



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Abbau von Phenylephrinhydrochlorid
in wässriger Lösung:
Identifizierung von Abbauprodukten
mittels HPLC, MS und NMR“

verfasst von / submitted by

Manuel Fleischmann, BSc

angestrebter akademischer Grad /

in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien, 2022 / Vienna 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears
on the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears
on the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Mag. Dr. Judith Wackerlig

**Abbau von Phenylephrinhydrochlorid in wässriger Lösung:
Identifizierung von Abbauprodukten mittels HPLC, MS und NMR**

Ich danke meiner Betreuerin Frau Mag. Dr. Judith Wackerlig für ihre Unterstützung auf dem Weg zu meiner Abschlussarbeit sowie für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe Pharmazeutische Analytik zu forschen, was mir einen tieferen Einblick in die Welt der naturwissenschaftlichen Forschung ermöglichte.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfe und ihren Einsatz, im Besonderen Herrn Daniel Dobusch, MSc, der für mich MS-Messungen durchführte, sowie Herrn ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban, der sich meiner NMR-Messungen und -Auswertungen annahm.

Ebenso danke ich Herrn Mag. Georg Länger vom Universitätsklinikum St. Pölten für das Bereitstellen von Materialien und Informationen für meine Arbeit.

Zudem danke ich meiner Studienkollegin Frau Mag. Verena Maisetschläger, die zeitgleich mit mir an ihrer Abschlussarbeit forschte und die mir in Augenblicken des Zweifels immer mit gutem Rat auszu helfen wusste.

Das α -Sympathomimetikum Phenylephrinhydrochlorid (PE-HCl) unterliegt in wässriger Lösung einem Abbau, wie er in Polypropylen-Fertigspritzen mit einer Konzentration von $0,04 \text{ mg/ml}$ PE-HCl in isotoner Natriumchloridlösung ($0,9 \text{ } \%$ (m/m)) mit einem Volumen von 10 ml beobachtet wurde. Dabei ergab sich bei vorgesehener Lagerung der Fertigspritzen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank ohne gesonderten Lichtschutz über einen Zeitraum von einem Jahr ein Abbau von etwa $1,4 \text{ } \%$, bezogen auf die Ausgangskonzentration von PE-HCl, wobei im Besonderen ein Abbauprodukt gebildet wurde. Ziel der Arbeit war, eben dieses Abbauprodukt durch Einsatz von HPLC, LC-MS und NMR zu isolieren und dessen Struktur aufzuklären, um eine mögliche von ihm ausgehende gesundheitliche Gefahr bewerten zu können. Es gelang, die Verbindung 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan zu identifizieren. Aufgrund unklarer struktureller Zusammenhänge mit PE-HCl und unzureichender Datenlage in der Literatur konnte jedoch nicht abschließend beurteilt werden, ob es sich bei der isolierten Substanz tatsächlich um ein Abbauprodukt von PE-HCl handelt und welche Auswirkungen dieses auf die Sicherheit des Produkts besitzt. Ein weitergehender Versuch, die Strukturen von mittels Belastung durch Wasserstoffperoxid gebildeten verschiedenen Abbauprodukten von PE-HCl mittels HPLC, LC-MS und NMR aufzuklären, brachte hingegen keine verwertbaren Ergebnisse.

The α -sympathomimetic agent phenylephrine hydrochloride (PE-HCl) is degraded in aqueous solutions as observed in pre-filled polypropylene syringes with a concentration of 0.04 mg/ml of PE-HCl in isotonic solution of sodium chloride ($0.9 \text{ } \%$ (m/m)) with a volume of 10 ml . When the pre-filled syringes were stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in the refrigerator without separate light protection, a degradation of about $1.4 \text{ } \%$, based on the initial concentration of PE-HCl, was achieved over a period of one year, whereby one degradation product was formed in particular. The aim of the work was to isolate this degradation product by using HPLC, LC-MS and NMR and to clarify its structure in order to be able to evaluate a possible health hazard. It was possible to identify the compound 2,4,6-tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxane. However, due to unclear structural relationship with PE-HCl and insufficient data in literature, it could not be conclusively assessed whether the isolated substance is actually a degradation product of PE-HCl and which impact it has on the safety of the product. A further attempt, in contrast, to clarify the structures of various degradation products of PE-HCl formed by exposure to hydrogen peroxide by means of HPLC, LC-MS and NMR did not yield any usable results.

Die Arbeit entstand in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum St. Pölten, welches neben den Fertigspritzen mit PE-HCl-Lösungen auch weiteres Probenmaterial, eine Säule für die HPLC sowie die dafür passende Methode bereitstellte.

I	Allgemeiner Teil	I
1.1	Grundlagen von Stabilität und Abbau von Arzneistoffen	3
1.1.1	Stabilitätsprüfungen unter gewöhnlichen sowie Zwangsbedingungen ..	3
1.1.2	Häufige Abbauwege von Arzneistoffen.....	5
1.2	Eigenschaften und Abbau des Arzneistoffs Phenylephrin	8
1.2.1	Eigenschaften und Darstellung	9
1.2.2	Verunreinigungen, Stabilität und Abbau.....	12
2	Experimenteller Teil	23
2.1	Materialien, Probenbereitung und Methoden	23
2.1.1	Materialien und Geräte.....	23
2.1.2	Bereitung der wässrigen Pufferlösungen	24
2.1.3	Probenbereitung	25
2.1.4	Methodenentwicklung für die Hochleistungsflüssigchromatographie..	28
2.2	Abbau einer wässrigen Lösung von Phenylephrinhydrochlorid unter Zwangsbedingungen	33
2.3	Fraktionierung einer wässrigen Lösung von Phenylephrinhydrochlorid zur Isolierung der Abbauprodukte.....	38
2.4	Strukturaufklärung der Abbauprodukte mittels Massenspektrometrie und Kernspinresonanzspektroskopie.....	42
2.5	Identifizierung des Abbauprodukts in Fertigspritzen mit Phenylephrinhydrochlorid.....	48
3	Schlussfolgerung.....	57
	Literaturverzeichnis.....	59

I Allgemeiner Teil

I.1 Grundlagen von Stabilität und Abbau von Arzneistoffen

Instabilitäten sind im Bereich der Arzneistoffe als zumeist organische Moleküle weit verbreitet. Um eine dem gewünschten Effekt abträgliche Wirkung aufgrund von Instabilitäten jedenfalls über den vorgesehenen Lagerzeitraum eines Arzneistoffs bewerten zu können, unterliegen diese strengen Prüfungen. Bei Zulassung eines neuen Arzneistoffs werden von den zuständigen Behörden – in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union übernimmt diese Funktion die Europäische Arzneimittel-Agentur mit Sitz in Amsterdam – Stabilitätsprüfungen der Substanz gefordert. Diese sollen Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit des Arzneimittels gewährleisten. Im Zuge von Herstellung, Lagerung und Vermarktung können am Arzneimittel chemische, physikalische sowie mikrobielle Instabilitäten auftreten. Die häufigsten Anzeichen einer Instabilität sind Verfärbungen oder Trübungen von flüssigen Zubereitungen, Veränderungen von Konsistenz, Teilchengröße oder Feuchtigkeitsgehalt bei festen oder halbfesten Zubereitungen, allgemein aber auch Schwankungen des Gehalts (1).

I.1.1 Stabilitätsprüfungen unter gewöhnlichen sowie Zwangsbedingungen

Die Stabilität eines Arzneistoffs ist von vielerlei Einflussfaktoren abhängig: sie beschränkt sich nicht allein auf die chemische Beständigkeit des Wirkstoffs, sondern wird ebenso von Herstellung, Lagerung und Handhabung bestimmt. Zu beachten sind somit auch Wechselwirkungen mit anderen Substanzen, darunter Hilfs- und Verpackungstoffe, und die Auswirkungen von Licht und Umgebungsfeuchtigkeit (1). Der *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, kurz *ICH*, ein Zusammenschluss der Arzneimittelbehörden der Europäischen Union, Japans sowie der USA erarbeitete unter anderem von den 1990er Jahren an Richtlinien für die Vorgehensweise bei Stabilitätsprüfungen (*Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2)*) (2).

Die Stabilitätsprüfungen werden nach den ICH-Richtlinien in drei Kategorien nach Lagerzeit und Lagerbedingungen wie folgt eingeteilt: Prüfungen über einen langen (*long*

term; 12 Monate bei einer Temperatur von 25 ± 2 °C und einer relativen Feuchte von 60 ± 5 % oder bei einer Temperatur von 30 ± 2 °C und einer relativen Feuchte von 65 ± 5 %) oder mittleren Zeitraum (*intermediate*; 6 Monate bei einer Temperatur von 30 ± 2 °C und einer relativen Feuchte von 65 ± 5 %); des Weiteren werden auch beschleunigte (*accelerated*) Bedingungen angeführt, wobei die Bezeichnung beschleunigt irreführend scheinen mag, da nicht die zeitliche Dauer verkürzt, sondern einzig die Lagerbedingungen verschärft werden (6 Monate bei einer Temperatur von 40 ± 2 °C und einer relativen Feuchte von 75 ± 5 %). Sie dienen dazu, durchschnittliche Umstände bei Lagerung und Transport des Arzneistoffs nachzuahmen und somit Rückschlüsse auf dessen Lagerfähigkeit und Ablaufdatum gewinnen zu können (2).

Davon abzugrenzen ist ein Abbau unter Zwangsbedingungen (*forced conditions*). Dieser dient nicht dazu, den Abbau eines Arzneistoffs unter gewöhnlichen Lagerbedingungen nachzustellen, sondern ermöglicht vielmehr, in einer möglichst kurzen Zeitspanne einen ausreichend starken Abbau herbeizuführen, um sodann die gebildeten Abbauprodukte identifizieren zu können. Oftmals fungiert er als Vorbereitung für einen Stabilitätstest. Möglich ist hierbei, den Abbau bei verschiedenen pH-Werten des Mediums, bei erhöhter Temperatur und Feuchte oder auch in Gegenwart von Licht oder Sauerstoff durchzuführen. Es gilt allerdings zu beachten, dass die gewählten Bedingungen nicht zu rau ausfallen, da ansonsten das Reaktionsgeschehen in einer unverhältnismäßigen Weise beeinflusst und den gewonnenen Ergebnissen somit nicht mehr vorbehaltlos Vertrauen geschenkt werden kann. Auch kann der mit der Probenaufbereitung verbundene Aufwand sich ungebührlich stark erhöhen, müssen etwa die Proben vor Vermessung zunächst aufwendig neutralisiert oder verdünnt werden. Als wünschenswert gilt zumeist zwischen 5 und 20 %, in der Regel etwa 10 % Abbaus im Vergleich zur Ausgangsmenge des Wirkstoffs (3).

Mögliche Bedingungen, unter welchen ein gezielter Abbau zu erzwingen ist, sind namentlich hydrolytische, oxidative, photolytische oder thermische Wege. Unter hydrolytischen Bedingungen vollzieht sich der Abbau in wässrigem, meist saurem oder basischem Medium; hierzu wird vornehmlich Raumtemperatur gewählt. Nur wenn bei dieser kein ausreichender Abbau zu erzielen ist, kann eine erhöhte Temperatur (50–70 °C) eingestellt werden. Am Ende der festgelegten Zeitspanne muss das Medium gegebenenfalls neutralisiert werden, um einen weiteren Abbau zu verhindern. Um einen oxidativen Abbau herbeizuführen, wird überwiegend Wasserstoffperoxid, werden aber auch Metall- oder Radikationen eingesetzt. Eine Belastung mit Ultraviolett(UV)- oder Fluoreszenzstrahlung

kann ebenso über freie Radikale einen Oxidationsvorgang initiieren. Für eine thermische Belastung wird ein Feststoff trockener oder feuchter, eine Flüssigkeit trockener Hitze bei Temperaturen zwischen 40 und 80 °C ausgesetzt (3).

Zu beachten ist jedenfalls die Löslichkeit des Arzneistoffs im Prüfmedium. Weiters ist das Ziel eines Abbaus unter Zwangsbedingungen nicht, unter allen Umständen den wünschenswerten Abbau von 5 bis 20 % zu erreichen. Ausreichend ist eben so viel, wie zur Identifizierung und Aufklärung der Abbauprodukte nötig ist. Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass nicht alle unter Zwangsbedingungen entstehenden Abbauprodukte auch unter gewöhnlichen Lagerbedingungen auftreten. Mitunter stellt die Aufklärung aller Abbauprodukte somit entbehrliche Mühe dar, die durch sorgfältige Vorbereitung vermieden werden kann. Endlich ist im Zuge der Auswertung der gewonnenen Daten die Aufstellung einer Stoffbilanz oftmals einer Massenbilanz vorzuziehen. Dies liegt darin begründet, dass bisweilen nicht die Strukturen und damit Molekulargewichte aller beteiligten Abbauprodukte restlos aufgeklärt werden können. Auch vollziehen sich zuweilen Reaktionen mit Hilfs- oder Verpackungstoffen, woraus zuweilen ein Wert für die Massenbilanz von größer 100 % resultieren kann (4).

1.1.2 Häufige Abbauwege von Arzneistoffen

Die meisten organischen Arzneistoffe, darunter im Besonderen niedermolekulare Substanzen, sogenannte small molecules, tragen an ihrem Kohlenwasserstoffgrundgerüst funktionelle Gruppen, welche unter Einwirkung von Einflüssen wie Licht, Hitze oder Feuchtigkeit, aber auch Oxidationsmittel, Säuren oder Basen leicht reagieren und somit in andere chemische Funktionen übergeführt werden. Die dabei am häufigsten sich vollziehenden Reaktionen sind Oxidationen sowie Hydrolysen, aber auch Solvolysen oder Racemisierungen (1) (4).

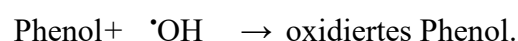
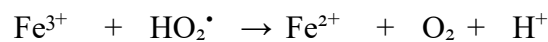
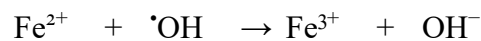
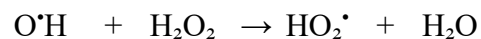
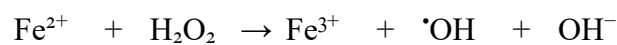
Oxidationsreaktionen an organischen Molekülen treten grundsätzlich sehr häufig auf, allerdings werden sie im Arzneimittelbereich oftmals durch Licht- und Luftausschluss oder durch Zusatz von Antioxidantien abgeschwächt. Bei Oxidationsprozessen organischer Moleküle kann im Vergleich zu anorganischen Redoxprozessen oftmals keine eindeutige Elektronenübergangsreaktion aufgestellt werden; vielmehr steht hier die Änderung der Oxidationsstufe eines Kohlenstoffatoms durch Abziehen eines Wasserstoff- bzw. Anfügen eines Sauerstoffatoms im Mittelpunkt. Damit die Oxidation eines Feststoffs ablaufen

kann, ist dessen morphologischer Zustand von Bedeutung; denn um eine Reaktion auszulösen, muss das oxidierende Molekül durch das Kristallgitter zum Reaktionsort diffundieren können. Dies geschieht um so leichter, je unregelmäßiger das Kristallgitter ausgebildet ist, je mehr Fehlstellen und Verunreinigungen es enthält. Es können vier Arten von Oxidationsreaktionen unterschieden werden: Oxidation durch Angriff eines Singulett-Sauerstoffs, Autoxidation, Oxidation durch Angriff eines Peroxids sowie Oxidation durch Übergangsmetalle (4) (5) (6).

Molekularer (Triplett-)Sauerstoff besitzt an sich keine stark oxidativen Eigenschaften. Allerdings kann etwa durch UV-Strahlung ein Übergang von Triplett- in Singulett-Sauerstoff angeregt werden; in diesem Zustand vermag er an C=C-Doppelbindungen anzugreifen und in Folge Peroxide, Ketone oder Aldehyde auszubilden (4).

Von Autoxidation spricht man, wenn über die Reaktion eines Initiatorradikals mit molekularem (Luft-)Sauerstoff ohne Katalyse eine Kettenreaktion in Gang gesetzt wird. Das entstehende Peroxyradikal kann nun ein Wasserstoffatom von einer Alkylkette abziehen und so ein Hydroperoxid (RO–OH) ausbilden, welches unter Freisetzung eines neuen reaktionsfähigen Radikals weiter zu einem Alkohol (ROH) zerfällt. Auch vorhandene Spuren organischer Peroxide können unter Einfluss von Licht oder Hitze in entsprechender Weise eine Kettenreaktion einleiten (4) (6).

Auch Übergangsmetalle wie Eisen oder Kupfer, die in Spuren in nahezu allen Puffern vorhanden sind, besitzen bereits in geringen Mengen oxidative Eigenschaften. Zugrunde liegt die im letzten Jahrzehnt des 19. Jahrhunderts von FENTON erstmals beschriebene (7) Reaktion organischer Substrate wie Phenole unter Eisenkatalyse in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (8):



Gängige Maßnahmen, um Oxidationsreaktionen zu verhindern oder zumindest zu verlangsamen, sind zum einen der Zusatz von Antioxidantien wie etwa α -Tocopherol oder Ascorbinsäure, zum anderen licht- und sauerstoffundurchlässige Verpackungen; bei dem

hierfür oft eingesetzten Braunglas wiederum besteht jedoch die Gefahr der Auswaschung von katalysierenden Metallen, weshalb in diesen Fällen Chelatbildner wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) oder Citronensäure beigelegt werden müssen (6).

Tatsächlich häufiger treten hydrolytische Abbaureaktionen auf. Von Hydrolyse besonders betroffen sind Carbonsäureester, Amide sowie Carbamate, wobei die Hydrolyse von Carbonsäureestern wegen der größeren Elektronegativitätsdifferenz zwischen Kohlenstoff und Sauerstoff rascher diejenige von Amiden mit geringerer Elektronegativitätsdifferenz zwischen Kohlenstoff und Stickstoff. Weitere für Hydrolyse anfällige funktionelle Gruppen sind Imine, Acetale, Sulfate und Phosphorsäureester. Die Reaktion läuft sowohl in saurer als auch basischer Umgebung ab und ist abhängig von pH-Wert und Temperatur des Mediums. Ein bekanntes Beispiel für eine hydrolytische Zersetzungsreaktion in Form einer Esterspaltung ist der Abbau der Acetylsalicylsäure zu Salicylsäure; die hierbei freigesetzte Essigsäure weist infolge ihres charakteristischen Eigengeruchs auf eine bereits angelaufene Abbaureaktion und somit Verfall des Produkts hin. Gleichzeitig werden besonders leicht ablaufende hydrolytische Reaktionen auch ausgenutzt, um einen Wirkstoff mit ungünstigen Löslichkeitseigenschaften oder unzureichender Verträglichkeit in Form eines Einschleuseesters, eines pro-drugs, leichter in den Körper einführen zu können, wo er sodann von körpereigenen Esterasen in die unveresterte Wirkform übergehen kann. Hydrolyseanfällige Arzneistoffe können durch Auswahl einer geeigneten Darreichungsform vor Abbau geschützt werden – in etwa die eines Pulvers zur Herstellung einer frischen Lösung, wie bei β -Lactam-Antibiotika üblich, – oder durch Vermeidung von hohen Temperaturen, etwa durch Verzicht auf Hitzesterilisation oder Sicherstellung einer gekühlten Lagerung (4) (5).

1.2 Eigenschaften und Abbau des Arzneistoffs Phenylephrin

Der im Europäischen Arzneibuch beschriebene (9) (10) Arzneistoff Phenylephrin (PE) gehört als α_1 -Adrenozeptoragonist zur Gruppe der direkten Sympathomimetika. Deren Bezeichnung gründet auf ihrer Wechselwirkung mit den G-Protein-gekoppelten Adrenozeptoren in der Peripherie und ihrer damit einhergehenden Nachahmung der Sympathikuswirkung. Sie stehen damit im Gegensatz zu den indirekt wirkenden Sympathomimetika, welche ihre Wirkung durch Freisetzung des natürlichen Botenstoffs Noradrenalin entfalten. PE weist eine enge strukturelle Verwandtschaft zu den natürlichen Botenstoffen an Adrenozeptoren auf, den sogenannten Catecholaminen Adrenalin und Noradrenalin. Diese besitzen ein β -Phenylethylamingrundgerüst. PE selbst zeigt jedoch anstelle der Brenzcatechinteilstruktur von Adrenalin und Noradrenalin eine Phenolteilstruktur (**Abb. 1, 1–3**).

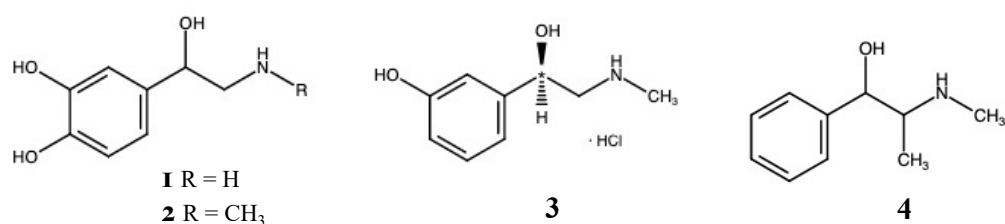


Abb. 1: Strukturformel von Noradrenalin (**1**), Adrenalin (**2**), (*R*)-Phenylephrinhydrochlorid (**3**) und Pseudoephedrin (**4**).

