

CHROM. 9376

## DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG MEHRERER WIRKSTOFFE AUS SALBEN UND SUPPOSITORIIEN UND IHRE ANSCHLIESSENDE DIREKTE QUANTITATIVE ANALYSE NACH DER REMISSIONSMETHODE\*

M. AMIN und U. JAKOBS

*Department Galenik, Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen (B.R.D.)*

(Eingegangen am 8. März 1976; geänderte Fassung eingegangen am 25. Mai 1976)

---

### SUMMARY

*Thin-layer chromatography of active compounds from ointments and suppositories followed by direct quantitative analysis by remission*

The paper describes a method for simultaneous thin-layer chromatographic separation of hydrocortisone, hydrocortisone acetate or hydrocortisone caproate alongside dibucaine hydrochloride, hexachlorophene and clemizole undecylate as well as clemizole hexachlorophenate in ointments and suppositories. Development of thin-layer chromatograms is carried out on silica gel 60 F-254 pre-coated plates. All four active ingredients can be separated on one silica gel plate using one solvent system and determined directly by the remission method using a densitometer. Hydrocortisone and its two esters are measured at 248 nm, dibucaine hydrochloride at 325 nm, hexachlorophene at 300 nm, and clemizole undecylate as well as clemizole hexachlorophenate at 275 nm. Evaluation of thin-layer chromatograms takes place on-line from a linear calibration curve using an IBM 1800 computer. The described method is very suitable for analyses of these active ingredients in drug forms, such as ointments or suppositories and is reproducible with coefficients of variation of 1.29–3.56%.

---

### EINLEITUNG

Das Kortikoid Hydrocortison und seine Ester Hydrocortisonacetat oder Hydrocortisoncapronat sind als entzündungshemmende Zusätze in Hämorrhoidalsalben und Suppositorien, zum Teil zusammen mit einem Antihistaminicum wie Clemizolundecylat oder Clemizolhexachlorophenat, einem Lokalanästheticum wie Dibucain hydrochlorid und einem Desinfiziens wie Hexachlorophen enthalten.

Über Methoden zur colorimetrischen, fluorimetrischen oder chromatographischen Bestimmung von Hydrocortison und seiner Ester sind zahlreiche Veröffentlichungen erschienen.

---

\* Herrn Prof. Dr. Heinz Gibian zum 60. Geburtstag gewidmet.

lichungen erschienen<sup>1-21</sup>. Bei den beschriebenen colorimetrischen<sup>1-6</sup> und fluorimetrischen<sup>7</sup> Methoden werden die Substanzen ohne vorhergehende chromatographische Trennung in Lösung gemessen. Bei den in den Arbeiten<sup>8-21</sup> beschriebenen Methoden handelt es sich entweder um colorimetrische Bestimmungen in Kombination mit der Papier- oder Säulenchromatographie<sup>8-14</sup> bzw. um dünnschicht-<sup>15-18</sup>, flüssigkeits-<sup>19,20</sup> oder gaschromatographische<sup>21</sup> Bestimmungsmethoden. Bei den dünnschichtchromatographischen (DC) Methoden werden die Substanzen nach chromatographischer Trennung aus dem Sorbens eluiert und in Lösung gemessen. Über Hexachlorophen sind colorimetrische<sup>22</sup>, flüssigkeitschromatographische<sup>23-25</sup>, polarographische<sup>26</sup> und gaschromatographische<sup>27-31</sup> Methoden publiziert. Die in der Literatur erschienenen Arbeiten über Dibucainhydrochlorid<sup>32-35</sup> befassen sich mit spektrophotometrischen sowie fluorimetrischen Bestimmungsmethoden des Wirkstoffes in Lösung und einer gaschromatographischen Methode. Die Arbeiten<sup>36,37</sup> über Clemizole befassen sich mit dem qualitativen papier- oder dünnschichtchromatographischen Nachweis.

