

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly lé iv

Kapillarelektrophoretische Bestimmung von Lactulose

Determination of Lactulose by capillary zone electrophoresis

(Stanovení laktulosy pomocí kapilární elektroforézy)

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Martin Doleflal, Ph.D.

Dr. Bodo Lachmann*

V Hradci Králové, 2011

Kristýna Holcová

*Diese Arbeit wurde als ein Teil des Erasmus-Programms an der Universität Wien im Department für Medizinische/Pharmazeutische Chemie durchgeführt.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass diese Arbeit mein ursprüngliches Werk ist. Die gesamte Literatur und andere Quellen, die ich während der Bearbeitung genutzt habe, sind in einer Liste der verwendeten Literatur angegeben und genau zitiert.

Prohlá-uji, že tato práce je mým p-vodním autorským dílem. Ve-kerá literatura a dal-í zdroje, z nichž jsem p-i zpracování-erpala, jsou uvedeny v seznamu pouflité literatury a v práci-ádn citovány.

V Hradci Královéí í í í í í í .

í í í í í í í í í í í í í í í í ..

Danksagung

Für das interessante Thema für meine Diplomarbeit, für die Einführung in wissenschaftliche Arbeit im Labor, für Hilfe, Geduld und Verständnis, möchte ich mich bei Dr. Lachmann sehr bedanken.

Bei Frau Kopelent möchte ich mich für nützliche Ratschläge und für eine Möglichkeit, wienerische Kultur kennenzulernen, bedanken.

Ich möchte mich bei Doc. PharmDr. Martin Doleflal, Ph.D., für seine Hilfe mit Abschluss der Arbeit bedanken.

Ich möchte mich auch bei Karls-Universität und Universität Wien für die Möglichkeit bedanken, an ERASMUS-Programm teilzunehmen.

Bei meinen Eltern und bei meiner Schwester möchte ich mich für eine Unterstützung bedanken.

Abstrakt

Stanovení laktulose pomocí kapilární elektroforézy

Kristýna Holcová

Pro analýzu cukru existuje mnoho metod. Kapilární elektroforéza (CE), vysokou i jiná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a další. Nejčastěji využívanou metodou je HPLC, ale i další metody mají své nesporné výhody.

Jednou z již popsaných, kapilárně-elektroforetických metod je separace sacharidů v alkalickém prostředí po komplexaci s malonátiými ionty s pomocí UV detekcí bez potřeby předchozí derivatizace. Tato metoda byla zkoušena pro jednoduché cukry, disacharidy, a některé aminokyseliny i anorganické kationty.

V této práci jsem aplikovala výše zmíněnou metodu na problematiku stanovení osmotického laxancia laktulose. Laktulosa je po chemické stránce disacharid a v komerčně vyráběných léčivých přípravcích se nachází ve formě sirupu. Metoda byla přizpůsobena přístrojovému vybavení a specifikám testované látky. Byla prokázána specifita metody i správnost a stanovení korelační faktor (0,9994). U vybraných vzorků pak byla provedena kvalitativní i kvantitativní analýza.

Abstract

Determination of Lactulose by capillary zone electrophoresis

Kristýna Holcová

A lot of sugar analysis methods exist. Capillary Electrophoresis (CE), High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gas Chromatography (GC), Thin-Layer Chromatography (TLC) etc. HPLC is the method which is most used, however other methods have also some advantage.

One of the already described capillary electrophoresis methods is the carbohydrate separation in alkaline medium after chelation with copper(II) ions with direct UV detection without need of previous derivatization. It has been tested for simple sugars, disaccharides, some amine-acids and inorganic cations.

I applied capillary electrophoresis method mentioned above on questions of setting up osmotic laxantium lactulose. Lactulose is disaccharide from the chemistry point of view. It appears in molasses form in commercial medicaments. The method has been suited to the apparatus used during the research and tested substance. It has been proved the specificity and accuracy of the method and it has been set up correlative factor (0,9994). Quality and quantity analysis has been applied on chosen samples.

Liste der Abkürzungen

AMD-HPTLC-High-Performance Thin-Layer Chromatography verbunden mit Automated Multiple Development

CE- Kapillarelektrophorese

CGE- Kapillargelelektrophorese

CMC -kritische micellare Konzentration

CZE- Kapillarzonenelektrophorese

DAD-Diode array detector

EC- Elektrochromatographie

EOF- Elektroosmotischer Fluss

FA- Flow analysis

GC- Gas Chromatographie

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

ICH-International conference of harmonisation

I.D.- Innendurchmesser

IEF- Isoelektrische Fokussierung

MEKC- Micellar-elektrokinetische Chromatographie

PAD-Puls-amperometrisch-Detektor

TLC- Thin-Layer Chromatography

Inhalt

| | |
|--|----|
| 1. Theoretisches Teil..... | 8 |
| 1.1. Einleitung | 8 |
| 1.2. Lactulose | 9 |
| 1.3. Bestimmungsmöglichkeiten der Lactulose | 13 |
| 1.4. Lactulose in der Literatur | 15 |
| 1.5. Kapillarelektrophorese (CE)..... | 17 |
| 1.6. Validierung | 27 |
| 2. Ziel der Arbeit | 31 |
| 3. Experimentales Teil | 32 |
| 3.1. Material | 32 |
| 3.2. Entwicklung der Methode | 37 |
| 3.3. Auswahl des internen Standards..... | 54 |
| 3.4. Validation | 54 |
| 3.5. Messung der kommerziellen Präparaten | 61 |
| 4. Ergebnisse und Diskussion | 66 |
| 4.1. Ergebnisse der Methodenentwicklung und Optimierung..... | 66 |
| 4.2. Ergebnisse der Auswahl des internen Standards | 71 |
| 4.3. Ergebnisse der Validation | 72 |
| 4.4. Ergebnisse der Probenmessung | 76 |
| 5. Zusammenfassung | 79 |
| 6. Shrnutí..... | 80 |
| 7. Quellenverzeichnis..... | 81 |
| 8. Lebenslauf | 84 |

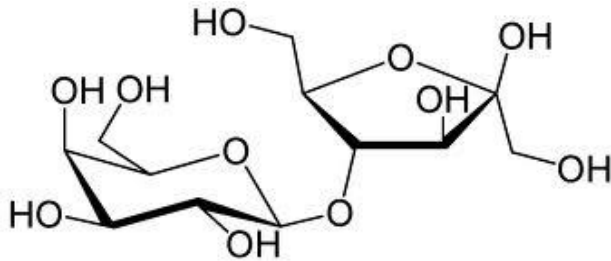
1. Theoretisches Teil

1.1. Einleitung

Es sind viele Methoden zur kapillarelektrophoretischen Analyse von Zucker bekannt. Die meisten von ihnen basieren entweder auf einer vorgeschalteten Derivatisierungsreaktion oder auf der Verwendung eines UV-aktiven Hintergrundelektrolyten und indirekter UV-Detektion. Die Möglichkeit der Derivatisierung besteht allerdings nur dann, wenn funktionelle Gruppen vorhanden sind, die selektiv mit einem Derivatisierungsreagenz umgesetzt werden können. Dies ist im allgemeinen bei allen reduzierenden Zuckern der Fall, hier bietet die Carbonylgruppe der offenkettigen Form einen Angriffspunkt für die Umsetzung z. B. mit primären Aminen über die Schiffschen Basen zu den entsprechenden Aminoalditolen. Diese Möglichkeit besteht bei nicht-reduzierenden Zuckern nicht, hier kommt nur die indirekte Detektion bzw. elektrochemische Methoden in Frage. Eine Alternative hierzu, die im Vergleich zur indirekten Detektion einige Vorteile aufweist, und im Unterschied zu elektrochemischen Methoden nur ein kapillarelektrophoretisches Gerät mit UV-Detektor benötigt, das in den meisten Laboren vorhanden ist, ist die Komplexbildung mit verschiedenen Metallionen. Hierbei ist vor allem die kapillarelektrophoretische Bestimmung von Kohlenhydraten unter alkalischen Bedingungen nach Komplexbildung mit Kupfer(II)-Ionen hervorzuheben. Die Komplexbildung geschieht direkt in der Trennkapillare (zwischen dem Zucker und den Kupferionen des Puffers). Da diese Zucker-Kupferkomplexe im UV-Bereich absorbieren, ist eine direkte Detektion möglich, damit ist es eine einfache und effektive Methode.

1.2. Lactulose

1.2.1. Eigenschaften



$C_{12}H_{22}O_{11}$

CAS Nr. 4618-18-2

M_r 342,3

Definition:

4-*O*-(β -D-Galactopyranosyl)-D-arabino-hex-2-ulofuranose

(Es ist ein Disaccharid aus β -D-Galactose und β -D-Fructose, die über die β -OH-Gruppe an C-1 der D-Galactose zur Hydroxygruppe an C-4 der Fructose verknüpft sind.)

Gehalt: 95,0 bis 102,0 Prozent (wasserfreie Substanz)¹

Eigenschaften:

Reine Lactulose ist ein weißes bis fast weißes, süß schmeckendes, kristallines Pulver, das leicht löslich in Wasser, wenig löslich in Methanol und praktisch unlöslich in Toluol ist. Schmelztemperatur ist etwa 168°C. Der Süßungsgrad liegt zwischen 0,48 und 0,62 (Sacharose = 1). Die Substanz ist stark hygroskopisch und neigt zur Sirup-Bildung.²

Stabilität:

Unter sauren Bedingungen wird Lactulose in D-Galactose und D-Fructose gespalten. Bei Einwirkung von Licht und Luft färbt sich eine wässrige Lösung von Lactulose braun.²

Lactulose kommt zur Anwendung sowohl als Wirkstoff als auch als Hilfsstoff für Pulver zum Auflösen, Granulate, Tabletten und Retardkapseln. In dieser Arbeit werde ich mich aber hauptsächlich mit Lactulose als Wirkstoff beschäftigen und zwar mit der Anwendung als Sirup.

1.2.2. Lactulose-Sirup

Definition:

Wässrige Lösung von 4-O- (-D-Galactopyranosyl)-D-arabino-hex-2-ulofuranose, die normalerweise durch alkalische Isomerisierung von Lactose gewonnen wird.¹

Die Substanz kann geringe Mengen anderer Zucker wie Lactose, Epilactose, D-Galactose, D-Tagatose und D-Fructose enthalten, die bei der Darstellung von Lactulose aus Lactose als Nebenprodukte gebildet werden. Ein geeignetes Konservierungsmittel kann verwendet werden.¹

Gehalt: mindestens 620g/l Lactulos, zwischen 95,0 bis 105,0 Prozent des deklarierten Gehaltes an Lactulose.¹

Relative Dichte d_{20}^{20} : von 1,296 bis 1,380

Eigenschaften:

Es ist eine klare bis schwach opaleszierende, farblose bis blass-bräunlich-gelbe, viskose Flüssigkeit, die mit Wasser mischbar ist und eine übersättigte Lösung sein kann, bzw. Kristalle enthalten kann, die sich beim Erwärmen auflösen.¹

Stabilität:

Licht und Luft wirken auf Lactulose-Sirup gleich wie auf Lactulose. Sie verursachen auch eine Braunfärbung. Durch saure Hydrolyse wird Lactulose-Sirup auch in D-Galactose und D-Fructose gespalten, bei Behandlung mit Alkali erfolgt Bildung von z. B. Epi-Lactose oder Tagatose.²

Abbauprodukte und Verunreinigungen:

4-*O*-(-D-Galactopyranosyl)-D-mannopyranose (Epilactose)

Galactose

Lactose

Fructose

D-*lyxo*-Hex-2-ulopyranose (Tagatose) ¹

1.2.3. Pharmakologische Eigenschaften:

Lactulose-Sirup gehört wie die anderen nicht-resorbierten Kohlenhydraten (Glycerin, Sorbitol oder Mannitol) zu den Osmotischen-Laxantien, sie wird außerdem auch zur Therapie und Prophylaxe der hepatischen Enzephalopathie, die durch toxische Stickstoffverbindungen verursacht wird, oder Divertikulose verwendet. Lactulose wird sogar bei Sanierungsversuchen von Salmonellen-Dauerausscheider angewendet.^{3,4}

Pharmakokinetik:

Aus dem Gastrointestinal-Trakt wird nur cca. 0,4 bis 2 % der Lactulose nach der peroralen Applikation resorbiert. Diese kleine Menge wird renal, biliär und auch fäkal exkretiert. Der Hauptbiotransformationsort ist der Dickdarm, wo das Disaccharid bakteriell (dank *Lactobacillus* und *Bacteroides*) zu Fructose und Laktose und folgend zu organischen Säuren, dem Hauptmetaboliten Milchsäure und dann zu Essigsäure und Ameisensäure metabolisiert wird. Andere entstehende Metaboliten wie Wasserstoff oder Methan werden nach Resorption ausgeatmet.^{2,5}

Pharmakodynamik:

Osmotische Wirkung:

Lactulose wird aus dem Gastrointestinal-Trakt nicht resorbiert und zum osmotischen Effekt tragen ihre Metaboliten bei, die Wasser binden, den Darminhalt vermehren und die Passage eines weichen, geformten Stuhls bewirken. Dank der organischen Säuren sinkt auch der intraluminalen pH-Wert, dies verstärkt die Motilität und Sekretion.^{2,3}

Therapie und Prophylaxe der hepatischen Enzephalopathie:

Leberzirrhose oder Leberinsuffizienz ist einer der Erkrankungen, die hepatische Enzephalopathie verursachen können, weil die Fähigkeit der Leber, im Organismus entstehendes NH_3 abzubauen, reduziert wird. Lactulose wird eingesetzt um den pH-Wert im Dickdarm dank der sauren Metaboliten zu senken. Bei der Verdauung im Intestinaltrakt entstehendes NH_3 wird protoniert zu Ammonium-Ionen und deswegen wird die Resorption verschlechtert, weil NH_4^+ im Gegensatz zu NH_3 die Darmschleimhaut nicht zu durchdringen vermag. Aus Plasma ins Darmlumen nachdiffundierendes Ammoniak wird auch protoniert und dort zurückgehalten. pH-Senkung kann auch die bakterielle Ammoniaksynthese reduzieren und der Kohlenhydratüberschuss im Darm bewirkt ein relatives Stickstoffdefizit für die Bakterienflora, so dass ein Mehrverbrauch von Ammoniak durch die Mikroben resultiert.⁵

Saure Bedingungen im Darmlumen können auch das Wachstum bestimmter Keime wie Salmonellen oder Shigellen hemmen.^{3,4}

Dosierung:²

| | Chronische Obstipation | Hepatische Enzephalopathie | Salmonellen- Dauerausscheider |
|-------------------|---|---|--|
| Erwachsene | 10 bis 20g Lactulose pro Tag verteilt auf 1 bis 2 Einzelgaben; Erhaltungsdosen 7 bis 10 g | Männer 60 bis 100g, Frauen 70 bis 120g verteilt auf 3 bis 4 Einzelgaben pro Tag, wobei das Ziel zwei bis drei weiche Stuhlgängen mit einem fäkalen pH 5 - 5,5 sein sollte | kurmäßig über 10 bis 12 Tage 3-mal täglich 10g; in der folgenden behandlungsfreien Woche bakteriologische Stuhlkontrolle und wenn nötig, z.B. wenn der pH-Wert der Fäzes nicht genügend senkt, weitere Behandlungszyklen mit höherer Dosierung |
| Kinder | 3 bis 6 g einmal bis zweimal pro tag | | Initial 3-mal täglich etwa 4 g Lactulose |

Nebenwirkungen:

Während Einleitung der Therapie können gastrointestinale Beschwerden wie Meteorismus, Flatulenz, Diarrhöen, Übelkeit, Erbrechen, Kämpfe oder Schmerzen auftreten, die aber später nachlassen. Bei Überdosierung kann Diarrhö mit Wasser- und Elektrolytverlust von Kalium-Ionen, Hybernatriämie und Verschlechterung der hepatischen Enzephalopathie auftreten, im Einzelfall auch Lactat-Acidose.^{2,4}

Kontraindikationen:

Darmverschluss, Galactose-Intoleranz, akut entzündliche Magen-Darm-Erkrankung, Störung des Wasser-Elektrolythaushaltes, Lactose- und Fructose-Intoleranz, Galactosämie, Glucose-Galactose-Malabsorptionssyndrom; Vorsicht bei Patienten mit Diabets mellitus; während der Schwangerschaft und Stielzeit ist Lactulose nicht kontraindiziert.^{2,3}

Interaktionen:

Antibakteriell wirkende Substanzen, die den bakteriellen Metabolismus von Lactulose verhindern und anderen Laxantien oder Antacida, die die Ansäuerung des Lumeninhalts abschwächen, können die Wirkung von Lactulose vermindern. Eine Verstärkung des Kaliumverlustes kann durch gleichzeitige Behandlung mit Thiazid-Diuretika, Corticosteroiden, Carbenolox oder Amphotericin auftreten. Kalium Verlust kann die Wirkung von Herzglykosiden verstärken.²

1.3. Bestimmungsmöglichkeiten der Lactulose

Lactulose ist ein Disaccharid und zusammen mit den anderen Disacchariden gehört es zur Gruppe der Kohlenhydrate. Die Entwicklung der analytischen Methoden wurde von den allgemeinen Eigenschaften der Kohlenhydrate beeinflusst. Zu diesen Eigenschaften gehören z. B. Polyfunktionalität, die Fähigkeit Komplexe zu bilden, eine neutrale Ladung, die Abwesenheit von Chromophoren oder die pK_a -Werte der Hydroxylgruppen zwischen 12 und 13.⁶

Im Arzneibuch werden als Bestimmungsmethoden, außer den einfachen chemischen Reaktionen und Messung des pH-Wertes, die Spezifische Drehung, Dünnschichtchromatographie oder Flüssigchromatographie verwendet.¹ Zu den älteren Methoden gehören aber auch die relative Dichte, der Brechungsindex bzw. die

Schmelztemperatur. Neben Kapillarelektrophorese, womit ich mich später noch besonders beschäftigen werde, und HPLC^{12, 13}, die ich schon erwähnt habe, ist heute auch eine üblich angewendete analytische Methode zur Bestimmung von Lactulose und von anderen Kohlenhydrate GC¹³. Es gibt aber auch einige besondere Methoden, wie zum Beispiel: Spektrophotometrische Methoden (Lactulose wird bestimmt dank der farbigen Reaktionsprodukte nach hydrolytischer Spaltung durch saure oder enzymatische Hydrolyse)¹², FA(Flow analysis)¹², oder AMD-HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography verbunden mit Automated Multiple Development)¹³.

Kapillarelektrophoretische Verfahren zur Bestimmung von Zuckern

Obwohl Lactulose und Zucker im Allgemeinen, nicht die optimalen Eigenschaften zur Bestimmung durch CE haben, wurde eine große Menge von Verfahren entwickelt. Am häufigsten werden Kapillarzonenelektrophorese (CZE) und Micellar-elektrokinetische Chromatographie (MEKC) angewendet. Dabei ist auch die Bestimmung von Zuckerenantiomeren möglich. Damit Zuckern eine Eigenmobilität im elektrischen Feld gewinnen und gut detektierbar sind, werden folgende Verfahren zur Bestimmung ausgenutzt:

- Bestimmung von Kohlenhydraten in stark alkalischen Medien
- Bestimmung von Kohlenhydraten nach Derivatisierung
- Bestimmung von Kohlenhydraten nach Komplexierung mit Borationen
- Bestimmung von Kohlenhydraten nach Komplexierung mit Metallionen⁶

Kohlenhydrate sind schwache Säure mit pK_a -Werten zwischen 12 und 13, damit kommt es zur Dissoziation und Entstehung negativ geladener Spezies erst bei pH-Wert oberhalb von 12. Erst dann bekommen die Zucker eine Eigenmobilität im elektrischen Feld und die Trennung ist möglich. Die Bestimmung von Kohlenhydrat nach Derivatisierung ist auch sehr verbreitet und hat den Vorteil einer Verbesserung der Nachweisgrenzen und schärferer Signale. Durch Komplexierung mit Borationen bekommen die Zucker auch eine Ladung. Mit Borationen bilden die Zucker negativ geladene Komplexe. Für meine Arbeit ist aber am wichtigsten war die Möglichkeit der Bildung von Kohlenhydrat-Metall-Komplexe. Verschiedene zwei- und dreiwertige Metallkationen bilden mit mehrwertigen Alkoholen positiv geladene Komplexe, deren Stabilität von der Konfiguration der beteiligten Hydroxylgruppen abhängt. So führt der Zusatz von verschiedenen Metall-Ionen zu wässrigen Zuckerlösungen zu positiv geladenen Metall-Aldose-Komplexen. Auch diese Komplexe lassen sich kapillarelektrophoretisch

trennen, bei Verwendung von z. B. Erdalkalitionen als Pufferkomponente können die entsprechenden positiv-geladenen Derivate nachgewiesen werden.⁶

Die Fähigkeit der Kohlenhydrate einen Komplex mit Kupfer-Ionen in ammoniakalischer Lösung zu bilden wurde schon im Jahr 1950 von Richard E. Reeves⁸ beschrieben. Er hat festgestellt, dass ammoniakalisches Kupfer (die Lösung bestand aus 0,01M Kupfer, 3M Ammoniak und 10 ml Ethanol pro Liter) mit D-Mannosan(1,6-anhydro- β -D-Mannopyranose) einen Komplex bilden, der im UV-Bereich sichtbar ist, eine Erhöhung der Absorption in diesem Bereich verursacht sowie eine Verschiebung des Drehwertes. An der stöchiometrischen Reaktion hierbei, sind ein Mol der D-Mannosan und ein Mol Kupferammonium beteiligt. E. J. Bourne et al.⁹ hat sich auch mit der Bildung der Komplexe zwischen Polyhydroxy-Verbindungen und Kupfer(II) beschäftigt. Ihm ist es gelungen, durch Papierelektrophorese (als Elektrolyt benutzte er 5% $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 5,1, oder 5% $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot \text{CuO} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 5,1-5.3) und Chromatographie auf der Cu^{2+} Form eines Kationenaustauscherharzes einige Polyhydroxy-Verbindungen zu trennen. Für ähnliches interessierte sich auch J. Briggs et al.¹⁰ Er erforschte die Dünnschichtchromatographie von Polyhydroxy-Verbindungen unter Zusatz von Natrium, Magnesium, Aluminium, Kalzium, Strontium, Zink, Cadmium, Barium und Kupfer. Hauptsächlich mit Kupfer(II), als Zentralatom, ist die Methode als eine einfache, billige und schnelle Methode beschrieben.

Meine Arbeit basiert auf einer Methode, die A. Bazzanella und K. Bächmann entwickelt haben und die in ihrem Artikel: "Separation and direct UV detection of sugars by capillary electrophoresis using chelation of copper(II)" erklärt wurde.¹¹ Die Zucker wurden unter alkalischen Bedingungen nach Komplexierung mit Kupfer(II)ionen ohne Derivatisierung nachgewiesen. Eine Beziehung zwischen Konzentration der Kupfer und Mobilität wurde beschrieben. (Die Mobilität steigt mit steigender Konzentration der Kupferionen im Puffer.) Die Detektionsgrenze liegen hierbei zwischen 50-100 M. Mit demselben Puffer ist es auch möglich, Aminosäure und anorganische Kationen zu trennen.

1.4. Lactulose in der Literatur

Eine Literaturrecherche in Chemical Abstract wurde durchgeführt, und nur wenig im Zusammenhang von Lactulose und Kapillarelektrophorese wurde gefunden.

Bis jetzt publizierte Bestimmungsmethoden von Lactulose in Nahrungsmittel wurde in einem Review von Zhong Zhang et al.¹² zusammengefasst. Spektrophotometrische Methoden, HPLC, Gas Chromatographie (GC), Flow Analysis (FA) und am Rande auch Kapillarelektrophorese wurden beschrieben. Dieser Publikation nach, sind die geeignetste Methoden HPLC und GC. Diese beiden Methoden zeichnen sich durch hohe Effektivität und Genauigkeit aus, allerdings sind häufig Derivatisierungen notwendig. Zur CE von Lactulose ist hingegen wenig bekannt.

Ein anderer Review wurde von C. Martínez Montero et al.¹³ publiziert. In dieser Arbeit werden ausführlich alle Möglichkeiten der Bestimmung von Kohlenhydrate in Nahrungsmittel beschrieben. Diese Studie beschäftigt sich mit den Hauptgruppen der Kohlenhydraten: Monosacchariden, Disacchariden, Trisacchariden, Oligosacchariden und mit vielen anderen verwandten Verbindungen. Besprochen wurden wieder nicht nur die Standardmethoden zur Bestimmung wie HPLC und GC sondern auch CE und High Performance Thin-Layer Chromatography with Automated Multiple Development (AMD-HPTLC). Zur CE wurden verschiedene Trennmethoden und Detektionsmöglichkeiten angegeben

In einem Artikel von Rita Paroni et al.¹⁴ wurde die Intestinalpermeabilität der Lactulose und Mannitol in Zusammenhang mit Darmerkrankungen und Diabetes Mellitus untersucht. Lactulose und Mannitol wurden hier mittels CE unter folgenden Bedingungen mittels indirekter UV-Detektion bestimmt: Kapillare: 27/20 cm, I.D. 50 µm; Puffer: 6mmol/L sorbic acid, 1.25mmol/L Cetyltrimethylammoniumbromid, 50mmol/L LiOH (pH 12.5); Spannung: -5kV (umgekehrte Polarität), Detektion: UV, 254 nm.

6mM sorbic acid als Puffer (mit pH 12,1) haben auch A.E. Vondran, P.J. Oefner und G.K. Bonn¹⁵ benutzt um Kohlenhydrate mit indirekter UV Detektion zu trennen. In einer anderen Arbeit hat sich A.E. Vondran mit P.J. Oefner et al.¹⁶ mit der Trennung von Zuckern nach Derivatisierung mit p-Aminobenzoic acid oder Ethyl-p-aminobenzoate beschäftigt.

Es wurde keine Literatur zur direkten UV-Bestimmung von Lactulose mittels Kupferkomplexen gefunden.

