

**10.3/2.02.29.00****2.2.29****Flüssig-chromatographie**

Das Arzneibuch beschreibt in diesem Allgemeinen Text die analytische Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC, high performance liquid chromatography). Die IUPAC definiert Chromatographie als ein physikalisches Verfahren, bei dem die Komponenten von Substanzgemischen aufgrund der Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase, die sich in eine definierte Richtung bewegt, aufgetrennt werden. In der Flüssigchromatographie ist die stationäre Phase fest und die mobile Phase eine Flüssigkeit. Aufgrund der geringen Partikelgröße der stationären Phase (in der Regel 3 bis 10 µm) ist ein hoher Druck erforderlich, um die mobile Phase durch die Säule zu bewegen. Die Bezeichnung „Hochleistungsflüssigchromatographie“ resultiert aus der hohen Trennleistung des Verfahrens, wofür u. a. die geringe Partikelgröße verantwortlich ist.

Der Text schließt alle Varianten wie die Ultrahochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC, ultra high-performance liquid chromatography) sowie neue Säulenmaterialien wie Monolithen oder oberflächlich poröse Partikel (sog. Core-shell- und Fused-core-Materialien) ein. In der Ph. Eur. 10.3 wurde die Partikelgröße der stationären Phase in der UHPLC präzisiert (Sub-2-µm-Partikel) und die möglicherweise missverständliche Angabe „Raumtemperatur“ durch „20 bis 25 °C“ ersetzt.

Die allgemeinen chromatographischen Parameter werden im Arzneibuch in dem separaten Allgemeinen Text **2.2.46** beschrieben (siehe den zugehörigen Kommentar).

Die USP beschreibt alle chromatographischen Verfahren, d. h. GC, DC, HPLC, UHPLC sowie die allgemeinen chromatographischen Parameter in *einem* Text (<621> Chromatography), die JAP führt getrennte Texte für die einzelnen Verfahren und beschreibt die chromatographischen Parameter im Text zur Flüssigchromatographie.

Für weiterführende Literatur zu HPLC und UHPLC einschließlich deren Anwendung in der pharmazeutischen Analytik siehe z. B. Lit.<sup>1-7)</sup>.

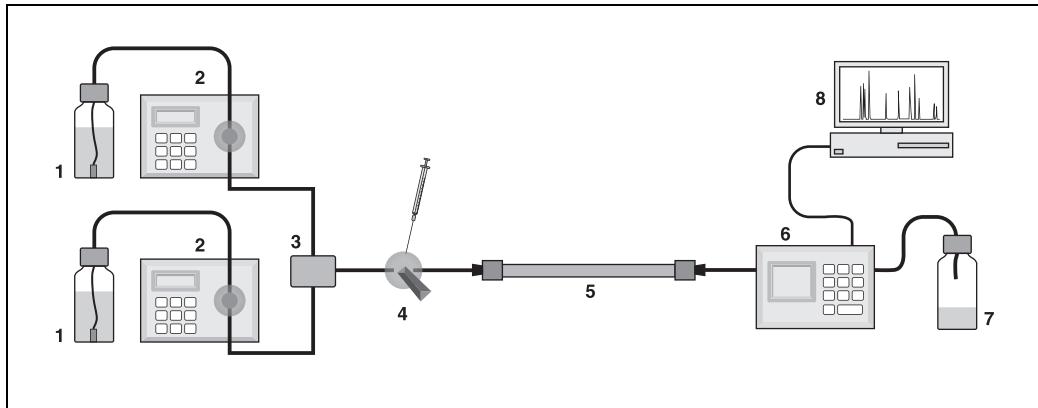
**Apparatur**

Eine HPLC-Anlage besteht aus mindestens fünf Komponenten: Eine oder mehrere Pumpen zur Förderung der mobilen Phase, eine Injektionseinheit, die Säule zur Trennung der Analysensubstanzen, ein Detektor zu deren Registrierung sowie ein Rechner zur Steuerung der Anlage und Auswertung der Chromatogramme. Der schematische Aufbau einer Anlage zur Gradientenelution ist in Abb. 1 dargestellt.

Als Gradient bezeichnet man die Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase während der Analyse. Dieser kann kontinuierlich (linearer Gradient) oder sprunghaft (Stufengradient) variiert werden. Die Pumpen (2) fördern aus den Vorratsgefäßen (1) die Lösungsmittel, die in einer Kammer (3) vermischt werden. Die mobile Phase gelangt anschließend über das Injektionsventil (4) zur Säule (5). Soll bei definierter Temperatur gearbeitet werden, kann die Säule in einem Säulenthermostat temperiert werden. Die getrennten Analyte werden im Detektor (6) registriert, bevor das Eluat im Abfallgefäß (7) gesammelt wird. Steuerung des Systems und Datenauswertung erfolgen über einen Computer (8). Erfolgt die Mischung der Komponenten der mobilen Phase nach den Pumpen unter Hochdruck (wie in Abb. 1 skizziert), spricht man auch von einem „Hochdruck-Gradienten“. Alternativ kann die Mischung vor der Pumpe beim „Niederdruck-Gradienten“ drucklos erfolgen. In diesem Fall ist *eine* Pumpe ausreichend. Ebenso genügt *eine* Pumpe für die isokratische Elution, d. h. mit unveränderter mobiler Phase während des analytischen Laufs.

**Pumpensysteme**

In der HPLC müssen die Pumpen einen Druck von bis zu 40 MPa erzeugen können, in der UHPLC über 100 MPa. Die HPLC-Pumpe muss mit hoher Präzision Fließgeschwindigkeiten von 0,1 bis 10 ml/min ermöglichen, in der UHPLC sind Flussraten von 0,01 bis 1,0 ml/min üblich. Der Fluss muss darüber hinaus pulsationsfrei sein, um eine stabile Basislinie zu erhalten. Weiterhin müssen die Pumpen korrosionsbeständig gegen eine Vielzahl von Lösungsmitteln einschließlich saurer und basischer Pufferlösungen sein.



**Abb. 1: Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems;** (1) Lösungsmittelreservoir, (2) Pumpe, (3) Mischkammer, (4) Injektionsventil, (5) HPLC-Säule, (6) Detektor, (7) Abfallgefäß, (8) Computer zur Steuerung der Anlage und Datenauswertung

Moderne kommerzielle HPLC- und UHPLC-Geräte besitzen Doppelkolbenpumpen. Kolbenpumpen bestehen im Prinzip aus einer zylindrischen Kammer, in welche die mobile Phase durch Vor- und Zurückbewegen des Kolbens gepumpt wird. Abwechselnd öffnende und schließende Kugelventile steuern den Lösungsmittelfluss in und aus der Kammer. Bei Doppelkolbenpumpen werden zwei Kolbenpumpen phasenversetzt Mikroprozessor gesteuert, sodass die eine ansaugt, während die andere fördert. Dadurch wird eine Minimierung der Pulsation erreicht. Vorteile von Kolbenpumpen sind das geringe innere Volumen (z.B. nur ca. 10 µl bei UHPLC-Pumpen), hoher Ausgangsdruck, gute Eignung zur Gradientenelution sowie konstante Flussraten weitgehend unabhängig vom Säulengegendruck und der Viskosität der mobilen Phase.

### Einspritzvorrichtung

Der Probeneinlass erfolgt kurz vor der Säule. Hierzu dienen Schleifendosierventile, in der Regel Sechswegeventile. Die Probenschleifen sind austauschbar, für analytische Zwecke werden in der Regel Probenschleifen mit einem Volumen von 1 bis 20 µl verwendet. Die Probenschleife wird mit Hilfe einer Mikroliterspritze gefüllt. Anschließend wird das Ventil umgeschaltet, sodass die Probelösung durch die mobile Phase auf die Säule gespült wird. Erfolgt die Injektion manuell, sollte die Probenschleife vollständig gefüllt werden, da bei unvollständiger Füllung der Schleife eine geringe

Präzision des injizierten Probevolumens und damit auch der Analyse resultiert. Autoinjektoren (Autosampler) erlauben die automatisierte Injektion vieler Proben, die ggf. bei langen Standzeiten im Gerät auch temperiert werden können. Die meisten modernen Geräte sind mit einem Autosampler ausgerüstet.

### Stationäre Phasen

In der HPLC werden in Abhängigkeit von den zu trennenden Analyten vielfältige Materialien als stationäre Phasen eingesetzt. Meistens basieren sie auf Kieselgel, doch werden auch Polymere, poröser Graphit oder Metalloxide wie Aluminiumoxid, Titandioxid oder Zirkoniumdioxid verwendet. Die Materialien befinden sich mit wenigen Ausnahmen in einer Edelstahlsäule. In der Mehrzahl analytischer Säulen werden sphärische Partikel aus Kieselgel eingesetzt, irreguläre Partikel spielen nur noch eine untergeordnete Rolle. Kieselgel besitzt hohe mechanische Stabilität, ist kostengünstig und mit eng verteilter Korn- und Porengröße sowie spezifischer Oberfläche herzustellen und erlaubt vielfältige Möglichkeiten der Oberflächenmodifizierung. Klassische HPLC-Phasen bestehen aus vollständig porösen Kieselgelpartikeln, wodurch eine Oberfläche von mehreren hundert Quadratmetern pro Gramm resultiert. In den Poren im Inneren dieser Partikel strömt die mobile Phase nicht, die Analyte bewegen sich nur durch Diffusion. Je größer ein Partikel, umso langsamer muss chromatographiert werden, um die Einstellung des

Gleichgewichts für einen Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase zu gewährleisten. Die Verkleinerung der Partikelgröße der stationären Phase erlaubt schnelle Trennungen bei hoher Trenneffizienz, da die Trennstufenzahl als Maß der chromatographischen Effizienz direkt proportional zum Verhältnis der Säulenlänge und des Partikel-durchmessers ( $l/d$ ) ist. Es resultieren kurze Analysenzeiten auf Kosten des Säulenengendrucks, der umgekehrt proportional zum Quadrat des Durchmessers der Partikel ansteigt. Die Verkleinerung der Säulenmaterialien führte zur Entwicklung der UHPLC, bei der 1,7 bis 1,9  $\mu\text{m}$  große Partikel eingesetzt werden im Vergleich zur Partikelgröße von 3 bis 5  $\mu\text{m}$  in der klassischen HPLC. 10- $\mu\text{m}$ -Partikel finden sich in analytischen HPLC-Säulen nur noch in Ausnahmefällen.

Die Core-shell-Materialien (auch Solid-core- oder Fused-core-Partikel oder oberflächlich poröse Materialien genannt) besitzen einen nichtporösen Kern mit einem Durchmesser von 1,7 bis 1,9  $\mu\text{m}$ , der mit einer 0,35 bis 0,5  $\mu\text{m}$  dicken Schicht aus porösem Kieselgel überzogen ist. Der gegenüber dem klassischen Material deutlich geringere Diffusionsweg ermöglicht einen raschen Stoffaustausch der Analyte zwischen stationärer und mobiler Phase. Es resultiert eine geringe theoretische Bodenhöhe auch bei hohen Flussraten mit der Folge effizienter Trennungen bei kurzen Analysenzeiten. Der Druck steigt weniger stark als bei Sub-2- $\mu\text{m}$ -Material an, sodass diese Säulen mit herkömmlichen HPLC-Pumpen betrieben werden können und meist bessere Auflösungen bei kürzeren Analysenzeiten als mit vollständig porösen 3- $\mu\text{m}$ -Phasen erreicht werden. Sub-2- $\mu\text{m}$ -Core-shell-Materialien mit Korngrößen von 1,3 bis 1,7  $\mu\text{m}$  für die UHPLC sind kommerziell ebenfalls verfügbar. Für den Methodentransfer von HPLC auf UHPLC sind Säulendimensionen, Injektionsvolumen der Probe,

die Flussrate der mobilen Phase sowie der Gradient der mobilen Phase in Falle einer Gradientenelution auf das neue Format anzupassen<sup>8, 9)</sup>.

Parallel zur Entwicklung partikulärer Materialien wurden Ende der 1990er Jahre monolithische Trennsäulen entwickelt, die aus einem durchgehenden Netzwerk mit bimodalem Poresystem bestehen<sup>10)</sup>. Makroporen verleihen dem Material eine hohe Permeabilität und sind für einen geringen Gegendruck verantwortlich, sodass hohe Flussraten erreicht werden können. Kleine Mesoporen im Skelett garantieren eine große spezifische Oberfläche, sodass eine ähnlich hohe Trenneffizienz resultiert wie beim 3- $\mu\text{m}$ -Material. Limitiert sind die Monolithe vor allem durch die relativ geringe Druckstabilität von ca. 20 MPa der Silicastäbe, die nur eine PEEK-Ummantelung besitzen und nicht in Stahlsäulen gepackt sind. Tab. 1 fasst gängige Säulendimensionen in der HPLC und UHPLC zusammen. Microbore- und Nano-LC-Säulen sind mit dem gleichen Material wie die „klassischen“ HPLC-Säulen gepackt, die Namen resultieren aus den geringeren Säulendurchmessern.

Die Trenneffizienz einer chromatographischen Säule, ausgedrückt als Trennstufenzahl, hängt nicht nur von den Säulen- und Partikeldimensionen, sondern auch von der Flussrate der mobilen Phase ab. Liegt beispielsweise das Optimum einer Säule mit der Dimension 100  $\times$  4,6 mm, die mit vollständig porösem 5- $\mu\text{m}$ -Material gepackt ist, bei isokratischer Elution bei 1 ml/min, so beträgt sie für 3- $\mu\text{m}$ -Material bei gleichen Säulendimensionen etwa 1,5 ml/min und für Core-shell-Partikel 2 ml/min. Reduziert man den Säulendurchmesser in Falle des Core-shell-Materials auf 2,1 mm, so liegen optimale Flussraten bei 0,4 bis 0,8 ml/min. In der UHPLC sind bei isokratischer Elution Flussraten von 0,2 bis 0,6 ml/min üblich. Bei einer Gradien-

Tab. 1: Bereiche typischer Dimensionen kommerzieller analytischer Säulen

Säulentyp	Partikelgröße [ $\mu\text{m}$ ]	Länge [mm]	Durchmesser [mm]
Analytische HPLC	5–3	250–150	4,6–3,0
Microbore HPLC	3,5–3	150–50	2,1–1,0
Kapillar-LC	3,5–3	250–50	1,0–0,1
Core shell	2,7–2,6	150–50	4,6–2,1
Monolith	–	100–50	4,6–2,0
UHPLC	1,9–1,7	150–30	2,1–2,0

tenelution hängt die optimale Flussrate der mobilen Phase auch von der Steilheit des Gradienten (Änderung der Zusammensetzung pro Zeiteinheit) ab.

Zur Herstellung von Kieselgel wird Tetraethoxysilan (TEOS) sauer hydrolysiert und kondensiert. Das resultierende viskose Poly(ethoxy)siloxan (PES) wird durch Rühren unter alkalischen Bedingungen in Kieselhydrogelpartikel umgewandelt. Sowohl die Viskosität des PES als auch die Rührgeschwindigkeit beeinflussen Größe und Größenverteilung der Partikel. An Wasch- und Sedimentationsstufen schließt sich zur Härtung und Verdichtung des Siloxangerüsts im Hydrogel zum Xerogel ein „Alterungsprozess“ bei erhöhten Temperaturen an. Oberhalb von 400 °C erfolgt die Kalzinierung des Materials, es folgt die Fraktionierung der Partikel, um ein einheitliches Material mit enger Korngrößenverteilung zu erhalten. Durch Behandlung mit Salzsäure werden freie Silanolgruppen generiert und Verunreinigungen von Metall-Ionen reduziert. Aus der Steuerung des Herstellungsverfahrens resultieren sphärische Partikel mit der gewünschten Porenstruktur und enger Korngrößenverteilung<sup>11)</sup>.

