

**Kapillarelektrophoretische
Trennung und Quantifizierung
von Aminoglykosiden
und Clotrimazol**

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

vorgelegt von
Frank Wienen
aus Neuwied

Würzburg 2003

Eingereicht am: 27. Oktober 2003

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

Gutachter: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

Gutachter: Prof. Dr. Tanja Schirmeister

der Dissertation

Prüfer: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

Prüfer: Prof. Dr. Tanja Schirmeister

Prüfer: Priv. Doz. Dr. Knut Baumann

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: 23. Januar 2004

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie des Fachbereiches Chemie und Pharmazie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

An dieser Stelle möchte ich ihr für die jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und die hervorragende Möglichkeit zum selbständigen Arbeiten in ihrem Arbeitskreis danken.

Dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Für die durchgeführten Messungen am ECD-Detektor danke ich Frau Dr. Petra Strunk unter der Leitung von Dipl.-Chem. Ernst J. Maier vom Labor für Pharma- und Umweltanalytik (LPU). Weiterhin danke ich Ralph Deubner für die NMR-Messungen und den daraus resultierenden Diskussionen.

Ich bedanke mich besonders bei meiner Kollegin Stefanie Laug für die tolle Zusammenarbeit, die mir immer großen Spaß gemacht hat und die ich sehr vermissen werde. Genauso großen Dank an Christine Kirchhoff für die Geduld bei der Korrektur der Textentwürfe und die vielen weiteren kleinen Dinge der letzten Jahre.

Letztendlich möchte ich mich bei allen Kollegen des Arbeitskreises für das mehr als angenehme Klima bedanken.

*Man muss die Dinge so einfach wie möglich machen.
Aber nicht einfacher.*

ALBERT EINSTEIN

für meine Familie

Teile der Arbeit sind bereits veröffentlicht in:

- 1) Frank Wienen und Ulrike Holzgrabe
“Characterization of Paromomycin Sulfate by Capillary Electrophoresis with UV Detection after Pre-Capillary Derivatization”
Chromatographia 55, **2002**, 327-331
- 2) Frank Wienen, Stefanie Laug, Knut Baumann, Albrecht Schwab, Stefan Just und Ulrike Holzgrabe
“Determination of clotrimazole in mice plasma by capillary electrophoresis”
J. Pharm. Biomed. Anal., 30, **2003**, 1879-1887
- 3) Frank Wienen, Ralph Deubner und Ulrike Holzgrabe
“Composition and impurity profile of multisource raw material of gentamicin – a comparison”
Pharmeuropa 15, **2003**, 273 - 279
- 4) Ulrike Holzgrabe, Ralph Deubner, Nikolai Novatchev und Frank Wienen
„Verunreinigungen in Arzneistoffen“
Deutsche Apotheker Zeitung, 26, **2003**, 57-64
- 5) Ralph Deubner, Curd Schollmayer, Frank Wienen und Ulrike Holzgrabe
“Assignment of the major components of gentamicin”
Magn. Reson. Chem., 41, **2003**, 589-598
- 6) Frank Wienen und Ulrike Holzgrabe
„A new MEKC method for separation of the components of the aminoglycoside antibiotics“
Electrophoresis, 24, **2003**, 2948-2957

Abstracta:

- 1) Frank Wienen und Ulrike Holzgrabe
“Characterization of aminoglycosides by means of capillary electrophoresis”
für DPhG-Jahrestagung 2001 in Halle
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem., 334 (Suppl. 2), **2001**, 52
- 2) Frank Wienen und Ulrike Holzgrabe
“Determination of clotrimazole in mice plasma by capillary electrophoresis”
für HPCE (15th International Symposium on Microscale Separations and Analysis)
in Stockholm 2002
- 3) Frank Wienen, Ralph Deubner und Ulrike Holzgrabe
“Characterization of gentamicin sulphate by means of CE and ^1H NMR”
für DPhG-Jahrestagung 2002 in Berlin
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem., 335 (Suppl. 1), **2002**, 105
- 4) Frank Wienen, Ralph Deubner und Ulrike Holzgrabe
“A comparison of the composition and impurities of multisource bulkware of gentamicin”
für HPCE (16th International Symposium on Microscale Separations and Analysis)
in San Diego 2003
- 5) Ralph Deubner, Frank Wienen und Ulrike Holzgrabe
„Composition of Gentamicin Sulphate Determined by Means of CE and ^1H -NMR”
für DPhG-Jahrestagung 2003 in Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis I

TEIL A

1	Einleitung	1
1.1	Kapillarelektrophorese (CE).....	3
1.1.1	Übersicht	3
1.1.2	Grundlagen.....	4
1.1.2.1	Geräteaufbau.....	4
1.1.2.2	Elektrophoretische Mobilität.....	5
1.1.2.3	Elektroosmotischer Fluss.....	6
1.1.3	Trenntechniken.....	8
1.1.3.1	Kapillarzonenlektrophorese (CZE).....	8
1.1.3.2	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC).....	9
1.1.3.3	Sonstige Techniken	9
1.1.4	Cyclodextrine	10
1.1.5	pH-Wert.....	11
1.2	Aminoglykosidantibiotika	12
1.2.1	Übersicht	12
1.2.2	Herstellung und Gewinnung.....	14
1.2.3	Eigenschaften	15
1.2.3.1	Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften	15
1.2.3.2	Pharmazeutische Anwendung	18
1.2.4	Analytik von Aminoglykosiden	22
1.2.4.1	Überblick	22
1.2.4.2	Detektion	23
1.2.4.3	Derivatisierung	26
1.3	Aufgabenstellung.....	33
2	Allgemeiner Teil	34
2.1	Paromomycinsulfat	34
2.1.1	Übersicht	34

2.1.2	Methodenentwicklung.....	35
2.1.2.1	Hintergrundelektrolyt-Optimierung	35
2.1.2.2	Optimierung der β -Cyclodextrin-Konzentration.....	35
2.1.2.3	Optimierung der Methanol-Konzentration.....	36
2.1.2.4	Optimierung des pH-Wertes.....	37
2.1.2.5	Optimierung der Derivatisierung	37
2.1.2.6	Methodenpräzision.....	40
2.1.3	Zusammenfassung.....	40
2.2	Gentamicinsulfat	42
2.2.1	Übersicht.....	42
2.2.2	Präparative säulenchromatographische Trennung	44
2.2.2.1	Dünnschichtchromatographie der Mischung	44
2.2.2.2	Ionenaustauschchromatographie	44
2.2.2.3	Kieselgel-Säulenchromatographie	44
2.2.3	Kapillaronenelektrophorese	46
2.2.3.1	Methodenentwicklung.....	46
2.2.4	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie	51
2.2.4.1	Methodenentwicklung.....	51
2.2.4.1.1	Optimierung der mizellenbildenden Substanzen.....	51
2.2.4.1.2	Optimierung des Natriumtetraborat-Puffers	52
2.2.4.1.3	Optimierung der Cyclodextrin-Konzentration.....	53
2.2.4.1.4	Optimierung des pH-Wertes	54
2.2.4.1.5	Wahl des Internen Standards	54
2.2.4.1.6	Zusatz von „organic modifier“	55
2.2.4.1.7	Optimierung der Spülprozedur	55
2.2.4.1.8	Optimierung der Detektionswellenlänge	56
2.2.4.2	Zuordnungen	57
2.2.4.3	Präzision der Methode.....	59
2.2.4.4	Ergebnis.....	61
2.2.4.5	NMR-Untersuchungen von Gentamicin	67
2.2.5	HPLC-Methode nach EuAB 4.5	70
2.2.6	Zusammenfassung.....	73
2.3	Sisomicin	74
2.4	Netilmicin.....	74

2.5	Amikacin.....	75
2.6	Kanamycinsulfat.....	76
2.6.1	Überblick.....	76
2.6.2	Methodenentwicklung.....	77
2.6.2.1	Optimierung des pH-Wertes.....	77
2.6.2.2	Optimierung des Natriumtetraborat-Puffers.....	78
2.6.2.3	Optimierung der mizellenbildenden Substanzen.....	79
2.6.2.4	Optimierung der β -Cyclodextrin-Konzentration.....	79
2.6.3	Zusammenfassung.....	81
2.7	Tobramycin.....	83
2.8	Neomycin.....	84
3	Experimenteller Teil.....	89
3.1	Reagenzien und Materialien.....	89
3.1.1	Lösemittel.....	89
3.1.2	Derivatisierungssubstanzen.....	89
3.1.3	Pharmazeutisch wirksame Substanzen.....	90
3.1.4	Elektrolyte und sonstige Substanzen.....	91
3.1.5	Cyclodextrine.....	91
3.1.6	Mizellenbildende Substanzen.....	91
3.2	Geräte und Software.....	92
3.2.1	Kapillarelektrophorese.....	92
3.2.2	NMR-Experimente.....	92
3.2.3	Sonstige analytische Geräte.....	93
3.3	Probenbereitung und Herstellung der Lösungen.....	94
3.3.1	Paromomycinsulfat.....	94
3.3.1.1	OPA-Derivatisierungsreagenz.....	94
3.3.1.2	Hintergrundelektrolyt.....	94
3.3.1.3	Probenbereitung/Derivatisierung.....	94
3.3.2	Gentamicinsulfat.....	95
3.3.2.1	Präparative säulenchromatographische Trennung.....	95
3.3.2.1.1	Dünnschichtchromatographie der Mischung.....	95
3.3.2.1.2	Ionenaustauschchromatographie.....	95
3.3.2.1.3	Kieselgel-Säulenchromatographie.....	96
3.3.2.2	CZE-Methode.....	96

3.3.2.2.1	OPA-Derivatisierungsreagenz	96
3.3.2.2.2	Hintergrundelektrolyt	96
3.3.2.2.3	Probenbereitung/Derivatisierung	96
3.3.2.3	MEKC-Methode	97
3.3.2.3.1	Derivatisierungsreagenz	97
3.3.2.3.2	Hintergrundelektrolyt	97
3.3.2.3.3	Probenbereitung/Derivatisierung	98
3.3.2.4	NMR-Experimente	98
3.3.2.4.1	Probenbereitung	98
3.3.3	Kanamycinsulfat	98
3.3.3.1	Derivatisierungsreagenz	98
3.3.3.2	Hintergrundelektrolyt	98
3.3.3.3	Probenbereitung/Derivatisierung	98
3.4	Elektrophoretische Bedingungen	99
3.4.1	Paromomycinsulfat	99
3.4.2	Gentamicinsulfat	100

TEIL B

4	Einleitung	103
4.1	Clotrimazol	103
4.2	Eigenschaften	105
4.2.1	Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften von Clotrimazol	105
4.2.2	Herstellung	105
4.3	Aufgabenstellung	105
5	Allgemeiner Teil	106
5.1	Analytik von Clotrimazol aus Mäuseplasma	106
5.1.1	Übersicht	106
5.1.2	Methodenentwicklung	107
5.1.2.1	Optimierung des Hintergrundelektrolyten	107
5.1.2.2	Interner Standard	108
5.1.2.3	Proteinfällung	109
5.1.2.4	Flüssig-Flüssig-Extraktion	110
5.1.2.5	Spülprozedur	111
5.1.2.6	Validierung nach ICH-Guideline Q2b	112

5.1.3	Zusammenfassung.....	113
6	Experimenteller Teil.....	115
6.1	Reagenzien und Materialien	115
6.1.1	Pharmazeutisch wirksame Substanzen.....	115
6.2	Geräte und Software	115
6.3	Probenbereitung und Herstellung der Lösungen	115
6.3.1	Hintergrundelektrolyt.....	115
6.3.2	SDS/Methanol-Reinigungslösung.....	115
6.3.3	Probenbereitung	116
6.4	Elektrophoretische Bedingungen.....	117
7	Zusammenfassung.....	118
7.1	Aminoglykoside.....	118
7.2	Clotrimazol	120
8	Summary	122
8.1	Aminoglycosides	122
8.2	Clotrimazole	124
9	Abkürzungsverzeichnis.....	126
10	Literaturverzeichnis.....	128
11	Anhang	137
11.1	Übersicht.....	137
11.2	CZE-Methode	138
11.3	MEKC-Methode, 12 kV	151
11.4	MEKC-Methode, 14 kV	166
12	Lebenslauf.....	183

TEIL A

1 Einleitung

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) werden gewöhnlich durch die pharmazeutisch wirksamen Substanzen selbst verursacht. Dennoch wird immer öfter beschrieben, dass UAWs auch durch die Verunreinigungen der Arzneistoffe entstehen können. Oftmals stehen diese UAWs im Zusammenhang mit dem Auftreten von Verunreinigungen, die nicht vom Innovator der Substanz bzw. in der entsprechenden Arzneibuchmonographie angegeben wurden.

Neu auftretende Verunreinigungen sind zumeist die Folge der Abänderung der bei der Zulassung eingereichten Herstellungsvorschrift. Wird die Aufreinigungsprozedur des Arzneistoffes den geänderten Umständen nicht angepasst, kommt es zu unerwarteten Nebenprodukten im Endprodukt, die im schlimmsten Fall toxisch sein können. Da sich der Nachweis und die Quantifizierung von Verunreinigungen mittels Arzneibuchmethoden auf einen oder mehrere bekannte Herstellungsprozesse beziehen, werden Verunreinigungen aus neuen bzw. geänderten Produktionswegen nur selten in ausreichendem Maße erfasst. Auf diese Weise können Arzneistoffe ungenügender Qualität auf den Markt kommen, die ggf. dann zu UAWs oder Todesfällen führen können.

Ein solcher Fall ist in den späten 80er Jahren mit der Aminosäure Tryptophan aufgetreten. Durch die Umstellung der Produktion änderte sich das Nebenprodukt-Profil erheblich und man beobachtete das häufige Auftreten des Eosinophilie-Myalgie-Syndroms (EMS), das bei ca. 30 Personen zum Tode führte [1]. Man stellte fest, dass nur Patienten davon betroffen waren, die Tryptophan aus Chargen einer bestimmten japanischen Firma eingenommen haben [2]. Diese hatte Tryptophan nicht synthetisch, sondern fermentativ mit Hilfe neuer Stämme von *Bacillus amyloliquefaciens* hergestellt. Außerdem wurde die Menge an Aktivkohle, mit der Tryptophan gereinigt wurde, reduziert. Eine dieser vermutlich toxischen Substanzen wurde später als 1,1'-Etylidenbistryptophan und eine zweite, die ebenfalls mit EMS in Verbindung gebracht wurde, als 3-Phenylamino-1-alanin mittels HPLC und Massenspektrometrie identifiziert [3,4,5]. Die aktuelle Tryptophan-Monographie berücksichtigt seitdem diese beiden Verunreinigungen [6].

Im Mai 2000 berichtete „USA Today“ über den Tod von 17 Personen nach „Off-label-use“ des Breitbandantibiotikums Gentamicinsulfat [7]. Unter einem „Off-label-use“ versteht man die Einnahme eines Medikamentes außerhalb der Zulassungsindikation, was mit Gentamicin durch Einmalgabe der Tagesdosis anstatt der Verteilung der Tagesdosis auf drei Einzeldosen passiert ist. In einer weiteren Veröffentlichung wird der Tod von 66 Personen und das Auftreten von zahlreichen starken UAWs an Hunderten weiterer Patienten beschrieben [8]. Da diese Fälle durch keine der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften des Gentamicinsulfats erklärt werden konnten, wird vermutet, dass diese mit einer mangelhaften Produktionsweise des Arzneistoffes im Zusammenhang steht, ähnlich wie bei der Tryptophan-Affäre.

Um die Ursache dieser Zwischenfälle zu ergründen, gilt es also, mit geeigneten analytischen Methoden nach zusätzlichen Verunreinigungen in den Gentamicin-Proben zu suchen, die die Todesfälle verursacht haben.

1.1 Kapillarelektrophorese (CE)

1.1.1 Übersicht

Vor etwa 100 Jahren beschrieb Kohlrausch physikalische Gesetzmäßigkeiten der Ionenwanderungen im elektrischen Feld. Das Phänomen, dass geladene Teilchen in einer Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in unterschiedliche Richtungen wandern, bezeichnete er als Elektrophorese. Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen hat zwei Ursachen: Die zu trennenden Ionen haben verschiedene Ladungen, was eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität im elektrischen Feld zur Folge hat; außerdem werden Ionen gleicher Ladung aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und des daraus resultierenden Reibungswiderstandes getrennt.

Früher führte man fast ausschließlich Gel-Elektrophoresen durch. Mit diesem Verfahren werden Ionen auf einem Polymer getrennt. Die Gel-Elektrophorese stieß sehr bald an ihre Grenzen, da die Reproduzierbarkeit sehr schlecht war. Dies war bedingt durch die auftretende Joule'sche Erwärmung des Elektrolyten über die Trennstrecke, die mit der Spannung quadratisch anwächst. Eine Kühlung des Gels war unerlässlich, damit es während der Analyse nicht austrocknete. Weiterhin war eine direkte Detektion technisch nicht möglich. Man war daher bestrebt, zum einen die Probleme der Gele durch die auftretende Joule'sche Erwärmung zu umgehen und zum anderen die direkte photometrische Bestimmung der Proben im Puffer zu ermöglichen.

Im Zuge der Entwicklung gelang es, die durch Konvektion in der Lösung auftretende Joule'sche Wärme abzuführen. Auslöser war die Erkenntnis, dass in dünnen Röhren Konvektionsströme, bedingt durch den kleinen Innendurchmesser der Kapillaren, relativ gering sind. Die große Oberfläche der Kapillarinenseite, bezogen auf das Puffervolumen, erlaubt einen schnellen und effektiven Abtransport der Joule'schen Wärme. Durch verschiedene instrumentelle Verbesserungen der Apparatur konnte sogar bei Anlegen von hohen Spannungen (bis 35 kV) die Erwärmung der Kapillare schnell ausgeglichen und sehr kurze Analysenzeiten erreicht werden.

Die Lösung des „Online-Detektion-Problems“ ist erst durch die Verwendung von geeignetem Kapillarmaterial möglich geworden. Es wurden Kapillaren entwickelt, die einen gleichmäßigen Durchmesser von 50 μm bis 100 μm und zudem eine hohe Transparenz im unteren UV-Bereich aufwiesen. Gleichzeitig wurden die aus der Isotachophorese anfänglich übernommenen Leitfähigkeitsdetektoren durch UV-Detektoren ausgetauscht. Dadurch

konnten neben klassischen chromatographischen auch Kapillarelektrophorese (CE)-Verfahren zu quantitativen Bestimmungen von Proben herangezogen werden.

Die erste Trennung in einer offenen Kapillare wurde von Hjerten 1967 [9] beschrieben. Durch die technische Weiterentwicklung der Geräte begann der eigentliche Aufschwung der CE erst Ende der 70er Jahre durch Mikkers und Everaerts [10] sowie durch Jorgenson und Lukacs [11,12] zu Beginn der 80er Jahre.

Diese technischen Verbesserungen der Apparaturen und das vermehrte Bedürfnis nach der Trennung von Biomolekülen führte in der Mitte der 80er Jahre zu einem gesteigerten Interesse an der Fortentwicklung der CE.

1.1.2 Grundlagen

1.1.2.1 Geräteaufbau

Das Prinzip und der Aufbau einer CE-Apparatur ist in Abbildung 1.1-1 dargestellt. Die dünne Quarzkapillare (amorphes Siliziumdioxid = fused silica) hat üblicherweise einen Innendurchmesser von 25 μm – 100 μm und eine Länge von 30 cm bis 100 cm. Sie überbrückt die beiden Elektrolytgefäße, zwischen denen eine Spannung von bis zu 35000 V angelegt werden kann. Zur Probenaufnahme wird der Kapillaranfang aus dem Elektrolytgefäß gehoben und in das jeweilige Probengefäß getaucht. Die Probe wird hydrodynamisch durch Druckunterschiede oder elektrokinetisch durch kurzzeitiges Anlegen einer Hochspannung in die Einlass-Seite der Kapillare gebracht. Die Probenzone ist wenige Millimeter lang und hat ein Volumen von wenigen Nanolitern. Bei älteren Modellen wurden zur hydrodynamischen Injektion die Niveaus der Gefäße einseitig angehoben, um durch den Höhenunterschied die Kapillare mit der Probenlösung zu füllen. Heutzutage wird zur hydrodynamischen Injektion entweder Druck auf der Einlass-Seite oder ein Vakuum auf der Auslass-Seite angelegt. Mit Beginn der Trennung wird der Kapillaranfang wieder in ein Elektrolytgefäß getaucht und die Hochspannung angelegt.

Bauliche Unterschiede gibt es in Bezug auf die Kühlung der Kapillare, auf die Art des Gläschentransportes oder auf die Probenaufbewahrung: Bei einigen Geräten wird die Kapillare durch Luft gekühlt, bei anderen wird der Abtransport der Joule'schen Wärme durch eine spezielle FCKW-haltige Flüssigkeit bewerkstelligt. Die Positionierung der Gläschen (Vials) erfolgt entweder durch ein Tablett, welches die entsprechende Position unterhalb

der Kapillare/Elektroden ansteuert, oder durch Anheben der einzelnen Gefäße durch einen Lift. Bei manchen Geräten können die Proben in temperierten Kammern gelagert werden.

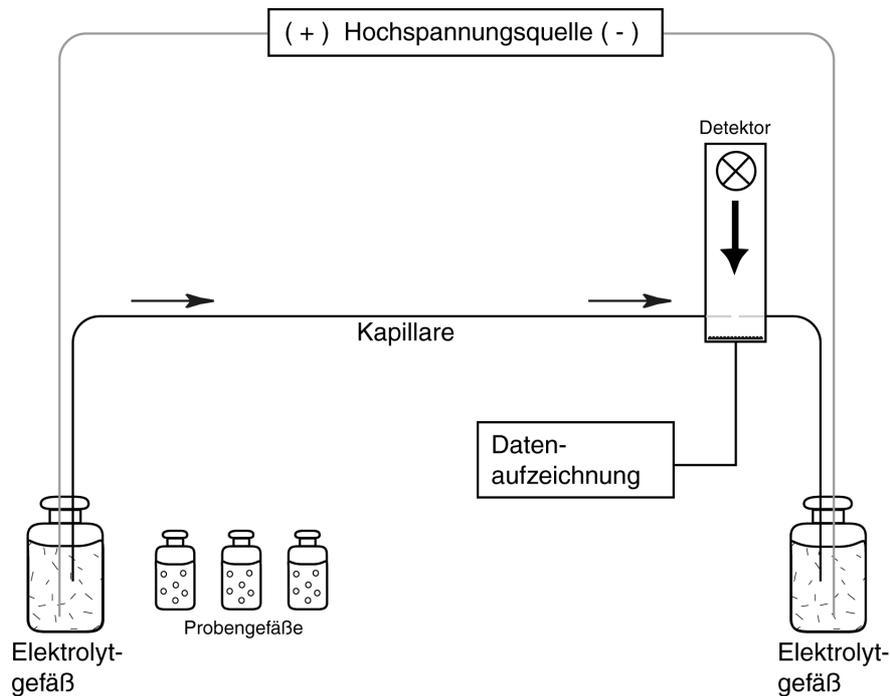


Abb. 1.1-0: Prinzipieller Aufbau eines CE-Gerätes

1.1.2.2 Elektrophoretische Mobilität

Wie bereits erklärt werden durch Anlegen von Hochspannung Moleküle aufgrund unterschiedlicher Ladungszahl und Größe getrennt. Gleichartige Ionen bewegen sich mit konstanter Geschwindigkeit, auch Mobilität genannt, in einem elektrischen Feld. Die Mobilität μ wird als der Quotient aus ihrer Geschwindigkeit v und der Elektrischen Feldstärke E (Gleichung 1.1-1) beschrieben.

Gleichung 1.1-1
$$\mu = \frac{v}{E}$$

Die Geschwindigkeit der Ionen berechnet sich aus der Migrationszeit t_M und der in der Kapillare bis zum Detektor zurückgelegten Strecke l (Gleichung 1.1-2); die Elektrische Feldstärke E ist der Quotient aus der Spannung U und der Gesamtlänge der Kapillare L (Gleichung 1.1-3).

Gleichung 1.1-2
$$v = \frac{l}{t_M}$$

Gleichung 1.1-3
$$E = \frac{U}{L}$$

Wird nun die Spannung angelegt, so erfolgt eine Trennung aufgrund verschiedener Wanderungsgeschwindigkeiten der Ionen im Trennelektrolyt. Dabei wandern die Ionen beschleunigt durch das elektrische Feld mit einer Mobilität μ , die nach folgender Gleichung berechnet werden kann:

Gleichung 1.1-4
$$\mu = \frac{l \cdot L}{t_M \cdot U}$$

Hierbei muss zwischen der gesamten Kapillarlänge L und der Kapillare vom Anfang bis zum Detektor (effektive Länge l) unterschieden werden, da das elektrische Feld über die Gesamtlänge besteht, die Ionen aber nur die effektive Kapillarlänge in der Migrationszeit durchwandern. Trennungen sind nur dann möglich, wenn sich die Ionen in ihrer elektrophoretischen Mobilität unterscheiden [13].

1.1.2.3 Elektroosmotischer Fluss

Während die Elektrophorese die Trennung von Teilchen unterschiedlicher Mobilität bewirkt, verursacht die Elektroosmose einen Fluss der Elektrolytlösung im elektrischen Feld. Der elektroosmotische Fluss (EOF) kommt auf folgende Weise zustande: In das Kapillarinne ragen im Fall von Quarzglas kapillaren Silanolgruppen. Aufgrund ihres pK_s Wertes von ca. 1.5 sind sie ab einem pH-Wert des Elektrolyten von ca. 3.5 vollständig deprotoniert. An die nun negativ geladene Oberfläche lagern sich in einer unbeweglichen Schicht, Helmholtz-Schicht genannt, (s. Abb. 1.1-1, a) Kationen (mit Hydrathülle) an. In einer zweiten beweglichen Schicht, Debye-Hückel-Schicht genannt, (s. Abb. 1.1-1, b) befinden sich sowohl weitere Kationen als auch Anionen, wobei die Kationen im Überschuss vorliegen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Kationen aufgrund ihrer Ladung zur Kathode und reißen dabei - bedingt durch ihre Hydrathüllen - die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mit. Somit gibt der daraus resultierende EOF der Elektrophorese eine Richtung.

Das sich aufbauende Potential wird nach der Theorie von Stern in zwei Regionen aufgeteilt: Eine lineare Abnahme des Potentials im Bereich der starren Grenzschrift (s. Abb. 1.1-2, a) und eine exponentielle Abnahme in der diffusen Grenzschrift (s. Abb. 1.1-2, b). Die exponentielle Abnahme ist verantwortlich für die Elektroosmose. Der Übergang von der linearen zur exponentiellen Grenzschrift nennt man das ζ -Potential („Zeta“-Potential) [14].

Da die Wanderung der Ionen von den positiv geladenen Ionen, die an der Kapillarwand fixiert sind, ausgeht, bildet sich ein extrem flach ausgebildetes (stempelförmiges) Strömungsprofil aus. Im Vergleich zu dem in der HPLC-Analytik auftretenden laminaren Strömungsprofil sind in der CE-Analytik dadurch wesentlich schmalere Peaks zu erwarten.

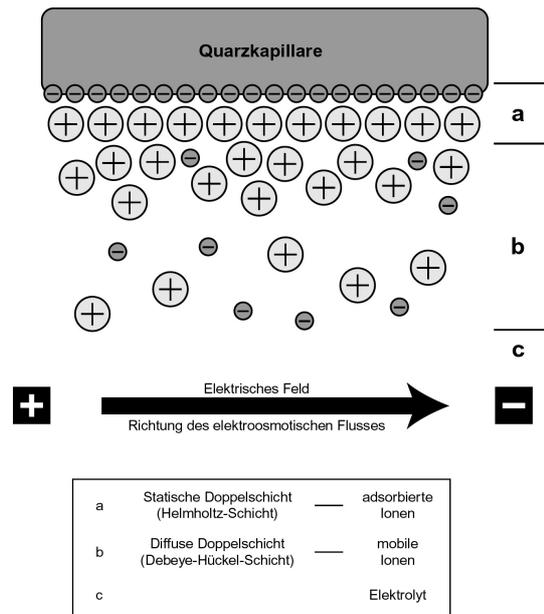


Abb. 1.1-1: Ladungsverteilung in der Oberfläche des Quarzes

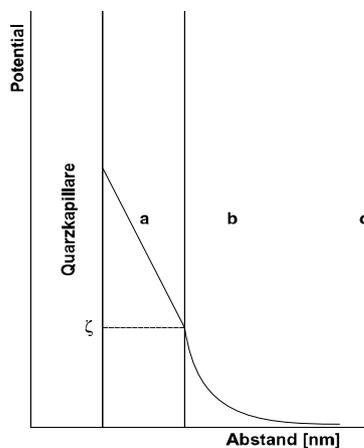


Abb. 1.1-2: Verlauf des Zeta-Potentials an der Grenzfläche Elektrolyt / Quarz

Bei Verwendung von Quarzkapillaren überlagert der EOF bei pH-Werten größer 3.5 die elektrophoretische Wanderung der Ionen. Dies kann man am Beispiel einer Probe mit negativ geladenen Molekülen verdeutlichen. Nach Anlegen der Hochspannung würden die negativen Ionen aufgrund ihrer Ladung in Richtung der Anode wandern, d.h. zurück zur Einlass-Seite der Kapillare. Die Fließrichtung des EOF's zur Kathode ist der Fließrichtung der Anionen entgegengerichtet. Da der EOF meist stärker ist als die elektrophoretische Mobilität der Anionen, werden die Anionen in Richtung der Kathode mitgerissen und sind so im

Detektionsfenster der Kapillare durch den Detektor erfassbar. Ist die elektrophoretische Wanderung der Anionen dennoch größer als der EOF, können sie durch Wechsel der Spannung an das Auslass-Ende der Kapillare und somit durch das Detektionsfenster bewegt werden. Weitere Möglichkeiten werden in Abb. 1.1-3 veranschaulicht.

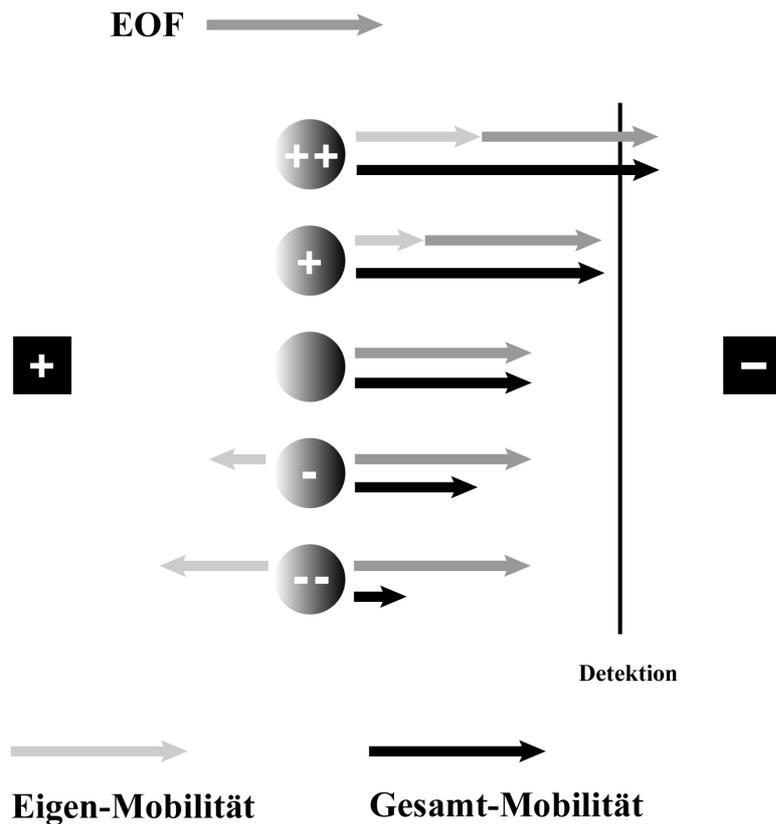


Abb. 1.1-3: Migrationsverhalten der einzelnen Probenspezies in der CZE

1.1.3 Trenntechniken

1.1.3.1 Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Die CZE ist die am häufigsten angewandte Methode in der CE. Die Trennung wird ausschließlich in mit Elektrolyt gefüllten Kapillaren durchgeführt. Die Trennung beruht auf Mobilitätsunterschieden der Analytmoleküle. Das aufgetragene Analytengemisch trennt sich nach Anlegen der Spannung in verschiedene Zonen, sofern sie aus verschiedenen Bestandteilen besteht. Diese Zonen wandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Trennsystem und sind im Optimalfall durch den Elektrolyt voneinander getrennt. Dies äußert sich dann in basisliniengetrennten Peaks im Elektropherogramm. Standardelektrolyte sind Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer (10-100 mM) mit optimaler Pufferkapazität für die pH-Bereiche 1-3 bzw. 6-8. Weiterhin werden Natriumtetraboratpuffer (5-50 mM) für den pH-Bereich von 8-10 oder auch Ammoniumacetatpuffer (10-100 mM) für den pH-Bereich von 4-6 verwendet.

1.1.3.2 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC)

Die von Terabe et al. [15] 1984 beschriebene MEKC ermöglicht die Auftrennung ungeladener Substanzen durch den Zusatz von geladenen Detergenzien zum Hintergrundelektrolyten. Es bilden sich nach Überschreitung der so genannten kritischen mizellaren Konzentration (CMC) Mizellen aus, die unterschiedliche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten der Analyten in der wässrigen mobilen und der pseudo-stationären Phase verursachen. Die Proben verteilen sich zwischen Puffer und den Mizellen nach ihrer Hydrophobie. Die Trennung beruht auf der Mobilität der Mizellen und dem Transport der Analyten außerhalb der Mizellen mit dem EOF. Es handelt sich dabei um einen Verteilungsprozess, sodass man von einem chromatographischen Verfahren reden kann. Als Standarddetergenz hat sich das anionische Natriumlaurylsulfat (= Sodiumdodecylsulfate, SDS) bewährt. Weitere Detergenzien sind Cholsäure-Natrium, Desoxycholsäure-Natrium, Taurodesoxycholsäure-Natrium oder Polyethylenglykoldodecylether (Brij[®]35). Bei kationischen Detergenzien, wie Hexadecyltrimethylammoniumbromid (= Cetyltrimethylammoniumbromid, CTAB) und Tetramethylammoniumbromid (TAB), kommt es zur Adsorption der Detergenz-Moleküle an der Kapillarwand und somit bei Konzentrationen unterhalb der CMC zu einer Umkehr des elektroosmotischen Flusses. Dies hat zur Folge, dass die Wanderung der Analyten in Richtung Anode erfolgt. Das elektrische Feld muss in diesem Fall so angelegt werden, dass sich der Detektor auf der Seite der Anode befindet.

Dass Gallensalze wie Chol, DChol und TDChol als Detergenzien geeignet sind, wurde auch schon in einigen Veröffentlichungen beschrieben [16,17,18]. Sie wurden auch zur chiralen Trennung von Arzneistoffen eingesetzt [19].

1.1.3.3 Sonstige Techniken

Kapillarelektrochromatographie (CEC): Geringere Bedeutung hat bisher die CEC erlangt, bei der stationäre Phasen aus der HPLC mit etwas feinerer Korngröße verwendet werden. Die Kapillaren werden mit unterschiedlich modifiziertem Kieselgel (C8, C18, RP8, RP18, SCX usw.) gepackt. Diese Packung wird am Detektionsfenster von einer Fritte begrenzt. Man versucht die hohe Selektivität und Robustheit der HPLC mit der Trennschärfe der CE durch Verwendung von gepackten Kapillaren zu kombinieren. Eine Durchsetzung dieser Technik scheiterte bisher an der mangelnden Homogenität von Säulenpackungen und Fritten verschiedener Chargen und am hohen Preis der Kapillaren im Vergleich zu normalen Quarzkapillaren.

Kapillargelelektrophorese (CGE): Eine weitere Variante ist die Kapillargelelektrophorese. Als Gel-Matrix werden hauptsächlich Acrylamide, Agarose und Cellulose benutzt. Diese Gele unterscheiden sich stark in ihren physikalischen Eigenschaften, insbesondere in ihrer Viskosität, der Stabilität im elektrischen Feld, der Porenstruktur und der Porengröße. Der Einsatz der Gele in der Elektrophorese liegt darin begründet, dass Biopolymere als Polyanionen bzw. Polykationen mit dem gleichen Oberflächen-/Ladungsverhältnis vorliegen, und somit die Auftrennung im normalen elektrischen Feld ohne weitere Hilfsmittel nicht möglich ist. Da sich diese Biopolymere stark in ihrer Größe unterscheiden, kann durch den Einsatz eines Gels die Mobilität der großen Polymere stärker beeinflusst werden als die der kleinen. Dies führt dann zu einer Trennung nach Molekülgröße, d.h. nach steigendem Molekulargewicht. Als Haupteinsatzgebiet der CGE sind die Trennung von DNA-Molekülen sowie die Trennung von mit SDS denaturierten Proteinen zu nennen. Ansonsten werden Gele überwiegend in der klassischen Elektrophorese als Stabilisierungsgele eingesetzt, die allerdings nicht zur Trennung beitragen.

1.1.4 Cyclodextrine

Cyclodextrine spielen eine wichtige Rolle in der CE-Analytik. Sie werden hauptsächlich als Selektoren für chirale Moleküle eingesetzt. Strukturell handelt es sich um cyclische Oligosaccharide, in denen α -D-Glucopyranose-Moleküle α -(1 \rightarrow 4)-glykosidisch miteinander verbunden sind (s. Abb. 1.1-4, a). Sie entstehen durch enzymatische Hydrolyse von Stärke mittels Glucosyltransferasen [20] wie sie z.B. in *Bacillus macerans* vorkommen. Dabei bilden sich Gemische aus Verbindungen mit 6, 7 oder 8 Glucoseeinheiten, die als α -, β - oder γ -Cyclodextrine bezeichnet werden [21].

Die Anzahl der Glucoseeinheiten bestimmt die Größe der Kavität. Bedingt durch die C1-Sesselkonformation der Glucosemoleküle haben die Cyclodextrine die Form eines hohlen Kegelstumpfes (s. Abb. 1.1-4, b), dessen weitere Öffnung mit den sekundären Hydroxylgruppen an den Positionen 2 und 3 der Glucosemoleküle und dessen engere Öffnung mit den primären Hydroxylgruppen in Position 6 ausgestattet sind. Im Inneren der Kavität weisen die Cyclodextrine hydrophobe Eigenschaften auf, die Außenseite ist aufgrund der Hydroxylgruppen in den Positionen 2, 3 und 6 hydrophil. Dies hat zur Folge, dass viele verschiedene hydrophobe Verbindungen in diesem Hohlraum eingeschlossen und die von Molekül zu Molekül unterschiedlichen Wechselwirkungen analytisch genutzt werden können.

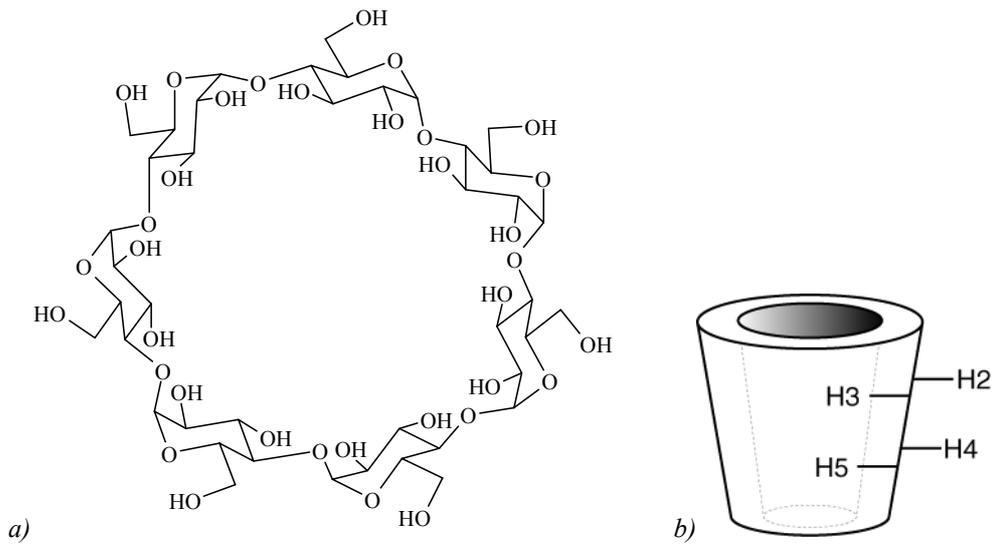


Abb. 1.1-4: Struktur des β -Cyclodextrins: a) Chemische Struktur, b) Kegelstumpfform nach [22]

1.1.5 pH-Wert

Um reproduzierbare Ergebnisse in der CE zu erhalten, ist eine sorgfältige Herstellung der Lösungen, besonders der Hintergrundelektrolyten, eines der wichtigsten Kriterien. Elektrophoretische Trennungen sind sehr stark vom pH-Wert abhängig, da dieser unmittelbar Einfluss auf die Mobilität des EOF's und der gelösten Analyten hat. Eine Abweichung von wenigen Zehntel pH-Einheiten kann zu einer Migrationszeitverschiebung von einigen Minuten führen. Somit kommt dem pH-Meter eine besondere Bedeutung zu und sollte dementsprechend sorgsam behandelt werden. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzte pH-Meter wurde jeweils durch ein integriertes automatisches Programm mit zwei IUPAC-Puffern (Zweipunktkalibrierung) kalibriert. Tabelle 1.1-1 zeigt die zur Kalibrierung der pH-Elektrode benutzten zertifizierten IUPAC-Puffer der Firma Radiometer Copenhagen.

Tabelle 1.1-1: Verwendete IUPAC-Kalibrierpuffer

Typ	Wert
pH 1.679	pH 1.679 \pm 0.010 bei 25 °C
pH 4.005	pH 4.005 \pm 0.010 bei 25 °C
pH 7.000	pH 7.000 \pm 0.010 bei 25 °C
pH 10.012	pH 10.012 \pm 0.010 bei 25 °C

1.2 Aminoglykosidantibiotika

1.2.1 Übersicht

Aminoglykoside sind Produkte der gezielten Suche nach einem wirksamen Arzneimittel

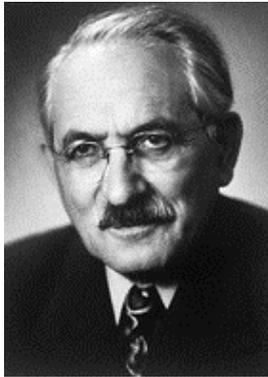


Abb. 1.2-1:
S.A. Waksman, geboren
am 22.07.1888 in
Priluka, Russland,
gestorben 1973.
Nobelpreis 1952

gegen die Tuberkulose (Tbc). Salman Abraham Waksman (s. Abb. 1.2-1¹) untersuchte von 1939-1943 systematisch im Erdboden vorkommende Actinomyceten. Aus diesen Pilzen wurden erfolgreich die ersten Aminoglykoside Actinomycin (1940), Clavacin (1942), Fumigacin (1943) und Streptothricin (1942) isoliert [23,24], die aber gegen Tbc aufgrund ihrer Toxizität nicht zum Einsatz kamen.

Die Geburtsstunde des Streptomycins war am 20. August 1943, als es aus *Actinomyces griseus* isoliert wurde. Die erste Veröffentlichung erschien im Januar 1944 [25]. Da mit Streptomycin (s. Abb. 1.2-2) eine neue Gruppe von wirksamen Arzneimitteln gefunden wurde, beschloss S.A. Waksman zusammen mit seinem Kollegen

Dr. Henrici die neue Spezies *Streptomyces* zu benennen. Aus *Actinomyces griseus* wurde somit *Streptomyces griseus* [26]. Aufgrund der schon

bald auftretenden Resistenzen und Nebenwirkungen, die vermutlich durch das toxische Nebenprodukt Dehydrostreptomycin verursacht wurden, bestand weiterhin Bedarf nach einem neuen effektiven Antibiotikum gegen die Tbc. Auch hier war es S.A. Waksman, der 1949 aus den von ihm schon 1915 entdeckten *Actinomyces fradii* (jetzt *Streptomyces fradiae*) ein

neues Aminoglykosid – das Neomycin - isolierte [27]. Zahlreiche Publikationen beschreiben die Entwicklung, Gewinnung, Reinigung und Potenz des neuen Aminoglykosids [z.B. 28,29]. Im Laufe der Zeit entwickelten sich allerdings auch gegen das Neomycin zahlreiche Resistenzen.

1952 bekam er den Nobelpreis für Physiologie und Medizin „für seine Entdeckung von Streptomycin, dem ersten effektiven Antibiotikum gegen die Tuberkulose“ [30]. Damit, so urteilt das Nobel-Komitee des Königlichen Karolinischen Medico-Chirurgischen Instituts

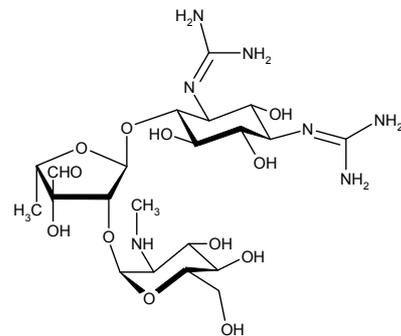


Abb. 1.2-2:
Strukturformel von Streptomycin

¹: Quelle: www.nobel.se

in Stockholm, ist eine von den zehn wichtigsten Entdeckungen gelungen, die die „Welt geprägt hat“ [30,31].

Im Jahr 1957 traten viele kritische Infektionen auf, da Staphylokokken und gram-negative Organismen resistent gegen alle bekannten Antibiotika waren [32].



Abb. 1.2-3:
Hamao Umezawa
(1914-1986)

In dieser Zeit wurde Kanamycin (Abb. 1.2-4) als weiteres Aminoglykosid von Hamao Umezawa (Abb. 1.2-3²) isoliert [33]. Das aus *Streptomyces kanamyceticus* gewonnene Aminoglykosid gleicht in seinem antibakteriellen Spektrum weitgehend dem Neomycin, hat aber den Vorzug der wesentlich geringeren Toxizität [34,35]. Es wurde deswegen bereits Mitte 1958 in den USA auf den Markt gebracht [36]. In dieser Zeit wurden sehr viele weitere Aminoglykoside entwickelt, u.a. auch das in dieser Arbeit aufgeführte Paromomycin, eine dem Neomycin verwandte Substanz.

Das belgische Patent dieser Substanz geht auf das Jahr 1956 zurück [37], die Markteinführung war dann im Jahr 1959 [38].

Das wichtigste Aminoglykosid neben dem Streptomycin ist Gentamicin (s. Abb. 1.2-6).

Marvin Weinstein (s. Abb. 1.2-5³), Mitarbeiter der Firma Schering-Plough in Madison, USA, isolierte 1963 die Substanz aus einer *Micromonospora*-Kultur [39]. Pharmakologische Untersuchungen ergaben, dass Gentamicin allen bisher entwickelten Aminoglykosiden überlegen ist und das Wachstum von 90 % aller bekannten Enterobakterien (*Proteus mirabilis*, indol-positive *Proteus vulgaris*, *morgani* und *rettegi* und weitere) hemmt [40,41].

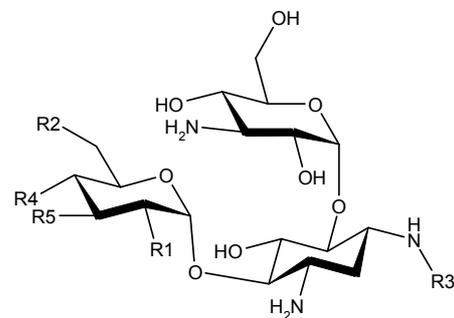


Abb. 1.2-4:
Allgemeine Strukturformel von Kanamycin

Das größte Problem in der Anwendung der Aminoglykoside waren und sind heute noch die auftretenden Resistenzen. Der Krankheitserreger der Tbc - *Mycobacterium tuberculosis* - stellte sich relativ schnell auf die „neuen“ Arzneistoffe ein. Hauptangriffspunkte im Aminoglykosid-Molekül sind die Amino- bzw. die Hydroxyl-Gruppen, die durch Kinasen

²: Quelle: www.pepnet.com

³: Quelle: www.depts.drew.edu



Abb. 1.2-5:
Marvin Weinstein

(O-Phosphotransferase, O-Adenyltransferase und N-Acetyltransferase) phosphoryliert, adenyliert oder acetyliert werden [42]. Dies führt zur Inaktivierung des Antibiotikums.

Um sowohl die zunehmenden Resistenzen gegen die bereits genannten Aminoglykoside in den Griff zu bekommen, als auch die bedenklichen Nebenwirkungen wie Oto- und Nephrotoxizität (s. auch Kapitel 1.2.3.2) zu reduzieren, wurde weiterhin nach neuen Aminoglykosiden gesucht. Zu dieser Gruppe der semi-synthetischen Aminoglykoside zählen Amikacin und Dibekacin, welche aus Kanamycin B hergestellt werden können. Weiterhin

kann Tobramycin, welches aus Kanamycin synthetisiert oder aus Streptomyces-Arten gewonnen wird und Netilmicin, welches aus Sisomicin durch Einfügen einer Ethyl-Gruppe synthetisiert werden kann [38], genannt werden. Mittlerweile kann Netilmicin auch fermentativ gewonnen werden [43].

Mit diesen neueren Aminoglykosiden konnte zwar das Nebenwirkungsrisiko gesenkt, die Resistenzentwicklung aber nicht aufgehalten werden.

1.2.2 Herstellung und Gewinnung

Alle oben aufgeführten Aminoglykoside werden aus Kulturfiltraten oder Fermentationslösungen verschiedener Mikroorganismen gewonnen. Im Laufe der Jahrzehnte sind verschiedene Arten und Methoden der Herstellung, Gewinnung und Reinigung beschrieben worden. Eine ausführliche Beschreibung soll in dieser Arbeit nicht vorgenommen werden. Tabelle 1.2-1 zeigt die oben genannten Aminoglykoside, die entsprechenden Mikroorganismen, aus denen sie produziert werden und die zugehörigen Literaturstellen [38].

Bei Betrachtung der vielen Aminoglykosid-Namen fällt die unterschiedliche Schreibweise der Endungen auf. Ihre Endsilben wurden ihnen aufgrund ihrer Herkunft zugeteilt. Substanzen, die von Streptomyces-Arten gebildet werden, haben die Endsilbe „mycin“, die von Micromonospora-Arten enden mit „micin“ [44].

1.2.3 Eigenschaften

1.2.3.1 Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften

Bei den Aminoglykosiden handelt es sich um Substanzen mit tri- oder tetrasaccharidartiger

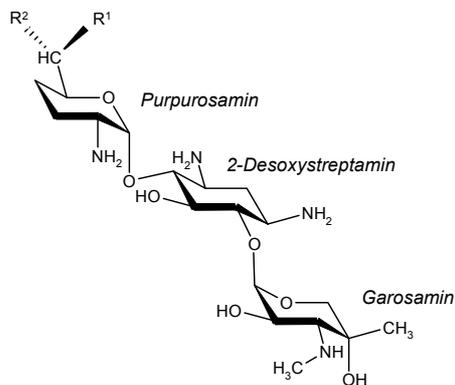


Abb. 1.2-6:
Allgemeine Strukturformel von Gentamicin

Struktur, die als gemeinsamen Bestandteil Streptomycin oder einen ähnlichen zyklischen Aminoalkohol haben, der mit zwei Aminozuckern glykosidisch verbunden ist (s. Abb. 1.2-7). Sie sind wasserlösliche, hitze-, säure- und basenstabile, polare Substanzen. Ihre Löslichkeit in Methanol ist begrenzt, und sie sind praktisch unlöslich in hydrophoben organischen Lösungsmitteln. Die Anzahl der Aminogruppen variiert von vier in Kanamycin bis zu sechs in Neomycin. Die pK_s-Werte der

Aminogruppen bewegen sich zwischen 7.0 und 8.8. In wässrigen Lösungen mit physiologischem pH-Wert sind Aminoglykoside deshalb aufgrund ihrer Aminogruppen positiv geladen [45]. Das „Ur“-Aminoglykosid Streptomycin und die in dieser Arbeit behandelten Aminoglykoside Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Paromomycin, Amikacin, Netilmicin, Sisomicin und Tobramycin sind in Abb. 1.2-7 bis Abb. 1.2-9 dargestellt.

Tabelle 1.2-1: Die wichtigsten Aminoglykoside

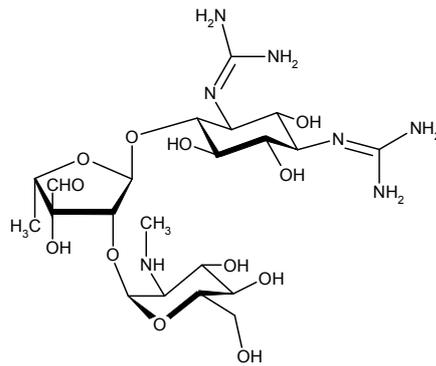
Aminoglykosid	Mikroorganismus	Entdecker und Jahr	Lit.
Gentamicin	<i>Micromonospora purpurea</i> und <i>M. echinospora</i>	Schering-Plough, 1963	[37,39]
Sisomicin	<i>M. inyoensis</i>	Schering-Plough, 1970	[46]
Netilmicin	<i>M. olivoasterospora</i> ^a	2000	[43]
Kanamycin	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Umezawa, 1957	[33,47]
Neomycin	<i>S. fradiae</i> und <i>S. albogriseolus</i>	Umezawa und Waksman, 1949	[28,29]
Paromomycin	<i>S. rimosus ssp. paromomycinus</i> ^b	Parke Davis, 1959	[48,49]
Tobramycin	<i>S. tenebrarius</i> ^c	Eli Lilly, 1967	
Streptomycin	<i>S. griseus</i> ^b	Waksman und Schatz, 1944	[23,24]

^a Herstellung ursprünglich aus Sisomicin [38]

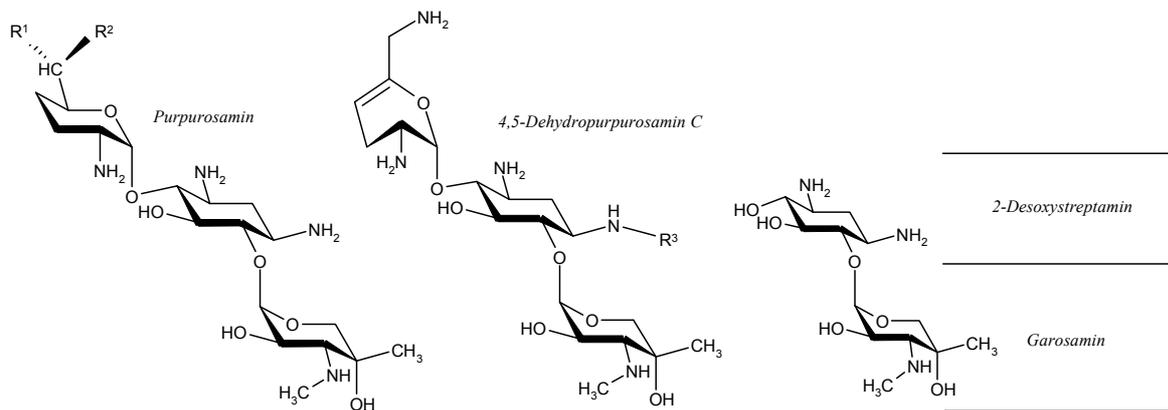
^b Die Produktion ist auch aus einigen anderen Stämmen möglich [32]

^c Die Herstellung aus Kanamycin A ist ebenso möglich [38]

Streptomycin



Gentamicin-Gruppe



Gentamicin

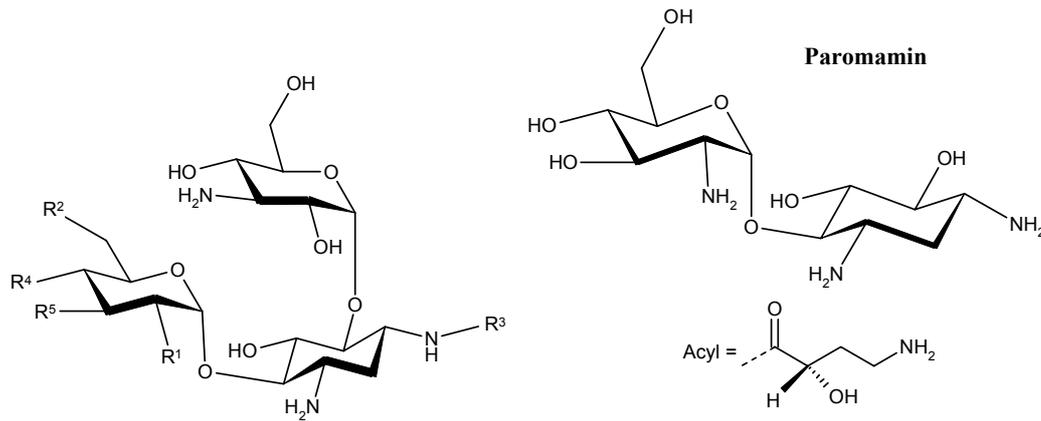
 $R^3 = \text{H} : \text{Sisomicin}$
 $R^3 = -\text{CH}_2-\text{CH}_3 : \text{Netilmicin}$

Garamin

	R^1	R^2
Gentamicin-C1	NH-CH ₃	CH ₃
Gentamicin-C1a	NH ₂	H
Gentamicin-C2	NH ₂	CH ₃
Gentamicin-C2a	CH ₃	NH ₂
Gentamicin-C2b	NH-CH ₃	H

Abb. 1.2-7: Chemische Strukturen von Streptomycin, Gentamicin und deren verwandten Aminoglykosiden

Kanamycin



	R¹	R²	R³	R⁴	R⁵
Kanamycin A	OH	NH ₂	H	OH	OH
Kanamycin B	NH ₂	NH ₂	H	OH	OH
Kanamycin C	NH ₂	OH	H	OH	OH
Amikacin	OH	NH ₂	Acyl	OH	OH
Dibekacin	NH ₂	NH ₂	H	H	H
Tobramycin	NH ₂	NH ₂	H	OH	H

Neomycin

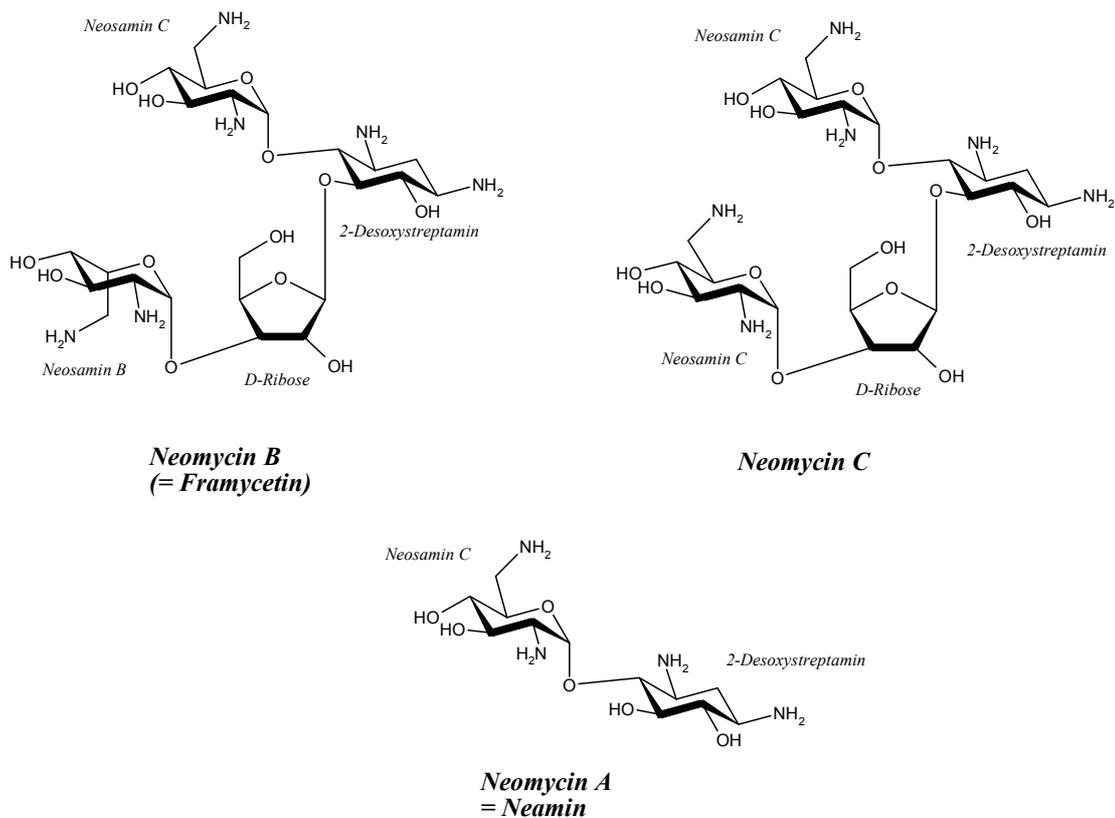


Abb. 1.2-8: Chemische Strukturen von Kanamycin, Neomycin und deren verwandten Aminoglykosiden

Paromomycin

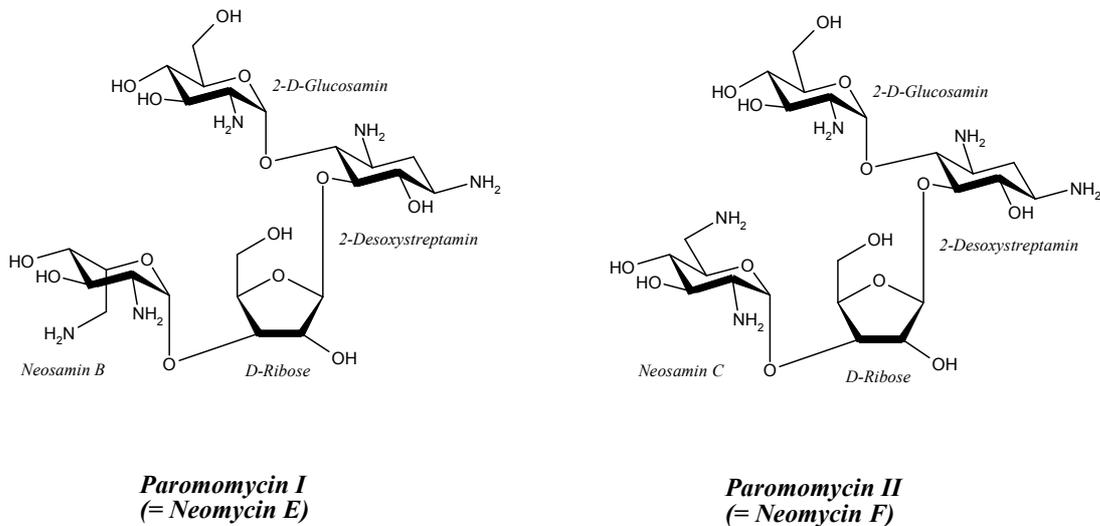


Abb. 1.2-9: Chemische Strukturen von Paromomycin

1.2.3.2 Pharmazeutische Anwendung

Das erste klinisch verwendete Aminoglykosid Streptomycin spielt heute nur noch in der Tuberkulose-Therapie eine Rolle. Die anderen älteren Aminoglykoside (Neomycin, Paromomycin, Kanamycin, Framycetin) werden wegen ihrer Neurotoxizität und dem häufigen Auftreten von Resistenzen heute sehr selten systemisch verabreicht. Ihre Anwendung beschränkt sich auf topische Behandlungen, z.B. durch Salben, Tropfen und Puder. Die neueren Aminoglykoside (Gentamicin, Tobramycin, Netilmicin, Amikacin) sind bei schweren Infektionen (vor allem bei Abwehrschwäche) weiterhin unentbehrlich [44]. Bei leichteren Infektionen, wie z.B. im Harnwegs- oder Nierenbereich, werden Monopräparate eingesetzt. Bei schweren Infektionen, wie z.B. einer bakteriellen Endocarditis (Herzinnenhautentzündung), Sepsis (Blutvergiftung) oder einer Pneumonie (Lungenentzündung) kommen Aminoglykoside in Kombination mit Penicillinen zum Einsatz [50]. Die therapeutische Breite der Aminoglykoside ist allerdings gering.

Sie werden weder in nennenswertem Maße an Plasmaproteine gebunden, noch werden sie metabolisiert. Aus dem Blut werden sie renal durch glomeruläre Filtration eliminiert [51].

Wirkungsmechanismus: Die Aminoglykoside stören primär die ribosomale Proteinsynthese in der Bakterienzelle. Durch Anreicherung in der Bakterienzelle binden sie irreversibel an die 30S-Untereinheit der Ribosomen und blockieren dadurch die Bindung von

N-Formylmethionin-tRNA. Außerdem unterbleibt die Verlängerung der begonnenen Peptidkette, da auch andere Aminoacyl-tRNA nicht angelagert werden. Weiterhin werden durch Bindung der Aminoglykoside an die Ribosomen Ablesefehler bei der Translation hervorgerufen und dadurch falsche Enzym- und Strukturproteine (sog. „Nonsense“-Proteine), die irreversible Membranschäden auslösen, gebildet [52]. Da Anaerobier Aminoglykoside nicht anreichern, sind diese resistent.

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW): Die in dieser Arbeit schon öfter angesprochene Gefahr der Oto- und Nephrotoxizität ist abhängig von der Behandlungsdauer zu betrachten. Die Gefahr dieser UAW betrifft in erster Linie Patienten, die über einen längeren Zeitraum mit Aminoglykosiden behandelt werden oder schon vor der Behandlung Schäden am Innenohr oder der Niere hatten.

Durch den aktiven Transport der Aminoglykoside (und nicht passiv durch Diffusion) kommt es zu einem Sättigungsprozess in der betroffenen Zelle (z.B. im proximalen Tubulus der Nierenrinde). Bei einem Überschreiten der Sättigungskonzentration wird das Antibiotikum nicht vermehrt aufgenommen. Dadurch hat eine einmalige Gabe einer hohen Konzentration am Wirkort geringere schädliche Folgen als eine dreimalige Gabe einer geringeren Konzentration. Weiterhin ist nach Gabe eines Aminoglykosides ein Phänomen zu beobachten, welches „transistorische Resistenz“ genannt wird: Die einmalige Einnahme des Antibiotikums führt zu einer Wachstumshemmung der Bakterienzelle für ca. 6-8 Stunden. Eine rasch folgende zweite Gabe hat wesentlich geringere Auswirkung auf die Bakterienzelle, falls diese die erste Gabe überlebt hat. Aufgrund beider Effekte ist die heutige Praxis einer Einmalgabe der Aminoglykosid-Tagesdosis statt der Verteilung der Dosis auf drei Einzelgaben zu verstehen, was einem Off-label-use gleichkommt.

Da Aminoglykoside nur sehr langsam aus z.B. den Tubuluszellen eliminiert werden, besteht auch bei vorangegangener Aminoglykosid-Therapie (innerhalb 6 Wochen) ein erhöhtes Risiko für toxische Wirkungen. Die im speziellen oftmals genannte Nephrotoxizität beruht auf der Einschleusung der Aminoglykoside in die proximalen Tubuluszellen und die dortige Akkumulation. Die dadurch induzierte (meist reversible) Nierenfunktionseinschränkung verlangsamt die weitere Ausscheidung und führt somit zur Schädigung. Die gleichzeitige Einnahme weiterer Arzneimittel, wie z.B. Furosemid, bestimmter Immunsuppressiva oder bestimmter Antibiotika verstärken diesen Effekt.

Der Wirkmechanismus der auftretenden Ototoxizität ist nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, dass es in den Haarzellen beim Aminoglykosid-Übertritt zum irreversiblen Ver-

lust der Sinneshärchen kommt. Dies induziert Gleichgewichtsstörungen und einen im Hochtonbereich beginnenden Hörverlust. Neben diesen beiden am häufigsten vorkommenden UAWs kann es auch zur Bildung neuromuskulärer Blockaden kommen, die durch lokale Anwendung konzentrierter Aminoglykosid-Lösungen provoziert werden können [51].

Weitere Anwendungsgebiete: Trotz dieser bekannten Nebenwirkungen sucht man nach weiteren Anwendungsgebieten für Aminoglykoside. Sie haben neben ihrer antibiotischen Aktivität auch die Eigenschaft, die Stopp-Codons auf der mRNA für die tRNA lesbar zu machen und somit die Proteinsynthese nicht abbrechen zu lassen. Dies erwies sich als sehr nützlich bei verschiedenen Erkrankungen, die durch eine Mutation der DNA und somit eine falsche Information auf der mRNA ausgelöst wurden.

Es wurde entdeckt, dass Gentamicin erfolgreich gegen die Mukoviszidose („cystic fibrosis“) eingesetzt werden kann [53]. Bei der Mukoviszidose handelt es sich um einen Enzymdefekt auf Chromosom 7. Dies hat zur Folge, dass das Regulatorenzym des Chlorid-Transports (CFTR – Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator) durch die Zellmembran des respiratorischen Systems nicht ausreichend gebildet oder in der Art gebildet wird, dass die Funktion irreversibel gestört ist. Das aus dem Gen hergestellte Protein/Enzym (CFTR-Protein) reguliert die Leitfähigkeit einer biologischen Membran: An der Oberfläche von Körperzellen befinden sich Kanäle (Regulatoren), durch die Salze und Wasser und damit auch elektrische Ströme fließen. Bei cystischer Fibrose ist der Salz- und Wassertransport und folglich der Stromfluss gestört. Die Veränderungen im CFTR-Protein führen dazu, dass zäher Schleim eine Reihe lebenswichtiger Organe verstopft. Davon sind vor allem Lunge, Bauchspeicheldrüse, Leber und Darm betroffen. Der Schleim in der Lunge bietet außerdem einen hervorragenden Nährboden für Bakterien.

Die Krankheitsursache liegt in der Ablesung des fehlerhaften Codons auf der mRNA. Aminoglykoside können das Ablesen der fehlerhaft eingebauten „Nonsense“-Codone (= Stopp-Codone) durch die tRNA erreichen und somit die Fortsetzung der Protein-Translation zum regulären Ende des Gens ermöglichen. Das hat zur Folge, dass mehr CFTR-Protein produziert wird und somit mehr Chlorid-Kanäle vorhanden oder in Funktion sind. Die damit verbundene Erhöhung des Wasseranteils und dadurch bedingte Verflüssigung des Schleims trägt schließlich zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes bei. Der genaue molekulare Mechanismus konnte aber bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden [53].

Gentamicin wird auch in der Hurler-Syndrom-Forschung eingesetzt [54]. Das Hurler-Syndrom ist eine sich ab dem 1. Lebensjahr manifestierende, autosomal-rezessive, erbliche Mucopolysaccharidose mit Ablagerungen von Dermatan- und Heparansulfat in Mesenchym- und Ganglienzellen. Der primäre Enzymdefekt betrifft die α -L-Iduronidase der Lysosomen, welche auf dem sog. „IDUA-Gen“ codiert ist. Folgen sind z.B. geistige Retardierung, aber auch physische Veränderungen, wie disproportionierter Minderwuchs, großer, plumper Schädel mit eingezogener Nasenwurzel und wulstigen Lippen (sog. „Wasserspeigeresicht“, „Gargoylismus“), kurzer Hals u.a. Durch Gentamicin erhofft man sich, die fehlerhaft eingebauten Stopp-Codone des IDUA-Gens zu unterdrücken, die m-RNA somit wieder lesbar zu machen und damit die Ausbildung der α -L-Iduronidase zu fördern.

Sehr große Erfolge verspricht man sich weiterhin vom Einsatz der Aminoglykoside zur Behandlung der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) [55,56,57,58]. Auslöser dieser Krankheit ist die fehlerhafte bzw. nicht stattfindende Ausbildung des Dystrophin-Proteins durch eine Nonsense-Mutation auf dem das Dystrophin codierende Gen der DNA. Das Dystrophin wird für die Funktion der Muskeln benötigt [59]. Der Wirkmechanismus gleicht dem oben Beschriebenen.

In neueren Untersuchungen versucht man die toxische Komponente von Gentamicin zu identifizieren und auszuschalten. Man testet die Einzelsubstanzen des Gemisches, die alle eine mehr oder weniger unterschiedlich antibiotische Potenz haben, aber auch unterschiedliche Stopp-Codon-reduzierende Eigenschaften haben sollen. Voraussetzung für genaue Zuordnung der Toxizitäten ist die Trennung der jeweiligen Aminoglykosid-Gemische in ihre Einzelfractionen.

1.2.4 Analytik von Aminoglykosiden

1.2.4.1 Überblick

Mit der Entdeckung der Aminoglykoside 1943 begann auch die Entwicklung verschiedener Analysemethoden. Dies erwies sich als schwierig, da es sich bei diesen Arzneistoffen aufgrund ihrer Herstellung immer um Gemische verschiedener Substanzen mit sehr ähnlicher Struktur handelt.

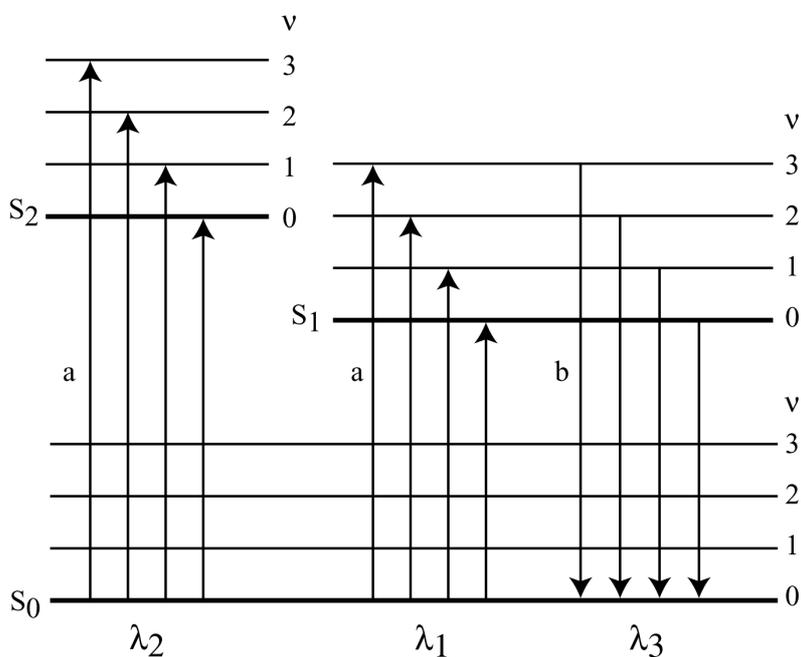
Erste brauchbare chromatographische Verfahren wurden 1948 veröffentlicht [60]. Mit Hilfe der Papierchromatographie (PC) wurde ein Streptomycin-Gemisch analysiert. Allerdings konnten mit dieser Methode keine Nebenprodukte erfasst werden, da die Flecken sehr groß und unförmig waren. Erst 1966 wurde von H. Heding eine PC-Methode entwickelt, bei der auch Streptomycin-Nebenprodukte, wie z.B. Streptidin, Hydroxystreptomycin, Dihydrostreptomycin und Mannosidostreptomycin erkennbar waren [61]. Zuvor wurden aber auch für alle weiteren Aminoglykoside papierchromatographische Methoden entwickelt, wie z.B. 1959 für Kanamycin [62] und 1968 für Gentamicin [63]. Gleichzeitig ging man aber immer mehr dazu über, die Dünnschichtchromatographie (DC) einzusetzen, da man mit ihr bessere Auftrennungen erhielt und vor allem die Analysenzeiten wesentlich kürzer waren. Bestes Beispiel ist hierfür die Auftrennung des Gentamicins von H. Maehr et al. [64] oder von G.H. Wagman et al. [63]. Ende der 60er Jahre setzte man die Gaschromatographie (GC) als geeignetes Trennsystem ein. Die Trennungen von Neomycin [65] und Kanamycin [66] in ihre Bestandteile wurden 1969 und 1970 von K. Tsuji et al. vorangetrieben. Paromomycin wurde 1978 von J.W. Mayhew et al. bearbeitet [67]. Aber diese Methoden führten nicht immer zu einer Basislinientrennung der untersuchten Komponenten. Außerdem konnten sehr kleine Mengen an Verunreinigungen auch mit diesen Methoden nicht erfasst werden. Dennoch boten sie den Vorteil der besseren Quantifizierung gegenüber der DC. Ende der 70er Jahre begann das Zeitalter der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) im Zusammenhang mit Aminoglykosiden. Die ersten Applikationen wurden 1977 über Gentamicin nach Serum-Extraktion veröffentlicht [68,69,70]. Für alle weiteren Aminoglykoside wurden in den folgenden Jahren HPLC-Methoden entwickelt. Erst 1985 wurde eine HPLC-Methode für das „Ur-Aminoglykosid“ Streptomycin veröffentlicht [71]. Dies unterstreicht deutlich das Gewicht von Gentamicin unter den Aminoglykosiden. Die HPLC-Aminoglykosid-Analytik wurde bis heute in zahlreiche Reviews zusammengefasst (z.B. [72]). Im Zuge der fortschreitenden Entwicklung hielt auch die CE Anfang der 90er Jahre Einzug in die Aminoglykosid-Analytik. Ackermans et al.

veröffentlichte 1992 als einer der Ersten eine MEKC-Methode mit indirekter Detektion (HGE bestehend aus Imidazol, CTAB und „FC 135“), die 13 Aminoglykoside trennte [73]. Seit diesem Zeitpunkt wird die CE neben der HPLC zur Analytik der Aminoglykoside eingesetzt.

1.2.4.2 Detektion

In den meisten modernen industriellen und forschenden Analytik-Abteilungen ist bei chromatographischen und elektrophoretischen Methoden der Gebrauch von UV/VIS-Detektoren Standard. Nur wenige Stoffe werden elektrochemisch, fluorimetrisch oder mit anderen Detektoren quantifiziert.

UV/VIS: Grundvoraussetzung für eine UV/VIS-Detektion ist das Vorhandensein oder die Schaffung eines chromophoren Systems im Molekül. Unter einem chromophoren System in einem Molekül versteht man anregbare π - und n-Elektronen. Dies wird im Jablonski-Termschema veranschaulicht (s. Abb. 1.2-10). Die Elektronen, die sich im Grundzustand



auf dem Energieniveau S_0 befinden, werden durch ν Energiezufuhr mittels UV-Licht (λ_1) in einen „angeregten“ Zustand, d.h. in ein leeres, antibindendes Orbital mit höherer Energie S_1 , oder bei höherer Energiezufuhr in Form von kürzeren Wellenlängen (λ_2) in S_2 , überführt (s. Abb. 1.2-10, a). Die bindenden σ - und π -Elektronen werden in die jeweils antibin-

Abb. 1.2-10: Vereinfachtes Jablonski-Termschema

denen Zustände σ^* und π^* angeregt. Die nicht bindenden n-Elektronen können sowohl $n \rightarrow \sigma^*$ - als auch $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge ausführen. Die Rückkehr nach S_0 erfolgt meist durch

strahlungslose Inaktivierung (λ_3), d.h. durch Umwandlung der Elektronenenergie in Wärmeenergie (s. Abb. 1.2-10, b).

Der Übergang der oben beschriebenen n-Elektronen ist in sofern erstaunlich, da es sich eigentlich um einen Elektronenübergang handelt, der nur mit geringer Wahrscheinlichkeit eintritt. Ein Übergang dieser Art wird auch als *verboten* bezeichnet. Verbotene Elektronenübergänge sind theoretische Übergänge, die innerhalb eines Moleküls nicht erlaubt sind. Bemerkenswert in der UV-Spektroskopie ist, dass unter bestimmten Umständen diese Verbote durchbrochen werden, so dass in diesen Fällen trotzdem Absorptionsbanden gemessen werden. Diese sind von geringer Übergangswahrscheinlichkeit, zeigen daher meist eine geringere Intensität. Das Spin-Verbot (*Interkombinationsverbot*) verbietet den Übergang von Singulett (antiparalleler Elektronenspin)- in Triplett (paralleler Elektronenspin)-Zustände. In diesen Triplett-Zustand können Elektronen theoretisch durch energielose Spinumkehr in die etwas energieärmeren Triplett-Zustände übergehen, bevor sie in den Grundzustand S_0 unter Spinumkehr zurückkehren (Phosphoreszenz). Von einem *Überlappungsverbot* (Raumverbot) spricht man, wenn die beteiligten Orbitale sich nicht oder nicht genügend überlappen. Das *Symmetrieverbot* verbietet den Übergang von Elektronen gleicher Symmetrie.

π -Elektronen von Doppel- oder Dreifachbindungen sind mit UV-Licht relativ leicht anzuregen. Wenn sie in Konjugation stehen, wird die zur Anregung eines solchen „konjugierten π -Elektronensystems“ notwendige Energie noch kleiner. n-Elektronen sind sogar noch einfacher durch VIS- oder UV-Licht anzuregen. Zur Anregung von σ -Elektronen reicht die Energie des sichtbaren und UV-Lichtes nicht aus. Die Anregungswellenlängen liegen im Bereich von 160 – 200 nm. Daher trägt z.B. das gesättigte Kohlenwasserstoffgerüst eines Moleküls zur Lichtabsorption in diesem Bereich nur in untergeordnetem Maße bei.

Fluoreszenz: Als weitere Detektionsmethode findet auch die Fluoreszenzdetektion Anwendung. Die Begriffe Fluoreszenz und Phosphoreszenz fasst man auch unter dem Oberbegriff Photolumineszenz zusammen, da die Anregung durch Absorption eines Photons erfolgt. Bei der Fluoreszenz findet die Umwandlung der Elektronenanregungsenergie in Lichtenergie unter Emission von Fluoreszenzlicht statt. Erklären kann man die Fluoreszenz wiederum mit Hilfe des Jablonski-Termschemas in Abb. 1.2-11: In Molekülen, die zur Fluoreszenz befähigt sind, verläuft die Rückkehr der Elektronen in den Grundzustand nach einem anderen Mechanismus als beim UV/VIS-Ablauf. Sie fallen zunächst strahlungslos in den Schwingungszustand $v = 0$ des Anregungszustandes S_1 . Erst von hier erfolgt der Über-

gang in die verschiedenen Schwingungszustände ($v = 0, 1, 2$ usw.) des Grundzustandes S_0 unter Aussendung des Fluoreszenzlichtes.