1.5. Kapillarelektrophorese (CE)

Kapillarelektrophorese ist heute ein universelles, vielseitiges, mit hoher Geschwindigkeit wachsendes, instrumentell-analytisches Trennverfahren, das zuerst im Bereich der Biochemie und Molekularbiologie zur Analyse der Peptide, Proteine, Oligosaccharide, DNA oder RNA eingeführt wurde. Später hat sich Kapillarelektrophorese auch in der pharmazeutischen Industrie, in der Zellbiologie, in der Umweltanalytik und auch in der chemischen Großindustrie durchgesetzt und wurde erfolgreich nicht nur zur Trennung der kleinen Ionen, neutralen Molekülen, großen Biomolekülen oder künstlich hergestellten Makromolekülen und Zellen, sondern auch zur Physikalisch-Chemischen Forschung verwendet und hat ihr Platz sowohl in der medizinischen Diagnostik als auch in der Nahrungsmittelindustrie.²¹

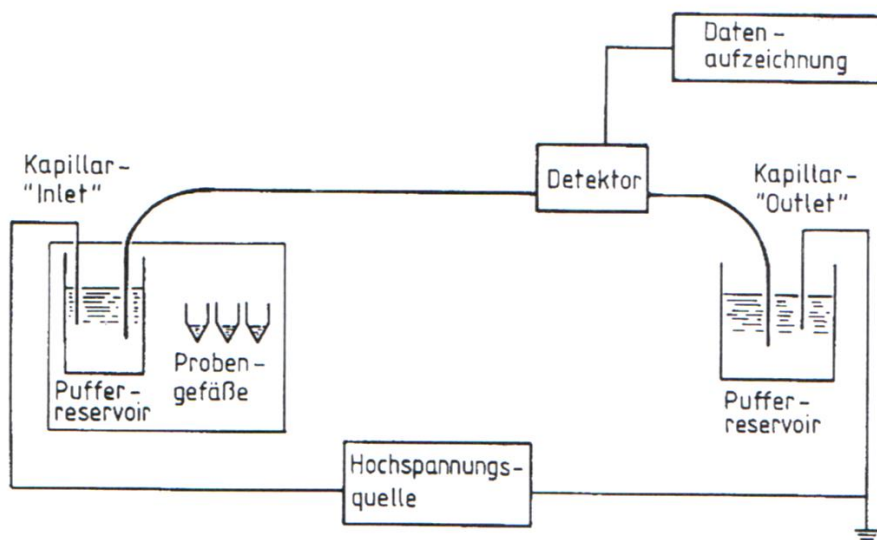
Grundlagen dieses Verfahrens wurden vor mehr als 100 Jahren gelegt, als die Fähigkeit der geladenen Atomen oder Molekülen in Lösung unter Einfluss eines angelegten elektrischen Felds mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und in unterschiedliche Richtung zu wandern, entdeckt wurde. (Wanderungsgeschwindigkeit ist wegen der unterschiedlichen Ladungszahlen und dem zu Folge wegen der unterschiedlichen Mobilität im elektrischen Feld oder durch verschiedenen Reibungswiderstand aufgrund unterschiedlicher Größe bei gleicher effektiver Ladung verursacht. Migrationsrichtung wird durch die Ladung der Ionen vorgegeben.) Dieses Prinzip wurde zuerst von Kohlrausch in 1897 genau beschrieben. Von dieser Zeit an bis zur Anwendung der Elektrophorese als analytische Methode sind jedoch noch 33 Jahre vergangen. Elektrophorese als Analysenmethode für Proteine wurde 1930 von Tiselius entwickelt. Seit 1940 wurde als antikonvektives (Konvektion = thermische Strömungen, entstehend durch Joulesche Wärme bei der Elektrophorese) Unterstutzungsmedium das Filterpapier für Trennung der ionisierten Verbindungen (Aminosäuren, Fette, Nukleotide, geladene Zucker) eingeführt. Weitere Verbesserungen haben Polyacrylamid- und Agarosegele als Unterstutzungsmedium gebracht. In Laufe der Zeit überwogen aber zahlreiche Mängel und Nachteile, wie die schwierig reproduzierbare Herstellung und Handhabung der auf Glassplatten gegossenen Gele, Joulesche Erwärmung, lange Analysenzeit, Unmöglichkeit der direkte Detektion und potentielle Wechselwirkungen zwischen Proben und Gelmatrix so dass nach Wegen gesucht wurde, diese Methode zu verbessern. Eine Entwicklung, diese Nachteile zu kompensieren, bestand in der Durchführung der Analyse in dünnen Röhren. Diese Innovation hat einige bis jetzt vorkommende Probleme gelöst, da in dünnen Röhren die Konvektion relativ gering ist; die große Oberfläche der Kapillare ermöglicht zusätzlich eine

gute Wärmeabführung und deswegen können größere Feldstärken angelegt werden und kürzere Analysenzeit erzielt werden. Ausserdem konnte die direkte Detektion ermöglicht werden und weitere Verbesserungen waren möglich. Erste Trennungen in einer offenen dünnen Glasröhre mit 3mm Innendurchmesser wurden in 1958 von Hjertén gezeigt. Die Eigenschaften der Kapillare wurden später zum Beispiel durch Methylcellulosebelegung der Glasoberfläche oder durch Teflonanwendung verbessert. Aber der wirkliche Durchbruch kam, als Jorgeson 1981 eine offene Quarzkapillare mit 75 μ m Innendurchmesser und eine Spannung von 30 kV verwendete.¹⁷

1.5.1. Gerätetechnik

Die Grundbestandteile der Kapillarelektrophorese sind eine *fused-Silica*-Kapillare (fused-Silica = amorpher Quarz SiO_2), eine Hochspannungsversorgung, zwei Elektroden, zwei Pufferreservoirs und ein on-Colum-Detektor. Heute sind die Geräte verbessert und mit vielen zusätzlichen Bestandteilen, die die Arbeit mit der CE erleichtern und genauer machen, ausgestattet. Unter diese Bestandteile gehören zum Beispiel: Probengeber, Fraktionssammler, Injektionssystem, oder effektiver Kapillarthmostatisierungseinheit. Eine Verknüpfung des Detektors mit einem Datenaufnahme- und Verarbeitungssystem (mit einem PC) ist heute schon eine Selbstverständlichkeit und es gibt die Möglichkeit einen Autosampler zu verwenden.¹⁹

Abb. 1. Grundbestandteile der Kapillarelektrophorese.¹⁹



Bei der CZE (Kapillarzonenelektrophorese) wird mit einer unbeschichteten Quarzkapillare gearbeitet. Am anodischen Ende der Kapillare wird die Probe aufgebracht, beide Ende der Kapillare und beide Elektroden werden dann in die Puffergefäße getaucht und Spannung wird angelegt. In der Kapillare kommt es zur Trennung und am kathodischen Ende werden die getrennten Substanzen detektiert. Vor dem Beginn und nach dem Abschluss der Trennung, ist es gut, die Kapillare zu spülen, damit alle Verunreinigungen entfernt werden.¹⁸

Spannungsquelle

Die Spannungsquelle sollte in der Lage sein, die Spannung im Bereich von $\pm 30\text{kV}$ bis $+30\text{kV}$ einzustellen und den Wert konstant zu halten.¹⁹

Kapillaren

Als günstigste und vielseitigste Kapillare wird heute die Quarzkapillaren aus geschmolzenem SiO_2 mit Innendurchmesser von $50\ \mu\text{m}$ bis $100\ \mu\text{m}$ (erhältlich sind aber Kapillare mit I.D. von $2\ \mu\text{m}$ bis $250\ \mu\text{m}$) verwendet. Auf der äußeren Oberfläche hat die Kapillare eine Polyamid- oder Teflonbeschichtung, die vor der Verwendung an der Stelle des Detektionsfensters durch Abbrennen entfernt werden muss. Die Glass- oder Kunststoffkapillaren haben nicht immer ausreichende Durchlässigkeit im kurzwelligen UV-Bereich. Am häufigsten werden unbehandelte und unmodifizierte Kapillaren eingesetzt.¹⁹

Injektionstechniken

Die Probe muss unbedingt immer reproduzierbar und so genau wie möglich aufgegeben werden. Das ist bei sehr kleinen Probevolumina im Bereich von 2nL bis $20\ \text{nL}$, die für CE verwendet werden, immer ein Problem. Um dieses Problem zu lösen wurden einige miniaturisierte und automatisierte Injektionsarten entwickelt. Es gibt zum Beispiel Elektrokinetische-, Hydrostatische-, Hydrodynamische-Injektion oder Injektion durch Probensplit-System. Am häufigsten wird Druck-Injektion (gehört mit der Vakuum-Injektion zu den Hydrodynamische-Injektionen) benutzt: die Probe wird durch Anlegen einer Druckdifferenz zwischen Probengefäß und Kapillarende aufgegeben (der Druck beim Probengefäß wird erhöht, oder am Kapillarende wird der Druck verringert).¹⁹

Detektion

Die Detektion wird meistens direkt in der Trennkapillare durchgeführt, man nennt das *on-column* Detektion. Die Mehrheit der Detektoren sind eigentlich modifizierte HPLC-Detektoren.

Am häufigsten werden folgende Detektionsprinzipien verwendet: UV-Absorption (für Aromatische Verbindungen, Proteine, Nukleinsäure), Indirekte Absorption (für Metallionen, Amine, organische und anorganische Ionen, Zucker), Fluoreszenz (für derivatisierte Aminosäuren, DNA, Peptide), Laserfluoreszenz (für DNA-Fragmente, derivatisierte Aminosäuren), Amperometrie (PAD für leichtreduzierbare und oxidierbare Substanzen, z.B.: Neurotransmitter), Konduktometrie (für ionische Probe, z.B.: Metallionen, Amine, Carbonsäuren), Potentiometrie mit ionenselektiven Mikroelektroden (für Alkali- und Erdkaliionen) und unter anderem auch DAD. Nicht alle sind aber kommerziell erhältlich.^{18,19}

1.5.2. Theoretische Grundlagen der CE

Hier werden einige für alle elektrophoretischen Trennmethode wichtige Grundlagen erwähnt, die eigentlich die Methode ermöglichen und einen Einfluss auf das analytische Ergebnis haben.

Elektrophoretische Wanderung

In einem elektrischen Feld bewegen sich Ionen mit konstanter Geschwindigkeit. Wachsende Feldstärke E verursacht durch zunehmende Spannung, zu einer Erhöhung der Wandergeschwindigkeit u der Ionen und damit höheren Analysengeschwindigkeiten. Die elektrophoretische Beweglichkeit (Mobilität) der Ionen ist bestimmt durch die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit u und die Feldstärke E :

$$u = \alpha E = L_{\text{eff}}/t_m$$

Die Geschwindigkeit eines Ions wird bestimmt, indem man die Kapillarlänge vom Inlet bis zum Detektor durch die Migrationszeit t_m des Peaks teilt.

Damit eine Trennung möglich ist, müssen die Ionen unterschiedliche Mobilitäten haben. Große Ionen mit geringer Ladung haben wegen Zusatzeffekte wie z.B. Reibungswiderstand nur eine geringere Mobilität, während kleine, stark geladene Ionen eine hohe Mobilität haben. Die Unterschiede in der Mobilität sind für diese Methode für die Trennung ausschlaggebend.¹⁹

Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit des Elektrolyten für den elektrischen Strom ist eine makroskopische Manifestation der elektrophoretischen Beweglichkeit der Ionen. Zum Ladungstransport und damit zum Strom, tragen alle ionischen Bestandteile des Elektrolyten bei. Die Stromdichte J ist proportional den Konzentrationen, den Ladungen und den Mobilitäten der verschiedenen ionischen Substanzen. Die Stromdichte, (der elektrische Strom I der durch die Einheitsfläche S transportiert wird), wird durch das Ohmsche Gesetz mit der Feldstärke bestimmt:

$$J = I/S = E \cdot \kappa,$$

wobei κ die spezifische Leitfähigkeit darstellt. Die übliche SI-Einheit für die molare Leitfähigkeit ist $\text{S cm}^2 \text{mol}^{-1}$.¹⁹

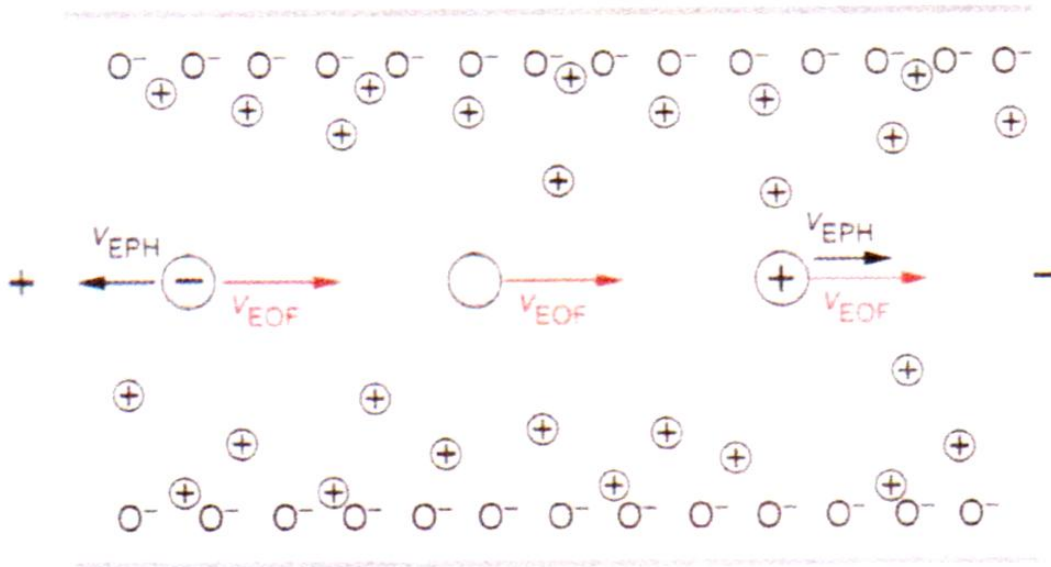
Elektroosmotischer Fluss (EOF)

Die Trennung von Teilchen unterschiedlicher Mobilität bewirkt die Elektrophorese, während die Elektroosmose einen Fluss der Pufferlösung im elektrischen Feld verursacht. Die elektrophoretische Wanderung der Ionen ist meistens in der CE durch den elektroosmotischen Fluss überlagert. Ursachen dieser EOF sind folgend: Nahezu alle Oberflächen tragen eine Ladung. Bei Quarzkapillaren sind dies negative Ladungen durch Dissoziation der Silanolgruppen. An der negativen Ladung bilden sich eine Schicht positiv geladener Teilchen aus der Pufferlösung, eine starre Schicht und eine bewegliche. Parallel zur Oberfläche liegt ein elektrisches Feld an und zieht die Gegenionen der mobilen Schicht Richtung Kathode. Durch diesen Transport wird die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare mitgezogen. Da der EOF ein extrem flaches Strömungsprofil bewirkt, ist in der CE eine wesentlich geringere Bandverbreitung als in anderen Methoden, wie z.B. in HPLC, zu beobachten. Der EOF steigt mit dem Dissoziationsgrad der Silanolgruppen (mit steigendem pH-Wert des Puffers steigt der Dissoziationsgrad), und sinkt mit steigender Viskosität (Konzentration) des Puffers. Der EOF ist bei allen elektrophoretischen Trennmethode anwesend und überlagert die elektrophoretische Mobilität. Deswegen können nicht nur geladene Teilchen bewegt werden, sondern auch neutrale Teilchen können vom EOF mittransportiert werden. Starke Anionen mit hoher Mobilität migrieren gegen den EOF zur Anode und sind nicht mehr detektierbar, während schwache Anionen mit kleinerer Mobilität als der EOF trotzdem zur Kathode transportiert werden. Der EOF ist in der CE ein erwünschtes Phänomen und es gibt viele Möglichkeiten zur Beeinflussung (z.B. durch pH-Wert des Puffers, Pufferkonzentration,

Temperatur, Zusatz von organischen Lösungsmittel, Tenside oder neutralen hydrophoben oder ionischen Polymere). Der EOF trägt zum Transport der Probenzonen bei, aber beeinflusst nicht die Trennung.¹⁹

Abb.2. Wanderung von Ionen und neutral geladenen Teilchen in einer Kapillare mit EOF.²¹

(v_{EPH} = elektrophoretische Geschwindigkeit, v_{EOF} = elektroosmotische Geschwindigkeit)



Bandenverbreiterung

Bandenverbreiterung ist zwar in der CE dank einem extrem flachen Strömungsprofil nicht so markant, trotzdem kann sie mehr oder weniger Effizienzverluste verursachen. Hier werden einige Gründe des Effizienzverlusts angegeben:

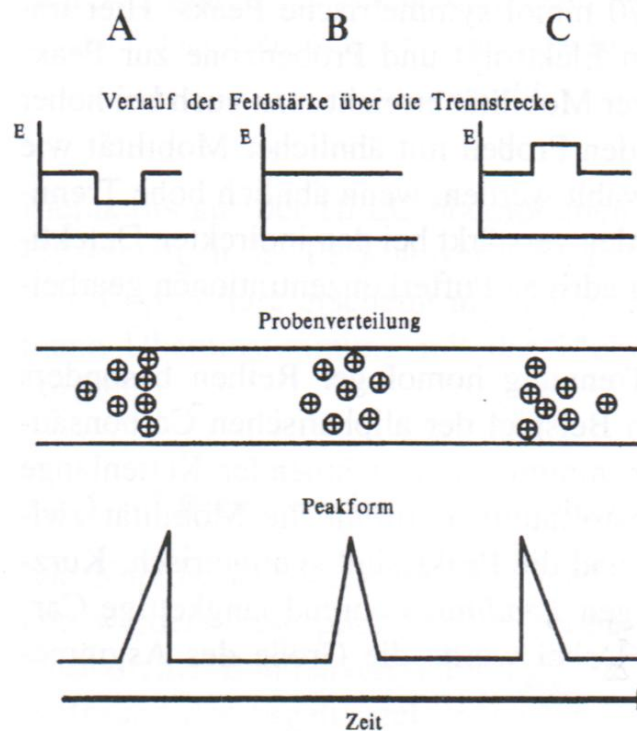
Effizienzverluste durch Elektrodispersion

Effizienzverluste durch Elektrodispersion ist in der CE der am häufigsten vorkommende Vorgang aller Effizienzverluste.

Im Idealfall soll die elektrische Feldstärke, bzw. die Leitfähigkeit, in der ganzen Trennkapillare konstant sein und die Mobilitäten von Analytione und Pufferionen sehr ähnlich sein. Dies ist dann der Fall, wenn die Konzentration der Analytione sehr viel geringer (Faktor $\ll 100$) als die des Puffers ist. Wenn jedoch große Unterschiede zwischen der Leitfähigkeit im Puffer und in den Probenzonen vorhanden sind, entstehen lokale

Störungen des elektrischen Feldes und die Zonen werden verzerrt und es kommt zur Peakverbreiterung.²¹

Abb.3. Abhängigkeit von Peakform an Feldstärke.¹⁹



Effizienzverluste durch Wandadsorption

Die Kapillaroberfläche hat aufgrund der negativ geladenen Silanolgruppen des Quarzes eine negative Ladung, aus diesem Grund können positiv geladene Probenmoleküle an der Wand adsorbiert werden. Dadurch wird das ζ -Potential verändert und anschließend auch der EOF. Es kommt also nicht nur zur Asymmetrie der Peaks, sondern auch zur Veränderungen der Migrationszeiten.¹⁹

Effizienzverluste durch Temperatureffekte

Während der Trennung entsteht in der Kapillare Joulsche Wärme, die zur Konvektion führt und die durch radiale Temperaturänderungen diskontinuierliche Viskosität verursacht. An der Wand, wo es kälter ist (dank Kühlung der Kapillare), gibt es ein Gebiet mit höherer Viskosität und dadurch wandern die Substanzen durch dieses Gebiet mit niedrigerer Geschwindigkeit. Umgekehrt hierzu ist es in der Mitte der Kapillare, dort ist die Temperatur höher, deswegen die Viskosität niedriger und die Substanzen migrieren durch dieses Gebiet mit höherer

Geschwindigkeit. Diese Migrationsunterschiede durch verschiedene Viskosität verursachen dann Zonenverbreitung.¹⁹

Effizienzverluste durch Überladung des Trennsystems

Maximal 1 - 2 % des Kapillarvolumens kann mit der Probe gefüllt werden, für die am häufigsten verwendete Kapillaren bedeutet das eine Probenvolumen von 2 bis 20 nL. Wenn dieses Volumen überschritten wird, kommt es wieder zur Bandenverbreitung. Volumenüberladung ist nicht der einzige Grund der Überladung des Trennsystems. Es kann bei zu hohen Probenkonzentrationen, als auch bei zu langer Injektionszeit beobachtet werden.¹⁹

Effizienzverluste durch Überlagerung von Strömungsprofilen

Effizienzverlust durch Überlagerung von Strömungsprofilen wird durch Niveau-Unterschied zwischen den beiden Puffergefäßen hervorgerufen. Der Beitrag zur Gesamtbandenverbreitung ist aber minimal.¹⁹

1.5.3. Qualitative und quantitative Analyse

Detektion erfolgt meistens direkt in der Trennkapillare und der Detektor ist heute meist mit einem Datenaufnahme- und Verarbeitungssystem verbunden. Aufgezeichnet wird dabei ein komplettes Elektropherogramm. Auf der waagerechten Achse wird die Zeit (Abszisse) und auf der senkrechten Achse (Ordinate) das Detektorsignal aufgezeichnet. Die Migrationszeit dient zur Identifikation der Probe, also zur qualitativen Analyse und die Peakfläche dient zur Feststellung des Gehaltes der gegebenen Substanz in der Probe, also zur quantitativen Analyse.

Die reproduzierbare Probenaufgabe ist in der CE ein schwieriges Problem. Um die Abweichungen bzw. Fehler der Injektionssysteme zu eliminieren wurde für die quantitative Analyse ein interner Standard angewendet.

Die Peakfläche der gemessenen Substanz wurde durch die Peakfläche des internen Standards geteilt.

Der interne Standard muss einige Bedingungen erfüllen:

- Er muss in dem verwendeten System und mit der verwendeten Wellenlänge nachweisbar sein.
- Er muss eine ähnliche Retentionszeit wie die Probensubstanz haben, aber er muss von der Probensubstanz und von allen Abbauprodukten getrennt sein.
- Er muss unter verwendeten Bedingungen stabil sein, darf die Stabilität der Probensubstanz nicht beeinflussen und darf mit der Probensubstanz nicht reagieren.¹⁸

1.5.4. Methodenentwicklung und Optimierung

Das Ziel der Methodenentwicklung ist es, eine geeignete Methode für den gegebenen Anwendungsbereich zu finden.

Grundparameter der Methodenentwicklung sind:

- Auswahl des Puffers
- Optimierung des pH-Wertes
- Optimierung der Pufferkonzentration¹⁹

1.5.5. Trenntechniken in der CE

Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Kapillarzonenelektrophorese ist das einfachste und heute am häufigsten verwendete Trennverfahren der CE. Sie wird in mit Elektrolyt gefüllten Kapillaren durchgeführt. Das Grundprinzip des Trennverfahrens beruht auf den verschiedenen Mobilitäten der Proben. Die Zonen wandern mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Kapillare und sollen optimal voneinander durch Elektrolyt getrennt werden.²¹

Kapillargelelektrophorese (CGE)

Kapillargelelektrophorese wird in einer Kapillare, die mit einer Polymerlösung oder einem Gel gefüllt ist, durchgeführt. Die Gelfüllung behindert die elektrophoretische Migration von Makromolekülen. Die Probe wird durch die Kapillare aufgrund der Ladung der Makromoleküle transportiert. Die Trennung ist also von der Molekülgröße abhängig.²¹

Micellare elektrokinetischer Chromatographie (MEKC)

Micellare elektrokinetischer Chromatographie ist eine Methode, die die Trennung ungeladener Moleküle ermöglicht. Zum Puffer werden geladene Tensiden zugesetzt und nach Überschreitung der kritischen micellaren Konzentration (CMC) werden Micellen gebildet. Im Inneren haben diese Micellen einen hydrophoben Charakter, Außen sind sie hydrophil. In Abhängigkeit von den benutzten Tensiden haben die Micellen eine positive oder negative Ladung und migrieren dadurch zur Katode oder Anode. Für die Trennung wird die gleiche Apparatur wie für die CZE benutzt werden und auch die Grundtrennungsprinzipien sind ähnlich.¹⁷

Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Isoelektrische Fokussierung wird als Trenntechnik für zwitterionische und amphotere Proteine und Peptide eingesetzt. Diese Substanzen unterscheiden sich nicht in ihrer Mobilität sondern in ihrem isoelektrischen Punkt (der pI-Wert ist eine spezifische Größe der amphoteren Substanzen, die sagt, bei welchem pH-Wert diese amphotere Substanz nach außen hin elektrisch neutral ist und im elektrischen Feld nicht mehr wandert). Für die Trennung braucht man einen pH-Gradient, der durch Zusatz von Ampholyten zum Puffer im elektrischen Feld gebildet wird.¹⁹

Elektrochromatographie (EC)

Bei Elektrochromatographie werden stationäre Phasen der HPLC verwendet und die Mobilisierung der Proben wird durch den elektroosmotischen Fluss verursacht. Allerdings ist das šPackenō dieser Kapillaren recht komplex, bzw. sind fertig gepackte Kapillaren recht teuer. Dadurch hat dieses Verfahren in der Routineanwendung noch keinen großen Stellenwert.^{18, 19}

Isotachophorese (ITP)

Im Unterschied zu der Kapillarzonenelktrophorese, die in einem konstanten Grundelektrolyten durchgeführt wird und die Substanzen verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten haben, wird die Isotachophorese in einem diskontinuierlichen Elektrolytssystem durchgeführt indem die Migrationszeit aller Substanzen gleich ist.²¹

1.5.6. Vorteile der Kapillarelektrophorese

Kapillarelektrophorese ist im Unterschied zu anderen analytischen Methoden wie GC, HPLC oder TLC verwendbar für die Analyse eines breiten Spektrums verschiedenen Substanzen ohne das Instrument zu tauschen oder zu verändern. Verschiedene Analysen können in derselben Kapillare durchgeführt werden, nur unter Variation der verschiedenen Bedingungen. Zu den anderen Vorteilen gehören: minimale Probenvolumina, geringer Lösungsmittelverbrauch, kurze Trennzeit, hohe Auflösung, einfache Methodenentwicklung.¹⁷

1.6. Validierung

Jede neu entwickelte Analytische Methode muss auf ihre Eignung für den jeweiligen Anwendungsbereich getestet werden. Dies wird als Validierung bezeichnet. Allgemeine Richtlinien und Empfehlungen zur Durchführen von Validierungen wurden von ICH (International conference of harmonisation) entwickelt. Damit die Methode in der Praxis der Arzneimittelanalytik eingesetzt werden kann, muss mittels einer erfolgreichen Validierung die Eignung gezeigt werden.²³

Arten von analytischen Verfahren, die validiert werden sollten:

- Identifizierungstests
- Quantitative Tests zur Bestimmung des Gehaltes
- Grenzttests von Verunreinigungen
- Quantitative Tests zur Bestimmung des aktiven Anteils in einer Zubereitung der Substanz oder anderer ausgewählter Bestandteile der Zubereitung.²²

Hier werden einige Grundbegriffe der Validierung erwähnt und ein kurz erklärt:

1.6.1. Richtigkeit

Der Grad der Übereinstimmung zwischen dem wahren Wert einer Probe und dem gemessenen Wert wird als Richtigkeit bezeichnet. Die Prüfung wird mit Probelösungen der Testsubstanz mit bekannten Konzentrationen durchgeführt.

Die Richtigkeit wird mit 9 Aufarbeitungen (z. B. je drei bei 80 %, 100 %, 120% des deklarierten Gehaltes) durchgeführt. Aus jeder Einwaage werden drei Injektionen injiziert und aus diesen drei Injektionen wird der Mittelwert berechnet.

