

10.0/2.02.31.00

## 2.2.31

# Elektrophorese

Die IUPAC definiert Elektrophorese als die Wanderung kolloidaler Partikel in einem elektrischen Feld<sup>1)</sup>. In der Praxis wird die Technik zur Trennung geladener gelöster oder dispergierter Moleküle in einem elektrischen Feld eingesetzt. Man unterscheidet die „klassische“ Elektrophorese (meist als planares Verfahren in Form der Gelelektrophorese) und die Kapillarelektrophorese, bei der die Trennung in einer elektrolytgefüllten Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50 bis 100 µm erfolgt. Während die klassische Elektrophorese zur Analytik von Makromolekülen (Nukleinsäuren und Proteinen) dient, können mittels Kapillarelektrophorese neben Makromolekülen auch niedermolekulare Substanzen analysiert werden. Der vorliegenden Text beschreibt die klassische Variante, während die Kapillarelektrophorese in 2.2.47 (Ph. Eur.) abgehandelt wird. Die isoelektrische Fokussierung ist ebenfalls ein elektrophoretisches Verfahren, das amphotere Substanzen nach ihren isoelektrischen Punkten trennt. Diese Technik wird in 2.2.54 (Ph. Eur.) beschrieben.

Zu Grundlagen und den verschiedenen experimentellen Durchführungen der elektrophoretischen Verfahren siehe Lit.<sup>2,3)</sup>, zur Terminologie von Trennverfahren siehe Lit.<sup>4)</sup>.

Die Elektrophorese ist kein chromatographisches Trennverfahren, beide Techniken unterscheiden sich in ihrem fundamentalen Trennprinzip. In der Chromatographie erfolgt die Trennung aufgrund unterschiedlicher Adsorption oder Verteilung der Analyte zwischen stationärer und mobiler Phase basierend auf ihrer Lipophilie. Elektrophoretische Verfahren trennen aufgrund unterschiedlicher Ladungsdichte der Analyte; unterschiedliche molekulare Eigenschaften wie Ladungszahl, Größe oder äußere Form, aber auch spezifische Wechselwirkungen mit dem Medium können die Auftrennung eines Substanzgemisches in einzelne Komponenten bewirken.

Der Text ist bezüglich Abschnitt 5 „Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS-PAGE)“ mit der USP und JAP harmonisiert

(siehe auch 5.8, Ph. Eur.); dieses Verfahren ist vor allem für die Analytik von Proteinen wichtig. Die in den ersten vier Abschnitten beschriebenen Grundlagen (Abschnitt 1) sowie relativ unbedeutende Methoden (2. Grenzflächenelektrophorese, 3. Zonenelektrophorese und 4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese in zylindrischen Gelen) finden sich nur in der Ph. Eur.

## 1. Allgemeine Grundlagen

Die Elektrophorese beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einem Elektrolyten unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes. Hauptanwendungsgebiet in der Ph. Eur. ist die Trennung von Proteinen.

Auf ein geladenes Teilchen, das sich in einem elektrischen Feld befindet, wirkt eine Kraft  $F$ , die proportional zu der effektiven Ladungszahl  $z_{\text{eff}}$  und der Feldstärke  $E$  ist [Gl. (1)].

$$F_{\text{el}} = z_{\text{eff}} \cdot E \quad (1)$$

$F_{\text{el}}$  = Kraft, hervorgerufen durch das elektrische Feld

$z_{\text{eff}}$  = effektive Ladungszahl

$E$  = elektrische Feldstärke

Als Folge dieser Kraft wandert das Teilchen bei negativer Ladung zur Anode, bei positiver zur Kathode. Diese Bewegung wird mit zunehmender Stärke des angelegten Feldes beschleunigt, andererseits durch die Reibung gebremst, die sich innerhalb eines definierten Mediums durch das Stokes'sche Gesetz (2) beschreiben lässt.

$$F_w = 6 \pi \cdot r_{\text{eff}} \cdot v \cdot \eta \quad (2)$$

$F_w$  = Reibung

$r_{\text{eff}}$  = effektiver hydrodynamischer Radius des Teilchens

$v$  = Geschwindigkeit des Teilchens

$\eta$  = Viskosität des Mediums

Einfluss auf die Reibung und damit die Wanderungsgeschwindigkeit haben die Größe und äußere Form der Teilchen, zu deren Charakterisierung der effektive Radius dient. Hierunter versteht man den Radius eines kugelförmigen Teilchens, das das gleiche Verhalten aufweist wie das betrachtete Teilchen. Die Reibung ist ferner von der Viskosität des Mediums abhängig. Nach kurzer Zeit stellt sich ein Kräftegleichgewicht ein; die Beschleunigung durch das elektrische Feld ist genau so groß wie die Abbremsung durch die Reibung, und das

Teilchen bewegt sich mit einer konstanten mittleren Geschwindigkeit  $v_{el}$  (Gl. 3).

$$v_{el} = \frac{z_{eff} \cdot E}{6\pi \cdot r_{eff} \cdot \eta} \quad (3)$$

Charakteristisch für das Verhalten einer Substanz ist ihre elektrophoretische Beweglichkeit  $\mu_{el}$ :

$$\mu_{el} = \frac{v}{E} \quad (4)$$

$$\mu_{el} = \frac{z_{eff}}{6\pi \cdot r_{eff} \cdot \eta} \quad (5)$$

Die elektrophoretische Mobilität  $\mu_{el}$  scheint auf den ersten Blick eine Stoffkonstante zu sein, die nur durch die Viskosität des Mediums beeinflusst wird, da lediglich der effektive Radius und die effektive Ladungszahl des Teilchens in Gl. (5) enthalten sind. Die elektrophoretische Beweglichkeit ist aber eine gegen Versuchsparameter sehr empfindliche Größe. So ändert sich bei Proteinen die effektive Ladungszahl mit dem pH-Wert. Im sauren Milieu liegen freie Aminogruppen protoniert vor, das Protein besitzt somit einen Überschuss positiver Ladungszentren. Durch Änderungen der Art der Ionen des Hintergrundelektrolyten (z.B. durch Austausch von Chlorid gegen Phosphat) oder durch die Änderung der Konzentration des Elektrolyten kann sich die Hydrathülle der Proteine und damit ihre Quartärstruktur ändern. Änderungen in der Lösungsmittelzusammensetzung können größere Änderungen der räumlichen Struktur der Proteine zur Folge haben, was mit einer Erhöhung oder Verminderung der effektiven Teilchengröße verknüpft ist. Alle experimentellen Details müssen deshalb sehr genau eingehalten werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Weiterhin gilt es zu bedenken, dass Moleküle nicht die Gestalt einer Kugel besitzen, für die die Beziehungen gelten. Für nichtsphärische Moleküle wie Proteine wurde experimentell der Zusammenhang zwischen relativer Molekülmasse und elektrophoretischer Mobilität abgeleitet:

$$\mu \sim \frac{z}{M_r^{\frac{2}{3}}} \quad (6)$$

Einige Materialien wie Glas, Agarose oder Cellulose bilden aufgrund der Dissoziation acider

Gruppen bei Kontakt mit Elektrolytlösungen eine elektrische Doppelschicht aus. Ist z.B. die Oberfläche des Materials negativ geladen, werden diese auf der Lösungsseite durch positive Ladungen (Kationen) kompensiert. Beim Anlegen einer Spannung bewirkt die kationische Gegenladung einen zur Kathode gerichteten Massenfluss der Elektrolytlösung, den elektroendosmotischen Fluss (auch elektroosmotischer Fluss, EOF, genannt). Die Geschwindigkeit des EOF,  $v_{eof}$ , ist eine Funktion der Permittivität der Elektrolytlösung, des Zetapotentials der Ladungsschicht, der Viskosität der Lösung und der elektrischen Feldstärke:

$$v_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot E}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad (7)$$

$\varepsilon$  = Permittivität der Elektrolytlösung

$\zeta$  = Zetapotential

$\eta$  = Viskosität der Elektrolytlösung

$E$  = elektrische Feldstärke

Der EOF wirkt auf alle Teilchen in einer Lösung gleichermaßen, sodass sich die für einen Analyten beobachtete Wanderungsgeschwindigkeit als summarische Größe der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und der Geschwindigkeit des elektroendosmotischen Flusses ergibt. Durch die angelegte Spannung kann es aufgrund der entstehenden Joule-Wärme zu lokaler Verdunstung der Elektrolytlösung in den Poren kommen. Dadurch wandert die Pufferlösung von den Enden des Trägers zum Zentrum hin, sodass die Ionenstärke im Trennsystem nicht mehr gleichmäßig ist, was zu einer Änderung der Beweglichkeit der Teilchen führt. Aufgrund der Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen von den experimentellen Bedingungen sowie der oben beschriebenen Effekte muss unter definierten experimentellen Bedingungen – am besten unter Verwendung von Referenzsubstanzen – gearbeitet werden.

## 2. Grenzflächenelektrophorese (trägerfreie Elektrophorese)

Die englische Bezeichnung des Abschnitts lautet „free or moving boundary electrophoresis“. Diese 1939 von Tiselius entwickelte Methode der elektrophoretischen Trennung eines Substanzgemisches arbeitet in einem U-förmigen Glasrohr. Die Analyt-Ionen befinden sich im unteren U-

förmigen Teil in einer Elektrolytlösung, darüber wird in beiden Schenkeln des Rohrs eine spezifisch leichtere Pufferlösung geschichtet, in die die Elektroden eintauchen. Bei Anlegen einer Gleichspannung wandern die Ionen entsprechend ihrer Ladung und Beweglichkeit in die Grenzfläche zwischen den beiden Lösungen und können dort konduktometrisch, refraktometrisch oder spektralphotometrisch detektiert werden. Da die angelegte Spannung und die Zeitdauer des elektrophoretischen Trennprozesses bekannt sind, kann die Beweglichkeit nach Gl. (8) berechnet werden.

$$\mu_{el} = \frac{s}{t \cdot E} \quad (8)$$

$s$  = zurückgelegte Strecke  
 $t$  = Trennzeit  
 $E$  = elektrische Feldstärke

Bei Kenntnis der effektiven Ladung der aufgetrennten Substanzen lässt sich nach Gl. (5) auch der effektive Radius errechnen, wenn die Viskosität des Trennmediums bekannt ist. Das Verfahren ist messtechnisch relativ aufwändig und besitzt in der pharmazeutischen Analytik keinerlei Bedeutung.

Ein von der Ph. Eur. nicht beschriebenes und für die pharmazeutische Analytik ebenfalls bedeutungsloses Verfahren der (trägerfreien) Zonenelektrophorese ist die Freiflusselektrophorese (Free-Flow-Elektrophorese). Dabei wird ein gleichmäßiger laminarer Flüssigkeitsstrom durch zwei Platten geleitet. Quer zur Fließrichtung wird ein elektrisches Feld angelegt. Dadurch werden die geladenen Teilchen gemäß ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit aus der senkrechten Flussrichtung abgelenkt und verlassen das Trennsystem an unterschiedlichen Stellen am unteren Rand. Sie können dort z.B. in Mikrogefäßen aufgefangen werden, sodass sich das Verfahren zur mikropräparativen Gewinnung von Teilchen eignet.

### 3. Zonenelektrophorese (Elektrophorese auf Trägermaterial)

Die Ph. Eur. verwendet den Begriff der Zonenelektrophorese für Verfahren unter Verwendung von mechanisch stabilen Trägermaterialien. Dies wird im englischen Titel des Abschnitts „zone

electrophoresis using a supporting medium“ klarer herausgestellt als in der deutschen Übersetzung. In der Literatur wird der Begriff Zonenelektrophorese auch für trägerfreie Verfahren verwendet, speziell auch im Format der Kapillarzonenelektrophorese.

Bei der Zonenelektrophorese erfolgt die Trennung der geladenen Teilchen in einem homogenen Puffer mit konstantem pH-Wert über die gesamte Trennstrecke (sog. kontinuierliche Elektrophorese). Die Verwendung eines Trägers bietet den Vorteil einer problemlosen Versuchsdurchführung. Neben der elektrophoretischen Beweglichkeit beeinflusst auch die Größe der Moleküle bedingt durch den Siebeffekt des Gelmediums die Trennung. Weiterhin ist die elektrophoretische Beweglichkeit der Analyte aufgrund des Trägermaterials geringer als bei der trägerfreien Elektrophorese, da die Teilchen Hindernisse umgehen müssen und in den Porenkanälen des Trägers längere Strecken zurücklegen. Weiterhin führen Inhomogenitäten im Träger zu ungleichmäßiger Wanderung. In der Realität ist daher die von den Teilchen durchlaufene Strecke größer als die aus der detektierten Wegstrecke abgeleitete Strecke, sodass sich die Verfahren nicht zur Bestimmung der Beweglichkeit von Substanzen eignen.

Als Trägermaterialien werden vor allem Celluloseacetat, Agarose- oder Polyacrylamidgele verwendet. Celluloseacetat auf einer Trägerfolie ist großporig und übt praktisch keine Siebwirkung auf Proteine aus. Derartige Gele werden auch als nichtrestriktiv bezeichnet. Elektrophoretische Trennungen auf diesen Materialien sind daher nur ladungsabhängig. Die Matrix wirkt kaum der Diffusion entgegen, sodass die getrennten Zonen relativ breit und die Auflösung sowie die Nachweisempfindlichkeit relativ niedrig sind. Vorteile sind einfache Handhabung, schnelle Trennung und Anfärbung. Celluloseacetat-Elektrophorese ist in der klinisch-chemischen Analytik weit verbreitet, z.B. zur Untersuchung der Serumproteine.

Agarosegele sind ebenfalls weitgehend nichtrestriktiv. Agarose ist ein lineares Polysaccharid aus Meeresalgen. Die Substanz wird durch Aufkochen in Wasser gelöst und geliert beim Abkühlen. Dabei lagern sich die Polysaccharid-Helices in Gruppen zu relativ dicken, untereinander verwobenen Fäden zusammen, was dem Gel seine Stabilität verleiht. Die Porengröße kann über die Agarosekonzentration gesteuert werden. Beispielsweise erhält man

150-nm-Poren mit einer 1%igen Lösung, während eine 0,16%ige Lösung ein Gel mit 500-nm-Poren ergibt. Agarosegele werden meist durch Ausgießen der Lösung auf eine Glasplatte oder Trägerfolie hergestellt. Agarosegele sind nicht völlig klar und nicht frei von EOF. Ebenso sind nicht alle Färbungsverfahren problemlos anwendbar.

Die universellsten Gele bestehen aus Polyacrylamid. Sie sind in der Regel restriktiv und die Porengröße ist gut steuerbar. Zu weiteren Ausführungen siehe den Abschnitt 5.1.4.

Die Ph. Eur. setzt das in diesem Abschnitt beschriebene Verfahren der Trägerelektrophorese beispielsweise zur Bestimmung der Proteinzusammensetzung in den Monographien **Albuminlösung vom Menschen** oder **Normales Immunglobulin vom Menschen zur intravenösen Anwendung** ein.

