

**Möglichkeiten und Grenzen
der Videodensitometrie
in der Dünnschichtchromatographie:
Ein Vergleich zur klassischen Densitometrie**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2000

vorgelegt von

Stefanie Essig

Tag der mündlichen Prüfung:

27. April 2000

Dekan:

Prof. Dr. U. Nagel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. K.-A. Kovar

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sz. Nyiredy

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar in der Zeit von Oktober 1996 bis April 2000 am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas und den großen Freiraum, den er mir während der Durchführung dieser Arbeit eingeräumt hat.

Den Firmen Byk Gulden (Konstanz), CAMAG (MuttENZ, Schweiz), Desaga (Wiesloch) sowie der Firma ratiopharm (Ulm), danke ich für die freundliche Bereitstellung von Probenmaterial und Videogeräten.

Allen jetzigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis danke ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima, stete Hilfsbereitschaft und für ihr Verständnis während fachlicher Höhen und Tiefen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Iris Dinkelacker für die unendliche Anzahl an DC-Platten, die sie in unserer Zusammenarbeit entwickelte, sowie für die wertvollen Gespräche fachlicher und privater Art.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Reichl, Herrn Büchler, Frau Dr. Stahlmann und Frau Dr. Muszynski für das sorgfältige Korrekturlesen bedanken.

Für meine Eltern und Dieter

Es ist ja auch etwas Wunderbares,
Nostalgie und Moderne in einem
Verfahren verwirklicht zu sehen.

Dr. G. Morlock und Dr. E. Reich

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. vorgestellt:

Essig S, Kovar KA. Quantitative determination of pharmaceutical drugs using videodensitometry. Proceedings of the 10th International Symposium on Instrumental Planar Chromatography in Visegrád, Ungarn. J Planar Chromatogr. 1998; 332-340.

Essig S, Kovar KA. Impurity test of Theophyllin: comparison of classical slit scanner with videodensitometry. J Planar Chromatogr. 1999; 12: 63-65.

Essig S, Kovar KA. Videodensitometrie: Quantitative Bestimmung in der Dünnschichtchromatographie. Archiv der Pharmazie 1999; 332: 32.

Essig S, Kovar KA. Current use and future trends of planar chromatography/video imaging in pharmaceutical analysis. Book of abstracts: 1st International Meeting on Imaging Techniques in Planar Chromatography, Slovenia, 1999; 25-31.

Essig S, Kovar KA. Quantitative Determination of Phospholipids in a Pharmaceutical Drug by Scanning and Video Densitometry. J AOAC. Accepted.

Essig S, Kovar KA. Fluorimetric Detection of Cinchocaine in a Pharmaceutical drug by Scanning and Video Densitometry. Chromatographia. Eingereicht.

Essig S, Kovar KA. Quantitative determination of pharmaceutical drugs using videodensitometry. *Posterbeitrag*: 10th International Symposium on Planar Chromatography in Visegrád, Ungarn, 1998.

Essig S, Kovar KA. Videodensitometrie: Quantitative Bestimmung in der Dünnschichtchromatographie. *Posterbeitrag*: DPhG DoktorandInnen-Tagung in Freiburg, 11.-13. März 1999.

Essig S. Vortrag der Dissertation im Rahmen des Graduiertenkollegs "Analytische Chemie" der Universität Tübingen. Februar 2000.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Geschichtliche Entwicklung	2
2.2 Problemstellung	5
3 Theoretische Grundlagen	8
3.1 Dünnschichtchromatographie	8
3.1.1 Stationäre Phase	8
3.1.2 Chromatogrammentwicklung	9
3.1.3 Detektionsmöglichkeiten	10
3.1.4 Meßprinzipien	11
3.2 Klassischer Scanner	14
3.2.1 Geräteaufbau	14
3.2.2 HPTLC-UV-Kopplung	15
3.3 Videodensitometrie	16
3.3.1 Geräteaufbau	16
3.3.2 Digitale Bildverarbeitung	17
3.3.2.1 Bildaufnahme	17
3.3.2.2 Datenverarbeitung	19
3.4 Vergleich des klassischen Scanners mit der Videodensitometrie	21
4 Gehaltsbestimmung von Analgetika	24
4.1 Wirkstoffbeschreibung	24
4.2 Quantifizierung der Arzneistoffe	25
4.3 Dünnschichtchromatographie	25
4.4 Kalibrierfunktionen und Nachweisgrenzen	28
4.5 Wiederfindung	30
4.6 Anwendungen	33
4.7 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	38
5 Reinheitsprüfung	40
5.1 Theophyllin	40
5.1.1 Rohstoff Theophyllin	40
5.1.1.1 Synthese	40
5.1.1.2 Pharmazeutische Anwendung	42
5.1.1.3 Monographie der Arzneibücher	42
5.1.2 Dünnschichtchromatographie	42
5.1.3 Auswertung	44
5.1.4 Nachweisgrenzen der Verunreinigungen	44
5.1.5 Anwendung	45
5.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	47

5.2	Chlordiazepoxid	48
5.2.1	Benzodiazepine	48
5.2.2	Analytische Methoden	50
5.2.3	Arzneibuchmonographien Chlordiazepoxid	50
5.2.4	Dünnschichtchromatographie	51
5.2.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	52
5.2.6	Anwendung	54
5.2.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	55
6	Analyse von Surfactants	56
6.1	Pharmazeutische Bedeutung	56
6.2	Chromatographische Methoden	58
6.3	Dünnschichtchromatographie	59
6.3.1	Gehaltsbestimmung	59
6.3.1.1	HPTLC-UV-Chromatogramm	59
6.3.1.2	Quantitative Auswertung	61
6.3.2	Wiederfindung	63
6.3.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	65
6.3.4	Anwendung	65
6.3.5	Reinheitsprüfung	66
6.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	68
7	Fluorimetrische Bestimmung von Cinchocainhydrochlorid	70
7.1	Cinchocain	70
7.2	Gehaltsbestimmung von Cinchocain-hydrochlorid	71
7.3	Dünnschichtchromatographie	71
7.4	Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme	74
7.5	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	74
7.6	Anwendung	76
7.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	77
8	Diskussion der Ergebnisse	79
9	Experimenteller Teil	88
9.1	Geräte	88
9.1.1	Scanner	88
9.1.2	Videogerät	88
9.1.3	Probenauftragung	90
9.1.4	ADC-Kammer	90
9.2	Dünnschichtchromatographie	91
9.2.1	Stationäre Phase	91
9.2.2	Lösungsmittel	91
9.3	Quantitative Auswertung	91

9.4	Statistische Kenngrößen	92
9.4.1	Kalibrierung	92
9.4.2	Linearität	92
9.4.3	Varianzhomogenität	93
9.4.4	Richtigkeit und Präzision	94
9.4.5	Vertrauensbereich	95
9.4.6	Lineare Kalibrierfunktion	96
9.4.7	Wiederfindung	96
9.4.8	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	96
9.5	Anwendungen	98
9.5.1	Gehaltsbestimmung von ASS, Paracetamol und Coffein	98
9.5.1.1	Materialien und Reagenzien	98
9.5.1.2	Dünnschichtchromatographie	99
9.5.1.3	Standard- und Probenvorbereitung	99
9.5.1.4	Aufnahmeparameter	101
9.5.1.5	Quantifizierung	101
9.5.2	Reinheitsprüfung von Theophyllin	107
9.5.2.1	Materialien und Reagenzien	107
9.5.2.2	Dünnschichtchromatographie	107
9.5.2.3	Standard- und Probenvorbereitung	108
9.5.2.4	Aufnahmeparameter	109
9.5.2.5	Quantifizierung	110
9.5.3	Reinheitsprüfung von Chlordiazepoxid	118
9.5.3.1	Materialien und Reagenzien	118
9.5.3.2	Dünnschichtchromatographie	118
9.5.3.3	Standard- und Probenvorbereitung	118
9.5.3.4	Aufnahmeparameter	119
9.5.3.5	Quantifizierung	119
9.5.4	Gehaltsbestimmung von POPG und DPPC	122
9.5.4.1	Materialien und Reagenzien	122
9.5.4.2	Dünnschichtchromatographie	123
9.5.4.3	Standard- und Probenvorbereitung	124
9.5.4.4	Aufnahmeparameter	125
9.5.4.5	Quantifizierung	125
9.5.5	Quantifizierung von Cinchocain	127
9.5.5.1	Materialien und Reagenzien	127
9.5.5.2	Dünnschichtchromatographie	128
9.5.5.3	Standard- und Probenvorbereitung	128
9.5.5.4	Aufnahmeparameter	129
9.5.5.5	Quantifizierung	129
10	Literaturverzeichnis	131

Abkürzungen

A/D	Analog/Digital
ADC	Automated Development Chamber
AE	Arbeitseinheiten
AMD	Automated Multiple Development
ASS	Acetylsalicylsäure
AU	Arbitrary Units
BG	Bestimmungsgrenze
CCD	Charge Coupled Device
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-3-sn-phosphatidylcholin
F ₂₅₄	Fluoreszenzindikator (manganaktiviertes Zinksilikat)
FBAS	Farb-Bild-Austast-Synchron Signal
FTIR	Fourier Transform Infrared
G	Grauwertmenge
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GMP	Good Manufacturing Practice
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
KG	Kieselgel
KM	Kubelka-Munk
LPC	Lysophosphatidylcholin

LPG	Lysophosphatidylglycerol
MS	Mass Spectroscopy
MOS	Metal Oxide Silicon
NG	Nachweisgrenze
NIR	Near Infrared
NTSC	National Television System Comittee
PAL	Phase Alternating Line
PC	Personal Computer
POPG	1-Palmitoyl-2-oleyl-3-sn-phosphatidylglycerol
R_f	Retentionsfaktor
RGB	Rot, Grün, Blau
RP	Reversed Phase
RSD	Reststandardabweichung
S	Streukoeffizient
SECAM	Séquentiel á mémoire
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SIT	Silicon Intensified Targed
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviolett
VK	Variationskoeffizient
VIS	Visuable
Y/C	Luminanz- Chrominanzsignal
YUV	Helligkeits- und Farbdifferenzsignale im PAL-Verfahren

1 Zusammenfassung

Neue Entwicklungen stehen auch in der Dünnschichtchromatographie unter dem Motto: schneller, kleiner, besser und preisgünstiger. Als Alternative zur quantitativen Auswertung von HPTLC-Platten mit dem Scanner steht seit den 80er Jahren die Videodensitometrie, ein bildverarbeitendes Verfahren, zur Verfügung. Software und Technik haben sich im Laufe der letzten Jahre stetig verbessert, so daß deren Attraktivität in der instrumentellen Analytik stark zugenommen hat.

Ziel dieser Arbeit war es, die Möglichkeiten und Grenzen, in Hinblick auf den Einsatz zur Quantifizierung, der heute angebotenen Geräte zu evaluieren und einen direkten Vergleich zum klassischen Scanner herzustellen. Am Beispiel der Gehaltsbestimmung von Tabletten konnte gezeigt werden, daß sich das Videogerät zur quantitativen Bestimmung von Wirkstoffen in pharmazeutischen Fertigarzneimitteln eignet. Es wurden die Wirkstoffe Acetylsalicylsäure, Coffein und Paracetamol in Mono- und Kombinationspräparaten quantifiziert. Die Detektion der Wirkstoffe erfolgte über Fluoreszenzlöschung bei einer Wellenlänge von 254nm. Weiterhin wurde der Einsatz des Videoscanners zur Reinheitsprüfung am Beispiel der Rohstoffprüfung von Theophyllin und der Reinheitsprüfung von Chlordiazepoxid nach der Methode des Deutschen Arzneibuches untersucht. Auch die Quantifizierung nicht UV-aktiver Verbindungen mittels der Bildverarbeitung war nach postchromatographischer Derivatisierung möglich. Zwei Inhaltsstoffe eines, noch in der Entwicklung stehenden, Lungensurfactant konnten nach der Derivatisierung mit dem klassischen Scanner bei 268nm quantifiziert werden. Zur videodensitometrischen Bestimmung wurde die DC-Platte mit Weißlicht aufgenommen und ausgewertet.

Die sehr empfindliche Fluoreszenzmessung wurde an Cinchocainhydrochlorid, einem Lokalanästhetikum, durchgeführt. Nach Extraktion des Wirkstoffes aus einer Hämorrhoidalsalbe und dünnschichtchromatographischer Entwicklung konnte der Gehalt bestimmt werden. Die Gehaltsbestimmung mit dem Scanner bei 312nm und mit dem Videogerät bei 366nm zeigten übereinstimmende Ergebnisse.

2 Einleitung

2.1 Geschichtliche Entwicklung

Wie in anderen Bereichen der instrumentellen Analytik ist auch in der Dünnschichtchromatographie eine fortschreitende Automatisierung zu verzeichnen. In den Bereichen Auftragung, Entwicklung und Evaluierung ist die Instrumentierung nicht mehr wegzudenken:

Aus der manuellen Auftragung mittels Kapillare entwickelte sich ein hochtechnisiertes, mikroprozessorgesteuertes Verfahren. PC-gesteuert können mit einem Autosampler unterschiedliche Proben sequentiell mit einer Spritze aufgesprüht werden. Beispiel hierfür ist der Probenautomat III ATS3 (Camag) [1] und der TLC-Applicator AS 30 (Desaga) [2].

Die traditionell verwendete Trogkammer erhielt Konkurrenz durch die ADC-Kammer (Automated Development Chamber) [3] und das AMD-Gerät (Automated Multiple Development) [4], in denen automatische Entwicklung und Trocknung möglich ist. Weiterhin kann mit der AMD-Kammer eine mit der HPLC vergleichbare Gradientenentwicklung in der Dünnschichtchromatographie durchgeführt werden.

Zu Beginn der Entwicklungsgeschichte der DC wurden die Substanzflecken nach der Trennung zur quantitativen Erfassung von der Platte abgekratzt, mit einem geeigneten Lösungsmittel eluiert und

anschließend photometrisch vermessen [5]. Mitte der 60er Jahre begann die Entwicklung kommerzieller Meßgeräte für die photometrische Direktauswertung, der sogenannten Densitometer. Bereits 1970 waren 15 Densitometermodelle, die heute weltweit als Scanner bezeichnet werden, auf dem Markt [6]. Das Prinzip der densitometrischen Auswertung unterliegt meistens einem mechanischen geführten Abtastverfahren. Das bedeutet, daß die DC- oder HPTLC-Platte auf einem Meßtisch an dem feststehenden Meßspalt vorbeigeführt und mit einem Lichtstrahl definierter Wellenlänge abgetastet wird. Das schrittweise Abtasten der einzelnen Bahnen erfordert entsprechend viel Zeit; dadurch entstand die Motivation, die Platte als Ganzes auszuwerten.

Auf dem Gebiet der Elektrophorese publizierten Hannig und Wirth bereits Ende der 60er Jahre ein elektronisches Bildverarbeitungsverfahren zur quantitativen Auswertung von Pherogrammen [7]. Es waren Messungen sowohl im VIS als auch im UV-Bereich möglich. Die heute in Anlehnung an das Densitometer als Videodensitometrie bezeichnete Technik sollte die densitometrische Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen beschleunigen. Mit dem Telechrom OE 976 (Chinoin) wurde 1976 der Grundstein für kommerziell erhältliche Videodensitometer gelegt. Das von Kerenyi und Devenyi entwickelte Aufnahmegerät setzt sich aus einer TV-Kamera (Vidicon) mit Zoomobjektiv, einer Beleuchtungseinheit und einem Rechner zusammen [8][9]. Devenyi führte mit einer weiterentwickelten Version dieses Modells, mit dem Messungen in Reflexion und Transmission sowie Fluoreszenzmessungen möglich waren, quantitative Bestim-

mungen von Aminosäuren in pflanzlichen Proteinen und freien Aminosäuren in Blut durch [10]. Mit dem PC konnten die digitalisierten Videodaten ausgewertet werden. Eine stetige Weiterentwicklung der Computertechnik und der Kamera führte zu einer Verbesserung der Bildanalyse. Im Jahre 1983 quantifizierten Ford-Holevinski *et al.* Cholesterol und Stearylspingosine. Mit einer Schwarz-Weiß-Videokamera wird von einer auf einem Lichtkasten liegenden Platte ein Transmissionsbild erzeugt [11][13]. Eine entsprechende Software zerlegt das Bild in 192 x 280 Bildelemente. Ein einziges Bild entspricht somit 53 760 bit. Sie untersuchten den Einfluß verschiedener Parameter wie Arbeitsbereich, Filter und Lichtquelle auf das Ergebnis. Ein ähnliches System zur Quantifizierung von Elektropherogrammen wurde bereits 1981 von Mariash *et al.* vorgestellt, jedoch mit deutlich niedriger Bildauflösung (8 192 pixel) und geringerer Graustufenzahl (64 Graustufen) [12].

Gianelli *et al.* stellten 1981/83 einen "Multikanal Bildphotospektrometer" vor [14][15]. Hierbei handelt es sich um ein auf der Grundlage eines SIT (Silicon intensified target)-Vidicon und Rechner basierendes System, mit dem gleichzeitig ein vorgeschalteter Monochromator angesteuert werden kann. Mit einer SIT-Vidicon-Kamera (Quantex QX-10) wurden monochromatische Transmissionsmessungen zur quantitativen Bestimmung von Tetraphenylporphinen durchgeführt. Burns *et al.* wendeten den "Multikanal Bildphotospektrometer" in der zweidimensionalen DC an [16]. Mit einer hochauflösenden Kamera (Pulnix TM-64K) konnten Belchamber *et al.* die Qualität der Ergebnisse durch eine Untergrundkorrektur (mathematische Subtraktion

einer Leerplatte) verbessern [17]. Als damals ungelöstes Problem stellte sich die dadurch entstandene hohe Datenmenge, das schlechte Ansprechverhalten der Kamera im UV-Bereich und der hohe Kostenfaktor dar. Eine Hamamatsu-Hochpräzisionskamera mit Quarzoptik (C 1000-13) wurde 1986 von Miwa *et al.* zur β -Radiolumineszenzmessung und 1987 von Prosek *et al.* eingesetzt [18][19]. Diese ermöglicht im Gegensatz zu den vorherigen Anwendungen im VIS-Bereich einen Arbeitsbereich von 200-700 nm. Aktuelle quantitative Bestimmungen mittels Videodensitometrie zeigen das wachsende Interesse an dieser Methode [20]. Es finden sich Anwendungen im Bereich der Lebensmittelchemie wie die Bestimmung von Coffein aus Coca-Cola[®] [21], Saccharose in fermentiertem und unfermentiertem Sojabohnenmehl [22] und von Lebensmittelfarbstoffen [29]. Auch im pharmazeutischen Bereich wird die Videodensitometrie zur Quantifizierung der Verunreinigungen eines Diuretikums [23] oder zur Anabolikabestimmung aus Urin [24] eingesetzt.

2.2 Problemstellung

Trotz einer großen Zahl technischer Neuerungen zum Beispiel die Kopplungsmethoden DC-FTIR [25], DC-MS [26], DC-HPLC [27] und DC-NIR [28] ist in der DC noch keine vollständige Online-Kopplung auf dem Markt. Daher ist das Bestreben die Teilschritte der Dünnschichtchromatographie zu rationalisieren entsprechend groß. Ein bisher in der Dünnschichtchromatographie wenig genutztes Medium, das diesem Trend gerecht werden könnte, ist die Videodensitome-

trie. Der Vorteil der Videodensitometrie gegenüber dem klassischen Scanner zeigt sich in der schnelleren Auswertung und in der Möglichkeit der Dokumentation. Außerdem hat sich die Bildverarbeitung bei Problemen in der Fleckposition, zum Beispiel bei asymmetrischen Flecken und schiefen Bahnen, als besonders geeignet erwiesen.

Das Videogerät ermöglicht aufgrund seiner technischen Ausstattung drei verschiedene Beleuchtungsmöglichkeiten: Bestrahlung mit 254nm, 366nm und mit Weißlicht. Zum Einsatz kommen zwei Videogeräte unterschiedlicher Hersteller, die sich sowohl in der Kamera (1-Chip- und 3-Chip-Kamera), als auch in der Software unterscheiden.

Die Applikationen werden so gewählt, daß sowohl diese gerätetechnischen Möglichkeiten ausgeschöpft als auch die beiden speziell für die pharmazeutische Industrie wichtigen Freigabe- und Laufzeitspezifikationen der Qualitätskontrolle – Gehaltsbestimmung und Reinheitsprüfung – mit einbezogen werden. Zum direkten Vergleich von Scanner und Videodensitometrie muß jeweils dieselbe Platte mit dem Scanner und möglichst sofort im Anschluß mit dem Videogerät aufgenommen werden. Sofern es technisch möglich und sinnvoll ist, soll die Messmethode des Scanners auf das Videogerät übertragen werden.

Die Gehaltsbestimmung soll am Beispiel kommerziell erhältlicher Fertigarzneimittel unter Verwendung von HPTLC-Platten mit Fluoreszenzindikator F_{254} erfolgen. Die Reinheitsprüfung spielt eine wichtige

Rolle bei der Rohstoffkontrolle (Prüfung auf Syntheseverunreinigungen) und bei Stabilitätsprüfungen (Prüfung auf Abbauprodukte). Die Rohstoffkontrolle soll am Beispiel des Theophyllins, die Prüfung auf Abbauprodukte am Beispiel von Chlordiazepoxid als Hauptinhaltsstoff eines Fertigpräparates erfolgen. Anhand der postchromatographischen Derivatisierung von Phospholipiden, die Bestandteile eines Surfactants sind, soll untersucht werden, ob sich die Videodensitometrie auch zur Auswertung farbiger Substanzen im VIS-Bereich eignet. Die Gehaltsbestimmung von Cinchocainhydrochlorid aus Salbe soll fluorimetrisch mit dem Videogerät bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm durchgeführt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand unterschiedlicher Einsatzgebiete, die Möglichkeiten und Grenzen der quantitativen Bildanalyse nach dem Stand der Technik zu beurteilen. Der Vergleich der videodensitometrischen Auswertung mit der Scannerauswertung soll zeigen, ob für die spezielle Meßmethode der Einsatz des Videogerätes möglich ist oder sogar den Scanner ersetzen kann. Ein Vergleich der unterschiedlichen Anwendungen soll eine Beurteilung der Grenzen der Videodensitometrie ermöglichen.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Dünnschichtchromatographie

3.1.1 Stationäre Phase

In der Dünnschichtchromatographie werden, im Gegensatz zur Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), zu 90% sogenannte Normalphasen als stationäre Phasen für die Trennung eingesetzt. Es handelt sich hierbei um amorphes, hochporöses Siliciumdioxid (Kieselgel). Die dabei zugrunde liegenden Trennmechanismen beruhen auf dem Prinzip der Adsorption, die jedoch häufig von Verteilungsvorgängen überlagert ist. Aufgrund der Si-OH-Gruppen zeigt das Kieselgel polare Eigenschaften, die wegen ihrer Reaktivität chemisch leicht modifiziert werden können. Es entstehen dadurch gebundene Phasen (*bonded phase*, BP), die neue physikalisch-chemische Eigenschaften aufweisen, bis hin zu den sogenannten Umkehrphasen (*reversed phase* RP). Diese zeigen aufgrund der Anbindung langkettiger Kohlenwasserstoffen hydrophobe Eigenschaften. Die Selektivität eines Systems ist abhängig von der Wechselwirkung zwischen der Substanz, dem Schichtmaterial und der mobilen Phase. In der Literatur finden sich für die verschiedenen Phasen vielfältige Einsatzgebiete: Kieselgel 60 [52] [54], Schichten mit Aluminiumoxid [87], Trennungen auf Cellulose [88], RP-Phasen [89] oder modifiziertes Kieselgel mit speziellen funktionellen Gruppen wie Amino- oder Cyanogruppen. Außerdem können Enantiomere

zum Beispiel über β -Cyclodextrin-Kieselgelplatten bzw. RP-Platten getrennt werden [90]. Die Trennleistung eines Schichtmaterials (Meßgröße: Bodenhöhe oder Trennzahl) wird in erster Linie von der Geometrie des Sorptionsmittels (Korngröße und -verteilung sowie Packungsdichte) und von der Homogenität des Porensystems (spezifische Oberfläche, Porendurchmesser, Porenvolumen) bestimmt. Die Trennung ist stark abhängig von der relativen Luftfeuchte, der Temperatur, der Dampfraumsättigung und vom Kammertyp [91]. HPTLC-Fertigschichten mit einer geringeren Korngröße (5 μm) und einer engeren Partikelverteilung zeigen eine deutlich höhere Trennleistung als konventionelle DC-Fertigschichten (mittlere Korngröße 15 μm). Industriell angefertigte Fertigschichten zeigen gegenüber handgestrichenen Platten reproduzierbare Trenneigenschaften, die auf die gute Schichthomogenität zurückzuführen sind [92][93].

3.1.2 Chromatogrammentwicklung

Neben der normalen Trogkammer existieren noch verschiedene Varianten wie die Horizontalkammer oder die Doppeltrogkammer. Letztere besitzt zwei getrennte Kammern und eignet sich speziell zum Vorkonditionieren unter definierten Bedingungen. Mit der ADC-Kammer [3] lassen sich Dünnschichtplatten vollautomatisch entwickeln. Ein CCD-Sensor überwacht das Fortschreiten der Fließmittelfront. Nach beendeter Entwicklung wird die DC-Platte mit gefilterter Warm- und Kaltluft getrocknet. Verschiedene Parameter wie Vorkonditionierung, Entwicklungsmodus (Tank- oder Sandwichkonfiguration), Länge der Trennstrecke sowie Trocken- und Heizzeit können eingestellt und abgespeichert werden, es können jedoch keine

gesättigten Kammerzustände erreicht werden [31]. Eine weitere vollautomatisierte Chromatogrammentwicklung ist mit der AMD-Technik möglich. Auch hier sind verschiedene Parameter wie die Trennstrecke (über die Entwicklungszeit) und Trocknungsschritte wählbar, zusätzlich besteht die Möglichkeit der Gradientenentwicklung [32].

3.1.3 Detektionsmöglichkeiten

Je nach Problemstellung stehen verschiedene Möglichkeiten der Detektion zur Verfügung. Handelt es sich um UV-aktive Substanzen, werden in der Regel HPTLC-Platten mit Fluoreszenzindikator (korrekterweise Phosphoreszenzindikator) verwendet, wobei der stationären Phase Mangan-aktiviertes Zinksilikat zugemischt wird. Dieser Indikator wird durch UV-Licht (254 nm) zur Phosphoreszenz angeregt. Auf der Platte vorhandene Substanzen absorbieren das UV-Licht und erscheinen daher als dunkle Flecken auf der Platte. Nicht UV-aktive Substanzen können durch prä- oder postchromatographische Derivatisierung sichtbar gemacht werden. Die UV/VIS Derivatisierung erfolgt in der DC überwiegend postchromatographisch, wobei die Reagenzien meist in Form von Lösungen zum Sprühen oder Tauchen angewandt werden. Die postchromatographische Detektion hat den Vorteil, daß die Trennung nicht beeinflußt wird und die Umsetzung sämtlicher getrennter Proben gleichzeitig erfolgt. Als nachteilig können sich überschüssige Reagenzien und technische Probleme beim Besprühen oder Tauchen erweisen. Im Vergleich zur postchromatographischen Derivatisierung findet durch prächromatographisches Derivatisieren meist eine (positive oder negative) Änderung des Trennverhaltens statt. Der zeitliche Aufwand der

prächromatographischen gegenüber der postchromatographischen Derivatisierung ist deutlich höher, da jede einzelne Analysenprobe umgesetzt werden muß. Der Vorteil daran ist, daß überschüssige Reagenzien noch vor der Trennung entfernt werden können.

3.1.4 Meßprinzipien

Zur Messung der Wechselwirkung von an DC-Schichten adsorbierten Substanzen und Licht können verschiedene Meßprinzipien eingesetzt werden: Transmission, Remission, simultane Remission-Transmission, Fluoreszenz und Fluoreszenzminderung [33] [34]. Im Vordergrund stehen heute die Remissions- und Fluoreszenzmessungen sowie Fluoreszenzlöschungen.

Unter Remission versteht man die an rauhen Oberflächen auftretende diffuse Reflexion. Die Strahlung, die von den Teilchen nicht absorbiert wird, wird an der Partikeloberfläche gestreut und diffus reflektiert (Abb 3-1). Mathematisch wurde der quantitative Zusammenhang zwischen Konzentration der absorbierenden Partikel und Lichteinwirkung auf streuende Medien von Kubelka und Munk erfaßt [35]. Diese gehen von einem vereinfachten Modell aus, in dem sie die Absorption und Streuung in und gegen die Einfallsrichtung berücksichtigen, nicht aber die Streuung in alle Richtungen. Voraussetzung für die Gültigkeit der Kubelka-Munk-Funktion ist eine "unendliche Schichtdicke", wobei 2-3mm als ausreichend angesehen werden können.

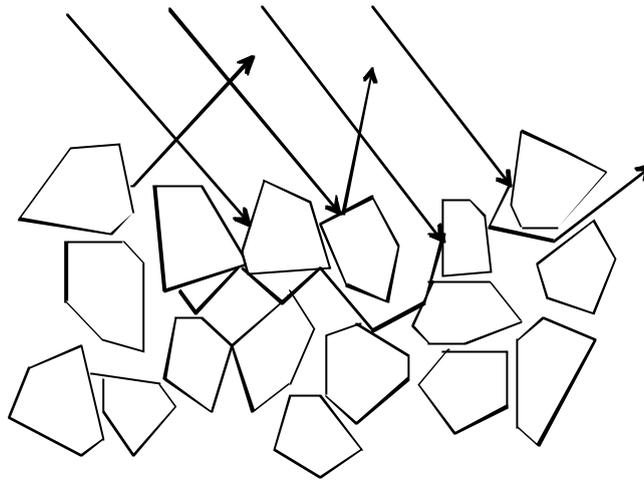


Abb. 3-1: Lichtstreuung an einer DC-Schicht.

Bei absorbierenden DC-Flecken lautet die Kubelka-Munk-Funktion:

$$F(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{S} = c \cdot \frac{\epsilon \cdot k}{S} \quad (3-1)$$

R_{∞} = absolute Remission einer unendlich dicken Schicht

K = Absorptionskoeffizient nach Kubelka-Munk

k = Proportionalitätsfaktor

S = Streukoeffizient der Remission

c = Konzentration der Substanz im Fleck

ϵ = Absorptionskoeffizient

Bei einheitlicher, konstanter Korngrößenverteilung kann der Streukoeffizient S bei einer bestimmten Wellenlänge näherungsweise als konstant betrachtet werden. Außerdem sollte die Korngröße deutlich kleiner als die Dicke der untersuchten Schicht sein [36]. Es ergibt sich dann eine lineare Beziehung zwischen der Kubelka-Munk-(KM)-Funktion und der Probenkonzentration. In der Dünnschichtchromatographie sind die Voraussetzungen der KM-Funktion nicht oder nur

teilweise erfüllt. Daher erhält man bei Remissionsmessungen über größere Konzentrationsbereiche meist keine lineare Kalibrierkurve. Diese wird nur in diskreten Bereichen näherungsweise erfüllt.

Im Gegensatz zur Absorptionsmessung wird bei der Fluoreszenzmessung nicht bei der Wellenlänge des einfallenden Lichtes gemessen, sondern möglichst im Maximum des Fluoreszenzspektrums, das gegenüber der Anregungswellenlänge bathochrom verschoben ist. Die Meßanordnung der Fluoreszenz entspricht der der Remission. Jedoch muß zwischen DC-Platte und Detektor ein Monochromator oder Kantenfilter geschaltet sein, der unter Absorption der Anregungswellenlänge das emittierte Fluoreszenzlicht durchläßt. Dadurch wird die Fluoreszenzmessung sehr empfindlich und für bestimmte Stoffe spezifisch. Die quantitative Grundlage für die fluorimetrische Auswertung wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$I_F = k \cdot I_0 \cdot c \quad (3-2)$$

I_F = Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes

I_0 = Intensität des eingestrahlten Lichts

k = Proportionalitätskonstante

c = Konzentration der Substanz im Fleck

3.2 Klassischer Scanner

3.2.1 Geräteaufbau

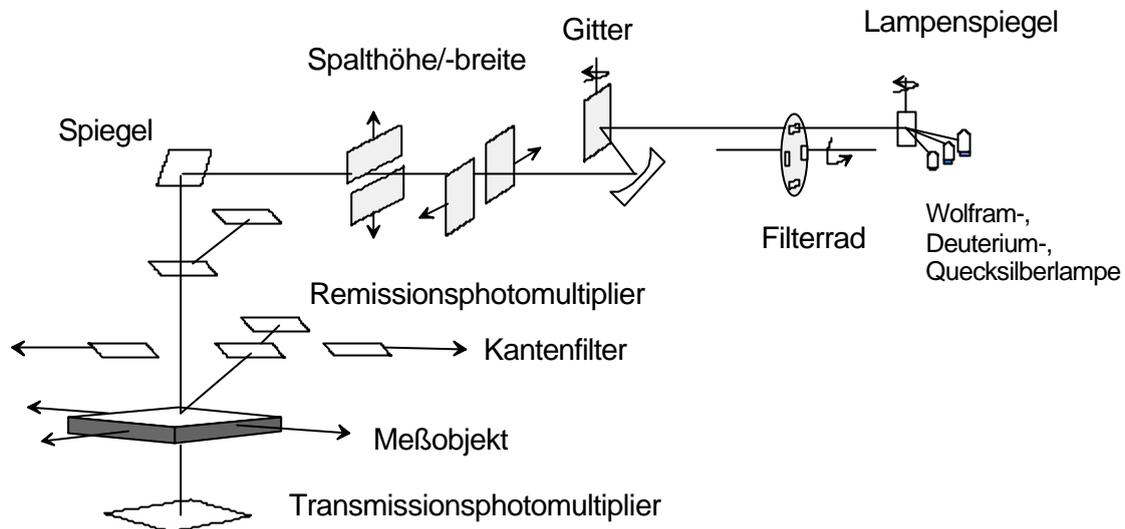


Abb. 3-2: Schematische Darstellung des Scanneraufbaus.