Die Wiederfindung sollte zwischen 95 % und 105 % sein, relative Standardabweichungen bei einem Konzentrationsniveau (80 %, 100 %, 120% des deklarierten Gehaltes) kleiner als 2 %, die relative Standardabweichung über alle neue Werte maximal 5 %.²²

1.6.2. Präzision

Der Grad der Übereinstimmung zwischen den einzelnen Messwerten einer einheitlichen Probe wird als Präzision bezeichnet.

Sie wird in folgende Bereiche geteilt:

Wiederholpräzision

Mindestens 6 Werte einer einheitlichen Probe werden innerhalb eines kurzen Zeitraumes gemessen.

Sie wird mittels 6 unabhängigen Aufarbeitungen bei 100 %, die unmittelbar nacheinander analysiert werden, gezeigt. Aus jeder Einwaage werden drei Bestimmungen durchgeführt.

Die relative Standardabweichung aller 6 Werte sollte maximal 5 % betragen.²²

Intermediante Präzision (Tag-zu-Tag Präzision):

Die Auswirkung von unterschiedlichen Bedingungen innerhalb eines Labors wird durch die Intermediate Präzision gezeigt.

Die Messung wird von unterschiedlichen Analytiker an verschiedenen Tagen und mit verschiedener Ausstattung durchgeführt.²²

1.6.3. Reproduzierbarkeit

Reproduzierbarkeit zeigt die Präzision einer Methode, die in verschiedenen Laboratorien durchgeführt wird.

Diese Untersuchungen sind notwendig, um eine analytische Methode zu standardisieren.²³

1.6.4. Spezifität

Spezifität ist die eindeutige Bestimmung des Analyten auch in Anwesenheit von verwandten Substanzen, wie z. B. Verunreinigungen, Abbauprodukten oder der Arzneimittelmatrix. Es muss nachgewiesen werden, dass sowohl in der mobilen Phase als auch in dem Lösungsmittel kein Signal bei der Migrationszeit von Lactulose nachgewiesen werden kann.

Um die Spezifität der Methode zu zeigen werden folgende Lösungen verwendet:

- 1) Mobile Phase (ohne Einwaage von Substanz)
- 2) Lösungsmittel (ohne Einwaage von Substanz)
- 3) Testlösung

Diese werden je einmal injiziert.

Es darf kein Signal bei 1) und 2) bei der Migrationszeit von Lactulose detektierbar sein.²²

1.6.5. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze gibt die niedrigste Konzentration an, bei der das Signal der Substanz noch eindeutig detektiert werden kann.

Sie wird mittels Signal/Rausch-Verhältnis des Detektors bestimmt und liegt bei 3:1.²³

1.6.6. Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze gibt die niedrigste Konzentration der Substanz an, bei der noch korrekt quantifiziert werden kann.

Sie wird durch graphische Auswertung des Signal/Rausch-Verhältnisses in den Elektropherogrammen bestimmt. Das Signal/Rausch-Verhältnis sollte hier bei ca. 10:1 liegen.²³

1.6.7. Linearer Bereich

Dies ist der Konzentrationsbereich, in dem die Messergebnisse direkt proportional zur Konzentration der geprüften Substanz in der Probelösung sind.

Zur Erstellung einer Regressionsgerade werden mindestens fünf Werte verschiedener Konzentration verwendet.

Für fertige Arzneimitteln liegt der Konzentrationsbereich gewöhnlich zwischen 80 % - 120 % der Testkonzentration.

Das Bestimmtheitsmaß (Quadrat des Korrelationskoeffizient), y-Abschnitt (d) und die Steigung (k) der Geraden ($y = k \cdot x + d$) werden berechnet.

Der Korrelationskoeffizient R sollte nicht kleiner als 0,99 sein.²²

1.6.8. Robustheit

Die Robustheit einer analytischen Methode bestimmt, wie stark kleine Veränderungen der Parameter, die während des Gebrauches der Methode auftreten können, die Ergebnisse beeinflussen können. Dies bestimmt die Zuverlässigkeit der Methode.

Zur Bestimmung der Robustheit können folgende charakteristische Parameter variiert werden:

- Injektion
- Spannung/Strom
- Pufferstärke und Stabilität
- Temperatur in der Kapillare²²

2. Ziel der Arbeit

Lactulose in Form von Sirup wird häufig als ein Osmolaxans angewendet und der Inhaltsstoff wird als nicht-reduzierender Zucker am häufigsten mit HPLC oder GC bestimmt. Eine andere herausragende analytische Methode für Bestimmung von verschiedenen Biomolekülen ist Kapillarelektrophorese. Im Unterschied zu anderen analytischen Methoden weist sie einige Vorteile auf, vor allem die notwendigen, lediglich minimale Probenvolumina, einen geringen Lösungsmittelverbrauch, kurze Trennzeit, hohe Auflösung und einfache Methodenentwicklung. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit von mir ein CE-Analysensystem für die Bestimmung des Osmolxans Lactulose entwickelt. In meiner Arbeit möchte ich die in der Literatur beschriebenen Methode zur Detektion von Zuckern unter der Verwendung von Kupferkomplexen an das Trennproblem der Lactulose anpassen und diese Methode für die Bestimmung von Lactulose-Sirup optimieren.

3. Experimentales Teil

3.1. Material

3.1.1. Substanzen für die quantitative Analyse

Lactulose Hersteller: Acros Organics

LOT: A0276609

Gehalt: 99,1%

L-(+)-Asparaginsäure Hersteller: Acros Organics

LOT: A0213169001

Gehalt: 99,7%

3.1.2. Substanzen für die qualitative Analyse

D(+)-Galactose reinst; Hersteller: E.Merck AG

Fructose: Arzneibuchqualität Ph.Eu.6.0

D(+)-Glucose; Hersteller: Rindel.de Haen

LOT: 63110

D(-)-Ribose Hersteller: Aldrich Chemie

Suchrose: Wiener Feinzucker, Nahrungsmittelqualität

D(+)-Lactose Hersteller: E.Merck Ag

Glycerol: Arzneibuchqualität Ph.Eu 6.0

Mannitol: Arzneibuchqualität Ph.Eu 6.0

3.1.3. Pufferbestandteile

Kupfer(II)-sulfat-5-hydrat krist. Reinst; Hersteller: Merck

Wasser: Aqua purifikata, Arzneibuchqualität

Methanol: HPLC Gradient grade Methanol; Hersteller: Fisher Scientific

2-Propanol für die HPLC: AppliChem

Acetonitril: J.T.BACER HPLC Grade

Ammoniaklösung TR 24% ; Hersteller: BRENNTAG CEE GmbH

3.1.4. Lösungsmittel

HPLC Gradient Grade Wasser; Hersteller: Fisher Scientific

3.1.5. Kommerzielle Präparaten

Probe 1: Lactulose AL Sirup 200 ml Sirup N1

Hersteller: ALIUD® PHARMA GmbH & Co. KG

Ch.-B.: 14893

Zul.-Nr.: 37144.00.00

Verwendbar bis: 11/2004

100 ml Sirup enthalten als arzneilich wirksamen Bestandteil: Lactulose 66,7g

Sonstige Bestandteile: D-Galactose, Lactose, gereinigtes Wasser

Probe 2: Lactulose AL Sirup 200ml Sirup N1

Hersteller: ALIUD® PHARMA GmbH & Co. KG

Zul.-Nr.: 37144.00.00

Ch.-B.: 21005

Verwendbar bis:02/2005

100 ml Sirup enthalten als arzneilich wirksamen Bestandteil: Lactulose 66,7g

Sonstige Bestandteile: D-Galactose, Lactose, gereinigtes Wasser

Probe3: Lactulose Neda® 200 ml Sirup N1

Hersteller: Novartis Consumer Health GmbH

Ch.-B.: 33001

Zul.-Nr.:6028346.00.00

Verwendbar bis: 06/2004

100 ml Sirup enthalten als arzneilich wirksamen Bestandteil: Lactulose 66,3g

Sonstige Bestandteile: Gereinigtes Wasser, Mandarinen-Aroma

Probe 4: Lactulose-ratiopharm® Sirup 200 ml Sirup N1

Hersteller: Merckle GmbH

Ch.-B.: C09523

Zul.-Nr.: 26912.00.00

Verwendbar bis: 04/2006

100 ml Sirup enthalten als arzneilich wirksamen Bestandteil: Lactulose Lösung 50%
132g (entspr.
66,7 g Lactulose)

Sonstige Bestandteile: < 10 g Galactose, < 6,7 g Lactose, gereinigtes Wasser

Hinweis: Enthält herstellungsbedingt Fructose, Galactose und Lactose

Probe 5: Lactulose-saar 200 ml Sirup N1

Hersteller: Chephasaar Chem. Pharm. Fabrik GmbH

Ch.-B.: 18104

Zul.-Nr.: 37981.00.01

Verwendbar bis: 02/2005

100 ml Sirup enthalten als arzneilich wirksamen Bestandteil: Lactulose 65 g

Sonstige Bestandteile: Aromastoffe

Hinweis: Enthält herstellungsbedingt Fructose, Galactose und Lactose

3.1.6. Geräte

CE Geräte

Kapillarelektrophoresegerät: BECKMAN P/ACE SYSTEM 5500 mit P/ACE UV Absorbance Detektor. Steuerung des Gerätes, Datenaufnahme und Bearbeitung mittels System Gold[®] 8.1 Software.

Kapillaren: Uncoated fused silica CE Kapillaren von Polymicro TECHNOLOGIES, Innendurchmesser 50µm, Außendurchmesser 362,5 µm; Gesamtlänge, Länge bis zum Detektor wie bei den Elektropherogrammen angegeben.

Capillary Cartridge: BECKMAN P/ACE SYSTEM P/N

Kühlung: Flüssigkühlung mit Beckman capillary cartridge coolant.

Detektion: 254nm, Detektor auf Kathodenseite (normale Polarität)

Injektion: Probenaufgabe 0.5 psi, 5s

Spülschritte: 20 psi

Probengefäß für Autosampler

Andere Geräte:

pH-Meter: Orion 420 A

Elektrode: Hamilton Slimtrode (Die Elektrode wurde vor der Messung mit Merck Pufferlösung pH4 und pH7 kalibriert.)

UV/VIS Spectrofotometer: SHIMADZU UV 160A

Analytische Waage: Sartorius A200S

Pipetten: NICHIRYO model 5000: 100,500,1000 μ l

TREFFLABmIKROPIPETTE Mikropipette variables Volume 200-1000 μ l

Glas: Messkolben, Bechergläser, Glasspipetten, Messuren, Wägegläschen

3.1.7. Puffer

Als Grundpuffer wurde 6mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer benutzt:

Entsprechende Mengen des Kupfer(II)-sulfat-5-hydrats wurde in 500mM Ammoniaklösung aufgelöst.

500mM Ammoniaklösung: 72,9 g der Ammoniaklösung TR 24% wurden zu 1000ml verdünnt.

Dieser Grundpuffer wurde durch Zusatz von Methanol, Acetonitril und 2-Propanol modifiziert. Ebenso wurden Versuche mit verschiedenen Kupfers Konzentrationen durchgeführt, um den Einfluss der Komplexe zu überprüfen.

Folgende Puffer wurden für die Vorversuche und Analysen verwendet:

4 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

(99,8 mg CuSO₄ • 5 H₂O werden in 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml gelöst)

6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

(0,150 g CuSO₄ • 5 H₂O werden in 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml gelöst)

8 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

(0,200 g CuSO₄ • 5 H₂O werden in 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml gelöst)

10 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

(0,250 g CuSO₄ • 5 H₂O werden in 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml gelöst)

4 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 5% MeOH

(99,8 mg CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 5 ml MeOH versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

4 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% MeOH

(99,8 mg CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 10 ml MeOH versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

4 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 15% MeOH

(99,8 mg CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 15 ml MeOH versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 5% MeOH

(0,150 g CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 5 ml MeOH versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% MeOH

(0,150 g CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 10 ml MeOH versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 15% MeOH

(0,150 g CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 15 ml MeOH versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% Isopropanol

(0,150 g CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 10 ml Isopropanol versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 15% Isopropanol

(0,150 g CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 15 ml Isopropanol versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

10 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% Isopropanol

(0,250 g CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 10 ml Isopropanol versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

10 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% Acetonitril

(0,250 g CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 10 ml Acetonitril versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

10 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% MeOH

(0,250g CuSO₄ · 5 H₂O werden mit 10 ml MeOH versetzt und mit 500mM Ammoniaklösung zu 100,0 ml verdünnt)

3.2. Entwicklung der Methode

Vorversuche wurden mit einer 47cm langen und mit einer 67cm langen Kapillare durchgeführt. Probelösungen wurden durch Auflösung der gegebenen Menge der Zucker in Wasser (Arzneibuchqualität) vorbereitet. Meistens wurden 20 kV angelegt, genaue Angaben sind bei den Elektropherogrammen aufgeführt.

3.2.1. 47/40 cm lange Kapillare

Außer verschiedenen Zusammensetzungen (Konzentration an Kupfer(II), Zusatz von organischen Modifiern) der Pufferlösung wurden unterschiedliche Werte für Spannung bzw. Strom evaluiert, um das System zu optimieren.

In den Elektropherogrammen entspricht das erste große Signal der Absenz von Ammoniak und Kupfer in der Probezone und der negative Peak vor den Zuckerpeaks entspricht dem EOF. (Obwohl das Kupfer im Zucker-Kupferkomplex positiv geladen ist, migriert der Komplex erst nach dem EOF. Dies ist bedingt durch die negative Gesamtladung des Kupfer/Zuckerkomplexes.)¹²

6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

Abb. 4. CE Chromatogramm des Lactulose-Sirups 1 (66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.

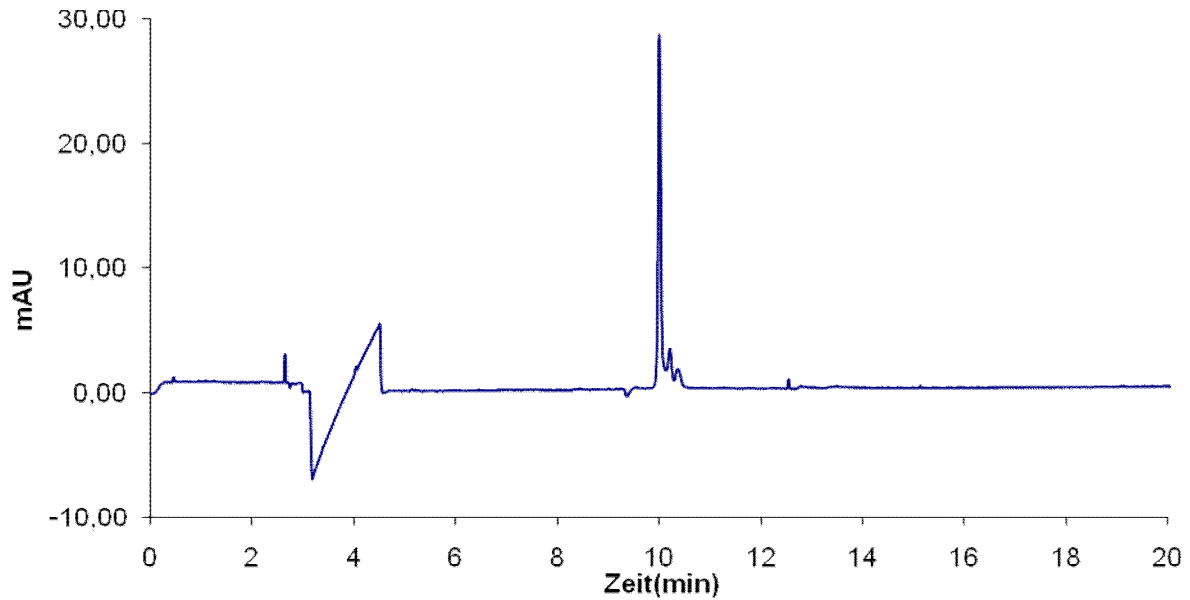


Abb. 5. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulosirup 2 66,7mg/100ml). 15 kV wurden angelegt.

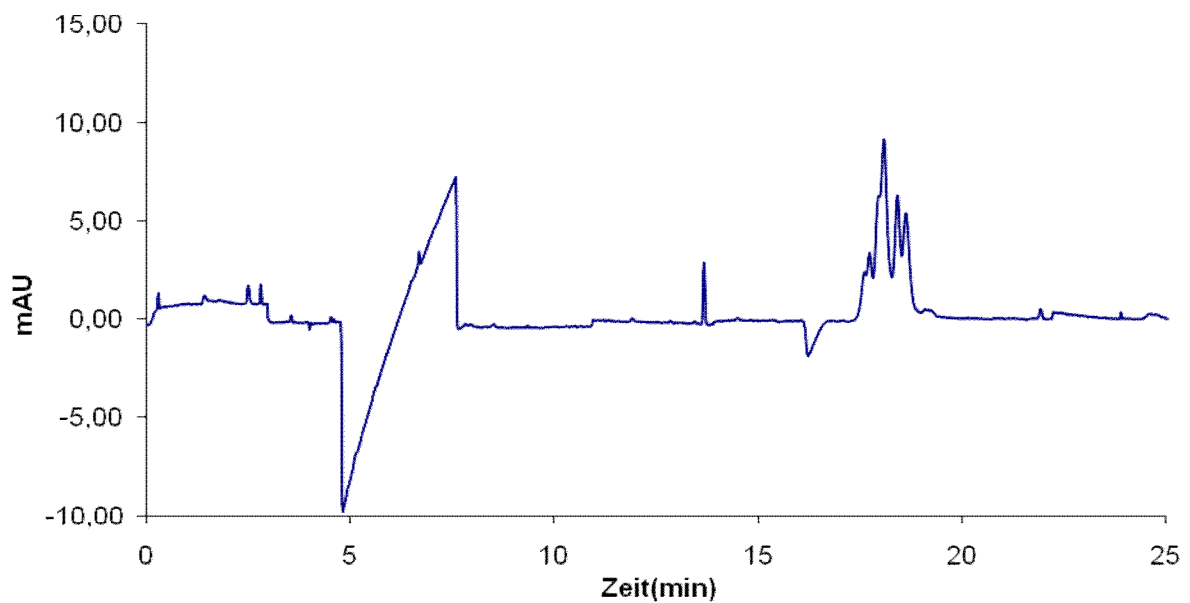
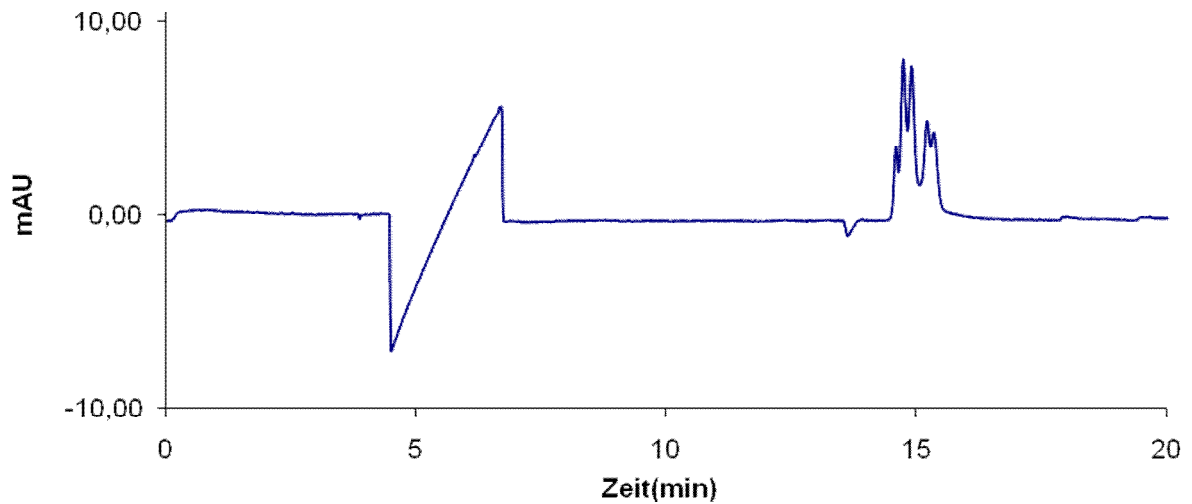


Abb. 6. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 13 μ A wurden angelegt.



8 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

Abb. 7. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Sucrose 90mg/100 ml, Lactulos-Sirup 1 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.

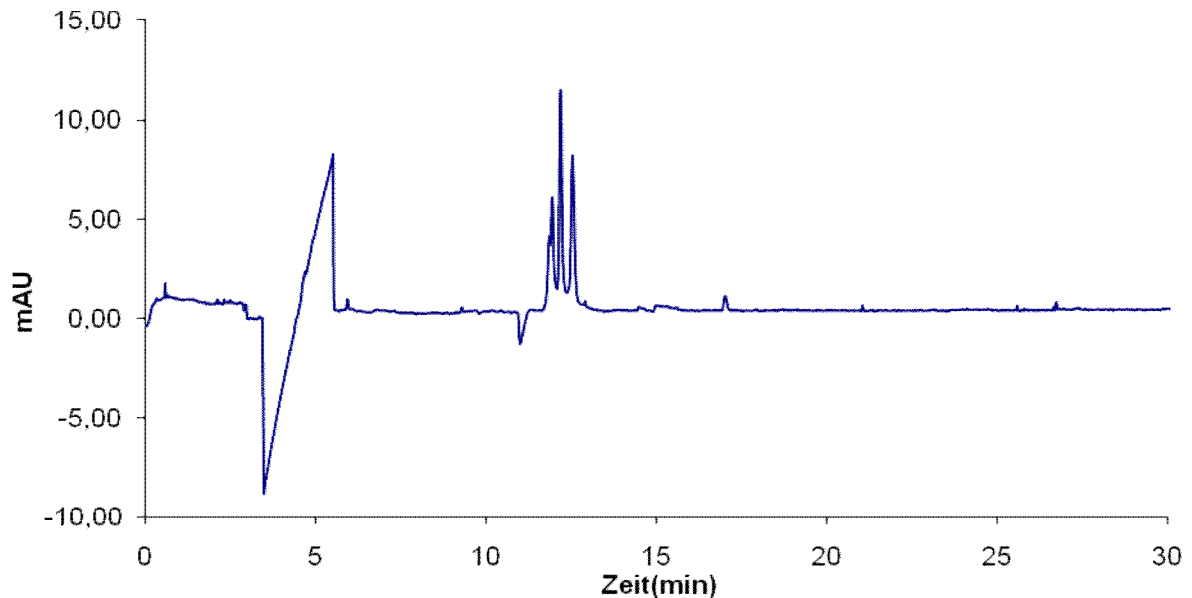


Abb. 8. CE Chromatogramm des Lactulose-Sirupes 1 (66,7 mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.

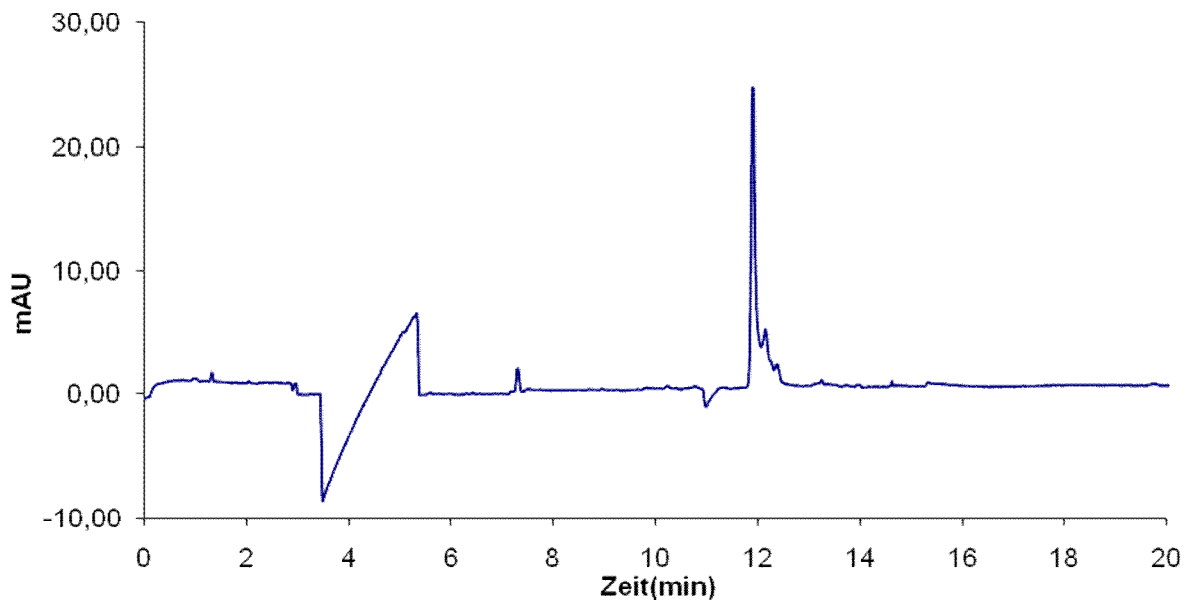
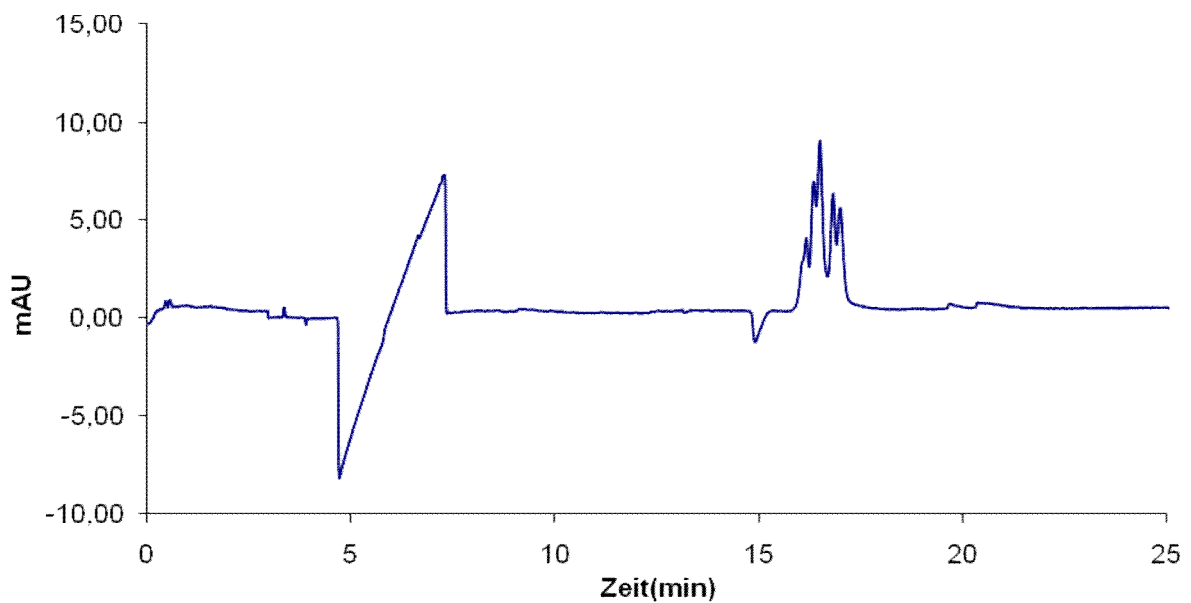


Abb. 9. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 15 kV wurden angelegt.