**Apparatur:** Ein Elektrophoresegerät in planarer Anordnung, das häufig bei der kontinuierlichen Trägerelektrophorese eingesetzt wird, ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

Es besteht aus einer regulierbaren Gleichstromquelle (300 bis 6000 V, 150 bis 1000 mA) und einer Elektrophoresekammer mit zwei Elektrodenkammern für die Elektrolytlösungen. In diese tauchen die Elektroden (meist aus Platin), an die die Spannung angelegt wird, ein. Das Flüssigkeitsniveau in den Kammern der Elektrolytlösung muss gleich sein, um eine Siphonwirkung zu vermeiden. Der Kontakt zum Träger wird über Filterpapierstreifen oder poröse Materialien sichergestellt oder das Trägermaterial steht in direktem Kontakt mit der Elektrolytlösung. Die Kammer sollte dicht verschlossen sein, um eine gesättigte Atmosphäre aufrechtzuerhalten und das Verdampfen des Lösungsmittels und somit ein Austrocknen des Trägermaterials zu vermeiden. Weiterhin sollte ein automatisches System vorhanden sein, das beim Öffnen des Deckels die Spannung unverzüglich abschaltet. Ab einer elektrischen Leistung von ca. 10 W sollte das Trägermaterial bei der Analyse gekühlt werden.

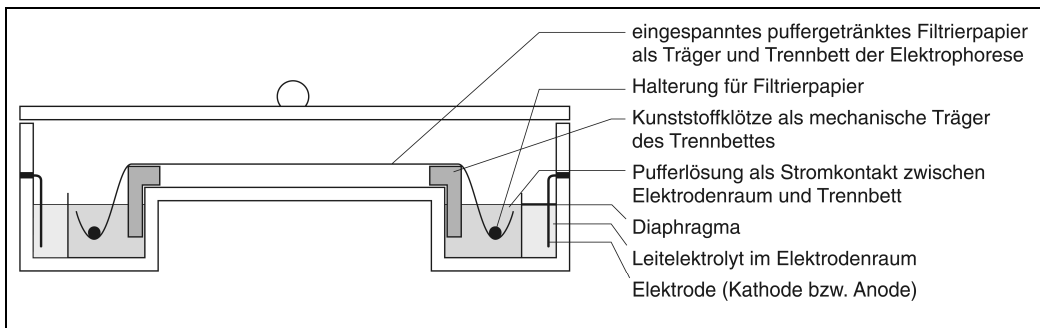


Abb. 1: Schematischer Aufbau einer planaren Elektrophoresekammer

**Ausführung:** Die Elektrodenkammern werden mit der Elektrolytlösung befüllt und das mit Elektrolytlösung imprägnierte Trägermaterial wird in die Kammer eingebracht. Die Probe wird am Start aufgetragen. Nach dem Verschluss der Kammer wird die Spannung für die vorgeschriebene Zeitdauer angelegt. Anschließend wird der Stromfluss unterbrochen, das Trägermaterial entnommen, getrocknet und die Banden in geeigneter Weise sichtbar gemacht (siehe z.B. Abschnitt 5.3).

#### 4. Polyacrylamid-Gelelektrophorese in zylindrischen Gelen

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden die Gele entweder als zylindrische Gele, oder häufiger als planare Gele durch radikalische Polymerisation hergestellt (siehe den Abschnitt 5.1.1). Für diese Variante werden Elektrophoresekammern benötigt, die eine geeignete Haltevorrichtung für zylindrische Gele besitzen. Die Polymeri-

sation zur Herstellung der Gele erfolgt in Röhrchen unmittelbar vor der Analyse. Nach vollständiger Gelbildung werden die Röhrchen so in die Kammer eingebracht, dass die unteren Enden in die mit der vorgeschriebenen Elektrolytlösung befüllte untere Vorratskammer eintauchen. Anschließend werden die Röhrchen vorsichtig mit Pufferlösung überschichtet und die Proben unter Zusatz von Succrose zur Erhöhung der Dichte sowie eines niedermolekularen Markerfarbstoffs auf die Gele aufgebracht. Nach Anlegen der vorgeschriebenen Spannung an die Elektroden wird die Trennung wie vorgeschrieben durchgeführt. Kurz bevor der Farbstoff das untere Ende des Gels erreicht hat, wird die Stromzufuhr unterbrochen und das Gel vorsichtig aus dem Röhrchen ausgestoßen. Die Banden werden nach dem angegebenen Verfahren sichtbar gemacht.

## 5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

Der harmonisierte Abschnitt beschreibt die „klassische“ und häufigste Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung planarer Gele, die durch Polymerisation hergestellt wurden. Diese können eine einheitliche durchschnittliche Porengröße über das gesamte Gel aufweisen (sog. gleichförmige Gele) oder die Porengröße verringert sich über die Trennstrecke (sog. Gradientengele).

Die SDS-PAGE wird zur Analytik von Proteinen eingesetzt. Dabei kommt das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) zum Einsatz, das Proteine solubilisiert und denaturiert. SDS bindet in einem ungefähr konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS pro g Protein an Proteine (entsprechend ca. *ein* Molekül SDS bezogen auf zwei Aminosäuren). Dadurch wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, sodass alle negativ geladene Teilchen zur Anode wandern. Durch die Denaturierung resultieren längliche Proteine, sodass die Trennung weitgehend proportional zur relativen Molekülmasse erfolgt, da größere Proteine durch die poröse Gelmatrix stärker in der Wanderung behindert werden als kleinere. Derartige Gele werden auch als restriktive Gele bezeichnet.

Probleme ergeben sich bei Modifikationen von Proteinen wie N- oder O-Glykosylierung, da die Glykosid-Reste SDS nicht in gleichem Ausmaß adsorbieren wie das Proteingrundgerüst. Dadurch ist die Proportionalität von relativer Molekülmasse und elektrophoretischer Beweglichkeit der Proteine nicht mehr gegeben.

### 5.1 SDS-PAGE – Gleichförmige Gele

#### 5.1.1 Eigenschaften von Polyacrylamidgelen

Polyacrylamidgele werden durch radikalische Polymerisation von Polyacrylamid und bifunktionellen Quervernetzern wie *N,N*-Methylenbisacrylamid hergestellt (siehe den Abschnitt 5.1.4). Polyacrylamidgele sind mechanisch sowie chemisch stabile und klare Gele, die nach der Trennung relativ einfach archiviert werden können. Sie weisen praktisch keinen EOF auf und sind für viele Färbemethoden geeignet. Nachteil ist vor allem die hohe Toxizität der Monomere, die bei der Selbstherstellung von Gelen beachtet werden muss. Außerdem eignen sich die Gele aufgrund der erreichbaren Porengröße nicht zur Analytik von Proteinen mit relativen Molekülmassen > 800 kDa.

#### 5.1.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Denaturierung

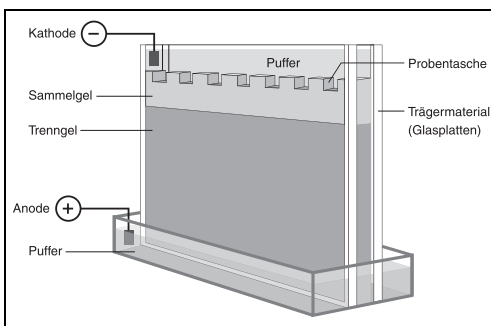
Bei dieser Durchführung wird dem Probenpuffer SDS im Überschuss zu den Proteinen zugegeben und die Probe für 2 bis 5 min auf 95 °C erhitzt. Dabei werden Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgebrochen und die Proteine nehmen eine längliche Gestalt an. Wie oben beschrieben wird SDS an die Proteine adsorbiert (1,4 g SDS pro g Protein), sodass diese Assoziate bei der anschließenden Elektrophorese getrennt werden. SDS befindet sich auch im Elektrophoresepuffer.

**Reduzierende Bedingungen:** Bei dieser Art der Durchführung werden Disulfidbindungen im Protein – in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol (5 % V/V) oder Dithiothreitol (10 mM) für 2 bis 5 min auf 95 °C erhitzt – durch Reduktion gespalten, wodurch die durch diese Bindungen stabilisierte Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine zerstört werden. Die freien SH-Gruppen können durch Alkylierung mit Iodacetamid, Iodessigsäure oder Vinylpyridin geschützt werden. SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen dient zur Bestimmung

der relativen Molekülmasse der Proteine bzw. Proteinuntereinheiten.

**Nicht reduzierende Bedingungen:** Hier wird die Probe nicht in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol erhitzt, sodass die Disulfidbrücken nicht aufgespalten werden und somit keine Dissoziation in Proteinuntereinheiten erfolgt, sofern diese durch Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Dadurch bleibt die dreidimensionale Struktur des Proteins teilweise erhalten. Weiterhin werden nicht reduzierte Proteine nicht vollständig mit SDS gesättigt, weshalb sie einen kleineren Stokes-Radius und damit kleinere scheinbare Molekülmassen als ein vollständig entfaltetes Protein besitzen. Zwar ist deshalb die Bestimmung der relativen Molekülmasse von Proteinen mit diesem Verfahren in der Regel nicht möglich, dennoch kann es informativ sein, ein Protein unter sowohl reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen zu analysieren.

Eine für die Durchführung der SDS-PAGE übliche einfache vertikale Elektrophoreseapparatur ist in Abb. 2 skizziert. Die Gele sind vollständig von Glasplatten und dem Puffer eingeschlossen. Die Proben werden vorsichtig in die Probentaschen unter den Kathodenpuffer unterschichtet. Der Probe ist ein niedermolekularer geladener Farbstoff zugesetzt. Erreicht dieser fast den unteren Rand des Gels, wird die Stromzufuhr abgeschaltet und das Gel zum Anfärben und weiteren Verarbeitung entnommen.



**Abb. 2:** Schematischer Aufbau einer vertikalen Gelelektrophoreseapparatur

### 5.1.3 Eigenschaften der Gelelektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem

Die SDS-PAGE im diskontinuierlichen Format wird auch als Disk-Elektrophorese bezeichnet und in der Regel nach dem von U. K. Laemmli be-

schriebenen Verfahren durchgeführt<sup>5)</sup>. Das vertikal orientierte Gel besteht aus einem Sammelgel und dem Trenngel. Das Sammelgel weist gegenüber dem Trenngel vier prinzipielle Unterschiede (Diskontinuitäten, daher die Bezeichnung Disk-Elektrophorese) auf. Es weist (1) größere Poren auf, (2) ist der pH-Wert des Sammelgelpuffers etwa 2 Einheiten geringer und weist (3) eine geringere Leitfähigkeit auf. Außerdem setzt man (4) unterschiedliche Anionen im Gelpuffer und dem Elektrophoresepuffer ein. Dadurch erfolgt im Sammelgel Aufkonzentrierung der Proteinbanden nach dem Prinzip der Isotachophorese, während im Trenngel die „klassische“ elektrophoretische Trennung nach Größe der Protein-SDS-Assoziate stattfindet. Die wichtigsten Schritte sind in Abb. 3 skizziert. Das großporige Sammelgel (3 bis 4% T) enthält einen 0,125 M Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol)-HCl-Puffer (pH 6,8), das engporige Trenngel (10 bis 20% T) einen 0,375 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,8). Der Elektrodenpuffer (Trennpuffer) besteht aus Tris-Glycin (pH 8,3). Glycin besitzt den isoelektrischen Punkt  $pI = 6,1$  und hat daher beim pH des Sammelgelpuffers nur eine geringe (negative) Ladungsdichte und damit geringe elektrophoretische Mobilität. Glycin ist hydrophil und lagert sich nicht an Proteine an. Das Chlorid-Anion ist unabhängig vom pH negativ geladen und weist eine hohe Mobilität auf. Beim Anlegen der Spannung trennen sich die Proteine im Sammelgel nach dem Prinzip der Isotachophorese als Stapel, basierend auf ihren elektrophoretischen Mobilitäten zwischen dem Leitelektrolyt Chlorid und dem Folgeelektrolyt Glycin. Dabei konzentrieren sie sich in Zonen, was man als Stacking bezeichnet. Aufgrund der großporigen nichtrestriktiven Matrix ist die Mobilität nur von der Ladung abhängig und nicht von der Molekülgröße. An der Grenze zum engporigen Trenngel wirkt auf die Proteinstapel ein Reibungswiderstand, der zur weiteren Zonenschärfung führt. Glycin ist aufgrund der geringen Molekülgröße nicht davon betroffen. Beim deutlich höheren pH-Wert des Trenngels ist die Aminosäure außerdem vollständig negativ geladen, „überholt“ die Proteine und wandert mit Chlorid in der Front. Die Proteine befinden sich im Trenngel daher in einem homogenen Puffersystem und trennen sich nach dem Prinzip der Zonelektrophorese. Die Mobilität wird nun neben der Ladung zusätzlich durch die Molekülgröße bestimmt. Die Proteine arrangieren sich in neuer Reihenfolge.

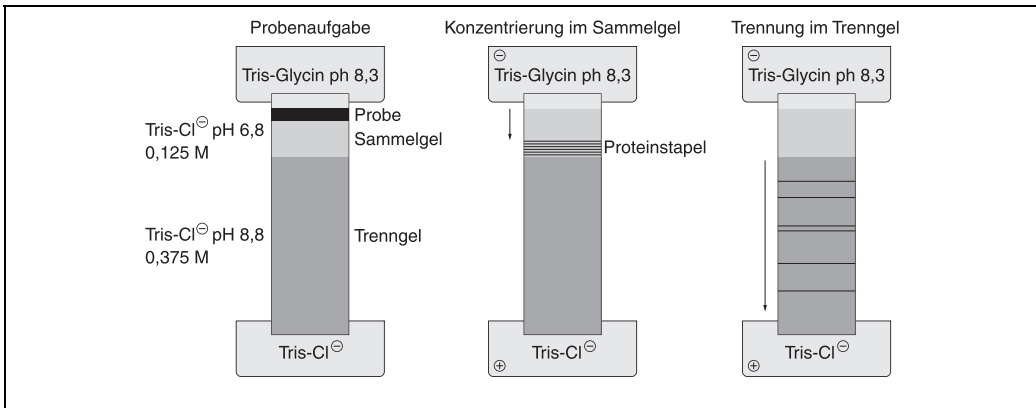


Abb. 3: Schema der diskontinuierlichen SDS-PAGE (nach Lit.<sup>2)</sup>)

Die diskontinuierliche Elektrophorese erreicht hohe Bandenschärfe und Auflösung. Bei „Beladung“ mit SDS sind alle Proteine negativ geladen und wandern zur Anode. Ohne Zusatz von SDS würden beispielsweise im beschriebenen System Proteine mit einem  $pI > 6,8$  zur Kathode wandern. Generell können die Puffersysteme für die Disk-Elektrophorese relativ frei gewählt werden. Wichtig sind unterschiedliche pH-Werte in Sammel- und Trenngel. Außerdem muss das Puffersystem ein beim pH-Wert des Sammelgels vollständig ionisiertes Ion mit hoher Mobilität und ein nur teilweise ionisiertes, daher langsam wanderndes Ion sowie ein gemeinsames Gegenion enthalten. Das vollständig ionisierte Ion weist eine höhere Mobilität auf als die Proteine, das unvollständig ionisierte eine geringere Mobilität.

