochreines Kieselgel	Wasserbeständigkeit
Hypersil Gold	175	220	10	+	+	+
Hypersil ODS	120	170	10	+	-	-
Symmetry C18	100	335	19	+	+	-
Uptisphere 5 HDO	120	320	17	?	?	+
YMC-Pack ODS-AQ	120	300	14	+	+	+

4.6.1.1. Hypersil-Gold-Säule

Zusätzlich zu den beim EDQM verwendeten stationären Phasen wurde die Anwendbarkeit einer Hypersil-Gold-Säule für die Reinheitsanalytik von Adenosin überprüft. Diese Säule wurde ausgewählt, weil sie nach Herstellerangaben wasserbeständig ist. Ebenso wie die Symmetry-C18-Säule wird die Säule aus hochreinem Kieselgel hergestellt und zeigt eine geringe Restsilanolaktivität. Der Hersteller empfiehlt die Hypersil-Gold-Säule als Ersatz für eine Symmetry-C18-Säule. Letztere zeigte bei den Untersuchungen durch das EDQM gute Trenneigenschaften (Abbildung 4-6).

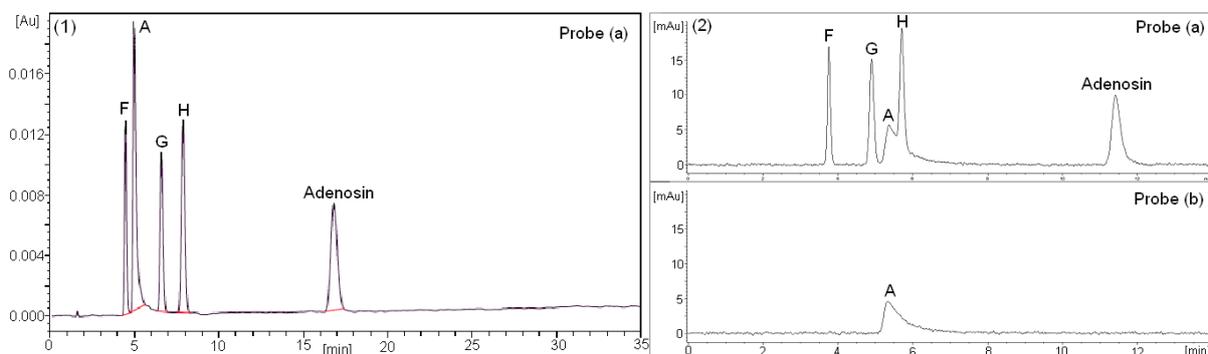


Abbildung 4-6: Trennung der Substanzen mit einer (1) Symmetry-C18-Säule und (2) Hypersil-Gold-Säule (250 x 4.6 mm, 5 µm). HPLC-Bedingungen: Mobile Phase: Sulfatpuffer (50 mM Kaliumhydrogensulfat, 10 mM TBAH, pH 6.5) und 0.01 % Natriumazid-Lösung im Verhältnis 60/40 (v/v); Fluss: 1.5 ml/min; Temperatur: 27 °C; Injektion: 20 µl; Detektion: 254 nm. Proben: (a) Adenin, Adenosin, Guanosin, Inosin, Uridin je 0.004 mg/ml; (b) Adenin 0.004 mg/ml. Peakzuordnung: (A) Adenin; (F) Uridin; (G) Inosin; (H) Guanosin.

Im Vergleich dazu konnten mit der Hypersil-Gold-Säule keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 4-6). Der Adenin-Peak zeigte ein starkes Tailing und Inosin, Adenin und Guanosin waren schlecht getrennt. Weiterhin kehrte sich im Vergleich zu allen anderen untersuchten Säulen die Elutionsreihenfolge von Inosin und Adenin um. Dennoch wurden die Systemeignungskriterien nach USP erfüllt (Tabelle 4-3). Das belegt, dass diese Kriterien nicht ausreichend sind, um die Trennung der verwandten Substanzen und Adenosin zu gewährleisten.

In den Monographievorschlag für das Ph. Eur. wurde deshalb eine Auflösung > 1.5 zwischen Adenin und Inosin aufgenommen. Dieser Parameter konnte von der Hypersil-Gold-Säule nicht erreicht werden (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-3: Systemeignungskriterien nach USP-Monographie [192], bestimmt mit einer Lösung aus Inosin und Adenosin je 0.2 mg/ml; Säule: Hypersil Gold (250 x 4.6 mm, 5 µm).

Systemeignungskriterium	Vorgabe USP-Monographie	ermittelter Wert
Auflösung zwischen Inosin und Adenosin	≥ 9.0	> 14
relative Standardabweichung von 6 aufeinander folgenden Injektionen	$\leq 2.0 \%$	Inosin: 0.1 % Adenosin: 0.3 %
Symmetriefaktor	≤ 2.5	Inosin: ~ 0.8 Adenosin: ~ 1.0

Tabelle 4-4: Retentionszeiten (RT), relative Retentionen (rel. RT) und Auflösungen (R_s) von Adenosin und den Verunreinigungen, bestimmt mit einer Lösung aus Adenin, Adenosin, Guanosin, Inosin und Uridin je 0.004 mg/ml; Säule: Hypersil Gold (250 x 4.6 mm, 5 µm).

	Uridin	Inosin	Adenin	Guanosin	Adenosin
RT [min]	3.88	5.22	5.68	6.07	12.48
rel. RT	0.31	0.42	0.46	0.49	1.00
R_s		7.33	1.11	0.91	17.38

Entsprechend dem allgemeinen Kapitel 2.2.46 „Chromatographische Trennmethode“ im Ph. Eur. sind verschiedene Variationen erlaubt, um die Anforderungen an die Systemeignung zu erfüllen [61]. In manchen Fällen kann durch die Veränderung der Säulentemperatur eine Selektivitätsänderung erzielt werden [211, 212].

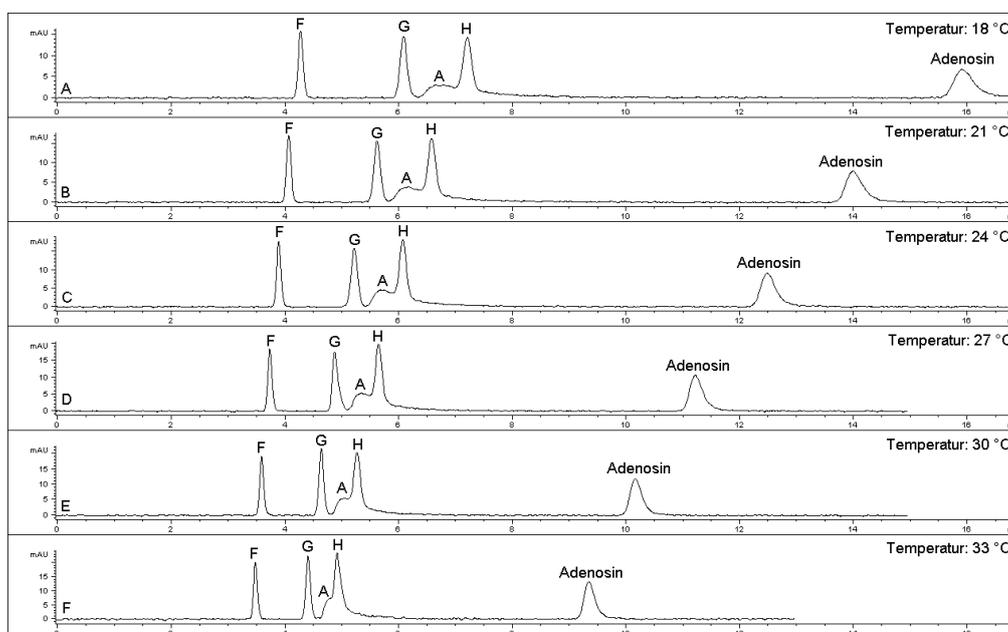


Abbildung 4-7: Trennung einer Modellmischung aus Adenin, Adenosin, Guanosin, Inosin und Uridin je 0.004 mg/ml bei verschiedenen Temperaturen. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 4-6; Säule: Hypersil Gold (250 x 4.6 mm, 5 µm); Temperatur: wie beschrieben. Peakzuordnung: wie in Abbildung 4-6.

Deshalb wurde die Trennung einer Modellmischung aus je 0.004 mg/ml Adenin, Adenosin, Guanosen, Inosin und Uridin in einem Temperaturbereich zwischen 18 °C und 33 °C untersucht (Abbildung 4-7). Mit steigender Temperatur verkürzte sich vor allen Dingen die Retentionszeit von Adenosin. Die Trennung von Inosin und Adenin zeigte keine Temperaturabhängigkeit, wohingegen sich die Trennung zwischen Adenin und Guanosen mit steigender Temperatur verschlechterte.

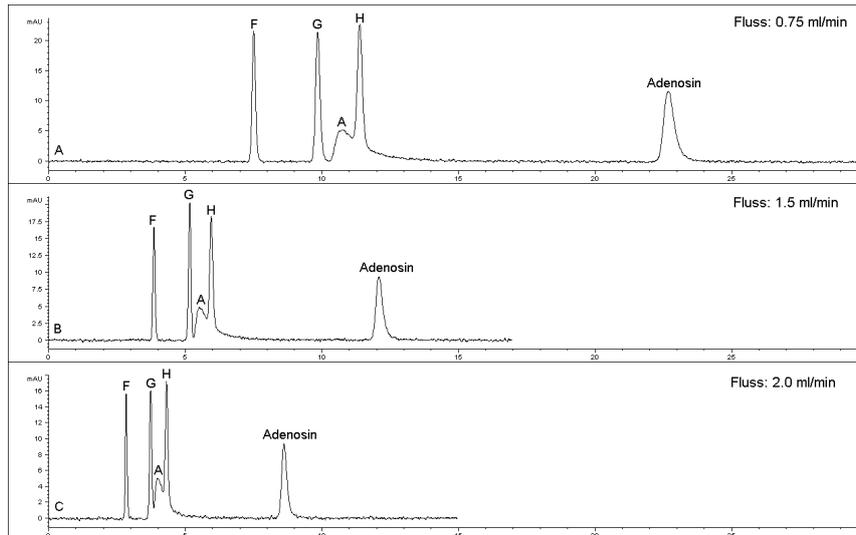


Abbildung 4-8: Trennung einer Modellmischung aus Adenin, Adenosin, Guanosen, Inosin und Uridin je 0.004 mg/ml bei verschiedenen Flussraten. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 4-6; Säule: Hypersil Gold (250 x 4.6 mm, 5 µm); Fluss: wie beschrieben. Peakzuordnung: wie in Abbildung 4-6.

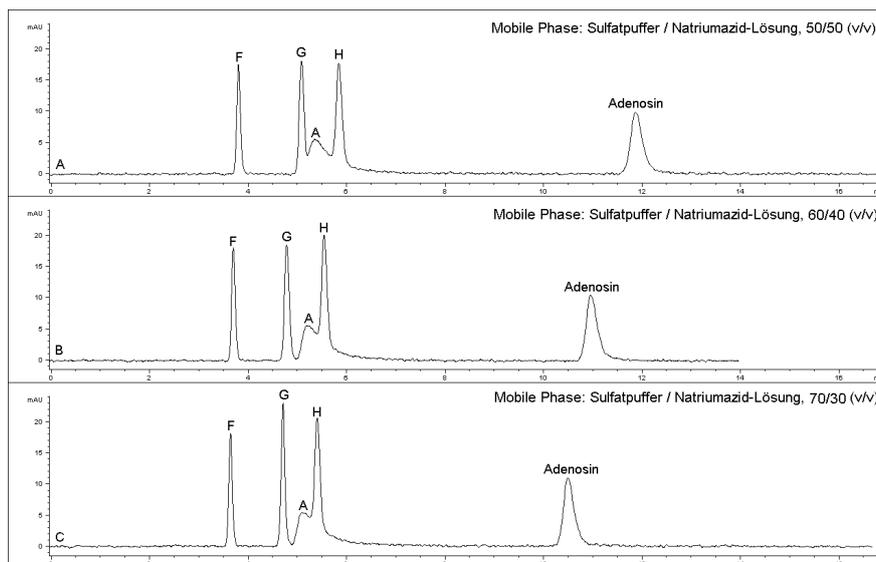


Abbildung 4-9: Trennung einer Modellmischung aus Adenin, Adenosin, Guanosen, Inosin und Uridin je 0.004 mg/ml bei unterschiedlicher Zusammensetzung der mobilen Phase. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 4-6; Säule: Hypersil Gold (250 x 4.6 mm, 5 µm); Mobile Phase: wie beschrieben. Peakzuordnung: wie in Abbildung 4-6.

Weiterhin wurde der Fluss der mobilen Phase variiert. Eine Änderung der Flussrate auf 0.75 ml/min bzw. 2.0 ml/min verbesserte die Trennung allerdings nicht (Abbildung 4-8). Ebenso zeigte eine Variation der Fließmittelzusammensetzung keinen Effekt auf die Trennung der Verunreinigungen (Abbildung 4-9).

Die Hypersil-Gold-Säule stellte sich somit als nicht geeignet für die Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mit der vorgeschlagenen HPLC-Methode heraus.

4.6.1.2. Hypersil-ODS-Säule

Verglichen mit der Symmetry-C18-Säule zeigt die Hypersil-ODS-Säule eine hohe Polarität durch eine hohe Restsilanolaktivität. Bei der Klassifizierung der Säulen durch ein von Hoogmartens *et al.* entwickeltes Programm [213] wird deutlich, dass die beiden Säulen sehr unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Dennoch wurde eine ähnliche Trennung von Adenosin und den Verunreinigungen gefunden [210]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche konnten die Eignung einer Hypersil-ODS-Säule für die Reinheitsanalytik von Adenosin bestätigen (Abbildung 4-10). Retentionszeiten und Auflösungen zeigt Tabelle 4-5.

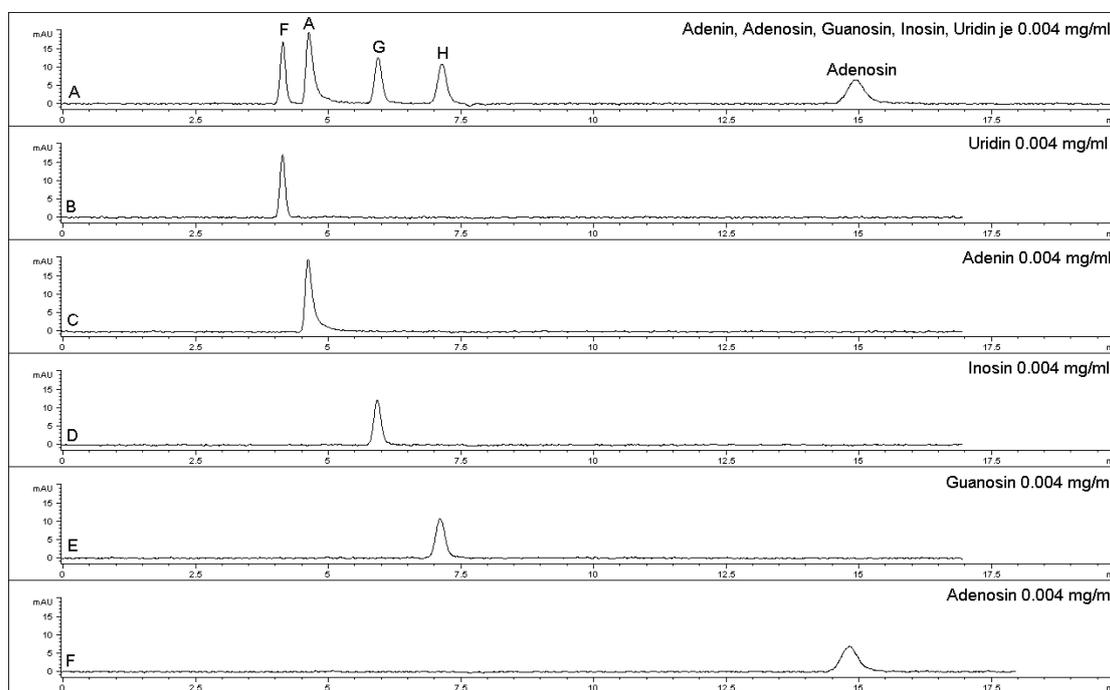


Abbildung 4-10: Trennung von Adenosin und den Verunreinigungen mit einer Hypersil-ODS-Säule (250 x 4.6 mm, 5 µm). HPLC-Bedingungen: Mobile Phase: Sulfatpuffer (50 mM Kaliumhydrogensulfat, 10 mM TBAH, pH 6.5) und 0.01 % Natriumazid-Lösung im Verhältnis 60/40 (v/v); Fluss: 1.5 ml/min; Temperatur: 24 °C; Injektion: 20 µl; Detektion: 254 nm. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: (A) Adenin; (F) Uridin; (G) Inosin; (H) Guanosin.

Tabelle 4-5: Retentionszeiten (RT), relative Retentionen (rel. RT) und Auflösungen (R_s) von Adenosin und den Verunreinigungen, bestimmt mit einer Lösung aus Adenin, Adenosin, Guanosin, Inosin und Uridin je 0.004 mg/ml; Säule: Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5 μ m).

	Uridin	Adenin	Inosin	Guanosin	Adenosin
RT [min]	4.14	4.62	5.93	7.14	14.94
rel. RT	0.28	0.31	0.40	0.48	1.00
R_s		2.28	5.18	4.27	17.51

Zusätzlich zu den Anforderungen des USP (Tabelle 4-6) wurde auch eine Auflösung > 1.5 zwischen Adenin und Inosin erreicht (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-6: Systemeignungskriterien nach USP-Monographie [192], bestimmt mit einer Lösung aus Inosin und Adenosin je 0.2 mg/ml; Säule: Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5 μ m).

Systemeignungskriterium	Vorgabe USP-Monographie	ermittelter Wert
Auflösung zwischen Inosin und Adenosin	≥ 9.0	> 20
relative Standardabweichung von 6 aufeinander folgenden Injektionen	$\leq 2.0 \%$	Inosin: 0.1 % Adenosin: 0.2 %
Symmetriefaktor	≤ 2.5	Inosin: ~ 1.0 Adenosin: ~ 1.0

Die Hypersil-ODS-Säule ist nach Herstellerangaben ausdrücklich nicht für 100 % wässrige mobile Phasen geeignet. Überraschenderweise ließ sich während der Messungen keine Verschlechterung der Trennleistung, die durch einen Phasenkollaps ausgelöst werden könnte, beobachten, auch nicht nach 14 Stunden (Abbildung 4-11). Ebenso zeigte die Säule bei den Untersuchungen im EDQM-Labor eine gute Beständigkeit gegenüber den gegebenen Bedingungen.

Das Phänomen des „Phasenkollapses“ wird auf Probleme bei der Benetzbarkeit der stationären Phase zurückgeführt (Kapitel 2.2.2). Es hat sich gezeigt, dass eine hohe Anzahl Restsilanolgruppen, wie sie z. B. bei der Hypersil-ODS-Säule vorliegt, für reproduzierbare Trennungen in wässrigem Milieu günstig ist [72, 73]. Daneben kann das zugesetzte Ionenpaarreagenz zwei Effekte bewirken [72]: Zum einen wird die Oberflächenspannung der mobilen Phase erniedrigt; zum anderen führt die mögliche Wechselwirkung des Ionenpaarreagenzes mit der stationären Phase dazu, dass deren Hydrophilie erhöht wird. Als Konsequenz bleiben die Poren des Kieselgels besser benetzbar. Dennoch wurde bei den durchgeführten Messungen darauf geachtet, dass die Säule am Ende eines Messtages bzw. einer Messreihe ausreichend mit Wasser/Acetonitril-Mischungen gespült wurde, um einem Phasenkollaps vorzubeugen.

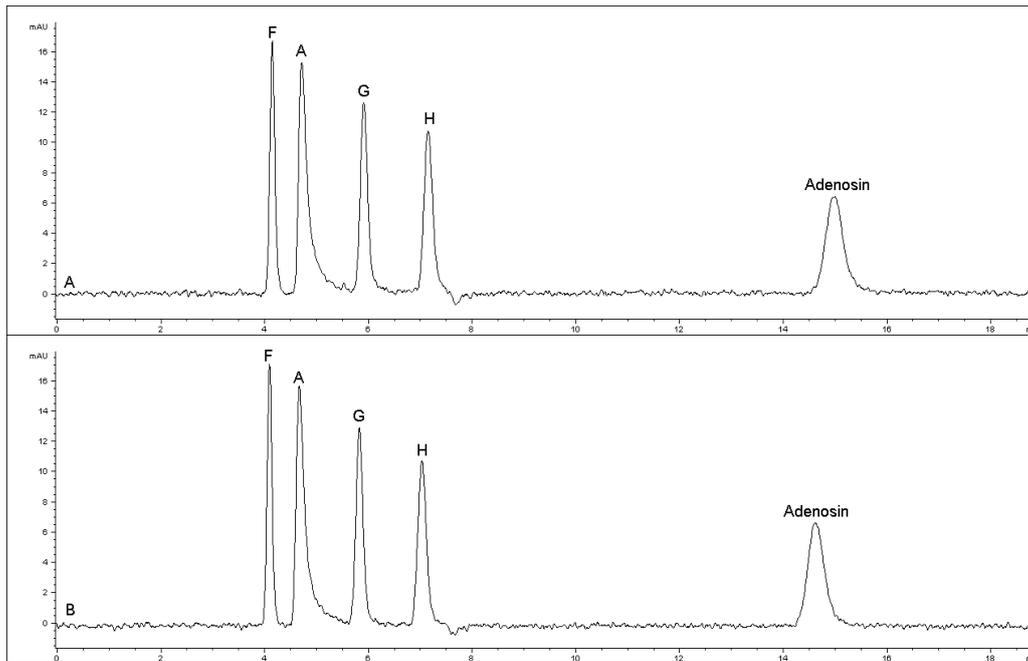


Abbildung 4-11: Systemeignung der Hypersil-ODS-Säule (A) zu Beginn der Messreihe und (B) am Ende der Messreihe nach 14 Stunden. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 4-10. Probe: Adenin, Adenosin, Guanosin, Inosin und Uridin je 0.004 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 4-10.

Auch für die Verwendung der Hypersil-ODS-Säule wurde der Einfluss der Temperatur auf die Trennung untersucht (Abbildung 4-12).

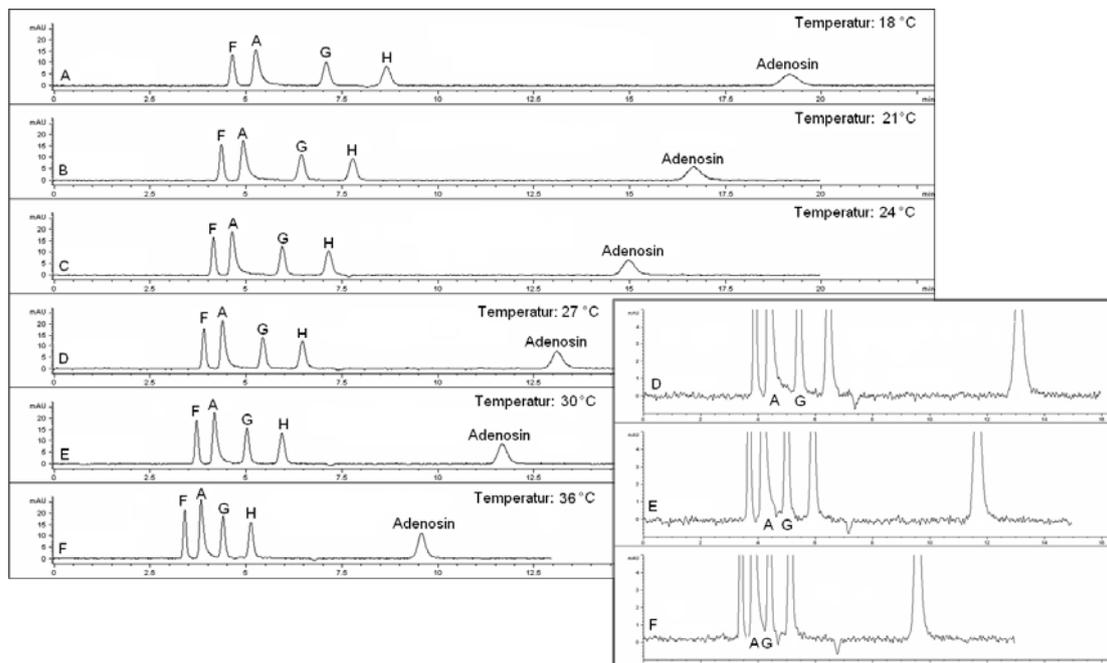


Abbildung 4-12: Trennung einer Modellmischung aus Adenin, Adenosin, Guanosin, Inosin und Uridin je 0.004 mg/ml bei verschiedenen Temperaturen. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 4-10; Temperatur: wie beschrieben. Peakzuordnung: wie in Abbildung 4-10.

Die Temperatur wurde in einem Bereich zwischen 18 °C und 36 °C variiert. Eine Temperaturerhöhung führte zu schärferen Peaks durch kürzere Retentionszeiten. Ab 30 °C waren Adenin und Inosin nicht mehr basisliniengetrennt, so dass eine Kontrolle der Temperatur < 30 °C sinnvoll erscheint.

4.6.2. Untersuchung von Adenosin-Proben

Drei Adenosin-Chargen wurden mit der vorgeschlagenen HPLC-Methode untersucht. Dazu wurden von jeder Charge drei Untersuchungslösungen (1 mg/ml Adenosin) und zwei Referenzlösungen (0.01 mg/ml Adenosin) hergestellt und je zweimal injiziert. Für die Zuordnung von Peaks zu den möglichen Verunreinigungen Adenin, Guanosin, Inosin und Uridin wurde eine Lösung, die 1 mg/ml Adenosin und je 0.001 mg/ml (0.1 %) der Verunreinigungen enthält, verwendet. Vor Beginn der Messungen und am Ende der Messreihe wurde durch die Injektion einer Modellmischung aus je 0.004 mg/ml aller Substanzen die Systemeignung überprüft. Zur Quantifizierung wurde das Normalisierungsverfahren (Kapitel 2.2.6), das in der USP-Monographie vorgesehen ist, und die „Externer-Standard“-Methode mit einer Referenzlösung, die 1 % der zu untersuchenden Substanz enthält, verglichen.

4.6.2.1. Respons- und Korrekturfaktoren

Zunächst wurden die Respons- und Korrekturfaktoren der Verunreinigungen mit Lösungen, die 0.01 mg/ml Adenosin (Charge 21934) und 0.01 mg/ml Adenin, Guanosin, Inosin oder Uridin enthalten, bestimmt. Für jede Verunreinigung wurden zwei Lösungen hergestellt, die je zweimal injiziert wurden. Tabelle 4-7 zeigt die gefundenen Mittelwerte der Respons- und Korrekturfaktoren. Die zum Vergleich aufgeführten Werte vom EDQM wurden mit Lösungen, die 0.2 mg/ml Adenosin und 0.2 mg/ml einer Verunreinigung enthalten, unter Verwendung einer Uptisphere-5-HDO-Säule ermittelt.

Tabelle 4-7: Respons- und Korrekturfaktoren für die Verunreinigungen A, F, G, H. Zum Vergleich sind die vom EDQM bestimmten Korrekturfaktoren angegeben.

Verunreinigung	Korrekturfaktor (EDQM)	Responsfaktor	Korrekturfaktor
A Adenin	0.6	1.7	0.6
F Uridin	1.4	0.8	1.2
G Inosin	1.4	0.9	1.1
H Guanosin	1.2	1.0	1.0

4.6.2.2. Ergebnisse der Untersuchung von Adenosin-Proben

Bei der Untersuchung der drei Adenosin-Chargen mit der vorgeschlagenen HPLC-Methode wurde in allen Chargen eine Verunreinigung detektiert, die weder Adenin noch Guanosen, Inosin oder Uridin zugeordnet werden konnte (Abbildung 4-13).

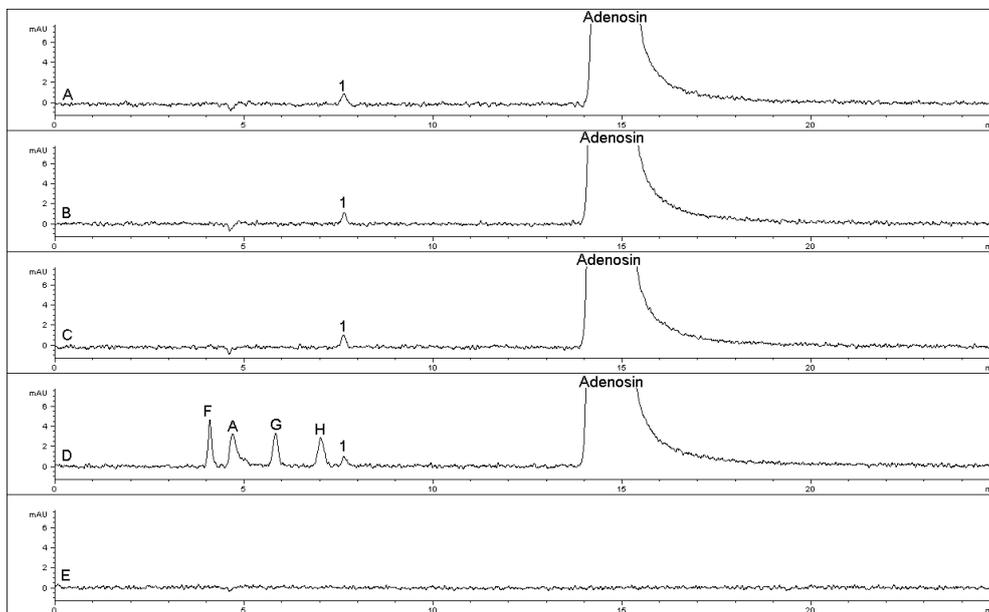


Abbildung 4-13: Untersuchung der Adenosin-Chargen. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 4-10. Proben: (A) Adenosin (21934, Hersteller A) 1 mg/ml; (B) Adenosin (21935, Hersteller A) 1 mg/ml; (C) Adenosin (21936, Hersteller A) 1 mg/ml; (D) Adenosin (21936) 1 mg/ml + Adenin, Guanosen, Inosin, Uridin je 0.001 mg/ml; (E) Blindwert. Peakzuordnung: wie in Abbildung 4-10; (1) unbekannte Verunreinigung.

Der Gehalt dieser unbekanntes Verunreinigung ist in allen Mustern < 0.05 %. Die Ergebnisse der Quantifizierung mit den beiden Verfahren, Normalisierung und „Externer-Standard“, zeigt Tabelle 4-8.

Tabelle 4-8: Ergebnisse der Quantifizierung von Verunreinigung (1) in den Adenosin-Proben mittels Normalisierungsverfahren und „Externer-Standard“-Methode. Angabe des Mittelwertes (MW; in %) und der relativen Standardabweichung (RSD; in %) von sechs Injektionen.

Charge	Gehalt („Externer-Standard“-Methode)		Gehalt (Normalisierungsverfahren)	
	MW [%]	RSD [%]	MW [%]	RSD [%]
21934	0.03	3.80	0.03	3.94
21935	0.03	3.47	0.03	3.32
21936	0.03	3.27	0.03	2.83

Bei der DC-Untersuchung der Adenosin-Chargen ließ sich ein Fleck auf der Höhe von 5'-AMP beobachten. Deshalb wurde überprüft, ob die Nucleotide 3'-AMP, 5'-AMP und 5'-ATP mit der vorgeschlagenen HPLC-Methode erfasst werden können. Dabei zeigte sich, dass 5'-AMP mit Adenosin coeluierte. Während 5'-ATP innerhalb von 65 Minuten nicht eluiert wurde, konnte 3'-AMP als sehr breiter und flacher Peak nach 55 Minuten detektiert werden (Abbildung 4-14).

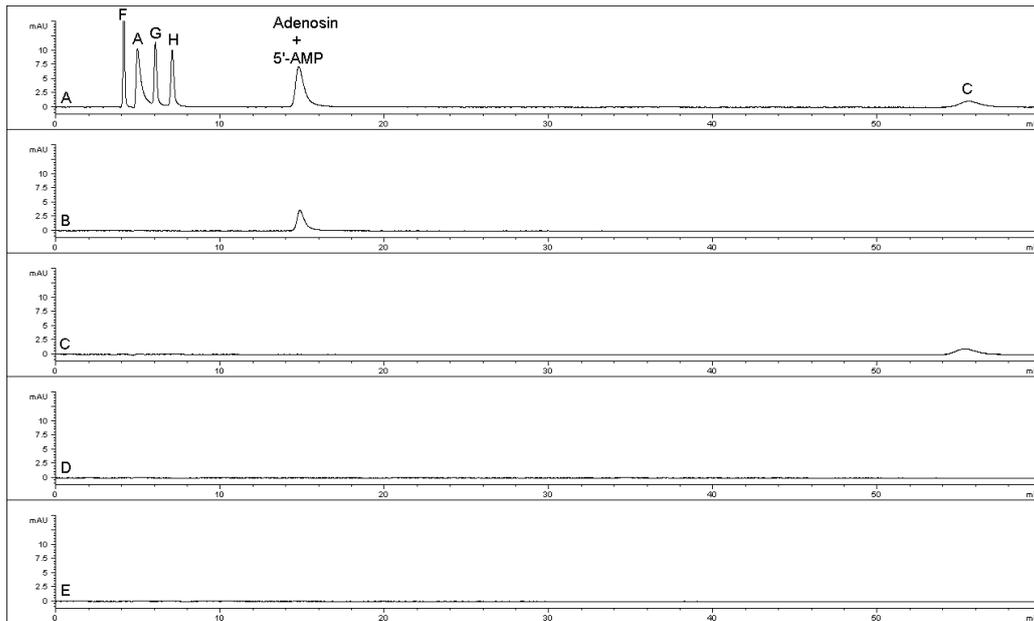


Abbildung 4-14: Trennung von Adenin, Nucleosiden und Nucleotiden. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 4-10. Proben: (A) Adenin, Adenosin, Guanosin, Inosin, Uridin, 3'-AMP, 5'-AMP, 5'-ATP je 0.004 mg/ml; (B) 5'-AMP 0.004 mg/ml; (C) 3'-AMP 0.004 mg/ml; (D) 5'-ATP 0.004 mg/ml; (E) Blindwert. Peakzuordnung: wie in Abbildung 4-10; (C) 3'-AMP.

Die Methode schien für die Untersuchung der ausgewählten Nucleotide nicht geeignet. Deshalb wurde nach einer anderen Methode gesucht, mit der Adenin, die Nucleoside und die Nucleotide gleichzeitig nachgewiesen werden können.

4.6.3. Variation der HPLC-Bedingungen zum Nachweis der Nucleotide

Fürst und Hallström [202] haben eine HPLC-Gradienten-Methode mit TBAH als Ionenpaarreagenz und einer Hypersil-ODS-Säule zur gleichzeitigen Trennung von Nucleobasen, Nucleosiden und Nucleotiden vorgestellt. Das Fließmittel besteht aus mobiler Phase A (100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 5.8 mM Tetrabutylammoniumhydrogensulfat, pH 5.5) und mobiler Phase B (Mischung aus mobiler

Phase A und Acetonitril im Verhältnis 75/25 (v/v). Die beiden Puffer wurden übernommen und der Gradient an die vorliegende Fragestellung angepasst, wobei folgende Bedingungen gefunden wurden:

Zeit [min]	Fließmittel B [%]	Fluss [ml/min]
0.0	0	1.0
1.0	0	1.0
21.0	70	1.0
25.0	70	1.0
26.0	0	1.0

Im vorderen Teil des Chromatogramms wurde ein der isokratischen USP-Methode vergleichbares Peakmuster für Adenin, Guanosin, Inosin und Uridin gefunden. Allerdings konnten durch die Einführung des Gradienten zusätzlich 3'-AMP, 5'-AMP und 5'-ATP detektiert werden (Abbildung 4-15).

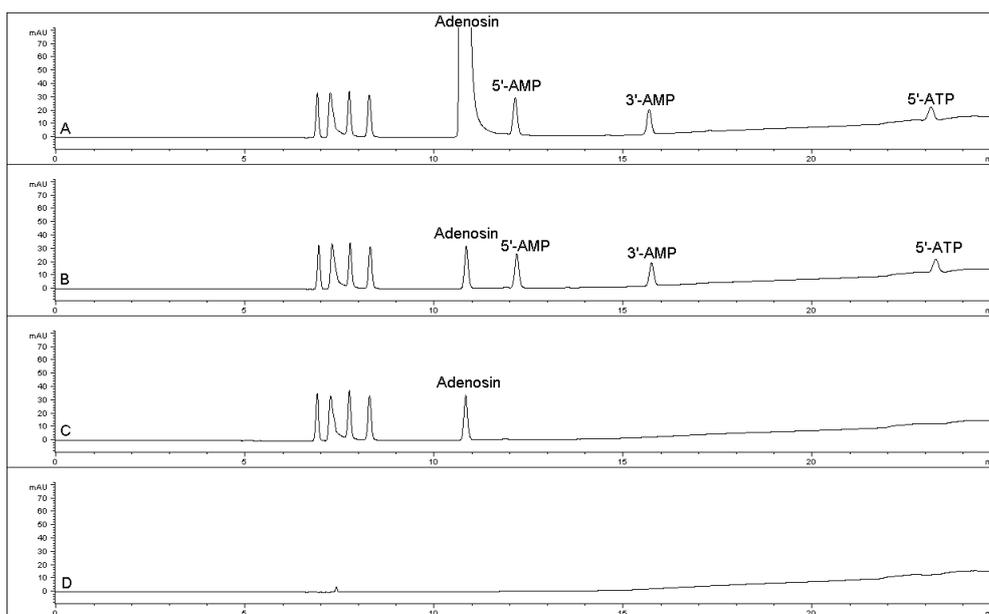


Abbildung 4-15: Detektion der Nucleotide 3'-AMP, 5'-AMP, 5'-ATP durch Einführung einer Gradienten-Methode. HPLC-Bedingungen: Säule: Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5 µm); Mobile Phase: (A) Puffer (100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 5.8 mM TBAH, pH 5.5), (B) mobile Phase (A) und Acetonitril im Verhältnis 75/25 (v/v); Gradient: 0 - 1 min 0 % B, 1 - 21 min 0 % - 70 % B, 21 - 25 min 70 % B; Fluss: 1.0 ml/min; Temperatur: 24 °C; Injektion: 20 µl; Detektion: 254 nm. Proben: (A) Adenosin (21934) 1mg/ml + Adenin, Guanosin, Inosin, Uridin, 3'-AMP, 5'-AMP, 5'-ATP je 0.004 mg/ml; (B) Adenosin, Adenin, Guanosin, Inosin, Uridin, 3'-AMP, 5'-AMP, 5'-ATP je 0.004 mg/ml; (C) Adenosin, Adenin, Guanosin, Inosin, Uridin je 0.004 mg/ml; (D) Blindwert. Peakzuordnung: wie beschrieben.

Wie auch in der Literatur beschrieben, eluieren die Nucleosid-Monophosphate vor dem Nucleosid-Triphosphat [198, 204]. Das Nucleosid-Triphosphat hat eine höhere negative Ladung unter den gegebenen Bedingungen als die Nucleosid-Monophosphate und kann deshalb stärkere Ionenpaare bilden [204], für deren Elution eine höhere Elutionskraft der mobilen Phase notwendig ist. Das ist auch der Grund, warum 5'-ATP bei den isokratischen, 100 % wässrigen Bedingungen der USP-Methode nicht detektiert werden konnte.

Die Untersuchung der drei Adenosin-Chargen mit dieser variierten HPLC-Methode zeigte zwei Peaks, die durch Verunreinigungen verursacht sein können (Abbildung 4-16). Weitere Experimente legten die Vermutung nahe, dass es sich bei Peak (1) um 5'-AMP handeln könnte, was die Ergebnisse der DC-Untersuchung bestätigt.

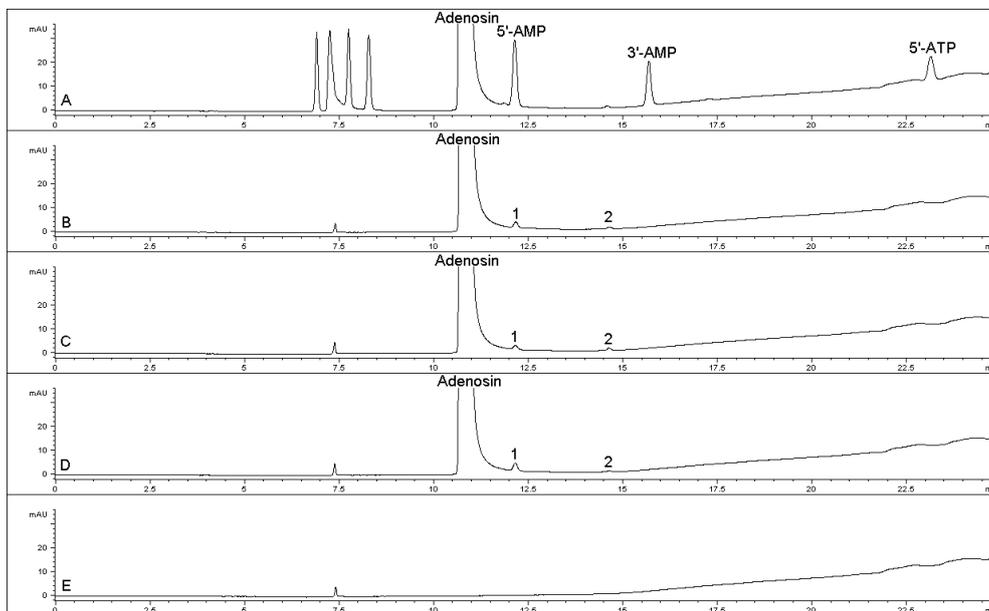


Abbildung 4-16: Untersuchung der Adenosin-Proben mit der Gradienten-Methode. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 4-15. Proben: (A) Adenosin (21934) 1 mg/ml + Adenin, Guanodin, Inosin, Uridin, 3'-AMP, 5'-AMP, 5'-ATP je 0.004 mg/ml; (B) Adenosin (21934) 1 mg/ml; (C) Adenosin (21935) 1 mg/ml; (D) Adenosin (21936) 1 mg/ml; (E) Blindwert. Peakzuordnung: wie beschrieben; (1), (2) Verunreinigungen.

4.7. Zusammenfassung

Die für die Adenosin-Monographie im Ph. Eur. vorgeschlagene HPLC-Methode ermöglicht die Trennung der Nucleoside Guanodin, Inosin und Uridin sowie Adenin. Dabei beeinflusst die ausgewählte stationäre Phase die Trennselektivität. Durch die Festlegung einer Auflösung > 1.5 zwischen Adenin und Inosin als

Systemeignungskriterium können nicht geeignete HPLC-Säulen erkannt werden, wie am Beispiel der Hypersil-Gold-Säule gezeigt wurde. Dagegen wurde mit einer Hypersil-ODS-Säule eine gute Trennung der Substanzen erzielt. Obwohl diese Säule nicht für 100 % wässrige Fließmittel geeignet ist, wurde eine gute Beständigkeit des Säulenmaterials gegenüber den gegebenen HPLC-Bedingungen beobachtet. Bei der Untersuchung von Adenosin-Chargen wurde ein Peak detektiert, der weder Guanosin, Inosin oder Uridin noch Adenin zugeordnet werden konnte.

Mit der im Ph. Eur. vorgeschriebenen DC-Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ waren die anderen Nucleoside zwar von Adenosin getrennt, zeigten jedoch gleiche R_F -Werte. Im Gegensatz dazu waren mit der DC drei ausgewählte Nucleotide (3'-AMP, 5'-AMP, 5'-ATP) sowohl von Adenosin als auch untereinander getrennt, während sie mit der vorgeschlagenen HPLC-Methode wegen Peaküberlagerungen oder sehr langer Retentionszeiten nicht erfassbar waren. Bei der Untersuchung der Adenosin-Chargen mit der DC-Methode wurde in allen Chargen ein Fleck auf der Höhe von 5'-AMP beobachtet.

Um die Anwesenheit von Nucleotiden zu belegen, wurde eine variierte HPLC-Methode eingesetzt. Dabei wurde die Trennung von Adenosin von allen Verunreinigungen, Nucleosiden, Nucleotiden und Adenin, mit einem Gradienten innerhalb von 25 Minuten erreicht. Die Ergebnisse der Untersuchung der Adenosin-Chargen mit der variierten HPLC-Methode bestätigten, dass 5'-AMP in den Proben vorhanden war. Ribose ist als mögliche Verunreinigung mit beiden HPLC-Methoden nicht nachweisbar, sondern nur nach Besprühen der DC-Platte mit KMnO_4 -Lösung.

Im Vergleich zur DC-Prüfung können mit der für die Adenosin-Monographie vorgeschlagenen HPLC-Methode die Nucleoside Guanosin, Inosin und Uridin selektiver und sensibler nachgewiesen werden. Nucleotide können mit dieser HPLC-Methode jedoch nicht erfasst werden. In ähnlicher Weise stellte sich auch im Fall von Norethisteronacetat (USP 29) und Nandrolondecanoat (Ph. Eur. 5.5) heraus, dass eine neu vorgeschlagene HPLC-Methode nicht ausreichend war, um alle vorher mittels DC überprüften Verunreinigungen einer Substanz zu erfassen [214]. In beiden Fällen wurde die DC-Methode nicht wie geplant gestrichen, sondern die Reinheitsprüfung wurde um die HPLC-Methode ergänzt. Auch in der revidierten Monographie zu Adenosin im Ph. Eur. 6.0 sind beide Methoden beschrieben, um auf Nucleoside, Nucleotide und Ribose als mögliche Verunreinigungen zu prüfen.

Bei den Untersuchungen gab es keinen Hinweis auf die Anwesenheit von Ribose und es wurden nur kleine Mengen 5'-AMP gefunden. Deshalb hat die mit der Bearbeitung der Monographie betraute Expertengruppe beschlossen, bei der nächsten Überarbeitung der Monographie auf die DC-Prüfung zu verzichten.

5. REINHEITSPRÜFUNG VON GLUTATHION MITTELS CE

5.1. Aufgabenstellung

Glutathion (L-γ-Glutamyl-L-cysteinylglycin, Abbildung 5-1) wird als Antidot bei Vergiftungen, z. B. durch Schwermetalle, Alkohol oder Medikamente verwendet. Auch Leberschädigungen und Traumata nach Strahlentherapie gehören zum Anwendungsgebiet [166, 194].

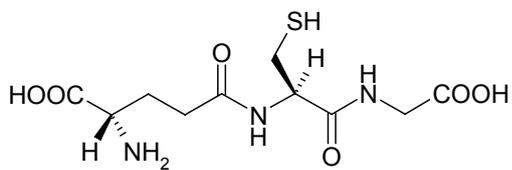


Abbildung 5-1: Strukturformel von Glutathion (GSH).

Die Ph.-Eur.-Kommission hat Glutathion in ihr Arbeitsprogramm aufgenommen mit dem Ziel, eine Monographie zu erarbeiten. Die Reinheitsprüfung von Glutathion kann mittels CE durchgeführt werden [215]. Diese CE-Methode wurde für die Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ in der Glutathion-Monographie vorgeschlagen [216]. Durch die Veröffentlichung in Pharmeuropa ist es jedem Anwender möglich, den Vorschlag zu kommentieren. Die Anwendbarkeit der CE-Methode wurde im EDQM-Labor untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Kommentare überprüft und der Monographievorschlag sollte entsprechend ergänzt werden. Für die Festlegung der Grenzwerte zur Limitierung der Verunreinigungen sowie im Zusammenhang mit der Etablierung einer Referenzsubstanz (CRS) wurden mehrere Glutathion-Chargen mit der CE-Methode untersucht.

5.2. Herstellung von Glutathion und mögliche Verunreinigungen

Glutathion ist aus den Aminosäuren Cystein, Glutaminsäure und Glycin aufgebaut und kommt in fast allen lebenden Zellen vor. In den Zellen übernimmt Glutathion u. a. wichtige Funktionen bei Oxidations- und Reduktionsprozessen [217]. Daneben spielt das Tripeptid beim Transport von Aminosäuren und niedermolekularen Peptiden durch Zellmembranen eine Rolle [217].

Glutathion entsteht durch zwei aufeinanderfolgende ATP-abhängige Reaktionen, wobei im ersten Schritt aus Glutaminsäure und Cystein das Dipeptid L- γ -Glutamyl-L-cystein (γ -Glu-Cys) gebildet wird. Im zweiten Schritt folgt die Reaktion mit Glycin, die durch das Enzym Glutathion-Synthetase (*GSHII*) vermittelt wird. Die Aktivität der γ -Glutamylcystein-Synthetase (*GSHI*) wird durch Glutathion gehemmt, um eine Überproduktion von Glutathion zu vermeiden [217, 218].

