



universität
wien

DIPLOMARBEIT

„Analytik von Nootropica“

Verfasserin

Carola Alexandra Waldherr

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban des Departments für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien für die Betreuung dieser Arbeit und für die Aufnahme und Auswertung der NMR-Spektren bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Ass.-Prof. Mag. Dr. Hannelore Kopelent und Herrn Dr. Bodo Lachmann der Abteilung für Arzneimittelanalytik des Departments für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien für die interessante Themenstellung und die hilfreiche und kompetente Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Jürgen König und Frau Sandra Auernigg-Haselmaier des Departments für Ernährungswissenschaften der Universität Wien für die Aufnahme und Auswertung der Massenspektren mit Summenformelberechnung.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	ALLGEMEINES ZUR STABILITÄTSPRÜFUNG	2
3.	PHOTOSTABILITÄTSPRÜFUNG.....	5
3.1	Allgemein.....	5
3.2	Lichtquelle	5
3.3	Wirkstoff.....	6
3.4	Fertigarzneimittel.....	7
3.5	Chinin Aktinometrie	9
4.	ANALYTISCHE METHODEN ZUR STABILITÄTSPRÜFUNG	10
4.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	10
4.2	Dünnschichtchromatographie (DC)	13
5.	ALZHEIMER-ERKRANKUNG	15
5.1	Allgemein.....	15
5.2	Ursachen.....	15
5.3	Diagnose	16
5.4	Medikamentöse Therapie.....	17
6.	CHARAKTERISTIKA DER VERWENDETEN SUBSTANZEN	19
6.1	Cinnarizin.....	19
6.2	Donepezil HCl.....	21
7.	LITERATURSITUATION.....	25
8.	VALIDIERUNG EINES HPLC-SYSTEMS.....	28
8.1	Spezifität.....	28
8.2	Richtigkeit.....	28
8.3	Präzision	29
8.4	Detektionsgrenze	30

8.5	Quantifizierungsgrenze.....	31
8.6	Linearität	32
8.7	Robustheit	33
9.	EXPERIMENTELLER TEIL.....	34
9.1	Geräte und Methoden.....	34
9.2	Substanzen.....	37
9.3	Lösungsmittel und Fließmittel	38
9.4	Methodenentwicklung und Vorversuche - Cinnarizin	38
9.5	Photostabilitätsuntersuchungen.....	39
9.5.1	Bestrahlung im Suntest	39
9.5.2	Bestrahlung bei UV 254nm	40
9.5.3	Bestrahlung bei UV 366nm	41
9.6	Hydrolyse von Cinnarizin im sauren Medium	41
9.7	Bestimmung von Cinnarizin in Fertigarzneimitteln	43
9.7.1	Bestimmung von Cinnarizin in Cinnabene®-Kapseln.....	43
9.7.2	Bestimmung von Cinnarizin in Stutgeron® 75mg-Kapseln	44
9.8	Vorversuche zur Bestimmung von Donepezil HCl	45
9.8.1	Bestimmung von Donepezil HCl in Aricept® 5mg-Filmtabletten	45
9.8.2	Bestimmung von Donepezil HCl in Aricept® 10mg-Filmtabletten	46
9.9	Weiterentwicklungen zur Arzneibuchmonographie von Donepezil HCl.....	46
10.	ERGEBNISSE	48
10.1	Methodenentwicklung und Vorversuche - Cinnarizin	48
10.2	Photostabilitätsuntersuchungen.....	50
10.3	Hydrolyse von Cinnarizin im sauren Medium	73
10.4	Bestimmung von Cinnarizin in Cinnabene®-Kapseln	86
10.5	Bestimmung von Cinnarizin in Stutgeron® 75mg-Kapseln	90
10.6	Ergebnisse der Validierung - Cinnarizin	92
10.6.1	Linearität	92
10.6.2	Richtigkeit.....	94
10.6.3	Präzision	96
10.6.4	Detektions- und Quantifizierungsgrenze	99
10.6.5	Robustheit	101
10.7	Vorversuche zur Bestimmung von Donepezil HCl	102
10.8	Weiterentwicklungen zur Arzneibuchmonographie von Donepezil HCl.....	104

11.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	107
12.	TABELLENVERZEICHNIS	111
13.	LITERATURVERZEICHNIS	112
14.	ANHANG	115

1. Einleitung

Cinnarizin, ein Ca^{2+} -Antagonist und Antihistaminikum, wird seit langem bei einer Reihe von Erkrankungen, die vor allem die Durchblutung betreffen, eingesetzt. In der Vergangenheit wurde es häufig als Nootropicum bei demenziellen Syndromen angewendet. Jedoch wurde Cinnarizin in den letzten Jahren zunehmend durch neuere Nootropica, wie z.B. die Acetylcholinesterasehemmer, vom Markt verdrängt. Heute gewinnt Cinnarizin wieder langsam an Bedeutung, da es vermehrt als Antiemetikum bei Seekrankheit verwendet wird.

Cinnarizin wurde bereits 1959 erstmalig zugelassen und stellt somit einen älteren Wirkstoff dar, der hinsichtlich Stabilität trotzdem noch nicht ausreichend untersucht wurde. Gerade im Bereich der Photostabilität wurde bisher, bezogen auf das Cinnarizin, wenig Forschung betrieben.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war eine analytische Methode zu entwickeln, um Cinnarizin sowohl in Arzneimitteln als auch in Gegenwart von Abbauprodukten zu bestimmen. Um Abbauprodukte zu erhalten, wurden photolytische und hydrolytische Stabilitätsprüfungen sowie Stresstests durchgeführt.

Neben den Untersuchungen des Cinnarizins wurden auch analytische Bestimmungen des Donepezilhydrochlorids durchgeführt. Donepezil HCl gehört zur Gruppe der Acetylcholinesterasehemmer und wird sehr häufig als Nootropicum bei demenziellen Syndromen eingesetzt. Im Vergleich zum Cinnarizin stellt das erst 1988 zugelassene Donepezil HCl einen wesentlich neueren Wirkstoff dar, der hinsichtlich Stabilität auch schon besser erforscht wurde.

Die analytische HPLC-Methode, die in der vorliegenden Arbeit für die Analytik des Donepezil HCl verwendet wurde, wurde von der Europäischen Arzneibuchkommission entwickelt. Diese neue Methode stellt eine Weiterentwicklung zur Monographie von Donepezil HCl in Bezug auf Related Substances dar.

2. Allgemeines zur Stabilitätsprüfung

Die Stabilitätsprüfung von Arzneistoffen ist nötig, um eine gleichbleibende Qualität während eines bestimmten Zeitraumes zu garantieren. Durch die bei der Lagerung gebildeten Abbauprodukte kann es nämlich zu einer Änderung der Wirkung, der pharmakokinetischen und toxikologischen Eigenschaften kommen. Außerdem können auch Verfärbungen und Geruchs- bzw. Geschmacksänderungen auftreten. Aus diesem Grund wird bei der Stabilitätsprüfung die Instabilität eines Stoffes, die durch seine Struktur bestimmt wird, experimentell ermittelt. Durch die Erkenntnisse der durchgeführten Stabilitätsprüfungen können dann Aussagen über die Haltbarkeit, Laufzeit, Verwendbarkeitsdauer, Lagerungsfähigkeit und Lagerungsbedingungen getroffen werden. [1]

Allgemein besteht die Stabilitätsprüfung aus der organoleptischen, der chemischen, der physikalischen bzw. physikalisch-chemischen und der mikrobiologischen Prüfung. Nachfolgend ein kurzer Überblick über die einzelnen Prüfungsziele. [1]

Organoleptische Prüfung

Bei dieser Prüfung werden Veränderungen des Aussehens, des Geruchs, des Geschmacks und der Homogenität beurteilt.

Chemische Prüfung

Hierbei werden Konzentrationsabnahmen der Wirk- und Hilfsstoffe bestimmt. Außerdem erfolgt die Identifizierung und Strukturaufklärung von Abbauprodukten.

Physikalische und physikalisch-chemische Prüfung

Zu der großen Anzahl an Parametern, die hier getestet werden, gehören der pH-Wert, der Ionisationsgrad, die Teilchengröße und Teilchengrößenverteilung, die Dichte, die Viskosität, das Schmelzverhalten, die mechanische Stabilität, die Biege- und Druckfestigkeit, die Zerfallszeit, die Lösungsgeschwindigkeit usw.

Mikrobiologische Prüfung

Hier wird nicht nur die mikrobiologische Belastung mit Hilfe von Indikatorkeimen untersucht, sondern es wird auch der Gehalt an Konservierungsmittel bestimmt und die Sterilitätsprüfung durchgeführt.

Die Veränderungen von Arzneimitteln, die bei den oben angeführten Stabilitätsprüfungen untersucht werden, werden durch verschiedene Faktoren verursacht. Zu den

stabilitätsbeeinflussenden Faktoren zählen einerseits äußere Faktoren wie Wärme, Wasser, Luftsauerstoff, Licht und Mikroorganismen, andererseits innere Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke und Wechselwirkungen zwischen Arzneistoffen, Arzneistoffen und Hilfsstoffen oder Arznei- bzw. Hilfsstoffen und Primärverpackung. Vor allem die äußeren Faktoren führen zur Instabilität, die sich durch chemische Abbaureaktionen wie Hydrolysen, Oxidationen, Autoxidationen, Racemisierungen, Epimerisierungen, photochemische Reaktionen, Decarboxylierungen, Dehydratisierungen, Reduktionen, Polymerisationen und enzymatische Reaktionen bemerkbar machen. [1, 2]

Im Folgenden wird nun näher auf die äußeren Faktoren eingegangen.

Wärme

Die Erhöhung der Temperatur führt stets zur Beschleunigung einer chemischen Reaktion. Dieser Effekt wird durch die Arrhenius-Gleichung beschrieben, welcher bei der beschleunigten Stabilitätsprüfung genutzt wird. Werden Arzneistoffe bei einer Temperatur von 2 bis 8°C gelagert, kann dieser Effekt minimiert werden. [1, 2]

Wasser

Die durch Wasser verursachte Hydrolyse gehört zu den häufigsten Ursachen für Instabilitäten von Arzneimitteln. Wasser kann dabei als Lösungsmittel oder in Form von Luftfeuchtigkeit vorliegen und führt bei den weit verbreiteten hydrolyseempfindlichen bzw. hygroskopischen Arzneistoffen zu Abbaureaktionen. Typische hydrolyseempfindliche Teilstrukturen sind Carbonsäurederivate wie Ester, Lactone, Lactame, Imide und Amide, ebenso Sulfonamide, Alkylhalogenide, Ether, Glycoside, Acetale und Ketale. Hydrolysen können aber auch durch Alkohole oder Amine verursacht werden, man spricht in diesem Fall auch von Alkoholysen bzw. Aminolysen. Dabei findet ein Acyltransfer von einem Alkohol auf ein Lösungsmittel statt, was auch als Umesterung bezeichnet wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird dabei durch die Kettenlänge des verwendeten Alkohols bestimmt. [1, 2]

Luftsauerstoff, Redoxsysteme

Redoxreaktionen zählen nach den Hydrolysen zu den bedeutungsvollsten chemischen Abbaureaktionen. Bei den Redoxreaktionen handelt es sich häufig um Radikalreaktionen, die oft durch Licht oder Schwermetallionen beschleunigt werden. Der pH-Wert wiederum bestimmt das Redoxpotential von wässrigen oder alkoholisch-wässrigen Lösungen. Zu den typischen oxidationsempfindlichen Struktureinheiten gehören Phenole, o-Diphenole, p-Diphenole, Aminophenole, Ketole, β -Enole, Endiole, Olefine, Ether, Aldehyde,

(heterocyclische) Aromaten und Polyenole. Viele dieser Strukturen sind aufgrund der beweglichen π -Elektronen gleichzeitig auch lichtempfindlich. In vielen Fällen kommt es zu lichtinduzierten Radikalreaktionen und/oder Autoxidationen. Die Endprodukte bilden chinoide Strukturen, Aldehyd-, Keto- oder Carbonylfunktionen sowie Peroxid- oder Epoxidstrukturen aus oder sie sind Dimere oder Polymere. Bei den Olefinen und Polyenen kann es sogar zur Abspaltung von Kettenbruchstücken kommen. [1, 2]

Licht

Licht begünstigt nicht nur Oxidationen, sondern führt selbst auch zu chemischen Abbauprozessen. Wie bereits oben erwähnt, kann es bei den oxidationsempfindlichen Strukturen auch zu photochemischen Reaktionen kommen. Vor allem kurzwelliges Licht des sichtbaren Spektrums und UV-Licht sind wichtige Umweltfaktoren, die Degradationen auslösen. Die von den Arzneistoffen absorbierte elektromagnetische Strahlung, kann zum Abbau führen, in Wärme umgewandelt werden oder in Form von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz mit anderer Wellenlänge abgestrahlt werden. Vorrangig handelt es sich bei den ablaufenden Reaktionen um Epimerisierungen und andere Umlagerungen, wie z.B. Isomerisierungen geometrischer Isomere. Allerdings können auch Dimerisierungen die Folge sein. [1, 2, 3]

Durch die Lagerung von lichtempfindlichen Arzneistoffen in Braunglasflaschen, kann ein Lichtschutz erreicht werden, da etwa 95% des einfallenden energiereichen UV-Lichts vom Glas absorbiert wird. [1, 2, 3]

pH-Wert

Viele der bereits erwähnten Abbaureaktionen wie Hydrolysen, Oxidationen, Epimerisierungen usw. sind, was ihre Reaktionsgeschwindigkeit betrifft, stark vom pH-Wert abhängig. Wird bei Lösungen der pH-Wert so eingestellt, dass die Reaktion am langsamsten verläuft, kann die Stabilität und damit die Lagerungsfähigkeit erhöht werden. Dabei muss aber stets der physiologische pH-Wert berücksichtigt werden und bei der Einstellung eventuell ein Kompromiss eingegangen werden. Dies trifft auch für chirale Wirkstoffe zu, bei denen es durch Racemisierung zur Qualitätsminderung kommen kann. [1, 2]

3. Photostabilitätsprüfung

Da die Photostabilitätsprüfung einen wesentlichen Teil der vorliegenden Arbeit ausmacht, wird im Anschluss näher darauf eingegangen.

3.1 Allgemein

Bei der Photostabilitätsprüfung muss streng unterschieden werden, ob die Reaktionen durch UV- bzw. sichtbares Licht oder durch den Infrarotanteil von Tages- oder Kunstlicht hervorgerufen werden. Generell werden bei der Prüfung auf Lichtempfindlichkeit nach der ISO-Norm 10977 (1993) definierte Xenon- oder Halogenlampen, deren Energieverteilung des Spektrums dem des Sonnenlichts ähnlich ist, eingesetzt. Studien geben an, wie viele Stunden Bestrahlung in Abhängigkeit von der Leistung einer Sonneneinstrahlung zeitlich äquivalent sind. Diese direkten Vergleiche sind jedoch kritisch zu betrachten. [1]

Laut ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) Q1B: *Photostability Testing of New Drug Substances and Products* sollten Photostabilitätsprüfungen Teil des Stresstests sein, welcher in erster Linie im Rahmen eines Zulassungsverfahrens durchgeführt wird. In der ICH-Guideline Q1B wird daher nicht auf die Photostabilitätsprüfung einer bereits zugelassenen Substanz eingegangen. Generell können folgende Photostabilitätsprüfungen durchgeführt werden: [4]

- Prüfung des Wirkstoffs
- Prüfung des Arzneimittels außerhalb der Primärverpackung
- Prüfung des Arzneimittels in der Primärverpackung
- Prüfung des Arzneimittels in der Sekundärverpackung

3.2 Lichtquelle

Bei der Wahl der Lichtquelle gibt es zwei Optionen zur Auswahl. Bei Option 1 kann jede Lichtquelle verwendet werden, die dem D65/ID65 Emissions-Standard entspricht. Dazu gehören künstliche fluoreszierende Tageslichtlampen, welche sichtbares und ultraviolettes (UV) Licht emittieren, Xenon- und Halogenlampen. D65 ist der international anerkannte Standard für Outdoor-Tageslicht, der in der ISO 10977 (1993) definiert ist, und ID65 stellt den Standard für indirektes Indoor-Tageslicht dar. Für Lichtquellen, die eine signifikante Strahlung unter 320nm emittieren, können Filter zur Beseitigung dieser Strahlung eingesetzt werden. [4]

Bei Option 2 wird die Probe von zwei Lampen bestrahlt, nämlich von einer fluoreszierenden Tageslichtlampe ohne IR-Anteil und einer im nahen UV-Bereich emittierenden Lampe. Die

fluoreszierende Tageslichtlampe ohne IR-Anteil entspricht dabei der ISO 10977 (1993) Norm und die im nahen UV-Bereich emittierende Lampe besitzt eine Energieverteilung des Spektrums von 320nm bis 400nm mit einer Maximumemissionsenergie zwischen 350nm und 370nm. [4]

Die Photostabilitätsprüfung erfolgt entweder am Wirkstoff oder am Fertigarzneimittel. [4]

3.3 Wirkstoff

Die Photostabilitätsprüfung am Wirkstoff besteht aus zwei Teilen: [4]

1. Forced Degradation Testing
2. Confirmatory Testing

Das Forced Degradation Testing dient der Ermittlung der allgemeinen Photosensitivität der Substanz. Bei diesem Test liegt die Substanz allein und/oder in Lösung bzw. Suspension vor. Flüssige Proben sollten sich dabei in chemisch inerten und transparenten Behältern befinden. Bei photolabilen Substanzen wird der Test beendet, wenn es zum extensiven Abbau kommt. Bei photostabilen Substanzen wird der Test beendet, nachdem ein bestimmter Expositionslevel erreicht wurde. Desweiteren können beim Forced Degradation Testing Abbauprodukte auftreten, die beim Confirmatory Testing nicht gebildet werden. Diese Tatsache wird bei der Entwicklung und Validierung von analytischen Methoden berücksichtigt. Folglich werden Abbauprodukte, die sich nicht beim Confirmatory Testing bilden, nicht weiter erforscht. [4]

Confirmatory Studies werden durchgeführt, um Informationen über die Handhabung, die Verpackung und die Kennzeichnung zu erhalten. Normalerweise wird dieser Test in der Entwicklungsphase nur an einer Charge der Substanz durchgeführt. Um eine Substanz schließlich als photostabil oder photolabil deklarieren zu können, werden die Confirmatory Studies an drei weiteren Chargen durchgeführt. [4]

Probenvorbereitung

Bei der Probenvorbereitung ist es wichtig, die physikalischen Eigenschaften einer Substanz zu berücksichtigen und Vorkehrungen wie z.B. Kühlung oder Verpackung der Probe in dichten Behältern zu treffen. Damit werden Veränderungen des physikalischen Zustandes wie Sublimation, Verdampfung oder Schmelzen während der Prüfung minimiert. Außerdem sollten auch mögliche Interaktionen zwischen Probe und Behälter berücksichtigt und beseitigt werden. [4]

Bei der Prüfung eines festen Wirkstoffs wird dieser in einen geeigneten Glas- oder Kunststoffbehälter überführt und darin gleichmäßig verteilt. Die Dicke der Schicht sollte dabei nicht mehr als 3mm betragen, da die photochemische Reaktion beim Feststoff meist nur in einer sehr dünnen Oberflächenschicht verläuft. Flüssige Substanzen sollten, wie bereits erwähnt, in chemisch inerten und transparenten Behältern getestet werden. [4]

Analyse der Proben

Nach der Bestrahlung werden einerseits Veränderungen der physikalischen Eigenschaften wie Aussehen, Klarheit oder Farbe der Lösung ermittelt und andererseits Abbauprodukte mittels geeigneter analytischer Methoden nachgewiesen. Außerdem sollte die Analyse der bestrahlten Probe gleichzeitig mit der Analyse der geschützten Vergleichsprobe bzw. Dunkelkontrolle erfolgen. [4]

Beurteilung der Ergebnisse

Die Forced Degradation Studies sollten brauchbare Informationen für die Entwicklung und Validierung der Confirmatory Testmethoden liefern. Mit diesen Testmethoden ist es möglich photolytische Abbauprodukte, die während des Confirmatory Tests entstehen, zu detektieren. [4]

Durch die Confirmatory Tests werden auch Vorkehrungen bestimmt, die für die Herstellung oder Zubereitung des Arzneimittels erforderlich sind. Desweiteren wird ermittelt, ob eine lichtundurchlässige Verpackung benötigt wird. Um nun sagen zu können, ob eine Veränderung aufgrund von Bestrahlung akzeptabel ist oder nicht, werden nicht nur die Ergebnisse der Confirmatory Tests berücksichtigt, sondern auch jene anderer formaler Stabilitätsprüfungen. Erst dann kann die Stabilität einer Substanz über einen bestimmten Zeitraum des Gebrauchs garantiert werden. [4]

3.4 Fertigarzneimittel

Normalerweise werden die Photostabilitätsprüfungen an Fertigarzneimitteln in folgender Reihenfolge durchgeführt: [4]

1. Prüfung des Arzneimittels außerhalb der Primärverpackung
2. Prüfung des Arzneimittels in der Primärverpackung
3. Prüfung des Arzneimittels in der Sekundärverpackung

Die Prüfungen werden so oft durchgeführt, bis durch die Ergebnisse gezeigt wird, dass das Arzneimittel ausreichend vor Licht geschützt ist. [4]

Wie beim Wirkstoff wird auch beim Arzneimittel in der Entwicklungsphase nur eine Charge getestet. Anschließend werden ebenfalls drei weitere Chargen untersucht, um das Produkt als photostabil oder photolabil deklarieren zu können. [4]

Falls es sich um Arzneimittel mit komplett lichtundurchlässigen Primärverpackungen, wie Aluminiumtuben oder -dosen, handelt, wird die Prüfung nur außerhalb der Primärverpackung durchgeführt. [4]

Außerdem ist es angemessen bestimmte Arzneimittel wie Infusionslösungen oder Hautcremes zu prüfen, um deren Photostabilität während des Gebrauchs zu bestimmen. [4]

Probenvorbereitung

Wie bereits in Punkt 3.3 erwähnt, sollten auch hier die physikalischen Eigenschaften berücksichtigt und entsprechende Vorkehrungen getroffen werden.

Auch hier sollten die Proben so positioniert werden, dass sie eine möglichst große Fläche für die Bestrahlung bieten. Das heißt, dass z.B. Tabletten oder Kapseln als Einzelschicht verteilt werden. [4]

Falls eine direkte Bestrahlung aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit des Produktes nicht möglich ist, sollte dieses in einen geeigneten schützenden und inerten transparenten Behälter überführt werden. Ein solcher Behälter könnte z.B. aus Quarzglas bestehen.

Bei der Prüfung des Arzneimittels in der Primär- oder Sekundärverpackung werden die Proben horizontal oder transversal zur Lichtquelle ausgerichtet, um eine möglichst einheitliche Bestrahlung der Proben zu gewährleisten. [4]

Analyse der Proben

Nach der Bestrahlung werden wieder Veränderungen der physikalischen Eigenschaften und Abbauprodukte untersucht. [4]

Werden pulverförmige Proben verwendet, sollte davon immer eine repräsentative Portion getestet werden. Bei festen oralen Arzneizubereitungen sollte eine geeignete Menge, wie z.B. 20 Tabletten, getestet werden. [4]

Auch hier werden bestrahlte Probe und Vergleichsprobe bzw. Dunkelkontrolle gleichzeitig analysiert. [4]

Beurteilung der Ergebnisse

Abhängig vom Ausmaß der Veränderung kann eine spezielle Kennzeichnung oder Verpackung erforderlich sein, um die Lichteinwirkung abzuschwächen. Zur Beurteilung ob die photochemische Veränderung einer Substanz akzeptabel ist oder nicht, werden wieder die Ergebnisse der Photostabilitätsprüfung und anderer formaler Stabilitätsprüfungen herangezogen. [4]

3.5 Chinin Aktinometrie

Um sicherzugehen, dass die erforderliche Bestrahlung erreicht wurde, wird als Referenz ein validiertes chemisches Aktinometrie-System eingesetzt. Im Anschluss wird das Chinin-Aktinometrie-System, das als Referenz für im nahen UV-Bereich emittierende Lampen verwendet wird, genauer beschrieben. Für andere Lichtquellen bzw. aktinometrische Systeme kann derselbe Ansatz angewendet werden, jedoch sollte jedes aktinometrische System für die verwendete Lichtquelle kalibriert werden. [4]

Beim Chinin-Aktinometrie-System wird zuerst eine 2%ige wässrige Lösung von Chinin Monohydrochlorid Dihydrat in ausreichender Menge hergestellt. Diese Lösung kann anschließend nach zwei Optionen weiterverarbeitet werden. Sowohl bei Option 1 als auch bei Option 2 wird die Chinin-Lösung jeweils als Probe- und Vergleichslösung verwendet. Die Vergleichslösung wird dabei in Aluminiumfolie eingewickelt, wodurch diese komplett lichtgeschützt ist. Anschließend werden die Probe- und die Vergleichslösung für eine angemessene Zahl an Stunden der Lichtquelle ausgesetzt. Nach der Bestrahlung wird die Absorption der Probelösung und der Kontrolle bei 400nm bestimmt und die Veränderung der Absorption berechnet. Der wesentliche Unterschied zwischen Option 1 und 2 besteht darin, dass die Chinin-Lösung entweder in eine Ampulle (Option 1) oder in eine Quarzküvette (Option 2) überführt wird. [4]

4. Analytische Methoden zur Stabilitätsprüfung

Zur Bestimmung von Cinnarizin und dessen Abbauprodukten, die durch die Stabilitätsprüfungen sowie Stresstests der vorliegenden Arbeit erhalten wurden, wurde die HPLC als analytisches Verfahren angewendet. Die HPLC wurde außerdem für die Analytik des Donepezil HCl eingesetzt.

4.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der HPLC handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, das aus einer auf eine Säule aufgetragenen stationären Phase und einer sich daran vorbeibewegenden mobilen Phase besteht. Die zu trennenden Substanzen wandern je nach Wechselwirkung mit der stationären und mobilen Phase mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit durch die Säule. Die Trennung erfolgt dabei durch Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch, Größenausschluss oder Affinität. [1, 5]

Aufbau einer HPLC-Anlage

Die HPLC-Anlage besteht im Wesentlichen aus einer Pumpe, um die mobile Phase durch die Säule zu befördern, einem Probenaufgabesystem, einer Trennsäule und einem Detektor, der mit einem Auswertesystem verbunden ist. [1, 5]

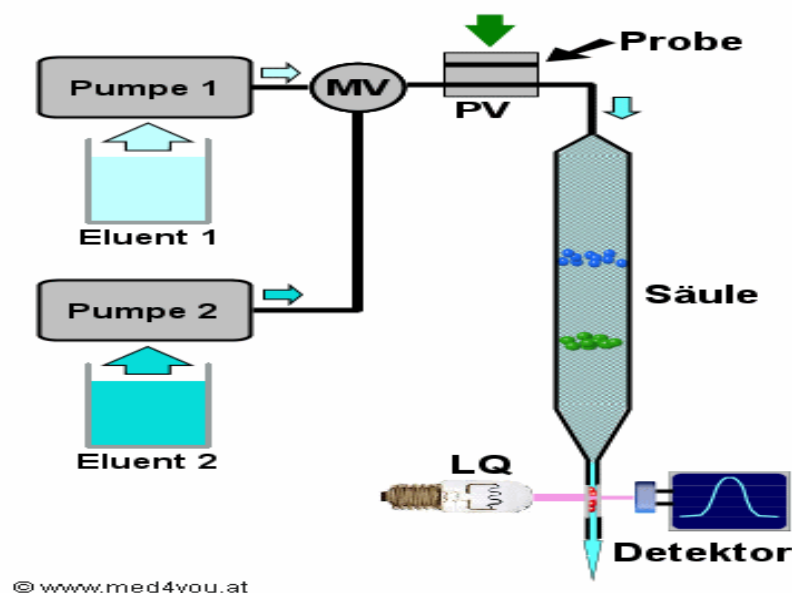


Abb. 1: Schema einer HPLC-Anlage

Pumpen

Bei der HPLC hängt die Effizienz der Säule entscheidend von der Partikelgröße der stationären Phase ab. Durch den kleinen Partikeldurchmesser, kommt es zu einem hohen Rückdruck, sodass das Fließmittel mit einem hohen Druck durch die Säule gepresst werden muss. Für diesen hohen Druck sind meist Kolbenhubpumpen zuständig, die Drücke von bis zu 400bar erzeugen können. Der durch die Kolbenhubpumpen erzeugte pulsierende Fluss muss mittels Pulsdämpfer gemildert werden, um starkes Rauschen der Grundlinie zu verhindern. [1, 5]

Bei der isokratischen Elution reicht eine Pumpe aus, da nur mit einem Lösungsmittel eluiert wird. Verändert sich jedoch die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Analyse, wie es bei der Gradientenelution der Fall ist, unterscheidet man zwischen Niederdruck- und Hochdruckgradientensystemen. Im Vergleich zum Niederdruckgradientensystem werden die Lösungsmittel beim Hochdruckgradientensystem nicht vor, sondern hinter der Hochdruckpumpe gemischt. Hochdruckgradientensysteme benötigen dazu zwei oder drei Pumpen. [1, 5]

Probenaufgabe

Die Injektion der Probenlösung erfolgt entweder über ein Injektionsventil oder über einen Autosampler. Die Probenschleifen besitzen dabei meist ein definiertes Volumen von 20 bis 100µl. [1, 5]

Säule

Die meisten Säulen bestehen aus rostfreiem Edelstahl. Für analytische Zwecke werden Säulen mit einer Länge von 10 bis 25cm und einem Innendurchmesser von 3 bis 4,6mm verwendet. Die stationäre Phase besteht aus Teilchen mit einer Größe von 3 bis 10µm. Analytische Trennsäulen haben zwischen 30 000 bis 60 000 theoretische Böden pro Meter. Hochgeschwindigkeitssäulen besitzen bei einer Länge von 3 bis 6cm bis zu 150 000 Böden pro Meter und ermöglichen Trennungen in sehr kurzer Zeit mit geringem Lösungsmittelverbrauch. Außerdem sind diese Säulen mit 3 oder 1,5µm Material gepackt, was aufgrund des hohen Rückdrucks auch nur bei diesen kurzen Säulen möglich ist. Desweiteren gibt es Kapillarsäulen, die einen Innendurchmesser von 100 bis 500µm besitzen. Dagegen weisen Säulen für die präparative HPLC Innendurchmesser bis zu 10cm auf, die mit Material bis zu 150µm gepackt sind. Um die analytischen Säulen vor Partikeln und Verunreinigungen des Lösungsmittels bzw. der Probe zu schützen, können kurze

Vorsäulen vorgeschaltet werden. Mit Hilfe eines Säulenofens kann die Säule thermostatisiert werden, falls dies für die Trennung nötig ist. [1, 5]

Detektor

Bei den Detektoren werden unterschiedliche Messprinzipien angewendet. Am häufigsten wird der UV/VIS- oder photometrische Detektor eingesetzt, der die Absorption der eluierten Substanzen aufzeichnet. Häufig werden auch Diodenarray-Detektoren verwendet, welche simultan mehrere Wellenlängen oder ein gesamtes UV/VIS-Spektrum aufzeichnen. Im gewählten UV-Bereich dürfen die zur Elution verwendeten Lösungsmittel keine nennenswerte Absorption aufweisen. Die meisten Detektoren können die injizierten Substanzen bis zu einer Menge von 0,1-1ng nachweisen. Fluoreszenzdetektoren sind dagegen um den Faktor 100 bis 1000 empfindlicher. Um Substanzen ohne UV-Absorption oder geringer Eigenfluoreszenz dem jeweiligen Detektor zugänglich zu machen, müssen sie mit entsprechenden Reagentien derivatisiert werden. Differenzialrefraktometer können auch Substanzen ohne UV/VIS-Absorption oder Fluoreszenz nachweisen, allerdings werden sie nur selten als Detektoren eingesetzt. Weitere, eher selten eingesetzte Detektoren sind elektrochemische Detektoren, die leicht oxidierbare oder reduzierbare Substanzen erfassen können. Die heute routinemäßige Kopplung mit einem Massenspektrometer ist eine sensitive und selektive Methode zum Nachweis und zur Identifizierung von Substanzen. Desweiteren gibt es auch Kopplungen mit IR- und NMR-Spektrometern, um zusätzliche Informationen über die Struktur zu erhalten. Die Datenauswertung erfolgt heute vorwiegend über computergestützte Software, selten werden noch einfache Integratoren oder Schreiber eingesetzt. Dabei wird das Detektorsignal in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet und ein äußeres Chromatogramm mit einer Reihe von Peaks erhalten. Aus diesem Chromatogramm kann die Retentionszeit der einzelnen Komponenten eines Analytengemischs abgelesen werden. Die Retentionszeit R_t ist die Zeit, die ein Analyt benötigt, um nach der Aufgabe auf die Säule den Detektor zu erreichen. [1, 5]

Stationäre Phase

Als stationäre Phasen dienen chemisch gebundene Trägermaterialien, die in erster Linie auf Kieselgel beruhen. Aufgrund der Polarität unterscheidet man zwischen Normalphasenchromatographie und Umkehrphasenchromatographie bzw. Reversed-Phase- oder RP-Chromatographie. Ist die stationäre Phase polarer als das Fließmittel, spricht man von Normalphasenchromatographie. Die stationäre Phase enthält dabei polare funktionelle Gruppen wie Cyano-, Amino- oder Diolgruppen. Es werden vorwiegend unpolare Fließmittel

eingesetzt, mit denen zuerst die lipophilen und anschließend die polaren Komponenten eines Analytengemischs eluiert werden. Wird die Polarität der mobilen Phase erhöht, verkürzen sich die Retentionszeiten. [1, 5]

Bei der Umkehrphasenchromatographie ist dagegen die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase polar. Hierbei erfolgt die Elution der polaren Komponenten vor den lipophilen. Durch Erhöhung der Lipophilie der mobilen Phase, verkürzen sich die Retentionszeiten. Die stationäre Phase besteht aus Siloxanen mit C8- oder C18-Ketten bzw. Phenylpropyl-Resten. Als mobile Phasen werden meist Mischungen aus organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder Methanol mit Wasser oder wässrigen Pufferlösungen angewendet. Beträgt der pH-Wert des Fließmittels mehr als 8, werden die Siloxane durch Hydrolyse zerstört. Beim Einsatz von Umkehrphasen auf Polymerbasis sind auch extreme pH-Bereiche wie z.B. pH 12-13 möglich. Je unpolarer eine Substanz, desto länger die Retentionszeit. Somit wird folgende Reihenfolge erhalten: $R_t \text{ Carbonsäure} < R_t \text{ Phenole} < R_t \text{ Alkohole} < R_t \text{ Amine} < R_t \text{ Aldehyde} < R_t \text{ Ketone} < R_t \text{ Ether} < R_t \text{ Kohlenwasserstoffe}$. [1, 5]

Da die Dünnschichtchromatographie ein einfaches und rasches Verfahren ist, wurde sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben der HPLC zum Nachweis von Abbauprodukten verwendet. Aus diesem Grund wird im Anschluss die Dünnschichtchromatographie näher ausgeführt.

4.2 Dünnschichtchromatographie (DC)

Bei der Dünnschichtchromatographie handelt es sich um ein planares Trennverfahren. Die stationäre Phase ist als dünne Schicht auf einem Träger aus Glas, Metall oder Kunststoff aufgebracht. Die mobile Phase bewegt sich aufgrund von Kapillarkräften durch die stationäre Phase. Als stationäre Phase wird hauptsächlich Kieselgel, gefolgt von RP-18 und RP-8 eingesetzt. Andere Möglichkeiten sind Aluminiumoxid, Cellulose sowie modifizierte Kieselgele. Die Adsorbatschicht ist ca. 200-250µm dünn und besteht aus Partikeln mit einer Größe von 5-40 µm. Bei der Hochleistungsdünnschichtchromatographie beträgt die Schichtdicke 100µm und der Partikeldurchmesser 2-10µm. Dadurch besitzt sie eine höhere Trennleistung und auch eine bessere Reproduzierbarkeit. [1, 6]

Die Probelösungen werden punkt- oder bandenförmig auf die DC-Platte aufgetragen. Um eine gute Auflösung zu erhalten, sollten möglichst kleine Flecken bzw. Banden aufgetragen werden. Die Auftragung kann einerseits manuell mit Glaskapillaren oder Mikroliterspritzen erfolgen, andererseits mit automatischen Dosiergeräten. Letztere weisen durch ihre höhere Exaktheit eine bessere Reproduzierbarkeit auf und sind für quantitative Analysen geeignet. [1, 6]

Die Entwicklung der DC-Platte erfolgt vertikal oder horizontal. Bei der vertikalen Entwicklung wird die Platte in eine Trogkammer gestellt, deren Boden ca. 0,5 bis 1cm mit Fließmittel bedeckt ist. Zur Sättigung des Dampftraumes wird die Kammer mit Filterpapier ausgekleidet. Die Sättigung hat Einfluss auf die Trennleistung. Besteht das Fließmittel aus mehreren Komponenten, kann es durch Adsorption an der stationären Phase zu einer Entmischung des Lösungsmittels kommen. Dabei entsteht keine einheitliche Fließmittelfront, sondern es bilden sich die sogenannten α -, β - und γ - Fronten. Während sich die γ -Front am nächsten zur Startlinie befindet, ist die α -Front am weitesten davon entfernt. [1, 6]

Die Entwicklung von Hochleistungsdünnschichtchromatographie-Platten erfolgt horizontal in sogenannten Sandwichkammern. Aufgrund der kürzeren Analysenzeit und dem geringeren Dampftraum, spielen Kondensations- und Verdampfungsvorgänge eine geringere Rolle. Zusätzlich wird auch weniger Lösungsmittel verbraucht. [1, 6]

5. Alzheimer-Erkrankung

Die Demenz gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen des Gehirns und ist gekennzeichnet durch den irreversiblen Verlust von geistigen Fähigkeiten. Dabei kommt es zu Gedächtnis-, Denk- und Wahrnehmungsstörungen, Persönlichkeitsveränderungen und körperlichem Abbau. [7]

5.1 Allgemein

Da die Demenz keine einheitliche Erkrankung ist, sondern ein komplexes Beschwerdebild, dem verschiedene Ursachen zugrunde liegen, spricht man auch vom Begriff Demenzsyndrom.

Die beiden häufigsten Formen der Demenz sind die Alzheimer-Demenz und die vaskuläre Demenz. Es gibt aber auch Mischformen dieser beiden Arten. Bis heute ist die Demenz nicht heilbar und führt nach meist jahrelanger Pflegebedürftigkeit zum Tod des Patienten. [7]

Der wichtigste Risikofaktor dieser Erkrankung ist das Alter. Etwa 3% der 70- bis 74-jährigen leiden an Demenz. Bei den 80- bis 84-jährigen sind es schon über 13% und bei den über 90-jährigen sind es etwa 35%. [7]

Am häufigsten tritt die Alzheimer-Demenz auf. Die Krankheit wurde nach dem Arzt Alois Alzheimer benannt, welcher erstmals im Jahr 1901 diesen Zustand bei einer 51-jährigen Frau namens Auguste Deter protokollierte. [7]

5.2 Ursachen

Die Ursachen der Erkrankung sind bis heute nicht geklärt. Genetische Faktoren spielen dabei eine wichtige Rolle. Personen mit einer Mutation des Apolipoproteins E haben ein erhöhtes Risiko für eine Alzheimer-Demenz. [7]

Schon Jahre vor den ersten Beschwerden kommt es zu Veränderungen im Gehirn ausgehend von den zuständigen Arealen für Gedächtnis und Sprache. Dabei werden einerseits krankhafte Tauproteine (hyperphosphorylierte Neurofilamentproteine) in den Nervenzellen abgelagert, andererseits sammeln sich zwischen den Nervenzellen extrazelluläre Plaques und Fibrillen, die aus dem aggregierten β -Amyloid-Protein bestehen. Das unlösliche β -Amyloid-Protein wird dabei aus einem Vorläuferprotein, dem Amyloid-Präkursor-Protein (APP), abgespalten. Durch diese Vorgänge kommt es zum Untergang der Nervenzellen und damit zur Atrophie des Gehirns. Außerdem führt dies zu Störungen im Neurotransmitterhaushalt. Es treten vor allem ein Mangel an Acetylcholin, welches für das Gedächtnis wichtig ist, und ein Überschuss an Glutamat auf. Im Durchschnitt treten die ersten Symptome einer Alzheimer-Demenz nach dem 60. Lebensjahr auf, werden aber erst

nach vier Jahren diagnostiziert. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu fortschreitendem geistigen Abbau und körperlichem Verfall und nach etwa neun Jahren stirbt der Patient. [7, 8] Ursachen einer Demenz können auch Gefäßerkrankungen sein, was bei der vaskulären Demenz der Fall ist. Aber auch bei genetisch bedingten neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. der Parkinson-Krankheit, der Huntington-Krankheit oder der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, kommt es zur Demenz. [7, 8]

Außerdem ist es wichtig zwischen der Demenz und der Altersvergesslichkeit zu unterscheiden, wobei die Grenzen oft schwer zu erkennen sind. [7]

5.3 Diagnose

Zur Diagnose der Alzheimer-Demenz müssen folgende Leitbeschwerden über mindestens sechs Monate bestehen. [7]

Denkstörungen

Hierbei kommt es zu Gedächtnisstörungen, vor allem des Kurzzeitgedächtnisses. Dies bedeutet, dass die Merkfähigkeit und Wiedergabe neuer Information beeinträchtigt ist. Desweiteren kommt es zur Beeinträchtigung des Urteils- und Problemlösungsvermögens, welches sich anfangs in komplexen und später auch in einfachen Situationen bemerkbar macht. Auch Störungen der zeitlichen und räumlichen Orientierung treten auf, wobei Personen, wie z.B. nahe Verwandte, nicht mehr erkannt werden. Ein weiteres Indiz für eine Alzheimer-Erkrankung sind Sprach- und Wortfindungsstörungen. Dabei werden nicht präsenste Wörter durch den Patienten umschrieben. Alzheimer-Patienten zeichnen sich außerdem durch Unkonzentriertheit aus. [7]

Stimmungsänderungen

Zu den häufigsten Stimmungsänderungen gehören Passivität und Interesselosigkeit, Angst und Ängstlichkeit und unangemessene Emotionen. Angst und Ängstlichkeit resultieren daraus, weil vieles nicht mehr erkannt wird. Bei den unangemessenen Emotionen kommt es z.B. zu plötzlicher Aggression oder unbegründeter Traurigkeit. [7]

Verhaltensänderungen

Zu den Verhaltensänderungen zählen einerseits Reizbarkeit, Unruhe und Rückzugsverhalten, andererseits ist das Verstecken, Verlegen oder Sammeln von Gegenständen typisch für Alzheimer-Patienten. Auch das mehrfache Wiederholen von

Fragen, Sätzen oder Handlungen ist ein Indiz für die Erkrankung. Häufig sind auch Bewegungsdrang und Bewegungsstörungen. Schließlich kommt es auch zu Harn- und Stuhlinkontinenz. [7]

5.4 Medikamentöse Therapie

Wird die Alzheimer-Demenz diagnostiziert, beginnt die medikamentöse Therapie, die aus drei Teilen besteht.

Zuerst wird versucht Durchblutungsstörungen des Gehirns zu vermeiden, indem eine eventuell bestehende Herzinsuffizienz oder Hypertonie behandelt wird. Dieser Punkt ist vor allem bei der vaskulären Demenz wichtig.

Als nächster Schritt werden Nootropica (Antidementiva) eingesetzt, welche die Gehirnleistung verbessern sollen. Ihre Wirkung wird jedoch kontrovers diskutiert.

Schließlich ist es auch wichtig, depressive Verstimmungen medikamentös zu behandeln. Gegen andere belastende Verhaltensweisen wie Unruhe, Aggressionen, Wahnvorstellungen oder Schlafstörungen sollten ebenfalls Medikamente verabreicht werden. [7]

Nootropica (Antidementiva)

Folgende chemisch sehr heterogene Stoffklassen werden derzeit in der Alzheimer-Therapie eingesetzt. [7]

- **Acetylcholinesterasehemmer** (AChE-Hemmer): Donepezil HCl (Aricept®), Galanthamin (Reminyl®), Rivastigmin (Exelon®)
- **Memantin** (Axura®, Ebixa®)
- **Piracetam** (Cerebryl®, Nootropil®)
- **Dihydroergotoxin** (Hydergin®)
- **Antiinflammatorische Substanzen**: NSAR wie Indomethacin, Ibuprofen
- **Cinnarizin** (Arlevert®, Pericephal®, [Cinnabene®, Stutgeron®])
- **Ginkgo biloba-Extrakte** (Tebonin®)
- **Radikalfänger** (Vitamin A, C und E)

Da es bei der Alzheimer-Demenz zu einem Mangel an Acetylcholin im Gehirn kommt, werden Acetylcholinesterasehemmer eingesetzt, welche den Abbau von Acetylcholin vermindern und damit die AcetylcholinKonzentration erhöhen. Ein Nachteil dieser Wirkstoffgruppe ist aber die begrenzte Wirkdauer, denn nach etwa einem Jahr lässt die stabilisierende Wirkung nach. Außerdem treten auch häufig Nebenwirkungen wie Übelkeit,

Erbrechen, Durchfall, Herzrhythmusstörungen, Schlaflosigkeit und Erregungszustände auf. [7]

Aus diesem Grund beginnt die Therapie einschleichend mit niedriger Dosierung, welche über einen Monat gesteigert wird. Laut Studien zeigen Acetylcholinesterasehemmer bei einer schweren Demenz keine Wirkung mehr. [7]

Memantin gehört zur Gruppe der NMDA-Rezeptor-Antagonisten und beeinflusst den Glutamatstoffwechsel im Gehirn. Auch dieser Wirkstoff ist nicht nebenwirkungsfrei, wobei es hier vor allem zu Schwindel, Unruhe und Erregungszuständen kommt. Häufig wird auch eine Kombination mit den Acetylcholinesterasehemmern empfohlen.

Dihydroergotoxin und Piracetam werden zwar seit langer Zeit eingesetzt, doch ihre Wirkung auf die Gehirnleistung wurde bis heute nicht bewiesen. [7]

Antiinflammatorische Substanzen werden aufgrund der Entzündung der Nervenzellen eingesetzt, aber auch hier wurde durch Studien keine eindeutige Wirkung bestätigt. [7]

Cinnarizin gehört zu den Calciumantagonisten, genauer zu den Calcium-Overload-Blockern. Aufgrund seiner calciumantagonistischen Wirkung wird es nicht nur bei Alzheimer eingesetzt, sondern auch als Koronartherapeutikum zur Förderung der coronaren Durchblutung.

Die am häufigsten eingesetzten Pharmaka zur Behandlung der Alzheimer-Demenz enthalten Trockenextrakte aus den Blättern des Ginkgo-Baumes. Zu den wichtigsten Inhaltsstoffen zählen Flavonglykoside (u.a. Isorhamnetin, Kämpferol und Quercetin) und Terpenlactone (Ginkgolide A, B und C, Bilobalid). Auch hier ist die Wirksamkeit nicht eindeutig belegt. Laut neueren Studien besteht sogar ein gewisses Blutungsrisiko bei gleichzeitiger Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern wie Acetylsalicylsäure. [7]

Ebenso ist die Einnahme von Vitaminen aufgrund fehlender Wirkung nicht empfehlenswert. Die Vitamine A, C und E sollen theoretisch die Bildung freier Radikale, die eine mögliche Ursache für die Schädigung der Hirnzellen sein können, verhindern. [7]

Im Großen und Ganzen ist die Wirksamkeit der Nootropica sehr umstritten und eine effektive medikamentöse Therapie ist nur beschränkt möglich.

6. Charakteristika der verwendeten Substanzen

Folgend ein Überblick über die wichtigsten Merkmale des Cinnarizins und des Donepezilhydrochlorids.

6.1 Cinnarizin

Nomenklatur: [9]

1-(Diphenylmethyl)-4-(3-phenyl-2-propenyl)piperazin

1-Cinnamyl-4-diphenylmethylpiperazin

N-benzhydryl-*N'*-*trans*-cinnamylpiperazin

1-*trans*-cinnamyl-4-diphenylmethylpiperazin

1-cinnamyl-4-benzhydrylpiperazin

1-diphenylmethyl-4-*trans*-cinnamylpiperazin

CAS-Nummer: 298-57-7

Molekulargewicht: 368,51

Summenformel: C₂₆ H₂₈ N₂

Strukturformel:

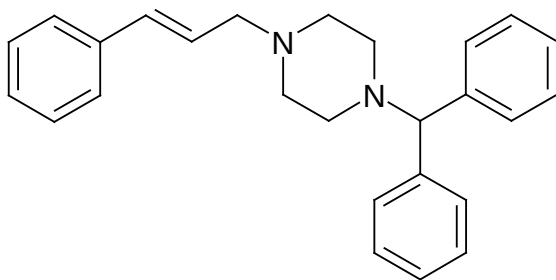


Abb. 2: Strukturformel von Cinnarizin

Präparate:

Derzeit sind folgende Präparate mit dem Wirkstoff Cinnarizin in Österreich erhältlich:

Arlevert® 20mg/40mg Tabletten

(Hennig Arzneimittel)

Pericephal®-Tabletten

(Arcana Arzneimittel)

Bis 2009/2010 waren auch folgende Präparate in Österreich erhältlich:

Cinnabene® Kapseln	(Ratiopharm AM)
Cinnarplus® Kapseln	(Gerot Pharmazeutika)
Stutgeron® 75mg Kapseln	(Janssen-Cilag Pharma)

Physikalisch-chemische Eigenschaften

Cinnarizin ist ein weißes bis fast weißes Pulver. Es ist praktisch unlöslich in Wasser, leicht löslich in Dichlormethan, löslich in Aceton, schwer löslich in Ethanol 96% und Methanol. [10]

Cinnarizin sollte vor Licht geschützt gelagert werden. [10]

Wirkungen und Wirkungsmechanismus

Cinnarizin gehört zur Gruppe der Benzhydryl-Piperazine und wird als Ca^{2+} -Kanal-Blocker und Antihistaminikum verwendet. Cinnarizin schützt die Zelle indem es den pathologisch erhöhten Kalzium-Einstrom hemmt. Außerdem interagiert es mit Histamin-H1- und Dopamin-D2-Rezeptoren, wodurch seine antihistaminische Wirkung einerseits und seine parkinsonoiden Nebenwirkungen andererseits ausgelöst werden. Cinnarizin wirkt zudem vasodilatierend, erhöht die Verformbarkeit der Erythrozyten, wodurch die rheologischen Eigenschaften des Bluts verbessert werden, und mindert die Erregbarkeit des Gleichgewichtorgans. [11]

Nebenwirkungen und Wechselwirkungen

Zu den häufigsten Nebenwirkungen des Cinnarizins gehören Somnolenz und gastrointestinale Störungen, welche meist nur vorübergehend sind. Andere, seltenere Nebenwirkungen sind Kopfschmerzen, Mundtrockenheit, Gewichtszunahme, Schwitzen oder allergische Reaktionen. In Einzelfällen können vor allem bei älteren Patienten extrapyramidale Störungen auftreten.

Da Cinnarizin in die Muttermilch übertreten kann, sollte es während der Stillzeit nicht eingenommen werden.

Durch die gleichzeitige Einnahme von Cinnarizin mit zentraldämpfenden Pharmaka oder Alkohol kann es zu einer Verstärkung der sedierenden Wirkung kommen. [11]

Pharmakokinetik

Cinnarizin wird nach oraler Gabe rasch aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Die relative Bioverfügbarkeit beträgt etwa 75%. Die maximale Plasmakonzentration wird nach 2 bis 4 Stunden erreicht. Im Blut wird Cinnarizin zu etwa 80-90% an Plasmaproteine gebunden. Die Plasmaeliminationshalbwertszeit beträgt im Durchschnitt 3 Stunden. Die Ausscheidung erfolgt zu etwa 2/3 im Stuhl und zu 1/3 im Harn. Die Metabolisierung in der Leber erfolgt vorwiegend durch aromatische Hydroxylierung zum Hydroxycinnarizin. Es wurden aber auch andere Abbauege, wie die N-Desalkylierung, nachgewiesen. [11]

Indikationen

Cinnarizin dient der Behandlung von cerebralen und peripheren Durchblutungsstörungen. Zu den cerebralen Durchblutungsstörungen zählen Ohrensausen, vestibuläre Störungen wie z.B. Vertigo und Morbus Menière, Kopfschmerzen, verminderte Merkfähigkeit, Konzentrationsmangel und Morbus Alzheimer. Bei den peripheren Durchblutungsstörungen handelt es sich häufig um Claudicatio intermittens („Schaufensterkrankheit“), Morbus Raynaud, diabetische Gefäßveränderungen und Parästhesien. [11]

Eine neuere Indikation für Cinnarizin stellen Kinetosen wie die Seekrankheit dar.

6.2 Donepezil HCl

Nomenklatur: [9]

2,3-Dihydro-5,6-dimethoxy-2-[[1-(phenylmethyl)-4-piperidiny]methyl]-1*H*-inden-1-on
 5,6-Dimethoxy-2-[[1-(phenylmethyl)-4-piperidiny]methyl]-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-on
 1-Benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-indanon-2-yl)methyl]piperidin

CAS-Nummer:	Donepezil HCl:	120011-70-3
	Donepezil:	120014-06-4

Molekulargewicht:	Donepezil HCl:	415,95
	Donepezil:	379,5

Summenformel:	Donepezil HCl	C ₂₄ H ₂₉ NO ₃ HCl
	Donepezil:	C ₂₄ H ₂₉ NO ₃

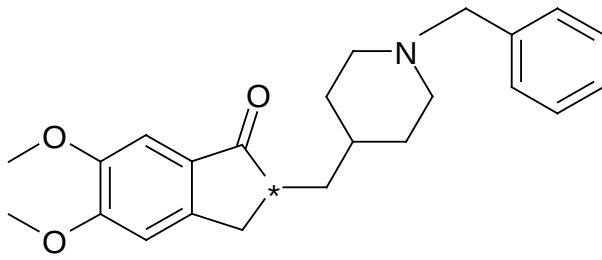
Strukturformel:

Abb. 3: Strukturformel von Donepezil

Präparate:

Derzeit sind folgende Präparate mit dem Wirkstoff Donepezil Hydrochlorid in Österreich erhältlich:

Aricept® 5mg/10mg Filmtabletten	(Pfizer)
Aricept® Evess 5mg/10mg Schmelztabletten	(Pfizer)

Desweiteren sind von folgenden Firmen Generica mit den Dosierungen 5mg und 10mg im Handel erhältlich: Actavis, Arcana, EGIS, Genericon, 1A Pharma, Hexal, Sandoz, Teva, Specifar, Ratiopharm

Physikalisch-chemische Eigenschaften

Donepezil Hydrochlorid ist ein weißes Pulver. Es ist gut löslich in Wasser, löslich in Chloroform, schwach löslich in Eisessig und Ethanol, schwerlöslich in Acetonitril, sehr schwer löslich in Ethylacetat und unlöslich in *n*-Hexan. [12]

Wirkungen und Wirkungsmechanismus

Donepezil HCl gehört zu einer neuen Klasse von Acetylcholinesterase-Hemmern (AChE-Hemmer). Es besitzt eine N-benzylpiperidin- und eine Indanon-Teilstruktur wodurch es eine längere und selektivere Wirkung hat. Donepezil HCl ist im Vergleich zu anderen Acetylcholinesterase-Hemmern ein hoch selektiver Inhibitor. In vitro und präklinische Studien haben gezeigt, dass Donepezil HCl eine rund 1200fach höhere Selektivität für die Acetylcholinesterase im Gehirn als für die Butyrylcholinesterase (BuChE) in der Peripherie besitzt. [12] Durch die Hemmung des Enzyms wird der Neurotransmitter Acetylcholin nicht zu Cholin und Essigsäure gespalten, wodurch die Konzentration von Acetylcholin im synaptischen Spalt erhöht und damit seine Wirkung verlängert wird.

Nebenwirkungen und Wechselwirkungen

Zu den häufigsten Nebenwirkungen des Donepezil HCl gehören Diarrhö, Muskelkrämpfe, Nausea, Erbrechen, Schlaflosigkeit, Anorexie, Schwindel, Alpträume, Agitiertheit, Verwirrtheit und Infekte der oberen Atemwege und des Urogenitaltrakts. [8, 13]

Bei der gleichzeitigen Verabreichung von Donepezil HCl und Hemmern des Cytochroms CYP3A4 ist mit pharmakokinetischen Interaktionen zu rechnen, die eine Erhöhung des Donepezil-Plasmaspiegels bewirken. Als Beispiele sind hier Chinidin, Makrolid-Antibiotika und oral applizierte Azol-Antimykotika zu nennen. [8, 13]

Dagegen können Enzyminduktoren wie Rifampicin, Phenytoin, Carbamazepin und Alkohol den Donepezil-Plasmaspiegel verringern. Desweiteren kann es bei gleichzeitiger Behandlung mit Succinylcholin, anderen Muskelrelaxantien oder Cholinergika bzw. mit β -Blockern, die auf das Reizleitungssystem des Herzens wirken, zu einer synergistischen Wirkung kommen. [13]

Donepezil sollte während der Schwangerschaft nicht angewendet werden. Da nicht bekannt ist, ob Donepezil in die Muttermilch übergeht, sollten Frauen unter Behandlung mit Donepezil nicht stillen. [13]

Pharmakokinetik

Donepezil HCl wird wie alle Acetylcholinesterase-Hemmer gut resorbiert. [8] Der maximale Plasmaspiegel wird etwa 3-4 Stunden nach oraler Gabe erreicht. [13] Aufgrund seiner Halbwertszeit von 70 Stunden wird Donepezil HCl nur einmal täglich verabreicht. Innerhalb von drei Monaten hat die Plasmakonzentration von Donepezil HCl das Steady State erreicht und bleibt während der weiteren Behandlung unverändert. Die Plasmakonzentration von Donepezil HCl beträgt bei Patienten, die 5mg/Tag erhalten, 30ng/ml und bei Patienten, die 10mg/Tag erhalten, 60ng/ml. [14] Donepezil HCl wird zu etwa 95% an Plasmaproteine gebunden. [13] Die Ausscheidung von Donepezil HCl erfolgt wie bei den anderen Acetylcholinesterase-Hemmern vorwiegend renal. [8] Wobei Donepezil HCl sowohl in unveränderter als auch in Form von Metaboliten nach Verstoffwechselung über das Cytochrom P450-System ausgeschieden wird. Als Metaboliten sind 6-O-Desmethyl-Donepezil, Donepezil-*cis*-N-oxid, 5-O-Desmethyl-Donepezil und das Glucuronidkonjugat von 5-O-Desmethyl-Donepezil bekannt. 6-O-Desmethyl-Donepezil ist außerdem der einzige Metabolit, der eine ähnliche Wirkung wie Donepezil HCl zeigt. [13]

Indikationen

Donepezil HCl wird vor allem zur symptomatischen Behandlung der milden bis moderaten Alzheimer-Demenz eingesetzt. [12, 13] Donepezil HCl ist aber auch der erste und einzige Acetylcholinesterase-Hemmer, der zur Behandlung der schweren Alzheimer-Demenz verwendet wird. [14]

7. Literatursituation

Bei der Literaturrecherche zu den Substanzen der vorliegenden Arbeit wurden nur Studien berücksichtigt, die einerseits eine allgemeine Bestimmung des Cinnarizins beinhalten und andererseits, jene, die sich auch mit Abbauprodukten und Verunreinigungen beschäftigen.

Die Suche nach Chemical Abstracts mit Hilfe des SciFinders lieferte 41 Ergebnisse für die verknüpften Suchbegriffe „cinnarizine hplc“. Sehr hilfreich war die Studie von *Hassan et al.* [15]. In dieser Studie wurden HPLC- und DC-Methoden vorgestellt, um Cinnarizin in der Gegenwart seiner Hydrolyseprodukte, seiner Related Substances und seiner Metabolite im Serum nachzuweisen. Als mobile Phase wurden bei der HPLC-Methode Methanol und ein Acetat-Puffer mit pH 4 im Verhältnis 70:30 verwendet. Bei der DC-Methode kamen Benzol, Methanol und Ameisensäure im Verhältnis 80:17:3 als mobile Phase zum Einsatz. Es wurden vier Related Substances und sechs Abbauprodukte von Cinnarizin isoliert und mittels Infrarot- und Massenspektrometrie identifiziert.

Die meisten Studien befassten sich mit der Gehaltsbestimmung von Cinnarizin in pharmazeutischen Zubereitungen. Einige davon befassten sich auch mit der Bestimmung von Cinnarizin in der Gegenwart seiner Related Substances und sauren Hydrolyseprodukte. Dabei wurde bei den meisten Studien eine RP-HPLC-Säule verwendet. Als mobile Phase wurden unterschiedliche Lösungsmittel eingesetzt, wobei Methanol fast immer ein Bestandteil war. Beispiele für mobile Phasen wären:

Methanol:0,2% Triethanolamin:Triethylamin (85:15:0,03) [16]

Methanol:0,01M dibasischem Natriumphosphat (4:1) mit 0,2% Triethanolamin [17]

Methanol:Wasser:Essigsäure:Triethylamin (65:35:1:0,04) [18]

Methanol:Acetonitril:Phosphat-Puffer pH 4,4 (50:35:15) [19]

Acetonitril:Triethylamin-Puffer pH 4,5:Tetrahydrofuran (30:66:4) [20]

Bei allen Studien erfolgte die Detektion des Cinnarizins bei einer Wellenlänge von 254nm mittels UV-Detektor oder Diodenarray-Detektor.

Es gibt auch Studien, die sich mit der Bestimmung von Cinnarizin in menschlichem Plasma beschäftigen. Bei der Studie von *Rosseel et Lefebvre* [21] wird Cinnarizin zuerst aus dem Plasma extrahiert, was durch Ansäuern des Plasmas (pH 4,7) und anschließendes Extrahieren mit Tetrachlorkohlenstoff erfolgt. Anschließend können die Produkte mittels RP-HPLC getrennt werden, wobei als mobile Phase eine Mischung aus 0,04% Triethylamin in

0,01M Ammoniumdihydrogenphosphat pH 4,2 und Acetonitril (20:80) verwendet wird. Die Detektion des Cinnarizins erfolgt durch Fluoreszenzdetektion bei 310nm nachdem es bei 254nm angeregt wurde.

