

**Stabilität von Octreotid
in Festen Dispersionen mit Polycarbophil
und in Lyophilisaten
sowie Untersuchungen
von physikalischen Veränderungen
und Reaktionsprodukten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Annette Grave

aus Werlte

Hamburg 2003

Gutachter: Prof. Dr. J. B. Mielck
Prof. Dr. W. A. König

Tag der mündlichen Prüfung: 21.08.2003

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter der Leitung von

Prof. Dr. J. B. Mielck

in der Zeit von März 1999 bis Juli 2003 in der Abteilung Pharmazeutische Technologie am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg.

Meinem Doktorvater und Lehrer, Herrn Prof. Dr. J. B. Mielck gilt mein besonderer Dank für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Seine wertvollen Anregungen und konstruktiven Diskussionen waren mir eine große Hilfe.

Auch allen Mitarbeitern der Abteilung Pharmazeutische Technologie gilt mein herzlicher Dank für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt Frau Janina Bielefeldt, Frau Ulrike Kraas und Herrn Carsten Roettger für viele gute Anregungen und interessante Gespräche.

Ein besonderes Dankeschön geht an Frau Edna Sommerfeld für ihre stete Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und Geduld.

Danken möchte ich auch allen ständigen Mitarbeitern der Abteilung für Pharmazeutische Technologie, besonders Frau Petra Borbe für ihre geduldige Hilfe bei vielen praktischen Dingen und Herrn Wulf Schüler für die stets schnelle, unkomplizierte Lösung aller technischen Probleme im Laboralltag. Frau Petra Belda und Herrn Dr. Albrecht Sakmann danke ich für die stete Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. A. König möchte ich für die Zeit danken, die er sich zur Diskussion der Massenspektren genommen hat. Dies hat wesentlich zur Identifizierung der Zersetzungsprodukte beigetragen.

Herrn F. Hetzel, Beiersdorf AG, Hamburg, danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des dortigen DSC-Gerätes und die freundliche Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Frau Angela Schaefer, Abteilung für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg, für die Möglichkeit der Nutzung der LC-MS-Apparatur.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Frau R. Walter, Zoologisches Institut, Universität Hamburg, für die gewissenhafte Anfertigung der REM-Aufnahmen.

Herrn Dr. C. Fritsch, Novartis Pharma GmbH, Wehr, danke ich für die kostenlose Überlassung des Peptides Octreotid und Herrn C. Schlueter, BFGoodrich, Raubling, für das zur Verfügung gestellte Polycarbophil.

Ganz besonders herzlich möchte ich meinen Eltern danken für ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten und die Unterstützung während aller Höhen und Tiefen von Studium und Promotion.

1	Einleitung	1
2	Allgemeiner Teil	3
2.1	Materialien	3
2.1.1	Octreotid	3
2.1.2	Polycarbophil	5
2.1.3	Puffer	6
2.2	Problemstellung	7
3	Methoden	8
3.1	Analytik	8
3.1.1	Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC)	8
3.1.1.1	Methodenentwicklung	8
3.1.1.2	Validierung	10
3.1.2	Kalibrierung der pH-Meter	17
3.1.3	Kopplung HPLC – Massenspektrometrie (MS)	18
3.1.4	Wasserdampfsorption	20
3.1.5	Wassergehaltsbestimmung	22
3.1.5.1	Thermogravimetrie	22
3.1.5.2	Karl-Fischer-Titration	23
3.1.6	Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	25
3.1.7	Mikroskopie	26
3.1.7.1	Thermomikroskopie	26
3.1.7.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	26
3.2	Sorption von Octreotid an Oberflächen	27
3.2.1	Adsorption an Glas	27
3.2.2	Adsorption an Polyethylen	28
3.2.3	Auswertung der Adsorptionsversuche	28
3.3	Herstellung der Festen Dispersionen und Lyophilisate	29
3.3.1	Rheologische Untersuchungen mittels Ubbelohde-Viskosimeter	33

3.4	Belastungsmethoden	34
3.4.1	Klimatische Bedingungen	34
3.4.1.1	Relative Feuchte	34
3.4.1.2	Temperatur	35
3.4.2	Statistische Auswertung	37
3.4.2.1	Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RGK)	37
3.4.2.2	Faktorenversuche	38
3.4.2.3	Haltbarkeit	39
3.4.2.4	Versuchsplan	40
3.4.3	$\log k$ / pH-Profil	40
4	Ergebnisse und Diskussion	42
4.1	Physikalische und physikochemische Befunde	42
4.1.1	Wasserdampfsorption	42
4.1.1.1	Polycarbophil	42
4.1.1.2	Polycarbophil mit Citratpuffer pH 4,0 (PCP 4,0)	45
4.1.1.3	Polycarbophil mit Phosphatpuffer pH 6,8 (PCP 6,8)	48
4.1.1.4	Vergleich der Wasseraufnahme der gepufferten Lyophilisate und des Polycarbofills	51
4.1.2	Wassergehalt	52
4.1.2.1	Polycarbophil	52
4.1.2.2	Feste Dispersionen und Lyophilisate	52
4.1.3	Dynamische Differenzkalorimetrie	54
4.1.3.1	Octreotid	54
4.1.3.2	Polycarbophil	54
4.1.3.3	Feste Dispersionen und Lyophilisate	55
4.1.4	Viskosität	61
4.1.4.1	Polycarbophil	61
4.1.4.2	Dispersionen und Lyophilisate	62
4.1.5	Sorption von Octreotid an Oberflächen	64
4.1.5.1	Adsorption an Glas in Citratpuffer pH 4,0	64
4.1.5.2	Adsorption an Glas in Phosphatpuffer pH 6,8	66
4.1.5.3	Adsorption an Polyethylen	66

4.2	Chemische Befunde	67
4.2.1	Zersetzung des Octreotids in Lyophilisaten und Festen Dispersionen bei verschiedenen Lagerungsbedingungen	67
4.2.1.1	Octreotid-Lyophilisat mit Citratpuffer (Oc 4,0)	67
4.2.1.2	Octreotid-Lyophilisat mit Phosphatpuffer (Oc 6,8)	69
4.2.1.3	Feste Dispersionen aus Octreotid mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0)	71
4.2.1.4	Feste Dispersionen aus Octreotid mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8)	73
4.2.2	Entstehung von Zersetzungsprodukten	77
4.2.3	Identifizierung von Zersetzungsprodukten aus der Einlagerung	83
4.2.4	Verlauf der Entstehung von Zersetzungsprodukten (ZP)	86
4.2.4.1	Zersetzungsprodukte in den verschiedenen Proben bei gleichen Lagerungsbedingungen	89
4.3	Statistische Auswertung – Ergebnisse	100
4.3.1	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) für die Zersetzung von Octreotid	100
4.3.2	Faktorenversuche	105
4.3.2.1	Faktorenversuch 1: Einfluss von pH-Wert, rel. Feuchte, Temperatur bei Anwesenheit von PCP	105
4.3.2.2	Faktorenversuch 2: Einfluss von pH-Wert, rel. Feuchte, Temperatur bei Abwesenheit von PCP	106
4.3.2.3	Faktorenversuche 3 - 5: Einfluss von Polymer, pH-Wert, relativer Feuchte bei 58 °C, 66 °C und 74 °C	106
4.3.2.4	Faktorenversuche 6 - 7: Einfluss von Polymer, pH-Wert, Temperatur bei 11 % und 30 % r. F.	108
4.3.2.5	Faktorenversuche 8 - 9: Einfluss von Polymer, Temperatur, relativer Feuchte bei pH 4,0 und pH 6,8	110
4.3.3	Haltbarkeit	112
4.3.3.1	Octreotid-Lyophilisat mit Citratpuffer (Oc 4,0)	112
4.3.3.2	Octreotid-Lyophilisat mit Phosphatpuffer (Oc 6,8)	114
4.3.3.3	Feste Dispersion mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0)	116
4.3.3.4	Feste Dispersion mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8)	118
4.3.4	log k / pH-Profil	119

4.4	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen	122
4.4.1	Octreotid	122
4.4.1.1	Partikelform und Größe	122
4.4.1.2	Thermomikroskopische Betrachtung	123
4.4.2	Polycarbophil	124
4.4.3	Feste Dispersionen	124
5	Zusammenfassung	129
5.1	Zusammenfassender Vergleich der Ergebnisse mit den Untersuchungen von Wratschko [86]	129
5.2	Zusammenfassung und Ausblick	130
5.3	Summary and Outlook	135
6	Anhang	139
7	Literaturverzeichnis	144
8	Geräteliste	153
9	Software	158
10	Gefahrstoffe	159
11	Lebenslauf	160

Abbildung 1: Chemische Struktur von Octreotid	3
Abbildung 2: Chemische Struktur von Polycarbophil	5
Abbildung 3: Chromatogramm von Octreotid, aufgenommen mit der validierten HPLC-Methode	12
Abbildung 4: Massenspektrum des Octreotids (LC-MS)	13
Abbildung 5: Chromatogramme des Octreotids mit Zersetzungsprodukten aus der Lagerung, Detektion: a) DAD 280 nm, b) DAD 210 nm, c) Fluoreszenzdetektion 270 nm, d) MS-Detektion	20
Abbildung 6: Wasseraufnahme des Polycarbophils bei 35 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 4	42
Abbildung 7: Wasseraufnahme des Polycarbophils bei 50 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 4	43
Abbildung 8: Wasseraufnahme des Polycarbophils in Abhängigkeit von der relativen Feuchte [%] bei verschiedenen Lagertemperaturen; $\bar{x} \pm s$, n = 4	45
Abbildung 9: Wasseraufnahme des PCP 4,0 bei 25 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 3	46
Abbildung 10: Wasseraufnahme des PCP 4,0 bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2, 75 %: n = 3	46
Abbildung 11: Wasseraufnahme bzw. –abnahme des Lyophilisates (PCP 4,0) in Abhängigkeit von der relativen Feuchte [%] bei verschiedenen Lagertemperaturen nach 260 Stunden; $\bar{x} \pm s$, n = 3, bei 58 °C / 30 % und 50 % r. F.: n = 2	48
Abbildung 12: Wasseraufnahme des PCP 6,8 bei 25 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 3	49
Abbildung 13: Wasseraufnahme des PCP 6,8 bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 3	49
Abbildung 14: Wasseraufnahme bzw. –abnahme des Lyophilisates (PCP 6,8) in Abhängigkeit von der relativen Feuchte [%] bei verschiedenen Lagertemperaturen nach 507 Stunden; $\bar{x} \pm s$, n = 3	51
Abbildung 15: Ausschnitt aus einer DSC-Kurve von Polycarbophil; 100 – 160 °C, 10 °C / min, Einwaage: 2,112 mg, verschlossene Tiegel, nicht gelocht	55
Abbildung 16: Abhängigkeit der Glasübergangstemperaturen von den Lagerungstemperaturen nach 1 Woche (30 % r. F.), Proben mit Citratpuffer; $\bar{x} \pm s$	56
Abbildung 17: Abhängigkeit der Glasübergangstemperaturen von den Lagerungstemperaturen nach 1 Woche (30 % r. F.), Proben mit Phosphatpuffer; $\bar{x} \pm s$	57

Abbildung 18: Abhängigkeit der Glasübergangstemperaturen von den Lagerungstemperaturen nach 15 Wochen bei 30 % r. F., Proben mit Citratpuffer; $\bar{x} \pm s$, n = 2	59
Abbildung 19: Abhängigkeit der Glasübergangstemperaturen von den Lagerungstemperaturen nach 15 Wochen bei 30 % r. F., Proben mit Phosphatpuffer; $\bar{x} \pm s$, n = 2	60
Abbildung 20: Adsorptionsisotherme des Octreotids an Glas in Citratpuffer pH 4,0 (n = 4) mit unterer (uG) und oberer (oG) Grenze des Konfidenzintervalls	64
Abbildung 21: Adsorptionsisotherme des Octreotids an Glas in Phosphatpuffer pH 6,8 (n = 3)	66
Abbildung 22: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2 NW: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze	67
Abbildung 23: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	68
Abbildung 24: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 66 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	68
Abbildung 25: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 74 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	68
Abbildung 26: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) bei 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2 NW: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze	69
Abbildung 27: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	70
Abbildung 28: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) bei 66 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	70
Abbildung 29: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) bei 74 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	70

Abbildung 30: Zersetzung von Octreotid in Fester Dispersion mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) bei 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2 NW: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze	71
Abbildung 31: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	72
Abbildung 32: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) bei 66 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	72
Abbildung 33: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) bei 74 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	72
Abbildung 34: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) bei 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2 NW: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze	73
Abbildung 35: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	74
Abbildung 36: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) bei 66 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	74
Abbildung 37: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) bei 74 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2	74
Abbildung 38: Struktur des Octreotids mit möglichen Angriffspunkten für Zersetzungsreaktionen (Pfeile)	77
Abbildung 39: Zersetzungsprodukte durch a) Abspaltung von D-Phenylalanin und b) Threoninol von Octreotid	79
Abbildung 40: Reaktionsprodukte durch a) Veresterung mit und Essigsäure b) Veresterung mit Citronensäure, hier beispielhaft am Threonin dargestellt	80
Abbildung 41: mögliche Oxidationsprodukte des a) und b) Tryptophans (nach [76]) c) Cystins im Octreotid	81
Abbildung 42: β -Eliminierung des Threoninrestes mit anschließender Spaltung der Peptid-Bindung, nach [76]	82
Abbildung 43: HPLC-Chromatogramm nach Lagerung von Octreotid-Lyophilisat mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 58 °C / 30 % r. F. für 178 Tage	83
Abbildung 44: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) während der Lagerung bei 58 °C / 30 % r. F. (Flächen > 30000)	86

Abbildung 45: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) während der Lagerung bei 58 °C / 30 % r. F. (Flächen > 30000)	87
Abbildung 46: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) während der Lagerung bei 58 °C / 30 % r. F. (Flächen > 30000)	88
Abbildung 47: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) während der Lagerung bei 58 °C / 30 % r. F. (Flächen > 30000)	88
Abbildung 48: Zersetzungsprodukt 1 (Tab. 21), Rt 10,0 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	90
Abbildung 49: Zersetzungsprodukt 4 (Tab. 21), Rt 11,9 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	90
Abbildung 50: Zersetzungsprodukt 5 (Tab. 21), Rt 12,1 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	91
Abbildung 51: Zersetzungsprodukt 6 (Tab. 21), Rt 12,3 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	91
Abbildung 52: Zersetzungsprodukt 7 (Tab. 21), Rt 15,7 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	92
Abbildung 53: Zersetzungsprodukt 8 (Tab. 21), Rt 15,9 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	93
Abbildung 54: Zersetzungsprodukt 9 (Tab. 21), Rt 16,3 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	93
Abbildung 55: Zersetzungsprodukt 10 (Tab. 21), Rt 17,5 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	94
Abbildung 56: Zersetzungsprodukt 17 (Tab. 21), Rt 20,7 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	94
Abbildung 57: Zersetzungsprodukt 11 (Tab. 21), Rt 18,3 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	95
Abbildung 58: Zersetzungsprodukt 12 (Tab. 21), Rt 18,5 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	96
Abbildung 59: Zersetzungsprodukt 14 (Tab. 21), Rt 19,5 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	96

Abbildung 60: Zersetzungsprodukt 13 (Tab. 21), Rt 19,1 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	97
Abbildung 61: Zersetzungsprodukt 15 (Tab. 21), Rt 19,8 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	98
Abbildung 62: Zersetzungsprodukt 16 (Tab. 21), Rt 20,2 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	98
Abbildung 63: Zersetzungsprodukt 19 (Tab. 21), Rt 25,5 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2	99
Abbildung 64: RGK der Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) mit asymptotic standard error (ase)	101
Abbildung 65: RGK der Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) mit asymptotic standard error (ase)	102
Abbildung 66: RGK der Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) mit asymptotic standard error (ase)	103
Abbildung 67: RGK der Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) mit asymptotic standard error (ase)	104
Abbildung 68: Octreotid-Zersetzung in verschiedenen Puffern und Wasser ($\bar{x} \pm s$, n = 2); zum Vergleich wurde das Octreotid-Lyophilisat mit Phosphatpuffer pH 6,8 mit ausgewertet	119
Abbildung 69: log k / pH-Profil für Octreotid in gepufferten Lyophilisaten bei 66 °C / 30 % r. F. (mit Konfidenzintervall 95 %)	120
Abbildung 70: Octreotid (Novartis), lichtmikroskopische Aufnahme	122
Abbildung 71: Octreotid (Novartis), REM-Aufnahme	123
Abbildung 72: Polycarbophil, unbearbeitet (BFGoodrich), REM-Aufnahme	124
Abbildung 73: Oc PCP 4,0, unbelastet, REM-Aufnahme	125
Abbildung 74: Oc PCP 6,8, unbelastet, REM-Aufnahme	125
Abbildung 75: Oc PCP 4,0, 50 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme	126
Abbildung 76: Oc PCP 6,8, 50 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme	126
Abbildung 77: Oc PCP 4,0, 74 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme	127
Abbildung 78: Oc PCP 6,8, 74 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme	127
Abbildung 79: Oc PCP 4,0, 25 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme	128
Abbildung 80: Oc PCP 4,0, 74 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme	128

Tabelle 1: relative Standardabweichungen der Retentionszeiten (Rt) und der Peakflächen (Area), n = 12	14
Tabelle 2: Zusammenfassung der HPLC-Validierung	17
Tabelle 3: Temperaturen und relative Feuchten für die Bestimmung der Wasserdampfsorption mit Literaturwerten; angegeben sind die durchschnittlichen gemessenen Temperaturen \pm Standardabweichung	21
Tabelle 4: Hergestellte Octreotid-haltige Lyophilisate und Feste Dispersionen	32
Tabelle 5: verwendete Temperaturen und rel. Feuchten während der Langzeiteinlagerung (178 Tage); angegeben sind die durchschnittlichen Ist-Temperaturen bzw. –Feuchten \pm Standardabweichung (T: n = 62; r. F.: n = 6) sowie Literaturwerte für die Soll-Feuchten	36
Tabelle 6: Versuchsplan der Faktorenversuche ($3^2 \times 2^3$)	38
Tabelle 7: Versuchsplan für die Langzeiteinlagerung	40
Tabelle 8: verwendete Temperatur und rel. Feuchte für das log k / pH-Profil	41
Tabelle 9: Prozentuale Wasseraufnahme des PCP nach 162 Stunden Lagerung (\bar{x} [% (m / m)] \pm s, n = 4) sowie die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts	44
Tabelle 10: Prozentuale Wasseraufnahme des PCP 4,0 nach 260 Stunden Lagerung (\bar{x} [% (m / m)] \pm s, n = 3, bei 58 °C / 30 % und 50 % r. F.: n = 2), sowie die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts	47
Tabelle 11: Prozentuale Wasseraufnahme des PCP 6,8 nach 507 Stunden Lagerung (\bar{x} [% (m / m)] \pm s, n = 3) sowie die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts	50
Tabelle 12: Wassergehalte von PCP 4,0 während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und rel. Feuchten ($\bar{x} \pm s$, n = 2)	53
Tabelle 13: Wassergehalte von PCP 6,8 während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und rel. Feuchten ($\bar{x} \pm s$, n = 2)	53
Tabelle 14: Glasübergangstemperaturen der Festen Dispersionen und Lyophilisate nach 1 Woche Lagerzeit; $\bar{x} \pm s$	55
Tabelle 15: Glasübergangstemperaturen von in Wasser dispergiertem und lyophilisiertem PCP und unverarbeitetem PCP nach 1 Woche Lagerung bei verschiedenen Temperaturen; $\bar{x} \pm s$, n = 2	57
Tabelle 16: Glasübergangstemperaturen der Festen Dispersionen und Lyophilisate nach 15 Woche Lagerzeit; $\bar{x} \pm s$, n = 2	58

Tabelle 17: Viskosität von 0,25 % (m / V) Polycarbophil in Wasser nach Behandlung mit dem Laborrührer (1h) bzw. einem Hochgeschwindigkeitsdispergiergerät (15 min); $\bar{x} \pm s$	61
Tabelle 18: Viskositäten der in verschiedenen Puffern hergestellten Dispersionen und Einfluss des Lyophilisierens; $\bar{x} \pm s$	62
Tabelle 19: Parameter der Nichtlinearen Langmuir-Regression aus der Adsorption von Octreotid an Glas in Citratpuffer pH 4,0; angegeben sind die Werte für a und b, der asymptotic standard error (ase) sowie die obere und untere Grenze des Konfidenzintervalls; $r^2 = 0,904$	65
Tabelle 20: Mögliche Zersetzungsreaktionen des Octreotids	78
Tabelle 21: Durch LC-MS-Kopplung erhaltene Massen der Peaks des Chromatogramms in Abb. 43	84
Tabelle 22: RGK der Zersetzung von Octreotid im Lyophilisat mit Citratpuffer (Oc 4,0)	101
Tabelle 23: RGK der Zersetzung von Octreotid in Fester Dispersion mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0)	102
Tabelle 24: RGK der Zersetzung von Octreotid im Lyophilisat mit Phosphatpuffer (Oc 6,8)	103
Tabelle 25: RGK der Zersetzung von Octreotid in Fester Dispersion mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8)	104
Tabelle 26: Einfluss von pH-Wert, rel. Feuchte, Temperatur auf die RGK (+ PCP)	105
Tabelle 27: Einfluss von pH-Wert, rel. Feuchte, Temperatur auf die RGK (- PCP)	106
Tabelle 28: Einfluss von Polymer, pH-Wert, rel. Feuchte auf die RGK bei 58 °C	107
Tabelle 29: Einfluss von Polymer, pH-Wert, rel. Feuchte auf die RGK bei 66 °C	107
Tabelle 30: Einfluss von Polymer, pH-Wert, rel. Feuchte auf die RGK bei 74 °C	107
Tabelle 31: Einfluss von Polymer, pH-Wert, Temperatur auf die RGK bei 11 % r. F.	108
Tabelle 32: Einfluss von Polymer, pH-Wert, Temperatur auf die RGK bei 30 % r. F.	109
Tabelle 33: Einfluss von Polymer, Temperatur, relativer Feuchte auf die RGK bei pH 4,0	110
Tabelle 34: Einfluss von Polymer, Temperatur, relativer Feuchte auf die RGK bei pH 6,8	110

Tabelle 35: Oc 4,0: Gewichtung der Werte für die Lineare Regression (Signifikanzniveau: 95 %)	112
Tabelle 36: Berechnung der Haltbarkeit für Oc 4,0; Vergleich der Werte aus gewichteter und ungewichteter Linearer Regression (in Klammern: VB 95 %)	113
Tabelle 37: Oc 6,8: Gewichtung der Werte für die Lineare Regression (Signifikanzniveau: 95 %)	114
Tabelle 38: Berechnung der Haltbarkeit für Oc 6,8; Vergleich der Werte aus gewichteter und ungewichteter Linearer Regression (in Klammern: VB 95 %)	115
Tabelle 39: Oc PCP 4,0: Gewichtung der Werte für die Lineare Regression (Signifikanzniveau: 95 %)	116
Tabelle 40: Berechnung der Haltbarkeit für Oc PCP 4,0; Vergleich der Werte aus gewichteter und ungewichteter Linearer Regression (in Klammern: VB 95 %)	116
Tabelle 41: Oc PCP 6,8: Gewichtung der Werte für die Lineare Regression (Signifikanzniveau: 95 %)	118
Tabelle 42: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten aus unterschiedlichen Lösungsmitteln während 293 Tagen Lagerung bei 66 °C / 30 % r. F. (* Oc 6,8: Proben aus der Haltbarkeitsuntersuchung, 178 Tage Lagerzeit)	120
Tabelle 43: Zersetzung des Octreotids in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0); $\bar{x} \pm s$, n = 2	139
Tabelle 44: Zersetzung des Octreotids in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8); $\bar{x} \pm s$, n = 2	140
Tabelle 45: Zersetzung des Octreotids in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0); $\bar{x} \pm s$, n = 2	141
Tabelle 46: Zersetzung des Octreotids in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8); $\bar{x} \pm s$, n = 2	142
Tabelle 47: Zersetzung des Octreotids in Lyophilisaten mit verschiedenen Lösungsmitteln (log k / pH-Profil); $\bar{x} \pm s$, n = 2	143
Tabelle 48: verwendete Gefahrstoffe	159

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ase	asymptotic standard error
Cys	Cystein
d	dies, Tag
DAD	Dioden-Array-Detektor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
FR	Flügelrührer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography Hochdruckflüssigchromatographie
ICH	International Conference on Harmonisation
i. m.	intramuskulär
INN	International Nonproprietary Name for Pharmaceutical Substances
Kap.	Kapitel
LC	Liquid Chromatography Flüssigchromatographie
Lys	Lysin
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
\bar{x}	Mittelwert
Oc 4,0	Lyophilisat aus Octreotid mit Citratpuffer pH 4,0
Oc 6,8	Lyophilisat aus Octreotid mit Phosphatpuffer pH 6,8
Oc PCP 4,0	Feste Dispersion aus Octreotid in Polycarbophil, Citratpuffer pH 4,0
Oc PCP 6,8	Feste Dispersion aus Octreotid in Polycarbophil, Phosphatpuffer pH 6,8
Oc	Octreotid
oG	obere Vertrauensgrenze
p. a.	pro analysi, zur Analyse
PCP	Polycarbophil
Phe	Phenylalanin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
r. F.	relative Feuchte
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RGK	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

s	Standardabweichung
s. c.	subkutan
SPSS	Statistical Package for Social Science
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
T _g	Glasübergangstemperatur
Thr	Threonin
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxidlösung
TMC	N-Trimethylchitosanchlorid
Trp	Tryptophan
uG	untere Vertrauensgrenze
USP	United States Pharmacopeia
UT	Ultra-Turrax [®]
UV	ultraviolett
ZP	Zersetzungsprodukt

1 Einleitung

Durch die Fortschritte in der Biotechnologie stehen immer mehr Arzneimittel mit Peptid- oder Proteinstruktur zur Verfügung. Meistens jedoch ist eine perorale Anwendung dieser Substanzen nicht möglich, da sie durch den niedrigen pH-Wert des Magens oder durch gastrointestinale Enzyme inaktiviert werden können.

Auch die Molekülgröße und die Hydrophilie von Peptid- und Proteinarzneistoffen sind für die geringe Bioverfügbarkeit dieser Arzneistoffe nach oraler Gabe verantwortlich. Die Applikation von Peptid- oder Proteinarzneistoffen erfolgt daher meistens durch Injektion. Zunehmend werden Peptide und Proteine mit Polymeren verarbeitet, um die Freisetzung über einen längeren Zeitraum zu gewährleisten. Verwendung findet hier z. B. Poly(glycolsäure-co-milchsäure) zur Herstellung von Implantaten mit dem Wirkstoff Octreotid (Sandostatin LAR[®]), die nur noch eine monatliche Injektion des Präparates erforderlich machen.

Die meisten Patienten bevorzugen jedoch die orale Anwendung ihrer Arzneimittel, besonders, wenn es sich um eine Dauertherapie handelt. Ziel vieler Forschungsarbeiten war und ist es daher, die Resorption von Peptid- und Proteinarzneistoffen zu verbessern. Hier stehen mehrere Ansatzmöglichkeiten zur Verfügung.

Uraizee, McPhillips, Sakr und Ritschel [81] untersuchten den Einfluss von Resorptionsvermittlern auf die Absorption von Insulin aus dem Ileum und fanden eine Erhöhung der Insulin-Aufnahme durch Natriumdesoxycholat und EDTA. In Anwesenheit von Chenodesoxycholat [21] oder Polyoxyethylen-24-cholesterolether [16] wurde eine vermehrte Absorption des Octapeptids Octreotid gefunden.

Die Resorption von Peptiden kann außerdem durch Beeinflussung der Integrität der tight junctions erhöht werden. Chitosanhydrochlorid, -glutamat und N-Trimethyl-chitosanchlorid (TMC) sind in der Lage, den Transport der Peptid-Arzneistoffe Buserelin [77, 78], 9-Desglycinamid, 8-Arginin Vasopressin und Insulin über Caco-2-Zellschichten zu verbessern [3, 38]. Auch für Octreotid konnte eine vermehrte Absorption in Anwesenheit von TMC nachgewiesen werden [79]. Als Indiz für die Beeinflussung der Dichtigkeit der tight junctions wird die Reduzierung des transepithelialen elektrischen Widerstandes durch diese Substanzen herangezogen.

Die Inaktivierung von Peptidarzneistoffen durch gastrointestinale Enzyme kann auch durch Poly(alkyl-cyanoacrylat)nanokapseln verringert werden, was Damge, Vranckx,

Balschmidt und Couvreur für Insulin nachweisen konnten [14]. Bei Octreotid wurde eine leichte Erhöhung der Plasmakonzentrationen bei Verarbeitung zu derartigen Nanokapseln gefunden [13].

Lueßen zeigte, dass die Polyacrylsäurederivate Polycarbophil und Carbomer potente Inhibitoren der proteolytischen Enzyme Trypsin, α -Chymotrypsin, Carboxypeptidase A und der cytosolischen Leucin-Aminopeptidase sind [47]. Polyacrylsäurederivate sind außerdem in der Lage, den transepithelialen elektrischen Widerstand von Caco-2-Zell-Monoschichten zu verringern, und damit in vitro die Permeabilität von Epithelzellschichten zu beeinflussen [5]. Eine Öffnung der tight junctions durch Polycarbophil wird auch von Kerec et al. diskutiert [36]. Aufgrund seines mucoadhäsiven Charakters [33, 35] kann Polycarbophil außerdem die Absorptionsphase von Peptiden verlängern und damit die Absorption verbessern [46, 89].

Die Verarbeitung eines Peptids zu einer Festen Dispersion mit Polycarbophil stellt eine Möglichkeit dar, eine orale Anwendungsform für Peptide und Proteine zu entwickeln. Der von Chiou und Riegelman eingeführte Begriff der Festen Dispersion bezeichnet Systeme, bei denen eine Komponente dispers in einem festen Träger verteilt ist [12]. Die Verarbeitung von schlecht wasserlöslichen Wirkstoffen mit hydrophilen Polymeren kann auf diese Weise eine Erhöhung der Lösungsgeschwindigkeit bewirken.

Bei Peptiden steht jedoch nicht die Löslichkeitsverbesserung im Vordergrund, sondern die Verlängerung der Verweilzeit im Gastrointestinaltrakt mittels Mucoadhäsion, der Schutz vor gastrointestinalen Enzymen und die Beeinflussung der Dichtigkeit der tight junctions.

Untersuchungen zur physikalischen und chemischen Stabilität eines Peptids in Fester Dispersion mit Polycarbophil wurden bisher nur von Wratschko durchgeführt [86]. In dieser Arbeit werden Feste Dispersionen des Octapeptids Octreotid mit Polycarbophil hergestellt und hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Stabilität untersucht. Es werden die Einflüsse des Polymers, des pH-Wertes, von Lagertemperatur und -feuchte bestimmt.

Außerdem sollen während der Lagerung auftretende Nebenprodukte identifiziert werden.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Materialien

2.1.1 Octreotid

Physikalisch-chemische und pharmakologische Eigenschaften

Das zyklische Octapeptid Octreotid weist strukturelle Ähnlichkeit zum Somatostatin auf, hat aber eine längere Wirkungsdauer.

Der INN-Name lautet: D-Phenylalanyl-L-Cysteinyl-L-phenylalanyl-D-tryptophyl-L-lysyl-L-threonyl-N-[(1R,2R)-2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)propyl]-L-cysteinamidcyclo(2→7)-disulfid.

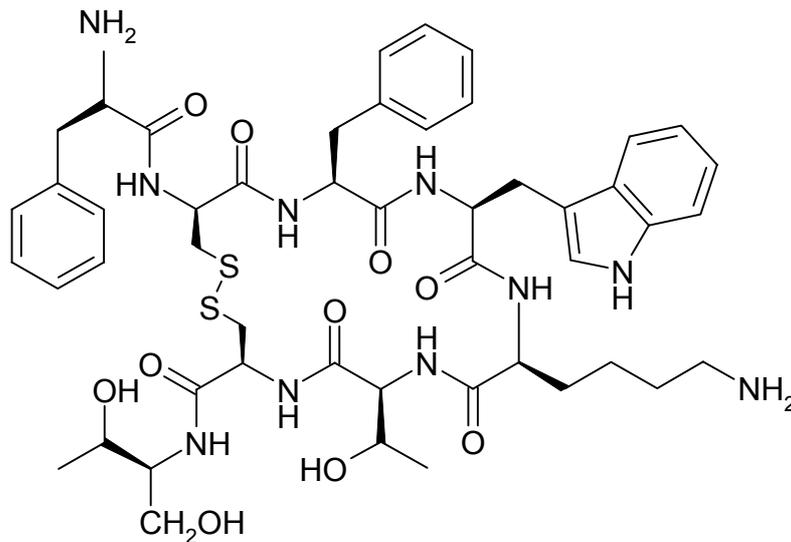


Abbildung 1: Chemische Struktur von Octreotid

H – D-Phe – Cys – Phe – D-Trp – Lys – Thr – Cys – Thr-ol

Summenformel: $C_{49}H_{66}N_{10}O_{10}S_2$

Molekularmasse: 1019,3 g / mol

Es handelt sich um ein nahezu weißes, amorphes Lyophilisat. Octreotid ist zu mehr als 10 mg / ml in Wasser löslich, außerdem in Methanol, Essigsäure und Natriumchloridlösungen. Eine einprozentige wässrige Lösung hat einen pH-Wert von 5,0 – 7,0. Die pKa Werte des Wirkstoffes betragen 7,0 (pKa₁) und 10,15 (pKa₂) [64]. Ein Schmelzpunkt kann nicht angegeben werden, bei 130 °C findet Zersetzung statt. Octreotid ist lichtempfindlich und sehr hygroskopisch.

Die Wirkungsweise des synthetischen Octreotids entspricht der des natürlich vorkommenden hypothalamischen Hormons Somatostatin. Im Gegensatz zu diesem hat es aber eine deutlich verlängerte Plasmahalbwertszeit (Somatostatin: weniger als drei Minuten, Octreotid: 70 – 110 Minuten). Durch die D-Konfiguration des Phenylalanins am N-terminalen Ende ist das Molekül geschützt gegenüber Endopeptidasen [2], auch die Reduktion des C-terminalen Endes zum Alkohol soll die Stabilität erhöhen [59].

Angewendet wird Octreotid zur Behandlung der Akromegalie und zur Therapie endokrinaktiver Tumoren des Magen-Darm-Traktes. Bei intrathekaler Infusion zeigt es auch eine analgetische Wirksamkeit [53].

Die Dosierung beträgt dreimal täglich 50 – 200 µg (in Einzelfällen bis zu 500 µg) s.c., bzw. 10 – 30 mg als Monatsdepot i. m.

Für die Herstellung der Lyophilisate und der Festen Dispersionen wurde Octreotid RP, Charge 06001000 von der Firma Novartis zur Verfügung gestellt. Laut Analysenzertifikat betrug der Gehalt an Octreotid 99,1 %.

2.1.2 Polycarbophil

Bei Polycarbophil handelt es sich um mit Divinylglykol quervernetzte Polyacrylsäure.

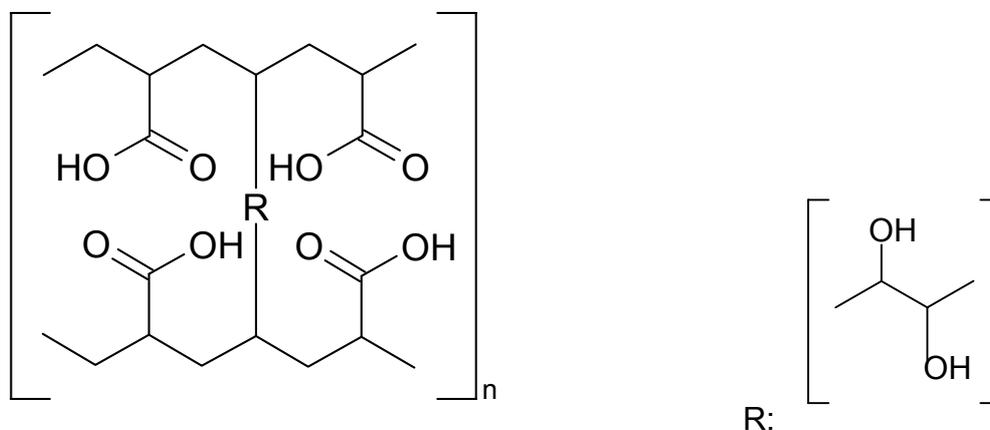


Abbildung 2: Chemische Struktur von Polycarbophil

Polycarbophil ist ein weißliches Pulver mit leicht säuerlichem Geruch. Es ist nicht löslich, aber quellbar in Wasser. Die Quellung ist abhängig vom pH-Wert [11] und von der Ionenstärke. Eine einprozentige wässrige Dispersion hat einen pH-Wert von 2,5 – 3,0. Der pKa-Wert der Substanz beträgt $6,0 \pm 0,5$, die Glasübergangstemperatur des Pulvers liegt bei 100 – 105 °C [8]. Exakte Daten über den Grad der Quervernetzung und das Molekulargewicht sind vom Hersteller nicht erhältlich. Von Kriwet [39] wurde für Polycarbophil ein Carboxylgruppengehalt von 59,1 % bestimmt. Die Partikelgrößen des Pulvers betragen 2 – 7 μm , sie werden aus Teilchengrößen von 0,2 μm produziert und können nach der Produktion nicht wieder in die Einzelteilchen überführt werden [9]. Die Polymerisierung erfolgt in Ethylacetat, von dem noch bis zu 0,45 % im Produkt enthalten sein dürfen (USP 23 [80]).

Aufgrund der mucoadhäsiven Eigenschaften kann Polycarbophil als Hilfsstoff für Arzneimittel eingesetzt werden, die an Schleimhäuten haften sollen, z. B. Buccal-, oder Nasaltabletten und -gele [18, 74].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Polycarbophil (Noveon® AA1, Charge CC9XAAW005) der Firma BFGoodrich verwendet. Laut Analysenzertifikat enthielt dieses 0,30 % Ethylacetat.

2.1.3 Puffer

Die Lyophilisate und die Festen Dispersionen wurden durch Auflösen des Octreotids in verschiedenen Puffern, und – bei Festen Dispersionen – Hinzufügen des Polycarbophils und anschließende Gefriertrocknung hergestellt.

Folgende Pufferlösungen wurden verwendet:

- **Phosphat-Pufferlösung pH 3,0 R (DAB 1997)**
0,69 ml Phosphorsäure 85 % R werden mit 100 ml Wasser gemischt. Die Mischung wird mit Wasser zu 900 ml verdünnt und mit Natriumhydroxid-Lösung 40 % R der pH-Wert auf 3,0 eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser zu 1000 ml verdünnt.
- **Citrat-Pufferlösung pH 4,0 RN (DAB 1997) ***
10,5 g Citronensäure R und 100,0 ml 1 N-Natriumhydroxid-Lösung werden in Wasser zu 500,0 ml gelöst. Mit der Lösung werden 100,0 ml 0,1 N-Salzsäure zu 250,0 ml verdünnt.
⇒ in 1000 ml: 12,6 g Citronensäure-Monohydrat
- **Phthalat-NaOH-Mischung pH 4,0 (nach Clark und Lubs [26])**
50 ml 0,2 M-Kaliumhydrogenphthalat-Lösung und 0,40 ml 0,2 N-Natriumhydroxid-Lösung werden mit Wasser zu 200,0 ml verdünnt.
⇒ in 1000 ml: 10,2 g Kaliumhydrogenphthalat
- **Pufferlösung pH 5,5 RN (DAB 1997)**
9,054 g Citronensäure R und 40,796 g Natriummonohydrogenphosphat R werden zu 1000,0 ml gelöst.
- **Phosphat-Pufferlösung pH 6,8 R (DAB 1997) ***
77,3 ml einer 7,15prozentigen Lösung (m / V) von Natriummonohydrogenphosphat R und 22,7 ml einer 2,1prozentigen Lösung (m / V) von Citronensäure R werden gemischt.
⇒ in 1000 ml: 55,3 g Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat
4,8 g Citronensäure-Monohydrat
- **Ammoniumchlorid-Pufferlösung pH 10,0 R (DAB 1997)**
5,4 g Ammoniumchlorid R werden in 20 ml Wasser gelöst. Nach Zusatz von 35,0 ml Ammoniak-Lösung 17 % R wird mit Wasser zu 100,0 ml verdünnt.
⇒ in 1000 ml: 54 g Ammoniumchlorid

Die mit * gekennzeichneten Pufferlösungen wurden zur Herstellung der Proben für die Stabilitätsuntersuchungen sowie die physikalischen und physikochemischen Untersuchungen verwendet. Sie werden im weiteren Verlauf mit Oc 4,0, Oc PCP 4,0 und PCP 4,0 sowie Oc 6,8, Oc PCP 6,8 und PCP 6,8 bezeichnet. Für die Erstellung des log k / pH-Profiles kamen auch die übrigen Pufferlösungen zur Anwendung.

2.2 Problemstellung

Es sollen Zubereitungen aus Octreotid und Polycarbophil hergestellt und die Stabilität hinsichtlich verschiedener Einflussfaktoren beurteilt werden. Die chemische Stabilität des Octapeptids Octreotid wird dazu im Hinblick auf die Auswirkungen der Lagerfeuchte und –temperatur untersucht. Außerdem soll abgeschätzt werden, welchen Einfluss der pH-Wert der Lyophilisate, die An- oder Abwesenheit von Polycarbophil sowie physikalische Veränderungen der Proben auf die Stabilität des Peptidarzneistoffes haben. Stabilitätsbeeinflussende Faktoren sollen mit Hilfe statistischer Methoden ausgewertet und gewichtet werden.

Der Zersetzungsverlauf des Wirkstoffes Octreotid wird während der Lagerzeit mittels HPLC bestimmt, die Nebenprodukte, die in dieser Zeit entstehen, sollen durch LC-MS-Kopplung identifiziert werden. Feste Dispersionen des Peptids Desmopressin in Polycarbophil wurden von Wratschko [86] analysiert.

Die dort ermittelten Stabilitätsdaten sollen mit denen des Octreotids verglichen werden. Die von Wratschko [86] entwickelte Herstellungsmethode für Feste Dispersionen soll weiter untersucht werden. Hierzu werden Viskositätsmessungen an Polycarbophil-Dispersionen durchgeführt.

Die physikalischen Veränderungen der Proben sollen über die Bestimmung des Wassergehaltes sowie DSC-Untersuchungen verfolgt werden.

Das verwendete Polymer sowie der Wirkstoff sollen physikalisch-chemisch charakterisiert werden.

3 Methoden

3.1 Analytik

Um das Octreotid, das Polycarbophil sowie die Lyophilisate und die Festen Dispersionen zu charakterisieren, wurden verschiedene analytische Methoden herangezogen.

3.1.1 Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC)

Da bei der Stabilitätsuntersuchung der octreotidhaltigen Festen Dispersionen und der Lyophilisate sehr große Probenanzahlen qualitativ und quantitativ analysiert werden sollten, erwies sich die HPLC als geeignete Analysenmethode [60]. Sie ist sehr gut automatisierbar und zeichnet sich durch relativ kurze Analysenzeiten aus.

3.1.1.1 Methodenentwicklung

Es sollte eine Methode entwickelt werden, mit der Octreotid quantitativ und selektiv sowie die Zersetzungsprodukte aus der Lagerung qualitativ nachgewiesen werden können. Dazu wurden verschiedene Methoden getestet und variiert, so dass die Einflüsse von Fließmittelzusammensetzung, Temperatur, Säulenmaterial und apparativen Parametern beurteilt werden konnten.

Viele der für die Analytik von Octreotid und anderen Somatostatin-Analoga veröffentlichten HPLC-Methoden verwenden als Fließmittel Tetramethylammoniumhydroxidlösungen im Gemisch mit Acetonitril und Wasser [25, 41, 44]. Hier traten aber z. T. relativ lange Retentionszeiten auf, was die Methoden für die Routineanalytik großer Probenmengen ausschloss. Außerdem waren die Nebenprodukte meistens nicht ausreichend getrennt. Mit Fließmitteln aus Trifluoressigsäure (TFA), Wasser und Acetonitril konnten kürzere Retentionszeiten und bessere Trennungen von Peptid und Zersetzungsprodukten erzielt werden. Das von Kuhn et al. [41] beobachtete signifikante Peaktailing bei Verwendung von TFA zur Analyse von Octreotid konnte nicht bestätigt werden. Ein weiterer Vorteil ist die mögliche Verwendung dieser Eluenten in der Kopplung von HPLC mit der Massenspektrometrie [siehe 3.1.3]. Als problematisch erwies sich die Abtrennung

des in den Festen Dispersionen enthaltenen Polycarbophils. Dies wurde zwar vor der HPLC-Analytik mittels Zentrifugation (30 Minuten, 3000 x g) abgetrennt, aber der verwendete Überstand enthielt anscheinend noch Reste des Polymers, was sich durch Druckanstieg im System nach wenigen Einspritzungen zeigte. Durch den Einbau einer weiteren Vorsäulenkartusche konnte das Problem behoben werden.

Folgende Parameter wurden während der Methodenentwicklung variiert:

Säulenmaterial:

Phenomenex[®] Prodigy ODS (3), 5 µm, 100 Å, 250 x 4,6 <10>

Phenomenex[®] Aqua, 5µ, C18, 125 Å, 250 x 4,6 mm <12>

Vorsäulen:

Phenomenex[®] Prodigy ODS (3) RP 18, 30 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å <11>

Phenomenex[®] C18 (ODS, Octadecyl), 4 mm L x 3,0 mm ID, Security Guard <13>

Säulentemperatur:

Raumtemperatur (RT)

40 °C

50 °C

Fließmittel:

Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung (TMAH-Lösung) – Wasser – Acetonitril (ACN), pH 4,5* (eingestellt mit o-Phosphorsäure), verschiedene Gradienten

TMAH-Lösung – Wasser – ACN pH 2,0* (eingestellt mit o-Phosphorsäure), verschiedene Gradienten

TMAH-Lösung – Wasser – ACN pH 5,5* (eingestellt mit o-Phosphorsäure), verschiedene Gradienten

Wasser – ACN mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), pH 2,0*, verschiedene Gradienten

*: Kalibrierung des pH-Meters siehe Kap. 3.1.2

Geräte:

Pumpe:	P100 (P1000), Spectra Series, Thermo separation products <14>
Degasser:	X-Act, 4-Channel, Jour Research <15>
Autosampler:	HPLC 360 Autosampler, Kontron Instruments <16>
Detektor:	BT 8200, HPLC UV / Vis-Detektor, Biotronik <18>
Autosampler:	Marathon, Spark Holland <17>
Detektor:	Knauer Spektralphotometer Nr. A 0293, Variable Wavelength Monitor <19>

3.1.1.2 Validierung

Validierte Methode:

Pumpe:	P100 (P1000), Spectra Series, Thermo separation products <14>
Degasser:	X-Act, 4-Channel, Jour Research <15>
Autosampler:	HPLC 360 Autosampler, Kontron Instruments <16>
Detektor:	BT 8200, HPLC UV / Vis-Detektor, Biotronik <18>
Datenaufnahme:	A / D-Wandlertkarte, SCPA GmbH <22>
Software:	ChromStar 4.06 SCPA GmbH <S3>
Säule:	Phenomenex [®] Aqua, 5 μ , C18, 125 Å, 250 x 4,60 mm <12>
Vorsäule:	C18 (ODS, Octadecyl), 4 mm L x 3,0 mm ID, Security Guard, Phenomenex [®] (doppelt) <13>
Filter:	Upchurch A 103x <20>
Fließmittel:	A: 75 T Wasser + 25 T Acetonitril / jeweils mit 0,1 % TFA B: 60 T Wasser + 40 T Acetonitril / jeweils mit 0,1 % TFA
Gradient:	100 % A zu 100 % B in 25 min
Flußrate:	1 ml / min
Wellenlänge:	210 nm
Einspritzvolumen:	20 μ l
Retentionszeit des Octreotids:	ca. 12 min.

Verwendete Materialien: Acetonitril, Art. Nr. A/0627/17, Fisher Chemicals
Trifluoressigsäure, Art. Nr. 61030, Riedel-de Haën

Die Fließmittel wurden jeweils direkt vor der Verwendung hergestellt, das verwendete Wasser wurde frisch destilliert. Der pH-Wert des wässrigen Elutionsmittelanteils betrug 2,0. Die einzelnen Fließmittelanteile wurden in getrennten Volumina abgemessen und zusammengegeben. Danach erfolgte eine zehnminütige Behandlung im Ultraschallbad <46> zur Entgasung.

Probenvorbereitung:

Die in den HPLC-Vials <21> gelagerten Proben wurden redispergiert, indem mit einer Eppendorf-Pipette <38> 1,000 ml Wasser hinzugefügt wurde. Die verwendete Eppendorf-Pipette hat nach Herstellerangaben eine Richtigkeit von $\pm 0,6 \%$ und eine Präzision von $\leq 0,3\%$. Diese Werte wurden durch Kalibrierung der Pipette mit Wasser (24 °C) auf der Analysenwaage <55> überprüft, wobei eine Richtigkeit von $\pm 0,86 \%$ und eine Präzision von $\leq 0,24 \%$ festgestellt wurden. Die redispergierten Proben wurden eine Stunde auf dem Horizontalschüttler <43> bei Stufe 3 geschüttelt. Es folgte eine 30minütige Zentrifugation <62> (3000 x g). Der Überstand wurde in ein zweites Vial abpipettiert <39> und erneut zentrifugiert (10 min). Die Vials waren bis zur Einspritzung dicht verschlossen. Aus jedem Vial wurden drei Einspritzungen vorgenommen.

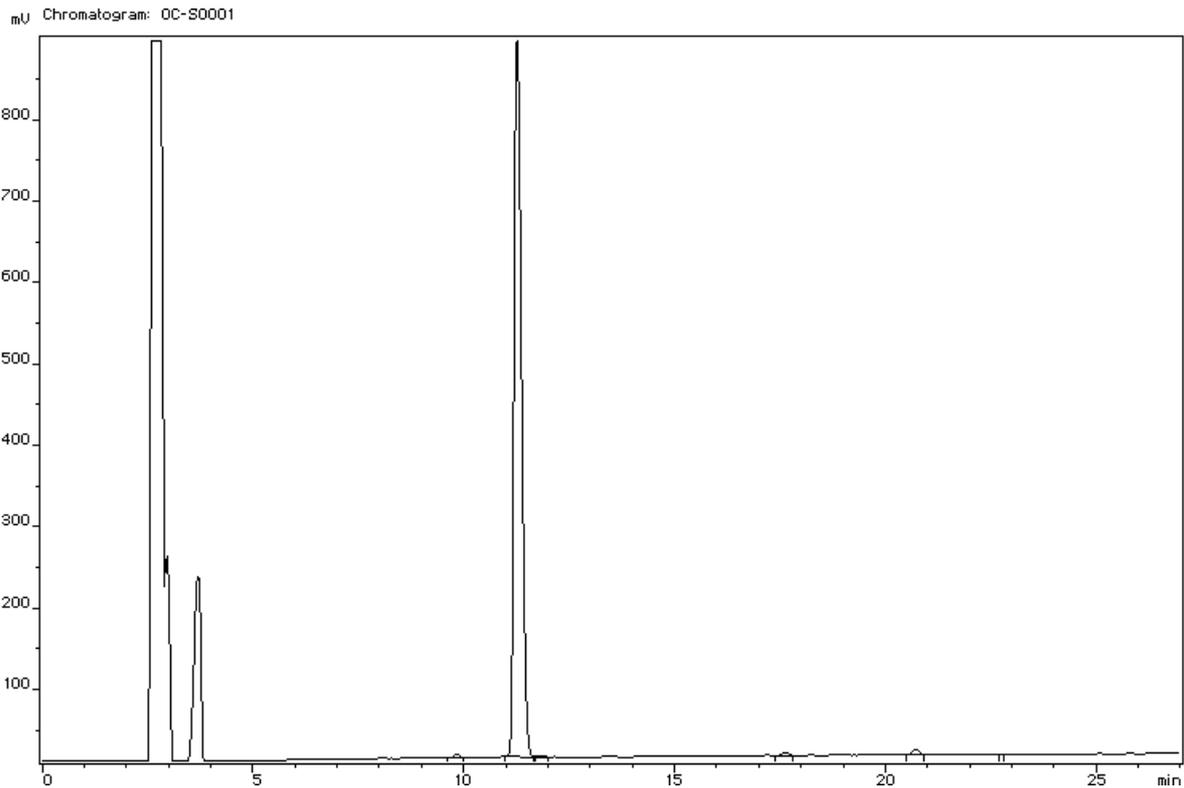


Abbildung 3: Chromatogramm von Octreotid, aufgenommen mit der validierten HPLC-Methode

3.1.1.2.1 Peakreinheit

Nach den ICH-Guidelines [28] muss die Peakreinheit überprüft werden. Dies kann entweder durch einen Dioden-Array-Detektor geschehen oder mit Hilfe der LC-MS-Kopplung. Letztere Möglichkeit wurde hier verwendet. Geräteparameter und Methodenbeschreibung finden sich in Kap. 3.1.3.

