

Abschlussbericht

zum Projekt

Untersuchungen zur Reduzierung der Umweltbelastung der konventionellen chemischen Analytik am Beispiel des Einsatzes der neuen Analysetechnik Kapillarelektrophorese (CE) im Bereich Arzneipflanzeninhaltsstoffe

**Gefördert durch die Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation
Geschäftszeichen 8312-38 62 61/ 330**

Zuwendungsempfänger: Forschungsvereinigung der
Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH)
Kranzweiherweg 10
53489 Sinzig

Laufzeit des Vorhabens: 01.01.1998 bis 31.12.2000

Bearbeiter: Glöckl (1.7.98-31.12.00) & Süß (1.8.98-31.8.00)

Inhaltsverzeichnis

AUSGANGSSITUATION, ZIELSETZUNG UND BEDEUTUNG DES VORHABENS	3
ERGEBNISSE	4
1. Allgemein	4
2. Teilprojekt 1: Bestimmung von Arbutinmetaboliten in Humanurin nach Einnahme einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung	5
2.1 Allgemein	5
2.2 Methodenentwicklung	7
2.3 Bestimmung des Hydrochinonglucuronids und Hydrochinonmonosulfats	7
2.4 Methodvalidierung	14
3. Teilprojekt 2: Bestimmung von Ginsenosiden in Ginseng-Extrakten	22
3.1 Allgemein	22
3.2 Methodenentwicklung	23
3.3 Methodvalidierung	33
3.4 Methodenvergleich	35
4. Teilprojekt 3: Bestimmung von Opiumalkaloiden in Schlafmohn-Extrakten	37
4.1 Allgemein	37
4.2 Methodenentwicklung	39
4.3 Methodvalidierung	42
4.4 Methodenvergleich	46
5. Teilprojekt 4: Trennung von charakteristischen Artischockeninhaltsstoffen	48
5.1 Allgemein	48
5.2 Methodenentwicklung	50
6. Teilprojekt 5: Charakterisierung von Vitamin D₃ mittels CE	54
6.1 Einleitung	54
6.2 Vorgehen	54
6.3 Zusammenfassung	59
7. Teilprojekt 6: Plasmaanalytik von Thymol	60
ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	61
VERÖFFENTLICHUNGEN UND POSTER IM RAHMEN DES PROJEKTES	64
BEDEUTUNG DES VORHABENS FÜR WIRTSCHAFT UND GESELLSCHAFT IN RHEINLAND-PFALZ	65
LITERATURVERZEICHNIS	66
DANK	70

Ausgangssituation, Zielsetzung und Bedeutung des Vorhabens

Für die Qualitätskontrolle von Arzneimitteln, Lebensmitteln u.a. ist die Hochleistungsflüssigchromatographie die Analysenmethode der Wahl. Aufgrund guter Analyseergebnisse hat sich diese Methode etabliert, obwohl sie einige Nachteile aufweist: Neben dem Verbrauch von großen Mengen organischen Lösungsmitteln, die sowohl umweltschädlich als auch kostenintensiv bei Anschaffung, Lagerung und Entsorgung als Sonderabfall sind, ist die Notwendigkeit zur Durchführung von aufwendigen Probenvorbereitungen und das Auftreten von teilweise relativ langen Analysenzeiten zu nennen.

Die Entwicklung der Kapillarelektrophorese mit anschließender Verbesserung der Robustheit kommerziell erhältlicher Geräte und damit dem Erhalt reproduzierbarer Analyseergebnisse, hat in den letzten Jahren zu einem routinemäßigem Einsatz dieser neuen Analysenmethode im Bereich der Protein-, Peptid- und Nukleotidanalytik geführt. Auch Fortschritte bei der Bestimmung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen aus Pflanzenextrakten, pflanzlichen Arzneimitteln sowie Vitaminen wurden innerhalb der letzten Jahre zunehmend in der wissenschaftlichen Literatur publiziert. Leider lassen sich die entwickelten Methoden häufig nicht von universitärer Ebene in die Qualitätskontrolle der Unternehmen übertragen, da mangelnde Robustheit, fehlende Validierung der Methoden oder fehlendes Know how dem entgegenstehen.

Aus diesem Grunde stellte sich die Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. im Rahmen dieses Projektes das Ziel, beispielhaft validierte Methoden zur kapillarelektrophoretischen Bestimmung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und deren Metaboliten sowie von Vitaminen zu entwickeln, um diese den beteiligten Unternehmen zur Verfügung stellen zu können. Dabei sollten diese Verfahren mit den bisher verwendeten Verfahren der Hochleistungsflüssigchromatographie hinsichtlich analytischer Aussagekraft, Umweltbelastung, Kosten, Zeitaufwand und Probenvorbereitung verglichen werden. Außerdem sollte in Form von Fortbildungen Know how an interessierte Unternehmen übertragen werden.

Ergebnisse

1. Allgemein

Aufgabe für die beteiligten Mitarbeiter der FAH e.V. war es zunächst, das im Jahr 1998 angeeignete Know how auf dem Gebiet der neuen Analysenmethode Kapillarelektrophorese für die Teilprojekte

- Ginsenganalytik,
- Vitamin-D₃-Analytik,
- Plasmaanalytik von Thymol,
- Bestimmung renal eliminiertes Inhaltsstoffe und Metaboliten aus einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung,
- Bestimmung von Opiumalkaloiden mittels CE in Extrakten aus *Papaver somniferum* sowie
- Trennung von Artischockeninhaltsstoffen mittels CE

im Sinne der Zielsetzung des Projektes anzuwenden. Neben der wissenschaftlichen Arbeit galt es, Kontakte zu verschiedenen Experten sowohl auf dem Gebiet der Kapillarelektrophorese als auch auf dem Gebiet der Analytik von Phytopharmaka und Vitaminen zu knüpfen, um die Qualität, Originalität und Praxisrelevanz der erzielten Ergebnisse sicherzustellen.

Desweiteren waren während der Projektbearbeitung zahlreiche Arbeiten organisatorischer Art, die mit dem Aufbau des wissenschaftlichen Instituts der FAH einhergingen, wie z. B. die Ausstattung des Laboratoriums mit verschiedenen Kleingeräten und Verbrauchsmaterialien durchzuführen.

Im Mai 2000 wurde von der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. ein Seminar zum Thema „Einsatzmöglichkeiten der Kapillarelektrophorese in der Arzneistoffanalytik“ in Bad Neuenahr-Ahrweiler mit großem Erfolg durchgeführt. Unter Beteiligung verschiedener Kooperationspartner des CE-Projektes sowie mehreren Geräteherstellern, die den Teilnehmern ihre CE-Geräte präsentierten, wurde ein Programm zusammengestellt, dass von den Teilnehmern aus der Industrie sehr positiv aufgenommen wurde.

2. Teilprojekt 1: Bestimmung von Arbutinmetaboliten in Humanurin nach Einnahme einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung

Bearbeiter: Ingmar Glöckl, Falko Süß

2.1 Allgemein

Zubereitungen aus Bärentraubenblätterextrakt gehören zu den bedeutendsten therapeutisch eingesetzten pflanzlichen Harnwegsdesinfizientien.

Als wirksamkeitsbestimmender Inhaltsstoff in den Bärentraubenblättern gilt das Arbutin. Es wird wahrscheinlich über einen Glucosecarrier in oberen Darmabschnitten aktiv resorbiert [1-3] und bereits in den Enterozyten deglycosyliert, glucuronidiert und sulfatiert. Der hepatische Anteil am Phase-II-Metabolismus ist bisher ungeklärt. Renal eliminiert werden ausschließlich die Konjugate Hydrochinonglucuronid und Hydrochinonmonosulfat. Diese sollen dann durch bakterielle Enzyme oder basischen Harn zum freien Hydrochinon verseift werden, dass antimikrobiell wirkt. Diese Hypothese [4] ist aber nur ungenügend belegt.

Bei den bisher durchgeführten Bioverfügbarkeitsuntersuchungen wurden die entsprechenden Konjugate entweder als photometrische Gesamtbestimmung aller Hydrochinonderivate im Urin [5] oder indirekt durch HPLC-Bestimmung des Hydrochinons nach enzymatischer Spaltung der Konjugate bestimmt [6].

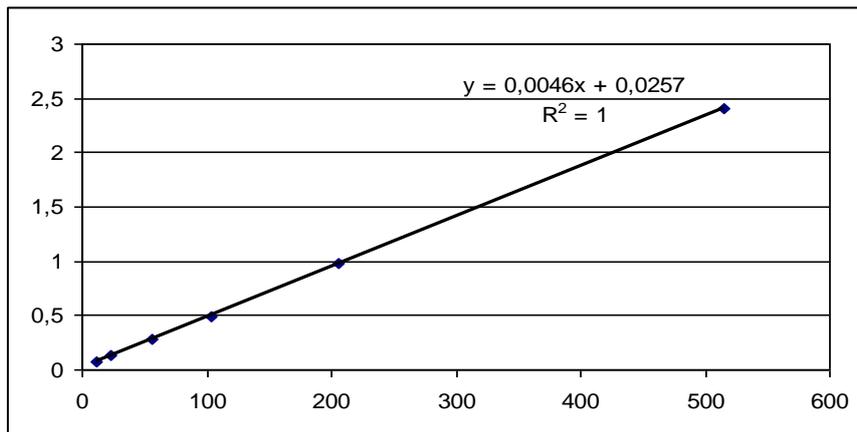


Abb. 1: Metabolismus von Arbutin (1) über Hydrochinon (2) zu Hydrochinonglucuronid (3) und Hydrochinonmonosulfat (4).

Im Rahmen des Projektes ist es nun gelungen, Hydrochinonglucuronid und Hydrochinonmonosulfat direkt im Urin zu bestimmen. Mit dieser Methode sowie durch die parallel durchgeführte HPLC-Bestimmung des Hydrochinons mit Coul-Array-Detektion [Wittig et al. (ZA GmbH); nicht Bestandteil des Projektes, Publikation eingereicht im Journal of Chromatography B] konnten erstmals Bioverfügbarkeits- und Bioäquivalenzmessungen mit einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung durchgeführt werden.

Die entwickelten CE-Methoden wurden entsprechend internationalen Regularien zur Validerung von bioanalytischen Methoden validiert [7,8]. Dies war die Voraussetzung für die Durchführung der offenen, randomisierten, 2-Wege-cross-over, Einzeldosis-, Bioverfügbarkeitsuntersuchung von einer wässrigen Bärentraubenblätterextrakt-Lösung sowie einer den Extrakt enthaltenden Filmtablette an 16 gesunden Probanden. Diese Studie war nicht Bestandteil des Projektes.

2.2 Methodenentwicklung

Ausgehend von einer kapillarelektrophoretischen Methode zur Bestimmung von Arbutin in Bärentraubenblättern [9] sowie verschiedenen Voruntersuchungen wurden die Methodenentwicklungen mit einem Standard-Boratpuffer-System (200 mM Borat, ohne pH-Einstellung) und einer standardmäßig verwendeten Kapillare (L=50 cm, I.D. 50 µm) begonnen.

Hydrochinonglucuronid und Hydrochinonmonosulfat liegen im pH-Bereich 8-10, an dem der Boratpuffer seine stärkste Pufferwirkung besitzt, als Anionen vor. Da in diesem pH-Bereich der EOF in der Kapillare größer ist als die Eigenmobilität der Analyten, werden auch diese zum Detektorfenster bewegt.

Um die für die Durchführung einer klinischen Studie erforderliche Empfindlichkeit zu erreichen, musste die UV-Detektion bei 200 nm erfolgen. Aus diesem Grunde war ein selektives Analysieren durch eine Detektion, bei der man bestimmte Substanzen einer Erfassung entziehen kann (z.B. LIF-Detektion, UV-Detektion im längerwelligen Bereich), nicht möglich. Bei 200 nm weist dagegen nahezu jede Substanz UV-Absorption auf. Deshalb war die Abtrennung der Analyten von der Vielzahl der im Urin vorhandenen endogenen und ebenfalls im genutzten pH-Bereich negativ geladenen Substanzen notwendig.

Hauptinflussfaktoren dafür waren der pH-Wert, die Ionenstärke, die Feldstärke sowie die Temperatur der Kapillare.

2.3 Bestimmung des Hydrochinonglucuronids und Hydrochinonmonosulfats

2.3.1 Bestimmung des Hydrochinonglucuronids

Da Hydrochinonglucuronid als Referenzsubstanz nicht verfügbar war, erfolgte die Bestimmung der Gehaltswerte des Hydrochinonglucuronids mit Kalibrierdaten vom Hydrochinonglucosid (Arbutin). Dies schien vertretbar, weil der Hydrochinonbaustein als Hauptchromophor in beiden Verbindungen identisch ist (Abb. 2).

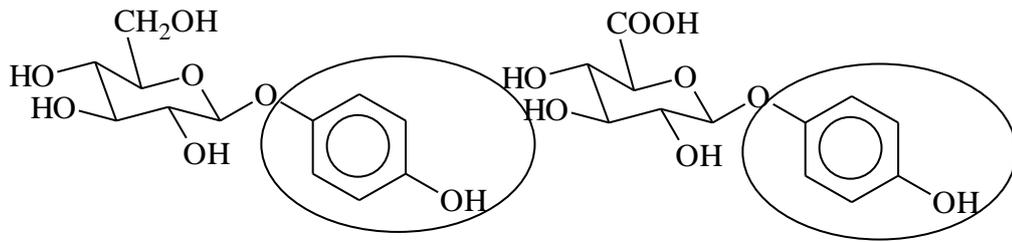


Abb. 2: Identische Chromophore von Arbutin und Hydrochinonglucuronid.

Zur Bestätigung wurden die Spektren von Arbutin und der als Glucuronid vermuteten Substanz, die nach Einnahme einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung im Elektropherogramm auftauchte, verglichen.

Desweiteren konnte mit Rattenlebermikrosomen aus Hydrochinon und UDP-Glucuronsäure das Hydrochinonglucuronid in kleinen Mengen hergestellt werden (Abb. 3).

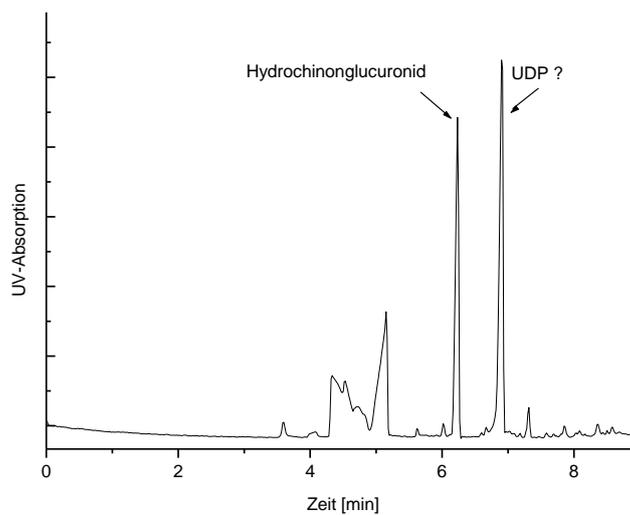


Abb. 3: Elektropherogramm des Mikrosomenansatzes. CE-Bedingungen: 200 mM Borat, 25 kV, I.D. 50 µm, Kap. 50/45,4 cm, 200 nm.

Durch Spaltung mit β -Glucuronidase wurde daraufhin ein weitgehendes Verschwinden des entsprechenden Peaks verfolgt (Abb. 4).

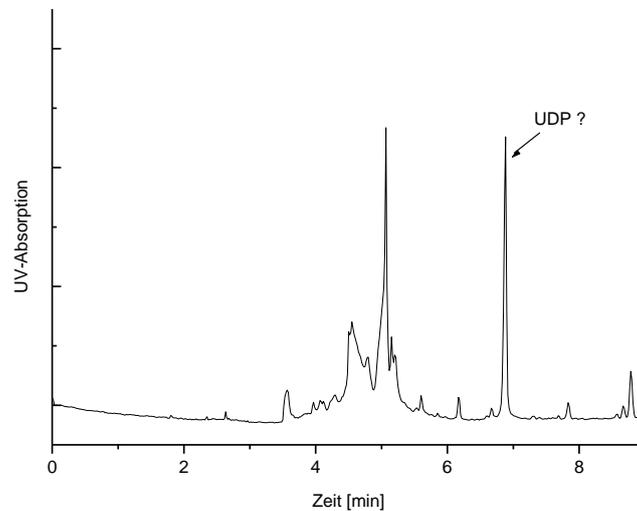


Abb.4: Elektropherogramm eines Mikrosomenansatzes nach Glucuronidasespaltung. CE-Bedingungen wie in Abb. 3.

Zur weiteren Bestätigung des Auftretens des Hydrochinonglucuronids im Urin nach Einnahme einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung wurde der Urin eines Probanden (Abb. 5) mit dem Mikrosomenansatz gespikt (Abb. 6). Die Retentionszeiten der Peaks aus dem Urin und dem Mikrosomenansatz sind identisch, es erfolgt eine Komigration der beiden Peaks.

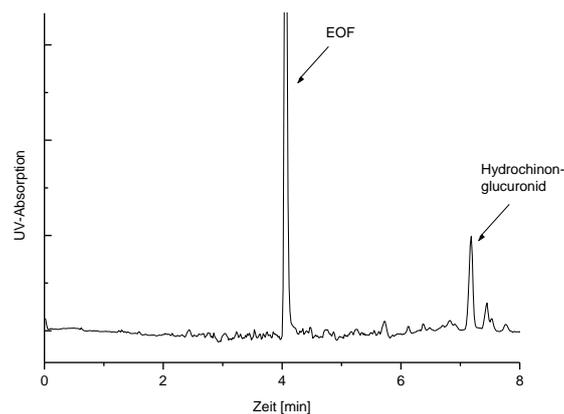


Abb. 5: Elektropherogramm eines Urin nach Einnahme einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung; CE-Bedingungen wie in Abb. 3.

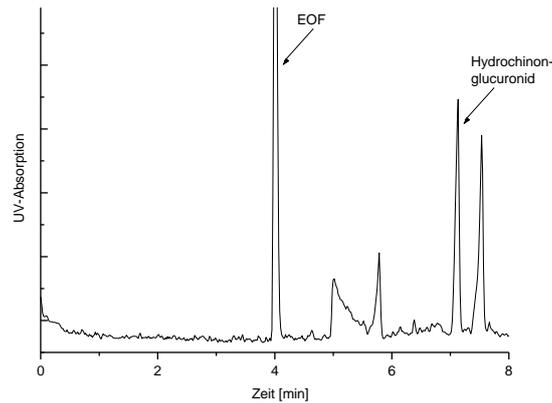


Abb. 6: Elektropherogramm eines Urin nach Einnahme einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung, gespikt mit Mikrosomenansatz. CE-Bedingungen: wie in Abb. 3.

Als Ergebnis einer umfangreichen Methodenentwicklung waren im Vergleich zu üblicherweise publizierten CE-Methoden sehr ungewöhnliche Bedingungen für die kapillarelektrophoretische Bestimmung des Hydrochinonglucuronids erforderlich.

Als Laufpuffer wurde ein Boratpuffer mit einer Konzentration von 400 mM verwendet. Bei den in der Kapillarelektrophorese allgemein üblichen Boratpuffer-Konzentrationen von bis zu 200 mM erfolgte Komigration einer Vielzahl von endogenen Substanzen im Humanrin mit dem Analyten Hydrochinonglucuronid (Abb. 7). Mit einem pH-Wert von 9,80 und einem Spannungsabfall von 500 Vcm^{-1} ergaben sich Stromstärken von knapp 200 μA .