Im Europäischen Arzneibuch 2008 (6.0) werden als Teil der Reinheitsprüfung Related Substances mittels Reversed-Phase-HPLC nachgewiesen. Als stationäre Phase wird desaktiviertes, octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie verwendet. Die mobile Phase besteht aus einer Lösung von Ammoniumacetat (10g/l) und einer 0,2%igen Lösung (V/V) von Essigsäure 99% in Acetonitril. Die Detektion erfolgt mittels UV-Spektrometer bei 230nm. [10]

Als spezifizierte Verunreinigungen (Related Substances) sind im Europäischen Arzneibuch folgende fünf Verbindungen, die mit den Buchstaben A, B, C, D und E bezeichnet sind, aufgelistet. [10]

- A. 1-(Diphenylmethyl)piperazin
- B. (Z)-1-(Diphenylmethyl)-4-(3-phenylprop-2-enyl)piperazin
- C. 4-(Diphenylmethyl)-1,1-bis[(E)-3-phenylprop-2-enyl]piperaziniumchlorid
- D. 1-(Diphenylmethyl)-4-[(1R,3E)-4-phenyl-1-[(E)-2-phenylethenyl]but-3-enyl]piperazin
- E. 1,4-Bis(diphenylmethyl)piperazin

Bei der Literaturrecherche für das Donepezilhydrochlorid wurden nur jene Studien berücksichtigt, die sich mit der Gehaltsbestimmung von Donepezil HCl in Arzneiformen mittels HPLC beschäftigen. Insgesamt wurden sieben Studien dazu gefunden. Bei allen Studien wurden Reversed-Phase-Säulen eingesetzt, wobei bei sechs Studien eine C18-Säule und bei einer Studie eine C8-Säule verwendet wurde. Typische Lösungsmittel, die als Bestandteile der mobilen Phase eingesetzt wurden, waren Methanol, Phosphorsäure, Triethylamin und Wasser. Folgende mobile Phasen wurden vorgeschlagen:

Methanol : wässriger Phosphatpuffer pH 4 (60:40) [22]

Wässriger Phosphatpuffer pH 2,50 ± 0,05 : Methanol : Triethylamin (550:450:5) [23]

Methanol : 0,02M Phosphatpuffer : Triethylamin (60:40:0,5) [24]

Methanol : Wasser : Trifluoressigsäure (75:25:0,2) [25]

Acetonitril : 0,025M Phosphatpuffer pH 7 (50:50) [26]

Methanol : 0,02M Phosphatpuffer : Triethylamin (50:50:0,5) [27]

Methanol : 0,005M Phosphatpuffer pH 3,67 (Gradient) [28]

Nur bei einer Studie wurde mit einem Gradienten eluiert, sonst erfolgte die Elution isokratisch. Die Detektion des Donepezil HCl erfolgte mittels UV-Detektor bei den Wellenlängen 228nm, 230nm, 268nm, 270nm, 271nm und 315nm.

8. Validierung eines HPLC-Systems

Das Ziel einer Validierung ist zu zeigen, dass eine analytische Methode für ihren Verwendungszweck geeignet ist.

Laut ICH-Guideline und ISO 17025 sollten die folgenden Parameter bei einer Validierung berücksichtigt werden. [29]

- Richtigkeit (*Accuracy*)
- Präzision (*Precision*)
 - Wiederholbarkeit (*Repeatability*)
 - Tag zu Tag Präzision (*Intermediate Precision*)
- Spezifität (*Specificity*)
- Detektionsgrenze (*Detection Limit*)
- Quantifizierungsgrenze (*Quantification Limit*)
- Linearität (*Linearity*)
- Arbeitsbereich (*Range*)

8.1 Spezifität

Die Spezifität ist die Fähigkeit einen Analyten in der Gegenwart anderer zu erwartender Komponenten eindeutig nachzuweisen. Zu diesen Komponenten zählen Verunreinigungen, Abbauprodukte, Matrix etc. [29]

Ein Mangel an Spezifität einer individuellen analytischen Methode kann durch andere unterstützende analytische Methoden kompensiert werden.

Diese Definition hat folgende Implikationen: [29]

Identifizierung: um die Identität des Analyten sicherzustellen

Reinheitsprüfung: um sicherzustellen, dass alle durchgeführten analytischen Methoden eine exakte Aussage über den Gehalt von Verunreinigungen eines Analyten erlauben. Dazu gehören Prüfungen auf Related Substances, Restlösungsmittelgehalte und Schwermetalle.

Gehaltsbestimmung: um eine genaue Aussage über die Menge eines Analyten in einer Probe zu treffen [29]

8.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit einer analytischen Methode drückt die Übereinstimmung des gemessenen Werts mit dem wahren Wert aus. Deshalb wird sie auch manchmal als Wahrheit bezeichnet.

[29] Die Richtigkeit ist somit ein Maß für den systematischen Fehler. [30]

Zu unrichtigen Ergebnissen kann es kommen, wenn die Selektivität der Methode mangelhaft ist, die Wiederfindungsrate weniger als 100% beträgt, ein falscher Gehalt des Referenzstandards aufgrund von Zersetzung angenommen wurde oder wenn der gefundene Wert aufgrund unterschiedlicher Matrix falsch ist. [30]

8.3 Präzision

Die Präzision einer analytischen Methode drückt die Übereinstimmung der Ergebnisse mehrerer Messungen einer homogenen Probelösung bei gleichbleibenden Bedingungen aus. [29] Die Präzision ist somit ein Maß für die Streuung der Messergebnisse. Über die Streuung kann wiederum eine Aussage über den zufälligen Fehler getroffen werden. Die Präzision und damit das Streuungsmaß werden normalerweise durch die Standardabweichung, die relative Standardabweichung und den Variationskoeffizient von mehreren Messungen ausgedrückt. [30]

Desweiteren wird die Präzision in drei Punkte unterteilt:

- Wiederholbarkeit
- Intermediate Precision
- Reproduzierbarkeit

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit drückt die Präzision unter denselben Arbeitsbedingungen über ein kurzes Zeitintervall aus. [29] Unter denselben Arbeitsbedingungen heißt, dass dasselbe Verfahren, an derselben Probe, in demselben Labor, durch denselben Bearbeiter und mit demselben Gerät angewendet wird. [30] Man nennt die Wiederholbarkeit auch Intra-assay precision. [29]

Bei der Tag zu Tag Präzision handelt es sich ebenfalls um die Wiederholbarkeit, allerdings wird hier nicht über ein kurzes Zeitintervall, sondern über mehrere aufeinanderfolgende Tage gemessen. [29, 30]

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit sollten entweder mindestens 9 Bestimmungen (z.B.: von 3 Konzentrationen jeweils 3 Injektionen) oder mindestens 6 Bestimmungen bei 100% der Testkonzentration durchgeführt werden. [29]

Intermediate Precision

Die Intermediate Precision drückt die Präzision durch Variation von Parametern innerhalb eines Labors aus. Zu den Variationen gehören Messungen an unterschiedlichen Tagen, unterschiedliche Analytiker, unterschiedliche Ausrüstung, usw. Hierbei sollte berücksichtigt werden, welche Parameter sich bei der Routineanwendung unter realen Bedingungen ändern könnten. Die Intermediate Precision ist vor allem dann wichtig, wenn eine bestimmte analytische Methode von mehreren Labors verwendet werden soll. [29, 30]

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit drückt die Präzision zwischen verschiedenen Labors aus. Die Reproduzierbarkeit wird auch Vergleichspräzision genannt, weil hier Messergebnisse von verschiedenen Labors, Bearbeitern oder Geräten miteinander verglichen werden. Nur das Verfahren und das Probenmaterial bleiben gleich. [29, 30]

Mess- und Methodenpräzision

Die Streuung der Messergebnisse kommt einerseits durch das Analysengerät selbst, andererseits durch die Methode zustande. Die Messpräzision gibt die Abweichungen an, die durch das Analysengerät verursacht werden und die Methodenpräzision gibt jene Abweichungen an, die durch die Methode verursacht werden. Hierbei spielen vor allem die einzelnen Schritte der Methode eine Rolle wie z.B. die Probennahme, das Wiegen, die Probenvorbereitung und die Auswertung. [29, 30]

8.4 Detektionsgrenze

Die Detektionsgrenze einer analytischen Methode stellt die kleinste Menge an Analyten in einer Probe dar, welche zwar detektiert, aber noch nicht quantifiziert werden kann. Die Bestimmung der Detektionsgrenze kann durch verschiedene Ansätze erfolgen, wobei die drei folgenden Methoden die wichtigsten sind: [29]

- Bestimmung durch visuelle Auswertung
- Bestimmung des Signal-to-Noise-Verhältnis
- Bestimmung durch die Standardabweichung der Response und die Steigung

Bestimmung durch visuelle Auswertung

Bei der visuellen Auswertung erfolgt die Bestimmung der Detektionsgrenze indem Probelösungen mit bekannter Konzentration analysiert werden und anschließend ein Minimumlevel für die verlässliche Detektion des Analyten festgelegt wird. [29]

Bestimmung des Signal-to-Noise-Verhältnis

Die Methode des Signal-to-Noise-Verhältnis kann nur bei analytischen Methoden angewendet werden, die ein Grundrauschen aufweisen. Die Bestimmung erfolgt dabei durch Vergleiche der gemessenen Signale von Proben mit bekannter niedriger Konzentration des Analyten mit den Signalen der Blindproben. Anschließend wird wieder ein Minimumlevel für die verlässliche Detektion des Analyten festgelegt. Generell sollte das Signal-to-Noise-Verhältnis 3 oder 2:1 für die Bestimmung der Detektionsgrenze betragen. [29]

Bestimmung durch die Standardabweichung der Response und die Steigung

Hierbei wird die Detektionsgrenze mit folgender Formel berechnet: [29]

$$DL \text{ (Detection Limit)} = 3,3 \sigma / S$$

σ = Standardabweichung der Response

S = Steigung der Kalibrationsgerade

8.5 Quantifizierungsgrenze

Die Quantifizierungsgrenze einer analytischen Methode ist die kleinste Menge an Analyten in einer Probe, die mit geeigneter Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann. Die Quantifizierungsgrenze wird teilweise auch für die Bestimmung von Verunreinigungen und Abbauprodukten verwendet. Die Bestimmung der Quantifizierungsgrenze erfolgt wie bei der Detektionsgrenze durch mehrere Methoden, wobei wieder die drei folgenden am wichtigsten sind: [29]

- Bestimmung durch visuelle Auswertung
- Bestimmung des Signal-to-Noise-Verhältnis
- Bestimmung durch die Standardabweichung der Response und die Steigung

Bestimmung durch visuelle Auswertung

Bei der visuellen Auswertung erfolgt die Bestimmung der Quantifizierungsgrenze indem Probelösungen mit bekannter Konzentration analysiert werden und anschließend ein Minimumlevel für die verlässliche Quantifizierung des Analyten mit akzeptabler Richtigkeit und Präzision festgelegt wird. [29]

Bestimmung des Signal-to-Noise-Verhältnis

Die Methode des Signal-to-Noise-Verhältnis kann nur bei analytischen Methoden angewendet werden, die ein Grundrauschen aufweisen. Die Bestimmung erfolgt dabei durch Vergleiche der gemessenen Signale von Proben mit bekannter niedriger Konzentration des Analyten mit den Signalen der Blindproben. Anschließend wird wieder ein Minimumlevel für die verlässliche Quantifizierung des Analyten festgelegt. Das Signal-to-Noise-Verhältnis sollte für die Bestimmung der Quantifizierungsgrenze 10:1 sein. [29]

Bestimmung durch die Standardabweichung der Response und die Steigung

Hierbei wird die Quantifizierungsgrenze mit folgender Formel berechnet: [29]

$$QL \text{ (Quantitation Limit)} = 10 \sigma / S$$

σ = Standardabweichung der Response

S = Steigung der Kalibrationsgerade

8.6 Linearität

Die Linearität einer analytischen Methode ist die Fähigkeit Messergebnisse zu erhalten, die direkt proportional zur Konzentration oder Menge des Analyten in der Probe sind. Dazu wird eine Regressionslinie mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate berechnet. Außerdem werden das Bestimmtheitsmaß (= Quadrat des Korrelationskoeffizienten), der y-Abschnitt (d) und die Steigung (k) der Geraden ($y=k*x+d$) berechnet. Mit der erhaltenen Kalibrationsgerade wird quantitatives Arbeiten ermöglicht. Generell ist für die Erstellung der Kalibrationsgerade eine Bestimmung von mindestens 5 Konzentrationen empfehlenswert. [29]

8.7 Robustheit

Die Robustheit einer analytischen Methode ist die Fähigkeit eines Systems von kleinen Änderungen der Methodenparameter unbeeinflusst zu bleiben. Dadurch soll die Verlässlichkeit der Methode während des normalen Gebrauchs gewährleistet werden. [29]

Im Fall der Flüssigchromatographie können folgende typische Parameter geändert werden:

- pH-Wert der mobilen Phase
- Konzentration/Zusammensetzung der mobilen Phase
- Temperatur
- Flussrate
- stationäre Phase

9. Experimenteller Teil

In diesem Teil werden neben den verwendeten Geräten und Materialien die einzelnen Versuchsanordnungen angeführt.

9.1 Geräte und Methoden

HPLC-Gerät

Degasser:	SHIMADZU DGU-20A ₅
Pumpen:	SHIMADZU LC-20AD
Autosampler:	SHIMADZU SIL-20AC
Communications Bus Module:	SHIMADZU CBM-20A
Diode Array Detector:	SHIMADZU SPD-M20A
Säulenofen:	SHIMADZU CTO-20AC

Folgende HPLC-Systeme bzw. Methoden wurden für die analytischen Bestimmungen von Cinnarizin und Donepezil Hydrochlorid verwendet.

HPLC-System 1:

Säule: ODS Hypersil von Thermo, 125 x 4mm

Mobile Phase: Methanol:0,1N Ammoniumacetat-Puffer pH 4 mit 10% Methanol (70:30)

Flussrate: 1ml/min

Säulenofen: 40°C

Detektion: 250nm, 280nm

Injektionsvolumen: 20µl

Laufzeit: 10 Minuten

Herstellung eines 0,1N Ammoniumacetat-Puffers mit pH 4:

7,708g Ammoniumacetat werden in 1000ml Wasser HPLC gradient grade gelöst und anschließend der pH-Wert mit Essigsäure 99,7+% A.C.S. Reagenz am pH-Meter auf 4 eingestellt. Erst danach werden 100ml Methanol zugesetzt. Zum Schluss wird der Puffer zum Entgasen 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt.

HPLC-System 2:

Säule: BDS Hypersil C18 von Thermo, 150 x 4mm

Mobile Phase: Methanol:0,05M Triethylaminpuffer pH 4 mit 10% Methanol (60:40)

Flussrate: 1ml/min

Säulenofen: 40°C

Detektion: 250nm, 280nm

Injektionsvolumen: 20µl

Laufzeit: 10 Minuten

Herstellung eines 0,05M Triethylaminpuffers mit pH 4:

2,5292g Triethylamin werden in 500ml Wasser HPLC gradient grade gelöst und anschließend der pH-Wert mit Essigsäure 96% p.a. am pH-Meter auf 4 eingestellt. Erst danach werden 100ml Methanol zugesetzt. Zum Schluss wird der Puffer zum Entgasen 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt.

HPLC-System 3:

Säule: Phenomenex® Luna 3u Phenyl-Hexyl, 150 x 4,60mm

Mobile Phase: Wässriger Phosphatpuffer pH 6,5:Acetonitril (Gradient)

Flussrate: 1,3ml/min

Säulenofen: 25°C

Detektion: 270nm

Injektionsvolumen: 10µl

Laufzeit: 18 Minuten

Zeit (min)	Wässriger Phosphatpuffer	Acetonitril
0-5	70 → 45	30 → 55
5-8	45	55
8-11	45 → 25	55 → 75
11-13	25	75
13-14	25 → 70	75 → 30
14-18	70	30

Tab. 1: Zeitprogramm für Gradientenelution

Herstellung eines wässrigen Phosphatpuffers mit pH 6,5:

1000µl ortho-Phosphorsäure 85% p.a. werden mittels Pipette zu 1000ml Wasser HPLC gradient grade zugesetzt und gut vermischt. Danach wird am pH-Meter der pH-Wert mit Triethylamin auf 6,5 eingestellt. Zum Schluss wird der Puffer zum Entgasen 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt.

Massenspektrometer

Finnigan LCQ Deca

Pumpe: Shimadzu LC-10AT

NMR-Spektrometer

Bruker Avance 500

Bruker-Spectrospin 200

Autosampler: Bruker B-ACS 60

Suntest

Heraeus Hanau Suntest CPS (Art.No.55007014) mit Fensterglasfilter

Bestrahlungsintensität: 1300W/m²

entspricht einer Schwarztafeltemperatur von 49°C

4min. Suntest entsprechen 1h Sonnenlicht (Faktor 15)

Xenon Strahler NXE 150

Abstand zum Probenstisch: 22cm

UV-Lampe

CAMAG CM3 SN: 011044

Trockenschrank

Heraeus UT6060

Ultraschallbad

BRANSON 5200

Analysenwaage

Sartorius A200S

Sartorius LE26P

pH-Meter

WTW inoLab pH 720

DC-Platten

Merck DC Kieselgel 60 F₂₅₄

Macherey-Nagel DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G / UV₂₅₄

Filter

Chromafil® Xtra PES-45/25 0,45µm

Sartorius RC 25 0,45µm und 0,2µm

Pipetten

Eppendorf Research 100-1000µl

9.2 Substanzen

- Cinnarizin
Fagron Ch.Nr.: 10J08-N02
- Cinnabene®-Kapseln
Ratiopharm Ch.Nr.:1324D9 Verw. bis: 03/2004
- Stutgeron® 75 mg-Kapseln
Janssen-Cilag Pharma Ch.Nr.: 00HV260 Verw. bis: 08/2005
- Donepezil Hydrochlorid Reference Standard
Janssen Ch.Nr.: 19042003 Code: 40814
- Aricept® 5mg-Filmtabletten
Pfizer Ch.Nr.: 3015811 Verw. bis 01/2006
- Aricept®10mg-Filmtabletten
Pfizer Ch.Nr.: 3046805 Verw. bis 03/2006

9.3 Lösungsmittel und Fließmittel

- Acetonitril HPLC grade
- Ameisensäure
- Aqua purificata
- Essigsäure 96% p.a.
- Ethylacetat
- Methanol
- Methanol HPLC grade
- Ortho-Phosphorsäure 85% p.a.
- Toluol
- Triethylamin
- Wasser HPLC gradient grade

9.4 Methodenentwicklung und Vorversuche - Cinnarizin

Bei der Entwicklung eines geeigneten HPLC-Systems zur Bestimmung von Cinnarizin in der Gegenwart seiner Abbauprodukte wurde anfänglich mit einer mobilen Phase aus 70% Methanol und 30% 0,1N Ammoniumacetat-Puffer pH 4 mit 10% Methanol eluiert. Um die Retentionszeit des Cinnarizins mit diesem Puffer herauszufinden, wurden 20,7mg einer gealterten Cinnarizin-Reinsubstanz aus dem Depot der Universität in Wasser mit 2% Essigsäure gelöst und auf 100ml aufgefüllt. Zusätzlich wurden als interner Standard 20,4mg Methyl-4-hydroxybenzoat (Methylparaben) in Methanol/Wasser (50:50) gelöst und auf 100ml aufgefüllt. 200µl dieses internen Standards wurden 1000µl Probelösung zugesetzt und mit dem HPLC-System 1 analysiert.

Zur Kontrolle wurde eine weitere Cinnarizin Probelösung hergestellt. Hierbei wurden 35,3mg Cinnarizin alt in Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30) gelöst und auf 100ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde dann dreimal injiziert.

Schließlich wurde mit dem Cinnarizin der Firma Fagron eine erste Kalibrationsgerade erstellt. Dazu wurden fünf Cinnarizin-Standardlösungen mit den Konzentrationen 153µg/ml, 204µg/ml, 255µg/ml, 303µg/ml und 355µg/ml hergestellt. Dabei wurde die jeweilige Einwaage von Cinnarizin in Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30) gelöst und auf 100ml aufgefüllt.

Lösung 1: EW= 15,3mg Cinnarizin => c= 153µg/ml

Lösung 2: EW= 20,4mg Cinnarizin => c= 204µg/ml

Lösung 3: EW= 25,5mg Cinnarizin => c= 255µg/ml

Lösung 4: EW= 30,3mg Cinnarizin => c= 303µg/ml

Lösung 5: EW= 35,5mg Cinnarizin => c= 355µg/ml

Jede Standardlösung wurde dreimal ins HPLC-Gerät injiziert. Die Chromatogramme wurden bei 250 und 280nm aufgenommen. Für jede Wellenlänge wurde die Kalibrationsgerade mittels linearer Regression in Excel® 97 berechnet.

Danach wurden drei weitere Cinnarizin-Lösungen hergestellt und mittels der Kalibrationsgeraden die Wiederfindung berechnet. Jede Cinnarizin Einwaage wurde in Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30) gelöst und auf 100ml aufgefüllt.

Lösung 1: EW= 17,7mg Cinnarizin => c= 177µg/ml

Lösung 2: EW= 28,2mg Cinnarizin => c= 282µg/ml

Lösung 3: EW= 33,1mg Cinnarizin => c= 331µg/ml

Jede Probelösung wurde dreimal injiziert.

9.5 Photostabilitätsuntersuchungen

Die Photostabilität des Cinnarizins wurde nach drei Methoden untersucht, deren Durchführung im Folgenden beschrieben wird.

9.5.1 Bestrahlung im Suntest

Zur Überprüfung der Photostabilität wurden zwei Cinnarizin-Probelösungen mit unterschiedlicher Konzentration hergestellt.

Die erste Probelösung enthielt 600µg Cinnarizin/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30). Die zweite Probelösung enthielt 2000µg Cinnarizin/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50). Beide Probelösungen wurden jeweils auf zwei 50ml Messkolben aufgeteilt. Von jeder Probelösung wurde jeweils ein Kolben in den Suntest und in den Trockenschrank gestellt. Die beiden Probelösungen aus dem Trockenschrank dienten dabei als Vergleichslösungen, da es bei der Bestrahlung im Suntest auch zur Wärmeentwicklung kommt und man dadurch unterscheiden kann, ob es sich um photochemische oder wärmebedingte Reaktionen handelt.

Die Probennahme und Injektion der Probelösungen aus dem Suntest erfolgte nach 48, 96, 144 und 264 Minuten, wobei 48 Minuten Suntest 12 Stunden natürlichem Sonnenlicht entsprechen.

Die Probennahme und Injektion der Probelösungen aus dem Trockenschrank erfolgte nach 91, 139 und 259 Minuten.

9.5.2 Bestrahlung bei UV 254nm

Um zu testen, ob sich bei der Bestrahlung mit energiereicher Strahlung kurzer Wellenlänge Abbauprodukte bilden, wurden 3ml der Cinnarizin-Probelösung mit der Konzentration 2000µg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50) in eine Petrischale pipettiert und unter der UV-Lampe bei 254nm 1 Stunde lang bestrahlt.

Nachweis der gebildeten Abbauprodukte mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Zum Nachweis der gebildeten Abbauprodukte wurden von der unverdünnten UV-bestrahlten Cinnarizin-Probelösung mit der Konzentration 2000µg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50) 5, 10 und 15µl in drei Bahnen auf eine DC-Platte der Firma Merck mit den Maßen 10x5cm aufgetragen und ca. 20 Minuten lang mit Ethylacetat entwickelt. Die Laufstrecke betrug dabei 9cm.

Zum Vergleich wurde auf einer 10x7cm DC-Platte in der Mitte die UV-bestrahlte Cinnarizin-Probelösung aufgetragen und links und rechts davon wurde ein Cinnarizin-Standard mit einer Konzentration von ca. 2mg Cinnarizin/ml Methanol aufgetragen. Dabei wurden von jeder Lösung 10µl aufgetragen. Anschließend wurde die Platte ca. 20 Minuten in Ethylacetat, der mit 2N Ammoniak gesättigt wurde, entwickelt. Die Laufstrecke betrug 9cm.

Desweiteren wurden auf eine 10x4cm DC-Platte links und rechts je 4µl des Cinnarizin-Standards mit der Konzentration 2mg/ml Methanol aufgetragen. In der Mitte wurden 4µl der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probelösung mit der Konzentration 2mg/ml aufgetragen. Die Entwicklung dieser DC-Platte mit einer Laufstrecke von 8cm erfolgte in reinem Ethylacetat und dauerte ca. 17 Minuten.

Beim nächsten Versuch wurden von denselben Lösungen je 2µl in gleicher Reihenfolge auf eine 10x3cm DC-Platte aufgetragen. Auch hier dauerte die Entwicklung bei einer Laufstrecke von 8cm ca. 18 Minuten.

Zuletzt wurden der Cinnarizin-Standard und die Cinnarizin-Probelösung übereinander auf eine 10x1cm DC-Platte aufgetragen, um zu testen, welchen Einfluss das Lösungsmittel auf die Wanderungsgeschwindigkeit hat.

Verlauf der Abbauproduktbildung bei UV 245nm

Um herauszufinden, wie schnell sich die Abbauprodukte bei Bestrahlung mit UV 254nm bilden, wurden 100ml Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50) hergestellt. Etwa 40ml dieser Probeflösung wurden in eine Petrischale pipettiert und unter der UV-Lampe bei 254nm bestrahlt. In den ersten 2 Stunden wurden jeweils nach 10 Minuten 100µl Probeflösung entnommen, mit Methanol 1:10 verdünnt und mit dem HPLC-System 2 analysiert. Die Probeflösung wurde weiterhin bestrahlt, wobei die Probenahme stündlich erfolgte. Das heißt nach 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660, 720, 780, 840, 900, 960 und 1020 Minuten. Insgesamt wurde die Probeflösung also 17 Stunden lang bestrahlt. Die Chromatogramme wurden bei 250 und 280nm aufgenommen und ausgewertet.

Nachweis der gebildeten Abbauprodukte mittels Massenspektrometrie (MS)

Anschließend wurde versucht, mittels Massenspektrometrie die Abbauprodukte zu identifizieren. Dazu wurde der pH-Wert des Triethylamin-Puffers auf 4,5 erhöht, wodurch die Substanzen langsamer eluierten und auch besser getrennt wurden. Die Substanzen der fünf Hauptpeaks wurden nach Verlassen des Detektors manuell jeweils in ein Eppendorf-Cap geleitet und die Fraktionen massenspektrometrisch analysiert. Die neuen Retentionszeiten der fünf Hauptpeaks waren bei Rt 2,2 (Rt 2,1 bei pH4), 4,2 (Rt 4,1 bei pH4), 8,9 (Rt 5,6-5,8 bei pH4), 12,1 (Rt 6,9-7 bei pH4) und 16,2 (Rt 8,5 bei pH4). Bei der Substanz mit der Rt 8,9 handelte es sich um das Cinnarizin selbst.

9.5.3 Bestrahlung bei UV 366nm

Zur Kontrolle, ob sich bei der Bestrahlung mit $\lambda=366\text{nm}$ auch Abbauprodukte bilden, wurden ca. 3ml der bereits hergestellten Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50) in eine Petrischale pipettiert und 1 Stunde lang unter der UV-Lampe bei 366nm bestrahlt. Danach wurde die Lösung 1:10 mit Methanol verdünnt und in das HPLC-System 2 injiziert.

9.6 Hydrolyse von Cinnarizin im sauren Medium

Zur Bestimmung von hydrolytischen Abbauprodukten wurden beim ersten Versuch von einer zehn Tage alten Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 353µg/ml Wasser/6N Salzsäure (4:1) und einer fünf Tage alten Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 355µg/ml

Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30) jeweils 25ml in einen 100ml Rundkolben überführt und 1 Stunde am Rückflusskühler bei 100°C am Ölbad erhitzt.

Beim zweiten Versuch wurden, wie in der Studie von *Hassan et al.* [15] beschrieben, 501mg Cinnarizin in einen 250ml Rundkolben eingewogen, mit 100ml 0,5M Salzsäure versetzt und mit Hilfe des Ultraschallbades gelöst. Statt die Probelösung am Rückflusskühler zu erhitzen, wurde der Rundkolben mit einem Glasstopfen und einer Klammer verschlossen, in ein Becherglas gestellt und 72 Stunden im Trockenschrank bei 90°C erhitzt.

Nach dem Erhitzen wurde die Lösung abgekühlt, wobei sich weiße Kristalle formten. 20ml der Lösung wurden in ein Becherglas überführt und mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert. Sobald die Bläschenproduktion durch das entstandene CO₂ aufhörte, wurde der pH-Wert mit einem Teststreifen kontrolliert. Danach wurde die Probelösung in einen 50ml Scheidetrichter überführt und zweimal mit je 10ml Ethylacetat gewaschen. Cinnarizin wurde dadurch in die organische Phase extrahiert. Beide Ethylacetat-Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und in einen 100ml Rundkolben filtriert. Anschließend wurde die Probelösung am Rotavapor zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in Chloroform-d gelöst. Davon wurde ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen.

Als nächstes wurden die Kristalle durch Abnutschen von der Mutterlauge getrennt. Die Mutterlauge wurde mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, 1:10 mit Methanol verdünnt und ins HPLC-System injiziert. Zur Kontrolle wurde ein Cinnarizin-Standard mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50) 1:10 mit Methanol verdünnt und mit der ebenfalls verdünnten Mutterlauge 1:1 gemischt. Diese Mischung wurde injiziert und mit dem HPLC-System 2 analysiert.

Die abgenutzten Kristalle wurden getrocknet und 12,8mg davon in 800µl Chloroform-d mit Hilfe des Ultraschallbades gelöst. Von dieser Lösung wurde ebenfalls ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen. Desweiteren wurde die Kristall-Lösung von der ¹H-NMR-Messung 1:10 mit Methanol verdünnt und ebenfalls mit dem HPLC-System 2 analysiert.

Nachweis der Hydrolyse-Produkte mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Außerdem wurden die Lösungen der Kristalle und der Mutterlauge-Kristall-Mischung von der ¹H-NMR-Messung auf eine 10x9cm DC-Platte aufgetragen. Zum Vergleich wurden auch ein Cinnarizin-Standard mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50), UV-bestrahltes Cinnarizin mit der gleichen Konzentration und der extrahierte Inhalt einer 75mg Cinnabene®-Kapsel aufgetragen. Von diesen Lösungen wurden je 2µl in folgender Reihenfolge und Kombination aufgetragen:

1. Cinnabene®-Kapselinhalt
2. Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin
3. UV-bestrahltes Cinnarizin
4. Kristall-Lösung
5. Mutterlauge-Kristall-Mischung
6. Cinnarizin-Standard
7. Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin
8. Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard

Die DC-Platte wurde in Ethylacetat ca. 18 Minuten entwickelt. Die Laufstrecke betrug dabei 8cm.

Beim nächsten Versuch wurden als Probelösungen UV-bestrahltes Cinnarizin mit der Konzentration 2 mg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50), die Kristall-Lösung von der ¹H-NMR-Messung, die Kristall-Lösung mit der Konzentration 1,5mg/ml Methanol, der Cinnarizin-Standard mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50), die Mutterlauge-Kristall-Mischung von der ¹H-NMR-Messung und die Mutterlauge auf eine 10x7cm DC-Platte aufgetragen und ca. 20 Minuten in Ethylacetat entwickelt. Die Laufstrecke betrug dabei 8cm. Von den genannten Probelösungen wurden je 2µl in folgender Reihenfolge aufgetragen:

1. UV-bestrahltes Cinnarizin
2. Kristall-Lösung mit Chloroform-d
3. Kristall-Lösung mit Methanol
4. Cinnarizin-Standard
5. Mutterlauge-Kristall-Mischung
6. Mutterlauge

9.7 Bestimmung von Cinnarizin in Fertigarzneimitteln

Zur Bestimmung von Cinnarizin in Fertigarzneimitteln wurden geeignete Präparate aus dem Arzneimittel-Depot der Universität herangezogen. Bei allen verwendeten Präparaten war das Haltbarkeitsdatum überschritten. Dadurch wurde ermöglicht auch eventuell vorhandene Abbauprodukte nachzuweisen.

9.7.1 Bestimmung von Cinnarizin in Cinnabene®-Kapseln

Zunächst wurde eine Packung Cinnabene®-Kapseln der Firma Ratiopharm mit der Chargennummer 1324D9 und dem Verfallsdatum 03/2004 untersucht. Laut

Gebrauchsinformation enthält eine Kapsel 75mg Cinnarizin, wobei der Wirkstoff als ölige Suspension vorliegt.

Für die Bestimmung wurde eine Kapsel abgewogen, mit einem Messer aufgeschnitten und die ganze Kapsel in einen 100ml Messkolben überführt. Dann wurden 40ml einer Mischung aus Methanol und Essigsäure 96% p.a. (90:10) zugesetzt und der Messkolben zum Lösen ca. 1½ Stunden ins Ultraschallbad gestellt. Danach wurde mit Methanol/Wasser (50:50) auf 100ml aufgefüllt. Etwa 2ml der gelb gefärbten Probelösung wurden mit einer Kunststoffspritze aufgesaugt und durch einen 0,45µm-Filter filtriert. Die filtrierte Lösung wurde 1:4 mit Methanol/Wasser (50:50) verdünnt und ins HPLC-Gerät injiziert.

Um zu testen, ob die Kapselhüllbestandteile einen Einfluss auf das Ergebnis haben, wurde erneut eine Kapsel aufgeschnitten, aber diesmal wurde nur der Kapselinhalt mit einer Kunststoffspritze aufgesaugt und in ein Vial gespritzt. Das Vial wurde mit Methanol aufgefüllt und zum Extrahieren ca. 5 Minuten ins Ultraschallbad gehalten. Anschließend wurden 500µl der Lösung 1:1 mit Methanol/Wasser (50:50) verdünnt. Dadurch wurde die Lösung weiß getrübt. Trotz weiterem Zusatz von 500µl Methanol wurde sie nicht mehr klar, worauf die Lösung mit einem 0,45µm-Filter filtriert wurde. Die dadurch erhaltene klare Lösung wurde anschließend ins HPLC-System injiziert.

Desweiteren wurde der extrahierte Cinnabene®-Kapselinhalt mit einem Cinnarizin-Standard und UV-bestrahltem Cinnarizin in folgender Reihenfolge und Kombination auf zwei 17x7cm DC-Platten aufgetragen.

1. Cinnarizin-Standard, c= 2mg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50)
2. Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin
3. UV-bestrahltes Cinnarizin, c= 2mg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50)
4. Cinnabene®-Kapselinhalt mit Methanol extrahiert
5. Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin
6. Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard

Es wurden von jeder Lösung je 2µl mit einer Mikroliterpipette aufgetragen. Als Fließmittel dienten Toluol, Methanol und Ameisensäure im Verhältnis 80:17:3. Die Laufstrecke betrug 15cm mit einer Laufzeit von ca. 55 Minuten.

9.7.2 Bestimmung von Cinnarizin in Stutgeron® 75mg-Kapseln

Als nächstes wurde eine Packung Stutgeron® 75mg-Kapseln der Firma Janssen-Cilag Pharma mit der Chargennummer 00HV260 und dem Verfallsdatum 08/2005 untersucht. Laut Gebrauchsinformation enthält eine Kapsel 75mg Cinnarizin. Als Hilfsstoffe sind laut

Deklaration Laktose, Stärke, Talk, Magnesiumstearat, Gelatine, Glycerin und Farbstoffe (E-110, E-127, E-171, E-172) enthalten. Zur Gehaltsbestimmung wurde eine Kapsel abgewogen, ihr pulverförmiger Inhalt in einen 100ml Messkolben überführt und mit Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50) auf 100ml aufgefüllt. Anschließend wurde der Messkolben zum Lösen ca. 10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Da sich die Probe nicht löste, wurde eine weiß gefärbte Suspension erhalten, was wahrscheinlich durch das Magnesiumstearat bedingt war. Deshalb wurden ca. 2ml der Lösung mit einer Kunststoffspritze aufgesaugt und durch einen 0,45µm-Filter filtriert. Die filtrierte Lösung wurde 1:4 mit Methanol verdünnt und mit dem HPLC-System 2 analysiert.

Insgesamt wurden vier Kapseln nach diesem Schema verarbeitet. Bei der vierten Kapsel wurde aber erst nach dem Verdünnen filtriert, um zu überprüfen, ob die Art der Aufarbeitung einen Einfluss auf das Messergebnis hat.

9.8 Vorversuche zur Bestimmung von Donepezil HCl

Bei den Vorversuchen zur Bestimmung von Donepezil HCl wurden ebenfalls geeignete Präparate aus dem Arzneimittel-Depot der Universität herangezogen.

9.8.1 Bestimmung von Donepezil HCl in Aricept® 5mg–Filmtabletten

Hierzu wurde eine Packung Aricept® 5mg-Filmtabletten der Firma Pfizer mit der Chargennummer 3015811 und dem Verfallsdatum 01/2006 untersucht. Laut Gebrauchsinformation enthält eine Filmtablette 5mg Donepezil Hydrochlorid entsprechend 4,56mg Donepezil als freie Base. Als Hilfsstoffe sind laut Deklaration Laktose, Maisstärke, mikrokristalline Zellulose, Hydroxypropylzellulose und Magnesiumstearat enthalten. Bestandteile des Filmüberzugs sind Talkum, Macrogol, Hypromellose und Titandioxid (E 171).

Zur Bereitung der Probelösung wurde eine Aricept® 5mg-Filmtablette in einer Achatschale verrieben, das gesamte Pulver in einen 20ml Messkolben überführt und mit einer Mischung aus Methanol und 0,05M Triethylamin-Puffer (50:50) gelöst und aufgefüllt. Da die Lösung weiß getrübt war, wurde etwa 1ml davon mit einer Spritze aufgesaugt und über einen 0,45µm-Filter in ein Vial filtriert. Anschließend wurde die Lösung ins HPLC-System injiziert. Die Elution erfolgte dabei mit den Einstellungen des HPLC-Systems 2, das auch für die Bestimmungen des Cinnarizins verwendet wurde. Die Probelösung wurde verwendet, um die Retentionszeit des Donepezil HCl in diesem System herauszufinden und zu optimieren.

9.8.2 Bestimmung von Donepezil HCl in Aricept® 10mg–Filmtabletten

Zur Bestimmung von Donepezil Hydrochlorid in Aricept® 10mg–Filmtabletten wurde eine Packung Aricept® 10mg–Filmtabletten von der Firma Pfizer mit der Chargennummer 3046805 und dem Verfallsdatum 03/2006 untersucht. Laut Gebrauchsinformation enthält eine Filmtablette 10mg Donepezil Hydrochlorid entsprechend 9,12mg Donepezil als freie Base. Als Hilfsstoffe sind laut Deklaration Laktose, Maisstärke, mikrokristalline Zellulose, Hydroxypropylzellulose und Magnesiumstearat enthalten. Bestandteile des Filmüberzugs sind Talkum, Macrogol, Hypromellose, Titandioxid (E 171) und Eisenoxid gelb (E 172) als Farbstoff.

Bei der Herstellung der Probelösung wurde eine Tablette zuerst abgewogen und anschließend in einer Achatreibschale pulverisiert. Das Gewicht der Tablette betrug 0,2796g. Etwa die Hälfte des Pulvers (0,1393g) wurde direkt in einen 10ml Messkolben eingewogen und mit einer Mischung aus Methanol und Wasser mit 2% Essigsäure (50:50) gelöst und aufgefüllt. Da 49,8% des Tablettengewichts eingewogen wurden, betrug die Konzentration der Probelösung 498µg Donepezil HCl/ml. Anschließend wurde die Probelösung gut geschüttelt und für ca. 5 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Die Probelösung blieb jedoch weiß getrübt, worauf etwa 2ml der Lösung mit einer Kunststoffspritze aufgesaugt und durch einen 0,2µm-Filter filtriert wurden. Danach wurde die filtrierte Lösung 1:10 mit Methanol verdünnt und ins HPLC-System injiziert. Die Konzentration der Probelösung betrug nun 49,8µg Donepezil HCl/ml. Die Elution erfolgte wie bei den Aricept® 5mg-Filmtabletten mit Methanol/Triethylamin-Puffer im Verhältnis 35:65. Die Laufzeit betrug dabei 10 Minuten.

9.9 Weiterentwicklungen zur Arzneibuchmonographie von Donepezil HCl

Um die Retentionszeit des Donepezil Hydrochlorids mit dem HPLC-System 3 zu bestimmen, wurden 5,117mg des Donepezil HCl Reference Standards mit der Codenummer 40814 in einen 50ml Messkolben eingewogen und mit Wasser HPLC gradient grade/Acetonitril (75:25) aufgefüllt. Von dieser Probelösung wurden 10µl ins HPLC-System injiziert.

Anschließend wurden mit dem Donepezil HCl Reference Standard zwei Kalibrationsgeraden erstellt. Zur Erstellung der Kalibrationsgeraden für die Gehaltsbestimmung wurden fünf Donepezil-Standardlösungen mit den Konzentrationen 125,32µg/ml, 107,30µg/ml, 75,62µg/ml, 116,31µg/ml und 91,46µg/ml hergestellt. Dabei wurde jede Einwaage in Wasser HPLC gradient grade/Acetonitril (75:25) gelöst und auf 100ml aufgefüllt.

Lösung 1a: EW= 12,532mg Donepezil HCl => c= 125,32µg/ml

Lösung 1b: EW= 10,730mg Donepezil HCl => c= 107,30µg/ml

Lösung 1c: EW= 7,562mg Donepezil HCl => c= 75,62µg/ml

Lösung 1d: Lösung 1a + Lösung 1b (1:1) => c= 116,31µg/ml

Lösung 1e: Lösung 1b + Lösung 1c (1:1) => c= 91,46µg/ml

Die fünf Standardlösungen wurden je dreimal zu je 10µl injiziert und mit dem HPLC-System 3 analysiert. Nach der Auswertung der Chromatogramme wurde die Kalibrationsgerade mittels linearer Regression in Excel® 97 berechnet.

Zur Erstellung der Kalibrationsgerade für die Bestimmung von Related Substances wurden fünf Donepezil-Standardlösungen mit den Konzentrationen 12,532µg/ml, 10,73µg/ml, 7,562µg/ml, 11,631µg/ml und 9,146µg/ml hergestellt. Bei der Herstellung dieser Standardlösungen wurden je 5ml der Standardlösungen für die Gehaltsbestimmung mit einer Vollpipette entnommen, in einen 50ml Messkolben überführt und mit Wasser HPLC gradient grade/Acetonitril (75:25) aufgefüllt. Die Standardlösungen für die Gehaltsbestimmung wurden somit 1:10 verdünnt. Folgend ein Überblick über die hergestellten Standardlösungen.

Lösung 2a: 5ml Lösung 1a auf 50ml verdünnt => c= 12,532µg/ml

Lösung 2b: 5ml Lösung 1b auf 50ml verdünnt => c= 10,73µg/ml

Lösung 2c: 5ml Lösung 1c auf 50ml verdünnt => c= 7,562µg/ml

Lösung 2d: 5ml Lösung 1d auf 50ml verdünnt => c= 11,631µg/ml

Lösung 2e: 5ml Lösung 1e auf 50ml verdünnt => c= 9,146µg/ml

Die fünf neuen Standardlösungen wurden ebenfalls je dreimal zu je 10µl ins HPLC-Gerät injiziert. Nach der Auswertung der Chromatogramme erfolgte die Berechnung der Kalibrationsgerade mittels linearer Regression in Excel® 97.

10. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche der Kapitel 9.4 bis 9.9 angeführt und interpretiert.

10.1 Methodenentwicklung und Vorversuche - Cinnarizin

Bei der Elution mit Methanol/0,1N Ammoniumacetat-Puffer pH 4 mit 10% Methanol (70:30) betrug die Retentionszeit des Cinnarizins ca. 2,8 Minuten. Bei der Methodenentwicklung wurde auch ein zweites HPLC-Gerät mit denselben Einstellungen und derselben Säule des HPLC-Systems 1 verwendet. Mit diesem Gerät betrug die Retentionszeit des Cinnarizins 3,3-3,5 Minuten.

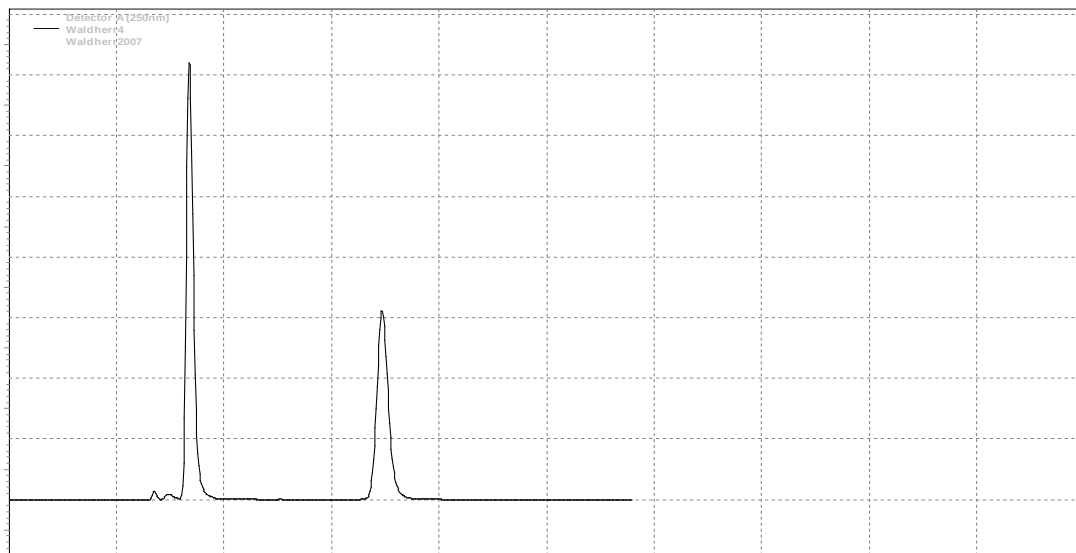


Abb. 4: Chromatogramm einer Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 207µg/ml Wasser mit 2% Essigsäure (1. Peak) und einer Nipagin-Lösung mit der Konzentration 204µg/ml Methanol/Wasser (50:50) (2. Peak) als internem Standard

Kalibrationsgerade von Cinnarizin bei 250nm

Die Ermittlung der Kalibrationsgerade bei 250nm erfolgte mit Hilfe der Konzentrationen und der entsprechenden Peakflächen der fünf Cinnarizin-Standardlösungen.

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
153	9847291	9850685	9852579	9850185
204	13304111	13301366	13307315	13304264
255	16462001	16477860	16459785	16466549
303	19940121	19946191	19968438	19951583
355	23731922	23630984	23782590	23715165

Tab. 2: Werte für die Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

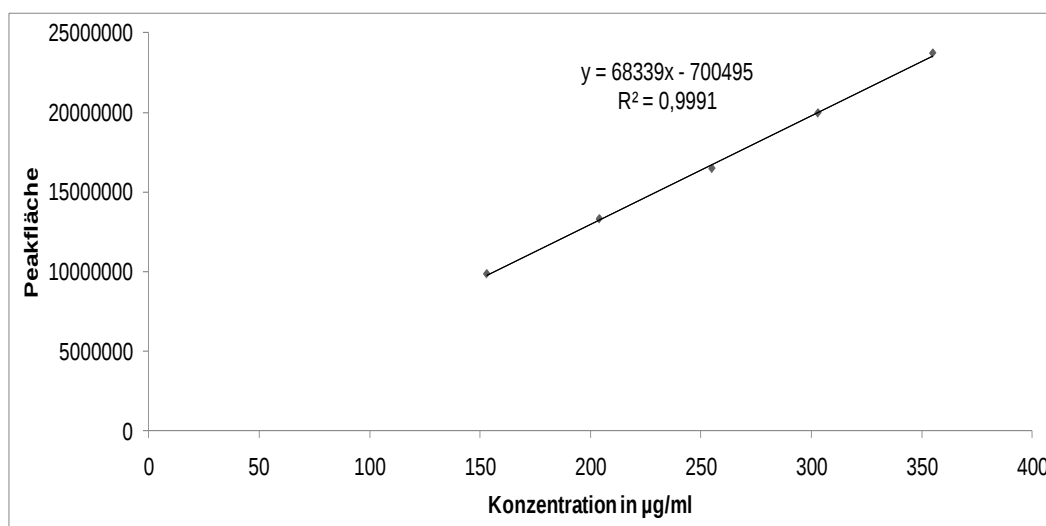


Abb. 5: Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

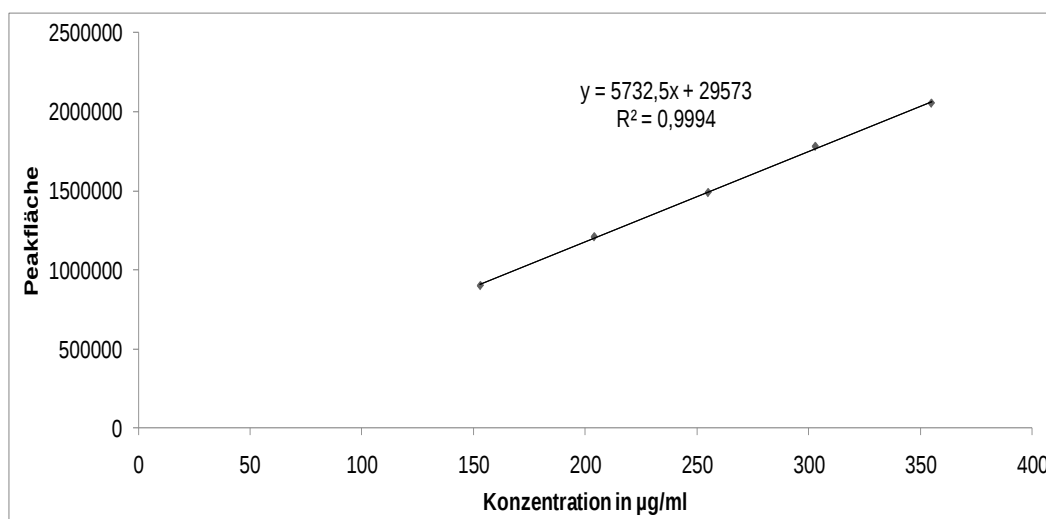
Weil bei 250nm das Bestimmtheitsmaß R^2 0,9991 betrug, konnte die Kalibrationsgerade für die Bestimmung von Cinnarizin verwendet werden.

Kalibrationsgerade von Cinnarizin bei 280nm

Die Ermittlung der Kalibrationsgerade bei 280nm erfolgte mit Hilfe der Konzentrationen und der entsprechenden Peakflächen der fünf Cinnarizin-Standardlösungen.

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
153	901494	897951	896004	898483
204	1208799	1208289	1205873	1207654
255	1484608	1486500	1491490	1487533
303	1781063	1779202	1781235	1780500
355	2055239	2052020	2054713	2053991

Tab. 3: Werte für die Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Abb. 6: Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Weil bei 280nm das Bestimmtheitsmaß R^2 0,9994 betrug, konnte die Kalibrationsgerade für die Bestimmung von Cinnarizin verwendet werden.

Wiederfindung von Cinnarizin

Die Wiederfindungen der drei Cinnarizin-Probeflösungen entsprechen, da die Werte in einem Bereich von 95% bis 105% liegen.

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	Wiederfind.	%
	Rep 1	Rep 2	Rep 3			
177	11510726	11515441	11513665	11513277	174,482	98,58
282	18410022	18419454	18411943	18413806	273,061	96,83
331	21943227	21962492	21962847	21956189	323,667	97,78

Tab. 4: Wiederfindung von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	Wiederfind.	%
	Rep 1	Rep 2	Rep 3			
177	1046106	1047389	1047004	1046833	169,543	95,79
282	1654133	1657364	1654093	1655197	270,937	96,08
331	1946334	1943945	1947290	1945856	319,381	96,49

Tab. 5: Wiederfindung von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

10.2 Photostabilitätsuntersuchungen

Die beiden Cinnarizin-Probeflösungen wurden im Suntest insgesamt 264 Minuten lang bei 300-800nm bestrahlt. Dabei haben sich keine Abbauprodukte gebildet. Im Chromatogramm war kein zusätzlicher Peak zum Cinnarizin-Peak sichtbar. (s. Abb. 7 und 8)

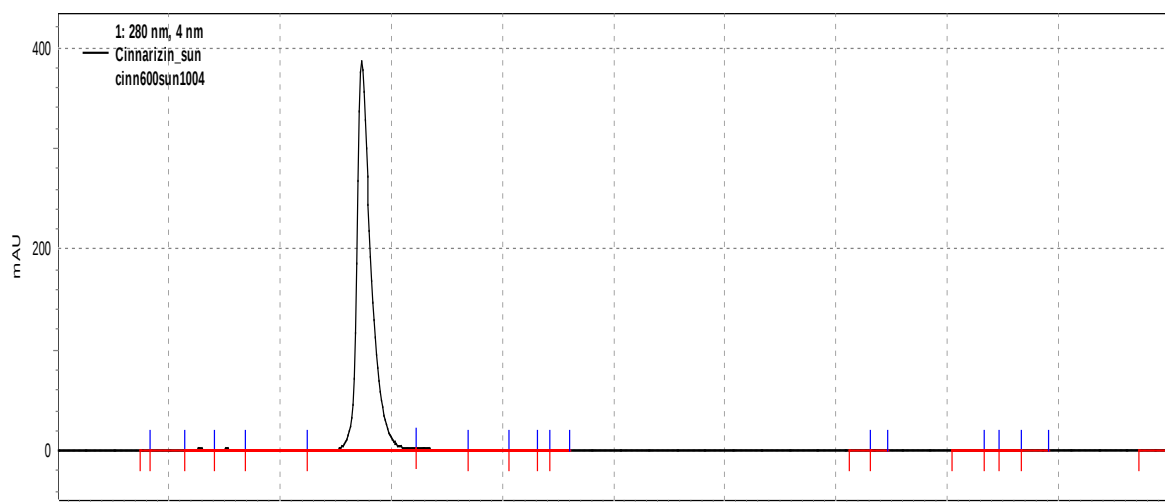


Abb. 7: Chromatogramm der Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 600µg/ml, die 264 Minuten lang im Suntest bestrahlt wurde

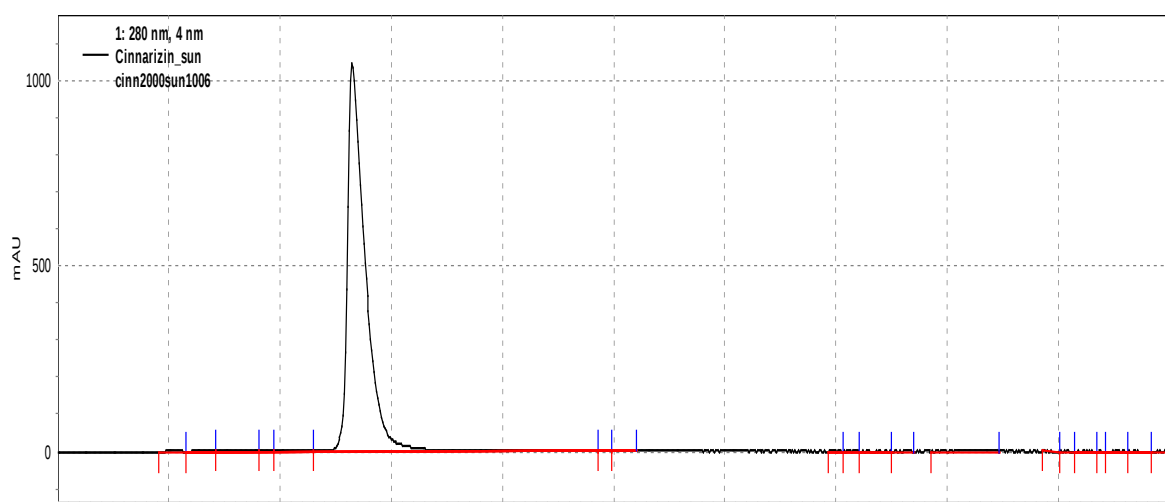


Abb. 8: Chromatogramm der Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2000µg/ml, die 264 Minuten lang im Suntest bestrahlt wurde

Die beiden Cinnarizin-Vergleichslösungen wurden im Trockenschrank insgesamt 259 Minuten bei 40°C erhitzt. Auch hier waren keine zusätzlichen Peaks von Abbauprodukten im Chromatogramm sichtbar. (s. Abb. 9 und 10)

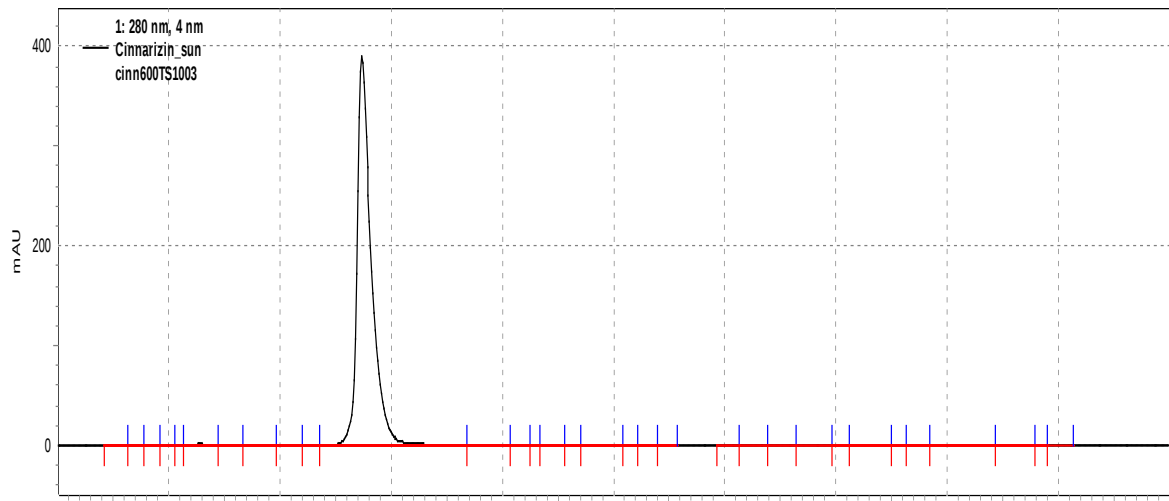


Abb. 9: Chromatogramm der Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 600µg/ml, die 259 Minuten lang im Trockenschrank erhitzt wurde

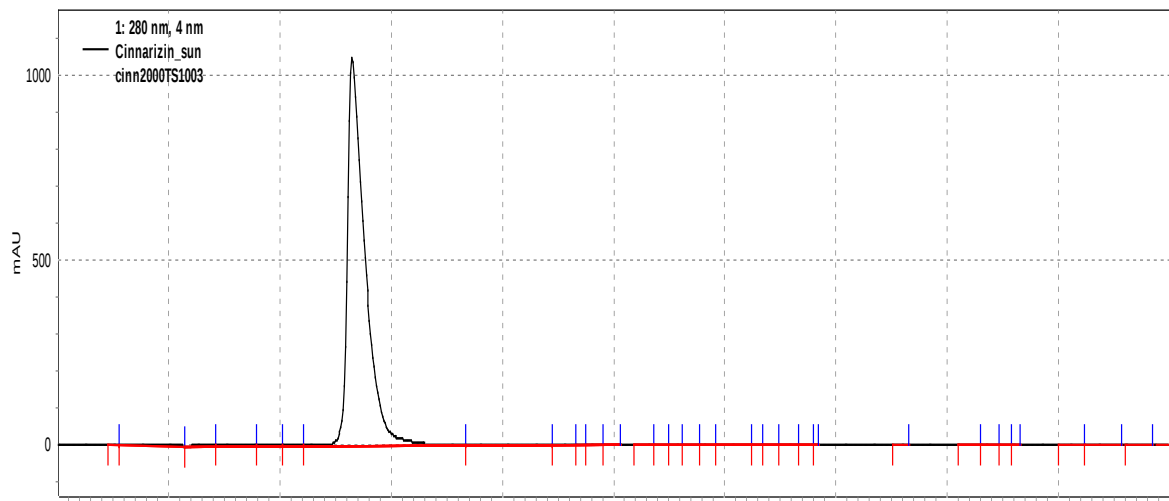


Abb. 10: Chromatogramm der Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2000µg/ml, die 259 Minuten lang im Trockenschrank erhitzt wurde

Somit wurde festgestellt, dass die Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 300-800nm für die Dauer von ca. 4,5 Stunden keinen Einfluss auf die Stabilität einer Cinnarizin-Lösung hat. Zudem haben sich auch keine wärmebedingten Abbauprodukte gebildet.

Bestrahlung bei UV 254nm

Nach der Bestrahlung waren noch ca. 2ml der Probeflösung übrig, die in eine Phiole gefüllt wurden. Beim Betrachten der Lösung fiel auf, dass diese leicht orange verfärbt war.

