

9.6/2.02.29.00

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.

Nachdem in der Ph. Eur. 8.3 die Anpassung auf die Anforderungen der Ultrahochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC, ultra high-performance liquid chromatography) sowie auf neue Säulenmaterialien wie Monolithen oder oberflächlich poröse Partikel (sog. Core-shell- und Fused-core-Materialien) erfolgte, wurde der Text in der Ph. Eur. 9.6 sprachlich erneut angepasst und neue Detektoren aufgenommen.

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.¹⁻⁷⁾.

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 zur 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 Säulenthmostat 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.

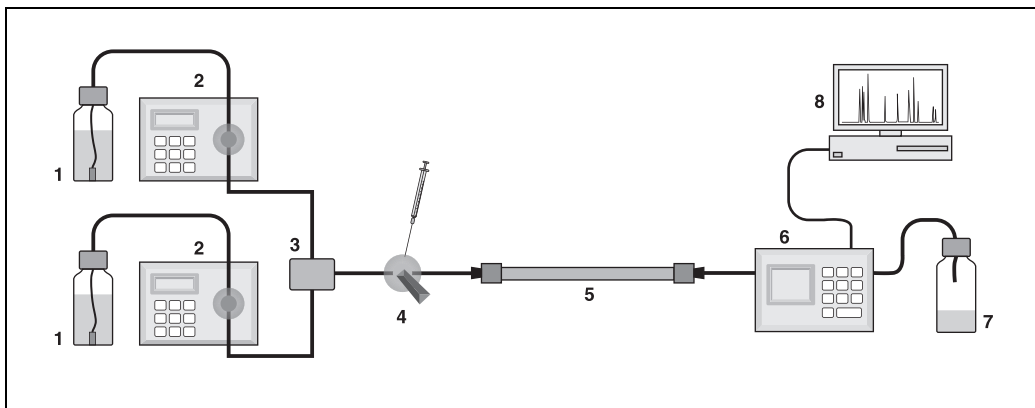


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines HPLC-Systems; (1) Lösungsmittelreservoir, (2) Pumpe, (3) Mischkammer, (4) Injektionsventil, (5) HPLC-Säule, (6) Detektor, (7) Abfallgefäß, (8) Computer zur Steuerung der Anlage und Datenauswertung

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 Kugelhventile 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 Sechsheventile. 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 Partikeldurchmessers (l/d) ist. Es resultieren kurze Analysenzeiten auf Kosten des Säulengegendrucks, 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 μm große Partikel eingesetzt werden im Vergleich zur Partikelgröße von 3 bis 5 μm in der klassischen HPLC. 10- μm -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 μm , der mit einer 0,35 bis 0,5 μm 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- μm -Material an, sodass diese Säulen mit herkömmlichen HPLC-Pumpen betrieben werden können und meist bessere Auflösungen bei kürzeren Analysenzeiten als mit vollständig porösen 3- μm -Phasen erreicht werden. Sub-2 μm -Core-shell-Materialien mit Korngrößen von 1,3 bis 1,7 μm 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^{8, 9)}.

Parallel zur Entwicklung partikulärer Materialien wurden Ende der 1990er Jahre monolithische Trennsäulen entwickelt, die aus einem durchgehenden Netzwerk mit bimodalem Porensystem bestehen¹⁰⁾. 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- μm -Material. Limitiert sind die Monolithen 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- μm -Material gepackt ist, bei isokratischer Elution bei 1 ml/min, so beträgt sie für 3- μm -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 Gradienten-

Tab. 1: Bereiche typischer Dimensionen kommerzieller analytischer Säulen

Säulentyp	Partikelgröße [μm]	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 Sedimentationsschritten 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 Korngrößenverteilung¹¹⁾.

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 längerketigen Chlorsilanderivaten die verbleibenden freien Silanolgruppen mit kurzkettigen Silanen (z.B. Trimethylchlorsilan) umgesetzt. Kieselgel besitzt ca. 9 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ Silanolgruppen auf der Oberfläche. Bei der Umsetzung mit C_{18} -Chlorsilanen gelingt aus sterischen Gründen keine vollständige Umsetzung (nur ca. 3 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 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_8 - oder C_{18} -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 Stereoisomeranalytik erhält man durch Coaten der Kieselgelpartikel mit den chiralen Selektoren oder durch kovalente Bindung

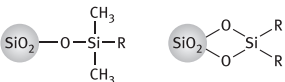

	
Typ	R
RP 8 (C_8)	$(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$
RP 18 (C_{18} , ODS)	$(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$
Phenyl	$(\text{CH}_2)_3$ - 
Amino	$(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
Cyano	$(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$
Diol	$(\text{CH}_2)_3-\text{O}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}}-\underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}_2}}$

Abb. 2: Beispiele chemisch modifizierter stationärer Phasen

der Selektoren an die Kieselgelmatrix. Selektoren umfassen Polysaccharide (in erster Linie Amylose- und Cellulosederivate), Cyclodextrine, Aminosäurederivate, 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 Ethylbenzol.

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 Amitriptylin.

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 Kieselgelmateriale 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. Daher 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-Butylbenzoesäure 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^[12–20] 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 Auswahl schemata einer chromatographischen Phase in Abhängigkeit von den Eigenschaften der zu analysierenden Substanzen siehe beispielsweise Lit.^[1–3] 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 organische 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 Lichtstreuungsdetektion durch

0,2-µm-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** eingesetzt. Beim Verdampfungs-Lichtstreuungsdetektor (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 Analytpartikel im Stickstoffstrom vorliegen. HPLC-Methoden unter Verwendung von ELSD-Detektion finden sich bei **Hydroxypropylbetadex**,

Sucrosetearat 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 amperometrische Detektion bei HPLC-Verfahren der Aminoglykosid-Antibiotika **Gentamicinsulfat**, **Neomicinsulfat** und **Tobramicin** (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. Guilleme, 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. Szepes, *J. Chromatogr. A* 1157, 122–130 (2007). 19) S. Nyiredy, Z. Szucs, L. Szepes, *Chromatographia* 69, 609–614 (2009). 20) P. G. Stevenson et al., *J. Chromatogr. A* 1217, 5358–5364 (2010).

Croscarmellose-Natrium

Carmellosum natricum conexum

Allgemeine Angaben

Die Monographie wurde im Zuge der internationalen Harmonisierung mit der USP und JAP harmonisiert. Abschnitte, die nicht Teil des harmonisierten Textes sind, sind speziell gekennzeichnet. Die Fassung der Ph. Eur. ist weiter gefasst: Sie enthält zusätzlich die Reinheitsprüfungen „Sulfatasche“, und „Partikelgrößenverteilung“ sowie die Bestimmung des Hausner-Faktors (im Abschnitt „Funktionalitätsbezogene Eigenschaften“). In der Ph. Eur. 9.0 wurde die Reinheitsprüfung auf Schwermetalle gestrichen.

Carmellose ist die internationale Bezeichnung für Carboxymethylcellulose. Die in der vorliegenden Monographie beschriebene Substanz ist eine modifizierte Natriumcarboxymethylcellulose, bei der die Polymerketten vernetzt sind. Die Vernetzung wird durch Veresterung von Oxymethylcarboxygruppen einer Kette mit Hydroxygruppen der Glucose einer anderen Kette herbeigeführt. Genauere Untersuchungen hierüber liegen in der Literatur offensichtlich nicht vor. Im Gegensatz zum ebenfalls in der Ph. Eur. aufgeführten nicht vernetzten **Carmellose-Natrium** (Carboxymethylcellulose-Natrium, CMC-Na) ist Croscarmellose-Natrium – die quervernetzte (crosslinked) Form (NaCMC-CL) – in Wasser praktisch unlöslich. Nähere Angaben zu CMC-Na, siehe den Kommentar zu **Carmellose-Natrium** (Ph. Eur.) und Lit.¹⁾.

In NaCMC-CL ist von den drei reaktionsfähigen Hydroxygruppen einer Glucose-Einheit nur ein Teil umgesetzt; der durchschnittliche Substitutionsgrad (DS) beträgt etwa 0,7 (siehe unter „Prüfung auf Reinheit“²⁾).

Darstellung: Siehe auch den Kommentar zu **Carmellose-Natrium** (Ph. Eur.). Nach Firmenangaben³⁾ erfolgt die Herstellung des quervernetzten Cellulosederivates nicht durch Zugabe von vernetzenden Agzien, sondern durch Steuerung der Re-

aktion von Alkalicellulose mit Natriummonochloracetat unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen. NaCMC-CL unterscheidet sich von wasserlöslichem **Carmellose-Natrium** (Ph. Eur.) dadurch, dass durch die Quervernetzung eine weitgehende Unlöslichkeit in Wasser erreicht wird. Ausgangsprodukt für die Gewinnung von NaCMC-CL ist nicht mehr ausschließlich pulverförmiges, hoch aufsaugendes Baumwollinters, sondern auch Holz. Der Grund dafür liegt darin, dass immer mehr Baumwolle gentechnisch modifiziert ist. In weiten Teilen der Nahrungsergänzungsmittelindustrie wird jedoch eine GMO-IP – Kennzeichnung (genetically modified organisms – identity preserved) gefordert. Dadurch muss der Produktionsweg bis zur Pflanze Gentechnik-frei sein³⁾. Die Quervernetzung wird durch Absenken des pH-Wertes während der Herstellung erreicht. Die freie Säure bildet anschließend unter ständigem Erhitzen Quervernetzungen durch Ether- und Esterbindungen.

Besondere Hinweise: Croscarmellose wird nicht resorbiert. Im Tierversuch ist die Toxizität der Substanz geprüft worden.

Akute orale Toxizität: Eine Dosierung von mehr als 2 g/kg Körpergewicht ergab bei Albinoratten eine Überlebensrate von 100% ohne klinische Zeichen einer Toxizität. Bei der Autopsie wurden keine pathologischen Veränderungen beobachtet. Die akute orale LD₅₀ an Ratten wird mit mehr als 2 g/kg Körpergewicht angegeben³⁾.

Subakute orale Toxizität: Entsprechende Untersuchungen wurden ebenfalls an Ratten durchgeführt. In einer 14-tägigen Fütterungsstudie mit täglicher Gabe von 6,7 g pro kg Körpergewicht zeigten sich keine physiologischen oder pathologischen Auswirkungen. Dem Standardfutter waren 5% des Hilfsstoffs zugesetzt worden. Eine Einarbeitung höherer Dosierungen war ebenfalls möglich.

C

Humane Hautirritationen: Bei einem Lappchen-test an 50 Probanden wurden weder Hautreizungen noch Sensibilisierungen festgestellt. Die Auflagefläche des NaCMC-CL wurde besonders präpariert, um eine große Oberfläche auf der Haut zu entwickeln. Die Probanden trugen zunächst 9 „Lappchen“ über 24 h, es folgte eine Pause von 12 Tagen, bevor die Proben für 24 h aufgebracht wurden. Alle Proben wurden vor äußerer Einwirkung abgedeckt.