Durch die gewählte hohe Ionenstärke der Pufferlösung von 400 mM Borat verlängerten sich die Analysenzeiten sehr stark. Ein „Auseinanderziehen“ aller Peaks lies sich jedoch nur durch die Veränderung dieses Methodenparameters ermöglichen. Versuche, die Selektivität der Bestimmung des Hydrochinonglucuronids durch Veränderung anderer Parameter, wie z.B. des pH-Wertes, der Temperatur oder durch den Zusatz von organischen Modifiern zu verbessern, führten nicht zum gewünschten Ergebnis. Die Ursache hierfür ist nicht darin zu sehen, dass diese Veränderungen für eine Selektivitätsverschiebung weniger geeignet sind, sondern dass sich im gesamten Bereich des analytischen Fensters keine Basislinie befand, in dem das Hydrochinonglucuronid abgetrennt von allen anderen Peaks hätte migrieren können (Abb. 7).

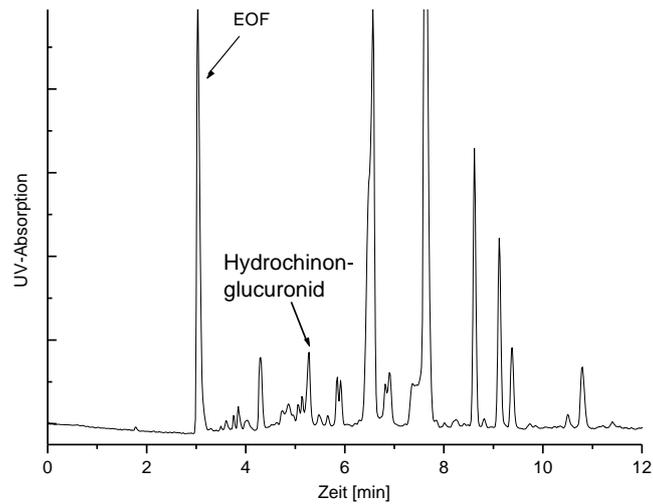


Abb. 7: Hydrochinonglucuronid ohne Abtrennung von endogenen Substanzen im Humanurin nach Einnahme einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung (Verwendung eines des Standard-Puffers 200 mM Borat, Methode zur Bestimmung des Hydrochinonmonosulfats).

Um die Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten bei der gewählten Direktaufgabe des Humanurins zu gewährleisten, war ein Spülen der Kapillare mit 0,1 N Natronlauge über 300 Sekunden und mit Laufpuffer über 120 Sekunden erforderlich.

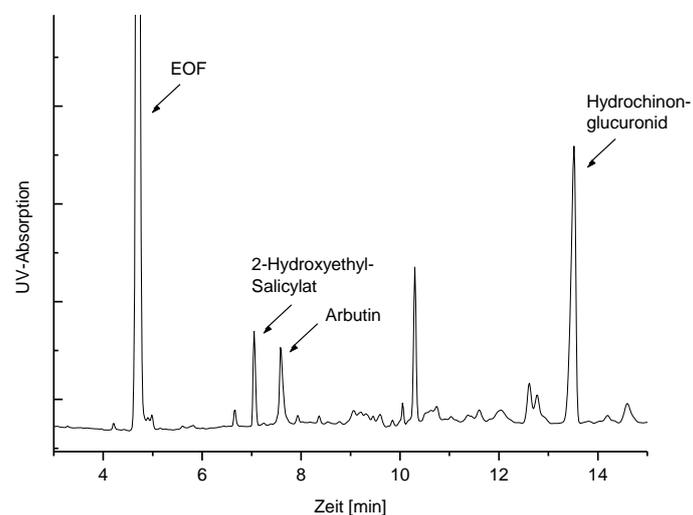


Abb. 8: Elektropherogramm der Bestimmung von Hydrochinonglucuronid.

Gerät:	Biofocus 3000
Puffer:	400 mM Borat, pH 9,80
Int. Standard:	(2-Hydroxyethyl)-Salicylat ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$)
Spannung:	25 kV
Kapillare:	I.D. 50 μm ; Länge: 50 cm/ 45,4 cm
Temperatur:	20°C
Injektion:	4 psi*sec.
Detektion:	200 nm
Spülprozedur:	300 sec. 0,1 N NaOH, 120 sec. Puffer

Allgemeine Voraussetzungen für einen Internen Standard sind gute UV-Absorption, Stabilität in der Untersuchungslösung sowie ausreichende Wasserlöslichkeit. Mit (2-Hydroxyethyl)-Salicylat wurde eine Verbindung verwendet, deren physikochemische Eigenschaften dafür passend waren. Das optimale analytische Fenster für die Migration des Internen Standards befindet sich zwischen dem Peak des EOF und dem Peak des für die Kalibrierung verwendeten Arbutin.

Das in dem in Abb. 8 dargestellten Elektropherogramm enthaltene Arbutin wurde zu Demonstrationszwecken zugespitzt, um alle für die Methode wichtigen Substanzen nebeneinander darstellen zu können. Tatsächlich konnte im Rahmen der gesamten Untersuchungen in keinem Probanden-Urin nach Einnahme einer Bärentraubenblätter-haltigen Zubereitung Arbutin nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass Arbutin, der Hauptinhaltsstoff der Bärentraubenblätter, selbst nicht an den Wirkort, die Harnblase, gelangt, sondern dass ausschließlich seine Metaboliten Hydrochinonglucuronid, Hydrochinonmonosulfat und freies Hydrochinon die ableitenden Harnwege erreichen.

2.3.2 Bestimmung des Hydrochinonmonosulfats

Für die Bestimmung von Hydrochinonmonosulfat (Abb. 9) musste das Standard-Boratpuffer-System (200 mM Borat, ohne pH-Einstellung) nur geringfügig variiert werden. Da beim Hydrochinonmonosulfat die Eigenmobilität in Richtung Anode stärker ausgeprägt ist als beim Hydrochinonglucuronid, wandert es langsamer zur Kathode, d.h. die Analysenzeit im alkalischen pH-Bereich (starker EOF) wäre bei gleichen Versuchsbedingungen länger. Dadurch, dass die meisten Matrixpeaks aus dem Humanurin vor dem Hydrochinonmonosulfat migrieren, musste die Pufferkonzentration und der pH-Wert (pH 9,35) nicht weiter verändert werden.

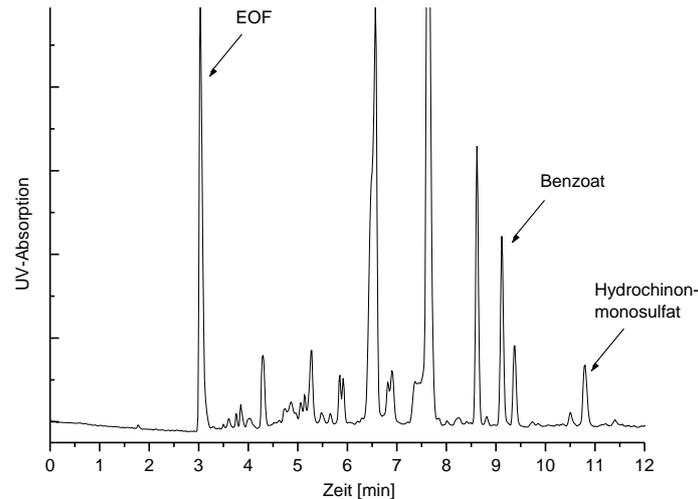


Abb. 9: Elektropherogramm der Bestimmung von Hydrochinonmonosulfat.

Gerät:	Biofocus 3000
Puffer:	200 mM Borat (pH 9,35)
Int. Standard:	Natriumbenzoat ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)
Spannung:	30 kV
Kapillare:	I.D. $50 \mu\text{m}$ (bubble-cell $150 \mu\text{m}$); Länge: 50 cm/ 45,4 cm
Temperatur:	20°C
Injektion:	4 psi*sec.
Detektion:	200 nm
Spülprozedur:	300 sec. 0,1 N NaOH, 120 sec. Puffer.

Um die Analysenzeit der Methode zu verkürzen, wurde die Spannung auf 30 kV erhöht (Feldstärke 600 V cm^{-1}).

Die Erhöhung der Kapillartemperatur von 20°C auf 30°C diente ebenfalls einer Verkürzung der Analysenzeit.

Um die für die Durchführung der klinischen Studie erforderliche Empfindlichkeit von ca. $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ zu erreichen, wurde, wie bei der Bestimmung des Hydrochinonglucuronids, bei 200 nm detektiert. Außerdem wurde eine bubble-cell-Kapillare verwendet, die am Detektorfenster eine Aufweitung des Innendurchmessers von 50 auf $150 \mu\text{m}$ aufweist und dadurch die Empfindlichkeit erhöht.

Als Interner Standard wurde Natriumbenzoat verwendet. Es ist gut wasserlöslich, auch in Lösung stabil, besitzt einen geeigneten Chromophor für die UV-Detektion und migriert bei der entwickelten CE-Methode zeitnah dem zu bestimmenden Analyten.

2.4 Methodenvalidierung

2.4.1 Validierung der Bestimmung von Hydrochinonglucuronid

Wie bereits beschrieben, erfolgte die Bestimmung von Hydrochinonglucuronid mit den Kalibrierdaten von Arbutin, da das Glucuronid nicht als Referenzsubstanz zur Verfügung stand. Somit wurde für die Validierung lediglich die Selektivität für das Hydrochinonglucuronid *und* das Hydrochinonglucosid bestätigt. Alle weiteren Validierungsparameter wurden ausschließlich für das Hydrochinonglucosid (Arbutin) bestimmt.

2.4.1.1 Selektivität

Die Selektivität der Methode wurde durch Vergleich der Elektropherogramme von Leerurin (versetzt mit Ascorbinsäure) 6 verschiedener Probanden mit Elektropherogrammen von Leerurin gespikt mit einer Lösung von Hydrochinonglucuronid (aus einem Rattenlebermikrosomenansatz) bzw. dem Internem Standard (2-Hydroxyethyl)-Salicylat gezeigt.

2.4.1.2 Linearität

Die Linearität der Methode wurde durch Bestimmung von jeweils 2 Proben an 9 Konzentrationsstufen über einen Bereich von 10-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($37\text{-}1837 \mu\text{mol L}^{-1}$) demonstriert.

Dabei wurde der Quotient aus korrigierter Peakfläche Hydrochinonglucosid und korrigierter Peakfläche Int. Standard gegen die Konzentration dargestellt (Abb. 10).

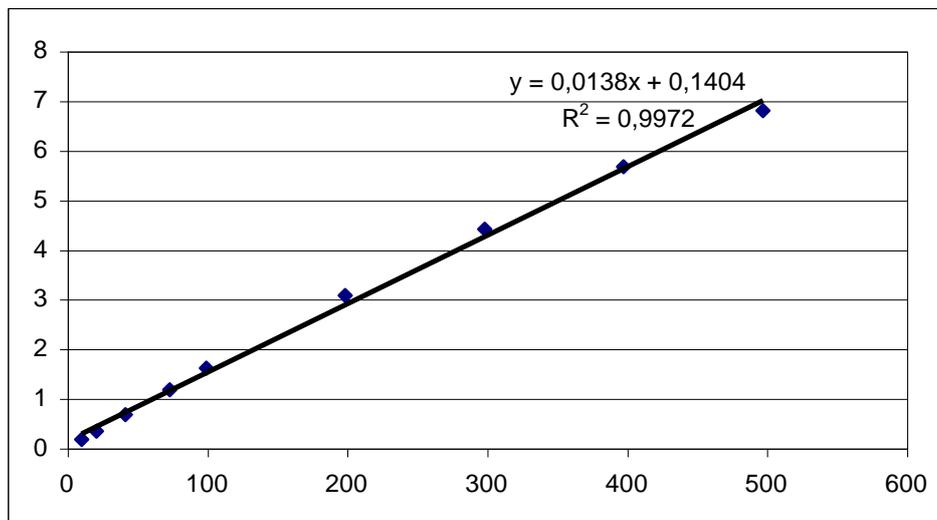


Abb. 10: Linearität Hydrochinonglucosid (10-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Durch eine Zweiteilung des Bereiches kann der lineare Regressionskoeffizient noch optimiert werden. Die Verwendung von 2 Geraden ist zur Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit des Flächenverhältnisses Arbutin/ Interner Standard aus diesem Grunde besser geeignet. Sowohl für den oberen als auch für den unteren Bereich existieren, wie in den Guidelines gefordert, jeweils 5 Konzentrationsstufen. Im Arbeitsbereich von 20-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($73\text{-}1837 \mu\text{mol L}^{-1}$) wurden deshalb auch jeweils 2 Kalibriergeraden verwendet.

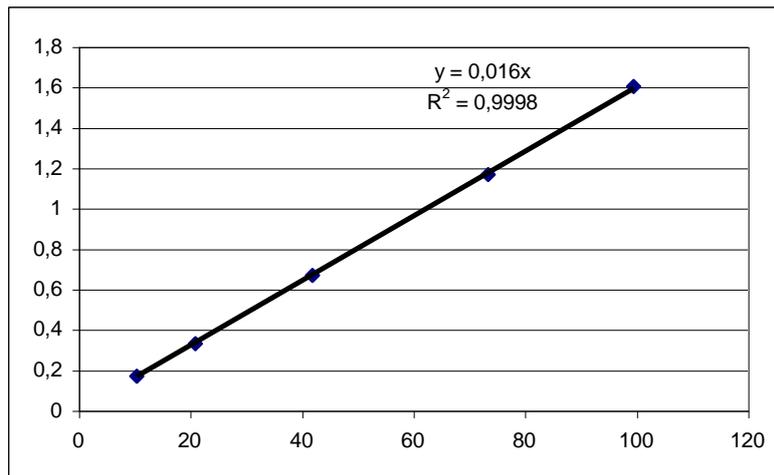


Abb. 11: Linearität Hydrochinonglucosid (10-100 µg mL⁻¹).

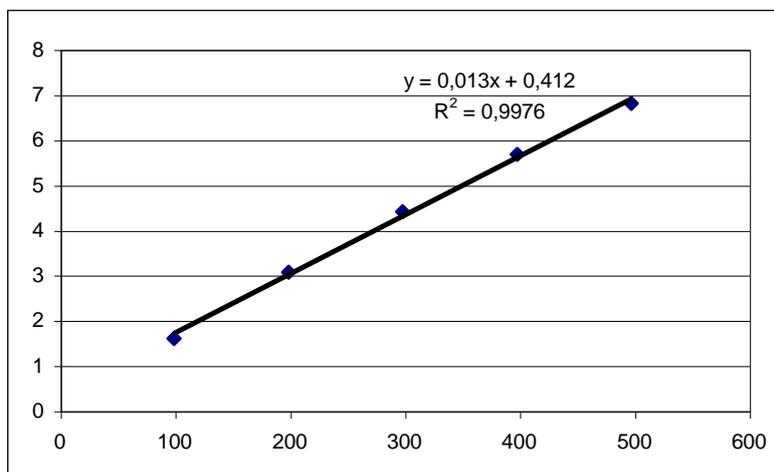


Abb. 12: Linearität Hydrochinonglucosid (100-500 µg mL⁻¹).

2.4.1.3 Präzision und Richtigkeit

Präzision und Richtigkeit wurden über den gesamten Bereich (LOQ, mittlere und oberste Konzentration) an 3 aufeinanderfolgenden Tagen nachgewiesen (Tab. 1,2). Bearbeiter und verwendete Reagenzien wurden variiert. Die Einzeldaten aus Präzision und Richtigkeit generieren sich aus demselben Datenpool. An jeder Konzentration betrug die Probenzahl n=6.

Um die Richtigkeit der Methode zu bestimmen und eine Aussage über die Güte der auch in der Routine täglich aufgenommenen Kalibriergeraden zu erhalten, wurde im Vorfeld jeweils der 2. und 3. Wert (von n=6) zur Erstellung der Kalibriergeraden

definiert. Die Richtigkeit der Methode ergab sich nun aus der Abweichung des Mittelwertes der 6 Bestimmungen von der jeweiligen Kalibriergeraden.

Tag	Kalibriergerade 1			
	20 µg mL ⁻¹		100 µg mL ⁻¹	
	RSD (%)	Richtigkeit (%)	RSD (%)	Richtigkeit (%)
1	2,84	102,41	1,77	101,94
2	2,82	103,03	4,91	100,76
3	3,85	104,09	2,72	102,19

Tag	Kalibriergerade 2			
	100 µg mL ⁻¹		500 µg mL ⁻¹	
	RSD (%)	Richtigkeit (%)	RSD (%)	Richtigkeit (%)
1	1,77	102,42	1,93	102,46
2	4,91	101,45	3,89	103,07
3	2,72	102,48	5,16	104,26

Tabellen 1 und 2: Präzision und Richtigkeit: Bestimmung von Arbutin.

Die ermittelten Werte liegen innerhalb der Grenzen, die in den internationalen Regularien [7,8] vorgegeben sind. Sie sollen sowohl für Präzision und Richtigkeit kleiner als 15 % sein, an der Bestimmungsgrenze sind auch bis zu 20 % Abweichung zulässig.

Die Bestimmung einer Wiederfindung zusätzlich zur Richtigkeit war nicht nötig, da keine Probenvorbereitung durchgeführt wurde.

2.4.1.4 Arbeitsbereich

Sowohl während der Validierung als auch in der Routineanalytik wurden zu 900 µL Urin 100 µL Stammlösung (Validierung: Arbutin und Interner Standard; Routine: nur Interner Standard) zugegeben.

Aus diesem Grunde unterschied sich die ursprünglich im Urin enthaltene Konzentration an Hydrochinonglucuronid von der nach Zugabe des Internen Standards ermittelten Konzentration um den Faktor 1,11.

Der Arbeitsbereich, in dem mit der hier aufgeführten Methode valide Ergebnisse erhalten werden können und der in der Validierung 20-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ betrug, entspricht demzufolge für die Routineanalytik einem Konzentrationsbereich von 22-556 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (82-2040 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

2.4.2 Validierung der Bestimmung des Hydrochinonmonosulfats

2.4.2.1 Selektivität

Die Selektivität der Methode wurde durch Vergleich der Elektropherogramme von Leerurin (versetzt mit Ascorbinsäure) 6 verschiedener Probanden, gespikt mit einer Lösung von Internem Standard ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) sowie Hydrochinonmonosulfat-Kalium, ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) gezeigt.

2.4.2.2 Linearität

Die Linearität der Methode wurde durch Bestimmung von jeweils 2 Proben an 6 Konzentrationsstufen über einen Bereich von 44-2190 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (bzw. 10-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bezogen auf das Kalium-Salz) demonstriert. Dabei wurde der Quotient aus korrigierter Peakfläche Hydrochinonmonosulfat und korrigierter Peakfläche Internem Standard gegen die Konzentration dargestellt (Abb. 13).

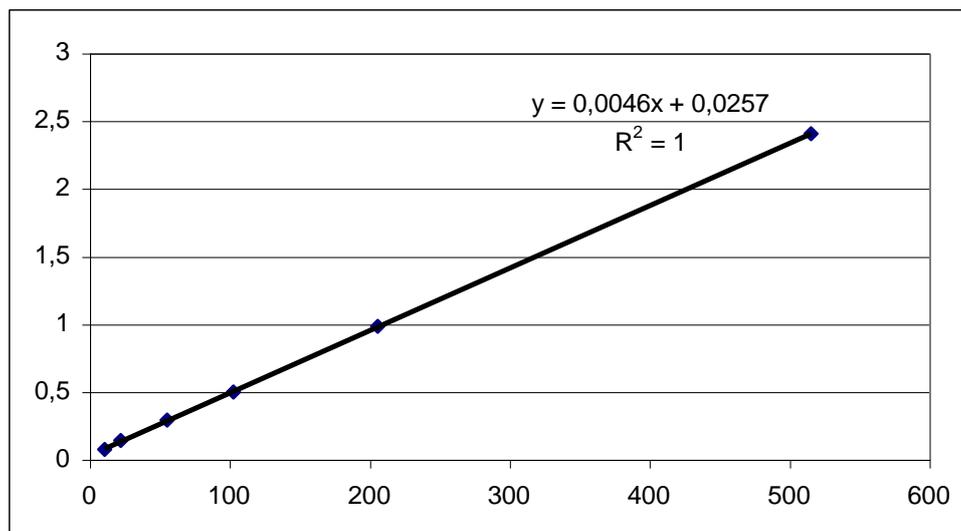


Abb. 13: Linearität Hydrochinonmonosulfat-Kalium (10-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

2.4.2.3 Präzision und Richtigkeit

Präzision und Richtigkeit wurden über den gesamten Range (LOQ, mittlere und oberste Konzentration) an 3 aufeinanderfolgenden Tagen nachgewiesen (Tab. 3). Bearbeiter und verwendete Reagenzien wurden variiert. Die Einzeldaten aus Präzision und Richtigkeit generieren sich aus demselben Datenpool. An jeder Konzentration betrug die Probenzahl $n=6$.