In der hier vorliegenden Arbeit wird eine schnelle spezifische Bestimmungsmethode für die genannten Substanzen beschrieben, mit der sich alle vier Komponenten auf einer Kieselgelplatte, mit einem Laufmittelsystem sowohl von den Fettanteilen als auch voneinander simultan trennen und direkt quantitativ nach der Remissionsmethode bestimmen lassen.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### *Wirkstoffe*

Hydrocortison, Hydrocortisonacetat, Hydrocortisoncapronat, Dibucainhydrochlorid (2-Butoxy-chinolin-4-carbonsäure-[2-diäthylamino-äthyl]-amid Hydrochlorid), Hexachlorophen (2,2'-Methylenbis-[3,4,6-trichlorphenol]), Clemizol (1-[4-Chlorbenzyl]-2-[pyrrolidin-1-ylmethyl]-benzimidazol), Clemizolhydrochlorid, Clemizolundecylat und Clemizolhexachlorophenat.

Clemizol und Clemizolhydrochlorid werden nur als Reinsubstanzen mit untersucht.

### *Arzneiformen*

Wasser/Öl Emulsionsalbe mit 0.5% Hydrocortison und 2.5% Clemizolhexachlorophenat (Präparat A).

Hydrophiles Lipogel mit: 0.29% Hydrocortison (Präparat B1); 0.32% Hydrocortisonacetat (Präparat B2); 0.40% Hydrocortisoncapronat (Präparat B3) und jeweils 0.5% Dibucainhydrochlorid, 0.5% Hexachlorophen und 1.0% Clemizolundecylat.

Suppositorien mit 1.3 mg Hydrocortisoncapronat, 1.0 mg Dibucainhydrochlorid, 2.5 mg Hexachlorophen und 5.0 mg Clemizolundecylat pro Stück (Präparat C).

### *Herstellung der untersuchten Lösungen*

Von jedem Präparat werden 1.00 g bzw. ein Suppositorium mit Chloroform-Methanol (9:1) zu 25 ml gelöst. Als Standard werden von den reinen Substanzen Lösungen in gleicher Konzentration der Präparatlösungen mit Chloroform-Methanol (9:1) hergestellt.

### *Dünnschichtchromatographie*

Als Sorbens werden Fertigplatten Kieselgel 60 F-254 (Merck, Darmstadt, B.R.D.) von 20 × 20 cm Grösse und 0.25 mm Schichtdicke verwendet, die in 1.5 cm breite Bahnen eingeteilt sind. Die Lösungen der genannten Substanzen werden punktförmig mit Mikropipetten\* aufgetragen. Für die Eichgeraden sind Substanzmengen von 1–10 µg pro Fleck einzusetzen. Die Variabilitätskoeffizienten werden bestimmt aus 11 Substanzflecken gleicher Menge aus verschiedenen Lösungen, die nebeneinander auf einer Kieselgelplatte chromatographiert wurden.

Zur Trennung von Hydrocortison und den Komponenten (Präparat A und B1) wird als Laufmittel, bei gesättigter Kammer, Hexan–Chloroform–Methylenchlorid–Methanol (3:3:3:1) verwendet. Die Kieselgelplatte wird zweimal je 20 cm in einer Laufzeit von jeweils 60 Min entwickelt und dazwischen 3 Min im warmen Luftstrom getrocknet.

Zur Trennung von Hydrocortisonacetat oder Hydrocortisoncapronat und den Komponenten (Präparat B2, B3 und C) wird als Laufmittel Hexan–Chloroform–Methylenchlorid–Cyclohexan–Methanol (30:30:30:5:5) ebenfalls nach Sättigung der Kammer benutzt. Die Entwicklung erfolgt dreimal je 20 cm in einer Laufzeit von jeweils 60 Min mit einer jeweiligen Trocknungszeit von 3 Min im warmen Luftstrom.