Das nachfolgend dargestellte Massenspektrum des Octreotids zeigt das durch die positive Ionisierung entstehende Signal für $M + 1$ bei 1019, das Na^+ -Addukt bei 1041 und das K^+ -Addukt bei 1057 m/z . (Es wurde für die LC-MS-Untersuchungen die isotopenfreie Masse des Octreotids von 1018 g/mol zu Grunde gelegt; vgl. auch Kap. 4.2.2).

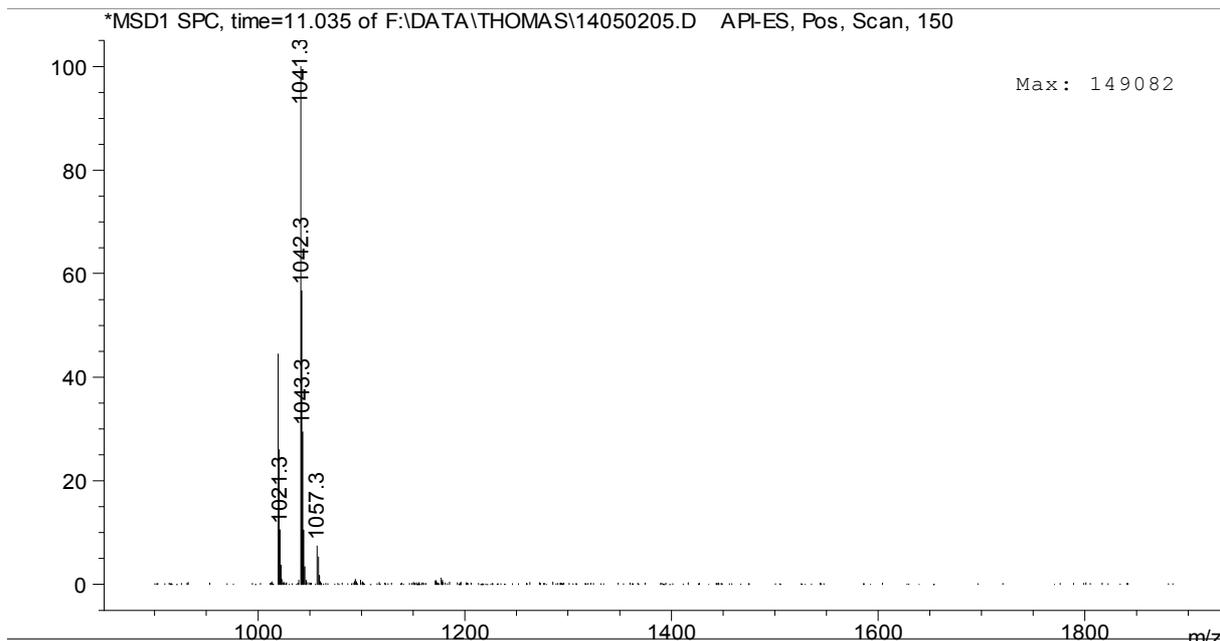


Abbildung 4: Massenspektrum des Octreotids (LC-MS)

3.1.1.2.2 Zuverlässigkeit

Um zu beweisen, dass ein HPLC-System generell für die Analytik einer bestimmten Substanz eingesetzt werden kann, verlangt die USP 23 [80] den System Suitability Test. Die relative Standardabweichung der Peakflächen darf dabei nicht mehr als 2 % betragen. Der Tailing-Faktor soll zwischen 0,8 und 1,2 liegen.

Der „Systemeignungstest“ umfasst Geräte, Methode, Proben und Rechner und muss mit realen Proben durchgeführt werden [40].

Durchführung:

Die frisch hergestellte Octreotid-Lösung, die den Wirkstoff in mittlerer Konzentration enthielt, wurde auf zwei Vials aufgeteilt. Unter gleichen chromatographischen Bedingungen wurden aus jedem Vial sechs Injektionen vorgenommen. Dieser Test wurde für die PCP-haltigen und für die PCP-freien Proben bei jeweils beiden pH-Werten durchgeführt (Oc 4,0, Oc 6,8, Oc PCP 4,0, Oc PCP 6,8).

Sowohl die relativen Standardabweichungen der Retentionszeiten, als auch die der Peakflächen lagen bei den sechs Einzelwerten und bei den zwölf Werten aus zwei Vials bei jedem System unter den maximal erlaubten 2 %.

Tabelle 1: relative Standardabweichungen der Retentionszeiten (Rt) und der Peakflächen (Area), n = 12

	Rt [%]	Area [%]
Oc 4,0	0,40	0,32
Oc 6,8	0,31	0,38
Oc PCP 4,0	0,37	0,46
Oc PCP 6,8	0,36	0,77

Der Tailing-Faktor (Symmetriefaktor) lag bei allen untersuchten Chromatogrammen zwischen 0,8 und 1,2.

3.1.1.2.3 Spezifität

Die nachzuweisende Substanz muss ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten erfasst und eindeutig identifiziert werden können.

Durchführung:

Es sollen Lösungen der einzelnen Komponenten und eine Mischung aller Komponenten eingespritzt und analysiert werden. Der daraus zu bestimmende Kapazitätsfaktor k' sollte zwischen 1 und 10 liegen, die Auflösung sollte > 1 sein [22]. Da von dem Peptid Octreotid keine Zersetzungsprodukte zur Verfügung standen, wurden verschiedene Proben thermisch belastet. Von jedem System (mit / ohne PCP, pH 4,0 und pH 6,8) wurde je eine Lösung für vier Stunden bei 100 °C im Trockenschrank aufbewahrt. Außerdem wurden Feste Dispersionen und Lyophilisate der verschiedenen Proben für eine Woche bei 70 °C und 30 % r. F. im Klimaschrank <56> gelagert.

Kapazitätsfaktor und Auflösung erfüllten die oben genannten Bedingungen. k' lag immer zwischen 1 und 10 (durchschnittlich 3,75), die Auflösung war > 1 (1,5 – 5,2).

3.1.1.2.4 Stabilität der Probelösung

Die Verwendung eines Autosamplers kann zu längeren Standzeiten der Proben führen, welche sich während dieser Zeit nicht zersetzen dürfen.

Es wird geprüft, ob es während eines bestimmten Zeitraumes zu einer signifikanten Verringerung der Peakflächen gekommen ist.

Durchführung:

Die Lösungen aus dem Test auf Zuverlässigkeit wurden nach mindestens drei Tagen erneut 6 mal eingespritzt.

Der Vergleich der Standardabweichungen und Mittelwerte durch F- und t-Test mit denen der ersten Injektionen ergab keinen signifikanten Unterschied ($\alpha = 0,05$).

Die Probelösungen sind also mindestens drei Tage stabil, in dieser Zeit kommt es zu keiner signifikanten Zersetzung.

3.1.1.2.5 Erstellung einer Kalibriergeraden

In der Literatur gibt es eine Reihe von Vorschlägen über die Mindestanzahl von Konzentrationsniveaus, die zur Erstellung einer Kalibrierfunktion verwendet werden sollten. Es sind mindestens fünf Konzentrationen notwendig, um eine eventuelle Krümmung der Funktion feststellen zu können, was auch von den ICH-Richtlinien [28] empfohlen wird. Üblicherweise werden sechs Konzentrationsniveaus verwendet, in DIN 38402 werden zehn Werte vorgeschlagen.

Es sollte der gesamte zu erwartende Konzentrationsbereich abgedeckt werden.

Nach einer Kalibrierung dürfen keine Veränderungen an den experimentellen Bedingungen vorgenommen werden. Daher wurden während der gesamten Analysenserie die Reinheitsgrade und Hersteller der Reagenzien nicht gewechselt und die apparativen Parameter beibehalten. Nach Beendigung der Analysenserie wurde eine erneute Kalibrierung durchgeführt.

Die Verdünnungen wurden mit einer auf Genauigkeit überprüften Eppendorf-Pipette <38> durchgeführt.

Durchführung:

Aus zwei Einwaagen <54> an zwei verschiedenen Tagen wurden je sechs Konzentrationen hergestellt. Da für die unterschiedlich gepufferten Lyophilisate und Festen Dispersionen einzelne Kalibrierfunktionen bestimmt wurden, erfolgte die Verdünnung mit dem jeweiligen Medium (Puffer pH 4,0 oder 6,8 bzw. Puffer + PCP pH 4,0 oder 6,8). Jede Lösung wurde dreimal injiziert. So wurden vier Kalibrierfunktionen erhalten.

Die Vertrauensbereiche der Steigung und des Ordinatenabschnittes einer Linearen Regression wurden für jeden Versuchstag bestimmt und mit denen des anderen Versuchstages verglichen. Wenn kein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$) zwischen den Messreihen bestand, wurden diese zusammengelegt und erneut eine Lineare Regression durchgeführt.

Die statistischen Voraussetzungen für eine Kalibrierung wurden mit Hilfe des Programmes TOCCATA <S2> geprüft. Es erfolgt dort eine Prüfung auf Gaußsche Normalverteilung der Response nach David auf einem Sicherheitsniveau von 90 % [63], die Gruppenvarianzen werden nach Cochran getestet. Die Residuen (vertikale Abstände der Messwerte von der Regressionskurve) können graphisch kontrolliert werden.

Die Prüfung auf Linearität wird im Programm TOCCATA <S2> nach Mager [48] durchgeführt. Es wurde eine homogene Regression durchgeführt, wenn kein statistisch signifikanter Unterschied zum Ursprung nachweisbar war ($\alpha = 0,05$). Da alle Kalibrierfunktionen durch den Ursprung gingen, konnten Nachweis- und Bestimmungsgrenze von TOCCATA <S2> nach Montag [50] berechnet werden.

3.1.1.2.6 Präzision

Die Präzision kann als Maß für die Streuung von Analyseergebnissen betrachtet werden. Unter Wiederholbedingungen sind mit identischen Geräten, Proben, Bearbeitern und Verfahren erhaltene Ergebnisse zu verstehen (Wiederholungspräzision, Maß für die Reproduzierbarkeit).

Durchführung:

Es wurden die jeweils 12 Injektionen für jede Probenreihe aus dem Test auf Zuverlässigkeit [vgl Kap. 3.1.1.2.2] ausgewertet.

Folgende Werte wurden ermittelt:

Oc 4,0: $\pm 0,20$ nmol / ml

Oc 6,8: $\pm 0,26$ nmol / ml

Oc PCP 4,0: $\pm 0,31$ nmol / ml

Oc PCP 6,8: $\pm 0,50$ nmol / ml

Tabelle 2: Zusammenfassung der HPLC-Validierung

	Steigung	Bestimmungsgrenze		Nachweisgrenze	
	[ml / μ g]	[μ g / ml]	[nmol / ml]	[μ g / ml]	[nmol / ml]
Oc 4,0	37900 ± 277	3,68	3,41	1,84	1,71
Oc 6,8	37240 ± 432	6,35	5,89	3,17	2,94
Oc PCP 4,0	24870 ± 529	8,89	8,25	4,44	4,12
Oc PCP 6,8	30240 ± 1064	14,86	13,78	7,43	6,89

3.1.2 Kalibrierung der pH-Meter

Die pH-Werte der Puffer wurden bei Raumtemperatur mit pH-Metern <35, 36, 37> überprüft. Das Metrohm-Gerät <35> wurde vor der Messung mit zwei Pufferlösungen (pH 7,00 \pm 0,02, Phosphat-Puffer, Merck, Art. 1.09439.1000 und pH 3,00 \pm 0,02, Citrat-Salzsäure-Puffer, Merck, Art. 1.09434.1000) kalibriert.

Die Kalibrierung des pH-Meters von Mettler <36, 37> erfolgte mit den Pufferlösungen pH 4,01 (pH 4,00 \pm 0,02, Mettler Toledo, Art. Nr. 9863) und pH 7,00 (pH 7,02 \pm 0,02, Mettler Toledo, Art. Nr. 9865).

3.1.3 Kopplung HPLC – Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie findet in der Arzneistoff-Analytik verbreitet Anwendung. Sie besitzt eine große Spezifität und es sind nur sehr geringe Substanzmengen nötig. Ein Fragmentierungsbild kann zusammen mit der relativen Molekülmasse zur Identifizierung von Substanzen – auch aus gleichen Stoffgruppen – führen. Um qualitative Aussagen über Substanzgemische machen zu können, wird die Massenspektrometrie mit chromatographischen Verfahren kombiniert. Da die Massenspektrometrie unter Hochvakuumbedingungen arbeitet, die HPLC dagegen in hohen Druckbereichen mit flüssigen mobilen Phasen, ist die Kombination dieser beiden Verfahren erst mit der Entwicklung effektiver Interfaces zwischen LC und MS [85] zu einer routinemäßig anwendbaren Methode geworden. Auch wenn die heutigen Geräte in der Lage sind, die für die HPLC üblichen Elutionsvolumina an mobiler Phase zu verdampfen, ist doch in manchen Fällen ein Wechsel des Puffers nötig, da z. B. Phosphatpuffer im Eluenten zwischen den Systemen auskristallisieren kann. Da das hier verwendete Fließmittelgemisch keine derartigen Puffersalze aufwies, konnte es auch für die Untersuchungen mittels LC-MS-Kopplung genutzt werden. Auch Säule und Vorsäule wurden nicht verändert, so dass eine geringfügige Änderung der Retentionszeiten im LC-MS-System nur auf veränderte apparative Parameter zurückgeführt werden kann (verändertes Totvolumen).

Gerätekonfiguration:

Hewlett Packard Series 1100, HP GmbH, D-76337 Waldbronn

Pumpe: G 1312 <23>

Degasser: G 1322 <24>

Autosampler: G 1313 <25>

UV-Vis-Detektor: G 1314 <27>

Fluoreszenzdetektor: G 1321 A <28>

Diodenarraydetektor: G 1315 B <29>

MS: HP MSD-System: G 1946 A / A 1947 A für Elektrospray- und chem. Ionisation <26>

MS-Bedingungen:Elektrospray-Ionisation, Atmospheric Pressure (AP-ESI-MS⁺)

Dry Gas Flow: 10 l / min

Dry Gas Temperature: 350 °C

Nebulizer Pressure: 50 psi

Capillary Voltage: 4000 V

Fragmentorspannung: 320 V, 150 V

Scanbereich der Masse: 500 – 1300 m/z

Chromatographische Bedingungen:Säule: Phenomenex[®] Aqua, 5µ, C 18, 125 Å,
250 x 4,60 mm <12>Vorsäule: C 18 (ODS, Octadecyl), 4 mm L x 3,0 mm ID, Security
Guard, Phenomenex[®] <13>

Säulentemperatur: Raumtemperatur

Injektionsvolumen: 50 µl, 100 µl

Fließmittel: A: 75 T Wasser + 25 T Acetonitril (jeweils mit 0,1 % TFA)
B: 60 T Wasser + 40 T ACN (jeweils mit 0,1 % TFA)

Flußrate: 1 ml / min

Gradient: 100 % A zu 100 % B in 25 Minuten

Detektion: DAD 280 nm <29>

DAD 210 nm <29>

Fluoreszenzdetektor 270 nm <28>

MS-Detektor <26>

Die verwendeten Reagenzien wurden in „pro analysi“ Qualität bezogen und so verwendet.

Die folgende Abbildung zeigt die mit den verschiedenen Detektionsmethoden erhaltenen Chromatogramme.

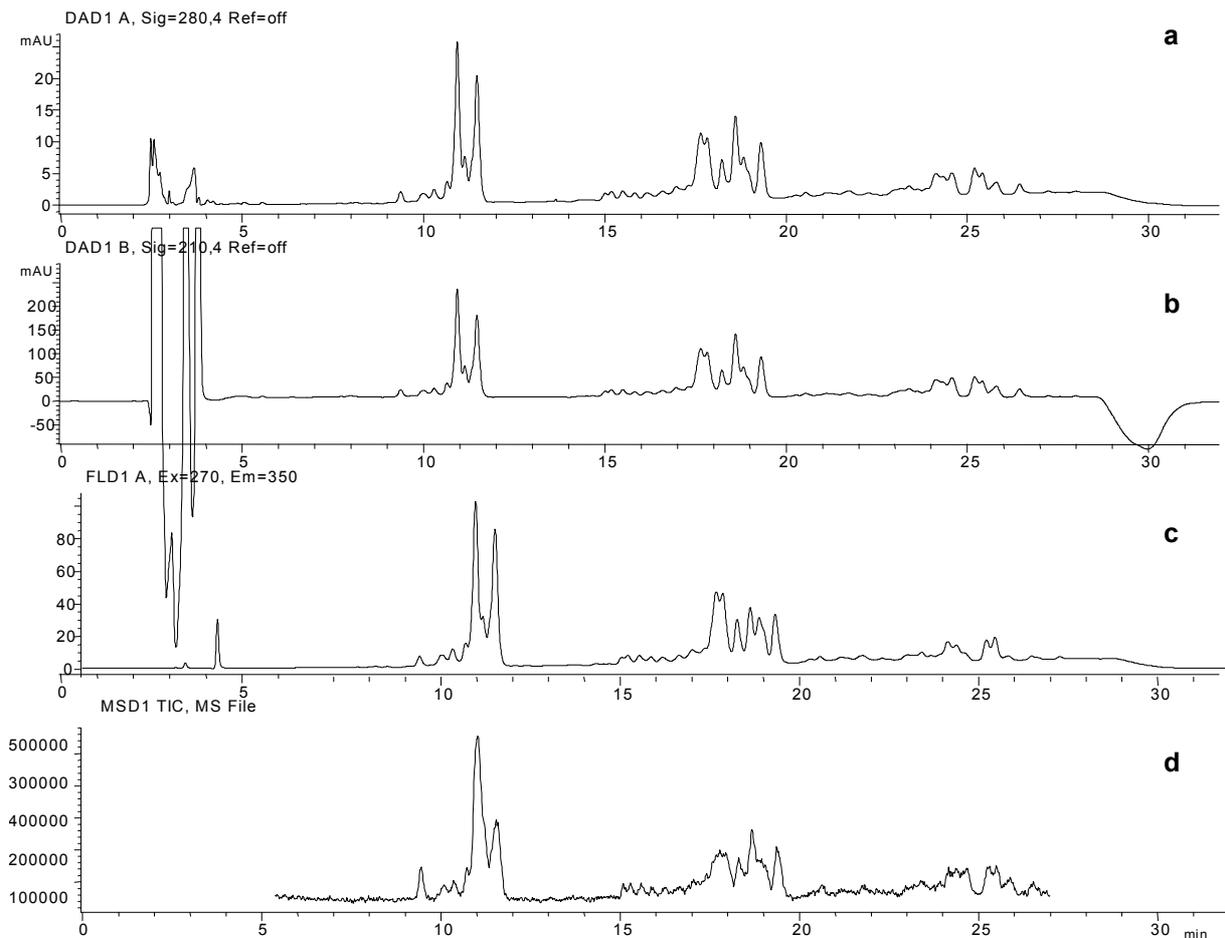


Abbildung 5: Chromatogramme des Octreotids mit Zersetzungsprodukten aus der Lagerung, Detektion: a) DAD 280 nm, b) DAD 210 nm, c) Fluoreszendendetektion 270 nm, d) MS-Detektion

Aus den Chromatogrammen ist ersichtlich, dass mit UV-, Fluoreszenz- und MS-Detektion die gleichen Substanzen nachweisbar sind.

3.1.4 Wasserdampfsorption

Die Herstellung der Festen Dispersionen erfolgt durch Gefriertrocknung. Es entstehen also Lyophilisate, die relativ hygroskopisch sind.

Der Wasseranteil in den Festen Dispersionen kann einen Einfluss auf die Zersetzung des verarbeiteten Arzneistoffes haben und zusätzlich über die Beeinflussung der Glasübergangstemperatur des Polymers die Stabilität des Wirkstoffes indirekt beeinträchtigen.

Die sorbierte Wassermenge wurde gravimetrisch unter Verwendung von Schepky-Gefäßen bestimmt [65]. Diese Glasgefäße erlauben eine gravimetrische Erfassung der Wasseraufnahme mit nur geringer Störung des Lagerklimas für die Probe. Das jeweilige Lagerklima wurde durch unterschiedliche gesättigte Salzlösungen hergestellt. Eine Überprüfung erfolgte mit dem Novasina-Feuchtemessgerät <45>, welches vorher mit Kalibriertabletten (SAL-33, SAL-53, SAL-90, Fa. Schulz Electronic, D-Höhenkirchen) bzw. eigenen Salzlösungen kalibriert wurde. Die Gefäße lagerten in Wärmeschränken, deren Temperatur zwei bis drei mal wöchentlich kontrolliert wurde. Die Lagerdauer betrug für PCP 4,0 260 h, für PCP 6,8 507 h und für unbearbeitetes PCP 162 h.

Tabelle 3: Temperaturen und relative Feuchten für die Bestimmung der Wasserdampfsorption mit Literaturwerten; angegeben sind die durchschnittlichen gemessenen Temperaturen \pm Standardabweichung

Verwendetes Salz	Temperatur [°C] -gemessener Wert-	r. F. [%] -gemessener Wert-	r. F. [%] -Literaturangaben-
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	25 \pm 0,0	27,3 \pm 0,3	32,8 \pm 0,1 (N)
	35 \pm 0,1	32,5 \pm 0,3	32,0 \pm 0,4 (N)
	50 \pm 0,0	33,7 \pm 0,8	30,5 \pm 0,2 (N)
	58 \pm 0,3	31,9 \pm 0,3	30,3*
K ₂ CO ₃	35 \pm 0,1	43,2 \pm 0,8	43,6 \pm 0,2 (S)
	50 \pm 0,0	43,8 \pm 1,6	42,8 \pm 0,6 bis 1,0 (S)
NaCl	25 \pm 0,0	71,3 \pm 2,8	75,5 \pm 0,3 bis 0,5 (S)
	35 \pm 0,1	71,4 \pm 0,6	75,1 (S)
	50 \pm 0,0	69,1 \pm 1,9	74,8 \pm 0,2 (S)
	58 \pm 0,3	80,8 \pm 0,5	74,9 (S)
Na Br · 2 H ₂ O	58 \pm 0,3	53,5 \pm 1,3	49,9*
Mg ₂ NO ₃ · 6 H ₂ O	25 \pm 0,0	49,0 \pm 0,3	53,4 \pm 0,3 bis 0,5 (S)

T: 25 und 58 °C: n = 3, 35 und 50 °C: n = 2
r. F.: 25 und 58 °C: n = 3, 35 und 50 °C: n = 4

(S): nach Stahl [75]

(N): nach Nyqvist [52]

* : bei 60 °C

verwendete Salze: Kaliumcarbonat reinst, Merck 4924
Magnesiumchlorid-Hexahydrat reinst, Merck 1.05832.1000
Magnesiumnitrat-Hexahydrat purum p.a., Fluka 63079
Natriumbromid reinst, Riedel-de Haën 02119
Natriumchlorid zur Analyse, Merck 6404.1000

Es wurden sowohl reines Polycarbophil als auch Lyophilisate aus PCP mit Citratpuffer pH 4,0 und mit Phosphatpuffer pH 6,8 untersucht. Die Proben wurden vor der Einwaage <52> in die Schepky-Gefäße mindestens 24 Stunden über Phosphorpentoxid (Siccapent mit Indikator, Merck, Art.-Nr. 1.00543.2800, Ch. ZC 100643215) gelagert bzw. direkt nach Gefriertrocknung verwendet. Diese Einwaagen lieferten die Werte der wasserfreien Substanz, welche von den späteren Massen abgezogen und auf welche die prozentuale Wasseraufnahme bezogen wurde.

3.1.5 Wassergehaltsbestimmung

Während der Einlagerungszeit sollte zu bestimmten Zeitpunkten der Wassergehalt der bei verschiedenen relativen Feuchten und Temperaturen gelagerten Proben untersucht werden. Es sollte daher eine Methode gefunden werden, die routinemäßig auch für eine große Probenanzahl anwendbar ist.

3.1.5.1 Thermogravimetrie

Wenn in der Probe keine weiteren Substanzen enthalten sind, die in dem untersuchten Temperaturbereich flüchtig sind, ist es mit thermogravimetrischen Methoden möglich, festzustellen, ob und wie fest das Wasser in der Substanz gebunden ist. Es sind daher auch quantitative Aussagen über den Gesamtwassergehalt möglich.

Es wurde eine Thermowaage TG 760 <60> (Stanton Redcroft) verwendet. Der Ofen wurde mit Wasser gekühlt (100 ml / min), es wurde ein Stickstoffstrom von 30 ml / min eingestellt. Die Einwaagen betragen zwischen 2,4 und 9,2 mg. Vor Beginn der Messungen wurde täglich die Anzeige kalibriert. Die Heizgeschwindigkeit betrug 50 °C / min (Natriumtartrat-Dihydrat: 20 – 150 °C, 15 min, PCP-Proben: 20 –

125 °C, 10 min; nach Erreichen der Endtemperatur wurde die Temperatur bis zum Ende der vorgegebenen Messzeit konstant gehalten).

Die Überprüfung der Richtigkeit erfolgte mit Natriumtartrat-Dihydrat (Hydranal-Standard, Riedel-de Haën, Art.-Nr. 34803, Wassergehalt: 15,66 % (m / m) \pm 0,05 %), es wurde ein Wassergehalt von 15,63 % (m / m) \pm 0,28 % gefunden (n = 6). Außerdem wurde die Methode mit den Proben aus den Schepky-Gefäßen getestet.

Hier zeigte sich, dass es innerhalb der einzelnen Messreihen und bei den Ergebnissen zu starken Schwankungen kam. Außerdem war der ermittelte Wassergehalt von der Maximaltemperatur abhängig. Wenn bis 200 °C aufgeheizt wurde, ergab sich für über Magnesiumnitrat-Hexahydrat (50 % r. F.) gelagertes PCP ein Wassergehalt von 7,41 \pm 0,94 % (m / m), bei einer Maximaltemperatur von 250 °C wurde ein Gewichtsverlust von 10,03 \pm 0,15 % (m / m) bestimmt (n = 3).

Für die Routineanalytik des Wassergehaltes während der Lagerungszeit wurde daher die Karl-Fischer-Titration verwendet.

3.1.5.2 Karl-Fischer-Titration

Für die Wassergehaltsbestimmung nach Karl Fischer wurde das Gerät Schott Titroline KF <59> (Schott-Geräte GmbH) verwendet. Es wurden für die Titration ca. 20 ml Hydranal-Solvent (Riedel-de Haën, Art.-Nr. 34800, Lot. 03220) im Titriergefäß vorgelegt. In einer Vortitration wurden eventuelle Wasserreste aus dem Solvent entfernt. Danach erfolgte die Einwaage <51> des Standards bzw. der Probe. Als Titriermittel wurde Hydranal-Titrant 2 (Riedel-de Haën, Art.-Nr. 34811, Ch. 10220) verwendet, dessen Titer vor jeder Versuchsreihe durch Titration von Eichstandard 5,00 (RdH 34813, Lot. 90330, 1 g entspricht 5,91 \pm 0,02 mg Wasser) bestimmt wurde.

Betriebsparameter:

Polspannung:	100 mV
Abschaltstrom:	20 μ A
Driftstop:	20 μ l / min

Das Gerät wurde mit Natriumtartrat-Dihydrat (Hydranal-Standard, RdH, Art.-Nr. 34803, Ch. 91540) kalibriert. Die Substanz enthält nach Herstellerangaben

15,66 % (m / m) \pm 0,05 % Wasser. Aus vierzehn Einwaagen zwischen 17,6 und 127,6 mg Natriumtartrat-Dihydrat, was einer Wassermenge von 2,8 bis 20,0 mg entsprach, wurde eine Kalibriergerade erstellt.

Die Prüfung auf Linearität wurde erfolgreich nach Mager durchgeführt ($\alpha = 0,05$) <S2>. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,01$ war kein signifikanter Unterschied zum Nullpunkt feststellbar, so dass eine homogene Regression durchgeführt wurde. Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden nach Montag [50] <S2> berechnet.

Als Nachweisgrenze wurden 0,22 mg ermittelt, die Bestimmungsgrenze lag bei 0,44 mg. Da in diesem Bereich nicht gemessen wurde, ermittelte TOCCATA <S2> die Grenzen durch Extrapolation.

Für das verwendete Natriumtartrat-Dihydrat wurde ein Wassergehalt von 15,63 % (m / m) \pm 0,27 % ermittelt, was einer Wiederfindungsrate von 99,81 % entspricht.

Die Präzision wurde aus je drei Einwaagen des mit Citratpuffer pH 4,0 bzw. mit Phosphatpuffer pH 6,8 lyophilisierten PCP bestimmt. Dabei ergab sich für PCP 4,0 eine Präzision von \pm 0,16 % (m / m), für PCP 6,8 eine Präzision von \pm 0,08 % (m / m) (bei beiden: n = 3).

Vor der eigentlichen Proben titration war es nötig, Vorversuche durchzuführen, um eine angemessene Extraktionszeit vorzugeben. Da die Proben sich im Solvent nicht lösten, mussten sie ausreichend gequollen sein, um das gesamte Wasser zu erfassen. Die Extraktionszeit durfte aber auch nicht zu lang gewählt werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Umgebungsfeuchte zu verhindern.

Es wurden verschiedene Extraktionszeiten getestet. Dabei zeigte sich, dass für die unterschiedlich gepufferten Proben (PCP 4,0 und PCP 6,8) bei 25 und 30 Minuten Extraktionszeit kein signifikanter Unterschied der Ergebnisse mehr feststellbar war ($\alpha = 0,05$), so dass 25 Minuten als ausreichend angesehen und für alle folgenden Proben vorgegeben wurden.

Vor und während der Einlagerungszeit wurden je zwei Proben von jedem System (alle Temperaturen und rel. Feuchten) untersucht. Es handelte sich dabei um Octreotid-freie Proben, da der Einfluss des Peptids auf den Wassergehalt aufgrund der geringen Konzentration als vernachlässigbar erachtet wurde.

Die Vials wurden nach der Entnahme aus dem Klimagefäß verschlossen und bis zur Titration in Exsiccatoren über gesättigter Lithiumchlorid- bzw. Magnesiumchlorid-Hexahydrat-Lösung aufbewahrt (Materialien siehe Wasserdampfsorption [Kap. 3.1.4] und Belastungsmethoden ([Kap. 3.4.1.1])).

Die nicht belasteten Proben (reines Polycarbophil, Proben vor der Einlagerung) wurden mindestens 24 Stunden vor der Bestimmung über Phosphorpentoxid aufbewahrt.

3.1.6 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Mit Hilfe der DSC wurden Glasübergangstemperaturen bestimmt. Diese können der Vorhersage der physikalischen Stabilität eines glasartigen Systems dienen. Um ein stabiles Produkt zu erhalten, sollte die Glasübergangstemperatur weit oberhalb der Lagerungstemperatur liegen [20].

Für die DSC-Untersuchungen der Lyophilisate und der Festen Dispersionen wurde die DSC 821e / 700 <2> (Mettler Toledo Star System) eingesetzt, Polycarbophil und Octreotid wurden mit der DSC 7 <4, 5> von Perkin Elmer untersucht. Die beiden Anlagen unterscheiden sich in ihrem Messprinzip.

Mit der DSC können Vorgänge ermittelt werden, die von einer exothermen oder endothermen Wärmetönung begleitet werden, wie z. B. Schmelzen, (Re-)Kristallisieren, Glasübergänge, Modifikationsumwandlungen. Die Probe wird dabei in einem Tiegel in einen genau beheiz- und kühlbaren Ofen gegeben. Ein Referenztiegel befindet sich entweder im gleichen Ofen (Wärmestrom-DSC: Mettler) oder in einem getrennten Ofen (Leistungskompensations-DSC: Perkin Elmer). Probe und Referenz durchlaufen das gleiche Temperaturprogramm. Die gewählte Heizrate hat dabei großen Einfluss auf das Ergebnis. Eine zu geringe Heizrate kann dazu führen, dass einige Effekte, wie z. B. Glasumwandlungen, vom Gerät nicht mehr erfasst werden. Auf der anderen Seite verschlechtern zu hohe Heizgeschwindigkeiten die Temperaturauflösung, so dass dicht beieinander liegende physikalische Umwandlungen nicht mehr getrennt werden. Es sollte also für vergleichende Analysen immer die gleiche Heizgeschwindigkeit gewählt werden.

Für die Untersuchung wurde mit einer Heizgeschwindigkeit von 10 K / min gearbeitet, die Proben wurden bis 150 °C (PCP: 160 °C) aufgeheizt. Die verwendeten Tiegel waren verschlossen und nicht gelocht, die Einwaage betrug zwischen 2 und 20 mg.

Folgende Proben wurden untersucht:

- PCP 4,0 und 6,8, Oc PCP 4,0 und 6,8, unbearbeitetes Octreotid und Polycarbophil, lyophilisiertes PCP, unbelastet, je zwei Proben (n = 2)
- PCP 4,0 und 6,8, Oc PCP 4,0 und 6,8, unbearbeitetes Polycarbophil, lyophilisiertes PCP aus allen Klimabedingungen nach 1 Woche, je zwei Proben (n = 2)
- PCP 4,0 und 6,8, Oc PCP 4,0 und 6,8 aus 25 °C, 50 °C, 74 °C / 30 % r. F. und 74 °C / 11 % r. F., nach 15 Wochen Einlagerungszeit, je zwei Proben (n = 2)

Es sollten die Veränderungen der Glasübergangstemperaturen in Abhängigkeit von der Lagerzeit und den Lagerbedingungen (rel. Feuchte, Temperatur) bestimmt werden. Der Einfluss der Puffer und des Peptids sollte zur Bewertung mit herangezogen werden.

3.1.7 Mikroskopie

Partikelform und -größe des Octreotids und des Polycarbophils wurden lichtmikroskopisch <30, 31, S7> untersucht. Die Festen Dispersionen wurden mit zusätzlichem Polarisationsfilter und λ -Filter betrachtet, um kristalline Anteile zu erkennen.

3.1.7.1 Thermomikroskopie

Das Schmelzverhalten von Octreotid und Polycarbophil wurde thermomikroskopisch untersucht. Dazu wurde das Lichtmikroskop <30> mit einem Heiztisch <32> ausgerüstet. Die Heizgeschwindigkeiten betragen 1 bis 10 K / min.

3.1.7.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Es wurden Lyophilisate aus Polycarbophil mit Citratpuffer pH 4,0 und mit Phosphatpuffer pH 6,8 (PCP 4,0 bzw. 6,8), reines, unbearbeitetes PCP sowie belastete Proben rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Proben wurden bis zur Vorbereitung der REM-Aufnahmen im Exsiccator aufbewahrt. Sie wurden auf den Probenhaltern präpariert und mit Gold bedampft.

Verwendet wurde das Gerät CamScan DV 4 <33> (Cambridge Scanning Company).

3.2 Sorption von Octreotid an Oberflächen

Bei Proteinen und Peptiden besteht die Möglichkeit, dass diese Substanzen an den Oberflächen, mit denen sie in Kontakt stehen, adsorbieren. Dies kann z. B. am Glas von HPLC-Vials oder an Pipettenmaterialien geschehen, was bei einer Gehaltsbestimmung zu niedrige Werte liefern würde.

Johansen et al. [31, 32] fanden eine Adsorptionsneigung von Tetanustoxoid an Borosilikatglas. Das Adsorptionsverhalten verschiedener Proteine an unterschiedlichen Glasbehältern wurde von Schrattenholz et al. [68] untersucht. Für Desmopressin wurde Adsorption sowohl an Glas als auch an Polypropylen festgestellt [87]. Auch der Einfluss verschiedener oberflächenaktiver Substanzen auf die Adsorption von Proteinen und Peptiden wurde gezeigt [17, 43].

Um einen Unterschied des Peptidgehalts durch Adsorptionserscheinungen auszuschließen, wurden daher alle Proben gleich behandelt [siehe 3.1.1.2], die Probenvorbereitung wurde nach der Validierung nicht mehr verändert. Von Adsorption am Vial oder Pipettenmaterial wären somit alle Proben gleichermaßen betroffen.

Da jedoch das Peptid vor allem mit dem Glas der Vials und dem Pipettenmaterial in Kontakt stand, wurde das Ausmaß der Adsorption an diesen Materialien untersucht. Es wurde dabei auch der Einfluss des pH-Wertes betrachtet.

3.2.1 Adsorption an Glas

Es wurden mittels überprüfter Eppendorf-Pipette <38> Verdünnungen des Octreotids im jeweiligen Puffer hergestellt (ca. 5 – 193 mg / l). Je eine Hälfte der Lösung wurde in ein 5 ml-Vial mit Glasperlen (Glasperlen BNT 112, Fa. Technolab, 165 – 335 µm, mittlere Korngröße 277 µm, massenspezifische Oberfläche 84,8 cm² / g, Dichte 2,60 g / cm³ <34, S8>) – ca. 1 – 3 g, genau gewogen <52> – die andere in ein Vial ohne Glasperlen pipettiert, die Vials wurden verschlossen und 2 Stunden geschüttelt <43> (Stufe 2,5). Aus jedem Vial wurden zwei HPLC-Vials <21> gefüllt und mit der validierten HPLC-Methode der Octreotid-Gehalt bestimmt.

Dieses Vorgehen gewährleistete, dass die Proben mit und ohne Glasperlen gleich behandelt wurden. Von einer möglichen Adsorption am Pipettenmaterial oder am Glas-Vial waren beide Proben in gleichem Maße betroffen, für die Berechnung der

adsorbierten Menge Peptid pro Oberflächeneinheit der Glasperlen mussten diese Flächen also nicht berücksichtigt werden.

3.2.2 Adsorption an Polyethylen

Die verwendeten Pasteurpipetten <39> bestanden aus Polyethylen (PE), so dass auch das Adsorptionsverhalten des Peptids an diesem Material überprüft werden sollte. Dazu wurden die Pipetten in Stücke geschnitten und genau gewogen <52>. Auch hier wurden Verdünnungsreihen des Octreotids im jeweiligen Puffer hergestellt (ca. 5 – 179 mg / l). Je eine Verdünnungsreihe wurde mit PE-Teilen versetzt, die andere nicht, so dass die Vergleichsproben und die PE-haltigen Proben die gleiche Konzentration hatten. Die Lösungen wurden geschüttelt <43> (90 min, 6 h, 12 h, 24 h, Stufe 2,5), danach der Peptid-Gehalt mit der validierten HPLC-Methode bestimmt.

3.2.3 Auswertung der Adsorptionsversuche

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS <S1>. Es wurde zunächst die Langmuir-Gleichung linearisiert und eine Lineare Regression durchgeführt. Dazu wurde der Kehrwert der adsorbierten Menge Peptid pro Oberflächeneinheit des Glases über dem Kehrwert der Gleichgewichtskonzentration aufgetragen. Durch die erhaltenen Werte wurde eine Ausgleichsgerade gelegt, um damit Werte für die maximal adsorbierbare Menge (a) des Peptids aus dem Achsenabschnitt und den Parameter b (entsprechend k_{des} / k_{ads}) aus der Steigung abschätzen zu können. Diese Werte konnten dann als Startwerte für die Nichtlineare Regression in SPSS <S1> verwendet werden. Als Modellformel diente hier die nichtlinearisierte Langmuir-Gleichung: $x / m = a \cdot c / (b + c)$.

3.3 Herstellung der Festen Dispersionen und Lyophilisate

Chiou und Riegelman [12] sowie Ford [19] beschrieben mehrere Herstellungsmethoden für Feste Dispersionen. Klassischerweise werden dabei die Schmelzmethode, die Lösungsmethode und die Schmelz- / Lösungsmethode eingesetzt. Ein weiteres Verfahren stellt die Schmelzextrusion dar [83]. Im Folgenden werden diese Herstellungsverfahren kurz betrachtet und deren Verwendbarkeit für die vorliegende Arbeit diskutiert. Eine relativ neue Herstellungsart für Feste Dispersionen mit Hilfe superkritischer Gase (SEDS: Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids) soll nur erwähnt werden [34].

Schmelzmethode

Bei dieser von Sekiguchi und Obi [72] vorgeschlagenen Methode wird die Mischung eines Arzneistoffes mit einem wasserlöslichen Hilfsstoff bis zum Schmelzen erhitzt. Nach dem schnellen Abkühlen wird die Mischung zerkleinert und gesiebt. Um die Verfestigung der Schmelze zu beschleunigen, kann die geschmolzene Mischung auf einer dünnen, gekühlten Metallplatte ausgegossen werden. Insgesamt zeichnet sich die Methode durch ihre Einfachheit aus. Nachteilig ist jedoch, dass die verwendeten Substanzen thermostabil sein müssen. Da Peptide jedoch temperaturempfindlich sind, ist diese Methode zur Herstellung der Festen Dispersionen hier nicht anwendbar.

Lösungsmethode

Eine Mischung von zwei Feststoffen (Arznei- und Hilfsstoff) wird in einem organischen Lösungsmittel gelöst, welches im Anschluss verdampft wird. Ein Vorteil dieser Methode ist die geringe thermische Belastung der Substanzen, da zum Verdampfen organischer Lösungsmittel, insbesondere unter vermindertem Druck, nur niedrige Temperaturen notwendig sind. Allerdings ist es meist schwierig, das Lösungsmittel restlos aus der Zubereitung zu entfernen, so dass eventuell vorhandene Reste die Stabilität des Arzneistoffes negativ beeinflussen oder

toxikologisch relevant sein könnten. Da in der vorliegenden Arbeit Lösungen unterschiedlicher pH-Werte hergestellt werden sollten, konnte nur mit wässrigen Lösungsmitteln gearbeitet werden. Eine schonende Entfernung des Lösungsmittels Wasser ist mit der Gefriertrocknung möglich [1, 83], so dass hier eine abgewandelte Form der Lösungsmethode angewandt wurde.

Schmelz- / Lösungsmethode

Diese Methode wurde u. a. von Haack [24] zur Herstellung von Piroxicam-Polyethylenglykol-4000-Dispersionen angewandt. Es wird zunächst ein Arzneistoff in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst. Der polymere Hilfsstoff wird geschmolzen und mit der Arzneistofflösung gemischt. Auch hier wird das organische Lösungsmittel, welches allerdings in geringerer Menge als bei der Lösungsmethode vorliegt, verdampft, was zu den oben genannten Problemen führt.

Schmelzextrusion

Dieses Verfahren kann als Kombination aus Schmelzen und mechanischer Herstellungsmethode angesehen werden [20]. Der Arzneistoff wird durch Schmelzen oder Plastifizieren in das Polymer eingearbeitet, was mit Hilfe eines Schneckenextruders in heizbaren Behältern geschieht. Durch die kurze Verweildauer können auch hitzeempfindliche Substanzen verarbeitet werden [6]. Offen bleibt, welchen physikalischen Zustand der Wirkstoff in der erstarrten Schmelze annimmt.

Perisutti et al. [56] zeigten, dass mittels Schmelzextrusion schnell freisetzende Arzneiformen aus Carbamazepin hergestellt werden können.

Vorteilhaft ist die geringe Zersetzungsgefahr für Arzneistoffe, da vor allem mechanische Energie eingebracht wird und in geschlossenen Behältnissen gearbeitet wird. Diese können mit Stickstoff gespült werden, was die Oxidationsgefahr mindert. Außerdem werden keine organischen Lösungsmittel benötigt. Insgesamt handelt es sich um eine sehr wirtschaftliche Methode, die einen hohen Substanzdurchsatz erlaubt. Nachteilig ist der hohe Substanzbedarf. Selbst

kleinste Extruder benötigen Substanzmengen von 5 – 10 g, was eine Anwendung für die vorliegende Arbeit ausschloss.

Wratschko [86] entwickelte ausgehend von der Lösungsmethode eine Möglichkeit, Feste Dispersionen aus Desmopressin in Polycarbophil herzustellen. Das Peptid wird dazu in Puffer gelöst, mit einem Hochleistungsdispergiergerät (Ultra-Turrax[®]) gerührt, dann Polycarbophil hinzugegeben und das Polymer dispergiert (mit Ultra-Turrax[®]). Nach dreistündigem Schütteln werden die Lösungen / Dispersionen auf Vials verteilt und gefriergetrocknet.

Problematisch könnte hier die Benutzung des Ultra-Turrax[®] sein, da die hohe Scherbelastung das Polymer beschädigen und zu Funktionsverlust führen kann [10]. Es sollte daher der Einfluss des Ultra-Turrax[®] untersucht und gegebenenfalls eine andere Möglichkeit zur Dispergierung gefunden werden. Um eine eventuelle strukturelle Zerstörung des Polymers beurteilen zu können, wurden rheologische Untersuchungen mit einem Ubbelohde-Viskosimeter <47> [vgl. Kap. 3.3.1] durchgeführt. Hier stellte sich heraus, dass die Viskosität bei gerührtem PCP (Laborrührer <42>, Stufe 2) in Wasser signifikant höher war als bei Behandlung mit dem Ultra-Turrax[®] <40> ($\alpha = 0,05$). Daher wurde für die Herstellung der Festen Dispersionen und Lyophilisate folgende Herstellungsweise gewählt:

- Das Octreotid wurde entsprechend einer Konzentration von 0,01 % (m / V) im jeweiligen Puffer (Citrat-Pufferlösung pH 4,0 RN, bzw. Phosphat-Pufferlösung pH 6,8 R, beide DAB 1997 [15]) gelöst und 4 min mit dem Flügelrührer <42> behandelt.
- Für die Herstellung der Festen Dispersionen wurde Polycarbophil entsprechend einer Konzentration von 0,25 % (m / V) hinzugefügt und 60 min mit dem Flügelrührer behandelt; bei der Herstellung der Lyophilisate entfiel dieser Schritt.
- Die Flüssigkeiten wurden drei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt <43> (Stufe 2).
- Mit der auf Genauigkeit überprüften Eppendorf-Pipette <38> wurden je 1,000 ml der Flüssigkeiten in 1 ml-HPLC-Vials <21> pipettiert.
- Die Vials wurden in die Gefriertrocknungsanlage <9> eingebracht und lyophilisiert.

- Für die Wassergehaltsbestimmung wurden zusätzlich Octreotid-freie Proben in analoger Weise mit 0,25 % (m / V) PCP in dem entsprechenden Puffer hergestellt (PCP 4,0 und PCP 6,8)

Die pH-Werte der Puffer wurden mit einem zuvor kalibrierten pH-Meter überprüft [vgl. Kap. 3.1.2].

Vor dem Einbringen der Vials wurde die Kontaktplatte der Gefriertrocknungsanlage auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, um die Proben möglichst schnell einzufrieren.

Während der Gefriertrocknung wurden die Temperaturen von Kontaktplatte, Proben und Kondensator mit dem Messwertscanner <1> (LSB36-III, Fa. Linseis GmbH) verfolgt und aufgezeichnet.

Tabelle 4: Hergestellte Octreotid-haltige Lyophilisate und Feste Dispersionen

	Oc 4,0	Oc 6,8	Oc PCP 4,0	Oc PCP 6,8
Einwaage Oc [mg]	29,83	29,76	29,68	29,51
Puffer * [ml]	300,0	300,0	300,0	300,0
Einwaage PCP [g]	-----	-----	0,7545	0,7553
Gehalt Oc [%]	0,01	0,01	0,01	0,01
Gehalt PCP [%]	-----	-----	0,25	0,25

*: Citrat-Pufferlösung pH 4,0 RN, bzw. Phosphat-Pufferlösung pH 6,8 R, beide DAB 1997

3.3.1 Rheologische Untersuchungen mittels Ubbelohde-Viskosimeter

Verwendet wurde das Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde <47> (Schott-Geräte GmbH, Type 50120, Gerätekonstante $k = 0,0155 \text{ mm}^2 / \text{s}^2$). Die Messungen wurden bei $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt (thermostatisiertes Wasserbad <48>), die Proben wurden zur Temperaturangleichung 30 Minuten im Viskosimeter belassen. Die Durchflusszeit wurde automatisch bestimmt <49>.

Das PCP wurde im Wasser oder Puffer mit Hilfe des Laborrührers (FR,<42>) bzw. mit dem Ultra-Turrax[®] <40> dispergiert. Die Konzentration des PCP im Dispersionsmedium betrug wie bei den Festen Dispersionen 0,25 % (m / V).

Von folgenden Proben wurden Viskositäten bestimmt:

- PCP in Wasser, 1 h mit Flügelrührer (FR) behandelt
- PCP in Wasser, 15 min mit Ultra-Turrax[®] (UT) behandelt
- PCP in Puffer pH 4,0, FR, nicht lyophilisiert
- PCP in Puffer pH 4,0, FR, lyophilisiert
- PCP in Puffer pH 6,8, FR, nicht lyophilisiert
- PCP in Puffer pH 6,8, FR, lyophilisiert
- Wasser, Puffer pH 4,0 (Citratpuffer) und pH 6,8 (Phosphatpuffer)

Durch diese Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob und welchen Einfluss die Lyophilisation, der pH-Wert und die Art des Dispergierens (FR oder UT) auf die Viskosität der Dispersionen haben.

3.4 Belastungsmethoden

Die Lyophilisate und die Festen Dispersionen wurden nach der Gefriertrocknung in den HPLC-Vials <21> belassen. Diese Vials wurden offen in die Klimagefäße eingebracht, welche in Wärmeschränken <56, 57, 58> gelagert wurden. Die Proben wurden durch verschiedene Kombinationen von Temperatur und relativer Luftfeuchte belastet.

3.4.1 Klimatische Bedingungen

3.4.1.1 Relative Feuchte

Für die Festen Dispersionen sollte eine maximale Lagerfeuchte nicht überschritten werden, da diese in halb feste Formen übergehen könnten. Aussagen über die Stabilität des Octreotids in fester Form wären dann nicht mehr möglich.

Bei den verwendeten Hygrostaten-Gefäßen handelte es sich um 5l-Weithalsgläser, die durch einen Glasdeckel mit Gummidichtung verschlossen wurden [45]. Am Boden der Gefäße befand sich eine gesättigte Salzlösung, das Salz ragte aus der Lösung heraus, damit sich an der Oberfläche Kristallisationskeime befanden. Verdampftes Wasser wurde ersetzt. Vor und während der Lagerungszeit erfolgte eine Überprüfung der relativen Feuchte mit dem Feuchtemessgerät <45> (n = 6) durch eine Öffnung im Deckel der Glasgefäße, die mit einem Chlorbutylstopfen verschlossen war. So wurde während der Messung das Klima im Gefäß nicht gestört. Die Proben befanden sich auf Plexiglasständern im Gefäß. Problematisch bei dieser Art der Lagerung ist die Störung des Klimas durch eine Probenentnahme. Nach 20 Minuten sind jedoch 90 % der Sollfeuchte wieder erreicht [54].