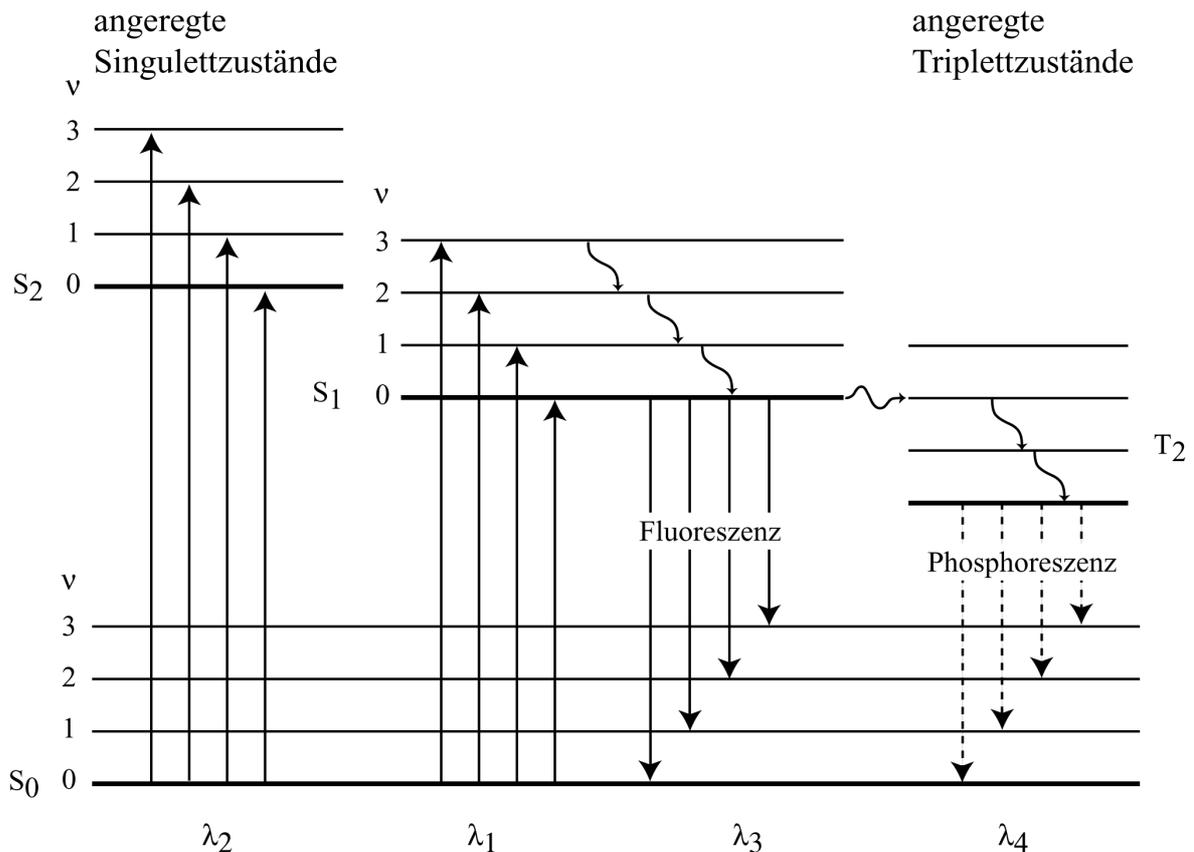


Abb. 1.2-11: Jablonski-Termschema der Fluoreszenz und Phosphoreszenz

Im Gegensatz zur Phosphoreszenz tritt Fluoreszenz nur während oder unmittelbar nach der Anregung des Elektronensystems auf. Sie ist wegen der Schnelligkeit (10^{-5} s) der ohne Spin-Umkehr verlaufenden Elektronenübergänge mit der Lichteinstrahlung beendet. Die Spin-Umkehr der Phosphoreszenz Singulett \rightarrow Triplett \rightarrow Singulett beansprucht dagegen mehr Zeit. Deshalb dauert die Phosphoreszenz nach Beendigung der Anregung noch messbar an (10^{-2} s bis mehrere Stunden).

Anhand der Strukturen der Aminoglykoside fällt auf, dass sie keine oder nur vernachlässigbar wenige (Sisomicin) π - oder n-Elektronen besitzen. Diese Eigenschaft hat zur Folge, dass sie ohne weiteres nicht mit einem UV/VIS- bzw. Fluoreszenz-Detektor detektiert werden können.

Für Analyten, die kein chromophores oder fluorophores System haben, gibt es andere Möglichkeiten zur Detektion. Eine Besonderheit in der CE stellt die indirekte UV/VIS-Detektion dar. Bei ihr wird dem Elektrolyten eine Substanz zugesetzt, die selbst UV-Licht zu adsorbieren vermag. Sie muss ähnliche Mobilitäten besitzen wie die zu trennende

Probe. Die Signale erscheinen als „negative Peaks“ im Elektropherogramm, da zum Detektionszeitpunkt des Analyten die UV-Absorption im Detektionsfenster der Kapillare sinkt. Mit diesen Detektionsverfahren können allerdings nur relativ hohe Bestimmungsgrenze von 10-30 µg/ml [73] erzielt werden. Vorteil der Methode ist, dass Analyten im extrem niedrigen Wellenlängenbereich (< 195 nm) verbunden mit Tetraborat-Komplexbildung mit dem UV/VIS-Detektor detektiert werden können [74,75].

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Moleküle mit bestimmten Reagenzien zu derivatisieren. Hierzu benutzt man Reagenzien, die selbst chromophore oder fluorophore Gruppen beinhalten, um eine UV/VIS- oder Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen.

1.2.4.3 Derivatisierung

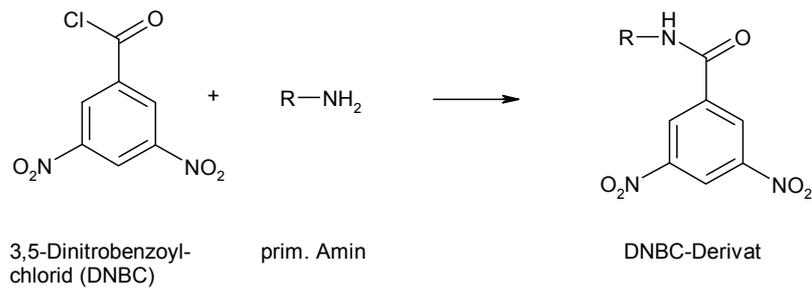
Wie bereits erwähnt fehlt allen Aminoglykosiden ein ausgeprägtes chromophores System (s. Kapitel 1.2.4.2). Deshalb muss der Analyt derivatisiert werden, um mit UV/VIS- oder Fluoreszenz-Detektoren erfasst werden zu können. Als Kopplungs-Gruppe an den Aminoglykosiden kommen die freien Hydroxylgruppen oder auch die primären und sekundären Aminogruppen in Frage.

Die gebräuchlichsten Derivatisierungsreagenzien sind in Tabelle 1.2-2 aufgelistet und werden im Folgenden besprochen:

Tabelle 1.2-2: Derivatisierungsreagenzien zur Erfassung von Aminoglykosiden mittels UV/VIS-Detektion

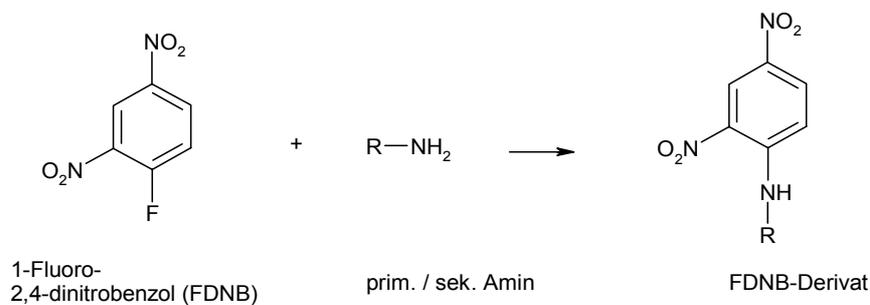
UV-Derivatisierungsreagenz	Aminoglykosid	Literatur
3-Fluordinitrobenzoylchlorid (DNBC)	Gentamicin	[76, 77, 78]
1-Fluordinitro-2,4-dinitrobenzol (FDNB)	Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Paromomycin, Sisomicin, Tobramycin	[79,80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87]
Ninhydrin	Kanamycin, Neomycin, Paromomycin	[63, 64, 88, 89]
Naphthalinsulfonylchlorid (NSCI)	Gentamicin, Kanamycin, Neomycin	[90, 91]
o-Phthaldialdehyd (OPA)	Gentamicin, Netilmicin, Paromomycin	[92, 93, 94, 95, 96, 97, 98]
2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)	Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Sisomicin, Tobramycin	[99, 100, 101, 102, 103]

3,5-Dinitrobenzoylchlorid (DNBC):



Sowohl Benzoylchlorid, *p*-Nitrobenzoylchlorid als auch DNBC wurden in einigen Veröffentlichungen im Bereich der Aminoglykosidanalytik mittels HPLC als Reagenzien zu Nachsäulen-Derivatisierungen verwendet. Ketamin und Serotonin wurden z. B. mit dem DNBC-Reagenz bestimmt [76,77]. Da dieses Reagenz sehr gut wasserlöslich ist, wurde es auch gerne bei gut wasserlöslichen Arzneistoffen eingesetzt. Für die Anwendung an Gentamicin war allerdings von Nachteil, dass in der beschriebenen Methode ein unidentifizierter Peak im Chromatogramm auftauchte, der zusätzlich mit Gentamicin-C1a koeluierte [78].

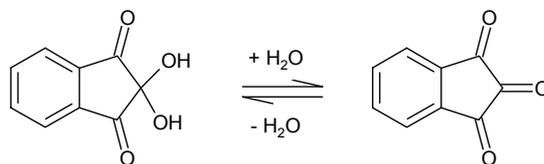
1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol (FDNB):



Das 1945 von F. Sanger entwickelte FDNB [104,105] reagiert im basischen Milieu mit primären und sekundären Aminen zu Anilinderivaten. Der für eine nukleophile Substitution aktivierte Aromat wird vom Amin angegriffen und bildet nach Freisetzung von Fluorwasserstoff ein farbiges Produkt. Sein UV-Maximum liegt bei 365 nm. An Aminoglykosiden (Tobramycin, Sisomicin) wurde Sangers-Reagenz (FDNB, auch DNFB) erstmalig 1981 erprobt [83] und seitdem bei zahlreichen weiteren Aminoglykosiden angewendet. Das Hauptproblem von FDNB ist seine schlechte Wasserlöslichkeit und seine Toxizität. Die Proben müssen immer geringe Mengen organisches Lösungsmittel enthalten, um FDNB in Lösung halten zu können. Außerdem reizt FDNB die Haut und kann eine blasenbildende

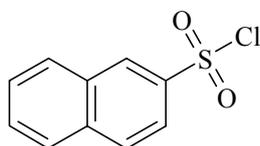
Dermatitis verursachen. Die Absorption durch Inhalation, Nahrungsaufnahme oder direkt durch die Haut kann tödlich sein [38].

Ninhydrin:



Ninhydrin stellt ein klassisches Derivatisierungsreagenz für primäre Amine, besonders für Aminosäuren dar. Viele Prüfungen auf primäre Amine der Arzneibücher werden mit diesem Reagenz durchgeführt. Es wird sowohl im Arzneibuch als auch in vielen Literaturstellen ausschließlich zur Detektion dünnschicht- oder papierchromatographischen Methoden eingesetzt. In der HPLC- oder CE-Analytik spielt Ninhydrin kaum eine Rolle, da die erhaltenen Derivate nicht genügend stabil sind.

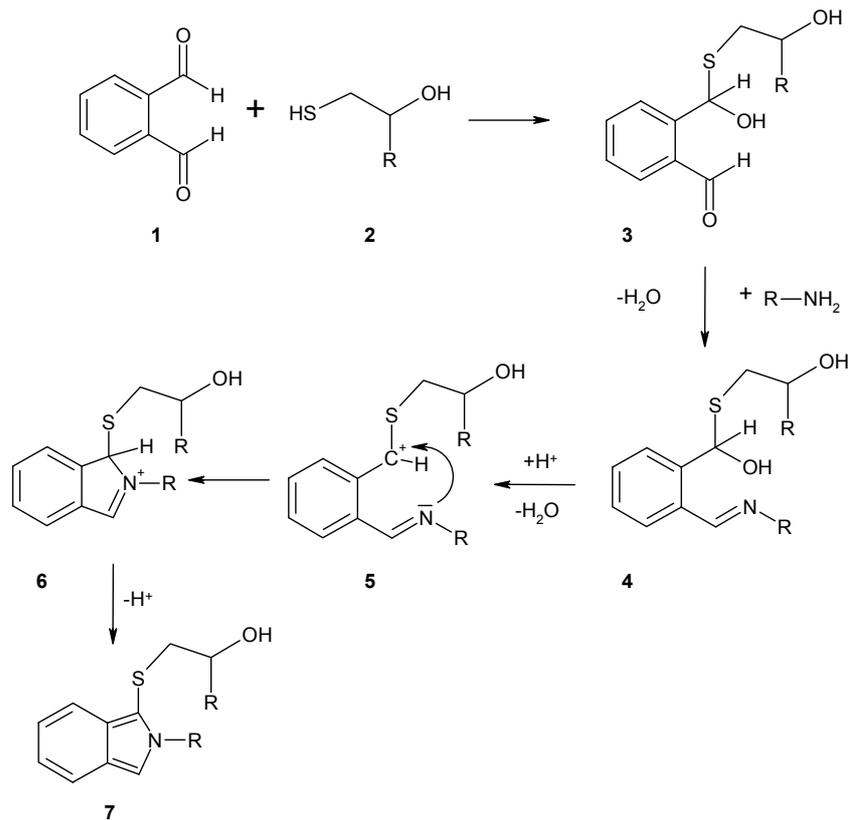
2-Naphthalinsulfonylchlorid (NSCl):



NSCl bildet mit Hydroxyl- und sekundären Aminogruppen Ester bzw. Amide. Die entstehenden Derivate absorbieren UV-Licht bei 254 nm. Bislang sind nur wenige Aminoglykoside mit NSCl derivatisiert worden. Als optimale Reaktionsbedingungen dienten Phosphatpuffer (pH 8.0-9.0) und eine Derivatisierungstemperatur von 100 °C für 10 Minuten [90,91]. Die hohe Derivatisierungstemperatur ist insbesondere für nicht stabile Arzneistoffe von Nachteil, da sich während der Derivatisierung leicht Abbauprodukte bilden können.

o-Phthaldialdehyd (OPA):

Das gebräuchlichste Derivatisierungsreagenz für primäre Aminogruppen ist OPA, welches mit einem Alkanthiol oder einem anderen stark reduzierenden Reagenz unter basischen



Bedingungen ein fluoreszierendes Derivat bildet. In Verbindung mit einem entsprechenden Mercaptan ist es aber auch mit UV-Detektoren detektierbar. Sehr vorteilhaft sind die schnelle Reaktionsgeschwindigkeit von OPA (Minuten) und die mögliche Anwendung im wässrigen Milieu. Allerdings sind OPA-Derivate nicht sehr stabil und sollten direkt nach der Derivatisierung vermessen werden. Da OPA selbst nicht fluoresziert, wird es oft für fluorimetrische Bestimmungen verwendet.

Als UV-absorbierendes bzw. fluoreszierendes Produkt dieser oben gezeigten Dreikomponenten-Reaktion (**1** + **2** + Amin) entsteht ein 1-Alkylthio-2-alkyl-isoindol (**7**). Dabei reagiert zunächst eine Aldehydgruppe von **1** mit dem nukleophileren Thiol **2** bzw. Anion **2** bei pH 10 zum Thioacetal **3**. Nun kondensiert das nachzuweisende primäre Amin mit der verbleibenden Aldehydgruppe zum Azomethin **4**. Nach Wasserabspaltung aus **4** resultiert das Carbokation **5**, bei dem das freie Elektronenpaar des Iminstickstoffes reagiert und das Isoindol-Kation **6** erzeugt. Nach Deprotonierung geht **6** in das UV-aktive oder fluoreszierende Isoindol **7** über.

Diese Verbindung zeigt ein Absorptionsmaximum bei ca. 330 nm (je nach R). Da in früheren Zeiten nicht bei allen UV/VIS –Detektoren die Wellenlängen frei wählbar waren, sondern nur einzelne Filter benutzt werden konnten, sind in der Literatur verschiedene Wellenlängen beschrieben, mit denen einzelne Verbindungen vermessen wurden. Bisher wurden Wellenlängen von 330 nm [93], 340 nm [106], 350 nm [92] und auch 254 nm [80]

angewendet. Die meisten Untersuchungen sind mit Fluoreszenzdetektion gemacht worden. Als Anregungswellenlänge wurde 340 nm, als gemessene Emissionswellenlänge 418 nm [70,107], 430 nm, 440 nm [108], 450 nm [109,110], 448 nm oder auch 455 nm [111,112,113] benutzt. Als weitere Anregungs-/Emissionswellenlängen wurden auch 350/430 nm, 360/450 nm [107] und 365/440 nm verwendet.

Als starke Reduktionsmittel werden üblicherweise Alkanthiole wie Mercaptoethanol, Mercaptoessigsäure oder 3-Mercaptopropionsäure (auch Thioglykolsäure), aber auch *N*-Acetylcystein, 2-Thioglycerol oder 1-Mercapto-2-propanol genutzt [97,114,]. Da die Mercaptoethanol-Derivate erwiesenermaßen weniger stabil sind als z.B. Mercaptopropionsäure-Derivate, werden sie oft zur Nachsäulenderivatisierung eingesetzt, d.h. das Aminoglykosid wird erst getrennt, danach derivatisiert und anschließend durch den Detektor geleitet [38]. Bei den etwas stabileren Mercaptopropionsäure-Derivaten ist eine Vorsäulenderivatisierung leichter zu handhaben. Hauptvorteil der Fluoreszenzdetektion bei einer OPA-Derivatisierung ist die Eigenschaft des Reagenz OPA nicht zu fluoreszieren und somit keine Störpeaks zu verursachen. Im Gegensatz dazu ist bei der Messung mit einem UV/VIS-Detektor im Elektropherogramm ein OPA-Peak zu erwarten, da OPA im Absorptionsmaximum der zu analysierenden Derivate bei 330 nm ebenfalls absorbiert.

2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS):

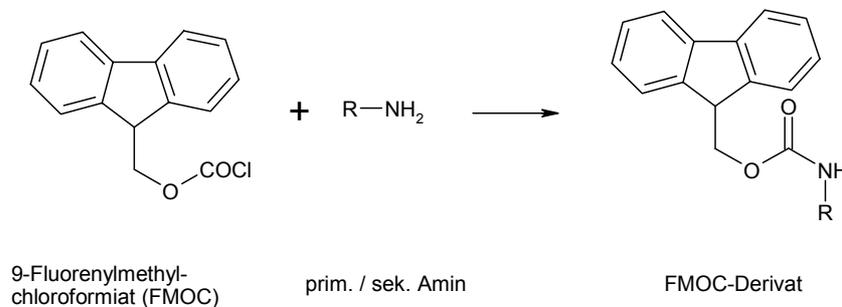
TNBS reagiert im basischen Milieu bei Raumtemperatur mit primären Aminen ohne auftretende Nebenreaktionen. Allerdings benötigt die quantitative Derivatisierung bei Raumtemperatur ca. 19-20 Stunden [100]. Um die Geschwindigkeit zu erhöhen, wurden Untersuchungen mit erhöhter Temperatur durchgeführt. Gentamicin wird beispielsweise bei 70 °C nach 15 Minuten vollständig derivatisiert [38]. TNBS-Derivate haben Absorptionsmaxima bei 350 nm und 420 nm. Wegen dem Einsatz von Pyridin in der Derivatisierungsprozedur wird auf diese Methode in dieser Arbeit verzichtet.

Weiterhin können Aminoglykoside fluorimetrisch bestimmt werden. Die entsprechenden Reagenzien sind in Tabelle 1.2-3 zusammengestellt. Sie werden im Folgenden diskutiert:

Tabelle 1.2-3: Derivatisierungsreagenzien zur Erfassung von Aminoglykosiden mittels Fluoreszenzdetektion

Fluoreszenz-Derivatisierungsreagenz	Aminoglykosid	Literatur
<i>o</i> -Phthaldialdehyd (OPA)	Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Netilmicin, Paromomycin, Sisomicin, Streptomycin, Tobramycin	[70, 107, 115, 116, 109, 110, 108, 112, 111, 113]
9-Fluorenylmethylchloroformiat (FMOC)	Gentamicin, Neomycin, Netilmicin, Sisomicin	[117, 118, 119]
Fluorescamin	Gentamicin, Kanamycin	[120, 121]
Dansylchlorid	Gentamicin, Netilmicin	[69]
β -Naphthochinon-4-sulfonsäure (NQS)	Streptomycin	[122, 123]

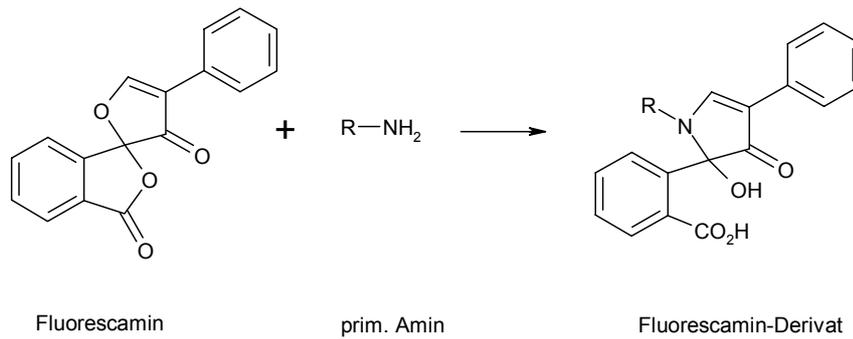
9-Fluorenylmethylchloroformiat (FMOC):



FMOC ist ein sehr reaktives Reagenz, welches mit primären und sekundären Aminen zu Carbaminsäure-Verbindungen reagiert. Bei Raumtemperatur läuft die Reaktion im Basischen sehr schnell ab. Oftmals werden deutliche Überschüsse an FMOC für die Reaktion benötigt, um eine vollständige Derivatisierung zu erreichen. Der Überschuss wird durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit *n*-Pentan wieder entfernt. Mit Aminoglykosiden wurden bisher gute Ergebnisse erzielt. Nachteil dieser Derivatisierung ist der hohe Anteil von Acetonitril (50 %) im Derivatisierungsgemisch, da Acetonitril nicht unproblematisch zu entsorgen ist.

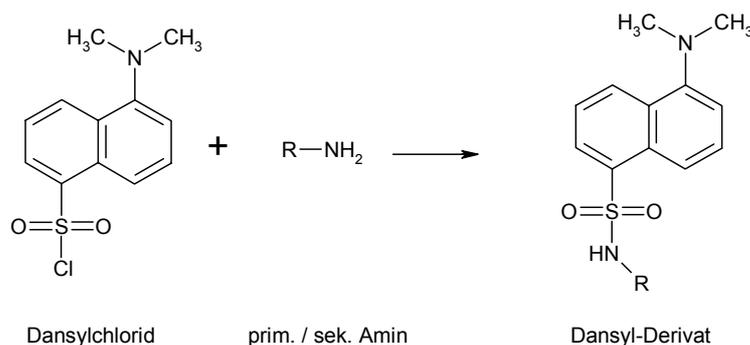
Vorversuche mit Gentamicin wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, führten aber nicht zum Erfolg.

Fluorescamin (4-Phenyl-spirofuran-2-(3H)-phthalan-3,3-dion):



Fluorescamin reagiert im basischen Milieu bei Raumtemperatur mit primären Aminen schnell zu einem stark fluoreszierenden Derivat. Das Reagenz selbst und seine Nebenprodukte sind nicht fluoreszierend. In den meisten Fällen musste Fluorescamin in 10-fachem Überschuss verwendet werden, um eine vollständige Derivatisierung zu erreichen. Gute Ergebnisse mit Gentamicin sind bei einem pH-Wert von 7.2-8.0 in 0.33 M Phosphatpuffer erzielt worden. Da die Derivate nur bei 390/475 nm fluorimetrisch bestimmt werden können [124], war diese Methode in dieser Arbeit aufgrund des fehlenden Fluoreszenzdetektors nicht durchführbar.

Dansylchlorid (1-Dimethyl-amino-naphthalin-5-sulfonsäurechlorid):



Dansylchlorid wird zur Vorsäulenderivatisierung bei Gentamicin und Netilmicin eingesetzt, da es mit primären und sekundären Aminen reagiert. Auch hier ist die optimale Derivatisierungstemperatur relativ hoch. Bei 75 °C und 5 Minuten Reaktionszeit werden diese Aminoglykoside vollständig derivatisiert.

In den letzten Jahren kamen auch neben UV/VIS- und Fluoreszenz-Detektion auch alternative Detektionsmöglichkeiten, wie z.B. die elektrochemische Detektion [z.B. 125,126] oder die massenspektroskopische Detektion [z.B. 127,128,129] auf. Sie haben den Vorteil, dass sie kein chromophores System zur Detektion benötigen. Somit müssen die Substanzen nicht derivatisiert und können „direkt“ detektiert werden. Allerdings sind solche Detektoren wesentlich komplizierter, empfindlicher und teurer als ein UV/VIS- oder Fluoreszenz-Detektor.

1.3 Aufgabenstellung

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese sollten im Rahmen dieser Arbeit Methoden entwickelt werden, die in der Lage sind, die Hauptkomponenten und Verunreinigungen ausgewählter Aminoglykoside deutlich erkennbar und quantifizierbar zu machen. Sie sollten der ansonsten üblichen HPLC-Methode in Bezug auf die Selektivität überlegen sein.

Mit den neuen kapillarelektrophoretischen Methoden sollten ca. 60 verschiedene Gentamicin-Proben untersucht werden, die auf dem asiatischen und amerikanischen Markt gesammelt und in Europa und Amerika in Fertigarzneimittel verarbeitet und vertrieben werden sollten. Unter diesen Proben befanden sich auch die Proben, die die bereits in der Einleitung angesprochenen Todesfälle verursacht haben. Weiterhin sollten 16 Neomycin-Proben von verschiedenen Herstellern untersucht werden. Es sollte geprüft werden, ob sich die Proben klassifizieren lassen. Somit könnte festgestellt werden, ob die Proben bestimmten Herstellern zugewiesen werden können oder gezeigt werden kann, von welchen Herstellern bestimmte Firmen ihre Substanzen beziehen. Weiterhin war es ein Ziel zu untersuchen, ob sich anhand der Klassifizierung die mit toxischen Verunreinigungen versehenen Proben selektieren lassen.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Paromomycinsulfat

2.1.1 Übersicht

Paromomycin gehört zur Gruppe der Neomycin-Aminoglykosid-Antibiotika. Es unterscheidet sich von Neomycin nur in der C6-Hydroxylgruppe am 2-Desoxystreptamin-Ring (s. Abb. 1.2-9). Wie auch bei allen anderen Aminoglykosiden handelt es sich um ein Gemisch ähnlicher Substanzen, welches durch Fermentation, in diesem Falle von *Streptomyces rimosus ssp. paromomyceticus*, gewonnen wird. Paromomycin wird hauptsächlich gegen Erkrankungen eingesetzt, die durch *Leishmania*-Arten ausgelöst werden.

Wie allen Aminoglykosiden fehlt Paromomycin ein chromophores System, um eine direkte Detektion mit UV-Licht durchführen zu können. Um 1970 wurden neben den DC-Methoden für Neomycin (s.v.) auch DC-Methoden für Paromomycin veröffentlicht. Da es als Nebenprodukt im Neomycin vorkommt, sind einige Methoden zusammen mit Neomycin entwickelt worden (z.B. [130]). Erst Ende der 90er Jahre wurden HPLC-Methoden vorgestellt, bei denen Paromomycin derivatisiert wurde. Einerseits benutzte man DNFB (s. Kapitel 1.2.4.3) und detektierte bei 350 nm UV-spektrometrisch [131], andererseits verwendete man OPA/2-Mercaptoethanol und detektierte fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm [132]. Weiterhin sind Methoden veröffentlicht worden, in denen Paromomycin aus pharmazeutischen Formulierungen bestimmt worden ist [133].

Tabelle 2.1-1: Verschiedene Bezeichnungen für Paromomycin und Neomycin

Neomycin	Sonstige Bezeichnungen
Neomycin A	Neamin
Neomycin B	Framycetin
Neomycin C	(Stereoisomer zu Neomycin B)
Neomycin D	Paromamin
Neomycin E	Paromomycin I
Neomycin F	Paromomycin II

Die Bezeichnungen von Paromomycin sind in der Literatur uneinheitlich. In bisher veröffentlichten Artikeln wurde Paromomycin I und II [130,132] oder Paromomycin B [67] erwähnt, wobei die Struktur von Paromomycin B nicht aus der Publikation hervorgeht. Vermutlich handelt es sich bei Paromomycin II und B um die gleiche Substanz. Darüber hinaus erwähnt das „Institute for Biological Standards and Control“ (NIBSC, Schweden) in

ihrem Analysenprotokoll ihrer CRS-Probe Paromomycin A-D, wobei auch hier die Strukturen nicht klar sind. Für Paromomycin gibt es noch weitere Bezeichnungen, die auf die Verwandtschaft zu Neomycin aufmerksam machen (s. Tabelle 2.1-1) [134].

2.1.2 Methodenentwicklung

2.1.2.1 Hintergrundelektrolyt-Optimierung

Kaale et al. beschrieb in [95] die Verwendung eines Natriumtetraboratpuffers (TB) zur Trennung von Sulfat-Salzen anderer Aminoglykoside. Ausgehend von dieser Methode wurde mit einer Kapillarlänge von 33.7/42.2 cm und einer Spannung von 15 kV gearbeitet und zusätzlich TB-Puffer in Konzentrationen zwischen 10 und 100 mM (pH 10.0) getestet. Standardmäßig wurde der TB-Puffer mit 7.5 mM β -Cyclodextrin und 1 % (v/v) Methanol versetzt. Für das anstehende Trennproblem wurde eine 40 mM Konzentration des TB-Puffers gewählt. So können fünf Peaks (a-e) vom Haupt-OPA-Peak größtenteils basisliniengetrennt werden.

2.1.2.2 Optimierung der β -Cyclodextrin-Konzentration

Um die Trennung zu verbessern, wurde die Konzentration des β -Cyclodextrins im Bereich zwischen 0-10 mM bei gleichzeitigem Konstanthalten der Konzentrationen des TBs und Methanols variiert. Eine Konzentration von 3 mM erwies sich als geeignet, da bei höheren Konzentrationen Peak d mit einem Doppelpeak des OPA (s. Abb. 2.1-1) komigriert. Wie auf Abb. 2.1-4 ersichtlich, ist der Doppelpeak bei einer Konzentration von 3 mM β -Cyclodextrin nicht mehr in dem Zeitfenster von 15 Minuten zu sehen. Demzufolge wurde für alle weiteren Versuche 3 mM β -Cyclodextrin verwendet.

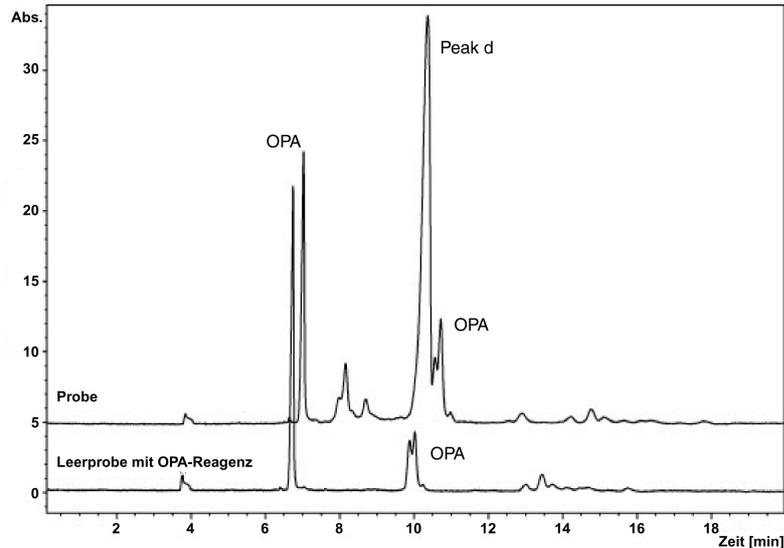


Abb. 2.1-1: Elektropherogramme einer Leerprobe mit OPA-Reagenz und einer Paromomycin-Probe unter folgenden Bedingungen: TB (30 μM , pH 9.5), $\beta\text{-CD}$ (5 mM), Methanol (1 %, v/v); Quarzglas Kapillare, 33.7/42.2 cm, 50 μm ID; angelegte Spannung 15 kV; Injektion 4 s mit 50 mbar; Temperatur 25 $^{\circ}\text{C}$; Detektionswellenlänge 330 nm

2.1.2.3 Optimierung der Methanol-Konzentration

Organische Lösungsmittel werden in der CE-Analytik oftmals als sog. „organic modifier“ benutzt. Sie haben Auswirkungen auf die Viskosität des Elektrolyten und Einfluss auf die Selektivität, da sie oftmals die Peakschärfe verbessern. In diesen Untersuchungen wurden unterschiedliche Konzentrationen (0-15 %) von 2-Propanol, Acetonitril und Methanol getestet. Es stellte sich heraus, dass Methanol im Gegensatz zu den beiden anderen Lösemitteln die Trennung positiv beeinflusst. Acetonitril und 2-Propanol führten einerseits zu einer stärkeren Verlangsamung der Läufe, andererseits zu einer etwas schlechteren Trennung der Probenbestandteile. Somit wurde Methanol zur weiteren Methodenoptimierung verwendet. Eine Erhöhung der Methanol-Konzentration verbesserte die Trennung erheblich. Dies hat allerdings zur Folge, dass sich die Migrationszeit aller Komponenten stark verlängert. Dieser Umstand wurde durch Anheben der Spannung (auf 18 kV) und Verkürzung der Kapillare (auf 24.5/33.0 cm) ausgeglichen, ohne dass es zu einer Verschlechterung der Selektivität kam. Eine Konzentration von 12.5 % Methanol ergab die besten Ergebnisse in Bezug auf die Trennung.

2.1.2.4 Optimierung des pH-Wertes

Die Wahl des richtigen pH-Wertes ist entscheidend für eine gute Trennung, da dieser sowohl die elektrophoretische Mobilität als auch den elektrophoretischen Fluss stark beeinflusst. Durch eine Erhöhung des pH-Wertes von 10.0 auf 10.5 verlängerten sich die Migrationszeiten erheblich, durch eine Erniedrigung auf 9.5 rückten die Peaks sehr nahe zusammen, so dass eine Basislinientrennung nicht mehr gegeben war. Folglich wurde der pH-Wert von 10.0 als guter Kompromiss gewählt.

2.1.2.5 Optimierung der Derivatisierung

Ziel einer Derivatisierung ist es, alle Kopplungsgruppen im Zielmolekül mit dem Derivatisierungsreagenz zu besetzen. Im Fall von Paromomycin sollten alle primären Aminogruppen mit OPA reagieren. Zur Auffindung der optimalen Bedingungen wurden Reaktionszeit, Reaktionstemperatur und Reagenzmenge variiert. Es wurden Versuche mit 100, 200 und 300 µl des OPA-Reagenzes (Herstellung s. exp. Teil) in 2 ml Probenlösung durchgeführt. Mit 100 µl wurden nicht alle Moleküle vollständig belegt, was aufgrund der vermehrten Peakbildung durch unterschiedlich derivatisierte Moleküle zu erkennen war. Bei 300 µl vergrößerte sich ausschließlich der OPA-Peak. Es stellte sich somit heraus, dass mit 200 µl (= sechsfacher Überschuss von OPA in Bezug auf alle primären Aminogruppen) die besten Ergebnisse erzielt wurden.

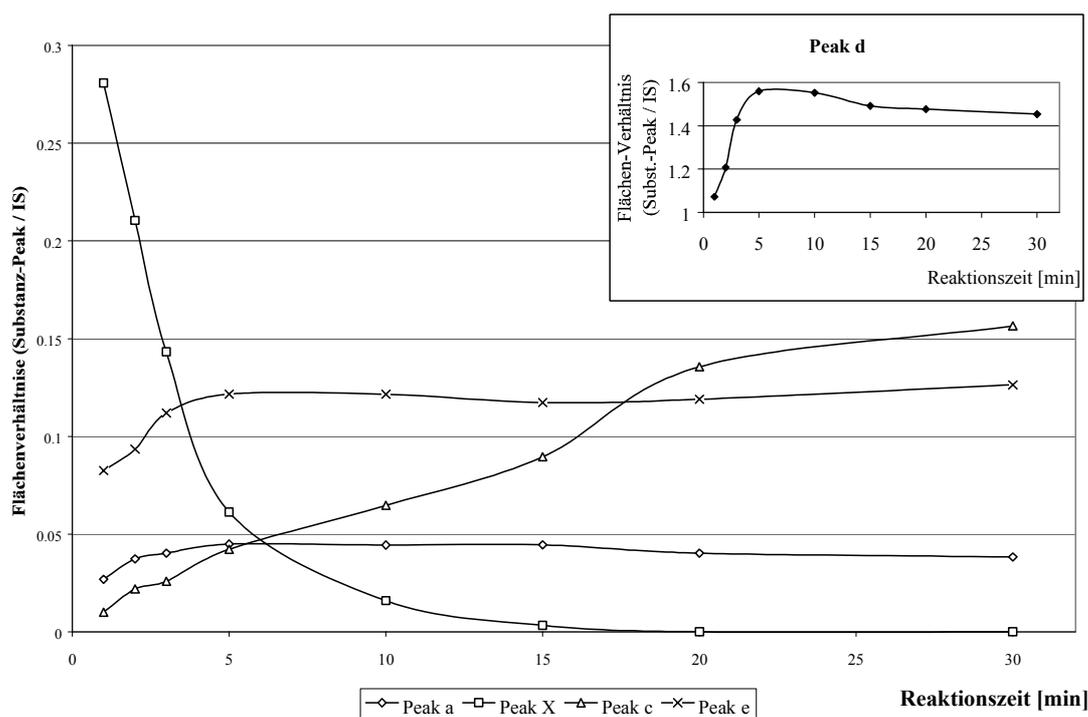


Abb. 2.1-2: Derivatisierung bei 40 °C

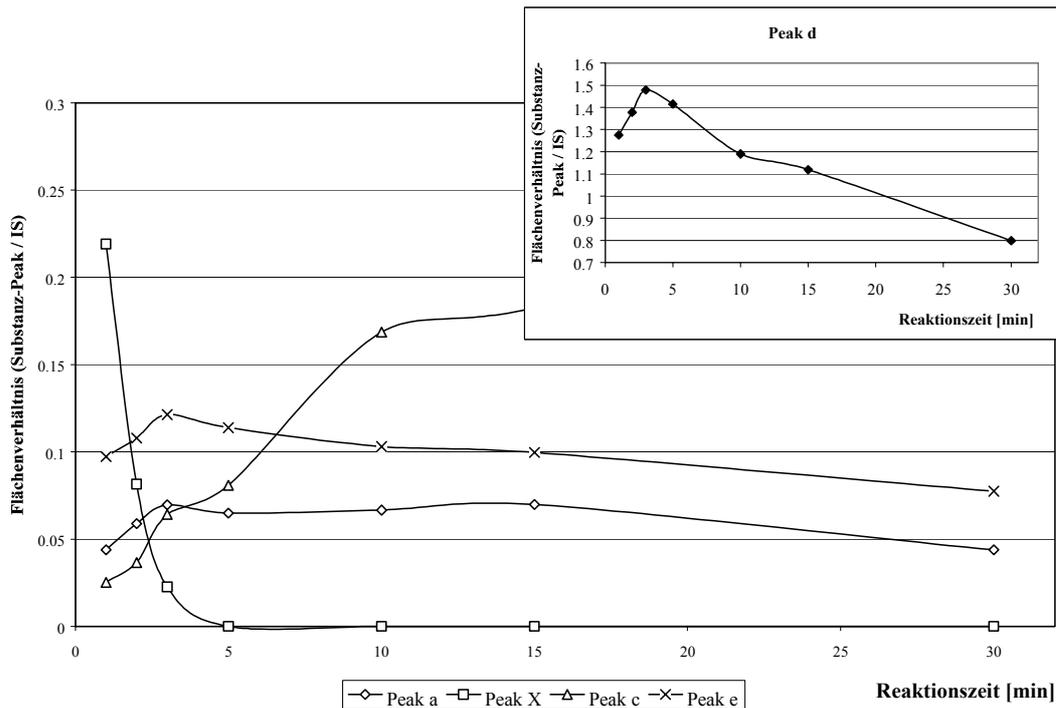


Abb. 2.1-3: Derivatisierung bei 60 °C

Zur Ermittlung der optimalen Derivatisierungstemperatur wurde bei Raumtemperatur (RT), 40 °C und 60 °C in einem Zeitraum von 1 bis 30 Minuten derivatisiert. Wie auf Abb. 2.1-4 zu sehen ist, ist die vollständige Derivatisierung nach einer Minute bei 60 °C noch nicht abgeschlossen, da unvollständig derivatisiertes Produkt (Peak x) noch zu sehen ist.

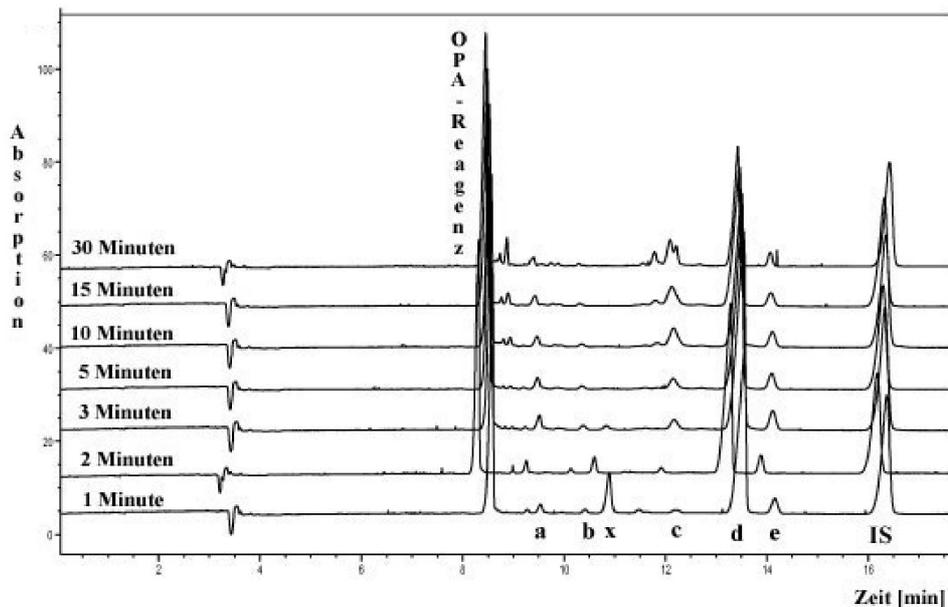


Abb. 2.1-4: Optimierung der Reaktionszeit der Derivatisierung bei 60 °C unter folgenden Bedingungen: TB-HGE (40 mM, pH 10.0), β -CD (3 mM), Methanol (12.5 %, v/v); Quarzglaskapillare, 33.7/42.2 cm, 50 μ m ID; angelegte Spannung 15 kV; Injektion 4 s mit 50 mbar; Temperatur 25 °C; Detektionswellenlänge 330 nm.

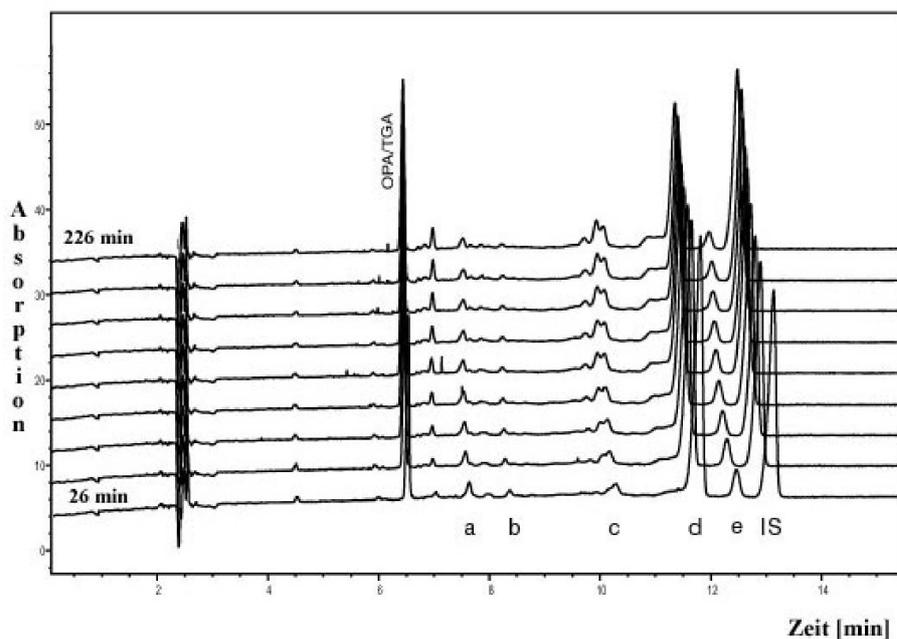


Abb. 2.1-5: Alterungsprozess einer Probe nach der Derivatisierung (60 °C, 5 Minuten) mit den Konditionen wie unter Abb. 2.1-4

Zusätzlich wird in Abb. 2.1-4 deutlich, dass Peak x erst nach ca. fünf Minuten vernachlässigbar klein geworden ist. Gleichzeitig werden die Peaks a-e in dieser Zeit alle größer. Diese beiden Tatsachen sprechen dafür, dass die Derivatisierung erst nach fünf Minuten vollständig ist. Nach diesen fünf Minuten sinken die Peakflächen leicht und zeigen ein Zerfallen der OPA-Derivate an. Einzig die Peakfläche von Peak c steigt nach fünf Minuten stärker an, was aber durch einen zweiten Peak verursacht wird, der in ähnlicher Zeit migriert und bei 30 Minuten Derivatisierungszeit deutlich zu sehen ist. Mit zunehmender Zeit entstehen zusätzlich weitere kleine Peaks zwischen OPA-Reagenz und Peak d. Ein ähnliches Bild ergibt die Derivatisierung bei 40 °C. Hier ist Peak x aber erst nach 15-20 Minuten verschwunden. Die maximale Fläche der anderen Peaks ist allerdings schon nach ca. 5-10 Minuten erreicht. Ebenso wie bei 60 °C zeigt Peak c einen steileren Anstieg nach fünf Minuten, da dort ein zweiter Peak komigriert.

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Lagerung der derivatisierten Probe die Ergebnisse beeinträchtigt. Auf Abb. 2.1-5 ist zu erkennen, dass einige Peaks hinzukommen. Beispielsweise ist der Peak vor Peak a und auch der zweite Peak in Peak c zu nennen.

Diese Untersuchungen haben ergeben, dass eine optimale Derivatisierung bei 60 °C für 5 Minuten durchzuführen ist. Weiterhin sollte die jeweilige Probe innerhalb der ersten 20 Minuten vermessen werden.

2.1.2.6 Methodenpräzision

Nachdem somit die optimalen Parameter ermittelt worden sind (s. exp. Teil), wurden mit der Methode Präzisionstests durchgeführt. Das Verhältnis von Migrationszeiten (MZ), Peakflächen (PF) und Peakhöhen (PH) der einzelnen Peaks zum IS wurden errechnet und ergaben sehr gute Werte in Bezug auf die Migrationszeiten und noch akzeptable Werte in Bezug auf Fläche und Höhe der Peaks. Die Werte sind in Tabelle 2.1-2 gezeigt.

Tabelle 2.1-2: Methodenpräzision (* = relative Standardabweichung)

Komponente	Wiederholpräzision (n=7)		
	RSD* (%) (MZ-Verhältnis Peak/IS)	RSD* (%) (PF-Verhältnis Peak/IS)	RSD* (%) (PH-Verhältnis Peak/IS)
Peak a	0.06	1.53	3.92
Peak b	0.06	3.81	4.43
Peak c	0.11	4.95	4.00
Peak d	0.14	1.65	2.46
Peak e	0.15	1.96	3.60

2.1.3 Zusammenfassung

Es wurde eine einfache CZE-Methode entwickelt, mit der es möglich ist, eine Paromomycin-Probe in fünf Komponenten zu trennen (s. Abb. 2.1-6). Die Derivatisierungsparameter

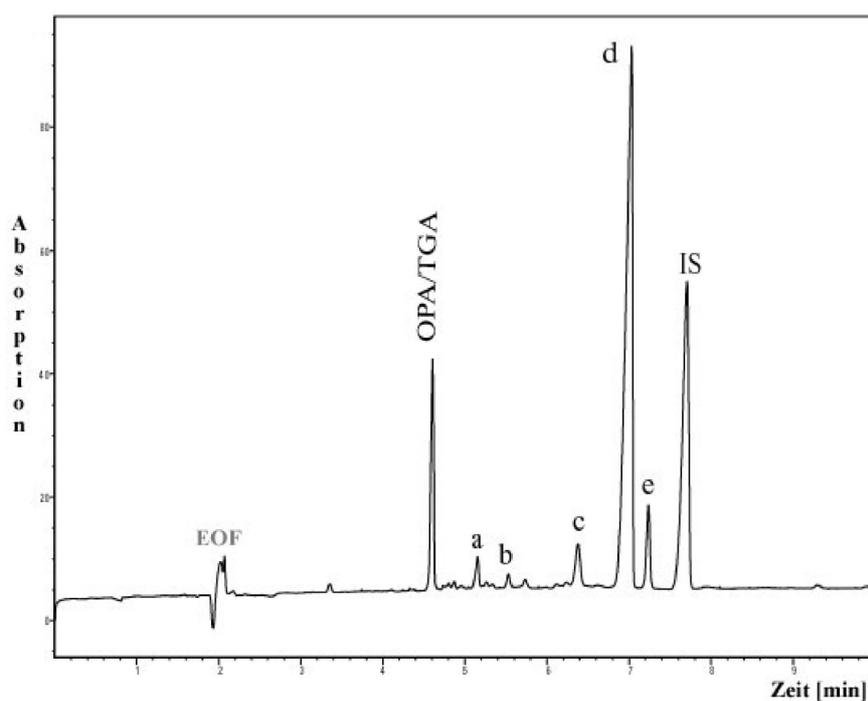


Abb. 2.1-6: Paromomycin-Elektropherogramm mit optimierter Methode.

wurden optimiert und mit dieser Methode verschiedene Präzisionsparameter bestimmt. Unklar ist die Zuordnung der Peaks. Anhand der CRS-Probe kann man bei den hier durchgeführten Analysen vermuten, dass es sich bei Peak d um Paromomycin A und/oder B handelt. Durch die auf dem Zertifikat ausgewiesene Quantifizierung der CRS-Substanz (Paromomycin A + B 94 %, D 5.5 % und C 0.5 %) lässt sich diese Vermutung stützen. Weitere Zuordnungen sind bei den untersuchten Proben nicht möglich, da weitere Paromomycin-Komponenten nicht in reiner Form zur Verfügung standen.

2.2 Gentamicinsulfat

2.2.1 Übersicht

1986 wurde Gentamicinsulfat zum ersten Mal im Deutschen Arzneibuch monographiert (DAB 9). Wurde dort noch die Zusammensetzung u.a. mittels 60 MHz NMR-Spektroskopie

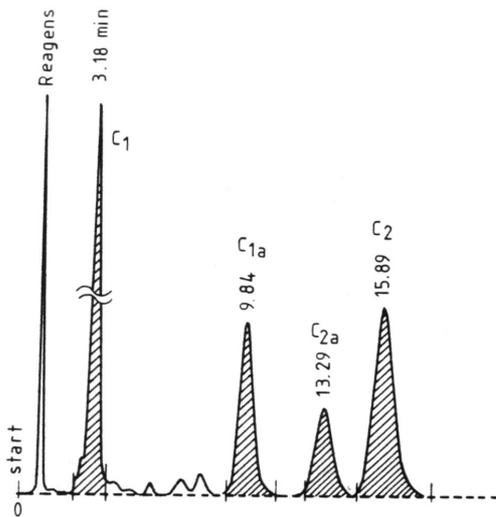


Abb. 2.2-1: Chromatogramm einer kommerziellen Gentamicin-Probe nach „alter“ Arzneibuchmonographie [92].

ermittelt, wird es seit dem DAB 10 (1991) mit der von Claes et al. 1984 entwickelten HPLC-Methode bestimmt [92]. Bei dieser Methode wird OPA/Mercaptoessigsäure als Derivatisierungsreagenzien verwendet, um Gentamicin mit einem UV/VIS-Detektor erfassen zu können. Als Resultat dieser Methode erhielt man ein Chromatogramm, auf dem deutlich die vier Hauptkomponenten des Gentamicin zu erkennen sind. Einige kleine Peaks werden nicht berücksichtigt (Abb. 2.2-1). Ausgewertet wurden die Chromatogramme über

den mit CRS-Substanz ermittelten Korrekturfaktor („Responsefaktor“), bezogen auf die Höhen der zu betrachteten Peaks. Diese Methode hatte bis zur Verfassung des Europäischen Arzneibuches (EuAB) 4.5, Juli 2003, Bestand. Sie ist dann durch eine andere HPLC-Methode ersetzt worden, bei der keine Derivatisierung mehr notwendig ist, da mit einem gepulsten amperometrischen Detektor gearbeitet wird [135]. Der Vorteil, dass Gentamicin nicht mehr derivatisiert werden musste, wird mit der selbst vom Entwickler angesproche-

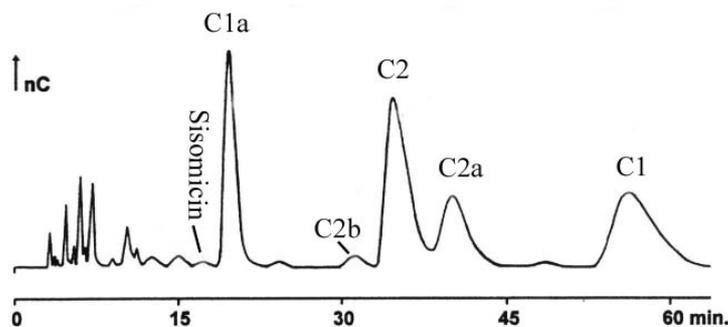


Abb. 2.2-2: Beispiel-Chromatogramm einer kommerziellen Probe nach „neuer“ Arzneibuchmonographie [135].

nen schlechten Robustheit dieser Methode relativiert. Weiterhin zeigt das Referenzchromatogramm (Abb. 2.2-2) keine Verbesserung der Trennung. Die Hauptpeaks sind nicht von einander basisliniengetrennt. Zusätzlich überdeckt der C1-Peak 10 Minuten der Grundlinie und die Gesamtlaufzeit beträgt über 60 Minuten im Gegensatz zu 20 Minuten in [92].

Mit dem Wechsel der Monographie wurden auch die Gehaltsgrenzen der einzelnen Bestandteile angepasst (Tabelle 2.2-1), da die Anteile ab jetzt mit der Normalisierungsmethode berechnet werden, d.h. die zu bestimmenden Flächen der Peaks werden gegeneinander ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 2.2-1: Vergleich der Grenzen der Zusammensetzung von Gentamicin nach alter [136] und neuer [137] Monographie

Gentamicin-Komponente	Alte Methode	Neue Methode
C1	25-50 %	20-35 % *
C1a	10-35 %	10-30 %
C2+C2a	25-55 %	---
C2+C2a+C2b	---	40-60 %

* Abänderung ab EuAB 4.7 auf 20-40 % vorgesehen, da bisher die wenigsten Proben den bisherigen Kriterien entsprachen

Im Jahr 2000 entwickelte Kaale et al. eine viel versprechende CE-Methode, die fast alle Hauptbestandteile des Gentamicin-Komplexes trennte [95]. Auch waren einige Nebenprodukte, wie z.B. Sisomicin oder Gentamicin-

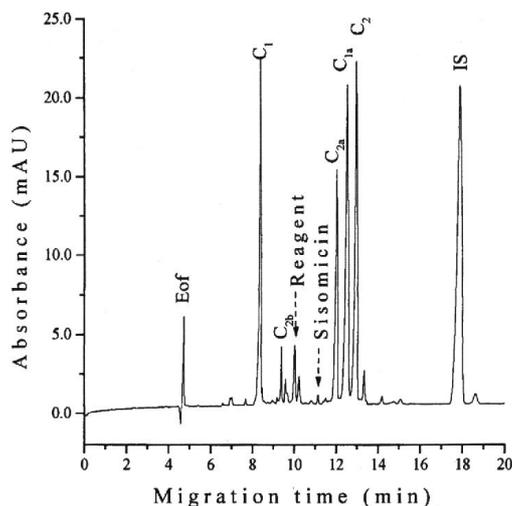


Abb. 2.2-3: Elektropherogramm einer kommerziellen Gentamicin-Probe nach Lit. [95]

C2, gut erkennbar. Im Jahr 2001 folgte von ihm eine Veröffentlichung, die eine „Online-Derivatisierung“ beschrieb, d.h. die Derivatisierung findet in der Kapillare statt [138].

Um eine bessere Methode für Gentamicin entwickeln zu können, ist es notwendig, die Einzelsubstanzen (Gentamicin-C1 bis Gentamicin-C2b) sowie die entstehenden Nebenprodukte (Sisomicin, Garamin, Desoxystreptamin oder Paromamin) zur Verfü-

gung zu haben. Alle Nebenprodukte und das Gentamicin-C2b konnten käuflich erworben werden oder wurden für Forschungszwecke kostenfrei zur Verfügung gestellt. Die noch fehlenden Bestandteile (Gentamicin-C1, C1a, C2 und C2a) wurden durch die im Folgenden beschriebene präparative Trennung gewonnen.

2.2.2 Präparative säulenchromatographische Trennung

2.2.2.1 Dünnschichtchromatographie der Mischung

Zur Überprüfung der Fraktionen, wurde die Methode des Arzneibuches zur Prüfung auf Identität von Gentamicin [136] in leicht abgewandelter Form verwendet. Als stationäre Phase diente eine aktivierte Kieselgelplatte, als Fließmittel die untere Phase einer Methanol/Chloroform/Ammoniak (26 %, v/v) Mischung im Verhältnis 1:1:1. Nach der Entwicklung und Detektion mit Ninhydrin-Lösung (1.0 g/10 ml Ethanol) sind drei deutlich voneinander getrennte violette Flecken sichtbar.

2.2.2.2 Ionenaustauschchromatographie

Für die Ionenaustauschchromatographie diente der Kationenaustauscher Amberlite® als stationäre und 0.125 M Ammoniak-Lösung als mobile Phase. Sobald Gentamicin in einer Fraktion mittels DC nachgewiesen werden konnte, wurde 0.2 M Ammoniak-Lösung als mobile Phase verwendet. Die Fraktionen, die Gentamicin-Base enthalten, werden vereinigt und das Lösungsmittelgemisch im Vakuum verdampft. Der jeweils erhaltene ölige Rückstand wird mit einem Lyophilisator gefriergetrocknet. Die Ausbeute beträgt 55.8 % (m/m) bezogen auf die eingesetzte Masse.

2.2.2.3 Kieselgel-Säulenchromatographie

Bei dieser Säulenchromatographie dient zuerst die untere Phase von 2-Propanol/Chloroform/Ammoniak (17 %, m/v) im Verhältnis 1:2:1 als mobile Phase. Gentamicin-Base wird in möglichst wenig der gleichen Phase gelöst und aufgetragen. Anschließend wird mit der unteren Phase von 2-Propanol/Chloroform/Ammoniak (26 %, m/v) im Verhältnis 1:2:1 eluiert, in 100 Fraktionen aufgefangen und dünnschichtchromatographisch detektiert.

Die Mischfraktionen, die mindestens noch zwei (bei C2/C2a: drei) Bestandteile beinhalten, wurden vereinigt und nochmals nach der unter 2.2.2.3 beschriebenen Methode getrennt, so dass sich insgesamt die Ausbeuten aus Tabelle 2.2-3 ergaben:

Es ist zu bemerken, dass Gentamicin-C2/C2a mit dieser Methode nicht getrennt werden konnte. Es wurde aber eine kommerzielle Gentamicin-Probe verwendet, bei der der Anteil von Gentamicin-C2 ca. doppelt so groß ist wie C2a, so dass eine spätere Identifizierung ohne weiteres möglich war.

Tabelle 2.2-2: Ausbeuten nach einfacher Chromatographie

Substanz	Ausbeute	entspricht ^a	entspricht ^b	aus Fraktion
Gentamicin-C1	128.5 mg	6.4 %	3.2 %	10-15
Gentamicin-C2/C2a	365.6 mg	18.3 %	9.1 %	33-42
Gentamicin-C1a	221.2 mg	11.1 %	5.5 %	60-93

^a bezogen auf die eingesetzte Menge NACH dem Ionenaustausch^b bezogen auf die eingesetzte Menge VOR dem Ionenaustausch

Die erhaltenen Fraktionen wurden mit der CE (MEKC-Methode) auf Reinheit überprüft. Als Interner Standard (IS)

Tabelle 2.2-3: Ausbeuten nach doppelter Chromatographie

Substanz	Ausbeute	Gesamt-Ausbeute	entspricht ^a
Gentamicin-C1	346.3 mg	474.8 mg	23.7 %
Gentamicin-C2/C2a	473.0 mg	838.6 mg	41.9 %
Gentamicin-C1a	59.1 mg	280.3 mg	14.0 %

wurde Pikrinsäure verwendet (0.14 mg/ml). Die Abb. 2.2-4 zeigt, dass Gentamicin-C1 und C1a sehr rein vorliegen. Die Gentamicin-C2/C2a-Fraktion ist mit einem geringen Anteil C1 und C2b verunreinigt. Die Substanzen C2/C2a sind dennoch zuzuordnen, da der Gehalt von Gentamicin C2 der eingesetzten Probe ca. doppelt so hoch war, wie der des C2a. Zu beachten sind die unterschiedlichen Maßstäbe auf der y-Achse.

Alle Einzelsubstanzen wurden zur Kontrolle mit einem 400 MHz NMR vermessen. Die ¹H-NMR-Spektren bestätigten die Ergebnisse der CE-Analyse.

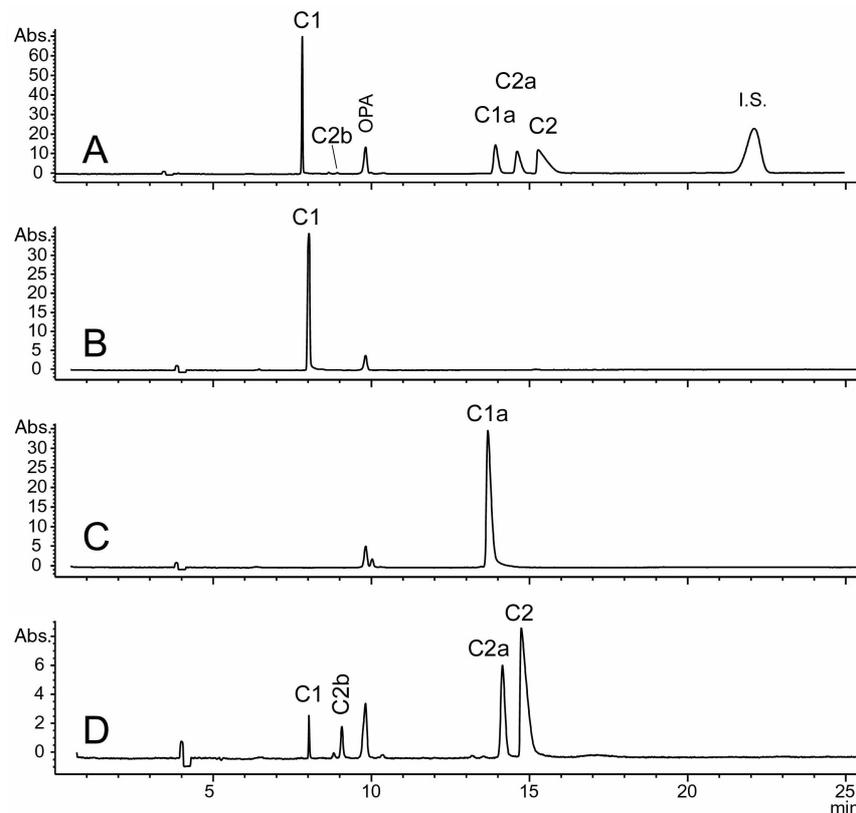


Abb. 2.2-4: Kapillarelektrophoretische Trennung der präparativ getrennten kommerziellen Gentamicin-Probe: Elektropherogramm A zeigt die Peaks einer kommerziellen Probe. Im Elektropherogramm B ist nur die Fraktion mit Gentamicin-C1 enthalten, im Elektropherogramm C nur die Gentamicin-C1a-Fraktion. Im Elektropherogramm D ist Fraktion der Gentamicin-C2/C2a-Fraktion enthalten.

2.2.3 Kapillarzonenelektrophorese

2.2.3.1 Methodenentwicklung

In den ersten Untersuchungen der von der Industrie erhaltenen Proben wurde die Methode von Kaale et al. [95] als Ausgangspunkt genutzt. Zunächst wurde versucht, die Methode mittels verschiedener ungeladener und geladener Cyclodextrine zu verbessern. Sämtliche Bedingungen bezüglich HGE und Geräteeinstellungen wurden beibehalten. Der Einfluss der in Tabelle 2.2-4 aufgeführten Cyclodextrine ist Abb. 2.2-5 zu entnehmen. Viele Cyclodextrine trennen die Peaks der drei Komponenten C2a, C1a und C2 an, doch konnte im Vergleich zum „einfachen“ β -Cyclodextrin keine wesentliche Verbesserung erzielt werden (s. Abb. 2.2-3).

Tabelle 2.2-4: Neutrale (N) und negativ geladene (G) Cyclodextrine und ihre eingesetzten Konzentrationen im Hintergrundelektrolyt

Cyclodextrin	Abk.	Neutral / Geladen	Konz.
β -CD, sulfatiert, Natrium	Sulf- β -CD	G	5 mM
Heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)- β -CD	HDAS- β -CD	G	5 mM
Heptakis-6-sulfato- β -CD	HS- β -CD	G	5 mM
Sulfobutylether-4- β -CD, Natrium	SBE- β -CD	G	5 mM
2,6-Dimethyl- β -CD	DM- β -CD	N	10 mM
2,6-Di-O-methyl- β -CD	DOM- β -CD	N	10 mM
Heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)- β -CD	HTOM- β -CD	N	10 mM
Heptakis-(2-N,N-dimethylcarbamoyl)- β -CD	HDMC- β -CD	N	10 mM
Hydroxypropyl- β -CD	OHP- β -CD	N	10 mM
β -CD	β -CD	N	0-25 mM

Ausgehend von der oben erwähnten CZE-Methode wurden 46 Rohstoff-Proben Gentamicin vermessen und ihre Elektropherogramme miteinander verglichen. 28 Proben stammen vom deutschen Markt (Proben G01-G21), 18 vom amerikanischen Markt (G22-G39). Die Bezeichnungen erfolgten in alphabetischer Reihenfolge. Den pharmazeutischen Vertreibern wurde ein Buchstabe zugeteilt, den Rohstoffquellen eine römische Zahl, sofern die Informationen verfügbar waren. Von den Proben aus den USA sind nur die Rohstoffquellen bekannt und nicht der pharmazeutische Vertreter.

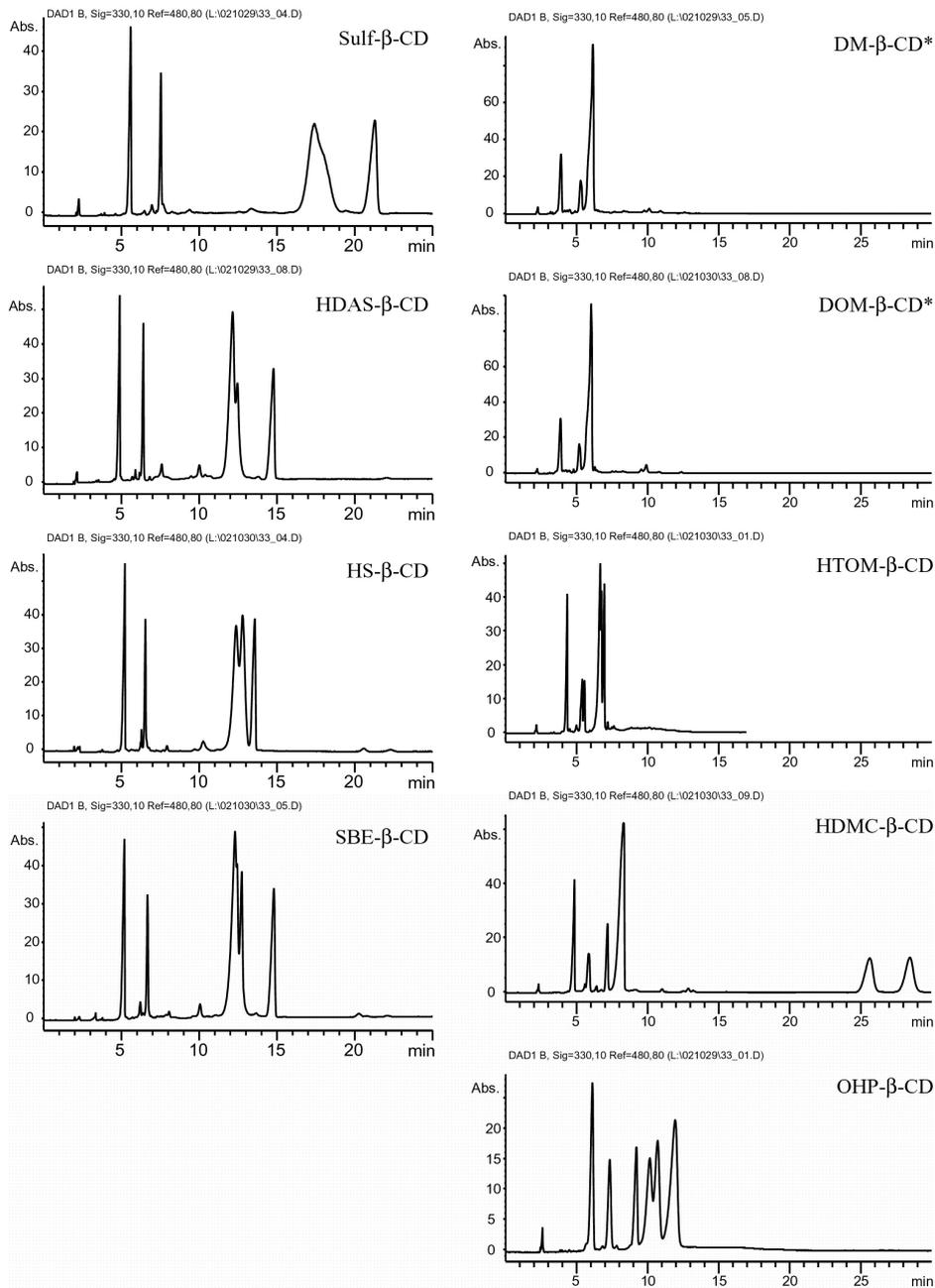


Abb. 2.2-5: Testläufe mit geladenen (links) und ungeladenen (rechts) Cyclodextrinen (Tabelle 2.2-4); Bedingungen: Kapillare: 24.4/33.0 cm, 50 μm ID, 20 $^{\circ}\text{C}$; Injektion: 4 Sekunden, 50 mbar; Derivatisierung: OPA, 4 Minuten, 60 $^{\circ}\text{C}$; Detektion bei 330 nm; Hintergrundelektrolyt: Natriumtetraborat (30 mM), Methanol (12.5 %, v/v), entsprechendes Cyclodextrin lt. Tabelle 2.2-4, pH 10.0, Trennungsspannung: 20 kV

* gleiche Substanz, unterschiedlicher Hersteller.

Die Zuordnung der erhaltenen Peaks im Elektropherogramm zu den einzelnen Gentamicin-Komponenten wurden durch „spiken“ mit Einzelsubstanzen, durch den Vergleich mit den Elektropherogrammen von Kaale et al. [95] und zusätzlich durch den Vergleich der Gehalte der zertifizierten CRS-Substanz identifiziert. Quantifiziert wurden die Proben nach der Methode der normalisierten Peakhöhe, wie es im EuAB für die HPLC-Methode vorge-

schrieben ist [136]. Alle Proben lagen innerhalb der Grenzen der neuen und der alten Monographie (Tabelle 2.2-1).

Ergebnis: Vergleicht man die Höhen der 4 Hauptpeaks C1, C1a, C2 und C2a und die Verhältnisse untereinander, so ergeben sich verschiedene Muster. Aufgrund ihrer Ähnlichkeiten im Elektropherogramm kann man die Proben in 7 verschiedene Gruppen einteilen (Abb. 2.2-6). Anhand kleiner Unterschiede der kleineren Peaks, kann man die (willkürlich) eingeteilten Gruppen 1, 3, 5 und 6 noch in Untergruppen einteilen (Tabelle 2.2-5).

Betrachtet man die Einteilung, so befinden sich in einigen Gruppen unterschiedliche Vertreterfirmen, z.B. in Gruppe 1 acht verschiedene Firmen und in Gruppe 3 vier verschiedene Firmen. In Gruppe 3a befinden sich exakt gleiche Elektropherogramme, die zwar von Substanzen unterschiedlicher Firmen stammen, die aber wahrscheinlich vom selben Hersteller aus der gleichen Charge beliefert wurden. Die Elektropherogramme der Gruppe 3a sind offensichtlich identisch, obwohl dort Hersteller III und Hersteller VII aufgeführt ist. Diese Konstellation ist nicht unmöglich, da diese Hersteller wahrscheinlich nicht die eigentlichen Hersteller der Substanzen, sondern nur (Zwischen-) Händler sind. Der ursprüngliche Hersteller ist vermutlich der gleiche. Weiterhin kann man aus der Liste ablesen, dass einzelne Hersteller in verschiedenen Gruppen zu finden sind. Das bedeutet, dass die Hersteller Substanzen in unterschiedlicher Qualität herstellen. Diese Unterschiede werden durch zum Teil leicht variierende Bedingungen der Fermentationsprozesse verursacht. Somit lässt sich erklären, dass in verschiedenen Chargen eines Herstellers mal mehr und mal weniger von einer Komponente enthalten ist. So ist z.B. Hersteller XI in den Gruppen 1a, 1d und 2 zu finden, Hersteller XIV in den Gruppen 4, 5, 5b und 7.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einerseits gleiche Elektropherogramme von Proben zu unterschiedlichen Herstellern gehören, andererseits Substanzen eines Herstellers untereinander verschiedene Elektropherogramme ergeben. Dies lässt vermuten, dass die angegebenen Hersteller teilweise die Substanz nicht selbst herstellen, sondern diese bei dem eigentlichen Hersteller einkaufen, dies aber nicht dokumentieren, und somit selbst als Hersteller auf den Zertifikaten aufgeführt sind. Somit ist ein Nachvollziehen von problematischen Substanzen sehr schwierig. Deshalb sollte die vertreibende Firma die Qualität eines bekannten Herstellers ständig und sorgfältig überwachen, um Risiken wie die oben schon angesprochenen UAWs durch evtl. veränderte Produktionsweisen so gering wie möglich zu halten.

Tabelle 2.2-5: Einteilung der 39 Gentamicin-Proben nach CZE-Methode

Gruppe	Proben-Nummer	Pharmazeutischer Vertreiber	Hersteller [#]
1a	G05	F	VII
	G16,	A	I
	G17, G18	A	II
	G25		XII
1b	G31, G32		XIV
1c	G20	G	IX
1d	G12	I	XI
	G14	I	X
	G21	G	VIII
	G26		XII
2	G22		XII
3a	G01	E	VII
	G07	H	III
	G15	B	III
3b	G27, G28, G29, G30		XIII
3c	G03, G04	C	V
4	G36		XV
5a	G06	H	V°
	G08, G09	L	V°
	G39		XV
5b	G19	K	V
	G34, G35, G37, G38		XV
6a	G02	D	VI
	G10, G11	M	IV*
6b	G23, G24		XII
7	G13	I	X
	G33		XV

[#] Angabe lt. Analysenprotokoll

* Hersteller nicht bekannt

° Pharmazeutischer Vertreiber = Hersteller

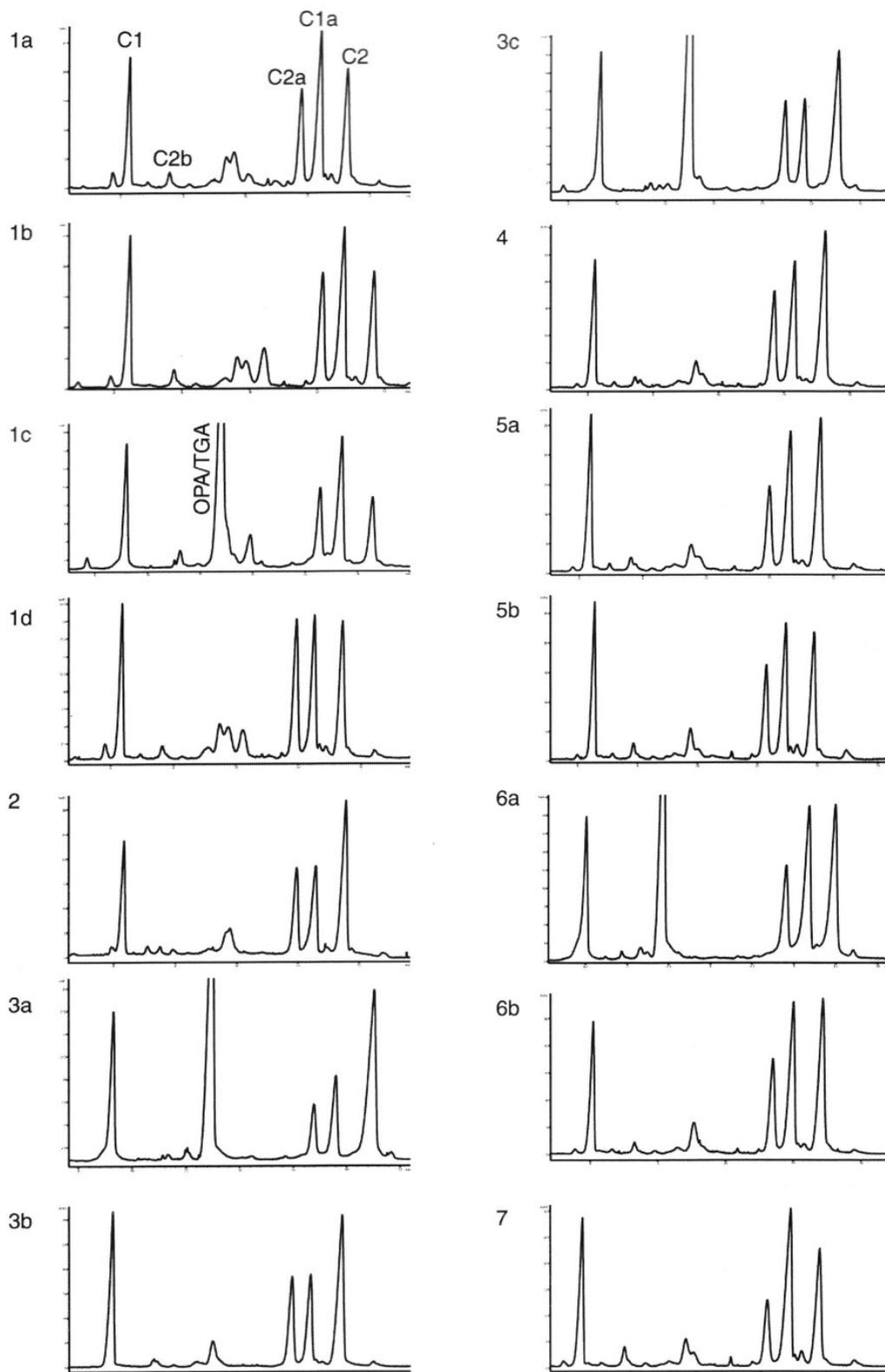


Abb. 2.2-6: Repräsentative Elektropherogramme der Gruppen 1 bis 7. Messbedingungen: Kapillare 24.4/33.0 cm, 50 μm ID; Angelegte Spannung: 15 kV; Temperatur der Kapillare: 25 $^{\circ}\text{C}$; Injektion: 4 Sekunden, 50 mbar; UV-Detektion bei 330 nm; Hintergrundelektrolyt Tetraborat (30 mM), β -Cyclodextrin (7.5 mM), Methanol (12.5 %, v/v), pH 10.0.

2.2.4 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie

2.2.4.1 Methodenentwicklung

Primär sollte die CZE-Methode von Kaale et al. [95] in Bezug auf die Trennung der Komponenten und Erkennung der Nebenkomponten und Verunreinigungen verbessert werden. Die von ihm benutzten Komponenten des Hintergrundelektrolytes (TB 30 mM, β -CD 7.5 mM, Methanol 12.5 %) wurden optimiert und/oder durch alternative Komponenten, insbesondere mizellenbildende Reagenzien, ersetzt. Auf eine weitere Optimierung mit β -Cyclodextrin wurde im Rahmen der folgenden MEKC-Methode verzichtet, da zuvor Cyclodextrine (Kapitel 2.2.3) eingehend getestet wurden. Die Derivatisierungsprozedur der Proben wurde hier weitestgehend von Kaale et al. [95] übernommen, d.h. die Probe wurde entsprechend hergestellt und für 4 Minuten bei 40 °C im Wasserbad erhitzt (s. experimenteller Teil, Tabelle 3.4-3).

2.2.4.1.1 Optimierung der mizellenbildenden Substanzen

Im nächsten Schritt wurden die in Tabelle 2.2-6 aufgeführten mizellenbildenden Substanzen in Konzentrationen von 25 mM zum HGE gegeben. Die Messungen erfolgten in 30 mM TB-Puffer und bei einer Spannung von 15 kV. Bei Verwendung des kationischen CTAB musste die Analyse jedoch bei einer Spannung von -15 kV vermessen werden, da die schon in Kapitel 1.1.3.2 angesprochene Umkehrung des EOFs keine Signale bei +15 kV auf der Detektorseite erscheinen ließ. Bei TAB hingegen musste die Spannung nicht umgekehrt werden, obwohl es sich ebenfalls um ein kationisches Detergenz handelt. Die Elektropherogramme in Abb. 2.2-8 zeigen, dass bei der Verwendung von DChol und TDChol der Dreier-Peak (C2a, C1a, C2) fast schon bei den Bedingungen der CZE-Standard-Methode (TB 30 mM, pH 10.0) getrennt ist. Mit den beiden Detergenzien wurden

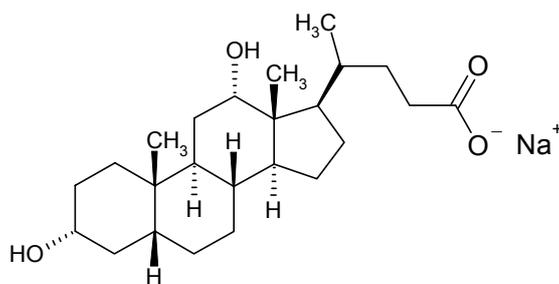


Abb. 2.2-7: Chemische Strukturformel von DChol

weitere Vorversuche durchgeführt. Beide Substanzen lieferten gleich gute Trennergebnisse in Bezug auf die Trennung der drei Komponenten C2a, C1a und C2. Aus Kostengründen wurden die weiteren Versuche mit DChol fortgeführt.