Das klassische Densitometer weist einen typischen Spektrometeraufbau auf. Als Lichtquelle stehen drei Lampen zur Auswahl: die Deuterium-, die Wolfram- und die Quecksilberdampfampe. Die Wolfram- und die Deuteriumlampe als Kontinuumstrahler decken ein Spektrum von 200-1200 nm gleichmäßig ab. Im Gegensatz dazu ist die Quecksilberdampfampe (Hg-Hochdruckbrenner) ein Linienstrahler, der wegen seiner hohen Lichtintensität hauptsächlich zur Fluoreszenzmessung verwendet wird. Die Quecksilberdampfampe zeigt charakteristische Linien bei 254, 311 und 365 nm. Der Lampenspiegel leitet das Licht zum Filterrad um, welches mit seinen beiden Filtern dazu dient störendes Fremdlicht schon vor dem Monochromator herauszufiltern. Bestandteil des Monochromators ist ein Beugungsgitter, das der Wellenlängendispersion dient. Die aufgetrennten Wel-

lenlängen werden unter verschiedenen Winkeln reflektiert und nur ein schmaler Bereich des Spektrums gelangt auf den Eckspiegel. Durch einen in Höhe und Breite einstellbaren Spalt kann der Lichtstrahl begrenzt werden. Über einen Spiegel wird das Licht auf das Meßobjekt gelenkt, welches sich auf einem in x- und y-Richtung beweglichen Tisch befindet. Das Licht wird von hochempfindlichen Photomultipliern (Sekundärelektronenvervielfacher, SEV), reflektiertes Licht vom Remissionsphotomultiplier und transmittiertes Licht vom Transmissionsphotomultiplier detektiert.

3.2.2 HPTLC-UV-Kopplung

Gegenüber der UV-Messung von Lösungen weist die photometrische Direktauswertung einige Besonderheiten auf. So hängt das Absorptionssignal nicht nur von der Substanzmenge sondern auch von ihrer Verteilung im Fleck ab. Diese ist nicht über die ganze Fläche gleichmäßig, sondern weist idealerweise eine symmetrische Substanzdichteverteilung mit dem Profil einer Gaußschen Glockenkurve auf. Mittels der im Scanner einstellbaren Option der *Fleckoptimierung*, die in x- und y-Richtung automatisch die maximale Absorption bestimmt, wird somit im Substanzmaximum gemessen. Im Gegensatz zur Absorptionsmessung in Lösung zeigt die Messung an festen Schichten keinen linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Schichtdicke. Dies ist auf die Lichtstreuung an den Sorbenspartikeln zurückzuführen. Bei kleinen Substanzmengen zeigt sich der Einfluß der Schichtstruktur, wobei sich Inhomogenitäten der Schicht in verstärktem Rauschen bemerkbar machen.

3.3 Videodensitometrie

3.3.1 Geräteaufbau

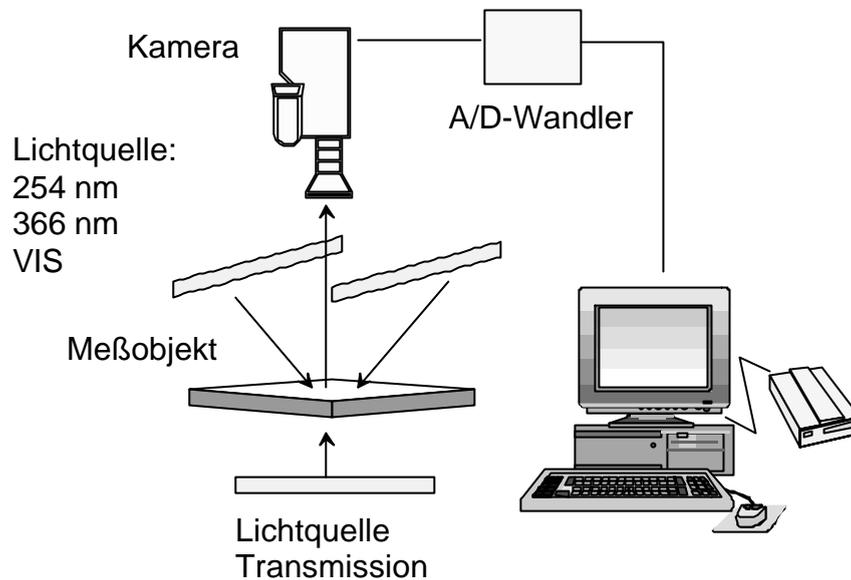


Abb. 3-3: Schematische Darstellung des videodensitometrischen Aufbaus.

Der Videodensitometer setzt sich aus zwei Einheiten zusammen: einem Bildaufnahme teil, bestehend aus Beleuchtungsquellen und Kamera, und einem Bildverarbeitungsteil, zu dem der A/D-Wandler und der PC gehören. Das Meßobjekt ist feststehend und kann, je nach Problemstellung, mit drei verschiedenen Lampen beleuchtet werden. Für Aufnahmen im VIS-Bereich stehen Weißlichtlampen zur Verfügung, die sowohl Remissions- als auch Transmissionsmessungen ermöglichen. Als Beleuchtungsquelle für Aufnahmen mit 254 und 366 nm dienen je eine Quecksilberniederdruckröhre. Die Lampen sind auf beiden Seiten der Abdeckvorrichtung angebracht. Der Lichtstrahl fällt auf die DC-Platte, wird dort reflektiert und trifft auf die Sensorfläche (CCD-Elemente) der Kamera. Das optische Signal wird

von den CCD-Elementen in ein elektrisches Signal umgewandelt und im A/D-Wandler digitalisiert. Mit dem PC können diese digitalen Daten weiterverarbeitet, das Bild gespeichert und nach Bedarf graphisch dargestellt bzw. gedruckt werden.

3.3.2 Digitale Bildverarbeitung

3.3.2.1 Bildaufnahme

Über einen opto-elektronischen Wandler wird das analoge, optische Signal in ein analoges elektrisches Signal gewandelt. Dies geschieht durch CCD-Elemente (charge-coupled-device = ladungsgekoppelte Halbleiterelement-Anordnung), deren Sensorfläche aus flächig angeordneten MOS-Halbleiterkondensatoren (MOS = Metal Oxide Silicon) besteht. Ein Analog-Digital-Wandler (sog. Frame-Grabber) transformiert zur Grauwertquantisierung das analoge in ein digitales Signal. Je nach Kamera-Typ stehen zur Umwandlung des optischen in das elektronische Signal ein oder drei CCD-Elemente zur Verfügung. Bei der 3-Chip-Kamera wird der einfallende Lichtstrahl mit Hilfe eines Prismas geteilt und die Teilstrahlen je einem Chip der drei Grundfarben Rot, Grün und Blau zugeführt. Die Güte des opto-elektronischen Wandlers und die Auflösung des Analog-Digital-Wandlers bestimmen die Zahl der Quantisierungsstufen. Für eine gute Bildrekonstruktion sind mindestens 100 Quantisierungsstufen notwendig [38].

Mit einer CCD-Kamera können 256 Graustufen digitalisiert werden. Um Bilder verarbeiten zu können, müssen die Grauwerte und die Ortsvariablen quantisiert oder diskretisiert werden. Im diskreten Fall

ist ein digitales Bild eine Matrix mit M Spalten und N Zeilen. Die Elemente der digitalen Bildmatrix sind die diskreten Bildpunkte, auch Pixel genannt. Die Digitalisierung läßt sich in zwei Schritte aufteilen: Rasterung und Quantisierung. Im ersten Schritt wird das Bild durch Überlagerung mit einem rechteckigen oder quadratischen Gitter in Rasterflächenstücke unterteilt. Das Gitter ist bestimmend für die Datenmenge und den Informationsgehalt des digitalisierten Bildes. Ist das Raster zu grob, gehen eventuell Bildinhalte verloren; ist es zu fein, wird die Datenmenge zu groß. Bei der Quantisierung wird jedem Rasterstück ein Grauwert aus einer Grauwertmenge G zugewiesen. Als Grauwertmenge hat sich $G = \{0-255\}$ durchgesetzt, da diese 256 Grauwerte mit einem Byte (1 Byte = 8 Bit und $2^8 = 256$) dargestellt werden können [37]. Der Wert 0 wird als Schwarz und 255 als Weiß definiert (Abb. 3-4).

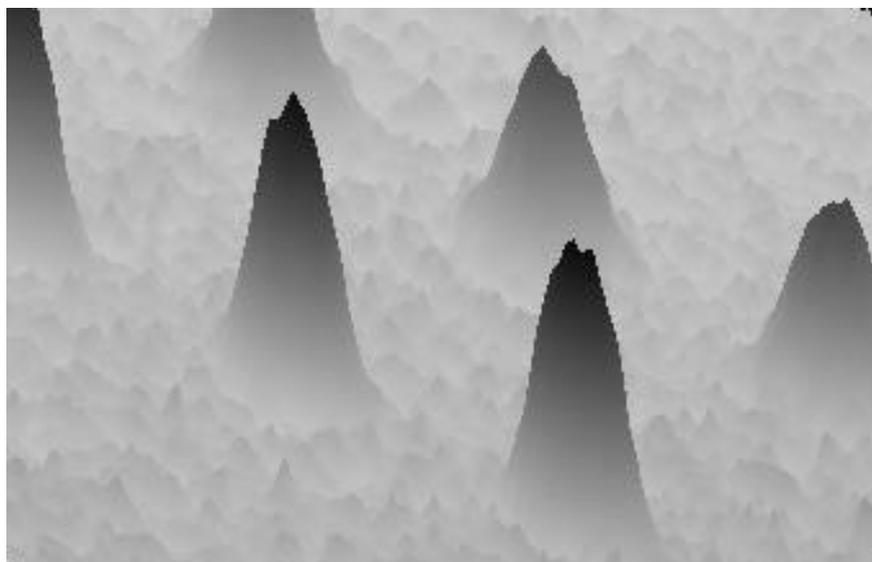


Abb. 3-4: 3-Dimensionale Darstellung der Flecken auf der HPTLC-Platte nach der Umwandlung in ein Graustufenbild.

3.3.2.2 Datenverarbeitung

Ist das Bild digitalisiert, stehen noch verschiedene Verfahren der Bildverbesserung zur Verfügung. Zu den Grauwerttransformationen gehören die lineare und die logarithmische Skalierung der Grauwerte. Bei der linearen Skalierung werden alle Bereiche der Grauwertmenge gleichmäßig verändert und so Kontrast und Helligkeit beeinflußt. Die logarithmische Skalierung hat den Vorteil, daß man den Kontrast selektiv verändern kann. Spezielle Frequenzen, die durch Rauschen oder Störungen bei der Bilderfassung entstanden sind, sollen unterdrückt werden, die restliche Bildinformation jedoch erhalten bleiben. Im Falle des Desaga-Videodensitometers steht hierfür ein Gauß-Tiefpaßfilter, im Falle des CAMAG-Videogerätes ein Savitsky-Golay-Filter zur Verfügung. Ein Vergleich der Abbildungen 3-5 und 3-6 zeigt in letzterer eine deutliche Glättung der Oberflächenstruktur und somit eine Verringerung des Rauschens. Mit einem Laplace-Hochpaßfilter (Abb. 3-7) können strukturreiche Bereiche hervorgehoben und weniger strukturreiche unterdrückt werden [39]; es kommt zu einer Kontrastverstärkung. Der Laplace-Filter reagiert sehr stark auf Rauschanteile im Bild, d.h. auch das Rauschen wird verstärkt. Welcher Filter geeignet ist, muß für das jeweilige Problem entschieden werden.

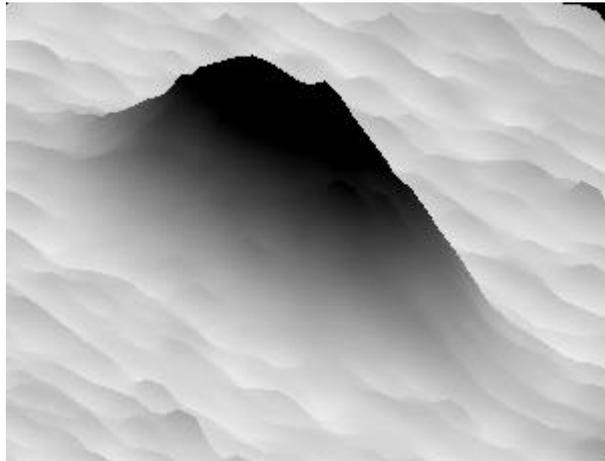


Abb. 3-5: 3-Dimensionale Darstellung eines Peaks nach Umwandlung in ein Graustufenbild.

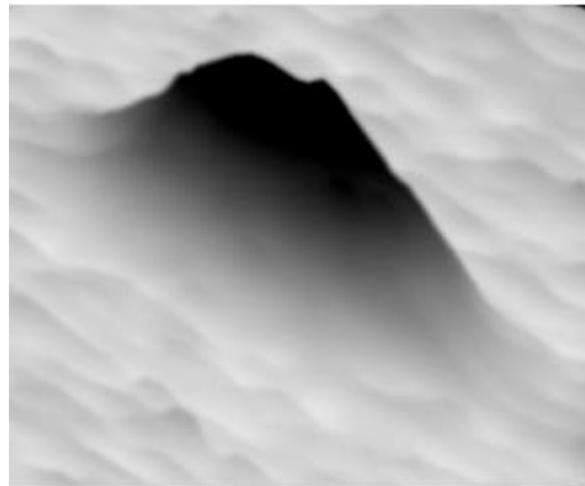


Abb. 3-6: Bild 3-5 nach Anwendung eines Gauß-Filters.

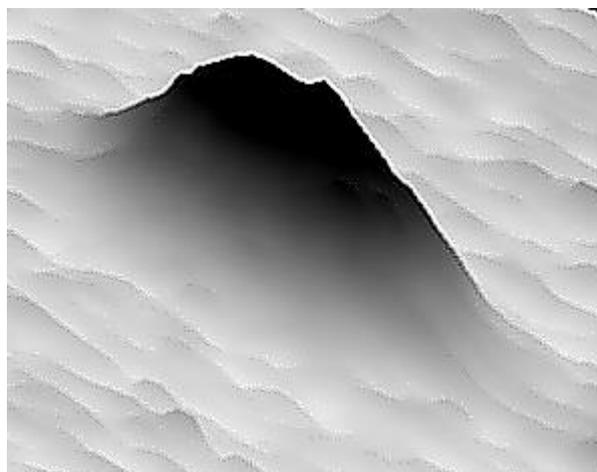


Abb. 3-7: Bild 3-5 nach Anwendung eines Laplace-Filters.

Mathematische Grundlage der Bildauswertung ist der Algorithmus. Der Bildverarbeitungsalgorithmus sollte den Ansprüchen der modernen Datenanalyse genügen. Hierzu gehören voraussagbare, zuverlässige und optimale Ergebnisse. Ein schnellerer und effizienter Algorithmus wirkt sich unmittelbar auf die Applikation aus, da ein höherer Durchsatz mit einer weniger leistungsfähigeren Hardware (kostengünstigere Videokamera) erreicht wird [40].

3.4 Vergleich des klassischen Scanners mit der Videodensitometrie

Aus dem gerätetechnischen Aufbau (s. Kapitel 3.2.1 und 3.3.1) ergeben sich Vor- und Nachteile des Scanners gegenüber dem Videogerät. Grundlegender Vorteil der Videotechnik ist die hohe Verarbeitungsgeschwindigkeit. Während die Bildaufnahme und Auswertung mit dem Videodensitometer nur ein bis zwei Minuten dauert, kann die Auswertung mit dem Densitometer bei voller HPTLC-Platenauslastung bis zu 30 Minuten beanspruchen. Dies ist auf die Art der Aufnahme zurückzuführen. Die Signale werden mittels CCD-Kamera von ca. 500 000 Sensoren parallel verarbeitet, wobei die Platte als Ganzes erfaßt wird. Eine gleichmäßige Ausleuchtung des Meßobjektes ist deshalb zwingend erforderlich, konnte aber bisher noch nicht in ausreichendem Maße realisiert werden (Abb. 3-8), während der schmale Spalt des Scanners homogen ausgeleuchtet werden kann.

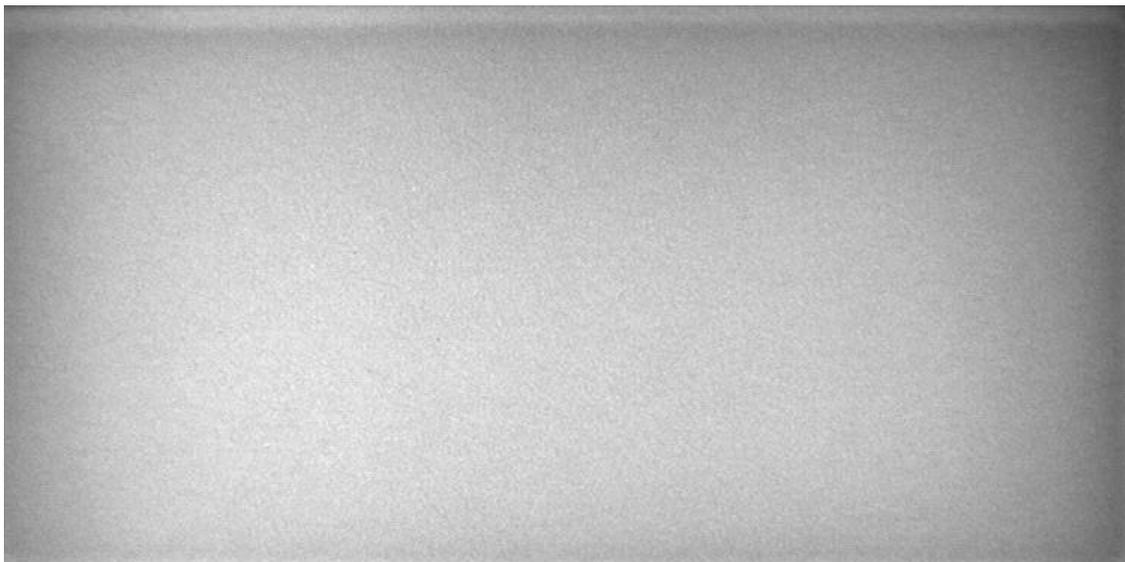


Abb. 3-8: Aufnahme einer Leerplatte (HPTLC Kieselgel 60 F_{254}) bei 254 nm.

Beim Scanner kann man von einer “Null-dimensionalen” Aufnahme sprechen, da – während Bahn für Bahn am Spalt vorbeigeführt wird – immer nur ein Punkt aufgenommen wird. Aufgrund der zweidimensionalen Aufnahmetechnik ist die Videodensitometrie im Gegensatz zum Scanner unempfindlich gegenüber schiefen Bahnen und ungleichmäßiger Fleckverteilung und deshalb für zweidimensionale Entwicklungstechnik besonders geeignet. Das Signal wird beim Densitometer mit 19 Bit digitalisiert, da der Sensor eine wesentlich höhere Dynamik besitzt als der CCD-Chip der Kamera, dessen Signal vom Frame-Grabber mit 8 Bit digitalisiert wird. Da pro Bit ein doppelter Informationsgehalt erhalten wird, ist die Informationsmenge beim Scanner signifikant höher.

Ein weiterer Vorteil des Scanners ist die Wellenlängenselektion durch den Monochromator, der aus einem Spektrum von 200-700nm definierte Wellenlängen selektiert. Beim Videogerät ist die Wellenlänge durch die Wahl der Beleuchtungsquelle vorgegeben.

Dies wirkt sich bei Substanzen mit Absorptionsmaxima, die nicht im Bereich der Anregungswellenlänge der Beleuchtungsquelle liegen, nachteilig aus. Da nicht der gesamte Spektralbereich zur Verfügung steht, kann mit dem Videodensitometer auch kein Spektrum aufgenommen werden, so daß eine Substanzidentifizierung nur mit dem Scanner erfolgen kann.

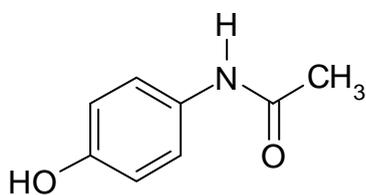
Ein herausragendes Argument für die Verwendung des Videosystems ist die zusätzliche GMP-konforme Dokumentation. Das Bild kann archiviert, verwaltet, gedruckt und in Dokumente eingebunden werden.

Der Spektrometernaufbau des Scanners schlägt sich natürlich auch auf den Preis nieder, so daß ein Scanner derzeit doppelt so teuer ist wie ein Videogerät.

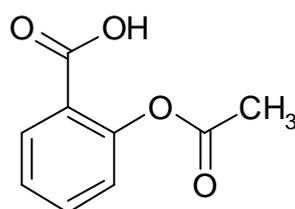
4 Gehaltsbestimmung von Analgetika

4.1 Wirkstoffbeschreibung

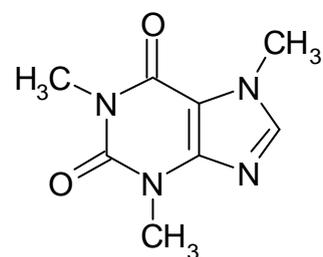
Paracetamol (1) gehört unter den Analgetika zur Gruppe der Aminophenolderivate. Es zeigt gute antipyretische und analgetische Wirkung. Paracetamol wird sowohl als Mono- wie auch als Kombinationspräparat, zum Beispiel in Kombination mit Acetylsalicylsäure (2), eingesetzt. Acetylsalicylsäure zeigt im Vergleich zu anderen Salicylsäurederivaten aufgrund der veresterten phenolischen Hydroxylgruppe stärkere antipyretische und antiphlogistische Wirkung und besitzt außerdem einen thrombozytenaggregationshemmenden Effekt. Coffein (3) ist ein Xanthinderivat und wird als zentralwirksames Stimulans eingesetzt.



(1)



(2)



(3)

4.2 Quantifizierung der Arzneistoffe

In der Literatur sind neben photometrischen [41], titrimetrischen [42] und gaschromatographischen [43] Methoden eine Vielzahl von flüssigchromatographischen [44][45][46] und dünnschichtchromatographischen Methoden [47][48][49][50] zur Bestimmung von Acetylsalicylsäure, Coffein und Paracetamol beschrieben. Weit weniger Literaturangaben findet man zur quantitativen Bestimmung mittels Videodensitometrie. Als Beispiel sei die Bestimmung der Verunreinigungen von Torasemid [23] genannt. Im Bereich der Lebensmittelchemie wurde auch Coffein mittels Videodensitometrie quantifiziert [21].

4.3 Dünnschichtchromatographie

Da die untersuchten Arzneistoffe keine Eigenfluoreszenz zeigen und auch im VIS-Bereich nicht detektierbar sind, wurde die Gehaltsbestimmung mittels Fluoreszenzlöschung bei 254nm durchgeführt. Dies hat jedoch zur Folge, daß Coffein mit einem Absorptionsmaxima bei 270 nm nur sehr schwache Absorption zeigt und aufgrund dessen die Detektion mit dem Videosystem schlechter ist. Um einen direkten Vergleich von Scanner und Videogerät durchführen zu können, wurde die Wellenlänge am Scanner nicht an das Coffein angepaßt. Bei den untersuchten Tabletten handelt es sich sowohl um Mono- als auch um Kombinationspräparate unterschiedlicher Zusammensetzung (Tab. 4.1).

Tabelle 4-1: Zusammensetzung der Tabletten in [mg]/Tabl.

Tablette	Paracetamol	ASS	Coffein
ParacetamolPlus-ratiopharm®	400	—	50
Paracetamol-ratiopharm®500	500	—	—
ASS-ratiopharm 500®	—	500	—
Spalt®	300	300	—

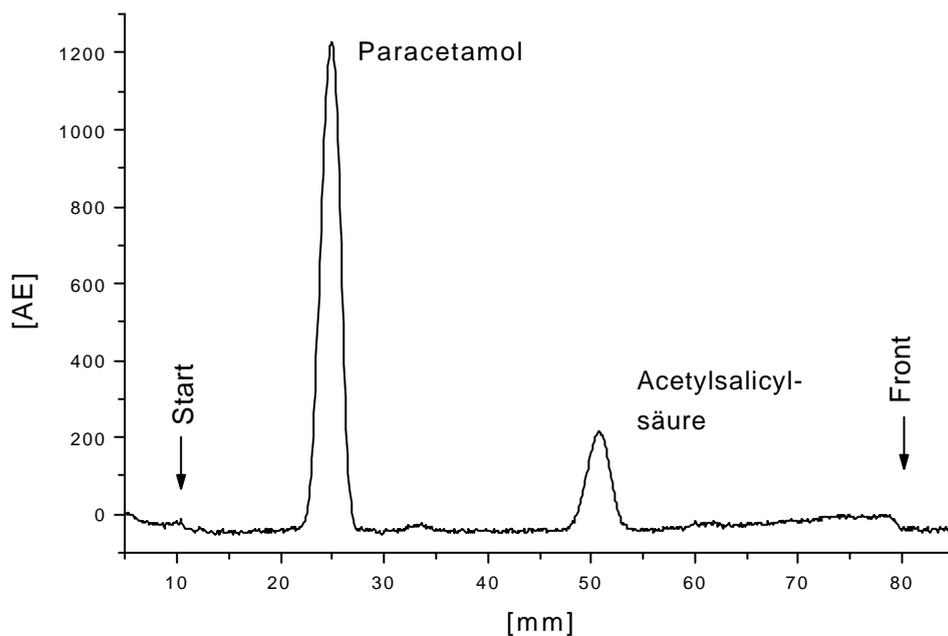


Abb. 4-1: HPTLC-Chromatogramm einer Spalt®-Tablette mit den Wirkstoffen Paracetamol und ASS bei einer Meßwellenlänge von 254 nm und einem Spalt von 0,1 x 2,0 mm.

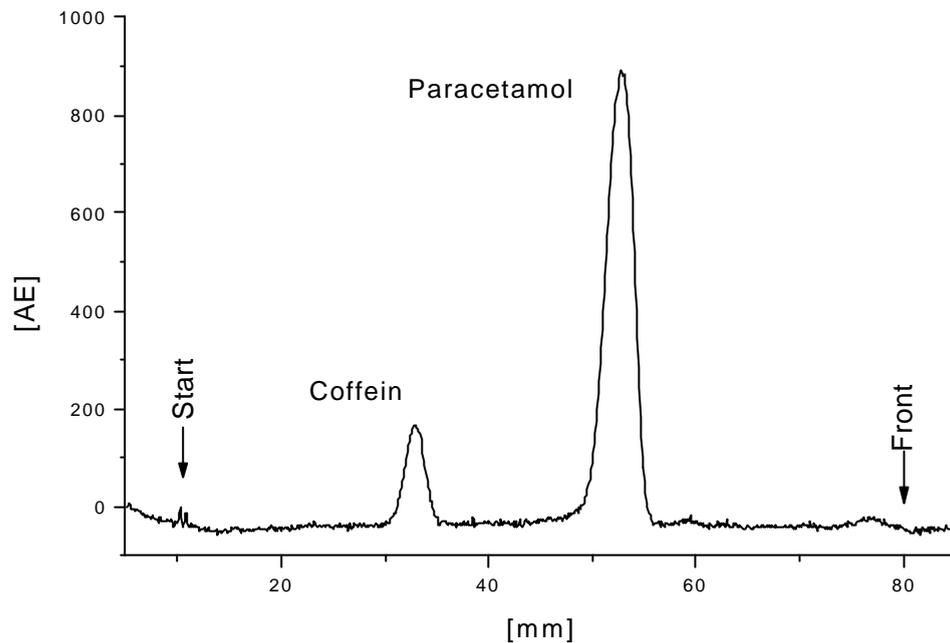


Abb. 4-2: HPTLC-UV-Chromatogramm einer ParacetamolPlus-ratio-pharm[®]-Tablette bei einer Meßwellenlänge von 254 nm und einem Spalt von 0,1 x 2,0 mm.

Als Fließmittel zur Trennung von Acetylsalicylsäure und Paracetamol wurde ein in der Literatur beschriebenes ternäres Gemisch aus Toluol, Ethylacetat und Ameisensäure eingesetzt [113]. Um die Trenneigenschaften zu verbessern wurde der Gehalt an Toluol um 25 % erhöht, der Ethylacetatgehalt um 25 % erniedrigt während der Anteil an Ameisensäure gleichbelassen wurde. Die Trennung von Coffein und Paracetamol erfolgte mittels einer Mischung aus Ethylacetat und Methanol (95 + 5, v+v).

4.4 Kalibrierfunktionen und Nachweisgrenzen

Die theoretischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden aus den linearen Kalibrierfunktionen (Abb. 4-3...4-5) nach Funk berechnet [105]. Hierzu wurden sieben äquidistante Standardkonzentrationen in einem Arbeitsbereich von 80-120% des Gehaltes der Probe auf die Platte aufgetragen.

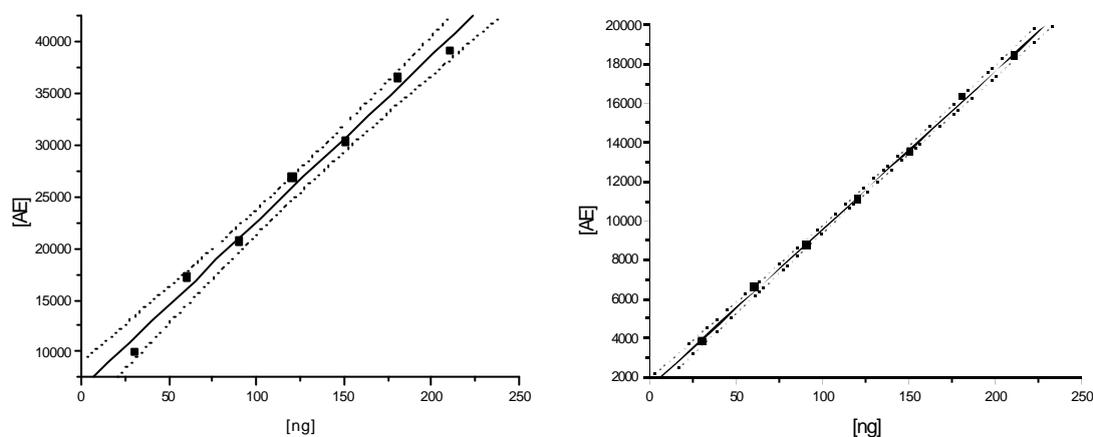


Abb. 4-3: Lineare Kalibrierfunktion von **ASS** mit Konfidenzintervall ($\alpha=0,05$). Video (links) $R=0,9947$, Scanner (rechts) $R=0,9994$. Vgl. Tab.9-8.

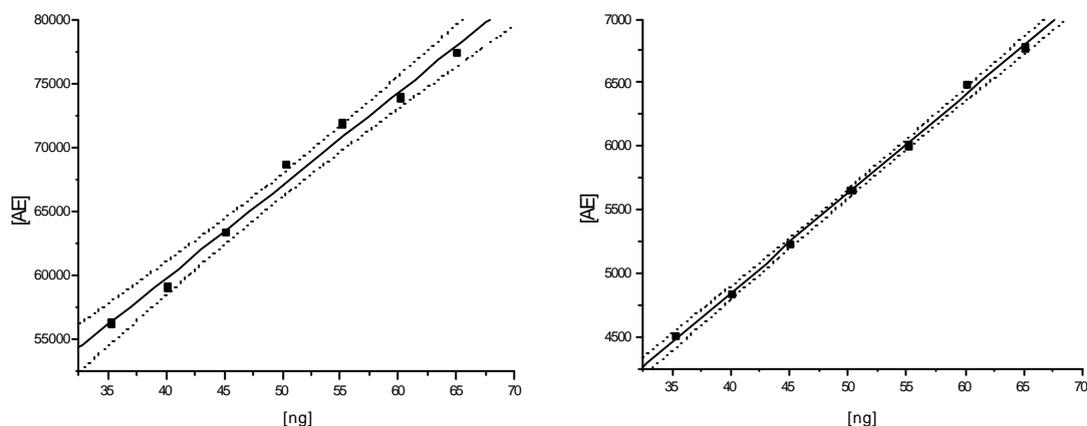


Abb. 4-4: Lineare Kalibrierfunktion von **Paracetamol** mit Konfidenzintervall ($\alpha=0,05$). Video (links) $R=0,9940$, Scanner (rechts) $R=0,9991$. Vgl. Tab.9-4.

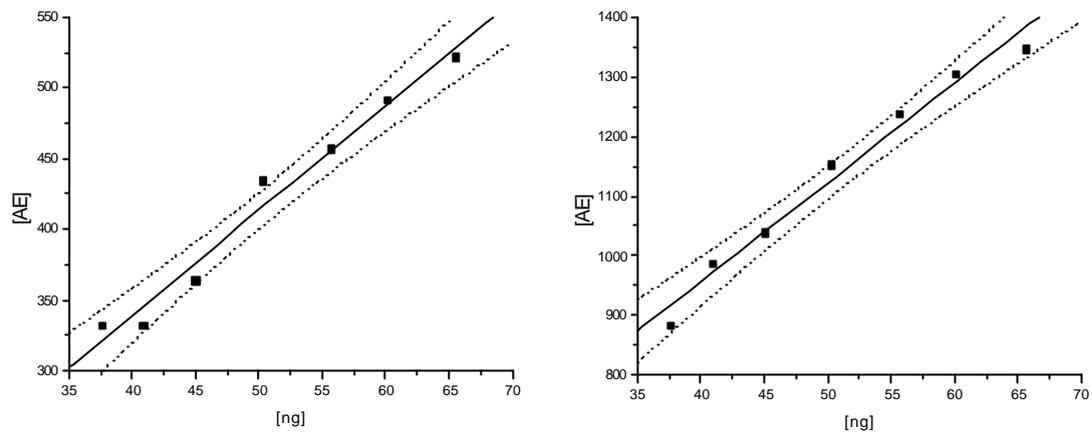


Abb. 4-5: Lineare Kalibrierfunktion von **Coffein** mit Konfidenzintervall ($\alpha=0,05$). Video (links) $R=0,9615$, Scanner (rechts) $R=0,9904$. Vgl. Tab.9-9.

Die theoretischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sind mit dem Videogerät aufgrund des höheren Vorhersagebereichs ca. doppelt bis dreifach so hoch, wie die für den entsprechenden Arbeitsbereich mit dem Scanner ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen (Abb. 4-6).