#### 5.1.4 Herstellung von vertikalen Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamidgelen in diskontinuierlichem Puffer

Polyacrylamidgele werden durch radikalische Copolymerisation von Polyacrylamid (**1**) und *N,N'*-Methylenbisacrylamid (**2**) als Quervernetzer der ansonsten linearen Polymerketten hergestellt (Abb. 4). Dabei dient Ammoniumpersulfat (**3**, APS, Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalstarter und Tetramethylethyldiamin (**4**; TEMED) als Katalysator. Die Porengröße hängt von der Monomer-Gesamtkonzentration  $T$  ( $T$ -Wert, Gl. 9) und dem Vernetzungsgrad  $C$  ( $C$ -Wert, Gl. 10) ab und lässt sich exakt und reproduzierbar einstellen.

$$T = \frac{m_{\text{Monomer}} + m_{\text{Monomer}}}{\text{Volumen (ml)}} \cdot 100 \quad (9)$$

$$C = \frac{m_{\text{Vernetzer}}}{m_{\text{Monomer}} + m_{\text{Vernetzer}}} \cdot 100 \quad (10)$$

$m_{\text{Monomer}}$  = Masse Acrylamid in g

$m_{\text{Vernetzer}}$  = Masse Methylenbisacrylamid in g

Bei konstantem  $C$  und steigendem  $T$  sinkt die Porengröße. Bei konstantem  $T$  und steigendem  $C$  folgt die Porengröße einer parabolischen Funktion, sodass bei hohen und niedrigen  $C$ -Werten große Poren erhalten werden. Bei  $T = 10\%$  liegt das Minimum bei  $C = 4\%$ . Generell sind Gele mit  $C > 5\%$  spröde und hydrophob, sie werden nur in Sonderfällen verwendet.

Die Polymerisation sollte unter Luftausschluss erfolgen, da Sauerstoff als Radikalfänger fungiert. Die Gele werden daher in vertikalen Apparaturen gegossen. Diese bestehen im einfachsten Fall aus zwei Glasplatten, die mit 0,5 bis 1,5 mm starken Abstandshaltern abgedichtet werden. Die Platten werden in eine Standvorrichtung eingespannt und mit der gepufferten wässrigen Polymerisationslösung blasenfrei befüllt. Zum Schutz vor Luftsauerstoff wird mit Wasser-gesättigtem Butanol oder 70%igem 2-Propanol überschichtet. Wird ein aus Sammel- und Trenngel bestehendes Gel gegossen, stellt man zuerst das Trenngel her. Die Alkoholschutzschicht wird anschließend abgegossen und Reste mit Filterpapier entfernt. Anschließend wird die gepufferte Polymerlösung für das Sammelgel blasenfrei eingefüllt. Zur Ausbildung der Proben-taschen wird ein scharfkantiger Kamm eingesetzt

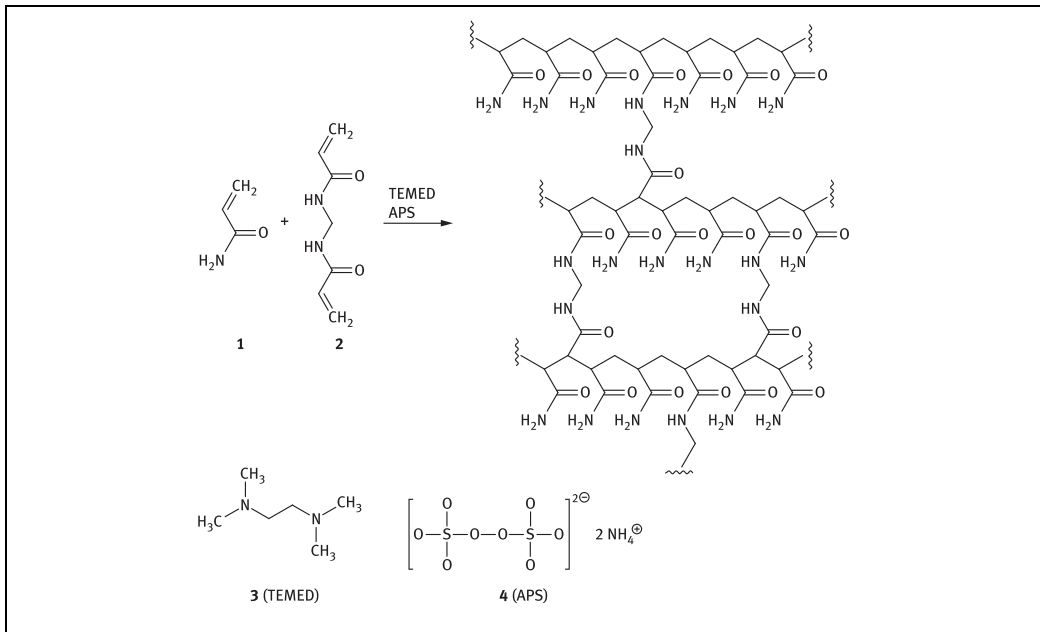


Abb. 4: Schema der Polymerisationsreaktion

und nach erfolgter Polymerisation vorsichtig herausgezogen. Die Polymerisationsgeschwindigkeit ist abhängig von der Temperatur, dem pH-Wert, der Gesamtkonzentration und der Katalysatorkonzentration und liegt je nach Bedingungen zwischen 15 min und einigen Stunden. Aufgrund langsamer Nachpolymerisation sollte ein Gel erst einen Tag nach der Herstellung verwendet werden. Die Zusammensetzung der Polymerisationslösungen für Trenn- und Sammelgele führt die Ph. Eur. in Tabellen auf.

Für die Verwendung in der diskontinuierlichen Elektrophorese wird das Sammelgel erst unmittelbar vor der Elektrophorese aufeinander gegossen, da es bei längerem Stehen zur Diffusion der Puffer-Ionen kommt. Alternativ kann man ein derartiges Gel in *einem* Arbeitsschritt ohne zwischenzeitliches Überschichten mit Butanol herstellen, indem man der Trenngel-Lösung Glycerin zusetzt und direkt mit der Sammelgel-Lösung überschichtet. Bei diesen Gelen gibt es keine Probleme mit der Diffusion der Puffer und sie können länger gelagert werden. Allerdings ist die Lagerdauer durch den hohen pH-Wert des Trenngels begrenzt, da nach ca. 10 bis 14 Tagen langsame Hydrolyse der Polyacrylmatrix einsetzt. Kommerzielle Fertiggele werden daher mit anderen

Puffern, beispielsweise einem Tris-Acetat-Puffer (pH 6,7) hergestellt. Bei diesen Gelen wird Tricin (*N*-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin) im Elektrodenpuffer mit einem pH-Wert von 8,3 eingesetzt. Für weitere Angaben siehe auch Lit.<sup>2,3</sup>.

## 5.2 SDS-PAGE – Gradientenkonzentrationsgele

Zu allgemeinen Ausführungen zur Herstellung von Polyacrylamidgelen siehe den Abschnitt 5.1.4. Gradientengele weisen abnehmende Porengröße im Verlauf der Trenngele auf. Sie werden durch Veränderung der Acrylamidkonzentration (meist 5 bis 15%) mit Hilfe eines Gradientenmischers bei der Herstellung der Gele erhalten. Im Prinzip stellt man zwei Polymerisationslösungen mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration her und mischt der konzentrierteren Lösung während des Gelgießens die niedriger konzentrierte Lösung zu, sodass die Größe der Poren von unten nach oben zunimmt. Man kann Gele mit linearem oder exponentiellem Porengradienten herstellen.

Nach abgeschlossener Polymerisation wird das Sammelgel auf das Trenngel polymerisiert. Gebrauchsfertige Gele sind auch im Handel erhältlich.



Vorteil der Gradientengele ist, dass damit Proteine getrennt werden können, die in gleichmäßigen Gelen co-migrieren. Dies liegt an dem zusätzlichen diskriminierenden Effekt der Porengröße durch den Siebeffekt. Proteine wandern durch das Gel, bis sie aufgrund ihrer Größe nicht mehr ungehindert durch die Poren wandern können. Zusätzlich erfolgt dadurch eine Anreicherung, sodass schärfere Banden als in gleichmäßigen Gelen resultieren. Weiterhin sind Trennungen von Proteinen über einen weiteren Molekülmassenbereich als mit gleichmäßigen Gelen möglich. Gradientengele werden häufig bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE als Trenngele eingesetzt.

### 5.3 Nachweis von Proteinen in Gelen

Zum Nachweis von Proteinen in den Gelen erfolgt die Anfärbung der Substanzonen typischerweise entweder mit dem Farbstoff Coomassie-Blau (Abb. 5) oder mittels Silberfärbung.

**Coomassie-Färbung:** Eines der wichtigsten Detektionsverfahren zur Visualisierung von Proteinbanden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung ist das Anfärben mit Coomassie (Coomassie-Brillantblau R-250, Säureblau 83). Dabei erfolgt in der Regel zunächst die Fixierung mit 10% Trichloressigsäure in Methanol oder in einem Methanol/Essigsäure/Wasser-Gemisch, da der Coomassie-Farbstoff nur im sauren Milieu an Protein bindet. Die Färbelösung selbst enthält den blauen Farbstoff in verdünnter Essigsäure/Ethanol-Lösung oder er wird der Fixierlösung direkt zugegeben. Zahlreiche weitere Färbeprotokolle sind beschrieben. Probleme bereitet u.U. die Entfernung des überschüssigen Farbstoffs mit verdünnter Essigsäure in Methanol/Wasser als Entfärberlösung. Hierbei können vor allem Proteine mit kleineren relativen Molekülmassen mit ausgewaschen werden. Dies kann durch die vorherige Fixierung mit Trichloressigsäure/Methanol vermieden werden. Da aber auch an Proteine assoziierter Farbstoff ausgewaschen werden kann, handelt es sich um eine Konventionsmethode. Die vorgeschriebenen Konzentrationen und Zeiten müssen vor allem bei einer quantitativen Analyse exakt eingehalten werden. Die Detektionsgrenze liegt üblicherweise bei etwa 1 µg Protein, durch bestimmte Protokolle resultieren aber auch deutlich niedrigere Detektionsgrenzen von wenigen ng Protein<sup>6)</sup>.

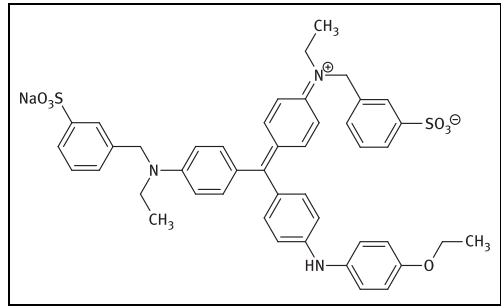


Abb. 5: Strukturformel von Coomassie-Blau

**Silberfärbung:** Das Anfärben mit Silbernitrat ist um das 10- bis 100fache empfindlicher als die Coomassie-Färbung. Sie kann allerdings nicht für alle Proteine eingesetzt werden, da einige (z.B. Troponin C oder Calmodulin) nicht angefärbt werden. Die Proteine werden zunächst mit Hilfe von Formaldehyd in Methanol/Wasser oder mit ethanolischer Essigsäure durch Denaturierung am Gel fixiert. Nach den Waschschritten und der Behandlung mit Glutaraldehyd-Lösung wird ammoniakalische Silbernitrat-Lösung zugegeben. Dabei binden die Silber-Ionen (nichtstöchiometrisch) an die Proteine. Überschüssige Silber-Ionen werden mit Wasser ausgewaschen und anschließend die gebundenen Ionen mit alkalischer Formaldehyd-Lösung oder Citronensäure-haltiger Formaldehyd-Lösung zu elementarem Silber reduziert, wodurch sich die Zonen der Proteine schwarz färben. Abgewandelte Protokolle ermöglichen Detektionsgrenzen im Bereich von 1 bis 0,1 ng Protein<sup>7)</sup>.

Weitere Verfahren unter Verwendung von Farbstoffen wie Amidoschwarz 10 B, Fast Green FCF oder SYNPRO Orange sind beschrieben<sup>2, 3, 8)</sup>. Weiterhin können die Proteine nach Western Blot immunologisch analysiert werden<sup>2, 3)</sup>.

### 5.4 Aufzeichnung der Ergebnisse

Die angefärbten Gele können feucht oder nach geeigneter Trocknung fotografiert oder gescannt und mit kommerzieller Software ausgewertet werden. Zur Archivierung werden die Gele in der Regel getrocknet. Dafür wird das Gel zunächst in eine Glycerol-Lösung eingelegt und anschließend zwischen porösen Cellulosefolien nach sorgfältiger Entfernung von Luftblasen bei Normaldruck oder im Vakuum getrocknet. Getrocknete Gele sind häufig

brüchig und müssen mit Vorsicht behandelt werden.

### 5.5 Bestimmung der relativen Molekülmasse

Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse  $M_r$  von Proteinen wird ihre elektrophoretische Beweglichkeit mit der von Markerproteinen bekannter relativer Molekülmasse verglichen. Die Mischung der Markerproteine, die auch bereits angefärbt sein können, wird auf dem gleichen Gel wie die zu bestimmenden Proteine analysiert. Zur Markierung der Front wird ein geladener niedermolekularer Farbstoff (häufig Bromphenolblau) verwendet. Die Front wird sofort nach der Elektrophorese markiert und anschließend werden die Proteine im Gel mit einer geeigneten Technik angefärbt (s. o.). Als Maß für die elektrophoretische Beweglichkeit wird die Laufstrecke jeder Proteinzone (Markerproteine und Proteine der Probe) vom oberen Rand des Gels gemessen und durch die Laufstrecke des Farbstoffs dividiert. Dieser Wert wird herkömmlich in Analogie zur DC auch als  $R_F$ -Wert bezeichnet. Trägt man die Logarithmen der relativen Molekülmassen  $M_r$  gegen die zugehörigen  $R_F$ -Werte auf, so erhält man näherungsweise eine Gerade. In der Praxis ergibt sich zumeist eine schwach gekrümmte sigmoide Funktion. Die gesuchten relativen Molekülmassen der untersuchten Proteine erhält man aus einer linearen Regression oder durch Interpolation zwischen zwei Referenzproteinen. Eine Auswertung mit Hilfe der linearen Regression ist beim Vorliegen sigmoider Kalibrierfunktionen nur innerhalb des linearen Bereichs möglich.