Kieselgel lässt sich durch eine Vielzahl chemischer Reaktionen modifizieren. Abb. 2 listet schematisch wichtige chemisch modifizierte Kieselgele. Die Substituenten sind als Silylether gebunden, wobei die Formel die Bindung lediglich prinzipiell darstellen soll, da weitere Bindungstypen existieren. Kieselgel ist nur bis etwa pH 8 stabil, sodass auf diesem Material basierende Phasen nicht mit stärker alkalischen mobilen Phasen betrieben werden

dürfen. Durch Vernetzung, z.B. über Ethylenbrücken, werden bis pH 12 stabile Kieselgele erhalten, welche als Grundlage für die Herstellung der Säulen mit erhöhter pH-Stabilität dienen. Alkylsubstituierte Phasen werden aufgrund ihrer Verwendung im Umkehrphasenmodus auch als Umkehrphasen (RP-Phasen, reversed phase) bezeichnet. Bei den nachsilanisierten Phasen („endcapped“) werden nach der initialen Derivatisierung mit längerkettigen Chlorsilanderivaten die verbleibenden freien Silanolgruppen mit kurzkettigen Silanen (z.B. Trimethylchlorsilan) umgesetzt. Kieselgel besitzt ca. 9 µmol/m<sup>2</sup> Silanolgruppen auf der Oberfläche. Bei der Umsetzung mit C<sub>18</sub>-Chlorsilanen gelingt aus sterischen Gründen keine vollständige Umsetzung (nur ca. 3 µmol/m<sup>2</sup> der Silanolgruppen werden typischerweise derivatisiert). Die verbleibenden freien Silanole lassen verstärkt Wechselwirkungen besonders mit polaren Analyten zu, was zu ausgeprägtem Peak tailing besonders bei basischen Substanzen führt. Um diese Wechselwirkungen zu reduzieren, führt man die Nachsilanisierung durch. Viele weitere chemisch modifizierte Materialien sind kommerziell erhältlich, beispielsweise Partikel mit Ionenaustauschergruppen oder zwitterionischen Substituenten. So genannte Mixed-mode-Säulen enthalten neben C<sub>8</sub>- oder C<sub>18</sub>-Resten ionisierbare funktionelle Gruppen; bei den polar selektiven Umkehrphasen (polar-embedded reversed phase) werden polare Gruppen (Amid, Carbamat, Harnstoff u.a.) in die Alkylketten „eingefügt“. Chirale Säulen zur Stereoisomerenanalytik erhält man durch Coaten der Kieselgelpartikel mit den chiralen Selektoren oder durch kovalente Bindung

Typ	R
RP 8 (C <sub>8</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> —CH <sub>3</sub>
RP 18 (C <sub>18</sub> , ODS)	(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> —CH <sub>3</sub>
Phenyl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
Amino	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —NH <sub>2</sub>
Cyano	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —CN
Diol	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> —O—CH <sub>2</sub> —CH(OH)—CH <sub>2</sub>

Abb. 2: Beispiele chemisch modifizierter stationärer Phasen

der Selektoren an die Kieselgelmatrix. Selektoren umfassen Polysaccharide (in erster Linie Amylose- und Cellulosederivate), Cyclodextrine, Aminosäurerenderivate, Proteine, Kronenether, makrozyklische Antibiotika, poly(Triphenylmethyl)methacrylate und viele weitere.

Eine kaum überschaubare Vielzahl chromatographischer stationärer Phasen ist kommerziell verfügbar, beispielsweise existieren einige hundert RP-Phasen. Die Eigenschaften der Phasen hängen wesentlich von ihren physikochemischen und chemischen Eigenschaften ab. Wichtige Kenngrößen sind Partikeldurchmesser, Porengröße, Oberfläche, Art der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche und die Dichte der Oberflächenbelegung. Die Eigenschaften, welche die Selektivität der RP-Phasen wesentlich beeinflussen, sind Hydrophobie, hydrophobe Selektivität, silanophile Aktivität, molekulare Formerkennung (sterische Selektivität, shape selectivity), polare Selektivität und Metallgehalt. Die Hydrophobie gibt an, wie stark eine bevorzugt über hydrophobe Wechselwirkungen mit der stationären Phase interagierende Substanz retiniert wird: Je höher die Retentionskraft, umso höher ist die Hydrophobie. Ein typischer Marker für diese Eigenschaft ist Toluol. RP-18-Phasen besitzen die höchste Hydrophobie. Steigt die Kettenlänge, so wird aus sterischen Gründen nur eine geringere Belegungsdichte erreicht. Bei kurzen Ketten existieren weniger hydrophobe Interaktionsstellen für den Analyten. Die Hydrophobie eines Materials wird durch die Oberfläche des Trägers, den Kohlenstoffgehalt und die Belegungsdichte des Trägermaterials bestimmt. Die spezifische Oberfläche des Trägermaterials bestimmt die Zahl der gebundenen funktionellen Gruppen. Je größer die Oberfläche, umso höher der Kohlenstoffgehalt und damit auch die Hydrophobie. Bei Verwendung von Phasen mit gleicher Hydrophobie können aber teils sehr unterschiedliche Trennungen selbst für homologe Reihen von Substanzen resultieren. Daher ist die hydrophobe Selektivität, auch Methylengruppenselektivität genannt, bedeutender für eine Trennung als die Hydrophobie selbst. Dieser Parameter beschreibt die Selektivität zweier durch hydrophobe Wechselwirkungen retinierter Substanzen, die sich durch eine Methylengruppe unterscheiden, wie beispielsweise Toluol und Ethylbenzen.

Die silanophile Aktivität charakterisiert die nach Derivatisierung verbleibenden Silanolgruppen, die

einen großen Einfluss auf die Selektivität einer Phase haben. Silanolgruppen sind oberhalb von pH 2 bis 3 deprotoniert und interagieren besonders mit basischen Analyten über ionische Wechselwirkungen. Diese sind energetisch deutlich stärker als hydrophobe Wechselwirkungen, sodass ein in der Regel sehr ausgeprägtes Peak tailing für Basen resultiert. Durch effektives Nachsilanisieren kann die Silanolaktivität reduziert werden. Auch kann die Zahl der Silanolgruppen über den Herstellungsprozess des Kieselgels gesteuert werden. Moderne Kieselgel-basierte Phasen weisen heute meist nur geringe silanophile Aktivität auf. Allerdings ist Silanolaktivität nicht immer unerwünscht, da einige Trennungen gerade auf den polaren Wechselwirkungen mit Silanolgruppen beruhen. Ein Beispiel ist die Wasserstoffbrückenwechselwirkung zwischen Silanol- und Carboxygruppen, die zu effektiven Trennungen führen kann. Testsubstanzen der silanophilen Aktivität sind allgemein basische Verbindungen, in Testgemischen findet man Anilin, Ethylanilin oder auch Arzneistoffe wie Propranolol oder Amitryptilin.

Die molekulare Formerkennung (sterische Selektivität) bezieht sich auf die Fähigkeit stationärer Phasen, zwischen planaren und nichtplanaren Molekülen unterscheiden zu können. Letztere besitzen einen höheren Platzbedarf, sodass sie mit weniger Adsorptionsstellen der stationären Phase interagieren als planare Moleküle. Dadurch werden nichtplanare Moleküle auf stationären Phasen mit ausgeprägter Formerkennung weniger stark retiniert. Für die molekulare Formerkennung sind besonders folgende Parameter verantwortlich: Belegungsdichte, Kettenlänge, Porengröße des Kieselgels sowie zusätzliche polare Wechselwirkungen. Je höher die Belegungsdichte, umso höher ist die molekulare Formerkennung. Ebenso steigt diese mit der Länge der Alkylkette. Besonders ausgeprägte sterische Selektivität findet man daher bei hoch belegten C-18- und C-30-Phasen. Weiterhin gilt: Je größer die Poren oder je höher die Zahl zusätzlicher polarer Wechselwirkungen, umso höher die molekulare Formerkennung. Die Abhängigkeit von der Porengröße basiert auf der Tatsache, dass mehr als 99 % der chromatographischen Oberfläche der porösen Kieselgelmaterialien innerhalb der Partikel liegen. Bei zu geringer Porengröße kann die für die sterische Selektivität erforderliche Belegungsdichte in der Regel nicht erreicht werden.

Zur Prüfung der molekularen Formerkennung eignet sich eine Mischung polyzyklischer Kohlenwasserstoffe.

Die polare Selektivität charakterisiert die Eigenschaft der Phase, polare Wechselwirkungen eingehen zu können. Moderne Alkylphasen zeigen aufgrund der effektiven Herstellungsverfahren nur noch sehr geringe Wechselwirkungen mit polaren Molekülen. Durch den „Einbau“ polarer Gruppen wie z.B. Amid-, Carbamat- oder Harnstoffgruppen in die Alkylkette werden die polar selektiven Umkehrphasen erhalten, die polare Wechselwirkungen ermöglichen. An diesen Materialien werden im Vergleich zu den klassischen Umkehrphasen saure Analyte stärker und Basen geringfügig schwächer retiniert als an einer „normalen“ C-18-Phase. Daraus sind die polar selektiven Umkehrphasen eine gute Alternative, wenn keine ausreichende Selektivität mit den herkömmlichen RP-Säulen erreicht wird. Zur Charakterisierung der polaren Selektivität findet man Substanzen wie Butyl-4-hydroxybenzoat (Butylparaben), Dipropylphthalat, 4-Butylbenzoësäure oder Phenol.

Der Metallgehalt einer Phase resultiert aus der Herstellung des Kieselgels und beeinflusst dessen Acidität sowie die silanophile Aktivität. Außerdem bereitet die Chromatographie von Substanzen, die mit Metallen Komplexe bilden können, Probleme wie z.B. breite, tailende Peaks. Kieselgele der ersten Generation, die aus Wasserglas hergestellt wurden, wiesen einen relativ hohen, oft auch schwankenden Metallgehalt (besonders Eisen und Aluminium) auf. Da die Acidität der Silanolgruppen auch die Reaktivität bei der Derivatisierung beeinflusst, ist die Reproduzierbarkeit der Produktion chemisch modifizierter Phasen bei Verwendung von Kieselgelen mit schwankenden Metallgehalten gering. Moderne Kieselgele besitzen nur noch einen geringen Metallgehalt (< 10 ppm). Testsubstanzen für diesen Parameter sind Bipyridine wie 2,2'-Bipyridin oder 4,4'-Bipyridin.

Zur Charakterisierung der genannten Eigenschaften stationärer Phasen und als Kriterien zum Vergleich von Säulen sind zahlreiche Mischungen von Testsubstanzen in der Literatur beschrieben<sup>12-20</sup> und werden auch von Säulenherstellern oder dem National Institute of Standards and Technology (NIST) vertrieben.

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften, der Bindungschemie und des Ausmaßes der Belegung

entsprechen sich nominell gleiche Säulen unterschiedlicher Hersteller keineswegs immer, weshalb in der Praxis unterschiedliche Trennselektivitäten mit ihnen erhalten werden können. Die bei der Erstellung einer Monographie verwendete Säule ist online in der Knowledge Database des EDQM hinterlegt, sodass ggf. auf diese Säule zurückgegriffen werden muss, falls die Prüfung auf Systemeignung auch nach Variation der chromatographischen Bedingungen im erlaubten Umfang negativ ausfällt. Zu allgemeinen Auswahlsschemata einer chromatographischen Phase in Abhängigkeit von den Eigenschaften der zu analysierenden Substanzen siehe beispielsweise Lit.<sup>1-3)</sup> sowie das Informationsmaterial oder die Internetseiten von Säulenherstellern.

Die Begriffe „Normalphasen-“ und „Umkehrphasenchromatographie“ beziehen sich auf die Polaritätsunterschiede zwischen stationärer und mobiler Phase. Die IUPAC definiert die Normalphasenchromatographie als ein flüssigchromatographisches Verfahren, bei dem die stationäre Phase signifikant polarer ist als die mobile Phase. Bei der Umkehrphasenchromatographie (RP-Chromatographie) ist die mobile Phase signifikant polarer als die stationäre Phase. Daher können beispielsweise Cyanopropyl-, Aminopropyl- oder Diolphasen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Fließmittels sowohl im Umkehrphasen- als auch im Normalphasenmodus betrieben werden. Polare stationäre Phasen können auch mit polaren organischen Fließmitteln genutzt werden, der polar organic mode (POM), oder mit polaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Acetonitril unter Zusatz eines Anteils Wasser oder wässriger Pufferlösungen in der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC, hydrophilic interaction chromatography).

## Mobile Phasen

In der HPLC verwendete Lösungsmittel und Puffersalze müssen einen hohen Reinheitsgrad besitzen. Stabilisatoren sollten speziell bei Verwendung von UV-Detektoren in Lösungsmitteln nicht enthalten sein. Im Handel werden daher spezielle Qualitäten – „HPLC-Qualität“ oder „HPLC grade“, von einigen Herstellern auch „UHPLC-Qualität“ – angeboten. Zur Entfernung kleiner Partikel sollte die mobile Phase vor Gebrauch durch 0,45-µm-Filter, bei Verwendung von Sub-2-µm-Säulenmaterial oder bei Lichtstreuendetektion durch

0,2- $\mu\text{m}$ -Filter filtriert werden, um besonders die Verstopfung der Säulenfritten durch kleine Partikel zu vermeiden. Weiterhin kann das Ansaugen der Lösungsmittel durch einen Filter erfolgen.

Die Lösungsmittel der mobilen Phase müssen vor der Verwendung entgast werden, da gelöste Gase zur Bildung von Gasblasen vor allem nach Durchgang durch die Säule aufgrund der Entspannung (Druckminderung) führen können, wodurch „Geisterpeaks“ oder erhöhtes Grundrauschen des Detektors resultieren. Ebenso ist Gasblasenbildung beim Ansaugen der Lösungen möglich, wodurch die gleichmäßige Förderung der mobilen Phase gestört wird. Die Entgasung kann erfolgen durch 1. Erwärmen des Eluenten unter Vakuum, 2. Ultraschallbehandlung unter Vakuum, 3. Verdrängen der gelösten Gase durch das Einleiten des gering löslichen Inertgases Helium ins Vorratsgefäß oder 4. durch On-line-Entgasung mit einem Vakuum-Membran-Entgaser, der zwischen Vorratsgefäß und Pumpe eingebaut wird.

Der Wassergehalt der in der Normalphasenchromatographie eingesetzten organischen Lösungsmittel muss streng kontrolliert werden um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Werden Lösungsmittelgemische eingesetzt, so müssen die Volumina getrennt abgemessen und anschließend gemischt werden, um einen Fehler beispielsweise durch Volumenkontraktion zu vermeiden. Beinhaltet ein Gemisch wässrige Pufferlösungen so ist der pH grundsätzlich in der wässrigen Phase vor dem Mischen einzustellen. Der pH in organisch-wässrigen Lösungen kann aufgrund des Diffusionspotentials nicht mehr korrekt gemessen werden. Bei der Verwendung von Puffern, Salzen, Ionenpaarreagenzien, chiralen Selektoren u.a.m. in der mobilen Phase muss die Pumpe nach der Analyse sorgfältig gespült werden, da auskristallisierende Substanzen zur Zerstörung der Pumpendichtungen und der Pumpenkolben sowie Verstopfung der Säule führen können.

Bei Gradientenelution wird das Mischungsverhältnis von zwei oder mehr Komponenten der mobilen Phase im Verlauf der Analyse verändert. Dabei ist zu beachten, dass die Änderung der Zusammensetzung, die in der Mischkammer erstellt wird, mit einer zeitlichen Verzögerung am Säulenanfang auftritt. Das Volumen zwischen Mischer und Säulenanfang wird als „dwell volume“ bezeichnet. Es ist bei einem Hochdruckgradienten mit Mischung „nach“ den

Pumpen deutlich geringer als beim Niederdruckgradienten mit Mischung „vor“ der Pumpe. Aus diesem Grund kann die Verwendung von Hochdruck- und Niederdruckgradienten zu unterschiedlichen Chromatogrammen der gleichen Probe führen. Die zeitliche Verzögerungskonstante (dwell time) kann bei bekannten Fluss aus dem Volumen des Systems zwischen Mischkammer und Säulenanfang berechnet oder experimentell bestimmt werden.

## Detektoren

Standarddetektor in der HPLC ist heute der Dioden-Array-Detektor; UV-Vis-Festwellenlängendetektoren unter Verwendung von Filtern werden heute praktisch nicht mehr hergestellt. Ein Vorteil des Dioden-Array-Detektors besteht in der Möglichkeit, während der Analyse UV-Spektren aufzunehmen. Dadurch werden für chromatographische Peaks spektrale Daten erhalten, die neben der Quantifizierung von Substanzen auch zu deren Identifizierung oder zur Bestimmung der Peakreinheit herangezogen werden können.