10 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

Abb.10. CE Chromatogramm des Lactulose-Sirups 1 (66,7 mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.

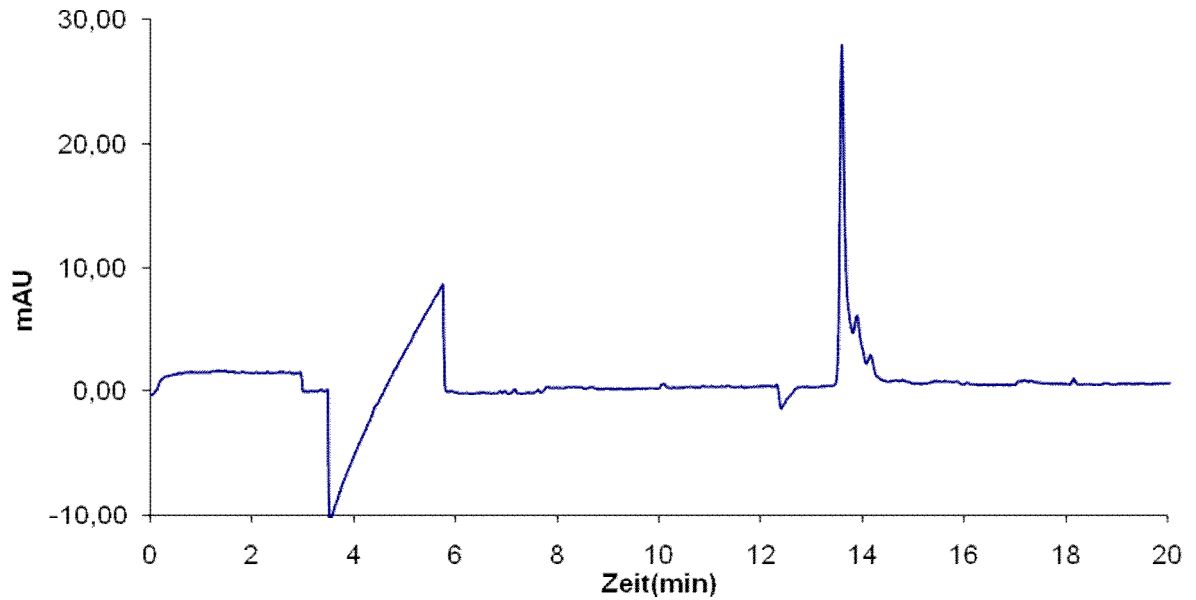


Abb. 11. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Sucrose 180mg/100 ml, Lactulos-Sirup 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.

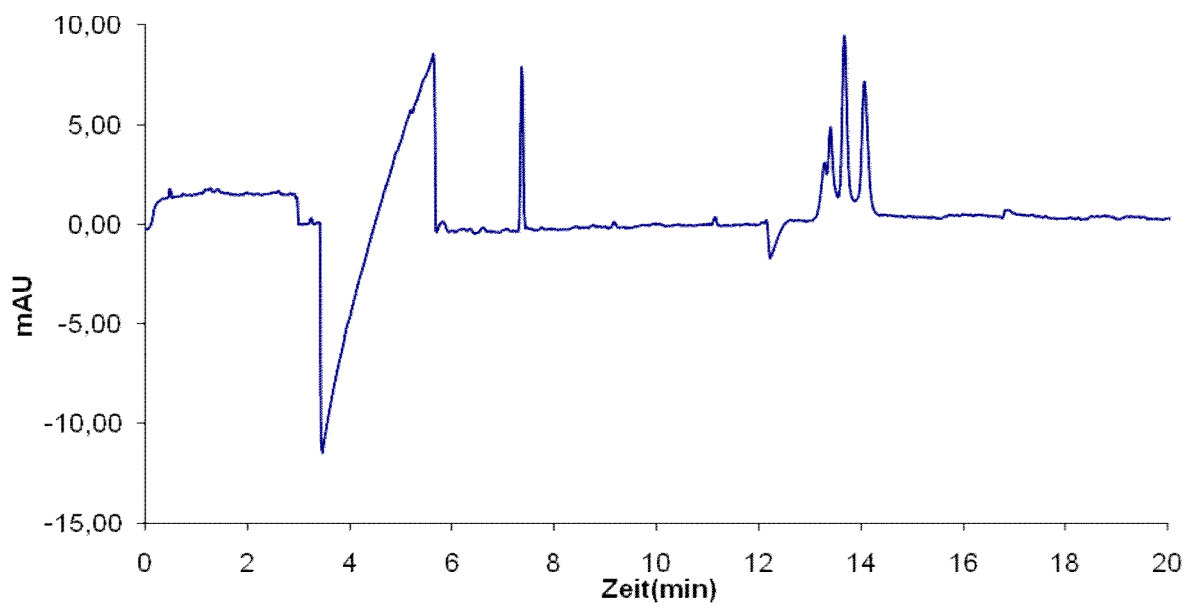


Abb. 12. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Sucrose 180mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 15 kV wurden angelegt.

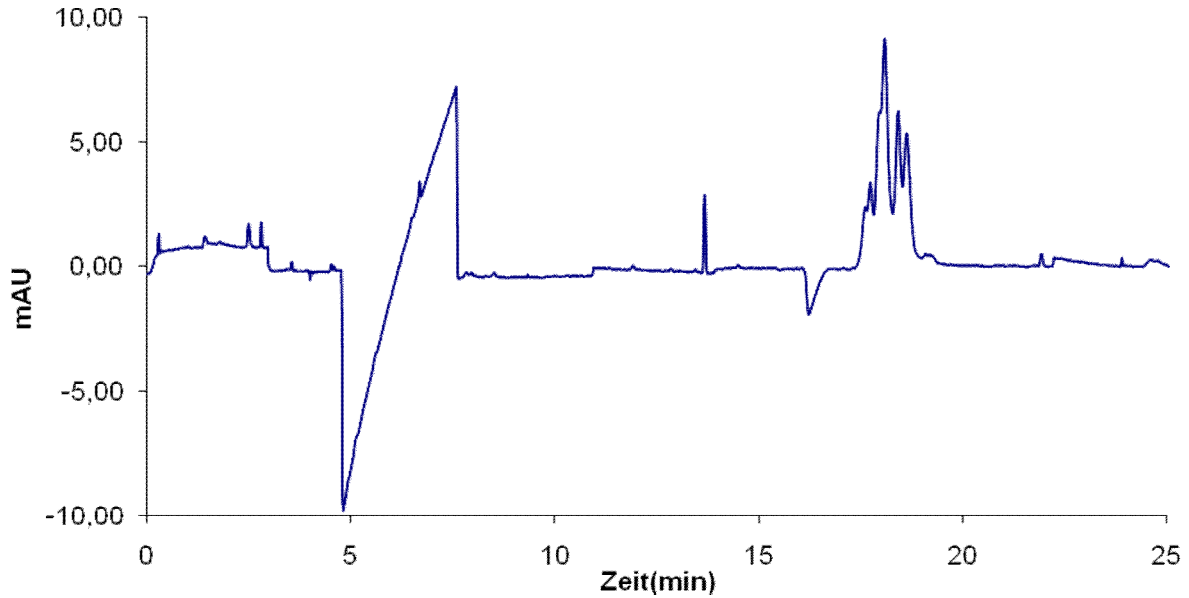
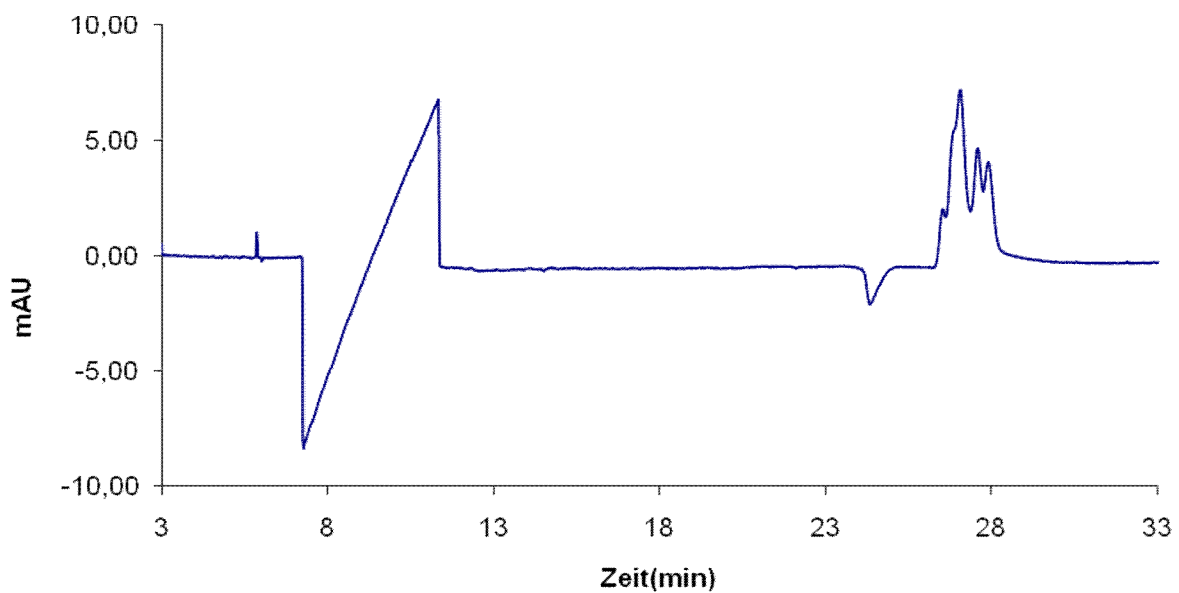
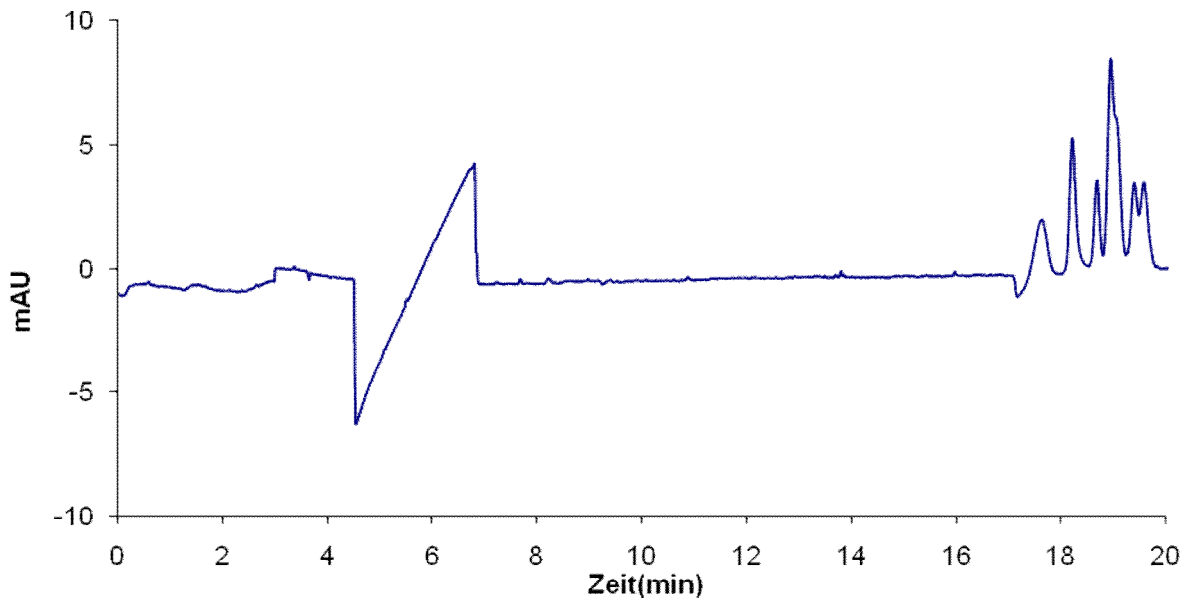


Abb. 13. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 10 mV wurden angelegt.



6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% MeOH

Abb. 14. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 13 μ A wurden angelegt.



6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% Isopropanol

Abb. 15. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 13 μ A wurden angelegt.

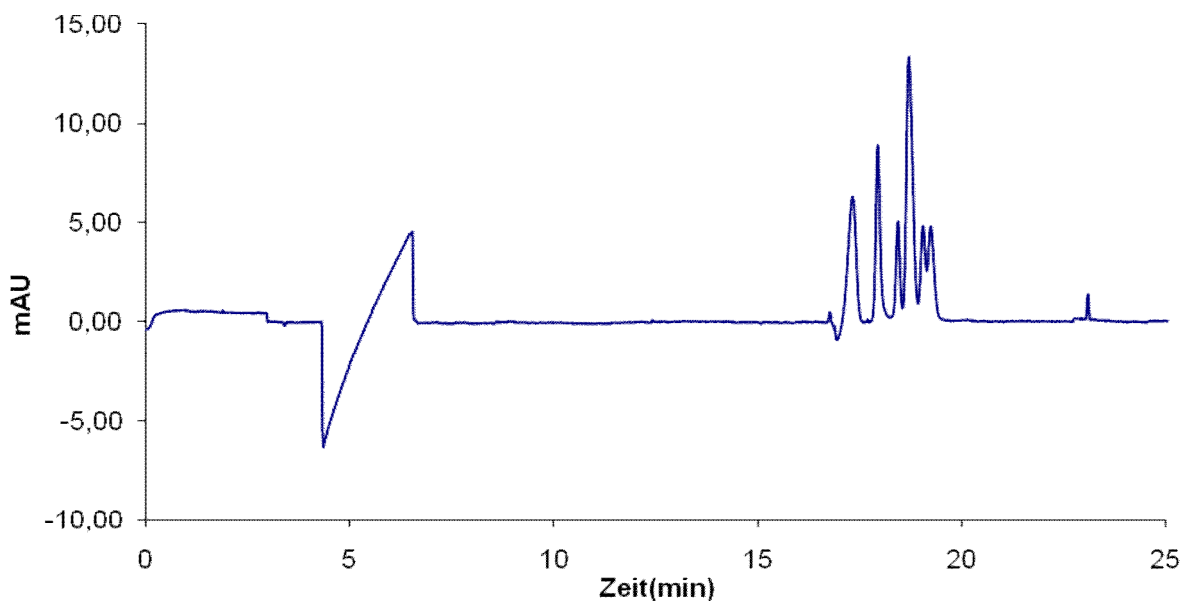
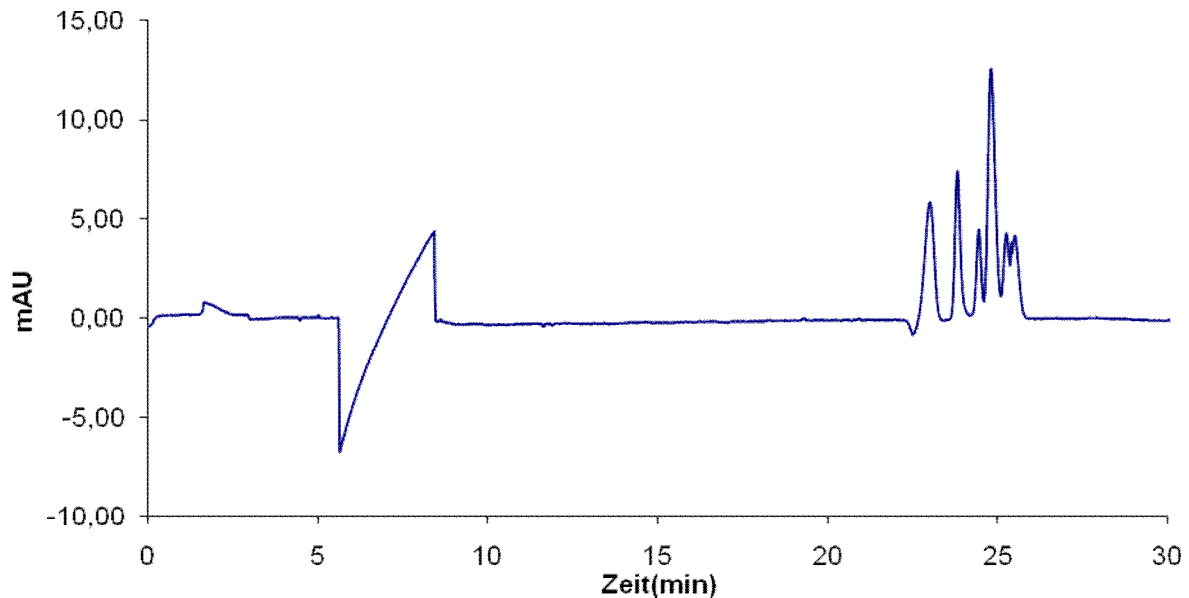


Abb. 16. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 10 μ A wurden angelegt.



6 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Puffer + 15% Isopropanol

Abb. 17. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 13 μ A wurden angelegt.

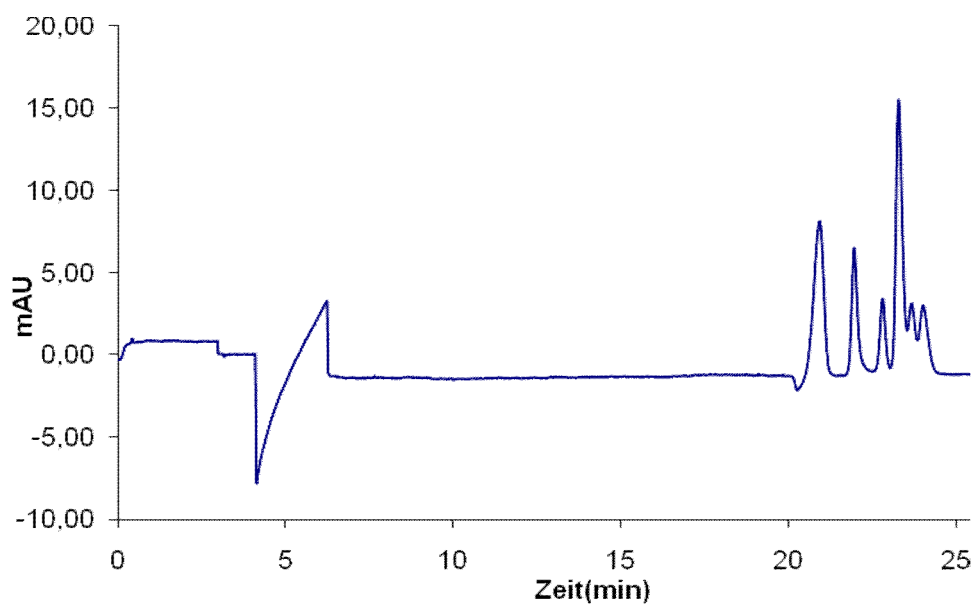
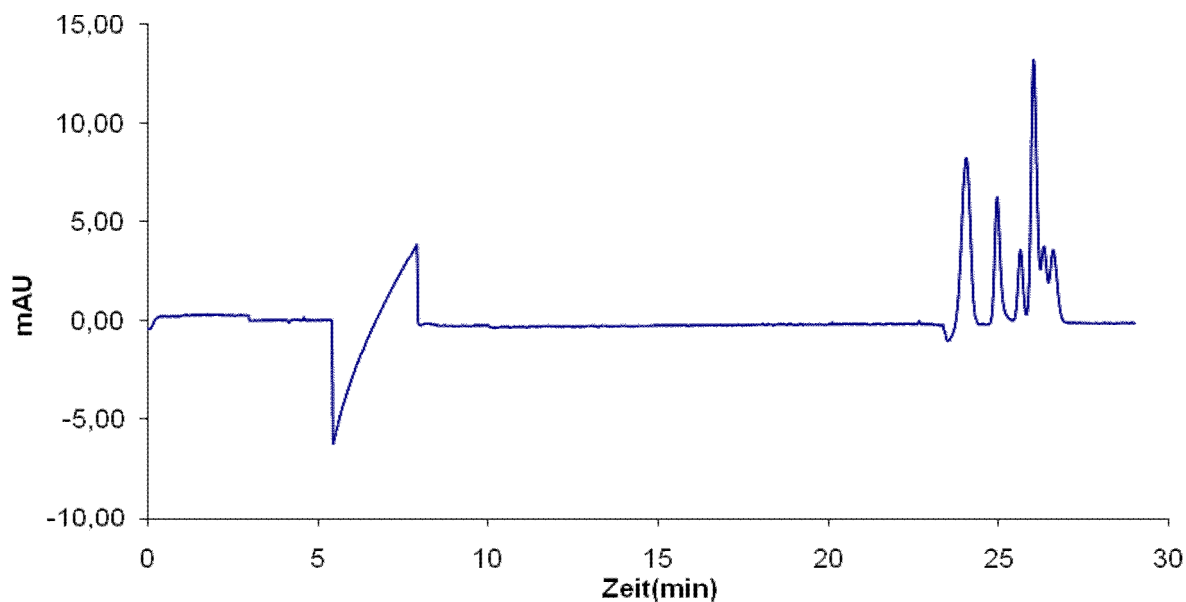
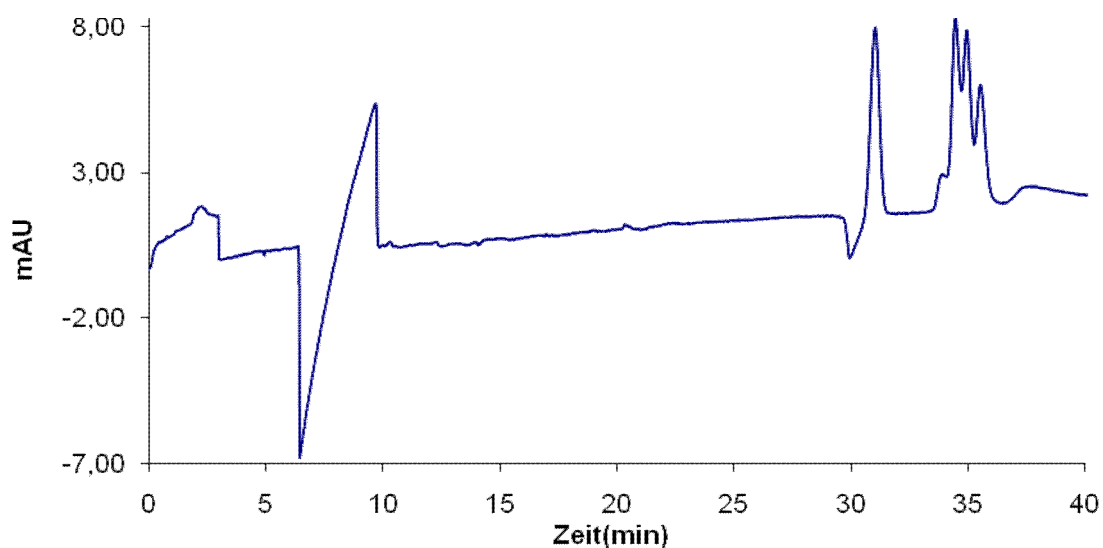


Abb. 18. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 10 μ A wurden angelegt.



10 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Puffer + 10% Isopropanol

Abb. 19. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 13 μ A wurden angelegt.



10 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% Acetonitril

Abb. 20. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 mV wurden angelegt.

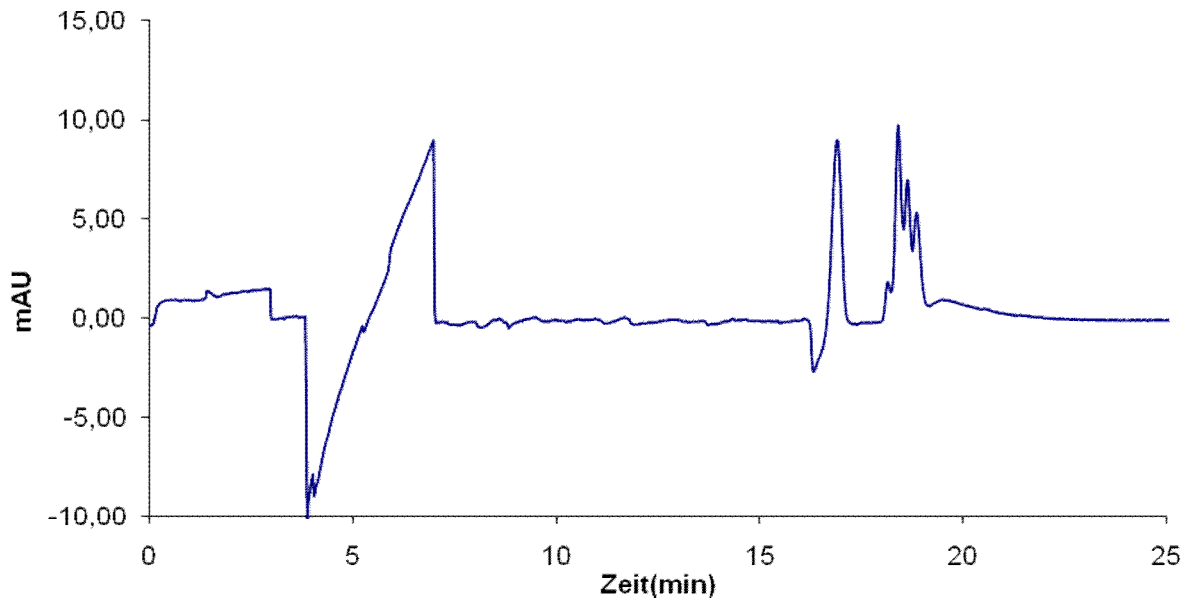


Abb. 21. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 15 mV wurden angelegt.