Eine verlässliche Bestimmung ist nur unter reduzierenden Bedingungen möglich. Unter nicht reduzierenden Bedingungen ist aufgrund sterischer Hinderung durch die vorhandene Tertiär- oder Quartärstruktur des Proteins die Assoziation mit Dodecylsulfat-Ionen möglicherweise nicht mehr direkt proportional zur relativen Molekülmasse, d. h. eine Bestimmung der relativen Molekülmasse nach diesem Verfahren führt zu systematischen Fehlern.

Weiterhin muss bedacht werden, dass im Falle N- und O-glykosylierter Proteine aufgrund der geringeren Adsorption von SDS an die Glykosidreste keine direkte Proportionalität zwischen der relativen Molekülmassen  $M_r$  und den  $R_F$ -Werten besteht.

Die Ph. Eur. prüft mittels SDS-PAGE z. B. **Konzentrierte Erythropoetin-Lösung**, **Konzentrierte Interferon-alfa-2-Lösung** oder **Konzentrierte Interferon-gamma-1b-Lösung**.

### 5.6 Validierung der Prüfung

Um eine Prüfung mittels Gelelektrophorese auswerten zu können, müssen etwa 80 % der Trennstrecke des Gels durch geeignete Molekülmassenmarker charakterisiert werden. Im Bereich der zu bestimmenden Proteine (Monomere oder Oligomere) muss eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der relativen Molekülmasse der Markerproteine und der zurückgelegten Wanderungstrecke (herkömmlich als  $R_F$ -Wert bezeichnet) bestehen. Bei sigmoidem Verlauf der Kurve darf nur der lineare Bereich für Berechnungen berücksichtigt werden. Die Empfindlichkeit muss durch Verwendung eines Referenzproteins in der entsprechenden Grenzkonzentration belegt werden.

### 5.7 Quantitative Bestimmung von Verunreinigungen

Die Auswertung erfolgt durch Verwendung eines Densitometers oder durch Verfahren der Bildanalyse. Wird die SDS-PAGE als Prüfung auf Verunreinigungen eingesetzt, erfolgt die quantitative Auswertung der Gele ähnlich wie bei der Chromatographie mittels Normalisierung und unter Bezug auf eine entsprechende Verdünnung der Untersuchungslösung. Nebenzonen der Untersuchungslösungen dürfen nicht stärker gefärbt sein als diese Verdünnung der Untersuchungslösung. Voraussetzung für eine quantitative Auswertung ist eine ähnliche Empfindlichkeit der Anfärbung der einzelnen Proteinzone.

G. Scriba

## Literatur

1) IUPAC Gold Book, <https://goldbook.iupac.org/terms/view/E02022> (abgerufen am 11.11.2019). 2) R. Westermeyer, *Elektrophorese leicht gemacht*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim 2016. 3) B. Michov, *Electrophoresis: Theory and Practice*, De Gruyter, Berlin 2020. 4) T. A.

Maryutina et al., *Pure Appl. Chem.* 90, 181–231 (2018). 5) U. K. Laemmli, *Nature* 227, 680–685 (1970). 6) D. Kang et al., *Bull Korean Chem. Soc.* 23, 1511–1512 (2002). 7) T. Rabilloud et al., *Electrophoresis* 9, 288–291 (1988). 8) C. M. Wilson, *Methods Enzymol.* 91, 236–247 (1983).

## Allgemeine Angaben

In der Ph. Eur. 10.0 wurden einige Änderungen in der mikroskopischen Abbildung vorgenommen.

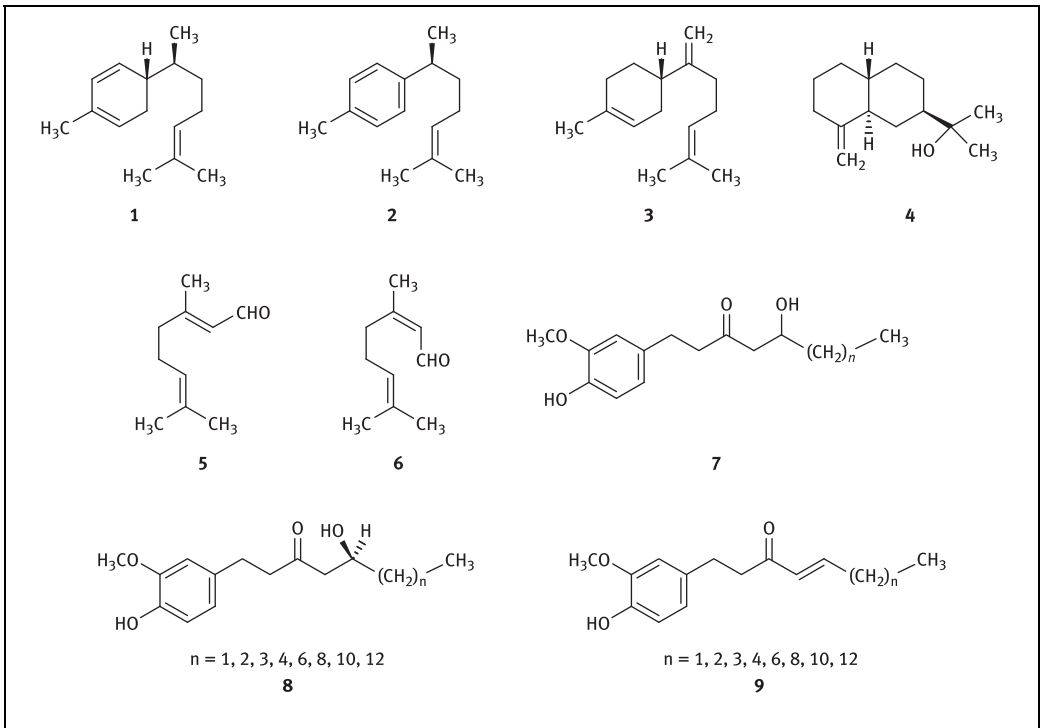
## Definition

**Stammpflanze:** Der Ingwer, *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), ist eine tropische Rhizomstaude. Ihre horizontal im Boden wachsenden, mehrgliedrigen Rhizomknollen sind geweihartig verzweigt, die daran anhängenden Wurzeln fädig. Die Pflanze treibt einen bis über 1 m hohen Scheinstängel aus, der aus mehreren langen, röhrenförmigen Blattscheiden der lineallanzettlichen Blätter gebildet wird. Blütenschäfte, bis 30 cm

hoch, treibt die Pflanze eher selten. Die daran in Ähren stehenden gelben Blüten sind dreizählige, unisymmetrische Röhrenblüten, die von dachziegelartig übereinander liegenden Deckblättern umgeben sind.

Die Ingwerpflanze ist in Südostasien heimisch; ihre ursprüngliche Wildform ist nicht bekannt. Heute ist sie eine wichtige Kulturpflanze der Tropen.

**Droge<sup>1, 2)</sup>:** Das frisch gegrabene Rhizom wird zunächst gesäubert, dann zumeist vorsichtig durch Schälen von der äußeren Korksicht befreit und anschließend in der Sonne 5 bis 6 Tage getrocknet. Als besonders wertvoll, aber auf dem Markt wegen



der geringen Anbaumenge eher selten, gilt der aus Jamaika stammende Ingwer; Bengalischer und Australischer Ingwer liefern ebenfalls eine gute Drogenqualität. Die in Deutschland importierte Ware stammt zum Großteil aus Südchina.

**Andere Drogenamen:** Ginger, Ginger root (engl.); Gingembre, Rhizome de gingembre (franz.); Rizoma di zenzero (ital.); Rizoma de gengibre (span.)

**Inhaltsstoffe<sup>1-5)</sup>:** Die Droge enthält 1,5 bis 3% ätherisches Öl<sup>6, 7)</sup>, das je nach Herkunft und Chemotyp sehr verschieden zusammengesetzt ist; die Ph. Eur. fordert einen Mindestgehalt an ätherischem Öl von 1,5% (ml/100 g). Bisher wurden ca. 160 Komponenten im Ingweröl nachgewiesen<sup>4)</sup>. Zumeist dominieren Sesquiterpene des Bisabolantyps wie (–)- $\alpha$ -Zingiberen (**1**) und (+)-*ar*-Curcumen (**2**), daneben kommen (–)- $\beta$ -Bisabolen (**3**), (*E*)- $\alpha$ -Farnesen, (–)- $\beta$ -Sesquiphellandren u.a. vor. Sauerstoffhaltige Sesquiterpene sind nur in geringen Konzentrationen enthalten, namentlich Sesquiphellandrol und Zingiberol. Letzteres ist ein Gemisch aus (–)- und (+)- $\beta$ -Eudesmol (**4**) und gilt als wesentlicher Geruchsträger. Auch sind zahlreiche Monoterpene enthalten, die ebenfalls wesentlich zum Aroma beitragen, besonders Citral, ein Isomengemisch aus Geranial (**5**) und Neral (**6**), sowie Linalool,  $\beta$ -Phellandren, Campher und andere. Australischer Ingwer enthält relativ viel Citral, was bereits am typisch zitronenartigen Geruch erkennbar ist.

Die Scharfstoffe des Ingwerrhizoms sind nicht flüchtig und weisen eine große Strukturvielfalt auf<sup>8-11)</sup>. Mengenmäßig dominieren die Gingerole (**7**); dies sind Arylalkanone mit unterschiedlich langer, gesättigter aliphatischer Seitenkette, die biogenetisch von einer Fettsäure stammt. Hauptkomponente ist [6]-Gingerol ( $n = 4$ ). Die in [ ] stehende Zahl, hier 6, bezeichnet die Anzahl der C-Atome der an der Biogenese beteiligten Fettsäure. Während der Lagerung von Ingwer können die Gingerole temperaturabhängig zu Shogaolen (**8**; 5-Desoxy-4,5-dehydrogingerole) dehydratisieren. Sie sind deutlich schärfer als die Gingerole; ihr Name leitet sich von jap. „Shoga“ (= Ingwer) ab. Die Gingerole und Shogaole liegen teilweise auch als Sulfate vor<sup>12)</sup>. Außerdem wurden mehrere 1,7-Diarylheptanderivate (Curcuminoid; Zingeron A bis C) sowie Gingerdione, Dehydrogingerdione,

Gingerdiol, Paradole (5-Deoxygingerole) und Di-terpenlactone nachgewiesen. Zingeron (**9**) ist ein Lagerartefakt und wirkt sich aromabeeinträchtigend aus.

Die Droge enthält reichlich Stärke, die auch diagnostisch von Bedeutung ist<sup>12)</sup>. Sie ist sackförmig und hat als Bildungszentrum eine kleine abgerundete Spitze; die Schichtung ist meist nicht zu erkennen.

## Prüfung auf Identität

C. Die DC-Prüfung zielt auf die Gingerole, die Shogaole und das ätherische Öl. Auf Kammer-sättigung wird bewusst verzichtet, um eine bessere Trennung der Gingerole und Shogaole zu erhalten. Die Droge wird mit Methanol extrahiert, der Extrakt auf einer konventionellen Kieselgelschicht (5 bis 40  $\mu$ m) mit einem Hexan-Diethylether-Gemisch (40+60) getrennt. Als Referenzsubstanzen werden Citral (Isomengemisch aus Neral und Geranial, Bestandteile des ätherischen Öls) und Resorcin (nicht in der Droge enthalten, dient zur Beschreibung des Chromatogramms) aufgetragen. Obwohl die Gingerole und Shogaole und die Hauptkomponenten des ätherischen Öls einen aromatischen Ring bzw. konjugierte Doppelbindungen enthalten und deshalb im UV-Licht (254 nm) durch Fluoreszenzminderung nachgewiesen werden könnten, wird eine Platte ohne Fluoreszenzindikator verwendet und diese Eigenschaft nicht genutzt. Nach der Entwicklung wird sofort mit einer 1%igen Lösung von Vanillin in konzentrierter Schwefelsäure besprüht, die DC-Platte dann erhitzt und im Tageslicht ausgewertet. Dabei handelt es sich um einen unspezifischen Nachweis von Terpenen und anderen organischen Substanzen (Bildung von Triphenylmethanfarbstoffen). Die Farbangaben sind bei diesem Reagenz nur als Anhaltspunkte zu verstehen, sie können je nach Erhitzungsgrad und -dauer variieren. Anstelle des vorgeschriebenen Reagenzes mit konzentrierter Schwefelsäure als Lösungsmittel kann mit gleichem Ergebnis das besser versprühbare Vanillin- oder Anisaldehyd-Reagenz verwendet werden (ethanolische Lösung). Bei der Interpretation des Chromatogramms der Untersuchungslösung werden nur die Gingerole

( $R_F$  0,20 bis 0,24, untere Zone [6]-Gingerol) und die Shogaole ( $R_F$  0,43 bis 0,48, untere Zone [6]-Shogaol) angesprochen. Weitere Zonen bilden Citral (2 schwach violette Zonen,  $R_F$  0,66 bis 0,69) und die Terpenkohlenwasserstoffe unterhalb der Fließmittelfront (intensive Zone bei  $R_F$  0,93, u.a. Zingiberen); Resorcin liegt bei etwa  $R_F$  0,35. Abb. in Lit.<sup>1, 13–15</sup>). Die ehemalige Forderung des DAB, dass zwischen den Gingerolen und Shogaolen nur schwächere Zonen vorhanden sein dürfen, bezog sich v.a. auf Zingeron, das eine Zone in diesem Bereich ( $R_F$  0,26) aufweist. Höhere Konzentrationen an Zingeron (Lagerartefakt, siehe unter „Inhaltsstoffe“) weisen auf eine zu lange und nicht sachgemäße Lagerung der Droge hin, die in ihrer geruchlichen Qualität deutlich gemindert ist.

**Andere Identitätsprüfungen:** Die DC-Prüfung kann mit modernen Plattenmaterialien (HPTLC LiChrospher) und präziseren Vorgaben für die DC (Kammertyp, Temperatur) deutlich verbessert werden und ist dann einer Dokumentation mit einem DC-Scanner durch einen Mehrwellenlängenscan (200 bis 280 nm) zugänglich<sup>11</sup>). Auch wird eine Detektion mit DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazylhydrat 95 %, freies Radikal 0,03 %, methanolische Lösung) empfohlen, wobei die Radikalfängereigenschaften der Gingerole und Shogaole ausgenutzt werden (gelbe Zonen auf violettem Hintergrund).

## Prüfung auf Reinheit

**Wasser:** Der Wassergehalt wird bei Drogen normalerweise in Form des Trockenrückstands bestimmt, bei dem die Droge auf ein konstantes Gewicht getrocknet und gewogen wird. Bei Drogen, die ätherisches Öl enthalten, würden mit dieser Methode die Werte zu hoch ausfallen, da auch der Ölanteil mit erfasst wird. Deshalb muss hier

der Wassergehalt etwas aufwändiger durch Destillation bestimmt werden.