Hautirritationen am Kaninchen: Für diesen Test wurde ein baumwollhaltiges Gewebe vorbereitet. Dieses bestand aus einer Mischung aus 80 % gebleichter Baumwolle und 20 % NaCMC-CL. Sowohl die intakte als auch die abgeschürfte Hautoberfläche weißer Kaninchen wurden der Probe ausgesetzt. Die Probe wurde abgedeckt und konnte 24 h einwirken. Der Versuch lief über 7 Tage; die Probe wurde täglich gewechselt. Es zeigten sich keinerlei hautschädigenden Effekte.

Inhalative Toxizität: Eine 10-malige subakute Staubinhalation zur Ermittlung der Toxizität an männlichen Albinoratten ergab keine unerwarteten Effekte. Die mittlere Staubkonzentration von NaCMC-CL über die 2-wöchige Untersuchungsperiode betrug 0,308 mg/l Luft. Es konnte kein Hinweis auf eine zelluläre Reaktion beobachtet werden.

Implantation am Kaninchenmuskel: Baumwollgewebe aus 80 % gebleichter Baumwolle und 20 % NaCMC-CL wurde 7 Tage lang in den Kaninchenmuskel implantiert. Anschließend wurden Muskel und Implantat sowohl visuell als auch mikroskopisch untersucht. Es ergaben sich keine signifikanten negativen Effekte außer Fremdkörperreaktionen, die auch die Kontrollgruppe zeigte.

Blutgerinnungstest: Bei einem Blutgerinnungstest mit menschlichem Blutplasma in vitro ließ NaCMC-CL keinen messbaren Einfluss auf Prothrombin oder Thromboplastin erkennen³⁾.

Biologische Abbaubarkeit: NaCMC-CL wird teilweise durch Mikroorganismen der menschlichen Haut und des weiblichen Genitaltraktes abgebaut. Innerhalb von 24 h werden ca. 15 bis 20 % der Substanz mikrobiologisch abgebaut. Fortgesetzte Inkubation bis zu 7 Tagen zeigte keinen weiteren Abbau.

Verwendung^{4, 5)}: Croscarmellose dient als Hilfsstoff in der Nahrungsmittelindustrie und bei der Herstellung von Medikamenten. Hier wird sie vorwiegend als Zerfallsförderer (Sprengmittel) bei Tabletten, Kapseln und Granulaten eingesetzt. Durch ihr hohes Wasserabsorptionsvermögen wird der Zerfall von Tabletten, die durch Granulat- oder Pulververpressung gewonnen werden, bereits bei Zusatz von nur 1 bis 5 % (in der Regel 3 %) deutlich gesteigert. Der Hilfsstoff kann bei granulatverpressten Komprimaten der Granulatmatrix oder als „äußere Phase“ dem Granulat zugesetzt werden. Croscarmellose wirkt im Unterschied zu anderen Sprengmitteln wie **Crospovidon** und **Carboxymethylstärke-Natrium (Typ A)** (beide Ph. Eur.) stärker über die Quellkraft als über das Quellvolumen, was bei hohen Tablettenhärten bemerkbar ist³⁾. NaCMC-CL kann ebenfalls in der inneren Phase feuchtgranuliert werden. Dies soll für eine rasche Auflösung sorgen, weil die Dochtwirkung zur Geltung kommt und Wasser in die Granulatkörner gezogen wird^{2, 6)}. Dies bewirkt, dass unter 0,5 % fast kein Effekt, dann bis 2,5 % ein starker Effekt auftritt, der sich ab 5 % asymptotisch abschwächt.

Die Substanz dient weiterhin als Stabilisator von Suspensionen und Emulsionen. Auch eine Begünstigung des Auflösungsverhaltens von Wirkstoffen ist beschrieben worden⁷⁾. Über den Einsatz von NaCMC-CL in Füllungen von Hartkapseln wurde berichtet; danach kann in bestimmten Fällen, z. B. bei Granulatfüllungen, die Auflösungsgeschwindigkeit von Arzneistoffen verbessert werden^{8, 9)}.

Außerdem wird NaCMC-CL topischen Zubereitungen zugesetzt, die dem Schutz der beanspruchten Haut und Schleimhaut dienen, u. a. zur Stomapflege, zum Mundschutz und bei Ulzera im Mund. Bis zu 1 %ige Lösungen dienen als künstlicher Speichel oder als künstliche Tränenflüssigkeit. Aufgrund des großen Wasseraufnahmevermögens wird die Substanz gelegentlich als Abführmittel oder als Magenfüller und somit als Appetitzügler verwendet. Der Effekt ist jedoch sehr gering.

Seit 2008 ist Croscarmellose in Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln als E 468 zugelassen¹⁰⁾. Anwendungen sind Mineralstoff- und Vitamintabletten, niedriger als Arzneimittel dosierte Phytopharmaka und Süßstofftabletten.

Synonyme: Kreuz- und quervernetzte Natrium-carboxymethylcellulose, E 468 (E-Nummer), Cross-Linked Sodium Carboxymethylcellulose, Carmellosum natricum conexum, Carboxymethyl-cellulosum natricum conexum, NaCMC-CL

Arzneibuchnamen: Croscarmellose Sodium (USP)⁽¹⁾

Eigenschaften

Das weiße bis grauweiße, hygroskopische Pulver ist frei fließend. Es löst sich weder in Wasser noch in organischen Lösungsmitteln wie Ethanol, Aceton und Diethylether. NaCMC-CL saugt innerhalb kurzer Zeit unter starker Quellung große Mengen Wasser auf. Nach Lit.⁽⁷⁾ wurde das Quellungsverhalten von direkt verpressten NaCMC-CL-Tabletten (12 mm Durchmesser, flach) in Wasser untersucht. Danach betrug nach 5 min die Quellung 150 % und nach 10 min ca. 200 % des Ausgangswertes.

Prüfung auf Identität

- NaCMC-CL besitzt ein starkes Adsorptionsvermögen, das mit einer Lösung des kationischen Phenothiazin-Farbstoffes Methylenblau nachgewiesen wird. Das Adsorbat setzt sich als blau gefärbte Gallerte ab (USP).
- Diese Prüfung ist ebenso wie der Methylenblau-Test mit den Vorschriften der USP identisch. Der Grund der entstehenden purpurroten Färbung an der Grenze zwischen der 1-Naphthol-Lösung und der 96 %igen Schwefelsäure ist u. W. bisher nicht bekannt.
- Es wird eine Lösung aus dem Rückstand der Reinheitsprüfung „Sulfatasche“ hergestellt. Die Prüfung auf Natrium erfolgt nach **2.3.1** (Ph. Eur.).

Prüfung auf Reinheit

pH-Wert: Zur Bestimmung wird 1 g Substanz mit 100 ml kohlendioxidfreiem Wasser geschüttelt und die Messung nach 5 min durchgeführt. Die USP schreibt vor, dass die Messung erst nach 1 h ausgeführt werden soll. Der zulässige pH-Bereich zwischen 5,0 und 7,0 wird von Handelspräparaten i. Allg. gehalten.

Natriumchlorid, Natriumglycolat: Die Substanzen fallen als Nebenprodukte bei der Herstellung an.

Natriumchlorid: Bestimmt wird der Gehalt an Natriumchlorid nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid der Untersuchungsprobe (Aufschluss) durch Titration mit 0,05 M-Silbernitrat-Lösung. Diese Reinheitsprüfung entspricht der USP. Der prozentuale Gehalt an Natriumchlorid wird nach folgender Formel berechnet:

$$\%(\text{NaCl}) = 584,4 \cdot V \cdot N / [(100-b) \cdot W]$$

V	Volumen der Silbernitrat-Lösung in ml
N	Normalität der Silbernitrat-Lösung
b	prozentualer Trocknungsverlust
W	Gewicht in g
584,4	Äquivalenzfaktor für Natriumchlorid

Natriumglycolat: Verunreinigungen durch Natriumglycolat werden extrahiert und durch Vergleich mit der Reinsubstanz kolorimetrisch bestimmt. Die Farbreaktion beruht darauf, dass durch oxidative Decarboxylierung mit Schwefelsäure aus Glycolsäure zuerst Formaldehyd abgespalten wird, der anschließend mit 2,7-Dihydroxynaphthalin zu farblosem 2,2',7,7'-Tetrahydroxydinaphthylmethan kondensiert⁽⁷⁾ (Reaktionsverlauf, siehe im Kommentar zu **Carmellose-Natrium**, Ph. Eur.). Die zunächst entstehende gelbe Lösung färbt sich durch Einwirkung von Oxidationsmitteln (hier konzentrierte Schwefelsäure) allmählich tiefrot bis rotviolett (λ_{max} 530 bis 550 nm). Die Struktur des entstehenden Farbstoffes ist u. W. noch unbekannt⁽²⁾. Die Ph. Eur. lässt die Absorption von Untersuchungs- und Kompensationsflüssigkeit bei 540 nm messen und den Gehalt an Natriumglycolat nach der im Arzneibuch angegebenen Formel errechnen.

In der vorliegenden Monographie wird ebenso wie in der USP die Summe an Natriumchlorid und Natriumglycolat auf höchstens 0,5 %, berechnet auf die getrocknete Substanz, begrenzt.

Wasserlösliche Substanzen: Um die Konzentration an wasserlöslichen Substanzen mit hinreichender Genauigkeit erfassen zu können, wird von 10,00 g Substanz ausgegangen, die mit 800,0 ml Wasser versetzt werden; für die Bestimmung des Trockenrückstands der filtrierten Lösung wird ein Volumen von 150,0 ml vorgeschrieben.

C

Trocknungsverlust: Der angegebene Höchstwert von 10,0 % stimmt mit dem der USP überein; er wird von Handelspräparaten i. Allg. nicht überschritten.

Sulfatasche: Der Bereich von 14,0 bis 28,0 % wird von Handelspräparaten i. Allg. gehalten.

Andere Reinheitsprüfungen: Die USP verlangt eine Prüfung auf flüchtige, organische Verunreinigungen. In Lit.¹³⁾ sind weitere Informationen unter dem Stichwort „Ac-Di-Sol®“ enthalten.

Funktionalitätsbezogene Eigenschaften

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Prüfungen des Arzneibuchs müssen nicht zwingend durchgeführt werden, sind aber empfehlenswert; siehe dazu unter **1.4 Monographien** (Ph. Eur.) und den zugehörigen Kommentar.

Sedimentationsvolumen: Diese Prüfung ist mit jener der USP identisch.