### *Remissionsmessung und Auswertung*

Die getrennten Substanzflecken werden direkt auf der Kieselgelplatte mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer PMQ II (Zeiss) nach der Remissionsmethode gemessen und die Messwerte on-line zum IBM 1800 Computer übertragen. Die quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatogramme erfolgt durch Integration der Peaks und Berechnung der Peakflächen und Flächenquadrate. Für die aufgeführten Beispiele wird der lineare Zusammenhang zwischen Peakfläche und aufgetragener Substanzmenge festgestellt. Für die Berechnung der Regressionsgeraden,  $y = ax + b$  (wobei  $y$  = Remissionsfläche,  $x$  = Substanzmenge,  $a$  = Steigung der Geraden, und  $b$  = Schnittpunkt auf der Ordinate), steht ebenso wie für die Berechnung der Variabilitätskoeffizienten, jeweils ein Programm zur Verfügung.

## ERGEBNISSE

In Fig. 1 sind die Remissionsspektren von Hydrocortison und seiner Ester, in Fig. 2 die von Clemizol und seiner Salze bzw. Additionsverbindungen und in Fig. 3 die von Dibucainhydrochlorid und Hexachlorophen graphisch dargestellt. Die Daten für die Remissionsspektren sowie die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen der untersuchten Präparate sind in Tabelle I zusammengefasst; die gute Reproduzierbarkeit der Bestimmungsmethode für jede der untersuchten Substanzen zeigen die Variabilitätskoeffizienten. Der lineare Zusammenhang zwischen Remissionsfläche und aufgetragenen Substanzmengen besteht für Hydrocortison bzw. seine Ester, für Dibucainhydrochlorid und Hexachlorophen in dem Bereich zwischen 1 und 5 µg und für die vier Clemizolverbindungen in dem zwischen 2 und 10 µg. Fig. 4 zeigt das Dünnschichtchromatogramm von Präparat B2 mit Hydrocortisonacetat, Dibucainhydrochlorid, Hexachlorophen und Clemizolundecylat; die gute Trennung der vier Wirkstoffe ist

\* Automatische Kapillar-Dosierungspipetten nach Dr. Barrolier 1, 2, 5 und 10 µl.

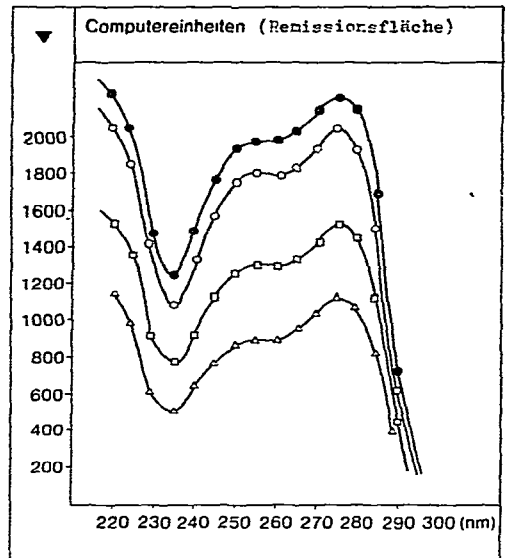
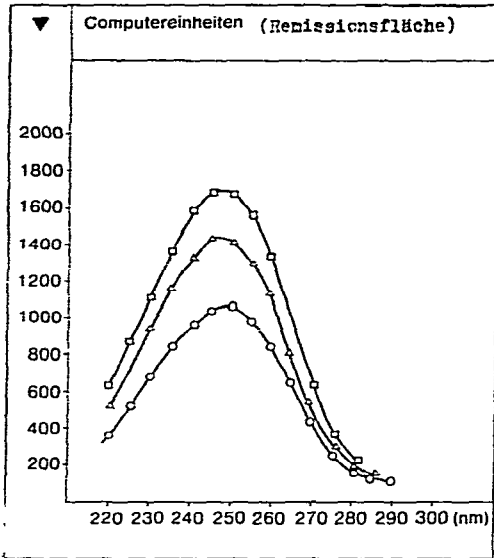


Fig. 1. Remissionsspektren von ○, 5  $\mu\text{g}$  Hydrocortison; △, 5  $\mu\text{g}$  Hydrocortisonacetat; □, 5  $\mu\text{g}$  Hydrocortisoncapronat; auf Kieselgelplatte gemessen.  $\lambda_{\text{max}}$  = 248 nm.