**Andere Reinheitsprüfungen:** Im DAB wurde ehemals der Extraktgehalt durch Extraktion mit Aceton bestimmt (Forderung  $\geq 4\%$ ). Mit dieser Prüfung ließ sich feststellen, ob einer Droge Inhaltsstoffe entzogen wurden, z.B. zur Herstellung von Gewürzextrakten. Da dies immer bei höheren Temperaturen geschieht, verkleistert dabei die Stärke, was sich mikroskopisch im Wasserpräparat gut erkennen lässt. Deshalb wurde im DAB mikroskopisch auch auf verkleisterte Stärke geprüft.

## Gehaltsbestimmung

Die Ph. Eur. fordert einen Mindestgehalt an ätherischem Öl von 1,5 % (ml/100 g). Für die saubere Abscheidung des ätherischen Öls bei der Kreislaufdestillation dient die „Hilfsphase“ Xylol. Da das ätherische Öl bei Ingwerwurzelstock in Ölzellen unter der Korkschicht und in tieferen Gewebeschichten lokalisiert ist, muss die Droge vor der Gehaltsbestimmung pulverisiert werden. Dies darf allerdings erst kurz vor der Bestimmung erfolgen und unter Vermeidung von Wärmeentwicklung, um möglichst wenig ätherisches Öl zu verlieren. Die Destillationszeit von 4 h ist angesichts der Tatsache, dass das Öl vorwiegend aus Sesquiterpenen besteht, angemessen.

Zur Methode siehe den Kommentar zu **2.8.12 Ätherische Öle in pflanzlichen Drogen** (Ph. Eur.).

**Andere Bestimmungsmethoden:** Die Gingerole und Shogaole lassen sich durch kombinierte HPLC/Tandem-MS quantitativ bestimmen<sup>10, 16</sup>).

E. Stahl-Biskup

## Pharmakologische Eigenschaften

Ingwer wird seit Jahrhunderten in Indien und China angebaut und gilt heute weltweit als eines der beliebtesten Gewürze. Das in der Ingwerwurzel enthaltene ätherische Öl bewirkt zusammen

mit dem Scharfstoff Gingerol eine Anregung der Speichel-, Magensaft- und Gallensekretion sowie der Peristaltik und führt somit zu einer Verdauungsförderung<sup>12</sup>). Ebenso kommt es zu einer Tonuserhöhung der Darmmuskulatur sowie zu antimikrobiellen, anthelminthischen, Blutzucker- und Blutlipid-senkenden, immunstimulierenden, antio-

xidativen und antiphlogistischen Effekten. Letztere sollen auf einer Hemmung der Cyclooxygenase und der NO-Synthase beruhen. Zusätzlich wirkt Ingwer in höheren Dosierungen antiemetisch, krampflösend und positiv inotrop. In kleineren klinischen Untersuchungen zeigten Ingwerextrakte eine gute Wirksamkeit bei Schwangerschaftserbrechen und Reisekrankheit. Die antiemetische Wirkung beruht offenbar auf einem Antagonismus an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren.

**Indikationen<sup>15)</sup>:** Die Droge wird bei Appetitlosigkeit und als Digestivum bei subakuter Gastritis sowie bei Dyspepsien und Blähungen empfohlen. Der relativ starke antiemetische Effekt wurde in mehreren Doppelblindstudien bestätigt und wird auf langkettige Shogaole und Gingerole zurückgeführt.

Das HMPC (Ausschuss der EMA) hat Ingwerwurzelstock für das Anwendungsgebiet „Vorbeugend gegen Reisekrankheit mit Übelkeit und Erbrechen“ als medizinisch anerkannt eingestuft (well-established use); für die Anwendungsgebiete „zur Linderung von Symptomen der Reisekrankheit und zur Behandlung leichter krampfartiger Magen-Darm-Beschwerden (Blähungen, Flatulenz)“ wur-

de es als traditionelles Arzneimittel eingestuft (traditional use)<sup>17)</sup>.

In der Volksmedizin wird Ingwer zusätzlich als Expektorans und Adstringens verwendet. In der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) kommt das Rhizom bei Fieber, Husten und Übelkeit zur Anwendung. In der Ayurvedischen Medizin wird die Droge zur Migränebehandlung eingesetzt.

**Dosierung:** Als Antiemetikum 2 bis 4 g frisch zerkleinerte Droge mit etwas Flüssigkeit einnehmen; diese Menge soll die gleiche antivertiginöse Wirkung wie 100 mg Diphenhydramin besitzen, der sedierende Effekt fehlt jedoch<sup>18)</sup>. Die Teebereitung ist bei Ingwer eher unüblich.

**Kontraindikationen:** Bei Gallensteinleiden ist vor der Anwendung ein Arzt zu befragen. Kinder unter 6 Jahren sollten vorsichtshalber nicht behandelt werden.

**Besondere Hinweise:** Aufgrund fehlender Daten sollte die Anwendung größerer Mengen Ingwerwurzel als Antiemetikum in der Schwangerschaft unterbleiben.

M. Neubeck/Mu

## Literatur

1) S. Germer, G. Franz, Dtsch. Apoth. Ztg. 137, 4260–4266 (1997). 2) B. Falch, J. Reichling, R. Saller, Dtsch. Apoth. Ztg. 137, 4267–4278 (1997). 3) S. Germer, *Zingiber*, in: Hager. 4) E. Teuscher, U. Lindequist, M. F. Melzig, *Biogene Arzneimittel*, 8. Aufl., 306–308 (2020). 5) H. Jiang, *Phytochemistry* 67, 1673–1685 (2006). 6) B. M. Lawrence, *Perfum. Flavor.* 30, 70–73 (2005) u. 33, 66–71, (2008). 7) G. Singh et al., *Flavor. Fragr. J.* 20, 1–6 (2005). 8) H. Kikuzaki, S. M. Tsai, N. Nakatani, *Phytochemistry* 31, 1783–1786 (1992).

9) Jianping Ma et al., *Phytochemistry* 65, 1137–1143 (2004). 10) H. Jiang et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 2957–2964 (2005). 11) Eun Mi Koh et al., *Planta Med.* 75, 148–151 (2009). 12) Wichtl, 6. Aufl., S. 704–706 (2016). 13) A. Koch, R. Richter, K. Jahn, *Pharm. Ztg.* 147, 4464–4465 (2002). 14) Rohdewald/Rücker/Glombitza, Bd. 2. 15) DAC, Bd. 4 und 5. 16) Yi Tao et al., *J. Agric. Food Chem.* 57, 10014–10021 (2009). 17) Herbal Medicinal Product Committee [www.ema.europa.eu/](http://www.ema.europa.eu/) (eingesehen 07/2020). 18) H. Wagner, *Pharmazeutische Biologie*, Bd. 2, 6. Aufl., S. 142, Wiss. Verlagsges., Stuttgart 1999.

# Carmellose-Natrium

## Carmellosum natricum

### Allgemeine Angaben

Carmellose-Natrium ist das Natriumsalz einer partiell *O*-carboxymethylierten Cellulose. Bereits für die Ph. Eur. 1997 wurde der Titel von „Carboxymethylcellulose-Natrium“ (Abkürzung: CMC-Na) in „Carmellose-Natrium“ geändert. Die USP behält für das Natriumsalz die alte Bezeichnung jedoch bei (siehe unter „Arzneibuchnamen“).

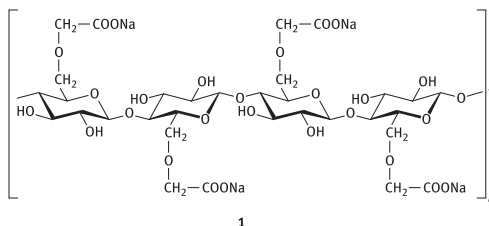
Die Substanz ist das Natriumsalz des Cellulose-Glycolsäureethers **1**. Dem geforderten Natriumgehalt von 6,5 bis 10,8 % entsprechen 0,35 bis 1,22 Carboxymethylgruppen pro Glucose-Einheit. Die Carboxymethylgruppen sind vornehmlich an C-6 der Glucose-Bausteine etherartig gebunden, da die primäre Alkoholfunktion an diesem C-Atom reaktiver ist als die sekundären Hydroxygruppen an C-2 und C-3.

Die USP und JAP beschreiben analoge Produkte mit einem Natriumgehalt von 6,5 bis 9,5 % bzw. 8,5 %, bezogen auf die getrocknete Substanz. Die USP enthält zusätzlich eine Monographie „Carboxymethylcellulose Sodium 12“ mit einem Natriumgehalt von 10,5 bis 12,0 %, entsprechend einem Durchschnittssubstitutionsgrad (DS) an Carboxymethylgruppen von 1,15 bis 1,45 pro Glucose-Einheit. Weiterhin enthält die USP eine Monographie „Croscarmellose Sodium“, dem Natriumsalz einer quervernetzten, partiell *O*-carboxymethylierten Cellulose. Handelsübliche Produkte haben häufig einen DS zwischen 0,4 und 0,8<sup>1)</sup>. Die Bestimmung des DS kann mit der Uranylinitrat-Methode sowie durch Perchlorsäure-Titration erfolgen<sup>2)</sup>.

Schon in der Ph. Eur. 9.0 wurde die Reinheitsprüfung auf Schwermetalle gestrichen.

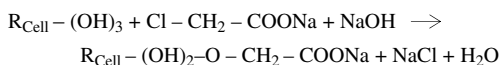
**CAS-Nr.:** 9004–32–4

**PubChem-Nr.:** 23706213



C

**Darstellung<sup>3)</sup>:** Cellulosebogen werden in hydraulische Pressen eingespannt und mit 15- bis 42 %iger Natronlauge bei 20 °C etwa 1 h durchtränkt und anschließend abgepresst. Die so erhaltene Alkalicellulose wird durch Mahlen zerfasert und mit Natriummonochloracetat bei 35 bis 40 °C umgesetzt. Dabei wählt man die Reaktionsbedingungen so, dass sich von jeder D-Glucopyranose-Einheit nur die reaktivste der drei Hydroxygruppen umsetzt. Als Nebenprodukte fallen Natriumchlorid und Natriumglycolat an.



Durch Auswaschen mit wässrigem Alkohol erhält man hochgereinigte Produkte<sup>3)</sup> mit einem Durchschnittspolymerisationsgrad (Anzahl der Glucose-Bausteine pro Molekül) zwischen 500 und 2000.

Eine moderne schnelle und effiziente Methode zur Gewinnung von Carboxymethyl-Hemicellulosen basiert auf einer Mikrowellensynthese, wodurch Produkte mit einem DS > 1,02 und einem günstigeren rheologischen Verhalten im Vergleich zu nativen Hemicellulosen erhalten werden<sup>4)</sup>.

**Stabilität/Lagerung:** Glycerol, Propylen- oder Butylenglycol sowie Ethanol (bis 50 %) und Aceton (bis 40 %) verändern das gleichmäßige Aussehen wässriger Lösungen nicht. Werden beispielsweise Aluminiumsalze zugesetzt, so entsteht nach einigen Stunden ein festes Gel, das bei Zusatz von



Konservierungsmitteln – auch in Gegenwart von Säuren oder bei höherer Temperatur – stabil ist. Im sauren pH-Bereich findet ein geringer hydrolytischer Abbau statt, der mit einer Viskositätsabnahme einhergeht. Bei pH-Werten < 3 wird aus wässrigen Lösungen die freie Säure ausgefällt. Wechselwirkungen mit polyvalenten anorganischen Kationen oder organischen Verbindungen vom Typ der Invertseifen sind zu erwarten.

Die Ph. Eur. gibt keinen Lagerungshinweis, siehe hierzu jedoch die Ausführungen zur Reinheitsprüfung „Trocknungsverlust“.

Auf der Beschriftung sind Angaben zur Viskosität notwendig.

**Besondere Hinweise:** Die Ph. Eur. verzichtet auf eine Gehaltsbestimmung. Sowohl die USP wie auch die JAP titrieren 0,500 g Substanz in 80 ml Eisessig nach 2-stündigem Erhitzen auf dem Wasserbad und Abkühlen auf Raumtemperatur mit 0,1 M-Perchlorsäure bei potentiometrischer Endpunktanzeige. Lit.<sup>5)</sup> beschreibt den Einsatz eines Rasterelektronenmikroskops als modernes analytisches Verfahren, um den Substitutionsgrad von Carmellose-Natrium exakt zu bestimmen.

**Toxizität:** Während für die perorale und lokale Anwendung keine toxikologischen Bedenken bestehen, sollte CMC-Na für Injektionspräparate nicht verwendet werden. Nach subkutaner Injektion von CMC-Na-Lösungen wurden mit einer Latenzzeit von 5 bis 18 Monaten im Bereich der Injektionsstelle Fibrome bzw. Sarkome bei 4 von 259 Ratten festgestellt<sup>6)</sup>. Eine wässrige Suspension mit 2 bis 4 % CMC-Na, 48 bis 50 % Bariumsulfat und 46 bis 50 % Wasser war für weiße Ratten praktisch untoxisch und kann daher bei der Bronchographie verwendet werden. Beim Kaninchenversuch wurden die Reste innerhalb von 2 bis 3 Tagen nach der bronchographischen Aufnahme selbsttätig entfernt<sup>1)</sup>. Nach Injektion eines Stereoidgels auf CMC-Basis im Wundbereich wurde eine kutanvaskuläre Allergie vom Soforttyp gegenüber CMC beobachtet<sup>1)</sup>.

**Verwendung:** Durch Zusatz von CMC-Na kann die Viskosität wässriger Systeme erhöht werden. Suspensionen und Emulsionen erhalten dadurch eine bessere Stabilität. Das DAB 1999 beschrieb ein Carmellosegel, das 5 % CMC-Na 600 sowie 10 % Glycerol (85 %) in Wasser als Lösungsmittel enthält.

Werden Lösungen in dünner Schicht getrocknet, so entstehen folienartige Trockengele (Xerogele), die durch Zusatz von Weichmachern – z.B. 10 bis 30 % Glycerol – eine günstige Flexibilität erhalten. Für die Tablettierung und Herstellung von Kapselfüllmassen ist CMC-Na als Bindemittel und Sprengmittel geeignet. Durch Zusatz von ca. 1 % CMC-Na kann eine günstige Beeinflussung der Zerfallszeit von Komprimaten erreicht werden; höhere Konzentrationen als 5 bis 10 % bewirken eine Zerfallsinhibition unter Ausbildung einer mehr oder weniger stabilen Hydrokolloidmatrix. Der Einfluss des Polymerisations- und Substitutionsgrades auf den Tablettenzerfall und die Auflösung wurde untersucht: Ein höherer Polymerisationsgrad und eine geringere Zahl von Carboxymethylgruppen begünstigen den Zerfall<sup>7)</sup>.

Wässrige Lösungen von CMC-Na sollten antimikrobiell wirksame Zusätze enthalten. Bei einer möglichen Wärmebehandlung ist zu berücksichtigen, dass die Viskosität abnimmt. Der Einfluss des pH-Werts, der Temperatur und der Verdünnung auf das rheologische Verhalten spielt bei der Herstellung von Augentropfen, die unter Verwendung von Celluloseethern wie z.B. Carmellose-Natrium hergestellt werden, eine wichtige Rolle<sup>8)</sup>. Nanoformulierungen und die Entwicklung von Nanopartikeln auf der Basis von Carboxymethylcellulose erlauben die kontrollierte Abgabe von Arzneistoffen wie z.B. Taxanen<sup>9)</sup>.