Substitutionsgrad: Die Bestimmung entspricht der USP. Unter dem Substitutionsgrad ist die Zahl der Carboxymethylgruppen, bezogen auf die reaktionsfähigen Hydroxygruppen der Grundeinheit der Cellulose (Glucose-Einheit), zu verstehen. Zur Bestimmung wird zunächst ein Überschuss an 0,1 M-Natronlauge zugefügt, offensichtlich zur Verseifung der die Quervernetzung bewirkenden Esterbindungen (siehe unter „Darstellung“). Dann wird mit 0,1 M-Salzsäure gegen *m*-Cresolpurpur neutralisiert (gelb; pH 7,4). Alle Carbonsäuregruppen liegen nun in der Säureform vor und werden mit 0,1 M-Natronlauge nach Violett (pH 9,0) titriert. Unter Einbezug des Ergebnisses der Bestimmung der Sulfatasche (C), die dem Natriumgehalt entspricht, berechnet man den Säurecarboxymethyl-Substitutionsgrad (A, freie und vorher veresterte Carboxymethylgruppen) und den Natriumcarboxymethyl-Substitutionsgrad (S), d.h. diejenigen Carboxymethylgruppen, die als Natriumsalz vorliegen. Beide werden addiert, die Summe muss zwischen 0,60 und 0,85 liegen, davon liegen ca. 70 % als Natriumsalz vor²⁾.

C. Siewert/Lth

Literatur

- 1) Bauer/Frömming/Führer, 10. Aufl., S. 273.
- 2) A. Bauer-Brandl, W. A. Ritschel, *Die Tablette*, 3. Aufl., S. 156 ff., ECV Editio Cantor, Aulendorf 2012.
- 3) LUV-Information Lehmann und Voss & Co., Hamburg, Alsterufer 19, 20354 Hamburg, Hersteller FMC Corporation, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- 4) Fiedler, 5. Aufl., Bd. I, S. 483. 5) Martindale.
- 6) M. S. Gordon et al., J. Pharm. Sci. 82, 220 (1993).

- 7) D. Gissinger, A. Stamm, Pharm. Ind. 42, 189 (1980).
- 8) J. E. Botzolakakis, L. E. Small, L. L. Augsburg, Int. J. Pharm. 12, 341 (1982).
- 9) J. E. Botzolakakis, L. L. Augsburg, J. Pharm. Pharmacol. 36, 77 (1984).
- 10) Richtlinie 2008/84/EG der Kommission der Europäischen Gemeinschaften vom 27.8.2008.
- 11) Hager, 6. Aufl., Bd. 2.
- 12) Kakáč/Vejdělek, *Photometrie*, Bd. I, S. 350; Ergbd. I, S. 138; Ergbd. 2, S. 149.
- 13) Fiedler, 5. Aufl., S. 139.

Glycerol

Glycerolum

Allgemeine Angaben

Glycerol (**8**; auch bekannt als Glycerin) ist ein integraler Bestandteil von Triglyceriden (z.B. in pflanzlichen fetten Ölen) und somit ein Bestandteil der Nahrung. Als Reinsubstanz findet es pharmazeutische Anwendung v.a. als rektal applizierbares Laxans, es wird aber auch als pharmazeutischer Hilfsstoff für unterschiedliche Zwecke eingesetzt.

Die Substanz ist auch in der USP und JAP beschrieben. Die USP fordert eine abweichende Gehaltsgrenze von 99,0 bis 100,0%. Sie beschreibt zudem als Zubereitungen „Glycerin ophthalmic solution“, „Glycerin oral solution“ und „Glycerin suppositories“. Ferner finden sich Monographien in älteren Arzneibüchern wie dem ÖAB 9 und DAB 10.

Im Nachtrag 9.6 wurde die 2. Identifizierungsreihe grundlegend überarbeitet und dabei die bisherigen Farbreaktionen gestrichen. Die Identifizierung in

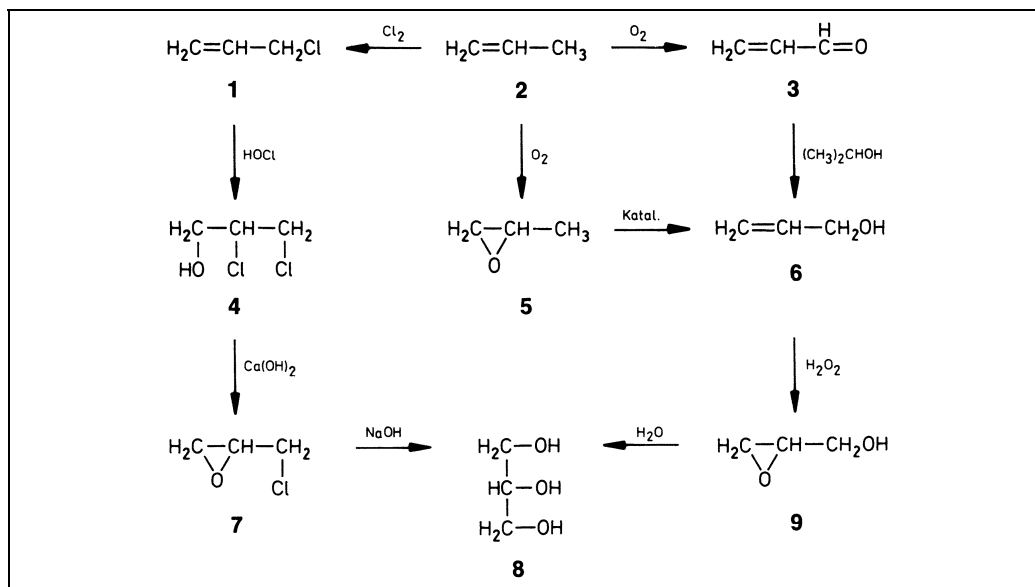
dieser Reihe erfolgt nun durch Bestimmung einfacher, aber aussagekräftiger physikalisch-chemischer Parameter (Brechungsindex, relative Dichte). Schon in der Ausgabe 9.0 war entsprechend der neuen Politik des EDQM die Reinheitsprüfung auf Schwermetalle gestrichen worden.

CAS-Nr.: 56–81–5

PubChem-Nr.: 753

DrugBank-Nr.: DB09462

Darstellung: Bis Mitte des vergangenen Jahrhunderts wurde Glycerol (**8**) ausschließlich aus natürlichen Fetten (Triglyceriden) gewonnen; seither hat die Synthese aus Propen (**2**) zunehmend an Bedeutung gewonnen¹⁾. Heute stammt der größte Teil der Weltproduktion aus synthetischen Prozessen.



Die Fettspaltung wird entweder durch Verseifen mit wässrigem Alkalihydroxid oder Alkalicarbonat bei Normaldruck durchgeführt oder mit reinem Wasser bei Temperaturen von 250 bis 260 °C und einem Druck von 5 bis 6 MPa. Die dabei anfallenden 12- bis 18%igen Glycerolwässer werden entsprechend dem angewandten Verfahren gereinigt, im Vakuum konzentriert und für pharmazeutische Zwecke unter vermindertem Druck durch Wasserdampfdestillation oder Dünnschichtverdampfung rektifiziert. Man kann auch mit Hilfe von Ionenaustauschern Verunreinigungen der Glycerolwässer entfernen und auch so ein Produkt erhalten, das den Reinheitsforderungen der Pharmakopöen entspricht. Ferner ist Glycerol aus natürlichen Fetten durch Umesterung mit Methanol erhältlich, wobei neben freiem Glycerol die Fettsäuremethylester entstehen.

Die chemische Synthese geht in der Regel von Propen (2) aus, das in unterschiedlichen Verfahren mit hohen Ausbeuten in Glycerol (8) überführt werden kann²⁾. So liefert z. B. die Hochdruckchlorierung von Propen Allylchlorid (1), das sich durch Hypochlorierung zum Dichlorhydrin (4) umsetzen lässt. Letzteres liefert mit Kalkmilch (Ca(OH)_2) Epichlorhydrin (7), das direkt weiter mit Natriumhydroxid oder Natriumcarbonat bei 100 bis 200 °C zu Glycerol (8) hydrolysiert wird. Propen kann auch mit Sauerstoff zu Acrolein (3) oxidiert und mit 2-Propanol/Aluminiumisopropylat nach Meerwein-Ponndorf-Verley zu Allylalkohol (6) reduziert werden. Letzterer lässt sich mit Wasserstoffperoxid oder Peressigsäure zu Glycidol (9) epoxidieren und anschließend mit Wasser zu Glycerol (8) hydrolysieren. Es ist auch möglich, das Propen im ersten Schritt zunächst mit Sauerstoff in Propenoxid (5) umzuwandeln und dieses nach dem Progil-Verfahren in Allylalkohol (6) umzulagern.

Stabilität/Lagerung: Glycerol (8) ist relativ stabil gegen Sauerstoff.

Wässrige Lösungen werden leicht von Mikroorganismen befallen. Bei Zusatz von starken Oxidationsmitteln wie Kaliumpermanganat, Kaliumperchlorat oder Chrom(VI)-oxid kann es zu Explosionen kommen.

Die Sterilisation von Glycerol ist problematisch, da bei der üblichen Temperatur von 120 °C Erdsporen nicht abgetötet werden. Für die Heißluftsterilisation bei 180 °C kommt nur wasserfreies Glycerol in Frage. Wasserhaltiges Glycerol (84 bis

88 %) siedet nämlich schon bei 130 bis 135 °C und kann bei höherem Erhitzen Explosionen verursachen³⁾. Mit basischem Bismutnitrat und Zinkoxid tritt bei Lichtexposition Schwarzfärbung auf⁴⁾. Glycerol kann Penicilline inaktivieren⁵⁾.

Besondere Hinweise: Diethylenglycol (Verunreinigung A) wird zwar nicht bei der Herstellung gebildet, kann aber als Verschnitt dem Glycerol zugesetzt sein. Die Aufnahme von 67 bis 78 g kann zu schweren Vergiftungen mit Todesfolge führen; eine tägliche Aufnahme von 30 bis 60 mg gilt als unbedenklich²⁾.

Arzneibuchnamen: Glycerin (USP), Glycerol (INTERN); in der JAP wird Glycerol als „Concentrated Glycerin“ bezeichnet, der Name „Glycerin“ steht dort für Glycerol 85 % (siehe den Kommentar zu **Glycerol 85 %**, Ph. Eur.).