3.4.1.2 Temperatur

Auch für die Temperatur sollte ein Höchstwert nicht überschritten werden, um eine physikalische Veränderung der Proben zu verhindern. Die Temperaturintervalle sollten möglichst groß gewählt werden, um einen geringen Fehler für die Aktivierungsenergie zu erhalten [71].

Die Hygrostaten-Gefäße mit den Proben lagerten in Wärmeschränken <56, 57, 58>, deren Temperaturen zwei bis drei mal wöchentlich kontrolliert wurden (n = 62). Die Thermometer <44> standen zur Wärmepufferung in mit Paraffin gefüllten Erlenmeyerkolben. Die Proben einer bestimmten Lagertemperatur wurden immer in nur einem Wärmeschrank gelagert, um unterschiedliche Belastungen auszuschließen.

In Tabelle 5 sind die Soll-Temperaturen, die arithmetischen Durchschnittstemperaturen, die Soll- und die Ist-Feuchten aufgeführt.

Da nach Lüdemann [45] der Unterschied zwischen der arithmetischen und der kinetischen Durchschnittstemperatur im Bereich der Messgenauigkeit liegt, wurde auf eine Berechnung der kinetischen Durchschnittstemperatur nach Haynes [27] verzichtet. Bei Temperaturdifferenzen von $> 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sollte diese jedoch berechnet werden [23].

Tabelle 5: verwendete Temperaturen und rel. Feuchten während der Langzeiteinlagerung (178 Tage); angegeben sind die durchschnittlichen Ist-Temperaturen bzw. -Feuchten \pm Standardabweichung (T: n = 62; r. F.: n = 6) sowie Literaturwerte für die Soll-Feuchten

Salz	Soll-Temperatur [°C]	Ist-Temperatur [°C]	Soll-Feuchte -Literaturwerte- [%]	Ist-Feuchte [%]
Lithiumchlorid	58	58,0 \pm 0,3	11,0 \pm 0,3 ^v	11,2 \pm 0,9
	66	66,1 \pm 0,3	10,9 \pm 0,3 ^v	11,6 \pm 0,8
	74	74,0 \pm 0,3	10,6 \pm 0,4 ^v	11,9 \pm 0,6
Magnesium- bromid- Hexahydrat	25	25,0 \pm 0,1	30,7 \pm 0,2 *	29,4 \pm 0,8
	40	40,1 \pm 0,1	30,0 \pm 0,1 *	29,3 \pm 0,8
	50	50,0 \pm 0,3	29,7 \pm 0,2 *	29,9 \pm 1,0
	58	58,0 \pm 0,3	k.A.	30,7 \pm 0,9
	66	66,1 \pm 0,3	k. A.	31,4 \pm 1,0
	74	74,0 \pm 0,3	k. A.	30,9 \pm 1,2

* nach Nyqvist [52]

^v nach NBS [51]

k. A. keine Angaben

verwendete Salze: Lithiumchlorid, Art. Nr. 1.05675, Merck

Magnesiumbromid-Hexahydrat, Art. Nr. 02118, Riedel-de Haën

Die ICH [29] akzeptiert Abweichungen von \pm 5 % für die rel. Feuchte und \pm 2 % für die Temperatur.

3.4.2 Statistische Auswertung

Mit dem Programm TOCCATA <S2> wurden die Linearen Regressionen im Rahmen der Kalibrierungen durchgeführt. Für die Nichtlineare Regression und die univariate Varianzanalyse sowie die log-linearen Regressionen im Rahmen der Haltbarkeitsuntersuchungen wurde SPSS <S1> verwendet.

3.4.2.1 Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RGK)

Die Abnahme der Octreotid-Flächenwerte aus der HPLC über die Zeit kann kinetisch als Prozess erster Ordnung aufgefasst werden. Eine Auftragung der logarithmierten Flächen gegen die Zeit liefert (angenähert) eine Gerade. Aus dieser linearisierten Darstellung ließe sich dann nach Linearer Regression die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante berechnen. Durch diese Transformation liegt aber keine Normalverteilung der Daten mehr vor, die eine Bedingung für die Durchführung der Linearen Regression ist. Daher muss korrekterweise eine Nichtlineare Regression ausgeführt werden. Dies ist mit SPSS <S1> möglich.

Es wurden dazu alle Flächenwerte und Zeitpunkte in das Datenblatt eingegeben. Die abhängige Variable war die Fläche (area), folgende Modellformel wurde gewählt: $\text{Anfangsfläche} \cdot \text{EXP}(-\text{RGK} \cdot \text{Zeit})$, wobei der Ausdruck EXP in SPSS für Exponentialfunktionen mit der Basis e steht. Als Anfangswerte wurden die extrapolierten Flächen bzw. Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten aus der logarithmischen Regression als Parameter eingegeben. Ausgehend von diesen Werten berechnete SPSS die Endwerte der Parameter iterativ.

Statt einer Standardabweichung wird von SPSS bei der Nichtlinearen Regression der Standardfehler angegeben. Dieser (asymptotic standard error, ase) ist der Standardfehler des Mittelwertes. Er errechnet sich aus der Standardabweichung dividiert durch die Quadratwurzel des Stichprobenumfanges, wird also mit zunehmendem Stichprobenumfang kleiner [82]. Außerdem wird das Konfidenzintervall (95 %) mit oberer (oG) und unterer (uG) Grenze angegeben.

3.4.2.2 Faktorenversuche

Der Einfluss der Faktoren pH-Wert, Lagerungstemperatur, relativer Lagerungsfeuchte und An- bzw. Abwesenheit des Polymers wurde mit mehreren 2^3 -Faktorenversuchen untersucht. Jeder Faktor wurde dazu auf zwei Niveaus verändert. Im folgenden sind die niedrigen Niveaus mit (1), die höheren mit (2) gekennzeichnet. Bei Verwendung von zwei Stufen ist es sinnvoll, diese möglichst weit auseinander liegend zu wählen, damit eventuelle Unterschiede möglichst deutlich werden [61]. Daher wurde neben der maximalen Lagerungstemperatur von 74 °C als niedrige Stufe 58 °C gewählt. Die relative Feuchte von 30 % konnte nicht überschritten werden, damit kein halbfestes System entstand, so dass eine weitere Feuchte von 11 % untersucht wurde. Der Faktor pH-Wert wurde bei 4,0 und 6,8 analysiert und als qualitativer Faktor wurde der Einfluss des Polycarbophils einbezogen. Der Einfluss dieser Faktoren auf die abhängige Variable Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) wurde untersucht. Die RGK wurde durch Nichtlineare Regression [vgl. Kap. 3.4.2.1] bestimmt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS <S1> durch mehrfaktorielle univariate Varianzanalyse (mehrfaktoriell: mehrere unabhängige Faktoren, univariat: eine abhängige Variable, hier RGK) [7].

Tabelle 6: Versuchsplan der 2^3 -Faktorenversuche

	Polymer		pH-Wert		Temperatur		rel. Feuchte	
					[°C]		[%]	
1.	+ PCP		4,0 (1)	6,8 (2)	58 (1)	74 (2)	11 (1)	30 (2)
2.	- PCP		4,0 (1)	6,8 (2)	58 (1)	74 (2)	11 (1)	30 (2)
3.	- PCP (1)	+ PCP (2)	4,0 (1)	6,8 (2)	58		11 (1)	30 (2)
4.	- PCP (1)	+ PCP (2)	4,0 (1)	6,8 (2)	66		11 (1)	30 (2)
5.	- PCP (1)	+ PCP (2)	4,0 (1)	6,8 (2)	74		11 (1)	30 (2)
6.	- PCP (1)	+ PCP (2)	4,0 (1)	6,8 (2)	58 (1)	74 (2)	11	
7.	- PCP (1)	+ PCP (2)	4,0 (1)	6,8 (2)	58 (1)	74 (2)	30	
8.	- PCP (1)	+ PCP (2)	4,0		58 (1)	74 (2)	11 (1)	30 (2)
9.	- PCP (1)	+ PCP (2)	6,8		58 (1)	74 (2)	11 (1)	30 (2)

Mit dem „Gesättigten Modell“ (SPSS) werden neben den Haupteffekten auch die Wechselwirkungen zwischen den Faktoren berechnet. Die Einzelfaktoren können nur dann als unabhängige Hauptfaktoren interpretiert werden, wenn sie nicht in übergeordneten Wechselwirkungen enthalten sind [57]. Einflüsse einzelner Faktoren auf die abhängige Variable RGK können über die Schätzung der mittleren Varianz festgestellt werden, die bei größerem Einfluss eines Faktors höhere Werte annimmt [61].

3.4.2.3 Haltbarkeit

Mit Stressversuchen kann es möglich sein, Haltbarkeitsprognosen für Arzneistoffe zu erstellen. Für die beschleunigten Prüfungen wurden hier die während der Lagerung bei 30 % relativer Feuchte und den Temperaturen 40 °C, 50 °C, 58 °C, 66 °C und 74 °C erhaltenen Flächenwerte (HPLC) ausgewertet. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden – wie oben beschrieben - durch Nichtlineare Regression berechnet. Die Abhängigkeit der RGK von der Temperatur beschreibt die Arrhenius-Gleichung. Wird diese logarithmiert, kann durch Auftragen von \ln RGK gegen den Kehrwert der Temperatur eine Gerade erhalten werden. Diese kann auf Raumtemperatur extrapoliert und die entsprechende RGK geschätzt werden. Bei einem solchen Vorgehen würden jedoch die RGK, die bei verschiedenen Lagertemperaturen erhalten wurden, mit gleichem Gewicht in die Berechnung der extrapolierten Werte eingehen, es bliebe unberücksichtigt, dass eine RGK bei höheren Temperaturen mit größerer Genauigkeit bestimmt werden kann als bei niedrigen Temperaturen. Daher wurde hier zusätzlich eine Gewichtung der Werte vorgenommen. Es wurde der \log RGK mit dem jeweiligen Kehrwert der Temperatur so oft in die Ausgleichsrechnung eingegeben, wie es dem reziproken Wert des Vertrauensbereiches dieser RGK im logarithmischen System entspricht [49], so dass die zuverlässigeren Werte ein höheres Gewicht erhielten [67]. Mit diesen Werten wurde dann eine Lineare Regression (SPSS) durchgeführt. Es wurden der Achsenabschnitt und die Steigung mit ihren Vertrauensbereichen berechnet. Außerdem wurden zum Vergleich der Verfahren die Regressionsgeraden mit den nicht gewichteten Werten berechnet. Es wurde die RGK für 25 °C ermittelt und daraus die Haltbarkeit errechnet.

3.4.2.4 Versuchsplan

Der Versuchsplan wurde so angelegt, dass bei höherer Temperatur und relativer Feuchte am Anfang der Lagerung öfter Proben gezogen wurden. So konnte der Verlauf des Octreotid-Gehalts über die Zeit genauer dargestellt werden, was für die Bestimmung der Reaktionsordnung von Bedeutung ist.

Tabelle 7: Versuchsplan für die Langzeiteinlagerung

Klima		Zeit [Tage]													
T [°C]	r. F. [%]	3	7	10	14	17	21	28	42	56	84	110	126	140	178
25	30								x		x		x		x
58	11								x		x		x		x
66	11								x		x		x		x
74	11								x		x		x		x
40	30		x		x			x		x	x	x		x	x
50	30		x		x			x		x	x	x		x	x
58	30		x		x			x		x	x	x		x	x
66	30		x		x		x	x		x	x	x		x	x
74	30	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x

x: Probenentnahme: je zwei Proben von Oc 4,0, Oc 6,8, Oc PCP 4,0 und Oc PCP 6,8

3.4.3 log k / pH-Profil

Da der pH-Wert bzw. die Anwesenheit von Puffersalzen auch in fester Form einen Einfluss auf die Stabilität von Arzneistoffen haben kann, sollte die Stabilität des Octreotids nach Lösen in verschiedenen Puffern und anschließender Gefriertrocknung ermittelt werden.

Als Lagerbedingungen wurden eine relativ hohe Temperatur (66 °C) und die maximale relative Feuchte (30 %) gewählt. In der Langzeiteinlagerung hatte sich herausgestellt, dass bei 74 °C, der höchsten Lagertemperatur, schon nach kurzer Zeit der Octreotid-Gehalt stark abgesunken war. Für die kinetischen Berechnungen ist zwar eine starke Zersetzung des Octreotids von Vorteil, der Gehalt sollte aber über den Untersuchungszeitraum möglichst oberhalb der Bestimmungsgrenze liegen.

Die Herstellung der Proben erfolgte analog Kap. 3.3 ohne PCP. Die Octreotid-Konzentration betrug 0,01 % (m / V). Folgende Lösungsmittel wurden verwendet:

- Phosphat-Pufferlösung pH 3,0 R (DAB 1997)
- Citrat-Pufferlösung pH 4,0 RN (DAB 1997)
- Phthalat-NaOH-Mischung pH 4,0 (nach Clark und Lubs) [26]
- Pufferlösung pH 5,5 RN (DAB 1997)
- Ammoniumchlorid-Pufferlösung pH 10,0 R (DAB 1997)
- dest. Wasser

Durch die Verwendung zweier verschiedener Puffer für den pH-Wert 4,0 sollte der Einfluss des Puffersalzes analysiert werden.

Die pH-Werte wurden mit dem pH-Meter <36, 37> überprüft [vgl. Kap. 3.1.2].

Zum Vergleich wurde Octreotid auch in Wasser gelöst und lyophilisiert.

Die Lagerung erfolgte wie bei der Langzeiteinlagerung in HPLC-Vials <21> im Hygrostatengefäß in einem Wärmeschrank <56>. Temperatur und Lagerfeuchte wurden vor und während der Lagerung überprüft.

Tabelle 8: verwendete Temperatur und rel. Feuchte für das log k / pH-Profil

Temperatur [°C]		rel. Feuchte [%]	
Soll	Ist (n = 63)	Soll	Ist (n = 6)
66	66,1 ± 0,3	30	31,1 ± 0,6

verwendetes Salz und Literaturwerte: siehe Kap. 3.4.1.2

Um den Einfluss unterschiedlicher Klimagefäße oder Wärmeschränke auszuschließen, wurden alle Proben im gleichen Gefäß gelagert.

Eine Probenentnahme von je 2 Vials erfolgte nach 0, 10, 20, 40, 60 und 293 Tagen (n = 2).

Die Gehaltsbestimmung wurde mit der validierten HPLC-Methode [Kap. 3.1.1] durchgeführt. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden durch Nichtlineare Regression <S1> berechnet.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Physikalische und physikochemische Befunde

4.1.1 Wasserdampfsorption

4.1.1.1 Polycarbophil

Die Wasserdampfsorption von unbearbeitetem Polycarbophil wurde wie in Kap. 3.1.4 beschrieben mittels Schepky-Gefäßen bei verschiedenen Temperaturen und relativen Feuchten bestimmt. Die Zunahme der Massen wurde an jeweils vier Proben ($n = 4$) über 162 Stunden verfolgt.

Die folgenden Abb. 6 und 7 zeigen den Verlauf der prozentualen Wasseraufnahme über den Messzeitraum.

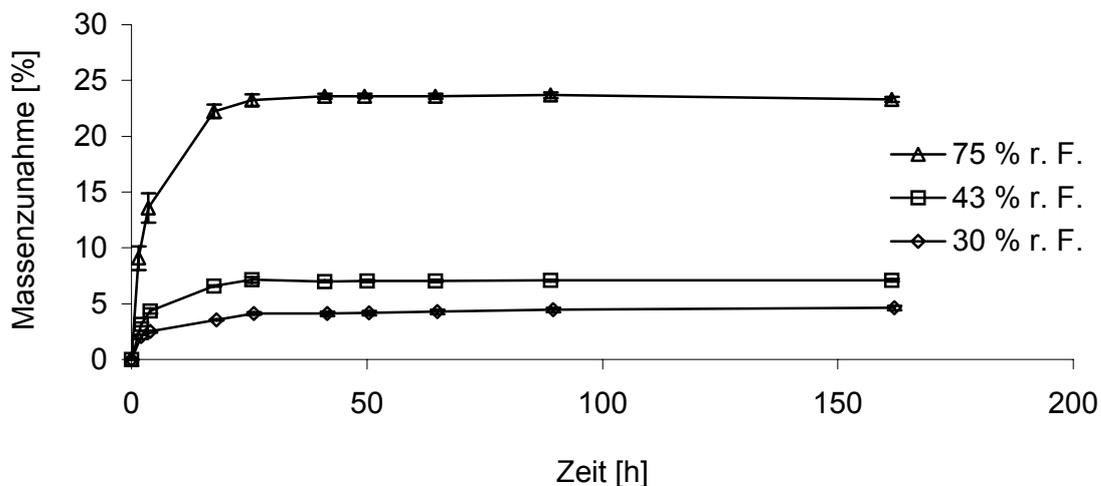


Abbildung 6: Wasseraufnahme des Polycarbophils bei 35 °C; $\bar{x} \pm s$, $n = 4$

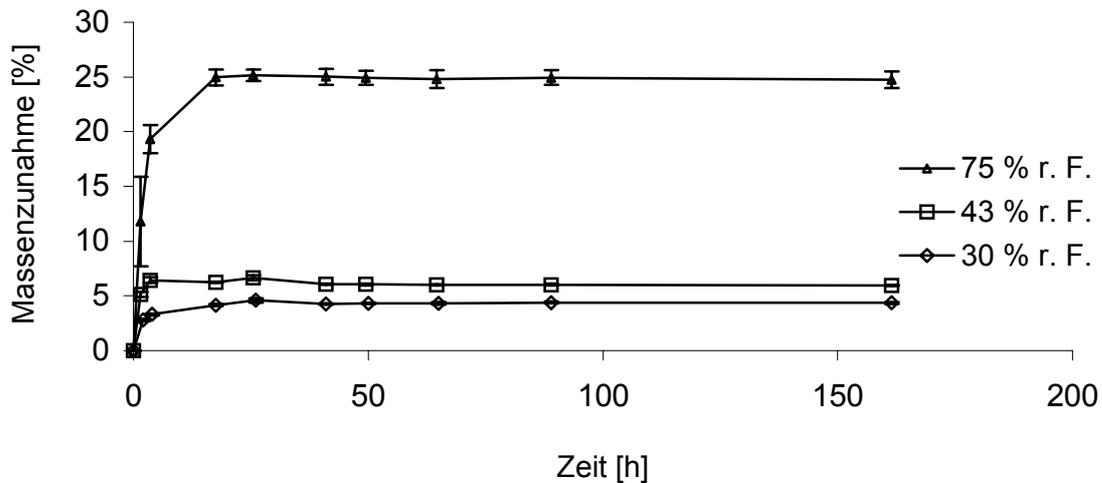


Abbildung 7: Wasseraufnahme des Polycarbophils bei 50 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 4

Die bei 35 °C gelagerten Proben erreichten nach 26 Stunden einen Gleichgewichtszustand. Danach war kein signifikanter Unterschied zwischen den sorbierten Wassermassen mehr feststellbar ($\alpha = 0,05$). Bei 50 °C erreichten die bei 30 % und 43 % r. F. gelagerten Proben erst nach 41 Stunden den Gleichgewichtszustand, während es bei 75 % schon nach 18 Stunden keine Veränderungen in der Wasseraufnahme mehr gab ($\alpha = 0,05$). In Tabelle 9 sind die Massenzunahmen bei den verschiedenen Temperaturen und relativen Feuchten sowie die Zeiten bis zur Gleichgewichtseinstellung aufgeführt.

Tabelle 9: Prozentuale Wasseraufnahme des PCP nach 162 Stunden Lagerung (\bar{x} [% (m / m)] \pm s, n = 4) sowie die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts

T [°C]	r. F. [%]	Massenzunahme [%]	Gleichgewichtseinstellung [h]
35	30	4,62 \pm 0,21	26
	43	7,09 \pm 0,11	26
	75	23,30 \pm 0,23	26
50	30	4,33 \pm 0,09	41
	43	5,94 \pm 0,05	41
	75	24,73 \pm 0,75	18

Bei beiden Temperaturen wurde mit steigender relativer Feuchte mehr Wasser aufgenommen. Bei 30 % relativer Feuchte wurde sowohl bei 35 °C als auch bei 50 °C 4 – 5 % (m / m) Wasser aufgenommen, wobei der Unterschied zwischen den beiden nicht signifikant war.

Die bei 43 % r. F. gelagerten Proben nahmen bei 35 °C ca. ein Prozent mehr Wasser auf als bei 50 °C, bei 75 % relativer Feuchte war es umgekehrt, hier sorbierten die bei höherer Temperatur gelagerten Proben die größeren Wassermengen. Die Unterschiede waren signifikant ($\alpha = 0,05$). Die folgende Abbildung zeigt den Zusammenhang zwischen der relativen Feuchte, über welcher das Polycarbophil gelagert wurde, und der prozentualen Wasseraufnahme.

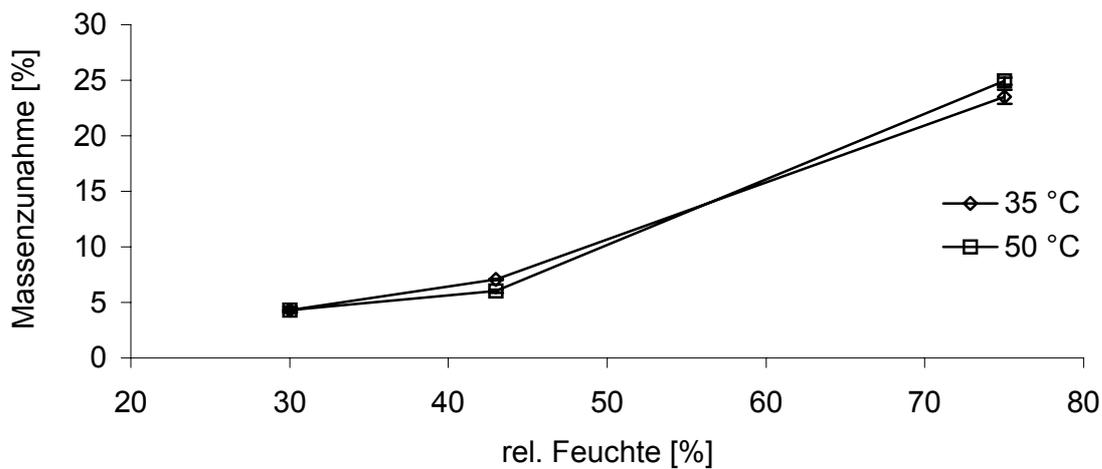


Abbildung 8: Wasseraufnahme des Polycarbophils in Abhängigkeit von der relativen Feuchte [%] bei verschiedenen Lagertemperaturen; $\bar{x} \pm s$, n = 4

Es besteht kein linearer Zusammenhang zwischen der Wasseraufnahme und der relativen Feuchte, sondern die Sorption steigt mit höherer Feuchte überproportional an. Dieses Verhalten wurde von Haack [24] auch für PVP K 30 beobachtet und mit einer Aufweitung des Polymers erklärt, die zu einer Einlagerung von weniger fest gebundenem Wasser führte.

4.1.1.2 Polycarbophil mit Citratpuffer pH 4,0 (PCP 4,0)

PCP wurde in Citratpuffer dispergiert und lyophilisiert. Das Wasseraufnahmevermögen wurde dann mit Schepky-Gefäßen untersucht. Die Zunahme der Massen wurde an je drei Proben (n = 3) bei verschiedenen Temperaturen (25 °C und 58 °C) und relativen Feuchten (35, 50, 75 %) über 260 Stunden untersucht. Folgende Abbildungen (Abb. 9 und 10) zeigen den Verlauf der Massenveränderungen über den Messzeitraum.

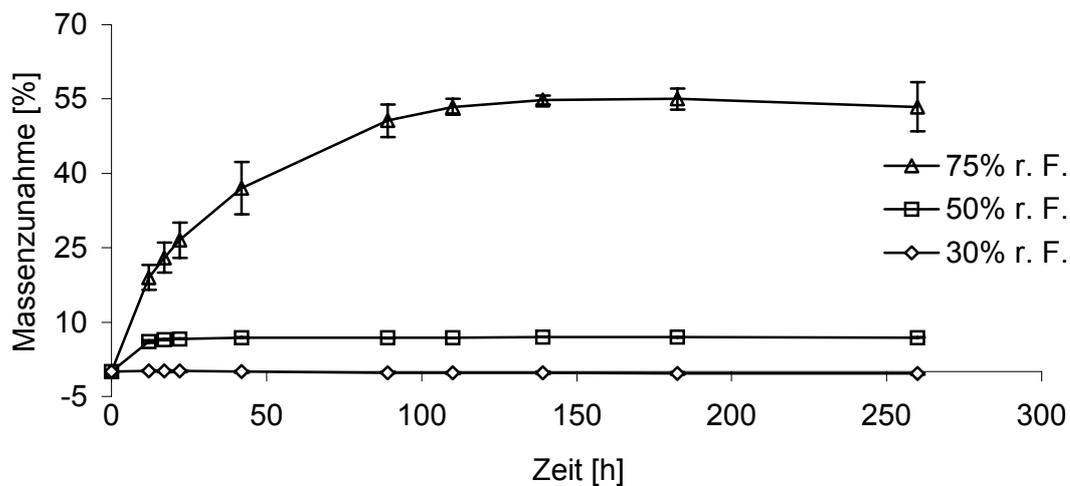


Abbildung 9: Wasseraufnahme des PCP 4,0 bei 25 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 3

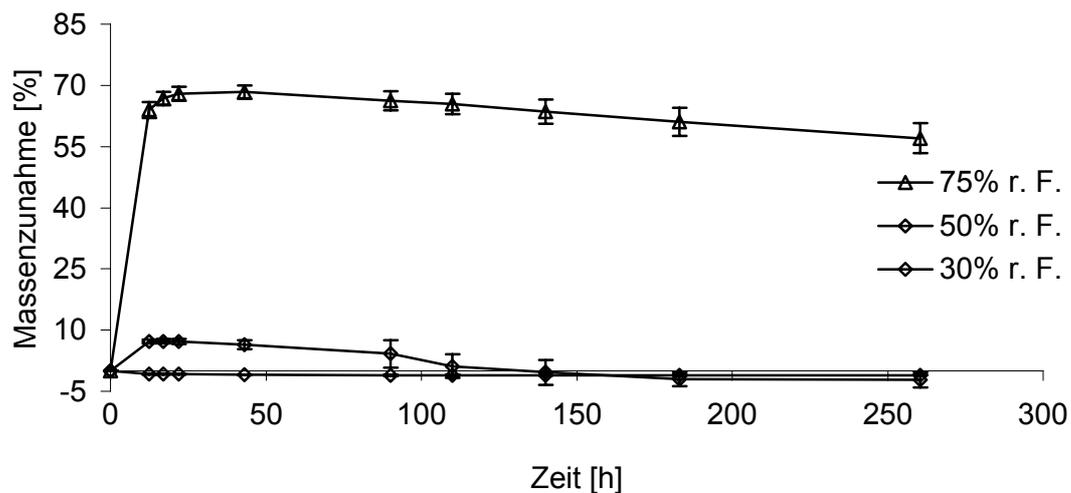


Abbildung 10: Wasseraufnahme des PCP 4,0 bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2, 75 %: n = 3

Bei geringer Temperatur und rel. Feuchte (25 °C / 30 % r. F.) schwankten die Werte um die Ausgangsmasse, es kam zu keiner Wasseraufnahme. Bei 50 % r. F. wurden ca. 7 % Wasser sorbiert, das Gleichgewicht stellte sich nach 12 Stunden ein. Bei 75 % relativer Feuchte dauerte es 89 Stunden bis zur Gleichgewichtseinstellung, es wurden 53 % Wasser sorbiert.

Auch bei 58 °C kam es bei 30 % r. F. zu keiner Wasseraufnahme. Im Gegensatz zu 25 °C verringerte sich hier die Masse um ca. 1 %, der Unterschied zu Null war signifikant ($\alpha = 0,05$). Eine Gleichgewichtseinstellung konnte nach 43 Stunden beobachtet werden. Bei 50 % r. F. wurden zunächst, wie bei der geringeren

Temperatur, zunächst ca. 7 % Wasser aufgenommen, dann (nach ca. 20 Stunden) nahmen die Massen bis unter die Ausgangsmassen ab. Bei hoher Lagerfeuchte und Lagertemperatur (58 °C / 75 % r. F.) kam es innerhalb von 12 Stunden zur Gleichgewichtseinstellung, es wurden 57 % Wasser aufgenommen. Tabelle 10 zeigt die Massenveränderungen des PCP 4,0 nach 260 Stunden sowie die Zeiten bis zur Gleichgewichtseinstellung.

Tabelle 10: Prozentuale Wasseraufnahme des PCP 4,0 nach 260 Stunden Lagerung (\bar{x} [% (m / m)] \pm s, n = 3, bei 58 °C / 30 % und 50 % r. F.: n = 2), sowie die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts

T [°C]	r. F. [%]	Massenänderung [%]	Gleichgewichtseinstellung [h]
25	30	-0,41 \pm 0,24	n. b.
	50	6,92 \pm 0,07	12
	75	53,43 \pm 5,00	89
58	30	-1,04 \pm 0,09	43
	50	-2,16 \pm 1,86	n. b.
	75	57,02 \pm 3,65	12

n. b.: nicht bestimmbar

Die Abb. 11 zeigt den Zusammenhang zwischen der relativen Feuchte, über der das Lyophilisat gelagert wurde, und der prozentualen Wasserauf- bzw. -abnahme.

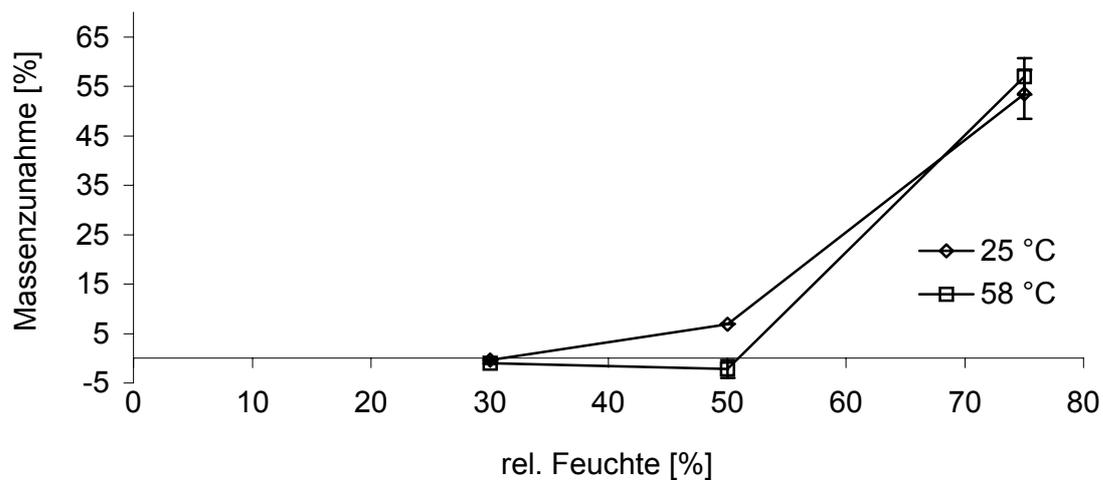


Abbildung 11: Wasseraufnahme bzw. -abnahme des Lyophilisates (PCP 4,0) in Abhängigkeit von der relativen Feuchte [%] bei verschiedenen Lagertemperaturen nach 260 Stunden; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$, bei 58 °C / 30 % und 50 % r. F.: $n = 2$

Es besteht kein linearer Zusammenhang zwischen rel. Feuchte und aufgenommener Wassermenge. Vielmehr kommt es zu einem überproportionalen Anstieg bei höheren Lagerfeuchten.

4.1.1.3 Polycarbophil mit Phosphatpuffer pH 6,8 (PCP 6,8)

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen den Verlauf der Massenveränderung der PCP 6,8-Lyophilisate über den Messzeitraum von 507 Stunden.

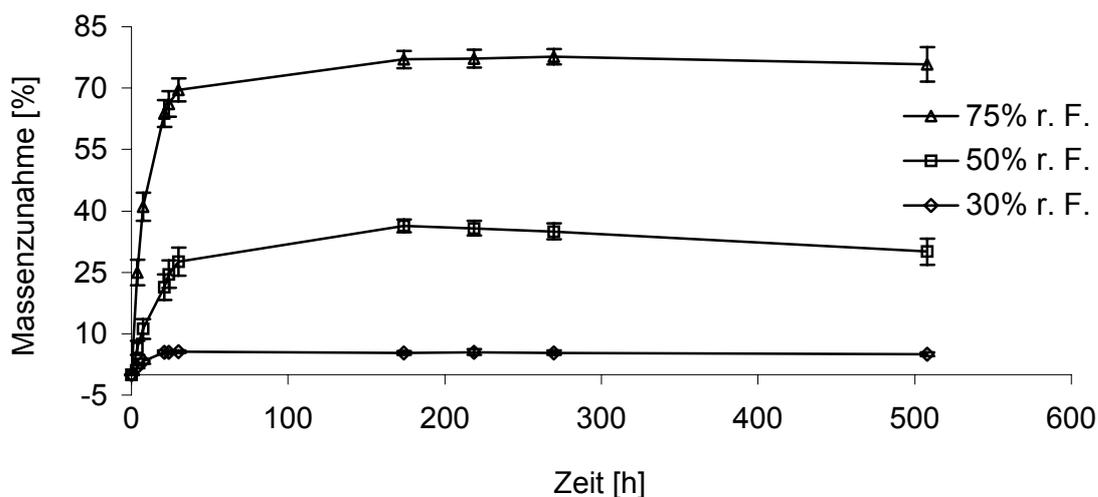


Abbildung 12: Wasseraufnahme des PCP 6,8 bei 25 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 3

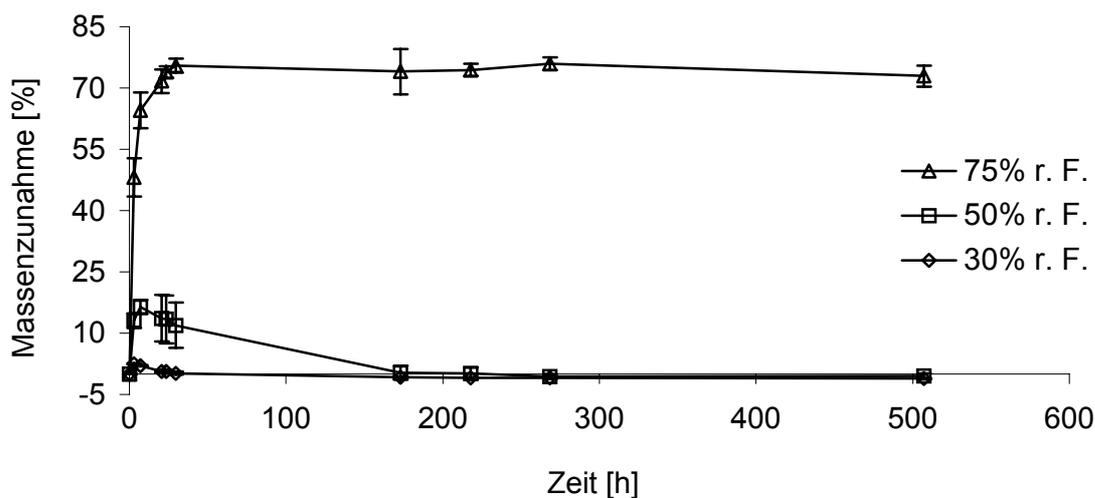


Abbildung 13: Wasseraufnahme des PCP 6,8 bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 3

Die bei 25 °C sowie die bei 58 °C und 75 % r. F. gelagerten Proben hatten nach spätestens 30 Stunden einen Gleichgewichtszustand erreicht. Für die Proben bei 58 °C und 30 % bzw. 50 % r. F. konnte kein Gleichgewicht festgestellt werden. Bei 30 % r. F. wurden innerhalb von ca. 3 Stunden mehr als 2 % Wasser aufgenommen, danach konnte eine Verringerung der Masse auf Werte unterhalb der Ausgangsmasse (-1 %) beobachtet werden. Auch der Verlauf bei der 50 % r. F.-Probe durchlief ein Maximum von ca. 16 %, welches innerhalb von ca. 7 Stunden erreicht wurde. Danach sank hier die Masse auf den Ausgangswert ab, es bestand

kein signifikanter Unterschied zu Null (d. h. es war keine Massenzunahme feststellbar, $\alpha = 0,05$). Die Tabelle 11 zeigt die nach 507 Stunden Lagerdauer aufgenommenen bzw. abgegebenen Wassermassen und die Zeiten bis zur Gleichgewichtseinstellung.

Tabelle 11: Prozentuale Wasseraufnahme des PCP 6,8 nach 507 Stunden Lagerung (\bar{x} [% (m / m)] \pm s, n = 3) sowie die Zeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts

T [°C]	r. F. [%]	Massenänderung [%]	Gleichgewichtseinstellung [h]
25	30	5,01 \pm 0,47	21
	50	30,03 \pm 3,21	24
	75	75,77 \pm 4,18	30
58	30	-1,16 \pm 0,15	n. b.
	50	-0,50 \pm 0,70	n. b.
	75	72,90 \pm 2,53	21

n. b. nicht bestimmbar

Die Abbildung 14 zeigt den Einfluss der relativen Lagerfeuchte auf die Wasseraufnahme. Während bei 25 °C die Wasseraufnahme fast linear mit der relativen Lagerfeuchte ansteigt ($r^2 = 0,989$) ist bei 58 °C erst ab 50 % r. F. ein deutlicher Anstieg der Wasseraufnahme erkennbar (vgl. PCP 4,0).

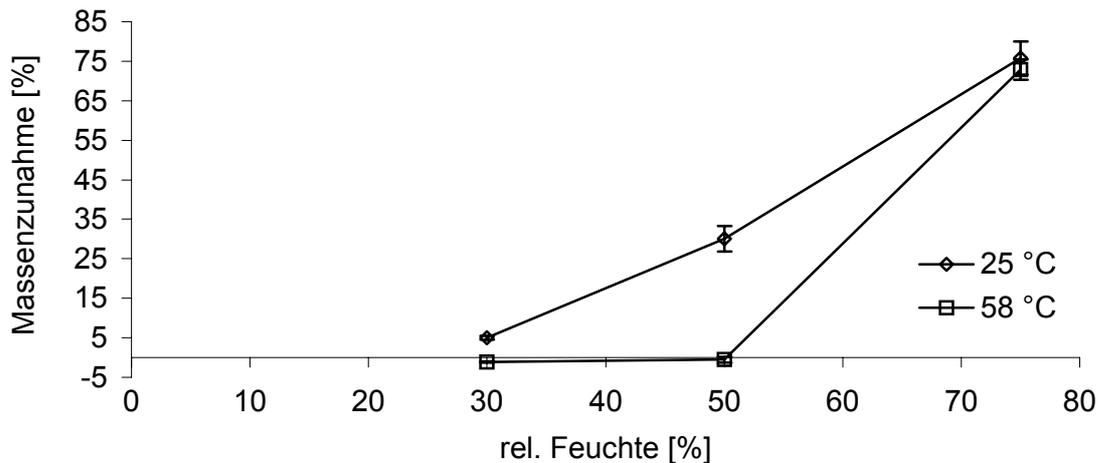


Abbildung 14: Wasseraufnahme bzw. -abnahme des Lyophilisates (PCP 6,8) in Abhängigkeit von der relativen Feuchte [%] bei verschiedenen Lagertemperaturen nach 507 Stunden; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$

4.1.1.4 Vergleich der Wasseraufnahme der gepufferten Lyophilisate und des Polycarbophils

Die Abbildungen zeigen für die lyophilisierten Proben und für das reine Polycarbophil unterschiedliches Wasseraufnahmeverhalten. Das reine Polycarbophil nahm in relativ kurzer Zeit Wasser auf, der erreichte Gleichgewichtszustand veränderte sich dann nicht mehr. Die in verschiedenen Puffern lyophilisierten Polycarbophil-Proben erreichten jedoch ein Maximum in der Wasseraufnahme, danach nahm bei bestimmten Proben der Wassergehalt wieder ab, z. T. bis unter die Ausgangswerte. Ein ähnliches Verhalten wurde von Zeng et al. [90] für lyophilisierte Proben aus Saccharose mit Polyvinylpyrrolidon beobachtet und mit der Kristallisation der Saccharose begründet, die stattfindet, sobald genügend Wasser anwesend ist. Dies führe dazu, dass die Saccharose nicht mehr den Wassergehalt des hydratisierten amorphen Zustandes beibehalten könne. Ein ähnliches Verhalten kann hier für die Citronensäure vermutet werden. Sowohl der Citratpuffer (pH 4,0) als auch der Phosphatpuffer (pH 6,8) enthalten Citronensäure. Ein Kristallisieren der Citronensäure kann zur Abgabe des sorbierten Wassers führen, was die Kurvenverläufe bei den lyophilisierten gepufferten Proben erklären könnte. Polarisationsmikroskopische Untersuchungen zeigten farbige Strukturen, die auf Kristallisation schließen lassen. Der Massenverlust ist besonders auffällig bei den bei

niedrigen rel. Feuchten gelagerten Proben, die nur relativ wenig Wasser aufgenommen haben.

Insgesamt haben – nach Gleichgewichtseinstellung – die mit Phosphatpuffer pH 6,8 hergestellten Proben deutlich mehr Wasser aufgenommen, als die mit Citratpuffer pH 4,0. Möglicherweise kommt es bei diesem höheren pH-Wert zur vermehrten Quellung des Polycarbophils, da eine größere Zahl der Carboxylgruppen dissoziiert vorliegt als bei pH 4,0. Dies könnte bedeuten, dass auch nach der Lyophilisation der Abstand im Polymernetzwerk vergrößert ist, und mehr Wasser aufgenommen werden kann.

4.1.2 Wassergehalt

4.1.2.1 Polycarbophil

Der Wassergehalt von Polycarbophil wurde durch Karl-Fischer-Titration bestimmt [Kap. 3.1.5].

Folgender Wassergehalt wurde ermittelt:

PCP, gelagert über Phosphorpentoxid: 1,90 % (m / m) \pm 0,31 (n = 3)

4.1.2.2 Feste Dispersionen und Lyophilisate

Die Wassergehalte der Festen Dispersionen und Lyophilisate wurden vor und während der Lagerungszeit durch Karl-Fischer-Titration untersucht.

Wassergehalt der unbelasteten Proben (m / m):

PCP 4,0 5,50 % (m / m) \pm 0,16 (n = 3)

PCP 6,8 3,78 % (m / m) \pm 0,08 (n = 3)

Die Tabellen 12 und 13 zeigen die Ergebnisse der Wassergehaltsbestimmungen während der Lagerungszeit.

Tabelle 12: Wassergehalte von PCP 4,0 während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und rel. Feuchten ($\bar{x} \pm s$, n = 2)

r. F. [%]	T [°C]	Wassergehalt [%]		
		1 Woche	6 Wochen	26 Wochen
11	58	5,83 ± 0,19	3,73 ± 1,08	3,63 ± 0,34
	66	4,24 ± 0,13	3,09 ± 0,06	3,25 ± 0,06
	74	5,72 ± 0,55	2,95 ± 0,26	3,10 ± 0,65
30	25	8,35 ± 0,69	7,19 ± 0,01	5,55 ± 0,19
	40	8,77 ± 0,69	7,92 ± 0,26	5,88 ± 0,33
	50	10,79 ± 1,09	7,98 ± 0,33	6,35 ± 0,64
	58	7,40 ± 1,46	8,91 ± 0,39	6,31 ± 0,92
	66	5,90 ± 0,22	5,76 ± 1,13	5,91 ± 0,34
	74	5,31 ± 0,54	5,70 ± 0,02	2,67 ± 0,03

Tabelle 13: Wassergehalte von PCP 6,8 während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen und rel. Feuchten ($\bar{x} \pm s$, n = 2)

r. F. [%]	T [°C]	Wassergehalt [%]		
		1 Woche	6 Wochen	26 Wochen
11	58	5,47 ± 0,66	4,09 ± 0,20	3,05 ± 0,09
	66	5,50 ± 1,38	3,76 ± 0,54	3,26 ± 0,10
	74	4,72 ± 1,65	3,68 ± 0,38	3,00 ± 0,03
30	25	14,55 ± 2,24	10,89 ± 1,90	7,67 ± 0,21
	40	11,17 ± 0,06	11,25 ± 0,33	5,19 ± 1,10
	50	7,12 ± 0,25	3,80 ± 0,53	3,19 ± 0,66
	58	6,14 ± 1,15	4,35 ± 0,32	2,81 ± 0,24
	66	5,09 ± 0,22	4,37 ± 0,22	3,13 ± 0,26
	74	3,74 ± 0,33	3,74 ± 0,42	2,24 ± 0,86

Bei allen Proben kam es innerhalb der Lagerdauer von 26 Wochen zur Abnahme (bzw. bei PCP 4,0, 30 % / 66 °C: Konstanz) des Wassergehaltes. Während die Proben PCP 4,0 sowohl bei 11 % als auch bei 30 % Lagerfeuchte nach 26 Wochen bei steigender Lagertemperatur nahezu gleiche Wassergehalte (Ausnahme:

74 °C / 30 % r. F.) aufwiesen, wurden bei PCP 6,8 bei höheren Temperaturen geringere Wassergehalte bestimmt. Möglicherweise wurde das Wasser in den Proben unterschiedlich gebunden. Beim PCP 4,0 könnte ein Großteil des Wassers unmittelbar an das – hier wahrscheinlich engmaschigere – Polymer gebunden sein. Im PCP 6,8 steht dem Wasser durch ein gröberes Netzwerk (durch vermehrte Quellung vor dem Lyophilisieren) mehr Raum zur Verfügung, so dass Wasser nicht nur am Polymer, sondern auch an weiteren Wasserschichten gebunden ist. Wenn durch Temperaturerhöhung die kinetische Energie erhöht wird, könnte dieses Wasser evtl. schneller desorbieren, woraus geringere Wassergehalte bei höheren Temperaturen resultieren.

4.1.3 Dynamische Differenzkalorimetrie

4.1.3.1 Octreotid

Die DSC-Untersuchung des Octreotids [vgl. Kap. 3.1.6] zeigte weder einen Glasübergang noch eine Schmelzendotherme. Laut Analysenzertifikat kommt es bei 130 °C zu einer Zersetzung.

4.1.3.2 Polycarbophil

Das Polycarbophil wurde mit der DSC 7 (Perkin Elmer) differenzkalorimetrisch untersucht. Dabei wurde eine Glasübergangstemperatur (T_g) von $130,60\text{ °C} \pm 0,30$ gefunden ($n = 4$). Laut Herstellerangaben [8] soll die Glasübergangstemperatur von PCP bei 100 – 105 °C liegen. Von Wratschko wurde für die Substanz eine T_g von 133 °C bestimmt.

Abbildung 15 zeigt die DSC-Kurve des Polycarbofills, aufgenommen mit einer Heizrate von 10 °C / min.

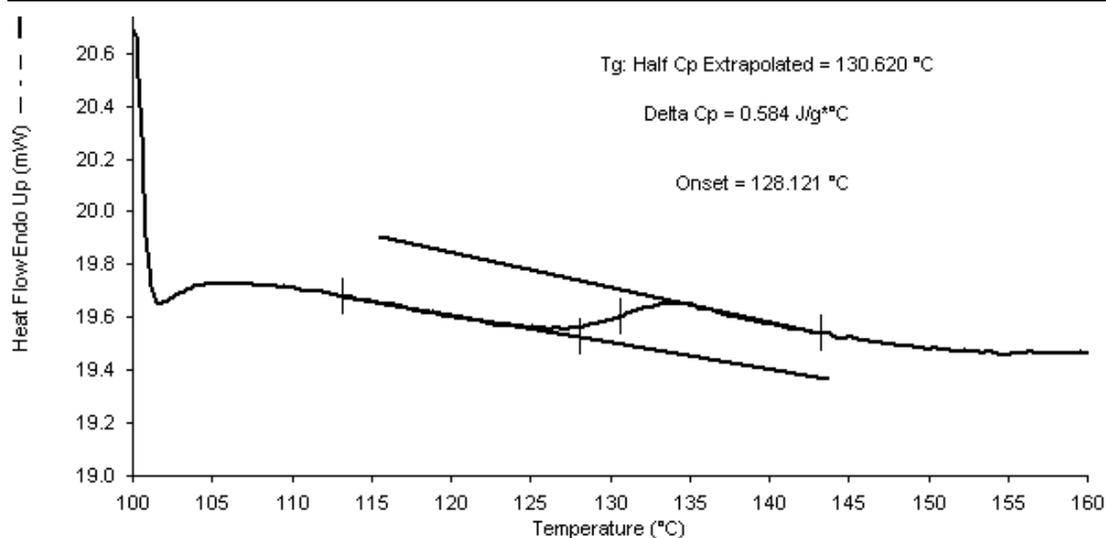


Abbildung 15: Ausschnitt aus einer DSC-Kurve von Polycarbophil; 100 – 160 °C, 10 °C / min, Einwaage: 2,112 mg, verschlossene Tiegel, nicht gelocht

4.1.3.3 Feste Dispersionen und Lyophilisate

Die Lyophilisate und die Festen Dispersionen wurden vor und während der Lagerung mit der DSC 821e / 700 von Mettler untersucht.

4.1.3.3.1 Glasübergangstemperaturen nach 1 Woche

Tabelle 14: Glasübergangstemperaturen der Festen Dispersionen und Lyophilisate nach 1 Woche Lagerzeit; $\bar{x} \pm s$

r. F. [%]	T [°C]	Glasübergangstemperatur [°C]			
		PCP 4,0	Oc PCP 4,0	PCP 6,8	Oc PCP 6,8
11	58	50,07 ± 11,22	54,32 ± 8,28	31,06 ± 19,61	27,20 ± 0,08
	66	33,10 ± 0,01	30,43 ± 0,64	19,29 ± 0,90	21,88 ± 4,82
	74	41,19 ± 13,75	44,77 ± 13,78	21,01 ± 2,47	22,24
30	25	35,95 ± 0,74	11,82 ± 0,31	2,58 ± 13,95	10,34 ± 0,29
	40	36,67 ± 13,37	23,34 ± 0,11	9,34 ± 0,45	10,12 ± 0,49
	50	30,99 ± 2,02	35,83 ± 11,86	25,58 ± 18,40	26,88 ± 19,85
	58	31,07 ± 0,08	33,06 ± 0,06	34,56 ± 0,12	37,70 ± 1,90
	66	35,02 ± 1,14	35,77 ± 0,16	45,30 ± 0,12	41,60 ± 0,71
	74	25,80 ± 12,33	28,20 ± 11,01	30,96 ± 1,03	32,54 ± 15,82

Nach einer Woche Lagerung waren noch sehr starke Schwankungen zwischen den einzelnen Proben für die Glasübergangstemperaturen erkennbar, die Standardabweichungen waren z. T. sehr hoch. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Wassergehaltsbestimmungen, auch hier waren nach einer Woche noch recht hohe Schwankungen der Werte feststellbar. Wahrscheinlich reichte die Zeit nicht aus, um die Proben vollständig zu akklimatisieren, so dass, je nach Wassergehalt der Probe, unterschiedliche Glasübergangstemperaturen gemessen wurden.

