

Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Germany

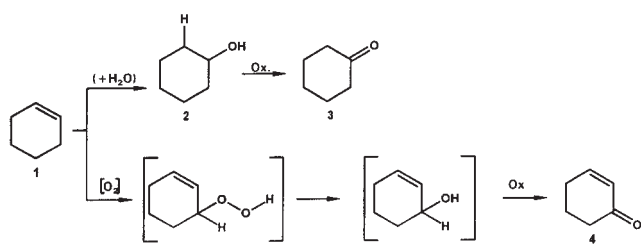
## Zur Bildung von Cyclohexanon und 2-Cyclohexanon aus Natriumcyclamat

B. UNTERHALT, C. BENSLIMAN, H. DEGUARA und H. LAHL

Bei unseren Untersuchungen auf dem Süßstoffgebiet verdienten Struktur-Wirkungs-Beziehungen an Cycloalkylsulfaminsäuren und deren Thiaanalogen besondere Beachtung [1]. Stabilitätsbestimmungen kamen nicht zur Durchführung. Inzwischen wurde von anderen Arbeitsgruppen gefunden, dass mit Natriumcyclamat gesüßte Erfrischungsgetränke nach längerem Aufbewahren (pH 3,0–3,5) geringfügige Mengen an Cyclohexanon (3) sowie 2-Cyclohexanon (4) enthalten [2, 3], wobei der Bildungsmechanismus dieser Produkte fraglich bleibt [4]. Die folgenden Ausführungen sollen einen Beitrag zur Klärung der Spaltungsreaktion liefern. Im ersten Schritt der Untersuchungen wurde Natriumcyclamat in salzsaurer Lösung (pH 3) 3 h lang zum Sieden erhitzt – es entstehen etwa 10% Cyclohexylamin-HCl –, nach dem Erkalten mit Dichlormethan extrahiert und nach dem Einengen der organischen Phase der Rückstand durch GC untersucht. Es konnten ebenso wie bei späteren Lagerungsversuchen im Dunkeln und bei Belichtung folgende Spaltprodukte identifiziert werden: Cyclohexen (1), Cyclohexanon (3) und 2-Cyclohexanon (4). Der Nachweis von Cyclohexen (1) stützt die Annahme, dass dies ein Zwischenprodukt beim Zerfall von Natriumcyclamat zu 3 und 4 ist. Gemäß älteren Arbeiten kann z. B. 2-Cyclohexanon (4) aus 1 über Cyclohexen-hydroperoxid entstehen [5–7]. Im zweiten Schritt der Untersuchungen wurde daher handelsübliches, mit 0,4% Cyclohexanol (2) und 1,0–1,5% 2-Cyclohexanon (4) verunreinigtes Cyclohexen (1) – die Verunreinigung ist ein weiterer Hinweis auf den o. a. Mechanismus – in gesättigter wässriger Lösung (2,74 g/l) den oben angegebenen Lagerungsbedingungen unterworfen. Bei Belichtung wurde u. a. ein erhöhter Anteil an 2 und 4 mittels GC nachgewiesen.

Für den Nachweis des angedeuteten Reaktionsablaufs zur Bildung von 4 war es wichtig, Cyclohexen-hydroperoxid zu synthetisieren und zu lagern bzw. zu erhitzen. Das nach Literaturangaben gewonnene Rohprodukt [8, 9] lieferte unter diesen Bedingungen in der Tat 2-Cyclohexanon (4) und auch Cyclohexanon (3) neben dem im Überschuss vorhandenen 1. Es ist daher der skizzierte Reaktionsverlauf (Schema) denkbar. Das Hydroperoxid besitzt im GC nach unseren Befunden offensichtlich die höchste Retentionszeit und kann mit Kaliumiodid-Lösung entfernt werden. Die Bildung von 2-Cyclohexanon (4)

### Schema



aus Natriumcyclamat ist durch den Zusatz von Ascorbinsäure nicht zu beeinflussen, bei der Zugabe von Natriumdisulfit (1:10) finden wir Cyclohexen (1) und Cyclohexanon (3) im Verhältnis 1,0:1,4, wobei der Anteil an 1 und 3 gegenüber den Versuchen ohne Natriumdisulfit-Zusatz vermindert ist.

