



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Quantitative Bestimmung von Gabapentin mittels HPLC
und CZE nach Derivatisierung“

Verfasserin

Julia Johanna Dümler

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof., Dr. rer. nat., Mag. pharm. Ernst Urban

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung.....	7
Kurzfassung.....	9
Abstract.....	11
Einleitung	13
1 Allgemeiner Teil.....	14
1.1 Epilepsien und Antikonvulsiva.....	14
1.1.1 Epilepsien.....	14
1.1.2 Antikonvulsiva	15
1.1.3 Wirkstoffe und Handelspräparate: (1) (3)	15
1.1.4 Gabapentin.....	16
1.2 Dansylchlorid und Dabsylchlorid.....	18
1.2.1 Dansylchlorid.....	18
1.2.2 Dabsylchlorid.....	20
1.3 Hochleistungs-Flüssigchromatographie	21
1.3.1 Chromatographische Analysenverfahren	21
1.3.2 Prinzip der Hochleistungs-Flüssigchromatographie	21
1.3.3 HPLC-Methoden	22
1.3.4 Aufbau eines HPLC-Gerätes.....	23
1.4 Kapillarelektrophorese (CE)	25
1.4.1 Theoretische Grundlagen der Kapillarelektrophorese	26
1.4.2 Aufbau und Funktion einer Kapillarelektrophorese-Einheit.....	27
1.4.3 Kapillarzonenelektrophorese.....	29
1.5 Massenspektrometrie	29
1.5.1 Aufbau und Funktion eines Massenspektrometers	30

1.6	Validierung analytischer Methoden	34
1.7	Literatursituation	38
2	Spezieller Teil.....	40
2.1	Allgemeines zur Analytik	40
2.2	HPLC-Bestimmung von Gabapentin nach Derivatisierung mit Dansylchlorid.....	41
2.2.1	Methodenentwicklung Dansylierung.....	41
2.2.2	Endgültige Methode	52
2.2.3	Ergebnisse Validierung Dansylierung	53
2.2.4	Massenspektrometrische Überprüfung	62
2.2.5	Quantifizierung von Gabapentin aus Tabletten – Dansylierung	63
2.3	HPLC-Bestimmung von Gabapentin nach Derivatisierung mit Dabsylchlorid.....	66
2.3.1	Methodenentwicklung Dabsylierung.....	66
2.3.2	Endgültige Methode	71
2.3.3	Ergebnisse Validierung Dabsylierung	72
2.3.4	Massenspektrometrische Überprüfung	80
2.3.5	Quantifizierung von Gabapentin aus Tabletten über Dabsylierung	81
2.4	Kapillarelektrophoretische-Bestimmung von Gabapentin nach Derivatisierung mit Dansylchlorid und Dabsylchlorid	83
2.4.1	Methodenentwicklung	83
2.4.2	Benzoessäure als interner Standard.....	86
2.4.3	Optimierung der Methoden	88
2.4.4	Endgültige Methoden	88
2.4.5	Kalibration Dansylierungsmethode.....	89
2.4.6	Kalibration Dabsylierungsmethode.....	90
2.4.7	Quantifizierung von Gabapentin aus Tabletten über CE	92

3	Experimenteller Teil.....	95
3.1	Geräte und Arbeitsmaterial.....	95
3.2	HPLC-Parameter.....	97
3.3	Vorsäulenderivatisierung.....	99
3.4	Stammlösungen.....	101
3.5	Analyse von Gabapentin Tabletten.....	103
3.6	Pufferbereitung.....	104
3.7	Substanzen und Lösungsmittel.....	105
4	Anhang.....	106
4.1	Verwendete Abkürzungen.....	106
4.2	Statistische Formelsammlung.....	108
4.3	Abbildungen.....	110
4.4	Abbildungsverzeichnis.....	113
5.1	Literaturverzeichnis.....	115
6	Lebenslauf.....	118

DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich all jenen, die mich bei der Entstehung dieser Diplomarbeit unterstützt und motiviert haben. Mein besonderer Dank gilt ...

... Herrn Prof. Dr. Mag. pharm. Ernst Urban, meinem Betreuer während dieser Diplomarbeit. Diese Arbeit wurde durch seine freundliche Unterstützung, seiner liebenswürdigen Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mit zu wirken erst ermöglicht.

... Herrn Dr. Bodo Lachmann, der mein Interesse für die Themenstellung dieser akademischen Arbeit geweckt hat und mir stets mit seiner wissenschaftlichen Erfahrung auf diesem Gebiet zur Seite gestanden hat. Seine fachkundigen Ratschläge, sein hilfsbereiter Einsatz und seine Fähigkeit, mich stets zu Motivieren, waren es, die diese Arbeit zu dem gemacht hat, was sie ist. Danke Bodo.

... meinen Kollegen innerhalb und rund um die Arbeitsgruppe, Herrn Prof. Dr. Mag. pharm. Martin Kratzel, Frau Mag. Andrea Deutsch, Herrn Cand. pharm. Bernhard Reich, Herrn Cand. pharm. Josef Schwaiger, sowie allen Assistenten und Laborantinnen danke ich für die kollegiale Unterstützung und das motivierende Arbeitsklima.

... meinen Eltern, die mich immer liebevoll unterstützt haben und mit stundenlangem Korrekturlesen einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich in den letzten Monaten und Jahren viel entbehrt und mir im privaten Bereich viel geholfen haben.

... meinen Kollegen in der Apotheke, die immer Verständnis und Interesse für mein Studium gezeigt haben und mit damit in ganz außergewöhnlicher Weise Hilfe geleistet haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Mag. pharm. Andreas Norden, der mich nicht nur zu diesem Studium ermutigt hat, sondern mich in all den Jahren unterstützt, gefordert und gefördert, und immer wieder motiviert hat.

KURZFASSUNG

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Gabapentin über Hochleistungsflüssigchromatographie und Kapillarelektrophorese nach Umsetzung mit Dansylchlorid und Dabsylchlorid entwickelt.

Die literaturbekannten Methoden zum Nachweis von Dansyl-dervatisiertem Gabapentin aus humanem Plasma über HPLC wurden zur Verwendung in der chemisch-pharmazeutischen Analytik weiterentwickelt, kapillarelektrophoretische Bestimmungen mit Dansyl-Derivaten waren bisher nicht bekannt und wurden neu entwickelt. Dabsyl-Derivate wurden bisher in keiner veröffentlichten Arbeit zur Analyse von Gabapentin herangezogen, hier wurden für beide instrumentellen Verfahren neue Methoden entwickelt.

Zunächst wurden Verfahren zur quantitativen Umsetzung von Gabapentin mit den beiden Reagenzien entwickelt oder bekannte Methoden optimiert.

Neben der Ausarbeitung und Optimierung von Trennbedingungen zur Bestimmung beider Derivate über Hochleistungschromatographie wurden verschiedene Aminosäuren auf ihre Eignung als interner Standard für die entwickelten Trennbedingungen getestet. Die Verfahren wurden anschließend validiert und auf Richtigkeit und Reproduzierbarkeit überprüft.

Ein kapillarelektrophoretisches Verfahren zur Identifizierung von Gabapentin nach Dansylierung konnte erfolgreich etabliert werden. Leider gelang es nicht, dieses Verfahren auch zur Quantifizierung zu nutzen, da kein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten und Peakfläche gefunden werden konnte.

Für die Dabsyl-Derivate von Gabapentin hingegen konnte erfolgreich ein Verfahren zur kapillarelektrophoretischen quantitativen Bestimmung von Gabapentin ausgearbeitet und validiert werden.

Darüberhinaus haben Untersuchungen die Eignung der entwickelten Systeme und Verfahren zur quantitativen chemischen Analyse aus im Handel befindlichen Gabapentin Filmtabletten bewiesen.

ABSTRACT

The aim of this work was to develop an HPLC- and a CE-method for a quantitative determination of the drug substance gabapentin in several dosage forms after derivatisation with either dansyl chloride or dabsyl chloride.

Dansyl chloride is already mentioned in literature in order to detect gabapentin after HPLC-separation of human plasma, but there are no publications about chemical-pharmaceutical analysis of gabapentin-dansyl-derivates by CE-methods. Until now there is also no method published concerning determination of gabapentin-dabsyl-derivates.

After evaluation and optimisation of the reaction conditions for both reagents, detection was carried out either by fluorescence after derivatisation with dansyl chloride in the HPLC-system or by VIS-spectroscopy in HPLC- and CE-systems for gabapentin derivates of dabsyl chloride.

During this optimization process several amino acids have been evaluated as suitable internal standards. In all cases, the best results have been obtained utilizing isoleucin as an internal standard. Only in the case of the CE method for the dabsyl-derivative of gabapentin, benzoic acid has been more suitable.

For both instrumental methods, optimised separation conditions have been worked out.

After the standard procedure was established successfully, the method has been applied for quantification of gabapentin in pharmaceutical formulations.

EINLEITUNG

Gabapentin ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Antikonvulsiva und wird erfolgreich zur Behandlung von Epilepsien und neuropathischen Schmerzen eingesetzt.

Dansylchlorid und Dabsylchlorid sind Reagenzien, die mit primären oder sekundären Aminogruppen reagieren und stabile Sulfonamide bilden. Beide Reagenzien wurden schon erfolgreich in der Aminosäureanalyse eingesetzt. Gabapentin selbst ist aufgrund seiner chemischen Struktur spektrophotometrisch nur bei Wellenlängen ≤ 210 nm (UV-Bereich) detektierbar. Gabapentin ist ein Analogon der γ -Aminobuttersäure und damit über seine primäre Aminogruppe mit Dansylchlorid und Dabsylchlorid derivatisierbar.

Dansyl-Derivate bieten den Vorteil, dass aus nicht-fluoreszierenden Substanzen wie Gabapentin Fluorophore entstehen und somit viel empfindlichere Nachweismethoden entwickelt werden können. Dabsylchlorid ermöglicht eine Vermessung von Gabapentin im VIS-Bereich und hiermit eine störungsfreie Detektion.

Ziel dieser Arbeit war mittels Vorsäulenderivatisierung entsprechende Derivatisierungsprodukte von Gabapentin mit beiden Reagenzien zu generieren sowie diese über Hochleistungs-Flüssigchromatographie und Kapillarelektrophorese zu trennen, zu identifizieren und zu quantifizieren.

1 ALLGEMEINER TEIL

1.1 Epilepsien und Antikonvulsiva

1.1.1 Epilepsien

Epilepsien sind chronische Erkrankungen des Zentralnervensystems, bei denen es durch eine gesteigerte Erregbarkeit zentraler Neuronen und einer damit verbundenen Erniedrigung der Krampfschwelle zu wiederholten Anfällen kommt.

Epileptische Anfälle werden durch abnorme elektrische Entladungen im Großhirn verursacht, dauern einige Sekunden bis wenige Minuten - mit Ausnahme des Status epilepticus - und können durch verschiedene die zentrale Erregbarkeit erhöhende Einflüsse ausgelöst werden. Die Folge sind abnorme motorische Reaktionen, Bewusstseinsstörungen bzw. Bewusstseinsverlust, sowie teilweise verstärkte vegetative Reaktionen. (1) (2)

Epilepsien zeigen sich in verschiedenen Anfallsformen, die sich in fokale und generalisierte Anfälle einteilen lassen.

Bei der generalisierten Epilepsie, die meist auf eine genetische Prädisposition zurückzuführen ist, entladen sich Neuronen beider Gehirnhemisphären synchronisiert. Eine fokale Epilepsie wird eher durch eine erworbene Hirnschädigung hervorgerufen, hier sind diese Entladungen auf eine Hemisphäre beschränkt.

Diese Unterscheidung ist für die Auswahl der Pharmakotherapie entscheidend.

In beiden Fällen ist das Gleichgewicht zwischen neuronaler Hemmung und neuronaler Erregung gestört. Die epileptische Entladung wird durch sogenannte Schrittmacherzellen verursacht. Die Erregung breitet sich anschließend in verschiedenen Hirnarealen aus. (2)

1.1.2 Antikonvulsiva

Antikonvulsiva hemmen die Erregbarkeit von Neuronen, die Erregungsausbreitung oder beides und dienen der symptomatischen Behandlung der verschiedenen Epilepsieformen.

bekannte Wirkmechanismen:

- Blockade spannungsabhängiger Na⁺-Kanäle
- Verstärkung GABAerger Effekte (inhibierende Funktion)
- Verringerung des depolarisierenden Ca²⁺-Einstroms
- Verhinderung der Freisetzung excitatorischer Aminosäuren (Glutamat, Aspartat)
- Hemmung der glutamatergen Erregungsübertragung an NMDA-Rezeptoren

1.1.3 Wirkstoffe und Handelspräparate: (1) (3)

- **vorwiegend Natriumkanal-blockierende Antiepileptika:**

Phenytoin (*Epilan*[®])

Carbamazepin (*Neurotop*[®])

Oxcarbazepin (*Trilepta*[®])

Lamotrigin (*Lamictal*[®])

- **vorwiegend die GABA-Wirkung verstärkende Antiepileptika:**

Barbiturate: Phenobarbital (nur mehr veterinär, *Phenoleptil*[®])

Desoxybarbiturate: Primidon (*Mysoline*[®])

Benzodiazepine: Clonazepam (*Rivotril*[®])

Diazepam (*Stesolid*[®])

Lorazepam (*Temesta*[®])

Vigabatrin (*Sabri*[®])

Tiagabin (*Gabitril*[®])

- **sonstige Antiepileptika:**

Gabapentin (*Neurontin*[®])

Topiramamat (*Topamax*[®])

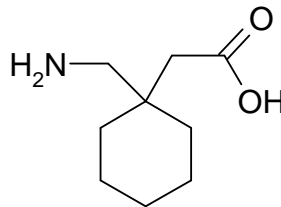
Felbamat (*Taloxa*[®])

Sultiam (*Ospolot*[®])

Mesuximid (in Österreich nicht registriert)

Hormone (Glucocorticoide und Corticotropin)

1.1.4 Gabapentin



1-(Aminomethyl)cyclohexan-essigsäure

CAS Registry Number: 60142-96-3

MG 171,24

Wirkmechanismus:

Obwohl Gabapentin strukturell mit GABA verwandt ist, besitzt es weder direkte noch indirekte GABA-Wirkungen.

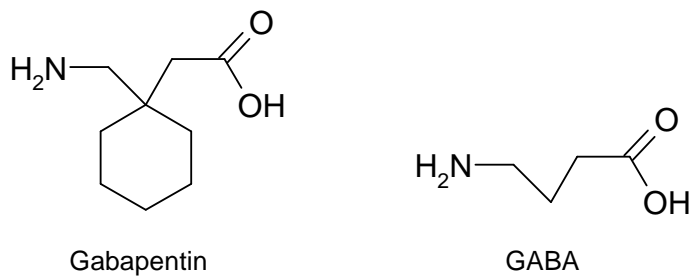


Abbildung 1: struktureller Vergleich von Gabapentin und GABA

Der genaue Wirkmechanismus von Gabapentin war lange Zeit nicht bekannt, neuere Lehrbücher (4) beschreiben zwei parallele Wirkmechanismen:

- 1) Hemmung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ
(Bindung an $\alpha 2\delta$ -Untereinheit)
- 2) Hemmung der glutaminergen Erregungsübertragung
(Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase)

Nebenwirkungen:

Als unerwünschte Wirkungen treten zentral nervöse Störungen wie Müdigkeit, Schwindel, Ataxie, sowie Übelkeit, Erbrechen, Gewichtszunahme und Ödembildung auf. Insgesamt ist Gabapentin aber gut verträglich. (1) (4)

Anwendung:

Gabapentin wird zur Mono- oder Kombinationstherapie von fokalen und sekundär generalisierten epileptischen Anfällen bei Erwachsenen und Kindern eingesetzt, die Anwendung bei Kindern unter 3 Jahren ist kontraindiziert. Daneben wird Gabapentin auch Therapie neuropathischer Schmerzen angewandt.

Die Tagesdosis beträgt 0,9 bis 2,4 g. (1) (4)

Präparate:

In Österreich sind derzeit das Originalpräparat *Neurotop*[®] und diverse Generika zur peroralen Einnahme mit Dosierungen von 100 mg, 300 mg, 400 mg, 600 mg und 800 mg zugelassen und am Markt erhältlich. (3)

1.2 Dansylchlorid und Dabsylchlorid

Dansylchlorid und Dabsylchlorid sind Reagenzien, die mit primären oder sekundären, aliphatischen oder aromatischen Aminogruppen reagieren und stabile Sulfonamide bilden.

Beide Reagenzien wurden schon erfolgreich in der Aminosäureanalyse eingesetzt.

(5) (6)

1.2.1 Dansylchlorid

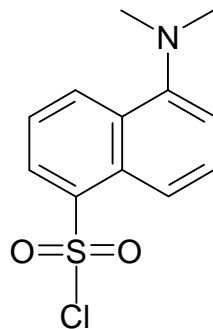


Abbildung 2: Dansylchlorid

5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylchlorid

CAS Registry Number: 605-65-2

MG 269,75

Dansylchlorid ist ein gelber Farbstoff, der selbst nicht fluoresziert, und ist in Wasser instabil. Erst durch Reaktion mit primären oder sekundären Aminen entsteht ein stabiles Sulfonamid, das eine blaue- bis blaugrüne Fluoreszenz aufweist.

Dies bietet den Vorteil dass aus nicht-fluoreszierenden Substanzen Fluorophore entstehen und ein Nachweis mittels empfindlicher Fluoreszenzdetektion ermöglicht wird.

Dansylchlorid eignet sich daher als Derivatisierungsreagens für Arzneistoffe mit Aminogruppen, Aminosäuren, Oligonucleotide und Proteine. (7)

Für eine quantitative Umsetzung bei Derivatisierungen von Aminen mit Dansylchlorid sind schwach alkalische Bedingungen und Temperaturen von etwa 50°C erforderlich.

Zur Herstellung einer Reagenzlösung eignen sich organische Lösungsmittel wie Aceton oder Acetonitril, auch wässrige Mischungen mit diesen Lösungsmitteln können verwendet werden. (5)

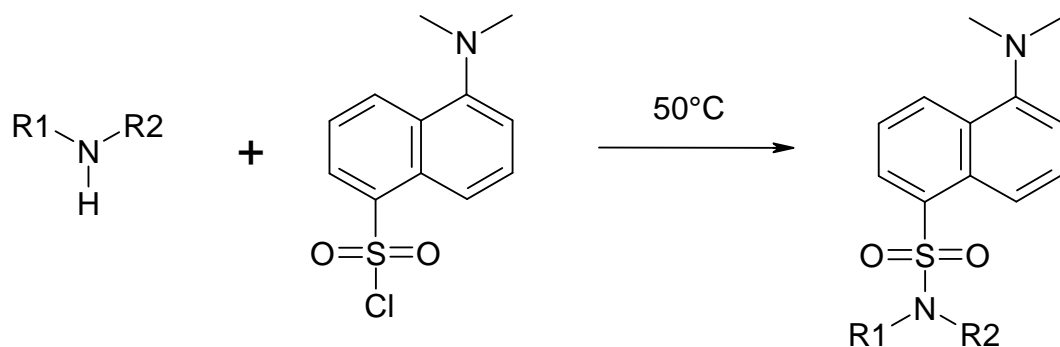


Abbildung 3: Dansyl-Derivatisierung von Aminen (5)

Dansylchlorid kann außerdem langsam mit Phenolen, Thiolen und Imidazolen, sehr langsam auch mit aliphatischen Hydroxylgruppen reagieren. (5)

1.2.2 Dabsylchlorid

Dabsylchlorid ist ein roter Farbstoff und reagiert in analoger Weise zu Dansylchlorid mit primären und sekundären Aminen.

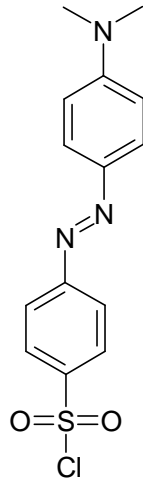


Abbildung 4: Dabsylchlorid

4-Dimethylaminoazobenzol-4'-sulfonylchlorid

CAS Registry Number: 56512-49-3

MG 323,80

Dabsyl-Reagenslösungen erhält man durch Lösen der Substanz in reinen organischen Lösungsmitteln (z.B. Aceton oder Acetonitril). Auch für Reaktionen mit Dabsylchlorid ist ein schwach basisches Milieu notwendig. Die für eine quantitative Umsetzung benötigte Temperatur ist allerdings höher und beträgt ca. 70°C. (5)

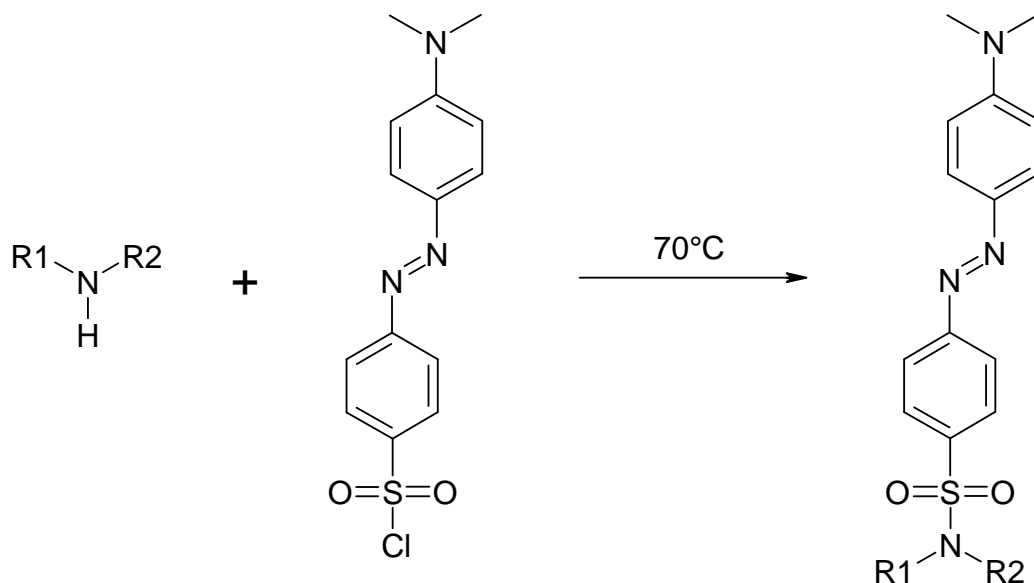


Abbildung 5: Dabsyl-Derivatisierung von Aminen (5)

1.3 Hochleistungs-Flüssigchromatographie

1.3.1 Chromatographische Analysenverfahren

Chromatographische Analysenverfahren dienen zur Trennung von Stoffgemischen und deren Nachweis und/oder Quantifizierung.

Die Trennmethode sind chemisch-physikalischer Natur und basieren meist auf Verteilungs- oder Adsorptionsvorgängen. Die Trennung erfolgt dabei zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Phasen: einer ruhenden, stationären Phase und einer mobilen Phase, die sich mitsamt dem zu trennenden Substanzgemisch an der stationären Phase vorbeibewegt.

Die stationäre Phase kann ein Feststoff oder eine Flüssigkeit sein und befindet sich meist stationär im Trennsystem. Die mobile Phase ist flüssig (Elutionsmittel) oder gasförmig (Trägergas). Aus der Kombination ergeben sich folgende Trennsysteme:

- Flüssigkeits – Flüssigkeits – Chromatographie
- Flüssigkeits – Feststoff – Chromatographie
- Gas – Flüssigkeits – Chromatographie
- Gas – Feststoff – Chromatographie

Der Name „Chromatographie“ leitet sich von der Tatsache ab, dass zu Anfang mit dieser Methode ausschließlich Farbstoffe getrennt wurden (griechisch: chroma = die Farbe). (8)

1.3.2 Prinzip der Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (englisch: high performance liquid chromatography, kurz: HPLC) ist eine Flüssigkeits – Feststoff – Chromatographie. Es handelt sich um eine Sonderform der Säulenchromatographie. Bei der Säulenchromatographie fließt die mobile Phase durch Schwerkraft durch eine mit der stationären Phase gefüllte Trennsäule. Die Trennleistung ist dabei umso höher, je kleiner die Partikel der stationären Phase sind.

Aus einer kleineren Partikelgröße resultiert jedoch eine höhere Packungsdichte und dadurch eine geringere Strömungsgeschwindigkeit.

Um eine hohe Trennleistung mit ausreichender Strömungsgeschwindigkeit zu erreichen wird bei der HPLC das Elutionsmittel unter Druck durch die Säule gepumpt. (8)

Die Säulenchromatographie unter Druck lässt sich nach verschiedenen Trennverfahren einteilen: (8)

- Adsorptionschromatographie
- Verteilungschromatographie
- Ionenpaarchromatographie
- Ionenaustauschchromatographie
- Ionenchromatographie
- Größenausschlusschromatographie

1.3.3 HPLC-Methoden

Normalphasen-HPLC

Bei dieser Art wird mit einem unpolaren Elutionsmittel über ein polares Säulenmaterial getrennt.

Umkehrphasen HPLC (reversed phase)

Die stationäre Phase ist hier unpolarer als die mobile Phase. Dies wird durch Veresterung der polaren Silanolgruppen des Kieselgels mit siliciumorganischen Verbindungen erreicht. (8) (9)

- Methylgruppen → RP-2
- Octylgruppen → RP-8
- Octadecylgruppen → RP-18

1.3.4 Aufbau eines HPLC-Gerätes

Das entgaste Elutionsmittel wird durch Probenaufgabe und Trennsäule zu einem Detektor gepumpt. In der Probenaufgabe wird ein definiertes Volumen an Probelösung in den Eluentenstrom eingebracht und mit dem Elutionsmittel weitertransportiert.

Nach erfolgter Trennung gelangen die Substanzen nacheinander zum Detektor. Dieser erzeugt ein elektrisches Signal, das nun durch den Schreiber aufgezeichnet und den Integrator ausgewertet werden kann. Heutzutage erfolgen Messung, Auswertung und Datenverarbeitung computerunterstützt. (8)

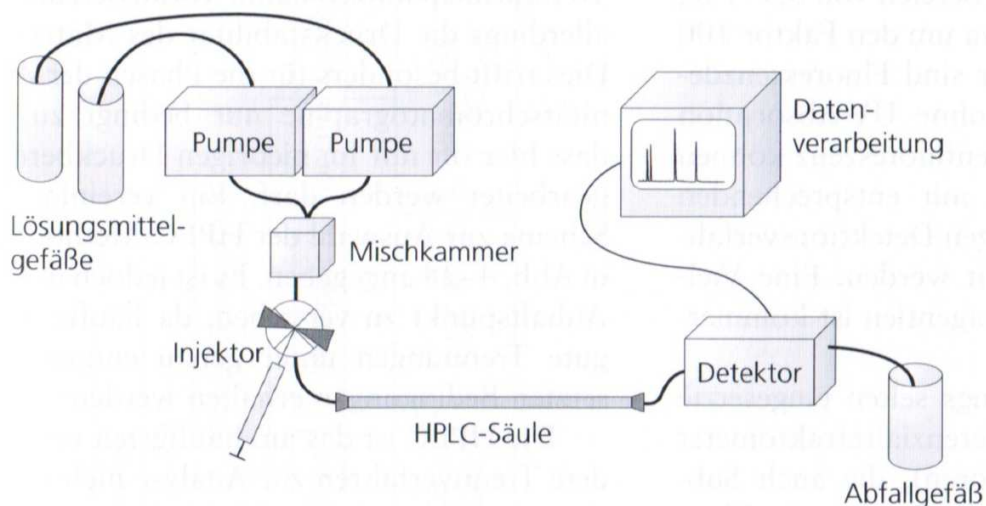


Abbildung 6: schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage (10)

Pumpen

Pumpen von HPLC-Geräten müssen Drücke bis über 400 bar und eine möglichst gleichmäßige Fließgeschwindigkeit liefern. Meist werden dafür Kolbenhubpumpen verwendet, deren Kolben über eine Nockenwelle angetrieben wird. Die entstehenden Pulsationen müssen mittels Pulsationsdämpfer gedämpft werden. Das ist Verwendung von Doppelkolbenpumpe durch deren Gegentakt nicht nötig. Bei der isokratischen Elution, bei der nur ein Elutionsmittel zum Einsatz kommt, ist nur eine Pumpe erforderlich. Zur sogenannten Gradientenelution, bei der sich während der Trennung die Zusammensetzung des Lösungsmittels verändert, wird neben der Pumpe gleichzeitig ein **Gradientenmischer** benötigt. (8)

Probenaufgabe

Der Probeneinlass erfolgt entweder über eine Einspritzvorrichtung oder eine sogenannte Dosierschleife.