Tabelle 2.2-6: Mizellenbildende Substanzen und ihre Konzentration im Hintergrundelektrolyt

Mizellenbildner	Abk.	Konz.
Natriumdodecylsulfat	SDS	25 mM
Cholsäure, Natrium	Chol	25 mM
Desoxycholsäure, Natrium	DChol	25 mM
Taurodesoxycholsäure, Natrium	TDChol	25 mM
Polyetylen glykoldodecylether	Brij [®] 35	25 mM
Cetyltrimethylammoniumbromid	CTAB	25 mM
Tetramethylammoniumbromid	TAB	25 mM

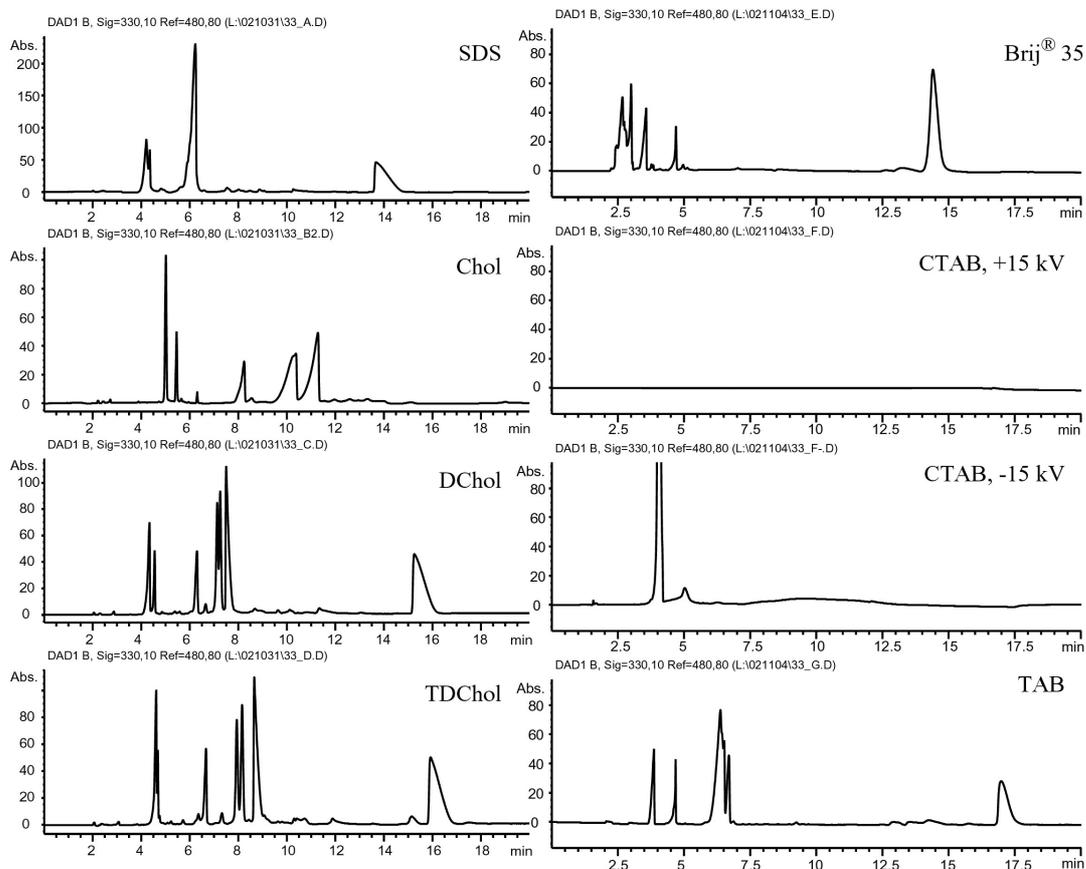


Abb. 2.2-8: Testläufe mit ausgewählten Detergenzien: Bedingungen: Kapillare: 24.4/33.0 cm, 50 μ m ID, 20 °C; Injektion: 4 Sekunden, 50 mbar; Derivatisierung: OPA, 4 Minuten, 60 °C; Detektion bei 330 nm; Hintergrundelektrolyt: Natriumtetraborat (30 mM), entsprechendes Detergenz lt. Tabelle 2.2-6, pH 10.0; Trennungsspannung: 15 kV (CTAB zusätzlich - 15 kV)

2.2.4.1.2 Optimierung des Natriumtetraborat-Puffers

Natriumtetraborat (TB) ist neben DChol der Hauptbestandteil des Hintergrundelektrolyten. Es wurden Konzentrationen von 10 mM bis 125 mM untersucht. Grundsätzlich verlängern sich mit steigenden Puffer-Konzentrationen die Migrationszeiten. Die drei Peaks C2a, C1a und C2 sind ausreichend basisliniengetrennt, sobald die Konzentration 100 mM und höher

ist. Die besten Trennungen ergaben sich bei Verwendung von 125 mM TB-Puffer. Von Nachteil war allerdings, dass der Strom schnell auf 300 μ A anstieg und damit an die mögliche Obergrenze des Gerätes stieß. Weiterhin war von Nachteil, dass der TB-Hintergrundelektrolyt (mit weiteren Bestandteilen) innerhalb eines Tages bei Raumtemperatur ausfällt. Zusätzlich dauert die Herstellung des HGE lange, da sich 125 mM TB erst nach mehreren Stunden im Ultraschallbad vollständig löst. 100 mM TB sind in ca. 20 Minuten gelöst und lassen sich mehrere Tage ohne signifikante Verschlechterung der Trennung aufbewahren. Deshalb wurde bei allen nachfolgenden Trennungen 100 mM TB-Puffer eingesetzt.

Im Muster-Hintergrundelektrolyten (TB 100 mM, β -CD 5.0 mM, DChol 25 mM; pH 9.3) stellte sich allerdings heraus, dass der eingesetzte Interne Standard (Pikrinsäure) mit Gentamicin-C1a komigrierte. Dies konnte später durch Änderung der folgenden Parameter korrigiert werden.

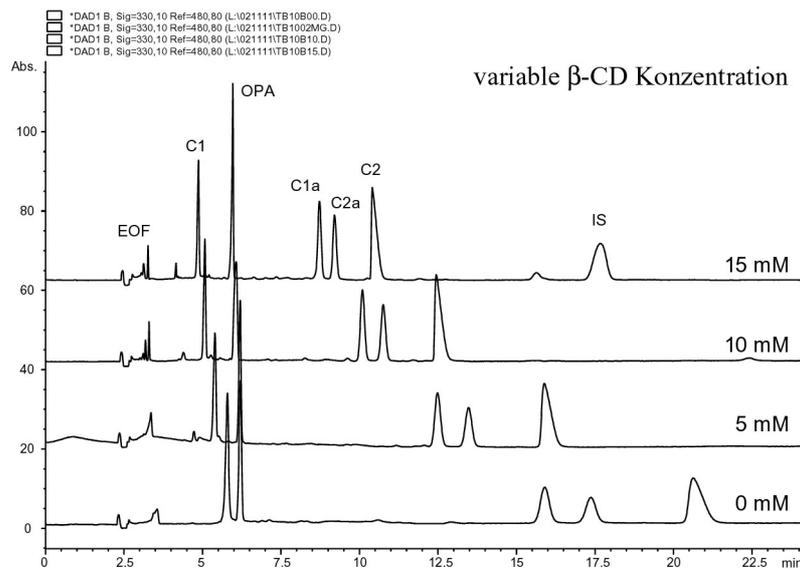


Abb. 2.2-9: Einfluss der β -Cyclodextrin-Konzentration; Bedingungen: HGE: TB 100 mM, TDChol 25 mM, β -Cyclodextrin s. Elektropherogramm, pH 9.3; Temperatur: 20 °C; Trennungsspannung: 15 kV; Kapillare: 24.5/33.0 cm; Derivatisierung: 4 Minuten, 60 °C; Detektion bei 330 nm

2.2.4.1.3 Optimierung der Cyclodextrin-Konzentration

Der Einfluss von neutralen Cyclodextrinen auf die Trennung wurde schon in einigen Veröffentlichungen beschrieben [z.B. 95,138] und in Vorversuchen ebenfalls untersucht (s.o.). In diesen Untersuchungen wurde die Menge des β -Cyclodextrins in 100 mM Tetraborat-Puffer optimiert. Durch die Zugabe von β -Cyclodextrin verringern sich die Migrationszeiten aller Komponenten, die von Gentamicin C1a, C2a und C2 sogar erheblich. Allein

die Zugabe von 5 mM β -Cyclodextrin bewirkt bei Gentamicin-C2 eine Migrationszeit-Verkürzung von ca. 5 Minuten. Der Effekt wird in Abb. 2.2-9 deutlich. Unter diesen Bedingungen (TB 100 mM, TDChol 25 mM (s. unten), β -Cyclodextrin variabel, pH 9.3) erhält man bei immer größeren Konzentrationen von β -Cyclodextrin sehr „scharfe“ Peaks. Im Laufe der Methodenentwicklung erwies sich eine Konzentration von 15 mM β -Cyclodextrin als sehr geeignet, da bei niedrigeren Konzentrationen der Peak des Sisomicins die gleiche Migrationszeit hat wie der des Gentamicin-C1a.

2.2.4.1.4 Optimierung des pH-Wertes

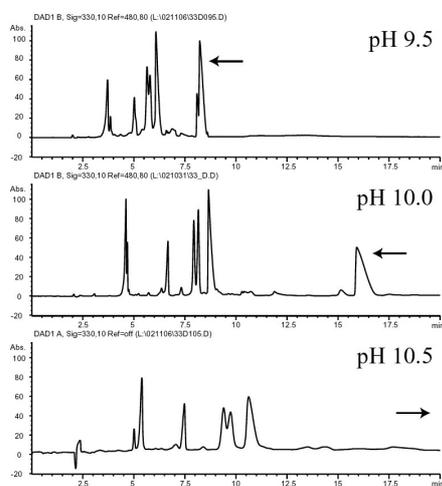


Abb. 2.2-10: Einfluss des pH-Wertes auf die Laufzeit: Kleine Abweichungen des pH-Wertes machen sich deutlich bemerkbar, was der mit dem Pfeil markierte Peak verdeutlicht (=IS; HGE nicht optimiert).

Mit leichtem Anstieg des pH-Wertes von 9.5 nach 10.5 erhöhten sich sowohl die Migrationszeiten der Bestandteile (s. Abb. 2.2-10), als auch der Strom bei angelegter konstanter Spannung. Wie oben angesprochen, migriert bei einem pH-Wert von 9.5 der IS in einem Substanz-Peak. Durch Anhebung auf 10.0 erscheint er deutlich abgegrenzt hinter dem letzten Peak (s. Pfeil). Auch wurden kleinere Peaks (z.B. von Sisomicin, Gentamicin-C2b, DSA) bei diesem pH-Wert von den Hauptkomponenten abgetrennt. Bei pH = 10.5 wurden alle Peaks breit, und die Migrationszeit des IS liegt über 18 Minuten. Schlussendlich wurde im Bereich von pH 9.5 bis pH

10.5 ein pH-Wert von 10.0 als Endbedingung gewählt. Bei diesem pH-Wert wurde unter optimierten Bedingungen in Bezug auf TB, β -CD und DChol die beste Trennung erreicht.

2.2.4.1.5 Wahl des Internen Standards

Da die Präzision von CE-Methoden im Vergleich zu HPLC-Methoden im Allgemeinen etwas schlechter ist [139], bedient man sich in der CE-Analytik gerne eines Internen Standards (IS), um Fehler z.B. in der Probenherstellung zu minimieren. Pikrinsäure wurde als IS in einigen Veröffentlichungen im Zusammenhang mit CE und Aminoglykosiden als IS eingesetzt [95,138,151]. Da der Pikrinsäure-Peak unter den Bedingungen des Muster-Hintergrundelektrolyten deutlich breiter war und sich dies auch nicht durch die Zugabe der „organic modifier“ oder andere IS-Konzentrationen änderte, wurde nach einer besseren

Alternative gesucht. Zu diesem Zweck wurden Ciprofloxacin, Levofloxacin, Enoxacin, Oxolinsäure, Tritoqualin und Hydrastin getestet. Diese Substanzen haben zwar keine primäre Aminogruppe wie die Aminoglykoside und sie werden auch nicht mit OPA derivatisiert, aber sie haben ein Absorptionsmaximum nahe der angewandten Detektionswellenlänge von 330 nm und sind unter den Messbedingungen stabil. Deshalb eignen sie sich als IS.

Die Fluorochinolone migrierten zwischen dem EOF und dem ersten Peak (Gentamicin-C1). Damit lagen sie in einem Bereich, in dem weitere Bestandteile des Gentamicin-Gemisches zu erwarten waren, und schieden deshalb aus. Tritoqualin und Hydrastin migrierten im EOF und waren somit auch nicht brauchbar. Da diese Untersuchungen erfolglos waren, wurde Pikrinsäure weiterhin als Interner Standard verwendet. Sie migriert hinter dem letzten Peak (Gentamicin-C2) im Elektropherogramm.

2.2.4.1.6 Zusatz von „organic modifier“

Der oft beschriebene Zusatz eines „organic modifier“, wie z.B. die Lösemittel Methanol, Isopropanol und Acetonitril wurde ebenfalls getestet. Eine Verwendung dieser drei Substanzen führte immer zu einer Verlängerung der Migrationszeiten, allerdings nicht zu einer Verbesserung der Peakform, weshalb auf den weiteren Einsatz verzichtet wurde.

2.2.4.1.7 Optimierung der Spülprozedur

Wegen der hohen Ionenstärke des HGE kam der Spülprozedur eine besonders wichtige Rolle zu. Aufgrund der vielen Bestandteile und der hohen Konzentrationen führten ungenügende Spülvorgänge häufig zu Auskristallisationen sowohl in der Kapillare als auch an den Elektroden. Dies wirkt sich auf die Trennleistung und auf die Reproduzierbarkeit der Methode aus. Spülprozeduren mit organischen Lösemittel-Gemischen wie Methanol/- oder Acetonitril/Wasser forcieren das Auskristallisieren. Sämtliche Mischungsverhältnisse (9:1 bis 1:9) wurden getestet, führten aber nicht zu einer signifikanten Verbesserung einer Trennung bzw. Reproduzierbarkeit der Methode. Auch die Verwendung einer 200 mM SDS/Acetonitril-Lösung, wie sie von Wienen et al. und Kunkel et al. [140,141] beschrieben worden ist, steigerte nicht die Reproduzierbarkeit der Methode. Erst der aufeinander folgenden Einsatz von NaOH und HCl (je 0.1 M) kombiniert mit Wasser und anschließendem HGE mit erhöhtem Druck (80 mbar anstatt 50 mbar) führten zum Erfolg. Außerdem muss die Kapillare gleich nach der Trennung mit Wasser (80 mbar) gespült werden, damit

die letzten Reste des HGEs aus der Kapillare gespült werden und sich nichts mehr ablagern kann. Weiterhin ist auch die Lagerung der Kapillare in Wasser wichtig, falls eine längere Pause zum nächsten Lauf (z.B. über Nacht) ist. Ansonsten kommt es zu einem Auskristallisieren des Puffers an den Elektroden, die dadurch fest mit den Kapillarenden verbunden sind.

2.2.4.1.8 Optimierung der Detektionswellenlänge

Ein Nachteil der Derivatisierung mit OPA ist die Eigenabsorption des überschüssigen Reagenzes im UV-Licht und das damit verbundene Auftreten eines oder mehrerer OPA-Peaks im Detektionsfenster. Durch Variation der Wellenlänge wurde versucht, nicht im Absorptionsmaximum des OPA's zu messen, um dadurch den Reagenzpeak zu minimieren. Gleichzeitig sollte es bei der so veränderten Wellenlänge möglich sein, die übrigen Peaks mit ausreichender Empfindlichkeit zu analysieren. Abb. 2.2-11 zeigt, dass bei einer Wellenlängenverschiebung von 330 nm auf 340 nm sich die Höhe und Fläche des OPA-Peaks auf ca. 44 % reduziert, die übrigen Peaks verändern ihre Höhe kaum (ca. -7 %). Nicht abgebildet ist der Pikrinsäure-Peak (IS), der sich bei der Veränderung der Detektionswellenlänge sogar um ca. 41 % vergrößert. Somit wurde für alle weiteren Messungen bei 340 nm detektiert.

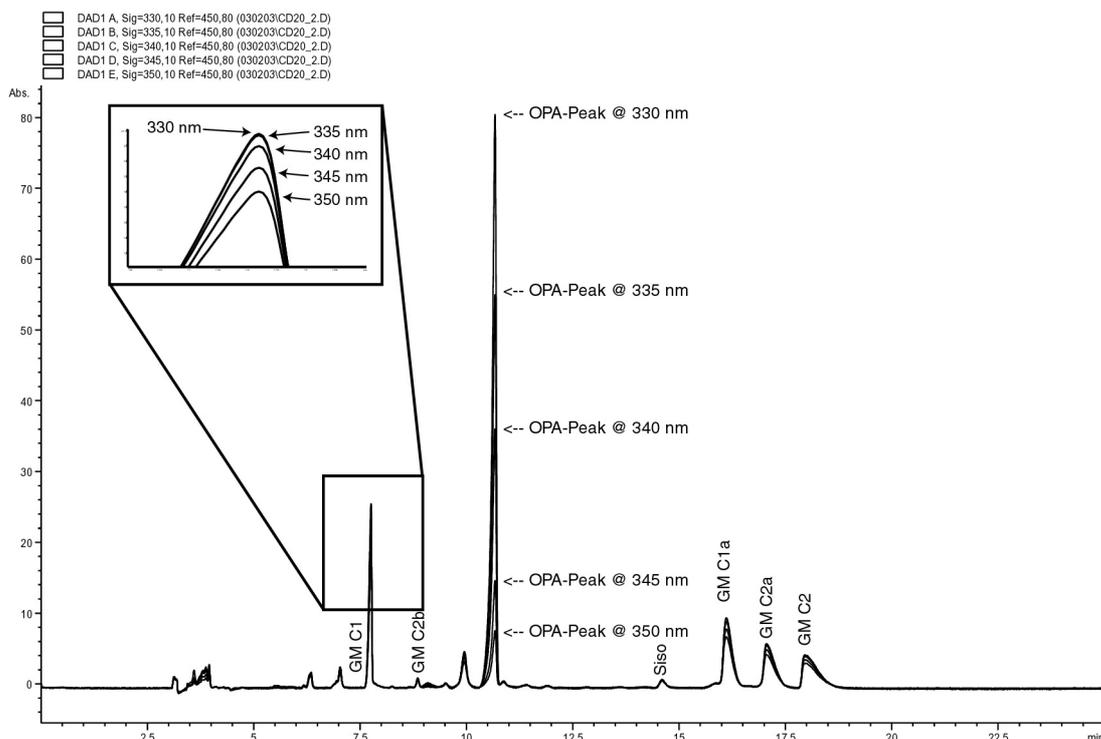


Abb. 2.2-11: Kommerzielle Gentamicin-Probe detektiert mit Wellenlängen von 330 nm bis 350 nm

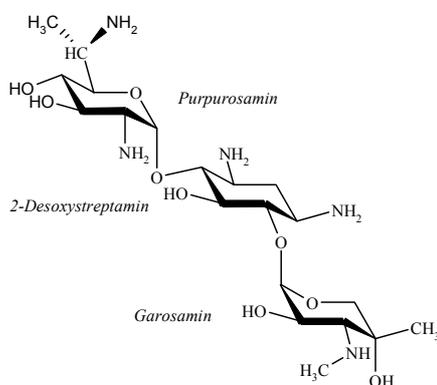
Zu bemerken ist weiterhin, dass alle Elektropherogramme gegen eine Referenzwellenlänge von 450 nm (Bandbreite 80 nm) aufgezeichnet worden sind. Dadurch werden Artefakte einer Trennung, deren Auftreten z.T. gerätespezifische Gründe haben und sich über das ganze Spektrum erstrecken können, direkt herausgefiltert.

2.2.4.2 Zuordnungen

Durch Zusatz der einzelnen Komponenten („spiking“), wie z.B. Gentamicin-C1, Gentamicin-C1a und Gentamicin-C2/C2a, konnten die Peaks im Elektropherogramm den einzelnen Komponenten zugeordnet werden. Für die Basislinientrennung aller Bestandteile und der in geringer Menge enthaltenen Komponenten, wie z.B. Gentamicin-C2b, GA, DSA und Sisomicin mussten folgende Parameter der Methode verwendet werden:

HGE:	TB 100 mM, β-CD 15 mM,	DChol 20 mM, pH 10.0	
Vor-Spülen:	0.1 M NaOH,	1.5 Minuten	50 mbar
	Wasser,	1.5 Minuten	50 mbar
	0.1 M HCl,	2.0 Minuten	50 mbar
	Wasser,	2.0 Minuten	50 mbar
	HGE,	3.0 Minuten	80 mbar
Nach-Spülen:	Wasser	2.0 Minuten	80 mbar
Trennungsspannung:	+12 kV		
Derivatisierung:	60 °C	4.0 Minuten	

Abb. 2.2-13 A zeigt das Elektropherogramm einer Gentamicin-Probe, die einen sehr hohen Anteil an weiteren Komponenten aufweist. Abb. 2.2-13 B dagegen zeigt eine relativ „saubere“ Gentamicin-Probe. Die bekannte Verunreinigung GA ist deutlich vom Gentamicin-C1-Peak bei ca. 7 Minuten getrennt. Ebenso kann Gentamicin-C2b (bei ca. 9 Minuten) basisliniengetreunt werden. Die Peaks a bis h konnten nicht identifiziert werden. In Proben mit sehr hohem Nebenkomponentenanteil kann es zu Überlappungen kommen. Deutlich wird dies an Peak h, der in fast jeder Probe vorhanden ist. Er komigriert leicht mit Sisomicin, sofern es in der Probe vorhanden ist. Zusätzlich liegt Peak h sehr nahe an Gentamicin-C1a. Durch „Spiking“-Experimente konnte die



JI-20 B
(Dihydroxy C2a)

Abb. 2.2-12:
Chemische Struktur von JI-20 B

C1-Peak bei ca. 7 Minuten getrennt. Ebenso kann Gentamicin-C2b (bei ca. 9 Minuten) basisliniengetreunt werden. Die Peaks a bis h konnten nicht identifiziert werden. In Proben mit sehr hohem Nebenkomponentenanteil kann es zu Überlappungen kommen. Deutlich wird dies an Peak h, der in fast jeder Probe vorhanden ist. Er komigriert leicht mit Sisomicin, sofern es in der Probe vorhanden ist. Zusätzlich liegt Peak h sehr nahe an Gentamicin-C1a. Durch „Spiking“-Experimente konnte die

Basislinientrennung zwischen Sisomicin und Gentamicin-C1a deutlich gezeigt werden. Besonders auffällig ist der Peak d. Vermutlich handelt es sich um das Nebenprodukt JI-20 B (Abb. 2.2-12). In der EuAB-Monographie für Gentamicin wird diese Verbindung als „Dihydroxy-Gentamicin-C2a“ beschrieben [137, Verunreinigung D]. Sie wird in einer vermessenen Probe mit ähnlichem Gehalt wie Sisomicin angegeben [135]. Dies trifft auch auf den Peak d in den für diese Arbeit verwendeten Proben zu, so dass es sehr wahrscheinlich ist, dass es sich um JI-20 B handelt.

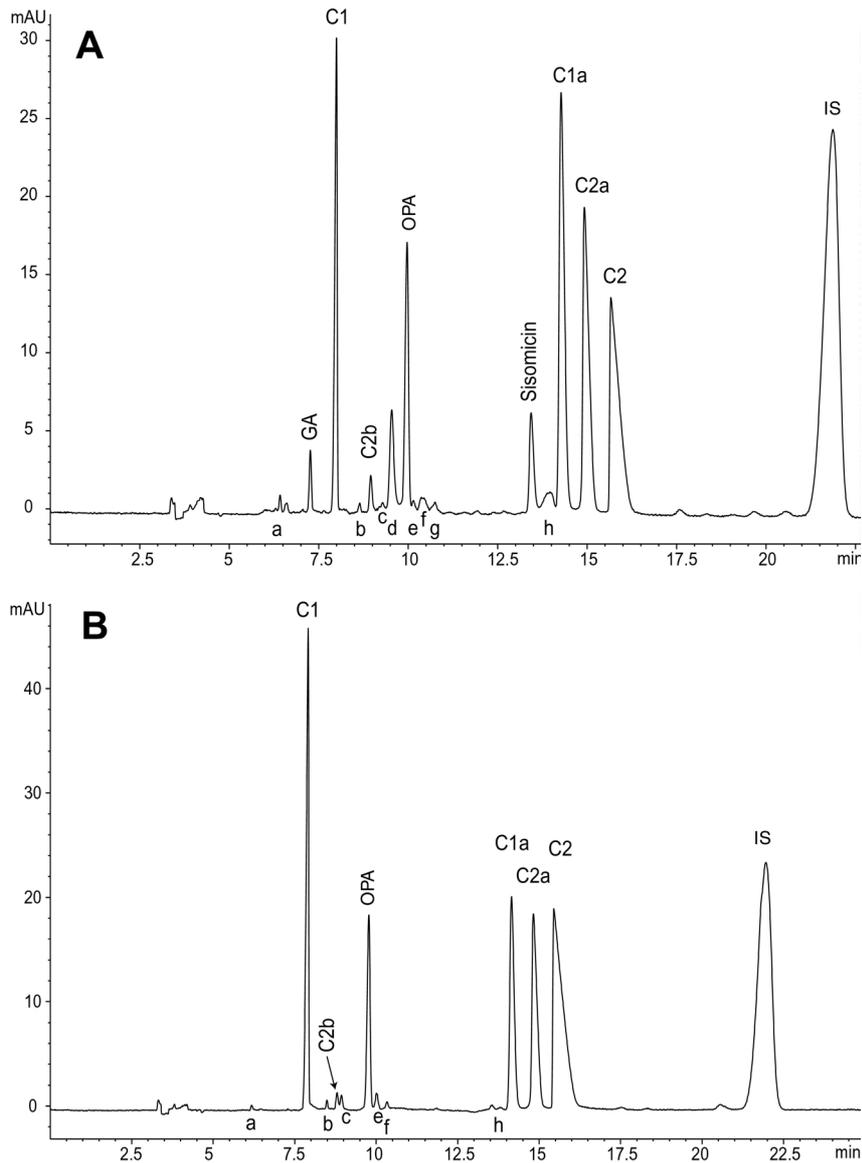


Abb. 2.2-13: Elektropherogramm zweier kommerziellen Proben mit einem hohen Anteil (A) und sehr niedrigem Anteil an Nebenkomponenten (B)

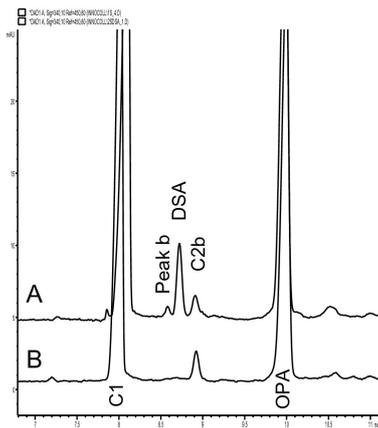


Abb. 2.2-14: Elektropherogramm einer kommerziellen Gentamicin-Probe mit (A) und ohne (B) DSA "gespiked"

DSA, migriert kurz vor dem C2b-Peak. Abb. 2.2-14 zeigt die Elektropherogramme einer „gespiketen“ Probe. Im Allgemeinen kommt DSA nur in wenigen der vermessenen Proben vor.

In einer Veröffentlichung wird Gentamicin auch auf die Substanz Paromamin geprüft [138]. Im Gegensatz zu dieser Veröffentlichung ist Paromamin mit dieser MEKC-Methode deutlich abgetrennt (Abb. 2.2-15), konnte aber in keiner Probe nachgewiesen werden.

Die hier entwickelte Methode ist robust in Bezug auf die Zusammensetzung des HGEs. So haben Unterschiede von 0.5 % (m/m) in der Einwaage der Bestandteile keinen signifikanten Einfluss auf die Güte der Trennung.

Dagegen muss der pH-Wert des Elektrolyten sehr genau eingehalten werden, da sich ansonsten die Migrationszeiten stark verschieben (s. auch Kapitel 2.2.4.1.4).

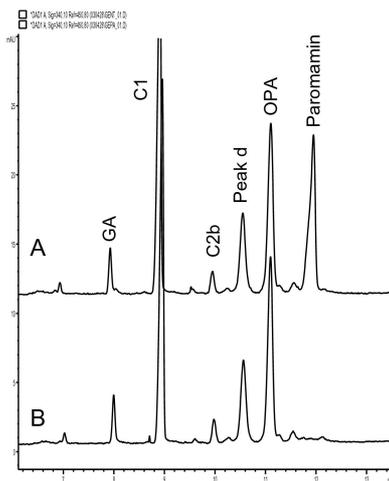


Abb. 2.2-15: Elektropherogramm einer kommerziellen Gentamicin-Probe mit (A) und ohne (B) Paromamin "gespiked"

2.2.4.3 Präzision der Methode

Generell sollte in Messpräzision und Methodenpräzision unterschieden werden. Messpräzisionswerte sind die Werte, die im Normalfall mit fehlerfreien analytischen Geräten erreicht werden können. Bei der Chromatographie liegt der Wert der relativen Standardabweichung (auch Variationskoeffizient V_k

genannt) bei $< 1\%$, bei der Kapillarelektrophorese/Elektrochromatographie bei $< 2\%$ [139]. Die Methodenpräzision ist allerdings auch abhängig von der Komplexität der Methode, der Matrix und der Konzentration. Für den Pharmabereich sind folgende Forderungen üblich [139]:

Gehalt der Neben- und Abbauprodukte bezogen auf die Hauptkomponente	Richtwerte für zulässigen V_k
$\geq 10\%$	3 %
10 %-1 %	5 %
1 %-0.1 %	10 %

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision wurden fünf Derivatisierungen der gleichen Probe durchgeführt und nacheinander vermessen. Die Migrationszeiten der einzelnen Komponenten wurden gegen die Migrationszeit des Internen Standards ins Verhältnis gesetzt und aus den erhaltenen fünf Werten pro Komponente die relative Standardabweichung ($RSD = V_k$) berechnet. Die gleiche Prozedur wird mit den Werten der Peakflächen und der Peakhöhen durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 2.2-7 angegeben. Sie zeigen für eine CE-Methode akzeptable Werte bezogen auf die oben genannten.

Tabelle 2.2-7: Präzisions-Daten von Gentamicin und seinen Verunreinigungen (* = Parameter (Komponente/IS; ° = relative Standardabweichung); Mehrtagespräzisionen wurden im Abstand von 2 Tagen durchgeführt)

	Wiederholpräzision RSD° [%]	Mehrtagespräzision RSD° [%]
Migrationszeit-Verhältnis* (n=5)		
GA	1.11	0.82
Gentamicin-C1	1.02	0.76
Gentamicin-C2b	1.04	0.64
Sisomicin	0.23	0.34
Gentamicin-C1a	0.53	0.24
Gentamicin-C2a	0.46	0.22
Gentamicin-C2	0.39	0.23
Flächen-Verhältnis* (n=5)		
GA	4.98	3.56
Gentamicin-C1	3.62	2.04
Gentamicin-C2b	3.53	6.30
Sisomicin	7.31	14.87
Gentamicin-C1a	3.12	4.71
Gentamicin-C2a	1.53	2.62
Gentamicin-C2	2.27	2.27
Höhen-Verhältnis* (n=5)		
GA	4.55	3.01
Gentamicin-C1	3.31	4.41
Gentamicin-C2b	3.51	5.55
Sisomicin	9.83	12.24
Gentamicin-C1a	3.31	4.48
Gentamicin-C2a	2.09	5.55
Gentamicin-C2	3.23	4.88

Die gleichen Vorgänge sind nach zwei Tagen wiederholt worden, um die Mehrtagespräzision bestimmen zu können (s. Tabelle 2.2-7). Auch sie zeigen akzeptable Werte. Bemerkenswert ist, dass die Werte der Mehrtagespräzision ähnlich wie die der Wiederholpräzision sind. Üblicherweise fallen sie schlechter aus. Diese Tatsache spricht für die Robustheit dieser Methode. Die starken Schwankungen bzw. die etwas höheren Werte für Sisomicin liegen einerseits in der geringen Größe des Peaks, andererseits in der nicht immer möglichen Basislinientrennung von der unbekanntem Verunreinigung h begründet.

2.2.4.4 Ergebnis

Ausgehend von der in Kapitel 2.1.2.1 angewandten CZE-Methode, wurde eine neue Methode entwickelt, mit der sehr viel mehr Nebenprodukte zu erkennen sind. Der C2a-Peak wurde aus der Mitte der „3er-Gruppe“ (bei ca. 15 Minuten) nach vorne verschoben, so dass eine verbesserte Basislinientrennung der Peaks gewährleistet ist. Dadurch sind evtl. auftretende Nebenprodukte deutlicher zu erkennen. Repräsentative Elektropherogramme sind in Abb. 2.2-16 dargestellt.

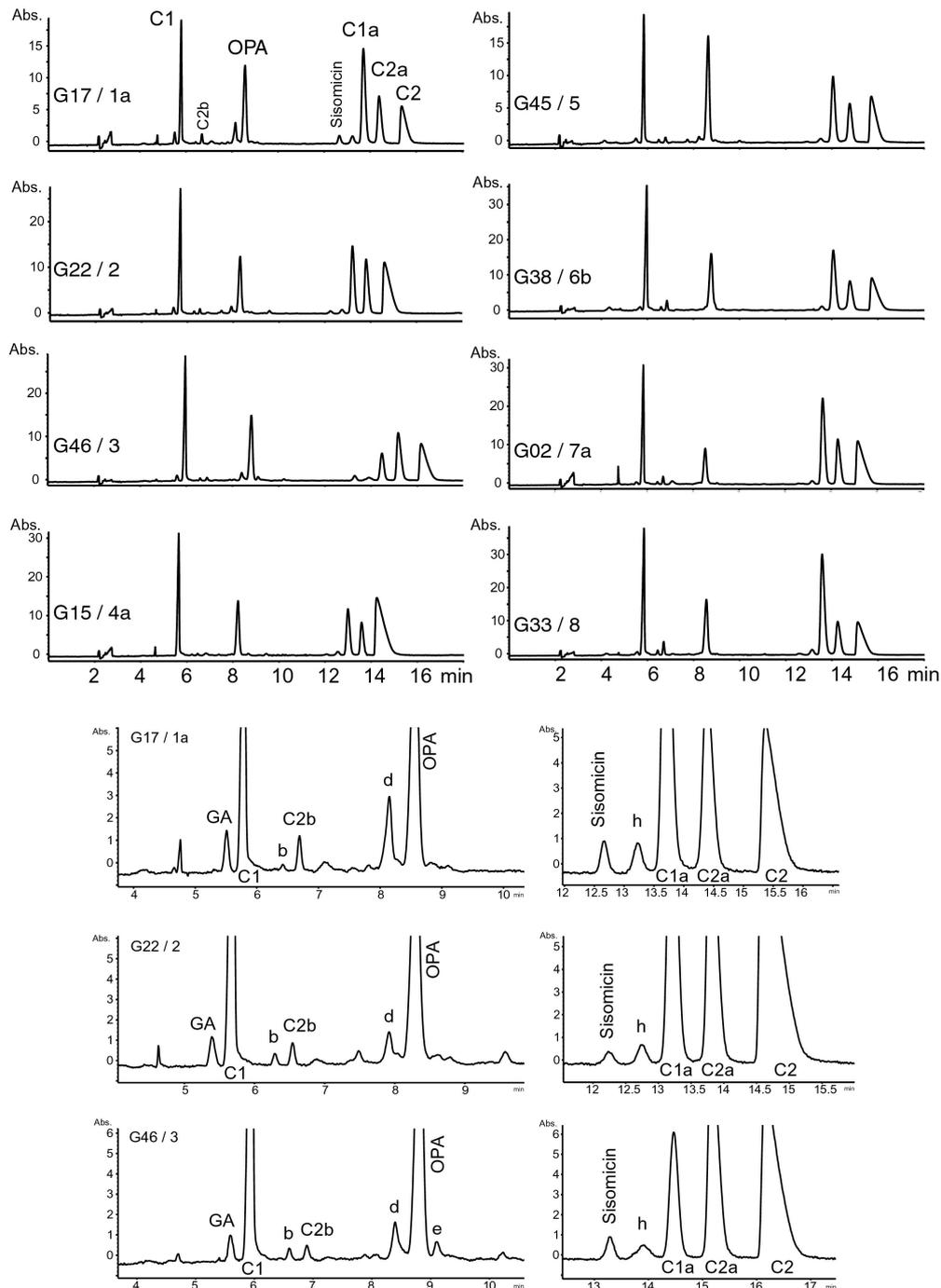


Abb. 2.2-16: Repräsentative Elektropherogramme aus jeder Gruppe (Probencodierung/Gruppe). Unten sind die Bereiche der Verunreinigungen vergrößert.

Es wurde überprüft, ob die Proben den Anforderungen der Gentamicin-Monographien des EuAB 4.4 und 4.5 entsprechen. Es ist zu beachten, dass die jeweiligen Auswertungsarten für eine HPLC-Methode bestimmt sind und sie nicht ohne weiteres auf CE-Methoden übertragbar sind. In der im EuAB 4.4 beschriebenen Methode wird das Verhältnis der vier Hauptpeaks anhand eines Höhenvergleichs berechnet, die mit den jeweiligen Höhen der CRS-Substanz verglichen werden. Auf diese Weise erhält man den Responsefaktor RF_x der einzelnen Komponenten. Berechnet wird er nach folgender Gleichung:

$$\text{Gleichung 2.2-1} \quad RF_x = \frac{H_x}{F_x}$$

F_x = Verhältnis des Bestandteiles C_x im Gentamicin-CRS

H_x = Höhe des Peaks des Bestandteiles C_x im Chromatogramm der Referenzlösung

Mit den ermittelten Responsefaktoren können mit folgender Formel die relativen Verhältnisse der vier Hauptpeaks (C_x) ausgerechnet werden:

$$\text{Gleichung 2.2-2} \quad C_x (\text{in } \%) = \frac{\frac{H'_x}{RF_x} \cdot 100}{\frac{H'_1}{RF_1} + \frac{H'_{1a}}{RF_{1a}} + \frac{H'_{2a}}{RF_{2a}} + \frac{H'_2}{RF_2}}$$

H_x = Peakhöhe des Bestandteils C_x im Chromatogramm der Untersuchungslösung

Alle Werte der Proben lagen innerhalb der geforderten Werte des EuAB 4.4 (Tabelle 2.2-1). Bei diesem Verfahren werden nur die vier Hauptpeaks betrachtet, nicht aber auftretende Nebenprodukte.

Die Berechnung von Gentamicin in der Monographie nach EuAB 4.5 erfolgt nach dem Normalisierungsverfahren. Hierbei werden alle relevanten Peaks der Haupt- und Nebenkomponten integriert. Die Peakflächen werden gegeneinander ins Verhältnis gesetzt. Bei der Auswertung der Elektropherogramme ist zu beachten, dass die korrigierten Peakflächen (Fläche/Migrationszeit) verwendet werden, da die integrierte Peakfläche eines Peaks nicht direkt im Verhältnis zur Menge der Komponente im Analyten steht. Bedingt durch die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Proben am Detektor erhält man

für Proben mit gleichen molaren Extinktionskoeffizienten unterschiedliche Peakflächen. Aus diesem Grund ist diese Korrektur notwendig.

Die Ergebnisse dieser Auswertungsmethode (EuAB 4.5) unterscheiden sich aber in großem Ausmaße von der Methode des EuAB 4.4. Die Werte von Peak Gentamicin-C1a sind ca. 60 % zu hoch, die Werte von Gentamicin-C2/C2a/C2b deutlich zu niedrig. Dies zeigt, dass ein direkter Vergleich der beiden Auswertungsarten nicht gestattet ist. Tabelle 2.2-8 gibt eine Übersicht der Werte, die nach der neuen (Normalisierungs-) Methode berechnet worden sind.

Dieser Unterschied der Gehalte ist erklärbar, da einerseits der genaue Gehalt der vier Komponenten durch Vergleich gegen die CRS-Substanz genau bestimmt wird (EuAB 4.4), andererseits „nur“ die Flächenverhältnisse untereinander verglichen werden (EuAB 4.5). Bei der Auswertung nach EuAB 4.5 wird nichts über den wahren Gehalt der Komponenten in der Probe ausgesagt.

Tabelle 2.2-8: Übersicht der Gehaltsbestimmung (in %) der Proben, vermessen nach EuAB 4.5 (HG = Hauptgruppe; UG = Untergruppe; GA = Garamin; Siso = Sisomicin; NP = Nebenpeak)

HG	UG	Proben-Code	C1	C1a	C2	C2a	C2b	C2-Gesamt	Siso	Peak d	GA	Größter NP	Gesamt NP
I	1a	G05	15.7	32.6	19.5	17.1	1.4	38.0	3.2	5.3	1.5	5.3	13.7
I	1a	G16	15.4	32.0	19.6	17.3	1.4	38.3	2.4	5.2	1.7	5.2	14.3
I	1a	G17	16.0	31.5	19.8	17.3	1.4	38.6	2.1	5.1	1.7	5.1	14.0
I	1a	G18	16.9	28.5	20.5	17.2	1.5	39.2	2.0	5.1	1.5	5.1	15.4
I	1a	G25	16.9	28.7	20.9	18.0	1.3	40.2	1.1	6.2	1.4	6.2	14.2
I	1b	G31	18.8	28.9	18.4	18.5	1.4	38.2	5.4	2.8	1.2	5.4	14.1
I	1b	G32	17.9	28.7	18.6	19.5	1.4	39.6	5.1	2.8	0.8	5.1	13.9
I	1b	G44	18.7	27.8	18.3	18.4	1.4	38.2	5.7	4.3	0.7	5.7	15.3
I	1c	G20	17.9	29.2	14.5	16.8	2.0	33.3	6.1	7.3	1.0	7.3	19.6
I	1d	G12	17.0	23.7	20.7	21.4	1.2	43.3	3.6	6.3	1.7	6.3	16.1
I	1d	G14	17.5	23.1	21.6	21.3	1.2	44.2	2.7	5.5	2.0	5.5	16.0
I	1d	G21	16.5	23.5	20.6	21.6	1.2	43.3	4.0	6.3	1.7	6.3	16.6
I	1d	G26	18.7	20.1	21.4	21.7	1.1	44.1	3.9	5.4	1.4	5.4	17.1
I	1d	G41	17.7	25.1	23.3	20.0	0.9	44.3	2.9	3.9	1.8	3.9	13.0
I	2	G22	17.7	21.0	34.0	18.3	0.7	53.0	0.8	1.2	1.1	1.6	8.3
I	3	G46	24.1	11.9	29.9	23.7	0.8	54.4	1.8	2.6	1.2	2.6	9.6
II	4a	G01	20.8	18.0	46.5	12.1	0.4	58.9	0.5	0.0	0.0	0.9	2.3
II	4a	G15	19.4	15.8	49.5	10.6	0.3	60.5	0.4	0.0	0.0	1.5	4.4
II	4a	G07	18.0	15.9	51.1	12.7	0.2	64.0	0.0	0.0	0.0	0.9	2.1
II	4a	G40	28.8	18.0	40.3	10.6	0.6	51.5	0.0	0.0	0.0	0.7	1.7
II	4b	G28	20.4	21.7	35.8	19.1	0.5	55.3	0.5	0.0	0.0	0.8	2.5
II	4b	G27	20.0	21.9	36.6	19.1	0.5	56.2	0.4	0.0	0.0	0.7	1.9
II	4b	G29	19.9	22.2	36.6	19.3	0.5	56.4	0.0	0.0	0.0	0.7	1.5
II	4b	G30	26.9	17.5	35.6	18.4	0.6	54.5	0.0	0.0	0.0	0.4	1.0
II	4c	G03	18.7	18.7	36.6	20.4	0.7	57.7	0.0	0.0	0.5	1.0	4.9
II	4c	G04	18.8	18.3	37.8	20.0	0.6	58.5	0.0	0.0	0.5	1.0	4.4
II	5	G36	18.4	25.6	34.1	18.7	0.8	53.5	0.4	0.0	0.0	1.0	2.5
II	5	G45	20.0	25.4	30.0	16.7	1.1	47.9	0.0	1.3	1.3	1.7	6.7
II	6a	G39	22.5	27.5	30.8	15.4	1.1	47.2	1.4	0.0	0.0	1.4	2.8
II	6a	G06	20.0	24.8	33.5	16.4	1.1	50.9	1.2	0.0	0.5	1.2	4.2
II	6a	G09	21.3	24.7	32.7	15.6	0.9	49.2	0.6	0.0	0.3	1.3	4.9
II	6a	G08	18.8	23.8	34.8	17.0	0.7	52.6	0.5	0.0	0.3	1.5	4.8
II	6b	G37	20.5	31.0	29.6	15.2	1.2	46.1	1.3	0.0	0.3	1.3	2.4
II	6b	G34	22.1	27.2	25.7	18.4	1.6	45.7	0.5	0.0	0.4	1.7	5.0
II	6b	G38	24.1	27.9	25.7	14.6	1.7	41.9	0.5	0.0	0.8	1.3	6.1
II	6b	G35	23.6	29.6	26.7	15.1	1.6	43.5	0.4	0.0	0.3	1.6	3.3
II	6b	G19	21.7	27.1	27.9	19.0	1.0	48.0	0.0	0.0	0.0	2.0	3.3
II	7a	G11	18.5	31.0	28.7	16.3	1.2	46.2	0.7	0.0	0.6	1.2	4.2
II	7a	G10	18.1	31.5	29.1	16.3	1.3	46.8	0.5	0.0	0.5	1.2	3.6
II	7a	G02	17.9	29.7	30.9	17.0	1.1	49.0	0.0	0.0	0.5	1.1	3.4
II	7b	G24	17.7	29.1	31.0	17.5	0.8	49.3	0.6	0.7	0.3	1.2	3.9
II	7b	G23	18.1	28.8	30.2	17.4	0.9	48.5	0.6	0.8	0.4	1.2	4.6
II	7b	G42	17.6	28.4	31.3	18.2	0.8	50.3	0.5	0.0	0.4	2.1	3.7
II	7b	G43	17.5	29.1	31.4	18.1	0.9	50.3	0.5	0.0	0.4	1.3	3.0
II	8	G13	20.9	34.1	22.9	13.6	2.0	38.5	0.8	0.5	2.2	2.2	6.4
II	8	G33	20.9	36.8	22.4	13.4	2.0	37.9	0.6	0.0	0.8	1.8	4.5

Wie in Kapitel 2.2.3 wurden die zur Verfügung gestellten Proben verschiedener Hersteller und Vertreiber nach den Anforderungen des EuAB 4.5 vermessen und miteinander verglichen. Zwischenzeitlich sind sieben Proben eines weiteren Herstellers bzw. Vertreibers hinzugekommen.

Tabelle 2.2-9: Neue Gruppeneinteilung der untersuchten Proben

Haupt-Gruppe	Unter-Gruppe	Probencode	Vertreiber	Hersteller
I	1a	G05	F	VII
		G16	A	I
		G17, G18	A	II
		G25		XI
	1b	G31, G32		XII
		G44	N	
	1c	G20	G	IX
	1d	G12	I	VIII
		G14	I	X
		G21	G	VIII
		G26		XI
		G41	N	
	2	G22		XI
	3	G46	N	
II	4a	G01	E	VII
		G07	H	III
		G15	B	III
		G40	N	
	4b	G27, G28, G29, G30		XII
	4c	G03, G04	C	V
	5	G36		XIV
		G45	N	
	6a	G06	H	V
		G08, G09	L	V ^o
		G39		XIV
G19		K	V	
6b	G34, G35, G37, G38		XIV	
	G02	D	VI	
7a	G10, G11	M	IV*	
	G23, G24		XI	
7b	G42, G43	N		
	G13	I	X	
8	G33		XIV	

^o Vertreiber = Hersteller; * Keine weiteren Informationen verfügbar

Tabelle 2.2-10: Transferliste von alter zu neuer Einteilung

Alte Gruppe	Neue Gruppe
1a	1a
1b	1b
1c	1c
1d	1d
2	2
8*	3
3a	4a
3b	4b
3c	4c
4	5
5a	6a
5b	6b
6a	7a
6b	7b
7	8

* nach Erhalt weiterer Proben neu entstandene Gruppe

Im Allgemeinen kann man die Proben in zwei große Gruppen einteilen: Eine, bei der die Proben fast nur aus den vier Hauptkomponenten bestehen und eine, bei der die Proben sehr viele Nebenkomponten beinhalten. Zur letzteren Gruppe gehören Proben, bei denen Sisomicin stets in beträchtlicher Menge vorhanden ist (Hauptgruppe I, s. Tabelle 2.2-9). Nach dieser ersten Unterteilung wurden die Peakhöhen der im Elektropherogramm enthaltenen Peaks und deren Verhältnisse zueinander betrachtet und weiter eingeteilt. Es entstanden dadurch insgesamt acht Gruppen, teilweise unterteilt in einzelne Untergruppen (Tabelle 2.2-9). Zur besseren Übersichtlichkeit wird in Tabelle 2.2-10 eine Transferliste dargestellt, um die alte und neue Gruppeneinteilung miteinander vergleichen zu können.

Durch die zusätzlichen Proben entsteht eine neue Gruppe 8 im Vergleich zur Einteilung nach der CZE-Methode. Der Vergleich der Einteilungen (CZE- und MEKC-Methode) ergibt innerhalb der einzelnen Gruppen 1-8 keine Unterschiede. Dies zeigt, dass die Messungen der beiden Methoden vergleichbar sind. Einzig die Einteilung nach „Sisomicin-haltig“ und „Sisomicin-frei“ ändert die Reihenfolge der Gruppen 1-8 untereinander.

Nach dieser Einteilung wurde festgestellt, in welcher Gruppe sich die Proben befanden, die zu den Todesfällen in den USA geführt haben. Diese befanden sich ausschließlich in der Gruppe der „Sisomicin-haltigen“ Proben, so dass man einen Zusammenhang der Proben mit den Todesfällen vermuten kann. Sisomicin kann somit als eine Leitsubstanz in Gentamicin für verunreinigte Proben betrachtet werden.

Weiterhin ist in sehr vielen Proben Netilmicin gefunden worden. Dies wurde erst möglich, nachdem die Trennungsspannung von 12 kV auf 14 kV geändert wurde, da unter Standardbedingungen der Netilmicin-Peak vom OPA-Peak überdeckt wird (s. Kapitel 2.4.). Da Netilmicin semisynthetisch aus Sisomicin hergestellt wird, ist es in der Gentamicin-Monographie nicht als Verunreinigung aufgeführt. Mittlerweile ist aber möglich, Netilmicin - wie Gentamicin - ebenfalls fermentativ aus *Micromonospora*-Kulturen zu gewinnen [43]. Durch Mutation der Gentamicin-produzierenden *Micromonospora purpurea* ist es also denkbar, dass neben den Hauptkomponenten des Gentamicins auch Netilmicin produziert werden kann.

2.2.4.5 NMR-Untersuchungen von Gentamicin

In den bisher erschienenen Publikationen und im DAB 9 wurden 60 MHz ^1H - und 22.5 MHz ^{13}C -NMR-Spektren zur Klassifizierung von Gentamicin herangezogen [142,143,144]. Um im Vergleich zur CE eine völlig unabhängige Methode zur Einteilung von Gentamicin zu erhalten, wurden alle vorhandenen Proben mit einem 400 MHz-Spektrometer in Deuteriumoxid vermessen.

Die Spektren wurden anhand ihrer Muster zunächst in den Regionen der anomeren Protonen im Bereich von 5.0 ppm bis 6.0 ppm (s. Abb. 2.2-18) verglichen. Dem Bereich A kann man eindeutig die anomeren Protonen des Purpurosamin-Ringes von Gentamicin C2a, C1, C2 bzw. C1a zuordnen. Das Signal von Gentamicin C2b erscheint unter dem C2a-Signal [145].

Besonders zwischen 5.7 ppm und 5.8 ppm zeigten sich bei einigen Proben zusätzliche Signale (Abb. 2.2-18; B). Bei 5.7 ppm sind die Signale des anomeren Protons des 4,5-Dehydropurpurosamin-Ringes von Sisomicin sichtbar, ebenso die von Netilmicin. Die beiden Substanzen zeigen zusätzlich Signale des anomeren Protons des Garosamin-Ringes bei 5.3 ppm (C). Eine Unterscheidung der beiden Substanzen ist nicht möglich.

Wie in Kapitel 2.2.4.2 schon angesprochen, wird als Peak d der MEKC-Methode die Substanz JI-20B vermutet. Die Reinsubstanz stand für „Spiking“-Experimente allerdings nicht zur Verfügung. Da sie oftmals in der Größenordnung des Sisomicins in „Sisomicin-haltigen“ Proben vorhanden war [135], stellt in den ^1H -NMR-Messungen vermutlich das Signal bei 5.8 ppm das anomere Proton des 3,4-Dihydroxypurpurosamin-Ringes von JI-20B dar, da dieses Signal die ungefähre Größe des Sisomicins hat. Die Tatsache, dass bei allen Elektropherogrammen, bei denen Peak d vorhanden ist, auch im ^1H -NMR-Spektrum dieses Signal zu sehen ist, bestärkt diese Vermutung.

Die Signale des anomeren Protons von Garosamin sind deutlich bei 5.2 ppm zu erkennen (C). Bei „unsauberen“ Proben (Abb. 2.2-18, oben) ist an der rechten Flanke auch ein Signal der Verunreinigung Garamin zu erkennen. Dies lässt sich auch mit den Elektropherogrammen der entsprechenden Proben stützen.

Weiterhin sind im Bereich zwischen den beiden N-CH₃-Signalen zwischen 2.7 ppm und 2.9 ppm teilweise Singulets zu beobachten (D). Ebenso zeigten sich weitere Signale zwischen 2.1 ppm und 2.5 ppm (E).

Alle oben genannten Signale waren nur von geringer Höhe im ^1H -NMR-Spektrum zu sehen.

Im Vergleich zu den CE-Messungen sah man in den NMR-Spektren der Proben, die durch CE-Messungen als „Sisomicin-haltig“ eingestuft wurden, zum einen Peaks, die auch dem Sisomicin/Netilmicin zuzuordnen sind (s. Abb. 2.2-17), zum anderen Signale, die auf Peak d/JI-20 B oder GA hinwiesen. Wie schon hingewiesen, kann man zwischen Sisomicin und Netilmicin im NMR-Spektrum nicht unterscheiden, dennoch lassen sich die Proben selektieren, die keine der beiden Substanzen beinhalten. Diese Proben zeigen auch im Elektropherogramm keine Sisomicin- bzw. Netilmicin-Peaks.

Anhand der Muster aller Spektren kann man die Gentamicin-Proben, in Gruppen einteilen. Zunächst wurden die untersuchten Proben wieder nach „Sisomicin/Netilmicin-haltig“ und „-nichthaltig“ unterteilt. Schließlich wurden die Größen der oben angesprochenen Signale der vier Hauptkomponenten bei 6.0 ppm, der Nebenkomponenten GA und JI-20B (5.2 ppm, 5.7 ppm, 5.8 ppm) und der Signale in den Regionen D und E und deren Verhältnisse untereinander verglichen. Letztendlich erhält man die gleiche Aufteilung der Proben wie bei den Messungen mit der CZE- oder MEKC-Methode.

Die Tatsache, dass zwei voneinander unabhängige analytische Methoden (CE und NMR) gleiche Ergebnisse liefern, unterstreicht die Richtigkeit der bisher getroffenen Aussagen.

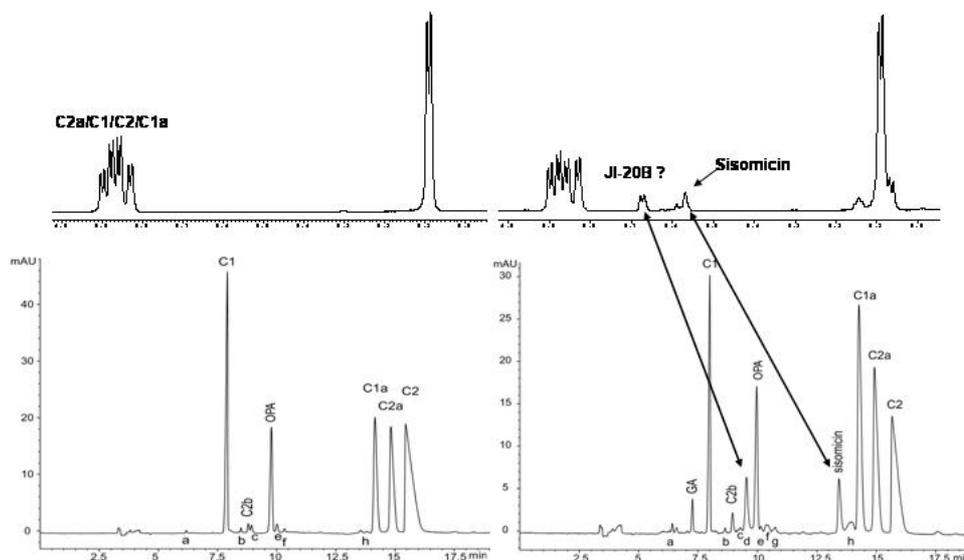


Abb. 2.2-17: Vergleich einer "Sisomicin-freien"- (links) und "Sisomicin-haltigen"- Probe (rechts) im NMR und CE. In der rechten Probe sind Sisomicin und Peak d (vermutlich JI-20 B) mit beiden Systemen zu erkennen.

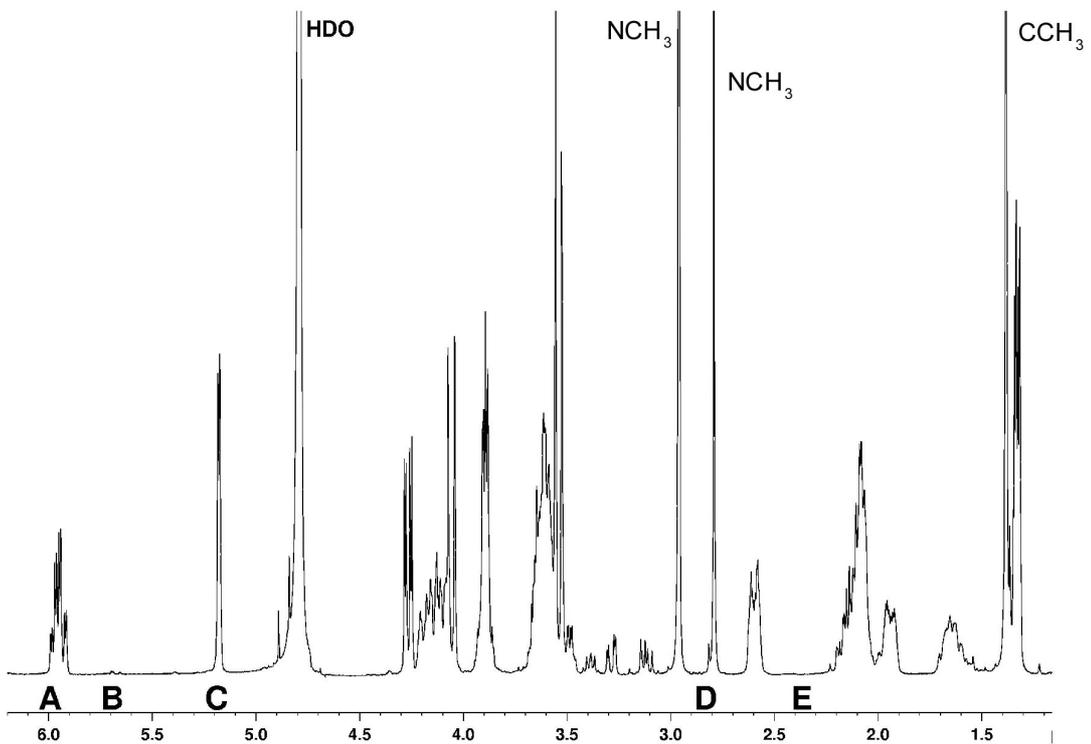
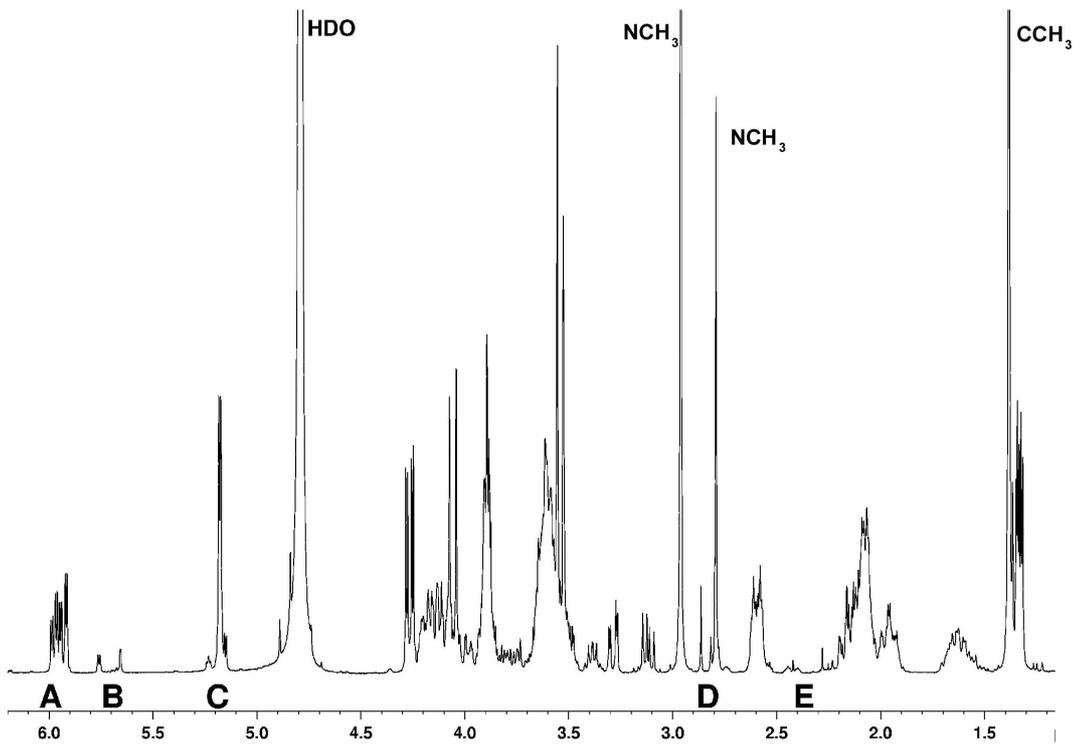


Abb. 2.2-18: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Gentamicin-Proben mit hohem (oben) und niedrigem (unten) Nebenproduktanteil; die Regionen A-D kennzeichnen die Bereiche signifikanter Unterschiede

2.2.5 HPLC-Methode nach EuAB 4.5

Um die Ergebnisse der MEKC-Methode mit Chromatogrammen aus der neuen Arzneibuchmethode vergleichen zu können, wurden einige Gentamicin-Proben mit dieser Arzneibuchmethode untersucht. Der Eluent besteht aus einer wässrigen Lösung aus Natriumsulfat (60 g/l) und Natriumoctansulfonat (1.75 g/l), Tetrahydrofuran (THF) (8 ml) und 50 ml Kaliumdihydrogensulfat (0.2 M). Diese wässrige Lösung wird vor der Zugabe des THF mit verdünnter Phosphorsäure R auf einen pH-Wert von 3.0 eingestellt. Die Proben wurden im Eluenten gelöst (0.5 mg/ml) und 20 µl injiziert. Die Säule besteht aus einem Styroldivinylbenzol-Kopolymer-Material (Korngröße 8 µm, Porengröße 100 nm, Länge der Säule = 0.25 m, Durchmesser = 4.6 mm). Das Eluat wird, nachdem es die Säule verlassen hat, auf einen pH-Wert >11 eingestellt. Dazu wird als Nachsäulen-Lösung eine 0.2 M Natriumhydroxid-Lösung hergestellt. Die Chromatogramme werden mit einem gepulsten elektrochemischen (amperometrischen) Detektor (ECD) aufgenommen.

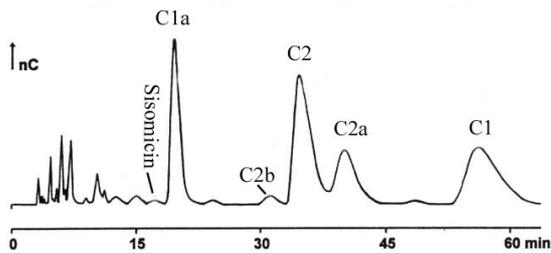


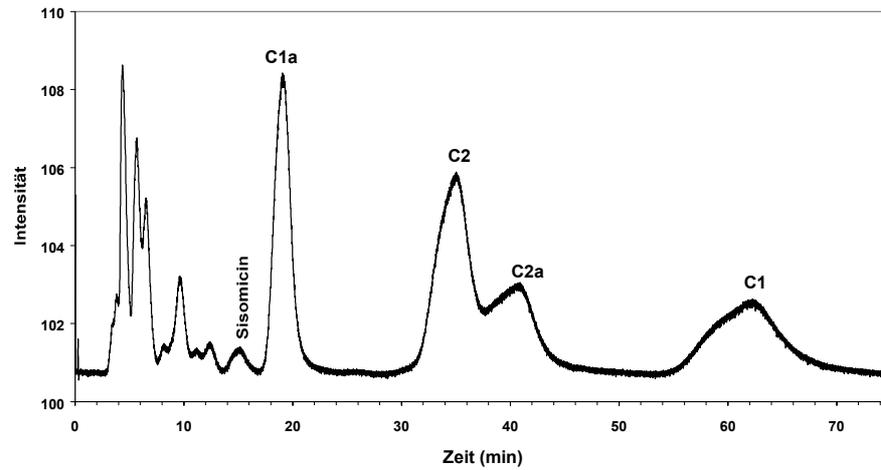
Abb. 2.2-19: Beispielchromatogramm einer kommerziellen Gentamicin-Probe aus Lit. [135]

Ziel dieser Untersuchung ist es einerseits zu überprüfen, ob die Verunreinigungen und Nebenkomponenten von Gentamicin, wie z.B. C2b, Sisomicin, Garamin und DSA im Chromatogramm detektiert werden können. Als Systemeignungstest wird in der Monographie eine Bestimmung des Peak-zu-Tal-Verhältnisses des C2a-Peaks

zum Tal zwischen C2 und C2a verwendet. Dieses soll mindestens den Wert 2 haben, d.h. der Abstand von der Basislinie zur Peakspitze von Gentamicin-C2a soll mindestens doppelt so groß sein wie der Abstand von der Basislinie zum Tal Gentamicin-C2/C2a (s. Abb. 2.2-22).

Durch „Spiking“-Experimente konnten die einzelnen Komponenten zugeordnet werden. Garamin, DSA und Paromamin eluieren innerhalb der ersten fünf Minuten, DSA allerdings im Einspritzpeak (s. Abb. 2.2-21). Gentamicin-C2b ist in den resultierenden Chromatogrammen nicht zu erkennen, obwohl die Proben laut CE-Ergebnissen diese Substanz zu ca. 2 % beinhalten.

ECD: Gentamicin (G22)



ECD: Gentamicin (G30)

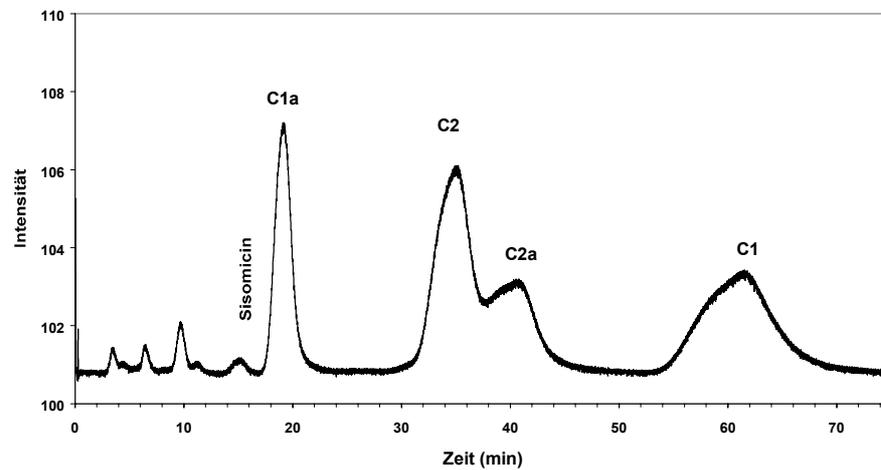


Abb. 2.2-20: Chromatogramme von einer kommerziellen Gentamicin-Probe nach EuAB 4.5. G22 stellt eine Probe mit zahlreichen Nebenprodukten dar (oben), G30 mit wenigen Nebenprodukten (unten).

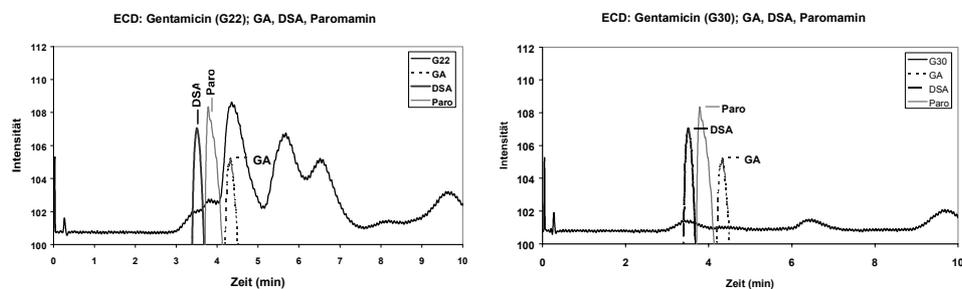


Abb. 2.2-21: Vergrößerter Bereich aus Abb. 2.2-20 im Zeitraum von 0-10 Minuten, unterlegt mit den Einzelsubstanzen DSA, Paromamin (Paro) und Garamin (GA)

Ergebnis:

Die Vermessung der Proben mit der im EuAB beschriebenen HPLC-Methode zur Bestimmung der Zusammensetzung von Gentamicinsulfat erwies sich als schwierig und führte zu mangelhaften Ergebnissen.

Die Vorgaben des Systemeignungstests der Monographie konnten für keine der sechs

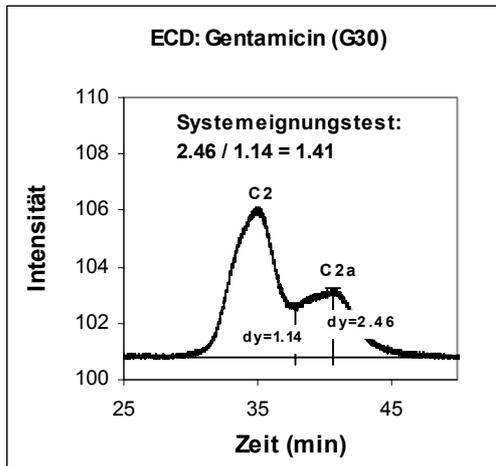


Abb. 2.2-22: Systemeignungstest einer kommerzieller Gentamicin-Probe nach EuAB 4.5 [137]; dy =Intensität (dimensionslos)

Gentamicin-Proben erfüllt werden, obgleich eine Anpassung der Methode versucht wurde. Das errechnete Peak-Tal-Verhältnis liegt mit einem Wert von durchschnittlich 1.4 deutlich unter dem geforderten Wert von 2. Wertet man die Chromatogramme bezüglich der Zusammensetzung dennoch aus, so fallen drei der sechs Proben aus den geforderten Grenzen der Monographie (Tabelle 2.2-1) heraus. Anhand Tabelle 2.2-11 wird deutlich, dass nicht immer die gleiche Komponente aus den Grenzen heraus fällt.

Deutlich sind hingegen stark „verunreinigte“ Proben (G22) von „sauberen“ (G30) Proben zu unterscheiden. Bei „sauberen“ Proben sind im Bereich der ersten 12 Minuten nur wenige Peaks zu erkennen, bei „verunreinigten“ Proben sind zahlreiche, sich überlagernde Peaks zu beobachten (s. Abb. 2.2-20).

Tabelle 2.2-11: Ergebnisse der vermessenen Proben. Angaben in % ([#]nach EP 4.5, * inkl. C2b); Werte, die ausserhalb der Grenzen sind, sind fett markiert.

Komponente	Grenzen [#]	Probe G02	Probe G13	Probe G22	Probe G30	Probe G36	Probe G46
C1	20-35	18.4	21.2	17.1	28.8	19.7	21.1
C1a	10-30	25.9	30.9	18.6	18.2	25.1	11.2
C2		27.9	20.9	25.7	32.2	28.3	21.0
C2a		13.9	9.2	13.3	16.9	15.5	16.8
Summe C2/C2a	40-60*	41.8	30.1	39.0	49.1	43.8	37.8

Einen weiteren Nachteil stellen die erhaltenen Peakformen dar. Der Gentamicin-C1-Peak hat eine Breite von über 10 Minuten, die Peaks von Gentamicin-C2 und C2a sind ebenfalls etwa 10 Minuten breit (s. Chromatogramm Abb. 2.2-19). Hier besteht durchaus die Möglichkeit, dass sich unter diesen Peaks weitere, bisher nicht identifizierte Substanzen befinden. Darüber hinaus sind die Komponenten Garamin, DSA und Paromamin, sowie

Gentamicin-C2b nicht quantitativ bestimmbar, da sie entweder nicht basisliniengetrennt vorliegen (Paromamin, Garamin, C2b) oder vom Einspritz-Peak überlagert werden (DSA).

Auch wenn man mit dieser Methode auf eine Derivatisierung von Aminoglykosiden verzichten kann, wird durch diese schlechten Ergebnisse deutlich, dass durch die Verwendung des ECD-Detektors keine bessere quantitative Bestimmung erzielt werden kann.

2.2.6 Zusammenfassung

Mit der neu entwickelten MEKC-Methode ist es möglich, sowohl die Haupt- als auch die Nebenkomponten und Verunreinigungen von Gentamicinsulfat basisliniengetrennt darzustellen. Durch diese differenzierte Trennung ist es möglich, verschiedene Gentamicin-Chargen voneinander zu unterscheiden. Es ermöglicht teilweise eine Zuordnung von Gentamicin-Chargen zu einzelnen Herstellern. Dies ist durch die alte und neue HPLC-Methode [92,135] in diesem Maße nicht möglich, da durch die enorme Peakbreite der Gentamicin-Peaks – besonders bei der neuen HPLC-Methode – Verunreinigungen überdeckt werden können. Dem Vorteil, unter Umgehung einer Derivatisierung eine Detektion mit einem gepulsten amperometrischen Detektor durchzuführen, steht die wesentlich bessere Robustheit der entwickelten MEKC-Methode entgegen. Zusätzlich sind bei der Anwendung der neuen HPLC-Methode [135] Schwierigkeiten bei der Durchführung der Analyse aufgetreten. Die geforderten Ergebnisse waren mit den vorhandenen Geräten nicht zu erreichen, obwohl in Bezug auf Pumpe und Detektor die gleichen Geräte benutzt wurden, wie in der Originalliteratur angegeben. Schwierigkeiten in Bezug auf die Reproduzierbarkeit auf anderen Geräten sind zu erwarten.

Die Richtigkeit der mit der neu entwickelten MEKC-Methode erzielten Ergebnisse wurde darüber hinaus durch $^1\text{H-NMR}$ -Messungen bestätigt. Die Ergebnisse dieser zweiten, nach einem anderen Messprinzip funktionierenden Methode, korrelieren mit den Ergebnissen der CE.

Dies lässt den Schluss zu, dass die MEKC-Methode allen bisherigen Methoden überlegen ist.

2.3 Sisomicin

Sisomicin besitzt, wie Gentamicin, eine antibiotische Aktivität, ist aber im EuAB nicht

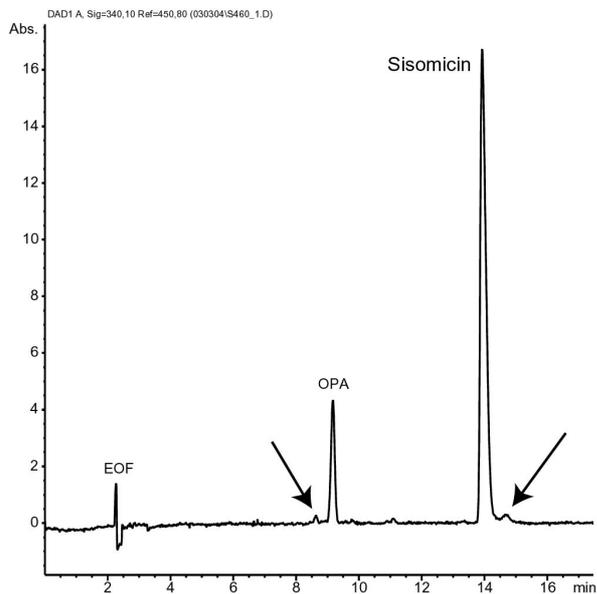


Abb. 2.3-1: Sisomicin-CRS-Probe bestimmt mit MEKC-Methode

monographiert. Eine entsprechende Monographie lässt sich jedoch im Amerikanischen Arzneibuch (USP 26) finden [146]. Allerdings wird hier nicht auf verwandte Substanzen geprüft.

Da mit der entwickelten MEKC-Methode Sisomicin von allen Peaks getrennt detektiert werden kann, ist es auch möglich, es als Einzelsubstanz zu betrachten und auf Verunreinigungen zu prüfen. In Abb. 2.3-1 ist ein Beispiel-elektropherogramm dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die CRS-Substanz

kleine Verunreinigungen (s. Pfeile) beinhaltet, die aber nicht identifiziert werden konnten.

2.4 Netilmicin

Netilmicin kann mit der MEKC-Standardmethode nicht identifiziert werden, da es mit dem OPA-Peak koeluiert. Um eine Trennung der beiden Peaks zu gewährleisten, muss entweder die Spannung von 12 kV auf 14 kV oder die Temperatur der Kapillare von 25 °C auf 35 °C erhöht werden. Der Effekt dieser Änderung wird in Abb. 2.4-1 gezeigt. Netilmicin tritt aus dem OPA-Peak hervor, so dass eine Prüfung auf Anwesenheit von Netilmicin in Gentamicin-Proben möglich wird. Diese geringfügigen Änderungen der Methode machen es möglich, dass Gentamicin-Proben auf die Anwesenheit von Netilmicin geprüft werden können. Da Netilmicin mit der NMR-Spektroskopie nicht eindeutig vom Sisomicin zu unterscheiden ist, ist diese Information wertvoll. Daraufhin wurden alle Gentamicin-Proben mit der veränderten Methode (14 kV anstatt 12 kV) vermessen. Im Anhang dieser Arbeit sind sämtliche Elektropherogramme dargestellt. Sie zeigen, dass sehr viele Proben Netilmicin enthalten. In einigen Proben ist es evtl. durch andere, unbekannte Komponenten überdeckt.

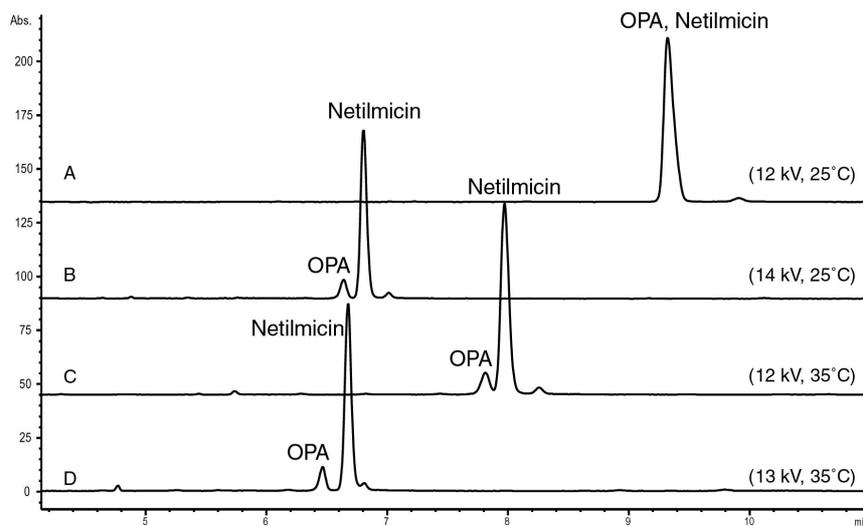


Abb. 2.4-1: Elektropherogramme von Netilmicin, aufgenommen bei unterschiedlichen Temperaturen und Spannungen

2.5 Amikacin

Ähnlich dem Netilmicin migriert auch Amikacin zur gleichen Zeit wie OPA. Auch hier kann man durch Variation der Spannung oder der Temperatur die beiden Peaks trennen (Abb. 2.5-2). Unterschiede zwischen Netilmicin und Amikacin sind mit dieser Methode nicht zu erkennen, da die Substanzen gleiches Verhalten zeigen. Allerdings ist aufgrund der verschiedenen Strukturen eine Unterscheidung im NMR möglich [147], so dass mit Hilfe dieser zweiten Analysetechnik eine Zuordnung möglich ist. Deutlich sind nicht identifizierte Verunreinigungen der CRS-Substanz (s. Pfeile) zu erkennen.