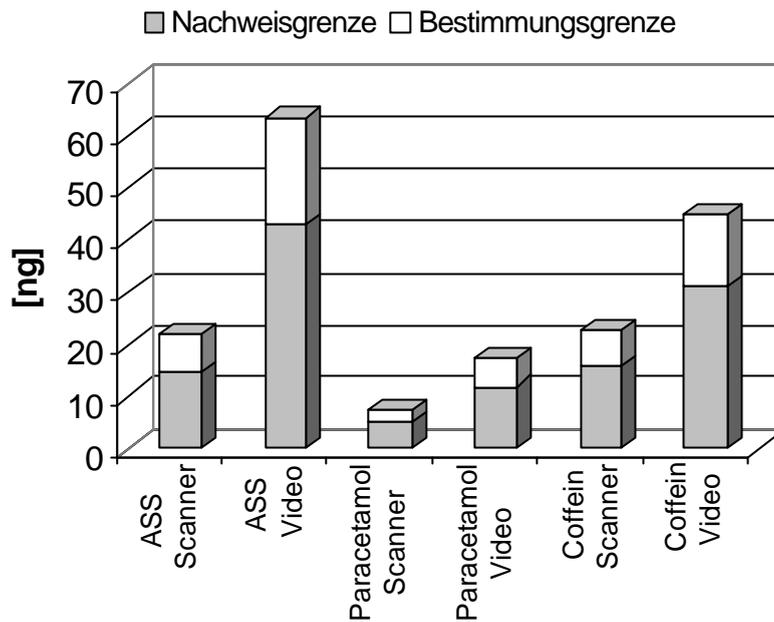


Abb. 4-6: Theoretische Nachweis- und Bestimmungsgrenzen, der angewandten Arbeitsbereiche für Acetylsalicylsäure (ASS), Paracetamol und Coffein.

4.5 Wiederfindung

In der EU sind für Fertigarzneimittel (und damit auch für Tabletten) Freigabespezifikationen für den Wirkstoffgehalt von 95-105% vorgeschrieben. Nur in begründeten Ausnahmefällen ist eine Ausweitung dieser Grenzen möglich. Liegt der gefundene Gehalt in diesem Bereich kann die Bulk-Charge zur Konfektionierung und Verpackung freigegeben werden, sofern alle weiteren Prüfanforderungen erfüllt sind.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die einzelnen Hilfsstoffkomponenten der Tabletten nach ihrer Deklaration (s. Exp. Teil Tab. 9-2) zusammengemischt. Die Wirkstoffe wurden entsprechend ihrem

Gehalt in der Tablette zugegeben. Diese Mischung wurde pulverisiert und der Wirkstoffgehalt nach der für die Gehaltsbestimmung beschriebenen Methode analysiert. Die Wiederfindung (Tab. 4-2) liegt mit dem Scanner für Paracetamol bei 102,9%, für ASS bei 99,2 % und für Coffein bei 96,7% während für die videodensitometrische Bestimmung für Paracetamol eine Wiederfindung von 101,4%, ASS von 101,5% und für Coffein von 103,9 % ermittelt wurde. Der Absolutwert der videodensitometrischen Auswertung weist im Vergleich zum Scanner eine doppelt bis dreifach so hohe Standardabweichung auf (Abb. 4-7).

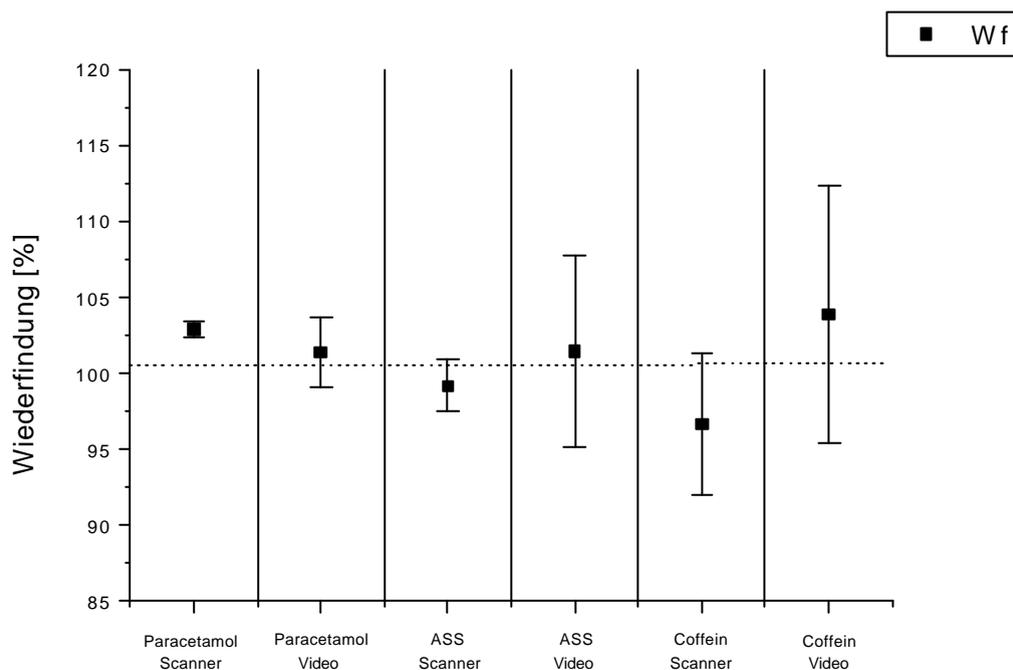


Abb. 4-7: Vergleichende Darstellung der Wiederfindung W_f ($n=6$) und der dazugehörigen Standardabweichung RSD ermittelt mit Scanner und Videogerät.

Tabelle 4-2: Wiederfindung der Wirkstoffe mit Standardabweichung RSD.

	Scanner [%]	RSD [%]	Video [%]	RSD [%]
Paracetamol	102,9	0,48	101,4	2,25
ASS	99,2	1,71	101,5	6,26
Coffein	96,7	4,61	103,9	8,50

Deutlich hebt sich der mit dem Scanner ermittelte Korrelationskoeffizient der Kalibrierfunktion von Paracetamol, ASS und Coffein vom Korrelationskoeffizient der videodensitometrisch ermittelten Kalibrierkurve ab (Abb. 4-8). Vergleicht man die Substanzen untereinander, so ist der Korrelationskoeffizient von Paracetamol und ASS annähernd gleich während der Korrelationskoeffizient von Coffein aufgrund der geringeren Konzentration und Absorption deutlich schlechter ist.

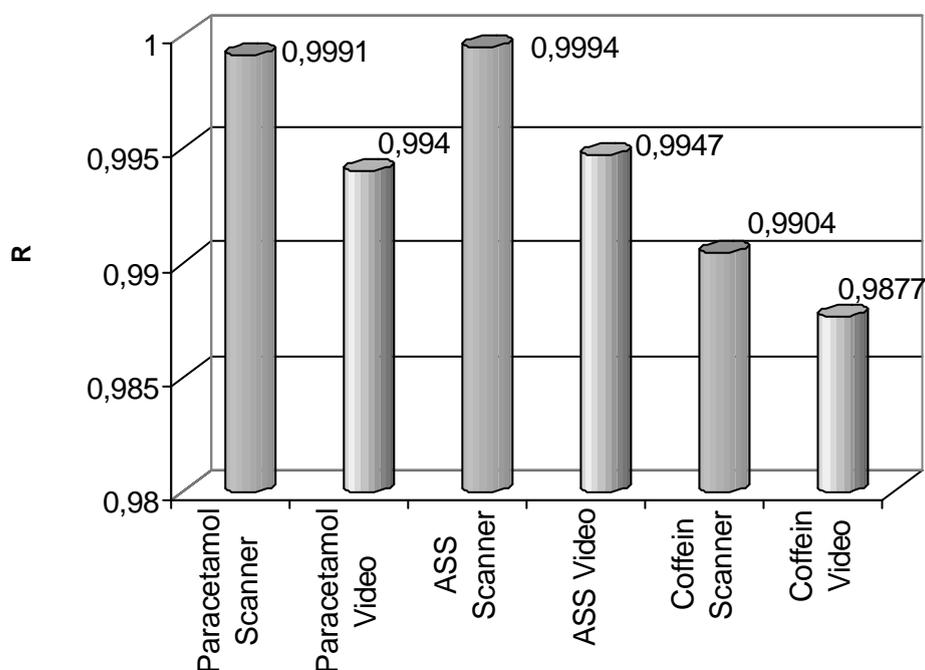


Abb. 4-8: Korrelationskoeffizient R der Kalibriergeraden zur Gehaltsbestimmung der Probe.

4.6 Anwendungen

Die Gehaltsbestimmung erfolgte bei ASS-, Paracetamol- und Coffeinhaltigen Tabletten. Es wurden sowohl Gehaltsbestimmungen aus Mischmustern als auch Tabletteneinzelbestimmungen zur Prüfung der Gleichförmigkeit des Gehaltes [51] durchgeführt.

Der Gehalt der Mischmuster muß innerhalb der Spezifikationsgrenzen (Gehalt $\pm 5\%$) (Tab. 4-3) liegen.

Tabelle 4-3: Spezifikationsbereich der Wirkstoffe pro Tablettentyp.

Wirkstoff	Bereich [mg]
Paracetamol (Spalt®)	285-315
Paracetamol (Kombi)	380-420
Paracetamol (Mono)	475-525
Coffein	47,5-52,5
ASS (Mono)	475-525
ASS (Spalt®)	285-315

Abbildung 4-9 gibt graphisch den mittels Videogerät und Scanner bestimmten Gehalt der Tabletten wieder. In einigen Fällen war der mittels HPLC bestimmte Gehalt des Analysenzertifikates bekannt und wurde zum Vergleich in die Graphik mit aufgenommen. Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche Chargen der ParacetamolPlus®-Tabletten vermessen und angegeben.

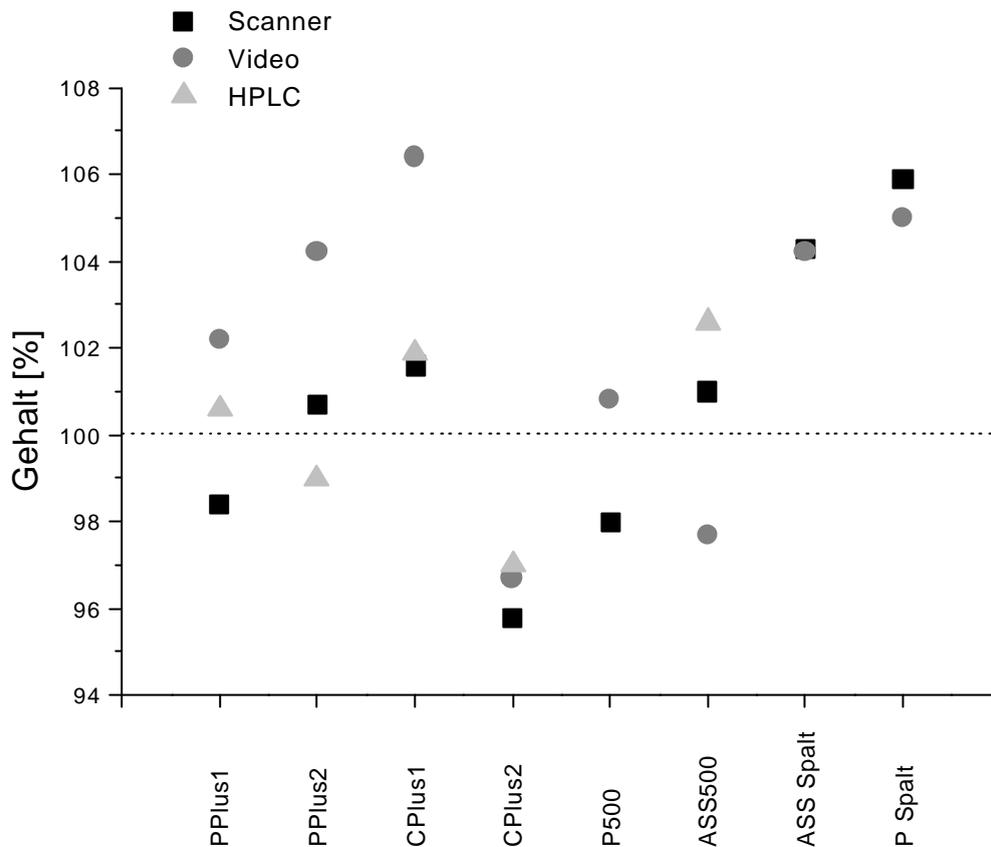


Abb. 4-9: Gehalt der Mischmuster bestimmt mit dem klassischen Scanner und Videogerät (P=Paracetamol 1,2= unterschiedliche Chargen, C= Coffein) im Vergleich zu HPLC-Analysewerten.

Die Prüfung auf Gleichförmigkeit des Gehaltes einzeldosierter Arzneiformen beruht auf der Bestimmung des einzelnen Wirkstoffgehalts einer Anzahl einzeldosierter Einheiten. Die Prüfung wird durchgeführt, um festzustellen, ob der Gehalt einer Einheit innerhalb der festgelegten Grenzen liegt, die auf den Durchschnittsgehalt eines Musters bezogen werden. Von 10 zufällig nach dem Stichprobenverfahren entnommenen Einheiten wird einzeln der Wirkstoffgehalt mit Hilfe eines geeigneten Analysenverfahrens bestimmt.

Für Tabletten entspricht die Zubereitung der Prüfung, wenn jeder Einzelgehalt zwischen 85 und 115 % des Durchschnittsgehalts liegt. Sie entspricht nicht, wenn mehr als ein Einzelgehalt außerhalb dieser Grenzen liegt, oder wenn ein Einzelgehalt außerhalb der Grenzen 75 bis 125 % des Durchschnittsgehalts liegt. Die durchgeführten Einzelbestimmungen lagen im geforderten Bereich von 85-115% bzw. 75-125% (Tab. 4-4).

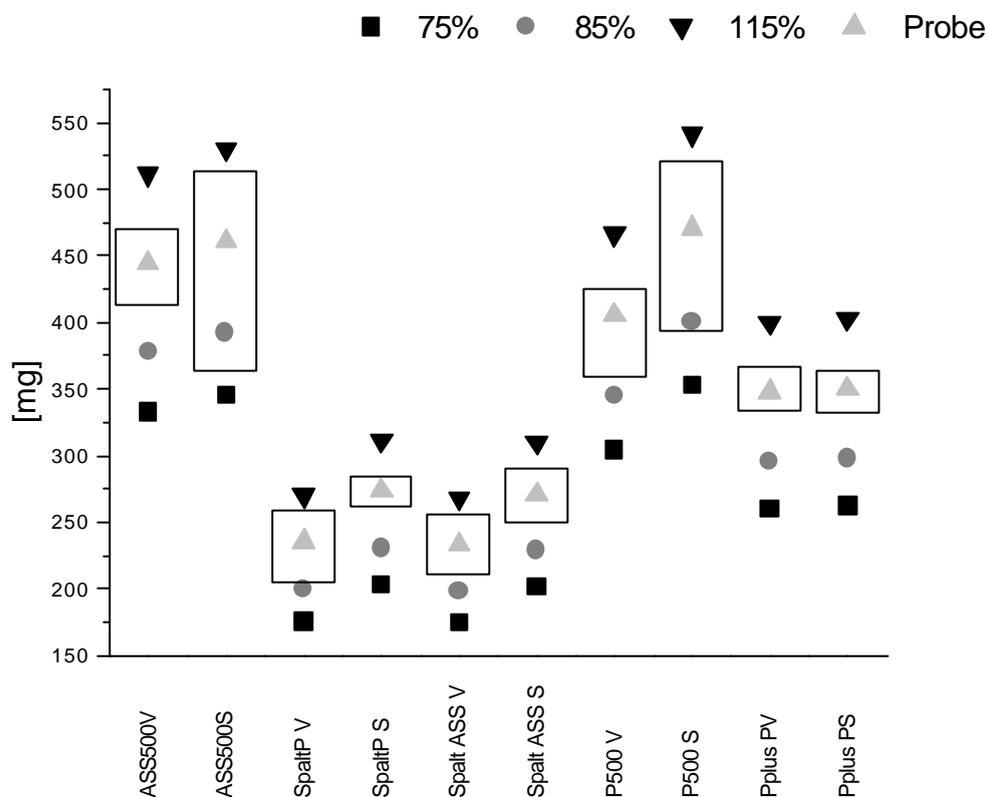


Abb. 4-10: Graphische Darstellung der Tabletteneinzelbestimmung. Angegeben ist der gefundene Bereich (Kasten), die Grenzwerte (75, 85 und 115 %), sowie der Mittelwert der Proben (P = Paracetamol 1,2 = unterschiedliche Chargen, C = Coffein, V = Video, S = Scanner).

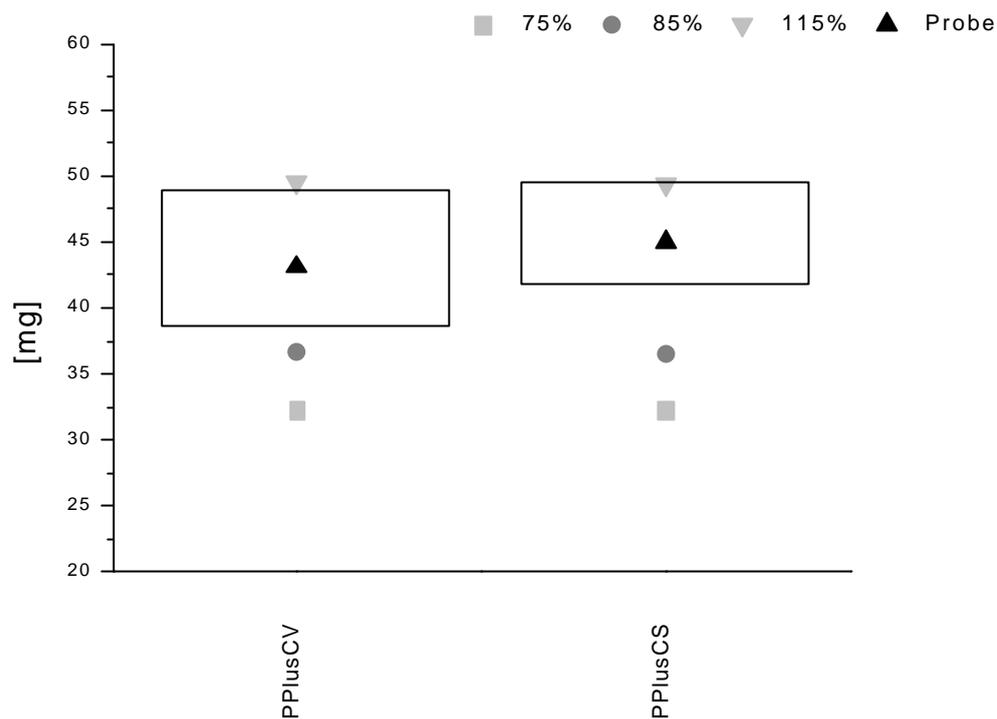


Abb. 4-11: Graphische Darstellung der Tabletteneinzelbestimmung von Coffein (C) in ParacetamolPlus-ratiopharm®-Tabletten. Kasten = gefundener Bereich, V = Video, S = Scanner.

In Abbildung 4-10 und 4-11 ist graphisch das Ergebnis der Tabletteneinzelbestimmung dargestellt. Angegeben sind die Grenzwerte der Einzelgehaltsbestimmung und der Durchschnittsgehalt der Tabletten (Probe). Das Rechteck stellt den Bereich dar, der für den Gehalt der 10 Einzelbestimmungen bestimmt wurde. Im Falle der Gehaltsbestimmung von ASS500 und P500 mit dem Scanner wurde der Grenzwert von 85% bei *einer* Tabletteneinzelbestimmung überschritten, liegt aber noch innerhalb der 75 %-Grenze. Da nach dem Deutschen Arzneibuch *ein* Einzelgehalt außerhalb der 85 %-Grenze liegen darf entspricht die Zubereitung der Prüfung.

Tabelle 4-4: Daten der Tabletteneinzelbestimmungen in [mg].
P = Paracetamol, Coff= Coffein.

Tablette	gefundener Bereich	75%	85%	115%
ASS 500 Video	413,4-470,7	333,4	377,9	511,2
ASS 500 Scanner	363,9-513,2	345,9	392,0	530,4
Spalt P Video	205,2-259,1	176,2	199,8	270,4
Spalt P Scanner	262,4-285,0	203,2	230,3	311,7
Spalt ASS Video	211,3-256,1	174,8	198,2	268,1
Spalt ASS Scanner	250,8-289,9	201,9	228,9	309,7
P500 Video	359,2-424,7	304,2	344,8	466,5
P500 Scanner	394,3-522,1	353,1	400,2	541,4
PPlus Para Video	334,3-366,4	260,5	295,3	399,6
PPlus Para Scanner	332,9-364,5	262,7	297,8	402,9
PPlus Coff Video	38,1-48,1	32,2	36,6	49,5
PPlus Coff Scanner	41,2-48,8	32,2	36,5	49,4

4.7 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Anhand der Bestimmung von ASS, Coffein und Paracetamol aus Tablettenmaterial konnte gezeigt werden, daß eine Gehaltsbestimmung mittels Bildauswertung bedingt möglich ist. Die Wirkstoffe wurden sowohl aus Mischmustern als auch aus Einzeleinheiten erfolgreich bestimmt. Die Bestimmung aus Mischmustern mit dem Scanner ergab für Paracetamol eine Wiederfindung von 102,9%, für ASS von 99,2% und für Coffein von 96,7% während für die videodensitometrische Bestimmung für Paracetamol eine Wiederfindung von 101,4%, ASS von 101,5% und für Coffein von 103,9 % ermittelt wurde. Der Scanner zeigte hierbei mit 0,4-4,6 % eine geringere Standardabweichung im Vergleich zum Videogerät mit 2,2-8,5 %. Da in der EU Gehaltsgrenzen von 95-105 % vorgegeben sind, und auch modernste Herstellungstechnologien eine Variabilität des tatsächlichen Wirkstoffgehaltes nicht vollkommen verhindern können, sollten die Gehaltsbestimmungsverfahren mit Variabilitäten $> 1,5\%$ zur Gehaltsbestimmung vorliegen. Ist dies nicht möglich, muß durch festlegen einer Anzahl von Parallelbestimmungen versucht werden, die Messunsicherheit zu reduzieren. Mit der Bildverarbeitung wird die gesamtzulässige Abweichung von 5% des Soll-Gehaltes überschritten, daher kann diese Methode nur als Screeningverfahren zur Gehaltsbestimmung herangezogen werden. Für die Bestimmung der Content Uniformity ist die Videodensitometry geeignet. Die Spezifikationsgrenzen der Tabletteneinzelbestimmung konnten eingehalten werden, es lagen keine Meßwerte außerhalb von 75 %. Aber auch

hier muß wieder auf die Einschränkung durch die hohe Standardabweichung hingewiesen werden, die das Verfahren für die Gehaltsbestimmung nur bedingt zulassen. Voraussetzung für die videodensitometrische Bestimmung ist ein Absorptionsmaximum im Bereich von 254nm. Liegt das Absorptionsmaximum stark außerhalb dieses Bereiches, wird die Fleckintensität zu schwach und der Fehler bei der Bildverarbeitung zu groß. Ein möglicher Einsatz zur Gehaltsbestimmung wäre der Bereich pflanzlicher Arzneistoffe, in denen die Spezifikationsgrenzen mit 15-20 % deutlich größer sind.

5 Reinheitsprüfung

5.1 Theophyllin

5.1.1 Rohstoff Theophyllin

5.1.1.1 Synthese

Die chemische Synthese (Abb. 5-1) des Theophyllins nach der Traub'schen Purinsynthese geht von N-Cyanacetyl-N,N-dimethylharnstoff (a) aus. Durch Cyclisierung gelangt man zum Aminodimethyluracil (b). Anschließende Nitrosierung (c) und Reduktion der Nitrosogruppe führt zum Diaminodimethyluracil (d). Die Cyclocondensation mit Formamid führt zum Theophyllin (e). Als Nebenprodukt der Synthese kann Aminodimethylformamidouracil (f) entstehen.

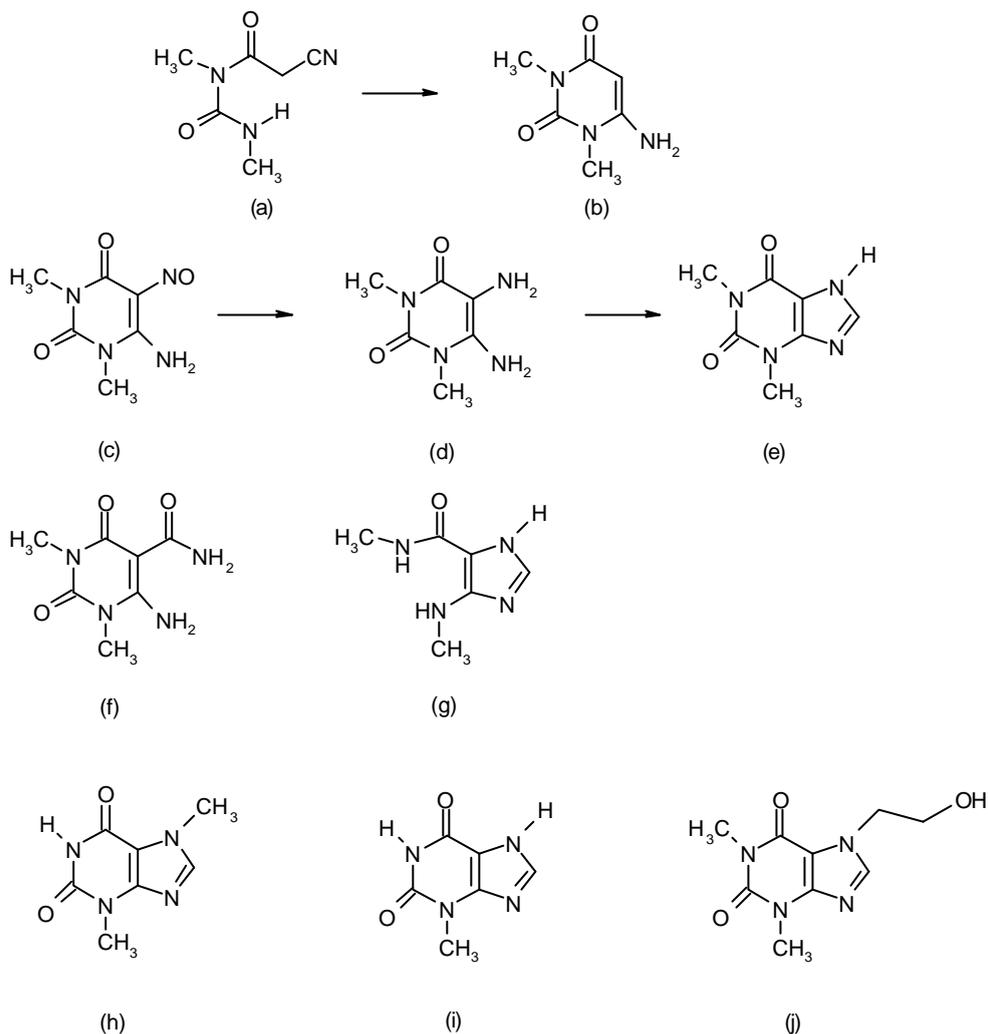


Abb. 5-1: Schematischer Syntheseweg (a)-(e), sowie strukturverwandte Substanzen des Theophyllins (f)-(j).

Einziges bekanntes Abbauprodukt von Theophyllin ist das Imidazolderivat Theophyllidin (g), das durch Einwirken starker Base auf Theophyllin entsteht [52]. Zum Beleg der Leistungsfähigkeit chromatographischer Reinheitsprüfungen werden in der pharmazeutischen Industrie meist strukturverwandte Substanzen in die Reinheitsprüfung mit aufgenommen. Es handelt sich hierbei um Theobromin (h), Methylxanthin (i) und Etofyllin (j).

5.1.1.2 Pharmazeutische Anwendung

Neben der zentralanregenden Wirkung besitzen Methylxanthine auch positiv inotrope, chronotrope und dromotrope Effekte auf das Herz sowie diuretische Eigenschaften. Theophyllin sowie seine wasserlöslichen Salze mit organischen Basen sind wie die β_2 -Sympathomimetika starke Bronchospasmolytika. Zur Asthmaprophylaxe werden Theophyllinkapseln oder Tabletten meist in retardierender Form eingesetzt.

5.1.1.3 Monographie der Arzneibücher

Die USP 1995 [53] sieht eine HPLC-Bestimmung auf einer RP-18-Kieselgelsäule als stationäre Phase und mit Theobromin als internen Standard vor. Als Fließmittel wird Acetatpuffer und Acetonitril verwendet. Auch GC-Bestimmungen und Trennungen sind in der Literatur beschrieben [54]. Nach dem Deutschem Arzneibuch wird die Reinheit von Theophyllin HPLC-analytisch mit RP-18-Kieselgel-Säulen überprüft [55]. Der Gehalt an verwandten Substanzen wird durch die Vergleichslösung auf je 0,5% begrenzt.

5.1.2 Dünnschichtchromatographie

Zur Reinheitsprüfung stellte die Firma Byk Gulden (Konstanz) eine von ihnen entwickelte DC-Methode zur Reinheitsprüfung des Rohstoffs Theophyllin zur Verfügung. Es wurden sowohl strukturverwandte Substanzen als auch mögliche Syntheseverunreinigungen untersucht. Im Chromatogramm (Abb. 5-2) erscheinen die Verunreinigungen zum Teil überlagert, bis auf Aminodimethylnitrosouracil

jedoch deutlich vom Wirkstoffpeak getrennt. In der Routineprüfung werden diese in der Summe erfaßt und auf die 0,5 %-ige Vergleichslösung der absorptionsschwächsten Substanz (*Theophyllidin*) bezogen. Die Auftragemenge an Theophyllin läßt sich – zur Konzentration der Verunreinigungen – nicht unbegrenzt erhöhen, da bei Überladung der Platte die angrenzenden Substanzen nicht mehr eindeutig vom Wirkstoffpeak getrennt werden können. Aminodimethylnitrosouracil und Theophyllin besitzen den gleichen R_f -Wert, Aminodimethylnitrosouracil kann jedoch mit dem Scanner selektiv bei 314 nm erfaßt werden.

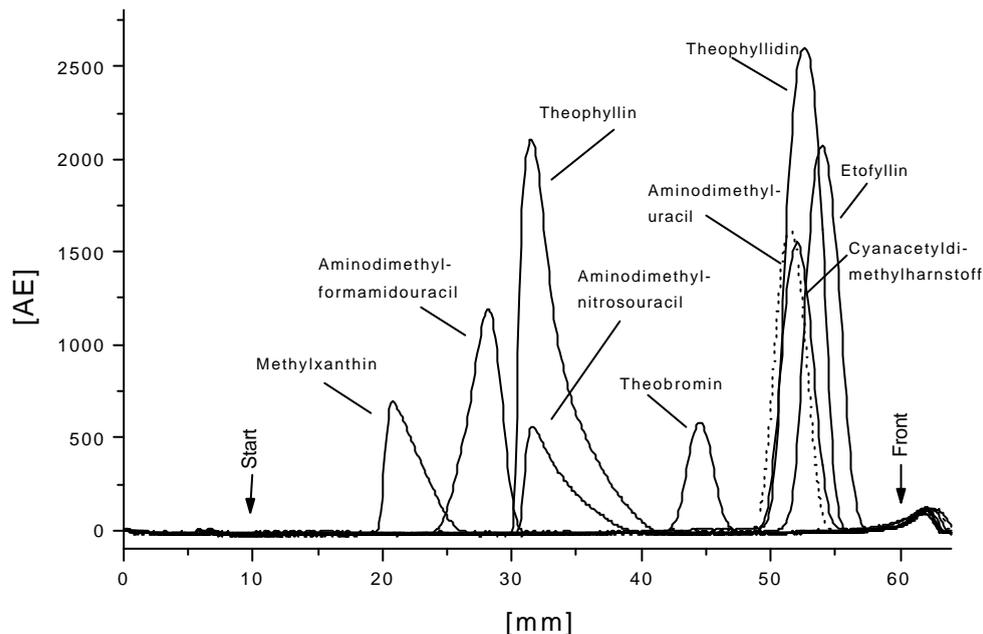


Abb. 5-2: UV-Chromatogramme aller untersuchten Verunreinigungen von Theophyllin. Fließmittel: Toluol, 2-Propanol und 25%-iger Ammoniak. Meßwellenlänge 268 nm, ausgenommen Aminodimethylnitrosouracil bei 314 nm.

5.1.3 Auswertung

Zur Auswertung standen im Falle der Reinheitsprüfung von Theophyllin die Scanner und Videogeräte der Firmen Desaga und Camag zur Verfügung. Die Auswertung an den Densitometern erfolgte bei einer Wellenlänge von 268 bzw. 314 nm und bei 254 nm mit den Videodensitometern. Die Validierung zeigt, daß das Verfahren statistisch gesicherte Ergebnisse liefert und somit zur Bestimmung des Gehalts von Verunreinigungen eingesetzt werden darf, sofern die Spezifikationsgrenzen erfüllt werden können.

5.1.4 Nachweisgrenzen der Verunreinigungen

Die Ermittlung der theoretischen Nachweisgrenze für den angegebenen Arbeitsbereich erfolgte rechnerisch (Gl. 9-9, S. 96) aus der linearen Kalibrierfunktion (Tab. 5-1).

Tabelle 5-1: Berechnete Nachweisgrenzen der Verunreinigungen in [ng].

	Desaga	Camag	DVideo	CVideo
Aminodimethyl-nitrosouracil	24	24	125	104
Theophyllidin	39	54	71	45
Aminodimethyl-uracil	13	24	61	37
Cyanacetyldimethylharnstoff	29	23	222	122
Aminodimethyl-formamidouracil	19	40	81	64
Theobromin	24	23	81	49
Etofyllin	8	33	86	46
Methylxanhin	16	19	50	67

Die theoretische Nachweisgrenze ist sowohl von der gemessenen Substanz als auch vom verwendeten Meßgerät abhängig (Abb. 5-3).