Bei Adrenozeptoragonisten lassen sich folgende Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufstellen: Zum einen steigt die Affinität zu den Rezeptoren mit der Zahl der Hydroxylgruppen am Molekül, zum anderen steigt die Affinität zu den β -Adrenozeptoren und sinkt umgekehrt diejenige zu den α -Rezeptoren mit der Größe des Rests an der Aminogruppe (11). So lässt sich aus der Struktur von PE seine Selektivität zu den α_1 -Adrenozeptoren ableiten. Das Fehlen einer dritten Hydroxylgruppe vermindert weiters seine Polarität gegenüber den natürlichen Botenstoffen Adrenalin und Noradrenalin. Hierdurch wird er zwar besser aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert, als Substrat der Monaminoxidasen aber dennoch rasch verstoffwechselt und folglich inaktiviert (11). Aufgrund dieser gerin-

gen oralen Bioverfügbarkeit wird PE überwiegend zur topischen, okkularen oder intravenösen Anwendung eingesetzt. Als Mittel zur lokalen Abschwellung der Schleimhäute drängte es in den letzten Jahren im Bereich der Erkältungsmittel das nahe strukturverwandte Pseudoephedrin zurück. Pseudoephedrin ist am Phenylrest nicht hydroxyliert, besitzt an Position 2 des Ethylrests jedoch eine zusätzliche Methylgruppe (**Abb. 1, 4**). Es ist also lipophiler als PE, kann dadurch die Blut-Hirn-Schranke übertreten und übt auf diese Art eine zentralnervös anregende Nebenwirkung aus. Da PE diese Eigenschaft fehlt, weist es, verglichen mit Pseudoephedrin, folglich ein günstigeres Nebenwirkungsprofil sowie ein geringeres Missbrauchspotential auf (12) (13). Die kontraktionsfördernde Wirkung von PE auf den pupillenerweiternden Muskel erklärt seinen Einsatz als Mydriatikum in der Augenheilkunde. Vorteilhaft ist, dass es im Gegensatz zu den Muscarinrezeptorantagonisten keine Lähmung des Ziliarmuskels und damit keine Akkomodationsstörungen herbeiführt (11). Darüber hinaus dient PE in Schockzuständen in der Anästhesie und Notfallmedizin in Form einer intravenösen Bolusgabe der Hebung des Blutdrucks (14).

1.2.1 Eigenschaften und Darstellung

Medizinisch eingesetzt wird PE in der Regel in Form seines Hydrochlorids (PE-HCl; $C_9H_{14}ClNO_2$, $M_r = 203,7 \frac{g}{mol}$). Dies wird vom Europäischen Arzneibuch als weißes bis fast weißes kristallines Pulver beschrieben. Ist PE selbst in Wasser und Ethanol 96 % schwer löslich und besitzt einen hohen Schmelzpunkt von $174^\circ C$, so löst sich PE-HCl in Wasser und Ethanol 96 % leicht und schmilzt mit etwa $143^\circ C$ bereits früher (9) (10). Die Substanz liegt als einziger gebräuchlicher Adrenozeptoragonist als (R)-Phenylephrinhydrochlorid in enantiomerenreiner Form vor (12). Der Grund hierfür ist, dass die (R)-Enantiomeren der natürlichen Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin und damit auch der synthetischen Agonisten im Vergleich zu den (S)-Enantiomeren über eine 20- bis 50-fach höhere Wirksamkeit verfügen (11). Die Prüfung auf Enantiomerenreinheit erfolgt laut Arzneibuch dabei über die spezifische Drehung (10). Für die phenolische Hydroxygruppe wird ein pK_s -Wert von 8,9, für die sekundäre Aminogruppe ein solcher von 10,1 bestimmt (12).

Die Synthese geht allgemein von 3-Hydroxyacetophenon (**Abb. 2, D1**) aus. Die Hydroxygruppe wird durch Benzoylierung geschützt (**D2**) und zum Bromacetophenonderivat (**D3**) umgesetzt. Die Aminogruppe wird zumeist mit Tosylmethylanid über (**D4**) und anschließende Spaltung mit Iodwasserstoff eingeführt; hierbei entsteht Phenylephron (**D6**). Das Bromketon (**D3**) kann auch direkt mit wässrigem Methylamin unter gleichzeitiger Abspaltung des Benzoylrestes zu (**D6**) umgesetzt werden. Das Keton (**D6**) wird zum racemischen sekundären Alkohol (**D7**) hydriert. Aus dem racemischen Phenylephrin (**D7**) wird das (*R*)-Enantiomer (**D8**) über das Tartrat gewonnen, die Base isoliert und zum Hydrochlorid umgesetzt. Das (*S*)-Enantiomer wird in saurer Lösung racemisiert und das Racemat wieder aufgearbeitet. Alternativ kann das Bromacetophenonderivat (**D3**) mit N-Methylbenzylamin zum Keton (**D5**) umgesetzt werden. Durch Hydrierung werden die Benzyl- und Benzoylreste abgespalten und die Carbonylgruppe zum racemischen PE (**D7**) hydriert. Beschrieben ist auch ein elegantes Verfahren zur homogenen enantioselektiven Hydrierung von **D5** mit einem Rhodium-Komplex als Katalysator. Das Keton (**D5**) wird dabei direkt zum sekundären Alkohol in der (*R*)-Form (**D5a**) reduziert. Durch Abspaltung der Schutzgruppen erhält man (*R*)-PE (**D8**) (12).

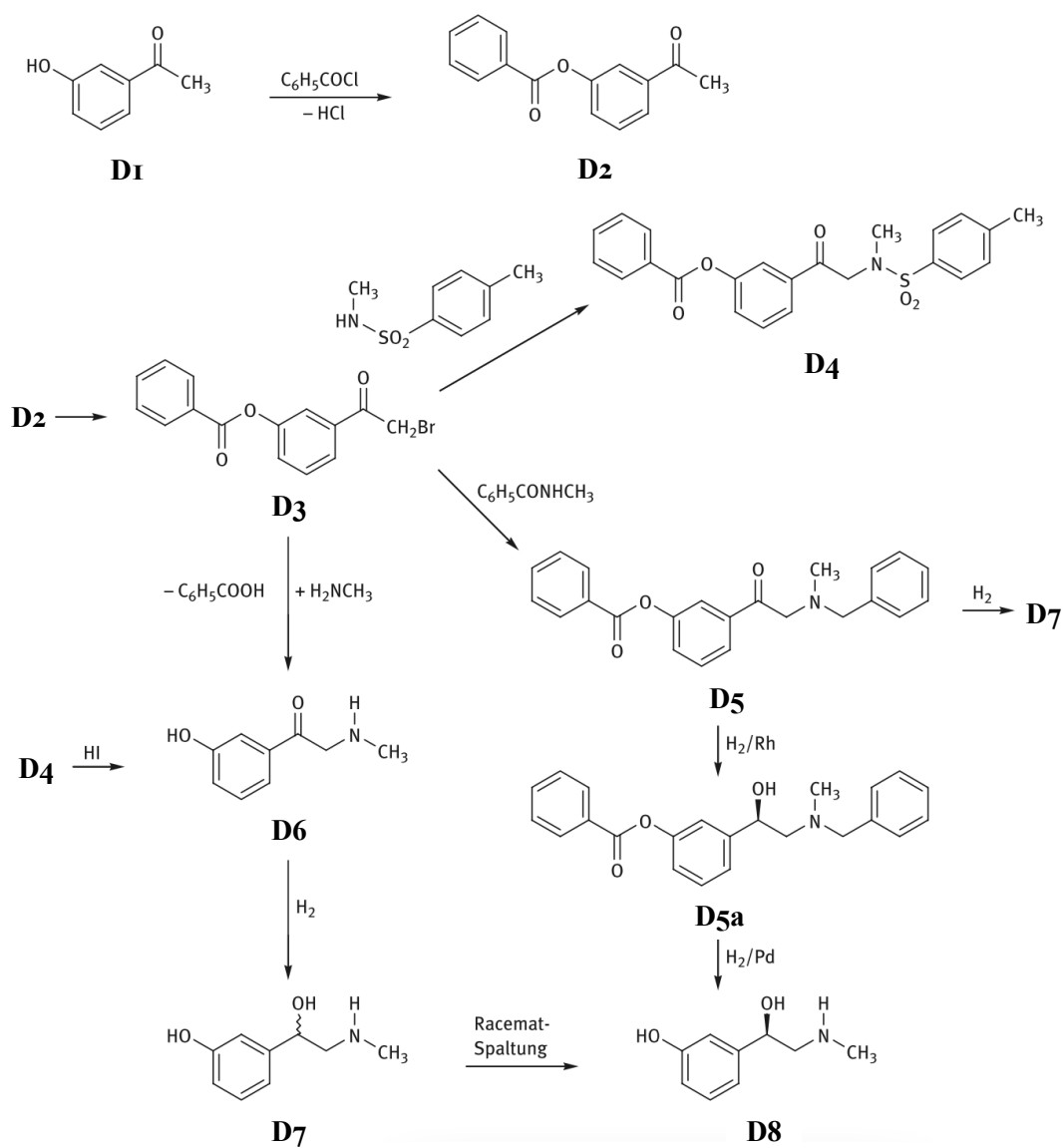


Abb. 2: Darstellung von enantiomerenreinem (*R*)-Phenylephrin (**D8**) ausgehend von 3-Hydroxyacetophenon (**D1**) über verschiedene Synthesewege (12).

1.2.2 Verunreinigungen, Stabilität und Abbau

Als verwandte Substanzen beziehungsweise Verunreinigungen nennt das Arzneibuch das demethylierte Norphenylephrin ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_2$, $M_r = 153,18 \text{ g/mol}$; **Abb. 3, 5**), Phenylephron ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$, $M_r = 165,19 \text{ g/mol}$; **6**), Benzylphenylephrin ($\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_2$, $M_r = 257,33 \text{ g/mol}$; **7**) sowie Benzylphenylephron ($\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_2$, $M_r = 255,31 \text{ g/mol}$; **8**) (9) (10). Unter Lichtschutz ist PE-HCl in Form des ungelösten Feststoffes laut Kommentar zum Europäischen Arzneibuch „gut lagerfähig“, wobei eine genauere Erläuterung fehlt (12). Eine Racemisierung von (R)-PE tritt nur in stark saurer Lösung auf. Ein solches stark saures Medium ist jedoch im Bereich der Galenik wegen seiner schädigenden Wirkung nur selten anzutreffen. Deshalb ist die Gefahr einer Racemisierung im Umfeld einer arzneilichen Anwendung als sehr gering und damit unbedeutend einzuschätzen (12).

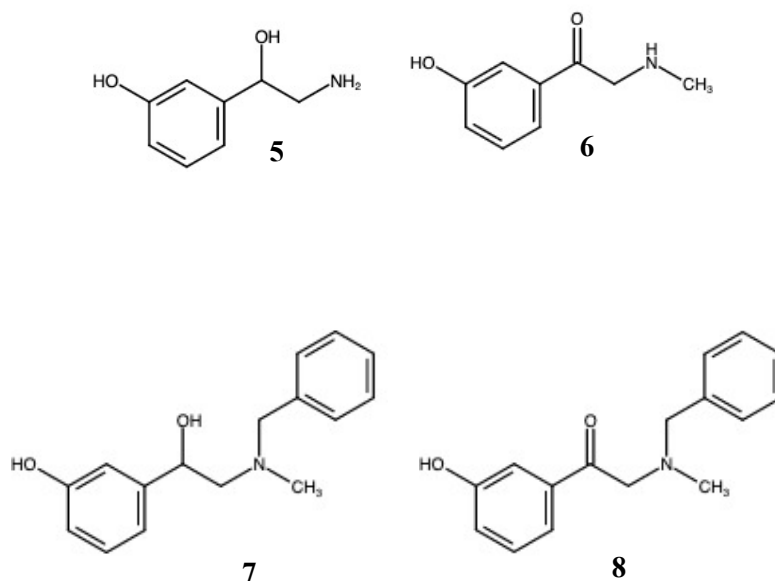


Abb. 3: Im Europäischen Arzneibuch beschriebene verwandte Substanzen von Phenylephrin, darunter das demethylierte Norphenylephrin (**5**), das Keton Phenylephron (**6**) sowie die beiden benzylierten Verbindungen Benzylphenylephrin (**7**) und Benzylphenylephron (**8**) (9).

Die am häufigsten eingesetzte Form einer Lösung von PE-HCl ist die einer wässrigen Lösung, meist in Form einer physiologischen Natriumchloridlösung zur parenteralen Gabe. KISER u. a. berichteten 2007 in einer im American Journal of Health-System Pharmacy erschienenen Studie von einer gewährleisteten Stabilität physiologischer Natriumchloridlösungen mit 100 µg/ml PE-HCl in Polypropylen-Spritzen über einen Zeitraum von 30 Tagen tiefgefroren bei -23 °C, gekühlt bei 4–5 °C sowie bei Raumtemperatur (23–25 °C). Sie bewerteten die physikalische Stabilität durch visuelle Prüfung und pH-Wertmessung, die chemische Stabilität mittels HPLC. Es zeigte sich keine Ausfällungsreaktion, auch erfolgte ein Abbau der unter keinen gesonderten Bedingungen belasteten Proben von weniger als 10 % verglichen mit der Ausgangskonzentration, womit sie als chemisch stabil bewertet wurden (15).

JANSEN u. a. veröffentlichten 2014 in der Zeitschrift Hospital Pharmacy eine Studie, in welcher sie physiologische Natriumchloridlösungen von 200 und 400 µg/ml PE-HCl bei Raumtemperatur (23–25 °C) in Polyvinyl-Beuteln über 60 Tage unter Fluoreszenzlicht belasteten. Auch sie bewerteten die chemische Stabilität mittels HPLC, wobei sie einen Abbau von weniger als 5 % verglichen mit der Ausgangskonzentration maßen (14).

Eine dritte Studie von DRÉNO u. a., welche 2015 in den *Annales pharmaceutiques françaises* erschien, untersuchte in Braunglasflaschen abgefüllte 2 %-ige wässrige PE-HCl-Augentropfenlösungen, welche mit Natriumchlorid isotonisiert wurden. Nach einem Zeitraum von ebenfalls 60 Tagen bei Raumtemperatur traten weder visuelle Anzeichen einer Ausfällung noch einer Verfärbung bei gleichbleibenden Werten für pH und Osmolarität hervor. Mittels HPLC und hochauflösender MS konnte kein signifikanter Gehaltsverlust nachgewiesen werden (16).

Insgesamt erscheint laut Literatur PE-HCl in wässriger Lösung unter den gewöhnlichen Aufbewahrungsbedingungen – jedenfalls über den in den Studien untersuchten Zeiträumen von 30 und 60 Tagen – ausreichend stabil und somit lagerfähig.

Der Abbau von PE (**Abb. 4**) erfolgt über eine oxidative Spaltung zum Ausgangsprodukt der Synthese 3-Hydroxybenzoesäure (**9**; $M_r = 138,12 \text{ g/mol}$), wobei als Nebenprodukte Methylamin (**10**; $M_r = 31,06 \text{ g/mol}$) und Formaldehyd (**11**; $M_r = 30,03 \text{ g/mol}$) anfallen. Letzterer reagiert wiederum mit einem weiteren Molekül PE zu isomeren dihydroxylierten N-Methyltetrahydroisochinolinderivaten (**15** und **17**; $M_r = 179,22 \text{ g/mol}$) (12). Weiters kann PE in fester Form in Gegenwart von Essigsäure bzw. Acetat, etwa in Form von Acetylsa-

licylsäure oder Paracetamol, eine Acetylierung erfahren (17). Unter UV-Lichteinfluss findet eine Autoxidation in Form einer photochemischen Hydroxylierungsreaktion zu dem natürlichen Botenstoff Adrenalin statt (18).

Im Jahr 2005 postulierte die Forschungsgruppe um MARÍN in der Zeitschrift *Analytical Chemistry* eine Strukturformel für das bei der Reaktion von PE mit Maleinsäure entstehende Abbauprodukt in Form eines Carbonsäureamids (**Abb. 4, 20**) (19). Dem widersprachen im Folgejahr WONG u. a. in einem in der gleichen Zeitschrift erschienenen Beitrag. Sie konnten das Reaktionsprodukt von PE und Maleinsäure als Michael-Addukt identifizieren (**Abb. 4, 19**), was sodann im Jahr 2008 durch CHAN u. a. bestätigt werden konnte (20) (21).

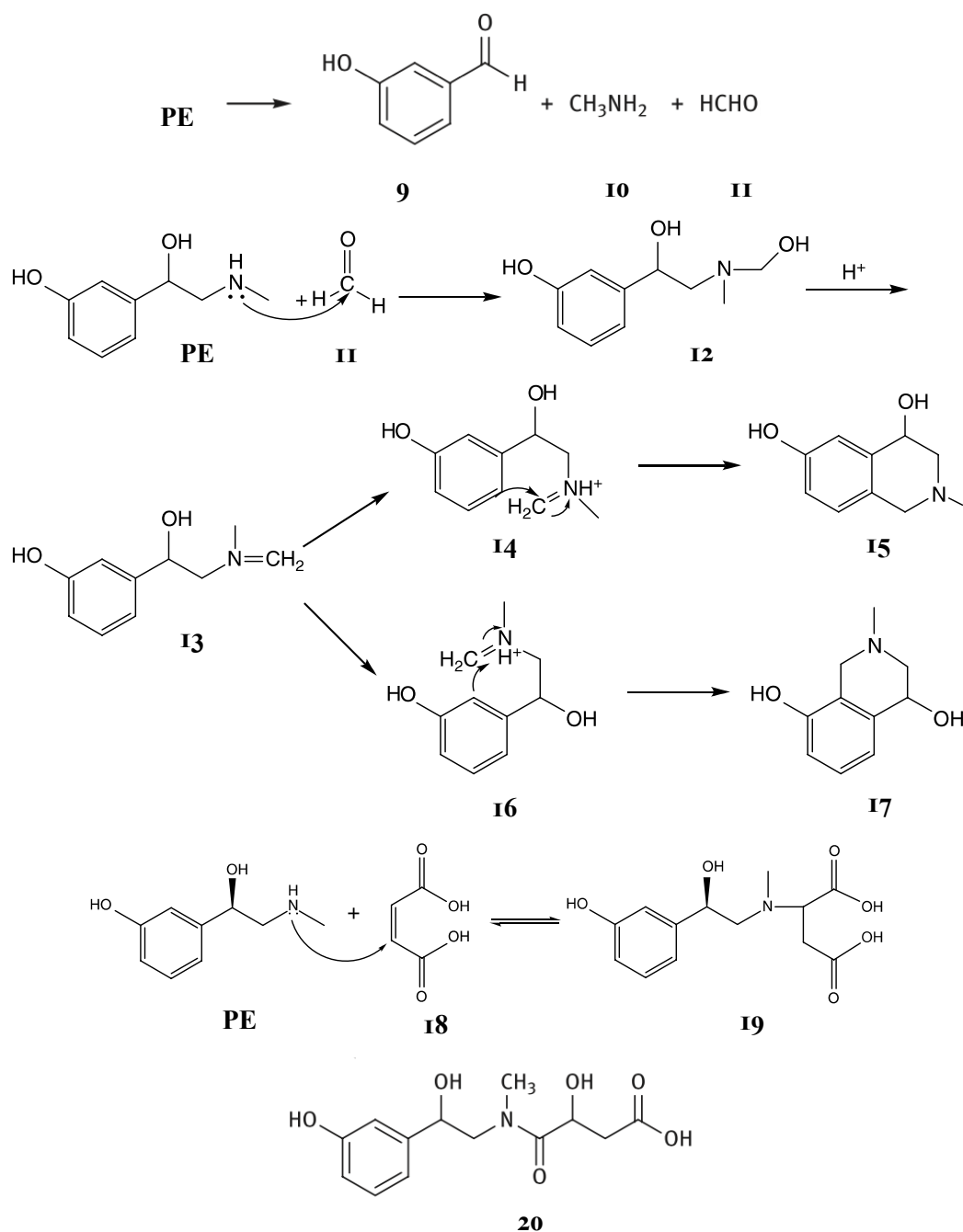


Abb. 4: Abbau von PE zu Tetrahydroisochinolinderivaten (**12**, **13**): In einem ersten Schritt wird die Verbindung zu 3-Hydroxybenzaldehyd (**9**) abgebaut, wobei neben Methylamin (**10**) Formaldehyd (**11**) freigesetzt wird (**12**); dieser reagiert in einem zweiten Schritt mit einem weiteren Molekül PE zu an verschiedenen Positionen hydroxylierten *N*-Methyltetrahydroisochinolinderivaten (**15**, **17**). – In Gegenwart von Maleinsäure (**18**) reagiert PE nach WONG u. a. zu einem Derivat (**19**) (**20**) und widerspricht damit dem Reaktionsweg hin zu einem Carbonsäureamid (**20**) nach MARÍN u. a. (**19**). – PE: Phenylephrin

TROMMER u. a. versuchten 2010 in ihrer im Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis erschienenen Studie, die Strukturen der bei Abbau von PE-HCl in wässrigen Lösungen entstehenden Verbindungen mittels Elektronensprayionisierung (ESI) und MS aufzuklären. Es wurden frisch bereitete wässrige Lösungen von PE-HCl mit einer Konzentration von $100 \mu\text{mol/l}$ eingesetzt, die vor der Vermessung im Verhältnis 1 : 5 mit Wasser und anschließend im Verhältnis 1 : 1 mit Methanol verdünnt wurden. Sie zeigten bei der Untersuchung bereits ohne gesonderte Fragmentierungsschritte neben dem zu erwartenden Hauptsignal der protonierten Base (Masse-Ladungs-Verhältnis m/z 168) ein weiteres Signal bei m/z 150 für das dehydroxylierte ungesättigte Kation aus **Abb. 5**. Dies wurde auf die natürliche Instabilität der Substanz in wässriger Lösung wie auch auf unvermeidbare ungezielte Fragmentierung während der ESI zurückgeführt (13).