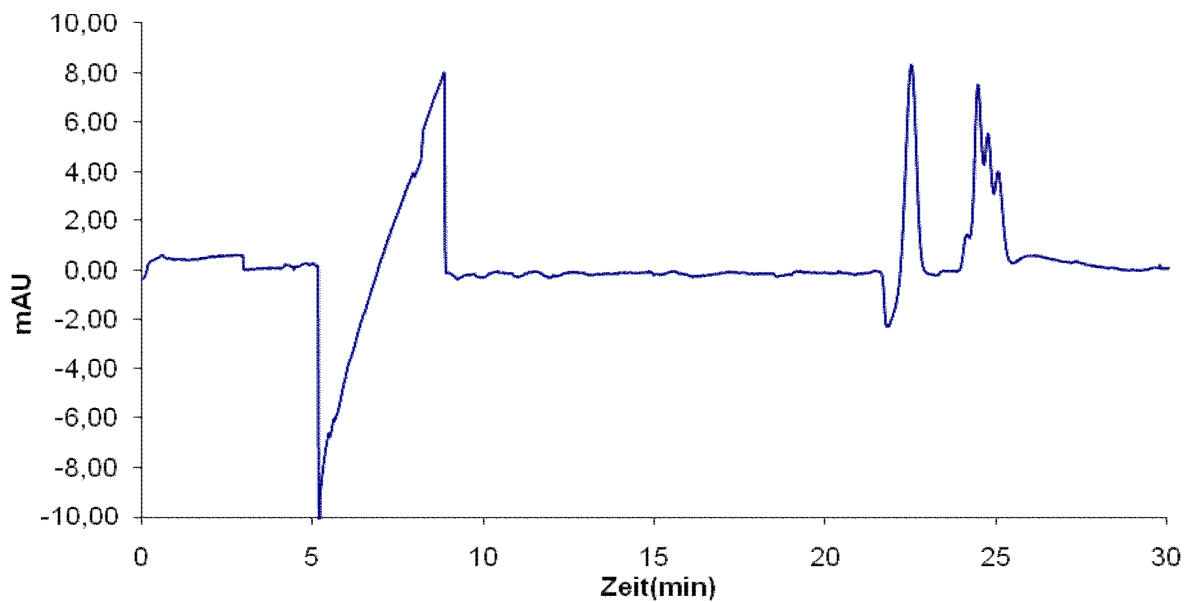
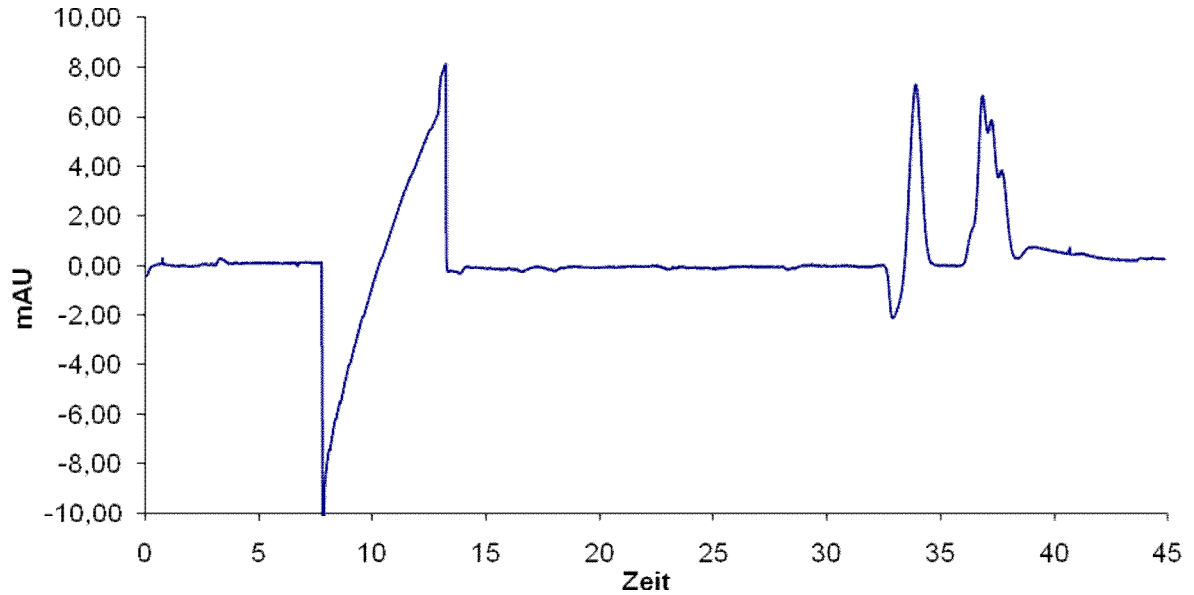


Abb. 22. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 10 mV wurden angelegt.



10 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% MeOH

Abb. 23. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Sucrose 180mg/100ml,Fructose90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.

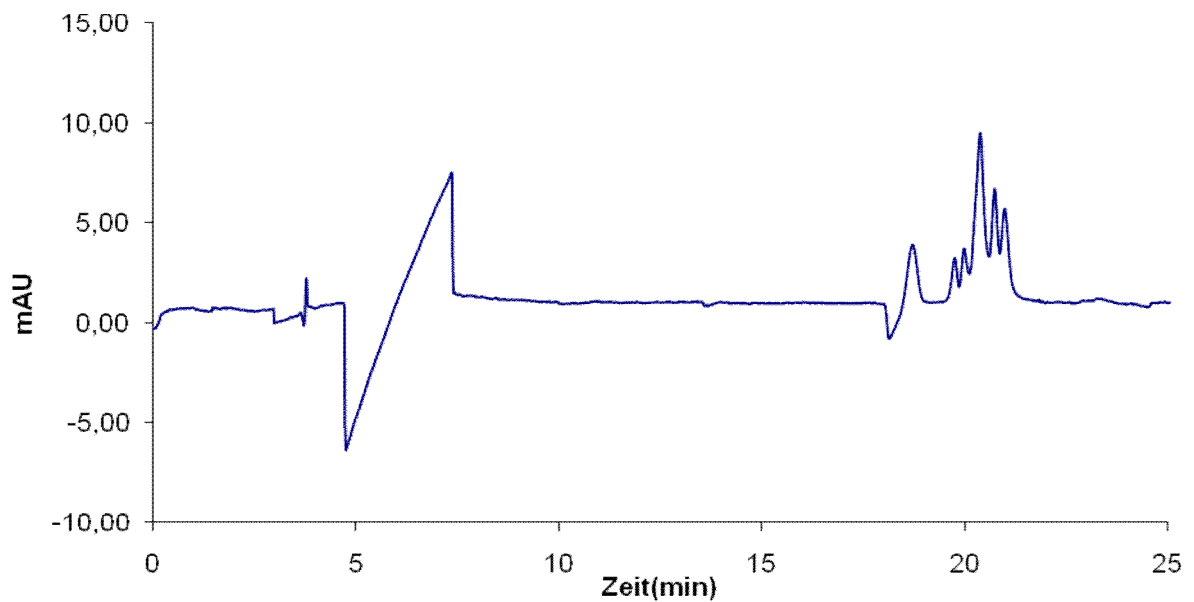


Abb. 24. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Sucrose 180mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulosirup 2 66,7mg/100ml). 15 kV wurden angelegt.

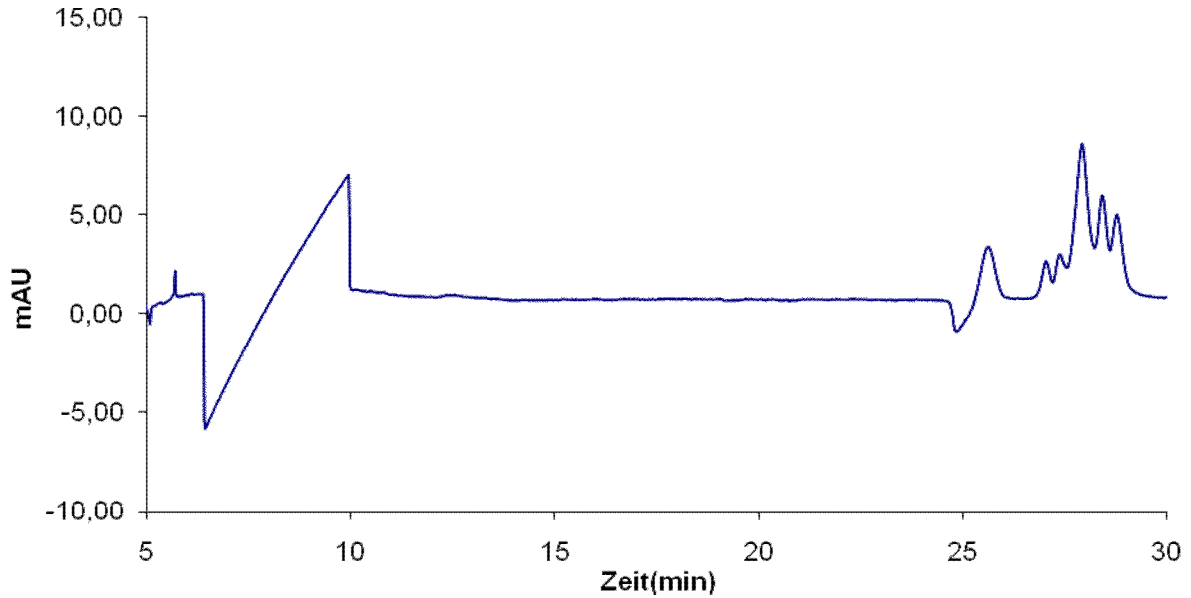


Abb.25. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Sucrose 180mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulosirup 2 66,7mg/100ml). 10 kV wurden angelegt.

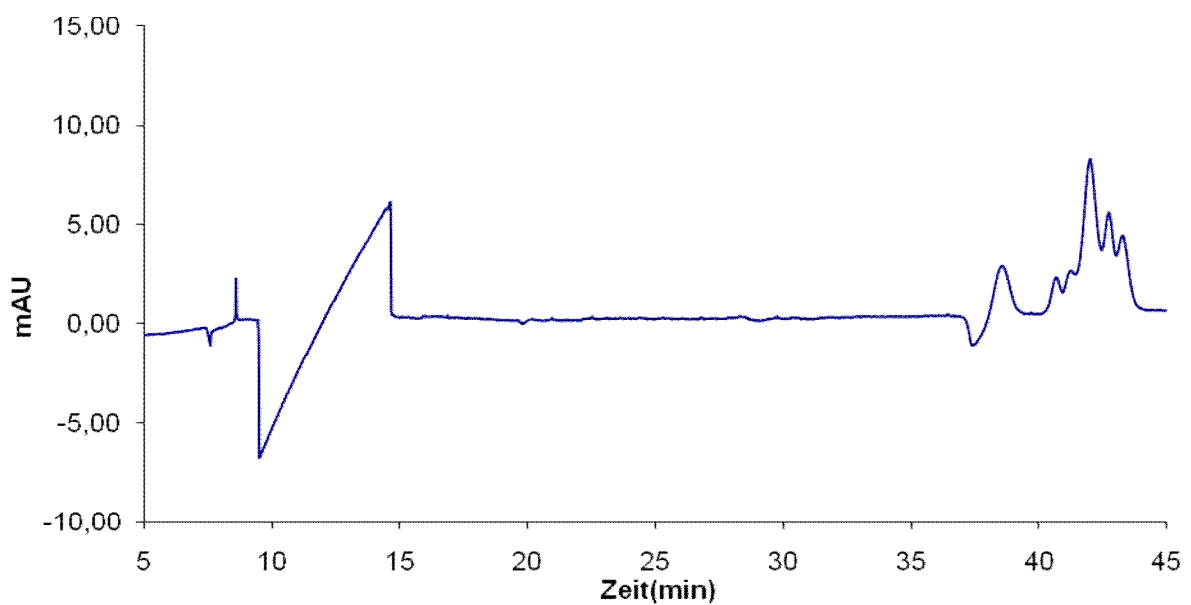
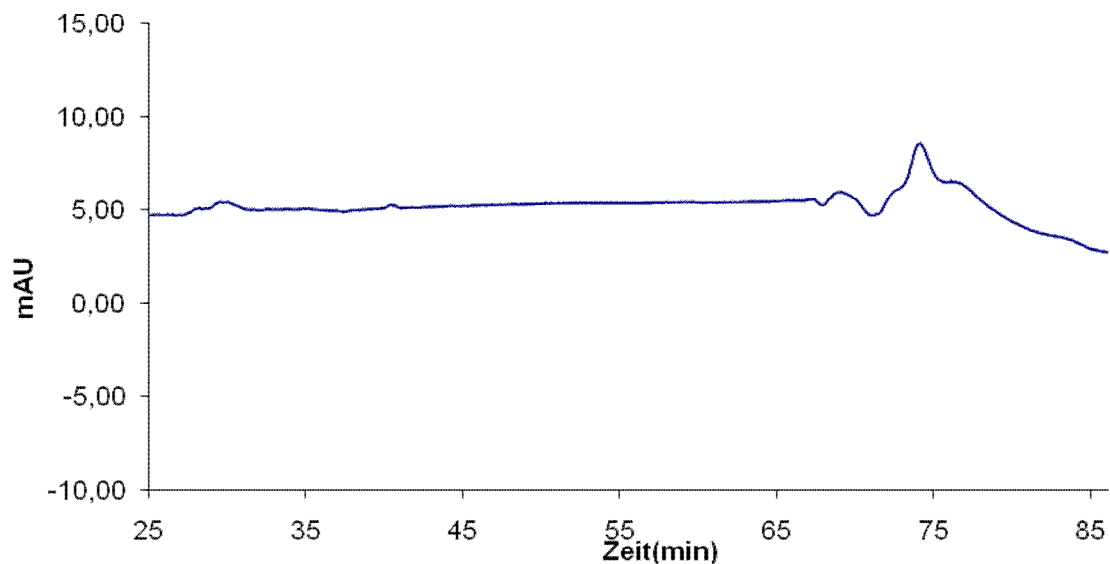


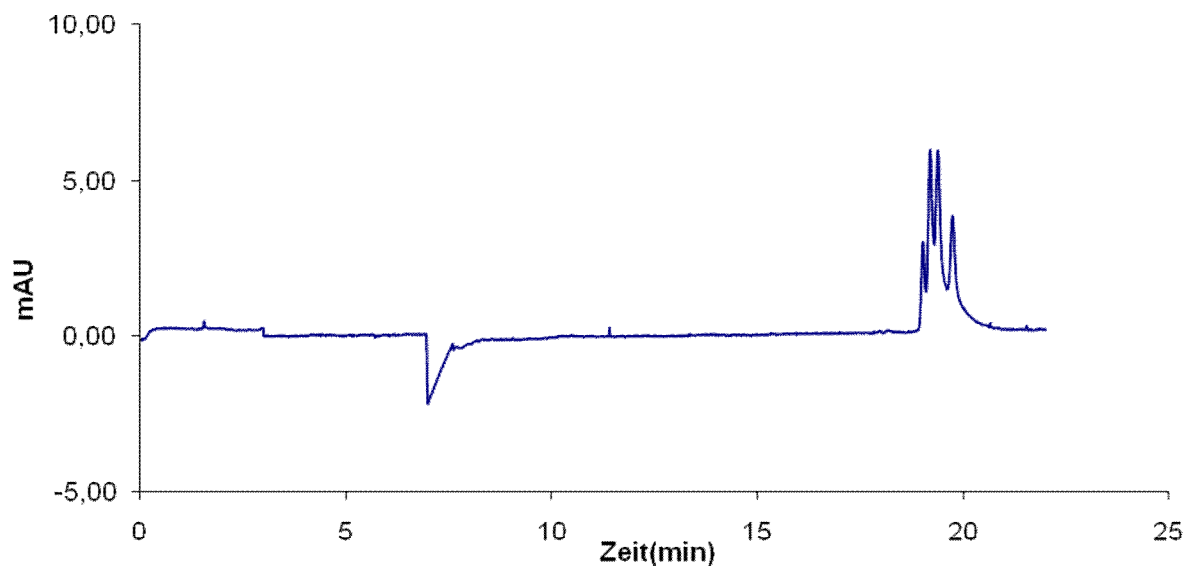
Abb. 26. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100m, Sucrose 180mg/100ml,Fructose90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 5 kV wurden angelegt.



3.2.2. 67/60 cm lange Kapillare

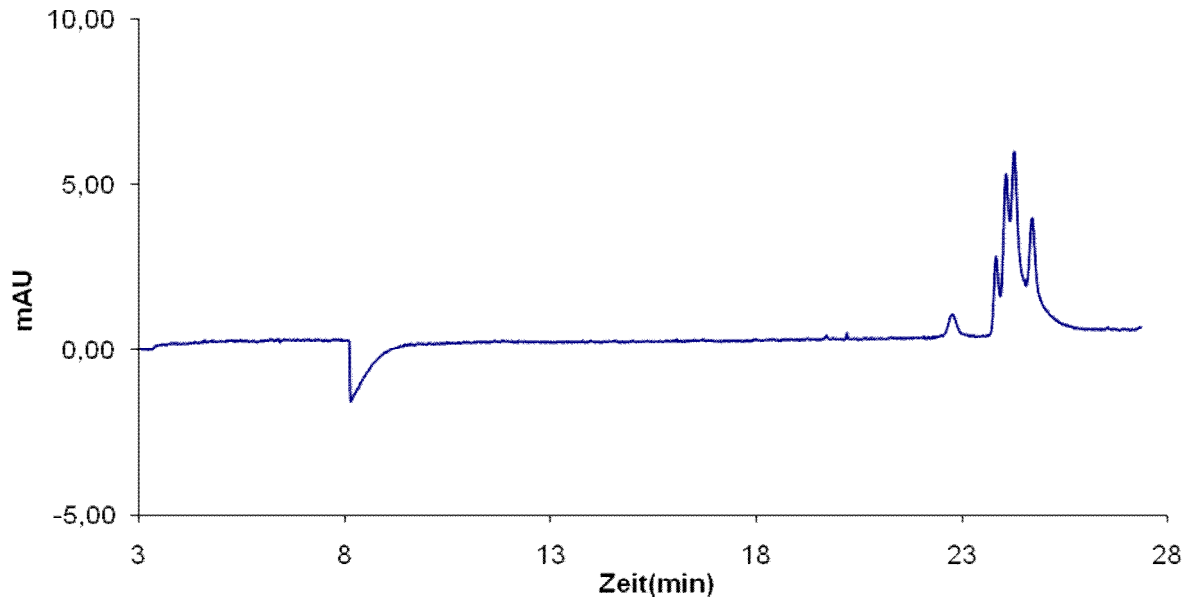
4 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

Abb. 27. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.



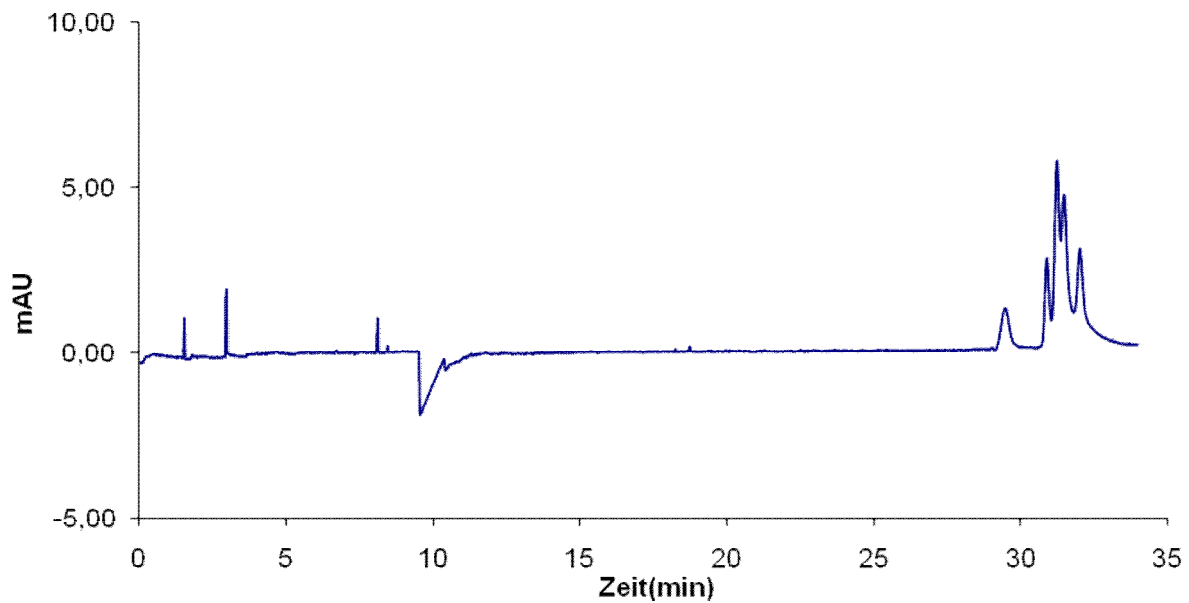
4 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 5% MeOH

Abb. 28. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.



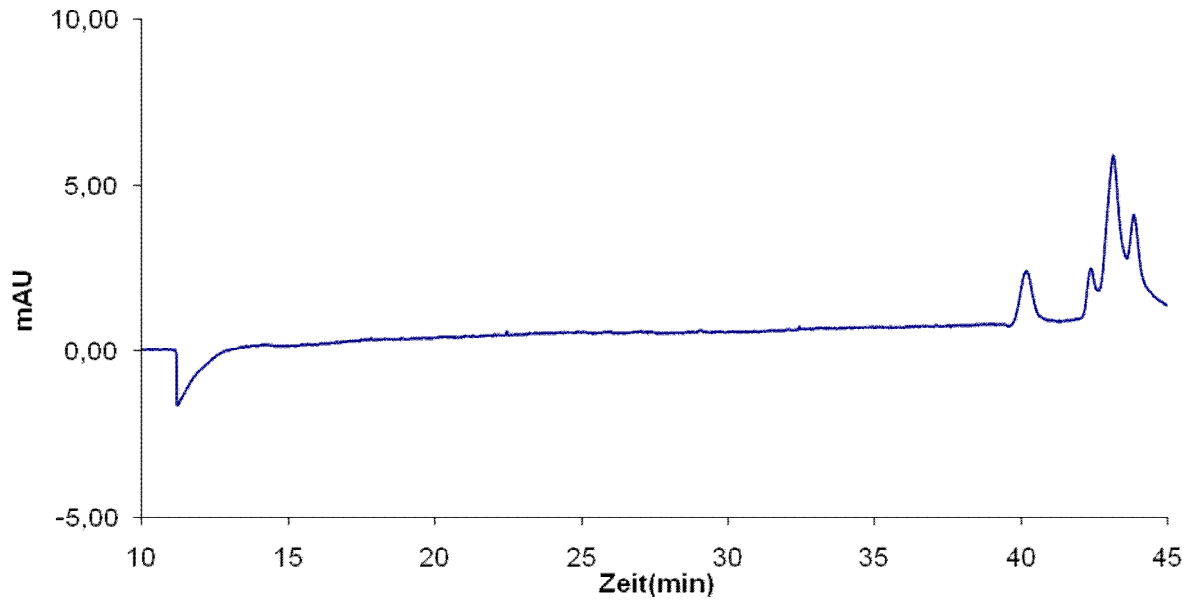
4 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% MeOH

Abb. 29. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.



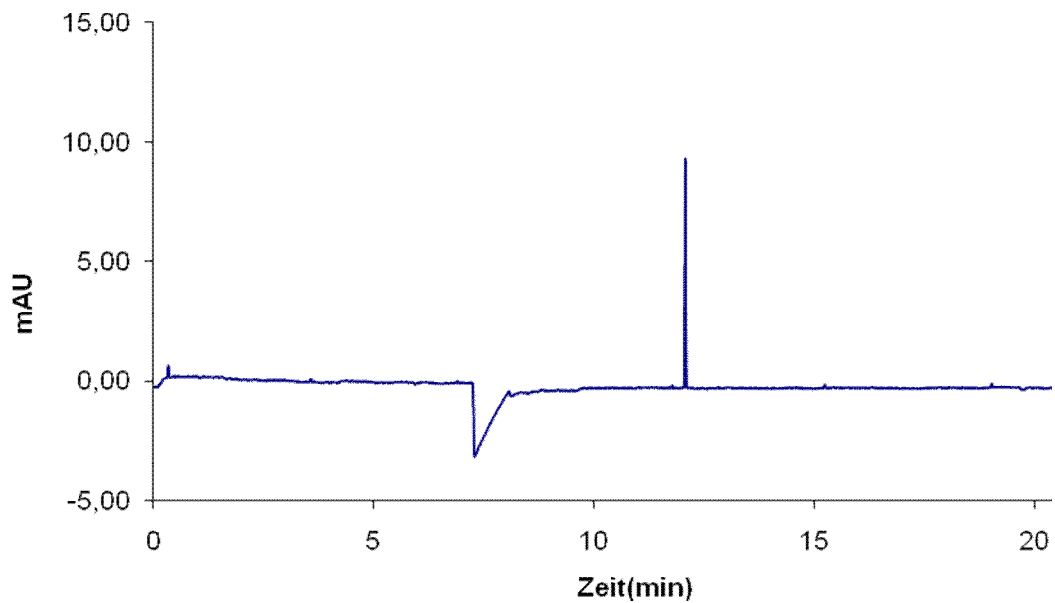
4 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 15% MeOH

Abb. 30. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.



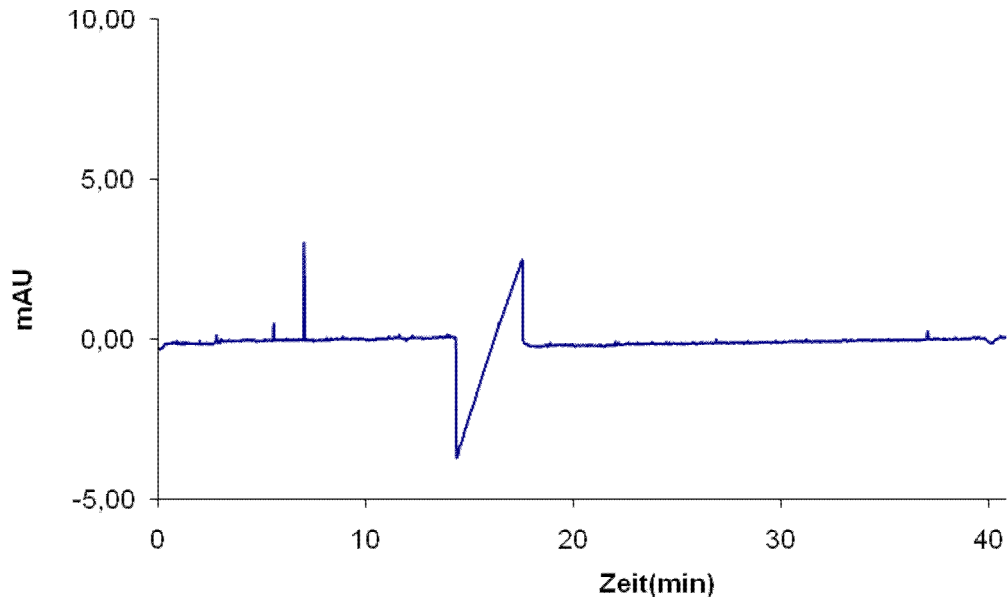
6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

Abb. 31. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.