Fluoreszierende Substanzen können spezifisch auch in komplexen Stoffgemischen mittels Fluoreszenzdetektoren analysiert werden. Die Ph. Eur. nutzt diesen Detektor u.a. bei der Bestimmung von Aflatoxin B1 oder Ochratoxin A in pflanzlichen Drogen. Für Substanzen ohne Chromophor sind Leitfähigkeits-, Brechungsindex- (Differentialrefraktometer), ELSD (evaporative light scattering detector), Multiwinkel-Streulicht Detektoren (MALS, multi angle light scattering detector) der CAD (charged aerosol detector) oder MS-Detektoren geeignet. Massenspektrometer sind universelle Detektoren für (fast) alle Substanzen und erlauben auch die Identifizierung der Analyte anhand der Massenspektren.

Brechungsindexdetektoren werden im Arzneibuch z.B. bei der HPLC-Analytik von **Betadex**, **Lactulose**, **Glycerolmonostearat**, **Sorbitol** oder **Sucralfat** (alle Ph. Eur.) eingesetzt. Beim Verdampfungs-Lichtstreuendetektor (ELSD) wird das Eluat in einem Stickstoffstrom zerstäubt und die resultierenden Tröpfchen an einer Heizwendel verdampft. Es entstehen winzige Feststoffpartikel, die Laserlicht streuen, welches von einem Fotodetektor registriert wird. Dadurch trifft nur Licht auf den Detektor, wenn Analytenteilikel im Stickstoffstrom vorliegen. HPLC-Methoden unter Verwendung von ELSD-Detektion finden sich bei **Hydroxypropylbetadex**,

**Sucrosestearat** oder **Hydroxyethylstärke** (alle Ph. Eur.). Beim CAD wird das Eluat ebenfalls im Stickstoffstrom vernebelt und das Lösungsmittel verdampft, sodass Partikel resultieren. Diese kollidieren mit einem zweiten Strom von positiv geladenen Gaspartikeln, die beim Passieren eines hochspannungsführenden Platin-Coronadrahts entstehen. Die Ladung wird auf die Analytpartikel übertragen, welche in einen Kollektor geleitet werden, wo diese von einem hochempfindlichen Elektrometer gemessen werden. Das resultierende Signal ist direkt proportional zur Analytmenge.

Redoxaktive Substanzen können mittels elektrochemischer Detektoren bestimmt werden. Beispielsweise ist die gepulste amperomtrische Detektion bei HPLC-Verfahren der Aminoglykosid-Antibiotika **Gentamicinsulfat**, **Neomicinsulfat** und **Tobramycin** (alle Ph. Eur.) vorgeschrieben. Zur Analytik von Radiopharmaka werden Radioaktivitätsdetektoren verwendet. Kommerziell verfügbar sind weiterhin FTIR-Detektoren sowie polarimetrische Detektoren zur Bestimmung chiraler Substanzen.

## Ausführung

Vor der Durchführung einer Analyse muss die Säule äquilibriert werden, d. h. mit der mobilen Phase bei der vorgeschriebenen Temperatur durchgespült werden, um eine stabile Basislinie des Detektorsignals zu erhalten. Hierzu wird mindestens ein etwa 10 Säulenvolumina entsprechendes Volumen der mobilen Phase empfohlen. Das Säulenvolumen kann nach

$$V = (0,5 \cdot 10^{-3}) \cdot l \cdot d^2$$

abgeschätzt werden, wobei  $l$  die Länge der Säule in mm und  $d$  der Säulendurchmesser in mm ist.

Für die Auswertung der Chromatogramme verweist die Ph. Eur. auf den Allgemeinen Text **2.2.46**. In diesem Text sind auch die zulässigen Änderungen der Parameter des chromatographischen Systems sowie deren zulässiges Ausmaß aufgeführt, sollten die in einer Monographie genannten Kriterien der Systemeignung mit dem vorhandenen System nicht erfüllt werden (siehe den Kommentar zu **2.2.46**, Ph. Eur.).

G. Scriba

## Literatur

- 1) Rücker/Neugebauer/Willems, S. 472–499.
- 2) S. Kromidas (Hrsg.), *Der HPLC Experte*, Wiley-VCH, Weinheim 2014.
- 3) V. Meyer, *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*, 10. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim 2009.
- 4) D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Flüssigchromatographie*, in: *Instrumentelle Analytik*, 6. Aufl., S. 793–830, Springer, Heidelberg 2013.
- 5) Y. Kazakevich, R. Lobrutto (eds.), *HPLC for Pharmaceutical Scientists*, Wiley, Hoboken 2007.
- 6) Q. A. Xu (ed.), *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and its Applications*, Wiley, Hoboken 2013.
- 7) D. Guillarme, J.-L. Veuthey (eds.), *UHPLC in Life Sciences*, RSC Publ., London 2012.
- 8) B. Debrus et al., *Method Transfer Between Conventional HPLC and UHPLC*, in: Lit. 7, S. 67–100.
- 9) G. K. Webster, T. F. Cullen, L. Kott, *Method Transfer between HPLC and UHPLC Platforms*, in: Lit. 6, S. 31–54.

- 10) K. K. Unger, N. Tanaka, E. Machtejevas (eds.), *Monolithic Silicas in Separation Science*, Wiley-VCH, Weinheim 2011.
- 11) M. Schulte et al., in: H. Schmidt-Traub (ed.), *Preparative Chromatography*, S. 70–72, Wiley-VCH, Weinheim 2006.
- 12) H. Engelhardt, M. Jungheim, *Chromatographia* 29, 59–68 (1990).
- 13) K. Kimkata et al., *J. Chromatogr. Sci.* 27, 721–728 (1989).
- 14) L. C. Sander, S. A. Wiese, *Anal. Chem.* 56, 504–510 (1984).
- 15) L. C. Sander, S. A. Wiese, *Anal. Chem.* 67, 3284–3292 (1995).
- 16) L. C. Sander, S. A. Wiese, *J. Sep. Sci.* 26, 283–294 (2003).
- 17) U. D. Neue, *J. Sep. Sci.* 30, 1611–1627 (2007).
- 18) S. Nyiredy, Z. Szucs, L. Szepesy, *J. Chromatogr. A* 1157, 122–130 (2007).
- 19) S. Nyiredy, Z. Szucs, L. Szepesy, *Chromatographia* 69, 609–614 (2009).
- 20) P. G. Stevenson et al., *J. Chromatogr. A* 1217, 5358–5364 (2010).

# Lindenblüten

## Tiliae flos

### Allgemeine Angaben

In der Ph. Eur. 10.3 wurde der Name einer Stammplante aktualisiert, die mikroskopische Identitätsprüfung B neu formuliert und diese mit einer Abbildung versehen; auch wurde die Identitätsprüfung C (DC) modernisiert und die Reinheitsprüfung konkreter benannt.

### Definition

**Stammpflanzen<sup>1)</sup>:** *Tilia cordata* Mill., die Winterlinde (Malvaceae, früher Tiliaceae), ist ein bis 25 m hoher, sommergrüner Baum mit asymmetrisch rundlichen, fast kahlen Blättern, deren Nervenwinkel einen rostfarbenen Haarbesatz zeigen. Der trugdoldige Blütenstand besteht aus 3 bis 11 (meist 5) Blüten, selten mehr, und ist mit einem netzaderigen Hochblatt bis etwa zur Hälfte verwachsen. Von den ca. 30 Staubblättern können gelegentlich einzelne als Staminodien (sterile, peltaoide Staubblätter mit verbreitertem Filament und rückgebildeten Theken) vorkommen.

*Tilia platyphyllos* Scop., die Sommerlinde, ist wie die vorstehend genannte Art u.a. in Mitteleuropa heimisch; sie wird bis 40 m hoch. Gute Unterscheidungsmerkmale zur Winterlinde sind die schwach behaarten Blätter mit weißlich bebarbten Nervenwinkeln und die Trugdolden aus 2 bis 9 (meist 3 oder 4) Einzelblüten mit 30 bis 40 Staubblättern, stets ohne Staminodien.

Beide *Tilia*-Arten gehören zu den extrem langlebigen Pflanzen; in Deutschland gibt es ca. 50 Bäume, die älter als 500 Jahre sind<sup>1)</sup>.

Als dritte Stammpflanze wird *Tilia x europaea* L., die Holländische Linde, aufgeführt, die ursprünglich mit ihrem synonymen Namen, *Tilia x vulgaris* Hayne, im Arzneibuch geführt wurde; in anderen Quellen heißt das Synonym *T. vulgaris* B. Heyne. Es handelt sich um eine natürlich vorkommen-

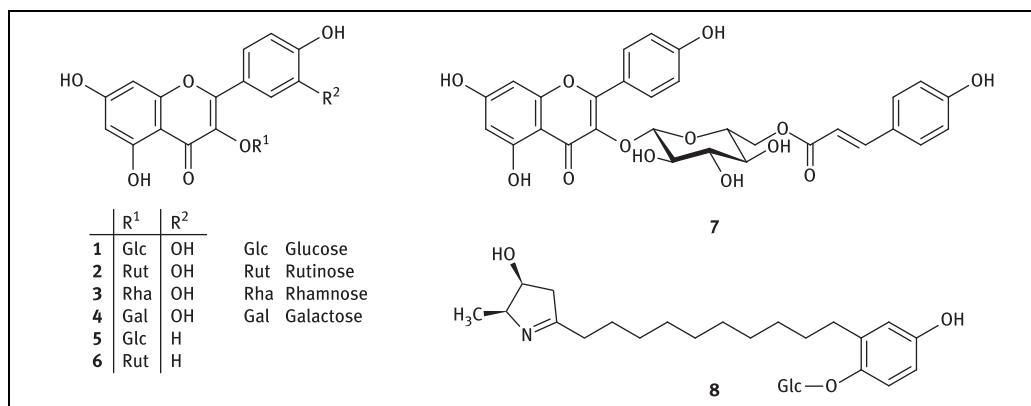
de Hybride der beiden vorstehend genannten Arten. Laut Definition der Droge sind auch Mischungen dieser drei *Tilia*-Arten erlaubt.

**Droge:** Die während der Vollblüte mitsamt dem Hochblatt geernteten Blütenstände werden in dünner Schicht bei Temperaturen von unter 40°C getrocknet; sie verlieren dabei stark an Duftstoffen. Da zahlreiche andere *Tilia*-Arten in Parks oder Alleen kultiviert werden und die Pflanzen häufig auch bastardisieren, gelangen auch Blüten anderer *Tilia*-Arten auf den Markt (Verwechslungsgefahr).

Die Droge wird aus osteuropäischen Ländern, den Balkanländern, der Türkei und aus China importiert.

**Andere Drogennamen:** Lime flower (engl.); Fleur de tilleul (franz.); Fiore di tiglio (ital.); Tila (span.)

**Inhaltsstoffe<sup>1-3)</sup>:** Lindenblüten enthalten ca. 1% Flavonoide, vorwiegend Glykoside des Quercetins; als solche dominieren Isoquercitrin (1; Quercetin-3-*O*-glucosid) und Rutosid (2; Quercetin-3-*O*-rutinosid), außerdem sind Quercitrin (3; Quercetin-3-*O*-rhamnosid) und Hyperosid (4; Quercetin-3-*O*-galactosid) enthalten. Auch Kämpferolglykoside wurden gefunden, u.a. Astragalin (5; Kämpferol-3-*O*-glucosid), Kämpferol-3-*O*-gluco-7-*O*-rhamnosid (6) und Kämpferol-3,7-di-*O*-rhamnosid. Der Zuckerteil kann mit Phenolcarbonsäuren verestert sein; ein für Lindenblüten charakteristischer Vertreter davon ist das Tilirosid (7; Astragalin-6''-*p*-Cumarsäureester). Lit.<sup>4)</sup> zufolge weist das Flavonoidmuster von Blüten und Hochblättern von *T. platyphyllos* quantitative Unterschiede auf, mengenmäßig spielen dabei die Quercetin- und Kämpferol-3,7-*O*-dirhamnoside eine Rolle. Die Ph. Eur. stellt an Lindenblüten keine Gehaltsanforderung.



Weitere Inhaltsstoffe sind Phenolcarbonsäuren und deren Derivate (Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure, Chlorogensäure u.a.) sowie etwa 2% Gerbstoffe vom Catechin- bzw. Gallocatechin-Typ. Auch wurden dimere Procyanidine (B<sub>2</sub> und B<sub>4</sub>) nachgewiesen sowie die Hydroxycumarine Scopoletin und Fraxin (Fraxetin-8- $\beta$ -D-glucosid)<sup>5)</sup>. Die Droge enthält etwa 10% Schleimstoffe, vorwiegend aus Arabino-galactanen bestehend mit einem hohen Anteil an D-Galacturonsäure und D-Glucuronsäure<sup>6)</sup>.

Eine zu 0,02 bis 0,1% enthaltene flüchtige Fraktion der Lindenblüten besteht vorwiegend aus Monoterpenen (Linalool, Cineol, Geraniol u.a.) und kleinen Anteilen an Sesquiterpenen und Phenylpropanen (z.B.  $\beta$ -Caryophyllen, Eugenol, Anethol); bisher sind über 70 Komponenten bekannt<sup>7,8)</sup>.

Eine neue phytochemische Untersuchung ergab, dass Lindenblüten auch Alkaloide enthalten<sup>9)</sup>. Identifiziert wurden die beiden diastereomeren Tiliine A (8) und b, die beiden diastereomeren Tiliamine A und B. Bei den Tiliinen ist ein 2-Methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-3-ol über eine C<sub>10</sub> Alkylkette mit einem glucosidierten Hydrochinon verbunden; die Tiliamine bestehen aus einem 2-Methylsubstituierten Piperidin-3-ol, das über eine C<sub>9</sub>-Alkylkette mit einem O-glucosidierten Hydrochinon verbunden ist; die Tilacetine sind die 3-*O*-Acetylerivate der Tiliamine. Aus den in Lit.<sup>9)</sup> angegebenen Alkaloidgehalten in sechs verschiedenen Drogenextrakten (0,007 bis 0,068 %) errechnet sich ein mittlerer Alkaloidgehalt in der Droge von ca. 0,04 %.

## Prüfung auf Identität

C. Die DC-Prüfung zielt auf die Flavonoide und Kaffeesäurederivate der Droge. Sie wird mit Methanol extrahiert, der Extrakt auf einer Kieselgel-Hochleistungs-DC-Platte (HPTLC, Korngröße 2 bis 10  $\mu$ m) mit einem relativ polaren Fließmittel getrennt. Hyperosid (4) und Rutosid (2) dienen als Referenzsubstanzen. Der Nachweis erfolgt, wie bei Flavonoiden üblich, mit Diphenylboryloxyethylamin (früher Naturstoffreagenz; Bildung von Bor-Chelatkomplexen), mit dem Flavonoide unter dem UV-Licht bei 366 nm gelborange (Flavonole) bzw. gelbgrün (Flavone) fluoreszierende Zonen liefern; Phenolcarbonsäuren (z.B. Kaffeesäure) und Kaffeesäurederivate (z.B. Chlorogensäure) fluoreszieren blau. Das Nachsprühen mit Macrogol 400 verstärkt und stabilisiert die Fluoreszenz. Im Arzneibuch werden die Flavonoid-Zonen nicht namentlich zugeordnet. Der zonenreiche DC-Fingerprint wird meist von einer bräunlich gelb bis orange fluoreszierenden Zone oberhalb der Hyperosid-Zone dominiert; vermutlich handelt es sich dabei um das Isoquercitrin (1). Tilirosid (7) liegt als grünblau fluoreszierende Zone unterhalb einer blaugrünen Zone unterhalb der Kaffeesäure-Zone (blaue Zone nahe der Front); ebenfalls nahe der Front liegen die rot fluoreszierenden Zonen der Chlorophylle. Abbildungen sind in Lit.<sup>10-12)</sup> zu finden. Die Abb. in Lit.<sup>12)</sup> zeigt zusätzlich das DC einer Droge der Stumpfblattart *T. tomentosa* (siehe unter „Prüfung auf Reinheit“); deren DC-Fingerprint ist ähnlich, jedoch liegt auf der Höhe von Rutosid oder etwas darunter eine in-

tensivere orangefarbene Zone und zwischen Hyperosid und der darunter liegenden sehr intensiven Zone noch eine zweite orangefarbene Zone. Blüten anderer *Tilia*-Arten ergeben stärker abweichende DC-Fingerprints.