Bei der Einspritzvorrichtung wird die Probe mittels einer Mikroliterspritze durch ein Septum in das System eingebracht. Dabei kann ein Druckstoß entstehen, der sich als Störsignal im Chromatogramm auswirkt. Mit einer Dosierschleife kann die Probe über Ventile drucklos auf die Säule transportiert werden. Störsignale werden auf diese Weise vermieden und das Injektionsvolumen ist exakter reproduzierbar. (8)

Autosampler

Autosampler sind spezielle Vorrichtungen, die Platz für mehrere Proben bieten und eine automatisierte Probenaufgabe ermöglichen. Dadurch können ohne einzelnes manuelles Einspritzen von Proben ganze Serien von Versuchen (Sequenzen) programmiert und durchgeführt werden.

Trennsäulen

Trennsäulen für die HPLC bestehen aus Edelstahl und sind, wenn nötig, innen mit Glas beschichtet. Je nach Anforderung werden Säulen mit einer Länge von 5 bis 30 cm und einem Innendurchmesser von 2 bis 8 mm verwendet. Im Inneren befindet sich die stationäre Phase.

Die stationäre Phase besteht entweder aus losen, sphärischen Partikeln (partikuläre Systeme) oder einem hochporösen Kieselgelstab (monolithische Systeme)

Die Säulenfüllung unterscheidet sich in Partikelgröße, Material, Porengröße und der Beschaffenheit der Oberfläche. Der Teilchendurchmesser beträgt bei aktuell verwendeten Säulen meist zwischen 1,8 µm und 30 µm. (8)

Detektoren

Für HPLC-Verfahren eignen sich grundsätzlich verschiedene Detektoren. UV/Vis-Detektoren messen die Lichtabsorption bei einer bestimmten Wellenlänge im ultravioletten und sichtbaren Spektralbereich. Mit Diode-Array-Detektoren kann

gleichzeitig bei mehreren Wellenlängen gemessen werden oder in kurzer Zeit ein gesamtes Absorptionsspektrum vermessen werden.

Fluoreszenz-Detektoren können eingesetzt werden, wenn die zu vermessenden Substanzen zur Fluoreszenz angeregt werden können. Anregung und Messung erfolgen hier bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen. Über Fluoreszenz kann sehr selektiv detektiert werden, da nur wenige Substanzen zur Fluoreszenz anregbar sind.

Weitere Detektorarten: Chemischer Reaktionsdetektor, Brechzahl-detektor, Leitfähigkeitsdetektor, Elektrochemischer Detektor und Massenselektiver Detektor.
(8)

1.4 Kapillarelektrophorese (CE)

Kapillarelektrophoretische Verfahren sind Weiterentwicklungen der „klassischen“ Elektrophorese, die sich für die Analytik von Makromolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren eignet. Die Kapillarelektrophorese, die in den 1980er-Jahren eingeführt wurde, kann darüber hinaus auch zur Analytik niedermolekularer organischer und anorganischer Verbindungen eingesetzt werden. Unter dem Begriff Kapillarelektrophorese werden sechs verschiedene Techniken zusammengefasst, die sich in ihren Trennprinzipien unterscheiden: (10)

- Kapillarzonenelektrophorese (CZE), oft auch nur als Kapillarelektrophorese (CE) bezeichnet
- Mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC)
- Kapillargelelektrophorese (CGE)
- Kapillarisoelektrische Fokussierung (CIEF)
- Kapillarisotachophorese (CITP)
- Kapillarelektrochromatographie (CEC)

1.4.1 Theoretische Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Das Prinzip der Elektrophorese besteht in der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Moleküle lassen sich nach Anlegen einer Spannung trennen, wenn sich die Substanzen unter gegebenen Bedingungen in ihrem Ladungs-Masse-Quotient unterscheiden.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei temperaturabhängig und direkt proportional zur elektrischen Feldstärke. Die elektrische Feldstärke wiederum ist abhängig von der angelegten Spannung und der Gesamtlänge der Kapillare.

Die elektrische Ladung von Molekülen kann durch den pH-Wert des eingesetzten Puffers beeinflusst werden. Vor allem bei schwachen Elektrolyten, also schwachen Säuren oder schwachen Basen sowie bei Ampholyten, die weniger ionisiert vorliegen, übt die Protonenkonzentration großen Einfluss auf den Dissoziationsgrad und somit auf deren Mobilität im elektrischen Feld aus.

Werden statische Trägermaterialien eingesetzt, tritt abhängig von der Ladungsverteilung an den Oberflächen ein allgemeiner Massenfluss, der elektroosmotische Fluss (EOF) auf. Ursache für den EOF ist die Bildung einer Doppelschicht (Helmholtz-Schicht) an der fest/flüssig Grenze zwischen Silanolgruppen der Quarzkapillare und dem Puffer. pH-abhängig werden die Silanolgruppen deprotoniert und sind anschließend negativ geladen. Durch Anlagerung von Kationen entsteht eine Doppelschicht.

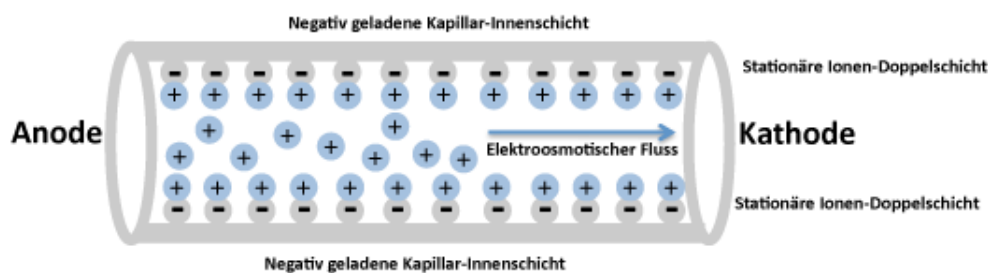


Abbildung 7: Prinzip der Kapillarelektrophorese

Bildquelle: medizin.uni-koeln.de

Der Überschuss an Kationen wandert nun bei angelegter Spannung in Richtung der Kathode. Abhängig ist der EOF von der Stärke des elektrischen Feldes sowie vom pH-Wert des Puffers.

Der EOF bewirkt auf diese Weise gleichzeitig eine Wanderung von positiv und negativ geladenen Teilchen sowie von ungeladenen Teilchen, die somit allesamt in einem Lauf detektiert werden können.

Die Vorteile der Kapillarelektrophorese stellen der geringe Verbrauch an Probe, Chemikalien und Lösungsmitteln, die hohe Auflösung und die relativ einfache Methodenentwicklung dar. (10) (11)

Man erhält schließlich ein Elektropherogramm, eine graphische Darstellung der Analyseergebnisse, in dem – wie in einem Chromatogramm – das Detektorsignal gegen die Zeit aufgetragen wird.

1.4.2 Aufbau und Funktion einer Kapillarelektrophorese-Einheit

Bausteine einer CE-Einheit sind eine Hochspannungsquelle, eine Trennkapillare, zwei Elektroden, zwei Puffergefäße, ein automatischer Probengeber, ein Detektor und ein Datenverarbeitungssystem. Die beiden Elektroden sind mit der Hochspannungsquelle verbunden.

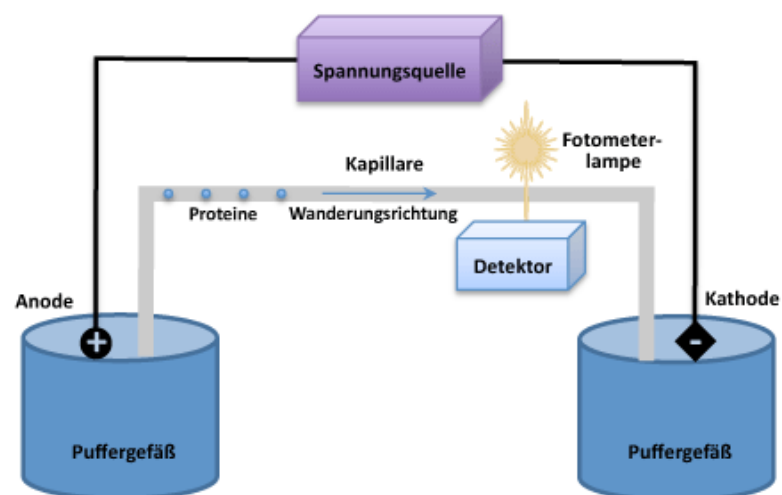


Abbildung 8: schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophoreseeinheit (9)

Bildquelle: medizin.uni-koeln.de

Die Trennkapillare wird zunächst mit Puffer gespült und die Probe wird aufgebracht. Anschließend tauchen Elektroden und die Kapillare in die Puffergefäße ein und Spannung wird angelegt, es kommt zur Trennung der Analyten in der Kapillare. Nach dem Trennungsvorgang wird erneut mit Puffer gespült. (11)

Trennkapillaren

Die Kapillaren bestehen zumeist aus Quarzglas und haben einen Innendurchmesser von 10 – 100 µm. Die Länge der Kapillare kann variiert werden. Längere Kapillaren bieten den Vorteil einer besseren Trennung, allerdings erhöhen sich dadurch Analysezeit und Probenverbrauch.

Injektionsmöglichkeiten

Injektion mittels angelegter Spannung: Die Probenzone wandert durch die Mobilität im elektrischen Feld oder durch den elektroosmotischen Fluß in die Kapillare.

Druckinjektion: Die Kapillare wird in das Probegefäß getaucht und anschließend das gesamte Gefäß unter Druck gesetzt. So wird eine Probenzone in die Kapillare gepresst.

Vakuuminjektion: Am anderen Ende der in die Probelösung getauchten Kapillare wird Vakuum angelegt, die Probenzone wird so in die Kapillare gesaugt. (11)

Polarität

Unterschieden werden kann zwischen *normaler* und *inverser* Polarität. Im Falle der *normalen* Polarität ist der Detektor auf der Kathodenseite der Kapillare angebracht. Bei der *inversen* Polarität wird anodenseitig detektiert. Dies kann auch durch einfache Umpolung der Spannungsquelle erreicht werden. (11)

Detektionsmöglichkeiten

Detektiert wird meist durch ein kleines Fenster in der Endzone der Kapillare. Dafür wird die äußere Schutzbeschichtung der Quarzkapillare im Bereich einiger Millimeter durch Erhitzen und anschließendem Reinigen mit Ethanol entfernt. Zur Detektion kommen am häufigsten UV/VIS-Detektoren (als Festwellenlängen-Detektoren oder als Diodenarray) oder Fluoreszenzdetektoren zum Einsatz.

Fluoreszenzdetektoren bieten den Vorteil, die relativ hohen Nachweisgrenzen der Kapillarelektrophorese zu verbessern.

Andere Detektionsmöglichkeiten stellen Kopplungen mit anderen Analysesystemen wie CE-MS oder CE-NMR dar. (11)

1.4.3 Kapillarzonenelektrophorese

Die Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ist eine kontinuierliche Technik, bei der pH und Ionenstärke über die Trennzeit und den gesamten Trennbereich konstant bleiben. Die Trennung der zu analysierenden Substanzen erfolgt aufgrund unterschiedlicher Ladungsdichten (Quotient Masse/Ladung) der Analyten. Die Migrationsgeschwindigkeit hängt von der Ladung der Moleküle und vom Ausmaß des EOF ab. Ladung und EOF wiederum werden durch den pH-Wert des Puffers beeinflusst. Je kleiner und je stärker geladen ein Molekül ist, desto schneller wandert es in der Kapillare. Größere, weniger geladene Teilchen wandern umgekehrt langsamer. Neutrale Teilchen können nicht getrennt werden, sie wandern mit dem EOF.

Optimierung einer Trennung in der CZE kann über eine Variation der angelegten Spannung, der Temperatur, Art und Länge der Kapillare sowie über Art, Konzentration und pH-Wert des Puffers erfolgen. (10)

1.5 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie (MS) handelt es sich um ein analytisches Verfahren, das zur Identifizierung, Reinheitsprüfung und Strukturaufklärung organischer und anorganischer Stoffe eingesetzt werden kann.

Organische Moleküle im Dampfzustand werden zunächst ionisiert. Diese Ionen sind meist instabil und zerfallen in geladene und ungeladene Bruchstücke (Fragmentierung). Anschließend werden die geladenen Bruchstücke in einem elektrischen Feld oder Magnetfeld nach ihrer Ladung und Masse getrennt.

Man erhält ein Massenspektrum, eine zweidimensionale graphische Darstellung der Ionenhäufigkeit in Abhängigkeit vom Quotient Masse/Ladung (m/z). (8) (10)

1.5.1 Aufbau und Funktion eines Massenspektrometers

Jedes Massenspektrometer benötigt ein Einlasssystem, eine Ionenquelle, einen Massenanalysator, einen Detektor und ein Datenverarbeitungssystem.

Probeneinlass

Gasförmige Proben können über eine Schleuse mit zwei Ventilen in das System eingebracht werden. Flüssige Proben können im einfachsten Fall über ein Septum eingespritzt und über Hochvakuum verdampft werden. Schwerflüchtige Flüssigkeiten und feste Proben werden über eine beheizbare Sonde in die Ionenquelle eingebracht.

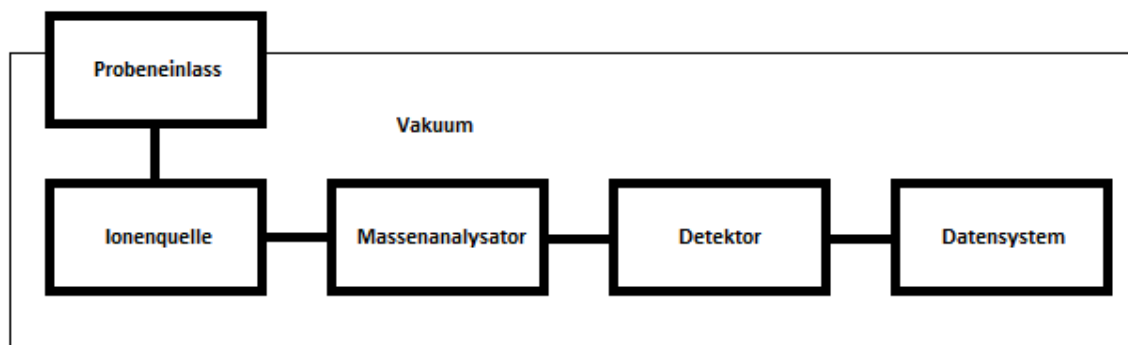


Abbildung 9: schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

Ionisierungsverfahren

In der Ionenquelle werden aus ungeladenen Probemolekülen Ionen erzeugt. Gasphasen können chemisch oder über Elektronenionisierung ionisiert werden. Verdampfung und Ionisierung sind hier getrennte Prozesse.

Für Proben, die über Variation von Druck und Temperatur nicht verdampft werden können, werden Desorptionsmethoden oder Sprayverfahren eingesetzt.

Die *klassische Ionisierungsmethode* ist die Elektronen-Ionisation. Die Probemoleküle werden im Hochvakuum mit einem Elektronenstrahl beschossen. Das entstandene Molekülion ($M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$) ist instabil und zerfällt in Fragmente (Neutralteilchen und Ionen), die weiter zerfallen können.

Die *chemische Ionisierung* erfolgt in zwei Schritten. Zuerst wird ein Reaktandgas (z.B. Methan), das im Überschuss vorliegt, durch Elektronen-Ionisation ionisiert. Danach erfolgt eine schnelle Reaktion der ionisierten Reaktandgas-Moleküle mit den noch nicht ionisierten Probenmolekülen. Dabei werden stabile Ionen gebildet. Bei den *Desorptionsmethoden* erfolgt die Ionenbildung durch Beschuss mit energiereichen Atomen oder Photonen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden ausschließlich Spray-Verfahren verwendet. Die Ionisation erfolgt hier unter Atmosphärendruck. Dazu muss die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst sein.

ESI: Electro-Spray-Ionisation

Die Lösung wird durch eine dünne Kapillare in ein elektrisches Feld eingebracht und dort zu einem feinen Tropfennebel versprüht. Aus den Flüssigkeitströpfchen werden letztlich Ionen gebildet, die in den Massenanalysator weiter geleitet werden.

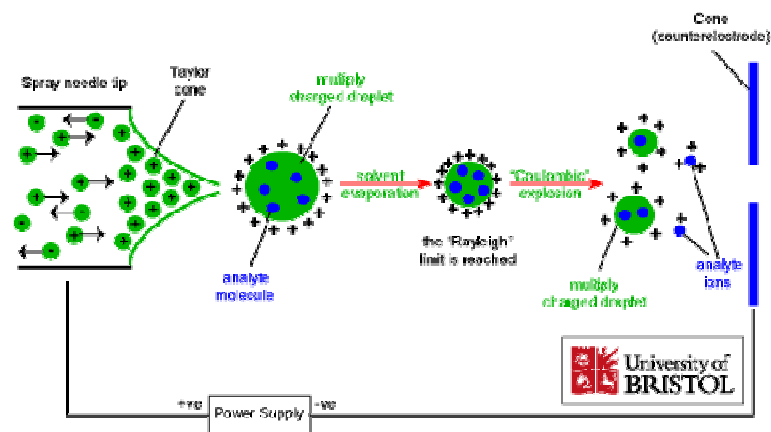


Abbildung 10: Prinzip der Electro-Spray-Ionisation

Bildquelle: www.chm.bris.ac.uk

ACPI : Atmospheric-pressure chemical ionization

Bei der ACPI wird der vernebelte Flüssigkeitsstrom durch ein beheiztes Rohr weitergeleitet und dort verdampft. In einer Koronarentladungszone wird der Gasstrom ionisiert. Dabei werden Lösungsmittelmoleküle ionisiert, die anschließend als Reaktandgasen fungieren und die Probe chemisch ionisieren. Der Vorteil dieser Methode besteht in der Bildung stabiler Ionen. (10)

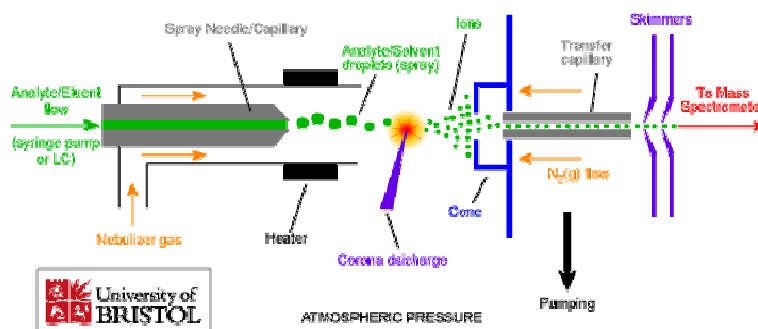


Abbildung 11: Prinzip der Atmospheric-pressure chemical ionisation

Bildquelle: www.chm.bris.ac.uk

Massenanalysator

Die gebildeten Ionen werden durch elektrische Felder fokussiert, beschleunigt und im Massenanalysator nach ihren Massen getrennt. Die kinetische Energie ist dabei von der Beschleunigungsspannung abhängig. Unterschieden werden kann zwischen scannenden Massenanalysatoren, Ionenfallen und Flugzeitmassenspektrometern. (10)

Scannende Massenanalysatoren wie *Sektorfeldgeräte* und *Quadrupol-Massenfilter* beschleunigen Ionen durch ein elektrisches Feld. Die Trennung der Ionen erfolgt schließlich nach steigender/ fallender Masse durch Ablenkung der Ionen in einem elektrischen oder magnetischen Feld. (12)

Ionenfallen: Ionisation, Ionentrennung, und Ionendetektion erfolgen diskontinuierlich nacheinander.

Die dampfförmige Probe wird zunächst durch einen kurzzeitigen Elektronenstrahl ionisiert. Eine Ringelektrode hält Ionen mittels eines elektrischen Feldes auf bestimmten cyclischen Bahnen. Die Ionen können somit einige Zeit „gefangen“ werden. Die Spannung der Ringelektrode wird nun kontinuierlich erhöht, wodurch die Ionen nach ansteigenden m/z -Werten aus der Ionenfalle ausgestoßen und dem Detektor zugeführt werden. (12)

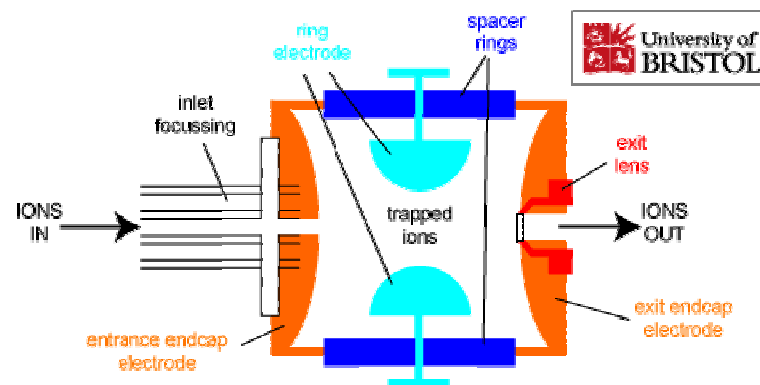


Abbildung 12: Prinzip einer Ionenfalle

Bildquelle: www.chm.bris.ac.uk

Flugzeitmassenspektrometer (TOF = engl.: time of flight) messen die Flugzeit, die ein Ion für eine bestimmte Wegstrecke benötigt. Häufig werden gepulste Ionenquellen verwendet, da die Startzeit eindeutiger bestimmbar ist. Die erzeugten Kationen werden im elektrischen Feld beschleunigt (alle einfach geladenen Kationen besitzen dieselbe kinetische Energie) und durchfliegen anschließend einen feldfreien Raum (Flugrohr) zum Detektor. Große Ionen fliegen langsamer und weisen daher eine längere Flugzeit auf. (10)

1.6 Validierung analytischer Methoden

Ziel ist, einen dokumentierten Beweis zu erbringen, dass die erarbeitete analytische Methode für den vorgesehenen Verwendungszweck geeignet ist und die im Vorfeld festgelegten Anforderungen erfüllt.

Die sogenannten **ICH-Guidelines** (13) sehen für die Validierung analytischer Prozesse definierte Parameter vor:

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

Weiterführend wurden für diese Diplomarbeit auch die Messpräzision und die Methodenpräzision über die Wiederholpräzision ermittelt.

Spezifität

„Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, *eine* Substanz oder *eine* Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren.“ (14)

Dafür werden Analysen mit Leerwerten (Systemleerwert mit reinem Puffer und Probeleerwerten) durchgeführt, um sicherzustellen, dass alle einzelnen Systempeaks und Substanzpeaks eindeutig identifiziert sind. (14)

Für System- und Probeleerwerte dürfen zu den zu erwartenden Retentionszeiten für die Probesubstanzen keine Signale messbar sein.

Messpräzision

„Messpräzision ist ein Maß für die Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden“. (14)

Zur Ermittlung wird eine Probenaufarbeitung sechsfach vermessen und die Standardabweichung s und die relative Standardabweichung RSD berechnet. Akzeptanzkriterium: maximal 2 % relative Standardabweichung

Methodenpräzision

„Die Methodenpräzision ist ein Maß für die Schwankungen der Ergebnisse, die durch alle Schritte der Methode verursacht werden, z. B. Probenahme, Wiegen, Probenvorbereitung; Extraktion, Filtration, Messung, Auswertung.“ (14)

Zur Ermittlung der Methodenpräzision werden sechs unabhängige Einwaagen analysiert und die relative Standardabweichung RSD ermittelt. Akzeptanzkriterium: maximal 2 % Abweichung der relativen Standardabweichung.

Außerdem wurde ein t-Test und ein F-Test im Bezug auf die Vergleichspräzision durchgeführt.

Der t-Test gibt Information über die Normalverteilung der Ergebnisse (normalverteilt ja oder nein). Der F-Test wird auch bezeichnet als „Test auf Varianzhomogenität“ und prüft, ob die Standardabweichungen aus zwei unterschiedlichen Messreihen vergleichbar sind und somit ob die Werte aus einer Grundgesamtheit stammen. (14)

Linearität

Innerhalb eines definierten Konzentrationsbereiches wird der direkt proportionale Zusammenhang zwischen Messergebnis und der Konzentration des Analyten überprüft. Dafür wird aus den Messergebnissen eine lineare Regressionsgleichung und -gerade erstellt ($y = kx + d$), sowie das Bestimmtheitsmaß r^2 errechnet. (13)

Akzeptanzkriterium: r^2 kleiner 0,99.

Arbeitsbereich

„Der Arbeitsbereich ist der Konzentrationsbereich des Analyten in der Probe mit einem akzeptablen Maß an Präzision, Richtigkeit und Linearität.“ (13)

Die Ermittlung des Arbeitsbereiches deckt sich üblicherweise mit dem Linearitätstest und sollte sich über einen minimalen Konzentrationsbereich von 80 – 120 % erstrecken. (13)

Detektionsgrenze, Limit of detection (LOD)

„Kleinste nachweisbare Menge. ... Analyt vorhanden: ja oder nein?“ (14)

Es werden dafür ausgehend von einer Leerprobe immer höhere Analyt-Konzentrationen vermessen, bis ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 ermittelt wird.

Quantifizierungsgrenze, Limit of quantification (LOQ)

„Kleinste quantifizierbare Menge. Das ist die Menge, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann.“ (14)

Es werden dafür ausgehend von einer Leerprobe werden ansteigende Konzentrationen des Analyten oder in umgekehrter Weise mit Verdünnungen werden immer niedrigerer Analyt-Konzentrationen vermessen, bis ein Signal/Rausch-Verhältnis von 10:1 ermittelt wird. (14)

Die relative Standardabweichung aus 3 wiederholten Messungen sollte noch 10 % betragen.

Richtigkeit

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung des Messwertes mit dem wahren Wert (errechneten Wert) der Probe. Die Richtigkeit sollte über den gesamten Arbeitsbereich bestimmt werden. (13)

Aus den Messergebnissen werden Wiederfindung und relative Standardabweichung *RSD* berechnet.

Überprüft wird die Richtigkeit der Methode mit dem t-Test, also ob der Sollwert (bekannter Gehalt einer Probe) mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit innerhalb des Vertrauensbereiches (Konfidenzintervall 95 % - 105 %) des Analyseergebnisses liegt. (14)

Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision)

„Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander oder einfacher ausgedrückt: das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen.“ (14)

Die Messungen erfolgen dabei in kurzen Zeitabständen. Aus den Messergebnissen werden die Standardabweichung s und die relative Standardabweichung RSD berechnet

Tag zu Tag Präzision (Vergleichspräzision)

Untersucht wird die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse aus demselben Verfahren, aber aus unterschiedlichen Serien. (14)

Die Messungen erfolgen hier am darauffolgenden Tag. Aus den Messergebnissen werden die Standardabweichung s und die relative Standardabweichung RSD ermittelt, sowie t-Test und F-Test in Bezug auf die Methodenpräzision durchgeführt.

F-Test

Der F-Test prüft, ob die Standardabweichungen aus zwei unterschiedlichen Messreihen vergleichbar sind, also ob die Werte aus einer Grundgesamtheit stammen. Voraussetzungen: beide Datenreihen sind normalverteilt und frei von Ausreißern.

Der erhaltene Wert wird mit einem Tabellenwert (F-Tabelle) verglichen und darf diesen nicht überschreiten. (14)

t-Test

Mit dem t-Test geprüft, ob die Werte einer Messreihe normalverteilt sind. Der erhaltene Wert wird mit einem Tabellenwert (t-Tabelle) verglichen und darf diesen nicht überschreiten. (14)

Akzeptanzkriterium: Beide Wertereihen (Messpräzision und Vergleichspräzision) kommen aus einer Grundgesamtheit, kein signifikanter Unterschied bei t- und F-Test.