Synonyme: Glycerin, E 422, Propantriol, Ölsüß

Eigenschaften

Wasserfreies Glycerol (8) ist eine viskose, sirupartige Flüssigkeit, deren Süße etwa 60 % der des Rohrzuckers erreicht. Der Geruch wird als eigenartig, aber kaum wahrnehmbar beschrieben (ÖAB 9), die Substanz fühlt sich fettig an. Glycerol ist bis 180 °C thermisch stabil, dann beginnt langsame Dehydratisierung (Wasserabspaltung) zu Di- und Polyglycerolethern, bei höheren Temperaturen zu Acrolein (3). Glycerol siedet bei 290 °C unter Zersetzung, zu Siedepunkten bei verschiedenen Drücken siehe Tab. 1. Bei längerem Abkühlen unter 0 °C erstarrt Glycerol zu farblosen, rhombischen Kristallen vom Schmelzpunkt 17,9 °C. Der Flammpunkt wird mit 177 °C und der Brennpunkt mit 204 °C angegeben⁵⁾. Die Substanz ist mit Wasserdampf flüchtig. Gegen Sauerstoff ist sie recht stabil. Beim Stehenlassen an der Luft vermag Glycerol bis zu 50 % seines Gewichts an Wasser aufzunehmen. Die Substanz absorbiert auch Schwefelwasserstoff, Schwefeldioxid und Blausäure⁶⁾. Glycerol ist in jedem Mengenverhältnis mischbar mit Wasser, Ethanol und Propylenglycol.

1 Teil Substanz löst sich in 11 Teilen Ethylacetat und in ca. 500 Teilen Diethylether. Sie ist wenig löslich in Aceton und unlöslich in Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Benzin, fetten Ölen, Kohlenstoffdisulfid und Petroläther⁶⁾.

Tab. 1: Siedepunkte von Glycerol bei verschiedenen Drücken⁷⁾

Sdp. [°C]	263,0	240,0	220,1	208,0	182,2	167,2	153,8	125,5
Druck [kPa]	53	26,6	13,3	8	2,6	1,3	0,7	0,13

Prüfung auf Identität

- A. Der Brechungsindex (und auch die relative Dichte, siehe Identitätsprüfung C) nehmen mit steigendem Wassergehalt annähernd linear ab. Beide sind daher wichtige Reinheitskriterien, die eine sehr genaue Bestimmung des Glycerolgehalts von Glycerol-Wasser-Gemischen ermöglichen. Der Brechungsindex (gefordert: 1,470 bis 1,475) erlaubt auch eine sichere Unterscheidung von **Glycerol 85 %** (Ph. Eur., dort gefordert: 1,449 bis 1,445; siehe auch den zugehörigen Kommentar). Siehe hierzu auch Tab. 2.
- B. IR-Spektroskopie: Wegen der starken Hygroskopizität des Glycerols hat die Ph.-Eur.-Kommission darauf verzichtet, eine Referenzsubstanz vorrätig zu halten. Sie fordert hingegen den Vergleich mit einem Referenzspekt-

rum. Als Referenzsubstanz dient Glycerol 85%; daher wird das zu prüfende wasserfreie Glycerol vor der Aufnahme des IR-Spektrums mit einer definierten Menge Wasser verdünnt. Vgl. Abb. 1.

- C. Die Bestimmung der relativen Dichte wurde neu in die Ph. Eur. 9.6 aufgenommen und ersetzt die beiden früheren Farbreaktionen. Auch hiermit (gefordert: 1,258 bis 1,268) lässt sich Glycerol gut von **Glycerol 85 %** (Ph. Eur.; dort gefordert: 1,221 bis 1,232) unterscheiden. Die in Tab. 2 angegebenen Werte sind den DGF-Einheitmethoden [E-III 1 (55) bzw. E-III 2 (55)] entnommen. Zur Umrechnung der hier aufgeführten absoluten Dichte ρ_{20}^{20} in die relative Dichte d siehe 2.2.5 (Ph. Eur.) und entsprechenden Kommentar.

Tab. 2: Dichte und Berechnungsindex von Glycerol-Wasser-Gemischen

% Glycerol	ρ_{20}	$n_{D,20}^{20}$	% Glycerol	ρ_{20}	$n_{D,20}^{20}$
100	1,26108	1,47399	80	1,20850	1,44290
99	1,25850	1,47234	79	1,20575	1,44135
98	1,25590	1,47071	78	1,20305	1,43982
97	1,25335	1,46909	77	1,20030	1,43832
96	1,25080	1,46752	76	1,19760	1,43683
95	1,24825	1,46597	75	1,19485	1,43534
94	1,24560	1,46443	74	1,19215	1,43385
93	1,24300	1,46290	73	1,18940	1,43236
92	1,24035	1,46139	72	1,18670	1,43087
91	1,23770	1,45989	71	1,18395	1,42938
90	1,23510	1,45839	70	1,18125	1,42789
89	1,23245	1,45689	69	1,17850	1,42640
88	1,22975	1,45539	68	1,17575	1,42491
87	1,22710	1,45389	67	1,17300	1,42342
86	1,22445	1,45237	66	1,17025	1,42193
85	1,22180	1,45085	65	1,16750	1,42044
84	1,21915	1,44930	64	1,16475	1,41895
83	1,21650	1,44770	63	1,16205	1,41746
82	1,21380	1,44612	62	1,15930	1,41597
81	1,21115	1,44450	61	1,15655	1,41448



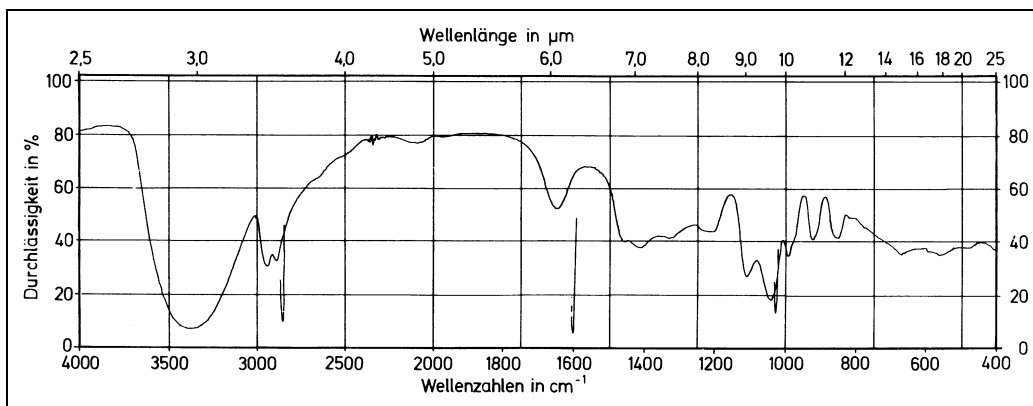


Abb. 1: IR-Spektrum von Glycerol 85 % (Film)

Andere Identitätsprüfungen: Die Ph. Eur. 9.0 sah in der 2. Identifizierungsreihe noch zwei Farbreaktionen vor: In einer wenig spezifischen Farbreaktion auf primäre und sekundäre Alkohole⁸⁾ mit Kaliumdichromat in salpetersaurer Lösung wird Glycerol unter gleichzeitiger Reduktion von Chrom(VI) zu Chrom(III) oxidiert; Chrom(III) ist mit seinen Absorptionsbanden bei 587 und 416 nm für die beobachtete Blaufärbung⁹⁾ verantwortlich. Diese Farbreaktion fällt auch bei zahlreichen anderen oxidierbaren organischen Verbindungen positiv aus. Sie war in erster Linie zur Unterscheidung von Glycerol und Propylenglycol (Verunreinigung C) gedacht, denn bei Letzterem greift die Blaufärbung innerhalb von etwa 2 min auf die untere Schicht über. Eine weitere Prüfung beruhte auf der Dehydratisierung zu Acrolein (3) beim trockenen Ergitzen mit Kaliumhydrogensulfat. Das gebildete Acrolein färbt mit Neßlers Reagenz getränktes Filterpapier.

Das 2. AB/DDR ließ entweichendes Acrolein mit Natriumpentacyanonitrosylferrat(II)-Lösung auf Filtrierpapier reagieren. Nach anschließendem Betupfen mit Piperidin muss Blaufärbung auftreten (Simon-Awe Reaktion, Legal Probe).

Glycerol bildet in der Borax-Perle eine grüne Flammenfärbung (BP 1958) und im alkalischen Milieu mit Kupfer(II)-Ionen einen blauen Komplex (ÖAB 9).

Prüfung auf Reinheit

Aussehen der Lösung: In Schichtdicken von etwa 20 cm weist auch sehr reines Glycerol eine

schwach gelbliche Färbung auf. Unter den hier gegebenen Bedingungen erscheint die Prüflösung jedoch farblos.

Sauer oder alkalisch reagierende Substanzen: Wässrige Lösungen von reinem Glycerol reagieren neutral gegen Phenolphthalein. Der pK_a -Wert beträgt 14,7¹⁰⁾.

Brechungsindex: Siehe die Identitätsprüfung A und Tab. 2.

Aldehyde: Diese Reinheitsprüfung dient dem Nachweis typischer Zersetzungsprodukte des Glycerols mit reaktiven Carbonylgruppen wie Acrolein (3), Formaldehyd, Acetaldehyd, Propionaldehyd, Glycerolaldehyd, 1,3-Dihydroxyaceton und Glyoxal. Als Vergleich dient ein gleich behandelter Formaldehyd-Standard, als Reagenz wird anstelle von Schiffs Reagenz (mit Fuchsin) das verwandte, aber chemisch reinere Pararosanilin-Reagenz eingesetzt, von dessen Qualität die Empfindlichkeit der Reaktion entscheidend abhängt (siehe den Kommentar unter 4.1.1, Ph. Eur., zu „Schiffs Reagenz R“). Statt eines visuellen Vergleichs von Probe und Standard schreibt die Ph. Eur. eine UV-Messung bei der 552 nm vor. Diese Probe spricht besonders gut auf Formaldehyd und Acetaldehyd an, weniger auf Acrolein, 1,3-Dihydroxyaceton und Propionaldehyd.

Die JAP lässt zur Prüfung auf vergleichbare Verunreinigungen („Acrolein, glucose, and other reducing substances“) mit ammoniakalischer Silbernitrat-Lösung auf 60 °C erwärmen. Dabei darf keine

Trübung auftreten (Tollens-Probe). Diese Grenzprüfung kann auch quantitativ durch eine Messung bei 400 nm ausgewertet werden¹¹⁾.

Ester: Zur Verseifung eventuell vorhandener Fettsäureester wird mit überschüssiger 0,1 M-Natriumhydroxid-Lösung auf dem Wasserbad erwärmt und der Alkaliverbrauch durch Rücktitration ermittelt. Diese Probe wird häufig nicht gehalten. Die USP und JAP führen eine ähnliche Prüfung unter dem Titel „Fatty acids and esters“ durch. Dieser Titel ist sinnvoll, da bei der Bestimmung auch freie Fettsäuren (z. B. aus der Triglyceridhydrolyse) mit erfasst werden.