Um die Richtigkeit der Methode zu bestimmen und eine Aussage über die Güte der auch in der Routine täglich aufgenommenen Kalibriergerade zu erhalten, wurde im Vorfeld jeweils der 2. und 3. Wert (von $n=6$) zur Erstellung der Kalibriergeraden definiert. Die Richtigkeit der Methode ergab sich nun aus der Abweichung des Mittelwertes der 6 Bestimmungen von der Kalibriergeraden.

Tag	20 $\mu\text{g mL}^{-1}$		100 $\mu\text{g mL}^{-1}$		500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	RSD (%)	Richt. (%)	RSD (%)	Richt. (%)	RSD (%)	Richt. (%)
1	7	93,53	4,94	105,07	4,52	104,8
2	11,37	114,91	5,75	104,33	2,12	101,77
3	6,83	111,9	7,98	95	1,87	98,13

Tabelle 3: Präzision und Richtigkeit, Hydrochinonmonosulfat-Kalium.

Die ermittelten Werte liegen innerhalb der Grenzen, die in den entsprechenden internationalen Regularien [7,8] vorgegeben sind.

Die Bestimmung einer Wiederfindung zusätzlich zur Richtigkeit war nicht nötig, da keine Probenvorbereitung durchgeführt wurde.

2.4.2.4 Arbeitsbereich

Wie während der Validierung wurden auch in der Routineanalytik zu 900 µL Urin 100 µL Stammlösung (Validierung: Arbutin und Interner Standard; Routine: nur Interner Standard) zugegeben.

Aus diesem Grunde unterschied sich die ursprünglich im Urin enthaltene Konzentration an Hydrochinonmonosulfat, von der nach Zugabe des Internen Standards ermittelten Konzentration um den Faktor 1,11.

Der Arbeitsbereich, in dem mit der hier aufgeführten Methode valide Ergebnisse erhalten werden können und der in der Validierung 20-500 µg mL⁻¹; 88-2190 µmol L⁻¹ betrug, entspricht demzufolge für die Routineanalytik einem Range von 22-556 µg mL⁻¹ (97-2434 µmol L⁻¹).

2.4.3 Stabilitätsuntersuchungen

Sowohl die Untersuchungen zur Langzeitstabilität (3 Monate bei -22°C) als auch zur Auftaustabilität (3 maliges Auftauen) und Autosamplerstabilität (24 Stunden) ergaben keine Hinweise auf Instabilität der Analyten unter den gewählten Bedingungen im Untersuchungszeitraum.

3. Teilprojekt 2: Bestimmung von Ginsenosiden in Ginseng-Extrakten

Bearbeiter: Ingmar Glöckl

3.1 Allgemein

Ginsengwurzel (von *Panax Ginseng* C.A. MEYER, *Araliaceae*) ist eine Droge aus der traditionellen Medizin Südostasiens, die auch in der westlichen Welt innerhalb der letzten Jahrzehnte zunehmend an Interesse gewonnen hat. Sie weist eine vielfältige pharmakologische Wirkung auf. Beispielhaft seien hier die adaptogene Wirkung sowie die Steigerung von psychischer und physischer Leistungsfähigkeit genannt [10-21]. Hauptverantwortlich für die Wirkung sind Triterpensaponine, auch als Ginsenoside bezeichnet, von denen zur Zeit mehr als 30 bekannt sind [22].

Da verschiedene Ginsenoside unterschiedliche Wirkungen besitzen und das Inhaltsstoffspektrum je nach Herkunft und Alter der Droge sowie dem Extraktionsverfahren variiert, ist für die Qualitätsbeurteilung des Produktes der Nachweis der verschiedenen Ginsenoside notwendig. Seit den 70er Jahren ist es möglich, die Ginsengsaponine mittels Hochleistungsflüssigchromatographie voneinander zu trennen und quantitativ zu bestimmen [22-31]. Neben dieser bisher spezifischsten Methode gibt es außerdem die Möglichkeiten die Ginsenoside photometrisch [32], mittels Dünnschichtchromatographie [33] sowie Gaschromatographie [34] zu bestimmen.

Nachteile der bestehenden HPLC-Methoden sind die Verwendung von großen Mengen Acetonitril, einem giftigen und umweltschädlichen organischen Lösungsmittel, im Eluenten, die für die Industrie sehr kostenaufwendigen langen Analysenzeiten von bis zu 90 Minuten pro Lauf sowie aufwendige Probenvorbereitungen. Die gerade auf diesen Gebieten liegenden Vorteile der Kapillarelektrophorese lassen trotz der Tatsache, dass die Triterpensaponine des Ginsengs für eine kapillarelektrophoretische Trennung nur wenig günstige physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen, einen Einsatz sehr attraktiv erscheinen.

3.2 Methodenentwicklung

Die Trennung von Analyten mittels „normaler“ Kapillaronenelektrophorese (CZE) beruht auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit von Ionen im elektrischen Feld. Ginsenoside sind elektrisch neutral (Abb. 14), eine Anwendung der CZE allein erschien deshalb nicht erfolgversprechend.

Die Ginseng-Saponine (lat. Sapo, die Seife) sind oberflächenaktive Stoffe. Als solche wechselwirken sie mit der Kapillarwand. Sie sind zu einer Eigenmicellbildung befähigt.

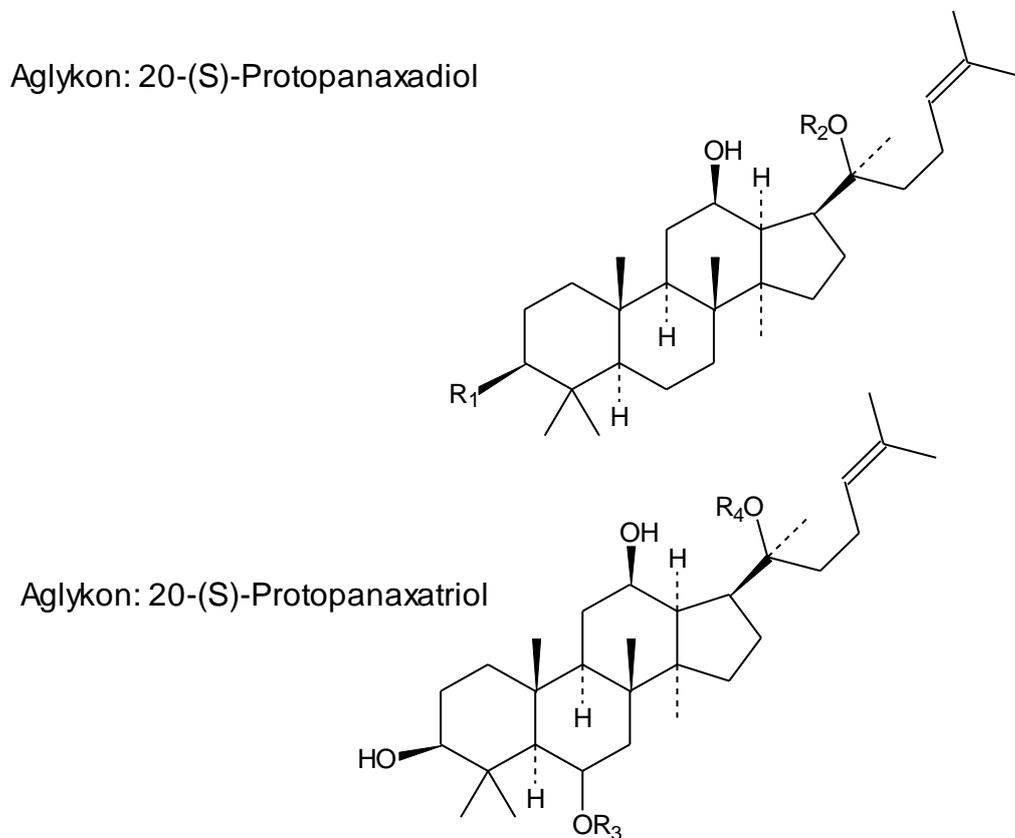


Abb. 14-1: Aglykone der 7 Hauptginsenoside.

Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Rb ₁	O-Glc ²⁻¹ Glc	O-Glc ⁶⁻¹ Glc		
Rb ₂	O-Glc ²⁻¹ Glc	O-Glc ⁶⁻¹ Arap		
Rc	O-Glc ²⁻¹ Glc	O-Glc ⁶⁻¹ Araf		
Rd	O-Glc ²⁻¹ Glc	O-Glc		
Re			O-Glc ²⁻¹ Rha	O-Glc
Rf			O-Glc ²⁻¹ Glc	H
Rg ₁			O-Glc	O-Glc

Abb. 14-2: Zuckerreste der 7 Hauptginsenoside. Glc: β -D-glucoopyranosyl, Arap: α -L-arabinopyranosyl, Araf: α -L-arabinofuranosyl, Rha: α -L-rhamno-pyranosyl.

Die CE-Methode der Wahl für ungeladene Analyten ist die Micellare Elektrokinetische Chromatographie, bei der die Trennungen auf hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen der Analyten mit Micellen als pseudostationärer Phase und der sich daraus ergebenden unterschiedlichen Aufenthaltswahrscheinlichkeit in mobiler und pseudostationärer Phase beruhen [35-44]. Als Micellbildner wird besonders häufig SDS eingesetzt, aber auch Gallensäuresalze u.a. kommen zur Anwendung [45,46]. Da Ginsenoside und Gallensäuresalze in ihrer Struktur Ähnlichkeiten aufweisen, ist anzunehmen, daß Gallensäuresalze eher dazu imstande sind, Ginsenoside zu diskriminieren als andere Micellbildner wie z.B. SDS. Durch Kombination verschiedener Micellbildner [38,47] oder durch den Zusatz von Cyclodextrinen [37] bietet sich die Möglichkeit, die Selektivität der Micellen für bestimmte Analyten zu steuern.

Die beiden Aglykone 20(S)-Protopanaxadiol und 20(S)-Protopanaxatriol der Ginseng-Saponine sind glykosidisch mit mehreren Zuckern verknüpft. Eine Komplexierung durch Borationen ist sowohl für vicinale Hydroxylgruppen als auch für 1,3-Diole in der Literatur beschrieben [47-52]. Diese ist abhängig von der Konzentration der Borationen und steigt mit zunehmender Konzentration. Pro Boration können ein oder zwei Diole komplexiert werden, dabei werden in cis-Stellung befindliche Hydroxylgruppen bevorzugt komplexiert. Durch die Bildung von Ginsenosid-Borat-Komplexen, deren Ausmaß durch Art und Anzahl der Zuckerreste der Ginsenoside bestimmt wird, erhalten die Saponine eine negative Ladung und sollten aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit, die von der

Ladung und Größe der Komplexe abhängt, im elektrischen Feld getrennt werden können.

Für die hier beschriebene Methodenentwicklung wurde die Kombination aus der MEKC und der CZE getestet.

Um bei anodischer Aufgabe eine Detektion der Ginsenoside am Detektionsfenster zu erreichen, d.h. die Analyten zur Kathode zu transportieren, muß der Elektroosmotische Fluß größer sein als die Wanderung der negativ geladenen Cholat-Micellen, deren elektrophoretische Mobilität in Richtung Anode gerichtet ist. Die Analyten besitzen demnach je nach Aufenthalt in den Mizellen als pseudostationärer Phase Migrationszeiten zwischen dem EOF und der Micellen. Eine schematische Darstellung zeigt Abb. 15.

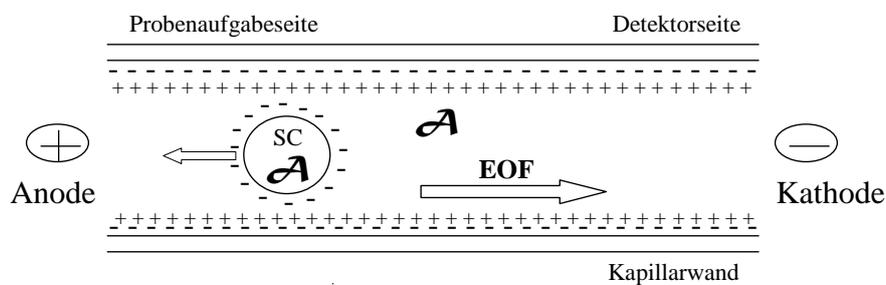


Abb. 15: Schematische Trennung von Analyten (**A**) durch SC-Micellen in der Micellaren Elektrokinetischen Chromatographie.

Ausgehend von einer beschriebenen CE-Methode zur Ginsenganalytik [53], die nur eine ungenügende Trennung der Analyten bei Verwendung eines höheren Anteils an organischem Lösungsmittel (Acetonitril) aufwies, wurde eine neue Methode entwickelt. Dabei sollten nicht nur die 7 als Referenzsubstanzen kommerziell erhältlichen Ginsenoside voneinander getrennt werden, sondern gleichzeitig eine Abwägung bezüglich Reproduzierbarkeit und Robustheit der Methode sowie der Analysenzeit durchgeführt werden. Die Haupteinflussfaktoren dafür waren der pH-Wert der Pufferlösung, der Spannungsabfall über der Kapillare, die Ionenstärke der Pufferlösung sowie die Art des Micellbildners.

Erste Untersuchungen wurden mit einer als Standard benutzten Kapillare von 50 cm Gesamtlänge (effektive Länge 45,4 cm; ID 50 μm) begonnen. Durch eine Verlängerung der Kapillare auf 75 cm Gesamtlänge (effektiv 70,4; ID 50 μm) zeigte sich eine verbesserte Trennung der Analyten. Nachteilig wirkte sich die längere Kapillare dabei auf die Analysenzeit aus.

Durch die Micellen (bzw. Helices) des Natriumcholats (SC) kam es in Folge einer selektiven Ein- oder Anlagerung der Analyten in Abhängigkeit von ihren physikochemischen Eigenschaften zur einer Diskriminierung der Ginsenoside. Die SC-Micellen stellen somit eine pseudostationäre Phase in der Kapillare dar. Der Boratpuffer bei alkalischem pH-Wert diente dazu, mit den Zuckerresten der Glykoside negativ geladene Boratkomplexe zu bilden, um so die Selektivität zu verbessern. Es wurde eine unbeschichtete Kapillare benutzt. Der bei dem gewählten pH-Wert des Puffers (10,0) erzeugte starke Elektroosmotische Fluß bewirkt den Transport der Analyten zur Kathode. Eine generelle pH-Abhängigkeit der Trennung konnte anhand der durchgeführten Untersuchungen in den verwendeten Puffersystemen nicht erkannt werden. Es wurde aber festgestellt, daß sich der EOF bei Verwendung des Boratpuffers mit steigendem pH-Wert vergrößert und sich damit die Analysenzeit verkürzt.

Eine Deprotonierung der Hydroxylgruppen der Zuckerreste bei so hohen pH-Werten, bei denen eine pH-abhängige Trennung der Analyten auch ohne den Einsatz von Mizellen zu erwarten wäre, wurde nicht untersucht, da der verwendete Borat-Puffer im pH-Bereich zwischen pH 8,5 und 10,5 die stärkste Pufferwirkung aufweist.

Probeläufe mit 0,1 N Natronlauge (pH 13) ergaben aufgrund fehlender Pufferkapazität keine verwertbaren Ergebnisse. Der Boratpuffer wurde bei pH-

Werten zwischen 8,0 und 11,0 getestet. Ein pH-Wert von 10,0 erwies sich als am besten geeignet. Neben dem Boratpuffer wurde auch CAPS-Puffer (Cyclohexylaminopropansulfonsäure) im pH-Bereich 8,0-12,0 getestet. Auch hiermit konnte eine Trennung der 7 Ginsenoside, allerdings unter Zuhilfenahme von höheren Anteilen Methanol als organischem „Modifizier“ im Laufpuffer, erreicht werden.

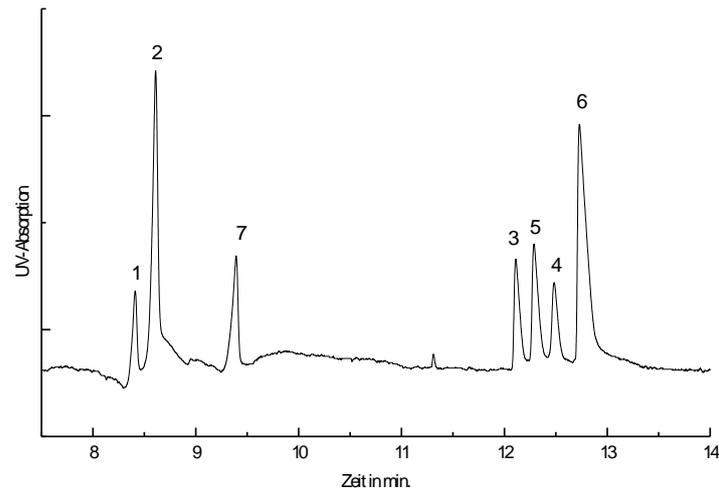


Abb. 16: Elektropherogramm einer Referenzsubstanzlösung von 7 Ginsenosiden: Rg₁ (1), Re (2), Rb₁ (3), Rc (4), Rb₂ (5), Rd (6) und Rf (7); 50 mM CAPS, 75mM SC, pH 9,2 + 30% Methanol, Kap. 50 cm, 30kV.

Da sich das Boratsystem stabiler als das CAPS-System darstellte, wurde ersteres bei der weiteren Methodenentwicklung verwendet. Interessant ist die unterschiedliche Migrationsreihenfolge der Ginsenoside Rb₂ und Rc, die die Hypothese der Komplexbildung der Ginsenoside im Boratsystem bestätigt (vgl. Abb. 16 und Abb. 17). Mit dem in einer Veröffentlichung [53] beschriebenen Phosphatpuffer konnte keine Trennung der Analyten erreicht werden.

Die Ginsenosid-Borat-Komplexbildung und damit die Selektivität verstärkt sich mit zunehmender Ionenstärke des Boratpuffers [47,48,52]. Außerdem verringern sich die Wandadsorptionsphänomene an der Kapillarwand bei einer höheren Ionenstärke des Puffers [54-57]. Damit werden die Peaks schmaler und die Auflösung verbessert sich. Nachteilig wirkt sich die hohe Ionenstärke auf die Analysenzeit aus. Durch die Reduktion des EOF wird diese verlängert [54-57]. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Analysenzeit stellt die an die Kapillare angelegte Spannung dar.

Um die Analysendauer so kurz wie möglich zu halten, wurde die Spannung auf 30 kV festgelegt.

Untersuchungen mit dem Natriumsalz der Cholsäure als Micellbildner ergaben bei Konzentrationen zwischen 75 und 100 mM zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Selektivität. Für die Analysenzeit erwiesen sich geringe Konzentrationen als vorteilhaft. Experimente mit anderen Gallensäuresalzen (z.B. Natriumsalze der Dehydrocholsäure, Desoxycholsäure und Taurodesoxycholsäure) sowie mit Mischmicellen aus SDS und SC in verschiedenen Konzentrationen sind erfolgt, ergaben aber keine zufriedenstellenden Ergebnisse hinsichtlich der Trennung.