1.7 Literatursituation

Die Literaturrecherche zu dieser Arbeit wurde über zwei Datenbanken durchgeführt:

- Chemical Abstracts mit Hilfe der SciFinders[®] (scifinder.cas.org),
American Chemical Society
- Reaxys[®] (www.reaxys.com),
Reed Elsevier Properties SA

Bestimmung von Gabapentin über HPLC nach Derivatisierung mit Dansylchlorid

Dansylchlorid wurde bereits in einer Studie von *Krivanek et al* (15) zum qualitativen Nachweis von Gabapentin und Vigabatrin aus humanem Plasma eingesetzt. *Mercolini et al* (16) fanden eine Methode um Gabapentin neben Vigabatrin und Topiramamat quantitativ aus humanem Plasma zu bestimmen.

Quantitative chemische Analysen von Gabapentin als Reinsubstanz oder aus Tablettenmatrix über Derivatisierung mit Dansylchlorid sind in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

Bestimmung von Gabapentin über HPLC nach Derivatisierung mit Dabsylchlorid

Die Recherche über den Einsatz von Dabsylchlorid zum Nachweis und zur Bestimmung von Gabapentin über HPLC ergab mit den Suchbegriffen „dabsyl“ und „Gabapentin“ keine Treffer.

Bestimmung über Kapillarelektrophorese nach Derivatisierung mit Dansyl- oder Dabsylchlorid

Sekar et al (17) quantifizierten Gabapentin über indirekte Detektion, d.h. über Abnahme der UV-Absorption im Vergleich zu einem dem BGE zugesetzten Chromophor. Auf diese Weise kann ein negativer Peak registriert werden.

Direkte Vermessungen von Gabapentin nach Reaktion mit einem Chromogen wurden in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Derivatisierungsreagenzien durchgeführt. *Cao et al (18)* etwa beschäftigt sich mit dem quantitativen Nachweis von Gabapentin über Kapillarelektrophorese nach Derivatisierung mit mit 5-(4,6-Dichlorotriazinyl)-aminofluorescein. Verbindungen mit Vanillin, Ninhydrin und p-Benzoquinon wurden von *Abdellatef et al (19)* zur Detektion von Gabapentin eingesetzt.

Kapillarelektrophoretische Aufarbeitungen von Gabapentin-Derivaten mit Dansyl- oder Dabsylchlorid sind bisher nicht beschrieben.

2 SPEZIELLER TEIL

2.1 Allgemeines zur Analytik

Qualitative Analytik

Die Zuordnung der einzelnen Peaks – sowohl in HPLC-Versuchen als auch bei der Kapillarelektrophorese – wurden durch separate Trennläufe mit Leerwerten, d.h. Weglassen einer oder mehrerer Substanzen im Probenansatz, überprüft.

Quantitative Analytik

Eine Quantifizierung erfolgte über das Flächenintegral der Peaks aus den Chromatogrammen bzw. Elektropherogrammen.

Zur Quantifizierung der Proben wurden internen Standards (IS) in gleichbleibender Konzentration verwendet. Dies bietet den Vorteil, Fehler des Injektionssystems sowie aus der Vorsäulenderivatisierung (Verdunstung der Lösungsmittel) zu vermeiden bzw. auszugleichen.

Dazu wurde der Quotient der Peakflächen zueinander nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Peakflächenquotient} = \frac{\text{Peakfläche Gabapentin}}{\text{Peakfläche des IS}}$$

Als interner Standard wurde eine nicht in der Probe enthaltene Substanz verwendet, die entweder analog zu Gabapentin derivatisiert wurde (Aminosäuren) oder aufgrund anderer Eigenschaften zur Detektion geeignet war (Benzoessäure).

2.2 HPLC-Bestimmung von Gabapentin nach Derivatisierung mit Dansylchlorid

Wie bereits in der Einleitung erwähnt ist eine Detektion von reinem Gabapentin mittels Fluoreszenzdetektor nicht möglich. Durch Derivatisierung mit Dansylchlorid (DNS-Cl) entsteht ein Fluorophor, der bei einer Wellenlänge von $\lambda = 370$ nm angeregt und bei 506 nm vermessen werden kann. Dies bietet die Möglichkeit eines weitaus selektiveren und empfindlicheren Nachweises für Gabapentin.

2.2.1 Methodenentwicklung Dansylierung

2.2.1.1 Aufgaben- und Problemstellungen

Eine exakte Quantifizierung von Gabapentin wird durch die Verwendung eines internen Standards erreicht. Als möglicher interner Standard wurden Aminosäuren mit *einer* Aminogruppe ausgewählt: γ -Aminobuttersäure (GABA), Valin und Isoleucin. Im Rahmen der Methodenentwicklung zeigte sich bereits in den ersten Vorversuchen, dass dansylierte Derivate von Gabapentin und Aminosäuren aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Eigenschaften Retentionszeiten innerhalb sehr geringer Zeitintervalle aufweisen.

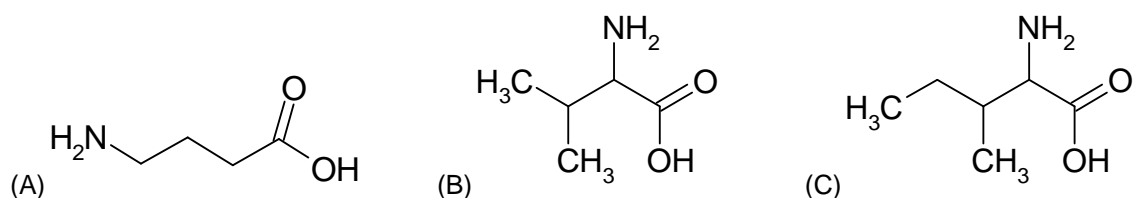


Abbildung 13: Strukturformeln von GABA (A), Valin (B) und Isoleucin (C)

Ziel war daher ein HPLC-System zu entwickeln, das trotz sehr kurzer Analysenzeit eine ausreichende Trennung erzielt.

2.2.1.2 Vorsäulenderivatisierung

Um Gabapentin, eine Aminosäure, mit Dansylchlorid umzusetzen, ist eine Pufferung im schwach alkalischen Bereich und eine höhere Temperatur als Raumtemperatur nötig.

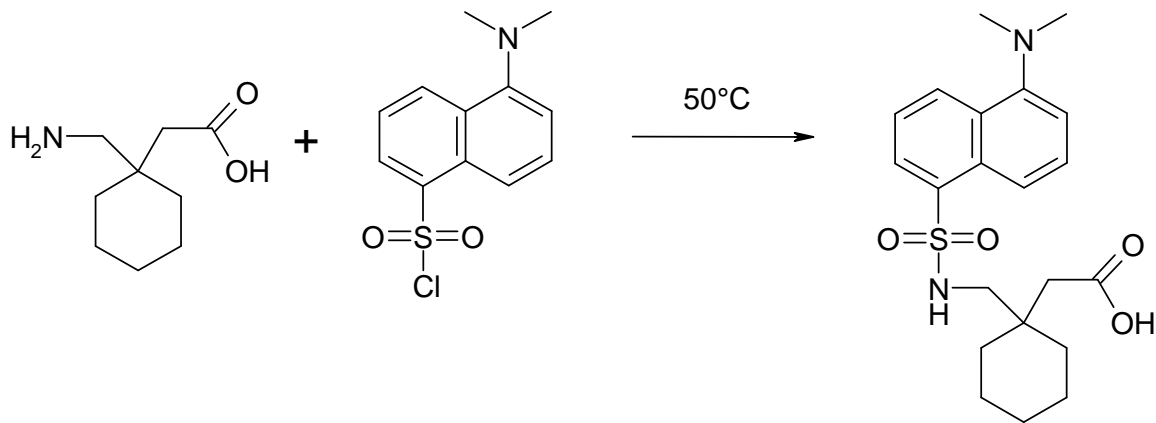


Abbildung 14: Reaktionsgleichung zur Umsetzung von Gabapentin mit Dansylchlorid

Die Methode zur Derivatisierung mit Dansylchlorid wurde von Anfang an die Methode von *Higashi* et al (20) angelehnt. Die von *Higashi* verwendeten Inkubationsbedingungen von 30 Minuten bei 50°C konnten unverändert übernommen werden. Auch der verwendete Phosphatpuffers pH 7,4 (PBS, siehe Kapitel 0) hat sich für die Derivatisierung von Gabapentin als geeignet herausgestellt.

Herstellung eines Probenansatzes:

100 µl	Gabapentin-Stammlösung
50 µl	Stammlösung des internen Standards
50 µl	PBS
100 µl	DNS-Cl-Lösung

Die Bestandteile wurden bei allen Vorversuchen in diesen Mengenverhältnissen in ein Reaktions-Gefäß pipettiert, homogenisiert (Vortex-Genie®), und nach derselben Methode inkubiert.

Konzentration und Lösungsmittel der zugegebenen DNS-Cl-Lösung mussten im Laufe der Vorversuche noch angepasst werden. Anfangs wurden dem Probenansatz DNS-Cl-Lösungen in Acetonitril mit einer Konzentration von 2 mg/ml zugegeben. Diese Konzentration hat sich als zu hoch herausgestellt.

Dansylchlorid hydrolysiert in gewissem Ausmaß – beschleunigt durch die Temperaturerhöhung während des Inkubationsvorganges – zur Dansylsulfonsäure. Dieses Hydrolyseprodukt ist wie die Dansylierungsderivate über Fluoreszenz detektierbar und verursacht bei $R_t \sim 1,7$ ein Signal im Chromatogramm. Jenes Signal ist jedoch mit dem in jedem Chromatogramm zu erwartenden Injektionspeak ($R_t \sim 1$) überlagert und teilweise nur über eine Verbreiterung des Injektionspeaks bei Erhöhung der DNS-Cl-Zugabe zur Probe zu erkennen.

Dies ist bei hohen DNS-Cl-Konzentration (zB 2 mg/ml) störend, da die für die Methodenentwicklung getesteten internen Standards Peaks kurz nach dem Hydrolyseprodukt zeigten (GABA: $R_t \sim 1,8$; Valin: $R_t \sim 2,4$, Isoleucin: $R_t \sim 2,8$) und die Signale sich zumindest teilweise überlagerten.

Außerdem hat sich die Verwendung von Acetonitril als Lösungsmittel für Dansylchlorid für das verwendete HPLC-System als ungeeignet herausgestellt. Ein zusätzlicher, nicht näher identifizierter aber wegen Überlagerung mit anderen Signalen ebenfalls störender Peak bei $RT \sim 1,5$ (siehe Anhang-Abb. 1), konnte durch die Verwendung von Aceton als Lösungsmittel eliminiert werden.

Als optimal erwies sich schließlich eine Lösung von DNS-Cl in Aceton mit einer Konzentration von 0,15 mg/ml.

Die Konzentrationen der Stammlösungen von Gabapentin und internen Standards wurden ebenfalls aufgrund der Ergebnisse der ersten Versuche angepasst. Begonnen wurde mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml Gabapentin. Später wurde die Konzentration an die Ergebnisse der ersten Versuche verschiedener HPLC-Methoden modifiziert und für die weiteren Vorversuche auf 25 µg/ml reduziert. Die Konzentration der getesteten internen Standards betrug bei allen Vorversuchen 5 - 25 µg/ml. Alle Einwaagen und Konzentrationsangaben sind im Kapitel 3.4 genauer beschrieben.

2.2.1.3 Versuche mit GABA als interner Standard

Prinzipiell wurde mit reversed-phase-Systemen gearbeitet. Die Versuche erfolgten mit verschiedenen Eluentensystemen, Säulentemperaturen, Flussraten, Säulen und internen Standards.

Als interner Standard wurde zunächst γ -Aminobuttersäure (GABA) gewählt. GABA ist als Teilstruktur in Gabapentin enthalten. Bei beiden Substanzen wird die primäre Aminogruppe daher gleichermaßen mit Dansylchlorid reagieren.

Als Probelösung wurden dafür Aufarbeitungen von Gabapentin-Stammlösungen und GABA-Stammlösungen (Kapitel 3.4) oder, wenn nötig, Verdünnungen aus diesen Stammlösungen verwendet.

Zunächst wurde eine Trennung auf einer Säule ODS Hypersil[®], 150 x 4 mm, 5 μ m, mit verschiedenen Eluentengemischen und mit unterschiedlichen Flussraten (jeweils mit 1,0 ml/min; 1,2 ml/min; 1,5 ml/min) untersucht.

Eluent	Zusammensetzung		
A	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	75 / 25 %	
B	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	70 / 30 %	
C	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	65 / 35 %	
D	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	60 / 40 %	
F	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	75 / 25 %	eingestellt auf pH 6,5 (NaOH)
G	MeOH / H ₂ O	75 / 25 %	

Alle Versuche wurden bei einer Säulentemperatur von 30°C, isokratisch, und mit einem Injektionsvolumen von 20 μ l durchgeführt.

Mit keinem dieser Laufmittel konnte mit isokratischer Elution eine zufriedenstellende Trennung zwischen Dansylsulfonsäure und GABA erzielt werden.

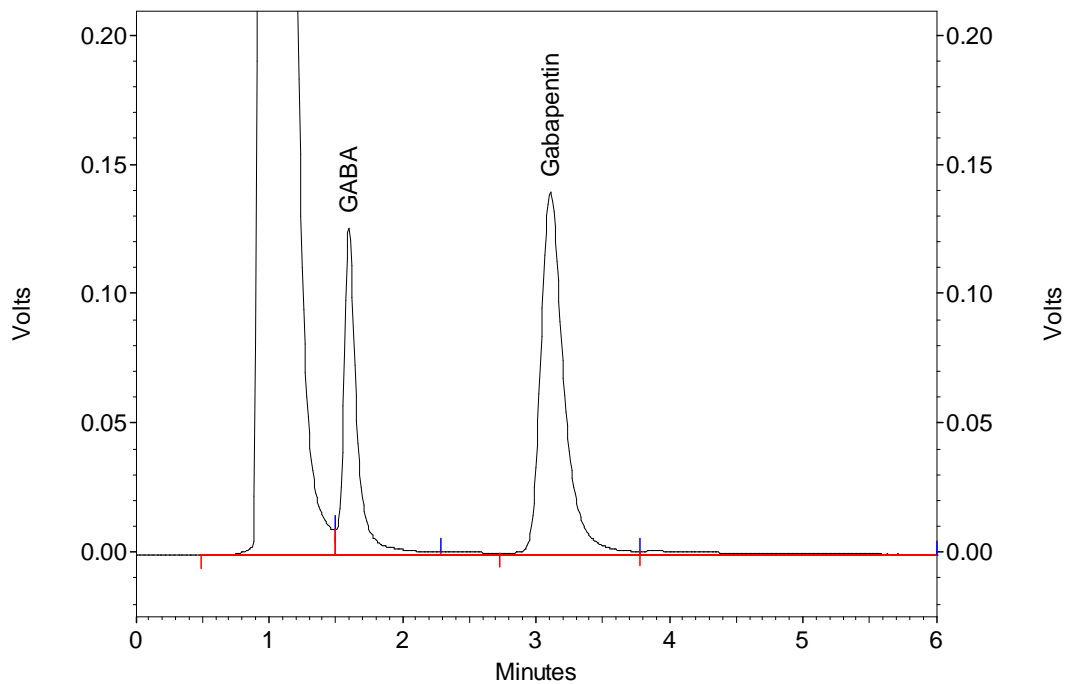


Abbildung 15: Chromatogramm, ODS Hypersil®, Eluent A

Um die Retentionszeit von GABA zu erhöhen wurden Versuche mit Elutionsgradienten durchgeführt. Dabei wurde zu Beginn der Laufzeit mit einem geringeren Methanolanteil eluiert und die Lipophilie während der Laufzeit durch vermehrten Methanolanteil erhöht:

Eluent C,	Steigerung von 10 % auf 25 % Methanolanteil innerhalb von 3 Minuten
Eluent D,	Steigerung von 10 % auf 25 % Methanolanteil innerhalb von 3 Minuten
Eluent D,	Steigerung von 10 % auf 50 % Methanolanteil innerhalb von 3 Minuten
Eluent D,	Steigerung von 10 % auf 75 % Methanolanteil innerhalb von 3 Minuten
Eluent D,	Steigerung von 10 % auf 100 % Methanolanteil innerhalb von 3 Min.

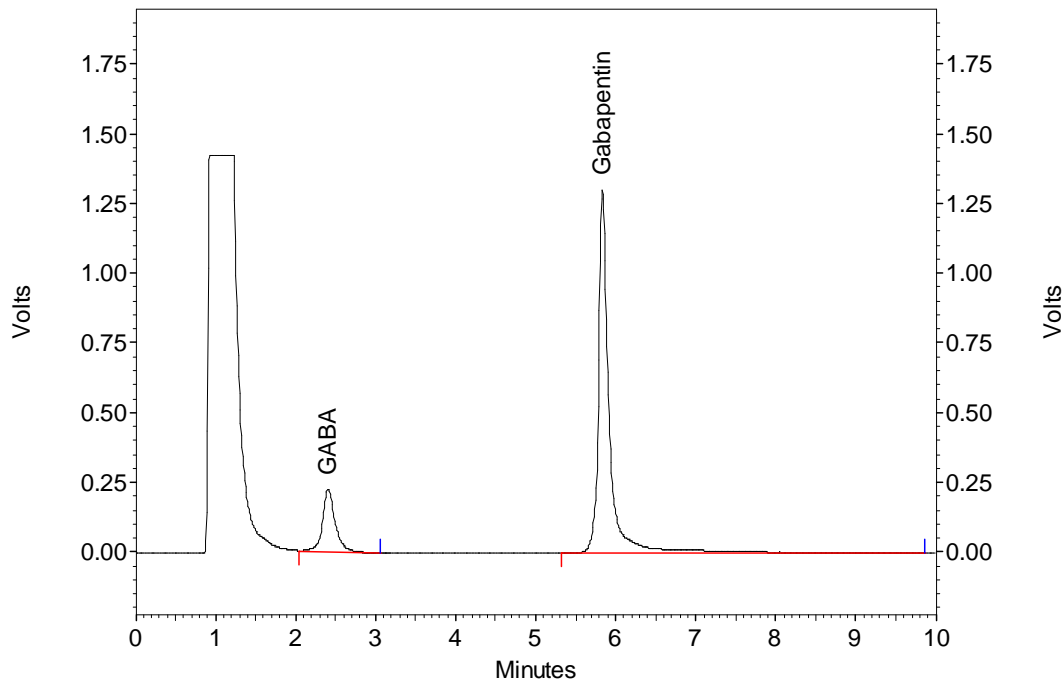


Abbildung 16: Eluent D, Steigerung von 10 % auf 50 % Methanolanteil innerhalb von 3 Minuten

Gabapentin: $c = 25,31 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 2)

GABA: $c = 25,28 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung G2)

Die verringerte Lipophilie des Eluenten verbesserte die Trennleistung zwar, allerdings immer noch nicht zufriedenstellend. Außerdem musste die Analysezeit verlängert werden und die Signale wurden breiter und tailten stärker.

Daher wurden die weiteren Versuche mit isokratischer Elution durchgeführt. Getestet wurden nun unterschiedliche Säulen.

Es wurden 3 Säulentypen gewählt, die sich in Dimension und Säulenfüllung unterschieden:

Bezeichnung	Länge x Durchmesser	Partikelgröße
BDS Hypersil [®] C18	150 x 4 mm	5 μm
ODS Hypersil [®] C18	125 x 4 mm	5 μm
Chromolith [®] Performance RP-18e	100 x 4,6mm	5 μm

Die folgenden Abbildungen zeigen die verschiedenen Trennergebnisse an den 3 unterschiedlichen Säulen: die beste Trennung ist mit der ODS Hypersil[®]-Säule zu erzielen (Abbildung 17), während sich das GABA-Signal bei der BDS Hypersil[®]-Säule teilweise (Abbildung 18) und bei der monolithische Säule Chromolith[®] Performance fast vollständig (Abbildung 19) mit dem Sulfonsäure-Peak überlagert. Alle drei Versuche wurden mit Eluent A und einer Flussrate von 1,2 ml/min durchgeführt.

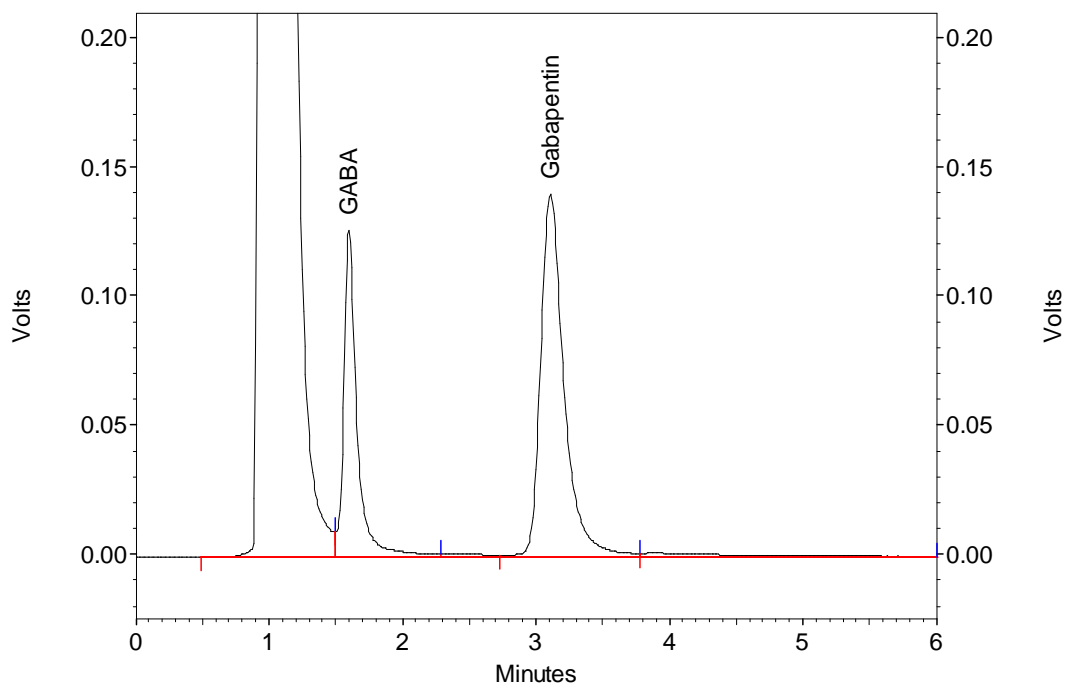


Abbildung 17: Trennung auf Säule ODS Hypersil[®]

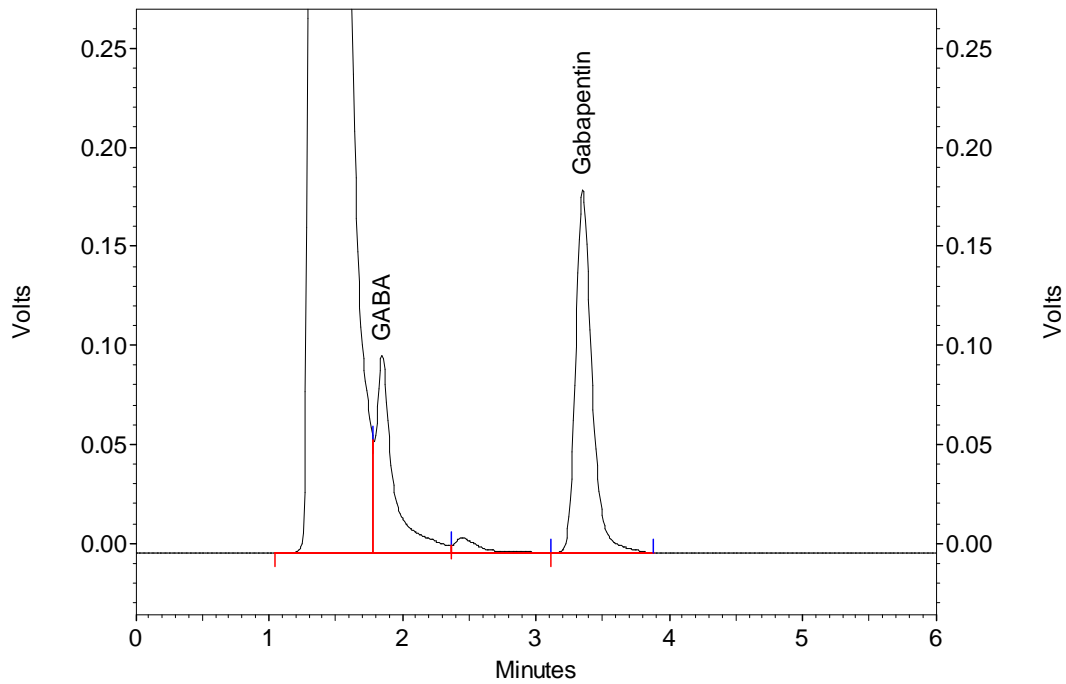


Abbildung 18: Trennung auf Säule BDS Hypersil®

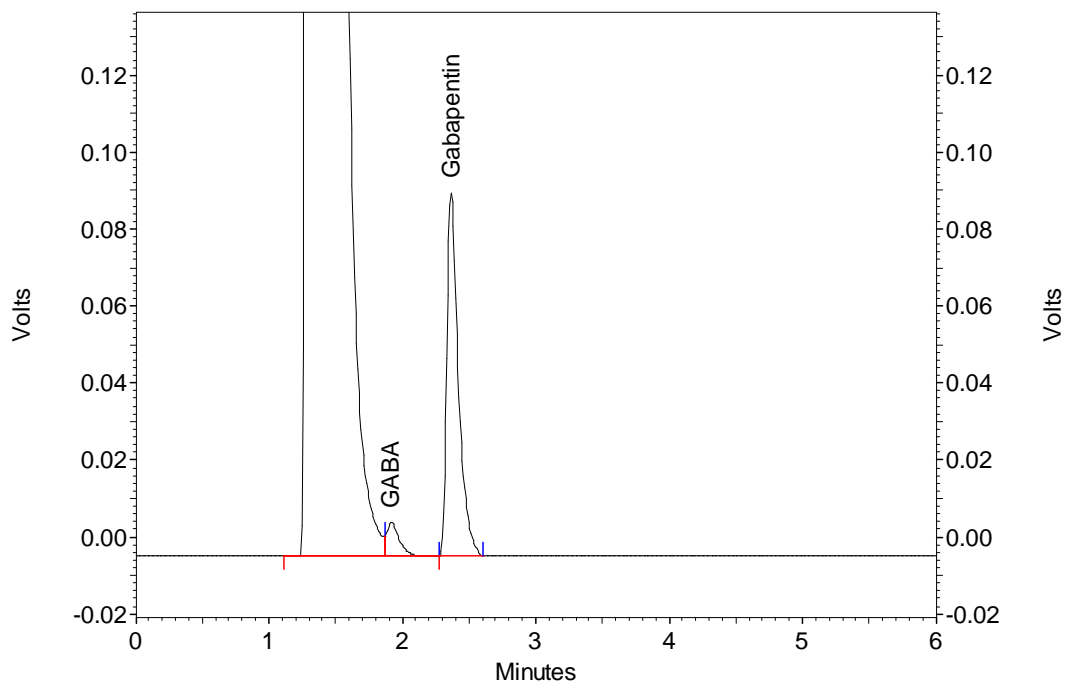


Abbildung 19: Trennung auf Säule Chlormolith performance®

Gabapentin: $c = 25,05 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 1)

GABA: $c = 25,20 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung G1)

Die Säule ODS Hypersil® und Eluent A lieferten die besten Trennergebnisse, weshalb dieses System für die nächsten Versuche verwendet wurde.

Um die Trennleistung dieser Kombination zu verbessern wurde die bisherige Methode mit unterschiedlichen Säulentemperaturen und Flussraten getestet.