## Prüfung auf Reinheit

***Tilia americana* L. oder *Tilia tomentosa* Moench:** Verfälschungen durch Blüten anderer *Tilia*-Arten kommen vor. Dabei handelt es sich zu meist um die Silberlinde, *Tilia tomentosa* Moench (Syn. *T. argentea* DC.), die häufig als Allee- oder Zierbaum gepflanzt wird, manchmal auch um die aus Nordamerika stammende *T. americana* L. Die Hochblätter dieser beiden Arten sind dicht mit Büschelhaaren bedeckt – ein sehr auffallendes Merkmal. Bei aus China stammender Droge sind auch Blüten von *T. chinensis* Maxim. und *T. mandshurica* Rupp. beobachtet worden.

**Andere Reinheitsprüfungen:** Ein geeignetes Reinheitskriterium ist auch die Quellungszahl, die auch als Gehaltsbestimmung betrachtet werden kann. Bei Lindenblüten ist die Quellungszahl besonders hoch: frisch bereitete, gute Droge besitzt einen Wert von über 50. Zur Bestimmung liegen kritische Anmerkungen vor<sup>13)</sup>, sie betreffen eine präzisere Angabe des Zerkleinerungsgrades und des Durchschüttelns. Die Quellungszahl sinkt während der Lagerung<sup>14)</sup> innerhalb von 2 bis 3 Jahren auf Werte von etwa 32 bis 35. Zur Methode siehe den Kommentar zu **2.8.4 Quellungszahl** (Ph. Eur.).

Eine HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung der Flavonoide wird in Lit.<sup>4)</sup> aufgezeigt, die auch die Flavonoidmuster von möglichen Verfälschungen dokumentiert.

E. Stahl-Biskup

## Pharmakologische Eigenschaften

**Verwendung**<sup>15, 16)</sup>: Lindenblüten wirken schwach adstringierend sowie diaphoretisch. Für die in der Droge enthaltenen Schleimstoffe konnte im Tierversuch eine Adhäsion an bukkalen Schleimhautmembranen gezeigt werden. Die schweißtreibende Wirkung von Lindenblütentee ist allerdings umstritten und beruht möglicherweise allein auf der Aufnahme großer Mengen an heißem Wasser. Ein im Tierversuch nachgewiesener sedierender Effekt könnte auf einer aromatherapeutischen Wirkung beruhen. Als mögliche Auslöser kommen Linalool, Geraniol und Benzylalkohol in Betracht.

Lindenblüten werden bei Erkältungskrankheiten und damit verbundenem Husten zur Milderung des

Hustenreizes und bei fieberhaften Erkrankungen, bei denen eine Schwitzkur erwünscht ist, angewendet.

**Indikationen:** Das HMPC (Ausschuss der EMA) hat Lindenblüten für das Anwendungsgebiet „banale Erkältung und leichte Stresssymptome“ als traditionelles pflanzliches Arzneimittel (traditional use) eingestuft.<sup>17)</sup>

**Dosierung:** Mehrmals täglich einen möglichst heißen Teeaufguss aus 1 bis 2 Teelöffeln Droge und 150 ml Wasser trinken<sup>15)</sup>. Die empfohlene Tagesdosis beträgt 2 bis 4 g Droge<sup>16)</sup>.

M. Neubeck/Mu

## Literatur

- 1) B. Bertram, M. Kairies, *Tilia*, in: Hager. 2) Wichtl, 6. Aufl., S. 651–653 (2016). 3) Hänsel/Sticher, 10. Aufl., S. 798–799 (2015). 4) G. Toker et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26, 111–121 (2001). 5) M. L. Barreiro Arcos et al., *Phytother. Res.* 20, 34–40 (2006). 6) G. Kram, G. Franz, *Pharmazie* 40, 501–502 (1985).

- 7) G. Buchbauer, L. Jirovecz, *Dtsch. Apoth. Ztg.* 132, 748–750 (1992). 8) N. Symma et al., *Planta Med.* 87, 686–700 (2021). 9) G. Toker et al., *J. Essent. Oil Res.* 11, 369–374 (1998). 10) Pachaly, Bd. 1. 11) DAC, Bd. 4 und 5. 12) Rohdewald/Rücker/Glombitzka, Bd. 2. 13) H. Kanschat, C. Lander, *Pharm. Ztg.* 129, 370–373 (1984). 14) H. Kanschat, C. Lander, *Pharm. Ztg.* 132, 2558–2560 (1987). 15) *Standardzulassungen für Fer-*

tigarzneimittel, Govi, Frankfurt/Main 1989. **16)** Aufbereitungsmonographie *Tiliae Flos, Lindenblüten* der Kommission E, BAnz vom 1.9.1990. **17)** Herbal Me-

dicinal Product Committee: [www.ema.europa.eu/en/medicines](http://www.ema.europa.eu/en/medicines) (eingesehen 09/2021).

# Betamethason

## Betamethasonum

### Allgemeine Angaben

Betamethason (**14b**) ist ein synthetisches Glucocorticoid mit antiinflammatorischer Wirkung. Betamethason und Dexamethason (**16**, A) unterscheiden sich lediglich durch die Konfiguration der 16-Methylgruppe.

Die Substanz ist auch in der USP, JAP und INTERN beschrieben. Die Ph. Eur. beschreibt auch das 21-Acetat, das 17 $\alpha$ , 21-Dipropronat, das Dihydrogenphosphat-Dinatrium und das 17 $\alpha$ -Valerat.

Im Nachtrag 10.3 wurde die DC-Methode (nun Identitätsprüfung B) überarbeitet und die Farbreaktion zur Identifizierung der Substanz (bisher Identitätsprüfung A) gestrichen.

**CAS-Nr.:** 378-44-9

**PubChem-Nr.:** 9782

**DrugBank-Nr.:** APRD00513

**Darstellung<sup>1,2)</sup>:** Zur Synthese des Cortisolderivats Betamethason (**14b**) werden zunächst in geeignete Vorstufen die 16 $\beta$ -Methyl- und die 17 $\alpha$ -Hydroxygruppe im D-Ring des Pregnan-Grundgerüsts eingeführt<sup>1-4)</sup>, siehe hierzu auch die Kommentare zu **Desoxycortonacetat**, **Dexamethason** und **Progesteron** (alle Ph. Eur.). Man addiert beispielsweise Diazomethan an das  $\Delta^{16-20}$ -Keto-Steroid **1<sup>5</sup>** und pyrolysiert das entstandene Pyrazolin **2** zu **3**, aus dem durch katalytische Hydrierung an Palladium die 16 $\beta$ -Methylverbindung **4** erhalten wird. Diese überführt man durch Behandlung mit Acetanhydrid/p-Toluolsulfonsäure in das Enolacetat **5**, mit Persäure in das Epoxid **6** und durch alkalische Hydrolyse in das Hydroxyketon **7**. Die auf diesem Weg dargestellte Verbindung **8** [3 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 17-Trihydroxy-16 $\beta$ -methyl-5 $\alpha$ -pregnan-20-on<sup>2)</sup>] wird nach

Einführen der 21-Acetoxygruppe durch Bromierung und Acetatsubstitution mit *N*-Bromacetamid (NBA) selektiv in 3-Stellung zur Ketoverbindung **10** oxidiert, aus der man nach erneuter Bromierung in 2- und 4-Stellung und anschließender Abspaltung von Bromwasserstoff das Dienon **11** erhält. Danach wird die 11 $\alpha$ -Hydroxygruppe mit *p*-Toluolsulfonsäure abgespalten, die entstandene 9,11-Doppelbindung in **12** durch Addition von Hypobromit und Behandlung mit Kaliumacetat in das 9,11 $\beta$ -Epoxid **13** übergeführt und Fluorwasserstoff zum 21-Acetat **14a** addiert. Milde Verseifung liefert schließlich Betamethason (**14b**).

**Stabilität/Lagerung:** Die Substanz (**14b**) ist lichtempfindlich. Ihre  $\beta$ -ständige Hydroxyketon-Seitenkette an C-17 neigt im alkalischen Milieu in Anwesenheit von Metall-Ionen, leicht reduzierbaren Stoffen oder Luft zur Oxidation<sup>6)</sup>. Dagegen ist Betamethason unter normalen Bedingungen bei Ausschluss von Licht an der Luft stabil (USP, JAP).

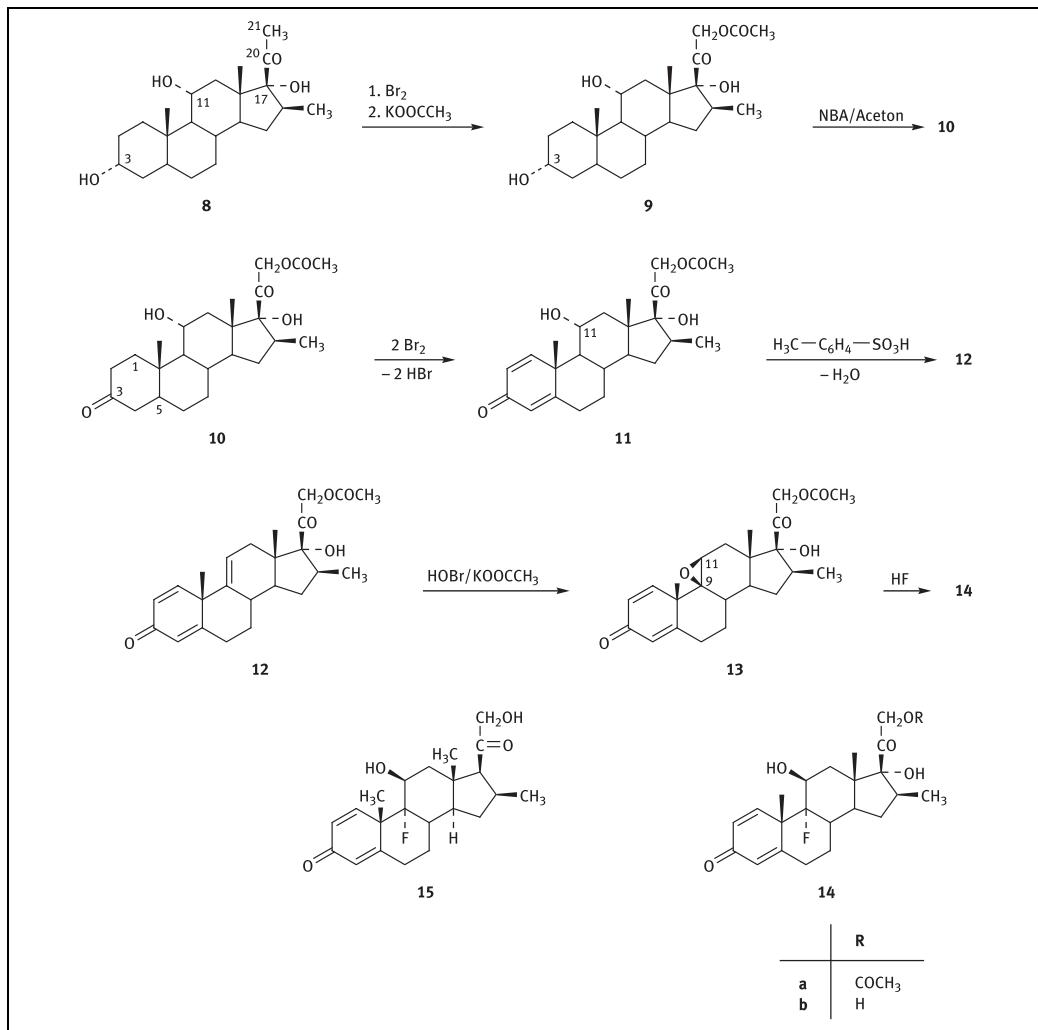
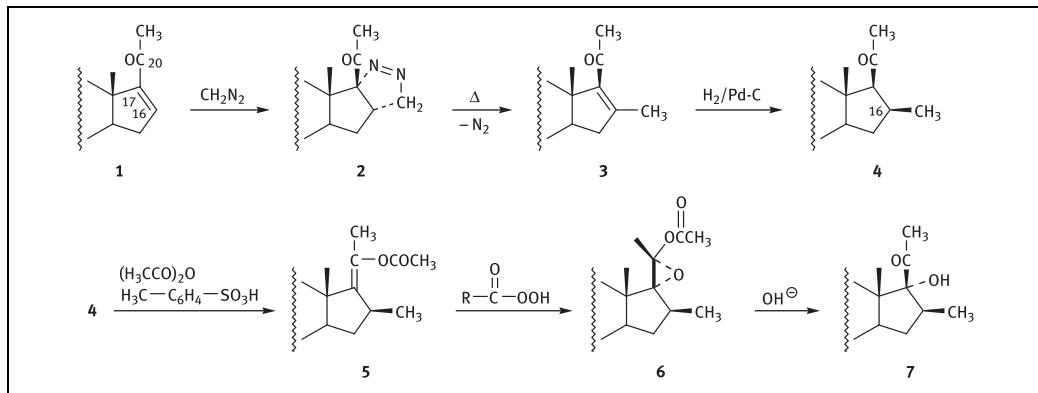
**Synonyme:** Betadexamethasone, Betacortil, Bepredrol, Betafluorene, Celestone, Flubenisolone, Sch 4831, Visubeta

**Arzneibuchnamen:** Betamethasone (USP, JAP, INTERN)

### Eigenschaften

Die Substanz ist ein weißes bis fast weißes, kristallines Pulver; sie ist polymorph, zwei Modifikationen sind bekannt.

1 Teil Substanz löst sich bei 20°C in etwa 5300 Teilen Wasser, 65 Teilen Ethanol, 15 Teilen warmem Ethanol, 325 Teilen Chloroform oder 3 Teilen Methanol<sup>7)</sup>.



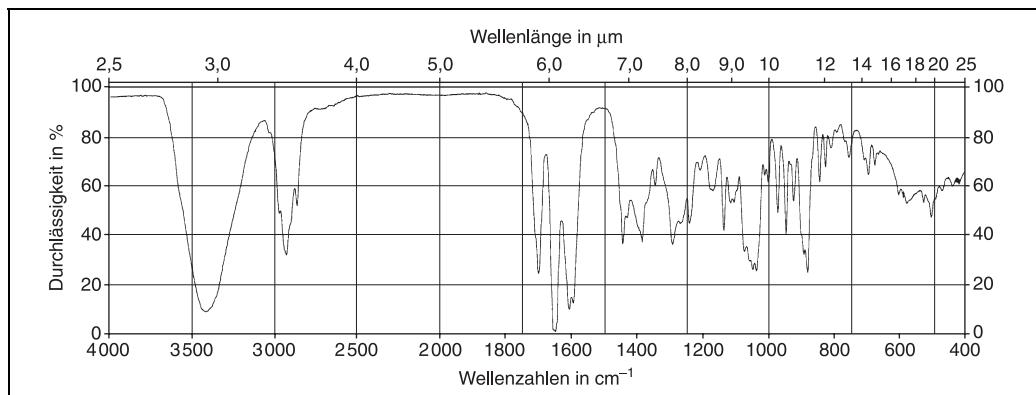


Abb. 1: IR-Spektrum von Betamethason in KBr (1,9 mg in 213 mg)

B

## Prüfung auf Identität

- A. Vgl. Abb. 1. Betamethason kann in zwei Modifikationen mit unterschiedlichen IR-Spektren vorliegen<sup>8)</sup>. Durch Eindampfen einer Ethanol-, Aceton- oder Methanol-Lösung der einen Modifikation wird ein Teil davon in die zweite Modifikation übergeführt. In reiner Form konnte die zweite Modifikation bisher nicht gewonnen werden. Die unterschiedlichen kristallinen Modifikationen lassen sich durch Lösen in Dichlormethan und Wiedereindampfen vereinheitlichen.
- B. Dieser DC-Test detektiert Betamethason nach einer Farbreaktion bei Tages- und unter UV-Licht (365 nm). Diese Prüfung schreibt das Arzneibuch auch zur Identifizierung des Epimers **Dexamethason** und **Dexamethasonacetat** vor (siehe auch die zugehörigen Kommentare); sie eignet sich zur Unterscheidung der Glucocorticoide. Der sonst in Sprühreagenzien für die DC gebräuchliche Anisaldehyd ist hier durch 2,4-Dihydroxybenzaldehyd ersetzt.
- C. Die Farbreaktion mit Schwefelsäure gilt als wenig spezifisch, sie ist positiv bei allen ungesättigten hydroxylierten Steroiden<sup>9)</sup>.