Verunreinigung A, verwandte Substanzen: Diese GC-Analyse begrenzt vor allem Verschnitte mit Diethylenglycol (A), aber auch verwandte Substanzen wie Ethylenglycol (B) und Propylenglycol (C) (siehe auch unter „Besondere Hinweise“).

Die Bestimmung der zwei Gruppen weiterer Verunreinigungen erfolgt durch Vergleich mit dem Diethylenglycol-Peak in Referenzlösung c. Die USP schreibt eine ähnliche Reinheitsprüfung vor. Es wurde auch vorgeschlagen, diese gaschromatographische Prüfung durch eine HPLC-Methode zu ersetzen¹²⁾.

Halogenverbindungen: Hier kommen vornehmlich organische Chlorverbindungen wie Allylchlorid (1), Dichlorhydrin (4) oder Epichlorhydrin (7) in Frage, die bei der Synthese als Zwischenprodukte auftreten. Schon in der Probe vorhandenes freies Chlorid (siehe die Reinheitsprüfung „Chlorid“) wird hier natürlich mit erfasst. Der Grenzwert von 35 ppm ist somit die Summe aus freiem und organisch gebundenem Chlorid.

Die C-Cl-Bindung wird beim Erwärmen in alkalischem Medium mit halogenfreiem Raney-Nickel hydrierend gespalten und das gebildete Chlorid mit Silbernitrat als schwer lösliches Silberchlorid gefällt. Die Opaleszenz der Prüflösung wird mit der einer mittels einer Chlorid-Standardlösung hergestellten Referenzlösung verglichen.

Die Abspaltung des organisch gebundenen Chlors kann auch durch Kochen einer Probe mit Morpholin (USP) erfolgen.

Zucker: Zunächst werden vorhandene Di- und Oligosaccharide in saurem Medium zu Monosac-

chariden hydrolysiert, die man in alkalischer Lösung durch ihre bekannte Reduktionswirkung auf Kupfer(II)-Ionen unter Bildung von schwer löslichem Kupfer(I)-oxid (Fehling-Reaktion) nachweist. Durch Gebrauch carbonatfreier Natriumhydroxid-Lösung soll die Bildung von Kupfercarbonat verhindert werden, das auch zu trüben Lösungen führen könnte.

Für eine HPTLC-Auftrennung und Identifizierung von Zuckern und Polyalkoholen siehe Lit.¹³⁾.

Chlorid: Wie USP prüft die Ph. Eur. auf lösliche Chlorid-Ionen (max. 10 ppm). Siehe auch die Reinheitsprüfung „Halogenverbindungen“, die v. a. auf organisch gebundenes Chlor abzielt.

Wasser: Die Ph. Eur. (wie auch die JAP und INTERN) stellt mit einem Grenzwert von 2,0 % schärfere Anforderungen als die USP mit 5 %.

Sulfatasche: Raffiniertes, technisches Glycerol hat Sulfatasche-Werte von etwa 0,3 bis 0,5 %.

Andere Reinheitsprüfungen: Die USP und die JAP begrenzen Sulfat auf 0,002 %, die JAP prüft zusätzlich auf Ammonium, Calcium und Arsen (2 ppm). Die USP prüft zusätzlich auf Sulfat (max. 20 ppm). Ältere Arzneibücher wie das BP 1958 und ÖAB 9 führten noch Reinheitsprüfungen auf Fettsäuren, reduzierende Substanzen, Ammonium, Eisen, Kupfer und Arsen an.

Gehaltsbestimmung

Glycerol (8) wird von überschüssiger Natriumperiodat-Lösung in 2 Mol Formaldehyd und 1 Mol Ameisensäure gespalten (Malaprade-Spaltung). Der Überschuss an Natriumperiodat wird durch Zusatz von Ethylenglycol verbraucht, das dabei weiteren Formaldehyd bildet. Bei potentiometrischer Indikation kann der Zusatz von Ethylenglycol prinzipiell entfallen¹⁴⁾. Die bei der Reaktion entstandene Ameisensäure kann anschließend alkalimetrisch bestimmt werden. Da der Verlauf der Periodatspaltung pH-abhängig ist, lässt die Ph. Eur. zusätzlich eine kleine Menge Schwefelsäure zusetzen, um ein saures Reaktionsmedium zu gewährleisten. Die zugesetzte Schwefelsäure wird bei der Titration mit der Natronlauge mit erfasst. Dieser Mehrverbrauch an Maßlösung wird

aber bei der Differenzbildung mit dem Verbrauch beim Blindversuch kompensiert.

Anstelle der Titration der Ameisensäure kann prinzipiell auch der Verbrauch an Natriumperiodat iodometrisch ermittelt werden. Für eine nähere Diskussion siehe den Kommentar zu **4.1.1** (Ph. Eur.) bei „Natriumperiodat *R*“ und Lit.¹⁵⁾. Von allen bekannten Titrationsmethoden zur Glycerolbestimmung ist die Reaktion mit Natriumperiodat am spezifischsten, da nur Stoffe mit wenigstens 3 benachbarten OH-Gruppen stören, z.B. Zucker, Zuckeralkohole, die aber von den Reinheitsprüfungen erfasst werden. Die Periodat-Methode wird auch von der USP vorgeschrieben, allerdings wird dort nicht gegen Phenolphthalein titriert, sondern der Endpunkt potentiometrisch bestimmt. Die Probe wird bis pH 8,1 ± 0,1 titriert, der Blindversuch bis pH 6,5 ± 0,1. Die USP lässt den pH-Wert der Probe vor der Bestimmung gegen Bromthymolblau einstellen. Die INTERN verzichtet auf den Zusatz von Ethylenglycol.

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, nach Zugabe des Ethylenglycols weitere 15 bis 20 min zu warten, bis der Periodat-Überschuss verbraucht ist. Außerdem sollte die Malaprade-Spaltung wie alle Redoxreaktionen mit Iodverbindungen unter Ausschluss direkter Lichteinwirkung erfolgen.

Infolge der starken Hygroskopizität von wasserfreiem Glycerol lässt sich die Einwaage zur Gehaltsbestimmung leichter als Differenzwägung durchführen.

Andere Bestimmungsmethoden: Die USP 20 ließ die Malaprade-Spaltung als Redox titration durch Titration mit Natriumarsenit-Maßlösung

auswerten. Die JAP lässt den Gehalt über die Messung der spezifischen Dichte (siehe Tab. 2) bestimmen und fordert mindestens 98,0 %. Weitere Verfahren werden in den DGF-Einheitmethoden beschrieben: die Dichromat-Methode [Oxidation des Glycerols zu CO₂ und H₂O mit Kaliumdichromat; siehe E-III 3e (55)] und die Acetin-Methode [Bestimmung der bei der Acetylierung gebundenen Essigsäure; siehe E-III 3d (55)]. Von den zahlreichen kolorimetrischen Verfahren¹⁶⁾ beruhen die meisten auf einer Bestimmung des durch Periodat-Oxidation gebildeten Formaldehyds. Dieser wird quantitativ mit Chromotropsäure^{15, 17)}, Acetylaceton (Nash-Reaktion)¹⁸⁾ oder Phenylhydrazin/K₃[Fe(CN)₆] (siehe den Kommentar zu **Formaldehyd-Lösung 35 %**, Ph. Eur.)¹⁹⁾ erfasst. Glycerol kann neben seinen organischen Verunreinigungen oder in biologischem Material auch gaschromatographisch bestimmt werden²⁰⁾. Eine enzymatisch-fluorimetrische Analyse von Glycerol in Plasma und anderem biologischem Material beschreibt Lit.²¹⁾.

Metabolisierung

Glycerol (**8**) wird in der Leber metabolisiert und in die Glykolyse eingespeist. Eine cytosolische Glycerinkinase phosphoryliert Glycerol unter ATP-Verbrauch zu Glycerol-3-phosphat, welches dann zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert wird. Entweder wird dies von einer cytosolischen Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (cGDH) oder einem membranständigen Isoenzym im Mitochondrium (mGDH) katalysiert.

J. Krauß/Br

Pharmakologische Eigenschaften

Pharmakodynamik⁴⁾: Das osmotisch, dehydratisierend und hygroskopisch wirkende Glycerol führt nach peroraler oder intravenöser Applikation zu einer Erhöhung der Plasmaosmolarität. Bei erhöhtem intrakraniellen Druck kommt es zu einer Umverteilung von Flüssigkeit in das Plasma sowie den gesamten Extrazellulärraum und somit zu einer Druckminderung. Bei rektaler Gabe von Glycerol wirkt die Substanz als Gleitmittel und weicht

die Fäzes von außen her auf. Durch den osmotischen Effekt kommt es zu einer Anregung der Darmmotilität sowie zur Steigerung des Defäkationsreizes. Auch nach peroraler Applikation wirkt Glycerol schwach laxierend.

Bei lokaler Anwendung an Schleimhäuten oder entzündlich veränderter Haut retiniert Glycerol Wasser. In Konzentrationen von mindestens 20 % kommt es zur Dehydratation von Bakterien und damit zu einem schwach desinfizierenden Effekt. Ferner erleichtert Glycerol die Auflösung von Zerumen.

Die topische Anwendung von Glycerol zur Senkung des erhöhten intraokularen Drucks ist wegen der nur kurzen Wirkdauer nicht mehr üblich.

Pharmakokinetik: Nach peroraler Gabe wird Glycerol gut resorbiert und relativ rasch zu Glucose und Glykogen bzw. zu Kohlendioxid und Wasser verstoffwechselt oder mit freien Fettsäuren verestert. Die Wirkung tritt 30 Minuten nach Einnahme ein und hält etwa 5 Stunden an. Glycerol verteilt sich in den gesamten Extrazellulärraum, der 50 bis 65% des Körpergewichtes entspricht. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 30 bis 45 min. Die Exkretion erfolgt hauptsächlich renal. Rektal appliziertes Glycerol wird kaum resorbiert.

Indikationen: Darmträgheit, Verstopfung, erhöhter intrakranieller Druck, zur Diagnose von M. Menière, Trigeminus-Neuralgie, Husten, vor und nach Operationen am Auge zur Reduktion des intraokularen Drucks, topische Anwendung bei Hornhautödem und trockenem Auge

Pharmazeutisch-technische Verwendung: Bestandteil von Salben, Suppositorien, Ohrentropfen, flüssigen Seifen und Gelen; Glycerol wirkt als Lösungsmittel, Weichmacher, Gefrierschutzmittel u.a.m.

Dosierung: Als Laxans erhalten Erwachsene Suppositorien oder Mikroklysmen mit bis zu 3 g einer 85%igen Glycerol-Lösung, Kinder entsprechend 1 bis 1,5 g. Das Medikament sollte 15 min am Wirkort verbleiben.