Säulen-temperatur	Flußrate
30°C	1,0 ml/min
30°C	1,2 ml/min
32°C	1,2 ml/min
26°C	1,0 ml/min
26°C	1,2 ml/min
26°C	1,5 ml/min

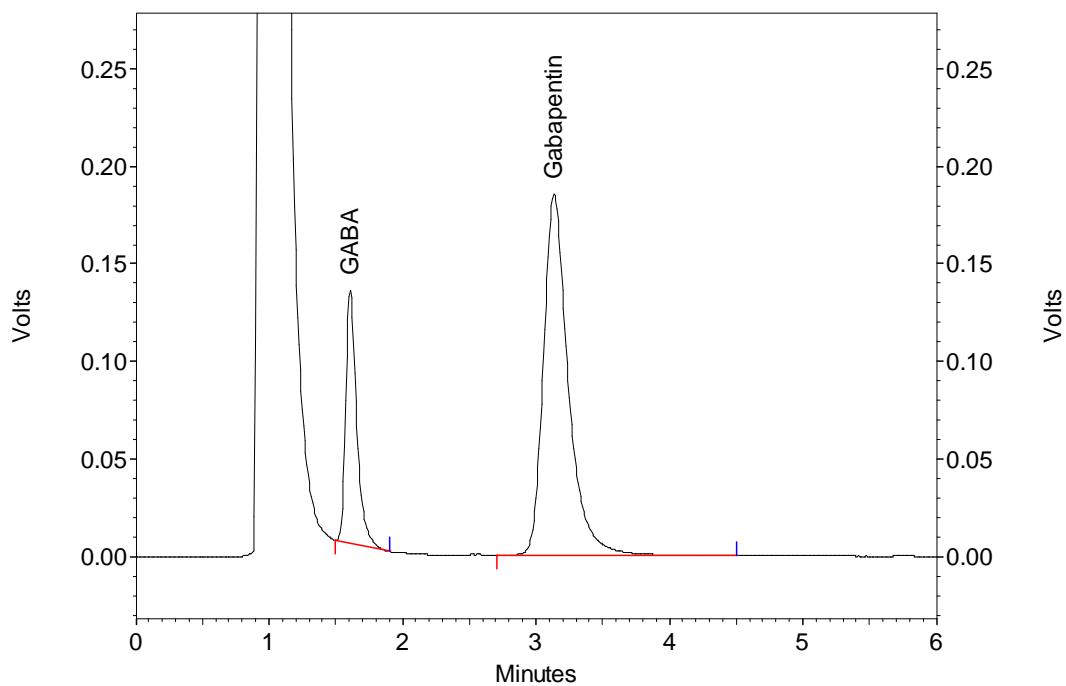


Abbildung 20: Säulentemperatur 32°C, Flussrate 1,2ml/min

Die besten Ergebnisse waren bei 26°C und einer Flussrate von 1,2 ml/min. zu erzielen:

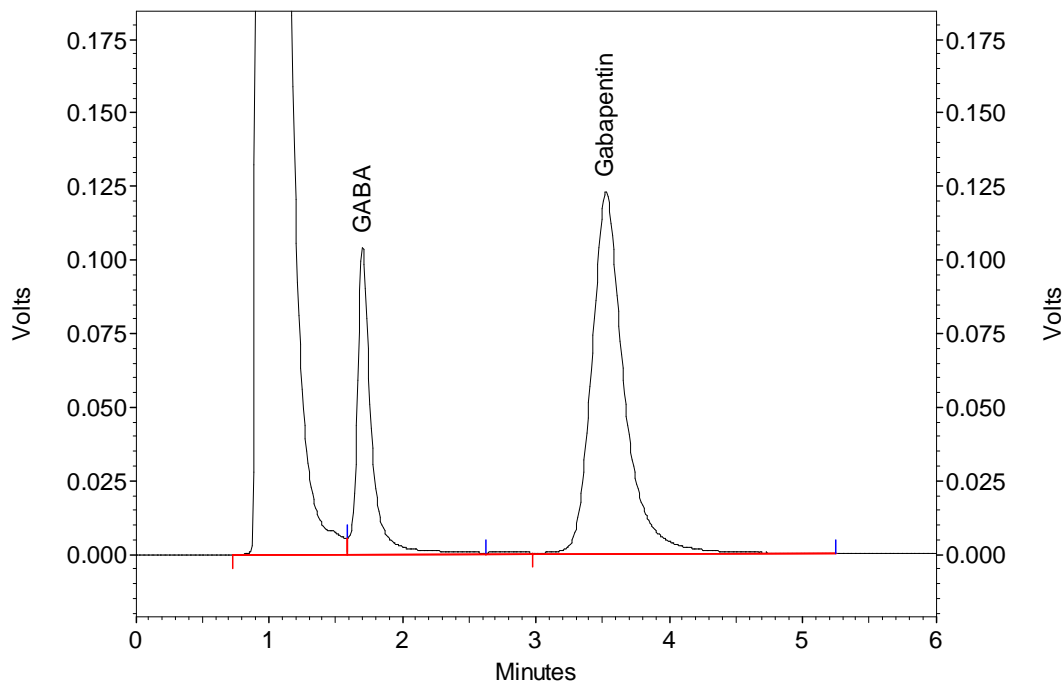


Abbildung 21: Säulentemperatur 26°C, Flussrate 1,2 ml/min

Gabapentin: $c = 25,05 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 1)

GABA: $c = 25,20 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung G1)

2.2.1.4 Versuche mit L-Isoleucin und L-Valin als interner Standard

GABA als interner Standard weist in den bisher getesteten Systemen und Methoden Retentionszeiten von etwa 1,5 bis 1,9 Minuten auf. Eine Basislinientrennung zum Sulfonsäurepeak war daher nicht möglich.

Für Isoleucin und Valin waren aufgrund ihres höheren Molekulargewichts spätere Retentionszeiten zu erwarten.

Die bisher optimierten System-Parameter wurden für die neuen Versuche beibehalten: ODS Hypersil[®], 26°C, Eluent A, Flussrate 1,2 ml/min, isokratische Elution, Injektionsvolumen 20 μl . Auch die Probenaufarbeitung und Inkubation erfolgte genau gleich.

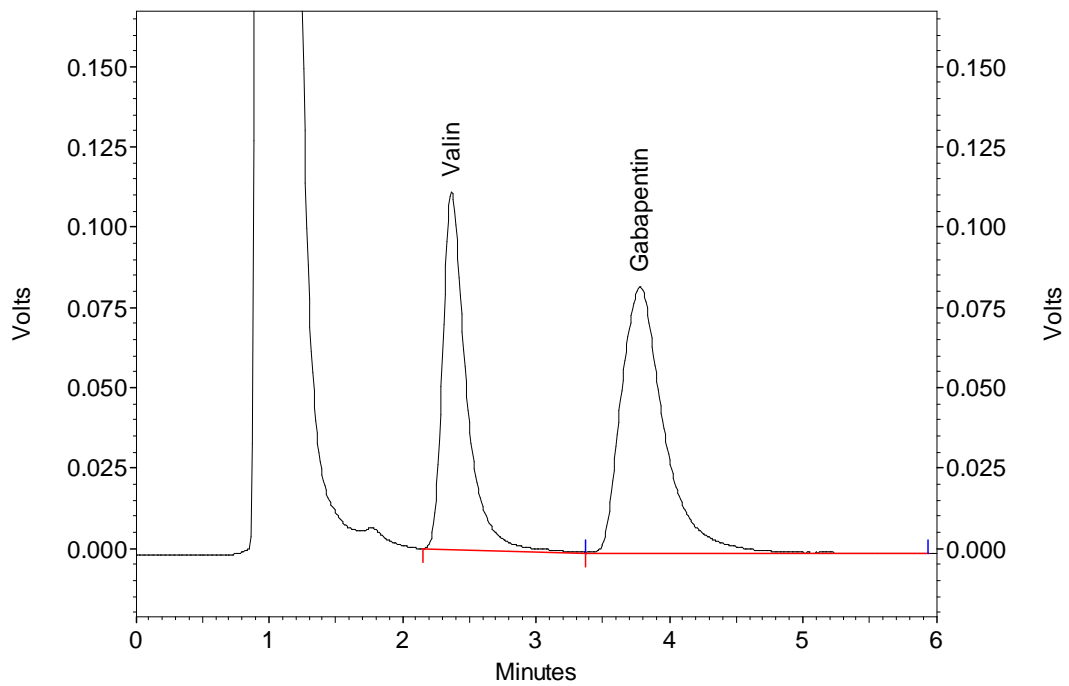


Abbildung 22: Valin als interner Standard

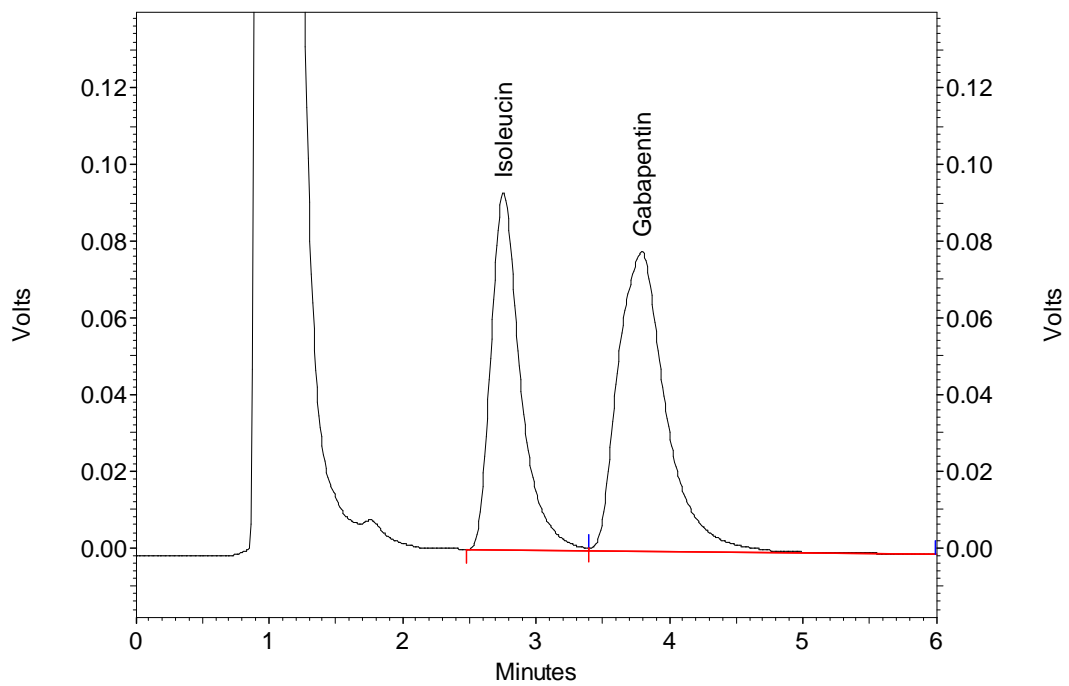


Abbildung 23: Isoleucin als interner Standard

Gabapentin: $c = 25,05 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 1)
Valin: $c = 19,98 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung V1)
Isoleucin: $c = 19,96 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung I1)

Die Versuche zeigten, dass Isoleucin sich am besten als interner Standard für das entwickelte HPLC-System eignet. Das Signal für Isoleucin ist vom Dansylsulfonsäure-Peak komplett getrennt und auch zu Gabapentin konnte eine für qualitative Zwecke sehr zufriedenstellender Trennung festgestellt werden.

2.2.2 Endgültige Methode

Herstellung eines Probenansatzes, Vorsäulenderivatisierung:

Menge		Konzentration
100 µl	Gabapentin	25,00 µg/ml
50 µl	Isoleucin	20,00 µg/ml
100 µl	DNS-Cl	0,15 mg/ml
50 µl	PBS	25,00 µg/ml

Inkubation bei 50°C für 30 Minuten.

HPLC-System

Säule	ODS Hypersil® C18, 125 x 4 mm, 5 µm
Säulentemperatur	26°C
Mobile Phase (Eluent)	75 % MeOH / 25% CH ₃ COOH (1 %)
Elution	isokratisch
Flussrate	1,2 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektion	Fluoreszenz, λ = ex 370 nm / em 506 nm
Laufzeit	6 min

2.2.3 Ergebnisse Validierung Dansylierung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die in Kapitel 0 näher beschriebenen Validierungsparameter zur Überprüfung der entwickelten Methode herangezogen. Der jeweils angegebene Peakflächenquotient bezieht sich auf die Verhältnisse der Peakflächen der Gabapentin-Stammlösung und der Isoleucin-Stammlösung und wird als Grundlage für die Vergleichbarkeit der Daten zur Berechnung herangezogen (siehe Kapitel 2.1).

Die Gabapentin-Stammlösungen wurden durch Einwaagen von 80,00 mg Gabapentin und anschließendem Lösen in 100,0 ml Wasser hergestellt. Die einzelnen Einwaagen für die Gabapentin-Stammlösungen sind im Kapitel 3.4 angeführt.

Die Isoleucin-Stammlösung I1 wurde für den gesamten Validierungsvorgang und alle Proben verwendet: EW = 20,18 mg, in 100 ml Wasser gelöst, entspricht einem Gehalt von 20,18 µg/ml.

Die Probenaufarbeitungen erfolgten nach der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Dansylierungsmethode. Die Angabe „Gehalt“ bezieht sich jeweils auf die Gabapentin-Konzentration der Probelösung bezieht

Spezifität

Um die Spezifität der entwickelten Methode beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse der Messung einer Probe mit verschiedenen Leerwerten verglichen. Die Inkubation erfolgte für Probe und alle Leerwerte gleich.

Systemleerwert:	300 µl PBS
Probeleerwert 1:	200 µl PBS + 100 µl DNS-Cl-Stammlösung
Probeleerwert 2:	200 µl PBS + 100 µl Gabapentin-Stammlösung 3
Probeleerwert 3:	200 µl PBS + 100 µl Isoleucin-Stammlösung
Probe:	Gabapentin-Stammlösung 3: 1:1 verdünnt

Akzeptanzkriterien: Keine Signale für den Systemleerwert und die Probeleerwerte.

Probe	Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient
Systemleerwert	0	0	0	0
Probeleerwert 1	0	0	0	0
Probeleerwert 2	40,01	2814920	0	0
Probeleerwert 3	0	0	1230031	0
Probe	40,01	2806663	1210353	2,319

Der Parameter *Spezifität* entspricht den Anforderungen.

Messpräzision

Zur Bestimmung der Messpräzision wurde eine Probenaufarbeitung einer 1:1-Verdünnung der Gabapentin-Stammlösung 3 sechsmal injiziert. Aus den gemessenen Daten wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung ermittelt. Akzeptanzkriterien: maximal 2 % relative Standardabweichung der Korrelationsfaktoren.

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Quotient d. Peakflächen	Gehalt berechnet [µg/ml]
40,01	2904062	1244213	2,334	40,18
40,01	2853695	1230030	2,320	39,95
40,01	2836858	1225388	2,315	39,86
40,01	2825079	1221364	2,313	39,83
40,01	2814919	1216039	2,315	39,86
40,01	2806663	1210353	2,319	39,93
Mittelwert			2,316	39,88
Standardabweichung			0,003	0,050
RSD (in %)			0,127	0,125

Der erste Wert dieser Messreihe wurde gemäß *Dixon-Test* (Berechnung siehe Kapitel 4.2) als Ausreißer definiert. Die starke Abweichung dieses Wertes könnte durch einen Fehler im Injektionssystem der HPLC-Anlage erklärt werden, da die Anlage in verschiedenen Versuchen des Öfteren Abweichungen im ersten

Messwert einer Versuchsreihe zeigte. Die Akzeptanzkriterien des Parameters Messpräzision (max. 2% relative Standardabweichung) werden erfüllt.

Methodenpräzision

Die Überprüfung der Methodenpräzision wird durch den Parameter *Wiederholbarkeit* abgedeckt und entspricht den Kriterien.

Linearität

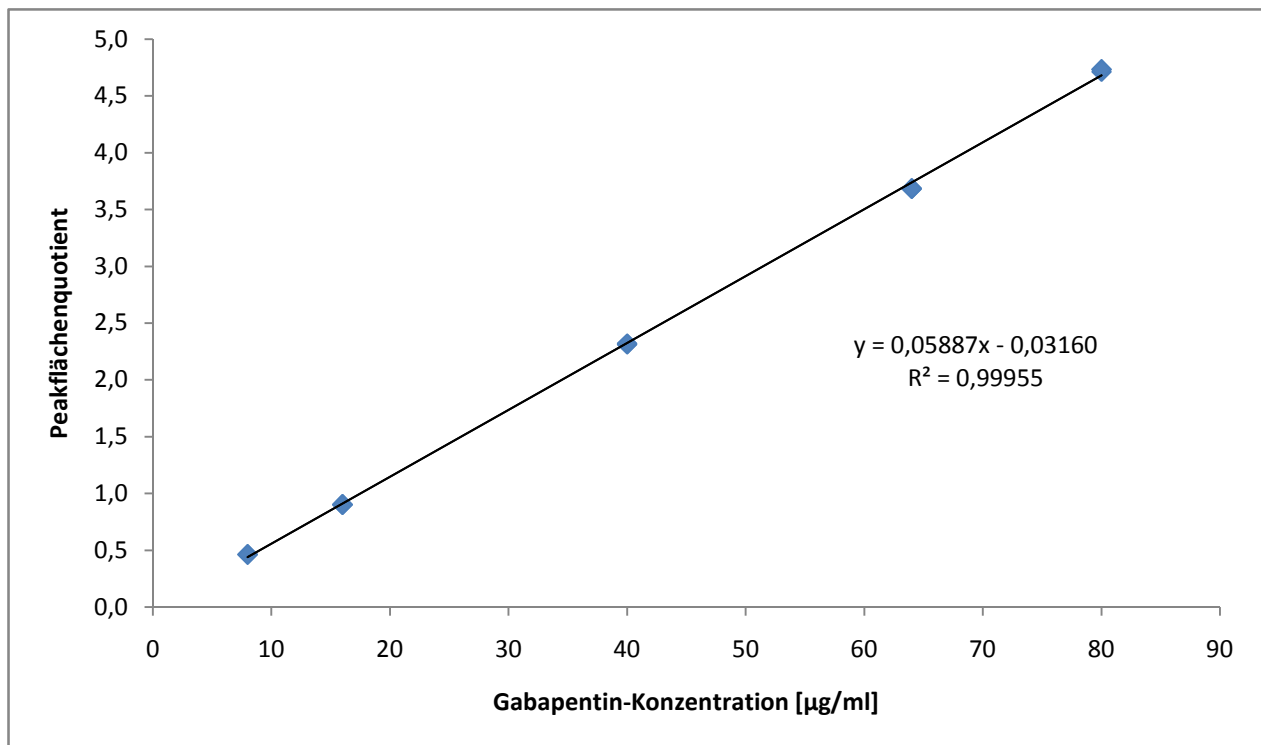
Zur Überprüfung der Linearität wurde die Gabapentin-Stammlösung 3 entsprechend verdünnt um einen Konzentrationsbereich von 200 % bis 20 % abzudecken. Die Probelösungen wurden nach Aufarbeitung je dreimal injiziert. Die höchste Konzentration lag bei somit 80,02 µg/ml, die niedrigste bei 8,002 µg/ml.

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient
200%			
80,02	5186662	1100792	4,712
80,02	5181166	1094644	4,733
80,02	5181174	1095004	4,732
160%			
64,016	4144844	1125939	3,681
64,016	4144536	1124320	3,686
64,016	4149256	1126596	3,683
100%			
40,01	2825079	1221364	2,313
40,01	2814919	1216039	2,315
40,01	2806663	1210353	2,319
40%			
16,004	990838	1098532	0,902
16,004	991844	1098741	0,903
16,004	990726	1097440	0,903

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient
20%			
8,002	543777	1175284	0,463
8,002	543332	1171177	0,464
8,002	543580	1174177	0,463

Aus den Messergebnissen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2007[®] mittels linearer Regressionsanalyse eine Geradengleichung erstellt sowie der Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß errechnet. Akzeptanzkriterium: Der Korrelationskoeffizient darf nicht < 0,99 betragen.

Bestimmtheitsmaß	0,9996
Korrelationskoeffizient	0,9998



Das Akzeptanzkriterium (Korrelationskoeffizient < 0,99) wurde erfüllt.

Arbeitsbereich

Der Parameter *Arbeitsbereich* wird mit dem Punkt *Linearität* abgedeckt.

Detektionsgrenze, Nachweisgrenze

Als Nachweisgrenze wurde eine Konzentration von 3 µg/ml der Gabapentin-Probelösung ermittelt (entspricht einer Gesamtkonzentration von $c = 1 \text{ µg/ml}$ im Probenansatz). Unterhalb dieser Konzentration zeigt das Chromatogramm kein Signal mehr. Definitionsgemäß soll für die Bestimmung der Detektionsgrenze ein Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 ermittelt werden. Da der Fluoreszenz-Detektor eine Basislinie ohne Rauschen zeigt, ist ein Signal/Rausch-Verhältnis nicht ermittelbar (siehe

Anhang-Abb. 2: HPLC - Messung zu LOD der Dansylierungsmethode).

Für die Messungen wurde Stammlösung 6 jeweils mit Wasser verdünnt, die Verdünnungen einzeln aufgearbeitet und analysiert.

Quantifizierungsgrenze

Auch hier konnte das Signal-Rauschen-Verhältnis aufgrund der glatten Basislinie nicht ermittelt werden. Die höchste Konzentration Gabapentin, die für diesen Versuch vermessen wurde betrug 5 µg/ml (entspricht einer Gesamtkonzentration von $c = 1,667 \text{ µg/ml}$ im Probenansatz).

Diese Konzentration befindet sich allerdings außerhalb des als linear definierten Bereiches.

Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde überprüft, indem aus 3 Einwaagen Verdünnungen einer Konzentration von 120 %, 100% und 80% hergestellt, aufgearbeitet und je dreimal injiziert wurden.

Aus den Messergebnissen wurden Wiederfindung und relative Standardabweichung berechnet. Akzeptanzkriterien: Wiederfindung zwischen 95 % und 105 %, relative Standardabweichung kleiner als 2 %, relative Standardabweichung alle Werte maximal 5 %.

Die Messungen erfolgten aus Verdünnungen der Gabapentin-Stammlösungen 3,4,5 und deren Verdünnungen.

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient	Quotient normalisiert	Gehalt %
160%					
63,98	5514991	1429632	3,858	0,06030	103,3 %
63,98	5426208	1417395	3,828	0,05984	102,5 %
63,98	5338939	1412890	3,779	0,05906	101,2 %
63,17	3938911	1124632	3,502	0,05545	95,0 %
63,17	3935372	1123272	3,503	0,05546	95,1 %
63,17	3929117	1121992	3,502	0,05544	95,0 %
64,02	4144844	1125939	3,681	0,05750	98,5 %
64,02	4144536	1124320	3,686	0,05758	98,7 %
64,02	4149256	1126596	3,683	0,05753	98,6 %
100%					
39,99	3136451	1356204	2,313	0,05784	99,6 %
39,99	3140058	1360536	2,308	0,05772	99,4 %
39,99	3146010	1361402	2,311	0,05779	99,5 %
39,48	3092396	1341686	2,305	0,05838	100,5 %
39,48	3092080	1342190	2,304	0,05835	100,5 %
39,48	3092899	1343345	2,302	0,05832	100,4 %
40,01	2801764	1206547	2,322	0,05804	99,9 %
40,01	2790639	1202633	2,320	0,05800	99,9 %
40,01	2796835	1203128	2,325	0,05810	100,0 %
40%					
15,99	1070145	1152075	0,929	0,05808	102,0 %
15,99	1072785	1153926	0,930	0,05813	102,1 %
15,99	1072005	1154929	0,928	0,05803	101,9 %
15,79	1373021	1477818	0,929	0,05883	103,3 %
15,79	1373224	1475776	0,931	0,05892	103,5 %
15,79	1367853	1473575	0,928	0,05878	103,2 %
16,00	990838	1098532	0,902	0,05636	99,1 %
16,00	991844	1098741	0,903	0,05641	99,2 %
16,00	990726	1097440	0,903	0,05641	99,2 %

Wiederfindung (Min.)	95,02 %
Wiederfindung (Max.)	103,5 %
RSD in % (80%)	3,2685
RSD in % (100%)	0,4290
RSD in % (120%)	1,8841
RSD in % (alle Werte)	2,1291

Die Ergebnisse entsprechen den Akzeptanzkriterien.

Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision)

Die Messungen zur Ermittlung der Wiederholpräzision erfolgten aus je drei aufeinanderfolgenden Injektionen sechs verschiedener Einwaagen: 1:1-Verdünnungen der Gabapentin-Stammlösungen 3 – 8.

Aus den Messergebnissen wurden die Standardabweichung, die relative Standardabweichung berechnet. Akzeptanzkriterium: relative Standardabweichung über alle Werte: maximal 5 %

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient	Gehalt berechnet [µg/ml]
40,01	2825079	1221364	2,313	39,93
40,01	2814919	1216039	2,315	
40,01	2806663	1210353	2,319	
39,99	3136451	1356204	2,313	39,79
39,49	3140058	1360536	2,308	
39,49	3146010	1361402	2,311	
39,48	3092396	1341686	2,305	39,65
39,48	3092080	1342190	2,304	
39,48	3092899	1343345	2,302	
40,06	3187570	1358054	2,347	40,54
40,06	3195895	1356887	2,355	
40,06	3194320	1356230	2,355	

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient	Gehalt berechnet [µg/ml]
40,22	2818551	1202352	2,344	
40,22	2823837	1203616	2,346	
40,22	2817217	1202892	2,342	40,32
40,18	2864311	1227088	2,334	
40,18	2863410	1227229	2,333	
40,18	2862795	1228277	2,331	40,13

Mittelwert (µg/ml)	40,06
Vertrauensbereich (Min.)	39,70
Vertrauensbereich (Max.)	40,41

Standardabweichung	0,3374
RSD (in %)	0,8422

Die Ergebnisse entsprechen den Anforderungen.

Tag zu Tag Präzision/ Vergleichspräzision

Die Messungen erfolgten einen Tag später als die Messungen der Wiederholpräzision aus Proben der Stammlösung 8. Aus den Messergebnissen wurden erneut die Standardabweichung und die relative Standardabweichung berechnet.

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient	Gehalt berechnet [µg/ml]
40,18	2864311	1227088	2,334	40,19
40,18	2863410	1227229	2,333	40,17
40,18	2862795	1228277	2,331	40,13
40,18	2863717	1227593	2,333	40,16
40,18	2858906	1227926	2,328	40,08
40,18	2861782	1228386	2,330	40,11

MW (µg/ml)	2,331	40,14
Standardabweichung	0,0023	0,0391
RSD (in %)	0,0988	0,0975

t-Test (Messpräzision)	0,007
t-Test (Vergleichspräzision)	2,190
F-Test	0,033

Akzeptanzkriterium: Beide Wertereihen kommen aus einer Grundeinheit. Kein signifikanter Unterschied zwischen t-Test und F-Test.

Die t-Test entsprechen den Akzeptanzkriterien. Auch der F-Test entspricht den Anforderungen, seine Berechnung und Bewertung ist allerdings nicht zulässig, da ein Messergebnis des Parameters Messpräzision als Ausreißer definiert wurde.

Zusammenfassung

Die entwickelte Methode entspricht in allen Validierungsparametern den im Vorfeld festgelegten Akzeptanzkriterien. Die Methode eignet sich daher zur quantitativen Bestimmung von Gabapentin über einen Konzentrationsbereich von etwa 8 µg/ml bis 80 µg/ml.

2.2.4 Massenspektrometrische Überprüfung

Im Rahmen der Vorversuche wurde der Erfolg der Derivatisierung von Gabapentin mit Dansylchlorid mittels Massenspektrometrie überprüft.

Probenvorbereitung:

100 μ l Gabapentin-Stammlösung (80 μ g/ml)

50 μ l DNS-Cl-Lösung (0,15 mg/ml)

150 μ l PBS

Inkubation: 50°C, 30 Min.

Messungen nach Ionisierungen mit ESI zeigten, dass dieses Ionisierungsverfahren für Dansyl-Gabapentin nicht geeignet ist, da das entstehende Molekülion offensichtlich zu instabil ist. Daher erfolgte Ionisierung der Probe erfolgte mittels APCI.