Fig. 2. Remissionsspektren von ●, 10  $\mu\text{g}$  Clemizol; ○, 10  $\mu\text{g}$  Clemizolhydrochlorid; □, 10  $\mu\text{g}$  Clemizolundecylat; △, 10  $\mu\text{g}$  Clemizolhexachlorophenat; auf Kieselgelplatte gemessen.  $\lambda_{\text{max}}$  = 275 nm.

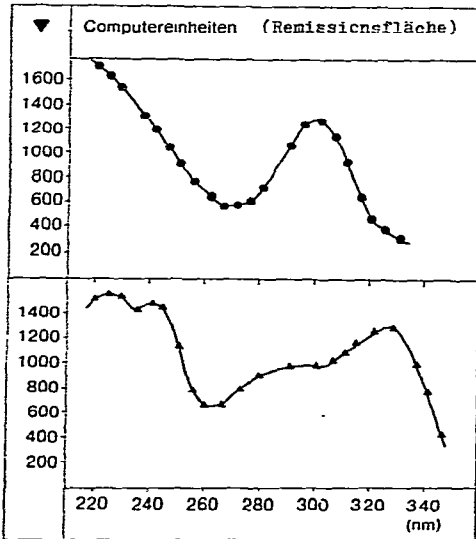


Fig. 3. Remissionsspektren von ●, 5  $\mu\text{g}$  Hexachlorophen;  $\lambda_{\text{max}}$  = 300 nm, und ▲, 5  $\mu\text{g}$  Dibucainhydrochlorid;  $\lambda_{\text{max}}$  = 325 nm; auf Kieselgelplatte gemessen.

TABELLE I

DATEN DER REMISSIONSSPEKTREN UND ERGEBNISSE DER GEHALTSBESTIMMUNGEN

Wirkstoff	Mol. Gew.	Spektren		Ergebnisse der untersuchten Präparate (% Wirkstoff/Soll)					Variabilitätskoeffizienten (n = 11)
		$\lambda_{max.}$ (nm)	Computer-einheiten (Remissionsfläche)	A	B1	B2	B3	C	
Hydrocortison	362	248	1043/5 $\mu$ g	98	102	—	—	—	1.81%/5 $\mu$ g
Hydrocortisonacetat	404	248	1422/5 $\mu$ g	—	—	100	—	—	2.60%/5 $\mu$ g
Hydrocortison-capronat	460	248	1669/5 $\mu$ g	—	—	—	103	97	2.96%/5 $\mu$ g
Dibucainhydrochlorid	379	325	1306/5 $\mu$ g	—	98	97	101	99	2.23%/5 $\mu$ g
Hexachlorophen	406	300	1250/5 $\mu$ g	—	101	99	100	97	2.85%/5 $\mu$ g
Clemizolbase	325	275	2224/10 $\mu$ g	—	—	—	—	—	1.29%/10 $\mu$ g
Clemizolhydrochlorid	362	275	2044/10 $\mu$ g	—	—	—	—	—	1.92%/10 $\mu$ g
Clemizolundecylat	510	275	1541/10 $\mu$ g	—	97	103	101	96	2.47%/10 $\mu$ g
Clemizolhexachlorophenat *	732	275	1123/10 $\mu$ g	97	—	—	—	—	3.56%/10 $\mu$ g

\* Bei Clemizolhexachlorophenat wird sowohl die Clemizolbase als auch Hexachlorophen auf Kieselgel gemessen (siehe Fig. 6).