Die beiden folgenden Abbildungen (16 und 17) zeigen die Abhängigkeit der Tg von der Lagertemperatur nach einer Woche Lagerungszeit bei 30 % r. F.

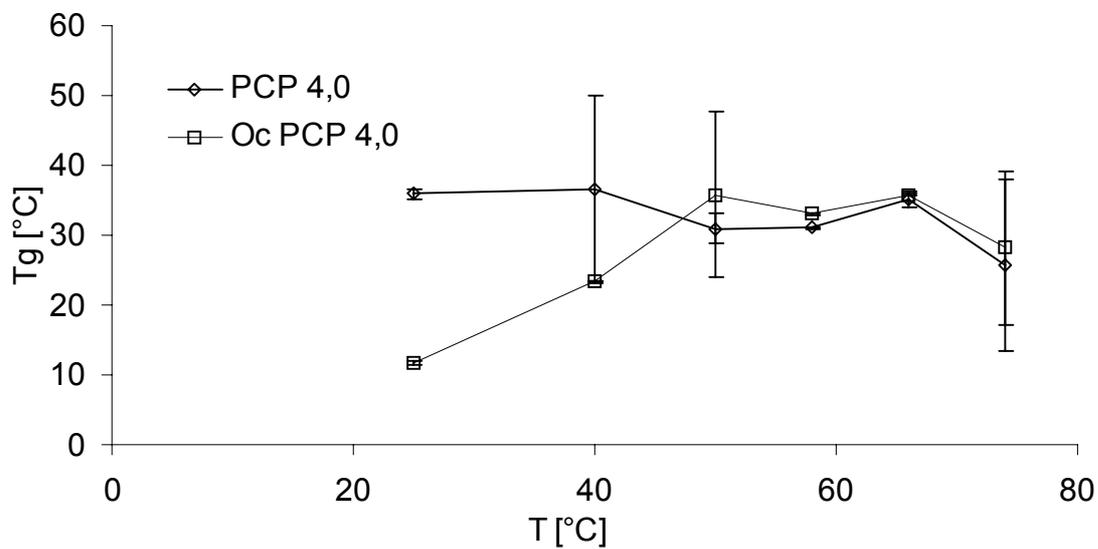


Abbildung 16: Abhängigkeit der Glasübergangstemperaturen von den Lagerungstemperaturen nach 1 Woche (30 % r. F.), Proben mit Citratpuffer;
 $\bar{x} \pm s$

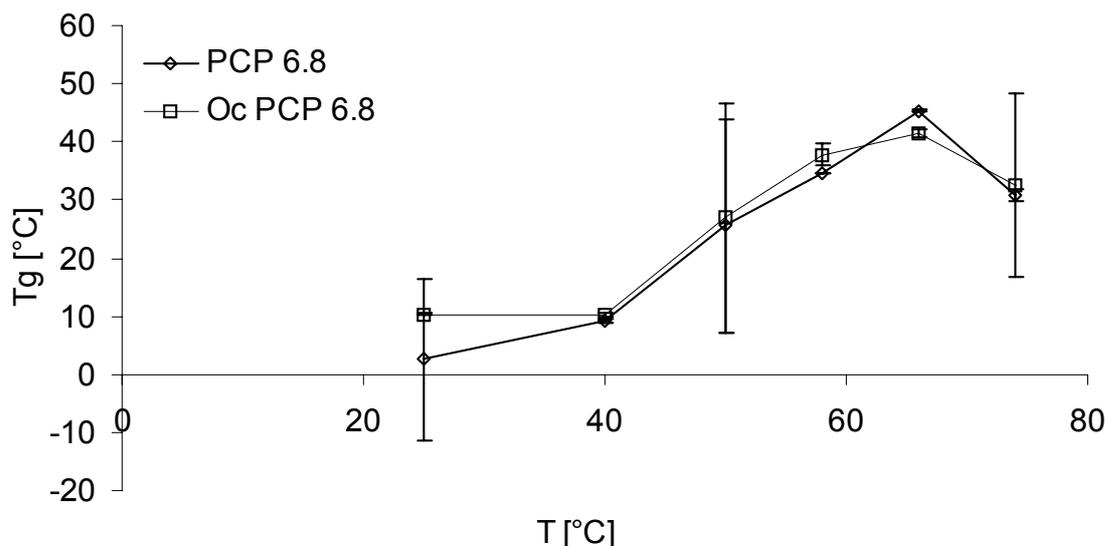


Abbildung 17: Abhängigkeit der Glasübergangstemperaturen von den Lagerungstemperaturen nach 1 Woche (30 % r. F.), Proben mit Phosphatpuffer; $\bar{x} \pm s$

Tendenziell konnte ein Anstieg der Glasübergangstemperaturen mit zunehmender Lagertemperatur beobachtet werden. Dies war bei den Proben mit Phosphatpuffer deutlicher zu erkennen. Zwischen 66 °C und 74 °C kam es jedoch sowohl bei den Proben mit Citratpuffer als auch bei den Proben mit Phosphatpuffer zu einer Abnahme der Tg.

Auch Polycarbophil, welches in Wasser dispergiert und dann lyophilisiert wurde, zeigte bei höherer Temperatur eine geringere Tg. Bei un bearbeitetem PCP kam es mit zunehmender Temperatur zu einem Anstieg der Tg. Die Tabelle 15 zeigt die Glasübergangstemperaturen für die reinen PCP-Proben.

Tabelle 15: Glasübergangstemperaturen von in Wasser dispergiertem und lyophilisiertem PCP und un verarbeitetem PCP nach 1 Woche Lagerung bei verschiedenen Temperaturen; $\bar{x} \pm s$, n = 2

r. F. [%]	T [°C]	Glasübergangstemperatur [°C]	
		PCP lyophilisiert	PCP „roh“
30	25	55,84 ± 0,86	52,09 ± 3,11
	74	42,55 ± 4,54	83,85 ± 0,20

Da mit den Viskositätsuntersuchungen kein Unterschied zwischen den lyophilisierten und den nichtlyophilisierten Proben festgestellt werden konnte, scheint es sich um keine strukturelle Veränderung des Polymers durch die Gefriertrocknung zu handeln. Möglicherweise sind die Polymerketten in den lyophilisierten Proben durch das Dispergieren und die anschließende Gefriertrocknung separiert worden, so dass es bei Temperaturerhöhung zu einer Vergrößerung des für Wasser zur Verfügung stehenden Volumens kommt, es kann also mehr Wasser aufgenommen werden, was zur Verringerung der Tg führt. Beim unbearbeiteten PCP sind evtl. nicht so viele Polymerketten dem Wasser zugänglich. Eine Temperaturerhöhung würde hier zu einer größeren Beweglichkeit der Wassermoleküle in Verbindung mit verringerter Bindungsintensität führen. Es würde also – wie von Oksanen und Zografi [55] für PVP K 30 beschrieben – mit höherer Temperatur weniger Wasser aufgenommen werden, was eine höhere Tg zur Folge hätte.

4.1.3.3.2 Glasübergangstemperaturen nach 15 Wochen

Tabelle 16: Glasübergangstemperaturen der Festen Dispersionen und Lyophilisate nach 15 Woche Lagerzeit; $\bar{x} \pm s$, n = 2

r. F. [%]	T [°C]	Glasübergangstemperatur [°C]			
		PCP 4,0	Oc PCP 4,0	PCP 6,8	Oc PCP 6,8
11	74	64,58 ± 1,28	65,03 ± 0,01	74,40 ± 0,33	68,09 ± 0,66
30	25	32,67 ± 0,19	33,52 ± 0,33	17,84 ± 0,19	25,01 ± 2,14
	50	35,51 ± 1,76	34,71 ± 0,58	44,79 ± 0,43	43,43 ± 0,20
	74	39,56 ± 0,30	38,50 ± 0,19	55,95 ± 0,05	52,34 ± 0,29

Nach 15 Wochen Lagerzeit waren die Standardabweichungen geringer als nach einer Woche. Es kam mit steigender Lagertemperatur und sinkendem Wassergehalt der Proben zum Anstieg der Glasübergangstemperaturen. Der Anstieg war bei den Proben mit Phosphatpuffer pH 6,8 sehr viel stärker als bei Proben mit Citratpuffer pH 4,0. Wie die Wasserdampfsorption [vgl. Kap. 4.1.1] zeigte, nahm PCP 6,8 bei 25 °C / 30 % r. F. ca. 5 % Wasser auf, während für PCP 4,0 keine Wasseraufnahme feststellbar war. Bei diesen Lagerbedingungen liegen die Glasübergangstemperaturen bei PCP 6,8 bei niedrigeren Werten als bei PCP 4,0, was auf den

Weichmachereffekt [69] des Wassers zurückzuführen ist. Dies wird auch bei einem Vergleich der nach 26 Wochen bestimmten Wassergehalte [vgl. Kap. 4.1.2.2] mit den gemessenen Glasübergangstemperaturen deutlich. Bei 25 °C enthielt die Probe mit Phosphatpuffer mehr Wasser (7,0 %) als die Probe mit Citratpuffer (5,6 %), folglich hatte erstere eine geringere Tg. Der Wassergehalt bei 50 °C war bei PCP 4,0 ca. doppelt so hoch wie bei PCP 6,8 (6,4 % zu 3,2 %), auch hier war die Tg bei höherem Wassergehalt tiefer. Bei 74 °C enthielten alle Proben, unabhängig von der Lagerfeuchte, nur ca. 2 – 3 % Wasser und entsprechend liegen die Glasübergangstemperaturen höher als bei den Proben mit mehr Wasser. Allerdings hatten alle Proben bei geringerer Lagerfeuchte höhere Glasübergangstemperaturen, trotz nahezu gleicher Wassergehalte. Die Glasübergangstemperaturen werden also nicht allein durch den Wassergehalt der Proben beeinflusst. Möglicherweise kommt es auch durch die Entstehung der Zersetzungsprodukte während der Lagerung zu einer Veränderung der Tg. Eventuell üben die Zersetzungsprodukte einen Weichmachereffekt aus.

Der Zusammenhang zwischen Lagertemperatur und Tg wird durch die folgenden Abbildungen (18 und 19) verdeutlicht.

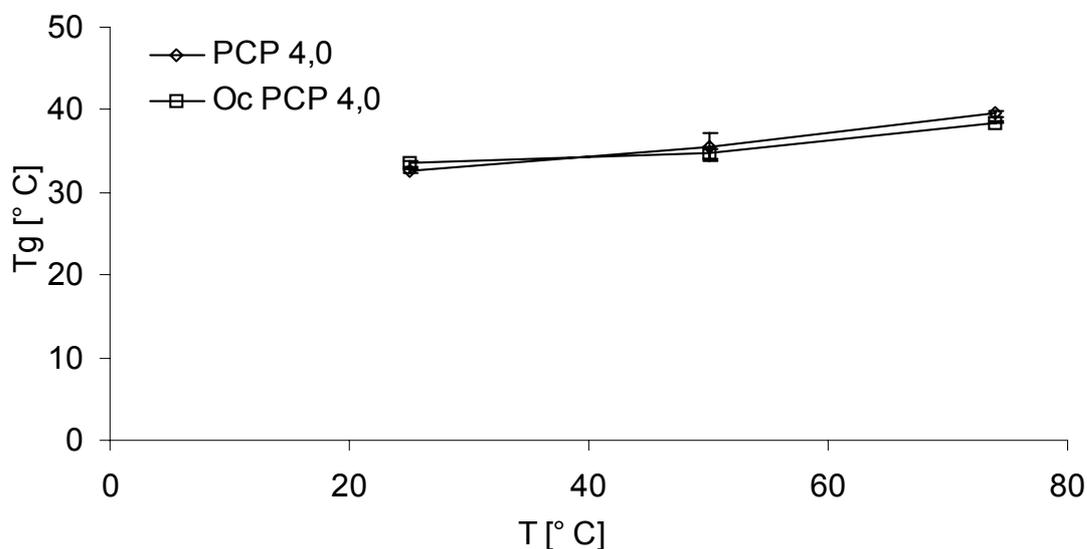


Abbildung 18: Abhängigkeit der Glasübergangstemperaturen von den Lagerungstemperaturen nach 15 Wochen bei 30 % r. F., Proben mit Citratpuffer; $\bar{x} \pm s$, n = 2

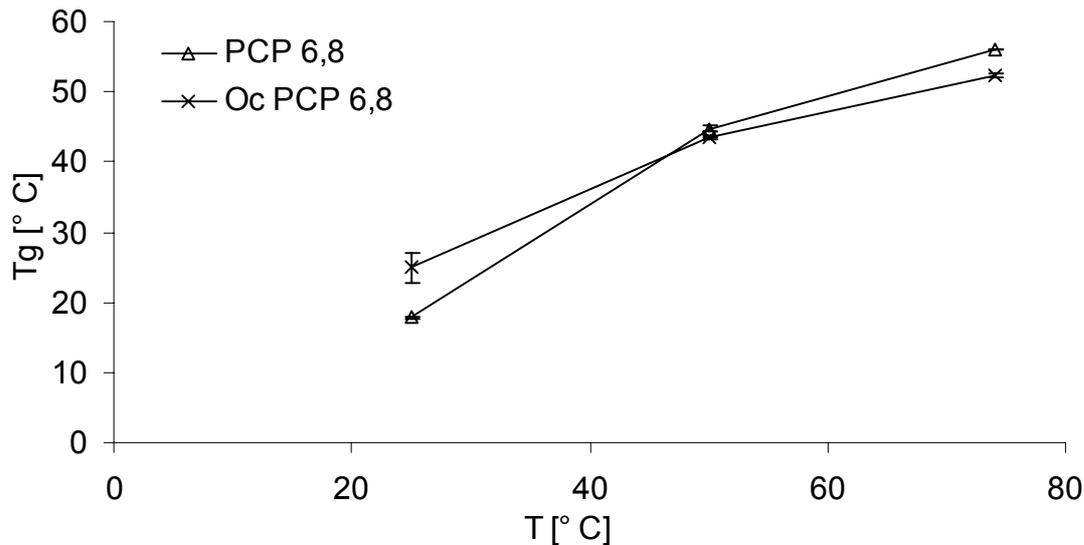


Abbildung 19: Abhängigkeit der Glasübergangstemperaturen von den Lagerungstemperaturen nach 15 Wochen bei 30 % r. F., Proben mit Phosphatpuffer; $\bar{x} \pm s$, n = 2

Die Proben mit Citratpuffer zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen octreotidhaltigen und -freien Proben ($\alpha = 0,05$). Bei den Proben mit Phosphatpuffer mit bzw. ohne Peptid war ein Unterschied sowohl bei 25 °C als auch bei 74 °C Lagertemperatur feststellbar. Bei 25 °C lag die Tg bei den octreotidhaltigen Proben ca. 7 °C höher, dagegen bei 74 °C ca. 4 °C (30 % r. F.) bzw. 6 °C (11 % r. F.) niedriger als in den Proben ohne Peptid. Möglicherweise bildet das Octreotid über Wasserstoffbrückenbindungen zusätzliche Quervernetzungen in dem Polymer aus, welche die Bewegungsfähigkeit einschränken und damit die Tg erhöhen, wie dies auch von Jans [30] für Feste Dispersionen aus Reserpin in PVP vermutet wurde. Dieser Effekt müsste bei einem grobmaschigeren Netzwerk, wie beim Polycarbophil in Phosphatpuffer pH 6,8, stärker ausgeprägt sein, als beim ohnehin wahrscheinlich engmaschigeren Polymer in Citratpuffer pH 4,0, so dass es hier zu keiner nachweisbaren Beeinflussung der Tg durch den Zusatz des Peptids kommt. Bei der höheren Temperatur (74 °C) dagegen werden die Wechselwirkungen zwischen Polymer und Peptid aufgrund der Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen geringer. Außerdem kommt es unter diesen Bedingungen zu einer stärkeren Zersetzung des Octreotids. Dies würde die oben aufgestellte Vermutung eines Weichmachereffektes durch die Zersetzungsprodukte erhärten. Es kann sich hier aber nur um Hypothesen handeln, die weiterer Untersuchungen bedürfen.

Nach 15 Wochen Lagerung bei 25 °C und 30 % r. F. zeigten die Proben mit Citratpuffer (PCP 4,0 und Oc PCP 4,0) endotherme Peaks bei ca. 60 °C. Bei der

Wasserdampfsorption wurde für Proben dieser Art keine Wasseraufnahme festgestellt [vgl. Kap. 4.1.1.2], was mit einer eventuellen Kristallisation der Citronensäure erklärt wurde. Die endothermen Peaks bei ca. 60 °C könnten hier den Schmelzvorgang von Citronensäure-Monohydrat darstellen (Schmelzpunkt: 60 – 70 °C [42]).

4.1.4 Viskosität

4.1.4.1 Polycarbophil

Die Messungen der Viskosität wurden mit einem Ubbelohde-Viskosimeter durchgeführt [vgl. Kap. 3.3.1]. Es sollte untersucht werden, ob das Polymer durch die Art des Dispergierens (Hochgeschwindigkeitsdispergiergerät – Laborrührer) beschädigt wird. Folgende Viskositätswerte wurden erhalten:

Tabelle 17: Viskosität von 0,25 % (m / V) Polycarbophil in Wasser nach Behandlung mit dem Laborrührer (1h) bzw. einem Hochgeschwindigkeitsdispergiergerät (15 min); $\bar{x} \pm s$

Dispergiermethode	Viskosität [mPa s]	Anzahl der Messungen
Laborrührer	1,37 ± 0,01	n = 7
Hochgeschwindigkeits- dispergiergerät (Ultra-Turrax®)	1,24 ± 0,00	n = 10

Die Viskosität der Polycarbophil-Dispersion nach der Behandlung mit dem Laborrührer war signifikant höher als nach der Dispergierung mittels Ultra-Turrax® ($\alpha = 0,05$). Man kann davon ausgehen, dass die hohen Schergeschwindigkeiten des Hochgeschwindigkeitsdispergiergerätes das Polymer strukturell zerstören und zu Funktionsverlust führen [9]. Für die Herstellung der Festen Dispersionen wurde daher zur Dispergierung der Laborrührer verwendet.

4.1.4.2 Dispersionen und Lyophilisate

Der Einfluss des Puffers und des Lyophilisierens auf die Viskosität der Polycarbophil-Dispersionen wurde durch Messungen mit dem Ubbelohde-Viskosimeter untersucht [vgl. Kap. 3.3.1]. Folgende Tabelle zeigt die für die verschiedenen Proben erhaltenen Werte.

Tabelle 18: Viskositäten der in verschiedenen Puffern hergestellten Dispersionen und Einfluss des Lyophilisierens; $\bar{x} \pm s$

Probe (Behandlung)		Viskosität [mPa s]	Anzahl der Messungen
PCP 4,0	„roh“	0,81 ± 0,01	6
	lyophilisiert	0,81 ± 0,00	6
Citratpuffer		0,65 ± 0,00	6
PCP 6,8	„roh“	1,18 ± 0,01	10
	lyophilisiert	1,17 ± 0,01	6
Phosphatpuffer		0,69 ± 0,00	6

„roh“: PCP im jeweiligen Puffer mit dem Laborrührer dispergiert,
Konzentration: 0,25 % (m / V)

lyophilisiert: PCP im Puffer mit dem Laborrührer dispergiert, lyophilisiert und
entsprechend einer Konzentration von 0,25 % (m / V) redispergiert

Durch den Zusatz von 0,25 % (m / V) Polycarbophil wurde die Viskosität der Puffer signifikant erhöht ($\alpha = 0,05$).

Die Viskositäten der in Phosphatpuffer dispergierten PCP-Proben war erwartungsgemäß signifikant höher als die der Proben, die in Citratpuffer dispergiert wurden ($\alpha = 0,05$). Das Polycarbophil hat einen pKa –Wert von $6,0 \pm 0,5$ [9], so dass bei einem pH-Wert von 6,8 mehr Carboxylgruppen dissoziiert vorliegen. Die negativ geladenen Gruppen stoßen sich ab, werden solvatisiert, und es kommt zur Quellung des PCP. Dagegen liegen im Citratpuffer die Carboxylgruppen weitgehend undissoziiert vor, sie sind weniger solvatisiert, die Quellung und damit die Viskosität sind geringer.

In Citratpuffer bestand kein signifikanter Unterschied zwischen lyophilisierten und nichtlyophilisierten Proben ($\alpha = 0,05$), d. h. der Gefriertrocknungsprozess hat keinen

signifikanten Einfluss auf die Viskosität der Proben, eine strukturelle Veränderung durch die Lyophilisation ist daher nicht wahrscheinlich. Mit 1 %iger Irrtumswahrscheinlichkeit besteht auch in Phosphatpuffer kein Unterschied zwischen lyophilisierten und nicht lyophilisierten Proben.

4.1.5 Sorption von Octreotid an Oberflächen

Wie in Kap. 3.2 beschrieben, wurde das Sorptionsverhalten des Octreotids in verschiedenen Puffern an Glas und an Polyethylen untersucht.

4.1.5.1 Adsorption an Glas in Citratpuffer pH 4,0

Zunächst wurden die HPLC-Flächenwerte der Octreotid-Lösungen in Citratpuffer pH 4,0 ohne das Adsorbens Glasperlen mit den Flächenwerten der Proben verglichen, die zuvor mit Glasperlen versetzt wurden.

Dabei wurden für alle untersuchten Konzentrationen bei den Proben, die mit Glasperlen versetzt wurden, signifikant geringere Flächenwerte gefunden als bei Proben ohne Glasperlen ($\alpha = 0,05$). Die Adsorptionsisothermen des Octreotids an Glas wiesen hier auf eine monomolekulare Adsorption nach Langmuir hin. Eine Auftragung der adsorbierten Peptidmenge pro Flächeneinheit des Glases gegen die Gleichgewichtskonzentration des Peptids in der Lösung zeigt folgendes Aussehen (Abb. 20):

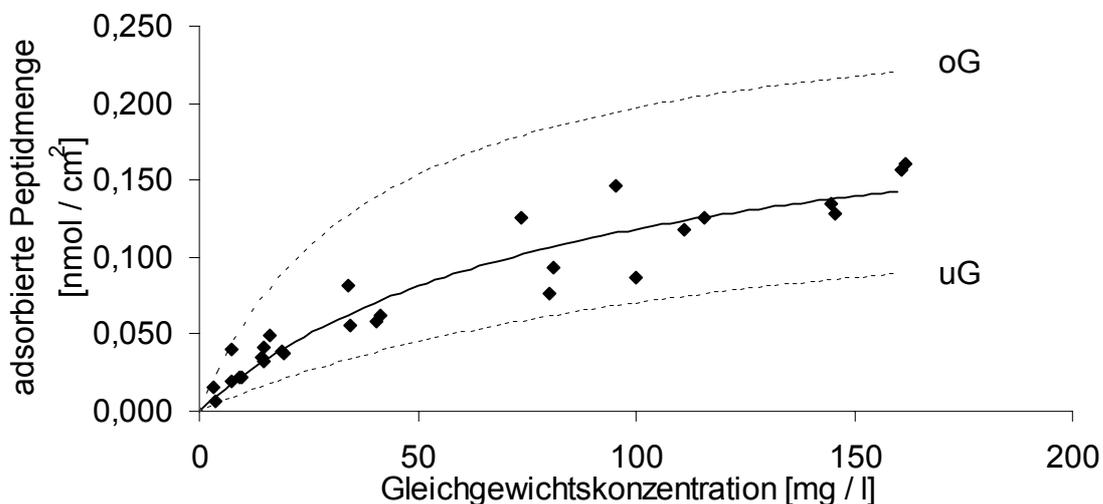


Abbildung 20: Adsorptionsisotherme des Octreotids an Glas in Citratpuffer pH 4,0 (n = 4) mit unterer (uG) und oberer (oG) Grenze des Konfidenzintervalls

Die Nichtlineare Regression mit SPSS erfolgte anhand der Langmuir-Gleichung:

$$x / m = a \cdot c / (b + c)$$

mit: x / m : Adsorbierte Peptidmenge pro Oberflächeneinheit des Glases
[nmol / cm²]

a: maximal adsorbierbare Peptidmenge pro Oberflächeneinheit des Glases [nmol / cm²]

c: Peptid-Konzentration im Gleichgewicht [mg / l]

b: Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten aus Desorption und Adsorption (k_{Des} / k_{Ads}) [mg / l];

Dabei wurden für die Parameter a und b folgende Werte ermittelt (Tab. 19):

Tabelle 19: Parameter der Nichtlinearen Langmuir-Regression aus der Adsorption von Octreotid an Glas in Citratpuffer pH 4,0; angegeben sind die Werte für a und b, der asymptotic standard error (ase) sowie die obere und untere Grenze des Konfidenzintervalls; $r^2 = 0,904$

	Parameter	ase	uG	oG
a [nmol / cm²]	0,2182	0,0273	0,1620	0,2744
b [mg / l]	84,6	22,0	39,3	129,9

Die maximal adsorbierbare Menge des Peptids pro Glasoberflächeneinheit beträgt hier 0,2182 nmol / cm². Bei der Annahme einer monomolekularen Adsorption, würde dies eine Fläche von 0,761 nm² für das Octreotid-Molekül bedeuten. Johansen et al. [31] fanden für Tetanustoxoid eine von jedem Molekül belegte Fläche von 268 nm².

4.1.5.2 Adsorption an Glas in Phosphatpuffer pH 6,8

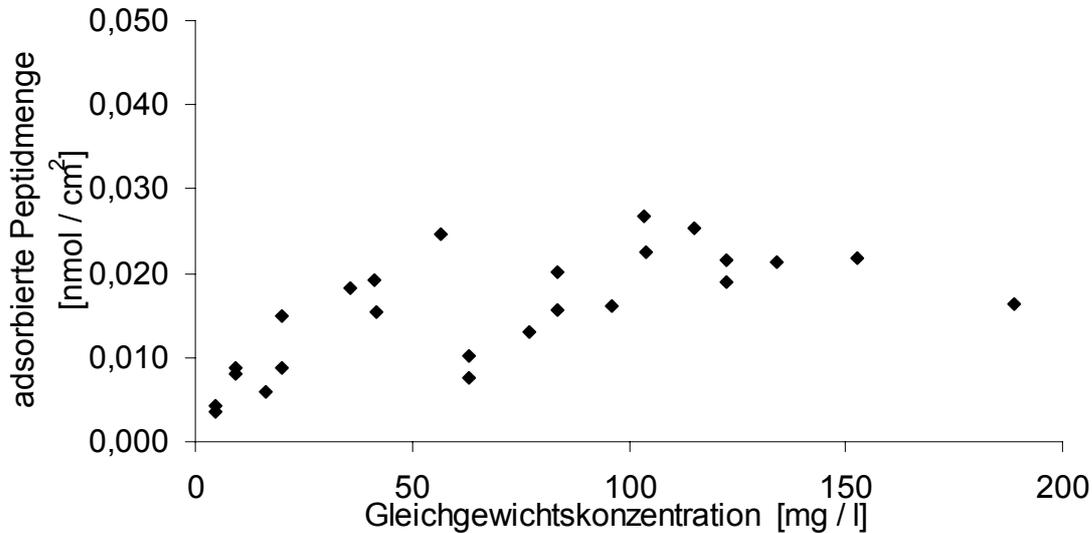


Abbildung 21: Adsorptionsisotherme des Octreotids an Glas in Phosphatpuffer pH 6,8 (n = 3)

Die Abb. 21 zeigt die Adsorptionsisotherme des Octreotids in Phosphatpuffer pH 6,8. Auch hier erfolgte zunächst ein Vergleich der HPLC-Flächenwerte der jeweiligen Konzentrationen mit und ohne Glasperlen. Die mit Glasperlen versetzten Lösungen zeigten geringere Flächenwerte als die Lösungen ohne Adsorbens. Die Unterschiede waren jedoch nicht immer signifikant ($\alpha = 0,05$).

Es ist zu erkennen, dass wesentlich weniger Peptid am Glas adsorbiert wird. Auch hier wurde eine Nichtlineare Regression auf Basis der Langmuir-Gleichung durchgeführt. Die Adsorption folgte jedoch nicht diesem Modell ($r^2 = 0,497$), die Langmuir-Parameter a und b können daher nicht angegeben werden.

4.1.5.3 Adsorption an Polyethylen

Es wurden Kontaktzeiten zwischen 90 Minuten und 24 Stunden getestet. Sowohl bei der Lösung in Citratpuffer als auch in Phosphatpuffer konnte keine Adsorption des Octreotids an die Oberfläche des Polyethylens festgestellt werden. Zwischen den Flächenwerten mit und ohne Adsorbens bestand kein signifikanter Unterschied ($\alpha = 0,05$).

4.2 Chemische Befunde

4.2.1 Zersetzung des Octreotids in Lyophilisaten und Festen Dispersionen bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Der Zersetzungsverlauf des Octreotids wurde in Lyophilisaten und Festen Dispersionen mit Citratpuffer pH 4,0 bzw. Phosphatpuffer pH 6,8 über 178 Tage verfolgt. Es wurde dabei der Einfluss der Temperatur und der relativen Feuchte auf die Zersetzung des Peptids untersucht.

4.2.1.1 Octreotid-Lyophilisat mit Citratpuffer (Oc 4,0)

Mit zunehmender Temperatur kam es bei den mit Citratpuffer lyophilisierten Proben zu einer stärkeren Abnahme des Gehaltes an Octreotid. Dies war sowohl bei der Lagerung bei 11 % r. F. (Abb. 23 - 25) als auch bei 30 % r. F. (Abbildung 22) zu beobachten. Die bei 25 °C / 30 % r. F. gelagerten Proben zeigten über den Untersuchungszeitraum keine signifikante Gehaltsabnahme ($\alpha = 0,05$). Der Gehalt der bei 25 – 50 °C gelagerten Proben stieg zum Ende der Einlagerungszeit wieder an. Bei 74 °C / 30 % r. F. war schon nach 56 Tagen die Bestimmungsgrenze unterschritten.

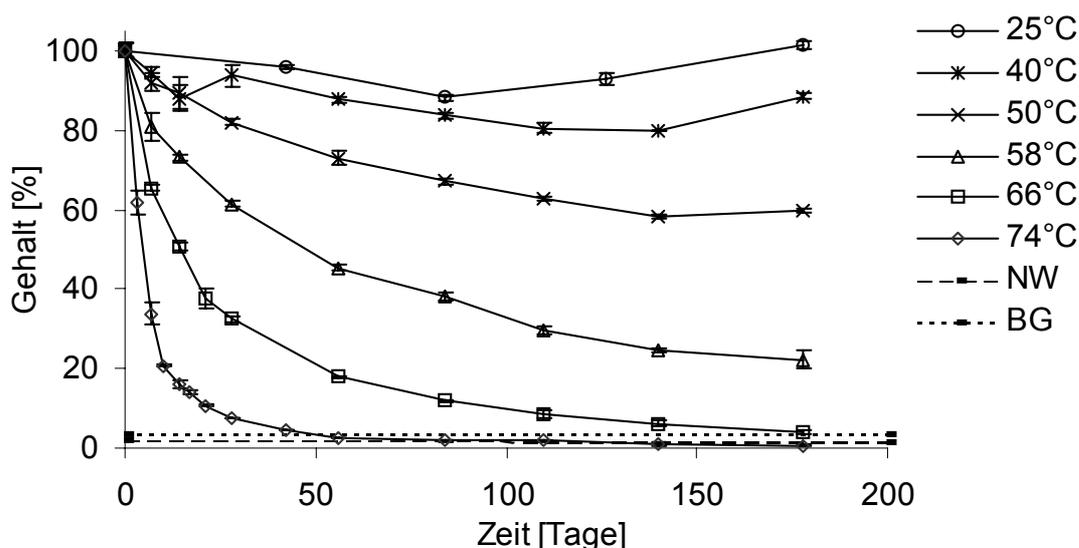


Abbildung 22: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2
NW: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze

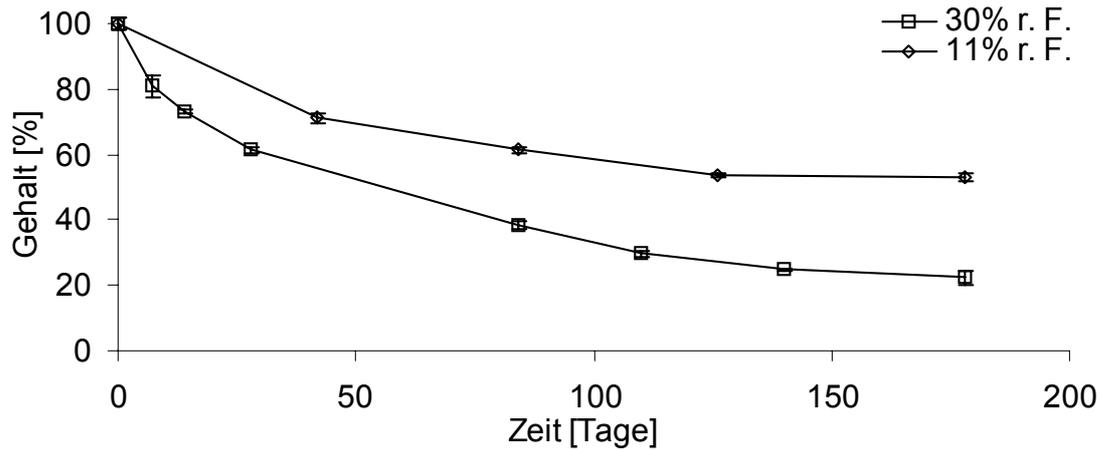


Abbildung 23: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

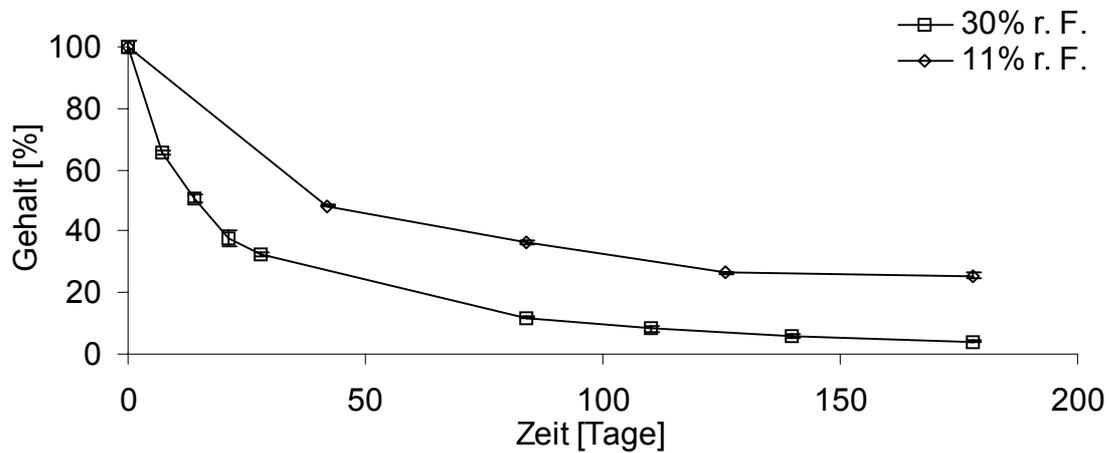


Abbildung 24: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 66 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

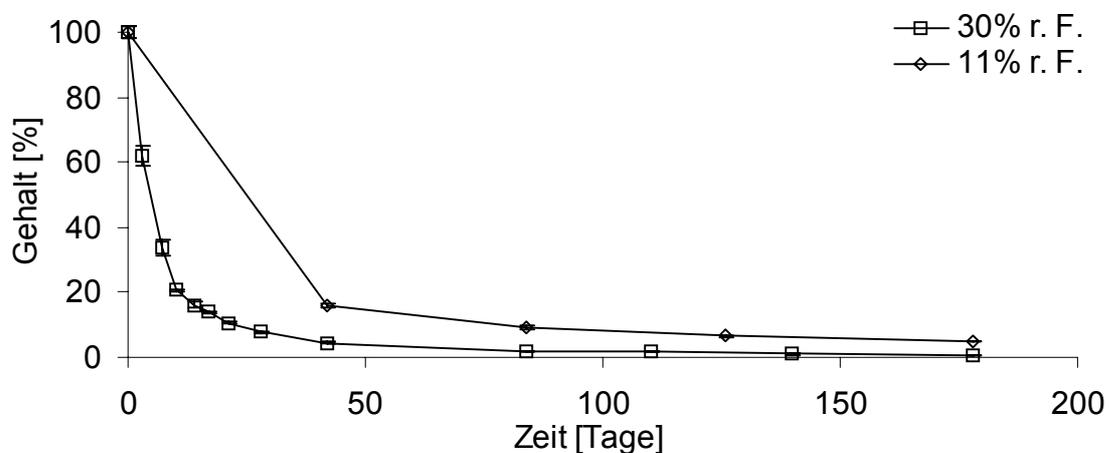


Abbildung 25: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 74 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

Bei allen untersuchten Temperaturen kam es bei höherer relativer Lagerfeuchte zu einer schnelleren Zersetzung des Octreotids.

4.2.1.2 Octreotid-Lyophilisat mit Phosphatpuffer (Oc 6,8)

Auch die Lyophilisate mit Phosphatpuffer zeigten mit zunehmender Temperatur eine schnellere Zersetzung, die RGK nahm zu [vgl. Kap. 4.3.1]. Im Gegensatz zu den Lyophilisaten mit Citratpuffer war die Abnahme des Gehaltes aber nicht so stark, dass er unter die Bestimmungsgrenze fiel (Abb. 26 – 29). Auch bei diesen Proben war bei Lagerbedingungen von 25, 40 und 50 °C / 30 % r. F. nach 126 bzw 140 Tagen Lagerung ein Anstieg des Octreotid-Gehaltes feststellbar.

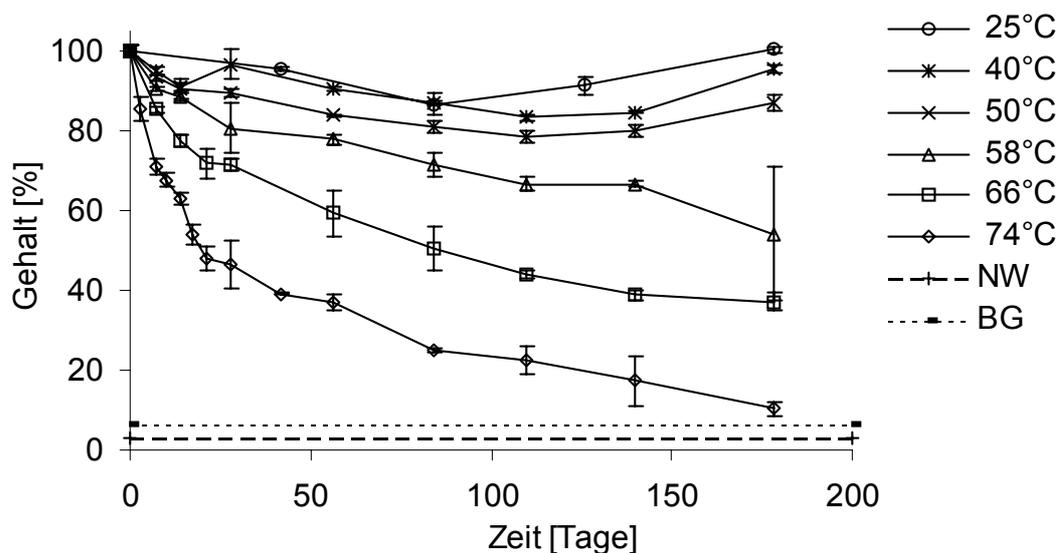


Abbildung 26: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) bei 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

NW: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze

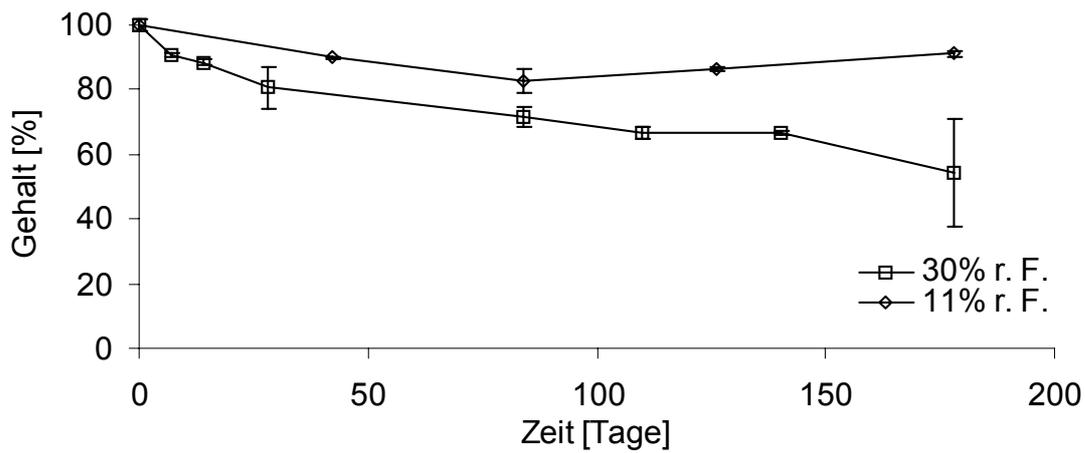


Abbildung 27: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

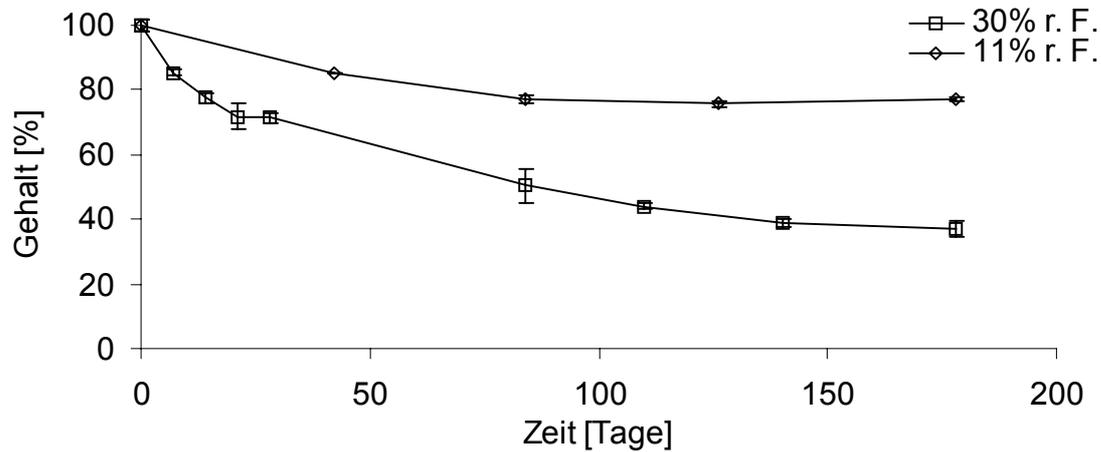


Abbildung 28: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) bei 66 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

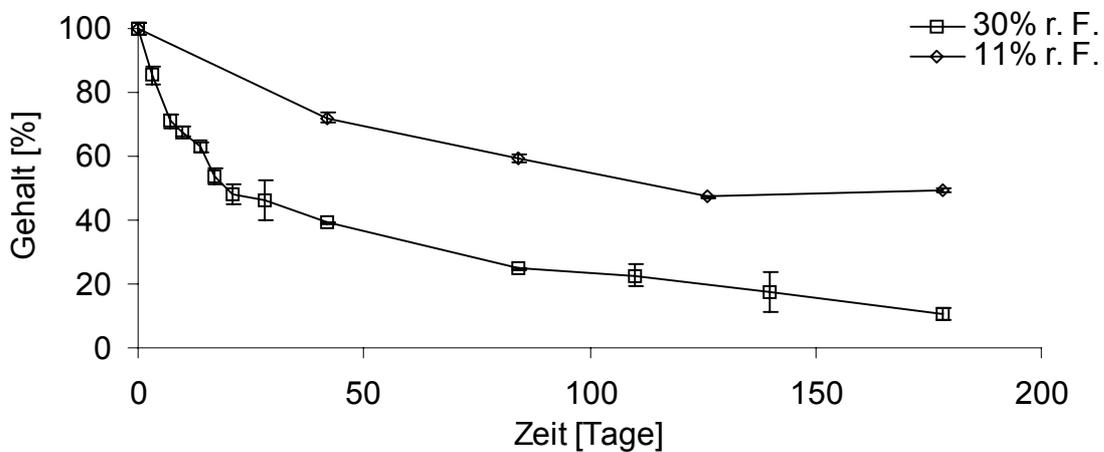


Abbildung 29: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) bei 74 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

Wie mit Citratpuffer war auch bei den Lyophilisaten mit Phosphatpuffer mit höherer Lagerfeuchte eine höhere Zersetzungsgeschwindigkeit verbunden. Bei 11 % relativer Feuchte stieg die Zersetzungsgeschwindigkeit, wie auch bei 30 %, mit der Lagertemperatur an.

4.2.1.3 Feste Dispersionen aus Octreotid mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0)

Der Octreotid-Gehalt der Festen Dispersionen mit Citratpuffer sank bei beiden Lagerfeuchten mit zunehmender Lagerungstemperatur. Dabei erreichten die Proben, welche bei 74 °C gelagert wurden, schon nach 21 Tagen die Bestimmungsgrenze, auch bei Lagerung bei 66 °C sank der Gehalt relativ schnell unter die Bestimmungsgrenze (84 Tage). Bei 25 und 40 °C war auch hier ein Gehaltsanstieg zum Ende der Lagerzeit erkennbar. Abbildung 30 zeigt die Gehaltsabnahme bei Lagerung bei 30 % r. F., Abbildung 31 – Abbildung 33 stellen vergleichend die Abnahme des Octreotid-Gehaltes bei Lagerung bei 11 % und 30 % r. F. gegenüber.

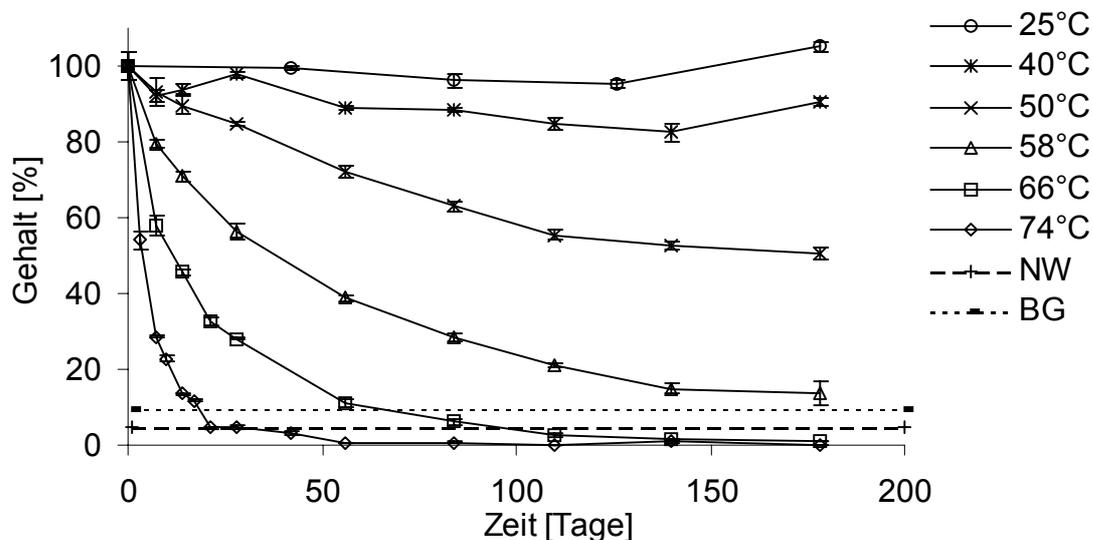


Abbildung 30: Zersetzung von Octreotid in Fester Dispersion mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) bei 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

NW: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze

Auch bei den Festen Dispersionen mit Citratpuffer sank der Peptidgehalt mit höherer Lagerfeuchte bei gleicher Temperatur schneller ab.

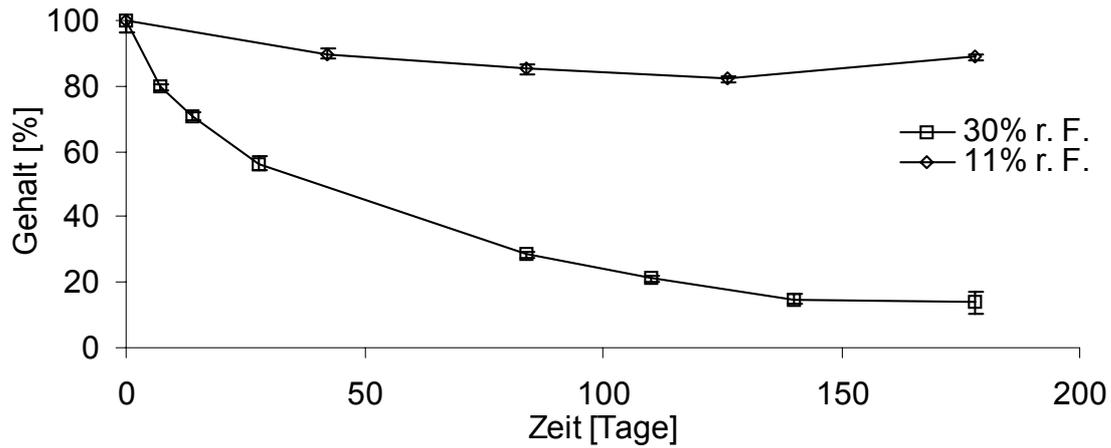


Abbildung 31: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

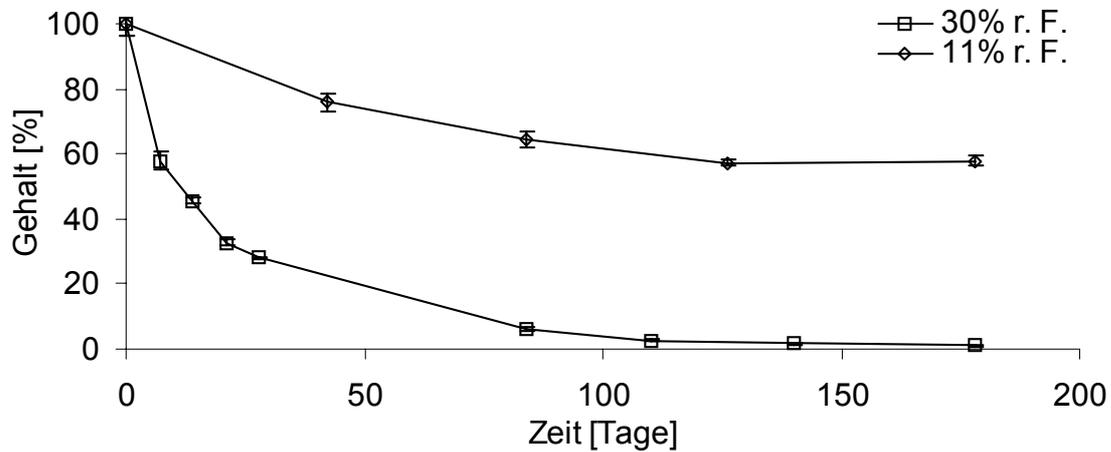


Abbildung 32: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) bei 66 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

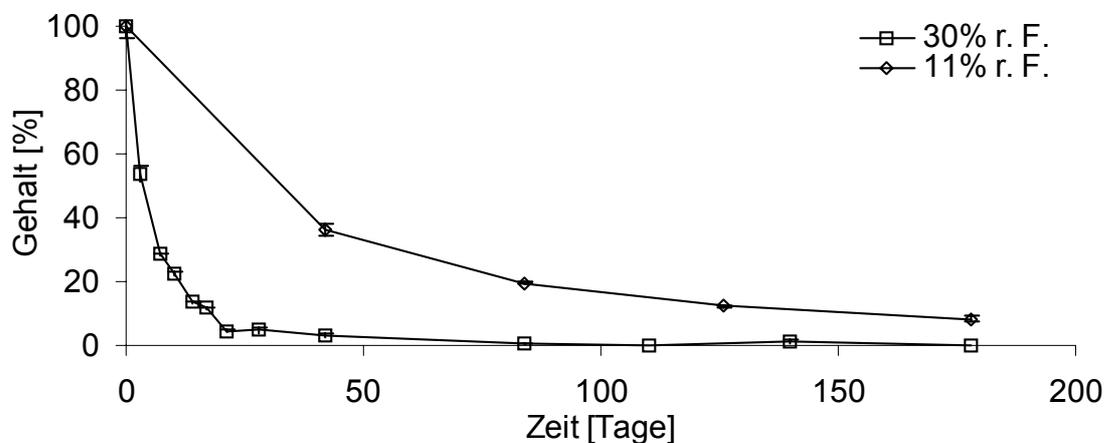


Abbildung 33: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) bei 74 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

4.2.1.4 Feste Dispersionen aus Octreotid mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8)

Die Festen Dispersionen aus Octreotid und Phosphatpuffer zeigten über den Untersuchungszeitraum bei Lagerung bei 25 – 50 °C und 30 % r. F. keine Gehaltsabnahme, nach 140 Tagen Lagerung war sogar eine Zunahme des Octreotid-Gehaltes erkennbar. Erst ab 58 °C sank der Octreotid-Gehalt mit zunehmender Lagertemperatur schneller ab (Abbildung 34).