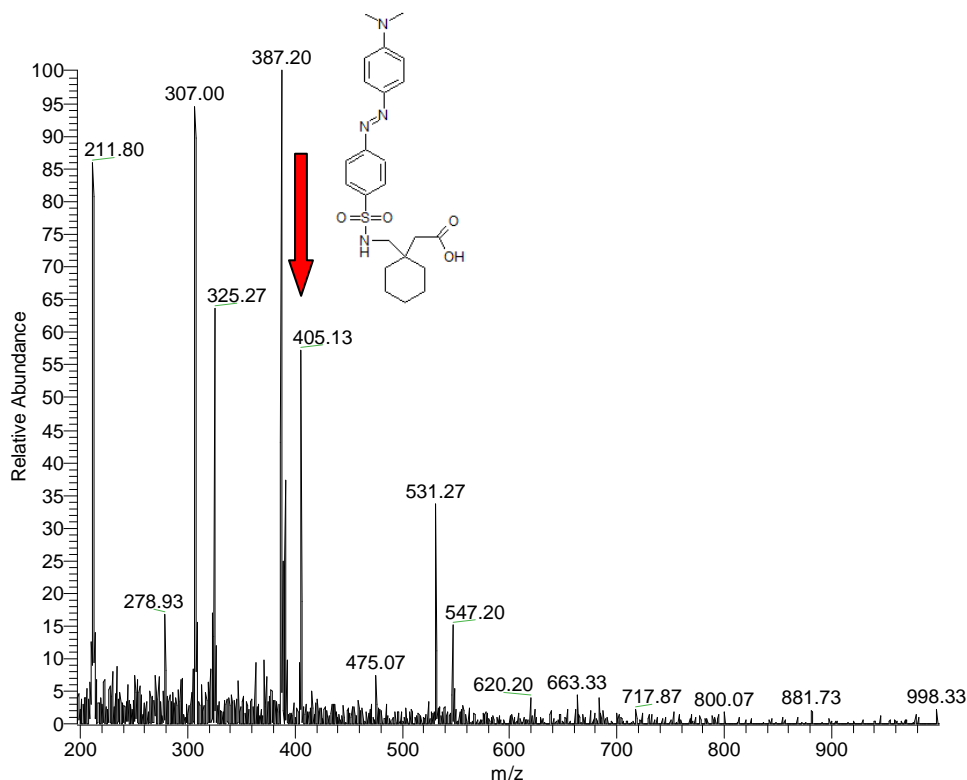


Abbildung 24: Massenspektrum von dansyliertem Gabapentin

Das Massenspektrum zeigt deutlich den Molekülionen-Peak (M⁺) des Derivatisierungsproduktes bei m/z 405,13 (MG 404,53).

2.2.5 Quantifizierung von Gabapentin aus Tabletten – Dansylierung

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, um Gabapentin nach Derivatisierung mit Dansylchlorid über HPLC quantifizieren zu können. Nun sollte überprüft werden, ob die Methode auch zur Gehaltsbestimmung von Gabapentin aus pharmazeutischen Zubereitungen geeignet ist.

Das Europäische Arzneibuch (21) sieht in der Monographie für Gabapentin eine Gehaltsbestimmung mittels HPLC durch Ermittlung eines Referenzwertes (100%) und Berechnung des entsprechenden Prozentgehaltes der Untersuchungslösung vor.

Als Referenzlösung diente eine Stammlösung von Reinsubstanz Gabapentin mit einer Konzentration von 40,30 µg/ml (entsprechend ~ 100% in der Linearitätsprüfung).

Zur Analyse wurden Gabapentin-Filmtabletten zu 800 mg der Firma Ratiopharm herangezogen. (Charge, Tablettengewicht sowie Tablettenspezifizierung siehe Kapitel 3.5)

Die Tabletten wurden mit einem Mörser händisch zerkleinert und verrieben. Anschließend wurde ein Aliquot von 50,00 mg eingewogen, zu 100,0 ml in Wasser gelöst und für 10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Einige Milliliter der so erhaltenen trüben Lösung/ Suspension wurden durch 0,45 µm-Spritzenaufsatzfilter filtriert und das Filtrat anschließend 1:10 mit Wasser verdünnt. Die verdünnte Lösung enthält somit etwa 35,79 µg Gabapentin/ ml. Diese Konzentration entspricht etwa einem 90%-Wert der Linearitätsprüfung und liegt somit genau im definierten Arbeitsbereich (siehe Kapitel 2.2.3).

Das durchschnittliche Gewicht einer Tablette beträgt 1,1176 g und enthält laut Herstellerangabe 800 mg Wirkstoff. Einwaagen von 50,00 mg der Tablettenmatrix enthalten daher theoretisch 35,79 mg Gabapentin.

Gehalt der Isoleucin-Stammlösung für alle Werte: 20,30 µg/ml (Stammlösung I2)

Ermittlung des Referenzwertes:

Probe	Gabapentin Einwaage [mg]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient
Referenz	40,30	3053417	1453672	2,100
Referenz	40,30	3048938	1451131	2,101
Referenz	40,30	3047166	1450313	2,101
Mittelwert				2,101

Messergebnisse der einzelnen Tabletten:

Probe	Tbl-Matrix Einwaage [mg]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient	GBP-Gehalt laut EW [µg]	GBP-Gehalt berechnet [µg]	Wiederf. %
Tablette 1	50,86	2029660	1083443	1,873	36,41	35,94	98,71 %
Tablette 1	50,86	2024376	1098956	1,842	36,41	35,34	97,07 %
Tablette 1	50,86	2021139	1101446	1,835	36,41	35,20	96,69 %
Tablette 2	50,06	2588813	1384953	1,869	35,84	35,86	100,07 %
Tablette 2	50,06	2560382	1392974	1,838	35,84	35,26	98,40 %
Tablette 2	50,06	2556085	1389654	1,839	35,84	35,29	98,47 %
Tablette 3	49,83	2645313	1464173	1,807	35,67	34,66	97,17 %
Tablette 3	49,82	2640727	1456969	1,812	35,66	34,77	97,50 %
Tablette 3	49,82	2633977	1454141	1,811	35,66	34,75	97,44 %
Mittelwert							97,98 %
Standardabweichung							1,00
relative Standardabweichung (in %)							1,03

Die Versuche zeigen, dass die entwickelte Methode geeignet ist, um Gabapentin aus pharmazeutischen Zubereitungen nachzuweisen. Die durchschnittlich um etwa 2 % vom tatsächlichen Gehalt abweichende Wiederfindung kann möglicherweise mit der Tatsache erklärt werden, dass Dansylchlorid auch in geringem Ausmaß mit Hydroxylgruppen reagieren kann. Diese sind in den zur Analyse verwendeten Filmtabletten aufgrund der als Hilfsstoffe verwendeten Cellulosen und Carrageen zahlreich vorhanden.

Im Allgemeinen ist vor einer Quantifizierung von Gabapentin aus Zubereitungen auf mögliche andere enthaltene und Hilfsstoffe zu achten, die mit Dansylchlorid eine Verbindung eingehen könnten. Im Fall von Gelatinekapseln etwa dürfte nur der Kapselinhalt analysiert werden, da Dansylchlorid mit den Aminogruppen des Gelatineproteins reagieren würde.

2.3 HPLC-Bestimmung von Gabapentin nach Derivatisierung mit Dabsylchlorid

2.3.1 Methodenentwicklung Dabsylierung

2.3.1.1 Vorsäulenderivatisierung

Eine Methode zur Derivatisierung von Gabapentin mit Dabsylchlorid ist bisher nicht bekannt gewesen. Allerdings sind wie schon eingangs erwähnt verschiedene Methoden zur Dabsylierung von Aminosäuren beschrieben.

Diese Methoden variieren hauptsächlich in der Wahl des Puffers, Konzentration und Lösungsmittel des Dabsylchlorid-Reagens, in der Zusammensetzung des Probenansatzes und der Inkubationszeit. Durchwegs wurde aber in allen einbezogenen Studien eine Inkubationstemperatur von etwa 70°C eingehalten.

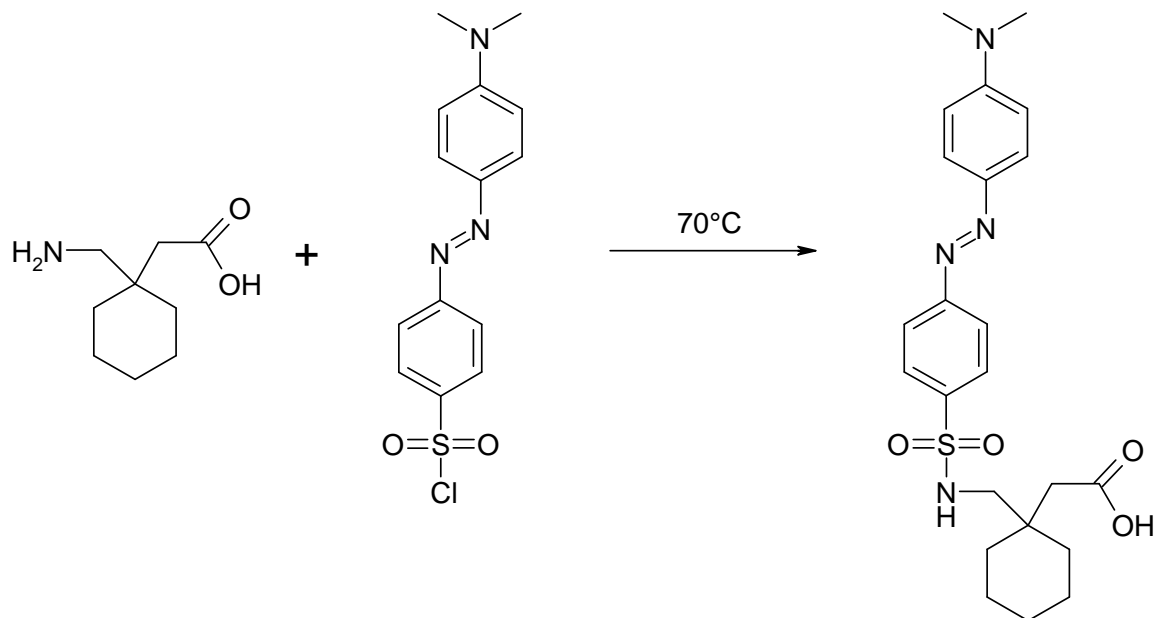
In der Literatur werden verschiedene Puffer für Derivatisierungsreaktionen mit Dabsylchlorid beschrieben. *Romero et al (22)* beispielsweise verwendeten Natriumcarbonat-Puffer. Aus der internen Arbeitsgruppen war bekannt, dass sich ein 100 mM Tetraboratpuffer (pH 9,4) für Reaktionen mit Memantin eignet. Allerdings stellte sich in den ersten HPLC-Läufen heraus, dass dieser Puffer für die Gabapentin-Versuche ungeeignet ist: es konnte keine ausreichende Trennung erzielt werden.

Gao et al (23) verwendeten zur Dabsyl-Derivatisierung von Fluoxetin und Norfluoxetin einen 100 mM Boratpuffer, pH 8,0. Die Inkubationszeit betrug in dieser Studie lediglich 3 Minuten. Wie zu erwarten war, konnte nach 3 Minuten Inkubation zwar ein Signal für dabsyliertes Gabapentin-Derivat registriert werden, Vergleichsversuche zeigten aber, dass Umsetzung zu diesem Zeitpunkt noch nicht quantitativ erfolgt war und das Signal nach 10 bzw. 30 Minuten Inkubationszeit weitaus deutlicher und größer zu detektieren war.

Die Konzentration an Gabapentin und internem Standard war in den ersten Vorversuchen mit etwa 0,1 mM zu gering. Bei Inkubationsversuchen mit

Stammlösungen einer zehnfachen Konzentrationen (~ 1 mM) entstand nach einigen Minuten ein Niederschlag (vermutlich aus dem Derivatisierungsprodukt), der sich zunächst durch Homogenisation und weiteres Erhitzen der Probe teilweise wieder lösen lässt, jedoch spätestens beim Abkühlen erneut ausfällt.

Daher wurde der Probenansatz nach 20 Minuten Inkubation mit einer Dilution Solution, bestehend aus 50 % Methanol, 25 % Ethanol und 25 % Wasser, versetzt und für weitere 10 Minuten inkubiert. Während des Inkubationsprozesses wurde die Probe außerdem nach 5 und nach 15 Minuten homogenisiert. Dadurch ließ sich eine klare Probelösung ohne weiteren Niederschlag generieren.



Die eingesetzte Reagenslösung enthielt 2 mg Dabsylchlorid gelöst in Acetonitril.

2.3.1.2 HPLC-System und interne Standards

Die meisten in der Literatur beschriebenen HPLC-Systeme basierten auf Gradientenelution in variabler Zusammensetzung. (6) (24) (22) Um das System aber möglichst einfach zu halten, sollte unter isokratischen Bedingungen eluiert werden. Gao et al (18) eluierten isokratisch mit einem Gemisch aus 740 ml Acetonitril und 260 ml Trifluoressigsäure (0,1%). Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte schon in anderen Versuchen mit Dabsyl-Derivaten mit einer mobilen Phase aus 75 % Acetonitril und 25 % Essigsäure (1%) gute Trennungen erzielt werden. Daher wurde dieses Elutionsmittel verwendet.

Bis auf die Änderung der mobilen Phase und eine Erhöhung Säulenofentemperatur auf 30°C wurden die HPLC-Bedingungen aus der zuvor in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Trennmethode für Dansylierungsderivate übernommen.

Wie auch schon bei den Versuchen zur Quantifizierung von Dansyl-Derivaten von Gabapentin wurde mit drei verschiedenen internen Standards experimentiert: GABA, L-Valin und L-Isoleucin.

GABA stellte sich als interner Standard als völlig ungeeignet heraus, da das Signal seines Derivatisierungsproduktes dieselbe Retentionszeit aufwies wie ein nicht näher identifizierter Peak („unknown“, siehe Abbildung 24: Massenspektrum von dansyliertem Gabapentin) bei $R_t \sim 1,5$. Dieser Peak zeigte auch in einem Systemleerwert mit 500 μ Boratpuffer, 100 μ l Dabsylchlorid-Reagens und 600 μ l Dilution Solution.

L-Valin zeigte erwartungsgemäß eine spätere Retentionszeit, eine vollständige Trennung zum Signal des unbekanntes Peaks war aber nicht gegeben (siehe Abbildung 25). Es kam daher nur die Verwendung von L-Isoleucin in Frage, dessen Signal eine Basislinientrennung zu allen anderen Peaks zeigte (Abbildung 27 + Abbildung 28).

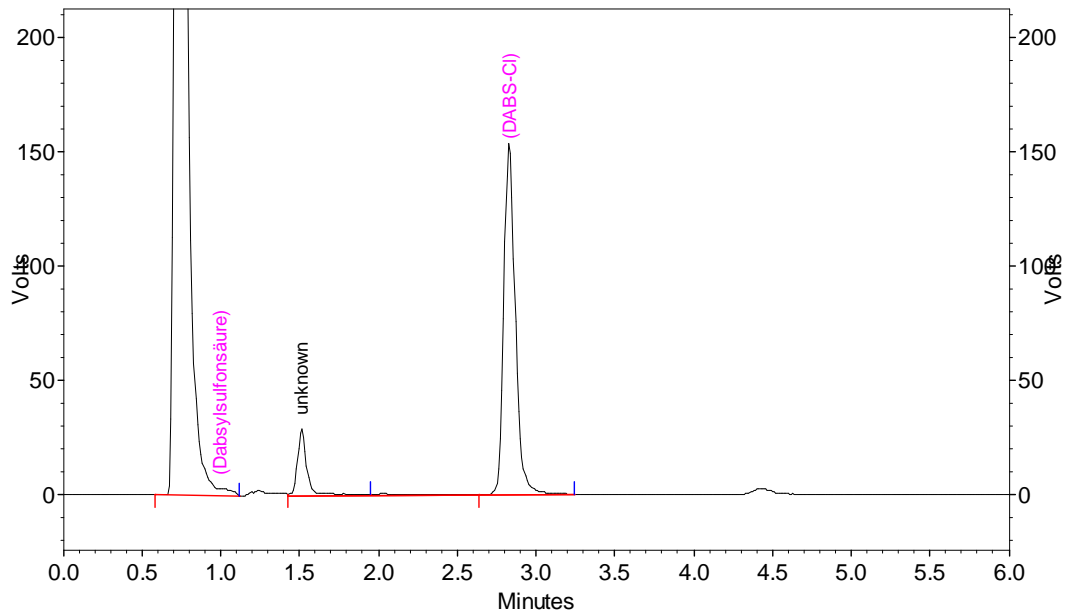


Abbildung 25: Chromatogramm - Systemleerwert Dabsylierung

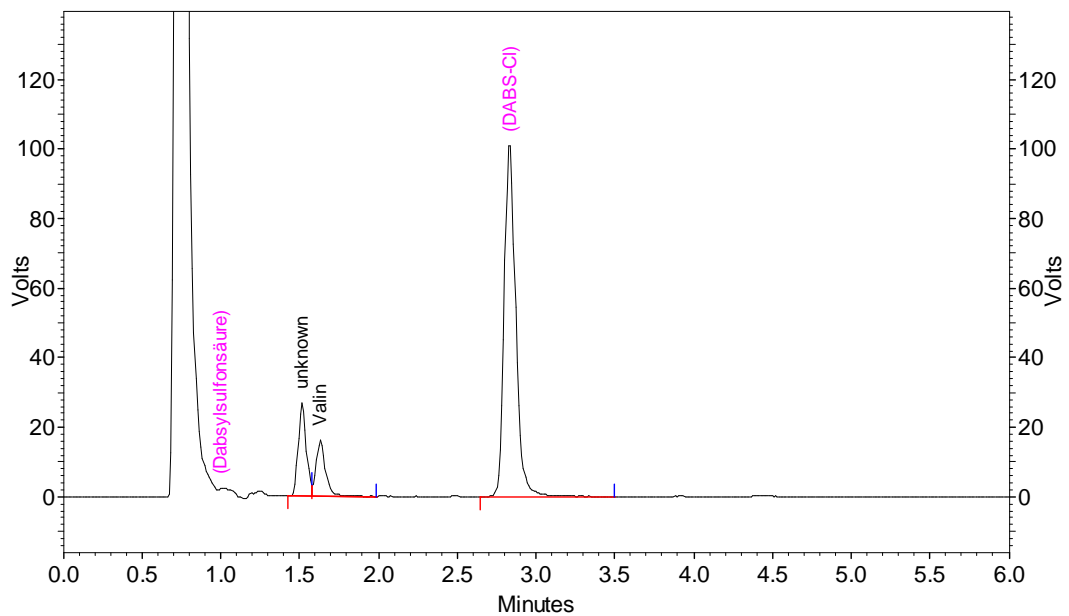


Abbildung 26: Chromatogramm - Dabsylierung, Interner Standard Valin

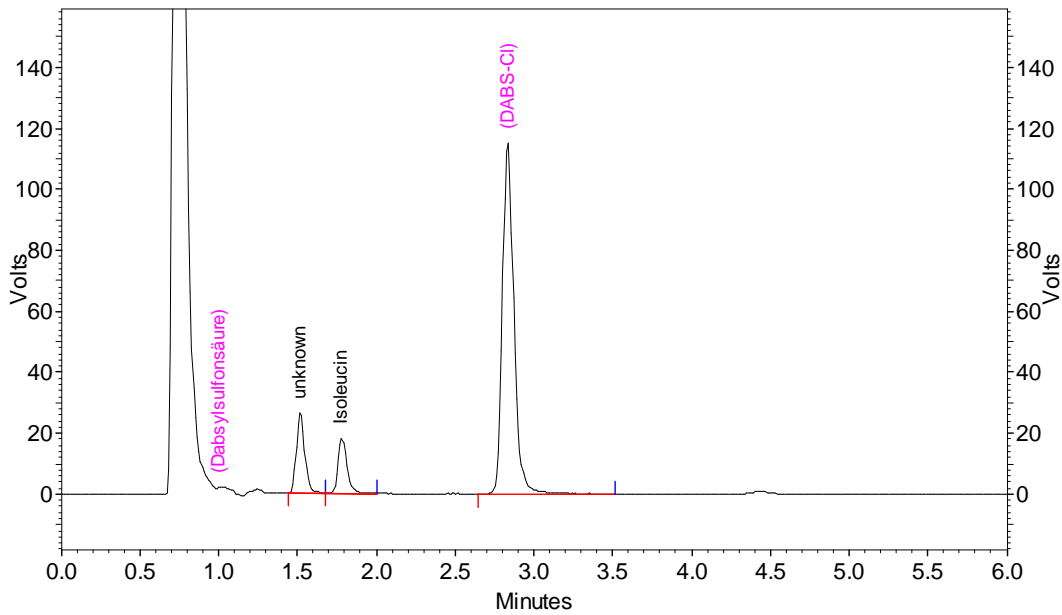


Abbildung 27: Chromatogramm - Dabsylierung, Interner Standard Isoleucin

Gabapentin: $c = 34,24 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 10)

Valin: $c = 11,70 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung V2)

Isoleucin: $c = 13,13 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung I3)

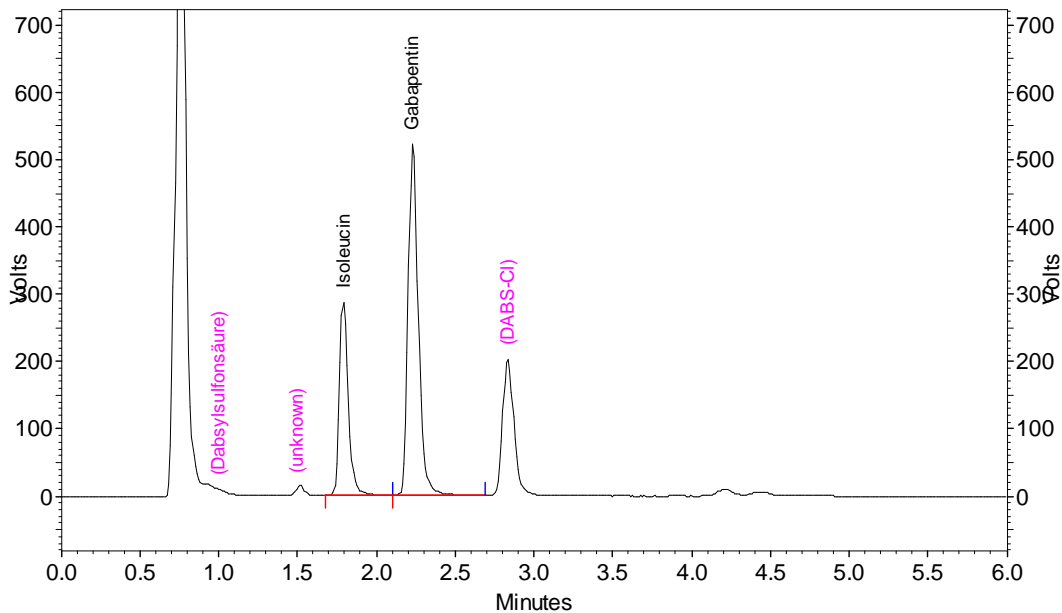


Abbildung 28: Chromatogramm – Dabsylierung, Gabapentin + Isoleucin

Gabapentin: $c = 342,4 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 10)

Isoleucin: $c = 131,3 \mu\text{g/ml}$ (Stammlösung I3)

2.3.2 Endgültige Methode

Herstellung eines Probenansatzes, Vorsäulenderivatisierung:

Menge		Konzentration
100 µl	Gabapentin	200 µg/ml
100 µl	Isoleucin	100 µg/ml
100 µl	DABS-Cl	2 mg/ml
300 µl	Borat-Puffer 100 mM (pH 8,0)	
600 µl	Dilution Solution	

Inkubation bei 70°C für 30 Minuten. Homogenisation nach 5 und weiteren 15 Minuten, Zugabe der Dilution Solution nach 20 Minuten.

HPLC-System

Säule	ODS Hypersil® C18, 125 x 4 mm, 5 µm
Säulentemperatur	30°C
Mobile Phase (Eluent)	75 % Acetonitril / 25 % CH ₃ COOH (1 %)
Elution	isokratisch
Flussrate	1,2 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektion	λ = 450 nm
Laufzeit	6 min

2.3.3 Ergebnisse Validierung Dabsylierung

Zur Validierung der Dansylierungsmethode wurden dieselben Parameter und Berechnungen herangezogen wie zur Validierung der Dansylierungsmethode.

Die Gabapentin-Stammlösungen wurden durch Einwaagen von 20,00 mg Gabapentin und anschließendem Lösen in 50,0 ml Wasser hergestellt. Die Einwaagen für die Gabapentin-Stammlösungen sind im Kapitel 3.4 angeführt.

Die Isoleucin-Stammlösung I4 wurde für den gesamten Validierungsvorgang und alle Proben verwendet: EW = 10,16 mg, in 100 ml Wasser gelöst. Das entspricht einem Gehalt von 101,6 µg/ml.

Die Probenaufarbeitungen erfolgten nach der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Methode zur Derivatisierung von Gabapentin mit Dabsylchlorid.

Spezifität

Um die Spezifität der entwickelten Methode beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse einer Messung einer nach der üblichen Methode aufbereiteten Probe mit verschiedenen Leerwerten verglichen:

Systemleerwert:	600 µl Boratpuffer
Probeleerwert 1:	500 µl Boratpuffer + 100 µl DABS-Cl-Stammlösung
Probeleerwert 2:	500 µl Boratpuffer + 100 µl Gabapentin-Stammlösung
Probeleerwert 3:	500 µl Boratpuffer + 100 µl Isoleucin-Stammlösung
Probe:	Gabapentin-Stammlösung 11: 1:1 verdünnt

Probe	Gehalt GBP [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächenquotient
Systemleerwert	0	0	0	0
Probeleerwert 1	0	0	0	0
Probeleerwert 2	200,9	1554125	0	0
Probeleerwert 3	0	0	1053031	0
Probe	200,9	1554064	1051321	1,478

Akzeptanzkriterien: Keine Signale für den Systemleerwert und die Probeleerwerte. Der Parameter *Spezifität* entspricht den Anforderungen.

Messpräzision

Zur Bestimmung der Messpräzision wurde eine Probenaufarbeitung einer 1:1-Verdünnung der Gabapentin-Stammlösung 11 sechsmal injiziert. Aus den gemessenen Daten wurden der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung ermittelt. Akzeptanzkriterien: maximal 2 % relative Standardabweichung der Korrelationsfaktoren.

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächenquotient	Gehalt berechnet [µg/ml]
200,9	1554064	1051321	1,478	197,5
200,9	1553353	1051024	1,478	197,5
200,9	1554127	1051671	1,478	197,4
200,9	1555905	1052686	1,478	197,5
200,9	1554913	1052371	1,478	197,4
200,9	1555424	1053029	1,477	197,4
Mittelwert			1,478	197,4
Standardabweichung			0,0004	0,054
RSD (in %)			0,027	0,027

Die vorgegebenen Akzeptanzkriterien wurden somit erfüllt.

Methodenpräzision

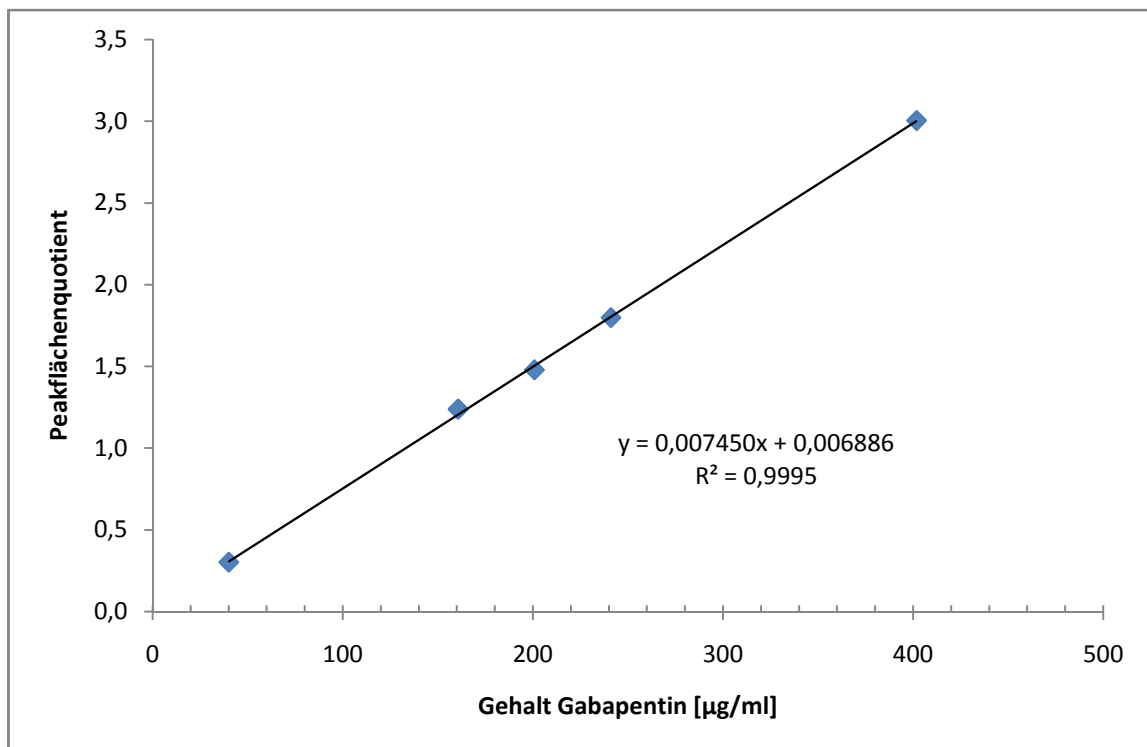
Die Überprüfung der Methodenpräzision wird durch den Parameter *Wiederholbarkeit* abgedeckt und entspricht den Kriterien.