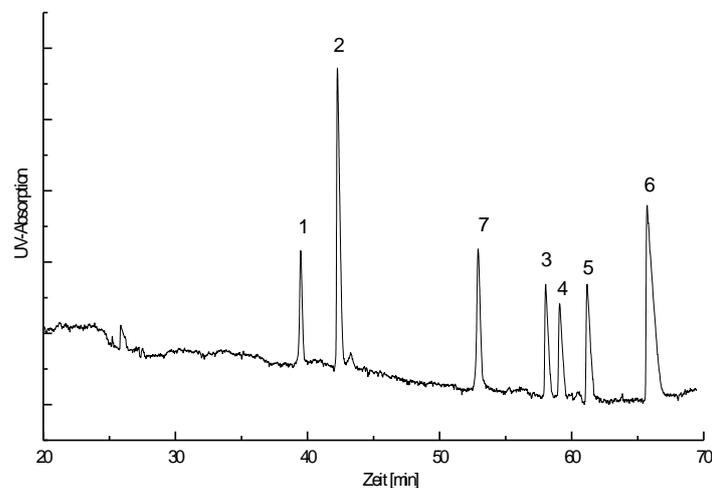


Abb. 17: Elektropherogramm einer Referenzsubstanzlösung von 7 Ginsenosiden: Rg₁ (1), Re (2), Rb₁ (3), Rc (4), Rb₂ (5), Rd (6) und Rf (7); 200 mM Borat, 75mM SC, pH10,0 + 10% Methanol, Kap. 75/ 70,4 cm, 30kV, 20 °C.

Methanol, Acetonitril, Isopropanol, Dimethylformamid und Tetrahydrofuran wurden in verschiedenen Konzentrationen als „Modifier“ eingesetzt. Bis auf Dimethylformamid erwiesen sich alle zur Verbesserung der Selektivität als verwendbar. In Anbetracht der verlängerten Analysenzeiten wurde jedoch auf die Verwendung organischer „Modifier“ verzichtet. So konnte durch den Verzicht auf Methanol sowie die Verringerung der Boratkonzentration von 200 mM auf 100 mM die Analysenzeit mehr als halbiert werden (vgl. Abb. 17 und Abb. 18).

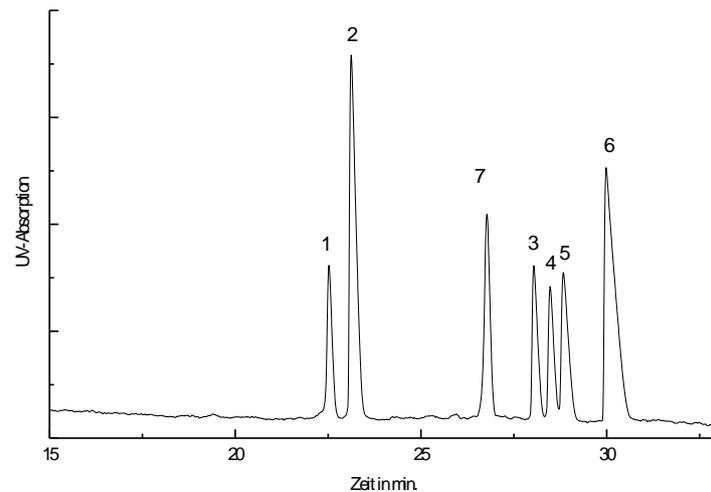


Abb. 18: Elektropherogramm einer Referenzsubstanzlösung von 7 Ginsenosiden Rg₁ (1), Re (2), Rb₁ (3), Rc (4), Rb₂ (5), Rd (6) und Rf (7); 100 mM Borat, 75 mM SC, pH 10,0; Kap. 75 cm, 30 kV, 20°C.

In der MEKC sind Trennungen aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten temperaturabhängig [56,57]. Dies konnte durch Experimente bei Temperaturen zwischen 15 und 40°C bestätigt werden. Je niedriger die Temperatur war, desto besser war die Auflösung. Je höher die Temperatur war, desto geringer war die Analysenzeit. Ein Optimum wurde für die bestehende Methode bei 30°C ermittelt.

Eine Basislinientrennung aller 7 Ginsengsaponine konnte, wie z.B. in Abb. 17 gezeigt, erreicht werden. Da dies nur mit langen Analysenzeiten möglich war, wurde letztendlich auf die vollständige Abtrennung der weniger bedeutenden Ginsenoside Rc und Rb₂ verzichtet.

Eine Trennung der Ginsengsaponine konnte so innerhalb von 21 Minuten (Abb. 19) erreicht werden, was in etwa einem Drittel der Analysenzeit üblicher HPLC-Trennungen entspricht.

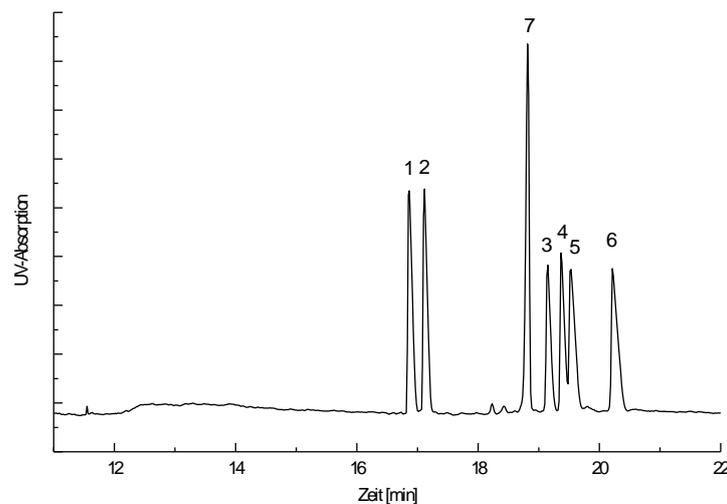


Abb. 19: Elektropherogramm einer Referenzsubstanzlösung von 7 Ginsenosiden Rg₁ (1), Re (2), Rb₁ (3), Rc (4), Rb₂ (5), Rd (6) und Rf (7); 100 mM Borat, 80 mM SC, pH 10,0; Kap. 75 cm, 30 kV, 30°C.

Die erreichten Bodenzahlen betragen ungefähr 500 000 für die verwendete 75-cm-Kapillare, umgerechnet auf einen Meter Kapillarlänge ergaben sich Bodenzahlen von über $7 \times 10^5 \text{ m}^{-1}$. Die Probenaufgabemenge betrug 4 psi*sec. Für kleinere Probemengen war die Genauigkeit des Gerätes bei der Druckinjektion unzureichend. Bei sehr großen Aufgabemengen wurde die Probenzone in der Kapillare zu lang. Es kommt dann, wie von Schmutz *et al.* [58] beschrieben, zu einer Verschlechterung der Auflösung.

Aus der Literatur ist bekannt, daß bei Messungen bei 198 nm der Absorptionskoeffizient der Ginsenoside aufgrund der Chromophore (nur eine C-C-Doppelbindung zwischen C₂₄ und C₂₅) um 50 % größer ist als bei 203 nm [59]. Zur Detektion wurde eine Wellenlänge von 200 nm verwendet, da bei 198 nm ein zu starkes Rauschen der Basislinie auftrat. Als vorteilhaft erwies sich hierbei auch der Verzicht auf organische „Modifier“ im Laufpuffer, da diese im Bereich um 200 nm Eigenabsorption aufweisen und damit die Empfindlichkeit verschlechtern hätten.

Für die Verwendung als Interner Standard wurde eine Verbindung gesucht, die sowohl bei der Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion als auch bei der CE-Methode den Ginsenosiden ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist. Im Laufe der Untersuchungen erwies sich Chloramphenicol als Interner Standard geeignet.

Abb. 20 zeigt eine Trennung der Ginsenoside aus einem vorgereinigten Extrakt.

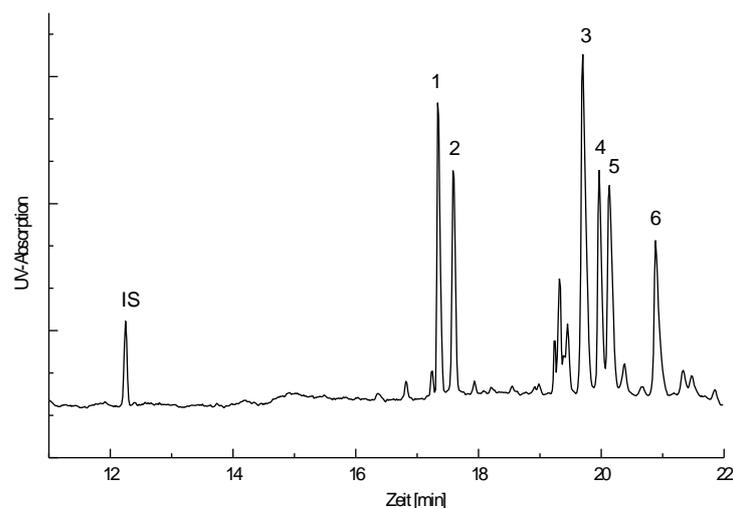


Abb. 20: Elektropherogramm eines vorgereinigten Ginsengwurzelextraktes Ginsenosid Rg₁ (1), Re (2), Rb₁ (3), Rc (4), Rb₂ (5), Rd (6) und Chloramphenicol (Bedingungen wie in Abb. 19).

Als Probenvorbereitung wurde eine Festphasenextraktionsmethode an RP18-Material entwickelt. Nach Adsorption der Ginsenoside am RP-Material der Kartusche und mehreren Waschvorgängen mit Wasser wurden die Analyten mit 96%-igem Ethanol eluiert.

Eine Verbesserung der CE-Methode bezüglich der Schnelligkeit, aber zu Lasten der Reproduzierbarkeit ergab eine zusätzliche Verkürzung der Analysenzeit auf ca. 15 Minuten (s. Abb. 21). Grund für die mangelnde Reproduzierbarkeit ist wahrscheinlich der hohe Spannungsabfall in der verkürzten Kapillare, der in höheren Stromstärken resultiert. Die unregelmäßige Basislinie ist durch thermische Effekte in der Kapillare zu erklären.

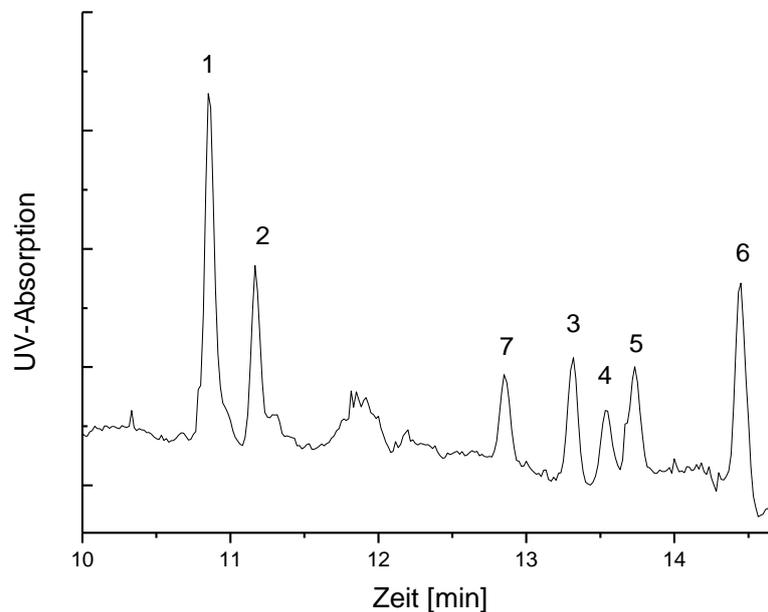


Abb. 21: Elektropherogramm einer Referenzsubstanzlösung von 7 Ginsenosiden Rg₁ (1), Re (2), Rb₁ (3), Rc (4), Rb₂ (5), Rd (6) und Rf (7); 100 mM Borat, 80 mM SC, pH 10,0 + 5% Methanol; Kap. 50 cm, 30 kV, 30°C.

Eine Einsatzmöglichkeit dieser Methode könnte eine schnelle Fingerprintanalytik sein, in der nur halbquantitative Aussagen nötig sind.

3.3 Methodenvalidierung

Die Validierung wurde am Beispiel des Ginsenosids Rb₁ für das gesamte analytische Verfahren beispielhaft durchgeführt, eingeschlossen der Festphasenextraktion. Da in der phytochemischen Analytik keine Leermatrix zur Verfügung steht, wurde die Methode der Standardaddition zu einem verdünnten Extrakt ausgewählt.

Der Arbeitsbereich, für den die Validierung der Methode durchgeführt wurde, wurde von 0,5 bis 1,5 mg mL⁻¹ Ginsenosid Rb₁ festgelegt. Ein Extrakt mit einem ungefähren Gehalt von 1 mg mL⁻¹ Rb₁ wurde zu einer Konzentration von 0,3 mg mL⁻¹ verdünnt, anschließend mit einer konzentrierten Stammlösung Rb₁ auf Konzentrationen von 0,5, 1,0 und 1,5 mg mL⁻¹ Rb₁ aufgestockt und kapillarelektrophoretisch vermessen. Das Spiken mit der Stammlösung Rb₁ und dem Internen Standard Chloramphenicol erfolgte vor der jeweils durchgeführten Festphasenextraktion.

3.3.1 Spezifität

Die Spezifität wurde durch den Vergleich der Elektropherogramme von Lösungsmittel, Extrakt, Internem Standard, Ginsenosid Rb₁ sowie mit IS und Rb₁ gespiketem Extrakt demonstriert.

3.3.2 Linearität

Die Linearität wurde im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1,5 mg mL⁻¹ demonstriert (n=8, R=0.99924; Abb. 22).

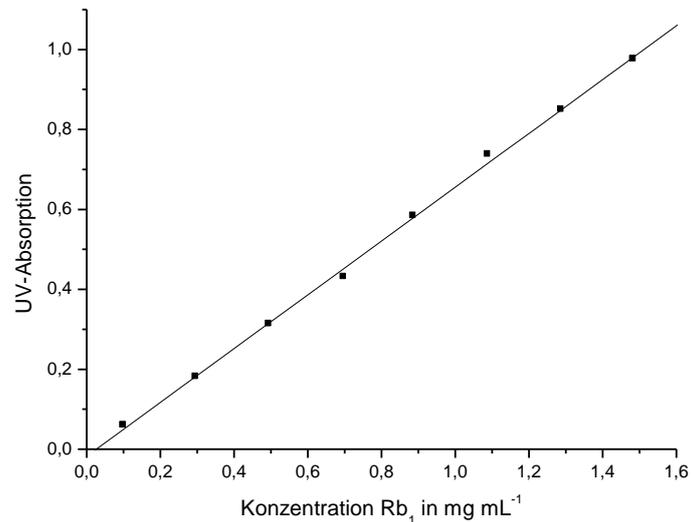


Abb. 22: Linearität Ginsenosid Rb₁ (n=8, R=0.99924, $y = 0,67319 x - 0,01763$).

Die mit Ginsenosid Rb₁ an 8 verschiedenen Konzentrationsniveaus und mit dem Internen Standard gespiketen Proben wurden doppelt bestimmt. Die resultierenden Quotienten aus den korrigierten Peakflächen wurden durch lineare Regression ausgewertet (Abb. 22)

3.3.3 Präzision und Richtigkeit

Präzision und Richtigkeit wurden an 2 verschiedenen Tagen am niedrigsten (0,5 mg mL⁻¹), mittleren (1,0 mg mL⁻¹) und höchsten (1,5 mg mL⁻¹) Konzentrationsniveau des zu validierenden Arbeitsbereiches bestimmt.

Die Angabe der Präzision wurde als Relative Standardabweichung (RSD) der korrigierten Peakflächen des Analyten (bezogen auf den Internen Standard) angegeben. Die Wiederholpräzision (repeatability) wurde durch 6 aufeinanderfolgende Analysenläufe mit 6 Injektionen aus einer einzigen Probe bestimmt. Es ergab sich dabei ein Wert von 1,66 %. Die Vergleichspräzision (intermediate precision) [n=6, k=3] betrug 2,48 bis 3,95 %.

Als ein Maß für die Robustheit des Systems kann der RSD-Wert der korrigierten Migrationszeiten herangezogen werden. Er betrug 0,84 bzw. 0,99 % an beiden Analysetagen.

Die Richtigkeit [n=6, k=3] wurde als Wiederfindung bestimmt. Sie betrug 95,16 % am höchsten Konzentrationslevel, 98,32 % am mittleren Konzentrationslevel und 100,83 % am niedrigsten Konzentrationsniveau.

Der Arbeitsbereich, abgeleitet aus Linearität, Präzision und Richtigkeit für die Bestimmung des Ginsenosids Rb₁ ergab sich dadurch von 0,5 bis 1,5 mg mL⁻¹.

3.4 Methodenvergleich

Da verschiedene RP-HPLC-Methoden momentan die Methode der Wahl darstellen, sollte die entwickelte CE-Methode mit diesen verglichen werden. Es handelt sich dabei um 2 orthogonale Trenntechniken, d.h. sie können sich aufgrund des unterschiedlichen Trennprinzips für Reinheits- und Richtigkeitsuntersuchungen sehr gut ergänzen.

Da die in der Validierung ermittelten Werte nicht nur die CE-Methode, sondern das gesamte analytische Verfahren inklusive Probenvorbereitung mittels Festphasenextraktion umfassen, ergeben sich, verglichen mit den publizierten HPLC-Methoden (z.B. Abb. 23), vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Präzision der Methoden.

So variieren die in der Literatur angegebenen RSD-Werte je nach HPLC-Methode, des Konzentrationsbereiches der Gehaltsbestimmung, der Art der Probenvorbereitung und der Art der Bestimmung eines Präzisionswertes zwischen 1 und 4%. Bei der Gehaltsbestimmung von Ginsenosiden unterhalb des Arbeitsbereiches der CE-Methode wurden Werte zwischen 4 und 33% erhalten [24]. RSD-Werte von 0,1 bis 3% wurden lediglich durch wiederholtes Injizieren einer einzelnen Probelösung („Gerätepräzision“) erreicht [28]. Da solche Bestimmungen keine Aussage über die Streuung der Analysenergebnisse eines gesamten analytischen Verfahrens erlaubt, sollten diese Angaben streng von Angaben zur Bestimmung der Methodenpräzision unterschieden werden. Eigene HPLC-Untersuchungen wurden dennoch nicht durchgeführt. Die Methodenpräzision der HPLC-Methode nach Sollorz [27], Abb. 23, beträgt 1,74% inklusive der Probenvorbereitung über eine Extrelutsäule.

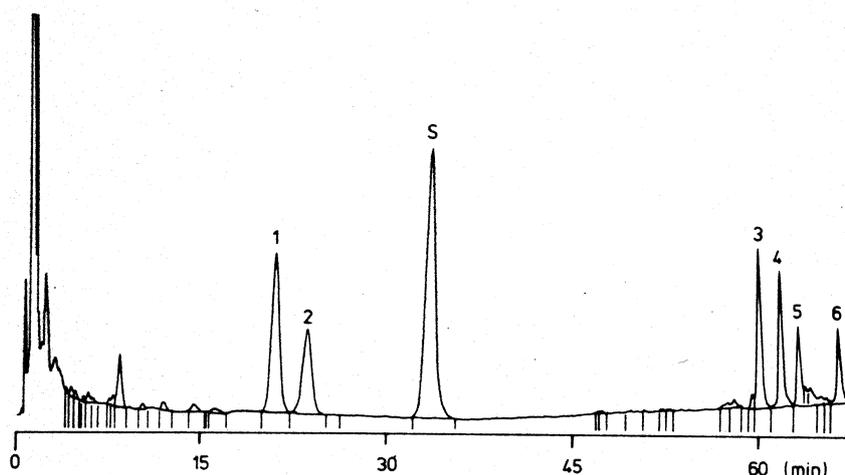


Abb. 23: HPLC-Chromatogramm eines vorgereinigten Ginsengwurzelextraktes [aus 27] mit Ginsenosid Rg1 (1), Re (2), Rb1 (3), Rc (4), Rb2 (5), Rd (6) und Int. St. (S).