Nachdem die Lösung 1:10 mit Methanol verdünnt wurde, wurde sie ins HPLC-System injiziert. Im Chromatogramm war deutlich ein großer Peak bei Rt 3,3 zusätzlich zum Cinnarizin-Peak bei Rt 2,9 sichtbar. Außerdem waren noch drei kleine Peaks bei Rt 1,5, 2,1 und 4,2 vorhanden. (s. Abb. 11)

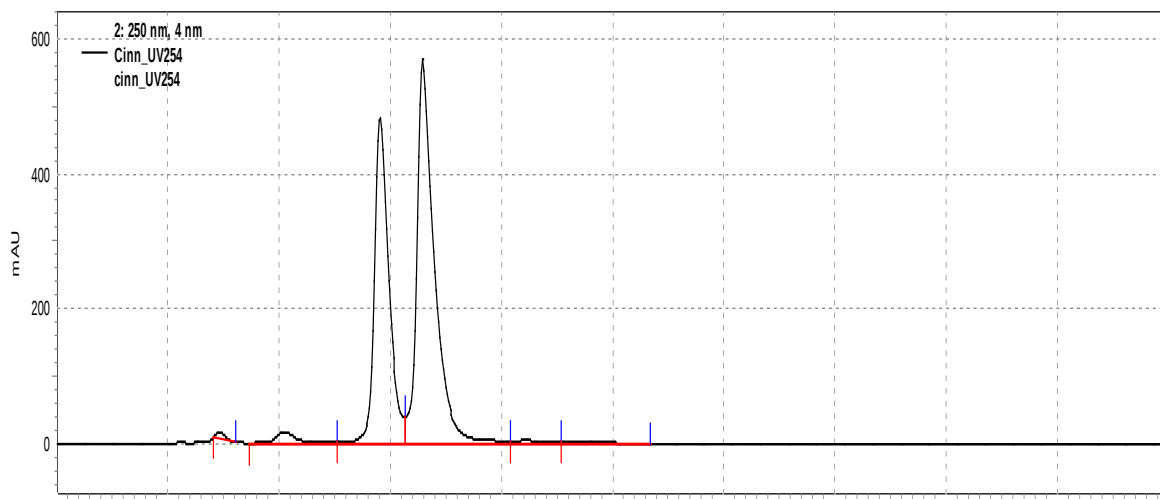


Abb. 11: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H₂O mit 2% Essigsäure (50:50), die eine Stunde lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (mobile Phase: Methanol/Ammoniumacetat-Puffer (70:30))

Durch die Bestrahlung mit der energetisch höheren Wellenlänge haben sich eindeutig vier detektierbare Abbauprodukte gebildet. Da die beiden Hauptpeaks im Chromatogramm nicht basisliniengetrennt waren, wurde die Konzentration der mobilen Phase verändert. Dazu wurde die bereits bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung statt mit 70% Methanol mit 65% Methanol eluiert. Die Peaks wurden jedoch nicht getrennt, zudem kam es auch noch zu starkem Tailing. (s. Abb. 12)

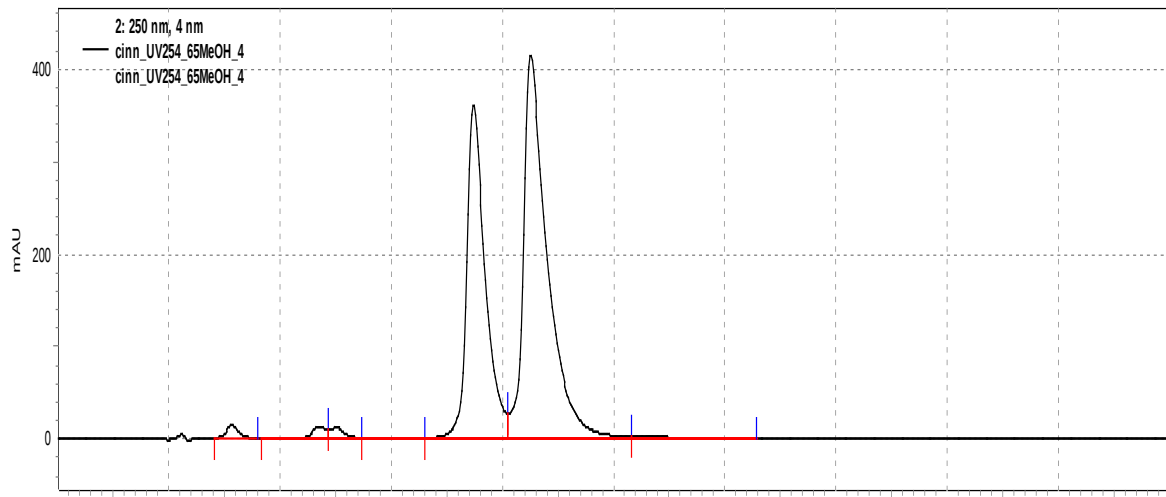


Abb. 12: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probelösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Ammoniumacetat-Puffer (65:35) eluiert wurde

Daraufhin wurde mit 60% Methanol eluiert. Dies führte zwar zu einer etwas besseren Peaktrennung, aber auch zu starkem Tailing. (s. Abb. 13)

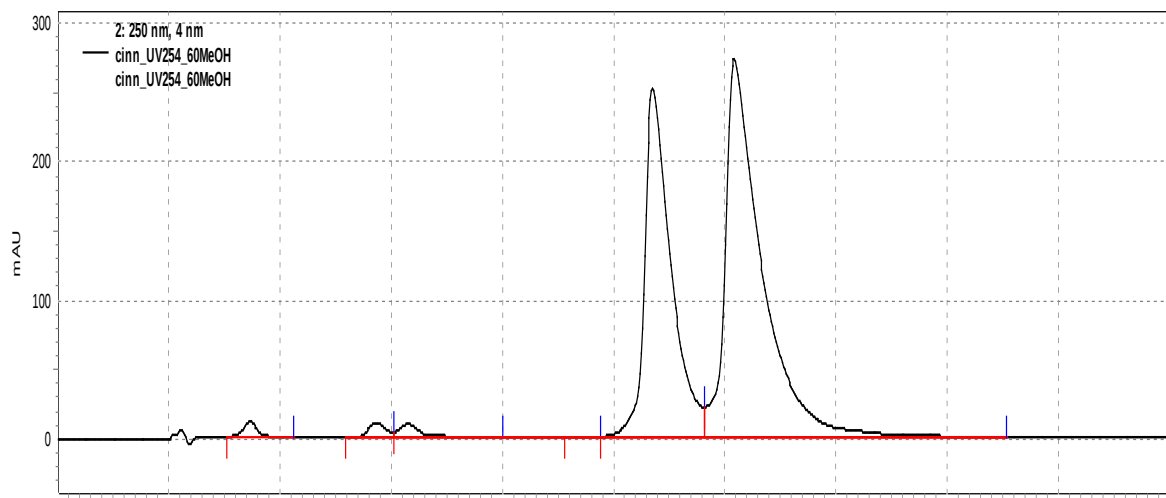


Abb. 13: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probelösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Ammoniumacetat-Puffer (60:40) eluiert wurde

Um dieses Tailing zu vermeiden, wurde die Zusammensetzung der mobilen Phase verändert. Statt des wässrigen Ammoniumacetat-Puffers wurde nun ein wässriger 0,05M Triethylamin-Puffer mit pH 4 verwendet. Die bestrahlte Cinnarizin-Probelösung wurde wieder injiziert und mit dem neuen Puffer und 60% Methanol eluiert. Die beiden Hauptpeaks wurden wieder nicht basisliniengetrennt, dafür wurde das Tailing stark reduziert. (s. Abb. 14)

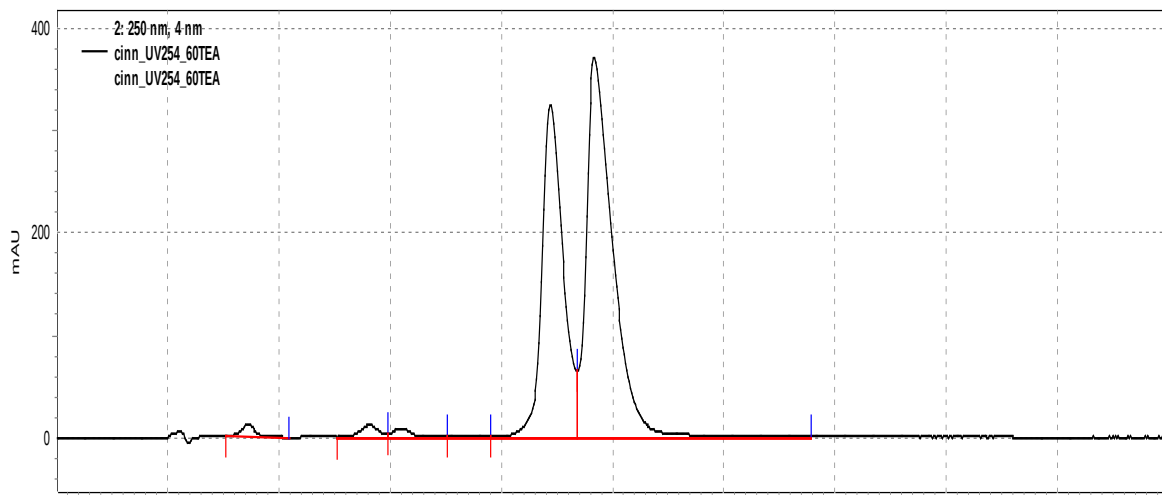


Abb. 14: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Triethylamin-Puffer (60:40) eluiert wurde

Als nächster Schritt wurde die bisher verwendete ODS Hypersil-Säule gegen eine BDS Hypersil C18-Säule ausgetauscht. Im Chromatogramm waren die Peaks nun besser getrennt und auch wesentlich symmetrischer. (s. Abb. 15)

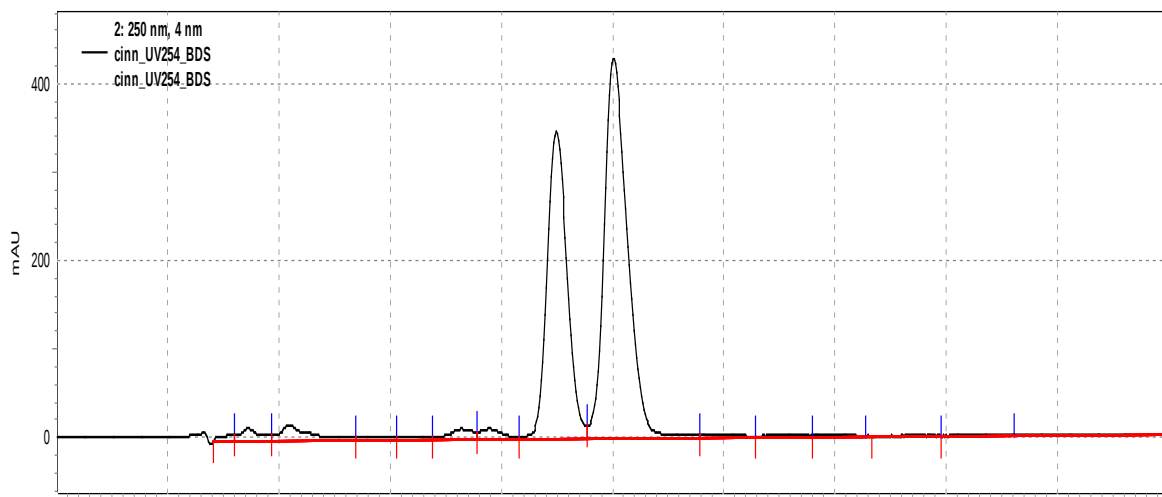


Abb. 15: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Triethylamin-Puffer (60:40) eluiert wurde. (Säule: BDS-Hypersil C18)

Um eine Basislinientrennung zu erhalten, wurde wieder der Anteil an Methanol in der mobilen Phase verändert. Zuerst wurde der Anteil von 60% auf 70% Methanol erhöht. Dies führte zu keiner besseren Peaktrennung, außerdem eluierte die Probeflösung zu schnell, sodass zwei kleinere Peaks im Vergleich zu Abb. 15 nicht mehr sichtbar waren. (s. Abb. 16)

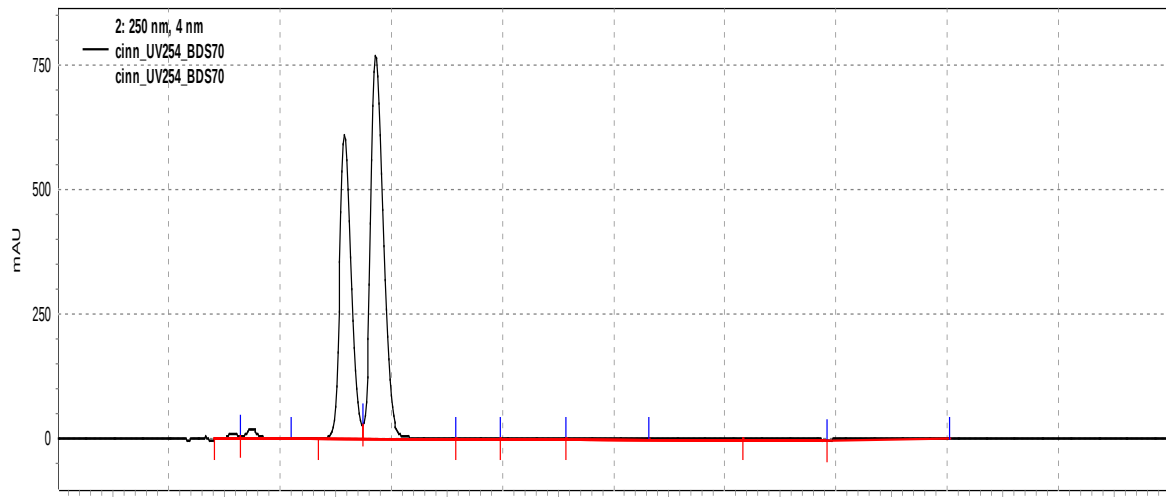


Abb. 16: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probelösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30) eluiert wurde. (Säule: BDS-Hypersil C18)

Auch nachdem der Anteil an Methanol auf 65% erniedrigt wurde, war ein kleiner Peak, der in Abb. 15 zu sehen war, nicht mehr vorhanden. (s. Abb. 17)

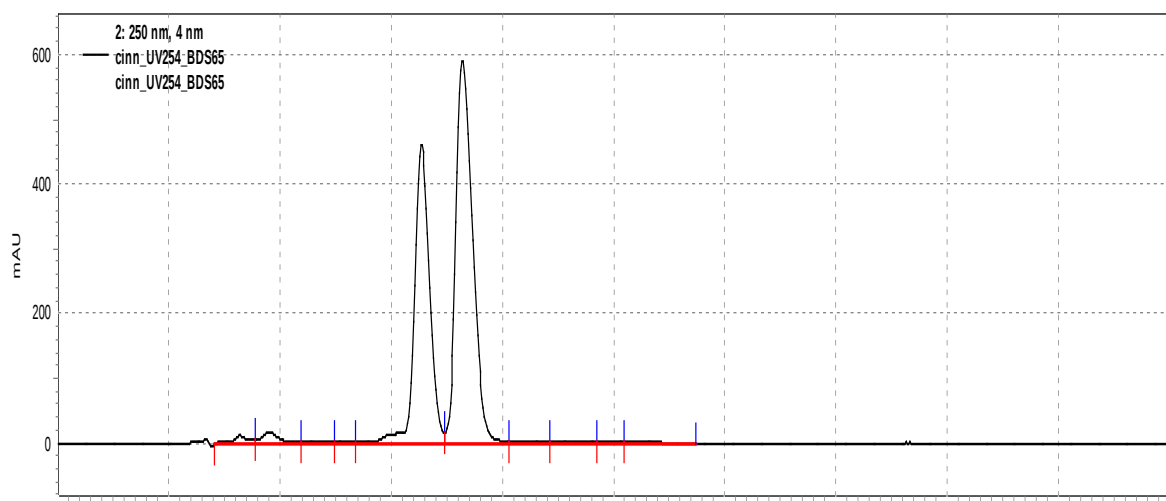


Abb. 17: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probelösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Triethylamin-Puffer (65:35) eluiert wurde. (Säule: BDS-Hypersil C18)

Somit wurde festgestellt, dass bei der Elution mit 60% Methanol die Peaktrennung auf der BDS-Säule noch am besten erfolgt.

Nachweis der gebildeten Abbauprodukte mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Beim Betrachten unter der UV-Lampe bei 254nm waren auf der DC-Platte der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung drei Banden mit den Rf-Werten 0,47, 0,56 und 0,94 zu sehen. Die letztere Bande befand sich in der Fließmittelfront und fluoreszierte schwach bei 366nm. Ein Teil der Probeflösung blieb auf der Startlinie zurück und fluoreszierte ebenfalls bei 366nm. Bei diesem Teil dürfte es sich um sehr polare Substanzen bzw. Abbauprodukte handeln. (s. Abb. 18)



Abb. 18: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: 5µl, 10µl und 15µl UV-bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)

Bei der Elution mit Ethylacetat, der mit 2N Ammoniak gesättigt wurde, war sowohl bei der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung als auch beim Cinnarizin-Standard eine Bande mit dem Rf-Wert 0,84 sichtbar. Das bedeutete, dass Cinnarizin in der Probeflösung noch vorhanden war und nicht vollständig abgebaut wurde. Zusätzlich befand sich bei der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung wieder eine schwache Bande in der Fließmittelfront bei Rf 0,92 und eine Bande auf der Startlinie. (s. Abb. 19)

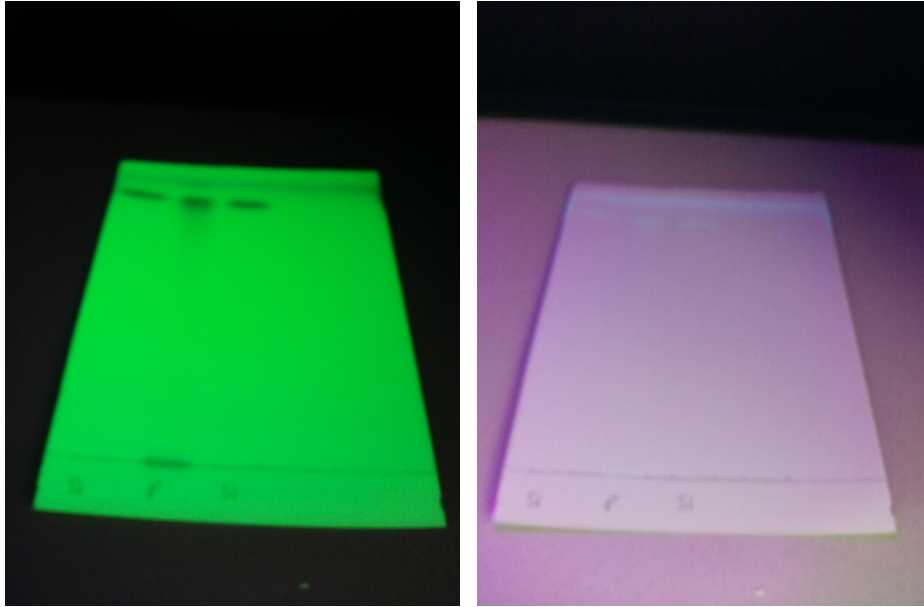


Abb. 19: DC mit folgendem Auftrageschema: links und rechts: Cinnarizin-Standard, Mitte: UV-bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat gesättigt mit 2N Ammoniak (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)

Wurde jedoch bei der Elution reines Ethylacetat verwendet, befand sich bei der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung auf Höhe des Cinnarizin-Standards keine Bande. Dadurch wurde der Anschein erweckt, dass in der Probeflösung kein Cinnarizin mehr enthalten sei.

Zur Veranschaulichung dieser Tatsache dienen die folgenden Fotos der DC-Platten.

Bei der ersten DC hatten die beiden Banden des Cinnarizin-Standards die R_f -Werte 0,74 und 0,77. Bei der Cinnarizin-Probeflösung waren die R_f -Werte der Banden 0,5, 0,59 und 0,98. Zudem blieb wieder ein Teil der Probeflösung auf der Startlinie zurück. (s. Abb. 20)

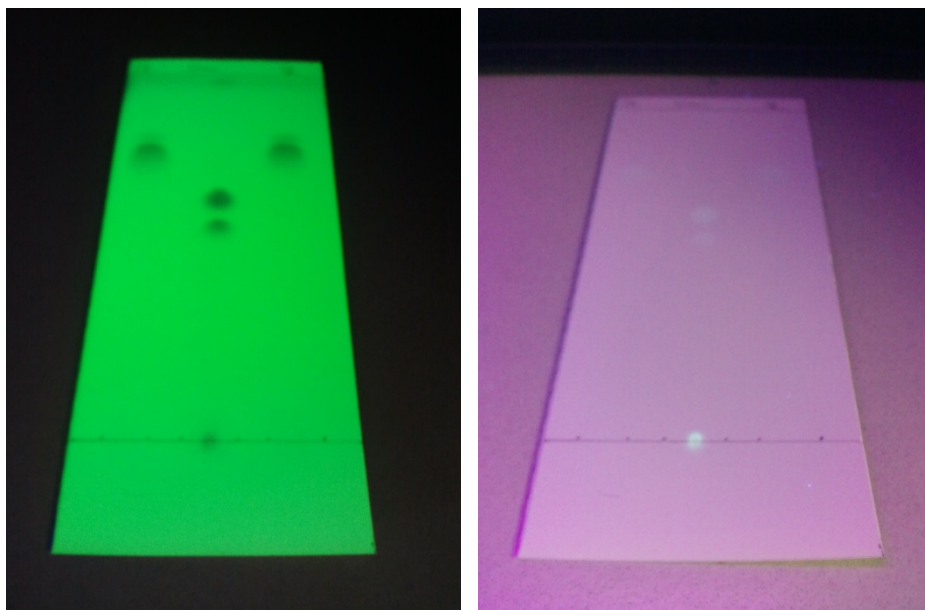


Abb. 20: Erste DC mit folgendem Auftrageschema: links und rechts: Cinnarizin-Standard, Mitte: UV-bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)

Beim nächsten Versuch befanden sich die Banden des Cinnarizin-Standards und der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung wieder nicht auf gleicher Höhe. (s. Abb. 21)

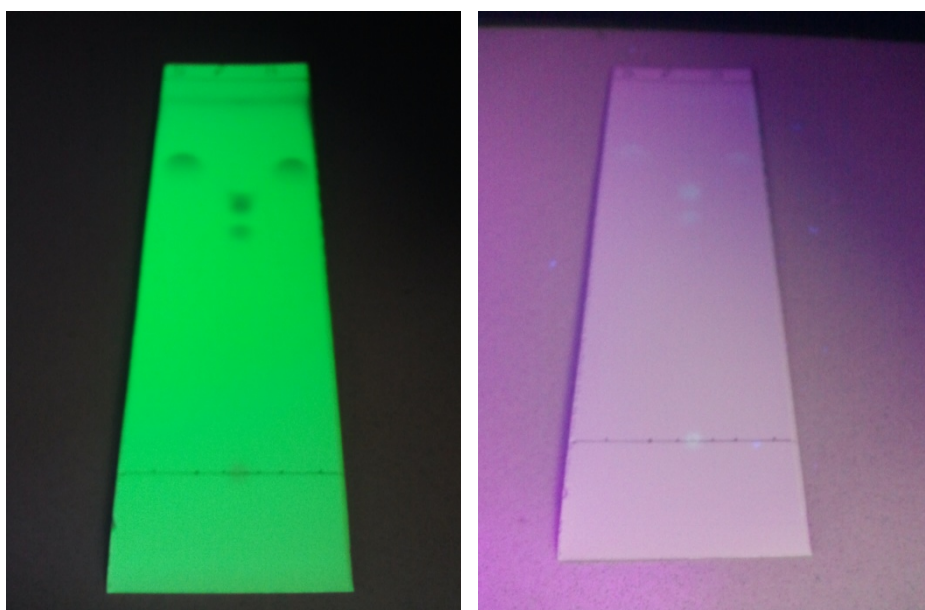


Abb. 21: Zweite DC mit folgendem Auftrageschema: links und rechts: Cinnarizin-Standard, Mitte: UV-bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)

Auch beim letzten Versuch waren die Banden der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung mit den Rf-Werten 0,56 und 0,93 deutlich getrennt von der Bande des Cinnarizin-Standards bei Rf 0,67. (s. Abb. 22)

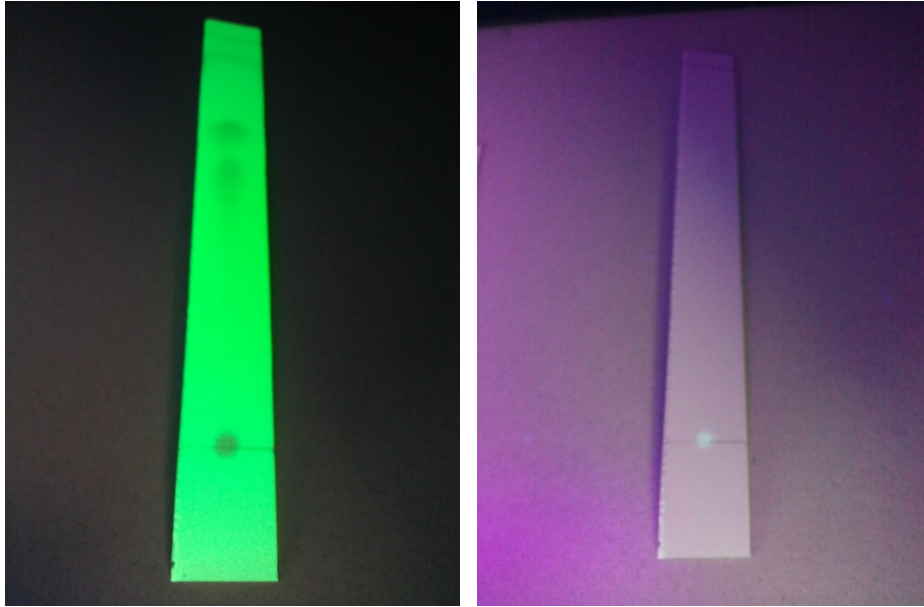


Abb. 22: Dritte DC mit folgendem Auftrageschema: links und rechts: Cinnarizin-Standard, Mitte: UV-bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)

Um diesem Phänomen nachzugehen, wurden zur Kontrolle die Lösungen der DC ins HPLC-System injiziert. Dazu wurde zuerst eine Mischung aus 980µl Cinnarizin-Probeflösung und 20µl Cinnarizin-Standard injiziert. (s. Abb. 23)

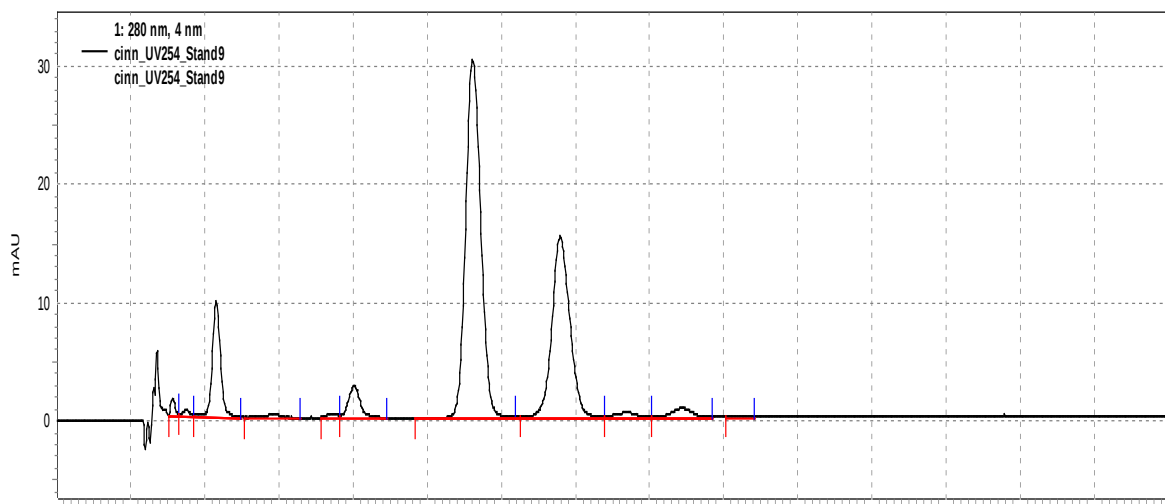


Abb. 23: Chromatogramm der Mischung aus UV-bestrahlter Cinnarizin-Probeflösung und Cinnarizin-Standard, beide Lösungen stammten von vorherigen DC-Untersuchungen (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$)

Danach wurden die Probeflösung und der Standard separat injiziert. (s. Abb. 24 und 25)

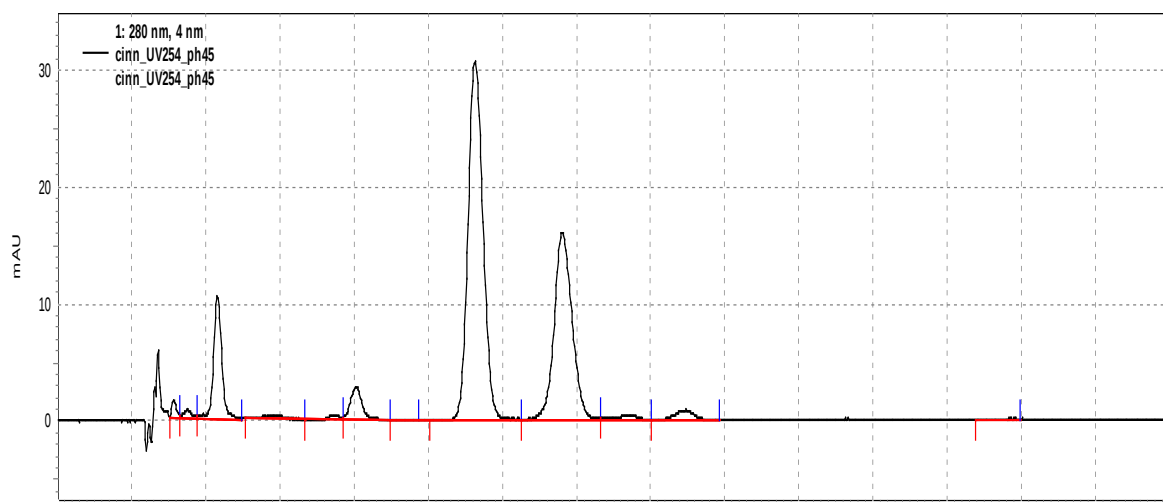


Abb. 24: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die auch auf DC-Platten aufgetragen wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$)

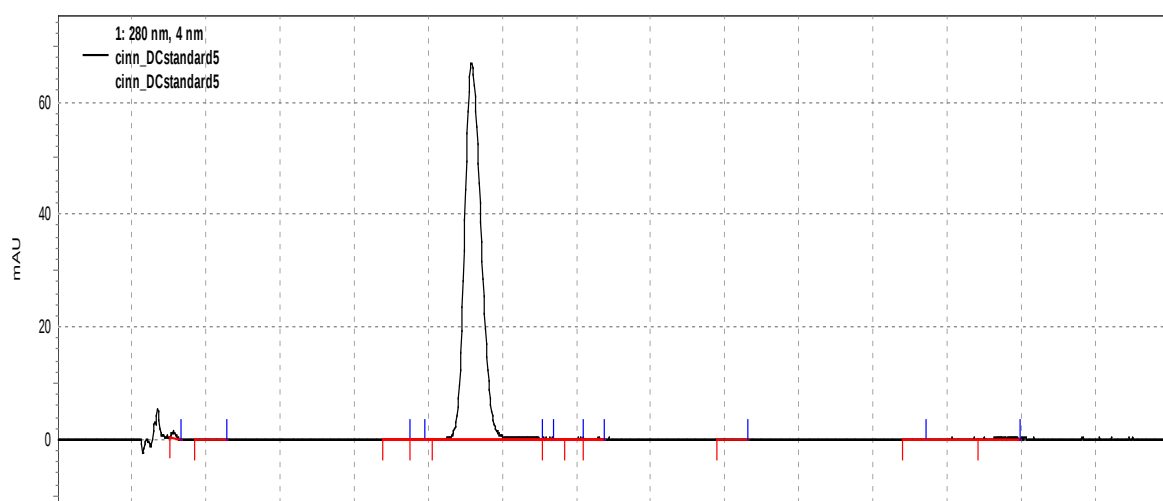


Abb. 25: Chromatogramm des Cinnarizin-Standards, der auch auf DC-Platten aufgetragen wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$)

Beim Vergleich der Peakflächen der Cinnarizin-Probeflösung und der Mischung fiel auf, dass bei der Mischung der Cinnarizin-Peak bei R_t 5,3 kaum erhöht war. Wahrscheinlich war der Anteil von 2% Standard in der Mischung zu gering, um einen deutlichen Anstieg in der Peakfläche zu erhalten. Immerhin wurde dadurch auch bewiesen, dass bei der Mischung kein zusätzlicher Peak im Chromatogramm auftrat. Das bedeutete, dass in der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung noch Cinnarizin enthalten sein musste.

Verlauf der Abbauproduktbildung bei UV 245nm

Bereits nach 10 Minuten war auf dem Chromatogramm die Peakflächenvergrößerung des Peaks bei Rt 6,9 nach dem Cinnarizin-Peak bei Rt 5,6-5,8 zu sehen. (s. Abb. 26)

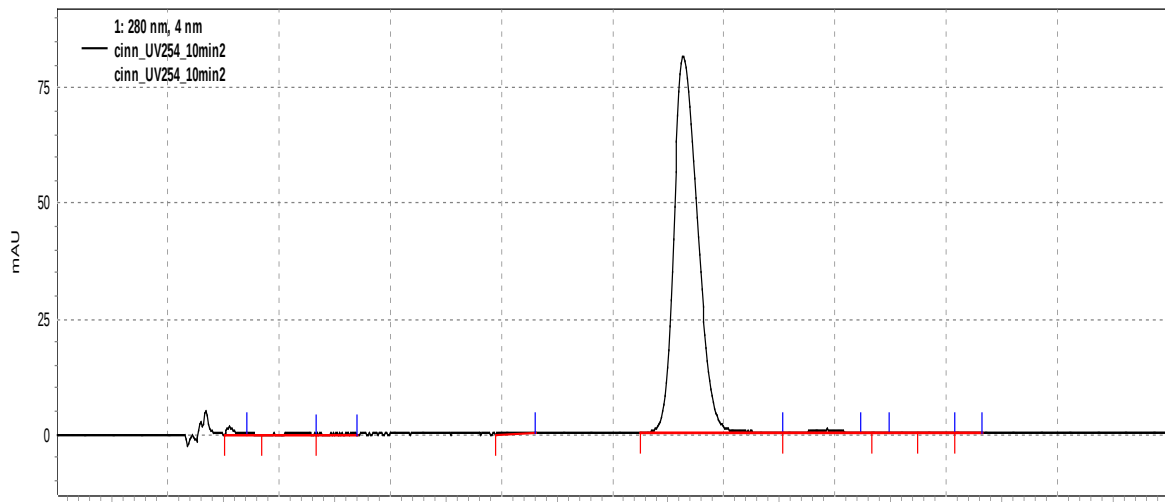


Abb. 26: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H₂O mit 2% Essigsäure (50:50), die 10 Minuten lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$)

Dieser Peak machte nach 2 Stunden Bestrahlung ca. 23% der Gesamtpeakfläche aus. (s. Abb. 27)

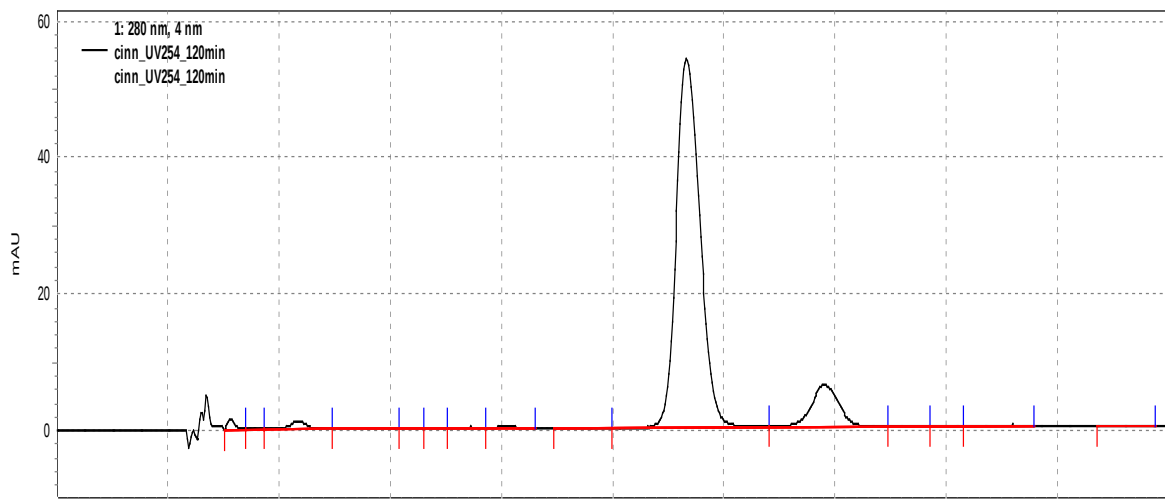


Abb. 27: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H₂O mit 2% Essigsäure (50:50), die 120 Minuten lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$)

Nach etwa 90 Minuten nahm auch die Peakfläche bei Rt 2,1 zu. Die Peakflächen bei Rt 4,1 und Rt 8,5 wurden ab ca. 240 Minuten größer, wobei der Peak bei Rt 8,5 ab 480 Minuten eine doppelt so große Peakfläche wie der Peak bei Rt 4,1 besaß. (s. Abb. 28)

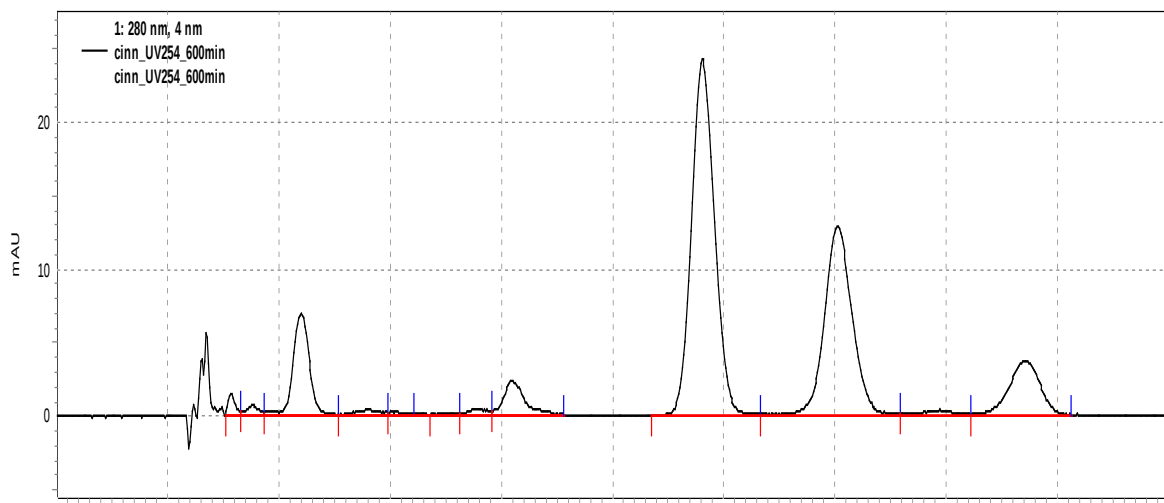


Abb. 28: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probelösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H₂O mit 2% Essigsäure (50:50), die 600 Minuten lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$)

Nach 17 Stunden Bestrahlung waren fünf Hauptpeaks zu sehen, wobei der Cinnarizin-Peak mit 34,29% und der Peak bei Rt 6,9-7 mit 22,19% die beiden größten Peaks waren. Der Peak bei Rt 4,1 hatte dagegen mit 7,63% den geringsten Anteil an der Gesamtfläche. (s. Abb. 29)

Die Peaks der Abbauprodukte waren in Form und Anzahl jenen der ersten UV-bestrahlten Cinnarizin-Probelösung sehr ähnlich.

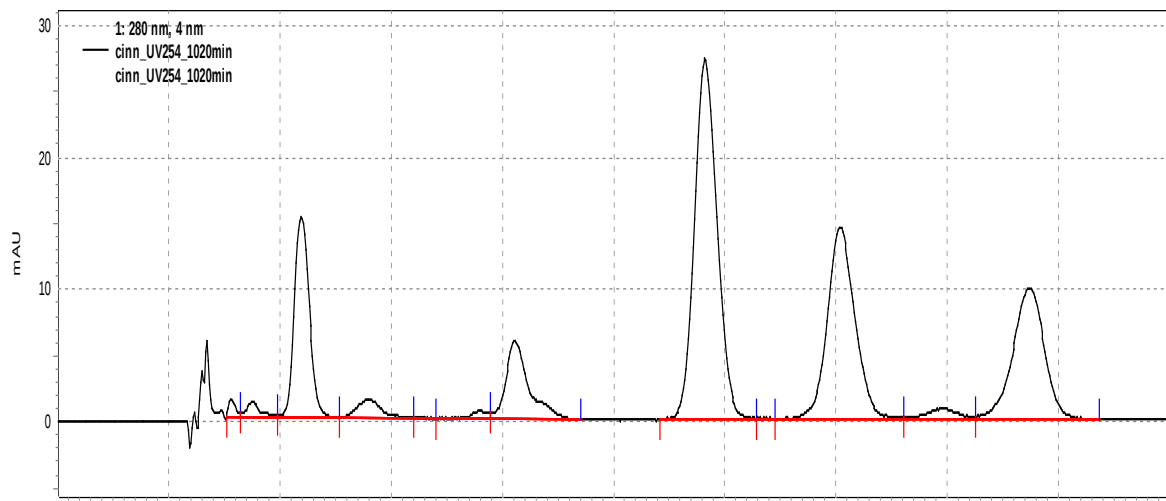


Abb. 29: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probelösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H₂O mit 2% Essigsäure (50:50), die 1020 Minuten lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$)

Die folgenden Tabellen dienen zur Veranschaulichung der wachsenden Peakflächen nach den jeweiligen Bestrahlungsintervallen.

Minuten	Peak bei Rt 2,1		Peak bei Rt 4,1		Cinnarizin Rt 5,6-5,8		Peak bei Rt 6,9-7		Peak bei Rt 8,5	
	Area	Area %	Area	Area %	Area	Area %	Area	Area %	Area	Area %
0					1255281	99,52				
10	2884	0,23			1219658	97,43	15969	1,28		
20	3683	0,32			1112755	96,65	24681	2,14		
30	3793	0,33			1106448	95,42	35675	3,08		
40	5391	0,48	1618	0,14	1057436	94,18	44225	3,94		
50	6358	0,58	1823	0,17	1021638	93,17	56676	5,17		
60	6841	0,64	1303	0,12	990797	92,25	62873	5,85		
70	9177	0,88	2266	0,22	952268	90,9	69255	6,61	2576	0,25
80	9102	0,87	1956	0,19	952934	90,65	78958	7,51		
90	10987	1,04	3152	0,3	921419	87,53	88988	8,45	4073	0,39
100	9355	0,94	2631	0,27	875957	88,44	92787	9,37		
110	11479	1,18	3745	0,39	834094	85,79	100409	10,33	4057	0,42
120	13506	1,41	5487	0,57	803253	83,68	109276	11,38	3575	0,37
180	17881	2,17	6477	0,79	635351	77,21	143121	17,39	6678	0,81
240	23699	3,05	6145	0,79	535793	69,01	175015	22,54	13334	1,72
300	30768	4,25	10021	1,38	454806	62,82	188656	26,06	20236	2,8
360	40560	5,67	18117	2,53	399692	55,89	198871	27,81	26870	3,76
420	48295	6,53	22607	3,05	383487	51,82	213098	28,8	35725	4,83
480	58161	7,75	26421	3,52	359656	47,93	215749	28,75	50242	6,7
540	63206	8,1	29691	3,8	362937	46,5	226831	29,06	64541	8,27
600	70850	8,93	32621	4,11	351940	44,35	225335	28,39	75744	9,54
660	78954	9,16	43492	5,05	368504	42,75	233156	27,05	94938	11,01
720	93052	10,58	51366	5,84	356399	40,54	227020	25,82	107238	12,2
780	103176	10,65	59996	6,19	374857	38,7	244364	25,23	128208	13,24
840	112046	11,08	63969	6,32	384221	37,99	250191	24,74	146254	14,46
900	120916	11,53	70979	6,77	379516	36,19	249108	23,76	161771	15,43
960	133107	12,19	78780	7,21	382428	35,01	248880	22,78	178139	16,31
1020	143985	12,65	86897	7,63	390369	34,29	252565	22,19	195390	17,19

Tab. 6: Verlauf der Peakflächenzunahme der Abbauprodukte einer Cinnarizin-Probelösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H₂O mit 2% Essigsäure (50:50) bei Bestrahlung mit UV 254nm (Detektion bei λ =280nm)

Minuten	Cinnarizin bei Rt 5,6-5,8		Peak bei Rt 6,9-7	
	Area	Area %	Area	Area %
0	13620149	99,91		
10	13218388	97,31	331270	2,44
20	11997247	95,26	568402	4,51
30	12018791	92,54	854199	6,58
40	11495321	90,78	1082675	8,55
50	10983881	89,41	1266148	10,31
60	10691729	87,56	1441048	11,8
70	10295328	85,64	1633946	13,59
80	10280345	84,08	1873319	15,32
90	9914665	82,1	2066632	17,11
100	9485439	79,37	2247050	18,8
110	9015167	78,34	2372423	20,62
120	8634402	75,61	2569984	22,51
180	6876970	64,35	3533772	33,07
240	5764484	56,37	4211704	41,18
300	4902682	50,28	4596973	47,14
360	4333885	45,03	4875044	50,66
420	4106323	42,02	5176629	52,97
480	3903061	39,97	5314016	54,41
540	3934202	38,8	5557097	54,81
600	3795226	38,56	5476116	55,64
660	3969514	38,06	5735045	54,99
720	3884238	37,67	5676651	55,06
780	4052071	37,71	5935810	55,25
840	4130698	37,16	6070108	54,61
900	4039115	37,25	5959667	54,97
960	4122634	36,94	6053831	54,25
1020	4234948	36,98	6219632	54,31

Tab. 7: Verlauf der Peakflächenzunahme des Hauptabbauproduktes einer Cinnarizin-Probelösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H₂O mit 2% Essigsäure (50:50) bei Bestrahlung mit UV254nm (Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$)

Nachweis der gebildeten Abbauprodukte mittels Massenspektrometrie (MS)

Die Molekulargewichte der Hauptfragmente des Abbauproduktes mit der Rt 2,2 betrugen 326, 284, 239 und 167. (s. Abb. 30)

Cinnarizin2.2 #2-45 RT: 0.04-0.99 AV: 44 NL: 1.97E6
T: + p ESI Full ms [80.00-1500.00]

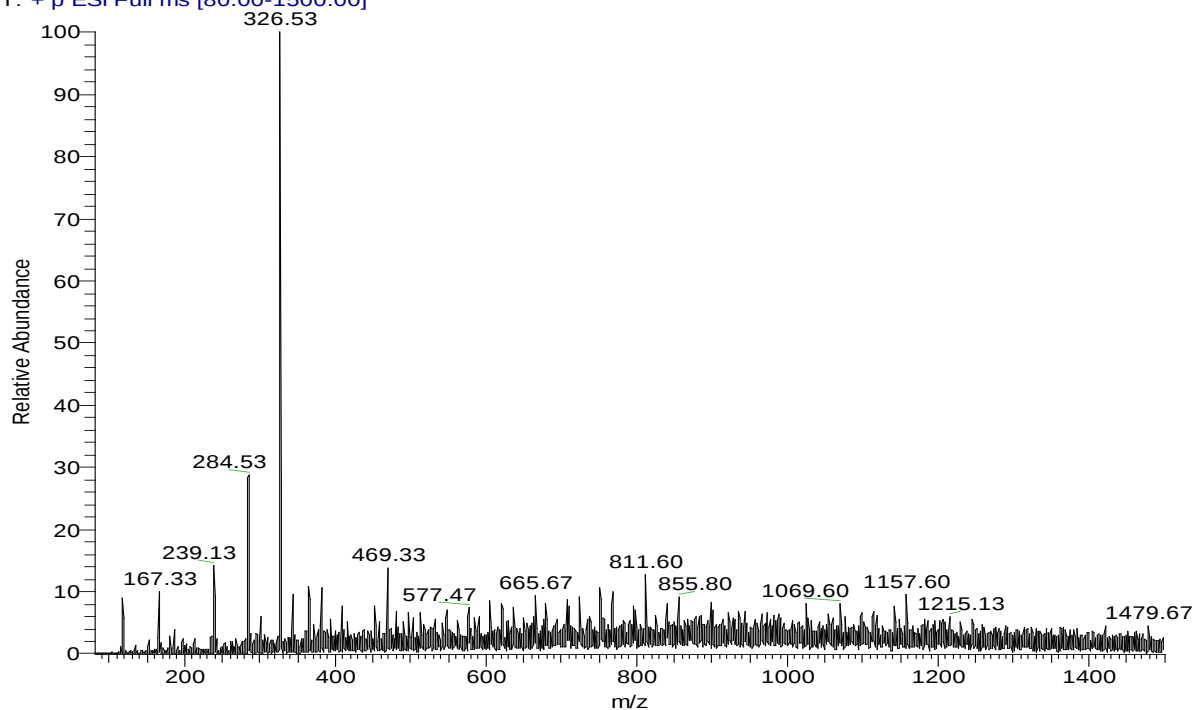


Abb. 30: Massenspektrum des Cinnarizin-Abbauproduktes mit der Rt 2,2

Bei der Substanz mit der Rt 4,1 betrugen die Molekulargewichte der Fragmente 402, 326 und 239. (s. Abb. 31)

Cinnarizin4.1 #2-27 RT: 0.04-0.60 AV: 26 NL: 3.88E5
T: + p ESI Full ms [85.00-1500.00]

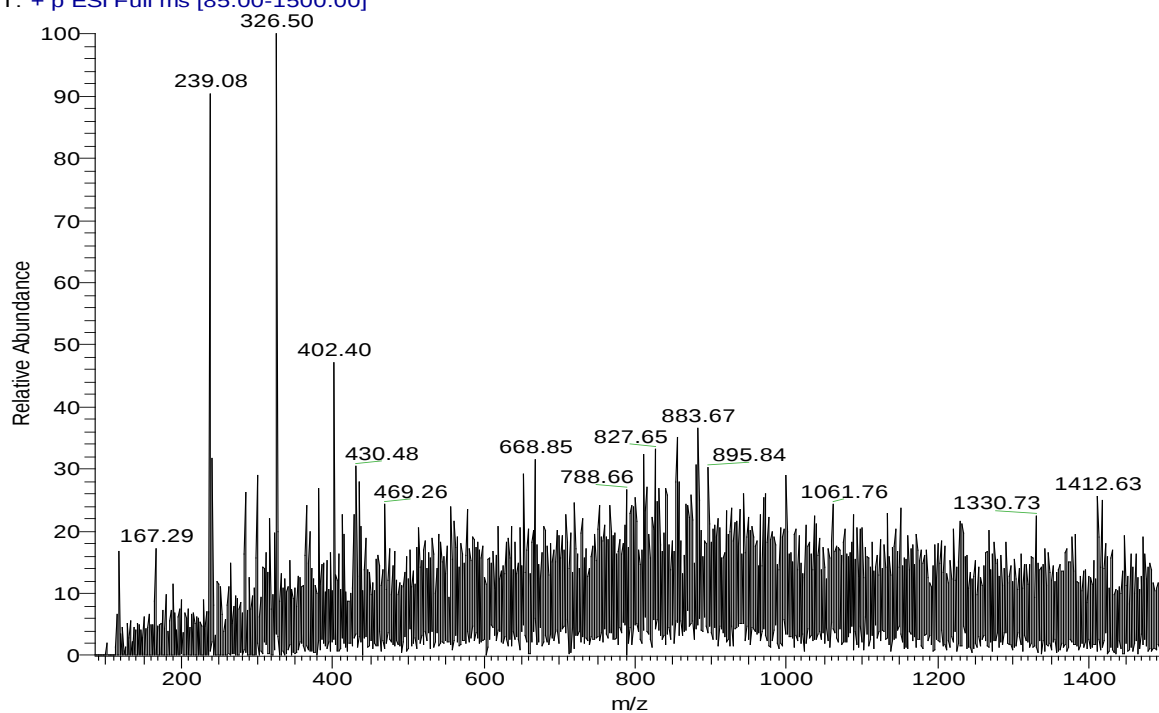


Abb. 31: Massenspektrum des Cinnarizin-Abbauproduktes mit der Rt 4,1

Beim Cinnarizin mit der Rt 8,9 wurden Fragmente mit den Molekulargewichten 369, 239 und 167 gefunden. (s. Abb. 32)

Cinnarizin8.9 #4-40 RT: 0.08-0.88 AV: 37 NL: 1.32E6
T: + p ESI Full ms [85.00-1500.00]

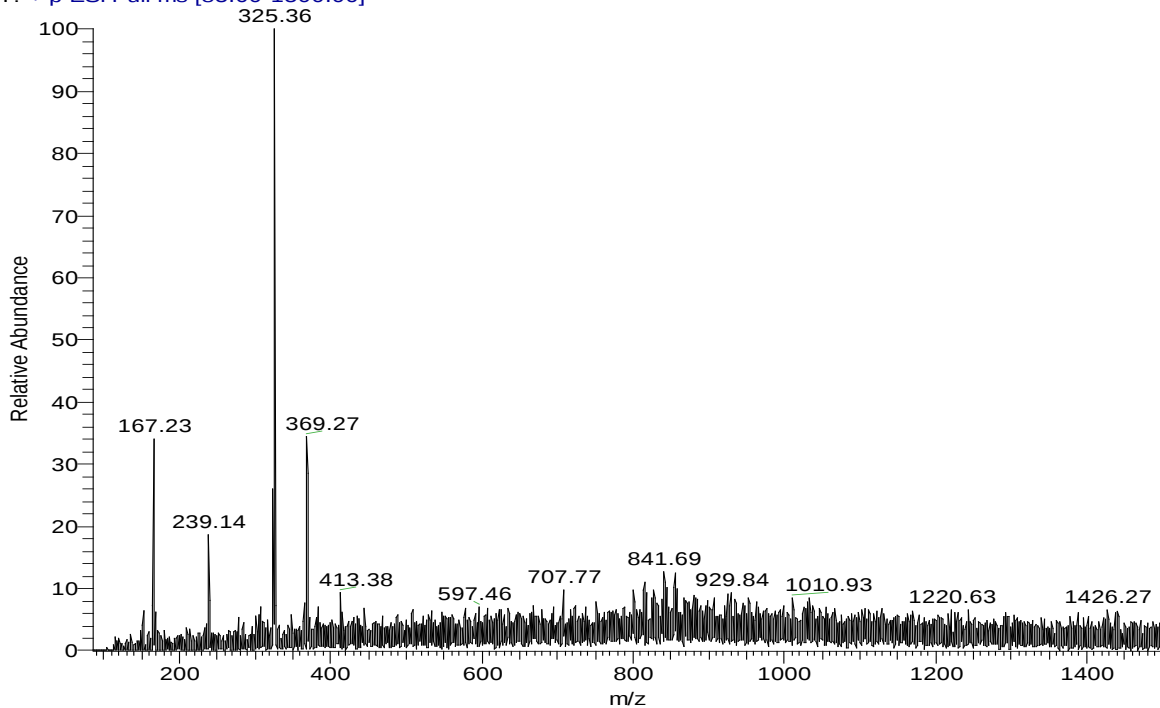


Abb. 32: Massenspektrum des Cinnarizins mit der Rt 8,9

Die beiden Hauptfragmente bei Rt 12,1 besaßen die MG 369 und 167. (s. Abb. 33)

Cinnarizin12 #2-27 RT: 0.04-0.60 AV: 26 NL: 1.70E6
T: + p ESI Full ms [85.00-1500.00]

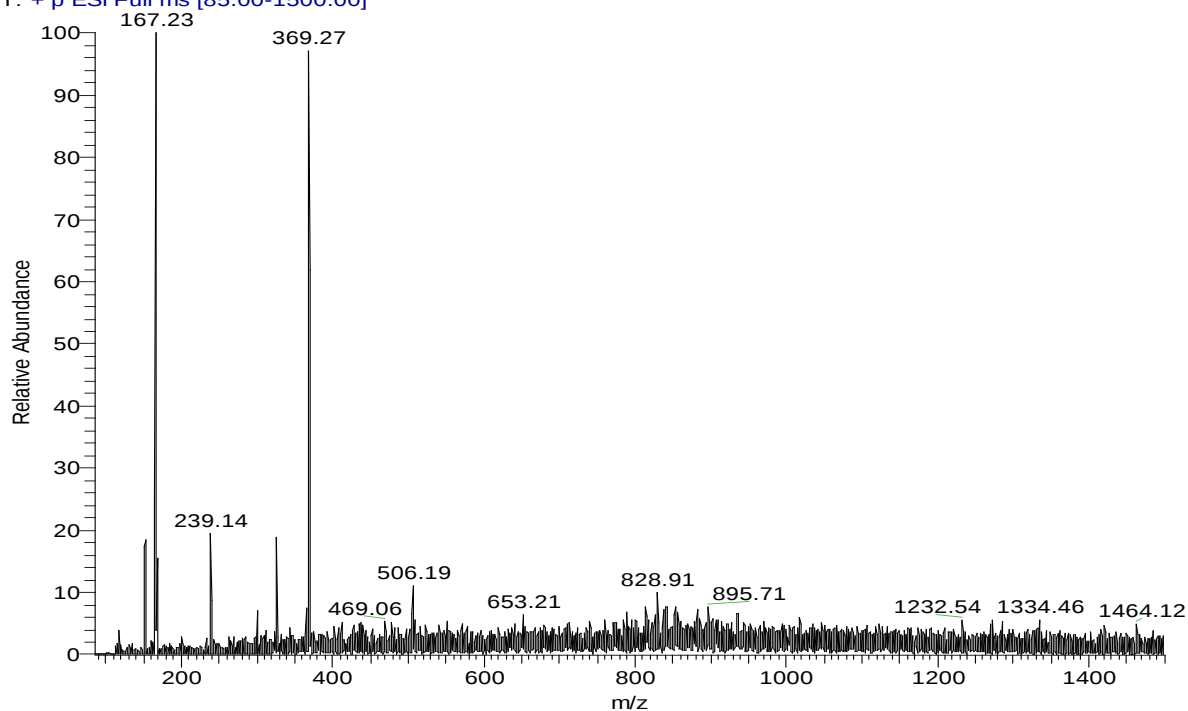


Abb. 33: Massenspektrum des Cinnarizin-Abbauproduktes mit der Rt 12,1

Zum Schluss erschienen beim Abbauprodukt mit der Rt 16,2 Fragmente mit den MG 469, 301 und 239. (s. Abb. 34)

Cinnarizin16.2 #2-45 RT: 0.03-0.97 AV: 44 NL: 8.56E5
T: + p ESI Full ms [100.00-1500.00]

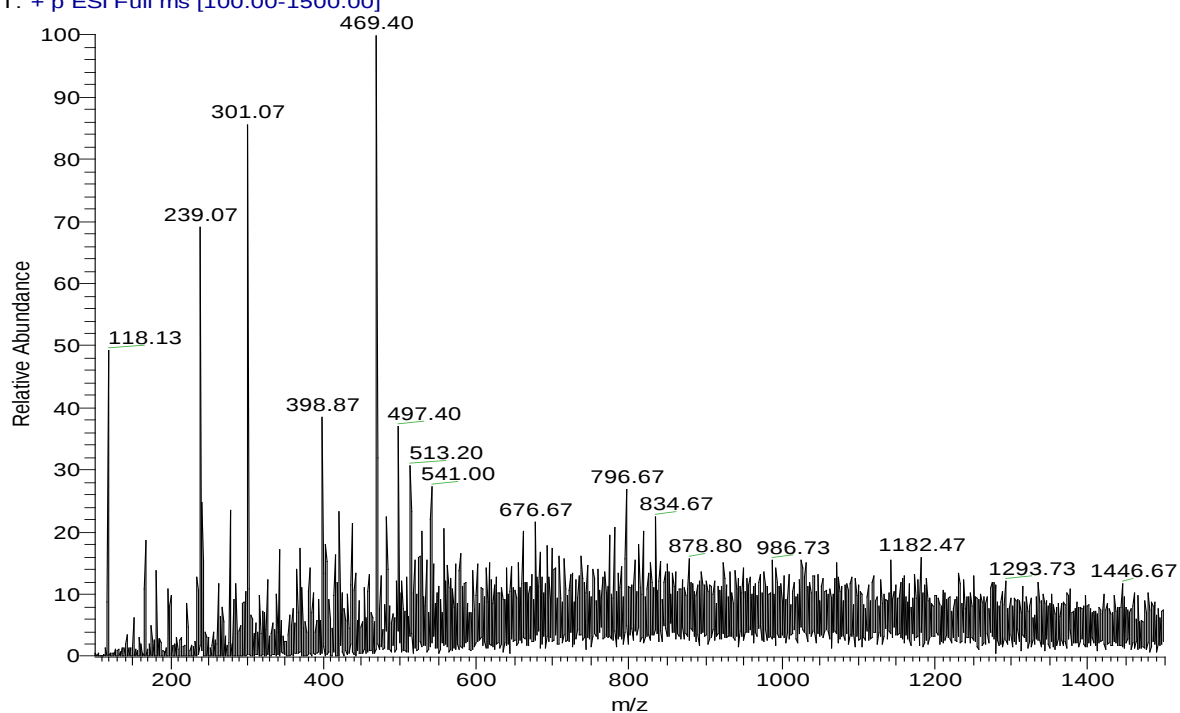


Abb. 34: Massenspektrum des Cinnarizin-Abbauproduktes mit der Rt 16,2

Bei der Berechnung des wahren Molekulargewichts muss man ein Wasserstoffatom vom Wert abziehen, da die Fragmente im Massenspektrometer ionisiert vorlagen.

Es war zu erkennen, dass die Fragmente mit den MG 239 und 167 öfter auftraten. Bemerkenswert war auch, dass beim Peak mit der Rt 12,1 dieselben Fragmente wie beim Cinnarizin selbst auftraten. Diese Tatsache ließ vermuten, dass es sich bei der Substanz mit der Rt 12,1 um das *cis*-Isomer des Cinnarizins handeln könnte.

Identifizierung der Abbauprodukte anhand ihrer Molekulargewichte

Um nun die Strukturformeln dieser Abbauprodukte herauszufinden, wurden die Molekulargewichte der Massenspektren mit den Molekulargewichten von bekannten Abbauprodukten aus Studien verglichen. Sehr hilfreich dabei war die Studie von *Hassan et al.* [15] in welcher nicht nur related substances, sondern auch durch Hydrolyse entstehende Abbauprodukte abgebildet waren. Die Autoren fanden die folgenden 6 Abbauprodukte: Zimtaldehyd (MG 132), Zimtalkohol (MG 134), Benzophenon (MG 182), Benzhydrol (MG 184), Cinnamylpiperazin (MG 202) und Benzhydrylpiperazin (MG 252). (s. Abb. 35)

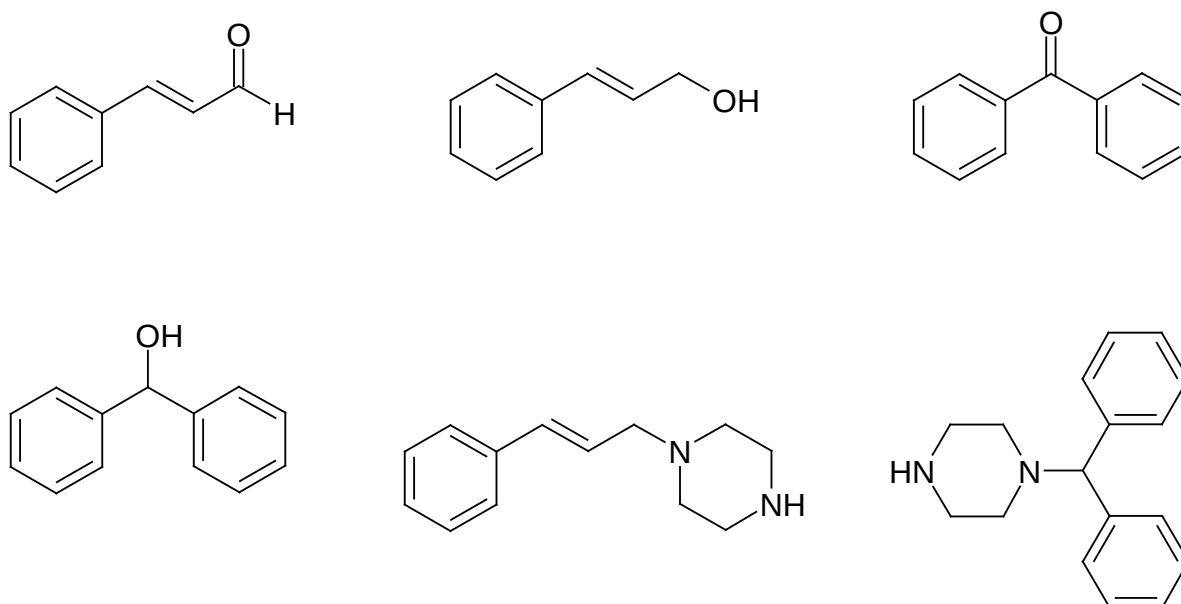


Abb. 35: Strukturformeln von links nach rechts: Zimtaldehyd, Zimtalkohol, Benzophenon, Benzhydrol, Cinnamylpiperazin und Benzhydrylpiperazin

Beim Vergleich ließen sich die Molekulargewichte der Massenspektren keiner der genannten Substanzen zuordnen. Als nächstes wurde die Strukturformel des Benzhydrols mit dem MG des kleinsten Fragments aus der Massenspektrometrie verglichen. Der Unterschied zwischen diesen beiden MG betrug 18 und konnte von der OH-Gruppe und dem tertiären

Wasserstoffatom stammen. Tatsächlich beträgt das MG des Diphenylmethan-Ions 167, was somit ein identifiziertes Abbauprodukt bzw. Fragment darstellte. (s. Abb. 36)

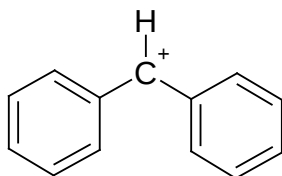


Abb. 36: Strukturformel des Diphenylmethan-Ions

Um mögliche Fehler bei der Messung auszuschließen, wurden die Substanzen aus den Eppendorf-Caps nochmal vermessen. Bis auf kleine Abweichungen bei Rt 4,1 stimmten die Werte der MG mit denen der ersten Messung überein. Bei beiden Messungen wurde auch jeweils ein Cinnarizin Standard mit einer Konzentration von ca. 1mg/ml Methanol injiziert, welcher die MG 369 und 167 lieferte.