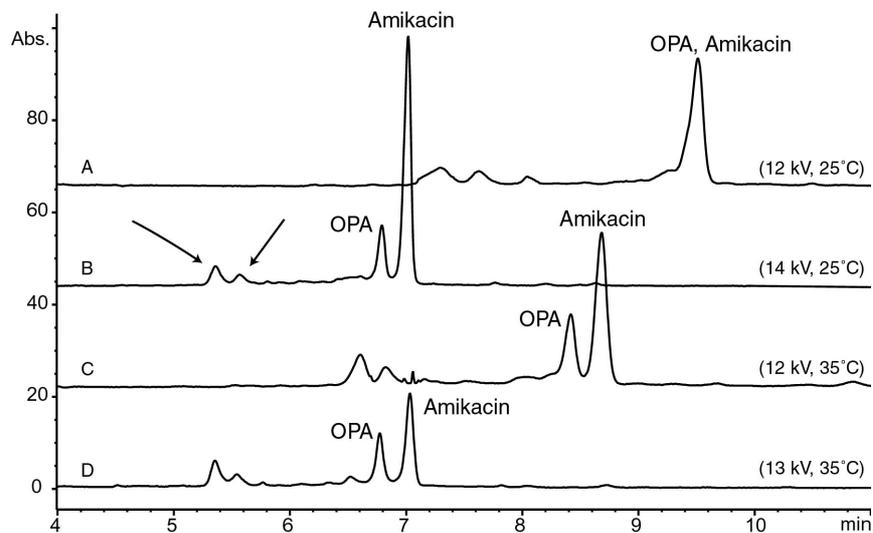


Abb. 2.5-2: Elektropherogramme von Amikacin, aufgenommen bei unterschiedlichen Temperaturen und Spannungen

2.6 Kanamycinsulfat

2.6.1 Überblick

Kanamycin liegt im Handel in Form zweier Salze vor. Einerseits als kristallines „Monosulfat-Monohydrat“, andererseits als Salz mit höherem Sulfatanteil, welches auch als „saures Kanamycinsulfat“ bezeichnet wird. Beide Formen sind im EuAB monographiert.

Kanamycin besteht zu ca. 98 % aus den drei Hauptkomponenten Kanamycin A („Kanamycin“, ca. 95 %), Kanamycin B (toxisch!) und Kanamycin C. Der Gehalt an Kanamycin B wird mittels DC und Ninhydrin (Sprühreagenz) überprüft (max. 4.0 %) [148]. Durch die fermentative Herstellung von Kanamycin liegen oftmals 10 verschiedene Kanamycin-Komponenten vor [149].

Tsuji et al. veröffentlichte 1970 eine GC-Methode zur Bestimmung von Kanamycin [66]. Es folgten nur sehr wenige Arbeiten über HPLC-Methoden in den Jahren danach [z.B. 125,150]. Flurer et al. veröffentlichte 1995 eine CE-Methode mit Natriumtetraborat-komplexiertem Kanamycin. Bei dieser Methode war keine Derivatisierung notwendig (s. auch Kapitel 1.2.4.2) [75]. 2001 gelang es Kaale et al. Kanamycin nach Derivatisierung mit OPA mittels CE zu trennen und mit einem UV-Detektor zu detektieren [151]. Mit dieser Methode sind viele der vorhandenen bekannten (und unbekannt) Verunreinigungen detektiert worden.

Die MEKC-Standardmethode für Gentamicin wurde auch auf Kanamycin angewendet. Unter diesen Bedingungen ergab sich folgendes Elektropherogramm (Abb. 2.6-1). Bei den zahlreich entstandenen Peaks (a-j), handelt es sich entweder um Nebenprodukte, Verunreinigungen oder nicht vollständig derivatisierte Peaks. Peak c konnte als DSA identifiziert werden. Es wurde daher versucht, die Methode und die Derivatisierungsbedingungen zu optimieren.

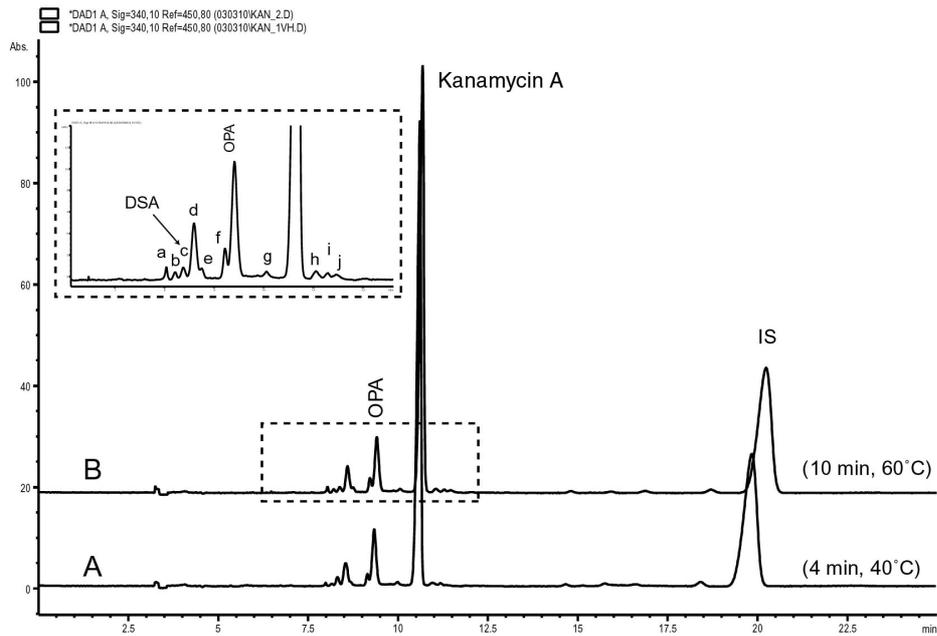


Abb. 2.6-1: Elektropherogramme von Kanamycin bei verschiedenen Derivatisierungsbedingungen

2.6.2 Methodenentwicklung

2.6.2.1 Optimierung des pH-Wertes

Es wurde der pH-Wert von 9.6 bis 10.2 variiert. Die Elektropherogramme zeigen, dass sich die Laufzeiten der einzelnen Komponenten mit steigendem pH verlängern (Abb. 2.6-2). Eine Einstellung des Elektrolyten auf pH 9.6 führt zu zahlreichen Peaküberlappungen. Bei

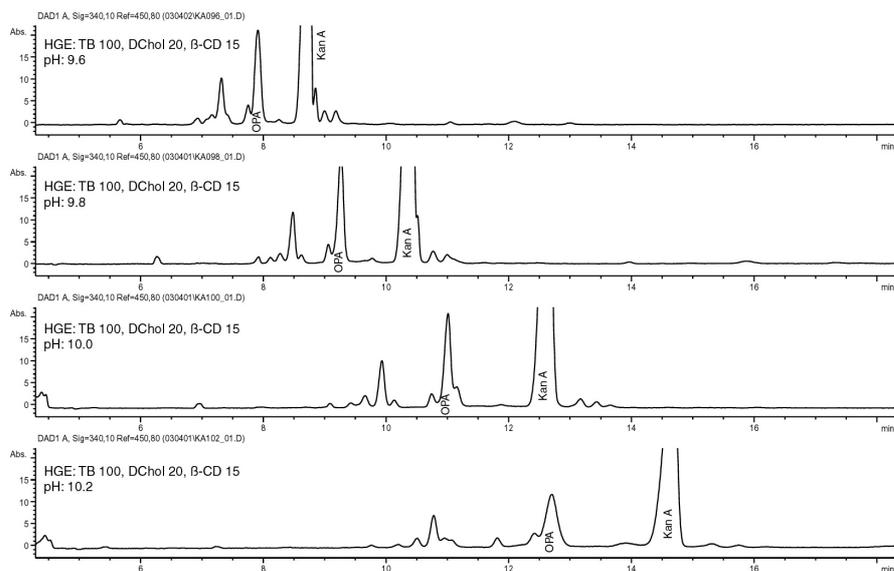


Abb. 2.6-2: Kanamycin: Messungen mit MEKC-Standard-HGE bei verschiedenen pH-Werten

einem pH-Wert von 10.2 ist trotz der nun weit auseinander liegenden Peaks durch flach auftretende Peakformen ebenfalls keine ausreichende Basislinientrennung gegeben. Bei pH 9.6 tritt aus dem Kanamycin-A-Peak bei ca. 9 Minuten ein zusätzlicher Peak heraus, der bei Standardbedingungen des Gentamicins (= pH 10.0) vorher nicht sichtbar war. Dieser Peak ist auch bei pH 9.8 als Schulter sichtbar.

Mit einem pH-Wert von 9.8 wurden die besten Ergebnisse erzielt, da hier im Bereich von 8 – 8.5 Minuten Peaks zu sehen sind, die bei pH 9.6 nicht zu erkennen sind.

Zunächst sollte jedoch die Veränderungen der Trennung durch Änderung nur eines Parameters (z.B. TB-, CD- oder DChol-Konzentration) untersucht werden, um deren Einflüsse auf die Güte der Trennung erkennen zu können.

2.6.2.2 Optimierung des Natriumtetraborat-Puffers

Durch Änderung der Ionenstärke des Tetraborat-Puffers von 100 mM auf 75 mM ergibt sich ein sehr ähnliches Elektropherogramm wie auf Abb. 2.6-2, pH 9.6. Die Migrationszeiten sind nur geringfügig kürzer. Hier ist ebenfalls der Peak zu erkennen, der aus dem Kanamycin-A-Peak hervortritt (Abb. 2.6-3). Vorteil der Verringerung der Ionenstärke ist der verringerte Strom, der bei Anlegen von 12 kV entsteht. Somit kommt es zu einer geringeren Entwicklung der Joule'schen Wärme und somit zu konstanteren Trennungsläufen. Durch diesen Vorteil und die fast gleiche Güte der Trennung wie mit dem MEKC-Stan-

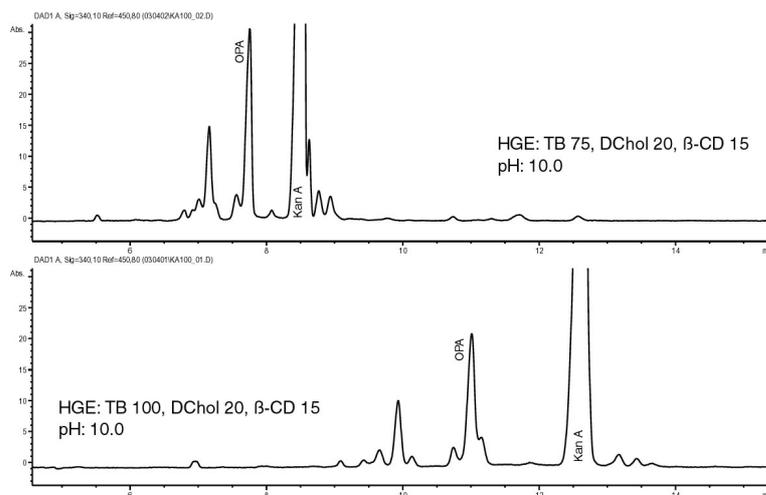


Abb. 2.6-3: Kanamycin: Auswirkung der Ionenstärkeänderung von 100 mM TB auf 75 mM TB.

dardpuffer für Gentamicin (pH 9.6), werden mit 75 mM TB-Puffer (pH 10.0) alle weiteren Optimierungsversuche durchgeführt.

2.6.2.3 Optimierung der mizellenbildenden Substanzen

Der Effekt des Einsatzes von mizellenbildenden Substanzen im HGE wurde ebenfalls untersucht. Zu diesem Zweck wurde bei den ersten Läufen auf β -Cyclodextrin verzichtet, um zu sehen, ob variierende Konzentrationen an Detergenzien Einfluss auf die Peakschärfe

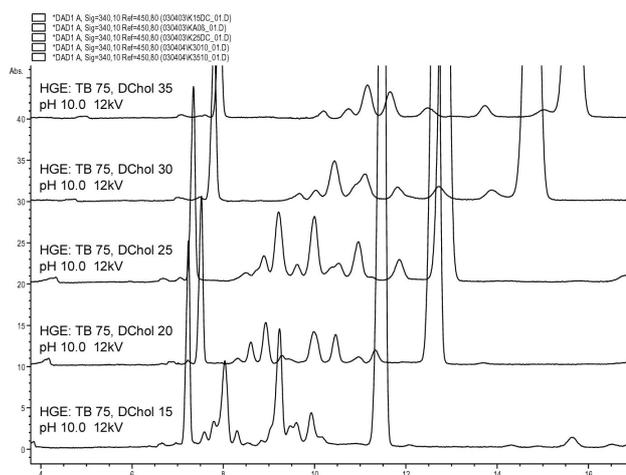


Abb. 2.6-4: Kanamycin: Variation des Detergenz DChol im Konzentrationsbereich von 15-35 mM

haben. Der Einsatz von DChol (15-35 mM) führte mit steigender Konzentration zu einer deutlichen Migrationszeitverlängerung aller Komponenten (außer dem Peak bei ca. 7 Minuten) und zu einer Verschlechterung der Peakschärfe. Die Peaks wurden breiter, und offensichtlich überlagern sich einige, da von den vielen Signalen bei einer DChol-Konzentration von 15 mM zwischen 7 und 11 Minuten nur

noch sechs Peaks bei einer DChol-Konzentration von 35 mM zu erkennen sind (Abb. 2.6-4).

Die Verwendung von TDChol anstelle von DChol führte zu keiner wesentlichen Änderung, die Trennung verschlechterte sich eher. Es wurde aus diesem Grund mit DChol weitergearbeitet.

2.6.2.4 Optimierung der β -Cyclodextrin-Konzentration

Es wurde überprüft, inwieweit sich eine Variation der β -Cyclodextrin-Konzentration auf die Trennung auswirkt. Dazu wurde der HGE (75 mM TB, 20 mM DChol) mit unterschiedlichen β -Cyclodextrin-Mengen (0, 10, 15 und 20 mM) hergestellt und der Effekt an Kanamycin-Proben untersucht (Abb. 2.6-5). Sobald β -Cyclodextrin im HGE enthalten ist, verkürzen sich die Migrationszeiten der Komponenten, die Peaks werden schmaler und überlappen. Dies lässt den Schluss zu, dass einerseits eine gewisse Menge β -Cyclodextrin notwendig ist, um möglichst schmale Peaks zu erhalten, andererseits sollte nur sehr wenig

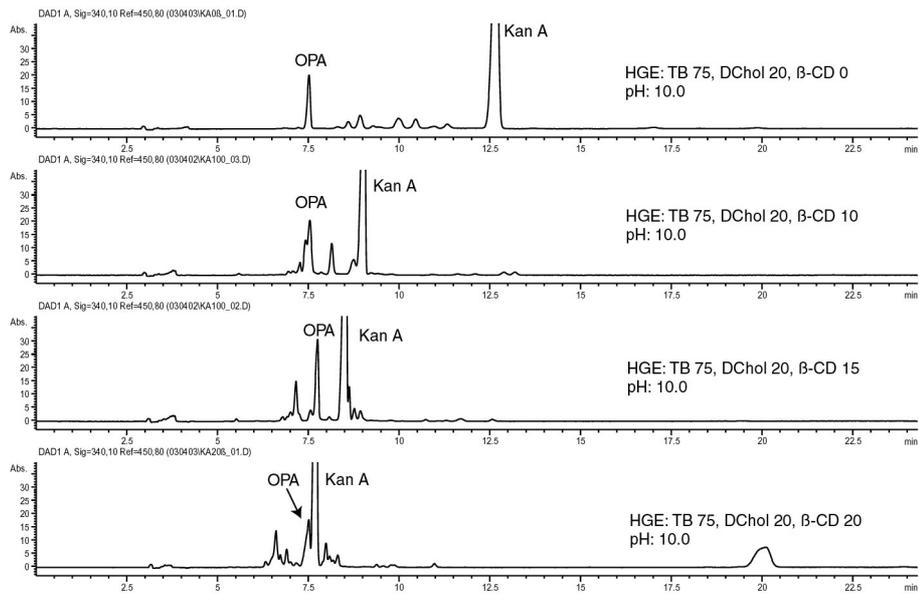


Abb. 2.6-5: Kanamycin: Einfluss der β -Cyclodextrin-Konzentration

β -Cyclodextrin zugegeben werden, damit die Peaks nicht überlappen. Alle weiteren Untersuchungen wurden mit 5 mM β -Cyclodextrin durchgeführt.

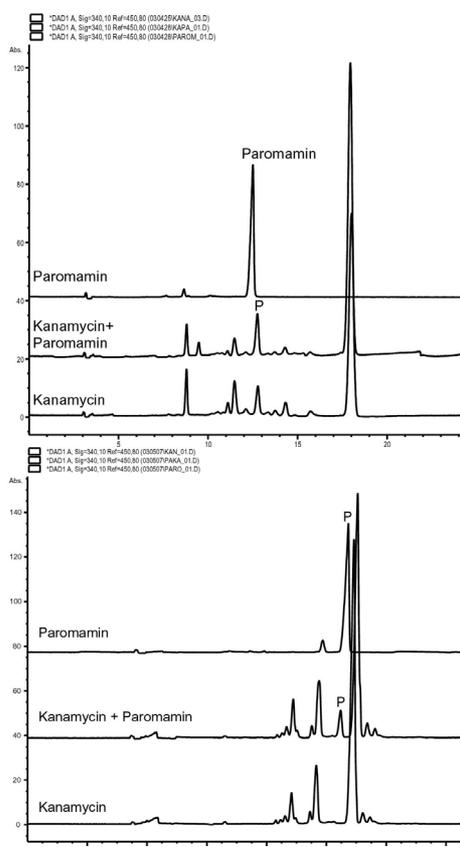


Abb. 2.6-6: Elektropherogramme von mit Paromamin versetzten Kanamycin-Proben. Oben: „Optimierte“ Kanamycin-Methode; Unten: MEKC-Standardmethode.

Es wurden weitere Parameter verändert, wie z.B. Temperatur der Kapillare (15-35 °C), Spannung (10-18 kV), Zusätze von Methanol, Acetonitril und 2-Propanol in verschiedenen Konzentrationen (5-10 %), Trennung mit konstantem Strom (100-250 μ A). Weiterhin wurden Spannungsgradienten angewandt. Durch diese Änderungen musste die Konzentration des Tetraborates im HGE von 75 mM auf 100 mM wieder angehoben werden. Eine sehr gute Trennung der Proben ergab sich durch den Einsatz von 25 mM DChol, einem pH-Wert von 9.8, einer Kapillartemperatur von 30 °C und einer Trennungsspannung von 12 kV. Nahezu alle Peaks konnten basisliniengetreunt werden. Ein Nachteil dieser Methode stellt die Koelution des Paromamin mit einem unbekanntem Peak dar (s. Abb. 2.6-6, oben). Bestimmt man Kanamycin mit der MEKC-Standard-Methode von Gentamicin wird dagegen ersichtlich, dass an der Stelle,

wo Paromamin migriert, kein weiteres Signal zu sehen ist (s. Abb. 2.6-6, oben). Da damit in Kanamycin kein Paromamin vorhanden ist und da das EuAB auch nicht auf Paromamin

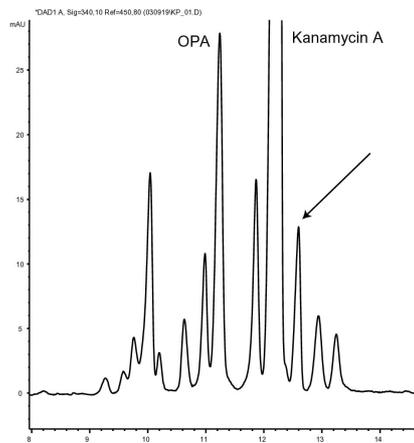


Abb. 2.6-7: Kanamycin-Probe, "gespiked" mit Paromamin, unbekannter Peak sichtbar durch Anlegen des Spannungsgradienten

prüft, spielt es keine Rolle, dass die hier verwendete MEKC-Methode Paromamin nicht von dem „unbekannten“ Peak abtrennen kann.

Bester Kompromiss aller Variationen der Trennbedingungen war schließlich die Verwendung der MEKC-Standard-Methode für Gentamicin mit einer Kapillartemperatur von 20 °C anstatt 25 °C. Die Temperaturerniedrigung wird benötigt, um den unbekanntem Peak, der bisher zusammen mit dem OPA-Reagenzpeak migrierte, sichtbar zu machen (s. Abb. 2.6-7, s. Pfeil).

Schließlich wurden die Derivatisierungsbedingungen optimiert, um eine vollständige Derivatisierung zu erreichen. Dazu wurden Proben für unterschiedliche Zeitabschnitte (5 – 30 Minuten) bei Raumtemperatur (RT), bei 40 °C und 60 °C derivatisiert. Für eine Beurteilung wurden Höhe bzw. Fläche der Peaks herangezogen. Zur besseren Übersichtlichkeit ist der Kanamycin-A-Peak mit Hilfe der Software auf gleiche Höhe normiert worden. So ist der Fortschritt der Derivatisierung an der Höhe des OPA-Peakes zu erkennen. Nimmt die Größe des OPA-Peaks nicht weiter ab (Umkehrschluss: Der Peak des Kanamycin A wird nicht größer), sind die optimalen Bedingungen erreicht. Bemerkenswert dabei ist, dass bei 60 °C Kanamycin A sehr schnell kleiner wird und sehr viel mehr (größere) Peaks zu erkennen sind als bei allen anderen Bedingungen. Es kommen keine unbekanntem Peaks hinzu.

Um eine möglichst vollständige Derivatisierung ohne Bildung von Zersetzungsprodukten zu erzielen, wird die Probe für 15 Minuten auf 40 °C erhitzt.

2.6.3 Zusammenfassung

Durch Änderung der Temperatur der Kapillare ist es mit der MEKC-Standard-Methode möglich, auch Kanamycin-Proben zu vermessen. Allerdings konnte keine Basislinientrennung aller Komponenten erzielt werden. Durch Erniedrigung der Temperatur gelingt es, einen zusätzlichen Peak aus dem OPA-Reagenzpeak sichtbar zu machen (Abb. 2.6-8). Da keine Kanamycin-Komponenten zur Verfügung standen, konnte bis auf Kanamycin A, das toxische Kanamycin B und DSA kein weiterer Peak zugeordnet werden. DSA migriert bei

ca. 9 Minuten, liegt damit in einer Ansammlung von Komponenten und ist somit nicht erkennbar. Kanamycin B dagegen migriert nach ca. 16 Minuten und kann in Anwesenheit der anderen NebenkompONENTEN ohne Störung analysiert werden. Neben den Änderungen der Geräteparameter (Spannungsgradient) müssen die Derivatisierungsbedingungen im Gegensatz zur Gentamicin-Methode angepasst werden, da die Derivatisierung bei den ursprünglichen 4 Minuten bei 40 °C nicht ausreicht, um Kanamycin vollständig mit OPA-Molekülen zu belegen. Bei Erhöhung auf 15 Minuten wird Kanamycin ausreichend derivatisiert.

Diese Methode ist ein guter Ansatz für eine Methodenentwicklung, mit der Kanamycinsulfat vollständig in seine Bestandteile getrennt werden kann.

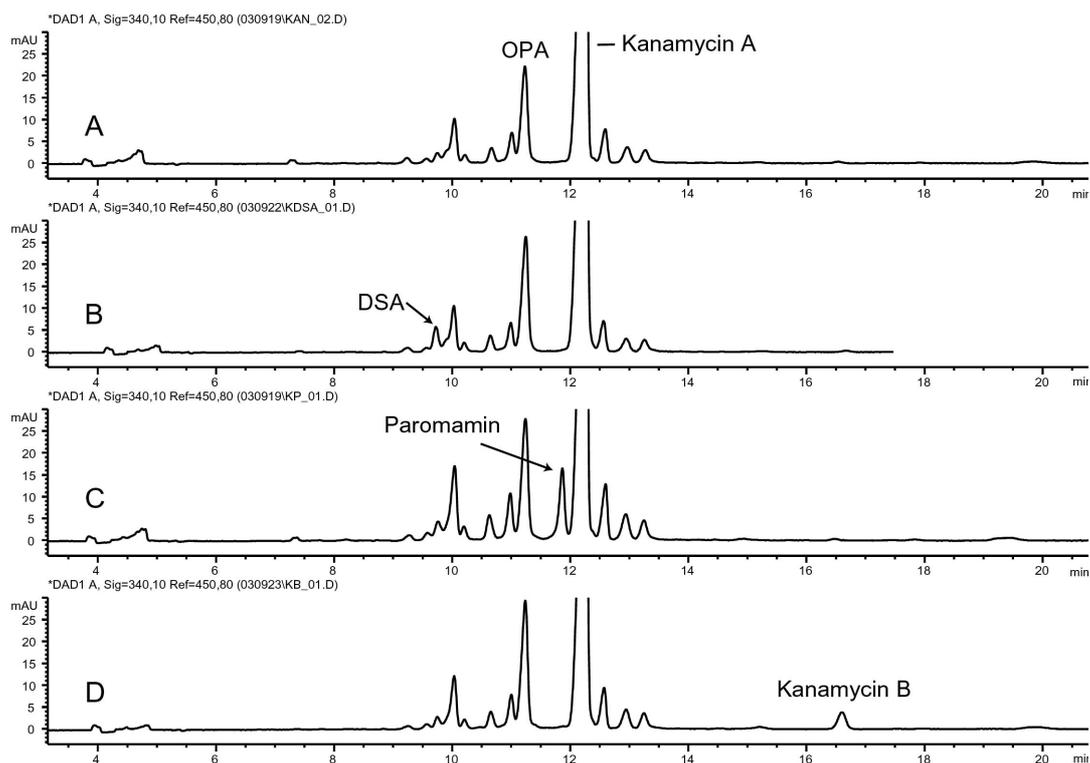


Abb. 2.6-8: Elektropherogramme einer mit DSA (B), Paromamin (C) und Kanamycin B (D) "gespikten" Kanamycin Probe unter folgenden Methoden-Bedingungen: HGE: 100 mM TB, 15 mM β -CD, 20 mM DChol, pH 10.0, Temperatur der Kapillare: 20 °C, Trennungsspannung: 12 kV

2.7 Tobramycin

Tobramycin unterscheidet sich vom Kanamycin B ausschließlich durch eine nicht vorhandene Hydroxyl-Gruppe an Position 3 am 6-Amino-6-desoxy- α -D-glucopyranose-Ring. In der Monographie im EuAB wird die Prüfung auf verwandte Substanzen mit Hilfe einer DC-Methode durchgeführt, mit der die verwandten Substanzen auf 1 % begrenzt werden.

Die Gentamicin-MEKC-Standard-Methode wurde auch auf Tobramycin angewendet. Unter den Standard-Derivatisierungsbedingungen (4 Minuten, 40 °C) sind im Elektropherogramm zwei Peaks ähnlicher Größen zu erkennen (Abb. 2.7-1). Peak x wird bei Erhöhung der Temperatur und Reaktionszeit kleiner, der Tobramycin-Peak größer, was bedeutet, dass sich unter Peak x ein „unterderivatisiertes“ Produkt verbirgt. Das Diagramm in Abb. 2.7-2 zeigt deutlich, dass die maximale Größe des Tobramycin-Peaks bei einer Reaktionszeit von 4 Minuten bei 60 °C erreicht wird, Peak x hingegen erst nach 20 Minuten bei 60 °C vernachlässigbar klein wird. Bei einer Derivatisierungszeit von 20 Minuten bei 60 °C sind zusätzlich einige unidentifizierte Peaks (s. Pfeile) zu erkennen.

Die Gentamicin-MEKC-Standard-Methode ist ein guter Ansatz zur Bestimmung von Tobramycin. Der Tobramycin-Peak erscheint abgetrennt vom OPA-Peak und ebenso von den Kanamycin-Komponenten (s. auch Kapitel 2.6), wobei die Tobramycin-Peakreinheit weiterhin noch überprüft werden muss. Eine Optimierung der Derivatisierungsbedingungen ist aber noch erforderlich.

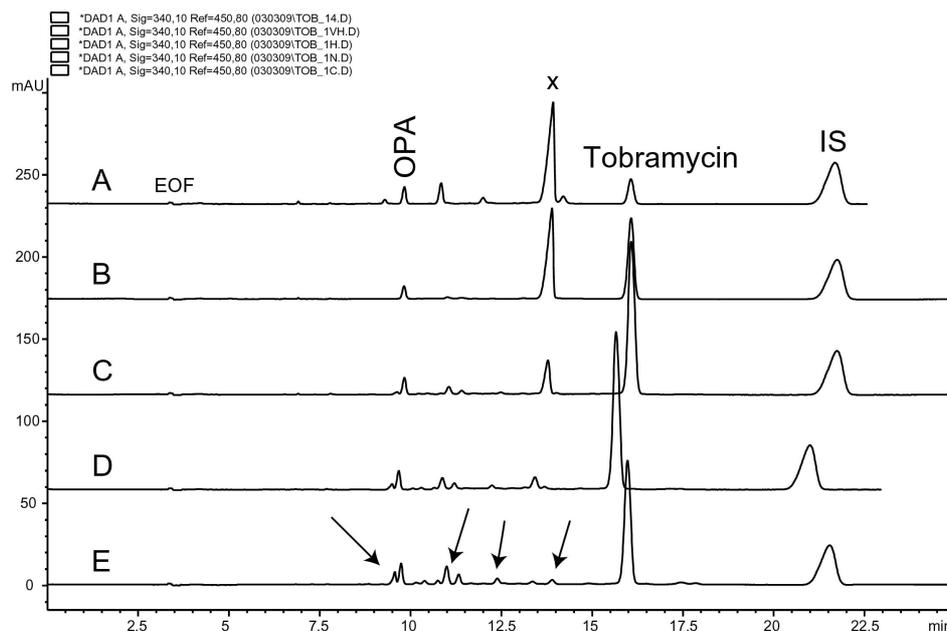


Abb. 2.7-1: Tobramycin-Probe vermessen mit der Gentamicin-MEKC-Standard-Methode unter verschiedenen Derivatisierungsbedingungen: RT, > 4 Minuten (A); 40 °C, 4 Minuten (B); 60 °C, 4 Minuten (C); 60 °C, 10 Minuten (D); 60 °C, 20 Minuten (E).

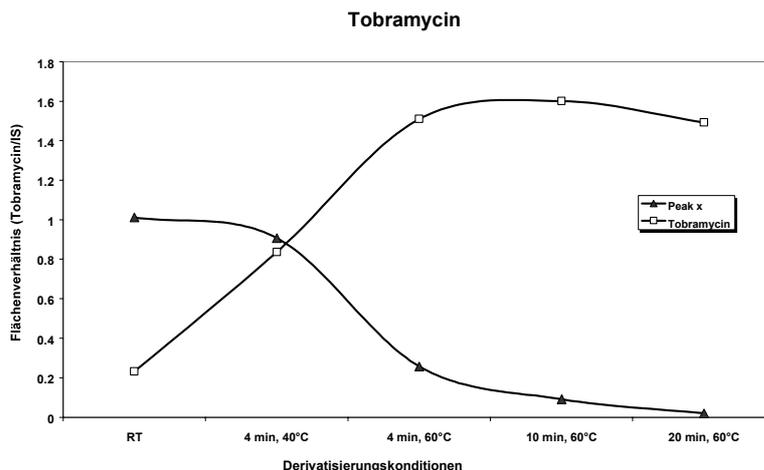


Abb. 2.7-2: Diagramm von Tobramycin-Proben unter verschiedenen Derivatisierungsbedingungen

2.8 Neomycin

Ebenso wie die anderen Aminoglykoside ist auch Neomycin chemisch nicht einheitlich zusammengesetzt. Es besteht aus mindestens drei Komponenten: Neomycin A (= Neamin, hydrolytisches Abbauprodukt von Neomycin B und C), Neomycin B (= Framycetin) und Neomycin C (Stereoisomer von Neomycin B) [152].

Das Arzneibuch beschreibt „Neomycinsulfat“ und „Framycetinsulfat“ in getrennten Monographien. Beide Monographien unterscheiden sich lediglich im zulässigen Anteil an Neomycin A und Neomycin C. Diese Unterschiede sind in Tabelle 2.8-1 aufgeführt.

Tabelle 2.8-1: Zulässige Anteile von Neomycin A und Neomycin C in den Monographien von "Neomycin" und "Framycetin"

„Neomycin“	Neomycin A	max. 2 %
	Neomycin C	3-15 %
„Framycetin“	Neomycin A	max. 1 %
	Neomycin C	max. 3 %

Ziel dieser Untersuchungen ist es zu überprüfen, ob es prinzipiell möglich ist, die Gentamicin-Standard-MEKC-Methode zur Trennung der einzelnen Neomycin-Komponenten zu nutzen.

Bei Anwendung der MEKC-Standard-Methode ist im Elektropherogramm in den ersten 60 Minuten nur der OPA-Peak mit einigen kleineren Verunreinigungen zu erkennen (s. Abb. 2.8-1). Auch in „gespikten“ Proben waren nach 60 Minuten keine Neomycin-Peaks zu beobachten.

Durch Variationen der Tetraborat-Ionenstärke (25 mM, 50 mM, 75 mM; pH 10.0) wurde versucht, die Migrationszeit von Neomycin zu verkürzen. Wie die Elektropherogramme zeigen, erhält man bei Verwendung eines 25 mM TB-HGEs eine Reihe von Peaks im Bereich von 4-7 Minuten (Abb. 2.8-2). Steigende TB-Konzentrationen führen zu einer deutli-

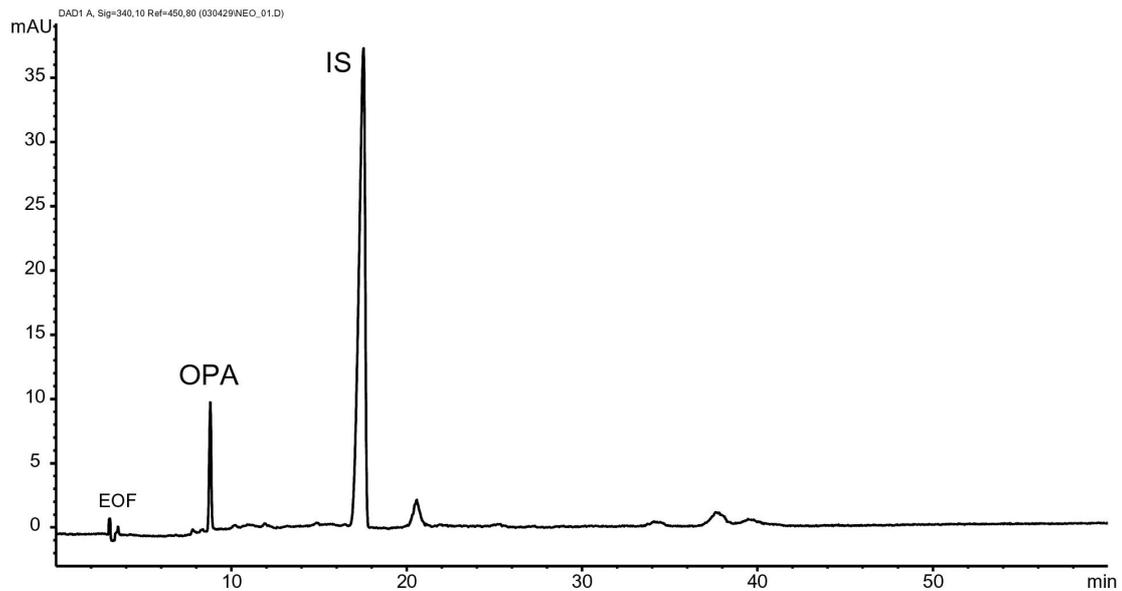


Abb. 2.8-1: Neomycin vermessen mit MEKC-Standard-Methode

chen Verlängerung der Migrationszeiten der Komponenten, die Lage des OPA-Peakes wird dabei kaum beeinflusst. Es wird anhand der drei Elektropherogramme deutlich, dass die Probe unter diesen Bedingungen sehr viele Peaks aufweist. Dies ist insofern erstaunlich, da Neomycin aus *einer* Hauptkomponente, nämlich Neomycin B, besteht, das mindestens zu 83 % in einer Probe vorhanden ist.

Diese Elektropherogramme lassen den Schluss zu, dass die Derivatisierungsbedingungen der MEKC-Standard-Methode (4 Minuten, 40 °C) für Neomycin nicht optimal sind.

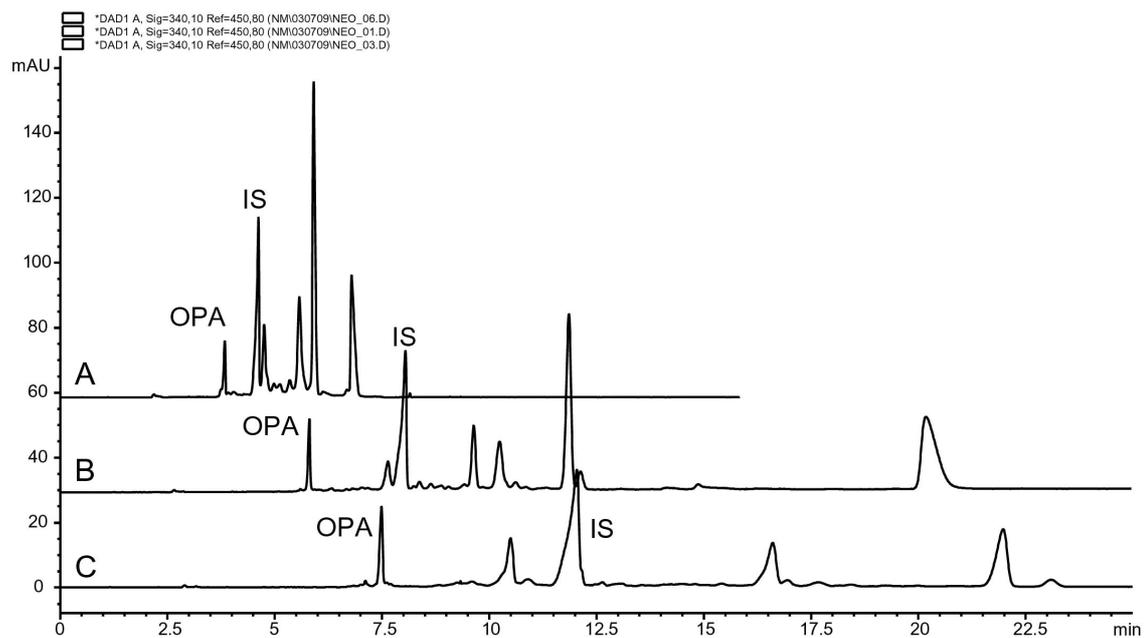


Abb. 2.8-2: Neomycin-Proben unter folgenden HGE-Bedingungen (jeweils pH 10.0): 25 mM TB (A), 50 mM TB (B), 75 mM TB (C)

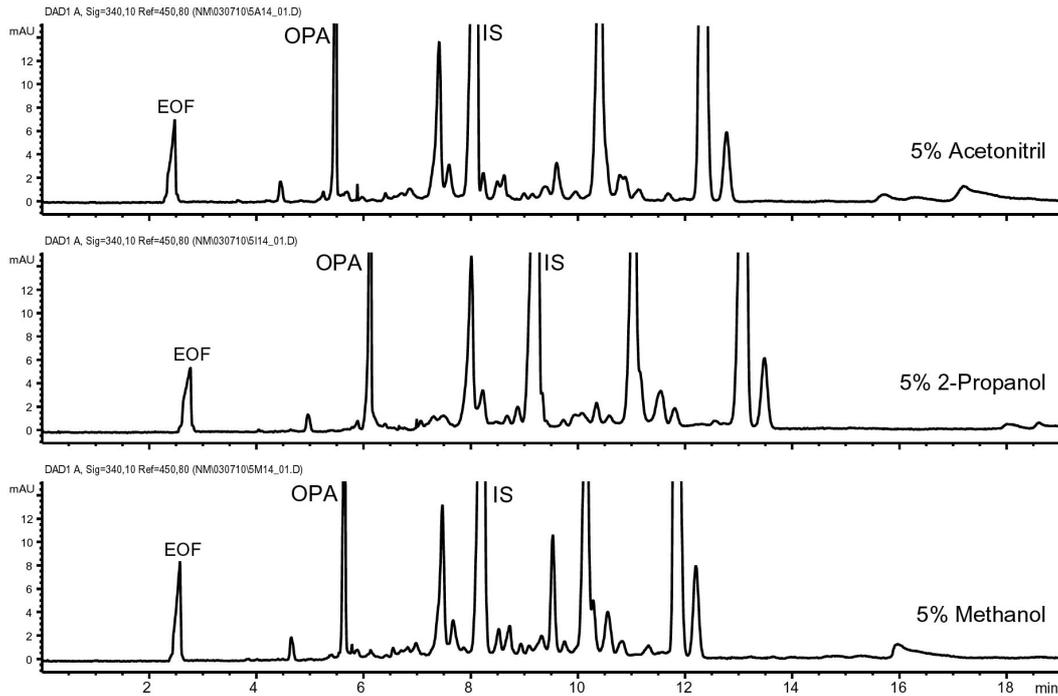


Abb. 2.8-3: Neomycin-Proben mit 5 % „organic modifier“ zum HGE (TB 50 mM, pH 10.0), Trennungsspannung: 14 kV, Derivatisierungsbedingungen: 10 Minuten bei 60 °C

Vor den Änderungen der Derivatisierungsbedingungen wurde zunächst der Effekt der „organic modifier“ Methanol, Acetonitril und 2-Propanol in Bezug auf die Selektivität des Trennungssystems und auf die Peakform untersucht. Durch den Zusatz dieser Substanzen verlängerte sich die Laufzeit, so dass die Trennungsspannung bei 5 % Methanol-Zusatz von 12 kV auf 14 kV angehoben werden musste. Mit dem Einsatz von 5 % Methanol sind im Bereich von 8-10 Minuten deutlich schärfere Peaks zu erkennen, als mit den anderen beiden Lösemitteln (Abb. 2.8-3). Deshalb wurde mit Methanol weitergearbeitet. Eine Erhöhung der Methanol-Konzentration auf 10 % verlängerte die Laufzeit erheblich, so dass die Spannung erneut um 2 kV auf 16 kV angehoben werden musste. Wie auf dem Elektropherogramm zu erkennen ist, sind die Peaks gut voneinander getrennt (Abb. 2.8-4).

Zur Bestimmung der optimalen Derivatisierungsbedingungen wurden die Proben bei unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur (RT), 40 °C, 60 °C) und Reaktionszeiten (5-30 Minuten) behandelt. Ein Vergleich der unterschiedlichen Derivatisierungstemperaturen bei gleicher Reaktionszeit (5 Minuten) zeigt, dass bei steigender Temperatur deutlich wachsende zusätzliche Peaks im Vergleich zur RT zu erkennen sind (Abb. 2.8-5, „?“). Weiterhin wird Peak a kleiner, Peak b und c werden größer.

Bei 15- und 30-minütiger Reaktionszeit bei RT sind zusätzliche Peaks („?“) zu erkennen (Abb. 2.8-6).

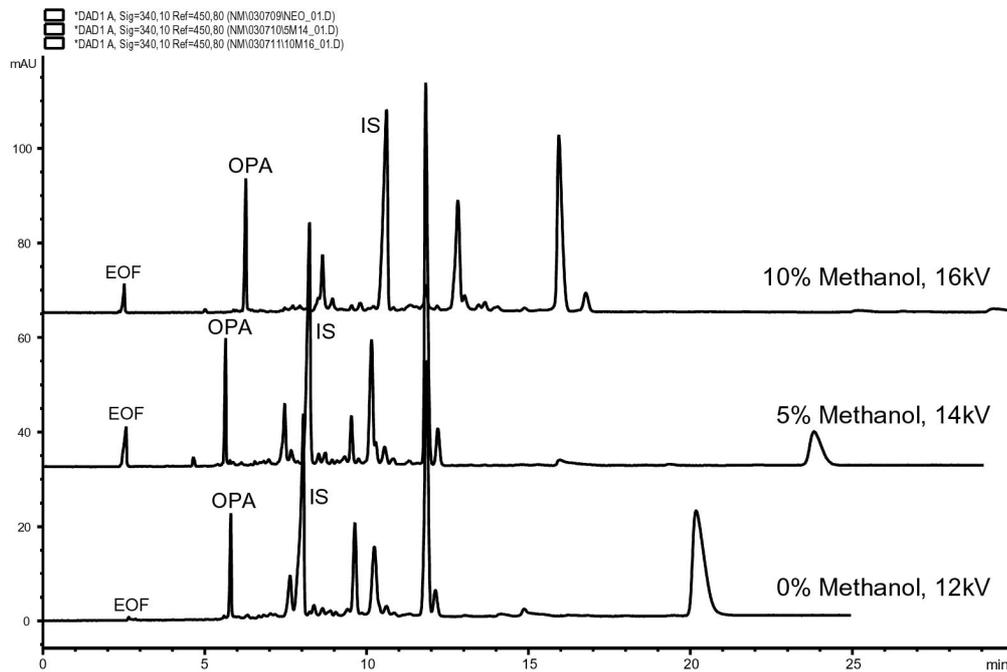


Abb. 2.8-4: Neomycin-Proben mit steigender Methanol-Konzentration im HGE und steigender Trennungsspannung

Um überprüfen zu können, ob es sich bei den Peaks a, b und c um derivatisiertes Neomycin A, B oder C handelt, wurde der Gehalt der Probe berechnet, die bei RT 5 Minuten deri-

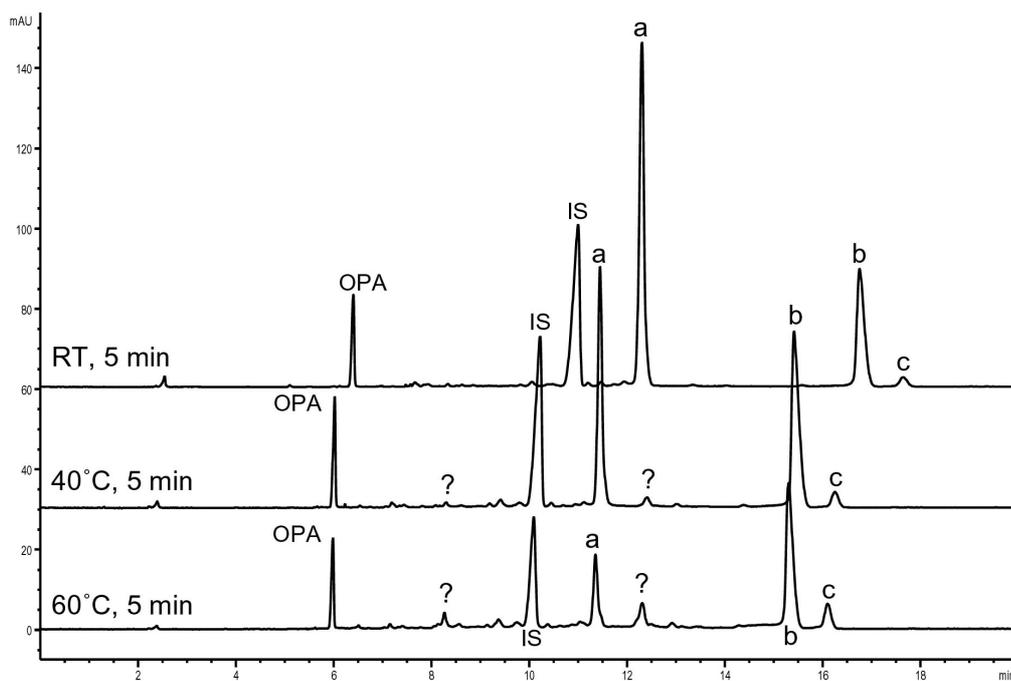


Abb. 2.8-5: Neomycin-Proben bei 5 Minuten Reaktionszeit und unterschiedlichen Derivatisierungstemperaturen (TB 50 mM, Methanol 10%, pH 10.0)

vatisiert wurde. Dazu wurden die korrigierten Flächen (Fläche/Migrationszeit) miteinander verglichen. Für Peak a ergab sich ein Wert von 70.1 %, für Peak b 27.8 % und für Peak c 2.1 %. Da es sich bei der Probe um eine kommerzielle Neomycin-Probe gehandelt hat,

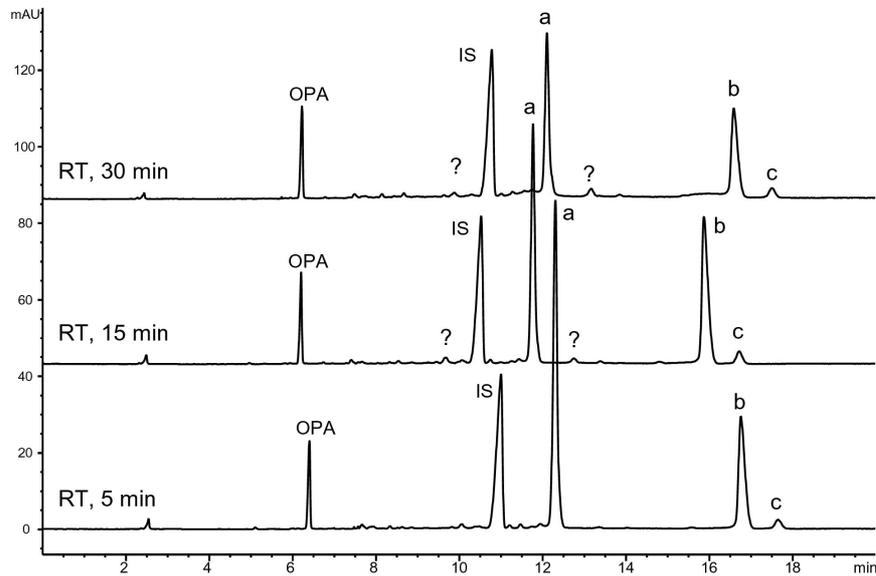


Abb. 2.8-6: Neomycin-Probe derivatisiert bei RT und unterschiedlichen Reaktionszeiten (TB 50 mM, Methanol 10%, pH 10.0).

wäre die Zuordnung Neomycin B = Peak a, Neomycin C = Peak b und Neamin = Peak c sehr zweifelhaft, da in dieser Probe mindestens 83 % (lt. Arzneibuchmonographie) Neomycin B enthalten sein müsste und nicht – wie errechnet – 70.1 %. Gegen die Zuordnung spricht weiterhin, dass bei „spiking“-Experimenten Neamin nicht dem Peak c sondern dem Peak a entsprechen würde.

Die aufgeführten Ergebnisse deuten darauf hin, dass für Neomycin die Gentamicin-MEKC-Methode nicht übernommen werden kann. Sowohl die Derivatisierung als auch die Trennbedingungen müssen angepasst werden, evtl. eine ganz neue Methode entwickelt werden.

3 Experimenteller Teil

3.1 Reagenzien und Materialien

Das in den Versuchen eingesetzte Wasser wurde ausschließlich aus einer Millipore-Filteranlage entnommen (Milli-Q, Millipore, Billerica, MA, USA). Alle Hintergrundelektrolyte wurden, sofern sie kein organisches Lösemittel enthielten, vor der Nutzung durch einen Filter mit einer Zellulosemischester-Membran (Acetat und Nitrat, CME) der Porengröße 0.22 μm filtriert. Enthielt der Elektrolyt geringe Mengen organischer Lösemittel, wurde durch einen Filter mit einer Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) der gleichen Porengröße filtriert (beide von Millipore, Billerica, MA, USA).

Aufgrund besserer Übersichtlichkeit, werden alle weiterhin verwendeten Chemikalien und Substanzen in tabellarischer Form aufgelistet:

3.1.1 Lösemittel

Tabelle 3.1-1: Lösemittel

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller / Lieferant
2-Propanol	p.a., 99.99 %	Fisher Scientific, Nidderau, D
Acetonitril	99.90 %	Carl Roth, Karlsruhe, D
Chloroform	99.98 %	Fisher Scientific, Nidderau, D
Dichlormethan	≥ 99.9 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ethanol, absolut		Chemikalienausgabe
Methanol	99.8 %	Merck, Darmstadt, D

3.1.2 Derivatisierungssubstanzen

Tabelle 3.1-2: Derivatisierungssubstanzen

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller / Lieferant
Borsäure	Ultra, ≥ 99.5 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Kaliumhydroxid	p.a.	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Mercaptoethanol	≥ 99 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Mercaptopropionsäure	≥ 99 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
<i>ortho</i> -Phthaldialdehyd	f.d. Fluoreszenz, ≥ 99.0 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Thioglykolsäure	≥ 99.0 %	Merck, Darmstadt, D

3.1.3 Pharmazeutisch wirksame Substanzen

Tabelle 3.1-3: Pharmazeutisch wirksame Substanzen

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller / Lieferant
2-Desoxystreptamin-dihydrochlorid		Von Merck, Darmstadt, D, zur Verfügung gestellt
Amikacin	Bulk	Bristol-Myers Squibb, München, D
Amikacin	CRS	Promochem, Wesel, D
Amikacin, Verunreinigung A	CRS	Promochem, Wesel, D
Clotrimazol	Bulk	Bayer, Leverkusen, D
Clotrimazol	Bulk	Hexal, Holzkirchen, D
Clotrimazol	CRS	Promochem, Wesel, D
Garaminhydrochlorid		Von Merck, Darmstadt, D, zur Verfügung gestellt
Gentamicin-C1	Bulk	Aus kommerzieller Probe getrennt nach Lit. [153]
Gentamicin-C1a	Bulk	Aus kommerzieller Probe getrennt nach Lit. [153]
Gentamicin-C2/C2a	Bulk	Aus kommerzieller Probe getrennt nach Lit. [153]
Gentamicin-C2b	Bulk	Pharm Chemicals, Shanghai Lansheng Corp., China
Gentamicinsulfat	Bulk	Verschiedene Hersteller und Lieferanten, vorzugsweise aus Asien und Europa*
Gentamicinsulfat	CRS	Promochem, Wesel, D
Kanamycin-B-sulfat	CRS	Promochem, Wesel, D
Kanamycin-monosulfat	Bulk	Verschiedene Hersteller und Lieferanten*
Kanamycin-monosulfat	CRS	Promochem, Wesel, D
Ketoconazol	Bulk	Fährhaus Pharma, Hamburg, D
Ketoconazol	CRS	Janssen-Cilag, Neuss, D
Neamin	CRS	Promochem, Wesel, D
Neomycin	Bulk	GlaxoSmithKline, München, D
Neomycin B	CRS	Promochem, Wesel, D
Neomycinsulfat	CRS	Promochem, Wesel, D
Netilmicinsulfat	Bulk	Essex Pharma, München, D
Netilmicinsulfat	CRS	Promochem, Wesel, D
Paromamin		Von J. Hoogmartens / E. Kaale, Leuven, B, zur Verfügung gestellt
Paromomycinsulfat	Bulk	Parke-Davis, Freiburg, D
Paromomycinsulfat	CRS	Promochem, Wesel, D
Sisomicin	CRS	Promochem, Wesel, D
Tobramycin	Bulk	Alcon Pharma, Freiburg, D
Tobramycin	CRS	Promochem, Wesel, D

* vom BfArM angeforderte Substanzen

3.1.4 Elektrolyte und sonstige Substanzen

Tabelle 3.1-4: Elektrolyte und sonstige Substanzen

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller / Lieferant
Amberlite® CG-50 I	k. A.	Merck, Darmstadt, D
Ammoniak	Arzneibuchqualität	Analysenausgabe
Deuteriumoxid	99.9 %	Deutero, Kastellaun, D
Di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei	Purissimum, ≥99 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Essigsäure	Purissimum	Merck, Darmstadt, D
Kieselgel 60	Arzneibuchqualität	Analysenausgabe
Natriumdihydrogenphosphat wasserfrei	Purum, ≥99.0 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Natriumtetraborat Decahydrat	Ultra, ≥99.5 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Ninhydrin	~99 %	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Phosphorsäure	Purum	Merck, Darmstadt, D
Pikrinsäure, (IS)	Arzneibuchqualität	Analysenausgabe
Schwefelsäure-d ₂	99.5 %	Deutero, Kastellaun, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	p.a.	Merck, Darmstadt, D

3.1.5 Cyclodextrine

Tabelle 3.1-5: Cyclodextrine

Substanz	Hersteller / Lieferant
2,6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)-β-cyclodextrin	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Heptakis-(2,3-diacetyl-6-sulfato)-β-cyclodextrin	Regis, Morton Grove, IL, USA
Heptakis-(2-N,N-dimethylcarbamoyl)-β-cyclodextrin	Hergestellt und zur Verfügung gestellt nach Lit [154]
Heptakis-6-sulfato-β-cyclodextrin	Regis, Morton Grove, IL, USA
Hydroxypropyl-β-cyclodextrin	Aldrich Chem., Milwaukee, WI, USA
Sulfobutylether-4-β-cyclodextrin, Natrium Salz	CyDex, Overland Park, KS, USA
β-Cyclodextrin	Wacker Chemie, Burghausen, D
β-Cyclodextrin, sulfatiert, Natrium-Salz	Aldrich Chem., Milwaukee, WI, USA

3.1.6 Mizellenbildende Substanzen

Tabelle 3.1-6: Mizellenbildende Substanzen

Substanz	Hersteller / Lieferant
Brij® 35P	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Cholsäure, Natrium Salz	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Deoxycholsäure, Natrium Salz, Monohydrat	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, D
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Taurodeoxycholsäure, Natrium Salz	Calbiochem/Merck, Darmstadt, D
Tetramethylammoniumbromid	Merck, Darmstadt, D

3.2 Geräte und Software

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzten Geräte werden in Tabelle 3.2-1 bis Tabelle 3.2-3 zusammengefasst:

3.2.1 Kapillarelektrophorese

Tabelle 3.2-1: Kapillarelektrophorese und Software

Gerät / Typ	Hersteller	Ergänzende Bemerkung
CE		
HP ^{3D} -CE	Agilent Technologies, Waldbronn, D	Aminoglykoside; externe Druckluft bis max. 12×10^5 Pa
P/ACE System MDQ	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA	Clotrimazol
Detektoren		
UV / Photo Dioden Array (PDA)	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA	Standard-Detektoren
LIF 488 Laser Modul	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA	Argon-Laser, Anregungswellenlänge: 488 nm, Detektor: 520 nm
Der PDA ist bei der Agilent HP ^{3D} -CE nicht auswechselbar, LIF- bzw. MS-Detektion ist durch spezielles Interface möglich		
Kapillaren		
50 – 100 μm I.D., 375 μm O.D.	Polymicro, bezogen von BGB-Analytik, Schloßböckelheim, D	Quarzglas, unbeschichtet
Diamant-Kapillarschneider	Agilent Technologies, Waldbronn, D	
Software		
Chemstation Rev. A 08.03	Agilent Technologies, Waldbronn, D	
P/ACE MDQ Version 2.3	Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA	
PC-Betriebssystem MS Windows NT 4.0	Microsoft, Unterschleißheim, D	
MS Excel 97	Microsoft, Unterschleißheim, D	

3.2.2 NMR-Experimente

Tabelle 3.2-2: NMR und Software

Gerät / Typ	Hersteller	Ergänzende Bemerkung
NMR		
Bruker Advance 400 MHz NMR	Bruker Analytik, Rheinstetten, D	Messungen bei 400.13 MHz (¹ H) und 100.61 MHz (¹³ C)
Software		
XWIN-NMR, Version 3.0	Bruker Analytik, Rheinstetten, D	

3.2.3 Sonstige analytische Geräte

Tabelle 3.2-3: Sonstige analytische Geräte

Gerät / Typ	Hersteller	Ergänzende Bemerkung
Kern 770-60 Waage	Kern, Balingen-Frommern, D	Elektronische Präzisionswaage
pH-Meter PHM220	Radiometer Copenhagen, Lyon, F	
Elektrode pH3359	Radiometer Copenhagen, Lyon, F	Spezial-Elektrode für kleine Volumenmengen
Eppendorf-Pipetten, Research	Eppendorf, Köln, D	Verschiedene Größen bis 5.000 ml
Heizplatte RH basic	IKA Labortechnik, Staufen, D	Derivatisierung, Abdampfen
Thermostat ETS-D4 fuzzy	IKA Labortechnik, Staufen, D	Derivatisierung, Abdampfen
Ultraschallbad Sonorex RK 153	Bandelin, Berlin, D	Clotrimazol, Lösungsbeschleunigung
Glasreiniger Qualilab LR-P	VWR-International, Darmstadt, D	Reinigung aller Glasgeräte
Heraeus Christ, Biofuge A, Type 320, Zentrifuge	Hanau, D	Clotrimazol
Probenschüttler Heidolph REAX-1	Heidolph, Schwabach, D	Clotrimazol
Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha II-12	Christ, Osterode am Harz, D	Gentamicin
Kieselgelplatten, 40x80 mm, 0.25 mm	Macherei-Nagel, Düren, D	Gentamicin

3.3 Probenbereitung und Herstellung der Lösungen

3.3.1 Paromomycinsulfat

3.3.1.1 OPA-Derivatisierungsreagenz

Zur Herstellung von 10.0 ml OPA-Reagenz werden 520 mg *o*-Phthaldialdehyd mit 1 ml Methanol gelöst und 4 ml Borsäure-Lösung (30 mM, pH 10.4, eingestellt mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung) hinzugefügt. Um die Lösungsgeschwindigkeit zu erhöhen, wird die Lösung in ein Ultraschallbad gestellt. Nachdem sich die Substanz vollständig gelöst hat, wird 1.0 ml Thioglykolsäure zugegeben und der pH-Wert mit 8 M wässriger Kaliumhydroxid-Lösung auf 10.4 eingestellt. Dabei ist zu beachten, dass die Temperatur der Lösung über 45 °C ansteigt und das pH-Meter entsprechend nachzustellen ist. Die Lösung wird mit der 30 mM Borsäure-Lösung auf 10.0 ml aufgefüllt, der pH-Wert nochmals kontrolliert und bei Bedarf vorsichtig mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung nachjustiert.

Die OPA-Lösung ist einen Tag bei 4 °C zu lagern, um Störsignale bei der UV-Detektion, die nicht von der Probensubstanz stammen, zu reduzieren.

3.3.1.2 Hintergrundelektrolyt

In der Standardmethode wird ein Natriumtetraborat-Elektrolyt (40 mM, pH 10.0) verwendet, der 3 mM β -Cyclodextrin und 12.5 % (v/v) Methanol enthält. Entsprechende Mengen von Natriumtetraborat und β -Cyclodextrin werden mit 70 % des benötigten Wassers gelöst und zur Beschleunigung der Lösung in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wird der pH-Wert mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf 10.0 eingestellt und 12.5 % (v/v) Methanol zugegeben. Schließlich wird mit Wasser zum Endvolumen aufgefüllt. Vor Gebrauch wird der Elektrolyt durch 10-minütige Ultraschallbehandlung entgast.

3.3.1.3 Probenbereitung/Derivatisierung

Zur Herstellung der derivatisierten Probe wird eine Paromomycin-Stammlösung (2.0 mg/ml) benötigt. Es werden 0.80 ml dieser Stammlösung und 0.50 ml Methanol in einen Kolben (2 ml) gefüllt. Bei Bedarf eines internen Standards wird noch 0.02 μ l einer wässrigen Pikrinsäurelösung (7.0 mg/ml) ergänzt. Anschließend wird 0.16 ml OPA-Reagenz-Lösung hinzugegeben und mit Methanol auf 2.0 ml aufgefüllt. Der Kolben wird für

exakt 5 Minuten bei 60 °C ins Wasserbad gestellt und anschließend unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur gekühlt und in ein CE-Gläschen gefüllt.

3.3.2 Gentamicinsulfat

3.3.2.1 Präparative säulenchromatographische Trennung

3.3.2.1.1 *Dünnschichtchromatographie der Mischung*

Als stationäre Phase dient eine aktivierte Kieselgelplatte (40x80 mm) (135 °C, 1 h), als Fließmittel die untere Phase einer Methanol/Chloroform/Ammoniak (26 %, v/v)-Mischung im Verhältnis 1:1:1. Die Proben werden jeweils mit Mikroliter-Pipetten punktförmig aufgetragen und die Platte nach Kammersättigung 20 Minuten (Laufstrecke 70 mm) entwickelt. Die Kieselgelplatte wird bei 135 °C im Ofen für 20 Minuten getrocknet. Die Detektion erfolgt mit einer Mischung aus Ninhydrin (1.0 g) in 50.0 ml Ethanol. Nach Trocknung bei 135 °C für 15 Minuten werden drei deutlich voneinander getrennte, violette Flecken sichtbar.

3.3.2.1.2 *Ionenaustauschchromatographie*

Für die Ionenaustauschchromatographie dienen 10 g des Kationenaustauschers Amberlite[®] als stationäre Phase. Wichtig dabei ist, dass nach dem Aufschlännen die feinen, an der Oberfläche schwimmenden Partikel entfernt werden. Mit Ammoniak wird auf einen pH-Wert von 9.0 eingestellt und die Säule befüllt. Vier Gramm einer kommerziellen Gentamicin-Probe werden mit wenig Wasser (pH 9.0) gelöst und auf die Säule gegeben. Anschließend wird mit 250 ml 0.125 M Ammoniak-Lösung das entstandene Ammoniumsulfat des Gentamicins eluiert. Sobald Gentamicin in einer Fraktion mittels DC nachgewiesen werden kann, wird 0.2 M Ammoniak-Lösung als mobile Phase verwendet. Nach ca. 600 ml wird die Chromatographie beendet, da nur noch Spuren von Gentamicin dünn-schichtchromatographisch gefunden werden können. Die Fraktionen, die Gentamicin-Base enthalten, werden vereint und das Lösemittelgemisch im Vakuum verdampft (40 °C, 5000 Pa). Der jeweils erhaltene, ölige Rückstand wird mit einem Lyophilisator gefriergetrocknet.

3.3.2.1.3 Kieselgel-Säulenchromatographie

Zur Herstellung der Kieselgelsäule wird Kieselgel mit der unteren Phase von 2-Propanol/Chloroform/Ammoniak (17 %, m/v) im Verhältnis 1:2:1 aufgeschlämmt und in die Säule eingefüllt. 2000 mg Gentamicin-Base werden in möglichst wenig der gleichen Phase gelöst und auf das Kieselgel aufgetragen. Ca. 800 ml des folgenden Eluenten mit der Zusammensetzung 2-Propanol/Chloroform/Ammoniak (26 %, m/v) im Verhältnis 1:2:1 werden in 100 Fraktionen aufgefangen, dünnschichtchromatographisch getrennt und mit dem unter 3.3.2.1.1 beschriebenen Reagenz detektiert.

Die Mischfraktionen, die mindestens noch zwei (bei C2/C2a: drei) Bestandteile enthalten, werden vereinigt und nochmals nach der unter 2.2.2.3 beschriebenen Methode getrennt.

3.3.2.2 CZE-Methode

3.3.2.2.1 OPA-Derivatisierungsreagenz

Die Herstellung des OPA-Derivatisierungsreagenzes wird unter 3.3.1.1 beschrieben.

3.3.2.2.2 Hintergrundelektrolyt

In der CZE-Standardmethode wird ein Natriumtetraborat-Elektrolyt (30 mM, pH 10.0) verwendet, der 7.5 mM β -Cyclodextrin und 12.5 % (v/v) Methanol enthält. Die Herstellung ist unter 3.3.1.2 beschrieben.

3.3.2.2.3 Probenbereitung/Derivatisierung

Zur Herstellung der derivatisierten Probe wird eine Gentamicin-Stammlösung (2.0 mg/ml) benötigt. Um systematische Fehler zu vermeiden, wird die entsprechende Menge Gentamicin CRS in einer wässrigen Lösung von Pikrinsäure (IS) gelöst, so dass nach Herstellung der Probe die Konzentration von Pikrinsäure 0.14 mg/ml beträgt. Es werden 0.80 ml dieser Stammlösung und 0.50 ml Methanol in einen Kolben (2 ml) gefüllt. Anschließend wird 0.16 ml OPA-Reagenz-Lösung dazugegeben und der Kolben für exakt 4 Minuten bei 60 °C ins Wasserbad gestellt. Die Lösung wird unter fließendem Wasser anschließend auf

Raumtemperatur gekühlt und mit Methanol auf 2.0 ml aufgefüllt. 1 ml der Lösung wird in ein PVC-CE-Gläschen gefüllt.

3.3.2.3 MEKC-Methode

3.3.2.3.1 *Derivatisierungsreagenz*

Zur Herstellung von 25.0 ml OPA-Reagenz werden 650 mg *o*-Phthaldialdehyd mit 2 ml Methanol versetzt. Nach wenigen Minuten hat sich OPA fast vollständig im Methanol gelöst. Es werden 15 ml Borsäure-Lösung (30 mM, pH 10.4, eingestellt mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung) hinzugefügt. Sollte noch nicht alles gelöst sein, wird die Lösung in ein Ultraschallbad gestellt. Danach wird 1.30 ml Thioglykolsäure zugegeben und der pH-Wert mit 8 M Kaliumhydroxid-Lösung auf 10.4 eingestellt. Dabei ist zu beachten, dass die Temperatur der Lösung auf über 35 °C ansteigt und das pH-Meter entsprechend nachzustellen ist. Die Lösung wird mit der o.g. Borsäure-Lösung auf 25.0 ml aufgefüllt, der pH-Wert nochmals kontrolliert und bei Bedarf vorsichtig mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung korrigiert.

Die OPA-Lösung ist einen Tag bei 4 °C zu lagern, um Störsignale bei der UV-Detektion, die nicht von der Probensubstanz stammen, zu reduzieren.

3.3.2.3.2 *Hintergrundelektrolyt*

In der MEKC-Standardmethode wird ein Natriumtetraborat-Elektrolyt (100 mM, pH 10.0) verwendet, der 15.0 mM β -Cyclodextrin und 20.0 mM DChol enthält. Entsprechende Mengen von Natriumtetraborat, β -Cyclodextrin und DChol werden mit 80 % des benötigten Wassers in einem Ultraschallbad gelöst, der pH-Wert mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf 10.0 eingestellt und die Lösung mit Wasser auf das erforderliche Endvolumen ergänzt. Der pH-Wert wird nochmals geprüft und bei Bedarf mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung korrigiert. Die sich durch die Zugabe einiger Tropfen Natriumhydroxid-Lösung evtl. ergebende Ungenauigkeit beeinflusst die Trennung nicht merklich.

3.3.2.3.3 *Probenbereitung/Derivatisierung*

Es werden die gleichen Substanzen verwendet wie in Kapitel 3.3.2.2.3. 0.45 ml der Stammlösung und 0.25 ml Methanol werden in einen 1 ml-Kolben gefüllt. Anschließend wird 0.16 ml OPA-Reagenz-Lösung dazugegeben und der Kolben direkt für exakt 4 Minuten bei 60 °C ins Wasserbad gestellt. Die Lösung wird er unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur gekühlt, mit Methanol auf 1.0 ml aufgefüllt und in ein PVC-CE-Gläschen gefüllt.

3.3.2.4 NMR-Experimente

3.3.2.4.1 *Probenbereitung*

Für die Messung der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren werden 15 mg des Gentamicingemisches bzw. 10 mg der jeweiligen Einzelkomponenten in 650 μl D_2O bzw. in 650 μl D_2O und 25 μl deuterierter Schwefelsäure (99.5 %) gelöst.

3.3.3 **Kanamycinsulfat**

3.3.3.1 Derivatisierungsreagenz

Die Herstellung des OPA-Derivatisierungsreagenzes ist unter 3.3.1.1 beschrieben.

3.3.3.2 Hintergrundelektrolyt

Es wird der gleich HGE verwendet, wie bei Gentamicin-MEKC-Standard-Methode (s. 3.3.2.3.2).

3.3.3.3 Probenbereitung/Derivatisierung

Zur Herstellung der derivatisierten Probe wird eine Kanamycin-Stammlösung (2 mg/ml) benötigt. Es werden 0.40 ml dieser Stammlösung und 0.25 ml Methanol in einen 1 ml-Kolben gefüllt. Es wird 0.16 ml OPA-Reagenz-Lösung dazugegeben und der Kolben direkt für exakt 10 Minuten bei 60 °C ins Wasserbad gestellt. Anschließend wird die Lösung unter fließendem Wasser auf Raumtemperatur gekühlt, mit Methanol auf 1.0 ml aufgefüllt und in ein PVC-CE-Gläschen gefüllt.

3.4 Elektrophoretische Bedingungen

Sind bei Spülvorgängen keine Druckangaben gemacht, so handelt es sich um den Gerätestandarddruck von 1×10^5 Pa.

3.4.1 Paromomycinsulfat

Tabelle 3.4-1: Standardmethodenbeschreibung für Paromomycinsulfat

Paromomycinsulfat CZE-Standard-Methode			
Gerät	Agilent HP ^{3D} -CE		
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, absolute Länge 33.0 cm, effektive Länge 22.4 cm, Innendurchmesser 50 µm, Außendurchmesser 375 µm		
Injektion	Hydrodynamisch, 4 Sekunden mit 5000 Pa		
Trennspannung	+18 kV		
Temperatur	25 °C		
Detektion	UV Messwellenlänge 330 nm, Bandbreite 10 nm		
Hintergrundelektrolyt	Natriumtetraborat	40 mM	
	β-Cyclodextrin	3 mM	
	pH 10.0		
	Methanol 12.5 % (v/v)		
Konditionierung	<i>Neue Kapillare:</i>		
	Natriumhydroxid-Lösung 1.0 M		3.0 Minuten
	Wasser		2.0 Minuten
	HGE		3.0 Minuten
	<i>Tageskonditionierung:</i>		
	Natriumhydroxid-Lösung 0.1 M 60 °C		5.0 Minuten
	Wasser		2.0 Minuten
	HGE		3.0 Minuten
	<i>Zwischen den Läufen:</i>		
	Hintergrundelektrolyt		3.0 Minuten
Derivatisierung	Paromomycin-Stammlösung [2.0 mg/ml]		0.80 ml
	Pikrinsäure-Lösung [7.0 mg/ml]		0.20 ml
	OPA-Reagenz		0.16 ml
	Methanol	ad	2.00 ml
	60 °C, 5.0 Minuten		

3.4.2 Gentamicinsulfat

Tabelle 3.4-2: Beschreibung der CZE-Standard-Methode für Gentamicinsulfat

Gentamicinsulfat CZE-Standard-Methode		
Gerät	Agilent HP ^{3D} -CE	
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, absolute Länge 42.2 cm, effektive Länge 33.7 cm, Innendurchmesser 50 µm, Außendurchmesser 375 µm	
Injektion	hydrodynamisch, 4 Sekunden mit 5000 Pa	
Trennungsspannung	+15 kV	
Temperatur	25 °C	
Detektion	UV	
	Messwellenlänge	330 nm, Bandbreite 10 nm
	Referenzwellenlänge	450 nm, Bandbreite 80 nm
HG-Elektrolyt	Natriumtetraborat	30 mM
	β-Cyclodextrin	7.5 mM
	pH 10.0	
	Methanol 12.5 % (v/v)	
Konditionierung	<i>Neue Kapillare:</i>	
	Natriumhydroxid-Lösung 1.0 M	3.0 Minuten
	Wasser	2.0 Minuten
	HGE	3.0 Minuten
	<i>Tageskonditionierung:</i>	
	Natriumhydroxid-Lösung 0.1 M, 60 °C	5.0 Minuten
	Wasser	2.0 Minuten
	HGE	3.0 Minuten
	<i>Zwischen den Läufen:</i>	
	Natriumhydroxid-Lösung 0.1 M	3.0 Minuten
	Wasser	3.0 Minuten
	HGE	3.0 Minuten
Derivatisierung	Gentamicin-Stammlösung [2.0 mg/ml]	0.80 ml
	OPA-Reagenz	0.16 ml
	Methanol	ad 2.0 ml
	60 °C, 4.0 Minuten	

Tabelle 3.4-3: Beschreibung der MEKC-Standard-Methode für Gentamicinsulfat

Gentamicinsulfat MEKC-Standard-Methode			
Gerät	Agilent HP ^{3D} -CE		
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, absolute Länge 33.0 cm, effektive Länge 24.5 cm, Innendurchmesser 50 µm, Außendurchmesser 375 µm		
Injektion	hydrodynamisch, 5 Sekunden mit 5000 Pa		
Trennungsspannung	+12 kV		
Temperatur	25 °C		
Detektion	UV		
	Messwellenlänge	340 nm, Bandbreite 10 nm	
	Referenzwellenlänge	450 nm, Bandbreite 80 nm	
HG-Elektrolyt	Natriumtetraborat	100 mM	
	DChol	20 mM	
	β-Cyclodextrin	15 mM	
	pH 10.0		
Konditionierung	<i>Neue Kapillare:</i>		
	Natriumhydroxid-Lösung 1.0 M		2.0 Minuten
	Wasser		5.0 Minuten
	Hintergrundelektrolyt		10.0 Minuten
	Spannungsgradient: 0 – 15 kV		20.0 Minuten
	HGE		2.0 Minuten
	<i>Tageskonditionierung:</i>		
	Wasser	5x10 ⁵ Pa	5.0 Minuten,
	HGE		5.0 Minuten
	<i>Zwischen den Läufen:</i>		
	Natriumhydroxid-Lösung 0.1 M	5x10 ⁵ Pa	1.5 Minuten
	Wasser	5x10 ⁵ Pa	1.5 Minuten
	Salzsäure 0.1 M	5x10 ⁵ Pa	2.0 Minuten
	Wasser	5x10 ⁵ Pa	2.0 Minuten
	HGE	8x10 ⁵ Pa	3.0 Minuten
	<i>Nach einer Trennung:</i>		
	Wasser	8x10 ⁵ Pa	2.0 Minuten
<i>Über Nacht:</i>			
Lagerung der Kapillar-Enden in Wasser			
Derivatisierung	Gentamicin-Stammlösung [2.0 mg/ml]	0.45 ml	
	OPA-Reagenz	0.16 ml	
	Methanol	0.25 ml	
	40 °C, 4.0 Minuten		
	Methanol	ad	1.00 ml

TEIL B

4 Einleitung

4.1 Clotrimazol

Als „Prototyp“ der antimykotisch wirksamen Imidazol-Derivate wurde Clotrimazol 1973 auf dem Markt eingeführt [155]. Ihm folgten in den nächsten Jahren etliche neue, teilweise auch etwas anders strukturierte Substanzen, wie z.B. Miconazol (1974), Ketoconazol (1981), Econazol und Bifonazol (beide 1983). Clotrimazol erwies sich als stark wirksames LokalanTIMYKOTIKUM mit breitem Wirkspektrum, angefangen bei *Candida albicans* bis hin zu Dermatophyten wie *Trichophyton interdigitale* oder *Microsporum gypseum* [156]. Bisher bekannte Antimykotika waren entweder nur gegen Hefen, wie z.B. das Amphothericin B, oder nur gegen Fadenpilze, wie z.B. das Griseofulvin, wirksam. Clotrimazol kann dagegen auch oral sowohl gegen Fadenpilze als auch gegen Hefen eingesetzt werden [157].

Die fungistatische Wirkung dieses Azolantimykotikums beruht auf einer Hemmung der Lanosterol-14 α -Demethylase. Die Demethylase gehört zu den Cytochrom P₄₅₀-abhängigen Monooxygenasen, die in Prokaryonten, Hefen, Pilzen, Pflanzen und Tieren vorkommen und die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden [158]. Das Imidazolderivat Clotrimazol lagert sich – ebenso wie die anderen Vertreter dieser Wirkstoffgruppe – an das zentrale Eisenion des Cytochrom P₄₅₀ an, wobei ein Stickstoff des Imidazolringes die Bindungsstelle für den molekularen Sauerstoff besetzt [159]. Die Hemmung der 14 α -Demethylase führt zu einer Verminderung des Ergosterolgehaltes und zu einer Zunahme von 14 α -Methyl-Sterolen in der Pilzmembran, die dadurch in ihrer Fluidität unphysiologisch verändert wird. Die Folge ist u.a. die Aktivitäts-Änderungen von membrangebundenen Enzymen, die für die Wachstumshemmung verantwortlich gemacht werden [160].

Clotrimazol wird in Form von Vaginaltabletten oder Cremes lokal zur Therapie der durch *Candida* verursachten Vulvovaginitis eingesetzt. Diverse Hautpilzkrankungen, insbesondere im Zehenbereich, sind als weitere Anwendungen zu nennen. Außerdem wird Clotrimazol zur Therapie bei Nagelmykosen eingesetzt. Allerdings reicht die Wirkpotenz oft nicht aus, so dass die Therapie mit zusätzlichen Antimykotika fortgesetzt werden muss [161].

Clotrimazol wird zusätzlich zu seiner antimykotischen eine entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben. Die Einsatzmöglichkeiten werden besonders im Bezug auf rheumatische Erkrankungen heutzutage klinisch erprobt.

Die entzündungshemmende Wirkung beruht auf folgenden Mechanismen: Clotrimazol ist ein potenter Inhibitor Calcium-sensitiver Kalium-Kanäle des IK1- oder SK4-Typen [162]. Die Kanäle kommen in vielen sekretorischen Epithelzellen vor [163], außerdem in Wanderzellen des Immunsystems wie Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen [164]. Diese Zellen sind in die Immunantwort eines Organismus involviert und deshalb von großem Interesse. Sie haben Einfluss auf die Zellbewegung [165], die Proliferation aktivierter T-Lymphozyten [166] und die Bildung von reaktiven sauerstoffhaltigen Zwischenprodukten [167]. IK1/SK4-Kanäle sind ein therapeutisches Ziel für Erkrankungen, die aufgrund einer Immunantwort eine Entzündung hervorgerufen haben. Genau in diesem Prozess greift Clotrimazol ein, wie bereits an rheumatoider Arthritis leidenden Patienten beobachtet wurde [168]. Die Signifikanz der IK1/SK4-Kanäle ist pharmakologisch durch die Anwendung von Kanalblockern wie Clotrimazol belegt. Die IC_{50} -Werte von Clotrimazol bei geklonten Kanälen liegen zwischen 24 nmol/l [169] und 387 nmol/l [170]. Die Konzentrationen konnten bereits leicht mittels *In-vitro*-Experimenten überprüft werden, die Kontrolle *in vivo* gestaltet sich dagegen aufgrund ihrer Komplexität viel komplizierter. Wichtig ist, den biologischen Effekt des Kanalblockers Clotrimazol *in vivo* mit dessen Plasmakonzentration zu vergleichen. Dies ist ohne weiteres mit Hilfe der Kapillarelektrophorese möglich, da diese Technik im Gegensatz zur HPLC mit sehr kleinen Probenvolumina auskommt. Erschwerend kommt hinzu, dass Clotrimazol eine Plasmabindung von 98 % aufweist [171] und außerdem nur sehr geringe Mengen an Mäuseplasma (200 μ l) zu Verfügung standen.