Bei erhöhtem intrakraniellen Druck werden bei Erwachsenen 25 bis 50 g Glycerol peroral oder 0,5 bis 1 g/kg Körpergewicht intravenös verabreicht. Die tägliche Maximaldosis wird mit 120 g angegeben.

Intoxikation: Lokale Überdosierungen am Auge sind ohne klinische Relevanz. Auch bei versehentlicher oraler Einnahme von Glycerol-Zubereitungen sind keine Maßnahmen erforderlich.

Nebenwirkungen: Diese beruhen primär auf der dehydatisierenden Wirkung von Glycerol. Bei topischer Anwendung auf empfindlicher oder bereits

vorgeschädigter Schleimhaut kann es zu Irritationen kommen. Dies betrifft auch Diabetiker mit durchblutungsbedingten trophischen Störungen.

Nach okulärer Gabe sind verschwommenes Sehen sowie Überempfindlichkeits- und Unverträglichkeitsreaktionen wie Lidödeme, Fremdkörpergefühl im Auge, Rötungen, Juckreiz, Schwellungen und Brennen möglich.

Nach peroraler und insbesondere nach intravenöser Applikation kommt es gelegentlich zu Kopfwere, Übelkeit, Hämolyse und Hyperglykämie, aber auch zu Arrhythmien. Plötzliche Umverteilung von Flüssigkeit in das Blut kann zu Lungenödem und Herzinsuffizienz führen. Bei Patienten mit Hypervolämie ist daher Vorsicht geboten.

Kontraindikationen: Für die perorale und intravenöse Anwendung sind es Anurie, schwere Dehydratation, akutes Lungenödem, schwere kardiale Dekompensation. Vorsicht bei Diabetes mellitus, da solche Patienten auf Grund der Metabolisierung von Glycerol Hyperglykämie und Glucosurie entwickeln können. Es kann zu einem hyperosmolaren Koma kommen. Bei Ileus und Verdacht auf Appendizitis sollte keine rektale Applikation erfolgen.

Interaktionen: Andere, ebenfalls rektal angewendete Medikamente können wegen der beschleunigten Ausscheidung nur kurz am Wirk- oder Resorptionssort verbleiben.

Schwangerschaft und Stillzeit: Berichte über schädliche Wirkungen während der Schwangerschaft und der Stillzeit sind nicht bekannt.

Besondere Hinweise: Durch Zusatz von Fruchtsäften kann die Trinkbarkeit der Glycerol-Zubereitungen verbessert werden. Die Daueranwendung als Laxans ist nicht empfehlenswert, da die Ursache der Verstopfung hierdurch nicht beseitigt werden kann.

Die topische Anwendung von Glycerol zur Senkung des erhöhten intraokularen Drucks ist wegen der nur kurzen Wirkdauer nicht mehr üblich.

M. Neubeck/Mu

Literatur

- 1a)** G. Jakobson et al., in: Ullmann, 5. Aufl., Bd. A 12, S. 477 (1989). **1b)** B. R. Franko-Filipasic, in: Ullmann, 4. Aufl., Bd. 12, S. 367 (1976). **1c)** Beilstein, Ergw. IV Bd. 1, S. 2751. **2)** *Toxicological Evaluations*, BG Chemie, Springer, Berlin 1990. **3)** G. Geist, Dtsch. Apoth. Ztg. 101, 110 (1961). **4)** Martindale. **5)** P. C. Schmidt, I. Christin, *Wirk- und Hilfsstoffe*, Wiss. Verlagsges., Stuttgart 1999. **6)** Merck Index. **7)** Pharmazeutische Stoffliste. **8)** Kakáč/Vejdělek, *Photometrie*, Bd. 1, S. 51. **9)** D. T. Englis, L. A. Wollermann, Anal. Chem. 24, 1983 (1952). **10)** E. Bottari, P. Ippoliti, R. Porto, Ann. Chim. (Rome) 73, 473 (1983); C. A. 99, 219737y (1983). **11)** R. Klaus, J. Rippbahn, J. Chromatogr. 244, 99 (1982). **12)** Pharmeuropa 14, 77 (2002). **13)** U. Bölsche, Fette, Seifen, Anstrichm. 83, 437 (1981); C. A. 96, 54254m (1982). **14)** Eger/Troschütz/Roth. **15)** A. Baer, H. Krämer, Krankenhauspharmazie 4, 117 (1983). **16)** Kakáč/Vejdělek, *Kolorimetrie*, Bd. 2, S. 53. **17)** Kakáč/Vejdělek, *Photometrie*, Bd. 1, S. 69; Ergbd. 1, S. 28; Ergbd. 2, S. 33. **18)** L. c. 16), Bd. 1, S. 71, Ergbd. 2, S. 34. **19)** L. c. 16), Bd. 1, S. 68. **20a)** J. Snyder, B. Franko-Filipasic, J. Am. Oil Chem. Soc. 60, 1269 (1983). **20b)** R. M. Matarese, C. Zamponi, J. Chromatogr. 273, 398 (1983). **21)** L. H. Boobis, R. J. Maughan, Clin. Chim. Acta 132, 173 (1983).

Allgemeine Angaben

Hartfett ist ein Gemisch aus Mono-, Di- und Triglyceriden gesättigter Fettsäuren (C_{12} - bis C_{18} -Fettsäuren, hauptsächlich Laurinsäure; siehe unter „Eigenschaften“), wobei Triglyceride klar dominieren und Monoglyceride nur einen geringen Anteil haben¹⁾. Im Vergleich zu früheren Ausgaben weist die aktuelle Monographie darauf hin, dass Hartfett auf Basis hydrierter Fettsäuren pflanzlichen Ursprungs oder aus hydrierten pflanzlichen Ölen erhalten wird (siehe unter „Darstellung“). Es gibt verschiedene Typen an Hartfett (s.u.), die sich in ihrem Schmelzverhalten sowie ihren Hydroxyl- und Verseifungszahlen unterscheiden.

Die ungünstigen Eigenschaften der Kakaobutter, wie z.B. ihr unregelmäßiges Erstarrungs- und Kristallisationsverhalten infolge Bildung instabiler Modifikationen¹⁻⁵⁾, die Schwankungen ihrer chemischen und physikalischen Kennzahlen und ihr relativ hoher Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, sind beim Hartfett deutlich weniger ausgeprägt. Da Hartfett partialsynthetisch hergestellt wird (siehe unter „Darstellung“), lassen sich erwünschte Eigenschaften gezielter einstellen.

Von den Herstellern werden in der Regel drei Handelsqualitäten (Typen 1 bis 3) produziert (vgl. Tab. 1):

- Typ 1: Universal-Suppositorienmassen für die Verarbeitung in der Apotheke und für die industrielle Großfabrikation
- Typ 2: Produkte für die industrielle Großfabrikation und die Verarbeitung in der Apotheke; besonders für extreme Kühlbedingungen geeignet, mit guten elastischen Eigenschaften
- Typ 3: Spezielle Massen für die Aufnahme schmelztemperaturerniedrigender Pharmaka, auch zur Schmelzpunktkorrektur

Für den Typ 3 werden zudem Qualitäten mit Schmelztemperaturen, die deutlich über die in

Tab. 1 angegebenen hinausgehen (bis zu 44 bis 45 °C, siehe unter „Prüfung auf Reinheit, Schmelztemperatur“) angeboten. Die Substanz ist ebenfalls in der USP sowie im 2. AB/DDR beschrieben, die HELV sowie BP hingegen verweisen auf die Monographie der Ph. Eur.

Schon in der Ph. Eur. 8.8 war die Monographie wesentlich überarbeitet worden. Seither sind die Identitätsprüfungen B und C (DC-Methoden zum Nachweis auf die Abwesenheit von Sojalecithin, Macrogolcetylstearylether, Polysorbat 65 sowie Bienenwachs) neu aufgenommen. Diese Bestimmungen dienen zur Unterscheidung von Hartfett mit Zusatzstoffen, welches in der Ausgabe 8.8 neu als Monographie aufgenommen wurde (siehe den Kommentar zu **Hartfett mit Zusatzstoffen**, Ph. Eur.). Außerdem wurde die Reinheitsprüfung „Unverseifbare Anteile“ gestrichen und die Prüfungen auf Schwermetalle sowie Asche durch die auf Nickel bzw. Sulfatasche ersetzt. Als weitere, wesentliche Ergänzung nimmt die aktuelle Monographie am Ende Bezug auf funktionalitätsbezogene Eigenschaften. Für Hartfett werden in diesem Zusammenhang die Schmelztemperatur, die Hydroxylzahl sowie die Verseifungszahl angeführt und auf deren jeweilige Prüfung auf Reinheit verwiesen.

In der Ph. Eur. 9.0 sind nur marginale Änderungen vorgenommen worden.

Darstellung: Hartfett kann auf zwei Arten erhalten werden, zum einen durch Veresterung von hydrierten Fettsäuren oder durch Umesterung hydrierter Pflanzenöle. Als Ausgangsprodukt dienen in beiden Fällen Palmkern- oder Kokosfett, die einen relativ hohen Gehalt an gesättigten Fettsäuren mit niedriger relativer Molekülmasse aufweisen, z.B. 37 bis 51 % Laurinsäure (C_{12}). Bei der Herstellung durch Veresterung wird zunächst das Naturprodukt verseift und das anfallende Fettsäurengemisch zur Entfernung der in geringeren Mengen (< 20 %)

Tab. 1: Kennzahlen von Hartfetten der Typen 1 bis 3

	1	2	3
Schmelztemperatur [°C] (Steigschmelzpunkt)	33,5–35,5	33,5–35,5	36–39
Erstarrungstemperatur [°C] (Shihoff-Methode)	32,0–34,5	27,0–31,0	32–36
Säurezahl	< 0,3	< 0,3	< 1,3
Hydroxylzahl	< 15	35,0–45,0	< 15
Iodzahl	< 3	< 3	< 3
Verseifungszahl	225–240	225–240	225–235
Unverseifbare Anteile [%]	< 0,3	< 0,3	< 3

vorliegenden ungesättigten, oxidationsempfindlichen Fettsäuren (z. B. Ölsäure) hydriert. Anschließend wird im Vakuum fraktioniert destilliert, um die niedermolekularen Fettsäuren wie Capron- (C₆), Capryl- (C₈) und Caprinsäure (C₁₀) weitgehend abzutrennen. Dabei geht ein Restanteil von ca. 2% Caprinsäure zusammen mit der Laurinsäure über. Das so gewonnene Fettsäurengemisch wird mit einer berechneten Menge Glycerol unter Einsatz bestimmter Katalysatoren verestert, um die erwünschte Zusammensetzung von Mono-, Di- und Triglyceriden zu erhalten. Dabei bestimmen das Fettsäurespektrum, die Stöchiometrie des Reaktionsgemisches sowie die Reaktionszeiten und -temperaturen die Eigenschaften des Produkts, wie Schmelzbereich, Solid-Fat-Index, Härte, Mono-, Di-, Triglyceridgehalt (Emulgierbarkeit/Dispergierbarkeit) und Viskosität. Bei der Umesterung werden Fettsäuren sowohl intra- als auch intermolekular ausgetauscht (Acylwanderung). Daneben werden bei Hartfetten mit höheren Partialglyceridanteilen durch Alkohololyse Triglyceride in ein Gemisch aus Mono- und Diglyceride überführt. Für die Herstellung von Suppositorienmassen wird in der Regel die sog. Einphasen-Umesterung durchgeführt, wodurch die Zahl der Glyceridarten erhöht und die Verteilung der Fettsäuren verbreitert wird, sodass die Einstellung eines weiten Schmelzbereichs möglich wird⁶⁾.