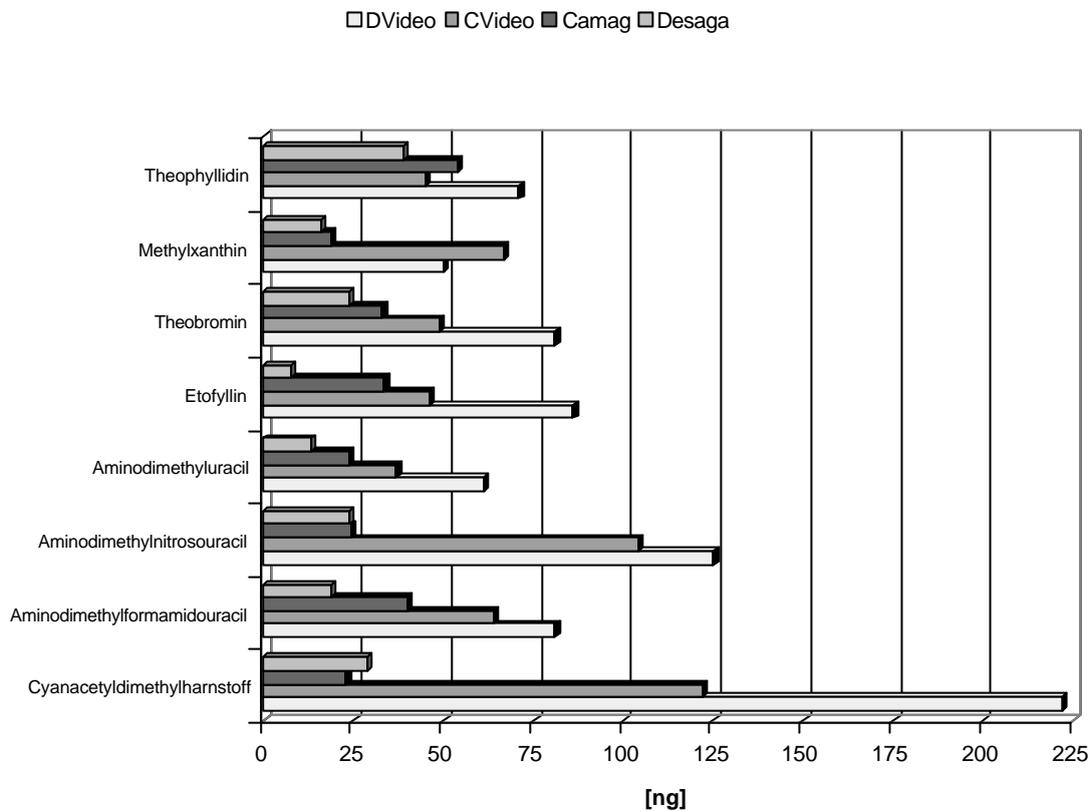


Abb. 5-3: Darstellung der Nachweisgrenzen mit unterschiedlichen Auswertegeräten (Densitometer: Camag, Desaga; Videogeräte: Camag: CVideo, Desaga: DVideo).

5.1.5 Anwendung

Die Überprüfung der Methode erfolgte anhand von Wiederfindungsexperimenten. Hierzu wurde das Fertigpräparat Euphyllong[®] mit einer definierten Menge an Verunreinigungen versetzt und der Gehalt an Theophyllin und dessen Verunreinigungen bestimmt (Abb. 5-4).

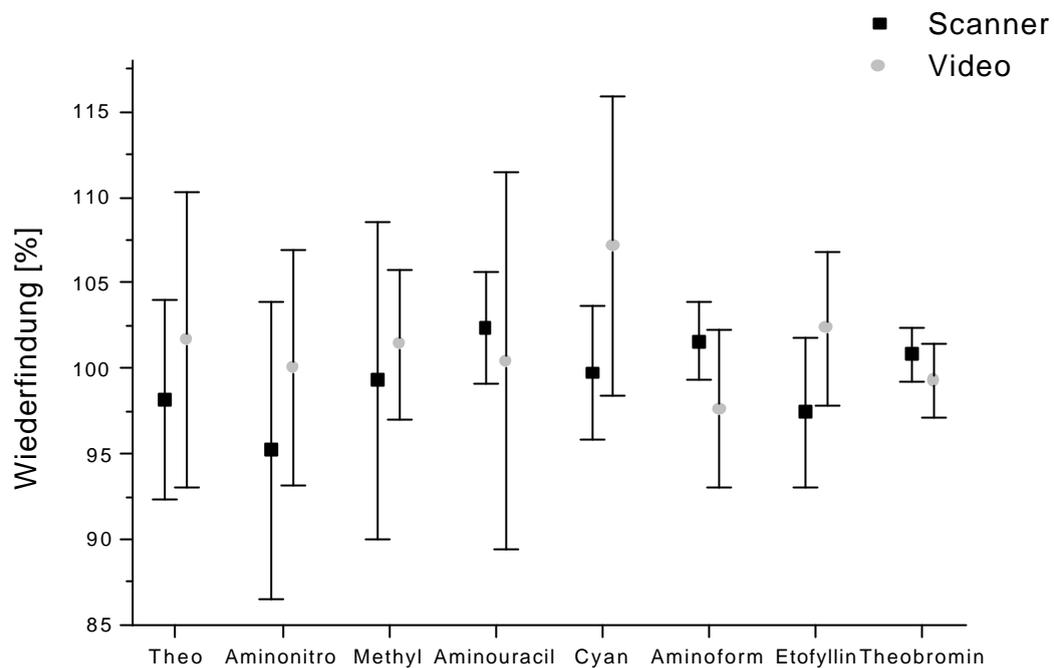


Abb. 5-4: Wiederfindungsrate [%] von je 250 ng der Verunreinigungen.
Theo = Theophyllidin, Aminonitro = Aminodimethylnitrosouracil, Methyl = Methylxanthin, Aminouracil = Aminodimethyluracil, Cyan = N,N-Dimethylcyanacetylharnstoff, Aminoform = Aminodimethylformamidouracil.

Der mit dem Scanner ermittelte Theophyllin-Gehalt von 101,0 % zeigt mit 0,6% einen deutlich kleineren Variationskoeffizienten (VK), im Vergleich zu 5,4 % VK für den mit dem Videogerät ermittelten Gehalt von 99,7 % (Abb. 5-5).

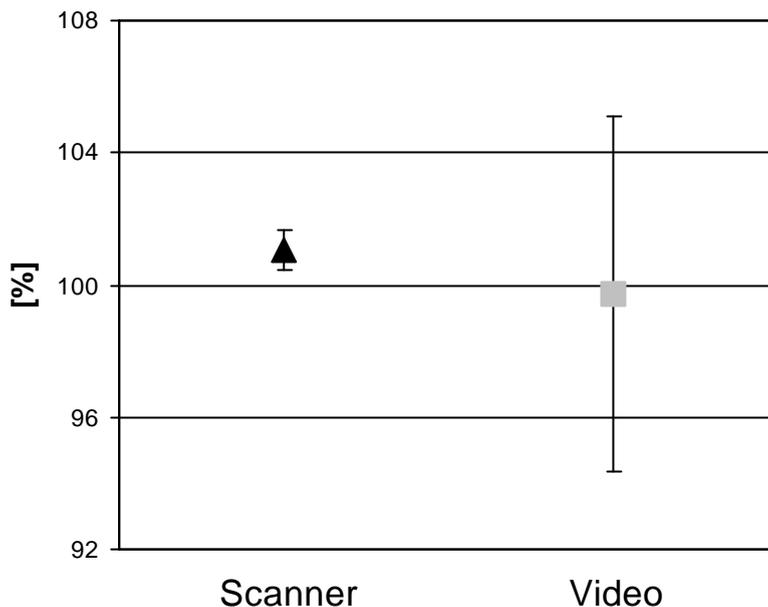


Abb. 5-5: Vergleichende Darstellung von Scanner und Videogerät des gefundenen Wirkstoffgehalts, bezogen auf den Soll-Gehalt, mit Variationskoeffizient [%] von Theophyllin.

5.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Reinheitsprüfung von Theophyllin auf sieben möglichen Verunreinigungen wurde bei unterschiedlichen Wellenlängen durchgeführt. Mit dem Scanner wurde eine Meßwellenlänge von 314 nm für Aminodimethylnitrosouracil und 268 nm für die weiteren Substanzen gewählt. Die Bildverarbeitung erfolgte bei 254 nm, hierdurch verschlechtern sich die Bedingungen für die videodensitometrische Auswertung, da nicht im Absorptionsmaximum der Substanzen gemessen werden konnte. Aminodimethylnitrosouracil konnte videodensitometrisch nicht zusammen mit Theophyllin erfaßt werden, da die Wellenlänge nicht selektiert werden kann und somit das unter Theophyllin liegende Aminodimethylnitrosouracil nicht erfaßt wird.

Die Scanner unterscheiden sich sowohl in den durchschnittlichen Nachweisgrenzen 23 und 24 ng als auch in den Variationskoeffizienten von 3,2 und 4,1% nicht signifikant. Sie sind somit beide zur Erfassung von Verunreinigungen geeignet. Beim Vergleich der vier Geräte zeigte sich eine starke Diskrepanz der beiden Videogeräte, die sich in durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 5,9 % und 17,4 % bemerkbar machte. Mängel des Suchalgorithmus in der Auswertesoftware bei einem Videogerät führten neben sehr hohen Variationskoeffizienten häufig zu nicht auswertbaren Ergebnissen. Eine Optimierung der Auswertesoftware und des Suchalgorithmus würde eine Auswertung mit diesem System verbessern. Der Einsatz der Videosysteme ist zum derzeitigen Stand nicht zur quantitativen Erfassung von Verunreinigungen im Nanogrammbereich geeignet, da die Nachweisgrenzen bereits im Bereich der Spezifikationsgrenzen ($0,1 \% \hat{=} 10 \text{ ng}$, $0,2 \% \hat{=} 20 \text{ ng}$, $0,5 \% \hat{=} 50 \text{ ng}$) liegen. Die Hardware und Dokumentationssoftware der beiden Videogeräte sind von vergleichbarer Güte, die 3-Chip-Kameras sind identisch.

5.2 Chlordiazepoxid

5.2.1 Benzodiazepine

Benzodiazepine bilden die größte Gruppe innerhalb der Tranquillantien. Sie besitzen meist eine sedierende Wirkungskomponente, sollen Angst und Spannungen abbauen und einen Zustand innerer Gelöstheit hervorrufen, ohne dabei die Leistungsfähigkeit und das Denkvermögen zu beeinflussen. Sie werden als Beruhigungsmittel,

Muskelrelaxantien, aber auch zur Schlaftherapie, zur Narkoseeinleitung oder als Antikonvulsiva eingesetzt [56]. Benzodiazepine können in Kombination mit Antidepressiva zur Behandlung von Angstzuständen im Rahmen einer Psychose eingesetzt werden [57]. Benzodiazepine wirken als allosterische Effektoren des GABA-Rezeptorkomplexes. Sie verstärken den inhibitorischen GABA-Effekt, der durch den Einstrom von Chloridionen zustande kommt [58]. 1960 wurde Chlordiazepoxid (Librium[®]) als erstes 1,4-Benzodiazepin in die Therapie eingeführt [59]. Chlordiazepoxid besitzt eine N-Oxid- und eine Amidinteilstruktur. Durch letztere ist eine Salzbildung möglich. In wässriger Lösung findet sowohl säure- als auch basekatalysiert eine hydrolytische Spaltung zum Demoxepam (2), 7-Chloro-1,3-dihydro-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on-4-oxid, und in saurem Medium weiter zu 4-Amino-5-chlorobenzophenon (4) und Glycin statt (Abb. 5-6).

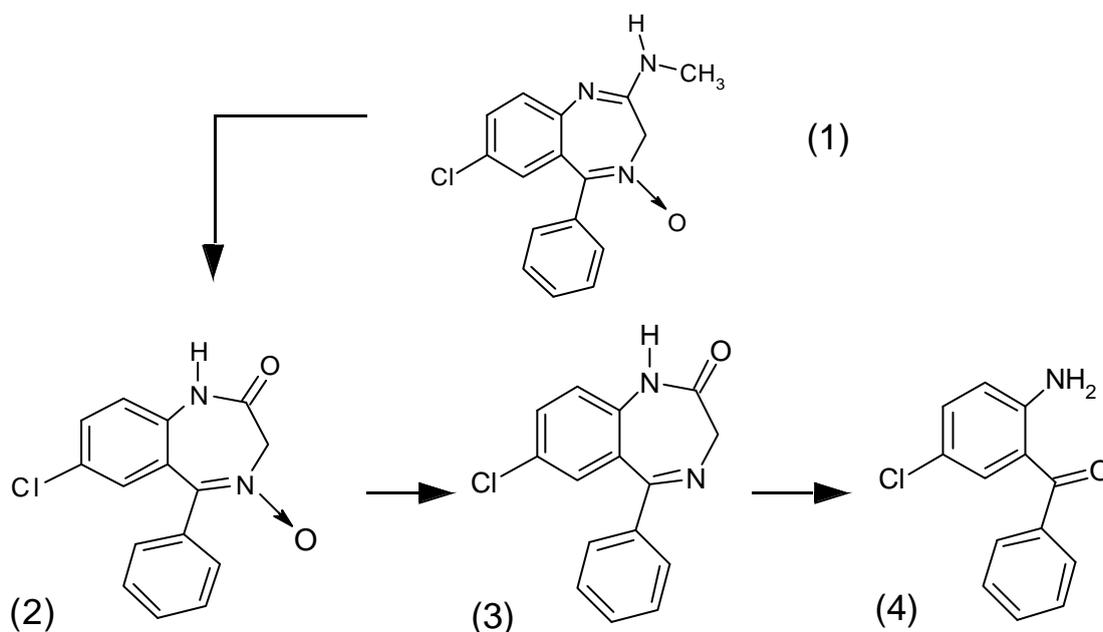


Abb. 5-6: Strukturformeln von Chlordiazepoxid (1) und seinen möglichen Verunreinigungen Demoxepam (2), Nordazepam (3) und Amino-chlorobenzophenon (4).

5.2.2 Analytische Methoden

Zur Quantifizierung der Verunreinigungen sind in der Literatur gaschromatographische [60], superkritisch-flüssig- [61] und hochleistungsflüssigchromatographische Verfahren [62] sowie dünnschichtchromatographische Verfahren [63] beschrieben.

5.2.3 Arzneibuchmonographien Chlordiazepoxid

Sowohl das Deutsche Arzneibuch [64], als auch das Europäische Arzneibuch [65] führen für Chlordiazepoxid die Identitäts- und Reinheitsprüfung dünnschichtchromatographisch durch: Die Prüfung erfolgt unter Verwendung einer Kieselgel 60 F₂₅₄-Platte. Die Untersuchungslösung, sowie die zu 0,1 % verdünnte Referenzlösung und eine Lösung von Aminochlorobenzophenon werden mit einem Fünfkomponentenfließmittel (Kap. 5.2.4) entwickelt. Die Auswertung des Chromatogramms erfolgt visuell mit ultraviolettem Licht bei 254 nm, wobei kein Nebenfleck der Untersuchungslösung größer oder intensiver sein darf als der Fleck der 0,1 %-igen Referenzlösung. Nach Besprühen der Platte mit Natriumnitrit/HCl und Naphtethyldiaminhydrochlorid/Ethanol zum Nachweis primärer aromatischer Amine darf kein dem Aminochlorobenzophenon entsprechender Fleck im Chromatogramm größer sein als die 0,1%-ige Vergleichslösung. Auch das USP 1995 führt Reinheitsprüfungen mit DC durch, prüft aber zusätzlich auf Demoxepam [66]. Die Konzentrationen dürfen 0,1% Demoxepam und 0,01% Aminochlorobenzophenon nicht überschreiten. In Kapseln oder Tabletten werden höhere Konzentrationen, vor allem an Demoxepam (4 %), zugelassen.

5.2.4 Dünnschichtchromatographie

Zur Reinheitsprüfung wird im Europäischen Arzneibuch ein Fünfkomponentenfließmittel [65], bestehend aus Toluol, Ethanol, Ethylacetat, Diethylamin und Wasser verwendet, während das USP 1995 [66] ein einfaches Einkomponentenfließmittel (Ethylacetat) einsetzt. In Vorversuchen wurden beide Fließmittel versuchsweise eingesetzt, wobei sich das Ethylacetat als ungeeignet herausstellte. Ethylacetat wurde in hochreiner Form (für die Chromatographie) bezogen, es zeigte sich jedoch, daß sich in der Fließmittelfront Verunreinigungen akkumulierten, die entweder aus dem Kieselgel der Platte herausgelöst oder mit dem Ethylacetat mitgeführt wurden. Dies macht eine Bestimmung des Aminochlorobenzophenon, welches in der Front mitläuft, unmöglich. Auch ein Vorreinigen der Platte in Ethylacetat erzielte nur geringfügige Verbesserungen, daher wurde für die Reinheitsuntersuchung das Fünfkomponentengemisch des DAB verwendet. Im Mehrkomponentengemisch können die Verunreinigungen der Chlordiazepoxid-Base gut von der Hauptsubstanz getrennt werden. Die Bestimmung des Aminochlorobenzophenon zeigt – insbesondere in der Videodensitometrie – eine höhere Standardabweichung als die anderen Verunreinigungen, da der Fleck aufgrund des hohen R_f -Wertes diffus wird. Eine typische Trennung gibt Abbildung 5-7 wieder.

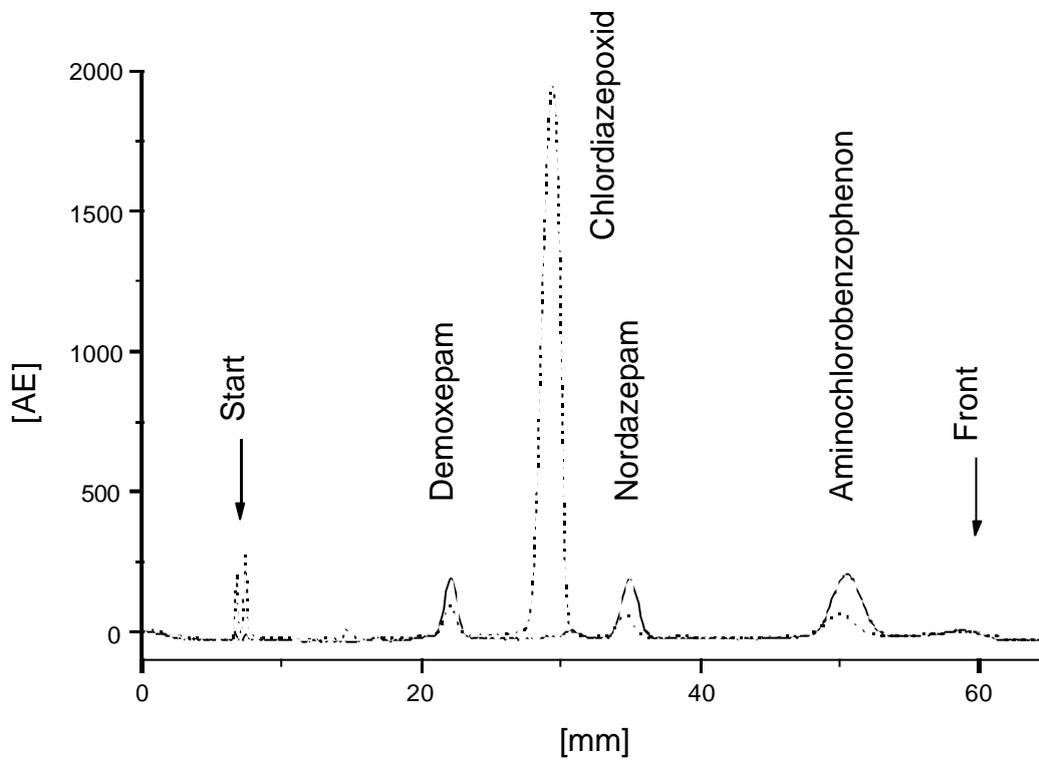


Abb. 5-7: HPTLC-UV-Chromatogramm einer gespikten Probe (gestrichelte Linie) und den Standardsubstanzen Demoxepam, Nordazepam und Aminochlorobenzophenon.

5.2.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Ermittlung der theoretischen Nachweis- (NG) und Bestimmungsgrenze (BG) für den angegebenen Arbeitsbereich erfolgte rechnerisch aus der linearen Kalibrierfunktion (Gl. 9-9 und 9-10 Exp. Teil). Für Demoxepam sind die Grenzen für den Scanner mit 22,8 (NG) und 33,7 ng (BG) im Vergleich zu 47,2 (NG) und 68,7 ng (BG) der videodensitometrischen Bestimmung nur halb so hoch. Mit nahezu identischen Werten (22,0 NG und 33,7 ng BG im Vergleich zu 47,2 NG und 68,7 ng BG) ist dieser Befund auch für Nordazepam wieder-

zufinden. Aminochlorobenzophenon weist dagegen für das Videogerät verglichen mit dem Scanner (32,5 bzw. 48,0 ng) um das dreifach höhere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen auf (83,0 bzw. 122,9 ng) (Abb. 5-8).

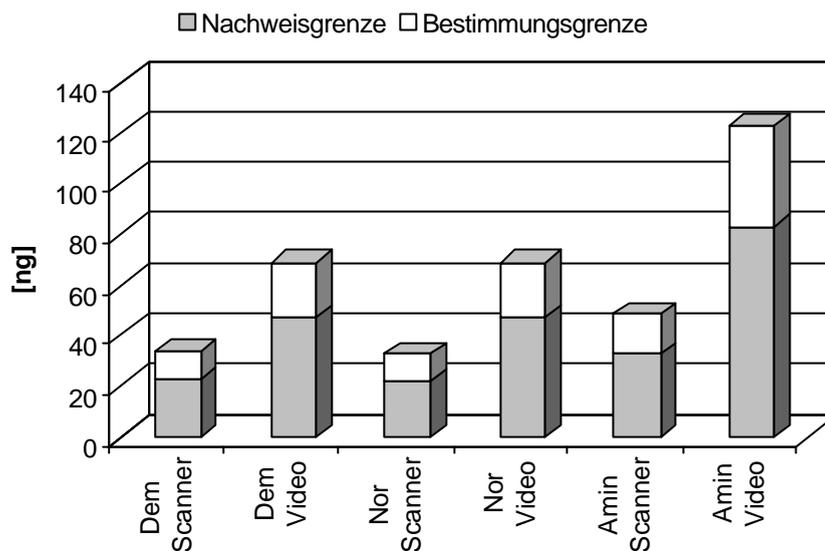


Abb. 5-8: Vergleich der von Scanner und Videogerät ermittelten theoretischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Demoxepam (Dem), Nordazepam (Nor) und Aminochlorobenzophenon (Amin).

5.2.6 Anwendung

Die Anwendung der Methode erfolgte an Radepur[®]-Dragees (10 mg Chlordiazepoxid/Dragee), die mit je 70 ng Demoxepam, Nordazepam und Aminochlorobenzophenon gespikt und anschließend deren Wiederfindung bestimmt wurde.

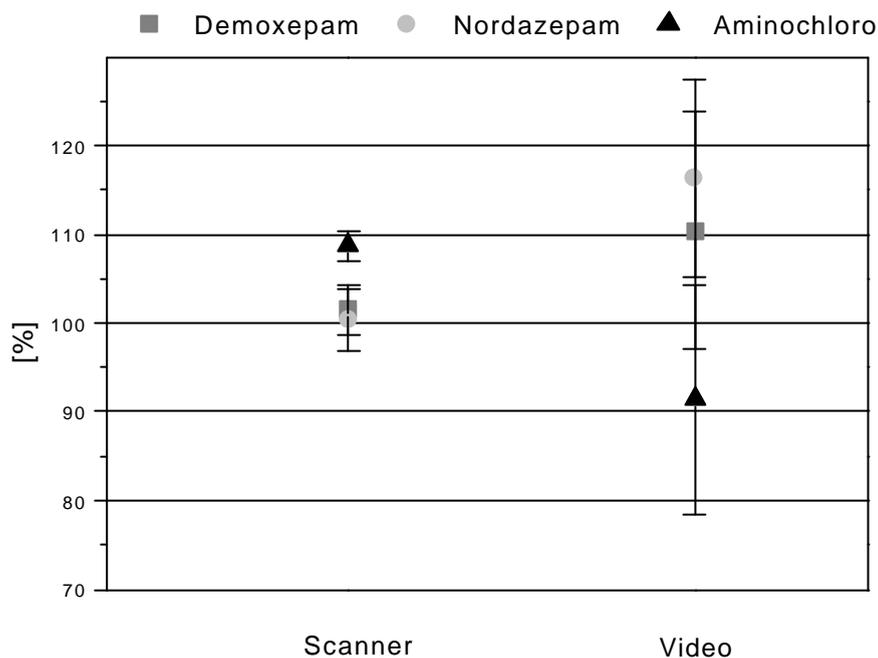


Abb. 5-9: Vergleich der mit dem Scanner und Videogerät ermittelten Wiederfindung [%] ($n=6$) von Demoxepam, Nordazepam und Aminochlorobenzophenon mit der entsprechenden Standardabweichung.

Abbildung 5-9 zeigt, daß die Wiederfindung mit dem Scanner dem theoretischen Wert besser entspricht, als die Auswertung mit dem Videogerät. Das Ergebnis mittels Videodensitometrie zeigt starke Abweichungen vom Soll-Wert und auch die Standardabweichungen von 8-13% sind deutlich höher, wie die entsprechenden beim Scanner.

5.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die guten Ergebnisse der Wiederfindung sowie die niedrigen theoretischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermöglichen die Auswertung der Reinheitsprüfung nach Ph. Eur. mit dem Scanner. Hierbei ist zu beachten, daß es sich nur um die Nachweisgrenzen für diesen Arbeitsbereich handelt, praktisch können mit dem Scanner Nachweisgrenzen im unteren Nanogrammbereich erreicht werden. Dieser Arbeitsbereich ist aber mit dem Videogerät nicht zugänglich. Eine videodensitometrische Quantifizierung ist ab einer Konzentration von 0,35% Verunreinigung für Demoxepam und Nordazepam möglich. Für Aminochlorobenzophenon ist eine quantitative Bestimmung aufgrund der höheren Bestimmungsgrenze ab 0,6 % videodensitometrisch realisierbar. Da die Spezifikationsgrenzen der Arzneibuchmonographien bei 0,1% Demoxepam liegen, ist eine Reinheitsprüfung mittels Videodensitometrie nicht möglich. In Fertigarzneimitteln ist jedoch ein Gehalt von 4 % Demoxepam zugelassen, so daß die Reinheitsprüfung von Kapseln oder Tabletten auch mit Videodensitometrie durchgeführt werden kann.

6 Analyse von Surfactants

6.1 Pharmazeutische Bedeutung

POPG und DPPC sind sogenannte Surfactants. Natürliche vorkommende Surfactants sind maßgeblich für eine intakte Lungenfunktion verantwortlich [67][68]. Diese ist nur gegeben, wenn auch die kleinsten Einheiten der Lunge, die Alveolen (Lungenbläschen), funktionsfähig sind.

Die innere Oberfläche der Alveolen ist von einem Flüssigkeitsfilm bedeckt, der – wenn er nur aus Wasser bestehen würde – aufgrund der hohen Oberflächenspannung zu einer Instabilität führen würde. Tatsächlich ist jedoch die Oberflächenspannung der Alveolen 10mal kleiner als dies für eine wässrige Grenzschicht zu erwarten wäre. Der alveoläre Flüssigkeitsfilm enthält also Substanzen (sog. Surfactants), die die Oberflächenspannung herabsetzen. Es handelt sich hierbei um ein Gemisch aus Proteinen und Lipiden, wobei zu 90 % Phospholipide (vorwiegend Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerin) die Oberflächenaktivität bestimmen. Ist die Bildung oder Wirksamkeit dieser oberflächenaktiven Substanzen gestört, so kollabieren viele Alveolen. Fallen ganze Lungengebiete zusammen, so bezeichnet man dies als Atelektase. Dies ist eine lebensbedrohliche Krankheit mit einer hohen Sterblichkeitsrate von 40-70 %, die bisher nicht pharmakologisch therapiert werden kann. Voraussetzung für eine gesunde Lunge ist die intakte Biosynthese der Surfactantkom-

ponenten sowie ihr Transport in den Lungenraum. Durch äußere Einflüsse wie toxische Gase und Verbrennungen oder krankhafte Veränderungen z.B. Sepsis oder Pneumonien kann die Biosynthese oder das Surfactantsystem gestört werden und damit zu akutem Lungenversagen führen. Mit synthetisch hergestellten oder aus biologischem Material gewonnenen Surfactants versucht man ein Lungenversagen zu verhindern. POPG und DPPC (Abb. 6-1 und 6-2) sind Inhaltsstoffe eines noch in der Entwicklung befindlichen Medikaments zur Behandlung akuten Lungenversagens (ALI, engl. *acute lung injury*).

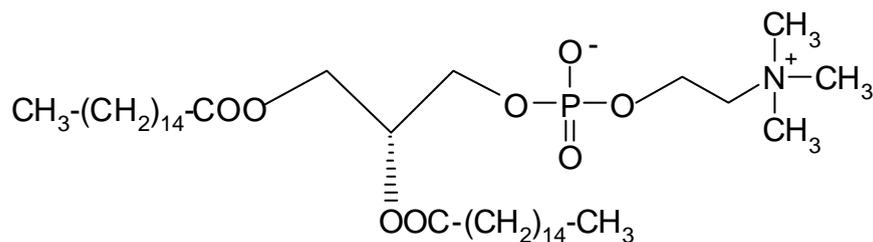


Abb. 6-1: 1,2-Dipalmitoyl-3-sn-phosphatidylcholin (DPPC)

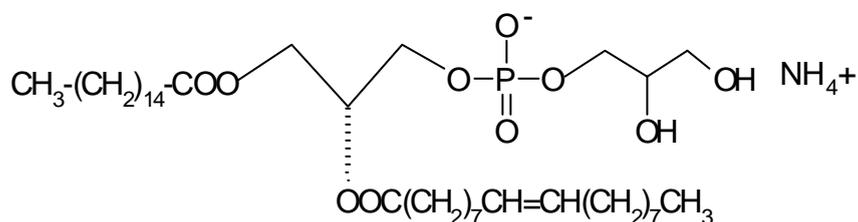


Abb. 6-2: 1-Palmitoyl-2-oleyl-3-sn-phosphatidylglycerol (POPG)

6.2 Chromatographische Methoden

Kolorimetrische [69][70] und fluorimetrische Verfahren [71] sind zeitintensive Methoden zur Lipidbestimmung und für die Routineanalytik ungeeignet. Die HPLC ist in der Phospholipidanalytik aufgrund der Detektionsproblematik nur bedingt einsetzbar [72][73][74]. Es sind mehrere HPLC-Methoden zur Bestimmung von oberflächenaktiven Phospholipiden der Lunge beschrieben [75][76][77]. Eine Alternative hierzu stellt die dünnschichtchromatographische Bestimmung dar. Zur RDS-Diagnose (Respiratory Distress Syndrom) entwickelten Iwamori *et al.* [78] eine dünnschichtchromatographische Immunodetektionsmethode zur Bestimmung des Phospholipid/Sphingomyelin-Verhältnisses im Fruchtwasser. Während Goppelt und Resch [79] eine Bestimmung von Phospholipiden aus biologischem Material mittels eindimensionaler DC durchführten, führten Ruiz und Ochoa [80] zusätzlich eine Bestimmung von Lipiden aus biologischem Material mittels Image Analysing durch. Eine der Videodensitometrie ähnliche Methode wendeten Yamamoto *et al.* [81] zur Bestimmung von Phospholipiden aus Sojabohnen an. Rischer *et al.* [82] stellen eine HPTLC-Methode zur Reinheitsprüfung und Bestimmung des Log-*P*-Wertes eines neuen Phospholipids vor. Es sind vielfältige dünnschichtchromatographische Methoden unterschiedlichster Anwendungsgebiete [85] bekannt, zum Beispiel zur Bestimmung von Phospholipiden in Lecithinen [86], aus pharmazeutischen Produkten und Hirnpräparaten [83] sowie aus Nahrungsfetten [84].

6.3 Dünnschichtchromatographie

6.3.1 Gehaltsbestimmung

6.3.1.1 HPTLC-UV-Chromatogramm

Die Voraussetzung für die Absorption, ein Chromophor, ist bei den Phospholipiden nicht gegeben. Substanzen, die im UV-Bereich nicht absorbieren und auch keine Fluoreszenz zeigen, können durch Derivatisierung detektierbar gemacht werden. Hierfür stehen zwei Verfahren zur Verfügung: die prä- und die postchromatographische Derivatisierung (vgl. Kap. 3.1.3). Am Beispiel des Phosphorsäureglycid und -cholinesters wurde die postchromatographische Derivatisierung mit Kupfer-(II)-sulfat/Phosphorsäure-Reagenz durchgeführt. Durch anschließendes Erhitzen erscheinen die Flecken hellbraun auf hellblauem Hintergrund. Die Chromatogramme werden mit dem Scanner bei 365 nm erstellt (Abb. 6-3). Die videotechnische Aufnahme erfolgte mit Weißlicht im VIS-Bereich (Abb. 6-4). Es ist notwendig, die derivatisierte DC-Platte innerhalb von 30 Minuten zu vermessen, da die Farben schnell verblassen.

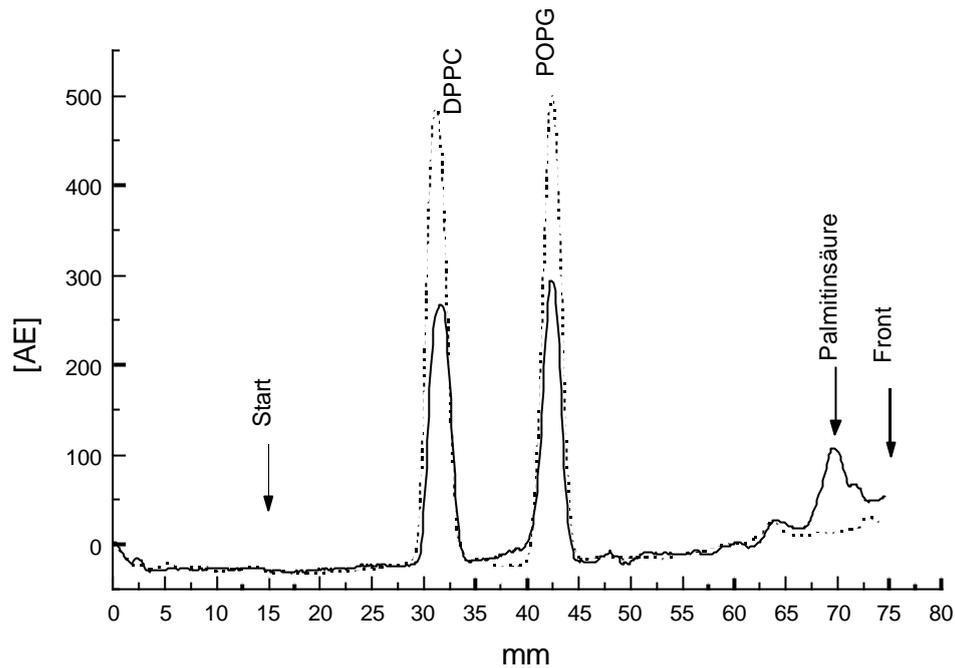


Abb. 6-3: UV-Chromatogramm der Probe (durchgezogene Linie) und einer Standardlösung (gepunktete Linie). Trennstrecke: 6 cm, Meßwellenlänge 365 nm.