Eine weitere Optimierung der Präzision der CE-Methode wäre möglich, wenn beim Handling kleiner Volumina von Stammlösungen aus Kostengründen nicht Eppendorff-Pipetten, sondern Vollpipetten und größere Volumina verwendet werden würden.

Vorteile der MEKC-Methode sind eine sehr kurze Analysenzeit von ungefähr 20 Minuten (~ 1/3 der der HPLC), damit verbunden die Möglichkeit eines höheren Probendurchsatzes, der Verzicht auf Acetonitril oder andere organische Lösungsmittel im Laufpuffer, der Verbrauch von nur sehr geringen Mengen "Laufmittel" und relativ geringe laufende Kosten (Tab. 4).

	MEKC	HPLC
Laufzeit	ca. 20 min.	ca. 60-90 min.
Organische Lösungsmittel	keine	Acetonitril (0.5 L pro Tag)
Kosten für Chemikalien	ca. 1 DM pro Tag	ca. 50 DM pro Tag
Gerätekosten	ca. 150 DM pro Tag	ca. 300 DM pro Tag
Anzahl der Analysen pro Tag	ca. 50	ca. 15

Tabelle 4: Vergleich von MEKC- und HPLC-Methode [18] zur Ginseng-Analytik.

4. Teilprojekt 3: Bestimmung von Opiumalkaloiden in Schlafmohn-Extrakten

Bearbeiter: Ingmar Glöckl

4.1 Allgemein

Schlafmohn, *Papaver somniferum L. ssp. Somniferum (Papaveraceae)* ist eine einjährige Kulturpflanze, von der mehrere Varietäten und zahlreiche Zuchtformen existieren, die sich im Alkaloidgehalt, Alkaloidspektrum und im Habitus unterscheiden. Die Pflanzen enthalten in allen Teilen, besonders aber in den Kapseln, Milchröhren, in deren Milchsaft die Alkaloide gespeichert werden.

Die Opiumalkaloide gehören hauptsächlich dem Morphinan-Typ (Morphin, Codein, Thebain), dem Benzylisochinolin-Typ (Papaverin) und dem Phthalidisochinolin-Typ (Noscapin) an. Zum größten Teil liegen die Alkaloide als Meconate vor.

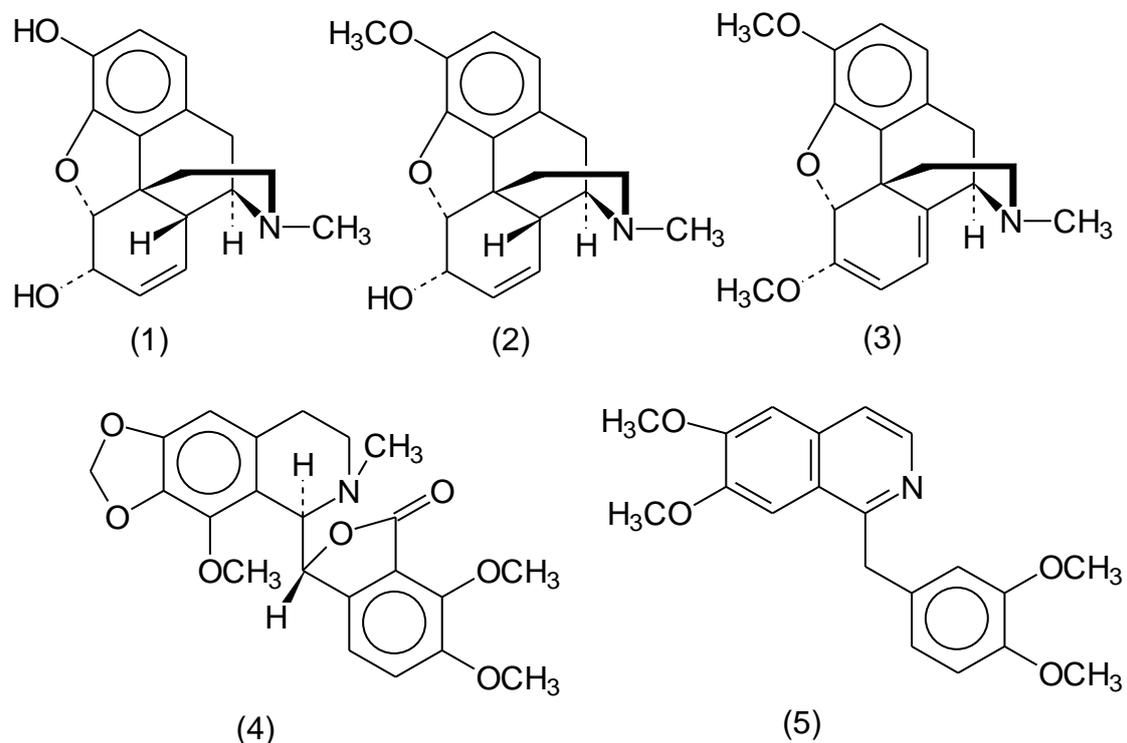


Abb. 24: Strukturformeln der Hauptalkaloide Morphin (1), Codein (2), Thebain (3), Noscapin (4) und Papaverin (5)

Die Hauptalkaloide zeigen unterschiedliche pharmakologische Effekte. Während Morphin eine starke endorphinomimetische Wirkung besitzt und deshalb auch in Reinform als starkes Analgetikum eingesetzt wird, ist die analgetische Wirkung des Codeins um ca. 1/10 geringer. Letzteres wirkt stark antitussiv. Neben den zentralen Wirkungen haben beide auch periphere Wirkungen. Typische Nebenwirkung einer Analgesie mit Morphin ist deshalb Obstipation.

Thebain weist einen strychninähnlichen Effekt auf und hat keine therapeutische Bedeutung. Noscapin zeigt eine dem Codein ähnliche Wirkung. Papaverin wirkt hauptsächlich peripher an den glatten Muskelzellen. Aufgrund seiner relaxierenden Wirkung kann es bei Spasmen des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes eingesetzt werden.

Auch das Opium, der getrocknete Milchsaft der unreifen ausgewachsenen Kapseln des Schlafmohn, oder die Opiumtinktur wurden früher als Mischung der Opiumalkaloide therapeutisch bei schweren Diarrhoen eingesetzt.

Zur Zeit auf dem deutschen Markt befindliche Zubereitungen aus einem Schlafmohnextrakt werden bei Spasmen des Magen-Darm-Traktes eingesetzt.

Da je nach Varietät, Herkunft, Anbau der Pflanze und Gewinnung des Extraktes Alkaloidspektrum und -gehalt variieren kann, ist für eine gleichbleibende Qualität und damit Wirksamkeit des Extraktes eine Standardisierung notwendig.

Zur Gehaltsbestimmung von Morphin und Codein sowie der Begrenzung des Gehaltes an Thebain in Opiumtinktur schreibt das Arzneibuch eine HPLC-Methode vor (mittels Ionenpaarchromatographie), die sich hauptsächlich durch eine aufwendige flüssigchromatographische Probenvorbereitung und der Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie Dichlormethan, Isopropanol und Acetonitril auszeichnet.

4.2 Methodenentwicklung

Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften sind die Opiate für die Kapillaronenelektrophorese sehr gut geeignet. Bei sauren pH-Werten sind sie protoniert und als Salze in Wasser sehr gut löslich.

Verschiedene Arbeiten zur Trennung von Opiaten wurden publiziert: Obwohl, wie bereits erwähnt, die Trennung von Alkaloiden in einem Puffer im sauren pH-Bereich aufgrund der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit in einem elektrischen Feld einfach möglich sein sollte, werden in der Literatur Methoden verwendet, die die Trennung der Opiuminhaltsstoffe mittels Micellarer Elektrokinetischer Chromatographie [60,61] oder auch unter Verwendung der nichtwässrigen Kapillarelektrophorese durchführen [62-64].

In der von Trenerry [60] beschriebenen MEKC-Methode wird Cetyltrimethylammoniumbromid als kationischer Micellbildner verwendet. Die Analysenzeiten sind kurz und liegen unter 10 Minuten. Die Daten, die bei der teilweise durchgeführten Validierung erhalten wurden, lassen aber auf Probleme bei der Reproduzierbarkeit schließen, weshalb die Methode für eine Extraktstandardisierung nicht eingesetzt werden kann.

Die Trennung im nichtwässrigen Medium diente mehr akademischem Interesse. Eine Quantifizierung erfolgte nicht.

Daneben sind Bestimmungen von Morphin, Codein und deren Metaboliten aus humanen Körperflüssigkeiten [65-68] oder auch Grundlagen-Untersuchungen mittels CE-MS [69,70] zu finden.

Eine validierte Methode zur Bestimmung der Opiate als Voraussetzung für eine Standardisierung aus einem Extrakt aus Schlafmohnextrakt mittels CE ist in der Literatur nicht beschrieben.

Ziel war es deshalb, eine schnelle CE-Methode zu entwickeln, die eine Quantifizierung der Hauptalkaloide Morphin, Codein, Thebain, Papaverin und Noscapin in einem Schlafmohn-Extrakt ermöglichen sollte und dabei reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Bei Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass es durch größere Mengen organischer Lösungsmittel in der Probe zu Problemen bei der Peakform bzw. auch zu Stromzusammenbrüchen während der Analysen kommen kann. Deshalb mussten

die Analyten zunächst in eine wässrige Lösung überführt werden. Dies erfolgte durch Abrotation des Extraktionsmittels und anschließender Aufnahme des Rückstandes in verdünnter Salzsäure. Dadurch wurden die Opiate in die zur Migration erforderlichen entsprechenden Ammoniumsalze überführt.

Auf der Suche nach einem geeigneten Laufpuffer wurden einige aus in der Literatur erfolgreicher Alkaloidtrennungen abgeleiteten Standardpuffer überprüft. Für die Trennung gut geeignet erwies sich ein 100 mM Phosphatpuffer pH 2,0, dem Methanol als organischer Modifier zugesetzt wurde. Je höher die Methanolkonzentration dabei war, desto besser war die Trennung. In einem weiteren Schritt wurde der Anteil an Methanol soweit wie möglich (auf 25 Vol%) wieder reduziert, da die Verdunstung des Modifiers durch die Beeinflussung des EOF und der Trennung [71] auch als eine Ursache für mangelnde Reproduzierbarkeit gilt.

Eine abschließende Verkürzung der Analysenzeit, die sich teilweise auch schon durch die verringerte Methanolkonzentration im Laufpuffer ergab, wurde durch Erhöhung des Spannungsabfalls über der Kapillare von 400 auf 500 V cm⁻¹ erreicht. Es resultierte eine kapillarelektrophoretische Trennung der Hauptopiumalkaloide Morphin, Codein, Thebain, Noscapin und Papaverin innerhalb von 10 Minuten. Abbildung 25 zeigt ein Beispiel-Elektropherogramm einer aufgearbeiteten Probe eines Schlafmohnextraktes, gespikt mit dem Internen Standard Tetracain sowie mit Noscapin und Papaverin. Der Zusatz von Noscapin und Papaverin erfolgte, da diese beiden nur in geringer Konzentration im Extrakt enthalten waren.

Die Peakzuordnung der einzelnen Verbindungen erfolgte durch Zuspiken der Referenzsubstanzen. Da eine CE-MS-Kopplung durch den verwendeten Phosphatpuffer nicht möglich war, konnte die Frage der Peakreinheit nicht vollständig geklärt werden. Anzumerken ist, dass aus Plausibilitätsgründen keine weiteren Hauptalkaloide im analytischen Fenster zu erwarten sind, d.h. Peakverunreinigungen durch Nebenalkaloide könnten nur in geringem quantitativem Ausmaß auftreten.

Zusätzlich lassen die hohe Trennschärfe in der Kapillarelektrophorese, durch die auch strukturell sehr ähnliche Verbindungen wie Morphin, Codein und Thebain voneinander getrennt werden können, die Wahrscheinlichkeit von Co-Migrationen gering erscheinen.

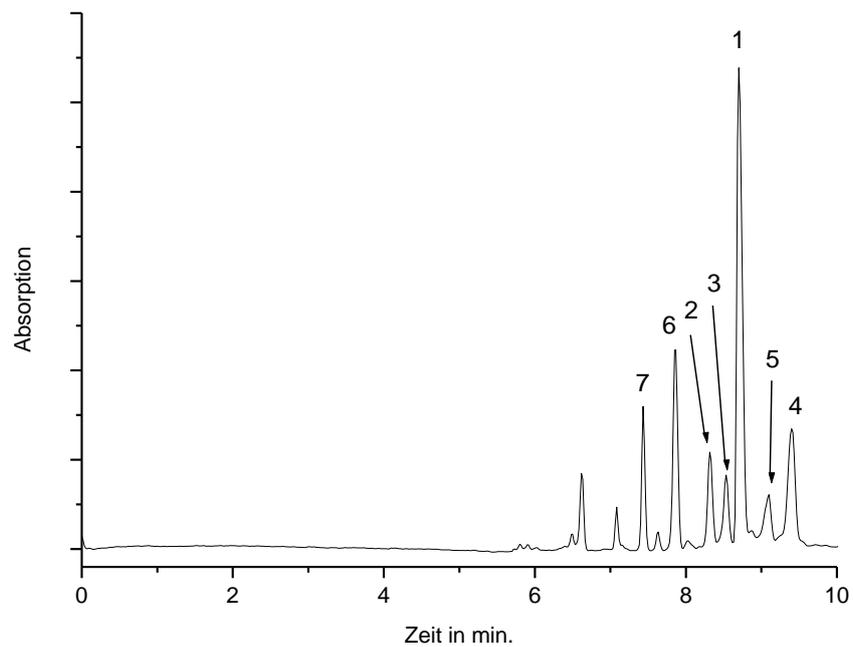


Abb. 25: Kapillarelektrophoretische Trennung der Opiumalkaloide Morphin (1), Thebain (2), Codein (3), Noscapin (4) und Papaverin (5) aus einem Schlafmohnextrakt sowie zugespiktes Tetracain (6) und Dextrometorphan (7) als potentielle Interne Standards.

Gerät: Biofocus 3000

Puffer: 75% 100 mM Phosphat pH 2,0; 25% Methanol

Kapillare: Länge: 45,4/ 50 cm, ID 50 μ m

Spannung: 25000 V

Temperatur: Kapillare 30°C, Probenraum 20°C

Injektion: 4 psi·sec.

Detektion: 200 nm

4.3 Methodvalidierung

Beispielhaft für alle untersuchten Opiumalkaloide wurde die Bestimmung von Papaverin und Noscapin validiert. Es wurden Linearität, Präzision und Richtigkeit (als Wiederfindung) nachgewiesen sowie die Bestimmungsgrenze (LOQ) abgeschätzt.

Die Validierung erfolgte ohne die Verwendung einer Matrix. Dies ist aus folgenden Gründen zulässig: Der zu validierende Bereich (5 bis 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) war sehr groß. Eine Leermatrix, wie in der Bioanalytik bei vergleichbaren Arbeitsbereichen vorhanden, stand aber nicht zur Verfügung. Bei einem durchzuführenden Standardadditionsverfahren müsste deshalb die Matrix um ein Vielfaches verdünnt werden. Da dies die Eigenschaften der Matrix komplett verändern würde, wurde darauf verzichtet. Andere Möglichkeiten, wie z.B. die selektive Extraktion der zu bestimmenden Opiate z.B. durch Ionenaustausch, wurden aus dem gleichen Grund verworfen.

Einzigste Möglichkeit wäre die drastische Verkleinerung des Arbeitsbereiches gewesen. Aus Gründen der universellen Einsetzbarkeit der Methode für verschiedene Extrakte auch nach langer Lagerung wurde auch dieser Lösungsansatz nicht umgesetzt.

Es wurde eine Verdünnungsreihe (5, 10, 20, 50 und 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Papaverin-HCl und Noscapin-HCl, berechnet als Base) hergestellt. Pro Konzentrationsstufe wurden 3 Proben jeweils mit und ohne Probenvorbereitung vermessen.

4.3.1 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität wurden die Mittelwerte der in Tabellen 5 und 6 angegebenen Messwerte (mit Probenvorbereitung) verwendet. Die Methode war über den Bereich von 5 bis 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ für beide Analyten linear (Abb. 26 und 27).

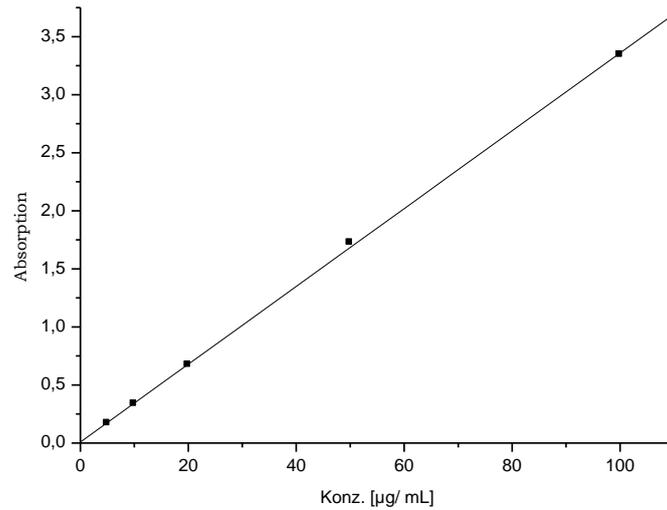


Abb. 26: Lineare Regression Papaverin ($y=0,03351*x+0,00871$; $R=0,99986$).

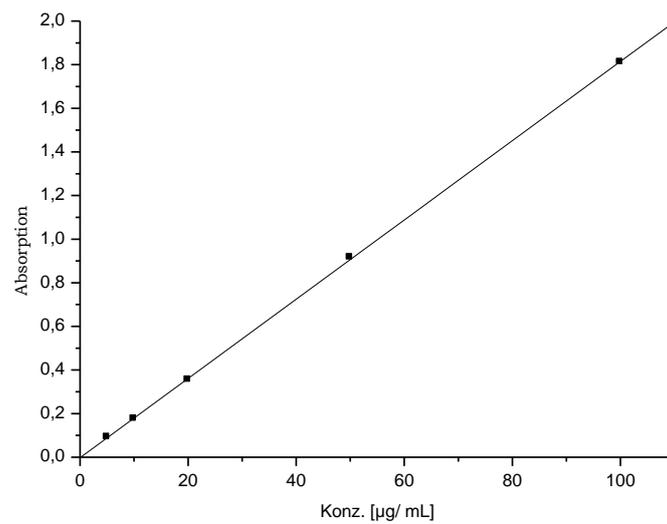


Abb. 27: Lineare Regression Noscapin ($y=0,01817*x-0,00231$; $R=0,99996$).

4.3.2 Präzision

Konzentration	RSD in %, Papaverin	RSD in %, Noscapin
5 µg mL ⁻¹	1,74	2,43
10 µg mL ⁻¹	1,98	0,87
20 µg mL ⁻¹	0,49	2,70
50 µg mL ⁻¹	0,99	0,28
100 µg mL ⁻¹	2,16	1,77

Tabelle 5: Vermessung ohne Probenvorbereitung

Konzentration	RSD in %, Papaverin	RSD in %, Noscapin
5 µg mL ⁻¹	1,12	8,70
10 µg mL ⁻¹	1,70	3,95
20 µg mL ⁻¹	1,93	3,54
50 µg mL ⁻¹	0,88	0,28
100 µg mL ⁻¹	2,36	1,42

Tabelle 6: Vermessung mit Probenvorbereitung.