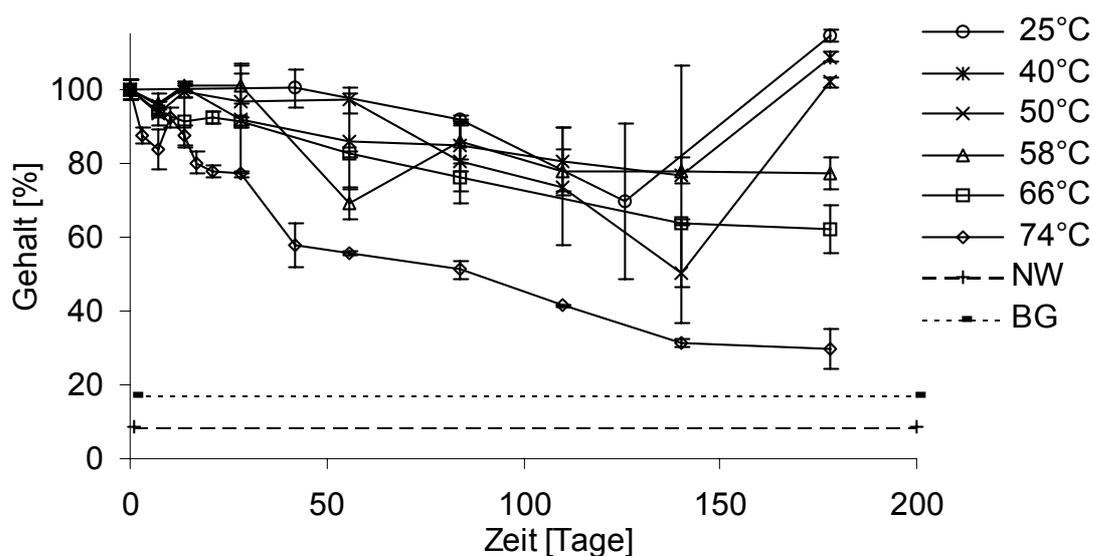


Abbildung 34: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) bei 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2
NW: Nachweisgrenze, BG: Bestimmungsgrenze

Die bei 11 % r. F. gelagerten Proben wiesen bei Temperaturen bis 66 °C nach 178 Tagen keine Gehaltsabnahme auf. Erst bei 74 °C sank der Peptid-Gehalt auf ca. 88 % des Ausgangsgehalts ab.

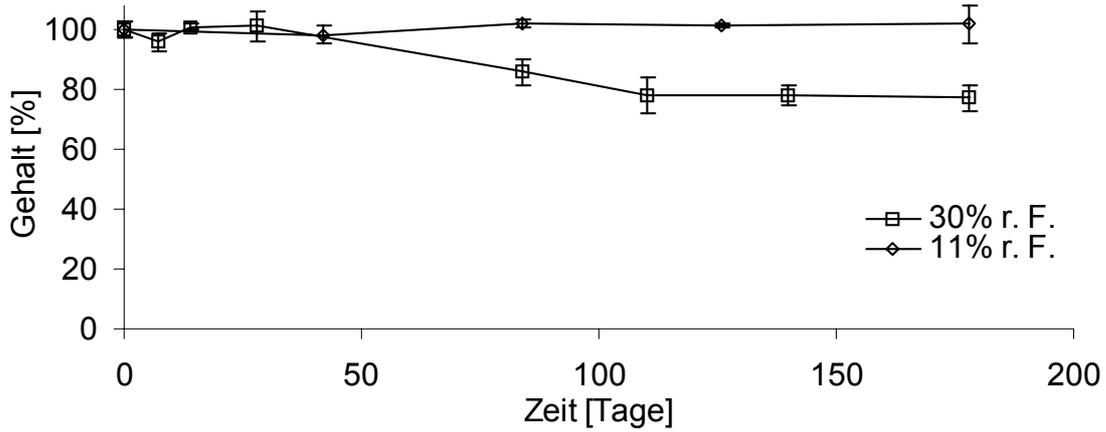


Abbildung 35: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) bei 58 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

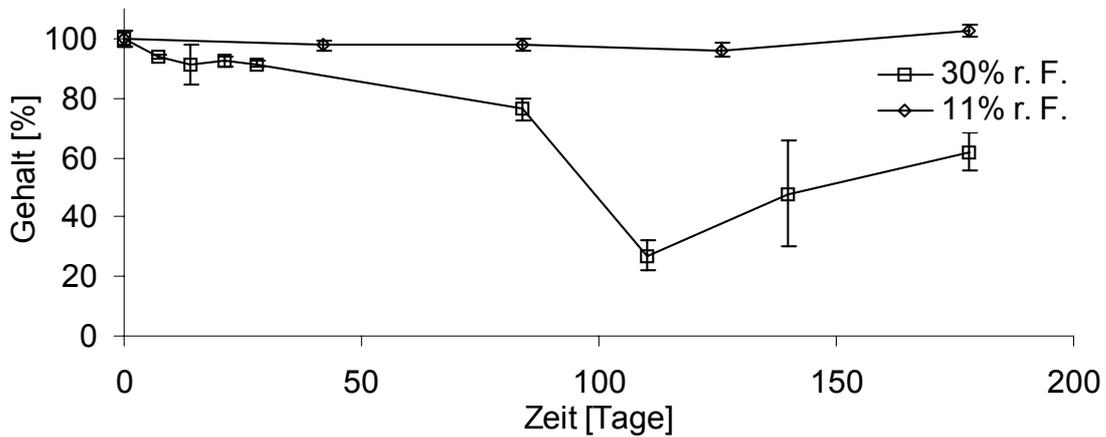


Abbildung 36: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) bei 66 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

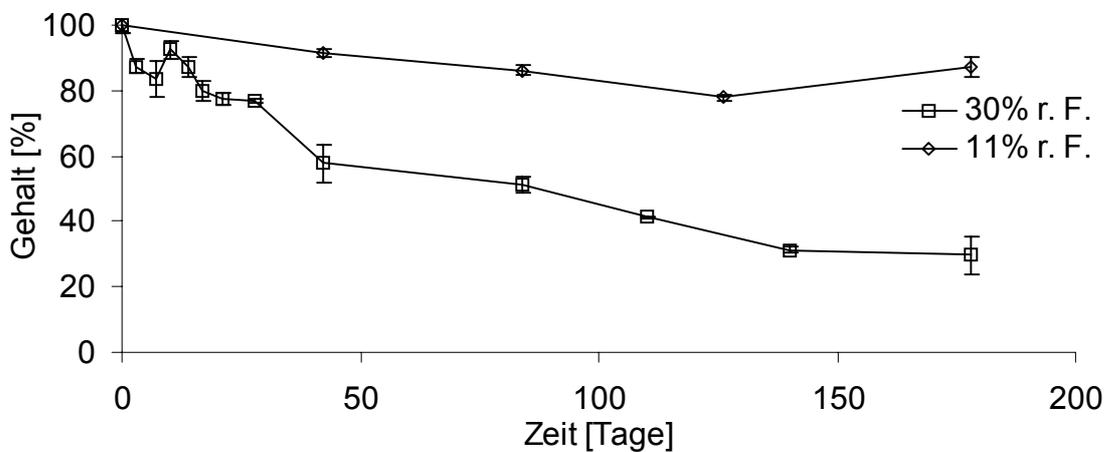


Abbildung 37: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) bei 74 °C; $\bar{x} \pm s$, n = 2

Sowohl in den Lyophilisaten als auch in den Festen Dispersionen kam es mit zunehmender Lagerfeuchte bei gleichen Temperaturen zu einer schnelleren Gehaltsabnahme. Bis auf die Proben Oc PCP 6,8, die bei Temperaturen bis 50 °C bei 30 % r. F. und bis 66 °C bei 11 % r. F. keine Gehaltsabnahme zeigten, nahm mit zunehmender Temperatur die Octreotid-Zersetzung zu.

Auffällig war, dass bei geringen Lagertemperaturen (25 und 40 °C) ein Anstieg des Peptid-Gehaltes bei allen Proben zu beobachten war. Bei Oc PCP 6,8 wurde dieser Anstieg besonders deutlich (+ 14 %), hier kam es auch noch bei höheren Lagertemperaturen zu einem Anstieg des Octreotid-Gehaltes. Mittels LC-MS-Untersuchungen wurde die Reinheit der Octreotid-Peaks untersucht, es konnte keine Überlagerung (z. B. mit Zersetzungsprodukten) festgestellt werden. Die HPLC-Methode wurde während der Lagerzeit nicht verändert, mit einer erneuten Kalibrierung nach sechs Monaten konnte kein signifikanter Unterschied zur ersten Kalibrierung nachgewiesen werden [vgl. Kap. 3.1.1.2.5]. Somit konnten analytische Gründe für den Anstieg weitgehend ausgeschlossen werden. Auch Wratschko [86] konnte während der Einlagerungszeit einen Gehaltsanstieg des Desmopressins – besonders bei geringen Lagertemperaturen – beobachten.

Ein Erklärungsansatz könnte in der Veränderung des molaren Extinktionskoeffizienten des Octreotids liegen. Schicknus et al. [66] konnten einen Einfluss von hydrotropen Substanzen auf die durch UV-Detektion messbare Estradiol-Konzentration feststellen. Sie vermuten Interaktionen von Wassermolekülen mit dem π -Elektronensystem des Estradiols, was den molaren Extinktionskoeffizienten erhöht. Durch Zusatz von hydrotropen Substanzen könnten die Wassercluster-Estradiol-Interaktionen verringert werden und der Extinktionskoeffizient auf seinen Ausgangswert zurückkehren.

In dieser Arbeit war der Gehaltsanstieg bei den Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer bei 25 °C (Oc PCP 6,8) am größten. Dies waren auch die Proben, die den größten Wassergehalt nach 26 Wochen Lagerzeit aufwiesen. Um diesen Effekt nachzuweisen, sind weitere Untersuchungen mit anderen Lösungsmitteln, z. B. Isopropanol oder hydrotropen Substanzen (z. B. Harnstoff), nötig.

Die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die verschiedenen Lyophilisate und Festen Dispersionen erfolgt in Kapitel 4.3.1 .

Der Einfluss der Temperatur, der relativen Feuchte, des pH-Wertes und des Polymers wird in Kapitel 4.3.2 näher betrachtet und quantifiziert.

Tabellarische Zusammenstellungen des Octreotid-Gehaltes in den verschiedenen Lyophilisaten und Festen Dispersionen bei unterschiedlichen Lagerbedingungen befinden sich im Anhang.

4.2.2 Entstehung von Zersetzungsprodukten

Bei der Lagerung der Lyophilisate und Festen Dispersionen entstanden abhängig von den Lagerungsbedingungen zu unterschiedlichen Zeiten verschiedene Zersetzungsprodukte, deren Molmassen – bei ausreichender Trennung – über LC-MS ermittelt wurden. Daraus konnten mögliche Zersetzungsprodukte abgeleitet werden.

In Kap. 3.1.1.1 sind Chromatogramme mit unterschiedlichen Detektionsmethoden mit Zersetzungsprodukten des Octreotids aufgeführt. Erkennbar ist dort, dass fast alle Zersetzungsprodukte eine längere Retentionszeit als das Octreotid selbst aufwiesen. Da der Fließmittelgradient vom polareren Anteil zum unpolaren Anteil [vgl. Kap. 3.1.1.2] verlief, waren die entstandenen Produkte wahrscheinlich weniger polar als das Ausgangspeptid.

Die Detektion mit dem Fluoreszenzdetektor (Absorption bei 270 nm, Emission bei 350 nm) zeigte die gleichen Zersetzungspeaks wie die anderen Detektionsverfahren. Daher ist anzunehmen, dass alle nachweisbaren Zersetzungsprodukte die Aminosäure Tryptophan [73] bzw. einen intakten Indolring [62] enthielten.

Ausgehend von der Struktur des Octreotids sind mehrere Zersetzungsreaktionen denkbar. Abbildung 38 zeigt die möglichen Angriffspunkte am Octreotid-Molekül.

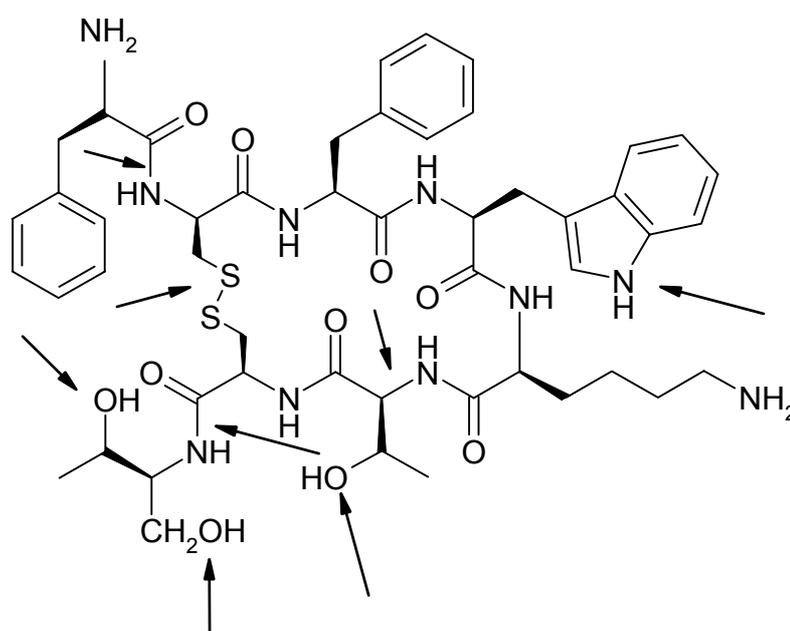


Abbildung 38: Struktur des Octreotids mit möglichen Angriffspunkten für Zersetzungsreaktionen (Pfeile)

Während der Lagerung können Produkte durch Abspaltung bestimmter Gruppen des Moleküls entstehen. Außerdem sind Reaktionen zwischen dem Octreotid bzw. dessen Zersetzungsprodukten und anderen im Lyophilisat oder in der Festen Dispersion enthaltenen Substanzen, wie z. B. den Bestandteilen der Puffersysteme, denkbar. In Tabelle 20 sind mögliche Produkte und Reaktionen mit den entsprechenden Massenänderungen aufgeführt.

Tabelle 20: Mögliche Zersetzungsreaktionen des Octreotids

Mögliche Produkte		ΔM^*
A	Hydrolyse zur „threoninolfreien“ Form	- 87
	Hydrolyse zur „D-Phenylalaninolfreien“ Form	- 147
B	Veresterung mit Essigsäure an verschiedenen OH-Gruppen, dadurch unterschiedliche Retentionszeiten strukturisomerer Produkte	+ 42
	Veresterung mit Citronensäure an verschiedenen OH-Gruppen, dadurch unterschiedliche Retentionszeiten strukturisomerer Produkte	+ 174
	Veresterung mit Aconitsäure (= Citronensäure minus 1 Wasser) oder zweifache Veresterung mit 1 Molekül Citronensäure	+ 156
C	Oxidation des Indolringes am Tryptophan	+ 4 + 16
	reduktive Spaltung bzw. Oxidation der Disulfidbrücke	+ 2 + 50
D	Kondensationen / β -Eliminierung	- 18
E	Isomerisierung	-
F	Aggregation	$x \cdot M_{\text{Peptid}}$

* für die Berechnung der Massen der Zersetzungsprodukte wurde die „exakte Masse“ des Octreotids (ohne Isotope, 1018 D) zu Grunde gelegt, nicht das Molekulargewicht (1019,3 D)

Wasserabspaltung der Citronensäure zu Aconitsäure erst bei Erhitzen auf 175 °C stattfindet [4], ist ein solches Produkt hier nicht wahrscheinlich.

Eine Esterbildung wird durch Säuren katalysiert, für eine schnelle Gleichgewichtseinstellung sind erhöhte Temperaturen erforderlich.

Abbildung 40 zeigt die möglicherweise entstehenden Ester mit ihren Molmassen.

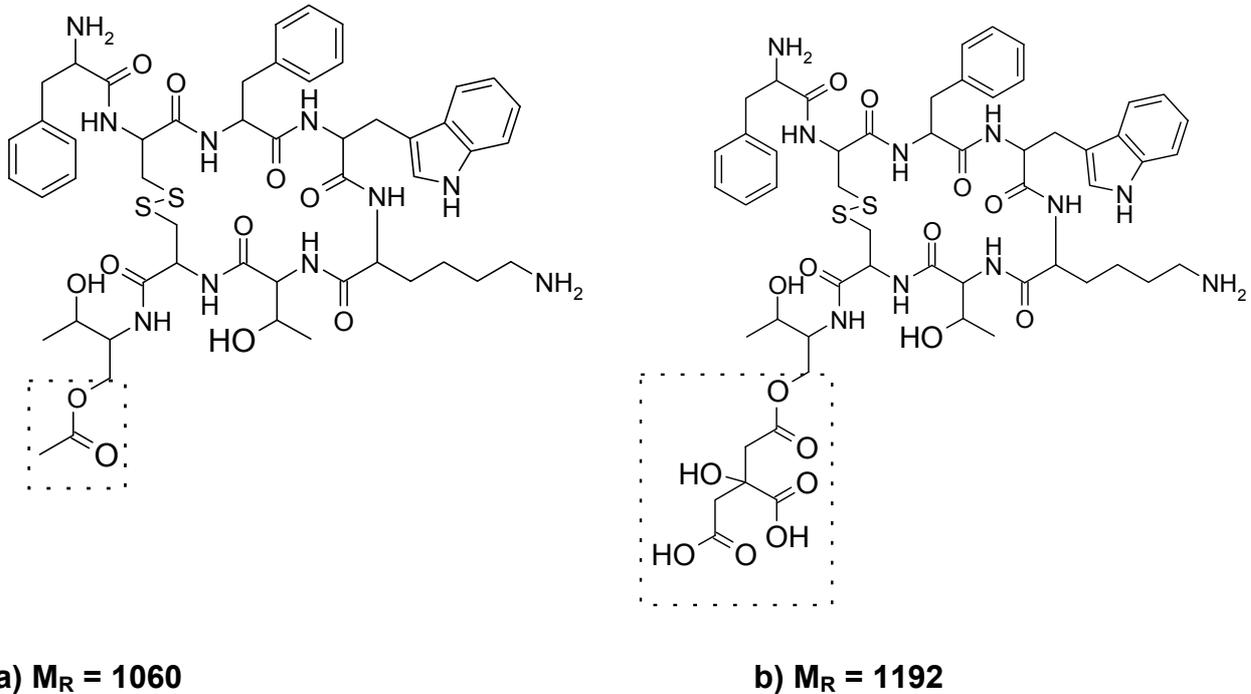


Abbildung 40: Reaktionsprodukte durch a) Veresterung mit Essigsäure und b) Veresterung mit Citronensäure, hier beispielhaft am Threonin dargestellt

Es sind auch mehrfache Veresterungen mit der gleichen oder verschiedenen Säuren an den alkoholischen Gruppen des Threoninols denkbar.

C) Oxidationen – Reduktionen

Besonders oxidationsempfindlich sind Aminosäuren, die aromatische Ringsysteme oder Schwefelatome enthalten [70]. Oxidationsreaktionen können daher im Octreotid an dem Indol-Ringsystem des Tryptophans und der Disulfid-Brücke stattfinden. Von Stevenson et al. [76] wurden die in Abb. 41 dargestellten Oxidationsprodukte des Tryptophans bei der Zersetzung von Leuprolide in DMSO postuliert. Bei beiden Produkten wird das Indol-Ringsystem zerstört. Da aber alle Zersetzungsprodukte bei der für Indol charakteristischen Wellenlänge von 270 nm nachweisbar waren, ist die Entstehung dieser Oxidationsprodukte hier nicht wahrscheinlich, oder sie wurden von anderen Zersetzungsprodukten mit intaktem Indolring überlagert.

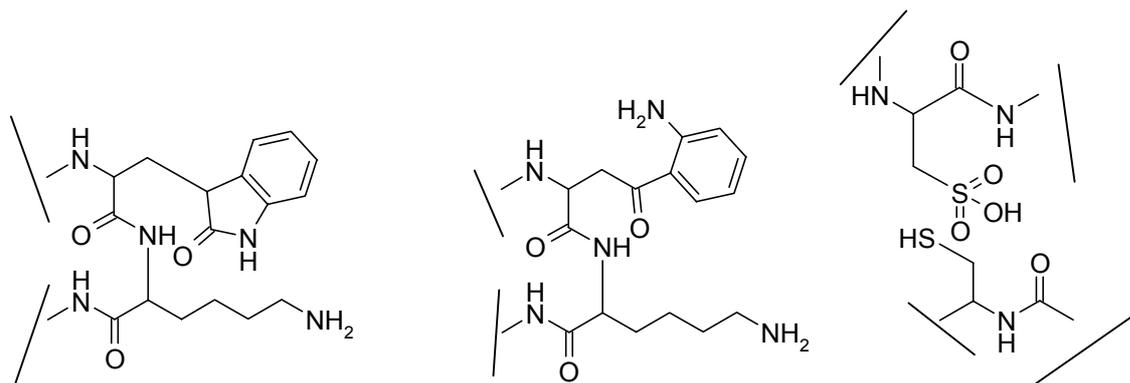
a) $M_R = 1034$ b) $M_R = 1022$ c) $M_R = 1068$

Abbildung 41: mögliche Oxidationsprodukte des a) und b) Tryptophans (nach [76]) c) Cystins im Octreotid

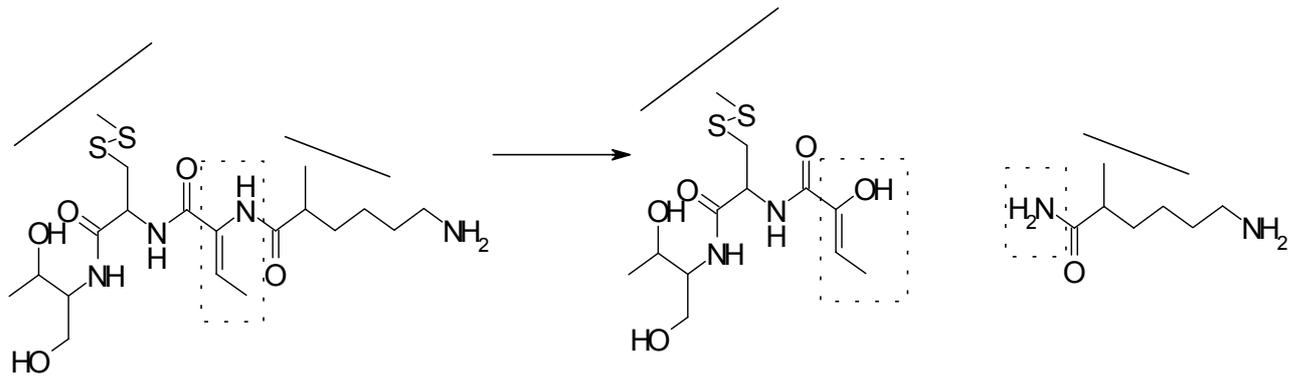
Die Disulfidbrücke des Cystins kann reduktiv gespalten werden, wobei zwei Thiole entstehen würden. Eine Oxidation des Schwefels würde jeweils zur Sulfonsäure führen (vgl. Abb. 41c: dort ist beispielhaft eine Sulfonsäure eingezeichnet).

Mit basischer Katalyse können aus ionisierten Thiolen durch Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktionen Peptid-Oligomere entstehen [58]. Diese sind mit der hier verwendeten LC-MS-Methode aufgrund ihrer hohen Massen nicht mehr nachweisbar.

D) Kondensationen / β -Eliminierung

Kondensation und β -Eliminierung können zu den gleichen Massenänderungen führen. Kondensationen können am Octreotid-Molekül selbst und auch bei gebildeten Zersetzungsprodukten auftreten, wie z. B. die unter B) erwähnte intramolekulare Wasserabspaltung der Citronensäure zur Aconitsäure zeigt.

Die β -Eliminierung wird von Stevenson et al. [76] für Serin beschrieben, der Mechanismus ist aber auch am Threoninrest des Octreotids denkbar (Abb. 42). Auch am Cysteinrest kann eine β -Eliminierung stattfinden [37].



$M_R = 1000$

Abbildung 42: β -Eliminierung des Threoninrestes mit anschließender Spaltung der Peptid-Bindung, nach [76]

E) Isomerisierung

Es wurden Zersetzungsprodukte mit gleichen Massen bei unterschiedlichen Retentionszeiten gefunden. Möglicherweise haben sich strukturisomere Zersetzungsprodukte gebildet, z. B. durch Veresterung an verschiedenen alkoholischen Gruppen des Peptids (vgl. B).

F) Aggregation

Peptid-Oligomere können sich – wie unter C) erwähnt – durch Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktionen bilden. Auch über nicht-kovalente Bindungen ist eine Zusammenlagerung der Moleküle möglich. Eine Charakterisierung derartiger Zersetzungsprodukte wäre z. B. mit einer Größenausschlusschromatographie [88] möglich, die hier nicht zur Verfügung stand.

4.2.3 Identifizierung von Zersetzungsprodukten aus der Einlagerung

Über die bei der LC-MS-Kopplung erhaltenen Massen bei bestimmten Retentionszeiten sowie die Detektionen mit dem Fluoreszenzdetektor wurde versucht, die Zersetzungsprodukte zu identifizieren.

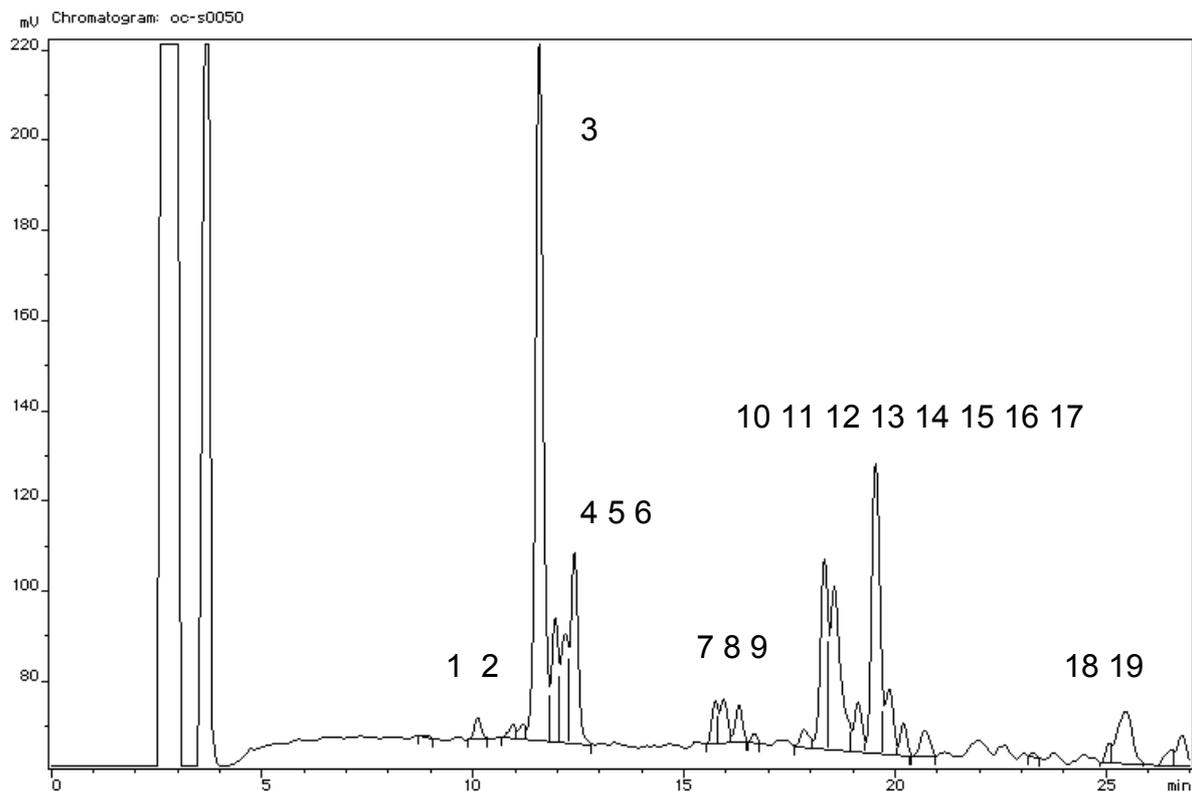


Abbildung 43: HPLC-Chromatogramm nach Lagerung von Octreotid-Lyophilisat mit Citratpuffer (Oc 4,0) bei 58 °C / 30 % r. F. für 178 Tage

Abbildung 43 zeigt beispielhaft ein Chromatogramm mit Zersetzungsprodukten des Octreotids, lyophilisiert mit Citratpuffer, nach 178 Tagen Lagerung. Erkennbar ist, dass nur wenige Zersetzungsprodukte vor dem Octreotid selbst (Nr. 3) eluiert wurden, der größte Teil erschien später. In Tabelle 21 sind die durch LC-MS-Kopplung erhaltenen Massen für die im Chromatogramm nummerierten Peaks mit den möglicherweise entstandenen Produkten aufgeführt.

Tabelle 21: Durch LC-MS-Kopplung erhaltene Massen der Peaks des Chromatogramms in Abb. 43

Peak-Nr.	Retentionszeit [min]	M	mögliches Zersetzungsprodukt
1	10,0	n. b.	
2	11,2	935 (1000) (1030)	„threoninolfreie“ Form und Oxidation an Trp* Kondensation
3	11,5	1018	Octreotid
4	11,9	n. b.	
5	12,1	n. b.	
6	12,3	(799) (931) (953)	„threoninolfreie Form“
7	15,7	n. b.	
8	15,9	n. b.	
9	16,3	n. b.	
10	17,5	(1060)	Ester aus Octreotid mit Essigsäure
11	18,3	1102 (1192) (1214) (1236)	2x Veresterung von Octreotid mit Essigsäure Ester aus Octreotid mit Citronensäure
12	18,5	1214 (1192)	Ester aus Octreotid mit Citronensäure
13	19,1	973	„threoninolfreie“ Form, verestert mit Essigsäure

14	19,5	1174 (1092) (1196)	Ester aus Octreotid und Citronensäure und Wasserabspaltung (oder 2x Citronensäure) Ester aus Octreotid und Essigsäure und Wasserabspaltung sowie Oxidation des Thiols
15	19,8	(1152) (1174) (1196)	siehe 14
16	20,2	1109 1131 (1125)	„threoninolfreie“ Form, verestert mit Citronensäure und Oxidation an Trp *
17	20,7	(1060)	Ester aus Octreotid mit Essigsäure
18	25,1	1174 (1152) (1190) (1196)	siehe 14
19	25,5	(1104) (1125)	

() Wenn die Massenspektren nur zwei Signale aufwiesen (z. B. nur $M + 1$ und Na^+ - oder K^+ -Addukt), wurden die Massen in Klammern gesetzt.

n. b. Massen nicht bestimmbar

* Durch eine Oxidation des Indolringes des Tryptophans dürfte mit dem Fluoreszenzdetektor kein Signal bei Abs. 270 / Em. 350 nm erscheinen, dieses ist hier jedoch vorhanden. Möglicherweise wird es durch die zweite Substanz, die mit eluiert wurde, hervorgerufen.

Wie schon in Abb. 43 erkennbar, war nicht immer eine exakte Trennung der Zersetzungsprodukte möglich. Oft wurden mehrere Zersetzungsprodukte gemeinsam eluiert, z. T. wurden bestimmte Massen auch in benachbarten Peaks nachgewiesen (z. B. 1174 in Peak Nr.14 und 15).

4.2.4 Verlauf der Entstehung von Zersetzungsprodukten (ZP)

Zersetzungsprodukte bildeten sich in den Proben Oc 4,0 und 6,8 bzw. Oc PCP 4,0 und 6,8 in unterschiedlichem Ausmaß und zu verschiedenen Zeitpunkten der Einlagerung.

Besonders in den mit Citratpuffer hergestellten Proben bildete sich eine Vielzahl von Zersetzungsprodukten, während in den Proben mit Phosphatpuffer die Anzahl insgesamt geringer war. Die HPLC-Flächenwerte der Zersetzungsprodukte nahmen z. T. bis zu einem Maximalwert zu, dann erfolgte eine Abnahme, was auf weitere Zersetzungsreaktionen schließen ließ. Eine Übersicht über die entstandenen Produkte in den verschiedenen Proben bieten die Abbildungen 44 – 47 beispielhaft für die Lagerungsbedingung 58 °C / 30 % r. F.

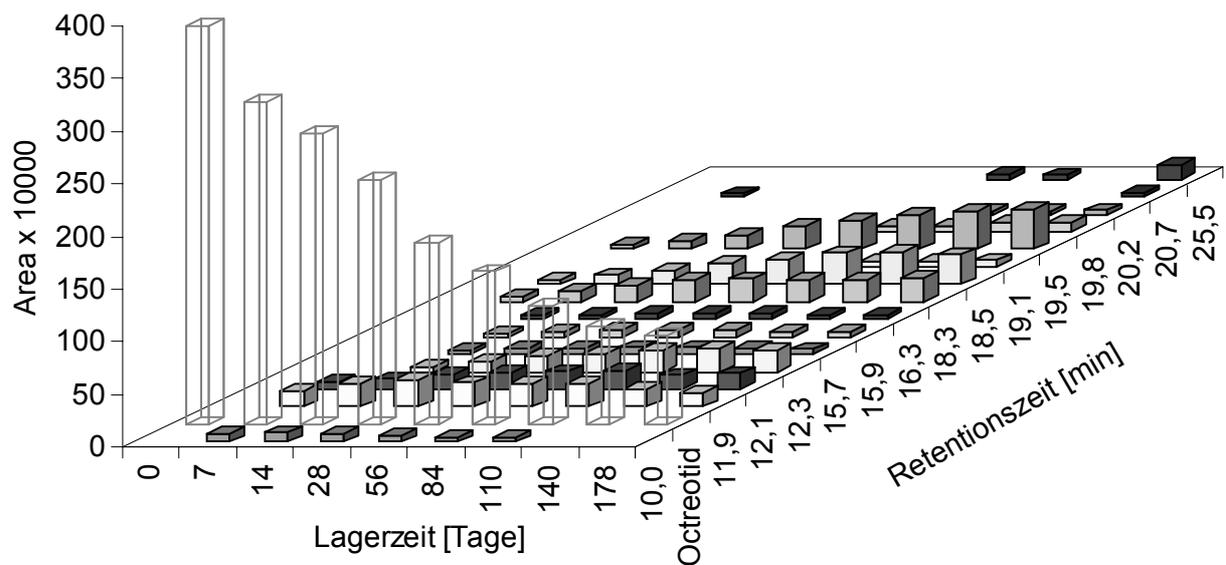


Abbildung 44: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) während der Lagerung bei 58 °C / 30 % r. F. (Flächen > 30000)

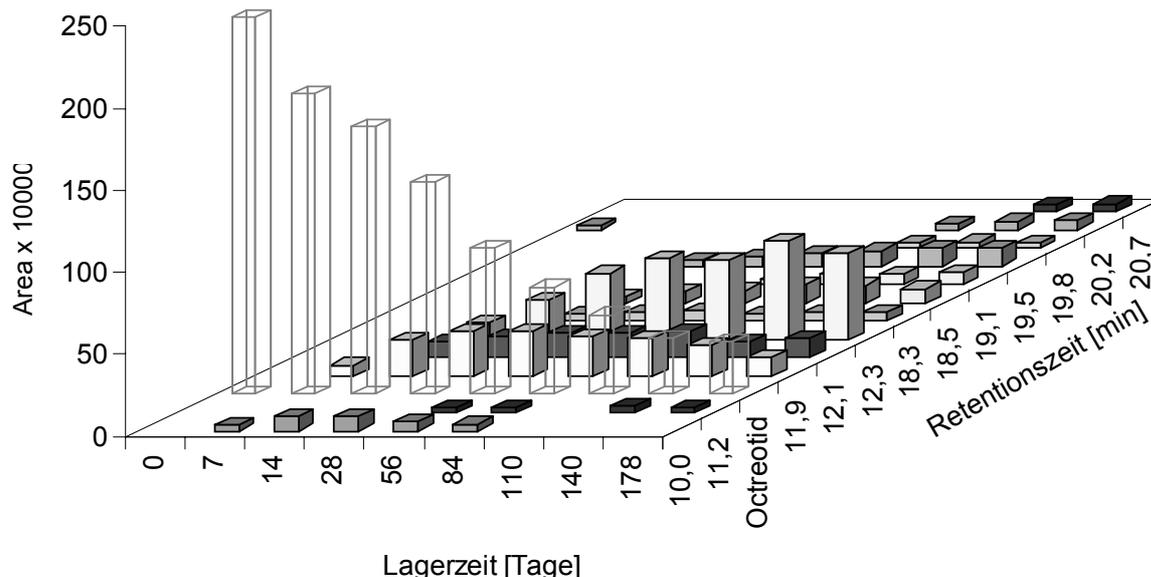


Abbildung 45: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) während der Lagerung bei 58 °C / 30 % r. F. (Flächen > 30000)

In Citratpuffer waren viele Zersetzungsprodukte bereits nach einer Woche Einlagerungszeit entstanden. Dies galt sowohl für PCP-haltige wie PCP-freie Proben. Bei den Proben, die Polycarboophil enthielten, fehlten jedoch die drei Zersetzungsprodukte bei einer Retentionszeit von ca. 16 min, die in den Proben ohne Polymer enthalten waren. Ein Zersetzungsprodukt bei 11,2 min war in den PCP-haltigen, nicht jedoch in den PCP-freien Proben enthalten.

Mit Phosphatpuffer kamen im Gegensatz zu den Proben mit Citratpuffer bei Anwesenheit von PCP weniger Zersetzungsprodukte vor (Abb. 46 und 47) als ohne Polymer. Das Produkt bei 12,3 min war nur in den polymerhaltigen Proben zu finden, das Produkt bei 17,5 min kam nach relativ kurzer Lagerungszeit (1 bzw. 2 Wochen) in beiden Proben vor.

Insgesamt scheint das PCP in Phosphatpuffer einen stabilisierenden Einfluss auf das Peptid auszuüben, was auf den polyanionischen Charakter des Polymers zurückgeführt werden könnte, der eine Aggregation verhindern soll [84]. Bei pH 6,8 sind mehr Carboxylgruppen dissoziiert als bei pH 4,0, so dass die stabilisierende Wirkung hier größer ist.

Eine genauere Betrachtung der einzelnen Zersetzungsprodukte erfolgt in Kap. 4.2.4.1.

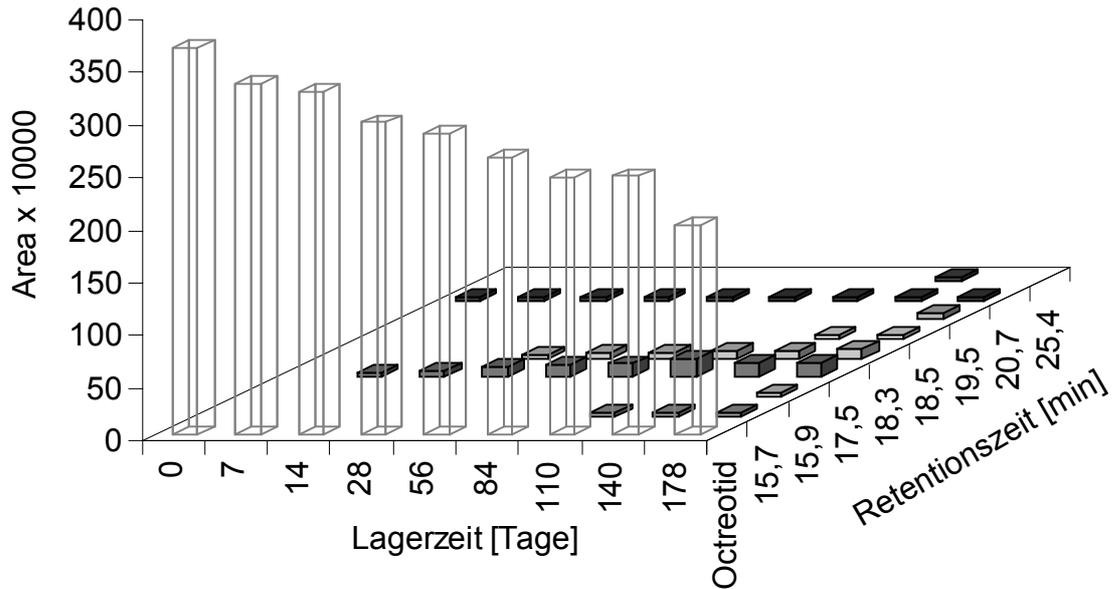


Abbildung 46: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) während der Lagerung bei 58 °C / 30 % r. F. (Flächen > 30000)

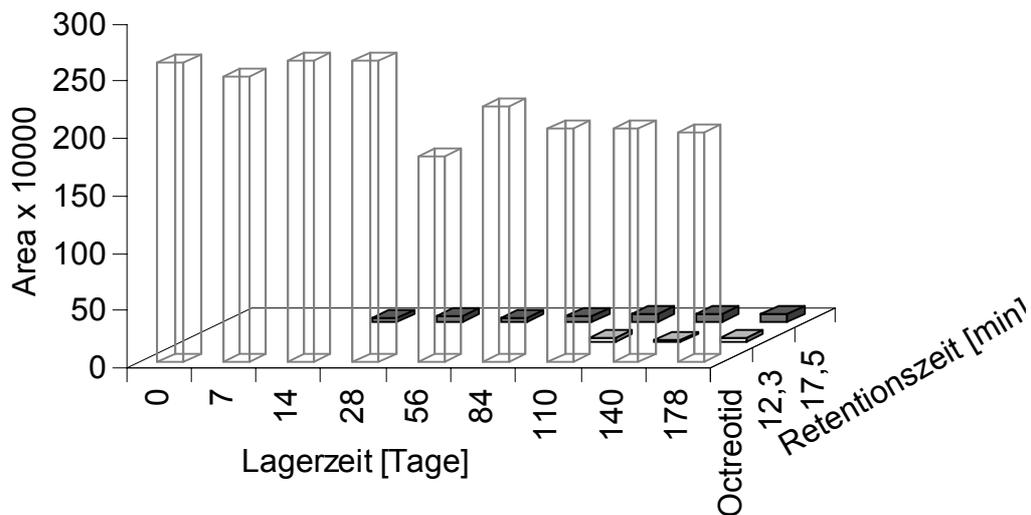


Abbildung 47: Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) während der Lagerung bei 58 °C / 30 % r. F. (Flächen > 30000)

4.2.4.1 Zersetzungsprodukte in den verschiedenen Proben bei gleichen Lagerungsbedingungen

Im folgenden werden die entstandenen Zersetzungsprodukte in den gepufferten Lyophilisaten (Oc 4,0 und 6,8) und den Festen Dispersionen (Oc PCP 4,0 und 6,8) während der Lagerung bei 58 °C / 30 % r. F. verglichen. Die Zuordnung der Zersetzungsprodukte erfolgte nach den Retentionszeiten, da nicht zu jedem Probeentnahmezeitpunkt eine LC-MS-Untersuchung durchgeführt wurde.

Um die entstandenen Zersetzungsprodukte in den einzelnen Proben miteinander vergleichen zu können, wurden die Flächenwerte (> 30000) anteilig auf den Anfangsgehalt des Octreotids in der jeweiligen Probe bezogen. Dieses Verfahren ist analytisch nicht ganz korrekt, da die Absorptionskoeffizienten der Produkte nicht bekannt sind. Da aber – wie in Kap. 4.2.3 beschrieben – bei den meisten Zersetzungsprodukten die Grundstruktur des Octreotids erhalten blieb und außerdem nur Produkte gleicher Retentionszeiten (und damit wahrscheinlich identische Produkte und Absorptionskoeffizienten) miteinander verglichen wurden, konnte der Fehler als gering erachtet werden.

Die Nummerierung entspricht den Peak-Nummern aus Tabelle 21 [Kap.4.2.3].

4.2.4.1.1 Zersetzungsprodukte 1 (Rt 10,1 min), 4 (Rt 11,9 min), 5 (Rt 12,2 min) und 6 (Rt 12,4 min)

Wie die Abbildungen 48 – 51 zeigen, bildeten sich diese Zersetzungsprodukte vor allem in den mit Citratpuffer hergestellten Proben. In der Festen Dispersion mit Phosphatpuffer war nur Produkt 6 erst nach 110 Tagen Lagerzeit zu ca. 1 % vorhanden. Nach 14 Tagen Lagerzeit war in allen Proben der Anteil dieser Produkte in den PCP-haltigen Festen Dispersionen höher als in den Lyophilisaten (ohne PCP). Der Anteil der Produkte 1, 4 und 5 stieg zunächst an, verringerte sich dann aber mit zunehmender Lagerdauer. Die Massen von ZP 1 und 4 waren durch LC-MS nicht bestimmbar. Für die Produkte 5 und 6 wurde neben anderen eine Masse bestimmt, die dem Octreotid ohne Threoninol entsprach (vgl. Tabelle 21).

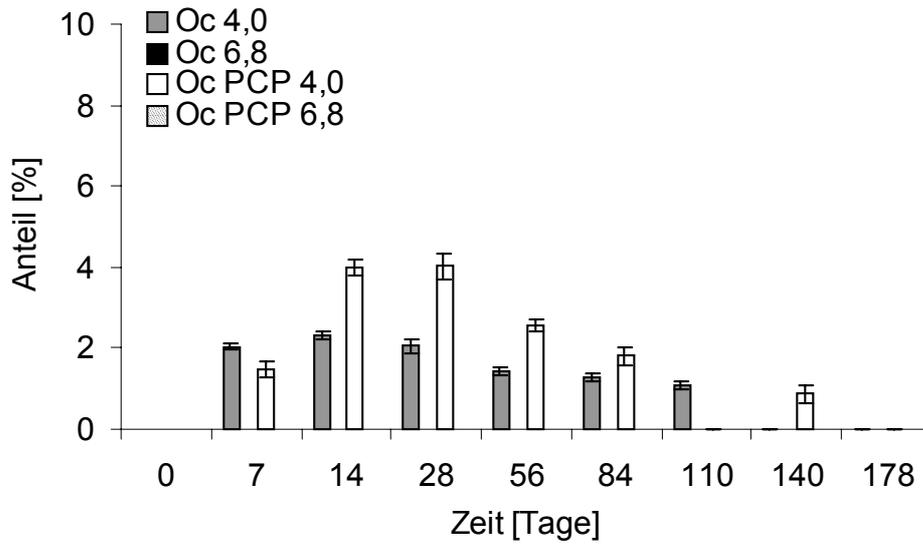


Abbildung 48: Zersetzungsprodukt 1 (Tab. 21), Rt 10,0 min bei 58 °C, 30 % r. F.;
 $\bar{x} \pm s, n = 2$

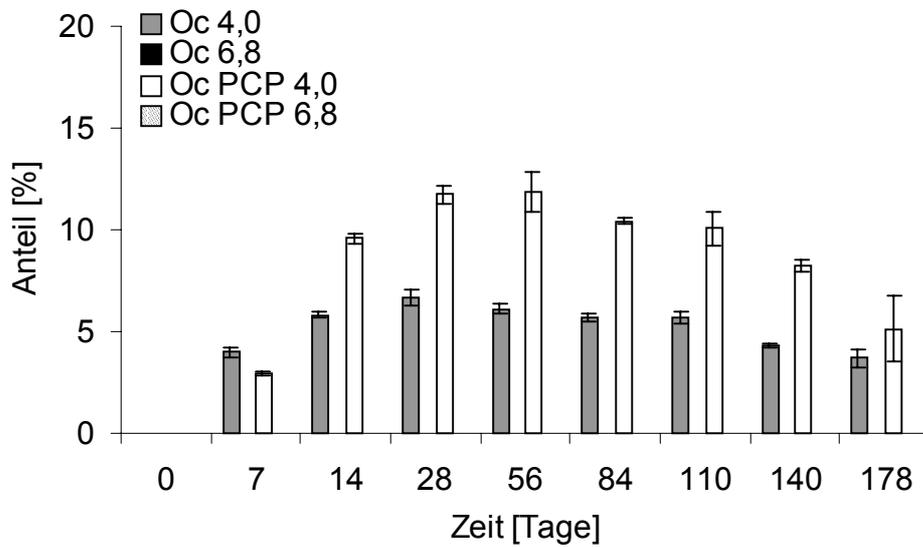


Abbildung 49: Zersetzungsprodukt 4 (Tab. 21), Rt 11,9 min bei 58 °C, 30 % r. F.;
 $\bar{x} \pm s, n = 2$

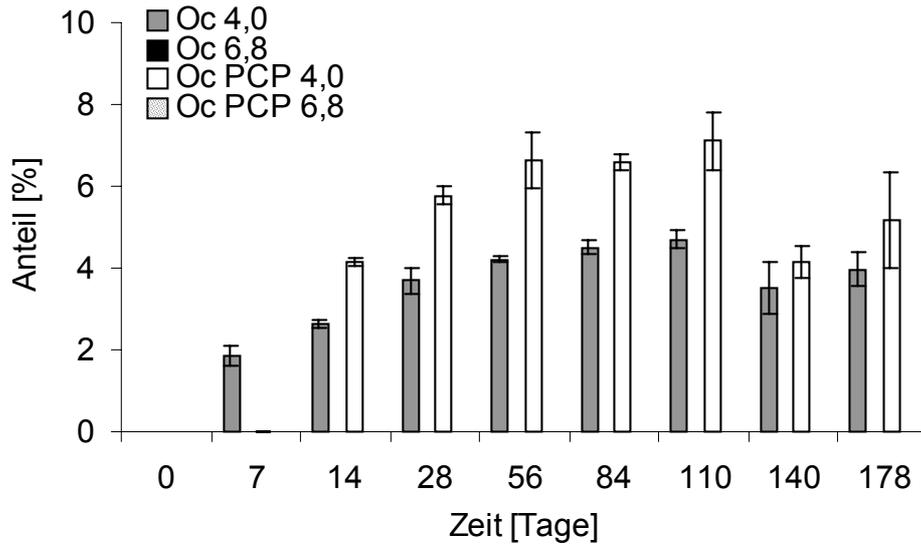


Abbildung 50: Zersetzungprodukt 5 (Tab. 21), Rt 12,1 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

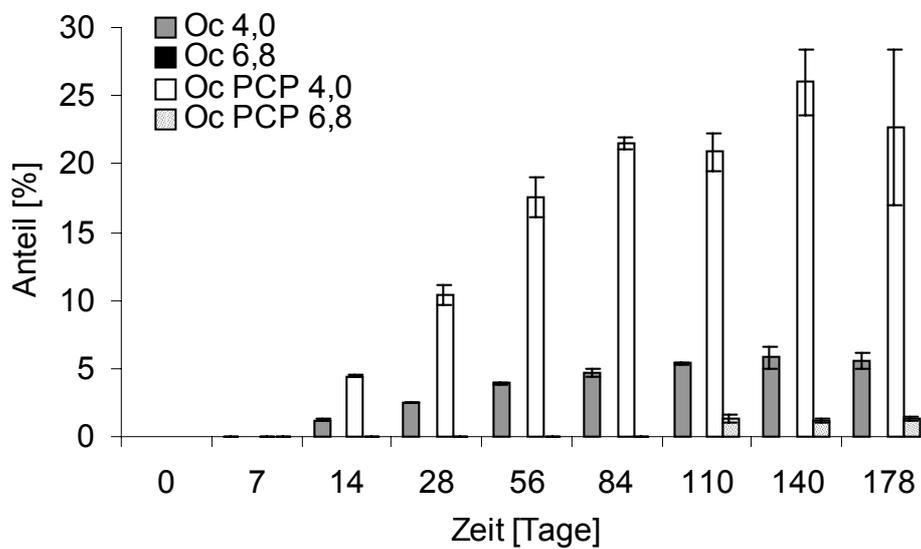


Abbildung 51: Zersetzungprodukt 6 (Tab. 21), Rt 12,3 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

4.2.4.1.2 Zersetzungsprodukte 7 (Rt 15,7 min), 8 (Rt 15,9 min) und 9 (Rt 16,3 min)

Die Zersetzungsprodukte 7, 8 und 9 waren nur zu geringen Anteilen (< 2 %) in den bei 58 °C / 30 % r. F. gelagerten Proben enthalten und kamen bei Oc 4,0 und nach längeren Lagerzeiten auch bei Oc 6,8, nicht jedoch in den polymerhaltigen Proben vor. Der prozentuale Anteil dieser Zersetzungsprodukte blieb über den Lagerungszeitraum nahezu konstant (Abb. 52 – 54). Es war keine genaue Masse mit der LC-MS-Untersuchung bestimmbar. Es gab jedoch relativ viele Signale für Massen zwischen 500 und 850 g/mol. Möglicherweise handelte es sich um Produkte, die aus der Spaltung von Peptidbindungen sowie der Disulfidbrücke entstanden, so dass sich z. B. Tetrapeptide bildeten, die evtl. verestert oder oxidiert wurden. Da diese Produkte v. a. in den polymerfreien Proben entstanden, könnte es sich auch um Peptid-Aggregate handeln, deren Massen durch LC-MS nicht mehr bestimmbar waren.