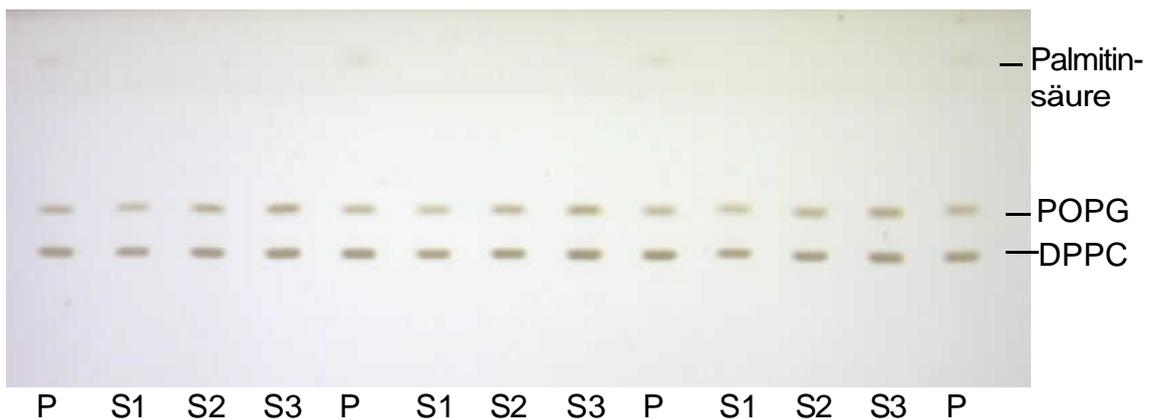


Abb. 6-4: Videodensitometrische Aufnahme mit Weißlicht nach Tauchen der Platte in Kupfer-(II)-sulfat/Phosphorsäurelösung und anschließendem Erhitzen (Probe P auf Bahn 1,5,9 und 13 und Standardbahnen S1-S3).

6.3.1.2 Quantitative Auswertung

Zur quantitativen Auswertung wurde eine Kalibrierung mit sieben äquidistanten Kalibrierpunkten durchgeführt. Die in Kapitel 9.5.4.5 angegebenen Kalibrierkenndaten lagen innerhalb der geforderten Grenzen, so daß diese Methode statistisch gesicherte Ergebnisse liefert und zur Bestimmung des Gehalts von DPPC und POPG eingesetzt werden kann.

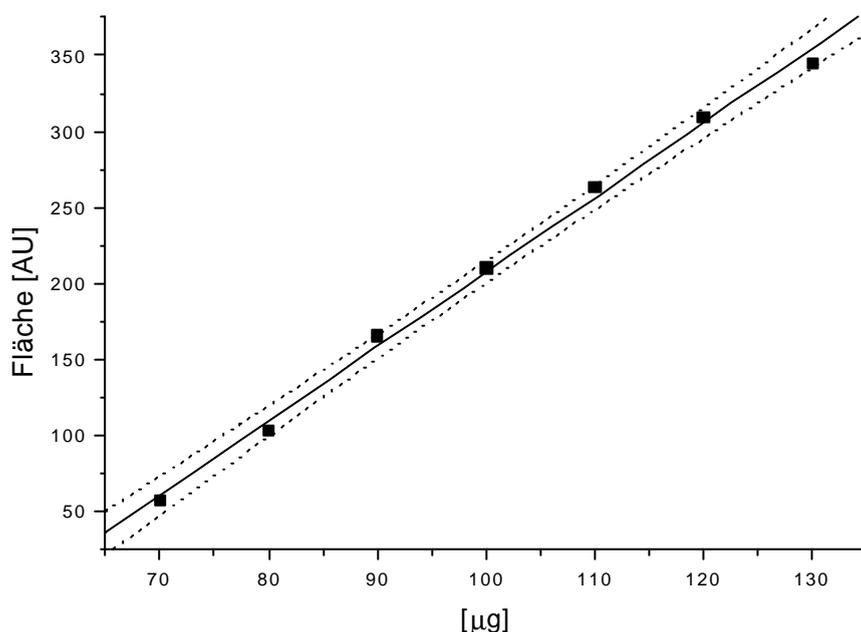


Abb. 6-5: Mit dem Scanner ermittelte Kalibriergerade von DPPC mit Konfidenzband ($\alpha=0,05$). $y=277,42x+6846,81$. $R=0,9968$.

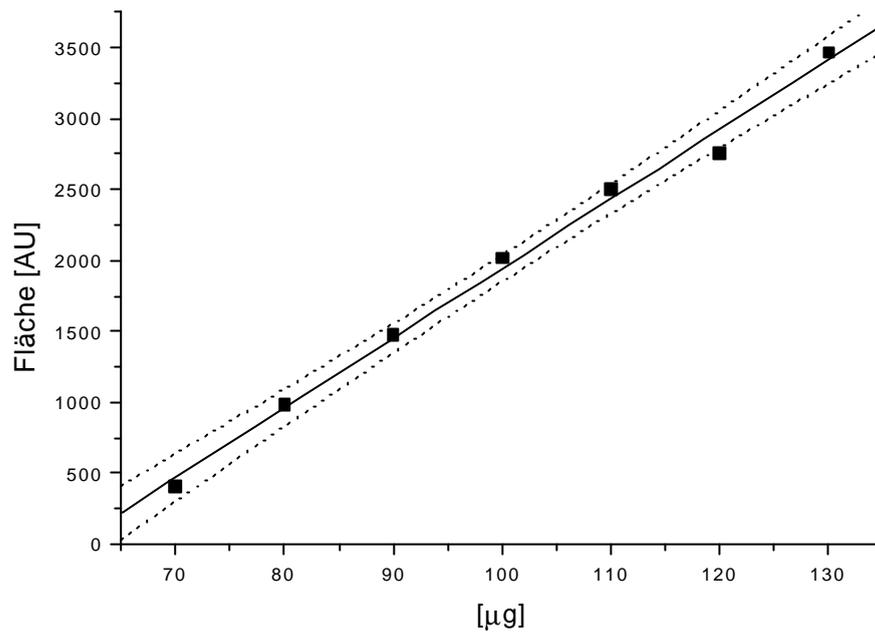


Abb. 6-6: Mit dem Videodensitometer ermittelte Kalibriergerade von DPPC mit Konfidenzband ($\alpha=0,05$). $y= 14,02x + 253,06$. $R= 0,9946$.

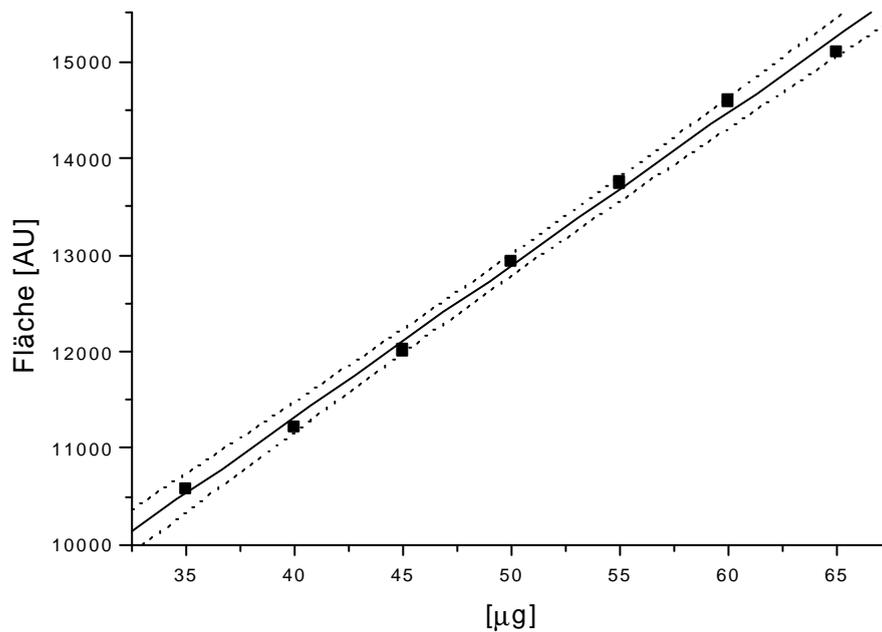


Abb. 6-7: Mit dem Scanner ermittelte Kalibriergerade von POPG mit Konfidenzband ($\alpha=0,05$). $y= 21,57x + 119,50$. $R= 0,9984$.

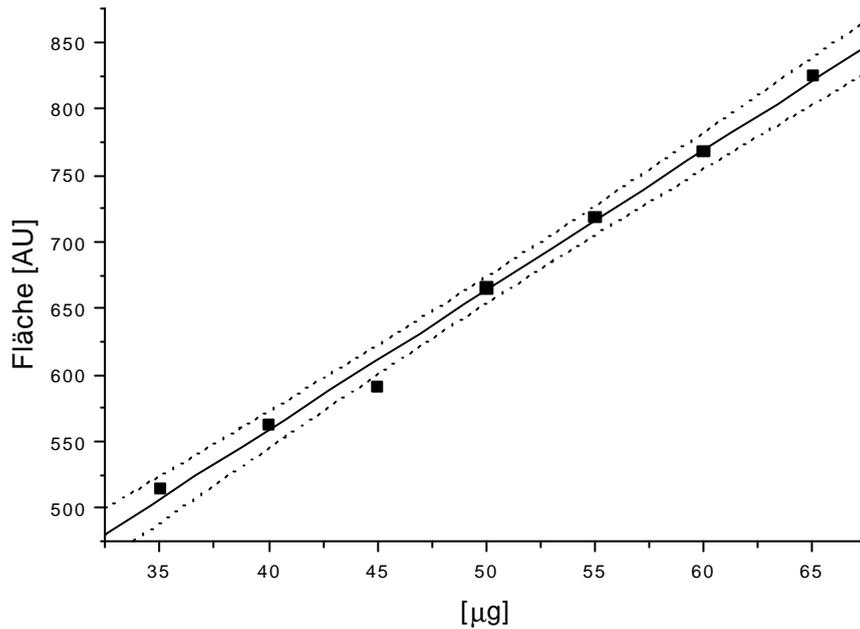


Abb. 6-8: Mit dem Videodensitometer ermittelte Kalibriergerade von PPOG mit Konfidenzband ($\alpha=0,05$). $y= 338,74x + 4401,78$. $R= 0,9990$.

Die Verfahrensvalidierung und Methodenkalibrierung wurde mit einer Siebenpunkt-Kalibrierung statistisch abgesichert. Der Gehalt der Probe wurde anschließend über eine in der Industrie übliche Dreipunkt-Kalibrierung, die Teil dieser Siebenpunkt-Kalibrierung ist, ermittelt. Aus den Kalibrierkurven ergaben sich mit dem Scanner Korrelationskoeffizienten von 0,9980 und videodensitometrisch 0,9967.

6.3.2 Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurde die Hilfstoffmischung aus Calciumchlorid, Palmitinsäure und Natriumhydrogencarbonat mit der einer Probe entsprechenden Wirkstoffmenge versetzt. Die so herge-

stellte Probe wurde nach der bei der Gehaltsbestimmung beschriebenen Methode dem analytischen Verfahren unterzogen. Aus den ermittelten Konzentrationen konnte die Wiederfindungsrate (Abb. 6-9) nach Gleichung (9-8) bestimmt werden. Für POPG ergaben sich eine Wiederfindung von 106 und 109%, für DPPC 95 und 97%. Auch bei der Wiederfindung wurde mit beiden Meßgeräten ein Variationskoeffizient von 5-6 % ermittelt; es ist daher anzunehmen, daß dies auf die Derivatisierung zurückzuführen ist.

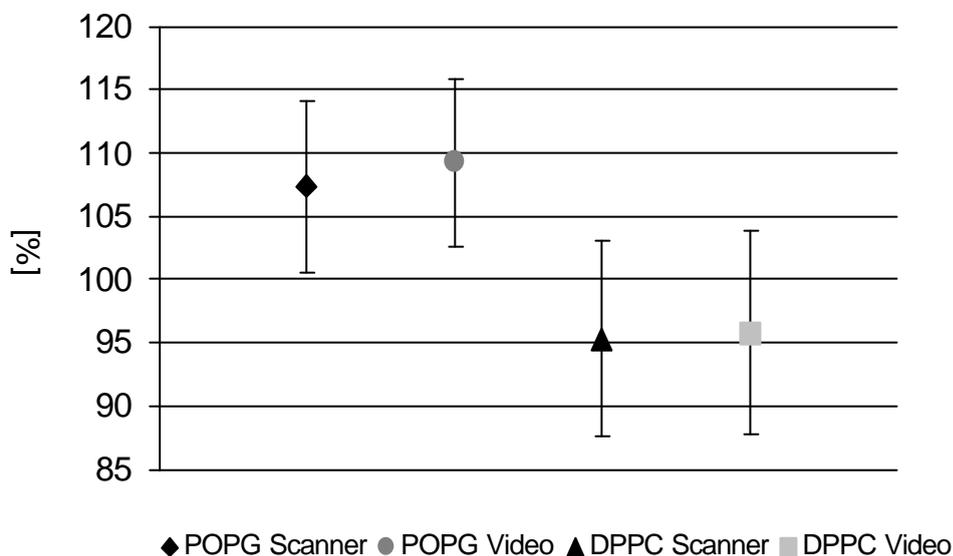


Abb. 6-9: Vergleich der Wiederfindung von POPG und DPPC.

6.3.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die theoretischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden sowohl für POPG als auch für DPPC nach Funk [105] ermittelt. Die Bestimmungsgrenze liegt für die klassische und die videodensitometrische Auswertung sowohl für DPPC als auch für POPG ungefähr eineinhalbmal höher als die Nachweisgrenze.

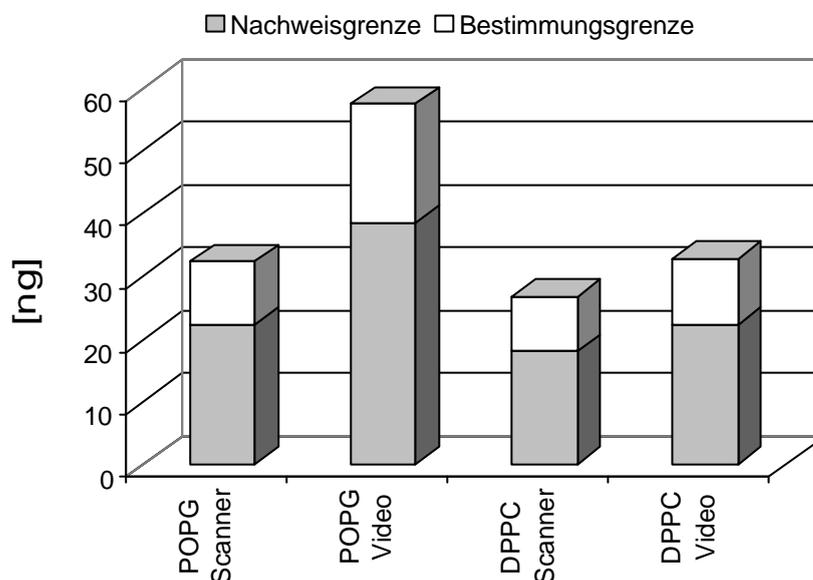


Abb. 6-10: Graphische Vergleich der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen von Scanner und Videogerät für POPG und DPPC.

6.3.4 Anwendung

Die Methode wurde auf das von Byk Gulden zur Verfügung gestellte Probenmaterial (*Venticute*[®]) angewandt. Es handelte sich hierbei um pulverförmiges Material (in Sterilflaschen), das zur Anwendung in Wasser gelöst wird. Neben POPG und DPPC ist in der Probe noch Palmitinsäure enthalten, die jedoch von den beiden Wirkstoffen gut

getrennt wird und somit die Bestimmung der Surfactants nicht beeinflusst. Für die Wirkstoffe wurde generell ein Gehalt von mehr als 100% bestimmt (Abb. 6-11). Dieses Ergebnis war unabhängig vom Meßgerät und wurde durch Mehrfachmessungen bestätigt. Ein hoher Variationskoeffizient von 5-6 % wurde nicht nur bei der Bildverarbeitung ermittelt, sondern durch die Scannerauswertung bestätigt (vgl. auch Wiederfindung Kapitel 6.3.2).

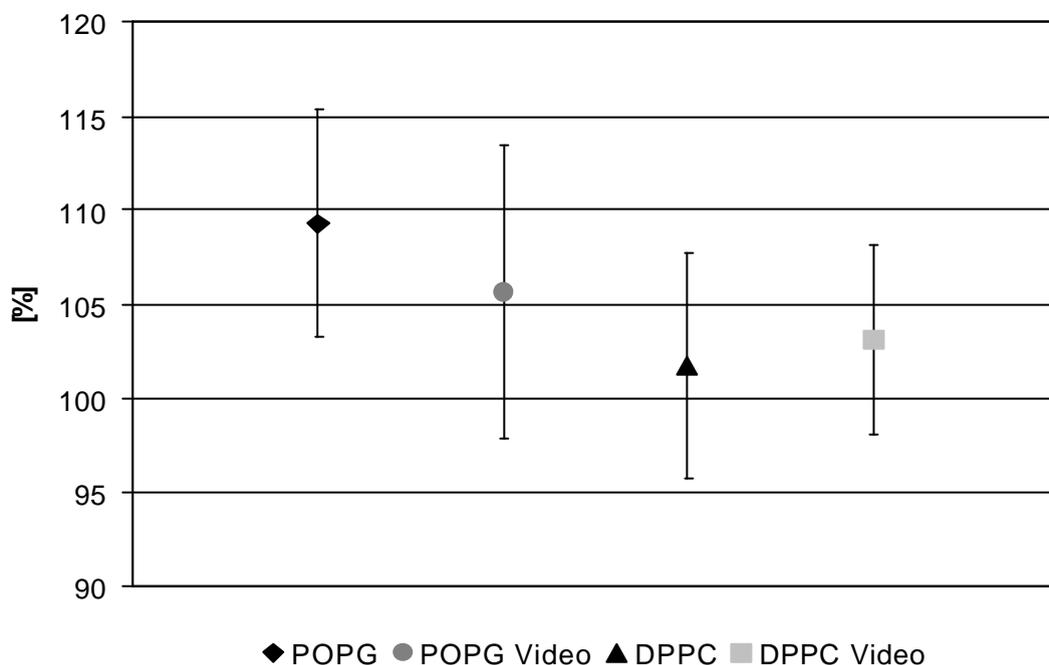


Abb. 6-11: Gehaltsbestimmung von POPG und DPPC mit Scanner und Videogerät bezogen auf den deklarierten Wirkstoffgehalt.

6.3.5 Reinheitsprüfung

Die Reinheitsprüfung erfolgte nach Gesichtspunkten der Arzneibuchmonographien. Für Venticute[®] sind folgende Spezifikationsgrenzen gemeldet: unbekannte Verunreinigungen < 1 %, LPC und LPG < 2 %. Es wurde eine 1%-ige und eine 0,5%-ige DPPC-Vergleichslösung aufgetragen und der prozentuale Gehalt aller Verunreinigungen

gen bestimmt. Die Probe enthält zwei bekannte (Lysophosphatidylglycerol LPG und Lysophosphatidylcholin LPC) sowie mehrere noch unbekannte Verunreinigungen, die sich jedoch gut von den Hauptkomponenten trennen (Abb. 6-12 und 6-13). Die aus den Peakflächen ermittelte Konzentration aller Verunreinigungen liegt mit 2% über der 1%-Vergleichskonzentration von DPPC.

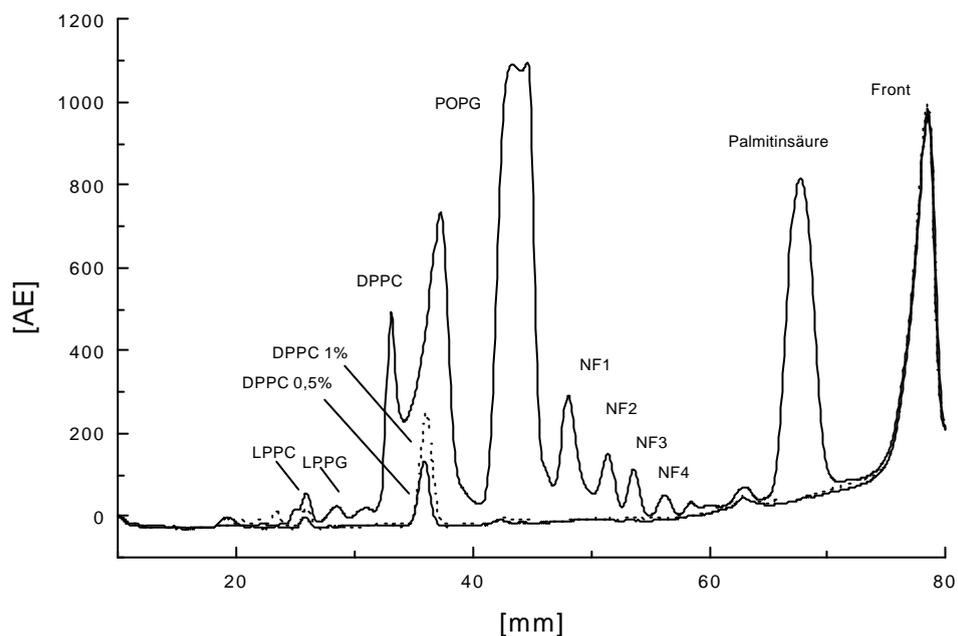


Abb. 6-12: Reinheitsprüfung: Remissions-Ortskurve einer Surfactant-Probe und den 0,5 bzw. 1 % DPPC-Vergleichslösungen.

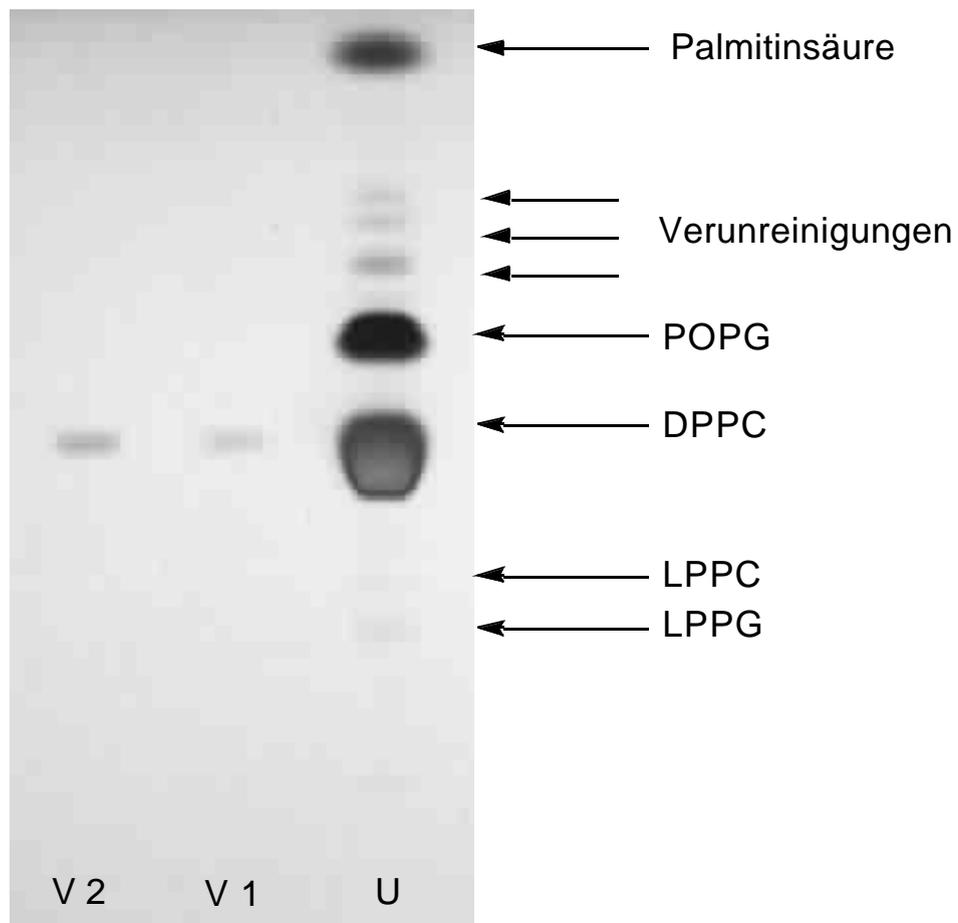


Abb. 6-13: Videoaufnahme der Reinheitsprüfung mit 0,1 % (V1) und 0,5 % (V2) -DPPC Vergleichslösung. U = Untersuchungslösung.

6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Gehalt von DPPC und POPG wurden nach postchromatographischer Detektion mit einem Variationskoeffizienten von 5% bestimmt. Diese hohen Schwankungen wurden mit beiden Auswerteverfahren ermittelt. Das heißt, eine Auswertung im sichtbaren Bereich ist prinzipiell sowohl mit der Bildverarbeitung als auch mit dem Scanner möglich, da das Ergebnis unabhängig vom Meßgerät ist. Die Reinheitsprüfung wies neben Lyso-DPPC und Lyso-POPG noch mehrere nicht bekannte Verunreinigungen auf, deren Summe

mit 2 % größer als der zulässige Gesamtgehalt an Verunreinigungen ist. Das videodensitometrische Ergebnis wurde durch den Scanner bestätigt, so daß auch eine Reinheitsprüfung mit dem Videogerät möglich ist.

7 Fluorimetrische Bestimmung von Cinchocainhydrochlorid

7.1 Cinchocain

Cinchocain (2-Butoxy-N-[2-(diethylamino)ethyl]-chinolin-4-carboxamid) ist ein Chinolinderivat. Es wird im amerikanischen Sprachraum auch als Dibucain bezeichnet.

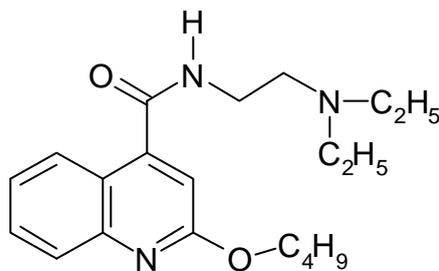


Abb. 7-1: Strukturformel von Cinchocain.

Cinchocain wird als Lokalanästhetikum eingesetzt, welches reversibel die Erregbarkeit der schmerzvermittelnden sensiblen Endorgane durch Blockade der Natriumionenpermeabilität der Nervenmembran unterbricht. Dadurch wird die Signalübertragung zuerst in autonomen, dann in sensorischen und schließlich in motorischen Nervenfasern gehemmt. Cinchocain wird zur Spinalanästhesie [94][95] sowie zur topischen Anwendung bei Hautverletzungen und Juckreiz verwendet.

7.2 Gehaltsbestimmung von Cinchocainhydrochlorid

Neben einer Vielzahl dünnschichtchromatographischen Verfahren – es seien hier nur einige zitiert [96][97] – kennt man unterschiedlichste Methoden zur Bestimmung von Lokalanästhetika: Das Europäische Arzneibuch führt die Gehaltsbestimmung mittels potentiometrischen Titrationsverfahren durch, während das USP 1995 mittels HPLC quantifiziert. Außerdem werden photometrische [98], fluorimetrische [99] und polarographische Verfahren [100] zur Gehaltsbestimmung eingesetzt. Zur Analytik aus biologischem Material – auch neben Metaboliten und anderen Arzneistoffen – wird neben HPLC [101] und GC [103] auch die Dünnschichtchromatographie eingesetzt [104]. Fluoreszenzdetektion mittels Videodensitometrie wurde auf dem Gebiet der Kapillaronenelektrophorese bereits durchgeführt [102].

7.3 Dünnschichtchromatographie

Da Cinchocainhydrochlorid Eigenfluoreszenz zeigt, erfolgte die dünnschichtchromatographische Bestimmung mit Kieselgel 60-HPTLC-Platten ohne Fluoreszenzindikator. Der Einfluß der Messmethodik schlägt sich bei Fluoreszenzmessungen in einem großen Signal-zu-Rausch-Verhältnis nieder. Zur Verdeutlichung wurde das Fluoreszenzchromatogramm (Abb. 7-2 A) von 400ng Cinchocainhydrochlorid auf 1 normiert und der Rauschbereich vergrößert (Abb. 7-2 B). Im Vergleich dazu wurde ein UV-Chromatogramm (Abb. 7-3A)

von 400 ng Paracetamol ebenfalls normiert und im selben Maßstab der Rauschbereich vergrößert (Abb. 7-3B). Deutlich ist das verringerte Rauschen der Fluoreszenzmessung zu erkennen.

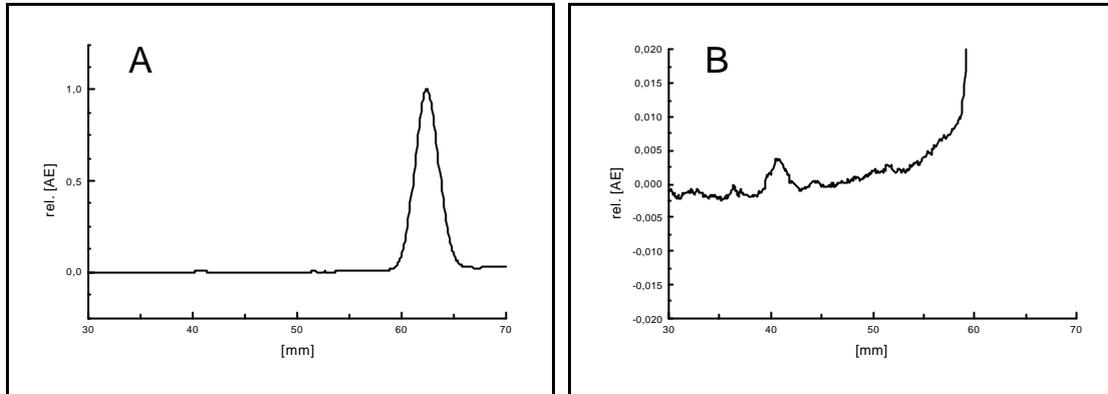


Abb. 7-2: Normiertes Fluoreszenz-Chromatogramm von 400 ng Cinchocainhydrochlorid. Anregungswellenlänge 366 nm.

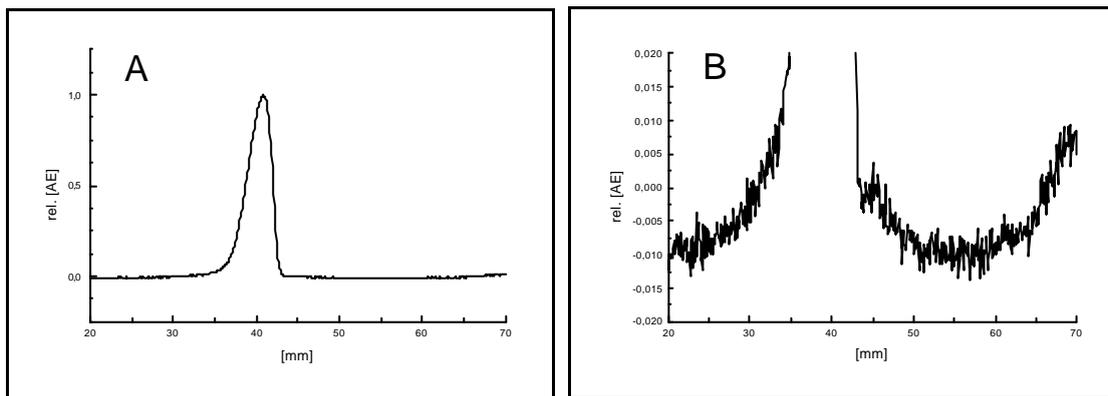


Abb. 7-3: Normiertes UV-Chromatogramm von 400 ng Paracetamol. Meßwellenlänge 254 nm.

Cinchocainhydrochlorid erscheint blau fluoreszierend auf schwarzem Hintergrund; zur besseren bildlichen Darstellung wurde die Aufnahme der HPTLC-Platte in ein Graustufenbild umgewandelt und invertiert (Abb. 7-4).

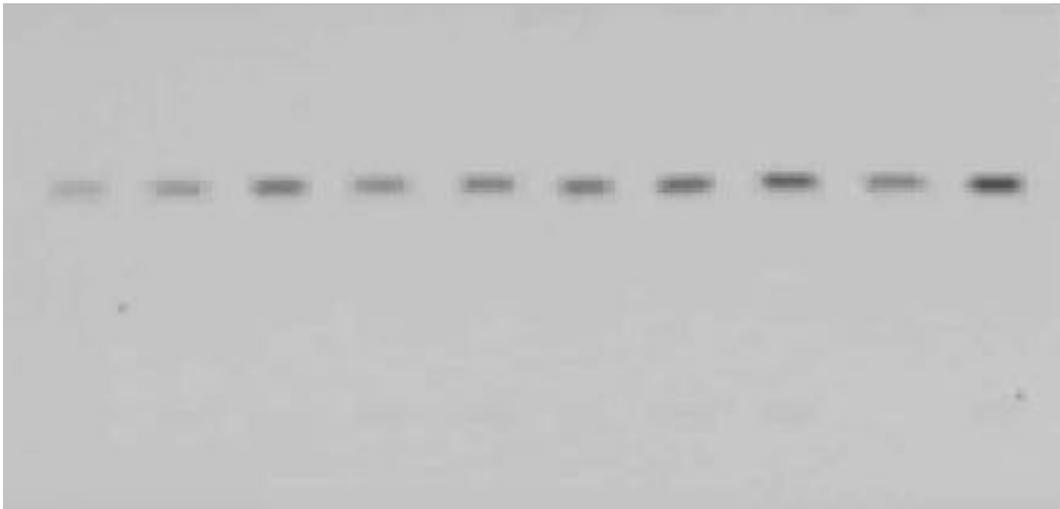


Abb. 7-4: Beispiel einer Fluoreszenzaufnahme (Faktu[®]-Salbe mit Standard-Lösungen) nach Umwandlung in ein Graustufenbild und anschließender Invertierung.