Schließlich wurden die Abbauprodukte aus denselben Eppendorf-Caps mit einem Massenspektrometer mit höherer Auflösung vermessen, um ein genaueres Massenspektrum inklusive Summenformel-Berechnung zu erhalten (Abb. siehe Anhang).

Bei der Substanz mit der Rt 2,2 wurden das MG 239,2243 mit der Summenformel C₁₃ H₂₇ N₄ und das MG 301,2231 mit der Summenformel C₁₄ H₂₉ N₄ O₃ gefunden.

Bei der Substanz mit der Rt 4,1 wurden das MG 326,3799 mit der Summenformel C₂₂ H₄₈ N und das MG 469,4011 mit der Summenformel C₃₂ H₅₃ O₂ gefunden.

Bei der Substanz mit der Rt 12 wurden das MG 403,1769 mit der Summenformel C₂₈ H₂₃ N₂ O und das MG 440,1800 mit der Summenformel C₂₃ H₂₆ N₃ O₆ gefunden.

Als letztes wurde bei der Substanz mit der Rt 16,2 wieder das MG 239,2225 mit der Summenformel C₁₃ H₂₇ N₄ gefunden.

Im Vergleich zu den beiden ersten Massenspektren wurde hier beim Peak mit der Rt 2,2 nur das Fragment mit dem MG 239 bestätigt, dafür wurde noch das Fragment mit dem MG 301 gefunden. Beim Peak mit der Rt 4,1 konnte nur das Fragment mit dem MG 326 bestätigt werden, dafür wurde hier zusätzlich das Fragment mit dem MG 469 gefunden. Beim Abbauprodukt mit der Rt 12,1 wurde kein Fragment der ersten beiden Messungen gefunden, stattdessen wurden Fragmente mit den MG 403 und 440 gefunden. Zuletzt wurde beim Peak mit der Rt 16,2 nur das Fragment mit dem MG 239 wiedergefunden. Aufgrund der abweichenden Ergebnisse wird vermutet, dass die Probelösungen bei der letzten Messung schon gealtert waren und deshalb keine verlässlichen Ergebnisse mehr lieferten. Zudem war es nicht möglich, trotz der vorgeschlagenen Summenformeln, auf die Strukturformeln der Abbauprodukte zu schließen.

Bestrahlung bei UV 366nm

Bei der einstündigen Bestrahlung einer Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50) bei UV 366nm haben sich keine Abbauprodukte gebildet. Auf dem Chromatogramm war kein Peak zusätzlich zum Cinnarizin-Peak sichtbar. (s. Abb. 37)

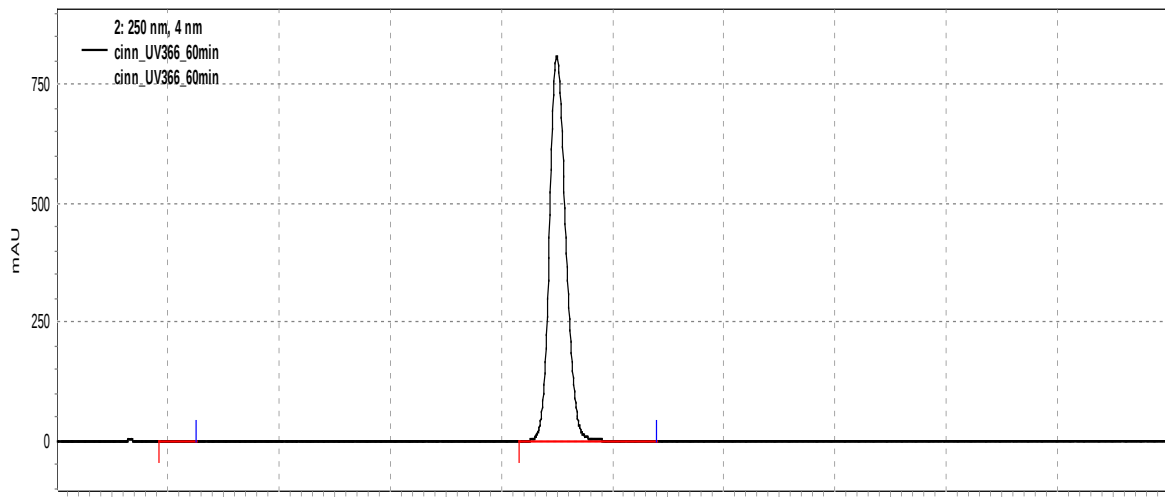


Abb. 37: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H₂O mit 2% Essigsäure (50:50), die 60 Minuten lang mit UV 366nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$)

Auch nachdem die Cinnarizin-Probeflösung eine weitere Stunde bei 366nm bestrahlt wurde, war kein zusätzlicher Peak auf dem Chromatogramm sichtbar. (s. Abb. 38)

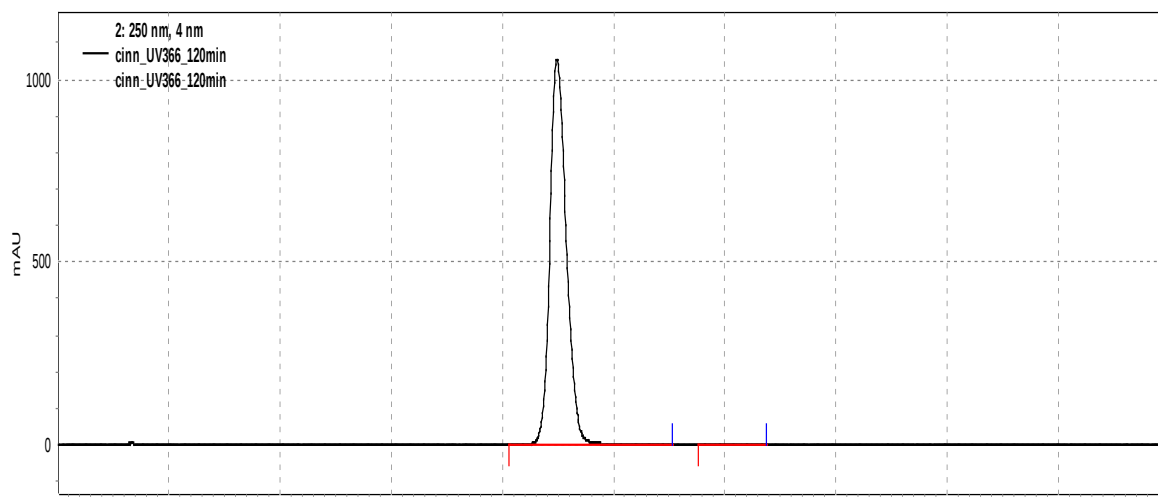


Abb. 38: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H₂O mit 2% Essigsäure (50:50), die 120 Minuten lang mit UV 366nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$)

Das Bestrahlen einer Cinnarizin-Lösung mit UV-Licht bei 366nm hat somit keinen Einfluss auf die Stabilität von Cinnarizin.

10.3 Hydrolyse von Cinnarizin im sauren Medium

Beim ersten Versuch war im Chromatogramm der fünf Tage alten Cinnarizin-Lösung kein zusätzlicher Peak zu sehen (s. Abb. 39). Dafür waren im Chromatogramm der zehn Tage alten Cinnarizin-Lösung insgesamt zwei Peaks zu sehen, wobei der erste bei Rt 1 vermutlich von der Salzsäure und der zweite bei Rt 2,7 vom Cinnarizin selbst stammte (s. Abb. 40). Das heißt in beiden Fällen haben sich keine Abbauprodukte gebildet.

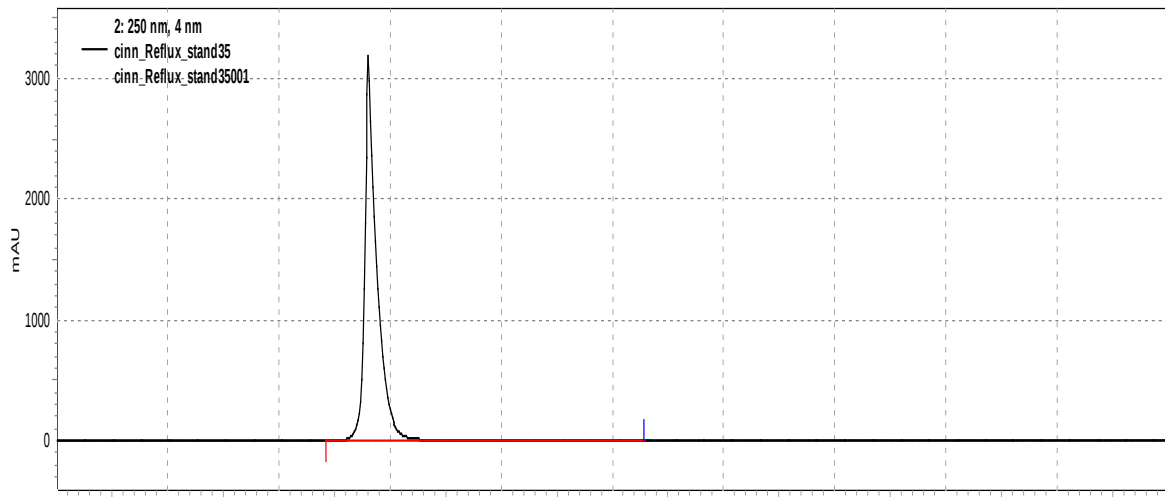


Abb. 39: Chromatogramm einer fünf Tage alten Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 355µg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30), die 1 Stunde lang bei 100°C am Rückflusskühler erhitzt wurde

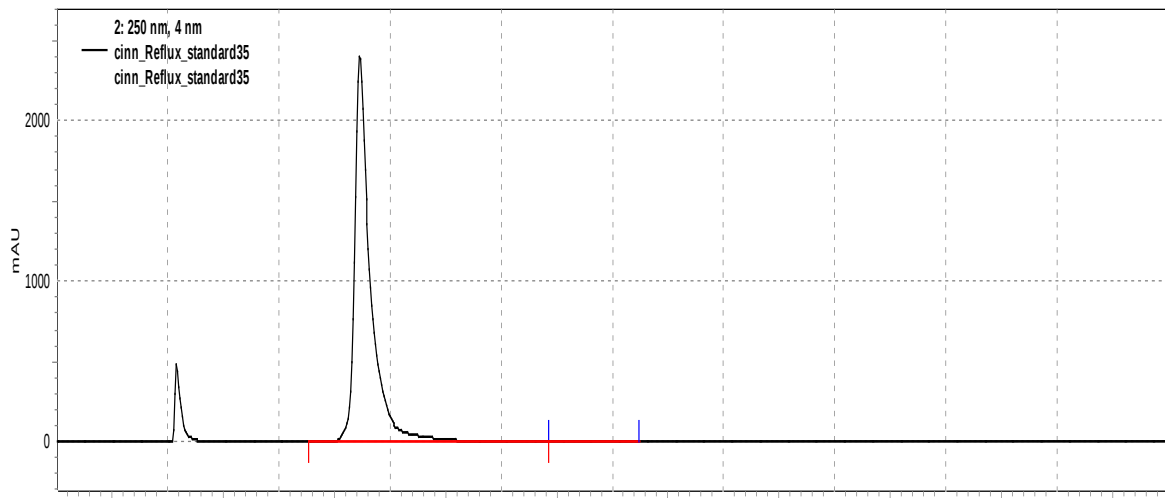


Abb. 40: Chromatogramm einer zehn Tage alten Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 353µg/ml Wasser/6N Salzsäure (4:1), die 1 Stunde lang bei 100°C am Rückflusskühler erhitzt wurde

Da beim zweiten Versuch der Hydrolyse von Cinnarizin weiße Kristalle entstanden, wurden die darauffolgenden Untersuchungen einmal nur an den Kristallen, einmal nur an der Mutterlauge und schließlich an der Mutterlauge-Kristall-Mischung durchgeführt.

Nachweis der Hydrolyse-Produkte mittels Dünnschichtchromatographie (DC)

Beim Betrachten der DC-Platte unter der UV-Lampe fiel auf, dass sowohl bei der Kristall-Lösung als auch bei der Mutterlauge-Kristall-Mischung keine Banden auf Höhe des Cinnarizin-Standards zu sehen waren. Bei beiden Lösungen war je eine starke Bande in der Fließmittelfront erkennbar. Dies deutete daraufhin, dass es sich bei den Abbauprodukten um sehr lipophile Substanzen handelte. Bei der Mutterlauge-Kristall-Mischung befand sich zusätzlich eine starke Bande auf der Startlinie, was wiederum auf eine sehr polare Substanz hindeutete. Außerdem waren bei der Kristall-Lösung und der Mutterlauge-Kristall-Mischung auch keine Banden auf Höhe des UV-bestrahlten Cinnarizins zu sehen. Dafür befanden sich sowohl bei der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung als auch bei der Mutterlauge-Kristall-Mischung jeweils intensiv fluoreszierende Banden auf der Startlinie. Dies ließ vermuten, dass sich bei der Hydrolyse ähnliche Abbauprodukte wie bei der UV-Bestrahlung bilden. Bemerkenswert war auch, dass hier, im Gegensatz zu den DC-Versuchen der Photostabilitätsprüfung, bei der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung eine Bande auf Höhe des Cinnarizin-Standards zu sehen war. (s. Abb. 41)

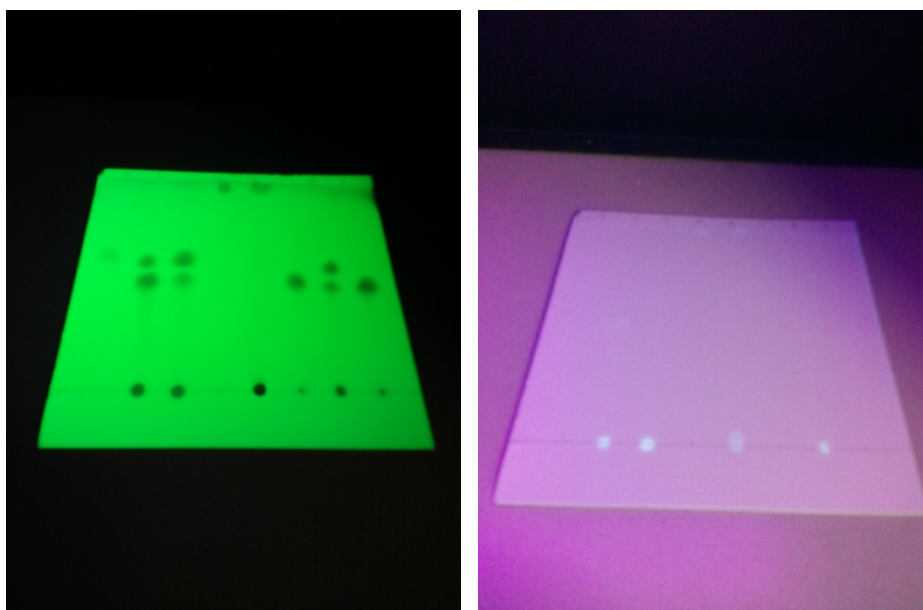


Abb. 41: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Kristall-Lösung, Mutterlauge-Kristall-Mischung, Cinnarizin-Standard, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)

Bei der nächsten DC befanden sich die Banden der beiden Kristall-Lösungen und der Mutterlauge-Kristall-Mischung wieder in der Fließmittelfront bei R_f 0,91. Auch die starke Bande auf der Startlinie war bei der Mutterlauge-Kristall-Mischung wieder vorhanden. Zudem waren bei der Cinnarizin-Standardlösung nun zwei Banden bei R_f 0,45 und 0,54 sichtbar, die

sich auf gleicher Höhe wie die beiden Banden der UV-bestrahlten Cinnarizin-Lösung befanden. (s. Abb. 42)

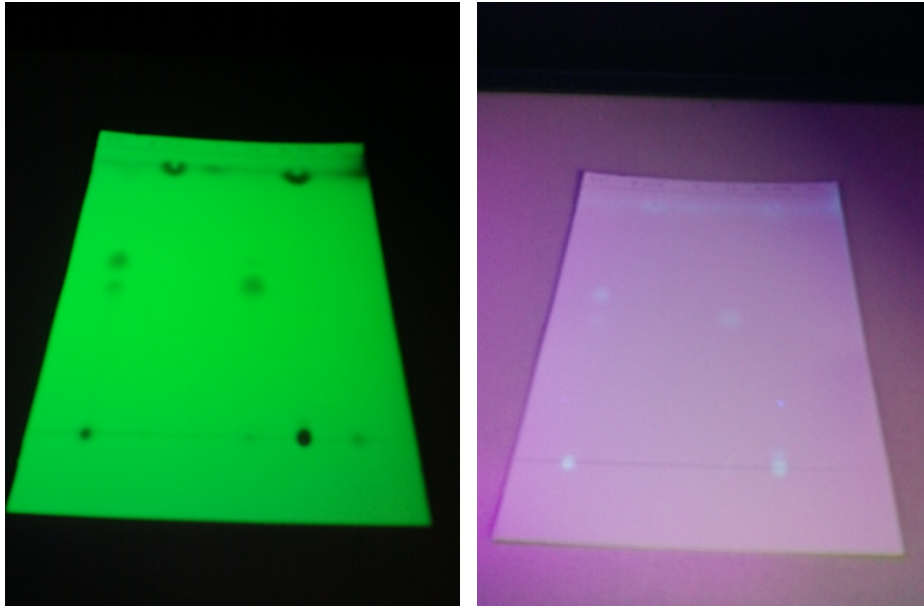


Abb. 42: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: UV-bestrahltes Cinnarizin, Kristall-Lösung in CDCl_3 , Kristall-Lösung in MeOH, Cinnarizin-Standard, Mutterlauge-Kristall-Mischung, Mutterlauge (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)

Der Versuch wurde wiederholt, indem die Reihenfolge der Probelösungen verändert wurde und die Mutterlauge und die methanolische Kristall-Lösung konzentrierter aufgetragen wurden. Das Ergebnis blieb unverändert.

Nachweis der Hydrolyse-Produkte mittels HPLC

Im HPLC-Chromatogramm der Mutterlauge war nur ein großer Peak bei R_t 1,7 sichtbar (s. Abb. 43). Dieser Peak konnte aber nicht vom Cinnarizin stammen, da Cinnarizin bei einer mobilen Phase aus 60% Methanol und 40% 0,05M Triethylaminpuffer pH 4 mit der R_t 5,8 eluiert.

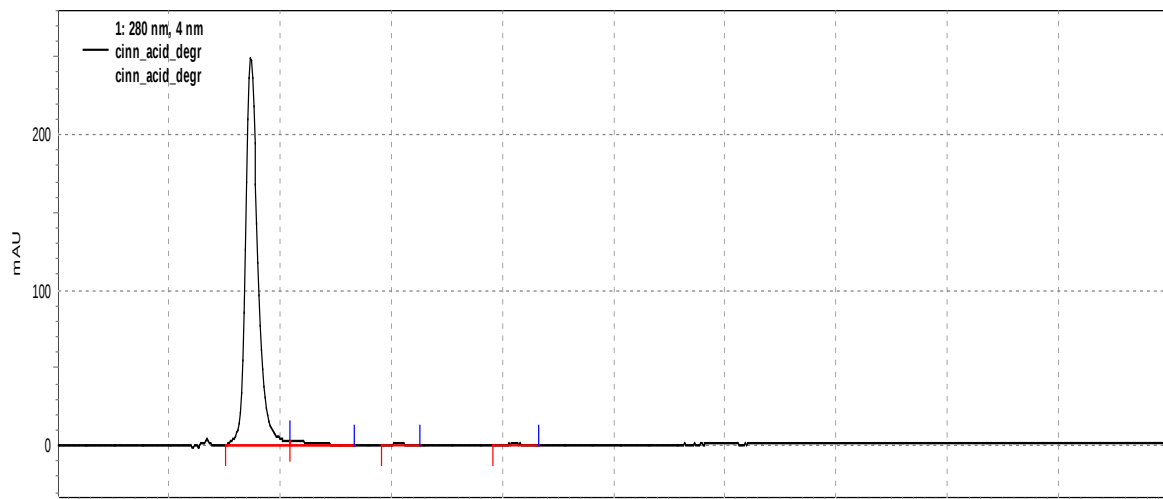


Abb. 43: Chromatogramm der Mutterlauge einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 5,01mg/ml 0,5M HCl, die 72 Stunden lang im Trockenschrank bei 90°C hydrolysiert wurde

Das HPLC-Chromatogramm der Mischung aus Mutterlauge und Cinnarizin-Standard zeigte zwei Peaks, einen bei Rt 1,75 und einen bei Rt 5,87. Der letztere Peak stammte vom Cinnarizin-Standard. Hiermit war klar, dass es sich beim Peak mit der Rt 1,75 um ein Abbauprodukt handelte. (s. Abb. 44)

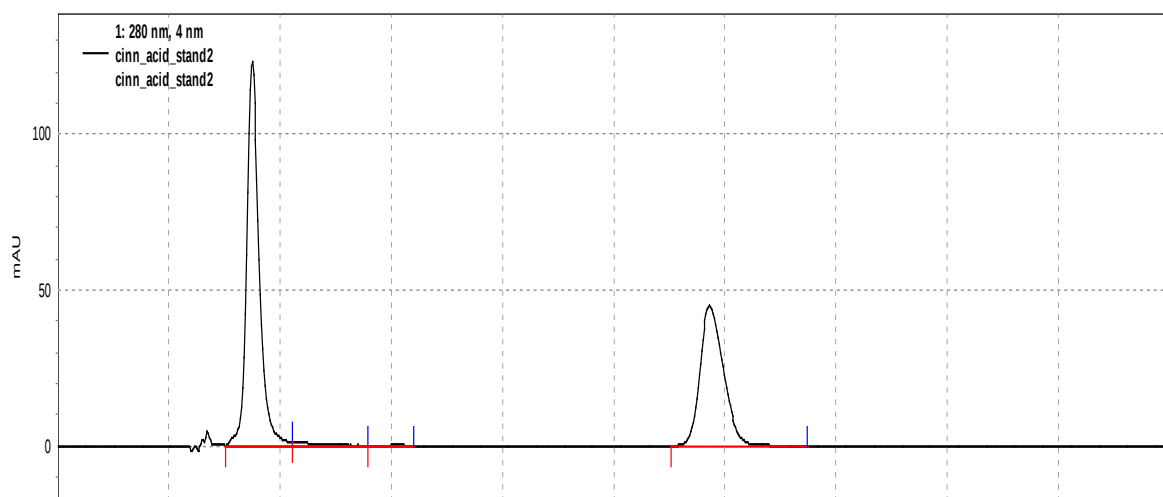


Abb. 44: Chromatogramm einer Mischung aus Mutterlauge und Cinnarizin-Standard

Im HPLC-Chromatogramm der Kristall-Lösung von der ^1H -NMR-Messung waren ca. 6 Peaks zu sehen, doch die lipophile Substanz, die auf der DC gefunden wurde, war nicht vorhanden (s. Abb. 45). Diese Substanz sollte erst sehr spät eluieren und in großer Menge vorhanden sein.

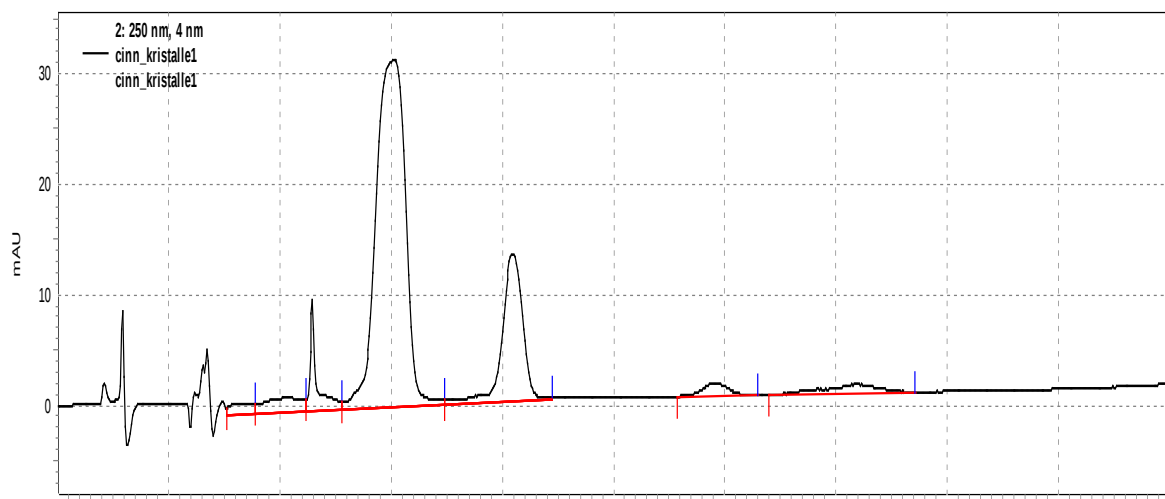


Abb. 45: Chromatogramm der Kristall-Lösung in CDCl_3 , Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer pH4 (60:40), Laufzeit: 10 Minuten

Folglich wurde die Laufzeit von 10 Minuten auf 20 Minuten verlängert. Es wurde zwar ein zusätzlicher Peak bei Rt 11 gefunden, aber dieser war in zu geringer Konzentration vorhanden, um die lipophile Substanz von der DC zu sein. Auch nachdem die Laufzeit auf 30 Minuten verlängert wurde, erschien der letzte Peak bei Rt 11. Schließlich wurde der Anteil an Methanol von 60% auf 70% erhöht und die Laufzeit von 30 Minuten beibehalten. Endlich erschien nun ein neuer großer Peak bei Rt 23,3, welcher von der lipophilen Substanz stammen musste. (s. Abb. 46)

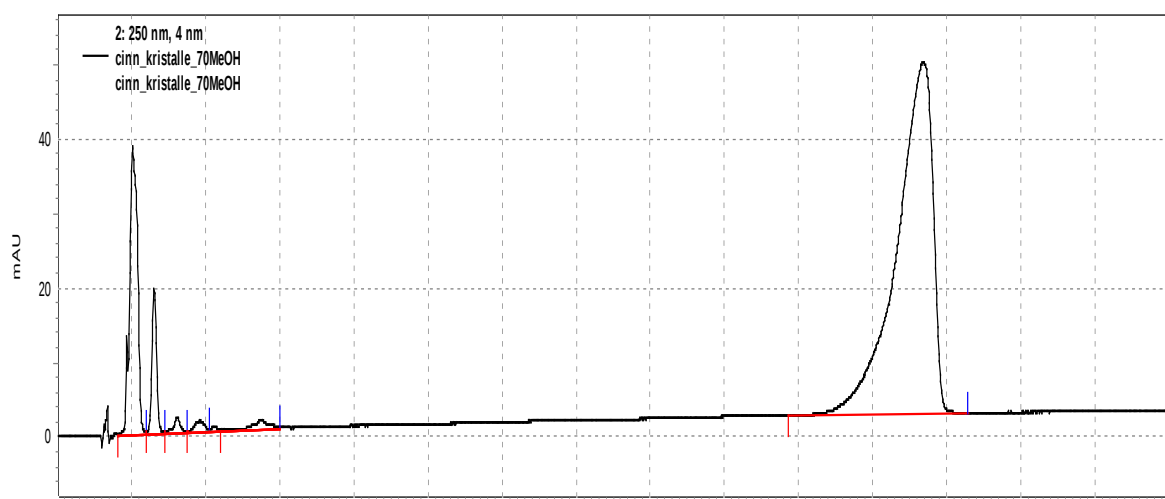


Abb. 46: Chromatogramm der Kristall-Lösung in CDCl_3 , Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30), Laufzeit: 30 Minuten

Zur Kontrolle wurde eine neue Kristall-Lösung hergestellt, indem 1,5mg der getrockneten Kristalle in 1ml Methanol gelöst wurden. Diese Lösung wurde ebenfalls ins HPLC-System injiziert. Die Peaks mit den Rt 3, 4 und 10,8 stimmten mit den Retentionszeiten der ersten Kristall-Lösung überein (s. Abb. 47). Außerdem war in beiden Chromatogrammen kein Cinnarizin-Peak bei Rt 5,8 detektierbar.

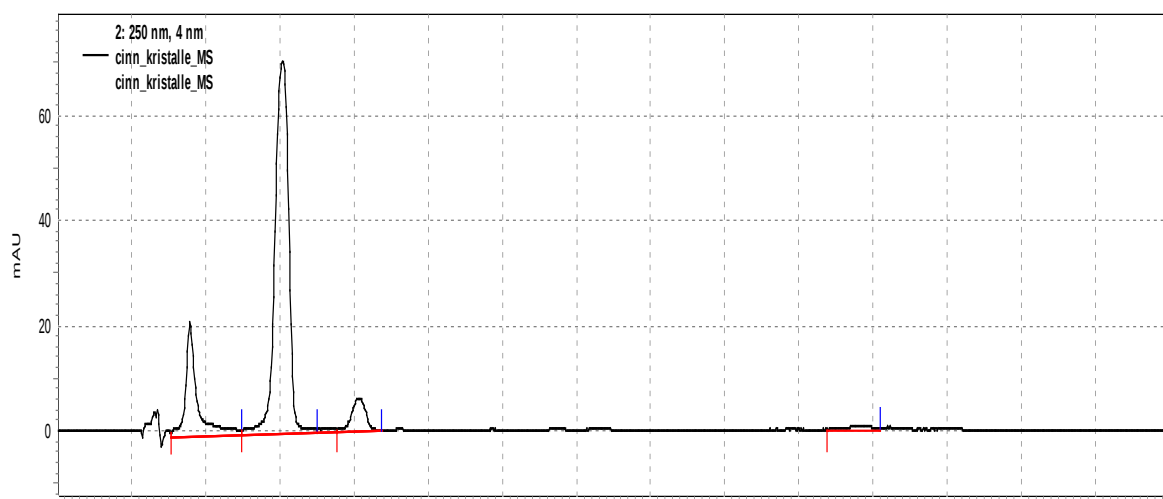


Abb. 47: Chromatogramm der Kristall-Lösung in MeOH, Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (60:40), Laufzeit: 30 Minuten

Die Kristall-Lösung mit der Konzentration 1,5mg/ml Methanol wurde ebenfalls mit 70% Methanol und einer Laufzeit von 30 Minuten eluiert. Im Chromatogramm erschien der erwartete große Peak bei Rt 23,3. (s. Abb. 48)

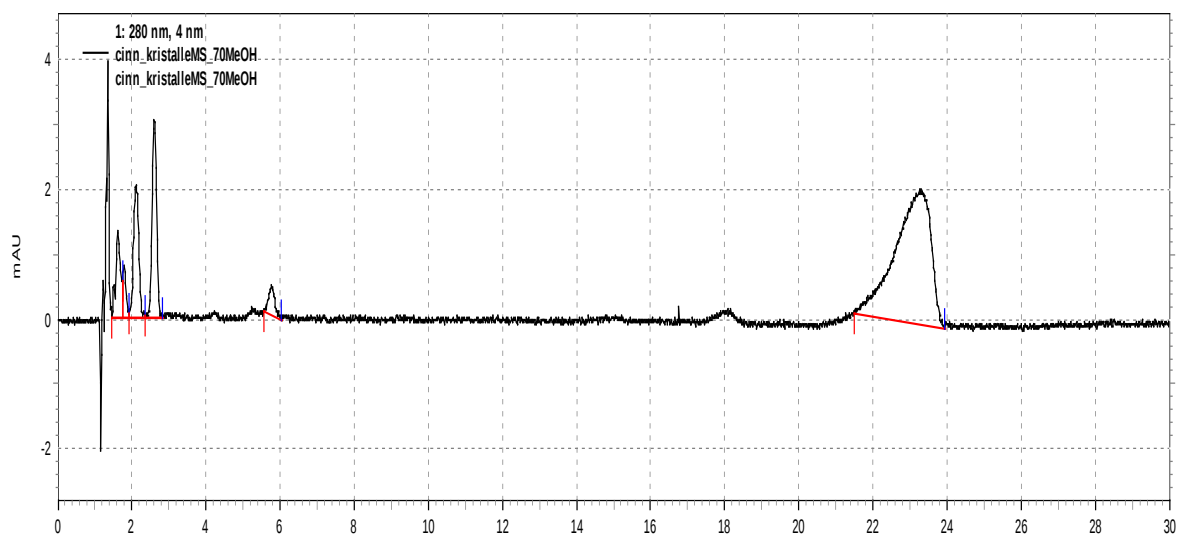


Abb. 48: Chromatogramm der Kristall-Lösung in MeOH, Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30), Laufzeit: 30 Minuten

Von diesem Peak wurde ein UV-Spektrum (s. Abb. 49) ausgedruckt und mit dem UV-Spektrum des Benzhydrols (s. Abb. 50) verglichen. Beide Spektren sahen einander sehr ähnlich. Die Absorptionsmaxima λ_{max} des Peaks bei Rt 23,3 waren 209nm, 259nm und 264nm.

Spectrum at time 23.34 min.

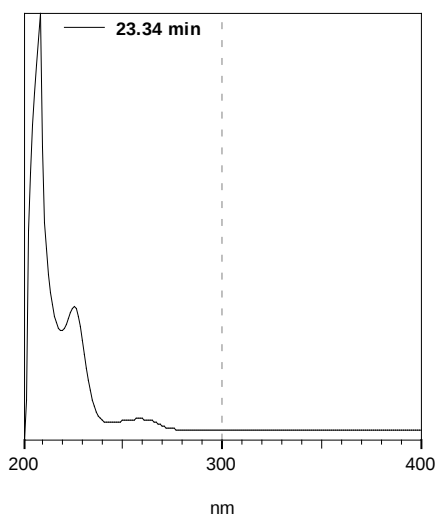
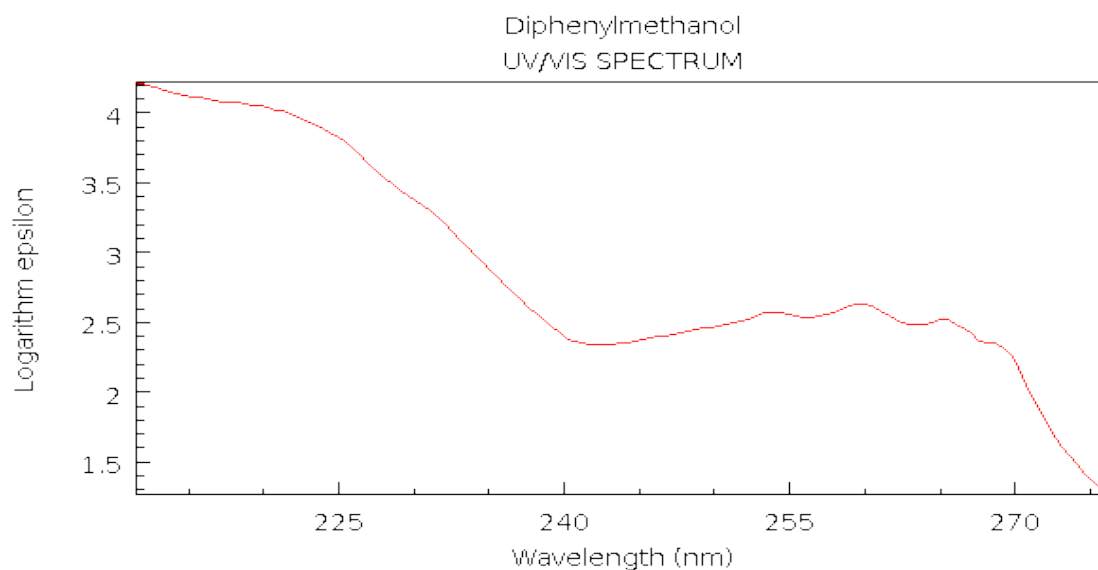


Abb. 49: UV-Spektrum des Peaks bei Rt 23,3 von der Kristall-Lösung



NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

Abb. 50: UV-Spektrum des Benzhydrols

Danach wurde die Mutterlauge-Lösung von der ersten HPLC-Messung nochmals injiziert und ebenfalls 30 Minuten lang mit 70% Methanol eluiert (s. Abb. 51). Aber bei Rt 23,3 erschien kein Peak. Es war auch kein Peak zu erwarten, da auf der DC der Mutterlauge keine Bande in der Fließmittelfront vorhanden war.

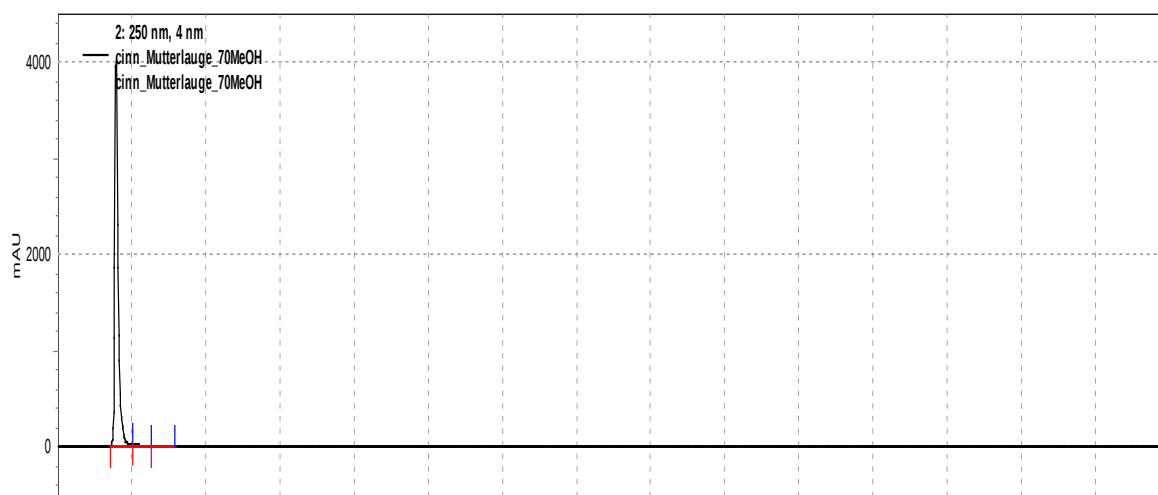


Abb. 51: Chromatogramm der Mutterlauge-Lösung, Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30), Laufzeit: 30 Minuten

Daraufhin wurde die Mutterlauge-Kristall-Mischung von der ^1H -NMR-Messung ins HPLC-System injiziert. Hier trat zwar bei Rt 22,9 ein Peak auf, aber dieser machte nur 2,69% der Gesamtpeakfläche aus (s. Abb. 52). Da sich auf der DC der Mutterlauge-Kristall-Mischung

eine starke Bande in der Fließmittelfront befand, war hier, wie bei der Kristall-Lösung, ein großer Peak zu erwarten.

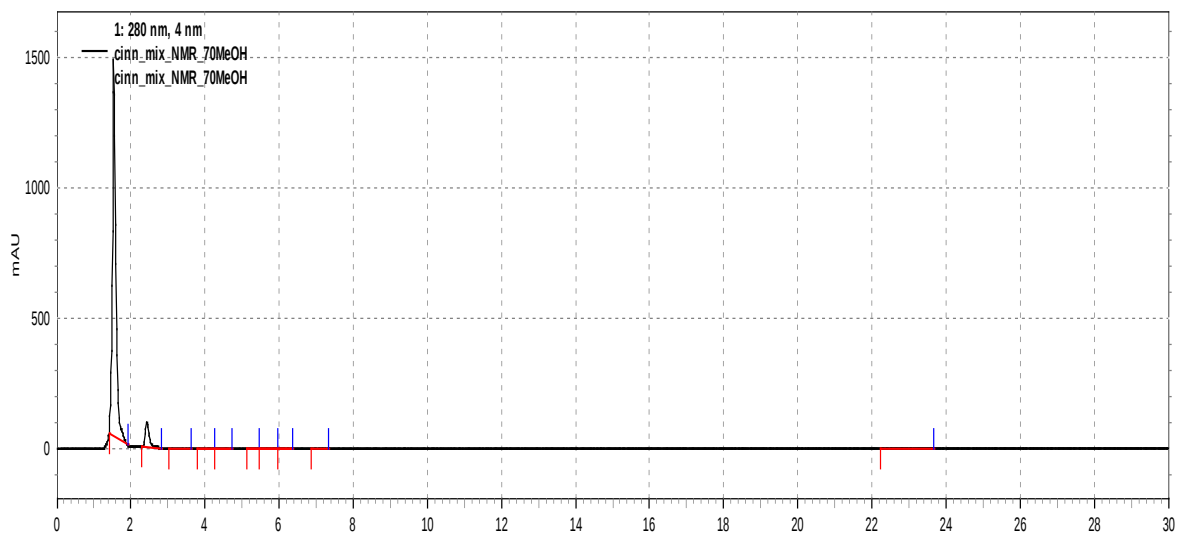


Abb. 52: Chromatogramm der Mutterlauge-Kristall-Mischung, Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30), Laufzeit: 30 Minuten

Bei den Kristallen konnte somit das lipophile Abbauprodukt sowohl mittels DC als auch HPLC nachgewiesen werden. Bei der Mutterlauge-Kristall-Lösung dagegen konnte dieses lipophile Abbauprodukt nur mittels DC nachgewiesen werden. Vielleicht war der Anteil an Kristallen in der Mutterlauge-Kristall-Mischung zu gering, um diese mittels HPLC detektieren zu können. Immerhin trat im Chromatogramm der Mutterlauge-Kristall-Mischung ein sehr kleiner Peak bei R_t 22,9 auf, der vermutlich von der lipophilen Substanz der Kristalle stammte.

Nachweis der Hydrolyse-Produkte mittels Massenspektrometrie (MS)

Um das Abbauprodukt in der Mutterlauge zu identifizieren, wurden die Lösungen der Substanz mit der R_t 1,75 und des Cinnarizin-Standards nach Verlassen des Diodenarray-Detektors manuell jeweils in ein Eppendorf-Cap geleitet und Massenspektren aufgenommen. Das Massenspektrum des Abbauproduktes mit der R_t 1,75 enthielt Fragmente mit den MG 163 und 102. (s. Abb. 53)

cin_Mischung #8-30 RT: 0.12-0.48 AV: 23 NL: 6.69E6
T: + p ESI Full ms [85.00-1000.00]

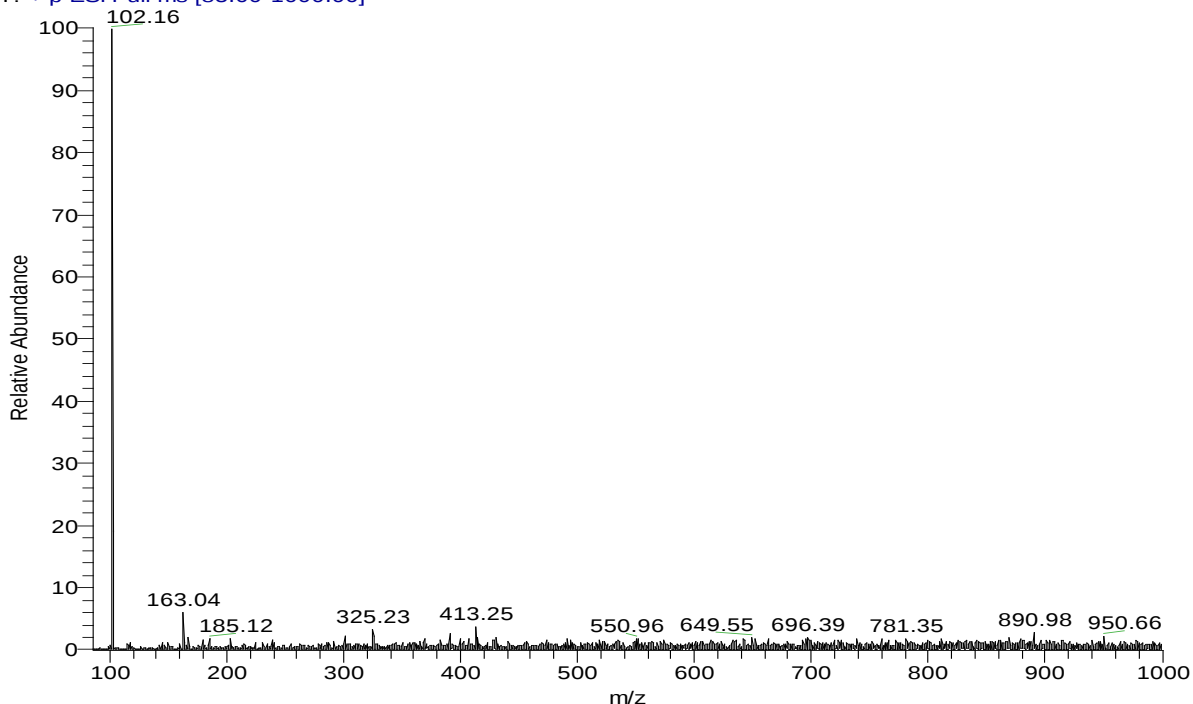


Abb. 53: Massenspektrum des Hydrolyse-Abbauproduktes mit der Rt 1,75 aus der Mutterlauge

Im Massenspektrum des Cinnarizin-Standards wurden Fragmente mit den MG 369, 167 und 102 gefunden (s. Abb. 54). Bei dem Fragment mit dem MG 102 handelte es sich um Triethylamin, welches Bestandteil der mobilen Phase war und somit vernachlässigbar war. Das MG 167 stammte, wie bereits bei den Photostabilitätsuntersuchungen erwähnt, vom Diphenylmethan-Ion und beim MG 369 handelte es sich wieder um das Cinnarizin selbst. Dem Fragment mit dem MG 163 konnte keine Substanz zugeordnet werden.

cin_Standard #3-54 RT: 0.04-0.65 AV: 39 NL: 1.18E7
T: + p ESI Full ms [85.00-1000.00]

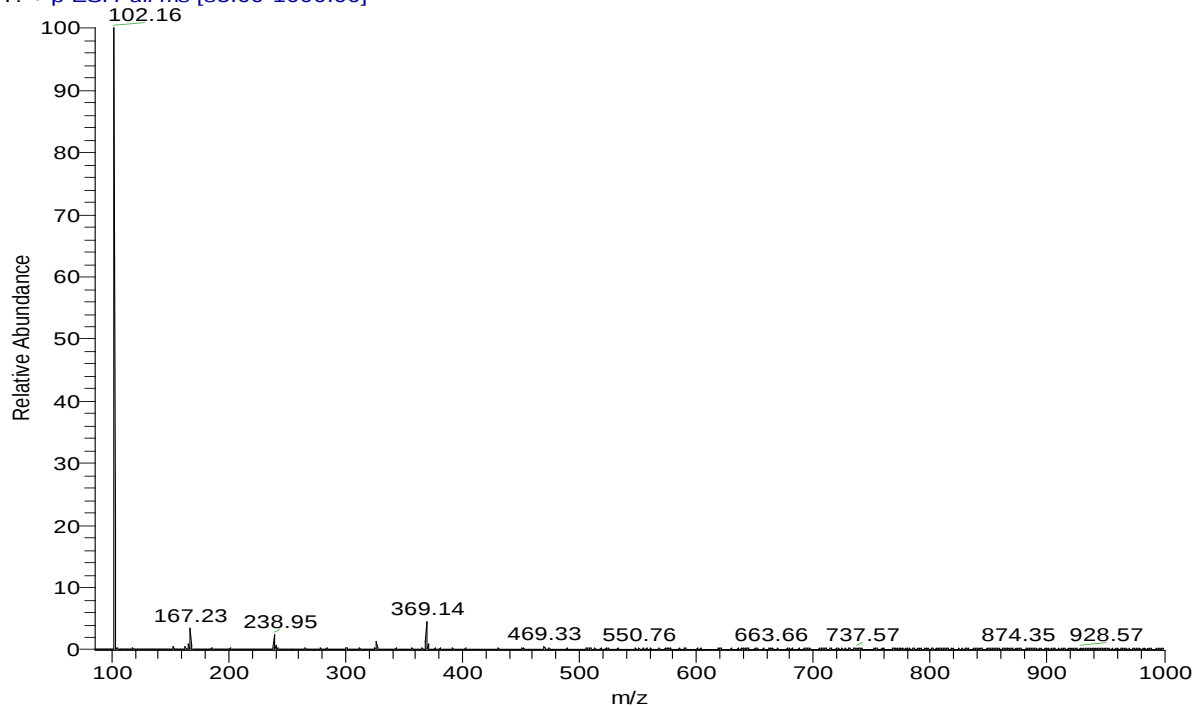


Abb. 54: Massenspektrum des Cinnarizin-Standards

Desweiteren wurde auch ein Massenspektrum der Kristall-Lösung mit der Konzentration 1,5mg/ml Methanol aufgenommen (s. Abb. 55). Dabei wurden Fragmente mit den MG 167 und 203 erhalten, wobei es sich beim Fragment mit dem MG 167 wieder um das Diphenylmethan-Ion handelte. Das Diphenylmethan-Ion konnte auch ein Fragment des vermuteten Benzhydrols sein. Das Fragment mit dem MG 203 passte zum MG des Cinnamylpiperazins (MG 202).

cin_Kristalle #8-32 RT: 0.13-0.51 AV: 25 NL: 8.22E6
T: + p ESI Full ms [85.00-1000.00]

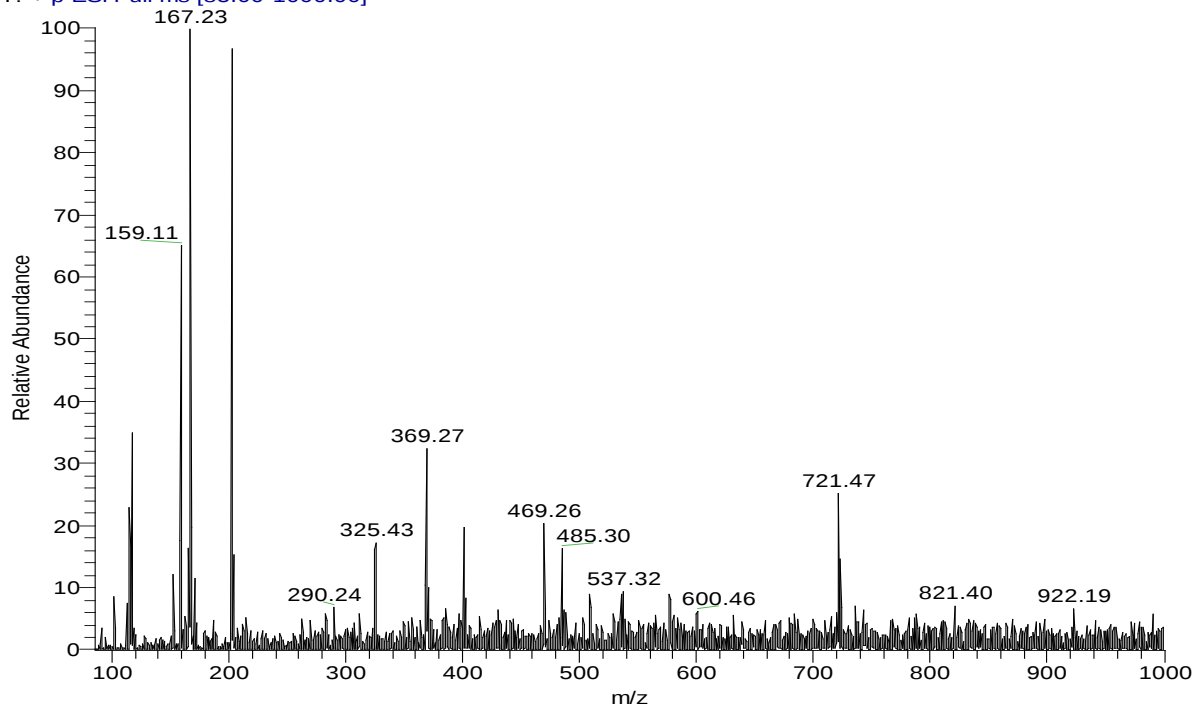


Abb. 55: Massenspektrum des Hydrolyse-Abbauproduktes, das Kristalle bildet

Identifizierung der Hydrolyse-Produkte mittels ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, COSY 45, HSQC und HMBC

In den ersten ^1H -NMR-Spektren der Mutterlauge-Kristall-Mischung und der Kristall-Lösung waren anfangs keine Abbauprodukte erkennbar. Die Spektren sahen zwar anders als die der Cinnarizin-Reinsubstanz aus, dennoch war es zu Beginn nicht möglich eindeutig ein Abbauprodukt zu identifizieren.

Da sich die UV- und ^1H -NMR-Spektren der Kristalle und des Benzhydrols einander sehr ähnlich sahen, wurden die Lösungen der Kristalle und der Mutterlauge-Kristall-Mischung nochmal vermessen. Diesmal wurden je ein ^1H -NMR-, ein ^{13}C -NMR-, ein COSY 45-, ein HSQC- und ein HMBC- Spektrum aufgenommen (Abb. siehe Anhang). Anhand der fünf Spektren wurde nun eindeutig festgestellt, dass es sich bei den Kristallen um Benzhydrol und sein Dimer, den Dibenzhydrolether, handelte, welche im Verhältnis 15:85 vorlagen. Die Mutterlauge-Kristall-Mischung enthielt Benzhydrol, Dibenzhydrolether und Cinnamylpiperazin im Verhältnis 51:6:43. Das Cinnamylpiperazin musste somit die polare Substanz, die auf der Startlinie der DC-Platte blieb, sein. Das Benzhydrol und sein Dimer waren somit die lipophilen Substanzen, die sich in der Fließmittelfront der DC-Platte befanden.

Beim Vergleich der MG der gefundenen Fragmente aus den Massenspektren mit den MG der Substanzen, die mittels ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-, COSY 45-, HSQC- und HMBC- Spektrum gefunden wurden, fällt auf, dass Cinnamylpiperazin im Massenspektrum der Mutterlauge-

Kristall-Mischung nicht gefunden wurde, obwohl es eindeutig ein Hauptbestandteil der Lösung war.

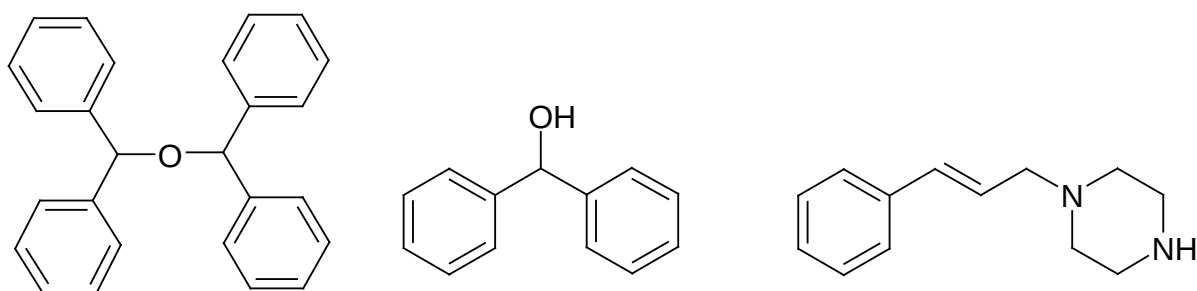


Abb. 56: Strukturformeln von links nach rechts: Dibenzhydrolether, Benzhydrol und Cinnamylpiperazin

Im Vergleich zur Studie von *Hassan et al.* [15] wurden nur zwei der sechs genannten Hydrolyse-Produkte gefunden. Dafür wurde auch der Dibenzhydrolether gefunden, welcher in dieser Studie nicht erwähnt wurde. Jedoch wurde in der japanischen Studie von *Tokumura et al.* [31] Dibenzhydrolether ebenfalls als Abbauprodukt identifiziert.

10.4 Bestimmung von Cinnarizin in Cinnabene®-Kapseln

Im Chromatogramm des Extraktes einer Cinnabene®-Kapsel samt Kapselhülle und -inhalt waren zwei Peaks mit den Retentionszeiten Rt 5,7 und Rt 7,1 sichtbar. (s. Abb. 57)

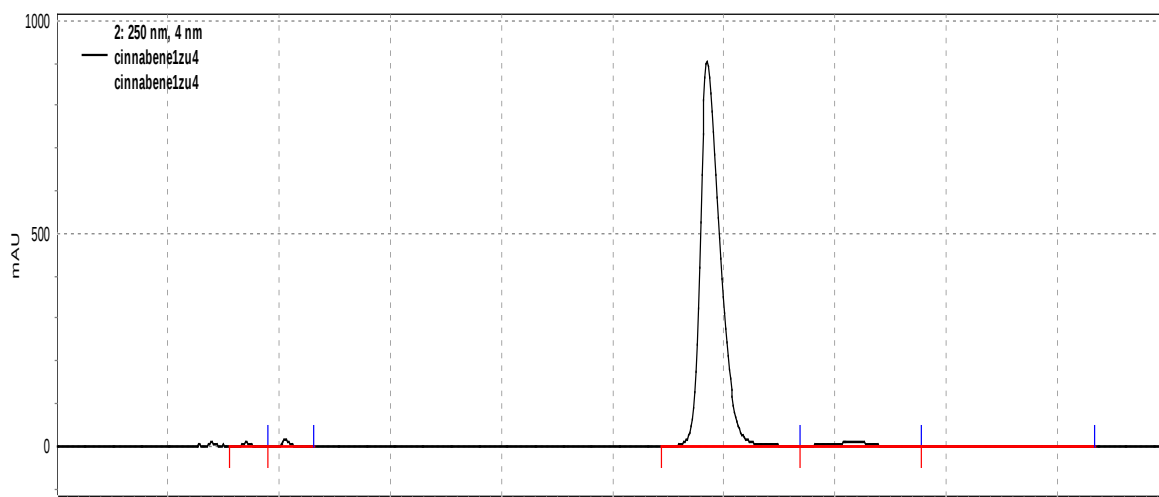


Abb. 57: Chromatogramm des Extraktes einer Cinnabene®-Kapsel samt Kapselhülle und -inhalt

Der Peak mit der Rt 5,7 stammte vom Cinnarizin. Beim kleinen Peak mit der Rt 7,1 konnte es sich entweder um einen Kapselhüllbestandteil oder ein Abbauprodukt handeln. Um einen Kapselhüllbestandteil ausschließen zu können, wurde ein Chromatogramm des extrahierten Cinnabene®-Kapselinhalts aufgenommen. Im Chromatogramm waren die gleichen Peaks sichtbar, aber aufgrund der höheren Konzentration kam es zu Tailing (s. Abb. 58). Somit wurde bestätigt, dass es sich beim Peak mit der Rt 7,1 um keinen Kapselhüllbestandteil handelte, sondern um ein Abbauprodukt. Im Vergleich zur UV-bestrahlten Cinnarizin-Probelösung konnte es sich um das Abbauprodukt mit der Rt 6,9-7 handeln.