Wegen seiner Fähigkeit, Wasser zu binden, wird der Zusatzstoff vielfach in energiereduzierten Lebensmitteln eingesetzt. Natrium-Carboxymethylcellulose ist ohne Höchstmengenbeschränkung (quantum satis) für Lebensmittel allgemein zugelassen. Ausgenommen sind lediglich unbehandelte und solche Lebensmittel, die nach dem Willen des Gesetzgebers nicht durch Zusatzstoffe verändert werden sollen<sup>10)</sup>.

**Synonyme:** Carboxymethylcellulose-Natrium, Cellulosecarboxymethylether-Natriumsalz

**Arzneibuchnamen:** Carmellose Sodium (JAP), Carboxymethylcellulose Sodium 12 (USP)

## Eigenschaften

Carmellose-Natrium, ein weißes bis nahezu weißes, nach Trocknen hygroskopisches Pulver ist in

organischen Lösungsmitteln (Aceton, wasserfreier Ethanol, Toluol) praktisch unlöslich; die Substanz quillt in Wasser unter Gelbildung und geht bei weiterem Wasserzusatz in eine kolloidale Lösung mit pseudoplastischem Fließverhalten über. CMC-Na löst sich in heißem und kaltem Wasser gleich gut und unterscheidet sich dadurch von **Methylcellulose** (Ph. Eur.), die beim Erhitzen ausfällt. Je höher der Substitutionsgrad und je niedriger die relative Molmasse, umso besser ist CMC-Natrium in Wasser löslich. Das Pulver kann vor der Wasserzugabe mit Ethanol oder Glycerol angefeuchtet werden. Andernfalls empfiehlt es sich, unter kräftigem Rühren dem zuvor erwärmten Wasser die fein gesiebte Substanz zuzusetzen. Im pH-Bereich von 2 bis 10 sind Lösungen stabil; unter pH 2 findet eine Ausfällung statt, und oberhalb pH 10 nimmt die Viskosität stark ab. Freie CMC kann aus wässrigen Lösungen bei pH 2,5 durch Ausfällung mit Alkohol gewonnen werden. In Gegenwart mehrwertiger Kationen, z.B. von Aluminium, Eisen und Chrom, sind die Lösungen weniger stabil als in Gegenwart von Ammonium- oder Natrium-Ionen. Zur Vermeidung eines mikrobiellen Wachstums ist der Zusatz von Konservierungsmitteln sinnvoll. Allgemein finden sich Rezepturhinweise zur Herstellung von Hydrogelen mit Celluloseethern in NRF<sup>(1)</sup>.

## Prüfung auf Identität

- A. Eine wässrige Lösung ergibt durch Zusatz von Kupfersulfat eine Ausfällung des schwer löslichen blauen Kupfersalzes der CMC.
- B. Im Gegensatz zu **Methylcellulose** (Ph. Eur.) bildet CMC-Na beim Erhitzen einer wässrigen Lösung keinen Niederschlag, da die Hydratation von CMC-Na auch bei höherer Temperatur erhalten bleibt.
- C. Analog **Carmellose-Calcium** (Ph. Eur.), bei der auf Calcium geprüft wird, lässt die Ph. Eur. gemäß **2.3.1**, Identitätsreaktion auf Natrium, nachweisen.

**Andere Identitätsprüfungen:** Wird eine 2%ige wässrige Lösung nach Zugabe von einigen Tropfen 4%iger 1-Naphthol-Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure unterschichtet, so bildet sich an der Grenzfläche eine rote bis purpurrote Farbe (USP). Aus der 2%igen wässrigen Lösung scheidet sich nach Zugabe von Bariumchlorid ein schwer lösliches Bariumsalz als weißer Niederschlag ab (USP).

## Prüfung auf Reinheit

**pH-Wert:** Die USP gibt einen pH-Bereich von 6,5 bis 8,5 für die 1%ige Lösung an, die JAP fordert wie die Ph. Eur. einen pH von 6,0 bis 8,0.

**Viskosität:** Der noch in Ph. Eur. 9.0 enthaltene Zusatz „Scheinbare“ Viskosität entfällt, es wird nur noch von Viskosität gesprochen. Auch bei Einhalten der Schergeschwindigkeit von  $10\text{ s}^{-1}$  kann man nicht davon ausgehen, dass mit verschiedenen Geräten gleiche Resultate erhalten werden.

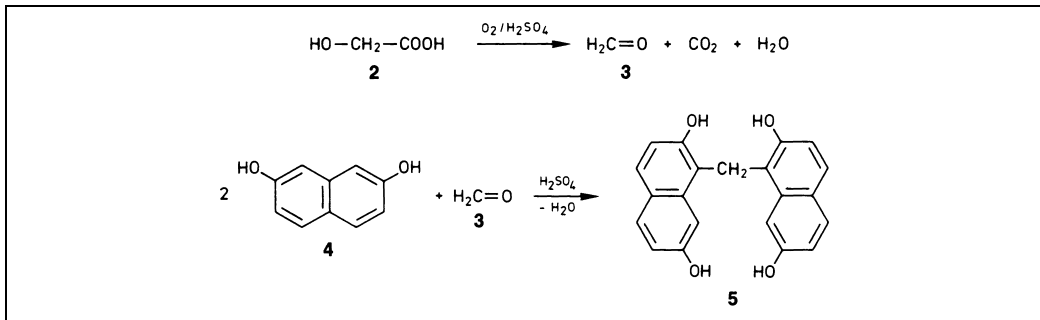
**Natriumglycolat:** Verunreinigungen von Natriumglycolat (siehe unter „Darstellung“) werden extrahiert und durch Vergleich mit der Reinsubstanz kolorimetrisch bestimmt. In der Ph. Eur. 10.0 wird der Gehalt an Natriumglycolat eindeutig festgelegt auf maximal 0,4%, berechnet auf die getrocknete Substanz. Bei der Extraktion ist nach Zusatz von Natriumchlorid und Aceton mehrere Minuten zu rühren, um die vollständige Ausfällung von CMC-Na abzuwarten. Im Filtrat wird durch oxidative Decarboxylierung mit Schwefelsäure aus Glycolsäure (2) zuerst Formaldehyd (3) abgespalten, der im weiteren Reaktionsverlauf mit 2,7-Dihydroxynaphthalin (4) zu farblosem 2,2',7,7'-Tetrahydroxydinaphthylmethan (5) kondensiert<sup>(2–14)</sup>. Die entstehende gelbe Lösung von 5 färbt sich durch Einwirkung von Oxidationsmitteln (hier konzentrierte Schwefelsäure) allmählich tiefrot bis rotviolett ( $\lambda_{\text{max}}$ : 530 bis 550 nm). Die Struktur des entstehenden Farbstoffes ist u. W. noch unbekannt<sup>(2–14)</sup>.

Die gleiche Reaktion kann auch zur Bestimmung von Carboxymethylcellulose (CMC) herangezogen werden, wenn vorher eine Behandlung der CMC mit Phosphortriiodid und Wasser oder mit Schwefelsäure erfolgt, um Glycolsäure (2) abzuspalten<sup>(2–14)</sup>.

**Chlorid:** Bei der Darstellung entsteht Natriumchlorid als Nebenprodukt.

**Trocknungsverlust:** Ein Wassergehalt von maximal 10% kann nur dann eingehalten werden, wenn CMC-Natrium nach der Herstellung getrocknet wurde und die Aufbewahrung in geschlossenen Gefäßen erfolgt. Die hygroskopische Substanz nimmt bei etwa 50% relativer Feuchte ca. 20% Wasser auf<sup>(15)</sup>. Die gleichen Werte fordern die USP und JAP.

C



**Sulfatasche:** Die Ermittlung der Sulfatasche kann indirekt als Bestimmung des Natriumgehalts gelten.

**Beschriftung:** Wie unter „Prüfung auf Reinheit“ wird auch für die Beschriftung nur noch die Be-

zeichnung „Viskosität“ und nicht mehr „scheinbare“ Viskosität verwendet.

W. Kiefer/Schi

## Literatur

1) Fiedler, S. 375 und 1177. 2) K. Thoma, E. Ullmann, P. Loos, Dtsch. Apoth. Ztg. 106, 1206 (1966). 3) K. Balser, in: Ullmann, 4. Aufl., Bd. 9, S. 203 (1975). P. H. List, in: Hager, Bd. 7B, S. 142. 4) X.W. Peng, J.L. Ren et al., J. Agric. Food Chem. 59, 570 (2011). 5) R.K. Singh, O.P. Kahtri, J. Microscop. 246, 43 (2012). 6) M.N. Teller, G.B. Brown, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 18, 225 (1977). 7) N.H. Saha et al., J. Pharm. Sci. 70, 611 (1981). 8) K. Ramaesh, M.Q.

Rahman et al., Eye 26, 1579 (2012). 9) M.J. Ernsting et al., J. Control. Release 162, 575 (2012). 10) EU-Commission, Scientific Committee on Food: Re-evaluation of five modified celluloses, 32. Serie (1994). 11) NRF, Govi-Verlag, Stand 1.10.2013 oder www.dac-nrf.de. 12) Kakáč/ Vejdělek, Photometrie, Bd. 1, S. 350. 13) Kakáč/ Vejdělek, Photometrie, Ergbd. 1, S. 138. 14) Kakáč/ Vejdělek, Photometrie, Ergbd. 2, S. 149. 15) Katalog pharmazeutischer Hilfsstoffe, Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e. V. (APV), Mainz 1974.

# Chlortalidon

## Chlortalidonum

### Allgemeine Angaben

Chlortalidon (**7**) ist ein Thiazid-analoges Diuretikum zur Behandlung der Hypertonie und zur Ausschwemmung von Ödemen.

In der Ph. Eur. 10.0 wurde die in der Ausgabe 6.0 erstmals aufgenommene, strukturell nicht gesicherte Verunreinigung J wieder gestrichen und alle betroffenen Textstellen wurden entsprechend korrigiert. Außerdem wurden einige der in der Transparenzliste aufgeführten Verunreinigungen A bis I gemäß IUPAC-Nomenklatur umbenannt.

Die Substanz ist auch in der USP beschrieben.

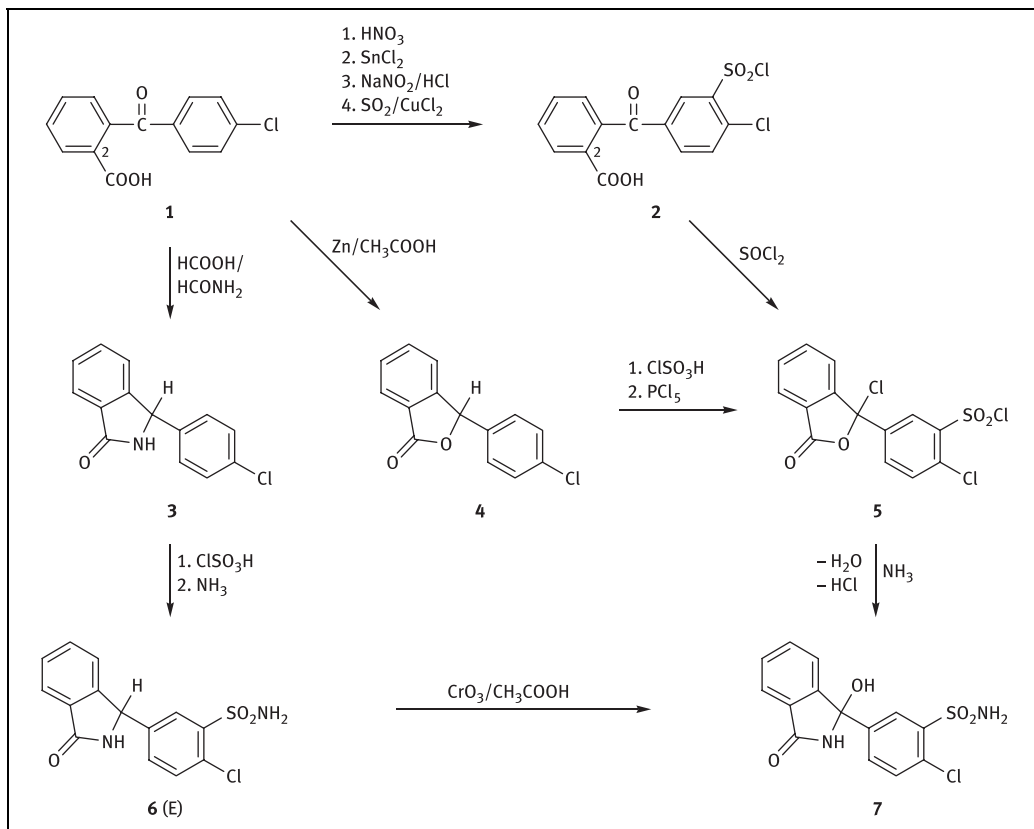
**CAS-Nr.:** 77-36-1

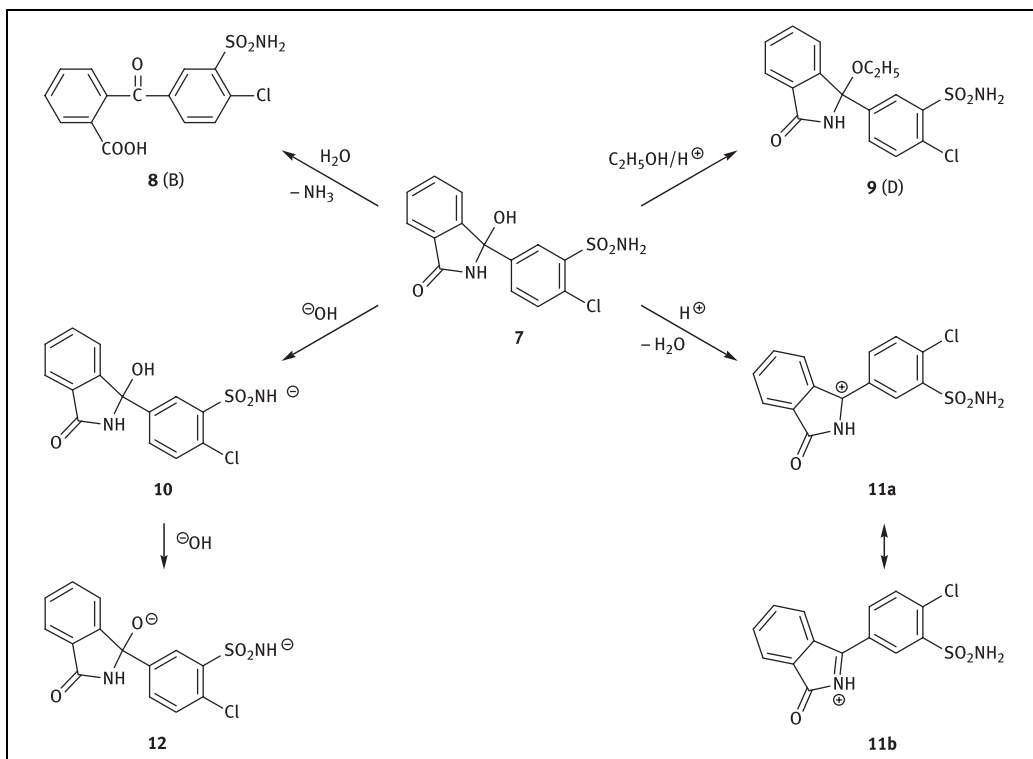
**PubChem-Nr.:** CID 2732

**DrugBank-Nr.:** DB 00310

**Darstellung<sup>1)</sup>:** Die aus Phthalsäureanhydrid und Chlorbenzol nach Friedel-Crafts erhältliche 4'-Chlorbenzophenon-2-carbonsäure (**1**) wird über die sukzessiven klassischen Syntheseschritte der Nitrierung, Reduktion mit Zinn(II)-chlorid, Diazö

C





tierung und Sandmeyer-Reaktion (in der Ausführung nach Körner-Contardi) mit Schwefeldioxid in Gegenwart von Kupfer(II)-chlorid in das entsprechende 3'-Chlorsulfonylderivat **2** übergeführt. Daraus erhält man durch Chlorierung mit Thionylchlorid ( $\text{SOCl}_2$ ) das Chlorphthalidderivat **5**, das schließlich mit Ammoniak in ethanolisch-wässriger Lösung beide Chloratome austauscht und Chlortalidon (**7**) bildet<sup>2)</sup>. Im Gegensatz zu den ringoffenen freien Benzophenon-2-carbonsäuren (z.B. **1**, **2** und **8**, B) liegen die entsprechenden Säurechloride und -amide (z.B. **5** und **7**) stets in der tautomeren zyklischen Form (Pseudoform) vor<sup>3)</sup>.