4.2 Eigenschaften

4.2.1 Struktur und physikalisch-chemische Eigenschaften von Clotrimazol

Clotrimazol (1-(2-Chlortrityl)imidazol) ist ein weißlich bis schwach gelbliches, kristallines

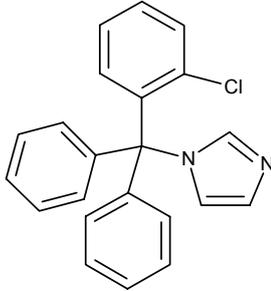


Abb. 4.2-1: Chemische Struktur von Clotrimazol

Pulver. Es ist geruchlos bis nahezu geruchlos. Der Schmelzpunkt liegt bei 143 °C. Es ist leicht löslich in Eisessig, Dichlormethan, Methanol, Ethanol, Chloroform und Dimethylformamid und schwer löslich in Wasser und Diethylether. Der pK_s -Wert liegt bei 4.7 (50 % Ethanol). Die Substanz ist hydrolyseempfindlich. Das UV-Spektrum zeigt ein Maximum bei 260 nm (in Methanol, $A_{1cm}^{1\%} = 19$) bzw. 262 nm (in 0.01 N-NaOH, $A_{1cm}^{1\%} = 25$) [172].

4.2.2 Herstellung

Die Herstellung von Clotrimazol wurde 1967 von der Firma Bayer zum Patent angemeldet und 1971 in Deutschland [157] und 1972 in den USA [173] patentiert. Synthetisiert wird die Substanz durch Reaktion von Imidazol-Silbersalzen mit *o*-Chlortrityl-Halogeniden in inerten organischen Lösemitteln wie Benzol, Hexan, Cyclohexan oder Diethylether bei Temperaturen zwischen 20 °C-80 °C [157]. Andere Herstellungsverfahren sind ebenfalls veröffentlicht [172].

4.3 Aufgabenstellung

Ziel war es, eine kapillarelektrophoretische Methode zu entwickeln, die Clotrimazol, das aus Mäuseblut extrahiert wurde, zuverlässig und empfindlicher als die bisher beschriebenen HPLC-Methoden (0.5–6.0 µM) quantifizieren kann [174,177]. Mit der CE-Methode sollten 74 Mäuseplasmaproben untersucht werden. Das Plasma stammt von Mäusen, denen Clotrimazol in unterschiedlichen Konzentrationen oral appliziert wurde. Es sollte mit diesen Messungen bestätigt werden, dass bei Mäusen, bei denen ein antirheumatischer Effekt aufgetreten ist, auch eine erhöhte Konzentration an Clotrimazol im Blut festgestellt werden kann.

5 Allgemeiner Teil

5.1 Analytik von Clotrimazol aus Mäuseplasma

5.1.1 Übersicht

Gewöhnlich ist die HPLC das Standardinstrument in der pharmazeutischen Industrie. Folglich existieren zahlreiche HPLC-Methoden, mit denen Clotrimazol und andere Azol-Antimykotika als Einzelkomponenten sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt werden können [174,175,176,177]. Ebenso wurden HPLC-Verfahren zur Trennung und qualitativen Bestimmung von Gemischen antimykotischer Substanzen publiziert [178,179]. Auch Bestimmungen aus pharmazeutischen Formulierungen mittels HPLC sind in der Literatur zu finden [180]. Seit den frühen 90ern werden auch immer mehr kapillarelektrophoretische Methoden beschrieben. Ein Vergleich der HPLC mit der CE am Beispiel von Azol-Antimykotika wurde bereits veröffentlicht [180]. Daraus resultierte, dass die CE in Bezug auf Analysenzeit und –aufwand bei Gehaltsbestimmungen der gut etablierten Methode wie der HPLC in nichts nachsteht. Eine Methode, mit der man mit Hilfe der CE Fluconazol als Einzelsubstanz aus Plasma bestimmen kann, wurde ebenfalls schon entwickelt [181]. Es wurden bei einer Proteinfällung eine Nachweisgrenze von $>5 \mu\text{g/ml}$, bei einer Flüssig-Flüssig-Extraktion von $1 \mu\text{g/ml}$ erreicht. Bei der Ausfällung der Proteine spielt die Plasma-Eiweiß-Bindung der Analyten eine große Rolle. Ein Teil kann je nach Stärke der Bindung an das Protein beim Ausfällen für die Analyse verloren gehen. Da Fluconazol eine Plasma-Eiweiß-Bindung von 20 %, Clotrimazol dagegen von ca. 98 % aufweist [171], ist die oben genannte Methode [181] nicht ohne weiteres auf Clotrimazol übertragbar.

Eine Schwierigkeit bei der Analyse von Plasmaproben stellen die darin enthaltenen Proteine dar. Sie beeinflussen die Trennungen mittels HPLC, da sie sich einerseits in das Säulenbett einlagern und nicht mehr zu entfernen sind, andererseits im Chromatogramm sichtbar sind. Deshalb werden die Proteine vor der Injektion meist durch verschiedene Verfahren aus dem Plasma entfernt. Üblicherweise werden die Proteine mit den unterschiedlichsten Substanzen, wie Methanol, Trichloressigsäure oder Zinksulfat, ausgefällt. Weiterhin kann man die Arzneistoffe durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit organischen Lösemitteln oder durch eine Festphasen-Extraktion aus dem Plasma gewinnen. Mit der CE ist es sogar möglich, die Proben ohne weitere Vorbehandlung zu vermessen [182].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Vorversuche ohne Vorbehandlung der Plasmaproben durchgeführt. Diese führten jedoch zu mangelhaften Ergebnissen, da sich oftmals kein konstanter Strom aufbauen konnte und die Kapillare sehr schnell verstopfte. Daher wurde bei der Analyse von Clotrimazol mit dem klassischen Verfahren der Proteinfällung gearbeitet und diese Methode mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion verglichen.

5.1.2 Methodenentwicklung

5.1.2.1 Optimierung des Hintergrundelektrolyten

Bei der Entwicklung des optimalen Trennpuffer-Systems wurden Vorversuche ohne Plasma mit verschiedenen Elektrolytsubstanzen durchgeführt. Erste Untersuchungen mit einem Natriumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7.2) zeigten keinen Clotrimazol-Peak. Auch Variationen der Ionenstärke (10 mM, 75 mM und 100 mM) und des pH-Wertes von 2.0 bis 9.3 führten nicht zum Erfolg.

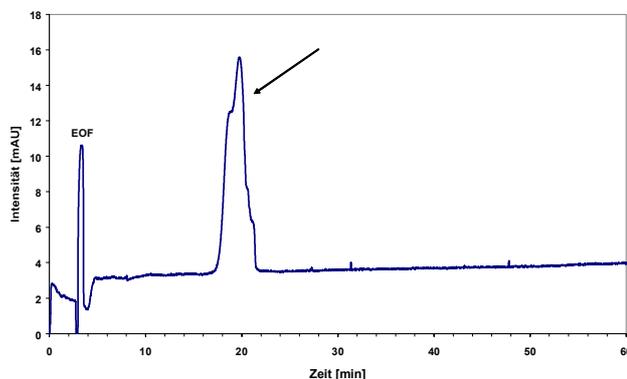


Abb. 5.1-1: Clotrimazol (2 mg/ml) mit folgendem HGE: 10 mM Na_2HPO_4 , 50 mM SDS, pH 7.2, Acetonitril 15 %, Butanol 5 %

sämtlicher Parameter (Konzentration von Na_2HPO_4 , SDS, Acetonitril, Butanol und pH-Wert) kein scharfer Clotrimazol-Peak erhalten werden konnte.

Erst durch den Einsatz von Natriumacetat oder Tris (jeweils pH 5.2) als Puffersubstanz konnte Clotrimazol als Einzelpeak detektiert werden. Unter identischen CZE-Trennbedingungen (Puffer, Methanol 20 %; Trennungsspannung 15 kV) ergab sich bei der Verwendung eines 75 mM Natriumacetat-Puffers für Clotrimazol eine Laufzeit von ca. 4 Minuten, bei Verwendung eines 75 mM Tris-Puffers migrierte Clotrimazol in 2.4 Minuten (s. auch Abb. 5.1-2) zum Detektorfenster.

Lin et al. entwickelten 1999 eine MEKC-Methode zur Trennung von Betamethason und Clotrimazol [180]. Mit dem von ihnen verwendeten Elektrolyten (10 mM Na_2HPO_4 , 50 mM SDS, pH 7.2, 15 % Acetonitril, 5 % Butanol) konnte eine „Peakansammlung“

detektiert werden (Abb. 5.1-1, s. Pfeil), aus der auch nach Variation

Beide Puffersubstanzen ergaben in Bezug auf Peakform und Laufzeit vergleichbare Ergebnisse von Clotrimazol, doch mit dem Acetat-Puffer konnte im pH-Bereich von 4.0-5.2 keine Kalibrierung durchgeführt werden, da die Werte der relativen Standardabweichungen für die Präzisionen im Bereich von 0.3 µg/ml-10.0 µg/ml meist größer als 10 % waren. Deshalb wurde mit Tris-Puffer weitergearbeitet. Durch Erhöhung der Pufferkonzentration

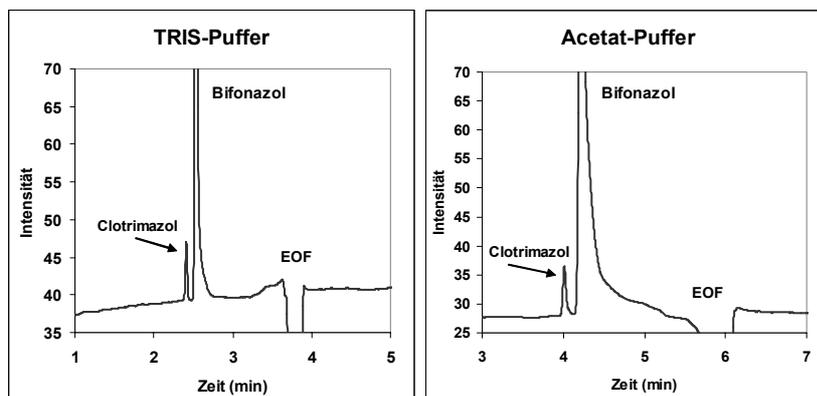


Abb. 5.1-2: Beispiелеktropherogramme von Clotrimazol (1 µg/ml) in Tris-Puffer (links; 75 mM, Methanol 20 %, pH 5.2) und in Natriumacetat-Puffer (rechts; 75 mM, Methanol 20 %; pH 5.2). Bifonazol wurde zeitweise als Interner Standard benutzt.

auf 100 mM konnte eine geringe Laufzeitverkürzung erzielt werden, ohne die Selektivität zum derzeit eingesetzten Internen Standard (Bifonazol) zu erniedrigen. Mit 100 mM Tris (Methanol 20 %) wurden alle weiteren Versuche unternommen. Eine Kalibrierung war mit diesem Puffer sowohl bei pH 3.0 als auch bei pH 5.2 durchführbar. Größere Peaks und somit eine bessere Nachweisgrenze wurde mit einem pH-Wert von 3.0 erreicht.

5.1.2.2 Interner Standard

Die Bearbeitung biologischer Proben ist aufgrund der vielen Arbeitsschritte vor dem eigentlichen Vermessen mit einigen zufälligen und systematischen Fehlern behaftet. Um diese Fehler möglichst klein zu halten setzt man einen Internen Standard (IS) ein. Zur Berechnung analytischer oder statistischer Daten wird das Verhältnis der zu analysierenden Substanz zum IS herangezogen. Die Substanz, die sich als IS eignet, sollte ähnliche physikalische und chemische Eigenschaften aufweisen wie Clotrimazol, damit auftretende Fehler beide im gleichen Maße tangieren und somit das Verhältnis der beiden Substanz in der Probe gleich bleibt.

Im Rahmen dieser Versuche wurden sowohl Imidazol als auch die Azol-Derivate Bifonazol, Mebendazol und Ketoconazol getestet. Diese Substanzen erfüllen in struktureller Hinsicht die geforderten Kriterien.

Imidazol und Mebendazol migrierten nicht im erforderlichen Detektionsfenster. Einzig Bifonazol und Ketoconazol kamen in Frage, da sie in nächster Nähe zum Clotrimazol migrierten. Da es im Laufe der Methodenentwicklung zwischen Clotrimazol und Bifonazol zu Peaküberlappungen kam, wurde letztendlich Ketoconazol als IS eingesetzt. Ketoconazol migriert unter optimalen Bedingungen ca. 60 Sekunden hinter dem Clotrimazol.

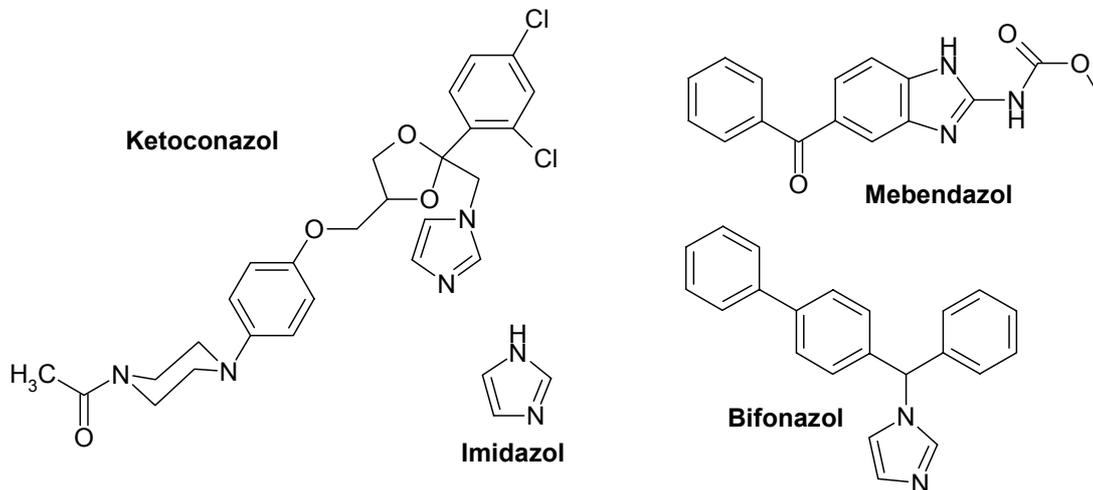


Abb. 5.1-3: Strukturformeln der eingesetzten Internen Standards

5.1.2.3 Proteinfällung

Für die Vorversuche stand sowohl Human-Plasma als auch Kaninchen-Plasma zur Verfügung. Da Clotrimazol eine Plasmabindung von ca. 98 % aufweist, war es Ziel der Proteinfällung, möglichst keinen Analyten durch die Fällung zu verlieren.

Zur Optimierung wurden drei verschiedene Fällungsreagenzien untersucht. Trichloressigsäure zersetzte die Probe, so dass im Elektropherogramm mehrere Peaks zu erkennen waren. Mit Acetonitril wurden gleiche Peakhöhen wie mit Methanol erreicht, jedoch führte der Gebrauch von Acetonitril zu einer unruhigeren Basislinie im Elektropherogramm. Da die Basislinie in biologischen Proben oftmals durch die Bestandteile des Plasmas unruhig ist, wurde zur Fällung der Proteine Methanol gewählt, da Methanol auch Bestandteil des HGEs ist. Zu 60 µl der Plasma-Probe wurde im Falle der Kalibrierung 100 µl der entsprechenden methanolischen Clotrimazol-Lösung, 100 µl methanolische Ketoconazol-(IS)-Lösung und 500 µl Methanol zugegeben. Zur Messung der Proben wurde anstelle der methanolischen Clotrimazol-Lösung 100 µl Methanol zugegeben. Nach der Zugabe bildete sich sofort der Niederschlag der ausgefallenen Proteine. Die Probe wurde ca. 30 Sekunden auf einem „Vortexer“ gut durchmischt. Um noch möglichst viel Clotrimazol aus dem Niederschlag herauszulösen, wurde die Probe für 15 Minuten in ein Ultraschallbad gestellt. Ohne

Ultraschallbehandlung wurde ca. 10 % weniger Clotrimazol extrahiert. Anschließend wurde der Niederschlag abzentrifugiert (10000 U/min, 7833 G) und der klare Überstand in einem Wasserbad bei 60 °C für 90 Minuten reduziert. Somit wurde das Methanol aus der Lösung entfernt. Der pH-Wert der Probe betrug ca. 7.0. Eine Ansäuerung der Probe auf einen pH-Wert von ca. 2 ergab schärfere Peaks als ohne Ansäuerung. Deshalb wurde die Probe nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit einem Tropfen Essigsäure versetzt, die ca. 100 µl in ein Vial überführt und vermessen.

Aufgrund der starken Plasma-Bindung des Clotrimazols wurde die Wiederfindung nach der Proteinfällungsprozedur bestimmt. Dazu wurde einerseits die Probenvorbereitung an fünf Proben mit 100 µl methanolischer Clotrimazol-Lösung wie oben beschrieben durchgeführt. Weiteren fünf Proben wurde die methanolische Clotrimazol- und Ketoconazol-Lösung erst nach der Fällung der Proteine dazugegeben. Clotrimazol wurde in einem Bereich von 1.0 µg/ml bis 10 µg/ml verwendet. In den Proben konnte Clotrimazol zu 73 % (1.0 µg/ml) bzw. 70 % (10.0 µg/ml) gefunden werden. In Anbetracht der starken Proteinbindung ist dies ein akzeptabler Wert.

5.1.2.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Bei der Extraktion von Clotrimazol aus dem Plasma wurde sowohl Dichlormethan als auch Trichlormethan als Extraktionsmittel verwendet. Es wurde 1.0 ml des jeweiligen Extraktionsmittels zur Probe gegeben (100 µl), 20 Sekunden mit einem „Vortexer“ gemischt. Die organische Phase wurde abgenommen und der Vorgang zweimal wiederholt. Zu Entfernung der nichtlöslichen Bestandteile wurden die vereinigten organischen Phasen schließlich bei 1500 G zentrifugiert, in einem Wasserbad bei 50 °C zur Trockene eingengt und mit 60 µl Essigsäure (pH 2.0) aufgenommen. Diese Lösung wurde vermessen.

Beide Extraktionsmittel ergaben ähnlich gut Ergebnisse, so dass auf Trichlormethan aufgrund seiner erhöhten Giftigkeit verzichtet werden konnte. Unter den gewählten Bedingungen (Tris 100 mM, Methanol 20 % (v/v), pH 3.0; 18 kV Trennungsspannung; Injektion 20 Sekunden/10 kV) konnte aber keine Kalibrierung durchgeführt werden, da mit dem Clotrimazol-Peak eine zweite, unbekannte Substanz des Plasmas migrierte (Abb. 5.1-4). Dies zeigt, dass Bestandteile des Plasmas, die bei der Methode der Proteinfällung beseitigt werden konnten, bei der Extraktion durch das organische Lösungsmittel in den Analyt gelangen und zu Störungen im Elektropherogramm führen können. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist jedoch wesentlich höher als bei der Proteinfällung, was sich in deutlich größeren Peaks äußert. Dennoch ist die Reproduzierbarkeit der Flüssig-Flüssig-Extraktion

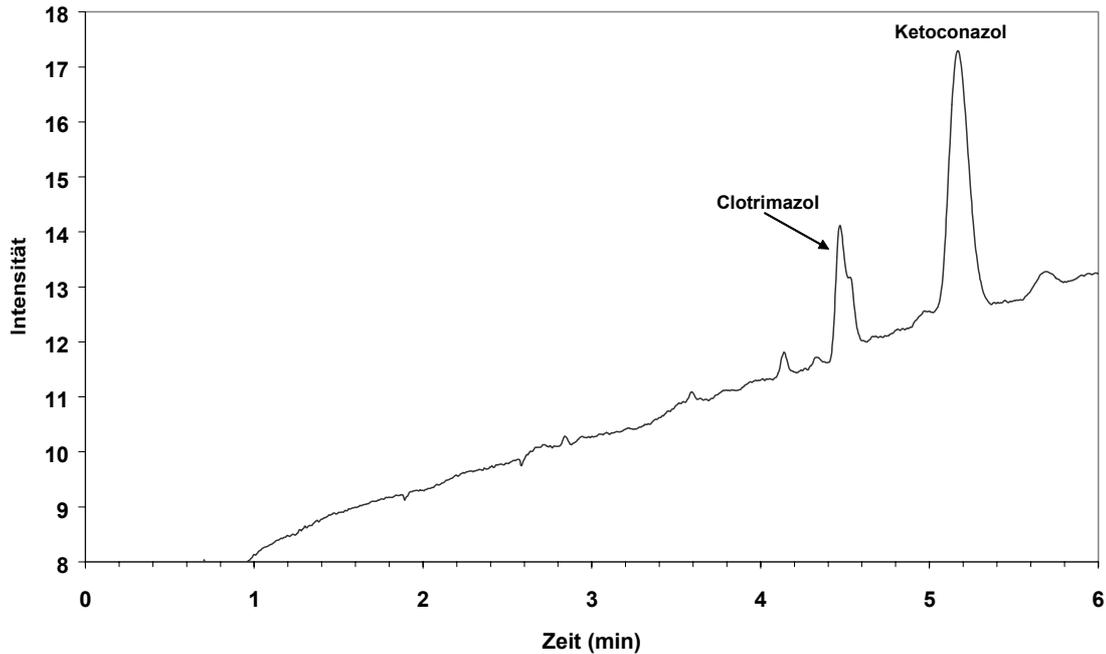


Abb. 5.1-4: Elektropherogramm nach einer Flüssig-Flüssig-Extraktion

deutlich schlechter, was evtl. durch eine Anlagerung der gelösten Bestandteile an der Kapillarwand bedingt ist. Dieses Problem konnte auch durch häufiges Wechseln der Kapillare und Optimierung der Spülprozeduren nicht beseitigt werden. Darüber hinaus ist die Wiederfindung dieser Methode sehr empfindlich bezüglich der Zeit der Einwirkung der Analyten auf das Plasma. Wird die Probe direkt nach Clotrimazol-Zugabe gemischt und die organische Phase entnommen, ist die Wiederfindung deutlich größer als nach 10-minütiger Wartezeit und anschließender Entnahme der organischen Phase. Dieser Effekt zeigt sich auch beim Ketoconazol. Wird eine Analyse demnach für kurze Zeit unterbrochen (Minuten), wird das Ergebnis verfälscht.

Diese Komigration einer Substanz und die schlechte Reproduzierbarkeit führten zu dem Schluss, dass die Vorbereitung der Proben mit der Proteinfällung durchgeführt werden sollten.

5.1.2.5 Spülprozedur

Die Spülprozedur spielt in der CE-Analytik eine besonders wichtige Rolle. Im Optimalfall wird zwischen den Läufen nur mit HGE gespült. In den meisten Veröffentlichungen wird die Kapillare mit Wasser und HGE gespült und anschließend mit einer Natriumhydroxid-Lösung (0.1 M) regeneriert. Beim Vermessen von biologischen Flüssigkeiten mit komple-

Der Matrix reichen diese Maßnahmen jedoch meist nicht aus. Die Reproduzierbarkeit der Läufe kann durch einen optimalen, z.T. drastischen Spülvorgang (z.B. 1 M Natriumhydroxid-Lösung, erhöhter Druck, erhöhte Temperatur usw.) wesentlich verbessert werden. Der Einsatz einer 100 mM SDS/Methanol-Lösung wie sie auch von Kunkel et al. benutzt wurde [141], erwies sich bei diesem Trennproblem als sehr vorteilhaft. Durch diesen Spülvorgang zwischen den Läufen konnte die relative Standardabweichung (RSD) der Präzision um den Faktor 3 verbessert werden.

5.1.2.6 Validierung nach ICH-Guideline Q2b

Die ICH [183] fordert bei der Bestimmung des Gehaltes einer Substanz die Überprüfung der Parameter Methodenpräzision (Wiederholpräzision, Mehrtagespräzision), Spezifität der Methode, d.h. die Genauigkeit der Methode bezüglich der Identität, und Linearität im untersuchten Messbereich.

Die Linearität wurde über einen Konzentrationsbereich von 0.5 µg/ml bis 10.0 µg/ml bestimmt. Dazu wurden je fünf Proben pro Konzentration (0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 µg/ml = Arbeitsbereich) hergestellt und vermessen. Der Korrelationskoeffizient von 0.9999 weist

Tabelle 5.1-1: Methodvalidierung nach ICH-Guideline

Linearität	
Korrelationskoeffizient	0.9999
y-Achsenabschnitt	0.0116
Steigung	0.3143
Fehlerquadratsumme	0.0054
Arbeitsbereich	0.5 – 10.0 µg/ml
Präzision	
	SD RSD
Wiederholpräzision	
(n=5) ^a	
0.5 µg/ml	0.002 0.4 %
10.0 µg/ml	0.058 0.6 %
Mehrtagespräzision	
(n=5; 3 Tage) ^a	
0.5 µg/ml	0.008 5.0 %
10.0 µg/ml	0.067 2.6 %
Bestimmungsgrenze (S/R >10)	0.5 µg/ml
Nachweisgrenze (S/R > 3)	0.3 µg/ml

auf eine sehr gute Korrelation der vermessen Konzentrationen hin (siehe Tabelle 5.1-1). Zur Bestimmung der Wiederholpräzision und Mehrtagespräzision wurden die fünf Proben der Linearitätsbestimmung der Konzentrationen 0.5 µg/ml und 10.0 µg/ml herangezogen. Die relativen Standardabweichungen (RSD) des Flächen-Verhältnisses Clotrimazol/IS zur Bestimmung der Wiederholpräzision

(0.5 µg/ml = 0.4 %; 10.0 µg/ml = 0.6 %) und zur Bestimmung der Mehrtagespräzision (0.5 µg/ml = 5.0 %; 10.0 µg/ml = 2.6 %) zeigen, dass diese Methode in diesem Messbereich zu präzisen Ergebnissen führt. Zusätzlich zu den geforderten Werten wurde die Nachweisgrenze bestimmt. Die ICH-Guideline empfiehlt ein Signal/Rausch-Verhältnis (S/R) größer 3:1 [183]. Diese Bedingung ist bei einer Konzentration von 0.3 µg/ml erfüllt.

Ebenso wurde die Bestimmungsgrenze ermittelt. Hier empfiehlt die ICH-Guideline einen S/R-Wert von 10. Diese Bedingung ist bei einer Konzentration von 0.5 µg/ml erfüllt.

Tabelle 5.1-2: Präzision des Migrationszeit-Verhältnisses

Konzentration	RSD (%)	n
0.5 µg/ml	0.07	8
1.0 µg/ml	0.25	8
2.5 µg/ml	0.09	8
5.0 µg/ml	0.13	8
10.0 µg/ml	0.04	8
Summe	0.55	40

mit einer RSD von 0.55 % einen sehr guten Wert.

Darüber hinaus wurde die Präzision der relativen Migrationszeiten von Clotrimazol und Ketoconazol über den kompletten Arbeitsbereich bestimmt. Diese Werte machen eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten zueinander. Die erreichten RSDs im Bereich von 0.07 bis 0.25 zeigen eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten. Alle 40 Werte (s. Tabelle 5.1-2) zeigen

5.1.3 Zusammenfassung

Folgende Methode erzielte die besten Ergebnisse: HGE: Tris-Puffer (75 mM, pH 3.0), Methanol 20 % (v/v); Proteinfällung einer 60 µl-Probe nach oben beschriebener Methodik; Injektion: Elektrokinetisch, 10 kV / 20 Sekunden; Trennungsspannung 18 kV; Kapillartemperatur 25 °C; Detektionswellenlänge 196 nm. Unter diesen optimierten Bedingungen ergab sich folgendes Elektropherogramm (Abb. 5.1-5):

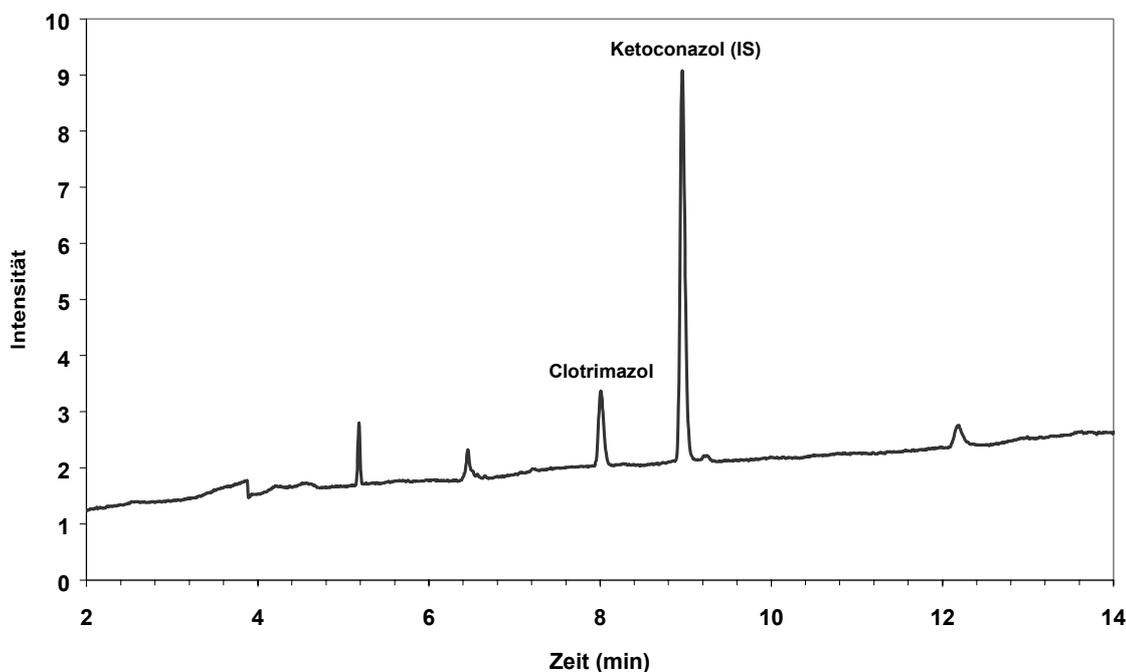


Abb. 5.1-5: Elektropherogramm einer Mustermischung (Clotrimazol 1 µg/ml, Ketoconazol (IS) 5 µg/ml) in Mäuseplasma nach Proteinfällung.

Mit dieser CZE-Methode kombiniert mit einer Proteinfällung ist es möglich, sehr kleine Probenvolumen von 60 μl zu vermessen. Es ist gelungen, Clotrimazol in einer Konzentration von bis zu 0.3 $\mu\text{g/ml}$ zu detektieren. Für pharmakokinetische Studien ist diese Grenze allerdings etwas zu hoch, da teilweise Blutkonzentrationen unter 0.5 $\mu\text{g/ml}$ zu erwarten sind.

Mit dieser Methode konnte in den gesamten Mäuseplasma-Proben kein Clotrimazol in einer Konzentration über 0.5 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden. Fünf von 74 Proben beinhalten eine Clotrimazol-Konzentration zwischen der Nachweisgrenze von 0.3 $\mu\text{g/ml}$ und der Bestimmungsgrenze von 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Dies lässt den Schluss zu, dass in vielen Mäusen eine wirksame Konzentration nicht erreicht wurde. Dies wurde auch durch die pharmakologischen Untersuchungen bestätigt, da bei den untersuchten Mäusen kein antirheumatischer Effekt festgestellt werden konnte.

6 Experimenteller Teil

6.1 Reagenzien und Materialien

6.1.1 Pharmazeutisch wirksame Substanzen

Tabelle 6.1-1: Pharmazeutisch wirksame Substanzen

Substanz	Reinheitsgrad	Hersteller / Lieferant
Clotrimazol	Bulk	Bayer, Leverkusen, D
Clotrimazol	Bulk	Hexal, Holzkirchen, D
Clotrimazol	CRS	Promochem, Wesel, D
Ketoconazol	Bulk	Fährhaus Pharma, Hamburg, D
Ketoconazol	CRS	Janssen-Cilag, Neuss, D

Weitere gemeinsam benutzte Substanzen s. Kapitel 6.2

6.2 Geräte und Software

Zur besseren Übersichtlichkeit sind benutzte Geräte und Software in Teil A, Kapitel 3.1 und 3.2 aufgeführt.

6.3 Probenbereitung und Herstellung der Lösungen

6.3.1 Hintergrundelektrolyt

In der Standardmethode wird ein 100 mM Tris-Puffer (pH 3.0) verwendet, der 20 % (v/v) Methanol enthält. Um Schwankungen aufgrund von Konzentrationsunterschieden zwischen verschiedenen Läufen zu vermeiden, wird zuerst eine Tris-Stammlösung mit einer Konzentration von 125 mM hergestellt. Hierzu wird die Substanz mit einer Genauigkeit von ± 0.3 % (m/m) genau eingewogen. Es werden 80 % (v/v) des benötigten Wassers hinzugegeben und der pH-Wert mit Essigsäure auf pH 3.0 eingestellt. Für die Herstellung des endgültigen Elektrolyten werden 8 Teile Tris-Stammlösung und 2 Teile Methanol (v/v) gemischt.

6.3.2 SDS/Methanol-Reinigungslösung

Für die Herstellung der 100 mM SDS/Methanol-Reinigungslösung wird erst eine wässrige 200 mM SDS-Stammlösung hergestellt. Diese wird 1:1 (v/v) mit Methanol gemischt.

6.3.3 Probenbereitung

Zur Herstellung der Clotrimazol-Kalibrierlösungen werden 60 mg Clotrimazol CRS in Methanol zu 10.0 ml gelöst (Lösung C1). Aus dieser Lösung werden 100 µl entnommen und zu 10.0 ml mit Methanol aufgefüllt (Lösung C2). Um eine Kalibriergerade für den Bereich 0.3 µg/ml bis 10.0 µg/ml erstellen zu können, werden entsprechende Volumina aus der letzten Verdünnung entnommen und auf 10.0 ml mit Methanol aufgefüllt (Lösung C3). D.h. für eine Zielkonzentration von 1 µg/ml in der Plasmaprobe muss 100 µl aus Lösung C3 entnommen werden und auf 10 ml aufgefüllt werden. Aus dieser Lösung werden schließlich 100 µl entnommen und zur Plasmaprobe (im Falle der Kalibrierung) gegeben.

Ketoconazol dient bei dieser Methode als Interner Standard. Zur Herstellung der Lösung werden 30 mg Ketoconazol CRS in Methanol zu 10.0 ml gelöst (Lösung K1). 1000 µl werden entnommen und zu 10.0 ml Methanol aufgefüllt (Lösung K2). Weitere 100 µl werden abgemessen und zu 10.0 ml Methanol verdünnt (Lösung K3).

Zur direkten Probenbereitung werden 60 µl des Plasmas abgenommen. Zur Proteinfällung werden 100 µl entsprechender Clotrimazol-Lösungen (Lösung C3 zur Kalibrierung, ansonsten 100 µl Methanol), 100 µl Ketoconazol-Lösung K3 und 500 µl Methanol zugegeben. Die Proben werden mit einem Probenschüttler gemischt, 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und die gefällten Proteine durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 10000 U/min abgetrennt. Der gesamte klare Überstand wird vorsichtig abgenommen und auf einem Wasserbad 90 Minuten bei 60 °C eingeengt. Um einen pH-Wert der Probe von etwa 2.0 zu erhalten, wird ein Tropfen Essigsäure zur eingeengten Probe gegeben.

Die Probe wird in ein spezielles CE-Probengläschen überführt, welches für Probenvolumina unter 200 µl geeignet ist.

6.4 Elektrophoretische Bedingungen

Sind bei Spülvorgängen keine Druckangaben gemacht, so handelt es sich um den Gerätestandarddruck von 1×10^5 Pa.

Tabelle 6.4-1: Standard-Methodenbeschreibung für Clotrimazol

Clotrimazol CZE-Standard-Methode	
Gerät	Beckman P/ACE MDQ and Agilent HP ^{3D} -CE
Kapillare	Quarzglaskapillare, unbeschichtet, Beckman: absolute Länge 31.2 cm, effektive Länge 21.0 cm Agilent: absolute Länge 33.0 cm, effektive Länge 24.5 cm Innendurchmesser 75 µm, Außendurchmesser 375 µm
Injektion	Elektrokinetisch, 20 Sekunden mit 10 kV
Trennungsspannung	+18 kV
Temperatur	25 °C
Detektion	UV Messwellenlänge 196 nm, Bandbreite 10 nm Referenzwellenlänge 450 nm, Bandbreite 80 nm
HG-Elektrolyt	Tris 100 mM pH 3.0 Methanol 20 % (v/v)
Konditionierung	<i>Neue Kapillare:</i> Natriumhydroxid-Lösung 1.0 M 2.0 Minuten Wasser 5.0 Minuten Trennelektrolyt 10.0 Minuten Spannungsgradient 0 – 15 kV in 20.0 Minuten HGE 2.0 Minuten <i>Tageskonditionierung:</i> Natriumhydroxid-Lösung 0.1 M 5.0 Minuten Wasser 5.0 Minuten HGE 5.0 Minuten <i>Zwischen den Läufen:</i> SDS/Methanol-Lösung 100 mM 1:1 3.0 Minuten Natriumhydroxid-Lösung 0.1 M 2.0 Minuten Wasser 1.0 Minuten HGE 2.0 Minuten
Proteinfällung	60 µl Plasma-Probe 100 µl Clotrimazol in Methanol 100 µl Ketoconazol in Methanol 500 µl Methanol 30 Sek. Mischen („vortexen“) 15 Min. Ultraschallbad 10 Min. zentrifugieren (7833 G) 1.5 Std. Überstand einreduzieren, mit 1 Tr. Essigsäure ansäuern

7 Zusammenfassung

7.1 Aminoglykoside

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kapillarelektrophoretische Methoden entwickelt, mit denen es möglich ist, Gentamicinsulfat in Haupt- und Nebenkomponten zu trennen.

Ausgelöst wurden die Untersuchungen im Jahr 2000, da in den USA über 60 Patienten durch Gentamicin starben. Es wurde vermutet, dass dies auf Verunreinigungen in gewissen Chargen zurückzuführen ist. Gentamicin wird fermentativ aus *Micromonospora purpurea* gewonnen. Durch leichte Abweichungen im Herstellungsprozess können Produkte entstehen, die mit den bisher angewendeten Analysenmethoden nicht nachzuweisen sind. In der momentanen Arzneibuch-Monographie von Gentamicinsulfat [135] wird zur Prüfung der verwandten Substanzen eine HPLC-Methode beschrieben, die Gentamicin ohne Derivatisierung mit einem gepulsten amperometrischen Detektor detektiert. Vorteil dieser Methode ist, dass Gentamicin nicht derivatisiert werden muss. Der große Nachteil dieser Methode ist aber, dass die einzelnen Peaks sehr lange Migrationszeiten haben (bis über 10 Minuten) und somit Verunreinigungen überdeckt werden können. Außerdem sind viele Bestandteile nicht von den Hauptkomponenten abgetrennt. Weiterhin ist diese Methode nicht sehr robust, da der Detektor sehr empfindlich ist. Eigene HPLC-Messungen an mehreren Gentamicin-Chargen zeigten die Probleme auf. Da Gentamicin kein chromophores System hat, kann es nicht mit einem UV/VIS-Detektor detektiert werden. Um dies dennoch zu ermöglichen, kann Gentamicin mit verschiedenen Reagenzien derivatisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Aminoglykoside mit ortho-Phthaldialdehyd und 2-Mercaptoessigsäure derivatisiert. Somit war eine Detektion bei 330 nm bzw. 340 nm möglich.

Zur Trennung von Gentamicinsulfat wurde eine spezielle kapillarelektrophoretische Methode entwickelt. Die mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) ist nach Derivatisierung in der Lage, nahezu alle in der Monographie beschriebenen aber auch einige nicht aufgeführte Verunreinigungen zu trennen. Die Trennung erfolgt in einer Kieselgelkapillare mit einer Gesamtlänge von 33.0 cm, einer effektiven Länge von 24.5 cm und einem Innendurchmesser von 50 µm. Als Hintergrundelektrolyt wird ein Natriumtetraborat-Puffer verwendet (100 mM, pH 10.0), zu dem Desoxycholsäure-Natrium als mizellbildendes Reagenz in einer Konzentration von 20 mM und weiterhin β-Cyclodextrin in einer Konzentration von 15 mM zugegeben wird. Die Proben werden hydrodynamisch bei 5000 Pa innerhalb 5 Sekunden auf der Anodenseite injiziert. Die Trennung erfolgt bei einer

Kapillartemperatur von 25 °C und einer Trennungsspannung von +12 kV. Pikrinsäure wird als Interner Standard benutzt. Die Detektion erfolgt UV-spektroskopisch bei 340 nm. Die Hauptpeaks konnten durch „spikes“ mit den Einzelkomponenten, die u.a. säulenchromatographisch gewonnen wurden, identifiziert werden. Die vier Hauptkomponenten Gentamicin-C1, C1a, C2 und C2a sind basisliniengetrennt ebenso wie Gentamicin-C2b, die Verunreinigungen Garamin, Desoxystreptamin und Sisomicin (Abb. 7.1-1). Bei den Untersuchungen von über 40 Gentamicin-Chargen verschiedener Hersteller und Händler fielen

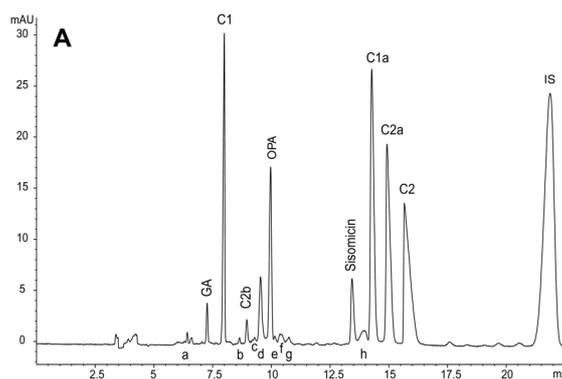


Abb. 7.1-1: Elektropherogramm einer kommerziellen Gentamicin-Probe

sowohl deutliche Unterschiede bezüglich der einzelnen Gehalte der Hauptkomponenten auf, als auch verschiedene Grade der Verunreinigungen. Anhand der Menge der Verunreinigungen konnten die Chargen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die Verunreinigung Sisomicin kann als Leitsubstanz der Verunreinigungen bezeichnet werden, da bei allen stärker ver-

unreinigten Chargen Sisomicin in beträchtlichen Mengen vorhanden ist. Unter den untersuchten Proben befanden sich auch die Proben, die in den USA die eingangs erwähnten Todesfälle verursacht haben. Diese Proben konnten der Gruppe der stärker verunreinigten Gentamicin-Chargen eindeutig zugewiesen werden. Die Richtigkeit aller Messungen wurde durch $^1\text{H-NMR}$ -Messungen bestätigt.

Die Anwendbarkeit der entwickelten MEKC-Methode wurde auch an weiteren Aminoglykosiden untersucht. Die Methode ist ohne Änderung auf Sisomicin übertragbar. Der Sisomicin-Peak ist deutlich abgetrennt vom OPA-Reagenzpeak. Selbst kleine Verunreinigungen der CRS-Substanz können mit dieser Methode erkannt werden.

Netilmicin und Amikacin können nicht ohne Änderungen mit der Methode vermessen werden, da sie unter diesen Bedingungen mit dem OPA-Peak komigrieren. Eine Anhebung der Trennungsspannung von +12 kV auf +14 kV lassen die Peaks hervortreten. Eine Unterscheidung der beiden Substanzen ist im Elektropherogramm nicht möglich, allerdings können sie durch $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Messungen identifiziert und unterschieden werden. Netilmicin wurde in vielen Gentamicin-Proben nachgewiesen.

Bei Kanamycin liegen mit dieser Methode im Elektropherogramm sehr viele kleine Peaks sehr nahe beieinander. Durch Absenkung der Kapillartemperatur auf 20 °C können diese

Peaks etwas besser getrennt werden. Die Entwicklung einer neuen Methode (Natriumtetraborat 100 mM, Desoxycholsäure-Natrium 25 mM, pH 9.8; 12 kV Trennungsspannung, 30 °C Kapillartemperatur) brachte nicht die erhofften Vorteile, da Paromamin durch einen unbekannten Peak überdeckt wird. Da nicht auf Paromamin geprüft werden muss, ist diese neue Methode sehr geeignet.

Tobramycin kann in Bezug auf die Migrationszeit ebenfalls mit dieser Methode bestimmt werden. Die Derivatisierungsbedingungen müssen optimiert werden, da bei den Standardbedingungen (4 Minuten, 40 °C) Tobramycin nicht vollständig derivatisiert vorliegt. Dies wird deutlich, da im Elektropherogramm zwei fast gleich große Peaks zu erkennen sind. Bei veränderten Derivatisierungsbedingungen wird der eine Peak größer, der andere ist bei den Derivatisierungsbedingungen von 20 Minuten bei 60 °C fast nicht mehr zu sehen.

Für Neomycin ist die entwickelte Methode nicht geeignet. Bei den Standardbedingungen kann Neomycin innerhalb von 60 Minuten nicht detektiert werden. Auch sind die Derivatisierungsbedingungen nicht geeignet. Nach optimiertem Hintergrundelektrolyten (Natriumtetraborat 50 mM, Methanol 10 %, pH 10.0) konnte eine Zuordnung der detektierten Peaks nicht durchgeführt werden. Zur Bestimmung von Neomycin muss eine vollständig neue Methode entwickelt werden.

Für Paromomycin wurde eine neue CZE-Methode entwickelt. Nach OPA-Derivatisierung und UV-spektroskopischer Detektion bei 330 nm konnten im HGE (TB 40 mM, β -Cyclodextrin 3 mM, pH 10.0, Methanol 12.5 % (v/v)) fünf Peaks getrennt werden. Diese Peaks konnten nicht identifiziert werden, da die Einzelkomponenten nicht zur Verfügung standen.

7.2 Clotrimazol

Zusätzlich zu seiner antifungistischen Wirkung, wird dem Clotrimazol eine entzündungshemmende Wirkung zugesprochen. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt mit dessen Konzentration im Mäuseplasma korreliert, wurde diese kapillarelektrophoretische Methode entwickelt, mit der man Clotrimazol in einer Konzentration von 0.5 μ g/ml bis 10.0 μ g/ml aus Mäuse-Plasma bestimmen kann..

Die Trennung erfolgt in einer Kieselgelkapillare mit einer Gesamtlänge von 33.0 cm, einer effektiven Länge von 24.5 cm und einem Innendurchmesser von 75 μm . Als Hintergrundelektrolyt wird ein Tris-Puffer verwendet (100 mM, pH 3.0) mit einem Methanol-Zusatz von 20 % (v/v). Die Proben werden elektrokinetisch bei 10 kV für 20 Sekunden auf der Anodenseite injiziert. Die Trennung erfolgt bei einer Kapillartemperatur von 25 $^{\circ}\text{C}$ und einer Trennungsspannung von +18 kV. Ketoconazol wird als Interner Standard benutzt. Die Detektion erfolgt UV-spektroskopisch bei 196 nm. Als Extraktionsmethode wurde eine Proteinfällung mit Methanol gewählt. Die Proteinfällung wurde mit einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Dichlormethan verglichen. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion konnte nicht benutzt werden, da unbekannte Inhaltsstoffe des Plasmas mit dem Clotrimazol-Peak komigrierten.

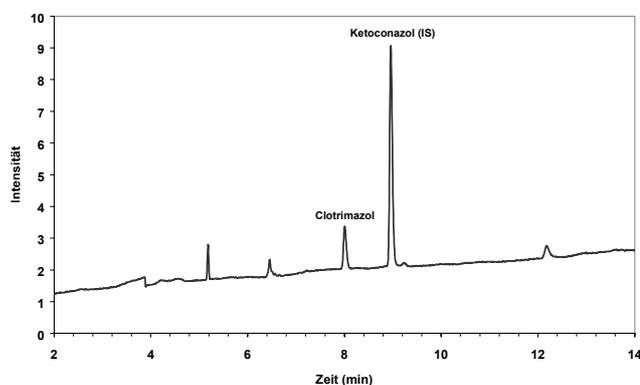


Abb. 7.2-1: "Gespikte" Mäuseplasma-Probe mit Clotrimazol (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Ketoconazol (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, IS) nach

Mit der entwickelten CZE-Methode erhält man ein Elektropherogramm, bei dem Clotrimazol und Ketoconazol im Abstand von ca. 60 Sekunden voneinander getrennt sind (Abb. 7.2-1). In Fünf von 74 Proben wurde eine Clotrimazol-Konzentration zwischen der Nachweisgrenze von 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und der Bestimmungsgrenze von

0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gefunden. In den restlichen Mäuseplasma-Proben konnte kein Clotrimazol in einer Konzentration über 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass in vielen Mäusen eine wirksame Konzentration nicht erreicht wurde. Dies wurde auch durch die pharmakologischen Untersuchungen bestätigt, da bei den untersuchten Mäusen kein antirheumatischer Effekt festgestellt werden konnte.

8 Summary

8.1 Aminoglycosides

The aim of this study was to separate gentamicin sulfate into its major and minor components by means of capillary electrophoresis.

In May 2000 the death of 17 people and 60 people, respectively, was reported, following the administration of the commonly used broad spectrum antibiotic gentamicin sulfate. In addition hundreds of patients suffering from severe side effects were reported. Since this could not be explained by the pharmacological and toxicological properties of gentamicin, it was assumed that the side effects were related to impurities. Due to the fact that gentamicin is a fermentation product of *Micromonospora purpurea*, minor variations in the fermentation procedure may cause products, that cannot be detected by the analytical methods applied thus far. The current European Pharmacopoeia limits for related substance of gentamicin by means of an HPLC-method in combination with a pulsed amperometric detector. The advantage of this method is the fact, that it is not necessary to derivatize gentamicin. However, a major disadvantage of the method is the broadness of the main peaks (>10 minutes/peak). Hence, minor products could be covered by the main peaks. Furthermore, various peaks are not baseline separated and the method is not very robust owing to the highly sensitive detector.

Due to the lack of a chromophore, gentamicin needs to be derivatized to allow detection by means of an UV-detector. In this study all aminoglycosides were labeled with orthophthaldialdehyde (OPA) in combination with 2-mercaptoacetic acid, which enabled detection at a wavelength of 340 nm.

To separate gentamicin as OPA derivative, a method based on micellar electrokinetic chromatography (MEKC) was developed. This technique makes it possible to separate most of the impurities specified in the gentamicin monograph (garamine, deoxystreptamine, and sisomicin) and some additional, not further specified impurities such as paromamine and unknown products. The separation is carried out in a fused-silica capillary with a total length of 33.0 cm, an effective length of 24.5 cm and an inner diameter of 50 μm . Using sodium tetraborate buffer (100 mM, pH 10.0) as background electrolyte (BGE), deoxycholic acid sodium in a concentration of 20 mM as micelle forming agent and β -cyclodextrin in a concentration of 15 mM are added. The samples are loaded hydrodynamically at 5000 Pa for 5 seconds on the anode side of the capillary and the separation is carried out at +12 kV and 25 °C. Picric acid is used as an internal standard and

UV-detection is performed at 340 nm. Spiking experiments were performed using reference substances, obtained by column chromatography and commercially purchased reference substances for the impurities. The four major components gentamicin C1, C1a, C2, and C2a as well as the minor component C2b and the impurities garamine, deoxystreptomine, and sisomicin are baseline separated (Fig. 8.1-1). Over 40 gentamicin batches of

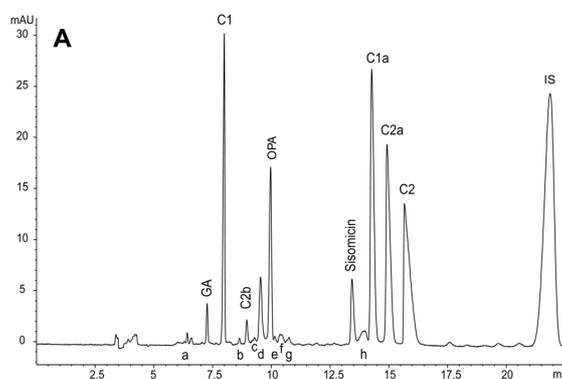


Fig. 8.1-1: Electropherogram of a commercial gentamicin sample

different pharmaceutical companies and producers were analyzed with respect to the content of the major components as well as the amount of the impurities. Varying levels of the major compounds as well as the impurities were identified, which allowed the grouping of the samples. All samples exhibiting a high amount of impurities were found to a high

sisomicin concentration. Hence, sisomicin can be referred to as an impurity indicator. Some of the batches under scrutiny were responsible for the deaths found in the US. All these samples could be unambiguously assigned to the group which is characterized by a high number and a relatively high quantity of most unspecified impurities. All CE-measurements were verified by ^1H NMR measurements.

To investigate the applicability of the developed MEKC method, other aminoglycosides were also investigated. For sisomicin the standard method can be used without modification, since the sisomicin peak is separated from the OPA reagent peak and even small amounts of impurities of the CRS-substance can be detected with this method.

For netilmicin and amikacin the developed method has to be modified. Under standard conditions the peaks of both substances co-migrates with the OPA reagent peak. Raising the voltage from +12 kV to +14 kV both peaks are separated. All Gentamicin samples were measured again using these new conditions. Netilmicin was often found in gentamicin samples. However, for these new conditions the migration time of netilmicin and amikacin are similar. Hence, they cannot be differentiated from each other in the same sample. Nevertheless, this differentiation can be carried out with ^1H NMR measurements.

Kanamycin samples show many peaks in a small zone of the electropherogram using the MEKC standard method. A slightly better separation can be obtained by using a lower temperature of the capillary of 20 °C instead of 25 °C. With respect to the separation a

novel method (sodium tetraborate 100 mM, deoxycholic acid sodium 25 mM, pH 9.8, 12 kV constant voltage, 30 °C temperature of the capillary) was investigated. This method was not successful with respect to the separation of paromamine which co-migrates with an unidentified component. Since it is not necessary to limit paromamine the method is a good alternative to the method given in the European pharmacopoeia.

Using the BGE of the standard method tobramycin can also be determined. For this substance only the standard derivatization procedure (4 minutes, 40 °C) has to be optimized with regard to complete labeling. This became evident with the electropherograms showing two peaks of nearly the same height. Changing the derivatization conditions to 20 minutes at 60 °C one peak enlarged, the other nearly disappeared

Under standard conditions, the gentamicin MEKC method is unsuitable for the evaluation of neomycin since the migration time is longer than 60 minutes. Furthermore, the derivatization conditions are not appropriate for neomycin. Assignment of the peaks was not possible after the adjustment of the BGE to optimal conditions (sodium tetraborate 50 mM, pH 10.0, methanol 10 % (v/v)). Hence, for the determination of neomycin an entirely new method has to be developed.

For paromomycin a new CZE-method was developed. After derivatization with OPA and detection at 330 nm, five peaks could be separated with the new BGE (sodium tetraborate 40 mM, β -cyclodextrin 3 mM, pH 10.0, methanol 12.5 % (v/v)). Since no reference compounds for paromomycin are available, these peaks could not be identified by spiking experiments.

8.2 Clotrimazole

In addition to its antifungal activity, clotrimazole attracts interest as an anti-inflammatory drug. In order to correlate this effect with plasma concentrations in mice, this capillary electrophoretic method was developed. With the method it is possible determine clotrimazole in a concentration range from 0.3 μ g/ml to 10.0 μ g/ml.

The separation is carried out in a fused-silica capillary with a total length of 33.0 cm, an effective length of 24.5 cm and an inner diameter of 75 μ m. A Tris buffer (100 mM, pH 3.0, methanol 20 % (v/v)) is used as background electrolyte. The samples are loaded electrokinetically at +10 kV for 20 seconds on the anode side of the capillary. The separation is carried out at +18 kV and 25 °C with ketoconazole used as internal standard. UV-detection

is performed at 196 nm. Sample preparation was carried out by protein precipitation using methanol. This type of extraction was compared to a liquid-liquid extraction using dichloromethane. Since an unknown compound from plasma co-migrates with clotrimazole using liquid-liquid extraction, the latter method is not applicable for this purpose.

In the resulting electropherograms both signals (clotrimazole and ketoconazole) are separated

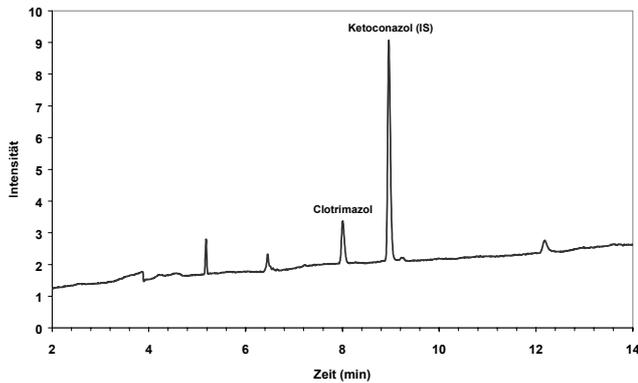


Fig. 8.2-1: Mice plasma sample spiked with clotrimazole (1 µg/ml) and ketoconazol (5 µg/ml, IS) after protein precipitation

separated over a range of 60 seconds (Fig. 8.2-1). In only five of the 74 samples a clotrimazole-concentration between the limit of detection (0.3 µg/ml) and the limit of quantitation (0.5 µg/ml) was determined. In no plasma sample clotrimazole was detected in a concentration range of 0.5 µg/ml - 10.0 µg/ml. In result, an effective concentration in mice was not

reached. This is verified by pharmacological tests, because in none of the mice an anti-inflammatory effect was measured.

9 Abkürzungsverzeichnis

BGE	Background electrolyte
Brij [®] 35	Polyethylenglykoldodecylether
CD	Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese
CEC	Kapillarelektrochromatographie
CGE	Kapillargelelektrophorese
Chol	Cholsäure Natrium
CRS	Chemische Referenzsubstanz
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid = Cetyltrimethylammoniumbromid
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DChol	Desoxycholsäure Natrium
DNBC	3,5-Dinitrobenzoylchlorid
DSA	2-Desoxystreptamin
ECD	gepulster elektrochemischer (amperometischer) Detektor
EMS	Eosinophilie-Myalgie-Syndrom
EOF	Elektroosmotischer Fluss
EuAB	Europäisches Arzneibuch
FDNB	1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol
Fmoc	9-Fluorenylmethylchloroformiat
GA	Garamin
GC	Gaschromatographie
HGE	Hintergrundelektrolyt
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
ICH	International Conference on Harmonisation
IS	Interner Standard
IUPAC	International Union of pure and applied chemistry
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
M	Molarität [mol/l]
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernmagnetische Resonanz
NSCI	2-Naphthalinsulfonylchlorid
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PC	Papierchromatographie
R	Reagenz nach Arzneibuch
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat, Natriumdodecylsulfat
TAB	Tetramethylammoniumbromid
TB	Natriumtetraborat
TDChol	Taurodesoxycholsäure Natrium
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen

10 Literaturverzeichnis

- [1] Varga, J. Uitto, J. und Jimenez, S.A., *Ann. Int. Med.*, 116, **1992**, 140-147
- [2] Slutsker, L., Hoesly, F.C., Miller, L., Williams, L.P., Waltson, J.C. und Fleming, D.W., *J. Am. Med. Assoc.*, 264, **1990**, 213-217
- [3] Mayeno, A.N., Lin, F., Foote, C.S., Loegering, D.A., Ames, M.M., Hedberg, C.W. und Gleich, G.J., *Science*, 250, **1990**, 1707-1708
- [4] Toyo'oka, T., Yamazaki, T., Tanimoto, T., Sato, K., Sato, M., Toyoda, M., Ishibashi, M., Yoshihira und Uchiyama, M., *Chem. Pharm. Bull.*, 39, **1991**, 820-822
- [5] Trucksess, M.W., *J. Chromatogr. A*, 630, **1993**, 147-150
- [6] Tryptophan Monographie 1272, *Europäisches Arzneibuch*, 4. Ausgabe, 5. Nachtrag, **2003**, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag, Eschborn
- [7] Pound, E.T. und Sternberg, S., *USA Today*, Arlington Va, May 9th, **2000**, 01A-01A
- [8] Hildebrand, J.R., *Pharm. Ind.*, 64, **2002**, 147-150
- [9] Hjerten, S., *Chromatogr. Rev.*, 9, **1967**, 122-219
- [10] Mikkers, F.E.P., Everaerts und Verheggen, T.P.E.M., *J. Chromatogr.*, 169, **1979**, 11-20
- [11] Jorgenson, J.W. und Lukacs, K.D., *J. Chromatogr.*, 169, **1981**, 209-216
- [12] Jorgenson, J.W. und Lukacs, K.D., *Anal. Chem.*, 53, **1981**, 1298-1302
- [13] Wätzig, H., *PZ Prisma*, 3, **1996**, 126-136
- [14] Engelhard, H., Beck, W. und Schmitt, T., *Kapillarelektrophorese*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, 1. Auflage, **1994**, 7-33
- [15] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, k., Tsuchiya, A. und Ando, T., *Anal. Chem.*, 56, **1984**, 111-113
- [16] Okafo, G.N., Bintz, C., Clarke, S.E. und Camilleri, P., *J. Chem. Soc, Chem. Commun.*, 17, **1992**, 1189-1192
- [17] Lucangioli, S.E., Rodriguez, V.G., Otero, G.C.F. und Carducci, C.N., *J. Capillary Electrop.*, 5, **1998**, 139-142
- [18] Clothier, J.G.Jr., Daley, L.M. und Tomellini, S.A., *J. Chromatogr. B*, 683, **1996**, 37-45
- [19] Nishi, H., Fukuyama, T. und Matsuo, M., *J. Chromatogr. A*, 515, **1990**, 233-243

- [20] Bender, H, *Carbohydr. Res.*, 65, **1978**, 85-97
- [21] Cramer, F. und Dietsche, W., *Chem. Ber-Recl*, 92, **1959**, 378-384
- [22] Fanali, S., *J. Chromatogr. A*, 792, **1997**, 227-267
- [23] Waksman, S.A., Schatz, A., *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.*, 34, **1945**, 273-291
- [24] Waksman, S.A., Schatz, A., *J. Am. Pharm. Assoc. P. P.*, 6, **1945**, 308-321
- [25] Schatz, A., Bugie, E. und Waksman, S.A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 55, **1944**, 66-69
- [26] Waksman, S.A., *Am. Rev. Tuberc. Pulm.*, 70, **1954**, 1-8
- [27] Waksman, S.A. und Lechevalier, H.A., *Science*, 109, **1949**, 305-307
- [28] Swart, E.A., Hutchinson, D. und Waksman, S.A., *Arch. Biochem.*, 24, **1949**, 92-103
- [29] Waksman, S.A., Lechevalier, H.A. und Harris, D.A., *J. Clin. Invest.*, 28, **1950**, 934-939
- [30] <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1952/waksman-bio.html>
- [31] Waksman, S.A., *Science*, 118, **1953**, 259-266
- [32] Gerhartz, W. (Ed.), *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5. Auflage, **1985**, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 485-491
- [33] Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., *J. Antibiot.*, 10, **1957**, 181-188
- [34] Bunn, P. und Baltch, A., *New Engl. J. Med.*, 259, **1958**, 659-662
- [35] Finland, M., *Lancet*, 2, **1958**, 209-211
- [36] Linzenmeier, G., *Deut. Med. Wochenschr.*, 85, **1958**, 2298-2302
- [37] Frohard, R.P., Haskell, T.H., Ehrlich, J. und Knudsen, M.P., *Belgian Patent 547,946*, **1956**, (06. Nov. to Parke, Davis & Company)
- [38] Isoherranen, N., Soback, S., *J. AOAC Int.*, 82, **1999**, 1017-1045
- [39] Weinstein, M.J., Luedemann, G.M., Oden, E.M. und Wagman, G.H., *J. Med. Chem.*, 6, **1963**, 463-464
- [40] Bulger, R.J., Sidell, S. und Kirby, W.M.M., *Ann. Intern. Med.*, 59, **1963**, 593-604
- [41] Bulger, R.J. und Kirby, W.M.M., *Am. J. Med. Sci.*, 246, **1963**, 717-726
- [42] Wright, G.D., *Curr. Opin. Microbiol.*, 2, **1999**, 499-503
- [43] Yang, L. und Wang, L., *Weishengwuxue Tongbao*, 27, **2000**, 356-359
- [45] Soltés, L., *Biomed. Chromtogr.*, 13, **1999**, 3-10
- [46] Cooper, D.J., Jaret, R.S., Reimann, H., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 7, **1971**, 285-292

- [47] Cron, M.J., Johnson, D.L., Palermi, F.M., Perron, Y., Taylor, H.D., Whitehead, D.F. und Hooper, I.R., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, **1958**, 752-753
- [48] Haskell, T.H., French, J.C., Bartz, Q.R., *J. Am. Chem. Soc.*, 81, **1959**, 3480-3481
- [49] Frohard, R.P, Haskell, T.H., Ehrlich, J. und Knudsen, M.P., *US Patent 2,916,485*, **1959**, (12. Jan. to Parke, Davis & Company)
- [44] Simon, C. und Stille, W., *Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis*, Schattauer-Verlag, Stuttgart, 10. Auflage, **2001**, 150-164
- [50] Stead, D.A., *J. Chromatogr.*, 747, **2000**, 69-93
- [51] Forth, W, Henschler, D. und Rummel, W., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 8. Auflage, **2001**, 828-835, Urban & Fischer Verlag München
- [52] Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K. und Schäfer-Korting, M., *Mutschler Arzneimittelwirkungen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 8. Auflage, **2001**, 801
- [53] Wilschanski, M., Famini, C., Blau, H., Rivilin, J., Augarten, A., Avital, A., Kerem, B. und Kerem, E., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161, **2000**, 860-865
- [54] Keeling, K.M., Brooks, D.A., Hopwood, J.J., Li, P., Thompson, J.N. und Bedwell, D.M., *Human Mol. Gen.*, 10, **2001**, 291-299
- [55] Senior, K., *Mol. Med Today*, 5, **1999**, 461-461
- [56] Barton-Davis, E.R., Cordier, L., Shoturma, D.I., Leland, S.E. und Sweeney, H.L., *J. Clin. Invest.*, 104, **1999**, 375-381
- [57] Howard, M.T., Shirts, B.H., Petros, L.M., Flanigan, K.M., Gesteland, R.F. und Atkins, J.F., *Ann. Neurol.*, 48, **2000**, 164-169
- [58] Wagner, K.R., Hamed, S., Hadley, D.W., Gropman, A.L., Burnstein, A.H., Escolar, D.M., Hoffman, E.P. und Fischbeck, K.H., *Ann. Neurol.*, 49, **2001**, 706-711
- [59] Mankin, A.S. und Liebman, S.W., *Nat. Genet.*, 23, **1999**, 8-10
- [60] Winsten, W.A. und Eigen, E., *J. Am. Chem. Soc.*, 70, **1948**, 3333-3339
- [61] Heding, H, *Acta Chem. Scand.*, 20, **1966**, 1743-1746
- [62] Rothrock, J.W., Goegelman, R.T. und Wolf, F.J., *Antibiot. Ann.*, **1959**, 796-803
- [63] Wagman, G.H., Marquez, J.A. und Weinstein, M.J., *J. Chromatogr.*, 34, **1968**, 210-215
- [64] Maehr, H. und Schaffner, C.P., *J. Chromatogr.*, 30, **1967**, 572-578
- [65] Tsuji, K. und Robertson, J.H., *Anal. Chem.*, 41, **1969**, 1332-1335
- [66] Tsuji, K. und Robertson, J.H., *Anal. Chem.*, 42, **1970**, 1661-1663
- [67] Mayhew, J.W. und Gorbach, S.L., *J. Chromatogr.*, 151, **1978**, 133-146

- [68] Maitra, S.K., Yoshikawa, T.T., Hansen, J.L.m Nilsson-Ehle, I., Palin, W.J., Schotz, M.C. und Guze, L.B., *Clin. Chem.*, 23, 1977, 2275-2278
- [69] Peng, G.W., Gadalla, M.A.F., Peng, A., Smith, V. und Chiou, W.L., *Clin. Chem.*, 23, 1977, 1838-1844
- [70] Anhalt, J.P., *Antimicrob. Agents Ch.*, 11, 1977, 651-655
- [71] Kurosawa, N., Kuribayashi, S., Owada, E. und Ito, K., *J. Chromatogr. B*, 343, 1985, 379-385
- [72] Tawa, R., Matsunaga, H. und Fujimoto, T., *J. Chromatogr. A*, 812, 1998, 141-150
- [73] Ackermans, M.T., Everaerts, F.M. und Beckers, J.L., *J. Chromatogr. A*, 606, 1992, 229-235
- [74] Flurer, C.L., *J. Chromatogr. A*, 663, 1994, 259-263
- [75] Flurer, C.L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 13, 1995, 809-816
- [76] Needham, L.L. und Kochhar, M.M., *J. Chromatogr.*, 114, 1975, 220-222
- [77] Troschütz, J. und Röder, E., *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 289, 1978, 202-205
- [78] Elrod, L.jr., White, L.B., Spanton, S.G., Stroz, D.G., Cugier, P.J. und Luka, L.A., *Anal. Chem.*, 56, 1984, 1786-1790
- [79] Papp, E.A., Knupp, C.A. und Barbhैया, R.H., *J. Chromatogr.*, 574, 1992, 93-99
- [80] Tsuji, K., Goetz, J.F., VanMeter, W. und Gusciora, K.A., *J. Chromatogr.*, 175, 1979, 141-152
- [81] Barends, D.M., Van der Sand, J.S.F. und Hulshoff, A., *J. Chromatogr.*, 182, 1980, 201-210
- [82] Barends, D.M., Zwaan, C.L. und Hulshoff, A., *J. Chromatogr.*, 222, 1981, 316-323
- [83] Barends, D.M., Zwaan, C.L. und Hulshoff, A., *J. Chromatogr.*, 225, 1981, 417-426
- [84] Helboe. P. und Kryger, S., *J. Chromatogr.*, 235, 1982, 215-220
- [85] Barends, D.M., Blauw, J.S., Smits, M.H. und Hulshoff, A., *J. Chromatogr.*, 276, 1983, 385-394
- [86] Isoherranen, N. und Soback, S., *Clin. Chem.*, 46, 2000, 837-842
- [87] Barends, D.M., Blauw, J.S., Mijnsbergen, C.W., Govers, C.J.L.R. und Hulshoff, A., *J. Chromatogr.*, 322, 1985, 321-331
- [88] Wilson, W.L., Richard, G. und Hughes, D.W., *J. Chromatogr.*, 78, 1973, 442-444
- [89] Frutos, P., Torrado, S., Perez-Lorenzo, M.E. und Frutos, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21, 2000, 1149-1159

- [90] Tsuji, K. und Jenkins, K.M., *J. Chromatogr.*, 333, **1985**, 365-380
- [91] Tsuji, K. und Jenkins, K.M., *J. Chromatogr. A*, 369, **1986**, 105-115
- [92] Claes, P.J., Busson, R. und Vanderhaeghe, *J. Chromatogr.*, 298, **1984**, 445-457
- [93] Albracht, J.H. und De Wit, M.S., *J. Chromatogr.*, 389, **1987**, 306-311
- [94] Seidl, G. und Nerad, H.P., *Chromatographia*, 25, **1988**, 169-171
- [95] Kaale, E., Leonard, S., Van Schepdael, A., Roets, E. und Hoogmartens, J., *J. Chromatogr. A*, 895, **2000**, 67-79
- [96] Al-Amoud, A., Clark, B.J. und Chrystyn, H., *J. Chromatogr.*, 769, **2002**, 89-95
- [97] Stroka, J., Capelletti, C., Papadopoulou-Bouraoui, A., Pallaroni, L. und Anklam, E., *J. Liq. Chromatogr. R.T.*, 25, **2002**, 1821-1833
- [98] Wienen, F. und Holzgrabe, U., *Chromatographia*, 55, **2002**, 327-331
- [99] Kabra, P.M., Bhatnagar, P.K. und Nelson, M.A., *J. Anal. Toxicol.*, 7, **1983**, 283-285
- [100] Kabra, P.M., Bhatnagar, P.K., Nelson, M.A., Wall, J.H. und Marton, L.J., *Clin. Chem.*, 29, **1983**, 672-674
- [101] Kabra, P.M., Bhatnager, P.K. und Nelson, M.A., *J. Chromatogr. B*, 307, **1984**, 224-229
- [102] Kabra, P.M., *Clin. Liq. Chromatogr.*, Vol. I, **1984**, 33-34
- [103] Gambardella, P., Punziano, R., Gionti, M., Guadalupi, C. und Mancini, G., *J. Chromatogr. A*, 348, **1985**, 229-240
- [104] Sanger, F., *Biochem. J.*, 39, **1945**, 507-515
- [105] Sanger, F., *Biochem. J.*, 40, **1946**, 261-262
- [106] Wienen, F., Deubner R. und Holzgrabe, U., *Pharmeuropa*, 15, **2003**, 273-279
- [107] Anhalt, J.P., Sancilio, F.D. und McCorkle, T., *J. Chromatogr.*, 153, **1978**, 489-493
- [108] Shaikh, B, Allen, E.H. und Gridley, J.C., *J. Assoc. Off. Ana. Chem.*, 68, **1985**, 29-36
- [109] Tawa, R., Koshide, K. und Hirose, S., *J. Chromatogr.-Biomed.*, 425, **1988**, 143-152
- [110] Tawa, R., Hirose, S. und Fujimoto, T., *J. Chromatogr.-Biomed.*, 490, **1989**, 125-132
- [111] Shaikh, B., Jackson, J., Guyer, G und Ravis, W.R., *J. Chromatogr.-Biomed.*, 571, **1991**, 189-198
- [112] Shaikh, B. und Jackson, J., *J. Liq. Chromatogr.*, 12, **1989**, 1497-1515

- [113] Shaikh, B. und Jackson, J., *J. AOAC Int.*, 76, **1993**, 543-548
- [114] Roth, Marc, *Anal. Chem.*, 43, **1971**, 880-882
- [115] Anhalt, J.P. und Brown, S.D., *Clin. Chem.*, 24, **1978**, 1940-1947
- [116] Rumble, R.H. und Roberts, M.S., *J. Chromatogr.*, 419, **1987**, 408-413
- [117] Stead, D.A. und Richards, R.M.E., *J. Chromatogr. B*, 675, **1996**, 295-302
- [118] Stead, D.A. und Richards, R.M.E., *J. Chromatogr. B*, 693, **1997**, 415-421
- [119] Posyniak, A., Zmudzki, J. und Niedzielska, J., *J. Chromatogr. A*, 914, **2001**, 59-66
- [120] Walker, S.E. und Coates, P.E., *J. Chromatogr. B*, 223, **1981**, 131-138
- [121] Medina, M.B. und Unruh, J.J., *J. Chromatogr. B*, 663, **1995**, 127-135
- [122] Gerhardt, G.C., Salisbury C.D.C. und MacNeil, J.D., *J. AOAC Int.*, 77, **1994**, 765-767
- [123] Gerhardt, G.C., Salisbury C.D.C. und MacNeil, J.D., *J. AOAC Int.*, 77, **1994**, 334-337
- [124] Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. und Weigele, M., *Science*, 178, **1972**, 871-872
- [125] Adams, E., Dalle, J., De Bie, E., De Smedt, I., Roets, E., und Hoogmartens, J., *J. Chromatogr. A*, 766, **1997**, 133-139
- [126] Zemann, A.J., *TRAC - Trend. Anal. Chem.*, 20, **2001**, 346-354
- [127] Kotretsou, S.I. und Constantinou-Kokotou, V., *Carbohydr. Res.*, 310, **1998**, 121-127
- [128] Getek, T.A., Vestal, M.L. und Alexander, T.G., *J. Chromatogr.*, 554, **1991**, 191-203
- [129] Morgan, J., Joyce-Menekse, M.E., Rowlands, R.T., Gilbert, I.H. und Lloyd, D., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15, **2001**, 1229-1238
- [130] Claes, P.J., Compernelle, F. und Vanderhaeghe, H., *J. Antibiot.*, 27, **1974**, 931-942
- [131] Lu, J., Cwik, M. und Kanyok, T., *J. Chromatogr. B*, 695, **1997**, 329-335
- [132] Olson, L.L., Pick, J., Ellis, W.Y. und Lim, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, **1997**, 783-793
- [133] Pick, J., Olson, L.L., Ellis, W.Y. und Lim, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 16, **1997**, 131-137
- [134] Hessler, E.J., Jahnke, H.K., Robertson, J.H., Tsuji, K., Rinehart Jr., K.J. und Shier, W.T., *J. Antibiot.*, 23, **1970**, 464-466
- [135] Adams, E., Roelants, W., De Paepe, R., Roets, E. und Hoogmartens, J., *J. Pharm.*

- Biomed. Anal.*, 18, **1998**, 689-698
- [136] Gentamicin Monographie 4.00/0331, *Europäisches Arzneibuch*, 4. Ausgabe, **2002**, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag, Eschborn, 1941-1943
- [137] Gentamicin Monographie 07/2003:0331, *Europäisches Arzneibuch*, 4. Ausgabe, 5. Nachtrag, **2003**, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag, Eschborn
- [138] Kaale, E., Van Goidesenhoven, E., Van Schepdael, A., Roets, E. und Hoogmartens, J., *Electrophoresis*, 22, **2001**, 2746-2754
- [139] Kromidas, S., *Die Validierungsparameter* in Gruber, U. und Klein, W. (Hrsg.) *Validierung in der Analytik*, **1999**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 80-83
- [140] Wienen, F., Laug, S., Baumann, K., Schwab, A., Just, S. und Holzgrabe, U., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30, **2003**, 1879-1887
- [141] Kunkel, A. und Wätzig, H., *Electrophoresis*, 20, **1999**, 2379-2389
- [142] Calam, D.H., Gilbert, J.N.T., Lightbown, J.W., Powell, J.W. und Thomas, A.H., *J. Pharm. Pharmacol.*, 30, **1978**, 220-232
- [143] Sun, S., *Yaowu Fenxi Zazhi*, 4, **1984**, 43-44
- [144] Kountourellis, J. Parfitt, R.T. und Casy, A.F., *J. Pharm. Pharmacol.*, 35, **1983**, 279-283
- [145] Deubner, R. und Holzgrabe, U., persönliche Information
- [146] Sisomicin Monographie, *United States Pharmacopoeia 26*, **2002**, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD
- [147] Gagelli, E., Gagelli, N., Maccotta, A., Valensin, G., Marini, D., Di Crocco, M.E. und Delfini, M., *Spectrochim. Acta*, A 51, **1995**, 1959-1963
- [148] Kanamycin Monographie, *Europäisches Arzneibuch*, 4. Ausgabe, **2002**, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag, Eschborn
- [149] Kanamycin Monographie, *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 1997*, 8. Lieferung, **1998**, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag, Eschborn
- [150] Rosano, T.G., Brown, H.H., Meola, J.M. und McDermott, C., *Clin. Chem.*, 25, **1979**, 1064-1064
- [151] Kaale, E., Van Schepdael, A., Roets, E., Hoogmartens, J., *J. Chromatogr. A*, 924, **2001**, 451-458
- [152] Neomycin Monographie, *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 1997*, NT 1998, 11. Lieferung, **1999**, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag, Eschborn
- [153] Deubner, R., Schollmayer, C., Wienen, F. und Holzgrabe, U., *Magn. Reson.*

- Chem.*, 41, **2003**, 589-598
- [154] Christians, T. und Holzgrabe, U., *J. Chromatogr. A*, 911, **2001**, 249-257
- [155] Roth, H.J. und Fenner, H., *Arzneistoffe – Struktur Bioreaktivität Wirkungsbezogene Eigenschaften*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, **1997**, 87-87
- [156] Wilson, R.G. und Ryley, J.F., *Screening and evaluation in vitro*. In: Ryley (Hrsg.) *Chemotherapy of fungal diseases*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, S. 111-128
- [157] Büchel, K.-H., Regel, E. und Plempel, M., *Offenlegungsschrift 1,617,481*, **1971**, (08. April to Farbenfabriken Bayer AG)
- [158] Nebert, D.W. und Gonzalez, F.J., *Ann. Rev. Biochem.*, 56, **1987**, 945-993
- [159] Hitchcock, C.A., Dickinson, K., Brown, S.B., Evans, E.G. und Adams, D.J., *Biochem. J.*, 266, **1990**, 475-480
- [160] Van den Bossche, H., *Curr. Top. Med. Mycol.*, 1, **1985**, 313-351
- [161] Hay, R.J., *Dermatophytosis and other superficial mycoses*. In: Mandell, G.L., Douglas, R.G., und Bennet, J.E. (Hrsg.) *Principles and practice of infectious diseases*, 1990, Churchill Livingstone, New York, 2.017-2.028
- [162] Alvarez, J., Montero, M. und Garcia-Sancho, J., *J. Biol. Chem.*, 267, **1992**, 11789-11793
- [163] Warth, R., Hamm, K., Bleich, M., Kunzelmann, K., von Hahn, T., Schreiber, R., Ullrich, E., Mengel, M., Trautmann, N., Kindle, P. und Schwab A., *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, 438, **1999**, 437-444
- [164] Aiyar, J., *Perspect. Drug Discov. Des.*, 15/16, **1999**, 257-280
- [165] Schwab, A., *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 280, **2001**, F739-F747
- [166] Ganshani, S., Wulff, H., Miller, M.J., Rohm, H., Neben, A., Gutman, G.A., Cahalan, M.D. und Chandy, K.G., *J. Biol. Chem.*, 275, **200**, 37137-37149
- [167] Schmidt-Antomarchi, H., Schmid-Alliana, A., Romey, G., Ventura, M.-A., Breittmayer, V., Millet, M.-A., Husson, H., Moghrabi, B., Lazdunki, M. und Rossi, B., *J. Immunolog.*, 159, **1997**, 6209-6215
- [168] Wojtulewski, J.A., Gow, P.J., Walter, J., Grahame, R., Bibson, T., Panayi, G.S. und Mason, J., *Ann. Rheum.*, 39, **1980**, 469-472
- [169] Ishii, T.M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C.T. und Adelman, J.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, **1997**, 11651-11656
- [170] Logsdon, N.J., Kang, J., Togo, J.A., Christian, E.P. und Aiyar, J., *J. Biol. Chem.*, 272, **1997**, 32723-32726
- [171] Rosenkranz, H. und Puetter, J., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 1, **1976**, 165-172

- [172] Clotrimazol Monographie, *Kommentar zum DAB 10, 1. NT 1992*, 4. Lieferung, **1994**, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, Govi-Verlag – Pharmazeutischer Verlag, Eschborn
- [173] Büchel, K.-H., Regel, E. und Plempel, M., *US Patent 3,705,172*, **1972**, (05. Dec. to Farbenfabriken Bayer AG)
- [174] Brugnara, C., Armsby, C.C., Sakamoto, M., Rifai, N., Alper, S.L. und Platt, O., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **273**, **1995**, 266-266
- [175] De Bruijn, P., Kehrer, D.F.S., Verweij, J. und Sparreboom, A., *J. Chromatogr. B*, **753**, **2001**, 395-400
- [176] Riley, C.M., *J. Chromatogr.*, **377**, **1986**, 287-294
- [177] Rifai, N., Sakamoto, M. und Law, T., *Clin. Chem.*, **41**, **1995**, 287-291
- [178] Crego, A.L., Marina, M.L. und Lavandera, J.L., *J. Chromatogr. A*, **917**, **2001**, 337-345
- [179] Arranz, A., Echevarria, C., Moreda, J.M., Cid, A. und Arranz, J.F., *J. Chromatogr. A*, **871**, **2000**, 399-402
- [180] Lin, M. und Wu, N., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **19**, **1999**, 945-954
- [181] Von Heeren, F., Tanner, R., Theurilat, R. und Thormann, W., *J. Chromatogr. A*, **745**, **1996**, 165-172
- [182] Nakagawa, T., Oda, Y., Shibukawa, A., Fukada, H., Tanaka, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, **1989**, 707-7011
- [183] Validation of analytical procedures: Methology, In: Proceedings of the International Conference on Harmonisation Guideline Q2B, **1996**

11 Anhang

11.1 Übersicht

Im Folgenden sind alle Elektropherogramme aufgeführt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Gentamicin erstellt worden sind.