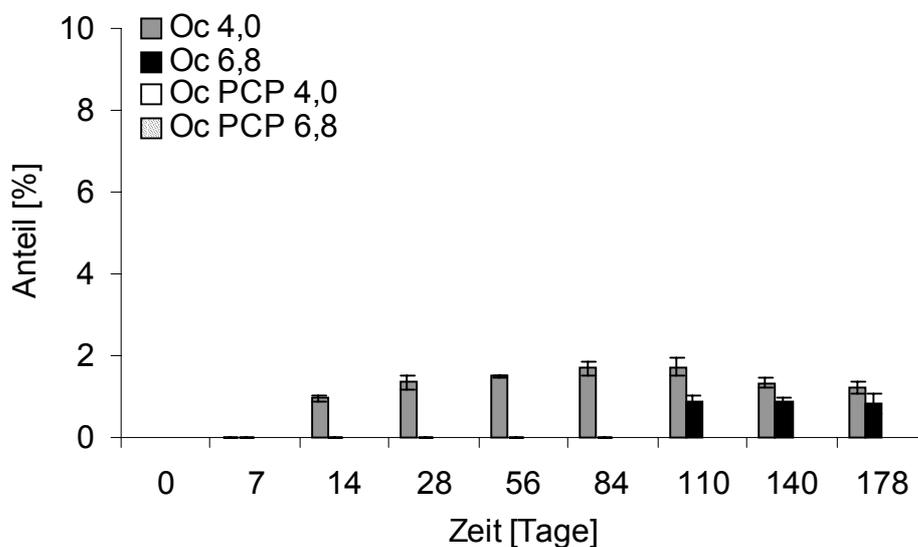


Abbildung 52: Zersetzungsprodukt 7 (Tab. 21), Rt 15,7 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

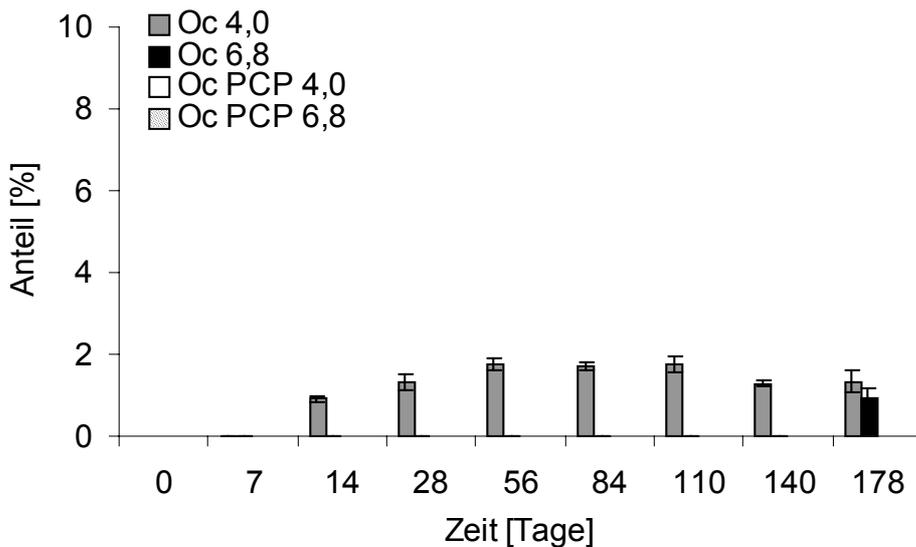


Abbildung 53: Zersetzungsprodukt 8 (Tab. 21), Rt 15,9 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

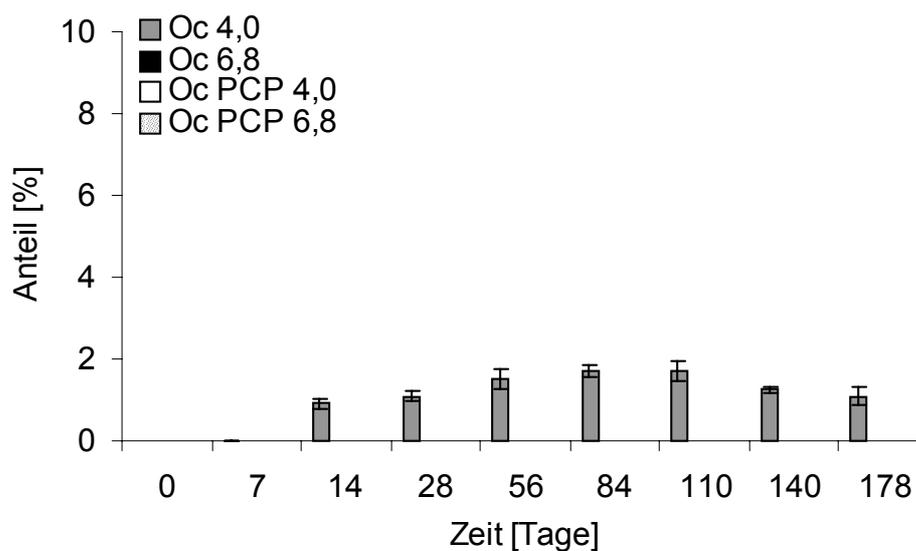


Abbildung 54: Zersetzungsprodukt 9 (Tab. 21), Rt 16,3 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

4.2.4.1.3 Zersetzungsprodukte 10 (Rt 17,8 min) und 17 (20,7 min)

Die mittels LC-MS bestimmten Massen dieser Zersetzungsprodukte deuteten auf Ester aus Octreotid mit Essigsäure [vgl. Kap. 4.2.3] hin. Durch verschiedene alkoholische Gruppen am Octreotid sind Strukturisomere möglich, die zu

unterschiedlichen Retentionszeiten führen. Welche Gruppen verestert wurden, ließ sich durch die verwendeten Methoden nicht feststellen. Die Abbildungen 55 und 56 zeigen, dass diese Zersetzungsprodukte hauptsächlich in den phosphatpufferhaltigen Proben vorkamen. Der Anteil von ZP 17 blieb in den Lyophilisaten mit Phosphatpuffer nahezu konstant, für ZP 10 war in Oc 6,8 und Oc PCP 6,8 bis 110 Tage ein Anstieg der Flächenwerte zu beobachten.

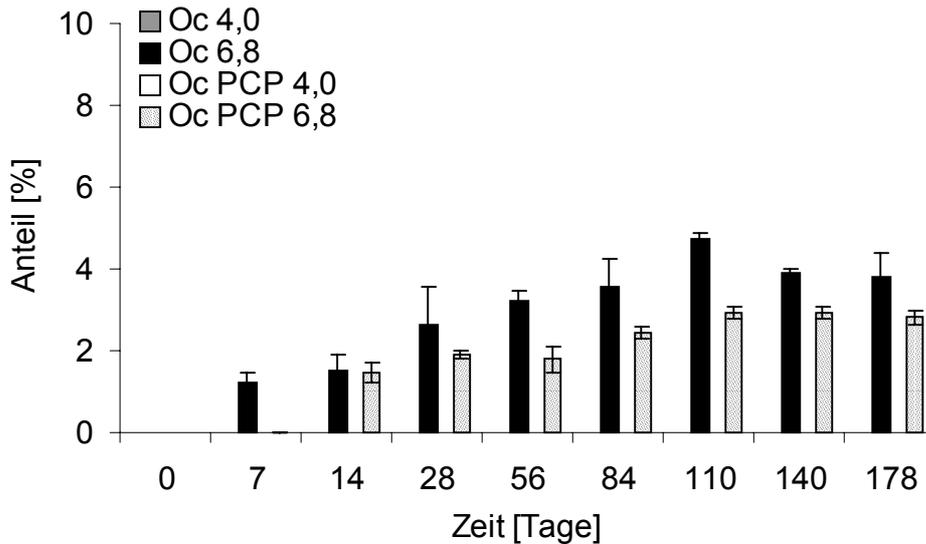


Abbildung 55: Zersetzungsprodukt 10 (Tab. 21), Rt 17,5 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

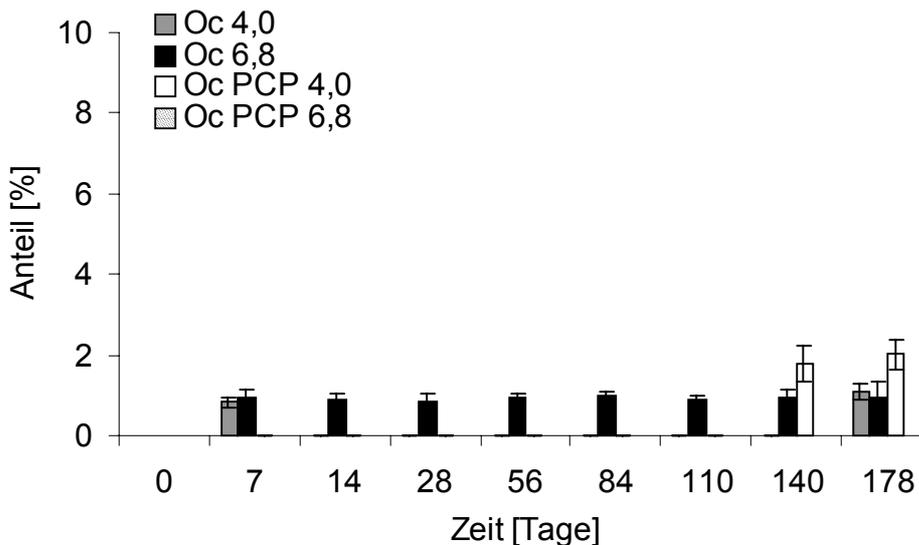


Abbildung 56: Zersetzungsprodukt 17 (Tab. 21), Rt 20,7 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

4.2.4.1.4 Zersetzungsprodukte 11 (Rt 18,3 min), 12 (18,5 min) und 14 (Rt 19,5 min)

Das Zersetzungsprodukt 11 kam nach 4 Wochen Lagerzeit außer in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer in allen Proben vor. Die ermittelten Massen lassen auf Ester aus Octreotid mit Citronensäure bzw. Essigsäure schließen. Für die Produkte 12 und 14 wurden u. a. Massen ermittelt, die auf Citronensäureester hinwiesen, aber auch auf Kondensationen oder Oxidationen dieser Ester (vgl. Tab. 21). Diese Produkte entstanden hauptsächlich in den citratpufferhaltigen Proben (Abb. 57 – 59).

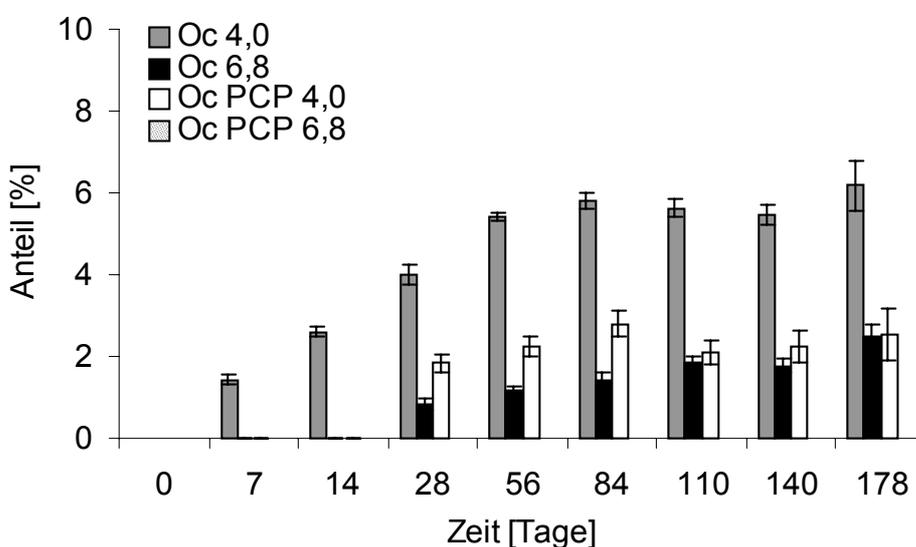


Abbildung 57: Zersetzungsprodukt 11 (Tab. 21), Rt 18,3 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

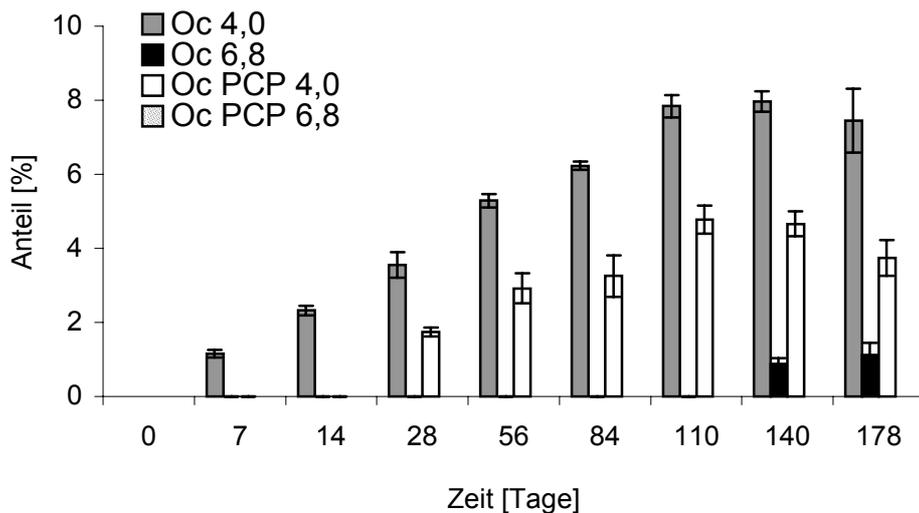


Abbildung 58: Zersetzungsprodukt 12 (Tab. 21), Rt 18,5 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

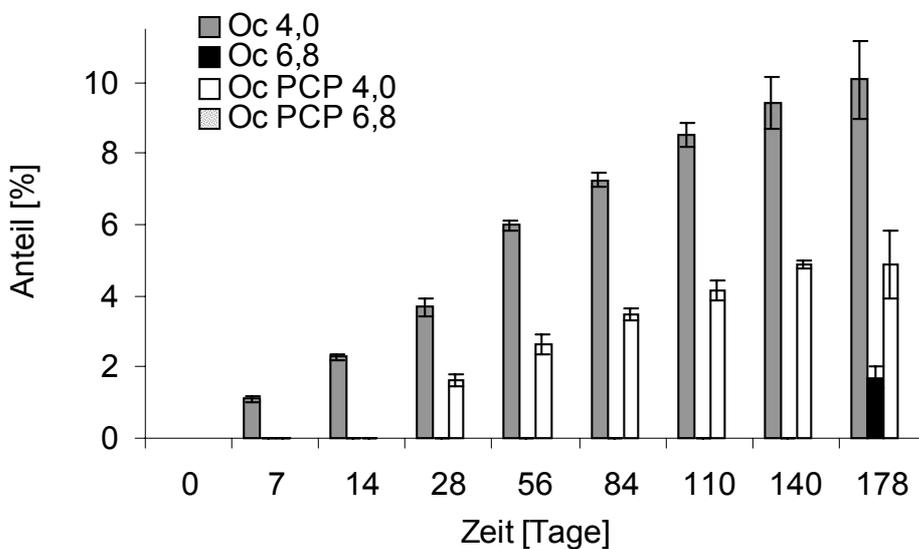


Abbildung 59: Zersetzungsprodukt 14 (Tab. 21), Rt 19,5 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

4.2.4.1.5 Zersetzungsprodukte 13 (Rt 19,1 min), 15 (Rt 19,8 min), 16 (20,2 min) und 19 (25,4 min)

Wie die Abbildungen 60 – 63 zeigen, entstanden diese Zersetzungsprodukte erst zu späteren Zeitpunkten der Lagerung vor allem in den citratpufferhaltigen Proben. Die Massen von Produkt 13 und 16 wiesen auf Ester des „threoninolfreien“ Octreotids mit Essigsäure bzw. Citronensäure hin, wobei ZP 16 wahrscheinlich am Tryptophan oxidiert wurde. In Peak 15 wurden auch Massen des Peaks 14 wiedergefunden, was auf eine Überlappung der Peaks schließen lässt, so dass eine exakte Bestimmung mittels LC-MS nicht möglich war.

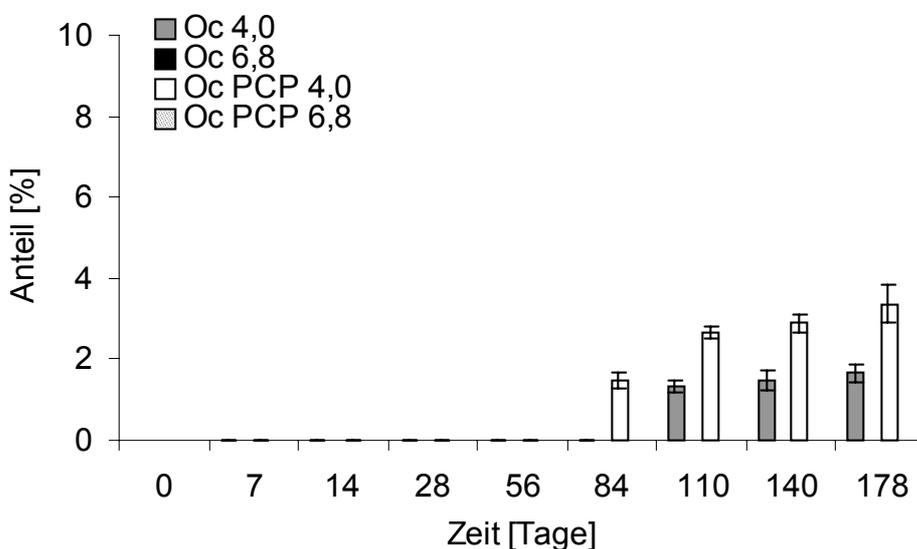


Abbildung 60: Zersetzungsprodukt 13 (Tab. 21), Rt 19,1 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

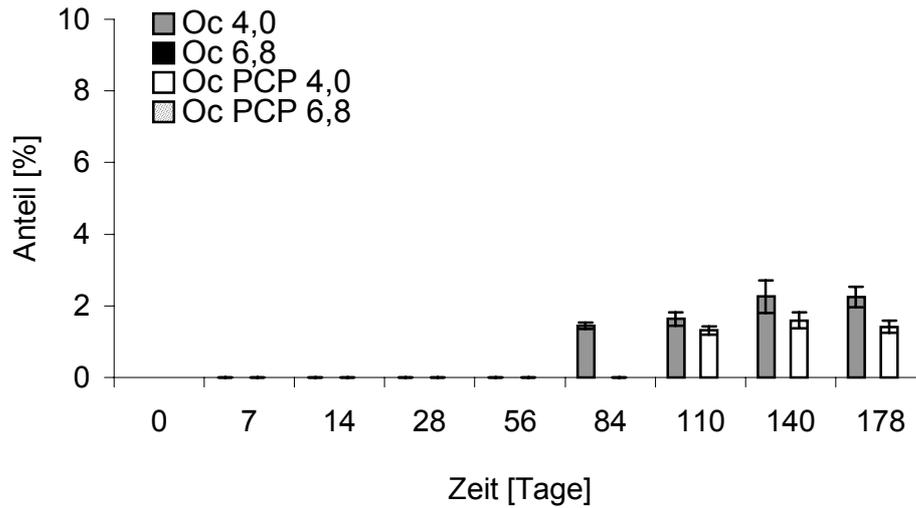


Abbildung 61: Zersetzungsprodukt 15 (Tab. 21), Rt 19,8 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

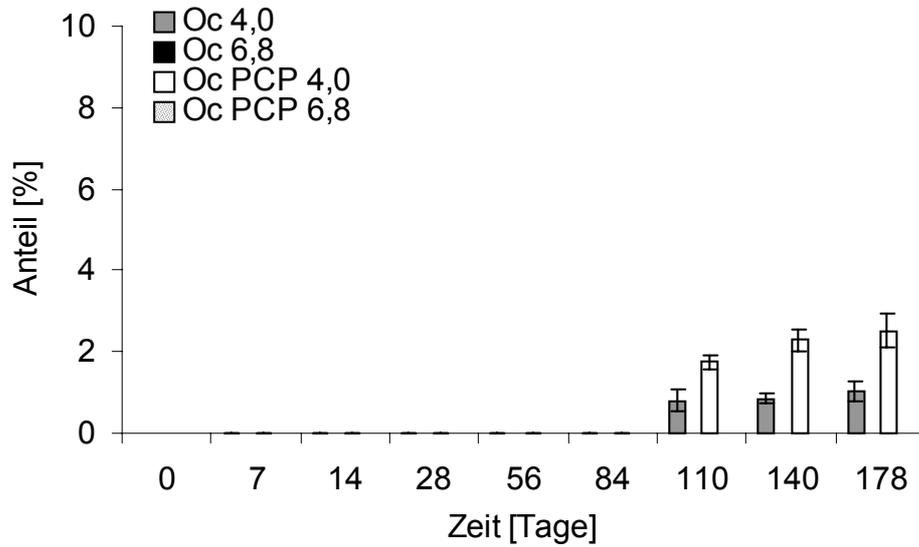


Abbildung 62: Zersetzungsprodukt 16 (Tab. 21), Rt 20,2 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

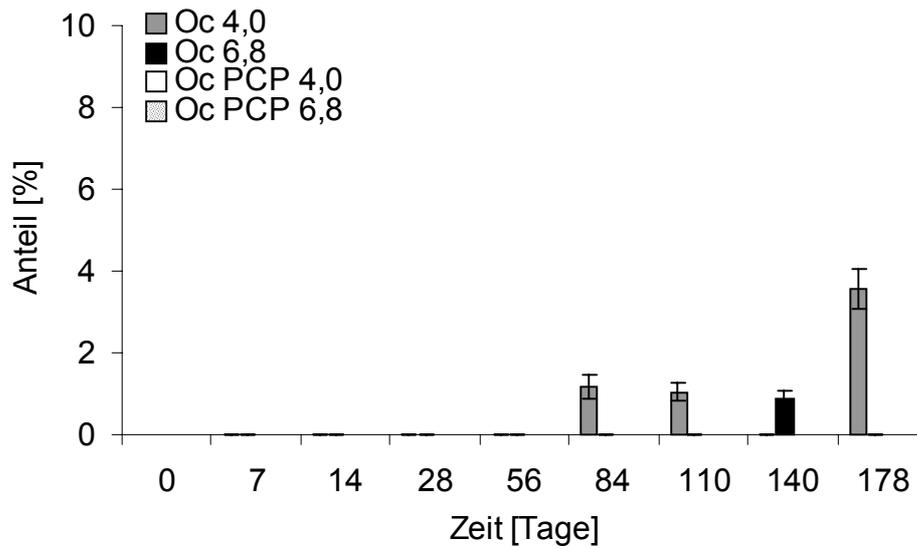


Abbildung 63: Zersetzungsprodukt 19 (Tab. 21), Rt 25,5 min bei 58 °C, 30 % r. F.; $\bar{x} \pm s$, n = 2

Die Zersetzungsprodukte 2 (Rt 11,2 min) und 18 (Rt 25,1 min) wurden wegen der zu geringen Flächenwerte nicht aufgeführt.

4.3 Statistische Auswertung – Ergebnisse

4.3.1 Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) für die Zersetzung von Octreotid

Die Werte der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden mit SPSS durch Nichtlineare Regression für eine Reaktion 1. Ordnung – wie in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben – berechnet. Die folgenden Tabellen 22 - 25 fassen die Werte für die RGK, die Standardfehler des Mittelwertes (ase: asymptotic standard error) und die Grenzen des Konfidenzintervalles (oG: obere Grenze, uG: untere Grenze) zusammen. Die Abbildungen 64 – 67 zeigen die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten mit den Standardfehlern für die jeweilige Lagertemperatur. Der Einfluss von Temperatur, der relativen Lagerfeuchte, des pH-Wertes und des Polymers wird im folgenden Kapitel [4.3.2] quantifiziert.

Tabelle 22: RGK der Zersetzung von Octreotid im Lyophilisat mit Citratpuffer (Oc 4,0)

r. F. [%]	T [°C]	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) [1/d]			
		RGK	ase	uG	oG
11	58	0,0045	± 0,0002	0,0040	0,0050
	66	0,0113	± 0,0006	0,0102	0,0125
	74	0,0401	± 0,0020	0,0361	0,0441
30	25	0,0002	± 0,0001	-0,0001	0,0004
	40	0,0011	± 0,0001	0,0008	0,0013
	50	0,0036	± 0,0001	0,0033	0,0039
	58	0,0110	± 0,0004	0,0102	0,0119
	66	0,0463	± 0,0013	0,0437	0,0488
	74	0,1425	± 0,0031	0,1364	0,1486

Mit ansteigender Lagertemperatur kam es zum Anstieg der RGK. Auch eine höhere Lagerfeuchte führte zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten. Bei 25 °C und 30 % r. F. kam es während des Untersuchungszeitraumes zu keiner signifikanten Gehaltsabnahme, das Konfidenzintervall der RGK schloss den Wert Null ein.

Abbildung 64 zeigt die für Octreotid-Lyophilisate erhaltenen RGK mit Standardfehler.

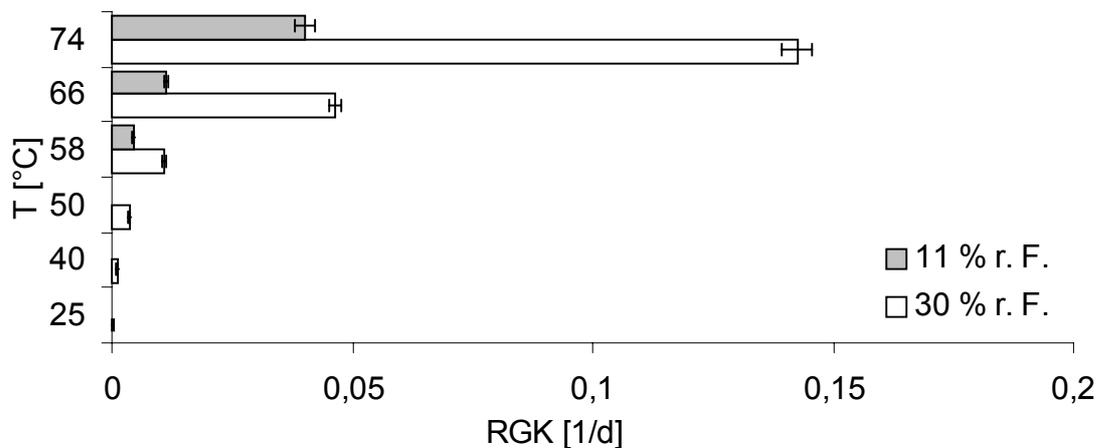


Abbildung 64: RGK der Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Citratpuffer (Oc 4,0) mit asymptotic standard error (ase)

Tabelle 23: RGK der Zersetzung von Octreotid in Fester Dispersion mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0)

r. F. [%]	T [°C]	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) [1/d]			
		RGK	ase	uG	oG
11	58	0,0010	± 0,0001	0,0007	0,0013
	66	0,0039	± 0,0002	0,0034	0,0043
	74	0,0205	± 0,0007	0,0190	0,0220
30	25	-0,0001	± 0,0001	-0,0003	0,0001
	40	0,0009	± 0,0010	0,0007	0,0011
	50	0,0045	± 0,0001	0,0043	0,0048
	58	0,0154	± 0,0005	0,0143	0,0164
	66	0,0525	± 0,0017	0,0492	0,0558
	74	0,1624	± 0,0041	0,1542	0,1706

Auch bei den Festen Dispersionen kam es sowohl mit steigender Lagertemperatur als auch mit höherer relativer Feuchte zu einem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten. Wie bei den PCP-freien Proben war auch hier bei 25 °C und 30 % r. F. kein signifikanter Abfall des Octreotid-Gehaltes nachweisbar.

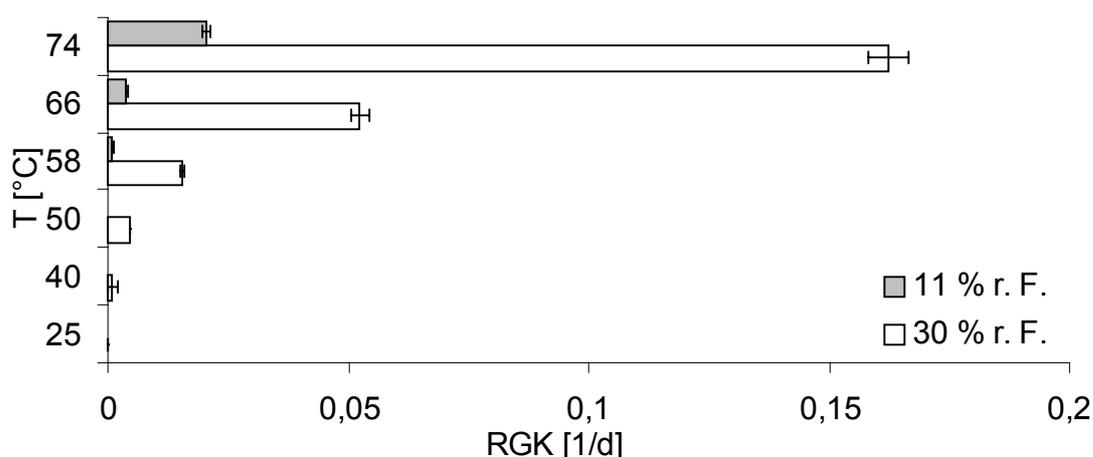


Abbildung 65: RGK der Zersetzung von Octreotid in Fester Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0) mit asymptotic standard error (ase)

Tabelle 24: RGK der Zersetzung von Octreotid im Lyophilisat mit Phosphatpuffer (Oc 6,8)

r. F. [%]	T [°C]	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) [1/d]			
		RGK	ase	uG	oG
11	58	0,0008	± 0,0001	0,0005	0,0011
	66	0,0018	± 0,0001	0,0015	0,0020
	74	0,0051	± 0,0002	0,0047	0,0056
30	25	0,0003	± 0,0001	0,0000	0,0005
	40	0,0007	± 0,0001	0,0005	0,0009
	50	0,0012	± 0,0001	0,0009	0,0014
	58	0,0032	± 0,0002	0,0028	0,0036
	66	0,0068	± 0,0003	0,0062	0,0074
	74	0,0197	± 0,0011	0,0176	0,0219

Auch bei Octreotid-Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) konnte ein Anstieg der RGK mit der Lagertemperatur und der Lagerfeuchte beobachtet werden. Insgesamt waren die Werte für die RGK hier ca. eine Zehnerpotenz geringer als bei den Lyophilisaten mit Citratpuffer (vgl. Tabelle 22).

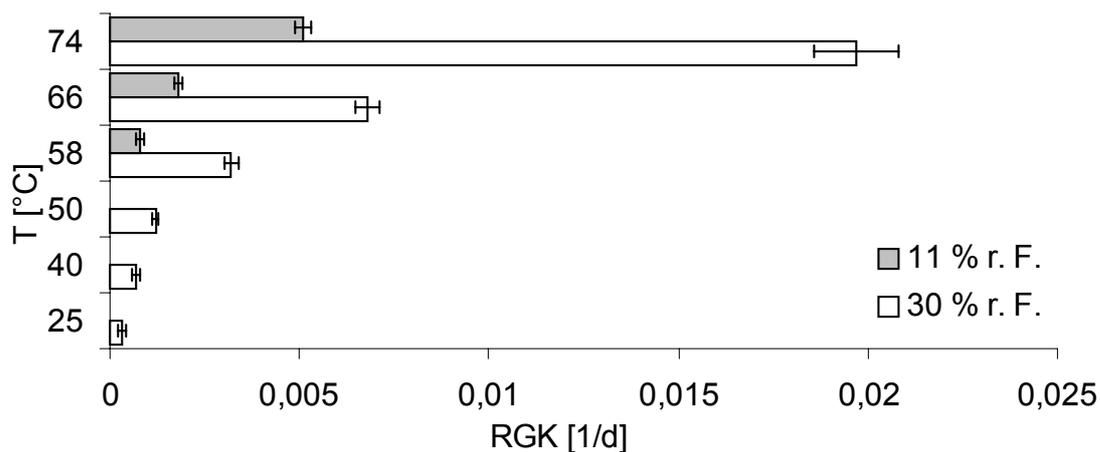


Abbildung 66: RGK der Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) mit asymptotic standard error (ase)

Tabelle 25: RGK der Zersetzung von Octreotid in Fester Dispersion mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8)

r. F. [%]	T [°C]	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) [1/d]			
		RGK	ase	uG	oG
11	58	-0,0001	± 0,0001	-0,0003	0,0000
	66	-0,0000	± 0,0001	-0,0002	0,0001
	74	0,0012	± 0,0001	0,0009	0,0014
30	25	0,0002	± 0,0004	-0,0006	0,0009
	40	0,0006	± 0,0003	-0,0001	0,0012
	50	0,0017	± 0,0004	0,0009	0,0024
	58	0,0018	± 0,0002	0,0014	0,0022
	66	0,0028	± 0,0001	0,0026	0,0031
	74	0,0081	± 0,0003	0,0075	0,0087

In den Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) war die Zersetzung des Octreotids am geringsten. Bei 11 % r. F. konnte für die Temperaturen 58 °C und 66 °C keine Abnahme des Gehalts festgestellt werden, das Konfidenzintervall für die RGK schloss den Wert Null ein. Dies war auch bei 30 % r. F. und 25 °C sowie 40 °C der Fall. Erst ab 50 °C konnte über den Untersuchungszeitraum Zersetzung des Peptids festgestellt werden.

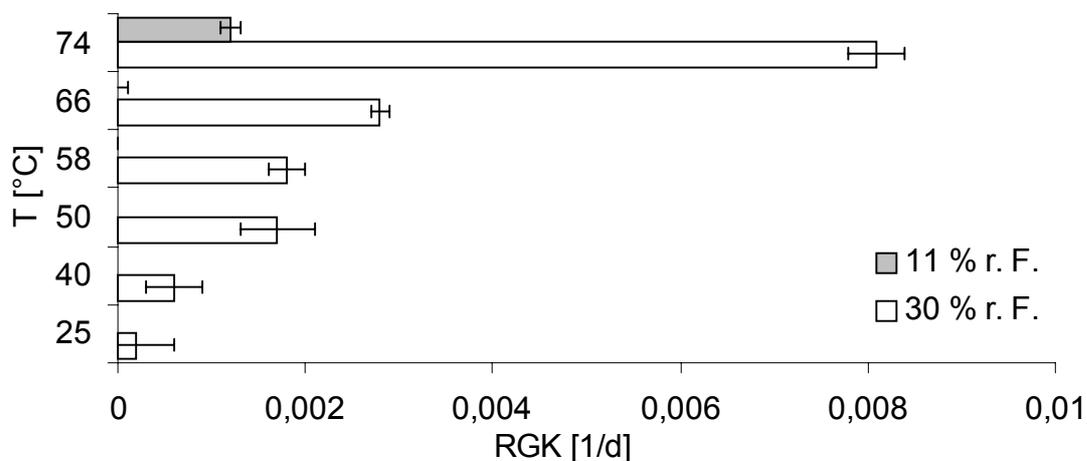


Abbildung 67: RGK der Zersetzung von Octreotid in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8) mit asymptotic standard error (ase)

4.3.2 Faktorenversuche

Es wurden mehrfaktorielle univariate Varianzanalysen mit SPSS durchgeführt [vgl. Kap. 3.4.2.2]. Die Einflussfaktoren werden in den Tabellen folgendermaßen abgekürzt:

pH: pH-Wert

r. F.: relative Feuchte

T: Temperatur

PCP: Polymer (Polycarbophil)

abhängige Variable:

RGK: Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

4.3.2.1 Faktorenversuch 1: Einfluss von pH-Wert, rel. Feuchte, Temperatur bei Anwesenheit von PCP

Tabelle 26: Einfluss von pH-Wert, rel. Feuchte, Temperatur auf die RGK (+ PCP)

Quelle	Mittlere Varianz	F	Signifikanz
pH	$1,330 \cdot 10^{-2}$	1489,154	0,000
r. F.	$1,023 \cdot 10^{-2}$	1145,719	0,000
T	$1,137 \cdot 10^{-2}$	1273,392	0,000
pH · r. F.	$8,149 \cdot 10^{-3}$	912,306	0,000
pH · T	$9,480 \cdot 10^{-3}$	1061,284	0,000
r. F. · T	$6,581 \cdot 10^{-3}$	736,823	0,000
pH · r. F. · T	$5,629 \cdot 10^{-3}$	630,172	0,000

Wegen der Signifikanz aller übergeordneten Wechselwirkungen und Einzelfaktoren durfte nur die Wechselwirkung auf der 2. Stufe interpretiert werden.

Der Einfluss der einzelnen Faktoren auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante wurde über die Schätzung der mittleren Varianz festgestellt. Diese nimmt bei größerem Einfluss eines Faktors höhere Werte an [61]. Auf diese Weise konnte folgende Reihenfolge für die Effekte aufgestellt werden:

$$\text{pH} > \text{T} > \text{r. F.}$$

4.3.2.2 Faktorenversuch 2: Einfluss von pH-Wert, rel. Feuchte, Temperatur bei Abwesenheit von PCP

Tabelle 27: Einfluss von pH-Wert, rel. Feuchte, Temperatur auf die RGK (- PCP)

Quelle	Mittlere Varianz	F	Signifikanz
pH	$1,074 \cdot 10^{-2}$	1453,042	0,000
T	$1,325 \cdot 10^{-2}$	1791,635	0,000
r. F.	$5,946 \cdot 10^{-3}$	804,248	0,000
pH · T	$8,020 \cdot 10^{-3}$	1084,757	0,000
pH · r. F.	$3,169 \cdot 10^{-3}$	428,718	0,000
T · r. F.	$4,380 \cdot 10^{-3}$	592,423	0,000
pH · r. F. · T	$2,627 \cdot 10^{-3}$	355,364	0,000

Auch hier war die Signifikanz der Wechselwirkungen auf der 2. Stufe zu beachten, die den Wechselwirkungen auf der 1. Stufe sowie den signifikanten Einzelfaktoren übergeordnet war. Die Auswertung über die Mittlere Varianz ergab hier folgende Reihenfolge der Effekte der Einflussfaktoren:

$$T > \text{pH} > \text{r. F.}$$

Bei Abwesenheit von Polycarbophil ergab sich also eine andere Rangordnung als mit dem Polymer. Während ohne Polymer die Temperatur den größten Einfluss auf die RGK hatte, war bei Anwesenheit des Polycarbophils der pH-Wert der Faktor mit dem größten Einfluss. Bei beiden Versuchen hatte die relative Feuchte den geringsten Einfluss.

4.3.2.3 Faktorenversuche 3 - 5: Einfluss von Polymer, pH-Wert, relativer Feuchte bei 58 °C, 66 °C und 74 °C

Die folgenden Tabellen fassen die Ergebnisse für die Faktorenversuche 3 – 5 zusammen, bei denen die An- und Abwesenheit des Polymers, der pH-Wert sowie die relative Feuchte variiert wurden.

Tabelle 28: Einfluss von Polymer, pH-Wert, rel. Feuchte auf die RGK bei 58 °C

Quelle	Mittlere Varianz	F	Signifikanz
Polymer	$7,777 \cdot 10^{-7}$	2,463	0,136
pH	$2,570 \cdot 10^{-4}$	813,754	0,000
r. F.	$2,397 \cdot 10^{-4}$	759,052	0,000
Polymer · pH	$3,755 \cdot 10^{-6}$	11,891	0,003
Polymer · r. F.	$2,073 \cdot 10^{-5}$	65,657	0,000
pH · r. F.	$1,029 \cdot 10^{-4}$	325,839	0,000
Polymer · r. F. · pH	$2,603 \cdot 10^{-5}$	82,422	0,000

Tabelle 29: Einfluss von Polymer, pH-Wert, rel. Feuchte auf die RGK bei 66 °C

Quelle	Mittlere Varianz	F	Signifikanz
Polymer	$1,844 \cdot 10^{-5}$	7,615	0,014
pH	$3,947 \cdot 10^{-3}$	1629,937	0,000
r. F.	$3,133 \cdot 10^{-3}$	1293,713	0,000
Polymer · r. F.	$4,971 \cdot 10^{-5}$	20,525	0,000
Polymer · pH	$7,878 \cdot 10^{-6}$	3,253	0,090
pH · r. F.	$2,154 \cdot 10^{-3}$	889,410	0,000
Polymer · r. F. · pH	$9,326 \cdot 10^{-5}$	38,507	0,000

Tabelle 30: Einfluss von Polymer, pH-Wert, rel. Feuchte auf die RGK bei 74 °C

Quelle	Mittlere Varianz	F	Signifikanz
Polymer	$8,687 \cdot 10^{-5}$	5,427	0,033
pH	$4,119 \cdot 10^{-2}$	2572,687	0,000
r. F.	$2,650 \cdot 10^{-2}$	1655,287	0,000
Polymer · pH	$9,505 \cdot 10^{-5}$	5,937	0,027
Polymer · r. F.	$3,803 \cdot 10^{-4}$	23,752	0,000
pH · r. F.	$1,861 \cdot 10^{-2}$	1162,566	0,000
Polymer · r. F. · pH	$8,336 \cdot 10^{-4}$	52,067	0,000

Bei 58 °C waren sowohl die übergeordneten Wechselwirkungen auf der 2. Stufe als auch die auf der 1. Stufe signifikant. Die Einzelfaktoren pH-Wert und relative Feuchte waren signifikant, jedoch nicht als unabhängige Hauptfaktoren zu bewerten, da sie in übergeordneten Wechselwirkungen enthalten waren.

Auch bei 66 °C waren die Wechselwirkungen auf der 2. Stufe signifikant, sowie auf der 1. Stufe die Wechselwirkungen Polymer · r. F. und r. F. · pH. Diese wie auch die signifikanten Einzelfaktoren konnten wegen der übergeordneten Wechselwirkung auf der 2. Stufe jedoch nicht interpretiert werden.

Die höchste Untersuchungstemperatur lieferte ein ähnliches Ergebnis: auch hier durften nur die Wechselwirkungen auf der 2. Stufe interpretiert werden, die 1. Stufe sowie die untergeordneten Einzelfaktoren durften nicht berücksichtigt werden.

Bei allen Temperaturen erfolgte daher die Auswertung über die Mittleren Varianzen. Dabei ergab sich folgende Reihenfolge, die sich bei den untersuchten Temperaturen nicht unterschied:

$$\text{pH} > \text{r. F.} \gg \text{Polymer}$$

4.3.2.4 Faktorenversuche 6 - 7: Einfluss von Polymer, pH-Wert, Temperatur bei 11 % und 30 % r. F.

Tabelle 31: Einfluss von Polymer, pH-Wert, Temperatur auf die RGK bei 11 % r. F.

Quelle	Mittlere Varianz	F	Signifikanz
Polymer	$2,934 \cdot 10^{-4}$	124,513	0,000
pH	$1,311 \cdot 10^{-3}$	556,288	0,000
T	$1,385 \cdot 10^{-3}$	587,851	0,000
Polymer · pH	$1,242 \cdot 10^{-4}$	52,699	0,000
Polymer · T	$1,367 \cdot 10^{-4}$	58,027	0,000
pH · T	$9,191 \cdot 10^{-4}$	390,089	0,000
Polymer · T · pH	$6,366 \cdot 10^{-5}$	27,020	0,000

Auch hier waren Einzelfaktoren und übergeordnete Wechselwirkungen signifikant, daher durften nur die Wechselwirkungen auf der 2. Stufe interpretiert werden.

Tabelle 32: Einfluss von Polymer, pH-Wert, Temperatur auf die RGK bei 30 % r. F.

Quelle	Mittlere Varianz	F	Signifikanz
Polymer	$4,796 \cdot 10^{-5}$	3,434	0,082
pH	$3,341 \cdot 10^{-2}$	2391,438	0,000
T	$3,405 \cdot 10^{-2}$	2437,432	0,000
Polymer · pH	$5,212 \cdot 10^{-4}$	37,312	0,000
Polymer · T	$1,059 \cdot 10^{-5}$	0,758	0,397
pH · T	$2,452 \cdot 10^{-2}$	1755,534	0,000
Polymer · T · pH	$2,493 \cdot 10^{-4}$	17,850	0,001

Die Wechselwirkungen auf der 2. Stufe waren signifikant. Diese waren den Wechselwirkungen auf der 1. Stufe (Polymer · pH und pH · T) sowie den ebenfalls signifikanten Einzelfaktoren pH-Wert und Temperatur übergeordnet. Die Einzelfaktoren konnten daher nicht als unabhängige Hauptfaktoren interpretiert werden.

Bei beiden relativen Feuchten erfolgte die Auswertung über die Mittlere Varianz. Folgende Reihenfolge für den Einfluss der Faktoren auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante wurde ermittelt:

$$T > \text{pH} > \text{Polymer}$$

4.3.2.5 Faktorenversuche 8 - 9: Einfluss von Polymer, Temperatur, relativer Feuchte bei pH 4,0 und pH 6,8

Tabelle 33: Einfluss von Polymer, Temperatur, relativer Feuchte auf die RGK bei pH 4,0

Quelle	Mittlere Varianz	F	Signifikanz
Polymer	$5,510 \cdot 10^{-7}$	0,035	0,853
T	$4,175 \cdot 10^{-2}$	2673,984	0,000
r. F.	$2,638 \cdot 10^{-2}$	1689,615	0,000
Polymer · T	$9,837 \cdot 10^{-8}$	0,006	0,983
Polymer · r. F.	$8,418 \cdot 10^{-4}$	53,914	0,000
r. F. · T	$1,871 \cdot 10^{-2}$	1198,504	0,000
Polymer · T · r. F.	$3,747 \cdot 10^{-4}$	24,001	0,000

Die Einzelfaktoren Temperatur und Relative Feuchte waren signifikant, aber auch in den übergeordneten Wechselwirkungen auf 1. Stufe (T · r. F. und Polymer · r. F.) enthalten. Da auch die Wechselwirkung auf 2. Stufe signifikant war, durfte nur diese interpretiert werden.

Tabelle 34: Einfluss von Polymer, Temperatur, relativer Feuchte auf die RGK bei pH 6,8

Quelle	Mittlere Varianz	F	Signifikanz
Polymer	$1,198 \cdot 10^{-4}$	168,262	0,000
T	$3,032 \cdot 10^{-4}$	425,847	0,000
r. F.	$2,512 \cdot 10^{-4}$	352,911	0,000
Polymer · T	$6,602 \cdot 10^{-5}$	92,732	0,000
Polymer · r. F.	$2,460 \cdot 10^{-5}$	34,554	0,000
r. F. · T	$1,105 \cdot 10^{-4}$	155,221	0,000
Polymer · T · r. F.	$1,946 \cdot 10^{-5}$	27,336	0,000

Alle Einzelfaktoren und Wechselwirkungen waren signifikant, es durften nur die Wechselwirkungen auf der 2. Stufe interpretiert werden.

Bei beiden pH-Werten wurde folgende Reihenfolge der Einflüsse der untersuchten Faktoren festgestellt:

T > r. F. > Polymer

Die Reihenfolge unterschied sich bei den untersuchten pH-Werten nicht. Bei pH 4,0 war der Einfluss des Polymers jedoch sehr viel geringer als die Einflüsse der beiden anderen untersuchten Faktoren, bei pH 6,8 waren die Unterschiede nicht so deutlich.

In fast allen Versuchen, in denen die Temperatur variiert wurde, hatte diese den größten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. Nur im ersten Faktorenversuch, bei Anwesenheit von Polycarbophil, war der Einfluss des pH-Wertes größer. Bei Variation des qualitativen Faktors Polymer hatte dieser einen relativ geringen Einfluss auf die RGK.

Der Einfluss der Temperatur war in allen Versuchen, in denen sie beide variiert wurden, größer als der Einfluss der relativen Lagerfeuchte. Der Wassergehalt der Proben [vgl. Kap. 4.1.2.2] ging nicht in die Berechnungen mit ein, da dieser nur für die PCP-haltigen Proben bestimmt wurde und eine Variation des Einflussfaktors auf hohem und niedrigem Niveau aufgrund der sehr ähnlichen Wassergehalte nicht möglich war.

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten [vgl. Kap. 4.3.1] für die Octreotid-Zersetzung in den phosphatpufferhaltigen Festen Dispersionen sind bei jeweils gleicher Lagertemperatur (58, 66, 74 °C) bei der höheren Lagerfeuchte (30 % r. F.) signifikant höher als bei 11 % r. F., trotz nahezu gleicher Wassergehalte (ca. 3 %). Auch die RGK der Festen Dispersionen mit Citratpuffer waren bei einer Lagertemperatur von 74 °C und einem Wassergehalt von ca. 3 % bei höherer Lagerfeuchte größer. Die relative Lagerfeuchte scheint also unabhängig vom Wassergehalt der Proben einen Einfluss auf die RGK zu haben. Möglicherweise besteht hier ein Zusammenhang zu den Veränderungen der Glasübergangstemperaturen [vgl. Kap. 4.1.3.3.2], die möglichst weit oberhalb der Lagertemperaturen liegen sollten [20]. Die T_g waren bei 11 % r. F. höher als bei 30 % r. F. Diese Zusammenhänge können nur vermutet werden, die Einflüsse dieser Faktoren müssten durch weitere Versuche geklärt werden.