Das Schmelz- und Erstarrungsverhalten wird durch Auswahl der Fettsäurenkomponenten (je länger-kettiger die Fettsäure, desto höher die Schmelztemperatur), durch Mischung mit höher schmelzenden Fetten (Glyceriden) und durch Änderung der Hydroxylzahl gesteuert. Die Hydroxylzahl kann ihrerseits variiert werden durch Änderung des Verhältnisses von Fettsäuren und Glyceriden, durch Mischen von zwei Qualitäten mit unterschiedlichen Hydroxylzahlen oder durch Zugabe von Mono- oder Diestern zum Triglycerid. Des-

halb können bei gleichen Fettsäuren und gleichen Hydroxylzahlen Produkte mit unterschiedlichen Eigenschaften entstehen, die für spezielle Wirkstoffe und Herstellungsverfahren maßgeschneidert sind.

Verwendung: Hartfett wird vorwiegend als Grundmasse für rektale und vaginale Arzneizubereitungen verwendet. Insbesondere im pädiatrischen Bereich stellen Suppositorien zur rektalen Applikation weiterhin eine wichtige Arzneiform dar⁷⁾. Hartfett wird grundsätzlich als nicht toxisch und gut verträglich angesehen. Einzelne Studien deuten für Suppositorienmassen, insbesondere solche mit hohen Hydroxylzahlen, einen irritierenden Effekt auf die Rektalschleimhaut an⁸⁾. Die Freigabe von Wirkstoffen aus der Grundlage nach dem Schmelzen ist in der Regel einwandfrei. Allerdings muss auf eine gleichmäßige Verteilung der Wirkstoffe und eine geeignete Partikelgröße geachtet werden. Zur Erzielung einer optimalen Stabilität und guten Wirksamkeit müssen mitunter mehrere Suppositoriengrundlagen mit unterschiedlichem Schmelzverhalten und verschiedenen Hydroxylzahlen zum Einsatz kommen. Zum Schutz gegen Sedimentationsvorgänge von dispergierten Stoffen während des Ausgießens kann ein Zusatz von hochdisperser Kieselsäure, beispielsweise Aerosil[®], zweckmäßig sein (siehe den Kommentar zu **Zubereitungen zur rektalen Anwendung**, Ph. Eur.).

Suppositorien lassen sich grundsätzlich auch durch Verpressen von Wirkstoffen mit Fettprodukten und verzweigten Fettalkoholen auf normalen Tablettenmaschinen oder durch Extrusion gewinnen. Die technische Großproduktion erfolgt heute allerdings fast ausschließlich mittels Gießverfahren. Im Gegensatz zur industriellen Fertigung wird bei der Herstellung von Suppositorien in der Apotheke das Cremeschmelzverfahren angewendet, um die als

Kristallisationskeim wirkende höher schmelzende, stabile β -Modifikation (siehe unter „Eigenschaften“) nicht zu entfernen. Durch die Cremeschmelze wird ferner eine Umwandlung der zunächst auch entstehenden metastabilen (β') in die stabile Modifikation beschleunigt⁹⁾. Schmelzzeitveränderungen von Suppositorien (Nachhärtung) sind auf einen Modifikationswechsel zurückzuführen¹⁰⁾ und bei der Entwicklung und Stabilitätsprüfung von Suppositorien ggf. zu berücksichtigen.

Über den Einfluss von Hilfsstoffen auf die In-vitro-Wirkstofffreisetzung aus Suppositorien wird u. a. in Lit.¹¹⁾ berichtet. Als Hilfsstoffe für Hartfett-Grundlagen wurden Tenside mit unterschiedlichen HLB-Werten sowie mittelkettige Triglyceride in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Hartfett mit Zusatzstoffen (Lecithin, oberflächenaktiven Substanzen, Bienenwachs oder einer Mischung derselben) wurde schon in der Ph. Eur. 8.8 neu als Monographie aufgenommen (siehe den Kommentar zu **Hartfett mit Zusatzstoffen**, Ph. Eur.).

Hartfett kann auch in vielen anderen Fällen, in denen natürliche Fette zum Einsatz kommen, verwendet werden, so für die Salben- und Cremeherstellung oder zur Behandlung von Oberflächen, wie z. B. von Filmdruck, ferner auch als Hilfsstoff für Retardzubereitungen¹²⁾. Darüber hinaus wurde Hartfett als Grundlage von Schmelzgranulaten, Extrudaten oder Lipidnanopartikeln^{13, 14)} beschrieben. Des Weiteren wird Hartfett als Füllstoff in der Rezeptur von Dronabinol-Hartkapseln¹⁵⁾ verwendet.

Die Substanz findet auch im Kosmetik- und Lebensmittelbereich Verwendung.

Synonyme: Adeps neutralis, Neutralfett

Arzneibuchnamen: Massa suppositorium 15 (2. AB/DDR)

Eigenschaften

Hartfett, eine weiße bis fast weiße, spröde Masse von wachsartiger Konsistenz, ist in Wasser praktisch unlöslich und schwer löslich in Ethanol sowie Dichlormethan, dagegen löst es sich gut in lipophilen Lösungsmitteln. Die Löslichkeitseigenschaften der Substanz sind typenabhängig; so zeigt die in der Apotheke hauptsächlich verwendete Qualität eine sehr gute Löslichkeit in 1,5 bis 2 Teilen Diethylether. Typen für Spezialrezepturen mit

Schmelztemperaturen über 37°C können eine geringere Löslichkeit von etwa 1 : 25 aufweisen. Aufgrund des Anteils an Partialglyceriden lässt sich im geschmolzenen Zustand warmes Wasser etwa 1:1 einarbeiten, sodass eine Emulsion entsteht¹⁶⁾.

Hartfett enthält etwa 37 bis 51% Laurinsäure (C₁₂). Der Anteil an Caprinsäure (C₁₀) muss möglichst klein sein, da die zugehörigen Glyceride Kristallisationsverzögerungen bedingen und damit zu leicht schmierigen und weniger lagerungsbeständigen Zäpfchen führen. In Abhängigkeit von der thermischen Vorbehandlung tritt Hartfett in unterschiedlichen Modifikationen (Polymorphie) auf (α : flüssigkristallin-instabil; β' : orthorhombisch-metastabil und β : triklin-stabil)^{9, 10, 17–21)}.

Prüfung auf Identität

Die Prüfung erfolgt mittels DC-Methode und eines charakteristischen R_F -Werts von etwa 0,7 für die Triglyceride. In Abhängigkeit des Anteils von Di- und Monoglyceriden können Flecke bei charakteristischen R_{st} -Werten auftreten. Bei Hartfetten mit niedriger Hydroxylzahl können Mono- und Diglyceride keine oder nur schwache Flecke zeigen, sodass in diesen Fällen zur Bestätigung der Identität zusätzlich die Reinheitsprüfung „Hydroxylzahl“ durchzuführen ist.

Das beschriebene Verfahren eignet sich grundsätzlich zur Trennung von Mono-, Di- und Triglyceriden vom freien Glycerin. Die Bedingungen geben keine ausreichende Trennung der Glyceride entsprechend der Kettenlänge ihrer Fettsäuren. Ebenso sind semiquantitative Schätzungen des Partialglyceridgehalts und der Hydroxylzahl schwierig. Die verschiedenen Hartfettbasen lassen sich mittels GC hinsichtlich ihrer Fettsäure- und Glyceridverteilung unterscheiden⁶⁾.

Zur Unterscheidung von modifizierten Hartfettgrundlagen wird mit den Identitätsprüfungen B und C (ebenfalls DC-Methoden) auf die Abwesenheit von Sojalecithin, Macrogolcetylstearyl ether, Polysorbat 65 sowie Bienenwachs geprüft.

Die USP schreibt keine Identitätsprüfung vor.

Prüfung auf Reinheit

Alkalisch reagierende Substanzen: Diese Substanzen stammen aus dem Raffinationsprozess, der

zur Abtrennung der freien Fettsäuren notwendig ist. Hierzu behandelt man mit Alkali-Laugen und steuert den Prozess zweckmäßigerweise so, dass die Seifen höchstens bis zu einem unteren Titrationsgrenzwert von 0,75 ml 0,01 M-Salzsäure pro 10 g Fett entfernt werden. Im Vergleich zu früher wurde die Einwaage an Fett erhöht, um eine größere Genauigkeit der Bestimmung zu erreichen. Die USP lässt die Prüfung unter ähnlichen Bedingungen, allerdings mit 2,0 g Fett durchführen und nennt äquivalente Akzeptanzkriterien (0,15 ml 0,01 N HCl).

Schmelztemperatur: Der zulässige Bereich liegt bei 30 bis 45 °C. Vom Nominalwert darf die Schmelztemperatur höchstens um 2 °C abweichen. Die entsprechenden Grenzwerte liegen in der USP bei 27 und 44 °C (siehe unter „Beschriftung“), wobei der Schmelzpunkt ebenfalls nicht um mehr als 2 °C vom Nominalwert abweichen darf. Dieser breite Bereich an Schmelztemperaturen ist notwendig, um Schmelzpunktdepressionen oder -erhöhungen, die durch den Zusatz von Arznei- und Hilfsstoffen auftreten, auszugleichen und für die finale Formulierung einen Schmelzpunkt oberhalb einer üblichen Lagertemperatur und unterhalb der Körpertemperatur zu gewährleisten. Durch Kombination verschiedener Hartfettqualitäten ist jeder gewünschte Schmelzpunkt innerhalb des o. a. Bereichs einstellbar.

Die Geschwindigkeit, mit der geschmolzene Hartfette erstarren, hängt von der chemischen Zusammensetzung und der thermischen Vorbehandlung ab. Hierzu wurden nach Lit.²²⁾ rheologische Messungen bei verschiedenen Temperaturen mit Hilfe des Oszillationsverfahrens durchgeführt, während die Substanzen definierten Temperierungszyklen unterworfen wurden. Die Maximaltemperatur dieser thermischen Behandlung beeinflusst den Beginn und die Geschwindigkeit des Erstarrens in starkem Maße. Das unterschiedliche Verhalten verschiedener Hartfetttypen kann zum Gehalt an Tri-, Di- und Monoglyceriden sowie zur Fettsäurezusammensetzung in Beziehung gesetzt werden.