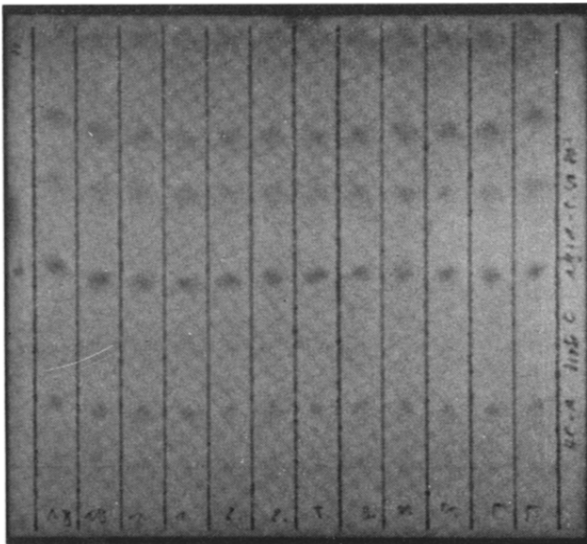


Fig. 4. Dünnschichtchromatogramm des Präparates B2. Vom Startpunkt in Richtung Front liegen folgende Wirkstoffe: Dibucainhydrochlorid, Hydrocortisonacetat, Hexachlorophen, Clemizolundecylat. Laufmittel: Hexan-Chloroform-Methylenchlorid-Cyclohexan-Methanol (30:30:30:5:5).

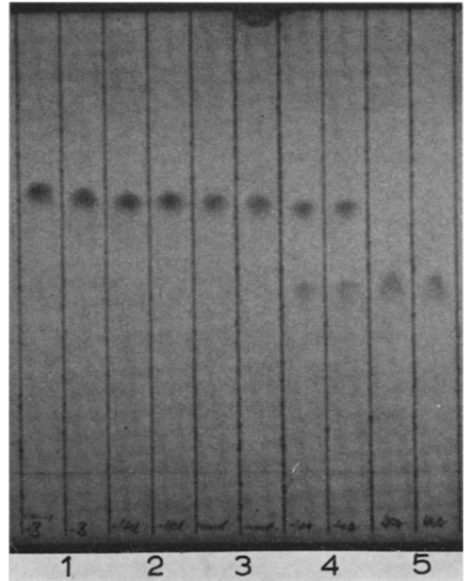
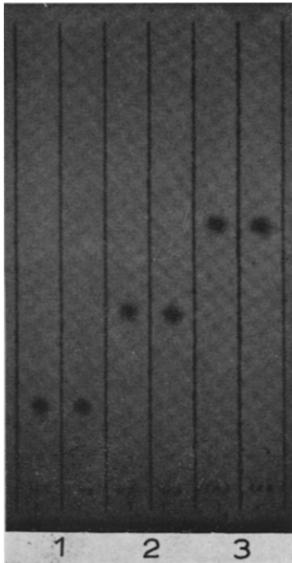


Fig. 5. Dünnschichtchromatogramm von je  $5 \mu\text{g}$  pro Fleck Hydrocortison (1), Hydrocortisonacetat (2) und Hydrocortisoncapronat (3). Laufmittel: Chloroform–Benzol–Essigester–Methanol (3:3:3:1).

Fig. 6. Dünnschichtchromatogramm von je  $10 \mu\text{g}$  pro Fleck Clemizol (1), Clemizolhydrochlorid (2), Clemizolundecylat (3), Clemizolhexachlorophenat (4) und Hexachlorophen (5). Laufmittel; Benzol–Methylenchlorid–Methanol (40:40:15).

zu sehen. In Fig. 5 sind Hydrocortison und seine Ester und in Fig. 6 sind Clemizol und seine Salze bzw. Additionsverbindungen zu sehen.