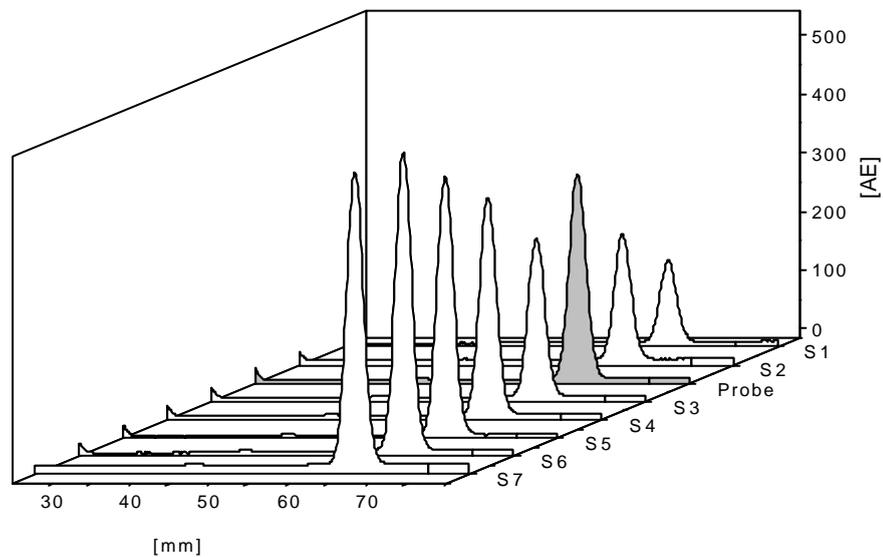


Abb. 7-5: Dreidimensionales HPTLC-Fluoreszenz-Chromatogramm: Standards S1-S7 mit Probe (grau unterlegt). Fließmittel: Toluol + Aceton + Methanol + 25%-iger Ammoniak (25+15+2,5+0,5, v+v).

7.4 Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme

Zur Aufnahme der Chromatogramme (Abb. 7-5) wurde beim klassischen Scanner ein 370 nm-Kantenfilter eingesetzt, bei der videodensitometrischen Aufnahme konnte die Anregungswellenlänge (366 nm) mittels eines Gelbfilters eliminiert werden. Als Vorteil der Videodensitometrie erwies sich die Möglichkeit der Bildaddition. Hierbei wird durch Integration mehrerer Bilder rechnerisch eine Kontrastverstärkung erreicht, so daß auch schwach fluoreszierende Flecken erkannt werden. 1987 wurde von Belchamber et al. [106] die quantitative Bestimmung von derivatisierten Arylsulfonaten mittels Videodensitometrie beschrieben. Zur Kontrastverstärkung war jedoch eine Addition von 800 Bildern notwendig. Bei der Quantifizierung des Cinchocainhydrochlorids war eine Integration von maximal 20 Bildern ausreichend.

7.5 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die theoretische Nachweis- und Bestimmungsgrenze im angegebenen Arbeitsbereich wurde nach Funk [105] über die lineare Kalibrierfunktion berechnet (Abb. 7-6 und Abb. 7-7).

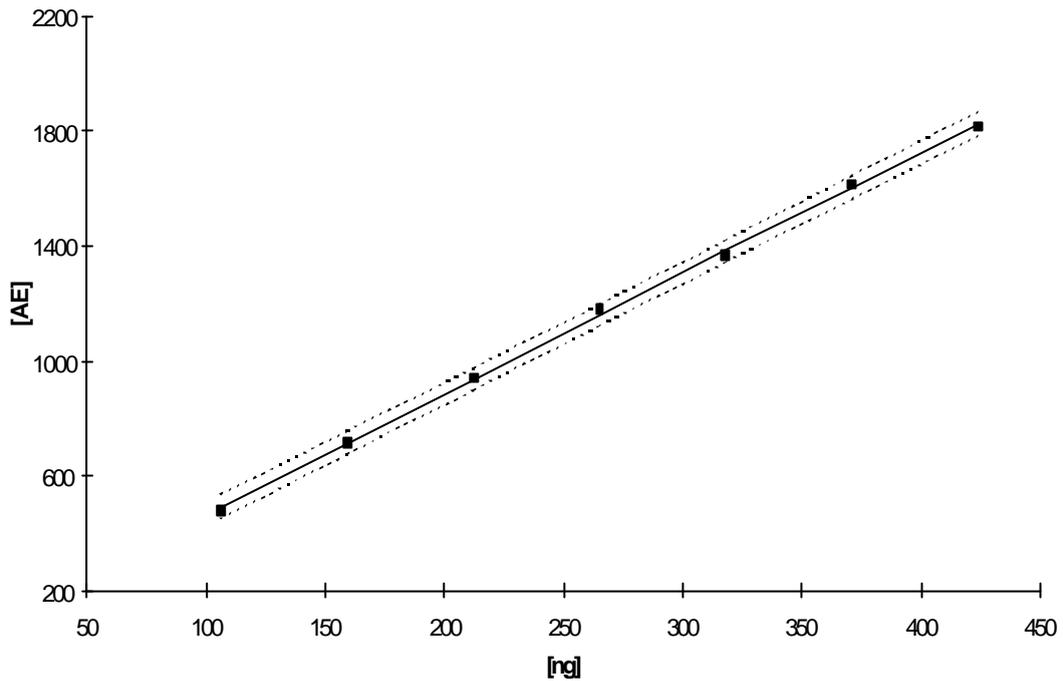


Abb. 7-6: Lineare Kalibrierfunktion aus den Flächeninformationswerten des Scanners mit Konfidenzintervall ($\alpha = 0,5$). $y = 3,27x + 51,8$. $R = 0,9993$.

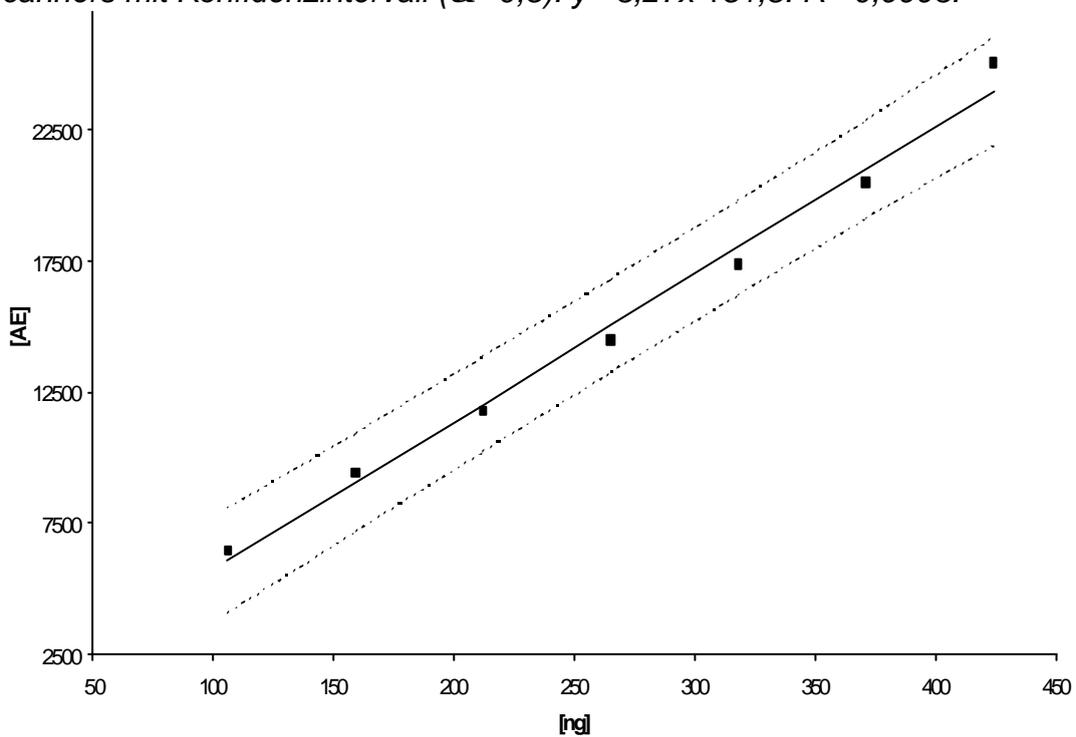


Abb. 7-7: Lineare Kalibrierfunktion ermittelt aus den Flächeninformationswerten des Videogerätes mit Konfidenzintervall ($\alpha = 0,5$). $y = 116x + 2174$. $R = 0,9958$.

Für Cinchocainhydrochlorid konnte mit dem Videogerät eine Nachweisgrenze von 14 ng und eine Bestimmungsgrenze von 21 ng ermittelt werden. Mit dem Scanner waren die Nachweis- und Bestimmungsgrenze mit 7 und 11 ng um den Faktor 2 niedriger (Abb. 7-8).

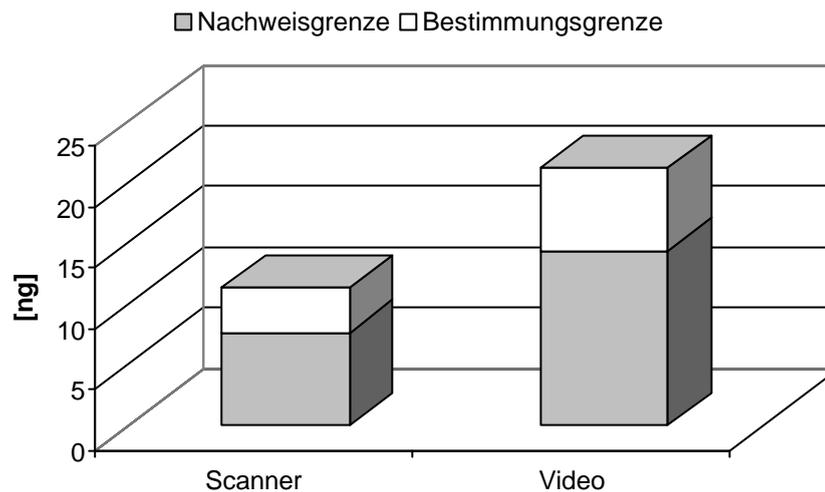


Abb. 7-8: Vergleich der mit dem Scanner und Videogerät ermittelten theoretischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.

7.6 Anwendung

Die Bestimmung des Wirkstoffgehaltes von Cinchocainhydrochlorid wurde an einem Salbenpräparat (Faktu[®]-Salbe) durchgeführt. Der Soll-Gehalt von Cinchocainhydrochlorid in der Salbe beträgt 10mg/100g, wobei eine Abweichung von 5% zugelassen ist. Für die Probenvorbereitung war eine einfache Filtration der gelösten Salbe durch einen Membranfilter ausreichend. Der Gehalt der untersuchten Chargen lag in den Spezifikationsgrenzen von 95 bis 105 % (Abb. 7-9). Für den Scanner und das Videogerät wurden Abweichun-

gen der Wiederholmessungen unter 1% ermittelt, wobei beim Videogerät die gemessenen Werte stärker von den Soll-Werten abweichen.

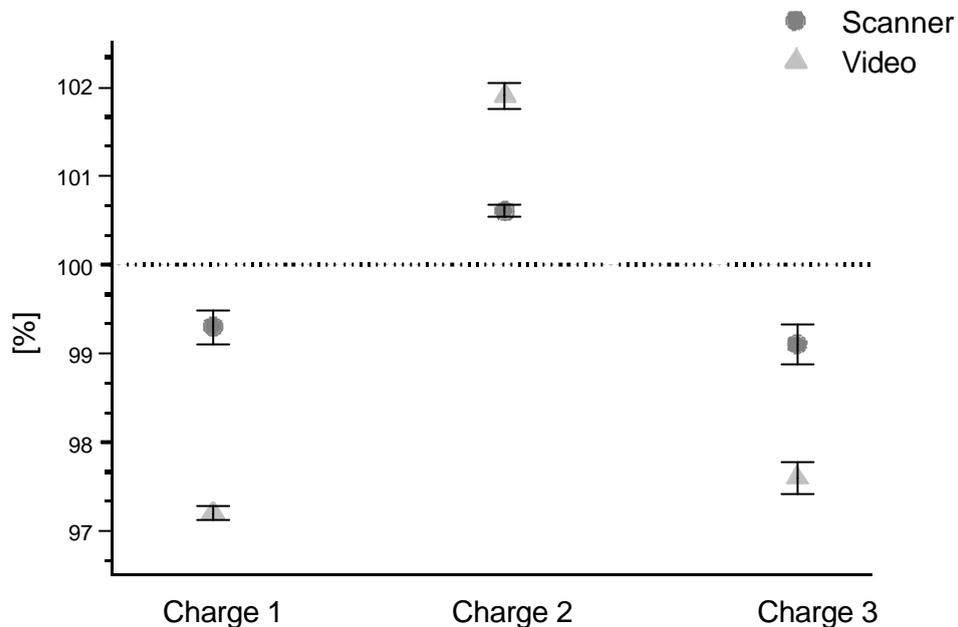


Abb. 7-9: Prozentualer Gehalt unterschiedlicher Salben-Chargen. Vergleich von Scanner und Videodensitometer.

7.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die fluorimetrische Bestimmung von Cinchocainhydrochlorid erwies sich als geeignete Methode in der dünnschichtchromatographischen Gehaltsbestimmung. Sowohl mit dem Scanner als auch mit dem Videogerät konnte zuverlässig der Wirkstoffgehalt aus Salben bestimmt werden. Insbesondere für die videodensitometrische Auswertung ist diese Methode geeignet, da ein deutlich geringeres Rauschen Bestimmungsgrenzen von 21 ng ermöglicht. Mit dem Scanner konnten Bestimmungsgrenzen im unteren Nanogrammbereich

erreicht werden. Bei der videodensitometrischen Auswertung muß jedoch die höhere Verfahrensstandardabweichung mit einbezogen werden.

Ein entscheidender Vorteil des Videogerätes für die Aufnahme von fluoreszierenden Substanzen ist die schnelle Digitalisierung der dünnschichtchromatographischen Platte (einige Sekunden). Dies kann besonders bei Verbindungen, die erst durch Derivatisierung zur Fluoreszenz angeregt werden entscheidend sein, zumal die Fluoreszenz innerhalb von Minuten nachläßt [106]. Kombiniert mit der rationellen Probenaufbereitung erweist sich daher die Videodensitometrie als schnelle und sichere Methode zur Bestimmung von Cinchocainhydrochlorid aus einer Salbenmatrix.

8 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals umfassende Untersuchungen zur videodensitometrischen Auswertung in der Dünnschichtchromatographie im Bereich der pharmazeutischen Qualitätskontrolle durchgeführt. Parallel zur videodensitometrischen Auswertung wurde eine klassische densitometrische Auswertung durchgeführt und die erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen.

In der Literatur sind bereits unterschiedliche Themen videodensitometrisch bearbeitet worden. Es handelt sich jedoch meist um sehr spezifische Anwendungen, die sich nur auf eine Substanz oder eine Detektionsmethode beziehen. Um die Möglichkeiten und Grenzen der Bildverarbeitung in der Dünnschichtchromatographie ermitteln zu können, war es daher notwendig, sowohl unterschiedliche Anwendungsgebiete wie die Gehalts- und die Reinheitsprüfung mit einzubeziehen, als auch verschiedene Detektionsmethoden der DC wie Fluoreszenzmessungen, Fluoreszenzlöschung und postchromatographische (VIS) Detektion zu untersuchen.

Die Gehaltsbestimmung pharmazeutischer Produkte unterliegt strengen Qualitätskriterien, die durch das Europäische Arzneibuch (bzw. Deutsche Arzneibuch) sowie behördlichen Anforderungen zur Erteilung der Zulassung festgelegt werden. Ob die Gehaltsbestimmung auch videodensitometrisch möglich ist, wurde anhand der Wirkstoff-

bestimmung in Tabletten untersucht. Der Gehalt von Acetylsalicylsäure, Coffein und Paracetamol wurde in Mono- und Kombinationspräparaten bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte gemäß dem Kommentar des Europäischen Arzneibuches sowohl an Mischmustern als auch an Tabletteneinzelbestimmungen. Für Coffein ergab sich eine Wiederfindung von 97 %, für Paracetamol von 103% und für ASS eine Wiederfindung von 99 %. Es zeigte sich jedoch, daß der Variationskoeffizient der mit dem Videodensitometer ermittelten Ergebnisse mit 2-8,5 % deutlich höher war, als die mit dem Scanner ermittelten Werte mit einem Variationskoeffizienten von 0,5-4,6%. Dies ist auf die geringere Auflösung des Videogerätes gegenüber dem Scanner zurückzuführen. Die gefundenen Abweichungen liegen mit der klassischen densitometrischen Bestimmung im zugelassenen Bereich, so daß eine dünnschichtchromatographische Gehaltsbestimmung mit dem Scanner möglich ist. Mit dem Videogerät kann aufgrund der hohen Standardabweichung im Rahmen dieser Spezifikationsgrenzen keine zuverlässige Aussage zum Gehalt gemacht werden, daher ist eine Auswertung mittels Bildauswertung nicht geeignet.

Ein weiterer Prüfpunkt der Qualitätskontrolle stellt die Reinheitsprüfung dar. Der zulässige Gehalt an Verunreinigungen ist für jede Arzneiform festgelegt. In der Dünnschichtchromatographie erfolgt meist ein visueller Vergleich mit einer 0,5- bzw. 1 %-igen-Referenzlösung. Dieser Vergleich unterliegt natürlich den subjektiven Einschätzungen des Betrachters. Der dabei auftretende Fehler könnte durch eine gerätetechnische Auswertung eliminiert werden. In dieser Arbeit

wurde diskutiert, ob die Videodensitometrie eine mögliche Alternative zur optischen Auswertung darstellt.

Die Reinheitsprüfung ist bei Freigabeuntersuchungen pharmazeutischer Substanzen im Routinebetrieb u.a. in der Rohstoffkontrolle wichtig. Die Rohstoffkontrolle wurde am Beispiel des Theophyllins durchgeführt. Dieses wurde auf fünf Syntheseverunreinigungen und auf zwei strukturverwandte Substanzen geprüft. Die Nachweisgrenzen für die Verunreinigungen lagen mit der videodensitometrischen Bestimmung bei 50 ng im Vergleich zu 15 ng bei der klassischen Bestimmung. Diese stark differierenden Ergebnisse sind auf die unterschiedlichen Verfahren zurückzuführen. Während mit dem Scanner bei einer Wellenlänge von 268 nm im Bereich des Absorptionsmaximum der Substanzen gemessen werden konnte, mußten die HPTLC-Platten mit dem Videodensitometer bei 254 nm ausgewertet werden. Dies hatte zur Folge, daß die Absorption deutlich schwächer und somit auch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis signifikant schlechter war. Besonders gravierend hat sich dieser Sachverhalt bei der Bestimmung des Aminodimethylnitrosouracils ausgewirkt, das bei den gegebenen Trennbedingungen den gleichen R_f -Wert besitzt wie Theophyllin. Mit dem Scanner kann Aminodimethylnitrosouracil bei 314 nm trotz überlagertem Theophyllin selektiv vermessen werden. Da mit dem Videogerät keine Wellenlängenselektion durchführbar ist, ist es nicht möglich Aminodimethylnitrosouracil bei der Reinheitsprüfung von Theophyllin mittels Videodensitometrie zu erfassen. Für die Verunreinigungen ergaben sich Nachweisgrenzen zwischen 8 und 50 ng mit dem Scanner und 37-222 ng für die videodensitometri-

sche Auswertung. Die Summe der Verunreinigungen wurde auf die absorptionsschwächste Substanz, Theophyllidin, bezogen, welches eine densitometrisch ermittelte Nachweisgrenze von 39 (54) bzw. eine videodensitometrische Nachweisgrenze von 45 (71) ng aufweist. Dadurch ist es nicht möglich die Spezifikationsgrenze von 0,1% an Verunreinigungen einzuhalten. Für diese Anwendung ist die videodensitometrische Auswertung daher nicht geeignet. Jedoch wäre es denkbar sie für Rohstoffkontrollen einzusetzen, deren Absorptionsmaxima im Bereich von 254 nm liegen. Anhand dieses Beispiels konnte demonstriert werden, daß der Anwendbarkeit der Videodensitometrie deutliche Grenzen in Bezug auf die Auswahl der Wellenlänge gesetzt sind und daher eine mögliche Anwendung individuell auf die Substanzen bezogen werden muß.

Für die Reinheitsprüfung von Theophyllin wurde sowohl ein Vergleich zwischen klassischem Scanner und Bildverarbeitung durchgeführt als auch der Vergleich zweier Geräte- und Software-Hersteller (jeweils Video und Densitometer). Zwischen den beiden Scannern konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen jeweils um 20ng mit vergleichbaren Standardabweichungen von 4-5%. Im Gegensatz hierzu wurde ein deutlicher Unterschied bei den Ergebnissen der Videogeräte sichtbar. Der implementierte Algorithmus der einen Auswertesoftware wies schwerwiegende Fehler auf, die zu Extremwerten in der Standardabweichung bis hin zu nicht auswertbaren Ergebnissen führten. Durch eine andere Auswertemethode bzw. eines geeigneten Algorithmus traten diese Probleme beim zweiten Videogerät

nicht auf, obwohl auch hier im Vergleich zum Scanner die Standardabweichungen höher waren. Aufgrund des besseren Algorithmus waren auch die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen niedriger. Dadurch wird deutlich, daß in der Bildverarbeitung die Auswertesoftware einen entscheidenden Einfluß auf das Ergebnis hat. Erwartungsgemäß hätten dadurch niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie niedrigere Standardabweichungen für die Gehaltsbestimmung von Tabletten und die Reinheitsprüfung von Chlordiazepoxid erreicht werden können.

Eine weitere Reinheitsprüfung wurde für Chlordiazepoxid-Base nach einer Methode des Deutschen Arzneibuch durchgeführt. Chlordiazepoxid wird über Demoxepam zu Nordazepam und schließlich zu Aminochlorobenzophenon zersetzt [107]. Der Gehalt an Verunreinigungen darf nicht mehr als 0,1 % betragen. In der Videodensitometrie erwies es sich als schwierig Aminochlorobenzophenon zu bestimmen, da es aufgrund der langen Migrationsstrecke zu einer Fleckverbreiterung kommt, so daß die Fleckränder bei niedriger Konzentration nicht mehr scharf gegen das Rauschen abgrenzbar sind. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermöglichen eine Reinheitsprüfung mittels Bildauswertung im Bereich fester Arzneiformen, da hier eine Konzentration von 4 % Demoxepam zugelassen ist, während die 0,1 %-Grenze der Arzneibuchmonographien des Wirkstoffs nicht eingehalten werden kann. Mit dem klassischen Densitometer liegt für diesen Arbeitsbereich die Bestimmungsgrenze mit 10 ng über der Spezifikationsgrenze, es wäre jedoch – im Gegensatz zur videodensitometrischen Bestimmung – möglich den Arbeits-

bereich zu senken, um so die Spezifikationsanforderungen zu erfüllen. Am Beispiel von gespikten Radepur[®]-Tabletten wurde die Methode überprüft. 70 ng der Verunreinigungen konnten von der Hauptkomponente abgetrennt und bestimmt werden.

Häufig werden UV-inaktive Verbindungen, sofern sie keine Fluoreszenz zeigen, durch prä- oder postchromatographische Detektion der Auswertung zugänglich gemacht. Da sich diese Methoden stark auf die Auswertung auswirken können, war es Ziel dieser Arbeit zu zeigen, daß auch DC-Platten nach postchromatographischer Derivatisierung videodensitometrisch ausgewertet werden können. Dies war am Beispiel der Inhaltsstoffe POPG und DPPC eines noch in der Entwicklung stehenden Surfactants möglich. Da es sich hierbei um Phospholipide handelt, die weder UV-aktiv sind noch fluoreszieren, wurden sie mittels eines Phosphorsäure-Kupfersulfat-Reagenzes sichtbar gemacht. Mit der Videokamera erfolgte die Aufnahme im VIS-Bereich, mit dem Scanner bei einer Wellenlänge von 365 nm. Die Gehaltsbestimmung konnte mit beiden Meßgeräten erfolgreich durchgeführt werden. Es ergaben sich Wirkstoffgehalte von 102_S (103_V) % für DPPC und 109_S (105_V) % für POPG, wobei sowohl der Scanner also auch die Bildauswertung relativ hohe Variationskoeffizienten von ca. 5-6 % aufwiesen. Dies könnte auf den Einfluß der postchromatographischen Derivatisierung zurückzuführen sein. Während für DPPC eine Wiederfindung von 95 und 97 % ermittelt wurde, war die Wiederfindung von POPG – wie auch die Gehaltsbestimmung – mit 106 und 109% deutlich erhöht. Die hohen Variationskoeffizienten wurden durch die Wiederfindungsexperi-

mente bestätigt. Es konnte also gezeigt werden, daß auch nach postchromatographischer Detektion eine videodensitometrische Auswertung erfolgreich durchführbar ist.

Eine weitere sehr empfindliche Methode stellt die Fluoreszenzmessung dar. Mit den auf dem Markt angebotenen Videogeräten ist nur eine Fluoreszenzanregung mit 366 nm möglich. Daß damit auch fluoreszierende Substanzen anderer Anregungswellenlänge quantifiziert werden können, wurde am Beispiel der quantitativen Bestimmung von Cinchocainhydrochlorid aus Salbenpräparaten gezeigt. Mit dem Scanner wurde ein durchschnittlicher Gehalt von 99,6% und mit dem Videogerät von 98,9 % ermittelt. Abweichungen der Wiederholmessungen zwischen 0,06 und 0,2% beweisen die Einsatzfähigkeit der Methode bei Messungen im Datenswerpunkt der Kalibrierkurve, wie sie bei Gehaltsbestimmungen durchgeführt werden. Mit der Fluoreszenzmessung konnten Nachweisgrenzen im unteren Nanogrammbereich erreicht werden. Als besonders vorteilhaft für die Bildverarbeitung erwies sich das durch die Meßmethodik stark verminderte Rauschen. Auch Hilfsstoffe, die oft störend mitchromatographiert werden, treten nicht in Erscheinung. Für Cinchocainhydrochlorid ist die Videodensitometrie in Kombination mit der rationellen Probenaufbereitung als schnelle, reproduzierbare Methode zur Gehaltsbestimmung hervorragend geeignet.

Bei beiden Auswerteverfahren (Video und Scanner) konnte ein sogenannter "*Randeffekt*" der HPTLC-Platten beobachtet werden, der nach Angaben des Herstellers auf das Produktionsverfahren der Platten zurückzuführen ist und zu hohen Standardabweichungen auf

der Platte führt. Dieser Effekt wird durch die ungleichmäßige Ausleuchtung der Platte bei der Bildverarbeitung noch verstärkt (Abb. 3-8). Solange dieses Problem vom Hersteller nicht behoben wird, kann der Fehler nur durch einen größeren Abstand zum Plattenrand minimiert werden, was allerdings die Effektivität der dünn-schichtchromatographischen Platten stark einschränkt.

Das Ziel, eine möglichst umfassende Arbeit über den Einsatz der Videodensitometrie in der DC zu erstellen, konnte erfüllt werden. Es wurden verschiedene Applikationsformen von Arzneistoffen wie Tabletten, Pulver und Salben und unterschiedliche Meßmethoden wie Fluoreszenzlöschung, postchromatographische Derivatisierung/VIS-Auswertung und Fluoreszenzmessung in den Vergleich mit einbezogen. Anhand der vielfältigen Anwendungsgebiete konnte gezeigt werden, daß der Einsatz der Videodensitometrie eine schnelle Alternative für die Auswertung in der DC darstellt. Ob die Videodensitometrie eingesetzt werden oder sogar den klassischen Scanner ersetzen kann, muß im speziellen Fall abgeklärt werden. Eine allgemeingültige Aussage ist nicht möglich, da die Entscheidung von folgenden Faktoren abhängig ist:

- den Spezifikationsgrenzen
- den zu untersuchenden Substanzen
- der chromatographischen Methode.

Generell kann man davon ausgehen, daß ein Einsatz des Videodensitometers in der Spurenanalytik beziehungsweise im unteren Nanogrammbereich nicht sinnvoll ist, da die Nachweisgrenzen und die Standardabweichungen zu hoch sind. Eine Optimierung des imple-

mentierten Algorithmus in der Auswertesoftware der Bildverarbeitung wird die Auswertung verbessern. So wäre es denkbar, eine Auswertung mittels multivariater Datenanalyse (fuzzy logic pattern recognition) einzuführen, die alle Informationen des Chromatogramms (z.B. Graustufen, R_f -Wert) miteinbezieht.

9 Experimenteller Teil

9.1 Geräte

9.1.1 Scanner

Die densitometrischen Aufnahmen wurden mit einem Densitometer CD60 der Firma Desaga (Wiesloch) durchgeführt. Die gerätetechnischen Einstellungen, wie zum Beispiel Spalt und Wellenlänge, wurden für die entsprechenden Anwendungen angepaßt, und werden in den analogen Kapiteln zu den Anwendungen aufgeführt.

9.1.2 Videogerät

Für die bildtechnische Auswertung stand zunächst ein Videodensitometer VD40 der Firma Desaga (Wiesloch) mit einer elektronisch ansteuerbaren 1-Chip-Kamera vom Typ Mitsubishi M300E zur Verfügung. Mit dem VD40-Videoscanner wurden die Gehaltsbestimmungen der Tabletten (Kapitel 9.5.1) und die Reinheitsprüfung von Chlordiazepoxid (Kapitel 9.5.3) durchgeführt. Zur Reinheitsprüfung von Theophyllin (Kapitel 9.5.2) sowie zur Bestimmung von POPG und DPPC (Kapitel 9.5.4) und Cinchocain (Kapitel 9.5.5) stand ein Videogerät der Firma CAMAG mit einer 3-Chip-Kamera, Typ Hitachi HV-CD20, zur Verfügung.

Tabelle 9-1: Technische Daten der Videosysteme.

	Desaga	Camag
<i>Kamera</i>	Mitsubishi M300E	Hitachi HV-CD20
Abtastelemente	1-Chip CCD, 1/3", 470.000 Pixel total	3-Chip CCD, 1/2", 470.000 Pixel total
Pixelanzahl	752H*582V (440.000 Pixel effektiv)	NTSC: 768H*494V PAL: 752H*582V (440.000 Pixel effektiv)
Videonorm	PAL, 625 Zeilen, 2:1, Zeilensprung- verfahren	NTSC/PAL
Horizontalauflösung	430 TV Zeilen	700 TVL Y 580 TVL RGB
Störabstand	> 46 dB	
Lichtempfindlichkeit	1 lx/F 1.8. Gain +30	200 lx, f 8, min. illum: 5,5 lx
Signalausgabe	Y/C	Y/C, RGB
Farbtemperatur		3200 K, 5600 K
<i>Objektiv</i>		
Objektiv	eingebaut moto- risch gesteuert	manuell
Lichtstärke	F= 1:1,8	
Zoom	f= 6,5-52 mm	f= 11,5-69 mm
<i>Signalverarbeitung</i>		
Framegrabber (Digi- talisierung)		Synoptics Prysm Grabber (Generic PCI)
Videonorm	PAL, NTSC, SECAM	FBAS
Signaleingang	Y/C	RGB

Tabelle 9-1: Technische Daten der Videosysteme.

	Desaga	Camag
Farbauflösung	24 Bit Farbtiefe, (16,7 Mio. Farben), True Colour	24 Bit Farbtiefe, (16,7 Mio. Farben), True Colour
Auflösung	768*576 Punkte	
Videoabtastrate	14,75 MHz	
Speicherformat	YUV 4:2:2	
VGA-Ausgabe	640*480, 800*600, 1024*768 Bild- punkte (non inter- laced)	
Ausgabe		
Graphikkarte	24 Bit bei 1024*768 Bild- punkte 16,8 Mio. Farben (True Colour)	Matrox MGA Mille- nium Power Desk 24 Bit bei 1024*768 Bild- punkte

9.1.3 Probenauftragung

Der Probenauftrag erfolgte mit dem automatischen Probeauftragegerät Linomat IV (CAMAG, Berlin). Mit Hilfe einer 100 µl-Hamilton-Spritze (Linomat Syringe 695.0014) wurden die methanolischen Lösungen bandförmig bei gleichzeitigem Stickstoffstrom mit einer Auftragegeschwindigkeit von 8 s/µl aufgesprüht.

9.1.4 ADC-Kammer

Die ADC-Kammer wurde zur Gehaltsbestimmung von Tabletten eingesetzt. Es wurden folgende Parameter eingestellt: Konfiguration "Tank", Fließmittelstrecke 8 cm, Vorkonditionieren: 10 Minuten, Trockenzeit 10 Minuten, Heizzeit: 0,30 Minuten. Ca. 13 ml Fließmittel wurden eingefüllt. Die Entwicklungszeit betrug ca. 18 Minuten.

9.2 Dünnschichtchromatographie

9.2.1 Stationäre Phase

Die dünnschichtchromatographische Trennung wurde mit HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 10 x 20 cm (Nr. 1.05642, Merck, Darmstadt) durchgeführt, die einen mit mangan-aktivierten Zinksilikat-Indikator enthalten. Lediglich für die Fluoreszenzmessungen wurden Kieselgel 60-HPTLC-Platten 10 x 20 cm **ohne** Fluoreszenzindikator (Nr. 1.05641, Merck, Darmstadt) verwendet. Als Trägermaterial der 200 µm dicken Silikatschichten diente Glas.

9.2.2 Lösungsmittel

Für die Herstellung des Fließmittels und der Probenlösungen wurden Lösungsmittel in p.a.- und LiChrosolv[®]-Qualität der Firma Merck (Darmstadt) verwendet.