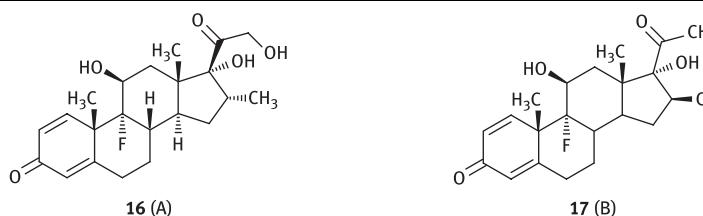
**Andere Identitätsprüfungen:** Die JAP lässt eine Probe nach der Schöniger-Methode aufschließen und das dabei freigesetzte Fluorid durch gebräuchliche Farbreaktionen identifizieren. Nach der JAP und in früheren Ausgaben der Ph. Eur. wird die Porter-Silver-Reaktion durchgeführt: Versetzen ei-

ner ethanolischen Lösung von Betamethason mit Phenylhydrazin und Schwefelsäure; das Absorptionsmaximum liegt bei 410 bis 420 nm. Nach Lit.<sup>10)</sup> soll Betamethason nicht das typische Reaktionsprodukt der Porter-Silver-Reaktion, das 21-Phenylhydrazone, sondern hauptsächlich die Verbindung **15** bilden. Die Absorption bei 450 nm soll auf eine Reaktion von Schwefelsäure mit Betamethason bzw. **15** zurückzuführen sein. Diese Probe ist vor allem zur Unterscheidung von Betamethason (**14b**) und Dexamethason (**16**, A) wichtig. Folgende Werte wurden gemessen<sup>11)</sup>:

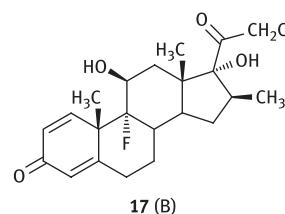
Betamethason (450 nm): < 0,25  
 Betamethason (419 nm): < 0,10  
 Betamethasonester (450/419 nm): < 0,10  
 Dexamethason (450 nm): > 0,40  
 Dexamethason (419 nm): > 0,25  
 Dexamethasonnatriumphosphat (419 nm): > 0,20  
 Dexamethasonacetat (419 nm): > 0,35  
 Prednisolonpivalat (415 nm): 0,20 bis 0,30  
 Prednisolonphosphat (415 nm): 0,10 bis 0,20

In früheren Ausgaben der Ph. Eur. war die zulässige Absorption bei 419 nm auf max. 0,10 festgelegt.

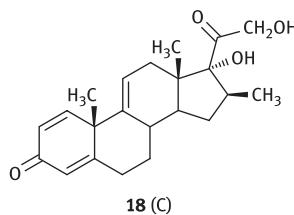
Das gebundene Fluor kann durch Glühen mit Magnesiumoxid in anorganisches Fluorid übergeführt werden. Letzteres wird mit Alizarin S nachgewiesen. Alizarin S bildet mit Zirconium(V)-Ionen einen löslichen violettroten Farblack. In Gegenwart von Fluorid-Ionen entstehen jedoch stabilere Fluorzircon-Komplexe unter Freisetzung von gelbem Alizarin S.



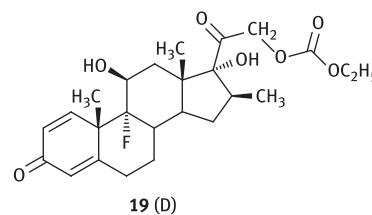
16 (A)



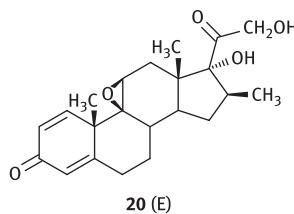
17 (B)



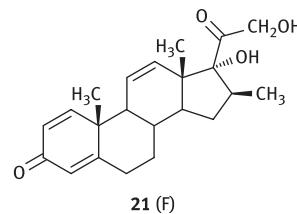
18 (C)



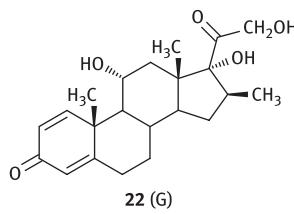
19 (D)



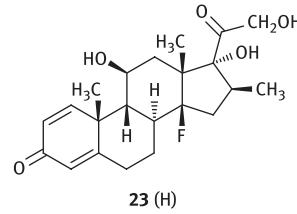
20 (E)



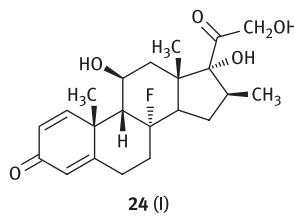
21 (F)



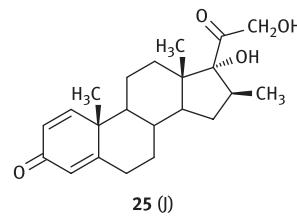
22 (G)



23 (H)



24 (I)



25 (J)

## Prüfung auf Reinheit

**Spezifische Drehung:** Die Ph. Eur. ersetzt das früher als Lösungsmittel gebräuchliche Dioxan (noch immer vorgesehen in der USP und JAP) durch das besser lösende Methanol und umgeht damit gelegentlich beobachtete Löslichkeitsprobleme.

**Verwandte Substanzen:** Die Ph. Eur. lässt mittels Methylprednisolon die Trennleistung der Gradienten-HPLC-Methode prüfen. Untersucht werden neben Dexamethason (16, A) auf die Verbindungen 17 bis 25 (Verunreinigungen B bis J); alle genannten Verunreinigungen sind spezifiziert.

Die USP lässt ebenfalls mittels HPLC prüfen. Die JAP begrenzt mittels DC jedes Nebenprodukt auf 1,0 %.

**Andere Reinheitsprüfungen:** Die JAP limitiert Asche auf 0,5 %, die USP auf 0,2 %. Die USP begrenzt außerdem den Trocknungsverlust auf 1,0 % und lässt zusätzlich eine GC-Prüfung auf organische, flüchtige Verunreinigungen durchführen.

## Gehaltsbestimmung

Die Reinheit der Substanz wird durch die HPLC-Prüfung „Verwandte Substanzen“ gewährleistet. Daher wird als Gehaltsbestimmung nur die relativ unspezifische UV-Absorptionsmessung bei 238,5 nm vorgeschrieben. Alle  $\alpha, \beta$ -ungesättigten 3-Ketosteroide zeigen eine UV-Bande in diesem Bereich.

**Andere Bestimmungsmethoden:** Für den kolorimetrischen Nachweis der  $\alpha$ -Ketolpartialstruktur kann man anstelle von Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) auch das weniger lichtempfindliche Tetrazoliumblau verwenden<sup>12)</sup>. Die Reaktionszeit wird mit 1 h bei 30 °C angegeben. Eine andere gebräuchliche kolorimetrische Methode basiert auf der Porter-Silver-Reaktion<sup>13)</sup>. Als  $\Delta^{1,4}$ -3-Ketosteroid reagiert Betamethason mit Isonicotinsäurehydrazid bei Raumtemperatur langsam, bei höheren Temperaturen beschleunigt unter Bildung eines Hydrazons, das in saurer methanolischer Lösung intensiv gelb ist und ein Absorptionsmaximum bei ca. 405 nm besitzt<sup>14)</sup>.

## Pharmakologische Eigenschaften<sup>17)</sup>

**Pharmakodynamik:** Betamethason ist ein Abwandlungsprodukt von Hydrocortison und Prednisolon. Die Substanz wirkt entzündungshemmend, antiallergisch sowie immunsuppressiv und wird sowohl systemisch als auch topisch eingesetzt. Die pharmakologischen Charakteristika entsprechen weitgehend Hydrocortison (siehe auch den Kommentar zu **Hydrocortison** [Ph. Eur.]). Durch Einführung des Fluorsubstituenten in 9 $\alpha$ -Position und der Methylgruppe in 16 $\beta$ -Position wird die antiinflammatorische Wirksamkeit (und damit auch

Die USP und JAP lassen den Gehalt mittels HPLC bestimmen. Beide verwenden als stationäre Phase mit Octadecyl gebundenes Siliciumdioxid; die mobile Phase ist wässrige Acetonitril-Lösung. Die Bewertung erfolgt unter Verwendung eines internen Standards (Propyl-4-hydroxybenzoat oder Butyl-4-hydroxybenzoat). Die Gehaltsgrenze wird in der USP wie in der Ph. Eur. mit 97,0 bis 103,0 % und in der JAP mit 96,0 bis 103,0 % festgelegt.

Noch spezifischer und sensitiver als die Analyse mittels HPLC ist eine Bestimmung mittels LC-MS/MS, die sich auch für den Nachweis und die Quantifizierung des Betamethasons in komplexen Spezimen wie Urin oder Plasma eignet<sup>15, 16)</sup>.

B

## Metabolisierung

Nach Verabreichung von Betamethason (peroral, i.m., intranasal, dermal) an gesunde Freiwillige wurden in Urinproben mittels LC-MS/MS 24 Metaboliten nachgewiesen, von denen 16 strukturell zugeordnet werden konnten<sup>15, 16)</sup>. Diese Metaboliten entstanden durch Oxidation an C-11 (11-Oxo-Betamethason), Hydroxylierung in C-6-Position (vornehmlich 6 $\beta$ -Hydroxy-Betamethason neben 6 $\alpha$ -Hydroxy-Betamethason), Reduktion an C-20 (die Isomere 20 $\alpha$ /20 $\beta$ -Dihydro-Betamethason), durch  $\Delta^{4-3}$ -on-Reduktion oder eine Kombination dieser Reaktionen. Ein weiterer Metabolit entstand durch Abspaltung der Seitenkette und nachfolgende Oxidation (17-Oxo-Betamethason).

P. Högger/Scr

die Wirkung auf den Intermediärstoffwechsel) gegenüber Prednisolon um den Faktor 5 bis 10 gesteigert, während die Mineralocorticoid-artige Wirkungskomponente fast verschwindet (die relative antiphlogistische Wirksamkeit ist im Vergleich zu Cortisol um den Faktor 30 erhöht).

**Pharmakokinetik:** Nach peroraler Applikation wird Betamethason schnell und fast vollständig resorbiert. Die höchsten Plasmakonzentrationen werden nach etwa 1 bis 2 h erreicht. Nach topischer Applikation werden 12 bis 14 % der Dosis über die Haut aufgenommen.

Betamethason wird zu ca. 65% an Albumin, jedoch nicht an Transcortin gebunden. Das Verteilungsvolumen wird mit 75 bis 90 Litern angegeben.

Bedingt durch die beiden zusätzlichen Substituenten (siehe unter „Pharmakodynamik“) wird Betamethason in der Leber wesentlich langsamer biotransformiert als Prednisolon (zu den wichtigsten Biotransformationsreaktionen siehe den Kommentar zu **Hydrocortison**, Ph. Eur.).

Mehr als 70% der Dosis werden renal in Form der Metaboliten und deren Konjugate, nur 5% als unveränderte Substanz ausgeschieden. Eine Anpassung der Dosierung ist bei Leberinsuffizienz angebracht, nicht jedoch bei Niereninsuffizienz. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt ca. 5 h die biologische Wirkzeit liegt bei etwa 36 bis 54 h.

**Indikationen:** Mit Ausnahme der Substitutionstherapie, bei der eine Mineralocorticoid-artige Wirkungskomponente erwünscht ist, besitzt Betamethason die gleichen Indikationsgebiete wie andere Glucocorticoide (siehe den Kommentar zu **Hydrocortison**, Ph. Eur.).

**Dosierung:** Parenteral können bis zu 9 mg täglich gegeben werden, peroral 0,6 bis 7,2 mg. Die topische Applikation erfolgt 1- bis 2-mal täglich.

Kinder erhalten peroral 0,0175 bis 0,25 mg/kg Körpergewicht täglich, verteilt auf 3 bis 4 Einzeldosen.

**Nebenwirkungen:** Siehe die Kommentare zu **Fluocinolonacetonid** und **Hydrocortison** (beide Ph. Eur.)

**Kontraindikationen:** Siehe die Kommentare zu **Fluocinolonacetonid** und **Hydrocortison** (beide Ph. Eur.)

**Bewertung:** Betamethason ist ein systemisch und topisch applizierbares Glucocorticoid zur Behandlung chronisch entzündlicher sowie von Autoimmunerkrankungen. Glucocorticoide wie Betamethason wirken nur symptomatisch und nicht kausal. Die Substanz ist stärker wirksam als die anderen Glucocorticoide Hydrocortison, Fluocinolon, Dexamethason oder Flumethalon. Allerdings ist sie schwächer wirksam als das sehr potente Clobetasol. Glucocorticoide greifen im Vergleich zu anderen Immunsuppressiva wie Ciclosporin, Tacrolimus, Zytostatika und Antikörpern in sehr frühe Phasen der Immunreaktion ein. Wenn möglich ist zur Vermeidung von systemischen Nebenwirkungen auf topisch applizierbare Glucocorticoide zurückzugreifen. Wegen der besseren Aufnahme in die Haut ist hier den Derivaten Betamethason-17-valerat und Betamethason-17,21-dipropionat der Vorzug zu geben. Glucocorticoide wie Betamethason werden wegen der Anpassung an den natürlichen Regelkreis vorzugsweise morgens appliziert.

M. Neubeck/Mu

## Literatur

- 1) U. Stache, in: *Ullmann*, 4. Aufl., Bd. 13, S. 58 (1977).
- 2) G. Neff, K. Prezewowsky, in: *Ullmann*, 5. Aufl., Bd. A13, S. 148 (1989).
- 3) E. P. Oliveto et al., *J. Am. Chem. Soc.* 80, 4428 (1958).
- 4) D. Taub et al., *J. Am. Chem. Soc.* 82, 4012 (1960).
- 5) A. Wettstein, *Helv. Chim. Acta* 27, 1803 (1944); *C. A.* 40, 883 (1946).
- 6) J. P. Bauwens, G. N. Logghe, *Pharm. Weekbl.* 111, 633 (1976); *C. A.* 85, 51793y (1976).
- 7) Martindale.
- 8) R. J. Mesley, *J. Pharm. Pharmacol.* 20, 877 (1968); *C. A.* 70, 25991g (1969).
- 9) Kakáč/Vejdělek, *Photometrie*, S. 1074, *Ergbd.* 1, S. 386; *Ergbd.* 2, S. 420.
- 10) T. Shibata, H. Isaka, K. Mochida, *Yakugaku Zasshi* 96, 810 (1976); *C. A.* 85, 112778w (1976).
- 11) A. van den Hoek, *Pharneuropa* 4, 296 (1992).
- 12) Kakáč/Vejdělek, *Photometrie*, S. 1111; *Ergbd.* 1, S. 390; *Ergbd.* 2, S. 427.
- 13) Kakáč/Vejdělek, *Photometrie*, S. 1095.
- 14) Kakáč/Vejdělek, *Photometrie*, S. 1129; *Ergbd.* 1, S. 392; *Ergbd.* 2, S. 433.
- 15) X. Matabosch et al., *Drug Test. Anal.* 7, 663 (2015).
- 16) S. Coll et al., *Drug Test. Anal.*, doi: 10.1002/dta.2928 (2020).
- 17) Drugdex®.

# Dimethylsulfoxid

## Dimethylsulfoxid

### Allgemeine Angaben

Dimethylsulfoxid (**1**, DMSO) ist das niedrigste Homologe der Dialkylsulfoxide und findet als aprotisches Lösungsmittel breite Anwendung in Laboratorien, Technik und Industrie. Aufgrund seiner Fähigkeit zur raschen Gewebepenetration dient es vor allem in der topischen Anwendung als Penetrationsenhancer für schlecht resorbierbare Wirkstoffe. Als natürliche Substanz kommt es in Konzentrationen von ca. 20 bis 40 ng/ml im menschlichen Plasma vor<sup>1)</sup>. DMSO konnte in vielen Nahrungsmitteln in Konzentrationen bis zu 16 µg/g nachgewiesen werden<sup>2)</sup>.

Die Substanz ist neben verschiedenen DMSO-Zubereitungen (Gel, Injektionslösung, Lösung zur topischen Anwendung) auch in der USP beschrieben.

In der Ph. Eur. 10.1 wurde die Prüfung auf verwandte Substanzen überarbeitet und für die Bestimmung des Wassergehalts ist nun das Verfahren **2.5.32** (Ph. Eur.) vorgeschrieben.