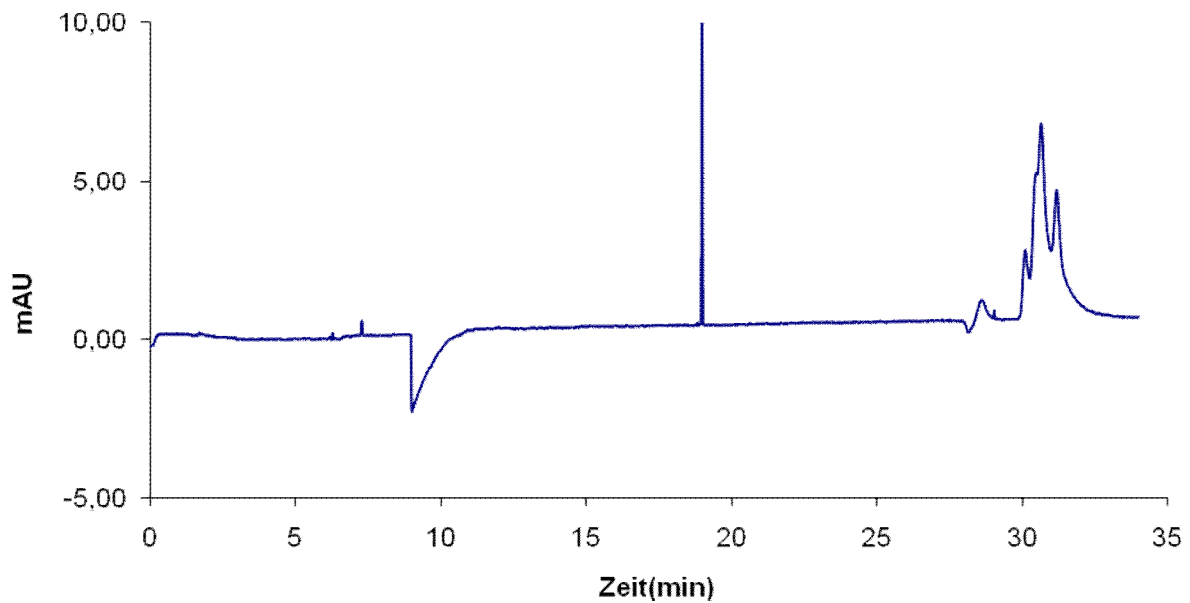
6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer

Abb. 32. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 10 kV wurden angelegt.



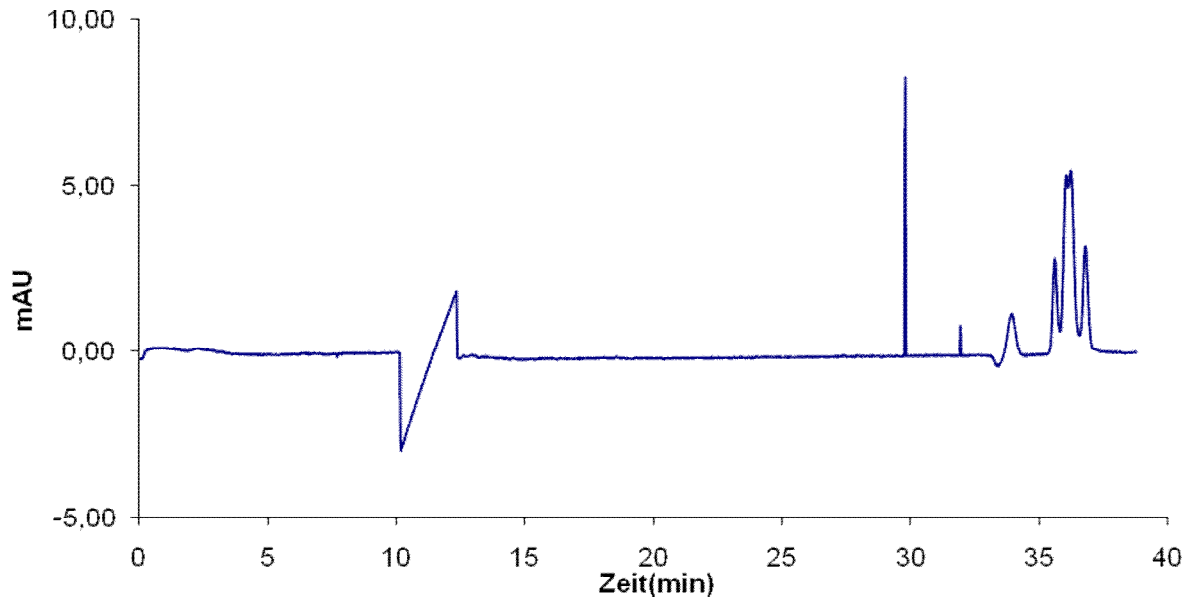
6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 5% MeOH

Abb. 33. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.



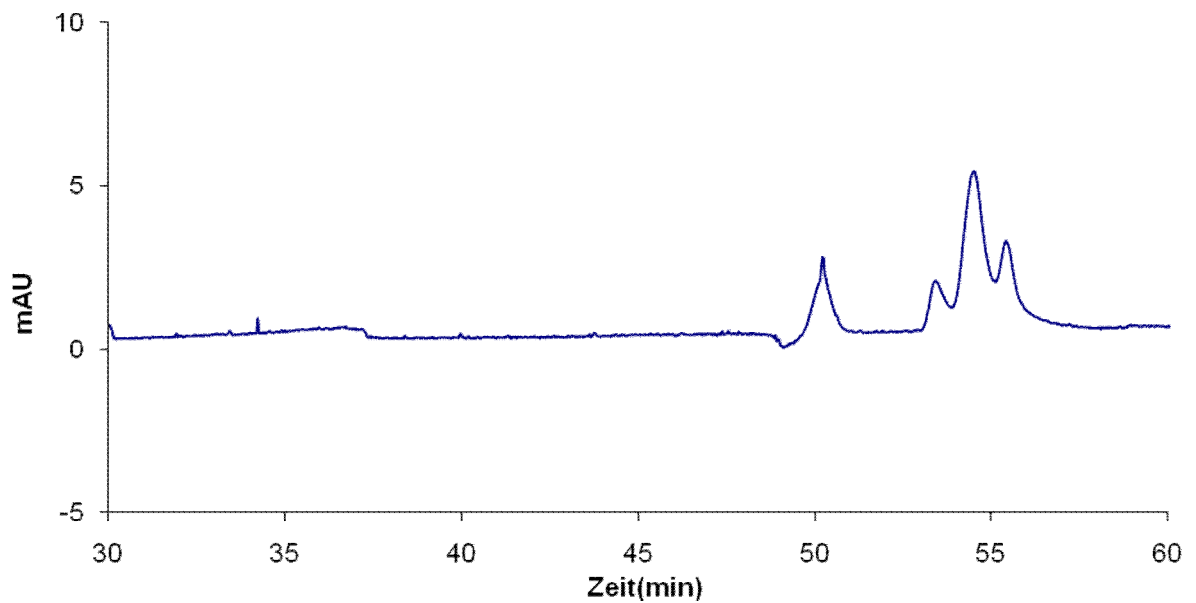
6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 10% MeOH

Abb. 34. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.



6 mM CuSO₄ • 5H₂O Puffer + 15% MeOH

Abb. 35. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 20 kV wurden angelegt.



3.3. Auswahl des internen Standards

Um ein interner Standard zu finden, wurde Lactulose (80mg/100ml) mit folgenden Substanzen injiziert: Glycerol (90,0mg/100ml), Mannitol (90,0mg/100ml), Glucose (90mg/100ml), Sucrose (90mg/100ml) und Asparaginsäure (90mg/100ml). Probelösungen wurden durch Auflösung der gegebenen Menge der Substanz in Wasser (HPLC-Qualität) vorbereitet.

3.4. Validation

3.4.1. Spezifität

Um die Spezifität der Methode zu zeigen wurden Hintergrundelektrolyte (Puffer), Lösungsmittel (Wasser und 500 mM Ammoniaklösung), eine Lösung des internen Standards (Asparaginsäure) und Lactuloselösung je einmal injiziert. Folgende Lösungen wurden injiziert:

Lactuloselösung (10,0mg/10ml), Asparaginsäure (10,0mg/10ml), Wasser (HPLC Gradient Grade), Ammoniaklösung (500mM) und Puffer (6mM $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Abb. 36. Kapillare: 67/60cm, I.D.: 50 μm ; Puffer: 6mM $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Spannung: 20kV; Probe: Lactulose (10,0mg/10 ml).

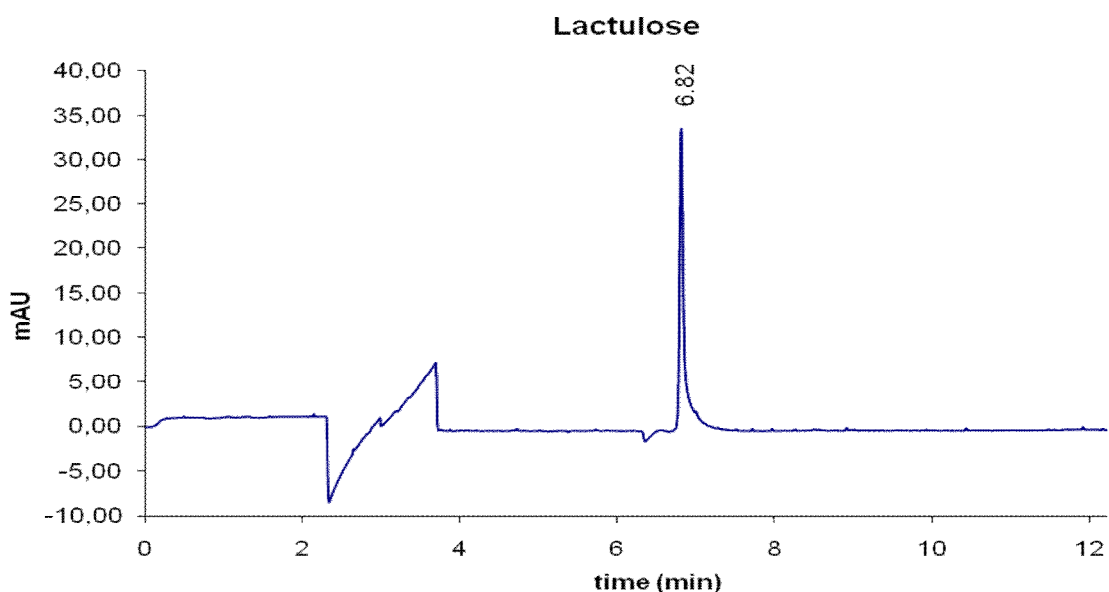


Abb. 37. Kapillare: 67/60cm, I.D.: 50 m; Puffer: 6mM $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Spannung: 20kV;
Probe: Asparaginsäure (10,0mg/10ml).

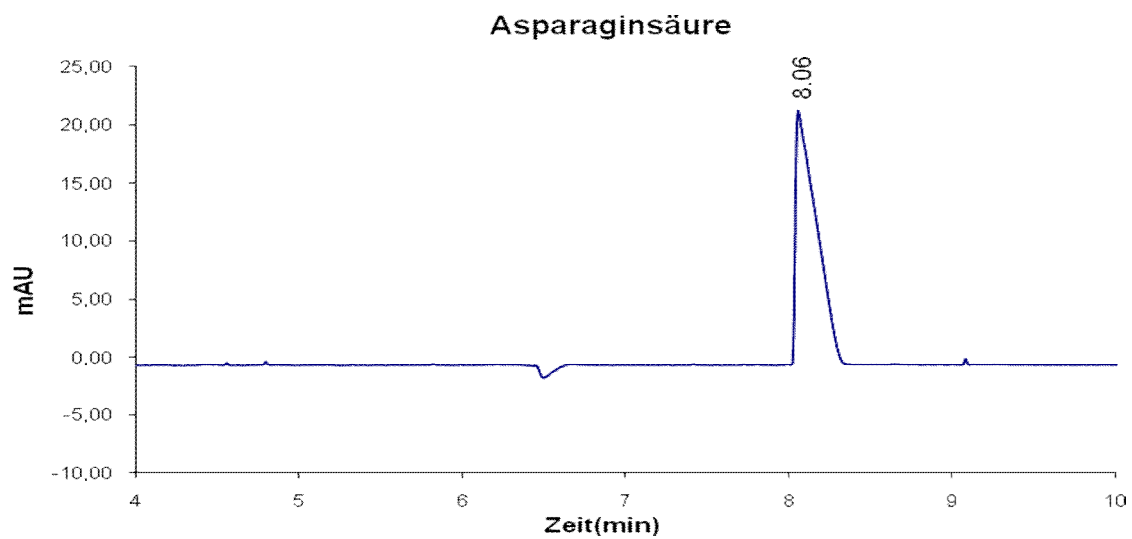


Abb. 38. Kapillare: 67/60cm, I.D.: 50 m; Puffer: 6mM $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Spannung: 20kV;
Probe: Wasser (HPLC-Qualität).

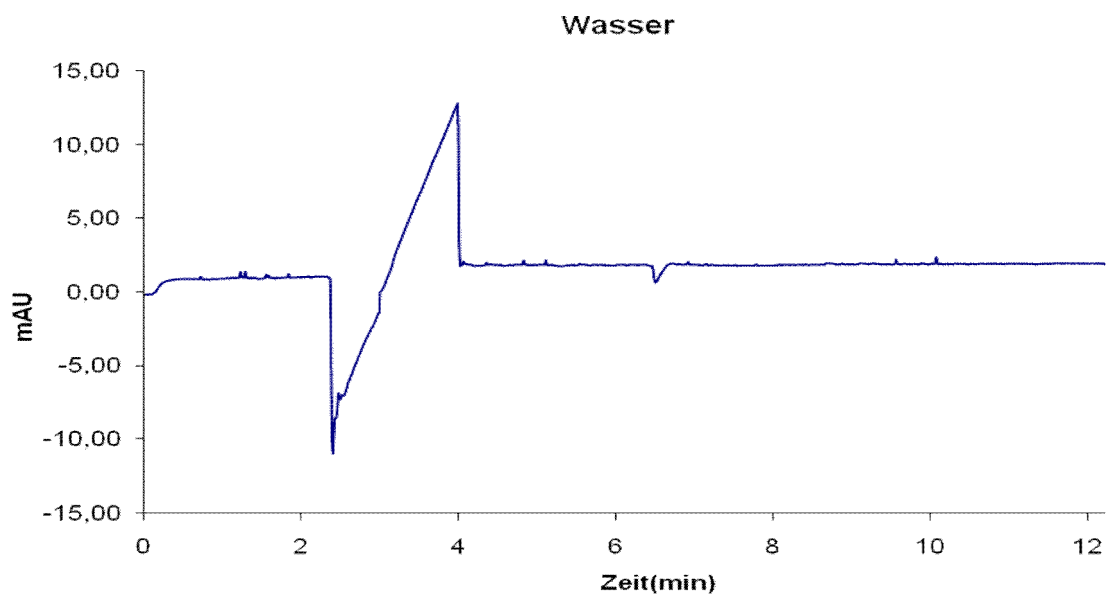


Abb. 39. Kapillare: 67/60cm, I.D.: 50 m; Puffer: 6mM $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Spannung: 20kV;
Probe: 500mM Ammoniaklösung.

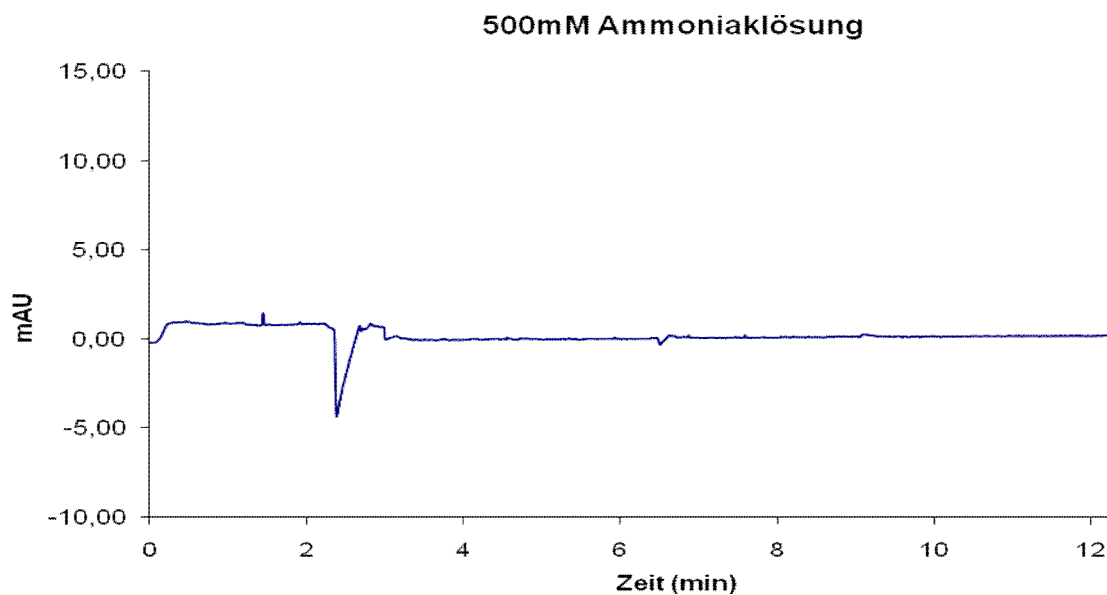
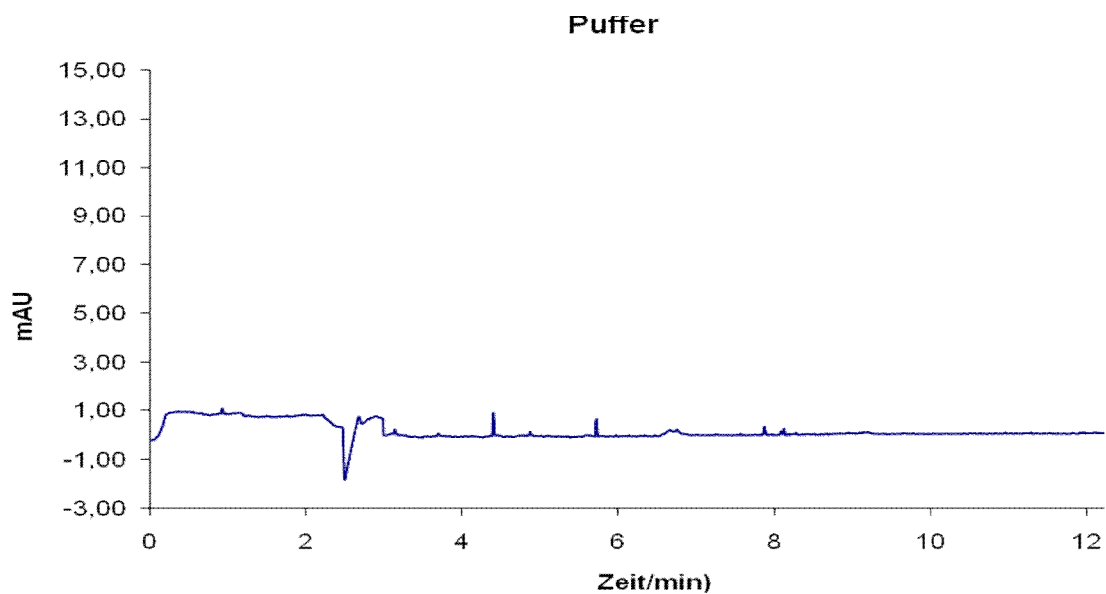


Abb. 40. Kapillare: 67/60cm, I.D.: 50 m; Puffer: 6mM $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Spannung: 20kV;
Probe: Puffer (6mM $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).



3.4.2. Linearer Bereich

Die Bestimmung des linearen Bereiches wurde mit einer 67/60 cm und einer 37/30 cm langen Kapillare unter Verwendung eines internen Standards durchgeführt.

67/60 cm lange Kapillare

Stammlösungen A

0,798 g Lactulose wurden in einem 100,0 ml Messkolben in Wasser gelöst. Diese Stammlösung enthält also 0,791 g Lactulose Reinsubstanz (bezogen auf das Analysenzertifikat des Lieferanten) in 100,0 ml und wurde mit Wasser (HPLC Qualität) als Lösungsmittel auf die Konzentrationen der Standardlösungen verdünnt und analysiert.

Stammlösung B

0,592 g Asparaginsäure wurden in einem 100,0 ml Messkolben in Wasser gelöst. Von dieser Lösung wurde zu jeder Standardlösung 1,0 ml zugegeben. Jeder Standardlösung enthält also 5,92mg Asparaginsäure in 10,0 ml.

Standardlösungen

3,95 mg/10 ml

0,50 ml der Stammlösung A und 1,0 ml der Stammlösung B wurden zu 10,0 ml verdünnt.

4,74 mg/10 ml

0,60 ml der Stammlösung A und 1,0 ml der Stammlösung B wurden zu 10,0 ml verdünnt.

5,54 mg/10 ml

0,70 ml der Stammlösung A und 1,0 ml der Stammlösung B wurden zu 10,0 ml verdünnt.

6,33 mg/ 10 ml

0,80 ml der Stammlösung A und 1,0 ml der Stammlösung B wurden zu 10,0 ml verdünnt.

7,91 mg/ 10 ml

1,0 ml der Stammlösung A und 1,0 ml der Stammlösung B wurden zu 10,0 ml verdünnt.

Lactulose und Asparaginsäure wurden zusammen in einem Messkolben eingewogen. Jede Konzentration der Standardlösung enthält also eine andere Menge der Asparaginsäure. Dies wurde bei der Berechnung entsprechend berücksichtigt.

37/30 cm lange Kapillare

Stammlösungen

0,775 g Lactulose und 0,567 g Asparaginsäure wurden zusammen eingewogen, mit 10 ml 500 mM Ammoniaklösung versetzt und mit Wasser zu 100,0 ml verdünnt. Diese Stammlösung enthält also 0,768 g Lactulose Reinsubstanz in 100,0 ml und wurde mit Wasser (HPLC-Qualität) als Lösungsmittel auf die Konzentrationen der Standardlösungen verdünnt und analysiert.

Standardlösungen

3,84 mg/10 ml

0,50 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

4,61 mg/10 ml

0,60 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

5,38 mg/10 ml

0,70 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

6,14 mg/ 10 ml

0,80 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

6,91 mg/ 10 ml

0,90 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

7,68 mg/ 10 ml

1,00 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

Lactulose und Asparaginsäure wurden zusammen in einem Messkolben eingewogen. Jede Konzentration der Standardlösung enthält also eine andere Menge der Asparaginsäure. Dies wurde bei der Berechnung entsprechend berücksichtigt.

3.4.3. Richtigkeit

Die Feststellung der Richtigkeit wurde mit 9 Aufarbeitungen (je drei bei etwa 80 %, 100 % und 120 % der Konzentration der Lactuloseproben) durchgeführt. Aus jeder Einwaage wurden drei Injektionen injiziert und aus diesen drei Werten wurde der Mittelwert berechnet.

Einwaage 1

Stammlösung

0,795 g Lactulose (d. h. 0,788 g Lactulose Reinsubstanz) und 0,593 g Asparaginsäure wurden zusammen eingewogen, mit 10 ml 500 mM Ammoniaklösung versetzt und mit Wasser zu 100,0 ml verdünnt. Diese Stammlösung wurde mit Wasser für HPLC als Lösungsmittel auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt und analysiert.

Standardlösungen

5,52 mg/10 ml

0,70 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

6,30 mg/10 ml

0,80 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

7,88 mg/10 ml

1,00 ml der Stammlösung wurde zu 10,0 ml verdünnt.

Die gemessene Peakflächen wurden über die Kalibartionsfunktion: $y = 7,9001 + 0,2303$ berechnet. Die Menge des internen Standards wurde entsprechend der Einwaage rechnerisch korrigiert.

Einwaage 2

Stammlösung

0,801 g Lactulose (d. h. 0,796 g Lactulose Reinsubstanz) und 0,588 g Asparaginsäure wurden zusammen eingewogen, mit 10 ml 500 mM Ammoniaklösung versetzt und mit Wasser auf 100,0 ml verdünnt. Diese Stammlösung wurde mit Wasser für HPLC als Lösungsmittel auf die Konzentrationen der Standardlösungen verdünnt und analysiert.

Standardlösungen

5,57 mg/10 ml

0,70 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

6,37 mg/10 ml

0,80 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

7,96 mg/10 ml

1,00 ml der Stammlösung wurde zu 10,0 ml verdünnt.

Die Konzentrationen der Proben wurden über die gemessene Peakfläche mittels der Kalibrationsfunktion: $y = 7,9001 + 0,2303$ berechnet. Die Menge des internen Standards wurde entsprechend berücksichtigt.

Einwaage 3

Stammlösung

0,798 g Lactulose (d. h. 0,791 g Lactulose Reinsubstanz) und 0,569 g Asparaginsäure wurden zusammen eingewogen, mit 10 ml 500 mM Ammoniaklösung versetzt und mit Wasser zu 100,0 ml verdünnt. Diese Stammlösung wurde mit Wasser für HPLC als Lösungsmittel auf die Konzentrationen der Standardlösungen verdünnt und analysiert.

Standardlösungen

5,54 mg/10 ml

0,70 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

6,32 mg/10 ml

0,80 ml der Stammlösung wurden zu 10,0 ml verdünnt.

7,91 mg/10 ml

1,00 ml der Stammlösung wurde zu 10,0 ml verdünnt.

Die Konzentrationen der Proben wurden über die gemessenen Peakflächen mittels der Kalibrationsfunktion: $y = 7,9001 + 0,2303$ berechnet. Die Menge des internen Standards wurde entsprechend berücksichtigt.

3.5. Messung der kommerziellen Präparaten

Dichtebestimmung

10 ml Messkolben wurde tariert, dann mit Lactulose-Sirup befüllt und dann wieder abgewogen. Jedes Präparat wurde dreimal abgewogen und der Mittelwert wurde berechnet.

Jedes Präparat wurde dann analysiert.

Probe 1:

0,911g Lactulose-Sirup wurden in einem 100,0 ml Messkolben in HPLC Wasser gelöst. 1 ml dieser Lösung und 1 ml der Asparaginsäurelösung (0,592g/100ml) wurden mit HPLC Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt.

Probe 2:

0,932g Lactulose-Sirup wurden in einem 100,0 ml Messkolben in HPLC Wasser gelöst. 1 ml dieser Lösung und 1 ml der Asparaginsäurelösung (0,592g/100ml) wurden mit HPLC Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt.

Probe 3:

1,064g Lactulose-Sirup wurden in einem 100,0 ml Messkolben in HPLC Wasser gelöst. 1 ml dieser Lösung und 1 ml der Asparaginsäurelösung (0,592g/100ml) wurden mit HPLC Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt.

Probe 4:

0, 875g Lactulose-Sirup wurden in einem 100,0 ml Messkolben in HPLC Wasser gelöst. 1 ml dieser Lösung und 1 ml der Asparaginsäurelösung (0,592g/100ml) wurden mit HPLC Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt.

Probe 5:

0, 883g Lactulose-Sirup wurden in einem 100,0 ml Messkolben in HPLC Wasser gelöst. 1 ml dieser Lösung und 1 ml der Asparaginsäurelösung (0,592g/100ml) wurden mit HPLC Wasser auf 10,0 ml aufgefüllt.

Abb. 41. Lactulose-Sirup, Probe 1; Puffer. 6mM Cu₂SO₄ 5H₂O; Kapillare: 67/60 cm, I. D.: 50 m; 20 kV wurden angelegt.