Alternative Synthesewege<sup>4-6)</sup> führen von **1** durch reduktive Zyklisierung mit Ameisensäure/Formamid oder Zink/Essigsäure direkt zur Phthalidstruktur **4** oder unter Einbau eines Stickstoffatoms zum Phthalimidin **3**. Sulfochlorierung von **3** mit anschließender Ammonolyse ergibt Desoxychlortalidon (**6**, E), das zu Chlortalidon (**7**) oxidiert werden kann. Reaktion von **4** mit Chlorsulfonsäure ( $\text{ClSO}_3\text{H}$ ) und Phosphor(V)-chlorid liefert die bereits oben erwähnte Zwischenstufe **5**.

**Stabilität/Lagerung:** Bei normalen Lagerbedingungen ist Chlortalidon (**7**) sehr beständig. In Gegenwart von Wasser, Säuren und Basen erfolgt allmählich Hydrolyse zur Carbonsäure **8** (B), in Gegenwart von Alkoholen und Säuren (auch in Spuren) bilden sich Ether wie z.B. **9** (D).

**Synonyme:** Chlorphthalidolone, Phthalamudin, G 33182, NSC 69200

**Arzneibuchnamen:** Chlorthalidone (USP)

## Eigenschaften

Die Substanz (**7**) ist ein farbloses, weiß bis schwach gelblich weiß erscheinendes, kristallines Pulver, das unter Zersetzung und Gelbverfärbung schmilzt. Je nach Heizrate und An- oder Abwesenheit von Luft schmilzt die Substanz zwischen 215 und 226 °C, bei sehr langsamem Erhitzen werden aber Schmelztemperaturen – durch Bildung eines hoch schmelzenden Zersetzungsprodukts – von bis zu 275 °C gefunden<sup>7)</sup>. Neben der üblicherweise vorliegenden,

aus Methanol kristallisierenden Modifikation ( $\alpha$ -Form, I) sind eine zweite, aus Dichlormethan kristallisierende polymorphe Form mit einem Schmelzbereich von 186 bis 189 °C ( $\beta$ -Form, III)<sup>8</sup>, eine hydratisierte Form (II)<sup>9</sup> sowie ein nichtstöchiometrisches Chloroform-Solvat (IV)<sup>10</sup> bekannt.

Chlortalidon ist eine zweibasische Säure. Das erste Proton gibt die Sulfamoylgruppe ab unter Bildung des Monoanions **10** ( $pK_{a1} = 9,35^{11}$  bzw.  $9,39^{12}$ ), das zweite die Hydroxygruppe des Isoindolrings unter Bildung des Dianions **12** ( $pK_{a2} = 11,6^{12}$ ). In sehr starken Säuren wird Chlortalidon zum mesomeriestabilisierten Carbenium-Iminium-Kation **11a/11b** protoniert<sup>3, 13</sup>. Der scheinbare Verteilungskoeffizient  $\log D$  bei pH 7,4 beträgt  $0,94^{14}$ .

Im UV-Spektrum zeigt die Substanz in ethanolischer Lösung relativ schwache Absorptionsmaxima bei 275 nm ( $\log \varepsilon = 3,28$ ) und 283 nm ( $\log \varepsilon = 3,18$ ), vgl. Abb. 1. Ein weiteres, kürzerwelliges Maximum bei 266 nm ( $\log \varepsilon = 3,23$ ) hebt sich nur ganz knapp von der Umgebung ab<sup>15</sup>.

Das Chlortalidon-Molekül besitzt ein asymmetrisches Kohlenstoffatom und lässt sich in seine Enantiomere auftrennen<sup>16–18</sup>. Die analysenreinen Enantiomere schmelzen unter Zersetzung bei 264 °C (Aceton/Pentan). Die experimentell ermittelten Werte für die spezifische Drehung betragen +140,9 bzw. –140,1 (Dioxan)<sup>19</sup>. In wässriger Lösung liegt ein Gleichgewicht zwischen den Enantiomeren vor, das sich über eine Carbeniumion-Zwischenstufe einstellt. Die Aktivierungsenthalpie von  $\Delta G = 90,4$  kJ/mol ist relativ klein<sup>20</sup>. Zur pH-abhängigen Racemisierung in Gegenwart von Liposomen siehe Lit.<sup>21</sup>. Das Optimum der Konfigurationsstabilität liegt im pH-Bereich 2 bis 4<sup>19</sup>.

1 Teil Chlortalidon löst sich bei Raumtemperatur in ca. 8000 Teilen Wasser, bei 37 °C in ca. 4000 Teilen Wasser. Mit steigendem pH-Wert steigt die Löslichkeit unter Salzbildung kräftig an<sup>15</sup>, sodass weniger als 200 Teile 1 M-Natriumcarbonat-Lösung oder weniger als 10 Teile 2 M-Natronlauge zur Auflösung von 1 Teil Substanz benötigt werden. Chlortalidon löst sich bei Raumtemperatur auch leicht in DMF und DMSO sowie in 18 Teilen Methanol, 27 Teilen Aceton oder 80 Teilen Ethanol. In alkoholischen Lösungen (speziell Methanol<sup>22</sup>) können infolge Etherbildung, die durch kleinste Mengen saurer Verunreinigungen katalysiert wird, Instabilitäten auftreten.

## Prüfung auf Identität

Zur Identitätsprüfung dient lediglich das IR-Spektrum, vgl. Abb. 2. Aufgrund der Polymorphie der Substanz (siehe unter „Eigenschaften“) muss eventuell aus Methanol auskristallisiert werden.

**Andere Identitätsprüfungen:** Bei der Identitätsprüfung durch Messung der UV-Absorption (siehe unter „Eigenschaften“) lässt die USP mit dem Referenzstandard vergleichen und benutzt als Lösungsmittel 2 M-Salzsäure in Methanol. Der sich dabei bildende Methylether stört nicht, da er die gleichen Absorptionseigenschaften hat. In starken Säuren bildet sich das Chlortalidon-Kation **11a/11b** mit einem Absorptionsmaximum bei 348 nm, einer Schulter bei 374 nm und einer ins sichtbare Licht auslaufenden Absorptionsbande<sup>23</sup>. Die Reaktion lässt sich weiterführen und in ihrer Spezifität steigern, indem die entstandene gelbe Lösung einige Zeit erhitzt (z. B. auf 80 °C während 60 min) und nach dem Abkühlen mit etwas  $\alpha$ -Naphthol versetzt wird. Es entsteht eine kräftige rote Farbe, die auf Bildung eines Triarylmethanfarbstoffs zurückzuführen ist<sup>13</sup>. Die gleiche Reaktion zeigt die Carbonsäure **8** (B) in Schwefelsäure, jedoch schon ohne Erhitzen<sup>3, 13</sup>. Zum spezifischen Nachweis und zur Unterscheidung von anderen Diuretika sind weitere DC-<sup>24</sup> und LC-Methoden<sup>25, 26</sup> beschrieben.

## Prüfung auf Reinheit

**Sauer reagierende Substanzen:** Erfasst werden die erste Dissoziationsstufe der relativ starken Carbonsäure **8** (B) ( $pK_{a1} = 3,20$ ;  $pK_{a2} = 9,27^{12}$ ) sowie ggf. aus der Kristallisation stammende Essigsäure. Der zulässige Verbrauch an 0,1 M-Natriumhydroxid-Lösung entspricht einem Anteil von 2,5 % der Carbonsäure **8** (B) oder 0,45 % Essigsäure. Die Begrenzung der Carbonsäure **8** (B) erfolgt allerdings spezifischer und strenger durch die HPLC-Prüfung „Verwandte Substanzen“, sodass die Grenztitration sauer reagierender Substanzen vor allem zur Erfassung von Essigsäure und anderen sauren Verunreinigungen geeignet ist.

C

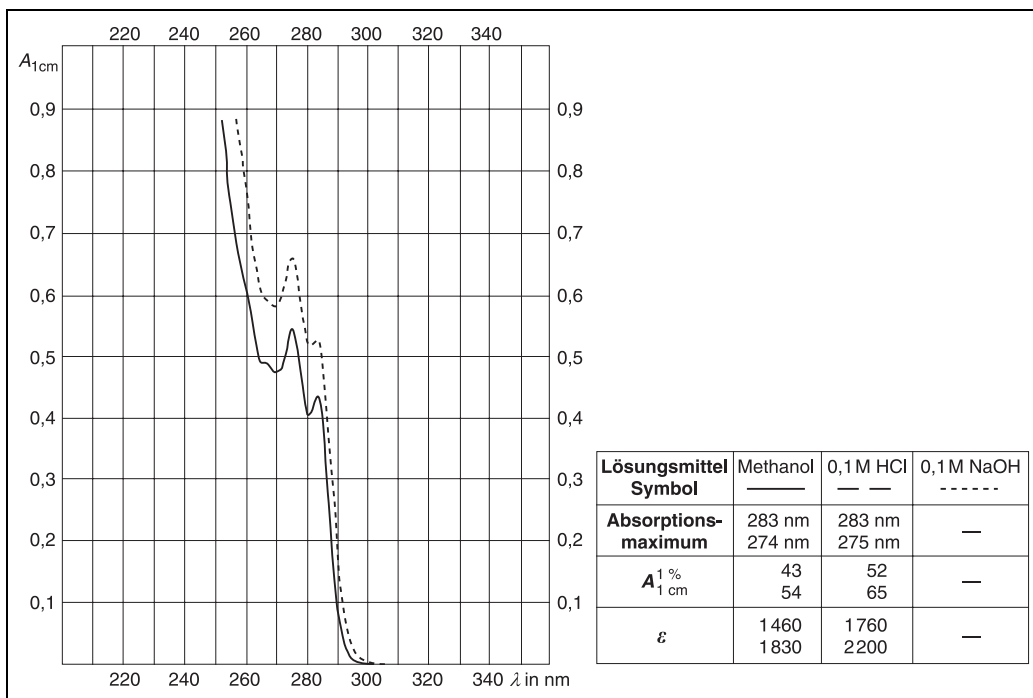
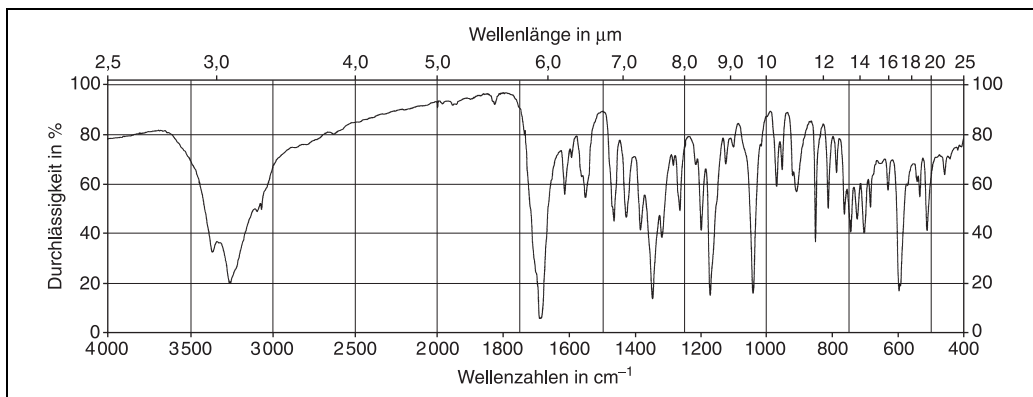
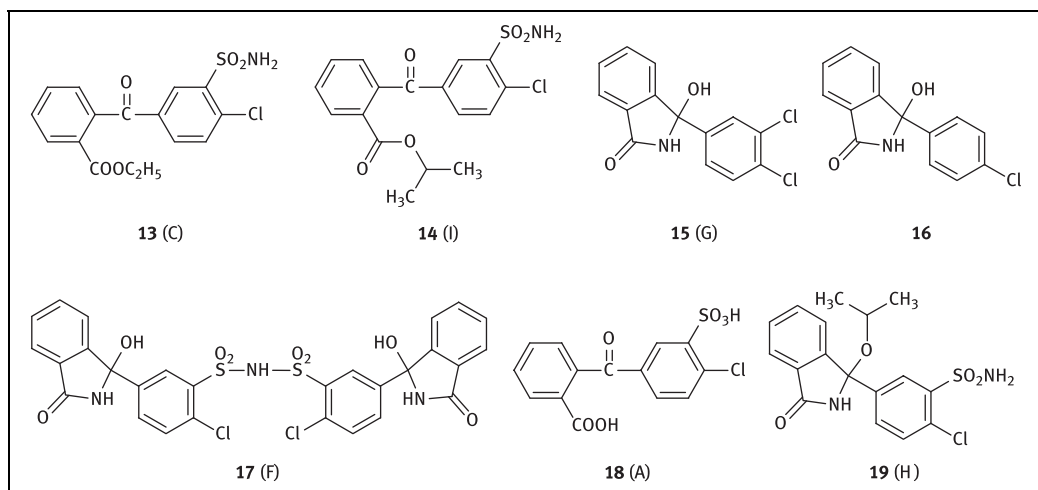
Abb. 1: UV-Spektren von Chlortalidon ( $c = 10\text{ mg}/100\text{ ml}$ ); Dibbern

Abb. 2: IR-Spektrum von Chlortalidon in KBr (2,0 mg in 214 mg)

**Verwandte Substanzen:** Das Arzneibuch prüft mit der HPLC speziell auf die durch Hydrolyse gebildete Carbonsäure **8** (B) und deren Ester **13** (C) und **14** (I), die Synthesenebenprodukte **6** (E), **15** (G), **17** (F) und **18** (A) sowie auf die Ether **9** (D) und **19** (H). Außerdem ist das Nebenprodukt **16** bekannt. Die Systemeignung wird anhand der Auflösung zwischen Chlortalidon und Verunrei-

gung **B** (**8**) unter Verwendung der CRS „Chlortalidon zur Peak-Identifizierung“ überprüft. Die spezifizierten Verunreinigungen **B** (**8**) und **G** (**15**) werden auf 0,7 bzw. 0,2% begrenzt. Jede weitere Verunreinigung darf als Einzelsubstanz 0,10% nicht überschreiten, in der Summe sind maximal 1,2% Nebenprodukte zulässig. Die Berücksichtigungsgrenze liegt bei 0,05%.