Wie die Figuren 5 und 6 zeigen, laufen Hydrocortison und seine Ester auf der Kieselgelplatte verschieden hoch, während Clemizol und seine Salze bzw. Additionsverbindungen auf gleicher  $R_F$ -Höhe bleiben. Der Grund dafür liegt in der Hydrolyse der Clemizolsalze bzw. Additionsverbindungen während der Chromatographie. Im letzteren Falle ist im UV-Licht zusätzlich nur Hexachlorophen zu sehen (Fig. 6). Ein solcher Hydrolysevorgang organischer Salze während der DC ist bekannt<sup>38</sup>. Die in Tabelle I angegebenen Remissionsflächen bestätigen, dass bei Clemizol und seinen Salzen bzw. Additionsverbindungen auf der Kieselgelplatte nur die freie Base chromatographiert und gemessen wird. Ihre Remissionswerte sind proportional ihres Gehaltes an freier Base. Trägt man von diesen Substanzen so viel auf, dass jeweils die gleiche Menge an freier Base vorhanden ist, so erhält man die gleichen Remissionswerte. Hydrocortison und seine Ester verhalten sich dagegen anders. Je höher diese Substanzen während der beschriebenen DC laufen (Fig. 5), umso grösser werden, infolge der Diffusion auf der Kieselgelplatte, die Substanzflecken und damit auch die Remissionsflächen (Tabelle I).

## DISKUSSION

Die in der Literatur beschriebenen Bestimmungsmethoden der genannten Wirkstoffe eignen sich weder für ihre Gehaltsbestimmungen nebeneinander noch für

ihre Stabilitätsuntersuchungen. DC dieser Wirkstoffe mit anschließender Eluierung aus dem Sorbens ist langwierig. Dagegen ist DC mit anschließender direkter quantitativer Bestimmung der Flecken auf der Kieselgelplatte nach der Remissionsmethode schneller, eleganter, vor allem aber spezifischer und empfindlicher als alle in der Literatur erwähnten Methoden.

Ein Versuch in der Gaschromatographie die vier Substanzen aus den genannten fetthaltigen Lösungen auf ein und derselben Säule zu trennen und zu bestimmen scheidet an der unterschiedlichen Polarität der Substanzen sowie an der zu grossen Belastung der Säule durch die Fettanteile. In der Flüssigkeitschromatographie wäre zwar eine Trennung der Salben- bzw. Suppositorienbestandteile von den Wirkstoffen möglich, nicht aber aus Polaritätsgründen eine Trennung der verschiedenen Wirkstoffe nebeneinander auf ein und derselben Säule.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine simultane dünnschichtchromatographische Trennung von Hydrocortison, Hydrocortisonacetat oder Hydrocortisoncapronat neben Dibucainhydrochlorid, Hexachlorophen und Clemizolundecylat sowie Clemizolhexachlorophenat in Salben und Suppositorien mit anschließender quantitativer Analyse nach der Remissionsmethode beschrieben. Die dünnschichtchromatographische Entwicklung erfolgt auf Kieselgel 60 F-254 Fertigplatten. Auf einer Kieselgelplatte lassen sich alle vier Wirkstoffe mit einem Laufmittelsystem trennen und direkt mit einem Chromatogramm-Spektralphotometer nach der Remissionsmethode bestimmen. Hydrocortison und seine beiden Ester werden bei 248 nm, Dibucainhydrochlorid wird bei 325 nm, Hexachlorophen bei 300 nm und Clemizolundecylat sowie Clemizolhexachlorophenat werden bei 275 nm gemessen. Die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme erfolgt on-line mit einem Computer (IBM 1800) über eine Eichgerade. Die beschriebene Bestimmungsmethode eignet sich gut für die Untersuchungen dieser Wirkstoffe in Arzneiformen wie Salben oder Suppositorien und lässt sich mit Variabilitätskoeffizienten von 1.29–3.56% reproduzieren.