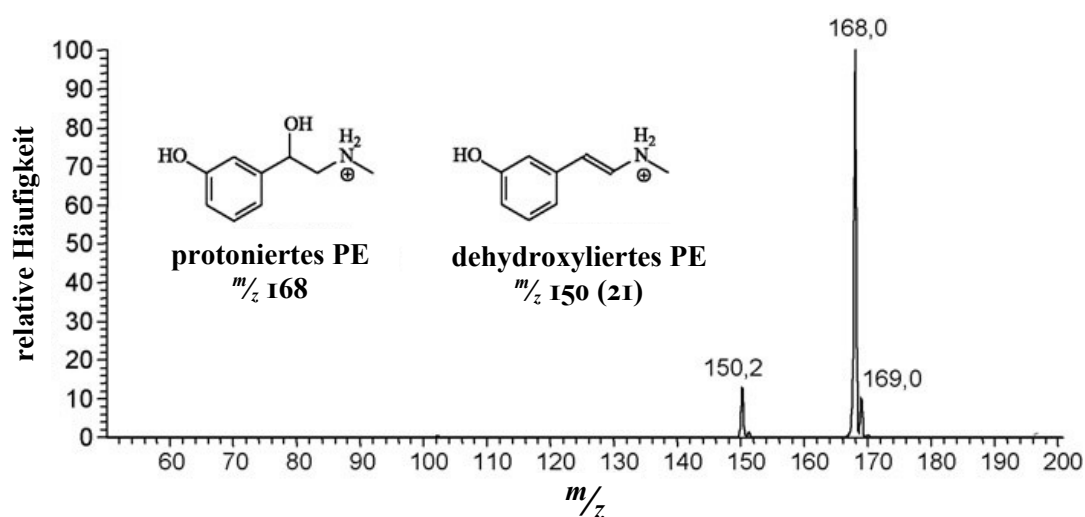
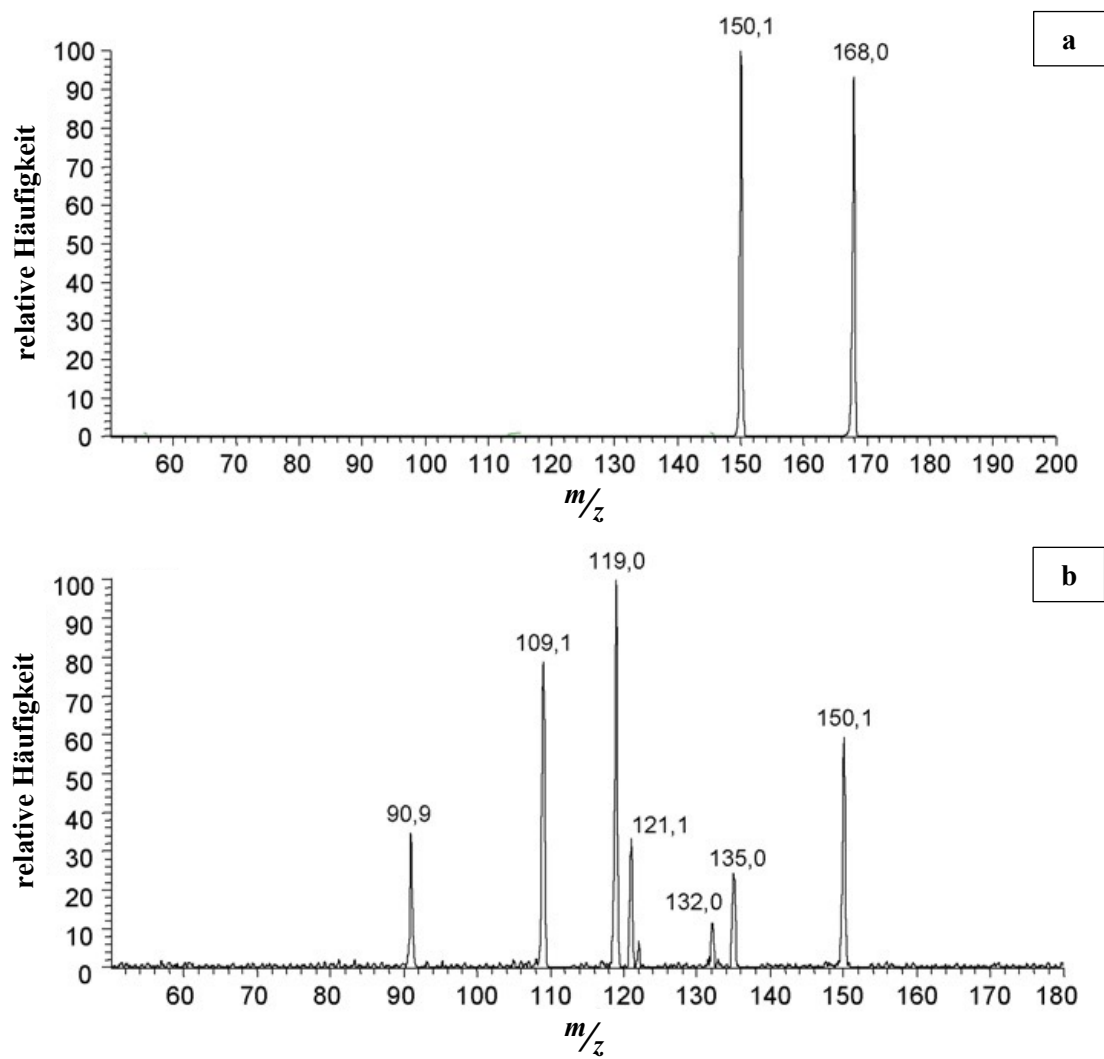


Abb. 5: Massenspektrum von PE, aufgenommen im Positivionenmodus ohne gesonderte Fragmentierungsschritte: neben dem Signal des Moleküllions von PE (m/z 168) dasjenige des Moleküllions des Abbauprodukts, eines dehydroxylierten gesättigten Derivats von PE (m/z 150). Zu beachten ist, dass das PE-Signal in etwa zehnfach stärker ausfällt als jedes des Abbauprodukts (vgl. **Abb. 7**) (13). – PE: Phenylephrin



zu Abb. 6

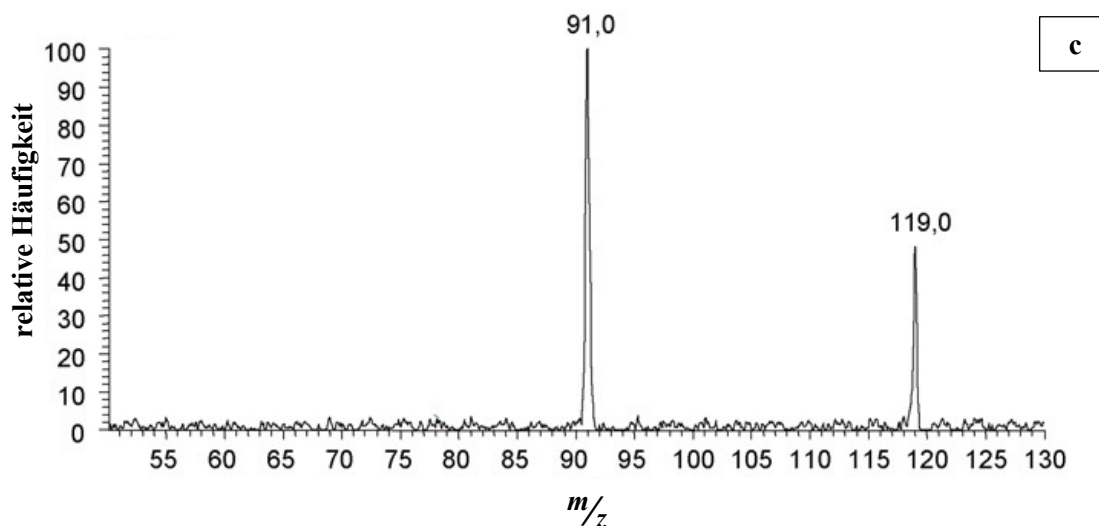


Abb. 6: Massenspektren mittels kationischer Fragmentierung von PE und dessen Abbauprodukten: **a)** Tandem-MS mit den Signalen der Molekülionen von PE (m/z 168) und einem dehydroxylierten ungesättigten Derivat (m/z 150); auffällig ist, dass sich das Verhältnis beider Signale zueinander gegenüber der Vermessung ohne gesonderte Fragmentierungsschritte nun ausgeglichen darstellt; **b)** MS³ mit den Signalen der Molekülionen verschiedener Abbauprodukte; ein PE-Signal fehlt nun völlig; **(c)** MS⁴ mit einzig den Signalen der Molekülionen zweier Abbauprodukte (m/z 91 sowie 119) (13).

PE: Phenylephrin

Bei Aufzeichnung eines Tandem-Massenspektrums mittels kationischer Fragmentierung (**Abb. 6**) durch ESI zeigen sich wiederum die Signale m/z 168 und 150. Das Signal für m/z 150 fällt nun wesentlich stärker aus als vor dem Fragmentierungsschritt (vgl. **Abb. 5**), sodass es eine annähernd gleiche Intensität wie das von m/z 168 aufweist. Erst bei fortdauernder Fragmentierung entstehen weitere Signale: MS³ mit m/z 150, 132, 121, 119, 109 und 91 mit m/z 119 als stärkstes Signal sowie MS⁴ mit m/z 119 und 91 mit m/z 91 als stärkstes Signal. **Abb. 7** ordnet die Signale möglichen Fragmenten zu; auffällig hierbei ist, dass nur ein Fragment (m/z 132) die Sekundäraminofunktion bewahrt (13).

Bei negativer Ionisierung tritt das Hauptsignal für die deprotonierte Base $[M-H]^-$ bei m/z 166 auf, weiters Chloridaddukte, zu erkennen am Isotopenmuster von ³⁵Cl und ³⁷Cl im Verhältnis 3 : 1; eine darüberhinausgehende Fragmentierung war nicht möglich (13).

Wird die Probe im Zuge einer Photostabilitätsprüfung über einen Zeitraum von 120 min UV-Licht ausgesetzt, so entstehen neben den oben genannten Fragmenten m/z 168 und 150 noch vier weitere m/z 230, 256, 275 sowie 277 (**Abb. 7**). Ein Fragment m/z 180, das nach Bestrahlung von PE-Hydrogentartrat mit UV-Licht entsteht und den oben als Abbauprodukte genannten isomeren Tetrahydroisochinolinderivaten zugeordnet werden kann, tritt bei PE-HCl nicht auf, ebenso wenig wie ein Signal für das Abbauprodukt 3-Hydroxybenzoesäure bei angenommenem m/z 123 (13).

Die Experimente zeigen, dass schon infolge natürlicher Instabilität beziehungsweise unter den Umständen der verhältnismäßig sanften Fragmentierungsmethode der ESI bereits zahlreiche Fragmente von PE entstehen. Dies wiederum kann als Hinweis auf eine geringe Stabilität in wässriger Lösung gewertet werden (13).

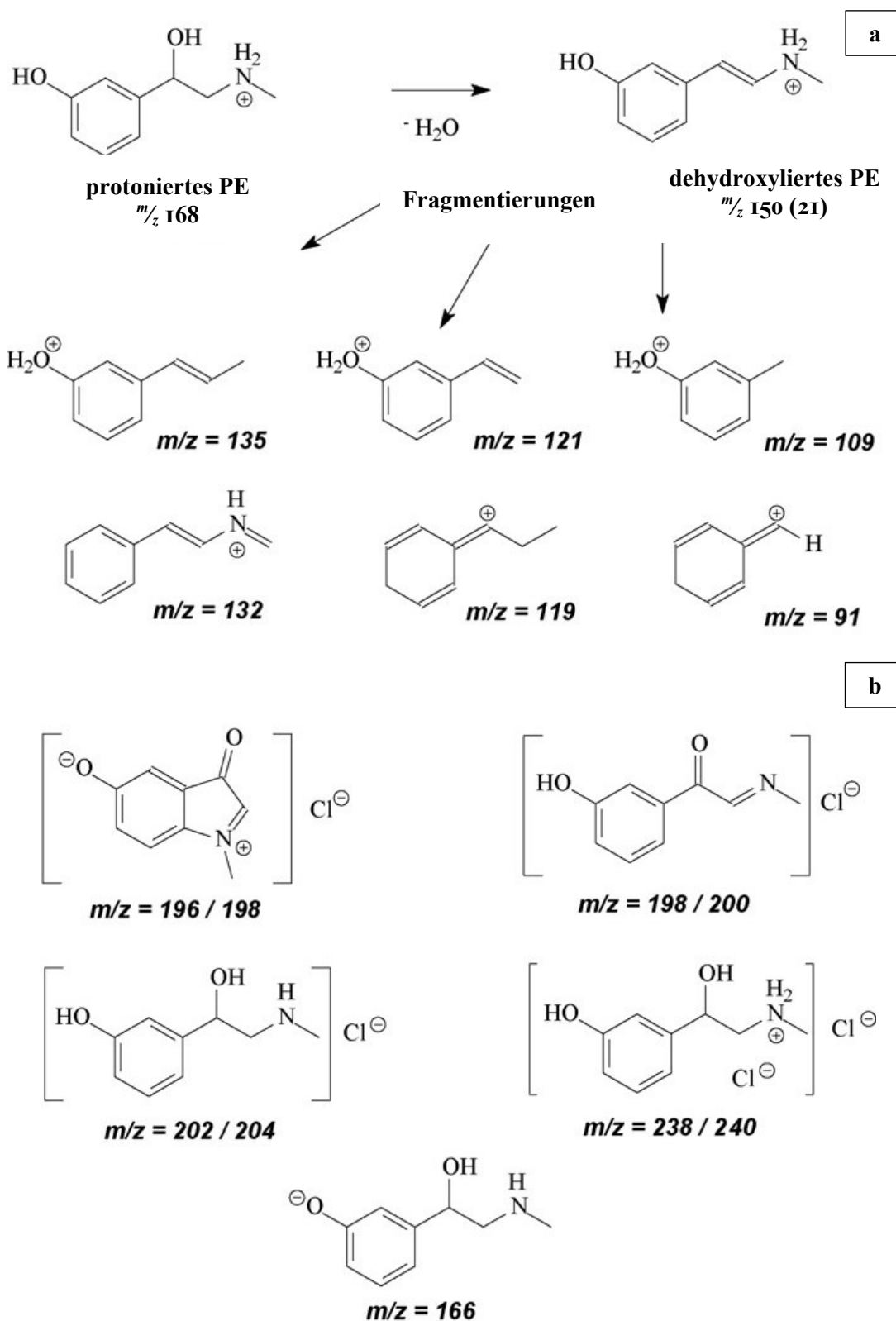


Abb. 7: Strukturformeln der Abbauprodukte von PE aus den MS-Messungen im Positiv- (a) und Negativionenmodus (b). Von m/z 132 abgesehen verlieren im Positivionenmodus alle Derivate von PE ihre Aminofunktion, im Negativionenmodus treten hauptsächlich Chloridaddukte auf (13). – PE: Phenylephrin

Eine andere Studie von REZK u. a., im Jahr 2017 im *Journal of AOAC International* veröffentlicht, bescheinigt PE-HCl Stabilität in saurem und alkalischem Medium, wobei aus der Publikation kein genauerer Zeitraum für diese Stabilitätsmessung entnommen werden kann. Empfindlich zeigt sich PE-HCl hingegen gegenüber einer 3 %-igen Lösung von Wasserstoffperoxid. Nach deren Einwirkung über einen Zeitraum von einem Tag bei Raumtemperatur ist die Lösung bereits bräunlich verfärbt, nach anschließendem dreistündigem Sieden unter Rückflusskühlung wird von einem vollständigen Abbau berichtet. Die Substanz wird hierbei zu Chinonderivaten oxidiert, wie sie **Abb. 8 (24, 25)** darstellt. Zur Detektion nutzte die Forschungsgruppe ebenfalls ESI und MS im Positivionenmodus (22).

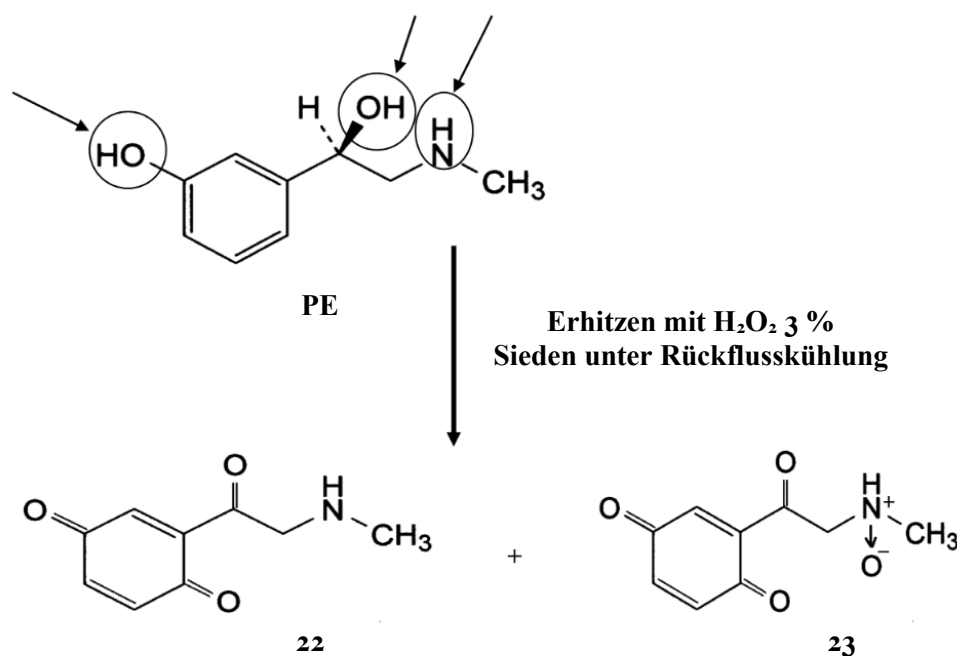


Abb. 8: Oxidative Umsetzung von PE in Gegenwart einer 3 %-igen Lösung von Wasserstoffperoxid bei Erhitzen unter Rückflusskühlung zu Chinonderivaten: sowohl die phenolische als auch die aliphatische Hydroxylgruppe werden zu Ketonen oxidiert, zusätzlich wird in *para*-Stellung des Phenylrests ein weiteres Sauerstoffatom ebenso in Form einer Ketonfunktion eingeführt, wodurch eine Chinonteilstruktur entsteht; darüber hinaus wird im rechten Derivat (**23**) die Aminogruppe in eine Amin-*N*-oxidfunktion übergeführt (**22**). – PE: Phenylephrin

Die folgende Tabelle (**Tab. 1**) ermöglicht eine Übersicht über alle besprochenen Abbauprodukte und ordnet ihnen ihre Summenformel sowie ihr Molekulargewicht zu; darüber hinaus fügt sie das für die Interpretation von Massenspektren entscheidende Masse-Ladungs-Verhältnis m/z bei.

Tab. 1: Überblick über Summenformel, Molekulargewicht und Masse-Ladungs-Verhältnis wichtiger Verbindungen und Fragmente von Phenylephrin.

Bezeichnung	Summenformel	Molekulargewicht M_r [$\frac{g}{mol}$]	Masse-Ladungs-Verhältnis m/z	Nachweise
Phenylephrin (PE, 3)	$C_9H_{13}NO_2$	167,21	168	(9)
Norphenylephrin (5)	$C_8H_{11}NO_2$	153,18	154	(23)
Phenylephron (6)	$C_9H_{11}NO_2$	≈ 165	166	(9)
Benzylphenylephrin (7)	$C_{16}H_{19}NO_2$	≈ 257	258	(9)
Benzylphenylephron (8)	$C_{16}H_{17}NO_2$	≈ 255	256	(9)
3-Hydroxybenzoesäure (9)	$C_7H_6O_3$	138,12	139	(23)
Methylamin (10)	CH_5N	31,06	32	(23)
Formaldehyd (11)	CH_2O	30,03	31	(23)
dihydroxylierte Tetrahydroisochinolinderivate (15 , 17)	$C_{10}H_{13}NO_2$	179,22	180	(20)
dehydroxyliertes, ungesättigtes Phenylephrin (21)	$C_9H_{11}NO$	149,2	150	(13)
Chinonderivat I (22)	$C_9H_9NO_3$	≈ 179	180	(22)
Chinonderivat II (23)	$C_9H_9NO_4$	≈ 195	196	(22)

2 Experimenteller Teil

2.1 Materialien, Probenbereitung und Methoden

2.1.1 Materialien und Geräte

Die organischen Fließmittel Methanol und Acetonitril für die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) sowie die Chemikalien zur Bereitung der Fließmittelpuffer wurden von den Firmen *Merck KGaA* (Darmstadt) in HPLC-Qualität bezogen. Als Wasser für Probenbereitung wie auch als Fließmittel diente im Haus aufbereitetes doppelt destilliertes Trinkwasser. Die Wasserstoffperoxidlösung 3 %, mit Phosphorsäure 10 % stabilisiert, wurde von der *Otto Fischar GmbH & Co. KG* (Saarbrücken) bezogen.

Der zur Probenbereitung verwendete Reinstoff (*R*)-Phenylephrinhydrochlorid (CAS 61-76-7; Reinheit 99 % (m/m)) wurde von der Firma *Acros Organics BVBA* (Geel, Belgien) bezogen.

Die eingesetzte Analysenwaage *Secura 225D-1S* zur Probeneinwägung stammte von der Firma *Sartorius* (Göttingen). Zur Homogenisierung der bereiteten Proben und Fließmittel wurde das Ultraschallbad *Branson 3210* des Herstellers *Emerson Electric Co.* (St. Louis (MO), USA) eingesetzt, darüber hinaus ein *Vortex-Genie 2* des Herstellers *Scientific Industries, Inc.* (Bohemia (NY), USA). Das zur Belastung der Probe bei erhöhter Temperatur verwendete Wasserbad wurde von der *GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH* (Burgwedel) hergestellt. Zur Einstellung des pH-Werts des Puffers diente ein pH-Meter *IS 2100 L* des Herstellers *VWR International* in Verbindung mit einem Magnetrührbad *MR 2001 K* von *Heidolph Instruments GmbH & Co KG* (Kelheim). Vom gleichen Hersteller stammten die Rotationsverdampfer *Hei-VAP Value*. Die Gefriertrocknungsanlage setzte sich zusammen aus dem Gefriertrockner *Alpha 2-4 Ldplus* sowie einer Vakuumzentrifuge *RVC 2-18*, beides *Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH* (Osterode am Harz), zusammen mit einer Vakuumpumpe *RC 6* der *Vacubrand GmbH & Co KG* (Wertheim).