Linearität

Zur Überprüfung der Linearität wurde die Gabapentin-Stammlösung 11 entsprechend verdünnt um einen Konzentrationsbereich von 200 % bis 20 % abzudecken. Die Probelösungen wurden nach Aufarbeitung je dreimal injiziert. Die höchste Konzentration lag bei somit 401,8 µg/ml, die niedrigste bei 40,18 µg/ml.

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Quotient d. Peakflächen
200%			
401,8	2765764	921030	3,003
401,8	2771667	922310	3,005
401,8	2776313	924527	3,003
120%			
241,1	1881989	1047285	1,797
241,1	1887257	1050099	1,797
241,1	1888007	1050833	1,797
100%			
200,9	1554064	1051321	1,478
200,9	1553353	1051024	1,478
200,9	1554127	1051671	1,478
80%			
160,7	1267157	1024170	1,237
160,7	1270925	1027074	1,237
160,7	1272107	1028147	1,237
20%			
40,18	355458	1182028	0,301
40,18	355936	1180629	0,301
40,18	355117	1181760	0,300

Aus den Messergebnissen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2007[®] mittels linearer Regressionsanalyse eine Geradengleichung erstellt sowie der Korrelationskoeffizient und das Bestimmtheitsmaß errechnet. Akzeptanzkriterium: Der Korrelationskoeffizient darf nicht < 0,99 betragen.



Bestimmtheitsmaß	0,9995
Korrelationskoeffizient	0,9998

Das Akzeptanzkriterium (Korrelationskoeffizient < 0,99) entspricht den Anforderungen.

Arbeitsbereich

Der Parameter *Arbeitsbereich* wird mit dem Punkt *Linearität* abgedeckt.

Detektionsgrenze, Nachweisgrenze

Als Nachweisgrenze wurde eine Konzentration von 0,4 µg/ ml ermittelt. Bei dieser Konzentration beträgt das Signal/Rausch-Verhältnis 3:1. Dazu wurde Stamm-lösung 14 in mehreren Schritten mit Wasser verdünnt, die Verdünnungen einzeln aufgearbeitet und analysiert. (siehe Anhang-Abb. 3: HPLC - Messung zu LOD der Dabsylierungsmethode (0,1 µg/ml))

Quantifizierungsgrenze

Definitionsgemäß soll für die Bestimmung der Quantifizierungsgrenze ein Signal/Rausch-Verhältnis von 10:1 ermittelt werden. Dieses Verhältnis konnte in analoger Arbeitsweise für eine Konzentration der Probelösung von etwa 0,1 µg/ml ermittelt werden.

Eine Quantifizierung der Probe ist in diesem Konzentrationsbereich allerdings nicht mehr möglich, da der Peak für den Internen Standard (Isoleucin) den Gabapentin-Peak durch Tailing teilweise überlagert (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Eine Konzentration von 0,1µg/ml entspricht etwa 0,05 % der für die Methode entwickelten Arbeitskonzentration und somit weit außerhalb des mit 20 bis 200 % definierten Arbeitsbereichs.

Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde überprüft, indem aus drei Einwaagen Verdünnungen einer Konzentration von 120 %, 100% und 80% hergestellt, aufgearbeitet und je dreimal injiziert wurden.

Die Messungen erfolgten aus Verdünnungen der Gabapentin-Stammlösungen 11, 12, 13 und deren Verdünnungen.

Aus den Messergebnissen wurden Wiederfindung und relative Standardabweichung berechnet.

Akzeptanzkriterien: Wiederfindung zwischen 95 % und 105 %, relative Standardabweichung kleiner als 2 %, relative Standardabweichung alle Werte maximal 5 %.

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient	Quotient normalisiert	Gehalt %
120%					
239,9	1910906	1063408	1,797	0,007491	100,2 %
239,9	1912354	1064509	1,796	0,007489	100,1 %
239,9	1913278	1064242	1,798	0,007495	100,2 %
238,6	1850061	1046623	1,768	0,007410	99,1 %
238,6	1855864	1049858	1,768	0,007410	99,1 %
238,6	1860454	1052248	1,768	0,007411	99,1 %
241,1	1881989	1047285	1,797	0,007454	99,7 %

241,1	1887257	1050099	1,797	0,007455	99,7 %
241,1	1888007	1050833	1,797	0,007453	99,7 %
Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient	Quotient normalisiert	Gehalt %
100%					
199,9	1581530	1046240	1,512	0,007562	101,0 %
199,9	1583326	1047356	1,512	0,007562	101,1 %
199,9	1583593	1046673	1,513	0,007569	101,1 %
198,8	1564216	1048353	1,492	0,007505	100,3 %
198,8	1563398	1047169	1,493	0,007510	100,3 %
198,8	1565356	1048765	1,493	0,007508	100,3 %
200,9	1554064	1051321	1,478	0,007358	98,3 %
200,9	1553353	1051024	1,478	0,007357	98,3 %
200,9	1554127	1051671	1,478	0,007356	98,3 %
80%					
159,9	1512191	1277395	1,184	0,007403	98,8 %
159,9	1511799	1276540	1,184	0,007406	98,8 %
159,9	1512392	1278513	1,183	0,007397	98,7 %
159,0	1529857	1284487	1,191	0,007489	99,9 %
159,0	1269718	1066401	1,191	0,007487	99,9 %
159,0	1529065	1283527	1,191	0,007491	100,0 %
160,7	1267157	1024170	1,237	0,007698	102,8 %
160,7	1270925	1027074	1,237	0,007699	102,8 %
160,7	1272107	1028147	1,237	0,007698	102,8 %
Wiederfindung (Min.)					98,3 %
Wiederfindung (Max.)					102,8 %
RSD in % (80%)					0,473
RSD in % (100%)					1,244
RSD in % (120%)					1,756
RSD in % (alle Werte)					1,303

Alle Kriterien entsprechen.

Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision)

Die Messungen zur Ermittlung der Wiederholpräzision erfolgten aus je drei aufeinanderfolgenden Injektionen sechs verschiedener Einwaagen: 1:1 - Verdünnungen der Gabapentin-Stammlösungen 11 - 16.

Aus den Messergebnissen wurden die Standardabweichung, die relative Standardabweichung berechnet. Akzeptanzkriterium: relative Standardabweichung über alle Werte: maximal 5 %

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient	Quotient normalisiert	Gehalt %
200,9	1554064	1051321	1,478	0,007358	98,3 %
200,9	1553353	1051024	1,478	0,007357	98,3 %
200,9	1554127	1051671	1,478	0,007356	98,3 %
199,9	1581530	1046240	1,512	0,007562	101,0 %
199,9	1583326	1047356	1,512	0,007562	101,1 %
199,9	1583593	1046673	1,513	0,007569	101,1 %
198,8	1564216	1048353	1,492	0,007505	100,3 %
198,8	1563398	1047169	1,493	0,007510	100,3 %
198,8	1565356	1048765	1,493	0,007508	100,3 %
201,4	1552285	1051326	1,477	0,007331	98,0 %
201,4	1552239	1050424	1,478	0,007337	98,0 %
201,4	1554337	1051617	1,478	0,007339	98,1 %
199,2	1590825	1112673	1,430	0,007177	95,9 %
199,2	1589510	1110890	1,431	0,007183	96,0 %
199,2	1587969	1108725	1,432	0,007190	96,1 %
197,0	1509342	1038329	1,454	0,007379	98,6 %
197,0	1508560	1035360	1,457	0,007396	98,8 %
197,0	1508381	1035140	1,457	0,007397	98,8 %

Mittelwert (Gehalt berechnet)	98,79 %
Standardabweichung	1,7017
relative Standardabweichung (in %)	1,7235

Die Ergebnisse entsprechen den Anforderungen.

Tag zu Tag Präzision/ Vergleichspräzision

Die Messungen erfolgten einen Tag später als die Messungen der Wiederholpräzision aus Proben der Stammlösung 16. Aus den Messergebnissen wurden erneut die Standardabweichung und die relative Standardabweichung berechnet.

Gehalt [µg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächenquotient	Gehalt berechnet [µg/ml]
197,0	1808369	1251272	1,445	193,1
197,0	1804071	1249275	1,444	193,0
197,0	1807638	1251216	1,445	193,0
197,0	1808249	1250832	1,446	193,1
197,0	1807410	1251034	1,445	193,0
197,0	1807739	1251904	1,444	192,9

Mittelwert (µg/ml)	1,444	193,0
Standardabweichung	0,0006	0,0853
RSD (in %)	0,0440	0,0442

t-Test (Methodenpräzision)	158,0
t-Test (Vergleichspräzision)	114,6
F-Test	0,3948

Akzeptanzkriterium: Beide Wertereihen kommen aus einer Grundeinheit. Kein signifikanter Unterschied zwischen t-Test und F-Test.

t-Test von Methodenpräzision und Vergleichspräzision entsprechen nicht den gestellten Anforderungen. Die hohen Werte ergeben sich aus der jeweils sehr geringen Standardabweichung, die für die Messwerte ermittelt wurde, und deuten somit statistisch auf einen systematischen Fehler hin. Da der berechnete Gehalt aber einer Wiederfindung von durchschnittlich 98 % entspricht – ein Ergebnis das mit dem der erfolgreich validierten Dansylierungsmethode vergleichbar ist – ist dieser statistische Parameter für die Eignung Methode nicht aussagekräftig, die Ergebnisse liegen deutlich im Konfidenzintervall von 95 % - 105 %.

Der F-Test entspricht den Anforderungen. Die Messwerte entstammen einer Grundgesamtheit.

2.3.4 Massenspektrometrische Überprüfung

Im Rahmen der Vorversuche wurde der Erfolg der Derivatisierung von Gabapentin mit Dabsylchlorid mittels Massenspektrometrie überprüft.

Probenvorbereitung:

100 µl	Gabapentin-Stammlösung (400 µg/ml)
100 µl	DABS-Cl-Lösung (2 mg/ml)
300 µl	Boratpuffer

Inkubation: 70°C, 30 Min.; Homogenisierung nach 5 und weiteren 15 Minuten, Zugabe der Dilution Solution nach gesamt 20 Minuten.

Das Massenspektrum (Ionisierung mittels ESI) zeigt den Molekülionen-Peak (M^+) des Derivatisierungsproduktes bei m/z 459,33 (MG 458,58). Der Peak m/z 481,13 zeigt das entsprechende Natriumsalz.

Der Peak m/z 224,07 lässt sich wahrscheinlich durch Fragmentierung der Ionisierungsproduktes der ESI-Technik erklären. *Chen et al* (6) (25) beschreiben m/z 224 als „das Hauptfragment für die meisten Dabsylchlorid derivatisierten Aminosäuren“.

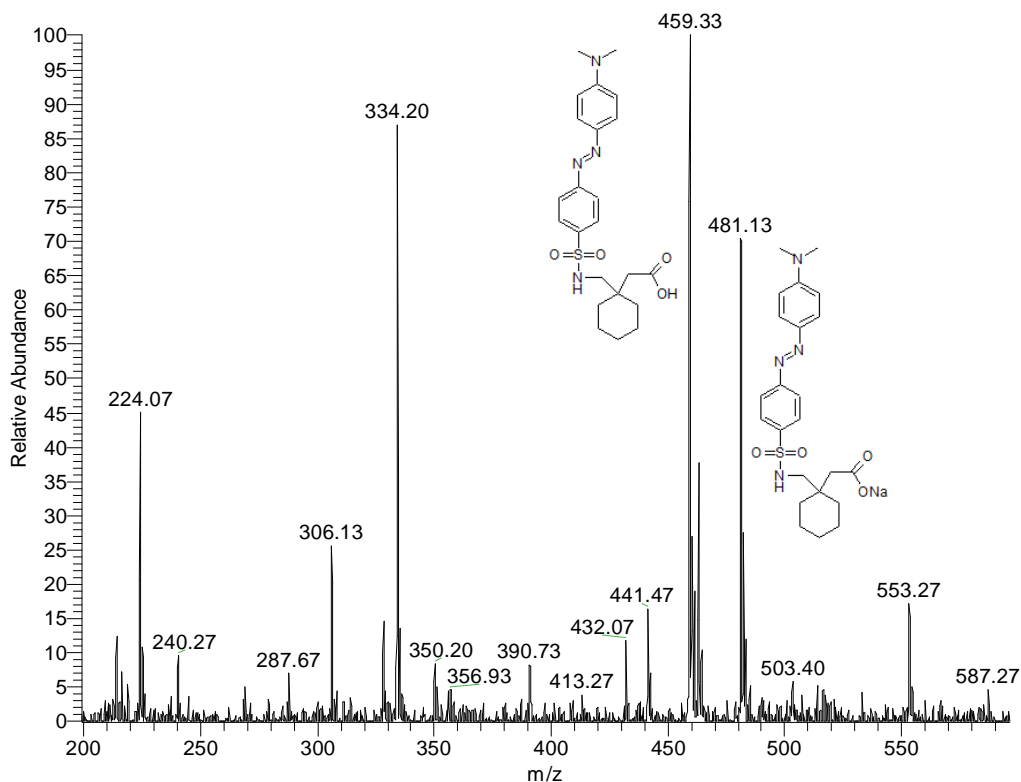


Abbildung 29: Massenspektrum von dabsyliertem Gabapentin

2.3.5 Quantifizierung von Gabapentin aus Tabletten über Dabsylierung

Die Prüfung zur Eignung der Methode zur Quantifizierung von Gabapentin aus Tabletten wurde in analoger Weise zur Überprüfung der Dabsylierungsmethode ähnlich der Arzneibuchmethode durchgeführt (Kapitel 2.2.5).

Als Referenzlösung diente eine Stammlösung von Reinsubstanz Gabapentin mit einer Konzentration von 198,80 µg/ml (Stammlösung 13, entsprechend einem 100%-Wert in der Linearitätsprüfung).

Die wurden Gabapentin-Filtabletten zu 800 mg der Firma Ratiopharm (siehe Kapitel 3.5) wurden mit einem Mörser händisch zerkleinert und verrieben. Anschließend wurde ein Aliquot von 50,00 mg der Tablettenmatrix eingewogen, zu 100,0 ml in Wasser gelöst und für 10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Einige Milliliter der so erhaltenen trüben Lösung/ Suspension wurden durch

0,45 µm-Spritzenaufsatzfilter filtriert und das Filtrat anschließend 1:1 mit Wasser verdünnt. Die verdünnte Lösung enthält somit etwa 180 µg Gabapentin/ml. Diese Konzentration entspricht cirka einem 90%-Wert der Linearitätsprüfung und liegt daher genau im definierten Arbeitsbereich.

Gehalt der Isoleucin-Stammlösung für alle Werte: 101,6 µg/ml (Stammlösung I4)

Ermittlung des Referenzwertes:

Probe	Gabapentin Gehalt [mg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient
Referenz	198,80	1564216	1048353	1,492
Referenz	198,80	1563398	1047169	1,493
Referenz	198,80	1565356	1048765	1,493
Mittelwert				1,493

Messergebnisse der einzelnen Tabletten:

Probe	Tbl-Matrix Einwaage [mg]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Isoleucin	Peakflächen- quotient	GBP-Gehalt laut EW [µg]	GBP-Gehalt berechnet [µg]	Wiederf. %
Tablette 4	49,86	664223	497752	1,334	178,46	177,74	99,60 %
Tablette 4	49,86	1510448	1131422	1,335	178,46	177,82	99,64 %
Tablette 4	49,86	1509515	1129741	1,336	178,46	177,97	99,73 %
Tablette 5	50,62	1429914	1073837	1,332	181,18	177,36	97,89 %
Tablette 5	50,62	1430035	1072339	1,334	181,18	177,63	98,04 %
Tablette 5	50,62	1431868	1073703	1,334	181,18	177,63	98,04 %
Tablette 6	50,38	1033286	762980	1,354	180,32	180,38	100,0 %
Tablette 6	50,38	1034356	764799	1,352	180,32	180,14	99,90 %
Tablette 6	50,38	1033811	764207	1,353	180,32	180,19	99,92 %
Mittelwert							99,46 %
Standardabweichung							0,87
relative Standardabweichung (in %)							0,88

Die Messergebnisse zeigen, dass die entwickelte Methode geeignet ist, um Gabapentin nach Derivatisierung mit Dabsylchlorid aus pharmazeutischen Zubereitungen nachzuweisen. Wie bereits zur Dansylierungsmethode in Kapitel 2.2.5 beschrieben, ist vor einer Analyse auf die chemischen Eigenschaften der Hilfsstoffe der jeweiligen Zubereitung zu achten.

2.4 Kapillarelektrophoretische-Bestimmung von Gabapentin nach Derivatisierung mit Dansylchlorid und Dabsylchlorid

2.4.1 Methodenentwicklung

Als interner Standard kamen zu nächst die bereits für die HPLC-Methoden verwendeten Aminosäuren γ -Aminobuttersäure, Valin und Isoleucin in Frage. Die ersten Vorversuche zeigten, dass Isoleucin davon am besten geeignet war, sowohl für dansyl-derivatisiertes, als auch für dabsyliertes Gabapentin.

Alle Versuche wurden auf einem Kapillarelektrophoresegerät von Beckmann Coulter (P/ACE System MDQ) durchgeführt. Als Kapillaren wurden außen Polyimid beschichtete Quarzkapillaren der Firma Polymicron Technologies mit einem Außendurchmesser von 365 μm und einem Innendurchmesser von 50 μm verwendet.

Als Laufpuffer (BGE = Background Electrolyte) wurde, angelehnt an *Lachmann et al* (26), ein 50 mM Natriumtetraborat-Puffer (pH 8,5) eingesetzt. Die Puffergefäße der Kapillarelektrophorese wurden täglich neu befüllt, um eine zu starke Aufkonzentration des Puffers durch Verdunstung, die eine Änderung in der Migrationsgeschwindigkeit der Substanzen verursacht, zu verhindern.

Die nachstehenden kapillarelektrophoretischen Parameter wurden aufgrund langjähriger Erfahrungen innerhalb der Arbeitsgruppe mit diesem Gerät vor Beginn der Versuche gewählt. Diese Parameter stellten sich als absolut geeignet heraus und konnten ohne Änderung für alle Versuche beibehalten werden:

Kapillarlänge	50 cm
Kühlungstemperatur Kapillare	20°C
Kühlungstemperatur Probengefäße	20°C
Spannung (Trennung)	25 kV
Injektion	0,5 PSI, 5 Sek

Die Zusammensetzung und Konzentration für die Derivatisierung wurden zunächst unverändert aus den für die HPLC entwickelten Methoden übernommen. Es zeigte sich aber, dass der Gehalt beider Analyten viel zu gering war.

Außerdem stellte sich die Verwendung von Aceton als Lösungsmittel für DNS-Cl als ungeeignet heraus: Probegefäße in der Kapillarelektrophorese sind technisch bedingt nicht dicht verschlossen. Kapillare und Elektrode müssen von oben eintauchen können. Aceton ist zu flüchtig und verdampft innerhalb weniger Stunden aus den Probegefäßen. Dies führt zunächst zu einer Erhöhung der Konzentration der Lösung und schließlich zum Ausfallen der Derivatisierungsprodukte.

Verschiedene Versuche zur Erhöhung der Konzentration brachten nur kleine Erfolge im Bezug auf eine Vergrößerung der Peakflächen:

Im Falle der Dabsylierungsmethode war die Konzentrationserhöhung der Gabapentin- und Isoleucin-Lösung beschränkt durch die Löslichkeit von DABS-Cl in Acetonitril. Bereits bei einem Gehalt von 2 mg pro ml Acetonitril ist bei Raumtemperatur das Löslichkeitsprodukt von Dabsylchlorid überschritten und die Lösung gesättigt. Die Zugabe eines größeren Volumens an Reagenzlösung ist auch nicht zielführend, da dies die Konzentration der Analyten in der Probe nur wieder verdünnen würde.

Bei der Dansylierungsmethode bestand noch Spielraum für weitere Konzentrationserhöhungen. Peakfläche und effektive Konzentration der Lösungen standen aber in keiner Relation zueinander.

Die Elektropherogramme von Dansylierungs- und Dabsylierungsmethode unterschieden sich kaum voneinander: die Derivate beider Reagenzien wiesen etwa dieselbe Migrationsgeschwindigkeit auf. Abbildung 30 zeigt stellvertretend für beide Methoden das Trennergebnis mit Isoleucin als interner Standard.

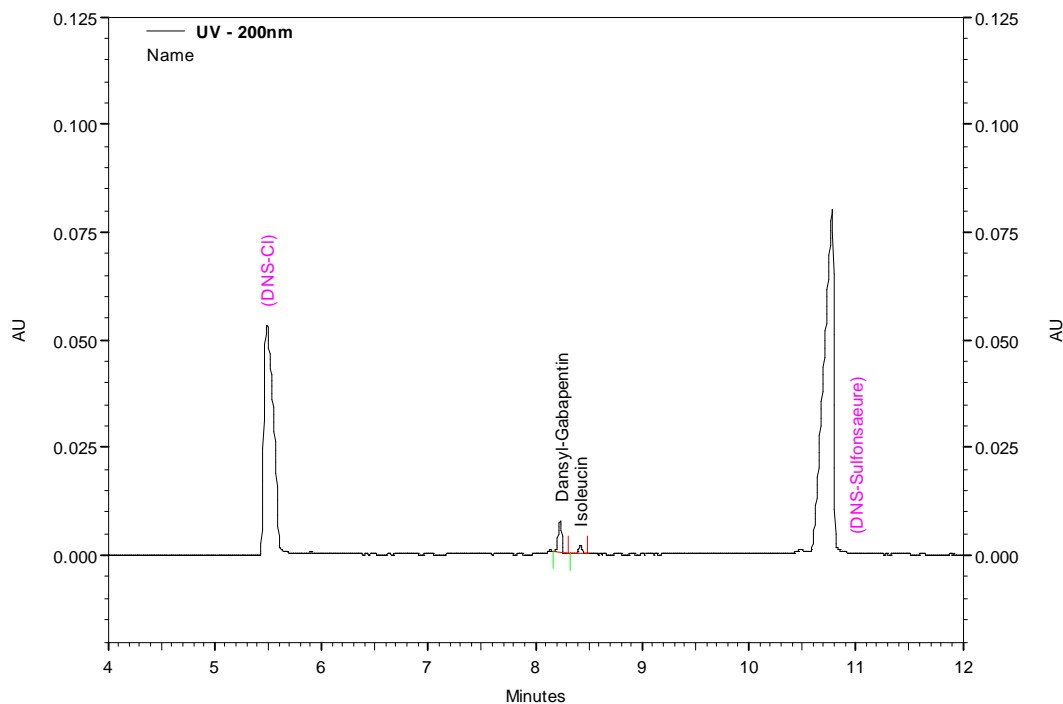


Abbildung 30: Elektropherogramm von dansyliertem Gabapentin und Isoleucin

Die Proben wurden hierfür bei verschiedenen Wellenlängen im nahen UV-Bereich vermessen. Die besten Detektionsergebnisse wurden bei 200 nm erzielt.

Fluoreszenz-Detektion wäre freilich erste Wahl für Dansylierungsderivate. Die zur Verfügung stehende Kapillarelektrophorese-Anlage verfügte über einen UV-Detektor und einen Diode-Array-Detektor, jedoch keinen Fluoreszenz-Detektor.

Die Verwendung des Diode-Array-Detektors wäre naheliegend um Dabsyl-Derivate im VIS-Bereich, beispielsweise bei 450 nm wie in der HPLC, vermessen zu können. Allerdings benötigen Diode-Array-Detektoren größere Detektionsfenster. Bei der bisher erreichten Trennung der Peaks für Gabapentin und Isoleucin ist der Einsatz dieses Detektors jedoch nicht möglich, da die beiden Substanzen fast zeitgleich das größere Fenster durchwandern würden.

Durch Änderung der kapillarelektrophoretischen Bedingungen wie Senkung der Spannung sowie Änderung des pH-Wertes des Puffers könnte eine getrennte Vermessung von dabsyliertem Gabapentin und Isoleucin möglicherweise doch noch erreicht werden. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde jedoch die Verwendung des UV-Detektors beibehalten.

Es sollte daher ein anderer interner Standard gefunden werden, der unter gegebenen Bedingungen geeignet war.

2.4.2 Benzoessäure als interner Standard

Die Vermessung im UV-Bereich bietet den Vorteil, dass Aromaten wie Benzoessäure bei diesen Wellenlängen erfassbar sind. *Lachmann* et al setzten Benzoessäure erfolgreich als internen Standard zum quantitativen Nachweis von Diclofenac ein. (26) (27)

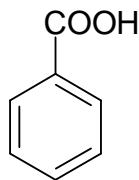


Abbildung 31: Strukturformel von Benzoessäure

Für die Versuche wurde ein 40 mM Natriumcarbonat-Puffer mit einem Zusatz von 1% Benzoessäure hergestellt, der mit 2N HCl auf pH 9,5 eingestellt wurde.

Die volumenmäßige Zusammensetzung eines Probenansatzes erfolgte für beide Reagenzien, Dansylchlorid und Dabsylchlorid gleich. Lediglich die Konzentration der Reagenslösungen und die Inkubationsmethode erfolgten auf unterschiedliche Weise.

Probenvorbereitung:

50 µl Gabapentin-Stammlösung werden mit 100 µl Pufferlösung samt internem Standard und 250 µl der jeweiligen Reagens-Lösung versetzt, homogenisiert und inkubiert.

Für Dansylierungen erfolgte die Inkubation bei 50° für 30 min. Dabsylierungen erfolgten bei 70°C für gesamt 30 Minuten, wobei nach 5 und weiteren 15 Minuten erneut homogenisiert wurde.

Mit dieser Methode konnte eine Trennung von Gabapentin-Derivaten beider Reagenzien erzielt werden. Die etwas langsamere Migrationsgeschwindigkeit von Benzoesäure musste lediglich die Laufzeit der Methode auf 16 Minuten verlängert werden, alle anderen bisher verwendeten kapillarelektrophoretischen Parameter konnten beibehalten werden.