## Experimenteller Teil

### 1. GC-Bestimmungen

Shimadzu 14A; Säule DB1, 30 m, 3,0 µm: Scientific; FID-Detektor; N<sub>2</sub> als Trägergas; isotherm, Split: 40ml/min, Inj.-Temp.: 200 °C; Det.-Temp.: 200 °C. 2-Punkte-Tageskalibrierung (0,25 u. 0,05g/l). Interner Standard: Lävulinsäuremethylester. T<sub>ret</sub>(min): Cyclohexen (1): 1,997; Cyclohexylamin: 3,898; Cyclohexanol (2): 4,175; Cyclohexenol: 4,225; Cyclohexanon (3): 4,300; Cyclohexanon (4): 5,035; Int.St.: 5,958. 20,0 ml Versuchslösung werden mit 2,0 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Der vorsichtig eingeeingte Extrakt wird unter Zusatz von 0,05 ml des internen Standards auf 1,00 ml aufgefüllt und evtl. unter Verdünnen (u. a. 1:5) injiziert.

### 2. Lagerungsversuche

1-prozentige wässrige Lösungen von Natriumcyclamat werden mit Citronensäure auf pH 3 eingestellt und 20–30 Tage lang bei RT im Dunkeln sowie im Tageslicht gelagert. Nach der Extraktion mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sind in beiden Fällen Spuren von Cyclohexen (1: im Dunkeln 7 · 10<sup>-5</sup>%, im Tageslicht 8 · 10<sup>-5</sup>%) und Cyclohexanon (3: im Dunkeln 2,5 · 10<sup>-4</sup>%, im Tageslicht 0,023%), bezogen auf die eingesetzte Natriumcyclamatmenge, nachzuweisen. 2-Cyclohexanon (4) wird nicht gefunden.

Die gleichen Versuche mit 10facher Tageslichtintensität im Lichtschrank ergeben Cyclohexanon (3) und 2-Cyclohexanon (4) im Verhältnis 5:1 bis 10:1 (1mg/l 3 sowie 0,1–0,2mg/l 4).

10-prozentige wässrige Lösungen von Natriumcyclamat liefern bei 4-tägiger Lagerung unter 10fachem Tageslicht (Tageslicht-Lampe Osram) 0,69% 3 sowie 0,0008% 4, bezogen auf die eingesetzte Natriumcyclamatmenge, und geringe Anteile (0,0002%) an 1. Bei 39-tägiger Lagerung werden 2,73% 3 und 0,22% 4 sowie 0,1% 1 gefunden.

Handelsübliches Cyclohexen (1), in dem 0,4% Cyclohexanol (2) und 1,0–1,5% 2-Cyclohexanon (4) enthalten sind, zeigt beim Lagern keine Veränderung. Wird jedoch die gesättigte wässrige Lösung (pH 3, Citronensäure) 10facher Tageslichtintensität (Tageslicht-Lampe Osram) ausgesetzt, so geht der Anteil an 1 zurück, und der Anteil an 2 und 4 wächst auf das Doppelte bzw. das Fünffache.

### 3. Cyclohexen-hydroperoxid

Die Mischung von 16,4 g (0,2 mol) Cyclohexen (1) und einer Spatelspitze (≈ 3 · 10<sup>-4</sup> mol) Teträthylporphyrin (TPP) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wird 1–2 h lang unter O<sub>2</sub> bei –20 °C mittels einer Halogenlampe (100 W Halostar Osram, 24 V) bestrahlt, das Rohprodukt für die gc-Analyse verwendet.

#### 3.1. Sofortige Analyse des Rohprodukts

Im GC sind neben dem Edukt 1 (T<sub>ret</sub>, 2,008 min; 21%) 3: (T<sub>ret</sub>, 4,368 min) und 4: T<sub>ret</sub>, 5,227 min) zu 1,3% und 3,6%, bezogen auf 1 (= 100%), sowie eine unbekannte Substanz (T<sub>ret</sub>, 9,988 min, 3%), die das Hydroperoxid sein sollte, zu erkennen.