Die eingesetzten modularen Hochleistungsflüssigchromatographen wie auch die zugehörigen Säulen wurden von der Firma *Shimadzu* (Kyōto) bezogen. Der analytische Chromatograph setzte sich zusammen aus dem automatisierten Probenwechsler *SIL-20AC*, der Pumpe *LC-20AD*, einem Entgaser *DGU-20A5R*, einem Säulenofen *CTO-*

20AC, einem Diodenarraydetektor SPD-M20A sowie einem Communicator CBM-20A. Der semipräparative Chromatograph setzte sich zusammen aus einem Communicator CBM-20A, zwei Pumpen LC-20AD, einem Entgaser DGU-20A3R, einem Diodenarraydetektor SPD-10Ai, sowie einem Fraktionierer FRC-10A und einer Haltevorrichtung für die Säule mit Injektor. Die verwendeten Säulen waren Shim-pack XR-ODS II (C_{18} , $d = 3 \text{ mm}$, $l = 150 \text{ mm}$) sowie Shim-pack GIS (für analytische HPLC C_{18} , $d = 4,6 \text{ mm}$, $l = 250 \text{ mm}$; für semipräparative HPLC C_{18} , $d = 20 \text{ mm}$, $l = 250 \text{ mm}$).

Zur massenspektrometrischen (MS) Untersuchung wurde ein Flüssigchromatograph der Bauart UltiMate 3000 RSLC von Dionex Co. (Sunnyvale (CA), USA) mit einem Massenspektrometer maXis HD ESIQq-TOF der Bruker Co. (Billerica (MA), USA) gekoppelt. Zur Datenanalyse wurde die Software Compass DataAnalysis 4.2 und QuantAnalysis 2.2 der Bruker Co. eingesetzt.

Zur Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) diente die Apparatur Bruker AVANCE 500 unter Verwendung einer 5 mm-Wechselsonde (TCI Prodigy Kryosondenkopf, 5 mm, mit dreifacher Resonanzinversdetektion) mit z-Achsen-Gradienten, automatischer Anpassung und passendem Zubehör der Bruker Biospin GmbH (Rheinstetten). Als Resonanzfrequenz wurde für die ^1H -NMR 500,13 MHz, für ^{13}C -NMR 125,75 MHz eingestellt. Die Vermessungen wurden in deuteriertem Methanol- d_4 , versuchsweise auch in deuteriertem Dimethylsulfoxid- d_6 bei 25 °C durchgeführt (beide Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt). ^1D - sowie ^2D -Experimente wie double quantum filtered COSY, HSQC und HMBC wurden, wie vom Hersteller bereitgestellt, eingesetzt. Die chemische Verschiebung wurde auf das ^1H -Signal des undeuterierten Lösungsmittelrückstands ($\delta = 3,31 \text{ ppm}$) und auf das ^{13}C -Kohlenstoffsignal von Methanol ($\delta = 49,3 \text{ ppm}$) bezogen.

2.1.2 Bereitung der wässrigen Pufferlösungen

Ammoniumformiatpuffer ($\text{pH} = 3$): 950 ml Wasser wurden mit 1,9 ml Ameisensäure 98–100 % (m/m) ($46,0 \text{ mol/l}$) versetzt und mit Ammoniak 25 % (m/m) ($13,3 \text{ mol/l}$) auf $\text{pH} = 3$ eingestellt. Anschließend wird mit Wasser auf 1000,0 ml aufgefüllt und die Lösung in einem Ultraschallbad homogenisiert.

Natriumphosphatpuffer ($\text{pH} = 3$): 950 ml Wasser wurden mit 3,4 ml Phosphorsäure 85% (m/m) ($14,8 \text{ mol/l}$) versetzt und mit konzentrierter Natriumhydroxidlösung ($10,0 \text{ mol/l}$) auf $\text{pH} = 3$ eingestellt. Anschließend wurde mit Wasser auf 1000,0 ml aufgefüllt und die Lösung in einem Ultraschallbad homogenisiert.

2.1.3 Probenbereitung

Zur Vermessung mittels analytischer HPLC wurde eine wässrige Lösung von PE-HCl mit einer Konzentration von etwa 5 mg/ml unter Zusatz einer 3-%-igen (V/V) wässrigen Lösung von Wasserstoffperoxid, mit Phosphorsäure 10 % stabilisiert, bereitet und in einem Wasserbad bei 40°C belastet (**Stammlösung 1**). Für die Auftrennung mittels semipräparativer HPLC wurde eine wässrige Lösung von PE-HCl mit einer zehnfach höheren Konzentration von 50 mg/ml unter gleichartiger Vorgehensweise bereitet (**Stammlösung 2**).

Ungefähr 50 mg PE-HCl ($M_r = 203,7 \text{ mg/mmol}$) wurden genau eingewogen, in einem Messkolben mit einer Lösung von 3 % (V/V) Wasserstoffperoxid und Wasser, stabilisiert mit Phosphorsäure 10 %, auf 10,00 ml aufgefüllt und sodann in einem Ultraschallbad vollständig gelöst. Daraus ergibt sich eine Massenkonzentration β von etwa 5 mg/ml , was einer Stoffmengenkonzentration c von $0,0245 \text{ mmol/ml}$ und einer Stoffmenge n von $0,245 \text{ mmol}$ PE-HCl entspricht.

Stammlösung 1: Bereitung einer Stammlösung mit einer Konzentration von ungefähr 5 mg/ml PE-HCl mit 3 % (V/V) Wasserstoffperoxid zur analytischen Vermessung. – PE: Phenylephrin

Ungefähr 2500 mg PE-HCl ($M_r = 203,7 \text{ mg/mmol}$) wurden genau eingewogen, in einem Messkolben mit einer Mischung von 3 % (V/V) Wasserstoffperoxid und Wasser, stabilisiert mit Phosphorsäure 10 %, auf 50,00 ml aufgefüllt und sodann in einem Ultraschallbad vollständig gelöst. Daraus ergibt sich für PE eine Massenkonzentration β von etwa 50 mg/ml , was einer Stoffmengenkonzentration c von etwa $0,245 \text{ mmol/ml}$ und einer Stoffmenge n von $12,3 \text{ mmol}$ PE-HCl entspricht.

Stammlösung 2: Bereitung einer Stammlösung mit einer Konzentration von etwa 50 mg/ml PE-HCl mit 3 % (V/V) Wasserstoffperoxid zur semipräparativen Auftrennung. – PE: Phenylephrin

Für die Kalibriergerade wurde eine Stammlösung von PE-HCl in Wasser mit einer Konzentration von etwa $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ mit Wasser zu 5, 10, 25, 50, 75 und $90 \mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt. Die Verdünnungsstufen wurden je dreimal mittels HPLC unter Verwendung der in Kapitel 2.1.3 beschriebenen **Methode 2** vermessen. Sodann wurde die jeweils erhaltene mittlere Peakfläche der PE-Peaks gegen die bekannten Konzentrationen aufgetragen (**Abb. 9**). Mithilfe der daraus ermittelten Geradengleichung

$$y = 4896,3 x - 485,68$$

$$\text{mit } R^2 = 1 \text{ bzw.}$$

$$x = (y - 485,68) : 4896,3;$$

wobei x der Konzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$ und y der Peakfläche in mAU entspricht, kann nun aus einer mittels genannter HPLC-Methode ermittelten Peakfläche die Konzentration von PE-HCl errechnet werden.

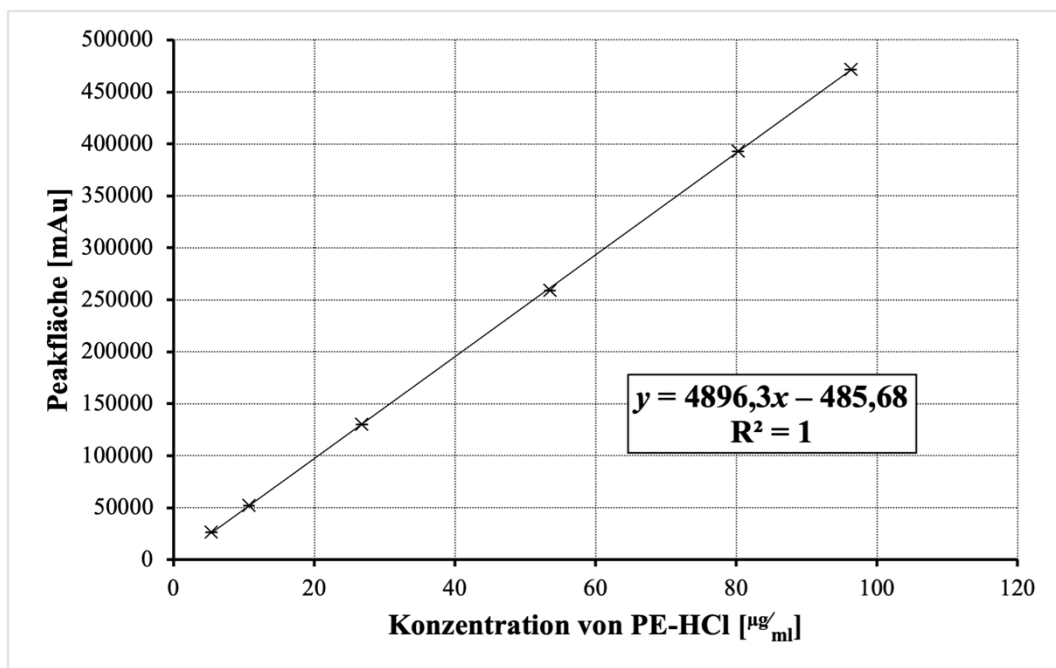


Abb. 9: Kalibriergerade mit der Peakfläche der jeweiligen Signale, aufgetragen gegen die Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ verschiedener Lösungen mit festgesetztem Gehalt an PE-HCl nebst Geradengleichung. Zur Erstellung wurden sechs Verdünnungsstufen zu etwa 5, 10, 25, 50, 75 sowie 90 $\mu\text{g/ml}$ PE-HCl in Wasser herangezogen und je dreimal vermessen, sodann die mittlere Peakfläche der jeweiligen Peaks gegen die Konzentration aufgetragen ($\bar{x} \pm \sigma$; $n = 3$).

PE: Phenylephrin

2.1.4 Methodenentwicklung für die Hochleistungsflüssigchromatographie

Zur Entwicklung einer geeigneten Methode für die HPLC wurde von den aus dem Universitätsklinikum St. Pölten übernommenen Einstellungen ausgegangen (**Methode 1**). Unter Verwendung einer Säule der Bauart *Shimadzu Shim-pack XR-ODS II*, welche als UPLC-Säule für validierte Analysen konzipiert ist, wurde bei einer Säulenofentemperatur von 40 °C mit einem Injektionsvolumen von 10 µl, einer Flussrate von 0,7 ml/min, woraus ein Druck von ungefähr 400 bar resultierte, über einen Zeitraum von 5 min mit einem Fließmittelgemisch aus 7,5 % (V/V) Methanol und 92,5 % (V/V) wässrigem Ammoniumformiatpuffer (pH = 3) gemessen. Die Detektion erfolgte mittels Photodiodenarray (PDA) bei einer Wellenlänge von 272 nm, da bei diesem Wert das PE-Signal ein Intensitätsmaximum durchläuft, damit folglich bestmöglich zu erkennen und von Basislinie und anderen Signalen abzugrenzen ist.

Vermessen wurden aus dem Universitätsklinikum St. Pölten übernommene Proben. Diese enthielten 0,04 mg/ml PE-HCl in Wasser mit drei Äquivalenten Wasserstoffperoxid, die über einen Zeitraum von 71 Tagen bei 30 °C belastet wurden. Sie zeigten etwa 31 % Abbau von PE-HCl. Nach Ablauf der 71 Tage wurden sie bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, um einen weiteren Abbau einzuschränken. Allerdings ließ sich mit dieser Methode das komplexe Gemisch aus PE und seinen Abbauprodukten nicht zufriedenstellend auftrennen. Die Peaks der Abbauprodukte mit t_{ret} von 0,9 bis 1,6 min zeigten keine Basislinientrennung und konnten somit nur schlecht voneinander abgegrenzt werden (**Abb. 10, a**). Als Kontrollstandard wurden Proben mit 0,04 mg/l PE-HCl in Wasser, ebenso bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, vermessen. Hiermit konnte die richtige Zuordnung des PE-Peaks bei $t_{\text{ret}} = 1,7$ min und die Abwesenheit von Abbauprodukten in unbelasteten Proben bestätigt werden (**Abb. 10, b**).

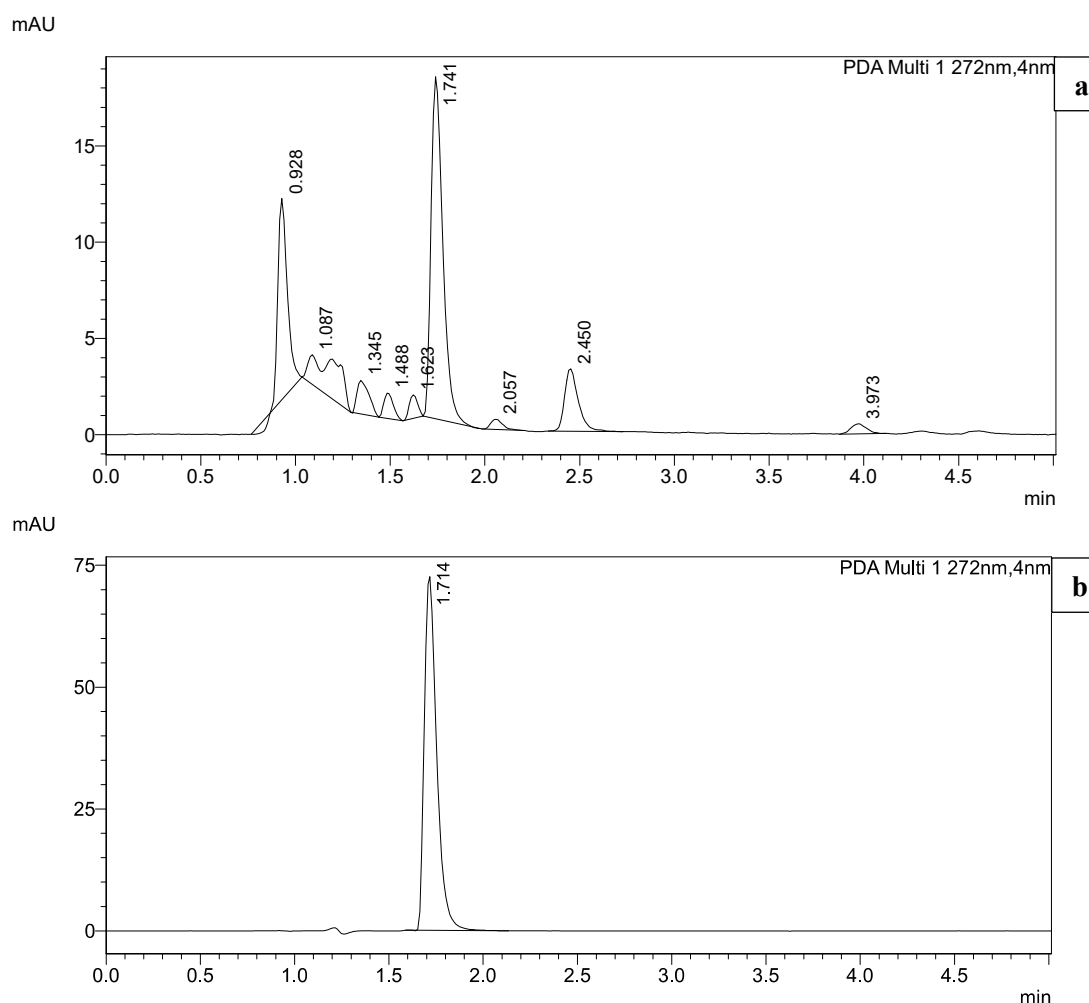


Abb. 10: Auftrennung eines komplexen Gemischs von PE-HCl und seiner Abbauprodukte mittels analytischer HPLC nach **Methode 1** (Säule: *Shimadzu Shim-pack XR-ODS II*, C_{18} , $d = 3$ mm, $l = 150$ mm; Säulenofentemperatur: 40 °C; Injektionsvolumen: 10 μ l; Flussrate: $0,7$ ml/min ; $p \approx 400$ bar; Flusszeit: 5 min; Fließmittel: Methanol + wässriger Ammoniumformiatpuffer ($\text{pH} = 3$) $7,5 + 92,5$ % (V/V); Detektion: PDA bei $\lambda = 272$ nm). **a)** Vermessen wurden über einen Zeitraum von 71 Tagen bei 30 °C mit drei Äquivalenten Wasserstoffperoxid belastete Proben von $0,04$ mg/l PE-HCl in Wasser. PE eluiert bei $t_{\text{ret}} = 1,7$ min. Die Peaks mit t_{ret} von $0,9$ bis $1,6$ min zeigen keine ausreichende Basislinientrennung und können so nur schwer voneinander abgegrenzt werden. **b)** Die Vermessung von Kontrollstandards mit $0,04$ mg/l PE-HCl in Wasser bestätigt die Zuordnung des PE-Peaks und die Abwesenheit von Abbauprodukten in der unbelasteten Probe.

PE: Phenylephrin

Für die Erfordernisse der Arbeit war es jedoch unerlässlich, die Peaks und damit die einzelnen Abbauprodukte isolieren zu können. Zu diesem Zweck musste die Methode in solcher Weise angepasst werden, dass die Peaks klar voneinander abzugrenzen waren.

Methode 1 wurde nun experimentell dahingehend verändert, dass die zu vermessen- den Proben bestmöglich aufgetrennt werden konnten (**Methode 2**). Dazu wurde auf eine längere Säule (250 anstelle von 150 mm) mit größerem Durchmesser (4,6 anstelle von 3 mm) der Bauart Shimadzu Shim-pack GIS, C₁₈ zurückgegriffen. Versuchsweise Mes- sungen über einem Zeitraum von 30 min zeigten keine weiteren merklichen Signale nach einer Retentionszeit von etwa 15 min (**Abb. 11**), weshalb die Flusszeit auf 16 min festge- setzt wurde. Mit dieser deutlich längeren Flusszeit (16 anstelle von 5 min) wurde hierbei zugunsten einer höheren Auflösung auf eine möglichst kurze Messdauer verzichtet, wie sie die UPLC-Säule aus **Methode 1** bietet. Weiters wurde die Flussrate von 0,7 auf 1,0 ml/min heraufgesetzt, der Anteil von Methanol am Fließmittelgemisch hingegen von 7,5 auf 5,0 % (v/v) erniedrigt.

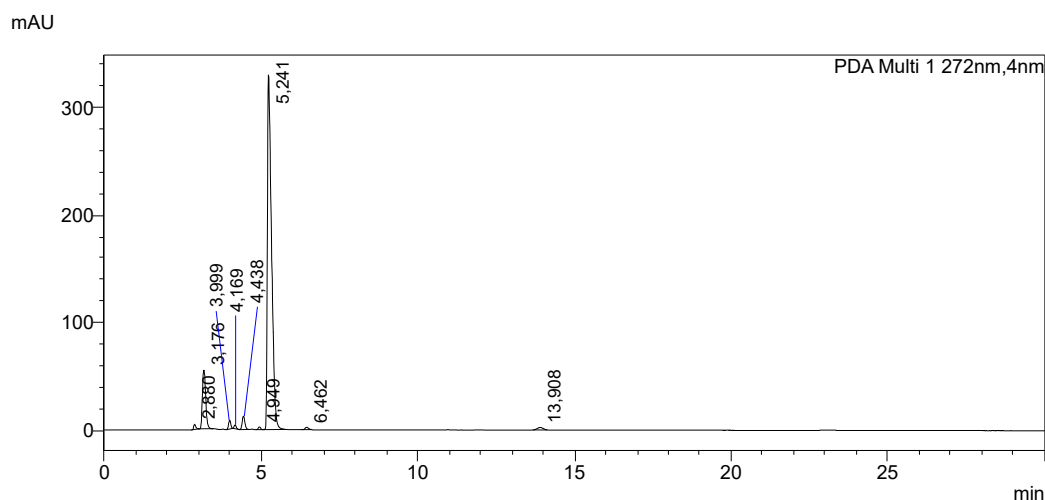


Abb. 11: Auftrennung eines komplexen Gemischs von PE-HCl und seiner Abbauprodukte mittels analytischer HPLC nach **Methode 2** (Säule: *Shimadzu Shim-pack GIS*, C₁₈, $d = 4,6$ mm, $l = 250$ mm; Säulenofentemperatur: 40 °C; Injektionsvolumen: 10 µl; Flussrate: 1,0 ml/min; $p \approx 100$ bar; Flusszeit: 30 min(!); Fließmittel: Methanol + wässriger Ammoniumformiatpuffer (pH = 3) 5,0 + 95,0 % (v/v); Detektion: PDA bei $\lambda = 272$ nm). Die abweichend von späteren Vermessungen von 16 auf 30 min verlängerte Flusszeit beweist, dass nach t_{ret} von etwa 15 min keine weiteren Signale zu erwarten sind und die Flusszeit somit auf 16 min begrenzt werden kann. PE eluiert bei $t_{\text{ret}} = 5,2$ min. Das Chromatogramm zeigt nun eine klare Basislinie, die Abbauprodukte sind deutlich voneinander abzugrenzen. – PE: Phenylephrin

Für die Auftrennung mittels semipräparativer HPLC wurden die Einstellungen der Vermessungen mittels analytischer HPLC an die Bedingungen der semipräparativen HPLC angepasst (**Methode 3**). Hierbei war der Einsatz einer Säule gleicher Bauart Shimadzu Shim-pack GIS, C₁₈ mit deutlich größerem Durchmesser (20 mm) notwendig. Das Injektionsvolumen wurde auf 2,00 ml, die Flussrate 20,0 ml/min angesetzt. Zu beachten gilt, dass die Messungen, bedingt durch die Abwesenheit eines Säulenofens, bei sommerlicher Raumtemperatur von etwa 25 °C erfolgten. **Abb. 12** zeigt das Chromatogramm der Auftrennung eines komplexen Gemisches aus PE und seinen Abbauprodukten mittels semipräparativer HPLC.