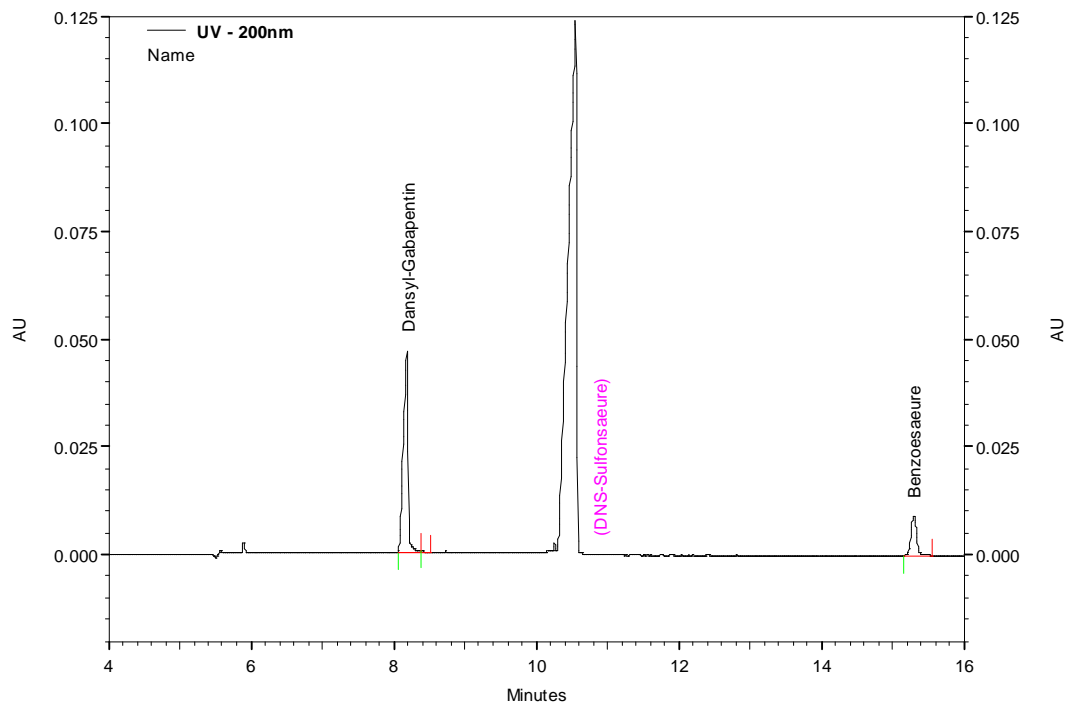


Abbildung 32: Elektropherogramm von Dansyl-Gabapentin mit Benzoesäure als IS

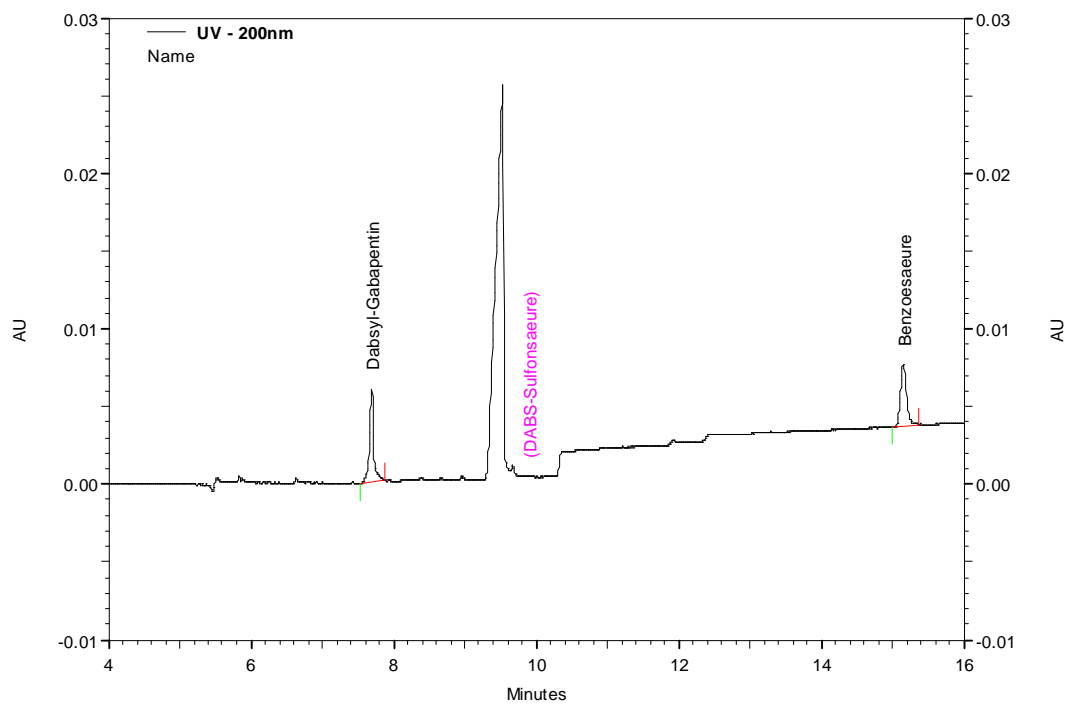


Abbildung 33: Elektropherogramm von Dabsyl-Gabapentin mit Benzoesäure als IS

2.4.3 Optimierung der Methoden

Wie bereits erwähnt stellt die Verdunstung der Lösungsmittel aus den Probegefäßen während Trennungsvorgängen ein großes Problem dar. Vor allem in größeren Versuchsreihen, bei denen mehrere Proben gleichzeitig vorbereitet werden, um sie dann nacheinander testen zu können, wurde diese Problematik festgestellt.

Um eine zu starke Aufkonzentration und eventuelles Ausfallen im Probegefäß während der Lagerung im Autosampler zu vermeiden, wurden die bereits vorgefertigten Proben erst unmittelbar vor deren Analysierung eingefüllt und maximal drei Testläufe oder Wiederholungen lang (gesamt etwa 1 Stunde) verwendet.

2.4.4 Endgültige Methoden

Die volumenmäßige Zusammensetzung eines Probenansatzes erfolgte für beide Reagenzien gleich. Lediglich die Konzentration der Reagenslösungen und die Inkubationsmethode erfolgten auf unterschiedliche Weise.

Probenvorbereitung:

50 µl	Gabapentin-Stammlösung (500 µg/ml)
100 µl	Pufferlösung (enthält IS)
250 µl	Reagens-Lösung

DNS-Cl 5mg/ml in MeCN <u>Inkubation:</u> 30 min bei 50°C	DABS-CL 2mg/ml in MeCN <u>Inkubation:</u> 30 min bei 70°C Homogenisierung nach 5 und 15 min
---	---

CE-System

Kapillarlänge	50 cm
Kapillarinne Durchmesser	50 μm
Kühlungstemperatur Kapillare	20°C
Kühlungstemperatur Probengefäße	20°C
Laufpuffer	50 mM Na-Tetraboratpuffer (pH8,5)
Spannung (Trennung)	25 kV
Injektion	0,5 psi, 5 sek
Detektion	$\lambda = 200 \text{ nm}$, 4Hz

2.4.5 Kalibration Dansylierungsmethode

Wie in Kapitel 2.4.1 und Kapitel 2.4.2 beschrieben konnten zwei unterschiedliche Methoden entwickelt werden, um Dansyl-derivatisiertes Gabapentin neben einem internen Standard zu detektieren und eindeutig zu identifizieren. Die Methode ist daher (auch und vor allem ohne die Verwendung eines internen Standards) durchaus zum qualitativen Nachweis von Gabapentin geeignet.

Jedoch sind die bisher erreichten Ergebnisse für quantitative Analysen nicht ausreichend. Es konnte kein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakflächen gefunden werden.

Da sogar aufeinanderfolgende Messungen derselben Probe (Messpräzision) völlig unterschiedliche Werte in Bezug auf den Peakflächenquotienten (Kapitel 2.1) ergaben, erscheint die Detektion über UV-Absorption für Dansylderivate von Gabapentin ungeeignet.

In einer weiterführenden Arbeit könnte die Methode unter Verwendung von Isoleucin als internem Standard in Verbindung mit Fluoreszenz-Detektion aber möglicherweise erfolgreich weiterentwickelt werden.

2.4.6 Kalibration Dabsylierungsmethode

Zur Kalibration der in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Methode zur Quantifizierung von Gabapentin über Kapillarelektrophorese nach Derivatisierung mit Dabsylchlorid wurde eine Verdünnungsreihe einer Lösung der Reinsubstanz (EW = 49,97 mg, gelöst in 10 ml Wasser) hergestellt.

Die Verdünnungen wurden einzeln aufgearbeitet. Jede Probe wurde erst direkt vor Start des Trennungsvorganges in das Probengefäß gefüllt und anschließend dreimal vermessen.

Als interner Standard diente Benzoesäure (1% gelöst im BGE).

Gehalt [mg/ml]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Benzoesäure	Peakflächen- quotient
1002,6	93885	44075	2,130
1002,6	186247	90273	2,063
1002,6	252701	120807	2,092
802,1	41596	24925	1,669
802,1	93980	57236	1,642
802,1	131852	84580	1,559
501,3	37509	34164	1,098
501,3	53104	49912	1,064
501,3	68734	66767	1,029
200,5	9360	21333	0,439
200,5	22356	57044	0,392
200,5	36344	97643	0,372
100,3	6677	39589	0,169
100,3	3166	18724	0,169
100,3	11237	58898	0,191

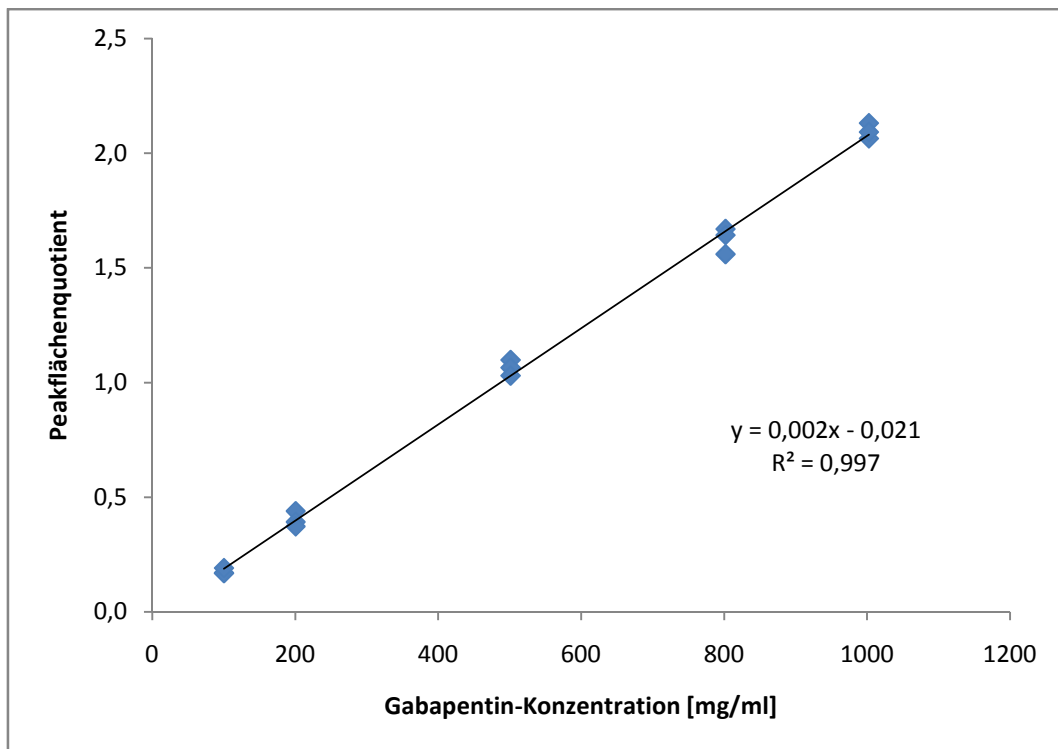


Abbildung 34: Kalibrationsgerade Dabsylierung CE

Aus den Messergebnissen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel 2007[®] mittels linearer Regressionsanalyse eine Geradengleichung und der Korrelationskoeffizient berechnet.

Der Korrelationskoeffizient der Kalibration beträgt 0,997 und entspricht somit den Anforderungen einer Linearitätsprüfung (Akzeptanzkriterium < 0,99).

Die Messwerte der Kalibration zeigten, dass die Methode innerhalb von einem Konzentrationsbereich von etwa 0,58 mM bis 5,8 mM lineare Ergebnisse zeigt. Bei höheren Konzentrationen als 1 mg/ml konnte festgestellt werden, dass keine Linearität mehr vorliegt.

2.4.7 Quantifizierung von Gabapentin aus Tabletten über CE

Zur Analyse wurden Gabapentin-Filmtabletten zu 800 mg der Firma Ratiopharm herangezogen. (Charge, Tablettengewicht sowie Tablettenspezifizierung siehe Kapitel 3.5)

Die Tabletten wurden verrieben, anschließend wurde ein Aliquot von 50,00 mg eingewogen, zu 100,0 ml in Wasser gelöst und für 10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Einige Milliliter der so erhaltenen trüben Lösung/ Suspension wurden durch 0,45 µm-Spritzenaufsatzfilter filtriert.

Das durchschnittliche Gewicht einer Tablette beträgt 1,1176 g und enthält laut Herstellerangabe 800 mg Wirkstoff. Einwaagen von 50,00 mg der Tablettenmatrix enthalten daher theoretisch 35,79 mg Gabapentin. Das Filtrat enthält somit etwa 359,7 mg Gabapentin. Diese Konzentration befindet sich im linearen Bereich der zuvor durchgeführten Kalibration.

Das Europäische Arzneibuch (21) sieht in der Monographie für Gabapentin eine Gehaltsbestimmung mittels HPLC durch Ermittlung eines Referenzwertes (100%) und Berechnung des entsprechenden Prozentgehaltes der Untersuchungslösung vor.

Als Referenzlösung diente eine Stammlösung von Reinsubstanz Gabapentin mit einer Konzentration von 501,3 µg/ml.

Jede Probe wurde dreimal vermessen. Sowohl die Referenzwerte als auch die Proben der Untersuchungslösungen wurden jeweils erst direkt vor deren Analysen in die Probegefäße gefüllt. Für die Versuche zu jeder Tablette wurden neue Vermessungen der Referenzlösung durchgeführt.

Ermittlung des Referenzwertes A

Probe	Gabapentin Gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Benzooesäure	Peakflächen- quotient
Referenz	503,8	21953	23925	0,918
Referenz	503,8	27022	30853	0,876
Referenz	503,8	23789	27141	0,876
Referenzwert A (MW)				0,890

Messergebnisse der Filmpille A

Tablette	Tablettenmatrix Einwaage [mg]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Benzooesäure	Peakflächen- quotient	GBP-Gehalt Matrix [μg]	berechneter Gehalt [μg]	Wiederf. %
A	50,86	18050	26754	0,6747	364,1	359,8	98,83 %
A	50,86	13684	20001	0,6842	364,1	364,9	100,22 %
A	50,86	12932	18957	0,6822	364,1	363,8	99,93 %
Mittelwert							99,66 %
Standardabweichung							0,73
relative Standardabweichung							0,74

Ermittlung des Referenzwertes B

Probe	Gabapentin Gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Benzooesäure	Peakflächen- quotient
Referenz	503,80	21953	23925	0,918
Referenz	503,80	27022	30853	0,876
Referenz	503,80	23789	27141	0,876
Referenzwert B (MW)				0,890

Messergebnisse der Filmpille B

Tablette	Tablettenmatrix Einwaage [mg]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Benzooesäure	Peakflächen- quotient	GBP-Gehalt Matrix [μg]	berechneter Gehalt [μg]	Wiederf. %
B	50,06	21368	33664	0,635	358,35	359,32	100,27 %
B	50,06	26473	41720	0,635	358,35	359,21	100,24 %
B	50,06	24217	38385	0,631	358,35	357,14	99,66 %
Mittelwert							100,06 %
Standardabweichung							0,34
relative Standardabweichung							0,34

Ermittlung des Referenzwertes C

Probe	Gabapentin Gehalt [$\mu\text{g/ml}$]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Benzoessäure	Peakflächen- quotient
Referenz	503,80	19099	20712	0,922
Referenz	503,80	28187	25445	1,108
Referenz	503,80	37111	43113	0,861
Referenzwert C (MW)				0,964

Messergebnisse der Filmpille C

Tablette	Tablettenmatrix Einwaage [mg]	Peakfläche Gabapentin	Peakfläche Benzoessäure	Peakflächen- quotient	GBP-Gehalt Matrix [μg]	berechneter Gehalt [μg]	Wiederf. %
C	49,83	19992	29574	0,676	356,71	353,45	99,09 %
C	49,83	31059	46581	0,667	356,71	348,63	97,73 %
C	49,83	33592	50467	0,666	356,71	348,02	97,57 %
Mittelwert							98,13 %
Standardabweichung							0,83
relative Standardabweichung							0,85

Die Ergebnisse zeigen, dass die entwickelte kapillarelektrophoretische Methode zum quantitativen Nachweis von Gabapentin nach Derivatisierung mit Dabsylchlorid geeignet ist.

Zu achten ist darauf, dass die Ermittlung des Referenzwertes jeweils direkt vor Vermessung der Probelösung erfolgt, da Abweichungen in den Messergebnissen durch Verdunstung von Lösungsmittel – sowohl in der Probe als auch in der Referenzlösung – dadurch vermieden werden können.

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Geräte und Arbeitsmaterial

HPLC-Anlage

Shimadzu LC20 Prominence

Diode-Array-Detektor: Shimadzu SPD-M20A

Fluoreszenz-Detektor: Merck Hitachi L-7480

Säulen:

BDS Hypersil® C18, 150 x 4 mm, 5 µm

ODS Hypersil® C18, 125 x 4 mm, 5 µm

Chromolith® Performance RP-18e, 100 x 4,6mm, 5 µm

Kapillarelektrophorese

Beckmann Coulter P/ACE System MDQ

mit UV-Detektor + Diode-Array-Detektor

Instrument control: 32 Karat®

Kapillaren: Hersteller Polymicron Technologies
außen Polyimid-beschichtet

Außendurchmesser 365 µm

Innendurchmesser 50 µm

Massenspektrometer

Finnigan LCQ Deca

Pumpe: Shimadzu LC-10AT

Analysenwaage

Sartorius ISO 9001

Ultraschallbad

Branson 5200

Trockenschrank

Heraeus UT6060

Vortexer

Vortex-Genie, Scientific Industries INC

pH-Meter

inoLab pH 720

Pipetten

Eppendorf Reference: 50-200 µl, 100-1000 µl

Spritzenaufsatzfilter

Sartorius Minisart RC 25[®], 0,45 µm

3.2 HPLC-Parameter

Mobile Phasen Vorversuche

Eluent	Zusammensetzung	
A	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	75 / 25 %
B	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	70 / 30 %
C	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	65 / 35 %
D	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	60 / 40 %
F	MeOH / CH ₃ COOH 1 %	75 / 25 % eingestellt auf pH 6,5 (NaOH)
G	MeOH / H ₂ O	75 / 25 %

Versuche zur Gradientenelution

Eluent C, Steigerung von 10 % auf 25 % innerhalb von 3 Minuten
Eluent D, Steigerung von 10 % auf 25 % innerhalb von 3 Minuten
Eluent D, Steigerung von 10 % auf 50 % innerhalb von 3 Minuten
Eluent D, Steigerung von 10 % auf 75 % innerhalb von 3 Minuten
Eluent D, Steigerung von 10 % auf 100 % innerhalb von 3 Minuten

HPLC-Parameter: Dansylierung

Säule	ODS Hypersil [®] C18, 125 x 4 mm, 5 µm
Säulentemperatur	26°C
Mobile Phase (Eluent)	75 % MeOH / 25 % CH ₃ COOH (1 %)
Elution	isokratisch
Flussrate	1,2 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektion	Fluoreszenz, λ = 506 nm
Laufzeit	6 min

HPLC-Parameter: Dabsylierung

Säule	ODS Hypersil® C18, 125 x 4 mm, 5 µm
Säulentemperatur	30°C
Mobile Phase (Eluent)	75 % Acetonitril / 25 CH ₃ COOH (1 %)
Elution	isokratisch
Flussrate	1,2 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl
Detektion	λ = 450 nm
Laufzeit	6 min

Kapillarelektrophoretische Parameter

Kapillarlänge	50 cm
Kapillardurchmesser	50 µm
Laufpuffer (BGE)	Na-Tetraboratpuffer (50 mM, pH 8,5)
Kühlungstemperatur Kapillare	20°C
Kühlungstemperatur Probengefäße	20°C
Spannung (Trennung)	25 kV
Injektion	0,5 psi, 5 sek
Detektion	200 nm, 4 Hz

Vor jeder Injektion wurden die Kapillaren 1 min mit NaOH und 2 min mit dem BGE mit 20 psi gespült.

3.3 Vorsäulenderivatisierung

Derivatisierung mit Dansylchlorid für HPLC

100 µl einer ca. 0,15 µM Gabapentinlösung wurden mit 50 µl einer ca. 0,15 µM Isoleucinlösung sowie einer Lösung von 0,15 mg Dansylchlorid in Aceton und 100 µl PBS-Puffer (pH 7,4) versetzt. Das Gemisch wurde homogenisiert und für 30 Minuten im Trockenschrank bei 50°C inkubiert.

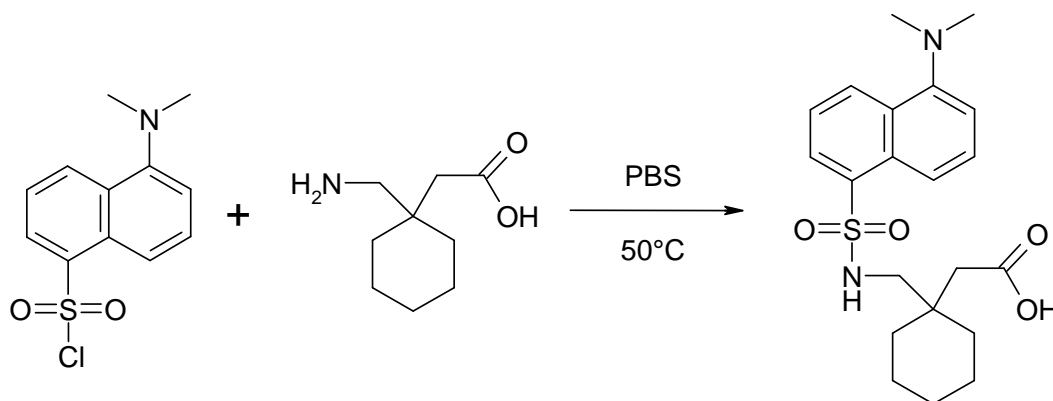


Abbildung 35: Derivatisierung von Gabapentin mit Dansylchlorid

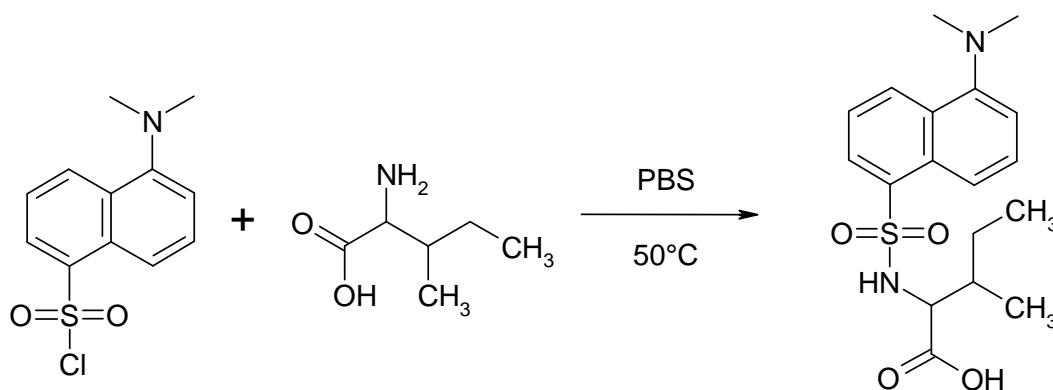


Abbildung 36: Derivatisierung von Isoleucin mit Dansylchlorid

Derivatisierung mit Dansylchlorid für Kapillarelektrophorese

50 µl Gabapentinlösung wurden mit 100 µl einer 40mM CO₃-Puffers (pH 9,5) mit 1% Benzoesäure als Interner Standard sowie 250 µl einer Lösung von Dansylchlorid 5 mg/ml in Acetonitril versetzt, anschließend wurde homogenisiert und für 30 Minuten im Trockenschrank bei 50°C inkubiert.

Derivatisierung mit Dabsylchlorid für HPLC

100 µl einer etwa 1,2 µM Gabapentinlösung wurden mit 100 µl einer ca. 0,76 µM Isoleucinlösung sowie einer Lösung von 2 mg Dabsylchlorid in Acetonitril und 300 µl eines 100 mM Boratpuffer-Puffer (pH 8,0) versetzt und anschließend homogenisiert.

Dieser Probenansatz wurde für gesamt 30 Minuten bei 70°C im Trockenschrank inkubiert, wobei nach 5 Minuten erneut homogenisiert wurde. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurde der Probe außerdem 600 µl einer Dilution Solution, bestehend aus 50 % Methanol, 25 % Ethanol und 25 % Wasser, zugegeben und nachmals geschüttelt.

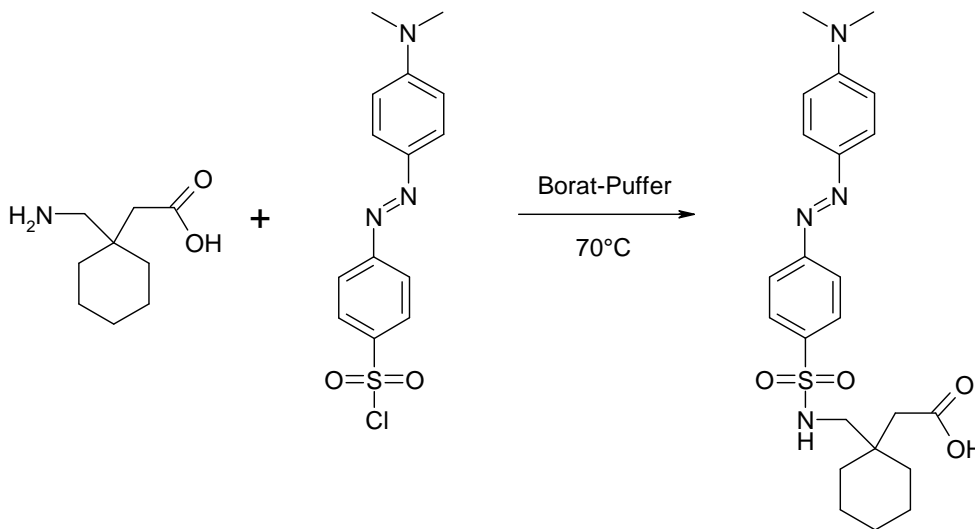


Abbildung 37: Derivatisierung von Gabapentin mit Dabsylchlorid

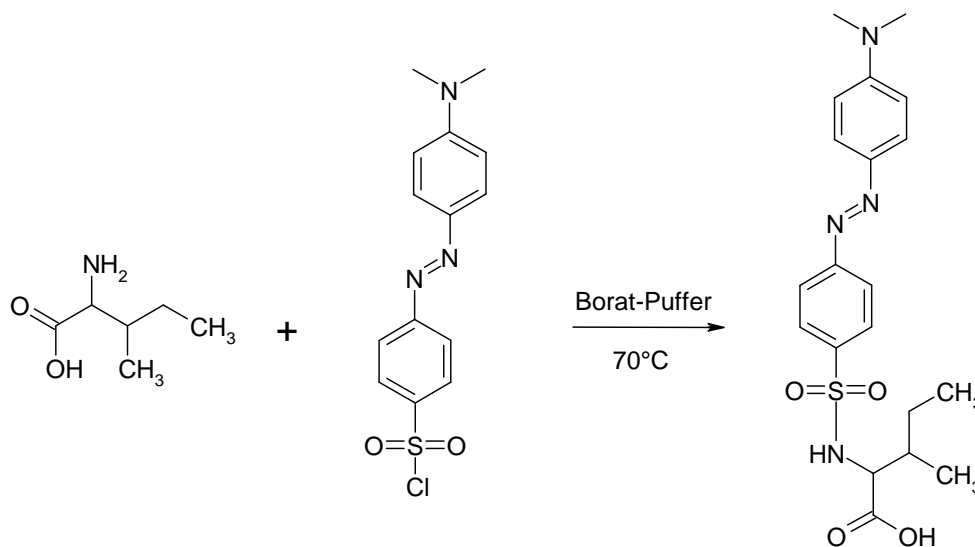


Abbildung 38: Derivatisierung von Isoleucin mit Dabsylchlorid

Derivatisierung mit Dabsylchlorid für Kapillarelektrophorese

50 μl einer ca. 3 mM Gabapentinlösung wurden mit 100 μl einer 40mM CO_3 -Puffers (pH 9,5) mit 1% Benzoesäure als Interner Standard sowie 250 μl einer Lösung von Dabsylchlorid 2 mg/ml in Acetonitril versetzt, anschließend wurde homogenisiert und für 30 Minuten im Trockenschrank bei 70°C inkubiert, die Probe wurde dabei nach 5 Minuten und nach weiteren 15 Minuten erneut homogenisiert.