4.3.3 Haltbarkeit

Es wurden gewichtete Lineare Regressionen mit SPSS durchgeführt [vgl. Kap. 3.4.2.3] und für die Lyophilisate (Oc 4,0 und Oc 6,8) sowie die Festen Dispersionen (Oc PCP 4,0 und Oc PCP 6,8) der Achsenabschnitt und die Steigung mit den jeweiligen Vertrauensbereichen errechnet. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für 25 °C wurde ermittelt und die Haltbarkeit berechnet. Außerdem wurde – zum Vergleich – eine nicht gewichtete Regression durchgeführt [vgl. Kap. 3.4.2].

4.3.3.1 Octreotid-Lyophilisat mit Citratpuffer (Oc 4,0)

In der Tabelle 35 sind die für die Gewichtung der Linearen Regression berechneten Daten wiedergegeben. Die letzte Spalte (n) gibt an, wie oft die Werte in die Ausgleichsrechnung eingegeben werden müssen, damit der Vertrauensbereich der logarithmierten RGK-Werte berücksichtigt wird. So erhalten die bei höheren Temperaturen und mit größerer Genauigkeit bestimmten Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ein höheres Gewicht.

Tabelle 35: Oc 4,0: Gewichtung der Werte für die Lineare Regression (Signifikanzniveau: 95 %)

T		1000/T [1000/ K]	RGK			log RGK			log VB ³⁾	n ⁴⁾
[°C]	[K]		RGK [1/d]	uG [1/d]	oG [1/d]	-log RGK ¹⁾	-log RGK uG ²⁾	-log RGK oG ²⁾		
40,1	313,3	3,1923	0,0011	0,0008	0,0013	2,9745	3,0817	2,8886	0,1930	5
50,0	323,2	3,0945	0,0036	0,0033	0,0039	2,4482	2,4852	2,4140	0,0712	14
58,0	331,2	3,0198	0,0110	0,0102	0,0119	1,9579	1,9928	1,9256	0,0672	15
66,0	339,2	2,9485	0,0463	0,0437	0,0488	1,3345	1,3591	1,3112	0,0479	21
74,0	347,2	2,8806	0,1425	0,1364	0,1486	0,8462	0,8652	0,8280	0,0372	27

¹⁾ log RGK : log der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RGK)

²⁾ log RGK uG bzw. oG: log der unteren bzw. oberen Grenze des Vertrauensbereiches

³⁾ log VB: Logarithmus des Vertrauensbereiches
(log RGK og – log RGK ug)

⁴⁾ n: 1 / log VB; n ∈ N

Die Lineare Regression nach Arrhenius lieferte eine Geradengleichung, deren Parameter Achsenabschnitt und Steigung in der Tabelle 35 angegeben sind. Durch Extrapolation auf Raumtemperatur (hier: 25 °C, entsprechend 298,15 K) konnte die RGK für diese Temperatur und damit die Haltbarkeit ($t_{90\%}$) abgeschätzt werden.

Tabelle 36: Berechnung der Haltbarkeit für Oc 4,0; Vergleich der Werte aus gewichteter und ungewichteter Linearer Regression (in Klammern: VB 95 %)

	Achsenabschnitt	Steigung	RGK _{25°C} [d]	$t_{90\%}$ [Jahre]
gewichtet	20,05 (19,66 – 20,44)	-7,26 (-7,39 – -7,13)	$5,0 \cdot 10^{-5}$ ($4,5 - 5,6 \cdot 10^{-5}$)	5,8 (5,2 – 6,4)
ungewichtet	19,08 (15,51 – 22,66)	-6,94 (-8,12 – -5,76)	$6,4 \cdot 10^{-5}$ ($2,7 - 15,5 \cdot 10^{-5}$)	4,4 (1,8 – 10,6)

Mit der gewichteten Linearen Regression wurde ein wesentlich schmalerer Vertrauensbereich für die Haltbarkeit errechnet als mit der ungewichteten Regression.

Die Proben, die bei 25 °C / 30 % r. F. gelagert wurden, zeigten über den Untersuchungszeitraum von 178 Tagen keine signifikante Gehaltsabnahme ($\alpha = 0,05$).

4.3.3.2 Octreotid-Lyophilisat mit Phosphatpuffer (Oc 6,8)

Die Vorgehensweise wurde in Kapitel 3.4.2.3 und 4.3.3.1 beschrieben. Tabelle 35 gibt die Daten für die Gewichtete Lineare Regression wieder.

Tabelle 37: Oc 6,8: Gewichtung der Werte für die Lineare Regression (Signifikanzniveau: 95 %)

T		1000/T [1000/ K]	RGK			log RGK			log VB ³⁾	n ⁴⁾
[°C]	[K]		RGK [1/d]	uG [1/d]	oG [1/d]	-log RGK ¹⁾	-log RGK uG ²⁾	-log RGK oG ²⁾		
40,1	313,3	3,1923	0,0007	0,0005	0,0009	3,1693	3,3399	3,0472	0,2927	3
50,0	323,2	3,0945	0,0012	0,0009	0,0014	2,9268	3,0297	2,8436	0,1862	5
58,0	331,2	3,0198	0,0032	0,0028	0,0036	2,4940	2,5494	2,4448	0,1046	10
66,0	339,2	2,9485	0,0068	0,0062	0,0074	2,1686	2,2087	2,1318	0,0769	13
74,0	347,2	2,8806	0,0197	0,0176	0,0219	1,7050	1,7554	1,6599	0,0955	10

¹⁾ log RGK : log der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RGK)

²⁾ log RGK uG bzw. oG: log der unteren bzw. oberen Grenze des Vertrauensbereiches

³⁾ log VB: Logarithmus des Vertrauensbereiches
(log RGK og – log RGK ug)

⁴⁾ n: 1 / log VB; n ∈ N

Die mit diesen Daten errechneten Parameter Achsenabschnitt und Steigung der Regressionsgeraden sind in Tabelle 38 angegeben. Durch Extrapolation auf 25 °C wurde die RGK_{25°C} erhalten und damit die Haltbarkeit berechnet.

Tabelle 38: Berechnung der Haltbarkeit für Oc 6,8; Vergleich der Werte aus gewichteter und ungewichteter Linearer Regression (in Klammern: VB 95 %)

	Achsenabschnitt	Steigung	RGK _{25°C} [d]	t _{90%} [Jahre]
gewichtet	12,61 (11,84 – 13,38)	-5,00 (-5,25 – -4,74)	$6,9 \cdot 10^{-5}$ ($5,9 - 8,8 \cdot 10^{-5}$)	4,0 (3,2 – 5,0)
ungewichtet	11,84 (7,47 – 16,22)	-4,74 (-6,18 – -3,29)	$8,8 \cdot 10^{-5}$ ($3,1 - 27,2 \cdot 10^{-5}$)	3,2 (1,1 – 9,3)

Auch hier ergibt die ungewichtete Regression den breiteren Vertrauensbereich.

Octreotid-Lyophilisate mit Phosphatpuffer (Oc 6,8) zeigten nach 178 Tagen Lagerung bei 25 °C / 30 % r. F. keine signifikante Gehaltsabnahme ($\alpha = 0,05$).

4.3.3.3 Feste Dispersion mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0)

Tabelle 39 zeigt die Daten zur Gewichtung der Werte für die Lineare Regression.

Tabelle 39: Oc PCP 4,0: Gewichtung der Werte für die Lineare Regression (Signifikanzniveau: 95 %)

T		1000/T [1000/ K]	RGK			log RGK			log VB ³⁾	n ⁴⁾
[°C]	[K]		RGK [1/d]	uG [1/d]	oG [1/d]	-log RGK ¹⁾	-log RGK uG ²⁾	-log RGK oG ²⁾		
40,1	313,3	3,1923	0,0009	0,0007	0,0011	3,0678	3,1826	2,9771	0,2054	5
50,0	323,2	3,0945	0,0045	0,0043	0,0048	2,3433	2,3704	2,3177	0,0528	19
58,0	331,2	3,0198	0,0154	0,0143	0,0164	1,8127	1,8434	1,7840	0,0594	17
66,0	339,2	2,9485	0,0525	0,0492	0,0558	1,2798	1,3079	1,2534	0,0545	18
74,0	347,2	2,8806	0,1624	0,1542	0,1706	0,7893	0,8119	0,7679	0,0439	23

¹⁾ log RGK : log der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RGK)

²⁾ log RGK uG bzw. oG: log der unteren bzw. oberen Grenze des Vertrauensbereiches

³⁾ log VB: Logarithmus des Vertrauensbereiches
(log RGK og – log RGK ug)

⁴⁾ n: 1 / log VB; n ∈ N

Achsenabschnitt und Steigung der Regressionsgeraden gibt Tabelle 40 wieder. Die $RGK_{25^{\circ}C}$ und damit die Haltbarkeit wurden mit Hilfe der Regressionsgleichung berechnet.

Tabelle 40: Berechnung der Haltbarkeit für Oc PCP 4,0; Vergleich der Werte aus gewichteter und ungewichteter Linearer Regression (in Klammern: VB 95 %)

	Achsenabschnitt	Steigung	$RGK_{25^{\circ}C}$ [d]	$t_{90\%}$ [Jahre]
gewichtet	20,22 (20,18 – 20,26)	-7,29 (-7,31 – -7,28)	$5,7 \cdot 10^{-5}$ ($5,5 - 5,8 \cdot 10^{-5}$)	5,0 (5,0 – 5,1)
ungewichtet	20,26 (19,98 – 20,54)	-7,31 (-7,40 – -7,21)	$5,5 \cdot 10^{-5}$ ($5,3 - 6,3 \cdot 10^{-5}$)	5,1 (5,1 – 5,5)

Die mit der gewichteten und der ungewichteten Linearen Regression berechneten Haltbarkeitsdaten waren hier nahezu gleich.

Während der 178tägigen Lagerung der Festen Dispersionen Oc PCP 4,0 bei 25 °C / 30 % r. F. war kein Abfall des Octreotid-Gehaltes feststellbar.

4.3.3.4 Feste Dispersion mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8)

Für die mit Phosphatpuffer hergestellten Festen Dispersionen wurden die in Tabelle 41 aufgeführten Daten errechnet.

Tabelle 41: Oc PCP 6,8: Gewichtung der Werte für die Lineare Regression (Signifikanzniveau: 95 %)

T		1000/T [1000/ K]	RGK			log RGK			log VB ³⁾	n ⁴⁾
[°C]	[K]		RGK [1/d]	uG [1/d]	oG [1/d]	-log RGK ¹⁾	-log RGK uG ²⁾	-log RGK oG ²⁾		
40,1	313,3	3,1923	0,0006	-0,0001	0,0012	3,2410		2,9193		
50,0	323,2	3,0945	0,0017	0,0009	0,0024	2,7768	3,0254	2,6196	0,4057	2
58,0	331,2	3,0198	0,0018	0,0014	0,0022	2,7372	2,8433	2,6520	0,1913	5
66,0	339,2	2,9485	0,0028	0,0026	0,0031	2,5498	2,5896	2,5133	0,0763	13
74,0	347,2	2,8806	0,0081	0,0075	0,0087	2,0908	2,1230	2,0608	0,0621	16

¹⁾ log RGK :

log der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RGK)

²⁾ log RGK uG bzw. oG:

log der unteren bzw. oberen Grenze des Vertrauensbereiches

³⁾ log VB:

Logarithmus des Vertrauensbereiches

(log RGK og – log RGK ug)

⁴⁾ n:

1 / log VB

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für 40,1 °C unterschied sich nicht signifikant von Null (der Vertrauensbereich schloss Null mit ein). Mit 5%iger Irrtumswahrscheinlichkeit nahm der Octreotid-Gehalt über den Untersuchungszeitraum nicht signifikant ab. Bei 50 °C und 58 °C überschritten sich die Vertrauensbereiche der RGK, ein signifikanter Unterschied zwischen ihnen war nicht nachweisbar. Für die Auswertung der Haltbarkeitsuntersuchung standen somit nur die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, welche bei 66 °C und bei 74 °C erhalten wurden, zur Verfügung. Damit konnte für die Proben Oc PCP 6,8 keine Lineare Regression zur Ermittlung der $RGK_{25^{\circ}C}$ und damit der Haltbarkeit durchgeführt werden.

4.3.4 log k / pH-Profil

Die in verschiedenen Puffern lyophilisierten Proben wurden 293 Tage bei 66 °C / 30 % r. F. gelagert und der Octreotid-Gehalt mit der validierten HPLC-Methode festgestellt [vgl. Kap. 3.4.3]. Die Auftragung des Gehaltes gegen die Zeit ergab für jede Probe einen exponentiellen Verlauf (siehe Abb. 68), so dass auf eine Reaktion erster Ordnung geschlossen wurde.

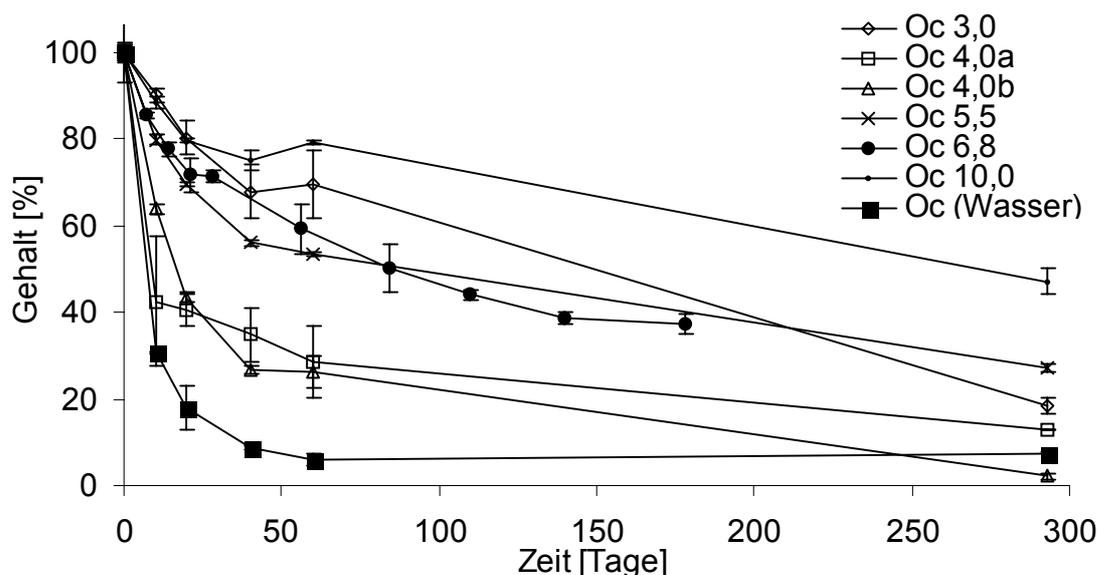


Abbildung 68: Octreotid-Zersetzung in verschiedenen Puffern und Wasser ($\bar{x} \pm s$, $n = 2$); zum Vergleich wurde das Octreotid-Lyophilisat mit Phosphatpuffer pH 6,8 mit ausgewertet

Es sind hier die pH-Werte der Lösungsmittel vor der Lyophilisation angegeben [vgl. Kap. 2.1.3], es bedeuten:

Oc 3,0:	Phosphatpufferlösung pH 3,0 RN
Oc 4,0 a:	Phthalat-NaOH-Mischung pH 4,0 [26]
Oc 4,0 b:	Citrat-Pufferlösung pH 4,0 RN
Oc 5,5:	Pufferlösung pH 5,5 RN
Oc 6,8:	Phosphat-Pufferlösung pH 6,8 R
Oc 10,0:	Ammoniumchlorid-Pufferlösung pH 10,0 R
Oc (Wasser):	destilliertes Wasser (gemessener pH-Wert: 7,1)

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden, wie in Kap. 3.4.2.1 beschrieben, durch Nichtlineare Regression ermittelt. In der folgenden Tabelle 42 sind die erhaltenen Werte aufgeführt.

Tabelle 42: Zersetzung von Octreotid in Lyophilisaten aus unterschiedlichen Lösungsmitteln während 293 Tagen Lagerung bei 66 °C / 30 % r. F. (* Oc 6,8: Proben aus der Haltbarkeitsuntersuchung, 178 Tage Lagerzeit)

pH-Wert des Lösungsmittels	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) [1/d]			
	RGK	ase	uG	oG
Wasser	0,1010	± 0,0057	0,0895	0,1125
3,0	0,0096	± 0,0008	0,0080	0,0112
4,0 a	0,0267	± 0,0036	0,0194	0,0341
4,0 b	0,0316	± 0,0017	0,0282	0,0350
5,5	0,0141	± 0,0015	0,0110	0,0171
6,8 *	0,0068	± 0,0003	0,0062	0,0074
10,0	0,0049	± 0,0010	0,0029	0,0069

Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten wurden logarithmiert und gegen den pH-Wert aufgetragen. Das resultierende log k / pH-Profil ist in Abbildung 69 dargestellt.

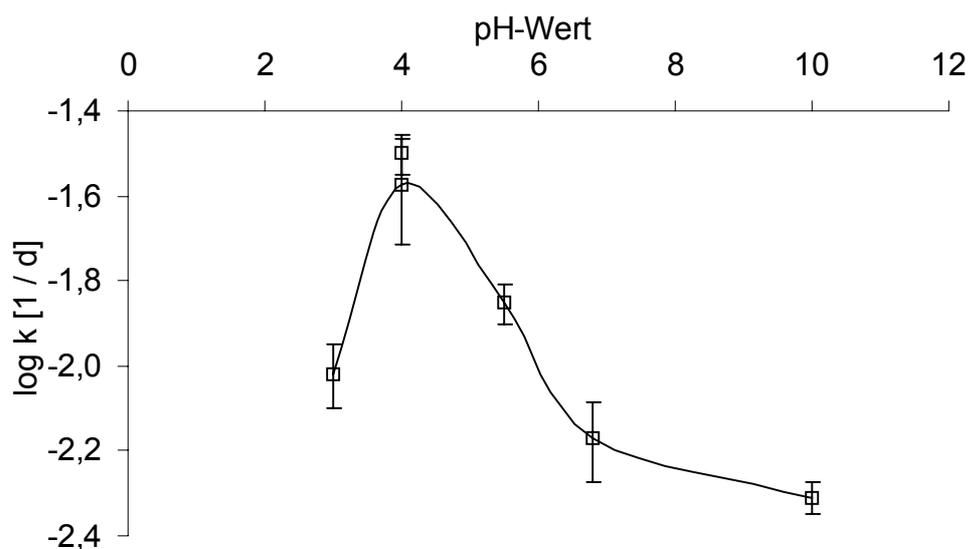


Abbildung 69: log k / pH-Profil für Octreotid in gepufferten Lyophilisaten bei 66 °C / 30 % r. F. (mit Konfidenzintervall 95 %)

Das Octreotid war in den Lyophilisaten bei pH 4,0 am wenigsten stabil. Es spielte dabei keine Rolle, ob Citratpuffer oder Phthalat-NaOH-Puffer verwendet wurde, ein Unterschied zwischen den RGK war nicht nachweisbar, die Konfidenzintervalle überschneiden sich. Mit zunehmender Entfernung von pH 4,0 nahm die Stabilität des Peptids zu, dies galt sowohl für saurere als auch für basischere Puffer.

Es bleibt jedoch unklar, ob die Stabilität des Peptids durch die pH-Werte oder die Puffersalze beeinflusst wurde. Sicherlich hat der pH-Wert der Lyophilisate einen Einfluss auf die Zersetzungsreaktionen des Octreotids, da einige Reaktionen eher im basischen, andere eher im sauren Milieu ablaufen [vgl. Kap. 4.2.2]. Andererseits haben auch die verwendeten Puffersalze selbst Effekte auf die Stabilität des Arzneistoffes. Diese sind jedoch konzentrationsabhängig und kaum vorhersagbar. Beispielsweise besitzt das Protein rhKGF (recombinant human keratinocyte growth factor) eine größere Stabilität in Citratpuffer als in Phosphatpuffer, auf der anderen Seite konnte Phosphat den Anteil der Protein-Aggregation bei aFGF (acidic fibroblast growth factor) signifikant verringern [84]. Da die Puffer pH 3,0, pH 5,5 sowie pH 6,8 Phosphate enthalten, könnte die größere Stabilität des Octreotids bei diesen Werten auch auf dieses Puffersystem zurückzuführen sein.

Auffällig ist die relativ geringe Stabilität in ungepufferten Lyophilisaten (Tabelle 42: Wasser). Diese Lyophilisate waren nach der Rekonstitution nicht klar gelöst, sondern trübe, was auf Peptidaggregation hindeutet. Scheinbar schützen die Puffersalze das Peptid vor einer Zersetzung bzw. vor Aggregation. Für lyophilisiertes BSA (bovine serum albumin) wurde eine solche Verhinderung der Aggregation durch Natriumchlorid und Natriumphosphat beschrieben [83].

4.4 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen

4.4.1 Octreotid

4.4.1.1 Partikelform und Größe

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung [Kap. 3.1.7] des Octreotids waren unregelmäßig geformte Partikel zu erkennen, die farblos durchscheinend aussahen (Abb. 70). Bei 100facher Vergrößerung konnte mittels Okularmikrometer eine Partikelgröße von 20 – 500 μm festgestellt werden. An der Oberfläche der größeren Partikel befanden sich kleinere.



Abbildung 70: Octreotid (Novartis), lichtmikroskopische Aufnahme

Die REM-Aufnahmen zeigten die „plättchenartige“ Form der Partikel. Die Höhe der Plättchen betrug ca. 2 – 5 μm (Abb. 71).

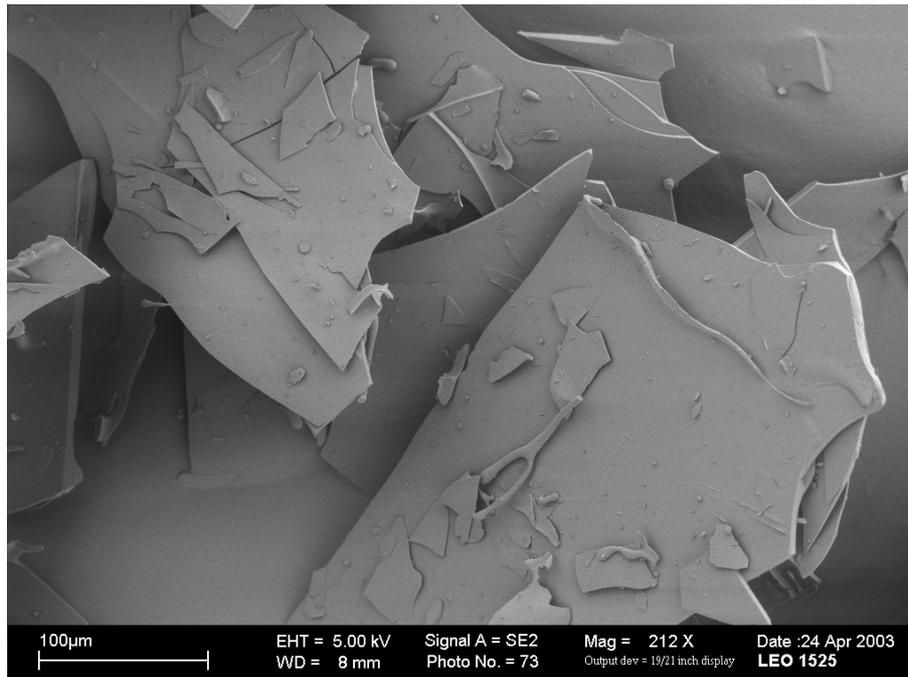


Abbildung 71: Octreotid (Novartis), REM-Aufnahme

4.4.1.2 Thermomikroskopische Betrachtung

Das Octreotid-Präparat wurde mit dem Heiztisch <32> zunächst mit 10 °C / min bis 125 °C aufgeheizt, da Vorversuche gezeigt hatten, dass bis zu dieser Temperatur keine Veränderung feststellbar war. Zwischen 125 °C und 165 °C betrug die Heizgeschwindigkeit 1 °C / min. Während des Aufheizens wurde das Präparat mit 100facher Vergrößerung im Mikroskop <30> beobachtet.

Im Bereich von 125 – 135 °C konnten bis auf eine sehr leichte Farbänderung von farblos nach hellgrau keine Veränderungen festgestellt werden. Ab 155 °C war eine beginnende Verfärbung nach durchscheinend gelb zu beobachten, mit zunehmender Temperatur wurde der Gelbton dunkler. Die Form der Partikel wurde dabei unschärfer, Kanten verschwanden.

4.4.2 Polycarbophil

Die REM-Aufnahme des Polycarbophils (Abb. 72) zeigt größere Partikel (ca. 2 μm), die aus zusammengelagerten kleineren Partikeln (ca. 0,2 μm) bestehen.

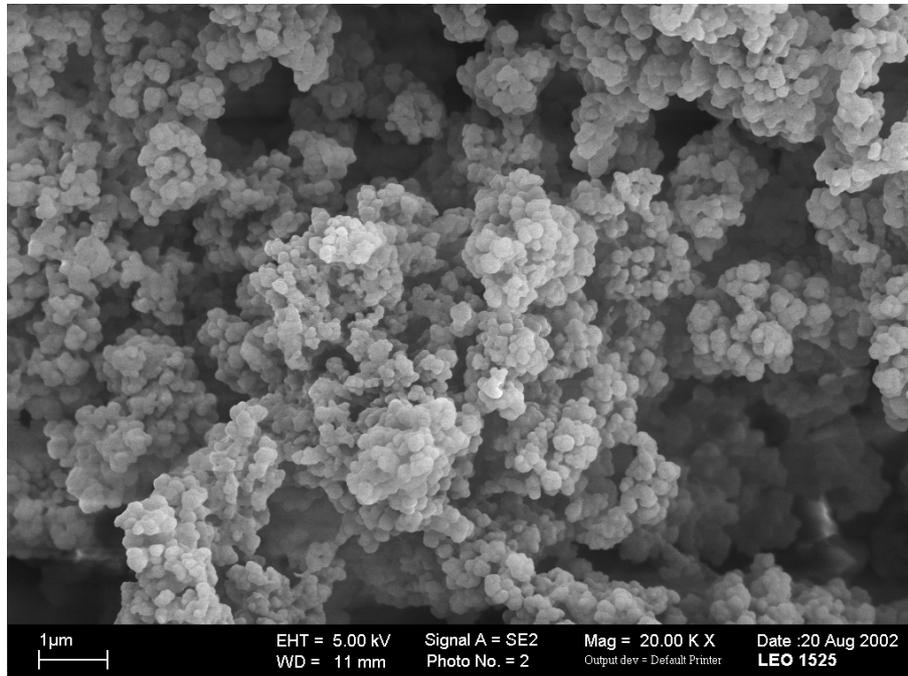


Abbildung 72: Polycarbophil, un bearbeitet (BFGoodrich), REM-Aufnahme

4.4.3 Feste Dispersionen

Hier ist auf den REM-Aufnahmen eine dreidimensionale Struktur zu erkennen, die z. T. sehr filigran ist, an anderen Stellen aber auch größere Strukturelemente enthält (Abb. 73 und 74).

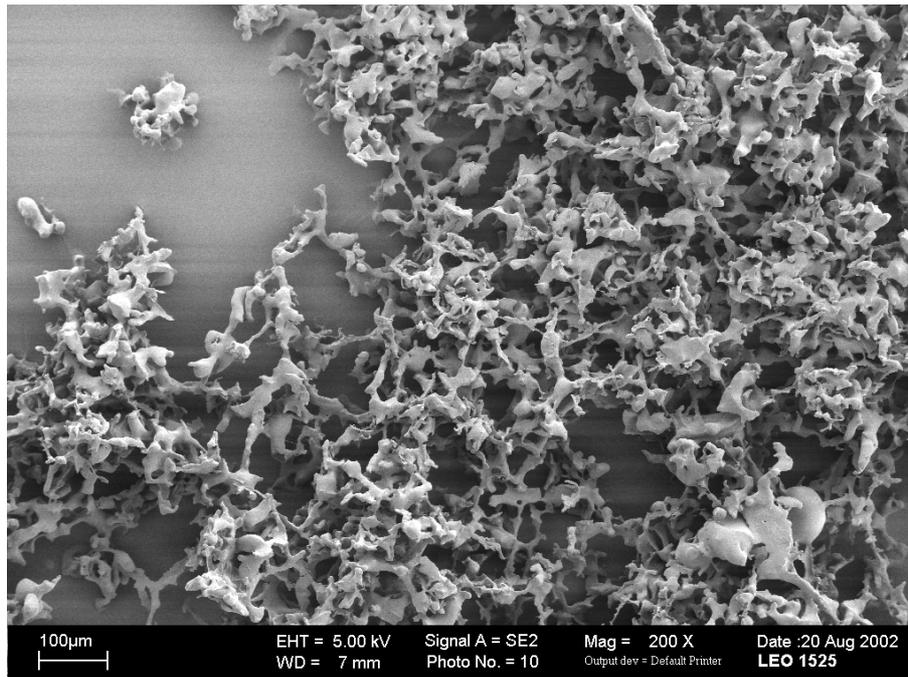


Abbildung 73: Oc PCP 4,0, unbelastet, REM-Aufnahme

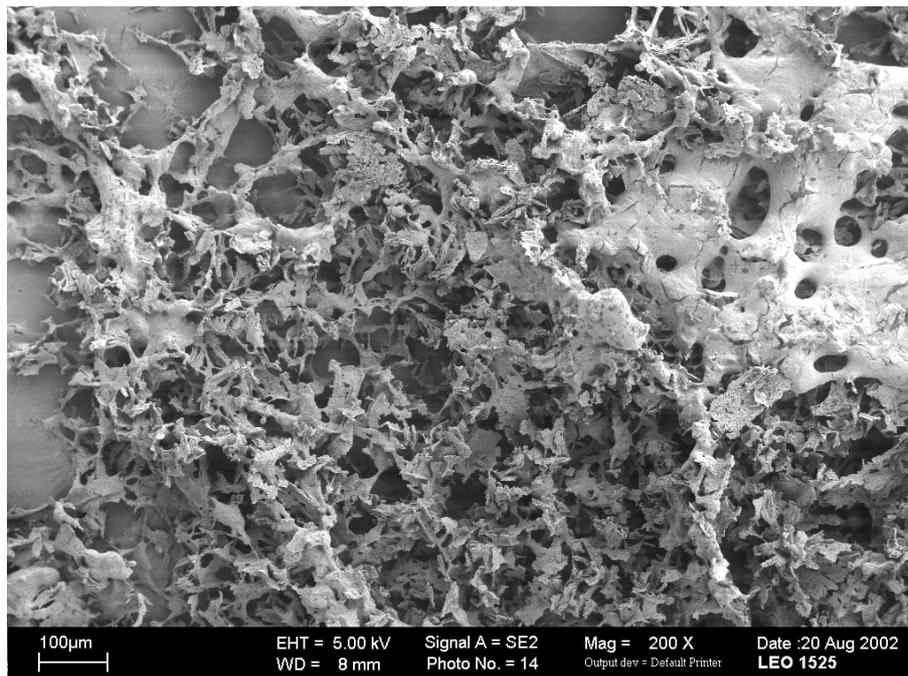


Abbildung 74: Oc PCP 6,8, unbelastet, REM-Aufnahme

An der Oberfläche der citratpufferhaltigen Proben sind Kristalle zu erkennen (vgl. Abb. 75 und 77). Möglicherweise handelt es sich hier um aus Natronlauge und Salzsäure bei der Lyophilisation entstandenes Natriumchlorid.

Die Proben mit Phosphatpuffer wiesen eine zwar strukturiertere Oberfläche auf, es waren aber keine Kristalle erkennbar (Abb. 76 und 78).

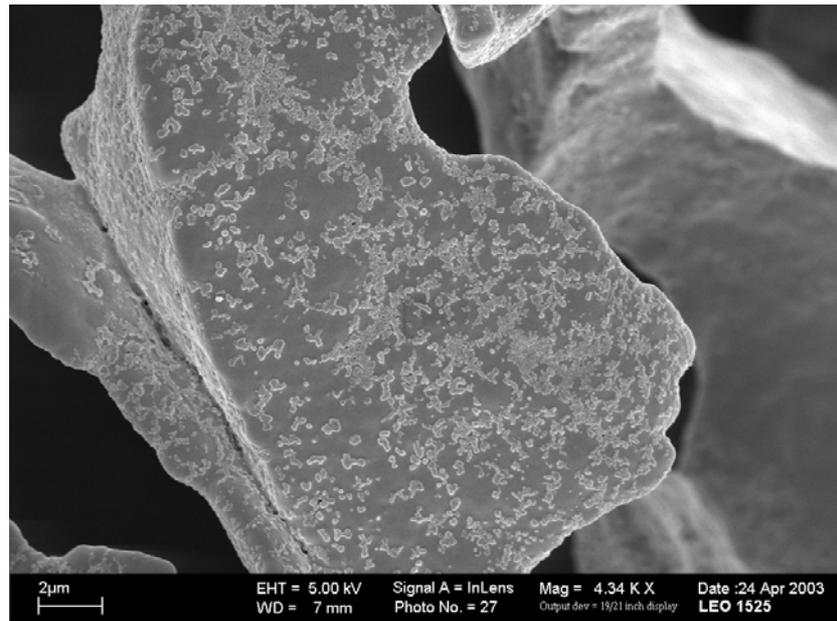


Abbildung 75: Oc PCP 4,0, 50 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme

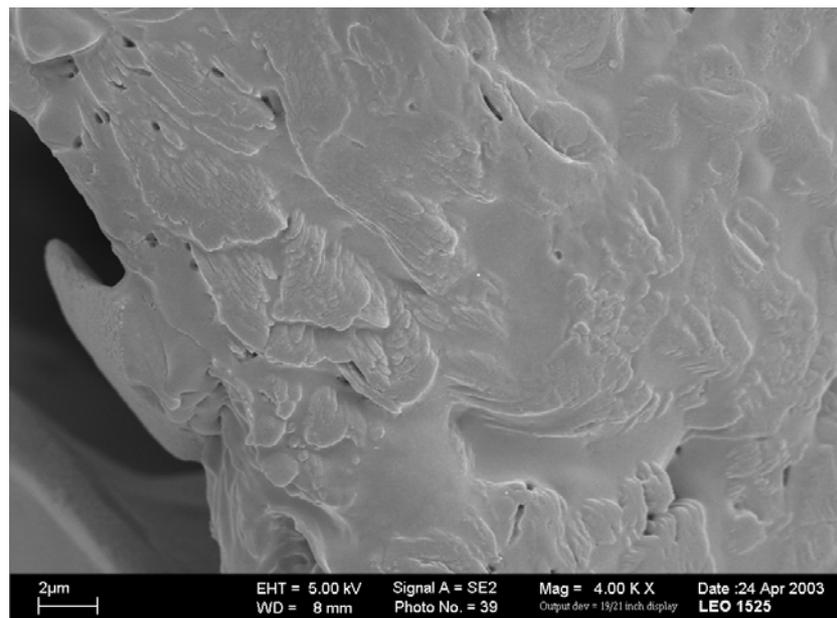


Abbildung 76: Oc PCP 6,8, 50 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme

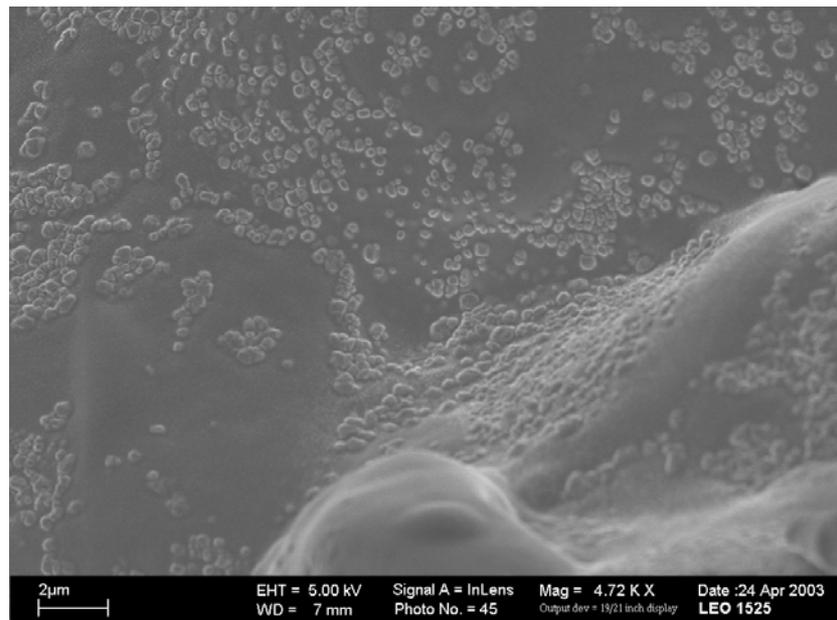


Abbildung 77: Oc PCP 4,0, 74 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme

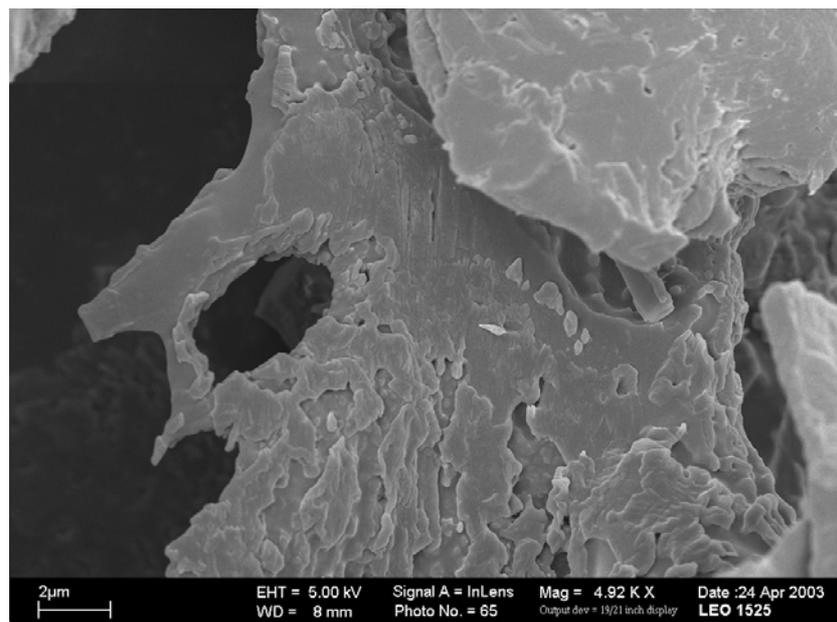


Abbildung 78: Oc PCP 6,8, 74 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme

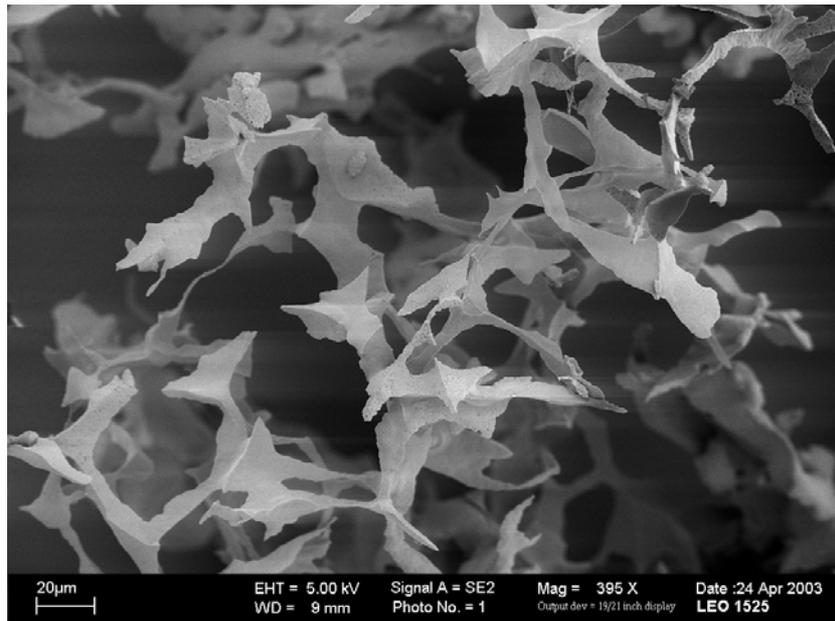


Abbildung 79: Oc PCP 4,0, 25 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme

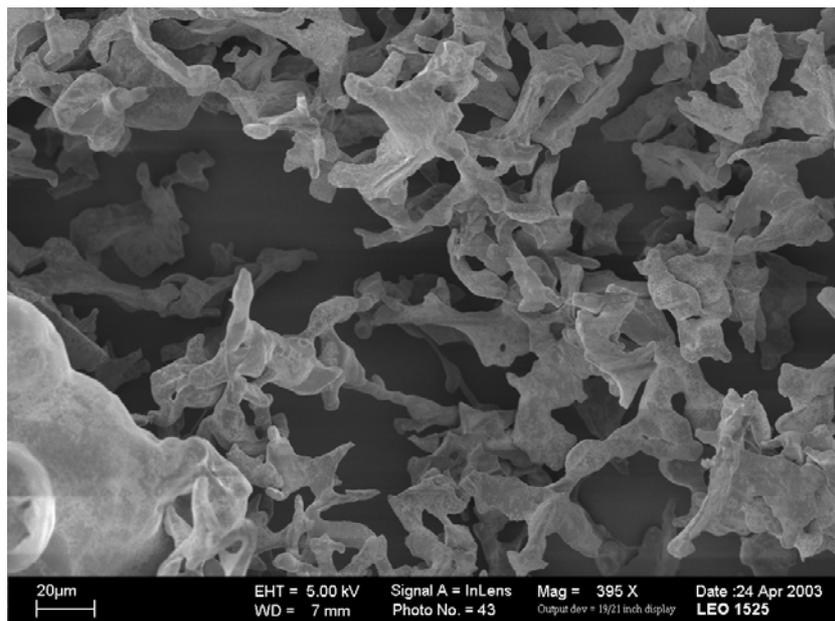


Abbildung 80: Oc PCP 4,0, 74 °C, 30 % r. F., REM-Aufnahme

Die Abbildungen 79 und 80 zeigen die citratpufferhaltigen Proben nach Lagerung bei 30 % r. F. und 25 °C bzw. 74 °C. Erkennbar ist, dass nach Lagerung bei 74 °C das dreidimensionale Gerüst eine gröbere Struktur aufweist, als bei der geringeren Temperatur.

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassender Vergleich der Ergebnisse mit den Untersuchungen von Wratschko [86]

Viele Untersuchungen zu Peptidarzneistoffen behandeln die Verbesserung der Resorbierbarkeit dieser Wirkstoffe. Mit der Herstellung Fester Dispersionen aus Peptiden und deren Stabilität hat sich bisher nur Wratschko [86] befasst. Dort wurden aus dem Peptid Desmopressin mit Polycarbophil Feste Dispersionen hergestellt und auf die Stabilität des Peptidarzneistoffes geprüft.

Das von Wratschko entwickelte Herstellungsverfahren wurde in dieser Arbeit modifiziert. Statt des Dispergierens mit einem Hochleistungsdispergiergerät wurde ein Laborrührer verwendet, um die Polymerstruktur nicht zu zerstören.

Es wurden weitere Untersuchungen zur Wassersorption und zum Wassergehalt der Proben durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass es bei den beiden untersuchten pH-Werten 4,0 und 6,8 wahrscheinlich zu unterschiedlicher Wasserbindung kommt. Dies ist möglicherweise auf das unterschiedliche Quellungsverhalten des Polycarbophils bei diesen beiden pH-Werten zurückzuführen.

Auch Wratscho [86] untersuchte das Adsorptionsverhalten des Peptids (Desmopressin) an Oberflächen. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde bei pH 4,0 Adsorption an Glas festgestellt.

Desmopressin wurde mit zunehmender Lagertemperatur zunehmend zersetzt. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit hatte dort aber die relative Lagerfeuchte einen größeren Einfluss auf die Stabilität des Desmopressins als die Lagertemperatur. Beim Octreotid war der Einfluss der Temperatur größer als der der relativen Feuchte. Beide Peptide wiesen aber bei identischen Puffersystemen die geringste Stabilität bei pH-Werten um 4,0 auf, was durch die $\log k / \text{pH}$ -Profile deutlich wird.

Insgesamt war das Peptid Octreotid in den Festen Dispersionen stabiler als das Desmopressin. Dies wird v. a. in den berechneten Haltbarkeitsdaten deutlich. Für Desmopressin wurden Werte von 0,24 – 1,1 Jahre berechnet, während die Octreotid-Dispersionen und -Lyophilisate ca. 5 Jahre haltbar sein sollen. Bei beiden Peptiden ergab sich aber bei Lagerung bei 25 °C / 30 % r. F. keine signifikante Gehaltsabnahme über den Lagerungszeitraum.

5.2 Zusammenfassung und Ausblick

Die allgemein sehr schlechte orale Bioverfügbarkeit von Peptiden kann eventuell durch Verarbeitung mit bioadhäsiven Polymeren wie z. B. Polycarbophil verbessert werden. Durch diese Polymere soll die Verweilzeit im Gastrointestinaltrakt verlängert werden, sie bieten einen Schutz vor enzymatischem Abbau des Peptids und ermöglichen durch Öffnen der tight junctions eine vermehrte Resorption dieser Arzneistoffe.

Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung der Herstellungsmethoden für Feste Dispersionen aus Peptiden mit Polycarbophil, die physikalisch-chemische Charakterisierung dieser Dispersionen sowie die Untersuchung der Stabilität des Arzneistoffes in diesen Systemen. Die Einflüsse des Polymers, des pH-Wertes, von Lagertemperatur und –feuchte sollten abgeschätzt werden. Es wurden dazu Lyophilisate aus Octreotid in verschiedenen Puffern (pH 3,0, pH 4,0, pH 5,5, pH 6,8, pH 10,0) sowie Feste Dispersionen aus Peptid, Polycarbophil und Puffer (pH 4,0 und 6,8) sowie peptidfreie Proben hergestellt und bei verschiedenen klimatischen Bedingungen gelagert.

Zur physikalischen und physikochemischen Beschreibung wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Zur Untersuchung der Wasseraufnahme der Proben bei verschiedenen relativen Lagerfeuchten wurde die sorbierte Wassermenge gravimetrisch unter Verwendung von Schepky-Gefäßen bestimmt.
- Die Wassergehalte der Proben wurde während der Einlagerungszeit durch Karl-Fischer-Titration untersucht.
- Da der Wassergehalt die Glasübergangstemperaturen beeinflussen kann, wurden zu bestimmten Zeitpunkten der Einlagerung DSC-Untersuchungen durchgeführt und die Glasübergangstemperaturen bestimmt.
- Viskositätsuntersuchungen wurden mit einem Ubbelohde-Viskosimeter durchgeführt, um mögliche Einflüsse des Herstellungsverfahrens der Festen Dispersionen auf die Struktur des Polycarbohils zu erkennen.
- Das Adsorptionsverhalten des Octreotids an Glas und Polyethylen wurde untersucht.

Zur Beurteilung der chemischen Stabilität des Peptids wurde die HPLC-Analytik eingesetzt. Die entwickelte HPLC-Methode war zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Octreotids geeignet, was durch die Validierung bewiesen wurde. Auch die Zersetzungsprodukte aus der Einlagerung konnten qualitativ nachgewiesen werden. Zur Identifizierung von Zersetzungsprodukten wurde die LC-MS-Kopplung verwendet.

Durch Nichtlineare Regression für Reaktionen 1. Ordnung wurden Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Octreotid-Zersetzung berechnet, daraus konnten Haltbarkeitsdaten für die Proben abgeschätzt sowie ein $\log k / \text{pH}$ -Profil erstellt werden. Durch mehrfaktorielle univariate Varianzanalyse konnten außerdem die Einflüsse des pH-Wertes, des Polymers, der Lagertemperatur und der Lagerfeuchte auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante quantifiziert werden.

Die Festen Dispersionen wurden durch Lösen des Peptids in Citratpuffer bzw. Phosphatpuffer, Hinzufügen und Dispergieren des Polycarbophils und anschließende Lyophilisation hergestellt.

Die Herstellung der Festen Dispersionen wurde nach Viskositätsuntersuchungen optimiert und der Einfluss des Lyophilisierens auf die Viskosität und damit auf die Struktur des Polymers untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Viskosität von Polycarbophil-Dispersionen bei Behandlung mit einem Hochleistungsdispergiergerät signifikant geringer ist als nach Rühren mit einem Laborrührer. Wahrscheinlich wird das Polymer durch die starke Scherung strukturell gestört. Der Prozess des Lyophilisierens hatte dagegen keinen Einfluss auf die Viskosität der Dispersionen.

Gravimetrisch wurde die Wassersorption von Polycarbophil und lyophilisiertem gepufferten Polycarbophil bestimmt. Hier zeigte sich für reines Polycarbophil und gepufferte Polycarbophil-Lyophilisate unterschiedliches Verhalten. Reines PCP nahm mit ansteigender relativer Lagerfeuchte mehr Wasser auf, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht war, die Lyophilisate hingegen gaben – abhängig von Lagerfeuchte, -temperatur und pH-Wert – zunächst aufgenommenes Wasser z. T. wieder ab. Diese Abgabe des sorbierten Wassers könnte auf eine Kristallisation der sowohl in Citrat- als auch in Phosphatpuffer enthaltenen Citronensäure zurückzuführen sein, so dass der Wassergehalt des hydratisierten amorphen Zustandes nicht mehr beibehalten werden konnte.

Während der Lagerung der Festen Dispersionen erfolgte eine Überprüfung der Wassergehalte der Proben mittels Karl-Fischer-Titration. Bei mit Citratpuffer pH 4,0 lyophilisierten Proben blieb der Wassergehalt mit zunehmender Lagertemperatur von 25 bis 66 °C nahezu konstant, bei Proben, die mit Phosphatpuffer pH 6,8 lyophilisiert wurden, nahm er mit zunehmender Lagertemperatur ab. Dieses Verhalten wurde auf unterschiedliche Wasserbindung in den Proben zurückgeführt. Vor dem Lyophilisieren ist das Polymer bei pH 6,8 stärker gequollen als bei pH 4,0, da bei höherem pH-Wert ein größerer Anteil der Carboxylgruppen dissoziiert vorliegt. Diese stärkere Quellung könnte – auch nach der Lyophilisation noch – ein weitmaschigeres Polymernetzwerk entstehen lassen, so dass dem Wasser mehr Raum zur Verfügung steht. Das Wasser könnte dann nicht nur am Polymer, sondern auch an weiteren Wasserschichten weniger fest gebunden sein, während es bei pH 4,0 – aufgrund des engeren Netzwerkes – größtenteils am Polymer selbst gebunden wird. Bei Temperaturerhöhung könnte es daher zu unterschiedlichem Desorptionsverhalten kommen, was sich in den verschiedenen Wassergehalten widerspiegeln würde.

Da die Glasübergangstemperaturen abhängig vom Wassergehalt sind, wurden auch diese über die Lagerzeit mittels DSC-Untersuchungen verfolgt. Die Proben mit höherem Wassergehalt wiesen jeweils geringere Glasübergangstemperaturen auf, was auf den Weichmachereffekt des Wassers zurückgeführt wurde. Die Glasübergangstemperaturen wurden jedoch nicht nur vom Wassergehalt der Proben beeinflusst. Bei den mit Phosphatpuffer lyophilisierten Proben hatte das Peptid Einfluss auf die Tg, und möglicherweise kommt es auch durch die entstandenen Zersetzungsprodukte zur Veränderung der Glasübergangstemperaturen.