Die USP begrenzt die Carbonsäure **8** (B) mit der HPLC auf 1,0 %.

**Chlorid:** Chlorid-Ionen können aus der Synthese stammen.

## Gehaltsbestimmung

Die Gehaltsbestimmung erfolgt mit der bereits zur Untersuchung auf verwandte Substanzen verwendeten HPLC-Methode unter Verwendung von Referenzsubstanz. Die USP schreibt ebenfalls die HPLC vor.

**Andere Bestimmungsmethoden:** Die Farbreaktion mit Schwefelsäure unter Bildung des Chlortalidon-Kations **11** kann unter optimierten Bedingungen ebenfalls zur Gehaltsbestimmung heran-

gezogen werden<sup>23)</sup>. Chlortalidon lässt sich auch mit basischen Farbstoffen als Ionenpaar extrahieren und bestimmen<sup>27)</sup>. Am selektivsten und universell sind die chromatographischen Methoden in Form der LC<sup>28, 29)</sup> und der GC nach Derivatisierung (Methylierung)<sup>30–32)</sup>. Eine UPLC-Methode zur Quantifizierung in biologischen Proben beschreibt Lit.<sup>33)</sup>.

## Metabolisierung

Chlortalidon (**7**) wird unverändert renal ausgeschieden. Metaboliten wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben.

G. Radau, A. Seeling/Scr

## Pharmakologische Eigenschaften

**Pharmakodynamik<sup>34)</sup>:** Chlortalidon entspricht hinsichtlich seiner Wirkungen auf die Elektrolyt- und Wasserausscheidung, den Blutdruck und den Stoffwechsel den Diuretika vom Thiazid-Typ (siehe auch den Kommentar zu **Hydrochlorothiazid**, Ph. Eur.). Chlortalidon hemmt vorwiegend im distalen Tubulus die Natriumreabsorption, wobei maximal etwa 15 % des glomerulär filtrierten Natriums ausgeschieden werden können. Das Ausmaß der Chlo-

rid-Ausscheidung entspricht in etwa dem der Natriumausscheidung. Durch Chlortalidon nimmt auch die Kaliumausscheidung zu. Bei Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz verlieren Thiazid-Diuretika und Thiazidanaloge wie Chlortalidon in der Monotherapie ihre diuretische Wirkung.

**Pharmakokinetik:** Die Bioverfügbarkeit von Chlortalidon beträgt bei oraler Gabe im Mittel 65 %. Die maximalen Plasmaspiegel (140 bis 260 ng/ml bei Einnahme von 50 mg) werden nach 8 bis 12 h erreicht.



Die wesentlich höhere Chlortalidon-Konzentration im Blut als im Plasma ist durch die Bindung des Wirkstoffs in Erythrozyten bedingt. Nach Erreichen des Verteilungsgleichgewichts befinden sich ca. 98 % der Substanz in den Erythrozyten, an Carboanhydratase gebunden. Im Plasma wird Chlortalidon zu 75 % an Eiweiß, vorwiegend an Albumin gebunden. Das Verteilungsvolumen liegt bei 4 l/kg Körpergewicht.

Plasmaclearance und renale Clearance werden mit 110 und 70 ml/min angegeben. Bei intravenöser Gabe werden 70 % der Dosis in unveränderter Form mit dem Harn ausgeschieden, kleine Mengen erscheinen in den Fäzes. Die Halbwertszeit von Chlortalidon beträgt 40 bis 90 h, die Plasmaspiegel fallen geringfügig rascher als die Blutspiegel ab.

Bei einer Behandlung mit Chlortalidon während der Schwangerschaft liegt beim Neugeborenen der Blutspiegel bei ca. 14 % der mütterlichen Blutkonzentration. In der Muttermilch werden Chlortalidonzentralkonzentrationen von 0,09 bis 0,86 µg/ml erreicht (Blutspiegel 4,1 bis 9,8 µg/ml bei einer Dosis von 50 mg/Tag)

**Indikationen:** Hypertonie; Ödeme infolge einer Funktionsstörung von Herz, Leber oder Nieren; Herzinsuffizienz; Zweilinientherapie bei Diabetes insipidus renalis

**Dosierung:**

- Ödeme und Herzinsuffizienz: Erwachsene initial 1-mal täglich 50 bis 100 mg, Erhaltungstherapie mit 25 bis 50 mg pro Tag
- Hypertonie: Erwachsene erhalten 1-mal initial täglich 12,5 bis 50 mg, Kinder 1 bis 2 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Die Erhaltungstherapie kann alternierend erfolgen.
- Diabetes insipidus: Initial 2-mal täglich 100 mg, zur Erhaltungstherapie 50 mg/Tag

Bei Patienten mit Niereninsuffizienz wird, falls überhaupt Thiazide gegeben werden sollen, eine Vergrößerung des Dosierungsintervalls empfohlen.

**Intoxikation:** Das Ausmaß der Symptome ist vom Elektrolyt- oder Flüssigkeitsverlust abhängig. Durch die verstärkte Dehydratation und Hypovolämie kann es zu Durst, Schwäche- und Schwindelgefühlen, Muskelschmerzen und -krämpfen, Kopfschmerzen, Tachykardie, Hypotonie und orthostatischen Regulationsstörungen kommen. In

schweren Fällen sind Benommenheit, Bewusstseinsstörungen, Lethargie, Verwirrheitszustände, Kreislaufkollaps, paralytischer Ileus und akutes Nierenversagen möglich. Aufgrund von Elektrolytstörungen, insbesondere einer Hypokaliämie, muss mit Müdigkeit, Muskelschwäche, Parästhesien, Paresen, Apathie, Meteorismus, Obstipation, Herzrhythmusstörungen und hypokaliämischem Koma gerechnet werden.

**Nebenwirkungen:** Die wichtigste Nebenwirkung ist der Kalium- und Magnesiumverlust mit der Gefahr einer Hypokaliämie bzw. Hypomagnesiämie. Sie ist dosisabhängig und kann durch eine Ernährungsumstellung sowie die Gabe von Kalium sparenden Diuretika vermieden oder behandelt werden. Weitere Nebenwirkungen sind Blutbildveränderungen, Pankreatitis, Leber- und Nierenschäden, Lungenödeme, Lichtempfindlichkeit, Verschlechterung der Glucosetoleranz, Hyperurikämie sowie ein Anstieg der Serumkonzentrationen von Cholesterolem und Triglyceriden. Innerhalb von Stunden bis Wochen kann es durch das Diuretikum zur Entwicklung eines Engwinkelglaukoms oder zu einer akuten transienten Myopie kommen. Als Folge muss mit einem dauerhafter Verlust des Augenlichts gerechnet werden. Chlortalidon führt zudem bei längerfristiger Gabe zur Hyperkalziämie. Ferner kann eine orthostatische Hypotonie auftreten.

**Kontraindikationen:** Überempfindlichkeit gegen Chlortalidon, Thiazide und/oder Sulfonamide; schwere Niereninsuffizienz, Anurie, Coma hepaticum, akute Glomerulonephritis, Gicht, schwere Hyponatriämie, Hypercalciämie, therapieresistente Hypokali- und -natriämie, Hypovolämie

**Interaktionen:** Nichtsteroidale Antiphlogistika vermindern die Wirkung von Chlortalidon geringfügig. Bei zusätzlicher Einnahme von ACE-Hemmern besteht insbesondere zu Therapiebeginn das Risiko eines massiven Blutdruckabfalls sowie einer Verschlechterung der Nierenfunktion bis zum akuten Nierenversagen. Zentral dämpfende Pharmaka (z.B. Alkohol, Barbiturate, Diazepam) verstärken die Hypotonie. Infolge eines Kaliummangels können Wirkung und Toxizität von Herzglykosiden erhöht werden. Glucocorticoide und Corticotropin sowie Carbenoxolon, Süßholzwurzelextrakte, Droperidol, Ketanserine, Bepidril und

Levomethadyl führen zu einer zusätzlichen Kaliumausscheidung, Kalium sparende Diuretika reduzieren sie. Die Lithium-Toxizität wird durch Chlortalidon über die Hemmung der renalen Ausscheidung erhöht. Bei gleichzeitiger Anwendung von Arzneimitteln, die ein Syndrom des verlängerten QT-Intervalls verursachen können (z.B. Terfenadin, einige Antiarrhythmika der Klassen I und III), besteht ein erhöhtes Risiko für Arrhythmien inklusive Torsades de pointes. Bei gleichzeitiger Anwendung von Zytostatika (z.B. Cyclophosphamid, Fluorouracil, Methotrexat) muss mit verstärkter Knochenmarktoxizität gerechnet werden. Chlortalidon vermindert die Wirkung von Vitamin-K-Antagonisten. Acetazolamid verdrängt Chlortalidon aus der Bindung an die Carboanhydratase.

**Besondere Hinweise:** Während der Behandlung müssen Leber- und Nierenfunktion, Blutzucker-, Harnsäure- und Elektrolytspiegel überwacht werden. Bei täglicher Einnahme von Chlortalidon ist allerdings eine effiziente Kaliumsubstitution nicht möglich, da Kalium-Ionen während der anhaltenden Diurese sofort wieder ausgeschieden werden. Bei Präeklampsie sind – infolge des ohnehin verminderten Blutvolumens und mangelhafter Perfu-

sion der Plazenta – Diuretika kontraindiziert; es besteht die Gefahr eines verminderten intrauterinen Wachstums.

**Bewertung:** Chlortalidon ist ein mit den Thiaziden verwandtes Diuretikum zur Behandlung der arteriellen Hypertonie, der Herzinsuffizienz sowie von akuten und chronischen Ödemen. Infolge der langen Verweildauer im Organismus hält die diuretische Wirkung von Chlortalidon mit mindestens 48 h länger als bei den meisten anderen Thiaziden an. Diuretika wie Chlortalidon sind wie  $\beta$ -Adrenozeptorblocker einer Reihe anderer Antihypertonika wie z.B. Calciumkanalblockern hinsichtlich der Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Letalität überlegen. Nach Gabe von Thiazid-Diuretika wie Chlortalidon sind im Gegensatz zu  $\beta$ -Adrenozeptorblockern weder bei Asthma noch bei peripheren Verschlusskrankungen negative Auswirkungen feststellbar. Chlortalidon wird deutlich seltener eingesetzt als die Leitsubstanz Hydrochlorothiazid, verursacht aber ebenfalls vergleichsweise geringe Behandlungskosten.

M. Neubeck/Mu

## Literatur

1) Kleemann/Engel, Ergbd. 1982–1987, S. 1125.  
 2) W. Graf, E. Schmid, W. G. Stoll, US Pat. 3055904 (1962); C. A. 58, 11330 (1963). 3) W. Graf et al., Helv. Chim. Acta 42, 1085–1101 (1959). 4) T. J. Giacobbe, H. C. White, US Pat. 4188330 (1980); C. A. 92, 198258 f (1980). 5) J. Auerbach, F. A. Golec, EU Pat. 51217 (1982); C. A. 97, 109870 n (1982). 6) J. Auerbach, F. A. Golec, EU Pat. 51215 (1982); C. A. 97, 127497 a (1982). 7) M. Kuhnert-Brandstätter, L. Müller, Microchem. J. 13, 20–29 (1968). 8) F. T. Martins et al. Cryst. Growth Des. 9, 3235–3244 (2009). 9) M. Kuhnert-Brandstätter, S. Wunsch, Microchim. Acta 57, 1297–1307 (1969). 10) R. Bonfilio et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 88, 562–570 (2014). 11) H. L. Fleuren, C. A. van Ginneken, J. M. von Rasum, J. Pharm. Sci. 68, 1056–1058 (1979). 12) K. Jäkel, Ciba-Geigy, Basel, pers. Mitt. 13) H. Auterhoff, W. Wessinger, Arch. Pharm. 312, 876 (1979). 14) M. Alimuddin et al., J. Med. Chem. 51, 5140–5142 (2008). 15) J. M. Singer et al., in: Florey, Bd. 14, S. 1–36. 16) D. W. Armstrong et al., Science 232, 1132–1135 (1986). 17) H. Riering, M. Sieber,

J. Chromatogr. A 728, 171–177 (1996). 18) A. M. Rizzi, C. Plank, J. Chromatogr. 557, 199–213 (1991). 19) G. Blaschke, H. Markgraf, Chem. Ber. 113, 2031–2035 (1980). 20) G. Severin, Chirality 4, 222–226 (1992). 21) E. Lamparter, G. Blaschke, J. Schlüter, Chirality 5, 370–374 (1993). 22) N. K. Pandit, J. S. Hinterliter, J. Pharm. Sci. 74, 857 (1985). 23) R. W. Schmid, Ciba-Geigy, Basel, pers. Mitt. 24) S. J. Stohs, G. A. Scratchley, J. Chromatogr. 114, 329–333 (1975). 25) F. de Croo, W. van den Bossche, P. de Moerloose, J. Chromatogr. 325, 395–411 (1985). 26) V. Douville et al., Pharm. Sci. Notes 2005, 5–10 (2005). 27) T. N. Prasad et al., Pharmazie 42, 135–136 (1987). 28) M. J. O'Hare, E. Tan, J. E. Moody, J. Pharm. Sci. 68, 106 (1979). 29) S. M. Walters, D. B. Stonys, J. Chromatogr. Sci. 21, 43–45 (1983). 30) H. Li, M. M. Johnston, D. Mufson, J. Pharm. Sci. 66, 1732–1734 (1977). 31) H. L. Fleuren, J. M. van Rasum, J. Chromatogr. 152, 41–54 (1978). 32) C. Fagerlund, P. Hartvig, J. Chromatogr. 168, 107–116 (1979). 33) G. Iriarte et al., J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 877, 3045–3053 (2009). 34) Drugdex®.