

Institut für Pharmazeutische Chemie, Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Halle (Saale)

## Zur Kenntnis des Glycinnachweises des Europäischen Arzneibuchs

G. PEINHARDT

Eigegangen 27. Juni, 2003, angenommen 18. Juli, 2003

Dr. G. Peinhardt, Fachbereich Pharmazie, Martin-Luther-Universität, Wolfgang-Langenbeck-Str. 4, 06120 Halle (Saale), Germany  
peinhardt@pharmazie.uni-halle.de

Pharmazie 59: 73–74 (2004)

Glycin reagiert in wässriger Lösung mit Hypochlorit zu Formaldehyd, Glyoxylsäure und Ammoniak. Nach dem Ansäuern und Verkochen des Formaldehyds bildet sich mit Resorcin das Lacton der Bis-2,4-dihydroxyphenyl-essigsäure. Im alkalischen Milieu wird das Lacton zunächst zum violett gefärbten Oxonol-Anion oxidiert. Durch Hydrolyse des Lactons bildet sich das gelb gefärbte fluoreszierende Carboxylat.

## Glycine determination according to the European Pharmacopoeia

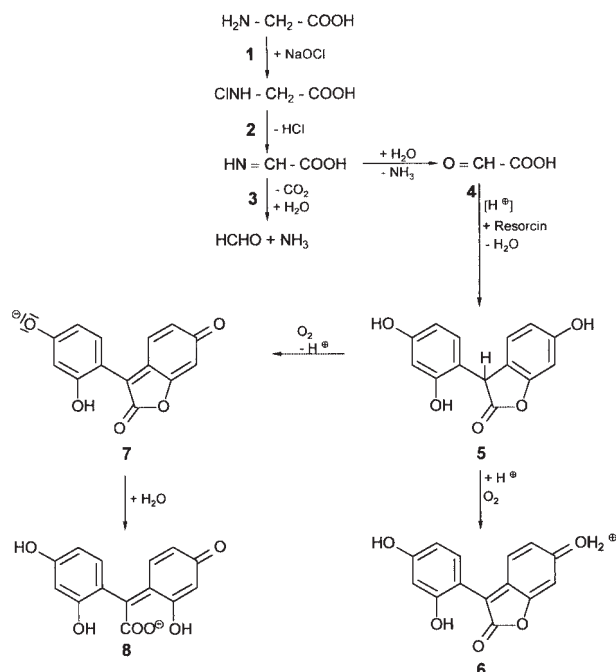
The treatment of an aqueous solution of glycine with hypochlorite yields formaldehyde and glyoxylic acid. After acidification and removing formaldehyde by boiling glyoxylic acid reacts with resorcinol to the lactone of bis-2,4-dihydroxyphenyl acetic acid. Under alkaline conditions the lactone is oxidized to the violet oxonol anion and subsequently, after hydrolysis of the lactone, to the yellow fluorescent carboxylate anion.

Das Europäische Arzneibuch (EuAB) lässt zur Identitätsprüfung (2. Reihe) von Glycin neben der dünnschichtchromatographischen Prüfung eine Farbreaktion ausführen, wozu die Substanz zunächst mit Natriumhypochlorit-Lösung zum Sieden erhitzt, dann nach Zugabe von Salzsäure mehrere Minuten weiter erhitzt und schließlich, nach erneuter Zugabe von Salzsäure, in der Siedehitze mit Resorcin umgesetzt wird. Beim Alkalisieren färbt sich die so erhaltene Lösung zunächst violett, die Farbe schlägt dann allmählich nach gelb um, wobei es zunehmend zur Ausbildung einer Fluoreszenz kommt.

Untersuchungen zur Nachweisreaktion für Glycin im EuAB liegen bisher nicht vor. Die Möglichkeit einer Aromat-Aldehyd-Säure-Reaktion des beim Glycinabbau mit Hypochlorit entstehenden Formaldehyd bzw. der ebenfalls möglichen Glyoxylsäure wird diskutiert (Eger et al. 1999). Ziel der Untersuchungen war, das an der Farbreaktion beteiligte Glycin-Abbauprodukt zu identifizieren, sowie Kenntnisse zum quantitativen Ablauf des Glycinabbaus zu erhalten.