Um eine eventuelle Adsorption des Peptids an Glasbehältnissen oder Pipetten zu erkennen, wurden Adsorptionsuntersuchungen an diesen Materialien durchgeführt und mit Nichlinearer Regression auf Grundlage der Langmuir-Gleichung ausgewertet. Für Octreotid konnte aus Lösungen mit pH-Wert 4,0 an Glas signifikante Adsorption festgestellt werden, die der Langmuir-Gleichung folgte. Es wurden etwa $0,2 \text{ nmol} / \text{cm}^2$ adsorbiert. Bei pH 6,8 kam es zu vergleichsweise geringer Adsorption, es gelang aber keine Anpassung an die Langmuir-Funktion. An Polyethylen konnte keine Adsorption festgestellt werden.

Es wurden aus Octreotid Lyophilisate und Feste Dispersionen hergestellt. Proben der Dispersionen aus Citratpuffer (Oc 4,0 und Oc PCP 4,0) und Phosphatpuffer (Oc 6,8 und Oc PCP 6,8) wurden bei verschiedenen Temperaturen (25, 40, 50, 58, 66, 74 °C) und relativen Feuchten (11, 30 % r. F.) 178 Tage gelagert. Zusätzlich wurden Lyophilisate mit durch Puffer eingestellten pH-Werten zwischen 3,0 und 10,0 für 293 Tage bei 66 °C / 30 % r. F. eingelagert, um die Einflüsse der Puffersalze bzw. des pH-Wertes zu bestimmen. Aus diesen Ergebnissen wurde ein $\log k / \text{pH}$ -Profil erstellt.

Es war mit zunehmender Temperatur eine schnellere Peptidzersetzung feststellbar. Auch höhere Lagerfeuchten führten zur Erhöhung der Zersetzungsgeschwindigkeit. Die Entstehung von Zersetzungsprodukten war abhängig von Lagerungsbedingungen, -zeit, pH-Wert sowie An- oder Abwesenheit des Polymers. In den Proben aus Citratpuffer entstanden insgesamt mehr Zersetzungsprodukte als in denen aus Phosphatpuffer. Bei letzteren wiesen die Proben mit PCP weniger Zersetzungsprodukte auf als die ohne Polymer, was auf den stabilisierenden polyanionischen Charakter des Polycarbophils zurückgeführt werden könnte.

Über den Einlagerungszeitraum wurden die Restgehalte des Octreotids durch HPLC bestimmt. Aus diesen konnten die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Zersetzung mit Nichtlinearer Regression berechnet werden. Mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung konnten die RGK für Raumtemperatur durch Extrapolation ermittelt und so die Haltbarkeitsdaten für die Lyophilisate aus Puffer von pH 4,0 bzw. 6,8, sowie für die Festen Dispersionen aus Puffer pH 4,0 abgeschätzt werden (berechnete Haltbarkeit ≥ 4 Jahre).

Das $\log k / \text{pH}$ -Profil ergab, dass die Peptid-Stabilität bei Werten um pH 4,0 am geringsten ist und bei Entfernung von diesem Wert zunimmt. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf die im Puffer enthaltene Citronensäure zurückzuführen ist, wurden auch Lyophilisate untersucht, deren pH-Wert 4,0 mit einem NaOH-Phthalat-Puffer eingestellt wurde. Es war kein Unterschied in den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten nachweisbar, auch in diesem Puffer war die Stabilität geringer als in den anderen untersuchten Puffern.

Der Einfluss von Lagertemperatur und –feuchte sowie von pH-Wert und Polymer wurde mittels mehrfaktorieller univariater Varianzanalyse berechnet. Dabei hatte in allen Versuchen, in denen die Temperatur und die relative Feuchte variiert wurden,

die Temperatur den größten Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Peptidzerersetzung. Der Einfluss des Polymers war in allen Versuchen gering.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Peptide in Festen Dispersionen mit Polycarbophil mit ausreichender Stabilität hergestellt werden können. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig, um diese Systeme zu charakterisieren und zu optimieren.

Es ist bisher ungeklärt, wie und wo der Arzneistoff sich im Polymer befindet. Eine Feste Dispersion eines Peptids sollte eine molekular- oder kolloiddisperse Verteilung im Polymer bedeuten, Untersuchungen dahingehend sind notwendig.

Auch der Einfluss der Puffersalze auf die Stabilität des Peptids sollte genauer betrachtet werden, da die Zersetzung sowohl vom pH-Wert als auch vom Puffersalz beeinflusst wird.

Zur weiteren physikalisch-chemischen Charakterisierung wären Untersuchungen zur Wasserbindung in den Proben, besonders bei verschiedenen pH-Werten interessant. Auch die Beeinflussung der Glasübergangstemperaturen durch den Wassergehalt, das Peptid oder Zersetzungsprodukte sowie Lagerungsbedingungen könnten untersucht und quantifiziert werden.

Weiterhin wäre eine Überprüfung der Resorbierbarkeit eines Peptids aus einer solchen Festen Dispersion sinnvoll, z. B. mit Hilfe von Caco-2-Zelllinien.

5.3 Summary and Outlook

The low oral bioavailability of peptides may be improved by processing them with bioadhesive polymers. These polymers prolong the residence time in the gastrointestinal tract, they protect the peptides against enzymatic degradation and – by opening of the tight junctions – they increase the resorption of these peptides.

Aim of this work was the further development of preparation methods of solid dispersions of octreotide with polycarbophil (PCP), the physico-chemical characterization of these dispersions as well as the examination of the chemical stability of the peptide in these systems. The influence of the polymer, the pH value, the storage temperature and the relative humidity should be assessed. Solid dispersions with peptide, polycarbophil and buffer (pH 4.0 and 6.8) and PCP-free systems (pH 3.0, pH 4.0, pH 5.5, pH 6.8, pH 10.0) as well as peptide-free systems were prepared and stored at various climatic conditions.

To investigate the physical and the physico-chemical properties the following examinations were carried out:

- the water uptake of the samples was investigated with so called Schepky vessels; they allow a gravimetrical determination of the water adsorbed at various climatic storage conditions;
- the water content was determined by Karl Fischer titration;
- since the water content can influence the glass transition temperatures DSC measurements were carried out;
- the viscosity of the samples was investigated with an Ubbelohde-Viskosimeter to analyze the influence of the production method on the structure of the polymer;
- the adsorption of the octreotide to polyethylene and to glass was investigated.

For investigation of the chemical stability the HPLC was used. The HPLC-method developed was validated for qualitative and quantitative analysis of octreotide. Degradation products were detected qualitatively. To identify the degradation products a technique of coupling HPLC with mass spectroscopy was used.

The rate constants of the decomposition of octreotide were calculated by non-linear regression. They were used to estimate the shelf-lives for the samples as well as to establish a log k / pH-profile.

The influence of pH, polymer and storing conditions on the rate constant was examined with different factorial designs and evaluated by analysis of variance.

Solid dispersions were prepared by dissolving the drug in citrate buffer and in phosphate buffer, respectively, according to Pharm. Eur. and PCP was added followed by lyophilization.

Investigation of the viscosity of the samples helped to optimize the preparation of these solid dispersions. When treated with a high shear mixer the viscosity was significantly lower than after treatment with a propeller mixer, which may be caused by a reduction in structure of the polymer by high shear rates. However, the lyophilization process did not have any influence on the viscosity of the dispersions.

The water uptake of PCP and of buffered freeze-dried PCP was determined gravimetrically with Schepky vessels. Pure PCP and buffered freeze-dried PCP showed different behaviour. While in pure PCP the water uptake increased with increasing relative humidity until it reached an equilibrium, the buffered freeze-dried PCP lost its absorbed water partially. The loss of the sorbed water may be attributed to a crystallization of citric acid, which is a component in both buffers used. So the citric acid cannot retain the moisture content of the hydrated amorphous state.

During storage of the solid dispersions their water content was determined by Karl Fischer titration. Samples with citrate buffer had an almost constant water content at storing conditions between 25 °C and 66 °C. The water content of samples with phosphate buffer decreased with increasing storing temperature. The reason for this may be the different water binding in the samples. Before freeze-drying the polymer is dispersed in buffer pH 4.0 and 6.8 resp. In pH 6.8, more carboxyl groups are dissociated, which leads to a more coarse polymer network. Even after lyophilization there remains more space between the polymer chains available for the water. It will be bound not only to the polymer itself but in layers to the other water molecules by hydrogen bonds. In pH 4.0, the water may be bound to the polymer itself because of a tight polymer network. With raising temperature these systems may show different desorption behaviour which would be reflected by different water contents.

Since the glass transition temperatures (T_g) are dependent on the water content these were pursued by means of DSC examinations during time of storage. The

samples with higher water content showed lower T_g because of the plasticizing effect of water. However, the T_g was not only influenced by the water content. In phosphate buffer, the octreotide and probably the degradation products have an influence, too.

To recognize a possible adsorption of the peptides at glass containers or pipettes, adsorption studies were carried out and evaluated with non-linear regression on the basis of the Langmuir equation. For octreotide in solutions with pH 4.0, a significant adsorption to glass could be stated which followed the Langmuir model. At pH 6.8 there was adsorption, too, but it did not follow the Langmuir function. No adsorption to polyethylene could be detected.

The solid dispersions and the PCP-free systems (pH 4.0 and 6.8) were stored at different temperatures (25, 40, 50, 58, 66, 74 °C) and relative humidities (11, 30 %) for 178 days. To determine the influence of the buffer salts or the pH PCP-free systems with pH values between 3.0 and 10.0 were prepared and stored for 293 days at 66 °C and 30 % r.h. The rate constants for octreotide decomposition were calculated and a log k / pH profile was constructed.

With increasing storage temperature the rate of peptide decomposition increased. Also higher relative humidities accelerated the decomposition. The development of degradation products was dependent on storage conditions, storage time, pH value and presence or absence of PCP. In the samples with citrate buffer more degradation products were detected than in samples with phosphate buffer. In phosphate buffer the samples with PCP developed less degradation products than those without PCP. This may be attributed to the stabilizing polyanionic character of PCP.

The octreotide content was determined during storage time by HPLC, and first order rate constants of octreotide decomposition could be calculated by non-linear regression. By means of the Arrhenius equation the rate constant for room temperature was extrapolated and the shelf lives for Oc 4.0, Oc 6.8 and Oc PCP 4.0 were estimated (calculated shelf life > 4 years).

The log k / pH-profile showed the lowest stability of the peptide at pH 4.0. The stability increased with increasing distance from this pH. To check whether this effect was related to the buffer salts, additional samples prepared with a different buffer pH 4.0 (NaOH-phthalate-buffer) were examined. No significant difference in the rate

constant of octreotide decomposition was detected. The stability in this buffer, too, was lower than in the other buffers.

The influence of storage temperature, relative humidity, pH and polymer was calculated by analysis of variance. When varying temperature and relative humidity the temperature had highest influence on the rate constant of peptide decomposition. The influence of the polymer was low.

These investigations show that the preparation of peptides in solid dispersions with sufficient stability is possible. However, these systems have to be characterized and optimized more thoroughly.

It is not yet clear, how and where the drug is located in the polymer. In solid dispersions the peptide should be molecularly or colloiddally dispersed, however, further examinations are necessary.

Since the decomposition of the peptide is influenced both by the pH-value and by the buffer salt, these factors should be taken into consideration.

For the further physico-chemical characterization investigations concerning water binding in the samples especially at different pH-values may be of interest. The influence of water content, peptide and degradation products has to be examined.

Furthermore it has to be investigated whether the peptides are absorbed from these solid dispersions, for example by means of Caco-2-cells.

6 Anhang

**Tabelle 43: Zersetzung des Octreotids in Lyophilisaten mit Citratpuffer
(Oc 4,0); $\bar{x} \pm s$, n = 2**

	Klima								
r. F. [%]	11			30					
T [°C]	58	66	74	25	40	50	58	66	74
Zeit [Tage]	Octreotid-Restgehalt [%]								
3	–	–	–	–	–	–	–	–	61,9 ± 2,9
7	–	–	–	–	94,5 ± 1,3	92,1 ± 2,3	80,9 ± 3,5	65,4 ± 0,7	33,8 ± 2,6
10	–	–	–	–	–	–	–	–	20,6 ± 0,3
14	–	–	–	–	88,1 ± 3,1	89,3 ± 4,0	73,2 ± 0,7	50,8 ± 1,1	16,1 ± 1,0
17	–	–	–	–	–	–	–	–	13,9 ± 0,4
21	–	–	–	–	–	–	–	37,7 ± 2,6	10,7 ± 0,2
28	–	–	–	–	93,7 ± 2,8	82,0 ± 0,9	61,5 ± 0,8	32,5 ± 0,7	7,7 ± 0,1
42	71,1 ± 1,8	48,3 ± 0,2	15,8 ± 0,6	95,8 ± 0,6	–	–	–	–	4,5 ± 0,2
56	–	–	–	–	87,7 ± 0,8	73,0 ± 1,8	45,4 ± 0,9	17,9 ± 0,3	2,6 ± 0,1
84	61,4 ± 1,0	36,1 ± 0,7	9,0 ± 0,6	88,4 ± 0,7	83,9 ± 0,8	67,2 ± 0,7	38,3 ± 1,1	11,9 ± 0,2	1,8 ± 0,1
110	–	–	–	–	80,6 ± 1,1	62,7 ± 0,4	29,6 ± 1,2	8,4 ± 0,9	1,8 ± 0,2
126	53,9 ± 0,7	26,4 ± 0,2	6,5 ± 0,3	93,0 ± 1,3	–	–	–	–	–
140	–	–	–	–	79,9 ± 0,1	58,1 ± 0,5	24,7 ± 0,5	6,1 ± 0,7	1,0 ± 0,3
178	52,8 ± 1,2	25,6 ± 0,9	5,1 ± 0,1	101,5 ± 1,0	88,6 ± 0,9	59,7 ± 0,6	22,4 ± 2,2	4,0 ± 0,4	0,6 ± 0,2

Tabelle 44: Zersetzung des Octreotids in Lyophilisaten mit Phosphatpuffer (Oc 6,8); $\bar{x} \pm s$, n = 2

	Klima								
r. F. [%]	11			30					
T [°C]	58	66	74	25	40	50	58	66	74
Zeit [Tage]	Octreotid-Restgehalt [%]								
3	–	–	–	–	–	–	–	–	85,4 ± 3,0
7	–	–	–	–	95,2 ± 1,0	93,3 ± 0,7	90,7 ± 0,6	85,5 ± 0,8	71,0 ± 2,0
10	–	–	–	–	–	–	–	–	67,7 ± 1,6
14	–	–	–	–	91,1 ± 1,1	90,5 ± 2,4	88,4 ± 1,0	77,7 ± 1,5	63,0 ± 1,5
17	–	–	–	–	–	–	–	–	53,9 ± 2,5
21	–	–	–	–	–	–	–	71,8 ± 3,9	48,0 ± 3,1
28	–	–	–	–	96,7 ± 3,8	89,4 ± 0,8	80,6 ± 6,3	71,5 ± 1,4	46,5 ± 6,2
42	90,0 ± 0,2	85,2 ± 0,3	72,0 ± 1,6	95,7 ± 0,4	–	–	–	–	39,1 ± 0,3
56	–	–	–	–	90,4 ± 0,5	83,8 ± 0,4	77,8 ± 1,3	59,3 ± 5,8	36,9 ± 2,2
84	82,6 ± 3,8	77,3 ± 1,3	59,5 ± 1,3	86,7 ± 2,6	87,1 ± 0,4	81,0 ± 1,6	71,7 ± 3,0	50,4 ± 5,5	24,8 ± 0,5
110	–	–	–	–	83,4 ± 0,8	78,6 ± 1,5	66,7 ± 1,9	44,0 ± 1,1	22,6 ± 3,4
126	86,4 ± 0,6	75,8 ± 0,9	47,3 ± 0,4	91,3 ± 2,4	–	–	–	–	–
140	–	–	–	–	84,7 ± 0,4	80,0 ± 1,5	66,7 ± 0,6	38,8 ± 1,4	17,4 ± 6,2
178	91,1 ± 0,9	77,4 ± 0,5	49,3 ± 0,4	100,3 ± 0,6	95,4 ± 1,0	86,8 ± 2,1	54,2 ± 16,6	37,2 ± 2,3	10,3 ± 1,9

Tabelle 45: Zersetzung des Octreotids in Festen Dispersionen mit Citratpuffer (Oc PCP 4,0); $\bar{x} \pm s$, n = 2

	Klima								
r. F. [%]	11			30					
T [°C]	58	66	74	25	40	50	58	66	74
Zeit [Tage]	Octreotid-Restgehalt [%]								
3	–	–	–	–	–	–	–	–	54,0 ± 2,5
7	–	–	–	–	92,1 ± 1,4	93,0 ± 3,7	79,7 ± 1,1	57,9 ± 2,6	28,6 ± 0,4
10	–	–	–	–	–	–	–	–	22,7 ± 0,8
14	–	–	–	–	93,9 ± 1,3	89,7 ± 2,3	70,8 ± 1,3	45,5 ± 1,0	13,5 ± 0,4
17	–	–	–	–	–	–	–	–	11,7 ± 0,3
21	–	–	–	–	–	–	–	32,5 ± 0,9	4,6 ± 0,2
28	–	–	–	–	97,7 ± 0,7	84,9 ± 0,5	56,3 ± 2,2	27,9 ± 0,3	4,7 ± 0,7
42	89,9 ± 1,4	75,8 ± 2,6	36,3 ± 1,8	99,6 ± 0,6	–	–	–	–	3,1 ± 0,3
56	–	–	–	–	88,8 ± 0,5	72,2 ± 1,5	38,8 ± 0,7	11,0 ± 1,3	0,5 ± 0,1
84	85,2 ± 1,4	64,4 ± 2,4	19,7 ± 0,4	96,1 ± 1,9	88,4 ± 0,5	63,1 ± 1,3	28,4 ± 0,8	6,1 ± 0,8	0,8 ± 0,2
110	–	–	–	–	85,0 ± 1,6	55,5 ± 1,1	21,1 ± 0,7	2,7 ± 0,4	
126	82,0 ± 1,1	57,3 ± 1,1	12,3 ± 0,5	95,3 ± 0,8	–	–	–	–	–
140	–	–	–	–	82,6 ± 2,3	52,7 ± 1,2	14,9 ± 1,4	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,4
178	89,0 ± 0,9	57,9 ± 1,5	8,4 ± 1,2	105,1 ± 1,3	90,6 ± 0,9	50,8 ± 1,6	13,8 ± 3,2	1,1 ± 0,2	

Tabelle 46: Zersetzung des Octreotids in Festen Dispersionen mit Phosphatpuffer (Oc PCP 6,8); $\bar{x} \pm s$, n = 2

	Klima								
r. F. [%]	11			30					
T [°C]	58	66	74	25	40	50	58	66	74
Zeit [Tage]	Octreotid-Restgehalt [%]								
3	–	–	–	–	–	–	–	–	87,4 ± 2,0
7	–	–	–	–	95,7 ± 0,7	93,3 ± 3,2	95,9 ± 3,0	93,8 ± 0,5	83,7 ± 5,4
10	–	–	–	–	–	–	–	–	92,5 ± 2,6
14	–	–	–	–	100,4 ± 1,1	99,4 ± 1,5	101,0 ± 1,2	91,2 ± 5,6	87,2 ± 3,2
17	–	–	–	–	–	–	–	–	80,1 ± 3,1
21	–	–	–	–	–	–	–	92,5 ± 1,7	77,6 ± 1,8
28	–	–	–	–	91,9 ± 14,7	96,9 ± 7,1	101,2 ± 5,1	91,4 ± 1,1	76,9 ± 0,6
42	98,0 ± 3,0	97,6 ± 1,5	91,6 ± 1,3	100,2 ± 5,1	–	–	–	–	57,8 ± 5,8
56	–	–	–	–	86,1 ± 12,6	97,1 ± 3,5	68,9 ± 3,8	82,5 ± 0,9	55,6 ± 0,7
84	102,0 ± 1,4	98,2 ± 2,1	86,1 ± 1,6	91,7 ± 1,2	84,6 ± 6,6	80,3 ± 11,5	85,8 ± 4,6	76,1 ± 3,7	51,1 ± 2,4
110	–	–	–	–	80,5 ± 9,2	73,6 ± 15,9	78,0 ± 5,9	–	41,3 ± 0,2
126	101,5 ± 0,9	96,2 ± 2,4	77,9 ± 0,9	69,5 ± 21,1	–	–	–	–	–
140	–	–	–	–	76,4 ± 29,8	50,2 ± 13,4	78,0 ± 3,5	63,9 ± 0,8	31,3 ± 1,1
178	101,7 6,3	102,6 ± 1,9	87,3 ± 3,2	114,4 ± 1,7	108,7 ± 1,3	101,8 ± 1,4	77,2 ± 4,3	62,0 ± 6,6	29,6 ± 5,5

Tabelle 47: Zersetzung des Octreotids in Lyophilisaten mit verschiedenen Lösungsmitteln (log k / pH-Profil); $\bar{x} \pm s$, n = 2

pH	3,0	4,0a	4,0b	5,5	10,0	Wasser
Zeit [Tage]	Octreotid-Restgehalt [%]					
10	90,1 ± 1,6	42,4 ± 15,0	63,8 ± 1,0	79,9 ± 1,1	88,6 ± 1,4	30,8 ± 0,2
20	80,3 ± 4,1	40,6 ± 4,0	43,3 ± 0,7	69,5 ± 0,4	79,8 ± 0,4	18,1 ± 5,1
40	67,9 ± 6,0	34,8 ± 6,4	26,6 ± 1,0	56,0 ± 0,4	74,9 ± 2,3	8,7 ± 0,3
60	69,4 ± 7,8	28,5 ± 8,2	26,3 ± 3,6	53,2 ± 0,5	79,1 ± 0,5	6,0 ± 1,5
293	18,4 ± 1,7	12,9 ± 0,2	2,2 ± 0,7	27,2 ± 0,8	47,2 ± 3,1	7,5 ± 0,4

7 Literaturverzeichnis

- [1] Barnickel, H.
Formulierung, Abfüllung und Lyophilisierung von Protein-Wirkstoffen
Pharm. Ind. 52 (7), 912 – 915 (1990)
- [2] Bauer, W., Briner, U., Doepfner, W., Haller, R., Huguenin, R., Marbach, P.,
Petcher, T. J., Pless, J.
SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of
somatostatin with prolonged action
Life Sci, 31, 1130 – 1140 (1982)
- [3] Bernkop-Schnürch, A.
Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide
delivery systems
Int. J. Pharm. 194, 1 – 13 (2000)
- [4] Beyer, H., Walter, W.
Lehrbuch der Organischen Chemie
22. Auflage, S. Hirzel Verlag Stuttgart 1991, S. 350
- [5] Borchard, G., Lueßen, H. L., de Boer, A. G., Verhoef, J. C., Lehr, C.-M.
Lehr, Junginger, H. E.
Effects of chitosan-glutamate and carbomer on epithelial tight junction *in
vitro*
J. Controlled Rel. 29, 329 – 338 (1994) und 39, 131 – 138 (1996)
- [6] Breitenbach, J.
Feste Lösungen durch Schmelzextrusion – ein integriertes
Herstellungskonzept
Pharmazie in unserer Zeit, 29, 46 – 49 (2000)
- [7] Bühl, A., Zöfel, P.
SPSS Version 8.0
5. Auflage, Addison-Welsley Longman Verlag, Bonn (1999)
- [8] Bulletin 1, Polymers for Pharmaceutical Applications
BFGoodrich, S. 2 (1997)
- [9] Bulletin 3, Nomenclature and Chemistry
BFGoodrich, S. 4 (1997)
- [10] Bulletin 9, Dispersion Procedures
BFGoodrich, S. 3 (1997)

-
- [11] Ch'ng, H. S., Park, H., Kelly, P., Robinson, J. R.
Bioadhesive Polymers as Platform for Oral Controlled Drug Delivery II:
Synthesis and Evaluation of Some Swelling, Water-Insoluble Bioadhesive
Polymers
J. Pharm. Sci. 74(4), 399 – 405 (1985)
- [12] Chiou, W. L., Riegelman, S.
Pharmaceutical Applications of Solid Dispersion Systems
J. Pharm. Sci. 60, 1281 – 1302 (1971)
- [13] Damge, C., Vonderscher, J., Marbach, P., Pinget, M.
Poly(alkyl cyanoacrylate) nanocapsules as a delivery system in the rat for
octreotide, a long-acting somatostatin analogue
J. Pharm. Pharmacol. 49 (10), 949 – 954 (1997)
- [14] Damge, C., Vranckx, H., Balschmidt, P., Couvreur, P.
Poly(alkyl cyanoacrylate) nanospheres for oral administration of insulin
J. Pharm. Sci. 86 (12), 1403 – 1409 (1997)
- [15] Deutsches Arzneibuch 1997
Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart
- [16] Drewe, J., Fricker, G., Vonderscher, J., Beglinger, C.
Enteral absorption of octreotide: Absorption enhancement by
polyoxyethylene-24-cholesterol ether
Br. J. Pharmacol. 108, 298 – 303 (1993)
- [17] Duncan, M. R., Lee, J. M., Warchol, M. P.
Influence of surfactants upon protein / peptide adsorption to glass and
polypropylene
Int. J. Pharm. 120, 179 – 188 (1995)
- [18] Eouani, C., Piccerelle, Ph., Prinderre, P., Bourret, E., Joachim, J.
In-vitro comparative study of buccal mucoadhesive performance of
different polymeric films
Eur. J. Pharm. Biopharm. 52, 45 – 55 (2001)
- [19] Ford, J. L.
The current status of Solid Dispersions
Pharm. Acta Helv. 61(3), 69 – 88 (1986)
- [20] Forster, A., Rades, T., Hempenstall, J.
Selection of Suitable Drug and Excipient Candidates to Prepare Glass
Solutions by Melt Extrusion for Immediate Release Oral Formulations
Pharm. Technol. Eur. 10, 27 – 37 (2002)
- [21] Fricker, G., Fahr, A., Beglinger, C., Kissel, T., Reiter, G., Drewe, J.
Permeation enhancement of octreotide by specific bile salts in rats and
human subjects: *in vitro*, *in vivo* correlations
Br. J. Pharmacol. 117(1), 213 – 23 (1996)

- [22] Frontini, R.
Validierung der HPLC-Analytik, unveröffentlichtes Skript (1991)
- [23] Grimm, W.
Storage conditions for the most important market for drug products,
including the EC, Japan, and the USA
APV-Kurs Nr. 182 (18.10. – 20.10.1995): Stabilitätsprüfung
pharmazeutischer Zubereitungen
- [24] Haack, D.
Physikalische und chemische Veränderungen in Festen Dispersionen:
Einfluss von hydrophilen Polymeren auf die Stabilität von Piroxicam
Dissertation, Universität Hamburg (2001)
- [25] Haeberlin, B., Gengenbacher, T., Meinzer, A., Fricker, G.
Cyclodextrins – useful excipients for oral peptide administration?
Int. J. Pharm. 137, 103 – 110 (1996)
unveröffentlichter Zusatz von G. Fricker
- [26] Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Bd. 1, S. 358 f
Springer Verlag (1967)
- [27] Haynes, J. D.
Worldwide virtual temperatures for product stability testing
J. Pharm. Sci. 60, 927 (1971)
- [28] ICH Harmonised Tripartite Guideline
Validation of Analytical Procedures: Methodology
ICH Steering Committee (1996)
- [29] ICH Harmonised Tripartite Guideline
Stability Testing of New Drug Substances and Products
ICH Steering Committee (1993)
- [30] Jans, H.
Physikalisch-chemische Veränderungen in Systemen aus Reserpin und
PVP und deren Einfluss auf die Stabilität des Arzneistoffes
Dissertation, Universität Hamburg (1993)
- [31] Johansen, P., Corradin, G., Merkle, H. P., Gander, B.
Release of tetanus toxoid from adjuvants and PLGA microspheres: How
experimental set-up and surface adsorption fool the pattern
J. Control. Rel. 56, 209 – 217 (1998)
- [32] Johansen, P., Merkle, H.-P., Gander, B.
Adsorption of tetanus toxoid on PLGA microspheres and borosilicate glass
Proc. 2nd World Meeting APGI / APV, Paris, 25 / 28 May 1998

-
- [33] Junginger, H. E., Thanou, M., Lueßen, H. L., Kotzé, A. F., Verhoef, J. C.
Safe Mucosal Penetration Enhancers: A Fiction? Polymers as Absorption
Enhancers for Transmucosal Drug Delivery
In: Controlled Drug Delivery: Designing Technologies for the Future, ACS
Symposium Series 752, Washington
- [34] Juppo, A. M., Boissier, C., Khoo, C.
Evaluation of Solid dispersion particles prepared with SEDS
Int. J. Pharm. 250, 385 – 401 (2003)
- [35] Kerec, M., Bogataj, M., Mugerle, B., Gasperlin, M., Mrhar, A.
Mucoadhesion on pig vesical mucosa: influence of polycarbophil / calcium
interactions
Int. J. Pharm. 241, 135 – 143 (2002)
- [36] Kerec, M., Sveglij, V., Bogataj, M., Mrhar, A.
The enhancement of pipemidic acid permeation into the pig urinary
bladder wall
Int. J. Pharm. 240, 33 – 36 (2002)
- [37] Kosen, P. A.
Disulfide Bonds in Proteins
in: Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A Chemical and Physical
Pathways of Protein Degradation, Ahern, T. J., Manning, M. C. (Edit.),
Plenum Press New York and London, 1992
- [38] Kotzé, A. F., de Leeuw, B. J., Lueßen, H. L., de Boer, A. G., Verhoef, J.
C., Junginger, H. E.
Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal
epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers
Int. J. Pharm. 159, 243 – 253 (1997)
- [39] Kriwet, B.
Mikro- und Nanopartikel aus Polyacrylsäure als bioadhäsive
Arzneistoffträger
Dissertation, Marburg / Lahn (1994)
- [40] Kromidas, S.,
Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim, 1999, S. 42
- [41] Kuhn, R., Morin, C., Erni, F.
A Simple Model Describing the Retention Behavior of Octreotide and its
Glycosylated Derivatives in Reversed Phase HPLC
Chromatographia, 41 (9/10), 516 – 520 (1995)
- [42] Kuhnert-Brandstätter, M.
International Series of Monographs
in Analytical Chemistry, Vol. 45
Thermomicroscopy in the Analysis of Pharmaceuticals
Pergamon Press, 1971

- [43] Law, S. L., Shih, C. L.
Adsorption of Calcitonin to Glass
Drug dev. Ind. Pharm. 25 (2), 253 – 256 (1999)
- [44] Lou Stilles, M., Allen jr., L. V., Restak, K. E., Prince, S. J.
Stability of octreotide acetate in polypropylene syringes
Am. J. Hosp. Pharm. 50, 2356 – 2358 (1993)
- [45] Lüdemann, J.
Physikalische und chemische Stabilität von Festphasensystemen unter Belastung am Beispiel Phenprocoumon / hochdisperse Kieselsäure / wasserfreie α -Lactose
Dissertation Universität Hamburg (1990)
- [46] Lueßen, H. L., Lehr, C.-M., Rentel, C.-O., Noach, A. B. J., de Boer, A. G., Verhoef, J. C., Junginger, H. E.
Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs
J. Controlled Rel. 29, 329 – 338 (1994)
- [47] Lueßen, H., de Leeuw, B. J., Pérard, D., Lehr, C.-M., de Boer, A. G., Verhoef, J. C., Junginger, H. E.
Influence of mucoadhesive excipients on the proteolytic activity of intestinal enzymes
Eur. J. Pharm. Sci. 4, 117 – 128 (1996)
- [48] Mager, H.
Moderne Regressionsanalyse
1. Auflage, Sauer + Sauerländer Verlag, Frankfurt / M. – Aarau (1982)
- [49] Mielck, J. B.
Möglichkeiten und Grenzen der beschleunigten Untersuchung zur Vorhersage der Haltbarkeit
Acta Pharm. Technol. 21 (1), 43 – 71 (1975)
- [50] Montag, A.
Beitrag zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze analytischer Meßverfahren
Fresenius Z. Ana. Chem. 312, 96 – 100 (1982)
- [51] NBS Washington
Feuchtwerte im vergrößerten Temperaturbereich
Information Fa. Schulz Electronic, D-Höhenkirchen
- [52] Nyqvist, H.
Saturated Salt Solutions for Maintaining Specified Relative Humidities
Int. J. Pharm. Tech. & Prod. Mfr., 4 (2), 47 – 48 (1983)

-
- [53] Oberdisse, E., Hackenthal, E., Kuschinsky, K. (Hrsg.)
Pharmakologie und Toxikologie
2. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, S. 459, 240
(1999)
- [54] Ohm, U.
Hydrolyse von Wirkstoffen in festen Arzneiformen – Ermittlung des
verfügbaren Wassers in Hilfsstoffen und anderer Einflussgrößen
Dissertation Universität Hamburg (1980)
- [55] Oksanen, C., Zografi, G.
The relationship between the glass transition temperature and water vapor
absorption by polyvinylpyrrolidone
Pharm. Research 7, 654 – 657 (1990)
- [56] Perissutti, B., Newton, J. M., Podczek, F., Rubessa, F.
Preparation of extruded carbamazepine and PEG 4000 as a potential
rapid release dosage form
Eur. J. Pharm. Biopharm. 53, 125 – 132 (2002)
- [57] Podczek, F.
Mehrdimensionale Statistische Methoden
Seminarunterlagen (Universität Hamburg, 1997)
- [58] Pourrat, H., Barthomeuf, C., Pourrat, A., Cottier, P.-E., Ibrahim, H.
Stabilization of Octastatin[®], a Somatostatin Analogue. Preparation of
Freeze-Dried Products for Parenteral Injection
Biol. Pharm. Bull. 18 (5), 766 – 771 (1995)
- [59] Produktinformation Sandostatin, Novartis, S. 20 (1998)
- [60] Qualitätssicherung synthetischer Peptidwirkstoffe
Empfehlungen der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG)
Pharm. Ind. 61 (11), 1064 – 1072 (1999)
- [61] Retzlaff, G., Rust, G., Waibel, J.
Statistische Versuchsplanung
2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim (1978)
- [62] Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G.
Instrumentelle pharmazeutische Analytik
2., überarbeitete und erweiterte Auflage
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1992, S. 68
- [63] Sachs, L.
Angewandte Statistik
6. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg – New York (1984)
- [64] Sandostatin[®] Octreotid Sandostatin[®] Octreotid/I.M. Injektion LAR
Monatsdepot
Standardinformation für Klinikapotheken, Fa. Novartis

- [65] Schepky, G.,
Ein Hygrostat mit einfacher und störungsarmer Probenauswaage
Acta Pharm. Technol. 28 (1), 87 – 88 (1982)
- [66] Schicksnus, T., Müller-Goymann, C., C.
The Influence of hydrotropic substances on the UV-detection of 17 β -
estradiol
Proc. 4th World Meeting ADRITELF / APV / APGI, Florence, 8/11 April
2002
- [67] Schömer, S.
Die gewichtete Regression zur Validierung
GITLabor-Fachzeitschrift 9, 1043 – 1046 (2000)
- [68] Schrattenholz, A., Auchter-Krummel, P., Walther, M., Spallek, M.
Reduced protein absorption by glass container surface modification
Proc. 2nd World Meeting APGI / APV, Paris, 25 / 28 May 1998
- [69] Schubnell, M., Schawe, J. E. K.
Quantitative determination of the specific heat and the glass transition of
moist samples by temperature modulated differential scanning calorimetry
Int. J. Pharm. 217, 173 – 181 (2001)
- [70] Schumacher, K., Winter, G., Mahler, H.-C.
Instabilitäten von Proteinarzneimitteln
PZ Prisma 10 (1), 15 – 18 (2003)
- [71] Schwetlick, K.
Kinetische Methoden zur Untersuchung von Reaktionsmechanismen
VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften (1971)
- [72] Sekiguchi, K., Obi, N.
Technique of solid dispersions
Chem. Pharm. Bull., 9, 866 (1961)
- [73] Simat, T., van Wickern, B., Eulitz, K., Steinhart, H.
Contaminants in biotechnologically manufactured L-tryptophan
J. Chromatogr. B 685, 41 – 51 (1996)
- [74] Singla, A. K., Chawla, M., Singh, A.
Potential Applications of Carbomer in Oral Mucoadhesive Controlled Drug
Delivery System: A Review
Drug Dev. Ind Pharm. 26 (9), 913 – 924 (2000)
- [75] Stahl, P. H.
Feuchtigkeit und Trocknen in der pharmazeutischen Technologie
Dr. Steinkopf-Verlag, D-Darmstadt, S. 183 (1980)

-
- [76] Stevenson, C. L., Leonard, J. J., Hall, S. C.
Effect of peptide concentration and temperature on leuprolide stability in dimethyl sulfoxide
Int. J. Pharm. 191, 115 – 129 (1999)
- [77] Thanou, M., Florea, B. I., Langemeyer, M. W. E., Verhoef, J. C., Junginger, H. E.
N-Trimethylated Chitosan Chloride (TMC) Improves the Intestinal Permeation of the Peptide Drug Buserelin In Vitro (Caco-2 Cells) and in Vivo (Rats)
Pharm. Res. 17 (1), 27 – 31 (2000)
- [78] Thanou, M., Verhoef, J. C., Florea, B. I., Junginger, H. E.
Chitosan derivatives as intestinal penetration enhancers of the peptide drug buserelin *in vitro* and *in vivo*
Advan. Chitin Sci. 4, 244 – 249 (2000)
- [79] Thanou, M., Verhoef, J. C., Marbach, P., Junginger, H. E.
Intestinal Absorption of Octreotide: N-Trimethyl Chitosan Chloride (TMC) Ameliorates the Permeability Properties of the Somatostatin Analogue *In Vitro* and *In Vivo*
J. Pharm. Sci. 89 (7), 951 – 957 (2000)
- [80] United States Pharmacopeia XXIII, 1995
United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, USA
- [81] Uraizee, S. A., McPhillips, A. M., Sakr, A. A., Ritschel, W. A.
Evaluation of Absorption Enhancers and Enzyme Inhibitors for the Protection of Human Insulin
A screening study
Pharm. Ind. 61, 259 – 262 (1999)
- [82] Voß, W.
Praktische Statistik mit SPSS
Carl Hanser Verlag München Wien (1997)
- [83] Wang, W.
Lyophilisation and development of solid protein pharmaceuticals
Int. J. Pharm. 203, 1 – 60 (2000)
- [84] Wang, W.
Instability, stabilization and formulation of liquid protein pharmaceuticals
Int. J. Pharm. 185, 129 – 188 (1999)
- [85] Wenig, N., Hall, T. D. J.
Systematic Troubleshooting for LC/MS/MS
Pharmaceutical Technology, March, 103 – 120 (2002)

- [86] Wratschko, S. C.
Feste Dispersion eines Peptids (Desmopressin) mit einem multifunktionellen Polymer (Polycarbophil): Untersuchungen zur Herstellung und Stabilität
Dissertation, Hamburg (1999)
- [87] Wratschko, S. C., Mielck, J. B.
Sorption of a small peptide (Desmopressin) to surfaces of glass and polypropylene
Proc. 2nd World Meeting APGI / APV, Paris, 25 / 28 May 1998
- [88] Wu, S.-L., Leung, DM., Tretyakow, L., Hu, J., Guzzetta, A., Wang, Y. J.
The formation and mechanism of multimerization in a freeze-dried peptide
Int. J. Pharm. 200, 1 – 16 (2000)
- [89] Yun, M.-O., Choi, H.G., Jung, J.-H, Kim, C.-K.
Development of a thermo-reversible insulin liquid suppository with bioavailability enhancement
Int. J. Pharm. 189, 137 – 145 (1999)
- [90] Zeng, X. M., Martin, G. P., Marriott, C.
Effects of molecular weight of polyvinylpyrrolidone on the glass transition and crystallization of co-lyophilized sucrose
Int. J. Pharm. 218, 63 – 73 (2001)

8 Geräteliste

Datenerfassung

1. Datenerfassung: Linseis LSB36-III
Firma Linseis GmbH, D-Selb

DSC und Zubehör

2. Mettler Toledo Star System, DSC 821e / 700 mit TSO 801 RO Sample robot
Firma Mettler-Toledo GmbH, D-Gießen
3. Tiegel: Aluminium Standard, 40 µl, mit Zentrierzapfen, ME 27331
Firma Mettler-Toledo GmbH, D-Gießen
4. Differential Scanning Calorimeter DSC 7
Firma Perkin Elmer, D-Überlingen
5. Thermal Analysis Controller TAC 7 / DX
Firma Perkin Elmer, D-Überlingen
6. DSC Aluminium-Tiegel, KIT No. 0219-0041
Firma Perkin Elmer, D-Überlingen
7. Verschlusspresse für Standardpfännchen
Firma Perkin Elmer, D-Überlingen
8. Lauda Ölbad RM 6, Thermostat Lauda T Typ RM 6 T
Firma Lauda, Dr. R. Wobser KG, D-Lauda-Königshofen

Gefriertrocknung

9. Gefriertrocknungsanlage E1 PTC Edwards
Firma Edwards Hochvakuum GmbH, D-Marburg

HPLC [Software <S3>]

10. Phenomenex[®] Prodigy ODS (3), RP 185 µm, 100 Å, 250 x 4,6 mm
Firma Phenomenex, USA-Torrence, California
11. Phenomenex[®] Prodigy ODS (3), RP 18, 5 µm, 100 Å, 30 x 4,6 mm
Firma Phenomenex, USA-Torrence, California
12. Phenomenex[®] Aqua, 5µ, C18, 125 Å, 250 x 4,6 mm
Firma Phenomenex, USA-Torrence, California

13. Phenomenex[®] C18 (ODS, Octadecyl), 4 mm L x 3,0 mm ID, Security Guard
Firma Phenomenex, USA-Torrence, California
14. Pumpe P1000 (P100)
Firma TSP, D-Darmstadt
15. Degasser X-Act Channel
Firma Jour Research, S-Onsala
16. Autosampler HPLC 360
Firma Kontron, D-Neufahrn
17. Autosampler Marathon
Firma Spark Holland, NL-Emmen
18. Detektor BT 8200, HPLC UV / Vis-Detektor
Firma Biotronik GmbH, D-Maintal
19. Detektor Knauer Spektralphotometer Nr. A 0293, Variable Wavelength Monitor
Dr. Herbert Knauer Wissenschaftliche Geräte KG, D-Bad Homburg
20. Vorsäulenfilter A 103x, stainless steel mit PEEK, 0,5 µm mittlerer
Porendurchmesser
Firma Upchurch, USA-Oak Harbor
21. Braunglasvial 1 ml, N 11-1
Firma Macherey & Nagel, D-Düren
22. A/D-Wandlerkarte, zwei Aufnahmekanäle
Firma SCPA, D-Stuhr

HPLC-MS [Series 1100, Hewlett Packard, Software <S4>]

23. Pumpe G 1312 A
Firma Hewlett Packard, D-Waldbronn
24. Degasser: G 1322 A
Firma Hewlett Packard, D-Waldbronn
25. Autosampler G 1313 A
Firma Hewlett Packard, D-Waldbronn
26. HP MSD G 1946 A / A für Elektrospray- und chem. Ionisation
Firma Hewlett Packard, D-Waldbronn
27. UV-VIS-Detektor G 1314 A
Firma Hewlett Packard, D-Waldbronn

28. Fluoreszenzdetektor G 1321 A

Firma Hewlett Packard, D-Waldbronn

29. Diodenarray-Detektor G 1315 B

Firma Hewlett Packard, D-Waldbronn

Mikroskope und Zubehör

30. Mikroskop Orthoplan (Vergrößerungen 40x, 100x, 400x)

Firma Leitz, D-Wetzlar

31. 3-CCD Color Camera HV-C20

Hitachi Denshi Ltd., J-Tokyo

32. Heiztisch FP 52

Firma Mettler, D-Gießen

33. Rasterelektronenmikroskop Typ Cam Scan DV 4

Firma Cambridge Scanning Company, GB-Cambridge

Partikelgrößenanalyse

34. Sympatec Laserdiffraktometrie (Helos / Rodos)

Firma Sympatec GmbH, D-Clausthal-Zellerfeld

pH-Meter und Zubehör

35. pH-Meter E 512 mit Komb. Mikroglaselektrode 6.0204.100

Firma Metrohm, CH-Herisau

36. pH-Meter MP 225

Firma Mettler Toledo, D-Gießen

37. pH-Einstabmesskette InLab 410

Firma Mettler Toledo, D-Gießen

Pipetten

38. Eppendorf Reference variabel 100 – 1000 µl

Firma Eppendorf, D-Hamburg

39. Einweg-Pasteurpipetten 1 ml, Art. Nr. 4895.1

Firma Carl Roth GmbH & Co KG, D-Karlsruhe

Rühren / Dispergieren / Schütteln

40. Ultra-Turrax[®] TP 18 / 10
Firma Janke & Kunkel, D-Stauffen
41. Dipergierwerkzeug S 25 N – 10 G
IKA-Werke, D-Stauffen
42. Laborrührer Type RZR
Firma Heikolph Elektro KG, D-Kelheim
43. Schüttler KS.B
Firma E. Bühler, D-Tübingen

Temperatur- / Feuchtemessung

44. Anschützthermometer (0 – 50 °C bzw. 50 – 100 °C, Teilung 0,1 °C)
Firma Brand, D-Wertheim
45. Feuchte- und Temperaturfühler Humidat IC II, mit Messkopf en BS-4/IC
Firma Novasina, CH-Zürich

Ultraschallbad

46. Ultraschallbad Sonorex Super RK 1028 BH
Firma Bandelin, D-Berlin

Vikosimeter und Zubehör

47. Kapillarviskosimeter Type Nr. 50120, Ubbelohde, KPG-Präzision, $k = 0,0155$
Schott Geräte GmbH, D-Hofheim am Taunus
48. Lauda Thermostat, Type NBD 8 / 17, Nr. 26021
Meßgerätewerk Lauda, Dr. R. Wobser KG, D-Lauda Königshofen
49. Viscoboy, Typ VB, Nr. AO 5001
Meßgerätewerk Lauda, Dr. R. Wobser KG, D-Lauda Königshofen
50. Relais Box R 10 Electronic, Type R / 2, Nr. 28754
Meßgerätewerk Lauda, Dr. R. Wobser KG, D-Lauda Königshofen

Waagen

51. Analysenwaage 1615 MP
Firma Sartorius, D-Göttingen
52. Analysenwaage 1712 MP 8
Firma Sartorius, D-Göttingen
53. Analysenwaage 2474
Firma Sartorius, D-Göttingen
54. Analysenwaage Micro M 500 P
Firma Sartorius, D-Göttingen
55. Analysenwaage AE 166
Firma Mettler Toledo, D-Gießen

Wärmeschränke

56. Wärmeschränke B 5050 E, 40 °C, 35 °C, 50 °C, 58 °C, 66 °C
Firma Heraeus, D-Hanau
57. Wärmeschrank Typ 2105, 25 °C
Firma Köttermann, D-Hänigsen / Hannover
58. Wärmeschrank T 6060, 74 °C
Firma Kendro Laboratory Products GmbH, D-Hanau

Wassergehaltsbestimmung

59. Titroline KF
Firma Schott Geräte GmbH, D-Hofheim am Taunus
60. Thermowaage TG 760
Firma Stanton Redcroft Lim., GB-London
61. Aluminium-Tiegel, Art. Nr. 7668
Firma Stanton Redcroft Lim., GB-London

Zentrifuge

62. Zentrifuge Medifuge
Firma Heraeus-Christ , D-Osterode

9 Software

- S1 SPSS Version 10.0
SPSS Inc., GB-Woking
- S2 TOCCATA Version 9/91, Dr. R. Frontini
Statistikprogramm zur Auswertung der Linearen Regression
- S3 Chromatographie-Software ChromStar 4.06
SCPA, D-Stuhr
- S4 HP Chem Station for GC, LC, AID and LC-MS Version A.06.01
Hewlett Packard GmbH, D-Waldbronn
- S5 Konvert 4.0 Linseis Software
Linseis GmbH, D-Selb
- S6 Pyris Series Thermal Analysis Version 4.01
Perkin Elmer, D-Überlingen
- S7 KS 400 Imaging System 3.0
Carl Zeiss Vision GmbH, D-Eching
- S8 Windox 3.2
Firma Sympatec GmbH, D-Clausthal-Zellerfeld

10 Gefahrstoffe

Tabelle 48: verwendete Gefahrstoffe

Gefahrstoff	Symbol	S-Sätze
Acetonitril	F, Xn	16-36/37
Ammoniak-Lösung 25 %	C, N	26-36/37/39-45-61
Ammoniumchlorid	Xn	22
Citronensäure-Monohydrat	Xi	26-36/37/39
Hydranal Solvent	F, T	16-26-36/37/39-45
Hydranal Titrant 2	F, T	7-16-36/37-45
Kaliumcarbonat	Xn	26-36
Lithiumchlorid	Xn	26
Magnesiumbromid-Hexahydrat	Xi	26-37/39
Magnesiumnitrat-Hexahydrat	O, Xi	17-26-36
Natriumhydroxid-Lösung 40 %	C	26-37/39-45
Natriumbromid-Dihydrat		22-24/25
Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Xi	26-36
Octreotid	Xn	22
Phosphorsäure 85 %	C	26-45
Salzsäure, 1N	Xi	26
Tetramethylammoniumhydroxid-Lösung 25 %	T	26-36/37/39-45
Trifluoressigsäure	C	26-36/37/39-45

- Abkürzungen:
- O: brandfördernde Stoffe
 - F+, F: hochentzündliche Stoffe, leichtentzündliche Stoffe
 - T+, T: sehr giftige Stoffe, giftige Stoffe
 - Xn: gesundheitsschädliche Stoffe
 - C: ätzende Stoffe
 - Xi: reizend wirkende Stoffe
 - N: umweltgefährliche Stoffe
 - E: explosionsgefährliche Stoffe (nicht verwendet)

11 Lebenslauf

Geburtsdatum: 04.12.1972

Geburtsort: Werlte

Schulausbildung

1979 – 1985 Grundschule und Orientierungsstufe Werlte

1985 – 1992 Hümmling–Gymnasium Sögel

Mai 1992 Abitur

Studium / Ausbildung

Okt. 1992 – Nov. 1996 Studium der Pharmazie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig

Apr. 1995 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Nov. 1996 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Nov. 1996 – Apr. 1997 1. Hälfte des Praktischen Jahres in der Einhorn-Apotheke, Braunschweig

Mai 1997 – Okt. 1997 2. Hälfte des Praktischen Jahres bei der Bayer AG, Leverkusen, Bereich Analytik

Dez. 1997 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung

Jan. 1998 Approbation als Apothekerin

Berufspraxis

Jan. 1998 – Apr. 1998 Anstellung bei Bayer Australia Ltd., Melbourne im Bereich Qualitätssicherung

Juni 1998 – März 1999 Apothekerin in der Hubertus-Apotheke, Sögel

März 1999 Beginn der Promotionsarbeit in der Abteilung Pharmazeutische Technologie des Institutes für Pharmazie der Universität Hamburg

April 1999 – März 2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für Pharmazie

Wissenschaftliche Veröffentlichung

April 2002

Chemical stability of octreotide lyophilized from buffered solutions and in buffered solid dispersions with polycarbophil, A. Grave, J. B. Mielck
Proc. 4th World Meeting ADRITELF / APGI / APV, Florence, 8/11 April 2002