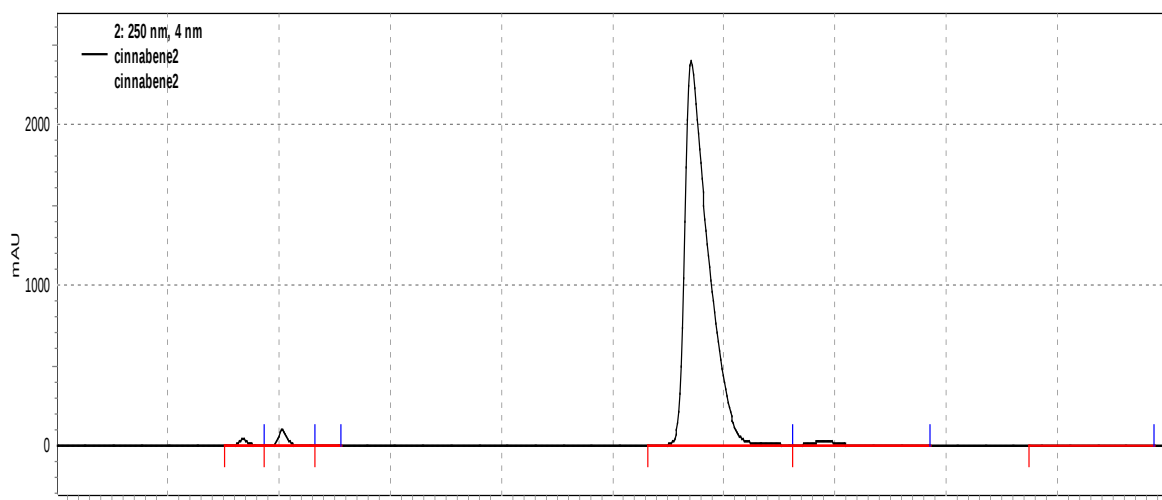


Abb. 58: Chromatogramm des Cinnabene®-Kapselinhalts, der mit Methanol extrahiert wurde

Um nun im extrahierten Cinnabene®-Kapselinhalt Cinnarizin und sein Abbauprodukt identifizieren zu können, wurde der extrahierte Kapselinhalt zusammen mit einem Cinnarizin-Standard und UV-bestrahltem Cinnarizin auf zwei DC-Platten aufgetragen. Jedoch war von jeder Lösung nur eine Bande bei einem Rf-Wert von 0,4 sichtbar, welche bei 366nm fluoreszierte. (s. Abb. 59)

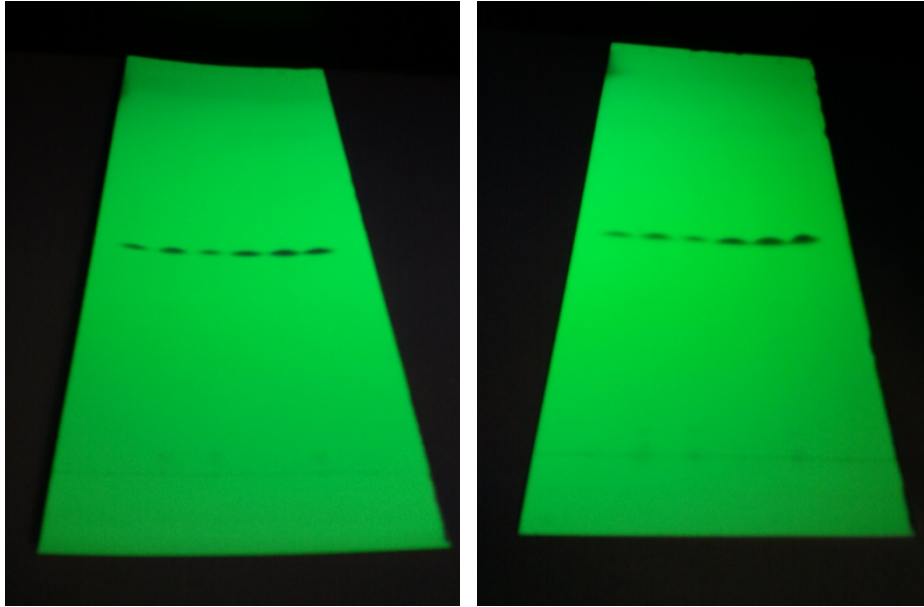


Abb. 59: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnarizin-Standard, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (links: DC Merck bei 254nm, rechts: DC Macherey-Nagel bei 254nm)

Die Banden hatten sich offensichtlich nicht getrennt, worauf das Fließmittel verändert wurde. Statt mit einem Gemisch aus Toluol, Methanol und Ameisensäure wurde mit reinem Ethylacetat eluiert. Es wurden dieselben Probelösungen in gleicher Reihenfolge und Kombination wie oben auf zwei 17x7cm DC-Platten aufgetragen und ca. 60 Minuten entwickelt. Auf beiden DC-Platten kam es zu starkem Tailing, wobei die Banden auf der DC-Platte von Macherey-Nagel symmetrischer waren als die Banden auf der DC-Platte von Merck. Auffallend war die Tatsache, dass beim Cinnabene®-Kapselinhalt keine Cinnarizin-Bande im Vergleich zum Standard zu sehen war. Außerdem war die Bande des Cinnabene®-Kapselinhalts mit einem Rf-Wert von 0,72 viel höher bzw. schneller gelaufen als die Banden der Vergleichslösungen. Merkwürdig war auch die Tatsache, dass der Cinnabene®-Kapselinhalt in Kombination mit UV-bestrahltem Cinnarizin und dem Cinnarizin-Standard langsamer lief. (s. Abb. 60)

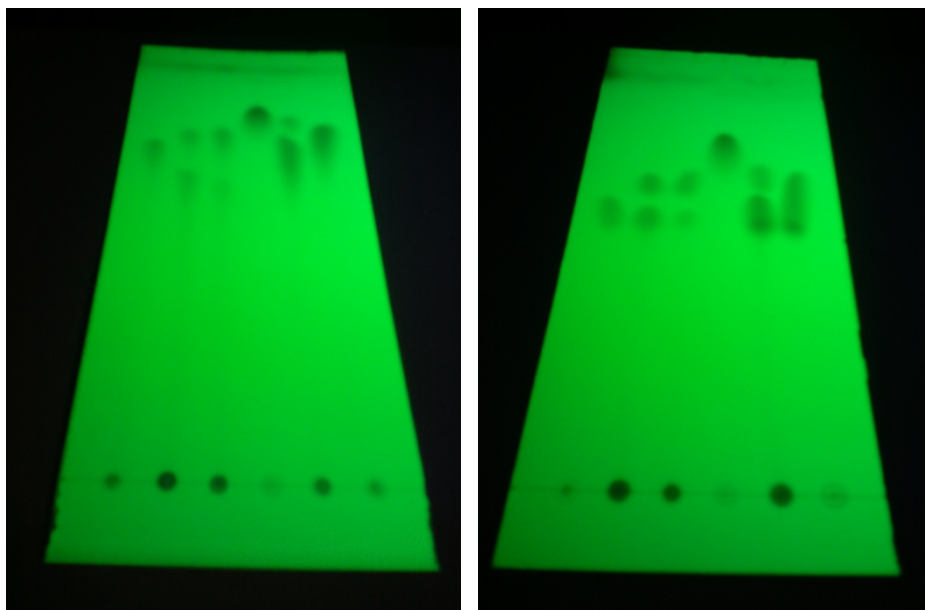


Abb. 60: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnarizin-Standard, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (links: DC Merck bei 254nm, rechts: DC Macherey-Nagel bei 254nm)

Beim dritten Versuch wurden wieder die gleichen Probelösungen auf eine 17x7cm DC-Platte von Merck aufgetragen, jedoch wurden die Bahnen 1 und 4 vertauscht. Es kam wieder zu Tailing und die Bande des Cinnabene®-Kapselinhalts war wieder schneller gelaufen. (s. Abb. 61)

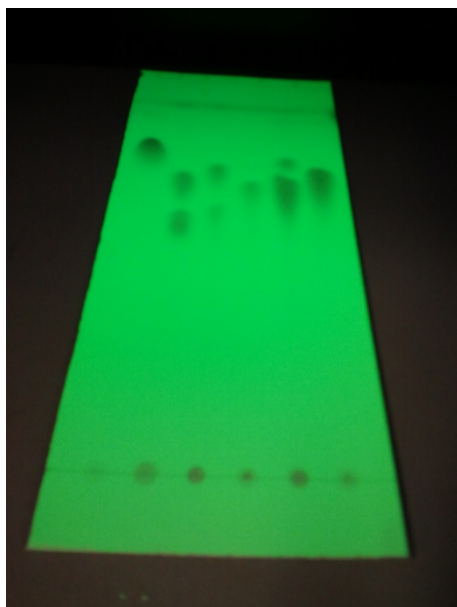


Abb. 61: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnarizin-Standard, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (DC Merck bei 254nm)

Beim vierten Versuch wurden die Probelösungen wie beim dritten Versuch aufgetragen, aber diesmal wurde auf zwei 10x7cm DC-Platten von Macherey-Nagel aufgetragen (s. Abb. 62). Dabei wurde ein neuer Cinnabene®-Kapselinhalt extrahiert und aufgetragen. Anschließend wurde eine Platte in reinem Ethylacetat und die andere in Ethylacetat/Dichlormethan (70:30) ca. 20 Minuten entwickelt. Durch die kürzere Laufstrecke von 8cm statt 15cm wurden die Banden besser getrennt und das Tailing minimiert. Bei der Entwicklung in Ethylacetat/Dichlormethan (70:30) waren die Banden schärfer und die Rf-Werte etwas kleiner. Trotzdem war die Trennung mit reinem Ethylacetat ausreichend für weitere Messungen. Die Cinnarizin-Banden befanden sich alle bei Rf 0,47 bei der Entwicklung mit reinem Ethylacetat. Bei der Entwicklung mit Ethylacetat/Dichlormethan (70:30) befanden sich die Cinnarizin-Banden bei Rf 0,31. Auf beiden DC-Platten war in der Bahn des Cinnabene®-Kapselinhalts wieder keine Bande auf Höhe des Cinnarizin-Standards zu sehen. Trotz der vielen Versuche wurde keine Erklärung für diese Beobachtung gefunden.

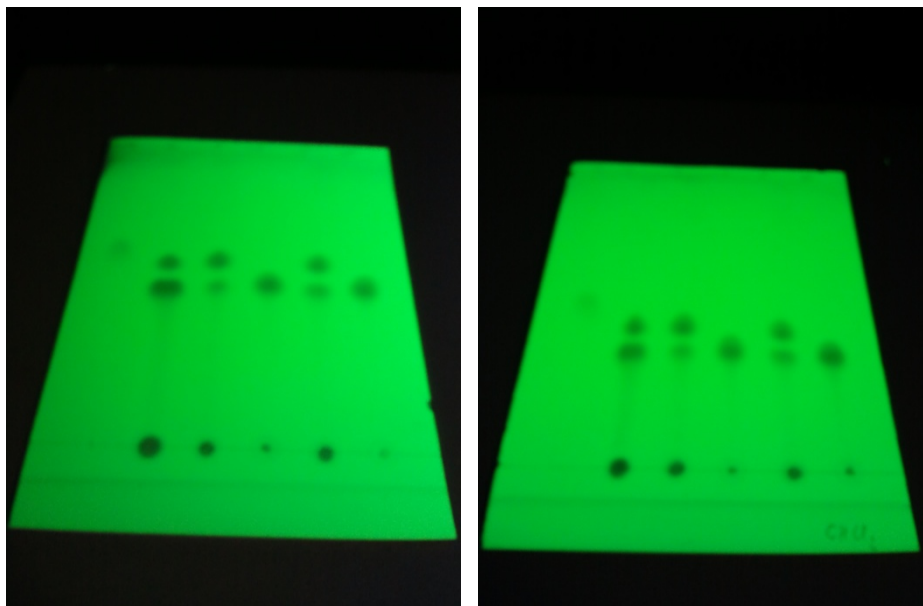


Abb. 62: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnarizin-Standard, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (links: Fließmittel: Ethylacetat, rechts: Fließmittel: Ethylacetat/Dichlormethan (70:30))

10.5 Bestimmung von Cinnarizin in Stutgeron® 75mg-Kapseln

Im Chromatogramm des Stutgeron®-Kapselinhalts war ein großer Cinnarizin-Peak bei Rt 5,8 zu sehen. (s. Abb. 63)

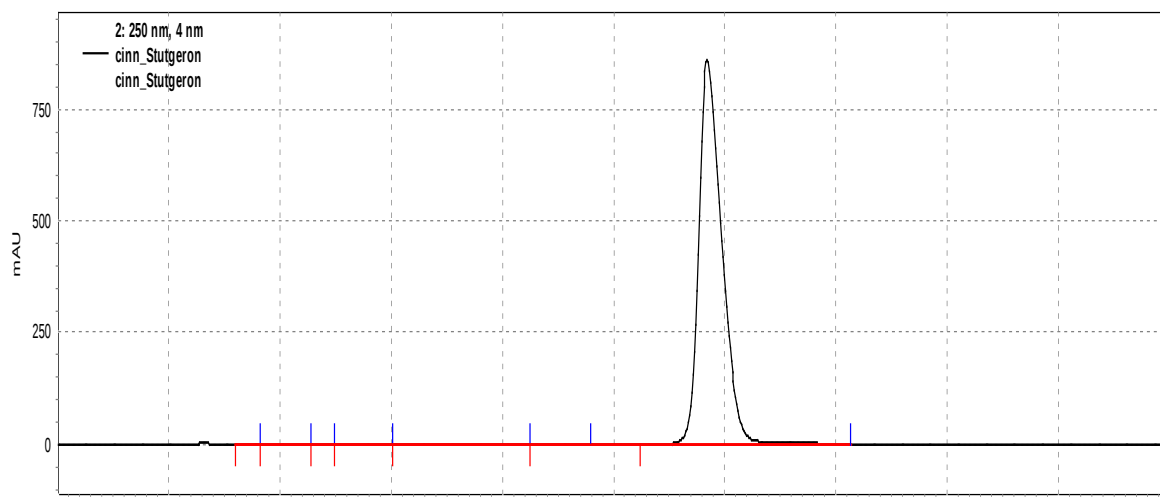


Abb. 63: Chromatogramm von Cinnarizin aus einer Stutgeron® 75mg-Kapsel

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Art der Aufarbeitung keinen Einfluss auf die Messergebnisse hat. Es ist daher gleich, ob vor oder nach dem Verdünnen filtriert wird. Desweiteren wurde das Gewicht der leeren Kapsel bestimmt und durch Differenzbildung der Inhalt berechnet.

Kapselgewicht in mg		Inhalt in mg	Rt	Peakfläche	mg	Wiederfindung in %
voll	leer					
184,2	38,6	145,6	5,845	12392405	19,159	102,18
182,6	36,9	145,7	5,845	12210439	18,893	100,76
187,9	39,2	148,7	5,835	12546259	19,384	103,38
189,3	37,4	151,9	5,845	12468071	19,270	102,77
					19,176	102,27
					MW mg	MW Wiederfindung

Tab. 8: Wiederfindung von Cinnarizin aus Stutgeron® 75mg-Kapseln, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Kapselgewicht in mg		Inhalt in mg	Rt	Peakfläche	mg	Wiederfindung in %
voll	leer					
184,2	38,6	145,6	5,845	1142249	19,410	103,52
182,6	36,9	145,7	5,835	1130432	19,204	102,42
187,9	39,2	148,7	5,835	1158844	19,699	105,06
189,3	37,4	151,9	5,845	1154649	19,626	104,67
					19,485	103,92
					MW mg	MW Wiederfindung

Tab. 9: Wiederfindung von Cinnarizin aus Stutgeron® 75mg-Kapseln, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels der Kalibrationsgeraden von Cinnarizin bei 250 und 280nm. Da die Probelösungen 1:4 mit Methanol verdünnt wurden, sollte der Gehalt an Cinnarizin in einer Kapsel 18,75mg betragen. Es wurde in allen vier Kapseln mehr als 18,75mg Cinnarizin gefunden und die Wiederfindungswerte in Prozent lagen bis auf einen Wert unterhalb der Akzeptanzgrenze von 105%.

10.6 Ergebnisse der Validierung - Cinnarizin

Anhand der Ergebnisse der Validierung wird gezeigt, dass die verwendete analytische Methode zur Bestimmung von Cinnarizin geeignet ist.

10.6.1 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität wurden fünf Cinnarizin-Standardlösungen in verschiedenen Konzentrationen je 6mal ins HPLC-System injiziert und deren Peakflächen ermittelt. Mit Hilfe der linearen Regression nach der Methode der kleinsten Quadrate wurden in Microsoft® Excel 97 die Geradengleichungen bei 250 und 280nm berechnet.

Die höchste Konzentration an Cinnarizin in einer Standardlösung war 355µg/ml und entsprach 117%. Die niedrigste Konzentration an Cinnarizin war 155µg/ml und entsprach 51%. Dazwischen lagen drei weitere Messpunkte mit den Konzentrationen 203µg/ml (67%), 253µg/ml (83%) und 303µg/ml (100%).

Herstellung der Cinnarizin-Standardlösungen

Die folgenden Einwaagen von Cinnarizin wurden jeweils in Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30) gelöst und auf 100ml aufgefüllt.

Lösung 1: EW= 15,5mg Cinnarizin => c= 155µg/ml

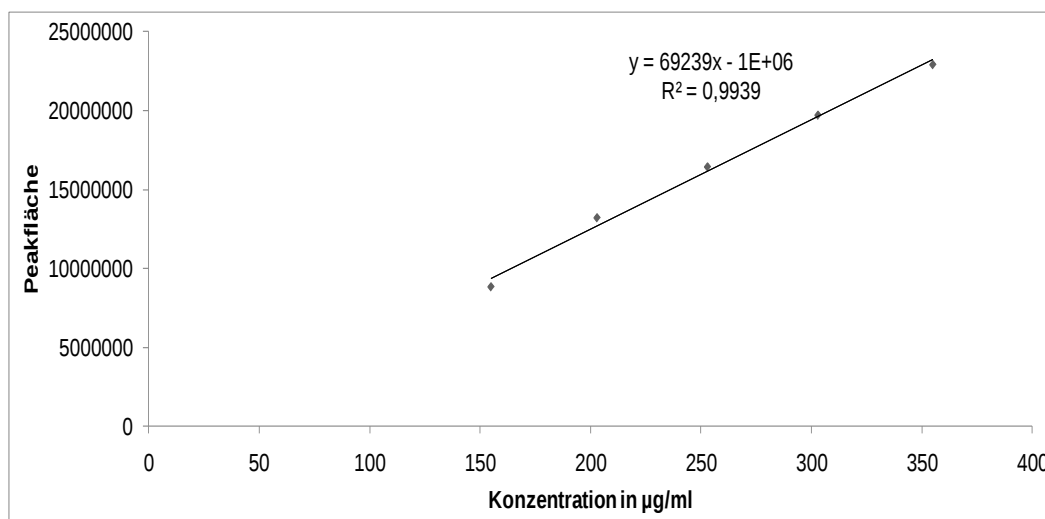
Lösung 2: EW= 20,3mg Cinnarizin => c= 203µg/ml

Lösung 3: EW= 25,3mg Cinnarizin => c= 253µg/ml

Lösung 4: EW= 30,3mg Cinnarizin => c= 303µg/ml

Lösung 5: EW= 35,5mg Cinnarizin => c= 355µg/ml

Konz. µg/ml	Peakfläche						Mittelwert
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 6	
155	10407950	10416582	10421206	10422485	10408982	10409892	10414516
203	13236555	13219144	13225390	13223182	13232761	13235918	13228825
253	16464281	16465001	16452944	16446872	16445757	16445510	16453394
303	19733694	19749360	19727093	19725377	19727170	19719561	19730376
355	22927183	22931728	22934186	22922694	22932858	22935426	22930679

Tab. 10: Cinnarizin: Linearität, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$ Abb. 64: Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche						Mittelwert
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5	Rep 6	
155	964010	961975	962397	966403	962816	961515	963186
203	1223743	1219792	1223069	1222594	1222954	1224464	1222769
253	1517701	1517296	1517071	1516987	1518136	1519316	1517751
303	1818493	1813108	1815093	1815423	1816896	1815724	1815790
355	2107246	2104932	2107456	2106793	2106161	2108777	2106894

Tab. 11: Cinnarizin: Linearität, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

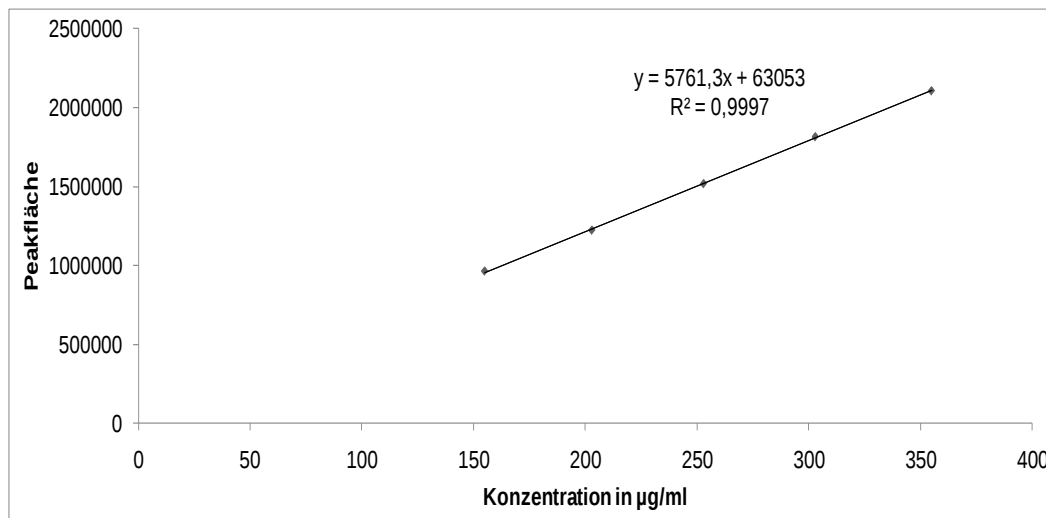


Abb. 65: Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Das Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt bei 250nm 0,9939 und bei 280nm 0,9997. Dies bedeutet, dass sich das Verhältnis zwischen Konzentration und Peakfläche linear verhält.

10.6.2 Richtigkeit

Bei der Bestimmung der Richtigkeit wurden insgesamt je drei Einwaagen bei 83%, 100% und 117% des Cinnarizin-Gehalts vermessen. Da auch die Werte von der bereits durchgeführten Linearitätsmessung herangezogen wurden, wurden nur mehr je zwei Einwaagen bei 83%, 100% und 117% bereitet.

Bei der Messung wurden aus jeder Einwaage drei Injektionen durchgeführt. Nach Berechnung der Mittelwerte und der relativen Standardabweichungen wurde die Wiederfindung ermittelt.

Herstellung der zusätzlichen Cinnarizin-Probeflösungen

Die folgenden Einwaagen von Cinnarizin wurden jeweils in Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30) gelöst und auf 100ml aufgefüllt.

83%:

(Lösung 1:siehe Linearität)

Lösung 2: EW= 25,2mg Cinnarizin => c= 252µg/ml

Lösung 3: EW= 25,3mg Cinnarizin => c= 253µg/ml

100%:

(Lösung 1: siehe Linearität)

Lösung 2: EW= 30,3mg Cinnarizin => c= 303µg/ml

Lösung 3: EW= 30,2mg Cinnarizin => c= 302µg/ml

117%:

(Lösung 1: siehe Linearität)

Lösung 2: EW= 35,4mg Cinnarizin => c= 354µg/ml

Lösung 3: EW= 35,4mg Cinnarizin => c= 354µg/ml

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD	Wiederfind.	%
	Rep 1	Rep 2	Rep 3					
253	16464281	16465001	16452944	16460742	6763	0,04	256,995	101,58
252	16301865	16319075	16293412	16304784	13078	0,08	254,742	101,09
253	16682271	16700067	16693060	16691799	8965	0,05	260,332	102,90
				16485775 MW ges.	194718 s ges.	1,18 RSD ges.		

Tab. 12: Cinnarizin: Richtigkeit von 83%, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD	Wiederfind.	%
	Rep 1	Rep 2	Rep 3					
253	1517701	1517296	1517071	1517356	319	0,02	252,425	99,77
252	1501929	1503733	1501933	1502532	1040	0,07	249,852	99,15
253	1535315	1553963	1540615	1543298	9609	0,62	256,928	101,55
				1521062 MW ges.	20634 s ges.	1,36 RSD ges.		

Tab. 13: Cinnarizin: Richtigkeit von 83%, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD	Wiederfind.	%
	Rep 1	Rep 2	Rep 3					
303	19733694	19749360	19727093	19736716	11437	0,06	304,309	100,43
303	19853584	19847586	19852564	19851245	3209	0,02	305,963	100,98
302	19858532	19863440	19852198	19858057	5636	0,03	306,061	101,34
				19815339 MW ges.	68175 s ges.	0,34 RSD ges.		

Tab. 14: Cinnarizin: Richtigkeit von 100%, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD	Wiederfind.	%
	Rep 1	Rep 2	Rep 3					
303	1818493	1813108	1815093	1815565	2723	0,15	304,185	100,39
303	1826707	1829969	1827732	1828136	1668	0,09	306,367	101,11
302	1825420	1831302	1826383	1827702	3155	0,17	306,292	101,42
				1823801 MW ges.	7136 s ges.	0,39 RSD ges.		

Tab. 15: Cinnarizin: Richtigkeit von 100%, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD	Wiederfind.	%
	Rep 1	Rep 2	Rep 3					
355	22927183	22931728	22934186	22931032	3553	0,02	350,443	98,72
354	23293761	23298611	23283117	23291830	7925	0,03	355,654	100,47
354	23190356	23210676	23198207	23199746	10247	0,04	354,324	100,09
				23140869 MW ges.	187466 s ges.	0,81 RSD ges.		

Tab. 16: Cinnarizin: Richtigkeit von 117%, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD	Wiederfind.	%
	Rep 1	Rep 2	Rep 3					
355	2107246	2104932	2107456	2106545	1401	0,07	354,691	99,91
354	2141452	2134551	2138456	2138153	3460	0,16	360,177	101,75
354	2127193	2123751	2129609	2126851	2944	0,14	358,216	101,19
				2123850 MW ges.	16016 s ges.	0,75 RSD ges.		

Tab. 17: Cinnarizin: Richtigkeit von 117%, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Als Akzeptanzkriterium muss bei der Prüfung der Richtigkeit die Wiederfindung zwischen 95% und 105% liegen, was auch bei allen drei Einwaagen bei 83%, 100% und 117% zutrifft. Zudem muss die relative Standardabweichung kleiner als 2% sein. Auch dieser Punkt wird von allen drei Einwaagen bei 83%, 100% und 117% erfüllt.

10.6.3 Präzision

- Tag zu Tag Präzision

Zur Bestimmung der Tag zu Tag Präzision wurden die fünf Cinnarizin-Standardlösungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen je dreimal injiziert. Wobei für den ersten Tag die Werte der Linearitätsmessung herangezogen wurden. Der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung wurden berechnet.

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD
	Rep 1	Rep 2	Rep 3			
155	10407950	10416582	10421206	10415246	6728	0,06
203	13236555	13219144	13225390	13227030	8821	0,07
253	16464281	16465001	16452944	16460742	6763	0,04
303	19733694	19749360	19727093	19736716	11437	0,06
355	22927183	22931728	22934186	22931032	3553	0,02

Tab. 18: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 1. Tag, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD
	Rep 1	Rep 2	Rep 3			
155	964010	961975	962397	962794	1074	0,11
203	1223743	1219792	1223069	1222201	2114	0,17
253	1517701	1517296	1517071	1517356	319	0,02
303	1818493	1813108	1815093	1815565	2723	0,15
355	2107246	2104932	2107456	2106545	1401	0,07

Tab. 19: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 1. Tag, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD
	Rep 1	Rep 2	Rep 3			
155	10360872	10378139	10353219	10364077	12765	0,12
203	13196461	13200390	13178642	13191831	11590	0,09
253	16407191	16414157	16396580	16405976	8851	0,05
303	19699147	19694534	19693384	19695688	3050	0,02
355	22845706	22859074	22834256	22846345	12421	0,05

Tab. 20: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 2. Tag, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD
	Rep 1	Rep 2	Rep 3			
155	960333	958490	957433	958752	1468	0,15
203	1215601	1218055	1219147	1217601	1816	0,15
253	1514642	1513364	1509556	1512521	2646	0,17
303	1812007	1812353	1812177	1812179	173	0,01
355	2092268	2097692	2094667	2094876	2718	0,13

Tab. 21: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 2. Tag, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD
	Rep 1	Rep 2	Rep 3			
155	10357428	10340052	10344792	10347424	8982	0,09
203	13174701	13177478	13173811	13175330	1913	0,01
253	16368189	16367557	16379757	16371834	6869	0,04
303	19643410	19643017	19636016	19640814	4160	0,02
355	22772387	22777317	22777599	22775768	2931	0,01

Tab. 22: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 3. Tag, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD
	Rep 1	Rep 2	Rep 3			
155	958009	961288	961445	960247	1940	0,20
203	1218489	1220321	1215847	1218219	2249	0,18
253	1506460	1508692	1508096	1507749	1156	0,08
303	1804312	1808929	1805308	1806183	2430	0,13
355	2097986	2092766	2093801	2094851	2764	0,13

Tab. 23: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 3. Tag, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

- **Intermediate Precision**

Zur Ermittlung der Intermediate Precision wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung über alle drei Tage berechnet.

	Konzentration in µg/ml				
	155	203	253	303	355
MW ges.	10375582	13198064	16412851	19691073	22851048
s ges.	35345	26407	44851	48117	77739
RSD ges.	0,34	0,20	0,27	0,24	0,34

Tab. 24: Cinnarizin: Intermediate Precision, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

	Konzentration in µg/ml				
	155	203	253	303	355
MW ges.	960598	1219340	1512542	1811309	2098757
s ges.	2044	2497	4803	4751	6744
RSD ges.	0,21	0,20	0,32	0,26	0,32

Tab. 25: Cinnarizin: Intermediate Precision, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

- **Wiederholbarkeit**

Die Wiederholbarkeit wurde durch sechs Einwaagen bei 100% des Cinnarizin-Gehalts bestimmt. Wobei die ersten drei Einwaagen bereits bei den Punkten Linearität und Richtigkeit vermessen wurden. Deshalb wurden nur drei weitere Einwaagen von Cinnarizin bei 100% bereitet. Bei der Messung wurden aus jeder Einwaage drei Injektionen durchgeführt und anschließend der Mittelwert, die Standardabweichung, die relative Standardabweichung und der Vertrauensbereich berechnet.

Herstellung der zusätzlichen Cinnarizin-Probeflösungen

100%:

(Lösung 1-3: siehe Linearität und Richtigkeit)

Lösung 4: EW= 30,1mg Cinnarizin => c= 301µg/ml

Lösung 5: EW= 30,4mg Cinnarizin => c= 304µg/ml

Lösung 6: EW= 30,2mg Cinnarizin => c= 302µg/ml

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD	Vertrauensbereich	
	Rep 1	Rep 2	Rep 3					
303	19733694	19749360	19727093	19736716	11437	0,06	19719739	19753692
303	19853584	19847586	19852564	19851245	3209	0,02	19846481	19856008
302	19858532	19863440	19852198	19858057	5636	0,03	19849691	19866423
301	19858314	19852729	19858601	19856548	3310	0,02	19851634	19861462
304	19785051	19771996	19767790	19774946	9001	0,05	19761585	19788306
302	18332138	18335600	18335765	18334501	2048	0,01	18331461	18337541
				19568669 MW ges.	606701 s ges.	3,10 RSD ges.		

Tab. 26: Cinnarizin: Wiederholbarkeit, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert	s	RSD	Vertrauensbereich	
	Rep 1	Rep 2	Rep 3					
303	1818493	1813108	1815093	1815565	2723	0,15	1811522	1819607
303	1826707	1829969	1827732	1828136	1668	0,09	1825660	1830612
302	1825420	1831302	1826383	1827702	3155	0,17	1823019	1832385
301	1825408	1825633	1827887	1826309	1371	0,08	1824274	1828344
304	1820356	1821455	1818155	1819989	1680	0,09	1817494	1822483
302	1691156	1689723	1686795	1689225	2223	0,13	1685925	1692524
				1801154 MW ges.	55057 s ges.	3,06 RSD ges.		

Tab. 27: Cinnarizin: Wiederholbarkeit, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$

Als Akzeptanzkriterium darf die relative Standardabweichung über alle sechs Werte maximal 5% betragen. Diese beträgt bei 250 und 280nm rund 3,1% und erfüllt somit das Akzeptanzkriterium.

10.6.4 Detektions- und Quantifizierungsgrenze

Die Bestimmung der Detektions- und Quantifizierungsgrenze erfolgte durch graphische Auswertung des Verhältnisses von Signal-to-Noise in den Chromatogrammen.

Bei der Detektionsgrenze sollte das Verhältnis von Signal-to-Noise zwischen 3:1 oder 2:1 sein und bei der Quantifizierungsgrenze sollte das Verhältnis größer als 10:1 sein.

Als Ausgangslösung (=Lösung A) wurde die Cinnarizin-Standardlösung mit der Konzentration 155µg/ml von der Linearitätsbestimmung verwendet. Diese Lösung wurde nach folgendem Schema verdünnt.

Verdünnungsreihe:

1. Schritt: Lösung A mit Methanol 1:10 verdünnen => Lösung 1 mit c= 15,5µg/ml
2. Schritt: Lösung 1 mit Methanol 1:10 verdünnen => Lösung 2 mit c= 1,55µg/ml

3. Schritt: Lösung 2 mit Methanol 1:10 verdünnen => Lösung 3 mit $c = 0,155 \mu\text{g/ml}$
4. Schritt: Lösung 2 mit Methanol 1:1 verdünnen => Lösung 4 mit $c = 0,775 \mu\text{g/ml}$

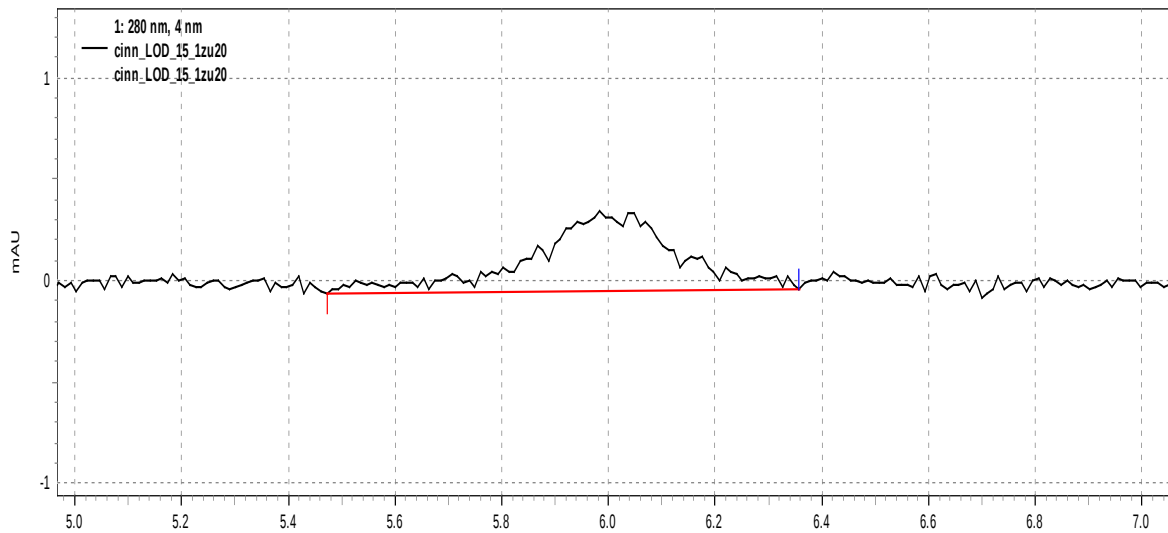


Abb. 66: Chromatogramm einer Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration $0,775 \mu\text{g/ml}$ Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30), das für die graphische Auswertung der Detektionsgrenze verwendet wurde.

Zur Bestimmung der Quantifizierungsgrenze wurde die Cinnarizin-Standardlösung mit der Konzentration $203 \mu\text{g/ml}$ von der Linearitätsmessung verwendet. Diese Lösung wurde 1:100 mit Methanol verdünnt, indem $100 \mu\text{l}$ der Lösung in einem 10 ml Messkolben mit Methanol aufgefüllt wurden. Die Konzentration der verdünnten Lösung betrug $2,03 \mu\text{g/ml}$.

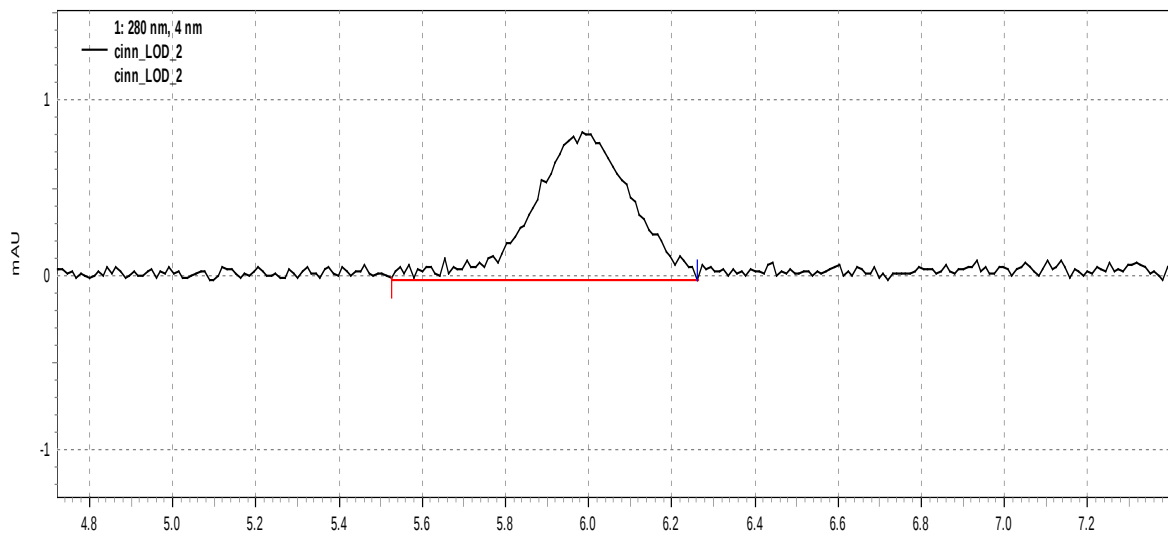


Abb. 67: Chromatogramm einer Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration $2,03 \mu\text{g/ml}$ Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30), das für die graphische Auswertung der Quantifizierungsgrenze verwendet wurde.

In diesem chromatographischen System liegt die Detektionsgrenze von Cinnarizin bei einer Konzentration von 0,775 µg/ml und die Quantifizierungsgrenze bei einer Konzentration von 2,03 µg/ml.

10.6.5 Robustheit

Zur Ermittlung der Robustheit wurde einerseits die Flussrate, andererseits der Anteil an Methanol in der mobilen Phase geändert. Für die Messungen wurde die Cinnarizin-Standardlösung mit der Konzentration 303 µg/ml von der Linearitätsbestimmung verwendet.

Änderung der Flussrate

Zuerst wurde die Flussrate von 1 ml/min auf 0,9 ml/min erniedrigt und anschließend auf 1,1 ml/min erhöht. Dabei wurde festgestellt, dass die Änderungen großen Einfluss auf die Retentionszeiten und die Wiederfindung haben. Die Werte der Wiederfindung lagen bei einer Flussrate von 0,9 ml/min über den akzeptierten 105% und bei 1,1 ml/min unter den akzeptierten 95%.

	Rt	Peakfläche	c [µg/ml]	%
250 nm	6,485	21945299	336,207	110,96
280 nm	6,485	2051702	345,172	113,92

Tab. 28: Cinnarizin: Robustheit, Flussrate 0,9 ml/min

	Rt	Peakfläche	c [µg/ml]	%
250 nm	5,355	18005134	279,300	92,18
280 nm	5,355	1662669	277,647	91,63

Tab. 29: Cinnarizin: Robustheit, Flussrate 1,1 ml/min

Änderung des Anteils an Methanol in der mobilen Phase

Hierbei wurde zuerst der Anteil an Methanol von 60% auf 58% erniedrigt und anschließend auf 62% erhöht. Die Flussrate blieb dabei unverändert bei 1 ml/min. Anhand der Chromatogramme war zu erkennen, dass die Änderung der Methanol-Konzentration zwar Einfluss auf die Retentionszeit, aber keinen auf die Wiederfindung hat. Nimmt die Konzentration an Methanol ab, so nimmt die Retentionszeit zu und umgekehrt.

	Rt	Peakfläche	c [µg/ml]	%
250 nm	6,869	19752592	304,538	100,51
280 nm	6,869	1821849	305,276	100,75

Tab. 30: Cinnarizin: Robustheit, Methanol 58%

	Rt	Peakfläche	c [µg/ml]	%
250 nm	5,109	19783809	304,989	100,66
280 nm	5,109	1813921	303,900	100,30

Tab. 31: Cinnarizin: Robustheit, Methanol 62%

10.7 Vorversuche zur Bestimmung von Donepezil HCl

Bei der Elution mit Methanol/Triethylamin-Puffer im Verhältnis 60:40 betrug die Retentionszeit des Donepezil HCl einer Aricept® 5mg-Filmtablette 1,632 Minuten. Da die Retentionszeit zu kurz war und sich der Donepezil-Peak mit dem Einspritz-Peak überlappen konnte, wurde die mobile Phase verändert. Dazu wurden 30µl derselben Aricept®-Probelösung mit Methanol/Triethylamin-Puffer im Verhältnis 50:50 eluiert. Auch diesmal erfolgte die Elution mit einer Retentionszeit von 1,984 Minuten zu rasch. Daraufhin wurden 20µl der Probelösung mit Methanol/Triethylamin-Puffer im Verhältnis 40:60 eluiert. Die Elution erfolgte mit einer Retentionszeit von 2,997 Minuten deutlich langsamer als bei den ersten beiden Versuchen, dennoch wurde versucht die Retentionszeit zu verlängern. Aus diesem Grund wurde der Anteil an Methanol in der mobilen Phase auf 30% erniedrigt und die Probelösung erneut injiziert. Hierbei betrug die Retentionszeit 6,997 Minuten, welche für die Bestimmung etwas zu lange dauerte. Schließlich wurde versucht, eine Retentionszeit zwischen 2,997 und 6,997 zu erhalten, indem das Verhältnis von Methanol/Triethylamin-Puffer auf 35:65 eingestellt wurde. Die Retentionszeit betrug nun 4,341 Minuten und war für weitere Analysenzwecke optimal. (s. Abb. 68)

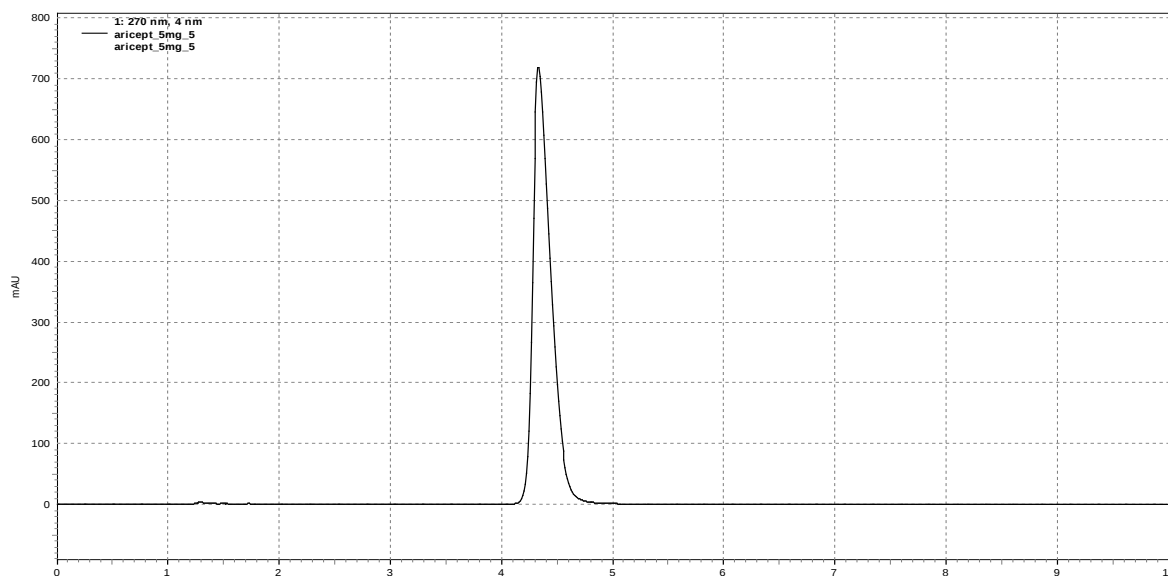


Abb. 68: Chromatogramm von Donepezil HCl aus einer Aricept® 5mg-Filmtablette

Die Retentionszeit des Donepezil HCl einer Aricept® 10mg-Filmtablette betrug 4,469 Minuten. Der Donepezil-Peak war jedoch im Vergleich zur Probelösung der Aricept® 5mg-Filmtablette viel zu breit und wies eine Schulter auf. Aufgrund der Form des Peaks wurde ein Löslichkeitsproblem vermutet, welches durch eine zu kurze Equilibrierung bedingt war. Daher wurde vor der nächsten Injektion der Aricept®-Probelösung 20 Minuten lang equilibriert. Die Retentionszeit des Donepezils war wieder 4,469 Minuten und auch die Form des Peaks blieb unverändert. Als nächstes wurde vermutet, dass die Konzentration der Probelösung zu hoch war, weshalb die Lösung 1:1 mit Methanol verdünnt und nochmal ins HPLC-System injiziert wurde. Die Konzentration der Probelösung betrug dabei 24,9µg/ml. Auch diesmal wies der Donepezil-Peak starkes Fronting auf. Schließlich wurde die mobile Phase geändert, indem das Verhältnis von Methanol/Triethylamin-Puffer auf 40:60 eingestellt wurde. Mit diesem System wurde die verdünnte Probelösung mit der Konzentration 24,9µg/ml nochmal vermessen. Der Donepezil-Peak erschien zwar früher, nämlich bei der Rt 3,072 und war etwas schmaler, dennoch wies er Fronting auf.

Um auch Fehler bei der Bereitung der Probelösung ausschließen zu können, wurde eine neue Aricept® 10mg-Filmtablette derselben Charge abgewogen und pulverisiert. Das Gewicht betrug 0,2854g und etwa die Hälfte (0,1424g) des Pulvers wurde direkt in einen 20ml Messkolben eingewogen. Zum Lösen und Auffüllen wurde Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (50:50) zugesetzt. Da 49,89% des Tablettengewichts eingewogen wurden, betrug die Konzentration der Probelösung 249,45µg Donepezil HCl/ml. Die weitere Aufbereitung der Probelösung erfolgte wie bei der ersten Aricept® 10mg-Filmtablette. Das heißt, die Probelösung wurde wieder filtriert, 1:10 mit Methanol verdünnt und anschließend ins HPLC-System injiziert. Die Konzentration der verdünnten Probelösung betrug dabei

24,945 µg/ml. Auch hier wies der Donepezil-Peak wieder starkes Fronting auf. Trotz der vielen Versuche wurde keine Lösung für das Problem gefunden.

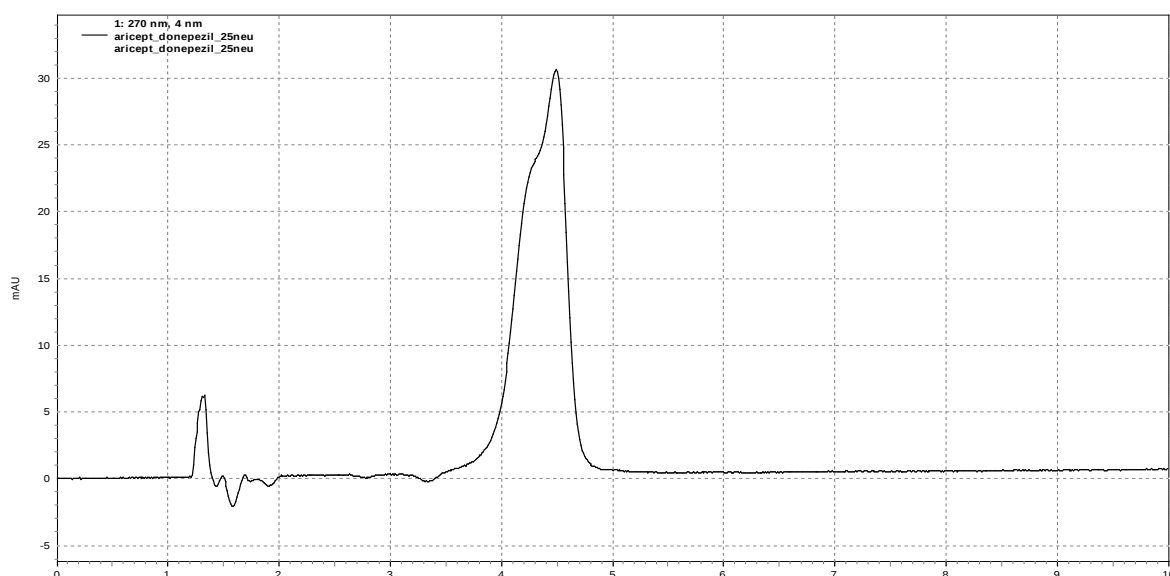


Abb. 69: Chromatogramm von Donepezil HCl aus einer Aricept® 10mg-Filmtablette

10.8 Weiterentwicklungen zur Arzneibuchmonographie von Donepezil HCl

Die Retentionszeit des Donepezil HCl Reference Standards mit der Codenummer 40814 betrug 5,664 Minuten bei der Elution mittels HPLC-System 3. (s. Abb. 70)

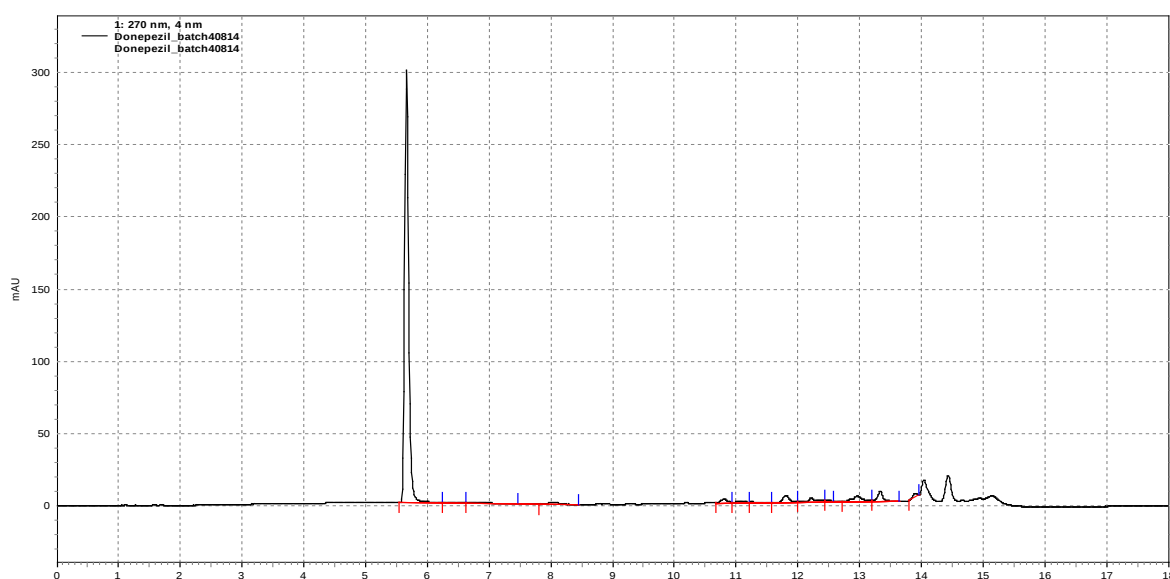


Abb. 70: Chromatogramm einer Donepezil-Probeflösung mit der Konzentration 102,34 µg/ml Wasser/Acetonitril (75:25)

Da das Rauschen der Grundlinie stark war, wurde dieselbe Probelösung nochmals injiziert. Beim zweiten Versuch war das Grundrauschen deutlich geringer und die Retentionszeit betrug 5,760 Minuten.

Somit wurde festgestellt, dass sich die Retentionszeit des Donepezil HCl zwischen 5,6 und 5,7 Minuten befinden musste.

Kalibrationsgerade zur Gehaltsbestimmung von Donepezil HCl

Die Ermittlung der Kalibrationsgerade erfolgte mit Hilfe der Konzentrationen und der entsprechenden Peakflächen der fünf Donepezil-Standardlösungen.

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
125,32	1584121	1582940	1581104	1582722
107,30	1366111	1369050	1370689	1368617
75,62	990307	990555	990634	990499
116,31	1468937	1467160	1468908	1468335
91,46	1169421	1170316	1170176	1169971

Tab. 32: Werte für die Kalibrationsgerade zur Gehaltsbestimmung von Donepezil HCl

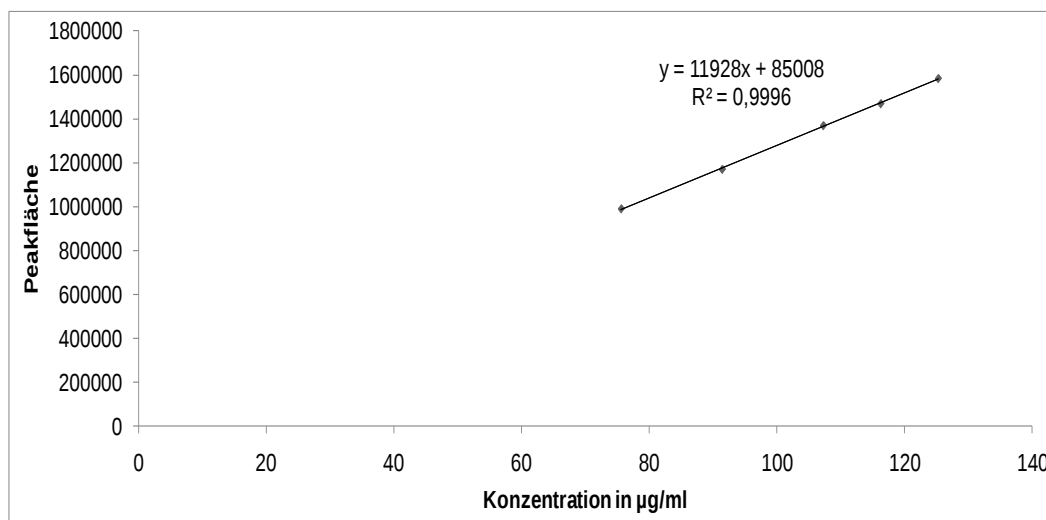


Abb. 71: Kalibrationsgerade zur Gehaltsbestimmung von Donepezil HCl

Da das Bestimmtheitsmaß R^2 0,9996 beträgt, kann die Kalibrationsgerade für Berechnungen des Gehalts von Donepezil HCl verwendet werden.

Kalibrationsgerade zur Bestimmung von Related Substances

Die Ermittlung der Kalibrationsgerade erfolgte mit Hilfe der Konzentrationen und der entsprechenden Peakflächen der fünf Donepezil-Standardlösungen.

Konz. µg/ml	Peakfläche			Mittelwert
	Rep 1	Rep 2	Rep 3	
12,532	153690	157663	157324	156226
10,73	136844	136649	135882	136458
7,562	99719	99619	98944	99427
11,631	147273	147799	145283	146785
9,146	116909	117078	117365	117117

Tab. 33: Werte für die Kalibrationsgerade zur Bestimmung von Related Substances

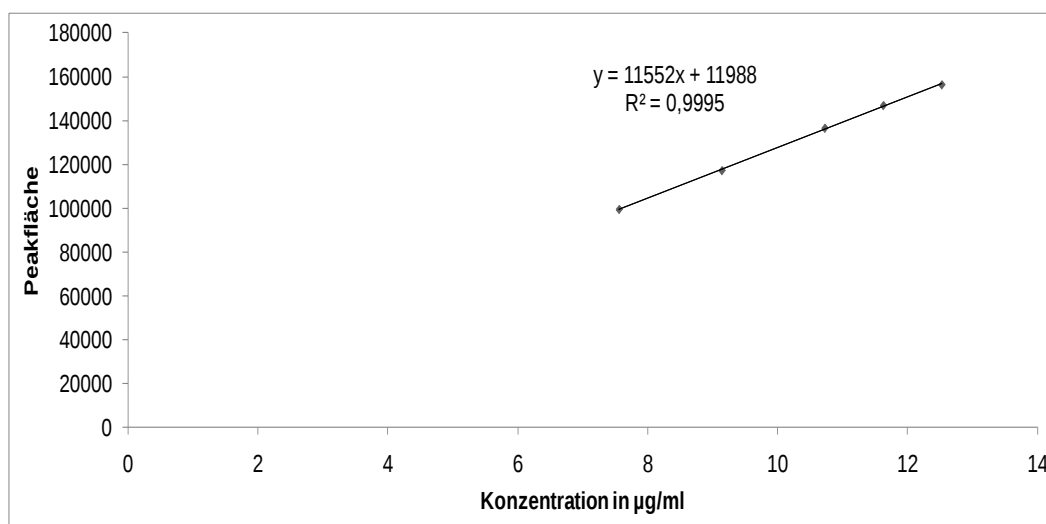


Abb. 72: Kalibrationsgerade zur Bestimmung von Related Substances des Donepezil HCl

Weil das Bestimmtheitsmaß R^2 0,9995 beträgt, kann die Kalibrationsgerade für Berechnungen der Related Substances von Donepezil HCl verwendet werden.

11. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema einer HPLC-Apparatur	10
Abb. 2: Strukturformel von Cinnarizin.....	19
Abb. 3: Strukturformel von Donepezil.....	22
Abb. 4: Chromatogramm einer Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 207µg/ml Wasser mit 2% Essigsäure (1. Peak) und einer Nipagin-Lösung mit der Konzentration 204µg/ml Methanol/Wasser (50:50) (2. Peak) als internem Standard.....	48
Abb. 5: Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	49
Abb. 6: Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	50
Abb. 7: Chromatogramm der Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 600µg/ml, die 264 Minuten lang im Suntest bestrahlt wurde.....	51
Abb. 8: Chromatogramm der Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2000µg/ml, die 264 Minuten lang im Suntest bestrahlt wurde.....	51
Abb. 9: Chromatogramm der Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 600µg/ml, die 259 Minuten lang im Trockenschrank erhitzt wurde	52
Abb. 10: Chromatogramm der Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2000µg/ml, die 259 Minuten lang im Trockenschrank erhitzt wurde	52
Abb. 11: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H ₂ O mit 2% Essigsäure (50:50), die eine Stunde lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (mobile Phase: Methanol/Ammoniumacetat-Puffer (70:30))	53
Abb. 12: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Ammoniumacetat-Puffer (65:35) eluiert wurde.....	54
Abb. 13: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Ammoniumacetat-Puffer (60:40) eluiert wurde.....	54
Abb. 14: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Triethylamin-Puffer (60:40) eluiert wurde.....	55
Abb. 15: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Triethylamin-Puffer (60:40) eluiert wurde. (Säule: BDS-Hypersil C18).....	55
Abb. 16: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30) eluiert wurde. (Säule: BDS-Hypersil C18).....	56
Abb. 17: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die mit der mobilen Phase Methanol/Triethylamin-Puffer (65:35) eluiert wurde. (Säule: BDS-Hypersil C18).....	56
Abb. 18: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: 5µl, 10µl und 15µl UV-bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)	57
Abb. 19: DC mit folgendem Auftrageschema: links und rechts: Cinnarizin-Standard, Mitte: UV-bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat gesättigt mit 2N Ammoniak (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)	58
Abb. 20: Erste DC mit folgendem Auftrageschema: links und rechts: Cinnarizin-Standard, Mitte: UV-bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm).....	59

Abb. 21: Zweite DC mit folgendem Auftrageschema: links und rechts: Cinnarizin-Standard, Mitte: UV- bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm).....	59
Abb. 22: Dritte DC mit folgendem Auftrageschema: links und rechts: Cinnarizin-Standard, Mitte: UV- bestrahlte Cinnarizin-Probeflösung, Fließmittel: Ethylacetat (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm).....	60
Abb. 23: Chromatogramm der Mischung aus UV-bestrahlter Cinnarizin-Probeflösung und Cinnarizin- Standard, beide Lösungen stammten von vorherigen DC-Untersuchungen (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$)	60
Abb. 24: Chromatogramm der UV-bestrahlten Cinnarizin-Probeflösung, die auch auf DC-Platten aufgetragen wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$).....	61
Abb. 25: Chromatogramm des Cinnarizin-Standards, der auch auf DC-Platten aufgetragen wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$).....	61
Abb. 26: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H ₂ O mit 2% Essigsäure (50:50), die 10 Minuten lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$).....	62
Abb. 27: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H ₂ O mit 2% Essigsäure (50:50), die 120 Minuten lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$).....	62
Abb. 28: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H ₂ O mit 2% Essigsäure (50:50), die 600 Minuten lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$).....	63
Abb. 29: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H ₂ O mit 2% Essigsäure (50:50), die 1020 Minuten lang mit UV 254nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$).....	64
Abb. 30: Massenspektrum des Cinnarizin-Abbauproduktes mit der Rt 2,2.....	67
Abb. 31: Massenspektrum des Cinnarizin-Abbauproduktes mit der Rt 4,1.....	67
Abb. 32: Massenspektrum des Cinnarizins mit der Rt 8,9.....	68
Abb. 33: Massenspektrum des Cinnarizin-Abbauproduktes mit der Rt 12,1.....	69
Abb. 34: Massenspektrum des Cinnarizin-Abbauproduktes mit der Rt 16,2.....	69
Abb. 35: Strukturformeln von links nach rechts: Zimtaldehyd, Zimtalkohol, Benzophenon, Benzhydrol, Cinnamylpiperazin und Benzhydrylpiperazin.....	70
Abb. 36: Strukturformel des Diphenylmethan-Ions.....	71
Abb. 37: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H ₂ O mit 2% Essigsäure (50:50), die 60 Minuten lang mit UV 366nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$).....	72
Abb. 38: Chromatogramm einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H ₂ O mit 2% Essigsäure (50:50), die 120 Minuten lang mit UV 366nm bestrahlt wurde (Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$).....	73

Abb. 39: Chromatogramm einer fünf Tage alten Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 355µg/ml Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30), die 1 Stunde lang bei 100°C am Rückflusskühler erhitzt wurde.....	74
Abb. 40: Chromatogramm einer zehn Tage alten Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration 353µg/ml Wasser/6N Salzsäure (4:1), die 1 Stunde lang bei 100°C am Rückflusskühler erhitzt wurde.....	74
Abb. 41: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Kristall-Lösung, Mutterlauge-Kristall-Mischung, Cinnarizin-Standard, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm)	75
Abb. 42: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: UV-bestrahltes Cinnarizin, Kristall-Lösung in CDCl ₃ , Kristall-Lösung in MeOH, Cinnarizin-Standard, Mutterlauge-Kristall-Mischung, Mutterlauge (links: DC bei 254nm, rechts: DC bei 366nm).....	76
Abb. 43: Chromatogramm der Mutterlauge einer Cinnarizin-Probeflösung mit der Konzentration 5,01mg/ml 0,5M HCl, die 72 Stunden lang im Trockenschrank bei 90°C hydrolysiert wurde	77
Abb. 44: Chromatogramm einer Mischung aus Mutterlauge und Cinnarizin-Standard	77
Abb. 45: Chromatogramm der Kristall-Lösung in CDCl ₃ , Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer pH4 (60:40), Laufzeit: 10 Minuten	78
Abb. 46: Chromatogramm der Kristall-Lösung in CDCl ₃ , Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30), Laufzeit: 30 Minuten.....	78
Abb. 47: Chromatogramm der Kristall-Lösung in MeOH, Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (60:40), Laufzeit: 30 Minuten	79
Abb. 48: Chromatogramm der Kristall-Lösung in MeOH, Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30), Laufzeit: 30 Minuten	80
Abb. 49: UV-Spektrum des Peaks bei Rt 23,3 von der Kristall-Lösung	80
Abb. 50: UV-Spektrum des Benzhydrols	81
Abb. 51: Chromatogramm der Mutterlauge-Lösung, Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30), Laufzeit: 30 Minuten	81
Abb. 52: Chromatogramm der Mutterlauge-Kristall-Mischung, Mobile Phase: Methanol/Triethylamin-Puffer (70:30), Laufzeit: 30 Minuten	82
Abb. 53: Massenspektrum des Hydrolyse-Abbauproduktes mit der Rt 1,75 aus der Mutterlauge ...	83
Abb. 54: Massenspektrum des Cinnarizin-Standards.....	84
Abb. 55: Massenspektrum des Hydrolyse-Abbauproduktes, das Kristalle bildet	85
Abb. 56: Strukturformeln von links nach rechts: Dibenzhydrolether, Benzhydrol und Cinnamylpiperazin	86
Abb. 57: Chromatogramm des Extraktes einer Cinnabene®-Kapsel samt Kapselhülle und -inhalt.	86
Abb. 58: Chromatogramm des Cinnabene®-Kapselinhalts, der mit Methanol extrahiert wurde.....	87
Abb. 59: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnarizin-Standard, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (links: DC Merck bei 254nm, rechts: DC Macherey-Nagel bei 254nm)	88

Abb. 60: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnarizin-Standard, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (links: DC Merck bei 254nm, rechts: DC Macherey-Nagel bei 254nm).....	89
Abb. 61: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnarizin-Standard, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (DC Merck bei 254nm).....	89
Abb. 62: DC mit Auftrageschema von links nach rechts: Cinnabene®-Kapselinhalt, Cinnarizin-Standard + UV-bestrahltes Cinnarizin, UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnarizin-Standard, Cinnabene®-Kapselinhalt + UV-bestrahltes Cinnarizin, Cinnabene®-Kapselinhalt + Cinnarizin-Standard (links: Fließmittel: Ethylacetat, rechts: Fließmittel: Ethylacetat/Dichlormethan (70:30))	90
Abb. 63: Chromatogramm von Cinnarizin aus einer Stutgeron® 75mg-Kapsel	91
Abb. 64: Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	93
Abb. 65: Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	94
Abb. 66: Chromatogramm einer Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration $0,775\mu\text{g/ml}$ Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30), das für die graphische Auswertung der Detektionsgrenze verwendet wurde.	100
Abb. 67: Chromatogramm einer Cinnarizin-Lösung mit der Konzentration $2,03\mu\text{g/ml}$ Methanol/Wasser mit 2% Essigsäure (70:30), das für die graphische Auswertung der Quantifizierungsgrenze verwendet wurde.	100
Abb. 68: Chromatogramm von Donepezil HCl aus einer Aricept® 5mg-Filmtablette	103
Abb. 69: Chromatogramm von Donepezil HCl aus einer Aricept® 10mg-Filmtablette	104
Abb. 70: Chromatogramm einer Donepezil-Probelösung mit der Konzentration $102,34\mu\text{g/ml}$ Wasser/Acetonitril (75:25).....	104
Abb. 71: Kalibrationsgerade zur Gehaltsbestimmung von Donepezil HCl	105
Abb. 72: Kalibrationsgerade zur Bestimmung von Related Substances des Donepezil HCl.....	106

12. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zeitprogramm für Gradientenelution	35
Tab. 2: Werte für die Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	49
Tab. 3: Werte für die Kalibrationsgerade von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	49
Tab. 4: Wiederfindung von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	50
Tab. 5: Wiederfindung von Cinnarizin, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	50
Tab. 6: Verlauf der Peakflächenzunahme der Abbauprodukte einer Cinnarizin-Probelösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H ₂ O mit 2% Essigsäure (50:50) bei Bestrahlung mit UV 254nm (Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$)	65
Tab. 7: Verlauf der Peakflächenzunahme des Hauptabbauproduktes einer Cinnarizin-Probelösung mit der Konzentration 2mg/ml Methanol/H ₂ O mit 2% Essigsäure (50:50) bei Bestrahlung mit UV254nm (Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$)	66
Tab. 8: Wiederfindung von Cinnarizin aus Stutgeron® 75mg-Kapseln, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	91
Tab. 9: Wiederfindung von Cinnarizin aus Stutgeron® 75mg-Kapseln, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	91
Tab. 10: Cinnarizin: Linearität, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	93
Tab. 11: Cinnarizin: Linearität, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	93
Tab. 12: Cinnarizin: Richtigkeit von 83%, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	95
Tab. 13: Cinnarizin: Richtigkeit von 83%, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	95
Tab. 14: Cinnarizin: Richtigkeit von 100%, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	95
Tab. 15: Cinnarizin: Richtigkeit von 100%, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	96
Tab. 16: Cinnarizin: Richtigkeit von 117%, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	96
Tab. 17: Cinnarizin: Richtigkeit von 117%, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	96
Tab. 18: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 1. Tag, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	97
Tab. 19: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 1. Tag, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	97
Tab. 20: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 2. Tag, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	97
Tab. 21: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 2. Tag, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	97
Tab. 22: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 3. Tag, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	97
Tab. 23: Cinnarizin: Tag zu Tag Präzision, 3. Tag, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	98
Tab. 24: Cinnarizin: Intermediate Precision, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	98
Tab. 25: Cinnarizin: Intermediate Precision, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	98
Tab. 26: Cinnarizin: Wiederholbarkeit, Detektion bei $\lambda=250\text{nm}$	99
Tab. 27: Cinnarizin: Wiederholbarkeit, Detektion bei $\lambda=280\text{nm}$	99
Tab. 28: Cinnarizin: Robustheit, Flussrate 0,9 ml/min	101
Tab. 29: Cinnarizin: Robustheit, Flussrate 1,1 ml/min	101
Tab. 30: Cinnarizin: Robustheit, Methanol 58%	102
Tab. 31: Cinnarizin: Robustheit, Methanol 62%	102
Tab. 32: Werte für die Kalibrationsgerade zur Gehaltsbestimmung von Donepezil HCl	105
Tab. 33: Werte für die Kalibrationsgerade zur Bestimmung von Related Substances	106

13. Literaturverzeichnis

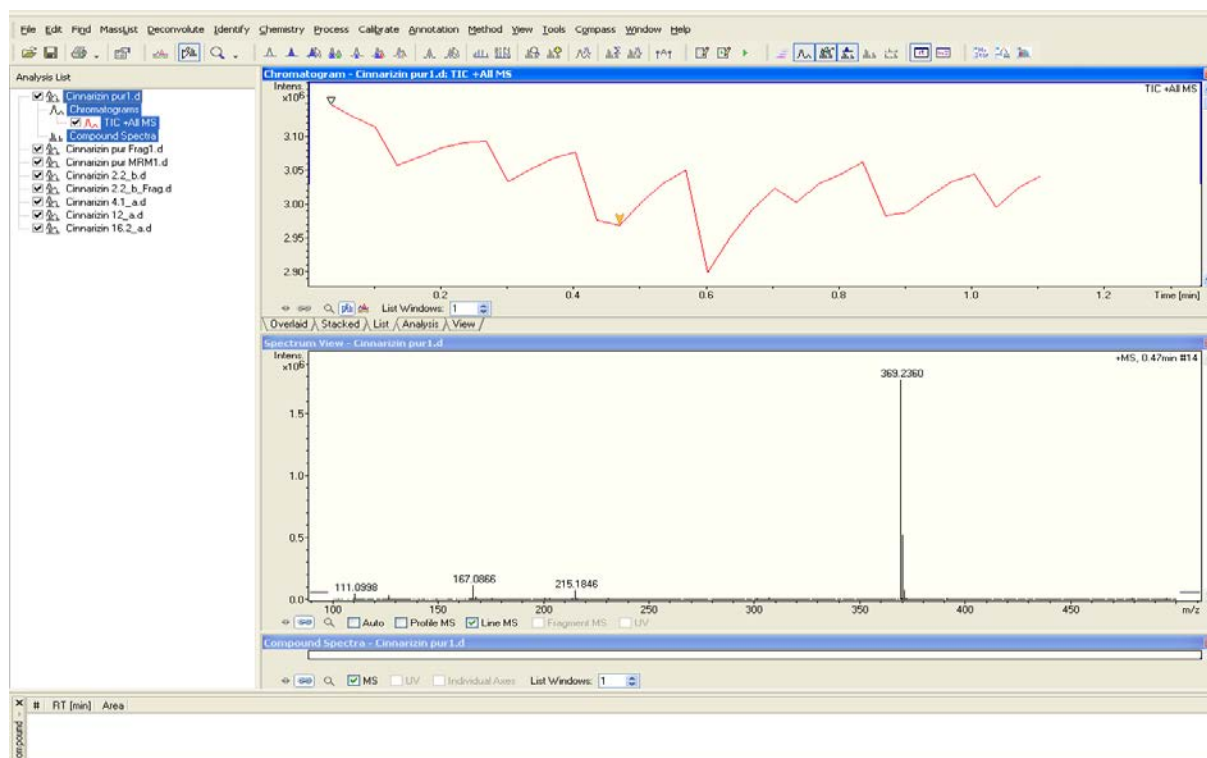
- [1] Berthold Göber, Peter Surmann: *Arzneimittelkontrolle Drug Control*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2005
- [2] Kenneth A. Connors, Gordon L. Amidon, Valentino J. Stella: *Chemical Stability of Pharmaceuticals, A Handbook for Pharmacists*. Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., 1986
- [3] A. Albini, E. Fasani: *Drugs – Photochemistry and Photostability*. Spec. Publ. – R. Soc. Chem. 225, 1-73 (1998)
- [4] *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B*. ICH Steering Committee, November 1996
- [5] Veronika R. Meyer: *Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie*. 6. durchgesehene Auflage, Otto Salle Verlag GmbH & Co., Frankfurt am Main, Verlag Sauerländer AG, Aarau, 1990
- [6] Frey Hans-Peter, Zieloff Klaus: *Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie: Grundlagen und Praxis*. VCH-Verl.-Ges., Weinheim, 1993
- [7] Dr.med. Arne Schäffler (Hrsg.): *Gesundheit Heute: Krankheit-Diagnose-Therapie. Das Handbuch für Schulmedizin, Naturheilkunde und Selbsthilfe*. 2. Auflage, Knauer Ratgeber Verlag, ein Unternehmen der Droemerschens Verlagsanstalt Th. Knauer Nachf. GmbH & Co. KG, München 2008
- [8] Mutschler E.: *Arzneimittelwirkungen*. 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001
- [9] *The Merck Index*. Thirteenth Edition, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, 2001
- [10] *Europäisches Arzneibuch*. 6.Ausgabe, Grundwerk 2008
- [11] *Austria-Codex Fachinformation 2007/2008*, Österreichische Apotheker-Verlagsgesellschaft m.b.H., Wien 2008
- [12] Yousif A. Asiri, Gamal A.E. Mostafa: *Donepezil*. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology, Volume 35, Elsevier Inc., 2010
- [13] *Austria-Codex Fachinformation 2010/2011*, Österreichische Apotheker-Verlagsgesellschaft m.b.H., Wien 2010
- [14] Vesna Jelic, Taher Darreh-Shori: *Donepezil: A Review of Pharmacological Characteristics and Role in the Management of Alzheimer Disease*. Clinical Medicine Insights: Therapeutics 2010: 2 771-788, Libertas Academica Ltd.
- [15] Saad S.M. Hassan, Mohamed A.F. Elmosallamy, Alaa B. Abbas: *LC and TLC determination of cinnarizine in pharmaceutical preparations and serum*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28 (2002) 711-719, Elsevier Science B.V., 2002

-
- [16] Liu Kui, Rong Xin-yu, Liu Hai-bo, Wang Yun-qing, Li Zi-cheng: *Determination of cinnarizine content and its related substances in cinnarizine dispersible tablets by RP-HPLC*. Huaxi Yaoxue Zazhi (2008), 23(2), 227-228, Huaxi Yike Daxue Yaoxueyuan
- [17] Wahbi Abdel-Aziz, El-Walily A., Bedair Mona, El-Gendy Alaa: *Determination of cinnarizine in the presence of its degradation products*. Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences (1993), 34(1-3), 35-46, National Information and Documentation Centre
- [18] Sane R.T., Sahasrabudhe S.P., Nayak V.G., Ladage K.D., Kothurkar R.M.: *High performance liquid chromatographic determination of cinnarizine in pharmaceutical preparations*. Indian Drugs (1989), 26(9), 491-3
- [19] El-Sattar Osama: *High-performance liquid chromatographic and derivative and differential UV spectrophotometric determination of cinnarizine and piracetam mixture in Cinaretam capsules*. Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences (1997), 19 94-107
- [20] A.A. Heda, A.R. Sonawane, G.H. Naranje, P.K. Puranik: *A Rapid Determination of Cinnarizine in Bulk and Pharmaceutical Dosage Forms by LC*. E-Journal of Chemistry 2010, 7(3), 1080-1084
- [21] Rosseel M.T., Lefebvre R.A.: *Sensitive determination of cinnarizine in human plasma by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection*. Chromatographia (1993), 36 356-8
- [22] U.K. Chhalotiya, K.K. Bhatt, D.A. Shah, C.D. Nagda: *Liquid Chromatographic Method for the estimation of Donepezil Hydrochloride in a Pharmaceutical Formulation*. International Journal of ChemTech Research, Vol. 3, No. 1, pp 112-118, Jan-Mar 2011
- [23] Barot Tushar G., Patel P.K.: *RP-HPLC method for the estimation of donepezil hydrochloride dosage form*. E-Journal of Chemistry (2009), 6(2), 594-600
- [24] S. Dharmaraj Santhosam, S. Kannan, S. Lakshmi Devi: *Development and validation of RP-HPLC method for estimation of Donepezil HCl from bulk and marketed dosage forms*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2010, 2(6): 62-67
- [25] Zhang Yuanyuan, Li Fengmei, Su Feng, Li Junfeng, Su Zhongliang: *Quantitative determination of donepezil hydrochloride in orally disintegrable tablets by HPLC*. Ziran Kexueban (2009), 30(3), 214-216
- [26] Sastry B.S., Ganandhamu S., Devadasu C., Balaji K.: *New RP-HPLC method for the estimation of donepezil hydrochloride in pharmaceutical formulations*. International Journal of Chemical Sciences (2008), 6(4), 1976-1983
- [27] Pappa Horacio, Farru Romina, Vilanova Paula Otano, Palacios Marcelo, Pizzorno Maria Teresa: *A new HPLC method to determine Donepezil hydrochloride in tablets*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2002), 27(1-2), 177-182
- [28] Kafkala Stella, Matthaïou Stella, Alexaki Pandora, Abatzis Morfis, Bartzeliotis Antonios, Katsiabani Maria: *New gradient high-performance liquid chromatography method for determination of donepezil hydrochloride assay and impurities content in oral pharmaceutical formulation*. Journal of Chromatography, A (2008), 1189(1-2), 392-397

- [29] *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. ICH Steering Committee, October 1994
- [30] Stavros Kromidas: *Validierung in der Analytik*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1999
- [31] Tokumura Tadakazu, Ichikawa Takaharu, Sugawara Nobuyuki, Tatsuishi Kimio, Kayano Masanori, Komuro Shigemi, Hoshida Haruhiko, Machida Yoshiharu, Nagai Tsuneji: *Degradation pathway of cinnarizine in acidic solution without and with β -cyclodextrin*. *Yakuzaigaku* (1985), 45(4), 321-6

14. Anhang

Cinnarizin im pos. Mode +1 und Formelvorschläge 369, 167



SmartFormula Manually

Min:

Max:

Note: for m < 2000 the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

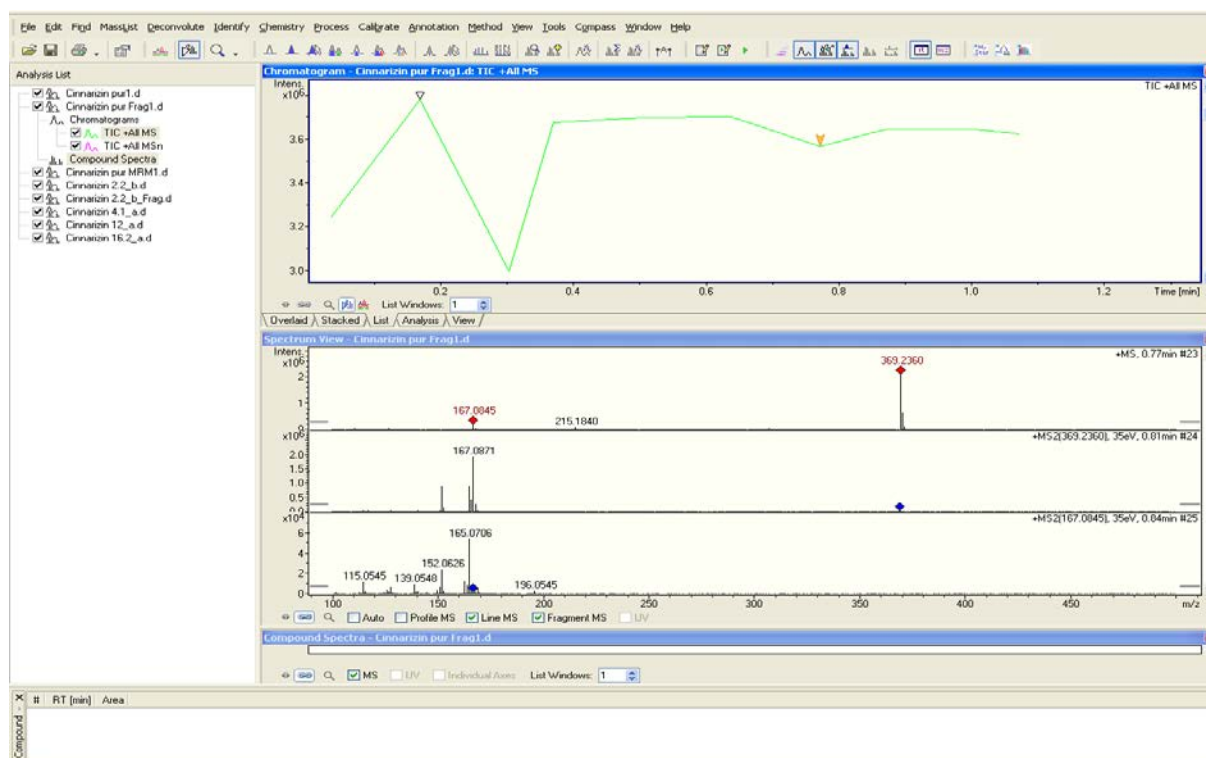
Measured m/z: Tolerance: mDa Charge:

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdB	e ⁻ Conf	N-Rule
369.2360	1	C ₂₆ H ₂₉ N ₂	100.00	369.2325	-3.5	-9.4	3.3	13.5	even	ok
	2	C ₂₀ H ₂₉ N ₆ O	38.81	369.2397	3.8	10.2	33.2	9.5	even	ok

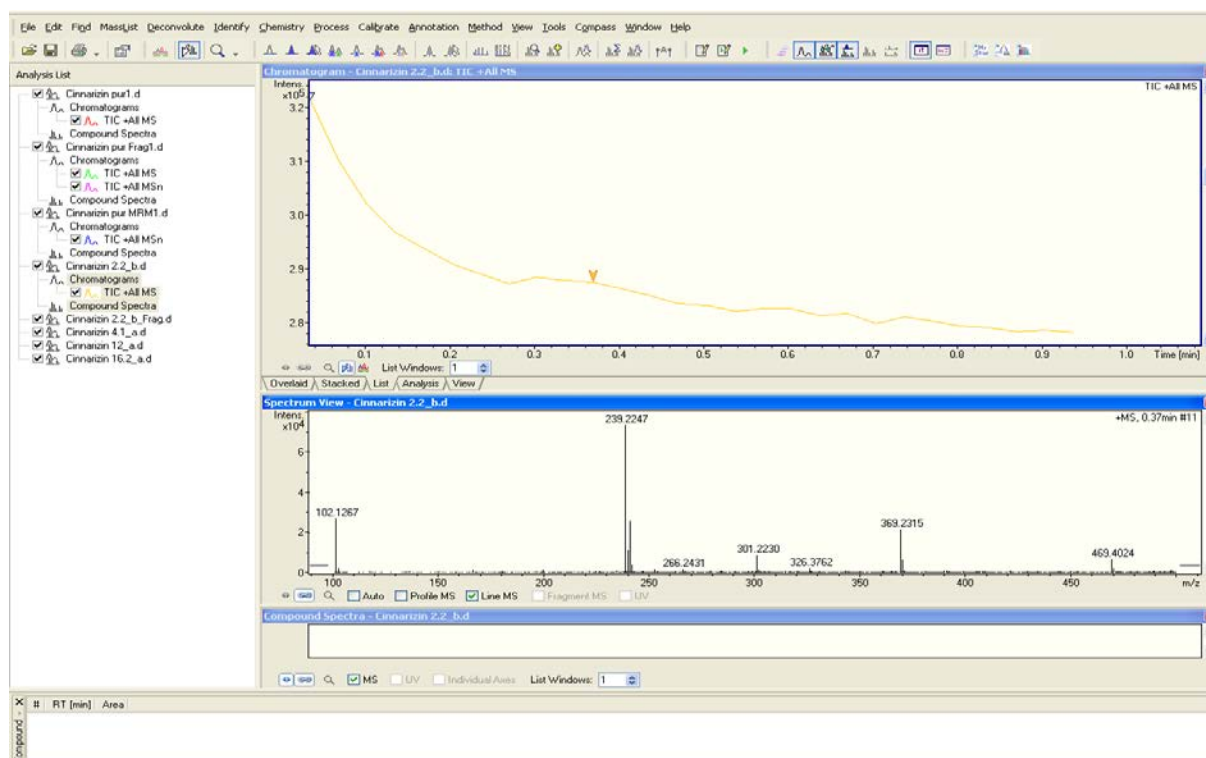
☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas: Electron configuration:

☒ Check rinos plus double bonds Minimum: Maximum: ☒ Filter H/C element ratio Minimum H/C: Maximum H/C:

☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately



Cinnarizin 2.2 und Formelvorschläge 102, 239,301



SmartFormula Manually

Min: Max:

Generate

Note: for m < 2000 the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

Measured m/z: Tolerance: mDa Charge:

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
102.1264	1	C 6 H 16 N	100.00	102.1277	1.3	12.8	7.1	-0.5	even	ok

☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas:

☒ Check rings plus double bonds Minimum: Maximum:

☒ Filter H/C element ratio Minimum H/C: Maximum H/C:

☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately

Show Pattern

SmartFormula Manually ? ✕

Min: Generate

Max: Help

Note: for $m < 2000$ the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

Measured m/z : Tolerance: mDa Charge:

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
239.2243	1	C 13 H 27 N 4	100.00	239.2230	-1.3	-5.4	200.0	2.5	even	ok

☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas:

☒ Check rings plus double bonds Minimum: Maximum:

☒ Filter H/C element ratio Minimum H/C: Maximum H/C:

☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately

Show Pattern

SmartFormula Manually ? ✕

Min: Generate

Max: Help

Note: for $m < 2000$ the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

Measured m/z : Tolerance: mDa Charge:

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
301.2231	1	C 14 H 29 N 4 O 3	100.00	301.2234	0.3	1.0	9.4	2.5	even	ok
	2	C 10 H 25 N 10 O	23.92	301.2207	-2.4	-7.9	15.7	3.5	even	ok

☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas:

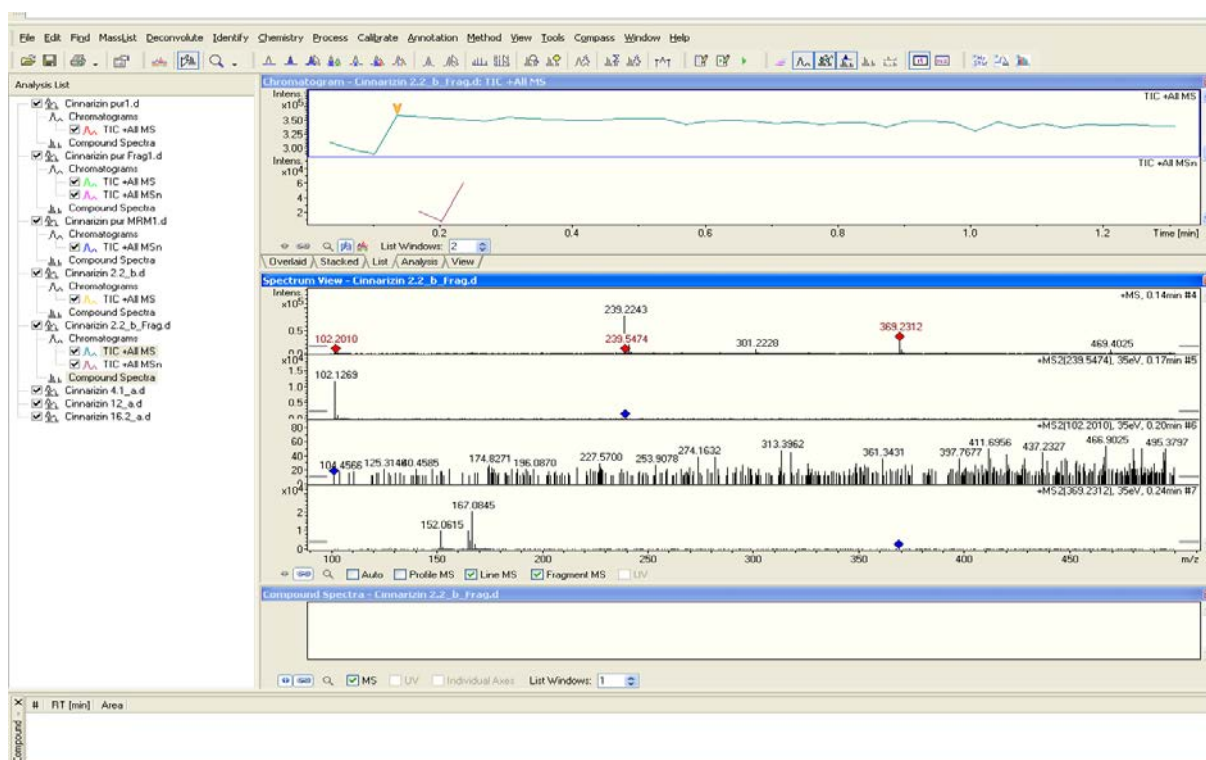
☒ Check rings plus double bonds Minimum: Maximum:

☒ Filter H/C element ratio Minimum H/C: Maximum H/C:

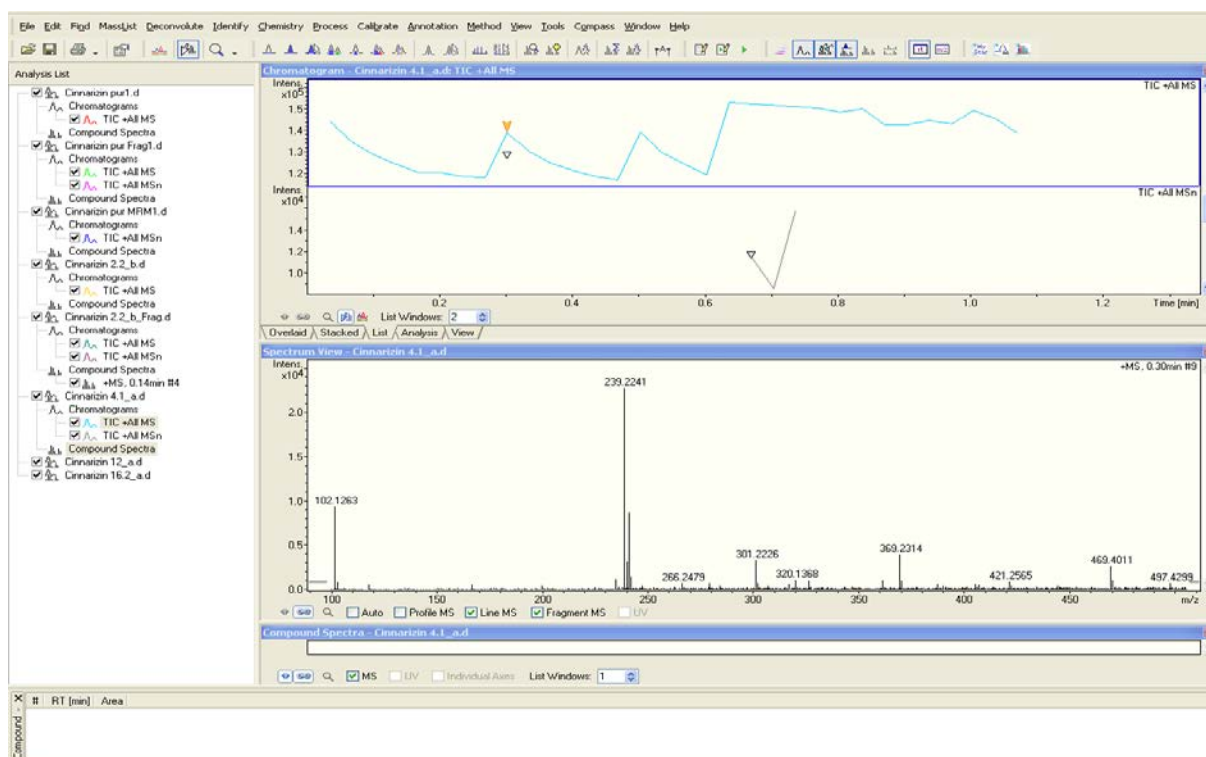
☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately

Show Pattern

Cinnarizin 2.2 Fragmentierungen



Cinnarizin 4.1 und Formelvorschläge 326, 469



SmartFormula Manually ? ✕

Min
 Max

Note: for $m < 2000$ the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

Measured m/z Tolerance mDa Charge

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
326.3799	1	C 22 H 48 N	100.00	326.3781	-1.7	-5.4	48.1	-0.5	even	ok

☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas
☒ Check rings plus double bonds Minimum Maximum
 Electron configuration
☒ Filter H/C element ratio Minimum H/C Maximum H/C
☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately

SmartFormula Manually ? ✕

Min
 Max

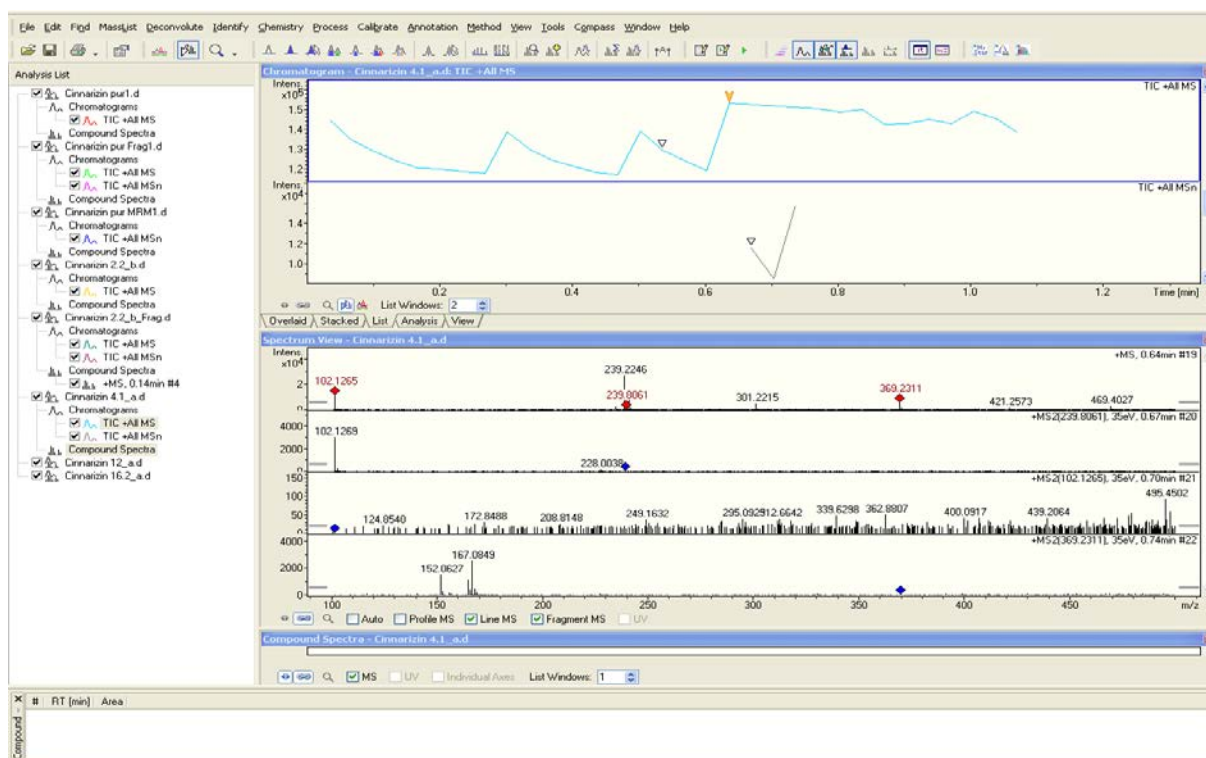
Note: for $m < 2000$ the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

Measured m/z Tolerance mDa Charge

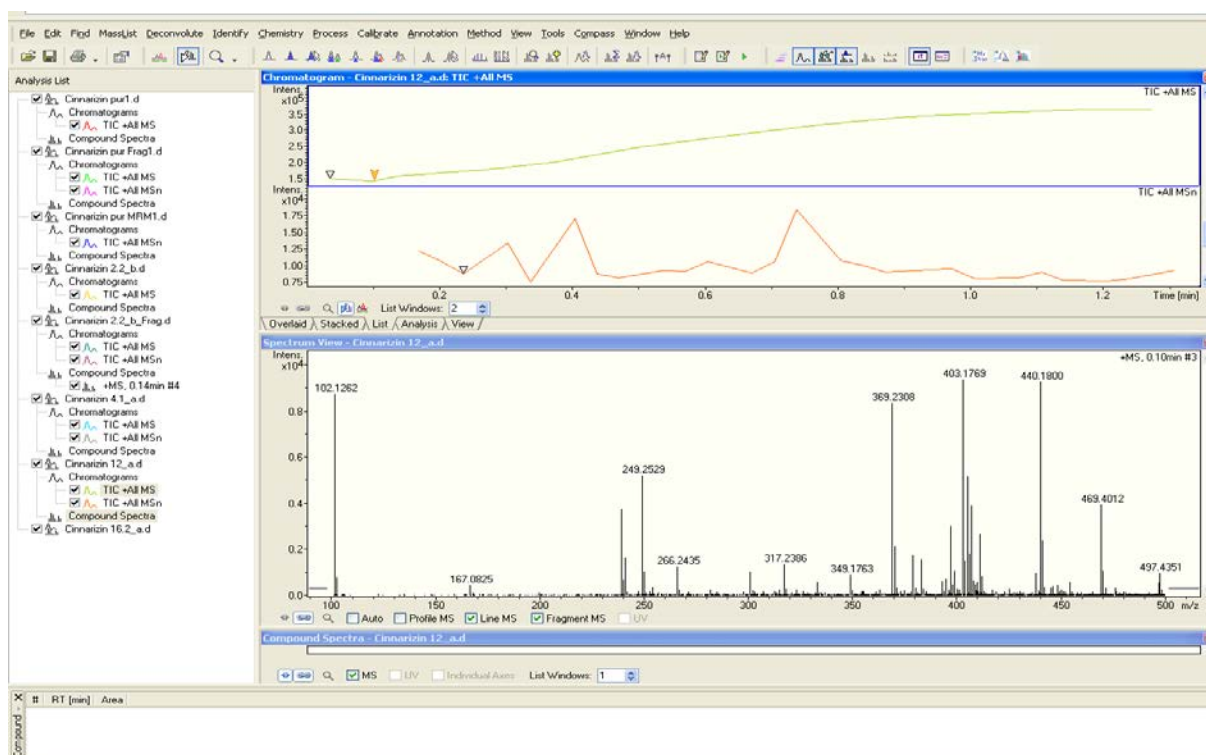
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
469.4011	1	C 32 H 53 O 2	21.56	469.4040	2.9	6.3	32.3	6.5	even	ok
	2	C 28 H 49 N 6	100.00	469.4013	0.3	0.5	44.0	7.5	even	ok

☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas
☒ Check rings plus double bonds Minimum Maximum
 Electron configuration
☒ Filter H/C element ratio Minimum H/C Maximum H/C
☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately

Cinnarizin 4.1 Fragmentierung



Cinnarizin 12 und Formelvorschläge 403, 440



SmartFormula Manually

Min: Max: Generate Help

Note: for m < 2000 the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

Measured m/z: Tolerance: mDa Charge:

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
403.1769	1	C ₂₈ H ₂₃ N ₂ O	100.00	403.1805	3.6	9.0	280.0	18.5	even	ok
	2	C ₂₂ H ₂₇ O ₇	61.50	403.1751	-1.7	-4.3	298.3	9.5	even	ok
	3	C ₁₁ H ₂₇ N ₆ O ₁₀	50.71	403.1783	1.4	3.6	301.5	1.5	even	ok
	4	C ₂₃ H ₂₃ N ₄ O ₃	85.36	403.1765	-0.4	-1.0	302.0	14.5	even	ok
	5	C ₁₂ H ₂₃ N ₁₀ O ₆	12.25	403.1797	2.8	6.9	304.5	6.5	even	ok
	6	C ₁₉ H ₁₉ N ₁₀ O	7.01	403.1738	-3.1	-7.7	306.6	15.5	even	ok
	7	C ₉ H ₁₅ N ₂₀	13.16	403.1783	1.4	3.6	312.3	12.5	even	ok

☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas:
☒ Check rings plus double bonds Minimum: Maximum:
 Electron configuration:
☒ Filter H/C element ratio Minimum H/C: Maximum H/C:
☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately Show Pattern

SmartFormula Manually

Min: Max: Generate Help

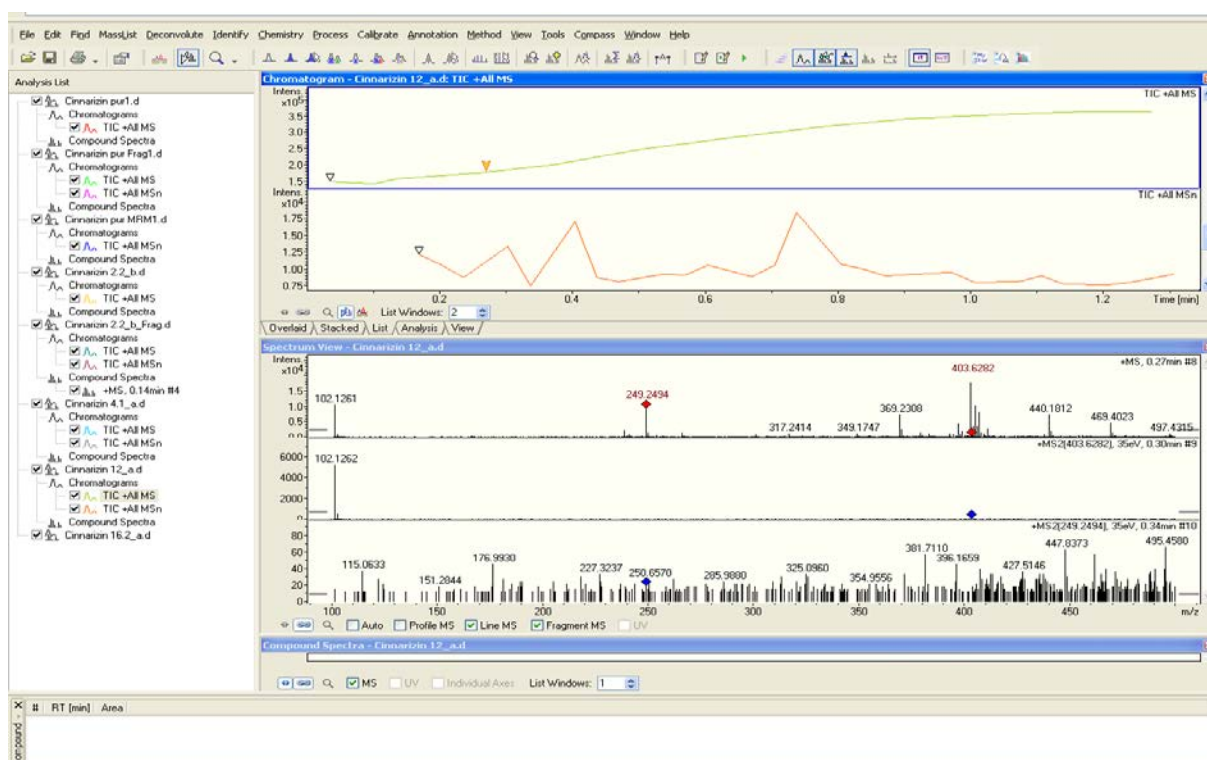
Note: for m < 2000 the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

Measured m/z: Tolerance: mDa Charge:

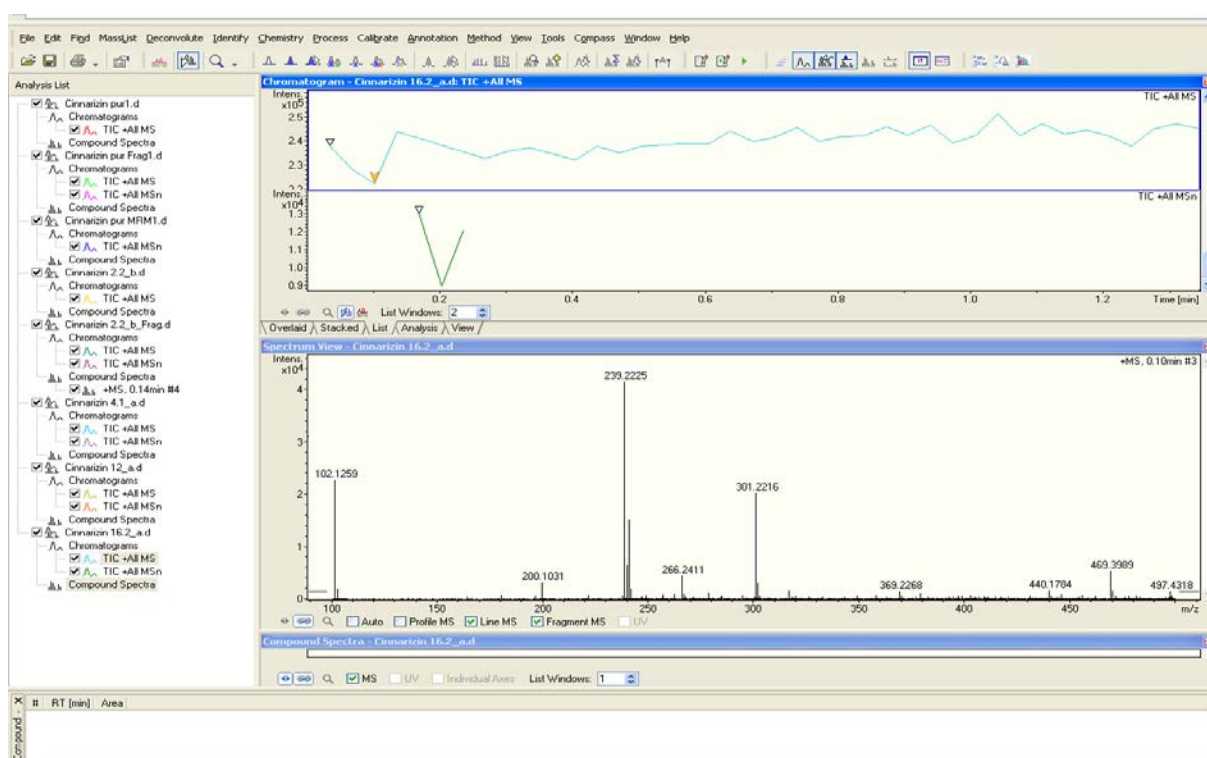
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
440.1800	1	C ₂₃ H ₂₆ N ₃ O ₆	48.97	440.1816	1.6	3.6	5.0	12.5	even	ok
	2	C ₂₀ H ₁₈ N ₁₃	100.00	440.1803	0.2	0.5	7.1	18.5	even	ok
	3	C ₁₉ H ₂₂ N ₉ O ₄	62.35	440.1789	-1.1	-2.5	8.8	13.5	even	ok
	4	C ₂₄ H ₂₂ N ₇ O ₂	12.72	440.1829	2.9	6.6	18.5	17.5	even	ok
	5	C ₁₈ H ₂₆ N ₅ O ₈	17.78	440.1776	-2.4	-5.5	23.4	8.5	even	ok
	6	C ₁₇ H ₃₀ N ₁₀	3.96	440.1763	-3.8	-8.6	30.8	3.5	even	ok

☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas:
☒ Check rings plus double bonds Minimum: Maximum:
 Electron configuration:
☒ Filter H/C element ratio Minimum H/C: Maximum H/C:
☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately Show Pattern

Cinnarizin 12 Fragmentierung



Cinnarizin 16.2 mit Formelvorschlägen 239



SmartFormula Manually

Min: Max:

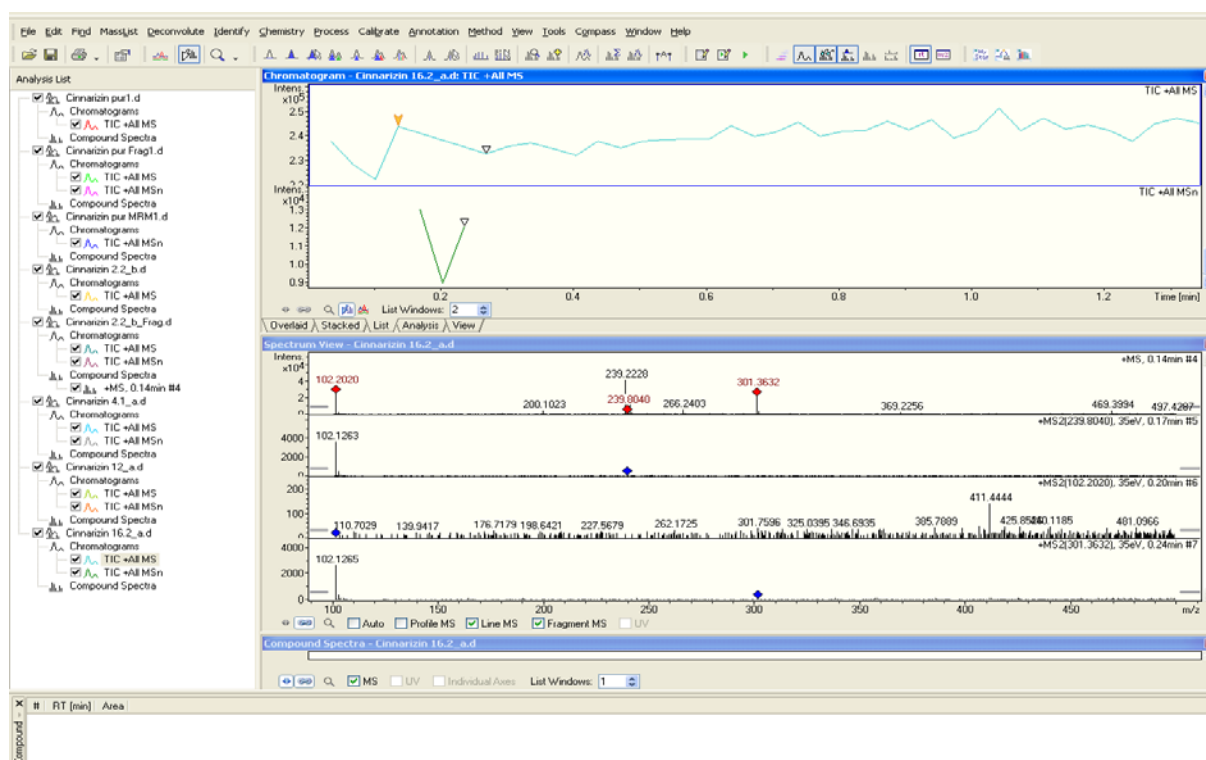
Note: for m < 2000 the elements C, H, N, and O are considered implicitly.

Measured m/z: Tolerance: mDa Charge:

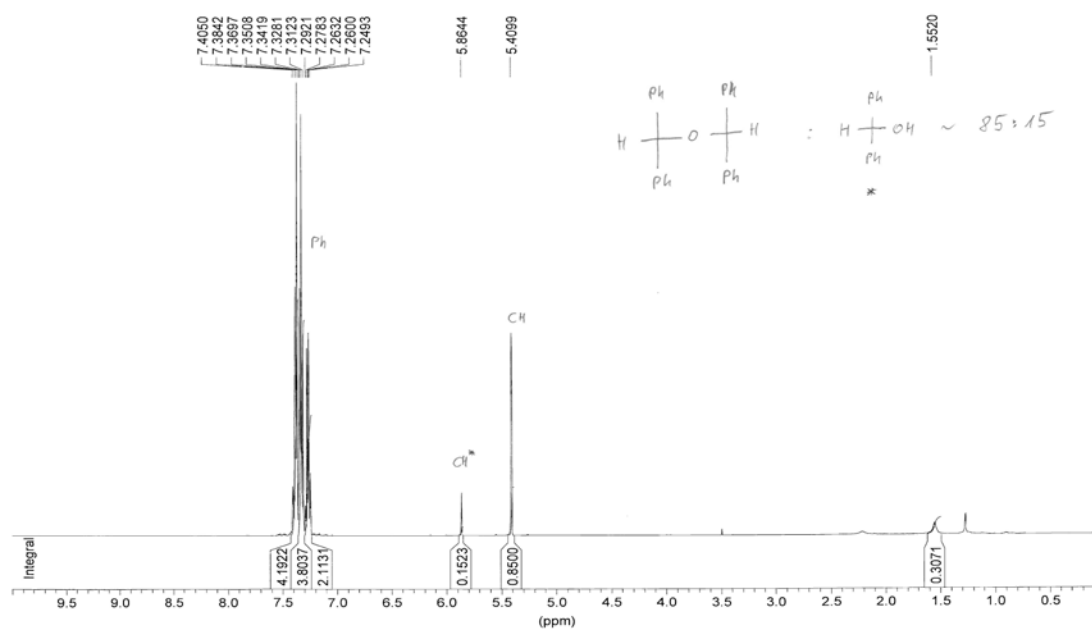
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
239.2225	1	C 13 H 27 N 4	100.00	239.2230	0.5	2.0	203.5	2.5	even	ok

☐ Automatically locate monoisotopic peak Maximum number of formulas:
☒ Check rings plus double bonds Minimum: Maximum:
☒ Filter H/C element ratio Minimum H/C: Maximum H/C:
☒ Estimate carbon number ☒ Generate immediately

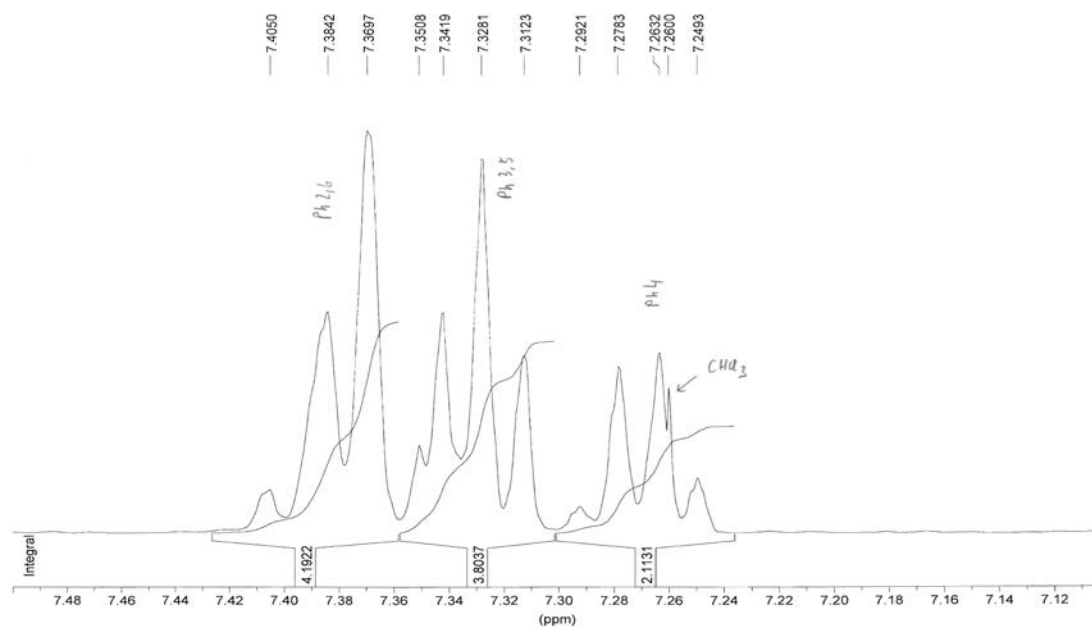
Cinnarizin 16.2 Fragmentierung



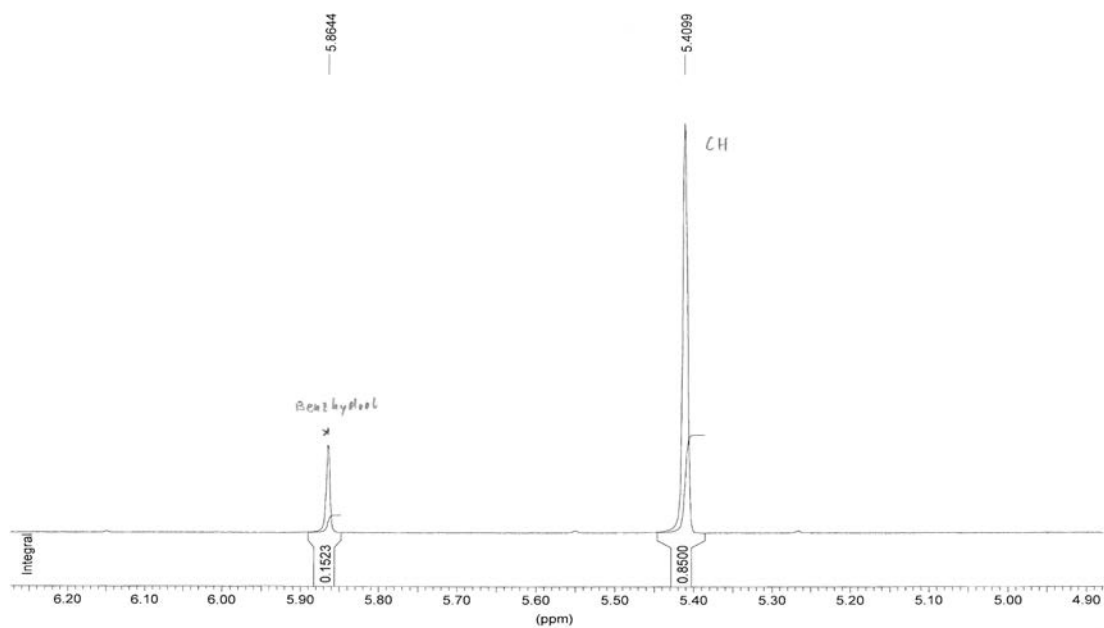
cw002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (Proton) 20.4.2011



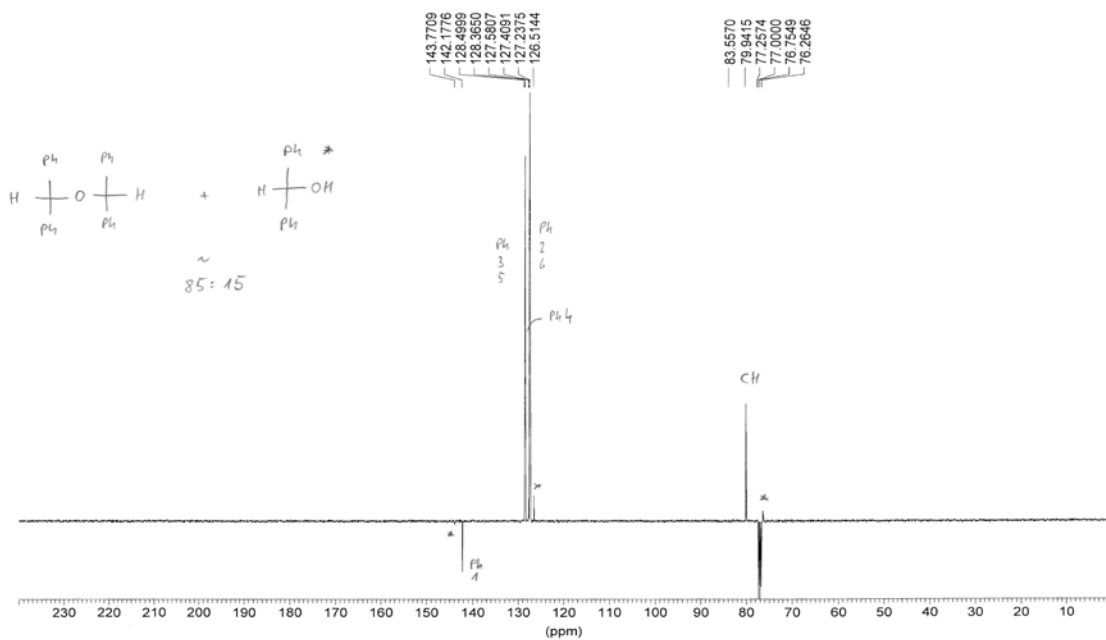
cw002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (Proton) 20.4.2011



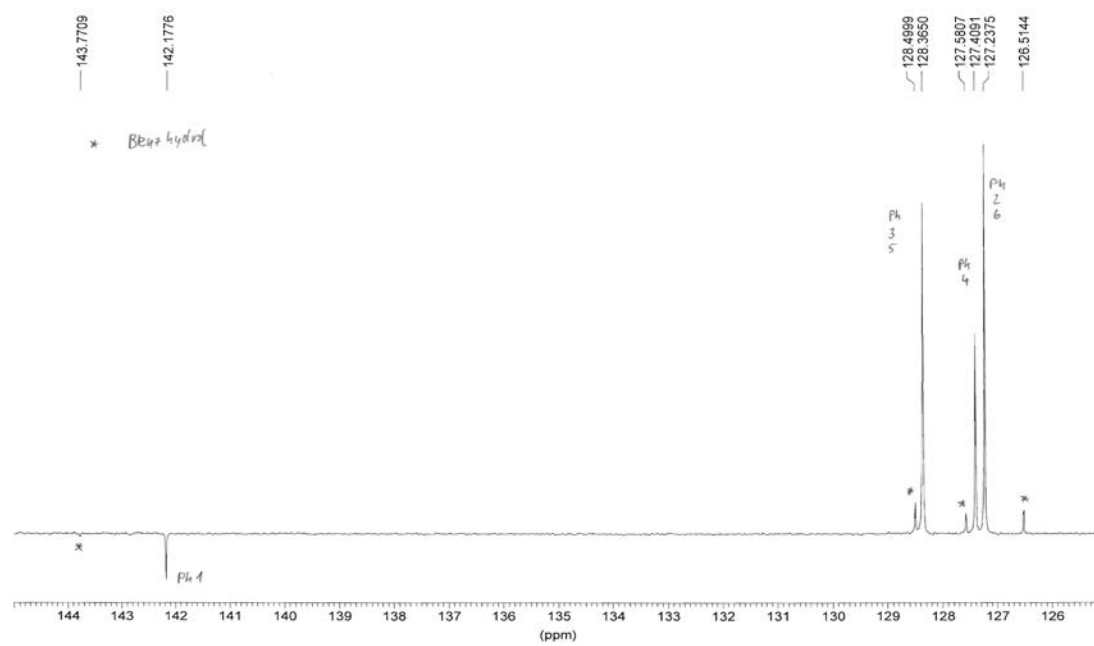
ow002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (Proton) 20.4.2011



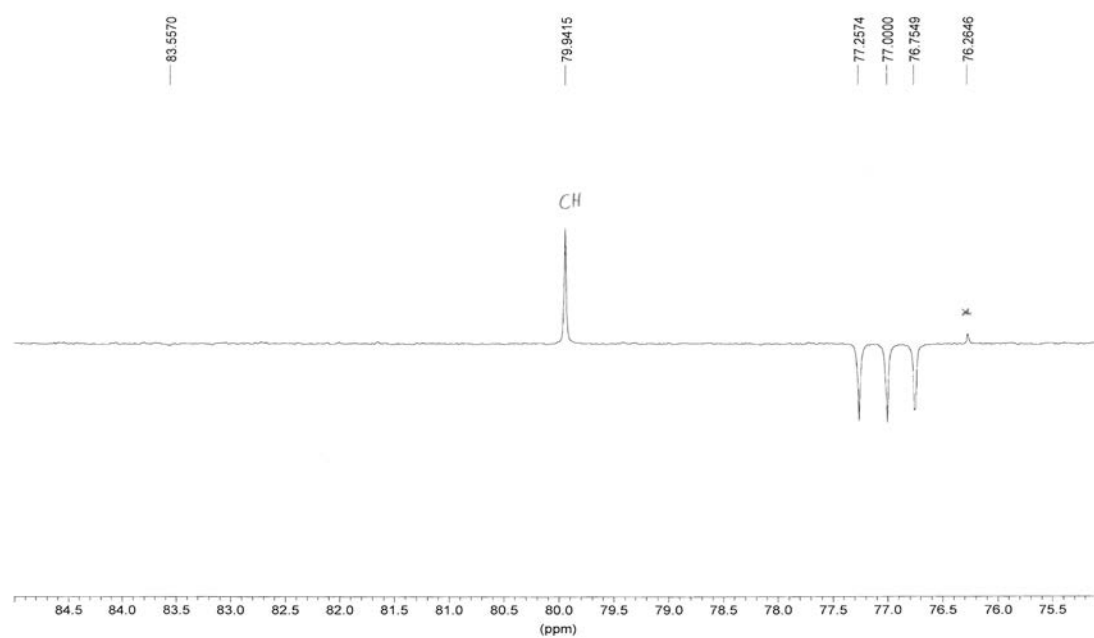
ow002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (APT) 27.4.2011



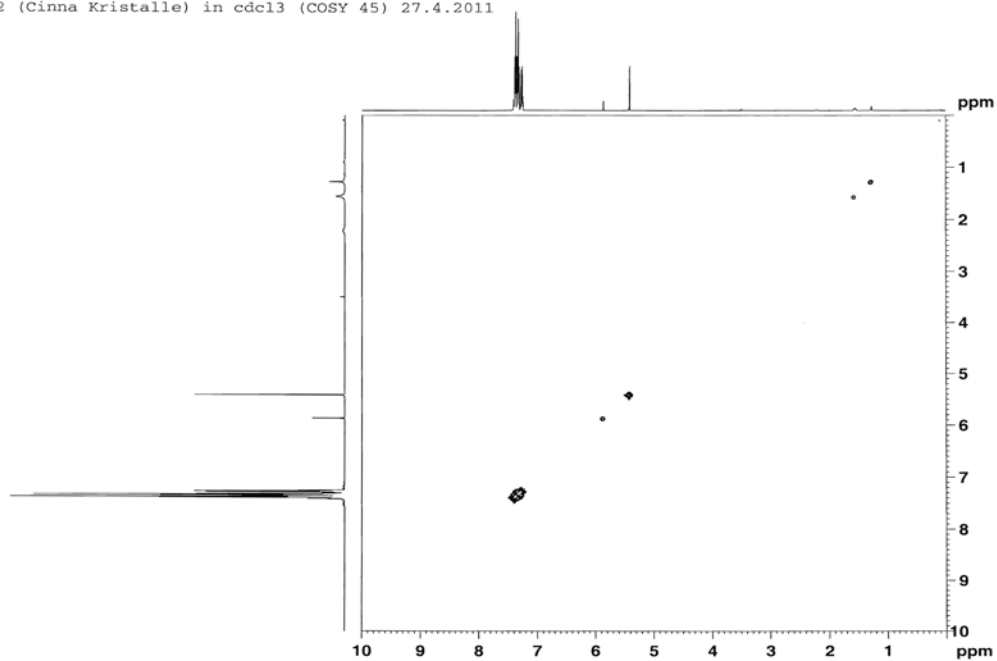
cow002 (Cinna Kristalle) in cdc3 (APT) 27.4.2011



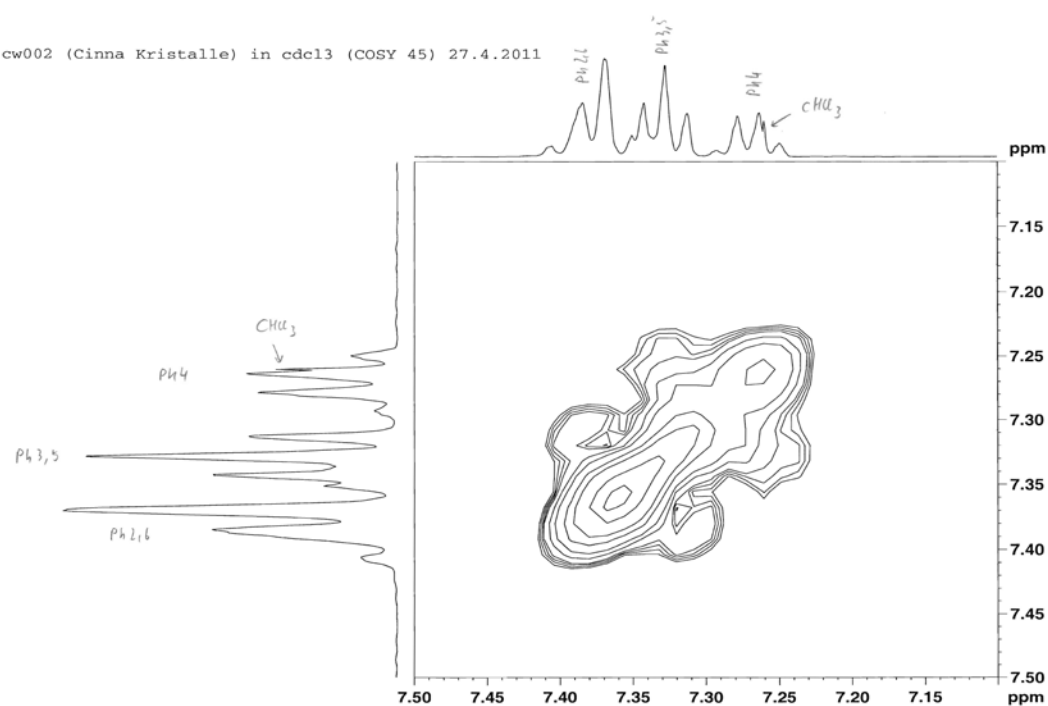
cow002 (Cinna Kristalle) in cdc3 (APT) 27.4.2011