Aus den in den Tabellen 5 und 6 angegebenen Präzisionswerten für die einzelnen Konzentrationsniveaus wurden Gesamt-RSD-Werte ermittelt. Für die Bestimmung des Papaverin ergaben sich so 1,47 % (ohne Probenvorbereitung) bzw. 1,60 % (mit Probenvorbereitung) und für die Bestimmung des Noscapin 1,61 % (ohne Probenvorbereitung) bzw. 3,59 % (mit Probenvorbereitung).

4.3.3 Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde als Wiederfindungsrate bestimmt. Es ergaben sich dabei die in Tabelle 7 dargestellten Werte.

Konzentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$	Wiederfindungsrate Papaverin in %	Wiederfindungsrate Noscapin in %
5	97,07	98,55
10	94,7	97,1
20	98,58	98,01
50	103,07	102,98
100	101,61	102,33

Tabelle 7: Wiederfindungsraten von Papaverin und Noscapin.

4.3.4 Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die Bestimmungsgrenze wurde in einer wässrigen Referenzsubstanzlösung aus dem Signal-Rausch-Verhältnis abgeschätzt. Sie lag danach bei der Detektionswellenlänge von 200 nm unter $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ Noscapin bzw. Papaverin.

Abb. 28 zeigt ein zur Bestimmung der LOQ aufgenommenes Elektropherogramm.

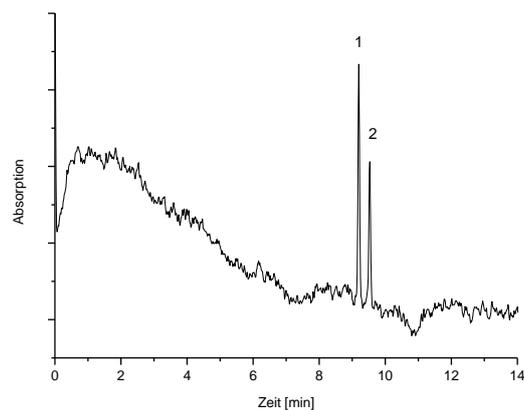


Abb. 28: Elektropherogramm von Papaverin (1) und Noscapin (2) [je $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$].

4.3.5 Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich ergibt sich aus den ermittelten Werten für Linearität, Präzision und Richtigkeit. Er beträgt demzufolge sowohl für Noscapin als auch für Papaverin 5 bis 100 µg mL⁻¹.

4.4 Methodenvergleich

Arzneibücher wie z.B. ÖAB90, BP88, und USPXXII noch auf die gravimetrische, maßanalytische bzw. spektrophotometrische Bestimmung von Morphin beschränkten, schreiben Ph.Eur.1997 und DAB 2000 eine HPLC-Methode zur Gehaltsbestimmung von Morphin und Codein sowie die Bestimmung eines Maximalgehaltes von Thebain in Opiumtinktur durch externe Standardisierung vor. Mittels Ionenpaarchromatographie werden dabei die Analyten mit Natriumheptansulfonat auf einer RP18-Phase in einem 30 %igen Acetonitril/Wasser-Gemisch getrennt und bestimmt. Die Probenvorbereitung erfolgt über Kieselgur, aus dem die Analyten mit einer Isopropanol/ Dichlormethan-Mischung eluiert werden. In Tabelle 8 sind die für die Arzneibuchmethode benötigten organischen Lösungsmittel im Vergleich zur entwickelten CE-Methode und die daraus entstehenden Kosten (für 20 Analysen pro Tag) gegenübergestellt. Sie unterscheiden sich um ein Vielfaches.

Ein weiterer Nachteil der HPLC-Methode ist, dass der Papaverin- und Noscapingehalt nicht bestimmt werden kann.

Aufgrund dieser Tatsache wurde von Krenn et al. [72] eine HPLC-Methode (ebenfalls unter Verwendung von Natriumheptansulfonat und RP18-Material als stationärer Phase) entwickelt, durch die neben Morphin, Codein und Thebain auch Papaverin und Noscapin quantitativ bestimmbar sind. Auch die Probenvorbereitung wurde in diesen Arbeiten vereinfacht. Sie erfolgte über eine Extrelut-Säule nach Auszug mit Säure im Ultraschall und anschließender Alkalisierung.

Die Analysenzeit der HPLC-Methode mit einem Acetonitril-Gradienten von 25 Minuten ist, verglichen mit der entwickelten CE-Methode, mehr als doppelt so lang. Die Standardabweichungen sind mit 5-10% beschrieben und somit größer als in der Kapillarelektrophorese. Zur Qualitätskontrolle scheint diese Methode deshalb nicht geeignet.

	CE-Methode	HPLC-Methode (DAB)
Verbrauch organischer Lösungsmittel inkl. Probenvorbereitung	Methanol (ca. 2 mL pro Tag)	Acetonitril (ca. ¾ L pro Tag) Isopropanol (ca. ¼ L pro Tag) Dichlormethan (ca. 1,3 L pro Tag)
Kosten für organische Lösungsmittel	ca. 0.05 DM pro Tag	ca. 100 DM pro Tag

Tab. 8: Verbrauch organischer Lösungsmittel in CE und HPLC (DAB) bei 20 Analysen pro Tag.

Daneben existieren in der Literatur noch zahlreiche weitere Methoden für die Bestimmung von Morphin und anderen Alkaloiden. So sind z.B. die Direktauswertung der Dünnschichtchromatographie [73,74], die Gaschromatographie [75] sowie eine GC-MS-Analytik nach Derivatisierung zum Diacetylmorphin bzw. Acetylcodein [76] beschrieben. Für die Morphinbestimmung wurde außerdem ein Radioimmunoassay entwickelt [77].

5. Teilprojekt 4: Trennung von charakteristischen Artischockeninhaltsstoffen

Bearbeiter: Ingmar Glöckl

5.1 Allgemein

Artischockenblätter (*Cynarae folium*) bestehen aus den getrockneten Grundblättern von *Cynara scolymus* L. (*Asteraceae*) oder *Cynara cardunculus* L.

Cynara scolymus ist eine wild nicht vorkommende, insbesondere in Südeuropa angebaute Kulturpflanze. Inhaltsstoffe sind verschiedene Caffeoylchinasäuren, Sesquiterpenlactone (Cynaropikrin) und die Flavonoide Scolymosid (Luteolin-7-O-rutinosid) und Cynarosid (Luteolin-7-O-glucosid). In frischen Artischockenblättern oder in alkoholischen Extrakten sind hauptsächlich Chlorogensäure (5-O-Caffeoylchinasäure) und 1,5-O-Dicaffeoylchinasäure neben den Flavonoiden Scolymosid und Cynarosid vorhanden. Das lange als Hauptinhaltsstoff geltende Cynarin (1,3-O-Dicaffeoylchinasäure) ist ein Artefakt, das bei Heisswasserextraktion durch Umesterung aus dem 1,5-O-Derivat entsteht [78-81].

Zubereitungen aus Artischockenblättern zeichnen sich durch choleretische, hepatoprotektive, antioxidative und lipidsenkende Eigenschaften aus [78,82-85].

Für die choleretische Wirkung werden häufig die Caffeoylchinasäuren, insbesondere Chlorogensäure und Cynarin verantwortlich gemacht [78,82,83], der lipidsenkende Effekt soll durch Flavonoide hervorgerufen werden. Nach enzymatischer Freisetzung aus seinen Glykosiden soll Luteolin eine Hemmung der Cholesterolsynthese hervorrufen [95].

Da die eigentlichen Wirkstoffe nicht sicher bekannt sind, befinden sich im Handel Präparate, die auf Leitsubstanzen standardisiert sind.

Analytische Arbeiten zur Artischocke als Arzneipflanze sind bisher nur in geringem Ausmaß publiziert [79-81,83,86]. Mittels Hochleistungsflüssigchromatographie sind simultane Bestimmungen von Coffeoylchinasäurederivaten (Ccs) und Flavonoiden bekannt. Die Analysenzeiten liegen hier zwischen 20 und 45 Minuten. Die Trennung erfolgt durch einen Acetonitril-Wasser-Gradienten oder eine Methanol-Wasser-Mischung an RP18-Phasen.

Die physiko-chemischen Eigenschaften der Inhaltstoffe sind für einen Einsatz der Kapillarelektrophorese gut geeignet. Bisher sind kapillarelektro-phoretische Methoden zur Charakterisierung von Extrakten oder Zubereitungen aus Artischocken jedoch nicht bekannt, obwohl sowohl für Flavonoide als auch für Phenolcarbonsäuren veröffentlichte Methoden existieren [87,88-90]. Sie beziehen sich entweder auf Extrakte anderer Pflanzen bzw. es sind Untersuchungen mit Modellsubstanzen, die grundlegende Erkenntnisse zur Methodik der CE oder die Anwendbarkeit innerhalb einer Inhaltstoffgruppe bringen sollen und die deshalb für die Analytik aus Artischockenextrakten nicht von direkter Bedeutung sind.

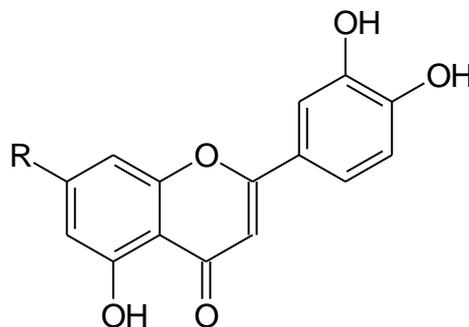


Abb. 29: Strukturformeln von Luteolin (R=OH), Cynarosid (R=glucosid), Scolymosid (R=rutinosid)

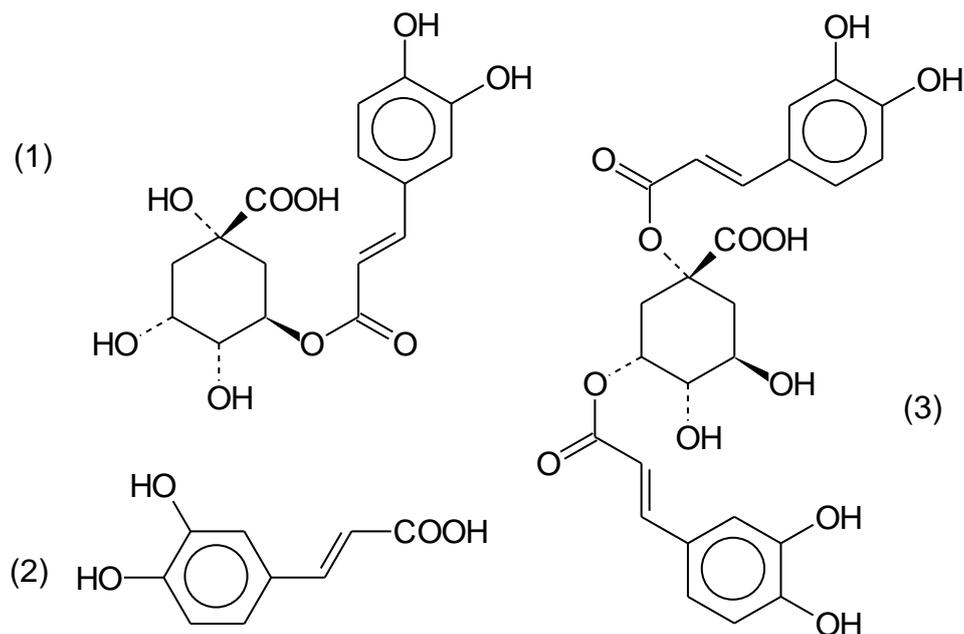


Abb. 30: Strukturformeln von Chlorogensäure (1), Kaffeesäure (2) und Cynarin (3)

5.2 Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung wurde für eine Trennung von Reinsubstanzen aus der Artischocke durchgeführt. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf Extrakte, Frischpflanzenpresssäfte oder andere Zubereitungen war nicht Thema dieses Projektes. Es handelt sich hierbei um orientierende Voruntersuchungen. Als Referenzsubstanzen dienten die Flavonoide Luteolin-7-O-glucosid und dessen Aglykon Luteolin sowie die Phenolcarbonsäuren Chlorogensäure, Kaffeesäure und das Artefakt Cynarin.

Für die Trennung von Flavonoidglykosiden und deren Aglykonen wird laut Literatur in der Regel auf Boratpuffer zurückgegriffen [47,48,91-94]. Diese ermöglichen durch Komplexierung von vicinalen Hydroxylgruppen und die daraus resultierende Bildung von negativ geladenen Borat-Komplexen eine Trennung der ansonsten ungeladenen Verbindungen im elektrischen Feld. Für die Trennung der Analyten wurden Borat-Puffer verschiedener Ionenstärken und unterschiedlicher pH-Werte getestet. Sowohl die Chlorogensäure als auch die Kaffeesäure und das Cynarin sind im stabilen pH-Bereich des Puffers (8,0-10,5) negativ geladen. Aus diesem Grunde war eine Trennung aufgrund unterschiedlicher Ladungs-Masse-Quotienten möglich.

Die Ionenstärke des Puffers sowie dessen pH-Wert bestimmt die Stärke der Komplexbildung mit den vicinalen Hydroxylgruppen, welche sich sowohl in den Strukturen der Kaffeesäurederivate als auch der der Flavonoide befinden. Damit besteht nicht nur ein Einfluss auf Peakform und Analysenzeit, sondern auch eine Beeinflussung der Selektivität der Analyten.

Durch die relativ geringe Pufferkonzentration von 25 mM Borat wurde eine Analysenzeit von unter 10 Minuten erreicht. Dafür wurden breite Peaks der Kaffeesäure und des Luteolin-7-O-glucosids in Kauf genommen. In Abb. 31 ist das Tailing des Peaks der Kaffeesäure und das Fronting des Peaks des Luteolin-7-O-glucosids zu erkennen. Die Ursache hierfür liegt in den unterschiedlichen Mobilitäten von Puffer-Ionen und den Ionen der Analyten bzw. deren Komplexen. Sind die Mobilitäten der Probe-Ionen größer als die des Hintergrundelektrolyten entstehen frontende Peaks, sind die Mobilitäten der Pufferionen dagegen größer, resultieren tailende Peaks [55]. Durch andere Puffersubstanzen, die sich in der Mobilität der Ionen von denen des Borat-Puffers unterscheiden, könnte eine Veränderung der Peakform erreicht werden. Durch zahlreiche Tests wurde aber festgestellt, dass gleichzeitig bei Verbesserung einzelner Peakformen die Peakformen anderer Substanzen aufgrund der unterschiedlichen Mobilitäten schlechter wurden.

Auf die Verwendung von Mizellen, wie sie unter anderem von Bjerregaard [89] zur Trennung von Phenolcarbonsäuren beschrieben wurde, wurde in den Untersuchungen verzichtet, um ein einfaches und stabiles Trennsystem zu entwickeln. Die Verwendung von organischen Modifiern sollte so gering wie möglich gehalten werden, um eine robuste Trennung zu erhalten, die u.a. unabhängig von Verdunstungseffekten ist. 10% Methanol im Trennpuffer waren für eine ausreichende Selektivität dennoch notwendig.

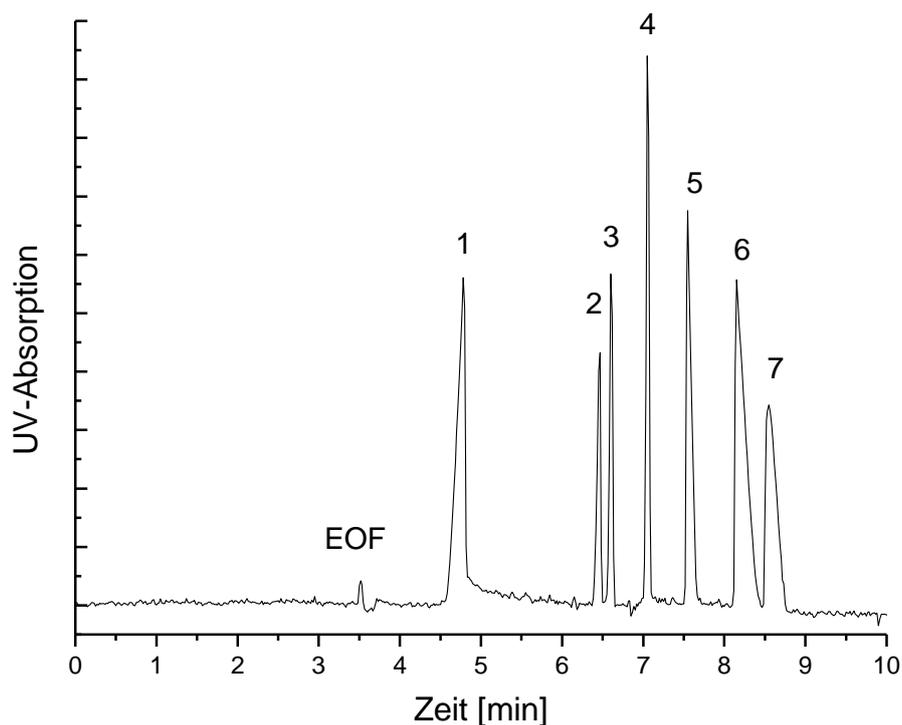


Abb. 31: Elektropherogramm eines Referenzsubstanzgemisches aus Luteolin-7-O-glucosid (1), Chlorogensäure (2), Luteolin (4), Cynarin (5), Kaffeesäure (6) sowie Abbauprodukte der Chlorogensäure (3) und Kaffeesäure (7).
25 mM Borat, pH 9,49 + 10% Methanol, 20 kV, Kap. 50 cm, 20 °C, 200 nm

Mit der entwickelten Methode gelang es nicht nur, für die Standardisierung von Artischockenpräparaten wichtige Inhaltsstoffe voneinander zu trennen, sondern gleichzeitig wichtige Abbauprodukte zu erfassen. So wurde das Luteolin ebenso abgetrennt, wie die beiden bei Licht entstandenen Abbauprodukte der Chlorogen- und der Kaffeesäure.

Eine Identifizierung konnte nicht durchgeführt werden, da keine CE-MS-Kopplung bei dem verwendeten Puffersystem zur Verfügung stand. Da die Verbindungen nur unter Lichteinfluss entstanden, dort die Abbaureaktionen aber auch in einer 2%igen Ascorbinsäure-Lösung unter Lichteinfluss stattfanden, kann ein durch Oxidation hervorgerufener Abbau ausgeschlossen werden. Es wurde die Bildung von cis-trans-Umlagerungsprodukten vermutet. Die Bildung dieser Abbauprodukte ist in der Literatur im Kontext der Artischockenanalytik bisher nicht beschrieben, obwohl er für die Chlorogen- und Kaffeesäure bekannt ist.

Eine mögliche Ursache könnte sein, dass im Extrakt der Abbau aufgrund der Anwesenheit von Begleitsubstanzen nicht stattfindet oder aber, dass in der HPLC

eine Abtrennung dieser Substanzen bisher nicht möglich war. Die hier gezeigte Abtrennung dieser Abbauprodukte mit der entwickelten CE-Methode ist somit nicht nur für die Durchführung von Stabilitätsuntersuchungen an Extrakten oder Fertigprodukten, sondern auch bei der Durchführung von In-Prozeß-Kontrollen von Bedeutung, durch die kritische Verfahrensabläufe kontrolliert werden könnten.

Zu diesem Zweck müßte in Folgeuntersuchungen die Ergebnisse auf Extrakte und Zubereitungen aus diesen übertragen werden sowie die Bestimmung der Zielverbindungen validiert werden.

6. Teilprojekt 5: Charakterisierung von Vitamin D₃ mittels CE

Bearbeiter: Falko Süß

6.1 Einleitung

Die Qualitätskontrolle von Vitamin D₃ (Colecalciferol) in Arzneiformen wird üblicherweise mit HPLC-Methoden durchgeführt, die eine aufwendige Probenvorbereitung erfordern. Darüber hinaus liegt Vitamin D₃ in relativ geringer Konzentration vor.