#### 3.2. Analyse des Rohprodukts nach dem Lagern

Nach 1-wöchiger Lagerung des Rohprodukts bei RT findet man 0,45% 3 und 1,4% 4; der vermutete Hydroperoxidanteil beträgt 3,3%. Nach 2-wöchiger Lagerung sind 3 und 4 praktisch unverändert (0,4% bzw. 1,6%), der Hydroperoxidanteil liegt gegen 7%.

#### 3.3. Analyse des Rohprodukts nach dem Erhitzen

Erhitzt man das Rohprodukt 4 Tage lang auf 60 °C, so erhält man im GC nur noch 3,9% Edukt 1 und darauf bezogen etwa 7% 3 bzw. 18% 4 sowie 2,5% Hydroperoxid.

#### 3.4. Analyse des Rohprodukts nach dem Behandeln mit KI-Lösung

Nach dem Ausschütteln des Rohprodukts mit 5proz. KI-Lösung und dem Entfernen des I<sub>2</sub> mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Lösung findet man neben 26% Edukt 1 0,9% 3 (+ Cyclohexenol), 0,4% 4 und 0,1% Hydroperoxid, bezogen auf 1 (= 100%).

## Literatur

- Unterhalt, B.; Möllers, M.: *Sci. Pharm.* **59**, 173 (1991)
- Hahn, H.: *Lebensmittelchemie* **50**, 52 (1996); *Dtsch. Lebensm.-Rdsch.* **93**, 74 (1997)
- Le Quere, J. L. et al.: *Trends in Flavour Research*, S.387, Elsevier 1994, cit. n. 2
- Glaab, V.; Janzowski, C.; Eisenbrand, G.: *Lebensmittelchemie* **53**, 46 (1999)
- Bateman, L.; Hughes, H.: *J. Chem. Soc.* 4594, **1952**
- Kötz, A.; Richter, K.: *J. Prakt. Chem.* **111**, 373 (1925)
- Hock, H.; Gänicke, K.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **71**, 1430 (1938)
- Dang, H.-S.; Davies, A. G.: *Tetrahedron Lett.* **32**, 1745 (1991)
- Chan, Y.-Y.; Li, X.; Zhu, C.; Liu, X.; Zhang, Y.; Leung, H.-K.: *J. Org. Chem.* **55**, 5497 (1990)

Eingegangen am 29. Juli 1999

Angenommen am 9. September 1999

Prof. Dr. B. Unterhalt

Institut für Pharmazeutische Chemie  
Hittorfstr. 58–62  
D-48149 Münster

Pharmaceutical Development, Jenapharm GmbH &amp; Co. KG, Jena, Germany

### Determination of testosterone, testosterone propionate, testosterone enanthate, testosterone undecanoate in pharmaceutical preparations by HPLC

S. CLAUSSEN, M. BÖSE and M. DITTGEN

The use of testosterone esters as pro-drugs has been described by several authors [1–4]. Several papers presented HPLC procedures for the determination of testosterone and testosterone esters in human plasma and pharmaceutical formulations [5–8]. Usually, porous silica gel columns with reversed phase  $C_{18}$  were used in those procedures and in most cases a  $UV_{243\text{ nm}}$  detector was used. There are, however, no publications to determine testosterone (T), testosterone propionate (TP), testosterone enanthate (TE) and testosterone undecanoate (TUD) in pharmaceuticals with fast LC.

In this work, we developed a precise and reliable method based on UV detection for the baseline separation of T, TP, TE, TUD in not more than 10 min.

With this technique, quite a good separation of testosterone and testosterone esters was obtained (Fig.). The method was optimised and proofed for robustness using a factorial design approach (Table).