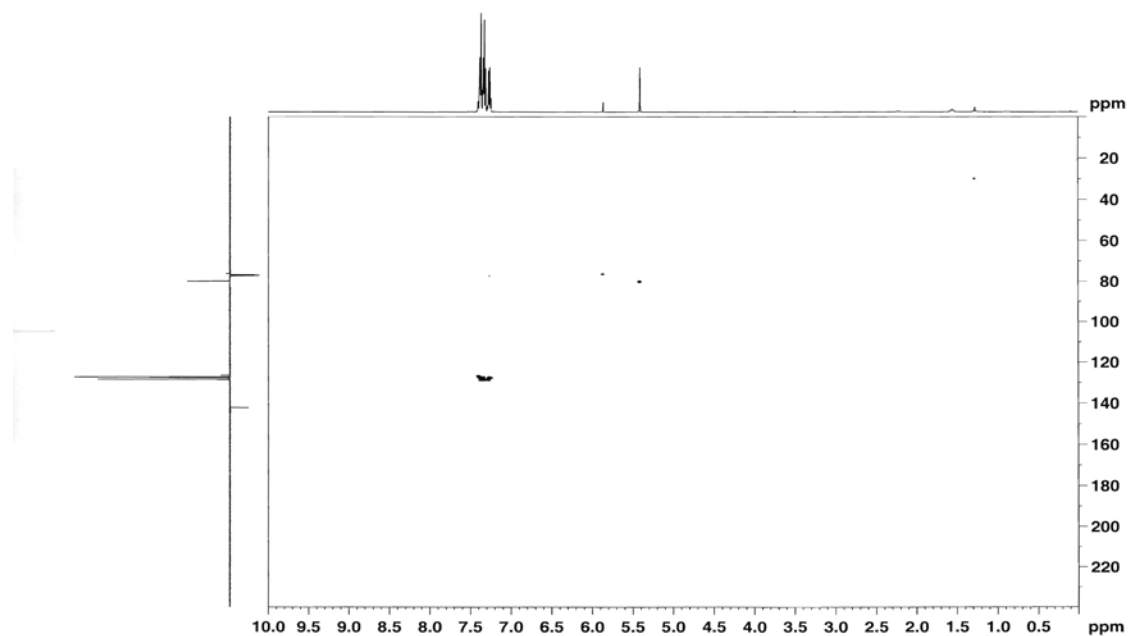
cw002 (Cinna Kristalle) in cdc13 (COSY 45) 27.4.2011



cw002 (Cinna Kristalle) in cdc13 (COSY 45) 27.4.2011

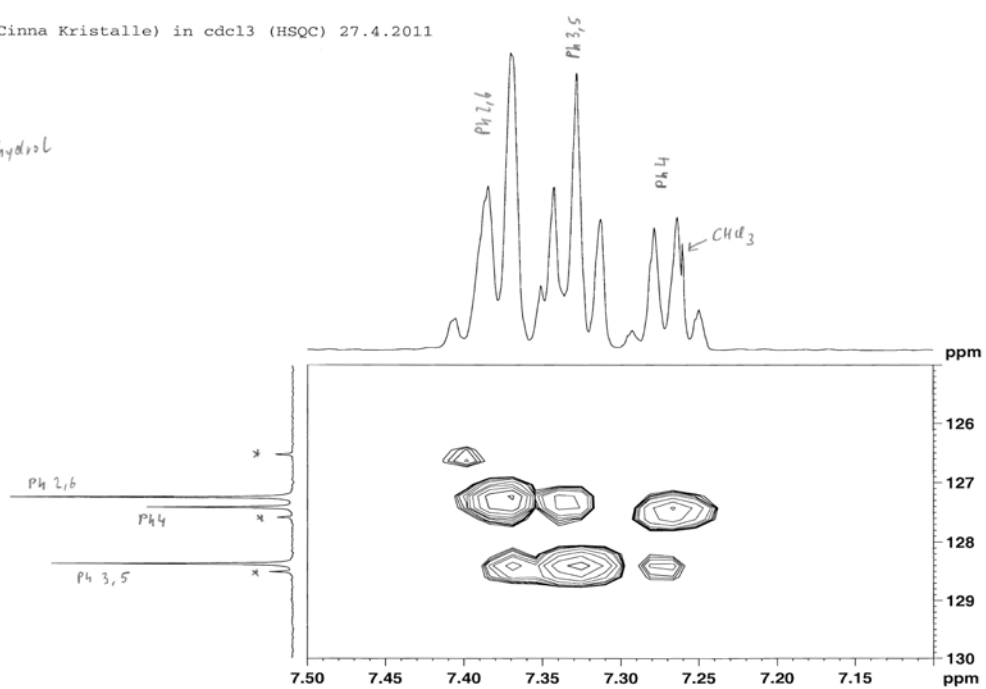


cw002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (HSQC) 27.4.2011

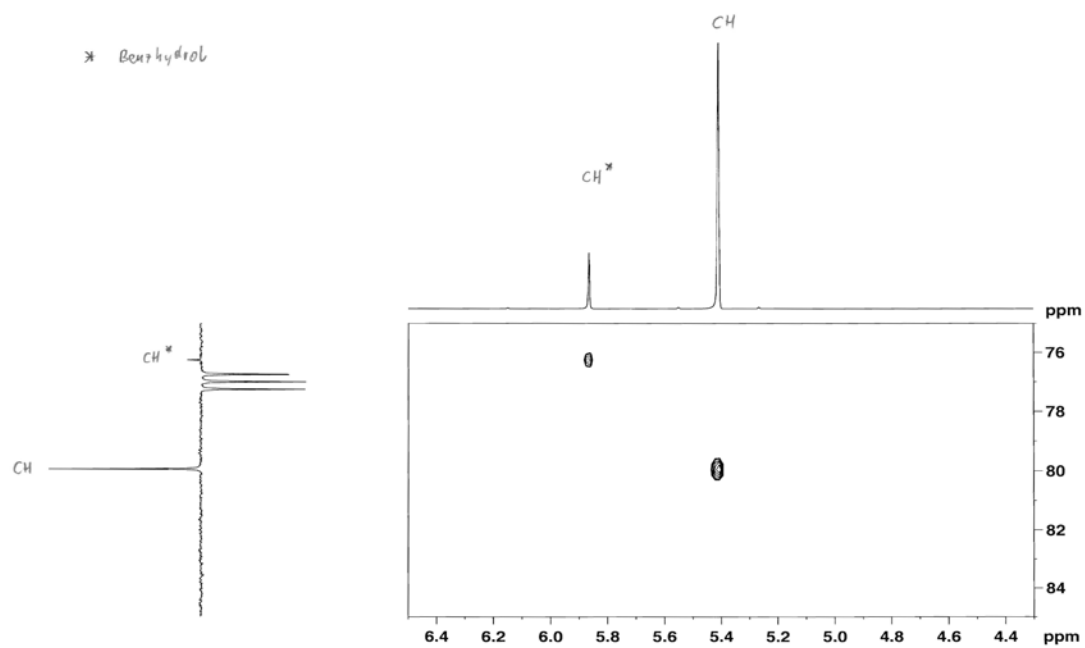


cw002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (HSQC) 27.4.2011

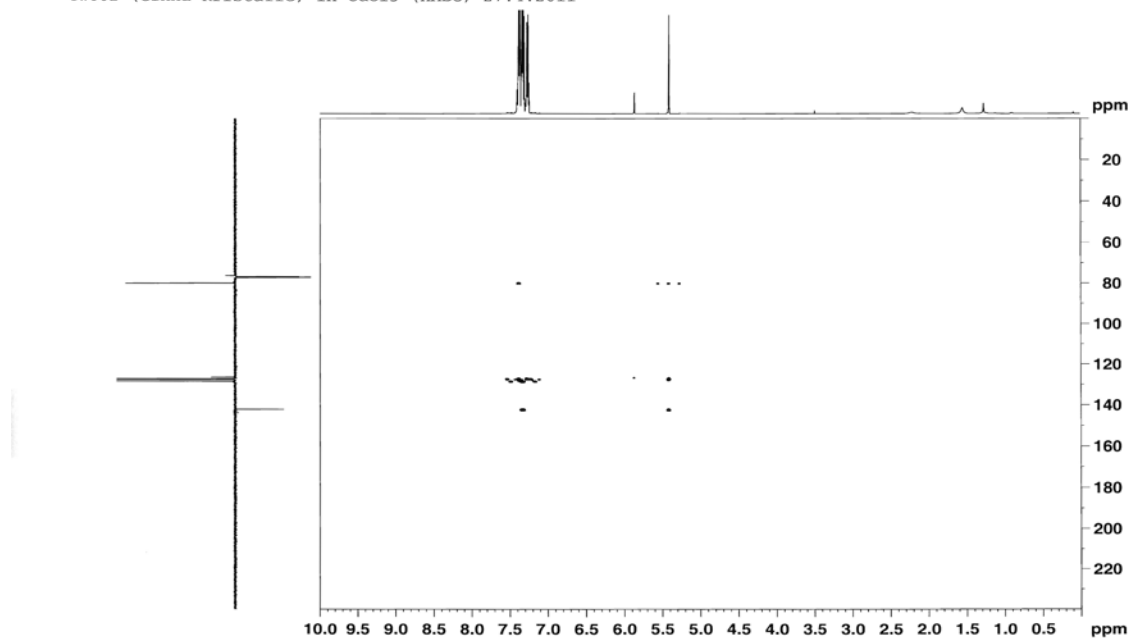
* Benzhydrol



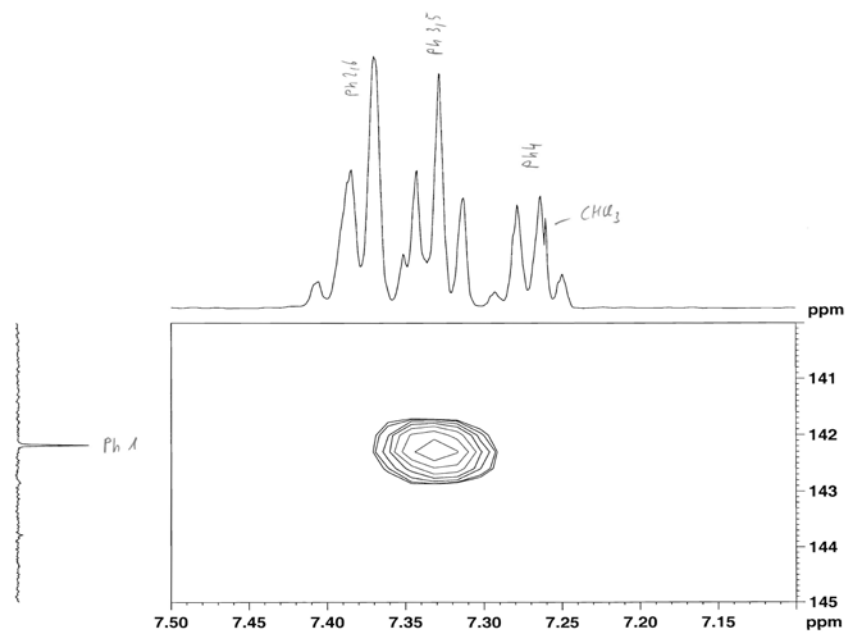
cw002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (HSQC) 27.4.2011



cw002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (HMBC) 27.4.2011

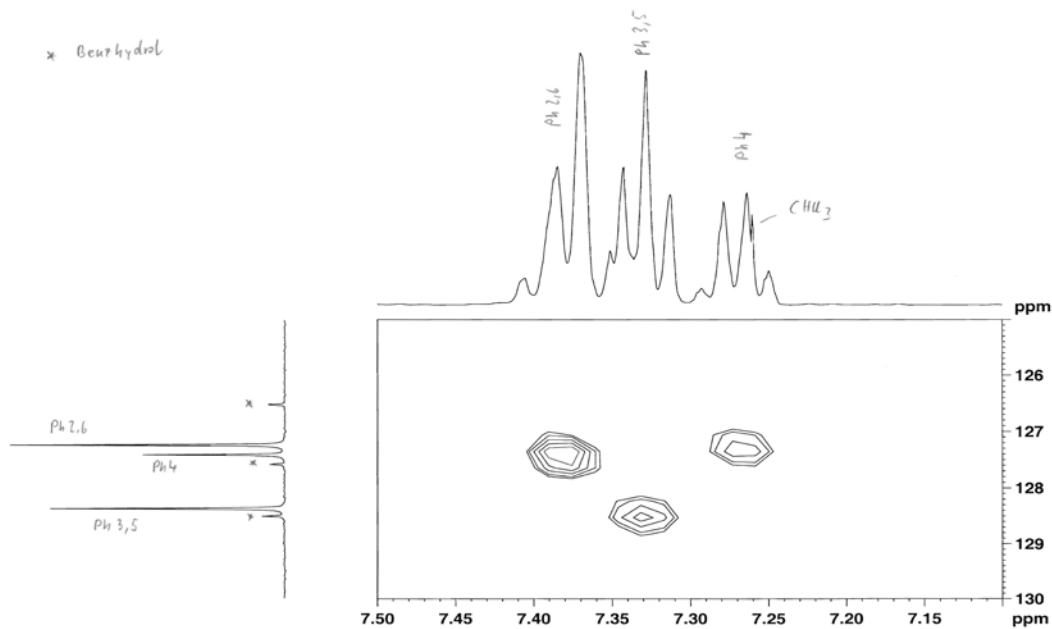


cw002 (Cinna Kristalle) in cdc13 (HMBC) 27.4.2011



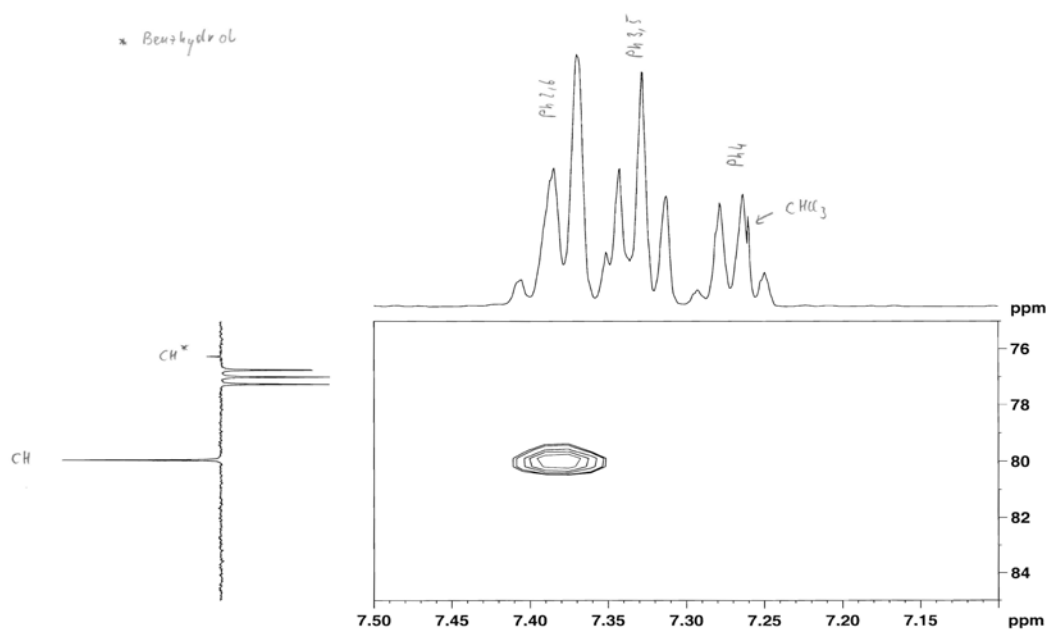
cw002 (Cinna Kristalle) in cdc13 (HMBC) 27.4.2011

* Benzhydrol

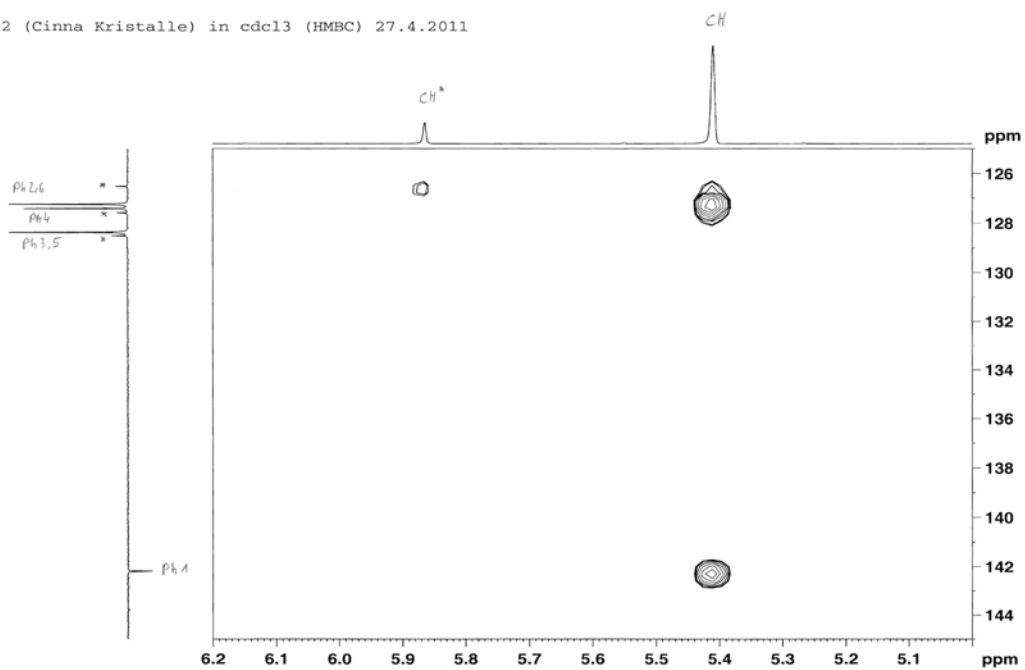


cw002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (HMBC) 27.4.2011

* Benzylhydrat

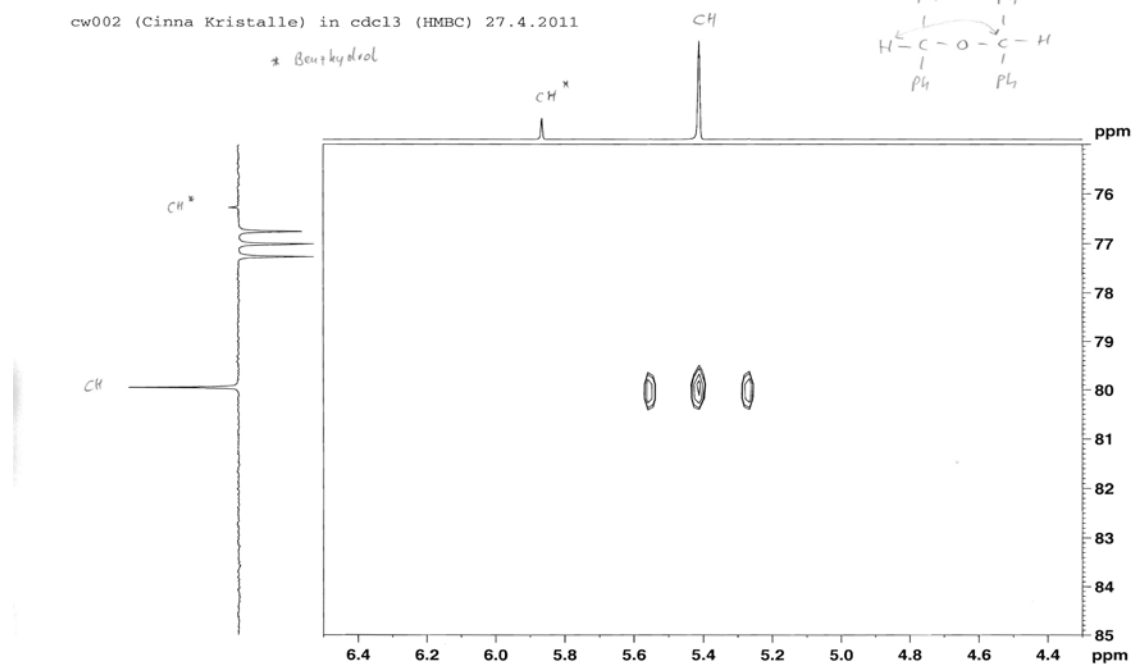
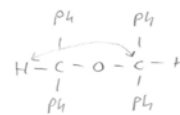


cw002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (HMBC) 27.4.2011

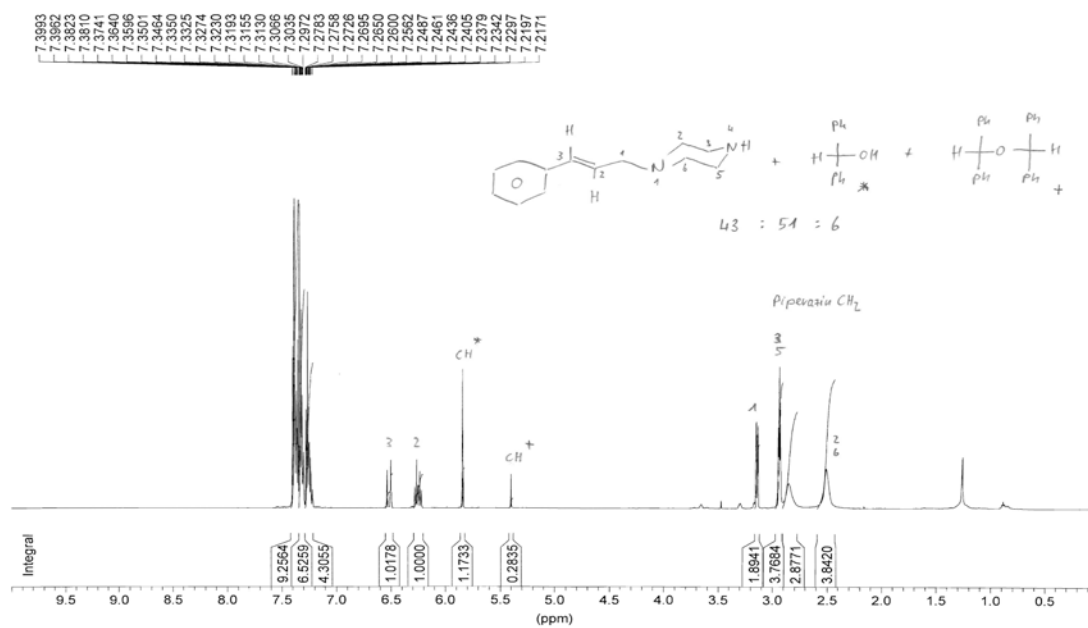


cw002 (Cinna Kristalle) in cdcl3 (HMBC) 27.4.2011

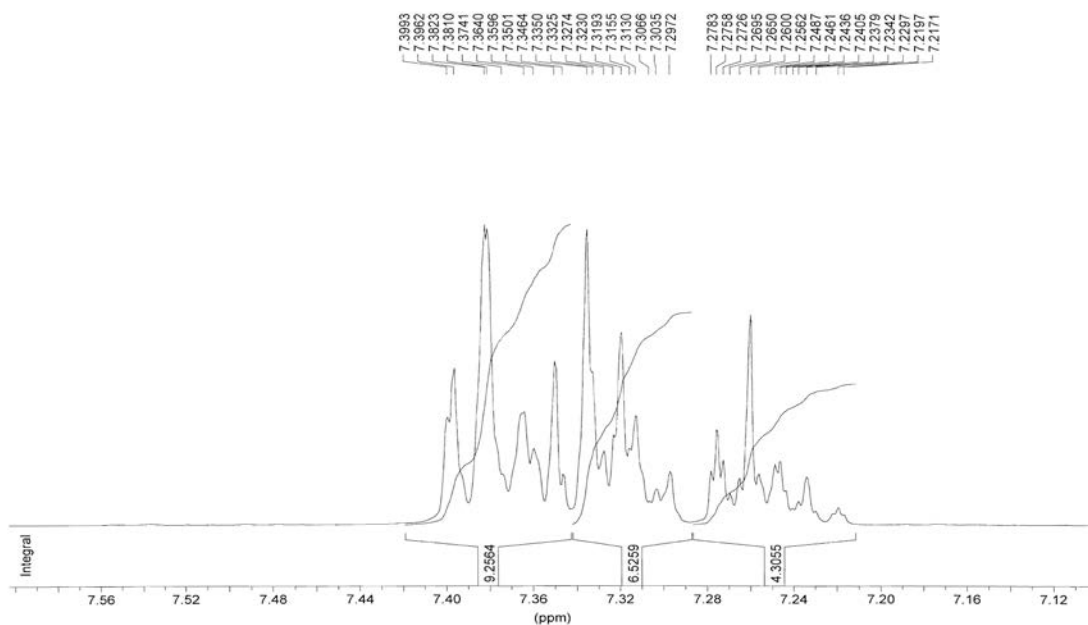
* Benzylaldehyd



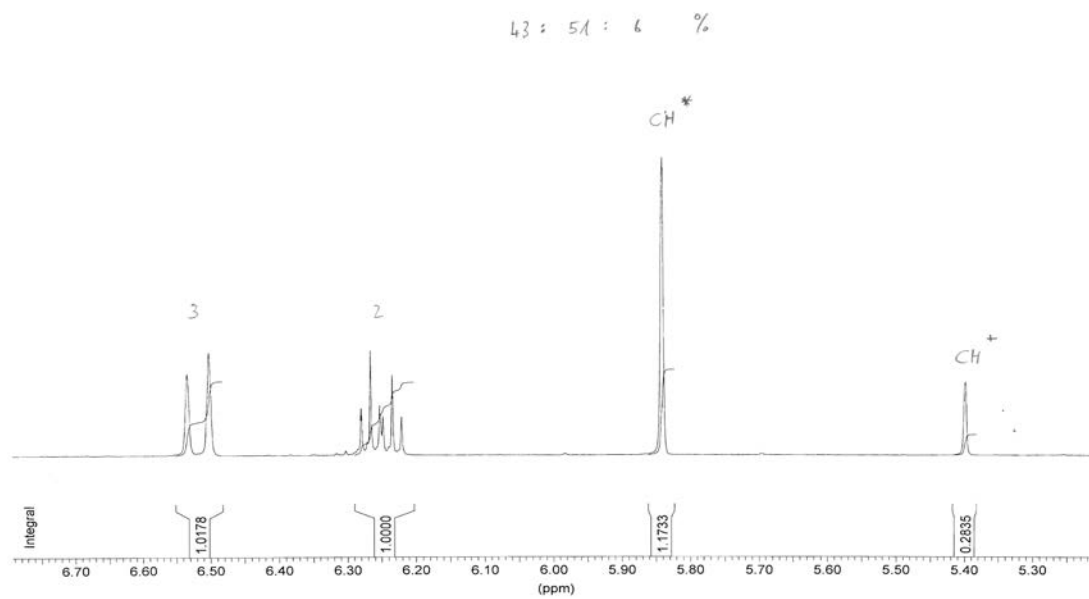
cw003 (Mischung) in cdcl3 (Proton) 3.5.2011



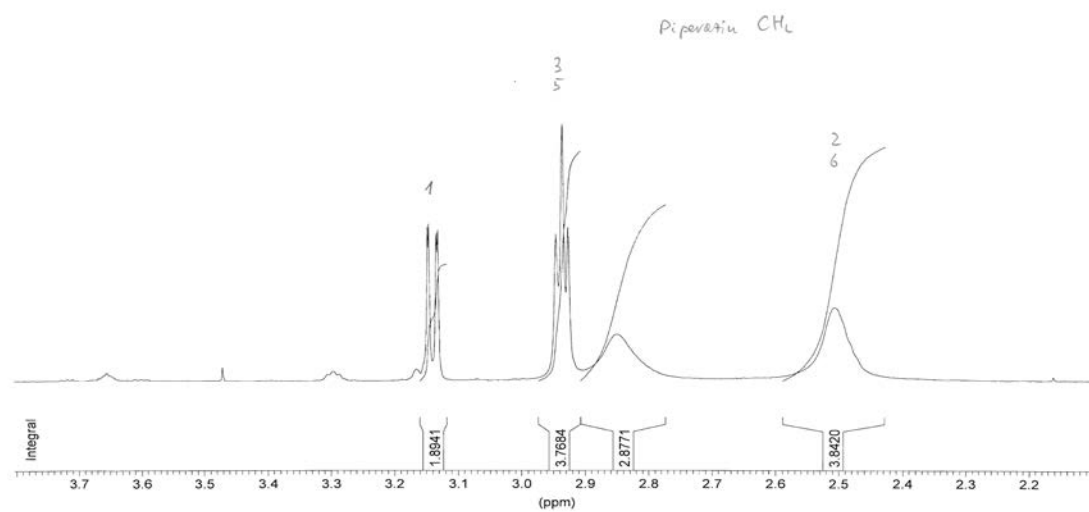
cw003 (Mischung) in cdcl3 (Proton) 3.5.2011

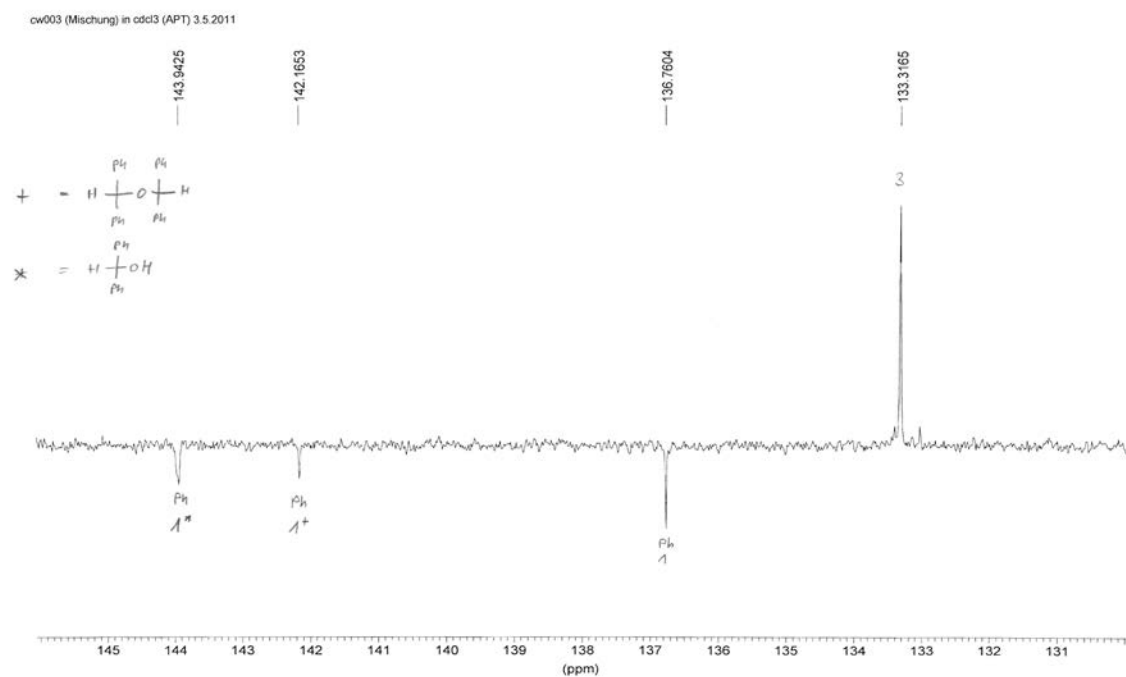
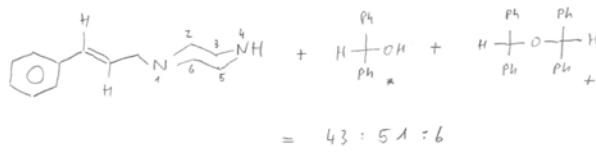


cw003 (Mischung) in cdcl3 (Proton) 3.5.2011

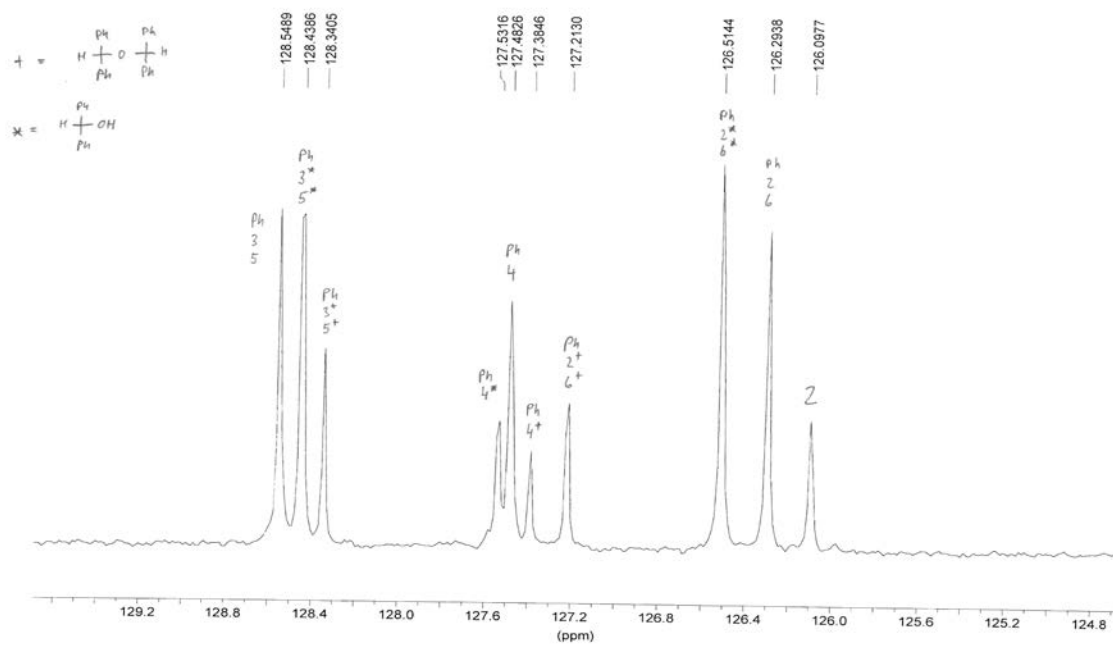


cw003 (Mischung) in cdcl3 (Proton) 3.5.2011

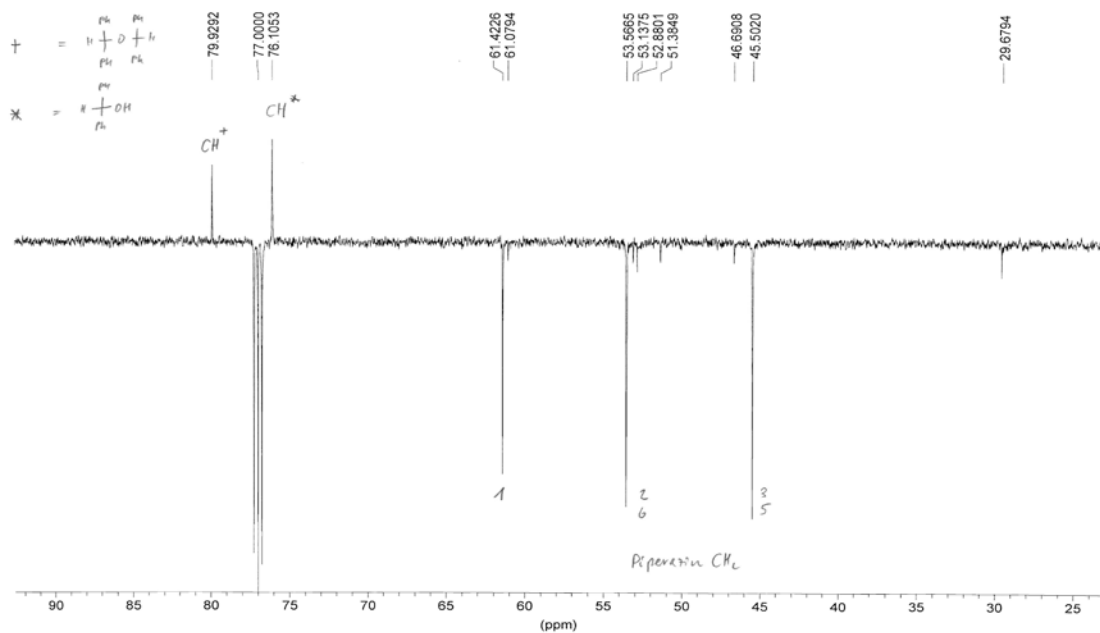




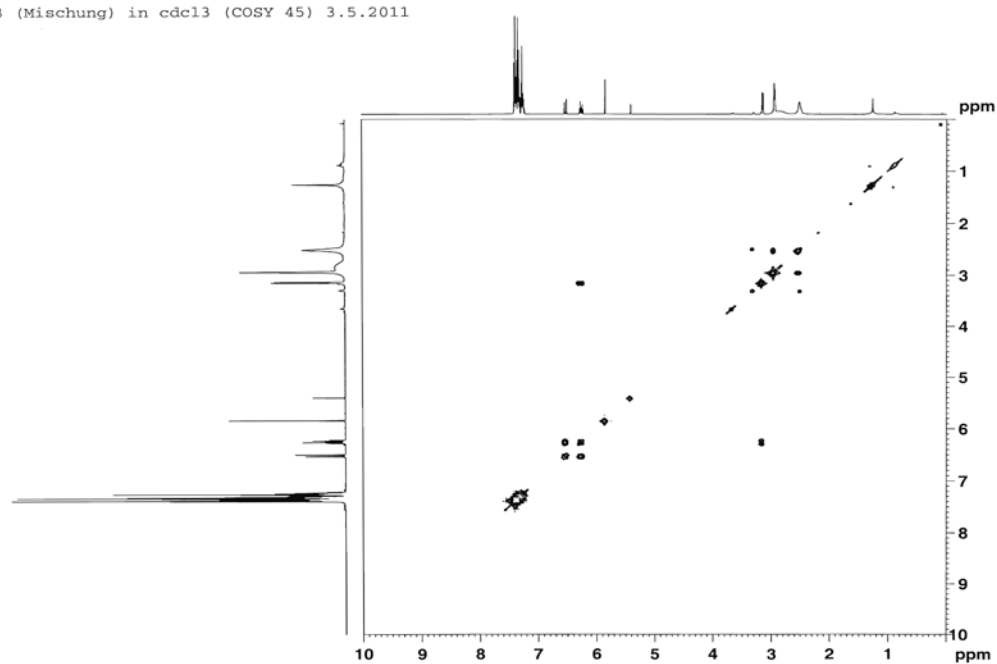
cw003 (Mischung) in cdd3 (APT) 3.5.2011



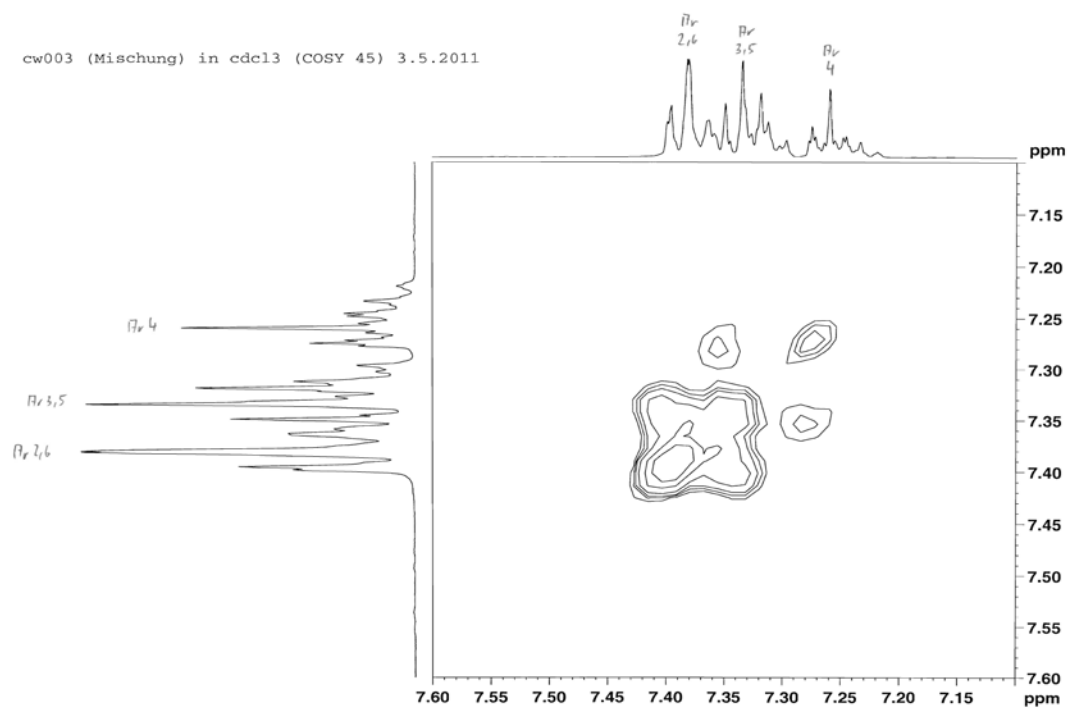
cw003 (Mischung) in cdd3 (APT) 3.5.2011



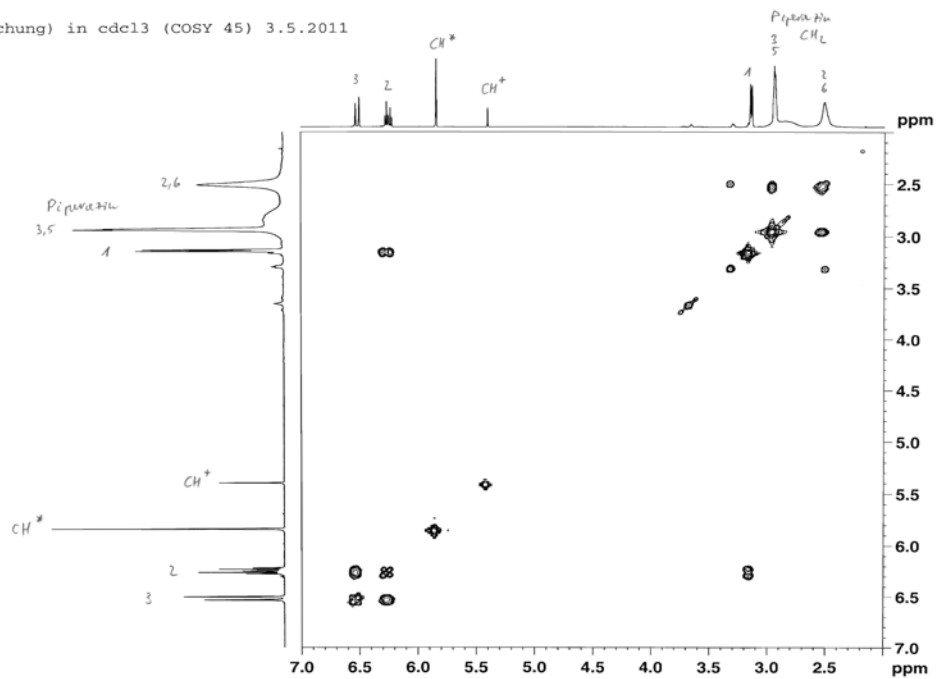
cw003 (Mischung) in cdcl3 (COSY 45) 3.5.2011



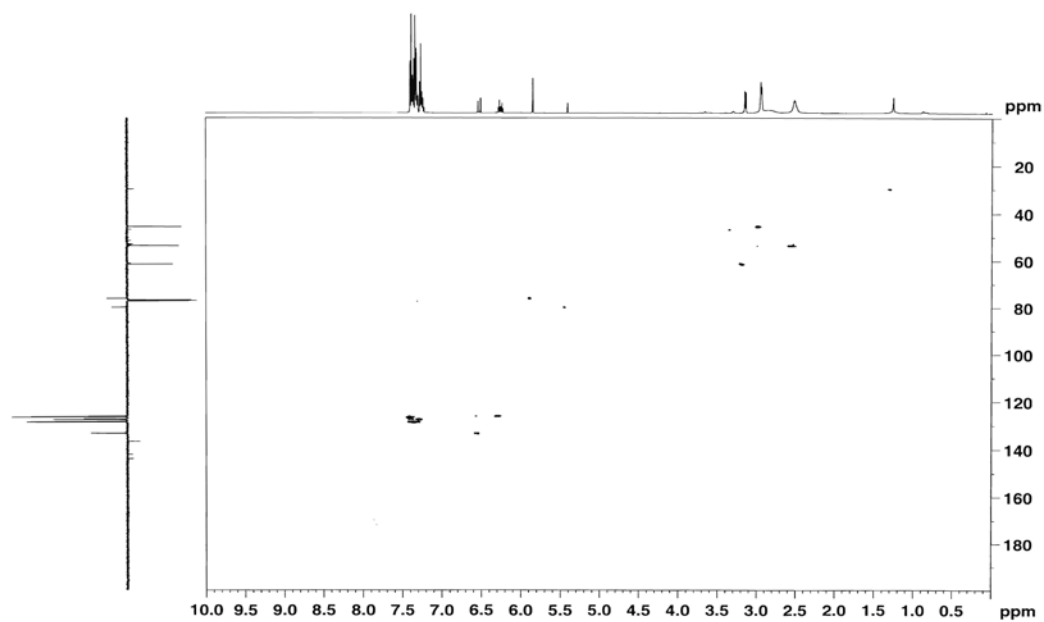
cw003 (Mischung) in cdcl3 (COSY 45) 3.5.2011



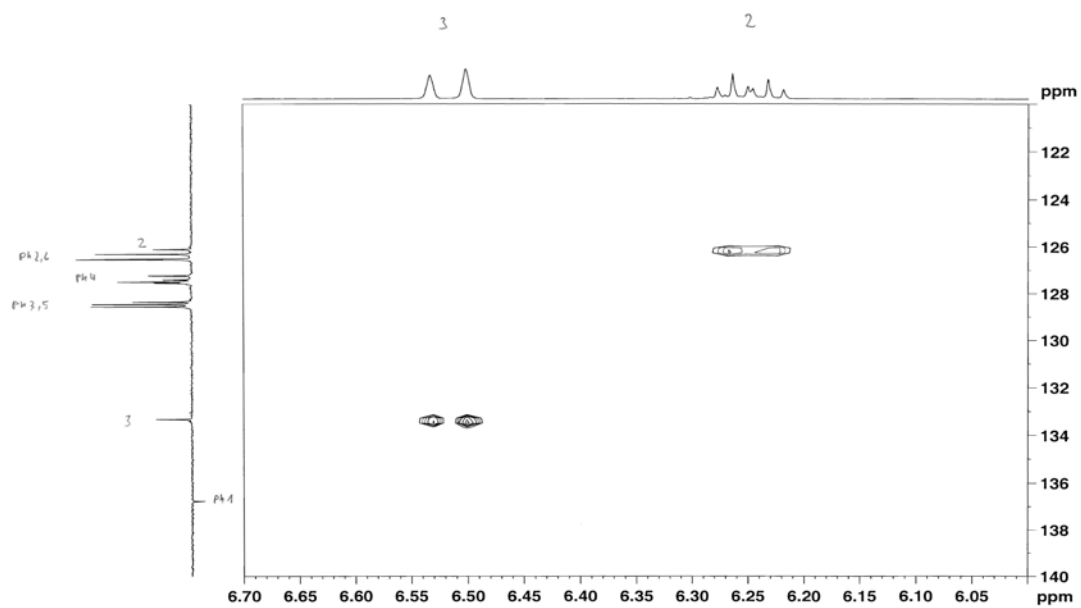
cw003 (Mischung) in cdc13 (COSY 45) 3.5.2011



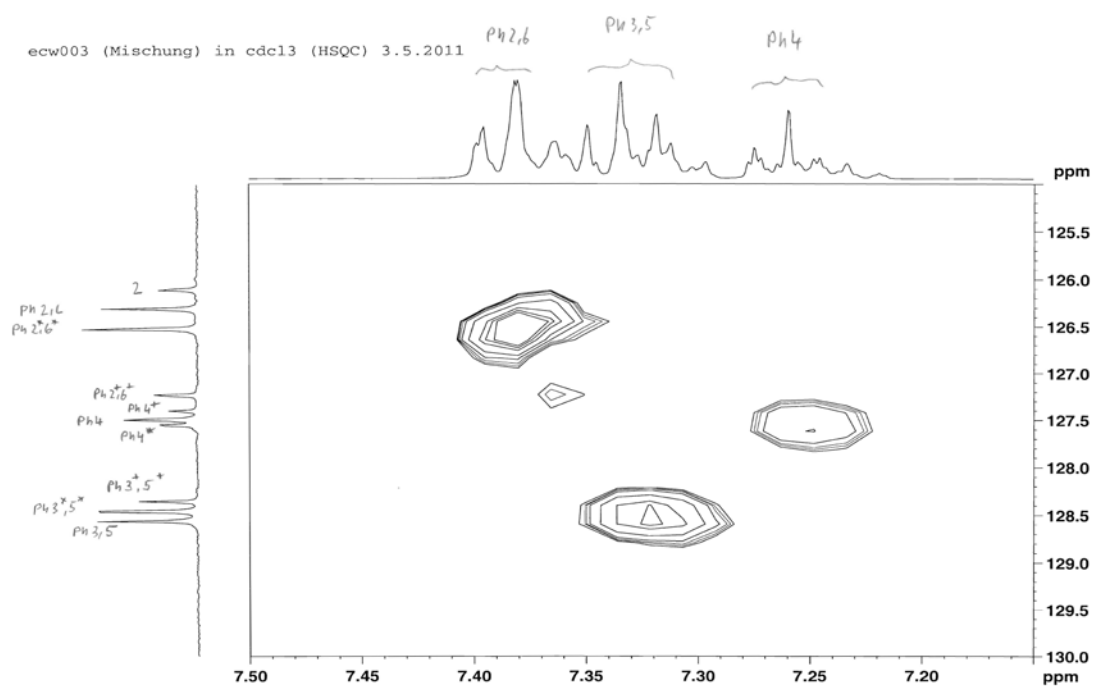
ecw003 (Mischung) in cdc13 (HSQC) 3.5.2011



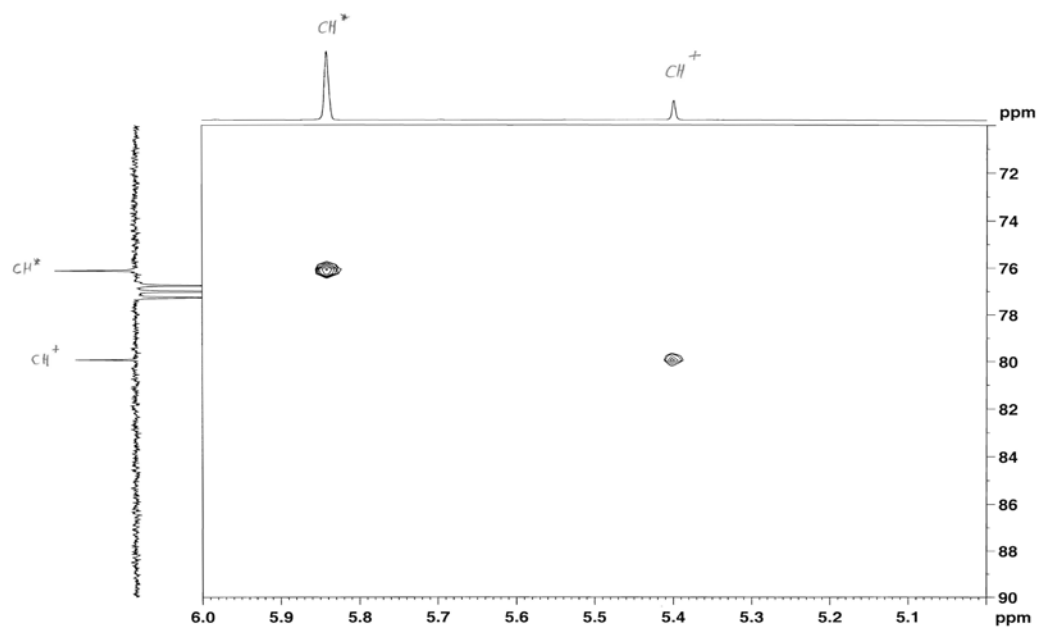
ecw003 (Mischung) in cdc13 (HSQC) 3.5.2011



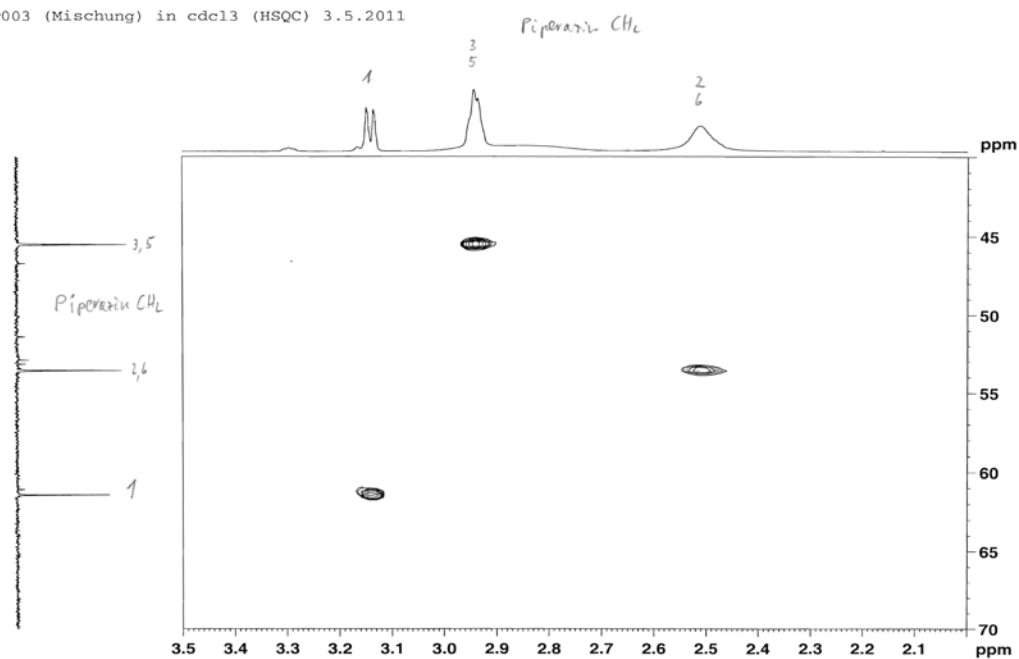
ecw003 (Mischung) in cdc13 (HSQC) 3.5.2011



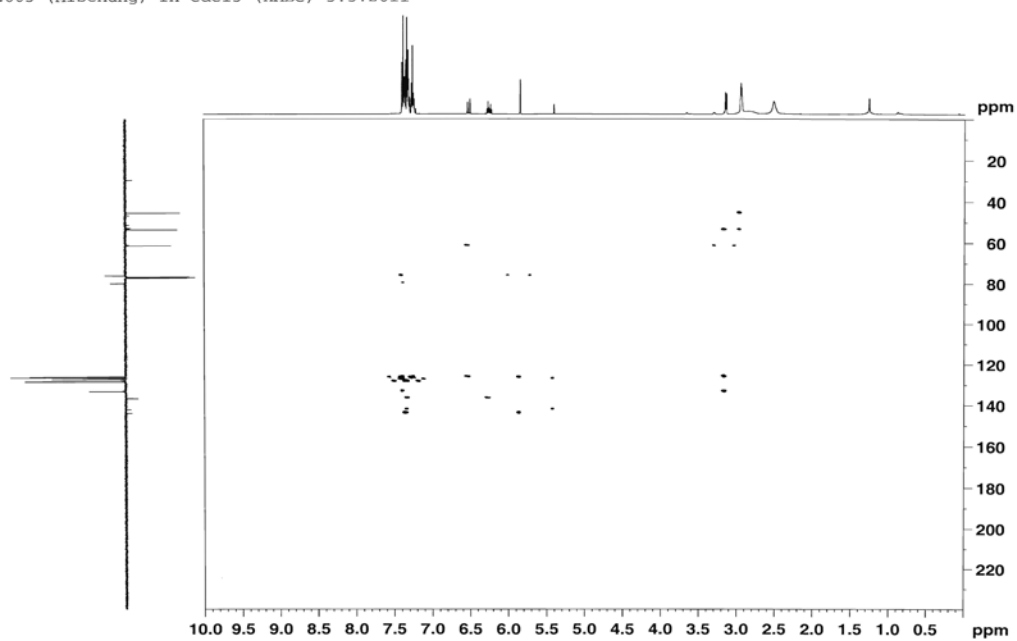
ecw003 (Mischung) in cdcl3 (HSQC) 3.5.2011



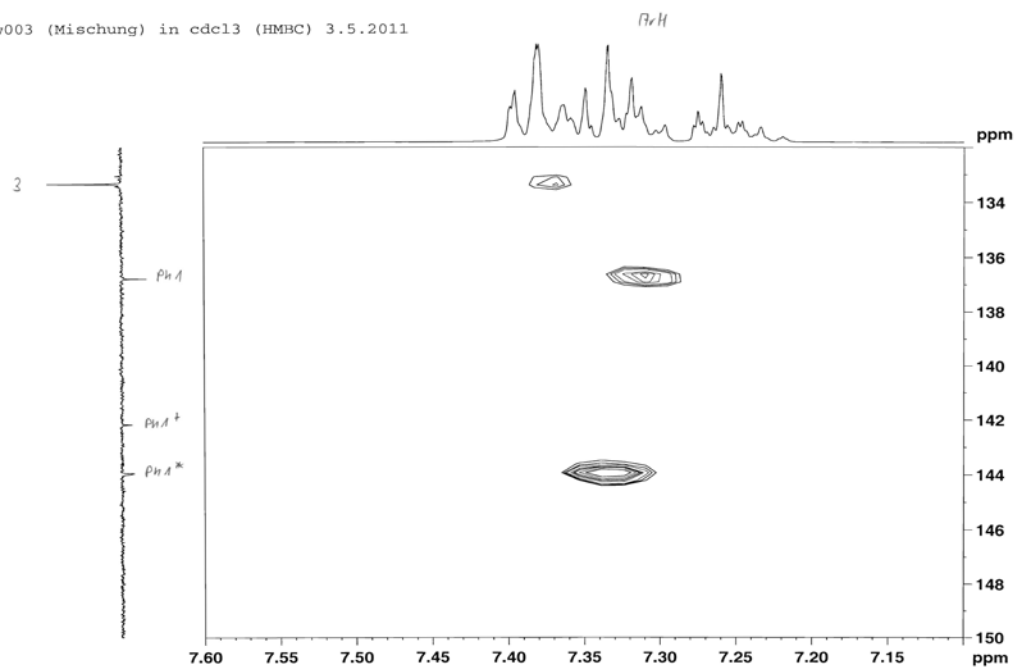
ecw003 (Mischung) in cdcl3 (HSQC) 3.5.2011



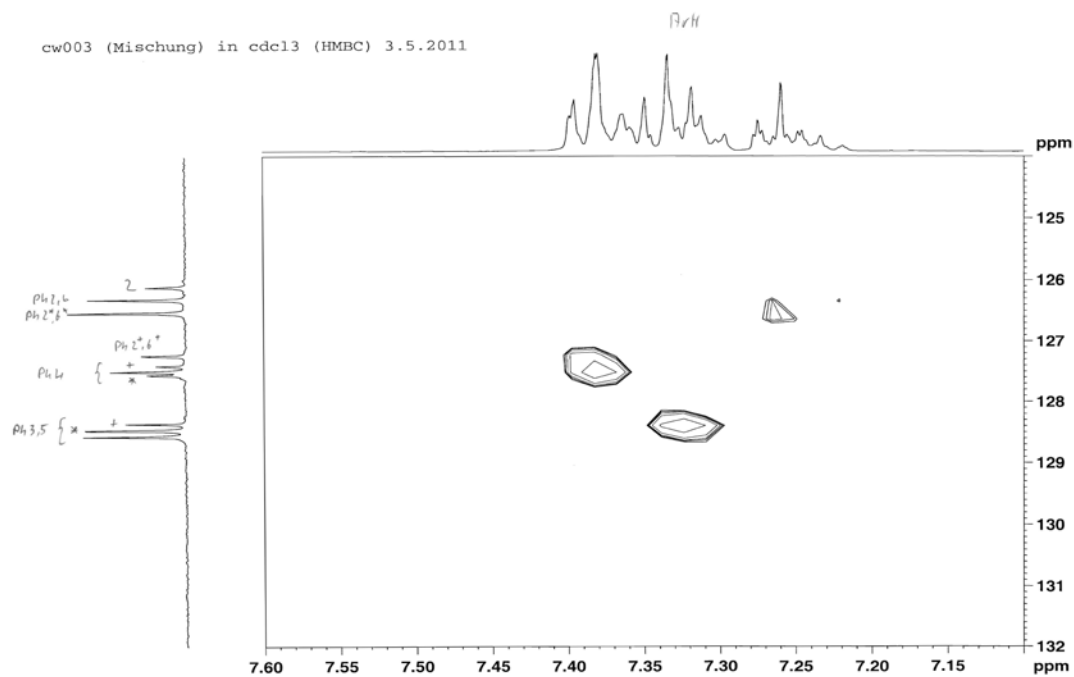
cw003 (Mischung) in cdcl3 (HMBC) 3.5.2011