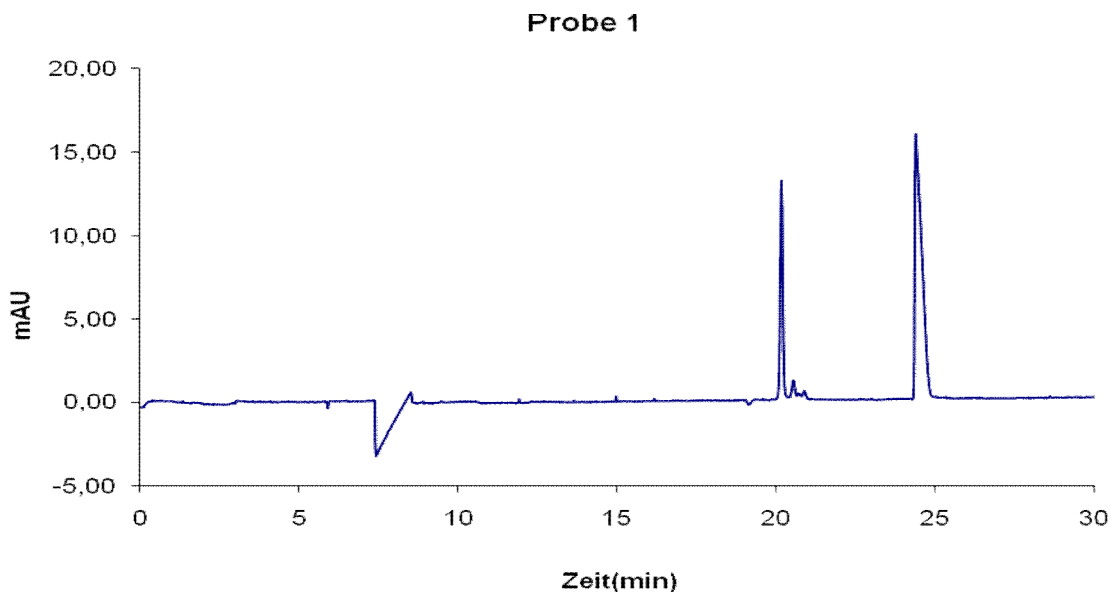


Abb. 42. Lactulose-Sirup: Probe 2; Puffer. 6mM Cu₂SO₄ 5H₂O; Kapillare: 67/60 cm, I. D.: 50 m; 20 kV wurden angelegt.

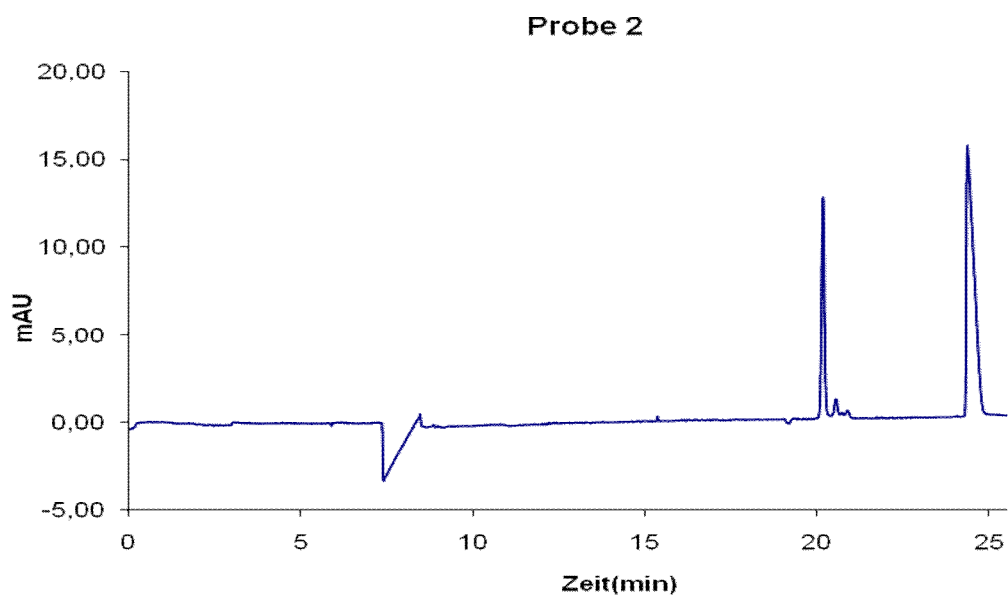


Abb. 43. Lactulose-Sirup: Probe 3; Puffer. 6mM Cu₂SO₄ 5H₂O; Kapillare: 67/60 cm, I. D.: 50 m; 20 kV wurden angelegt.

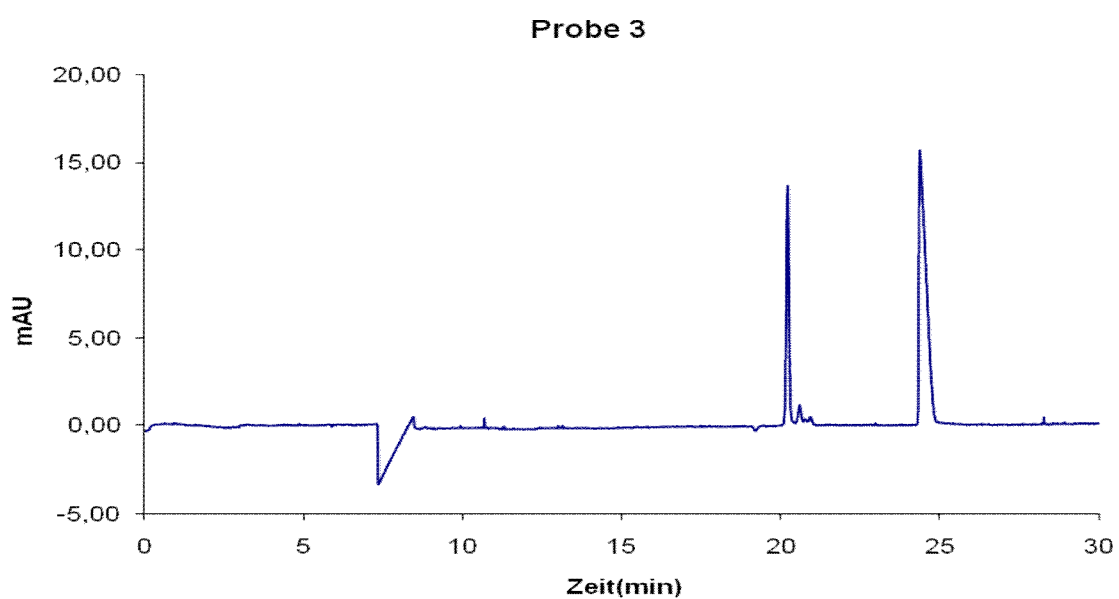


Abb. 44. Lactulose-Sirup: Probe 4; Puffer. 6mM Cu₂SO₄ 5H₂O; Kapillare: 67/60 cm, I. D.: 50 m; 20 kV wurden angelegt.

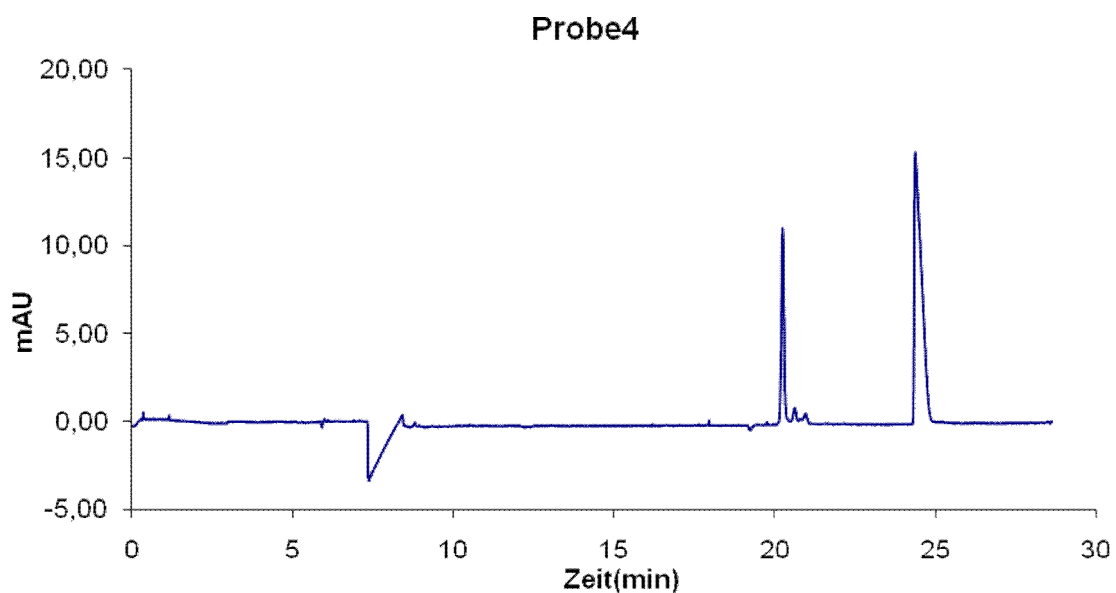
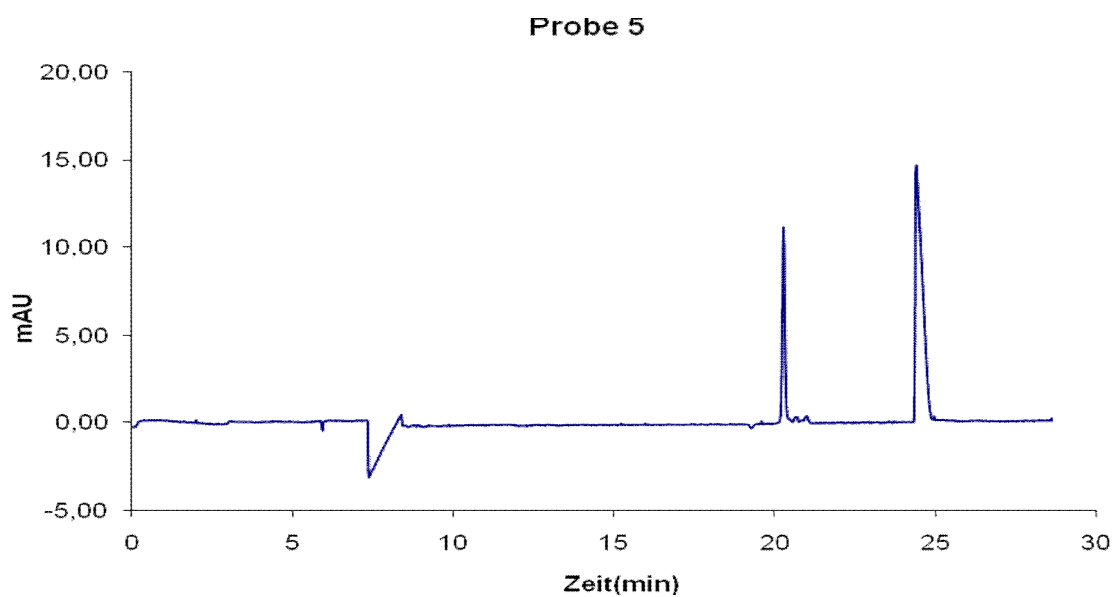


Abb. 45. Lactulose-Sirup: Probe 5; Puffer. 6mM Cu₂SO₄ 5H₂O; Kapillare: 67/60 cm, I.D.: 50 m; 20 kV wurden angelegt.



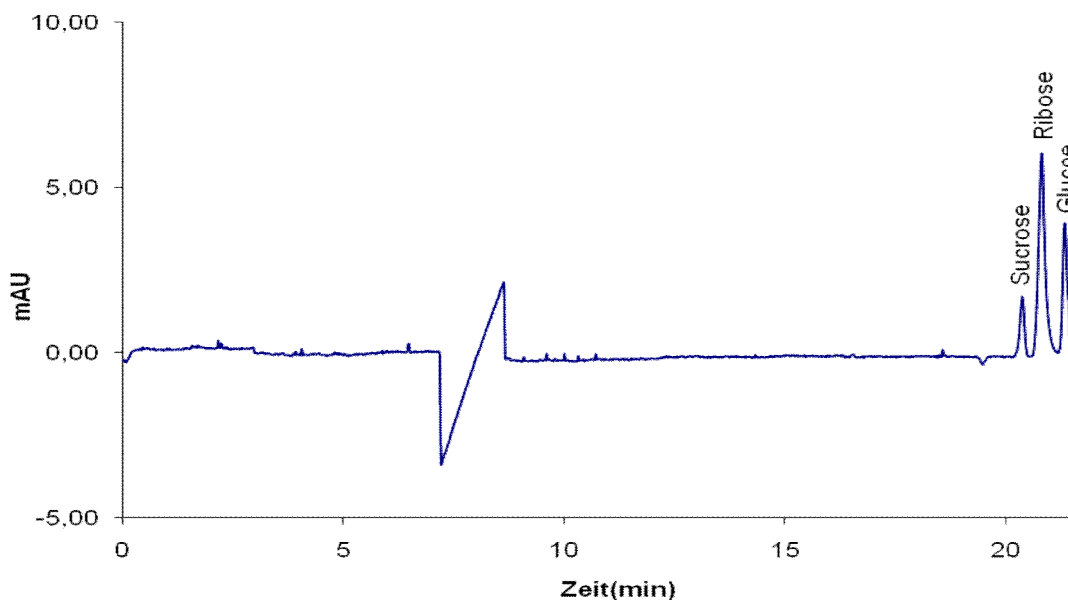
Die Konzentrationen der Proben wurden über die gemessene Peakfläche mittels der Kalibrationsfunktion: $y = 7,9001 + 0,2303$ berechnet. Die Menge des internen Standards wurde entsprechend berücksichtigt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Ergebnisse der Methodenentwicklung und Optimierung

Das Ziel der Methodenentwicklung war es, ein geeignetes System zur Bestimmung des Lactulose-Sirups zu finden und dieses System zu optimieren. Meine Methode basiert auf einer Methode, die A. Bazzanella und K. Bächmann¹² entwickelt haben. Sie haben Sucrose, Ribose und Glucose erfolgreich voneinander getrennt. Die in der Literatur beschriebenen Bedingungen wurden an das Trennproblem bzw. die instrumentelle Ausstattung hin angepasst. Zur Überprüfung wurde dasselbe Experiment durchgeführt, das Ergebnis ist in in Abb. 46 dargestellt. Es gelang, die Basislinientrennung der drei Zucker ohne Schwierigkeiten nachzuvollziehen.

Abb. 46. Kapillarlänge: 67/60 cm, I.D.: 50µm; Spannung: 20 kV; Temperatur: 20°C; Injektion: Druck 5s, Elektrolyten: 6 mM CuSO₄ • 5H₂O, 500mM Ammoniaklösung; Proben: Ribose und Glucose 90mg/100ml, Sucrose 180 mg/100 ml; Detektion: direkt UV, 254nm.



Allerdings gelang bei anderen Zuckermischungen keine Basislinientrennung aller Analyte. Einer der möglichen Gründe kann sein, dass Sucrose, Ribose und Glucose verschiedene molare Massen haben. Zucker mit gleicher molare Masse haben meistens auch sehr ähnliche

Migrationszeiten (Ausnahme bestätigten die Regel). Dies kann entweder wirklich nur auf die reine Molekularmasse zurückzuführen sein, andererseits könnte auch eine sehr ähnliche Komplexierung mit Kupfer-Ionen innerhalb einer Zuckerspezies (z. B. Pentosen, Aldohexosen usw.) der Grund hierfür sein. Um diesen Nachteil der Methode zu eliminieren, wurde die Methode durch verschiedene Abänderungen optimiert.

Vorversuche wurden mit einer 47cm und einer 67cm langen Kapillare durchgeführt. Zum Validierung wurde aber auch eine 37 cm lange Kapillare verwendet. Die Länge der Kapillare beeinflusst die Trennzeit. Je kürzer die Kapillare ist, desto kürzer sind die Analysezeiten. Dabei kann sich jedoch die Trennung, wenn in der Probe Substanzen mit ähnlichen Migrationszeiten vorliegen, verschlechtern.

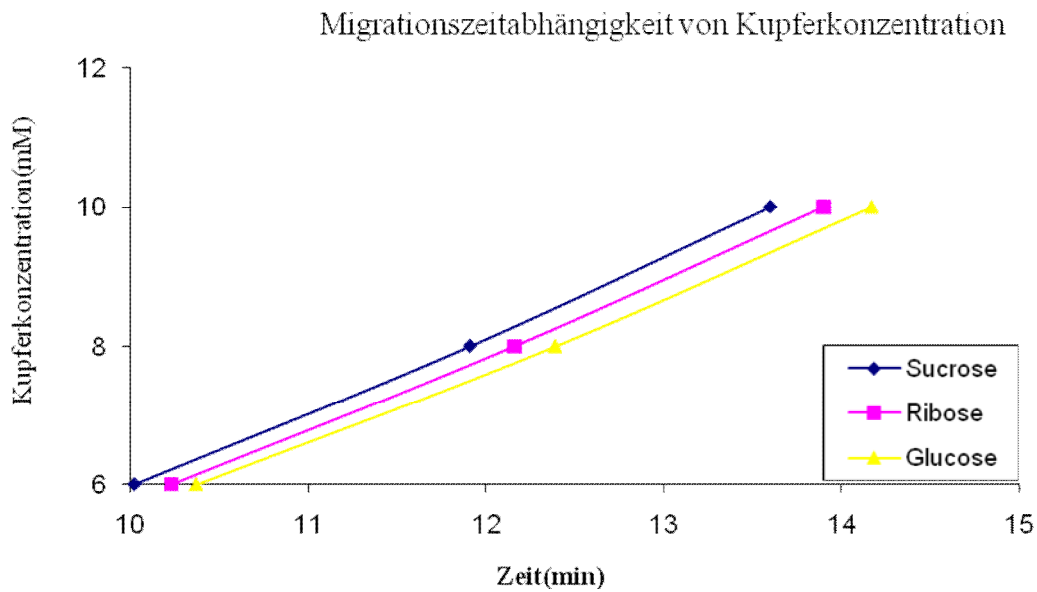
Grundparameter der Optimierung waren:

- Pufferkonzentration
- Zusatz der organischen Modifizierfaktoren
- Abänderungen der angelegten Spannung/Strom

4.1.1. Optimierung der Pufferkonzentration

Eine Migrationszeitabhängigkeit von der Kupferkonzentration wurde beobachtet. Mit steigender Konzentration der Kupferionen im Puffer wurde die Migration der Analyte verlangsamt. Theoretisch soll diese Erscheinung die Trennung verbessern, praktisch aber war die Trennung am besten, als ein 6mM Puffer verwendet wurde. Höhere Konzentration des Kupfers verursachten eine größere Bandenverbreitung sowie stärkeres Rauschen in der Grundlinie. In Abb. 47 ist die Abhängigkeit der Migrationszeit der drei Kohlenhydrate von der Kupferionen-Konzentration gezeigt. Deutlich sichtbar ist, dass die Differenzen in der Migrationszeit praktisch unverändert bleiben.

Abb. 47. Migrationszeitabhängigkeit von Kupferkonzentrationen. Kapillare: 47/40 cm; 20 kV wurden angelegt.



4.1.2. Zusatz von organischen Modifikationsfaktoren

Methanol, Isopropanol und Acetonitril wurden zur Modifikation des Puffers verwendet. Durch ihre Viskosität wurde die Trennzeit ebenfalls verlängert. Konzentrationsabhängigkeiten von Methanol im Puffer wurden in Abb. 48 und 49 gezeigt.

Abb. 48. Konzentrationsabhängigkeit von Methanol im 4mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Puffer; Kapillare: 67/60cm; 20kV wurden angelegt.

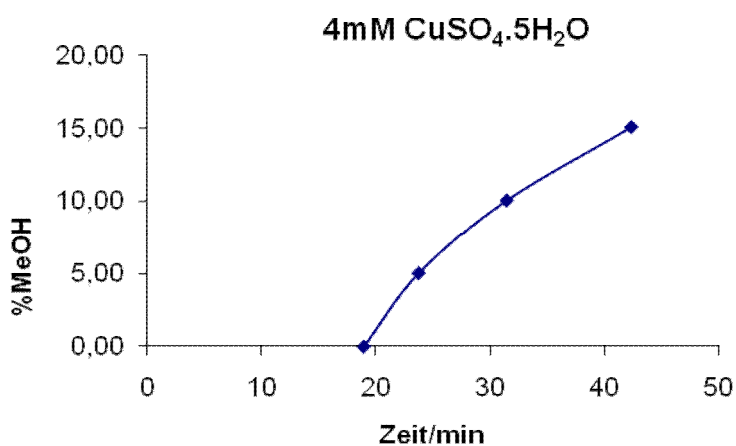
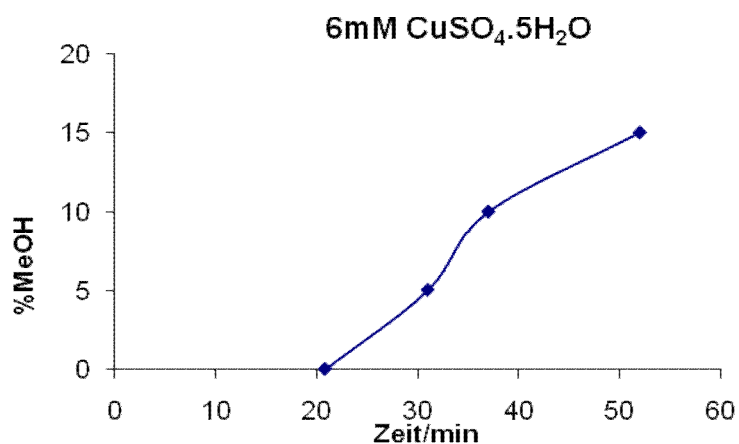


Abb.49. Konzentrationsabhängigkeit von Methanol im 6mM CuSO₄·5H₂O Puffer.

Kapillare: 67/60cm; 20kV wurden angelegt.

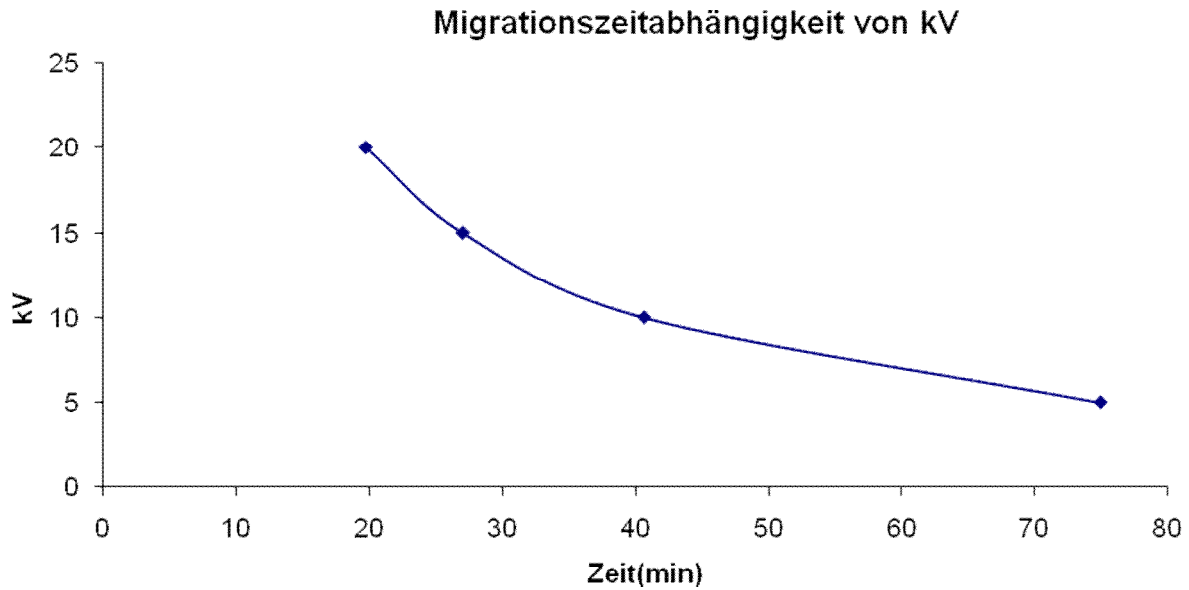


Isopropanol und Methanol in Konzentration von 10% bzw. 15% haben eine Verbesserung der Trennung gezeigt.

4.1.3. Optimierung der angelegten Spannung/ des angelegten Stromes

Je kleiner die angelegte Spannung/Strom war, desto langsamer wurde die Wanderungsgeschwindigkeit der Analyte. Allerdings wurden die Peaks wegen der Diffusion sehr breit, fast undeutlich und überhaupt nicht getrennt. Migrationsabhängigkeit von angelegter Spannung wurde in Abb. 50 dargestellt.

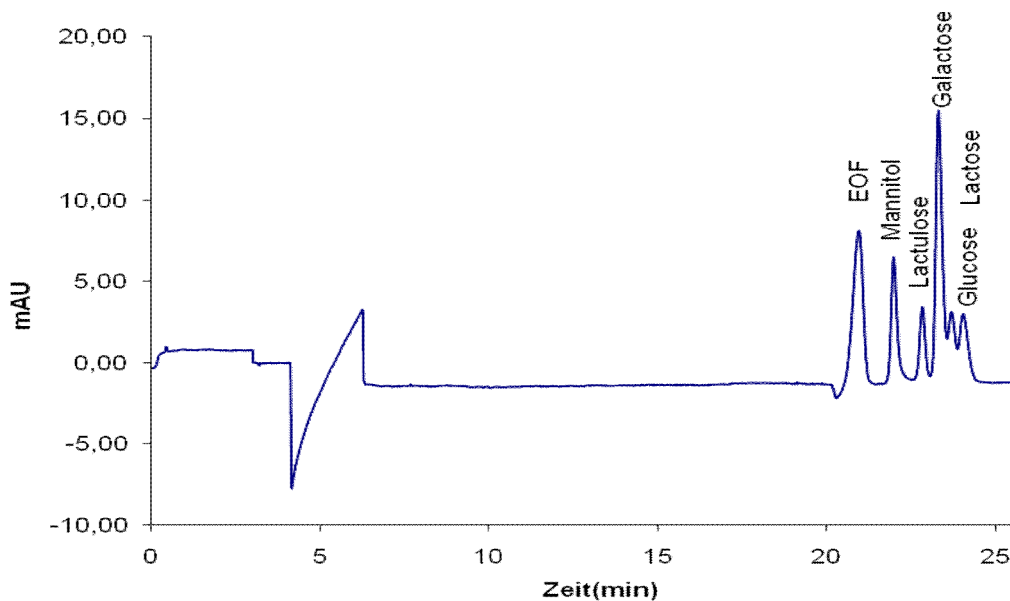
Abb. 50. Migrationsabhängigkeit von angelegter Spannung. Kapillare: 47/40 cm; Puffer: 10mM CuSO₄ 5H₂O.



Beste Trennungseffizienz wurde gezielt, wenn 20 kV, bzw. 10 A angelegt wurden.

4.1.4. Identifikation der Zucker in einer Zuckermischung:

Abb. 51. CE Chromatogramm der Zuckermischung (Glucose 90mg/100ml, Galactose 90mg/100ml, Lactose 90mg/100ml, Fructose 90mg/100ml, Mannitol 360mg/ml, Lactulos-Sirup 2 66,7mg/100ml). 13 µA wurden angelegt.



Obwohl es nicht gelungen hat, eine universelle Methode für die Trennung aller Zucker zu entwickeln, konnte Lactulose von ihren Abbauprodukten getrennt werden. Die besten Bedingungen sind folgende: eine 67/60 cm lange Kapillare, 6mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Puffer + 15% Isopropanol, 13 A (konstanter Strom).