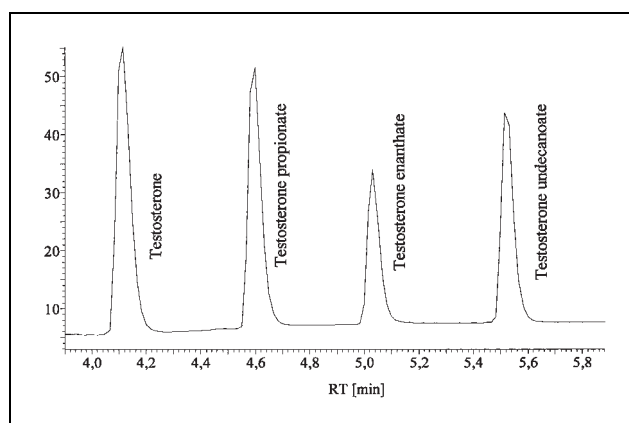


Fig.: Separation of (T), (TP), TE and TUD by the gradient HPLC on Micra RP 18

## Experimental

### 1. Materials and agents

T and TP were obtained from Fluka Chemie Ag, CH-Buchs, TE from AK 20 Nobel and TUD from Jenapharm GmbH & Co. KG. HPLC acetonitrile was obtained from E. Merck, Darmstadt. Purified water was used.

### 2. Instrumentation and procedure

The chromatography was performed using a Shimadzu LC 10A chromatograph. The liquid chromatograph was equipped with a LC-10 AS pump system and a variable-wavelength UV-detector. Separations were performed on a  $33 \times 4.6$  mm i.d.  $1.5 \mu\text{m}$  Micra RP 18 column (Bischoff chromatography, Leonberg, FRG). The gradient system consisted of acetonitrile/water with following time procedure: 0–2 min 10% acetonitrile in water, 2–5 min linear up to 96% acetonitrile, 5–6 min 96% acetonitrile at a flow-rate of 1.4 ml/min at  $40^\circ\text{C} \pm 0.3^\circ\text{C}$ . The detector wavelength was 243 nm. In all cases the injection volume was 10  $\mu\text{l}$  in duplicate.

The concentrations of testosterone and testosterone esters were calculated by peak area ratio of analyte in comparison with calibration curves which were linear in the described working ranges. An overall chromatographic time of 6 min provides an efficient method. The analysis time is reported

**Table: Factorial design set (a) and results (b); established working range (c) for the method**a) 2<sup>4</sup>-cube + star Statistical design for optimising of chromatographic conditions

Set	-x	-1	0	+1	+x
Variable					
Start acetonitrile (%)	6	8	10	12	14
End acetonitrile (%)	92	94	96	98	100
Flow-rate (ml/min)	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
Temperature (°C)	30	35	40	45	50

b) Results of selected experiments

Exp. no.	Res* T-TP	Res* TP-TE	Res* TE-TUD	Sym T	Sym TP	Sym Te	Sym TUD
1	5.516	6.108	7.193	1.269	1.247	1.328	1.097
11	5.73	5.093	6.189	1.379	1.284	1.229	1.211
12	4.902	5.638	6.844	1.391	1.373	1.349	1.306
13	6.825	5.328	5.808	1.140	1.272	1.163	1.101
26	6.178	4.779	5.16	1.184	1.31	1.128	1.174

Res\* — Resolution

Sym — Symmetry

Boldface-optimum

c) working range (W) of the method, retention time (R), Slope (S) and correlation coefficient (C) for the calibration curve

Substance	R (min)	W (ng/10 µl injection)	S (µV · s/µg/ml)	C
T	4.10	0.1012–0.6072	7061	0.9997
TP	4.59	0.1016–0.6096	5382	0.9997
TE	5.02	0.1042–0.6252	2091	0.9991
TUD	5.53	0.1004–0.6024	1098	0.9974

in the literature [5, 6]. Short reequilibration time of the column and a variable rinse time for sample clean-up with 10% acetonitrile in water prefers the method for build-in in automated analysis systems.