**CAS-Nr.:** 67-68-5

**PubChem-Nr.:** CID 679

**DrugBank-Nr.:** DB01093

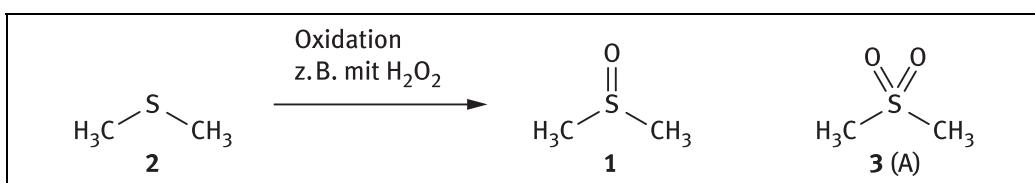
**Darstellung<sup>3-6)</sup>:** Die technische Synthese von DMSO (**1**) erfolgt durch Oxidation von Dimethylsulfid (**2**; DMS) mit Wasserstoffperoxid, Natriumiodat, Distickstoffoxid ( $N_2O_4$ ) oder  $O_2/N_2O_4$ -Gemischen. Dabei kann es leicht zu einer Weiteroxidation zu Dimethylsulfon (**3**, A) kommen. DMSO fällt auch als Nebenprodukt bei der Zellstoffherstellung an.

**Stabilität/Lagerung:** Die Substanz (**1**) kann mit Halogenverbindungen, Periodsäure, Fluorierungsmitteln und Natriumhydrid heftig reagieren, möglicherweise unter Explosion. Alkohole werden dehydratisiert, sekundäre Alkohole auch zu Ketonen oxidiert. Für eine Übersicht über Eigenschaften und Reaktionen siehe Lit.<sup>4-6)</sup>. Über photochemische Reaktionen liegen keine Angaben in der Literatur vor.

Die Lagerung erfolgt dicht verschlossen und unter Lichtschutz in Glasbehältern. Kontakt mit Plastikmaterial ist zu vermeiden.

**Synonyme:** DMSO, Mastan, Methylsulfoxide, Sulfinyldimethan, Sulfinylbismethan, SH 900/V, DF 307, SQ 9453

**Arzneibuchnamen:** Dimethyl Sulfoxide (USP)



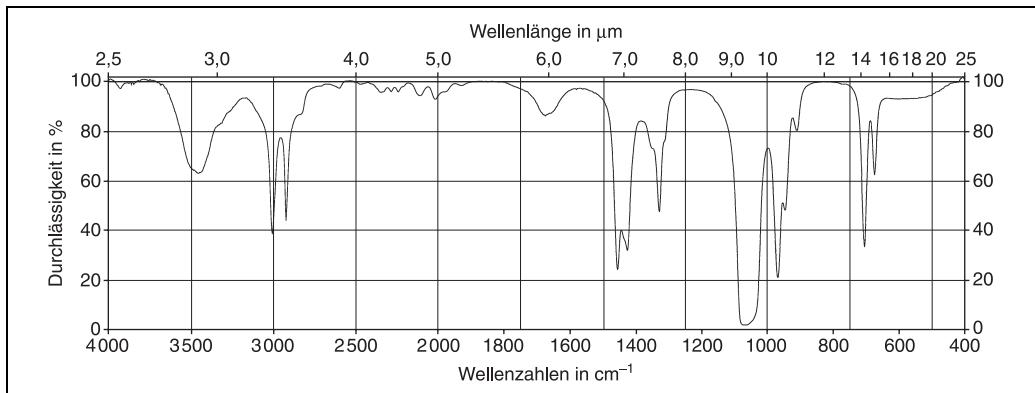


Abb. 1: IR-Spektrum von Dimethylsulfoxid (Film)

## Eigenschaften

DMSO (**1**) ist eine praktisch farb- und geruchlose, sehr stark hygroskopische Flüssigkeit<sup>6,7)</sup>.

Die Schmelztemperatur liegt bei 18,45°C, die Siedetemperatur bei 189°C (unter partieller Zersetzung), der Flammpunkt bei 95°C. Die relative Dichte  $d^{20}$  beträgt 1,100 und der Brechungsindex  $n_{20}^{20}$  1,4795. Bei 20°C liegt die Viskosität bei 1,1 mPa · s<sup>6-8)</sup>. Die Dielektrizitätskonstante beträgt 46,7<sup>4)</sup>, das Dipolmoment 4,3<sup>5)</sup>. Lösungen der Substanz in Wasser reagieren neutral. Aufgrund der polaren Schwefel-Sauerstoffbindung ist DMSO schwach CH-acide. Der  $pK_a$ -Wert liegt bei 31,3. Der  $pK_a$  des am Sauerstoff protonierten Sulfoxids beträgt 0,911<sup>5)</sup>. Der Nernst'sche Verteilungskoeffizient (log  $P$ ) beträgt – 1,35.

Wegen seines stark hygroskopischen Charakters kann DMSO bei 20°C und 65 % relativer Luftfeuchtigkeit über 10% seines Eigengewichts an Feuchtigkeit aufnehmen<sup>5)</sup>. Der Gefrierpunkt von Wasser wird durch DMSO deutlich herabgesetzt (40%ige wässrige Lösung: – 25°C)<sup>7)</sup>. Daten zur MS, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR- und UV-Spektroskopie finden sich in Lit.<sup>5)</sup>.

DMSO ist in jedem Verhältnis mischbar mit Wasser, Aceton, Diethylether, DMF, Dioxan, Ethanol, Glycerin, Pyridin, Toluol und Xylol, nicht jedoch mit Paraffinen<sup>4-7)</sup>.

## Prüfung auf Identität

C. Vgl. Abb. 1. Die Ph. Eur. macht keine Angaben zur Aufnahmetechnik des IR-Spektrums. Mög-

lich ist nach **2.2.24** (Ph. Eur.) die Aufnahme als Film zwischen zwei NaCl-Plättchen oder in einer Küvette, ggf. in Lösung. Die USP empfiehlt KBr-Plättchen. Wegen des stark hygroskopischen Verhaltens (siehe unter „Eigenschaften“) ist jedoch bei Aufnahme als Film ein mehr oder weniger starkes Signal von freien oder assoziierten OH-Valenzschwingungen des Wassers bei ca. 3400 bis 3500 cm<sup>-1</sup> vorhanden (vgl. Abb. 1).

D. Nickel(II)-chlorid bildet mit DMSO den grün-gelben Komplex  $\text{NiCl}_2 \cdot 8 \text{ DMSO}$ . Dieser lagert sich oberhalb 48,5°C in eine grünblaue Verbindung mit der Zusammensetzung  $\text{NiCl}_2 \cdot 3 \text{ DMSO}$  um<sup>9)</sup>.

**Andere Identitätsprüfungen:** Die USP identifiziert durch Reduktion mit Iodwasserstoffsäure, wobei sich ein stöchiometrisch zusammengesetzter dunkelvioletter 1:1-Chargetransfer-Komplex der Struktur  $(\text{H}_3\text{C})_2\text{S} \cdot \text{I}_2$  aus in situ gebildetem Dimethylsulfid und Iod bildet, der kristallin ausfällt<sup>10)</sup>. Zur Identitätsprüfung bei den Zubereitungen (siehe unter „Allgemeine Angaben“) setzt die USP die GC ein.

## Prüfung auf Reinheit

**Sauer reagierende Substanzen:** Mit dieser Prüfung werden vor allem aus der Synthese stammende sauer reagierende Verunreinigungen wie Methansulfinsäure auf eine Protonenkonzentration von  $10^{-3}$  mol · l<sup>-1</sup> limitiert.

**Relative Dichte:** In der Ph. Eur. wird der Bereich auf 1,100 bis 1,104 festgelegt. Die USP spezifiziert auf 1,095 bis 1,101 (bezogen auf 25 °C).

**Brechungsindex:** Die Ph. Eur. fordert 1,478 bis 1,480, die USP spezifiziert auf  $n_D^{25} = 1,4755$  bis 1,4775. Weitere Angaben, siehe Lit.<sup>6, 8)</sup>.

**Erstarrungstemperatur:** Die USP gibt die gleiche Grenze von 18,3 °C wie die Ph. Eur. an und leitet daraus einen Reinheitsgrad von über 99,9 % ab.

**Absorption:** Die Substanz besitzt bei den genannten Wellenlängen keine Maxima, sondern unterhalb 275 nm lediglich einen kontinuierlichen Anstieg der Absorption. Die vor der Messung durchzuführende Stickstoffbegasung dient zur Entfernung eventuell vorhandener flüchtiger Bestandteile, hier vor allem Dimethylsulfid (2). Die USP schreibt die gleiche Prüfung vor, lässt den Grad des Anstiegs aber über die Berechnung der Absorptionsquotienten  $A_{285}/A_{275}$  und  $A_{295}/A_{275}$  ermitteln, die 0,65 bzw. 0,45 nicht überschreiten dürfen.

**Verwandte Substanzen:** Im Nachtrag 10.1 wurde das zuvor vorgeschriebene GC-Verfahren mit gepackter Säule durch eine Kapillar-GC-Methode mit Temperaturgradient ersetzt. Statt der mittels Bibenzyl als internem Standard durchgeföhrten Quantifizierung erfolgt die Grenzprüfung auf verwandte Substanzen nun nach dem Normalisierungsverfahren. Das Arzneibuch prüft vor allem auf das während der Synthese durch Folgeoxidation gebildete Dimethylsulfon (3, A) als nicht spezifizierte Verunreinigung. Die Systemeignung wird anhand der Auflösung zwischen Dimethylsulfoxid (1) und Dimethylsulfon überprüft, die mindestens 5,0 betragen muss. Jede nicht spezifizierte Verunreinigung darf zu höchstens 0,10 % enthalten sein, wobei in der Summe 0,15 % nicht überschritten

werden dürfen. Verunreinigungen jeweils unter 0,05 % bleiben unberücksichtigt.

**Wasser:** Zur Wasserbestimmung wird seit dem Nachtrag 10.1 die coulometrische Titration vorgeschrieben, die gegenüber der ebenfalls geeigneten Karl-Fischer-Titration den Vorteil besitzt, dass sie mit einem Zehntel des für die Prüfung bisher vorgeschriebenen Substanzeinsatzes auskommt.

**Andere Reinheitsprüfungen:** Der USP prüft auf nicht flüchtige Anteile (max. 0,01 %) und auf durch Kaliumhydroxid verfärbbare Verbindungen wie Mercaptane, Disulfide und Dimethylsulfat<sup>7)</sup>.

## Gehaltsbestimmung

Während die Ph. Eur. keine Gehaltsbestimmung vorschreibt, da der Wert des Lösungsmittel durch die Bestimmung der verwandten Substanzen ausreichend charakterisiert ist, lässt die USP den Gehalt des Gels, der sterilen Injektionslösung und der topischen Lösung (siehe unter „Allgemeine Angaben“) per GC gegen Referenzsubstanz ermitteln. Unter bestimmten Bedingungen ist auch die Umsetzung mit Acetylchlorid in Gegenwart von Iodiden<sup>11)</sup> sowie die Reduktion mit Iodwasserstoffsäure in essigsaurer Lösung unter Wasserstoffgas<sup>12)</sup>, jeweils mit anschließender iodometrischer Bestimmung, zur Gehaltsermittlung geeignet.

## Metabolisierung

Dimethylsulfoxid (1) wird durch hepatische Flavinmonooxygenasen zu Dimethylsulfon (3, A) und in geringerem Umfang durch hepatische Reduktasen zur Dimethylsulfid (2) biotransformiert<sup>13)</sup>.

Seeling/Scr

## Pharmakologische Eigenschaften<sup>6, 14, 15)</sup>

**Pharmakodynamik:** Dimethylsulfoxid (DMSO) wird vor allem aufgrund seiner penetrationsfördernden Eigenschaften in der Dermatologie als Vehikel zur Erleichterung des Membrantransports für topisch applizierte Wirkstoffe verwendet (penetration enhancer). Durch Erhöhung der Lipidflu-

idität im Stratum corneum wird die Penetration von Salzen, z. B. Arzneistoffen, in diesem Bereich erhöht. Dies gilt für Salze mit einem Molekulargewicht kleiner 3000 Dalton.

Die Substanz selbst verfügt darüber hinaus über antiphlogistische und analgetische Wirkungen und ist daher Bestandteil zahlreicher dermatologischer Präparate. In-vitro-Untersuchungen konnten zeigen, dass DMSO kompetitiv die Acetylcholinester-

rase hemmt, was möglicherweise die neuromuskuläre Signalübertragung abschwächt. Eine Relaxation der Skelettmuskulatur könnte die schmerzlindernde Wirkung bei Muskelverspannungen erklären. Verschiedene Studien zeigten, dass DMSO hochreaktive Hydroxylradikale, die als bedeutsame Entzündungsmediatoren gelten, inaktiviert und somit einer Entgleisung des Sauerstoffmetabolismus bei Entzündungen wie auch der Bildung und Freisetzung weiterer Mediatoren entgegenwirkt<sup>16)</sup>. Eine Reihe weiterer klinischer Studien konnte allerdings keinen Wirksamkeitsnachweis bei Entzündungen und Schmerzen verschiedener Ursache erbringen. Die signifikante Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate bei Karzinomen im Magen und Kolon soll auf den gleichen Wirkungsmechanismus zurückzuführen sein<sup>17)</sup>.

**Pharmakokinetik:** DMSO wird schnell und gut resorbiert – nach lokaler Anwendung auf der Haut jedoch in geringerem Ausmaß – und ins Gewebe verteilt. Maximale Plasmakonzentrationen treten nach oraler Gabe innerhalb von 4 h, bei dermaler Applikation nach 4 bis 8 h auf.

Hauptbiotransformationswege sind die oxidative Metabolisierung zu Dimethylsulfon ( $t_{max}$  36 bis 72 h) sowie die Reduktion zu Dimethylsulfid ( $t_{max}$  48 h). Beide Metaboliten sind noch ca. 2 Wochen nach Einmalgabe im Plasma nachweisbar. Während die unveränderte Substanz (innerhalb von 48 h) und Dimethylsulfon renal und mit den Fäzes ausgeschieden werden, wird Dimethylsulfid auch über die Haut und Lunge eliminiert (knoblauchartiger Geruch).

**Indikationen:** DMSO wird in Kombination mit Heparin-Natrium und Dexpanthenol zur äußerlichen Behandlung von Schwellungen, Blutergüssen, stumpfen Verletzungen der Muskeln, Sehnen und Gelenke angewendet. Auch bei akuten Neuralgien und Beschwerden bei oberflächlichen venösen Beinleiden werden derartige Zubereitun-

gen eingesetzt. Eine weitere klinische Anwendung ist die Installation in die Blase bei der symptomatischen Behandlung der interstitiellen Zystitis.

DMSO kommt auch in der Veterinärmedizin bei einer ganzen Reihe sehr verschiedener Indikationen systemisch und topisch zum Einsatz. In Zellkulturen findet DMSO als Einfriermedium bei der Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen Verwendung. Es hemmt die Bildung von Eiskristallen und verhindert die Zerstörung von Zellorganellen und somit auch von ganzen Zellen.

**Nebenwirkungen:** Häufig treten ein knoblauchartiger Geruch und Geschmack auf (Dimethylsulfid, selten kommt es zu gastrointestinalen Beschwerden, Müdigkeit, Kopfschmerzen oder einer Eosinophilie). Auf der Haut können insbesondere hohe Konzentrationen von DMSO Hautirritationen wie Brennen, Jucken, Erytheme und selten Blasenbildung verursachen.

**Kontraindikationen:** Keine Anwendung bei Kindern unter 5 Jahren; DMSO hat bei topischer Anwendung eine Histamin freisetzende Wirkung und sollte deswegen bei Asthmatischen nicht eingesetzt werden.

**Interaktionen:** Aufgrund der Eigenschaft als Penetrationsbeschleuniger fördert DMSO die Aufnahme von Salzen durch die Haut. Sofern dies nicht gewollt ist, sollte die gleichzeitige Applikation von Arzneistoffen/Salzen im mit DMSO behandelten Hautareal unterbleiben. Gleichzeitige Anwendung von Sulindac kann eine periphere Neuropathie verursachen.