Glycin (**1**) reagiert wie alle  $\alpha$ -Aminosäuren mit Hypochlorit zur Chloraminosäure (**2**), die unter HCl-Abspaltung in die Iminocarbonsäure (**3**) übergeht (Langheld 1909). In

## Schema



schwach alkalischer, nahezu neutraler Lösung zerfällt die Iminocarbonsäure unter Decarboxylierung und nachfolgender Hydrolyse der Schiffschen Base in Formaldehyd und Ammoniak (Langheld 1909). In stärker alkalischer Lösung wird die Iminosäure ohne Decarboxylierung zur  $\alpha$ -Oxosäure (**4**, Glyoxylsäure) und Ammoniak hydrolysiert (Wieland et al. 1949).

EuAB setzt mit 50 mg Glycin (0,66 mmol) und 1 ml einer Natriumhypochlorid-Lösung, die 2,5–3% aktives Chlor enthält (0,7–0,85 mmol), etwa äquivalente Mengen um. Der pH-Wert der Lösung wird dabei durch die schwach alkalisch reagierende Natriumhypochlorid-Lösung bestimmt, im hier beschriebenen Fall pH 9,4. Das Kondensat der beim Erhitzen entweichenden Dämpfe reagiert durch Ammoniak alkalisch und gibt mit dem Acetylaceton-Reagenz EuAB (Nash-Reagenz) eine positive Reaktion auf Formaldehyd. Die Hauptmenge Formaldehyd verbleibt, durch Ammoniak als Methenamin gebunden, in der Reaktionslösung (Langheld 1909). Nach der Salzsäurezugabe wird Methenamin zersetzt und Formaldehyd beim mehrminütigen Siedeprozess verkocht. **4** wird bei der aktuellen Salzsäurekonzentration (ca. 12%) nicht decarboxyliert (Taylor et al. 1947) und ist nicht wasserdampfflüchtig (Mestres 1953). Nachdem die restliche Lösung mit Resorcin umgesetzt wird, verbleibt eine klare farblose Lösung. Damit ist angezeigt, dass Formaldehyd, welcher bei der aktuellen Salzsäurekonzentration mit Resorcin zu einem rotgefärbten Präzipitat reagieren würde, vollständig entfernt ist. Aus der Reaktionslösung lässt sich mit Ethylacetat ein Reaktionsprodukt extrahieren, das bei der DC mit zwei Laufmitteln unterschiedlicher Selektivität mit dem von Vieles und Badre (1947) beschriebenen und von Auerhoff und Philippi (1976) bestätigtem Reaktionsprodukt aus Glyoxylsäure und Resorcin, dem Lacton der Bis-2,4-dihydroxyphenylessigsäure (**5**), identisch ist. Die Substanz kann auf dem Chromatogramm gut detektiert werden: Bei Behandlung mit ethanolischer Schwefelsäure und nachfolgendem Erwärmen auf einer Heizplatte entwickelt sich ein blau gefärbter Fleck, der das durch Oxidation entstandene