#### LITERATUR

- 1 I. A. Elsebai, A. M. Wahbi und M. Abdelsalam, *Pharmazie*, 28 (1973) 195.
- 2 I. A. Elsebai, A. M. Wahbi und M. Abdelsalam, *Pharmazie*, 28 (1973) 232.
- 3 S. Görög, *J. Pharm. Pharmacol.*, 21 (1969) 46.
- 4 R. E. Graham, P. A. Williams und C. T. Kenner, *J. Pharm. Sci.*, 59 (1970) 1152.
- 5 F. E. Turner und J. C. King, *Amer. J. Hosp. Pharm.*, 30 (1973) 128.
- 6 G. S. Richter und G. Szepesi, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 1079.
- 7 W. Goedicke und E. Neumann, *Deut. Gesundheitsw.*, 27 (1972) 247.
- 8 G. Cavina und E. Cingolani, *Farmaco, Ed. Prat.*, 15 (1960) 246.
- 9 S. Bernstein und R. H. Lenhard, *J. Org. Chem.*, 18 (1953) 1146.
- 10 H. Hofmann und H. Staudinger, *Naturwissenschaften*, 38 (1951) 213.
- 11 H. Hofmann und H. Staudinger, *Biochem. Z.*, 322 (1951) 230.
- 12 D. Banes, *J. Amer. Pharm. Ass., Sci. Ed.*, 42 (1953) 669.
- 13 E. R. Cook, B. Dall und D. J. Warcham, *Analyst (London)*, 80 (1955) 215.
- 14 D. F. Johnson, E. Heftmann und A. L. Hayden, *Acta Endocrinol.*, 23 (1956) 341.
- 15 J. Bruinsvels, *Experientia*, 19 (1963) 551.

- 16 H. G. Gänshirt, in E. Stahl (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 1962, p. 49.
- 17 J. L. Martin, R. E. Duncombe und W. H. C. Shaw, *Analyst (London)*, 100 (1975) 243.
- 18 N. M. Ivanova und S. D. Sokolov, *Khim.-Farm. Zh.*, 7 (1973) 54.
- 19 M. C. Olson, *J. Pharm. Sci.*, 62 (1973) 2001.
- 20 E. Gaetani und C. F. Laureri, *Farmaco, Ed. Prat.*, 29 (1974) 110.
- 21 M. Novotný und J. Janák, *Chem. Listy*, 66 (1972) 693.
- 22 W. N. French, F. Matsi, S. J. Smith und R. J. Wood, *J. Pharm. Sci.*, 64 (1975) 125.
- 23 P. J. Porcaro und P. Shubiak, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 1865.
- 24 C. H. Wilson, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 57 (1974) 563.
- 25 R. L. Yates, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 57 (1974) 318.
- 26 E. Jacobsen und T. Rojahn, *Anal. Chim. Acta*, 61 (1972) 320.
- 27 D. G. Ferry und E. G. McQueen, *J. Chromatogr.*, 76 (1973) 233.
- 28 N. D. Greenwood, C. Hetherington, W. J. Cunliffe, J. C. Edwards und B. Williamson, *J. Chromatogr.*, 89 (1974) 103.
- 29 H. König, *Z. Anal. Chem.*, 266 (1973) 119.
- 30 A. G. Ulsamer und D. C. Washington, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 1294.
- 31 A. Curley und R. Hawk, *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc.*, 161 Pest. 1-2 (1971).
- 32 R. Suzuki, M. Murata, K. Kamei und A. Momose, *J. Pharm. Soc. Jap.*, 93 (1973) 942.
- 33 J. D. Martucci und S. G. Schulman, *Anal. Chim. Acta*, 77 (1975) 317.
- 34 W. R. Moquil, H. C. Browne und J. B. Weber, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, 55 (1972) 789.
- 35 J. Buechi, V. Lorini und X. Perlia, *Pharm. Acta Helv.*, 47 (1972) 377.
- 36 E. Vidic und J. Schütte, *Arch. Pharm.*, 295 (1962) 342.
- 37 W. W. Filke, *Anal. Chem.*, 38 (1966) 1697.
- 38 M. Amin, *J. Chromatogr.*, 101 (1974) 387.