**Schwangerschaft und Stillzeit:** Von einer Anwendung während der Schwangerschaft und Stillzeit ist abzuraten.

M. Neubeck/Mu

## Literatur

1) W. Martin, in: *Internationaler DMSO-Workshop Hannover*, Hrsg. S. W. Jacob, J. E. Kappel, S. 71, Zuckschwerdt, München 1988. 2) T. W. Pearson et al., *J. Agric. Food Chem.* 29, 1089–1091 (1981). 3) N. L. Allinger et al., *Organische Chemie*, S. 1032, de Gruyter, Berlin 1980. 4) Römpf. 5) D. Martin et al., *Angew. Chem.* 79, 340–357 (1967). 6) Hager. 7) Fiedler. 8) Merck Index. 9) H. L. Schläfer, H. P. Opitz, Z. An-

org. Allgem. Chem. 313, 178–186 (1961). 10) G. C. Hayward, P. J. Hendra, *J. Chem. Soc. A*, 1760–1764 (1969). 11) S. Allenmark, *Acta Chem. Scand.* 20, 910–911 (1966). 12) H. Hogeveen, F. Montanari, *Gazz. Chim. Ital.* 94, 176 (1964). 13) H. B. Hucker et al., *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 155, 309–317 (1967). 14) Drugdex®. 15) Martindale. 16) W. Kneer et al., *Fortschr. Med.* 112, 142–146 (1994). 17) A. S. Salim, *Chemotherapy* 38, 127 (1992).

D

# Xylometazolinhydrochlorid

## Xylometazolini hydrochloridum

### Allgemeine Angaben

Xylometazolinhydrochlorid (**4**) ist ein  $\alpha$ -Ssymathomimetikum mit 2-Imidazolin-Grundstruktur, das 1956 von A. Hüni entdeckt und 1957 patentiert wurde<sup>1-4</sup>.

Die Substanz ist auch in der USP enthalten, die ebenso wie die Ph. Eur. einen Gehalt von 99,0 bis 101,0% fordert. Die USP beschreibt zusätzlich „Xylometazoline Hydrochloride Nasal Solution“ als pharmazeutische Zubereitung. Die BP 2010 enthält die Monographie „Xylometazoline Nasal Drops“.

**CAS-Nr.:** 1218-35-5 (Hydrochlorid)  
526-36-3 (Xylometazolin-Base)

**PubChem-Nr.:** 7847822 (Hydrochlorid)  
5709 (Xylometazolin-Base)

**DrugBank-Nr.:** DB06694 (Base)

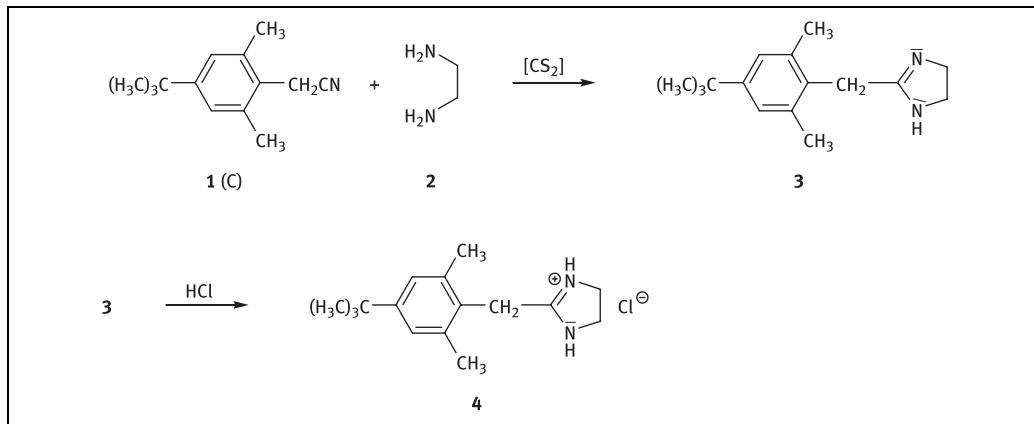
**Darstellung:** 4-*tert*-Butyl-2,6-dimethylphenylacetonitril (**1**, C) wird mit 1,2-Diaminoethan (**2**) unter Zusatz von Schwefelkohlenstoff als Katalysator zu Xylometazolin (**3**) umgesetzt<sup>1</sup>). Mit Salzsäure entsteht das Hydrochlorid (**4**).

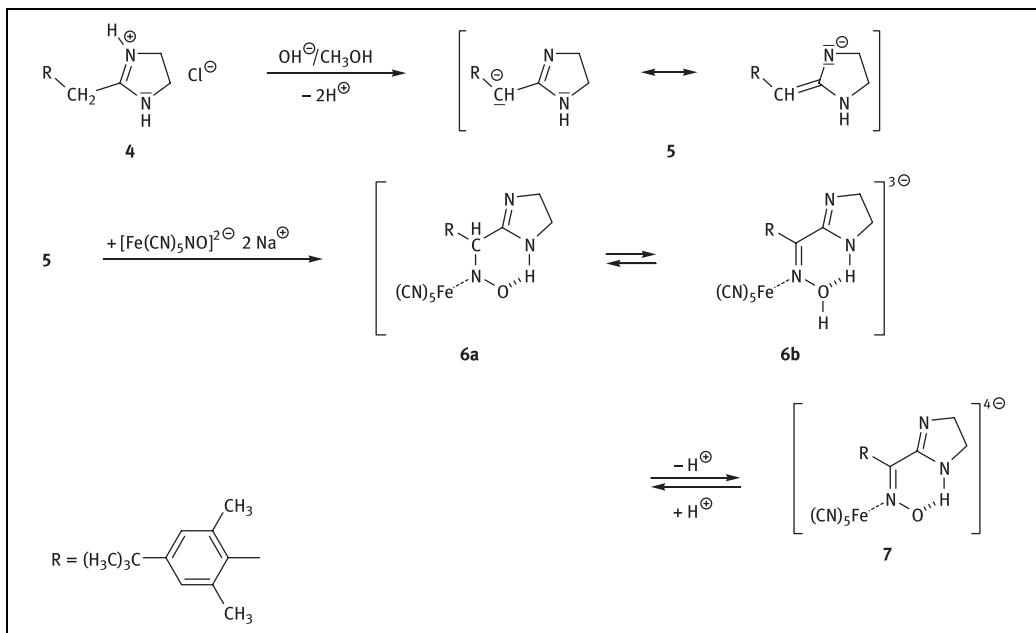
**Struktur/Stereochemie:** Gemäß der Definition im Arzneibuch ist das Arzneistoffsalz (**4**) ein substituiertes Benzyl-4,5-dihydro-1*H*-imidazolhydrochlorid, in dem ein sterisch anspruchsvoll substituierter Benzenkern über eine CH<sub>2</sub>-Brücke mit einem N-protonierten Imidazolinium-Kation verknüpft ist.

Eine Kristallstrukturanalyse<sup>5</sup> zeigt, dass das Hydrochlorid monoklin ist und in der Raumgruppe P21/c kristallisiert. Der Benzolkern und der Imidazolinring sind planar, der Diederwinkel zwischen beiden Ringen ist 95,0°. Die positive Ladung der Amidiniumfunktion im Imidazolinring ist über beide N-Atome verteilt, die C(3)-N(1)- und C(3)-N(2)-Bindungslängen sind mit 130,9(4) und 130,4(4) pm sehr ähnlich.

**Stabilität/Lagerung:** Vor Licht geschützt und unter Ausschluss von Luftfeuchtigkeit bei Raumtemperatur aufbewahrt, ist Xylometazolinhydrochlorid (**4**) mindestens 8 Jahre stabil<sup>6</sup>.

Studien zur Stabilität des Arzneistoffs in wässriger Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert (zwischen 0,09 bis 8,0) bei Temperaturen zwischen 70 und 90°C zeigen ein Stabilitäts optimum mit niedrigster Hydrolyserate bei pH 1,8. Bei Raumtemperatur





sind wässrige Lösungen von Xylometazolinhydrochlorid mit einem pH 5,7 bis zu 8 Jahre lang stabil<sup>7,8)</sup>.

Hydrolyse erfolgt in wässriger Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur, besonders im alkalischen, weniger im neutralen und sauren Milieu<sup>6)</sup>. Als Hydrolyseprodukte findet man das Säureamid **8** (A) und die substituierte Phenyl-essigsäure **11** (F) neben Ethylen diamin<sup>6)</sup>. Eine Kinetik der Hydrolyse des Arzneistoffs und die Analyse der Hydrolyseprodukte mittels HPLC beschreibt Lit.<sup>9)</sup>. Vorteilhaft bezüglich der Stabilität sind wässrige Lösungen von pH 6, die bis zu 0,1% Xylometazolinhydrochlorid (*m/m*), bis zu 10% Zinkgluconat und 5% Natriumcitrat enthalten bei einer Osmolalität von 280 mOsm/l<sup>10)</sup>. Xylometazolinhydrochlorid scheint jedoch hydrolysestabil er zu sein als andere Imidazolinderivate wie Naphazolin, Tolazolin oder Antazolin, was auf die sterische Abschirmung durch die beiden *ortho*-ständigen Methylgruppen zurückzuführen ist<sup>11)</sup>.

Eine Studie zur radiochemischen Stabilität belegt, dass das Arzneistoffsalz nicht durch Bestrahlung sterilisiert werden kann, weil Erniedrigung des Schmelzpunktes und Veränderungen einiger physikochemischer Eigenschaften damit verbunden sind<sup>12)</sup>.

Zur Stabilität von 1:1-Einschlusseverbindungen von Xylometazolin-Base (**3**) in  $\beta$ -Cyclodextrin siehe Lit.<sup>13)</sup>.

Wegen der Lichtempfindlichkeit, verbunden mit Radikal- und Hydroperoxidbildung in den Benzylpositionen, verlangen die Ph. Eur. und USP die Aufbewahrung in dicht verschlossenen Behältern unter Lichtausschluss.

**Synonyme:** Balkis, Brizolin, 2-(4-*tert*-Butyl-2,6-dimethylbenzyl)-2-imidazolin Monohydrochlorid, 2-[[4-(1,1-Dimethyl ethyl)-2,6-dimethylphenyl]methyl]-4,5-dihydro-1*H*-imidazol Monohydrochlorid, Dorenasin, Galazolin, Imidin, Mentopin, Neo-Rinoleina, Neo-Synephrin II, Novorin, Olynth, Otrivenhydrochlorid, Rapako, Therapin, Xymelin Ba 11391 (für Xylometazolin-Base)

## Eigenschaften

Xylometazolin-Base (**3**) hat einen Schmelzbereich von 131 bis 133 °C<sup>14)</sup>. Das Hydrochlorid (**4**) zer setzt sich bei 317 bis 324 °C (DAC 1986), hat einen  $\text{pK}_a$  von 10,6<sup>2)</sup> und ein UV-Maximum in 0,01 M-Salzsäure bei 265 nm ( $A_{1\text{ cm}}^{1\%} = 10$ )<sup>6)</sup>.

Der pH-Wert einer 5%igen wässrigen Lösung soll zwischen 5,0 und 6,6 liegen (USP). Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum referiert Lit.<sup>15)</sup>.

Der berechnete  $\log P$ -Wert der Xylometazolin-Base wird mit  $4,592 \pm 0,395$  ( $25^\circ\text{C}$ ) angegeben<sup>16)</sup>.

1 Teil Xylometazolinhydrochlorid löst sich in 35 Teilen Wasser; es ist schlecht löslich in Chloroform (USP). Die Substanz löst sich außerdem in Methanol und Ethanol<sup>17)</sup>.

## Prüfung auf Identität

Das Arzneibuch sieht zwei Reihen von Identitätsprüfungen vor, siehe hierzu den Kommentar zu **1.4** (Ph. Eur.).

- Vgl. Abb. 1. Die hervorstechenden Banden bei 3200 bis 2600 und 1610  $\text{cm}^{-1}$  werden von den N-H- bzw. C=N-Valenzschwingungen hervorgerufen.
- Bei der DC-Prüfung wird mit einem basischen Fließmittel die Xylometazolin-Base (**3**) freigesetzt. Zur Detektion lässt man die getrocknete Platte mit gasförmigem Chlor reagieren, das durch Oxidation von Chlorid durch Permanganat hergestellt wird. Das Chlor wird von Xylometazolin und verwandten Substanzen absorbiert und nur an diesen Stellen nicht vom Kaltluftstrom vertrieben. Es oxidiert Iodid aus dem Sprühreagenz zu Iod, das durch die blaue Einschlussverbindung mit Amylose empfindlich detektiert wird.

- Bei dieser Reaktion, bei der laut DAC 1986 eine dunkelblaue Färbung auftritt, bildet sich ein Farbkomplex bisher unbekannter Struktur<sup>18, 19)</sup>. Denkbar ist, dass der Arzneistoff im alkalischen Milieu als N- oder C-Nucleophil mit dem Stickstoff des Nitrosyl-Liganden des Reagenzes reagiert. Plausibel erscheint, dass im Sinne einer Simon-Awe-Reaktion (siehe den Kommentar zu **Ethanol 96 %**, Ph. Eur., Identitätsprüfung C) aus dem Amidinium-Kation **4** in methanolischer Natriumhydroxid-Lösung das stark nucleophile Ketenaminal-Anion **5** entsteht; dieses könnte mit Nitroprussidnatrium primär zum Farbkomplex **6a** **6b** reagieren, der im alkalischen Milieu zum farbigen Komplexanion **7** deprotoniert wird.
- Diese Reaktion schließt das Vorliegen anderer Arylimidazoline aus.

**Andere Identitätsprüfungen:** Die Identifizierung des Arzneistoffs in der Zubereitung „Xylometazoline Hydrochloride Nasal Solution“ der USP erfolgt durch DC nach Freisetzung der Arzneistoff-Base aus wässriger Lösung des Hydrochlorids mit Natriumcarbonat-Lösung. Die Base wird mit Chloroform extrahiert und nach Entfernung des Solvens, in Chloroform/Methanol (1:1) gelöst, an Kieselgel chromatographiert. Detektiert wird mit *p*-Nitrobenzoldiazonium-tetrafluoroborat/Natriumcarbonat-Lösung, die – nacheinander aufgesprührt – zu einem roten Farbfleck des Diazofarbstoffs der Arzneistoff-Base führt.

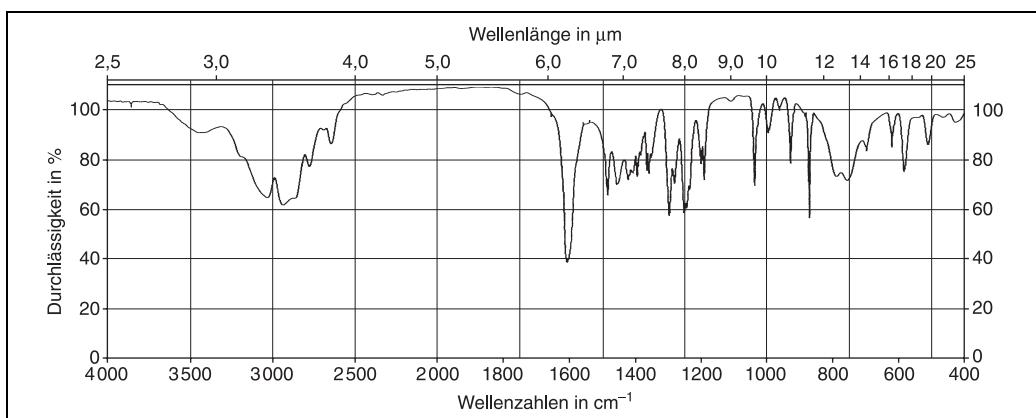


Abb. 1: IR-Spektrum von Xylometazolinhydrochlorid in KBr (1,3 mg in 200 mg)

Außerdem kann Xylometazolin kolorimetrisch in einer Reaktion mit Dithizon (gelöst in Chloroform) nachgewiesen werden, wobei sich im Basischen nach Zugabe von KCN ein Komplex in der Chloroform-Phase bildet, der bei 490 nm bestimmt werden kann<sup>20)</sup>.

Auch das UV-Spektrum (BP 2003) kann zur Identifizierung herangezogen werden. <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR- und Massenspektren werden in der Literatur diskutiert<sup>21)</sup>.