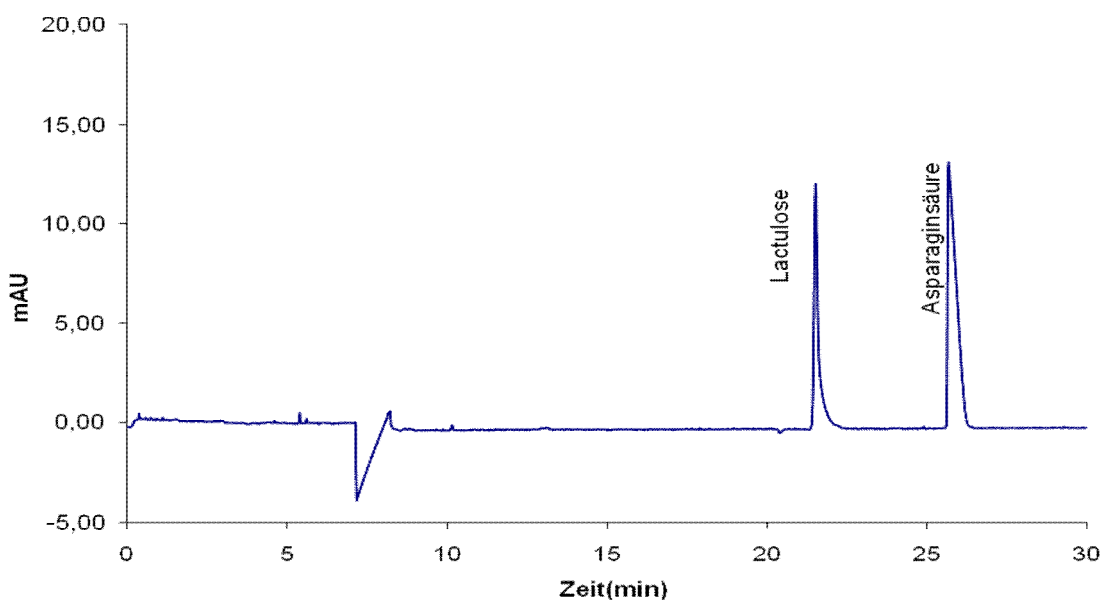
4.2. Ergebnisse der Auswahl des internen Standards

Verschiedene Zucker und Zuckeralkohole wurden auf ihre Eignung getestet. Es wurde vorausgesetzt, dass eine Verbindung mit ähnlicher Struktur wie Probensubstanz (Lactulose) aber unterschiedlichem Molekulargewicht unter den verwendeten Bedingungen erfolgreich eingesetzt werden kann. (Folgende Zucker und Zuckeralkohol wurden getestet: Glycerol, Mannitol, Glucose, Sucrose.)

Alle haben aber sehr ähnliche Retentionszeit wie Lactulose, daher wurde eine andere Verbindung gesucht. Außer neutralen Zuckern wurden auch Kupfer-Komplexe unter gleichen Bedingungen von Aminosäuren gebildet werden.

Eine der Aminosäuren, die Asparaginsäure wurde deswegen auf ihre Eignung getestet.

Abb.52. Kapillare 67/60cm, I.D. 50 m; Spannung:20kV; Puffer: 6 mM $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Proben: Lactulose(7,92mg/10ml), Asparaginsäure (9,12mg/10ml).



Asparaginsäure ist von Lactulose eindeutig getrennt und erwies sich als ein guter interner Standard, deswegen wurde als ein interner Standard für quantitative Analyse angewendet.

4.3. Ergebnisse der Validation

4.3.1. Spezifität

Um die Spezifität der Methode zu zeigen wurden Hintergrundelektrolyte (Puffer), Lösungsmittel (Wasser und 500 mM Ammoniaklösung), eine Lösung des internen Standards (Asparaginsäure) und Lactuloselösung je einmal injiziert. Alle Lösungen, außer Lactuloselösung, zeigten kein Signal bei der Migrationszeitzeit von Lactulose.

Die Migrationszeit der Lactulose beträgt 6,82 min. Bei dieser Zeit gibt es kein Signal bei den anderen Proben. Spezifität wurde nachgewiesen.

4.3.2. Linearer Bereich

In dem Linearen Bereich einer Methode sollten die Messergebnisse direkt proportional zur Konzentration der geprüften Substanz sein. Außerdem ergibt sich aus dem linearer Bereich der Methode der Arbeitsbereich, der ein Teil der Validierung ist, dieser bestimmt die Konzentrationen von Lactulose in den Proben bei denen eine quantitative Analyse und eine Auswertung mittels der erhaltenen Kalibrationsfunktion möglich ist.

Die Bestimmung des linearen Bereiches wurde mit einer 67/60 cm und einer 37/30 cm langen Kapillare unter Verwendung eines internen Standards durchgeführt.

Messergebnisse wurden in Tab. 1 und 2. zusammengefasst und in Abb. 53 und 54 wurden Kalibrationsfunktionen gezeigt.

67/60 cm lange Kapillare

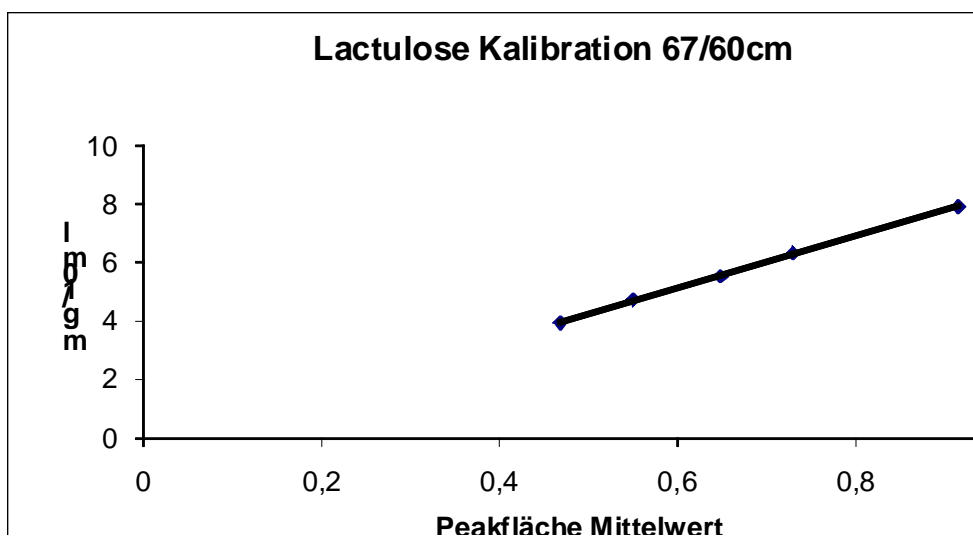
Tab. 1.: Peakflächen der Kalibartionskonzentrationen (bezogen auf den I. S.).

| mg/10ml | Peakfläche I. | Peakfläche II. | Mittelwert |
|---------|---------------|----------------|------------|
| 3,95 | 0,4781846 | 0,4574907 | 0,46783765 |
| 4,74 | 0,5653838 | 0,5335197 | 0,54945175 |
| 5,54 | 0,6707133 | 0,626118 | 0,64841565 |
| 6,33 | 0,7605966 | 0,6978653 | 0,72923095 |
| 7,91 | 0,948222 | 0,8828058 | 0,9155139 |

Geradengleichung der Kalibartionsfunktion : $y = 8,8204x \pm 0,149$

Korrelationskoeffizient: $R^2 = 0,9994$

Abb. 53. Kalibrationsfunktion von Lactulose



37/30 cm lange Kapillare

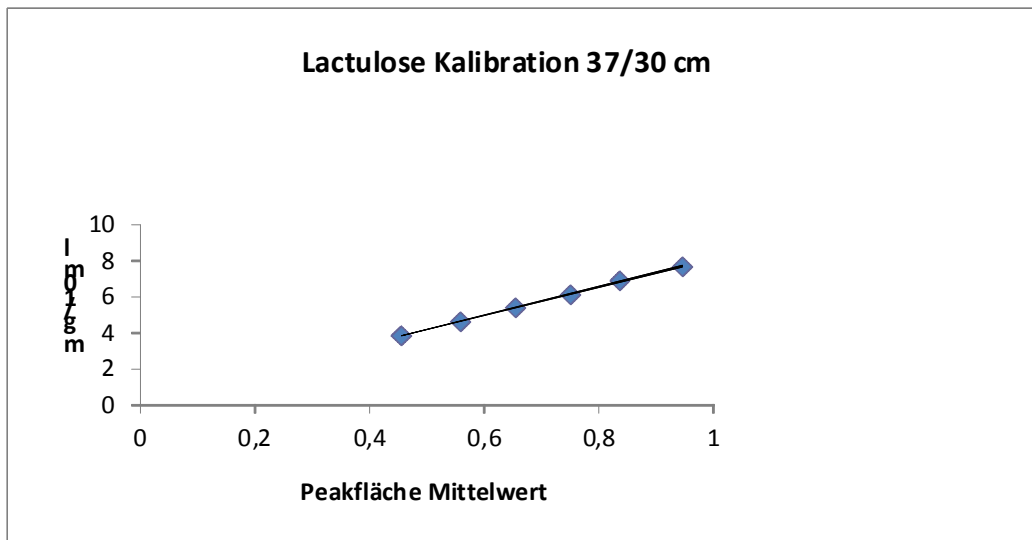
Tab.2.: Peakflächen der Kalibartionskonzentrationen (bezogen auf den I. S.).

| mg/10ml | Peakfläche I. | Peakfläche II. | peakfläche III. | Mittelwert |
|---------|---------------|----------------|-----------------|-------------|
| 3,84 | 0,447738245 | 0,435077666 | 0,482450919 | 0,455088943 |
| 4,61 | 0,545255484 | 0,537294247 | 0,587469494 | 0,556673075 |
| 5,38 | 0,649842904 | 0,614581978 | 0,693856635 | 0,652760506 |
| 6,14 | 0,730085847 | 0,718244565 | 0,805047973 | 0,751126128 |
| 6,91 | 0,814860041 | 0,795621198 | 0,902412274 | 0,837631171 |
| 7,68 | 0,897315148 | 0,876147204 | 1,065868569 | 0,94644364 |

Kalibrationsfunktion: $y = 7,90010 + 0,2303$

Korrelationskoeffizient: $R^2 = 0,9994$

Abb. 54. Kalibrationsfunktion von Lactulose



Die Linearität wurde nachgewiesen. Die Korrelationskoeffizienten bei den beiden Kapillarlängen sind größer als 0,99.

4.3.3. Richtigkeit

Messergebnisse wurden in Tab. 3, 4 und 5 zusammengefasst.

Einwaage 1

Tab. 3. Messergrbnisse der Richtigkeit

| | Mg | % | Mg | % | mg | % |
|----------------|--------|------|--------|------|--------|------|
| Einwaage | 5,52 | 100 | 6,3 | 100 | 7,88 | 100 |
| I. Injektion | 5,44 | 98,6 | 6,16 | 97,8 | 7,65 | 97,1 |
| II. Injektion | 5,52 | 100 | 6,24 | 99,1 | 7,81 | 99,1 |
| III. injektion | 5,44 | 98,6 | 6,14 | 97,5 | 7,75 | 98,4 |
| MW | 5,47 | 99,1 | 6,18 | 98,1 | 7,74 | 98,2 |
| S | 0,0462 | | 0,0530 | | 0,0808 | |

Einwaage 2

Tab. 4. Messergrbnisse der Richtigkeit

| | Mg | % | Mg | % | mg | % |
|----------------|--------|-------|--------|------|--------|-------|
| Einwaage | 5,57 | 100 | 6,37 | 100 | 7,96 | 100 |
| I. Injektion | 5,42 | 97,3 | 6,15 | 96,5 | 7,8 | 98 |
| II. Injektion | 5,35 | 96,1 | 6,36 | 99,9 | 8,07 | 101,4 |
| III. injektion | 5,65 | 101,5 | 6,37 | 100 | 8,08 | 101,5 |
| MW | 5,47 | 98,3 | 6,29 | 98,8 | 7,98 | 100,3 |
| S | 0,1570 | | 0,1242 | | 0,1589 | |

Einwaage 3

Tab. 5. Messergrbnisse der Richtigkeit

| | Mg | % | mg | % | mg | % |
|----------------|--------|-------|--------|------|--------|------|
| Einwaage | 5,54 | 100 | 6,32 | 100 | 7,91 | 100 |
| I. Injektion | 5,55 | 100,2 | 6,3 | 99,7 | 7,74 | 97,8 |
| II. Injektion | 5,48 | 98,9 | 6,3 | 99,7 | 7,78 | 98,3 |
| III. injektion | 5,43 | 98,1 | 6,24 | 98,7 | 7,72 | 97,6 |
| MW | 5,49 | 99,1 | 6,28 | 99,4 | 7,75 | 97,9 |
| S | 0,0603 | | 0,0346 | | 0,0306 | |

Die Richtigkeit der Bestimmung konnte gezeigt werden. Die Wiederfindung war zwischen 96,1% und 101,5% des deklarierten Gehaltes, die relativen Standardabweichungen überstiegen auch nicht die erlaubten Werte.

4.4. Ergebnisse der Probenmessung

Der Gehalt an Lactulose wurde bei den Präparaten in Gramm pro ml angegeben. Durch die erhöhte Viskosität des Sirups war es aber unmöglich Lactulose-Sirup genau zu pipettieren, deswegen wurde eine Dichtebestimmung durchgeführt. Die Messergebnisse wurden in der Tab.6. zusammengefasst.

Tab.6. Dichtebestimmung des Lactulose-Sirups

| Probe | g | g | g | Mittelwert/g |
|-------|-------|-------|-------|--------------|
| 1 | 13,46 | 13,54 | 13,52 | 13,51 |
| 2 | 13,47 | 13,44 | 13,48 | 13,46 |
| 3 | 13,20 | 13,21 | 13,16 | 13,19 |
| 4 | 13,24 | 13,27 | 13,30 | 13,27 |
| 5 | 13,22 | 13,21 | 13,22 | 13,22 |

Probe 1:

Die Lösung sollte 9,11 mg des Lactulose-Sirups, entsprechend 4,50 mg Lactulose Reinsubstanz, enthalten.

Probe 2:

Die Lösung sollte 9,32 mg des Lactulose-Sirups, entsprechend 4,62 mg Lactulose Reinsubstanz, enthalten.

Probe 3:

Die Lösung sollte 10,64 mg des Lactulose-Sirups, entsprechend 5,35 mg Lactulose Reinsubstanz, enthalten.

Probe 4:

Die Lösung sollte 8,75 mg des Lactulose-Sirups, entsprechend 4,40 mg Lactulose Reinsubstanz, enthalten.

Probe 5:

Die Lösung sollte 8,83 mg des Lactulose-Sirups, entsprechend 4,34 mg Lactulose Reinsubstanz, enthalten.

Die Messergebnisse wurden in folgender Tab.7. zusammengefasst:

Tab 7.: Messergebnisse der Probemessung

| Probe | Theoretischer Gehalt | Gemessener Gehalt | % |
|-------|----------------------|-------------------|------|
| 1 | 4,50 | 3,14 | 69,8 |
| 2 | 4,62 | 3,16 | 68,4 |
| 3 | 5,35 | 3,30 | 61,7 |
| 4 | 4,40 | 2,75 | 62,4 |
| 5 | 4,34 | 2,91 | 67,0 |

Alle Proben wurden gemessen, und der Gehalt in einzelnen Proben liegt unter 70% des deklarierten Gehaltes. Der Abbaugrad der Proben ist ziemlich hoch, da die Proben schon lange Zeit abgelaufen waren. Die Abbauprodukte sind in den Elektropherogrammen gut erkennbar.

5. Zusammenfassung

Kapillarelektrophorese ist eine herausragende analytische Methode bezüglich ihrer breiten Anwendbarkeit für die verschiedenen Biomoleküle. Im Unterschied zu anderen analytischen Methoden wie GC, HPLC oder TLC weist sie viele Vorteile auf, vor allem die notwendigen, lediglich minimale Probenvolumina, einen geringen Lösungsmittelverbrauch, kurze Trennzeit, hohe Auflösung und einfache Methodenentwicklung. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit von mir ein CE-Analysensystem für die Bestimmung des Osmolxans Lactulose entwickelt. Das einfachste und heute am häufigsten verwendete Trennverfahren der CE, welches ich auch verwendet habe, ist die Kapillaronenelektrophorese (CZE). Meine Arbeit basiert auf einer Methode, die von A. Bazzanella und K. Bächmann entwickelt wurde, diese nutzen die Bildung von Kupferkomplexen von Polyhydroxylverbindungen zum Nachweis solcher Verbindungen mittels CZE. In der hier vorliegenden Arbeit, handelt es sich um die Kapillarelektrophoretische Bestimmung von Lactulose nach Komplexbildung mit Kupfer(II)ionen in einem stark alkalischen Medium. Dies ermöglicht die direkte Detektion und es bedarf keiner Derivatisierung außerhalb der Kapillare. Die Vorteile der direkten Detektion beruhen u.a. auch darauf, dass der unerwünschte Effizienzverlust durch Peakverbreiterung, die bei der indirekten Detektion häufig vorkommt, entfällt und die Peaks eine bessere Symmetrie besitzen. Das zu entwickelnde System sollte einerseits für die quantitative Analyse geeignet sein, andererseits sollten die Abbauprodukte von der Wirksubstanz zumindest basisliniengetrennt werden. Die Spezifität der Methode wurde gezeigt und die einzelnen Zucker in einer Mischung von Abbauprodukten der Lactulose wurden identifiziert. Die Abbauprodukte wurden von der Lactulose getrennt, aber die einzelnen Abbauprodukte wurden unter keinen der untersuchten Bedingungen voneinander basisliniengetrennt. (Das gleiche gilt z. B. auch für Galactose und Fructose, die gleiche Migrationszeiten zeigen und für Lactose und Glucose.) Für die quantitative Analyse wurde Asparaginsäure als interner Standard verwendet, die Linearität nachgewiesen und die Geradengleichung der Kalibrationsfunktion berechnet. Die Richtigkeit konnte erfolgreich nachgewiesen werden. Man kann sagen, dass die Komplexbildung mit Kupfer(II)ionen eine universelle Methode zur Bestimmung von verschiedenen Zuckerarten (Ketosen, Aldosen, Zuckeralkohole) ist, trotzdem würden noch weitere Untersuchungen benötigt.

6. Shrnutí

Laktulosa ve formě sirupu je dnes velmi často používaným projímadlem. Po chemické stránce se jedná o neredukující cukr. Mezi běžné metody stanovení této látky patří například vysokouinná kapalinová chromatografie, plynová chromatografie, nebo tenkovrstvá chromatografie. Nejčastěji používanou metodou je právě HPLC, ale i další metody mají své klady. Jednou z vynikajících instrumentálních analytických metod pro stanovení různých biomolekul je kapilární elektroforéza (metoda založená na pohybu nabitých částic v elektrickém poli různou rychlostí a různými směry). Oproti ostatním metodám vykazuje značné výhody, kterými jsou například: potřeba minimálního množství vzorku pro analýzu, zanedbatelná spotřeba rozpouštědel - což zvyšuje i ekologičnost této metody, nebo vysoká rychlost analýzy. Z uvedených důvodů jsem v rámci této práce vyvíjela pro stanovení tohoto projímadla právě kapilární elektroforetický systém. Nejjednodušší a v dnešní době asi i nejpoužívanější metoda kapilární elektroforézy, kterou jsem použila také já, je kapilární zónová elektroforéza (CZE). Probíhá v kapiláře naplněné elektrolytem a vzorek je dle svého sledku rozdílné mobility jednotlivých iontů i nabitých molekul v něm obsažených. Moje práce vychází z metody, která se zakládá na tvorbě komplexů polyhydroxysloučenin s mnoha natiými ionty v silně alkalickém prostředí a je možné i ní možná přímá UV-detekce bez potřeby předchozí derivatizace mimo kapiláru. Vyvíjená metoda by měla být na jednu stranu vhodná pro kvantitativní analýzu a na druhou stranu by rozkladné produkty měly být odděleny od hlavní účinné látky. Specifita vyvinuté metody byla prokázána a jednotlivé cukry ve směsi rozkladných produktů byly identifikovány. Rozkladné produkty byly sice od laktulosity odděleny, ale vzájemně vůči základní linii se je oddělit nepodařilo. (To samé platí třeba i pro galaktosu a fruktosu nebo laktosu a glukosu, které vykazují podobné migrační chyby.) Pro tomu tak je se nám objasnit nepodařilo. Pro kvantitativní analýzu byla jako vnitřní standard použita kyselina asparagová, byla prokázána linearita metody a stanovena rovnice kalibrační funkce. Správnost metody byla rovněž úspěšně dokázána. Lze uzavřít, že tato metoda je univerzální způsob pro stanovení různých cukrů (ketóz, aldóz i cukerných alkoholů), i kdyžli ne všechny cukry je možné vzájemně oddělit. Proto by bylo třeba ještě dalšího zkoumání.

7. Quellenverzeichnis

¹ *Europäisches Arzneibuch*. 6. Ausgabe, 3. Nachtrag. Stuttgart: Dt. Apotheker-Verl, p. 5532-5537, 2009. [ISBN 978-3-7692-4766-4].

² *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch: Lactulose-Sirup* (Kommentar zur Ph. Eur. 6.3/0924, 33. Lfg., 2009), *Lactulose* (Kommentar zur Ph. Eur. 4.03/1230, 20. Lfg., 2005). Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges. [ISBN 978-3-8047-2825-7].

³ MUTSCHLER, E. et al.: *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 2001, p. 657-659. [ISBN 3-80-471763-2].

⁴ LÜLLMANN, H. et al.: *Pharmakologie und Toxikologie*. 17. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2010, p. 247-253. [ISBN 3-13-368517-1].

⁵ HARDMAN, J.; GOODMAN GILMAN, A. et al.: *Goodman & Gilman pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie*. 9. Auflage. Frankfurt am Main: McGraw-Hill, 1998, p. 949-950. [ISBN 3-89028-850-2].

⁶ LACHMAN, B.; NOE, C. R.: *Kapillarelektrophoretische Bestimmung von Kohlenhydrat Enantiomeren*. *Sci. Pharm.*, 2001, vol. 69, p. 299-314. [ISSN 00368709].

⁸ REEVES, R. E.: *Cuprammonium-glycoside Complexes. VI. The D-Mannosan Complex*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, vol. 73, p. 957-959. [ISSN 0002-7863].

⁹ BOURNE, E. J.; SEARLE, F.; WEIGEL, H.: *Complexes between polyhydroxy compounds and cooper(II)ions*. *Carbohydr. Res.*, 1971, vol. 16, p. 185-187. [ISSN 0008-6215].

¹⁰ BRIGGS, J.; FINCH, P.; WEIGEL, H.; MATULEWICZ, M. C.: *Complexes of cooper (II), calcium, and other ions with Carbohydrates: Thin-layer ligand-exchange chromatography and determination of relative stabilities of complexes*. *Carbohydr. Res.*, 1981, vol. 97, p. 181-188. [ISSN 0008-6215].

¹¹ BAZZANELLA, A.; BÄCHMENN, K.: *Separation and direct UV detection of sugars by capillary elektrophoresis using chelation of cooper (II)*. *J. Chromatogr. A.*, 1998, vol. 799, p. 283-288. [ISSN 0021-9673].

- ¹² ZHANG, Z.; YANG, R.; WANG, H.; YE, F.; ZHANG, S.; HUA, X.: *Determination of lactulose in foods: a review of recent research*. Int. J. Food Sci. Technol., 2010, vol.45, no. 6, p. 1081-1087. [ISSN 0950-5423].
- ¹³ MARTÍNEZ MONTERO, C.; RODRÍGUEZ DODERO, M. C.; GUILLÉN SÁNCHEZ, D. A.; BARROSO, C. G.: *Analysis of Low Molecular Weight Carbohydrates in Food and Beverages: A review*. Chromatografia, 2004, vol. 59, p. 15-30. [ISSN 0009-5893].
- ¹⁴ PARONI, R.; FERMO, I.; MOLTENI, L.; FOLINI, L.; PASTORE, M. R.; MOSCA, A.; BOSI, E.: *Lactulose and mannitol intestinal permeability detected by capillary electrophoresis*. J. Chromatogr. B., 2006, vol. 834, no.1-2, p. 183-187. [ISSN 1570-0232].
- ¹⁵ VORNDRAN, A. E.; OEFNER, P.J.; SCHERZ, H.; BONN, G. K.: *Indirect UV detection of carbohydrates in capillary Zone Electrophoresis*. Chromatographia, 1992, vol. 33, no. 3-4, p. 163-168. [ISSN 0009-5893].
- ¹⁶ OEFNER, P. J.; VORNDRAN, A. E.; GRILL, E.; HUBER, C.; BONN, G. K.: *Capillary zone electrophoretic analysis for carbohydrates by direct and indirect UV detection*. Chromatographia, 1992, vol. 34, no. 5-8, p. 308-316. [ISSN 0009-5893].
- ¹⁷ ISSAQ, J. H.: *A Decade of capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2000, vol. 21, p. 1921-1939. [ISSN 0173-0853].
- ¹⁸ ALTRIA, D. K.: *Analysis of Pharmaceuticals by Capillary Electrophoresis*. 1. Auflage. Wiesbaden: Vieweg. 1998, p. 286. [ISBN 3-5280-6696-2].
- ¹⁹ ENGELHARDT, H.; BECK, W.: *Kapillarelektrophorese*. 1. Auflage. Braunschweig: Vieweg, 1994, p. 206. [ISBN 3-5280-6597-4].
- ²⁰ LI, S. F. Y.: *Capillary electrophoresis principles, practice and application*. 1. Auflage. Amsterdam: Elsevier, 1992, p. 480-485. [ISBN 0-444-89433-0].
- ²¹ LOTTSPREICH, F.; ZORBAS, H.: *Bioanalytik*. 1. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum, Akad. Verl., 1998, p. 217-285. [ISBN 3-8274-0041-4].
- ²² International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1), *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. 2005.

²³ KROMIDAS, S.: *Validierung in der Analytik*. 1. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH, 1999, p. 287. [ISBN 3-527-28748-5].

8. Lebenslauf

Kristýna Holcová

| | |
|------------------------------|---|
| 1987 | geboren am 8. März in Píbram |
| 1993 bis 1998 | Besuch der Grundschule in Mníšek pod Brdy |
| 1998 bis 2006 | Besuch des achtjährigen Erzbischöflichen Gymnasiums in Prag |
| Seit 2006 | Pharmazeutische Fakultät in Hradec Kralové der Karlsuniversität in Prag |
| Juli 2007 | Praxis in der Apotheke šLukaň in Prag |
| August 2009 | Praxis in dem Zentralen Labor des Fakultätkrankenhauses auf dem Karlesplatz in Prag |
| Mai ó August 2010 | Praxis in der Apotheke šLékárna Kr skáň in Prag |
| September 2010 ó Januar 2011 | Diplomarbeit in Wien |
| Februar ó März 2011 | Praxis in der Apotheke šLékárna Kubaň in Prag |