Zur physikalisch-chemischen Charakterisierung von Glyceriden kann die Bestimmung des Solid-Fat-Index (SFI) dienen. Das Rekristallisationsvermögen zu thermostabilen, höher schmelzenden Modifikationen sowie die Entstehung von Sprö-

digkeit hängt mit dem Flüssigfettanteil in der Grundlage zusammen. Der SFI von Fetten gibt das prozentuale Verhältnis von festen zu flüssigen Glyceriden in Abhängigkeit von der Temperatur an. Der SFI lässt daher einen Aufschluss darüber zu, ob Fette bereits bei normalen Lagertemperaturen flüssige Anteile enthalten oder auch bei höheren Temperaturen noch ausreichend hart sind²³⁾. Die Abhängigkeit des SFI von Hydroxylzahl, Schmelzbereich, Glyceridtyp sowie vom Zusatz von Arznei- und Hilfsstoffen wird in Lit.²⁴⁾ diskutiert.

Säurezahl: Im Hartfett können mittelkettige Fettsäuren als Glycerinester vorliegen. Freie Laurinsäure und auch Caprinsäure sind als potentiell schleimhautreizend bekannt, sodass ihr Anteil zu begrenzen ist. Der Maximalwert liegt unverändert bei 0,5, allerdings werden bei der Durchführung der Bestimmung die 5,0 g Fett nunmehr in 20 ml der vorgeschriebenen Lösungsmittelmischung gelöst. Die USP begrenzt auf maximal 1,0.

Hydroxylzahl: Das Arzneibuch lässt einen Wert von höchstens 50 mit einer Abweichung von maximal 5 vom Nominalwert zu. Ist der Nominalwert kleiner als 5 darf die bestimmte Hydroxylzahl höchstens 5 betragen. Die USP legt einen Grenzwert von 70 fest.

Bei Produkten mit einem niedrigen Gehalt an Partialglyceriden und einer Hydroxylzahl von 10 treten naturgemäß höhere Bestimmungsfehler auf, sodass höhere Einwaagen bis zu 12 g empfehlenswert sind.

Die Hydroxylzahl ist ein Maß für die freien Hydroxygruppen in der Hartfettmasse und somit für den Anteil an Partialglyceriden. Mono- und Diglyceride können die Eigenschaften sowohl der Hartfettmasse als auch der wirkstoffhaltigen Suppositorien wesentlich beeinflussen. Hartfette mit hoher Hydroxylzahl beeinflussen die Kristallisation der Triglyceride und erhöhen die Elastizität. Sie sind bei Schockkühlung in der Regel weniger spröde, neigen aber zu einer stärkeren Nachhärtung und weisen somit eine Tendenz zur Erhöhung des Schmelzpunktes auf. Darüber hinaus resultieren höhere Hydroxylzahlen in einer erhöhten Viskosität der geschmolzenen Fette.

Die Stabilität von Wirkstoffen, insbesondere von hydrolyseempfindlichen, wird mitunter durch

Handelsqualitäten mit höheren Hydroxylzahlen ungünstig beeinflusst, sodass Produkte mit niedrigen Hydroxylzahlen zur Erhöhung der chemischen Stabilität eingesetzt werden müssen.

Partialglyceride weisen Tensideigenschaften auf. Dies kann zu einer besseren Auflösung, Benetzung oder Dispersion von Wirkstoffen führen. Bei der Prüfung auf Emulgierfähigkeit von Hartfett kann nur dann eine einwandfreie und weiße Emulsion entstehen, wenn in ausreichendem Maße Mono- und Diglyceride anwesend sind, deren Anteil durch die Hydroxylzahl charakterisiert wird. Man beobachtet bei Handelsqualitäten mit Hydroxylzahlen unter 15, dass dieser Emulgiertest negativ ausfällt. Da für die Hydroxylzahl keine untere Grenze gegeben ist, sind offensichtlich auch diese Typen zugelassen.

Iodzahl: Für eine gute Haltbarkeit von Hartfett hinsichtlich der Anfälligkeit für einen oxidativen Verderb ist eine geringe Iodzahl wichtig. Der Grenzwert von 3 entspricht den Handelsqualitäten. Die USP legt einen Grenzwert von 7,0 fest.

Peroxidzahl: Diese Prüfung bestimmt den Oxidationsgrad von Hartfett und dient somit als Maß für die Verdorbenheit. Die Ph. Eur. fordert einem Maximalwert von 3. Die USP lässt die Peroxidzahl nicht bestimmen.

Verseifungszahl: Der Toleranzbereich ist mit 210 bis 260 etwas weiter gefasst als in der USP, die Werte zwischen 215 und 255 verlangt. Die Ph. Eur. lässt Abweichungen von höchstens 5 % vom Nominalwert zu.

Die Verseifungszahl ist eine für Fette charakteristische Größe und steht mit ihrem Molekulargewicht in direkter Beziehung. Aus der Verseifungszahl kann man allerdings auf keine bestimmte Fettsäurezusammensetzung im Hartfett schließen, da sie sich aus der Summe der verschiedenen Fettsäureanteile ergibt. Außerdem ist das Verhältnis von Mono-, Di- und Triglyceriden nicht festgelegt.

Nickel: Diese Bestimmung ersetzt die frühere Prüfung auf Schwermetalle. Der Grenzwert liegt bei 1 ppm. Die USP lässt nicht auf Nickel oder Schwermetalle prüfen.

Sulfatasche: Auch diese Prüfung war schon mit der Ausgabe 8.8 neu aufgenommen worden, sie

ersetzt die Prüfung „Asche“. Die Ph. Eur. 8.8 ließ noch einen Grenzwert von 0,4 % zu, wohingegen die Ausgabe 9.0 höchstens 0,2 % fordert.

Die USP begrenzt den Glührückstand auf 0,05 %.

Andere Reinheitsprüfungen: Die in der Ph. Eur. 8.0 noch vorhandene Prüfung „Unverseifbare Anteile“ beinhaltet einen Grenzwert von 0,6 %. Die USP enthält diese Prüfung noch und lässt maximal 3,0 % zu. Bei der Bestimmung des Wassergehalts durch Karl-Fischer-Titration ermittelt man Werte von 0,02 bis 0,05 %; in jedem Fall liegen sie unter 0,1 %.

Lagerung

Lichtschutz ist in der Regel durch die Verpackung gewährleistet. Eine Lagerung im Kühlschrank ist nicht erforderlich, jedoch hat die Lagerung mindestens 5 °C unterhalb der nominalen Schmelztemperatur zu erfolgen. Die USP schreibt die Lagerung dicht verschlossen, bei einer Temperatur von 5 °C (oder tiefer) unterhalb des auf der Beschriftung angegebenen Schmelzbereichs vor.

Beschriftung

Anzugeben sind die nominale Schmelztemperatur, die nominale Hydroxylzahl sowie die nominale Verseifungszahl. Die Schmelztemperatur darf nur um 2 °C vom angegebenen Wert abweichen, Hydroxylzahl um 5 Einheiten und die Verseifungszahl um 5 %. Diese Deklaration ist zur Kennzeichnung der jeweiligen Typen notwendig. Die USP schreibt lediglich die Angabe der nominalen Schmelztemperatur vor, welche im Bereich von 27 bis 44 °C liegen muss.

Funktionalitätsbezogene Eigenschaften

Als Eigenschaften, die die Funktionalität von Hartfett und daraus hergestellten festen Darreichungsformen maßgeblich beeinflussen, wurden die Schmelztemperatur, die Hydroxylzahl sowie die Verseifungszahl definiert. Zur Erzielung einer geeigneten Funktionalität sind deshalb Grenzbereiche für diese Eigenschaften definiert worden, deren Einhaltung in den jeweiligen Reinheitsprüfungen überprüft wird.

S. Reichl

H

Literatur

- 1) Fiedler. 2) Bauer/Frömming/Führer, 10. Aufl., S. 467 (2017). 3) K. Bauer in Hager, Bd. 8, S. 330, 6. Aufl. (2007). 4) N. V. Lovegren, M. S. Gray, R. O. Feuge, J. Am. Oil Chem. Soc. 53, 108-112 (1976); C. A. 84, 178434s (1976). 5) A. Huyghebaert, H. Hendrickx, Lebensm. Wiss. Technol. 4, 59-63 (1971); C. A. 75, 87263 h (1971). 6) B. W. Müller, *Suppositorien*, S. 98, Wiss. Verlagsges., Stuttgart 1986. 7) V. Jannin et al., Adv. Drug. Deliv. Rev. 73, 34-49 (2014). 8) C. De Muynck et al., Pharm. Res. 8, 945-950 (1991). 9) E. Nürnberg, D. Schenk, P. Kohl, Pharm. Ztg. 122, 1376-1382 (1977). 10) K. Thoma, D. Precht, P. Serno, Arch. Pharm. (Weinheim) 315, 729-732 (1982). 11) G. Regdon et al., Pharm. Ind. 53, 283-288 (1991). 12) P. Speiser, Sci. Pharm. 37, 14 (1969). 13) J. Vaasen et al., Int. J. Pharm. 429, 1-2, 99-103 (2012). 14) I. Friedrich et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 56, 111-119 (2003). 15) DAC/NRF, Stand: 2018/2, Dronabinol-Kapseln 2,5 mg/5 mg/10 mg (NRF 22.7.). 16) Voigt, 11. Aufl., S. 170 (2010). 17) E. Frede, D. Precht, Fette, Seifen, Anstrichm. 79, 69-75 (1977); C. A. 86, 198287r (1977). 18) J. B. Rossell, J. Am. Oil Chem. Soc. 52, 505-511 (1975); C. A. 84, 42108f (1976). 19) N. V. Lovegren, M. S. Gray, R. O. Feuge, J. Am. Oil Chem. Soc. 53, 83-88 (1976); C. A. 84, 149447t (1976). 20) J. W. Hagemann, W. H. Tallent, K. E. Kolb, J. Am. Oil Chem. Soc. 49, 118-123 (1972); C. A. 77, 7657t (1972). 21) K. Thoma, P. Serno, Pharm. Ztg. 127, 980-986 (1982). 22) H. Loth, P. Bosché, Pharm. Ind. 58, 161-166 (1996). 23) B. W. Müller, *Suppositorien*, S. 61, Wiss. Verlagsges., Stuttgart 1986. 24) B. W. Müller, I. Hassan, Acta Pharm. Technol. 36, 149-154 (1990).