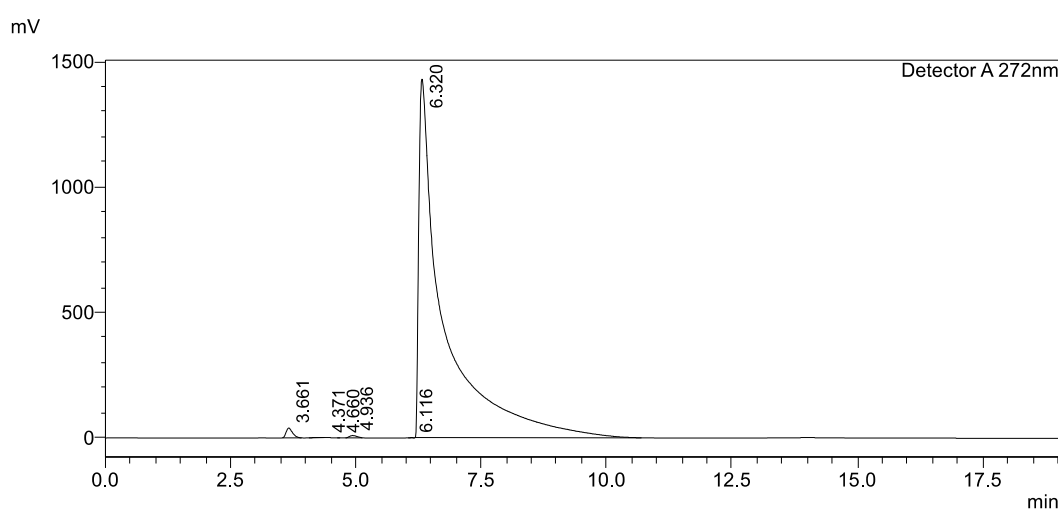


Abb. 12: Auftrennung eines komplexen Gemisches aus PE und seiner Abbauprodukte mittels semipräparativer HPLC nach **Methode 3** (Säule: *Shimadzu Shim-pack GIS*, C₁₈, $d = 20$ mm, $l = 250$ mm; Temperatur: ≈ 25 °C (Raumtemperatur); Injektionsvolumen: 2,00 ml; Flussrate: 20,0 ml/min; $p \approx 120$ bar; Flusszeit: 20 min; Fließmittel: Methanol + wässriger Ammoniumformiatpuffer (pH = 3) 5,0 + 95,0 % (V/V); Detektion: PDA bei $\lambda = 272$ nm). PE eluiert bei $t_{\text{ret}} = 6,3$ min. Zu beachten ist, dass die Messung nicht wie bei der analytischen HPLC bei einer eingestellten Temperatur von 40 °C durchgeführt werden konnte, sondern von der zu dieser Zeit herrschenden Raumtemperatur von etwa 25 °C bestimmt wurde. Dies bedingte vermutlich das starke *tailing* des PE-Peaks, welcher dadurch allfällige andere Abbauprodukte überdeckt.

PE: Phenylephrin

Im Folgenden werden die verschiedenen eingesetzten HPLC-Methoden zusammengefasst dargestellt:

Säule: *Shimadzu Shim-pack XR-ODS II*, C_{18} , $d = 3 \text{ mm}$, $l = 150 \text{ mm}$

Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Injektionsvolumen: $10 \text{ }\mu\text{l}$

Flussrate: $0,7 \text{ ml/min}$, daraus $p \approx 400 \text{ bar}$

Flusszeit: 5 min

Fließmittel: Methanol + wässriger Ammoniumformiatpuffer ($\text{pH} = 3$) $7,5 + 92,5 \text{ } \%$ (V/V)

Detektion: PDA bei $\lambda = 272 \text{ nm}$

Methode 1: Einstellungen für die Vermessungen mittels analytischer HPLC, wie sie vom Universitätsklinikum St. Pölten übernommen wurden.

Säule: *Shimadzu Shim-pack GIS*, C_{18} , $d = 4,6 \text{ mm}$, $l = 250 \text{ mm}$

Säulenofentemperatur: $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Injektionsvolumen: $10 \text{ }\mu\text{l}$

Flussrate: $1,0 \text{ ml/min}$, daraus $p \approx 100 \text{ bar}$

Flusszeit: 16 min

Fließmittel: Methanol + wässriger Ammoniumformiatpuffer ($\text{pH} = 3$) $5,0 + 95,0 \text{ } \%$ (V/V)

Detektion: PDA bei $\lambda = 272 \text{ nm}$

Methode 2: Weiterentwickelte Methode für die Vermessung mittels analytischer HPLC, auf die gegebenen Bedingungen angepasst, um eine bestmögliche Auftrennung der Abbauprodukte in hoher Auflösung zu erlangen.

Säule: *Shimadzu Shim-pack GIS*, C_{18} , $d = 20 \text{ mm}$, $l = 250 \text{ mm}$

Temperatur: $\approx 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Raumtemperatur)

Injektionsvol.: $2,00 \text{ ml}$

Flussrate: $20,0 \text{ ml/min}$, daraus $p \approx 120 \text{ bar}$

Flusszeit: 20 min

Fließmittel: Methanol + wässriger Ammoniumformiatpuffer ($\text{pH} = 3$) $5,0 + 95,0 \text{ } \%$ (V/V)

Detektion: PDA bei $\lambda = 272 \text{ nm}$

Methode 3: Angepasste Methode für die Auftrennung mittels semipräparativer HPLC unter Berücksichtigung der veränderten Säulenkenngößen und den abweichenden Temperaturbedingungen während der Messung.

2.2 Abbau einer wässrigen Lösung von Phenylephrinhydrochlorid unter Zwangsbedingungen

Um Verhalten und Abbau einer wässrigen Lösung von PE-HCl mit einer Konzentration von etwa 5 mg/ml im Laufe der Zeit zu beschreiben, wurde diese Lösung unter Belastung mit Wasserstoffperoxid in einem auf 40°C temperierten Wasserbad über einen Zeitraum von 36 Tagen untersucht. Dabei konnte eine anfangs noch leicht rötliche, später stark dunkelbraune Verfärbung der Probelösung sowie der Abbau von PE-HCl zu verschiedenen Abbauprodukten erfasst werden.

Vermessen wurden mittels analytischer HPLC nach **Methode 2** (Kap. 2.1.4) bei einer Wellenlänge von 272 nm. Als Leerprobe diente reines Wasser. An 10 Tagen innerhalb eines Zeitraums von insgesamt 36 Tagen erfolgte die Probenentnahme aus **Stammlösung I** (Kap. 2.1.3), wobei jeweils ein Äquivalent von $20 \mu\text{l}$ aus den Probenlösungen entnommen und im Verhältnis 1 : 5 mit Wasser auf $100 \mu\text{l}$ verdünnt wurde. Dies entspricht einer Konzentration von 1 mg/ml bzw. $1000 \mu\text{g/ml}$ PE-HCl. Die übrige Probelösung verblieb im Wasserbad zu andauernder Belastung und weiterem Abbau.

Eine Vermessung der noch unverfärbten Probe nach 24 Stunden zeigte nur einen Peak für PE bei $t_{\text{ret}} = 5,6 \text{ min}$ (**Abb. 14, a**). Als erstes auch makroskopisch sichtbares Anzeichen einer Abbaureaktion prägte sich nach sechs Tagen im Wasserbad eine leichte rötliche Verfärbung der Probelösungen aus. Die Chromatogramme der drei Proben zeigten zu diesem Zeitpunkt bereits schwache Peaks der Abbauprodukte bei $t_{\text{ret}} = 2,9, 3,3, 4,7$ sowie $6,9 \text{ min}$ neben dem sich deutlich abhebenden Signal von PE bei $t_{\text{ret}} = 5,6 \text{ min}$. Nach 14 Tagen treten neue, noch sehr schwache Signale bei $t_{\text{ret}} = 4,3$ sowie $4,4 \text{ min}$ hinzu (**b**). Über den folgenden Zeitraum bis 36 Tagen nach Beginn der Belastung im Wasserbad wurden keine neuen Signale sichtbar (**c**). Über diesen Zeitraum intensivierte sich die Verfärbung der Probelösung hin zu einem stark dunkelbraunen Ton, ohne dass Anzeichen einer Ausfällung sichtbar wurden. Die Konzentration an PE-HCl nahm von anfangs $1000 \mu\text{g/ml}$ auf etwa $600 \mu\text{g/ml}$ nach ungefähr 14 Tagen ab, was einer Verminderung der Konzentration um etwa 40 % entspricht. Nach etwa 14 Tagen ist jedoch keine nennenswerte Erniedrigung mehr auszumachen, die Konzentration von PE-HCl verbleibt bei etwa $600 \mu\text{g/ml}$ (**Abb. 13**). Das Ausbleiben weiteren Abbaus trotz fortwährender Belastung der Probe legt nahe, dass

die Höchstzahl an möglichen Abbauprodukten bereits nach etwa zwei Wochen erreicht wird und sich somit ihre Anzahl nicht mehr verändert.

Ein Vergleich mit aus dem Universitätsklinikum St. Pölten erhaltenen Proben zeigt einige Übereinstimmungen, die Proben zeigen ein ähnliches Auftrennungsmuster. Der PE-Peak tritt bei den aus St. Pölten erhaltenen Proben bei $t_{\text{ret}} = 5,4$ min auf und liegt somit im Bereich der anderen Messungen ($t_{\text{ret}} = 5,6$ min; **Abb. 14, d**). Er macht etwa 71 % der Gesamtpeakfläche im Vergleich zu etwa 85 % bei den eigenen Proben aus. Unterschiede sind bei den Abbauprodukten festzustellen. Bei den Proben aus St. Pölten erscheint ein zusätzliches Signal bei $t_{\text{ret}} = 3,8$ min (0,8 % der Gesamtpeakfläche), das in den eigenen Proben fehlt. Das erste Signal nach dem PE-Peak tritt bei den eigenen Proben bei $t_{\text{ret}} = 6,5$ min (0,6 %), bei denen aus St. Pölten erst bei $t_{\text{ret}} = 8,6$ min auf (2,8 %). Das zweite und letzte Signal nach dem PE-Peak eluiert bei Proben beider Ursprungsorte bei $t_{\text{ret}} = 14,5$ min (eigene Proben: 0,8 %; Proben aus St. Pölten: 1,4 %). Die übrigen Signale der Abbauprodukte stimmen wiederum überein ($t_{\text{ret}} = 3,2$ min mit 10/16 % eigen/St.Pölten; $t_{\text{ret}} = 4,0/4,1$ min 0,6/0,7 %; $t_{\text{ret}} = 4,2$ min 0,4/0,7 %; $t_{\text{ret}} = 4,5$ min 0,2/0,6 %).

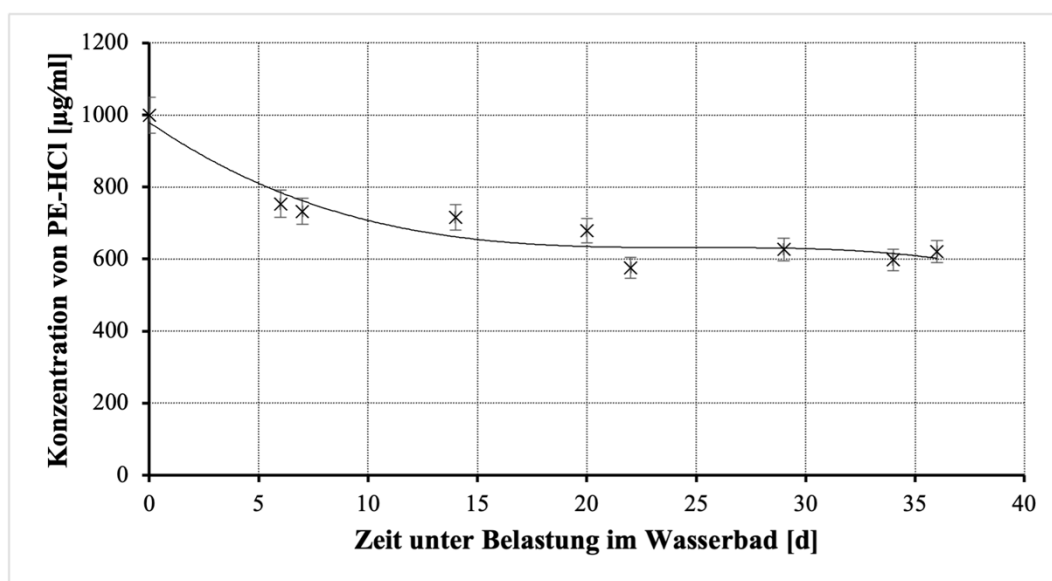
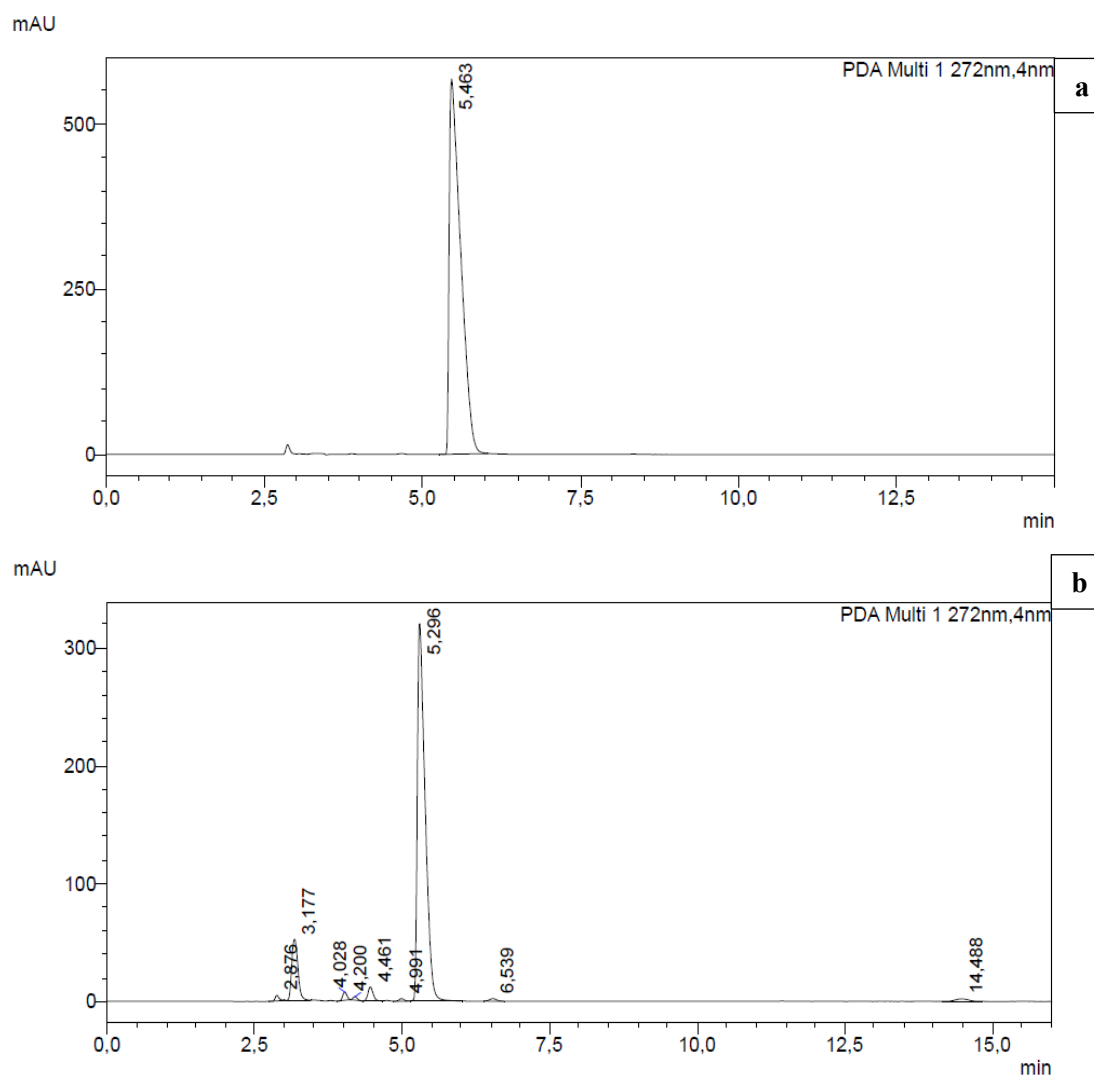
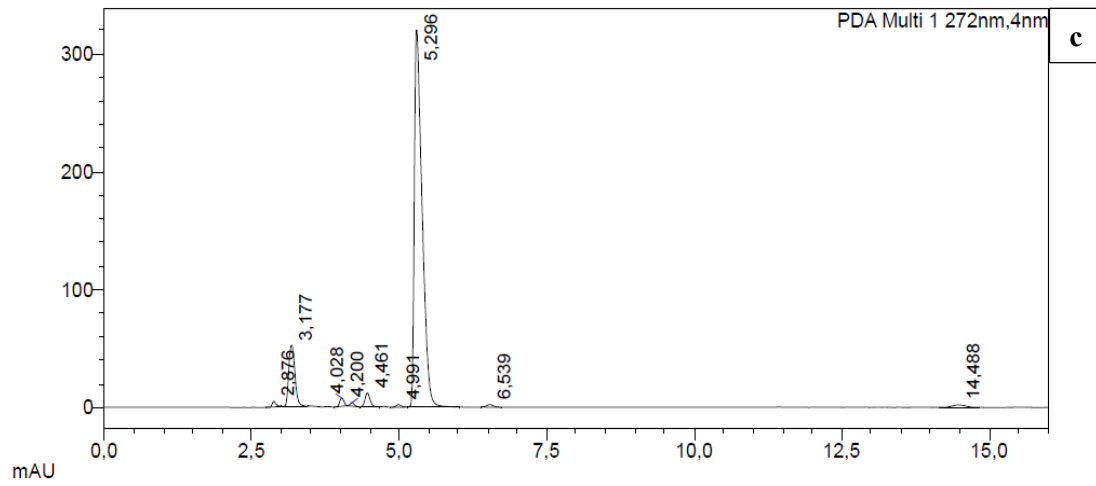


Abb. 13: Konzentrationsabnahme von PE-HCl über einen Zeitraum von 36 Tagen unter Belastung mit drei Äquivalenten Wasserstoffperoxid im Wasserbad bei einer Temperatur von 40 °C. Über die in Kapitel 2.1.2 dargestellte Geradengleichung abgeleitete errechnete Konzentrationen der Proben sind gegen die Zeit aufgetragen ($\bar{x} \pm \sigma$; $n = 3$). Die Konzentration von PE-HCl nimmt von anfangs 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf etwa 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach ungefähr 14 Tagen ab, was einer Verminderung von etwa 40 % entspricht. Danach ist keine nennenswerte Erniedrigung der Konzentration mehr festzustellen. – PE: Phenylephrin

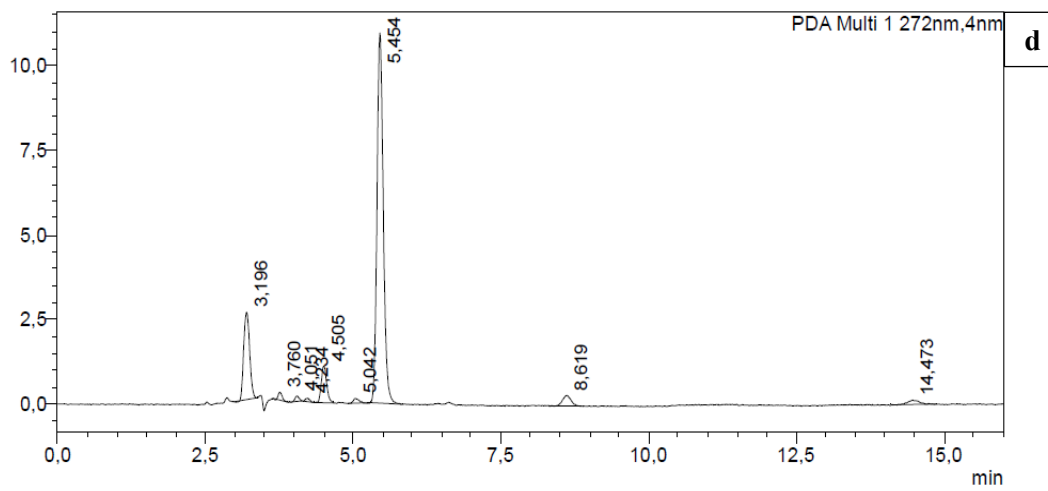


zu Abb. 14

mAU



mAU



zu Abb. 14

Abb. 14: Abbau von PE-HCl unter Belastung mit drei Äquivalenten Wasserstoffperoxid bei einer Temperatur von 40 °C, mittels analytischer HPLC vermessen nach **Methode 2** (Säule: *Shimadzu Shim-pack* GIS, C₁₈, $d = 4,6$ mm, $l = 250$ mm; Säulenofentemperatur: 40 °C; Injektionsvolumen: 10 µl; Flussrate: 1,0 ml/min; $p \approx 100$ bar; Flusszeit: 16 min; Fließmittel: Methanol + wässriger Ammoniumformiatpuffer (pH = 3) 5,0 + 95,0 % (V/V); Detektion: PDA bei $\lambda = 272$ nm). Chromatogramme der analytischen Auftrennung von Probenziehungen von 20 µl aus **Stammlösung 1**, im Verhältnis 1 : 5 mit Wasser verdünnt, nach 24 Stunden (**a**), 20 (**b**) sowie 34 Tagen (**c**). Das Signal für PE hebt sich bei $t_{\text{ret}} = 5,3$ min deutlich von den anderen Signalen ab. Die Abbauprodukte erscheinen in ihrer Mehrzahl, nämlich 6 Signale bei $t_{\text{ret}} = 2,9, 3,2, 4,0, 4,2, 4,5$ sowie 5,0 min, vor dem Hauptpeak, zwei Peaks bei $t_{\text{ret}} = 6,5$ sowie 14,5 min jedoch auch nach diesem. Dazu das Vergleichschromatogramm der analytischen Auftrennung von aus St. Pölten erhaltenen Proben (**d**). Eine Gegenüberstellung mit dem Chromatogramm einer eigenen Probe zeigt eine weitgehende Übereinstimmung beider, doch erscheint bei den Proben aus St. Pölten ein zusätzliches Signal bei $t_{\text{ret}} = 3,8$ min, welches bei den eigenen Proben fehlt, auch tritt das erste Signal nach dem PE-Peak bei den eigenen Proben bei $t_{\text{ret}} = 6,5$ min, bei denen aus St. Pölten erst bei $t_{\text{ret}} = 8,6$ min auf.