Ziel der Untersuchung war die Entwicklung einer Methode mittels Kapillarelektrophorese, bei der sich eine aufwendige Probenvorbereitung erübrigt.

Colecalciferol ist eine ungeladene und sehr stark hydrophobe Substanz. In der Kapillarelektrophorese wird für ungeladene Substanzen die Trenntechnik der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie (MEKC) eingesetzt, bei der als pseudostationäre Phase Mizellbildner verwendet werden. Die Trennung in der MEKC erfolgt aufgrund der Verteilung der Substanzen zwischen Trennpuffer und pseudostationärer Phase.

6.2 Vorgehen

Es standen Colecalciferol als Reinsubstanz, Colecalciferol-Trockenkonzentrat (2,5 mg Colecalciferol/g, Roche-Zubereitung), Colecalciferol for Performance Test CRS und Brausetabletten (10 µg Colecalciferol/Tablette) zur Untersuchung zur Verfügung. Zunächst wurde das Migrationsverhalten von Colecalciferol als Reinsubstanz als Lösung in verschiedenen Trennpuffern getestet, denen unterschiedliche Mizellbildner und organische Modifier zugesetzt wurden.

Als Lösungsmittel zur Herstellung der Untersuchungslösungen wurden Isopropylalkohol, Methanol bzw. Ethanol verwendet.

Bei den Puffersystemen handelt es sich um Borat- und Phosphatpuffer sowie um Mischungen aus beiden. Als weitere Parameter bei der Methodenentwicklung wurden die Ionenstärke und der pH-Wert der Puffersysteme variiert.

Als pseudostationäre Phase kamen Natriumdodecylsulfat (SDS), Gallensäuresalze und Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) in verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz. Die Anwendung dieser Mizellbildner allein ohne weitere Pufferzusätze erwies sich aufgrund von Peakverbreiterung als ungeeignet. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß das Colecalciferol sich als sehr hydrophobe Substanz vorrangig im Inneren der Mizellen aufhält.

Der Zusatz organischer Modifier zum Trennpuffer ergab eine Verbesserung der Verteilung des Colecalciferols zwischen den Mizellen und dem Puffersystem. Dies führte zu einer deutlichen Verbesserung der Peakschärfe mit steigender Konzentration des organischen Zusatzes (Abb. 32). Als organische Modifier wurden bisher Acetonitril, Isopropylalkohol und Ethanol eingesetzt.

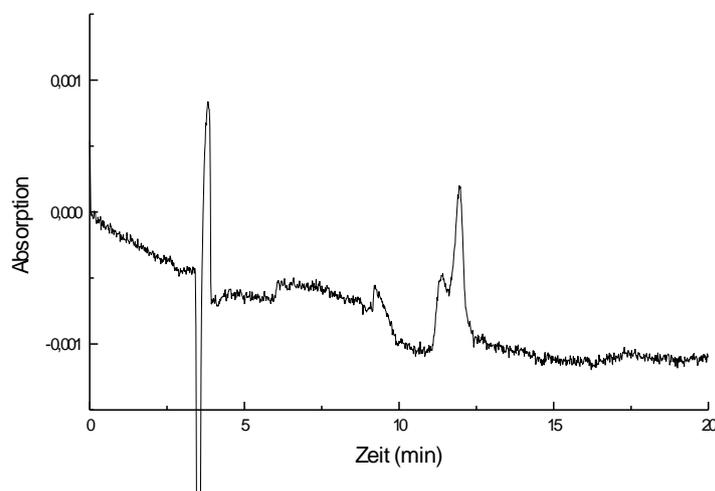


Abb. 32: Bestimmung von Colecalciferol als Reinsubstanz.

CE-Gerät: BioFocus 3000 (BIO-RAD), Trennbedingungen: Puffer 50 mM Borax pH 9.4, 50 mM Natriumcholat, 15% Acetonitril, Kapillare 35/40 cm, ID 50 µm, Spannung 20 kV, Detektion UV, 265 nm, Druckinjektion, 1 psi × sec, Temperatur Kapillare und Probenraum 20°C.

Darüber hinaus wurden ungeladene Cyclodextrine (CD) als weitere pseudostationäre Phase dem Trennpuffer zugesetzt (Abb. 33). Fettlösliche Vitamine wie Vitamin D₃ bilden mit Cyclodextrinen Einschlußverbindungen. Bei diesem Trennpuffer ist davon auszugehen, daß es zu einer Verteilung des Colecalciferols zwischen den ungeladenen Cyclodextrinen, die mit dem elektroosmotischen Fluß wandern, und den anionischen Mizellen, die elektrophoretisch in die entgegengesetzte Richtung bewegt werden, kommt. Insgesamt kommt es zu einer Wanderung des Colecalciferols in Richtung Kathode, also in Richtung des Detektorfensters. Als ungeladene Cyclodextrine wurden γ -Cyclodextrin und Dimethyl- β -Cyclodextrin in steigenden Konzentrationen eingesetzt.

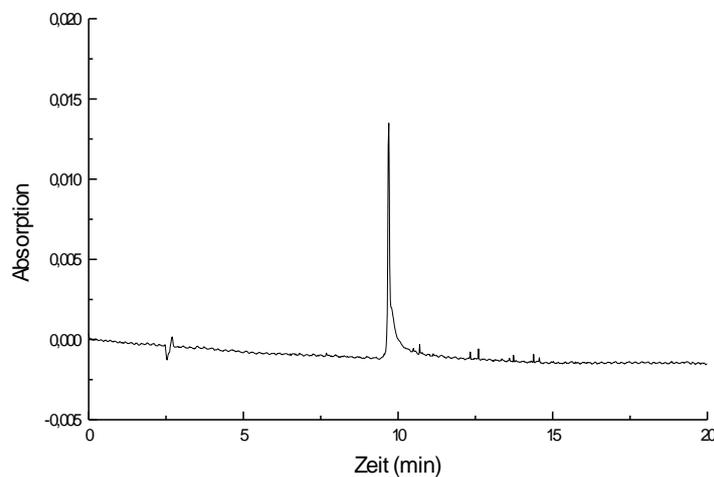


Abb. 33: CD-MEKC von Colecalciferol-Reinsubstanz.

Trennbedingungen: 25 mM Borax pH 9,4, 50 mM SDS, 3 mM γ -Cyclodextrin, Bedingungen sonst wie Abb. 32.

Durch die Anwendung eines Boratpuffers mit SDS und γ -Cyclodextrin bzw. Anwendung eines Phosphatpuffers mit SDS, Dimethyl- β -Cyclodextrin und Ethanol konnte die Peakschärfe nochmals deutlich verbessert werden (Abb. 34).

Die Stabilität der beschriebenen Trennsysteme wies Probleme auf, die sich in Peak-Splitting und starkem Rauschen der Basislinie äußerten (Abb. 35).

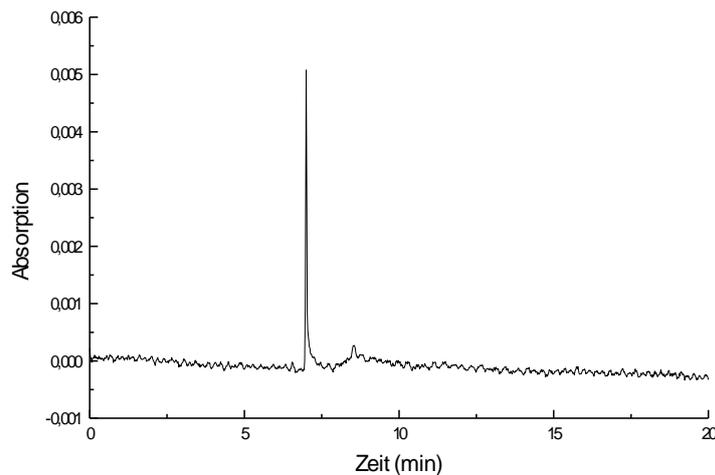


Abb. 34: CD-MEKC von Colecalciferol-Reinsubstanz.

Trennbedingungen: 15 mM Phosphat pH 7,5, 20 mM SDS, 40 mM Dimethyl- β -Cyclodextrin, 2% Ethanol, Bedingungen sonst wie Abb. 32.

In der HPLC-Gehaltsbestimmung des DAB wird eine klare Trennung der Peaks für Colecalciferol, Präcoleciferol (Isomerisierungsprodukt des Colecalciferols in Lösungen) und Transvitamin D₃ (Abbauprodukt des Colecalciferols) gefordert.

Um eine einwandfreie Qualitätskontrolle zu gewährleisten, wird es als notwendig erachtet, die Forderung nach der Trennung der Um- und Abbauprodukte des Colecalciferols auf die CE-Methode zu übertragen.

Zunächst wurde Colecalciferol for Performance Test CRS (ölige Lösung) in Isopropylalkohol gelöst und anschließend 45 Minuten lang unter Rückfluß bei 90°C erhitzt. Dadurch kann davon ausgegangen werden, daß die Probe Colecalciferol, Präcoleciferol und Transvitamin D₃ enthält. Diese Isomere wurden mit der zur Verfügung gestellten HPLC-Methode getrennt.

Die Vermessung von gleich behandelten Proben mit den beschriebenen CE-Systemen ergab keine Trennung.

Da die Trennung von Colecalciferol, Präcoleciferol und Transvitamin D₃ für die Qualitätskontrolle unerlässlich ist, wurde die neue Trenntechnik der Elektrokinetischen Mikroemulsions-Chromatographie (Microemulsion Electrokinetic Capillary Chromatography, MEEKC) angewendet (Abb. 36).

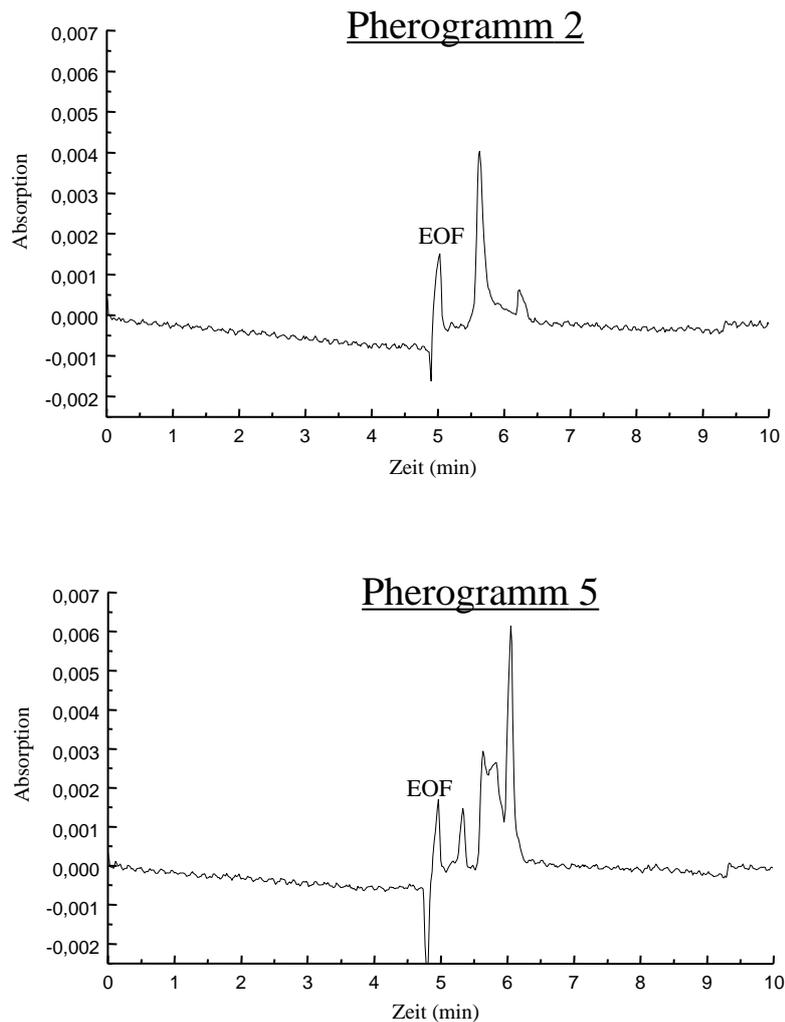


Abb. 35: CD-MEKC von Colecalciferol-Reinsubstanz (mehrmaliges Vermessen der gleichen Probe).

Trennbedingungen: 25 mM Borax pH 9,4, 50 mM Natriumcholat, 40 mM Dimethyl- β -Cyclodextrin, 10% Isopropylalkohol, Bedingungen sonst wie Abb. 32.

Bei dieser Trenntechnik kommt es zu einer Verteilung der Substanz zwischen den Mikroemulsionströpfchen und der wässrigen Trennpufferphase. Die MEEKC wurde speziell für sehr hydrophobe und ungeladene Substanzen entwickelt. Sie soll eine höhere Selektivität als die MEKC besitzen. Auch mit dieser Trenntechnik konnten Präcolecalciferol und Transvitamin D₃ nicht vom Colecalciferol abgetrennt werden. Dabei wurde wiederum Colecalciferol for Performance Test CRS entsprechend der HPLC-Methode verwendet. Die Proben wurden mit der Mikroemulsion verdünnt.

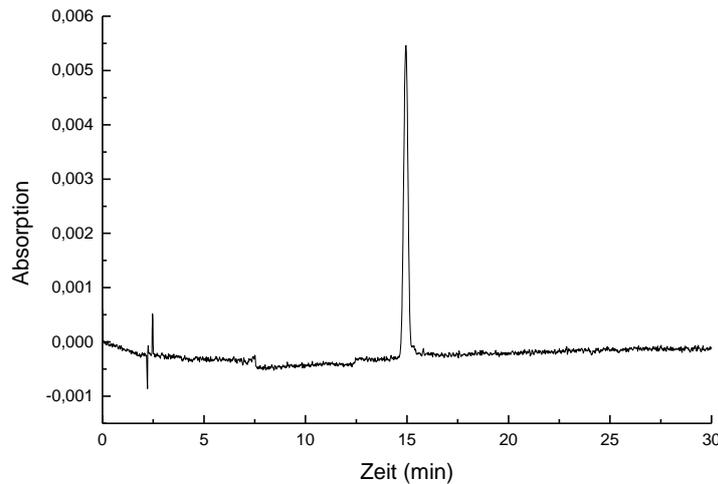


Abb. 36: MEEKC einer öligen Lösung von Colecalciferol.

CE-Gerät: BioFocus 3000 (BIO-RAD), Trennbedingungen: Mikroemulsion 0,81% Octan, 6,61% Butanol, 89,27% 10 mM Borax pH 9,4, 3,31% SDS, Kapillare 25/30 cm, ID 50 μm , Spannung 12 kV, Detektion UV, 265 nm, Druckinjektion, 2 psi \times sec, Temperatur Kapillare 40°C und Probenraum 20°C.

Parallel dazu wurde mit der Entwicklung einer Methode zur Festphasenextraktion des Colecalciferols aus dem Rohstoff begonnen. Diese Methode befindet sich noch in den Anfängen der Entwicklung.

6.3 Zusammenfassung

Bisher konnte nicht gezeigt werden, daß die Kapillarelektrophorese zur Bestimmung von Vitamin D₃ geeignet ist, da eine Trennung des Colecalciferols, Präcoleciferols und Transvitamins D₃ nicht möglich war.

Eine Lösung des Problems – die Verkürzung der Probenvorbereitungszeit – kann erreicht werden, indem eine Festphasenextraktionsmethode kombiniert mit HPLC entwickelt wird.

7. Teilprojekt 6: Plasmaanalytik von Thymol

Bearbeiter: Falko Süß

Ziel dieses Teilprojektes war die Entwicklung einer CE-Methode zur Bestimmung des Thymols bzw. dessen nichtflüchtiger Metabolite nach Einnahme eines Thymianhaltigen Fertigarzneimittels im Humanplasma.

Die Methode ist prinzipiell zur Analytik von Thymian-Inhaltstoffen geeignet. Sie kann sehr gut zur Qualitätsanalytik von entsprechenden Fertigarzneimitteln, Halbfertigwaren und Rohstoffen eingesetzt werden. Die dabei zu erreichenden Bestimmungsgrenzen liegen jedoch weit über der für die Bioanalytik erforderlichen Empfindlichkeit (nmol- und pmol-Bereich). Die CE kann daher nicht für bioanalytische Fragestellungen (Bioverfügbarkeits- und Bioäquivalenzuntersuchungen) verwendet werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Kapillarelektrophorese eignet sich auch in der Naturstoffanalytik als Komplementärmethode zur Hochleistungsflüssigchromatographie. Wie alle anderen analytischen Verfahren weist auch sie Vor- und Nachteile bei deren Anwendung auf, welche in diesem Projekt für den untersuchten Bereich der Arzneipflanzeninhaltsstoffe eruiert wurden.

Große Vorteile der CE liegen auf dem Gebiet der Bioanalytik.

Bei bisher durchgeführten Bioverfügbarkeitsuntersuchungen von Bärentraubenblätterhaltigen Zubereitungen wurden die entsprechenden Hydrochinonkonjugate entweder als photometrische Gesamtbestimmung aller Hydrochinonderivate im Urin oder indirekt durch HPLC-Bestimmung des Hydrochinons nach enzymatischer Spaltung der Konjugate bestimmt, da aufgrund der stark polaren Eigenschaften der Analyten eine direkte HPLC-Bestimmung nicht möglich war. Erstmals war nun im Rahmen dieser Arbeit die Bestimmung des Hydrochinonglucuronids und des Hydrochinonmonosulfats im Humanurin nach Einnahme einer Bärentraubenblätterhaltigen Zubereitung möglich. Hierbei konnte der Urin ohne Probenvorbereitung direkt in das CE-System injiziert werden. Durch die parallel durchgeführte HPLC-Bestimmung des Hydrochinons mit Coul-Array-Detektion am Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH (nicht Bestandteil dieses CE-Projektes) konnte erstmals die Bioverfügbarkeit einer Bärentraubenblätterhaltigen Zubereitung direkt untersucht werden.

Ein weiteres Teilprojekt im Bereich der Bioanalytik war der Versuch, Thymol und Carvacrol in Humanplasma nach Einnahme einer Thymianhaltigen Zubereitung zu bestimmen. Dies führte aufgrund mangelnder Empfindlichkeit des Systems nicht zum Erfolg, da die im Plasma enthaltenen Konzentrationen der Analyten durch den handelsüblichen UV-Detektor des CE-Gerätes nicht erfassbar waren.

Alle weiteren Teilprojekte wurden auf dem Gebiet der analytischen Qualitätskontrolle durchgeführt.

So konnte erstmals eine kapillarelektrophoretische Methode zur Bestimmung von Ginsenosiden entwickelt werden. Sie wurde entsprechend den internationalen Regularien validiert. Die dabei erhaltenen Ergebnisse waren vergleichbar mit denen, die aus publizierten HPLC-Methoden bekannt sind. Deutliche Vorteile ergaben sich bezüglich der Analysenzeiten und der laufenden Kosten bei der Analytik. Entscheidender Vorteil im Sinne des Projektes ist jedoch, dass auf umweltschädliche organische Lösungsmittel, die in der Vergleichsanalytik in großen Mengen eingesetzt werden, gänzlich verzichtet werden kann.

Zur Bestimmung von Opiumalkaloiden konnte ebenso eine kapillarelektrophoretische Methode entwickelt und validiert werden. Zur Trennung von Opiumalkaloiden sind Veröffentlichungen bekannt, Ergebnisse waren aus Gründen mangelnder Robustheit der Methoden, Verwendung großer Mengen organischer Lösungsmittel oder anderer nicht möglich. Die etablierten Methoden (HPLC), die z.B. auch in den Arzneibüchern Anwendung finden, benutzen große Mengen sehr umweltschädlicher organischer Lösungsmittel, sowohl für die umfangreiche Probenvorbereitung als auch für die Methode selber. Die im Rahmen dieses Projektes entwickelte Methode verbraucht eine bezogen auf die Kosten für organische Lösungsmittel um ein Vielfaches geringere Menge im Vergleich zur HPLC-Analytik. Die analytische Aussagekraft der verschiedenen Methoden ist dabei vergleichbar.