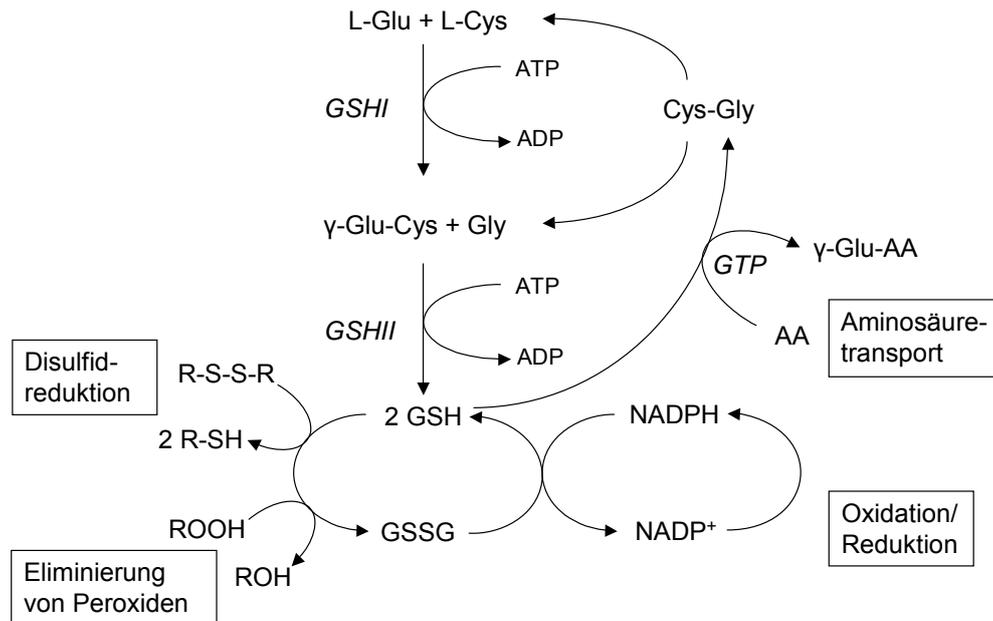
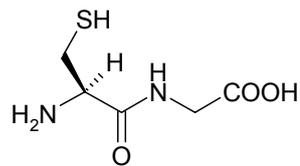


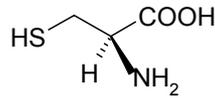
Abbildung 5-2: Überblick über die Biosynthese und die physiologische Rolle von Glutathion. AA, Aminosäure; *GSHI*, γ -Glutamylcystein-Synthetase; *GSHII*, Glutathion-Synthetase; *GTP*, γ -Glutamyltransferase (aus [218]).

Synthesen zur Herstellung von Glutathion wurden beschrieben [194, 218]. Allerdings wird Glutathion industriell seit über 30 Jahren fermentativ gewonnen vor allen Dingen mit Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida utilis* [218]. Durch die Kontrolle des Fermentationsprozesses sowie durch die Optimierung der Nährstoffzufuhr, z. B. durch Gabe von Cystein, kann die Ausbeute erhöht werden [218, 219].

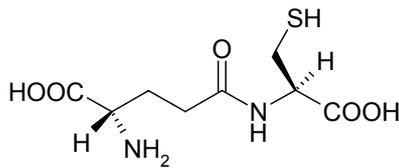
Zu den bekannten Verunreinigungen gehören die beiden Dipeptide L-Cysteinylglycin (Cys-Gly, Verunreinigung A) und γ -Glu-Cys (Verunreinigung D), Cystein (Verunreinigung B) und das Disulfid (Verunreinigung C). Letzteres kann auch durch Oxidation von Glutathion während der Lagerung entstehen. Abbildung 5-3 zeigt die Strukturformeln der bekannten Verunreinigungen.



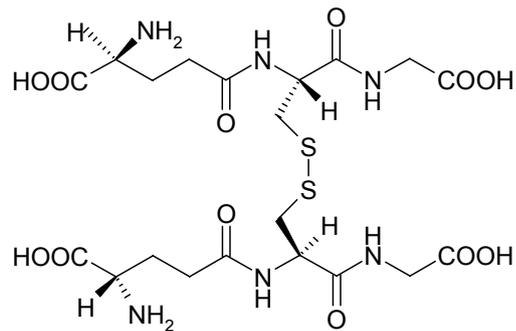
Verunreinigung A: Cys-Gly



Verunreinigung B: Cys



Verunreinigung D: Glu-Cys



Verunreinigung C: GSSG

Abbildung 5-3: Strukturformeln der bekannten Verunreinigungen von Glutathion.

5.3. Reinheitsanalytik von Glutathion

Im Japanischen Arzneibuch wird eine HPLC-Methode zur Reinheitsanalytik von Glutathion vorgeschrieben. Ein Nachteil dieser Methode ist die Zersetzung der Probe während der Trennung [134, 220].

Aufgrund der Struktur von Glutathion stellt die CE eine Alternative zur HPLC für die Untersuchung dar. Glutathion ist in neutraler und alkalischer Lösung nicht stabil. Deshalb wurde für die CE-Methode eine Elektrolytlösung mit einem kleinen pH-Wert ausgewählt (50 mM Phosphatpuffer pH 1.80) [215]. Bei diesem pH-Wert liegen die Silanolgruppen der Kapillarwand weitgehend protoniert vor und der EOF wird unterdrückt. Glutathion und die verwandten Verunreinigungen sind positiv geladen und können aufgrund ihrer eigenen elektrophoretischen Mobilität getrennt werden. Die Detektion der Substanzen erfolgt bei 200 nm. Abbildung 5-4 zeigt die Trennung einer Testmischung aus 20 mg/ml Glutathion versetzt mit 0.2 mg/ml internem Standard und je 0.1 mg/ml der Verunreinigungen B bis D. Wegen der strukturellen Verwandtschaft wurde Phenylalanin als interner Standard gewählt [215]. Neben den bekannten Verunreinigungen können mit dieser Methode viele unbekannte Verunreinigungen detektiert werden.

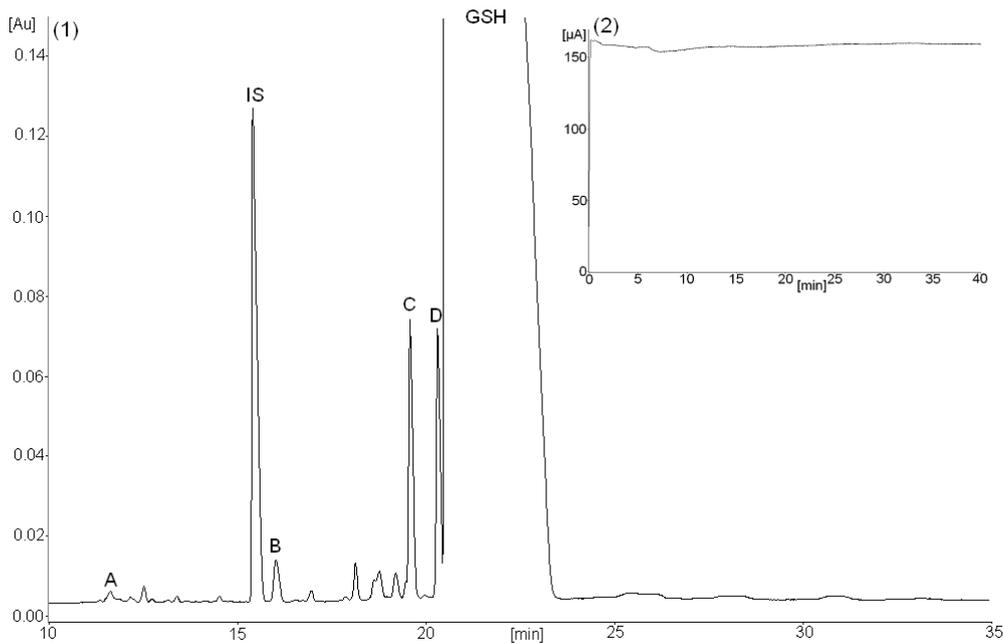


Abbildung 5-4: Trennung einer Modellmischung (1) und dazugehöriger Stromverlauf (2). CE-Bedingungen: Kapillare: Quarzkapillare, 60.2 cm Gesamtlänge, 50.0 cm effektive Länge, 75 µm; Elektrolytlösung: 50 mM Phosphatpuffer pH 1.80; Spannung: 20 kV; Injektion: 0.5 psi, 5 sec; Temperatur: 25 °C; Detektion: 200 nm. Probe: GSH (17467) 20 mg/ml + IS 0.2 mg/ml + Verunreinigungen B – D je 0.1 mg/ml. Peakzuordnung: (A) Cys-Gly; (B) Cys; (C) GSSG; (D) γ-Glu-Cys; (IS) interner Standard Phenylalanin.

5.4. Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels CE

5.4.1. Systemeignung

Für die Prüfung der Systemeignung wurde eine neue Referenzlösung eingeführt, die 20 mg/ml Glutathion, 0.2 mg/ml Phenylalanin als internen Standard und je 0.1 mg/ml der Verunreinigungen B bis D enthält. Als Kriterien wurden eine Auflösung > 1.5 zwischen den Peaks des internen Standards und der Verunreinigung B sowie ein Peak-Tal-Verhältnis > 2.5 für die Trennung zwischen Verunreinigung D und Glutathion vorgeschlagen [221].

5.4.1.1. Migrationszeiten und relative Migration

Der im Monographievorschlag vorgegebene Spülschritt zwischen zwei Läufen (10 Minuten Elektrolytlösung bei 20 psi) wurde durch weitere Spülschritte ergänzt, um die Migrationszeiten und den Stromverlauf zu stabilisieren. Die Kapillare wurde zwischen zwei Trennungen nach folgender Prozedur gewaschen:

1 min	20 psi	Wasser
2 min	20 psi	0.1 M NaOH
1 min	20 psi	Wasser
3 min	20 psi	0.1 M HCl
10 min	20 psi	Elektrolytlösung (50 mM Phosphatpuffer pH 1.80)

Für die Bestimmung der relativen Migration wurde das Verhältnis der Migrationszeit eines Peaks zur Migrationszeit des internen Standards ausgewählt. Tabelle 5-1 zeigt die Migrationszeiten und relativen Migrationen von aufeinander folgenden Injektionen am Beispiel eines Messtages.

Tabelle 5-1: Migrationszeiten (MT) und relative Migrationen (rMT) von aufeinander folgenden Injektionen von vier Untersuchungslösungen ULb1 bis ULb4 (20 mg/ml GSH (17478) mit 0.2 mg/ml internem Standard (IS)) und einer Referenzlösung RLc (20 mg/ml GSH (17478) mit 0.2 mg/ml IS und je 0.1 mg/ml der Verunreinigungen B – D). Angabe des Mittelwertes (MW), der Standardabweichung (Stabw) und der relativen Standardabweichung (RSD).

	Verunreinigung A		IS	Verunreinigung B		Verunreinigung C		Verunreinigung D	
	MT [min]	rMT	MT [min]	MT [min]	rMT	MT [min]	rMT	MT [min]	rMT
ULb1	10.64	0.76	14.00	14.64	1.05	17.70	1.26	18.30	1.31
ULb2	10.62	0.76	13.98	14.61	1.05	17.66	1.26	18.26	1.31
ULb3	10.49	0.76	13.77	14.38	1.04	17.35	1.26	17.92	1.30
ULb4	10.48	0.76	13.75	14.36	1.04	17.30	1.26	17.84	1.30
RLc	10.58	0.76	13.94	14.52	1.04	17.58	1.26	18.23	1.31
MW	10.562	0.761	13.888	14.502	1.044	17.518	1.261	18.110	1.304
Stabw	0.074	0.001	0.119	0.129	0.002	0.182	0.002	0.213	0.004
RSD [%]	0.70	0.18	0.86	0.89	0.15	1.04	0.19	1.18	0.34

Die niedrige relative Standardabweichung der relativen Migrationen belegt die Eignung der Spülprozedur für die Konditionierung der Kapillare.

5.4.1.2. Einfluss des pH-Wertes der Elektrolytlösung

Um den Einfluss des pH-Wertes der Elektrolytlösung auf die Trennung von Glutathion und den Verunreinigungen zu untersuchen, wurden fünf Phosphatpuffer (50 mM) mit verschiedenen pH-Werten (pH 1.70, pH 1.75, pH 1.80, pH 1.85, pH 1.90) hergestellt. Der entsprechende Puffer wurde sowohl als Lösungsmittel für die Proben als auch als Elektrolytlösung für die Trennung verwendet.

Bei einem kleinen pH-Wert der Elektrolytlösung sind Verunreinigung D und Glutathion voneinander getrennt. Allerdings verschwindet der Peak von Verunreinigung B unter dem Peak des internen Standards. Durch eine Erhöhung des

pH-Wertes verbessert sich die Trennung zwischen internem Standard und Verunreinigung B. Jedoch wird der Peak der Verunreinigung D vom Hauptpeak überlagert (Abbildung 5-5).

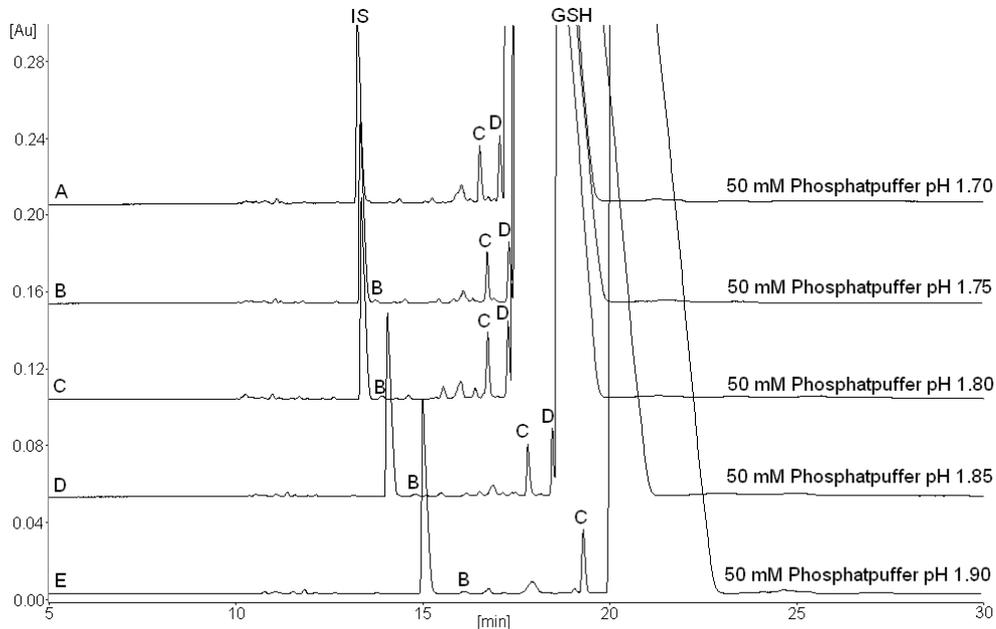


Abbildung 5-5: Trennung von Glutathion und den Verunreinigungen bei verschiedenen pH-Werten der Elektrolytlösung. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 5-4; Elektrolytlösung: wie beschrieben. Probe: Glutathion (42753/1 52702, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) 20 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 5-4.

Die Ergebnisse zeigen, dass der pH-Wert der Elektrolytlösung einen großen Einfluss auf die Selektivität der Trennung hat. Falls die Systemeignungskriterien nicht erfüllt werden, sollte der pH-Wert der Elektrolytlösung kontrolliert werden. Eine Auflösung < 1.5 zwischen dem internen Standard und Verunreinigung B ist ein Zeichen für einen zu niedrigen pH-Wert, während ein Peak-Tal-Verhältnis < 2.5 auf einen zu hohen pH-Wert hindeutet. Dementsprechend sollte der pH-Wert der Elektrolytlösung mit verdünnter Natriumhydroxid-Lösung bzw. Phosphorsäure nachjustiert werden.

5.4.2. Stabilität der Testlösung

Die Instabilität von Glutathion in Lösungen ist bekannt [215]. Deshalb wurde die Stabilität einer Testlösung (20 mg/ml Glutathion (Charge 17478) mit 0.2 mg/ml Phenylalanin) bei Raumtemperatur untersucht. Dazu wurden eine frisch hergestellte Testlösung und Testlösungen, die zwischen 5 Minuten und 180 Minuten bei

Raumtemperatur gelagert waren, mit der CE-Methode analysiert. Abbildung 5-6 zeigt die aufgezeichneten Elektropherogramme.

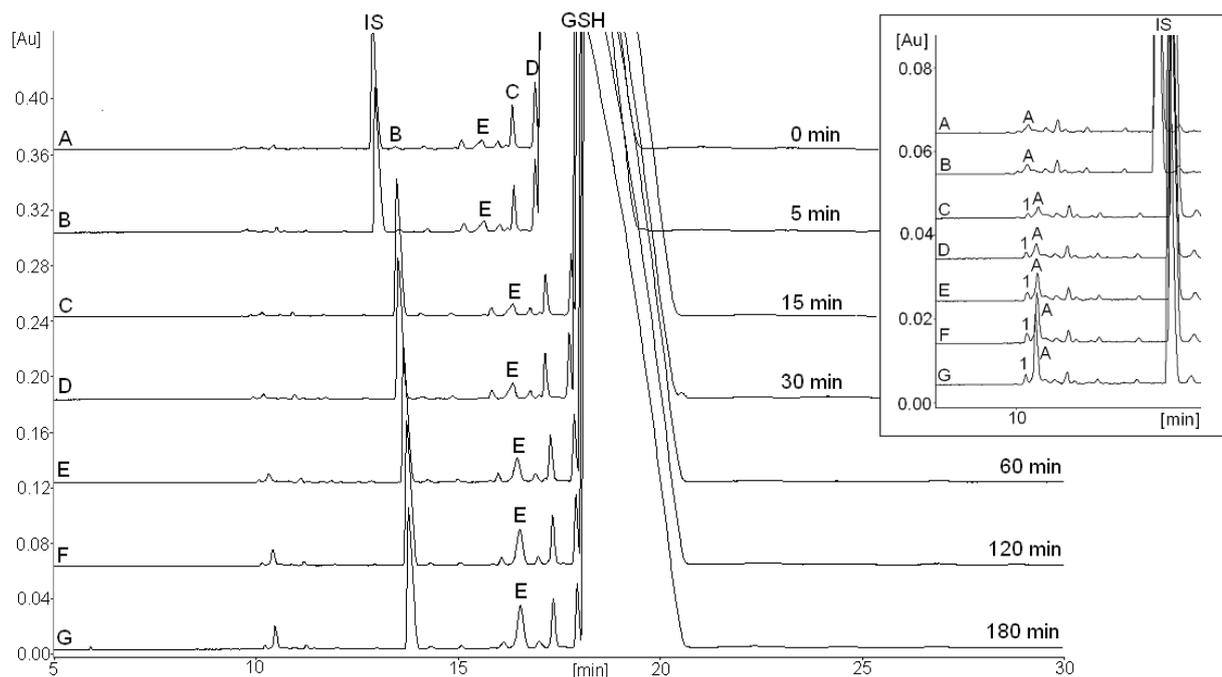


Abbildung 5-6: Elektropherogramme einer Untersuchungslösung, analysiert nach verschiedenen Lagerungszeiten der Probe. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 5-4. Probe: Glutathion (17478) 20 mg/ml + IS 0.2 mg/ml, Alter der Probe: wie beschrieben. Peakzuordnung: wie in Abbildung 5-4; (E) unbekanntes Zersetzungsprodukt; (1) unbekannte Verunreinigung.

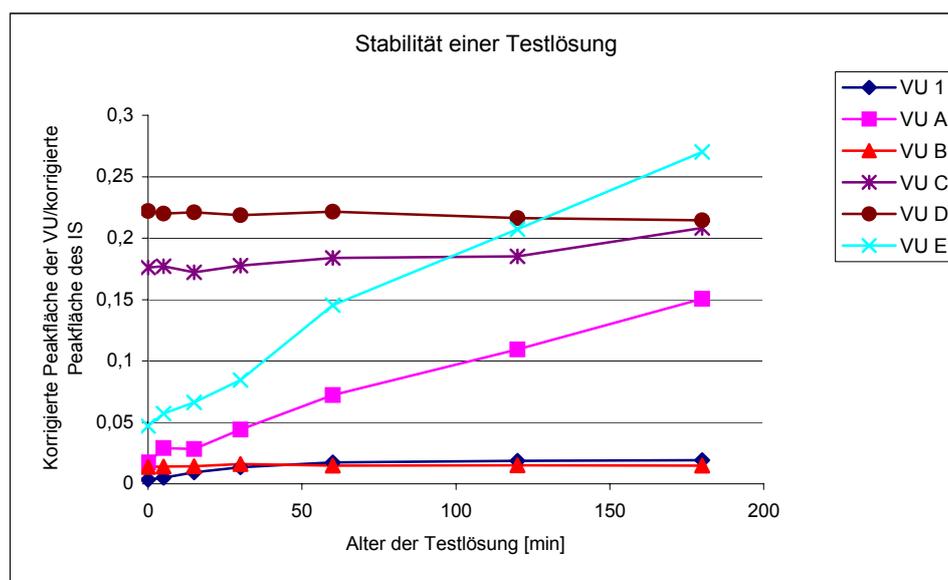


Abbildung 5-7: Stabilität einer Testlösung (20 mg/ml Glutathion mit 0.2 mg/ml internem Standard (IS) Phenylalanin).

Während die Peaks der Verunreinigungen B, C und D nur geringe Veränderungen während des Untersuchungszeitraumes zeigten, konnte für Verunreinigung A eine deutliche Zunahme der Peakgröße beobachtet werden. Weiterhin wurde eine Verunreinigung mit einer relativen Migration von 1.20 detektiert, bei der es sich um ein Zersetzungsprodukt handelt, denn die Peakfläche nimmt mit längerer Standzeit der Probe stark zu (Abbildung 5-6). Diese Verunreinigung wurde als unbekannte Verunreinigung E in die Transparenzliste der Glutathion-Monographie aufgenommen. Für eine weitere unbekannte Verunreinigung (Verunreinigung 1) wurde nur während der ersten Stunde eine Zunahme der Peakfläche festgestellt. Abbildung 5-7 fasst die Ergebnisse der Messreihe zusammen.

Bei der Untersuchung von Glutathion-Proben sollte darauf geachtet werden, dass die Untersuchungslösung unmittelbar vor der Injektion hergestellt und eine längere Standzeit vermieden wird. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen an einem Beckman P/ACE MDQ-Gerät wurde diese Vorgabe durch die Programmierung von zwei getrennten Methoden umgesetzt:

Spülmethode:	1 min	20 psi	Wasser
	2 min	20 psi	0.1 M NaOH
	1 min	20 psi	Wasser
	3 min	20 psi	0.1 M HCl
	10 min	20 psi	Elektrolytlösung (50 mM Phosphatpuffer pH 1.80)
Trennmethode:	1 min	5 psi	Elektrolytlösung
	5 sec	0.5 psi	Injektion
	45 min	20 kV	Trennung

Die Probe wurde nach Ende des Spülvorgangs direkt vor dem Start der Trennmethode in das Gerät gestellt. Ohne den kurzen Spülschritt zu Beginn der Trennmethode kam es zu Problemen mit dem Strom während der Trennung.

Die quantitative Auswertung der Elektropherogramme von älteren Testlösungen führt zu Verfälschungen der Gehalte der Verunreinigungen, insbesondere für die Verunreinigungen A und E. Dadurch können ggf. die Akzeptanzkriterien der Monographie für die Limitierung der Verunreinigungen nicht erfüllt werden.

5.4.3. Untersuchung von Glutathion-Chargen

Insgesamt wurden 14 Glutathion-Chargen mit der vorgeschlagenen CE-Methode untersucht. Vor Beginn einer Messreihe wurde die Systemeignung durch die Analyse einer Referenzlösung RLc der zu untersuchenden Glutathion-Probe gemäß Kapitel 5.4.1 überprüft. Von jeder Charge wurden vier Untersuchungslösungen ULb durch Lösen von 20 mg/ml Glutathion in einer Lösung des internen Standards (0.2 mg/ml) frisch zubereitet und je einmal injiziert. Als Referenzlösung RLb diente eine Glutathion-Lösung (0.2 mg/ml) mit 0.2 mg/ml internem Standard. Pro Charge wurden zwei Referenzlösungen hergestellt und je einmal injiziert. Zusätzlich wurde eine Untersuchungslösung ULa (20 mg/ml Glutathion) analysiert. Falls ein Peak in dieser Testlösung mit der Migrationszeit des internen Standards detektiert wird, muss die Peakfläche des internen Standards in der Untersuchungslösung ULb um die entsprechende Fläche dieses Peaks korrigiert werden.

Für die Quantifizierung der Verunreinigungen wurde die „Interner-Standard“-Methode verwendet (Kapitel 2.3.4), um eventuelle Schwankungen bei der Injektion auszugleichen. Alle Peakflächen wurden durch die Normierung auf die Migrationszeit korrigiert. Weiterhin wurde für jede Verunreinigung in der Untersuchungslösung ULb das Verhältnis aus der entsprechenden korrigierten Peakfläche zur korrigierten Peakfläche des internen Standards ermittelt. Zur Berechnung der Gehalte wurde dieses Verhältnis einer Verunreinigung mit dem Verhältnis der korrigierten Peakfläche von Glutathion zur korrigierten Peakfläche des internen Standards in der Referenzlösung RLb verglichen. Als Grenzwert, ab dem Peaks nicht mehr berücksichtigt werden, wurde 0.05 % angesetzt.

5.4.3.1. Respons- und Korrekturfaktoren

Die quantitative Auswertung erfolgt über eine Referenzlösung, die je 0.2 mg/ml Glutathion und internen Standard enthält. Deshalb müssen die Respons- bzw. Korrekturfaktoren der Verunreinigungen bestimmt werden. Dazu wurden drei Lösungen hergestellt, die je 0.2 mg/ml Glutathion (Charge 17477), internen Standard und die Verunreinigungen B bis D enthalten. Jede Lösung wurde einmal injiziert. Tabelle 5-2 zeigt die gefundenen Mittelwerte der Respons- und Korrekturfaktoren. Zum Vergleich sind die im Monographievorschlag angegebenen Werte sowie die bei den Untersuchungen im EDQM-Labor ermittelten Korrekturfaktoren aufgeführt.

Tabelle 5-2: Respons- und Korrekturfaktoren für die Verunreinigungen B, C und D. Zum Vergleich sind die Werte aus dem Monographievorschlag [216] sowie die vom EDQM bestimmten Werte [221] angegeben.

	Responsfaktor	Korrekturfaktor	Korrekturfaktor (Monographievorschlag)	Korrekturfaktor (EDQM)
VU B	0.34	2.98	2.8	4.0
VU C	0.98	1.02	1.1	1.2
VU D	0.71	1.41	1.6	1.6

Da der Korrekturfaktor von Verunreinigung C innerhalb des Bereichs ≥ 0.8 und ≤ 1.2 liegt, wurde er entsprechend den Vorgaben im „Technical Guide for the Elaboration of Monographs“ [22] aus dem Monographieentwurf gestrichen.

5.4.3.2. Ergebnisse der Untersuchung von Glutathion-Chargen

Es standen zehn Glutathion-Chargen von zwei japanischen Herstellern zur Verfügung. Bei der Untersuchung der Proben wurde ein für den jeweiligen Hersteller charakteristisches Peakmuster gefunden (Abbildung 5-8). Die Proben der beiden Hersteller unterscheiden sich in der Anwesenheit der Verunreinigungen B und D. Zusätzlich zeigten die Chargen des Herstellers B deutlich weniger Verunreinigungspeaks.

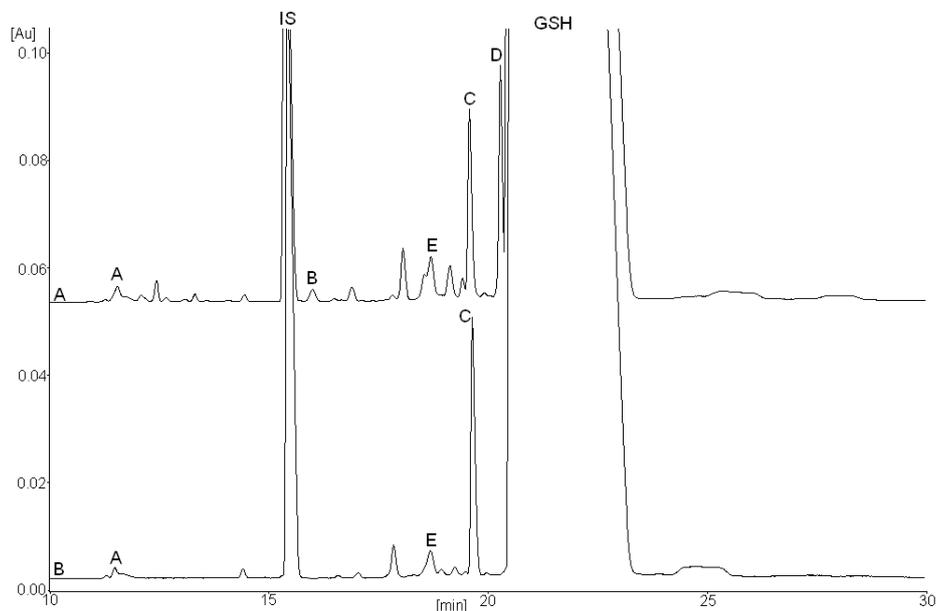


Abbildung 5-8: Verunreinigungsprofil von Glutathion-Proben verschiedener Hersteller. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 5-4. Proben: (A) GSH (17476, Hersteller A) 20 mg/ml + IS 0.2 mg/ml; (B) GSH (17715, Hersteller B) 20 mg/ml + IS 0.2 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 5-4; (E) unbekanntes Zersetzungsprodukt.

Neben diesen Mustern wurden noch vier Chargen im Auftrag eines pharmazeutischen Unternehmens untersucht (Abbildung 5-9).

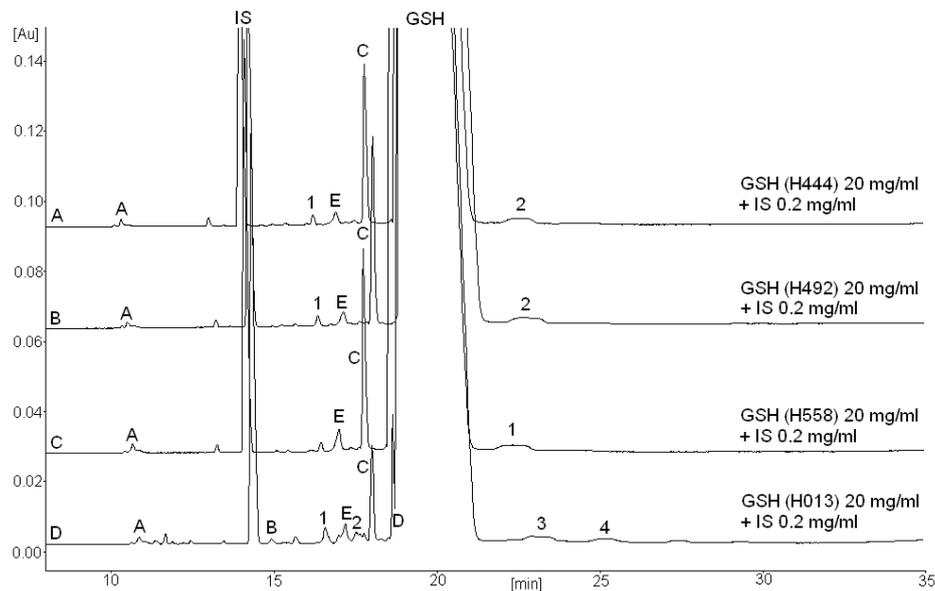


Abbildung 5-9: Untersuchung von Glutathion-Chargen im Auftrag eines pharmazeutischen Unternehmens. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 5-4. Proben: wie beschrieben. Peakzuordnung: wie in Abbildung 5-4; (E) unbekanntes Zersetzungsprodukt; (1) – (4) unbekannte Verunreinigungen.

Der Herstellungsprozess hat einen großen Einfluss auf das Verunreinigungsprofil einer Substanz (Kapitel 1.2.2). Deshalb ist es in vielen Fällen möglich, Proben aufgrund ihres Peakmusters einem Hersteller zuzuordnen. So stammen mit großer Wahrscheinlichkeit alle Chargen mit Ausnahme der Charge H013 von Hersteller B. Das Verunreinigungsprofil der Charge H013 ist mit dem Profil, das bei den Proben des Herstellers A gefunden wurde, vergleichbar.

Tabelle 5-3 fasst die Ergebnisse der Quantifizierung der Verunreinigungen zusammen, wobei die Verunreinigungen in den einzelnen Proben in der Reihenfolge ihres Auftretens nummeriert wurden. Eine Übersicht der vorhandenen Chargen gibt Kapitel 9.3.1. Die Untersuchung einiger Chargen (17476, 17477, 17478, 17715, 17716, 17717) wurde in einem Abstand von 14 Monaten wiederholt. Abbildung 5-10 und Abbildung 5-11 zeigen exemplarisch Elektropherogramme der Chargen 17478 und 17715 der ersten Prüfung und der Wiederholungsmessung.

Bei der Zersetzung von Glutathion in Lösung kann vor allen Dingen eine Zunahme der Peakflächen von Verunreinigung A und E beobachtet werden. Mit dieser Instabilität können die zum Teil sehr großen relativen Standardabweichungen der Gehalte der Verunreinigungen A und E erklärt werden.

Tabelle 5-3: Ergebnisse der Quantifizierung der Verunreinigungen in Glutathion-Proben mittels „Interner-Standard“-Methode unter Einbeziehung der Korrekturfaktoren. Angabe des Mittelwertes (MW; in %) und der relativen Standardabweichung (RSD; in %) von vier bzw. drei Injektionen für die Chargen H444, H492, H558, H013. Falls eine Verunreinigung nicht bei allen Injektionen detektiert wurde, ist keine RSD angegeben. Wiederholungsmessungen sind durch „W“ gekennzeichnet.

Charge	VU A		VU B		VU C		VU D		VU E		unbekannte VU		Summe		
	MW [%]	RSD [%]	MW [%]	RSD [%]	MW [%]	RSD [%]									
17476	0.059	13.82	0.117	0.88	0.451	2.78	0.595	0.81	0.188	11.46	1	0.061	3.43	1.794	5.31
											2	0.108	16.87		
											3	-			
											4	0.103	1.64		
											5	0.083	24.58		
17476 W	0.090	15.46	0.126	1.06	0.409	0.81	0.607	1.04	0.137	25.86	1	0.065	0.60	1.871	1.93
											2	0.129	2.22		
											3	0.059	8.67		
											4	0.108	2.62		
											5	0.112	3.62		
17477A	0.077	18.32	0.100	4.60	0.454	2.02	0.544	3.52	0.175	22.22	1	<0.05		1.575	6.08
											2	0.090	3.91		
											3	0.060	5.78		
											4	-			
											5	0.076	14.99		
17477A W	0.091	14.06	0.108	10.64	0.501	7.44	0.645	10.62	0.169	15.86	1	0.056	6.56	1.866	4.63
											2	0.113	7.12		
											3	0.105	6.03		
											4	-			
											5	0.075	7.55		
17477B	0.095	23.87	0.105	4.07	0.448	1.57	0.559	0.82	0.188	20.21	1	<0.05		1.723	3.49
											2	0.094	2.28		
											3	0.067	3.43		
											4	0.078	3.69		
											5	0.089	1.44		
17478	0.072	5.69	0.103	4.42	0.436	0.55	0.754	1.29	0.141	6.72	1	0.055	2.18	1.868	3.48
											2	0.095	1.74		
											3	0.065	4.92		
											4	0.104	0.86		
											5	0.085			
17478 W	0.077	8.43	0.103	1.17	0.430	2.64	0.732	4.06	0.141	8.24	1	0.063	0.78	1.790	3.01
											2	0.086	3.42		
											3	<0.05			
											4	0.063	2.91		
											5	0.095	10.25		
17715	0.059	11.93	<0.05		0.565	2.08	<0.05		0.164	28.28	1	<0.05		1.002	6.67
											2	0.078	2.56		
											3	0.136	6.12		
17715 W	0.067	14.04	<0.05		0.559	4.61	<0.05		0.142	22.98	1	0.057		1.036	8.46
											2	0.094	1.06		
											3	0.146	2.34		
17716	0.062	19.98	<0.05		0.555	1.31	<0.05		0.187	18.62	1	0.089	2.13	1.034	4.94
											2	0.140	7.58		
17716 W	0.067	15.05	<0.05		0.483	3.12	<0.05		0.131	22.59	1	0.085	4.34	0.898	5.22
											2	0.130	8.63		
17717	0.078	9.07	<0.05		0.532	3.17	<0.05		0.165	14.62	1	0.113	5.20	1.059	6.51
											2	0.171	15.74		
17717 W	0.072	21.51	<0.05		0.513	2.44	<0.05		0.131	19.66	1	0.107	4.42	0.994	3.11
											2	0.171	4.28		
22721	0.072	12.63	0.112	1.23	0.366	1.75	0.695	1.86	0.150	14.29	1	0.054	1.83	1.845	1.90
											2	0.116	1.54		
											3	0.079	2.11		
											4	0.072	25.94		
											5	0.130	2.21		

Tabelle 5-3 (Fortsetzung).

Charge	VU A		VU B		VU C		VU D		VU E		unbekannte VU		Summe		
	MW [%]	RSD [%]	MW [%]	RSD [%]	MW [%]	RSD [%]									
26932	<0.05		<0.05		0.867	2.20	<0.05		0.118	4.06	1	0.052		1.216	1.63
											2	0.055	4.36		
											3	0.149	4.89		
26933	<0.05		<0.05		0.668	0.20	<0.05		0.127	10.98	1	0.055		0.950	4.77
											2	0.055	2.80		
											3	0.073	9.11		
26934	<0.05		<0.05		0.604	0.33	<0.05		0.103	18.18	1	<0.05		0.882	6.05
											2	0.057	0.80		
											3	0.093	10.75		
H444	0.065	18.46	<0.05		0.737	1.55	<0.05		0.114	15.47	1	0.057	4.82	1.093	3.57
											2	0.120	1.83		
H492	<0.05		<0.05		0.725	0.14	<0.05		0.092	8.81	1	0.052	2.89	0.996	1.20
											2	0.127	6.18		
H558	0.069	11.26	<0.05		0.748	0.41	<0.05		0.131	15.67	1	0.110	1.49	1.058	3.01
H013	0.064	6.05	0.082	3.84	0.359	0.38	0.505	1.13	0.120	9.97	1	0.069	5.97	1.392	1.29
											2	0.056	2.14		
											3	0.104	7.51		
											4	0.051			

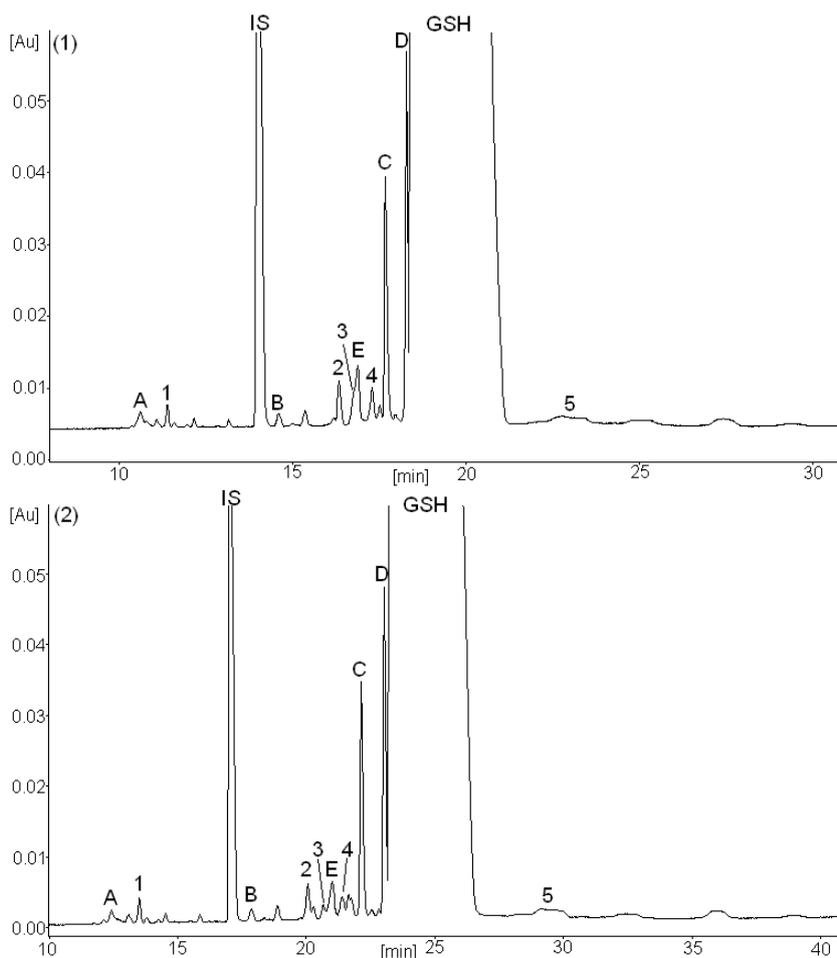


Abbildung 5-10: Glutathion-Charge 17478 bei der ersten Untersuchung (1) und bei der Wiederholungsmessung (2). CE-Bedingungen: wie in Abbildung 5-4. Probe: GSH (17478, Hersteller A) 20 mg/ml + IS 0.2 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 5-4; (E) unbekanntes Zersetzungsprodukt; (1) – (5) unbekannte Verunreinigungen.

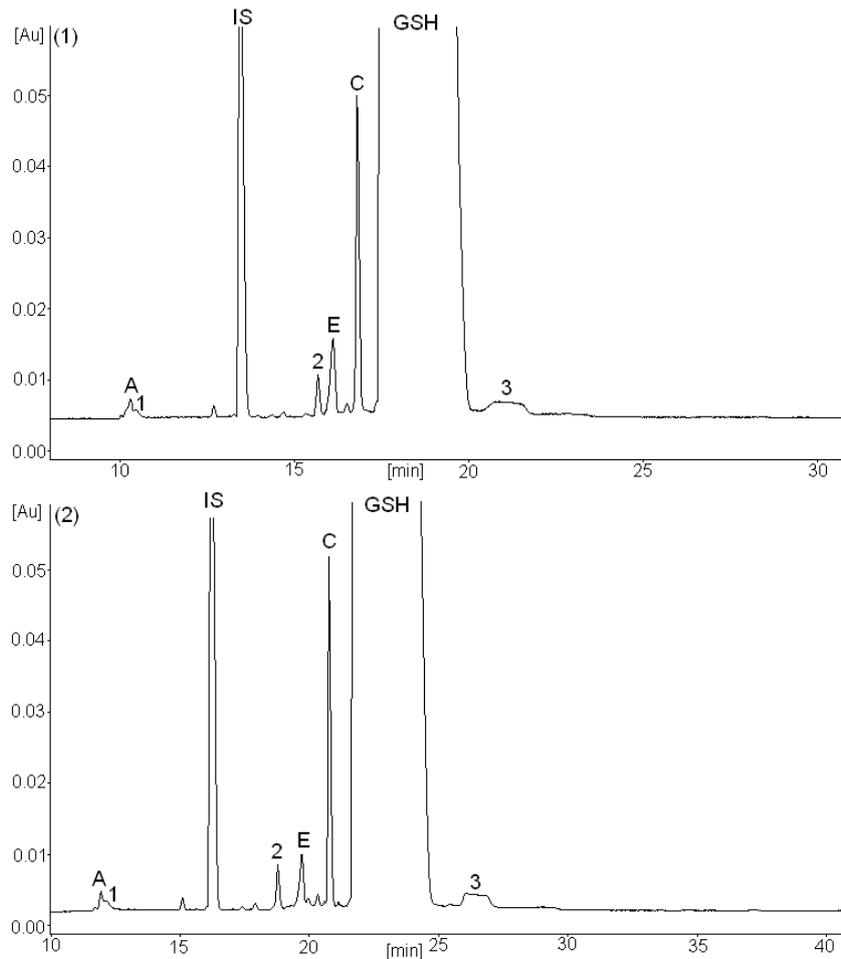


Abbildung 5-11: Glutathion-Charge 17715 bei der ersten Untersuchung (1) und bei der Wiederholungsmessung (2). CE-Bedingungen: wie in Abbildung 5-4. Probe: GSH (17715, Hersteller B) 20 mg/ml + IS 0.2 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 5-4; (E) unbekanntes Zersetzungsprodukt; (1) – (3) unbekannte Verunreinigungen.

5.5. Zusammenfassung

Mit der für die Glutathion-Monographie im Ph. Eur. vorgeschlagenen CE-Methode ist die Kontrolle der bekannten Verunreinigungen Cys-Gly, Cystein, GSSG und γ -Glu-Cys möglich. Die Eignung des Systems wird mit einer Glutathion-Lösung (20 mg/ml) gespikt mit 1 % internem Standard und je 0.5 % der Verunreinigungen B bis D überprüft. Dabei muss die Auflösung zwischen den Peaks des internen Standards und Cystein > 1.5 sowie das Peak-Tal-Verhältnis zwischen Glu-Cys und dem Hauptpeak > 2.5 sein. Für die Erfüllung der Kriterien spielt der pH-Wert der Elektrolytlösung eine große Rolle. Zu kleine pH-Werte ($\text{pH} < 1.80$) führen zur Überlagerung von Verunreinigung B durch den internen Standard, während bei zu

großen pH-Werten ($\text{pH} > 1.80$) Verunreinigung D nicht vom Hauptpeak abgetrennt ist.

Neben den bekannten Verunreinigungen wurde in allen untersuchten Proben eine unbekannte Verunreinigung detektiert, deren Gehalt mit dem Alter der Untersuchungslösung zunimmt. Dieses Abbauprodukt wurde als unbekannte, spezifizierte Verunreinigung E in die Transparenzliste der Monographie aufgenommen.

Die erste Glutathion-Monographie erschien im 1. Nachtrag zum Ph. Eur. 5.0 [222]. Die Akzeptanzkriterien für die Verunreinigungen sind in Tabelle 5-4 zusammengefasst. Bei einer Überarbeitung der Monographie [223] wurde der Grenzwert für Verunreinigung D auf 1.0 % angehoben. Gleichzeitig wurden unspezifizierte Verunreinigungen auf 0.10 % limitiert. Dieser Wert entspricht dem Grenzwert, ab dem Verunreinigungen identifiziert werden sollen (Tabelle 1-1). Allerdings gilt diese Vorgabe nicht für Fermentationsprodukte [19], worunter Glutathion fällt. Deshalb konnte der Grenzwert für unspezifizierte Verunreinigungen in der überarbeiteten Monographie im Ph. Eur. 5.7 auf 0.2 % erhöht werden [154].

Tabelle 5-4: Akzeptanzkriterien für die Verunreinigungen in der Glutathion-Monographie im Ph. Eur. 5.1 [222], Ph. Eur. 5.5 [223] und Ph. Eur. 5.7 [154].

Verunreinigung	Monographie Ph. Eur. 5.1	Monographie Ph. Eur. 5.5	Monographie Ph. Eur. 5.7
A, B, E	0.5 %	0.5 %	0.5 %
C	0.7 %	0.7 %	1.0 %
D	0.7 %	1.0 %	1.0 %
unspezifizierte VU	0.1 %	0.10 %	0.2 %
Summe	2.0 %	2.5 %	2.5 %
Berichtsgrenzwert	0.05 %	0.05 %	0.05 %

Bei der Untersuchung von Glutathion-Chargen von zwei japanischen Herstellern wurde ein für den jeweiligen Hersteller charakteristisches Peakmuster gefunden. Dabei zeigten die Proben des Herstellers B weniger Verunreinigungspeaks und einen geringeren Gehalt an Verunreinigungen. Gegenwärtig wird Glutathion als API weltweit nur noch von Hersteller B produziert.

6. REINHEITSPRÜFUNG VON AMINOSÄUREN MITTELS CE UND HPLC

6.1. Aufgabenstellung

Jährlich werden über zwei Millionen Tonnen Aminosäuren produziert [55]. Sie werden in erster Linie als Zusatzstoffe in der Nahrungsmittelindustrie (z. B. L-Glutaminsäure, Glycin, L-Cystein) und in der Futtermittelindustrie (z. B. D,L-Methionin, L-Lysin, L-Threonin) verwendet [224]. Ein geringer Anteil wird in Kosmetika verarbeitet (z. B. L-Cystein). Als enantiomerenreine Produkte spielen Aminosäuren bei chiralen Synthesen eine Rolle [48]. So kann L-Prolin als Edukt in der Synthese von Angiotensin-Conversions-Enzym-Inhibitoren (z. B. Captopril) eingesetzt werden [194]. Der Arzneistoff Levodopa, der bei der Behandlung von Parkinson angewendet wird, kann ausgehend von L-Tyrosin hergestellt werden [194]. L-Glutamin ist ein Edukt bei der Synthese von Thalidomid [225].

Medizinisch werden Aminosäure-Infusionslösungen bei der parenteralen Ernährung von Patienten eingesetzt. Daneben ist auch die therapeutische Wirkung einzelner Aminosäuren bekannt [224]. So wird L-Ornithin-L-Aspartat zur Behandlung von Lebererkrankungen, u. a. bei hepatischer Enzephalopathie, eingesetzt. Tryptophan wirkt schlafanstoßend und antidepressiv [41] und wurde aus diesem Grund bis zum Auftreten von gravierenden Nebenwirkungen von vielen Patienten eingenommen (Kapitel 1.2.4). Die sogenannte Tryptophan-Affäre hat gezeigt, wie wichtig die Qualitätskontrolle der Aminosäuren ist.

Monographien zu Aminosäuren sind im Ph. Eur. und im DAB beschrieben. Beide Arzneibücher sehen im Rahmen der Reinheitsprüfung von Aminosäuren die Durchführung einer DC vor, mit der Verunreinigungen, die mit Ninhydrin reagieren, erfasst werden. Dabei handelt es sich vor allen Dingen um „andere“ Aminosäuren. Die Analyse von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit FMOC-Cl ermöglicht einen sensitiveren und selektiveren Nachweis anderer Aminosäuren als Verunreinigungen [226]. Weiterhin wurde die Untersuchung von CBQCA-Derivaten mittels CE und LIF-Detektion in die Reinheitsanalytik eingeführt [120].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Aminosäuren nach Derivatisierung mit FMOC-Cl und CBQCA mit den beschriebenen CE-Methoden analysiert werden, um detaillierte Informationen über deren Verunreinigungsprofil zu sammeln. Zu diesem Zweck hat das Bundesinstitut für Arzneimittel und

Medizinprodukte (BfArM) insgesamt 71 Chargen verschiedener Aminosäuren (L-Histidin, L-Isoleucin, L-Phenylalanin und L-Serin) zur Verfügung gestellt. In einem zweiten Schritt sollte am Beispiel von L-Alanin und L-Asparaginsäure eine HPLC-Methode in Kombination mit ELS-Detektion entwickelt werden, mit der die gleichzeitige Trennung und Detektion von Aminosäuren und organischen Säuren möglich ist. Dieses Verfahren sollte ebenso wie die beiden CE-Methoden auch auf die Bestimmung des Verunreinigungsprofils von L-Ornithin-L-Aspartat übertragen werden.

6.2. Herstellung von Aminosäuren und mögliche Verunreinigungen

6.2.1. Allgemeine Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren

Aminosäuren können durch verschiedene Verfahren hergestellt werden (Abbildung 6-1). Viele Artikel und Bücher beschäftigen sich mit ihrer Gewinnung [224, 227, 228, 229, 230, 231].

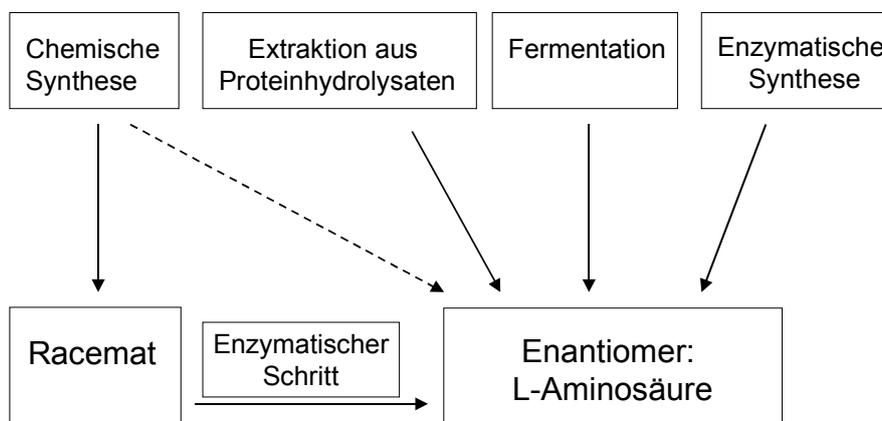


Abbildung 6-1: Verfahren zur Herstellung und Gewinnung von Aminosäuren.

Bis Mitte des letzten Jahrhunderts waren Aminosäuren nur durch chemische Synthese oder Extraktion aus Proteinhydrolysaten zugänglich [55]. Prinzipiell lassen sich alle Aminosäuren auf synthetischem Weg, z. B. durch die Strecker-Synthese, herstellen. Weil dabei aber Racemate entstehen, hat die Synthese nur im Fall von Glycin und D,L-Methionin wirtschaftliche Bedeutung. Um die proteinogenen L-Aminosäuren zu erhalten, muss ein zusätzlicher enzymatischer Schritt angeschlossen werden. Dazu werden die Aminosäuren acetyliert. Durch die Umsetzung mit einem Enzym (L-Aminoacylase) ist die stereoselektive Hydrolyse der

N-Acetyl-L-Aminosäuren möglich. Die entstandenen L-Aminosäuren werden aus dem Gemisch entfernt, während die N-Acetyl-D-Aminosäuren racemisiert und dadurch der Racematspaltung wieder zugeführt werden können [227].

Ein Vorteil der hydrolytischen Verfahren ist, dass auf diesem Weg nahezu alle proteinogenen L-Aminosäuren zugänglich sind [228]. Unter sauren Bedingungen werden die Bindungen von Proteinen gespalten und die freigesetzten Aminosäuren mittels chromatographischer Verfahren getrennt [227].

In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde entdeckt, dass *Corynebacterium glutamicum* in großen Mengen Glutaminsäure produzieren kann [55]. Seit dieser Zeit hat die Biotechnologie immer größere Bedeutung gewonnen. Heutzutage werden jährlich ca. 1.5 Tonnen Glutaminsäure und 700 000 Tonnen Lysin durch Corynebakterien gewonnen [46, 55]. Ein wichtiger Parameter für gute Ausbeuten der Fermentation ist die Entwicklung eines geeigneten Mikroorganismus. Neben Corynebakterien werden vor allen Dingen Mutanten von *Escherichia coli* eingesetzt. So wird L-Cystein, das über Jahrzehnte durch Extraktion von L-Cystin aus Hydrolysaten von Haaren mit nachfolgender Reduktion des Disulfids gewonnen wurde, seit einigen Jahren bei Wacker Chemie, München, fermentativ durch einen optimierten Stamm von *E. coli* hergestellt. Neben den Mikroorganismen wurde der Fermentationsprozess im Hinblick auf die Automatisierung und die Aufreinigung der Produkte verbessert.

Zur Herstellung einiger Aminosäuren ist eine enzymatische Synthese interessant, insbesondere wenn preisgünstige Ausgangsmaterialien zur Verfügung stehen. Bei der Reaktion entsteht durch die stereoselektive Enzymkatalyse die gewünschte L-Aminosäure (Kapitel 1.2.5.1).

6.2.2. Herstellung der untersuchten Aminosäuren

In der Regel gibt es mehrere Methoden zur Gewinnung einer Aminosäure. Eine Übersicht über die industriell eingesetzten Verfahren zur Produktion von Aminosäuren gibt der Artikel [232]. Im Folgenden werden nur die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Aminosäuren vorgestellt.

L-Asparaginsäure wird durch Umsetzung von Fumarsäure und Ammoniak in Gegenwart von L-Aspartase gewonnen (Abbildung 6-2 A) [233]. Auch L-Alanin kann durch enzymatische Synthese hergestellt werden. Dazu wird L-Asparaginsäure mit Hilfe des Enzyms L-Aspartat- β -Decarboxylase decarboxyliert (Abbildung 6-2 B).

Daneben wird Alanin durch Extraktion aus Proteinhydrolysaten oder chemischer Synthese mit nachfolgender Racematspaltung der N-Acetyl-Derivate gewonnen [230].

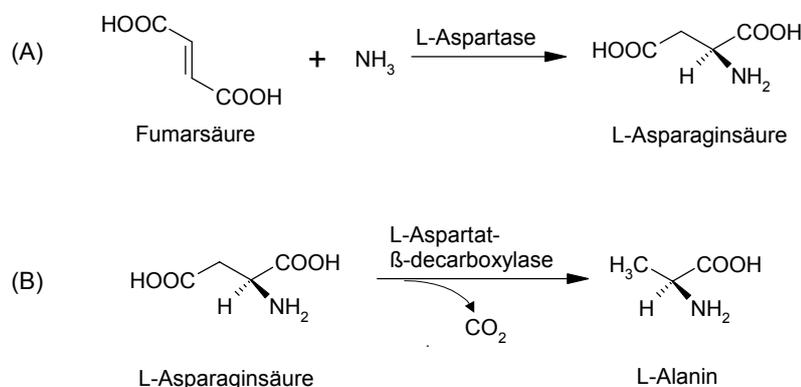


Abbildung 6-2: Enzymatische Synthese zur Herstellung von L-Asparaginsäure (A) und L-Alanin (B).

L-Histidin kann aus Proteinhydrolysaten isoliert werden. Daneben sind eine Vielzahl fermentativer Verfahren mit Mutanten von *E. coli*, *Corynebacterium* und *Brevibacterium* bekannt [232, 234].

Für die Herstellung von L-Isoleucin ist Fermentation die Methode der Wahl. Dazu werden Stämme von *E. coli*, *Corynebacterium* und *Brevibacterium* eingesetzt [228, 235]. Häufig enthalten die Kulturmedien L-Threonin, eine Vorstufe im Biosyntheseweg, weil die direkte Gewinnung aus Zucker schwierig ist [227].

Durch die Einführung des Süßstoffes Aspartam (L-Aspartyl-L-Phenylalanin-methylester) hat die Herstellung von L-Phenylalanin wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Verschiedene fermentative Verfahren wurden beschrieben [228]. Ausgehend von Benzaldehyd kann D,L-Phenylalanin synthetisiert werden, das nach Acetylierung enzymatisch getrennt wird. Weiterhin kann mit Hilfe der L-Phenylalanin-Ammoniumlyase Ammoniak enzymatisch an trans-Zimtsäure addiert werden. Transaminierung von Phenylpyruvat in Gegenwart von L-Aspartat durch das Enzym L-Aspartase führt ebenfalls zu L-Phenylalanin [236].

Serin wird in Japan vor allen Dingen durch Fermentation hergestellt, wobei Mutanten von *Pseudomonas*, *Corynebacterium* und *Nocardia* eingesetzt werden. In Europa spielt auch die Extraktion aus Proteinhydrolysaten eine Rolle [224, 227].

Bei L-Ornithin-L-Aspartat handelt es sich um ein Salz aus Ornithin und Asparaginsäure. Ornithin wird hauptsächlich durch Fermentation, z. B. mit Stämmen

von *Corynebacterium glutamicum*, gewonnen. Durch die Ausschaltung des Enzyms Ornithin-Transcarbamylase ist der Biosyntheseweg zu Arginin im Mikroorganismus unterbrochen und es kommt zur Anreicherung von Ornithin [227, 237]. L-Ornithin-L-Aspartat entsteht, wenn eine Lösung stöchiometrischer Mengen Asparaginsäure und Ornithin durch den Zusatz eines organischen Lösungsmittels zur Kristallisation gebracht wird [238].

6.2.3. Mögliche Verunreinigungen von Aminosäuren

Das Verunreinigungsprofil von Substanzen richtet sich wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben nach dem Herstellungsprozess. Insofern kann man gerade für Aminosäuren, die auf verschiedenen Wegen gewonnen werden, je nach Produktionsverfahren unterschiedliche Verunreinigungen erwarten.

Für synthetisierte Aminosäuren spielen die in Kapitel 1.2.1 genannten Verunreinigungen eine Rolle: u. a. Edukte, Zwischenprodukte und Nebenprodukte. Bei der Extraktion aus Proteinhydrolysaten fallen vor allen Dingen andere Aminosäuren an. Gerade wenn die Rohstoffe tierischen Ursprungs sind, muss auf eine effektive Entfernung bzw. Zerstörung von Viren geachtet werden [239].

Das Verunreinigungsprofil von biotechnologisch hergestellten Aminosäuren ist komplex und schwierig vorhersagbar. Da hierbei der gesamte Biosyntheseweg eines Mikroorganismus ausgenutzt wird, können alle Zwischenprodukte und Nebenprodukte der Biosynthese als Verunreinigungen vorkommen (Abbildung 6-3). Das sind neben Aminen auch Carbonsäuren (z. B. Fumarsäure, Essigsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure) und Ketocarbonsäuren (z. B. Brenztraubensäure). Komponenten des Kulturmediums, u. a. Antibiotika und Wachstumsfaktoren wie Aminosäuren oder Vitamine, zählen auch zum Kreis der möglichen Verunreinigungen.

Aus diesen Gründen ist eine sorgfältige Aufreinigung der Aminosäuren besonders wichtig. Hierzu werden zunächst chromatographische Methoden eingesetzt, durch die die Aminosäure von organischen und anorganischen Verunreinigungen abgetrennt wird. Durch zusätzliche Behandlung mit Aktivkohle kann die Reinheit verbessert werden. Substanzen mit hoher molarer Masse, z. B. Endotoxine, werden durch Filtration entfernt. Als letzter Schritt erfolgt die Kristallisation und das Waschen der Kristalle [239].

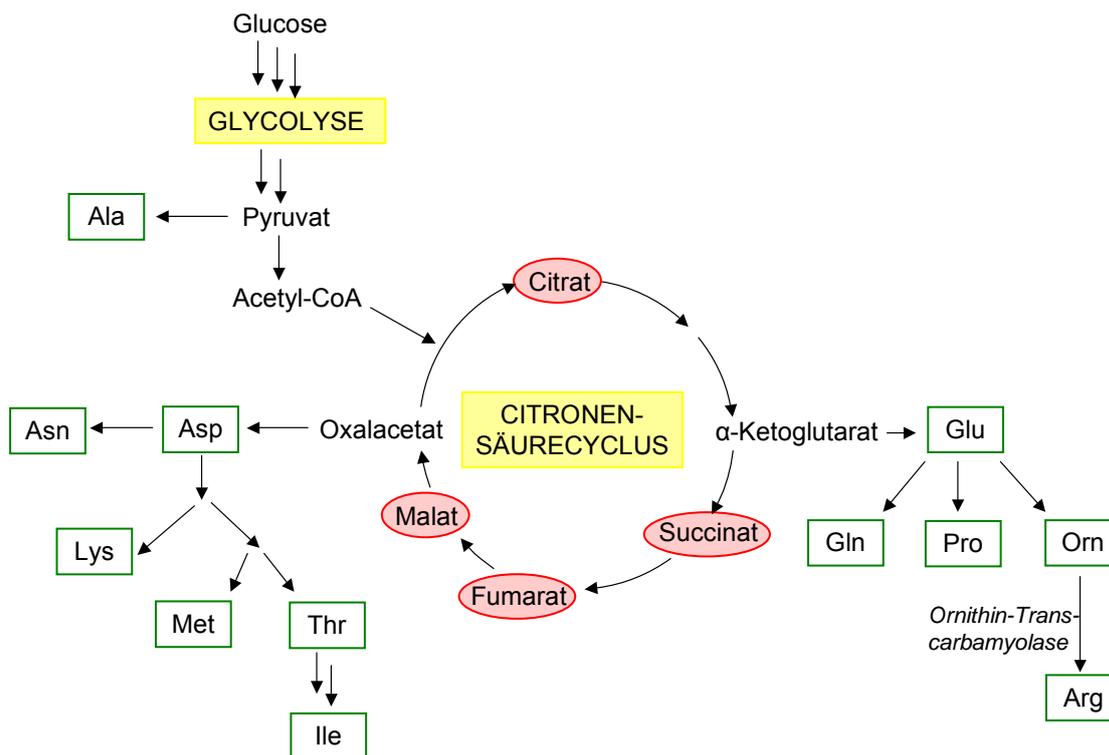


Abbildung 6-3: Schematische Darstellung der Biosynthese von Aminosäuren.

6.3. Aminosäuren im Arzneibuch

Die Monographien zu Aminosäuren im Ph. Eur. und im DAB beschreiben eine DC-Reinheitsprüfung auf „Mit Ninhydrin nachweisbare Substanzen“. In den meisten Monographien wird ein Fließmittel aus Essigsäure 99 %, Wasser und 1-Butanol im Verhältnis 20/20/60 (v/v/v) eingesetzt. Nach Entwicklung der Platte wird diese mit Ninhydrin-Lösung besprüht und danach im Tageslicht ausgewertet.

In vielen Fällen muss die Systemeignung durch die Trennung der zu untersuchenden Aminosäure von einer weiteren Aminosäure belegt werden. Die Verunreinigungen werden durch den Vergleich ihrer Flecken mit dem Fleck der zu untersuchenden Aminosäure in einer Referenzlösung auf 0.5 % begrenzt.

Auch in der USP werden Aminosäuren mittels DC und Ninhydrin-Detektion geprüft. Dabei sind die Vorschriften sowohl in Bezug auf die Konzentrationen der Prüf- und Referenzlösungen als auch in Bezug auf die Zusammensetzung des Fließmittels mit den Vorgaben im Ph. Eur. vergleichbar [230]. Zusätzlich zur Begrenzung einzelner Verunreinigungen auf 0.5 % wird die Summe der Verunreinigungen auf 2 % begrenzt.

Die Monographien sind auf Aminosäuren ausgerichtet, die durch chemische

Synthese oder Extraktion aus Proteinhydrolysaten hergestellt werden. So werden mit der DC-Reinheitsprüfung vor allen Dingen andere Aminosäuren, die bei der Gewinnung aus Proteinhydrolysaten nicht vollständig entfernt wurden, erfasst [230]. Allerdings werden immer mehr Aminosäuren fermentativ hergestellt. Deshalb werden viele mögliche Verunreinigungen durch die Monographien des Ph. Eur. nicht abgedeckt. Die biotechnologisch hergestellten Aminosäuren unterliegen jedoch der allgemeinen Monographie „Fermentationsprodukte“ und den darin gestellten Anforderungen an Herstellung und Aufarbeitung. Dort wird gefordert, dass durch die Reinigungsverfahren Überreste der Mikroorganismen, Kulturmedien, Substrate, Vorläufersubstrate sowie unerwünschte Umwandlungsprodukte von Substraten und Vorläufersubstraten entfernt werden [18]. Durch diese Vorgaben soll die Qualität der Substanzen gewährleistet werden.

6.4. Untersuchung von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit Fmoc-Cl

6.4.1. Fmoc-Cl als Derivatisierungsreagenz

9-Fluorenylmethylchloroformat (Fmoc-Cl) wurde 1972 von Carpino und Han als Schutzgruppe für Aminogruppen in die Synthese eingeführt [240]. Einarsson *et al.* haben Fmoc-Cl 1983 als Derivatisierungsreagenz für Aminosäuren im analytischen Maßstab verwendet und die Derivate mittels RP-HPLC getrennt [241].

Fmoc-Cl reagiert nach dem in Abbildung 6-4 gezeigten Schema mit primären und sekundären Aminen zu Urethanen. Die fluoreszierenden Derivate können bei einer Anregungswellenlänge von 260 nm und einer Messwellenlänge von 310 nm mit einem Fluoreszenzdetektor erfasst werden. Daneben reagiert Fmoc-Cl allerdings auch mit Wasser zu Fmoc-OH. Da sowohl Fmoc-Cl als auch Fmoc-OH fluoreszieren und dadurch die Detektion der gewünschten Derivate stören können, müssen beide Substanzen nach der Reaktion aus dem Ansatz entfernt werden. Dazu eignet sich eine Extraktion, z. B. mit n-Pentan [241, 242, 243]. Durch diesen Schritt wird auch die Reaktion beendet.

Fmoc-Derivate von Aminosäuren wurden von Chan *et al.* mittels MEKC in Kombination mit LIF-Detektion analysiert [243]. Mit einem 20 mM Boratpuffer pH 9.2 mit 25 mM SDS konnten fast alle Aminosäuren einer Mischung aus 18 Aminosäuren

getrennt werden (Kapillare: 70 cm Gesamtlänge, 60 cm effektive Länge, 50 μm ; 20 kV).

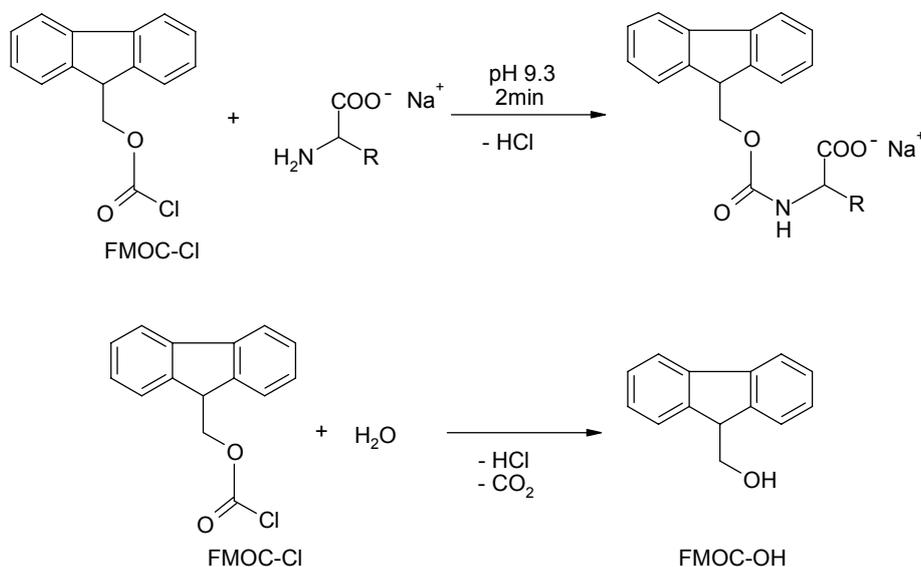


Abbildung 6-4: Reaktion von 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl) mit Aminosäuren und Hydrolyse des Reagenzes.

Novatchev hat eine MEKC-Methode nach Derivatisierung mit FMOC-Cl zur Reinheitsanalytik von Aminosäuren eingesetzt [226]. Die gewählte UV-Detektion ist in der Regel ca. 25-mal weniger empfindlich als eine Fluoreszenz-Detektion der FMOC-Derivate [244]. Dennoch können mit dieser Methode andere Aminosäuren als Verunreinigungen von Aminosäuren auf 0.1%-Niveau nachgewiesen werden [226]. Nach der anodischen Injektion (1 psi, 10 Sekunden) erfolgt die Trennung der derivatisierten Probe mit einem 20 mM Boratpuffer pH 9.3 mit 25 mM SDS und einer Spannung von 15 kV. Die Derivatisierungsbedingungen und die Spülbedingungen der Kapillare zwischen zwei Trennungen der von Novatchev vorgeschlagenen Methode wurden leicht geändert. Für die Bestimmung des Verunreinigungsprofils von Aminosäuren wurde die modifizierte Methode angewendet.

Abbildung 6-5 zeigt das bei der Detektionswellenlänge von 254 nm aufgenommene Elektropherogramm einer Mischung aus 19 Aminosäuren (Aminosäure-Modellmischung) je 0.007 mg/ml. Es wird eine Comigration der FMOC-Derivate von Asparagin, Glutamin und Threonin beobachtet. Ebenso überlagern die Peaks von Histidin, Lysin und Cystein. Die basischen Aminosäuren können unter den Reaktionsbedingungen zweifach derivatisiert werden [241, 247]. Durch die zwei FMOC-Reste haben die Derivate eine höhere Affinität zu den SDS-Mizellen als die

einfach derivatisierten Aminosäuren und deshalb eine größere Migrationszeit. Aufgrund der Wanderungszeit kann auch für Cystein eine Doppelderivatisierung über die Aminogruppe und das Thiol angenommen werden.

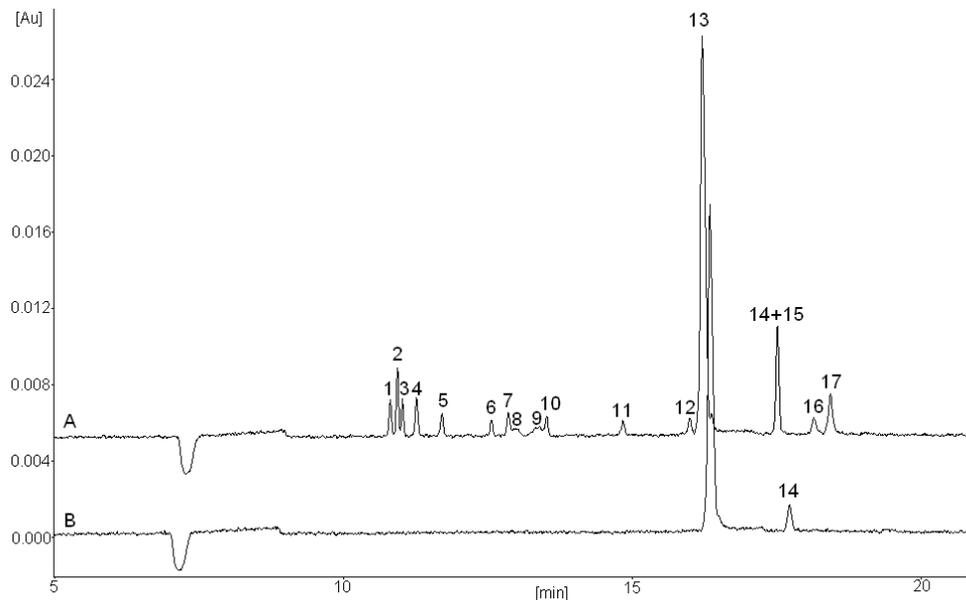


Abbildung 6-5: Trennung einer Modellmischung aus 19 Aminosäuren nach Derivatisierung mit FMOC-Cl. CE-Bedingungen: Kapillare: Quarzkapillare, 70.0 cm Gesamtlänge, 60.0 cm effektive Länge, 75 μm ; Trennpuffer: 20 mM Boratpuffer pH 9.30; 25 mM SDS; Spannung: 15 kV; Injektion: 1 psi, 10 sec; Temperatur: 25 $^{\circ}\text{C}$; Detektion: 254 nm. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Proben: (A) Aminosäure-Modellmischung je 0.007 mg/ml; (B) Blindwert. Peakzuordnung: (1) Ser; (2) Asn, Gln, Thr; (3) Ala; (4) Gly; (5) Val; (6) Met; (7) Ile; (8) Glu; (9) Asp; (10) Leu; (11) Phe; (12) Trp; (13), (14) FMOC-Überschuss; (15) Cystin; (16) Arg; (17) Cys, His, Lys.

6.4.2. Untersuchungen zur Identifizierung eines unbekanntes Peaks

In den Elektropherogrammen von derivatisierten Isoleucin-, Phenylalanin- und Serin-Proben fällt ein Peak mit einer Migrationszeit von ca. 18 Minuten auf (Abbildung 6-6). Nachfolgend beschriebene Versuche sollten klären, wodurch dieser Peak verursacht wird.

In Betracht kommen die Aminosäuren Histidin, Lysin und Cystein, die bei der gleichen Migrationszeit im Elektropherogramm erscheinen. Novatchev ordnet in seinem Artikel einen Peak mit einer Wanderungszeit von ca. 17.5 Minuten einem nicht näher beschriebenen Abbauprodukt der Reaktion zu [226]. Neben Abbauprodukten müssen auch eventuelle Nebenprodukte der Reaktion berücksichtigt werden.

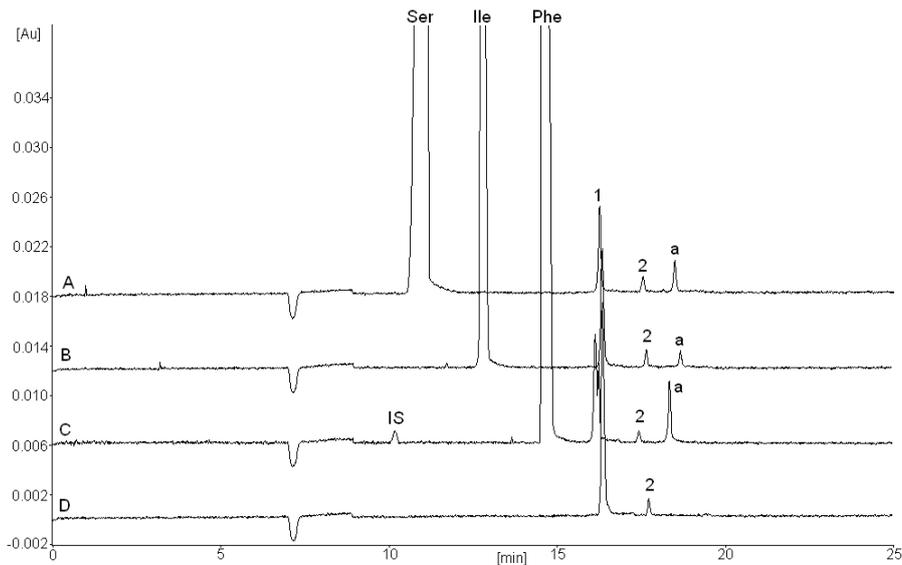


Abbildung 6-6: Vergleich von derivatisierten Isoleucin-, Phenylalanin- und Serin-Proben. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Proben: (A) Ser 3.5 mg/ml; (B) Ile 3.5 mg/ml; (C) Phe 3.5 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml; (D) Blindwert. Peakzuordnung: (1), (2) FMOc-Überschuss; (IS) interner Standard 4-Hydroxyprolin; (a) unbekannter Peak.

6.4.2.1. CE-Untersuchungen

Die Untersuchungen einer Isoleucin-Probe, die mit Lysin versetzt wurde, sowie von Phenylalanin-Proben, die mit einer Mischung aller Aminosäuren gespikt waren, zeigten, dass die Derivate von Cystein, Histidin und Lysin mit dem zu identifizierenden Peak, der als Peak a bezeichnet wird, comigrieren (Abbildung 6-7).

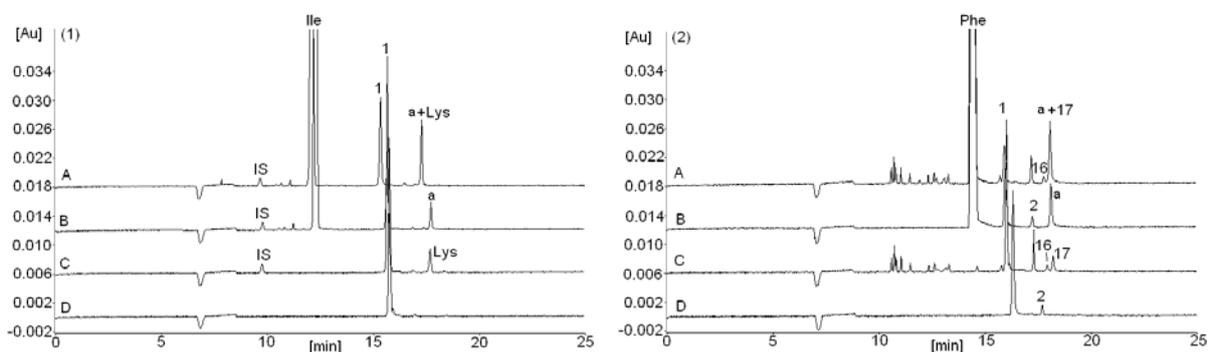


Abbildung 6-7: Untersuchung gespikter Isoleucin-Proben (1) und Phenylalanin-Proben (2). CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Proben: **(1)**: (A) Ile 3.5 mg/ml + Lys 0.035 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml; (B) Ile 3.5 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml; (C) Lys 0.035 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml; (D) Blindwert; **(2)**: (A) Phe 3.5 mg/ml + Aminosäure-Modellmischung je 0.007 mg/ml; (B) Phe 3.5 mg/ml; (C) Aminosäure-Modellmischung je 0.007 mg/ml; (D) Blindwert. Peakzuordnung: (1), (2) FMOc-Überschuss; (16) Arg; (17) Cys, His, Lys; (a) unbekannter Peak; (IS) interner Standard 4-Hydroxyprolin.

Bei Variationen des Extraktionsschrittes wurde festgestellt, dass die Größe des Peaks a von der Dauer der Pentan-Extraktion abhängt. So wurde eine deutliche Zunahme des Peaks beobachtet, wenn statt der gewählten Extraktionszeit von einer Minute die Zeit auf 10 Minuten verlängert wurde (Abbildung 6-8). Eine Verlängerung der Reaktionszeit von 2 Minuten auf 10 Minuten hatte keinen Einfluss.

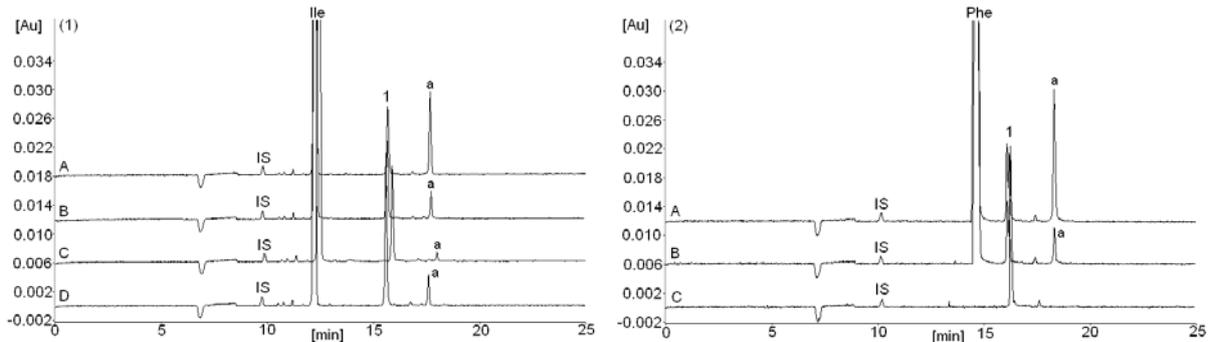


Abbildung 6-8: Untersuchung von Isoleucin-Proben (1) und Phenylalanin-Proben (2) in Abhängigkeit von der Extraktionszeit. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben, mit Ausnahme der Reaktions- und Extraktionszeit. Proben: **(1)**: Ile 3.5 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml, (A) 3x Extraktion je 2 ml Pentan, 10 min; (B) 3x Extraktion je 2 ml Pentan, 1 min; (C) 3x Extraktion je 2 ml Pentan, 30 sec; (D) wie (B) aber Reaktionszeit 10 min; **(2)**: Phe 3.5 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml, (A) 3x Extraktion je 2 ml Pentan, 10 min; (B) 3x Extraktion je 2 ml Pentan, 1 min; (C) Blindwert, wie (B). Peakzuordnung: (1) Fmoc-Überschuss; (a) unbekannter Peak; (IS) interner Standard 4-Hydroxyprolin.

Zum Vergleich wurden Lysin-Lösungen untersucht. Das Verhalten des Peaks a war nicht mit den Eigenschaften des Fmoc-Lysin-Peaks in Bezug auf die Extraktion vergleichbar. Hier war der entsprechende Peak im Elektropherogramm bei einer Extraktionszeit von 10 Minuten kleiner als bei einer einminütigen Extraktion (Abbildung 6-9). Wahrscheinlich wird bei zu langer Extraktion das Fmoc-Lysin-Derivat zusammen mit dem Reagenzüberschuss aus dem Reaktionsansatz entfernt. Diese Problematik wird auch in der Literatur beschrieben [244, 245, 246, 247]. Ein weiterer Effekt ist die mögliche Adsorption von doppel-derivatisierten Aminosäuren an Glaswänden [247, 248]. In diesem Zusammenhang wird allerdings berichtet, dass Reste des n-Pentans in der derivatisierten Probe die Adsorption der Aminosäuren verhindern [247]. Auch die Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel für Fmoc-Cl ist günstig, denn Acetonitril wird nur zu einem geringen Teil bei der Extraktion mit n-Pentan entfernt und trägt dadurch zur besseren Löslichkeit der Derivate bei [244, 248].

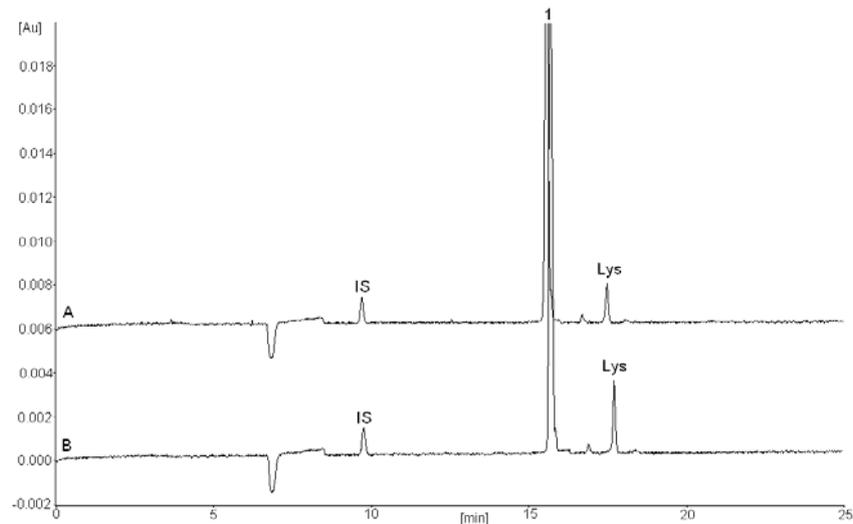


Abbildung 6-9: Untersuchung von Lysin-Proben 0.035 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml in Abhängigkeit von der Extraktionszeit. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben, mit Ausnahme der Extraktionszeit. Proben: (A) 3x Extraktion je 2 ml Pentan, 10 min; (B) 3x Extraktion je 2 ml Pentan, 1 min. Peakzuordnung: (1) Fmoc-Überschuss; (IS) interner Standard 4-Hydroxyprolin.

Es wurde weiterhin beobachtet, dass der Peak a durch Filtration des derivatisierten Ansatzes entfernt werden konnte (Abbildung 6-10).

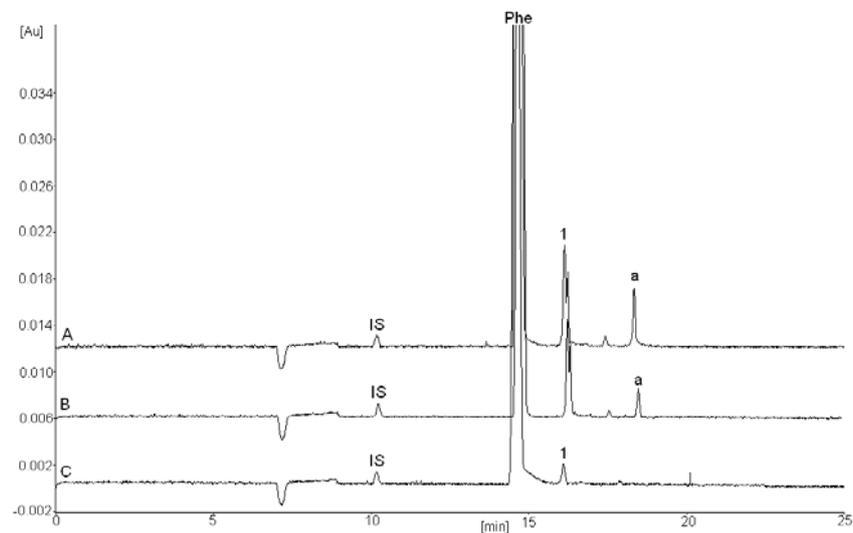


Abbildung 6-10: Einfluss der Filtration von derivatisierten Phenylalanin-Proben 3.5 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Probe: (A) ohne Filtration; (B) Filtration durch PVDF-Filter; (C) Filtration durch CME-Filter. Peakzuordnung: (1) Fmoc-Überschuss; (a) unbekannter Peak; (IS) interner Standard 4-Hydroxyprolin.

Für die FMOC-Derivate von Phenylalanin und 4-Hydroxyprolin wurde keine Veränderung der Peakgröße durch eine Filtration festgestellt. Bei der Filtration handelt es sich um einen sensiblen Prozess, durch den, zum Schutz der instrumentellen Geräte, Partikel der Probelösung entfernt werden sollen. Vom Verlust von Analyten durch Adsorption an Filtermaterialien wird berichtet [249]. Für die Untersuchung der Aminosäure-Proben wurde auf eine Filtration verzichtet, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen.

In einem nächsten Schritt wurde nach CE-Bedingungen gesucht, um den Peak a von den Aminosäuren Cystein, Histidin und Lysin abzutrennen. Das Migrationszeitfenster, also die Zeit zwischen dem EOF (t_{EOF}) und der Wanderungszeit der Mizellen (t_{mc}), kann durch den Zusatz eines organischen Lösungsmittels erweitert werden. Durch das mit Wasser mischbare Lösungsmittel werden die elektroosmotische Geschwindigkeit reduziert und die Aggregationseigenschaften des Mizellbildners verändert. In vielen Fällen wird die Auflösung verbessert [122, 123]. Für das vorliegende Trennproblem wurden Puffer, denen Methanol bzw. Acetonitril zugesetzt wurde, getestet. Mit einem Boratpuffer bestehend aus 20 mM Borat, 25 mM SDS, pH 9.30 und 15 % Acetonitril (v/v) konnte eine Trennung der derivatisierten Aminosäuren Cystein, Histidin und Lysin vom Peak a erzielt werden (Abbildung 6-11). Bei einer Verlängerung der Extraktionszeit wurde ein Wachstum des letzten Peaks beobachtet, weshalb dieser dem Peak a zugeordnet wurde. Die aufgezeichneten Elektropherogramme belegten, dass es sich bei Peak a nicht um FMOC-Derivate von Cystein, Histidin oder Lysin handelt.

Neben Phenylalanin wurden Isoleucin- und Serin-Proben mit dem variierten Trennpuffer untersucht (Abbildung 6-12, Abbildung 6-13).

Bei Verwendung des Standard-Trennpuffers (20 mM Boratpuffer pH 9.30; 25 mM SDS) wurden keine Unterschiede der Migrationszeiten der Peaks in Isoleucin-, Phenylalanin- und Serin-Proben beobachtet (Abbildung 6-6). Dagegen zeigte der zu identifizierende Peak in den Serin-Proben durch die Variation des Trennpuffers andere Migrationseigenschaften als die entsprechenden Peaks in Isoleucin- und Phenylalanin-Ansätzen (Abbildung 6-12, Abbildung 6-13). Es wurde deshalb vermutet, dass die Verbindung, die den Peak a verursacht, in den verschiedenen untersuchten Aminosäure-Proben nicht identisch ist.

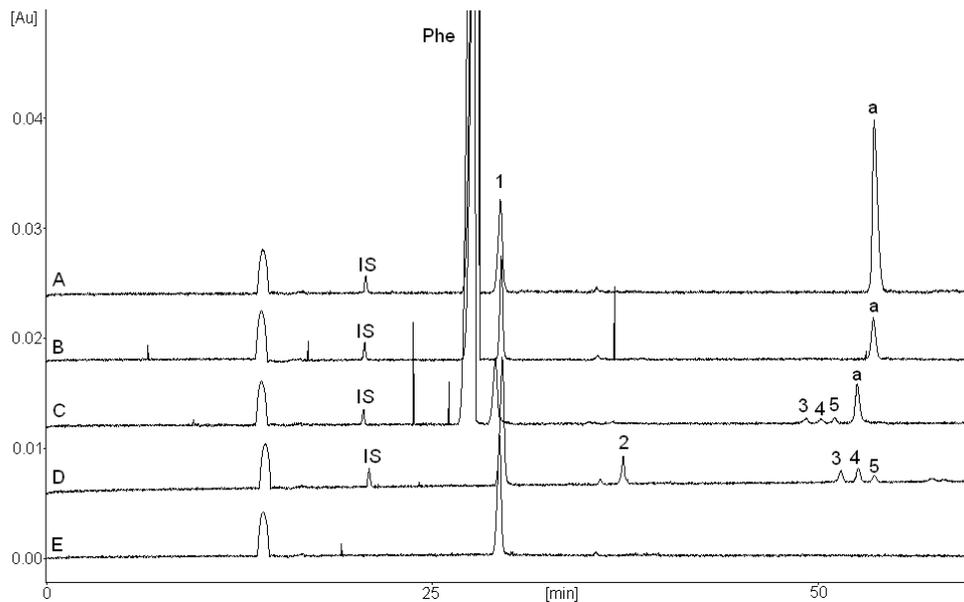


Abbildung 6-11: Variation des Trennpuffers. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5; Trennpuffer: 20 mM Boratpuffer, 25 mM SDS, pH 9.30; 15 % Acetonitril (v/v); Spannung: 10 kV. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Proben: (A) Phe 3.5 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml, 3x Extraktion je 2 ml Pentan, 10 min; (B) Phe 3.5 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml; (C) Phe 3.5 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml + Cys, His, Lys je 0.0035 mg/ml; (D) Arg 0.035 mg/ml und Cys, His, Lys je 0.0175 mg/ml; (E) Blindwert. Peakzuordnung: (1) Fmoc-Überschuss; (2) Arg; (3) Lys; (4) His; (5) Cys; (a) unbekannter Peak; (IS) interner Standard 4-Hydroxyprolin.

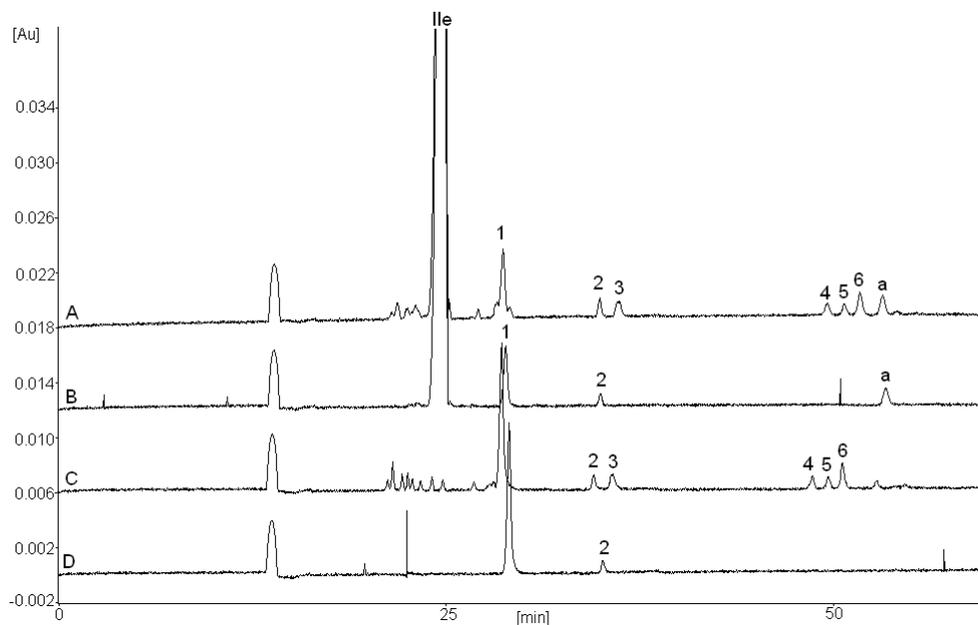


Abbildung 6-12: Variation des Trennpuffers. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-11. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Proben: (A) Ile 3.5 mg/ml + Aminosäure-Modellmischung je 0.007 mg/ml; (B) Ile 3.5 mg/ml; (C) Aminosäure-Modellmischung je 0.007 mg/ml; (D) Blindwert. Peakzuordnung: (1), (2) Fmoc-Überschuss; (3) Arg; (4) Lys; (5) His; (6) Cys; (a) unbekannter Peak.

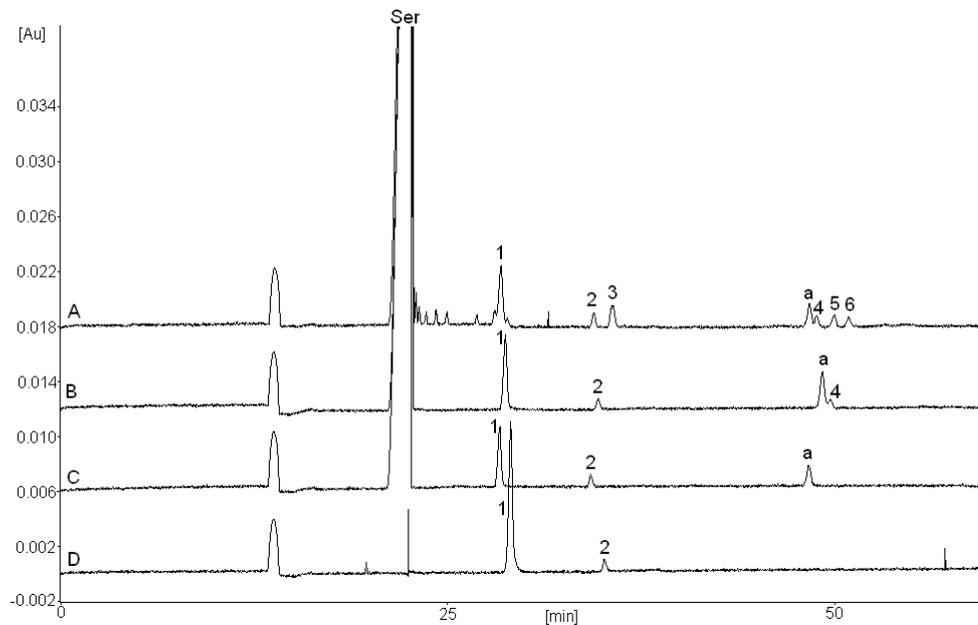


Abbildung 6-13: Variation des Trennpuffers. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-11. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Proben: (A) Ser 3.5 mg/ml + Aminosäure-Modellmischung je 0.007 mg/ml; (B) Ser 3.5 mg/ml + Lys 0.007 mg/ml; (C) Ser 3.5 mg/ml; (D) Blindwert. Peakzuordnung: (1), (2) FMOC-Überschuss; (3) Arg; (4) Lys; (5) His; (6) Cys; (a) unbekannter Peak.

6.4.2.2. Isolierung der Substanz mittels DC

Die FMOC-Derivate der Aminosäuren sind auf einer mit einem Fluoreszenzindikator imprägnierten DC-Platte unter einer UV-Lampe (254 nm) detektierbar. Nach der Trennung der Komponenten kann die zu identifizierende Verbindung von der DC-Platte extrahiert werden. Mit der isolierten Substanz können weitere Versuche durchgeführt werden. Phenylalanin wurde für die Untersuchungen gewählt.

In der Synthese wird FMOC-Cl als Schutzgruppe für Aminogruppen eingesetzt. Mehrere Artikel beschreiben die Reaktion von FMOC-Cl mit Aminosäuren. Zum Teil werden DC-Methoden angegeben, mit denen die Derivate untersucht wurden [250, 251, 252]. Einige dieser Fließmittel wurden für die vorliegende Fragestellung getestet.

Mit einem Fließmittel aus Dichlormethan, Methanol und Essigsäure 99 % im Verhältnis 90/10/0.1 (v/v/v) konnte auf einer Kieselgel GF₂₅₄-Platte über eine Laufstrecke von 17 cm eine Trennung eines derivatisierten Phenylalanin-Ansatzes in drei Flecke erzielt werden (R_{F1} 0.32, R_{F2} 0.44, R_{F3} 0.65). Der größte Fleck (R_{F1}) wurde Phenylalanin zugeordnet. Der FMOC-Überschuss hat einen R_F -Wert von 0.65, wie durch die Chromatographie eines Blindwertes festgestellt wurde. Daher wurde angenommen, dass die zu isolierende Substanz einen R_F -Wert von 0.44 hat.

Um die Ausbeute bei der Isolierung von der DC-Platte zu erhöhen, wurde bei der Derivatisierung eine Zeit von 10 Minuten je Extraktionsschritt gewählt. In diesem Fall wurde in der CE ein Wachstum des zu identifizierenden Peaks beobachtet. Zusätzlich wurde der Ansatz nach der Extraktion nicht wie im Experimentalteil beschrieben 1:10, sondern 1:2 verdünnt.

Zur Isolierung der Substanz wurden die entsprechenden Flecke von entwickelten DC-Platten abgekratzt und mit Acetonitril extrahiert. Nach Zentrifugieren (4800 UPM, 8 Minuten) wurde der Überstand dekantiert. Extraktion und Zentrifugation wurden dreimal wiederholt. Die Acetonitril-Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel wurde bei Raumtemperatur im Vakuum entfernt. Neben dem Fleck der zu identifizierenden Verbindung wurde auch FMOC-Phenylalanin von DC-Platten isoliert.

Mittels CE wurde überprüft, ob es sich bei den gewonnenen Rückständen um die vermuteten Substanzen handelt. Abbildung 6-14 zeigt, dass der Fleck mit R_{F1} dem FMOC-Derivat von Phenylalanin zugeordnet werden kann. Wegen der besseren Trennung der Peaks wurde der variierte Trennpuffer (20 mM Boratpuffer, 25 mM SDS, pH 9.30; 15 % Acetonitril (v/v)) für die Untersuchung der unbekanntes Substanz eingesetzt (Abbildung 6-15). Die aufgezeichneten Elektropherogramme legten nahe, dass es sich bei der isolierten Verbindung mit R_{F2} um die zu identifizierende Substanz handelt.

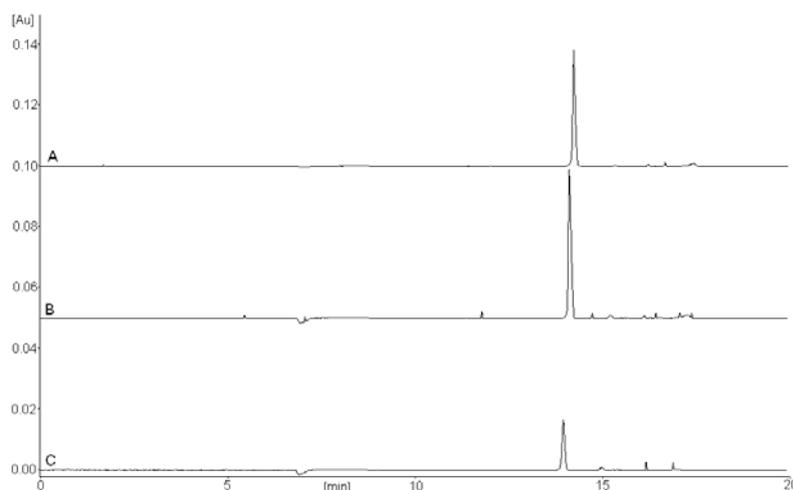


Abbildung 6-14: Überprüfung des DC-Extraktes des Flecks mit R_{F1} mittels CE. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5. Proben: (A) DC-Extrakt des Flecks mit R_{F1} ; (B) derivatisierte Phenylalanin-Probe versetzt mit dem DC-Extrakt R_{F1} ; (C) derivatisierte Phenylalanin-Probe.

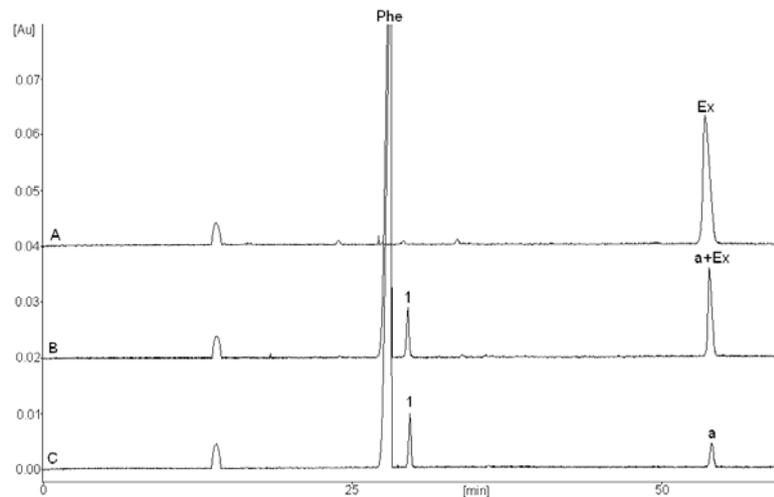


Abbildung 6-15: Überprüfung des DC-Extraktes des Flecks mit R_{F2} mittels CE. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-11. Proben: (A) DC-Extrakt des Flecks mit R_{F2} ; (B) derivatisierte Phenylalanin-Probe versetzt mit dem DC-Extrakt R_{F2} ; (C) derivatisierte Phenylalanin-Probe. Peakzuordnung: (1) FMOCC-Überschuss; (a) unbekannter Peak; (Ex) Signal im DC-Extrakt R_{F2} .

6.4.2.3. Untersuchung der isolierten Substanz mittels NMR-Spektroskopie

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei der Synthese von FMOCC-Aminosäuren mit FMOCC-Cl nicht zu vernachlässigende Mengen von Oligopeptiden als Verunreinigungen gebildet werden [251, 252, 253, 254, 255]. Lapatsanis *et al.* haben mittels HPLC abgeschätzt, dass FMOCC-Aminosäuren 3 % bis 7 % des entsprechenden FMOCC-Dipeptids enthalten [252]. Die Bildung der Nebenprodukte erfolgt vermutlich nach dem in Abbildung 6-16 gezeigten Mechanismus [251, 252, 255].

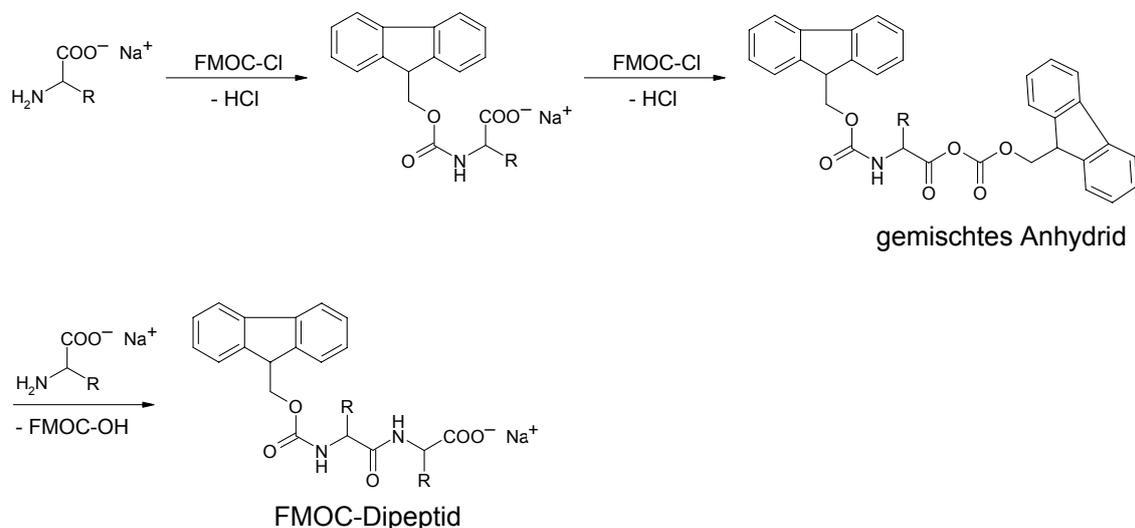


Abbildung 6-16: Bildung von FMOCC-Dipeptiden als Nebenprodukte der Synthese von FMOCC-Cl mit Aminosäuren.

Nach einem nucleophilen Angriff des Fmoc-Aminosäure-Anions an das Carbonyl-Kohlenstoff-Atom von Fmoc-Cl entsteht ein gemischtes Anhydrid, das relativ stabil ist [251]. In einem zweiten Schritt reagiert die Aminosäure mit dem Anhydrid unter Bildung des entsprechenden Fmoc-Dipeptids. Theoretisch ist nach diesem Reaktionsschema auch die Bildung von Oligopeptiden möglich. Tatsächlich wurden geringe Mengen von Fmoc-Tripeptiden in Fmoc-Aminosäuren gefunden [253, 254]. Die mittels DC isolierte Substanz wurde mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Zum Vergleich wurden auch die Spektren von Fmoc-Phenylalanin aufgezeichnet (Tabelle 6-1).

Aufgrund der Integralhöhen im ^1H -Spektrum kann angenommen werden, dass in der gesuchten Substanz Fmoc und Phenylalanin im Verhältnis 2:1 vorliegen. Im IR-Spektrum der zu identifizierenden Substanz fehlt ein charakteristischer „Säurebauch“ der OH-Valenzschwingung. Die Aminosäuren werden mit einem ca. 10-fachen Molüberschuss Fmoc-Cl umgesetzt, so dass am Ende der Reaktionszeit keine freie Aminosäure mehr vorliegen sollte. Deshalb erscheint die Bildung eines Fmoc-Dipeptides unwahrscheinlich. Aus diesen Überlegungen heraus wird vermutet, dass die in Abbildung 6-16 gezeigte Reaktion auf der Stufe des gemischten Anhydrids stehen bleibt. Entsprechende Signale für die beiden Carbonyl-Kohlenstoffatome konnten im ^{13}C -Spektrum bei 167.8 ppm bzw. 175.4 ppm zugeordnet werden.

Tabelle 6-1: NMR-Spektren von Fmoc-Phenylalanin und der unbekanntenen Substanz. Die Signale des ^1H -Spektrums von Fmoc-Phenylalanin entsprechen den Angaben in der Literatur [256].

Fmoc-Phenylalanin		
^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3)	$\delta = 3.14$ ppm, dd, 1H	CH_2 (Phenylalanin)
	$\delta = 3.21$ ppm, dd, 1H	CH_2 (Phenylalanin)
	$\delta = 4.22$ ppm, t, 1H	CH (Fmoc)
	$\delta = 4.38$ ppm, dd, 1H	CH_2 (Fmoc)
	$\delta = 4.45$ ppm, dd, 1H	CH_2 (Fmoc)
	$\delta = 4.70$ ppm, dd, 1H	CH (Phenylalanin)
	$\delta = 5.17$ ppm, d, 1H	NH
	$\delta = 7.14 - 7.19$ ppm, m	} ~ 13 H aromatische H
	$\delta = 7.26 - 7.32$ ppm, m	
	$\delta = 7.40$ ppm, t	
	$\delta = 7.51 - 7.56$ ppm, m	
	$\delta = 7.76$ ppm, d	
^{13}C -NMR	$\delta = 38.7$ ppm	CH_2 (Phenylalanin)
	$\delta = 47.1$ ppm	CH (Fmoc)
	$\delta = 54.5$ ppm	CH (Phenylalanin)
	$\delta = 67.1$ ppm	CH_2 (Fmoc)
	$\delta = 120.0$ ppm, 125.0 ppm, 127.1 ppm, 127.3 ppm, 127.7 ppm, 128.7 ppm, 129.3 ppm	aromatische CH
	$\delta = 135.4$ ppm, 141.3 ppm, 143.6 ppm	aromatische quartäre C
	$\delta = 156.0$ ppm	-O-CO-NH-
	$\delta = 174.7$ ppm	-COOH

Tabelle 6-1 (Fortsetzung).

unbekannte Substanz		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 2.87 ppm, dd, J = 10.5, 14.0 Hz, 1H	CH ₂ (Phenylalanin)
	δ = 3.22 ppm, dd, J = 5.0, 14.0 Hz, 1H	CH ₂ (Phenylalanin)
	δ = 4.14 ppm, t, J = 6.0 Hz, 2H	CH (FMOC)
	δ = 4.40 ppm, dd, J = 6.5, 10.5 Hz, 2H	CH ₂ (FMOC)
	δ = 4.54 ppm, dd, J = 6.5, 10.5 Hz, 2H	CH ₂ (FMOC)
	δ = 5.20 ppm, dd, J = 5.0, 10.5 Hz, 1H	CH (Phenylalanin)
	δ = 6.81 – 6.84 ppm, m	} ~ 21 H aromatische H
	δ = 7.03 – 7.09 ppm, m	
	δ = 7.16 – 7.21 ppm, m	
	δ = 7.27 – 7.32 ppm, m	
δ = 7.43 – 7.48 ppm, m		
δ = 7.62 – 7.71 ppm, m		
¹³ C-NMR	δ = 35.4 ppm	CH ₂ (Phenylalanin)
	δ = 46.6 ppm	CH (FMOC)
	δ = 68.9 ppm	CH ₂ (FMOC)
	δ = 120.0 ppm, 124.9 ppm, 125.0 ppm, 126.6 ppm, 127.2 ppm, 127.2 ppm, 127.8 ppm, 127.8 ppm, 128.4 ppm, 129.2 ppm, 136.9 ppm	aromatische CH
	δ = 137.0 ppm, 141.3 ppm, 141.3 ppm, 141.3 ppm, 143.3 ppm, 143.4 ppm	aromatische quartäre C
	δ = 153.2 ppm	-O-CO-NH-
	δ = 167.8 ppm	-O-CO-O-
	δ = 175.4 ppm	R-CO-O-

Durch die zwei gebundenen FMOC-Reste hat das Molekül eine große Affinität zu den SDS-Mizellen und erscheint in den Elektropherogrammen bei großen Migrationszeiten. Es wird deshalb vorgeschlagen, dass es sich bei dem Peak a, der in derivatisierten Phenylalanin-Proben detektiert wird, um die in Abbildung 6-17 gezeigte Verbindung und damit um ein Nebenprodukt der Derivatisierungsreaktion handelt.

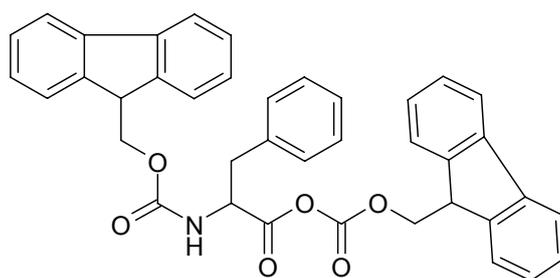


Abbildung 6-17: Gemischtes Anhydrid von Phenylalanin als Vorschlag für die Verbindung, die als Peak a in derivatisierten Phenylalanin-Proben detektiert wird.

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass das Ausmaß der Nebenreaktion von der Extraktion abhängt. Diese ist für die Entfernung des FMOC-Überschusses notwendig. Aufgrund der Bildung der Nebenprodukte wird in erster Linie der Nachweis der basischen Aminosäuren (Arginin, Histidin, Lysin) und Cystein als

mögliche Verunreinigungen in Aminosäure-Proben gestört, da deren FMOC-Derivate mit dem Nebenprodukt comigrieren. Deshalb ist ihre Zuordnung nicht eindeutig. Die Bestimmung der anderen Aminosäuren als mögliche Verunreinigungen ist von der Nebenreaktion nicht betroffen.

6.4.3. Untersuchung von Aminosäure-Proben

In die Studie wurden Isoleucin-, Phenylalanin- und Serin-Proben, die vom BfArM zur Verfügung gestellt wurden, einbezogen. Eine Übersicht aller Chargen gibt Kapitel 9.4.1. Die Methode ist zur Untersuchung von Histidin-Proben nicht geeignet, weil die Derivate unter den gegebenen Reaktionsbedingungen während der Extraktion nicht löslich sind.

Von jeder Charge wurden zwei Untersuchungslösungen (3.5 mg/ml Aminosäure in 0.1 M Boratpuffer pH 9.30) hergestellt, wobei eine der beiden Lösungen einen internen Standard (0.0175 mg/ml) enthielt. Für die Phenylalanin- und Serin-Proben wurde als interner Standard 6-Aminocapronsäure eingesetzt. Da Isoleucin von dieser Substanz nicht vollständig abgetrennt ist, wurde für die Isoleucin-Proben 4-Hydroxyprolin als interner Standard gewählt.

Jede Untersuchungslösung wurde einmal derivatisiert und zweimal analysiert. Falls erforderlich, wurden zur Quantifizierung Referenzlösungen, die 0.035 mg/ml der zu untersuchenden Aminosäure und 0.0175 mg/ml internen Standard enthalten, hergestellt. Der Gehalt der Verunreinigungen wurde mittels Normalisierungsverfahren bestimmt. Zum Vergleich wurde die „Interner-Standard“-Methode eingesetzt (Kapitel 2.3.4).

6.4.3.1. Ergebnisse der Untersuchung von Isoleucin-Proben

Insgesamt wurden 19 Isoleucin-Proben von zwei Herstellern untersucht. Abbildung 6-18 zeigt exemplarisch Elektropherogramme, die für den jeweiligen Hersteller charakteristisch sind.

Zur Identifizierung der Peaks wurden Proben hergestellt, die mit 0.5 % der Aminosäuren gespikt wurden, die aufgrund des Vergleichs von Migrationszeiten mit der Aminosäure-Modellmischung als Verunreinigungen in Frage kommen. So wurden die in den Chargen des Herstellers A detektierten Peaks den Aminosäuren Glycin, Valin und Leucin zugeordnet. Eine Charge dieses Herstellers enthielt zusätzlich

Alanin (Abbildung 6-18). In den Chargen des Herstellers C wurden Glycin und Valin gefunden.

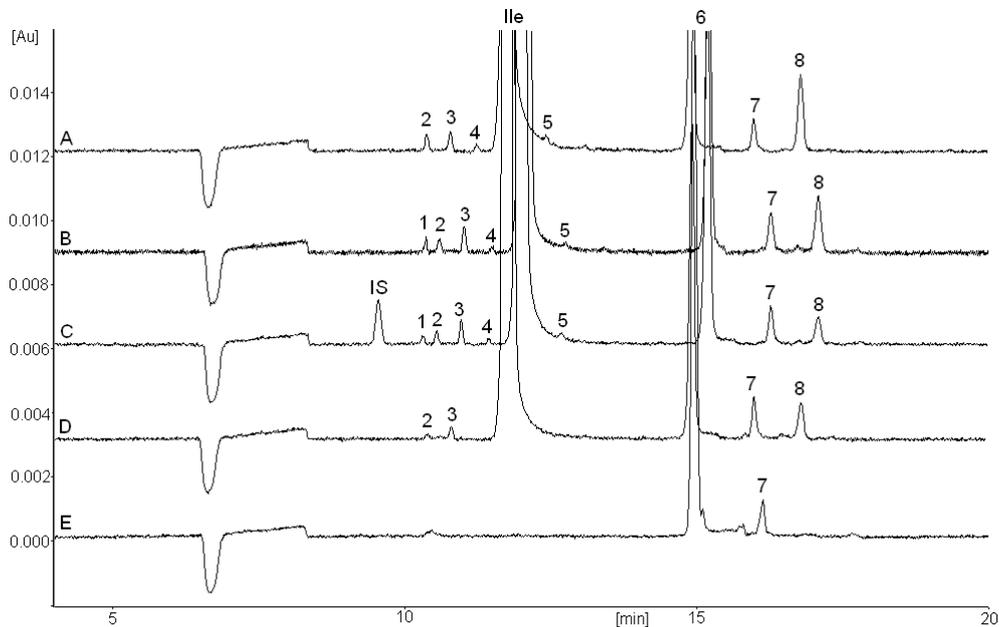


Abbildung 6-18: Untersuchung von Isoleucin-Chargen nach Derivatisierung mit Fmoc-Cl. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Proben: (A) Ile (03-03/03, Hersteller A) 3.5 mg/ml; (B) Ile (17-03/03, Hersteller A) 3.5 mg/ml; (C) Ile (17-03/03, Hersteller A) 3.5 mg/ml + IS 0.0175 mg/ml; (D) Ile (08-03/03, Hersteller C) 3.5 mg/ml; (E) Blindwert. Peakzuordnung: (1) Ala; (2) Gly; (3) Val; (4) unbekannte Verunreinigung; (5) Leu; (6), (7) Fmoc-Überschuss; (8) Nebenprodukt der Synthese; (IS) interner Standard 4-Hydroxyprolin.

Zur Berechnung des Gehaltes der Verunreinigungen über die „Interner-Standard“-Methode wurden die Respons- bzw. Korrekturfaktoren der zugeordneten Aminosäuren bestimmt. Dazu wurden drei Lösungen hergestellt, die 0.035 mg/ml Isoleucin und je 0.035 mg/ml Alanin, Glycin, Leucin und Valin sowie 0.0175 mg/ml internen Standard 4-Hydroxyprolin enthielten. Jede Lösung wurde einmal derivatisiert und nach der Reaktion zweimal injiziert. In Tabelle 6-2 sind die gefundenen Mittelwerte der Respons- und Korrekturfaktoren angegeben.

Tabelle 6-2: Respons- und Korrekturfaktoren für Alanin, Glycin, Leucin und Valin.

Aminosäure	Responsfaktor	Korrekturfaktor
Alanin	1.73	0.58
Glycin	2.09	0.48
Leucin	0.99	1.00
Valin	1.18	0.84

Nach den Vorgaben des „Technical Guide for the Elaboration of Monographs“ [22] wurden die Responsfaktoren zwischen 0.8 und 1.2 nicht berücksichtigt und nur die Korrekturfaktoren für Alanin und Glycin in die Berechnung einbezogen.

Tabelle 6-3 fasst die Ergebnisse der Quantifizierung der Verunreinigungen zusammen.

Tabelle 6-3: Ergebnisse der Quantifizierung der Verunreinigungen in Isoleucin-Proben. Angabe des Mittelwertes (MW; in %) und der relativen Standardabweichung (RSD; in %) von 4 Injektionen (Normalisierungsverfahren) bzw. des Mittelwertes von 2 Injektionen („Interner-Standard“-Methode). (KF) Korrekturfaktor; (VU 4) unbekannte Verunreinigung.

Charge		Normalisierungsverfahren					„Interner-Standard“-Methode						
		Ala	Gly	Val	Leu	VU 4	ohne KF				mit KF		
							Ala	Gly	Val	Leu	VU 4	Ala	Gly
01-03/03	MW		0.097	0.169	0.037	0.042		0.096	0.162	0.034	0.036		0.046
	RSD		8.12	3.09	16.66	16.44							
02-03/03	MW		0.128	0.143	0.049	0.047		0.118	0.131	0.043	0.047		0.056
	RSD		2.54	5.42	14.81	6.03							
03-03/03	MW		0.134	0.140	0.043	0.039		0.128	0.129	0.037	0.031		0.061
	RSD		3.74	4.41	15.83	19.28							
04-03/03	MW		0.113	0.165	0.048	0.051		0.106	0.152	0.048	0.039		0.051
	RSD		7.55	3.32	17.17	18.16							
05-03/03	MW		0.095	0.182	0.034	0.025		0.091	0.176	0.032	0.028		0.044
	RSD		16.27	1.48	9.57	21.74							
06-03/03	MW		0.086	0.177	0.025	0.022		0.080	0.173	0.027	0.028		0.038
	RSD		9.76	4.83	21.81	65.59							
07-03/03	MW		0.038	0.098				0.036	0.089				0.017
	RSD			9.85									
08-03/03	MW		0.034	0.086				0.032	0.081				0.016
	RSD		7.95	8.80									
09-03/03	MW		0.117	0.150	0.027	0.043		0.116	0.148	0.023	0.039		0.056
	RSD		5.53	3.85	18.19	15.71							
10-03/03	MW		0.121	0.175	0.030	0.031		0.112	0.163	0.027	0.038		0.053
	RSD		8.31	5.10	17.25	23.99							
11-03/03	MW		0.035	0.094				0.035	0.089				0.017
	RSD		20.41	5.61									
12-03/03	MW		0.028	0.092				0.026	0.083				0.012
	RSD		61.62	2.84									
13-03/03	MW		0.108	0.178	0.047	0.066		0.112	0.170	0.060	0.063		0.053
	RSD		13.21	3.63	52.15	3.73							
14-03/03	MW		0.091	0.176	0.029	0.022		0.095	0.181	0.030	0.027		0.045
	RSD		5.22	0.31	27.26	40.39							
15-03/03	MW		0.087	0.171	0.040	0.025		0.086	0.170	0.037	0.025		0.041
	RSD		6.99	3.86	19.51	31.04							
16-03/03	MW		0.096	0.136	0.039	0.047		0.097	0.132	0.043	0.047		0.046
	RSD		5.22	1.10	28.70	17.89							
17-03/03	MW	0.069	0.094	0.174	0.039	0.036	0.063	0.088	0.166	0.033	0.032	0.037	0.042
	RSD	9.44	3.30	1.61	27.29	18.19							
18-03/03	MW		0.052	0.086				0.032	0.097				0.015
	RSD		66.97	40.20									
19-03/03	MW		0.043	0.093				0.044	0.091				0.021
	RSD		15.22	3.90									

Die meisten durch das Normalisierungsverfahren ermittelten Gehalte der Verunreinigungen waren ≤ 0.1 %. Nur in den Chargen des Herstellers A wurden bis

zu 0.18 % Valin gefunden. Beide Auswertungsverfahren liefern ähnliche Gehalte für die Verunreinigungen, wenn ohne Korrekturfaktor gerechnet wird. Durch die Korrektur der Peakflächen von Alanin und Glycin wird der mittels Normalisierung gefundene Wert ungefähr halbiert.

6.4.3.2. Ergebnisse der Untersuchung von Phenylalanin-Proben

Es standen 19 Phenylalanin-Proben von zwei Herstellern zur Verfügung. Abbildung 6-19 zeigt Elektropherogramme der beiden Hersteller. In keiner Charge wurden Peaks detektiert, die eindeutig einer Verunreinigung zugeordnet werden konnten.

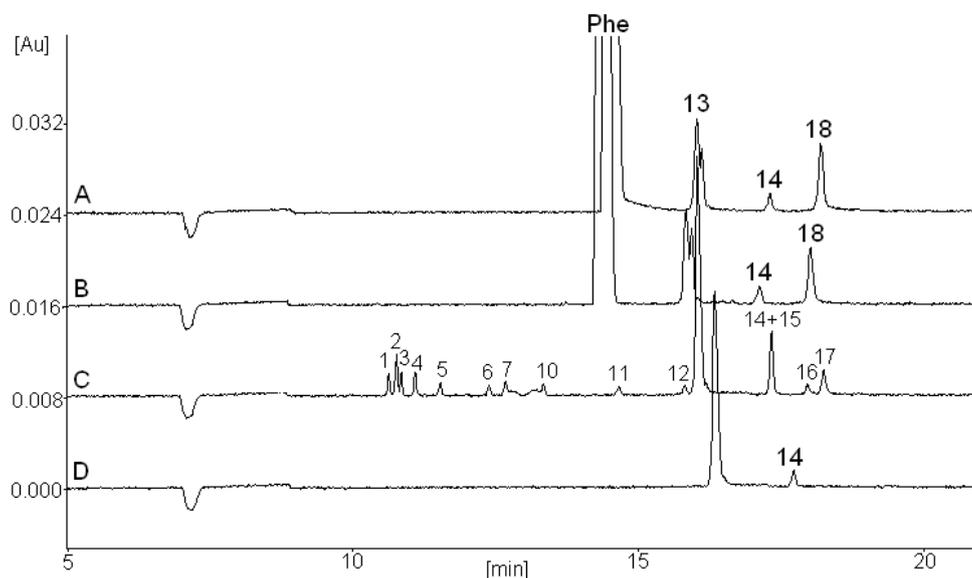


Abbildung 6-19: Untersuchung von Phenylalanin-Chargen nach Derivatisierung mit FMOC-Cl. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Proben: (A) Phe (01-04/03, Hersteller A) 3.5 mg/ml; (B) Phe (05-04/03, Hersteller B) 3.5 mg/ml; (C) Aminosäure-Modellmischung je 0.007 mg/ml; (D) Blindwert. Peakzuordnung: (1) bis (17) wie in Abbildung 6-5; (18) Nebenprodukt der Synthese.

6.4.3.3. Ergebnisse der Untersuchung von Serin-Proben

In den 14 untersuchten Serin-Chargen von drei Herstellern konnten keine Peaks durch andere Aminosäuren festgestellt werden (Abbildung 6-20).

Allerdings überlagert der Hauptpeak unter den gegebenen CE-Bedingungen die Peaks der FMOC-Derivate von Asparagin, Glutamin, Threonin und Alanin, die aus diesem Grund nicht nachweisbar sind.

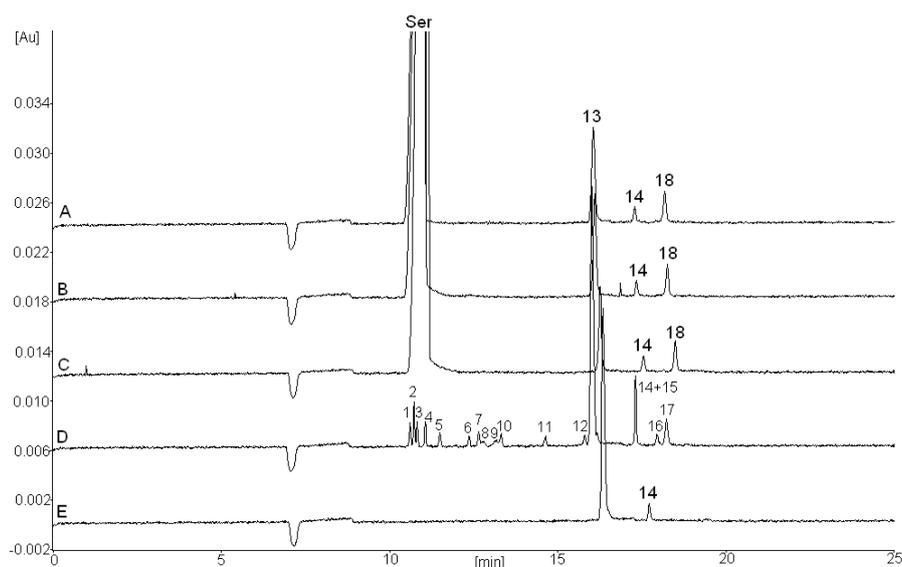


Abbildung 6-20: Untersuchung von Serin-Chargen nach Derivatisierung mit FMOCl. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-5. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.3.3 beschrieben. Proben: (A) Ser (01-05/03, Hersteller A) 3.5 mg/ml; (B) Ser (02-05/03, Hersteller B) 3.5 mg/ml; (C) Ser (04-05/03, Hersteller C) 3.5 mg/ml; (D) Aminosäure-Modellmischung je 0.007 mg/ml; (E) Blindwert. Peakzuordnung: (1) bis (17) wie in Abbildung 6-5; (18) Nebenprodukt der Synthese.

6.4.4. Untersuchung von L-Ornithin-L-Aspartat

L-Ornithin-L-Aspartat (LOLA) ist ein Salz der beiden Aminosäuren L-Asparaginsäure und L-Ornithin. Für Letztere wird aufgrund der δ -Aminogruppe eine Doppelderivatisierung mit FMOCl angenommen. Aus diesem Grund werden bei der Anwesenheit von L-Ornithin als Hauptkomponente die auch bei hohen Histidin- und Lysin-Konzentrationen festgestellten Schwierigkeiten bei der Derivatisierung erwartet. Bei Anwendung der für die Untersuchung von Isoleucin-, Phenylalanin- und Serin-Proben gewählten Reaktionsbedingungen zur Derivatisierung von L-Ornithin-L-Aspartat wurden Löslichkeitsprobleme der Derivate während der Reaktion, Extraktion und in der verdünnten Lösung beobachtet. Deshalb wurden die Bedingungen derart modifiziert, dass die Derivate in Lösung blieben: 1.0 ml Probelösung (3.5 mg/ml in 0.1 M Boratpuffer pH 9.30) wurden mit 0.2 ml 0.4 M Boratpuffer pH 9.30, 0.6 ml Aceton und 0.8 ml FMOCl-Lösung (300 mM in Acetonitril) gemischt. Nach einer Reaktionszeit von 2 Minuten wurde der FMOCl-Überschuss dreimal mit je 2 ml n-Pentan extrahiert. 200 μ l der wässrigen Phase wurden mit 200 μ l Aceton versetzt und mit 20 mM Borsäure-Lösung, die 4 % Acetonitril enthält, zu 2.0 ml verdünnt.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die möglichen Verunreinigungen zu trennen. Dazu zählt Arginin, das in Mikroorganismen aus Ornithin gebildet wird. δ -Aminovalerolactam, das durch intramolekulare Wasserabspaltung aus Ornithin entsteht, kann in Ornithin-Hydrochlorid nachgewiesen werden [237] und ist deshalb auch als potenzielle Verunreinigung von L-Ornithin-L-Aspartat anzusehen.

Variationen der Ionenstärke und des pH-Wertes des Boratpuffers sowie der SDS-Konzentration führten nicht zu einer Trennung der Komponenten. In der Literatur wird beschrieben, dass Harnstoff die Trennung hydrophober Substanzen mittels MEKC ermöglichen kann [123]. Durch den Zusatz von Harnstoff zum Trennpuffer (20 mM Boratpuffer pH 9.30; 25 mM SDS) konnte im vorliegenden Fall nur eine Antrennung der Substanzen erzielt werden (Abbildung 6-21).

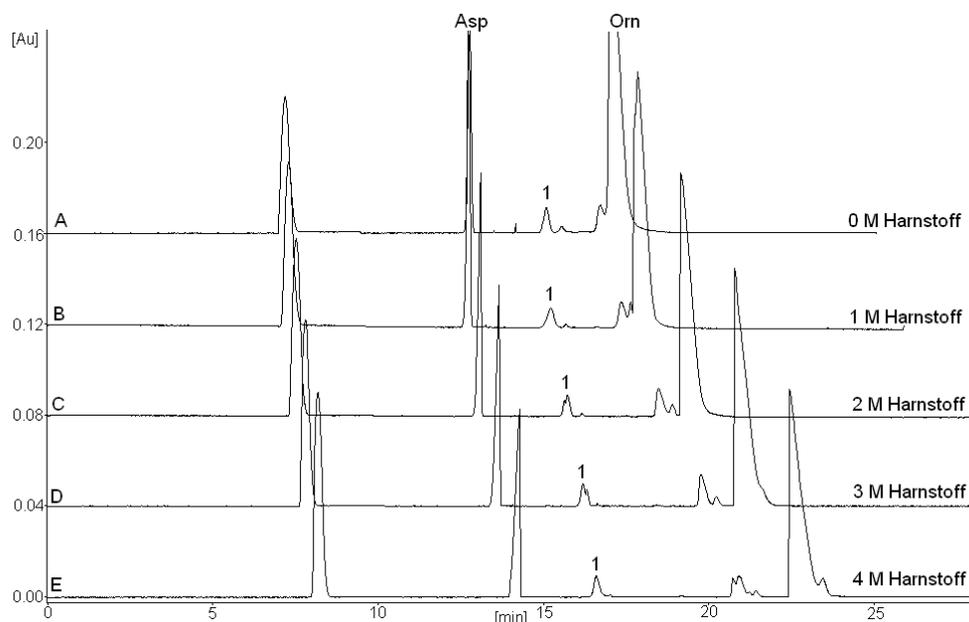


Abbildung 6-21: Trennung einer Modellmischung aus L-Ornithin-L-Aspartat 3.5 mg/ml + Arg, Lys, δ -Aminovalerolactam und Verunreinigung A je 0.175 mg/ml. CE-Bedingungen: Kapillare: Quarzkapillare, 70.0 cm Gesamtlänge, 60.0 cm effektive Länge, 75 μ m; Trennpuffer: 20 mM Boratpuffer pH 9.30; 25 mM SDS; Zusatz von Harnstoff wie beschrieben; Spannung: 15 kV; Injektion: 1 psi, 10 sec; Temperatur: 25 °C; Detektion: 254 nm. Derivatisierung: wie im Text beschrieben. Peakzuordnung: (1) FMOC-Überschuss.

Insbesondere die Peaks von Ornithin und Lysin überlagern. Deren Trennung konnte auch durch den Zusatz von Acetonitril zum Puffer nur unvollständig erreicht werden (Abbildung 6-22).

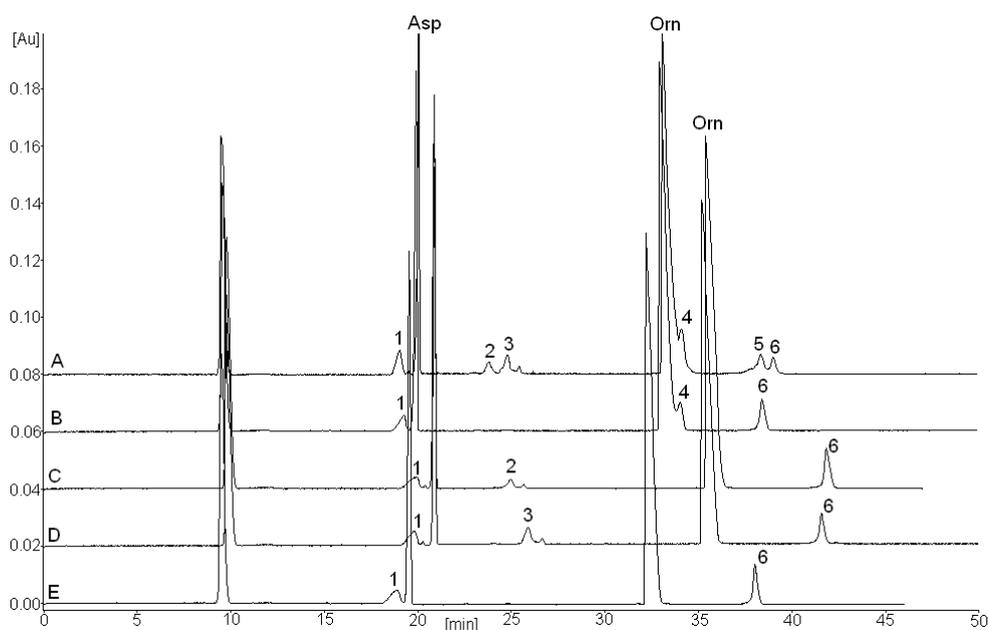


Abbildung 6-22: Trennung von Modellmischungen. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-21; Trennpuffer: 20 mM Boratpuffer, 25 mM SDS, 0.5 M Harnstoff, pH 9.30; 15 % Acetonitril (v/v). Derivatisierung: wie im Text beschrieben. Proben: (A) LOLA 3.5 mg/ml + Arg, Lys, δ -Aminovalerolactam und Verunreinigung A je 0.175 mg/ml; (B) LOLA 3.5 mg/ml + Lys 0.175 mg/ml; (C) LOLA 3.5 mg/ml + Arg 0.175 mg/ml; (D) LOLA 3.5 mg/ml + δ -Aminovalerolactam 0.175 mg/ml; (E) LOLA 3.5 mg/ml. Peakzuordnung: (1) FMOC-Überschuss; (2) Arg; (3) δ -Aminovalerolactam; (4) Lys; (5) Verunreinigung A; (6) unbekannter Peak.

Die Migrationszeiten sind wegen des hohen organischen Anteils, nicht nur im Trennpuffer sondern auch in der Probe, schlecht reproduzierbar. Aufgrund der beschriebenen Probleme wurde die Untersuchung von L-Ornithin-L-Aspartat nach Derivatisierung mit FMOC-Cl nicht weiter verfolgt.

6.5. Untersuchung von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit CBQCA

6.5.1. CBQCA als Derivatisierungsreagenz

3-(4-Carboxybenzoyl)chinolin-2-carboxaldehyd (CBQCA) wurde 1991 von Novotny *et al.* als Derivatisierungsreagenz für primäre Amine beschrieben [257]. In Gegenwart von Cyanid reagiert CBQCA mit Aminen zu fluoreszierenden Isoindol-Derivaten (Abbildung 6-23), die mittels CE getrennt werden können. Zur empfindlichen Detektion eignet sich ein LIF-Detektor (Argon-Ion-Laser, λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 520 nm).

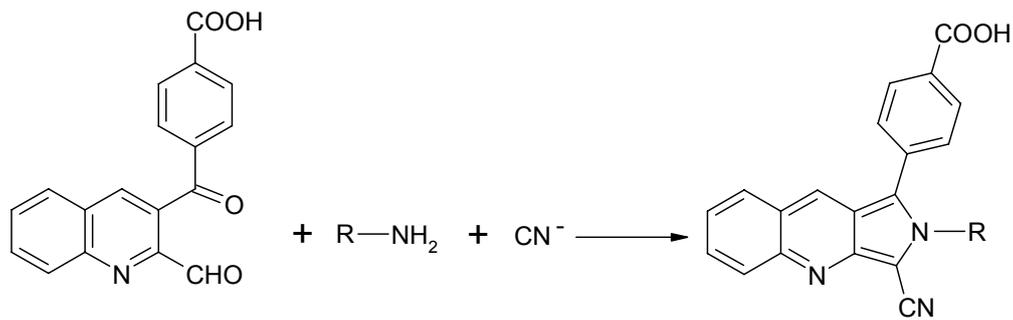


Abbildung 6-23: Reaktion von CBQCA mit primären Aminen in Anwesenheit von Cyanid.

Novatchev hat die Derivatisierung mit CBQCA zur Reinheitsanalytik von Aminosäuren eingesetzt und dadurch das Spektrum an erfassbaren möglichen Verunreinigungen auf Aminozucker und kleine Peptide erweitert [120, 258].

Ein Vorteil von CBQCA ist, dass dieses Reagenz selbst nicht fluoresziert [257]. Dennoch wurden in den Elektropherogrammen von Blindwerten mehrere Peaks beobachtet (Abbildung 6-24).

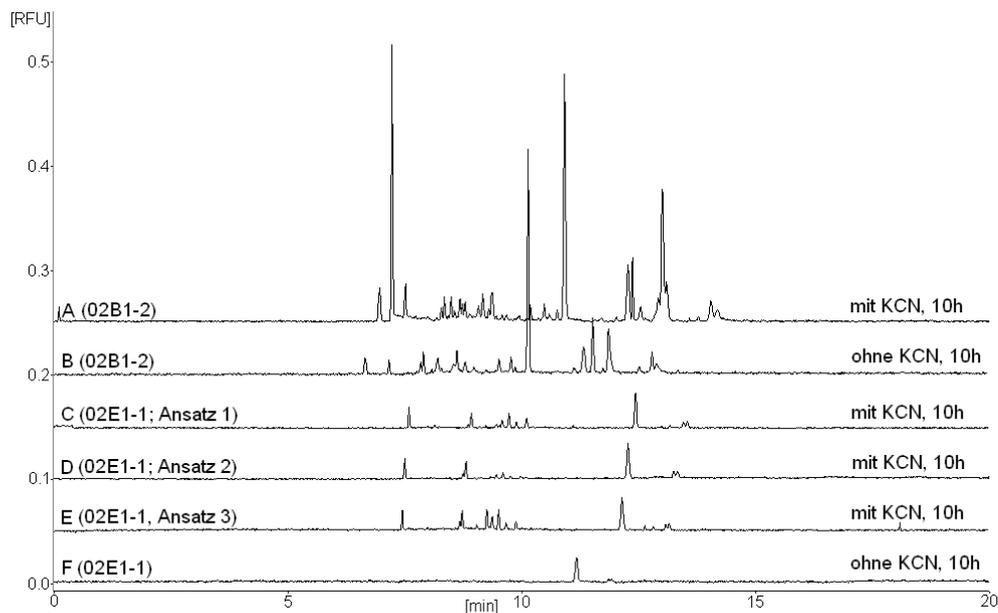


Abbildung 6-24: Blindwerte verschiedener CBQCA-Chargen. CE-Bedingungen: Kapillare: Quarzkapillare: 70.0 cm Gesamtlänge, 60.0 cm effektive Länge, 75 μm ; Trennpuffer: (A), (B), (F): 20 mM Boratpuffer pH 9.30; 25 mM SDS; (C), (D), (E): 25 mM Boratpuffer pH 9.20; 25 mM SDS; Spannung: 20 kV; Injektion: 0.5 psi, 5 sec; Temperatur: 25 °C; Detektion: LIF-Detektor, λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 520 nm. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: CBQCA-Charge wie angegeben; (B), (F) Verwendung von H₂O für die Derivatisierung statt KCN.

Sogar ohne Cyanid-Zusatz wurden bei Verwendung der CBQCA-Charge (02B1-2) Peaks detektiert, was auf eine unzureichende Reinheit dieser Charge hindeutet. Die Signale liegen sowohl in Bezug auf ihre Migrationszeit als auch in Bezug auf ihre Intensität in dem für die Aminosäuren und ihren Verunreinigungen erwarteten Bereich. Dadurch wird die Bestimmung des Verunreinigungsprofils der Aminosäuren gestört. Eine weitere CBQCA-Charge (02E1-1) stellte sich als besser geeignet heraus, da weniger Peaks detektiert wurden (Abbildung 6-24). Diese Charge wurde deshalb für alle Derivatisierungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet.

In der Literatur werden als Ursache für die in Blindwerten aufgezeichneten Peaks durch Cyanid hervorgerufene Nebenreaktionen beschrieben [259, 260], z. B. Bildung von Cyanhydrinen aus Cyanid und Aldehyden/Ketonen oder Kondensation von zwei aromatischen Aldehyden zu α -Hydroxyketonen. Letztere Reaktion wird auch im Zusammenhang mit den bei der Derivatisierung mit Anthracen-2,3-dialdehyd bzw. Naphthalen-2,3-dialdehyd gefundenen Nebenprodukten diskutiert [261].

6.5.2. CE-Bedingungen zur Detektion möglicher Verunreinigungen von Aminosäuren

Die von Novatchev beschriebene CE-Methode wurde zur Bestimmung des Verunreinigungsprofils verschiedener Aminosäuren mit kleinen Veränderungen übernommen. Zum einen wurde die Spülprozedur zwischen zwei Injektionen angepasst, um reproduzierbare Trennungen zu erhalten. Zum anderen wurde bei der Untersuchung von Phenylalanin-Proben festgestellt, dass im Vergleich zu dem beschriebenen Trennpuffer (20 mM Boratpuffer pH 9.3; 25 mM SDS) durch eine kleine Modifikation (25 mM Boratpuffer pH 9.20; 25 mM SDS) vor dem Phenylalanin-Hauptpeak ein zusätzlicher Verunreinigungspeak detektiert werden konnte (Abbildung 6-25). Daher wurde dieser Trennpuffer verwendet.

Novatchev hat die elektrophoretischen Bedingungen nicht im Hinblick auf die Trennung aller Aminosäuren eingestellt. So zeigt Abbildung 6-26, dass viele Aminosäuren überlagern und nur schlecht getrennt sind. Vielmehr war es das Ziel, in den Aminosäure-Proben möglichst viele Verunreinigungspeaks zu detektieren und die Trennung von Aminosäuren (z. B. D-(+)-Glucosamin, D-(+)-Galactosamin) und Peptiden (z. B. Gly-Gln, Gly-Ala-Leu, Ala-Val-Leu) zu ermöglichen.

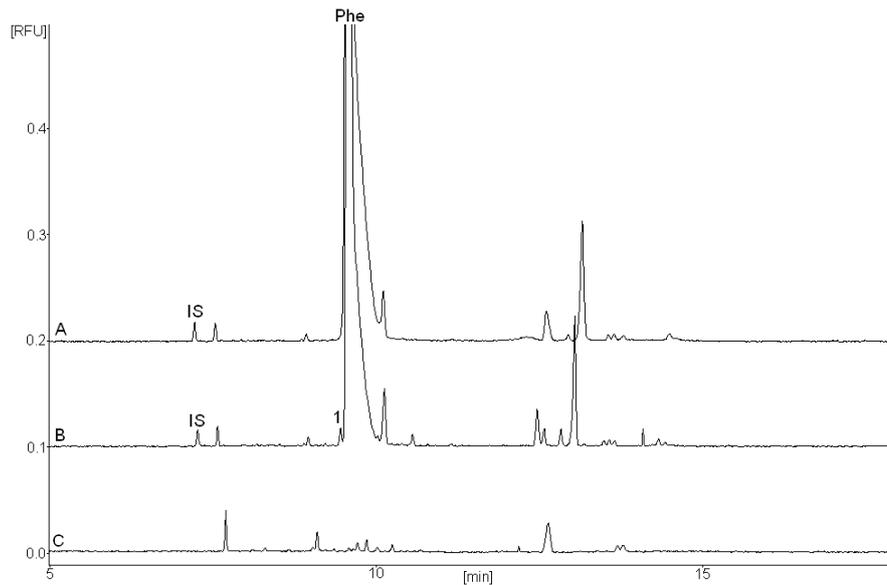


Abbildung 6-25: Variation des Trennpuffers. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-24; Trennpuffer: (A) 20 mM Boratpuffer pH 9.30; 25 mM SDS; (B), (C) 25 mM Boratpuffer pH 9.20; 25 mM SDS. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A), (B) Phe 0.45 mg/ml + IS 0.1 %; (C) Blindwert. Peakzuordnung: (IS) interner Standard D-(+)-Glucosamin; (1) unbekannte Verunreinigung.

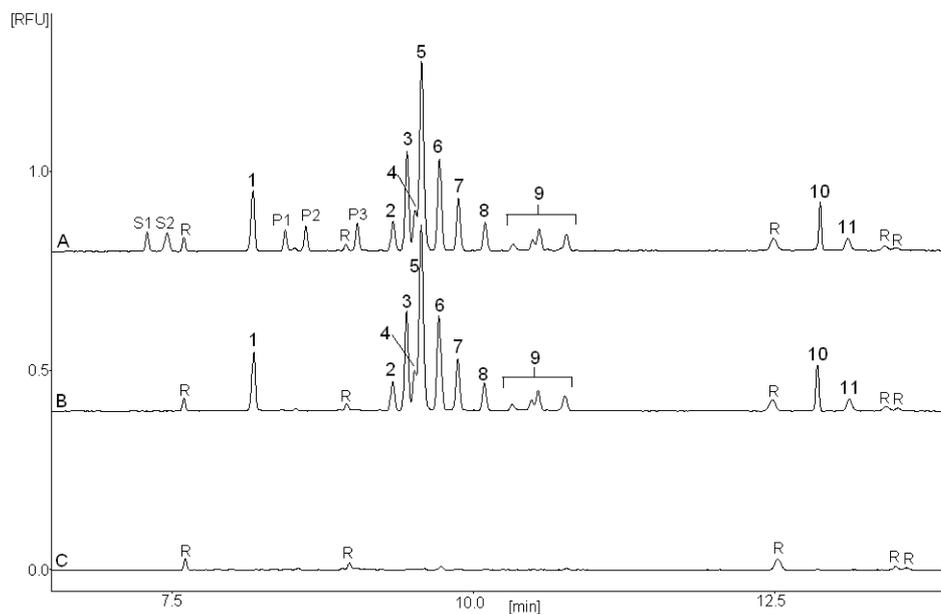


Abbildung 6-26: Trennung von Modellmischungen nach Derivatisierung mit CBQCA. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-24; Trennpuffer: 25 mM Boratpuffer pH 9.20; 25 mM SDS. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml mit Aminozuckern und Peptiden je 0.001 mg/ml; (B) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (C) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (S1) D-(+)-Glucosamin; (S2) D-(+)-Galactosamin; (P1) Ala-Val-Leu; (P2) Gly-Ala-Leu; (P3) Gly-Gln; (1) Arg; (2) Met; (3) Gln, His, Tyr; (4) Ile, Thr; (5) Asn, Leu, Phe, Val; (6) Ser, Cys, Cystin; (7) Ala; (8) Gly; (9) Lys; (10) Glu; (11) Asp.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es interessant, die Ergebnisse der Untersuchung von Aminosäure-Proben nach Derivatisierung mit FMOC-Cl im Hinblick auf die Anwesenheit „anderer Aminosäuren“ als Verunreinigungen mit den Ergebnissen nach CBQCA-Derivatisierung zu vergleichen. Insbesondere wurde auf die Aminosäuren geachtet, deren FMOC-Derivate comigrieren oder von dem Nebenprodukt der Reaktion überlagert werden. Zu diesem Zweck wurde nach einem Trennpuffer gesucht, der die Trennung der Aminosäuren und dadurch eine Zuordnung der detektierten Peaks zu Aminosäuren ermöglichte.

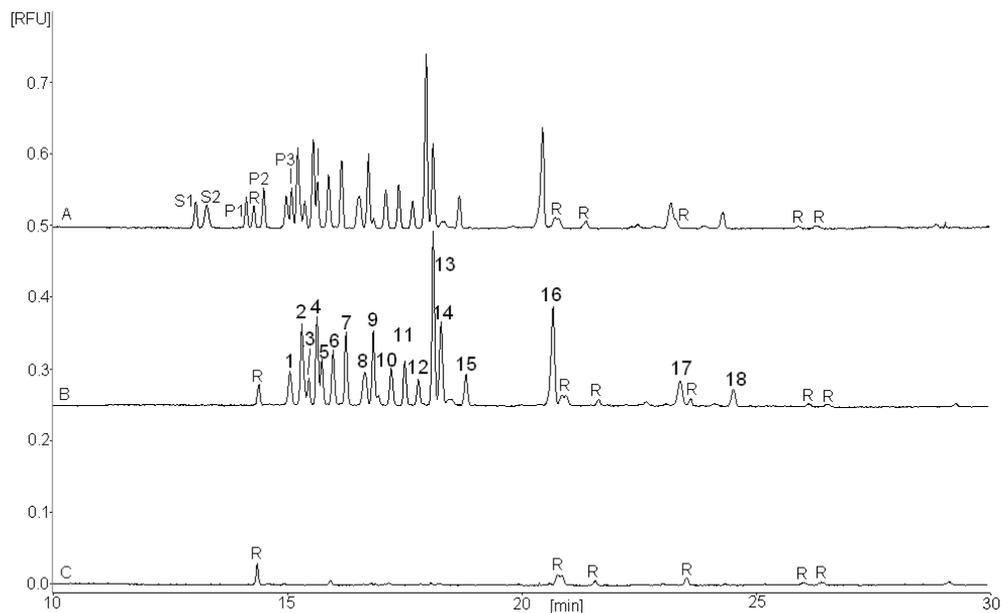


Abbildung 6-27: Trennung von Modellmischungen nach Derivatisierung mit CBQCA. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-24; Trennpuffer: 20 mM Tetraboratpuffer pH 9.3; 100 mM SDS. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml mit Aminozuckern und Peptiden je 0.001 mg/ml; (B) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (C) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (S1) D-(+)-Glucosamin; (S2) D-(+)-Galactosamin; (P1) Ala-Val-Leu; (P2) Gly-Ala-Leu; (P3) Gly-Gln; (1) Met; (2) Gln, His; (3) Thr; (4) Asn; (5) Tyr; (6) Ser; (7) Cys; (8) Val; (9) Ala, Lys; (10) Gly; (11) Ile, Lys; (12) Lys; (13) Leu; (14) Phe; (15) Lys; (16) Arg; (17) Glu; (18) Asp.

Gute Ergebnisse wurden mit einem 20 mM Tetraboratpuffer pH 9.3 mit 100 mM SDS beobachtet (Abbildung 6-27). Mit Ausnahme des Dipeptides Gly-Gln war mit diesem Puffer auch die Trennung der exemplarisch gewählten Aminozucker und Peptide möglich. Durch diese Variation des Trennpuffers kann sowohl mit der CBQCA-Methode als auch mit der von Novatchev beschriebenen FMOC-Methode, die als

orthogonale Verfahren angesehen werden können, die Anwesenheit „anderer Aminosäuren“ als Verunreinigungen überprüft werden.

6.5.3. Untersuchung von Aminosäure-Proben

Die bereits nach FMOC-Derivatisierung analysierten Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Serin wurden auch nach Derivatisierung mit CBQCA untersucht. Zusätzlich wurden die vom BfArM zur Verfügung gestellten Histidin-Proben in die Studie einbezogen. In einem zweiten Schritt wurden exemplarisch Chargen der verschiedenen Hersteller einer Aminosäure mit dem variierten Trennpuffer analysiert. Dadurch wurde die Anwesenheit anderer Aminosäuren als mögliche Verunreinigungen überprüft.

Von jeder Charge wurden zwei Untersuchungslösungen (0.45 mg/ml Aminosäure in 125 mM Phosphatpuffer pH 7.0) hergestellt, wobei eine der beiden Lösungen einen internen Standard enthielt. Für Phenylalanin- und Isoleucin-Proben wurden 0.00054 mg/ml Glucosamin-Hydrochlorid (0.1 % Glucosamin) als interner Standard verwendet. Der interne Standard für Serin- und Histidin-Proben war Asparaginsäure (0.0009 mg/ml, d. h. 0.2 %). Beide Untersuchungslösungen wurden einmal derivatisiert und je dreimal injiziert. Referenzlösungen, die 0.0045 mg/ml der entsprechenden Aminosäure und den internen Standard enthalten, wurden täglich hergestellt, einmal derivatisiert und dreimal analysiert. Zusätzlich wurde jeden Tag ein Blindwert angesetzt, um die Reaktionsbedingungen zu kontrollieren. Die Peaks, die in Blindwerten detektiert wurden, wurden in Bezug auf ihre Lage und Größe mit den in den Aminosäure-Proben aufgezeichneten Signalen verglichen. Dadurch konnte zugeordnet werden, welche Peaks in den Aminosäure-Proben durch Verunreinigungen und welche durch das Reagenz verursacht sind.

Zur Bestimmung des Gehaltes der Verunreinigungen wurde das Normalisierungsverfahren und die „Interner-Standard“-Methode verwendet (Kapitel 2.3.4). Detaillierte Ergebnisse der Quantifizierung sind in einem Bericht beschrieben [262]. Im Folgenden werden nur die interessanten Gehalte angegeben. Da die Struktur der meisten Verunreinigungen unbekannt ist, schließt die Berechnung der Gehalte keine Korrekturfaktoren ein. Deshalb sind die Daten nur als Anhaltspunkt zu bewerten.

6.5.3.1. Ergebnisse der Untersuchung von Histidin-Proben

Das Verunreinigungsprofil von 19 Histidin-Chargen von drei Herstellern wurde bestimmt. Dabei wurden in den Proben bis zu 17 Verunreinigungen detektiert, deren Gehalt in den meisten Fällen $< 0.05\%$ war (Abbildung 6-28). Zwischen den Chargen der verschiedenen Hersteller wurden keine charakteristischen Unterschiede festgestellt.

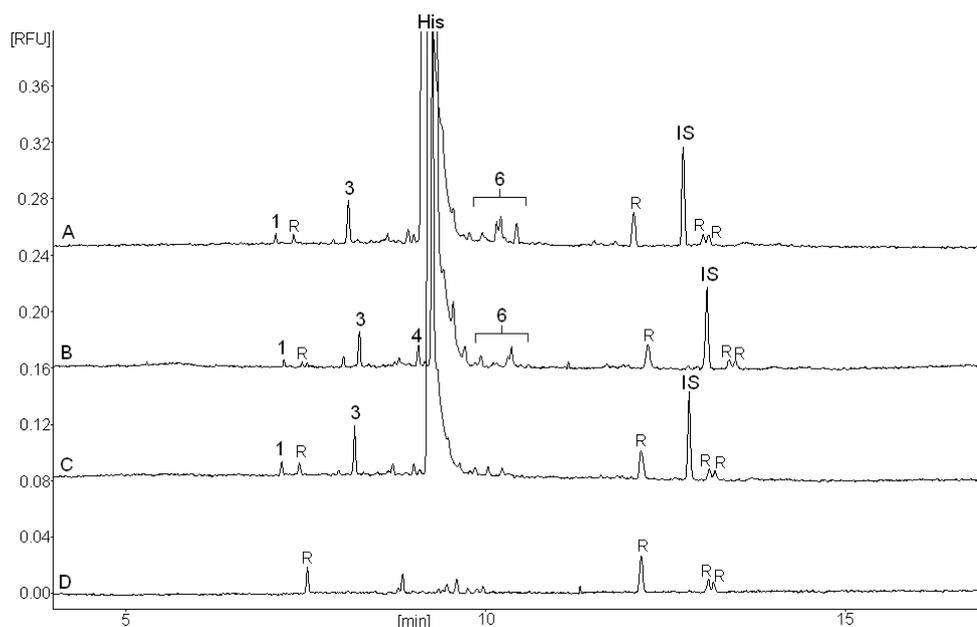


Abbildung 6-28: Untersuchung von Histidin-Proben nach Derivatisierung mit CBQCA. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-26. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) His (01-02a/03, Hersteller A) 0.45 mg/ml + IS 0.2 %; (B) His (05-02a/03, Hersteller C) 0.45 mg/ml + IS 0.2 %; (C) His (12-02a/03, Hersteller D) 0.45 mg/ml + IS 0.2 %; (D) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (IS) interner Standard Asparaginsäure; (1), (3), (4), (6) Verunreinigungen.

Fast alle Histidin-Proben zeigten ein Peakmuster zwischen 10 Minuten und 11 Minuten, das für Lysin charakteristisch ist (Abbildung 6-29). Lysin wurde deshalb als mögliche Verunreinigung von Histidin angenommen. In der Literatur wird einerseits beschrieben, dass Lysin aufgrund von Fluoreszenzquenching nicht nachgewiesen werden kann [257, 263]. Andererseits werden aber auch mehrere Peaks für Lysin in Elektropherogrammen beobachtet [264]. Als Ursache für das detektierte Peakmuster sind verschiedene Derivate, über die α -Aminogruppe, die ϵ -Aminogruppe oder Doppelderivatisierung, denkbar. Der genaue Grund für die unter den gegebenen Bedingungen bis zu fünf aufgezeichneten Lysin-Signale ist allerdings nicht bekannt.

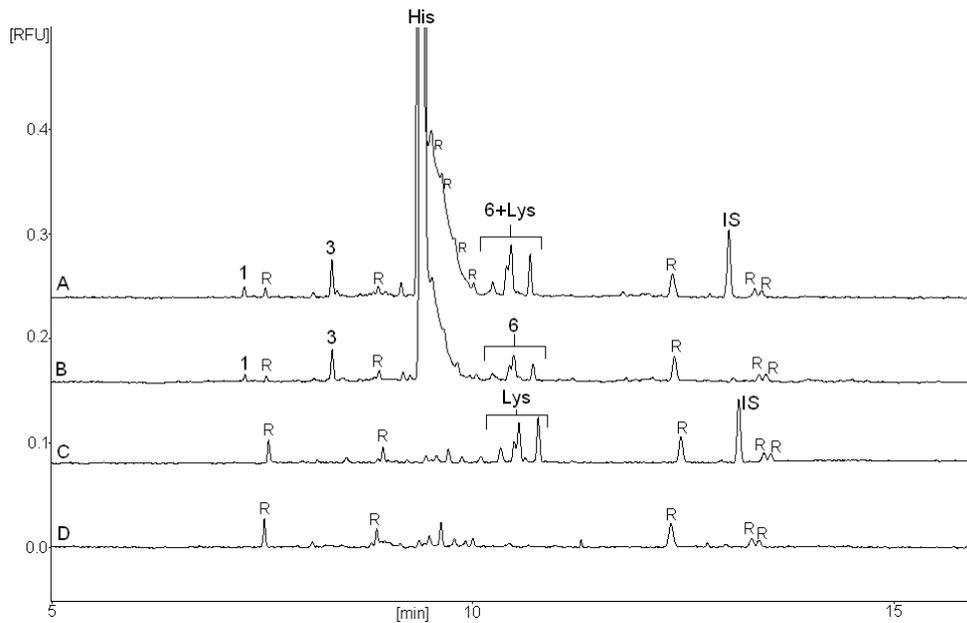


Abbildung 6-29: Zuordnung von Lysin in Histidin-Proben. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-26. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) His (01-02a/03) 0.45 mg/ml + Lys 0.000225 mg/ml und IS 0.2 %; (B) His (01-02a/03) 0.45 mg/ml; (C) Lys 0.00045 mg/ml + IS 0.2 %; (D) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (IS) interner Standard Asparaginsäure; (1), (3), (6) Verunreinigungen.

Für die Quantifizierung des Lysin-Gehaltes wurden die mittels Normalisierung gefundenen prozentualen Gehalte der einzelnen Peaks addiert. Bei der Bestimmung über die „Interner-Standard“-Methode wurde die Summe der Quotienten (korrigierte Peakfläche zu korrigierter Peakfläche des internen Standards) der einzelnen Peaks gebildet und mit dem Verhältnis der korrigierten Peakfläche von Histidin zur korrigierten Peakfläche des internen Standards in der Referenzlösung verglichen. Zusätzlich wurde eine Referenzlösung, die 0.00045 mg/ml Lysin und 0.0009 mg/ml Asparaginsäure enthält, für die Berechnung eingesetzt. Tabelle 6-4 gibt eine Übersicht über die ermittelten Gehalte.

Zur Zuordnung von Aminosäuren als Verunreinigungen in Histidin-Proben wurden Chargen mit dem variierten Trennpuffer (20 mM Tetraboratpuffer pH 9.3; 100 mM SDS) analysiert. Die detektierten Peaks wurden in Bezug auf ihre Migrationszeiten mit den Signalen in derivatisierten Aminosäure-Modellmischungen, die aus 18 Aminosäuren bestehen, verglichen. Durch die Verwendung des variierten Trennpuffers ist die Zuordnung der Lysin-Peaks schwieriger, da sie verstreut im Elektropherogramm liegen. Der Vergleich zweier Histidin-Chargen (01-02a/03 und 12-02a/03), bei deren Untersuchung mit dem Standard-Puffer (25 mM Boratpuffer

pH 9.20; 25 mM SDS) unterschiedliche Lysin-Gehalte festgestellt wurden, legte nahe, dass die Peaks im Bereich zwischen 16 Minuten und 19 Minuten von Lysin stammten (Abbildung 6-30). Unter dieser Voraussetzung wurden in den Histidin-Proben keine weiteren „anderen“ Aminosäuren beobachtet.

Tabelle 6-4: Ergebnisse der Quantifizierung der Verunreinigungen in Histidin-Proben. Angabe des Mittelwertes (MW; in %) und der relativen Standardabweichung (RSD; in %) von 6 Injektionen (Normalisierungsverfahren) bzw. 3 Injektionen („Interner-Standard“-Methode und Lysin-Referenzlösung). Für die Bestimmung des Lysin-Gehaltes wurde die Summe der einzelnen Peaks verwendet.

Charge		Normalisierungsverfahren			„Interner-Standard“-Methode			Lysin-RL
		VU 3	VU 4	Lys	VU 3	VU 4	Lys	Lys
01-02a/03	MW	0.098	0.026	0.200	0.120	0.034	0.252	0.056
	RSD	4.26	10.77	17.96	4.96	7.65	24.17	24.17
02-02b/03	MW	0.098	0.020	0.090	0.107	0.022	0.109	0.022
	RSD	5.17	4.50	13.57	2.84	5.01	15.74	15.74
03-02b/03	MW	0.098	0.020	0.071	0.118	0.025	0.092	0.020
	RSD	3.84	4.01	20.95	4.08	3.05		
05-02a/03	MW	0.089	0.050	0.087	0.102	0.054	0.098	0.022
	RSD	6.03	3.60	11.39	9.83	3.89	14.51	14.51
06-02a/03	MW	0.095	0.036	0.123	0.140	0.053	0.166	0.037
	RSD	2.93	4.33	11.17	3.17	6.20	8.52	8.52
07-02a/03	MW	0.092	0.031	0.091	0.132	0.041	0.124	0.028
	RSD	4.60	6.57	6.89	6.88	3.16	7.51	7.51
08-02a/03	MW	0.098	0.029	0.081	0.140	0.032	0.125	0.028
	RSD	2.05	27.24	12.15	2.81	7.77	5.77	5.77
09-02a/03	MW	0.098	0.034	0.069	0.125	0.044	0.100	0.022
	RSD	5.72	8.11	25.38	8.27	10.64	23.84	23.84
10-02c/03	MW	0.101	0.027	0.122	0.135	0.028	0.148	0.025
	RSD	2.88	26.19	20.07	2.71	7.73	12.84	12.84
11-02c/03	MW	0.096	0.027	0.103	0.117	0.025	0.092	0.016
	RSD	3.69	28.30	38.81	3.21	9.92	16.19	16.19
12-02a/03	MW	0.096	0.021	0.033	0.124	0.026	0.038	0.001
	RSD	3.06	4.88	23.95	4.89	8.51	4.97	4.97
13-02a/03	MW	0.091	0.021	0.058	0.108	0.025	0.067	0.018
	RSD	2.70	4.24	13.51	2.95	3.85	5.83	5.83
14-02b/03	MW	0.099	0.018	0.073	0.125	0.021	0.087	0.018
	RSD	2.10	17.01	15.60	3.20	3.52	21.10	21.10
15-02a/03	MW	0.094	0.029	0.101	0.135	0.045	0.146	0.035
	RSD	2.19	9.33	6.82	0.95	1.67	4.83	4.83
16-02a/03	MW	0.093	0.032	0.115	0.114	0.033	0.138	0.033
	RSD	4.12	17.65	8.06	1.99	7.16	9.63	9.63
17-02a/03	MW	0.096	0.021	0.111	0.124	0.027	0.143	0.038
	RSD	1.99	37.10	4.079	2.03	16.53	4.80	4.80
18-02a/03	MW	0.095	0.021	0.078	0.167	0.040	0.129	0.035
	RSD	2.58	39.60	11.10	4.81	10.92	8.11	8.11
19-02a/03	MW	0.102	0.020	0.149	0.124	0.025	0.195	0.050
	RSD	4.75	5.36	10.84	2.27	8.68	1.13	1.13
20-02a/03	MW	0.097	0.018	0.078	0.111	0.021	0.088	0.022
	RSD	3.29	13.13	19.77	3.57	14.02	20.58	20.58

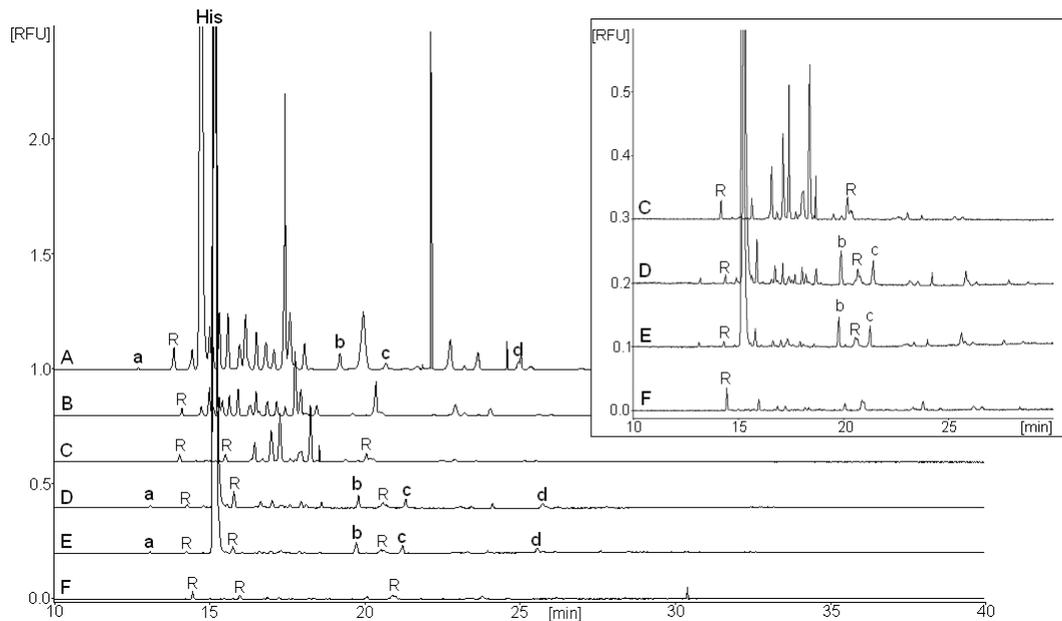


Abbildung 6-30: Untersuchung von Histidin-Proben mit dem variierten Trennpuffer. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-27. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) His (01-02a/03) 0.45 mg/ml + Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (B) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (C) Lys 0.00225 mg/ml; (D) His (01-02a/03) 0.45 mg/ml; (E) His (12-02a/03) 0.45 mg/ml; (F) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (a) – (d) Verunreinigungen.

6.5.3.2. Ergebnisse der Untersuchung von Isoleucin-Proben

Bei der Untersuchung von 19 Isoleucin-Proben von zwei Herstellern wurden bis zu 16 Verunreinigungen detektiert, wobei nur wenige einen Gehalt > 0.05 % hatten (Abbildung 6-31). Die Chargen der beiden Hersteller unterscheiden sich nur geringfügig in den Signalen nach dem Hauptpeak. Hier zeigten die Chargen des Herstellers A den Peak 4 und die Charge 17-03/03 zusätzlich den Peak 5. Für die Probe des Herstellers C konnten in diesem Bereich nur Peaks detektiert werden, die dem Reagenz zugeordnet wurden.

Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Tabelle 6-5 zusammengefasst.

In den FMOC-Derivaten der Isoleucin-Proben wurden Alanin, Glycin, Valin und Leucin als Verunreinigungen festgestellt. Mit dem Standard-Trennpuffer (25 mM Boratpuffer pH 9.20; 25 mM SDS) überlagern diese Aminosäuren mit dem Hauptpeak oder sind nur schlecht getrennt. Deshalb wurde der variierte Trennpuffer verwendet, um die Anwesenheit anderer Aminosäuren zu überprüfen. Das Peakmuster der Isoleucin-Proben der beiden Hersteller unterscheidet sich in den Peaks a bis d (Abbildung 6-32). Aufgrund weiterer Experimente wurden die Signale

Valin (Peak a), Glycin (Peak c) und Leucin (Peak d) zugeordnet (Abbildung 6-33). Peak b wurde in dieser Größe nur in der Charge 17-03/03 gefunden; die anderen Proben zeigten hier einen Peak, der auch im Blindwert detektiert wurde (Abbildung 6-32). Vermutlich überlagert in der Charge 17-03/03 Alanin mit dem Reagenzpeak (Abbildung 6-33).

Tabelle 6-5: Ergebnisse der Quantifizierung der Verunreinigungen in Isoleucin-Proben. Angabe des Mittelwertes (MW; in %) und der relativen Standardabweichung (RSD; in %) von 6 Injektionen (Normalisierungsverfahren) bzw. 3 Injektionen („Interner-Standard“-Methode).

Charge		Normalisierungsverfahren				„Interner-Standard“-Methode			
		VU 4	VU 5	VU 10	VU 11	VU 4	VU 5	VU 10	VU 11
01-03/03	MW	0.298		0.035	0.101	0.303		0.032	0.095
	RSD	7.84		14.20	3.29	8.85		8.66	0.76
02-03/03	MW	0.326		0.047	0.107	0.387		0.058	0.115
	RSD	9.72		49.20	2.67	3.11		62.21	2.27
03-03/03	MW	0.329		0.041	0.108	0.347		0.045	0.117
	RSD	3.47		7.63	3.51	0.55		10.28	4.19
04-03/03	MW	0.240		0.038	0.106	0.254		0.034	0.108
	RSD	2.80		28.53	3.07	6.16		14.51	6.57
05-03/03	MW	0.220		0.035	0.104	0.205		0.034	0.094
	RSD	7.13		18.55	2.83	2.92		13.25	2.33
06-03/03	MW	0.214		0.040	0.106	0.194		0.035	0.097
	RSD	11.85		21.83	3.92	5.07		33.25	6.45
07-03/03	MW			0.039	0.103			0.046	0.110
	RSD			18.55	1.43			12.13	3.63
08-03/03	MW			0.056	0.103			0.069	0.106
	RSD			37.14	2.63			39.46	4.29
09-03/03	MW	0.271		0.048	0.094	0.291		0.047	0.093
	RSD	7.82		16.58	3.02	7.38		5.93	3.64
10-03/03	MW	0.246		0.038	0.104	0.245		0.038	0.104
	RSD	10.27		19.75	1.75	12.96		27.54	3.09
11-03/03	MW			0.039	0.115			0.037	0.111
	RSD			17.18	14.83			12.37	16.99
12-03/03	MW			0.042	0.107			0.050	0.106
	RSD			24.51	2.04				1.52
13-03/03	MW	0.259		0.046	0.104	0.249		0.048	0.102
	RSD	8.39		12.50	3.16	2.97			2.54
14-03/03	MW	0.223		0.044	0.095	0.212		0.048	0.093
	RSD	5.94		17.23	3.33	7.05		9.30	5.44
15-03/03	MW	0.193		0.051	0.101	0.183		0.045	0.095
	RSD	6.66		10.01	2.79	9.88		10.76	0.95
16-03/03	MW	0.230		0.055	0.100	0.232		0.051	0.095
	RSD	7.57		9.14	3.23	9.08		8.45	4.22
17-03/03	MW	0.220	0.085	0.061	0.098	0.249	0.092	0.070	0.109
	RSD	4.21	6.19	6.91	3.33	3.42	5.78	4.48	4.28
18-03/03	MW			0.056	0.098			0.054	0.102
	RSD			10.63	3.42			6.94	0.89
19-03/03	MW			0.060	0.097			0.065	0.096
	RSD			13.10	3.62			11.06	1.74

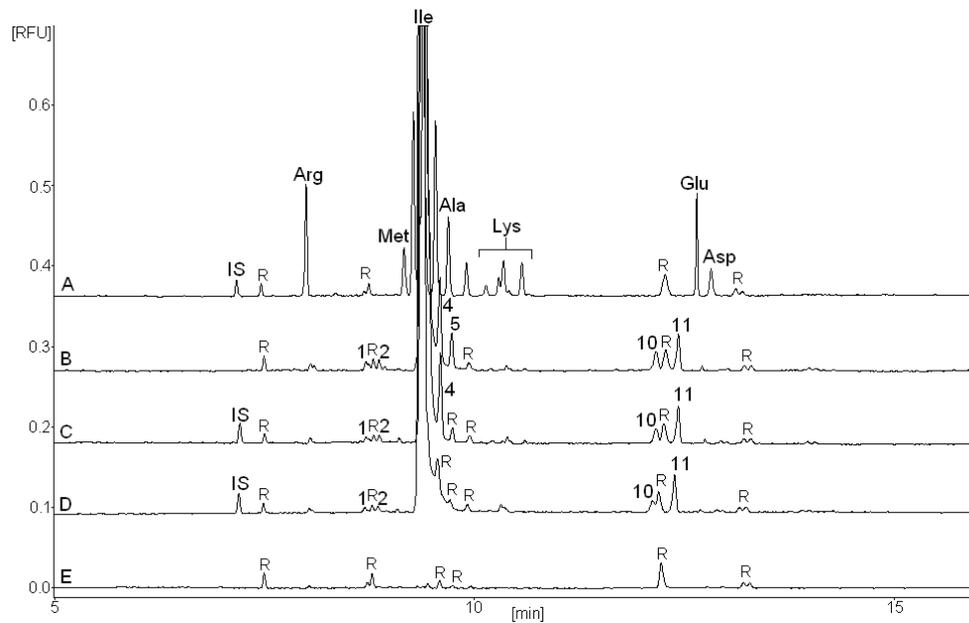


Abbildung 6-31: Untersuchung von Isoleucin-Proben nach Derivatisierung mit CBQCA. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-26. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (B) Ile (17-03/03, Hersteller A) 0.45 mg/ml; (C) Ile (14-03/03, Hersteller A) 0.45 mg/ml + IS 0.1 %; (D) Ile (07-03/03, Hersteller C) 0.45 mg/ml + IS 0.1 %; (E) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (IS) interner Standard D-(+)-Glucosamin; (1), (2), (4), (5), (10), (11) Verunreinigungen.

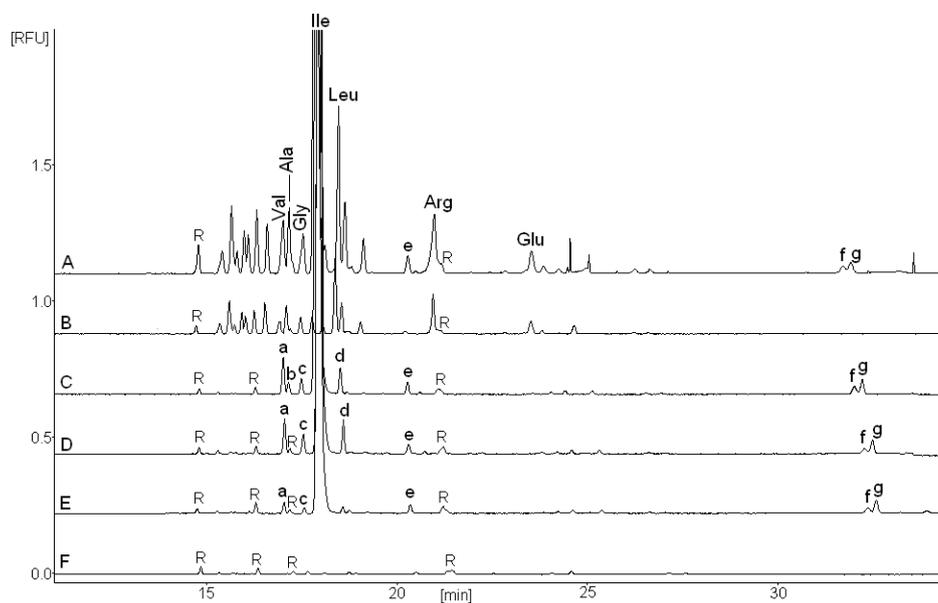


Abbildung 6-32: Untersuchung von Isoleucin-Proben mit dem variierten Trennpuffer. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-27. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) Ile (17-03/03) 0.45 mg/ml + Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (B) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (C) Ile (17-03/03, Hersteller A) 0.45 mg/ml; (D) Ile (01-03/03, Hersteller A) 0.45 mg/ml; (E) Ile (08-03/03, Hersteller C) 0.45 mg/ml; (F) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (a) Val; (b) Ala; (c) Gly; (d) Leu; (e) – (g) Verunreinigungen.

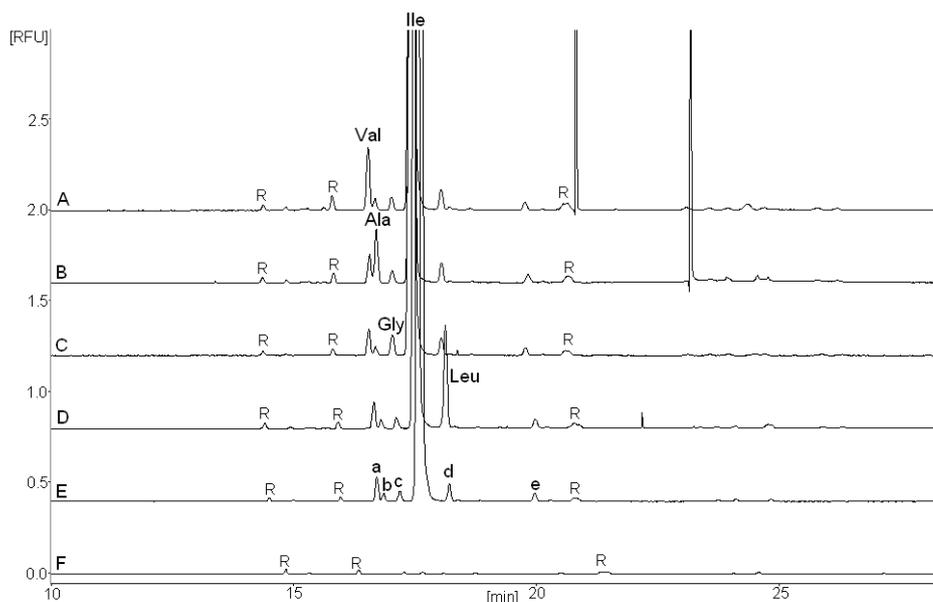


Abbildung 6-33: Zuordnung von Aminosäuren in Isoleucin-Proben. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-27. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) Ile (17-03/03) 0.45 mg/ml + Val 0.001125 mg/ml; (B) Ile (17-03/03) 0.45 mg/ml + Ala 0.00045 mg/ml; (C) Ile (17-03/03) 0.45 mg/ml + Gly 0.001125 mg/ml; (D) Ile (17-03/03) 0.45 mg/ml + Leu 0.00045 mg/ml; (E) Ile (17-03/03) 0.45 mg/ml; (F) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (a) Val; (b) Ala; (c) Gly; (d) Leu; (e) Verunreinigung.

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Isoleucin-Proben keine basischen Aminosäuren (Arginin, Histidin, Lysin) sowie Cystein enthalten. Diese Ergebnisse entsprechen denen nach FMOC-Derivatisierung im Hinblick auf die Anwesenheit anderer Aminosäuren.

6.5.3.3. Ergebnisse der Untersuchung von Phenylalanin-Proben

In den CBQCA-derivatisierten Phenylalanin-Proben wurden bis zu zehn Verunreinigungspeaks detektiert (Abbildung 6-34). Tabelle 6-6 fasst die ermittelten Gehalte zusammen.

Peak 1 wurde nur in Chargen des Herstellers A gefunden. Bei dieser Migrationszeit zeigten die Proben des Herstellers B nur einen Reagenzpeak. Peak 5 wurde in allen untersuchten Phenylalanin-Proben detektiert und comigriert mit Glutaminsäure. Wurden die Derivate jedoch mit dem variierten Trennpuffer untersucht, wurde kein der Glutaminsäure entsprechender Peak gefunden (Abbildung 6-35). Dies stimmt mit den Ergebnissen nach FMOC-Derivatisierung überein. Es wird deshalb angenommen, dass Peak 5 nicht Glutaminsäure entspricht. Die Elektropherogramme der beiden Chargen unterscheiden sich in Peak a und Peak c. Peak a, der in der

Charge des Herstellers A gefunden wurde, konnte Tyrosin zugeordnet werden. Mit dem Standard-Trennpuffer comigriert Tyrosin mit Glutamin und Histidin und erscheint bei der gleichen Migrationszeit wie Peak 1 im Elektropherogramm. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass sowohl Peak a als auch Peak 1 in den Chargen des Herstellers A Tyrosin entsprechen. Fmoc-Tyrosin hat nur eine geringe Intensität in den entsprechenden Elektropherogrammen. Deshalb kann es sein, dass Tyrosin in den Phenylalanin-Proben nach Derivatisierung mit Fmoc-Cl nicht nachweisbar ist, jedoch durch die empfindlichere LIF-Detektion als CBQCA-Derivat erfasst wird.

Tabelle 6-6: Ergebnisse der Quantifizierung der Verunreinigungen in Phenylalanin-Proben. Angabe des Mittelwertes (MW; in %) und der relativen Standardabweichung (RSD; in %) von 6 Injektionen (Normalisierungsverfahren) bzw. 3 Injektionen („Interner-Standard“-Methode).

Charge		Normalisierungsverfahren			„Interner-Standard“-Methode		
		VU 1	VU 2	VU 5	VU 1	VU 2	VU 5
01-04/03	MW	0.024	0.044	0.140	0.025	0.042	0.141
	RSD	7.87	14.93	3.24	11.66	12.08	6.76
02-04/03	MW	0.024	0.057	0.141	0.025	0.058	0.145
	RSD	3.01	22.86	3.58	4.57	29.68	2.89
03-04/03	MW	0.029	0.067	0.139	0.035	0.088	0.149
	RSD	15.92	36.92	3.13	1.87	28.64	6.07
04-04/03	MW	0.018	0.059	0.141	0.016	0.053	0.120
	RSD	5.30	13.06	3.03	1.43	8.40	0.64
05-04/03	MW		0.059	0.136		0.052	0.132
	RSD		20.74	3.56		23.28	0.33
06-04/03	MW		0.052	0.139		0.051	0.132
	RSD		15.64	1.12		19.70	1.00
07-04/03	MW	0.023	0.052	0.137	0.016	0.031	0.102
	RSD	7.14	21.87	2.06	2.37	2.08	4.73
08-04/03	MW	0.022	0.054	0.139	0.025	0.058	0.184
	RSD	15.33	22.12	3.01	7.68	7.41	6.04
09-04/03	MW	0.025	0.040	0.138	0.030	0.045	0.170
	RSD	5.15	17.56	3.67	12.42	18.09	11.44
10-04/03	MW	0.018	0.036	0.131	0.015	0.028	0.127
	RSD	23.19	24.71	6.43	11.59	8.86	1.34
11-04/03	MW		0.054	0.132		0.053	0.133
	RSD		7.05	1.46		3.56	3.49
12-04/03	MW			0.127			0.149
	RSD			1.65			3.10
13-04/03	MW	0.018	0.060	0.136	0.017	0.057	0.129
	RSD	3.73	10.61	2.40	4.13	14.27	3.46
14-04/03	MW	0.024	0.062	0.137	0.026	0.058	0.140
	RSD	5.65	14.79	1.77	2.81	17.58	3.65
15-04/03	MW	0.023	0.067	0.132	0.022	0.071	0.127
	RSD	4.67	16.98	0.98	2.68	8.28	2.36
16-04/03	MW	0.023	0.053	0.131	0.022	0.048	0.130
	RSD	5.13	20.99	2.48	7.93	10.08	4.94
17-04/03	MW		0.040	0.130		0.044	0.137
	RSD		13.71	3.22		4.68	4.98
18-04/03	MW			0.121			0.138
	RSD			2.15			2.29
19-04/03	MW		0.077	0.138		0.076	0.137
	RSD		13.29	4.31		14.68	14.20

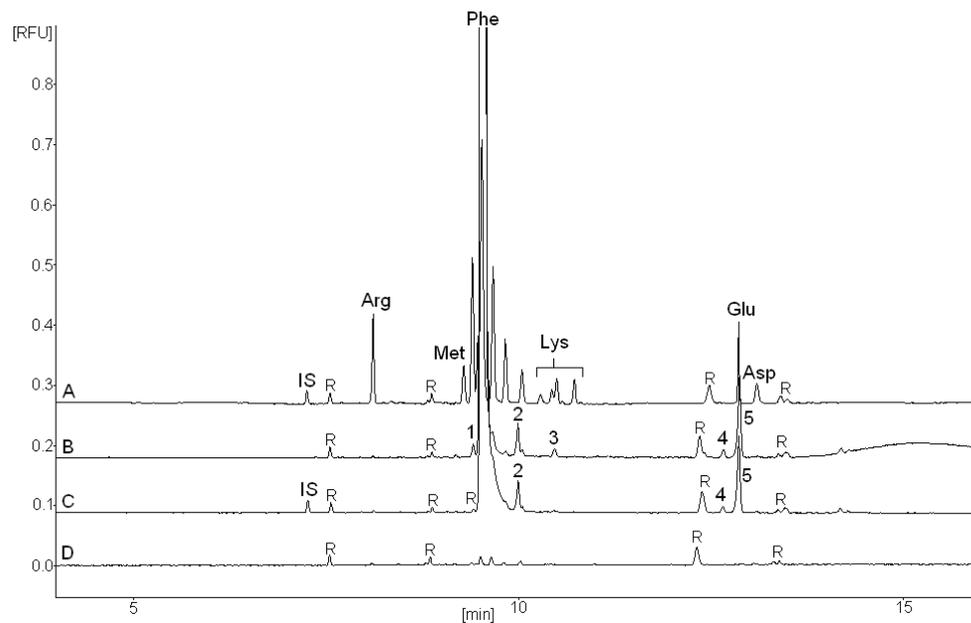


Abbildung 6-34: Untersuchung von Phenylalanin-Proben nach Derivatisierung mit CBQCA. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-26. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml + IS 0.1 %; (B) Phe (14-04/03, Hersteller A) 0.45 mg/ml; (C) Phe (06-04/03, Hersteller B) 0.45 mg/ml + IS 0.1 %; (D) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (IS) interner Standard D-(+)-Glucosamin; (1) - (5) Verunreinigungen.

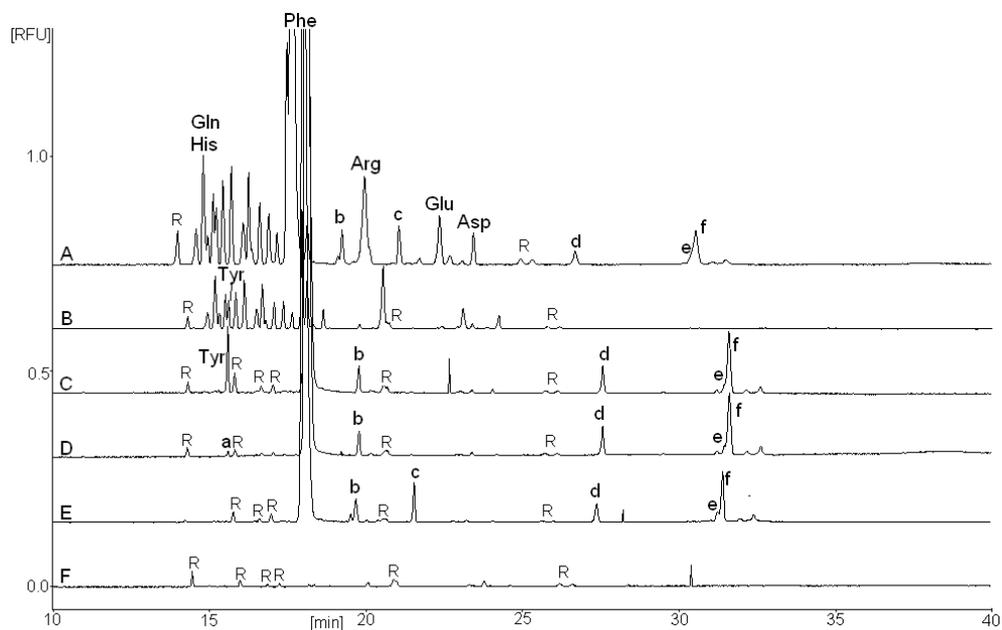


Abbildung 6-35: Untersuchung von Phenylalanin-Proben mit dem variierten Trennpuffer. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-27. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) Phe (05-04/03) 0.45 mg/ml + Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (B) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (C) Phe (14-04/03) 0.45 mg/ml + Tyr 0.2 %; (D) Phe (14-04/03, Hersteller A) 0.45 mg/ml; (E) Phe (05-04/03, Hersteller B) 0.45 mg/ml; (F) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (a) Tyr; (b) – (f) Verunreinigungen.

6.5.3.4. Ergebnisse der Untersuchung von Serin-Proben

Bei den untersuchten 14 Serin-Proben wurde kein für einen Hersteller charakteristisches Verunreinigungsprofil erkannt (Abbildung 6-36). Es wurden bis zu 11 Verunreinigungspeaks detektiert. Die ermittelten Gehalte zeigt Tabelle 6-7.

Tabelle 6-7: Ergebnisse der Quantifizierung der Verunreinigungen in Serin-Proben. Angabe des Mittelwertes (MW; in %) und der relativen Standardabweichung (RSD; in %) von 6 Injektionen (Normalisierungsverfahren) bzw. 3 Injektionen („Interner-Standard“-Methode).

Charge		Normalisierungsverfahren		„Interner-Standard“-Methode	
		VU 2	VU 3	VU 2	VU 3
01-05/03	MW	0.069	0.080	0.073	0.091
	RSD	1.80	18.67	2.50	17.82
02-05/03	MW	0.069	0.064	0.072	0.078
	RSD	1.97	46.40	1.81	54.03
03-05/03	MW	0.073	0.016	0.087	0.016
	RSD	1.36	53.60	1.68	76.22
04-05/03	MW	0.077	0.047	0.089	0.057
	RSD	1.18	46.91	0.92	61.75
05-05/03	MW	0.074	0.057	0.079	0.063
	RSD	1.95	19.02	3.01	
06-05/03	MW	0.074	0.040	0.087	0.051
	RSD	0.97	44.29	2.18	51.40
07-05/03	MW	0.073	0.056	0.077	0.065
	RSD	2.42	39.68	2.27	23.68
08-05/03	MW	0.071	0.106	0.085	0.183
	RSD	2.96	48.75	2.28	12.05
09-05/03	MW	0.076	0.063	0.090	0.118
	RSD	5.90	82.18	2.69	39.16
12-05/03	MW	0.067		0.076	
	RSD	2.03		3.07	
13-05/03	MW	0.065	0.068	0.071	0.083
	RSD	2.48	19.99	1.65	19.66
14-05/03	MW	0.080	0.124	0.096	0.152
	RSD	2.04	4.22	2.73	2.56
15-05/03	MW	0.082	0.096	0.101	0.134
	RSD	1.60	27.82	4.18	26.38
16-05/03	MW	0.077	0.040	0.085	0.042
	RSD	1.80	25.25	2.28	20.06

Die meisten Aminosäuren waren vom Hauptpeak abgetrennt. Nur Cystein, Alanin und Glycin wurden ganz oder teilweise von Serin überlagert. Nach der Untersuchung mit dem Standard-Puffer wurde angenommen, dass die Serin-Proben keine anderen Aminosäuren als Verunreinigungen enthalten. Dies wurde durch die Analyse mit dem variierten Trennpuffer bestätigt. Mit diesem Puffer sind die nach FMOC-Derivatisierung wegen Peaküberlagerungen nicht nachweisbaren Aminosäuren Alanin, Asparagin, Glutamin und Threonin sowohl untereinander als auch von Serin getrennt. Zu den entsprechenden Migrationszeiten konnten in den untersuchten Proben keine Peaks festgestellt werden (Abbildung 6-37).

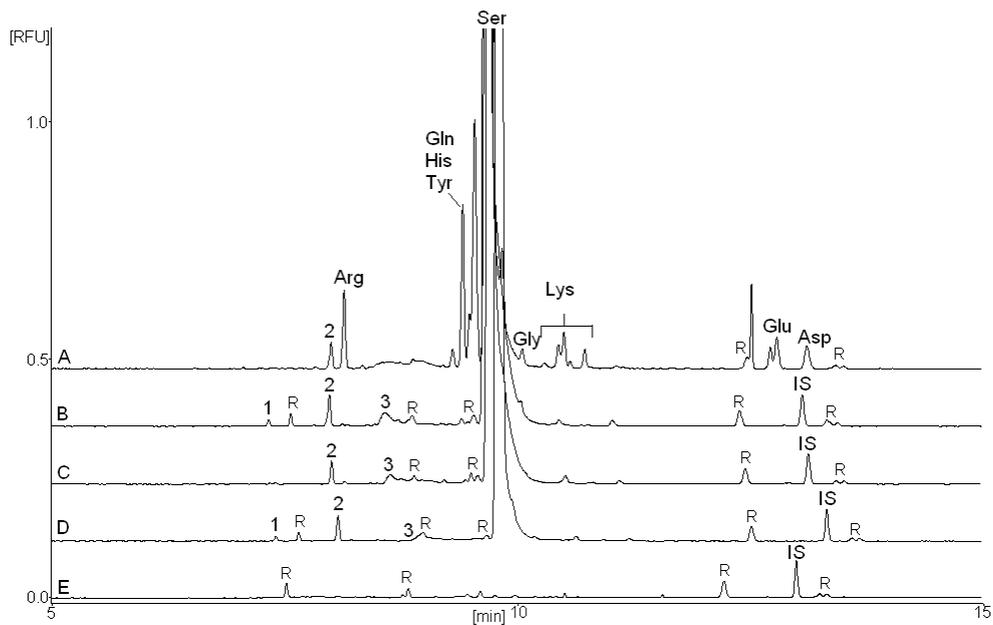


Abbildung 6-36: Untersuchung von Serin-Proben nach Derivatisierung mit CBQCA. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-26. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) Ser (15-05/03) 0.45 mg/ml + Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (B) Ser (15-05/03, Hersteller A) 0.45 mg/ml + IS 0.2 %; (C) Ser (13-05/03, Hersteller B) 0.45 mg/ml + IS 0.2 %; (D) Ser (05-05/03, Hersteller C) 0.45 mg/ml + IS 0.2 %; (E) IS 0.0009 mg/ml. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (IS) interner Standard Asparaginsäure; (1) - (3) Verunreinigungen.

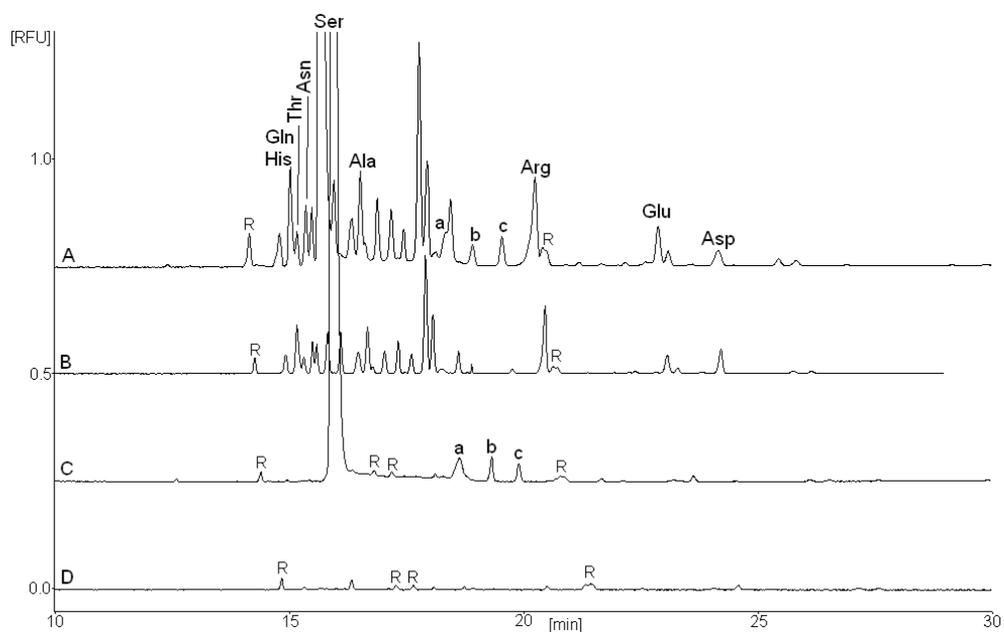


Abbildung 6-37: Untersuchung von Serin-Proben mit dem variierten Trennpuffer. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-27. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) Ser (15-05/03) 0.45 mg/ml + Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (B) Aminosäure-Modellmischung je 0.00045 mg/ml; (C) Ser (15-05/03, Hersteller A) 0.45 mg/ml; (D) Blindwert. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (a) – (c) Verunreinigungen.

6.5.4. Untersuchung von L-Ornithin-L-Aspartat

Bei der Untersuchung der CBQCA-Derivate von Lysin wurde in den Elektropherogrammen ein Peakmuster aus mehreren Peaks detektiert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zeigte auch eine derivatisierte Ornithin-Probe mehrere Signale. Mit dem für die Untersuchung der Aminosäure-Chargen verwendeten Trennpuffer (25 mM Boratpuffer pH 9.20; 25 mM SDS) überlagerten die Peaks von Ornithin und Lysin (Abbildung 6-38).

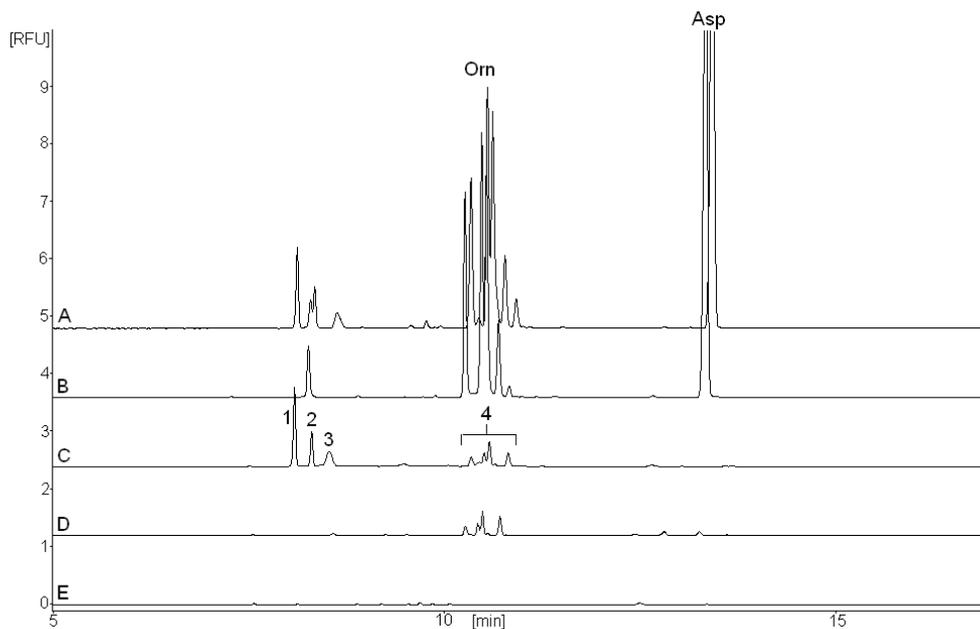


Abbildung 6-38: Trennung von Modellmischungen. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-26. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) LOLA 0.45 mg/ml + Arg, Lys, δ -Aminovalerolactam, Verunreinigung A je 0.0045 mg/ml; (B) LOLA 0.45 mg/ml; (C) Arg, Lys, δ -Aminovalerolactam, Verunreinigung A je 0.0045 mg/ml; (D) Lys 0.0045 mg/ml; (E) Blindwert. Peakzuordnung: (1) Arg; (2) Verunreinigung A; (3) δ -Aminovalerolactam; (4) Lys.

Ziel der Optimierung der CE-Bedingungen war deshalb, Lysin und Ornithin zu trennen. Der Zusatz von Cyclodextrinen zum Trennpuffer in der MEKC ist nicht nur für chirale Trennungen interessant, sondern wurde auch zur Trennung hydrophober Analyten eingesetzt [123, 265]. Cyclodextrine bilden neben Wasser und den Mizellen eine dritte Phase im elektrophoretischen System und stellen eine Konkurrenz zu den Mizellen dar. Die Trennung wird zusätzlich zur Verteilung in die Mizellen von dem Einschluss des Analyten in die Kavität der Cyclodextrine beeinflusst [116, 123]. Im Zusammenhang mit der Analyse von CBQCA-Derivaten wird berichtet, dass α -Cyclodextrin und β -Cyclodextrin die Detektionsempfindlichkeit von CBQCA-Peptiden

erhöhen [257, 266] sowie deren Trennung verbessern [266]. Für das vorliegende Trennproblem wurde festgestellt, dass durch den Zusatz von γ -Cyclodextrin die Lysin-Peaks von den Ornithin-Signalen getrennt werden (Abbildung 6-39).

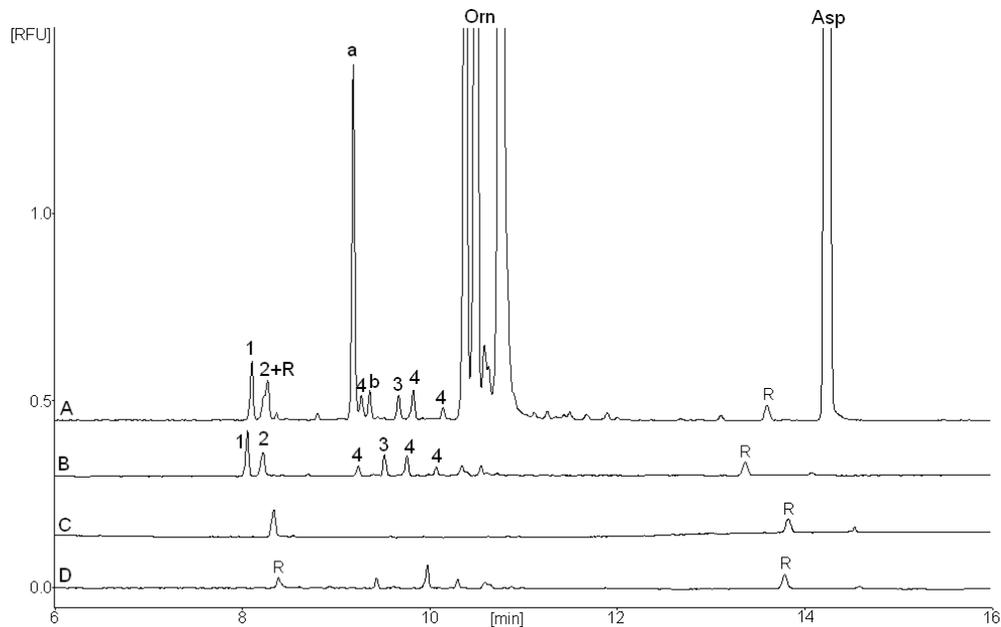


Abbildung 6-39: Trennung von Modellmischungen. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-26; Trennpuffer: 20 mM Boratpuffer pH 10,0, 25 mM SDS, 15 mM γ -CD. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) LOLA 0,45 mg/ml + Arg, Lys, δ -Aminovalerolactam, Verunreinigung A je 0,00045 mg/ml; (B) Arg, Lys, δ -Aminovalerolactam, Verunreinigung A je 0,00045 mg/ml; (C) Verunreinigung A 0,00045 mg/ml; (D) Lys 0,00045 mg/ml. Peakzuordnung: (R) Reagenz; (1) Arg; (2) Verunreinigung A; (3) δ -Aminovalerolactam; (4) Lys; (a), (b) unbekannte Verunreinigungen.

Jedoch comigriert das CBQCA-Derivat von Verunreinigung A (Peak 2) mit einem Peak, der auch im Blindwert detektiert wird. Weil dadurch eine Zuordnung der Verunreinigung in den L-Ornithin-L-Aspartat-Proben nicht möglich ist, wurde versucht durch den Zusatz von Natriumchlorid zum Puffer eine Trennung zu erreichen. Aufgrund des Salzzusatzes ändern sich Größe und Form der Mizellen. Dadurch können sich die Analyten anders zwischen wässriger Phase und Mizellen verteilen [125, 267]. Im vorliegenden Fall konnte allerdings keine Basislinientrennung des Peaks von Verunreinigung A und des Peaks, der auch im Blindwert nachgewiesen wurde, erzielt werden (Abbildung 6-40).

Dennoch wurde dieser Puffer (20 mM Boratpuffer pH 10,0, 25 mM SDS, 15 mM γ -CD, 5 mM NaCl) verwendet, um die zur Verfügung stehenden L-Ornithin-L-Aspartat-Proben zu untersuchen und dadurch einen Eindruck von dem Verunreinigungsprofil der Substanz zu erhalten (Abbildung 6-41).

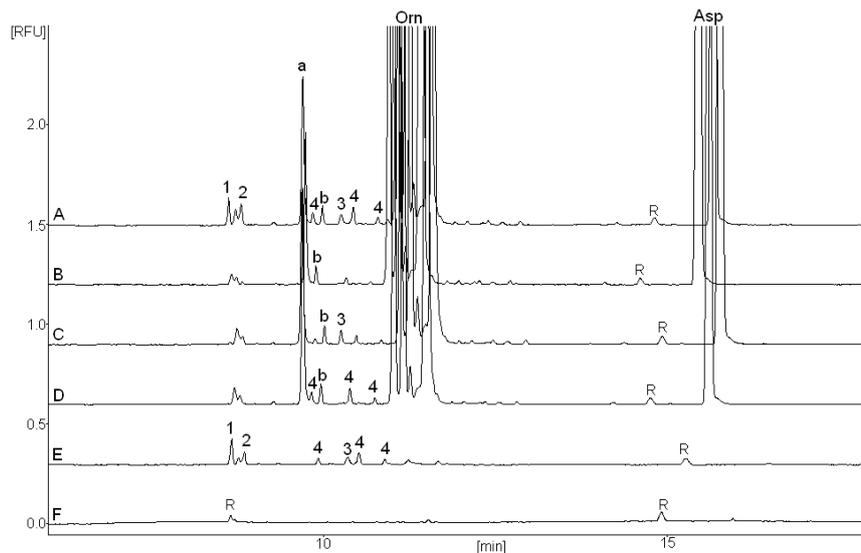


Abbildung 6-40: Trennung von Modellmischungen. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-26; Trennpuffer: 20 mM Boratpuffer pH 10,0, 25 mM SDS, 15 mM γ -CD, 5 mM NaCl. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) LOLA 0.45 mg/ml + Arg, Lys, δ -Aminovalerolactam, Verunreinigung A je 0.00045 mg/ml; (B) LOLA 0.45 mg/ml; (C) LOLA 0.45 mg/ml + δ -Aminovalerolactam 0.00045 mg/ml; (D) LOLA 0.45 mg/ml + Lys 0.00045 mg/ml; (E) Arg, Lys, δ -Aminovalerolactam, Verunreinigung A je 0.00045 mg/ml; (F) Blindwert. Peakzuordnung: wie in Abbildung 6-39.

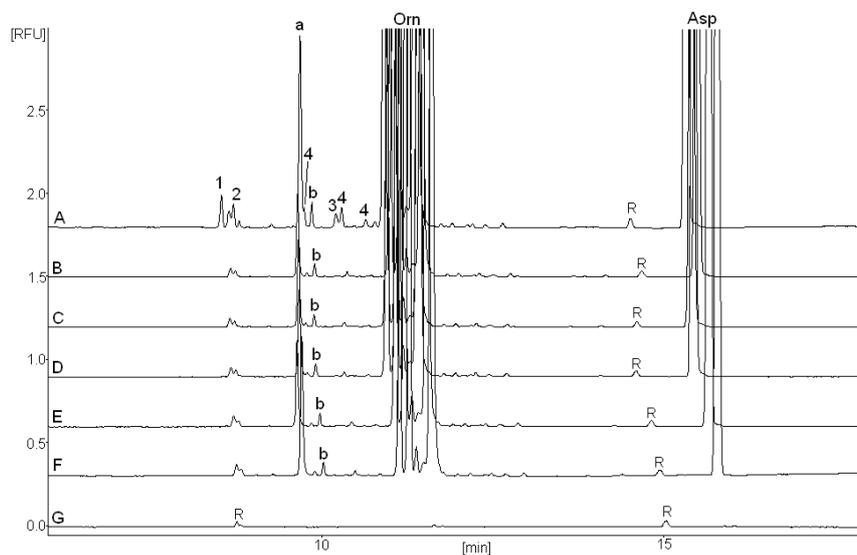


Abbildung 6-41: Untersuchung von L-Ornithin-L-Aspartat-Proben nach Derivatisierung mit CBQCA. CE-Bedingungen: wie in Abbildung 6-40. Derivatisierung: wie in Kapitel 9.4.4.3 beschrieben. Proben: (A) LOLA 0.45 mg/ml + Arg, Lys, δ -Aminovalerolactam, Verunreinigung A je 0.00045 mg/ml; (B) LOLA (H741) 0.45 mg/ml; (C) LOLA (H742) 0.45 mg/ml; (D) LOLA (H743) 0.45 mg/ml; (E) LOLA (H744) 0.45 mg/ml; (F) LOLA (H745) 0.45 mg/ml; (G) Blindwert. Peakzuordnung: wie in Abbildung 6-39.

In allen Proben fiel ein Peak (Peak a) mit einer Migrationszeit von ca. 9.7 Minuten auf. Mittels Normalisierungsverfahren wurde grob ein Gehalt von 2 % für diese

Verunreinigung abgeschätzt. Weiterhin wurde in allen Proben Peak b detektiert. Der Vergleich mit dem Elektropherogramm einer Modellmischung aus 18 Aminosäuren zeigte, dass weder Peak a noch Peak b einer Aminosäure zugeordnet werden können. Daneben wurden viele kleinere Signale detektiert. Arginin und δ -Aminovalerolactam wurden in den Proben nicht gefunden. Eine eindeutige Zuordnung von Lysin war wegen des auftretenden Peakmusters nicht möglich. Ebenso ließ sich Verunreinigung A wegen Peaküberlagerung nicht zuordnen. Die Flächen der Signale in den Elektropherogrammen der L-Ornithin-L-Aspartat-Chargen zur Migrationszeit der Verunreinigung A (ca. 8.7 Minuten) sind kleiner als die entsprechenden Peaks in einer Probe, die mit 0.1 % Verunreinigung A versetzt wurde (Abbildung 6-40). Deshalb kann man annehmen, dass eventuell in den L-Ornithin-L-Aspartat-Proben vorkommende Mengen der Verunreinigung A mit einem Gehalt < 0.1 % (bezogen auf Verunreinigung A) vorliegen.

6.6. Untersuchung von Aminosäuren mittels HPLC-ELSD

6.6.1. Organische Säuren als mögliche Verunreinigungen

Zu den potenziellen Verunreinigungen von biotechnologisch hergestellten Aminosäuren zählen alle Zwischen- und Nebenprodukte der Biosynthese, u. a. auch organische Säuren. Beispielsweise sind Äpfelsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure und Fumarsäure Zwischenstufen im Citronensäurezyklus. Diese werden durch die bisher vorgestellten CE-Methoden nach Derivatisierung mit FMOC-Cl bzw. CBQCA nicht erfasst. Aus diesem Grund sollte eine Methode entwickelt werden, mit der Aminosäuren und organische Säuren nebeneinander getrennt und detektiert werden können. Viele organische Säuren zeigen bei einer UV-Detektion bei niedrigen Wellenlängen eine Absorption. Sie können mittels HPLC an C18-Umkehrphasen getrennt werden. Üblicherweise werden mobile Phasen mit einem hohen wässrigen Anteil, z. B. Phosphatpuffer mit einem pH-Wert < 3 , eingesetzt [268, 269, 270, 271]. Die meisten Aminosäuren haben keinen ausgeprägten Chromophor. Sie werden in der Regel derivatisiert, um eine empfindliche Bestimmung mittels UV zu ermöglichen. Der Vorteil eines Verdampfungsstreulichtdetektors ist, dass das Detektionsprinzip von den chromophoren Eigenschaften der Moleküle unabhängig ist (Kapitel 2.2.3.2). Deshalb wurde eine chromatographische Trennung der interessierenden Substanzen in Kombination mit einer ELS-Detektion für die vorliegende Fragestellung verwendet.

Als Verunreinigungen von Alanin und Asparaginsäure, die mittels enzymatischer Synthese gewonnen werden, kommen Fumarsäure sowie deren Verunreinigungen Äpfelsäure und Maleinsäure in Frage. Alanin kann neben Asparaginsäure auch Glutaminsäure enthalten. Beispielhaft wurden noch Bernsteinsäure und Citronensäure für die Untersuchungen ausgewählt.

6.6.2. Methodenentwicklung

6.6.2.1. Auswahl der HPLC-Säule

Bei der Verwendung eines ELS-Detektors müssen die Zusätze zur mobilen Phase flüchtig sein. Phosphatpuffer, die für die Trennung von organischen Säuren häufig eingesetzt werden, sind deshalb nicht geeignet. Für erste Versuche wurden Ameisensäure (FA) und Trifluoressigsäure (TFA) zur Ansäuerung der mobilen Phase verwendet. Zunächst wurde die Trennung von Modellmischungen aus organischen Säuren und Aminosäuren an verschiedenen HPLC-Säulen getestet. Dabei stellten sich die Aquasil-C18-Säule (125 x 4.6 mm, 5 µm; Thermo Hypersil-Keystone) und die Synergi-Hydro-RP-Säule (150 x 4.6 mm, 4 µm; Phenomenex) als günstig heraus.

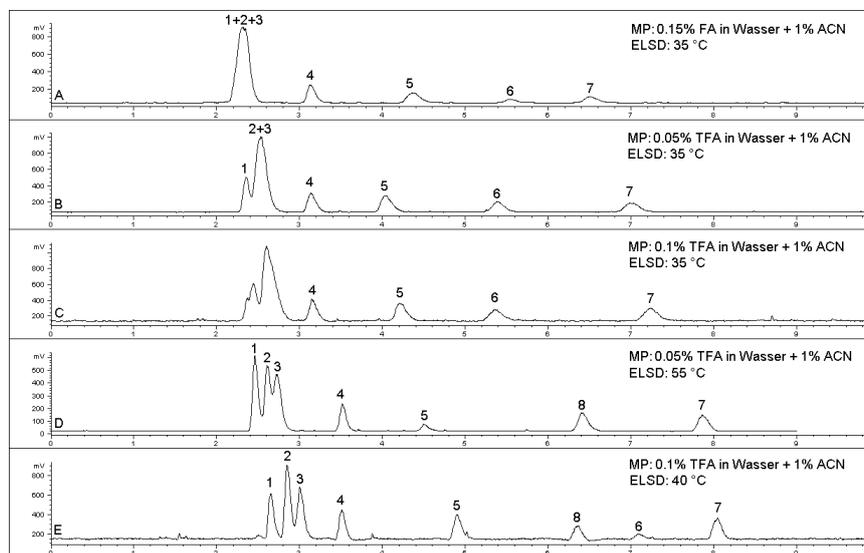


Abbildung 6-42: Trennung einer Modellmischung aus Aminosäuren und organischen Säuren. HPLC-Bedingungen: Säule: (A), (B), (C) Aquasil C18 (125 x 4.6 mm, 5 µm); (D), (E) Synergi Hydro-RP (150 x 4.6 mm, 4 µm); Mobile Phase (MP): wie beschrieben; Fluss: (A), (B), (C) 0.7 ml/min; (D), (E) 0.8 ml/min; Injektion: 10 µl; Detektion: ELSD, 3.6 bar, Signalverstärkungsfaktor 10, Temperatur wie beschrieben. Proben: (A), (B), (C) Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Fumar-, Maleinsäure je 0.1 mg/ml; (D) Asp, Glu je 0.05 mg/ml und Ala, Äpfel-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.1 mg/ml; (E) Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.1 mg/ml. Peakzuordnung: (1) Asp; (2) Ala; (3) Glu; (4) Äpfelsäure; (5) Maleinsäure; (6) Bernsteinsäure; (7) Fumarsäure; (8) Citronensäure.

Beim Vergleich dieser beiden Säulen zeigte die Synergi-Hydro-RP-Säule bei der Verwendung einer mobilen Phase aus 0.1 % Trifluoressigsäure in Wasser mit 1 % Acetonitril eine Antrennung der Aminosäuren und wurde deshalb für alle weiteren Messungen verwendet (Abbildung 6-42). Zusätzlich war mit der Synergi-Hydro-RP-Säule auch die Trennung von Citronensäure möglich.

6.6.2.2. Auswahl der mobilen Phase

Die Aminosäuren sind bei den für die Trennung der organischen Säuren notwendigen sauren Bedingungen positiv geladen. Weil sie nur eine geringe Wechselwirkung mit der stationären Phase zeigen, eluieren sie schnell und kaum getrennt. Die in der Literatur beschriebenen HPLC-ELSD-Methoden zur Trennung von Aminosäuren verwenden perfluorierte Carbonsäuren als flüchtige Ionenpaarreagenzien. Dazu zählen Trifluoressigsäure [272], Heptafluorbuttersäure (HFBA) [273, 274, 275], Nonafluorpentansäure [276] und Pentadecafluoroctansäure [277].

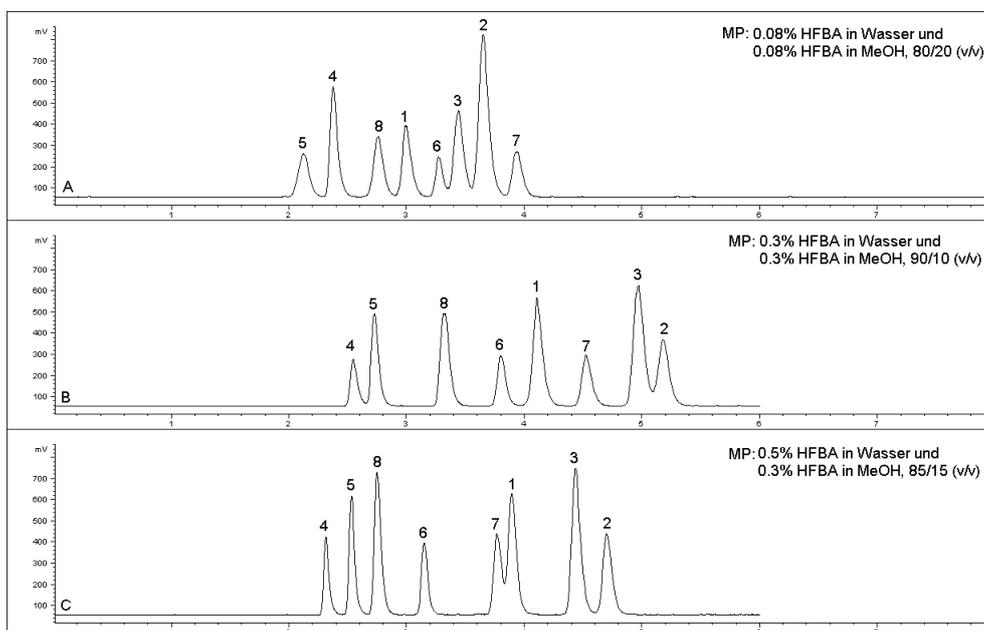


Abbildung 6-43: Trennung von Modellmischungen. HPLC-Bedingungen: Säule: Synergi Hydro-RP (150 x 4.6 mm, 4 μ m); Mobile Phase (MP): wie beschrieben; Fluss: 0.8 ml/min; Injektion: 10 μ l; Detektion: ELSD, 35 $^{\circ}$ C, 3.6 bar, Signalverstärkungsfaktor 10. Proben: (A) Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.1 mg/ml; (B), (C) Asp, Glu je 0.05 mg/ml und Ala, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.1 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 6-42.

Für die Retention geladener Analyten mittels Ionenpaar-HPLC spielt die Kohlenstoff-Kettenlänge der Ionenpaarreagenzien eine Rolle [278]. Wie oben gezeigt, eignet sich Trifluoressigsäure nicht für das vorliegende Trennproblem. Insbesondere für die Trennung hydrophiler Aminosäuren zeigen länger-kettige perfluorierte Carbonsäuren eine größere Selektivität [278]. Die Trennung von Alanin, Asparaginsäure und Glutaminsäure wurde bei Verwendung einer Aqua-Säule (250 x 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex) mit einer mobilen Phase aus 0.3 % HFBA in Wasser und 0.3 % HFBA in Methanol erzielt [275]. Deshalb wurde HFBA als Ionenpaarreagenz ausgewählt. Bereits eine geringe HFBA-Konzentration führte zu einer Trennung der Aminosäuren (Abbildung 6-43).

Eine Basislinientrennung aller Komponenten der Modellmischung wurde mit einer mobilen Phase aus 0.5 % HFBA in Wasser und 0.3 % HFBA in Methanol im Verhältnis 83/17 (v/v) erreicht (Abbildung 6-44).

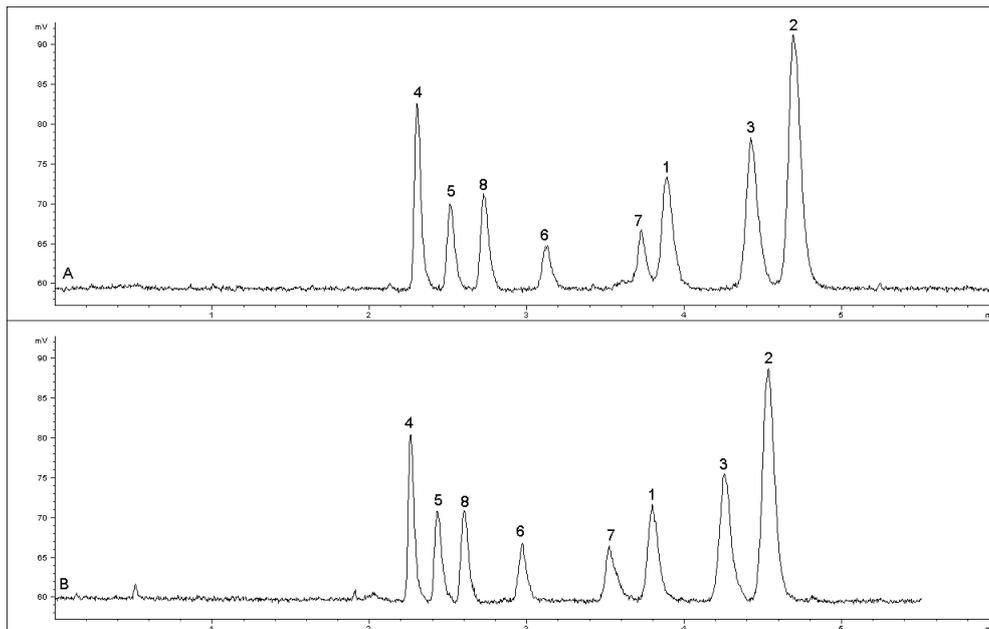


Abbildung 6-44: Trennung einer Modellmischung. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 6-43; Mobile Phase: 0.5 % HFBA in Wasser und 0.3 % HFBA in Methanol im Verhältnis (A) 85/15 (v/v), (B) 83/17 (v/v). Probe: Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.01 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 6-42.

Durch den höheren organischen Anteil im Vergleich zu den in Kapitel 6.6.2.1 beschriebenen Trennpuffern nimmt die Flüchtigkeit der mobilen Phase zu. Die Kondensation der bei der Verneblung entstehenden Tröpfchen an der Wand der Verneblungskammer wird dadurch verringert. So gelangen bei Wasser als mobiler

Phase nur 10 % des Eluates, bei organischen Fließmitteln hingegen bis zu 90 % des Eluates in den Verdampfer, weshalb das Signal der Substanzen im aufgezeichneten Chromatogramm größer wird [89]. Dieser Effekt wurde auch im vorliegenden Fall beobachtet. Im Vergleich zu den mobilen Phasen mit nur 1 % Acetonitril konnten durch einen organischen Anteil von 17 % Methanol größere Signale beobachtet werden. Zusätzlich hatte die HFBA-Konzentration einen Einfluss auf die Größe der Peaks. Bei Verwendung der mobilen Phase mit der höheren HFBA-Konzentration zeigten die Substanzen bei 0.005 mg/ml noch deutliche Signale (Abbildung 6-45).

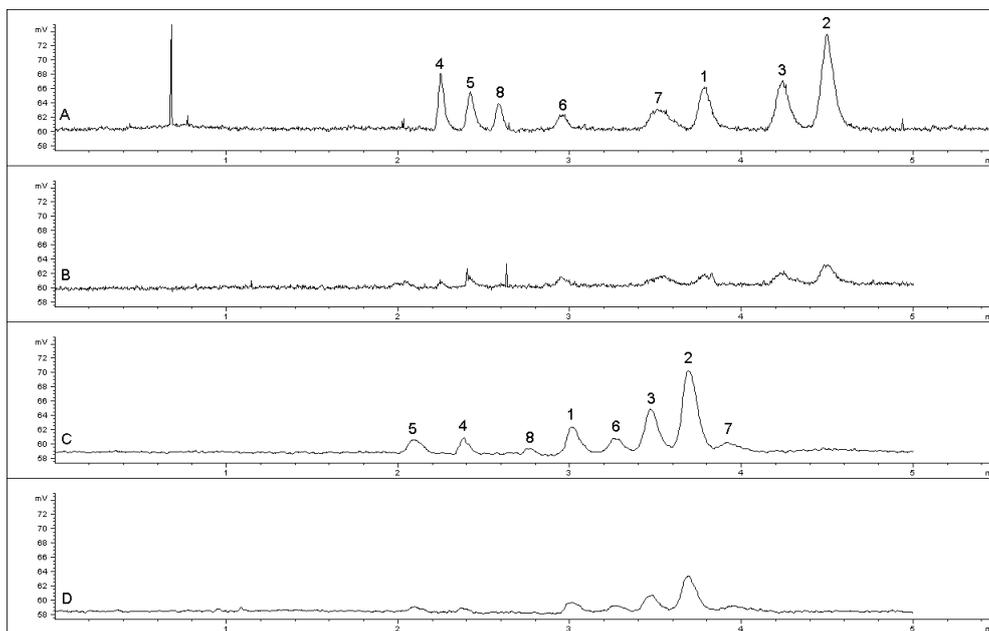


Abbildung 6-45: Nachweisgrenze der Methode in Abhängigkeit von der HFBA-Konzentration. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 6-43; Mobile Phase: (A), (B) 0.5 % HFBA in Wasser und 0.3 % HFBA in Methanol im Verhältnis 83/17 (v/v); (C), (D) 0.08 % HFBA in Wasser und 0.08 % HFBA in Methanol im Verhältnis 80/20 (v/v). Proben: (A), (D) Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.005 mg/ml; (B) Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.002 mg/ml; (C) Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.0075 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 6-42.

Die ELSD-Signale sind vom Durchmesser der Partikel nach der Verdampfung abhängig [89]. Daher wird diskutiert, ob der mögliche Einschluss der Anionen des Ionenpaarreagenzes in die Partikel der Analyten durch elektrostatische Wechselwirkungen für die Zunahme der Signalgröße der Peaks verantwortlich ist [92].

6.6.2.3. Auswahl der ELSD-Bedingungen

Die Temperatur des Verdampfers ist ein kritischer Parameter für die Detektion der Substanzen. Sie sollte so gewählt werden, dass die mobile Phase effektiv entfernt wird. Die Analyten dürfen bei dieser Temperatur allerdings nicht flüchtig sein.

Im vorliegenden Fall nimmt das Rauschen der Basislinie mit steigender Temperatur ab. Jedoch kann man auch eine Abnahme der Peakhöhe aller Peaks beobachten (Abbildung 6-46). Für Maleinsäure und Bernsteinsäure ist die Temperaturabhängigkeit der Peaks besonders deutlich. Beide Substanzen sind ab 50 °C nicht mehr nachweisbar. Für die Messungen wurde eine Temperatur von 35 °C als Kompromiss zwischen Basislinienrauschen und Peakhöhe ausgewählt.

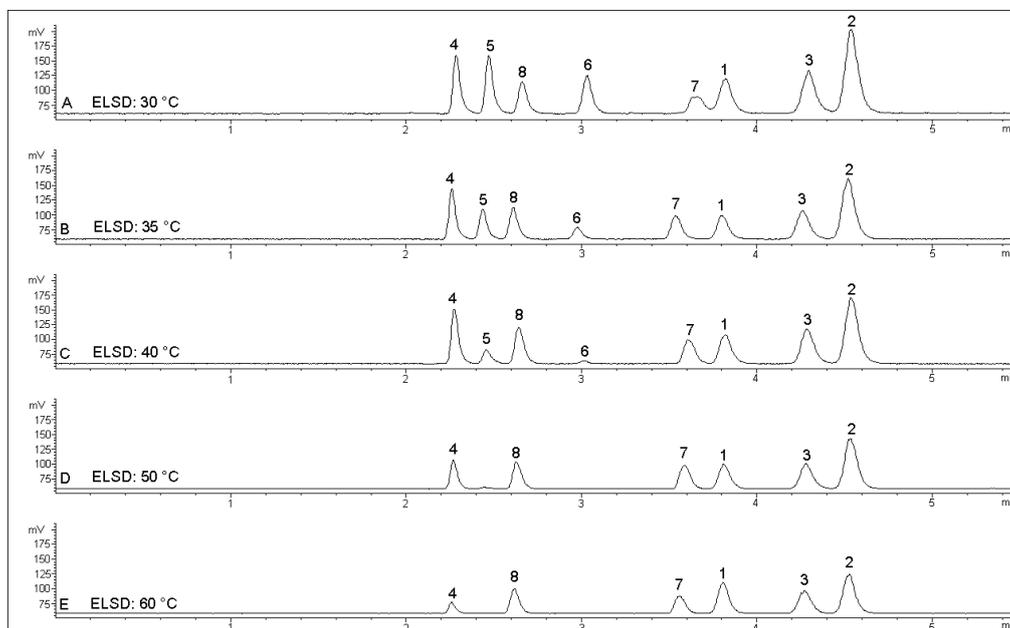


Abbildung 6-46: Variation der Temperatur des Verdampfers. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 6-43; Mobile Phase: 0.5 % HFBA in Wasser und 0.3 % HFBA in Methanol im Verhältnis 83/17 (v/v); Detektion: ELSD, 3.6 bar, Signalverstärkungsfaktor 10, Temperatur wie beschrieben. Probe: Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.02 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 6-42.

6.6.3. Schwierigkeiten der Methode

Die Methode sollte zur Reinheitsanalytik der Aminosäuren eingesetzt werden. Die Konzentration der Hauptkomponente in der Probelösung richtet sich dabei nach der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze der möglichen Verunreinigungen. Als LOQ wurde 0.005 mg/ml für Citronensäure und Maleinsäure abgeschätzt. Das S/N-

Verhältnis von Bernsteinsäure lag bei dieser Konzentration im Bereich des LOD. Diese Werte entsprechen den in der Literatur gefundenen Angaben: Das LOQ ist in der Regel größer als 0.1 µg/ml [279]. Für kleine Moleküle werden im günstigsten Fall 1 ng bis 50 ng (injizierte Menge), häufiger jedoch 50 ng bis 100 ng (injizierte Menge) als LOD gefunden [280].

Wurden Alanin oder Asparaginsäure in einer größeren Konzentration injiziert, traten nach dem Peak der Hauptkomponente nicht reproduzierbare Nachsignale auf, die die Detektion der möglichen Verunreinigungen stören (Abbildung 6-47).

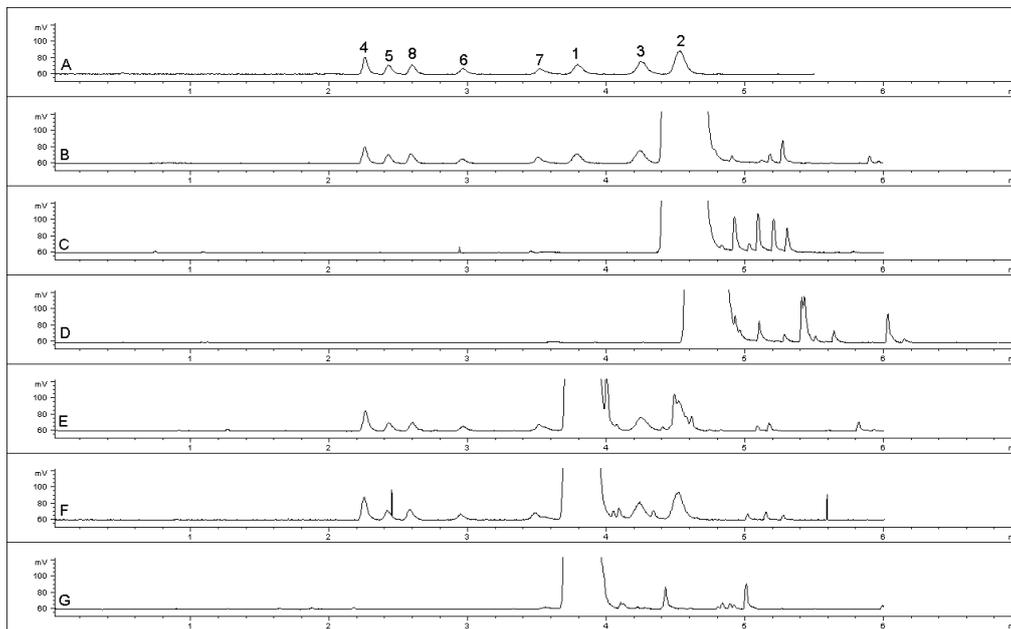


Abbildung 6-47: Störung der Detektion der Verunreinigungen durch Nachsignale nach dem Hauptpeak. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 6-46; Detektion: ELSD, 35 °C, 3.6 bar, Signalverstärkungsfaktor 10. Proben: (A) Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.01 mg/ml; (B) Ala 1 mg/ml + Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.01 mg/ml; (C), (D) Ala 1 mg/ml; (E), (F) Asp 1 mg/ml + Ala, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.01 mg/ml; (G) Asp 1 mg/ml. Peakzuordnung: wie in Abbildung 6-42.

Eine Temperaturerhöhung des Verdampfers brachte keine zufriedenstellende Verbesserung, zumal bei hohen Temperaturen die Verunreinigungen zum Teil flüchtig sind (Abbildung 6-48).

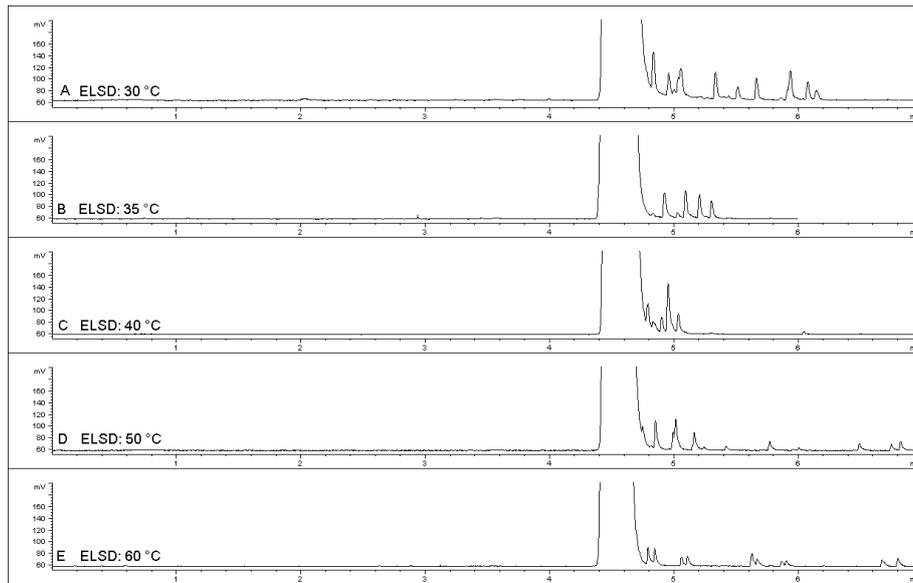


Abbildung 6-48: Variation der Temperatur des Verdampfers. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 6-46; Detektion: ELSD, 3.6 bar, Signalverstärkungsfaktor 10, Temperatur wie beschrieben. Probe: Ala 1 mg/ml.

Der beobachtete Effekt war von der Konzentration der Probe abhängig und trat nicht nur bei Aminosäuren sondern auch bei anderen Substanzen (Coffein, Fumarsäure, Spectinomycin) auf. Für weitere Untersuchungen wurden die Proben in das System injiziert, ohne dass eine Säule eingebaut war (Abbildung 6-49).

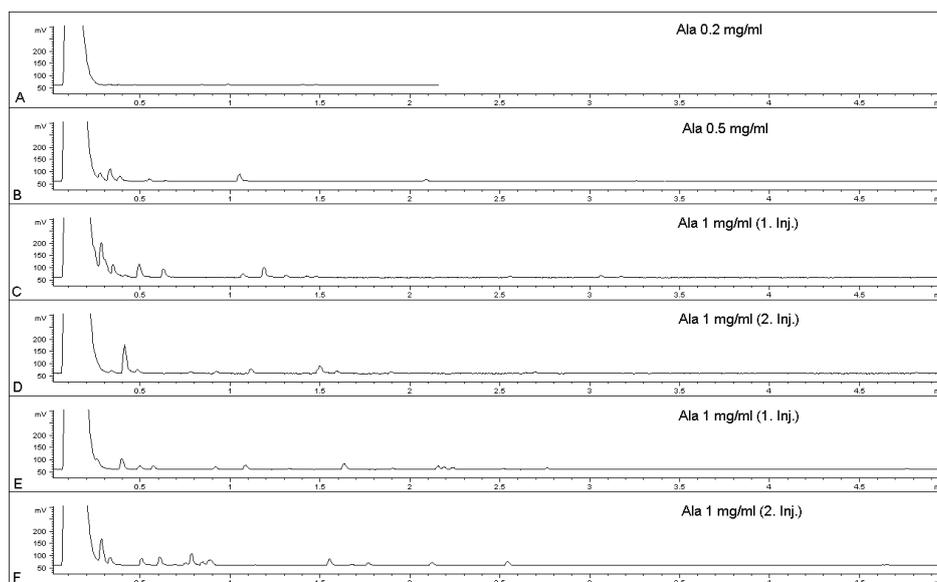


Abbildung 6-49: Messungen ohne HPLC-Säule. HPLC-Bedingungen: Mobile Phase: (A) – (D) 0.5 % HFBA in Wasser und 0.3 % HFBA in Methanol im Verhältnis 83/17 (v/v); (E), (F) Wasser und Methanol im Verhältnis 83/17 (v/v); Fluss: 0.8 ml/min; Injektion: 10 µl; Detektion: ELSD, 35 °C, 3.6 bar, Signalverstärkungsfaktor 10. Proben: wie beschrieben.

Da in diesem Fall die Nachsignale ebenfalls auftraten, konnte ein Einfluss der HPLC-Säule ausgeschlossen werden. Wenn im Anschluss an eine Probelösung einer Substanz ein Blindwert gemessen wurde, traten keine Störpeaks auf. Daher kamen eventuelle Probleme am Injektor der HPLC-Anlage durch Verschleppung von Substanzen nicht als Ursache in Betracht.

Stattdessen legten die durchgeführten Experimente die Vermutung nahe, dass das Problem im ELSD lokalisiert ist. Dieser Verdacht wurde durch Untersuchungen, die von dem Vertriebspartner¹ des ELSD-Herstellers² durchgeführt wurden, bestätigt. Auch hier wurden sowohl bei Coffein als auch bei Alanin bei Konzentrationen von 1 mg/ml Nachsignale beobachtet. Der Hersteller äußerte sich nicht zu der Fragestellung. Ein Ansatz zur Erklärung des Effektes könnte sein, dass der Vernebler mit der Substanzmenge überlastet ist und es an dieser Stelle zu einer Verschleppung von Substanz kommt.

Abbildung 6-50 zeigt beispielhaft das Chromatogramm von Alanin versetzt mit den möglichen Verunreinigungen.

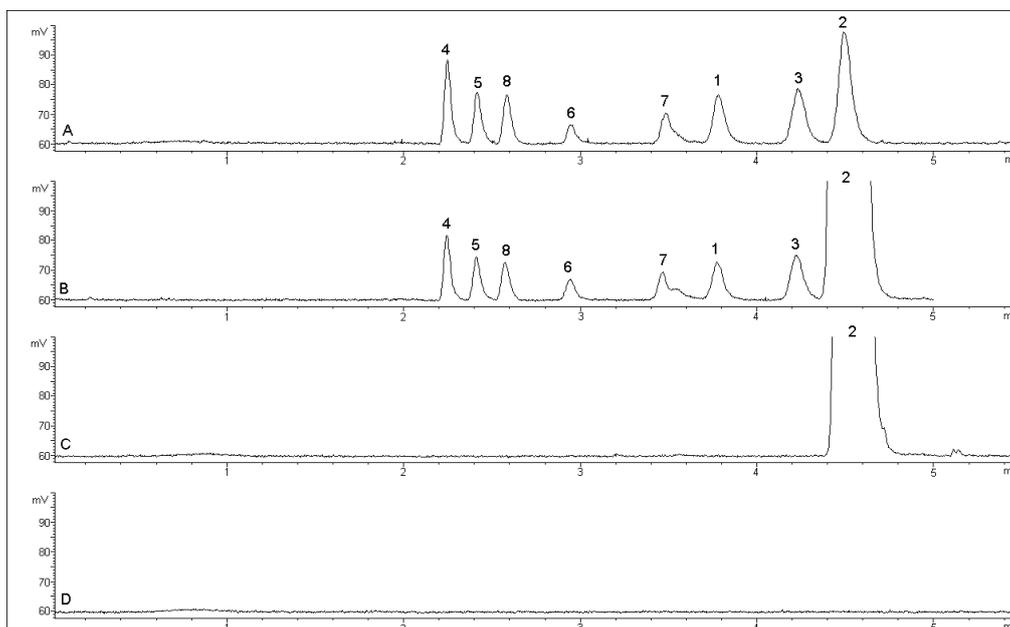


Abbildung 6-50: Trennung von Alanin und den möglichen Verunreinigungen. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 6-47. Proben: (A) Ala, Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.01 mg/ml; (B) Ala 0.2 mg/ml + Asp, Glu, Äpfel-, Bernstein-, Citronen-, Fumar-, Maleinsäure je 0.01 mg/ml; (C) Ala 0.2 mg/ml; (D) Blindwert. Peakzuordnung: wie in Abbildung 6-42.

¹ ERC GmbH, Riemerling, Deutschland

² Sedere Sa., Alfortville, Frankreich

Bei einer Konzentration von 0.2 mg/ml der Hauptkomponente traten die Störsignale noch nicht auf. Allerdings wäre bei dieser Konzentration eine Bestimmungsgrenze von 0.0002 mg/ml (d. h. 2 ng injizierte Menge) notwendig, damit die Methode zur Reinheitsprüfung auf 0.1 %-Niveau geeignet wäre. Aufgrund der Literaturdaten erschien es unwahrscheinlich, dass dieser Wert erzielt werden könnte.

6.6.4. Untersuchung von L-Ornithin-L-Aspartat

Die Wechselwirkung der basischen Aminosäuren mit dem Ionenpaarreagenz und damit auch mit der stationären Phase ist durch die zusätzliche positiv geladene Aminogruppe größer als bei Alanin, Asparaginsäure oder Glutaminsäure. Mit der beschriebenen Methode wurden Ornithin, Lysin und Arginin stark reteniert und erschienen spät im Chromatogramm als sehr breite Peaks. Deshalb wurde eine Gradientenelution eingeführt, um die Trennung von L-Ornithin-L-Aspartat von den Verunreinigungen zu ermöglichen (Abbildung 6-51).

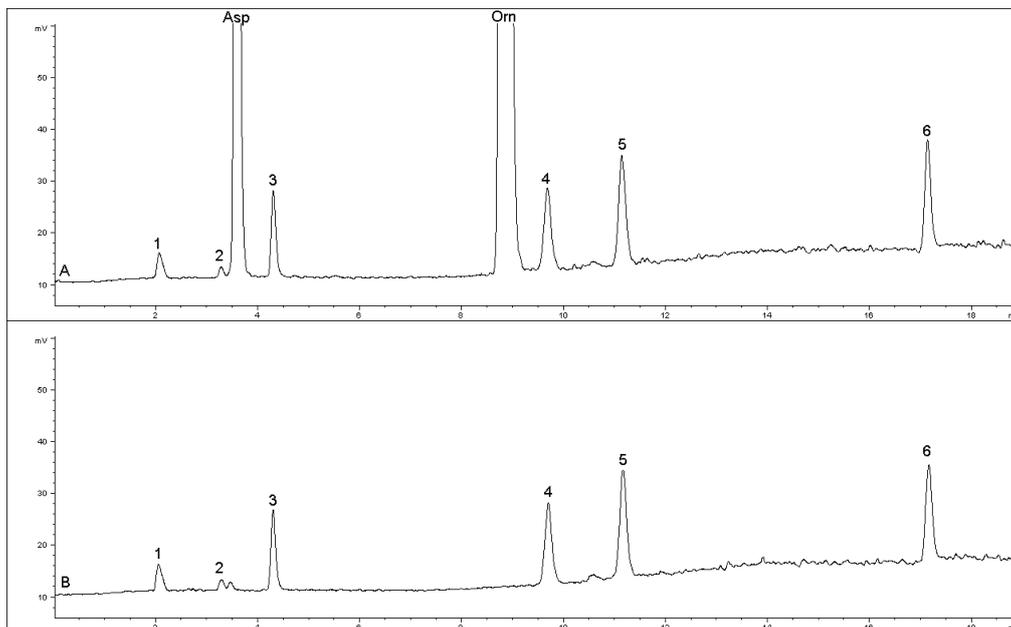


Abbildung 6-51: Gradientenelution zur Trennung von LOLA und den Verunreinigungen. HPLC-Bedingungen: wie in Abbildung 6-47; Mobile Phase: (A) 0.5 % HFBA in Wasser, (B) 0.3 % HFBA in Methanol; Gradient: 4 min 25 % B, 4 – 18 min 25 % – 65 % B, für 1 min 65 % B, Post-run 10 min 25 % B; Detektion: ELSD, 35 °C, 3.6 bar, Signalverstärkungsfaktor 10, Filter 3S. Proben: (A) LOLA 0.2 mg/ml + Glucose, Fumarsäure, δ -Aminovalerolactam, Lys, Arg, Verunreinigung A je 0.01 mg/ml; (B) Glucose, Fumarsäure, δ -Aminovalerolactam, Lys, Arg, Verunreinigung A je 0.01 mg/ml. Peakzuordnung: (1) Glucose; (2) Fumarsäure; (3) δ -Aminovalerolactam; (4) Lys; (5) Arg; (6) Verunreinigung A.

Durch den ansteigenden organischen Anteil nimmt die Peakgröße der spät eluierenden Substanzen zu [93].

Das LOQ für δ -Aminovalerolactam, Arginin und Lysin betrug ca. 0.0025 mg/ml. Verunreinigung A hatte bei dieser Konzentration ein S/N-Verhältnis von ca. 3, da das Basislinienrauschen unter den gewählten ELSD-Bedingungen mit steigendem organischen Lösungsmittel zunahm. Wird 0.0025 mg/ml als 0.1 %-Niveau angesetzt, so ergibt sich eine Konzentration von 2.5 mg/ml für die Hauptkomponente. Bei dieser L-Ornithin-L-Aspartat-Konzentration traten sowohl nach dem Asparaginsäure-Peak als auch nach dem Ornithin-Peak die bereits beschriebenen Nachsignale auf. In Abbildung 6-51 ist zu erkennen, dass bei einer Konzentration von 0.2 mg/ml keine Störsignale beobachtet wurden. Wird diese Konzentration für die Hauptkomponente angesetzt, könnten Nebenkomponenten auf 1 %-Niveau nachgewiesen werden.

6.7. Zusammenfassung

Mehrere Chargen verschiedener Aminosäuren wurden nach Derivatisierung mit FMOC-Cl bzw. CBQCA untersucht. Tabelle 6-8 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 6-8: Übersicht über die Anwesenheit von Verunreinigungen (Anzahl und, wenn möglich, Identität) in Aminosäure-Proben.

Aminosäure	Hersteller	DC (Ph. Eur.)	FMOC-Cl	CBQCA	
				25 mM Boratpuffer pH 9.20; 25 mM SDS	20 mM Tetraboratpuffer pH 9.3; 100 mM SDS
His	A	entspricht	nicht anwendbar	≤ 17 Peaks, davon 1 > 0.05 %; Lys	Lys, unbekannte VU
	A (His-HCl)	entspricht	nicht anwendbar	≤ 13 Peaks, davon 1 > 0.05 %; Lys	Lys, unbekannte VU
	C	entspricht	nicht anwendbar	≤ 15 Peaks, davon 1 > 0.05 %; Lys	Lys, unbekannte VU
	D	entspricht	nicht anwendbar	≤ 14 Peaks, davon 1 > 0.05 %; Lys	Lys, unbekannte VU
Ile	A	entspricht	4 Peaks: Gly, Val, Leu, unbekannte VU	≤ 16 Peaks, davon 3 > 0.05 %	Gly, Val, Leu, unbekannte VU
	A (17-03/03)	entspricht	5 Peaks: Ala, Gly, Val, Leu, unbekannte VU	13 Peaks, davon 4 > 0.05 %	Ala, Gly, Val, Leu, unbekannte VU
	C	entspricht	2 Peaks: Gly, Val	≤ 13 Peaks, davon 2 > 0.05 %	Gly, Val, unbekannte VU
Phe	A	entspricht	keine Aminosäuren gefunden	≤ 10 Peaks, davon 2 > 0.05 %	Tyr, unbekannte VU
	B	entspricht	keine Aminosäuren gefunden	≤ 10 Peaks, davon 2 > 0.05 %	keine Aminosäuren gefunden, unbekannte VU
Ser	A	entspricht	keine Aminosäuren gefunden	≤ 11 Peaks, davon 2 > 0.05 %	keine Aminosäuren gefunden, unbekannte VU
	B	entspricht	keine Aminosäuren gefunden	≤ 10 Peaks, davon 2 > 0.05 %	
	C	entspricht	keine Aminosäuren gefunden	≤ 9 Peaks, davon 2 > 0.05 %	

Zum Vergleich ist die DC-Methode auf „Ninhydrin-positive Substanzen“, die in den Aminosäure-Monographien im Ph. Eur. vorgeschrieben ist, aufgeführt.

Durch die Variation des Puffers (20 mM Tetraboratpuffer pH 9.3; 100 mM SDS) war es möglich, andere Aminosäuren als mögliche Verunreinigungen in CBQCA-derivatisierten Proben zuzuordnen. Dabei sind die Ergebnisse im Hinblick auf die Anwesenheit anderer Aminosäuren denen nach FMOC-Derivatisierung der Proben ähnlich. Sowohl durch die Variation des Trennpuffers der FMOC-CE-Methode als auch der CBQCA-CE-Methode wurde gezeigt, dass die analysierten Isoleucin-, Phenylalanin- und Serin-Proben nicht mit den basischen Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin sowie Cystein verunreinigt waren. Aufgrund von NMR-Untersuchungen wurde als Ursache für einen in allen mit FMOC-Cl derivatisierten Proben auftretenden Peak, der mit dem Standard-Trennpuffer die gleiche Migrationszeit wie die FMOC-Derivate von Arginin, Histidin, Lysin und Cystein hat, ein Nebenprodukt der Derivatisierungsreaktion vorgeschlagen.

Beim Vergleich der beiden Derivatisierungsverfahren ist auf der einen Seite die Reaktion von FMOC-Cl schneller (2 Minuten gegen 10 Stunden), im Elektropherogramm werden weniger Signale durch das Reagenz detektiert und die Kosten von FMOC-Cl sind geringer. Auf der anderen Seite ist das Spektrum an nachweisbaren Verunreinigungen bei der CBQCA-Derivatisierung breiter und durch die LIF-Detektion ist die Methode empfindlicher. So wurden in den CBQCA-derivatisierten Proben sehr viele Peaks detektiert. Das legt die Vermutung nahe, dass die Proben mit vielen bisher nicht bekannten Substanzen verunreinigt sein können. Als mögliche Verunreinigungen kommen bei fermentativ hergestellten Aminosäuren alle Neben- und Zwischenprodukte der Biosynthese in Frage. Dazu zählen auch organische Säuren. Durch Verwendung von HFBA als Ionenpaarreagenz und einer „hydrophil endcappten“ C18-Säule wurde die Trennung einer Modellmischung aus organischen Säuren und Aminosäuren mittels HPLC erzielt. Der verwendete ELSD hat den Vorteil, dass im Gegensatz zu einem UV-Detektor auch Substanzen mit geringen chromophoren Eigenschaften, wie z. B. die untersuchten Aminosäuren, erfasst werden. Als Voraussetzung müssen die Verbindungen weniger flüchtig sein als die mobile Phase. Eine Temperatur des Verdampfers von 35 °C wurde als Kompromiss zwischen Basislinienrauschen und Peakhöhe gewählt. Bei höheren Temperaturen werden vor allen Dingen Bernsteinsäure und Maleinsäure während der Verdampfung aus dem System

entfernt und sind nicht mehr nachweisbar. Die Anwendung der Methode zur Reinheitsprüfung der Aminosäuren stellte sich als schwierig heraus. Bei Konzentrationen > 0.2 mg/ml wurden nach dem Hauptpeak Peaks detektiert, die den Nachweis möglicher Verunreinigungen störten. Die durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass der ELS-Detektor mit der großen Substanzmenge überlastet ist und es zur Verschleppung von Substanz kommt.

Zur Bestimmung des Verunreinigungsprofils von L-Ornithin-L-Aspartat eignete sich die Derivatisierung mit FMOC-Cl und CE-Messung der Derivate nicht, da der hohe organische Anteil in der Probe bzw. im Trennpuffer zu breiten Peaks und stark schwankenden Migrationszeiten führte. Zusätzlich war die Trennung der Komponenten schwierig. Bei der Derivatisierung mit CBQCA zeigten sowohl Ornithin als auch Lysin ein Muster aus mehreren Peaks, was die Zuordnung der Signale erschwerte. Durch die Einführung eines Gradienten konnte L-Ornithin-L-Aspartat mittels HPLC-ELSD von den Verunreinigungen getrennt werden. Allerdings wurden auch hier die Störsignale nach den beiden Hauptpeaks beobachtet.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Qualitätskontrolle von pharmazeutisch verwendeten Substanzen ist eine Voraussetzung für die sichere Anwendung von Arzneimitteln. Sie ist eng mit der Bestimmung der Verunreinigungen einer Substanz im Rahmen der Reinheitsanalytik verknüpft. Dabei spielt das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) eine wichtige Rolle, denn hier werden in allgemeinen Monographien (z. B. Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung, Fermentationsprodukte) und allgemeinen Texten (z. B. Kontrolle von Verunreinigungen in Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung) sowie in Monographien zu Einzelsubstanzen Qualitätsstandards festgelegt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Bestimmung des Verunreinigungsprofils waren auf die Neuerarbeitung oder Überarbeitung der im Ph. Eur. beschriebenen Prüfungen auf „Verwandte Substanzen“ ausgerichtet.

Im Rahmen der Neuerarbeitung einer Monographie für Trimebutin und Trimebutin-Maleat wurde eine RP-HPLC-Methode zur Reinheitsprüfung entwickelt. Durch die Verwendung einer RP18-Säule, die mit polaren Endgruppen modifiziert war, war es mittels Gradientenelution möglich, die bekannten Verunreinigungen zu trennen. Als mobile Phasen wurden ein 30 mM Phosphatpuffer pH 3.0 und Acetonitril eingesetzt. Neben den bekannten Verunreinigungen war noch ein weiterer Peak nachweisbar, der N-Desmethyltrimebutin zugeordnet werden konnte. Untersuchungen zur Robustheit der Methode, bei denen die Säulentemperatur, der pH-Wert des Phosphatpuffers und der Gradient variiert wurden, haben gezeigt, dass die Trennung zwischen N-Desmethyltrimebutin und dem Hauptpeak sowie zwischen zwei bekannten Verunreinigungen kritisch ist. Für beide Peakpaare wurden deshalb Systemeignungskriterien festgelegt. Zur Definition von Akzeptanzkriterien in den beiden erarbeiteten Monographieentwürfen wurden Trimebutin- bzw. Trimebutin-Maleat-Proben untersucht. Die Quantifizierung erfolgte über die „Externer-Standard“-Methode mit einer Verdünnung der Untersuchungslösung als Referenzlösung. Falls erforderlich, wurden die Korrekturfaktoren in die Berechnung des Gehaltes einbezogen. Die Trimebutin-Maleat-Proben zeigten im Vergleich zu den Trimebutin-Proben weniger Peaks und einen geringeren Gehalt der Verunreinigungen. Es fiel auf, dass nur die Trimebutin-Maleat-Chargen eines Herstellers mit N-Desmethyltrimebutin verunreinigt waren.

Die Ph.-Eur.-Kommission hat die Monographie zu Adenosin in das Revisionsprogramm aufgenommen mit dem Ziel, die DC-Methode zur Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ gegen eine HPLC-Methode auszutauschen. In Übereinstimmung mit Ergebnissen des EDQM-Labors haben die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigt, dass mit einer Ionenpaar-HPLC-Methode die Anwesenheit von Inosin, Guanosin, Uridin und Adenin als Verunreinigungen in Adenosin kontrolliert werden kann. Durch die Festlegung einer Auflösung > 1.5 zwischen Adenin und Inosin als Systemeignungskriterium können nicht geeignete HPLC-Säulen erkannt werden, wie am Beispiel der Hypersil-Gold-Säule gezeigt wurde. Gute Trennselektivität wurde mit einer Hypersil-ODS-Säule erzielt. Bei der Untersuchung von Adenosin-Chargen mit der Ionenpaar-HPLC-Methode wurde keine Verunreinigung oberhalb des Berichtsgrenzwertes (0.05 %) gefunden. Durch die DC-Prüfung des Ph. Eur. können verschiedene Nucleotide nachgewiesen werden. Alle Proben zeigten einen schwachen Fleck auf der Höhe von Adenosin-5'-monophosphat. Da die vorgeschlagene HPLC-Methode die Erfassung von Nucleotiden nicht ermöglicht, wurden die Bedingungen durch die Einführung eines Gradienten so geändert, dass Nucleotide, Nucleoside und Adenin gleichzeitig nachgewiesen werden konnten. Die Analyse der Proben bestätigte, dass kleine Mengen Adenosin-5'-monophosphat in den Chargen vorhanden waren.

Eine CE-Methode zur Reinheitsprüfung von Glutathion wurde entsprechend der Kommentare zum in Pharmeuropa veröffentlichten Monographievorschlag angepasst und überarbeitet. Die kritischen Trennungen zwischen dem internen Standard und Cystein sowie zwischen L- γ -Glutamyl-L-cystein und dem Hauptpeak, die durch den Systemeignungstest überprüft werden, waren durch den pH-Wert des Trennpuffers kontrollierbar: pH-Werte < 1.80 führten zu einer Überlagerung von Cystein durch den internen Standard, während bei pH-Werten > 1.80 L- γ -Glutamyl-L-cystein nicht vom Hauptpeak abgetrennt war. Es wurden mehrere Glutathion-Chargen von zwei japanischen Herstellern untersucht. Dabei wurde ein für den entsprechenden Hersteller charakteristisches Peakmuster gefunden. Glutathion zeigt beispielhaft, dass das Verunreinigungsprofil fermentativ gewonnener Produkte komplex ist und stark von den Herstellungs- und Aufreinigungsprozessen abhängt.

Gleiches gilt auch für Aminosäuren, die nicht mehr ausschließlich durch chemische Synthese oder Extraktion aus Proteinhydrolysaten, sondern vermehrt biotechnologisch gewonnen werden. In den Aminosäure-Monographien im Ph. Eur.

ist zur Reinheitsprüfung eine DC auf „Ninhydrin-positive Substanzen“ vorgeschrieben. Diese Methode steht schon länger in der Diskussion, da sie in erster Linie auf den Nachweis anderer Aminosäuren, die durch unvollständige Abtrennung bei der Extraktion aus Proteinhydrolysaten stammen können, ausgelegt ist und nicht alle potenziellen Verunreinigungen, die durch eine biotechnologische Gewinnung vorkommen können, abdeckt. Die Analyse von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit FMOC-Cl ermöglicht einen sensitiven und selektiven Nachweis anderer Aminosäuren als Verunreinigungen. Durch den Einsatz von CBQCA als Derivatisierungsreagenz kann das Spektrum an detektierbaren Verunreinigungen auf Aminozucker und kleine Peptide erweitert werden. Beide Methoden wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung des Verunreinigungsprofils von Isoleucin, Phenylalanin und Serin angewendet. Histidin wurde nur nach Derivatisierung mit CBQCA untersucht, da die FMOC-Methode wegen Unlöslichkeit der Derivate nicht anwendbar war.

Während in den Phenylalanin- und Serin-Proben keine Verunreinigungen erfasst wurden, wurden in den Isoleucin-Proben nach Derivatisierung mit FMOC-Cl andere Aminosäuren gefunden. Alle untersuchten Aminosäuren zeigten nach Derivatisierung mit CBQCA sehr viele Verunreinigungen. Wegen Peaküberlagerungen konnten Aminosäuren als Verunreinigungen mit dem verwendeten Trennpuffer (25 mM Boratpuffer pH 9.20; 25 mM SDS) nicht bestimmt werden. Durch eine Variation des Trennpuffers (20 mM Tetraboratpuffer pH 9.3; 100 mM SDS) war es möglich, die CBQCA-derivatisierten Aminosäuren zu trennen und somit in den Proben zuzuordnen. Im Hinblick auf die Anwesenheit anderer Aminosäuren waren die Ergebnisse der beiden Verfahren miteinander vergleichbar. Insbesondere wurden in den Isoleucin-, Phenylalanin- und Serin-Proben keine basischen Aminosäuren (Arginin, Histidin, Lysin) sowie Cystein gefunden. Deren FMOC-Derivate comigrierten mit einem Peak, der nach Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie als Nebenprodukt der Derivatisierungsreaktion mit FMOC-Cl identifiziert wurde.

Als Verunreinigungen von biotechnologisch hergestellten Aminosäuren kommen nicht nur Verbindungen mit Aminogruppen, die mit den beiden CE-Methoden nachweisbar sind, in Frage sondern auch organische Säuren, z. B. aus dem Citronensäurecyclus. Unter Verwendung einer C18-Phase mit polaren Gruppen als „Endcapping“ und einer mobilen Phase mit Heptafluorbuttersäure als Ionenpaarreagenz wurde eine HPLC-Methode entwickelt, mit der die Aminosäuren

und die organischen Säuren einer Modellmischung getrennt werden konnten. Durch das Detektionsprinzip des ELSD waren auch die wenig UV-aktiven Aminosäuren in einer Konzentration von 0.005 mg/ml nachweisbar. Allerdings stellte sich die Anwendung der Methode zur Reinheitsprüfung der Aminosäuren als schwierig heraus. Bei Konzentrationen > 0.2 mg/ml wurden nach dem Hauptpeak Signale detektiert, die den Nachweis möglicher Verunreinigungen störten. Die durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass der ELSD mit der großen Substanzmenge überlastet ist und es zur Verschleppung von Substanz kommt.

8. SUMMARY

The quality control of active pharmaceutical ingredients is a prerequisite for the safe use of drug products and is intimately connected with the determination of the impurity profile of the substances. The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) is a key instrument for purity control since quality standards are given in general monographs (e. g., Substances for Pharmaceutical Use, Products of Fermentation) and general texts (e. g., Control of Impurities in Substances for Pharmaceutical Use) as well as in individual monographs of each substance. Within this work, impurity profiling was aimed at elaboration or revision of the tests for “Related substances” described in the Ph. Eur.

For purity control of trimebutine and trimebutine maleate an RP-HPLC method was developed. Using a hydrophilic endcapped RP18 stationary phase and gradient elution with phosphate buffer (30 mM, pH 3.0) and acetonitrile the known impurities could be separated. Moreover, an additional peak could be detected being due to desmethyl trimebutine. The robustness of the method was studied by changing the column temperature, the pH of the phosphate buffer and the gradient. Critical parameters of the method were the separation between desmethyl trimebutine and the main peak as well as the separation between two known impurities. Both should be controlled for system suitability testing. Acceptance criteria described in the draft monograph take account of batch testing of trimebutine and trimebutine maleate samples. Contents of impurities were calculated by means of external standard method using a dilution of test solution as reference. If necessary the correction factors were used. Considering the results of batch testing, in trimebutine maleate samples less impurities with a lower content compared with trimebutine batches could be detected. Only trimebutine maleate samples of one manufacturer contained desmethyl trimebutine.

The monograph for adenosine was included in the revision program of the Ph. Eur. Commission. In accordance with the current policy for control of impurities it was proposed to replace the thin layer chromatography method for determination of related substances by a HPLC method. In accordance with results of the EDQM laboratory within this work it was confirmed that an ionpair-RP-method was suitable for the determination of inosine, guanosine, uridine and adenine in adenosine samples. A resolution of not less than 1.5 between the adenine and inosine peaks is

a measure for adequate performance of the chromatographic system. This criterion was not achieved by Hypersil Gold column, whereas Hypersil ODS column was found to have a good selectivity. Analysing adenosine batches, no impurity above the disregard level (0.05 %) was found. Nucleotides can be determined by means of the TLC method described in the Ph. Eur. monograph for adenosine. Chromatograms of adenosine batches showed a slightly detectable spot with an R_F -value of adenosine-5'-monophosphate. The proposed ionpair-HPLC-method was found to be not suitable for determination of nucleotides. However, using modified chromatographic conditions and gradient elution the detection of nucleotides, nucleosides and adenine was possible. The analysis of adenosine batches confirmed the presence of small amounts of adenosine-5'-monophosphate.

A CE method can be used for impurity profiling of glutathione. The draft monograph for glutathione published in Pharmeuropa was revised with reference to the given comments. The separations between the internal standard and cysteine as well as L- γ -glutamyl-L-cysteine and the main peak are checked by means of the system suitability tests. Both separations could be controlled by the pH of the electrolyte solution: At pH < 1.80 cysteine disappeared under the peak due to the internal standard, whereas at pH > 1.80 L- γ -glutamyl-L-cysteine was not separated from the main peak. Applying the CE method to plenty of glutathione batches collected from two Japanese manufacturers, two typical impurity profiles were found. Glutathione is indicative of the complex impurity profile of fermentatively produced substances, which is particularly dependent on the manufacturing and purification process.

Amino acids should be regarded in a similar way. In the past, amino acids were commonly produced by chemical synthesis or extraction methods. Nowadays, biotechnological processes dominate the industrial production. Monographs in the Ph. Eur. are mainly adapted to amino acids obtained from extraction since the described TLC method for "ninhydrin-positive substances" limits the presence of other amino acids as impurities. However, this method does not meet the requirements for limitation of putative impurities resulting from biotechnological production. Derivatisation with FMOC-Cl in combination with CE is sensitive and selective for determination of other amino acids as impurities. In order to broaden the spectrum of detectable impurities towards amino sugars and low molecular peptides derivatisation with CBQCA can be used. Within this work both methods were applied

to impurity profiling of isoleucine, phenylalanine and serine. Histidine was not included in the Fmoc study because of solubility problems of the Fmoc derivatives. Amino acids as impurities were only found in isoleucine batches, but not in phenylalanine and serine batches. However, analysis of CBQCA labelled samples revealed a number of peaks. Using the standard separation buffer (25 mM borate buffer pH 9.20; 25 mM SDS) the assignment of amino acids was difficult because of comigration. But varying the separation buffer (20 mM tetraborate buffer pH 9.3; 100 mM SDS) could improve the separation of amino acids and, at the same time, the possibility of assignment. Considering the presence of other amino acids, results of both methods were well comparable. Particularly, isoleucine, phenylalanine and serine batches did not contain basic amino acids (arginine, histidine, lysine) as well as cysteine. Their Fmoc derivatives overlapped with a peak, which was identified by means of NMR spectroscopy to be a by-product of the derivatisation reaction with Fmoc-Cl.

Nevertheless, putative impurities of biotechnologically produced amino acids include not only substances with an amino moiety, which can be controlled by means of the CE methods, but also carboxylic acids, originating e. g. from the citric acid cycle. For simultaneous detection of amino acids and organic acids a HPLC method in combination with ELSD was developed. Model mixtures were separated using a hydrophilic endcapped C18 stationary phase and a mobile phase containing heptafluorobutyric acid. As the detection principle of ELSD is independent from the chromophoric properties of the analytes amino acids were detectable at a concentration of 0.005 mg/ml. However, the application of the method for purity control was not successful because of peaks, which appeared after the main peak disturbing the detection of the putative impurities. Regarding the performed experiments the problem seems to be located in the ELSD. Probably because of the huge amount of substance the detector is overloaded resulting in a carryover of the substance.

9. EXPERIMENTALTEIL

9.1. Reinheitsprüfung von Trimebutin und Trimebutin-Maleat mittels RP-HPLC

9.1.1. Proben und Verunreinigungen

Proben	Charge	Quelle	Hersteller
Trimebutin	17167 ^(*)	EDQM	A
	17168 ^(*)	EDQM	A
	17169 ^(*)	EDQM	A
	17170 ^(*)	EDQM	A
Trimebutin-Maleat	16351 ^(*)	EDQM	B
	16356 ^(*)	EDQM	C
	16357 ^(*)	EDQM	C
	17171 ^(*)	EDQM	A
	17172 ^(*)	EDQM	A
	17173 ^(*)	EDQM	A
	17174 ^(*)	EDQM	A

Verunreinigung	Charge	Quelle	Hersteller
A	16328 ^(*)	EDQM	B
B	17105 ^(*)	EDQM	D
C	17106 ^(*)	EDQM	D
D	17107 ^(*)	EDQM	D
E	050504	Edmond Pharma s.r.l., Mailand, Italien	

Die mit ^(*) gekennzeichneten Chargenbezeichnungen wurden vom EDQM vergeben.

9.1.2. Reagenzien

Reagenz	Qualität	Hersteller/Lieferant
Acetonitril	für UV, 99.99 %	Fisher Scientific UK Ltd., Leicestershire, Großbritannien
Demineralisiertes Wasser	Hergestellt durch Millipore-Filteranlage	(Milli-Q, Millipore corporation, Bedford MA, USA)
Natriumdihydrogenphosphat, wasserfrei	Purum, p.a. ≥ 99 %	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Phosphorsäure 85 %	p.a.	Grüssing, Filsum, Deutschland

9.1.3. RP-HPLC-Bedingungen

- HPLC-Gerät: Agilent System 1100 LC (Waldbronn, Deutschland)
- Säule: Hypersil Aquasil C18, 125 x 4.6 mm i.d., 5 µm
(Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA, USA)
- Detektor: DAD-Detektor, Messwellenlänge 215 nm

- Injektion: 10 μ l
- Temperatur: 25 °C
- Mobile Phase: (A) 30 mM Phosphatpuffer pH 3.0
3.6 g Natriumdihydrogenphosphat wasserfrei werden in 100 ml Wasser gelöst und durch einen 0.22 μ m CME-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert. Die Lösung wird mit Wasser auf ca. 995 ml verdünnt. Der pH-Wert wird mit Phosphorsäure 85 % und 1N Phosphorsäure auf pH 3.0 eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser auf 1000.0 ml aufgefüllt.

(B) Acetonitril

- Gradient:

Zeit [min]	Fließmittel B [%]	Fluss [ml/min]
0.0	22	1.2
3.0	35	1.2
6.0	35	1.2
6.5	35	0.8
15.0	40	0.8
16.0	40	0.8

Equilibrierung: 4 min, 22 % Acetonitril, 1.2 ml/min

9.1.4. Probelösungen

Alle Proben werden vor der Injektion durch 0.22 μ m PVDF-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert.

- Lösungsmittel: 20 mM Phosphatpuffer pH 2.5 / Acetonitril (80:20; v/v)
240 mg Natriumdihydrogenphosphat wasserfrei werden in 95 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit Phosphorsäure 85 % und 1 N Phosphorsäure auf pH 2.5 eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser auf 100.0 ml aufgefüllt. Das Lösungsmittel für Proben wird durch Mischen von 100 ml 20 mM Phosphatpuffer pH 2.5 mit 25 ml Acetonitril hergestellt.
- Stammlösungen der Verunreinigungen
Von jeder Verunreinigung wurden drei Stammlösungen (1 mg/ml, getrennt gewogen) hergestellt. Dazu wurden die Verunreinigungen in Acetonitril gelöst. Die Stammlösungen wurden mit Acetonitril auf 0.1 mg/ml sowie 0.01 mg/ml verdünnt. Diese Stammlösungen wurden für die Herstellung aller gespikten Trimebutin-

bzw. Trimebutin-Maleat-Proben verwendet, u. a. Proben zur Überprüfung der Linearität, Präzision, LOD/LOQ, Responsfaktoren.

– Trimebutin-Maleat-Untersuchungslösung und Referenzlösung

5.0 mg Trimebutin-Maleat wurden in 5.0 ml des Lösungsmittels für Proben gelöst. Die Referenzlösung, die für die Quantifizierung des Gehaltes der Verunreinigungen verwendet wurde, war eine Verdünnung der Untersuchungslösung und enthielt 0.01 mg/ml Trimebutin-Maleat.

– Trimebutin-Untersuchungslösung und Referenzlösung

Trimebutin ist schwer löslich. Deshalb wurden 5.0 mg Trimebutin in 200 µl Acetonitril gelöst und dann mit dem Lösungsmittel für Proben auf 5.0 ml verdünnt. Wenn notwendig wurde ein Ultraschallbad zur Herstellung der Lösungen verwendet. Die Referenzlösung war eine Verdünnung der Untersuchungslösung und enthielt 0.01 mg/ml Trimebutin.

9.2. Reinheitsprüfung von Adenosin mittels DC und HPLC

9.2.1. Proben und Verunreinigungen

Proben	Charge	Quelle	Hersteller
Adenosin	21934 ^(*)	EDQM	A
	21935 ^(*)	EDQM	A
	21936 ^(*)	EDQM	A

Verunreinigung	Name	Charge	Quelle	Hersteller/Lieferant
A	Adenin	21907 ^(*)	EDQM	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
B	Ribose	398384/1 14199		Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
C	3'-AMP	446696/1 44605077		Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
F	Uridin	21937 ^(*)	EDQM	A
G	Inosin	21939 ^(*)	EDQM	A
H	Guanosin	21938 ^(*)	EDQM	A
-	5'-AMP	23H7830		Sigma Chemical Co., St. Louis, MA, USA
-	5'-ATP	A0208801001		Acros Organics, Geel, Belgien

Die mit ^(*) gekennzeichneten Chargenbezeichnungen wurden vom EDQM vergeben.

9.2.2. Reagenzien

Reagenz	Qualität	Hersteller/Lieferant
1-Propanol		Grüssing, Filsum, Deutschland
Acetonitril	für UV, 99.99 %	Fisher Scientific UK Ltd., Leicestershire, Großbritannien
Ammoniak 25 %		Staub, Nürnberg, Deutschland
Demineralisiertes Wasser	Hergestellt durch Millipore-Filteranlage (Milli-Q, Millipore corporation, Bedford MA, USA)	
Essigsäure	DAB 6	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Kaliumhydrogensulfat	p.a., 99 %	Grüssing, Filsum, Deutschland
Kaliumhydroxid (Plätzchen)	p.a.	Grüssing, Filsum, Deutschland
Natriumazid	reinst	Acros Organics, Geel, Belgien
Natriumdihydrogenphosphat, wasserfrei	Purum, p.a. ≥ 99 %	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid (Plätzchen)	p.a.	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat (TBAH)	zur Synthese	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland

9.2.3. Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels DC nach Ph. Eur.

Die Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels DC wurde nach den Vorgaben der Adenosin-Monographie des Ph. Eur. 5.0 durchgeführt [191].

9.2.3.1. DC-Bedingungen

- DC-Platten: DC-Fertigplatten SIL G-25 UV₂₅₄
(Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)

9.2.3.2. Probelösungen

Zusätzlich zu den im Ph. Eur. vorgeschriebenen Lösungen wurden noch folgende Lösungen hergestellt:

- Lösungen der möglichen Verunreinigungen
Die einzelnen Verunreinigungen wurden in Wasser (5'-AMP, 5'-ATP, Ribose) oder verdünnter Essigsäure (Adenin, 3'-AMP, Guanosin, Inosin, Uridin), ggf. unter Verwendung eines Wasserbades bei 60 °C, gelöst (1 mg/ml). Nach Bedarf wurden diese Lösungen mit Wasser verdünnt und für die Identifizierung der Flecken in den Chromatogrammen verwendet.
- Referenzlösungen
Eine Referenzlösung, die je 1 mg/ml Adenosin, Adenin, Ribose, 3'-AMP, 5'-AMP und 5'-ATP enthält, wurde durch Lösen der Substanzen in verdünnter Essigsäure hergestellt. Eine weitere Referenzlösung bestand aus je 1 mg/ml Adenosin, Adenin, 3'-AMP, 5'-AMP, Guanosin, Inosin und Uridin.

9.2.4. Prüfung auf „Verwandte Substanzen“ mittels HPLC

9.2.4.1. HPLC-Bedingungen

Entsprechend den Vorgaben im Monographievorschlag [209] wurden folgende Bedingungen eingestellt:

- HPLC-Gerät: Agilent System 1100 LC (Waldbronn, Deutschland)
- Säule:
 - Hypersil GOLD, 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm
 - Hypersil ODS, 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm(Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA, USA)
- Detektor: DAD-Detektor, Messwellenlänge 254 nm
- Injektion: 20 µl
- Temperatur: < 30 °C
- Lösungsmittel: 50 mM Kaliumhydrogensulfat, 10 mM TBAH, pH 6.5
6.8 g Kaliumhydrogensulfat und 3.4 g Tetrabutylammoniumhydrogensulfat werden in ca. 900 ml Wasser gelöst. Der pH-

Wert wird mit 2 M Kaliumhydroxid-Lösung auf pH 6.5 eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser auf 1000.0 ml verdünnt und der pH-Wert kontrolliert. Falls notwendig, wird der pH-Wert mit 1 M Kaliumhydroxid-Lösung nachgestellt.

- Mobile Phase: Filtrierte und entgaste Mischung des Lösungsmittels und einer 0.01 % Natriumazid-Lösung im Verhältnis 60/40 (v/v)
- Fluss: 1.5 ml/min

9.2.4.2. Probelösungen

Alle Proben werden vor der Injektion durch 0.22 µm CME-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert.

– Lösungen

Adenosin und die Verunreinigungen wurden in mobiler Phase im Ultraschallbad gelöst (1 mg/ml). Diese Stammlösungen wurden, ggf. nach Verdünnung, für die Herstellung von Referenzlösungen verwendet.

– Untersuchungslösung und Referenzlösung (a)

10.0 mg Adenosin wurden in 10.0 ml mobiler Phase im Ultraschallbad gelöst. Eine Verdünnung der Untersuchungslösung mit 0.01 mg/ml der Substanz wurde als Referenzlösung für die Quantifizierung mittels „Externer-Standard“-Methode verwendet.

– Referenzlösung (b)

Für die Prüfung der Systemeignung wurde eine Lösung, die je 0.004 mg/ml Adenin, Adenosin, Guanosin, Inosin und Uridin, gelöst in mobiler Phase, enthält, hergestellt.

9.2.5. Variation der HPLC-Bedingungen zum Nachweis der Nucleotide

9.2.5.1. HPLC-Bedingungen

- HPLC-Gerät: Agilent System 1100 LC (Waldbronn, Deutschland)
- Säule: Hypersil ODS, 250 x 4.6 mm i.d., 5 µm
(Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA, USA)
- Detektor: DAD-Detektor, Messwellenlänge 254 nm
- Injektion: 20 µl
- Temperatur: 24 °C

- Mobile Phase: (A) 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 5.8 mM TBAH, pH 5.5
12.0 g Natriumdihydrogenphosphat und 2.0 g Tetrabutylammoniumhydrogensulfat werden in ca. 800 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 5.5 eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser auf 1000.0 ml verdünnt und der pH-Wert kontrolliert. Falls notwendig, wird der pH-Wert mit 0.1 M Natriumhydroxid-Lösung nachgestellt.

(B) Mischung aus mobiler Phase (A) und Acetonitril im Verhältnis 75/25 (v/v)

- Gradient:

Zeit [min]	Fließmittel B [%]	Fluss [ml/min]
0.0	0	1.0
1.0	0	1.0
21.0	70	1.0
25.0	70	1.0
26.0	0	1.0

Equilibrierung: 20 min, 0 % Mobile Phase (B), 1.0 ml/min

9.2.5.2. Probelösungen

Alle Proben werden vor der Injektion durch 0.22 µm PVDF-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert.

- Lösungen

Adenosin und die Verunreinigungen wurden in mobiler Phase (A) im Ultraschallbad gelöst (1 mg/ml). Diese Stammlösungen wurden, ggf. nach Verdünnung, für die Herstellung von Referenzlösungen verwendet.

- Untersuchungslösung

2.0 mg Adenosin wurden in 2.0 ml mobiler Phase (A) im Ultraschallbad gelöst.

- Referenzlösungen

Eine Lösung, die je 0.004 mg/ml Adenin, Adenosin, Guanosin, Inosin und Uridin, gelöst in mobiler Phase (A), enthält, wurde hergestellt. Eine weitere Referenzlösung bestand aus einer Mischung von Adenosin und allen möglichen Verunreinigungen (Adenin, Guanosin, Inosin, Uridin, 3'-AMP, 5'-AMP, 5'-ATP) je 0.004 mg/ml in mobiler Phase (A). Weiterhin wurde Adenosin (1 mg/ml, in mobiler Phase (A)) mit allen möglichen Verunreinigungen je 0.004 mg/ml versetzt.

9.3. Reinheitsprüfung von Glutathion mittels CE

9.3.1. Proben und Verunreinigungen

Proben	Charge	Quelle	Hersteller
Glutathion	17476 ^(*)	EDQM	A
	17477 ^(*) A	EDQM	A
	17477 ^(*) B	EDQM	A
	17478 ^(*)	EDQM	A
	17715 ^(*)	EDQM	B
	17716 ^(*)	EDQM	B
	17717 ^(*)	EDQM	B
	22721 ^(*)	EDQM	A
	26932 ^(*)	EDQM	B
	26933 ^(*)	EDQM	B
	26934 ^(*)	EDQM	B
	H444	Pharm. Unternehmen	
	H492	Pharm. Unternehmen	
	H558	Pharm. Unternehmen	
H013	Pharm. Unternehmen		

Verunreinigung	Name	Charge	Quelle	Hersteller/Lieferant
A	Cys-Gly	20794 ^(*)	EDQM	
B	Cystein	360339/1 43997		Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
C	GSSG	17718 ^(*)	EDQM	B
D	Glu-Cys	17719 ^(*)	EDQM	B

Interner Standard	Charge	Quelle	Hersteller/Lieferant
Phenylalanin	397408/1 51199		Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Die mit ^(*) gekennzeichneten Chargenbezeichnungen wurden vom EDQM vergeben. Von der Charge 17477 wurden zwei Muster erhalten, die durch den Zusatz A bzw. B unterschieden wurden.

9.3.2. Reagenzien

Reagenz	Qualität	Hersteller/Lieferant
0.1 M HCl-Lösung		Grüssing, Filsum, Deutschland
0.1 M NaOH-Lösung		Grüssing, Filsum, Deutschland
Demineralisiertes Wasser	Hergestellt durch Millipore-Filteranlage (Milli-Q, Millipore corporation, Bedford MA, USA)	
Natriumdihydrogenphosphat, wasserfrei	Purum, p.a. ≥ 99 %	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Phosphorsäure 85 %	p.a.	Grüssing, Filsum, Deutschland

9.3.3. CE-Bedingungen

Die CE-Bedingungen wurden wie in der Glutathion-Monographie [154] beschrieben eingestellt.

- CE-Gerät: Beckman Coulter P/ACE MDQ, ausgestattet mit einem UV-Detektor (Fullerton, CA, USA)
- Kapillare: Quarzkapillaren
(BGB Analytik, Schloßböckelheim, Deutschland)

Die Elektrolytlösung wurde vor der Verwendung durch einen 0.22 µm CME-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert. Die Puffervorratsgefäße, die für die Trennung verwendet wurden, wurden nach jedem Lauf erneuert, um Variationen durch eine Zersetzung des Puffers zu vermeiden.

9.3.4. Probelösungen

Alle Lösungen wurden wie in der Monographie beschrieben unmittelbar vor der Injektion hergestellt [154].

9.4. Reinheitsprüfung von Aminosäuren mittels CE und HPLC

9.4.1. Proben und Verunreinigungen

Proben	Charge	Quelle	Hersteller
Histidin	01-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	05-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C
	06-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	07-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	08-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	09-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	12-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	D
	13-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	D
	15-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	16-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	17-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	18-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	19-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
20-02a/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C	
Histidin-HCl	02-02b/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	03-02b/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	10-02c/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	11-02c/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	14-02b/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A

Proben	Charge	Quelle	Hersteller
Isoleucin	01-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	02-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	03-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	04-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	05-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	06-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	07-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C
	08-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C
	09-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	10-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	11-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C
	12-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C
	13-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	14-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	15-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	16-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	17-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	18-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C
	19-03/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C

Proben	Charge	Quelle	Hersteller
Phenylalanin	01-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	02-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	03-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	04-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	05-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B
	06-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B
	07-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	08-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	09-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	10-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	11-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B

Proben	Charge	Quelle	Hersteller
Phenylalanin	12-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B
	13-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	14-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	15-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	16-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	17-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	18-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B
	19-04/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B

Proben	Charge	Quelle	Hersteller
Serin	01-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	02-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B
	03-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B
	04-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C
	05-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	C
	06-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	07-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	08-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	09-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	12-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B
	13-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B
	14-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	15-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	A
	16-05/03 ⁽⁺⁾	BfArM	B

Proben	Charge	Quelle	Hersteller
L-Ornithin-L-Aspartat	H741	Pharm. Unternehmen	
	H742	Pharm. Unternehmen	
	H743	Pharm. Unternehmen	
	H744	Pharm. Unternehmen	
	H745	Pharm. Unternehmen	

Verunreinigung	Charge	Quelle	Hersteller
L-Aminosäuren			Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
δ-Aminovalerolactam		Pharm. Unternehmen	
Verunreinigung A		Pharm. Unternehmen	
Ala-Val-Leu	500880		Bachem, Weil am Rhein, Deutschland
Gly-Ala-Leu	0541048		Bachem, Weil am Rhein, Deutschland
Gly-Gln	39H1423		Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim, Deutschland

Interner Standard	Charge	Quelle	Hersteller/Lieferant
6-Aminocapronsäure	430123/1 14602238		Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
4-Hydroxyprolin	368084/1 33997		Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
D-(+)-Glucosamin-HCl	400891/1 11800		Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
L-Asparaginsäure	390559/1 31299		Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

Die mit ⁽⁺⁾ gekennzeichneten Chargenbezeichnungen wurden vom BfArM vergeben.

9.4.2. Reagenzien

Derivatisierungsreagenz	Qualität	Charge	Hersteller/Lieferant
9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl)	≥ 97 % (HPLC)	67H3685	Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O., Steinheim, Deutschland
9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl)	≥ 98 % (HPLC)	450374/1 24703100	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl)	≥ 98 % (HPLC)	456478/1 22504212	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl)	≥ 98 % (HPLC)	1151408 15104124	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl)	≥ 98 % (HPLC)	1179931 21705106	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl)	≥ 98 % (HPLC)	1217941 21606022	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC-Cl)	≥ 98 % (HPLC)	450374/1 24703100	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
ATTO-TAG™ CBQCA Amine derivatisation kit		02B1-2	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ATTO-TAG™ CBQCA Amine derivatisation kit		02E1-1 (Okt. 2004)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ATTO-TAG™ CBQCA Amine derivatisation kit		02E1-1 (Juni 2005)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ATTO-TAG™ CBQCA Amine derivatisation kit		02E1-1 (Nov. 2005)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Reagenz	Qualität	Hersteller/Lieferant
0.1 M HCl-Lösung		Grüssing, Filsum, Deutschland
0.1 M NaOH-Lösung		Grüssing, Filsum, Deutschland
Acetonitril	für UV, 99.99 %	Fisher Scientific UK Ltd, Leicestershire, Großbritannien
Borsäure	p.a.	Grüssing, Filsum, Deutschland
Demineralisiertes Wasser	Hergestellt durch Millipore-Filteranlage (Milli-Q, Millipore corporation, Bedford MA, USA)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	99.9 %, für die Spektroskopie	Acros Organics, Geel, Belgien
Dinatriumhydrogenphosphat	p.a.	Grüssing, Filsum, Deutschland
Heptafluorbuttersäure (HFBA)	99 %	Acros Organics, Geel, Belgien
Methanol	HPLC-Gradient Grade, Residue after evaporation: 1ppm	Fisher Scientific UK Ltd, Leicestershire, Großbritannien
Natriumdihydrogenphosphat, wasserfrei	Purum, p.a. ≥ 99 %	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumdodecylsulfat	≥ 99.0 % (GC); Ultra for molecular biology	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumhydroxid (Plätzchen)	p.a.	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Natriumtetraborat Decahydrat	p.a.	Grüssing, Filsum, Deutschland
n-Pentan		Staub, Nürnberg, Deutschland
Phosphorsäure 85 %	p.a.	Grüssing, Filsum, Deutschland

9.4.3. Untersuchung von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit FMOC-Cl

9.4.3.1. CE-Bedingungen

- CE-Gerät: Beckman Coulter P/ACE MDQ, ausgestattet mit einem UV-Detektor (Fullerton, CA, USA)

- Kapillare: Quarzkapillaren
Gesamtlänge: 70.0 cm, effektive Länge: 60.0 cm, 75 µm
(BGB Analytik, Schloßböckelheim, Deutschland)
- Temperatur: 25 °C
- Spannung: 15 kV
- Trennpuffer: 20 mM Boratpuffer pH 9.30; 25 mM SDS
123.6 mg Borsäure werden in ca. 80 ml Wasser gelöst und mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 9.28 eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser auf 100.0 ml verdünnt, der pH-Wert kontrolliert und ggf. auf pH 9.30 nachjustiert. 360.5 mg SDS werden in dem 20 mM Boratpuffer gelöst und mit diesem zu 50.0 ml verdünnt. Vor der Verwendung wurde der Trennpuffer durch einen 0.22 µm CME-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert.
- Injektion: 1 psi, 10 sec
- Detektion: UV bei 254 nm
- Konditionierung: *Vor der ersten Messung:*

10 min	20 psi	0.1 M HCl
20 min	20 psi	0.1 M NaOH
10 min	20 psi	Wasser

Jeden Tag:

4 min	20 psi	0.1 M HCl
1 min	20 psi	Wasser
4 min	20 psi	0.1 M NaOH
4 min	20 psi	Wasser

Zwischen zwei Läufen:

2 min	20 psi	Wasser
4 min	40 psi	0.1 M HCl
2 min	20 psi	Wasser
8 min	40 psi	0.1 M NaOH
2 min	20 psi	Wasser
8 min	40 psi	Trennpuffer

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zur Identifizierung eines unbekanntes Peaks wurden die angelegte Spannung und der Trennpuffer variiert:

- Spannung: 10 kV
- Trennpuffer: 20 mM Boratpuffer, 25 mM SDS, pH 9.30; 15% Acetonitril
31.0 mg Borsäure und 180.2 mg SDS werden in 19 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 9.30 eingestellt. Nach Zugabe von 3.75 ml Acetonitril wird mit Wasser auf 25.0 ml aufgefüllt. Vor der Verwendung wurde der Puffer durch einen 0.22 µm PVDF-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert.

9.4.3.2. Probelösungen

- Lösungsmittel für Proben: 0.1 M Boratpuffer pH 9.30
- Untersuchungslösungen
Zur Bestimmung des Verunreinigungsprofils der Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Serin wurden Untersuchungslösungen mit 3.5 mg/ml der entsprechenden Aminosäure in 0.1 M Boratpuffer pH 9.30 hergestellt. Lösungen mit internem Standard enthielten diesen zusätzlich in einer Konzentration von 0.0175 mg/ml.
- Referenzlösung Isoleucin
Für die Quantifizierung der Verunreinigungen in den Isoleucin-Proben wurde eine Referenzlösung, die 0.035 mg/ml Isoleucin und 0.0175 mg/ml 4-Hydroxyprolin enthält, hergestellt.
- Aminosäure-Modellmischung
Die Aminosäure-Modellmischung enthielt die Aminosäuren Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Cystin, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Val, gelöst in 0.1 M Boratpuffer pH 9.30 in der jeweils angegebenen Konzentration.

9.4.3.3. Derivatisierung

1.0 ml Probelösung werden mit 0.2 ml 0.4 M Boratpuffer pH 9.30 versetzt. Unter Rühren werden 0.8 ml FMOC-Lösung (80 mg/ml in Acetonitril, ca. 300 mM) zugegeben. Der Ansatz wird 2 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zur Entfernung von überschüssigem Reagenz werden 2 ml n-Pentan zugegeben, und es wird 1 Minute gerührt. Die Pentanphase wird abgenommen und verworfen. Der

Extraktionsschritt wird 2x wiederholt. Von der wässrigen Phase werden 0.2 ml mit einer 20 mM Borsäure-Lösung zu 2.0 ml verdünnt und in die CE injiziert.

9.4.4. Untersuchung von Aminosäuren mittels CE nach Derivatisierung mit CBQCA

9.4.4.1. CE-Bedingungen

- CE-Gerät: Beckman Coulter P/ACE MDQ, ausgestattet mit einem LIF-Detektor (λ_{ex} 488 nm; λ_{em} 520 nm) (Fullerton, CA, USA)
- Kapillare: Quarzkapillaren
Gesamtlänge: 70.0 cm, effektive Länge: 60.0 cm, 75 μm
(BGB Analytik, Schloßböckelheim, Deutschland)
- Temperatur: 25 °C
- Spannung: 20 kV
- Trennpuffer 1: 25 mM Boratpuffer pH 9.20; 25 mM SDS
154.5 mg Borsäure werden in ca. 80 ml Wasser gelöst und mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 9.18 eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser auf 100.0 ml verdünnt, der pH-Wert kontrolliert und ggf. auf pH 9.20 nachjustiert. 360.5 mg SDS werden in dem 25 mM Boratpuffer gelöst und mit diesem zu 50.0 ml verdünnt. Vor der Verwendung wurde der Trennpuffer durch einen 0.22 μm CME-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert.
- Trennpuffer 2: 20 mM Tetraboratpuffer pH 9.3; 100 mM SDS
762.8 mg Natriumtetraborat Decahydrat werden in Wasser gelöst und die Lösung wird mit Wasser auf 100.0 ml verdünnt. Die Kontrolle des pH-Wertes ergibt pH 9.3. 721 mg SDS werden in dem 20 mM Tetraboratpuffer gelöst und mit diesem zu 25.0 ml verdünnt. Der Trennpuffer wurde durch einen 0.22 μm CME-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert.
- Injektion: 0.5 psi, 5 sec
- Detektion: LIF, Argon-Ion-Laser (λ_{ex} 488 nm, λ_{em} 520 nm)
- Konditionierung: *Vor der ersten Messung:*

10 min	40 psi	Wasser
15 min	40 psi	0.3 M H ₃ PO ₄

10 min	40 psi	Wasser
30 min	40 psi	0.1 M NaOH
30 min	40 psi	Wasser
<i>Jeden Tag:</i>		
1 min	60 psi	Wasser
3 min	60 psi	0.3 M H ₃ PO ₄
4 min	60 psi	Wasser
5 min	60 psi	0.1 M NaOH
5 min	60 psi	Wasser
<i>Zwischen zwei Läufen:</i>		
1 min	20 psi	Wasser
3 min	20 psi	0.3 M H ₃ PO ₄
4 min	20 psi	Wasser
8 min	20 psi	0.1 M NaOH
4 min	20 psi	Wasser
8 min	20 psi	Trennpuffer

9.4.4.2. Probelösungen

– Lösungsmittel für Proben: 125 mM Phosphatpuffer (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) pH 7.0

– Untersuchungslösungen

Zur Bestimmung des Verunreinigungsprofils der Aminosäuren wurden Untersuchungslösungen mit 0.45 mg/ml der entsprechenden Aminosäure in 125 mM Phosphatpuffer (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) pH 7.0 hergestellt. Als interner Standard wurde 0.1 % D-(+)-Glucosamin für Phenylalanin- und Isoleucin-Proben bzw. 0.2 % Asparaginsäure für Serin- und Histidin-Proben verwendet.

– Referenzlösungen

Für die Quantifizierung der Verunreinigungen nach „Interner-Standard“-Methode wurden Referenzlösungen, die 0.0045 mg/ml der Aminosäure und den entsprechenden internen Standard enthielten, hergestellt.

– Aminosäure-Modellmischung

Die Aminosäure-Modellmischung enthielt die Aminosäuren Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, (Cystin), Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Tyr, Val, gelöst in 125 mM Phosphatpuffer pH 7.0 in der jeweils angegebenen Konzentration.

9.4.4.3. Derivatisierung

Die Derivatisierung wurde wie in der Literatur [120] beschrieben durchgeführt: 10 µl Probelösung werden mit 10 µl CBQCA-Lösung (10 mM in DMSO) und 10 µl KCN-Lösung (10 mM in Wasser) gemischt. Danach wird der Ansatz für 10 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Die Proben werden mit Wasser auf 1.0 ml verdünnt und vor der Injektion durch einen 0.22 µm PVDF-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert. Derivatisierte Proben wurden bei 2-8 °C aufgehoben.

9.4.5. Untersuchung von Aminosäuren mittels HPLC-ELSD

9.4.5.1. HPLC-Bedingungen

- HPLC-Gerät: Agilent System 1100 LC (Waldbronn, Deutschland)
- Säule: Synergi Hydro-RP, 150 x 4.6 mm i.d., 4 µm
(Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland)
- Detektor: Low Temperature Evaporative Light Scattering Detector
(ELSD) Sedex Model 85
(ERC GmbH, Riemerling, Deutschland)
Temperatur: 35 °C, Gas: 3.6 bar, Signalverstärkungsfaktor
(gain): 10
- Injektion: 10 µl
- Temperatur: Raumtemperatur
- Mobile Phase: (A) 0.5 % HFBA in Wasser (~ pH 1.76)
(B) 0.3 % HFBA in Methanol
im Verhältnis 83/17 (v/v)

9.4.5.2. Probelösungen

- Stammlösungen
Stammlösungen der Aminosäuren und organischen Säuren wurden durch Lösen der Substanzen in Wasser im Ultraschallbad hergestellt.
- Modellmischungen
Zur Herstellung der Modellmischungen wurden entsprechende Volumina der Stammlösungen gemischt. Vor der Injektion wurden die Lösungen durch einen 0.22 µm CME-Filter (Roth, Karlsruhe, Deutschland) filtriert.

10. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz AMG) vom 24.08.1976, in der Fassung vom 12.12.2005; letzte Änderung vom 14.06.2007 (BGBl. I 1066).
- [2] Sigvardson, K. W., Adams, S. P., Barnes, T. B., Blom, K. F. *et al.*, J. Pharm. Biomed. Anal. 2002, 27, 327-334.
- [3] Görög, S., Babják, M., Balogh, G., Brlik, J. *et al.*, Talanta 1997, 44, 1517-1526.
- [4] Berridge, J. C., J. Pharm. Biomed. Anal. 1995, 14, 7-12.
- [5] Blaschke, G., Ali, S. L., Pharm. Unserer Zeit 1997, 26, 88-97.
- [6] DiFeo, T. J., Drug Dev. Ind. Pharm. 2004, 30, 247-257.
- [7] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, <http://www.ich.org>.
- [8] Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, Straßburg, 2005.
- [9] United States Pharmacopoeia 30, United States Pharmacopoeial Convention Inc, Rockville, 2007.
- [10] Japanese Pharmacopoeia, 14. Ausgabe, Society of Japanese Pharmacopoeia, Tokio, 1993.
- [11] Mohr, R., Dtsch. Apoth. Ztg. 2006, 146, 1033-1039.
- [12] Übereinkommen über die Ausarbeitung eines Europäischen Arzneibuchs vom 22.07.1964, in Kraft getreten am 08.05.1974.
- [13] Mohr, R., Dtsch. Apoth. Ztg. 2006, 146, 1145-11151.
- [14] EDQM: Since 1964 at the service of quality of medicines in Europe, EDQM Booklet UK 2007; http://www.edqm.eu/site/page_604.php.
- [15] Calam, D. H., J. Pharm. Biomed. Anal. 1995, 14, 1-5.
- [16] Mohr, R., Dtsch. Apoth. Ztg. 2006, 146, 1395-1400.
- [17] Allgemeiner Text 5.10, Kontrolle von Verunreinigungen in Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, 5. Nachtrag, EDQM, Straßburg, 2005.
- [18] Allgemeine Monographie 1468, Fermentationsprodukte, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2005.

-
- [19] Allgemeine Monographie 2934, Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, 7. Nachtrag, EDQM, Straßburg, 2005.
- [20] Style guide, European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, Straßburg, Dezember 2006.
- [21] Imming, P., Arzneibuchanalytik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2006.
- [22] Technical Guide for the Elaboration of Monographs, 4. Ausgabe, European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, Straßburg, 2005.
- [23] Guideline Q3A(R2), Impurities in New Drug Substances, International Conference on Harmonisation 2006, <http://www.ich.org>.
- [24] Gotti, R., Pomponio, R., Andrisano, V., Cavrini, V., J. Chromatogr. A 1999, 844, 361-369.
- [25] Penicillamin, Kommentar zur Monographie 0566, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 5.3, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 25. Lieferung 2006.
- [26] Argentine, M. D., Owens, P. K., Olsen, B. A., Adv. Drug Deliv. Rev. 2007, 59, 12-28.
- [27] FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs, U. S. Food and Drug Administration, May 1992.
- [28] Wirth, D. D., Olsen, B. A., Hallenbeck, D. K., Lake, M. E. *et al.*, Chromatographia 1997, 46, 511-523.
- [29] Wirth, D. D., Miller, M. S., Boini, S. K., Koenig, T. M., Org. Process Res. Dev. 2000, 4, 513-519.
- [30] Świst, M., Wilamowski, J., Parczewski, A., Forensic Sci. Int. 2005, 152, 175-184.
- [31] Świst, M., Wilamowski, J., Parczewski, A., Forensic Sci. Int. 2005, 155, 100-111.
- [32] Ahuja, S., Adv. Drug Deliv. Rev. 2007, 59, 3-11.
- [33] Gavin, P. F., Olsen, B. A., Wirth, D. D., Lorenz, K. T., J. Pharm. Biomed. Anal. 2006, 41, 1251-1259.
- [34] Belz, S., Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz 2006, 49, 1205-1211.

-
- [35] Allgemeiner Text 5.4, Lösungsmittel-Rückstände, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2005.
- [36] Jacobson-Kram, D., McGovern, T., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 38-42.
- [37] Holzgrabe, U., Deubner, R., Novatchev, N., Wiene, F., *Dtsch. Apoth. Ztg.* 2003, 143, 3221-3228.
- [38] Hess, S., Teubert, U., Ortwein, J., Eger, K., *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 14, 301-311.
- [39] Hess, S., Akermann, M., Ropte, D., Eger, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 25, 531-538.
- [40] Trimethoprim, Monographie 0060, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2005.
- [41] Hill, R. H., Caudill, S. P., Philen, R. M., Bailey, S. L. *et al.*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1993, 25, 134-142.
- [42] Simat, T. J., Eulitz, K. D., Steinhart, H., *GIT Fachz. Lab.* 1996, 40, 339-344.
- [43] Tryptophan, Monographie 1272, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2005.
- [44] Schnädelbach, D., *Pharm. Unserer Zeit* 1997, 26, 76-80.
- [45] Certification of Suitability of the Monographs of the European Pharmacopoeia (Revised Version), *Pharmeuropa* 2007, 19.3, 461-464.
- [46] Flaschel, E., Sell, D., *Chem. Ing. Tech.* 2005, 77, 1298-1312.
- [47] Stürmer, R., Breuer, M., *Chem. Unserer Zeit* 2006, 40, 104-111.
- [48] Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B. *et al.*, *Angew. Chem.* 2004, 116, 806-843.
- [49] Pollard, D. J., Woodley, J. M., *Trends Biotechnol.* 2006, 25, 66-73.
- [50] Rimpler, H. (Hrsg.), *Biogene Arzneistoffe*, 2. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 1999.
- [51] DiPaolo, B., Pennetti, A., Nugent, L., Venkat, K., *Pharm. Sci. Technol. Today* 1999, 2, 70-82.
- [52] Doblhoff-Dier, O., Bliem, R., *Trends Biotechnol.* 1999, 17, 266-270.
- [53] Bichsel, V. E., Curcio, V., Gassmann, R., Otto, H., *Pharm. Acta Helv.* 1996, 71, 439-446.
- [54] Crueger, W., Crueger, A., *Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*, 3. Auflage, Oldenbourg Verlag GmbH, München, 1989.
- [55] Hermann, T., *J. Biotechnol.* 2003, 104, 155-172.

-
- [56] Allgemeine Methode 2.2.27, Dünnschichtchromatographie, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, 2. Nachtrag, EDQM, Straßburg, 2005.
- [57] Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G., Instrumentelle pharmazeutische Analytik, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2001.
- [58] Dünnschichtchromatographie, Kommentar zur allgemeinen Methode 2.2.27, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 5.2, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 25. Lieferung 2006.
- [59] Göber, B., Surmann, P., Arzneimittelkontrolle – Drug Control, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 2005.
- [60] Krasikov, V. D., J. Anal. Chem. 2003, 58, 706-719.
- [61] Allgemeine Methode 2.2.46, Chromatographische Trennmethode, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2005.
- [62] Ermer, J., Miller, J. H. M., Method Validation in Pharmaceutical Analysis, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2005.
- [63] Ovalles, J. F., Tettey, J. N. A., Miller, J. H. M., Skellern, G. G., J. Pharm. Biomed. Anal. 2000, 23, 757-761.
- [64] Agbaba, D., Vucicevic, K., Marinkovic, V., Chromatographia 2004, 60, 223-227.
- [65] Krzek, J., Hubicka, U., Szczepańczyk, J., J. AOAC Int. 2005, 88, 1530-1536.
- [66] Grozdanovic, O., Antic, D., Agbaba, D., J. Sep. Sci. 2005, 28, 575-580.
- [67] Allgemeine Methode 2.2.29, Flüssigchromatographie, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2005.
- [68] Bidlingmeyer, B. A., J. Chromatogr. Sci. 1980, 18, 525-539.
- [69] Meyer, V., Practical High Performance Chromatography, 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2004.
- [70] Weiß, J., Ionenchromatographie, 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2001.
- [71] Flüssigchromatographie, Kommentar zur allgemeinen Methode 2.2.29, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 4.0, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 16. Lieferung 2004.
- [72] Doshi, S., Enami, T., Nagae, N., LC-GC Europe 2003, 16, 418-425.

-
- [73] Bidlingmeyer, B. A., Broske, A., D., J. Chromatogr. Sci. 2004, 42, 100-106.
- [74] Poole, C. F., The Essence of Chromatography, Elsevier Science B. V., Amsterdam, 2003.
- [75] Kirkland, J. J., J. Chromatogr. A 2004, 1060, 9-21.
- [76] Majors, R. E., Przybyciel, M., LC-GC Europe 2002, 15, 780-786.
- [77] Olsen, B. A., Castle, B. C., Myers, D. P., Trends Analyt. Chem. 2006, 25, 796-805.
- [78] Stella, C., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Tchaplá, A., Chromatographia 2001, 53, S113-S131.
- [79] Stella, C., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., Tchaplá, A., Chromatographia 2001, 53, S132-S140.
- [80] Iványi, T., Vander Heyden, Y., Visky, D., Baten, P. *et al.*, J. Chromatogr. A 2002, 954, 99-114.
- [81] Visky, D., Vander Heyden, Y., Iványi, T., Baten, P. *et al.*, J. Chromatogr. A 2003, 1012, 11-29.
- [82] Dehouck, P., Visky, D., Van den Bergh, G., Haghedooren, E. *et al.*, LC-GC Europe 2004, 17, 592-601.
- [83] Visky, D., Haghedooren, E., Dehouck, P., Kovács, Z. *et al.*, J. Chromatogr. A 2006, 1101, 103-114.
- [84] Kóczyán, K., Haghedooren, E., Dragovic, S., Noszál, B. *et al.*, J. Pharm. Biomed. Anal. 2007, 44, 894-905.
- [85] Lendi, B. E., Meyer, V. R., LC-GC Europe 2005, 18, 156-163.
- [86] Webster, G., LaborPraxis 1995, 19, 68-77.
- [87] Kohler, M., Haerdi, W., Christen, P., Veuthey, J.-L., Trends Analyt. Chem. 1997, 16, 475-484.
- [88] Felton, M. J., Anal. Chem. 2002, 74, 631A-634A.
- [89] Douville, V., Lodi, A., Miller, J., Nicolas, A. *et al.*, Pharmeuropa Scientific Notes 2006, 1, 9-15.
- [90] <http://www.discoverysciences.com/productinfo/technical/posters/Pitt98-6.pdf>.
- [91] Webster, G. K., Jensen, J. S., Diaz, A. R., J. Chromatogr. Sci. 2004, 42, 484-490.
- [92] Megoulas, N. C., Koupparis, M. A., J. Chromatogr. A 2004, 1057, 125-131.
- [93] Mathews, B. T., Higginson, P. D., Lyons, R., Mitchell, J. C. *et al.*, Chromatographia 2004, 60, 625-633.

-
- [94] Lane, S., Boughtflower, B., Mutton, I., Paterson, C. *et al.*, *Anal. Chem.* 2005, 77, 4354-4365.
- [95] Risley, D. S., Peterson J. A., *J. Liq. Chromatogr.* 1995, 18, 3035-3048.
- [96] McCrossen, S. D., Bryant, D. K., Cook, B. R., Richards, J. J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17, 455-471.
- [97] Vogel, R., DeFillipo, K., Reif, V., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 24, 405-412.
- [98] Ying, L., Chang-qin, H., *Chromatographia* 2003, 57, 143-146.
- [99] Clarot, I., Chaimbault, P., Hasdenteufel, F., Netter, P., Nicolas, A., *J. Chromatogr. A* 2004, 1031, 281-287.
- [100] Wang, J., Wang, D., He, H., Ni, K., *J. Chromatogr. Sci.* 2006, 44, 529-534.
- [101] Nageswara Rao, R., Nagaraju, V., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33, 335-377.
- [102] Husain, S., Nageswara Rao, R., *Process Contr. Qual.* 1997, 10, 41-57.
- [103] Dolan, J. W., *LC-GC North America* 2006; 24, 458-466.
- [104] Kromidas, S., *Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1999.
- [105] http://extranet.edqm.eu/publications/recherches_sw.shtml.
- [106] Olsen, B. A., Tsang, P. K. S., *Process Contr. Qual.* 1997, 10, 25-39.
- [107] Claessens, H. A., Cramers, C. A., de Haan, J. W., den Otter, F. A. H. *et al.*, *Chromatographia* 1985, 20, 582-586.
- [108] Majors, R. E., *LC-GC North America* 2006, 24, 1172-1182.
- [109] Entwurf für die Revision der allgemeinen Methode 2.2.46, *Pharmeuropa* 2006, 18.3, 410-416.
- [110] *Chromatographische Trennmethode*, Kommentar zur allgemeinen Methode 2.2.46, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 4.05*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 16. Lieferung 2004.
- [111] Meyer, V. R., *Chromatographia* 1995, 40, 15-22.
- [112] Bicking, M. K. L., *LC-GC North America* 2006, 24, 402-414.
- [113] Bicking, M. K. L., *LC-GC North America* 2006, 24, 604-616.
- [114] *Allgemeine Methode 2.2.47, Kapillarelektrophorese*, *Europäisches Arzneibuch*, 5. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2005.
- [115] *Kapillarelektrophorese*, Kommentar zur allgemeinen Methode 2.2.47, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, *Kommentar zum*

-
- Europäischen Arzneibuch 4.0, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 16. Lieferung 2004.
- [116] Engelhardt, H., Beck, W., Schmitt, T., Kapillarelektrophorese. Methoden und Möglichkeiten, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1994.
- [117] Wätzig, H., Günter, S., Clin. Chem. Lab. Med. 2003, 41, 724-738.
- [118] Engelhardt, H., Beck, W., Kohr, J., Schmitt, T., Angew. Chem. 1993, 105, 659-680.
- [119] Wätzig, H., Degenhardt, M., Kunkel, A., Electrophoresis, 1998, 19, 2695-2752.
- [120] Novatchev, N., Holzgrabe, U., J. Pharm. Biomed. Anal. 2002, 28, 475-486.
- [121] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., Anal. Chem. 1984, 56, 111-113.
- [122] Riekkola, M.-L., Wiedmer, S. K., Valkó, I. E., Sirén, H., J. Chromatogr. A 1997, 792, 13-35.
- [123] Terabe, S., J. Pharm. Biomed. Anal. 1992, 10, 705-715.
- [124] Ahuja, E. S., Foley, J. P., Anal. Chem. 1995, 67, 2315-2324.
- [125] McLaren, D. G., Boulat, O., Chen, D. D. Y., Electrophoresis 2002, 23, 1912-1920.
- [126] Little, E. L., Foley, J. P., J. Microcol. Sep. 1992, 4, 145-154.
- [127] Lalljie, S. P. D., Sandra, P., Chromatographia 1995, 40, 513-518.
- [128] Issaq, H. J., Horng, P. L. C., Janini, G. M., Muschik, G. M., J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 1997, 20, 167-182.
- [129] Nishi, H., Electrophoresis 1999, 20, 3237-3258.
- [130] Hilhorst, M. J., Somsen, G. W., de Jong, G. J., Electrophoresis 2001, 22, 2542-2564.
- [131] Kašička, V., Electrophoresis 2006, 27, 142-175.
- [132] Poinot, V., Lacroix, M., Maury, D., Chataigne, G. *et al.*, Electrophoresis 2006, 27, 176-194.
- [133] Altria, K., Marsh, A., Sängner-van de Griend, C., Electrophoresis 2006, 27, 2263-2282.
- [134] Holzgrabe, U., Brinz, D., Kopec, S., Weber, C., Bitar, Y., Electrophoresis 2006, 27, 2283-2292.
- [135] Altria, K. D., Chen, A. B., Clohs, L., LC-GC Europe 2001, 14, 736-744.
- [136] Kopec, S., Holzgrabe, U., Electrophoresis 2007, 28, 2153-2167.

-
- [137] Gotti, R., Pomponio, R., Bertucci, C., Cavrini, V., J. Chromatogr. A 2001, 916, 175-183.
- [138] Jaworska, M., Szulińska, G., Wilk, M., Tautt, J., J. Chromatogr. A 1999, 853, 479-485.
- [139] Degenhardt, M., Wätzig, H., J. Chromatogr. A 1997, 768, 113-123.
- [140] Hillaert, S., Van den Bossche, W., J. Pharm. Biomed. Anal. 1999, 21, 65-73.
- [141] Dette, C., Wätzig, H., J. Chromatogr. A 1995, 700, 89-94.
- [142] Sokoließ, T., Köller, G., Electrophoresis 2005, 26, 2330-2341.
- [143] Matthijs, N., Vander Heyden, Y., Biomed. Chromatogr. 2006, 20, 696-709.
- [144] Penicillamin, Monographie 0566, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, 3. Nachtrag, EDQM, Straßburg, 2005.
- [145] Zhao, Y., Yang, X.-B., Jiang, R., Sun, X.-L. *et al.*, Chirality 2006, 18, 84-90.
- [146] Faller, T., Engelhardt, H., J. Chromatogr. A 1999, 853, 83-94.
- [147] Schaeper, J. P., Sepaniak, M. J., Electrophoresis 2000, 21, 1421-1429.
- [148] Mayer, B. X., J. Chromatogr. A 2001, 907, 21-37.
- [149] Altria, K., LC-GC Europe 2007, 20, 194-200.
- [150] Mayer, B. X., Müller, M., Altria, K., LC-GC Europe 2001, 14, 19-25.
- [151] Boone, C. M., Franke, J.-P., de Zeeuw, R. A., Ensing, K., Electrophoresis 2000, 21, 1545-1551.
- [152] Altria, K. D., LC-GC Europe 2002, 15, 588-594.
- [153] Hasemann, P., ter Balk, M., Wätzig, H., Electrophoresis 2007, 28, 1798-1804.
- [154] Glutathion, Monographie 1670, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, 7. Nachtrag, EDQM, Straßburg, 2005.
- [155] General Information <1086>, Impurities in official articles, United States Pharmacopoeia 30, United States Pharmacopoeial Convention Inc, Rockville, 2007.
- [156] Krstulovic, A. M., Lee, C. R., J. Chromatogr. B 1997, 689, 137-153.
- [157] Görög, S., Trends Analyt. Chem. 2003, 22, 407-415.
- [158] Rahman, N., Azmi, S. N. H., Wu, H.-F., Accred. Qual. Assur. 2006, 11, 69-74.
- [159] Saavedra, L., Huidobro, A. L., García, A., Cabanelas, J. C. *et al.*, Electrophoresis 2006, 27, 2360-2366.
- [160] Deubner, R., Holzgrabe, U., J. Pharm. Biomed. Anal. 2004, 35, 459-467.
- [161] Van Gyseghem, E., Jimidar, M., Sneyers, R., Redlich, D. *et al.*, J. Chromatogr. A 2005, 1074, 117-131.

-
- [162] Van Gyseghem, E., Van Hemelryck, S., Daszykowski, M., Questier, F. *et al.*, J. Chromatogr. A 2003, 988, 77-93.
- [163] Pellett, J., Lukulay, P., Mao, Y., Bowen, W. *et al.*, J. Chromatogr. A 2006, 1101, 122-135.
- [164] Marsh, A., Clark, B. J., Altria, K. D., Electrophoresis 2004, 25, 1270-1278.
- [165] Hilhorst, M. J., Derksen, A. F., Steringa, M., Somsen, G. W., de Jong, G. J., Electrophoresis 2001, 22, 1337-1344.
- [166] Reynolds, J. E. F., Martindale. The Extra Pharmacopoeia, 31st edition, Royal Pharmaceutical Society, London, 1996.
- [167] Roman, F. J., Lanet, S., Hamon, J., Brunelle, G. *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999, 289, 1391-1397.
- [168] Delvaux, M., Wingate, D., J. Int. Med. Res. 1997, 25, 225-246.
- [169] Kim, J. Y., An, G., Chun, K.-S., Rhee, H., Bull. Korean Chem. Soc. 2005, 26, 340-342.
- [170] El-Gindy, A., Emara, S., Hadad, G. M., J. Pharm. Biomed. Anal. 2003, 33, 231-241.
- [171] Abdel-Gawad, F. M., J. Pharm. Biomed. Anal. 1998, 16, 793-799.
- [172] El-Shiekh, R., Zahran, F., El-Fetouh Gouda, A. A., Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2007, 66, 1279-1287.
- [173] Tsukamoto, T., Ushio, T., Haginaka, J., J. Chromatogr. A 1999, 864, 163-171.
- [174] Li, F., Yu, L., Biomed. Chromatogr. 2001, 15, 248-251.
- [175] Wang, L., Zhang, Z., Yang, W., J. Pharm. Biomed. Anal. 2005, 39, 399-403.
- [176] Lavit, M., Saivin, S., Boudra, H., Michel, F. *et al.*, Arzneimittelforschung 2000, 50, 640-644.
- [177] Saivin, S., Lavit, M., Michel, F., Labaune, J. P. *et al.*, Arzneimittelforschung 2000, 50, 717-721.
- [178] Wang, H., Zhou, H., Horimoto, S., Jiang, J. *et al.*, J. Chromatogr. B 2002, 779, 173-187.
- [179] Trimebutine Maleate, Monographie, Japanisches Arzneibuch, Society of Japanese Pharmacopoeia, Tokio, 1993.
- [180] Deubel, A., Kopec, S., Interim report of draft monograph, EDQM-Bericht PA/PH/Exp. 10D/T (05)31, 15.09.2005.
- [181] Deubel, A., Kopec, S., Batch testing of trimebutine and trimebutine maleate samples, EDQM-Bericht PA/PH/Exp. 10D/T (06)7, 24.01.2006.

-
- [182] Dolan, J. W., LC-GC Europe 2006, 19, 12-16.
- [183] Aquasil C18 HPLC Columns, Technical Guide, Thermo Electron Corporation, http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_26355.pdf.
- [184] Chandran, S., Singh, R. S. P., Pharmazie 2007, 62, 4-14.
- [185] Guideline Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, International Conference on Harmonisation 2005, <http://www.ich.org>.
- [186] Positionspapier der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft zum Thema Spezifikationssetzung, Pharm. Unserer Zeit 2002, 31, 501-503.
- [187] Allgemeine Vorschriften 1.4, Monographien, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2005.
- [188] Agut, C., Segalini, A., Bauer, M., Boccardi, G., J. Pharm. Biomed. Anal. 2006, 41, 442-448.
- [189] Trimebutin-Monographie 2181 (Entwurf), Pharmeuropa 2007, 19.4, 666-668.
- [190] Trimebutin-Maleat-Monographie 2182 (Entwurf), Pharmeuropa 2007, 19.4, 668-669.
- [191] Adenosin, Monographie 1486, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, EDQM, Straßburg, 2005.
- [192] Adenosin, Monographie, United States Pharmacopoeia 28, United States Pharmacopoeial Convention Inc, Rockville, 2005.
- [193] Adenosin, Kommentar zur Monographie 1486, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 4.0, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 17. Lieferung 2004.
- [194] Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, E., Holzgrabe, U. *et al.*, Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. HagerRom2004, Springer Verlag, Heidelberg, 2005.
- [195] Lehninger, A. L., Prinzipien der Biochemie, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 1994.
- [196] Proot, P., Van Schepdael, A., Raymakers, A. A., Hoogmartens, J., J. Pharm. Biomed. Anal. 1998, 17, 415-418.
- [197] Kießling, P., Scriba, G. K. E., Süß, F., Werner, G. *et al.*, J. Pharm. Biomed. Anal. 2004, 36, 535-539.
- [198] Werner, A., J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1993, 618, 3-14.
- [199] Grune, T., Siems, W. G., J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1993, 618, 15-40.

-
- [200] Perrone, P. A., Brown, P.R., in: Hearn, M. (Hrsg.), Ion-Pair chromatography: Theory and biological and pharmaceutical applications, Marcel Dekker, Inc., New York, 1985.
- [201] Xu, G., Enderle, H., Liebich, H., Lu, P., *Chromatographia* 2000, 52, 152-158.
- [202] Fürst, W., Hallström, S., *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1992, 578, 39-44.
- [203] Di Pierro, D., Tavazzi, B., Perno, C. F., Bartolini, M. *et al.*, *Anal. Biochem.* 1995, 231, 407-412.
- [204] Perrone, P. A., Brown, P. B., *J. Chromatogr.* 1984, 317, 301-310.
- [205] Lim, C. K., Peters, T. J., *J. Chromatogr.* 1989, 461, 259-266.
- [206] Uesugi, T., Sano, K., Uesawa, Y., Ikegami, Y., Mohri, K., *J. Chromatogr. B* 1997, 703, 63-74.
- [207] Adenosin, Monographie, Deutsches Arzneibuch 10, 1. Nachtrag 1992, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, 1991.
- [208] Adenosin, Kommentar zur Monographie, in: Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G., Wichtl, M., Kommentar zum Deutschen Arzneibuch, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, DAB 10, 1. Nachtrag 1992.
- [209] Entwurf für die Revision der Adenosin-Monographie 1486, *Pharmeuropa* 2006, 18.2, 239-241.
- [210] Kopec, S., Almeling, S., Holzgrabe, U., *Pharmeuropa Scientific Notes* 2006, 2, 17-21.
- [211] Dolan, J. W., *J. Chromatogr. A* 2002, 965, 195-205.
- [212] Dolan, J. W., *LC-GC Europe* 2007, 20, 386-389.
- [213] http://pharm.kuleuven.be/pharmchem/Pages/7_CCS.html
- [214] Ferenczi-Fodor, K., Végh, Z., Renger, B., *Trends Analyt. Chem.* 2006, 25, 778-789.
- [215] Novatchev, N., Holzgrabe, U., *Chromatographia* 2003, 57, 345-349.
- [216] Glutathion-Monographie 1670 (Entwurf), *Pharmeuropa* 2003, 15.1, 129-130.
- [217] Römpp-Lexikon Online, Version 3.0, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2007.
- [218] Li, Y., Wei, G., Chen, J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 66, 233-242.
- [219] Alfafara, C., Miura, K., Shimizu, H., Shioya, S., Suga, K.-I., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992, 37, 141-146.

-
- [220] Holzgrabe, U., Pharm. Ind. 2005, 67, 1209-1213.
- [221] Laboratory report, Establishment of glutathione CRS, verification of the draft monograph, EDQM-Bericht PA/PH/LAB 10D (03)11, August 2003.
- [222] Glutathion, Monographie 1670, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, 1. Nachtrag, EDQM, Straßburg, 2005.
- [223] Glutathion, Monographie 1670, Europäisches Arzneibuch, 5. Ausgabe, 5. Nachtrag, EDQM, Straßburg, 2005.
- [224] Kleemann, A., Leuchtenberger, W., Hoppe, B., Tanner, H., in: Gerhartz, W. (Hrsg.), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. Auflage, Band A2, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1985.
- [225] Li, J., Jaworsky, M. S., Stirling, D. I., J. Pharm. Biomed. Anal. 2003, 31, 19-27.
- [226] Novatchev, N., Holzgrabe, U., J. Pharm. Biomed. Anal. 2001, 26, 779-789.
- [227] Hoppe, B., Martens, J., Chem. Unserer Zeit 1984, 18, 73-86.
- [228] Leuchtenberger, W., in: Rehm, H. J. (Hrsg.), Biotechnology, Band 6, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1996.
- [229] Rehm, H. J., Industrielle Mikrobiologie, 2. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, 1980.
- [230] Alanin, Kommentar zur Monographie 0752, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 4.0, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 17. Lieferung 2004.
- [231] Leuchtenberger, W., Plöcker, U., Chem. Ing. Tech. 1988, 60, 16-23.
- [232] Kopec, S., Holzgrabe, U., Pharmeuropa Scientific Notes 2005, 1, 39-45.
- [233] Aspartinsäure, Kommentar zur Monographie 0797, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 4.0, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 17. Lieferung 2004.
- [234] Histidin, Kommentar zur Monographie 0911, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 4.8, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 19. Lieferung 2005.
- [235] Isoleucin, Kommentar zur Monographie 0770, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 4.0, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 20. Lieferung 2005.
- [236] Phenylalanin, Kommentar zur Monographie 0782, in: Bracher, F., Heisig, P., Langguth, P., Mutschler, E. *et al.*, Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 5.0, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 22. Lieferung 2005.

-
- [237] Ornithinhydrochlorid, Kommentar zur Monographie, in: Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G., Wichtl, M., Kommentar zum Deutschen Arzneibuch 2005, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, 21. Lieferung 2005.
- [238] Ornithinaspartat, Kommentar zur Monographie, in: Hartke, K., Hartke, H., Mutschler, E., Rücker, G., Wichtl, M., Kommentar zum Deutschen Arzneibuch 2005, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Govi-Verlag GmbH, 21. Lieferung 2005.
- [239] <http://www.rexim.fr/content/safety.htm>.
- [240] Carpino, L. A., Han, G. Y., J. Org. Chem. 1972, 37, 3404-3409.
- [241] Einarsson, S., Josefsson, B., Lagerkvist, S., J. Chromatogr. 1983, 282, 609-618.
- [242] Näsholm, T., Sandberg, G., Ericsson, A., J. Chromatogr. 1987, 396, 225-236.
- [243] Chan, K. C., Janini, G. M., Muschik, G. M., Issaq, H. J., J. Chromatogr. A 1993, 653, 93-97.
- [244] Haynes, P. A., Sheumack, D., Greig, L. G., Kibby, J., Redmond, J. W., J. Chromatogr. 1991, 588, 107-114.
- [245] Gustavsson, B., Betnér, I., J. Chromatogr. 1990, 507, 67-77.
- [246] Kirschbaum, J., Luckas, B., Beinert, W.-D., J. Chromatogr. A 1994, 661, 193-199.
- [247] Bank, R. A., Jansen, E. J., Beekman, B., te Koppele, J. M., Anal. Biochem. 1996, 240, 167-176.
- [248] Einarsson, S., Folestad, S., Josefsson, B., Lagerkvist, S., Anal. Chem. 1986, 58, 1638-1643.
- [249] Carlson, M., Thompson, R. D., J. Chromatogr. Sci. 2000, 38, 77-83.
- [250] Chang, C.-D., Waki, M., Ahmad, M., Meienhofer, J. *et al.*, Int. J. Pept. Protein Res. 1980, 15, 59-66.
- [251] Sigler, G. F., Fuller, W. D., Chaturvedi, N. C., Goodman, M., Verlander, M., Biopolymers 1983, 22, 2157-2162.
- [252] Lapatsanis, L., Milias, G., Froussios, K., Kolovos, M., Synthesis 1983, 8, 671-673.
- [253] Tessier, M., Albericio, F., Pedroso, E., Grandas, A. *et al.*, Int. J. Pept. Protein Res. 1983, 22, 125-128.

-
- [254] Bolin, D. R., Sytwu, I.-I., Humiec, F., Meienhofer, J., *Int. J. Pept. Protein Res.* 1989, 33, 353-359.
- [255] Gopi, H. N., Suresh Babu, V. V., *J. Pept. Res.* 2000, 55, 295-299.
- [256] Hioki, K., Kinugasa, M., Kishimoto, M., Fujiwara, M. *et al.*, *Synthesis* 2006, 12, 1931-1933.
- [257] Liu, J., Hsieh, Y.-Z., Wiesler, D., Novotny, M., *Anal. Chem.* 1991, 63, 408-412.
- [258] Novatchev, N., Holzgrabe, U., *Pharmeuropa* 2002, 14.4, 640-647.
- [259] Arriaga, E. A., Zhang, Y., Dovichi, N. J., *Anal. Chim. Acta* 1995, 299, 319-326.
- [260] Zhang, Y., Arriaga, E., Diedrich, P., Hindsgaul, O., Dovichi, N. J., *J. Chromatogr. A* 1995, 716, 221-229.
- [261] Kwakman, P. J. M., Koelewijn, H., Kool, I., Brinkman, U. A. Th., De Jong, G. J., *J. Chromatogr.* 1990, 511, 155-166.
- [262] Kopec, S., Determination of impurity profile of amino acids by means of capillary electrophoresis after derivatization with CBQCA, *BfArM-Bericht*, 13.03.2006.
- [263] Ummadi, M., Weimer, B. C., *J. Chromatogr. A* 2002, 964, 243-253.
- [264] Boulat, O., McLaren, D. G., Arriaga, E. A., Chen, D. D. Y., *J. Chromatogr. B* 2001, 754, 217-228.
- [265] Terabe, S., Miyashita, Y., Shibata, O., Barnhart, E. R. *et al.*, *J. Chromatogr.* 1990, 516, 23-31.
- [266] Product Information, ATTO-TAGTM CBQCA and ATTO-TAGTM FQ, Molecular Probes, <http://www.probes.com>.
- [267] Thongkhao-On, K., Kottegoda, S., Pulido, J. S., Shippy, S. A., *Electrophoresis* 2004, 25, 2978-2984.
- [268] HPLC Application Note 021354, Separation of Organic acids, Merck, Darmstadt, 01/2004.
- [269] Application K775-092, Organic acids, Thermo Electron Corporation, 2006.
- [270] Tatár, E., Mihucz, V. G., Kmethy, B., Záray, G., Fodor, F., *Microchem. J.* 2000, 67, 73-81.
- [271] Zotou, A., Loukou, Z., Karava, O., *Chromatographia* 2004, 60, 39-44.
- [272] Application Note 0040E, Underivatized Amino Acids, Alltech Associates, Inc., Deerfield, 1999.
- [273] Petritis, K., de Person, M., Elfakir, C., Dreux, M., *Chromatographia* 2004, 60, 293-298.

-
- [274] Yan, D., Li, G., Xiao, X.-H., Dong, X.-P., Li, Z.-L., *J. Chromatogr. A* 2007, 1138, 301-304.
- [275] HPLC Application 10164, Amino Acids – Underivatized, Phenomenex Inc.
- [276] Chaimbault, P., Petritis, K., Elfakir, C., Dreux, M., *J. Chromatogr. A* 2000, 870, 245-254.
- [277] Petritis, K., Elfakir, C., Dreux, M., *J. Chromatogr. A* 2002, 961, 9-21.
- [278] Petritis, K. N., Chaimbault, P., Elfakir, C., Dreux, M., *J. Chromatogr. A* 1999, 833, 147-155.
- [279] Megoulas, N. C., Koupparis, M. A., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2005, 35, 301-316.
- [280] Young, C. S., Dolan, J. W., *LC-GC North America* 2003, 21, 120-128.