PE: Phenylephrin

2.3 Fraktionierung einer wässrigen Lösung von Phenylephrinhydrochlorid zur Isolierung der Abbauprodukte

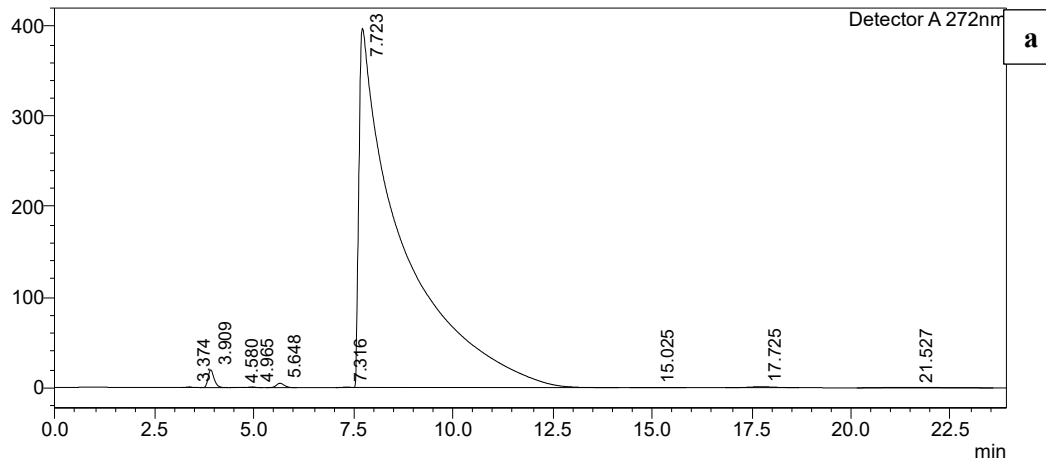
Zur Isolierung der einzelnen Abbauprodukte wurden wässrige Lösungen von PE-HCl mit einer Konzentration von etwa 50 mg/ml bereitet (**Stammlösung 2**), folgend unter Einwirkung von drei Äquivalenten Wasserstoffperoxid über 14 Tage bei 40°C im Wasserbad belastet, um einen Abbau von etwa 40 % zu erzielen (vgl. Kap. 2.2), und sodann mittels semipräparativer HPLC nach **Methode 3** (Kap. 2.1.4) fraktioniert.

Jeweils 1 ml der Probenlösung wurden zu gleichen Teilen mit Wasser verdünnt und anschließend injiziert. Dies entspricht einer Konzentration von 25 mg/ml und je Fraktionierungsschritt mit einem Injektionsvolumen von 2,00 ml etwa 50 mg PE-HCl einschließlich seiner Abbauprodukte. Bei 22 durchgeführten Fraktionierungsschritten entspricht dies theoretisch 1100 mg PE-HCl einschließlich seiner Abbauprodukte. Aus den einzelnen Messungen ergab sich eine PE-HCl-Konzentration von rund $11,3 \text{ mg/ml}$. Bei einer theoretischen Ausgangskonzentration der injizierten Probelösung von 25 mg/ml entspricht dies einem Abbau von etwa 55 %. Dies übertrifft den in Kap. 2.2 erhaltenen Wert für den Abbau. Insgesamt verblieben auf diesem Wege etwa 500 mg PE-HCl unverändert, zugleich wurden etwa 600 mg PE-HCl zu Abbauprodukten umgesetzt.

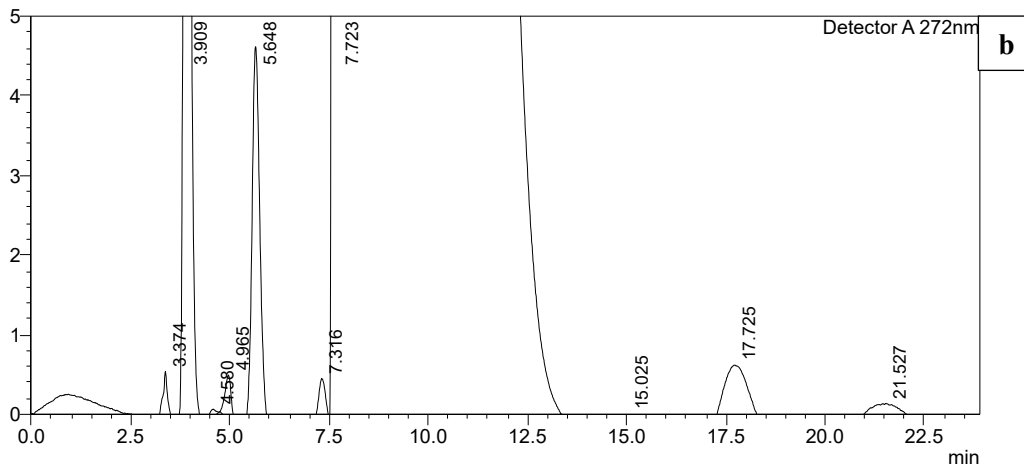
Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Lösung gegenüber Verfärbung, besonders in Gegenwart von Metallionen – in diesem Fall der Metallkanüle der Aufzugsspritze entstammend –, war es wesentlich, bei Probenaufzug und -injektion möglichst zügig vorzugehen und die gesamte Spritze nach jedem Injektionsvorgang sorgfältig mit Wasser auszuspülen. Dies verhinderte die Ansammlung stark verfärbter Probenflüssigkeit in Spritze und Metallkanüle.

Abb. 15 zeigt exemplarisch das Chromatogramm einer Fraktionierung mittels semi-präparativer HPLC nach **Methode 3** als Gesamtdarstellung (**a**) sowie vergrößert zur besseren Sichtbarmachung der Abbauprodukte (**b**). Deutlich zu erkennen ist der PE-Peak ($t_{\text{ret}} = 5,2$ min), welcher starkes *tailing* zeigt, daneben Peaks von insgesamt neun Abbauprodukten ($t_{\text{ret}} = 3,4; 3,9; 4,6; 5,0; 5,6; 7,3; 15,0; 17,7$ und $21,5$ min). Zum Vergleich ist darüber hinaus das Chromatogramm einer Auftrennung mittels analytischer HPLC nach **Methode 2** angeführt (**c**). Auffällig ist, dass nicht alle bei der Fraktionierung auftretenden Peaks eindeutig solchen der analytischen Auftrennung zugeordnet werden können. Namentlich den drei nach dem PE-Peak hervortretenden Peaks im Chromatogramm der Fraktionierung ($t_{\text{ret}} = 15,0; 17,7$ und $21,5$ min) stehen nur zwei Peaks in dem der analytischen Auftrennung gegenüber ($t_{\text{ret}} = 6,5$ und $14,5$ min). Auch ist nicht auszuschließen, dass der große PE-Peak mit *tailing* noch weitere kleinere Abbauprodukte überlagert.

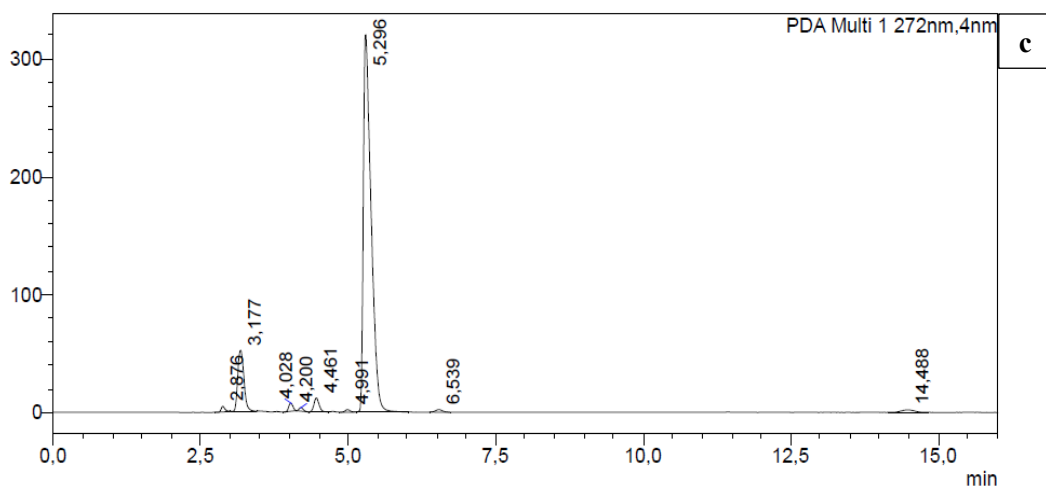
mV



mV



mAU



zu Abb. 15

Abb. 15: Fraktionierung mittels semipräparativer HPLC einer mit Wasserstoffperoxid bei 40 °C belasteten wässrigen Lösung von PE-HCl mit einer Konzentration von 50 mg/ml nach **Methode 3** (Säule: *Shimadzu Shim-pack* GIS, C₁₈, $d = 20$ mm, $l = 250$ mm; Temperatur: ≈ 25 °C (Raumtemperatur); Injektionsvolumen: 2,00 ml; Flussrate: 20,0 ml/min; $p \approx 120$ bar; Flusszeit: 20 min; Fließmittel: Methanol + wässriger Ammoniumformiatpuffer (pH = 3) 5,0 + 95,0 % (V/V); Detektion: PDA bei $\lambda = 272$ nm). **a)** Gesamtansicht, **b)** vergrößerter Ausschnitt. Deutlich zu erkennen ist der mächtige Peak von PE mit *tailing* ($t_{\text{ret}} = 5,2$ min), daneben Peaks von neun Abbauprodukten ($t_{\text{ret}} = 3,4; 3,9; 4,6; 5,0; 5,6; 7,3; 15,0; 17,7$ und 21,5 min). **c)** Zum Vergleich angeführtes Chromatogramm einer Auftrennung mittels analytischer HPLC. Ersichtlich ist, dass nicht alle bei der Fraktionierung auftretenden Peaks eindeutig solchen der analytischen Auftrennung zugeordnet werden können. Namentlich den drei nach dem PE-Peak hervortretenden Signalen im Chromatogramm der semipräparativen Auftrennung stehen nur zwei Peaks in dem der analytischen Auftrennung gegenüber.

PE: Phenylephrin

2.4 Strukturaufklärung der Abbauprodukte mittels Massenspektrometrie und Kernspinresonanzspektroskopie

Um die Struktur der Abbauprodukte aufzuklären, wurden die unter Kap. 2.3 beschriebenen Proben mittels LC-MS und NMR untersucht. Die LC-MS-Vermessung führte Herr Daniel Dobusch, MSc durch, die NMR-Vermessung wie auch die Analyse der gewonnenen Daten Herr ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ernst Urban (beide am Department für Pharmazeutische Wissenschaften an der Universität Wien).

Die unter Kap. 2.3 beschriebenen gewonnenen Fraktionen wurden gesammelt, in einem Rotationsverdampfer eingedampft und sodann jeweils in 1500 µl Wasser gelöst.

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels LC-MS vermessen. Einzig dem PE-Peak ($t_{\text{ret}} = 5,3$ min; **Abb. 15, c**) konnten eindeutig Masse-Ladungs-Verhältnisse zugeordnet werden. Es treten durchwegs m/z 150 und 168, wie sie auch TROMMER u. a. beschrieben (vgl. Kap. 1.2.2), gemeinsam auf. Diese ließen sich recht eindeutig über die Summenformel $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}$ (m/z 150) mit dem dehydroxylierten Derivat von PE sowie über die Summenformel $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2$ (m/z 168) mit PE selbst verknüpfen.

Die übrigen Masse-Ladungs-Verhältnisse wurden jeweils für mehrere Retentionszeiten im Chromatogramm nachgewiesen und konnten folglich nicht verlässlich einzelnen Peaks zugeordnet werden. Darunter waren zwei Signale mit m/z 180, die noch genauer differenziert werden konnten zu m/z 180,07, was über die Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2$ mit den eingangs beschriebenen Tetrahydroisochinolinderivaten, sowie m/z 180,10, was über die Summenformel $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$ mit dem ebenso beschriebene Chinonderivat assoziiert werden konnte. Allerdings erschienen die beiden m/z -Verhältnisse durchwegs gemeinsam, womit nur schwer eine klare Trennung der beiden Signale möglich war.

Ein weiteres Signal bei m/z 166 legte mit der Strukturformel $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ einen Zusammenhang zu einem zweifach deprotonierten Derivat von PE nahe, möglicherweise also in Form des Ketonderivats mit einem Ketoethylrest. Ein letztes Signal bei m/z 184 mit der Summenformel $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_3$ schien hingegen ein PE-Derivat zu sein, das ein zusätzliches Sauerstoffatom in Form einer weiteren Hydroxylgruppe trägt.

Die unter Einsatz von MS beschriebenen Strukturen stellten Oxidationsprodukte der PE-Grundstruktur dar. Der aromatische Phenylring blieb hierbei erwartungsgemäß erhalten, erfuhr aber teils zusätzliche Hydroxylgruppen oder wurde zu Ketonen umgesetzt,

wodurch eine Chinonstruktur entstand. Auch ein Ringschluss der Ethylaminogruppe durch Anellierung mittels des Kohlenstoffs aus der im Fließmittelpuffer vorhandenen Ameisensäure hin zu einer Isochinolinstruktur legten die Daten nahe.

Auf die MS-Messungen folgend wurden die einzelnen Fraktionen in einer Vakuumzentrifuge gefriergetrocknet, in deuteriertem Methanol gelöst und sodann mittels ^1H - und ^{13}C -NMR nach unter Kap. 2.1.1 beschriebener Methode vermessen. In gleicher Weise wurde ein Kontrollstandard von 7 mg an reinem PE-HCl, welcher keinen Zwangsbedingungen unterworfen wurde, behandelt und vermessen. Es wurden die Verfahren *attached proton tests* (APT), *correlated spectroscopy* (COSY), *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) und *heteronuclear multiple bond correlation* (HMBC) angewandt.

Wider Erwarten zeigten die NMR-Messungen der Abbauprodukte jedoch nicht die angedachten oxidierten Derivate von PE, sondern aus der Reaktion von PE mit Ameisensäure hervorgegangene Addukte in Form von *N*-Formyl-PE-Rotameren (**Abb. 16**,

Tab. 2). Diese lagen in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander vor, im Beispiel aus **Abb. 16** im Verhältnis 71 : 21 : 8 für PE, *N*-Formyl-PE (Rotamer*) und *N*-Formyl-PE (Rotamer⁺). Die für PE erhaltenen Werte für die chemischen Verschiebung konnten durch den Kontrollstandard bestätigt werden. Auch die Spektren der übrigen Fraktionen zeigten entsprechende Muster in wechselnden Verhältnissen von PE und den *N*-Formyl-PE-Rotameren, sofern die Signale überhaupt einer plausiblen Struktur zugeordnet werden konnten. Ihre Herkunft ließ sich auf den für die HPLC verwendeten Ammoniumformiatpuffer zurückführen. Allerdings gilt es zu beachten, dass die leicht flüchtige Komponente Ameisensäure durch das eingesetzte Verfahren der Gefriertrocknung im Grunde sehr leicht von den Proben abzutrennen sein müsste. Der Ursprung aus dem oben beschriebenen Abbauweg mit Freisetzung von Formaldehyd (s. Kap. 1.2.2) ist hingegen unwahrscheinlich, da die hierbei entstehenden Abbauprodukte nicht nachzuweisen waren.

Ein versuchsweiser Wechsel des Fließmittelpuffersystems weg von einem Ammoniumformiat- hin zu einem Natriumphosphatpuffer, um eine Wechselwirkung der Ameisensäure aus dem Fließmittel mit den Proben ausschließen zu können, brachte bei analytischen HPLC-Messungen keine verwertbaren Ergebnisse. Einerseits war der Peak des Abbauprodukts mit $t_{\text{ret}} = 6,7$ min nicht ausreichend von dem PE-Peak ($t_{\text{ret}} = 6,9\text{--}7,0$ min) zu trennen, andererseits unterschieden sich die Intensitäten der Signale deutlich von denen, die aus den Messungen mit Ammoniumformiatpuffer bekannt waren. So hatte nicht mehr der PE-Peak die höchste Intensität (25 % der Gesamtpeakfläche), sondern wurde

von einem Abbauprodukt mit $t_{\text{ret}} = 3,7$ min übertroffen (36 % der Gesamtpeakfläche; **Abb. 17**).

Durch einen versuchsweisen Austausch des Lösungsmittels für die NMR-Messungen von deuteriertem Methanol zu deuteriertem Dimethylsulfoxid konnten Löslichkeitschwierigkeiten der Abbauprodukte in deuteriertem Methanol ausgeschlossen werden.

Das Ziel, den Peaks der Chromatogramme passende Strukturen zuzuordnen, konnte mithilfe dieser gewonnenen Ergebnisse demnach nicht erreicht werden. Da die formylierten PE-Derivate auf eine Reaktion mit dem Fließmittel hindeuten, sind diese Verbindungen nicht relevant für die Zielsetzung dieser Arbeit.

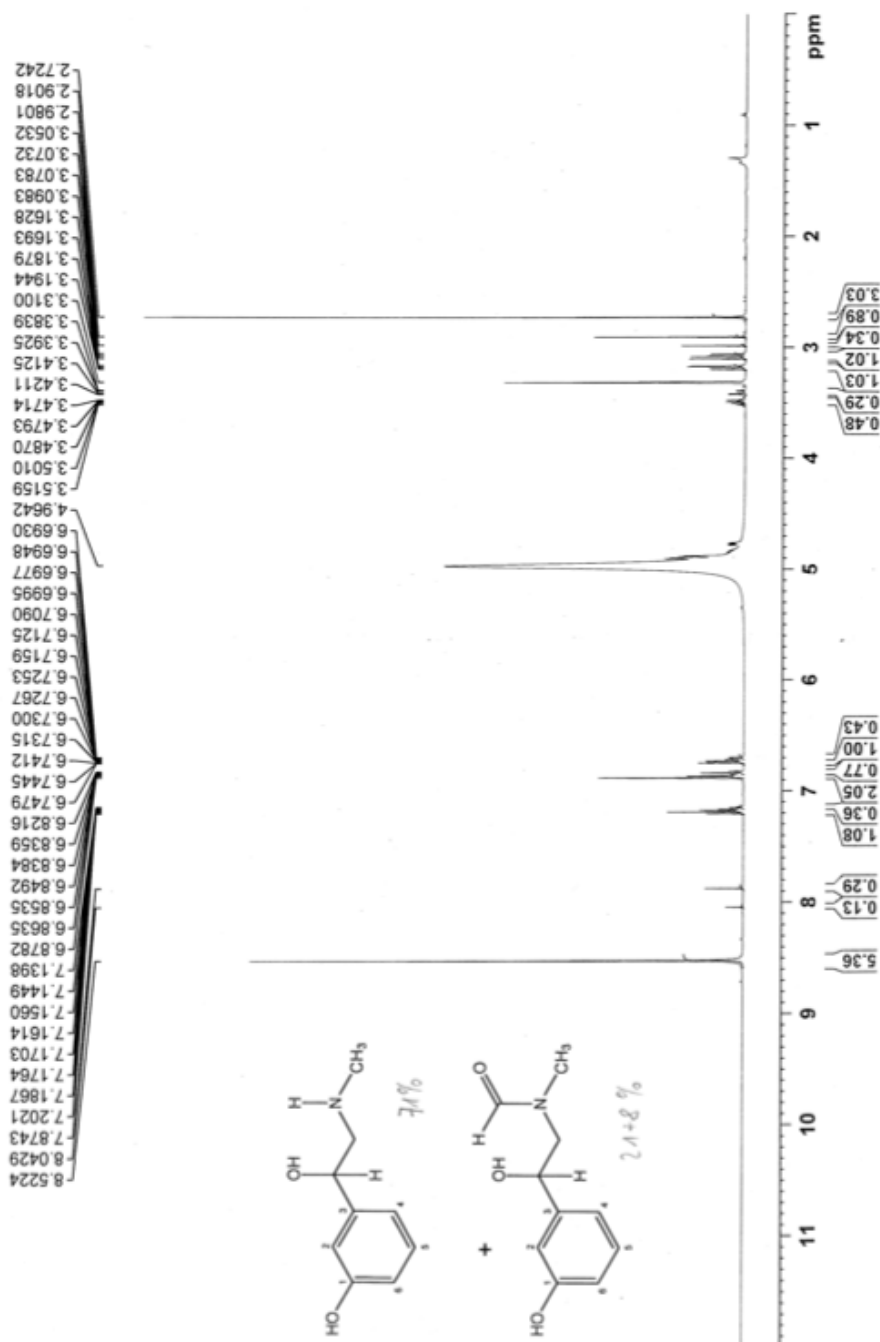


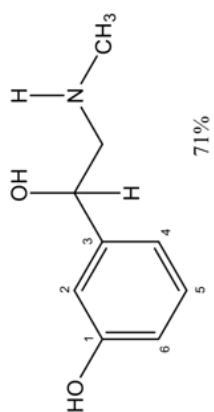
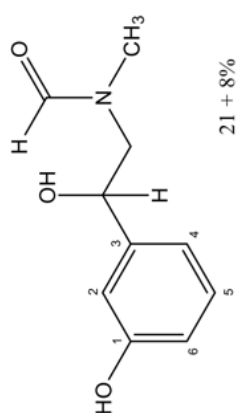
Abb. 16: Beispielhaftes ^1H -NMR-Spektrum einer irrtümlich als Oxidationsprodukt von PE angesehenen Substanz: Vermessen wurde eine durch semipräparative HPLC gewonnene, gefriergetrocknete und anschließend in deuteriertem Methanol gelöste Fraktion. Die Spektren zeigen, dass die Fraktion keines der eigentlich erwarteten oxidierten Derivate von PE enthält, sondern vielmehr den Ausgangsstoff PE begleitet von *N*-Formyl-PE-Rotameren. Zur Zuordnung der Signale siehe

Tab. 2.