Oxonol-Kation (6) anzeigt. Durch Behandlung mit Natronlauge (0,1 M) entwickelt sich ein tief blau gefärbter Fleck, dessen Farbe allmählich nach gelb umschlägt und dabei im langwelligen UV-Licht (365 nm) intensiv fluoresziert. Dabei bildet sich zunächst das Phenolat, das sofort zum blau gefärbten Oxonol-Anion 7 oxidiert wird, welches durch Öffnung des Lactonringes in das gelb gefärbte, fluoreszierende Carboxylat-Anion 8 übergeht (Schema). Zur Abschätzung der unter den Bedingungen des EuAB entstehenden Glyoxylsäuremengen wurde die entstehende Färbung photometrisch vermessen und gegen Lösungen verglichen, die durch analoge Umsetzung von Glyoxylsäure und Resorcin erhalten worden waren. Im beschriebenen Fall wurden etwa 7% des Glycins zu Glyoxylsäure abgebaut. Erwartungsgemäß war die Glyoxylsäureausbeute bei Durchführung der Reaktion mit einer Lösung des Glycins in Natronlauge (0,2 M) anstelle Wasser höher: Die Färbung war etwa vier Mal intensiver (und möglicherweise durch die Resorcinmenge (0,18 mmol) limitiert). Bei stärker alkalischen Reaktionsbedingungen muss jedoch mit einem Abfall der Ausbeute an Glyoxylsäure gerechnet werden, die dann in einer Cannizarro-Reaktion zu Oxalsäure und Glykolsäure disproportioniert wird (Debus 1856).

### Experimenteller Teil

50 mg Glycin, in 5 ml Wasser (bzw. 5 ml Natronlauge, 2M) gelöst, werden mit 1 ml Natriumhypochlorit-Lösung (2,5 bis 3% aktives Chlor) 2 min und nach Zugabe von 1 ml Salzsäure (conc.) weitere 4 min zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 1 ml Resorcin-Lsg. (2%) und 2 ml Salzsäure (conc.) zugegeben. Die Lösung wird zu insgesamt 10 g ergänzt (Reaktionslösung).

Die Lösung wird 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt und mit 10 ml Wasser verdünnt (Produktlösung). Nach dem Abkühlen werden 5 ml Produktlösung mit 6 ml Natronlauge (2 M) versetzt. Die Extinktion der Lösung wird unverzüglich bei einer Wellenlänge von 540 nm gegen den Blindwert gemessen (Schichtdicke: 2 mm).

**Blindwert:** 1 ml Resorcin-Lsg. werden mit 3 ml Salzsäure (conc.) versetzt und mit Wasser zu insgesamt 10 g ergänzt. Die Mischung wird wie die Reaktionslösung behandelt.

**Referenzlösung:** 2,5 mg, 5 mg bzw. 7,5 mg Glyoxylsäure-Hydrat (Aldrich; Deisenhofen/Germany) werden in 5 ml Wasser gelöst, mit 3 ml Salzsäure (conc.) sowie 1 ml Resorcin-Lsg. (2%) versetzt und mit Wasser zu insgesamt 10 g ergänzt. Die Mischung wird wie die Reaktionslösung behandelt.

**Dünnschichtchromatographie:** 10 ml Produktlösung werden mit 5 ml Ethylacetat extrahiert. Der Extrakt (1 µl) wird auf einer Kieselgel-GF<sub>254</sub>-Schicht chromatographiert.

**Fließmittel 1:** Aceton/Methanol (60 + 40); R<sub>f</sub> = 0,73 (Resorcin 0,65) [Auterhoff et al. 1976].

**Fließmittel 2:** Ethylacetat; R<sub>f</sub> = 0,46 (Resorcin 0,58).

**Detektion:** 1) UV-Licht 254 nm

2) durch kurzes Eintauchen in ethanolische Schwefelsäure (5%, v/v)

3) durch kurzes Eintauchen in Natronlauge (0,1M)