## Prüfung auf Reinheit

**Verwandte Substanzen:** Mit Hilfe der HPLC lassen sich sowohl Syntheseverstufen wie **9** (B), **10** (C), **12** (D) und **13** (E) als auch Hydrolyseprodukte wie **8** (A) und **11** (F; Hydrolyseprodukt von **10**, C) detektieren. Die Prüfung erfolgt in Form einer Gradientenelution an octadecylsilyliertem Kieselgel, bei dem eine Nachbehandlung mit Trimethylchlorsilan die Anzahl der aus sterischen Gründen nicht umgesetzten Silanolgruppen verringert. Die mobile Phase besteht aus Mischungen von wässrigen Acetonitril als Solvens, das mit unterschiedlichen Mengen eines Phosphatpuffers (pH 3,0) versetzt wird. Die Detektion erfolgt spektrophotometrisch bei 220 nm. Die mobile Phase A besteht aus einer gepufferten, wässrigen Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung, die mit Phosphorsäure auf pH 3,0 eingestellt ist; die mobile Phase B ist reines Acetonitril. Das noch in der Ph. Eur. 10.0 verwendete Acetonitril *R1* wurde im Nachtrag 10.1 durch Acetonitril zur Chromatographie *R* ersetzt. Dieses weist bei einer Wellenlänge von 240 nm eine Transmission von über 98 % auf, während Acetonitril *R1* eine Absorption von max. 0,1 bei 200 nm aufweisen darf. Da bei 220 nm detektiert wird, führt dies zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zur vorherigen mobilen Phase.

Die Trennung mittels Gradienten-HPLC dauert nach vorgegebenem Programm 35 min und verläuft in drei Zeitabschnitten: Zunächst wird 5 min isokratisch, also unter konstanten Trennbedingungen ohne Gradient eluiert (mobile Phase A 70 %, mobile Phase B 30 %). In einer anschließenden Gradientenelution (15 min) wird die mobile Phase A kontinuierlich durch Eluent B bis zu einem 15:85-Verhältnis (unter Erniedrigung der Polarität des Eluenten) ersetzt; im dritten Abschnitt wird

nochmals 15 min mit gleichem Phasengemisch (15:85) isokratisch eluiert; danach sind alle Substanzen eluiert. Auf die in der Ph. Eur. 6.0 vorgesehene zweistufige, 12-minütige Wiederherstellung des HPLC-Systems wird nun verzichtet.

Die Referenzlösung b dient zur Validierung der Trennleistung der Säule. Die Peaks von Verunreinigung A (**8**) und Xylometazolin (**3**) müssen eine Auflösung von mindestens 2,5 aufweisen. Die Identifizierung von Verunreinigung A (**8**) erfolgt durch Vergleich der für A (**8**) angegebenen Retentionszeit mit der von Xylometazolin (**3**).

Die einzige spezifizierte Verunreinigung A (**8**) darf nicht in höherer Konzentration als 0,2 % vorliegen, die nicht spezifizierten Verunreinigungen B bis D (**9** bis **13**) in nicht höherer Konzentration als jeweils 0,10 %. Die Summe der Konzentrationen aller Verunreinigungen darf 0,5 % nicht überschreiten. Verunreinigungen mit Konzentrationen geringer als 0,05 % bleiben unberücksichtigt.

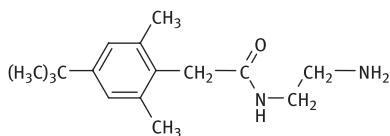
**Trocknungsverlust:** Die USP begrenzt wie die Ph. Eur. auf 0,5 %.

**Sulfatasche:** Da während der Syntheseprozesse anorganische Verbindungen als Nebenprodukte anfallen, ist eine Begrenzung auf 0,1 % sinnvoll.

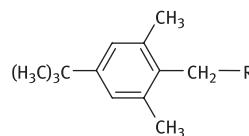
**Andere Reinigungsprüfungen:** Nach der Ph. Eur. 5.0 wurde dünnenschichtchromatographisch mit Detektion durch Chlorgas geprüft (siehe die Identitätsprüfung B). Die BP 1993 ließ in der DC-Prüfung mit Ninhydrin-, dann mit Dragendorff-Reagenz detektieren; der DAC 1986 mit Dragendorff-Reagenz, dann mit Natriumnitrit.

## Gehaltsbestimmung

Im wasserfreiem Medium wird mit 0,1 M-Percchlorsäure in Gegenwart von Acetanhydrid das Chlorid-Anion bestimmt. Dabei entstehen vermutlich Acetylchlorid und Acetat; Letzteres wird im Zuge der Titration protoniert<sup>22, 23)</sup>. Die BP 1993 (gegen Naphtholbenzein) und USP (potentiometrische Indikation) lassen bei der Titration Quecksilber(II)-acetat zusetzen.



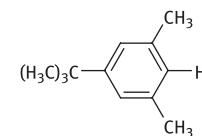
8 (A)



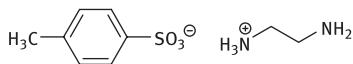
9 (B) R = Cl

10 (C) R = CN

11 (F) R = COOH



12 (D)



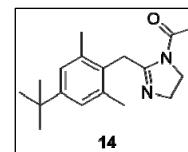
13 (E)

**Andere Bestimmungsmethoden:** HPLC-Verfahren<sup>24, 25)</sup> (z.B. mit der stationären Phase Kieselgel und der mobilen Phase Dichlormethan/Methanol/Ammoniak) und GC-Methoden<sup>24, 26)</sup>, die sich auch für Xylometazolin-Zubereitungen eignen, sind in Lit.<sup>24)</sup> beschrieben. Die USP sieht für Xylometazolin-Nasentropfen eine kolorimetrische Bestimmung auf der Basis der Reaktion mit Pentacyanonitrosylferrat (siehe die Identitätsprüfung C) vor. Zudem kann der Chlorid-Gehalt des Hydrochlorides auch über eine argentometrische Titration bestimmt werden<sup>27)</sup>.

## Metabolisierung

Imidazoline sind schwach basisch und lipophil, weshalb sie rasch resorbiert werden und eine hohe

Bioverfügbarkeit aufweisen. Xylometazolin wird zum Teil in der Leber metabolisiert, der Großteil wird jedoch unverändert ausgeschieden<sup>28)</sup>. In der Literatur wird Xylometazolin-Acetat (14) als Metabolit beschrieben, wobei die Acetylierung an N-1 des Imidazolrings erfolgt<sup>29, 30)</sup>. Zudem kann Xylometazolin auch an beiden Stickstoffatomen des Imidazolrings acetyliert werden (Xylometazolin-Diacetat).



N. Fuchs/Schi

## Pharmakologische Eigenschaften<sup>31)</sup>

**Pharmakodynamik<sup>32)</sup>:** Xylometazolin ist ein lokal angewandtes  $\alpha$ -Sympathomimetikum mit Imidazolin-Struktur. Die lokale Anwendung bewirkt eine Vasokonstriktion dilatierter Arteriolen. Daraus resultiert eine Normalisierung des Arteriolentonus bei vermehrter Schleimhautdurchblutung. Bei der Anwendung am Auge werden Symptome einer konjunktivalen Reizung vermindert. Bei intranasaler Applikation führt die Vasokonstriktion zu einer Reduktion der Ödembildung, einer Verminderung übermäßiger Sekretabsonderung und damit einer Schleimhautabschwellung sowie einer Verbesserung der nasalen Ventilation. Ferner werden durch die Nasenschleimhautabschwellung die Ausfüh-

rungsgänge der Nasennebenhöhlen eröffnet oder erweitert sowie die Tuba auditiva freigehalten. Dadurch wird der Sekretabfluss aus den Nebenhöhlen und dem Mittelohr erleichtert und die Ansiedlung von Keimen erschwert.

**Pharmakokinetik<sup>14, 33)</sup>:** Nach intranasaler Anwendung tritt die Wirkung innerhalb von 5 bis 10 min ein und hält bis zu 12 h lang an.

Bei normaler Dosierung sind die resorbierten Mengen an Xylometazolin vernachlässigbar klein. Gelegentlich kann es bei intranasaler Applikation und bei Applikation größerer Mengen am Auge (Resorption in der Nase nach Passage des Tränenkanals) jedoch zu systemischen Effekten kommen (siehe unter „Nebenwirkungen“).

Tieruntersuchungen mit radioaktiv markiertem Xylometazolin ergaben, dass die Substanz nach oraler Gabe nahezu vollständig resorbiert und schnell metabolisiert wird. Die Halbwertszeit nach intravenöser Gabe beim Hund betrug 1,85 h für unverändertes Xylometazolin.

Die Ausscheidung bei der Ratte erfolgte zu ca. 80% renal, zu ca. 5% biliär und zu ca. 5% mit den Fäzes.

**Indikationen<sup>32)</sup>:** Nicht infektiöse und allergische Formen der Bindehautentzündung; Rhinitis acuta, Rhinitis vasomotorica, Rhinitis allergica; zur Erleichterung des Sekretabflusses bei Sinusitis und Tubenmittelohrkatarrh

#### Dosierung:

- Anwendung am Auge<sup>32)</sup>: Bis zum Abklingen der Beschwerden 2- bis 4-mal täglich 1 Tropfen der 0,1 %igen Lösung in den Bindehautsack einbringen.
- Anwendung in der Nase: 2- bis 3-mal täglich 1 bis 2 Tropfen oder 1 Sprühstoß in jedes Nasenloch; für Erwachsene und Schulkinder wird eine 0,1 %ige, für Kleinkinder eine 0,05 %ige und für Säuglinge eine 0,025 %ige Lösung von Xylometazolin verwendet<sup>2)</sup>.

Die Dauer der Anwendung sollte ohne ärztliche Kontrolle nur kurzfristig, in der Regel nicht länger als 5 bis 7 Tage erfolgen<sup>32)</sup>.

**Intoxikation<sup>32, 33)</sup>:** Bei Überdosierung oder versehentlicher oraler Einnahme besteht die Gefahr folgender Symptome: Mydriasis, Übelkeit, Zyanose, Fieber, Krämpfe, Tachykardie, kardiale Arrhythmie, Herzstillstand, Hypertonie, Lungenödem, Atemstörungen, psychische Störungen. Eine Hemmung von zentralen Funktionen kann sich durch Bradykardie, Hypotonie, Apnoe und Koma zeigen. Folge eines chronischen Missbrauchs können neben einem Wirkungsverlust eine irreversible Schleimhautatrophie mit Rhinitis sicca sowie eine reaktive Kongestion mit Rhinitis medicamentosa sein.

**Therapie:** Die Behandlung umfasst bei oraler und nasaler Überdosierung die Gabe von medizinischer Kohle oder Laxanzien. Weitere Maßnahmen richten sich nach den auftretenden Symptomen. Zur Blutdrucksenkung sollte ein nicht selektiver  $\alpha$ -Adrenozeptorblocker eingesetzt werden, beispielsweise 5 mg Phentolamin in Kochsalzlösung

langsam intravenös. Vasopressoren sind kontraindiziert. In schweren Fällen sind die Gabe von Antikonvulsiva sowie eine Sauerstoffbeatmung indiziert.

In Fällen einer chronischen Überdosierung kann Xylometazolin zunächst einseitig abgesetzt werden, um wenigstens einen Teil der Nasenatmung aufrecht zu erhalten. Nach Abklingen der Beschwerden erfolgt ein Wechsel auf die andere Seite.

#### Nebenwirkungen<sup>32, 33)</sup>:

Anwendung am Auge: Verschwommenes Sehen, Bindehautreizung und selten Mydriasis

Anwendung in der Nase: Gelegentlich Brennen oder Trockenheit der Nasenschleimhaut, Nasenbluten; vereinzelt Herzklagen, Pulsbeschleunigung, Blutdruckanstieg und reaktive Hyperämie; sehr selten Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit oder Müdigkeit.

Bei Dauergebrauch von abschwellenden Rhinologika besteht die Möglichkeit, dass die Wirkung nachlässt. Folge eines Missbrauchs lokaler Rhinologika kann eine irreversible Schleimhautschädigung (Atrophie) mit Rhinitis sicca sowie eine reaktive Kongestion mit Rhinitis medicamentosa sein.

**Kontraindikationen<sup>32, 33)</sup>:** Überempfindlichkeit gegen Xylometazolin; wegen möglicher systemischer Nebenwirkungen ist bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, Störungen der Schilddrüsenfunktion, Hypertonie und Diabetes mellitus Vorsicht geboten.

Anwendung am Auge: Engwinkelglaukom

Anwendung in der Nase: Rhinitis sicca

**Interaktionen<sup>32)</sup>:** Bei gleichzeitiger Therapie mit MAO-Hemmern vom Tranylcypromin-Typ oder tricyclischen Antidepressiva kann es zu einer additiven Erhöhung des Blutdrucks kommen.

**Schwangerschaft und Stillzeit:** In Tierstudien zeigte Xylometazolin keine teratogenen oder reproduktionstoxischen Effekte<sup>32)</sup>.

Aufgrund unzureichender Erfahrungen am Menschen sollte die Anwendung in Schwangerschaft und Stillzeit dennoch unterbleiben<sup>33)</sup>.

**Besondere Hinweise:** Untersuchungen zur Mutagenese erbrachten keinen Hinweis auf ein genotoxisches Potential von Xylometazolin.

**Bewertung<sup>34)</sup>:** Xylometazolin ist ein  $\alpha$ -Sympathomimetikum zur lokalen Vasokonstriktion bei akuter oder chronischer Rhinitis. Alle substituierten Imidazoline wie auch Xylometazolin wirken

bei lokaler Anwendung vergleichbar gut Schleimhaut-abschwellend. Die Wirkung von Xylometazolin hält länger an als bei ebenfalls topisch appliziertem Ephedrin. Die Langzeitanwendung lokal wirksamer  $\alpha$ -Sympathomimetika ist wegen chronischer Komplikationen zu vermeiden.

M. Neubeck/Mu

## Literatur

- 1) Kleemann/Engel/Kutscher/Reichert, S. 953. 2) Y. Golander, W. J. DeWitte, in: Florey, Bd. 14, S. 146. 3) H. Albrecht (CIBA), Pat. No. DE 1049387, 19590129 (1959). 4) H. Albrecht (CIBA), Pat. No. US 2868802, 19590113 (1959). 5) S. Ghose, J. K. Dattagupta, Acta Crystallogr. C 42, 1524–1526 (1986). 6) Hager, Bd. 9, S. 1218f. 7) J. Grabowska, D. Rajzer, Acta Polon. Pharm. 41, 359–363 (1984). 8) B. Stanisz, React. Kin. Katal. Lett. 80, 67–73 (2003). 9) B. Stanisz, React. Kinet. Catal. Lett. 80, 67–73 (2003). 10) F. Böhme et al. (Merck Pat.), PCT Int. Appl. Pat. No. WO 2005018601 A1 20050303 (2005). 11) P. F. Boon, W. Sudds, J. Pharm. Pharmacol. 19, Suppl., 88S–92S, 1130 (1967). 12) B. Marciniec et al., J. Therm. Anal. Calorim. 88, 337–342 (2007). 13) A. D. Abdulilah, Al-R. Nathir, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 60, 293–301 (2008). 14) Merck Index. 15) K. A. Kovar, Arch. Pharm. 317, 246–256 (1984). 16) Berechnet unter Anwendung von Adv. Chem. Dev. (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994–2010 ACD/Labs.). 17) Merck Index, 9. Aufl., S. 9747 (1976). 18) S. C. Slack, W. J. Mader, J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 46, 742–744 (1957); C. A. 52, 4110i (1958). 19) I. Grabowska, D. Rajzer, Acta Polon. Pharm. 38, 449–452 (1981); C. A. 96, 149239z (1982). 20) H. Deppele, A. Becker, Z. Anal. Chem. 199, 414–419 (1964). 21) Florey, Bd. 14, S. 137–143. 22) P. Surmann et al., Dtsch. Apoth. Ztg. 123, 1110ff. (1983). 23) J. H. McB. Miller, Pharmeuropa 8, 400f. (1996); und in 22) zit. Lit. 24) Florey, Bd. 14, S. 135–156. 25) Z. Milojevic et al., J. Chromatogr. A 949, 79–82 (2002). 26) A. Sioufi, F. Leroux, J. P. Dubois, J. Chromatogr. 487, 81–89 (1989). 27) Y. Golander, W. J. DeWitte, *Analytical Profiles of Drug Substances*, Elsevier, New York 1985. 28) R. Dalefield, Vet. Toxicol. Austr. New Zeal. 12, 155–201 (2017). 29) H. G. Topf et al., Monatsschr. Kinderheilkd. 161, 537–542 (2013). 30) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Xylometazoline-acetate>, 27.11.2020. 31) Drugdex®. 32) Xylometazolin-Monographie, BAnz. Nr. 138 vom 26.7. 1994. 33) Fachinformation Otriven®, Zyma (1996). 34) Ammon/Mutschler/Scholz.

X