PE: Phenylephrin

Tab. 2: Zuordnung der Signale im ^1H -NMR-Spektrum aus **Abb. 16**.

δ [ppm]		PE-Kontrollstandard				PE		N-Formyl-PE (Rotamer*)		N-Formyl-FE (Rotamer*)	
		^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
Amid	CH	—	—	—	—	—	—	7,87	165,84	8,04	165,45
1	C	—	158,95	—	158,97	—	158,78	—	—	—	—
2	CH	6,89	113,75	6,87	113,77	6,84	113,94	6,84	113,97	6,84	113,97
3	C	—	143,76	—	143,86	—	144,91	—	145,36	—	145,36
4	CH	6,88	117,91	6,88	117,89	6,83	118,18	6,83	118,24	6,83	118,24
5	CH	7,19	130,80	7,19	130,78	7,16	130,55	7,16	130,46	7,16	130,46
6	CH	6,74	116,17	6,74	116,16	6,74	115,68	6,74	115,64	6,74	115,64
CH	CH	4,90	69,93	4,89	69,99	4,77	71,76	4,77	72,42	4,83	72,42
NCH ₂	CH ₂	3,19/3,09	56,68	3,18/3,08	56,69	3,49/3,41	58,40	3,48	53,47	3,48	53,47
NCH ₃	CH ₃	2,74	33,72	2,72	33,64	2,90	31,14	2,98	36,82	2,98	36,82



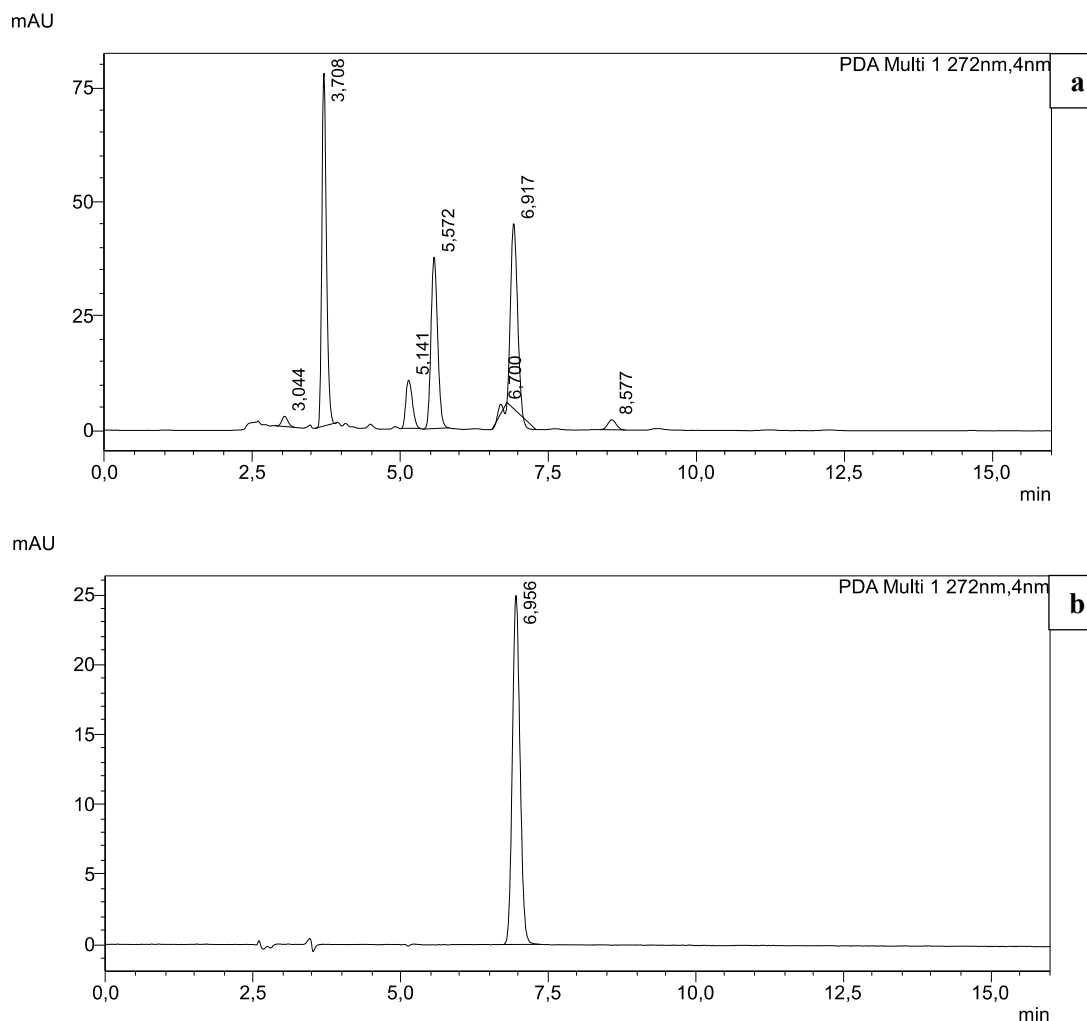


Abb. 17: Abbau von PE-HCl unter Belastung mit drei Äquivalenten Wasserstoffperoxid bei einer Temperatur von 40 °C, mittels analytischer HPLC vermessen nach **Methode 2** (Säule: *Shimadzu Shim-pack* GIS, C₁₈, $d = 4,6$ mm, $l = 250$ mm; Säulenofentemperatur: 40 °C; Injektionsvolumen: 10 µl; Flussrate: 1,0 ml/min; $p \approx 100$ bar; Flusszeit: 16 min; Detektion: PDA bei $\lambda = 272$ nm), allerdings mit Methanol und wässrigem Natriumphosphatpuffer (pH = 3) 5,0 + 95,0 % (V/V) als Fließmittel. **a)** Chromatogramm der analytischen Auftrennung einer Probenziehung von 20 µl aus **Stammlösung 1**, im Verhältnis 1 : 5 mit Wasser verdünnt. **b)** Vergleichschromatogramm mit reinem PE-HCl mit $t_{\text{ret}} = 6,9\text{--}7,0$ min. Aufgrund von unzureichender Auftrennung der Peaks, verändertem Auftrennungsmuster und veränderter Signalintensität können durch einen Umstieg von einem Ammoniumformiat- auf einen Natriumphosphatpuffer keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

PE: Phenylephrin

2.5 Identifizierung des Abbauprodukts in Fertigspritzen mit Phenylephrinhydrochlorid

Da entgegen den Erwartungen durch die bisherigen Verfahren keine Aufklärung der Strukturformeln von unter Zwangsbedingungen gebildeten Abbauprodukten möglich war, wurden nun anstelle der unter Zwangsbedingungen behandelten Proben der Inhalt von transparenten Polypropylen-Fertigspritzen mit $0,04 \text{ mg/ml}$ PE-HCl in isotoner Natriumchloridlösung ($0,9 \text{ } \%$ (m/m)) zu 10 ml , welche vom Universitätsklinikum St. Pölten bereitgestellt wurden, zur Untersuchung herangezogen. Diese wurden zuvor bei vorgesehener Lagerbedingung von $4 \text{ }^\circ\text{C}$ im Kühlschrank ohne gesonderten Lichtschutz und ohne Zusatz eines Belastungsagens wie Wasserstoffperoxid aufbewahrt. Hierbei wurden nach sechs Monaten in etwa $1,1 \text{ } \%$ des beinhalteten PE-HCl bezogen auf die Gesamtpeakfläche bei 272 nm abgebaut.

Aus den für 12 Monate gelagerten Fertigspritzen wurden ohne weitere Probenaufbereitung je $150 \text{ } \mu\text{l}$ zur dreifachen Vermessung mittels analytischer HPLC nach **Methode 2** herangezogen. Die Chromatogramme zeigen durchgängig in gleichem Auftrennungsmuster und auch in gleichem Verhältnis zueinander neben dem deutlichen Peak von PE nur ein wesentliches Abbauprodukt ($t_{\text{ret}} = 5,4 \text{ min}$; etwa $1,4 \text{ } \%$ der Gesamtpeakfläche) unmittelbar vor dem PE-Peak ($t_{\text{ret}} = 5,8 \text{ min}$; etwa $98,6 \text{ } \%$ der Gesamtpeakfläche; **Abb. 18**). Unvermutet ist dies das Signal eines Abbauprodukts, welches zwar ebenso unter Zwangsbedingungen auftritt (Kap. 2.2), dort aber nur sehr schwach ausfällt ($< 0,4 \text{ } \%$ der Gesamtpeakfläche), sowohl im Vergleich mit dem Signal von PE selbst als auch im Vergleich mit den übrigen Abbauprodukten. Andere Abbauprodukte, wie sie unter Zwangsbedingungen sehr deutlich hervortreten, fehlen hingegen völlig.

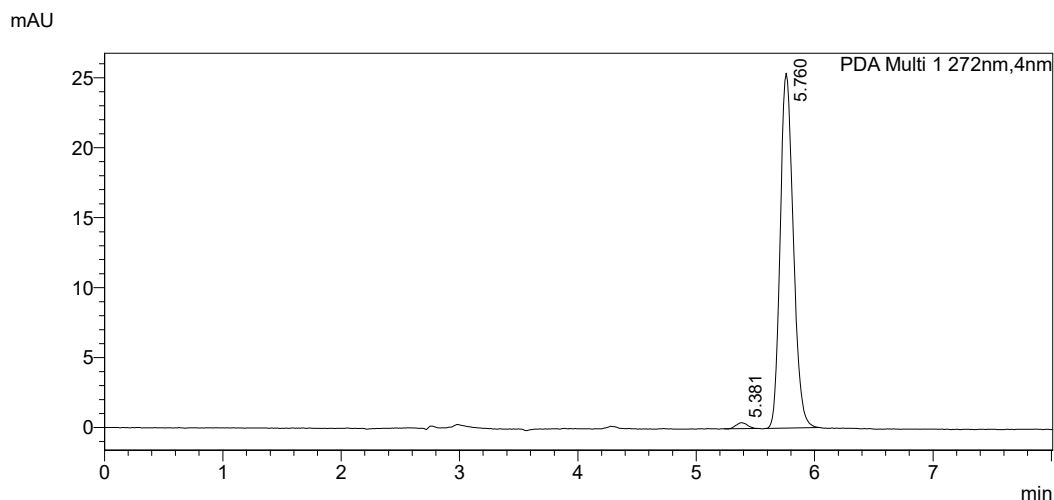


Abb. 18: Fertigspritzen nach 12-monatiger Lagerung mit einer Konzentration von $0,04 \text{ mg/ml}$ PE-HCl in isotoner Natriumchloridlösung ($0,9 \text{ } (\text{m}/\text{m})$) zu 10 ml . Vermessung mittels analytischer HPLC nach **Methode 2** (Säule: *Shimadzu Shim-pack GIS*, C_{18} , $d = 4,6 \text{ mm}$, $l = 250 \text{ mm}$; Säulenoftemperatur: $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Injektionsvolumen: $10 \text{ } \mu\text{l}$; Flussrate: $1,0 \text{ ml}/\text{min}$; $p \approx 100 \text{ bar}$; Flusszeit: 8 min ; Fließmittel: Methanol + wässriger Ammoniumformiatpuffer ($\text{pH} = 3$) $5,0 + 95,0 \text{ } (\text{V}/\text{V})$; Detektion: PDA bei $\lambda = 272 \text{ nm}$). Neben dem deutlichen Signal von PE mit $t_{\text{ret}} = 5,8 \text{ min}$ (etwa $98,6 \text{ } \%$ der Gesamtpeakfläche) ist nur ein wesentliches Abbauprodukt mit $t_{\text{ret}} = 5,4 \text{ min}$ (etwa $1,4 \text{ } \%$ der Gesamtpeakfläche) unmittelbar vor dem PE-Peak zu erkennen. Dieses Auftrennungsmuster tritt mit übereinstimmender Intensität in jeder der drei untersuchten Fertigspritzen auf.

($n = 3$) – PE: Phenylephrin

Die Fertigspritzen enthalten zum Zweck der Isotonisierung $0,9 \text{ } (\text{m}/\text{m})$ Natriumchlorid. Da dieses im Verhältnis zur enthaltenen Menge an Wirkstoff PE-HCl und seinem Abbauprodukt in sehr hoher Konzentration vorliegt, kann es sich ungünstig auf die NMR-Messungen auswirken. Um das beigelegte Natriumchlorid vor der Vermessung mittels NMR jedenfalls weitgehend abzutrennen, wurde der Inhalt von zehn Fertigspritzen mittels Rotationsverdampfung getrocknet und sodann in Methanol gelöst. Da Natriumchlorid in Methanol ungelöst bleibt, konnte das lösliche PE-HCl wie auch sein Abbauprodukt im Rückstand durch Vakuumfiltration über eine Glasfritte abgetrennt werden. Die methanolische Lösung wurde abermals mittels Rotationsverdampfung getrocknet und der gebildete Rückstand für NMR-Vermessungen herangezogen.

Durch die NMR-Spektren (**Abb. 20**) konnten die Strukturen dreier Verbindungen aufgeklärt werden. Neben dem Hauptprodukt PE (**a**) waren dies zwei weitere Komponenten, zum einen Glycerin ($M_r = 92,09 \text{ g/mol}$; **c**), zum anderen die tetracyclische Verbindung 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_3$; $M_r = 402,53 \text{ g/mol}$; Strukturformel:

Abb. 19; NMR-Spektrum: **Abb. 20, b).** Die Anteile der Verbindungen zueinander, berechnet aus den Integralen isolierter Protonen, betrugen 91 : 3 : 6 (PE : Glycerin : 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan).

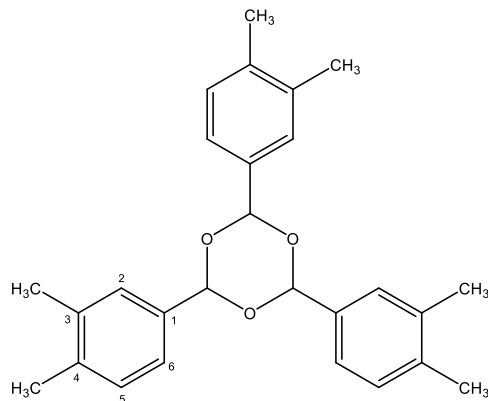


Abb. 19: Strukturformel von 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan. Diese Verbindung wurde nach 12-monatiger Lagerung als wesentliches Abbauprodukt in Polypropylen-Fertigspritzen mit 0,04 mg/ml PE-HCl in isotoner Natriumchloridlösung (0,9 % (m/m)) zu 10 ml neben Glycerin bestimmt. Sie tritt bei vorgesehener Lagerbedingung der Fertigspritzen von 4 °C im Kühlschrank ohne gesonderten Lichtschutz und ohne Zusatz des Belastungsagens Wasserstoffperoxid auf.

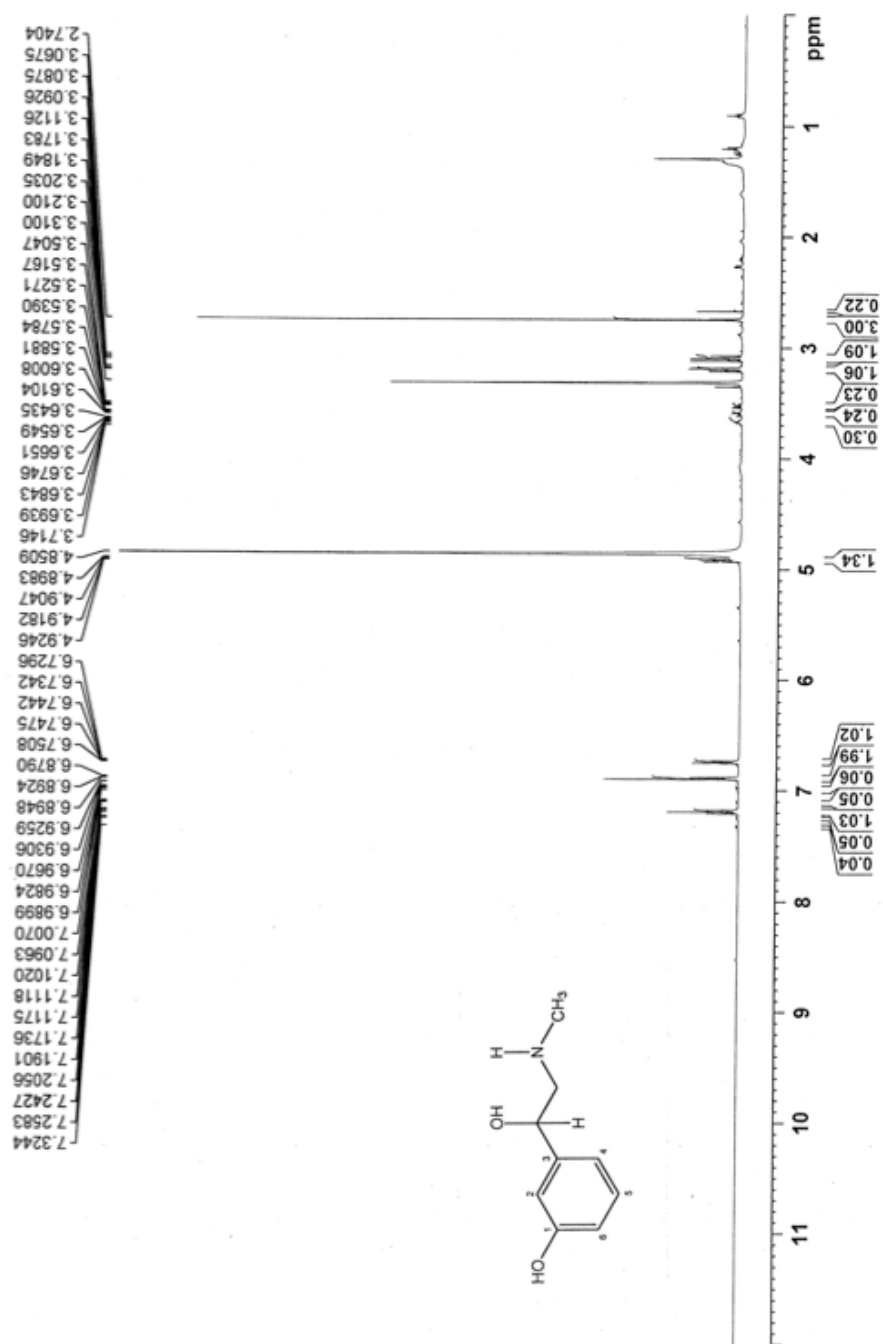
PE: Phenylephrin

2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan mit zu erwartendem m/z 403,53 ließ sich bei Vermessung mittels LC-MS nicht nachweisen. Ein Zusammenhang mit dem Signal von m/z 403,26 kann ausgeschlossen werden, da für dieses Masse-Ladungs-Verhältnis keine Summenformel mit 27 Kohlenstoffatomen simuliert werden konnte. Auch fiel dieses sehr schwach aus und war kaum von dem Grundrauschen abzugrenzen. Ferner konnten keine 3,4-Dimethylbenzaldehydteilsturkutren mit m/z 135 oder 1,2,4-Trimethylbenzol mit m/z 121 als mögliche Zerfallsprodukte detektiert werden. Vielmehr zeigte das Massenspektrum (**Abb. 21**) wiederum die aus vorausgehenden Messungen und aus der Literatur (Kap. 1.1.2 und 2.4) bekannten Werte für m/z 150, 168, 180 und 282, die mit Ausnahme von m/z 168 für PE keiner mittels NMR in den Proben nachgewiesenen Struktur zugeordnet werden konnten.