In einem weiteren Teilprojekt wurden charakteristische Inhaltsstoffe der Artischocke getrennt. Die Methode zeichnet sich durch kurze Analysenzeiten aus. Ausserdem sind Abbauprodukte von einzelnen Inhaltsstoffen mit dieser Methode erfassbar. Dies könnte nach weitergehenden Untersuchungen z.B. für Stabilitätsbetrachtungen an Artischockenzubereitungen genutzt werden.

Ziel der Untersuchungen bei der Vitamin D₃-Analytik war die Entwicklung einer CE-Methode, bei der sich die aufwendige Probenvorbereitung bei der Aufarbeitung der Vitamin D₃-haltigen Fertigarzneimittel erübrigt. In der HPLC-Gehaltsbestimmung des Deutschen Arzneibuches wird eine klare Trennung der Peaks für Colecalciferol, Präcoleciferol (Isomerisierungsprodukt des Colecalciferols in Lösungen) und Transvitamin D₃ (Abbauprodukt des Colecalciferols) gefordert. Alle Verbindungen sind ungeladene und sehr stark hydrophobe Substanzen, was die Anwendung der Kapillarelektrophorese sehr schwierig gestaltete. Da Spezialanwendungen der CE wie die Kapillarelektrochromatographie (CEC) mit den Geräten der FAH nicht durchführbar waren, mussten die Untersuchungen im Entwicklungsstadium abgebrochen werden.

Zusammenfassend lässt sich festzustellen, dass Vorteile der CE-Technik hauptsächlich bei der Analytik von polaren oder polarisierbaren und wasserlöslichen Verbindungen liegen.

Die Analysenzeiten sind im allgemeinen sehr kurz, was zu einer Erhöhung des Probendurchsatzes und zur Kostenreduktion führt. Ein besondere Vorteil der Kapillarelektrophorese gegenüber der HPLC liegt in der drastischen Reduktion (bis zum Verzicht) auf umweltschädliche organische Lösungsmittel. Einspareffekte bei der Probenvorbereitung sind häufig zu erzielen, speziell in der Bioanalytik kann sie durch Direktaufgabe der Proben in das CE-System oft ganz entfallen.

Wie am Beispiel der Vitamin D₃-Analytik und der Bestimmung von Thymol im Humanplasma demonstriert, ist die CE keine generell einsetzbare Technik. Um o.g. Vorteile nutzen zu können, muss sich jedoch ein Einsatz der Kapillarelektrophorese in der Analytik von Arzneipflanzeninhaltsstoffen immer nach der jeweiligen Fragestellung und den physiko-chemischen Eigenschaften der Analyten richten.

Veröffentlichungen, Poster, Vorträge

Ergebnisse des Projektes wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

- Glöckl, I.; Blaschke, G.; Veit, M.: Validated methods for direct determination of hydroquinone glucuronide and sulphate in human urine after oral intake of bearberry leaf extract by capillary zone electrophoresis. Eingereicht zur Publikation im Journal of Chromatography B. (2001).
- Glöckl, I.; Veit, M.; Blaschke, G.: Determination of ginsenosides from *Panax Ginseng* using micellar electrokinetic chromatography. Eingereicht zur Publikation in *Planta Medica* (2001).

Desweiteren wurden Ergebnisse auf folgenden Postern veröffentlicht:

- Glöckl, I.; Blaschke, G.; Süß, F.; Veit, M.: Direct CE analysis of hydroquinone conjugates after oral application of *Arctostaphylos* preparations in humans. *Phytomedicine* 2000, München.
- Glöckl, I.; Veit, M.; Blaschke, G.: Capillary electrophoresis as a tool in quality control analysis for herbal preparations. Doktorandentagung 2000, Frankfurt/ M.
- Süß, F.; Blaschke, G.; Veit, M.: Determination of metabolites from extracts from *Arctostaphylos uva-ursi* in human urine by capillary electrophoresis. Doktorandentagung 2000, Frankfurt/ M.

Während des laufenden Projektes berichteten Herr Glöckl und Herr Süß den Mitglieder des Arbeitskreises "Analytik und Hygiene" der FAH regelmäßig (15.12.98, 27.10.99 und 12.12.00) durch Vorträge über den allgemeinen Sachstand des Projektes. Zusätzlich wurde ein Vortrag am 01.12.99 zur FAH-Mitgliederversammlung gehalten.

Ergebnisse des Projektes wurden außerdem in der Dissertationsschrift "Analytik von Arzneipflanzeninhaltsstoffen und deren Metaboliten mittels Kapillarelektrophorese in pharmazeutischer Qualitätskontrolle und Bioanalytik" von Herrn Glöckl (Universität Münster, 2001) der Öffentlichkeit zugänglich gemacht.

Bedeutung des Vorhabens für Wirtschaft und Gesellschaft in Rheinland-Pfalz

Durch den Wegfall des Einsatzes großer Mengen giftiger und umweltschädlicher, organischer Lösungsmittel in der Routineanalytik durch den Ersatz der Hochleistungsflüssigchromatographie durch die Kapillarelektrophorese kann es einerseits zu einer Umweltentlastung, für die entsprechenden Firmen andererseits zu erheblichen Einsparpotentialen aufgrund bisher hoher Kosten für Anschaffung, Lagerung und Entsorgung dieser Lösungsmittel führen.

Mit dem vorliegenden Projekt der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller wurde im Land Rheinland-Pfalz eine wissenschaftliche Kompetenz auf dem Gebiet der Kapillarelektrophorese speziell zur Analytik von Phytopharmaka in den Bereichen Qualitätskontrolle und Bioanalytik aufgebaut.

An der FAH konnte wissenschaftliches Know how auf dem Gebiet der neuen Analysentechnik Kapillarelektrophorese geschaffen werden. Dies kann nun anhand der entwickelten Verfahren in kleinere und mittelständische Unternehmen der Pharmabranche transferiert werden, um bestehenden Wettbewerbsvorteilen gegenüber Großunternehmen zu begegnen.

Literaturverzeichnis

- [1] Semenza, G.; Bircher, J.; Mühlhauüt, E.; Koide, T.; Pfenniger, E.; Marthaler, Z.; Gmünder, U.; Haemmerli, U.P.: *Clinica Chimia Acta* 25 (1969) 213-219.
- [2] Alvarado, F.: *Biochimia et Biophysica Acta* 109 (1965) 478-494.
- [3] Lostao, M.P.; Hirayama, B.A.; Loo, D.D.F.; Wright, E.M.: *J. Membrane Biol.* 142 (1994) 161-170.
- [4] Hoffmann-Bohm, K.; Simon, P.: *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis* Bd. 4 (1992) 330-336.
- [5] Paper, D.H.; Koehler, J.; Franz, G.: *Pharm. Pharmacol. Lett.* 3 (1993) 63-66.
- [6] Siegers, C.P.; Siegers, J.P.; Pentz, R.; Bodinet, C.; Freudenstein, J.: *Pharm. Pharmacol. Lett.* 7, 2/3 (1997) 90-92.
- [7] wpd12/14/98 Guidance for Industry: Bioanalytical Methods Validation for Human Studies, Draft Guidance (<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>).
- [8] Hartmann, C.; Massart, D.L.; McDowall, R.D.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12 (1994) 1337-43.
- [9] Kenndler, E.; Schwer, C.; Fritsche, B.; Pöhm, M.: *J. Chromatogr.* 514 (1990) 383-388.
- [10] Sonnenborn, U.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 9 (1987) 433-441.
- [11] Wagner, H.; Wurmböck, A.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 117 (1977) 743-748.
- [12] Oh, K.W.; Kim, H.S.; Wagner, G.C.: *Planta Med.* 63 (1997) 80-81.
- [13] Jeong, T.C.; Kim, H.J.; Park, J.; Ha, C.S.; Park, J.D.; Kim, S.; Roh, J.K.: *Planta Med.* 63 (1997) 136-140.
- [14] Byun, B.H.; Shin, I.; Yoon, Y.S.; Kim, S.; Joe, C.O.: *Planta Med.* 63 (1997) 389-392.
- [15] Hasegawa, H.; Sung, J.H.; Benno, Y.: *Planta Medica* 63 (1997) 436-440.
- [16] Kwon, B.M.; Ro, S.E.; Kim, M.K.; Nam, J.Y.; Jung, H.J.; Lee, I.R.; Kim, Y.K.; Bok, S.H.: *Planta Med.* 63 (1997) 552-553.
- [17] Atopkina, L.N.; Malinovskaya, G.V.; Elyakov, G.B.; Uvarova, N.I.; Woerdenbag, H.J.; Koulman, A.; Pras, N.; Potier, P.: *Planta Med.* 65 (1999) 30-34.
- [18] Kimata, H.; Sumida, N.; Matsufuji, N.; Morita, T.; Ito, K.; Yata, N.; Tanaka, O.: *Chem. Pharm. Bull.* 33 (1985) 2849-2853.
- [19] Dou, D.Q.; Hou, W.B.; Chen, Y.J.: *Planta Med.* 64 (1998) 585-586.

- [20] Ferrando, A.; Vila, L.; Voces, J.A.; Cabral, C.; Alvarez, I.; Prieto, J.G.: *Planta Med.* 65 (1999) 239-244.
- [21] Sallerberg, U.: *PTA heute* 13 (1999) 573-576.
- [22] Chuang, W.C.; Wu, H.K.; Sheu, S.J.; Chiou, S.H.; Chang, H.C.; Chen, Y.P.: *Planta Med.* 61 (1995) 459-465.
- [23] Soldati, F.; Sticher, O.: *Planta Med.* 38 (1980) 348-357.
- [24] Sticher, O.; Soldati, F.: *Planta Med.* 36 (1979) 30-42.
- [25] Besso, H.; Saruwatari, Y.; Futamura, K.; Kunihiro, K.; Fuwa, T.; Tanaka, O.: *Planta Med.* 37 (1979) 226-233.
- [26] Pietta, P.; Mauri, P.; Rava, A.: *J. Chromatogr.* 356 (1986) 212-219.
- [27] Sollorz, G.: *Deutsche Apotheker Zeitung* 41 (1985) 2052-2055.
- [28] Chuang, W.C.; Sheu, S.J.: *J. Chromatogr. A* 685 (1994) 243-251.
- [29] Chuang, W.C.; Wu, H.K.; Sheu, S.J.; Chiou, S.H.; Chang, H.C.; Chen, Y.P.: *Planta Med.* 61 (1995) 459-465.
- [30] Kanazawa, H.; Nagata, Y.; Matsushima, Y.; Tomoda, M.: *J. Chromatogr.* 537 (1991) 469-474.
- [31] Samukawa, K.I.; Yamashita, H.; Matsuda, H.; Kubo, M.: *Chem. Pharm. Bull.* 43 (1995) 137-141.
- [32] Honerlagen, H.; Tretter, H.R.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 119 (1979) 1483-1486.
- [33] Wagner, H.; Wurmböck, A.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 117 (1977) 743-748.
- [34] Cui, J.F.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 3 (1995) 77-85.
- [35] Muijselaar, P.G.; Otsuka, K.; Terabe, S.: *J. Chromatogr.* 780 (1997) 41-61.
- [36] Wätzig, H.; Lloyd, D.K.: *Electrophoresis* 16 (1995) 57-63.
- [37] Nishi, H.; Matsuo, M.: *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 973-986.
- [38] Bumgarner, J.G.; Khaledi, M.G.: *Electrophoresis* 15 (1994) 1260-1261.
- [39] Schmutz, A.; Thormann, W.: *Electrophoresis* 15 (1994) 1295-1303.
- [40] Ishihama, Y.; Terabe, S.: *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 933-944.
- [41] Cifuentes, A.; Bernal, J.L.; Diez-Masa, J.C.: *J. Chromatogr.* 824 (1998) 99-108.
- [42] Otsuka, K.; Higashimori, M.; Koike, R.; Karuhaka, K.; Okada, Y.; Terabe, S.: *Electrophoresis* 15 (1994) 1280-1283.
- [43] Morin, Ph.; Archambault, J.C.; Andre, P.; Dreux, M.; Gaydou, E.: *J. Chromatogr.* 791 (1997) 289-297.
- [44] Pietta, P.G.; Mauri, P.L.; Rava, A.; Sabbatini, G.: *J. Chromatogr.* 549 (1991) 367-373.

- [45] Nishi, H.; Fukuyama, T.; Matsuo, M.: *J. Chromatogr.* 513 (1990) 279-295.
- [46] Wiedmer, S.; Jumppanen, J.H.; Haario, H.; Riekkola, M.L.: *Electrophoresis* 17 (1996) 1931-1937.
- [47] Morin, Ph.; Villard, F.; Dreux, M.: *J. Chromatogr.* 628 (1993) 153-160.
- [48] Morin, Ph.; Villard, F.; Dreux, M.: *J. Chromatogr.* 628 (1993) 161-169.
- [49] Honda, S.; Togashi, K.; Uegaki, K.; Taga, A.: *J. Chromatogr.* 805 (1998) 277-284.
- [50] Smith, J.T.; el-Rassi, Z.: *Electrophoresis*. 15 (1994) 1248-1259.
- [51] Foster, A.B.; Stacey, M.: *J. Chem. Soc.* (1995) 1778-1781.
- [52] Hoffstetter-Kuhn, S.; Paulus, A.; Gassmann, E.; Widmer, H.M.: *Anal. Chem.* 63 (1991) 1541-1547.
- [53] Iwagami, S.; Sawabe, Y.; Nakagawa, T.: *Shoyakugaku Zasshi* 46 (1992) 339-347.
- [54] *J. Chromatogr. Library Bd. 52: Capillary Electrophoresis*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1992.
- [55] Engelhardt, H. ;Beck, W. ; Schmitt, T.: *Kapillarelektrophorese. Methoden und Möglichkeiten*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden 1994.
- [56] *Methods in Molecular Biology Bd. 52: Capillary Electrophoresis Guidebook*, Humana Press, Totowa 1996.
- [57] Landers, J.P.: *Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton 1997.
- [58] Schmutz, A.; Thormann, W.: *Electrophoresis* 15 (1994) 51-61.
- [59] Meier, B.; Sticher, O.: *Pharm. Ind.* 48 (1986) 87-91.
- [60] Trenerry, V.C.; Wells, R.J.; Robertson, J.: *J. Chromatogr. A* 718 (1995) 217-225.
- [61] Vandeppeer, J.; Trenerry, V.C.; Keogh, G.: *Electrophoresis* 17 (1996) 1361-1366.
- [62] Bjornsdottir, I.; Hansen, S.H.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 38 (1999) 155-161.
- [63] Bjornsdottir, I.; Hansen, S.H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1083-1089.
- [64] Bjornsdottir, I.; Hansen, S.H.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 1473-1481.
- [65] Taylor, R.B.; Low, A.S.; Reid, R.G.: *J. Chromatogr. B* 675 (1996) 213-223.
- [66] Tagliaro, F.; Poiesi, C.; Aiello, R.; Dorizzi, R.; Ghielmi, S.; Marigo, M.: *J. Chromatogr.* 638 (1993) 303-309.
- [67] Wey, A.B.; Zhang, C.X.; Thormann, W.: *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 95-106.
- [68] Zhang, C.X.; Thormann, W.: *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 157-168.

- [69] Unger, M.; Stöckigt, D.; Belder, D.; Stöckigt, J.: J. Chromatogr. A 767 (1997) 263-276.
- [70] Unger, M.; Stöckigt, D.; Belder, D.; Stöckigt, J.: Pharmazie 52 (1997) 691-695.
- [71] Kunkel, A.; Gunter, S.; Dette, C.; Wätzig, H.: J. Chromatogr. A 781 (1997) 445-455.
- [72] Krenn, L.; Glantschnig, S.; Sorgner, U.; Kopp, B.: Sci. Pharm. 62 (1994) 114.
- [73] Pothier, J.; Galand, N.; Viel, C.: J. Planar. Chromatogr. Mod. TLC 4 (1991) 392-396.
- [74] Hendricks, H.; Battermann, S.; Smith, D.: Dtsch. Apoth. Ztg. 122 (1982) 1800.
- [75] Joint Committee Pharm. Society: Analyst (London) 103 (1978) 268-283.
- [76] Kartnig, Th.; Bucar, F.; Udermann, H.: Sci. Pharm. 61 (1993) 175-183.
- [77] Hahn, E.F.; Fishman, J.H.; Fishman, J.: J. Pharm. Pharmacol. 31 (1979) 250-252.
- [78] Brand, N.: apotheken Journal Reise und Pharmazie 21/7 (1999) 202-208.
- [79] Brand, N.; Weschta, H.: Zeitschrift für Phytotherapie 12 (1991) 15-21.
- [80] Wiedenfeld, H.: Pharm. Ztg. 2 (1999) 28-34.
- [81] Brand, N.: Dtsch. Apoth. Ztg. 137 (1997) 3564-3578.
- [82] Brand, N.: Zeitschrift für Phytotherapie 20 (1999) 292-302.
- [83] Schilcher, H.; Hagels, H.: Dtsch. Apoth. Ztg. 139 (1999) 2725-2729.
- [84] Brand, N.: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis Bd. 4 (1992) 1117-1122.
- [85] Dtsch. Apoth. Ztg. 139 (1999) 1839.
- [86] Adzet, T.; Puigmacia, M.: J. Chromatogr. 348 (1985) 447-453.
- [87] Tomas-Barberan, F.A.: Phytochem. Anal. 6 (1995) 177-92.
- [88] Pietta, P.; Mauri, P.; Bauer, R.: Planta Med. 64 (1998) 649-52.
- [89] Bjerregaard, C.; Michaelsen, S.; Sörensen, H.: J. Chromatogr. 608 (1992) 403-411.
- [90] Unger, M.: Dissertation 1998, Universität Mainz.
- [91] Issaq, H.J.: Electrophoresis 18 (1997) 2438-2452.
- [92] McGhie, T.K.; Markham, K.R.: Phytochem. Anal. 5 (1994) 121-126.
- [93] Seitz, U.; Oefner, P.J.; Nathakarnkitkool, S.; Popp, M.; Bonn, G.K.: Electrophoresis 13 (1992) 35-38.
- [94] Kreimeyer, J.; Petereit, F.; Nahrstedt, A.: Planta Med. 64 (1998) 63-67.
- [95] Dtsch. Apoth. Ztg. 139 (1999) 2636.

Dank

Das vorliegende Projekt wurde durch das Ministerium für Wirtschaft, Landwirtschaft, Verkehr und Weinbau des Landes Rheinland-Pfalz über die Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation finanziell gefördert.

Der Dank gilt darüber hinaus allen beteiligten Mitgliedern des Arbeitskreises Analytik des Bundesfachverbandes der Arzneimittel-Hersteller e.V. (BAH) sowie den Mitgliedsunternehmen der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), die tatkräftig die Durchführung des Projektes unterstützten. Dies waren Bio-Rad Laboratories GmbH, Chemische Fabrik Dr. Hetterich KG, Hermes Arzneimittel GmbH, Bionorica, Dr. Poehlmann & Co GmbH, Klinge Pharma GmbH, Kneipp Werke, Finzelberg`s Nachf. GmbH, Queisser Pharma GmbH u.a.

Der besondere Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Blaschke, Herrn F. Sütering und Herrn Malinka sowie allen Beteiligten Mitarbeitern der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V., ohne deren tatkräftige Mitarbeit dieses Projekt nicht hätte durchgeführt werden können.