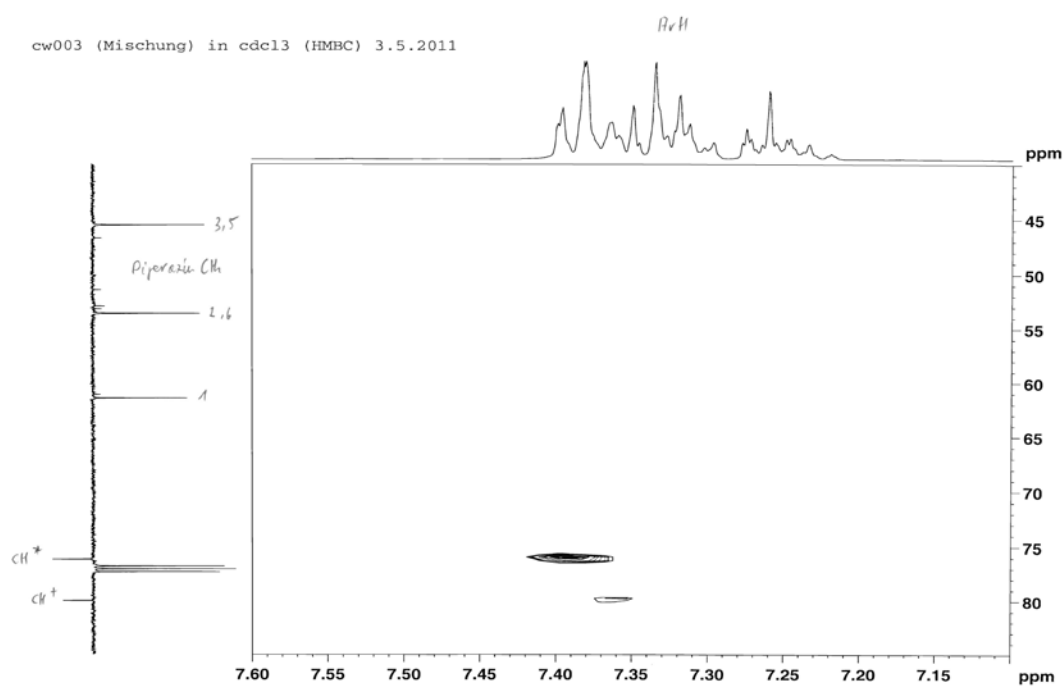
cw003 (Mischung) in cdcl3 (HMBC) 3.5.2011



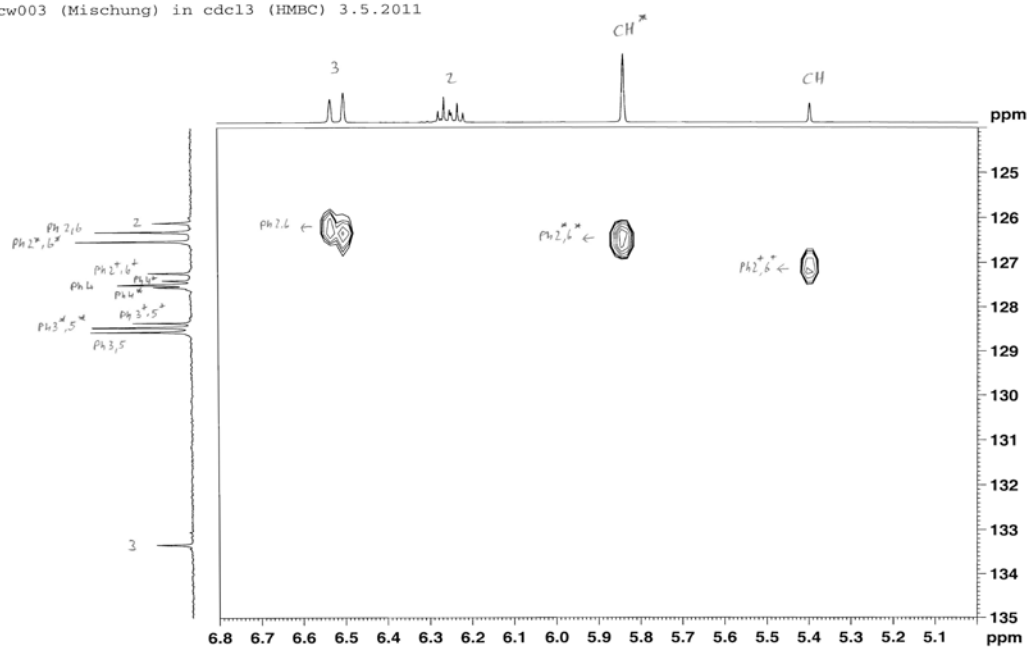
cw003 (Mischung) in cdcl3 (HMBC) 3.5.2011



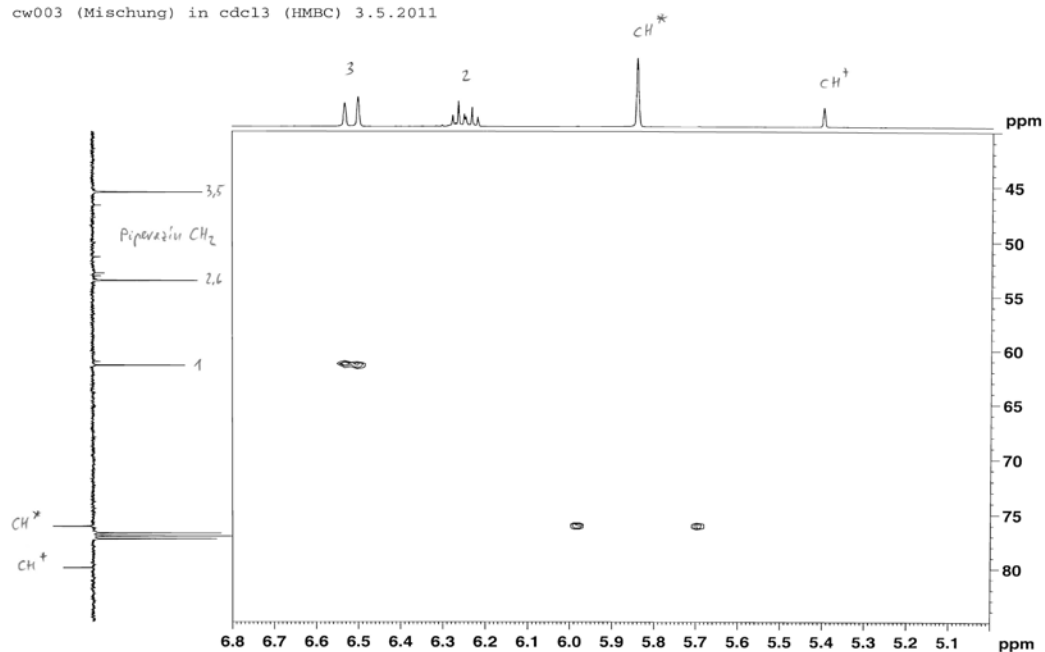
cw003 (Mischung) in cdcl3 (HMBC) 3.5.2011



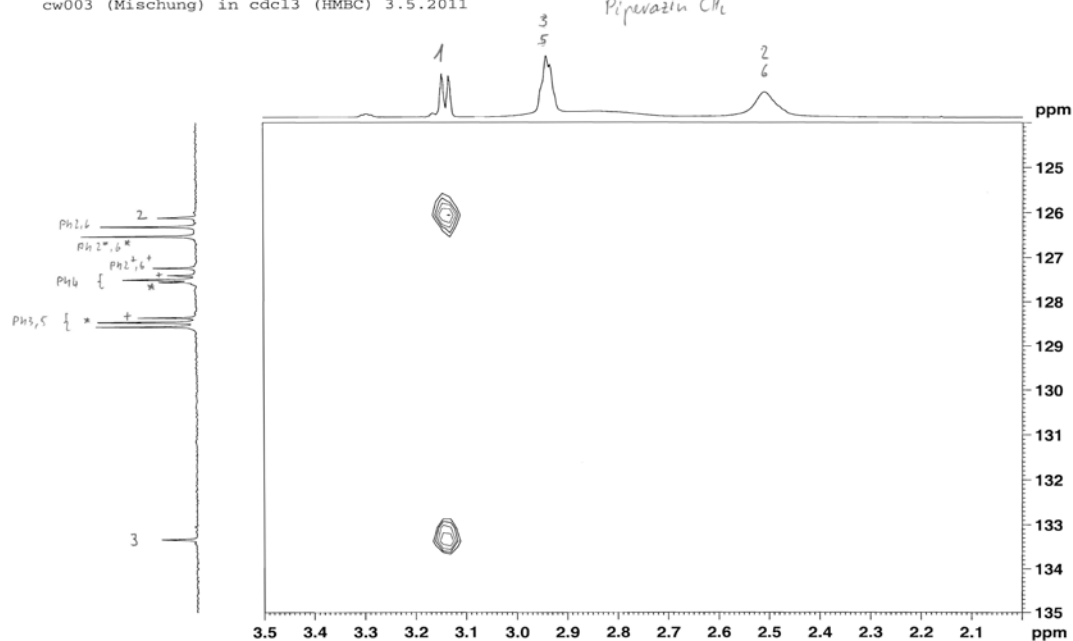
cw003 (Mischung) in cdcl3 (HMBC) 3.5.2011



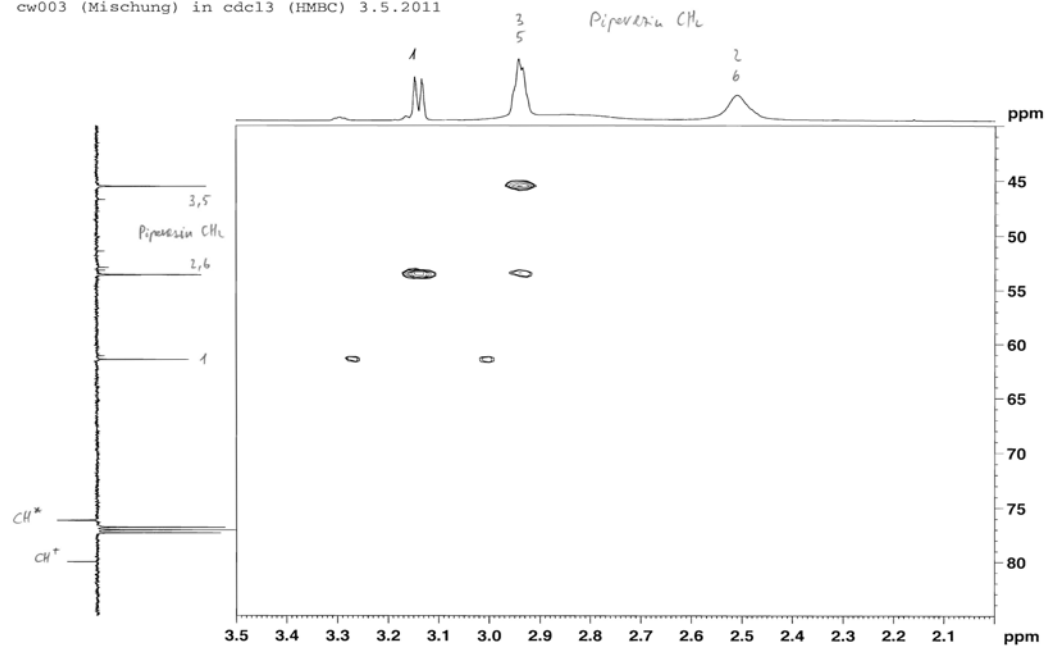
cw003 (Mischung) in cdcl3 (HMBC) 3.5.2011



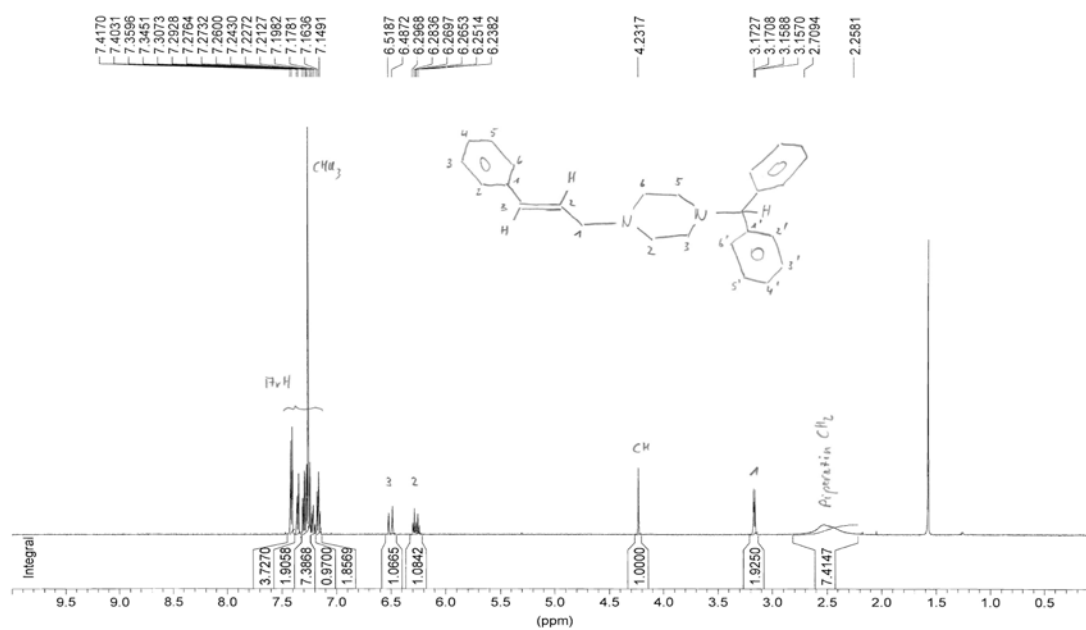
cw003 (Mischung) in cdcl3 (HMBC) 3.5.2011

Piperazin CH₂

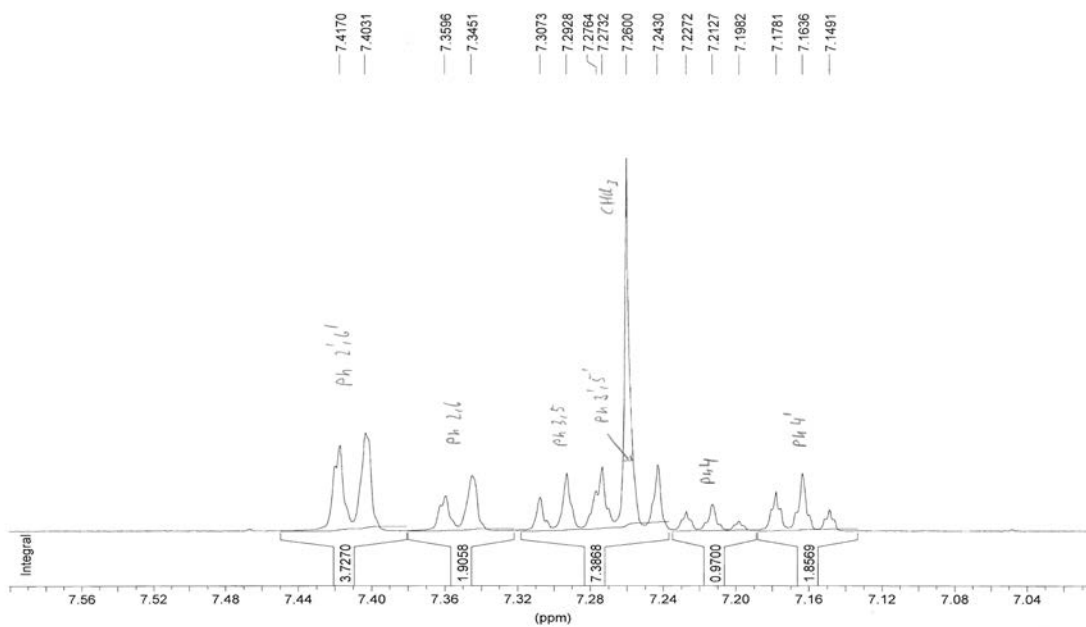
cw003 (Mischung) in cdcl3 (HMBC) 3.5.2011

Piperazin CH₂

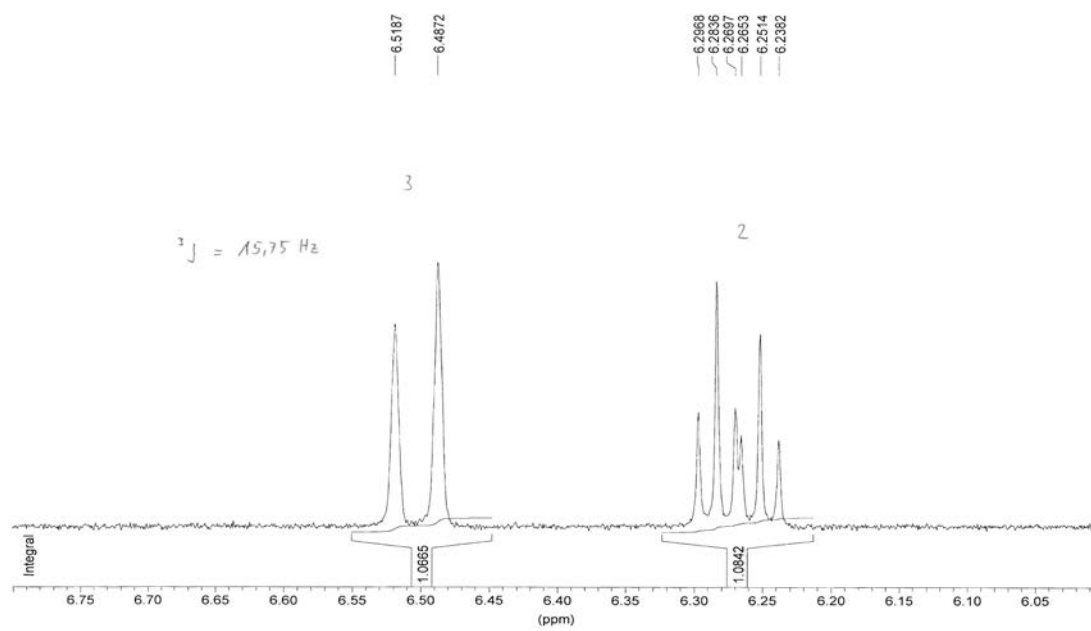
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdcl3 (Proton) 20.4.2011



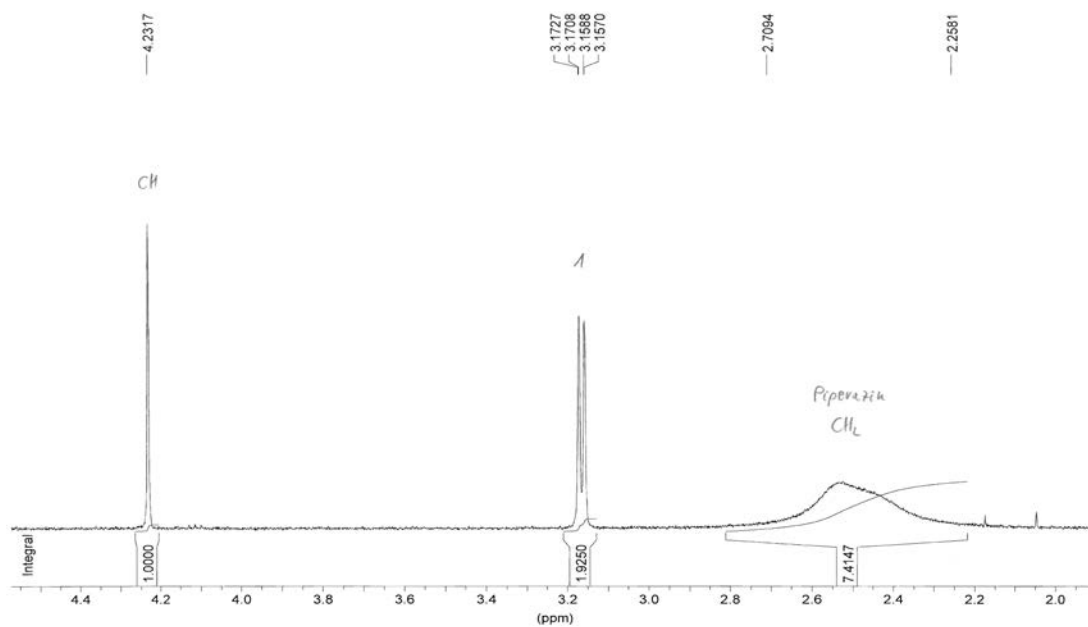
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdcl3 (Proton) 20.4.2011



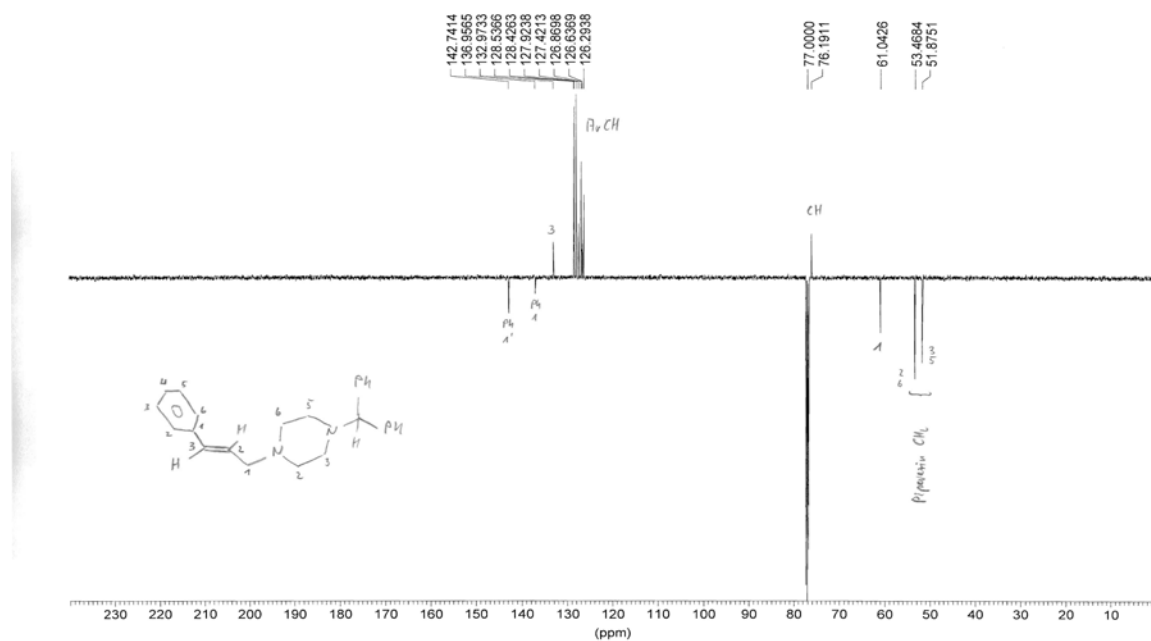
ow001 (Cinna Reinsubstanz) in cdd3 (Proton) 20.4.2011



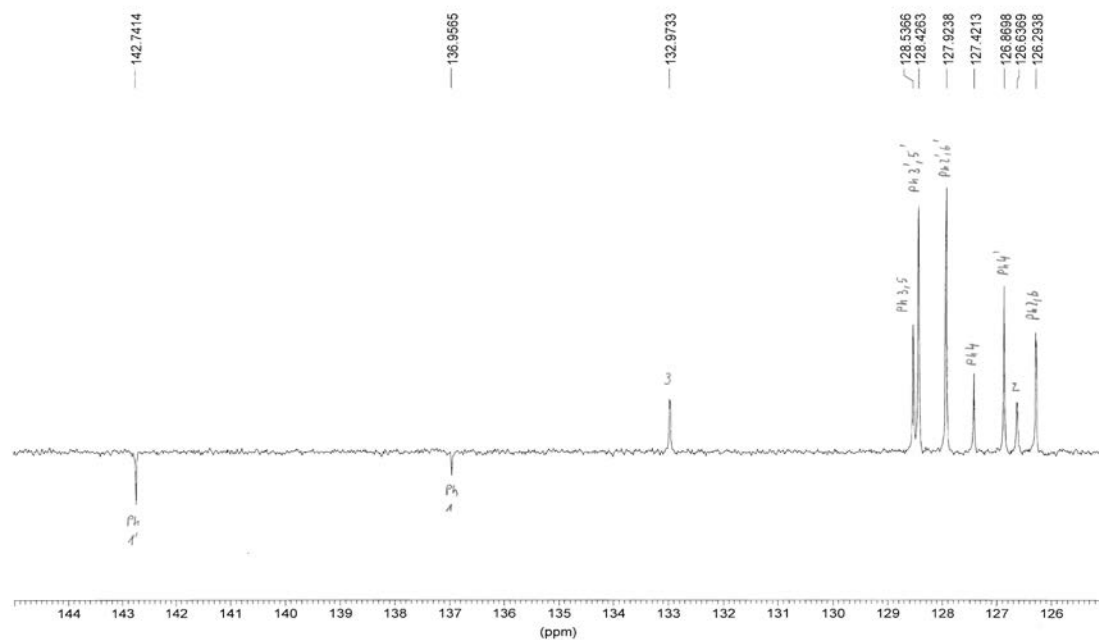
ow001 (Cinna Reinsubstanz) in cdd3 (Proton) 20.4.2011



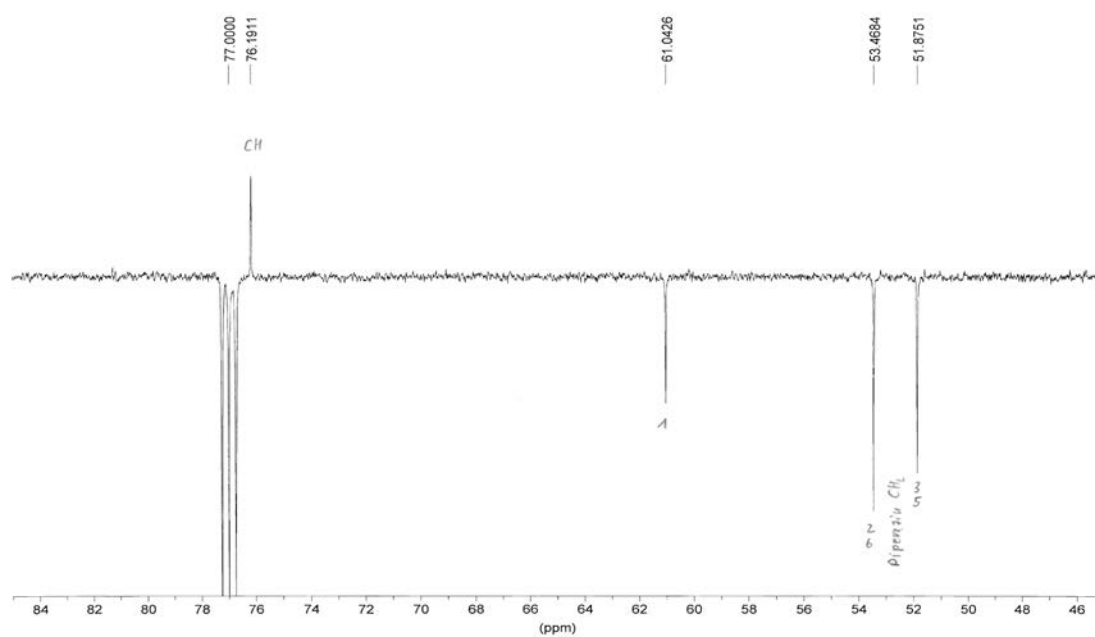
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdd3 (APT) 20.4.2011



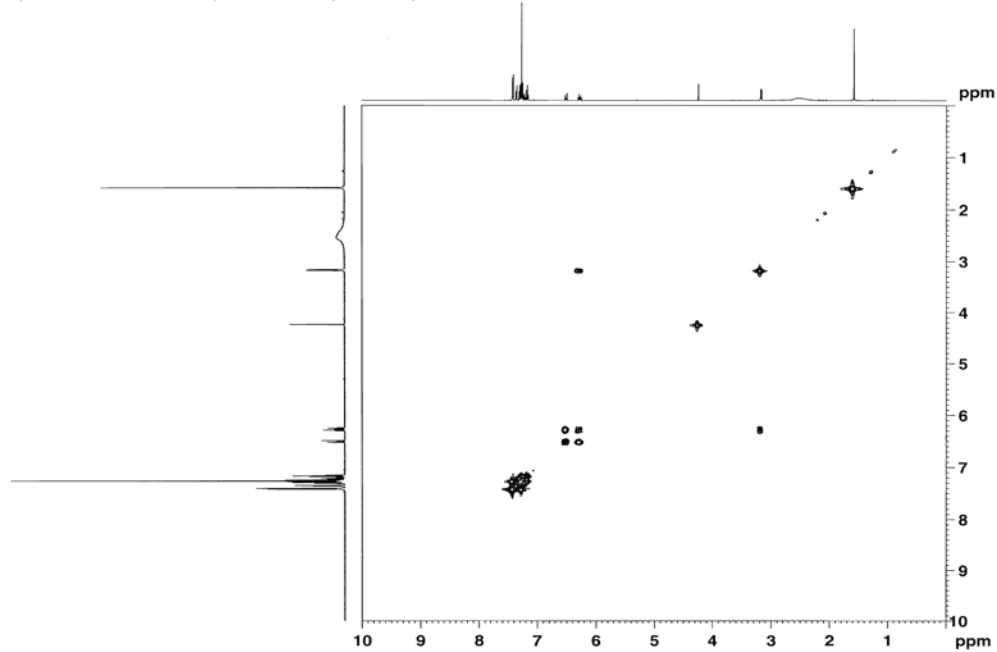
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdd3 (APT) 20.4.2011



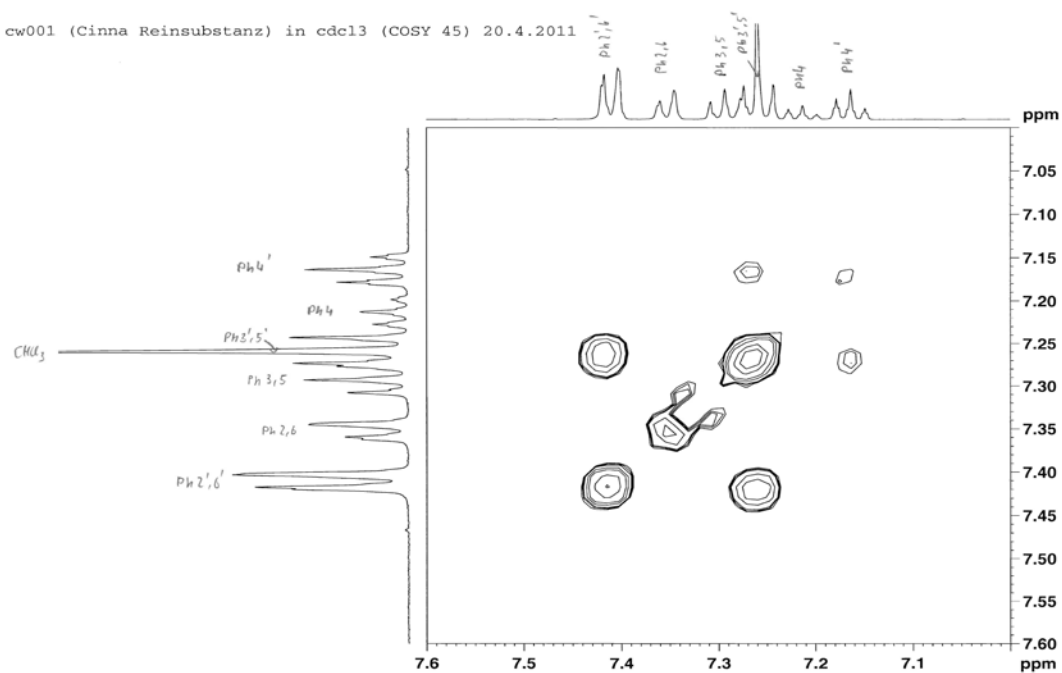
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdc13 (APT) 20.4.2011



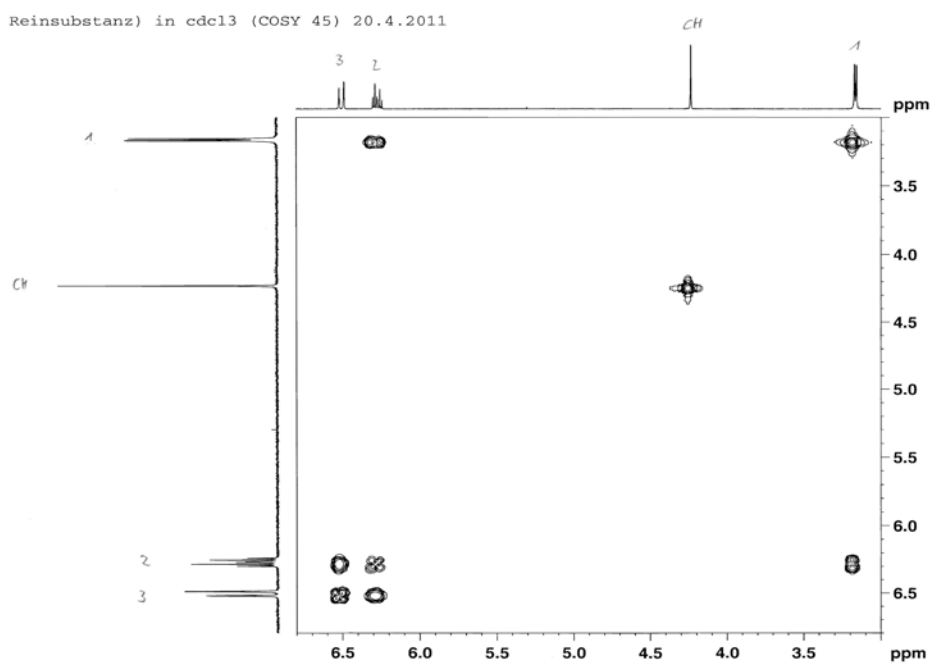
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdc13 (COSY 45) 20.4.2011



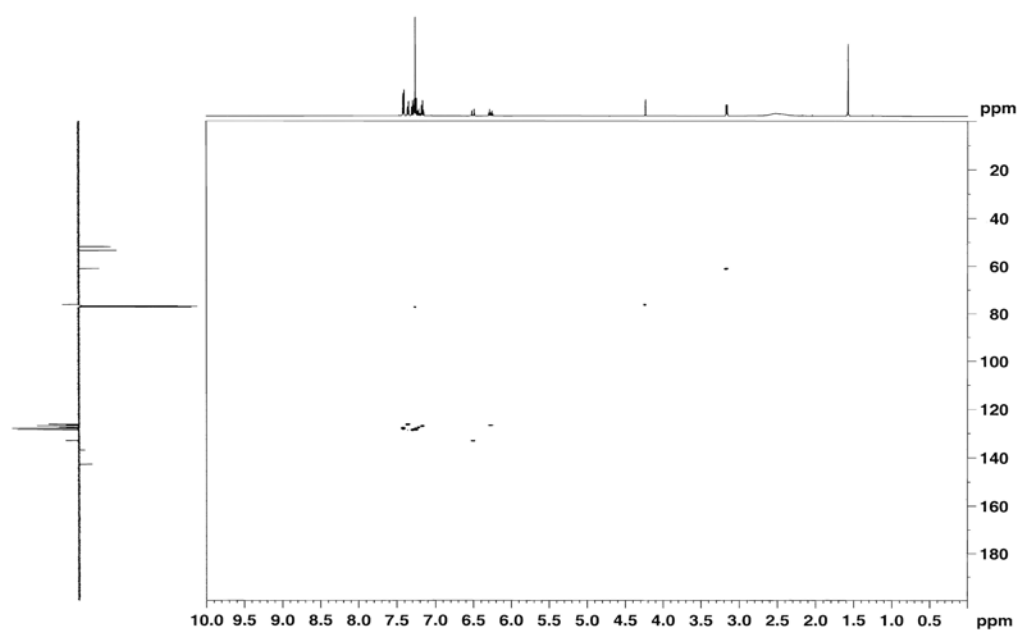
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdc13 (COSY 45) 20.4.2011



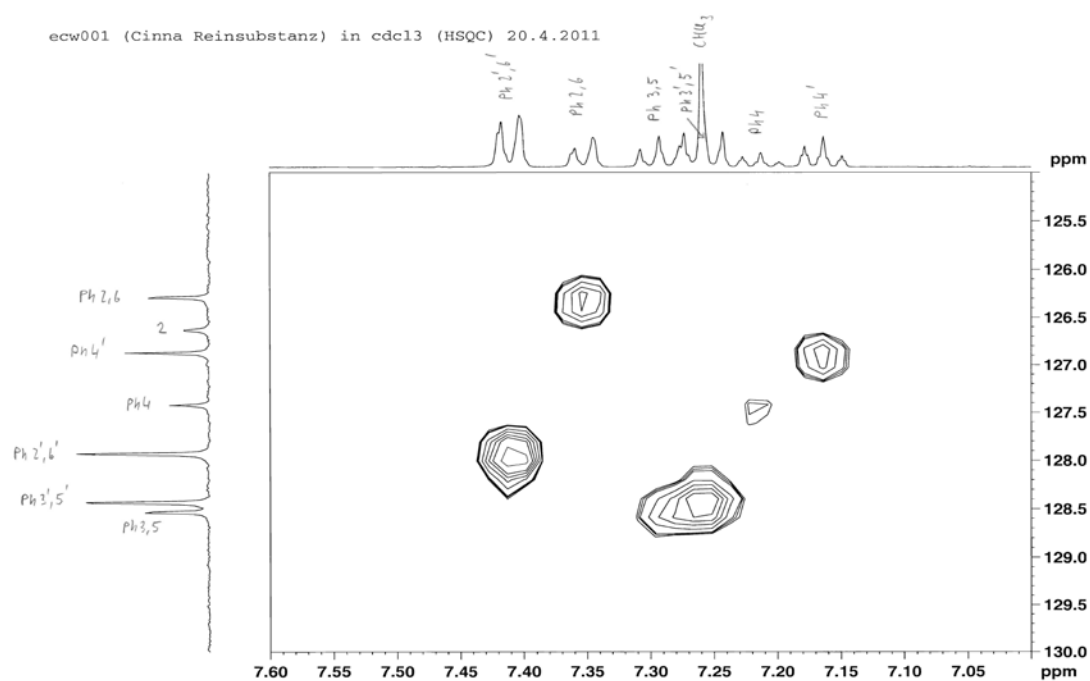
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdc13 (COSY 45) 20.4.2011



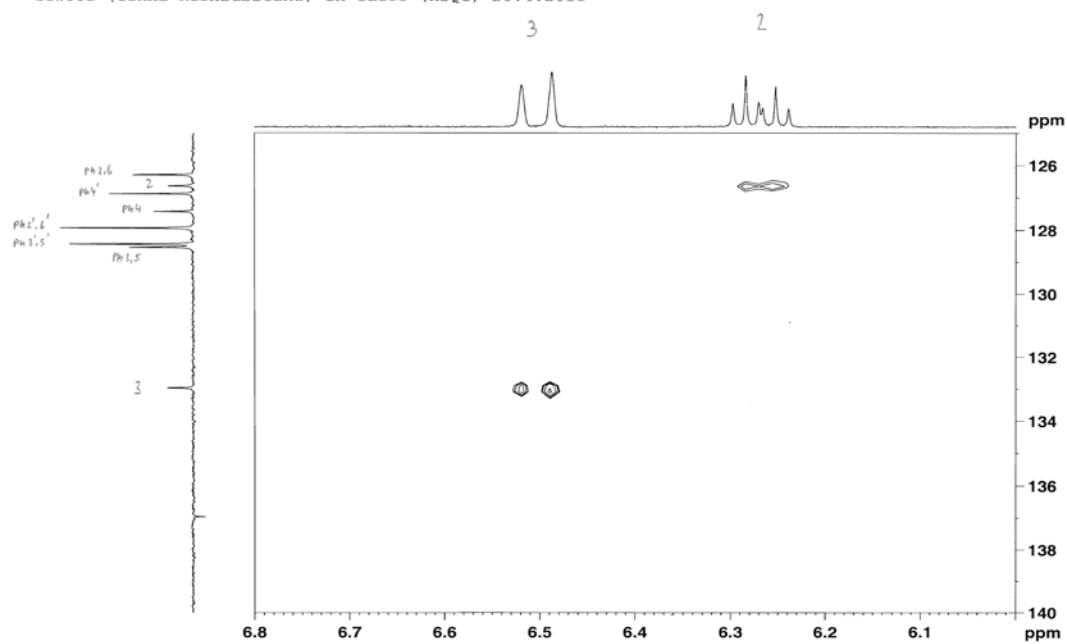
ecw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdcl3 (HSQC) 20.4.2011



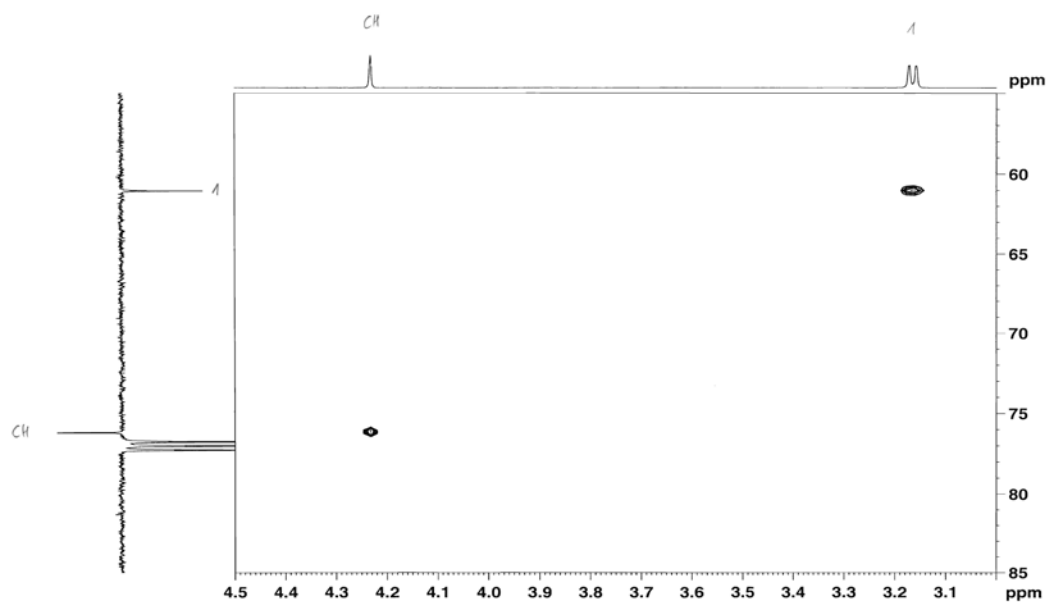
ecw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdcl3 (HSQC) 20.4.2011



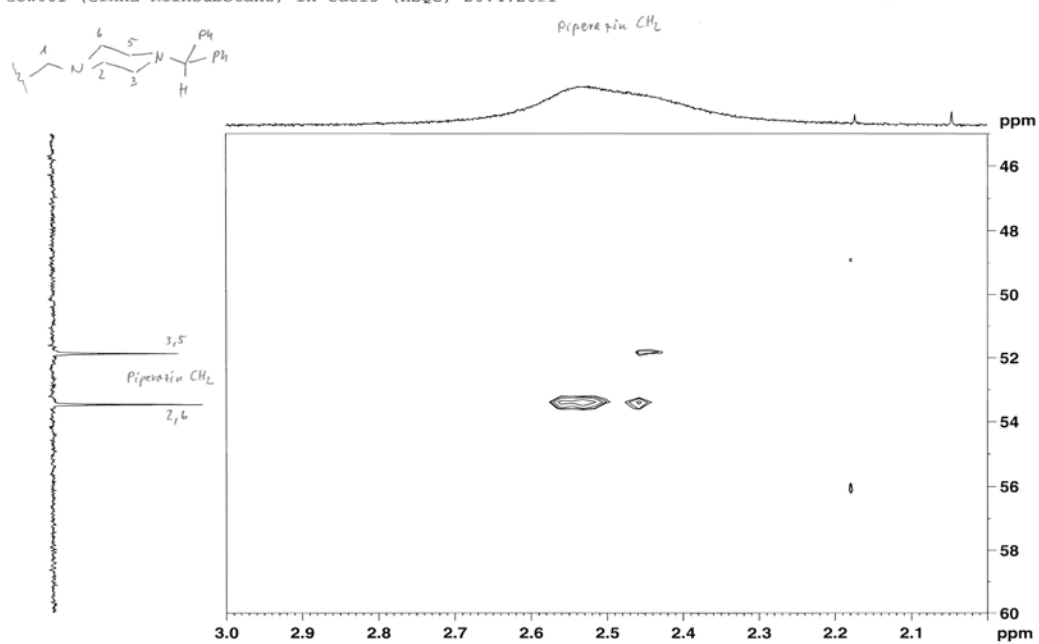
ecw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdcl3 (HSQC) 20.4.2011



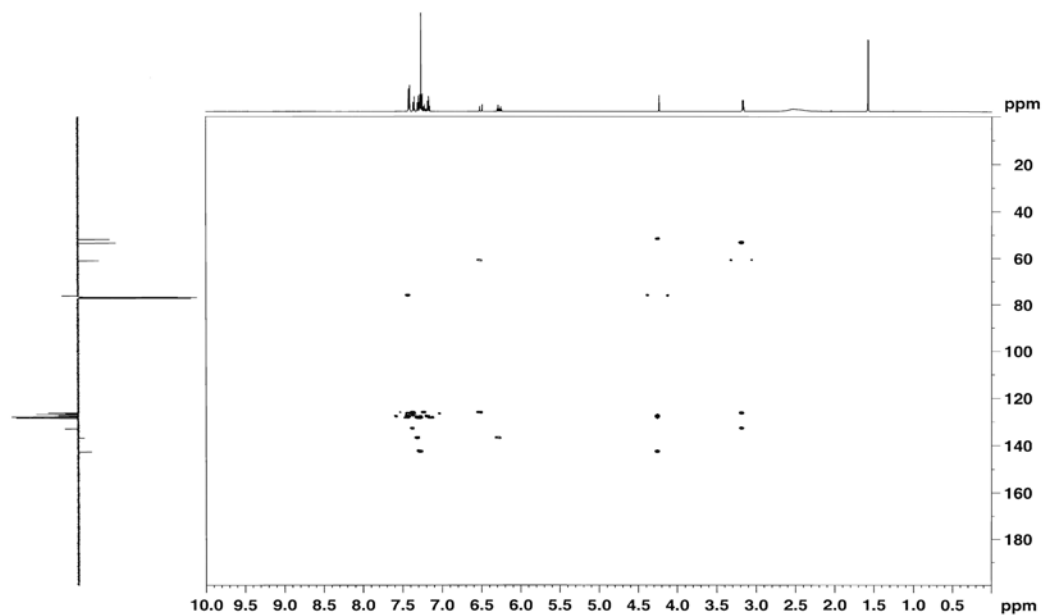
ecw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdcl3 (HSQC) 20.4.2011



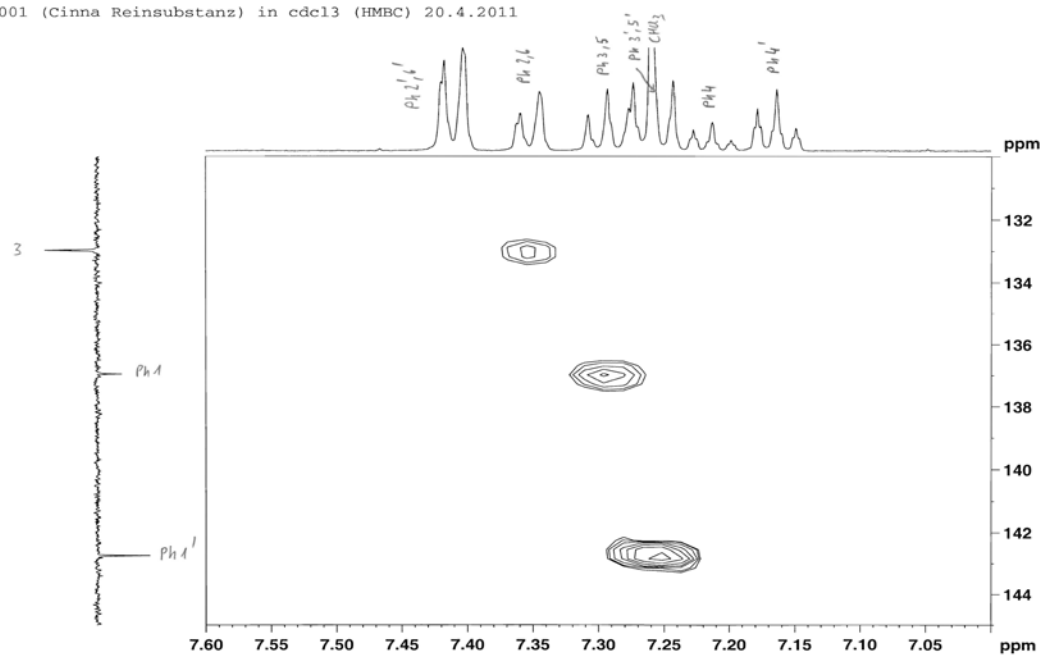
ecw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdcl3 (HSQC) 20.4.2011



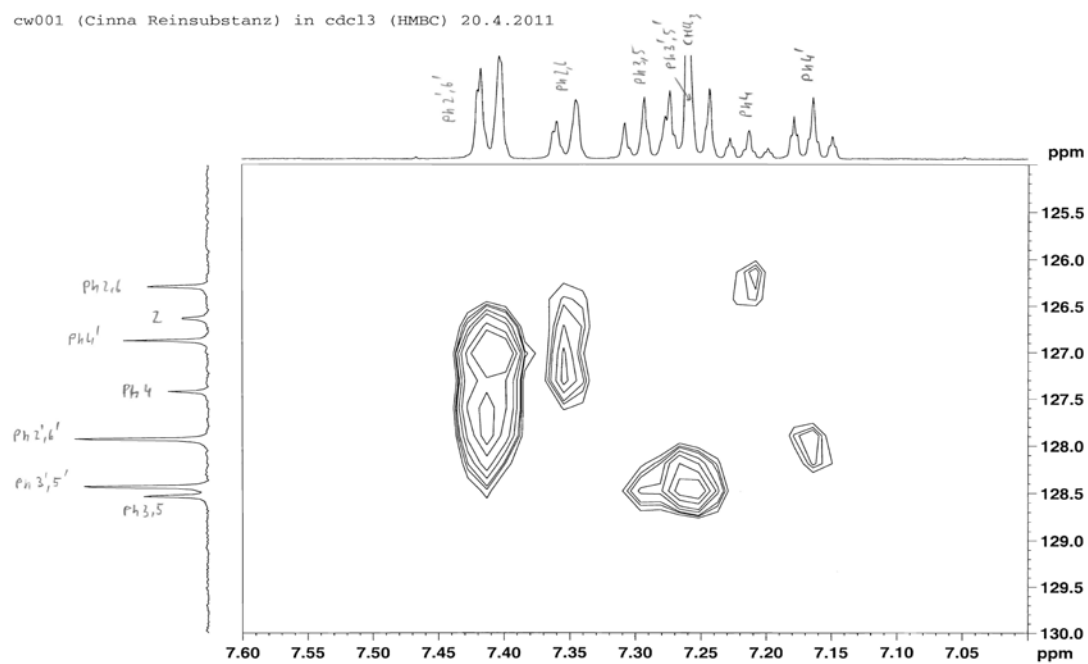
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdcl3 (HMBC) 20.4.2011



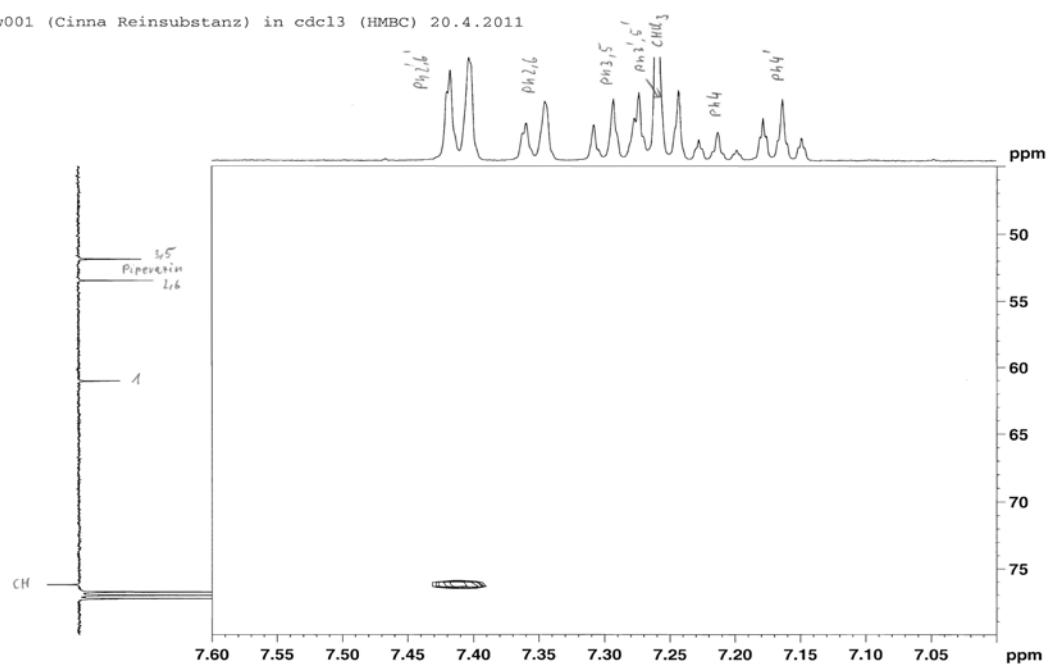
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdc13 (HMBC) 20.4.2011



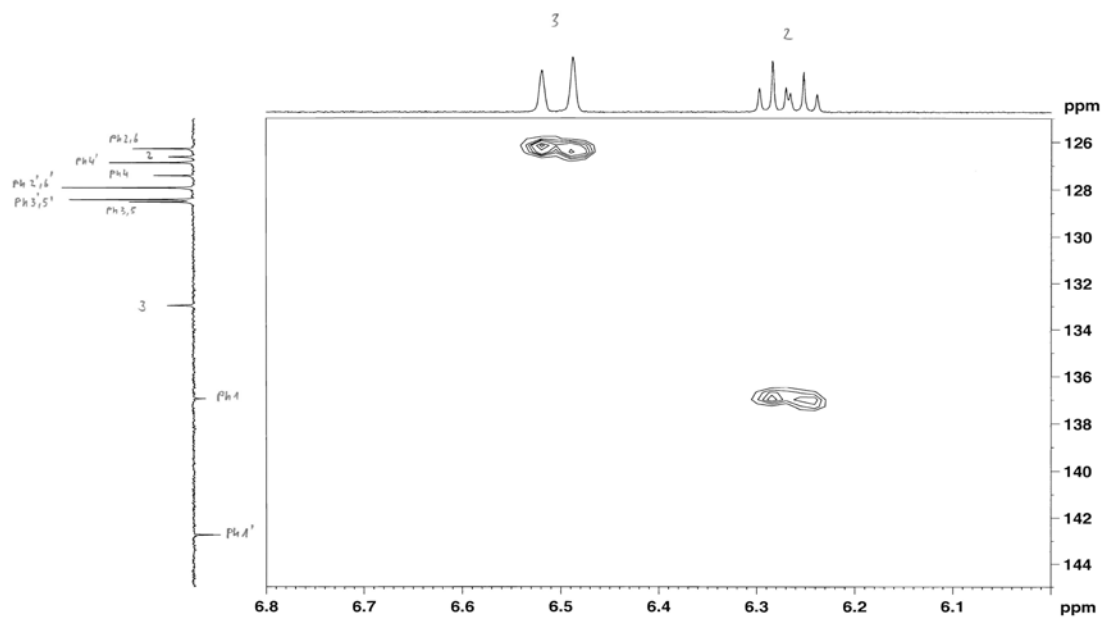
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdc13 (HMBC) 20.4.2011



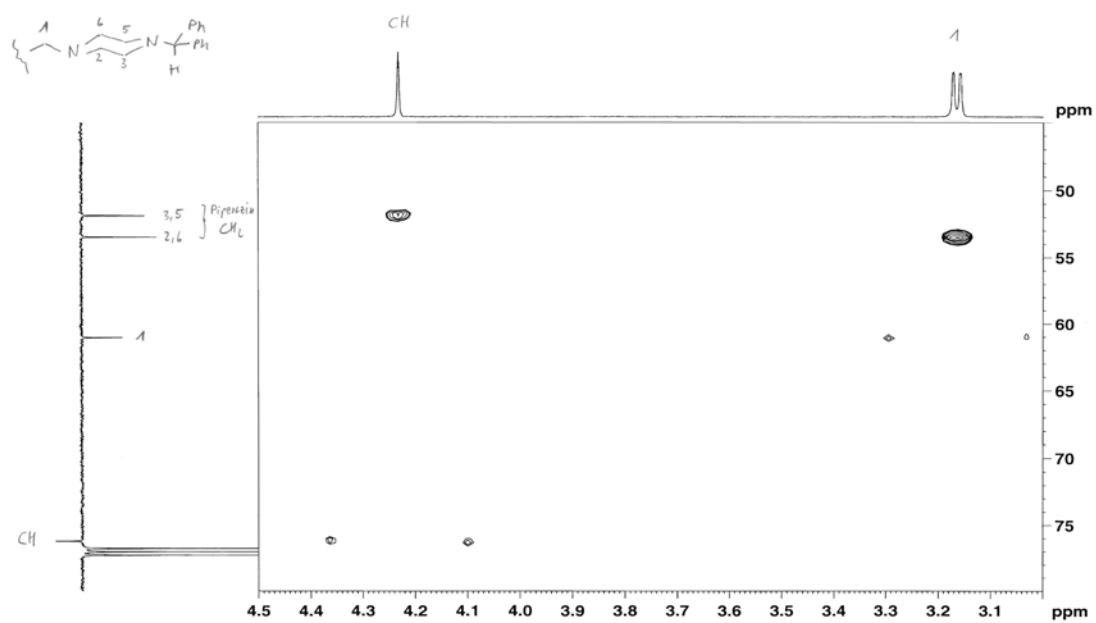
cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdc13 (HMBC) 20.4.2011



cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdc13 (HMBC) 20.4.2011



cw001 (Cinna Reinsubstanz) in cdcl3 (HMBC) 20.4.2011



Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine analytische Methode entwickelt, um Cinnarizin sowohl in Arzneimitteln als auch in Gegenwart von Abbauprodukten zu bestimmen. Diese neue HPLC-Methode zur Bestimmung von Cinnarizin wurde gemäß den ICH-Richtlinien validiert. Um Abbauprodukte zu erhalten, wurde Cinnarizin mit UV/Vis-Licht bestrahlt und mit 0,5M HCl hydrolysiert. Cinnarizin war gegenüber der Bestrahlung im Suntest und mit UV 366nm stabil, es konnten keine Abbauprodukte nachgewiesen werden. Jedoch konnten bei der Bestrahlung mit UV 254nm Abbauprodukte detektiert werden. Dabei waren im Chromatogramm vier relevante Peaks zusätzlich zum Cinnarizin-Peak sichtbar. Mittels DC wurden eine sehr polare Substanz, welche auf der Startlinie blieb und bei 366nm fluoreszierte, und eine sehr lipophile Substanz, welche sich in der Fließmittelfront befand und bei 366nm leicht fluoreszierte, nachgewiesen. Zwischen diesen beiden Banden befanden sich noch zwei Banden. Mittels Massenspektrometrie konnten die Abbauprodukte nicht eindeutig identifiziert werden, da die gesammelten Fraktionen zu viele Fragmente enthielten, denen keine Strukturformeln zugeordnet werden konnten. Jedoch konnte das Fragment mit dem MG 167 eindeutig als Diphenylmethan-Ion identifiziert werden. Die Vermutung, dass es sich beim Peak, der im Chromatogramm nach dem Cinnarizin-Peak auftrat, um das *cis*-Isomer handelte, wurde durch das Massenspektrum mit Summenformelberechnung nicht bestätigt. Um den detektierten Substanzen eindeutige MG und Strukturformeln zuordnen zu können, sind weitere Studien erforderlich.

Bei der Hydrolyse von Cinnarizin entstanden weiße Kristalle. Aus diesem Grund wurden die darauffolgenden Untersuchungen einmal nur an den Kristallen, einmal nur an der Mutterlauge und schließlich an der Mutterlauge-Kristall-Mischung durchgeführt. Mittels DC wurde in keiner der genannten Lösungen Cinnarizin selbst nachgewiesen. Das heißt, Cinnarizin wurde durch die Hydrolyse komplett abgebaut. Dafür war auf der DC bei der Kristall-Lösung eine starke Bande in der Fließmittelfront sichtbar und bei der Mutterlauge war eine Bande auf der Startlinie zu erkennen. Das heißt bei den Kristallen handelte es sich um eine sehr lipophile Substanz und bei der Mutterlauge um eine sehr polare. Die DC der Mutterlauge-Kristall-Mischung zeigte, wie von der Mischung zu erwarten war, eine starke Bande in der Fließmittelfront und eine auf der Startlinie. Im Vergleich zum UV-bestrahlten Cinnarizin, könnte es sich bei der Bande auf der Startlinie um die gleiche Substanz handeln. Mittels HPLC wurde die lipophile Substanz der Kristalle bei der R_t 23,3 detektiert und die polare Substanz der Mutterlauge bei der R_t 1,7. Das Massenspektrum der beiden Lösungen lieferte, wie bei den Messungen der Photoabbauprodukte, keine eindeutigen Ergebnisse. Eindeutige Ergebnisse wurden erst durch das ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-, COSY 45-, HSQC- und HMBC-Spektrum erhalten. Durch diese Spektren wurde bewiesen, dass es sich bei den

Kristallen um Benzhydrol und Dibenzhydrylether handelte. Bestandteile der Mutterlauge-Kristall-Mischung waren Cinnamylpiperazin, Benzhydrol und Dibenzhydrylether. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass Cinnamylpiperazin der Hauptbestandteil der Mutterlauge war. Bei den Bestimmungen von Cinnarizin und Donepezil HCl in Fertigarzneimitteln wurde festgestellt, dass sich laut Chromatogramm bei den Cinnabene®-Kapseln ein Abbauprodukt gebildet hat, welches aber mit DC nicht bestätigt werden konnte, da die Cinnabene®-Probelösung nicht verlässliche Rf-Werte zeigte. Bei den Stutgeron®-Kapseln konnte dagegen kein Abbauprodukt nachgewiesen werden. Auch der Gehalt an Cinnarizin hatte trotz überschrittenem Verfalldatum nicht abgenommen.

Bei den Vorversuchen zur Bestimmung von Donepezil HCl in Aricept® 5mg-Filmtabletten wurde die Retentionszeit des Donepezil HCl optimiert. Die Versuche, Donepezil HCl auch in Aricept® 10mg-Filmtabletten zu bestimmen, scheiterten, da das Fronting des Donepezil-Peaks nicht beseitigt werden konnte. Desweiteren wurden mit einer neuen HPLC-Methode der Europäischen Arzneibuchkommission, die eine Weiterentwicklung zur Monographie von Donepezil HCl darstellt, Kalibrationsgeraden für die Gehaltsbestimmung und für die Bestimmung von Related Substances von Donepezil HCl erstellt.

Lebenslauf

Carola Alexandra Waldherr

1986	geboren am 24.12. in St. Pölten
1993 bis 1997	Besuch der Volksschule Eisenstadt
1997 bis 2005	Besuch des BRG/BORG Kurzweise Eisenstadt
2005	Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
seit 2005	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
2007	1. Diplomprüfung
2010	2. Diplomprüfung

Praktika:

September 2006	Ferialpraktikum in der Apotheke zum Granatapfel Eisenstadt
August 2007	Ferialpraktikum in der Apotheke zum Granatapfel Eisenstadt