Ob es sich bei der Verbindung 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan tatsächlich um ein Abbauprodukt von PE handelt oder ob diese auf anderem Wege Eingang in

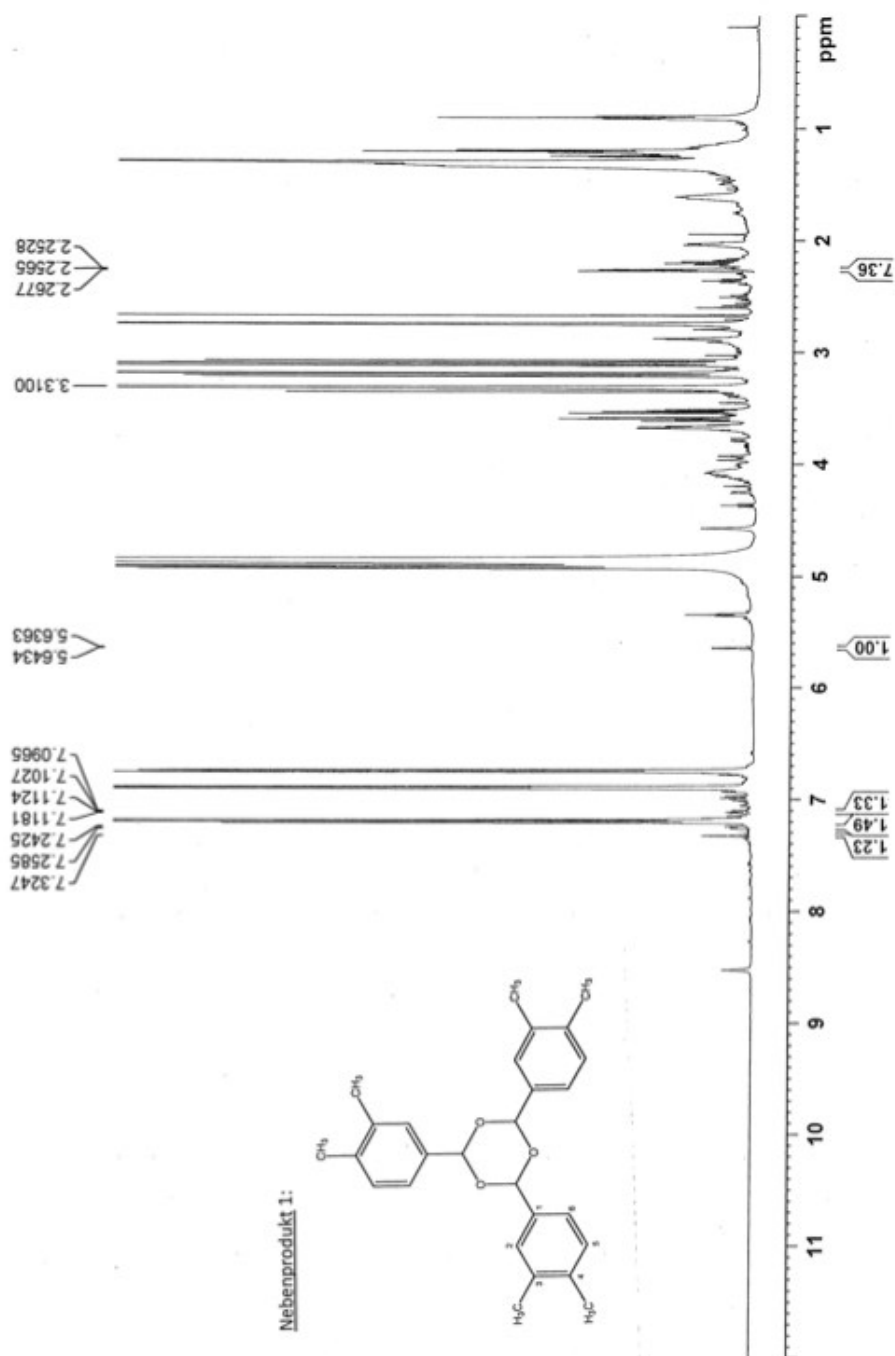
die Probe fand, ist schwer zu beurteilen. Einerseits ist es möglich, die dimethylierten Phenylstrukturen auf den aromatischen Ring von PE zurückzuführen, wobei nicht nur der Aminoethylrest auf einen Kohlenstoff abgebaut werden, sondern der Phenylring eine weitere Methylierung in *ortho*-Position erfahren muss. Die Kohlenstoffe des 1,3,5-Trioxanrings können von Formaldehyd oder Ameisensäure, in etwa aus dem Fließmittelpuffer, hergeleitet werden. Andererseits lassen sich in der Verbindung 3,4-Dimethylbenzoesäureteilstrukturen und damit Abkömmlinge von 1,2,4-Trimethylbenzol (Pseudocoumol) ausmachen.

Über 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan selbst enthält die Literatur bislang keine Auskunft über Eigenschaften oder Toxizität. Hingegen wurden Trimethylbenzole sowie deren Metaboliten Dimethylbenzoesäuren als Bestandteile von Erdölprodukten, darunter Kunststoffe, und aromatischen Lösungsmittelgemischen nachgewiesen; sie werden bei vornehmlich inhalativer Aufnahme mit zentralnervösen Beschwerden wie Kopfschmerzen, Schwindel und Müdigkeit in Zusammenhang gebracht (24). Ob ähnliche Wirkungen auch 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan ausübt und welcher Gestalt diese genau sind, bedarf weiterer Untersuchung.



zu Abb. 20

b



zu Abb. 20

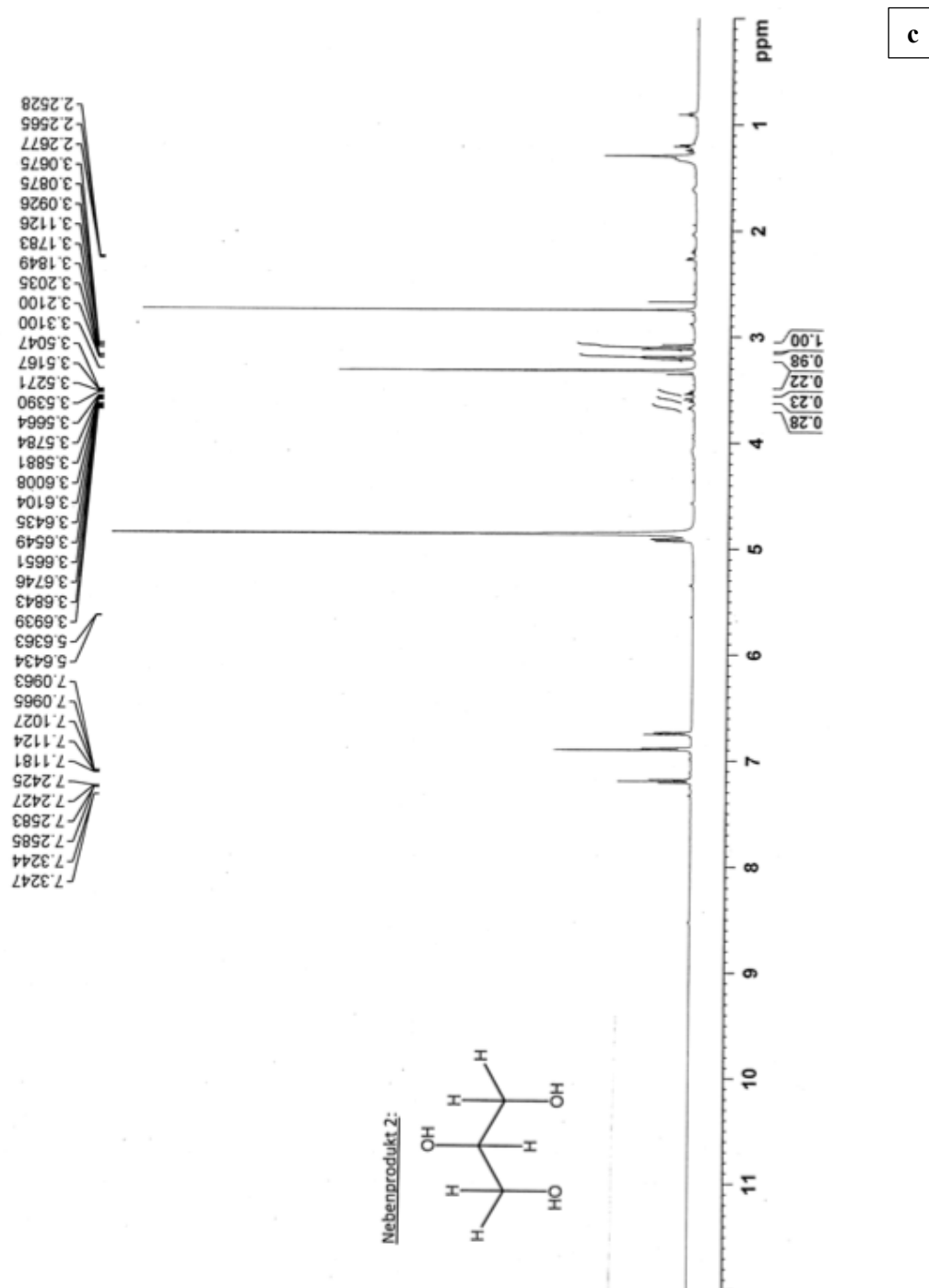
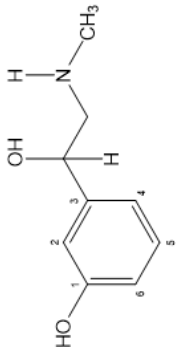
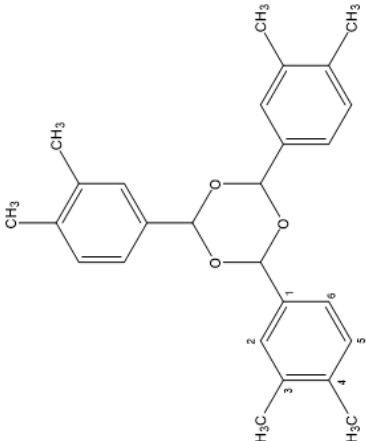
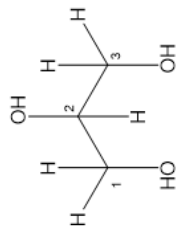


Abb. 20: ^1H -NMR-Spektren von PE (a), 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan (Nebenprodukt 1, b) und Glycerin (Nebenprodukt 2, c) aus Polypropylen-Fertigspritzen nach 12-monatiger Lagerung mit $0,04 \text{ mg/ml}$ PE-HCl in isotoner Natriumchloridlösung, gelagert im Kühlschrank bei 4°C ohne gesonderten Lichtschutz und ohne Zusatz eines Belastungsagens wie Wasserstoffperoxid. Zur Zuordnung der Signale siehe **Tab. 3**. – PE: Phenylephrin

Tab. 3: Zuordnung der Signale im ^1H -NMR-Spektrum aus **Abb. 20**.

δ [ppm]	PE-Kontrollstandard			Hauptprodukt (PE)			Nebenprodukt 1			δ [ppm]		Nebenprodukt 2		
	^1H	^{13}C		^1H	^{13}C		^1H	^{13}C		δ [ppm]		^1H	^{13}C	
1	—	158,95		—	158,92	1	—	137,10	2	CH	2	3,66	73,77	
2	6,89	113,75		6,89	113,75	2	7,32	128,68	1 und 3	CH ₂		3,59/3,52	64,34	
3	—	143,76		—	143,78	3	—	137,10						
4	6,88	117,91		6,88	117,93	4	—	138,22						
5	7,19	130,80		7,19	130,77	5	7,11	130,16						
6	6,74	116,17		6,74	116,15	6	7,25	125,01						
CH	4,90	69,93		4,91	69,93	CH	5,64	102,09						
NCH ₂	3,19/3,09	56,68		3,19/3,09	56,70	CH ₃ an 3	2,27	19,82						
NCH ₃	2,74	33,72		2,74	33,76	CH ₃ an 4	2,26	19,63						

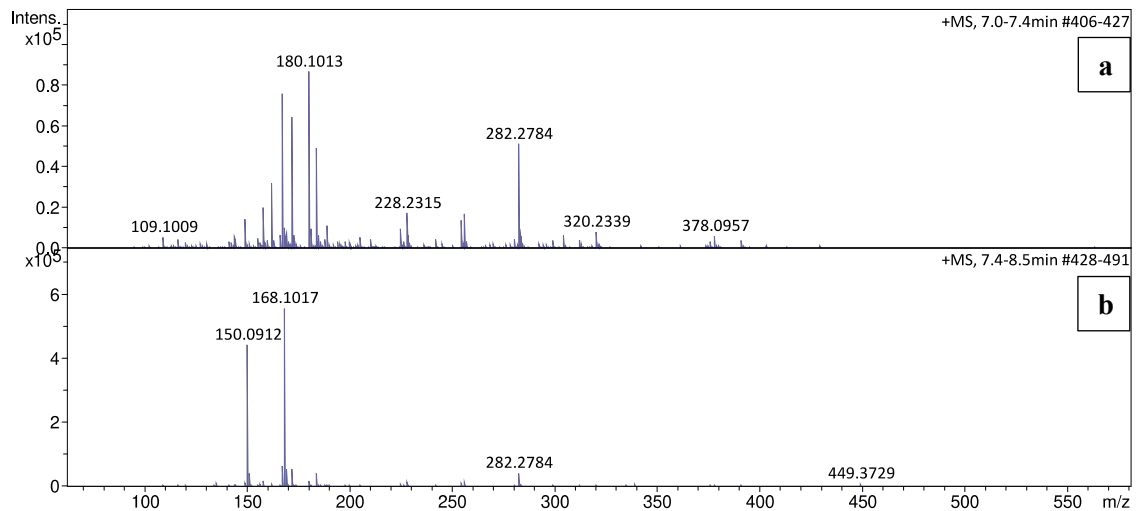


Abb. 21: Fertigspritzen nach 12-monatiger Lagerung mit einer Konzentration von $0,04 \text{ mg/ml}$ PE-HCl in isotoner Natriumchloridlösung ($0,9 \text{ } (\text{m/m})$) zu 10 ml , LC-MS-Messungen: Massenspektrum für das mögliche Abbauprodukt bei $t_{\text{ret}} 7,0\text{--}7,4 \text{ min}$ (a) und für PE $t_{\text{ret}} 7,4\text{--}8,5 \text{ min}$ (b). Zwar konnte wie in den analytischen HPLC-Messungen (Abb. 19) unmittelbar vor dem PE-Peak das Signal eines Abbauprodukts ($t_{\text{ret}} = 7,2 \text{ min}$) registriert werden, doch lässt sich die durch NMR-Messungen bestimmte Substanz 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan ($M_r = 402,53 \text{ g/mol}$; $m/z 403$) nicht nachweisen.

PE: Phenylephrin

3 Schlussfolgerung

Zielsetzung der Arbeit war, mögliche Abbauprodukte von PE-HCl in wässriger Lösung bestimmen und deren Struktur aufklären zu können. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf transparenten Polypropylen-Fertigspritzen mit 0,04 mg/ml PE-HCl in isotoner Natriumchloridlösung zu 10 ml, welche im Universitätsklinikum St. Pölten zur internen Verwendung hergestellt werden und von welchen bekannt ist, dass sich bei vorgesehener Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C ohne gesonderten Lichtschutz und ohne Zusatz eines Belastungsagens wie Wasserstoffperoxid ein bis dahin unbestimmtes Abbauprodukt bildet. Diese Fragestellung sollte beantwortet werden, indem zu Beginn unter Zwangsbedingung die Bildung verschiedenster Abbauprodukte herbeigeführt und deren Struktur sodann mittels LC-MS und NMR aufgeklärt werden sollte.

Der Stabilitätstest über 36 Tage mittels analytischer HPLC zeigte, dass sich unter den gegebenen Zwangsbedingungen – genauer bei Versetzen der wässrigen Lösung von PE-HCl mit drei Äquivalenten Wasserstoffperoxid bei einer Temperatur von 40 °C – innerhalb von 14 Tagen ein Abbau des Arzneistoffs um etwa 40 % bezogen auf die Ausgangskonzentration möglich war und sich dabei verschiedene Abbauprodukte bildeten. Zahl und Konzentration der gebildeten Abbauprodukte unterläuft nach etwa zwei Wochen keiner nennenswerten Veränderung. Vergleichende Messungen von in entsprechender Weise behandelten Proben aus dem Universitätsklinikum St. Pölten bewiesen weiters, dass diese Behandlung reproduzierbare Ergebnisse bezüglich des Abbaumusters erzielt. Mit den im Universitätsklinikum St. Pölten erfolgreich eingesetzten Einstellungen des Chromatographen konnte jedoch keine zufriedenstellende Auftrennung der Abbauprodukte erreicht werden, weshalb sie in einigen Punkten angepasst werden mussten.

Die durch Auftrennung mittels semipräparativer HPLC gewonnenen Fraktionen der Abbauprodukte von PE-HCl wurden sodann einzeln mittels LC-MS und NMR vermessen, um die Struktur des jeweils enthaltenen Abbauprodukts aufzuklären. Wider Erwarten brachte dieser Schritt keine verwertbaren Ergebnisse. Die gebildeten Substanzen zeigten sich durchwegs als Reaktionsprodukte mit Ameisensäure, welche sehr wahrscheinlich dem als Fließmittel für die HPLC verwandten Ammoniumformiatpuffer entstammt, in Form von *N*-Formyl-PE-Rotameren. Ein Wechsel auf ein anderes, natriumphosphathaltiges Puffersystem erwies sich jedoch unzweckmäßig, da es keine zufriedenstellende Auftrennung der einzelnen Substanzen ermöglichte.

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit war ohnehin ein einziges, im Chromatogramm der HPLC unmittelbar vor PE auftretendes Abbauprodukt, wie es in PE-HCl-Fertigspritzen mit einer Konzentration von $0,04 \text{ mg/ml}$ PE-HCl in isotoner Natriumchloridlösung ($0,9 \text{ } \%$ (m/m)) bei vorgesehener Lagerung auftritt. Um dessen Strukturformel dennoch aufstellen zu können, wurde der Inhalt dieser Fertigspritzen mittels NMR vermessen. Die Verbindung wurde als 2,4,6-Tris(3,4-dimethylphenyl)-1,3,5-trioxan identifiziert. Jedoch ist unklar, ob damit tatsächlich ein Abbauprodukt von PE-HCl vorliegt oder die Substanz nicht vielmehr anderen Ursprungs ist. Auch konnte die Verbindung mittels LC-MS-Messungen nicht bestätigt werden. Weiters sind deren Eigenschaften, besonders in Bezug auf Toxizität, noch völlig unbekannt und müssen im Zuge weiterer Untersuchungen ergründet werden.

Das Ziel der Arbeit, das bei Lagerung auftretende Abbauprodukt aufzuklären, konnte erreicht werden. Die gewonnenen Ergebnisse erlauben jedoch keine abschließende und schlüssige Erklärung. Damit kann zum jetzigen Zeitpunkt keine verlässliche Bewertung der Unbedenklichkeit dieses Abbauprodukts getroffen werden.

Literaturverzeichnis

1. **Bajaj, S., Singla, D. und Sakhuja, N.:** Stability Testing of Pharmaceutical Products. *J. App. Pharm. Sci.* 2012, 2,3, S. 129-138.
2. **Europ. Ag. f. d. Beurt. v. Arzenim [Hrsg.]:** Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). 2003.
3. **Blessy, M. u. a.:** Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. *J. Pharm. Anal.* 2014, 4,3, S. 159-165.
4. **Xiao, K.:** Degradation Chemistry and Product Development. *Analytical Scientists in Pharmaceutical Product Development: Task Management and Practical Knowledge.* Hoboken, NJ : John Wiley & Sons, 2021.
5. **Astles, A. M., Snape, T. J. und Davi, J.:** Understanding the chemical basis of drug stability and degradation. *Pharm. J.* 9. Oktober 2010.
6. **Hovorka, S. und Schöneich, C.:** Oxidative degradation of pharmaceuticals: theory, mechanisms and inhibition. *J. Pharm. Sci.* März 2001, 90,3, S. 253-269.
7. **Fenton, H. J. H.:** Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Chem Soc Trans.* 1894, 65, S. 899–910.
8. **Ameta, R. u. a.:** Fenton and Photo-Fenton Processes. *Advanced Oxidation Processes for Waste Water Treatment.* Cambridge, MA : Academic Press, 2018, S. 49–87.
9. **Europ. Dir. f. d. Qual. v. Arzneim. [Hrsg.]:** Phenylephrin (Eintrag 1035). *Europ. Arzneibuch.* 10. Ausgabe. 2020 (Grundwerk), S. 528off.
10. **Europ. Dir. f. d. Qual. v. Arzneim. [Hrsg.]:** Phenylephrinhydrochlorid (Eintrag 0632). *Europ. Arzneibuch.* 10. Ausgabe (Grundwerk). 2020, S. 5282ff.
11. **Starke, K.** Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme. Aktories, K. und Förstermann, U. [Hrsg.]. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 12. Auflage. München : Elsevier GmbH, 2017, S. 137ff.
12. **Bracher, F. u. a. [Hrsg.]:** Phenylephrinhydrochlorid (Eintrag 0632). *Arzneibuch-Kommentar.* 42. Lfg. Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2015.
13. **Trommer, H., Raith, K. und Neubert, R. H.:** Investigating the degradation of the sympathomimetic drug phenylephrine by electrospray ionisation-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 52,2, S. 203-209.

14. **Jansen, J. J., Oldland, A. R. und Kiser, T. H.:** Evaluation of phenylephrine stability in polyvinyl chloride bags. *Hosp. Pharm.* 2014, 49,5, S. 455-457.
15. **Kiser, T.H., Oldland, A.R. und Fish, D.N.:** Stability of phenylephrine hydrochloride injection in polypropylene syringes. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2007, 64,10, S. 1092-1095.
16. **Dréno, C., Gicquel, T., Harry, M. u. a.:** Formulation et étude de stabilité d'un collyre pédiatrique de chlorhydrate de phényléphrine à 2 %. *Ann. Pharm. Fr.* 2015, 73,1, S. 31-36.
17. **Wouters, I., Roets, E. und Hoogmartens, J.:** Analysis of tablets containing acetylsalicylic acid and phenylephrine by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1984, 2,3-4, S. 481-490.
18. **Chafetz, L. und Chow, L. H.:** Photochemical hydroxylation of phenylephrine to epinephrine (adrenaline). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1988, 6,5, S. 511-514.
19. **Marín, A. u. a.:** Major degradation product identified in several pharmaceutical formulations against the common cold. *Anal. Chem.* 15. Jänner 2005, 77,2, S. 471-477.
20. **Wong, J. u. a.:** Major degradation product identified in several pharmaceutical formulations against the common cold. *Anal. Chem.* 15. November 2006, 78,22, S. 7891-7895.
21. **Chan, T.M. u.a.:** Syntheses of Potential Degradation Products of Phenylephrine in OTC Products. *Synth. Comm.* 2008, 38,13, S. 2252-2260.
22. **Rezk, M. R. u. a.:** Chromatographic Determination of Cyclopentolate Hydrochloride and Phenylephrine Hydrochloride in the Presence of Their Potential Degradation Products. *J. AOAC Int.* 2017, 100,2, S. 434-444.
23. **Böckler, F. u. a. [Hrsg.]: RÖMPP [Online].** Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2022.
24. **Schettgen, T. und Alt, A.:** Dimethylbenzoesäuren – Metabolite des Trimethylbenzols. *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe: Analysen in biologischem Material.* 2012, 19. Lieferung.