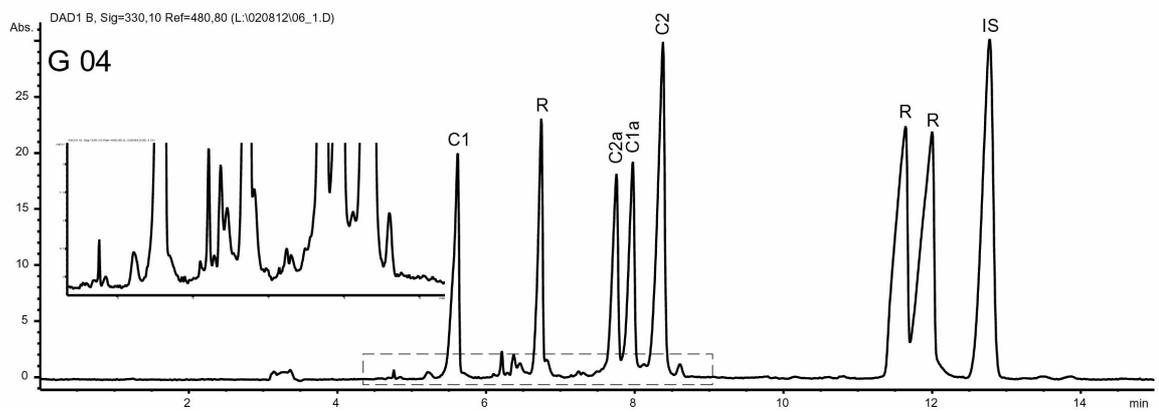
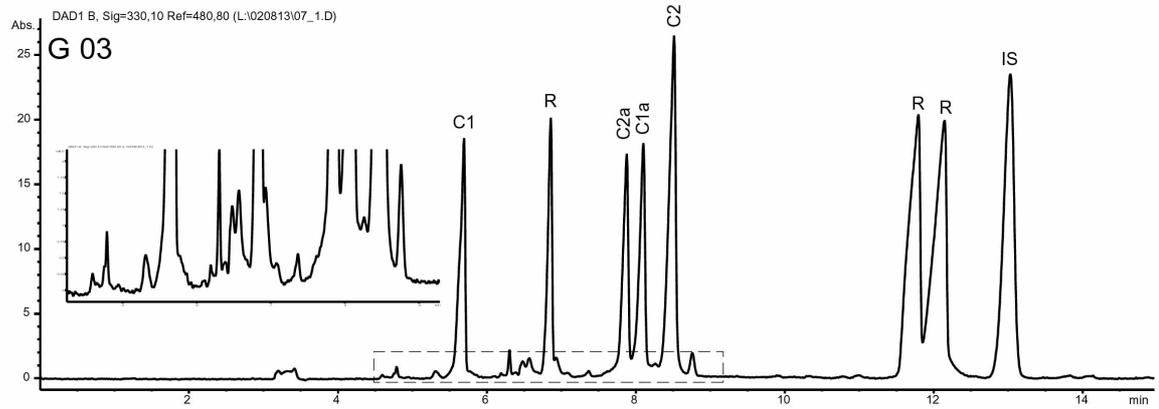
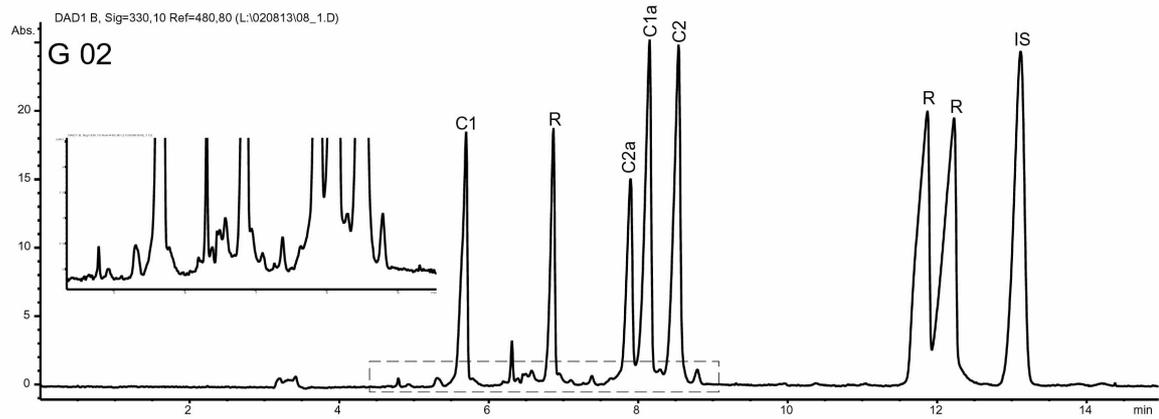
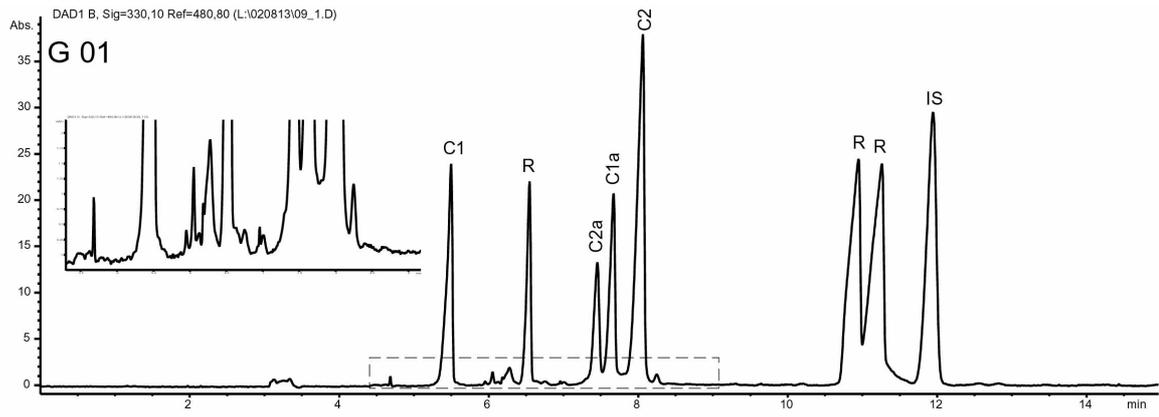
Es sind alle Elektropherogramme dargestellt, die mit der CZE-Methode, mit der MEKC-Methode und mit der abgewandelten MEKC-Methode (14 kV) aufgenommen wurden.

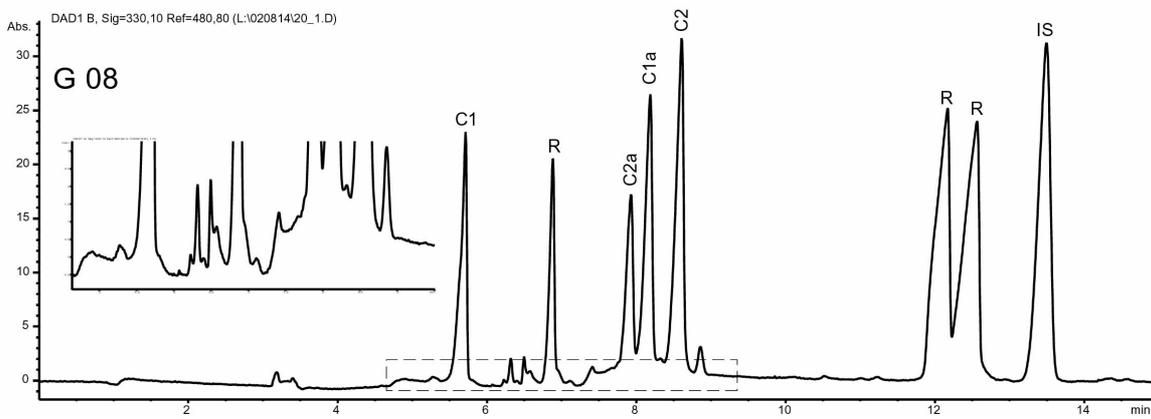
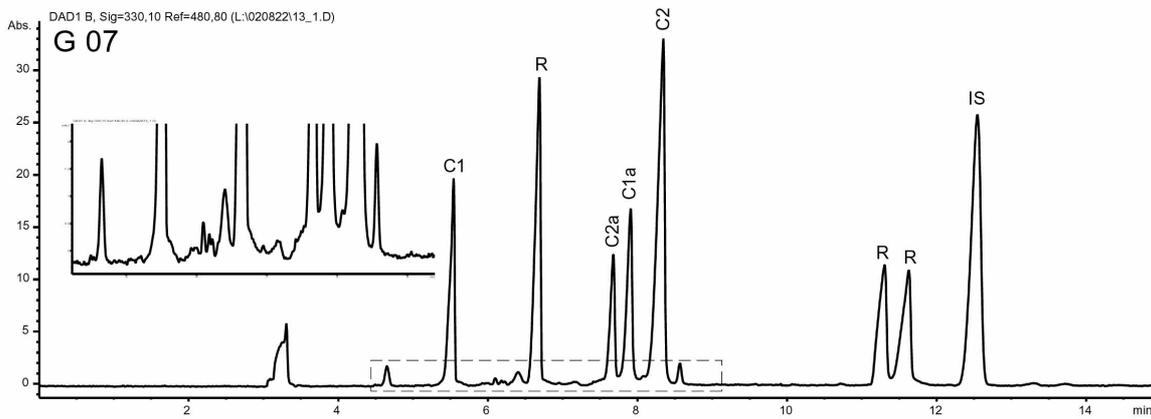
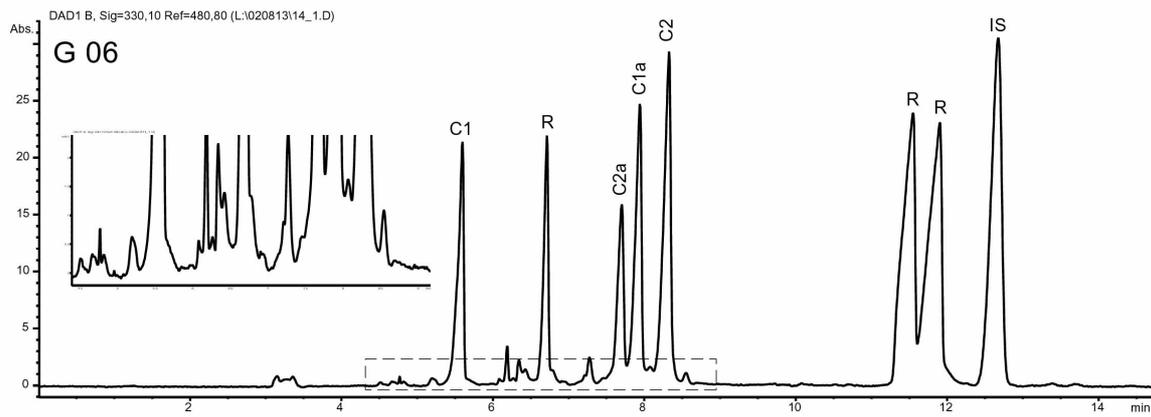
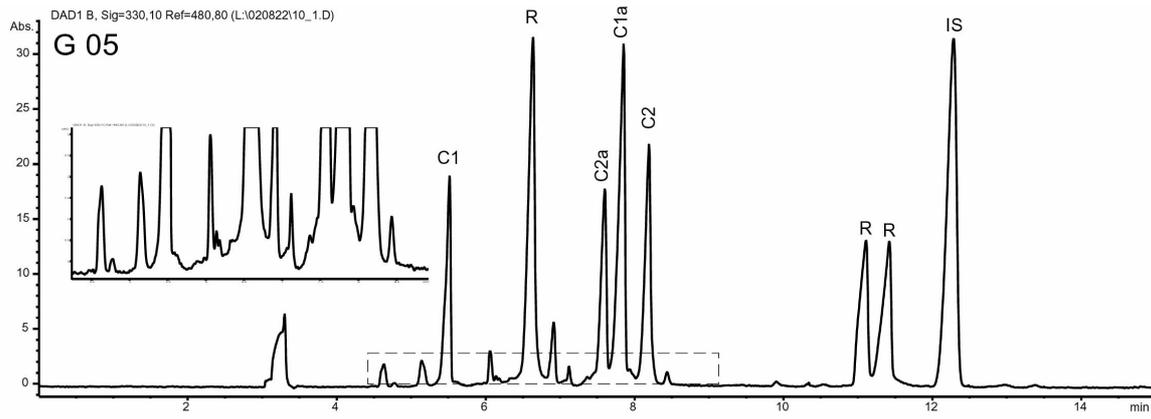
Zeichenerklärung:

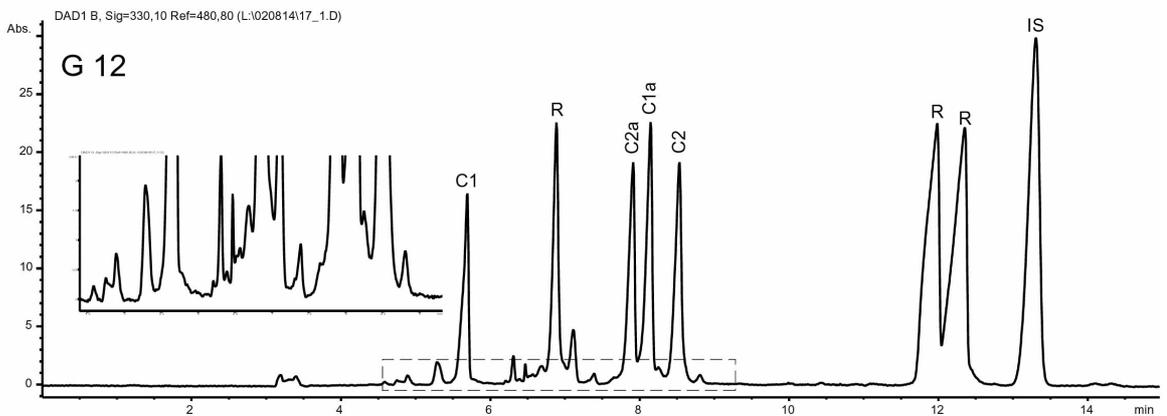
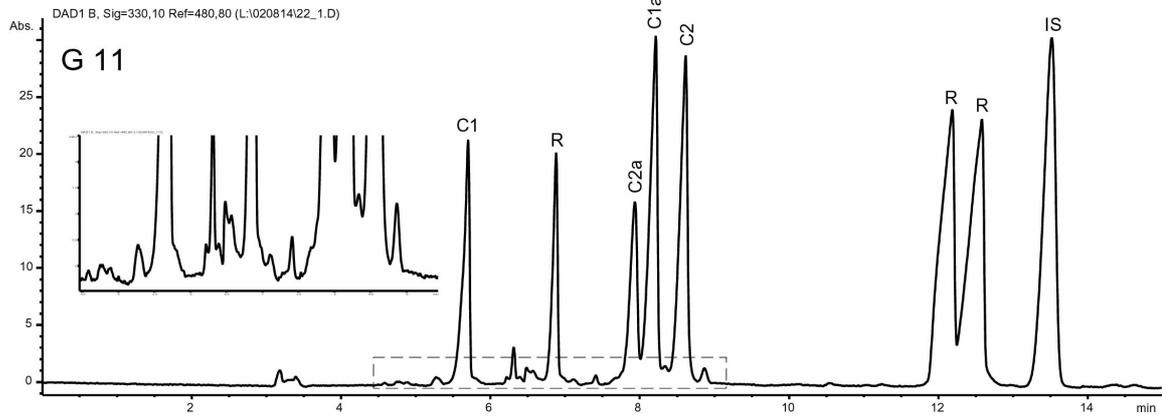
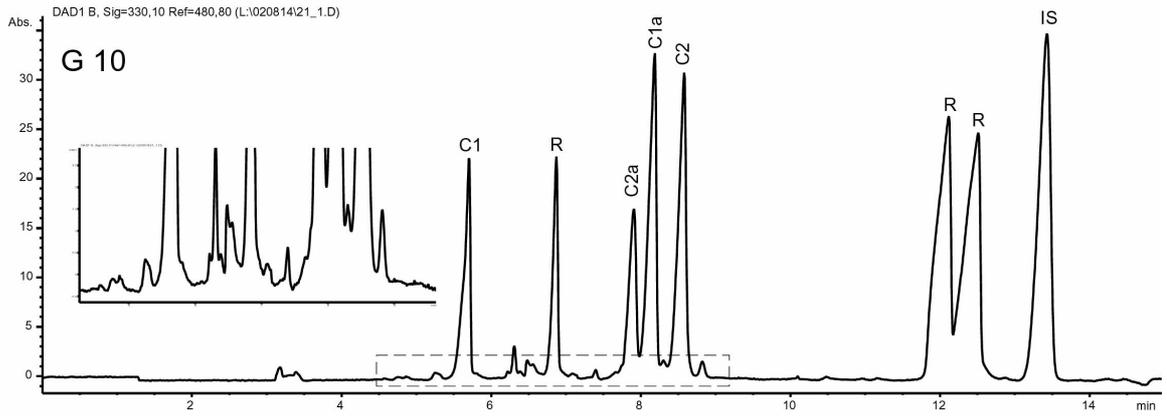
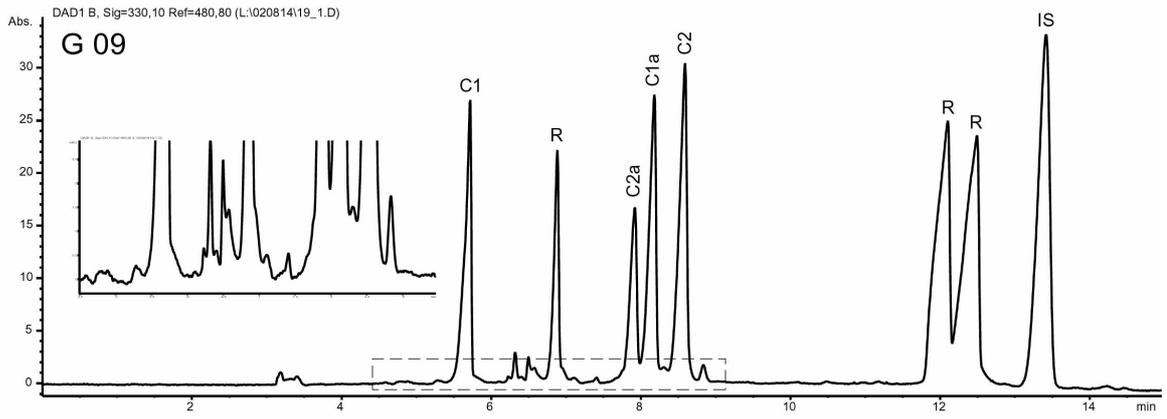
C1	=	Gentamicin-C1
C1a	=	Gentamicin-C1a
C2	=	Gentamicin-C2
C2a	=	Gentamicin-C2a
C2b	=	Gentamicin-C2b
R	=	OPA-Reagenzpeak(s)
N	=	Netilmicin

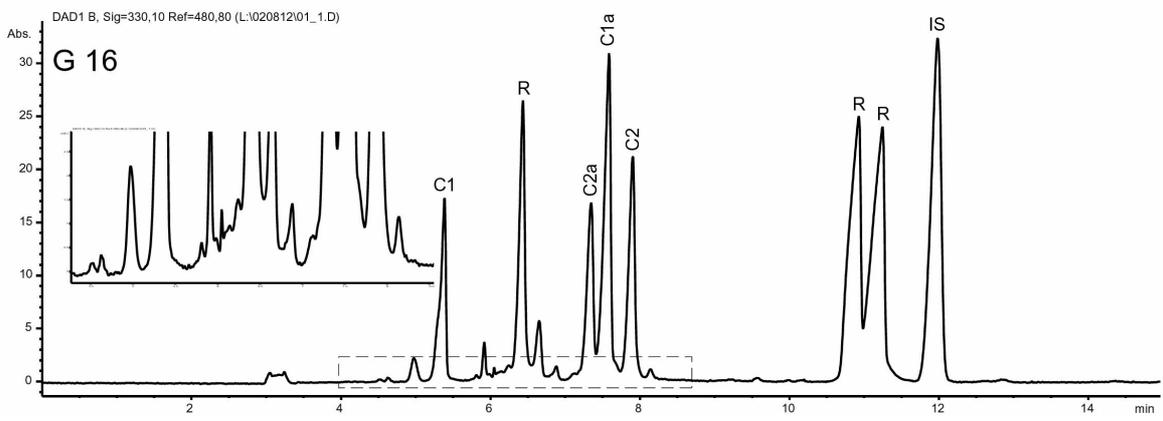
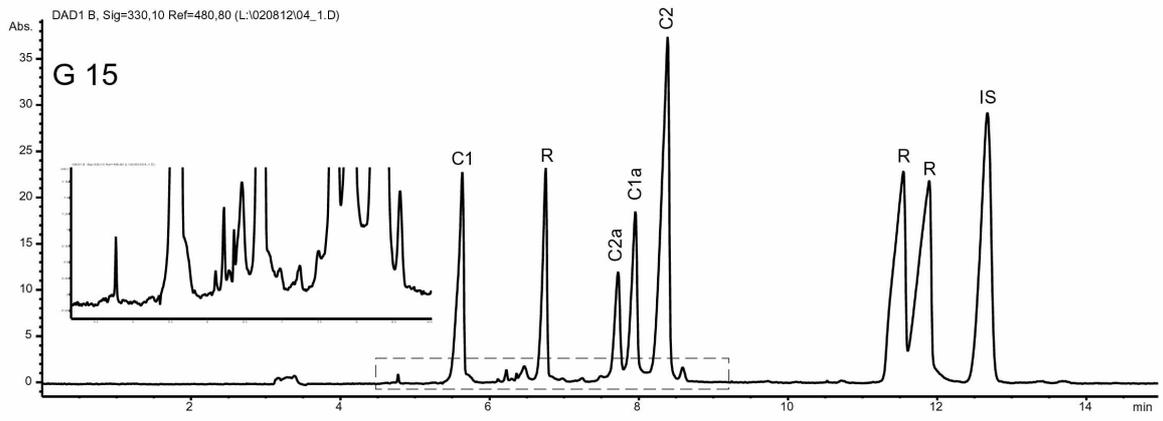
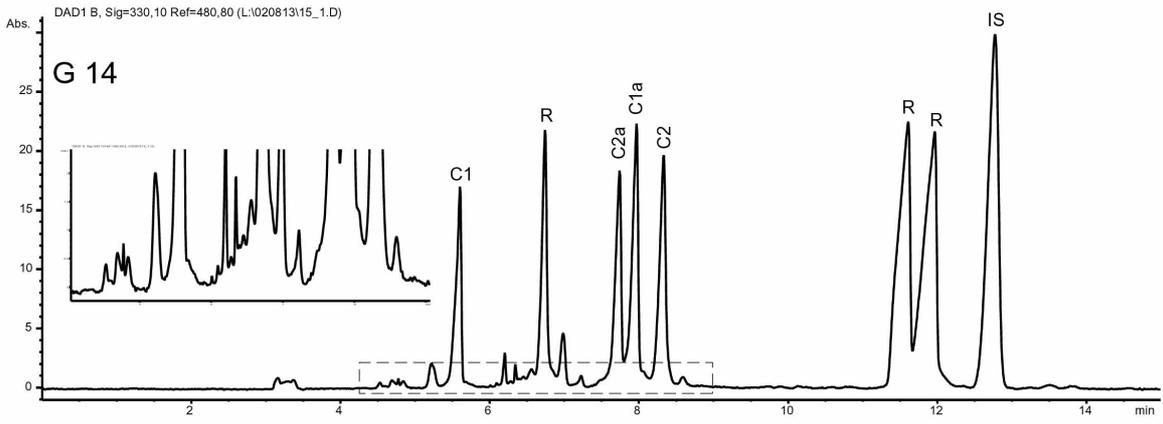
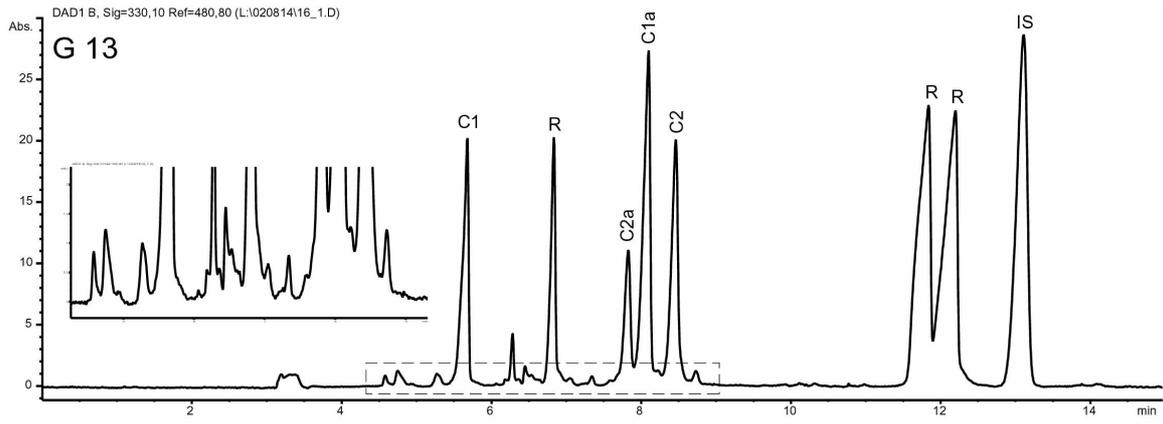
11.2 CZE-Methode

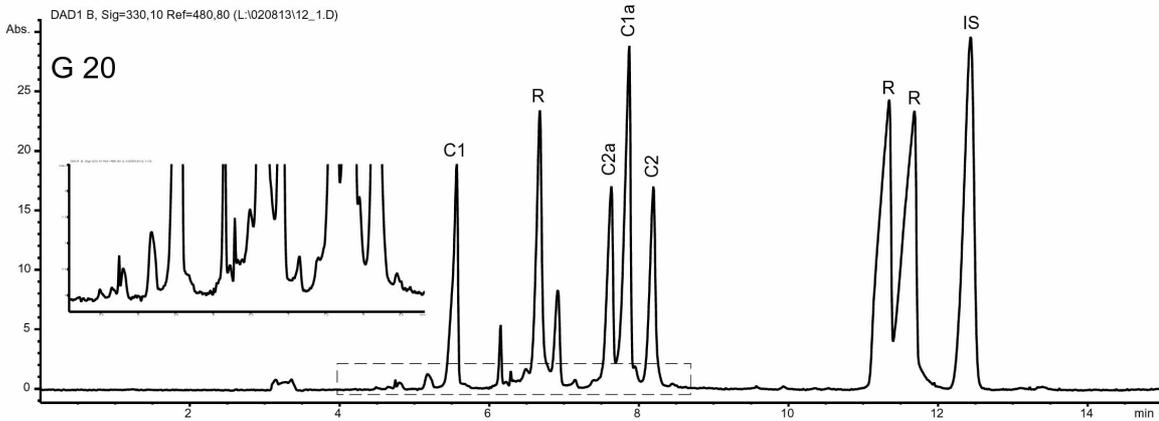
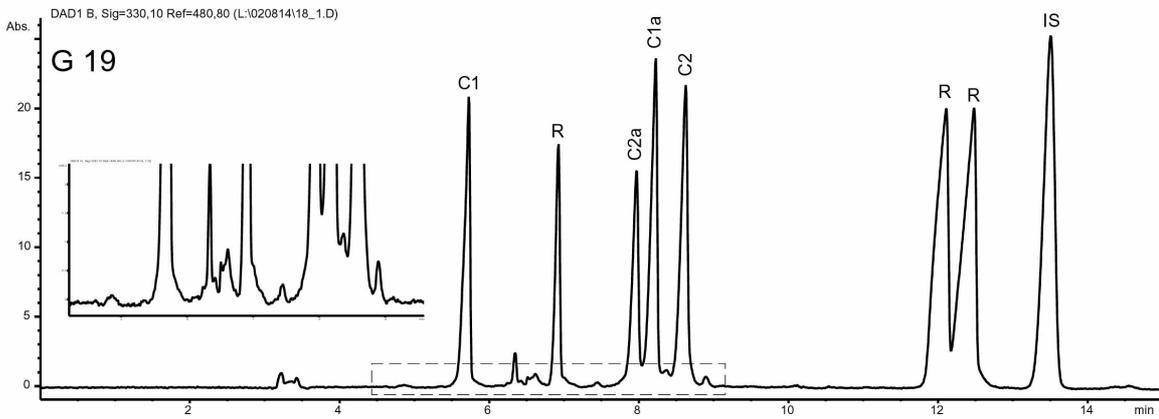
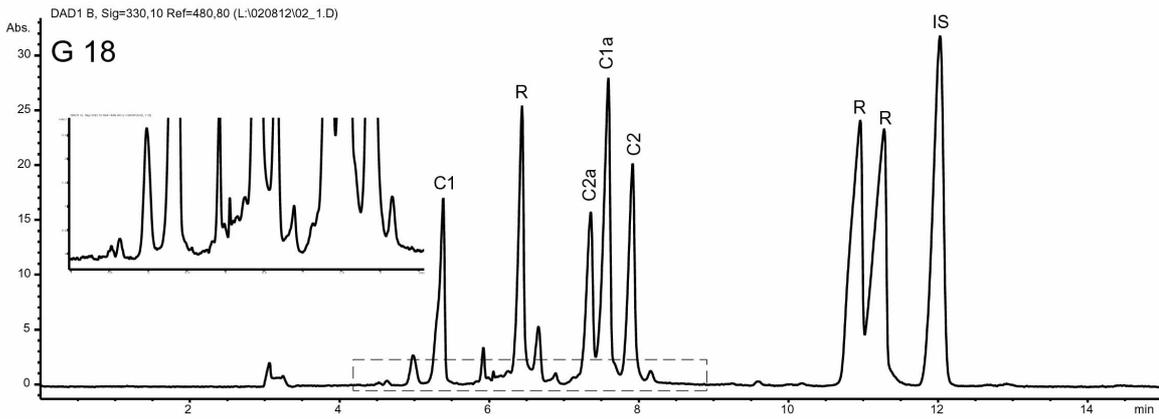
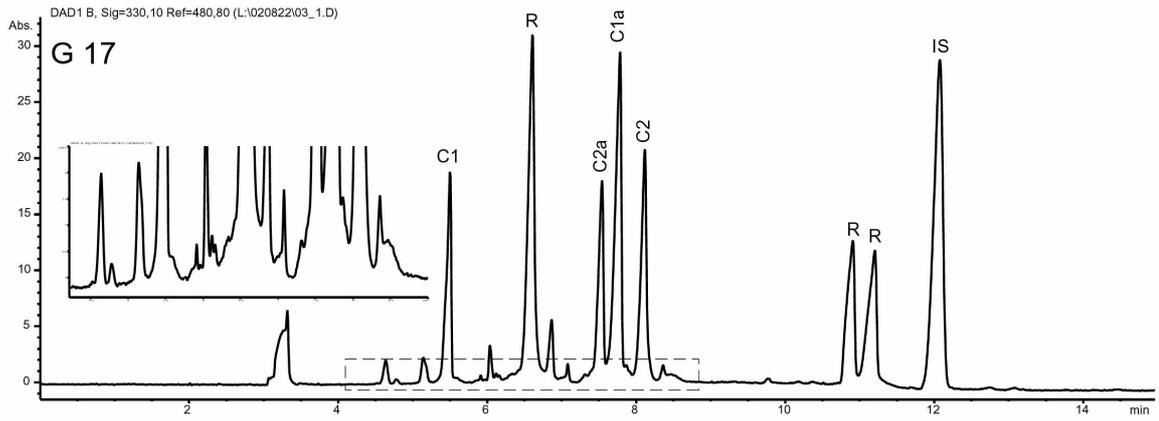
In diesem Kapitel sind alle 46 Elektropherogramme der CZE-Methode abgebildet. Zum Zeitpunkt der Anfertigung lagen die neu dazugekommenen 10 Proben noch nicht vor. Mit dieser Methode wurde die erste Unterteilung der vorliegenden Proben durchgeführt. Es wurde in sieben Gruppen und diverse Untergruppen unterteilt.

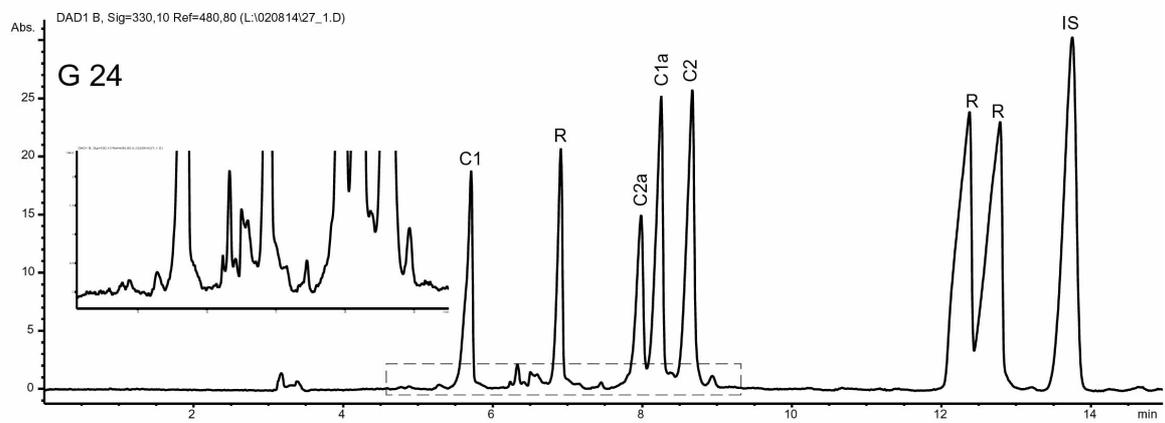
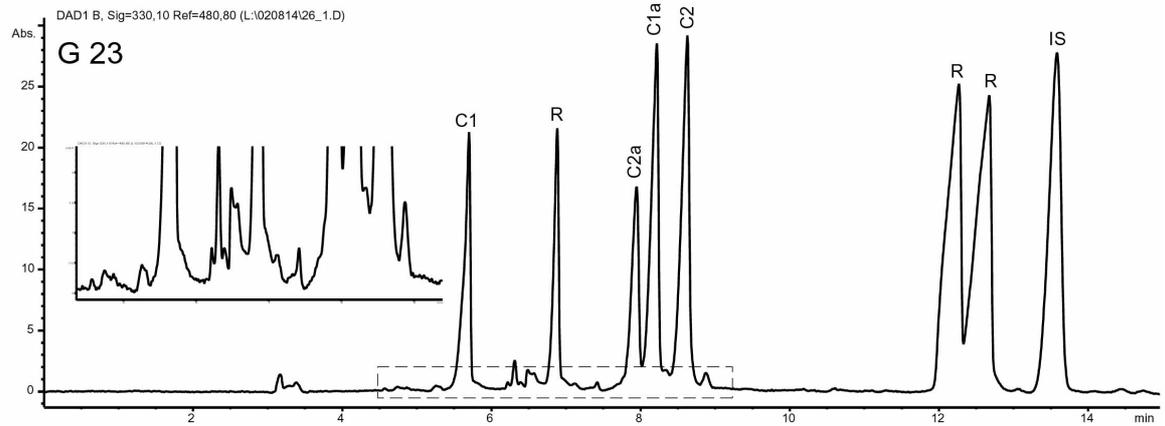
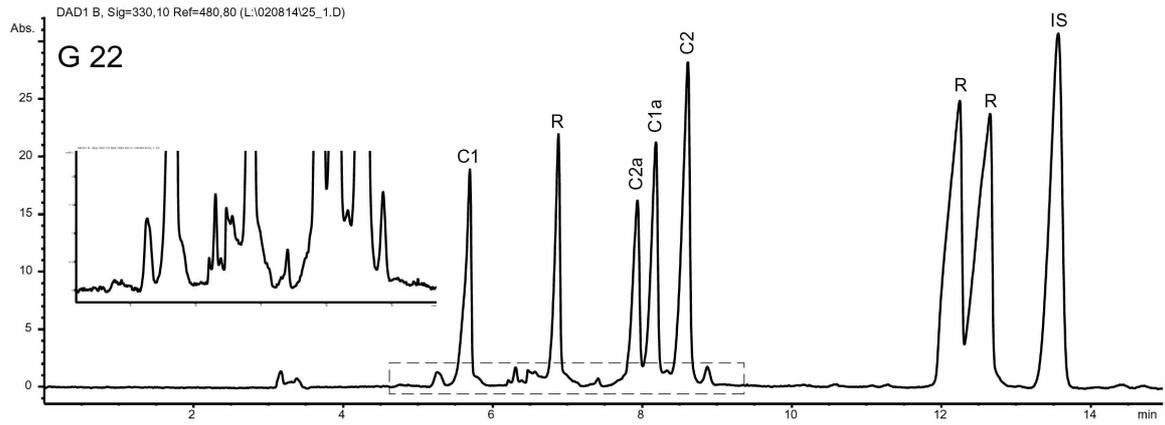
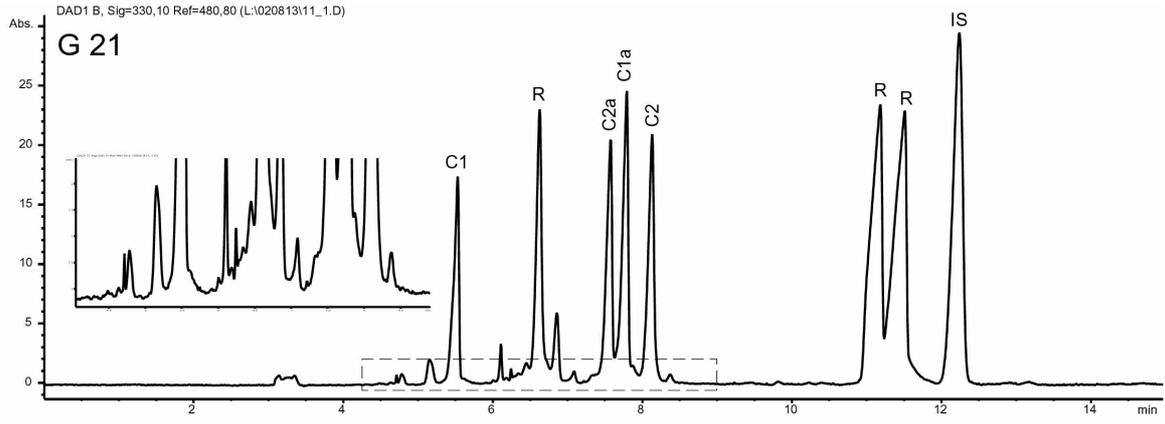


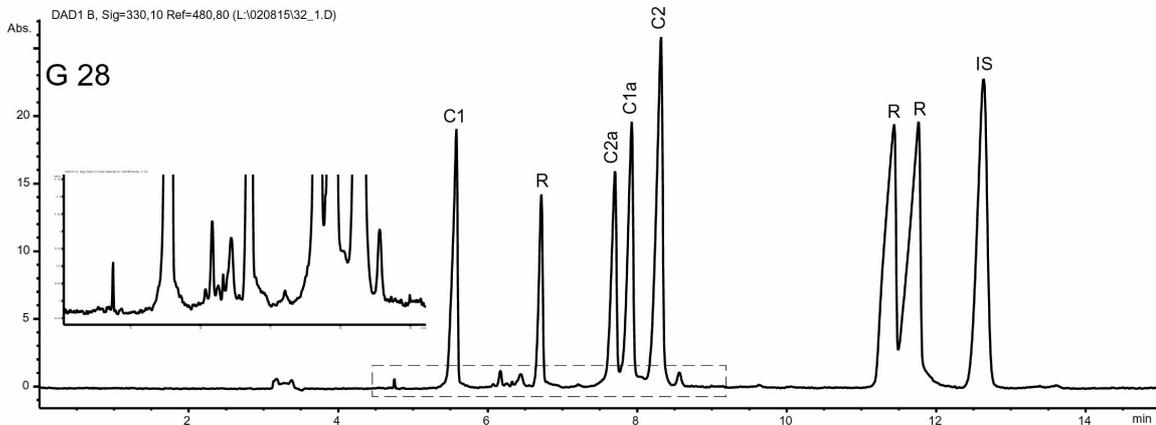
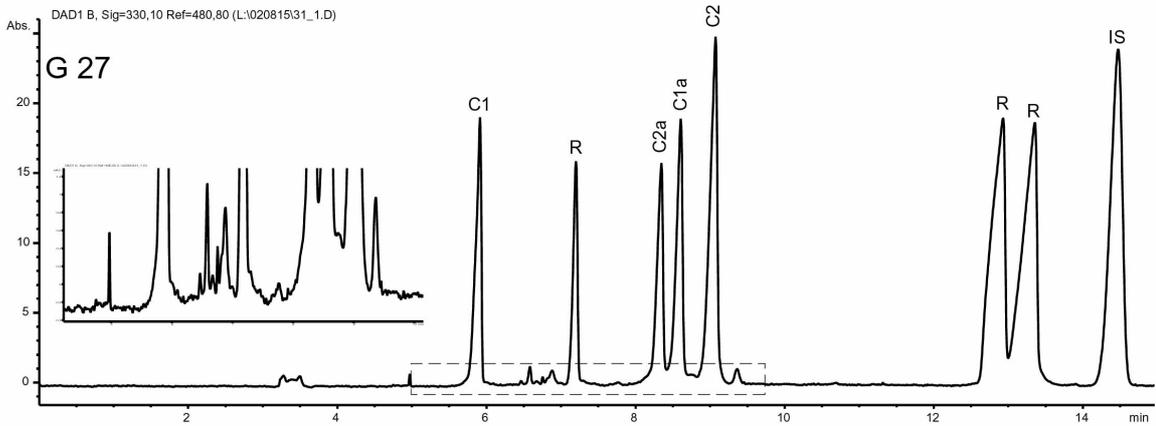
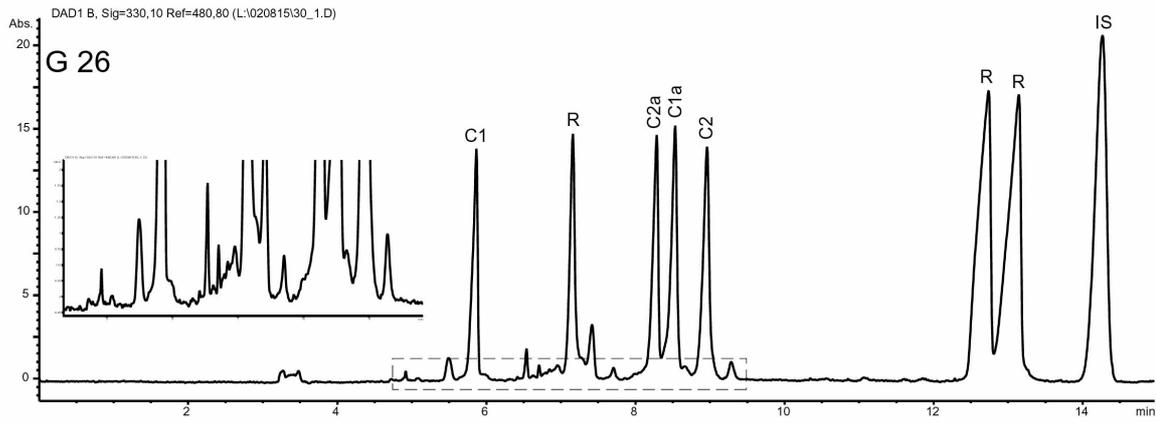
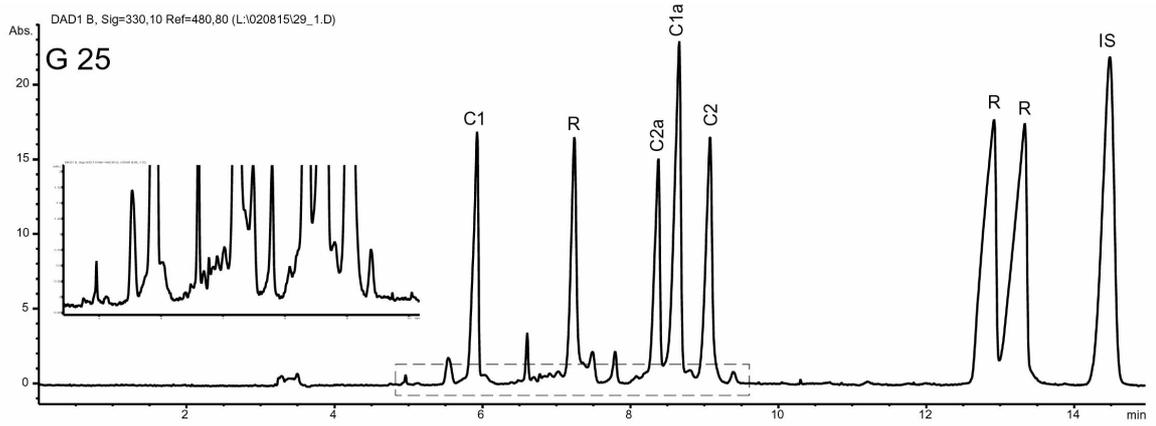


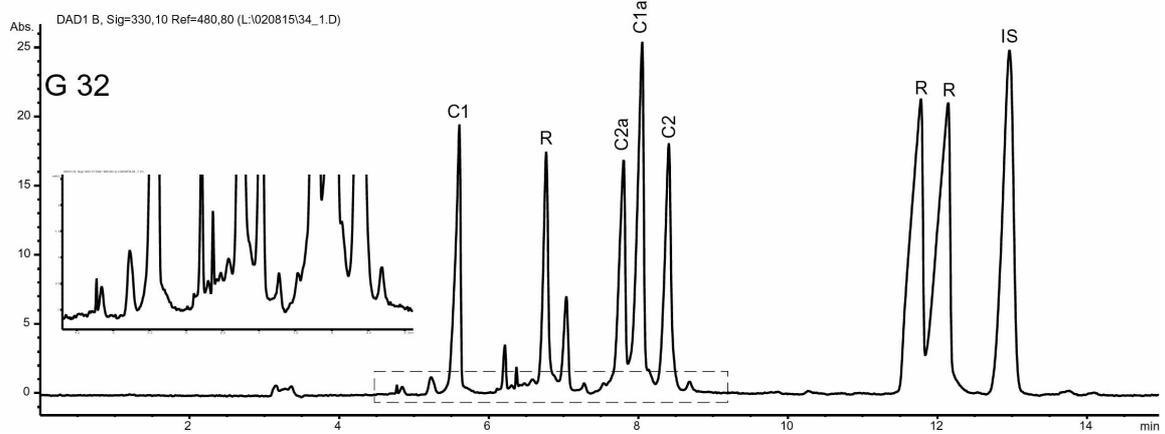
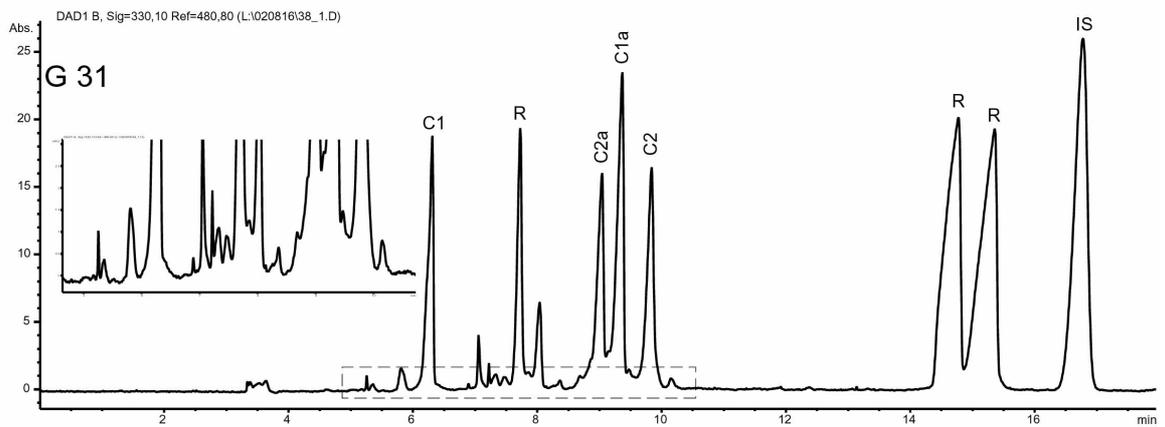
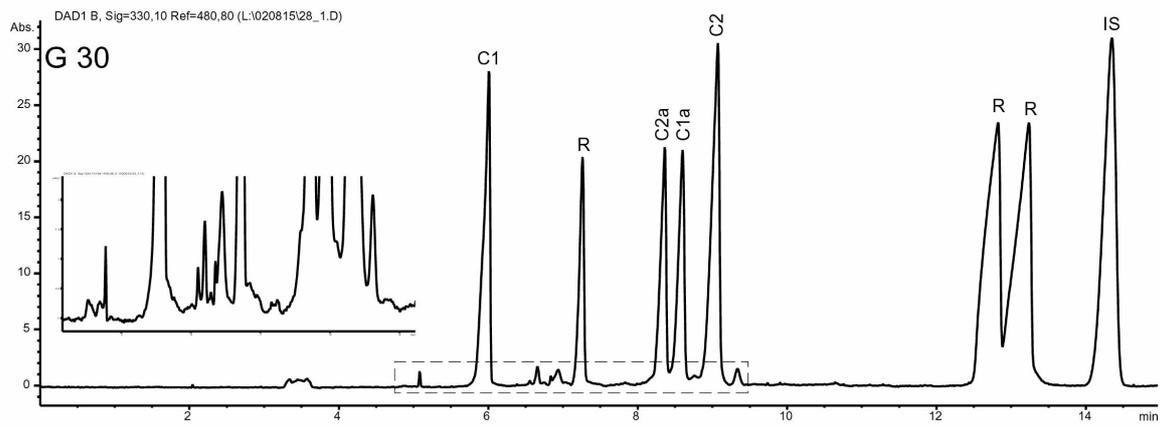
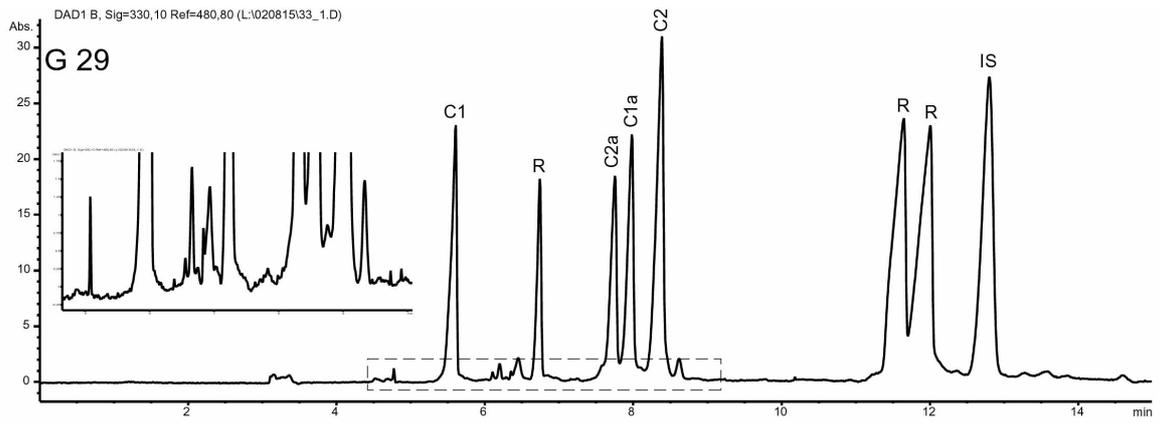


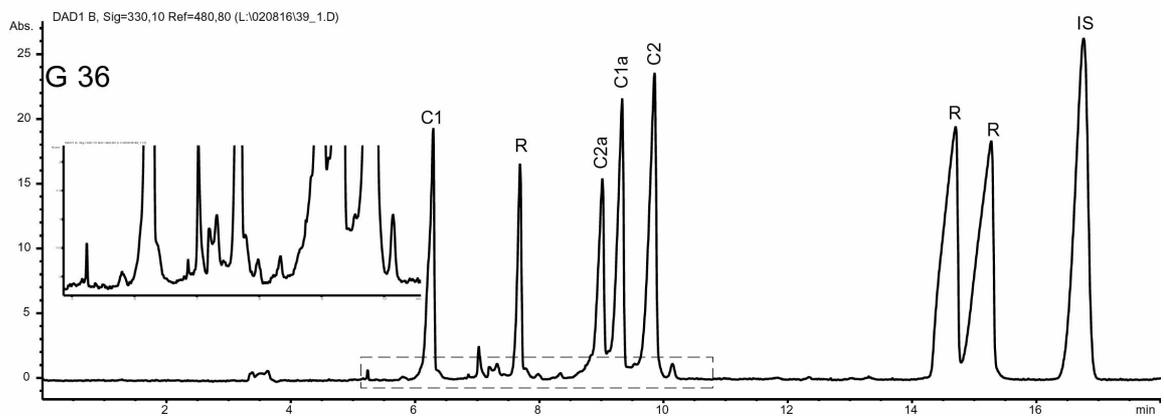
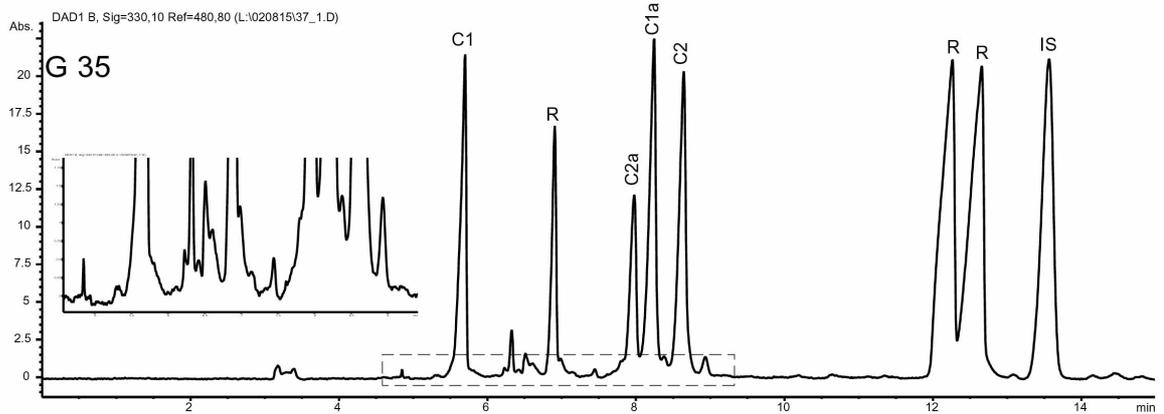
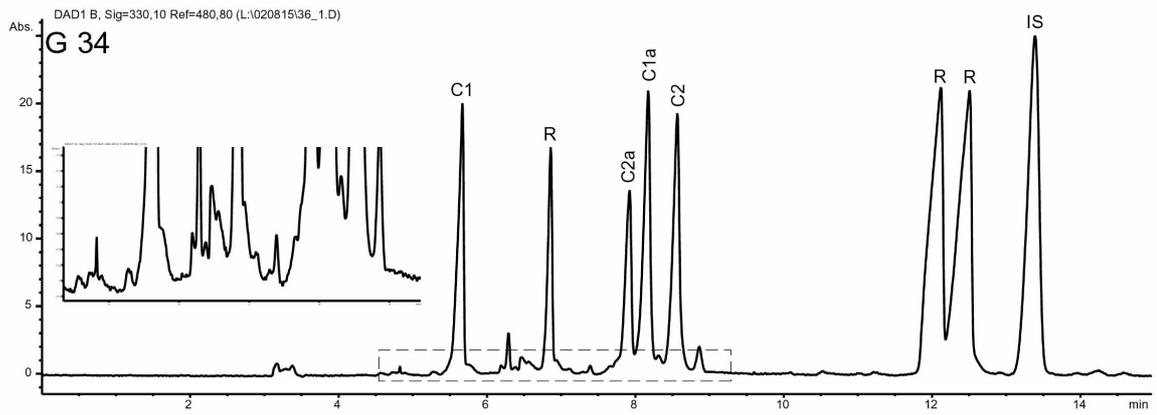
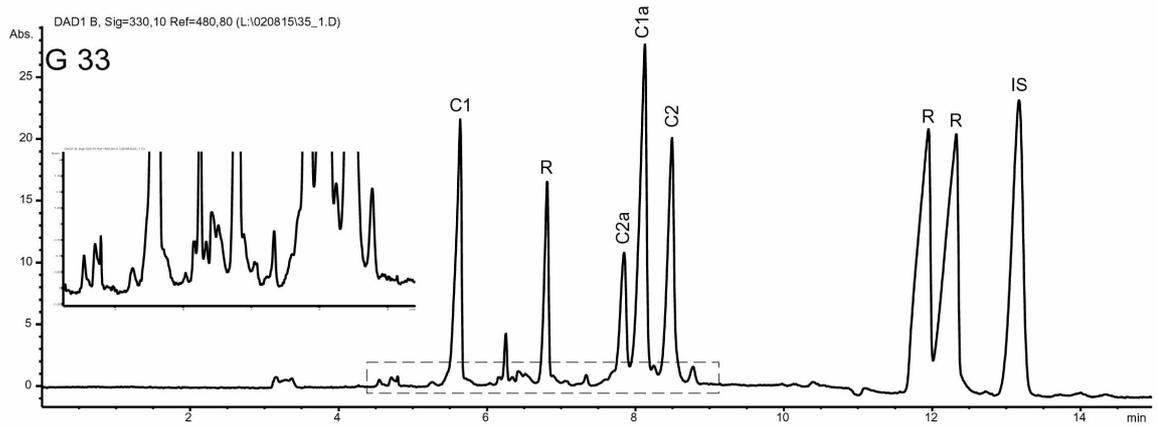


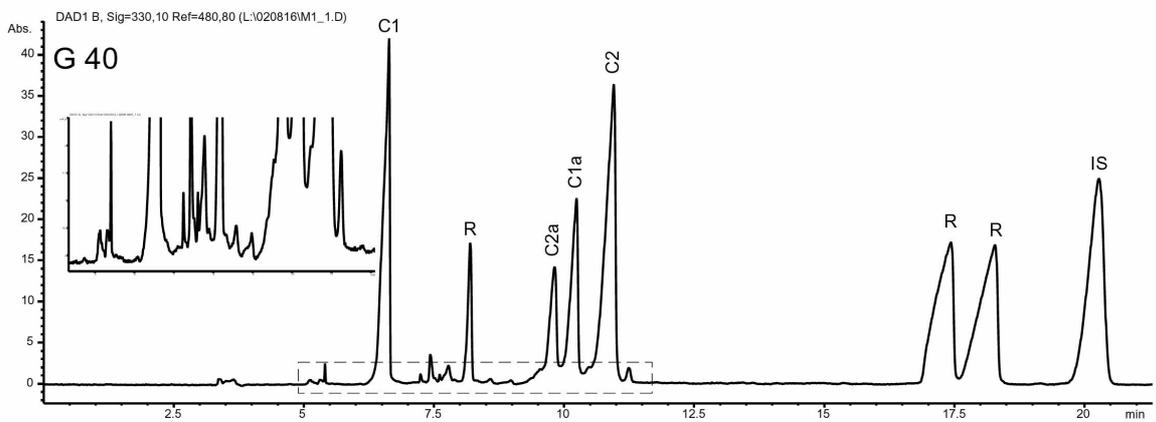
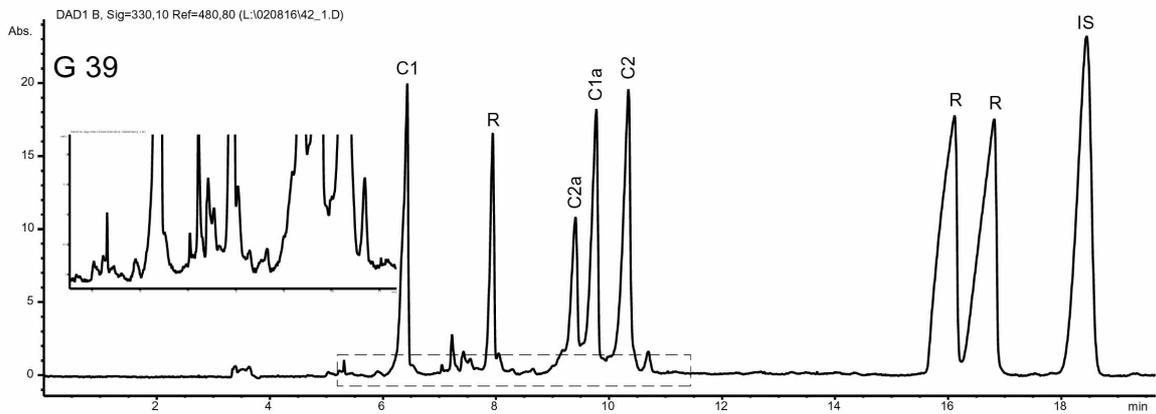
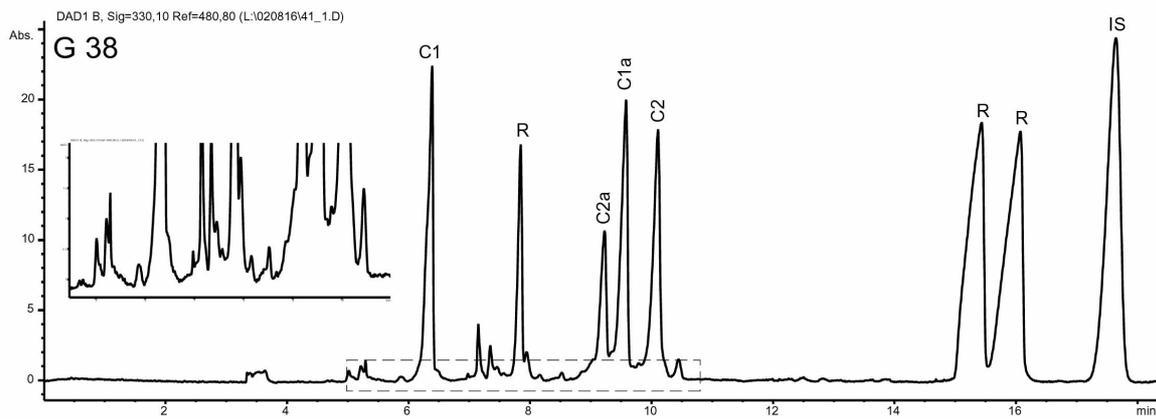
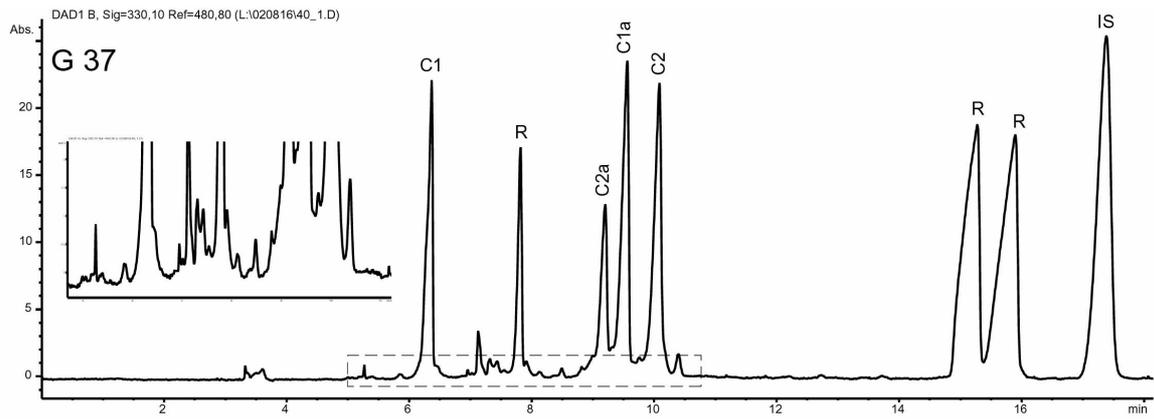


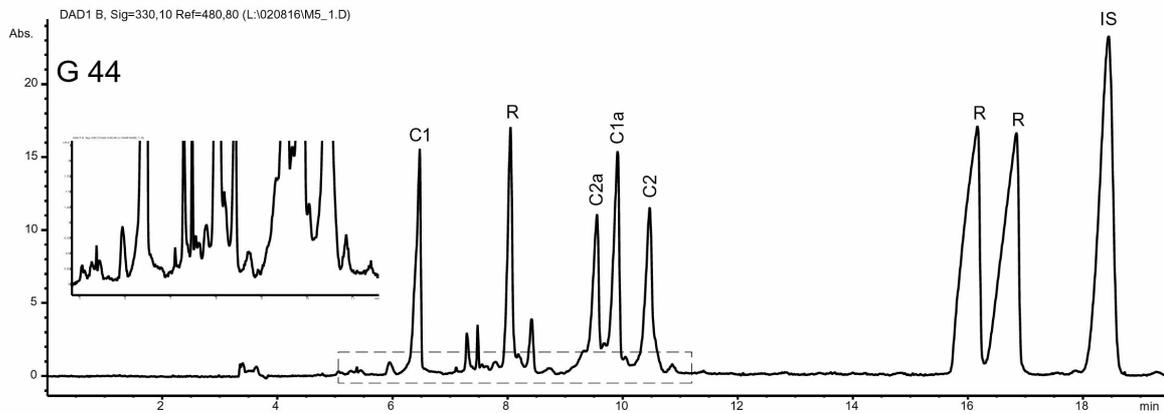
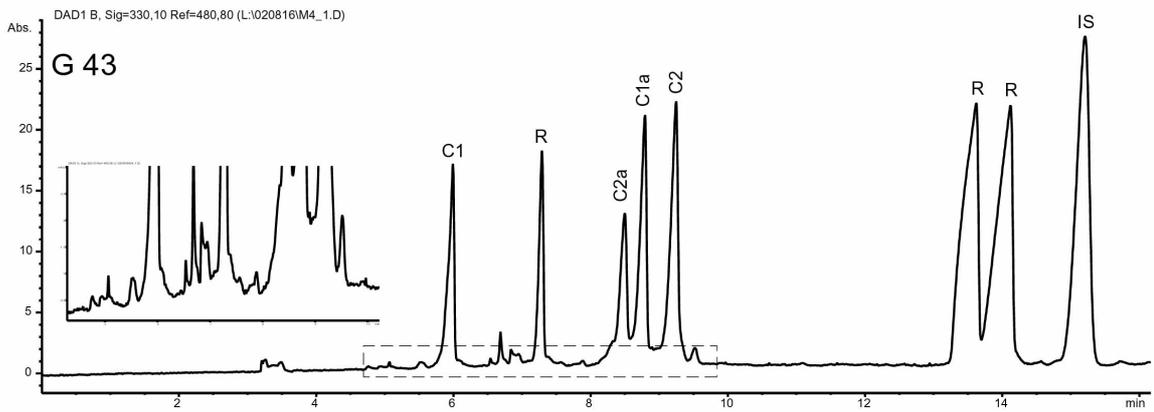
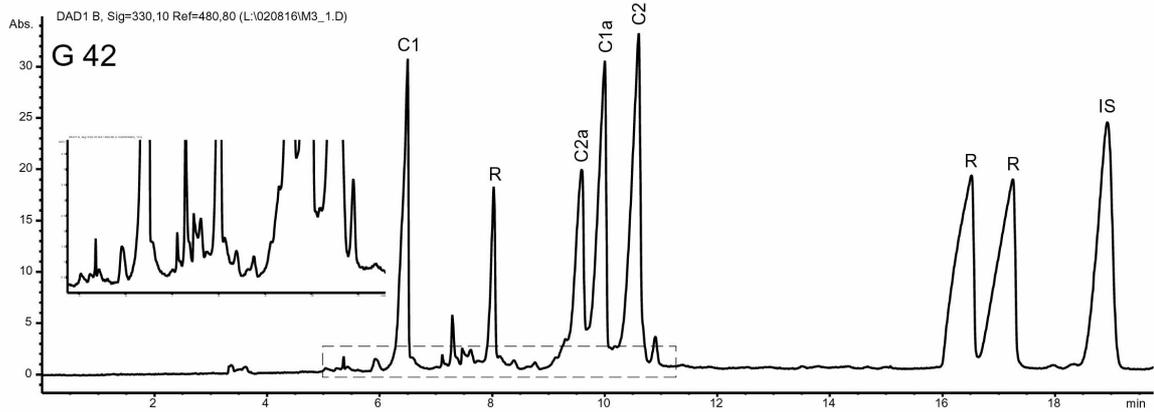
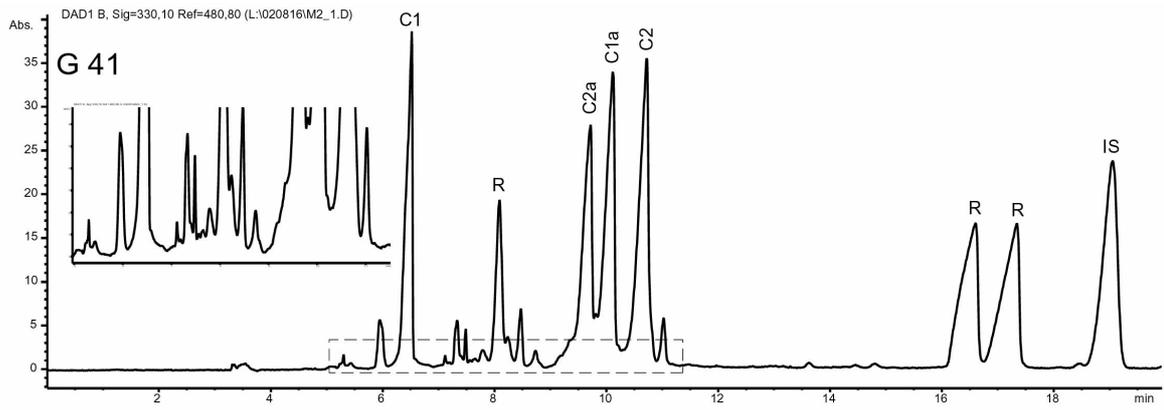


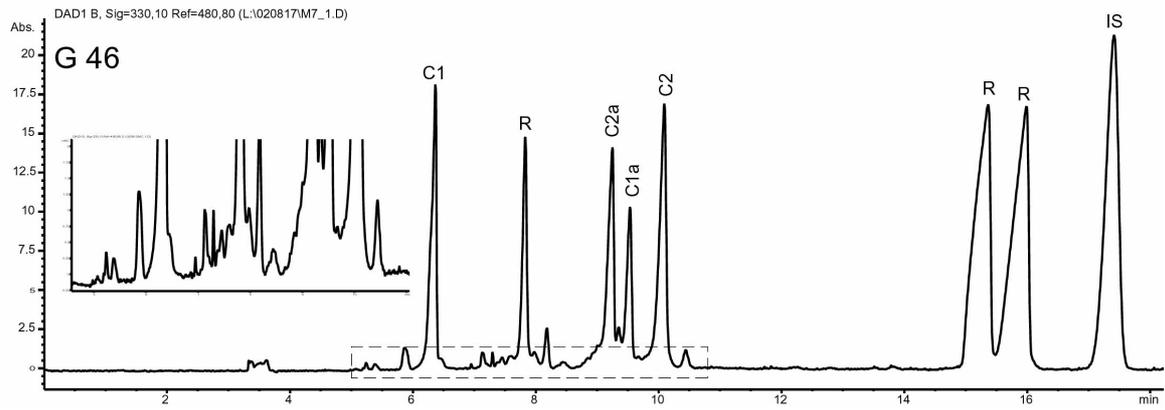
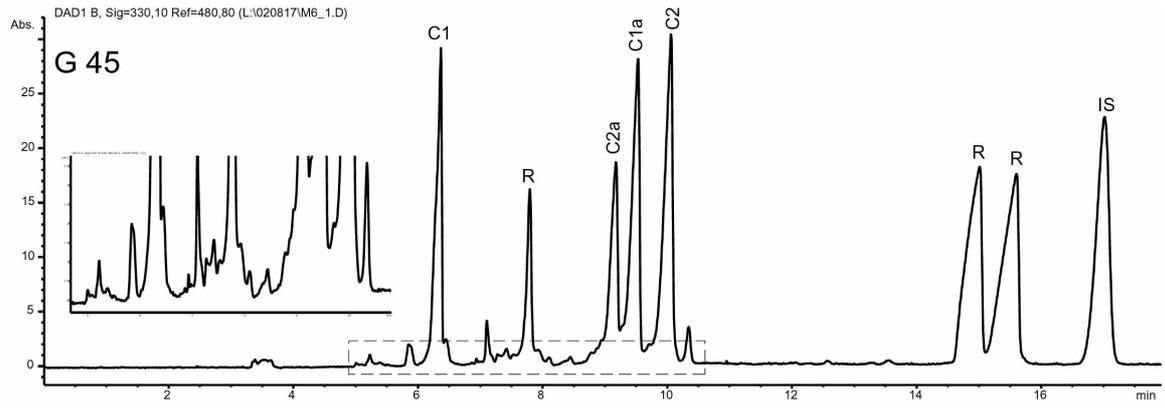






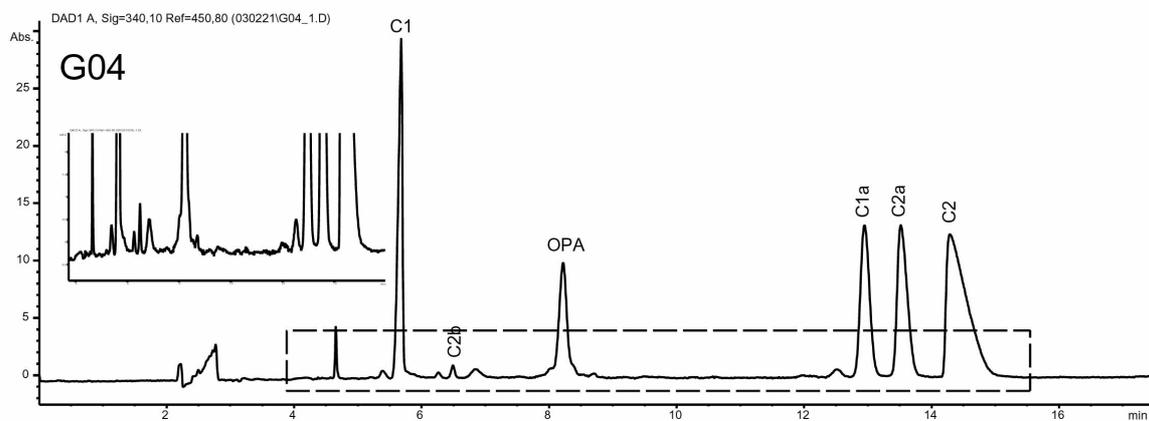
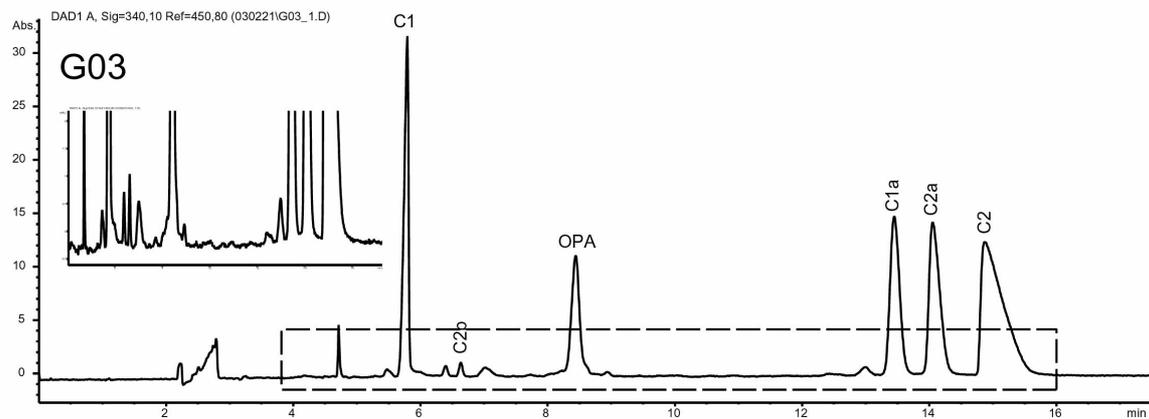
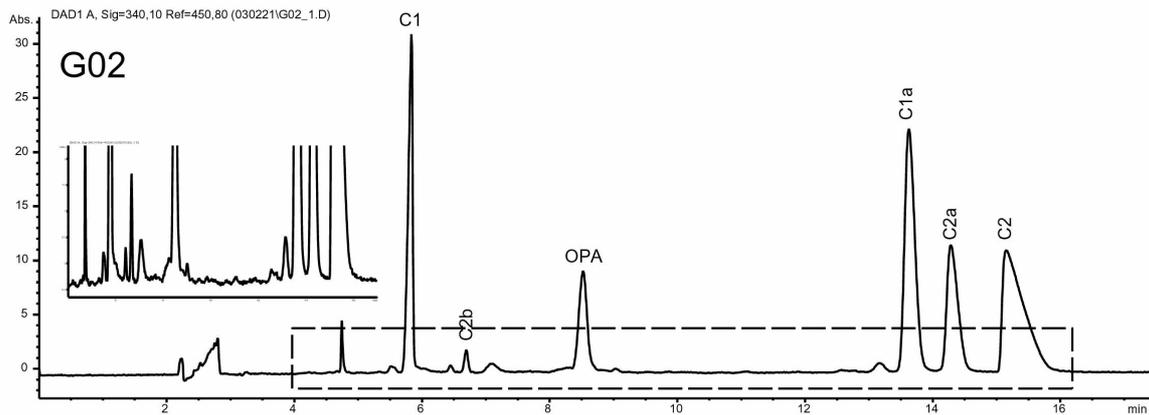
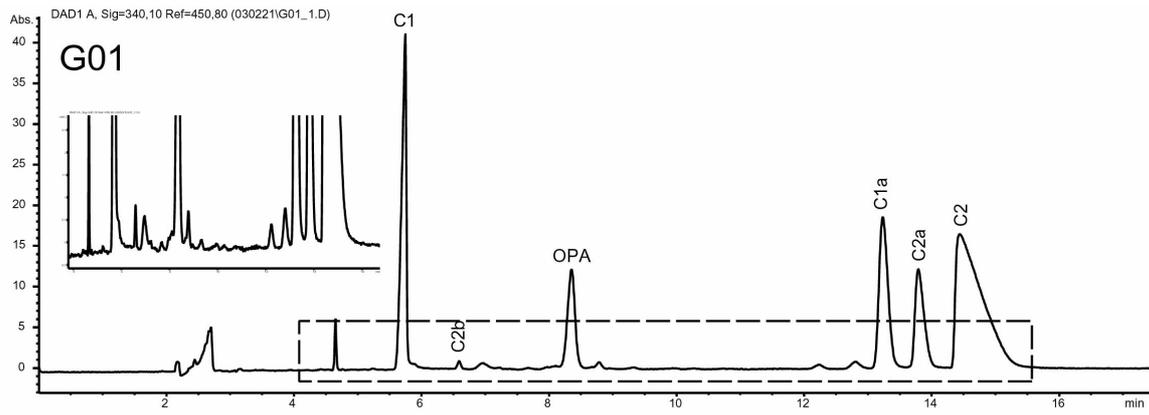