3.4 Stammlösungen

Die Herstellung der Stammlösungen erfolgte durch Einwaage von Gabapentin und anschließendem Lösen in Wasser zu 100 ml. Verdünnungsschritte erfolgten jeweils mit Vollpipetten und Messkolben mit Wasser.

Gabapentin-Stammlösungen

Stammlösung 1:	EW = 25,05 mg
Stammlösung 2:	EW = 25,31 mg
Stammlösung 3:	EW = 80,02 mg
Stammlösung 4:	EW = 79,97 mg
Stammlösung 5:	EW = 79,96 mg
Stammlösung 6:	EW = 80,11 mg
Stammlösung 7:	EW = 80,44 mg
Stammlösung 8:	EW = 80,35 mg
Stammlösung 9:	EW = 19,98 mg
Stammlösung 10:	EW = 34,25 mg
Stammlösung 11:	EW = 20,09 mg
Stammlösung 12:	EW = 19,99 mg
Stammlösung 13:	EW = 19,88 mg
Stammlösung 14:	EW = 20,14 mg
Stammlösung 15:	EW = 19,92 mg
Stammlösung 16:	EW = 19,70 mg

GABA-Stammlösungen

Stammlösung G1: EW = 25,20 mg

Stammlösung G2: EW = 25,28 mg

Isoleucin-Stammlösungen

Stammlösung I1: EW = 20,18 mg

Stammlösung I2: EW = 20,30 mg

Stammlösung I3: EW = 13,12 mg

Stammlösung I4: EW = 10,16 mg

Valin-Stammlösungen

Stammlösung V1: EW = 19,98 mg

Stammlösung V2: EW = 11,72 mg

3.5 Analyse von Gabapentin Tabletten

Alle Versuche zur Quantifizierung von Gabapentin aus Arzneispezialitäten wurden aus Gabapentin ratiopharm® 800 mg Filmtabletten einer zum Zeitpunkt dieser Arbeit aktuell im Handel befindlichen Charge (CH: M26135) durchgeführt.

Die Tabletten wurden vor deren Analyse einzeln gewogen und das durchschnittliche Tablettengewicht errechnet.

Tablette Nr.	Gewicht in g
Tablette 1	1,1208
Tablette 2	1,1118
Tablette 3	1,1197
Tablette 4	1,1217
Tablette 5	1,1095
Tablette 6	1,1219
Tablette 7	1,1008
Tablette 8	1,1326
Tablette 9	1,1207
Tablette 10	1,1233
Tablette 11	1,1234
Tablette 12	1,1045
MW	1,1176

Zur Bestimmung des Gehaltes wurden einzelne Tabletten mit einem Mörser verrieben und anschließend ein Aliquot von 50,00 mg der Tablettenmatrix analysiert.

Das Aliquot wurde in 100 ml Wasser gelöst und für 5 – 10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde die erhaltene trübe Lösung durch einen 0,45 µm Spritzenaufsatzfilter filtriert um die nichtlöslichen Anteile der Tablettenmatrix abzutrennen. Das Filtrat wurde schließlich direkt vermessen oder mit Wasser auf die benötigte Konzentration verdünnt.

Bei einem durchschnittlichen Tablettengewicht und einem angegebenen Gehalt von 800 mg enthalten 50 mg Tablettenmatrix 35,79 mg Gabapentin.

3.6 Pufferbereitung

PBS-Puffer (pH 7,4) (20)

EW für 100 ml

140,0 mM	NaCl	818,16 mg
2,5 mM	KH ₂ PO ₄	34,02 mg
7,5 mM	NaH ₂ PO ₄	89,99 mg

Die Substanzen wurden in etwa 90 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend mit 1N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Boratpuffer 100 mM (pH 8,0)

0,62 g Borsäure wurden in etwa 90 ml gelöst, die Lösung mit 1N NaOH auf pH 8,0 eingestellt und anschließend mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Natriumtetraborat-Puffer 100 mM (pH 8,5)

3,80 g Natriumtetraborat wurden in ca. 90 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 2N HCl auf pH 8,5 eingestellt und mit Wasser zu 100 ml verdünnt.

Natriumtetraborat-Puffer 50 mM (pH 8,5)

1,90 g Natriumtetraborat wurden in ca. 90 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 2N HCl auf pH 8,5 eingestellt und mit Wasser zu 100 ml verdünnt.

CO₃-Puffer 40 mM mit Benzoesäure als IS (pH 9,5)

423,96 mg Na₂CO₃ und 10,00 mg Benzoesäure wurden in etwa 90 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde mit 2N HCl auf pH 9,5 eingestellt und mit Wasser zu 100 ml verdünnt.

3.7 Substanzen und Lösungsmittel

Substanz	Hersteller	Charge
4-Aminobuttersäure	Sigma-Aldrich	1290512 20907207
Borsäure	Sigma-Aldrich	BCBF7652V
Dabsylchlorid	Sigma-Aldrich	LB89793V
Dansylchlorid	Sigma-Aldrich	BCBF4473V
Gabapentin	Sigma-Aldrich	P500049
Kaliumdihydrogenphosphat	Acros Organics	A016721301
L-Isoleucin	Bachem	0564410
L-Valin	Sigma-Aldrich	1056043 11304234
Natriumchlorid	unbekannt	unbekannt
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich	1338483 42008094
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich	395448/1 20299
Natronlauge 1N	Loba Feinchemie	01291
Salzsäure	Merck	Z339621

Lösungsmittel	Hersteller	Charge
Aceton	Sigma-Aldrich	421595/1 41301
Acetonitril	Fisher Scientific	1071684
Essigsäure	Merck	K26194162
Ethanol	Merck	K37727483
Methanol (HPLC grade)	Merck	I646307 227
Wasser (HPLC grade)	VWR international	12F130525

4 ANHANG

4.1 Verwendete Abkürzungen

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
bzw	beziehungsweise
CE	Kapillarelektrophorese
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
d.h.	das heißt
DABS-	Dabsyl-
DABS-Cl	Dabsylchlorid
DNS-	Dansyl-
DNS-Cl	Dansylchlorid
em	Emissionswellenlänge
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ESI	Electro Spray Ionisation
EtOH	Ethanol
EW	Einwaage
exc	Excitationswellenlänge
GABA	γ -Aminobuttersäure
GBP	Gabapentin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IS	Interner Standard
l	Liter
M	molar - mol/l
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie

PBS	Phosphatpuffer
psi	Druck in "pounds per sqare inch"
RSD	relative Standardabweichung
Rt	Retentionszeit
sek	Sekunde
V	Volt
zB	zum Beispiel

4.2 Statistische Formelsammlung

Mittelwert \bar{x}

Wurde bestimmt über MS Office Excel 2007, Funktion [*MITTELWERT*]

Standardabweichung s

Wurde bestimmt über MS Office Excel 2007, Funktion [*STABW*]

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

relative Standardabweichung RSD

$$RSD = \frac{s * 100}{\bar{x}}$$

Korrelationskoeffizient r

Wurde bestimmt über MS Office Excel 2007, Funktion [*PEARSON*]

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

Bestimmtheitsmaß r^2

Quadrat des Korrelationskoeffizienten

Vertrauensbereich (95 % Konfidenzintervall)

$$\text{Vertrauensbereich (min.)} = \frac{x - 2,571 * s}{\sqrt{(n)}}$$

$$\text{Vertrauensbereich (max.)} = \frac{x + 2,571 * s}{\sqrt{(n)}}$$

n = Anzahl der Werte

t-Test

$$t = \frac{|x - u|}{s} \sqrt{n}$$

u = wahrer Wert

t-Tabellenwert ($f = 95\%$)	$n = 6$ (Vergleichspräzision)	2,447
	$n = 5$ (Messpräzision)	2,571

F-Test (Fisher-Test)

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{wobei } s_1 > s_2 \text{ ist}$$

Dixon-Test

$$Q = \left| \frac{x_1 - x_2}{R} \right|$$

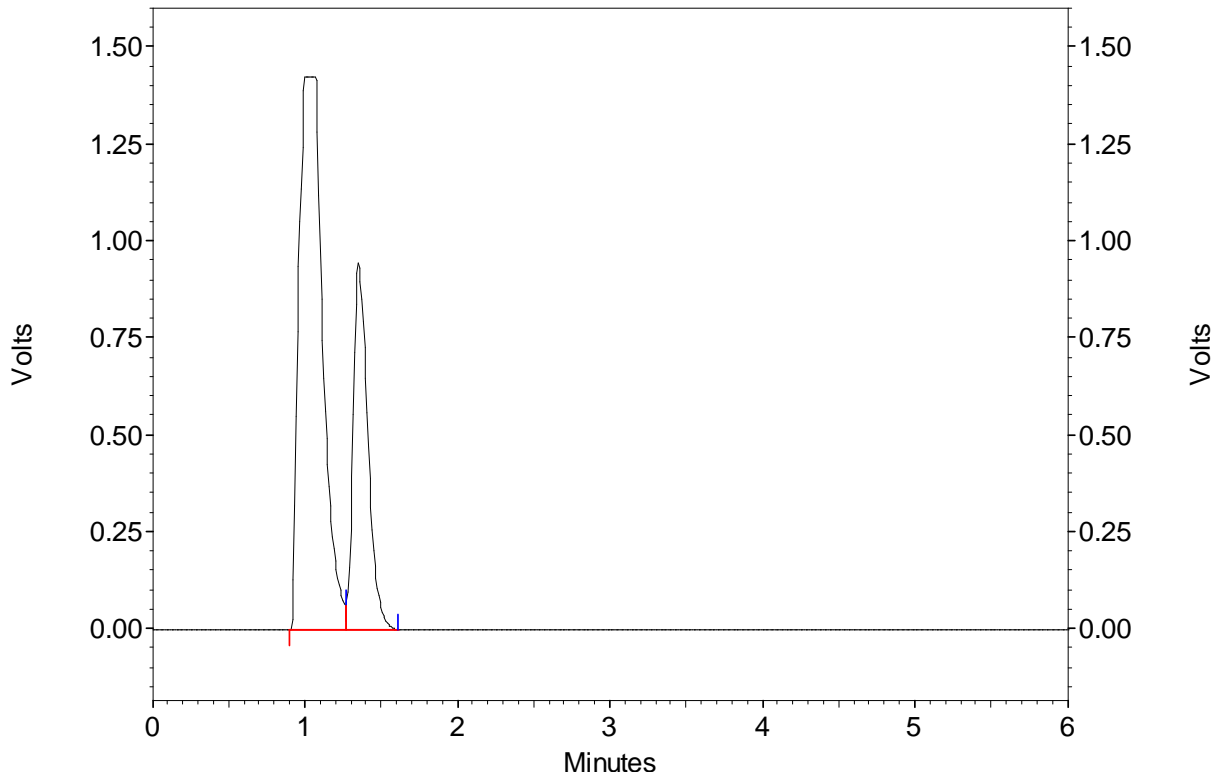
x_1 = ausreißerverdächtiger Wert

x_2 = benachbarter Wert

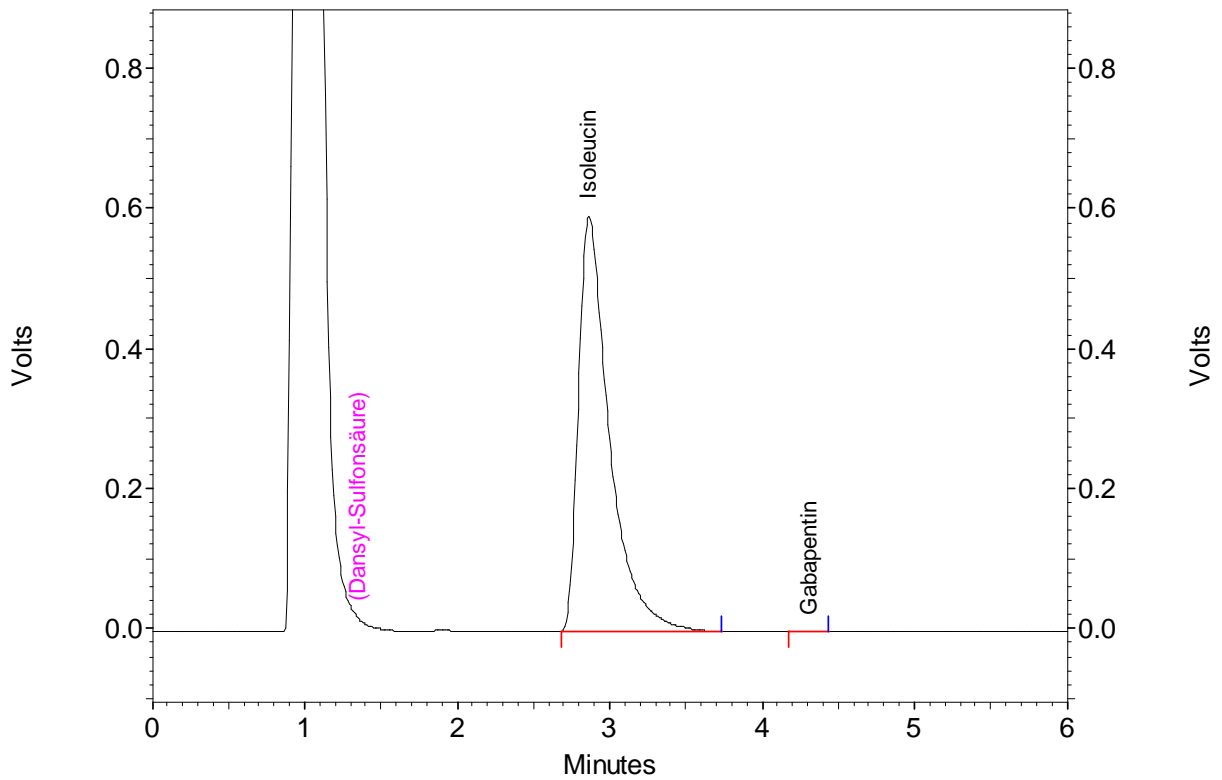
R = Spannweite (Abstand zwischen größtem und kleinem Wert)

Der erhaltene Wert Q wird mit der Dixon-Tabelle verglichen und darf den dort angeführten Wert nicht überschreiten.

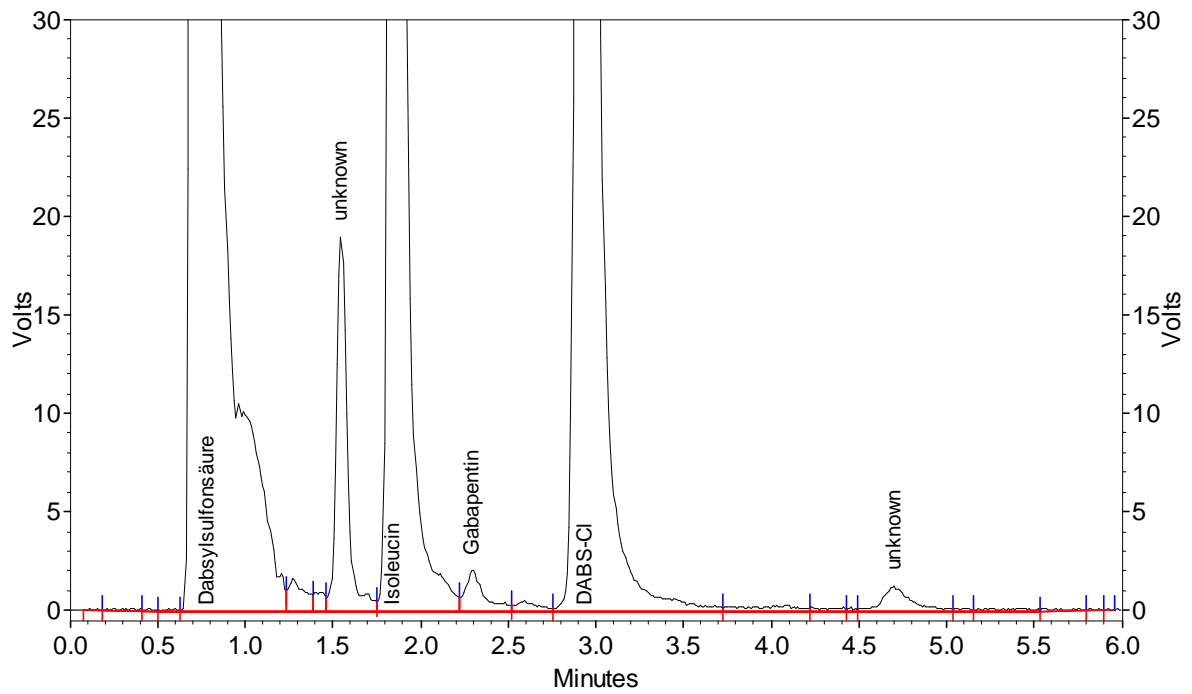
4.3 Abbildungen



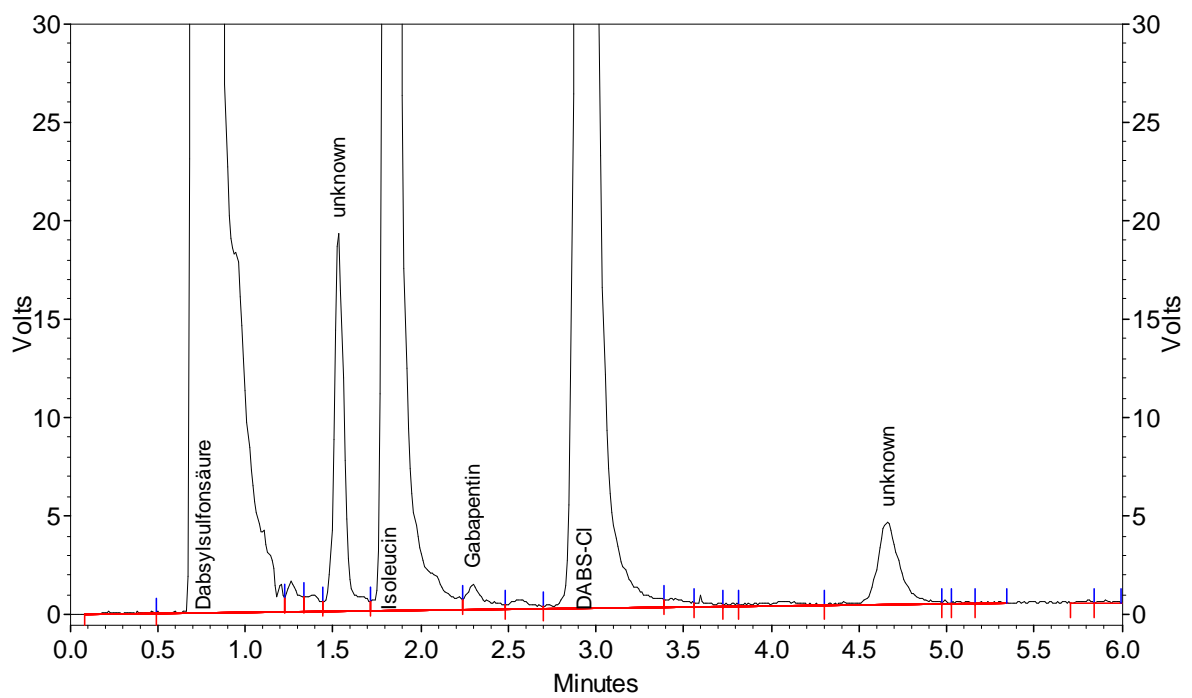
Anhang-Abb. 1: HPLC - Leerwert von Dansylchlorid in Acetonitril



Anhang-Abb. 2: HPLC - Messung zu LOD der Dansylierungsmethode



Anhang-Abb. 3: HPLC - Messung zu LOD der Dabsylierungsmethode (0,1 µg/ml)



Anhang-Abb. 4: HPLC - Messung zu LOQ der Dabsylierungsmethode (0,4 µg/ml)

4.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: struktureller Vergleich von Gabapentin und GABA	16
Abbildung 2: Dansylchlorid	18
Abbildung 3: Dansyl-Derivatisierung von Aminen (5).....	19
Abbildung 4: Dabsylchlorid	20
Abbildung 5: Dabsyl-Derivatisierung von Aminen (5).....	20
Abbildung 6: schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage (10)	23
Abbildung 7: Prinzip der Kapillarelektrophorese Bildquelle: medizin.uni-koeln.de .26	
Abbildung 8: schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophoreseeinheit (9)	27
Abbildung 9: schematischer Aufbau eines Massenspektrometers	30
Abbildung 10: Prinzip der Electro-Spray-Ionisation.....	31
Abbildung 11: Prinzip der Atmospheric-pressure chemical ionisation.....	32
Abbildung 12: Prinzip einer Ionenfalle.....	33
Abbildung 13: Strukturformeln von GABA (A), Valin (B) und Isoleucin (C)	41
Abbildung 14: Reaktionsgleichung zur Umsetzung von GBP mit Dansylchlorid	42
Abbildung 15: Chromatogramm, ODS Hypersil®, Eluent A	45
Abbildung 16: Gradientenelution.....	46
Abbildung 17: Trennung auf Säule ODS Hypersil®	47
Abbildung 18: Trennung auf Säule BDS Hypersil®	48
Abbildung 19: Trennung auf Säule Chlormolith performance®	48
Abbildung 20: Säulentemperatur 32°C, Flussrate 1,2ml/min	49
Abbildung 21: Säulentemperatur 26°C, Flussrate 1,2 ml/min	50
Abbildung 22: Valin als interner Standard.....	51
Abbildung 23: Isoleucin als interner Standard.....	51
Abbildung 24: Massenspektrum von dansyliertem Gabapentin	62
Abbildung 25: Chromatogramm - Systemleerwert Dabsylierung	69
Abbildung 26: Chromatogramm - Dabsylierung, Interner Standard Valin	69
Abbildung 27: Chromatogramm - Dabsylierung, Interner Standard Isoleucin	70
Abbildung 28: Chromatogramm – Dabsylierung, Gabapentin + Isoleucin.....	70
Abbildung 29: Massenspektrum von dabsyliertem Gabapentin	81
Abbildung 30: Elektropherogramm von dansyliertem Gabapentin und Isoleucin ...	85
Abbildung 31: Strukturformel von Benzoesäure.....	86

Abbildung 32: Elektropherogramm v. Dansyl-GBP mit Benzoessäure als IS	87
Abbildung 33: Elektropherogramm von Dabsyl-GBP mit Benzoessäure als IS	87
Abbildung 34: Kalibrationsgerade Dabsylierung CE	91
Abbildung 35: Derivatisierung von Gabapentin mit Dansylchlorid.....	99
Abbildung 36: Derivatisierung von Isoleucin mit Dansylchlorid.....	99
Abbildung 37: Derivatisierung von Gabapentin mit Dabsylchlorid.....	100
Abbildung 38: Derivatisierung von Isoleucin mit Dabsylchlorid.....	100
Anhang-Abb. 1: HPLC - Leerwert von Dansylchlorid in Acetonitril.....	110
Anhang-Abb. 2: HPLC - Messung zu LOD der Dansylierungsmethode.....	110
Anhang-Abb. 3: HPLC - Messung zu LOD der Dabsylierungsmethode.....	111
Anhang-Abb. 4: HPLC - Messung zu LOQ der Dabsylierungsmethode.....	111

5.1 Literaturverzeichnis

1. **Mutschler, Geisslinger, Kroemer, Schäfer-Korting.** *Arzneimittelwirkungen.* Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001.
2. **Aktories Förstermann, Hofmann, Starke.** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage.* München : Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 2009.
3. *Austria Codex Stoffliste.* Wien : Österreichischer Apotheker-Verlag, 2012/13.
4. **Karow, Lang-Roth.** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie, 21. Auflage.* Köln, 2012.
5. **Takeuchi.** HPLC of Amino Acids as Dansyl and Dabsyl Derivatives. *Journal of Chromatography Library.* 2005, Vol. 70.
6. **Chen, Shih, Liou, Chen.** Analysis of Dabsyl-Cl Derivated Amino Acids By High Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Food Sci. Techno.l Res.* 2003, 9 (3), 276-282.
7. **Haugland.** *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* Leiden : Molecular Probes Inc., 1996.
8. **Rücker, Neugebauer, Willems.** *Instrumentelle pharmazeutische Analytik.* Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2007.
9. **Gottwald.** *RP-HPLC für Anwender.* Weinheim : VCH-Verlagsgesellschaft mbH, 1993.
10. **Göber, Surmann.** *Arzneimittelkontrolle.* Stuttgart : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2005.
11. **Lachmann.** *Kapillarelektrophoretische Bestimmung reduzierender Zucker.* Frankfurt : Shaker Verlag, 2000.

12. **Hesse, Meier, Zeeh.** *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie.* Stuttgart : Gerog Thieme Verlag KG, 1979.

13. *ICH harmonised tripartit guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methology Q2 (R1).* **pharmaceuticals, Int. conferende on harmonisation of technical requirements for registration of.** 27 October 1994.

14. **Kromidas.** *Validierung in der Analytik.* Weinheim : Wiley-VCH, 1999.

15. **Krivanek, Koppatz, Turnheim.** Simultaneous Isocratic HPLC Determination of Vigabatrin and Gabapentin in Human Plasma by Dansyl Derivatisation. *Therapeutic Drug Monitoring.* 2003, 25(3), 374-377.

16. **Mercolini, Mandrioli, Amore, Raggi.** Simultaneous HPLC-F analysis of three recent antiepileptic drugs in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2010, 53(1), 62-67.

17. **Sekar, Azhaguvel.** Indirect photometric assay determination of Gabapentin in bulk drug and capsules by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmazeutical and biomedical Analysis.* 2004, 36 (2004) 663-667.

18. **Cao, Liang, Tan, Meng.** Determination of Gabapentin in human plasma by capillary electrophoreses-laser induced fluorecence detection with and without solid-phase extraction. *Microchimica Acta.* 2012, 178(3-4), 285-292.

19. **Abdellatef, Khalil.** Colorimetric determination of Gabapentin in pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2003, 31 (2003) 209-214.

20. **Higashi, Youichi.** Sensitive Determination of the Binding of Antidepressants to Synthetic Melanin by Liquid Chromatography After Pre-column Derivatisation with Dansyl Chloride. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.* 2004, Vol. 24, No.12, pp. 1903-1914.

21. *Euröpäisches Arzneibuch 7, 3. Nachtrag.* 2011.

-
22. **Romero, Bagur, Sánchez-Vinas, Gázquez.** Optimization of Experimental Variables in the Dabsyl Chloride Derivatisation of Biogenic Amines for their Determination by RP-HPLC. *Chromatographia*. 2000, Vol.51, No.7/8.
23. **Gao, Higashi, Fijii.** Simple Determination of Floxetine in Human Serum and Urine by Dabsylation Followed by HPLC with Visible Light Detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 2010, 33:1405-1415.
24. **Krause, Bockhardt, Neckermann, Henle, Klostermeyer.** Simultaneous Determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. *Journal of Chromatography A*. 1995, 715 (1995) 67-69.
25. **Chen, Lin, Liou, Chen.** Mass spectrometric determination of dabsyl-chloride derivatised anserine, carnosine and taurine in commercial chicken essences. *International Journal of Food Science and Technology*. 2007, 42,593-600.
26. **Lachmann, Kratzel, Noe.** Rapid Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations by Capillary Zone Electrophoresis. *Scientia Pharmaceutica*. 2012, 80: 311-316.
27. **Lachmann, Kopelent-Frank, Noe.** A Standard Protocol for the Calibration of Capillary Electrophoresis (CE) Equipment. *Scientia Pharmaceutica*. 2011, 79: 877-883.

6 LEBENS LAUF

Name: Julia Dümler

1988-1992 Volksschule in Wien und Matzen

1992-1996 Gymnasium Gänserndorf

1996-2000 Gymnasium Mödling

2000-2003 Ausbildung zur Pharmazeutisch-Kaufmännischen-Assistentin
Apotheke zum schwarzen Adler, Weppersdorf

2003-dato Beschäftigung als Pharmazeutisch-Kaufmännischen-Assistentin
Apotheke zum schwarzen Adler, Weppersdorf

2004-2005 Studienberechtigungsprüfung an der Universität Wien

2005-2007 Beginn des Pharmaziestudiums an der
Karl-Franzens-Universität Graz

2007-dato Studium der Pharmazie an der Universität Wien