### Literatur

- Auterhoff H, Philippi I (1976) Reaktionen der Weinsäure und ihrer Abbauprodukte mit Resorcin. Arch Pharm 309: 409–413.
- Eger K, Troschütz R, Roth HJ (1999) Arzneistoffanalyse. 4. Aufl., Stuttgart 1999, S. 169.
- Debus H (1856) Über einige Oxydationsprodukte des Alkohols. Annalen der Chemie und Pharmazie 100: 1–19.
- Langheld K (1909) Über das Verhalten von α-Aminosäuren gegen Natriumhypochlorit. Berichte 42: 2360–2377.
- Mestres R (1953) Constante de volatilité de l'acide glyoxylique en solution diluée. Bull Soc Chim France 520–521.
- Taylor EW, Fowlett WF, McGee PA (1947) Investigations of the properties of cellulose oxidized by nitrogen dioxide. III. The evolution of carbon dioxide from uronic acids and polyuronides. J Amer Chem Soc 69: 343–347.
- Vieles P, Badre R (1947) Sur la combinaison de l'acide glyoxylique avec le resorcinol. Bull Soc Chim France 247–251.
- Wieland Th, Vogelbach C, Bielig H-J (1949) Das Verhalten der Aminosäuren gegenüber Natriumchlorit und ihre quantitative Desaminierung mit Hypochlorit. Liebigs Ann Chem 561: 116–123.

Department of Pharmacy, Faculty of Technology and Engineering, M.S. University of Baroda, Vadodara, India

### Use of electrolyte induced flocculation technique for an *in vitro* steric stability study of steric stabilized liposome formulations

N. SUBRAMANIAN, R. S. R. MURTHY

Received March 15, 2003, accepted July 3, 2003

Prof. R. S. R. Murthy, Department of Pharmacy, Faculty of Technology and Engineering, M.S. University of Baroda, Kalabhavan, Vadodara-390001, India  
murthyrsr@satyam.net.in

Pharmazie 59: 74–76 (2004)

The aim of the present study was to investigate the electrolyte induced flocculation as a tool to evaluate the steric stability of the prepared liposomes. Various liposomal formulations containing methotrexate were formulated using the lipid film hydration technique with different ratios of drug, lipids (Phosphatidyl choline & Cholesterol) and surface coating agents (Methoxy poly ethylene glycol 5000, Methoxy polyethylene glycol 2000, Pluronic F-68, Pluronic F-127, Tween 20 and Tween 80). The formulations have been optimized for their entrapment efficiency, particle size and steric stabilization effect. The electrolyte induced flocculation test was carried out with different concentrations of sodium sulphate solutions. The results suggested that out of all the polymers used, the poly ethylene glycols proved to provide better steric stabilization to the liposomes even at higher concentrations of electrolyte.

Sterically stabilized liposomes were developed with the primary goal of evading the rapid clearance by the reticuloendothelial system, after i.v. injection thus allowing them to remain longer in the circulation (Papahadjopoulos et al. 1991). The coating of liposomes with hydrophilic polymers renders steric stability to the liposomes by providing a hydrophilic surface, which is thought to limit the binding of serum opsonins as well as direct interactions with cells, most importantly, of the reticuloendothelial system (Huang et al 1993). This results in enhanced circulation times and increased localization in the tumor (Hobbs et al. 1998; Huang et al. 1992; Stewart et al. 1998). In the earlier studies, the steric stabilization effect of the long circulating liposomes was determined mainly by *in vivo* circulation time and by *in vivo* drug release studies (Allen et al. 1989; Gabison et al. 1994; Working et al. 1994; Yuan et al. 1994). Hence the present work was focused on the *in vitro* steric stability of stabilized liposomes using the electrolyte induced flocculation technique.

The liposomes were prepared using methotrexate as a model drug by the thin film hydration technique. The conventional liposomes were prepared using 83 mg of egg phosphatidyl choline, 17 mg of cholesterol and 5 mg of methotrexate (molar ratio 1 : 0.4 : 0.1). The sterically stabilized liposomes were prepared using one of the following hydrophilic polymers, Tween<sup>®</sup> 20 (T20)-4% wt of lipids, Tween 80 (T80)-4% wt of lipids, Pluronic F-68 (PF-68)-4% wt of lipids, Pluronic<sup>®</sup> F-127 (PF-127)-4% wt of lipids, methoxy polyethylene glycol 5000-phosphatidyl ethanolamine (mPEG5000-PE)-5 mol% of lipids, and methoxy polyethylene glycol 2000-phosphatidyl ethanol-