9.3 Quantitative Auswertung

Die Aufnahme und Auswertung der Chromatogramme wurde mit Hilfe der CD60-Software (Version 5.3) des Desaga-Scanners durchgeführt. Die Integration erfolgte automatisch, zur Auswertung wurden die Peakflächen herangezogen. Die Bildaufnahme und Auswertung erfolgte mit einem Pentium-II-Rechner (NT4.0-Betriebssystem). Zur videodensitometrischen Bestimmung wurde im Fall des VD40 (Desaga) die Aufnahmesoftware Doct (Version 2.x) und zur Auswer-

tung die ProResult-Software (Version 2.x) eingesetzt. Im Falle des CAMAG Videosystems wurde die entsprechende CAMAG-Software VideoStore (Version 1.01) und VideoScan (Version 1.01) eingesetzt.

9.4 Statistische Kenngrößen

9.4.1 Kalibrierung

Die Kalibration erfolgte nach statistischen Methoden, die in der Literatur zur Chemometrie beschrieben sind [109][110]. Um die funktionalen Zusammenhänge zwischen Meßgrößen und den vorgegebenen Gehalten richtig angeben zu können, bedarf es einer Kalibrierung des Analysenverfahrens. Die Kenndaten der Kalibrierfunktion geben Auskunft über die Leistungsfähigkeit des Analysenverfahrens. Zur Erstellung einer Kalibrierfunktion wurden Standardlösungen im erwarteten Arbeitsbereich (80-120% der Meßgröße) in äquidistanten Abständen vermessen. Die Auswertung erfolgte über die Peakflächen.

9.4.2 Linearität

Da in der Dünnschichtchromatographie, bedingt durch das Meßprinzip, häufig eine nichtlineare Kalibrierfunktion vorliegt, muß die Kalibrierfunktion auf ihre Linearität hin geprüft werden. Die Entscheidung, ob eine lineare oder nichtlineare Funktion (Polynom 2. Grades) vorliegt, kann nicht visuell beurteilt werden, sondern muß mittels eines Linearitätstests berechnet werden. Die Linearität der Analysenfunktion wurde mit Hilfe des Anpassungstests nach Mandel [105] nach DIN 38402, Teil 51 überprüft. Dieser Linearitätstest hat

gegenüber dem einfachen Vergleich der Restvarianzen zweier unterschiedlicher Kalibrierfunktion den Vorteil, daß die Prüfgröße nicht durch die unterschiedlichen Freiheitsgrade beeinflusst wird. Aus der linearen und quadratischen Kalibrierfunktion ergeben sich die Reststandardabweichungen s_{y1} und s_{y2} . Aus den Reststandardabweichungen wird die Differenz der Varianzen DS^2 berechnet:

$$DS^2 = (N-2) \times s_{y1}^2 - (N-3) \times s_{y2}^2 \quad (9-1)$$

wobei N die Anzahl der Kalibrierpunkte angibt. Aus DS^2 wird die Prüfgröße PG berechnet:

$$PG = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (9-2)$$

Der Vergleich der Prüfgröße mit dem tabellierten F-Wert ($P = 99\%$, $f_1 = 1$, $f_2 = N-3$) ergibt keine signifikant bessere Anpassung durch die Ausgleichsfunktion 2. Grades, falls $PG < F$. Die Kalibrierfunktion kann durch eine lineare Funktion berechnet werden. Wenn $PG > F$ ist, stellt die Regression 2. Ordnung eine bessere Anpassung dar.

9.4.3 Varianzhomogenität

Zur Überprüfung der Varianzhomogenität wurden jeweils 10 Standardproben der niedrigsten x_1 und der höchsten Konzentration x_{10} des Arbeitsbereichs getrennt analysiert, wobei jeweils 10 Informationswerte erhalten wurden. Aus diesen wurde jeweils der Mittelwert berechnet und die dazugehörige Standardabweichung s_1 und s_{10} . Mit Hilfe des einfachen Varianzentests wurden die Streuungen der

Informationswerte an den Grenzen des Arbeitsbereichs auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Dazu wurde folgende Prüfgröße bestimmt:

$$PG = \frac{s_{10}^2}{s_1^2} \quad \text{falls} \quad s_{10}^2 > s_1^2 \quad (9-3)$$

und mit dem F-Wert ($P = 99 \%$, $f_1 = n_1 - 1$, $f_2 = n_{10} - 1$) verglichen. Ist die Prüfgröße $PG < F$, so ist der Unterschied zwischen den Varianzen lediglich wahrscheinlich, für $PG > F$ ist er signifikant.

9.4.4 Richtigkeit und Präzision

Unter Richtigkeit versteht man das Ausmaß der Annäherung des Erwartungswertes des Analyseergebnisses an den Bezugswert. Bezugswert ist der wahre Wert bzw. der Soll-Wert. Die Richtigkeit erfaßt systematische Abweichungen im Analysenverfahren. Die Richtigkeit wurde mit dem Sollwert- t -Test [111] überprüft und mit dem Wert aus der t -Tabelle verglichen:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n} \quad (9-4)$$

\bar{x} = ermittelter Mittelwert

μ = Sollwert (Standard)

s = Standardabweichung

n = Zahl der Wiederholmessungen

Ist der berechnete Prüfwert $\leq t$ -Wert ($P=95 \%$), so ist der Unterschied zufällig, liegt der berechnete t -Wert zwischen t (95 %) und t (99%) so ist der Unterschied wahrscheinlich, bei einem Prüfwert $> t$ ($P=99 \%$) handelt es sich um einen signifikanten Unterschied.

Die Präzision ist eine qualitative Bezeichnung für die Übereinstimmung voneinander unabhängiger Analysenergebnisse bei mehrfacher Anwendung eines Analysenverfahrens. Durch Bestimmung der Präzision werden zufällige Fehler erfaßt. Als Maß dient die Standardabweichung s oder der Variationskoeffizient VK . Der Variationskoeffizient wurde aus Mehrfachmessungen unabhängiger Proben bestimmt.

$$VK = \frac{\sqrt{s^2}}{\bar{x}} \times 100 \quad (9-5)$$

9.4.5 Vertrauensbereich

Die Kalibrierfunktion ist, ebenso wie der Informationswert der Analyse, fehlerbehaftet. Aus dem Fehlerfortpflanzungsgesetz ergibt sich hierfür ein durch zwei Hyperbeläste begrenztes Prognoseintervall (oder Vertrauensbereich), in dem auch die wahre Kalibrierfunktion mit einer durch den Student-t-Faktor gegebenen statistischen Sicherheit liegen wird. Für eine lineare Regression besitzt die Hyperbelgleichung folgende Form:

$$y = a_0 + a_1 x \pm s_y t \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(\hat{x} - \bar{x})^2}{\Sigma(x_i - \bar{x})^2}} \quad (9-6)$$

a_0 = errechneter Blindwert der Kalibrierfunktion

a_1 = Steigung der Kalibrierfunktion

N = Anzahl der Kalibrierpunkte

\hat{N} = Anzahl der Parallelanalysen an derselben Probe

s_y = Reststandardabweichung

t = Student-t-Faktor (P , f)

\bar{x} = Schätzwert des Mittelwertes der Konzentrationen x_i

\hat{x} = berechnetes Analysenergebnis

x_i = Konzentration der i -ten Probe

9.4.6 Lineare Kalibrierfunktion

Aus der Geradengleichung der linearen Kalibrierfunktion kann die Steigung a_1 entnommen werden, die die Empfindlichkeit des Analyseverfahrens wieder gibt. a_0 ist der berechnete Blindwert der Kalibriergeraden.

$$y = a_0 + a_1 x \quad (9-7)$$

9.4.7 Wiederfindung

Das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe wird als Wiederfindungsrate oder einfach Wiederfindung bezeichnet. Einer Placeboprobe wird eine definierte Menge Standardsubstanz zugesetzt und nach folgender Gleichung die Wiederfindung berechnet:

$$W = \frac{\bar{x}}{x_R} \cdot 100 \quad (9-8)$$

W = Wiederfindungsrate in %

\bar{x} = gemessener Mittelwert, x_R = richtiger Wert

9.4.8 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Als Nachweisgrenze eines Analyseverfahrens bezeichnet man diejenige kleinste Menge oder Konzentration eines Stoffes, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit bei einmaliger Analyse mit einem Fehlerrisiko von 5% qualitativ nachgewiesen werden kann. Unter der Bestimmungsgrenze eines Analyseverfahrens versteht man diejenige kleinste Menge oder Konzentration eines Stoffes, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit bei einmaliger Analyse mit einem Fehlerrisiko ≤ 5 % quantitativ nachgewiesen werden kann [112].

Die Nachweis- (XN) und Bestimmungsgrenzen (XB) lassen sich rechnerisch aus den Kalibrierkenndaten ermitteln. Dies hat gegenüber der Bestimmung durch das Blindwertverfahren den Vorteil, daß Streuungen "realer Meßwerte" zur Ermittlung herangezogen werden, die eher im Sinne einer Normalverteilung um den Mittelwert streuen als die Meßwerte von Blindproben. Außerdem werden subjektive Fehler, die bei der Auswertung von Blindwertsignalen auftreten, verringert bzw. vermieden. In der videodensitometrischen Auswertung stellte sich die Blindwertmethode zudem als Problem dar, da das angegebene Chromatogramm keine oder nur sehr indifferente Skalierungen aufwies, wodurch die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nur grob geschätzt werden können.

Die Nachweisgrenze XN wird mit Gleichung (9-9) berechnet:

$$XN = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9-9)$$

Die Bestimmungsgrenze läßt sich mit Gleichung (9-10) berechnen:

$$XN = \frac{y_h - a_0}{a_1} + \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9-10)$$

a_0 = Ordinatenabschnitt der Kalibrierfunktion

a_1 = Steigung der Kalibrierfunktion

s_y = Reststandardabweichung

t = Student- t -Faktor

N = Anzahl der Konzentrationsstufen

y_c/y_h = Hilfsgrößen

x_{ic}/y_i = Konzentration bzw. Informationswert der i -ten Probe

\bar{x}/\bar{y} = Schätzwert des Mittelwertes der Konzentrationen x_i bzw. Mittelwert der Informationswerte y_i

9.5 Anwendungen

9.5.1 Gehaltsbestimmung von ASS, Paracetamol und Coffein

9.5.1.1 Materialien und Reagenzien

Die Gehaltsbestimmung erfolgte anhand folgender im Handel befindlicher Fertigarzneimittel: ASS-ratiopharm[®]-500 (Ch.B. 1458T7 und 346T5), Paracetamol-ratiopharm[®]-500T (Ch.B. 3477T5), sowie ParacetamolPlus-ratiopharm[®] (Ch.B. 611T5). Die Standardsubstanzen Acetylsalicylsäure, Coffein und Paracetamol sowie die Tabletten stellte die Firma ratiopharm (Ulm) zur Verfügung. Außerdem erfolgte eine quantitative Bestimmung von ASS und Paracetamol aus Spalt[®]-Tabletten (Ch.B. E140). Die Tablettentypen wurden wie folgt benannt: ASS-ratio-pharm[®]-500 = ASS500, Paracetamol-ratio-pharm[®]-500T = P500, Spalt[®]-Tabletten = Spalt, ParacetamolPlus-ratiopharm[®] = PPlus.

Der Wirkstoffanteil pro Tablette liegt für ASS-ratiopharm[®]-500 bei 500 mg ASS, für Paracetamol-ratiopharm[®]-500T bei 500 mg Paracetamol, für ParacetamolPlus-ratiopharm[®] bei 400 mg Paracetamol und 50 mg Coffein. Das Kombinationspräparat Spalt[®] enthält je 300mg Paracetamol und ASS pro Tablette. Zur Herstellung der entsprechenden Hilfsstoffmischung der Tabletten wurden Aerosil, Croscarmellose, mikrokristalline Cellulose, Magnesiumstearat, Maisstärke und Talkum eingesetzt. Die zur Bestimmung der Wiederfindung benötigten Hilfsstoffe stellte der Fachbereich Technologie des Pharmazeutischen Instituts in Tübingen zur Verfügung.

9.5.1.2 Dünnschichtchromatographie

Die HPTLC-Platten wurden mit Methanol vorgereinigt und an der Luft getrocknet. Proben- und Standardlösungen wurden bandförmig (4 mm) in der Data-Pair-Technik aufgetragen. Der Abstand zum linken und unteren Plattenrand betrug jeweils 1 cm. Anschließend wurde in der ADC-Kammer über eine Trennstrecke von 7 cm linear aufsteigend chromatographiert. Als Fließmittel zur Gehaltsbestimmung von Paracetamol und Coffein wurden Ethylacetat und Methanol (95+5, v+v) eingesetzt. Für die Chromatographie von ASS und Paracetamol wurde ein in der Literatur angegebenes Fließmittel [113] modifiziert: Toluol, Ethylacetat und Ameisensäure (70 + 25 + 5, v+v).

9.5.1.3 Standard- und Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Standardlösungen wurden die Reinsubstanzen in einem 100 ml Meßkolben in Methanol gelöst und anschließend 1 zu 10 verdünnt. Je Standardlösung wurden 15 µl aufgesprüht. Die Probenlösungen wurden durch Lösen eines Aliquots von 10 gepulverten Tabletten in 100 ml Methanol hergestellt. Tabelle 8.1 gibt das mittlere Tablettengewicht wieder. Nach zentrifugieren (EPA 8 Zentrifuge, 6000 UpM, Hettich, Tuttlingen) dieser Lösung wurde das Zentrifugat zu einer Konzentration von 0,4 µg/µl verdünnt. Für die Tabletteneinzelbestimmungen wurden die Tabletten einzeln pulverisiert, gelöst, zentrifugiert und auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnt. Die Wiederfindung wurde bestimmt, indem zu der entsprechenden Hilfsstoffmischung (Tab. 9-2) die Reinsubstanz entspre-

chend dem Tablettengehalt zugesetzt und anschließend nach dem zur Herstellung der Probenlösungen beschriebenen Verfahren weitergearbeitet wurde.

Tabelle 9-2: Mittleres Tablettengewicht (aus 10 Tabletten) und Hilfsstoffe der Tablettentypen [mg/Tablette].

	ASS-500	P-500	PPlus	Spalt
mg/Tablette	597,67 ±4,33	558,64 ±4,41	365,14 ±7,86	826,03 ±6,92
Aerosil	—	4,8 mg	3,84 mg	—
micro. Cellulose	30,0 mg	60,0 mg	48,0 mg	—
Cellulosepulver	30,0 mg	—	—	—
Croscarmellose-Na	—	12,0 mg	9,6 mg	—
Magnesiumstearat	—	3,0 mg	2,4 mg	Stearinsäure
Maisstärke	40,0 mg	41,4 mg	33,1mg	—
Talkum	—	8,0 mg	6,4 mg	—
Sonstiges	—	—	—	Spezialfett (gehärtet), Polividon 25

9.5.1.4 Aufnahmeparameter

Tabelle 9-3: Einstellungen des Scanners und der Mitsubishi-M300E-Kamera.

Scanner		Video	
Meßwellenlänge [nm]	254	Meßwellenlänge [nm]	254
Spalt [mm]	0,1 x 2,0	Iris	8
Messungen/ Punkt	8	Helligkeit	10
Meßart	Remission/ Extinktion	Details	30
		Kontrast	5
		Background	10

9.5.1.5 Quantifizierung

Die statistischen Daten der Kalibrierung sind in Tabelle 9-4 bis 9-9 wiedergegeben. Der Linearitätstest nach Mandel (s. Kapitel 9.4.2) ergab keine signifikant bessere Anpassung einer Regressionskurve 2. Ordnung. Der nach Kapitel 9.4.3 durchgeführte Varianztest bestätigte die Varianzhomogenität über alle Kalibrierbereiche.

Tabelle 9-4: Kalibrierkenndaten von P500.

	Scanner	Video
Steigung a_1	83,45	726,2
Achsenabschnitt a_0	3272,78	30737,48
Arbeitsbereich [ng]	352,7-651,2	352,7-651,2

Tabelle 9-4: Kalibrierkenndaten von P500.

	Scanner	Video
Linearität	1,04	3,30
F = 21,20		
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	2,70	1,35
Reststandardabweichung RSD	0,48	2,25
Korrelationskoeffizient	0,9991	0,9940
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	2,50	2,57
Richtigkeit ($t_{\text{soll}} = 2,57$, P=95 %, n=6)		
oben	2,36	0,03
mitte	1,97	0,43
unten	2,35	0,44

Tabelle 9-5: Kalibrierkenndaten von PPlus.

	Scanner	Video
Steigung a_1	4,06	488,63
Achsenabschnitt a_0	-308,98	-121071
Arbeitsbereich [ng]	375,8-430,9	375,8-430,9
Linearität	0,13	10,25
F = 21,20		
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	2,70	1,35
Reststandardabweichung RSD	24,22	3385,59

Tabelle 9-5: Kalibrierdaten von PPlus.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9736	0,9555
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	1,31	1,72
Richtigkeit ($t_{\text{soll}}=2,57$, $P=95\%$, $n=6$)		
oben	2,22	0,40
mitte	2,31	0,08
unten	2,36	0,90

Tabelle 9-6: Kalibrierdaten von Paracetamol Spalt.

	Scanner	Video
Steigung a_1	1730	16935,68
Achsenabschnitt a_0	51,9	486,6
Arbeitsbereich [ng]	252,7-351,2	252,7-351,2
Linearität	1,04	3,30
$F = 21,20$		
Varianzhomogenität ($P = 99\%$, $F = 5,35$)	2,70	1,35
Reststandardabweichung RSD	0,48	2,25

Tabelle 9-6: Kalibrierdaten von Paracetamol Spalt.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9991	0,9940
Rel.Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	1,08	3,09
Richtigkeit ($t_{soll}=2,57$, $P=95\%$, $n=6$)		
oben	1,74	2,56
mitte	0,73	0,85
unten	0,23	1,60

Tabelle 9-7: Kalibrierdaten von ASS 500.

	Scanner	Video
Steigung a_1	129,07	1987,96
Achsenabschnitt a_0	19,13	232,75
Arbeitsbereich [ng]	351,8-654,1	351,8-654,1
Linearität $F = 21,20$	0,13	10,25
Varianzhomogenität ($P = 99\%$, $F = 5,35$)	3,23	1,03
Reststandardabweichung RSD	29,27	589,06

Tabelle 9-7: Kalibrierdaten von ASS 500.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9918	0,9781
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	3,04	5,04
Richtigkeit ($t_{\text{soll}}=2,57$, $P=95\%$, $n=6$)		
oben	1,93	1,85
mitte	2,06	1,15
unten	2,04	1,20

Tabelle 9-8: Kalibrierdaten von ASS Spalt.

	Scanner	Video
Steigung a_1	0,02	26,02
Achsenabschnitt a_0	-1,69	2905,26
Arbeitsbereich [ng]	351,8-654,1	351,8-654,1
Linearität $F = 21,20$	0,13	10,25
Varianzhomogenität ($P = 99\%$, $F = 5,35$)	3,23	1,03
Reststandardabweichung RSD	0,23	416,46

Tabelle 9-8: Kalibrierkenndaten von ASS Spalt.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9995	0,9463
rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	3,04	5,28
Richtigkeit ($t_{soll}=4,03$, $P=99\%$, $n=6$)		
oben	2,65	1,42
mitte	0,15	0,20
unten	0,53	1,35

Tabelle 9-9: Kalibrierkenndaten von Coffein.

	Scanner	Video
Steigung a_1	163,8	137,28
Achsenabschnitt a_0	6267,57	2857,79
Arbeitsbereich [ng]	37,6-65,6	37,6-65,6
Linearität $F = 21,20$	5,74	14,7
Varianzhomogenität ($P = 99\%$, $F = 5,35$)	1,23	1,50
Reststandardabweichung RSD	257,53	2281,9

Tabelle 9-9: Kalibrierdaten von Coffein.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9904	0,9615
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	3,09	6,72
Richtigkeit ($t_{\text{soll}}=2,57$, $P=95\%$, $n=6$)		
oben	1,01	1,91
mitte	0,64	2,56
unten	1,27	1,28

9.5.2 Reinheitsprüfung von Theophyllin

9.5.2.1 Materialien und Reagenzien

Die zur Herstellung der Standardlösungen verwendeten Substanzen wurden alle von der Firma Byk Gulden Lomberg zur Verfügung gestellt. Die untersuchten Retard-Kapseln, Euphylong[®] (Byk Gulden Lomberg, Ch.B. 198171), wurden aus einer öffentlichen Apotheke bezogen. Der Wirkstoffanteil pro Tablette liegt bei 125 mg Theophyllin.

9.5.2.2 Dünnschichtchromatographie

Die verwendeten HPTLC-Platten wurden mit Fließmittel vorgereinigt und getrocknet. Die Proben- und Standardsubstanzen wurden in Bändern á 10 mm mit einer Aufsprühgeschwindigkeit von 8 s/ μ l aufgetragen. Der Abstand betrug jeweils 1,5 cm vom unteren und linken Plattenrand. Die Chromatographie erfolgte in einer Normalkammer

ohne Kammersättigung. Es wurde linear aufsteigend über 5 cm (ca. 35 Minuten) chromatographiert. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Toluol, Isopropanol und 25 %-igem Ammoniak (6+12+2, v+v) eingesetzt.

9.5.2.3 Standard- und Probenvorbereitung

Zur Herstellung der Standardlösungen 4-Amino-1,3-dimethyluracil, 4-Amino-1,3-dimethyl-5-nitrosouracil, 4-Amino-1,3-dimethyl-5-formamidouracil, N-Cyanacetyl-N,N-dimethylharnstoff, Etofylin, 3-Methylxanthin und Theobromin wurden je 2,5 mg Substanz in 100 ml Methanol gelöst. 50 mg Theophyllin wurden in 10 ml Methanol gelöst. Diese Lösung mit einer Konzentration von 5 µg/µl wurde als Prüflösung verwendet. Es wurden 3 Vergleichslösungen hergestellt: Vergleichslösung1 mit einer Konzentration von 0,01 µg Theophyllin/µl (entsprechend 0,2% der Theophyllin-Prüflösung), Vergleichslösung2 mit einer Konzentration von 0,005 µg Theophyllin/µl (entsprechend 0,1 % der Theophyllin-Prüflösung), und Vergleichslösung3 mit einer Konzentration von 0,025 µg Theophyllin/µl (entsprechend 0,5 % der Theophyllin-Prüflösung).

Die Probenlösung wurde durch Pulverisieren des Kapselinhaltes der Euphylong[®]-Kapseln, anschließendem Lösen in Methanol und Verdünnen auf 0,025 µg/µl hergestellt.

9.5.2.4 Aufnahmeparameter

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Default-Werte der Kameraeinstellung übernommen.

Tabelle 9-10: Einstellungen des Camag-Scanners und der Hitachi-HV-C20-Kamera.

	Scanner		Video
Meßwellenlänge [nm]	268 bzw. 314 für Aminodimethylnitrosouracil	Meßwellenlänge [nm]	254
Spalt [mm]	0,3 x 4,0	Belichtungszeit	1 Vollbild, 0,04 Sekunden
Messungen/Punkt	8	Bildakkumulation	aus
Meßart	Absorption/-Reflexion	Filter	keiner

Tabelle 9-11: Einstellungen des Desaga-Scanners und der Mitsubishi- M300E-Kamera.

	Scanner		Video
Meßwellenlänge [nm]	268 bzw. 314 für Aminodimethylnitrosouracil	Meßwellenlänge [nm]	254
Spalt [mm]	0,2 x 4,0	Belichtungszeit	automatisch
Messungen/Punkt	8	Bildakkumulation	aus
Meßart	Remission/Extinktion	Filter	keiner

9.5.2.5 Quantifizierung

In einem Arbeitsbereich von 50-400 ng wurden die zur Charakterisierung des Analysenverfahrens (Tabelle 9-11 bis 9-18) notwendigen statistischen Daten ermittelt. Der Linearitätstest nach Mandel (Kapitel 9.4.2) ergab keine signifikant bessere Anpassung einer Regressionskurve 2. Ordnung. Der nach Kapitel 9.4.3 durchgeführte Varianztest bestätigte Varianzhomogenität über alle Kalibrierbereiche. Die Richtigkeit des Verfahrens wurde über den t -Test (Kapitel 9.4.4) ermittelt ($n = 5$; $P = 95 \%$, $t_{soll} = 2,776$; $P = 99 \%$, $t_{soll} = 4,604$; $P = 99,9\%$, $t_{soll} = 8,610$).

Tabelle 9-12: Kalibrierdaten von Aminodimethyluracil.

	Scanner	Video
Steigung a_1	2,53	16,75
Achsenabschnitt a_0	3,72	253,41
Arbeitsbereich [ng]	58,4-408,8	58,4-408,8
Linearität $F = 21,20$	-0,17	0,34
Varianzhomogenität ($P = 99 \%$, $F = 5,35$)	2,14	2,05
Reststandardabweichung RSD	17,06	109,52

Tabelle 9-12: Kalibrierkenndaten von Aminodimethyluracil.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9967	0,9984
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	2,88	2,79
Richtigkeit		
oben	2,28	0,50
mitte	0,54	2,29
unten	2,76	1,30

Tabelle 9-13: Kalibrierkenndaten von Aminodimethylformamidouracil.

	Scanner	Video
Steigung a_1	1,37	11,14
Achsenabschnitt a_0	41,37	630,21
Arbeitsbereich [ng]	52-364	52-364
Linearität F = 21,20	13,34	1,94
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	3,23	2,41
Reststandardabweichung RSD	11,10	129,82

Tabelle 9-13: Kalibrierkenndaten von Aminodimethylformamidouracil.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9975	0,9942
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	3,88	5,60
Richtigkeit		
oben	1,36	1,05
mitte	4,56	3,49
unten	4,11	5,46

Tabelle 9-14: Kalibrierkenndaten von Aminodimethylnitrosouracil.

	Scanner	Video
Steigung a_1	0,972	12,97
Achsenabschnitt a_0	4,95	-310,3
Arbeitsbereich [ng]	55-385	55-385
Linearität	0,17	0,34
F = 21,20		
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	1,25	3,26
Reststandardabweichung RSD	10,33	258,21

Tabelle 9-14: Kalibrierkenndaten von Aminodimethylnitrosouracil.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9966	0,9803
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	3,91	9,04
Richtigkeit		
oben	0,89	2,10
mitte	3,67	0,03
unten	1,92	1,08

Tabelle 9-15: Kalibrierkenndaten von Cyanacetyldimethylharnstoff.

	Scanner	Video
Steigung a_1	1,39	9,14
Achsenabschnitt a_0	4,75	27,24
Arbeitsbereich [ng]	58-406	58-406
Linearität		
$F = 21,20$		
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	1,77	1,36
Reststandardabweichung RSD	7,15	130,60

Tabelle 9-15: Kalibrierkenndaten von Cyanacetyldimethylharnstoff.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9987	0,9848
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	2,20	6,15
Richtigkeit		
oben	1,12	3,85
mitte	0,46	5,51
unten	4,32	1,76

Tabelle 9-16: Kalibrierkenndaten von Etofyllin.

	Scanner	Video
Steigung a_1	1,19	6,33
Achsenabschnitt a_0	13,57	64,74
Arbeitsbereich [ng]	50,5-353,5	50,5-353,5
Linearität F = 21,20	0,00	0,75
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	2,20	3,14
Reststandardabweichung RSD	8,46	240,77
Korrelationskoeffizient	0,9957	0,9636
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	3,51	18,82
Richtigkeit		
oben	1,14	4,44
mitte	3,81	3,36
unten	0,22	1,91

Tabelle 9-17: Kalibrierdaten von Methylxanthin.

	Scanner	Video
Steigung a_1	1,88	9,29
Achsenabschnitt a_0	17,34	362,31
Arbeitsbereich [ng]	53,2-372,4	53,2-372,4
Linearität F = 21,20	5,96	0,30
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	4,55	5,06
Reststandardabweichung RSD	5,44	113,29
Korrelationskoeffizient	0,9991	0,9942
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	1,44	5,72
Richtigkeit		
oben	1,10	1,31
mitte	4,72	0,25
unten	1,07	1,71

Tabelle 9-18: Kalibrierdaten von Theobromin.

	Scanner	Video
Steigung a_1	1,46	9,07
Achsenabschnitt a_0	25,92	114,48
Arbeitsbereich [ng]	50,1-350,7	50,1-350,7
Linearität F = 21,20	13,04	11,06

Tabelle 9-18: Kalibrierkenndaten von Theobromin.

	Scanner	Video
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	1,98	2,33
Reststandardabweichung RSD	7,85	79,17
Korrelationskoeffizient	0,9986	0,9986
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} [%] (Präzision)	2,67	4,35
Richtigkeit		
oben	7,81	3,36
mitte	3,27	2,07
unten	0,55	0,44

Tabelle 9-19: Kalibrierkenndaten von Theophyllidin.

	Scanner	Video
Steigung a_1	2,99	10,92
Achsenabschnitt a_0	-111,29	-116,46
Arbeitsbereich [ng]	100,4-401,4	100,4-401,4
Linearität	8,51	7,33
F = 21,20		
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	3,25	2,74
Reststandardabweichung RSD	18,25	77,92

Tabelle 9-19: Kalibrierkenndaten von Theophyllidin.

	Scanner	Video
Korrelationskoeffizient	0,9997	0,9980
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} [%] (Präzision)	2,42	2,84
Richtigkeit		
oben	4,56	0,46
mitte	2,66	1,61
unten	1,29	8,34

9.5.3 Reinheitsprüfung von Chlordiazepoxid

9.5.3.1 Materialien und Reagenzien

Chlordiazepoxid-Base wurde – wie auch die Standardsubstanzen der Verunreinigungen Nordazepam und Demoxepam – von der Firma Hoffmann-La Roche (Basel) zur Verfügung gestellt. Aminochlorobenzophenon wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) geliefert. Die Radepur[®]-Dragees (AWD, Ch.-B. 5009) wurden aus einer öffentlichen Apotheke bezogen. Der Wirkstoffgehalt beträgt 10 mg Chlordiazepoxid-Base/Dragee.

9.5.3.2 Dünnschichtchromatographie

Die Chromatographie erfolgte nach der Methode des Europäischen Arzneibuches. Die Banden werden 5 mm breit aufgetragen, wobei der Abstand zum linken Plattenrand 2 cm beträgt, der Abstand zum unteren Plattenrand 1 cm. Mittels eines 5-Komponentenfließmittels wurde über eine Trennstrecke von 6 cm in einer ungesättigten Normalkammer chromatographiert. Das Fließmittel setzt sich aus Toluol, Ethanol, Ethylacetat, Diethylamin und Wasser in den Volumenteilen 70+10+15+4+1 zusammen.

9.5.3.3 Standard- und Probenvorbereitung

Zur quantitativen Bestimmung wurden je 5 mg Aminochlorobenzophenon, Nordazepam und Demoxepam in Methanol gelöst und auf eine Konzentration von 0,01 µg/µl verdünnt. 6-18 µl der Standardlösungen wurden aufgetragen. 100,0 mg Chlordiazepoxid-Base wurde

als Stammlösung in 10 ml Methanol gelöst und 2 µl dieser Lösung aufgesprüht. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden fünf Draagees pulverisiert und ein Aliquot davon in Methanol gelöst. Diese Lösung wurde ohne weitere Probenvorbereitung mit je 70 ng der Verunreinigungen aufgetragen.

9.5.3.4 Aufnahmeparameter

Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Mitsubishi-1-Chip-Kamera. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Default-Werte der Kameraeinstellung beibehalten.

Tabelle 9-20: Einstellungen des Scanners und der Mitsubishi- M300E-Kamera.

Scanner		Video	
Meßwellenlänge [nm]	354	Meßwellenlänge [nm]	254
Spalt [mm]	3,0 x 0,3	Iris	8
Messungen/ Punkt	8	Helligkeit	10
Meßart	Remission/ Extinktion	Kontrast	5
		Background	10

9.5.3.5 Quantifizierung

Die Kalibrierdaten von Demoxepam, Nordazepam und Aminochlorobenzophenon sind den Tabellen 9-20 bis 9-22 zu entnehmen. Der Linearitätstest nach Mandel (s. Kapitel 9.4.2) ergab keine signifikant

bessere Anpassung einer Regressionsfunktion 2. Ordnung. Der nach Kapitel 9.4.3 durchgeführte Varianztest bestätigte Varianzhomogenität über alle Kalibrierbereiche.

Tabelle 9-21: Kalibrierkenndaten von Demoxepam.

	Scanner	Video
Steigung a_1	1,91	27,39
Achsenabschnitt a_0	14,85	2385,73
Arbeitsbereich [ng]	60,6-181,8	60,6-181,8
Linearität $F = 21,20$	0,5	4,5
Varianzhomogenität ($P = 99 \%$, $F = 5,35$)	1,02	1,57
Reststandardabweichung RSD	5,08	126,67
Korrelationskoeffizient	0,9985	0,9940
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} (Präzision)	3,19	5,08
Richtigkeit ($t_{\text{sol}} = 4,78$, $P = 99,9\%$, $n = 10$)		
oben	3,75	1,58
mitte	1,88	1,88
unten	0,43	0,43

Tabelle 9-22: Kalibrierkenndaten von Nordazepam.

	Scanner	Video
Steigung a_1	1,85	35,06
Achsenabschnitt a_0	4,36	1978,9
Arbeitsbereich [ng]	61,9-185,7	61,9-185,7
Linearität F = 21,20	11,6	5,8
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	1,43	1,59
Reststandardabweichung RSD	1,4585	124,17
Korrelationskoeffizient	0,9998	0,9966
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} (Präzision)	0,94	3,81
Richtigkeit ($t_{\text{soll}} = 4,78$, P=99,9%, n=10)		
oben	3,83	0,58
mitte	1,56	2,06
unten	0,04	3,22

Tabelle 9-23: Kalibrierkenndaten von Aminochlorobenzophenon.

	Scanner	Video
Steigung a_1	2,25	40,55
Achsenabschnitt a_0	13,52	2932,22
Arbeitsbereich [ng]	75,96-177,24	75,96-177,24

Tabelle 9-23: Kalibrierkenndaten von Aminochlorobenzophenon.