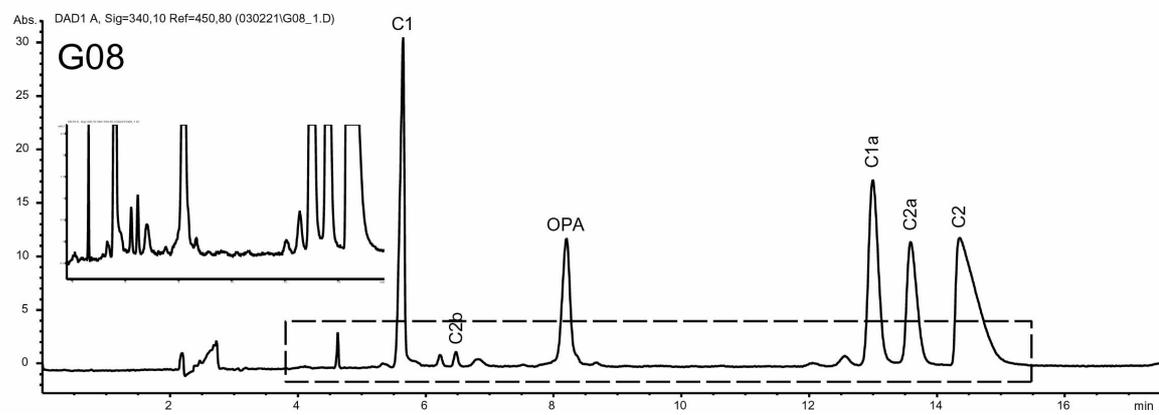
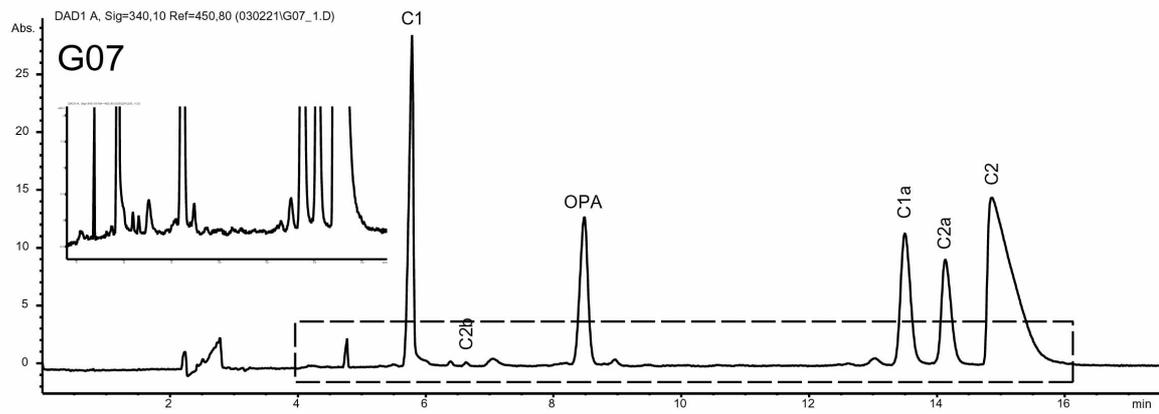
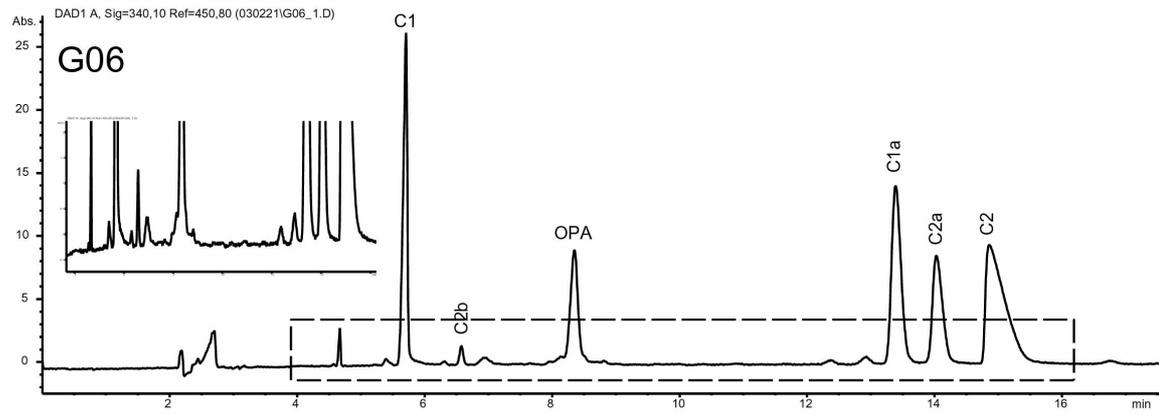
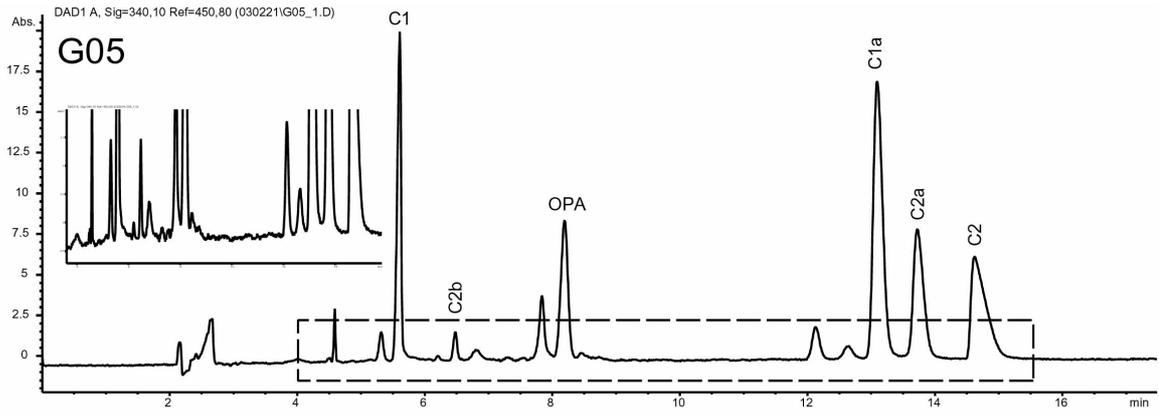


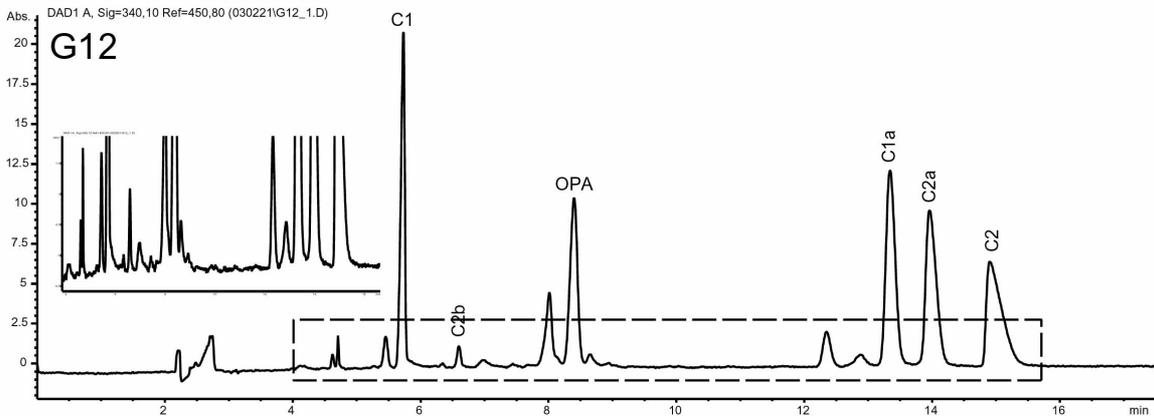
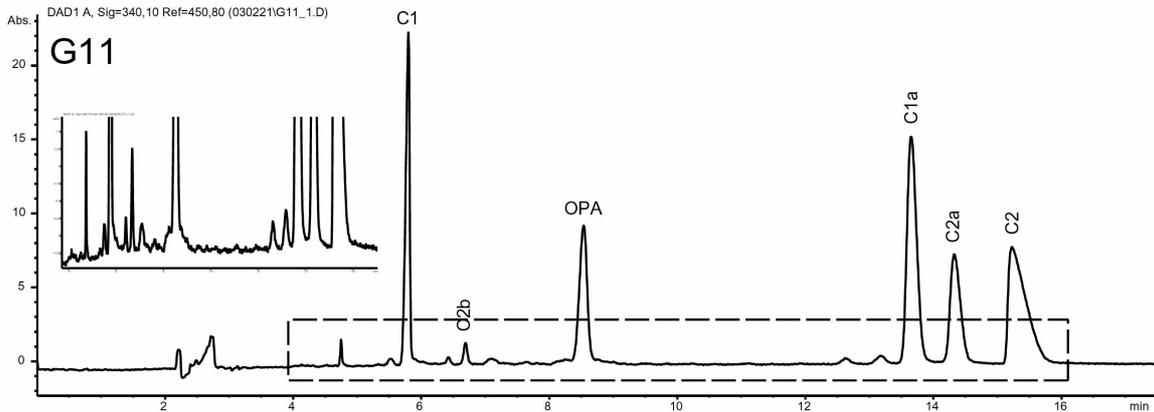
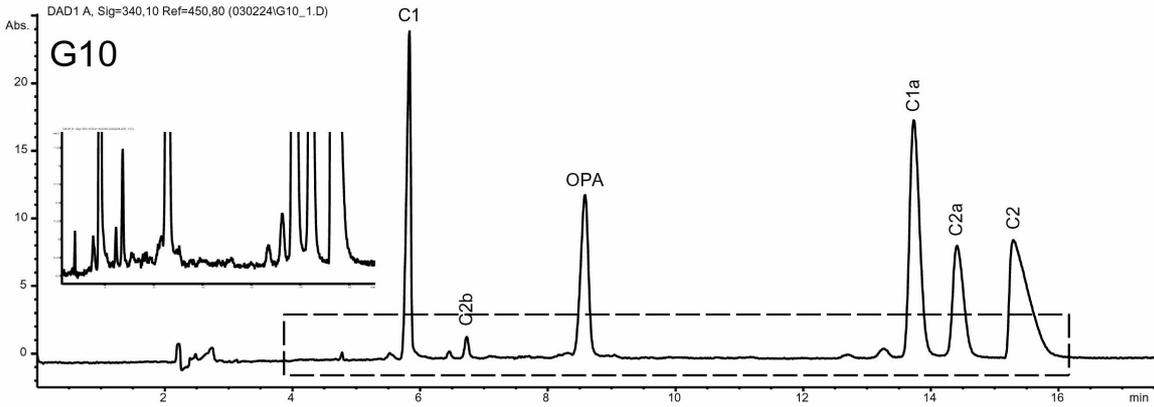
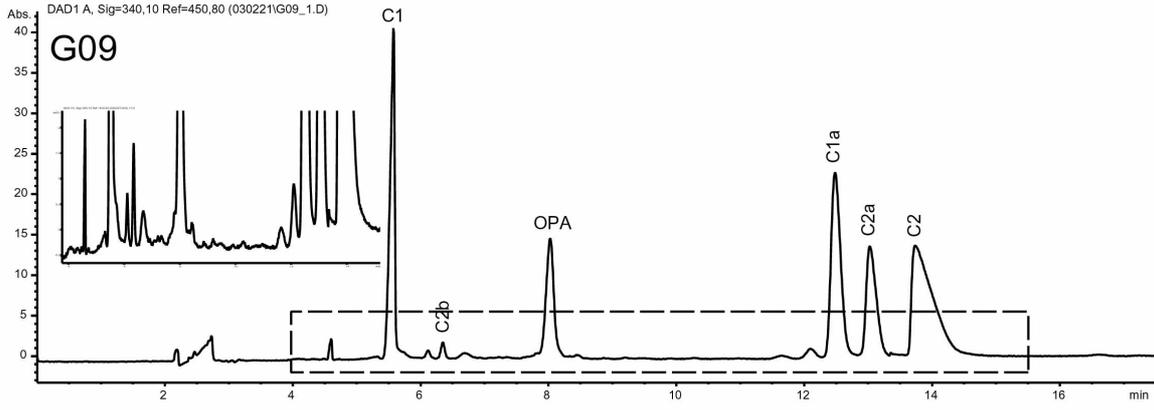


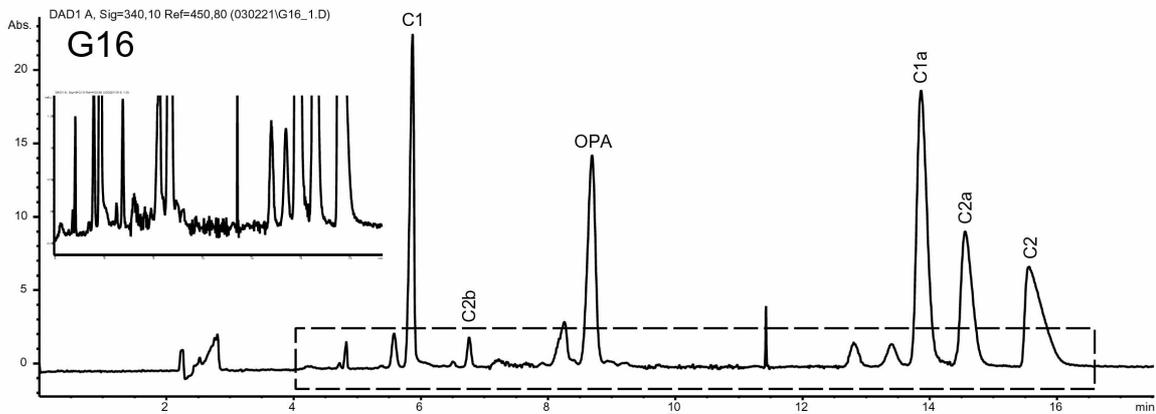
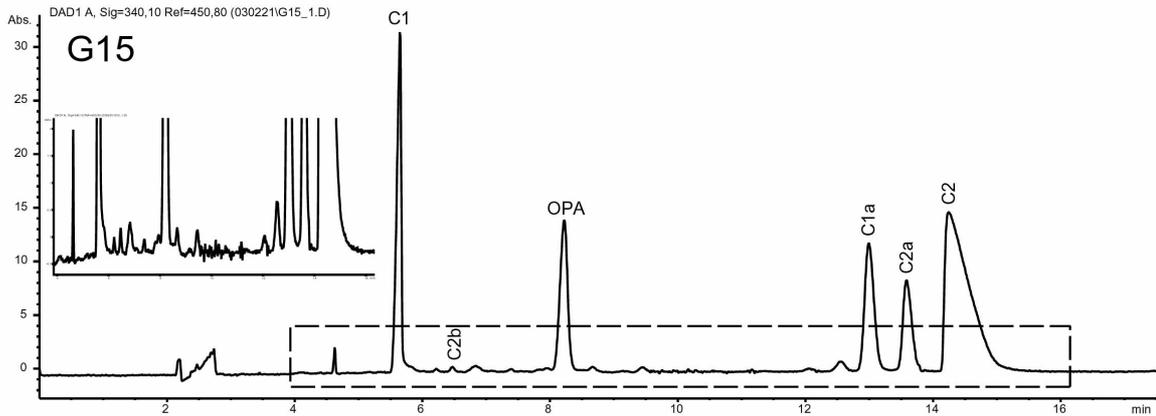
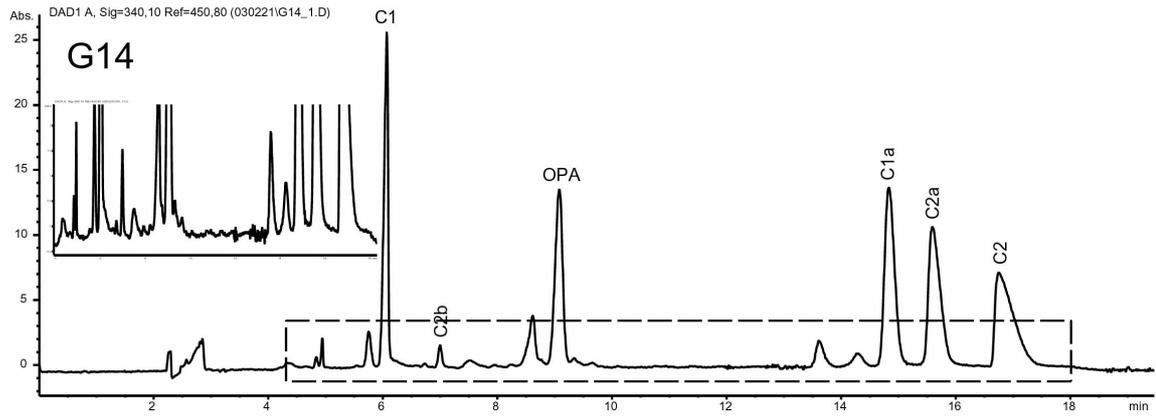
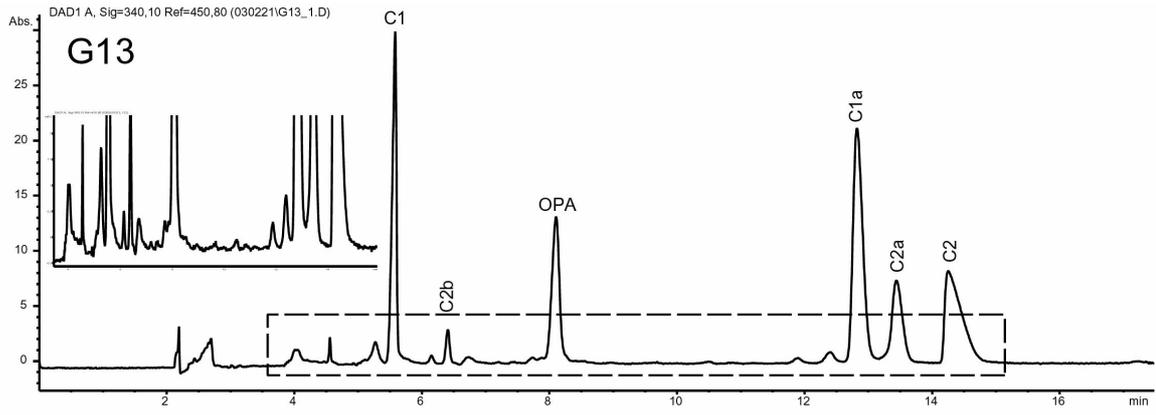
11.3 MEKC-Methode, 12 kV

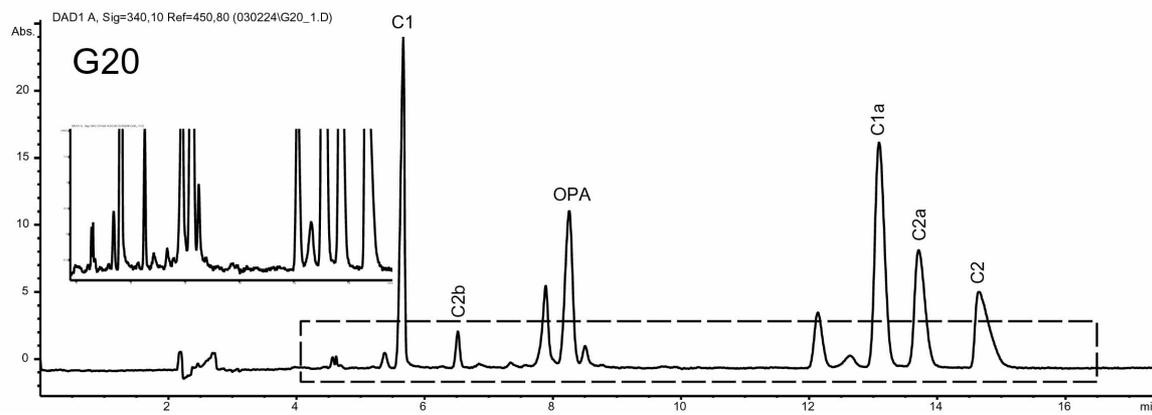
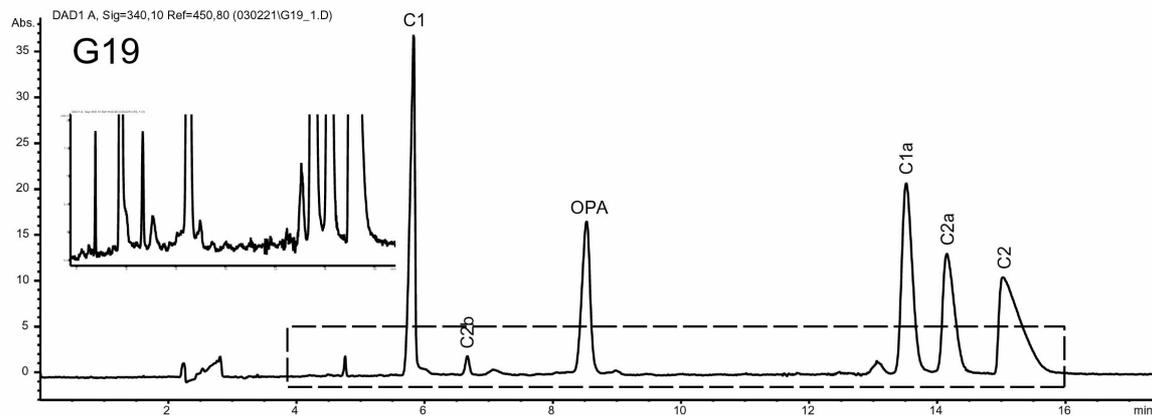
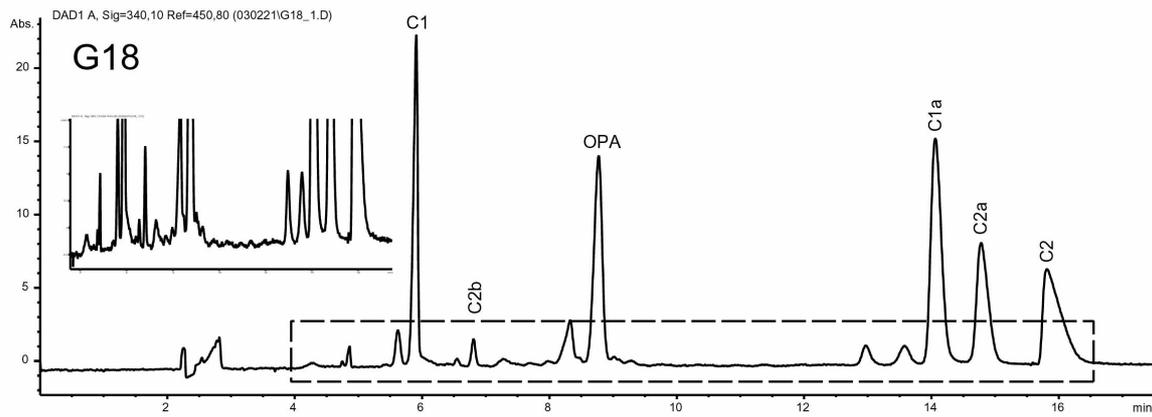
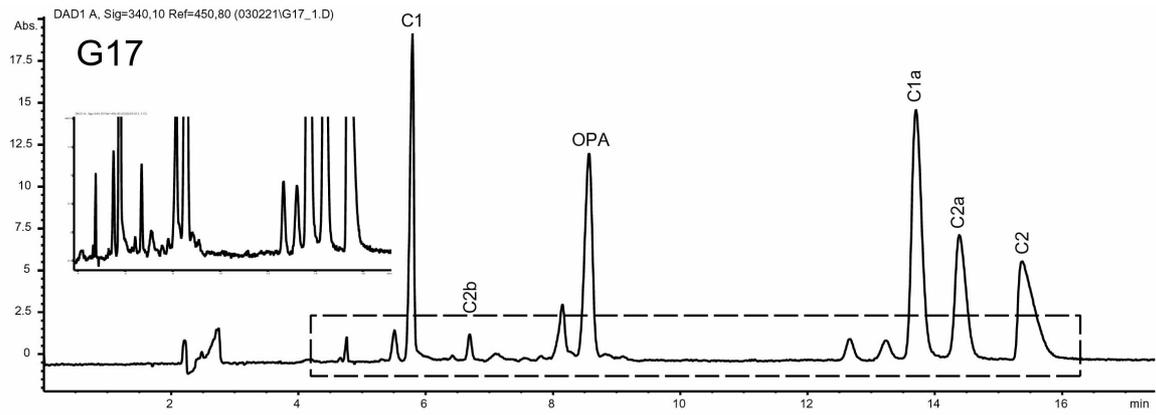
Hier werden alle Elektropherogramme der 56 Gentamicin-Proben gezeigt, die mit der neu entwickelten MEKC-Methode vermessen worden sind. Die darauf folgende Einteilung in Gruppen bestätigte die Einteilung, die mit der CZE-Methode durchgeführt wurde.

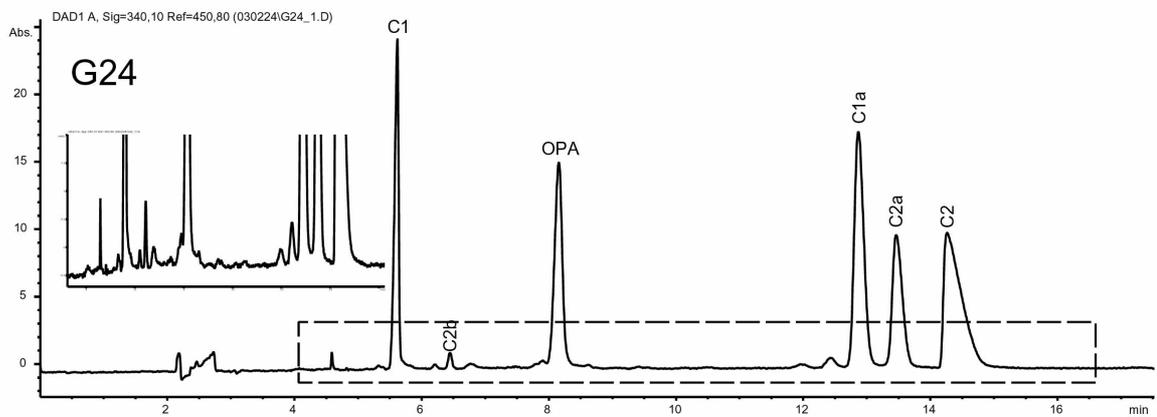
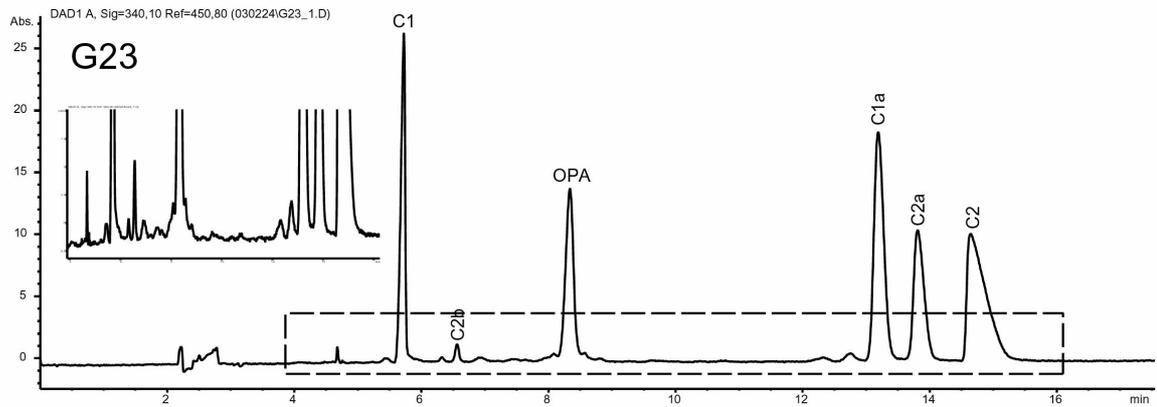
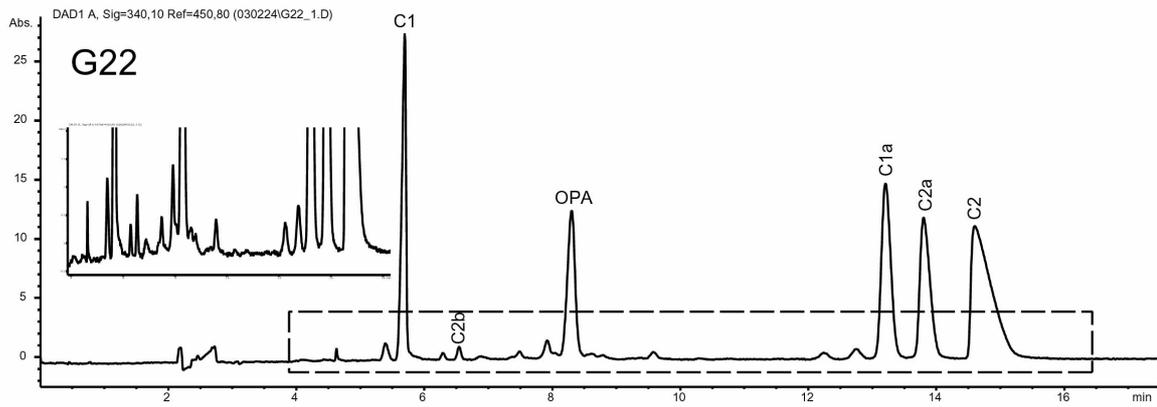
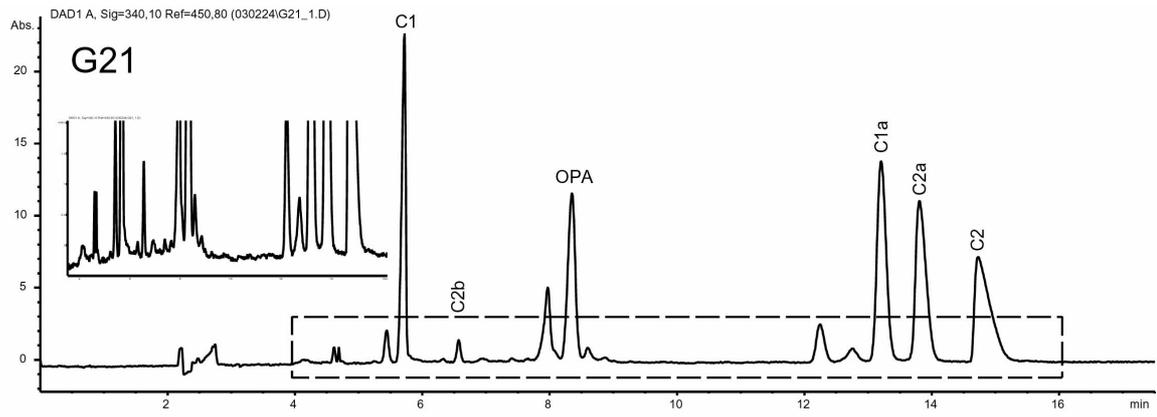


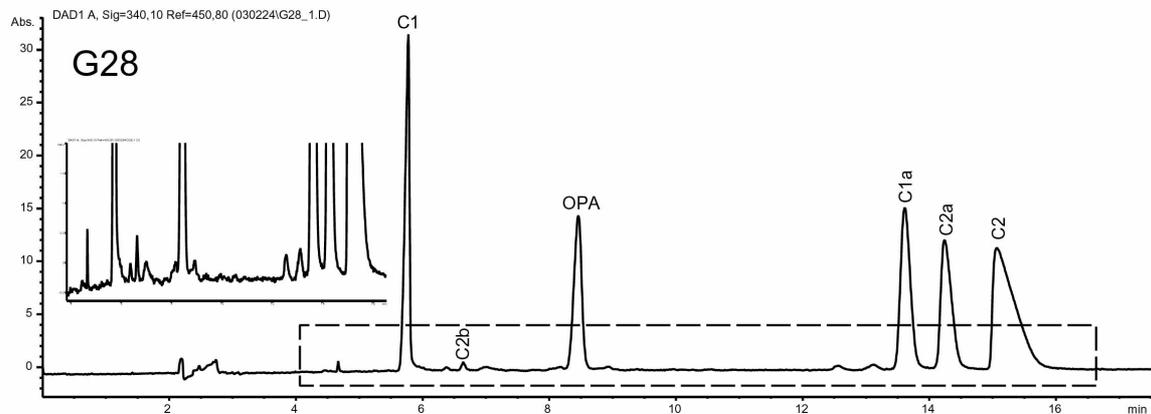
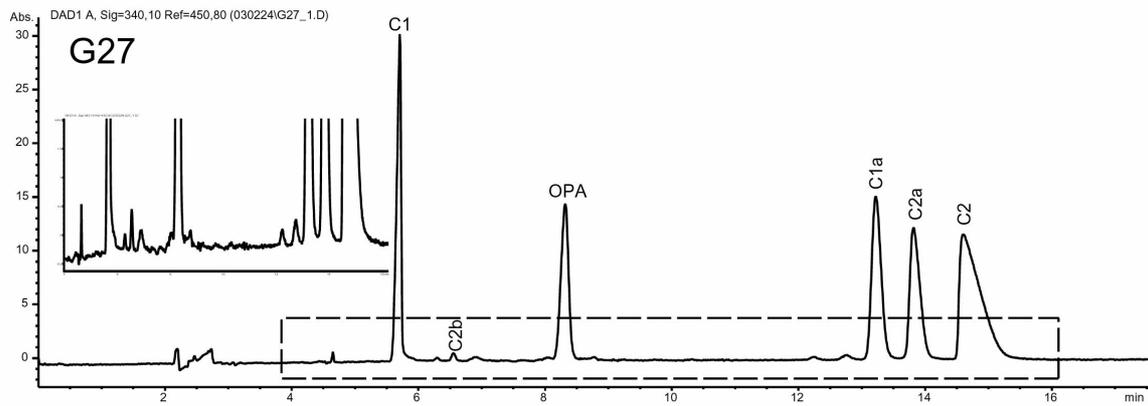
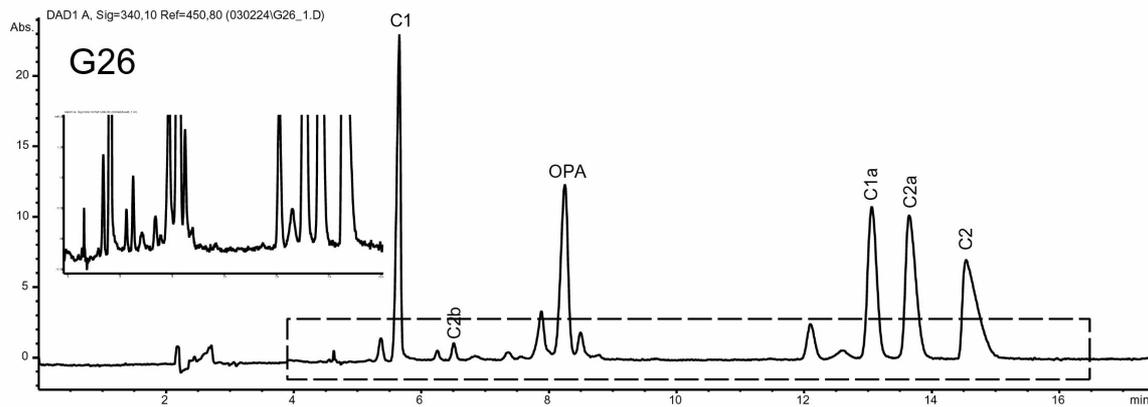
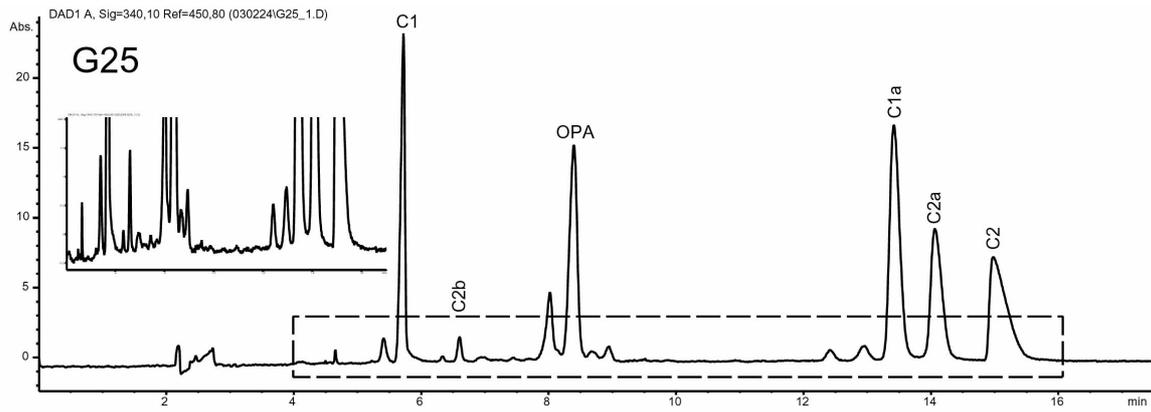


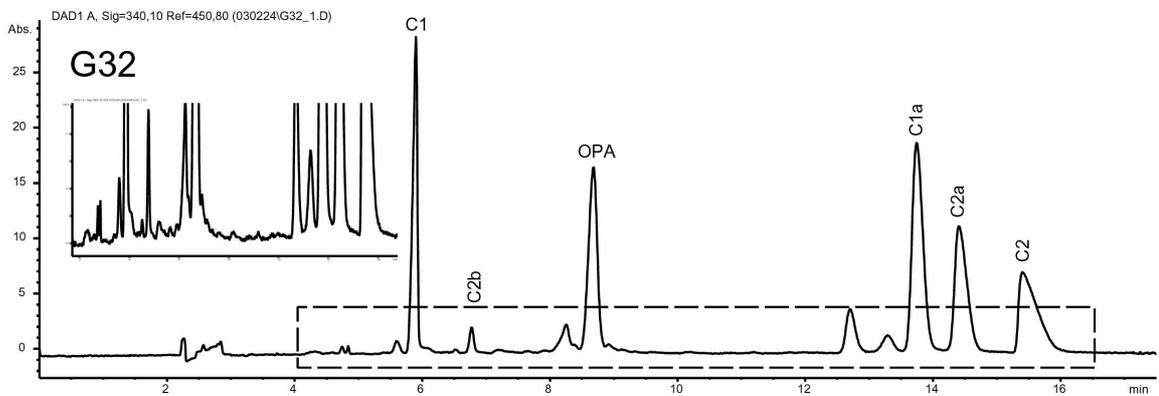
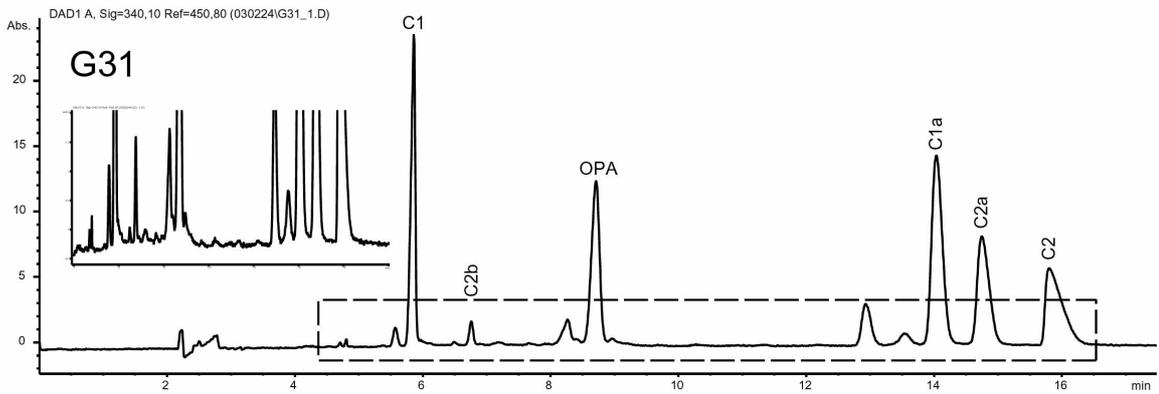
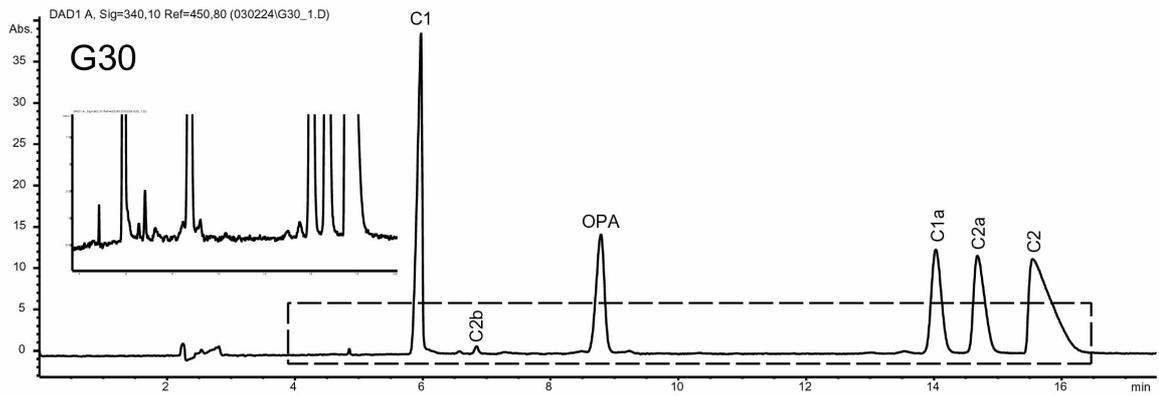
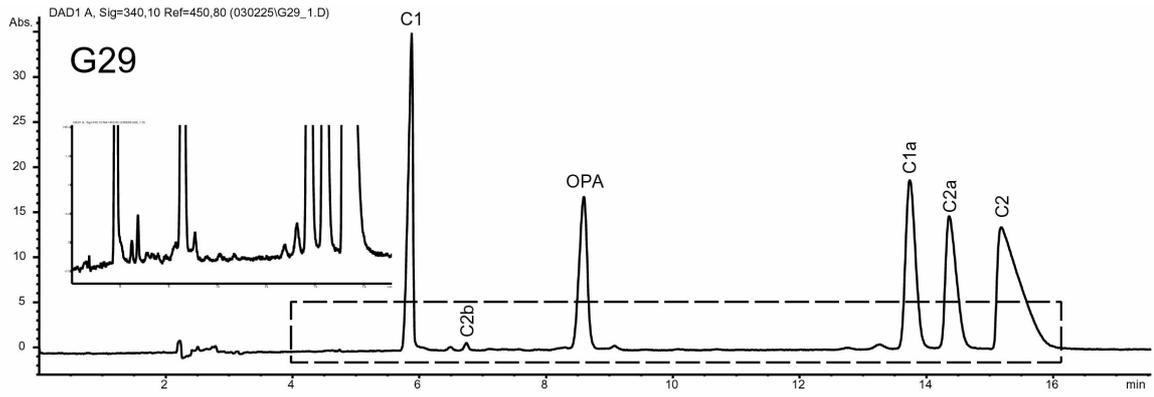


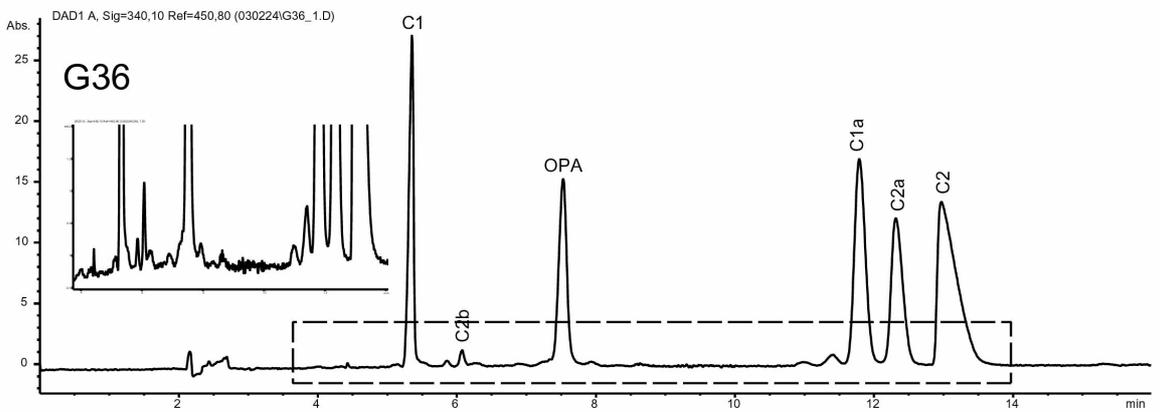
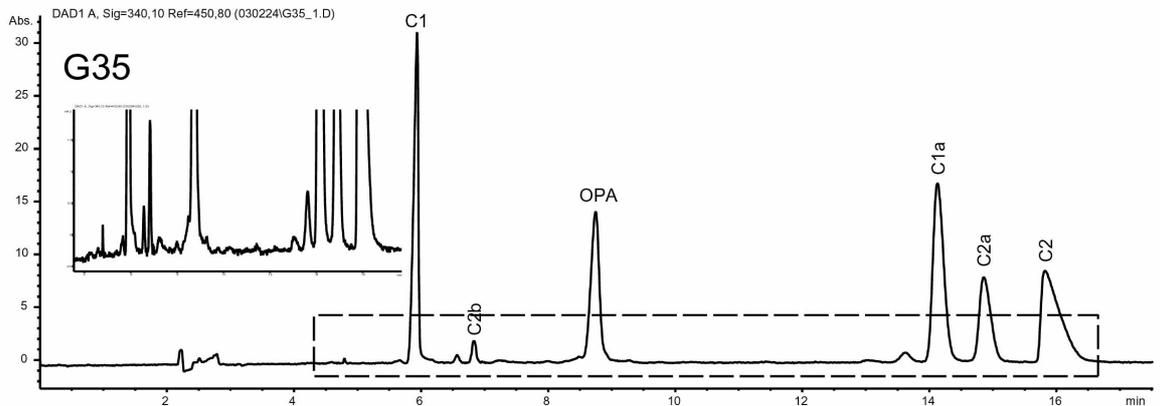
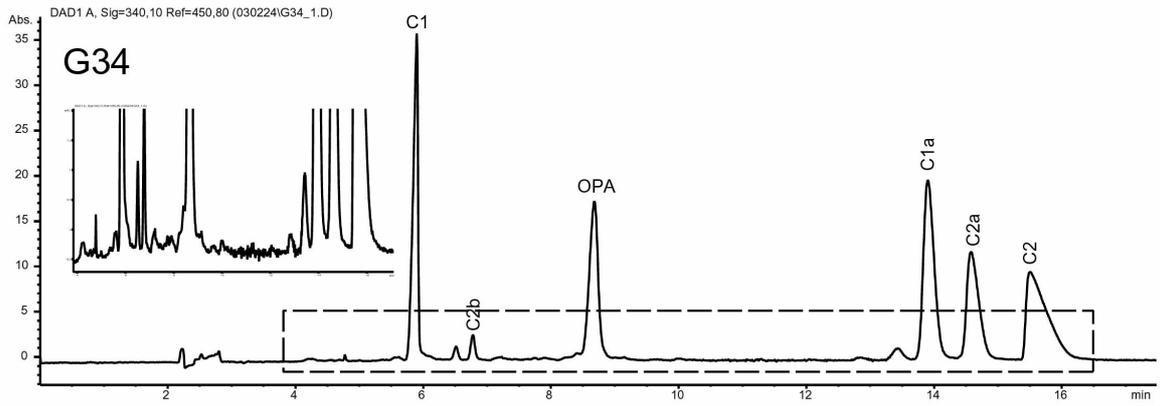
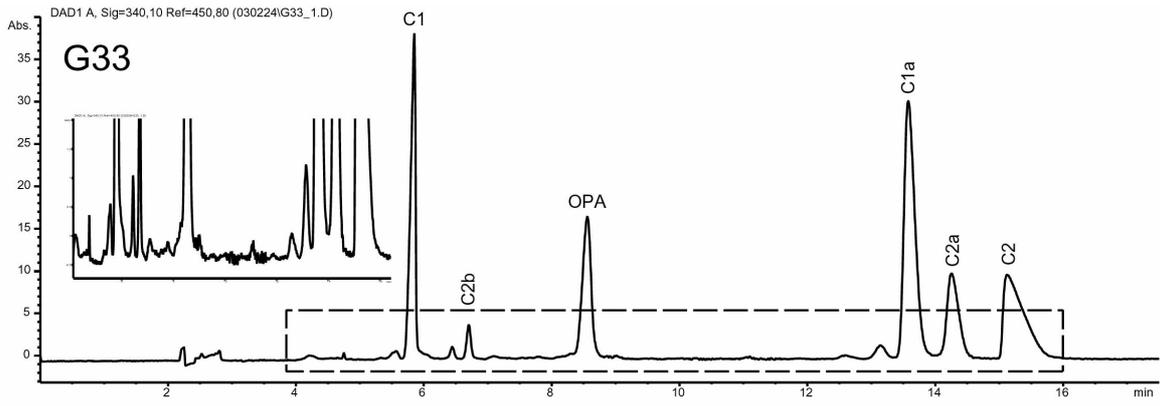


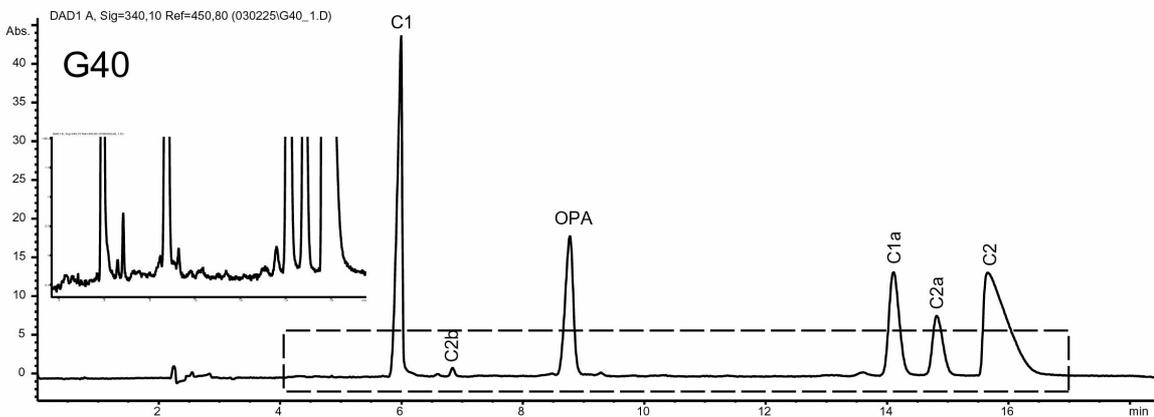
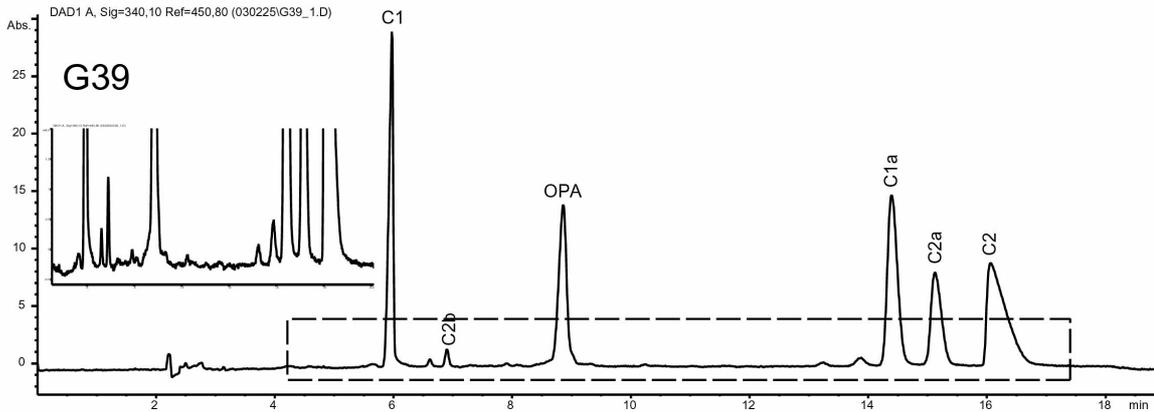
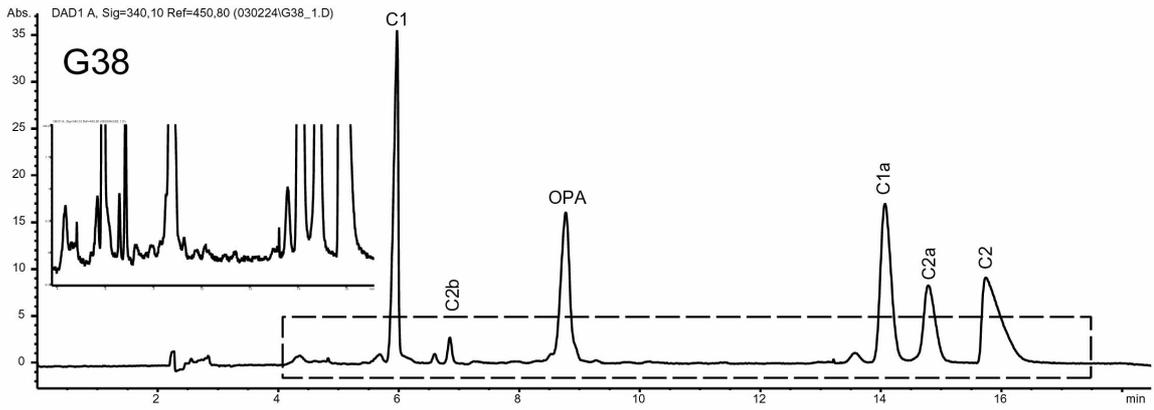
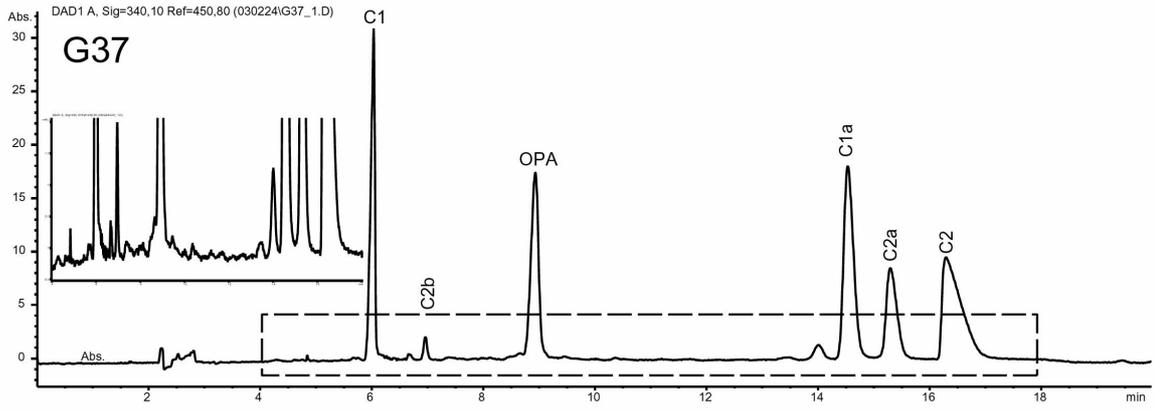


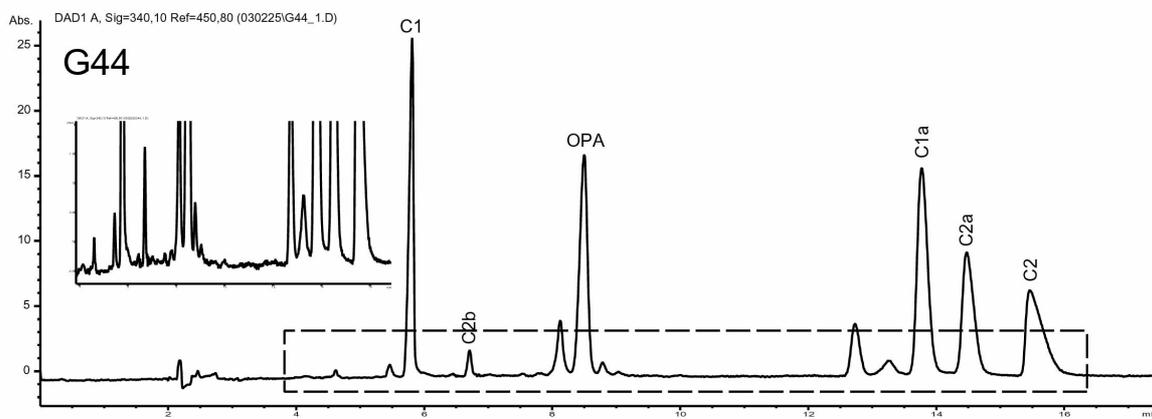
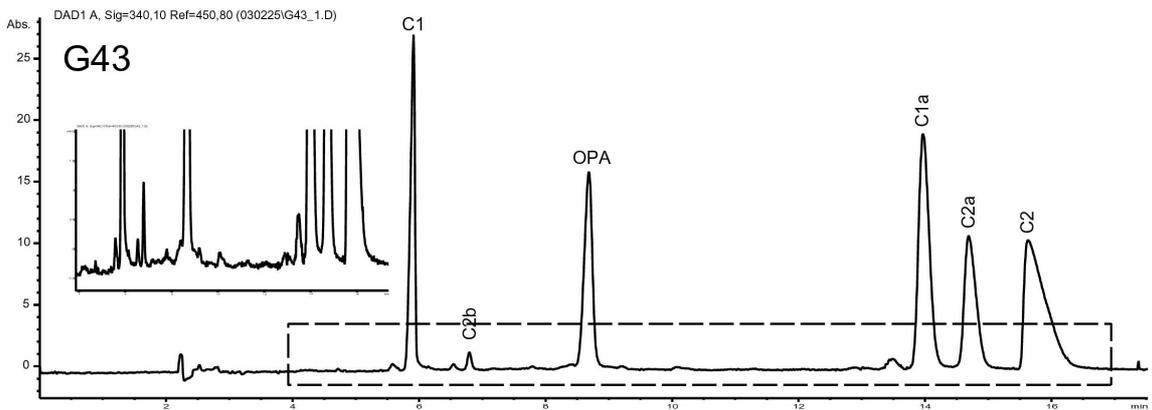
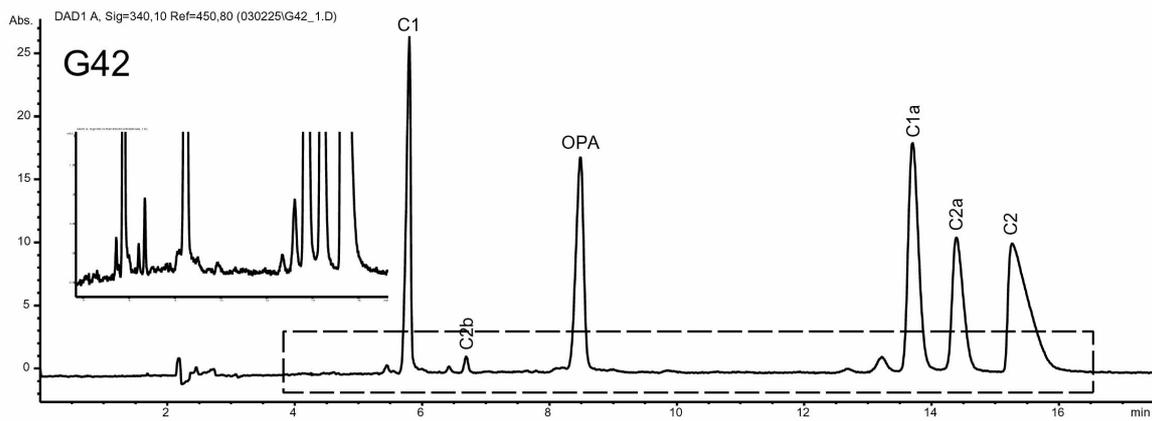
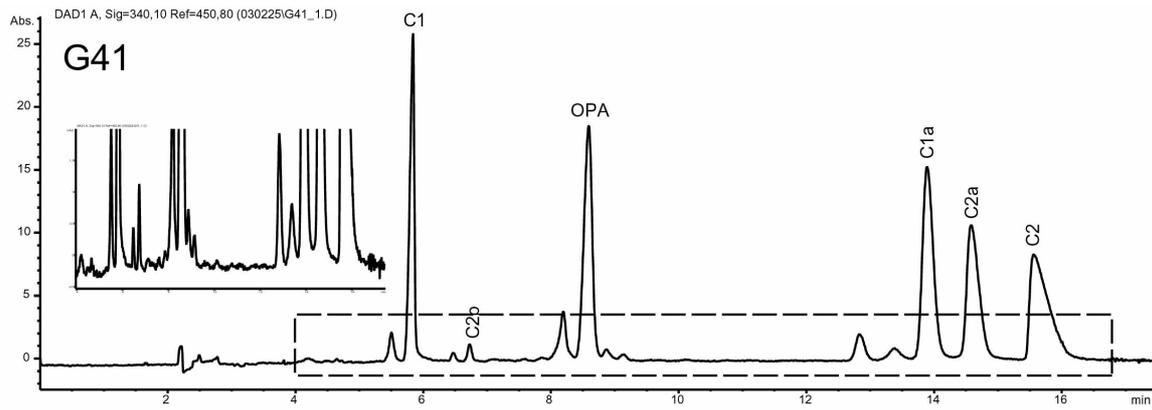


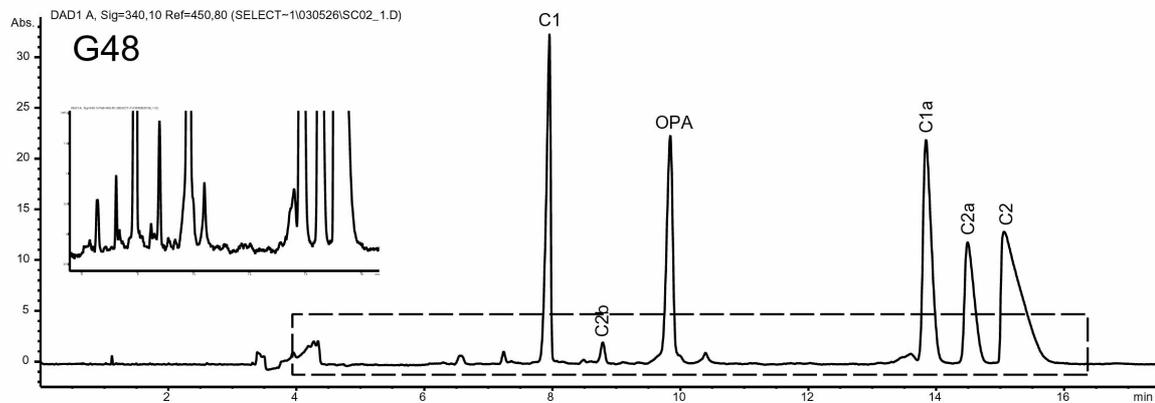
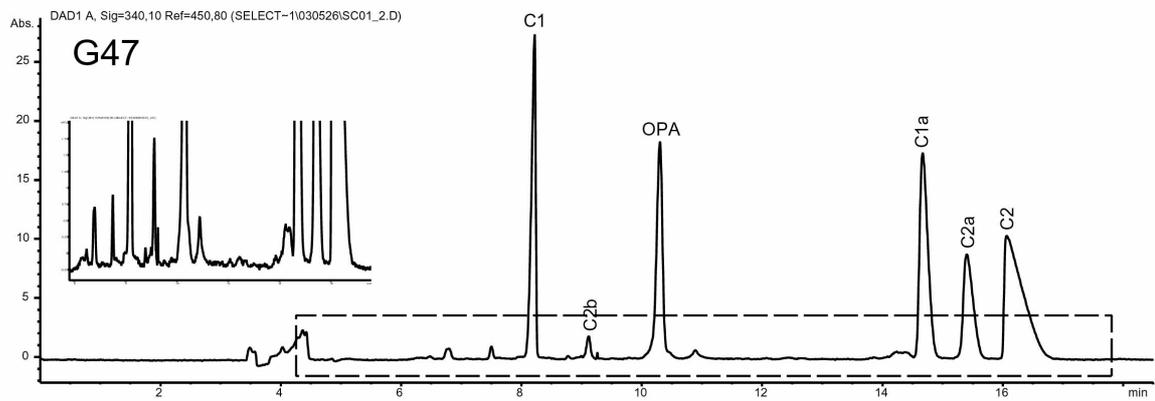
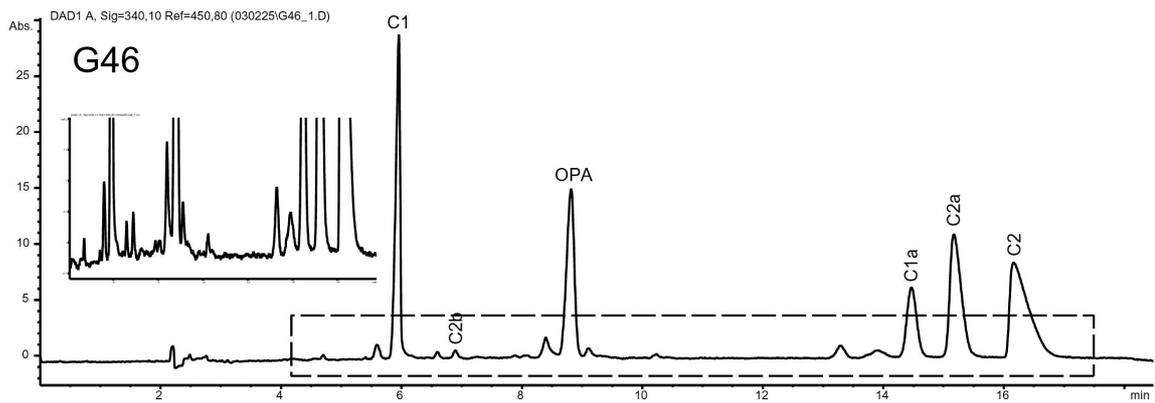
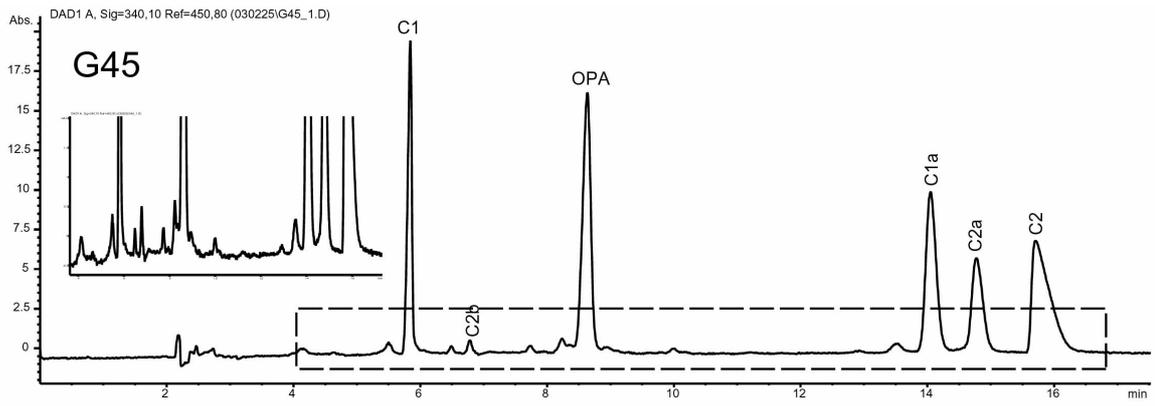


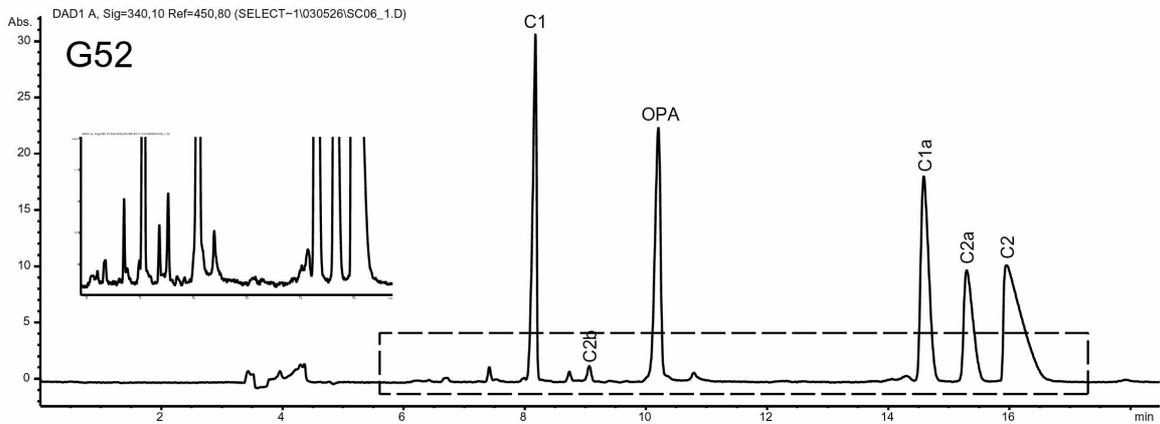
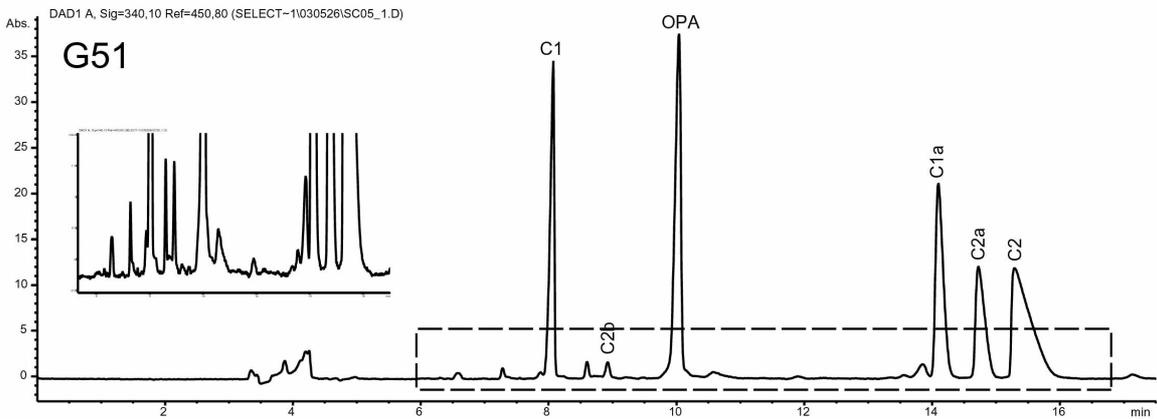
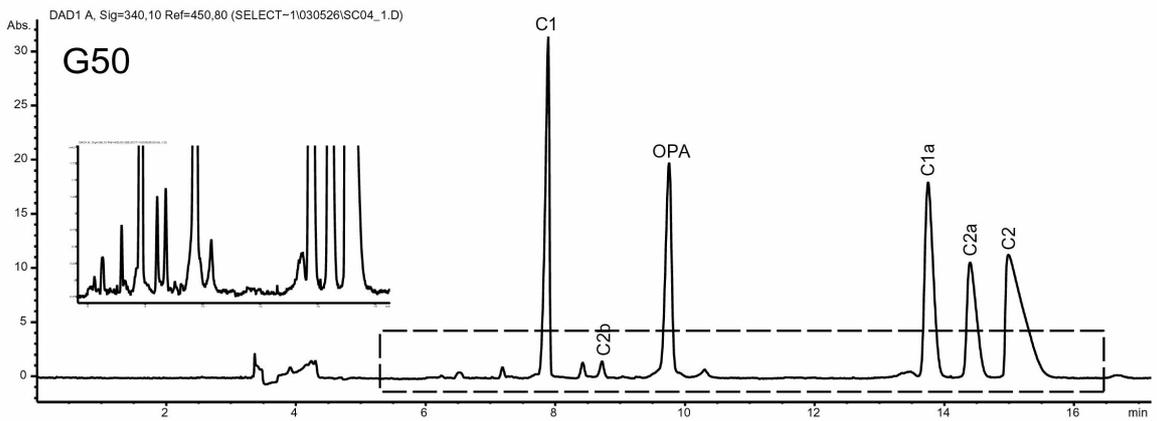
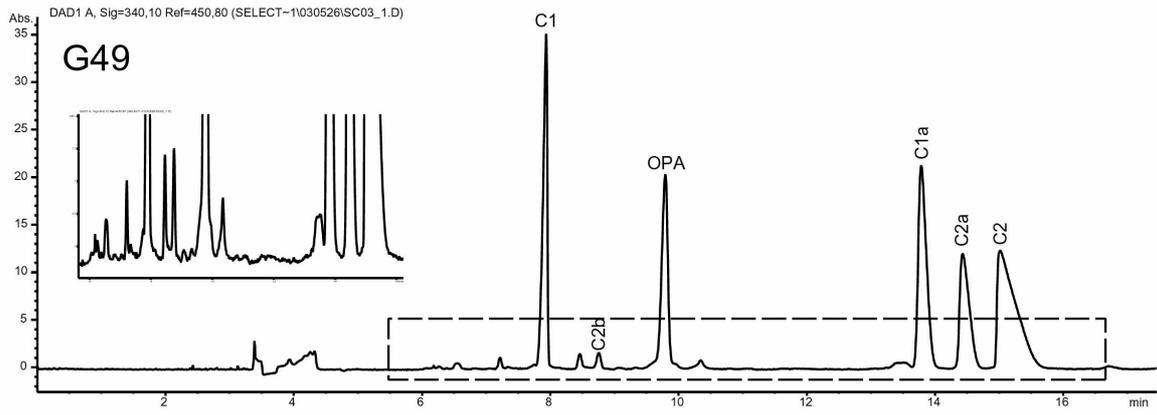


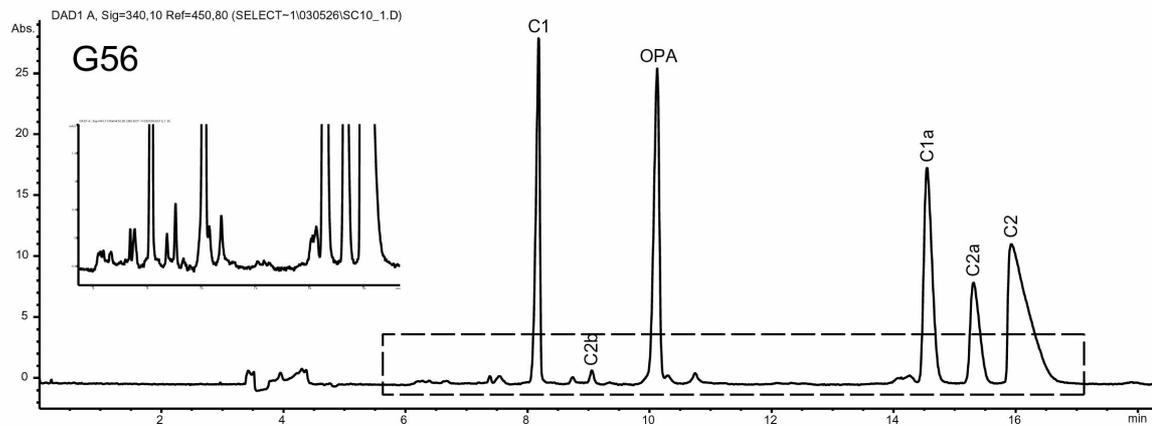
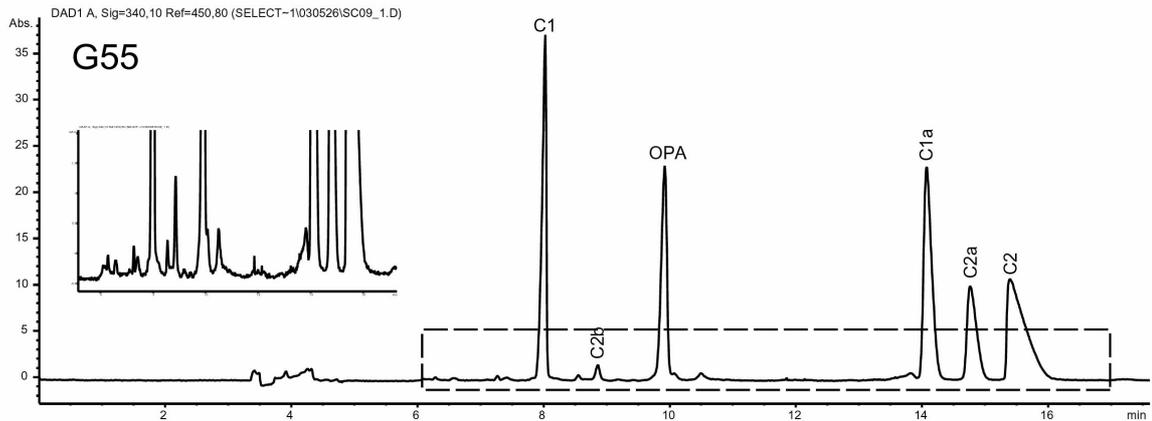
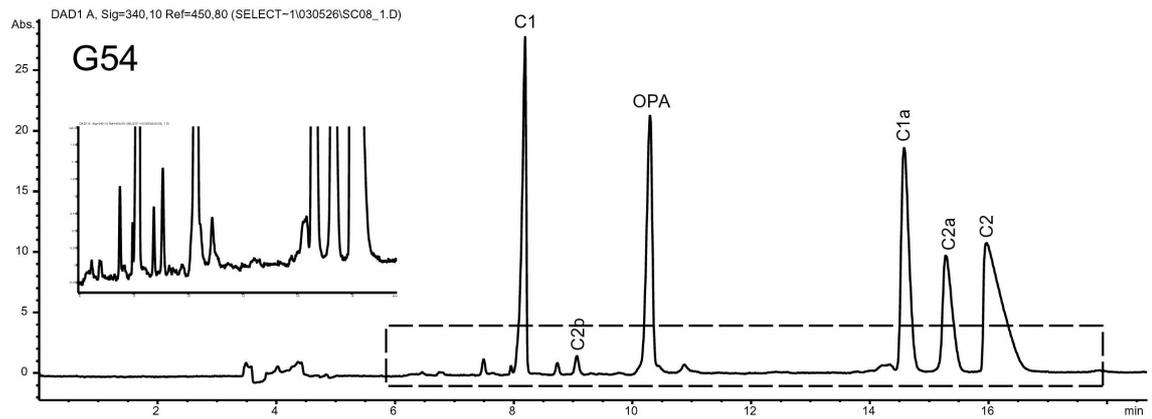
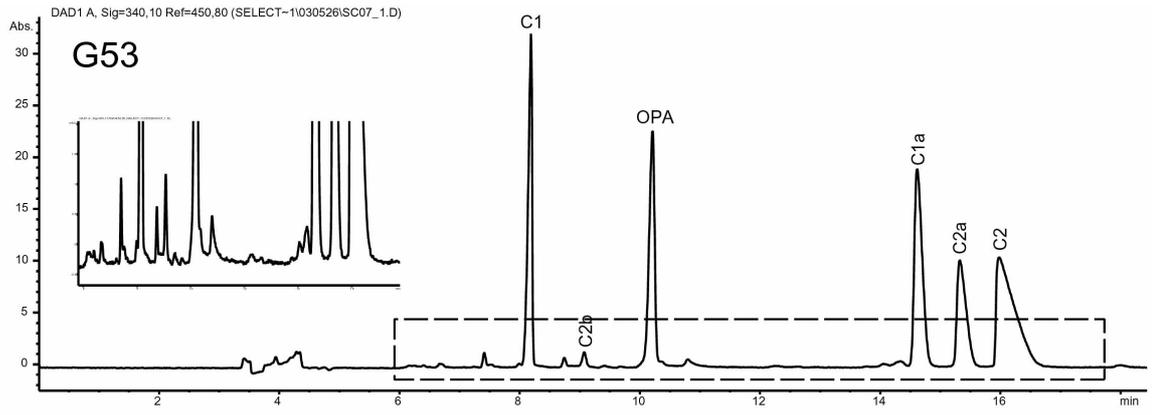






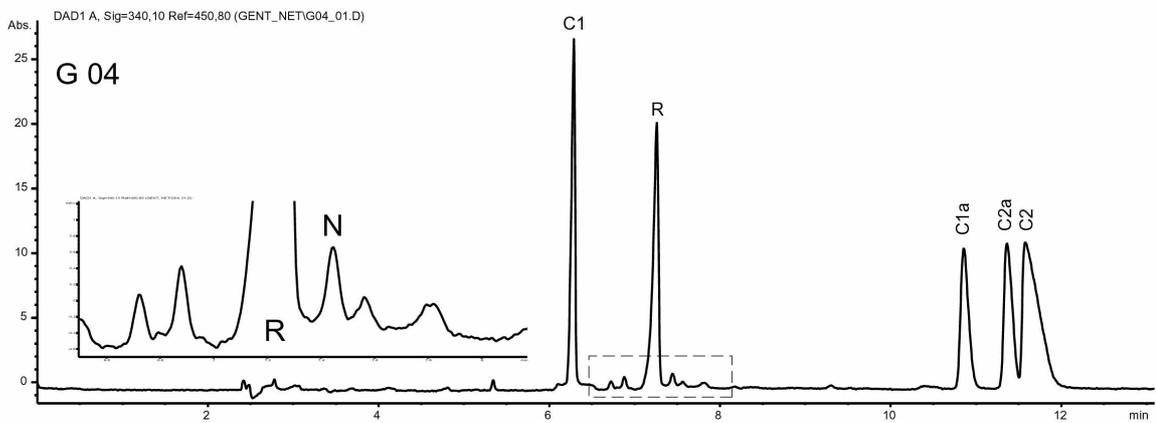
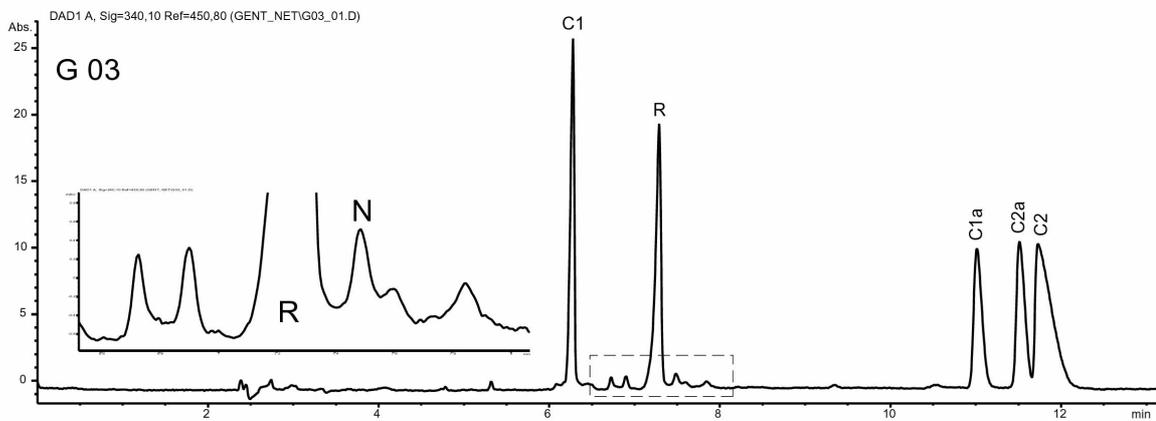
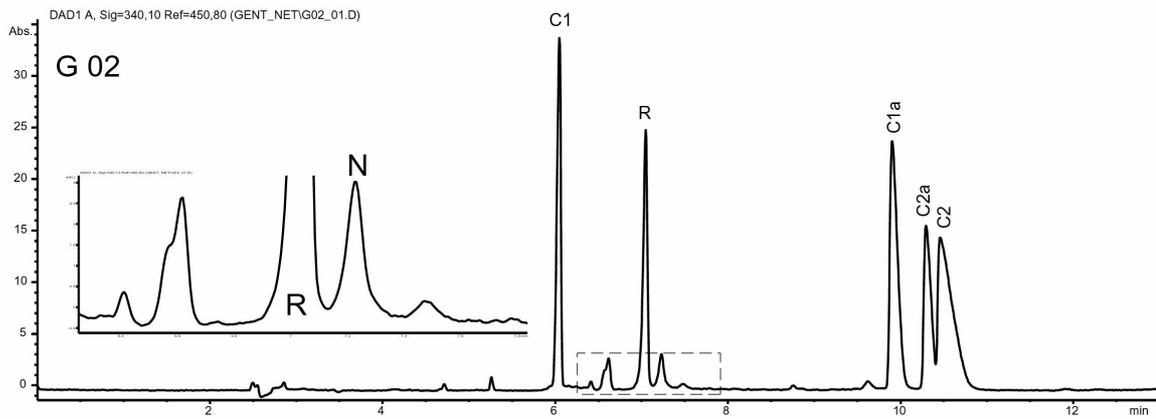
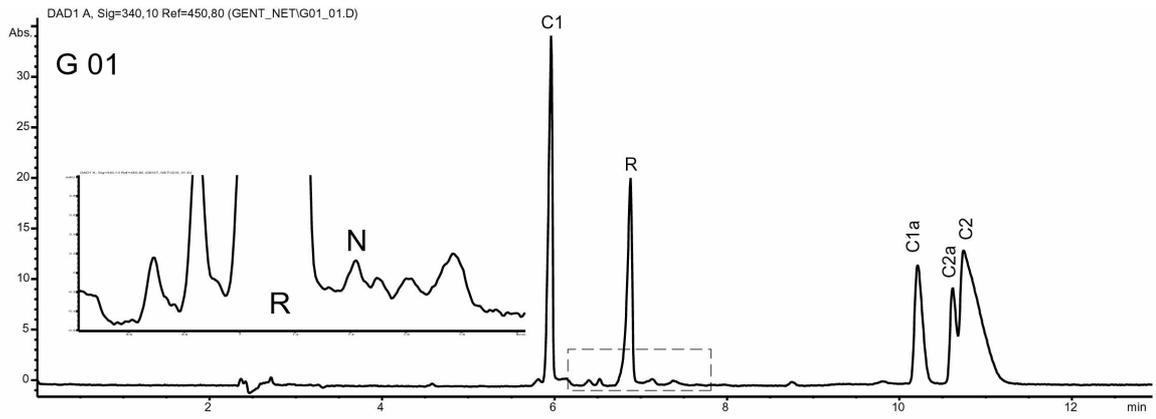


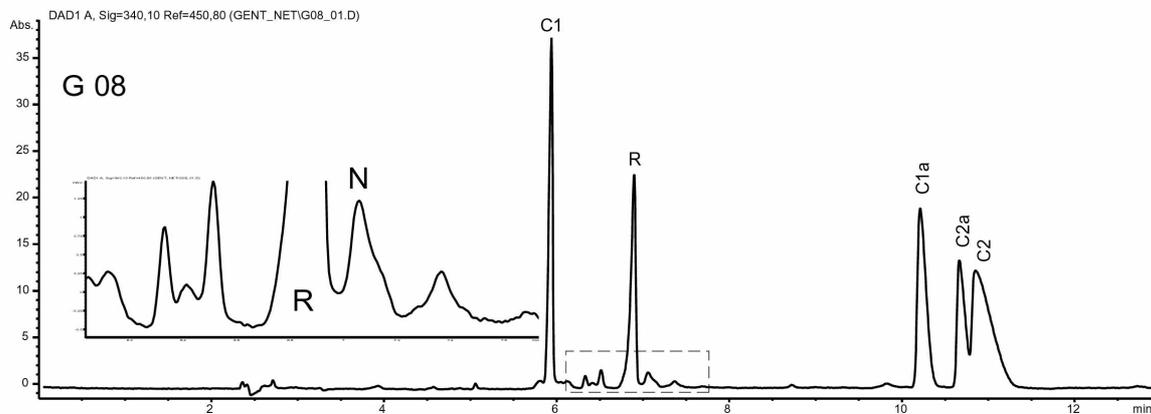
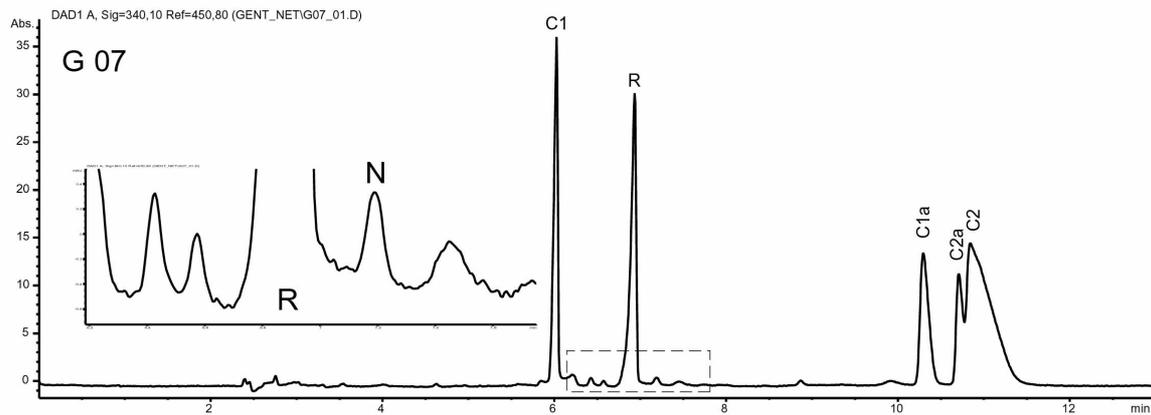
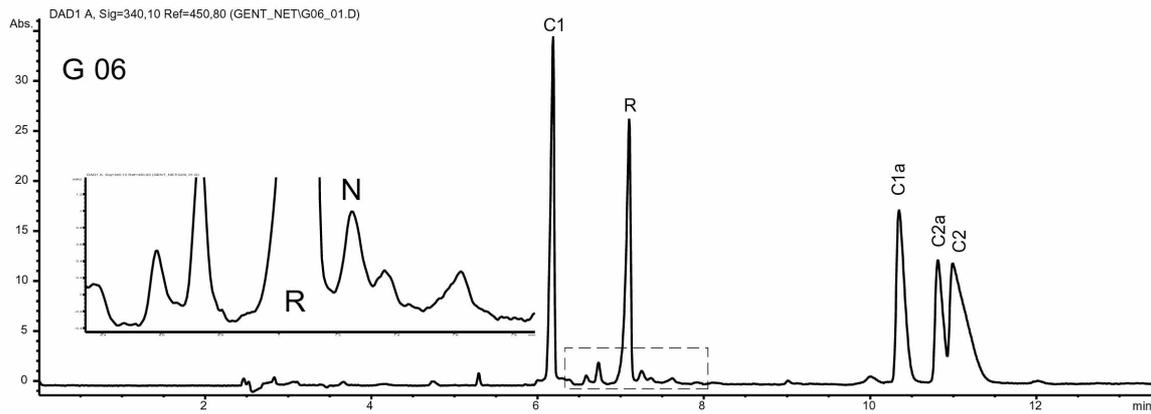
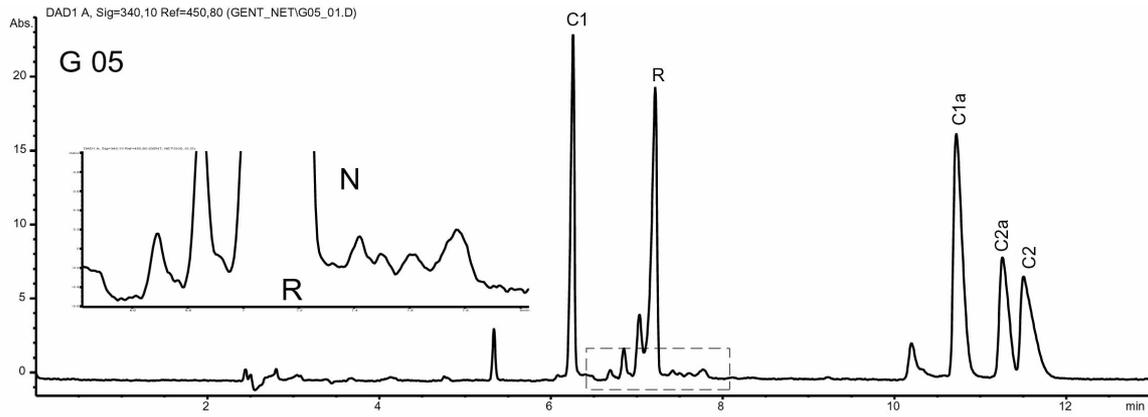


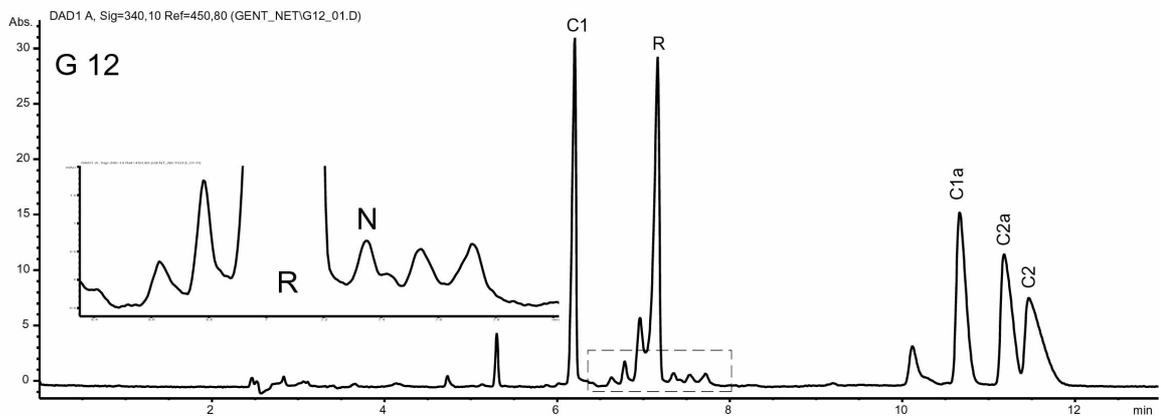
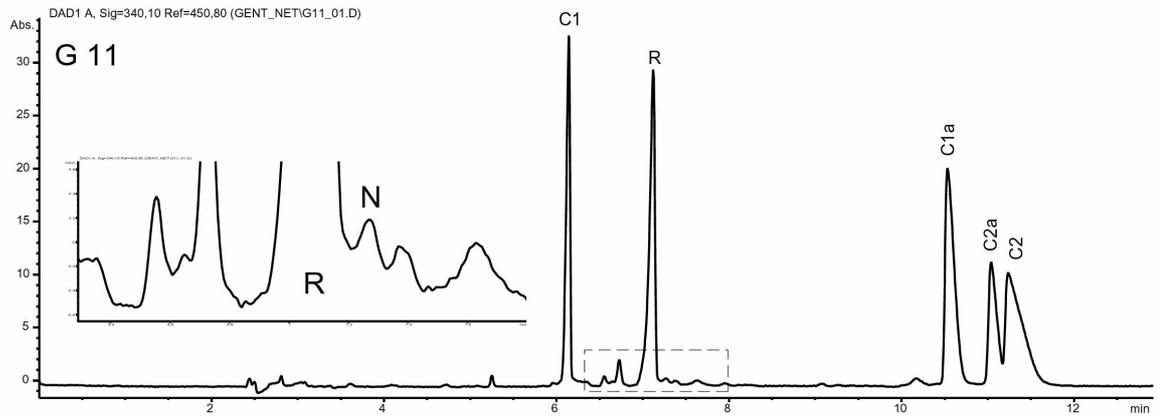
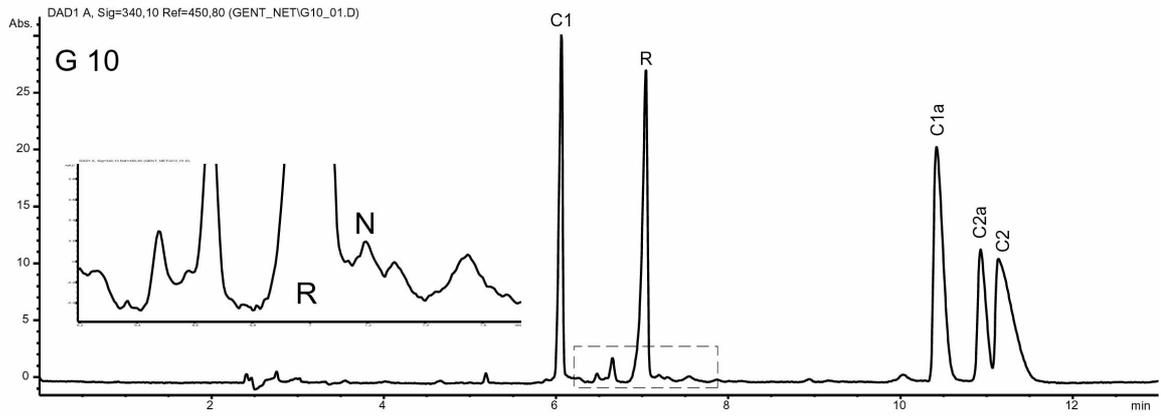
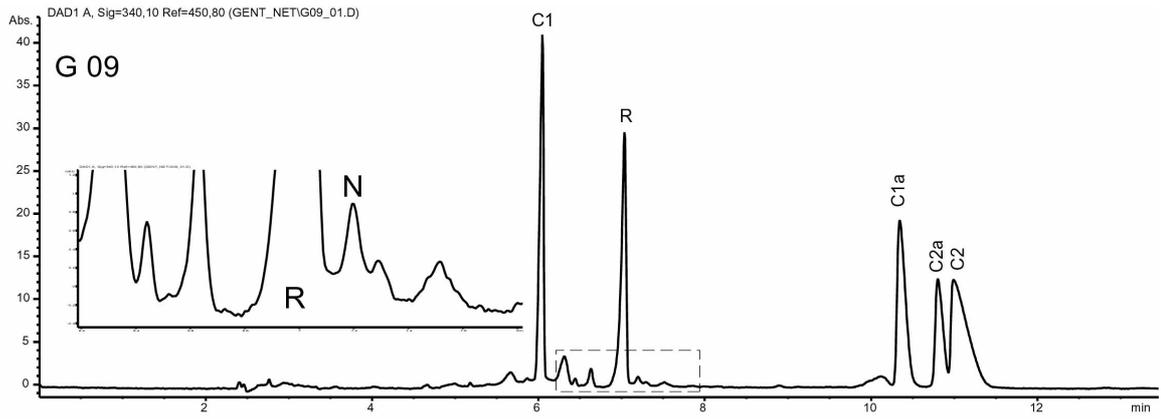


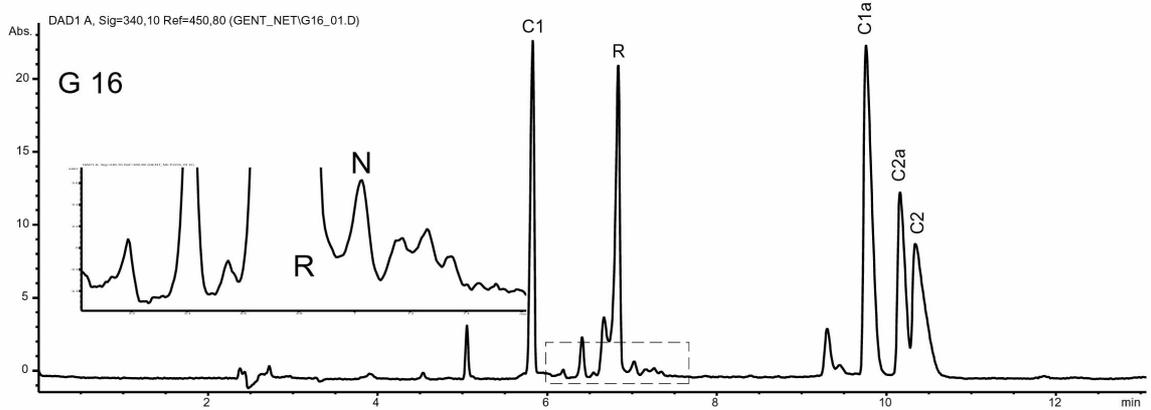
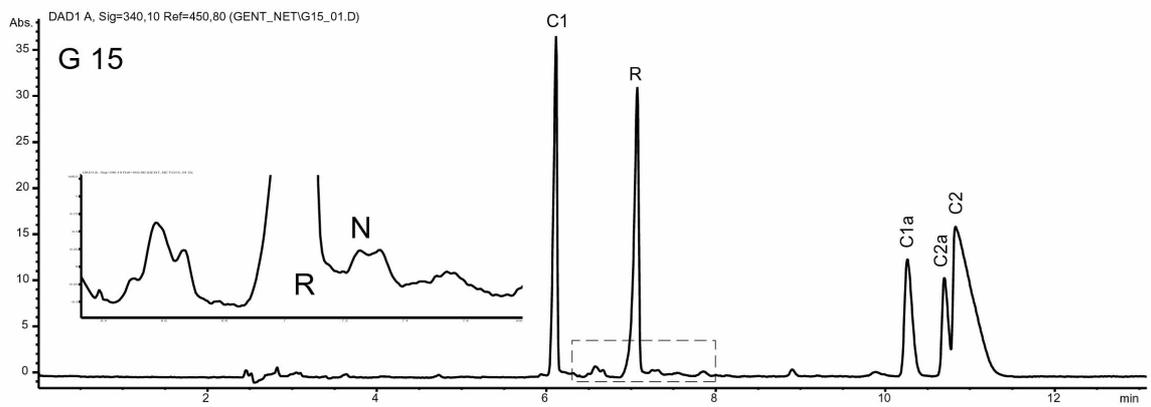
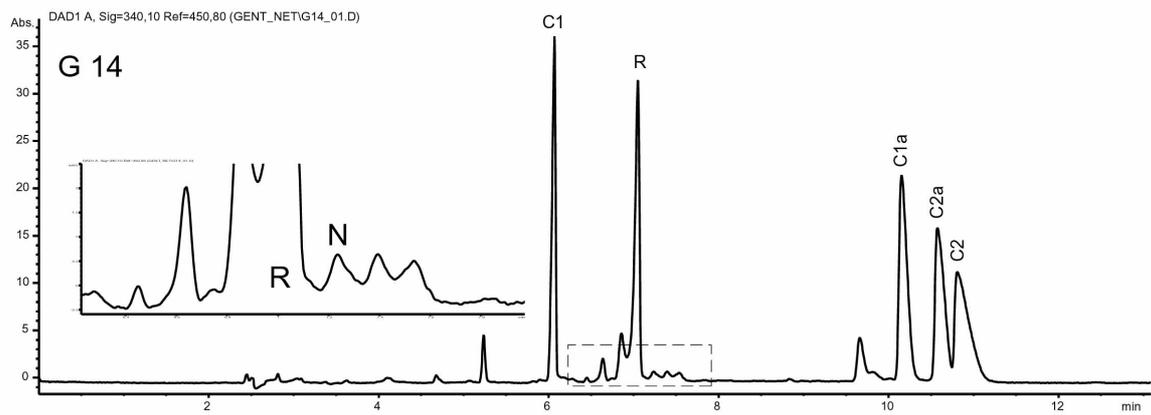
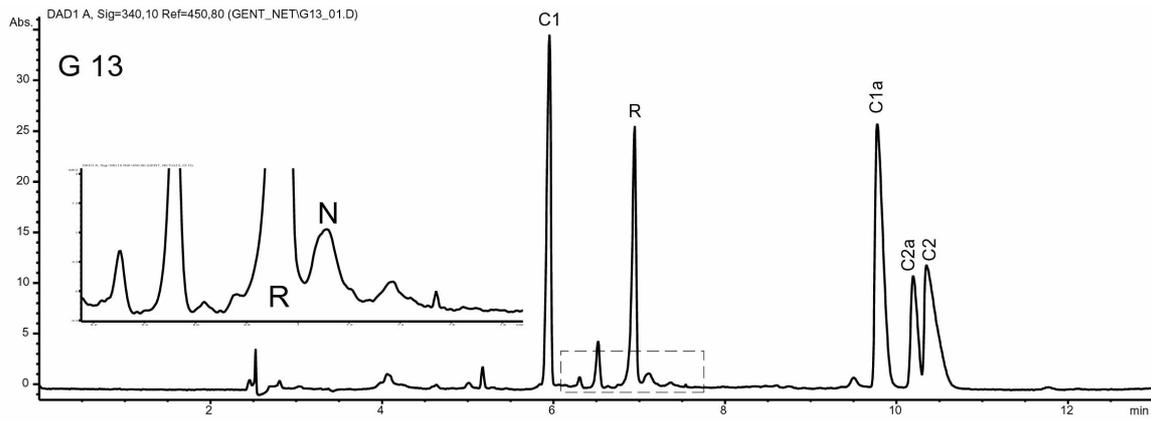
11.4 MEKC-Methode, 14 kV

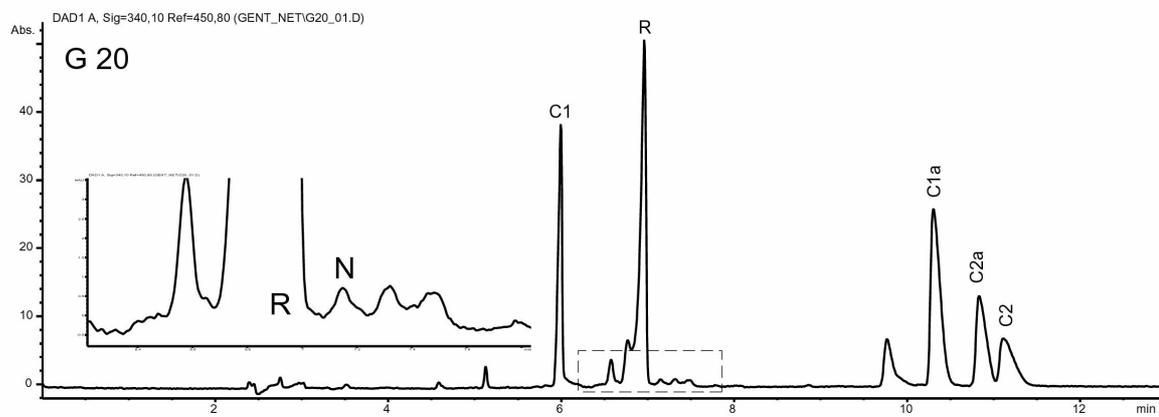
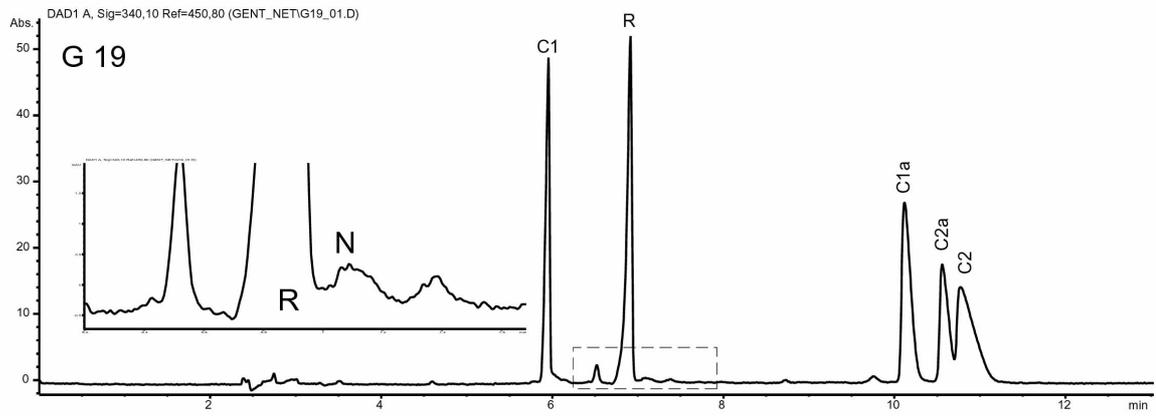
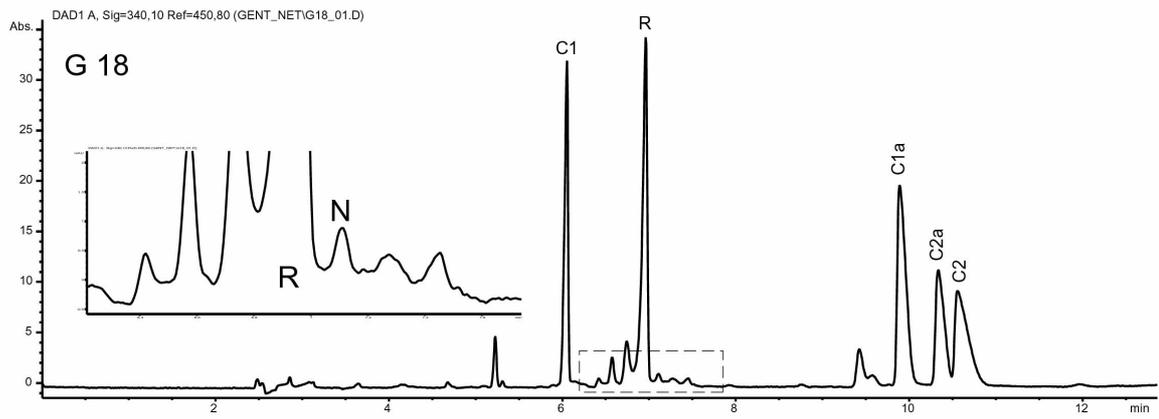
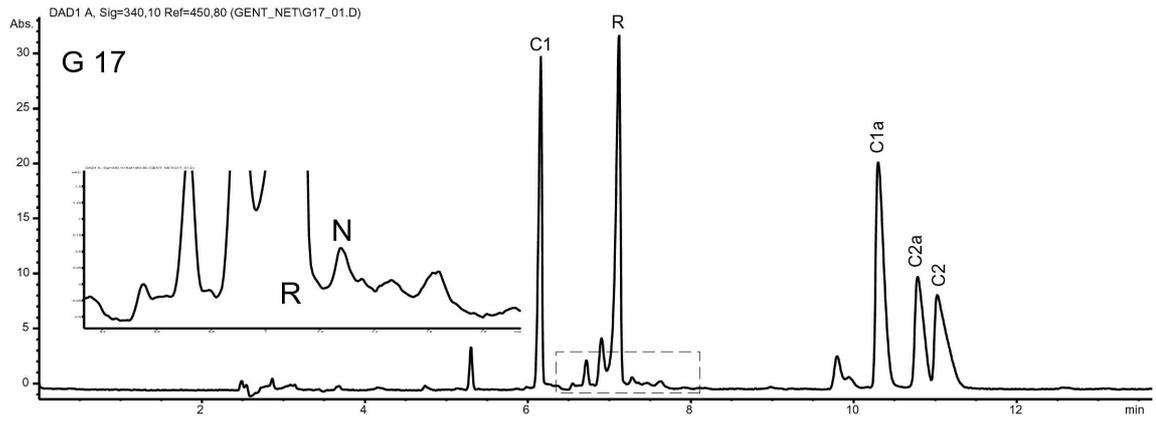
Hier sind alle Elektropherogramme der 56 Gentamicin-Proben wiedergegeben, die mit der abgewandelten MEKC-Methode vermessen wurden. Die Abwandlung bestand darin, dass nicht mit 12 kV sondern mit 14 kV vermessen wurde. Diese Änderung lies den Netilmicin-Peak aus dem OPA-Peak treten. Somit konnte getestet werden, ob in der Probe Netilmicin vorhanden war.

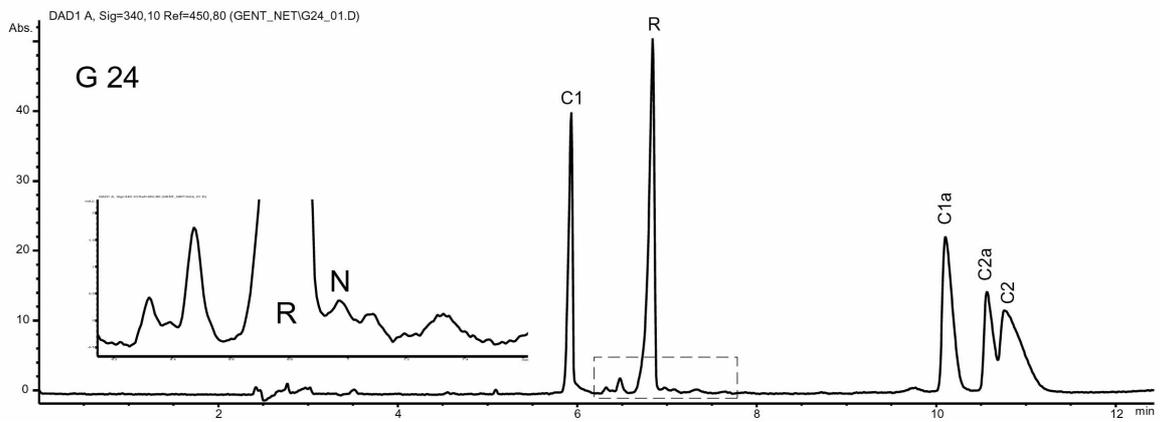
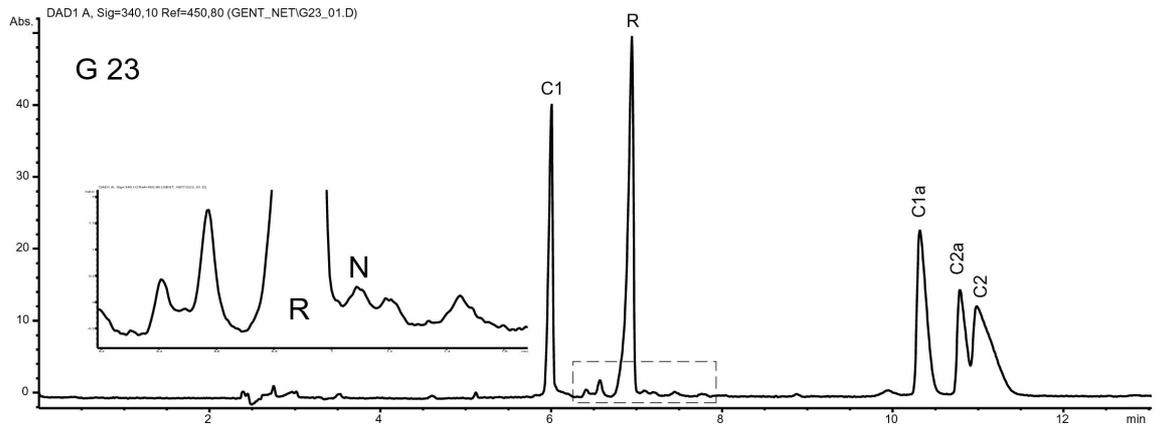
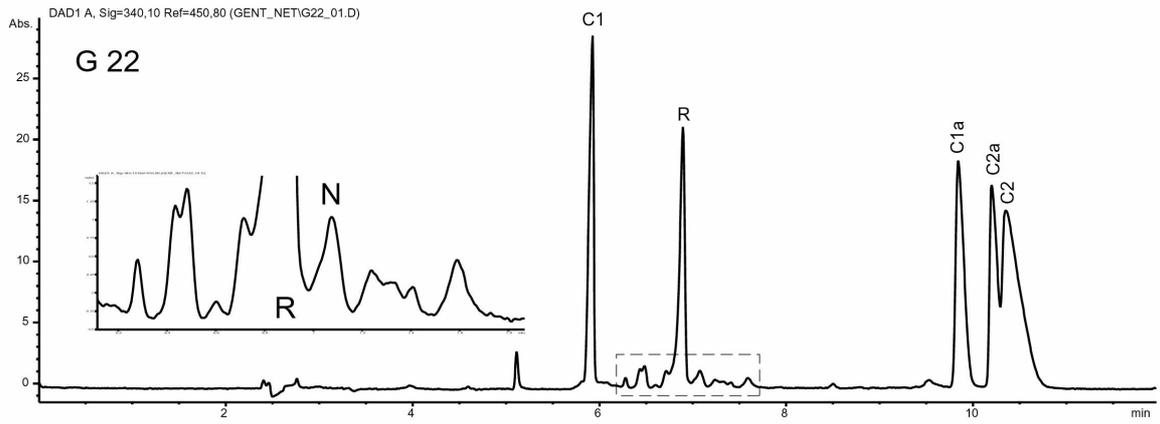
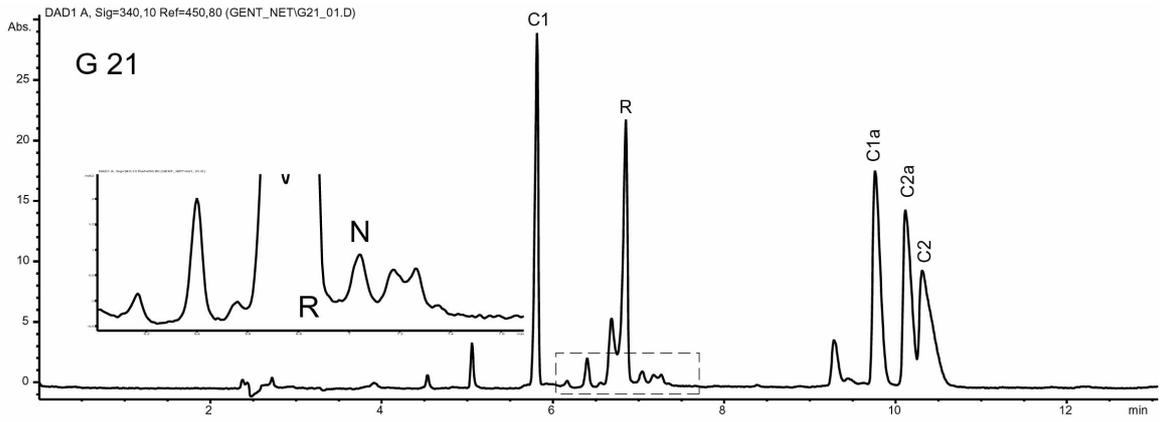


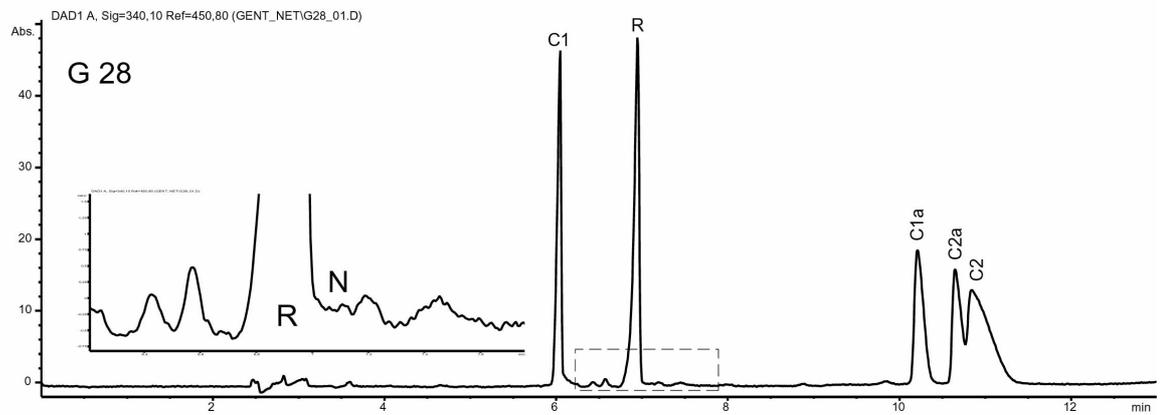
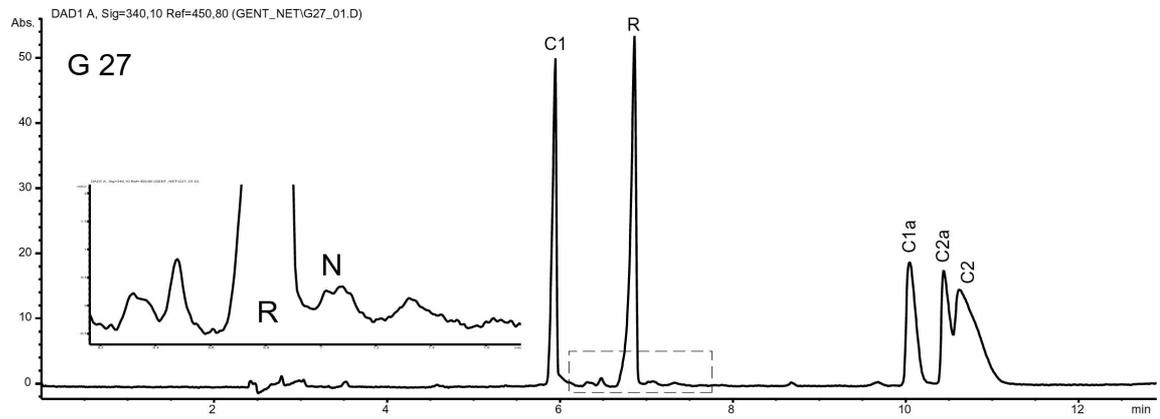
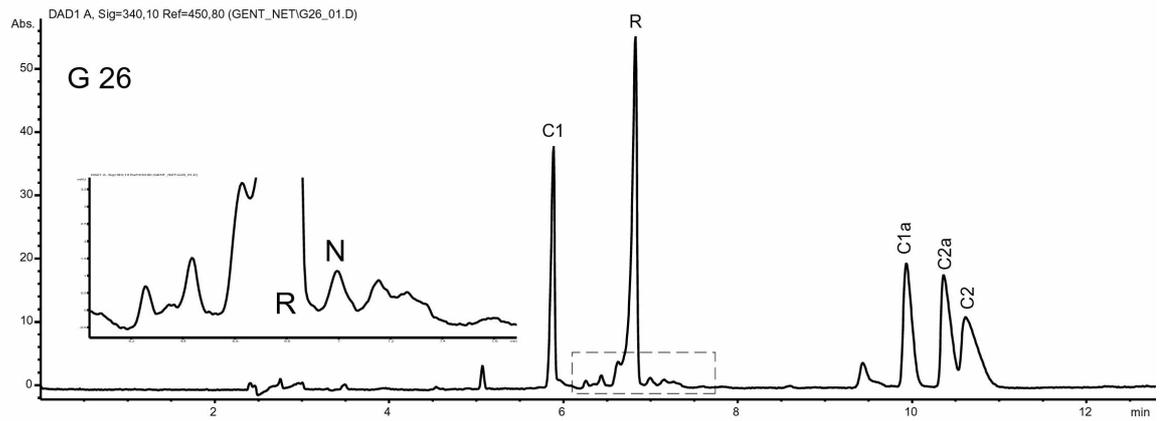
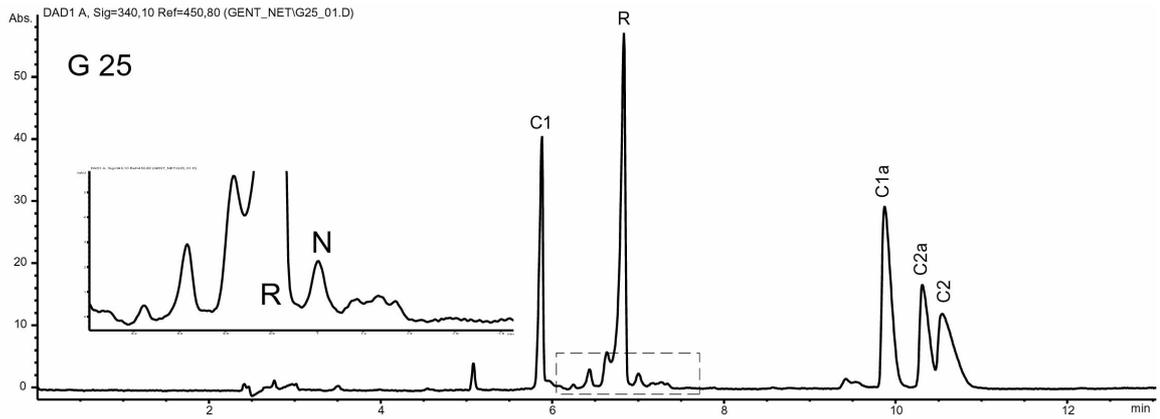


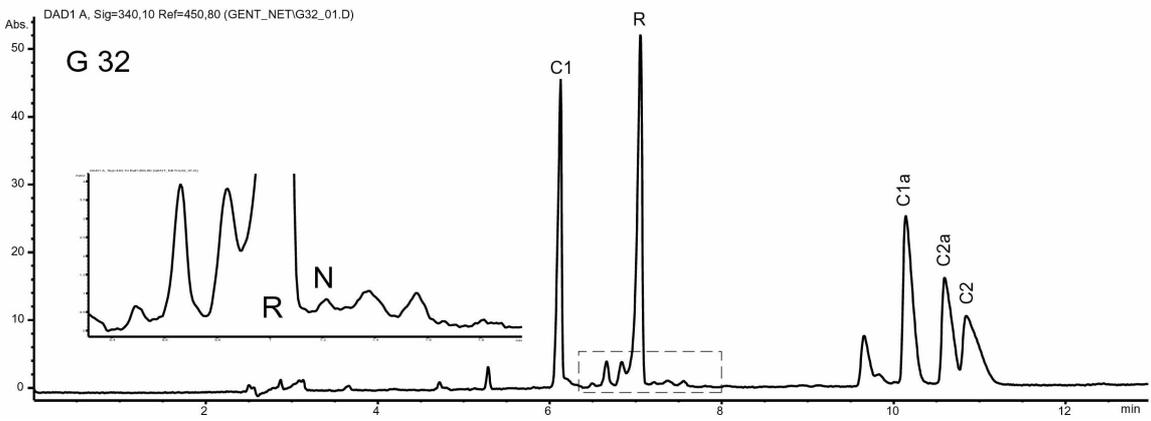
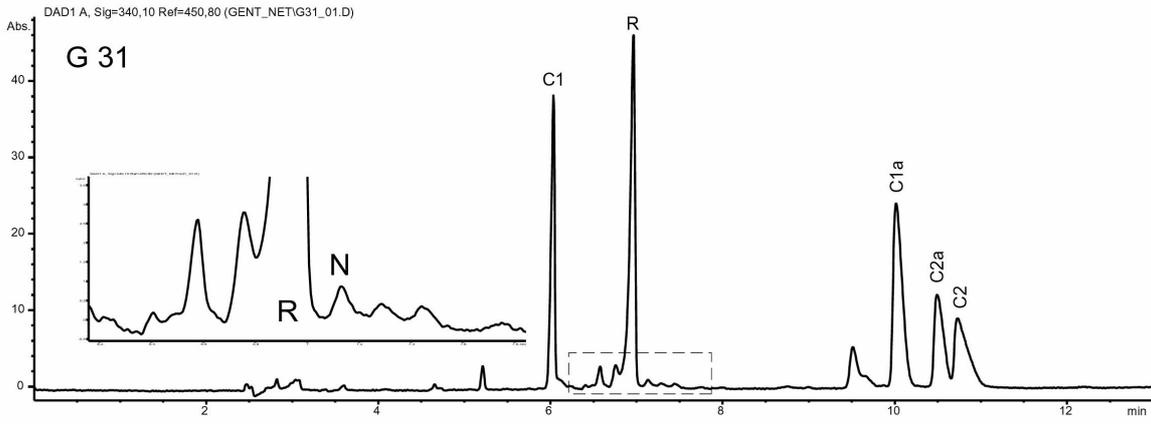
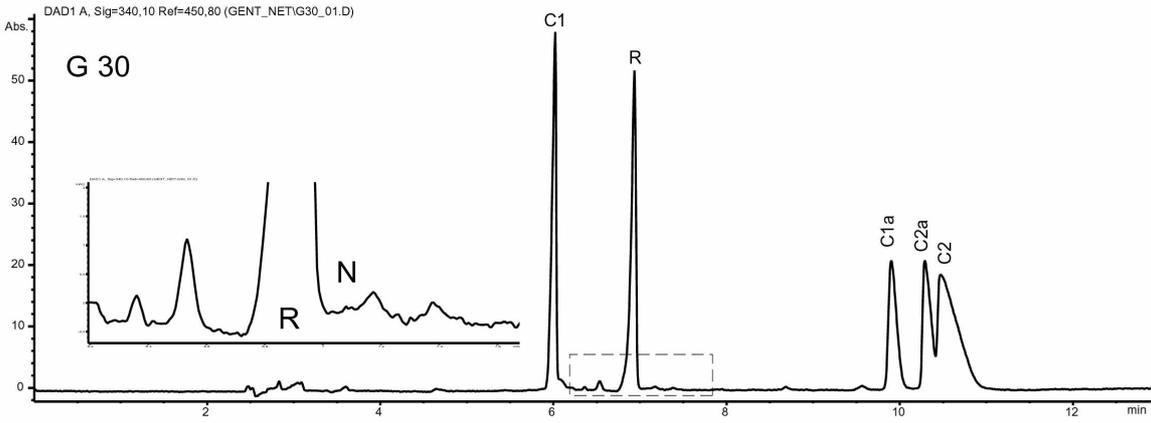
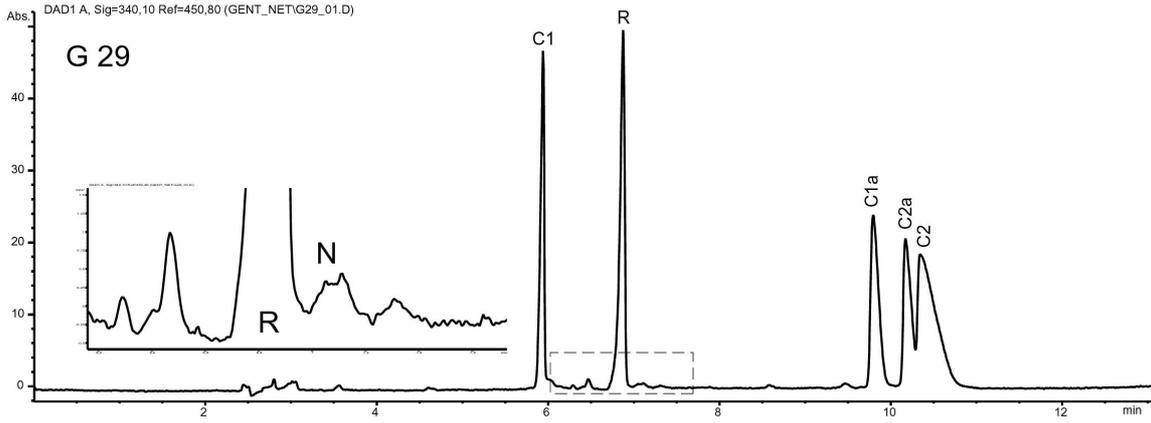


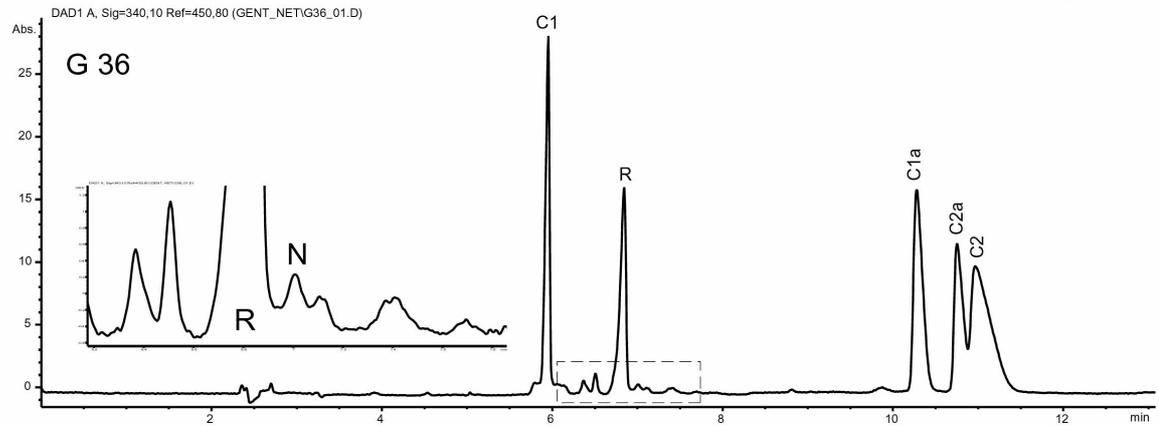
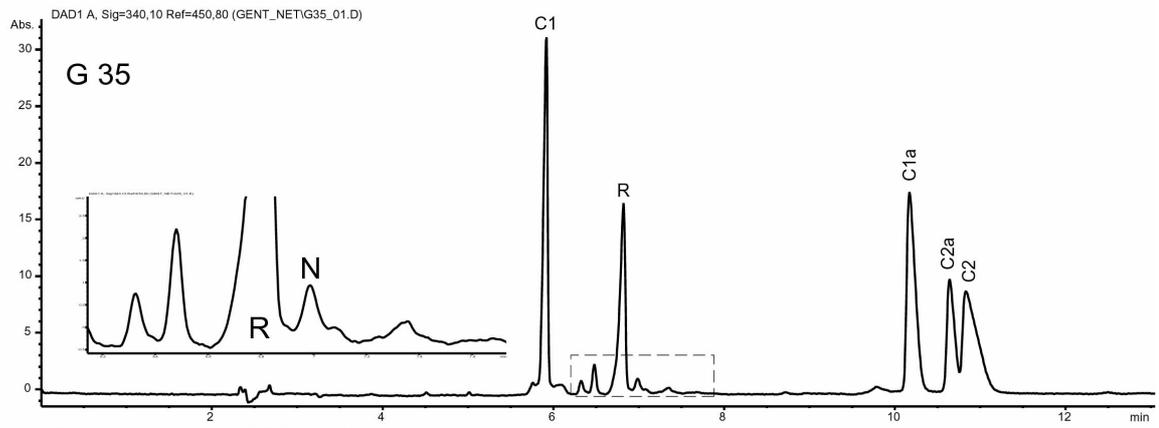
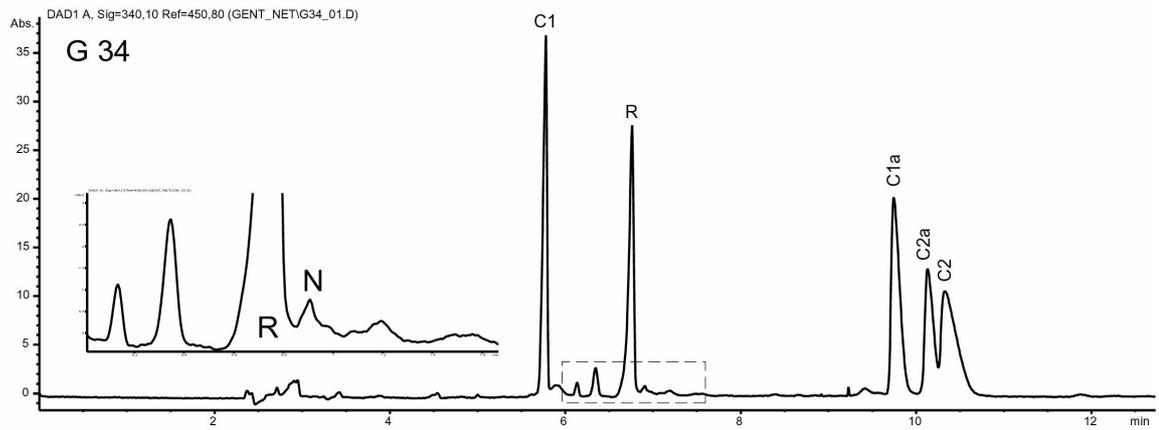
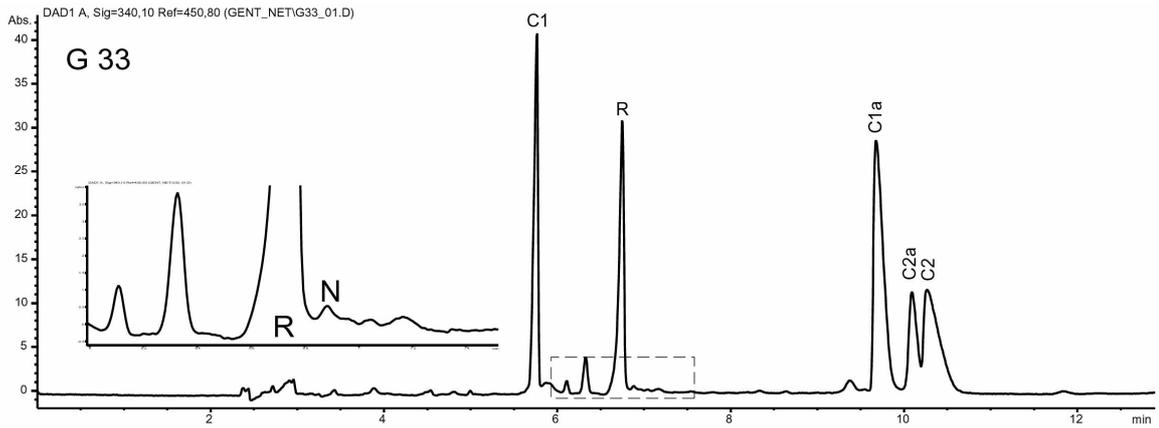


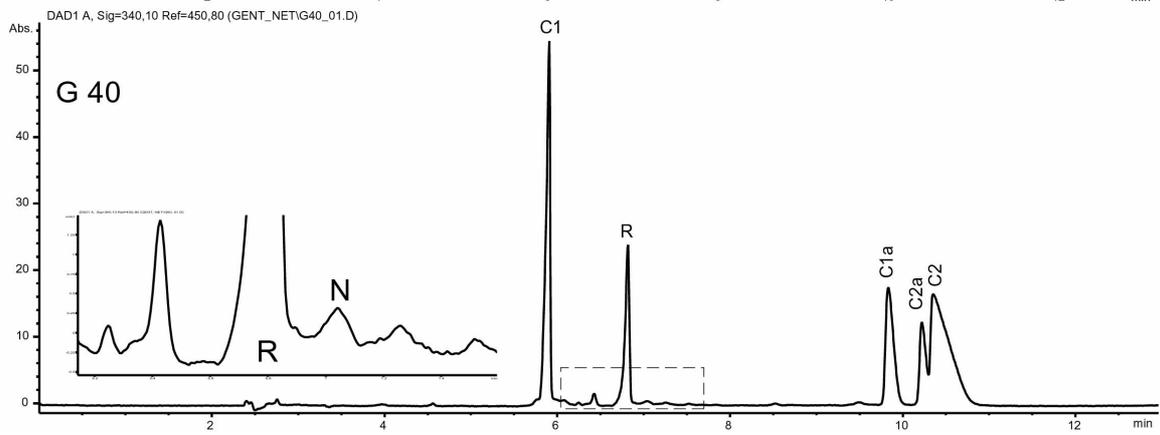
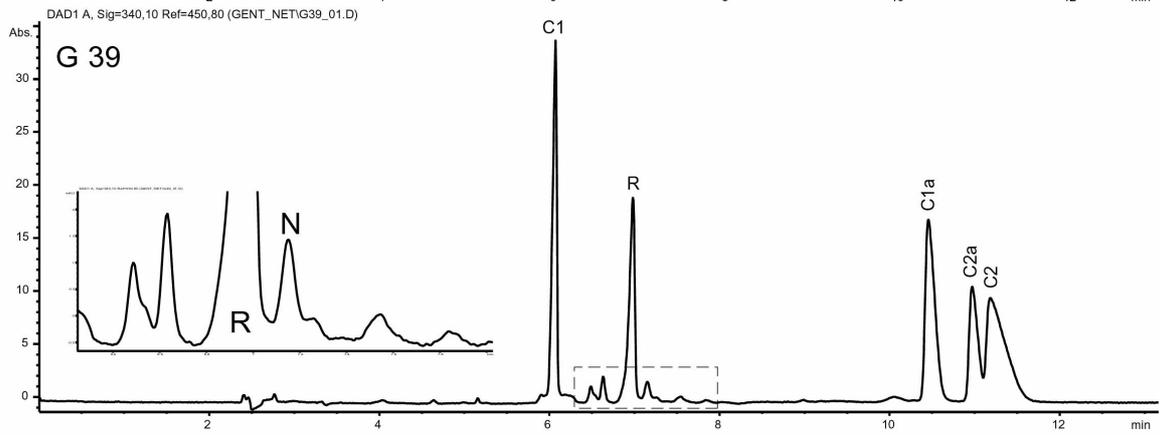
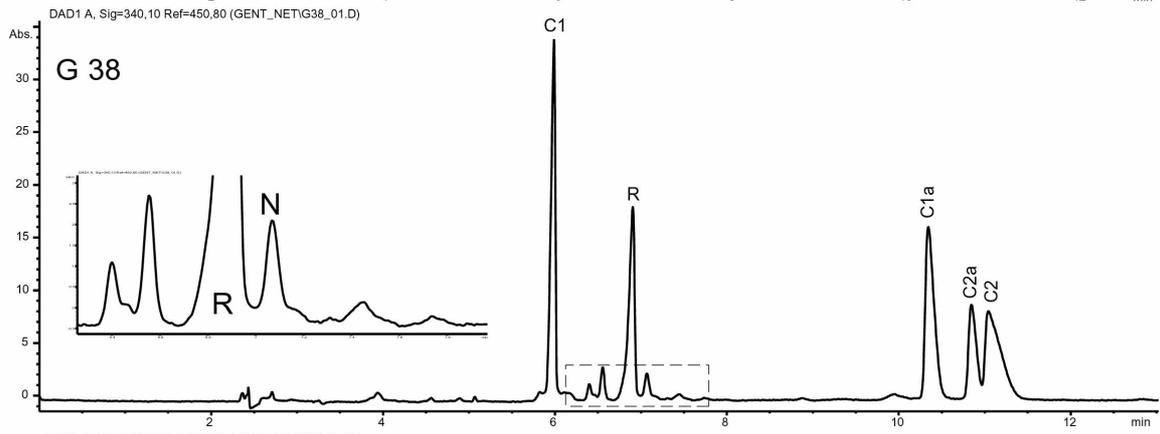
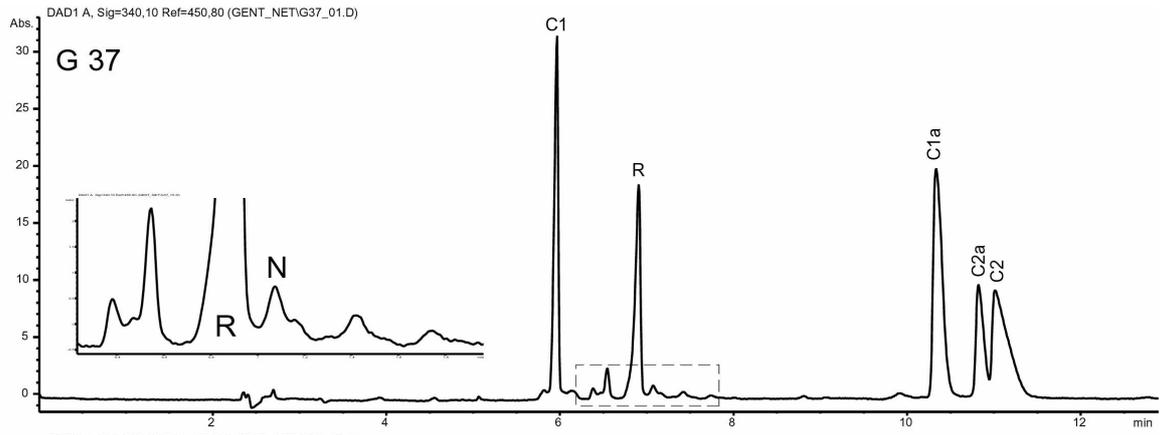


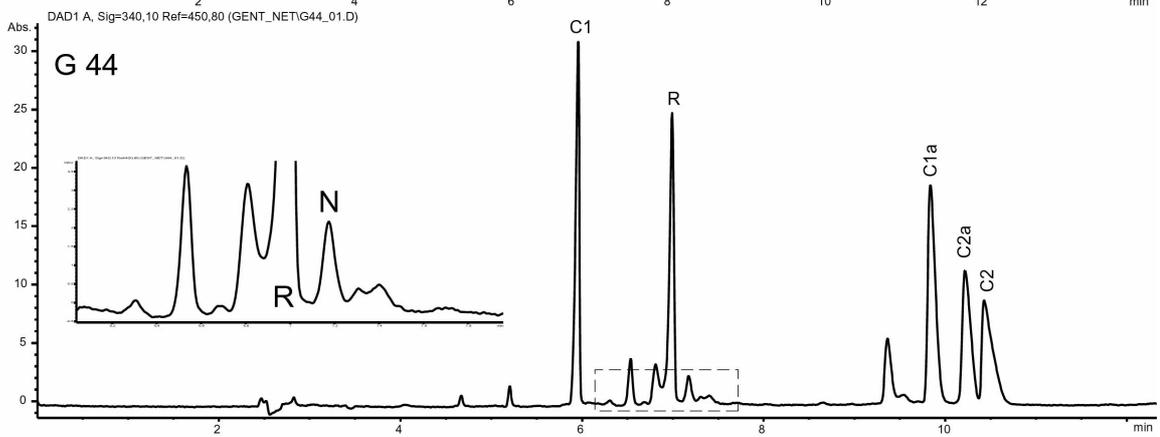
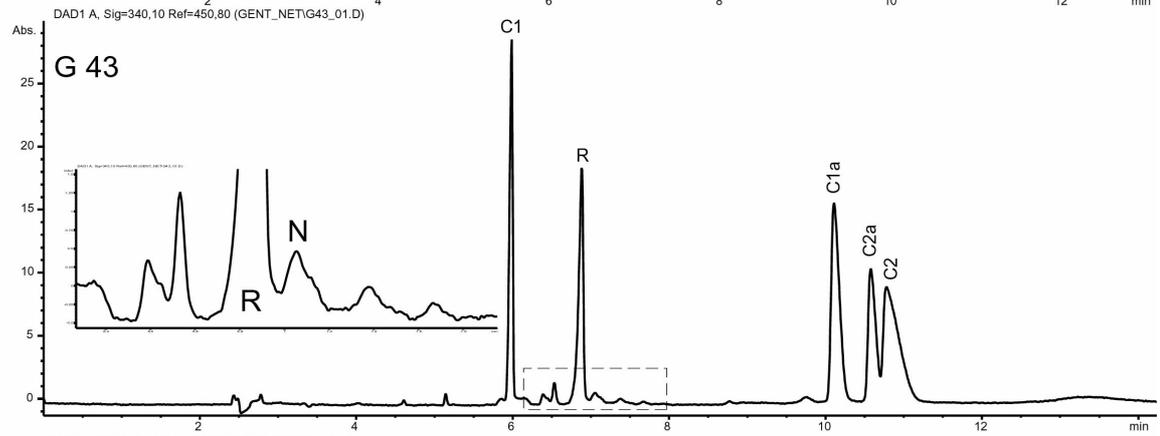
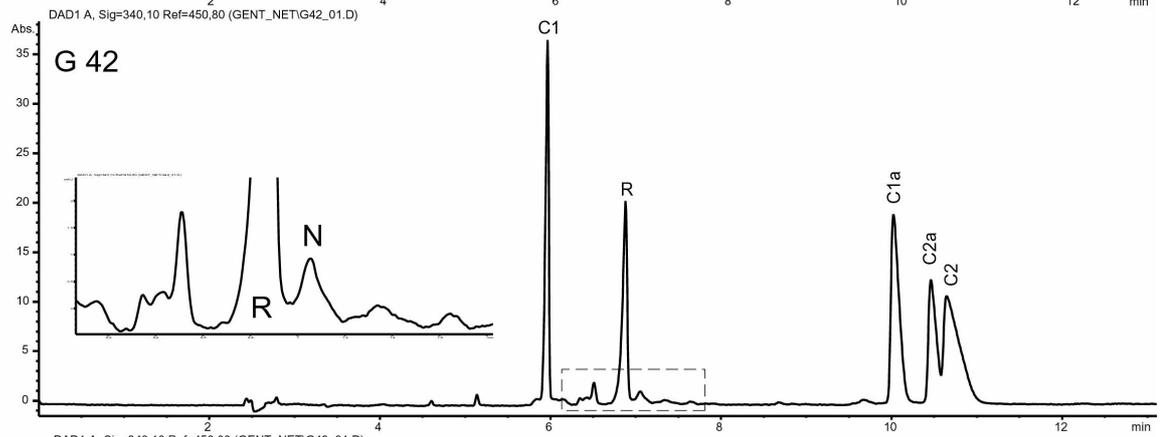
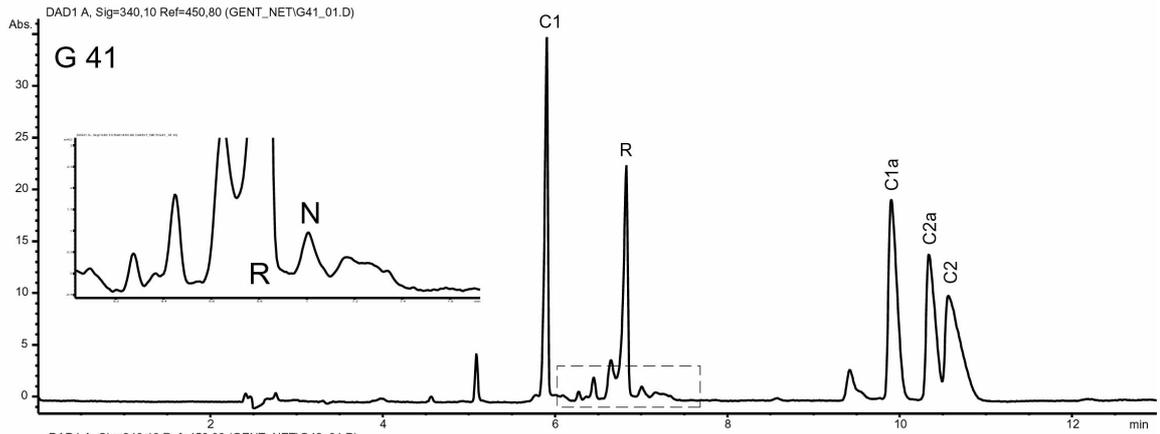


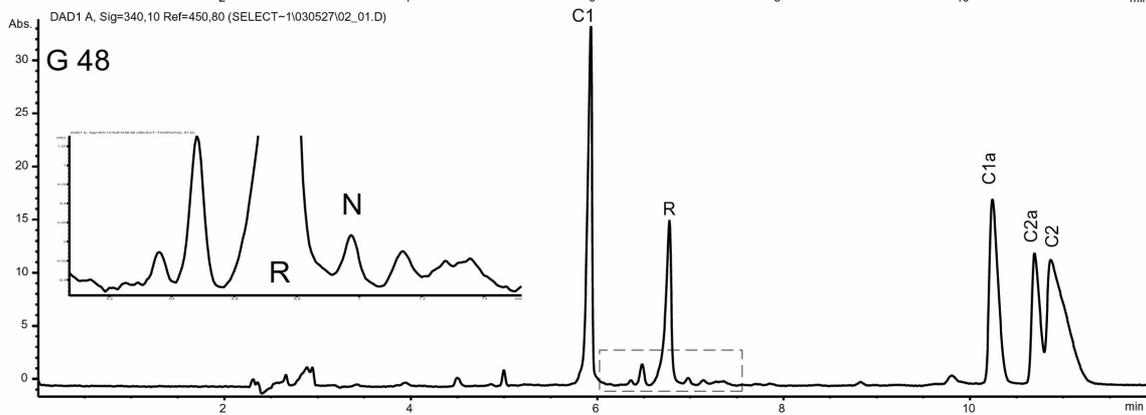
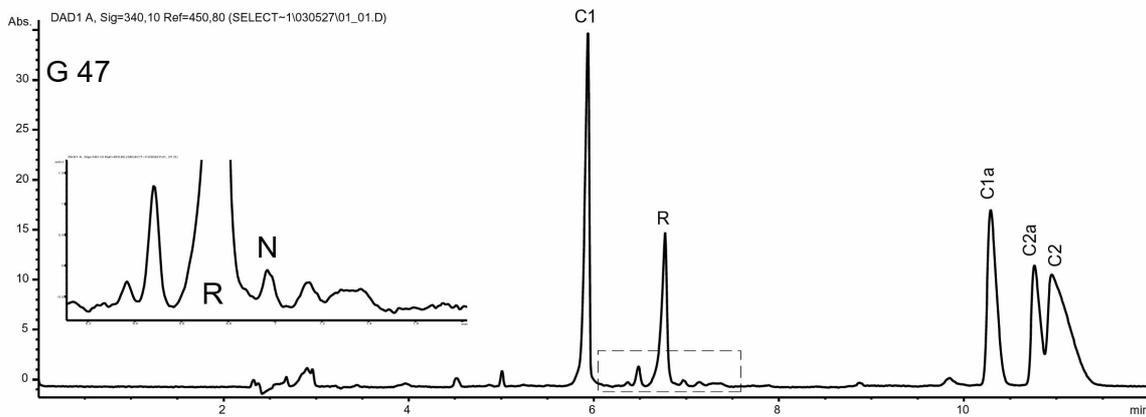
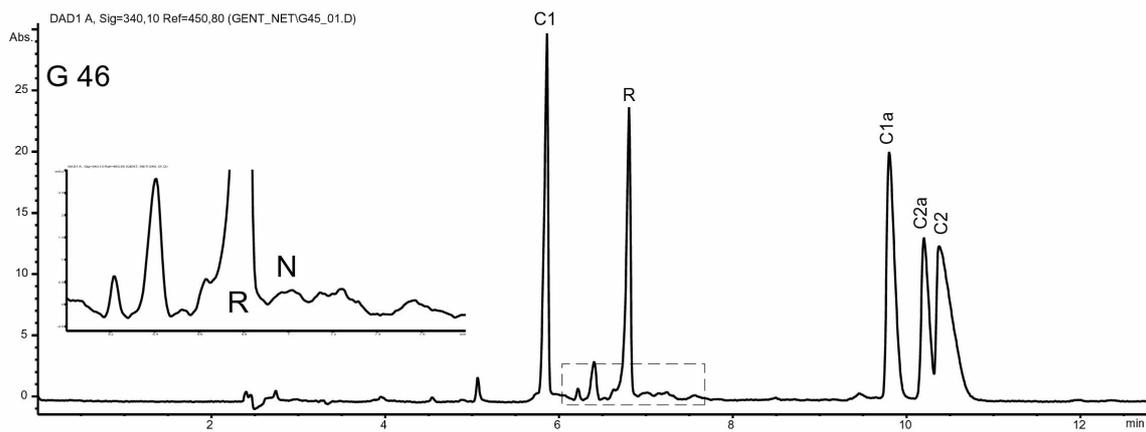
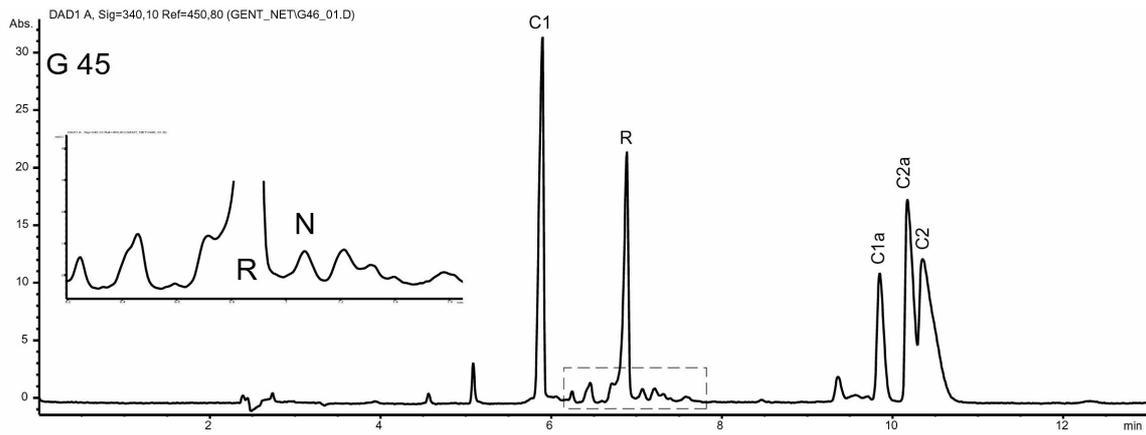


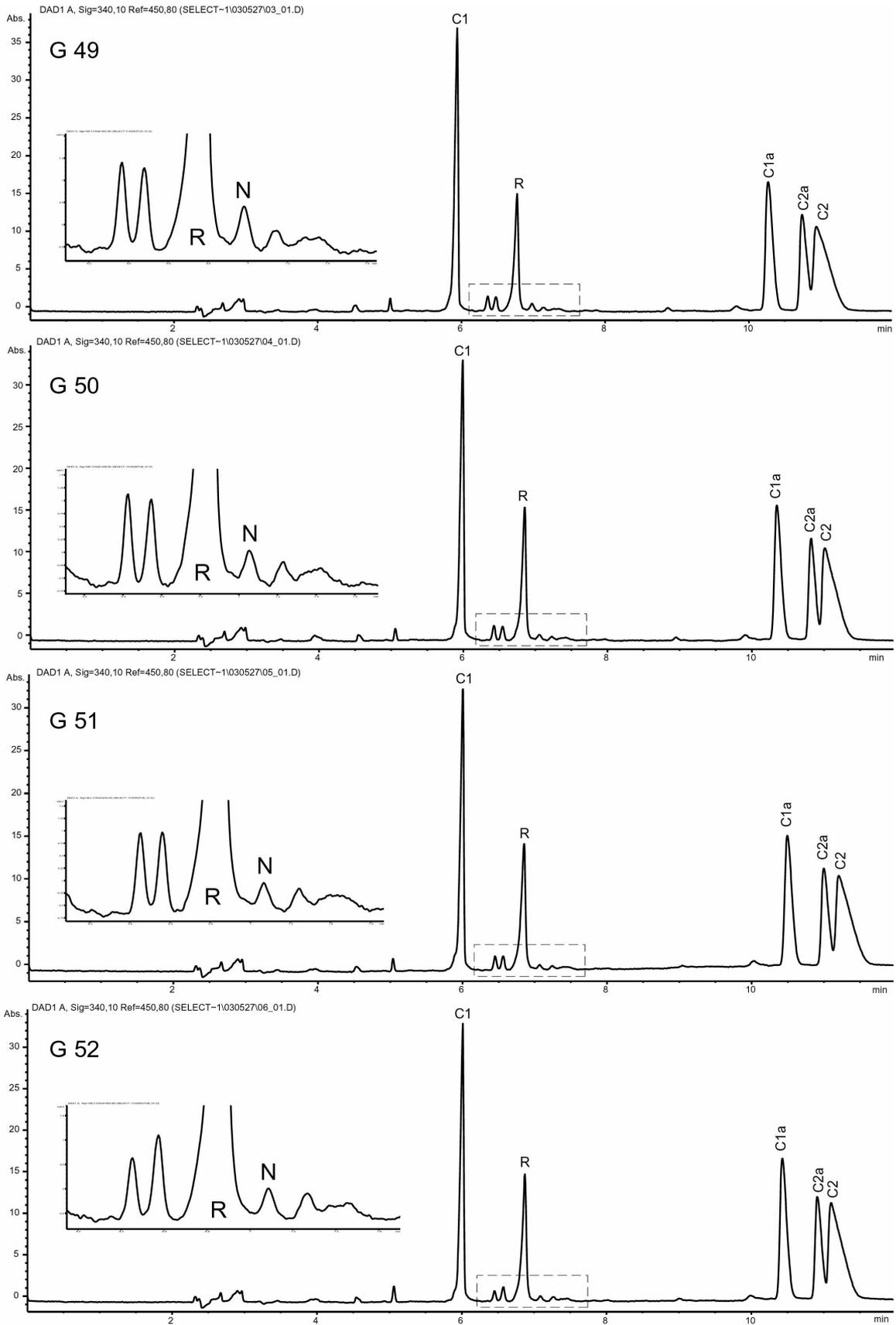


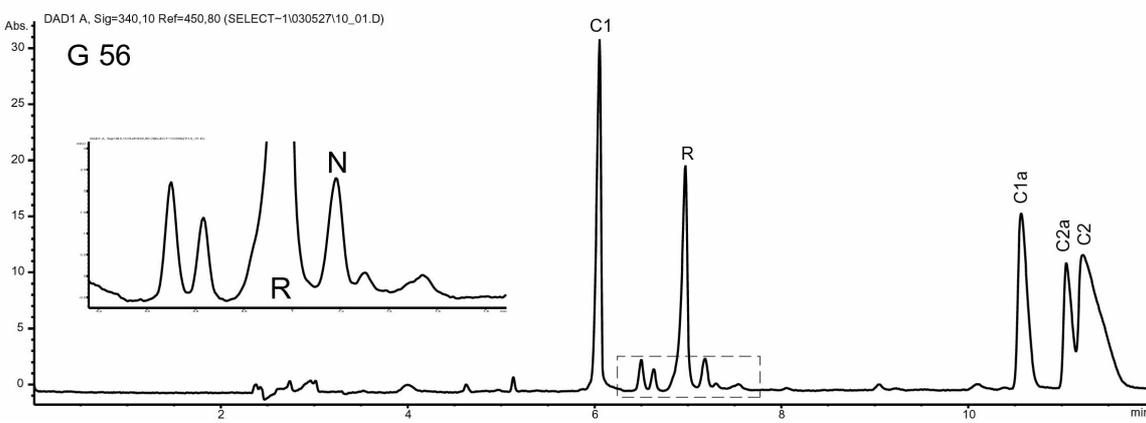
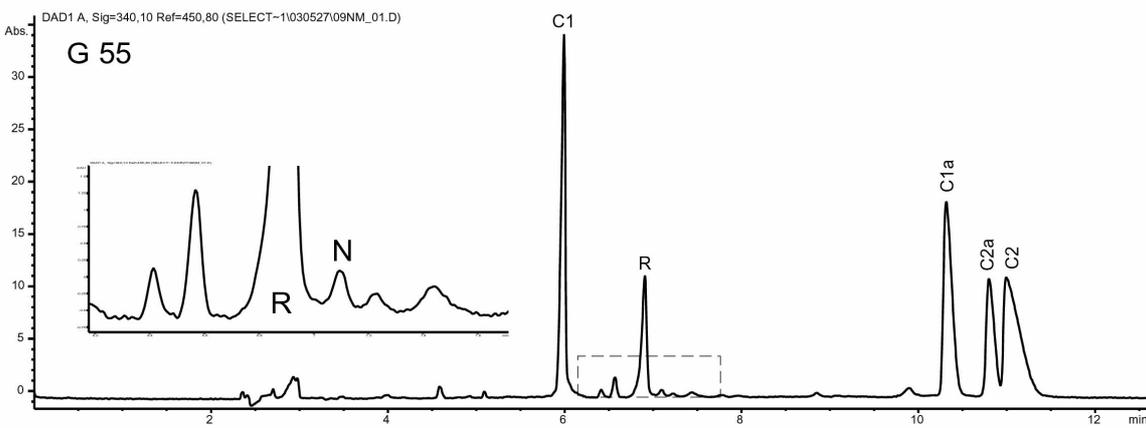
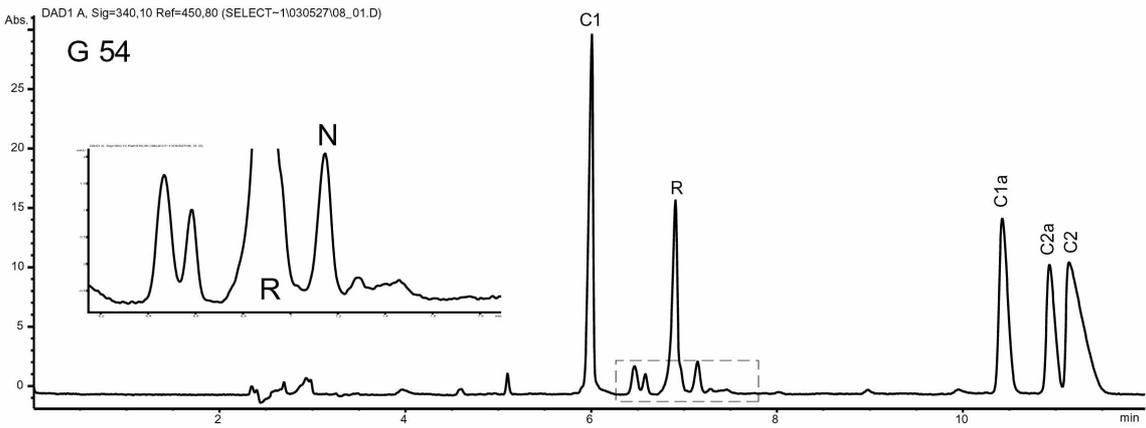
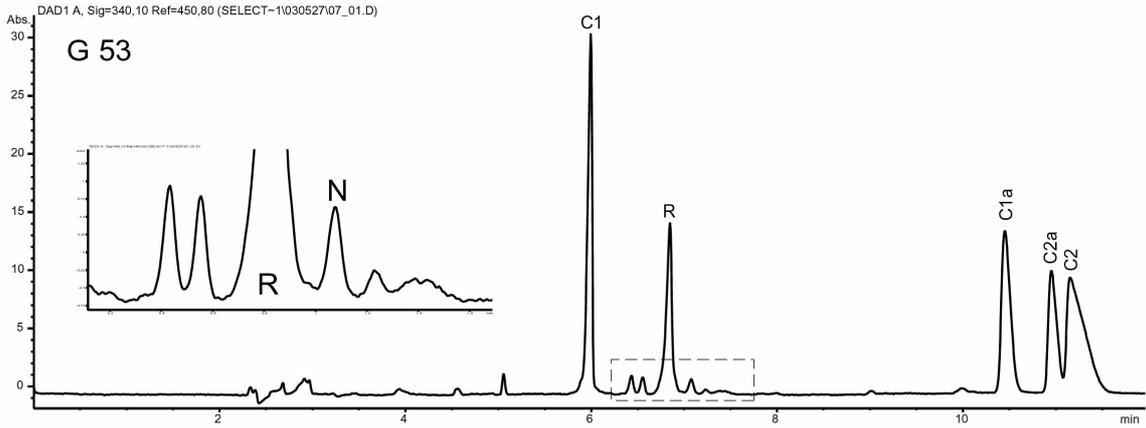












12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Frank Martin Wienen
Geburtsdatum	01. September 1970
Geburtsort	Neuwied
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	verheiratet

Bildungsweg:

09/1977 - 06/1981	Sonnenland Grundschule, Neuwied
09/1981 - 05/1990	Werner-Heisenberg-Gymnasium, Neuwied Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
07/1990 - 06/1991	Wehrdienst
09/1991 - 03/1994	Ausbildung zum pharmazeutisch-technischen Assistenten an der staatl. PTA-Lehranstalt, Bonn – Bad Godesberg
03/1994	Abschluss: Pharmazeutisch-technischer Assistent
04/1994 - 09/1998	Studium der Pharmazie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms- Universität, Bonn
11/1998 - 04/1999	Pharmaziepraktikum bei Gödecke AG, Freiburg
05/1999 - 10/1999	Pharmaziepraktikum in der Regenbogen-Apotheke, Koblenz
03/2000	Approbation als Apotheker
11/1999 - 09/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians- Universität, Würzburg