## References

- 1 Täuber, U.; Schröder, K.; Düsterberg, B.; Matthes, H.: J. Drug Metab. Pharmacokin. **11**, 145 (1986)
- 2 Nieschlag, E.: Clin. Endocrinol. (Oxf.) **45**, 261 (1996)
- 3 Coert, A.; Geelen, J.; de Visser, J.: Acta Endocr. **79**, 789 (1975)
- 4 Nieschlag, E.; Behre, H. M.: Testosterone: Action, Deficiency, Substitution, p. 332, Springer-Verlag, Heidelberg 1998
- 5 Karunanithy, R.; Becket, G.; Leung, S. L.; Ng, S. E.: J. Pharm. Biomed. Anal. **13**, 375 (1985)
- 6 Carignan, G.; Lodge, B.; Shakum, W.: J. Pharm. Sci. **69**, 1214 (1980)
- 7 Matlin, S. A.; Chan, L.; Prazeres, M. A.; Mehani, S.; Cass, Q. B.: J. High Resolut. Chromatogr. **10**(4), 186 (1987)
- 8 Najavas, R.; Imaz, C.; Carrera, D.; Garcia, M.; Perez, M.; Rodriguez, C.: J. Chromatogr. **673**, 159 (1995)

Received July 14, 1999

Accepted September 1, 1999

Sven Claußen  
Pharmaceutical Development  
Jenapharm GmbH & Co. KG  
Otto-Schott-Str. 15  
D-07745 Jena

Faculty of Pharmacy, Medical University, Sofia, Bulgaria

## Development of biodegradable poly(α-methylmalate) microspheres

K. YONCHEVA and N. LAMBOV

During the recent years some novel biodegradable oligoesters based on tartaric, malic and other acids have been used for the development of biodegradable drug delivery systems apart from conventional poly(lactic acid) (PLA), poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA), polycaprolactone (PCL), and their co-polymers [1]. Some of our previous papers reported the possibilities to prepare chemically crosslinked drug delivery systems based on malic acid via polycondensation [2]. Being biocompatible and biodegradable is the main advantage of the polymalates as drug carriers [3]. Their degradation results in malic acid which is a natural metabolite in the Krebs Cycle. Thus Belcheva et al. [4] implemented a polycondensation method to prepare a series of polymalates of Mw > 5000 with potential application as biodegradable drug carriers. Wada et al. [5] used low molecular weight PLA oligomers for achieving drug release rates higher than those provided by high molecular weight PLA.

The above mentioned studies provoked our investigations aiming at the preparation of drug loaded microspheres based on a novel biodegradable poly(α-methyl-malate) polymer (PMM). Microspheres were prepared by a simple solvent evaporation method. Comparatively, microspheres from traditionally used PLGA co-polymer were obtained under the same process conditions. Isopropylantipyrine was selected as a model agent for incorporation because it is a lowly soluble compound and release could be followed easily by spectrophotometry.

PMM microspheres were obtained with a drug loading of 30% and PLGA microspheres were loaded with 28% drug. A negligible amount of drug was wasted in the external aqueous phase since the drug is slightly soluble in water. Scanning electron microscopy (SEM) showed that both samples of microspheres have spherical shape and smooth surfaces. No drug crystals are observed on the microsphere surfaces. Microspheres obtained from PMM seem to be on average smaller (5–80 µm) than those obtained from PLGA (30–80 µm). The reason for this difference might be the higher viscosity of the inner organic phase of the PLGA emulsion. This leads to the formation of larger drops during emulsification and respectively to

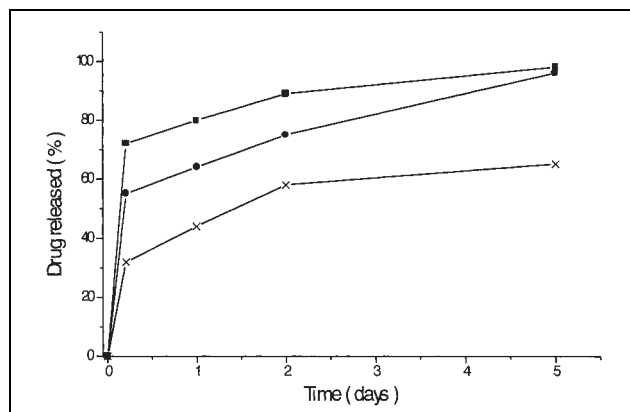


Fig. 1: In vitro release of isopropylantipyrine from: lyophilized PMM microspheres (■); non-lyophilized PMM microspheres (●); and PLGA-microspheres (×)