	Scanner	Video
Linearität F = 21,20	0,25	6,05
Varianzhomogenität (P = 99 %, F = 5,35)	2,20	5,30
Reststandardabweichung RSD	6,41	5,17
Korrelationskoeffizient	0,9988	0,9986
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} (Präzision)	2,81	2,45
Richtigkeit ($t_{\text{soll}} = 4,78$ P=99,9%, n=10)		
oben	2,16	0,34
mitte	0,05	0,05
unten	0,91	1,04

9.5.4 Gehaltsbestimmung von POPG und DPPC

9.5.4.1 Materialien und Reagenzien

Die Standardsubstanzen POPG und DPPC sowie die Proben LSF (Ch.B. *ERa11*) wurden von der Firma Byk Gulden Lomborg bereitgestellt. Kupfer-(II)-Sulfat-Pentahydrat sowie 85%-ige Phosphorsäure wurde in p.a.-Qualität (Merck, Darmstadt) eingesetzt.

9.5.4.2 Dünnschichtchromatographie

Die HPTLC-Platten wurden im Fließmittel Toluol, Methanol, Eisessig und Wasser (28+8+3,2+2, v+v) vorgereinigt und an der Luft getrocknet. Probe und Standards wurden mit einer Aufsprühgeschwindigkeit von 8 s/ μ l 5 mm bandförmig aufgesprüht, wobei ein Plattenrand von 5 cm zum linken und 1,5 cm zum unteren Plattenrand eingehalten wurde. Die Entwicklung der Platte wurde in einer gesättigten Doppeltrogkammer 20 x 20 cm (CAMAG, Berlin) durchgeführt. Nach einer Trennstrecke von 7 cm (ca. 30 Minuten) wurde die Platte kurz im Warmluftstrom getrocknet und anschließend 7 Minuten bei 110°C auf der Heizplatte erhitzt.

Derivatisierung:

Die Glasseite der Platte wurde nach Erlangen der Raumtemperatur mit Ethanol gereinigt. Anschließend wurde die Platte in 10%-iger Kupfer-(II)-sulfat-Pentahydrat-Lösung (in 4 %-iger Phosphorsäure) für 2 Sekunden bis zur Fließmittelfront getaucht. Zum Tauchen wurde ein elektronisches DC-Tauchgerät (Baron, Reichenau) mit einem 200 x 100 mm Glaseinsatz (Desaga, Wiesloch) verwendet. Nach dem Tauchen wurde die Platte sofort für ca. 3 Minuten waagrecht abgelegt, bis die Tauchlösung eingezogen war. Anschließend wurde die Platte 5 Minuten bei 110°C und dann 30 Minuten bei 170°C erhitzt. Während der Entwicklung und Derivatisierung mußte darauf geachtet werden, daß kein Staub auf die Platte gelangt, da dieser beim Erhitzen auf 170°C verbrennt und ebenfalls dunkle Flecken ergibt.

9.5.4.3 Standard- und Probenvorbereitung

Zur Herstellung der *Standardlösungen* für die **Reinheitsprüfungen** wurden 26 mg DPPC in 50 ml Methanol gelöst. Dies entsprach einer Konzentration von 0,5 mg DPPC/ml (1%-Vergleich DPPC für unbekannte Nebenprodukte). Aus dieser Lösung wurde durch weitere Verdünnung eine Konzentration von 0,05 mg DPPC/ml erreicht (0,5%-Vergleich DPPC für unbekannte Nebenprodukte). Zur Herstellung der Standards für die **Gehaltsbestimmung** wurden 40 (D1), 50 (D2) und 60 (D3) mg DPPC sowie 20 (P1), 25 (P2) und 30 (P3) mg POPG jeweils einzeln in einen 20 ml-Meßkolben eingewogen. Durch weitere Verdünnung ergaben sich theoretische Konzentrationen an DPPC von 0,4-0,5 und 0,6 mg/ml, an POPG von 0,2-0,25 und 0,3 mg/ml.

238 mg Pulver wurden für die *Probenlösungen* der **Reinheitsprüfung** entnommen und in einem 10 ml-Meßkolben mit Methanol gelöst. 5 ml dieser Lösung wurden mit einer EPA 8 Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) bis zur Klärung zentrifugiert (ca. 5 Minuten bei 6000 UpM). Die Probenlösung enthält 10,5 mg/ml DPPC und 4,5 mg/ml POPG freie Säure. Zur **Gehaltsbestimmung** wurden 210 mg Pulver in einem 50 ml-Meßkolben mit Methanol gelöst. 8 ml dieser Lösung wurden mit einer Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert, bis die Lösung klar war (ca. 5 Minuten bei 3500 UpM). Vom Zentrifugat wurde durch weitere Verdünnung eine Konzentration 0,5 mg/ml DPPC und 0,25 mg/ml POPG der Probenlösung erreicht.

Zur *Gehaltsbestimmung* wurden je 2 µl der Probe- und Standardlösungen im Data-pair-Verfahren aufgetragen. Für die *Reinheitsprüfung* wurden 2 µl (entsprechend 0,5 %-Vergleich) und 4 µl (entsprechend 1%-Vergleich) DPPC-Standardlösung aufgetragen, sowie 2 µl der Probelösung.

9.5.4.4 Aufnahmeparameter

Die derivatisierte Platte mußte innerhalb von 30 Minuten aufgenommen bzw. vermessen werden, da die Farben verblassen. Die Aufnahme der HPTLC-Platte erfolgte mit dem CAMAG-Videogerät.

Tabelle 9-24: Einstellungen des Scanners und der Hitachi-HV-C20-Kamera.

Scanner		Video	
Meßwellenlänge [nm]	365	Meßwellenlänge [nm]	VIS
Spalt [mm]	0,1 x 2,0	Belichtungszeit	1 Vollbild, 0,04 Sekunden
Messungen/Punkt	8	Bildakkumulation	aus
Meßart	Remission/ Extinktion	Filter	keiner

9.5.4.5 Quantifizierung

Die Kalibrierdaten der Kalibrierfunktionen ergeben sich aus den Peakflächenwerten der 7 Standardkonzentrationen. Der Linearitätstest nach Mandel (Kapitel 9.4.2) ergab keine signifikant bessere Anpassung einer Regressionskurve 2.Ordnung. Die Richtigkeit

wurde nach Gleichung (9-4) ($f = n-1$, $n = 5$, $P = 95 \%$, $t_{\text{soll}} = 2,776$) ermittelt. Der nach Kapitel 9.4.3 durchgeführte Varianztest bestätigte Varianzhomogenität über alle Kalibrierbereiche.

Tabelle 9-25: Statistische Kenndaten von DPPC.

	Scanner	Video
Steigung a_1	277,42	14,02
Achsenabschnitt a_0	6846,81	253,06
Arbeitsbereich [μg]	0,7-1,3	0,7-1,3
Linearität $F = 18,5$	0,25	5,30
Varianzhomogenität ($P = 99 \%$, $F = 5,35$)	2,60	1,09
Reststandardabweichung RSD	7,87	204,72
Korrelationskoeffizient	0,9968	0,9946
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x0} (Präzision)	1,11	1,46
Rel. system. Abweichung (Richtigkeit)	2,35	1,98
Richtigkeit ($t_{\text{soll}} = 2,77$, $P = 95 \%$, $n = 5$)		
oben	4,47	1,46
mitte	0,99	0,71
unten	1,41	2,59

Tabelle 9-26: Statistische Kenndaten von POPG.

	Scanner	Video
Steigung a_1	21,57	338,74
Achsenabschnitt a_0	119,5	4401,78
Arbeitsbereich [μg]	0,35-0,65	0,35-0,65
Linearität $F = 18,5$	1,11	0,96
Varianzhomogenität ($P = 99 \%$ $F = 5,35$)	1,13	1,20
Reststandardabweichung RSD	6,93	52,95
Korrelationskoeffizient	0,9984	0,9990
Rel. Verfahrensstandardabweichung V_{x_0} (Präzision)	1,13	0,622
Richtigkeit ($t_{\text{soll}} = 2,77$, $P = 95 \%$, $n = 5$)		
oben	1,48	2,29
mitte	2,04	2,09
unten	1,89	1,85

9.5.5 Quantifizierung von Cinchocain

9.5.5.1 Materialien und Reagenzien

Die Hauptsubstanz Cinchocainhydrochlorid sowie die vermessenen Salbenproben wurden von der Firma Byk Gulden Lomberg zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um Faktu[®]-Salbe unterschiedlicher Chargen (Ch.B. 299721, 299701, 299741). Der Wirkstoffgehalt an Cinchocainhydrochlorid ist mit 10 mg/g Salbe angegeben.

9.5.5.2 Dünnschichtchromatographie

Probe- und Standardlösungen werden im Data-Pair-Verfahren auf die Platte aufgesprüht. Die methanolischen Lösungen wurden mit einer Aufsprühgeschwindigkeit von 8 s/ μ l bandförmig (8 mm) aufgesprüht. Der Abstand zum linken und unteren Plattenrand betrug jeweils 1,5 cm. Die Chromatographie erfolgte in einer gesättigten Doppeltrogkammer mit Toluol, Aceton, Methanol und 25 %-igem Ammoniak (25+15+2,5+0,5, v+v) als Fließmittel. Zum Erreichen der Kammersättigung wurde in den vorderen Trog der Kammer Fließmittel eingefüllt. Die HPTLC-Platte wurde in den hinteren, fließmittel-freien Trog gestellt, die Kammer mit dem Deckel verschlossen und 10 Minuten in diesem Zustand belassen. Danach wurde – um die Chromatographie zu starten – die Kammer nach hinten geneigt, so daß die Hälfte der Fließmittelmenge in den Trog mit der Platte floß. In einer Zeit von ca. 20 Minuten wurde über eine Trennstrecke von 8 cm chromatographiert. Anschließend wurde im Warmluftstrom getrocknet.

9.5.5.3 Standard- und Probenvorbereitung

Ca. 1 g Salbe wurde in 50 ml Methanol bei 40°C im Wasserbad unter leichtem Umschwenken gelöst. Nach dem Abkühlen wurde durch ein Membran-Einmalfilter 0,45 μ m filtriert. Die ersten 1-2 Milliliter des Filtrates wurden verworfen, das restliche Filtrat diente als Stammlösung. Von der Stammlösung wurde 1 ml zu einer Konzentration von 0,01 μ g/ μ l verdünnt.

9.5.5.4 Aufnahmeparameter

Tabelle 9-27: Einstellungen des Scanners und der Hitachi-HV-C20-Kamera.

	Scanner		Video	
Anregungswellenlänge [nm]	312	Anregungswellenlänge [nm]	366	
Lampe	Quecksilberdampflampe	Belichtungszeit	7 Vollbilder, 0,28 Sekunden	
Spalt [mm]	0,1 x 2,0	Bildakkumulation	an	
Messungen/Punkt	8	Filter-Typ	Gelbfilter 2A (75 x 75 mm)	
Meßart	Remission/Fluoreszenz	Kontrastwert der Digitalisierkarte	1	
Kanten-Filter	370 nm			

9.5.5.5 Quantifizierung

Für die quantitative Bestimmung von Cinchocain wurde ein Arbeitsbereich von 50-350 ng gewählt. Die Peakflächen dienten zur Berechnung der Kalibrierkenndaten und der Analyseergebnisse. Der Linearitätstest nach Mandel (s. Kapitel 9.4.2) ergab keine signifikant bessere Anpassung einer Regressionsfunktion 2. Ordnung. Der nach Kapitel 9.4.3 durchgeführte Varianztest bestätigte Varianzhomogenität über alle Kalibrierbereiche. Der t-Wert der Richtigkeit wurde nach Gleichung (9-4) ermittelt.

Tabelle 9-28: Statistische Kenndaten von Cinchocain.

	Scanner	Video
Steigung a_1	3,27	116
Achsenabschnitt a_0	51,8	2174
Arbeitsbereich [ng]	106-424	106-424
Linearität $F =$ 21,20	9,95E-05	15,4
Varianzhomogeni- tät (P = 99 %, F = 5,35)	4,0	1,0
Reststandardab- weichung RSD	14,56	4,07
Korrelationsko- effizient	0,99937	0,99579
Rel. Verfahrens- standardabwei- chung V_{x0}	1,34	4,35
Richtigkeit ($t_{\text{soll}} =$ 2,57, P=95 %, n=6)		
oben	2,55	1,97
mitte	2,14	0,72
unten	2,54	1,54

10 Literaturverzeichnis

- [1] Firmenschrift zum Automatischen Probenauftragegerät III (ATS3) für die Dünnschichtchromatographie. Muttenz: CAMAG: 1998/99.
- [2] Firmenschrift zum Automatischen Probenauftragegerät TLC-Applicator TS 30. Wiesloch: Desaga: 1998/99.
- [3] Firmenschrift zur Automatischen Entwicklungskammer für die Dünnschichtchromatographie. Muttenz: CAMAG: 1994.
- [4] Burger K. DC-PMD, Dünnschicht-Chromatographie mit Gradientenelution im Vergleich zur Säulenflüssigkeits-Chromatographie. Fresenius Z Anal Chem. 1984; 318: 228-233.
- [5] Kirchner JG, Miller JM, Rice RG. Determination of biphenyl in citrus fruits and fruit products by means of chromatostrips. J Agric Food Chem. 1954; 2: 1031.
- [6] Densitometry in Thin Layer Chromatography – Practice and Applications (Hrsg.: Touchstone JC, Sherma J). New York, Chichester, Brisbane, Toronto: John Wiley & Sons; 1979.
- [7] Hannig K, Wirth H. Ein neuartiges Densitometer zur raschen Auswertung von Pherogrammen und trägerfreien Trennungen. Z Anal Chem. 1968; 243: 522-526.
- [8] Kerenyi G, Pataki T, Devenyi J. Ungar. Patent Nr. 170-287 (1976).
- [9] Devenyi T. High speed video-densitometry I: Principles and instrument. Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung. 1976; 11:1-10.
- [10] Devenyi T, Pungor S. High-speed videodensitometrie V: a general overview. Hung Sci Instr. 1980; 50: 3-8.
- [11] Ford-Holevinski T, Agranoff B. An inexpensive, microcomputer-based videodensitometer. Anal Biochem. 1983; 132(1): 132-6.
- [12] Mariash CN, Seelig S, Oppenheimer JH. A rapid, inexpensive, quantitative technique for the analysis of two-dimensional elektropherograms. Anal Biochem. 1981; 121: 388-394.
- [13] Ford-Holevinski T, Radin N. Quantitation of thin-layer chromatograms with an Apple II computer-based videodensitometer. Anal Biochem. 1985; 150: 359-63.

-
- [14] Gianelli M, Burns D. Multichannel Image Spectrophotometer for Direct Analysis of Mixtures on TLC. *Anal Chem.* 1983; 55: 1858-1862.
- [15] Gianelli M, Callis J. TLC with in Situ Multichannel Image Detection of Fluorescent Compounds. *Anal Chem.* 1981; 53: 1357-1361.
- [16] Burns DH, Callis JB, Christian GD. Robust method for quantitative analysis of two-dimensional (chromatographic/spectral) data sets. *Trends Anal Chem.* 1986; 5(2): 50-52.
- [17] Belchamber R, Read H. Image Processing of HPTLC-Plates. *J Chromatogr.* 1987; 395: 47-53.
- [18] Miwa M, Matsumoto M, Tezuka M, Okada S, Ohsuka S, Fujiwake H. Quantitative Fluorographic Detection of ^3H and ^{14}C Two-dimensional Thin-Layer Chromatographic Sheets with Ultra-High-Sensitivity TV Camera System. *Anal Biochem.* 1986; 152: 391-395.
- [19] Prosek M, Medja A, Jelnikar M, Kaiser RE. Proceedings of the 4th International Symposium on HPTLC. Selvino-Bergamo (Hrsg.: Traitler H, Studer A, Kaiser RE), Bad Dürkheim: Eigenverlag Institut für Chromatographie: 1985.
- [20] Petrovic M, Kastelan-Macan M. Quantitative evaluation of 2D-chromatograms with a CCD camera. *J AOAC Int.* 1999; 82(1): 25-30.
- [21] Vovk I, Golc-Wondra A, Prosek M. Validation of an HPTLC method for determination of caffeine. *J Planar Chromatogr.* 1997; 10: 416-419.
- [22] Vovk I, Prosek M. Quantitative evaluation of chromatograms from totally illuminated thin-layer chromatographic plates. *J Chromatogr. (A)* 1997; 768: 329-333.
- [23] Mall T. TLC Evaluation: Densitometry or Video Documentation. Proceedings of the 10th International Symposium on Instrumental Planar Chromatography, Visegrad, Hungary. 1998; 103-109.
- [24] Jansen EHJM, Van den Bosch D, Stephany RW, Van Look LJ, Van Peteghem C. Quantitative analysis of anabolics on TLC using image analysis techniques. *J Chromatogr.* 1989; 489 (1): 205-212.
- [25] Frey OR, Kovar KA, Hoffmann V. Possibilities and limitations of assays by on-line coupling of thin layer chromatography and FTIR spectroscopy. *J Planar Chromatogr.* 1993; 6: 93-99.
- [26] Busch KL, Mullis JO, Chakel JA. Mass spectrometric detection for TLC separations. *J Planar Chromatogr.* 1992; 5: 9-15.

- [27] Wippo U, Stan HJ. Determination of iprodione residues in vegetable food samples using online coupling of RP-HPLC following by AMD-TLC. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 1997; 5: 144-148.
- [28] Fong A, Hieftje GM. Near IR Spectroscopic Examination of Thin-layer Chromatography Plates in diffuse Transmittance Mode. *Appl Spectrosc.* 1994; 48: 394-399.
- [29] Wright PR, Richfield-Fratz N, Rasooly A, Weisz A. Quantitative Analysis of Components of the Color Additives D&C Red Noes 27 and 28 (Phloxine B) by Thin-Layer Chromatography and Video Densitometry. *J Planar Chromatogr.* 1997; 10: 157-162.
- [30] Essig S, Kovar KA. Quantitative Determination of Pharmaceutical Drugs using Videodensitometry. *Proceedings of the 10th International Symposium on Instrumental Planar Chromatography, Visegrad, Hungary.* 1998; 332-340.
- [31] Essig S, Kovar KA. The Efficiency of thin-layer chromatographic Systems: A Comparison of Separation Numbers using Addictive Substances as an example. *J Planar Chromatogr.* 1996; 11: 15-20.
- [32] Frey HP, Zieloff K. *Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie.* Weinheim, New York, Basel, Cambridge: VCH. 1993; 137-139.
- [33] Frei RW. A critical study of some parameters in quantitative in situ investigations of thin-layer chromatography by light absorption methods. *J Chromatogr.* 1972; 64: 285-295.
- [34] Kirchner JG. Thin-layer chromatographic quantitative analysis. *J Chromatogr.* 1973; 82: 101-115.
- [35] Kubelka P, Munk F. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. *Z Tech Phys.* (Leipzig) 1931; 12: 593.
- [36] Kortüm G. *Reflexionsspektroskopie.* Berlin: Springer Verlag; 1969.
- [37] Haberäcker P. *Praxis der digitalen Bildverarbeitung und Mustererkennung.* München, Wien: Hanser; 1995.
- [38] Rosenfeld A, Kak AC. *Digital Picture processing. Vol 1+2.* New York: Academic Press; 1982.
- [39] Abmayr W. *Einführung in die digitale Bildverarbeitung.* Stuttgart: Teubner; 1994.
- [40] Jähne B. *Bildverarbeitung '95. Forschen, Entwickeln, Anwenden.* Herausgeber: Ahlers RJ. Technische Akademie Esslingen: 1995.

-
- [41] Fogg AG, Sausins PJ, Smithson JR. The determination of paracetamol and aspirin in mixtures by non-aqueous potentiometric titrimetry or by ultraviolet spectrophotometry. *Anal Chim Acta*. 1970; 49 (2): 342-345.
- [42] British Pharmacopeia. Vol I, British Pharmacopeia Commission Her Majesty's Stationery Office, London 1988; 414.
- [43] De Fabrizio F. Analysis of acetaminophen, phenylephrine hydrochloride, diphenhydramine hydrochloride, and ascorbic acid in a capsule preparation. *Asian J Pharm Sci*. 1975;1 (1): 61-65.
- [44] Ascah TL, Hunter BT. Simultaneous High-Performance liquid chromatographic determination of propoxyphene and acetaminophen in pharmaceutical preparations. *J Chromatogr*. 1988; 455: 279-289.
- [45] Kim M, Steward JT. HPLC post-column ion-pair extraction acidic drugs using a substituted α -phenylcinnammonitrile quarternary ammonium salt as a new fluorescent ion-pair reagent. *J Liq Chromatogr*. 1990; 13 (2): 213-237.
- [46] Di Pietra AM, Gatti R, Andrisano V, Cavrini V. Application of high-performance liquid chromatography with diode-array detection and on-line post-column photochemical derivatization to the determination of analgesics. *J Chromatogr. (A)* 1996; 729: 355-361.
- [47] Cummings AJ, King ML, Martin BK. A kinetic study of drug elimination: the excretion of paracetamol and its metabolites in man. *Br J Pharmacol Chemother*. 1967; 29:150.
- [48] Pfandl A. Gehaltsbestimmung pharmazeutischer Zubereitungen, die Analgetica und Antipyretica enthalten. *Dtsch Apoth Ztg*. 1968; 108: 568.
- [49] Schlemmer W, Kammer EJ. Application of quantitative Thin-layer Chromatography in drug assay and stability testing. Determination of Codein Phosphate, Noscapine, Diphenhydramine hydrochloride, Phenylephrine hydrochloride, Caffeine, Etoffylene, Phenobarbital and Thiamine hydrochloride by in situ Reflectance Spectroscopy. *J Chromatogr*. 1973; 82:143.
- [50] El Sadek M, El Shanawany, Aboul Khier A, Rucker G. Determination of the components of analgesic mixtures using high-performance thin-layer chromatography. *Analyst* 1990; 115: 1181-1184.
- [51] Kommentar des Europäischen Arzneibuch 1997; Band I, Kapitel 2.9.6. 3. Ausgabe, Amtliche deutsche Ausgabe, Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag, Eschborn: Govi-Verlag GmbH, 1997.

- [52] Pohloudek-Fabini R, Döge G, Kottke D. Stability of oxyethyltheophylline solutions for injections. *Pharmazie* 1984; 39:24.
- [53] Theophylline. The United States Pharmacopeia, 23rd Revision, The US Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD, USA: 1995.
- [54] Reisch J, Walker H. Gaschromatographic separation of various xanthine derivatives. *Pharmazie* 1966; 21:467.
- [55] Theophyllin Monographie des Deutschen Arzneibuches 1997, Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, Eschborn: Govi-Verlag GmbH: 1997.
- [56] Garattini S, Mussini E, Randall LO (Hrsg.). The Benzodiazepines. New York: Raven Press, 1973: 53 ff..
- [57] Breyer-Pfaff U, Gaertner HJ. Antidepressiva - Pharmakologie, therapeutischer Einsatz und Klinik der Depressionen. Medizinisch-pharmazeutisches Kompendium Band 5, S. 173, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: 1987.
- [58] Möhler H. Grundlagen zum Wirkungsmechanismus der Benzodiazepine, in Kugler J, Leutner V (Hrsg.). Benzodiazepine in der Neurologie. Symposium Mannheim 4. und 5. Oktober 1986. Editions Roche, Grenzach-Whylen: Mayr Miesbach Druckerei und Verlag GmbH; 1987: 29ff.
- [59] Sternbach LH. The discovery of librium. *Agents-Actions*. 1972; 2 (4): 193-196.
- [60] French W, Matsui FF, Smith SJ. Determination of major impurity in chlordiazepoxide formulations and drug substance. *J Pharm Sci*. 1975; 64: 1545-1547.
- [61] Baggi TR, Chatterjea JN. HPLC separation of hydrolysate benzophenones of some benzodiazepines. *J Inst Chem. (India)* 1986; 58 (5): 177-178.
- [62] Butterfield AG, Matsui FF, Smith SJ, Sears RW. HPLC Determination of chlordiazepoxide and major related impurities in pharmaceuticals. *J Pharm Sci*. 1977; 66 (5): 684-687.
- [63] White DJ, Steward JT, Honigberg IL. Quantitative Analysis for chlordiazepoxide hydrochloride and related compounds in drug substances and tablet dosage form by HPLC and scanning densitometry. *J Planar Chromatogr*. 1991; 4: 330-332.
- [64] Chlordiazeoxid Base Monographie des Deutschen Arzneibuches 1997. Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag, Eschborn: Govi-Verlag GmbH: 1997.

-
- [65] Chlordiazepoxid Monographie im Europäischen Arzneibuch 1997, 3. Ausgabe, Amtliche deutsche Ausgabe, Stuttgart: Deutscher Apothekerverlag, Eschborn: Govi-Verlag GmbH: 1997.
- [66] Chlordiazepoxide and Chlordiazepoxide tablets Official Monographs. The United States Pharmacopeia, 23rd Revision. The US Pharmacopeial Convention Inc.: Rockville, MD, USA: 1995.
- [67] King RJ. Pulmonary Surfactant. *J Appl. Physiol.* 1982; 53:1-8.
- [68] Batenburg JJ. Surfactant phospholipids: synthesis and storage. *Am J Physiol.* 1992; 262: 367-385.
- [69] Steward JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanat. *Anal Biochem.* 1980; 104: 10-14.
- [70] Raheja RK, Kaur C, Singh A, Bhatja IS. New colorimetric method for the quantitative estimation of phospholipids without acid digestion. *J Lipid Res.* 1973; 14: 695-697.
- [71] Gamble W, Vaughan M, Kruth HS, Avigan J. Procedure for determination of free and total cholesterol in micro- or nanorange amounts suitable for studies with culture cell. *J Lipid Res.* 1978; 19(8): 1068-1070.
- [72] Christie WW. *HPLC and Lipids.* Oxford: Pergamon Press: 1987.
- [73] Kaluzny MA, Duncan LA, Merritt MV, Epps DE. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J Lipid Res.* 1985; 26: 135-140.
- [74] Ågren JJ, Julkunen A, Pentillä. Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column. *J Lipid Res.* 1992; 33: 1871-1876.
- [75] Bünger H, Pison U. Quantitative analysis of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chromatogr. (B)* 1995; 672: 25-31.
- [76] Bonnano LM, Denizot BA, Tchoreloff PC, Puisieux F, Cardot PJ. Determination of Phospholipids from Pulmonary Surfactant using an On-Line Coupled Silica/Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography System. *Anal Chem.* 1992; 64: 371-379.
- [77] Dethloff LA. Separation of pulmonary surfactant phospholipids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr. (B)* 1986; 382: 79-87.

- [78] Iwamori M, Hirota K, Utsuki T, Momoeda K, Ono K, Tsuchida Y, Okomura K, Hanaoka K. Sensitive Method for the Determination of pulmonary surfactant phospholipid/Sphingomyelin Ratio in Human Amniotic Fluids for the Diagnosis of Respiratory Distress Syndrome by Thin-Layer Chromatography-Immuno-staining. *Anal Biochem.* 1996; 238: 29-33.
- [79] Goppelt M, Resch K. Densitometric Quantitation of Individual Phospholipids from Natural Sources Separated by One-Dimensional Thin-Layer Chromatography. *Anal Biochem.* 1984; 140: 152-156.
- [80] Ruiz JI, Ochoa B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *J Lipid Res.* 1997; 38: 1482-1489.
- [81] Yamamoto H, Nakamura K, Nakatani M. Determination of phospholipids on two-dimensional thin-layer chromatographic plates by imaging densitometry. *J Chrom.* 1991; 543 (1): 201-10.
- [82] Rischer M, Schnell H, Greguletz R, Wolf-Heuss G, Engel J. Validation of an HPTLC Method for Impurities Testing and Determination of the Log *P* of a new Phospholipid. *J Planar Chromatogr.* 1997; 10: 290-297.
- [83] Vuorela P, Vuorela H, Suppala H, Hiltunen R. Development of Quantitative TLC Assay for Phospholipid Products. *J Planar Chromatogr.* 1996; 9: 254-259.
- [84] Henderson RJ, Tocher DR. In Hamilton RJ und Hamilton S (Hrsg.) *Lipid Analysis*, Oxford, UK: IRL Press. 1992; 65-111.
- [85] Olsson NU. Advances in planar chromatography for the separation of food lipids. *J Chromatogr.* 1992; 624: 11-19.
- [86] Lendrath G, Bonekamp-Nasner A, Kraus L. Analytische Möglichkeiten zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Phospholipide in Lecithinen unterschiedlicher Herkunft. *Fat Sci Technol.* 1991; 2: 53-61.
- [87] Caissie GE, Mallet VN. The fluorimetric detection of pesticides on aluminium oxide layers. *J Chromatogr.* 1976; 117: 129-136.
- [88] Szabo A, Kovacs Nagy M, Tömörkeny E. Thin-layer chromatographic assay of tetracyclines. *J Chromatogr.* 1978; 151: 256.
- [89] Lepri L, Coas V, Desideri PG. Reversed phase planar chromatography of enantiomeric compounds with bovine serum albumin in the mobile phase. *J Planar Chromatogr.* 1992; 5: 294-296.

-
- [90] Alak A, Armstrong DW. Thin-layer Chromatographic Separation of Optical, Geometrical, and Structural Isomers. *Anal Chem.* 1986; 58(3): 582-584.
- [91] Geiss F. Stand der Reproduzierbarkeit in der Dünnschichtchromatographie. *J Chromatogr.* 1968; 33: 9-25.
- [92] Halpaap H. Standardisierung der Dünnschichtchromatographie durch Verwendung von Fertigplatten. *J Chromatogr.* 1968; 33: 144-164.
- [93] Hauck HE, Junker-Buchheit A, Wenig R. Reproducibility of silica gel 60 pre-coated plates in TLC and HPTLC. *GIT Fachz Lab.* 1993; 11: 973.
- [94] Covino BG. Pharmacology of local anesthetic agents. *Br J Anaesth.* 1986; 58 (7): 701.
- [95] Pryanishnikova NT. Degree of ionization and active form of anesthetics. *Khim-Farm Zh.* 1970; 4 (1): 35-39.
- [96] Šaršünová M. Dünnschichtchromatographie ohne Bindemittel in der Arzneimittelanalyse. *Pharmazie.* 1963; 18 (11): 748-50.
- [97] De Spiegeleer, Van den Bossche and De Moerloose. A Strategy for Two-Dimensional, High-Performance Thin-Layer Chromatography, Applied to Local Anesthetics. *Chromatographia.* 1987; 23(6): 407-411.
- [98] Florey K. *Analyt Prof Drug Subst.* Academic Press, New York- London, 1983; Bd. 12.
- [99] Martucci JD, Schulman SG. The fluorimetric determination of dibucaine. *Anal Chim Acta.* 1975; 77: 317.
- [100] Dusinsky G. Die polarographische Bestimmung des Percains. *Pharmazie.* 1954; 9: 27.
- [101] Rop PP und Mitarb. Liquid chromatographic analysis of cocaine benzylecgonine, local anesthetic agents and some of their metabolites in biological fluids. *J Liq Chromatogr.* 1993; 16(13) : 2797-811.
- [102] Sweedler JV, Shear JB, Fishman HA, Zare RN. Fluorescence Detection in Capillary Zone Electrophoresis using a Charge Coupled Device with Time-Delayed Integration. *Anal Chem.* 1991; 63: 496-502.
- [103] Seno H, Suzuki O, Kumazawa T, Hattori H. Rapid isolation with sep-pak C₁₈ cartridges and wide-bore capillary gas chromatography of benzophenons, the acid hydrolysis products of benzodiazepines. *Forensic Sci Int.* 1991; 50: 239.

- [104]Tanaka T, Aramaki S, Momose A. Thin-layer chromatographic screening procedure for some drugs in horse plasma. *J Chromatogr.* 1989; 496: 407-415.
- [105]Funk W, Damann V, Vonderheid C, Oehlmann G. *Statistische Methoden in der Wasseranalytik* 1. Auflage. Weinheim: VCH: 1985.
- [106]Belchamber RM, Brinkworth SJ, Read H, Roberts JDM. Recent Adv Thin-Layer Chromatogr [Proc Chromatogr Soc Int Symp]. 1987; 37-43. Dallas, F.A.A Plenum: New York: 1988.
- [107]Fernandez P, Hermida I, Bermejo AM, Lopez-Rivadulla M, Cruz A, Concheiro L. Simultaneous determination of diazepam and its metabolites in plasma by high performance liquid chromatography. *J Liquid Chromatogr.* 1991; 14(13): 2587-2600.
- [108]Sachs L. *Angewandte Statistik*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer: 1992.
- [109]Otto M. *Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH: 1997.
- [110]Doerffel K. *Statistik in der analytischen Chemie*. Weinheim: Wiley-VCH: 1987.
- [111]Kromidas S. *Valierung in der Analytik*. Weinheim: Wiley-VCH: 1999.
- [112]Koch OG, Koch-Gedic GA. *Handbuch der Spurenanalyse*, 2. Auflage, Teil 1. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag: 1974.
- [113]Egli RA, Tanner S. Universelle, halogenfreie DC-Fließmittel für Arzneisubstanzen. *Fresenius Z Anal Chem.* 1979; 295: 398-401.

Meine akademischen Lehrer neben Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

K. Albert, E. Bayer, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, J. Gelinek, F. Gönnerwein, W. Göpel, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, D. Hoffmann, V. Hoffmann, W. Jäger, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Koch, B. Koppenhöfer, D. Krug, E. Lindner, H. A. Mayer, U. Nagel, G. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, B. Rieger, O. Rössler, D. Schrenk, V. Schurig, F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, K.-P. Zeller.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Essig
Geburtstag: 04.05.1970
Geburtsort: Kirchheim/Teck
Eltern: Siegfried und Doris Essig, geb. Esslinger
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Ausbildung

1976 - 1980 Grund- und Hauptschule in Wendlingen
1980-1986 Johannes-Kepler-Realschule in Wendlingen
1986-1989 berufl. Gymnasium auf dem Säer in Nürtingen
1989-1996 Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
04/1991 Vordiplomprüfung Chemie
03/1996 Diplomprüfung Chemie
03/1996 Diplomarbeit am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. K.-A. Kovar mit dem Titel *“Die Trennzahl zum Vergleich dünnschichtchromatographischer Verfahren mit HPLC”*

10/96 - 03/00 Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit dem Titel
*“Möglichkeiten und Grenzen der Videodensitometrie in
der Dünnschichtchromatographie: Ein Vergleich zur
klassischen Densitometrie”* am Pharmazeutischen
Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter
Anleitung von Prof. Dr. K.-A. Kovar

Berufliche Tätigkeiten

10/96 - 11/96 Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen
Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

11/96 - 03/00 Wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen
Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen