

**Feste Dispersion eines Peptides (Desmopressin)
mit einem
multifunktionalen Polymer (Polycarbophil):
Untersuchungen zur Herstellung und Stabilität**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Susanne C. Wratschko

aus Dortmund

Hamburg 1999

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

Tag der mündlichen Prüfung: 24.09.1999

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von

Prof. Dr. J. B. Mielck

in der Zeit von März 1995 bis März 1999 in der Abteilung Pharmazeutische Technologie des Institutes für Pharmazie an der Universität Hamburg.

Meinem Doktorvater und Lehrer, Herrn Prof. Dr. J. B. Mielck, gilt mein besonderer Dank für die großzügige Überlassung von geistiger Freiheit während dieser Arbeit, ohne daß es an fachlichen und sehr wertvollen Diskussionen gefehlt hat.

Ebenfall besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. W. A. König, der bei der Aufklärung der Zersetzungsprodukte eine enorme Hilfs- und Diskussionsbereitschaft gezeigt hat.

Desweiteren bin ich folgenden Personen zum Dank verpflichtet, da sie unermüdlich mit mir diskutiert oder mich fachlich unterstützt haben, als da wären
Frau PD Dr. habil. Fridrun Podczek bei der statistischen Auswertung und
Herrn Dr. Thomas Lemcke bei der Berechnung von energiearmen Zuständen.

An dieser Stelle möchte ich Frau Petra Wamp, Herrn Dieter Siebeneicher und Herrn Dirk Evers für den sehr hilfreichen Einsatz bei der Durchführung von wichtigen Messungen und vor allem Herrn Dr. Heiko Brunner von der Lilly Forschung GmbH für die Großzügigkeit bei der Nutzung der HPLC-MS-Kopplung danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Henrik L. Lueßen, der mir vor allem zu Beginn der Arbeit mit fachlichen Informationen zur Hilfe kam.

Weiterhin möchte ich mich bei allen denjenigen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit in meinem Arbeitskreis begleitet haben, besonders

Herrn Peter Lennartz, Herrn Peter Kühl und Frau Babette Brüggmann für die interessanten Diskussionen,

Herrn Schüler für seine unermüdliche Art, mir jeden technischen Wunsch zu erfüllen, Frau Petra Borbe, Frau Petra Belda und Herrn Dr. Sakmann für deren stete Hilfsbereitschaft.

Großem Dank bin ich meiner Familie, meinen lieben Eltern, meiner Schwester Claudia und Felix, sowie Familie Anke und Heiner Müller schuldig, die während dieser Arbeit sehr häufig auf mich Rücksicht nehmen mußten.

Aber der größte Dank gilt meinem Partner Arne, dem ich diese Arbeit widme, um ihm damit ein bißchen von dem wiederzugeben, was er für mich in der ganzen Zeit getan hat.

für Arne

wer aber beharret...
(Matthäus 24, 13)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material	7
2.1	Desmopressin	
2.1.1	Physikalische, chemische und pharmakologische Eigenschaften	7
2.2	Polycarbophil	9
2.2.1	Physikalische und chemische Eigenschaften	
3.	Methoden	11
3.1.	Analytik	11
3.1.1	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	11
3.1.1.1	Validierung	17
3.1.1.1.1	Verwendete Methode	17
3.1.1.1.2	Probenvorbereitung	17
3.1.1.1.3	Erstellung der Kalibriergeraden	18
3.1.1.1.4	Grenzen der Kalibrierung	20
3.1.1.1.5	Genauigkeit der Analysenmethode	20
3.1.1.1.6	Stabilität der Probelösung	21
3.1.1.1.7	Bestimmung der Totzeit	21
3.1.1.1.8	Zuverlässigkeit des Systems	22
3.1.1.1.9	Spezifität	22
3.1.1.1.10	Validierungsergebnisse	23
3.1.2	Kopplung HPLC / Massenspektrometrie	24
3.1.3	Spektralphotometrie	35
3.1.4	Wassergehaltsbestimmung	28
3.1.4.1	Trocknungswaage	39
3.1.4.2	Thermogravimetrie	40
3.1.4.3	Karl-Fischer-Titration	42
3.1.5	Dynamische Differenzkalorimetrie	44

Inhaltsverzeichnis

3.1.6	Rheologie	46
3.1.6.1	Abhängigkeit von der Herstellungsweise	48
3.1.6.2	Abhängigkeit von der Quellungsdauer	49
3.1.6.3	Abhängigkeit vom pH-Wert des Dispersionsmediums	50
3.1.7	Mikroskopie	51
3.1.7.1	Thermomikroskopie	51
3.1.8	Bestimmung der Löslichkeit von Polycarbophil	52
3.2.	Herstellung von Lyophilisaten und Festen Dispersionen	53
3.3.	Sorption von Desmopressin an Oberflächen (Glas und Polypropylen)	58
3.4.	Einlagerung von Lyophilisaten und Festen Dispersionen	60
3.4.1	Lagerbedingungen (Temperaturen / relative Feuchten)	60
3.4.2	Ermittlung der maximalen relativen Feuchte	61
3.4.3	Vorversuch (12 Wochen - Lagerung)	64
3.4.4	Hauptversuch (24 Wochen - Lagerung)	67
3.4.5	Log k / pH – Profil	70
3.5.	Statistische Auswertung	72
3.5.1	Einflußfaktoren	72
3.5.2	Haltbarkeit	77
3.6.	Identifizierung von Zersetzungsprodukten	79
3.6.1	Qualitative und quantitative Bestimmung	79
3.6.2	Reaktion mit Dithiothreitol und Amberlyst 15	79
3.7.	Molecular Modelling von Desmopressin	82
3.8.	Permeation von Desmopressin durch eine Polyethylen-Membran (Transwell®)	84

Inhaltsverzeichnis

4. Ergebnisse und Diskussion	86
4.1. Physikalische und physikochemische Befunde	86
4.1.1 Desmopressin	86
4.1.1.1 Partikelform- und -größe	86
4.1.1.2 Schmelzverhalten	87
4.1.1.3 Wassergehalt	89
4.1.1.4 Massenspektrum	89
4.1.1.5 Sorptionseigenschaften an Oberflächen	90
Einfluß von Bovinem Serum Albumin	92
Glas- und Polypropylenoberflächen	95
4.1.2 Polycarbophil	98
4.1.2.1 Partikelform und -größe	98
4.1.2.2 Wassergehalt	99
4.1.2.3 Löslichkeit	102
4.1.2.4 Rheologische Eigenschaften	103
4.1.2.4.1 Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten	103
4.1.2.4.2 Viskosität	105
4.1.2.5 Kalorimetrische Daten	107
4.1.3 Lyophilisate und Feste Dispersionen	114
4.1.3.1 Wasseraufnahmevermögen	114
4.1.3.1.1 Einfluß der Temperatur	114
4.1.3.1.2 Einfluß der Feuchte	116
4.1.3.2 Wassergehalt	118
4.1.3.3 Kalorimetrische Daten	126

Inhaltsverzeichnis

4.2. Chemische Befunde	134	
4.2.1	Stabilität von Desmopressin in fester Form	134
4.2.1.1	Vergleich der Stabilität zweier Desmopressin-Chargen in Lyophilisaten und Festen Dispersionen über 12 Wochen bei 50 °C / 30 % r.F.	163
4.2.2	Zersetzungsreaktionen von Desmopressin	169
4.2.2.1	Hydrolyse von endständigen Säureamidgruppen	169
4.2.2.2	Weitere Reaktionsmöglichkeiten	170
4.2.3	Log k / pH-Profil von Desmopressin	172
4.2.4	Faktoren, welche die Stabilität beeinflussen	177
4.2.5	Haltbarkeit (t _{90%})	178
4.2.6	Identifizierung von Zersetzungsprodukten	186
4.2.6.1	Reaktion mit Dithiothreitol und Amberlyst 15	189
4.2.6.1.1	Kinetik	190
4.2.6.1.2	Sorption von Desmopressin und deren Zersetzungsprodukte an Amberlyst 15	200
4.2.7	Konformation von Desmopressin	209
4.2.8	Permeation von Desmopressin	212
5. Zusammenfassung und Ausblicke	216	
6. Summary	221	
7. Anhang	224	
8. Literaturverzeichnis	239	
9. Geräteliste	252	
10. Software	255	
11. Lebenslauf / Veröffentlichungen	256	

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AMB	Amberlyst
Arg	Arginin
ase	asymptotic standard error
Asn	Asparagin
BSA	Bovine Serum Albumin
Cys	Cystein
DAD	Dioden-Array-Detektion
DDAVP	Desmopressin
DTT	Dithiothreitol
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
HBSS	Hanks´ Balanced Salt Solution
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
MS	Massenspektrometrie
MSD TIC	Massenspektrometrie-Detektion Totalionenchromatographie
MSD	Mass selective detector
MSD SPC	Massenspektrometrie-Detektion Spektrum
n.d.	not detectable
oG	Obere Vertrauensgrenze
PCP	Polycarbophil
PE	Polyethylen
Phe	Phenylalanin
PP	Polypropylen
Pro	Prolin
RGK	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
Rt	Retentionszeit
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid
Tyr	Tyrosin
uG	Untere Vertrauensgrenze
UV	Ultraviolet

Inhaltsverzeichnis

Probencode:

D	Desmopressin-Lyophilisat
DP	Feste Dispersion bestehend aus Desmopressin und Polycarbophil
P	Polycarbophil-Lyophilisat
PCP	Polycarbophil Ausgangssubstanz
4	Dispergiert in Citratpuffer pH 4.0
6	Dispergiert in Phosphatpuffer pH 6.8
0	Lagerungsklima - 20 °C
I	25 °C / 30 % r.F.
II	50 °C / 30 % r.F.
III	58 °C
IV	66 °C
V	74 °C
a	11 % r.F.
b	30 % r.F.

1. Einleitung

Peptide gewinnen in der Therapie und in der Diagnostik eine immer größere Bedeutung.

Aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber gastrointestinalen Enzymen werden sie meist in Form von Lösungen zur intravenösen Applikation oder als Nasenspray verabreicht. Feste orale Arzneiformen, wie z.B. eine Tablette oder Kapsel, sind jedoch bei Patienten weitaus beliebter.

Die intravenöse Applikation stellt für den Patienten eine Einschränkung in der Lebensqualität dar. Die Verwendung von nasalen Zubereitungen ist aus der Patientensicht schon eine deutliche Erleichterung gegenüber der zu injizierenden Lösung, vor allem für die kleinen Patienten, die gelegentlich auf bestimmte Peptidhormone angewiesen sind. Allerdings ist die Lagerung solcher Zubereitungen nicht besonders patientenfreundlich, da peptidhaltige Lösungen meist im Kühlschrank aufbewahrt werden müssen. Ebenso ist die gleichbleibende Bioverfügbarkeit nasaler Zubereitungen an eine intakte Nasenschleimhaut geknüpft; Erkältungen oder Allergien können somit die Absorption des nasal applizierten Wirkstoffes zum Erliegen bringen.

Eine orale Applikation in Form einer Tablette beispielsweise würde dem Patienten diese Nachteile (Anwendungs- und Lagerungsproblematik) ersparen.

Außerdem sind die Therapiekosten mit Injektionspräparaten vergleichsweise hoch.

Auch aus industrieller Sicht ist die Herstellung einer Tablette gegenüber einer sterilen Arzneiform wesentlich erleichtert; außerdem ist die Produktion von Tabletten vergleichsweise kostengünstig, da diese im Großmaßstab hergestellt werden können.

Seit 1996 ist die erste peroral applizierbare Darreichungsform, eine Tablette, mit einem Peptidwirkstoff in Deutschland erhältlich.

Es handelt sich hierbei um Minirin[®] Tabletten mit dem Wirkstoff Desmopressin, einem Vasopressin-Analogon, zur Behandlung des zentralen Diabetes insipidus.

Betrachtet man jedoch die orale Verfügbarkeit des Peptides aus dieser Tablettenformulierung, so beträgt diese nur ca. 1 %, verbunden mit hohen intra- und interindividuellen Schwankungen.

Für die Ursache weshalb Peptide, oral appliziert, nur in sehr geringem Umfang im Blut und damit am Wirkort ankommen, sind folgende Eigenschaften der Peptide verantwortlich:

- Hydrophilie
- Molekülgröße

Peptide sind, da sie aus polaren, hydrophilen Bausteinen, den Aminosäuren bestehen, sehr hydrophil. Der Verteilungskoeffizient von Desmopressin beispielsweise liegt laut [6] unterhalb von $3.2 \cdot 10^{-4}$ (Octanol/Wasser, keine Temperaturangabe).

Die Molare Masse der Peptide beträgt, je nach Anzahl und Art der Aminosäuren, nicht selten über 1000 g/mol, meist weit darüber.

Aus diesen Gründen sind Peptide zur Permeation durch epitheliale Zellen, z.B. des Gastrointestinaltraktes, nicht befähigt.

Eine zusätzliche Ursache für die geringe Bioverfügbarkeit von oral applizierten Peptidwirkstoffen ist die Tatsache, daß diese durch gastrointestinale Enzyme zersetzt werden [48, 57, 37, 84, 22], die unter anderem in der Nähe des Bürstensaumes der Darmschleimhaut lokalisiert sind.

In folgender Graphik sind die Möglichkeiten der Absorption durch epitheliale Zellen der Darmschleimhaut dargestellt:

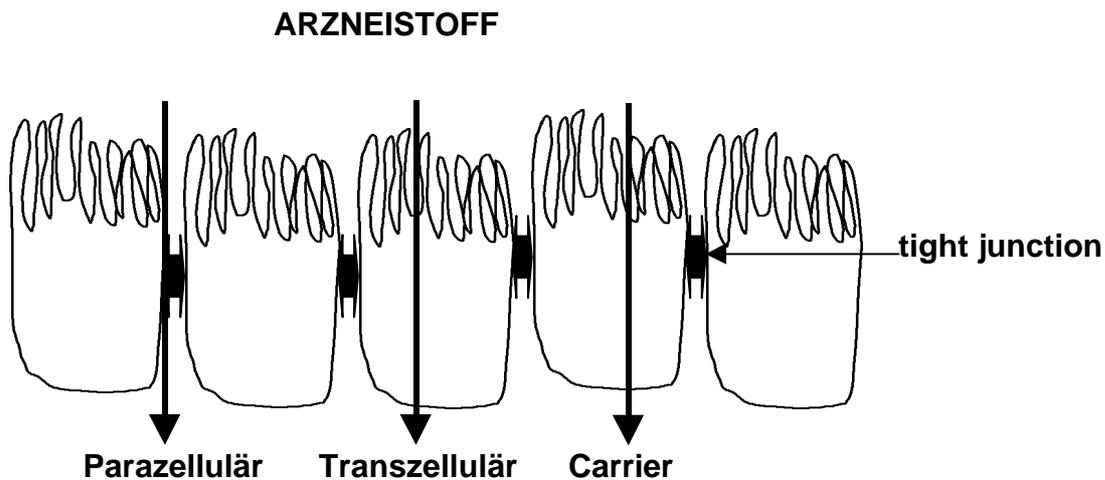


Abb. 1 : Möglichkeiten der Arzneistoff-Absorption durch epitheliale Zellen der Darmschleimhaut

Von diesen Möglichkeiten der Absorption (trans- und parazellulär oder mit Hilfe von Carriern) ist jedoch nur die parazelluläre Absorption für Peptide zugänglich. Dies ist u.a. von Lundin und Artursson [60], nachgewiesen worden.

In den vergangenen Jahren wurden eine Vielzahl an wissenschaftlichen Arbeiten zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit publiziert [27, 37, 43, 48, 58, 72, 87].

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit von Peptiden ist die Verwendung von Polymeren, die multifunktionale Eigenschaften besitzen und in die Ursachen für die geringe orale Bioverfügbarkeit eingreifen.

Ein Polymer, welches diese multifunktionellen Eigenschaften besitzt, ist Polycarbophil, ein Polyacrylsäurederivat.

Polycarbophil besitzt folgende Eigenschaften:

<u>Eigenschaft</u>	<u>Mechanismus [Lueßen, 1996]</u>
Inhibierung von peptidzersetzenden Enzymen	Komplexierung von Ca^{2+} - und Zn^{2+} -Ionen
Mucoadhäsion	Wasserstoffbrücken-Bindungen
Öffnung der tight junction	Nicht vollständig geklärt (eventuell durch Komplexierung von extrazellulären Ca^{2+} - Ionen)

Diese Funktionalitäten des Polycarbophils sind zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit von Peptiden nutzbar. In verschiedenen Modellversuchen wurden diese Polymereigenschaften in Kombination mit verschiedenen Peptiden ähnlicher Größenordnung wie Desmopressin untersucht [44, 54]. Es konnte gezeigt werden, daß es durch die Gegenwart von Polycarbophil zu einer signifikanten Erhöhung der absorbierten Peptidmenge kommt.

Die mucoadhäsive Eigenschaft des Polycarbophils ist im Vergleich zu anderen Polymeren besonders hoch [36].

Als proteolytische Enzyme sind vor allem Trypsin und Chymotrypsin zu nennen, deren physiologische Wirksamkeit an die Gegenwart der genannten zweiwertigen Kationen im Enzym gebunden ist (Cofaktoren). Durch Komplexierung dieser Ionen verlieren die Enzyme ihre Wirksamkeit.

Die Mucoadhäsion ist eine wichtige Bedingung, um die Verweildauer des im Polymer dispergierten Peptides am Absorptionort (Schleimhaut) zu erhöhen bzw. den Kontakt zum absorbierenden Gewebe zu intensivieren. Es ist jedoch zu bedenken, daß die Erneuerungsgeschwindigkeit der Mucus-Gelschicht des Gastrointestinaltraktes relativ hoch ist, so daß zwar das Polymer an der

Mucinschicht haftet, diese sich jedoch nach einer gewissen Zeit von dem Gewebe ablöst und erneuert wird.

Die Freigabe des Peptides aus dem Polymer sollte deshalb relativ rasch erfolgen.

Der Aufbau und die Eigenschaften der Schleimhaut sind in der Literatur [72] beschrieben. Die Testung der bioadhäsiven Kraft mucoadhäsiver Polymere ist u.a. in den Publikationen [51, 46, 36, 37] beschrieben worden.

Desweiteren sind die mucoadhäsiven Polymere in der Lage, die normalerweise für Peptide undurchlässigen tight junction zwischen zwei benachbarten Epithelzellen kurzzeitig zu öffnen, so daß ein parazellulärer Transport des Peptides ermöglicht werden kann. Diese Beobachtungen konnten mit Hilfe von CaCo-II-Zellen gemacht werden [47, 58, 60].

Die Absorption des Peptidarzneistoffes Desmopressin durch epitheliale Zell-Linien (CaCo-II) ist u.a. von Hovgaard et al. [33, 6] beschrieben worden.

Lundin und Artursson [60] beschreiben für das Peptid Desmopressin einen Permeabilitätskoeffizienten durch CaCo-II-Zell-Linien im Bereich von $4 \cdot 10^{-8}$ bis $14 \cdot 10^{-8}$ cm/s und Hovgaard et al.[33] von $6.37 \cdot 10^{-7}$ cm/s.

Die bisher publizierten Untersuchungen zur Erhöhung der oralen Verfügbarkeit von Peptiden beinhalten vor allem die physiologischen (in-vitro, in-vivo und in-situ) Betrachtungen der Peptide in Gegenwart von mucoadhäsiven Polymeren.

Untersuchungen zur Stabilität eines Peptides in Kombination mit einem mucoadhäsiven Polymer sind bisher jedoch nicht durchgeführt worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun eine feste Formulierung entwickelt werden, bestehend aus Peptid und einem multifunktionalen Polymer, sowie deren chemische und physikalische Stabilität untersucht werden.

Eine gute Möglichkeit, die orale Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen zu verbessern, ist die Einbettung des Wirkstoffes in ein hydrophiles Polymer.

Systeme, in denen die aktive Komponente dispers in einem festen Träger (Polymer) verteilt ist, werden nach Chiou und Riegelman [8] als Feste Dispersionen bezeichnet.

Meist werden Feste Dispersionen, bestehend aus einem lipophilen, schlecht wasserlöslichen Arzneistoff und einem gut wasserlöslichen Polymer hergestellt, mit der Zielsetzung, die Löslichkeit des Wirkstoffes zu erhöhen und dadurch die orale Verfügbarkeit des Wirkstoffes zu verbessern.

In einer Reihe von wissenschaftlichen Arbeiten wurden diesbezüglich Untersuchungen zur Stabilität lipophiler Arzneistoffe in Fester Dispersion mit hydrophilen Polymeren durchgeführt [13, 23, 35, 65].

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine ganz andere, sehr aktuelle Wirkstoffgruppe untersucht, deren geringe orale Verfügbarkeit nicht aufgrund von Löslichkeitsproblemen hervorgerufen wird: Peptide.

Als Modellpeptid wurde Desmopressin gewählt, ein seit langem in der Medizin eingesetztes Nonapeptid, welches bei Beginn der Arbeit als intravenöse und intranasale Lösung erhältlich war. Es ist das erste Peptid, welches in oraler Arzneiform, einer Tablette, eingesetzt wird.

Das zur Herstellung der Festen Dispersion verwendete Polymer Polycarbophil hat sich in wissenschaftlichen Arbeiten [Junginger, 1991] als besonders günstig in bezug auf mucoadhäsive Eigenschaften herausgestellt, so daß dieses Polymer als fester Träger für den Peptidwirkstoff Desmopressin in Fester Dispersion eingesetzt wurde.

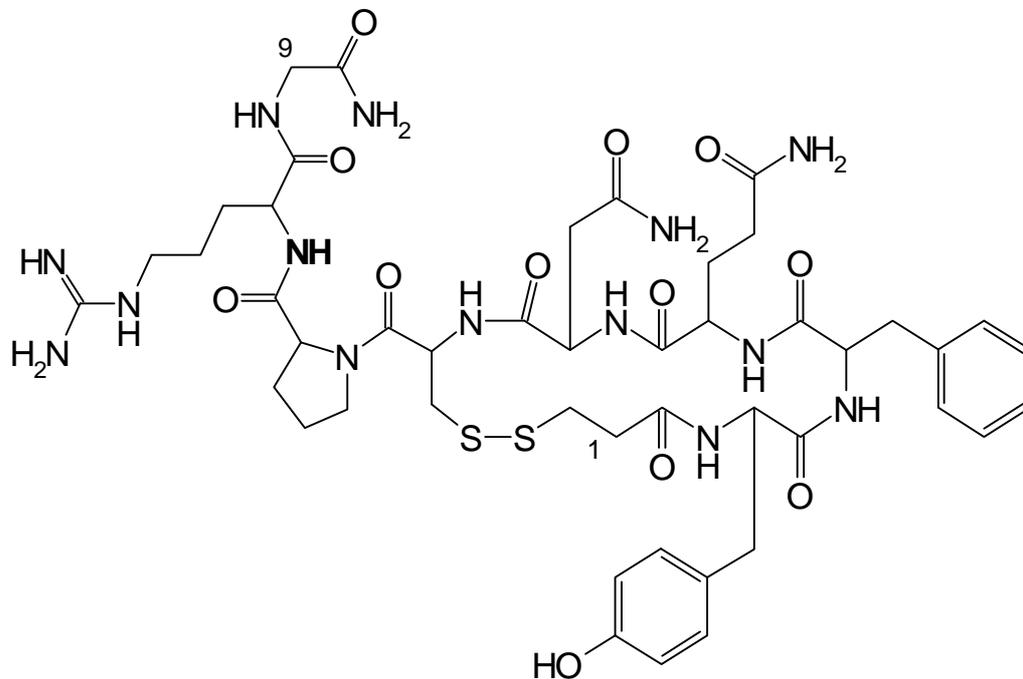
2. Materialien

Folgende Materialien wurden zur Herstellung der Festen Dispersionen verwendet:

- Desmopressin
- Polycarbophil

2.1 Desmopressin

1-Deamino-8-D-Arginin-Vasopressin (DDAVP)



$\text{C}_{46}\text{H}_{64}\text{N}_{14}\text{O}_{12}\text{S}_2$

Molare Masse 1068.42 [g/mol]

Offizinell: Europäische Pharmacopöe

pH_i errechnet: 6,2 ± 0,1

CAS:16679-58-6

Verwendete Chargen: UA2545, Ferring, S-Malmö

1485-1-1, Ferring, S-Malmö

Eigenschaften:

Desmopressin ist ein weißes, flockiges Pulver, löslich in Wasser, Essigsäure (98%) und Ethanol. Das industrielle Produkt liegt als amorphes Lyophilisat vor, welches noch Anteile von Essigsäure und Wasser enthält. Teilweise liegt die Essigsäure als Acetat, gebunden an die Guanidingruppe des Arginins vor, teilweise in freier Form. Das Wasser liegt nicht als Kristallwasser vor. Der Essigsäure- und Wassergehalt sind von den Bedingungen der Lyophilisation abhängig.

Desmopressin ist ein cyclisches Nonapeptid mit antidiuretischer Wirkung. Es ist ein synthetisches Analogon zum natürlichen, antidiuretischen Hormon Adiuretin (ADH, bzw. L-Arginin-Vasopressin, AVP). Es unterscheidet sich von diesem durch die Entfernung der Aminogruppe des Cysteins an Position 1 und den Austausch von L-Arginin durch D-Arginin. Dadurch erhöht sich die antidiuretische Wirkung um das 10fache, während die pressorische Wirkung deutlich vermindert wird. Desmopressin induziert im Blut vorübergehend die Freisetzung von Faktor-VIII und des von-Willebrand-Faktors.

Desmopressin dient zur Behandlung des zentralen Diabetes insipidus. Ebenfalls eingesetzt wird es zur Differentialdiagnose von zentralem und renalem Diabetes insipidus. Desweiteren kann es bei Kindern mit nächtlichem Bettnässen angewandt werden. Eine weitere Indikation ist die Steigerung der Faktor-VIII-Aktivität bei Patienten mit Hämophilie A.

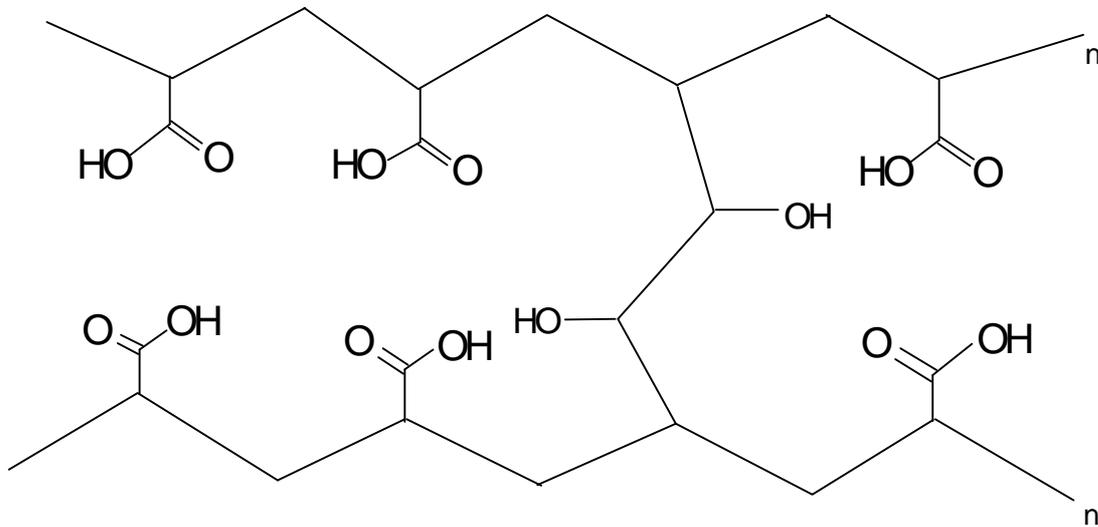
Darreichungsformen:

- Lösung zur intravenösen bzw. intranasalen Applikation
- Feste Form (Tablette) zur oralen Applikation

Die Lösungen zur intravenösen bzw. intranasalen Anwendung sind seit 1976 zugelassen, während Desmopressin-Tabletten seit 1996 erhältlich sind.

Die Bioverfügbarkeit nach intranasaler Applikation beträgt 6-12 %, während nach oraler Applikation nur ca. 1 % im Blut ankommen.

2.2 Polycarbophil (PCP, Noveon™ AA1)



Molare Masse ca. $3.5 \cdot 10^9$ [g/mol]

Offizinell: USP XXIII

CAS: 9003-97-8

Verwendete Charge: W037063, B.F. Goodrich, D-Neuss

Eigenschaften:

Weißes, leicht säuerlich riechendes hygroskopisches Pulver, quellbar in Wasser, verdünnten Säuren und Alkalihydroxiden. Polycarbophil ist amorph und zersetzt sich oberhalb 200 °C.

Der pKa-Wert liegt bei 6.0 ± 0.5 , wobei Schwankungen auf unterschiedliche Produktionsbedingungen zurückzuführen sind. Eine 1 %ige wässrige Dispersion zeigt einen pH-Wert zwischen 2 und 4.

Polycarbophil ist Polyacrylsäure quervernetzt mit Divinylglycol. Der Vernetzungsgrad ist abhängig von den experimentellen Bedingungen der Polymerisation und der genauen Menge des Vernetzungsmittels (1-2 %).

Es kann viel Wasser aufnehmen, wobei die aufgenommene Flüssigkeitsmenge pH-abhängig ist. So nehmen 1 g Polycarbophil mindestens 62 g Natriumbicarbonat-Lösung (USP XXIII) und nicht weniger als 31 g einer Lösung pH 4.0 auf.

Aufgrund der chemischen Struktur von Polycarbophil ergeben sich folgende biologisch wichtige Eigenschaften:

1. Mucoadhäsion
2. Inaktivierung von eiweißspaltenden Enzymen
3. Öffnen der tight junction

Die mucoadhäsive Eigenschaft des Polycarbophils wird durch verschiedene Faktoren ermöglicht:

- Wasserstoffbrückenbindung zwischen Polycarbophil und der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes
- Verknäuelung von Polycarbophil-Ketten mit Glykoproteinen der Schleimhaut
- Oberflächenphänomene

Die mucoadhäsiven Eigenschaften sind bei undissoziierter Form der Polyacrylsäure verbessert.

Die enzyminaktivierenden Eigenschaften des Polycarbophils werden über die Komplexierung von Calcium- und Zinkionen hervorgerufen. Die Tertiärstruktur bestimmter gastrointestinaler Enzyme wird durch Calcium- oder Zinkionen stabilisiert. Polycarbophil besitzt eine große Affinität zu zweiwertigen Kationen und verdrängt diese kompetitiv aus deren Proteinen. Die Folge ist die Inaktivierung des Enzymes. Polycarbophil ist in der Lage, Resorptionskanäle für Peptide zu öffnen. Zwischen den epithelialen Zellen der Darmwand bestehen feste Zusammenhänge (tight junction), die eine parazelluläre Absorption verhindern sollen. Polycarbophil vermag diese tight junction zu öffnen, wodurch ein parazellulärer Transport auch für Peptide möglich ist. Die Öffnung der tight junction wird auf eine Komplexierung von extrazellulären Calciumionen zurückgeführt.

Die physikalischen und biologischen Eigenschaften des Polycarbophils sind demnach stark vom pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig.

Technologisch wird Polycarbophil vor allem zur Erstellung von mucoadhäsiven Tabletten und Gelen genutzt, aber auch für Tabletten mit kontrollierter Wirkstoff-Freigabe. Polycarbophil ist bei der FDA sowohl für topisch als auch für oral anzuwendende Arzneiformen registriert.

3. Methoden

3.1. Analytik

Die Analytik hatte im Rahmen dieser Arbeit einen sehr hohen Stellenwert.

Mit Hilfe verschiedener analytischer Methoden sollten physikalische und chemische Eigenschaften der verwendeten Materialien (Desmopressin, Polycarbophil) untersucht werden. Es ist von entscheidender Bedeutung, vor der Entwicklung einer neuen Arzneiform die verwendeten Materialien zu charakterisieren, um so einen Eindruck über das physikalisch-chemische Verhalten der Substanzen zu bekommen. Die mittels analytischer Untersuchungen gemachten Erfahrungen mit den Materialien sollten in der Entwicklung einer Herstellungsmethode sowie bei der Wahl der geeigneten Lagerbedingungen während der Stabilitätslagerung berücksichtigt werden.

In der Literatur sind physikalisch-chemische Eigenschaften von Desmopressin und Polycarbophil bisher relativ wenig beschrieben worden.

3.1.1 HPLC-Analytik

Die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie diente zur qualitativen und quantitativen Analyse von Desmopressin und zur Untersuchung der Stabilität von Desmopressin in Lyophilisaten und Festen Dispersionen.

Dieses analytische Verfahren beinhaltet eine Reihe von Vorzügen:

- relativ kurze Analysenzeiten
- Automatisierung
- relativ einfache Handhabung
- weit verbreitetes Verfahren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von HPLC-Methoden getestet, die teilweise aus Veröffentlichungen [Hovgaard, 1995] und aus einer Arzneibuchmonographie (DAB 10) stammten.

Zusätzlich wurden die beschriebenen Methoden weiter verändert, um den Einfluß einzelner Parameter zu beurteilen und um eine in vielerlei Hinsicht optimale Methode zu entwickeln.

Gerätekonfiguration:

Pumpe	Thermo Separation Products (TSP) GmbH, D-Egelsbach Typ P 100 mit Gradientenoption
Autosampler	Kontron Instruments GmbH, D-Neufahrn Typ 360
Detektor	Kontron Instruments GmbH, D-Neufahrn Uvikon LC 720

Folgende Parameter wurden während der Methodenentwicklung variiert:

- Säulentyp (Hersteller, Dimensionen)
- Stationäre Phase (RP8, RP18, sphärisch, irregulär, Partikelgröße, PorenØ)
- Elutionsmittel (Bestandteile, Zusammensetzung, pH, Puffer)
- Elutionsart (Gradient, Isokrat)
- Fließgeschwindigkeit
- Wellenlänge
- Injektionsvolumen

Die folgende Tabelle stellt die während der Methodenentwicklung durchgeführten Versuchsvarianten dar.

Dabei entspricht:

λ der Wellenlänge der UV-Detektion

Rt der Retentionszeit des Desmopressin-Peak

Suit.Test einem System Suitability Test, durchgeführt nach USP XXIII

Tail.F. dem Tailing Faktor in 1/5 der Peakhöhe des Desmopressin-Peak

ÜBERSICHT ÜBER QUALITATIVE HPLC-METHODEN:

Säule	Elution	λ [nm]	Rt [min]	Suit.Test S _{rel} [%]	Tail.F.
Merck Hibar Lichrosorb LichroKart RP 8 7 μ m 250-4.0	0.1% H ₃ PO ₄ pH 2.2 / ACN 72 / 28 1 ml/min	220	4.5	0.18	1.8
Vorsäule: Merck RP 18 25-4.0	TEAP-Puffer pH 2.2 / ACN 72 / 28 1 ml/min 50 μ l Inj.vol.	200	4.5	-	-
	Gradient 1.25% TMAH-Puffer pH 2.8 / ACN (siehe Waters)	210	14.0	0.8	1.8
	Gradientenänder. zugunsten ACN-Anteil		3.7	-	-
Merck Lichrospher 100 RP 18 10 μ m 125-4.0	Phosphatpuffer pH 7.0 / ACN 80 / 20 2 ml/min *	220	4.5	0.96	1.1
	TEAP-Puffer pH 2.2 / ACN 80 / 20 2 ml/min	220	3.8	1.9	1.0
	Gradient 1.25 % TMAH-Puffer pH 2.8 / ACN (siehe Waters)	210	8.3	0.48	0.9
Bischoff Hyperchrome Hypersil ODS RP 18 5 μ m 125-4.6	Phosphatpuffer pH 7.0 / ACN 80 / 20 2 ml/min *	220	5.4	1.3	0.75
				* nach DAB 10	

Säule	Elution	λ [nm]	Rt [min]	Suit.Test S _{rel} [%]	Tail.F.
Waters μ -Bondapak RP 18 10 μ m, 125 Å 300-3.9	Gradient 1.25% TMAH-Puffer pH 2.8 / ACN Eluent A:15% ACN Eluent B:40% ACN linearer Gradient (15 min.) von 100% A zu 70% A 1 ml/min	210	4.3	0.75	1
CS μ -Bondapak RP 18 6-10 μ m, 125 Å 300-4.0	Gradient (siehe Waters)	210	18.0	0.3	-
	Gradient linearer Gradient (15 min.) von 100% A zu 30% A (Eluenten siehe Waters)	210	3.2	-	-
	Gradient (siehe Waters) Flow 1.5 ml/min	210	14.0	0.19	0.75
	Isokrat 1.25% TMAH-Puffer pH 2.7 / ACN 70% A 30% B (Eluenten siehe Waters)	210	4.1	0.3	1
Phenomenex Prodigy ODS (3) RP 18 5 μ m, 100 Å 250-4.6	Isokrat 1.25% TMAH-Puffer pH 2.7 / ACN 70 % A 30 % B (Eluenten siehe Waters) 1 ml/min	210	5.5	0.9	-
	dto. 0.7 ml/min	210	6.7	-	-
	65 % A 35 % B (Eluenten siehe Waters)	210	6.8	-	-
	1.25% TMAH-P. pH 2.7 / ACN 77.5 / 22.5 1 ml/min	210	4.2	-	-

Säule	Elution	λ [nm]	Rt [min]	Suit.Test S _{rel} [%]	Tail.F.
Phenomenex Prodigy ODS (3) RP 18 5 μ m, 100 Å	dto.	220	4.3	24.6	-
	0.5% TMAH-P. pH 2.7 / ACN 77.5 / 22.5 1 ml/min	210	4.8	-	-
Zusätzlich: Vorsäule: Phenomenex Prodigy ODS (3) RP 18 5 μ m, 100 Å 30-4.6	dto.	210	8.0	0.3	0.9
	0.5% TMAH-P. pH 2.7 / ACN 77 / 23 1 ml/min ♥	210	8.0	0.7	0.8
Vorsäulenfilter: Upchurch Edelstahl Poren \varnothing 0.5 μ m	H ₂ O dest. / ACN 77 / 23	210	4.0	0.9	Tailing!
	H ₂ O dest. / ACN 77.5 / 22.5	210	4.0	3.3	Tailing!

♥ validierte Methode

Der pH-Wert des Eluenten hat sich als besonders entscheidend für das chromatographische Verhalten von Desmopressin herausgestellt. Bei niedrigem pH-Wert des Eluenten (< pH 3) ist die Peakschärfe verbessert. Die Gegenwart von Säuren oder saurem Puffer (< pH 3) im Fließmittel ist für ein geringes Tailing und die optimale Isolierung des Hauptpeak (Desmopressin) unerlässlich.

Für die Methodenwahl wurden folgende Parameter herangezogen:

- Optimale Abtrennung des Hauptpeaks (Desmopressin)
- Gute Trennleistung der Säule
- Geringer Kostenaufwand für Säule und Fließmittel
- Geringe Analysenzeiten
- Gutes Signal / Rausch-Verhältnis
- Geringe Belastung der Geräte und der Säule

Danach war folgende Methode als die für die qualitative und quantitative Analyse von Desmopressin am geeignetsten anzusehen:

Säule	Phenomenex Prodigy ODS (3) RP 18, 250-4.6 mm, 5 µm, 100 Å
Vorsäule	Phenomenex Prodigy ODS (3) RP 18, 30-4.6 mm, 5 µm, 100 Å
Vorsäulenfilter	Upchurch A103x, stainless steel mit PEEK, 0.5 µm mittlerer Porendurchmesser
Fließmittel	Acetonitril : TMAH-Puffer pH 2.7 23 : 77
Flußrate	1 ml / min
Wellenlänge	210 nm
Einspritzvolumen	20 µl

Diese Methode wurde für weitere qualitative und quantitative Untersuchungen von Desmopressin verwendet.

Die Gegenwart von Polycarbophil und die Anwesenheit von Puffersalzen (pH) in der Probelösung beeinflussen nicht das chromatographische Verhalten (Retentionszeit, Peakbreite) von Desmopressin. Allerdings zeigen diese Faktoren einen Einfluß auf die Wiederfindung von Desmopressin, so daß die Validierung der HPLC-Methode unter Berücksichtigung des pH-Wertes der Probelösung durchgeführt wurde. Bestimmte Parameter in der Methodvalidierung (System Suitability Test, Kalibrierung, Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze) wurden zusätzlich in Gegenwart von Polycarbophil durchgeführt.

Die Validierung der HPLC-Methode wurde mit allen Formulierungen durchgeführt, die später auch im Rahmen der Stabilitätseinlagerung untersucht wurden.

3.1.1.1 Validierung der HPLC-Methode

3.1.1.1.1 Verwendete Methode

Säule	Phenomenex Prodigy ODS (3) RP 18, 250-4.6 mm, 5 µm, 100 A, Charge 224500
Vorsäule	Phenomenex Prodigy ODS (3) RP 18, 30-4.6 mm, 5 µm, 100 A, Charge 224512G
Vorsäulenfilter	Upchurch A103x, stainless steel mit PEEK, 0.5 µm mittlere Porengröße
Fließmittel	Acetonitril : TMAH-Puffer pH 2.7 23 : 77
Flußrate	1 ml / min.
Wellenlänge	210 nm
Einspritzvolumen	20 µl
Retentionszeit	ca. 8 min.

Die verwendeten Materialien wiesen analytische Reinheit auf.

Acetonitril Artikel Nr. 50097, Biomol, D-Hamburg

TMAH Artikel Nr. 87729, Sigma-Aldrich, D-Deisenhofen

3.1.1.1.2 Probenvorbereitung

Um zu vermeiden, daß das Peptid an Filtermaterialien sorbiert wird, wurde statt der Filtration die Zentrifugation in der Probenvorbereitung eingesetzt.

In das vial <18>, welches das Lyophilisat bzw. die Feste Dispersion enthielt, wurde destilliertes Wasser pipettiert (Eppendorf-Pipette) und das vial verschlossen. Das vial wurde in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und auf dem Horizontal-Schüttler <15> eine Stunde bei mittlerer Geschwindigkeit (Stufe 3) bei Raumtemperatur geschüttelt.

Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen mit dem darin enthaltenen vial in eine Zentrifuge <17> überführt und 15 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Während des Zentrifugierens wurde die Temperatur im Zentrifugenraum konstant auf 20 °C gehalten (Kühlung im Zentrifugenmantel).

Danach wurde das vial vorsichtig dem Zentrifugenröhrchen entnommen, wobei darauf geachtet wurde, daß ein erneutes Aufschütteln des Zentrifugenrückstandes vermieden wird.

Das vial wurden geöffnet, der Zentrifugenüberstand mit einer Einmalpipette (PE) abgenommen und in ein neues HPLC-vial pipettiert. Aus diesem vial erfolgte die Injektion in die HPLC.

Bei den PCP-freien Lyophilisaten ist diese Vorgehensweise ebenfalls durchgeführt worden, womit jedes System der gleichen Aufbereitung unterzogen wurde. Somit ist ein Unterschied in den Desmopressin-Gehalten bei PCP-haltigen (Feste Dispersionen) und PCP-freien Systemen (Lyophilisate) allein durch die Probenaufbereitung auszuschließen.

3.1.1.1.3 Erstellung einer Kalibriergeraden

Eine Kalibrierung gilt nur für die gleichen experimentellen Bedingungen.

Dies bedeutet, daß alle Parameter an den Geräten sowie die Reagenzien, Lösungsmittel und die Geräte selbst bei der Kalibrierung die gleichen sein sollten wie bei späteren Analysen.

Besondere Aufmerksamkeit sollte dem pH-Wert und der Zusammensetzung des Lösungs- und Fließmittels geschenkt werden, da hier Änderungen gegenüber der Kalibrierung sehr viel ausmachen.

Die Konzentrationen, die bei der Kalibrierung eingesetzt werden, sollten den gesamten später zu untersuchenden Meßbereich abdecken. Eine Extrapolation auf niedrigere oder höhere Meßbereiche ist nicht zulässig, da die Linearität der Kalibrierkurve in diesen Meßbereichen nicht überprüft werden kann.

Bei der Herstellung der Verdünnungen wurde darauf geachtet, daß die Verdünnungsfehler so gering wie möglich sind. Es wurden deshalb die verwendeten Eppendorf-Pipetten auf deren Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) getestet.

Die verschiedenen konzentrierten Lösungen entstanden durch Verdünnung der Stammlösung mit dem entsprechende Blindmedium (Pufferlösung, PCP-haltige Pufferlösung 0.25 %).

Eine 1:1-Verdünnung beispielsweise erfolgte demnach durch Abpipettierung von 500 µl Stammlösung in ein HPLC-vial und Zugabe von 500 µl Blindmedium. Auf die Verwendung von Meßkolben wurde verzichtet, um den Verlust von Desmopressin durch Adsorption von Desmopressin an Glasoberflächen so gering wie möglich zu halten. Außerdem zeigen Meßkolben, verglichen mit Eppendorf-Pipetten, relativ hohe Ungenauigkeiten.

In Gegenwart von Polycarbophil wurden die Dispersionen vor der Analyse zentrifugiert, um klare Lösungen zu erhalten. Analog erfolgte später die Aufbereitung der Proben.

Alle Parameter der Kalibrierung (Geräteparameter, Gerätetyp, Reagenzien sowie deren Qualitäten, Desmopressin-Charge, Polycarbophil-Charge, Herstellungs- und Aufbereitungstechnik der Lösungen und Dispersionen) wurden nach der Kalibrierung nicht mehr verändert.

Es wurde für jedes System (D4, DP4, D6, DP6) eine Kalibriergerade erstellt.

Die Kalibriergerade eines Systems beinhaltete sechs Konzentrationen, wobei die Erstellung der Kalibriergeraden an einem weiteren Tage mit neuer Einwaage und Verdünnungsschritten wiederholt wurde. Jede Lösung wurde dreimal injiziert. Die Vertrauensbereiche der Parameter (Steigung, Ordinatenabschnitt) der linearen Regression jeder Kalibrierung wurden auf signifikanten Unterschied geprüft ($\alpha=0,05$) und nur, wenn ein signifikanter Unterschied nicht nachweisbar war, sind die Meßreihen zusammengelegt und erneut eine lineare Regression mit allen Konzentrationen ($n=12$) durchgeführt worden. Es wurde auf signifikanten Unterschied des Ordinatenabschnittes von Null geprüft ($\alpha=0.05$) und, falls dieser nicht nachweisbar war, eine homogene Regression durchgeführt.

Für jede Kalibrierung wurden die statistischen Voraussetzungen für eine Kalibrierung (Normalität, Linearität, Homoskedastizität, Ausreißer, Nullpunkt) geprüft.

3.1.1.1.4 Grenzen der Kalibrierung

Mit Hilfe der gesamten Kalibrierreihe ($n=36$, $k=12$) wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mittels TOCCATA errechnet ($\alpha=0.05$).

Die Nachweisgrenze ist die kleinste Menge Substanz (Konzentration), die detektiert, aber nicht quantifiziert werden kann.

Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste Menge Substanz (Konzentration), die mit gegebener Genauigkeit quantifiziert werden kann.

3.1.1.1.5 Genauigkeit der Analysenmethode

Die Genauigkeit einer Analysenmethode beinhaltet die Ermittlung der Richtigkeit und der Präzision.

3.1.1.1.5.1 Richtigkeit

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem als wahr angenommenen und dem gemessenen Gehalt. Sie ist ein Indikator für systematische Fehler in der Analysenmethode. Als größtes Problem ist hierbei die Festlegung des wahren Gehaltes anzusehen. Als Substanz für die Messung sollte eine solche gewählt werden, deren Reinheit entweder garantiert (CRS) oder mittels CRS ermittelt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Gehalt der eingesetzten Desmopressin-Charge mit Hilfe einer Chemischen Referenzsubstanz (Europäische Arzneibuchkommission) ermittelt.

Aus zwei Einwaagen wurden jeweils zwei Verdünnungen hergestellt, so daß vier Untersuchungslösungen entstanden, die den gesamten zu berücksichtigenden Konzentrationsbereich abdecken. Die Lösungen wurden in zufälliger Reihenfolge jeweils dreimal hintereinander injiziert. Dies wurde an fünf weiteren Tagen mit neuen Einwaagen und Verdünnungen wiederholt ($n=72$). Die Verdünnungsschritte erfolgten analog der Kalibrierung.

3.1.1.1.5.2 Präzision

Die Präzision ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter gleichen Bedingungen.

Aus zwei Einwaagen wurden jeweils zwei Verdünnungen hergestellt, so daß vier Untersuchungslösungen entstanden, die den gesamten zu berücksichtigenden Konzentrationsbereich abdeckten. Dies wurde an zwei weiteren Tagen mit neuen Einwaagen und Verdünnungen wiederholt ($k=12$). Die Verdünnungsschritte erfolgten analog der Kalibrierung. Auch hier wurden von jeder Konzentration drei Einspritzungen vorgenommen, so daß sich $n=36$ ergab.

3.1.1.1.6 Stabilität der Probelösung

Bei hohem Probeaufkommen ist mit langen Standzeiten im Autosampler bei Raumtemperatur zu rechnen. Die längste zu erwartende Standzeit einer Probe bei Auslagerung wurde mit drei Tagen ermittelt, so daß sich die Prüfung der Stabilität der Probelösung auf drei Tage erstreckte.

Während dieser Zeit sollte keine signifikante Abnahme des Desmopressin-Gehaltes auftreten, keine weiteren Zusatzpeaks sollten detektierbar sein.

3.1.1.1.7 Bestimmung der Totzeit

Die Bestimmung der Totzeit erfolgte mittels Natriumnitrat.

Dabei wurden 75 mg Natriumnitrat (Artikel-Nr. 6537, Ch.B. 739A254937, Merck) in 10 ml des Fließmittels gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden auf 10 ml mit Fließmittel verdünnt (1:1000).

Dies wurde mit einer weiteren Einwaage an Natriumnitrat wiederholt.

Die beiden Lösungen (entspr. 0.0075 % NaNO_3) wurden jeweils sechsmal unter den gewählten chromatographischen Bedingungen injiziert. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 220 nm.

Die Totzeit ist die mittlere Retentionszeit des detektierten Peak.

3.1.1.1.8 Zuverlässigkeit des Systems

Die Durchführung und Auswertung erfolgte nach dem System Suitability Test USP XXIII.

Eine Lösung, die Desmopressin in einer mittleren Konzentration enthält und frisch hergestellt wurde, wird auf zwei HPLC-vials aufgeteilt. Aus jedem vial werden unter den gleichen chromatographischen Bedingungen sechs Einspritzungen gemacht.

Die Auswertung erfolgt anhand aller (n=12) Einspritzungen, wobei vorher mittels F- und t-Test geprüft wird, ob es zwischen dem ersten und zweiten vial signifikante Unterschiede gibt ($\alpha=0.05$).

Die Bewertung wurde für die erhaltenen Flächen und Retentionszeiten vorgenommen.

Der System Suitability Test wurde für jedes System (D4, DP4, D6, DP6) unter den oben genannten Bedingungen erfolgreich durchgeführt .

3.1.1.1.9 Spezifität

Die Spezifität ist die Fähigkeit der HPLC-Methode, den Analyt zweifelsfrei in Gegenwart von anderen zu erwartenden Komponenten (Zersetzungsprodukte, Matrix) erfassen zu können.

Man unterscheidet zwischen selektivem und quantitativem Aspekt der Spezifität. Die Selektivität bedeutet, daß die zu erwartenden Substanzen getrennt eluiert werden. Der quantitative Aspekt bezieht sich auf die Quantifizierung, d.h. auf die Empfindlichkeit des Detektors für eine Substanz. Diese wurde aus der Neigung der Kalibriergeraden ermittelt und für jedes System errechnet (inkl.Vertrauensbereich).

Für die Bestimmung der Selektivität wurden zwei Lösungen unter den gewählten Analysenbedingungen in zufälliger Reihenfolge eingespritzt (n=12).

Es wurde der Kapazitätsfaktor (k') und die Auflösung ermittelt, wobei der Peak, der dem Desmopressin-Peak am nächsten lag, in die Bewertung einbezogen wurde.

Die Bestimmung der Spezifität wurde in Lösungen mit den später verwendeten pH-Werten (pH 4.0 und 6.8) vorgenommen und getrennt für jeden pH ausgewertet.

Für beide Lösungen (pH 4.0 und 6.8) war die Selektivität der Analysenmethode gegeben.

Der Kapazitätsfaktor k' lag zwischen 1 und 10 und die Auflösung ergab einen Wert > 1 .

Desweiteren wurde der Tailing Faktor des Desmopressin-Peak ermittelt, wobei jeder Peak einen Tailing Faktor zwischen 0,8 und 1,2 aufwies (n=12).

3.1.1.1.10 Validierungsergebnisse

System	Steigung d.Kalibr.Funktion [100 ml*g ⁻¹]	Nachweisgrenze [µg*ml ⁻¹] [nmol*ml ⁻¹]	Bestimmungsgrenze [µg*ml ⁻¹] [nmol*ml ⁻¹]
DDAVP-Lyoph. hergest. pH 4.0	2626510 ± 7205	1,05 0,98	2,10 2,0
Feste Dispersion	2270632 ± 13555	2,29 2,0	4,58 4,0
DDAVP-Lyoph. hergest. pH 6.8	2613977 ± 8461	0,95 0,88	1,89 2,0
Feste Dispersion	2486527 ± 20214	2,97 3,0	4,22 4,0

Richtigkeit	100,9 % ± 6,1
Präzision	0,41 [µg*ml ⁻¹] 0,38 [nmol*ml ⁻¹]
Totzeit	3,04 Minuten ± 0,005
Tailing Faktor	0,8 bis 1,2

3.1.2 Kopplung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie (HPLC / MS – Kopplung)

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist heute eines der gebräuchlichsten Verfahren zur Analyse von Substanzgemischen.

Die meisten HPLC-Geräte beinhalten zur Detektion des Analyten einen UV-Detektor. Die mittels UV-Detektion bei einer bestimmten Wellenlänge erhaltenen Signale (Peaks) geben jedoch keine Aussage über Art und Reinheit der eluierten Substanz.

Modernere UV-Detektoren messen deshalb mittels Dioden-Array-Detektion (DAD). Dieser Detektortyp erfaßt nicht nur Signale einer Wellenlänge, sondern nimmt von der am Detektor ankommenden Substanz ein UV-Spektrum von 190 bis 400 nm auf. Dadurch kann die Peakreinheit überprüft werden.

Da UV-Spektren jedoch nicht sehr spezifisch sind, und chemisch ähnliche Stoffe oft ein ähnliches UV-Spektrum besitzen, ist die Detektion mittels DAD zwar gegenüber dem einfachen UV-Detektor verbessert, jedoch nicht optimal.

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine der wichtigsten Analysenmethoden in der heutigen organischen Chemie. Mit kleinen Substanzmengen kann die relative Molekülmasse einer Substanz ermittelt werden. Darüber hinaus kann durch Fragmentierung des Stoffes eine wichtige Aussage über die Struktur und deren labilen Bereiche im Molekül getroffen werden. Es sind jedoch möglichst reine Substanzen nötig, damit die Interpretation der Ergebnisse eine richtigen Aussage liefert.

Um den Informationsgehalt von Analysenmethoden deutlich zu erhöhen, werden in der instrumentellen Analytik immer mehr Kopplungstechniken eingesetzt.

Bei der direkten Kopplung der HPLC mit der MS bestehen besondere Probleme, da die beiden Geräte unter völlig unterschiedlichen Bedingungen arbeiten. Die Trennung mittels HPLC erfolgt durch eine Verteilung zwischen fester (stationärer) und flüssiger (mobiler) Phase, bei hohen Drücken und meist bei Raumtemperatur. Das MS dagegen funktioniert nur im Hochvakuum und bei hohen Temperaturen.

Es können nicht alle HPLC-Methoden problemlos auf HPLC / MS-Kopplungen übertragen werden.

Besondere Anforderungen sind an die mobile Phase zu stellen: Der Eluent darf keine allzu hohe Pufferkonzentration aufweisen und muß verdampfbar sein. Der im Fließmittel häufig verwendete Phosphatpuffer ist deshalb für diese Kopplungstechnik nicht geeignet.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der HPLC / MS-Kopplung möglichst umfangreiche Informationen (Molekulargewicht und eventuelle Strukturhinweise) über unbekannte Abbauprodukte von Desmopressin zu bekommen.

Bei der Methodenentwicklung für die HPLC / MS-Analytik wurde darauf geachtet, daß trotz Veränderung des Eluenten eine Peakzuordnung aus den Chromatogrammen der HPLC-Methode möglich war.

Vorgehensweise

Vorab mußte eine Methodenentwicklung und Optimierung stattfinden, da die bisher verwendete HPLC-Methode ungeeignet ist für eine Kopplung an ein Massenspektrometer (Phosphat-Puffer im Fließmittel ca. 50 mmol). Dieser Puffer würde an der Nadel des MS auskristallisieren und starke Störungen der Spannung hervorrufen. So wurde die Pufferkonzentration im ersten Schritt der Methodenentwicklung auf ein Zehntel reduziert (5 mmol), wobei das Verhältnis Acetonitril und Puffer (23 : 77) gleich blieb. In den ersten Versuchen stellte sich jedoch heraus, daß dies Fließmittel mit dem Phosphat-Puffer keine starken MS-Signale ergibt. Der Grund dafür ist, daß der Puffer in der Gasphase verdampft, wobei die Phosphorsäure nicht verdampfbar ist. Dadurch entsteht ein Gasnebel, der alkalisch ist. Dies führt dazu, daß keine positiv geladenen Ionen gebildet werden können, die im MS bei diesem Modus (positiv) erfaßbar wären.

Die zweite, für diese Untersuchungen entwickelte Methode beinhaltete eine andere Fließmittelzusammensetzung: Acetonitril : 0.5 % Ameisensäure (20 : 80). Mit diesem Fließmittel ließen sich gute Trennungen erzeugen (Hauptpeak und Zersetzungspeaks), wobei bei diesem pufferfreien Fließmittel der große Vorteil war, daß die MS- Signale deutlich stärker und damit besser auswertbar waren.

Desweiteren mußte geprüft werden, ab welcher Spannung das Desmopressin im MS zerstört wird. Bei diesem Test wird jede Minute eine Probe in das MS gegeben (sogenannte Flowinjektion), wobei von Probe zu Probe die Fragmentorspannung um 50 V erhöht wurde. Da die mobile Phase einen sehr hohen Wasseranteil enthält, wurde die Temperatur des Trocknungsgases auf einen Wert von 350 °C gesetzt. Tiefere Temperaturen hätten zur Folge, daß die relativ hohe Wassermenge nicht mehr verdampft werden kann, so daß Wasser in der Spraykammer kondensieren würde. Das hätte wiederum zur Folge, daß die Isolatoren der Hochspannung ihren elektrischen Widerstand verlieren würden und somit die Spannung in der Spraykammer zusammenbrechen würde.

Abb. 2: Optimierung der Fragmentorspannung

Die Zahl hinter der Angabe MSD1 entspricht der Molaren Masse des detektierten Peak.

Die Abbildung zeigt eine Flow-Injektion aus einer Desmopressin-Probe mit den angelegten Fragmentorspannungen 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 und 400 V. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Signalstärke sehr stark von der eingestellten Fragmentorspannung abhängt.

Die obere Grenze für die anzulegende Spannung lag demnach bei 300 V, d.h. oberhalb einer Spannung von 250 V kommt es zu einer Fragmentierung des Peptides im MS. Solche überhöhten Spannungen können genutzt werden, um labile Bereiche des Moleküls zu erfassen, da es sein könnte, daß ähnliche Bruchstücke ebenfalls während der Lagerung entstehen.

Bei allen Proben wurde eine Spannung von 250 V und eine Fragmentorspannung von 325 V gewählt.

Eine relativ hohe Spannung von 250 V war notwendig, um das große Desmopressin-Molekül zu ionisieren.

Methodenparameter

Gerätekonfiguration

LC / MS -Gerät von Hewlett® Packard Series 1100 <2>

Ionisation Elektrospray, Modus: positiv, Scanbereich: Masse 50-1500

Fragmentorspannung am MS 250 V und 325 V (zur Fragmentierung)

Gas Temperatur 350 °C

Gasdruck 60 psi (entspricht $4,137 \cdot 10^5$ Pa)

Chromatographische Bedingungen:

Säule Phenomenex Prodigy ODS (3) RP 18, 5 µm, 100 Å, 250-4.6 mm
inkl. Vorsäule und Fritte

Säulentemperatur 40 °C ± 0.8 °C

Fließmittel Acetonitril : Ameisensäure 0.5 %
20 : 80

Wellenlänge 210 nm

Flow 1 ml / min

Detektion - DAD (Dioden-Array-Detector), Spektrum von 190 bis 400 nm
- MSD (Mass-Spectrum-Detector)

Injektionsvolumen 100 µl

Die verwendeten Reagenzien wiesen analytische Reinheit auf.

Untersuchte Proben:

Mit Hilfe der HPLC / MS-Kopplung wurden Proben aus der Langzeiteinlagerung (8 und 24 Wochen Lagerdauer) analysiert. Es wurden jedoch nur Polycarbophil-freie Proben untersucht, da erstens die HPLC-Chromatogramme der PCP-haltigen und – freien Proben sich bezüglich der Peakanzahl und deren Retentionszeiten nicht unterschieden und zweitens die Gegenwart von Polymeren zu gerätetechnischen Problemen führen könnte (Verkleben der Nadel). Außerdem würden durch die Fragmentierung Bruchstücke des Polycarbophil-Moleküls entstehen, die dann fälschlicherweise dem Desmopressin zugeordnet werden könnten.

Desweiteren ist eine Zersetzungskinetik von Desmopressin mit den Reagenzien Dithiothreitol (DTT) und Amberlyst 15 durchgeführt worden, wobei die quantitative und qualitative Bestimmung von Desmopressin und dessen Zersetzungsprodukten mittels HPLC / MS - Kopplung erfolgte.

Zur Aufklärung der Zersetzungsprodukte wurden folgende Parameter herangezogen:

<u>Parameter</u>	<u>Sinn</u>
MS - Spektren	Erfassung der Massen der Zusatzpeaks
Peak-Purity der MS-Peak	Reinheit des Signals (mehr Substanzen unter einem Peak ?)
Fragmentierung bei 325 V	Strukturinformationen durch Fragmente im MS-Spektrum

Vergleich der Chromatogramme aus beiden HPLC-Methoden:

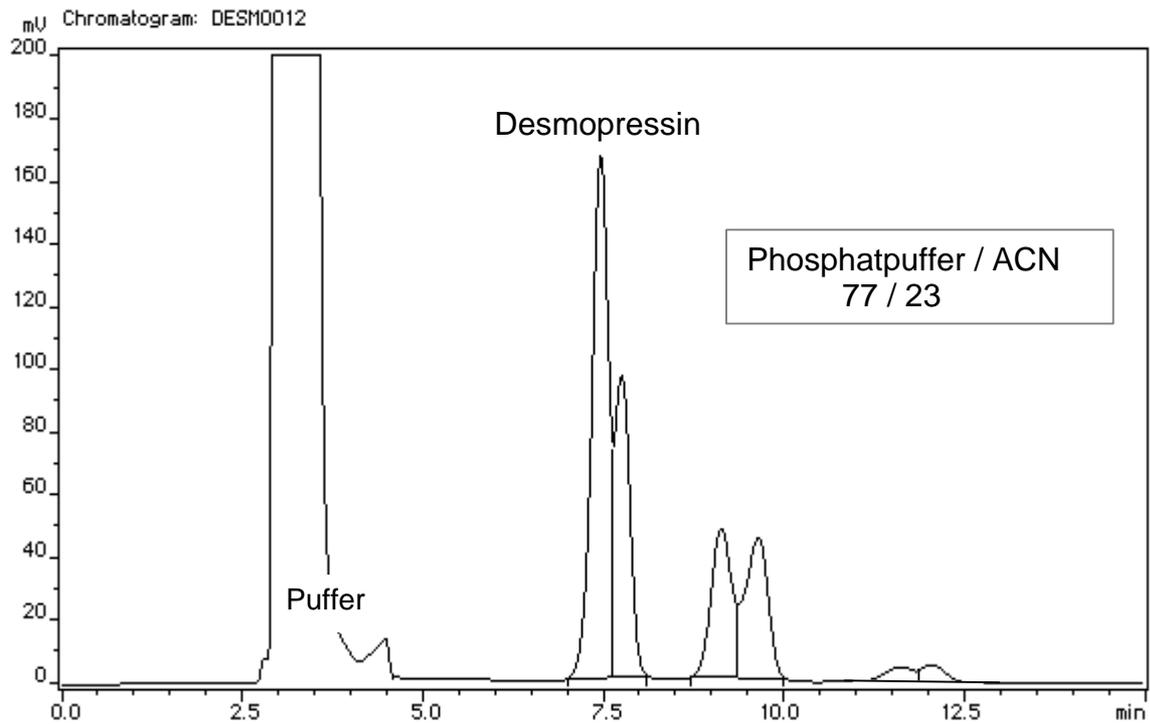


Abb. 3: Chromatogramm der **HPLC**-Methode

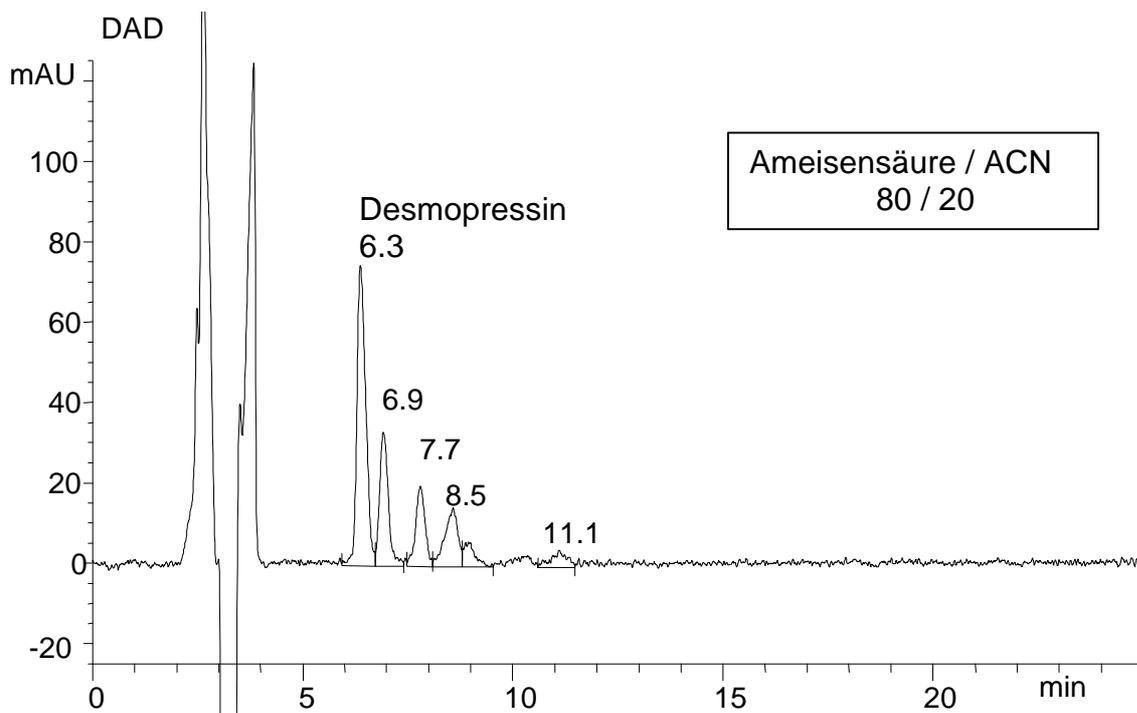


Abb. 4: Chromatogramm der **HPLC / MS** - Methode

Vergleich der Detektion mittels DAD und MSD:

1. DAD

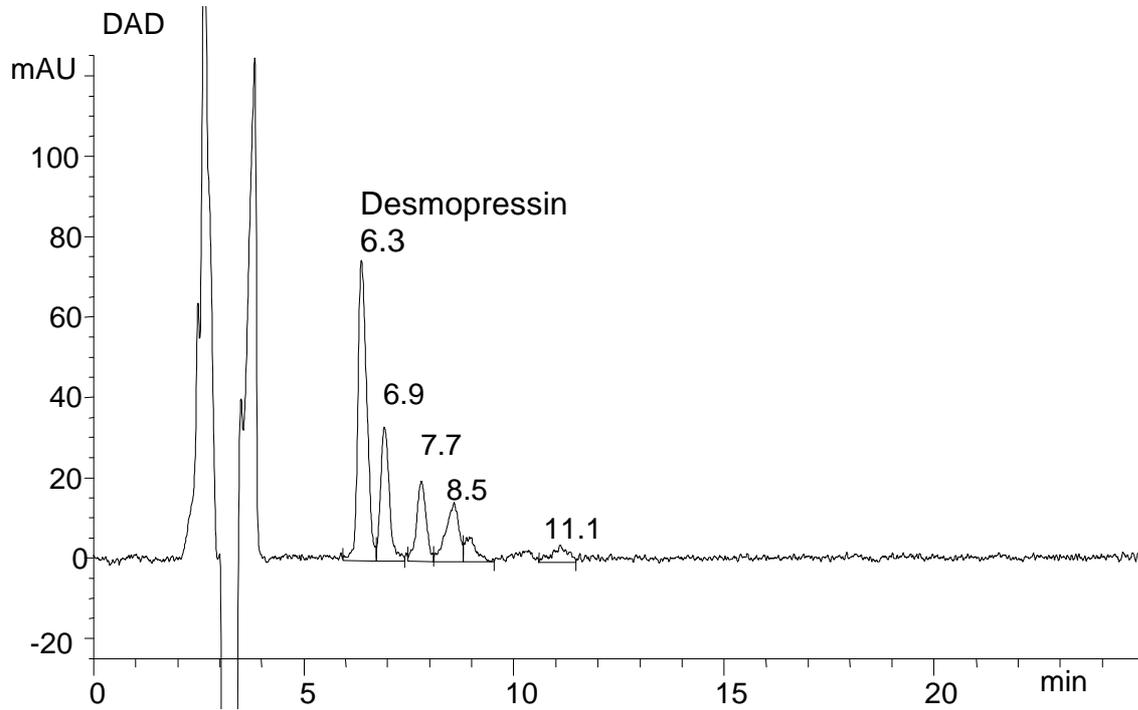


Abb. 5: Chromatogramm mittels **UV-Detektion**

2. MSD

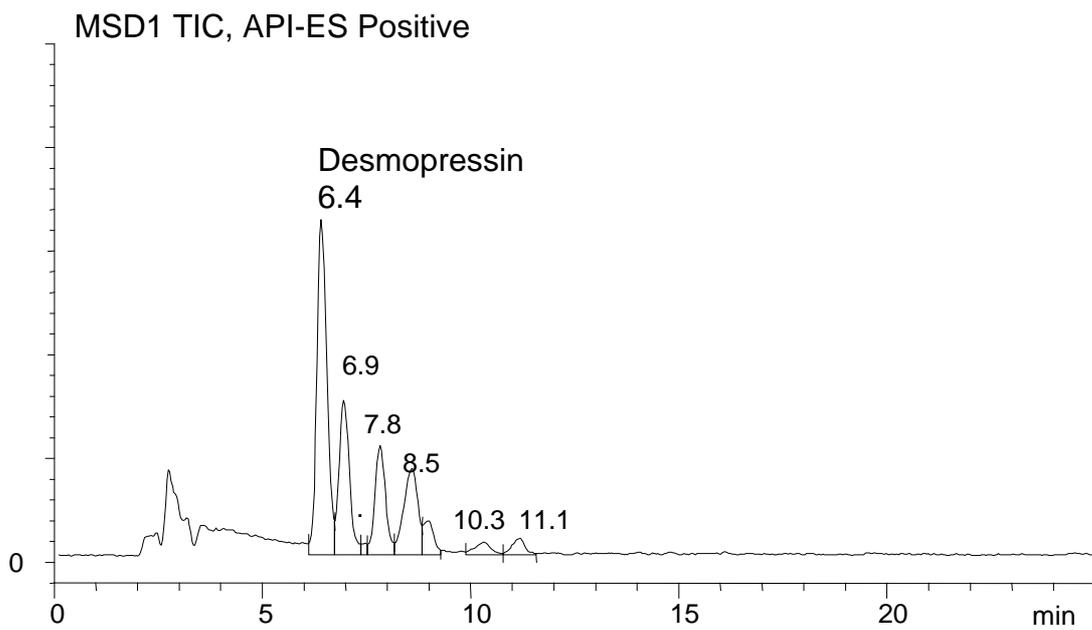


Abb. 6: Chromatogramm mittels **MS-Detektion**

Anhand der Abbildungen 3 und 4 ist zu erkennen, daß die Änderung der Fließmittelzusammensetzung zu der gleichen Anzahl an Peaks im Chromatogramm führt.

Die Retentionszeiten sind etwas nach vorne verschoben, was daran liegt, daß bei der HPLC / MS-Kopplung die Säule bei 40 °C temperiert wurde, während bei der reinen HPLC-Methode die Säule nicht temperiert wurde (Raumtemperatur). Die höhere Säulentemperatur wirkt sich demnach nicht negativ auf die Peaktrennung aus.

Im Vergleich der beiden Detektionsmöglichkeiten, UV- und MS-Detektion, ist zu erkennen, daß das Signal-Rausch-Verhältnis bei der MS-Detektion weitaus günstiger ist, d.h. weniger Basislinienrauschen beobachtet werden kann.

Desweiteren ist zu erkennen, daß im MS-Chromatogramm noch Substanzen detektiert werden konnten, die mittels UV-Detektion nicht erfaßt worden wären (Rt bei 10 und 11 Minuten; Peak bei ca. 11 Minuten mußte im UV-Chromatogramm von Hand integriert werden, sonst wäre er nicht erfaßt worden !).

Das bedeutet, daß die Nachweisgrenze bei der MS-Detektion im Vergleich zur UV-Detektion geringer ist, was für die Untersuchung von Zersetzungsprodukten und für die Spurenanalytik äußerst günstig ist.

Im folgenden sind die Abbildungen der MS-Spektren für jeden Peak dargestellt:

Anmerkung:

Die Ordinatenkalierung ist der entsprechenden Signalstärke angepaßt und der maximale Ausschlag als "Max:" in den MS-Spektren angegeben.

1. Peak bei Rt 6.4 min

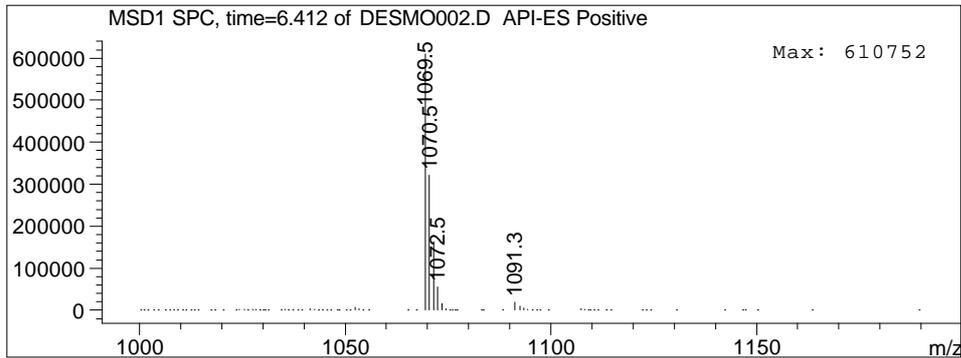


Abb. 7: MS-Spektrum vom Peak bei Rt 6.4 min

2. Peak bei Rt 7.0 min

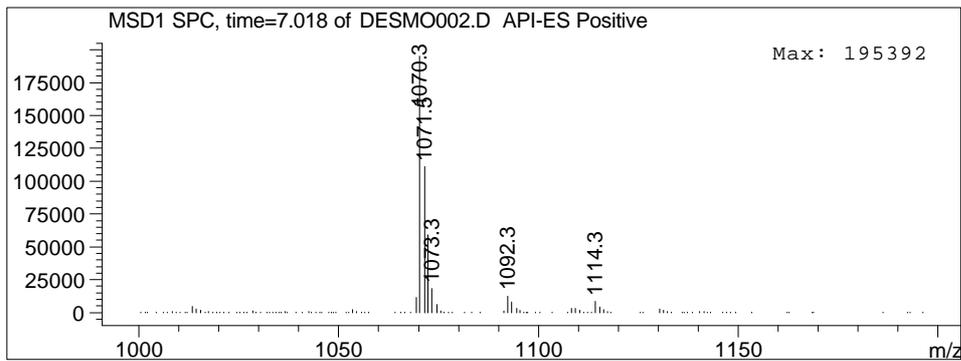


Abb. 8: MS-Spektrum vom Peak bei Rt 7.0 min

3. Peak bei 7.9 min

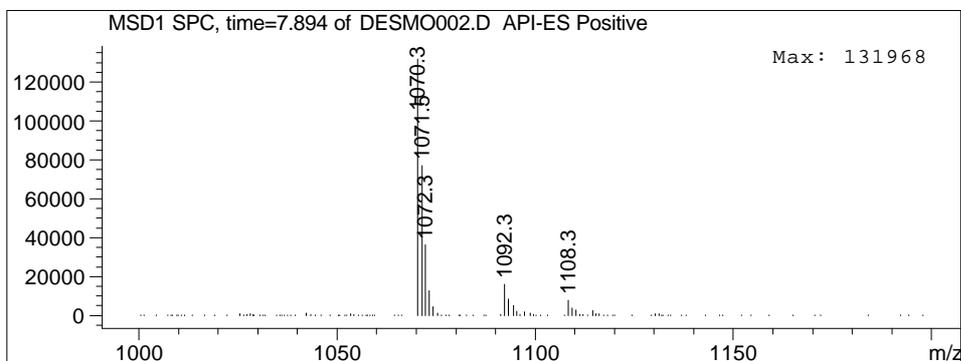


Abb. 9: MS-Spektrum vom Peak bei Rt 7.9 min

4. Peak bei Rt 8.7 min

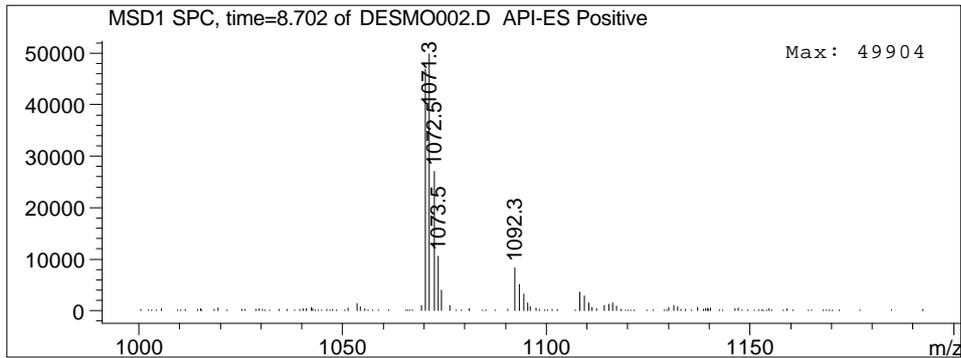


Abb. 10: MS-Spektrum vom Peak bei Rt 8.7 min

5. Peak bei Rt 9.0 min

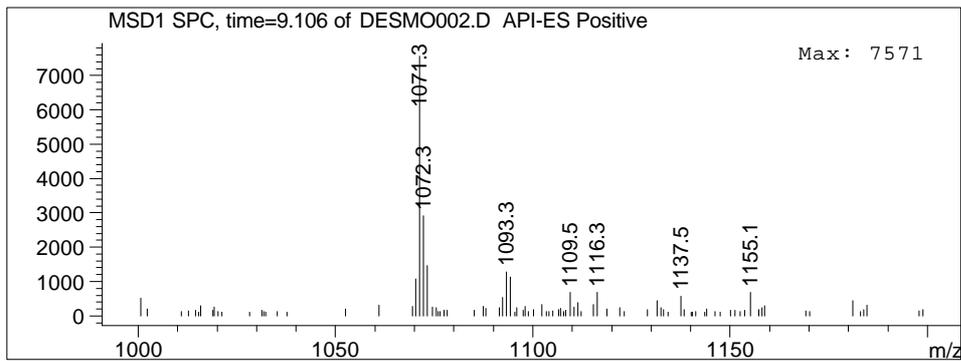


Abb. 11: MS-Spektrum vom Peak bei Rt 9.0 min

6. Peak bei 10.4 min

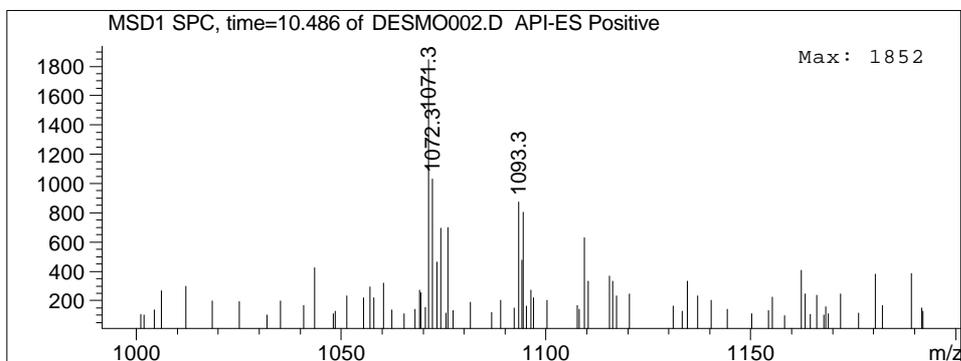


Abb. 12: MS-Spektrum vom Peak bei Rt 10.4 min

7. Peak bei 11.3 min

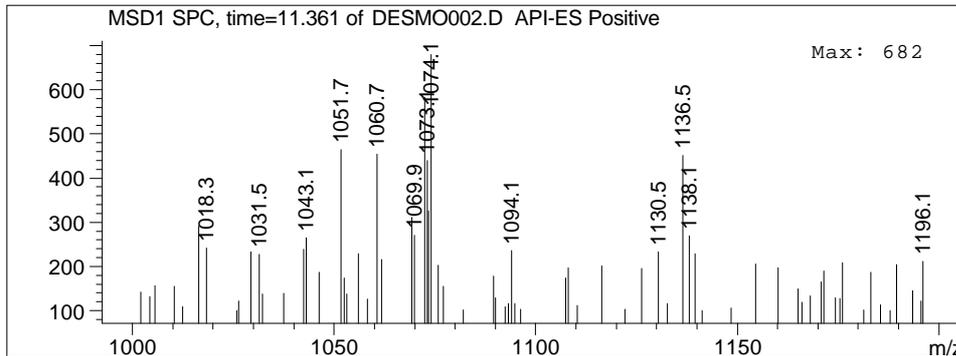


Abb. 13: MS-Spektrum vom Peak bei Rt 11.3 min

Es sind bei allen Hauptsignalen die entsprechenden Kohlenstoffisotope zu erkennen ($\Delta+1$, $\Delta+2$).

Der erste Peak bei Rt 6.4 trägt eine Masse von 1069.5 und ist dem Desmopressin zuzuordnen. Dies wurde auch mit Hilfe von Desmopressin Reinsubstanz bestätigt.

Eine weitere auftretende Masse von $\Delta +22$ entspricht dem Natriumaddukt der entsprechenden Substanz.

Folgende Massen sind neben der Desmopressin-Masse ermittelt worden:

<u>Masse</u>	<u>Rt</u>
1070.3	7.0
1070.3	7.9
1071.3	8.6
1071.3	9.0
1071.3	10.4
1072.3 *	11.3

* Die Masse des ^{13}C -Isotopes überlagert die Zahl 1072.3 in der Abbildung. Jedoch ist anhand des Natriumadduktes $\Delta+22$, hier 1094.1, zu ersehen, daß eine Hauptmasse von 1072 vorgelegen haben muß.

3.1.3 Spektralphotometrie

Die Spektralphotometrie diente im Rahmen dieser Arbeit zur Erstellung eines UV-Spektrums von Desmopressin und zur Optimierung der Detektionswellenlänge in der HPLC.

Es wurden die Absorptionen von Desmopressin-Lösungen verschiedener Konzentrationen bei drei verschiedenen Wellenlängen (200, 210 und 220 nm) gemessen, da in der Literatur für die verschiedenen HPLC-Methoden diese drei Wellenlängen angegeben wurden.

Eine Wellenlänge in diesem Größenordnungsbereich (< 230 nm) stellt immer einen Kompromiß im Signal-Rausch-Verhältnis dar. Die zu detektierende Substanz sollte bei der eingestellten Detektionswellenlänge ein möglichst großes Signal erzeugen, wobei Absorptionen, die von Fließ- oder Lösungsmitteln hervorgerufen werden, gering sein sollten.

Gerät	<3> Scan 190-400 nm, Scan speed 25 nm/min
Küvette	Quarzglas Schichtdicke 0.2 cm <4a>

Für die spektralanalytischen Untersuchungen wurde eine Küvette mit geringem Füllvolumen gewählt, da nur ein geringes Volumen (5 ml) an Desmopressin-Lösung hergestellt werden sollte (geringer Verbrauch an Desmopressin).

Desweiteren sollte die Kontaktfläche der desmopressinhaltigen Lösung mit der Glaswandung der Küvette möglichst klein sein, um das Ausmaß der Sorption von Desmopressin an die Oberfläche der Glaswand so gering wie möglich zu halten. Bei sehr gering konzentrierten Lösungen macht sich dann der prozentuale Wirkstoffverlust durch Absorption an die Glaswand stärker bemerkbar, als bei höherer Konzentration.

UV-Spektrum von Desmopressin

Konzentration 0.00812 % Desmopressin in destilliertem Wasser
Desmopressin Ch.B. UA 2545, Ferring Schweden

- Die Absorption von Desmopressin ist unterhalb 230 nm relativ groß.
- Es ist ein leichtes Maximum bei einer Wellenlänge von 275 nm zu erkennen, welches durch das Tyrosin im Desmopressin-Molekül hervorgerufen wird. Das Signal ist jedoch nicht ausreichend, um eine Detektion bei 275 nm in der HPLC zu ermöglichen. Die Desmopressin-Konzentration in den Proben müßte dann zu hoch sein.

Auf eine weitergehende Untersuchung bei einer Wellenlänge von 275 nm wurde deshalb verzichtet.

Spektralanalytische Messung von Desmopressin in destilliertem Wasser bei verschiedenen Wellenlängen:

DDAVP-Konzentration [%]	Wellenlänge [nm]		
	200	210	220
0.00135	0.148	0.080	n.d.
0.00270	0.315	0.142	0.068
0.00406	0.509	0.213	0.118
0.00812	0.965	0.405	0.241

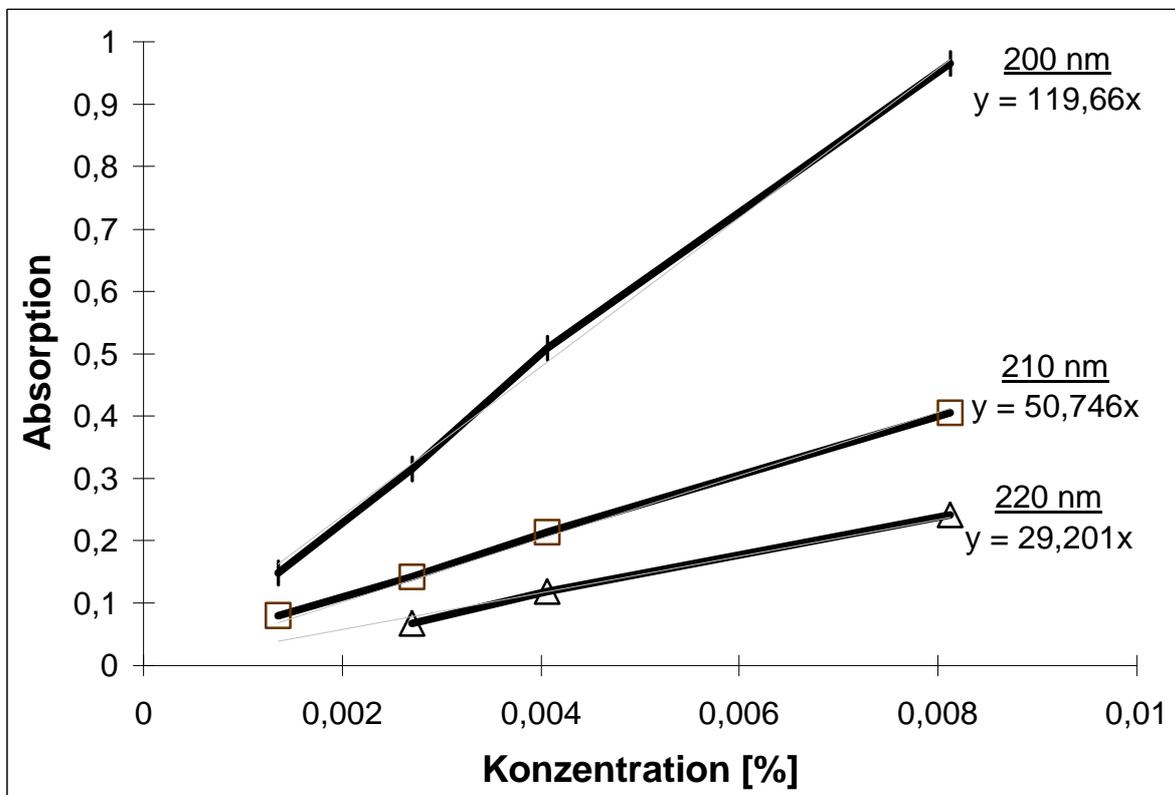


Abb. 14: Absorption von Desmopressin in destilliertem Wasser in Abhängigkeit der Wellenlänge ($d=0.2$ cm)

Spezifische Absorption [$100 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] von Desmopressin in destilliertem Wasser:

Wellenlänge [nm]	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>
Spezifische Absorption [$100 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	598	254	146

Wie zu erwarten, besitzt Desmopressin bei der geringsten Wellenlänge die größte Absorption. Bei 200 nm ist zwar das größte Absorptions-Signal zu erkennen, jedoch werden bei dieser Wellenlänge viele Substanzen in der Untersuchungslösung, auch solche, die sonst keine Absorption zeigen, ein Signal ergeben und somit die Interpretation des Ergebnisses erschweren. Das Grundrauschen ist bei dieser Wellenlänge sehr hoch.

Die Detektion bei einer Wellenlänge von 220 nm würde diese starke Grundabsorption verringern, jedoch ist die spezifische Absorption von Desmopressin dort sehr gering. Da im Rahmen dieser Arbeit mit sehr kleinen Desmopressin-Konzentrationen gearbeitet wurde (< 0.01 %), sollte die spezifische Absorption nicht zu gering sein.

Als optimaler Kompromiß im Signal-Rausch-Verhältnis scheint demnach die Detektion bei einer Wellenlänge von 210 nm zu sein.

Bei dieser Wellenlänge absorbieren die Peptidbindungen.

3.1.4 Wassergehaltsbestimmung

Die Ermittlung des Wassergehaltes ist für die Charakterisierung eines polymeren Hilfstoffes unerlässlich, da die Ausprägung bestimmter physikalischer Eigenschaften (Fließverhalten, Oberflächenspannung, Glasübergangstemperatur) von dem Wassergehalt abhängig ist.

Desweiteren kann die Stabilität eines Arzneistoffes von dem im System (Lyophilisat, Feste Dispersion) enthaltenen Wassergehalt abhängig sein.

Deshalb wurden unter anderem auch Proben aus der Langzeiteinlagerung bei verschiedenen Temperaturen und relativen Feuchten auf deren Wassergehalt geprüft.

Da das Desmopressin in nur sehr geringem Massen-Anteil in den Festen Dispersionen vorliegt und deshalb keinen Einfluß auf das Wasseraufnahmevermögen besitzt, wurde auf die Untersuchung von desmopressinhaltigen Festen Dispersionen verzichtet.

Es wurden die Wassergehalte von folgenden Proben bestimmt:

- Polycarbophil Ausgangssubstanz
- Lyophilisiertes Polycarbophil (P4 und P6)
- Desmopressin Ausgangssubstanz

Zur Ermittlung des Wassergehaltes in der Probe wurden folgende Methoden angewendet:

1. Trocknungswaage (3.1.4.1)
2. Thermogravimetrie (3.1.4.2)
3. Karl-Fischer-Titration (3.1.4.3)

3.1.4.1 Trocknungswaage

Mit Hilfe der Infrarot-Trockenwaage <5> wurde der Wassergehalt von Polycarbophil Ausgangssubstanz ermittelt.

Bei dieser Methode wurde die Probe mittels Infrarotlampe auf 110 °C erwärmt und gravimetrisch deren Gewichtsverlust gemessen. Es wurde der Wert nach einer bestimmten Zeit abgelesen, bei der keine Gewichtsänderung mehr detektiert werden konnte; diese Zeit ergab sich hier mit fünf Minuten.

Gerät <5>
Heiztemperatur: 110 °C
Heizdauer: 5 Minuten

Die Ermittlung der Feuchtigkeit [%] erfolgt nach folgender Gleichung und wird vom Gerät selber berechnet:

$$\text{Feuchtigkeit [\%]} = \frac{\text{Anfangsgewicht} - \text{Endgewicht}}{\text{Anfangsgewicht}} * 100$$

Die Messung der Restfeuchte erfolgte mit drei Polycarbophil-Proben [n=3].

3.1.4.2 Thermogravimetrie

Mit Hilfe der Thermogravimetrie wurde der Wassergehalt von gelagerten lyophilisierten Polycarbophil-Proben (P4, P6), Polycarbophil Ausgangssubstanz und Desmopressin Ausgangssubstanz ermittelt.

Es wurden zwei verschiedene Geräte verwendet:

Geräte 1. <6>
Temperatur 20-125 °C
Heizgeschwindigkeit 10 °C / min

Zunächst wurde der Wassergehalt von Desmopressin (Ch.B. UA2545) und Polycarbophil Ausgangssubstanz im Temperaturbereich 20 bis 125 °C bei 10 K*min⁻¹ ermittelt <6>.

Es wurden Untersuchungen an drei Desmopressin-Proben durchgeführt, wobei die zweite Messung derart starke Schwankungen aufwies, daß diese in der Auswertung unberücksichtigt blieb.

2. <7>
Temperaturbereich 30-300 °C
Heizgeschwindigkeit 20 °C / min

Die Ermittlung des Wassergehaltes mit dieser Methode ist nur dann verlässlich, wenn über einen Temperaturbereich (100 bis 150°C) die thermogravimetrische Kurve parallel zur Abzisse verläuft, so daß über diesen Bereich davon ausgegangen werden kann, daß kein signifikanter Masseverlust der Probe stattfindet.

Außerdem sollte die Gewichtsänderung einen deutlichen Sprung in der thermogravimetrischen Kurve zeigen (Abb. 54). Bei geringen Massendifferenzen (schleichender Gewichtsverlust) ergibt sich dieser Sprung nicht, da das Wasser schleichend aus der Probe entweicht (Abb. 53), wodurch die Interpretation des Ergebnisses sehr fraglich wird.

Die Ermittlung des Wassergehaltes erfolgte nach einer Konventionsmethode der Lilly Forschung GmbH, wo auch die Messungen mit Gerät <7> durchgeführt wurden:

Bei einer Temperatur von 100 °C wurde der Schnittpunkt mit der thermogravimetrischen Kurve ermittelt und das Lot zur Ordinate (Gewicht der Probe [%]) gefällt. Durch Differenzbildung zu 100 % (Ausgangsgewicht der Probe) wurde der prozentuale Wassergehalt errechnet.

Diese Vorgehensweise ist nicht unproblematisch und das Ergebnis ist nur dann korrekt interpretierbar, wenn die Kurve um den Bereich von 100 °C keine signifikante Änderung im Verlauf zeigt (Parallele zur x-Achse, Abb. 54).

Der Wassergehalt von Polycarbophil Ausgangssubstanz und von gelagerten Polycarbophil-Proben (Ausgangssubstanz und Lyophilisat) wurde später mit einer weiteren Methode parallel thermoanalytisch (Kapitel 3.1.5) und thermogravimetrisch bestimmt. Es sollte geprüft werden, ob der Wassergehalt in den Systemen abhängig ist von der Lagertemperatur, Lagerfeuchte und Lagerdauer. Desweiteren sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied im Wassergehalt bei Polycarbophil-Pulver (Ausgangssubstanz) und - Lyophilisat gibt. Zusätzlich sollte der Einfluß des pH-Wertes des Dispersionsmittels auf den Wassergehalt der Lyophilisate überprüft werden.

Faktoren, die einen Einfluß auf den Wassergehalt des festen Systemes (Pulver, Lyophilisat) ausüben könnten:

- pH des Dispersionsmediums vor Lyophilisation
- Lagerfeuchte
- Lagerdauer
- Lagertemperatur
- Pulver respektive Lyophilisat

Für diese Untersuchung wurden die Proben (P4, P6, PCP) bei 25 und 74 °C (11 und 30 % r.F.) für eine und für sechs Wochen eingelagert.

Die Untersuchung erfolgte jeweils an einer Probe (n=1).

Diese Proben wurden ebenfalls mittels Differenzkalorimetrie (3.1.5) untersucht.

3.1.4.3 Karl-Fischer-Titration

Die Karl-Fischer-Titration <8> diente zur Ermittlung des Wassergehaltes von Polycarbophil-Lyophilisaten (P4, P6), die bei unterschiedlichen Klimata im Rahmen der Langzeiteinlagerung gelagert wurden.

Vor jedem Meßtag wurde eine Titerbestimmung der Titrationslösung mit Hydranal®-Water Standard 10,0 mit jeweils n=5 Einwaagen durchgeführt.

Die Titerbestimmung erfolgte in Anlehnung an die Anweisung von Fa. Riedel-de Haën und wurde statt mit drei mit fünf Bestimmungen durchgeführt.

Desweiteren wurde die Drift (Verbrauch pro Minute), die allein durch das System und die Reagenzien hervorgerufen wird, bestimmt und in der Berechnung des Wassergehaltes berücksichtigt.

Im Titriergefäß wurden 30 ml Methanol reinst vorgelegt (Solventvorlage).

Die Einwaage <25> der Proben aus der Lagerung betrug etwa 20 mg (n=1 pro Probe).

Die Umgebungstemperatur während der Messungen lag zwischen 22 und 24 °C.

Die Titrationsdauer, bis zum Erreichen des Endpunktes (danach keine signifikante Änderung im Response) lag zwischen 5 und 10 Minuten.

Es wurde darauf geachtet, daß das Polymer in dem Solvent vollständig quoll, damit die gesamte Wassermenge erfaßbar wurde.

Desweiteren wurde beachtet, daß das Polycarbophil nicht die Elektrode verklebte und so das Ergebnis der Titration in Frage stellen würde.

Vor der Untersuchung der gelagerten Proben wurde der Wassergehalt von Polycarbophil-Lyophilisaten, hergestellt in Citrat- respektive Phosphatpuffer mit verschiedenen Einwaagen <25> zwischen 20 und 100 mg bestimmt (Voruntersuchung).

Errechnung des Netto-Verbrauches (NV):

$$\text{NV [ml]} = \text{Verbrauch [ml]} - \text{Drift [ml*min}^{-1}] * \text{Titrationsdauer bis zum Endpunkt [min]}$$

Der Wassergehalt (WG) wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{WG [\%]} = ((\text{NV [ml]} * 100 [\%]) / \text{Einwaage [mg]}) * \text{Titer [mg*ml}^{-1}]$$

Materialien:

1) Standard zur Titereinstellung Hydranal[®]-Water Standard 10,0

Artikel-Nr. 34849, Ch.B. 6352.0, Riedel-de Haën, D-Seelze

Laut Herstellerzertifikat (nach DIN 50049-2.3) enthalten 1 g Standard dieser Charge eine Wassermenge von 10.04 mg (Standardabweichung 0.01 mg, n=16, Volumetrische Bestimmung nach ISO 760).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur diese eine Charge Standard verwendet.

2) Titrationslösung Hydranal[®] –Composite 1

Artikel-Nr. 34827, Ch.B. 72440, Riedel-de Haën, D-Seelze

Ergebnisse aus der Titerbestimmung:

1. Tag: $\xi = 0,94 \pm 0,004$ (1 ml Titrationslösung entspr. 0,94 mg H₂O)

2. Tag: $\xi = 0,96 \pm 0,007$ (1 ml Titrationslösung entspr. 0,96 mg H₂O)

Ergebnisse aus der Driftbestimmung:

1. Tag: 0,0178 ml*min⁻¹

2. Tag: 0,0612 ml*min⁻¹

Ergebnisse [%] aus der Wassergehaltsbestimmung der Voruntersuchung:

Polycarbophil-Lyophilisat, hergestellt in pH 4.0: 4,64 ± 0,82 (n=4)

Polycarbophil-Lyophilisat, hergestellt in pH 6.8: 2,88 ± 0,95 (n=5)

Eine größere Einwaage führte zu einer höheren Response (Verbrauch Titrationslösung).

3.1.5 Dynamische Differenzkalorimetrie

Bei der Dynamischen Differenzkalorimetrie (nach DIN 51005), auch DSC genannt, wird der Wärmestrom zur Probe gemessen. Durch Integration des Wärmestromes über die Zeit erhält man den Wärmeumsatz oder die Enthalpieänderung einer Probe. Differenzkalorimetrische Messungen werden meist mit einem dynamischen Temperaturprogramm durchgeführt, mit dem ein interessierender Temperaturbereich durchlaufen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Polycarbophil-Proben untersucht, sowohl Lyophilisate als auch Pulver (Ausgangssubstanz). Zusätzlich wurden desmopressinhaltige Feste Dispersionen mit Polycarbophil aus der Langzeiteinlagerung (74 °C / 30 % r.F.) untersucht.

Mittels DSC-Untersuchungen sollte geprüft werden, ob sich das Polycarbophil durch folgende Faktoren bezüglich seiner physikalischen Eigenschaften, wie Glasübergangstemperatur und Schmelzverhalten verändert:

- Lyophilisat respektive Pulver
- pH-Wert des Dispersionsmediums vor Lyophilisation (Gegenwart von Puffersalzen im Lyophilisat)
- Lagertemperatur

Für diese Untersuchung wurden Polycarbophil-Lyophilisate hergestellt, wobei darauf geachtet wurde, daß zur Herstellung die gleichen Puffer (Dispersionsmittel) verwendet wurden, wie bei den Lyophilisaten in den Lagerungen (Citratpuffer pH 4.0 und Phosphatpuffer pH 6.8).

Die Lagerdauer von Polycarbophil-Pulver und –Lyophilisaten betrug 6 Wochen.

Folgende Proben wurden mit Hilfe der Differenzkalorimetrie untersucht:

- P4 und P6, gelagert
- DP4 und DP6, gelagert

- Verwendete Puffer (Citratpuffer pH 4.0 und Phosphatpuffer pH 6.8) als Lyophilisate
- PCP Ausgangssubstanz
- PCP Ausgangssubstanz, gelagert
- Lyophilisiertes Polycarbophil, in destilliertem Wasser dispergiert (ohne Puffersalze)

Gerät <9>

Temperaturbereich 30 – 300 °C

Heizgeschwindigkeit 20 °C / min

Aluminiumpfännchen mit Loch im Deckel, Durchmesser 0.8 cm

Die Einwaagen der Proben, jeweils etwa 2 mg, erfolgten auf der Waage <23>.

Vor Beginn der Messreihe wurde das Gerät kalibriert (mit Indium) und die Heizgeschwindigkeit so gewählt, daß das Meßsignal deutlich erkennbar und auswertbar war.

Desweiteren wurden vergleichende Untersuchungen mit geschlossenen Aluminiumpfännchen vorgenommen.

Diese Proben wurden ebenfalls mittels Thermogravimetrie (3.1.4.2) untersucht.

3.1.6 Rheologie

Die rheologischen Messungen wurden im Rahmen der Vorversuche durchgeführt und dienten zur Optimierung der Herstellungsmethode der Festen Dispersionen.

Es sollte überprüft werden, ob durch die Dispergierung mittels Ultra Turrax <14>, was einer sehr starken Scherung entspricht, das Polycarbophil strukturell zerstört wird, was sich in einer Änderung der rheologischen Eigenschaften äußern würde.

Während und nach der Dispergierung quillt Polycarbophil .

Es kann davon ausgegangen werden, daß bis zur maximalen Quellung des Systems noch Änderungen in den Fließkurven zu beobachten sind. Die Zeit, die das Polycarbophil bis zur vollständigen Quellung benötigt, sollte in der Herstellungsmethode der Festen Dispersionen berücksichtigt werden.

Daher wurden während der Quellung des Polycarbophils in den Puffersystemen Proben gezogen und untersucht.

Desweiteren dienten die Messungen zur Charakterisierung der rheologischen Eigenschaften von Polycarbophil-Dispersionen in Abhängigkeit des pH-Wertes des Dispersionsmediums.

Zusätzlich wurden die Dispersionen filtriert und der Filtrerrückstand untersucht, da davon auszugehen ist, daß bei höherer Flüssigkeitsaufnahme eine geringere Festigkeit des Filtrerrückstandes resultiert.

Die Messungen wurden mit 0.5 %igen Polycarbophil-Dispersionen durchgeführt.

Folgende Proben wurden untersucht:

- 1., 2. Polycarbophil-Dispersionen 0.5 %, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0, unter leichtem Rühren, bzw. unter starkem Dispergieren mittels Ultra Turrax
- 3., 4. Polycarbophil-Dispersionen 0.5 %, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8, unter leichtem Rühren, bzw. unter starkem Dispergieren mittels Ultra Turrax

Die Herstellung und die Quellung der Dispersionen erfolgte bei Raumtemperatur (22-24 °C).

Während der Quellungszeit wurden die Systeme verschlossen gehalten.

Gerät	<10>
Meßsysteme	<11>
Schergeschwindigkeiten	0.1 – 1000 [s ⁻¹] 100 [s ⁻¹] fix, bei Ermittlung der Quellungsdauer

Folgende Messungen wurden durchgeführt:

<u>Untersuchung</u>	<u>Ergebnis</u>
1. Abhängigkeit der Herstellung (Rühren vs. Dispergieren mit Ultra Turrax) - Filtrerrückstand -	Kein Unterschied in der Viskosität → keine Zerstörung des Polymers durch Herstellung mit Ultra Turrax
2. Viskosität der Dispersion in Abhängigkeit der Quellungsdauer	Abhängig vom pH-Wert → pH 4.0 keine Änderung → pH 6.8 Erhöhung der Viskosität während 24 h Quellungsdauer → nach 180 Min. keine Änderung → 180 Min. Quellungsdauer sind ausreichend
3. Viskosität des Filtrerrückstandes in Abhängigkeit des pH des Dispersionsmittels	Geringere Viskosität bei pH 6.8 → höherer pH (6.8) führt zur Erhöhung aufnehmbarer Flüssigkeitsmenge → bei pH 4.0 leichter zu filtrieren/zentrifugieren
4. Prüfung auf energetische Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten (Cox-Merz-Regel) - Filtrerrückstand -	siehe Ergebnisse Polycarbophil (Kapitel 4.1.2.4.1)
5. Viskosität einer 0.5 % Polycarbophil- Dispersion	siehe Ergebnisse Polycarbophil (Kapitel 4.1.2.4.2)

Im Folgenden sind die Graphiken aus den rheologischen Messungen (1.-3.) dargestellt :

3.1.6.1 Abhängigkeit der Viskosität von der Herstellungsweise

Zur Untersuchung auf mögliche strukturelle Veränderungen durch das starke Scheren mittels Ultra Turrax wurde der Filtrerrückstand einer Polycarbophil-Dispersion untersucht, da dieser aufgrund der höheren Viskosität mehr Aussagekraft besitzt, als die flüssige Dispersion.

Ultra Turrax
Rühren

Abb. 15: Viskositätskurve einer Polycarbophil-Dispersion pH 4.0, Filtrerrückstand
- Einfluß des Herstellungsverfahrens (Rühren versus Ultra Turrax) -

In der Graphik ist kein Unterschied in den Viskositätskurven zu erkennen. Das bedeutet, daß die Dispergierung mittels Ultra Turrax (Stufe 6) keine zerstörende Wirkung auf die Polymerketten ausübt.

3.1.6.2 Abhängigkeit der Viskosität von der Quellungsdauer

Zur Untersuchung der Quellungsdauer des Polycarbophils in den verschiedenen Puffern (pH 4.0 respektive 6.8) wurden die Dispersionen nach 0, 40, 100 bzw. 180 Minuten und 24 h untersucht.

Symbol	pH	Qt
	4.0	0min
		40
		100
		24 h
	6.8	0min
		40
		180
		20 h
		24 h

Abb. 16: Viskosität von Polycarbophil-Dispersionen 0,5 % (m/V) in Abhängigkeit von der Quellungsdauer (Qt), Schergeschwindigkeit 100 s^{-1}

Nach ca. 180 Minuten ist der Quellungsprozeß des Polycarbophils in beiden Puffer-Systemen (pH 4.0 und 6.8) abgeschlossen.

Deshalb ist es nicht notwendig, die Dispersionen, die in späteren Ansätzen das Peptid enthalten, länger als drei Stunden quellen zu lassen.

Das Peptid sollte eine möglichst kurze Zeit in der flüssigen Dispersion bei Raumtemperatur vorliegen, um Degradation während dieser Zeit zu verhindern.

Desweiteren ist in dieser Graphik zu erkennen, daß die Viskosität der Polycarbophil-Dispersion bei Herstellung in Phosphatpuffer pH 6.8 höher ist als bei Herstellung in Citratpuffer pH 4.0.

3.1.6.3 Abhängigkeit der Viskosität vom pH-Wert des Dispersionsmediums

Der pH-Wert des Dispersionsmediums spielt für die Quellungseigenschaften des Polycarbophils eine wichtige Rolle.

Bei vermehrter Flüssigkeitsaufnahme durch das Polycarbophil kann auch mehr Peptid in das quellende Gerüst eindringen, was eine wichtige Voraussetzung für mögliche Wechselwirkungen zwischen Peptid und Polymer ist.

Es wurde der Filtrerrückstand der Polycarbophil-Dispersionen untersucht, da er aufgrund der höheren Viskosität eher Unterschiede durch den pH-Wert erkennen läßt.

pH 4.0

pH 6.8

Abb. 17: Viskositätskurven der Filtrerrückstände von Polycarbophil-Dispersionen 0,5 % (m/V) - Einfluß des pH-Wertes des Dispersionsmediums -

Der Filtrerrückstand der Dispersion, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0, besitzt eine höhere Viskosität (ca. sechsfach) als der in Phosphatpuffer pH 6.8.

Daraus könnte der Rückschluß gezogen werden, daß die Aufnahmekapazität für Flüssigkeitsmengen von Polycarbophil, dispergiert in pH 6.8, deutlich höher ist, so daß das Filtrat eine geringere Viskosität besitzt, da mehr Flüssigkeit aufgenommen wurde.

Die Ergebnisse aus der Untersuchung zur Prüfung auf energetische Wechselwirkungen (Scher- und Schwingungsmessung) werden in Kapitel 4.1.2.4.1 beschrieben.

Die Daten aus der Untersuchung zur Viskosität einer 0.5 %igen Polycarbophil-Dispersion sind in Kapitel 4.1.2.4.2. dargestellt.

3.1.7 Mikroskopie

Mit Hilfe mikroskopischer Betrachtungen sollten die Partikelformen und -größen von Desmopressin und Polycarbophil untersucht werden.

Das Schmelzverhalten von Desmopressin wurde mittels Thermomikroskopie untersucht (Kapitel 3.1.7.1).

Proben - Desmopressin, Ch.B. UA2545
 - Polycarbophil

Gerät <12>
 Vergrößerungen 40, 100 und 400 fach

3.1.7.1 Thermomikroskopie

Diese Untersuchung sollte Aufschluß über Vorgänge, wie z.B. Verfärbung, während des Schmelzens von Desmopressin geben.

Probe Desmopressin, Ch.B. UA2545

Gerät <12> , Vergrößerungen 40, 100 und 400 fach

Heiztisch <13>

Heizgeschwindigkeit 3 °C / min, maximale Temperatur 250 °C

3.1.8 Löslichkeitsbestimmung von Polycarbophil

Zur Ermittlung des Lösungsverhaltens von Polycarbophil wurde dieses in verschiedenen organischen Lösungsmitteln sowie in wässrigen Systemen unterschiedlichen pH-Wertes dispergiert.

Materialien:

- Polycarbophil
- Ethanol, Ch.B. 742K02085683, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Methanol, Ch.B. 648K3453, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Essigsäure, Ch.B. 125K16250463, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Aceton, Ch.B. 133K16503114, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Toluol, Ch.B. 2222, Fa. Riedel-deHaën, D-Seelze
- Acetonitril, Ch.B. 261766, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Natronlauge, Ch.B. 7474966, Fa. Merck, D-Darmstadt

Vorgehensweise:

Ca. 10 mg Polycarbophil, genau gewogen <25>, wurden in einem Glasvial (5 ml) mit 1 ml des entsprechenden Lösungsmittels versetzt, geschüttelt und 24 h bei Raumtemperatur und geschlossenem Gefäß stehengelassen.

3.2. Herstellung von Lyophilisaten und Festen Dispersionen

In der Literatur [Chiou und Riegelmann, 1971; Ford, 1986] ist eine Reihe von Herstellungsmethoden für Feste Dispersionen beschrieben worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte jedoch eine andere, sehr empfindliche Wirkstoffgruppe, Peptide, eingebettet werden, so daß hinsichtlich der Auswahl der Herstellungsmethode nur wenig Möglichkeiten zur Verfügung standen. Dies hat folgende Gründe:

1. Peptide sind temperaturempfindlich, so daß die Schmelzmethode nicht in Frage käme. Deshalb kann die Entfernung des Lösungsmittels nur über eine Gefriertrocknung erfolgen.
2. Es liegen nur geringste Mengen des Wirkstoffes vor.
3. Das in dieser Arbeit verwendete Polymer besitzt grundlegend andere Eigenschaften als z.B. Polyethylenglykole, die üblicherweise in Festen Dispersionen verwendet werden.
4. Es sollten rein wässrige Systeme hergestellt werden, da in Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten gearbeitet und deren Einfluß auf die Stabilität von Desmopressin untersucht werden sollte.

In der Literatur sind bisher keine Arbeiten zu Festen Dispersionen dieser Art veröffentlicht worden. Außerdem wurde Polycarbophil relativ selten in der pharmazeutischen Entwicklung verwendet.

Es konnte demnach nicht auf die üblichen Herstellungstechniken der Festen Dispersionen zurückgegriffen werden, sondern es mußte eine neue Methode entwickelt werden, die sowohl für das Peptid als auch für das Polymer geeignet ist.

Die sehr geringe zur Verfügung stehende Menge des zu untersuchenden Peptides schloss eine umfangreiche Methodenentwicklung mit dem Wirkstoff aus.

Deshalb wurden grundlegende Untersuchungen zur Entwicklung einer Herstellungsmethode der Festen Dispersionen zunächst mit der Aminosäure Tyrosin als Modellsubstanz durchgeführt.

Folgende Parameter wurden im Rahmen der Methodenentwicklung variiert:

- Polycarbophil-Konzentration (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.35, 0.5 %)
- Herstellungsmethode (Rühren vs. Dispergieren, Reihenfolge der Zugabe von Polycarbophil)
- Inkubationszeit
- Abtrennung des Polycarbophils (Filtration, Zentrifugation)
- Quantitative Bestimmung von Tyrosin mittels UV-Spektrometrie und HPLC

Dazu wurden physikalisch-chemische Eigenschaften von Tyrosin ermittelt (Sättigungslöslichkeit und spezifische Absorption in Lösungen mit verschiedenen pH-Werten und in demineralisiertem Wasser).

Ergebnis der physikalischen Charakterisierung von **Tyrosin** :

Lösungsmittel	Sättigungslöslichkeit (22 °C) [g * 100 ml ⁻¹]	Spez. Absorption 275 nm [100 ml * g ⁻¹ * cm ⁻¹]
Dem. Wasser (gem.pH 6.8)	0.046 ± 0.00023	70.24
Citratpuffer pH 4.0	0.049 ± 0.00013	73.06
Phosphatpuffer pH 6.8	0.053 ± 0.00046	69.53
Phosphatpuffer pH 5.5 *	0.048 ± 0.00006	70.33

* pH-Wert nah am isoelektrischen Punkt des Tyrosins (pH_i=5.6). Dieser Puffer wurde bei den Desmopressin-haltigen Systemen nicht verwendet, sondern nur die Puffer mit pH-Werten 4.0 und 6.8.

Die Auswahl der optimalen Herstellungsweise und der geeigneten Konzentration an Polycarbophil erfolgte nach folgenden Aspekten:

1. Die Konzentration an Polycarbophil soll dafür ausreichend sein, daß es zur Ausbildung eines kohärenten Gerüsts kommt, in dem sich der Wirkstoff verteilen kann. Der Konzentration war jedoch nach oben eine Grenze gesetzt, da ansonsten keine Abtrennung des Polymers möglich wäre (Filtration und Zentrifugation wurden ab einer PCP-Konzentration von 0.35 % extrem erschwert und waren mit den üblichen Abtrennungsmethoden nicht mehr zu handhaben). Eine Polycarbophil-Konzentration von 0.25 % scheint optimal zu sein. Diese Polymerkonzentration wurde auch in der Literatur [Lueßen et al., 1996] für Permeationsuntersuchungen (in-situ, in-vitro) angewendet.
2. Das Polymer sollte gleichmäßig in dem Puffer dispergiert werden. Zur Verteilung des Polycarbophils wurde die Dispergierung mittels Ultra Turrax bevorzugt, da es zu einer guten Verteilung des Polymers führte, während unter Rühren zum Teil Klümpchen erhalten wurden.
3. Bei der Auswahl der Reihenfolge der Zugabe des Polymers wurde danach entschieden, welche Methode zur zügigsten Gleichgewichtseinstellung des Gesamtsystems führte. Wurde beispielsweise das Tyrosin erst nach der Dispergierung des Polycarbophils hinzugefügt, so kam es zu einer Verringerung der Löslichkeit des Tyrosins und die Gleichgewichtseinstellung war vergleichsweise verzögert.
Es sollte jedoch beachtet werden, daß dieses Ergebnis nur bedingt auf Desmopressin übertragbar ist, da sich das Peptid sehr viel besser in wässrigen Systemen löst, als das Tyrosin.
4. Ab einer Polymerkonzentration > 0.1 % wurden die Dispersionen schwerer zu filtrieren, da sich ab dieser Konzentration die Gelbildung des Polycarbophils bemerkbar machte. Es wurden eine große Anzahl verschiedenster Filtertypen (Porengröße, Filtermaterial, Filtergröße) getestet, mit dem Ergebnis, daß es keinen geeigneten Filtertyp gab. Außerdem liegt der Desmopressin-Verlust durch Sorption bei ca. 30 %, wenn die desmopressinhaltige Lösung durch einen Filter zwecks Probenaufbereitung gegeben wird (untersuchter Filtertyp: Millipore, 0.2 µm mittlere Porengröße, Regenerierte Cellulose). Die Abtrennung des Polycarbophils war dagegen mit Hilfe der Zentrifugation $<17>$ (3000 UpM, 15

Minuten) problemlos möglich. Auch ist bei der Zentrifugation ein Wirkstoff-Verlust durch Sorption nahezu auszuschließen.

Bei der Auswahl der geeigneten Herstellungsweise sollte beachtet werden, daß die Ergebnisse, die mit Tyrosin erzielt wurden, teilweise nicht direkt auf Desmopressin übertragen werden können, da die Lösungseigenschaften des Desmopressins deutlich anders sind: es löst sich spontan in wässrigem Milieu unterschiedlichen pH-Wertes.

Diese Vorversuche waren jedoch für die Beurteilung der Handhabung von Polycarbophil zur Herstellung von Festen Dispersionen und für die Ermittlung der einzusetzenden Polycarbophil-Konzentration sehr wichtig.

Die aus diesen Vorversuchen erhaltene Herstellungsweise konnte problemlos auf Desmopressin-haltige Systeme übertragen werden.

Herstellung der Desmopressin-haltigen Lyophilisate und Festen Dispersionen:

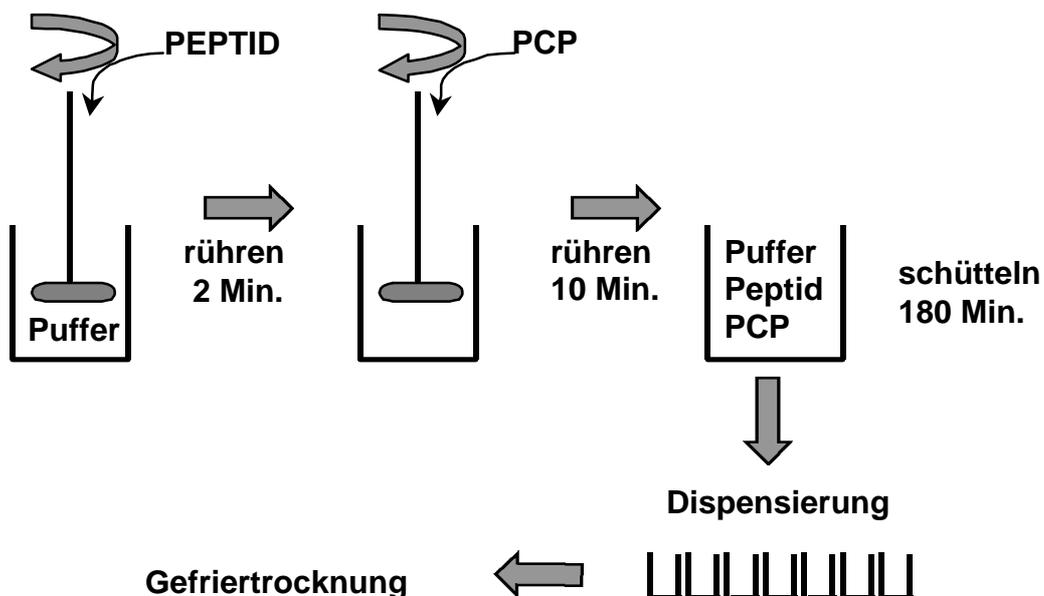


Abb. 18: Herstellungsweise der Lyophilisate und Festen Dispersionen

Die Polycarbophil-freien Systeme (Lyophilisate) wurden in analoger Weise hergestellt, nur daß kein Polycarbophil zugefügt wurde.

Bei der Gefriertrocknung <16> wurde darauf geachtet, daß die Proben möglichst schnell einfroren. Dies wurde durch eine Vorkühlung der Kontaktplatte im Gefriertrockner auf - 40 °C und durch eine geringe Füllhöhe (ca. 1 cm) in den Probenvials gewährleistet.

Der Gefriertrocknungsprozeß der Proben (Lyophilisate und Feste Dispersionen) für die Langzeiteinlagerung (24 Wochen) wurde mit Hilfe eines Meßwertscanners (Typ LSB36-III V5.K, Fa. Linseis) aufgezeichnet. Dabei wurden die Temperaturen von Kontaktplatte, Kondensator und der Festen Dispersionen verfolgt.

3.3. Sorption von Desmopressin an Oberflächen

Während der Herstellung und der Analytik kommt ein Arzneistoff mit einer Reihe von Oberflächen in Kontakt. Peptide können mit diesen Oberflächen Wechselwirkungen eingehen, was mit einer Verringerung der Peptid-Konzentration in der Lösung einhergeht.

Horbett (1992) beschreibt die Ursachen für die Adsorptionsneigung von Proteinen und Peptiden und schätzt das Ausmaß der Adsorption ab. Desweiteren wird in der Literatur [Law et al.(1999),Duncan et al. (1995)] der Einfluß von oberflächenaktiven Substanzen auf die Adsorption von Peptiden gezeigt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Ausmaß der Adsorption von Desmopressin an Oberflächen von Glas und Polypropylen untersucht werden. Zusätzlich wurde der Einfluß von Bovinem Serum Albumin (BSA) auf das Ausmaß des Desmopressinverlustes durch Adsorption untersucht.

Desmopressin und dessen Formulierungen stehen vor allem mit Oberflächen von vials für die HPLC-Analytik und während der Lagerung in Kontakt. Aus diesem Grund wurde die Sorptionsuntersuchung mit vials dieser Art durchgeführt. Außerdem ist es von Vorteil, die Adsorptions-Versuche in den Gefäßen durchzuführen, in denen auch die Probe direkt zur Analyse gezogen werden kann.

Material:

- Desmopressin , Ch.B. UA2545
- Bovine Serum Albumin, Fraktion V, Ch.B. 02933, Serva, D-Heidelberg
- Einmalpipetten 1 ml, LDPE, Artikel 747755, Plastibrand[®], Brand, D-Wertheim

Vials:

- Glas, Braunglasvials, Hydrolytische Klasse I, Typ 70214, Macherey & Nagel, D-Düren <18>
Oberfläche: 9.61 cm²
- Polypropylen (PP), Typ SR 78843-PM, Internationale Chemie Technik (ICT), D-Bad Homburg <19>
Oberfläche: 6.44 cm²

Vorgehensweise:

1. Einwaage von Desmopressin und überführen in Glas- respektive PP-vials
2. Zugabe des Lösungsmittels (destilliertes Wasser respektive BSA-Lösung)
3. Leichtes Schütteln für 15 Minuten
4. Injektion in das HPLC-System direkt aus dem vial
5. Nach der Analyse wurde das restliche Volumen in das nächste vial pipettiert (vial: 1-6)

Wiederholung der Schritte 3.-5., so daß insgesamt eine Oberfläche von sechs vials für die Adsorption zur Verfügung stand.

Die Sorptionsuntersuchung erfolgte bei Raumtemperatur (22-24 °C).

Anzahl an Wiederholungen: n=3

Die Desmopressin-Lösungen wiesen vor der Untersuchung eine Konzentration im Bereich von 0.01 und 0.04 % auf.

Der Einfluß von BSA wurde in 0.01 und 0.1 %igen Lösungen untersucht, indem das Desmopressin den BSA-Lösungen zugefügt wurde (Konzentration an Desmopressin ebenfalls im Bereich 0.01 und 0.04 %).

Die quantitative Bestimmung von Desmopressin erfolgte mit der validierten HPLC-Methode (Kapitel 3.1.1).

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes TOCCATA <S2> durchgeführt.

3.4. Einlagerung von Lyophilisaten und Festen Dispersionen

3.4.1 Lagerbedingungen

Die klimatischen Bedingungen setzen sich aus der Temperatur und der relativen Feuchte zusammen.

Die relativen Feuchten wurden mit Hilfe von gesättigten Salzlösungen in fest verschließbaren Hygrostatengefäßen nach Einstellung eines Gleichgewichtes erreicht. Nyquist (1983) und Stahl (1980) fassten Angaben zur relativen Feuchte in Abhängigkeit von der Temperatur zusammen.

Die Temperaturen wurden in verschiedenen Wärmeschränken <20, 21>, in denen die Hygrostatengefäße lagerten, eingestellt.

Die Hygrostatensalze wurden so gewählt, daß eine möglichst geringe Änderung der relativen Feuchte in Abhängigkeit der Temperatur gewährleistet war.

Materialien:

- Lithiumchlorid Artikel Nr. 5675, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Magnesiumbromid Artikel Nr. 02118, Fa. Riedel-de Haën, D-Seelze
- Probengefäße: Braunglasvials 1 ml <18>

Salz	Relative Feuchte [%]				
	Temperatur [°C]				
	25*	50*	58	66	74
LiCl	11.6 ±0.5	11.2±0.2	11.0±0.3⁺	10.9±0.3⁺	10.6±0.4⁺
MgBr ₂ * 6 H ₂ O	30.7 ±0.2	29.7±0.2	29.8	29.7	29.6

* Literaturangaben nach Stahl (1980)

⁺ Angabe nach NBS, USA-Washington [69]

Lagerart: offene Lagerung

Die Überprüfung der relativen Feuchte und der Temperatur in den Hygrostatengefäßen erfolgte mit Hilfe eines Feuchte- und Temperaturfühlers <22>.

Der Feuchtefühler wurde vor der Untersuchung mit Hilfe von speziellen Kalibriertabletten, die verschiedene relative Feuchten erzeugen (Artikel Nr. SAL-11, SAL-33 und SAL-53, Fa. Schulz Electronic, D-Höhenkirchen), kalibriert. Dabei zeigte sich, daß das Gerät sich nicht mehr auf den angegebenen Wert des Kalibriersalzes regulieren ließ, so daß der einstellbare Wert als der wahre Wert der entsprechenden Feuchte nach Kalibrierung angenommen wurde. Dies wurde bei der Bestimmung der relativen Feuchten in den Hygrostaten berücksichtigt.

Die Proben wurden erst nach Erreichen eines Temperatur- und Feuchte-Gleichgewichtes in die Hygrostatengefäße gegeben.

Es wurde darauf geachtet, daß das Klima innerhalb des Hygrostaten bei der Probenentnahme nicht zu stark beeinträchtigt wurde.

3.4.2 Ermittlung der maximalen relativen Feuchte für die Einlagerung der Lyophilisate und Festen Dispersionen

Die Feste Dispersion muß während der Lagerung ihren festen Aggregatzustand beibehalten.

Da die Festen Dispersionen durch Gefriertrocknung hergestellt wurden, demnach Lyophilisate darstellen, besitzen diese hygroskopische Eigenschaften. Deshalb ist die relative Feuchte bei der Lagerung nach oben begrenzt.

Materialien:

- Lithiumchlorid Artikel Nr. 5675, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Magnesiumbromid Artikel Nr. 02118, Fa. Riedel-de Haën, D-Seelze
- Magnesiumchlorid Artikel Nr. 5833, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Natriumjodid Artikel Nr. 6520, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Kaliumcarbonat Artikel Nr. 4928, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Magnesiumnitrat Artikel Nr. 5854, Fa. Merck, D-Darmstadt
- Kaliumbromid Artikel Nr. 4900, Fa. Merck, D-Darmstadt

Proben:	Polycarbophil-Lyophilisate, hergestellt in pH 6.8 (P6)
Lagergefäß:	Schepky-Gefäß, [78]
Temperaturen:	25 und 40 °C (Wärmeschrank <20, 21>)
Lagerdauer:	19 Tage

Tab. 1: Gemessene <22> relative Feuchten verschiedener gesättigter Salzlösungen bei 25 und 40 °C

Salz	<u>r.F. [%]</u>	
	25 °C	40 °C
LiCl	11,6	11,3
MgBr ₂	30,0	30,0
MgCl ₂	33,0	31,6
NaJ	38,0	32,5
K ₂ CO ₃	44,0	43,4
Mg(NO ₃) ₂	52,8	48,4
KBr	80,9	79,5

Die Abschätzung der maximalen Lagerfeuchte wurde in zwei Schritten durchgeführt:

1. Grober Feuchtebereich von 30, 50 und 80 % r.F..
2. Aufgrund des erhaltenen Ergebnisses aus 1. Feinabstufung in den relativen Feuchten von 11, 30, 33, 38 und 44 % r.F..

Die Einwaage <26> an Polycarbophil-Lyophilisat betrug ca. 100 mg.

Eine detaillierte Auswertung der prozentual aufgenommenen Wassermengen in Abhängigkeit der relativen Feuchte findet sich in Kapitel 4.1.3.1.

Ergebnisse:

1. Untersuchung (30, 50 und 80 % r.F.)

- Die aufgenommene Wassermenge ist abhängig von der relativen Feuchte und der Temperatur während der Lagerung.
- Bei 25 °C und 50 und 80 % r.F. wird die Konsistenz pastös-flüssig, wobei dieses Phänomen bei der höheren Lagertemperatur (40 °C) noch stärker ausgeprägt ist.

2. Untersuchung (11, 30, 33, 38 und 44 % r.F.)

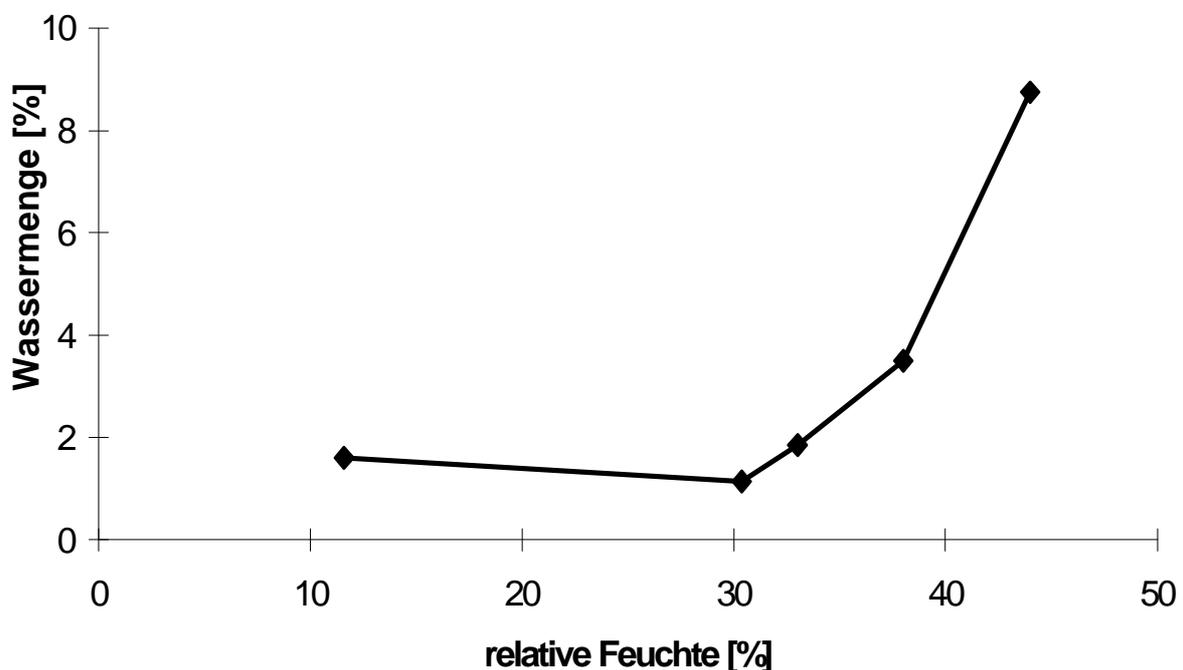


Abb. 19: Prozentual aufgenommene Wassermenge in Abhängigkeit der relativen Feuchte - Lagertemperatur 25 °C -

- Ab 30 % r.F. steigt die aufgenommene Wassermenge steil an. Die prozentual aufgenommene Wassermenge ist dann proportional zur eingestellten relativen Feuchte.
- Zwischen 11 und 30 % r.F. besteht kein Unterschied in der aufgenommenen Wassermenge.
- Die aufgenommene Wassermenge bleibt bei 25 °C und ≤ 33 % r.F. unter 2 %. Bei Erhöhung der Temperatur auf 40 °C steigt jedoch die Wasseraufnahme zwischen den Lagerfeuchten von 30 % bis 31.6 % sehr drastisch auf 17 % an.
- Bei 44 % r.F. und 25 °C wurde das System pastös.

→ Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse aus beiden Untersuchungen sollte eine **relative Feuchte** von **maximal 30 %** während der Lagerung nicht überschritten werden.

Bei einer höheren Feuchte als 30 % kann nicht garantiert werden, daß der physikalische Zustand der Formulierung während der Lagerung unverändert bleibt. Außerdem ist zu bedenken, daß noch höhere Temperaturen als 40 °C während der Stabilitätsuntersuchung (Streßtest bis 74 °C, siehe Kapitel 3.4.1) der Festen Dispersionen und Lyophilisate eingestellt werden, so daß sich der Einfluß der Feuchte noch stärker bemerkbar macht.

3.4.3 Einlagerung von Lyophilisaten und Festen Dispersionen bei 50 °C / 30 % r.F. über 12 Wochen

In einem Vorversuch über drei Monate (12 Wochen) bei 50 °C / 30 % r.F. sollten erste Erfahrungen über die Stabilität von Desmopressin in Lyophilisaten und Festen Dispersionen gemacht werden. Außerdem sollte geprüft werden, ob bei Auftreten von Zersetzungsprodukten die etablierte HPLC-Methode geeignet ist, um eine zufriedenstellende Peaktrennung zu ermöglichen. Es wurde eine andere Desmopressin-Charge verwendet als bei dem Hauptversuch, so daß auch ein Vergleich zweier Desmopressin-Chargen möglich wurde.

Material:	- Desmopressin Ch.B. UA 2545
	- Polycarbophil
	- Citratpuffer pH 4.0 Pharm.Eur.
	- Phosphatpuffer pH 6.8 Pharm. Eur.
Untersuchte Systeme:	- D4, DP4, D6, DP6, P4, P6
	- Desmopressin-Reinsubstanz
Lagerbedingungen:	- 50 °C / 30 % r.F.
	- offene Lagerung in Braunglasvials
	- Klimagefäß mit gesättigter Magnesiumbromid-Hexahydrat-Lösung
	- -20 °C (Gefrierfach im Laborkühlschrank, geschlossene Lagerung in Braunglasvials)
Ansatzvolumen:	10 ml (Braunglas-Schraubdeckelgefäß)
	Dispensierung auf Braunglasvials mit je 1000 µl

Konzentrationen:

- ca. 0.01 % DDAVP
- ca. 0.04 (I. vial) und 0.05 (II. vial) % bei DDAVP-Reinsubstanz
- ca. 0.25 % PCP

Probenzug:

- t_0 , 1, 2, 4, 8 und 12 Wochen
- je ein vial mit je n=3 Einspritzungen

Ergebnisse des Vorversuches:

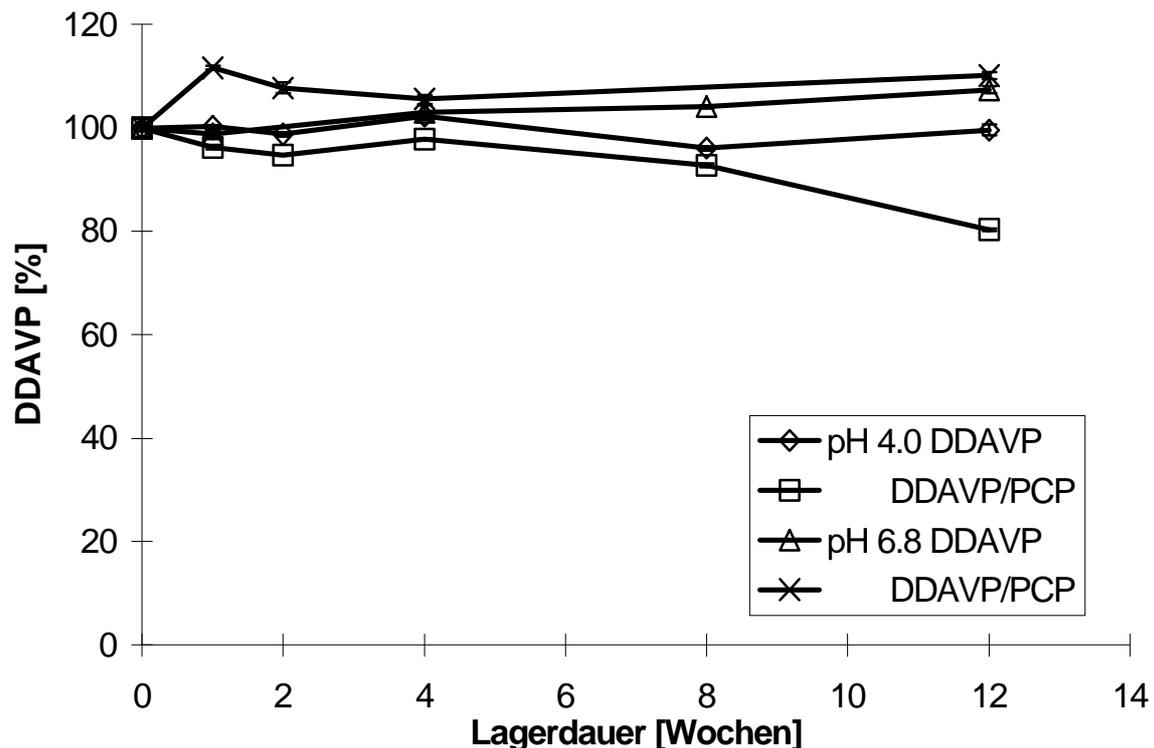


Abb. 20: Stabilität von Desmopressin in Lyophilisaten (DDAVP) und Festen Dispersionen (DDAVP/PCP) bei 50 °C / 30 % r.F. – Vorversuch –

- Mit Hilfe des Statistik-Programmes TOCCATA <S2> wurde geprüft, ob ein signifikanter Abfall im Desmopressin-Gehalt nachweisbar ist. Nur bei den Festen Dispersionen, hergestellt in pH 4.0 und gelagert bei 50 °C / 30 % r.F., konnte eine signifikante Verringerung des Desmopressin-Gehaltes über die Zeit nachgewiesen werden. Die anderen Systeme zeigten bei beiden Temperaturen (50 und – 20 °C) keinen signifikanten Abfall im Desmopressin-Gehalt.
- Es ist ein Zusatzpeak bei ca. 9.5 Minuten (ca. 2 Minuten nach dem Desmopressin-Peak) detektierbar. Dieser trat bei Systemen, die in pH 4.0

hergestellt wurden, bei 50 °C Lagertemperatur bereits nach einer Woche, bei Systemen, die in pH 6.8 hergestellt wurden, erst nach vier Wochen Lagerung auf. Der Zusatzpeak ist im Chromatogramm zufriedenstellend vom Desmopressin-Peak abgetrennt, so daß keine Änderungen im chromatographischen Verfahren notwendig wurden.

- Die erhaltenen Flächenwerte für Desmopressin sind in Gegenwart von Polycarbophil geringer als bei den Polycarbophil-freien Lyophilisaten. Der Unterschied in den Flächenwerten zwischen den Polycarbophil-haltigen und Polycarbophil-freien Systemen ist abhängig vom pH-Wert des Dispersionsmediums:

pH 4.0

Die Differenz dieser Flächenwerte zwischen Polycarbophil-haltigen und Polycarbophil-freien Systemen steigt mit der Lagerdauer an. Zu Beginn der Lagerung beträgt die Differenz ca. 10 %, nach 12 Wochen Lagerung bei 50 °C ca. 27 %, bei -20 °C etwa 15 %. Die Lagertemperaturen scheinen demnach einen Einfluß auf die Flächendifferenz (Desmopressin-Peakfläche) zwischen Polycarbophil-haltigen und Polycarbophil-freien Systemen zu haben. Es könnte vermutet werden, daß die Gegenwart von Polycarbophil einen destabilisierenden Einfluß auf Desmopressin besitzt, da sonst die Flächendifferenz über die Lagerdauer gleich bleiben würde und unabhängig von der Lagertemperatur wäre.

pH 6.8

Die entsprechende Differenz in den Flächenwerten in den Systemen (Lyophilisat und Feste Dispersion), hergestellt in pH 6.8, beträgt ca. 20 % und ist unabhängig von der Lagerdauer und Lagertemperatur. Demnach ist zu vermuten, daß es zwischen Desmopressin und Polycarbophil bereits während der Herstellung zu Wechselwirkungen kommt; so könnte z.B. Desmopressin an das Polycarbophil gebunden werden.

Durch die Herstellung in Phosphatpuffer pH 6.8 kann dann anscheinend mehr Desmopressin an das Polycarbophil gebunden werden, als in Citratpuffer pH 4.0. Bei pH 6.8 würde ca. doppelt so viel Desmopressin gebunden als bei pH 4.0. Dies erscheint nicht völlig unerwartet, da bei pH 6.8 der größte Anteil des Polycarbophils und des Desmopressin dissoziiert vorliegt, so daß hydrophile

Wechselwirkungen zwischen den Carboxylgruppen des Polycarbophils und der protonierten Guanidingruppe des Desmopressins stattfinden könnten. Außerdem sind die Polycarbophil-Ketten bei pH 6.8 weiter voneinander entfernt, da die Carboxylgruppen negativ geladen sind und sich gegenseitig abstoßen. Dadurch besteht ein größerer Zwischenraum, in dem das relativ große Desmopressin-Molekül besser eingelagert werden kann. Die Beobachtung, daß das Polycarbophil bei pH 6.8 ca. doppelt so viel Wirkstoff aufnehmen kann als in pH 4.0, wurde bereits in vorhergehenden Untersuchungen mit Tyrosin und Polycarbophil gemacht. Dies könnte die Annahme einer Bindung von Desmopressin an Polycarbophil stützen.

- Bei den beiden Desmopressin-Reinsubstanz-Proben konnten neben dem o.g. Zusatzpeak bei ca. 9.5 Minuten weitere Peaks detektiert werden, die vor dem Hauptpeak eluiert wurden. Es könnte sein, daß in Abwesenheit der Puffersalze noch weitere Zersetzungsprodukte entstehen.
- Mit zunehmender Lagerzeit bei 50 °C / 30 % r.F. ließen sich die Festen Dispersionen schlechter zentrifugieren. Teilweise wurde eine Verlängerung der Zentrifugenzeit von 15 auf 30 Minuten notwendig. Dies trat bei den Polycarbophil-freien Systemen und bei den Proben, die bei – 20 °C gelagert wurden nicht auf. Das in verschiedenen pH-Werten dispergierte und lyophilisierte Polycarbophil (mit und ohne Desmopressin) scheint sich während der Lagerung bei höheren Temperaturen physikalisch–chemisch zu verändern. Makroskopisch konnte keine Veränderung der Festen Dispersionen erkannt werden.

3.4.4 Einlagerung von Lyophilisaten und Festen Dispersionen über 24 Wochen (Langzeiteinlagerung)

Auf der Grundlage der Vorversuche sollten die Lyophilisate und Festen Dispersionen einem größeren Temperaturbereich und einer längeren Lagerdauer unterzogen werden. Dabei sollten alle denkbaren Parameter, die auf die Stabilität von Desmopressin einen Einfluß haben könnten, in dem Versuchsplan berücksichtigt werden.

Mit Hilfe der Langzeiteinlagerung sollte die Reaktionsordnung der Zersetzungsreaktion von Desmopressin ermittelt werden. Es wurden relativ hohe

Temperaturen gewählt, da aufgrund des Vorversuches bei einer Lagertemperatur von 50 °C die Systeme über 12 Wochen relativ stabil waren. Es sollte jedoch nicht auf die Untersuchung bei niedriger Temperatur (-20 °C, 25 °C) verzichtet werden, um eine breitere Beurteilungsmöglichkeit zu erhalten, und um zu prüfen, ob der Reaktionsmechanismus unter Normalbedingungen der gleiche ist, wie unter verschärften Bedingungen.

Mit den Daten dieser Lagerung sollten Berechnungen nach Arrhenius durchgeführt werden. Deshalb mussten die zeitlichen Abstände der Probenziehung und die Lagertemperatur-Differenzen geplant werden.

Möchte man die Aktivierungsenergie für die Zersetzungsreaktion relativ genau berechnen, so sollte erstens zwischen den untersuchten Zeitpunkten eine möglichst große Flächenänderung des Hauptpeaks stattfinden, damit die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante mit geringem Fehler ermittelt werden kann. Zweitens sollte das Temperaturintervall möglichst groß gewählt werden, damit der mittlere Fehler der Aktivierungsenergie möglichst gering ist, da dieser umso kleiner ist, je größer das Temperaturintervall ist [80]. Der Temperatur ist jedoch nach oben hin ebenfalls eine Grenze gesetzt, da sich die Lyophilisate und Festen Dispersionen physikalisch verändern können, in eine halbfeste Form übergehen und somit andere Bedingungen vorliegen als bei festen Systemen. Das gleiche gilt für die relative Feuchte, deren Maximalwert, oberhalb dessen es zu einem Übergang von fester zu halbfester Form kommt, im Vorversuch ermittelt worden ist. Eine Aussage über die Stabilität von Desmopressin in fester Form zu treffen wäre nur dann korrekt, wenn das Lyophilisat und die Feste Dispersion, physikalisch betrachtet, über den gesamten Lagerzeitraum und bei jedem Klima feste Systeme blieben.

Der Probenzugplan wurde so konzipiert, daß bei drastischeren Bedingungen (Temperatur, Feuchte) häufiger Proben gezogen wurden, da hier mit einer größeren Änderung der Desmopressin- Flächen zwischen den Probenzügen gerechnet werden konnte. Dadurch ist die korrekte Ermittlung der Reaktionsordnung erleichtert, da mehr Punkte zur Erstellung eines Verlaufes (Peakfläche / Lagerzeit) zur Verfügung standen.

Die Herstellung und Aufbereitung der Proben erfolgte analog dem Vorversuch. Die eingesetzten Materialien waren die gleichen wie im Vorversuch.

Es wurde allerdings bei diesem Hauptversuch eine neue Desmopressin-Charge eingesetzt. Bei identischem Klima und gleichem Probenzug wie im Vorversuch können somit beide Desmopressin-Chargen verglichen werden.

Materialien: - Desmopressin Ch.B. 1485-1-1
 - Lithiumchlorid reinst zur Einstellung von 11 % r.F.
 - Alle anderen Materialien wie im Vorversuch
 (12-Wochen-Lagerung)

Untersuchte Systeme: D4, DP4, D6, DP6, P4, P6

Lagerbedingungen:	<u>Temperatur [°C]</u>	<u>relative Feuchte [%]</u>
	-20	geschlossen
	25	30
	50	30
	58	11, 30
	66	11, 30
	74	11, 30

Lagerbedingungen siehe Kapitel 3.4.1.

Ansatzvolumen: 200 ml (Braunglas-Schraubdeckelgefäß)
 Dispensierung auf Braunglasvials mit je 1000 µl

Konzentrationen: - ca. 0.01 % DDAVP
 - ca. 0.25 % PCP

Probenzug:	<u>Klima [°C / %]</u>	<u>Probenzug [Wochen]</u>
	-20	24
	25 / 30	6, 12, 18, 24
	58 / 11	dto.
	66 / 11	dto.
	74 / 11	dto.
	50 / 30	1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24
	58 / 30	2, 4, 8, 12, 16, 20, 24
	66 / 30	1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24
	74 / 30	3, 10 und 17 Tage; 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24

Es wurden jeweils zwei vials (Proben) gezogen, aus denen je drei Einspritzungen vorgenommen wurden (n=6). Die quantitative Bestimmung von Desmopressin und deren Zersetzungsprodukte erfolgte mit Hilfe der validierten HPLC-Methode (♥).

3.4.5 logk / pH – Profil

Der pH-Wert des Lösungs- bzw. Dispersionsmittels während der Herstellung der Lyophilisate und Festen Dispersionen kann einen Einfluß auf die Stabilität des Peptides ausüben.

Nach Gefriertrocknung der Flüssigkeiten zu den Lyophilisaten und Festen Dispersionen ergeben sich in den festen Systemen Bereiche, in denen die Hydroxyl- und Hydroxoniumionen des Lösungsmittels aktiv sind, so daß es lokal zur pH-abhängigen Hydrolyse des Wirkstoffes kommen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluß des pH-Wertes des Lösungsmittels auf die Stabilität von Desmopressin in fester Form (Lyophilisat) untersucht und die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, in Gegenwart von Puffersalzen verschiedenen pH-Wertes, ermittelt werden.

Die Untersuchung erfolgte mit der Desmopressin-Charge 1485-1-1, die auch im Rahmen der Langzeiteinlagerung (24 Wochen) eingesetzt wurde.

Es wurde die höchste Lagertemperatur und – Feuchte gewählt (74 °C / 30 % r.F.), die auch im Rahmen der Langzeiteinlagerung verwendet wurde. Dies hatte den Grund, daß über den untersuchten Zeitraum möglichst viel Desmopressin zersetzt werden sollte, um kinetische Berechnungen mit geringem Fehler durchführen zu können. Eine geringe Zersetzung bringt immer einen großen Fehler in der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten mit sich.

Folgende Pufferlösungen des DAB 1997 wurden verwendet:

- pH 2.0 RN
- 3.0 R
- 5.5 RN
- 8.0 R
- 10.0 R

Mit den beiden Puffern pH 4.0 und 6.8 aus der Langzeiteinlagerung sind demnach insgesamt sieben verschiedene pH-Werte untersucht worden.

pH-Werte unter- oder oberhalb der gewählten Bereiches (pH 2-10) wurden nicht untersucht, da es zu Problemen mit dem Säulenmaterial (HPLC-Säule) kommen könnte.

Lagerbedingung: 74 °C / 30 % r.F. (Probengefäße und Lagerart siehe Kapitel 3.4.1)

Vorgehensweise:

1. Herstellung der Desmopressin-Lösungen in den verschiedenen Puffern.
Es wurden in 15 ml Puffer 1500 µg Desmopressin gelöst, so daß Lösungen mit einer Desmopressin-Konzentration von 0.01 % entstanden.
2. Dispensierung des Ansatzes auf 1ml HPLC-vials (14 Stück)
3. Gefriertrocknung
4. Einlagerung
5. Untersuchung der Proben (zwei vials mit je drei Einspritzungen entspr. n=6) mittels validierter HPLC-Methode nach folgenden Lagerzeiten:

0, 1, 2, 4 und 12 Wochen.

Es wurden zu Beginn der Untersuchung häufiger Proben gezogen, da davon auszugehen ist, daß gerade am Anfang der Abfall im Desmopressin-Gehalt besonders groß ist. Dadurch ist die genauere Erstellung des Gehalts-Verlaufes möglich, wodurch die Reaktionsordnung ermittelt werden kann.

Zusätzlich wurde Desmopressin-Reinsubstanz nach den o.a. Lagerbedingungen und Lagerzeiten untersucht. Es sollte beurteilt werden, inwieweit die Gegenwart von Puffersalzen einen Einfluß auf die Stabilität von lyophilisiertem Desmopressin besitzt.

3.5. Statistische Auswertung

Statistische Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit bei einer Vielzahl von Untersuchungen eingesetzt.

Folgende Statistikprogramme wurden benutzt:

- TOCCATA < S2 >
- SPSS Version 8.0 < S1 >

Das Programm TOCCATA diene vornehmlich zur statistischen Auswertung von Daten aus der Kalibrierung in der Analytik und zur Durchführung einer Linearen Regression.

Eine gute und umfangreiche Möglichkeit der statistischen Auswertung ist die Nutzung des Programms *SPSS* (*Statistical Package for Social Sciences*). Mit Hilfe dieses Software-Programmes wurden Nichtlineare Regressionen und univariate Varianzanalysen durchgeführt.

Eine Hauptanwendung dieses Programmes lag in der statistischen Bewertung der aus der Langzeiteinlagerung (Hauptversuch) erhaltenen Daten.

Folgende Fragen sollten geprüft und statistisch abgesichert werden :

1. Welcher Faktor hat den größten Einfluß auf die Stabilität von Desmopressin und welche Wechselwirkungen zwischen den Faktoren gibt es (Kapitel 3.5.1)
2. Welche Haltbarkeit kann für jedes System abgeschätzt werden (Kapitel 3.5.2)

3.5.1 Einflußfaktoren

Folgende Faktoren sind in die Untersuchung eingegangen:

Temperatur

Feuchte

pH

Polymer

Es wurden alle Desmopressin-Flächenwerte (n=6) folgender Faktoren in die Berechnung einbezogen:

Temperatur:	58 , 66 und 74 °C
Feuchte:	11 und 30 % relative Feuchte
pH:	Herstellung in Puffer pH 4.0 und 6.8
Polymer:	mit und ohne Polycarbophil

Der Faktor ZEIT wurde in der statistischen Analyse ebenfalls berücksichtigt, jedoch nicht direkt als Einflußgröße, sondern indirekt in Form der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RGK). Das hat folgende Gründe:

1. Es besteht kein linearer Zusammenhang zwischen dem Desmopressin-Flächenwert und der Zeit. Aus diesem Grund ist das Einbeziehen dieses Faktors (Zeit) in die Varianzanalyse, die ja ein lineares Modell ist, nicht möglich.
2. Der Flächenwert von Desmopressin ist nicht die eigentliche Größe, die uns interessiert, sondern die Geschwindigkeit der Zersetzung, und dieses wird durch die RGK ausgedrückt.

Die Abhängigkeit der Desmopressin-Fläche (HPLC) von der Zeit entspricht kinetisch einem Prozeß erster Ordnung. Daher kann die RGK einmal mit Hilfe einer log-Linearen (LR) oder mit der Nichtlinearen Regression (NLR) bestimmt werden. Die zweite Variante (NLR) ist die mathematisch genauere.

Tab. 2: Vergleich der Werte für die RGK, ermittelt aus der log-Linearen Regression (LR) respektive aus der Nichtlinearen Regression (NLR):
(Daten ermittelt aus der Lagerung über 24 Wochen bei 30 % r.F.)

Parameter	<u>LR</u>			<u>NLR</u>		
	58	66	74	58	66	74
D4	Temp. [°C]					
RGK [w^{-1}]	0,0705	0,1663	0,3062	0,0775	0,1568	0,2274
VB / ase	0,0101	0,0417	0,0483	0,0077	0,0107	0,0072
uG	0,0603	0,1244	0,2579	0,0619	0,1353	0,2129
oG	0,0806	0,2080	0,3545	0,0931	0,1783	0,2419

DP4

Parameter	58	66	74	58	66	74
RGK [w^{-1}]	0,0880	0,2441	0,3594	0,0931	0,1796	0,2107
VB / ase	0,0195	0,0406	0,0252	0,0076	0,0112	0,0067
uG	0,0685	0,2034	0,3342	0,0778	0,1570	0,1973
oG	0,1075	0,2846	0,3846	0,1084	0,2022	0,2241

D6

Parameter	58	66	74	58	66	74
RGK [w^{-1}]	0,0003	0,0042	0,0083	-0,0007	0,0059	0,0143
VB / ase	0,0028	0,0032	0,0031	0,0013	0,0019	0,0014
uG	0,0031	0,0009	0,0051	0,0019	0,0020	0,0114
oG	-0,0025	0,0073	0,0114	-0,0034	0,0098	0,0173

DP6

Parameter	58	66	74	58	66	74
RGK [w^{-1}]	0,0518	0,0340	0,0663	0,0554	0,0537	0,0792
VB / ase	0,0240	0,0221	0,0199	0,0102	0,0090	0,0104
uG	0,0278	0,0119	0,0463	0,0348	0,0357	0,0583
oG	0,0758	0,0562	0,0863	0,0760	0,0718	0,1001

Anmerkungen:

- Ein negatives Vorzeichen entspricht einer positiven Steigung der Regressionsgeraden. Das deutet darauf hin, daß der Desmopressin-Flächenwert über den untersuchten Zeitraum nicht abgenommen hat. In diesem Fall ist kein signifikanter Unterschied ($\alpha=0.05$) der Steigung des Regressionsverlaufes von Null zu ermitteln.
- Bei der Nichtlinearen Regression ist es nicht möglich, exakt definierte Werte für die Vertrauensgrenzen der Regression anzugeben. Alle Angaben basieren auf der Simulation großer Stichproben, und es wird auf den Fehler bzw. auf die Vertrauensgrenzen zurückgeschlossen. Bei einem exakt definierten Modell wie dem vorliegenden, ist die Schätzung, die erhalten wird, jedoch sehr genau. Der Vertrauensbereich einer Nichtlinearen Regression wird als asymptotic standard error (ase) bezeichnet.
- Die Vertrauensgrenzen um den Schätzwert sind bei der NLR geringer als bei der LR, d.h. das gewählte Regressionsmodell (NLR) beschreibt die Daten richtig.
- Die Unterschiede in den Schätzwerten zwischen log-Linearer und Nichtlinearer Regression entstehen durch die Fehlerverteilung in den Daten.
Bei der log-Linearen Regression verschieben sich die Daten durch die Transformation von einer Normalverteilung zu einer schiefen Verteilung. Dadurch ist die Anwendung einer Linearen Regression strenggenommen nicht statthaft.
Die Nichtlineare Regression (NLR) basiert dagegen auf den Urdaten. Die Daten sind normalverteilt und durch das Ausbleiben einer logarithmischen Transformation, wie sie bei der log-Linearen Regression durchgeführt wird, werden die Daten auch nicht bezüglich deren Verteilung verschoben.

Zur Ermittlung der Faktorengröße und den Wechselwirkungen zwischen den Faktoren wurde wie folgt vorgegangen:

1. Eingabe aller Desmopressin-Flächenwerte ($n=6$) für jede Temperatur, Feuchte, pH und Polymer
2. Nichtlineare Regression mittels SPSS ($\alpha=0.05$)
3. Abhängige Variable: Desmopressin-Flächenwert (Fläche)
4. Modellgleichung: $\text{Fläche} * \text{EXP}(-\text{RGK} * \text{Zeit})$
Startwerte für die Anfangsfläche und die RGK aus der Linearen Regression
In Fläche gegen Zeit
5. Prüfen auf ein stabiles stationäres Optimum dieser Lösung durch Variation der Startwerte.

Je näher der Startwert dem optimalen Ergebnis kommt, desto weniger Iterationsschritte werden benötigt. Bei einer stabilen Lösung ändern sich die Schätzwerte (Steigung und Ordinatenabschnitt) der Regression nicht durch eine Änderung der Startwerte.

Damit erhält man für jede Temperatur, Feuchte, pH und System (mit und ohne Polycarbophil) Schätzwerte, sowie obere und untere Vertrauensgrenzen (oG und uG) für die Steigung, was hier der RGK entspricht.

6. Die aus der NLR erhaltenen Werte (RGK-Schätzwerte, obere und untere Vertrauensgrenze) wurden für alle Systeme in SPSS eingegeben und eine univariate ANOVA (abhängige Variable: Reaktionsgeschwindigkeitskonstante; unabhängige Variablen: Feuchte, Temperatur, pH, Polymer) durchgeführt. Bei der Bildung der Quadratsummen wurde Typ III verwendet. Bei dieser Methode werden die Quadratsummen eines Effektes im Design als Quadratsummen mit Bereinigung um alle anderen Effekte berechnet, welche diesen Effekt nicht enthalten und orthogonal zu anderen Effekten stehen, die den Effekt enthalten.

Die univariate Varianzanalyse (hier: mehrfaktoriell) untersucht den Einfluß von unabhängigen Variablen auf eine abhängige Variable (hier: RGK).

Es werden die Wechselwirkungen der einzelnen Einflußfaktoren auf den drei möglichen Stufen geprüft ($\alpha=0.05$). Im Falle einer signifikanten Wechselwirkung bleibt die darunterliegende Stufe unberücksichtigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gefunden, daß alle Hauptfaktoren und alle übergeordneten Wechselwirkungen als signifikant ausgewiesen wurden. Daher darf nur die Wechselwirkung auf der 3. Stufe interpretiert werden.

Desweiteren kann mit Hilfe der Schätzung der mittleren Varianz (TYP III) der Einfluß jedes einzelnen Faktors auf die RGK geprüft und eine Rangfolge aufgestellt werden, wobei der Faktor mit dem höchsten Mean Square-Wert den größten Einfluß auf die RGK (abhängige Variable) und damit auf die Zersetzungsgeschwindigkeit von Desmopressin besitzt.

Es wurden nur die Datensätze in die univariate Varianzanalyse einbezogen, bei denen beide Feuchten (11 und 30 % r.F.) während der Lagerung vorlagen.

3.5.2 Haltbarkeit

Vorgehensweise zur Abschätzung der Haltbarkeit:

1. Eingabe der Daten (alle Flächenwerte und Zeitpunkte) in das Programm SPSS und Durchführung einer Nichtlinearen Regression.
2. Eingabe der Daten ($1/T$ und $-\ln$ RGK) und Durchführung einer gewichteten Linearen Regression mittels TOCCATA.
Als Werte für die RGK (bei 50, 58, 66 und 74°C) dienten die Schätzwerte aus der Nichtlinearen Regression.
3. Mit Hilfe der Regressionsgleichung aus der gewichteten Regression wurde die RGK für 25 °C geschätzt.
Es wurden die Aktivierungsenergie E_a (Steigung *allg.Gaskonstante) und die Häufigkeitszahl A (Ordinatenabschnitt) und deren Vertrauensbereiche ermittelt.
4. Mittels geschätzter RGK bei 25 °C sowie deren Vertrauensgrenzen wurde die Haltbarkeit ($t_{90\%}$) und deren Vertrauensbereich errechnet.

Anmerkung zur Vorgehensweise:

Es könnte gesagt werden, daß die Arrhenius-Gleichung eine exponentielle Funktion darstellt, und die RGK (25 °C) mit Hilfe der Nichtlinearen Regression berechnet werden könnte. Jedoch ist diese Vorgehensweise hier nicht sinnvoll.

Begründung:

1. Die NLR mit mehr als einer Unbekannten benötigt wesentlich mehr Datenpunkte als nur vier !

Dadurch, daß nur vier Datenpunkte vorliegen, die zusätzlich nur einen kleinen Temperatur-Bereich abdecken (50 - 74 °C), wird die NLR sehr ungenau.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur ein kleiner Temperatur-Bereich untersucht werden, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, daß bei geringen Temperaturen (< 50 °C) nur wenig Zersetzung stattfindet und damit die zu ermittelnde RGK mit starken Streuungen behaftet ist.

Eine Lagertemperatur größer 74 °C würde zu physikalischen Veränderungen der Lyophilisate und Festen Dispersionen führen; ein festes System wäre dann nicht mehr gegeben.

2. Die Genauigkeit, mit der die RGK bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt werden kann, ist verschieden.

Dies sollte bei der Modellierung der Arrhenius-Gleichung Berücksichtigung finden. Eine Wichtung der Einflußgrößen erscheint in diesem Sinne ideal.

Leider bietet SPSS im Moment ein gewichtetes Verfahren der NLR noch nicht an. Daher erscheint eine gewichtete log-Lineare Regression als am besten geeignet.

Es sollen die Einzelwerte für die Regression im umgekehrten Verhältnis ihres Vertrauensbereiches **gewichtet** werden. Man kann diese Gewichtung so durchführen, daß man z.B. bei der Berechnung der Arrhenius-Geraden den \ln RGK - mit dem dazugehörenden Wert für $1/T$ [K] - so oft (ng) in die Ausgleichsrechnung eingibt, wie es dem reziproken Wert des Vertrauensbereiches dieser RGK im logarithmischen System entspricht. Die zuverlässigeren Werte (höhere Temperatur, größerer Zersetzungsgrad) erhalten ein größeres Gewicht als die weniger zuverlässigen Werte (niedrigere Temperatur, kleinerer Zersetzungsgrad).

Die Angaben zur Haltbarkeit sind fehlerbehaftet, da in diese Untersuchung nur vier Temperaturen eingegangen sind. Sie sollten daher nur als grobe Schätzwerte angesehen werden.

3.6. Identifizierung von Zersetzungsprodukten

3.6.1 Qualitative und quantitative Bestimmung

Die Identifizierung der Massen möglicher Zersetzungsprodukte erfolgte mit Hilfe der HPLC-MS-Kopplung (Kapitel 3.1.2).

3.6.2 Reaktion mit DTT und Amberlyst 15

Mit Hilfe spezieller Reagenzien sollten nun die aus der HPLC-MS-Kopplung erhaltenen Vermutungen bezüglich des strukturellen Aufbaus der Zersetzungsprodukte überprüft werden.

Aus den Ergebnissen der massenspektrometrischen Untersuchung wurden zwei mögliche Zersetzungsmechanismen vermutet:

1. Deamidierung an den endständigen Säureamidgruppen des Glycinamid, Asparagin und Glutamin (Masse +1 je Deamidierung)
2. Reduktive Spaltung der Disulfidbrücke (Masse +2) .

Mit Hilfe folgender Reagenzien sollten diese Reaktionen an Desmopressin simuliert werden:

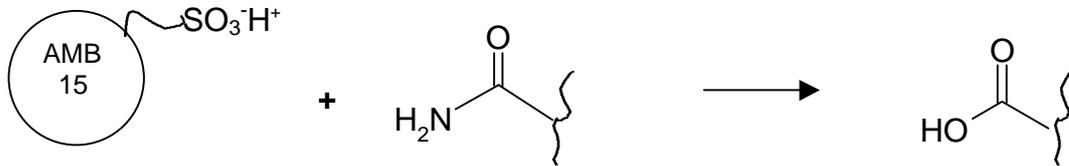
1. Amberlyst 15, Perlen 20-50 mesh, Artikel 06423, Ch.B. 379305/1 51398, Fa. Sigma-Aldrich, D-Deisenhofen → Deamidierung durch sauren Ionenaustausch
2. 1,4-Dithio-D,L-threitol (DTT), Lösung 1 M, Artikel 43816, Ch.B. 47547/1 31398, Fa. Sigma-Aldrich, D-Deisenhofen → Reduktive Spaltung von Disulfidbrücken

Diese Reagenzien sind spezifisch für die entsprechende Reaktion.

Es wurde die Desmopressin-Charge eingesetzt, die auch während der Langzeiteinlagerung des Hauptversuches untersucht wurde (Ch.B. 1485-1-1).

Reaktionsmechanismen:

1. Reaktion mit Amberlyst 15



Amberlyst-Perlen

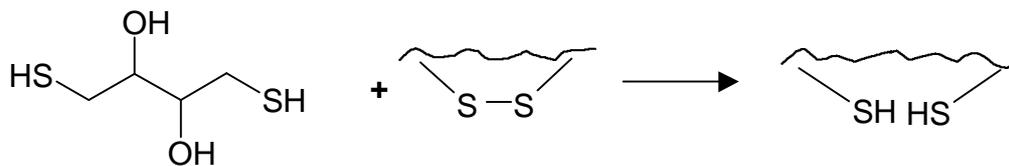
DDAVP

endständ. Amidgruppe

DDAVP

endständ. Säuregruppe

2. Reaktion mit DTT



DTT
reduzierte Form

DDAVP
oxidierte Form

DDAVP
reduzierte Form

Vorgehensweise:

1. Entwicklung einer optimalen Reagenzienkonzentration ohne Störung der chromatographischen Detektion von Desmopressin
2. Ansätze mit Desmopressin und DTT-Lösung bzw. Amberlyst-Perlen:
Menge bzw. Volumen an Reagenzien bezogen auf einen Desmopressin-Ansatz von 5 ml (DDAVP-Konz. ca. 0.015 %):
 - DTT: 10 µl 1M Lösung (entsprechend 0.00013 %)
 - Amberlyst-Perlen: 0.02 g
3. Probenzug nach 0, 10, 60, 120, 180, 240, 360 Minuten und nach 24 und 47 h
4. Quantitative und qualitative Analyse mittels HPLC und HPLC-MS-Kopplung

Der Versuch der Zersetzungskinetik mit DTT und Amberlyst wurde zweimal durchgeführt.

Anzahl Einspritzungen je Zeitpunkt:	2
Reaktionsgefäß:	10 ml Braunglasvials mit Schraubverschluß (während der Reaktion wurden die Gefäße verschlossen gehalten)
Temperatur:	24 °C ± 0.5
Probenvolumen:	500 µl

3.7. Molecular Modelling von Desmopressin

Mit Hilfe von Molecular Modelling können Konformationen eines Moleküls ermittelt werden.

Diese Information ist sehr wichtig im Hinblick auf Wechselwirkungen mit anderen Substanzen, wobei vor allem Substrat – Rezeptor – Untersuchungen mittels Molecular Modelling durchgeführt werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Anwendung von Molecular Modelling ist die Aufklärung von Wechselwirkungen innerhalb eines Moleküls, die aufgrund der ermittelten Konformation möglich wären.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe von Molecular Modelling geprüft werden, ob sich manche funktionelle Gruppen innerhalb des Desmopressin-Moleküls so nah kommen können, daß dort chemische Wechselwirkungen möglich wären.

Aufgrund der Ergebnisse aus den HPLC-MS-Untersuchungen konnte durch die erhaltenen Massen aus dem Massenspektrometer eine mögliche Kondensationsreaktion innerhalb des Desmopressin-Moleküls nicht ausgeschlossen werden.

Es sollte nun untersucht werden, ob diese Kondensationsreaktion aufgrund der Konformation von Desmopressin überhaupt möglich ist.

Existieren keine Daten zur Konformation der Substanz in fester Form (Kristall), so können zur ersten Information die bekannten Konformationen von strukturell sehr ähnlichen Molekülen genutzt werden.

Anhaltspunkte zur möglichen Konformation von Vasopressin sowie deren Analoga sind in der Literatur [12, 26, 38, 53, 79, 90] beschrieben worden.

Eine wichtige Voraussetzung zur Ermittlung der Konformation eines Moleküls ist die Kenntnis der Bindungslängen und -winkel zwischen den Atomen. Diese können unter anderem durch Röntgenstrukturanalyse erhalten werden, jedoch muß die Substanz dabei kristallin vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit zur Konformationsbestimmung ist die zweidimensionale NMR-Spektroskopie, wobei die zu untersuchende Substanz in Lösung vorliegen muß. NMR-Untersuchungen von Desmopressin in wässriger Lösung wurden bereits durchgeführt [Walse et al. ,1998].

In der Literatur [90] wurden verschiedene energiearme Konformationen des Desmopressins, die in wässriger Lösung experimentell ermittelt wurden, beschrieben.

Das Ringsystem im Desmopressin scheint danach relativ wenig flexibel zu sein, während die Seitenkette, bestehend aus drei Aminosäuren (Pro7, D-Arg8, Glyamid9) eine hohe Flexibilität aufweist und deshalb theoretisch mit anderen, aus dem Ringsystem herausragenden Seitenketten der Aminosäuren, Wechselwirkungen eingehen könnte.

Um diese Möglichkeiten nun genauer zu untersuchen, wurden die Koordinaten der von Walse et al. ermittelten energieärmsten Konformation des Desmopressins verwendet. Es wurden verschiedene Torsionswinkel der Seitenkette (vor allem des Gln6, Tyr2 und Asn5) sowie der ψ -Winkel von Pro7, im Bereich der bei Peptiden im allgemeinen beobachteten Seitenketten-Konformationen *, systematisch so verändert, daß mögliche Annäherungsbereiche deutlich wurden.

Die Konformation des Peptidrückrades im Ringbereich (Aminosäuren 1-6) wurde nicht verändert.

* χ_1 / χ_2 - Häufigkeitsverteilungen und ϕ - sowie ψ - Winkel der entsprechenden Aminosäuren wurden der Brookhaven Protein Datenbank entnommen.

Für die Berechnung der Konformation wurde folgendes Software-Programm <S5> benutzt:

Sybyl 6.5

Trypos Inc., 1699 South Hanley Rd.

St.Louis, Missouri, 63144, USA

3.8. Permeation von Desmopressin durch eine Polyethylen-Membran

Sinn dieser Untersuchung ist, zu prüfen, ob und wie schnell Desmopressin eine Polyethylen-Membran durchwandert.

Es sollte als Voruntersuchung für eventuell folgende Permeationsstudien an CaCo-II-Zell-Linien (Screening-Methode für orale Verfügbarkeitsuntersuchungen) dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden an folgenden festen Formulierungen Permeationsstudien durchgeführt:

D4

DP4

D6

DP6

Es sollte sowohl der Einfluß des pH-Wertes des Dispersionsmittels aus dem Herstellungsprozeß (pH 4.0 respektive 6.8) als auch der Einfluß des Polycarbophils (Lyophilisat respektive Feste Dispersion) auf die Freigabe und Permeation von Desmopressin untersucht werden.

Die Permeationsstudie erfolgte an speziellen Membraneinsätzen <27>, die im Falle einer CaCo-II-Permeationsuntersuchung noch mit einer Monoschicht dieses Zelltyps belegt werden können. Es wurde ein Einsatz gewählt, dessen Membran klar ist, so daß mikroskopische Betrachtungen (z.B. Konfokale Laser Mikroskopie) gegebenenfalls möglich wären.

Membraneinsätze: Transwell® – Clear

PE-TC (Polyethylen-Transwell clear), Artikel Nr. 3460,

Lot 09198007, Fa. Corning Costar, D-Bodenheim

Durchmesser 12 mm

Querschnittsfläche 1.13 cm²

Membrandicke 10 µm

Porengröße 0.4 µm

aufnehmbares Volumen: apikal 0.5 ml

basolateral 1.5 ml

Verwendeter Puffer: HBSS (Hanks' balanced salt solution),
pH-Wert : 7.40

Transwell®

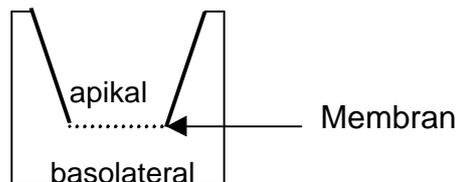


Abb. 21: Schematischer Aufbau eines Transwell® - Systems

Vorgehensweise:

1. Zugabe von 0.5 ml HBSS-Puffer auf die apikale Seite des Transwell® (Donor) und 1.5 ml auf die basolaterale Seite (Akzeptor). Die Pufferlösung auf der apikalen Seite wurde nach ca. 5 Minuten wieder abgezogen und diente nur der Benetzung der Membran.
2. Auftragen der Lyophilisate und Festen Dispersionen auf die apikale Seite des Transwell®, wobei darauf geachtet wurde, daß das System gleichmäßig auf der Membran verteilt wurde.
3. Probenzug nach: 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 480 Minuten.
Abpipettiertes Volumen: 200 µl.
Das entnommene Volumen wurde nach dem Probenzug durch reinen HBSS-Puffer ersetzt.
Zwischen den Probenzügen erfolgte leichtes horizontales Schütteln per Hand.
4. Analyse der Proben mittels validierter HPLC-Methode (n=2 Einspritzungen).

Die Untersuchungen erfolgten bei Raumtemperatur (22-24 °C).

Anzahl an Untersuchungen pro System (Lyophilisat und Feste Dispersion): n=3 .

-
- 4. Ergebnisse und Diskussion**
 - 4.1. Physikalische und physikochemische Befunde**
 - 4.1.1 Desmopressin**
 - 4.1.1.1 Partikelform und –größe

Mittels mikroskopischer Untersuchungen (Kapitel 3.1.7) wurden die Form und Größe von Desmopressin-Partikeln bestimmt.

Abb. 22: Mikroskopische Aufnahmen von Desmopressin, 100 fache Vergrößerung
Balkenlänge entspricht 100 µm

Abb. 23: Mikroskopische Aufnahmen von Desmopressin, 400 fache Vergrößerung
Balkenlänge entspricht 25 μm

Partikelform: **Rund bis plättchenartig, irregulär, durchscheinend, amorph**
Partikelgröße: **6 – 300 μm**

Bei einigen Partikeln sind kreisrunde Lufteinschlüsse zu erkennen. Außerdem sind auf den Plättchen kleinere Partikel von Desmopressin zu sehen.

4.1.1.2 Schmelzverhalten

Das Desmopressin-Präparat wurde mikroskopisch beobachtet, während es mit Hilfe des Heiztisches bis auf 250 °C erhitzt wurde (Kapitel 3.1.7.1).

Photographische Aufnahmen des Präparates zeigen die Veränderungen während der Temperaturerhöhung.

Es ist zu beobachten, daß sich bei Erhöhung der Temperatur das Desmopressin zusammenzieht und Vakuolen bildet.

Ab 207 °C konnte eine Braunfärbung an der Oberfläche eines Plättchens beobachtet werden. Es ist zu erkennen, daß sich Desmopressin ab 207 °C zersetzt. In der Literatur [Mannig, M., Journal of Medicinal Chemistry, 1976, Vol 19, No 6] wird ein Schmelzbereich von 206 – 207,5 °C angegeben, der mit dieser Untersuchung übereinstimmt.

Bei weiterer Temperaturerhöhung ziehen sich die Partikel immer weiter zusammen. Es sind große Vakuolen zu erkennen.

Bei 250 °C haben sich die Desmopressin-Partikel verflüssigt und das gesamte Präparat ist braun gefärbt (Zersetzung).

Der Schmelzpunkt von Desmopressin kann mit 207 °C angegeben werden, wobei es sich eher um einen breiten Schmelzbereich handelt, was typisch für amorphe Substanzen ist.

Photographische Aufnahmen von Desmopressin vor und nach dem Schmelzvorgang:

Abb. 24: 400 fache Vergrößerung, - vor dem Schmelzvorgang -

Abb. 25: 40 fache Vergrößerung, - nach dem Schmelzvorgang –

4.1.1.3 Wassergehalt

Mit Hilfe der Thermowaage <6> wurde der Wassergehalt von zwei Desmopressin-Proben (Ch.B. UA2545) ermittelt.

Ergebnis: 4.7 % \pm 0.2

4.1.1.4 Massenspektrum von Desmopressin

Die Methode und Parameter wurden in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

Probe: Desmopressin Ch.B. 1485-1-1

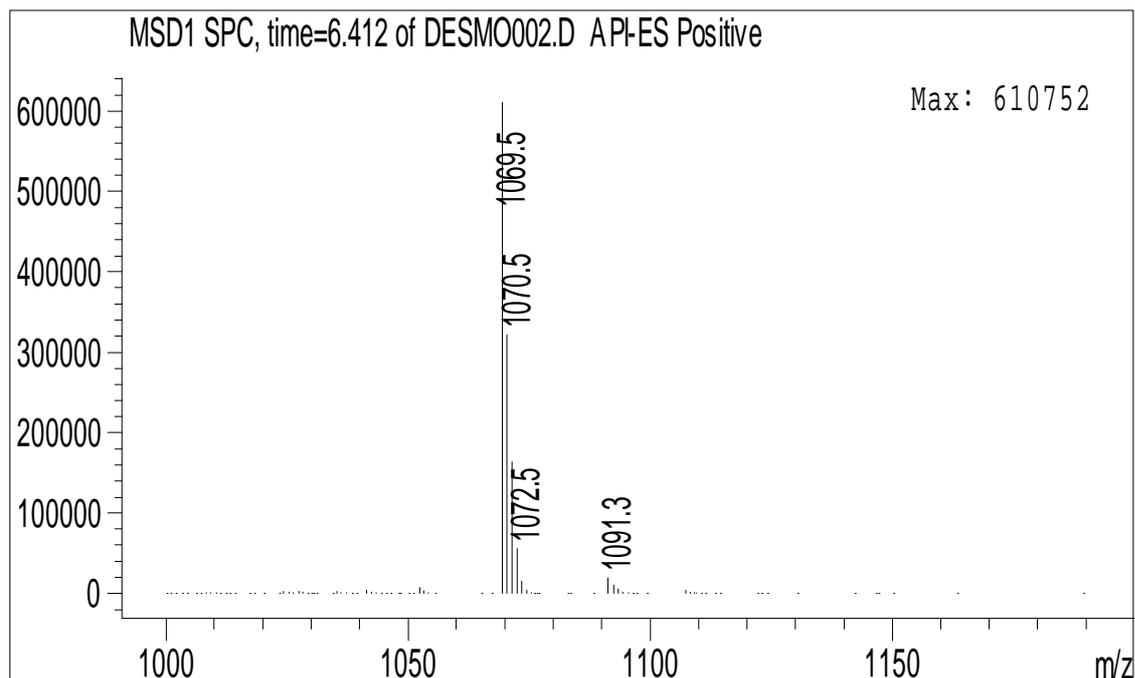


Abb. 26: Massenspektrum von Desmopressin

Es ist ein Hauptsignal mit einer Masse von 1069.5 zu erkennen, welches der molaren Masse des Desmopressins +1H⁺ (Positive Mode) entspricht.

Die aus der Anzahl der Atome und deren Massenzahlen errechnete molare Masse von Desmopressin beträgt 1068.42 g/mol.

Im Massenspektrum sind die Kohlenstoffisotope des Desmopressins zu erkennen, die jeweils eine um +1 größere Masse besitzen. Das Kohlenstoffisotop mit der Masse 1071.5 ist in obiger Abbildung nicht am entsprechenden Signal angeschrieben worden, jedoch vorhanden.

Desweiteren ist eine Masse von 1091.3 zu erkennen, welches dem Natrium-Addukt des Desmopressins entspricht ($1068.42 \Delta +22.98 \text{ m/z} \rightarrow 1091.4$). Auch von diesem Produkt sind die Kohlenstoff-Isotope zu erkennen, in der Abbildung jedoch nicht zahlenmäßig aufgeführt worden.

Diese Adduktbildung mit Natriumionen ist bei Messungen im positiven Modus der Ionisation im Elektrospray nicht ungewöhnlich und kommt dadurch zustande, daß sich Natriumionen in der zu versprühenden Lösung befinden.

Nicht selten findet man auch Kalium-Addukte, die jedoch in obiger Abbildung aufgrund der verhältnismäßig geringen Menge nicht detektiert werden konnten.

4.1.1.5 Sorptionseigenschaften von Desmopressin an Oberflächen von Glas und PP

Die Methode und Vorgehensweise ist in Kapitel 3.3. beschrieben worden.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Adsorptionsuntersuchung dargestellt :

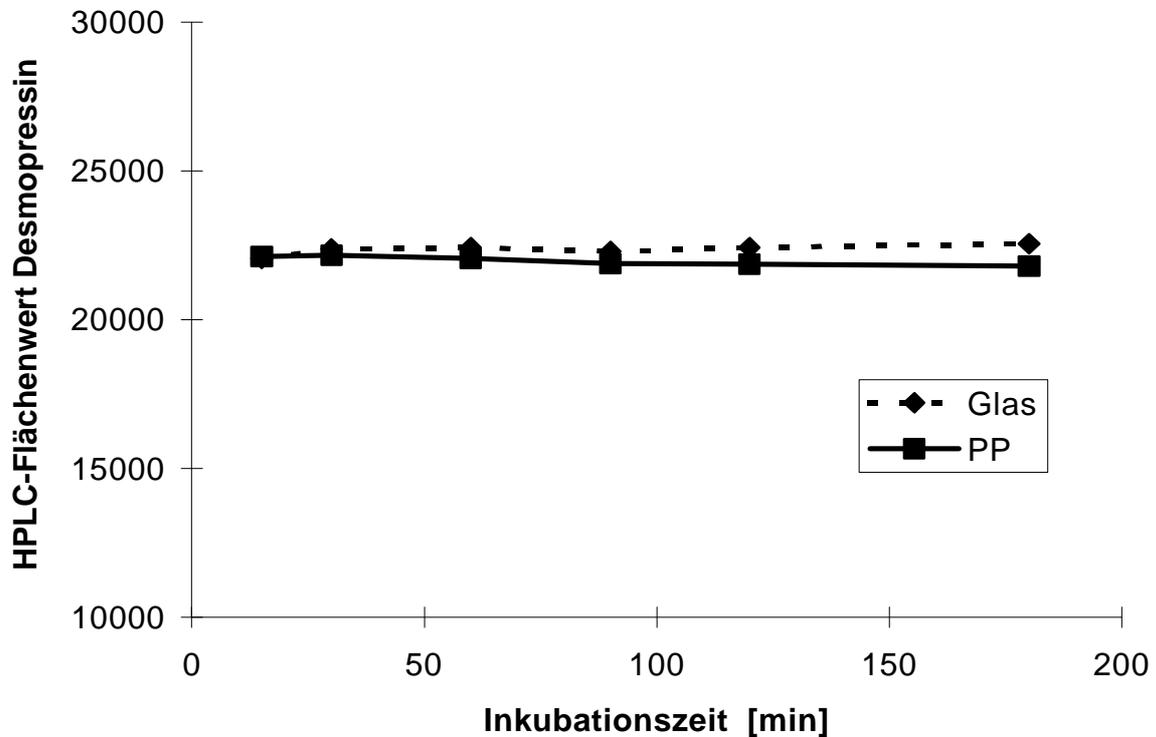


Abb. 27: Sorptionsgeschwindigkeit von Desmopressin an die Oberfläche von Glas- respektive PP-vials

Anhand der Graphik ist zu erkennen, daß die Geschwindigkeit der Adsorption von Desmopressin an die Oberflächen sehr groß ist, da nach 15 Minuten Inkubation einer wässrigen Desmopressinlösung mit dem entsprechenden vial keine signifikante Änderung in der Steigung ($\alpha=0.05$) der Regressionsgeraden nachgewiesen werden kann.

Diese Untersuchung diente als Vorversuch zur Ermittlung der Sorptionsgeschwindigkeit, um bei den folgenden Versuchen eine ausreichende Kontaktzeit zwischen dem Peptid und der Oberfläche zu gewährleisten.

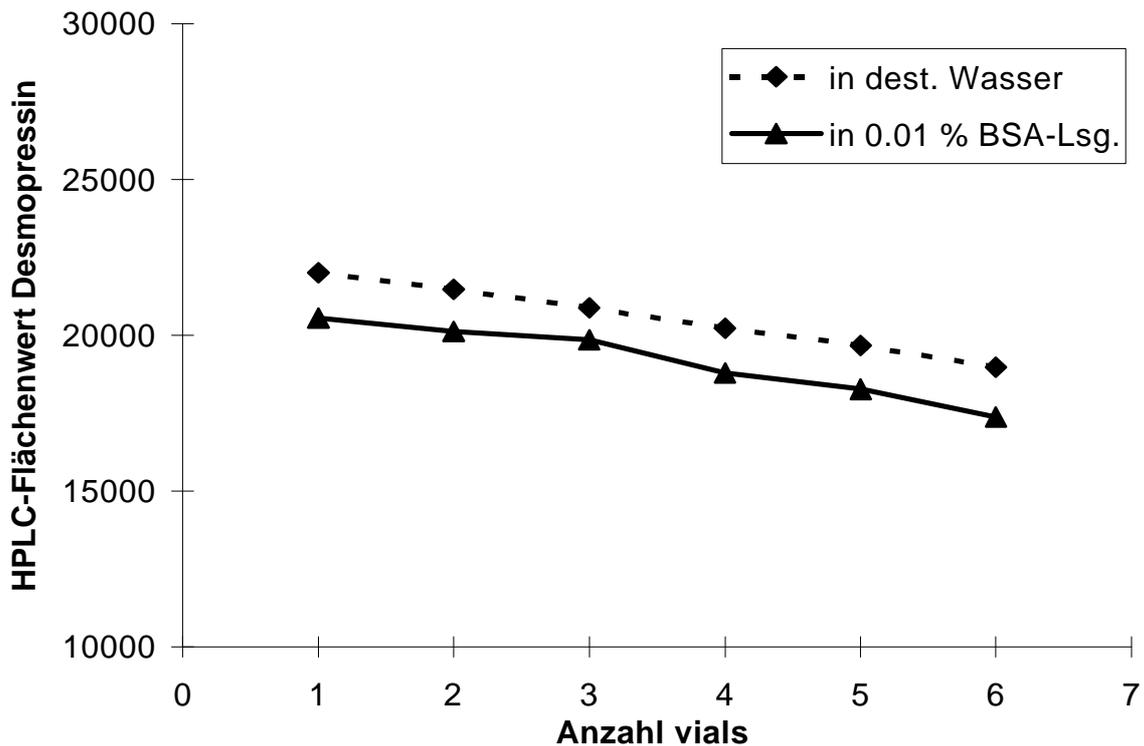


Abb. 28: Adsorption von Desmopressin an die Glasoberfläche von sechs vials.
Desmopressin gelöst in destilliertem Wasser respektive in 0.01 % BSA-Lösung

Mittels Regressionsanalyse konnte kein signifikanter Unterschied ($\alpha=0.05$) in den Steigungen beider Geraden nachgewiesen werden.

Der Zusatz von BSA in dieser Konzentration (0.01 %) besitzt somit keinen Einfluß auf das Ausmaß der Adsorption von Desmopressin.

In weiteren Untersuchungen wurde die BSA-Konzentration auf 0.1 % erhöht, mit dem Ergebnis, daß diese BSA-Konzentration ausreichend war, das Desmopressin kompetitiv von den Bindungsstellen der Glas- bzw. PP-Oberflächen zu verdrängen.

In einer Konzentration an BSA von 0.1 % fand kein signifikanter Abfall im Desmopressin-Gehalt statt.

In folgender Graphik wird dies veranschaulicht:

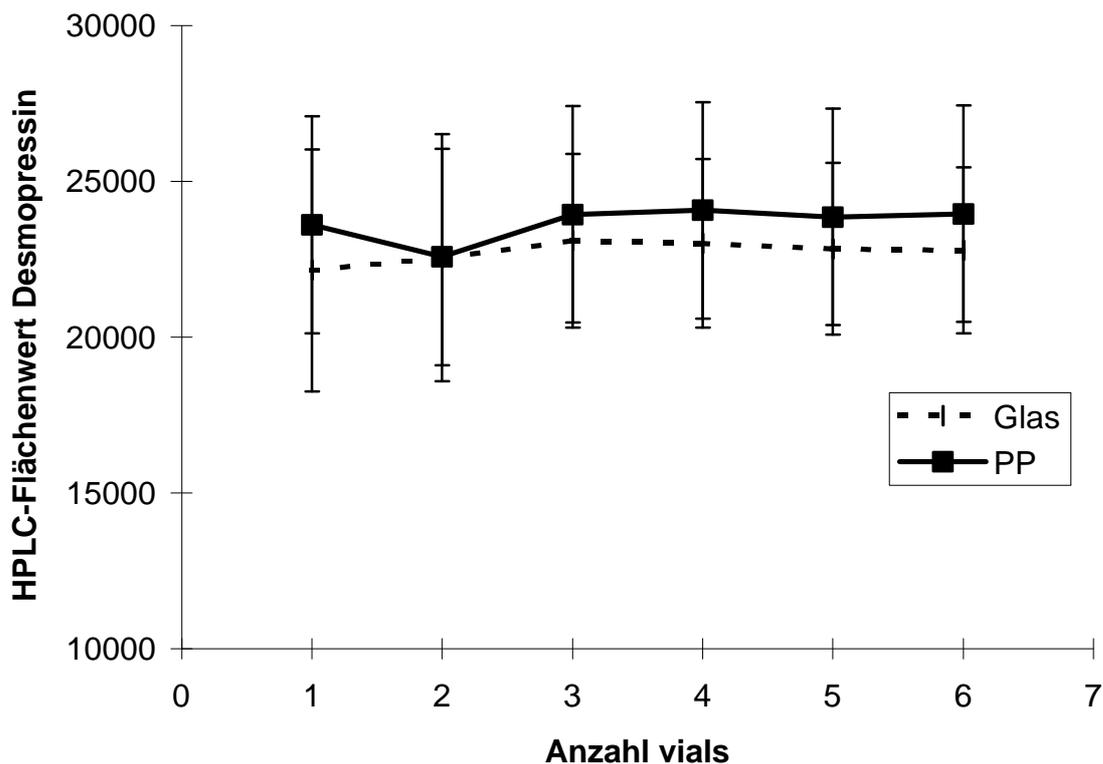


Abb. 29: Verhalten von Desmopressin in 0.1 % BSA-Lösung gegenüber Oberflächen von Glas und PP

Es ist keine signifikante Änderung in der Desmopressin-Konzentration (hier ausgedrückt als Desmopressin HPLC-Flächenwert) mit zunehmender Kontaktfläche von Glas oder PP nachweisbar ($\alpha=0.05$).

Es sollte jedoch beachtet werden, daß die Gegenwart von Proteinen (hier BSA) im Hinblick auf Stabilitätsprüfungen neuer Formulierungen problematisch ist, da deren Einfluß auf die Stabilität des Arzneistoffes (Desmopressin) nicht eingeschätzt werden kann. Desweiteren besitzt BSA wie alle Peptide und Proteine oberflächenaktive Eigenschaften, die in manchen Fällen sehr nützlich sein können, jedoch die Wechselwirkungen von Polymer und Peptid beeinflussen können.

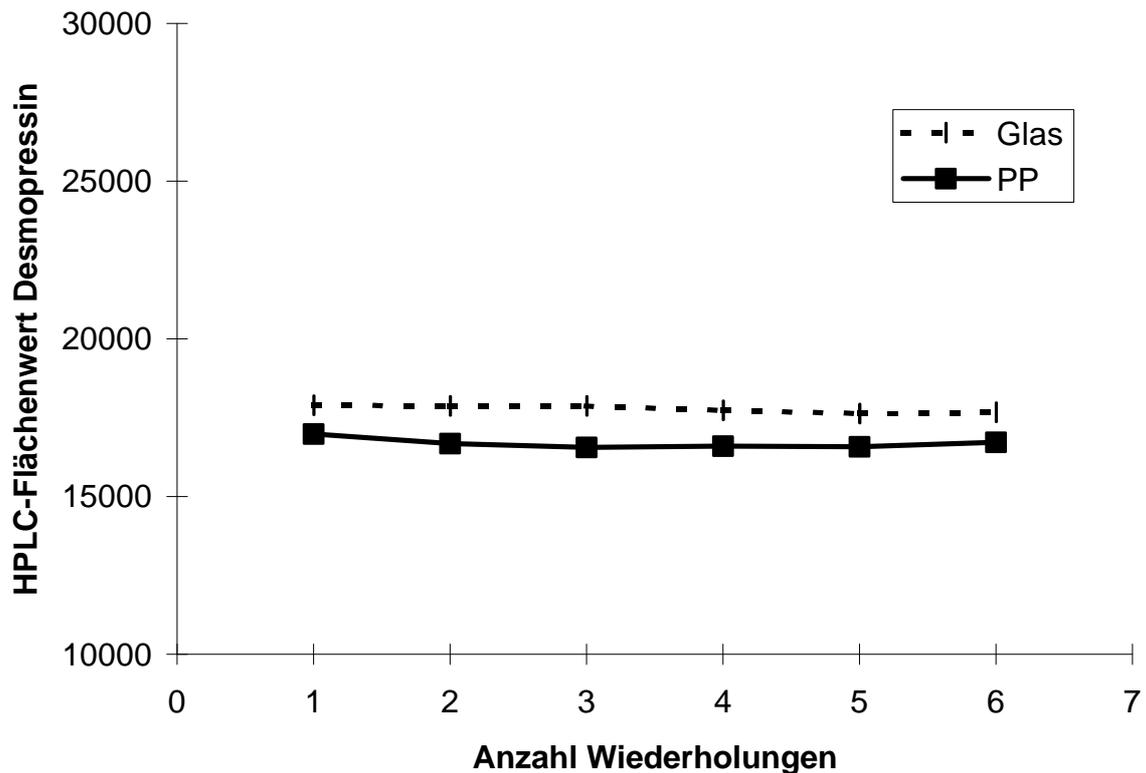


Abb. 30: HPLC-Flächenwerte von Desmopressin in destilliertem Wasser
- Pipettierung nach quantitativer Bestimmung in das gleiche vial -

Sinn dieser Untersuchung war, den Einfluß der Pipette (Einmalpipette) zu prüfen. Es wäre theoretisch möglich, daß der Gehaltsverlust von Desmopressin durch die Einmalpipetten, die nötig sind, um das Volumen nach der Analyse in ein weiteres vial zu überführen, hervorgerufen wird.

Es ist jedoch zu erkennen, daß die Pipettierung keinen Einfluß auf den Wirkstoffverlust besitzt; die Einmalpipette demnach keine Sorptionsfläche für Desmopressin darstellt.

Diese Erkenntnis ist im Rahmen der Sorptionsuntersuchung eine sehr wichtige Voraussetzung, um das Ergebnis richtig interpretieren zu können und keine falschen Schlüsse aufgrund der Möglichkeit, daß das Peptid durch die Pipettierung "verlorengeht", zu ziehen.

Ein Verlust an Desmopressin durch die Pipettierung mit den verwendeten Einmalpipetten kann demnach ausgeschlossen werden.

Auch im Hinblick auf die Eignung solcher Einmalpipetten für die Herstellung und Analytik ist dies Resultat sehr wichtig, da diese Pipetten dort sehr nützlich sind.

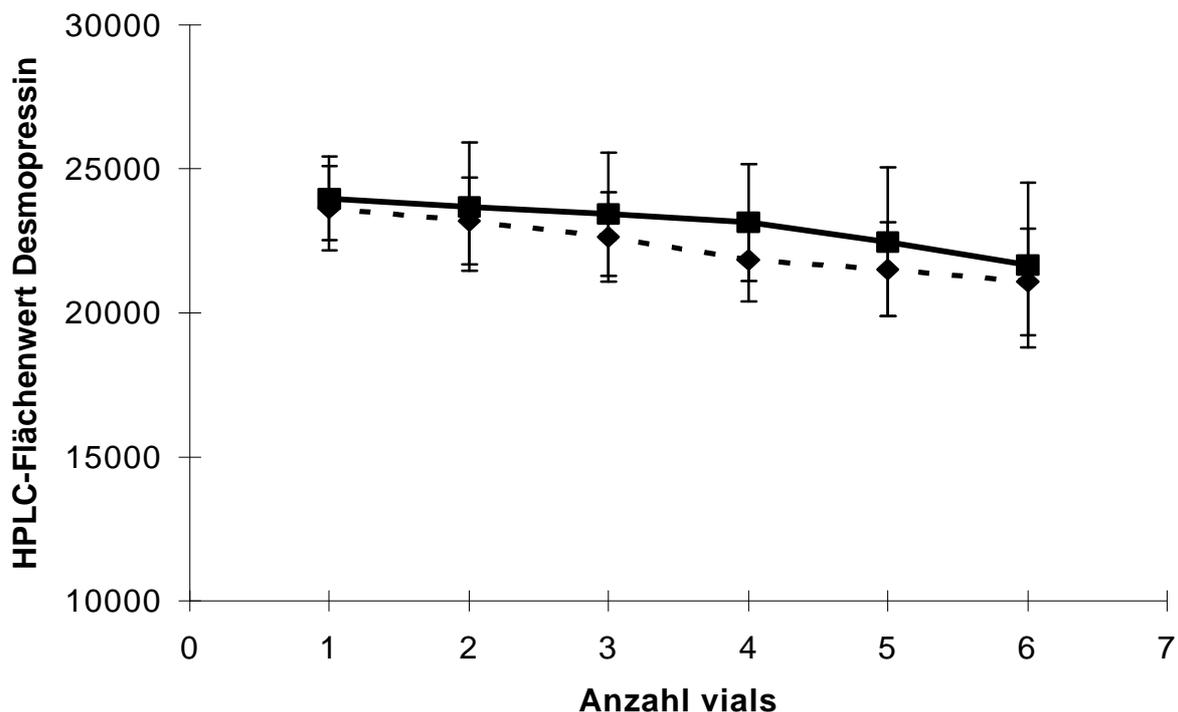


Abb. 31: Verringerung der Desmopressin-Flächenwerte (normalisiert auf eine Konzentration) von vial zu vial durch Adsorption an Glas respektive PP

Es ist ein linearer Zusammenhang zwischen der Desmopressin-Konzentration (hier dargestellt als HPLC-Flächenwert) und der Kontaktfläche bei beiden Materialien (Glas und PP) zu erkennen ($\alpha=0.05$).

Mit zunehmender Kontaktfläche (von vial 1 bis vial 6) verringert sich die Konzentration an Desmopressin in der Untersuchungslösung.

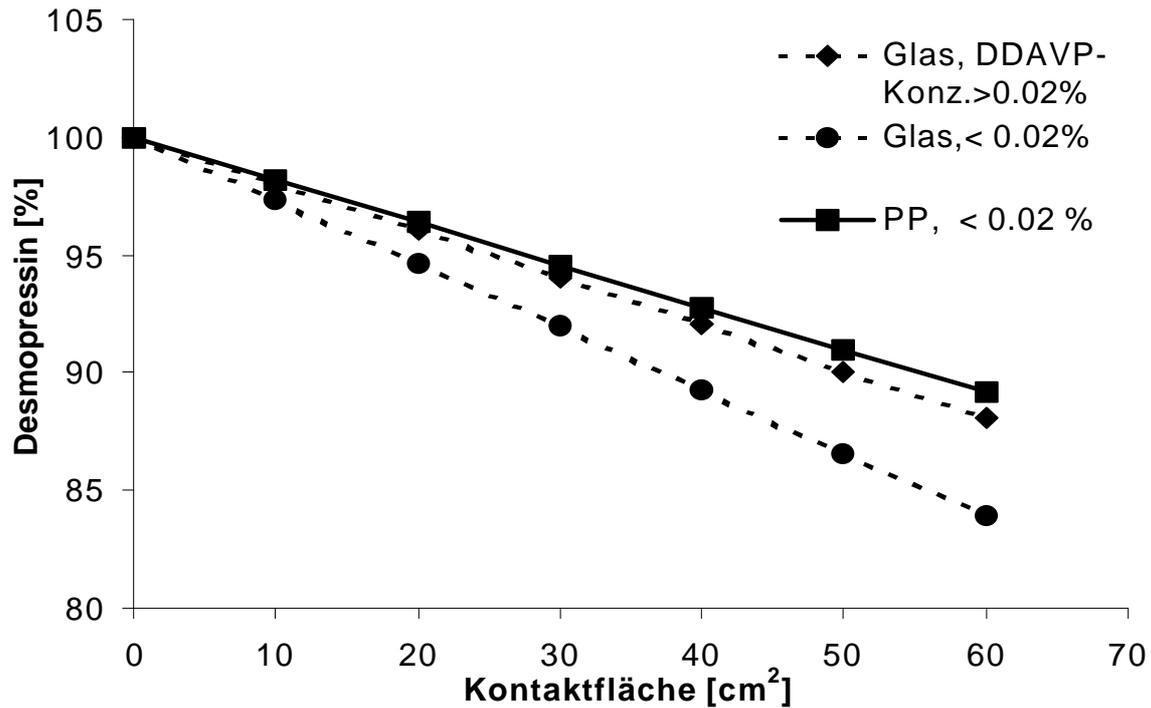


Abb. 32: Verringerung des Desmopressin-Gehaltes in destilliertem Wasser durch Adsorption an Glas und PP ,
- Abhängigkeit der Desmopressin-Ausgangskonzentration -

Bei der Untersuchung der Adsorption von Desmopressin an Glasoberflächen kann eine Konzentrations-Abhängigkeit gezeigt werden.

Ist die Desmopressin-Konzentration in Lösung zu Beginn geringer als 0.02 %, so ist der prozentuale Wirkstoffverlust deutlich größer als bei einer Ausgangskonzentration von > 0.02 %.

Bei der Untersuchung der Adsorption von Desmopressin an PP-Oberflächen wurden nur Desmopressin-Konzentrationen < 0.02 % eingesetzt, so daß hier keine Differenzierung möglich ist.

Abschätzung der **adsorbierten Menge Desmopressin [μg] pro cm^2 Kontaktfläche:**

	DDAVP [%]	
	< 0.02	> 0.02
Glas	0.27 \pm 0.01	0.41 \pm 0.12
PP	0.28 \pm 0.10	n.d.

Ergebnis:

1. Desmopressin sorbiert an die Oberflächen von Glas und PP.
2. Geschwindigkeit der Adsorption: < 15 Minuten.
3. Das Ausmaß der Adsorption von Desmopressin an Glas- respektive PP-Oberflächen ist vergleichbar; ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Materialien ist nicht nachweisbar ($\alpha=0.05$).
4. Je höher die eingesetzte Desmopressin-Konzentration ist, desto größer ist die adsorbierte Menge an Desmopressin. Oberhalb einer Desmopressin-Konzentration von 0.02 % ist ein weiterer Mengenverlust nicht nachweisbar ($\alpha=0.05$).
5. Die Gegenwart von 0.1 % BSA in wässriger Lösung beeinflusst die Adsorption von Desmopressin an Glas- und PP-Oberflächen. Eine Verringerung der Desmopressin-Konzentration in Lösung ist nicht mehr nachweisbar ($\alpha=0.05$).
6. Eine BSA-Konzentration von 0.01 % ist für eine Verringerung der Adsorption von Desmopressin an Glas-Oberflächen nicht ausreichend.

4.1.2 Polycarbophil

4.1.2.1 Partikelform und -größe

Die im Mikroskop (Kapitel 3.1.7) zu erkennenden Partikel sind annähernd rund und stellen Agglomerate dar, die eine Größe von bis 300 μm erreichen können. Die meisten Agglomerate besitzen jedoch eine Größe von 3 – 25 μm .

Die Primärpartikel konnten im Lichtmikroskop nur sehr unscharf erkannt werden. Laut Herstellerangaben besitzen diese eine Größe von ca. 0.2 μm .

Die Polycarbophil-Partikel sind amorph (keine Brechung des polarisierten Lichtes).

Bei geringfügiger Wasseraufnahme durch die Umgebungsfeuchte bilden die Polycarbophil-Partikel eine quellende Hülle um die Feststoffpartikel (Information B.F.Goodrich).

Abb. 33: Mikroskopische Aufnahme von Polycarbophil, 100 fache Vergrößerung
Balkenlänge entspricht 100 μm

4.1.2.2 Wassergehalt

Aus der Untersuchung mittels Trocknungswaage (3.1.4.1):

Probe: Polycarbophil Ausgangssubstanz

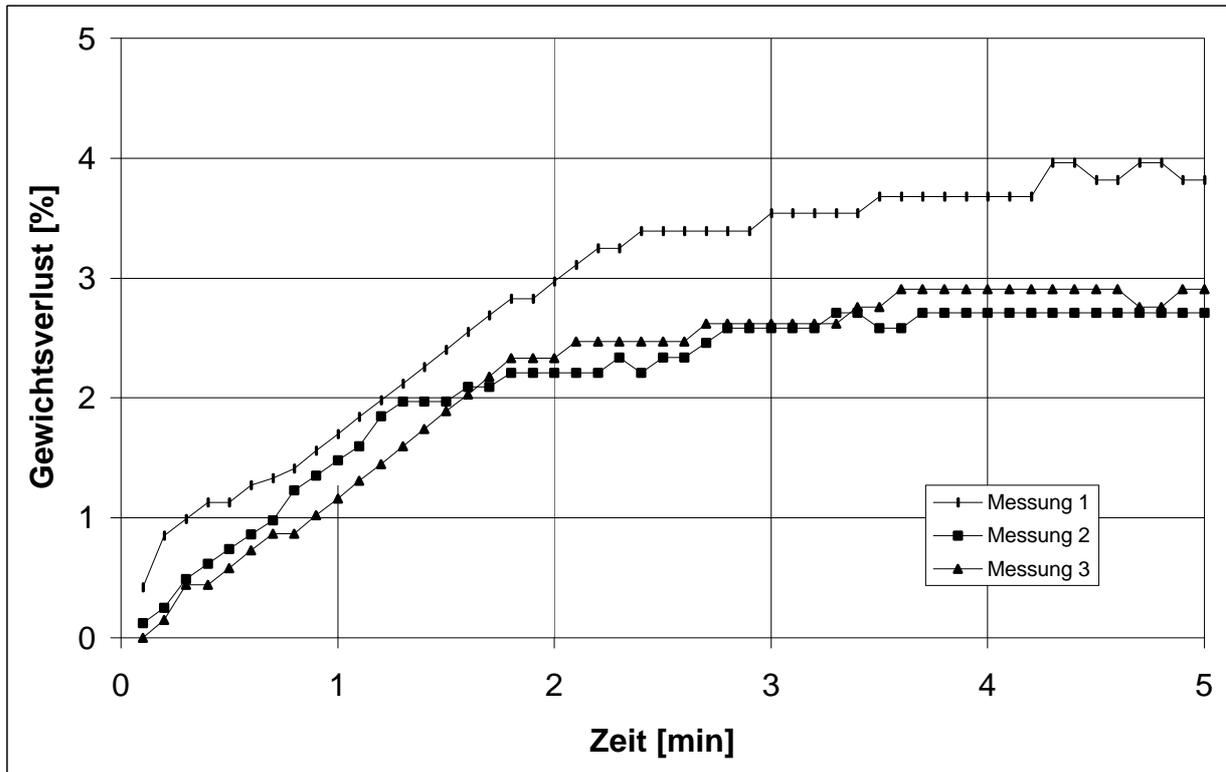


Abb. 34: Gewichtsverlust von Polycarbophil Ausgangssubstanz während der Untersuchung in der Trocknungswaage bei 110 °C

Man erkennt bei der ersten Messung einen deutlich höheren Gewichtsverlust als bei der zweiten und dritten Messung. Es wurden dennoch die Werte aus allen drei Untersuchungen (Messungen 1-3) gemittelt.

Daraus errechnete sich ein mittlerer Massenverlust, der als Wassergehalt interpretiert wird.

Ergebnis [%]: 3.14 ± 0.59

Aus der Untersuchung mittels Thermogravimetrie (3.1.4.2):

Abb. 35: Thermogravimetrische Bestimmung des Wassergehaltes von Polycarbophil Ausgangssubstanz

Ergebnis [%]: 7.0 ± 0.5 [n=3] , gemessen mit TG 7 <7>
(Siehe dazu auch Kapitel 4.1.3.2)

(Ohne Abbildung)

7.5 ± 6.3 [n=3] , gemessen mit TG 760 <6>

Die aus der Bestimmung mittels Trocknungswaage erhaltenen Werte für den Wassergehalt sind deutlich geringer, als die mittels Thermogravimetrie bestimmten Wassergehalte.

Es zeigt sich bezüglich der Wassergehaltsbestimmung mittels Thermogravimetrie kein signifikanter Unterschied in den erhaltenen Ergebnissen, die aus den beiden Gerätetypen (<6> und <7>) hervorgegangen sind. Jedoch ist die Standardabweichung des Ergebnisses aus der thermogravimetrischen Untersuchung mit der Thermogravimetrie-Apparatur TG 760 <6> deutlich größer.

Die Unterschiede der Ergebnisse aus der Trocknungswaage und denen aus der Thermogravimetrie könnten folgendermaßen erklärt werden:

Die Strahlungswärme bei der Trocknungswaage heizt die Partikel an deren Oberfläche schnell auf, so daß Wasser in diesem Bereich sehr schnell abgegeben wird und sich damit eine relativ dichte Barriere für weitere Diffusion des Wassers aus dem Inneren der Partikel ergibt.

In der Thermogravimetrie erfolgt dagegen die Wärmeübertragung über Kontakt und die lineare Temperaturerhöhung erlaubt genügend schnelle Diffusion von freiem und locker gebundenem Wasser aus dem Inneren der Partikel an die Oberfläche.

4.1.2.3 Löslichkeit von Polycarbophil

Die Vorgehensweise wurde in Kapitel 3.1.8 beschrieben.

t.l. = teilweise löslich
n.l.= nicht löslich

<u>Lösungsmittel</u>	<u>Ergebnis</u>
WASSER	
dem.	Gel (trübe)
dest.	Gel (flüssiger als bei dem.Wasser)
80°C	Gel (trübe)
ETHANOL	
abs.	n.l.
50%	Gel (sehr fest)
70%	Gel
METHANOL	
abs.	Gel (flüssig)
50%	Gel
70%	Gel (fest, klar)
ESSIGSÄURE	
100%	n.l.
90%	Quellung (gering)
10%	Quellung
5%	Quellung
ACETON	
reinst	n.l.
TOLUOL	
reinst	t.l.
ACETONITRIL	
reinst	n.l.
NATRONLAUGE	
1N	Gel (flüssig, trübe)
0.1N	Gel (fest, klar)

4.1.2.4 Rheologische Eigenschaften

Die Methode und herstellungsrelevanten Ergebnisse sind bereits in Kapitel 3.1.6 ausführlich beschrieben worden.

4.1.2.4.1 Prüfung auf energetische Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten

Zu beachten ist, daß bei dieser Messung der Filtrerrückstand der Dispersionen untersucht wurde.

Die Kurven der Viskositäten, erhalten aus einer Schwingungs- und einer Schermessung, liegen in beiden Systemen (pH 4.0 und 6.8) nicht aufeinander. Das bedeutet, daß innerhalb der Polymerketten energetische Wechselwirkungen vorliegen, die umso größer sind, desto größer der Unterschied zwischen der Schwingungs- und Scherviskosität ist.

<u>Dispersionsmedium</u>	Viskosität [Pa*s], 0.1 s⁻¹, Filtrerrückstand	
	<u>Schermessung</u>	<u>Schwingungsmessung</u>
Citratpuffer pH 4.0	10³	6 * 10³
Phosphatpuffer pH 6.8	0,4 *10³	2,5 *10³

Abb. 36: Viskositätskurve einer Polycarbophil-Dispersion, pH 4.0, Filtrerrückstand
- Vergleich der Scher- und Schwingungsviskosität -

Abb. 37: Viskositätskurve einer Polycarbophil-Dispersion, pH 6.8, Filtrerrückstand
- Vergleich der Scher- und Schwingungsviskosität -

Die Schwingungsviskositäten liegen um das sechsfache höher als die Scherviskositäten. Dies gilt für beide Dispersionsmedien (pH 4.0 und 6.8), d.h.

1. Es liegen energetische Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten im gequollenen Zustand vor
2. Der pH-Wert des Dispersionsmediums (pH 4.0 resp. 6.8) hat keinen Einfluß auf die energetischen Wechselwirkungen .

4.1.2.4.2 Viskosität einer 0.5 %igen Polycarbophil-Dispersion

Die Viskosität einer Polycarbophil-Dispersion ist abhängig von

- der Quellungsdauer
- dem pH-Wert des Dispersionsmediums .

Auf die Quellungsdauer wurde bereits in Kapitel 3.1.6.2 eingegangen.

Die folgende Übersicht zeigt die Viskosität einer 0.5 %igen Polycarbophil-Dispersion in Abhängigkeit des pH-Wertes des Dispersionsmediums nach abgeschlossener Quellzeit:

<u>Dispersionsmedium</u>	<u>Viskosität [Pa*s]</u>
--------------------------	--------------------------

Citratpuffer pH 4.0	$0,2 \cdot 10^{-2}$
---------------------	---------------------

Phosphatpuffer pH 6.8	10^{-2}
-----------------------	-----------

D.h. die Viskosität einer 0.5 %igen Polycarbophil-Dispersion ist bei geringerem pH (4.0), bei dem die Polycarbophil-Ketten vor allem undissoziiert vorliegen, um das fünffache geringer als bei höherem pH.

Die Dissoziation der Carboxylgruppen (pH 6.8) im Polycarbophil führt zur Solvatisierung durch eingelagerte Wassermoleküle.

Der Abstand zwischen den Polymerketten wird vergrößert, es kommt zur verstärkten Quellung, so daß die Viskosität der Lösung zunimmt.

Bei geringerem pH-Wert (pH 4.0) liegen die Carboxylgruppen v.a. undissoziiert vor, so daß der Abstand zwischen den Polycarbophil-Ketten geringer ist als bei dissoziierten Polycarbophil-Ketten, da die undissoziierten Carboxylgruppen weniger solvatisiert werden und außerdem durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polymerketten zusammengehalten werden. Die Folge ist eine geringere Flüssigkeitsaufnahme, d.h. eine geringere Quellung des Polycarbophils in pH 4.0, verbunden mit einer geringeren Viskosität der entstehenden Dispersion.

Dies bestätigen auch die Untersuchungen der Filtrerrückstände, die im Falle der in pH 4.0 hergestellten Dispersionen eine höhere Viskosität zeigten (siehe Kapitel 4.1.2.4.1).

4.1.2.5 Kalorimetrische Daten

Mit Hilfe der Differenzkalorimetrie sollte das Schmelzverhalten und die Glasübergangstemperatur von verschiedenen Polycarbophil-Proben untersucht werden.

Die Methode und die untersuchten Proben bzw. deren Einflußgrößen sind bereits in Kapitel 3.1.5 beschrieben worden.

Folgende Faktoren werden hier näher dargestellt und diskutiert:

1. Heizgeschwindigkeit
2. Offenes versus geschlossenes Aluminiumpfännchen
3. Lagertemperatur
4. Glasübergangstemperatur
5. Lyophilisation

Anmerkung: Signale, die bei Temperaturen unter 40 °C auftreten, sollten vernachlässigt werden, da das Gerät noch einschwingt.

1. Optimierung der Heizgeschwindigkeit:

Um möglichst viele Informationen aus den Kurvenverläufen zu bekommen, ist im Rahmen von Vorversuchen mit Polycarbophil die Heizrate optimiert worden.

Folgende Heizgeschwindigkeiten wurden getestet: 1, 5, 10, 20 und 40 °C / min.

Bei einer Heizgeschwindigkeit < 20 °C / min waren relativ viele Störpeaks zu beobachten, während bei einer Heizgeschwindigkeit von ≥ 40 °C / min der Kurvenverlauf etwas unscharf wurde.

Das Optimum der Heizgeschwindigkeit sollte deshalb zwischen 20 und 40 °C / min liegen.

Abb. 38: DSC-Kurve von Polycarbophil, Heizgeschwindigkeit: 1 °C / min

Abb. 39: DSC-Kurve von Polycarbophil, Heizgeschwindigkeit: 10 °C / min

Abb. 40: DSC-Kurve von Polycarbophil, Heizgeschwindigkeit: 40 °C / min

2. Offenes versus geschlossenes Aluminiumpfännchen:

Es sollte geprüft werden, ob die Art des Probenpfännchens (geschlossen oder mit Loch) einen Unterschied in der resultierenden DSC-Kurve ergibt.

Beobachtung: Das geschlossene Pfännchen war nach der Messung extrem aufgebläht. Das ist ein Zeichen dafür, daß eine Substanz in den gasförmigen Zustand übergegangen ist und aus dem Pfännchen nicht entweichen konnte. Es könnte sich dabei möglicherweise um CO₂, Essigsäure-Ethylester oder Wasser handeln. Dies sind jedoch nur Vermutungen und es wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Versuche, die diese Vermutungen bestätigen könnten, durchgeführt.

Desweiteren wurde beobachtet, daß bei der Untersuchung im geschlossenen Alupfännchen auch exotherme Reaktionen vorkommen (bei ca. 148 °C).

3. Einfluß der Lagertemperatur (25 °C respektive 74 °C):

Polycarbophil Ausgangssubstanz wurde für sechs Wochen bei zwei verschiedenen Temperaturen offen eingelagert:

25 °C und 74 °C bei einer relativen Feuchte von 30 %.

Es sollte der Einfluß der Temperatur auf die Ausprägung von physikalischen Eigenschaften (Glasübergangstemperatur, Schmelzvorgang) untersucht werden. Die mit Hilfe der Thermogravimetrie (3.1.4.2) erhaltenen Wassergehalte (4.1.2.2) waren bei diesen Lagertemperaturen vergleichbar, jedoch unterschieden sich die Kurvenverläufe aus der thermogravimetrischen Untersuchung (Kapitel 4.1.3 Abb. 54 und Abb. 55).

Bei der bei 25 °C gelagerten Probe ist ein Gewichtsverlust bei einer Temperatur von ca. 52 °C zu erkennen. Dies ist bei der bei 74 °C gelagerten Probe nicht zu beobachten, wodurch vermutet werden kann, daß diese Substanz sich bei der 74°C-Lagerung dem Polycarbophil entzieht und somit während der TGA-Messung auch nicht durch einen Gewichtsverlust erfasst werden konnte.

Auch mittels DSC-Untersuchungen konnte ein Unterschied der Kurvenverläufe von Polycarbophil Pulver in Abhängigkeit der Lagertemperatur festgestellt werden:

Die Glasübergangstemperatur ist von der Lagertemperatur nicht beeinflusst worden, genausowenig wie das Auftreten einer endothermen Reaktion bei ca. 225 °C.

Es ist jedoch nur bei der Polycarbophil-Probe, die bei 25 °C gelagert wurde, ein weiteres Signal (endotherm) zwischen 50 – 125 °C zu erkennen. Dies ist bei der bei 74 °C gelagerten Probe nicht zu finden, was wohl auf die Gegenwart einer Substanz zurückzuführen ist, die bei 74 °C Lagerung sich dem System (Polycarbophil) entzieht oder in geringerem Maße vorliegt (z.B. leicht gebundenes Wasser).

Es ist nicht auszuschließen, daß es sich bei der sich verflüchtigenden Substanz u.a. um Essigsäure-Ethylester handelt, welches einen Siedepunkt von 76 °C besitzt und bei der Polymerisation im Herstellungsprozeß von Polycarbophil verwendet wird.

In der Spezifikation von Polycarbophil wird auf Essigsäure-Ethylester geprüft und es wird eine obere Gehaltsgrenze von 0.45 % gefordert.

Abb. 42: DSC-Kurve von Polycarbophil, gelagert bei 25 resp. 74°C / 30 % r.F.

Abb. 43: DSC-Kurve von Polycarbophil, Glasübergangstemperatur

4. Ermittlung der Glasübergangstemperatur von Polycarbophil Pulver

Der Wert für die Glasübergangstemperatur (**T_g**) für Polycarbophil Pulver kann aus der Graphik (Abb. 43) entnommen werden:

$$\mathbf{T_g = 133 \text{ }^\circ\text{C}}$$

Diese Angabe gilt bei einem Wassergehalt im Polycarbophil Pulver von ca. 7 % (Kapitel 4.1.2.2, Wassergehalt, ermittelt mit Hilfe der Thermogravimetrie).

Der Wert der Glasübergangstemperatur ist für das Pulver und das in destilliertem Wasser hergestellte Lyophilisat gleich.

Die Lagertemperatur beeinflusst die Glasübergangstemperatur nicht.

5. Einfluß der Lyophilisation

Durch den Vorgang des Dispergierens mit darauffolgender Lyophilisation kann sich der strukturelle Aufbau eines Systems verändern.

Dies kann sich in einer Veränderung des Schmelzverhaltens ausdrücken.

Um abzuschätzen, ob durch den Prozeß des Dispergierens und Lyophilisierens eine physikochemische Veränderung des Polycarbophils hervorgerufen wird, wurde Polycarbophil Pulver in destilliertem Wasser dispergiert, anschließend gefriergetrocknet und bis zur DSC-Untersuchung im Exsikkator über Phosphorpentoxid gelagert.

Die Kurvenverläufe der DSC-Untersuchungen von Polycarbophil-Pulver und – Lyophilisat sind sehr ähnlich.

Die Glasübergangstemperatur hat sich durch die Dispersion mit anschließender Lyophilisation nicht verändert (133 °C).

Jedoch zeigt sich folgender Unterschied:

Das Signal (endotherm) in der DSC-Kurve zwischen 50 - 125 °C ist bei der lyophilisierten Probe deutlich geringer als bei der Ausgangssubstanz. Es ist zu vermuten, daß durch den Trocknungsprozeß (Lyophilisation) und anschließende Lagerung über Phosphorpentoxid das freie und locker gebundene Wasser aus dem System entweicht (siehe dazu auch Abb. 35 Kapitel 4.1.1.2).

Abb. 44: DSC-Kurve von Polycarbophil, Vergleich -Pulver und -Lyophilisat

4.1.3. Lyophilisate und Feste Dispersionen

4.1.3.1. Wasseraufnahmevermögen von Polycarbophil-Lyophilisaten

Die Vorgehensweise ist in Kapitel 3.4.2 beschrieben.

Es wurde das Wasseraufnahmevermögen von Polycarbophil-Lyophilisaten, die in Phosphatpuffer pH 6.8 hergestellt wurden, bei verschiedenen Temperaturen und relativen Feuchten bestimmt. Es wurde nur dieser Lyophilisat-Typ untersucht, da aus rheologischen Untersuchungen (Kapitel 4.1.2.4.) erkannt werden konnte, daß in Gegenwart des Phosphatpuffers pH 6.8 die Wasseraufnahme vergleichsweise höher lag. Dies hatte sich in einer geringeren Festigkeit der abtrennbaren Gelphase bei Dispersionen gezeigt, die in wässrigem Puffer mit pH 6.8 hergestellt wurden.

Deshalb sind die in folgender Untersuchung angegebenen Daten für das Wasseraufnahmevermögen als obere Grenze für beide Systeme (pH 4.0 resp. 6.8) anzusehen.

Es wurde auf die Untersuchung von Desmopressin-haltigen Systemen (Feste Dispersionen) verzichtet, damit Desmopressin nicht unnötig verbraucht wurde. Der Desmopressin-Anteil ist in den Festen Dispersionen sehr gering (Verhältnis Polycarbophil / Desmopressin = 25 / 1), so daß davon ausgegangen werden kann, daß das Peptid keinen Einfluß auf das Wasseraufnahmevermögen der festen Systeme besitzt.

4.1.3.1.1 Einfluß der Temperatur

Es wurden die Wasseraufnahmekapazitäten von lyophilisiertem Polycarbophil bei folgenden Temperaturen untersucht:

- 25 °C
- 40 °C .

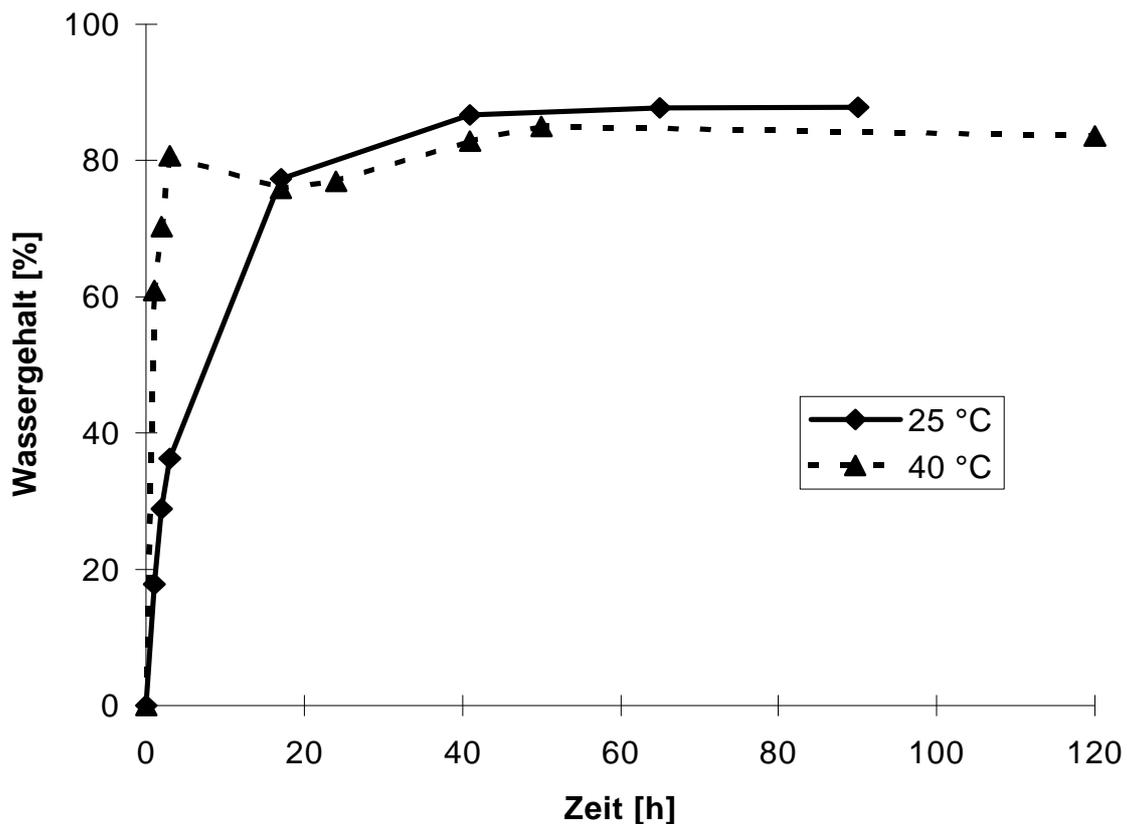


Abb. 45: Wasseraufnahme über die Zeit von lyophilisiertem Polycarbophil (P6) in Abhängigkeit von der Temperatur bei 80 % r.F.

Ergebnis:

Die Geschwindigkeit der Wasseraufnahme, betrachtet für dieses System (P6), ist abhängig von der Temperatur.

Bei einer höheren Temperatur nimmt lyoph. Polycarbophil sehr viel schneller Wasser auf und es kommt bei 40 °C Lagertemperatur zu einer Gleichgewichtseinstellung innerhalb von drei Stunden, verglichen mit ca. 40 Stunden (zwischen 17 und 40 h) bei einer Lagertemperatur von 25 °C.

Der aufgenommene Wassergehalt [%] nach Gleichgewichtseinstellung liegt jedoch bei der Polycarbophil-Probe, die bei 40 °C gelagert wurde, ca. 4 % unter dem Wert, der bei 25 °C erhalten wurde. Ob es sich hierbei um einen statistisch signifikanten Unterschied handelt, kann nicht gesagt werden, da der Versuch nur einmal durchgeführt wurde, so daß keine Angaben zu den Vertrauensbereichen gemacht werden konnten.

4.1.3.1.2 Einfluß der Feuchte

Zur Ermittlung der Wasseraufnahme aus der Umgebung wurden die Proben (P6) verschiedenen relativen Feuchten ausgesetzt (siehe hierzu auch Kapitel 3.4.2.).

Folgende Feuchten wurden untersucht:

11 , 30 , 33 , 38 , 44 , 50 und 80 % r.F.

Der besseren Übersicht halber wurde in der folgenden Graphik auf die Feinabstufungen in den relativen Feuchten zwischen 30 und 50 % r.F. verzichtet:

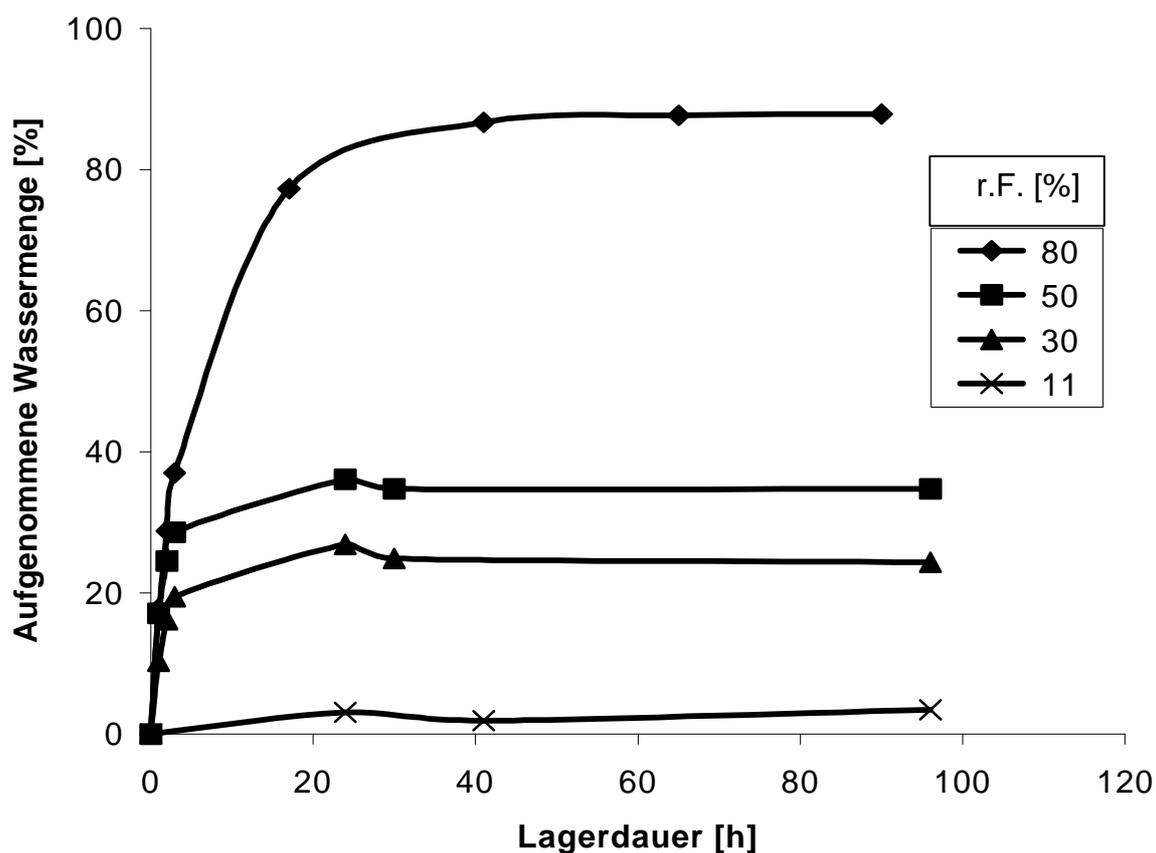


Abb. 46: Prozentual aufgenommene Wassermenge von Polycarbophil-Lyophilisaten in Abhängigkeit von der relativen Feuchte - Lagertemperatur: 25 °C -

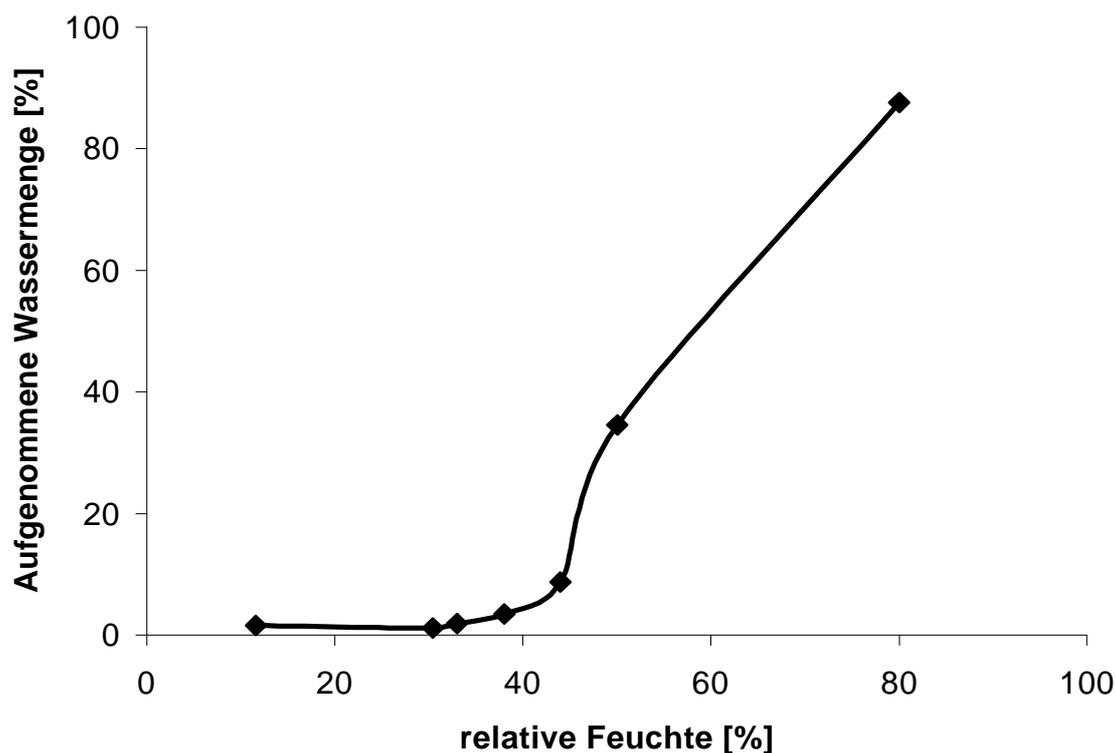


Abb. 47: Sorptionsisotherme von Polycarbophil-Lyophilisat, hergestellt in pH 6.8
- Lagertemperatur: 25 °C -

Ergebnis:

- Innerhalb von 17 bis 40 Stunden stellte sich ein Gleichgewicht zwischen dem Polycarbophil-Lyophilisat und der Umgebungsfeuchte ein.
Bei einer relativen Feuchte von 80 % stellte sich das Gleichgewicht vergleichsweise geringfügig langsamer ein.
- Je höher die relative Luftfeuchte ist, desto größer ist die aufgenommene Wassermenge.
Bei 11 % r.F. nimmt das Lyophilisat ca. 2 % Wasser auf, während bei einer relativen Feuchte von 80 % ca. 90 % Wasser aufgenommen werden können.
- Es konnte bei 80 % r.F. eine Konsistenzänderung des Lyophilisates beobachtet werden; das Lyophilisat wurde pastös.
- Anhand der Sorptionsisotherme ist zu erkennen, daß die Wasseraufnahme zwischen 40 und 80 % r.F. sprunghaft ansteigt, während die Änderung in der aufgenommenen Wassermenge zwischen 11 und 40 % r.F. nur gering ist.

4.1.3.2 Wassergehalt

Die Durchführung erfolgte mit Hilfe der in Kapitel 3.1.4.2 beschriebenen Thermogravimetrie <7> und mittels Karl-Fischer-Titration <8> (3.1.4.3).

Tab. 2: Wassergehalt [%] von Polycarbophil-Lyophilisaten, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 bzw. Phosphatpuffer pH 6.8 nach 1, 6 und 24 Wochen Lagerdauer ermittelt mit Karl-Fischer-Titration (KF) bzw. Thermogravimetrie (TG):

pH	Lagerungs-Klima		Lagerdauer	Wassergehalt [%]				
	T [°C]	r.F. [%]	[w]	KF	TG			
4.0	25	30	1	-	2.5	(Abb. 48)		
			6	-	2.5 [!]			
			24	7.2	-			
	50	30	24	5.8	-	(Abb. 52)		
			58	11	24		2.2	-
				30	24		4.0 *	-
	66	11	24	3.2	-	(Abb. 53)		
			74	30	24		4.0	-
				11	1		-	1.0 [!]
	6.8	25	30	6	-	n.d.	(Abb. 49)	
				24	2.5	-		
				1	-	1.5 [!]		
50		30	6	-	1.5 [!]	(Abb. 51)		
			24	3.5 *	-			
			1	-	1.5 [!]			
6.8	25	30	1	-	6.5	(Abb. 50)		
			6	-	5.0 [!]			
			24	8.2	-			
	50	30	24	5.0	-	(Abb. 53)		
			58	11	24		4.8 [?]	-
				30	24		2.1 *	-
	66	11	24	2.9	-	(Abb. 53)		
			74	30	24		1.9 [?]	-
				11	1		-	2.0
	6.8	25	30	6	-	2.0 [!]	(Abb. 53)	
				24	4.0	1.0 [!]		
				1	-	1.0 [!]		
50		30	6	-	1.0 [!]	(Abb. 51)		
			24	2.7	-			

! Ergebnis fraglich, da kein Kurven-Sprung (siehe Kapitel 3.1.4.2)

* Proben lösten sich relativ schlecht !

(?) Titrationsprobleme

Wassergehalt [%] von der Polycarbophil-Ausgangssubstanz (Polycarbophil-Pulver), ermittelt mit Thermogravimetrie <7> bei Lagerung über 6 Wochen:

1. ungelagert	7.0 ± 0.5 (deutlicher Kurvensprung)
2. 25 °C / 30 % r.F.	6.0 (Abb. 54)
3. 74 °C / 11 % r.F.	nicht detektierbar
4. 74 °C / 30 % r.F.	3.0 (Abb. 55)

Ergebnis:

- Die Wassergehalte sinken mit zunehmender Lagertemperatur.
- Bei 25 °C Lagertemperatur ergibt sich der höchste Wassergehalt. Dabei besitzen die Lyophilisate, die Phosphatpuffer-Salze enthalten (P6), einen deutlich höheren Wassergehalt.
- Bis zu einer Lagertemperatur von 66 °C sind die Unterschiede zwischen den Systemen (pH 4.0 respektive 6.8) relativ groß.
- Bei den beiden Lagertemperaturen 66 und 74 °C sind nur geringe Unterschiede in den Wassergehalten zwischen den Temperaturen und den relativen Feuchten erkennbar.
- Die Polycarbophil-Lyophilisate, hergestellt in pH 4.0, zeigen tendenziell einen geringeren Wassergehalt, als die in pH 6.8 hergestellten.
- Es ist keine Zu- oder Abnahme im Wassergehalt über die Lagerzeit erkennbar.
- Polycarbophil-Lyophilisate, die in Citratpuffer pH 4.0 hergestellt wurden, nehmen bei höherer Feuchte und gleicher Temperatur etwas mehr Wasser auf (Δ ca.1 %). Dies trifft für Polycarbophil-Lyophilisate, die in Phosphatpuffer pH 6.8 hergestellt wurden, nicht zu.
- Die Polycarbophil Ausgangssubstanz (Polycarbophil-Pulver) zeigt ein etwas anderes Verhalten:

Bei einem Lagerungsklima von 25 °C / 30 % r.F. enthält das Polycarbophil-Pulver ca. 6 % Wasser, d.h. etwas weniger als bei dem Polycarbophil-Lyophilisat, hergestellt in pH 4.0 (7.2 %) und deutlich weniger als bei dem Polycarbophil-Lyophilisat, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 (8.2 %).

Allerdings ist bei der Polycarbophil-Ausgangssubstanz (Pulver) ein deutlicher Masseverlust (7 %) bei einer Temperatur um 50 °C zu verzeichnen.

Dieses Phänomen tritt bei den Lyophilisaten nicht auf und könnte möglicherweise folgendermaßen erklärt werden:

Der Masseverlust bei der Ausgangssubstanz könnte auf das Vorhandensein eines relativ flüchtigen Nebenproduktes, z.B. aus der Synthese (Ethylacetat) oder durch freies bzw. schwach gebundenes Wasser zurückzuführen sein. Während der Trocknung unter Vakuum im Gefriertrockner würden diese Substanzen aus der Probe verdampfen und somit im Produkt (Lyophilisat) nicht mehr nachweisbar sein.

Das gleiche gilt für die bei 74 °C gelagerten Proben: Bei dieser Temperatur haben sich die Substanzen der Probe entzogen, so daß sie mittels thermogravimetrischer Methoden nicht mehr detektiert werden können. Das erklärt, warum die bei 74 °C gelagerten Polycarbophil-Lyophilisate und das Polycarbophil-Pulver keinen Masseverlust bei ca. 50 °C (Kurvensprung) während der thermogravimetrischen Analyse zeigen.

Ob es sich nur um eine Substanz, nämlich Wasser, oder um mehrere Bestandteile, z.B. aus der Synthese (Ethylacetat) handelt, kann entweder durch eine Head Space Analyse (GC) oder mit Hilfe einer Schätzung der Enthalpie des Peaks aus der Dynamischen Differenzkalorimetrie (Abb. 42) ermittelt werden.

Verdampfungswärme von Wasser : 2.4 kJ*g⁻¹

Verdampfungswärme von Ethylacetat: 0.3 kJ*g⁻¹

Peakfläche 375 mJ

Der Wassergehalt der Probe betrug 7 bis 8 %, die Einwaage der Probe für die DSC-Untersuchung betrug 2.120 mg <23>. Das bedeutet, daß bei einem Wassergehalt von 7 bis 8 % die untersuchte Probe 0.148 bis 0.169 mg Wasser enthielt.

Um diese Menge Wasser zu verdampfen ist eine Wärmemenge (Energie) von 355 bis 407 mJ notwendig. Die graphisch ermittelte Enthalpie von 375 mJ liegt innerhalb dieses Bereiches.

Laut Analysenzertifikat beträgt der Gehalt an Ethylacetat 0.45 %, was bedeutet, daß in der untersuchten Probe (2.120 mg) 0.009 mg Ethylacetat enthalten waren. Um 0.009 mg Ethylacetat zu verdampfen ist eine Wärmemenge von 0.0027 mJ notwendig.

Die Berechnung zeigt, daß es bei dieser Mess-Methode nicht möglich ist, Ethylacetat als Verunreinigung aus der Synthese des Polycarbophils neben freiem oder schwach gebundenem Wasser zu identifizieren.

Außerdem resultiert aus der Berechnung, daß davon ausgegangen werden kann, daß die Massenänderung bei ca. 50 °C durch freies bzw. schwach gebundenes Wasser hervorgerufen wird.

- Bei 74 °C / 30 % r.F. zeigt das Pulver, verglichen mit den Lyophilisaten, die bei dem gleichen Klima eingelagert wurden, einen höheren Wassergehalt.
- Bei hohen Lagertemperaturen (74 °C) findet nur eine geringe Gewichtsänderung bei Erhöhung der Temperatur während der Messung statt; ein Kurvensprung wie bei dem Polycarbophil-Ausgangsmaterial (Pulver) bleibt aus. Dies deutet darauf hin, daß Polycarbophil durch die Lyophilisation und Lagerung bei hohen Temperaturen strukturell verändert wird, so daß das in den Lyophilisaten enthaltene Wasser nicht spontan aus dem System entfernt werden kann. Es ist anzunehmen, daß das gebundene Wasser in den Lyophilisaten langsam aus den Lyophilisaten entfernt wird, was sich in geringen Gewichtsänderungen während der Messung äußert. Dies bestätigt die Beobachtungen, die bei der Probenaufbereitung der bei hohen Temperaturen gelagerten Lyophilisaten gemacht wurden: Mit zunehmender Lagerdauer ließen sich die Polycarbophil-Lyophilisate und Feste Dispersionen immer schlechter zentrifugieren, was auf eine Verringerung der Ausbildung eines kohärenten Gerüsts (Gel) hindeutet.
- Bei Mess-Temperaturen > 150 °C findet eine starke Gewichtsverringerung der Probe statt. Es ist zu vermuten, daß es sich hierbei um die Bildung von Anhydriden handelt, die durch die große Anzahl an Carboxylgruppen (siehe Kapitel 2.: chemischer Aufbau von Polycarbophil) möglich ist. Der Gewichtsverlust kommt durch den Austritt von Wasser durch eine chemische Reaktion (Kondensation) zustande. Interessanterweise ist die dafür notwendige Temperatur bei der Polycarbophil-Ausgangssubstanz deutlich größer (um ca. 50°C), verglichen mit den Lyophilisaten. Es ist daher anzunehmen, daß bei den Polycarbophil-Lyophilisaten eine Anhydridbildung leichter möglich ist, da weniger Energie (Temperatur) für diese Kondensationsreaktion notwendig war.

Übersicht der Graphiken aus der Thermogravimetrie (3.1.4.2), ermittelt mit <7>:

Abb. 48: Polycarbophil lyophilisiert pH 4.0, Lagerung bei 25 °C / 30 % r.F., 6 Wochen

Abb. 49: Polycarbophil lyophilisiert pH 4.0, Lagerung bei 74 °C / 30 % r.F., 6 Wochen

Abb. 50: Polycarbophil lyophilisiert pH 6.8, Lagerung bei 25 °C / 30 % r.F., 6 Wochen

Abb. 51: Polycarbophil lyophilisiert pH 6.8, Lagerung bei 74 °C / 30 % r.F., 6 Wochen

Abb. 52: Polycarbophil lyophilisiert pH 4.0, Lagerung bei 74 °C / 11 % r.F., 6 Wochen

Abb. 53: Polycarbophil lyophilisiert pH 6.8, Lagerung bei 74 °C / 11 % r.F., 6 Wochen

Abb. 54: Polycarbophil Ausgangssubstanz, Lagerung bei 25 °C / 30 % r.F.,6 Wochen

Abb. 55: Polycarbophil Ausgangssubstanz, Lagerung bei 74 °C / 30 % r.F.,6 Wochen

4.1.3.3 Kalorimetrische Daten

Die dynamische Differenzkalorimetrie diente im Rahmen dieser Arbeit dazu, strukturelle Veränderungen der Festen Dispersionen und Lyophilisate während der Lagerung zu untersuchen.

Es sollte vor allem geprüft werden, ob durch die Lagerung der Lyophilisate bei hohen Temperaturen (74 °C / 30 % r.F.) über sechs Wochen Veränderungen in der Polymerstruktur stattfinden, die sich dann in einer Änderung im Schmelzverhalten äußern würden.

Desweiteren wurden die Lyophilisate zusätzlich bei 25 °C / 30 % r.F. für sechs Wochen eingelagert, so daß der Einfluß der Lagertemperatur abgeschätzt werden konnte.

Außerdem wurden Desmopressin-haltige Feste Dispersionen, die sieben Monate bei 74 °C / 30 % r.F. gelagert wurden, untersucht und mit den Polycarbophil-Lyophilisaten (Blindwert) verglichen.

Es wurden die Schmelzkurven der Lyophilisate, die in Citratpuffer pH 4.0 und Phosphatpuffer pH 6.8 hergestellt wurden, miteinander verglichen.

Die Gegenwart der Puffersalze stellt bei Untersuchungen mittels Differenzkalorimetrie ein Problem dar, da diese ebenfalls Signale erzeugen und somit das Schmelzverhalten der eigentlich zu untersuchenden Substanz stören können.

Deshalb ist es unumgänglich, die eingesetzten Puffersalze isoliert zu analysieren (Blindwert), um abzuschätzen, welche Signale in der DSC-Schmelzkurve allein durch die Puffersalze hervorgerufen werden. Für diese Untersuchung wurden die Pufferlösungen ebenfalls lyophilisiert.

Die Methode wurde bereits in Kapitel 3.1.5 beschrieben.

Vergleichende kalorimetrische Daten von Polycarbophil (Ausgangssubstanz und gelagert) siehe Kapitel 4.1.2.5.

Anmerkung: Signale, die bei Temperaturen unter 40 °C auftreten, sollten vernachlässigt werden, da das Gerät noch einschwingt.

1. Vergleich der Polycarbophil-Lyophilisate mit den Lyophilisaten des Dispersionsmittels (Puffer)

Citratpuffer pH 4.0 zeigt extrem starke Signale, die in Polycarbophil lyophilisiert (P4) deutlich geringer sind, da die Kristallisation des Puffers gestört sein müßte. Die DSC-Kurve des lyophilisierten Citratpuffers läßt einen deutlichen Schmelzpeak der Citronensäure erkennen. Die Temperatur liegt für den ersten Peak bei etwa 135 °C; die deutliche Abweichung vom Literaturwert (153 °C) dürfte durch gestörte Kristallisation infolge Lyophilisation hervorgerufen worden sein. Die folgenden Signale resultieren vermutlich aus thermischen Zersetzungsreaktionen.

Die flache Endotherme des Polycarbophil-Citronensäurepuffer-Lyophilisates ab Temperaturen von etwa 160 °C deutet an, daß der Puffer nicht kristallisierte, mithin fein im Polymer verteilt vorliegen muß.

Nach der Messung des lyophilisierten Citratpuffers konnten Spuren von Zersetzungsprodukten des Puffers am Aluminiumpfännchen beobachtet werden.

Die DSC-Kurvenverläufe des Polycarbophil-Lyophilisates, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 (P6) und lyophilisiertem Phosphatpuffer pH 6.8 sind sehr ähnlich. Bei dem lyophilisierten Phosphatpuffer ist ein zusätzliches Signal bei ca. 200 °C zu erkennen.

Abb. 56: DSC-Kurve von Polycarbophil-Lyophilisat, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0
- Vergleich mit dem Lyophilisat des Dispersionsmittels (Citratpuffer pH 4.0) -

Abb. 57: DSC-Kurve von Polycarbophil-Lyophilisat, hergestellt in Puffer pH 6.8
- Vergleich mit dem Lyophilisat des Dispersionsmittel (Phosphatpuffer pH 6.8) -

2. Einfluß der Lagertemperatur

Bei beiden pH-Werten ist ein Unterschied im Schmelzverhalten durch die beiden Lagertemperaturen (74 respektive 25 °C) zu erkennen:

Bei P4, 74 °C-Lagerung (Abb. 58) ist ein Signal (endotherme Reaktion) bei 175 °C zu ermitteln, welches bei der bei 25 °C gelagerten Probe nur in ganz geringem Ausmaß und zu etwas geringeren Temperaturen hin verschoben, zu beobachten ist.

Bei P6, 25 °C-Lagerung (Abb. 59) ist ein zusätzliches Signal zwischen 50 - 125 °C zu beobachten, welches bei der bei 74 °C gelagerten Probe nicht zu erkennen ist, jedoch auch bei dem lyophilisiertem Phosphatpuffer zu finden ist. Es liegt die Vermutung nahe, daß das Signal von oberflächlich gebundenem Wasser hervorgerufen wird.

Aus den Untersuchungen mittels Thermogravimetrie konnte für den lyophilisierten Phosphatpuffer ein deutlich höherer Wassergehalt ermittelt werden (ca. 6 %), als für den lyophilisierten Citratpuffer (ca. 2 %).

Den Ergebnissen aus der Wassergehaltsbestimmung (4.1.3.2) ist zu entnehmen, daß der Wassergehalt in den Lyophilisaten, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 und gelagert bei 25 °C / 30 % r.F. am höchsten ist.

Abb. 59: DSC-Kurve von Polycarbophil-Lyophilisat, hergestellt in pH 6.8 (P6)
- Einfluß der Lagertemperatur –

3. Einfluß des pH-Wertes

Eine Abhängigkeit des Schmelzverhaltens der Lyophilisate vom pH-Wert des Dispersionsmediums ist nur bei den bei 25 °C gelagerten Proben zu beobachten.

Die Kurvenverläufe der bei 74 °C gelagerten Proben sind sehr ähnlich. Ein Unterschied im strukturellen Aufbau der Lyophilisate scheint sich während der Lagerung bei dieser relativ hohen Temperatur auszugleichen.

Die Gegenwart der Puffersalze hat einen großen Einfluß auf das Schmelzverhalten der Lyophilisate. Ein Vergleich der folgenden DSC-Kurven (Abb. 60 und 61) mit den DSC-Kurven des Polycarbophil-Lyophilisates, dispergiert in destilliertem Wasser (Abb. 44) und von Polycarbophil-Pulver, gelagert bei 74 °C (Abb. 42) zeigt, daß in Gegenwart von Puffersalzen

1. eine Glasübergangstemperatur bei ca. 133 °C nicht mehr zu erkennen ist,
2. eine endotherme Reaktion (Zersetzung) mit einem Maximum bei ca. 225 °C nicht vorliegt.

Die DSC-Kurven von Polycarbophil-Pulver und Polycarbophil-Lyophilisat, hergestellt in destilliertem Wasser, sehen sich sehr ähnlich, jedoch unterscheiden sich diese beiden deutlich von den DSC-Kurven der Puffersalz-haltigen Lyophilisate.

Zum Vergleich siehe Kapitel 4.1.2.5: Ergebnisse Polycarbophil -Kalorimetrische Daten.

Abb. 60: DSC-Kurve von Polycarbophil-Lyophilisaten, hergestellt in pH 4.0 und 6.8 nach Lagerung bei 25 °C / 30 % r.F., 6 Wochen

Abb. 61: DSC-Kurve von Polycarbophil-Lyophilisaten, hergestellt in pH 4.0 und 6.8 nach Lagerung bei 74 °C / 30 % r.F., 6 Wochen

4. Vergleich von Polycarbophil-Lyophilisaten und Festen Dispersionen

Um zu prüfen, ob die Festen Dispersionen, bestehend aus Desmopressin und Polycarbophil, das gleiche Schmelzverhalten zeigen wie die Polycarbophil-Lyophilisate (Blindwert), wurden diese miteinander verglichen.

Es wurden die Festen Dispersionen aus der Langzeiteinlagerung untersucht. Diese waren zum Zeitpunkt der DSC-Untersuchungen sieben Monate bei 74 °C / 30 % r.F. gelagert worden.

Die DSC-Kurven der Polycarbophil-Lyophilisate unterscheiden sich von den Desmopressin-haltigen Festen Dispersionen: In der Festen Dispersion, hergestellt in pH 4.0 (Abb. 62), ist ein Signal bei ca. 50 °C klar zu erkennen. Dies Signal fehlt bei dem Blindwert oder ist nur extrem gering.

In der Festen Dispersion, hergestellt in pH 6.8 (Abb. 63), ist ein weiteres Signal bei 160 °C, verglichen mit dem Blindwert, zu erkennen.

Abb. 62: DSC-Kurve einer Festen Dispersion, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0
gelagert bei 74 °C / 30 % r.F. - Vergleich mit dem Blindwert -

Abb. 63: DSC-Kurve einer Festen Dispersion, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8,
gelagert bei 74 °C / 30 % r.F. - Vergleich mit dem Blindwert -

4.2. Chemische Befunde

4.2.1 Stabilität von Desmopressin in fester Form

Methode und Vorgehensweise siehe Kapitel 3.4.4 und 3.1.2. .

Tabellarische Darstellung des Desmopressin-Gehaltes und der Zersetzungsprodukte über die Zeit siehe Anhang.

Betrachtet und ausgewertet wurden die Formulierungen (Lyophilisate und Feste Dispersionen) aus der Langzeiteinlagerung (24-Wochen-Lagerung).

I. Einfluß der Temperatur

System **D4** (Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0):

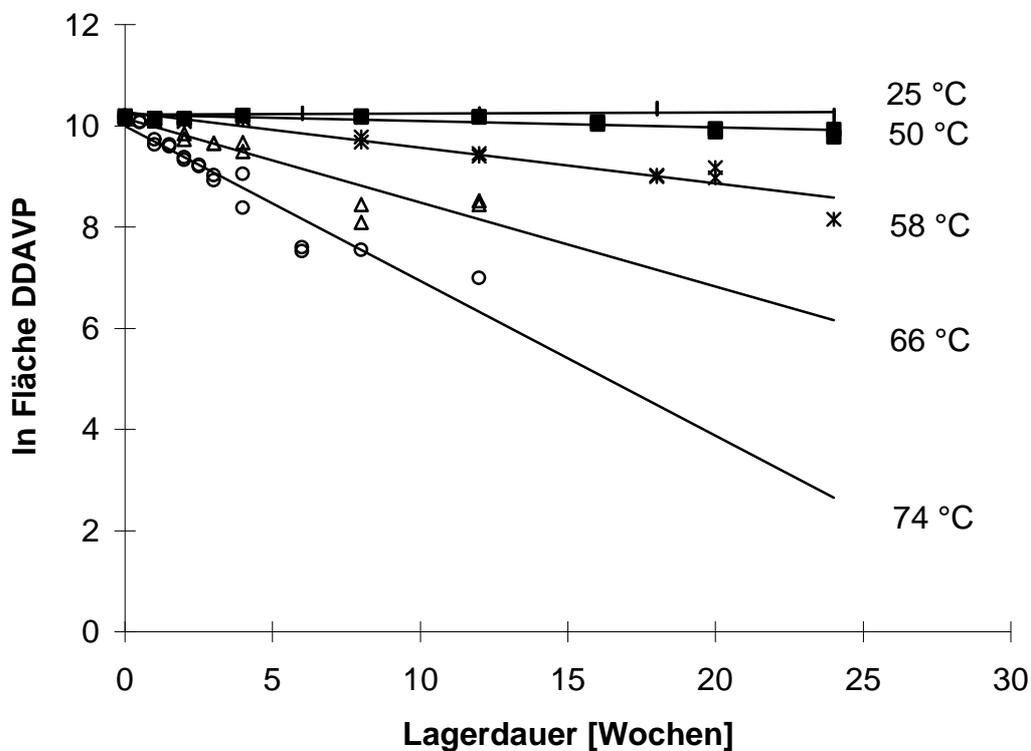


Abb. 64: Stabilität von Desmopressin-Lyophilisaten, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 in Abhängigkeit der Lagertemperatur bei 30 % r.F.

→ Nach logarithmischer Transformation der Desmopressin-Peakflächenwerte ist eine lineare Abnahme an Desmopressin in Abhängigkeit der Temperatur über die Lagerdauer zu erkennen, was auf eine Zersetzungs-Reaktion erster Ordnung hindeutet.

→ Mit zunehmender Temperatur nimmt der Desmopressin-Gehalt pro Zeiteinheit drastisch ab. Entsprechend nimmt mit zunehmender Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeit zu, so daß eine größere Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) resultiert.

→ Bei 25 °C / 30 % r.F. findet über den untersuchten Zeitraum praktisch keine Gehaltsabnahme von Desmopressin statt.

System **DP4** (Feste Dispersion, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0):

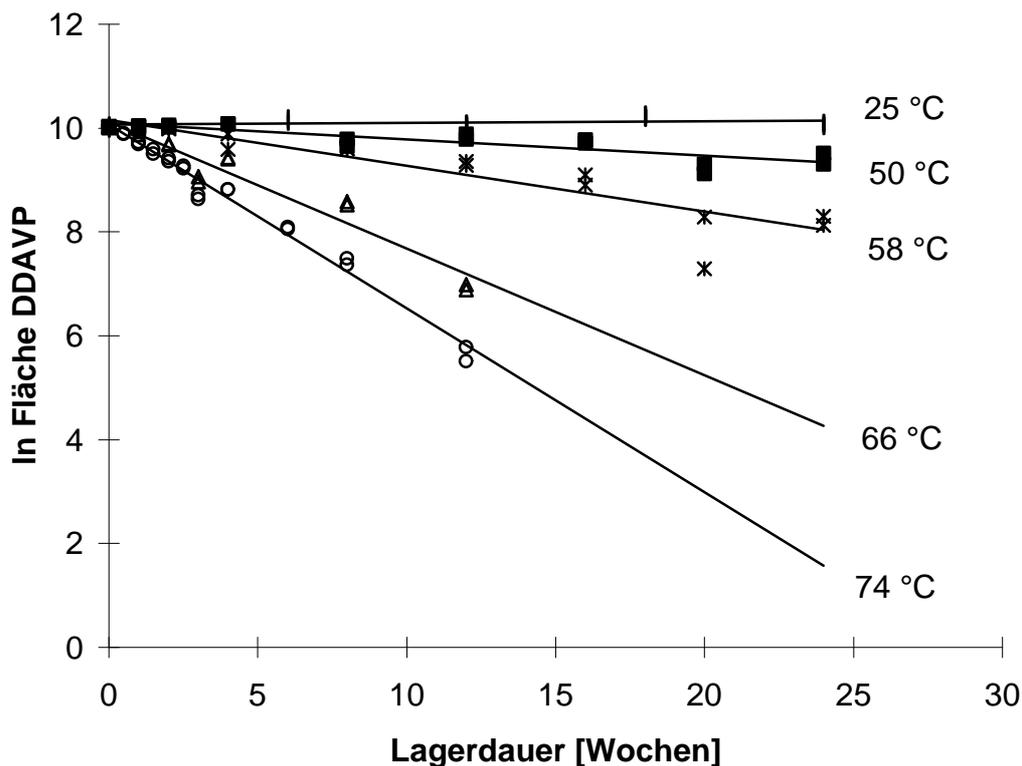


Abb. 65: Stabilität von Festen Dispersionen, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 in Abhängigkeit der Lagertemperatur bei 30 % r.F.

→ Analog dem Polycarbophil-freien System (D4) findet auch bei der Festen Dispersion, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 (DP4) eine Zersetzung nach Reaktion erster Ordnung statt.

→ Mit zunehmender Temperatur nimmt der Desmopressin-Gehalt pro Zeiteinheit drastisch ab. Entsprechend nimmt mit zunehmender Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeit zu, so daß eine größere Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) resultiert.

→ Bei 25 °C / 30 % r.F. findet über den untersuchten Zeitraum praktisch keine Gehaltsabnahme von Desmopressin statt.

System **D6** (Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8):

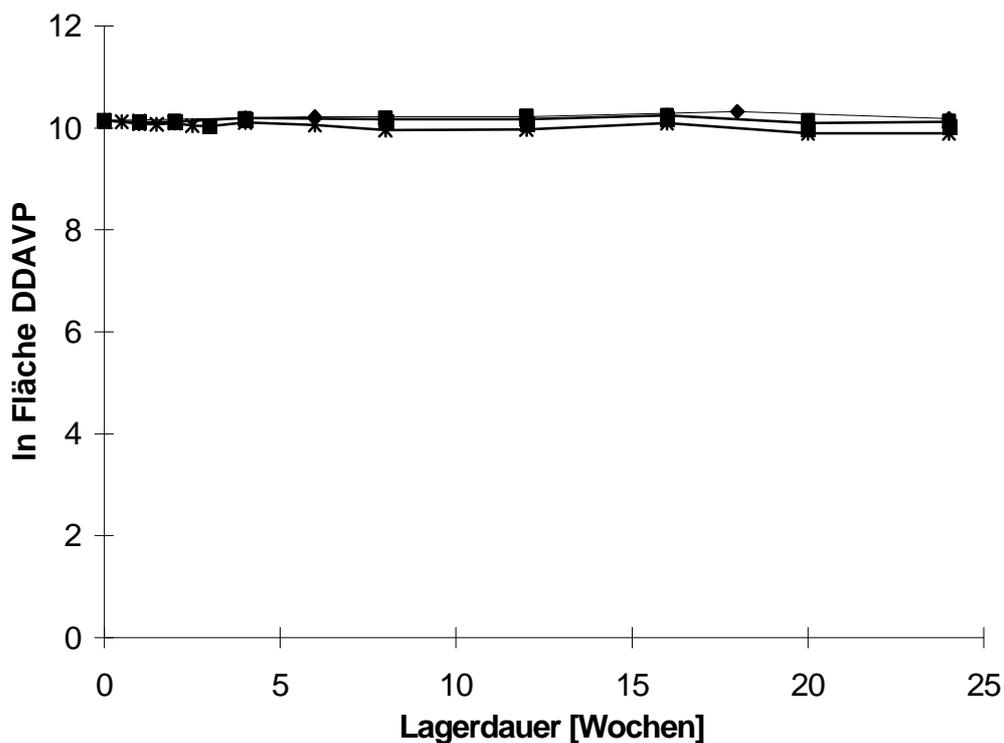


Abb. 66: Stabilität von Desmopressin-Lyophilisaten, hergestellt in Puffer pH 6.8 in Abhängigkeit der Lagertemperatur bei 30 % r.F.

→ Die Ermittlung der Reaktionsordnung ist nicht möglich, da die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Desmopressin-Zersetzung in diesem Lyophilisat (D6) über den untersuchten Zeitraum zu gering ist.

→ Desmopressin ist in diesem Lyophilisat (D6) auch bei hohen Temperaturen sehr stabil. Bei 25 – 58 °C Lagertemperatur ist eine signifikante Verringerung des Desmopressin-Gehaltes nicht nachweisbar. Erst ab einer Lagertemperatur von 66 °C ist ein signifikanter Abfall im Desmopressin-Gehalt über den Untersuchungszeitraum detektierbar.

→ Die aus der Nichtlinearen Regression ermittelten RGK (siehe Kapitel 3.5.) sind bei 66 und 74 °C sehr klein und liegen zwischen 0.002 und 0.017 [1/Wochen].

System **DP6** (Feste Dispersion, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8):

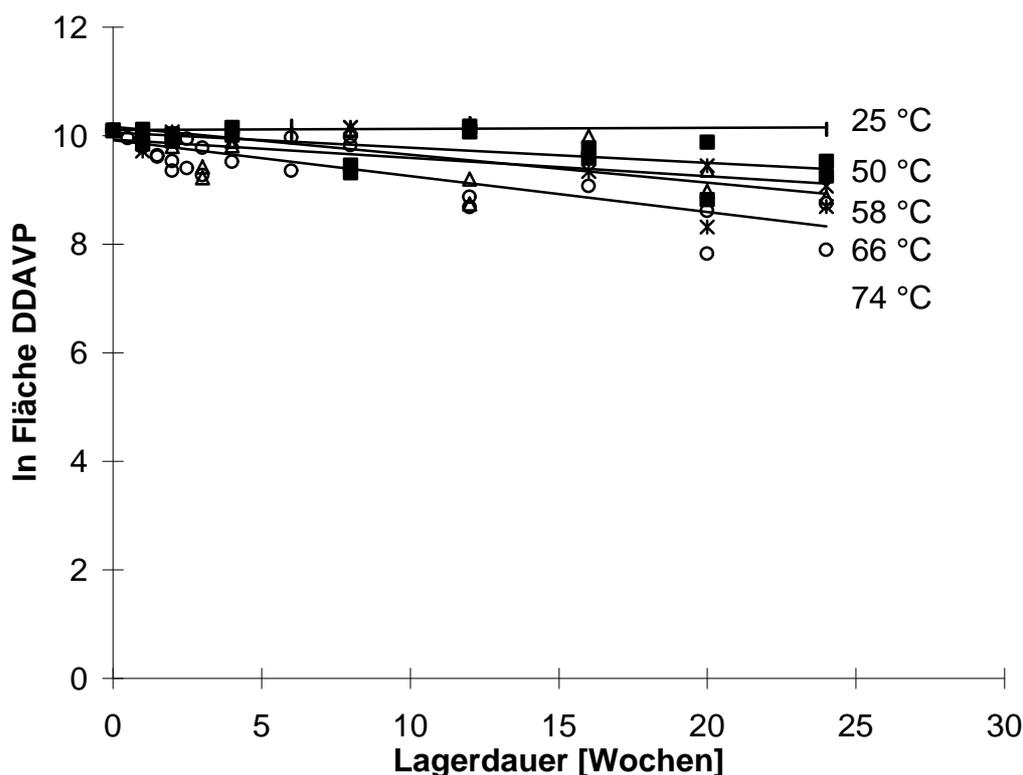


Abb. 67: Stabilität von Festen Dispersionen, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 in Abhängigkeit der Lagertemperatur bei 30 % r.F.

→ Als Reaktionsordnung für die Zersetzungs-Reaktion von Desmopressin in dieser Festen Dispersion (DP6) wird eine Reaktion erster Ordnung angenommen. Nach logarithmischer Transformation ergibt sich ein linearer Abfall der Desmopressin-Peakflächenwerte, der allerdings bei einer Lagertemperatur von 25 °C nicht signifikant ist.

Erst ab einer Temperatur von 50 °C findet eine Desmopressin-Gehaltsabnahme über den untersuchten Zeitraum statt.

→ In diesem System (DP6) sind die Streuungen der Einzelwerte (n=6) der Desmopressin-Peakflächen sehr groß. Desweiteren ergeben sich zwischen den Untersuchungszeitpunkten starke Schwankungen in den Flächenwerten, wodurch der Vertrauensbereich (genauer gesagt: asymptotic standard error, da NLR !) der Regressionskurve aus der Nichtlinearen Regression sehr groß ist. Dadurch ergibt sich, daß signifikante Unterschiede in den RGK der Temperaturen 50 – 74 °C nicht nachweisbar sind. Eine Ermittlung der Haltbarkeit ist für dieses System mit den vorliegenden Daten nicht möglich (Erläuterungen siehe Kapitel Haltbarkeit).

Ergebnis: Stabilität in Abhängigkeit von der Temperatur

- Die Zersetzung von Desmopressin in den unterschiedlichen Systemen erfolgt nach einer Reaktion erster Ordnung.
Da für die primäre Zersetzung von Desmopressin unter den gegebenen Umständen (Formulierung, relative Feuchte) eine Hydrolyse der endständigen Säureamidgruppen nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.2.6.) ist die vermutete Reaktionsordnung (erste Ordnung) im Einklang mit dem bewiesenen Zersetzungsmechanismus.
- In allen Systemen konnte keine signifikante Änderung des Desmopressin-Gehaltes bei 25 °C / 30 % r.F. über den Untersuchungszeitraum beobachtet werden.
- Eine Temperaturerhöhung führt zu einer Beschleunigung der Desmopressin-Zersetzung. Eine Abweichung davon stellt das Desmopressin-Lyophilisat,

hergestellt in pH 6.8 (D6) dar: Dort findet bis zu einer Lagertemperatur von 66 °C keine stärkere Zersetzung mit zunehmender Temperatur (25-58 °C) statt.

- Insgesamt kann von einer relativ großen Temperaturstabilität der hergestellten Lyophilisate (D4, D6) und Festen Dispersionen (DP4, DP6) bei den üblichen Lagerbedingungen für Arzneimittel ausgegangen werden.

Berechnung nach Arrhenius und Angaben zur Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten siehe Kapitel 4.2.5. : Haltbarkeit

II. Einfluß der relativen Feuchte

Alle Systeme wurden bei 11 und 30 % relativer Feuchte und 58, 66 und 74 °C Lagertemperatur eingelagert. Die Ermittlung der maximal zulässigen Feuchte erfolgte in Vorversuchen (Kapitel 3.4.2.).

Im Folgenden sind die Desmopressin-Gehalte in Abhängigkeit der relativen Feuchte und der Temperatur während der Lagerung graphisch dargestellt.

Die Abbildungen (Abb. 68 bis 79) sind nach der Art der Formulierung (Lyophilisat, pH) getrennt aufgeführt (erst D4 bei beiden Feuchten, in der Reihenfolge zunehmender Temperatur; dann DP4 usw.).

System **D4** (Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0):

58 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	1,68	1,68
1		95,85	1,14	
4		96,10		0,24
6	103,73		0,68	
8		63,64		5,85
12	100,64	47,27	0,72	2,98
16		31,02		1,70
18	112,81		1,19	
20	29,75		1,84	
24	93,32	13,21	1,91	3,54

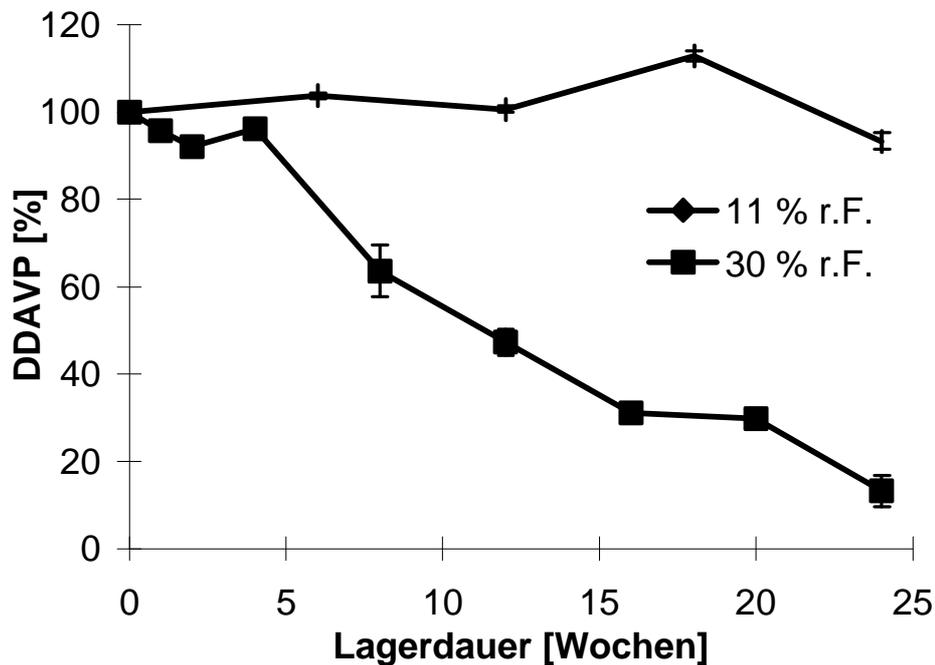


Abb. 68: Stabilität von Desmopressin-Lyophilisaten, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei **58 °C**

66 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	1,68	1,68
1		92,05		0,68
2		67,76		6,28
3		59,26		0,76
4		55,04		10,18
6	97,44		0,87	
8		14,96		18,65
12	81,74	18,20	1,86	5,26
16		0,00		-
18	81,95		2,65	
20		0,00		-
24	63,29	0,00	1,80	-

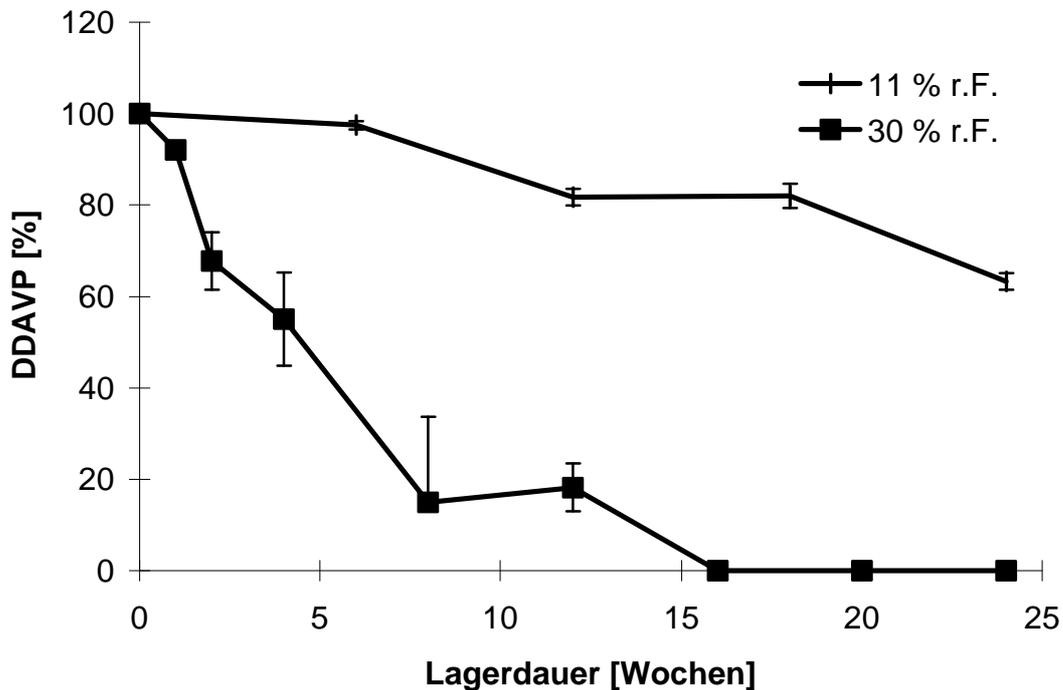


Abb. 69: Stabilität von Desmopressin-Lyophilisaten, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei 66 °C

74 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	1,68	1,68
0,5		89,93		1,03
1		60,75		5,22
1,5		56,59		2,57
2		43,82		3,39
2,5		38,14		1,56
4		24,31		35,45
6	80,47	7,28	1,06	10,32
8		7,17		3,37
12	63,17	4,15	1,70	4,49
16		0,00		-
18	59,66		0,78	
20		0,00		-
24	43,29	9,26	4,11	7,29

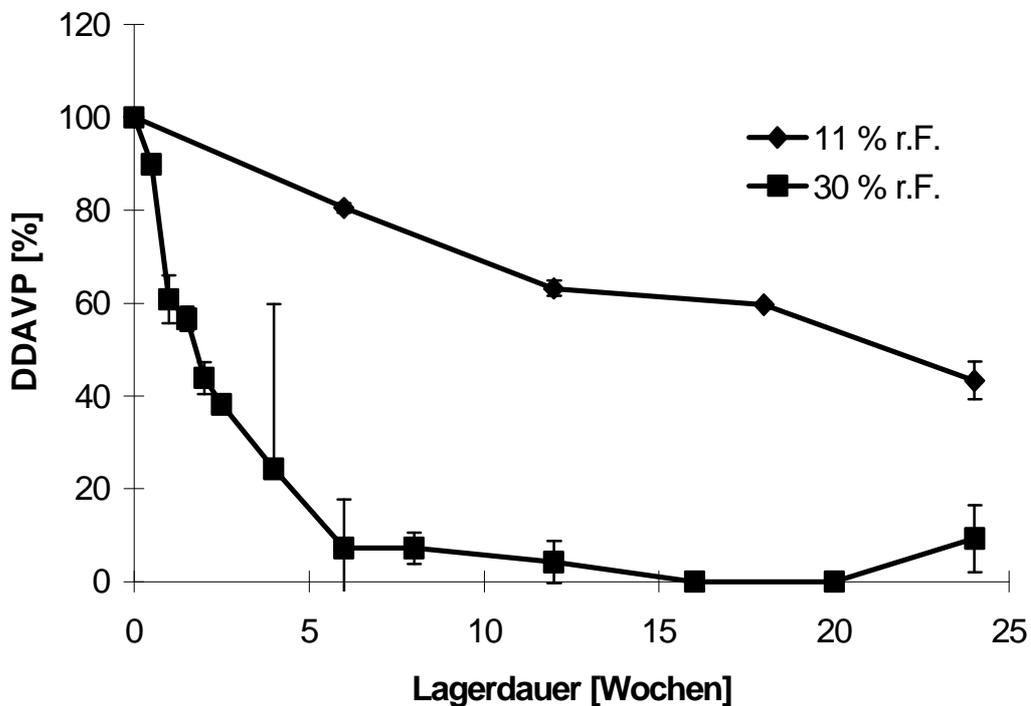


Abb. 70: Stabilität von Desmopressin-Lyophilisaten, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei 74 °C

System **DP4** (Feste Dispersion, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0):

58 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	1,21	1,21
1		100,17		0,52
2		96,86		0,45
4		76,20		17,23
6	108,76		0,41	
8		65,88		0,55
12	108,56	49,66	0,82	6,45
16		36,28		10,93
18	111,83		0,88	
20		12,10		50,22
24	87,42	16,43	0,46	10,46

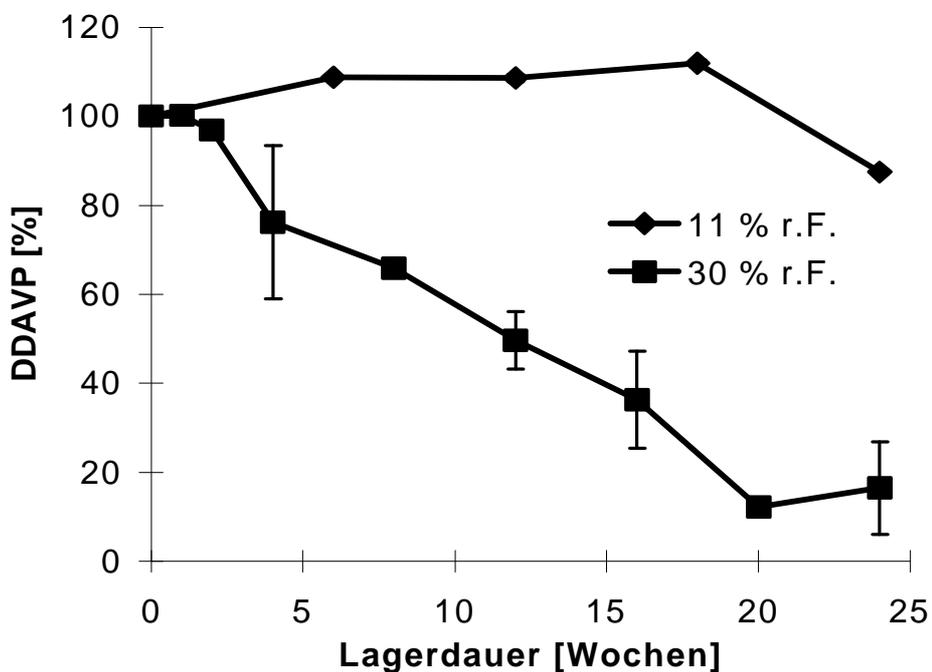


Abb. 71: Stabilität von Desmopressin in Festen Dispersionen, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei **58 °C**

66 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	1,21	1,21
1		91,20		6,48
2		71,35		1,34
4		54,70		1,31
6	100,04		0,33	
8		23,02		3,02
12	78,57	4,58	3,88	12,05
16		0,00		-
18	67,86		4,75	
20		0,00		-
24	54,34	0,00	1,50	-

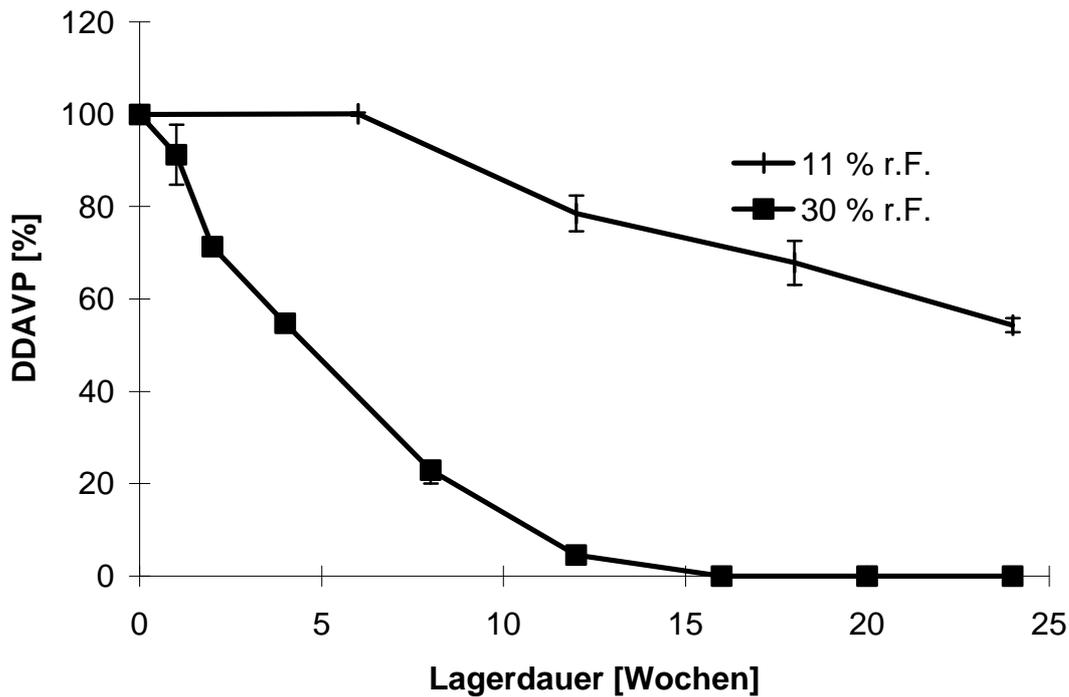


Abb. 72: Stabilität von Desmopressin in Festen Dispersionen, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei 66 °C

74 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	1,21	1,21
0,5		87,66		0,81
1		73,00		2,62
1,5		62,47		4,91
2		53,18		3,58
2,5		46,01		3,16
4		29,91		0,85
6	74,79	14,38	2,77	2,72
8		7,37		6,89
12	52,71	1,27	2,60	17,91
16		0,00		-
18	35,98		15,02	
20		0,00		-
24	25,83	2,48	5,74	42,00 (?)

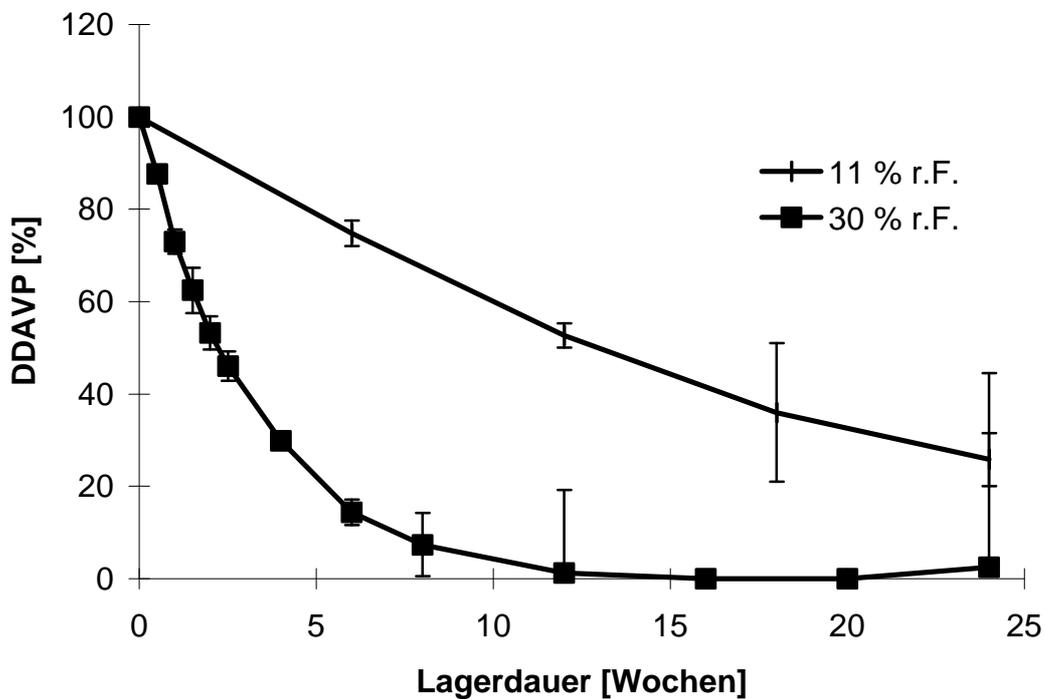


Abb. 73: Stabilität von Desmopressin in Festen Dispersionen, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei 74 °C

System **D6** (Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8):

58 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	1,37	1,37
1		96,34		1,28
2		97,52		0,67
4		104,11		0,64
6	105,45		0,60	
8		102,02		0,70
12	103,35	101,44	0,74	0,38
16		109,49 (?)		1,77
18	118,60 (?)		1,56	
20		94,77		0,20
24	99,38	96,48	1,57	2,79

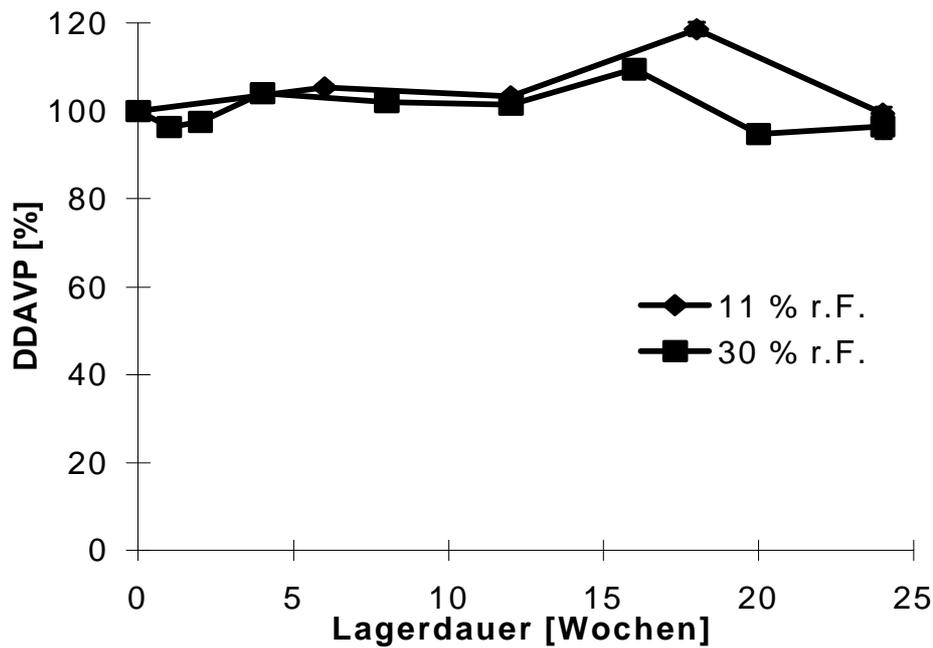


Abb. 74: Stabilität von Desmopressin-Lyophilisaten, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei **58 °C**

66 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	1,37	1,37
1		97,83		0,43
2		96,64		0,89
4		101,76		0,93
6	104,37		0,44	
8		96,67		0,37
12	99,27	93,19		0,59
16		103,98		0,70
18	110,60 (?)		0,86	
20		85,97		3,72
24	96,36	88,10	1,29	1,63

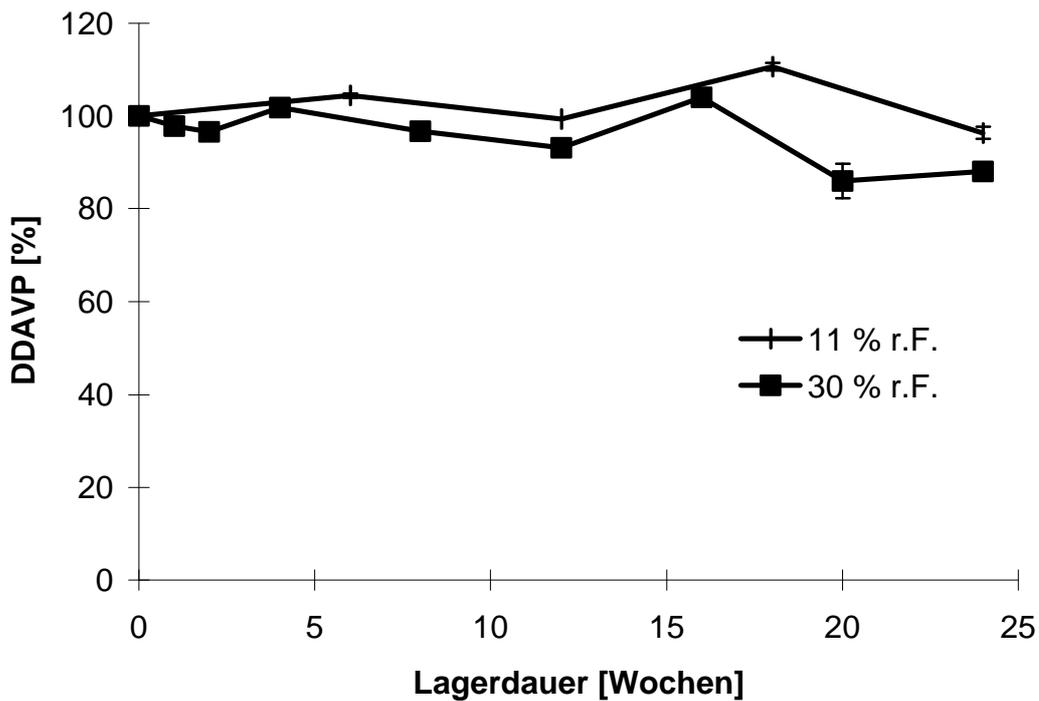


Abb. 75: Stabilität von Desmopressin-Lyophilisaten, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei 66 °C

74 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	1,37	1,37
0,5		97,08		1,53
1		93,50		3,29
1,5		92,02		4,02
2		94,73		1,82
2,5		90,34		0,56
4		96,07		2,20
6	101,55	91,05	0,53	8,43
8		82,21		2,82
12	96,02	83,95	1,36	4,16
16		95,02 (?)		3,12
18	103,51		0,75	
20		77,35		1,33
24	89,05	77,24	1,34	3,23

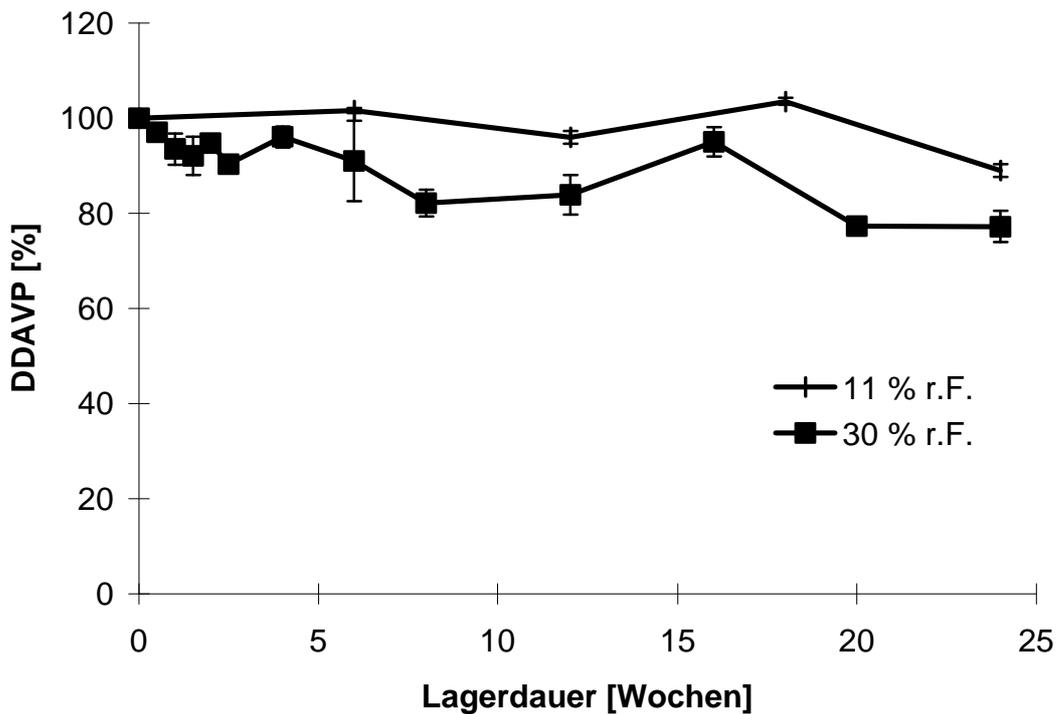


Abb. 76: Stabilität von Desmopressin-Lyophilisaten, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei 74 °C

System **DP6** (Feste Dispersion, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8):

58 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	0,59	0,59
1		89,42		0,20
2		93,54		3,85
4		-		-
6	107,13		4,80	
8		105,45		0,39
12	100,92	98,53	2,70	0,34
16		46,59		0,71
18	100,66		23,12	
20		34,45		56,18 (?)
24	95,31	30,14	7,03	20,81

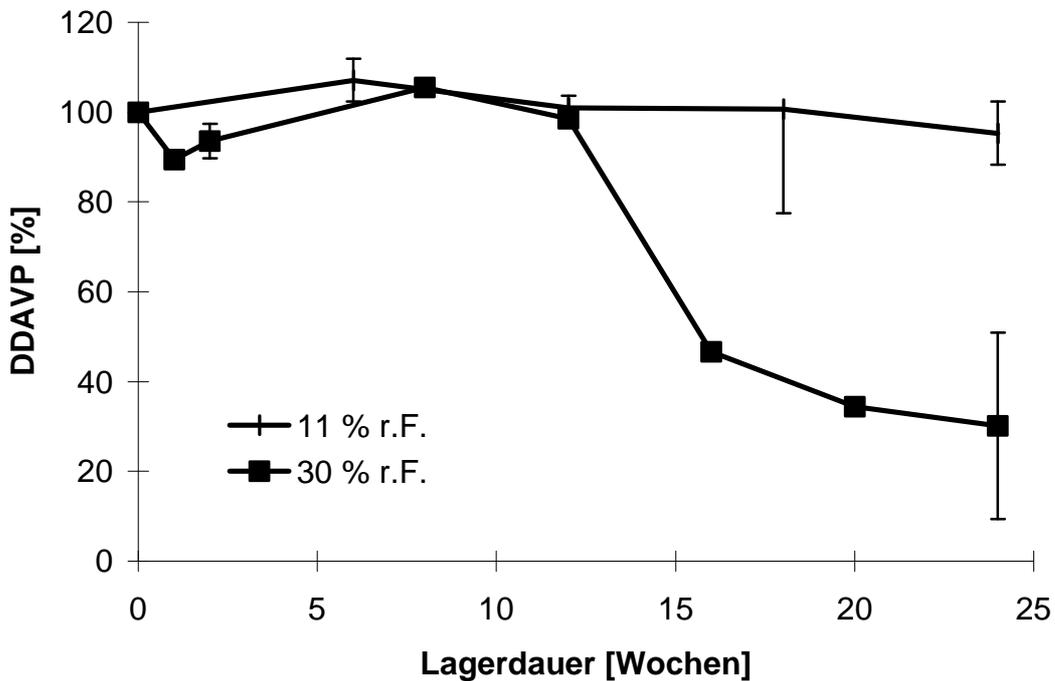


Abb. 77: Stabilität von Desmopressin in Festen Dispersionen, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei **58 °C**

66 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	0,59	0,59
1		93,25		4,92
2		78,26		5,62
4		78,00		4,34
6	107,24		0,86	
8		100,59		0,77
12	105,53	33,09	1,65	24,33
16		89,33 (!)		0,53
18	98,75		14,06	
20		40,16		20,91
24	100,68	40,61	1,59	31,33

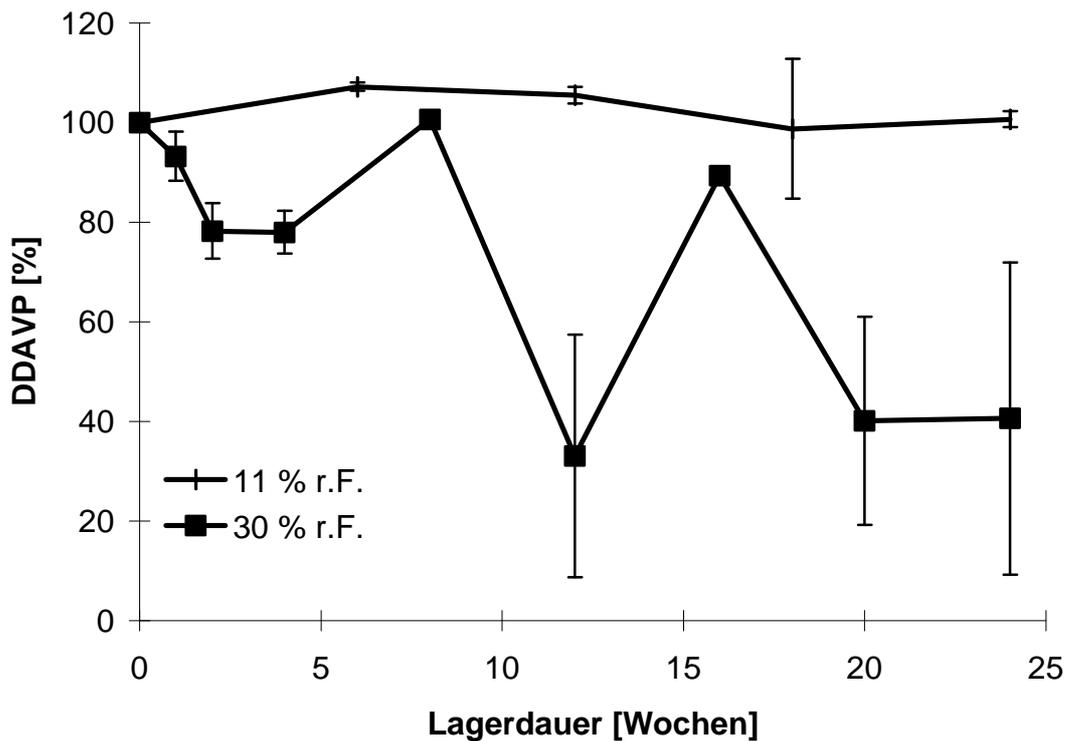


Abb. 78: Stabilität von Desmopressin in Festen Dispersionen, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei 66 °C

74 °C

Zeit [w]	Gehalt DDAVP [%]		S _{rel.}	
	11 % r.F.	30 % r.F.	11 % r.F.	30 % r.F.
0	100,00	100,00	0,59	0,59
0,5		86,72		0,98
1		81,65		10,94
1,5		62,14		1,02
2		51,88		9,94
2,5		67,85		9,60
4		76,70		29,56
6	104,73	67,43	0,40	32,73
8		82,06		8,85
12	71,67	26,81	3,97	10,02
16		35,83		7,96
18	91,82		19,56	
20		16,40		40,85
24	86,90	18,57	16,46	45,25

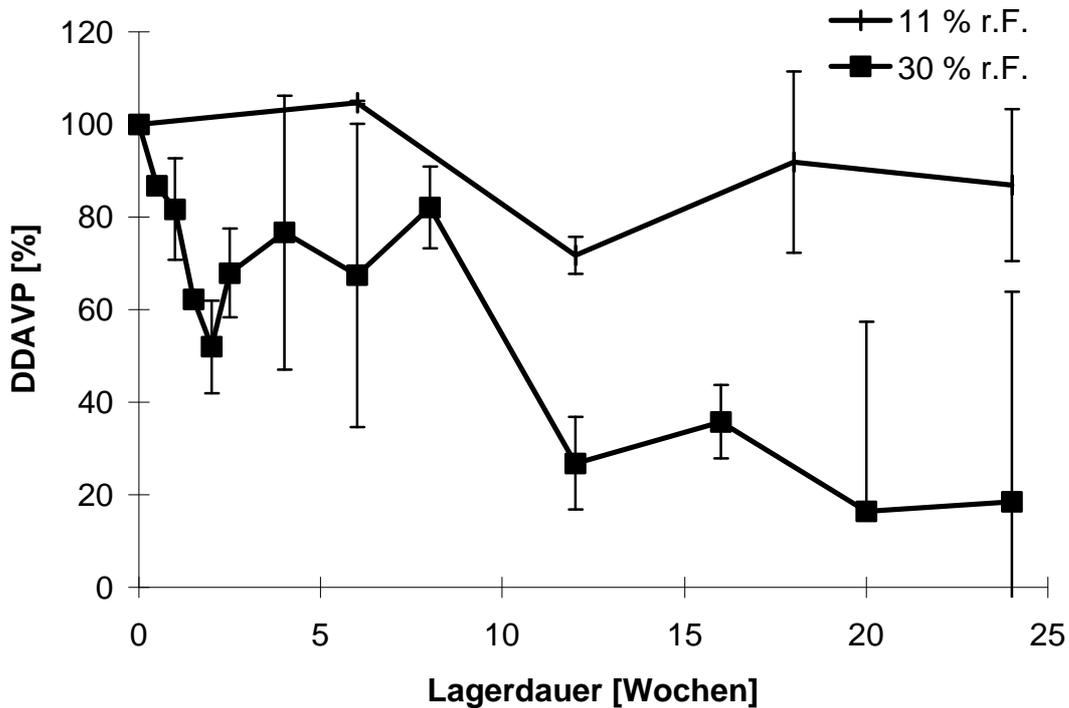


Abb. 79: Stabilität von Desmopressin in Festen Dispersionen, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 in Abhängigkeit der relativen Feuchte bei 74 °C

Ergebnisse: Stabilität von Desmopressin in fester Form in Abhängigkeit der Feuchte

→ Die relative Feuchte besitzt einen großen Einfluß auf die Stabilität von Desmopressin in allen Systemen (Lyophilisate und Feste Dispersionen).

D4:

→ Bei 30 % r.F. ist die Geschwindigkeit der Gehaltsabnahme des Wirkstoffes ca. fünf- bis sechsmal so groß, verglichen mit einer relativen Lagerfeuchte von 11 %.

DP4:

→ Bei 30 % r.F. ist die Geschwindigkeit der Gehaltsabnahme des Wirkstoffes ca. drei- bis viermal so groß, verglichen mit einer relativen Lagerfeuchte von 11 %.

D6:

→ Ab einer Lagertemperatur > 58 °C besitzt die relative Feuchte einen Einfluß auf die Stabilität von Desmopressin in lyophilisierter Form (hergestellt in pH 6.8).

→ Bei einer relativen Feuchte von 11 % r.F. findet bei einer Lagertemperatur kleiner 74 °C praktisch keine Gehaltsabnahme statt.

→ Bei 30 % r.F. ist die Geschwindigkeit der Gehaltsabnahme des Wirkstoffes ca. viermal so groß, verglichen mit einer relativen Lagerfeuchte von 11 %.

DP6:

→ Die relative Feuchte besitzt einen Einfluß auf die Stabilität von Desmopressin in Fester Dispersion mit Polycarbophil (hergestellt in pH 6.8).

Bei einer relativen Feuchte von 11 % r.F. findet bei einer Lagertemperatur kleiner 74 °C praktisch keine Gehaltsabnahme statt.

→ Bei 30 % r.F. ist die Geschwindigkeit der Gehaltsabnahme des Wirkstoffes ca. zwei- bis dreifach so groß, verglichen mit einer relativen Lagerfeuchte von 11 %.

→ Die Streuungen der Werte zwischen den Proben sind enorm groß. Innerhalb eines vials liegen die relativen Standardabweichungen der Einspritzungen (n=3) nicht selten unterhalb von 1 %.

III. Einfluß des pH-Wertes des Dispersionsmediums und des Polymers (Polycarbophil)

In den vorangegangenen Darstellungen sind bereits die Einflüsse dieser Faktoren (pH und Polymer) deutlich geworden.

An dieser Stelle soll deshalb nur eine beispielhafte Übersicht bei höchster Lagertemperatur und -feuchte (Lagerdauer: 24 Wochen) dazu dienen, die Unterschiede dieser Einflußgrößen auf die Stabilität von Desmopressin darzustellen:

74 °C / 30 % r.F. - 24 Wochen Lagerdauer -

<u>System</u>	<u>Gehalt DDAVP [%]</u>	<u>S_{rel}</u>	(Mittelwerte aus n=6)
D4	9,26	7,26	
DP4	2,48	(42,00 ?)	
D6	77,24	3,23	
DP6	18,57	(45,25 ?)	

→ Die Gegenwart von sauren Salzen (Herstellung in pH 4.0) führt zur Beschleunigung der Desmopressin-Zersetzung.

→ Die Stabilität von Desmopressin ist in den Lyophilisaten vergleichsweise größer als in den Festen Dispersionen. Das Polycarbophil scheint einen eher negativen Einfluß auf die Desmopressin-Stabilität zu besitzen. Es könnte vermutet werden, daß der saure Charakter des Polymers (Polyacrylsäure, chemische Struktur siehe Kapitel 2.) für eine vergleichsweise höhere Zersetzungsgeschwindigkeit des Desmopressins verantwortlich ist. Desweiteren könnten Verunreinigungen aus dem Polymer (z.B. Synthesenebenprodukte) eine Gehaltsabnahme von Desmopressin beschleunigen. Eine Aufklärung über Art und Menge der im Polymer enthaltenen möglichen Verunreinigungen, z.B. mittels Head Space (GC), wäre bei weiterem Einsatz dieses Hilfstoffes unerlässlich. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt ist die

Möglichkeit, daß das Polymer Wassermoleküle auf das Peptid überträgt und somit die Hydrolyse des Desmopressins begünstigt wird.

→ Polycarbophil-haltige Formulierungen (Feste Dispersionen) zeigen deutlich größere Streuungen in den Werten als Polycarbophil-freie Systeme.

→ Die beiden Puffersysteme (Citrat- und Phosphatpuffer) haben in Gegenwart von Polycarbophil einen deutlichen Einfluß auf die Streuungen der Desmopressin-Restgehalte (siehe dazu Abb.73 und 79).

IV. Zersetzungsprodukte

Die Peakflächenwerte der Desmopressin-Zersetzungsprodukte, aufgeteilt nach den unterschiedlichen Peaks (Rt), sind im Anhang tabellarisch dargestellt.

Eine Angabe der prozentualen Gehalte der Zusatzpeaks ist nicht zulässig, da die Absorptionskoeffizienten der Produkte nicht bekannt sind.

Es sollten deshalb nicht, wie so häufig fälschlicherweise durchgeführt, daraus die prozentualen Gehalte, bezogen auf den Wirkstoff, angegeben werden.

Es ist jedoch anzunehmen, da sich die molaren Massen der Zersetzungsprodukte nur gering von der molaren Masse des Desmopressins unterscheiden, und die UV-Detektion die Peptidbindungen erfaßt, daß die spezifischen Absorptionen vergleichbar sind.

Während der Lagerung der Proben treten eine Reihe von zusätzlichen Peaks im HPLC-Chromatogramm auf.

Es ist zu beobachten, daß manche Zusatzpeaks sehr schnell entstehen. Andere wiederum sind erst nach längerer Lagerzeit detektierbar.

Auch kann nicht jeder Peak in allen Formulierungen detektiert werden.

Desweiteren wurde erkannt, daß manche Zersetzungsprodukte durch fortschreitende Lagerung der Probe zu neuen Produkten weiterreagieren, d.h. es konnten Folgereaktionen beobachtet werden, was sich im Auftreten von neuen Peaks mit anderen Retentionszeiten äußerte.

Von den Zersetzungsprodukten, die relativ schnell gebildet wurden und in jeder Formulierung auftraten (D4, DP4, D6, DP6), konnten die chemischen Strukturen im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden (siehe Kapitel 4.2.6.).

Die molaren Massen dieser Zersetzungsprodukte konnte mittels HPLC-MS-Kopplungstechnik ermittelt werden.

Im folgenden sind die entstehenden Peaks (R_t) angegeben (Ergebnis der HPLC-MS-Untersuchungen). Es sei nochmal darauf hingewiesen, daß auf die Untersuchung von Polycarophil-haltigen Systemen verzichtet wurde, da erstens im HPLC-Chromatogramm bei diesen Formulierungen keine weiteren oder anderen Zusatzpeaks detektiert wurden und zweitens das MS-System nicht unnötig mit Polymer konfrontiert werden sollte.

Peaks im MSD TIC (Totalionenchromatogramm) bei der am stärksten zersetzten Probe (D4 Vb 24 Wochen): ! Probencode siehe Inhaltsverzeichnis

<u>Rt [min]</u>	<u>ebenfalls aufgetreten in folgenden Proben</u>
5.85	
6.51	
7.07	D4 II, D6 II, D6 IIIb, D4 IIIb
7.53	
8.20	
8.65	D4 II, D6 II, D4 IIIb, D6 IIIb, D6 Vb, D4 Vb 8 Wochen, D6 Vb 8 Wochen
10.04	D4 Vb 8 Wochen
11.06	D4 Vb, D6 Vb,
12.96	
14.33	D4 IIIb, D4 Vb 8 Wochen
15.63	
16.70	D4 Vb 8 Wochen
17.67	
18.75	D4 IIIb
19.33	
21.05	
22.21	

Weitere Peaks (nicht in der total zersetzten Probe enthalten):

7.94	D6 0, D4 II, D6 II, D4 IIIb
9.11	D4 II, D4 IIIb, D6 Vb
5.19	D4 Vb 8 Wochen

Folgende Peaks ($R_{t [min]}$) treten bei allen Formulierungen auf und sind als primäre Zusatzpeaks zu bezeichnen (Primärpeaks):

7.03	D4 0, D4 II, D4 IIIb, D4 Vb, D4 Vb 8 Wochen, D6 II, D6 IIIb, D6 Vb, D6 Vb 8 Wochen
7.94	D4 0, D4 II, D4 IIIb, D4 Vb 8 Wochen, D6 0, D6 II, D6 IIIb, D6 Vb, D6 Vb 8 Wochen
8.70	D4 II, D4 IIIb, D4 Vb, D4 Vb 8 Wochen, D6 II, D6 IIIb, D6 Vb, D6 Vb 8 Wochen,
9.11	D4 II, D4 IIIb, D4 Vb 8 Wochen, D6 Vb
10.48	D4 II, D4 IIIb, D4 Vb, D4 Vb 8 Wochen,
11.48	D4 0, D4 II, D4 IIIb, D4 Vb, D4 Vb 8 Wochen, D6 Vb

Folgende Peaks ($R_{t [min]}$) sind bei der total zersetzten Probe (D4 Vb 24 Wochen) nicht mehr enthalten (weiter reagiert zu neuen Produkten):

5.19

7.94

9.11

Zuordnung der einzelnen Peaks aus dem MSD TIC und den dazugehörigen Massen aus dem MS SPC:

<u>Rt (MSD)</u>	<u>Masse(n)</u>
5.85	1264
6.51	1069 (Desmopressin)
7.07	1070 + 1071
7.94	1070
8.65	1071 + 1014
9.11	1071
10.04	1054 + 1072 (evtl. + 1015)
11.06	1072 + 1015
12.96	1002
14.33	1054 + 997
15.63	1054 + 997
16.70	1054

Entsprechend zu den angegebenen Massen sind die Isotope im Massenspektrum zu erkennen.

Sind zwei Massen angegeben, so handelt es sich um zwei Substanzen, die im Chromatogramm unter Detektion mittels DAD und MSD gemeinsam eluiert wurden.

Daß es sich um zwei Substanzen handelt, wurde mittels Peak-Purity der MSD TIC überprüft. Liegen zwei Substanzen unter einem Peak, so ergeben sich in der Peak-Purity jeweils Kurven, die nicht untereinander liegen und unterschiedliche Formen aufweisen. Handelt es sich um nur eine Substanz, so zeigen alle Kurven der Isotope in der Peak-Purity die gleiche Form und liegen untereinander.

Massen der Primärpeaks, d.h. der Peaks, die schnell während der Lagerung von Desmopressin in fester Form bei hohen Temperaturen entstehen:

Rt [Min]	Masse(n)
7.03	1070 + 1071 (kein Isotop !)
7.94	1070
8.70	1071 + 1014
9.11	1071
10.48	1054 + 1072
11.48	1072 + 1015
14.33	1054 + 997
15.63	1054 + 997

Masse	mögliche Reaktion	entst. Produkt
1070	Deamidierung (Hydrolyse)	DDAVP deamidiert an <i>einer</i> Aminosäure (Glu, Asp, Gly-amid)
1071	dto.	dto. jedoch an <i>zwei</i> AS
1072	dto.	dto. jedoch an <i>drei</i> AS
1054	Kondensation	versch. Kondens.-Produkte
1014	Abspaltung von Gly (1071 -57)	desglycinamid-DDAVP (8 AS), partial hydrolysiert (an zwei AS)
1015	dto. (1072 -57)	desglycinamid-DDAVP (8 AS), partial hydrolysiert (an drei AS)
997	dto. (1054 -57)	desglycinamid-DDAVP (8 AS), partial kondensiert

Die Hydrolyse des Desmopressins zu den verschiedenen Deamidierungsprodukten konnte im Rahmen dieser Arbeit als Zersetzungsreaktion bewiesen werden (siehe Kapitel 4.2.6.).

Die möglichen Bereiche für eine Kondensationsreaktion innerhalb des Moleküls konnten mit Hilfe von Konformationsberechnungen durch Molecular Modelling (Kapitel 4.2.7.) abgeschätzt werden.

Ergebnis und Diskussion: Stabilität von Desmopressin in fester Form

- Die Stabilität von Desmopressin ist in den hergestellten Formulierungen unterschiedlich. Die Geschwindigkeit und das Ausmaß, mit der Desmopressin zersetzt wird und neue Produkte gebildet werden, ist abhängig von der Formulierung (Lyophilisat resp. Feste Dispersion) und dem pH-Wert des Dispersionsmittels (Gegenwart von sauren oder basischen Salzen).
- Die meisten Zersetzungsprodukte konnten im Rahmen dieser Arbeit in ihren molaren Massen aufgeklärt werden. Bei den auffälligsten Zersetzungsprodukten (Massen 1070, 1071, 1072) wurde der vermutete Reaktionsmechanismus mit Hilfe von selektiven Reagenzien simuliert und konnte somit nachgewiesen werden.
- Die relative Feuchte während der Lagerung besitzt einen signifikanten Einfluß auf die Stabilität von Desmopressin in den hergestellten Lyophilisaten und Festen Dispersionen.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärten Zersetzungsmechanismus (Hydrolyse) des Desmopressins ist dieses Resultat nachvollziehbar, da die Deamidierung der Säureamidgruppen als Hydrolyse-Reaktion nur in Gegenwart von Wasser stattfinden kann. Bei höherer Lagerfeuchte besitzen die Formulierungen (Feste Dispersionen und Lyophilisate) einen höheren Wassergehalt, so daß die Hydrolyse des Desmopressins möglich wird.

- Die Festen Dispersionen scheinen gegenüber der Lagerfeuchte noch sensibler zu sein, als die Polycarbophil-freien Lyophilisate. Dies führt zu stärkerer Degradation von Desmopressin während der Lagerung bei höherer relativer Feuchte (30 %). Dazu könnten folgende Hypothesen aufgestellt werden:
 1. Die Verteilung des Desmopressins ist in Gegenwart von Polymer in Richtung molekulardispers bzw. fein kolloiddispers verschoben.
 2. Das Polymer könnte die Übertragung von Wassermolekülen aus sorbiertem Zustand auf das Desmopressin fördern. Damit würde eine hydrolytische Zersetzung des Peptides gefördert werden.
 3. Es könnte vermutet werden, daß es während der Lagerung zur Freisetzung von Bestandteilen des Polycarbophils kommt oder daß bereits die von Anfang an vorhandenen Bestandteile des Polymers an der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Desmopressin-Zersetzung maßgeblich beteiligt werden. So würde es beispielsweise denkbar sein, daß Restmonomere aus der Synthese des Polycarbophils, die Acrylsäure, forcierend auf die Desmopressin-Zersetzung wirken. Je höher dabei die Lagertemperatur und Feuchte sind, desto stärker könnten diese Polymer-Bestandteile ihre Wirksamkeit entfalten, da sie erstens eventuell erst bei diesen klimatischen Bedingungen entstehen und zweitens die Beweglichkeit der Moleküle bei höherer Temperatur und Feuchte größer ist.

- Die Formulierungen, die in Citratpuffer pH 4.0 hergestellt wurden, zeigen eine deutlich größere Empfindlichkeit gegenüber der Lagertemperatur und –Feuchte. In Gegenwart dieser sauren Salze sind die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Desmopressin-Zersetzung wesentlich verstärkt.

Es ist zu vermuten, daß die Hydrolyse des Desmopressins (Deamidierung) in saurem pH-Wert bevorzugt stattfindet.

- Die Geschwindigkeit und das Ausmaß, mit der Zersetzungsprodukte gebildet werden, ist von der Formulierung (pH, Lyophilisat resp. Feste Dispersion) abhängig. Es konnte beobachtet werden, daß Desmopressin in Festen Dispersionen, die in Citratpuffer hergestellt wurden (DP4), sehr schnell bei hohen Temperaturen Zersetzungsprodukte bildet. Auch bei 25 °C Lagertemperatur konnte in jeder Formulierung, in unterschiedlichem Ausmaß, ein Zusatzpeak

detektiert werden. Dieser besitzt eine molare Masse von 1070, er stellt somit ein Deamidierungsprodukt dar. Desweiteren ist zu beobachten, daß einige Peaks sich mit zunehmender Lagerdauer wieder verkleinern, d.h. weiter abgebaut werden. Es entstehen dann nach voranschreitender Lagerdauer neue Peaks, wobei die schnell (primär) gebildeten Zusatzpeaks (Flächen) mit den Massen 1070 und 1071 (Deamidierungsprodukte) sich verringern.

- Der Reaktionsmechanismus der Desmopressin-Zersetzung ist unabhängig von der Feuchte, Temperatur, pH und Gegenwart des Polycarbophils. Das zeigte sich in den Chromatogrammen, die auch bei geringerer relativen Feuchte die typischen Zusatzpeaks mit den entsprechenden Retentionszeiten auftreten und als Deamidierungsprodukte des Desmopressins nachgewiesen werden konnten. Allerdings sind die Geschwindigkeit und das Ausmaß, mit denen diese Hydrolyseprodukte gebildet werden, bei geringerer relativen Feuchte, höherem pH-Wert des Dispersionsmediums (pH 6.8), Abwesenheit von Polycarbophil und geringerer Temperatur kleiner.

Eine Gewichtung dieser Einflußgröße wurde bereits in Kapitel 4.2.4. : "Faktoren, welche die Stabilität beeinflussen" ausgeführt. Aufgrund der direkten Übersicht sei es an dieser Stelle nochmal erwähnt:

Gewichtung der Einflußfaktoren auf die Stabilität von Desmopressin in
Lyophilisaten und Festen Dispersionen:

FEUCHTE > pH > TEMPERATUR > POLYMER

Nach den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Stabilität von Desmopressin sollte für eine hohe Stabilität von Desmopressin in Festen Formulierungen folgendes beachtet werden:

- Die relative Feuchte während der Lagerung sollte so gering wie möglich sein (Maximal-Feuchte: 30 %)
- Der pH-Wert des Dispersionsmediums (vor Trocknung) sollte nahe dem isoelektrischen Punkt des Desmopressins liegen (siehe Kapitel 4.2.3. log k / pH - Profil)
- Die Temperatur sollte so gering wie möglich sein (eine Lagerung der Formulierungen im Kühlschrank/Eisfach ist nicht zwingend notwendig !)
- Es sollten nur chemisch reine Polymere mit geringem Anteil an sauren Monomer-Bestandteilen eingesetzt werden .

Werden diese Faktoren neben der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Herstellungstechnik berücksichtigt, so kann von einer stabilen Formulierung, bestehend aus Desmopressin und Polycarbophil in Form einer Festen Dispersion, bei Raumtemperatur ausgegangen werden.

4.2.1.1 Vergleich der Stabilität zweier Desmopressin-Chargen

Sinn dieser Untersuchung war, zu prüfen, ob Unterschiede in zwei unabhängigen Desmopressin-Chargen bezüglich der Stabilität und des Zersetzungsmusters in Lyophilisaten und Festen Dispersionen bestehen.

Es sollten durch die Erweiterung der Stabilitätsuntersuchungen um eine weitere, andere Desmopressin-Charge, die ersten Ergebnisse bestätigt werden. Damit wird die zu fällende Aussage bezüglich der Stabilität um eine weitere Charge erweitert und gibt demnach eine größere Sicherheit in der Ergebnis-Interpretation.

Alle Bedingungen wurden dabei gleich gehalten betreffend

- Verwendete Materialien
- Herstellung der Systeme
- Verwendete Geräte
- Lagerungs - Klima .

Dadurch ändert sich der Versuchsplan nur um den Faktor der eingesetzten Desmopressin-Charge.

Desmopressin-Chargen:

- 1) UA 2545, Fa. Ferring, S-Malmö
- 2) 1485-1-1, Fa. Ferring; S-Malmö

Lagerbedingung: 50 °C / 30 % r.F. (offene Lagerung in Braunglasvials)

Lagerdauer: 12 Wochen

Untersuchte Systeme: D4 und DP4
D6 und DP6

Desweiteren wurden jeweils die Blindwerte (P4 und P6) hergestellt und analysiert.

Kurvenverläufe siehe Anhang.

Anhand der Chromatogramme konnte erkannt werden, daß sich die Anzahl und die Retentionszeiten der zusätzlich auftretenden Peaks während der Lagerung der beiden Chargen nicht unterscheiden.

Der statistische Vergleich beider Chargen wurde mit Hilfe des Statistik-Programmes TOCCATA <S2> auf dem 95 %igen Sicherheitsniveau ($\alpha=0.05$) durchgeführt.

Verglichen wurden die Vertrauensbereiche (VB) der Regressionsparameter (abh. Variable = Gehalt [%]; unabhängige Variable = Zeit [Wochen]):

System **D4** (Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0):

Charge	VB (Ordinate)	VB (Steigung)
I. Desmopressin-Gehalt		
UA 2545	96.59...103.64	-0.72...0.42
1485-1-1	95.08...102.39	-0.44...0.73
II. Zusatzpeaks		
UA 2545	-0.66...0.12	0.49...0.62
1485-1-1	-0.73...0.71	0.57...0.80

→ Die Vertrauensbereiche der Regressionsparameter (Ordinatenabschnitt, Steigung) überschneiden sich.

→ Es ist kein signifikanter Unterschied im Desmopressin-Gehalt über die Zeit nachweisbar.

Desweiteren schließt der VB der Steigung der Regressionsgerade den Wert Null mit ein, d.h. eine Gehaltsabnahme an Desmopressin ist über den untersuchten Zeitraum von 12 Wochen nicht nachweisbar.

→ Es ist kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Zusatzpeak-Flächen über die Zeit nachweisbar.

System **DP4** (Feste Dispersion, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0):

Charge	VB (Ordinate)	VB (Steigung)
I. Desmopressin-Gehalt		
UA 2545	94.05...105.34	-2.26...-0.43
1485-1-1	89.48...118.56	-4.49...0.21
II. Zusatzpeaks		
UA 2545	-1.09...0.38	0.72...0.96
1485-1-1	-9.60...5.43	0.70...3.13

→ Bei der Charge 1485-1-1 sind die Vertrauensbereiche der Regressionsparameter sehr viel größer.

→ Es ist kein signifikanter Unterschied im Desmopressin-Gehalt über die Zeit nachweisbar.

→ Es ist kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Zusatzpeak-Flächen über die Zeit nachweisbar.

System **D6** (Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8):

Charge	VB (Ordinate)	VB (Steigung)
I. Desmopressin-Gehalt		
UA 2545	97.02...101.68	0.30...1.00
1485-1-1	95.44...101.41	0.34...1.31
II. Zusatzpeaks		
UA 2545	-0.65...0.16	0.09...0.22
1485-1-1	-0.35...0.10	0.05...0.12

→ Die Verläufe sind sehr ähnlich (geringe Streuung der Werte).

→ Die Steigung der Regressionsgeraden des Desmopressin-Gehaltes beider Chargen schließt den Wert Null nicht mit ein, d.h. es findet tendenziell eine leichte Gehaltszunahme statt. Die Ursache für diesen Verlauf ist z.Zt. noch nicht geklärt.

→ Es ist kein signifikanter Unterschied im Desmopressin-Gehalt über die Zeit nachweisbar.

→ Es ist kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Zusatzpeak-Flächen über die Zeit nachweisbar.

System **DP6** (Feste Dispersion, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8):

Charge	VB (Ordinate)	VB (Steigung)
I. Desmopressin-Gehalt		
UA 2545	91.90...119.69	-1.27...3.21
1485-1-1	81.38...104.55	-1.25...2.77
II. Zusatzpeaks		
UA 2545	-1.88...0.67	0.13...0.54
1485-1-1	-0.82...0.25	0.08...0.25

→ Extrem große Streuungen der Werte.

→ Der VB der Steigung der Regressionsgeraden schließt den Wert Null mit ein, d.h. es ist kein signifikanter Abfall im Desmopressin-Gehalt über die Zeit nachweisbar.

→ Es ist kein signifikanter Unterschied im Desmopressin-Gehalt über die Zeit nachweisbar.

→ Es ist kein signifikanter Unterschied im Verlauf der Zusatzpeak-Flächen über die Zeit nachweisbar.

Ergebnis: Vergleich der Stabilitäten zweier Desmopressin-Chargen in fester Form

- Bei allen hergestellten Systemen (D4, DP4, D6, DP6) ist ein signifikanter Unterschied ($\alpha=0.05$) zwischen den beiden Desmopressin-Chargen in den Verläufen des Desmopressin-Gehaltes und der Zusatzpeaks über den untersuchten Zeitraum nicht nachweisbar.
- Die Anzahl und das Ausmaß der während der Lagerung auftretenden Zusatzpeaks ist in beiden Desmopressin-Chargen gleich.
Es kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei den entstehenden Zusatzpeaks um die gleichen Zersetzungsprodukte handelt, da deren Retentionszeiten gleich sind.
- Bei Polycarbophil-haltigen Systemen (Feste Dispersionen) sind die VB verglichen mit den Polycarbophil-freien Systemen (Lyophilisate) wesentlich größer, d.h. die Streuungen der Werte sind bei den Festen Dispersionen größer.

4.2.2. Zersetzungsreaktionen von Desmopressin

Peptide bieten eine Vielzahl an möglichen Zersetzungsprodukten, da sie aufgrund ihrer Molekülgröße und der großen Anzahl an funktionellen Gruppen zu einer Reihe von Reaktionen befähigt sind.

Eine sehr häufig vorkommende Reaktion bei Peptiden ist die Hydrolyse. Dabei können sowohl Bindungen im inneren des Moleküls (Peptidbindungen) hydrolysiert werden als auch endständige Gruppen (z.B. endständige Säureamide) des Peptides.

4.2.2.1 Hydrolyse von endständigen Säureamidgruppen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte u.a. die Hydrolyse von endständigen Säureamid-Bindungen mit Hilfe der HPLC-MS-Kopplung (Kapitel 3.1.2.) nachgewiesen werden. Jede hydrolytische Spaltung führte zu einer Änderung der Molaren Masse von $\Delta m/z +1$.

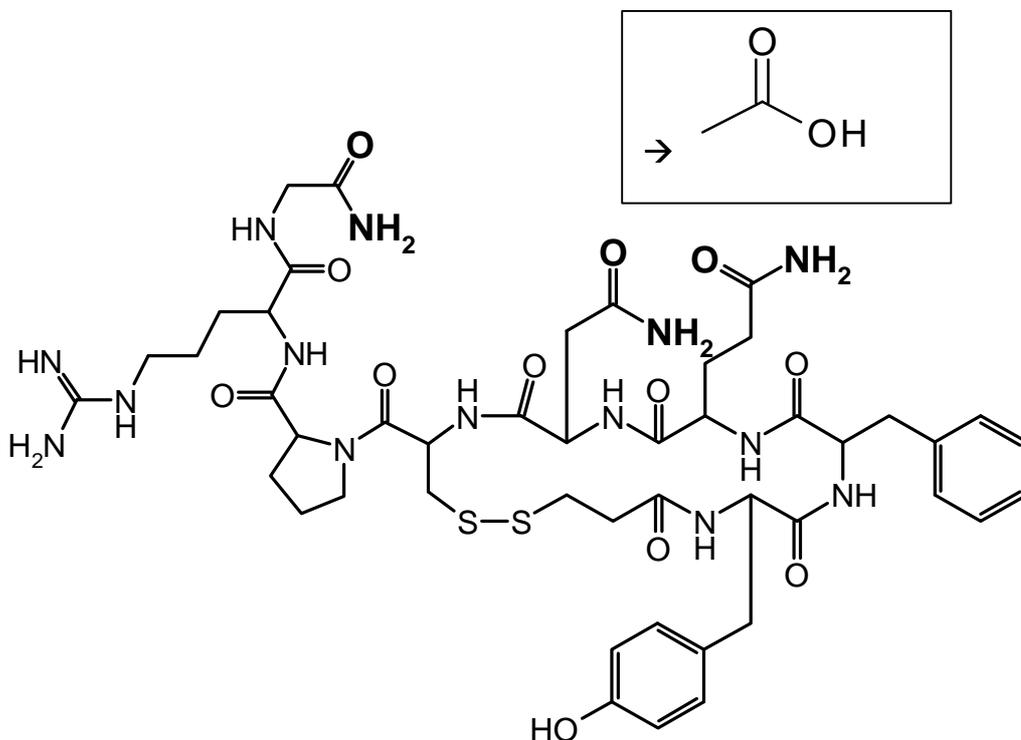


Abb. 80: Deamidierung von Desmopressin

Die Deamidierung durch Hydrolyse kann an folgenden Aminosäuren des Desmopressins erfolgen, die in der Abb. 80 markiert sind:

1. Glycinamid → Glycin
2. Asparagin (Asn) → Asparaginsäure
3. Glutamin (Gln) → Glutaminsäure

Jede Deamidierung führt zu einer Zunahme der Masse von +1, so daß Massen von 1070 (Deamidierung an einer Position), 1071 (Deamidierung an zwei Positionen) und 1072 (Deamidierung an allen endständigen Säureamidgruppen) entstehen.

Der Masse 1070 könnten drei verschiedene Moleküle zugeordnet werden, je nachdem an welcher Aminosäure die Deamidierung erfolgte.

Die Masse 1071 könnten ebenfalls drei verschiedene Moleküle besitzen, da folgende Kombinationen im Hydrolysemuster möglich sind:

- Deamidierung von Glycinamid + Asn
- Glycinamid + Gln
- Asn + Gln

Die Masse 1072 entsteht, wenn alle drei endständigen Säureamidgruppen hydrolysiert werden.

Es konnten mit Hilfe von Kopplungstechniken (HPLC-MS) diese drei Massen 1070, 1071 und 1072 gefunden werden.

4.2.2.2 Weitere Reaktionsmöglichkeiten

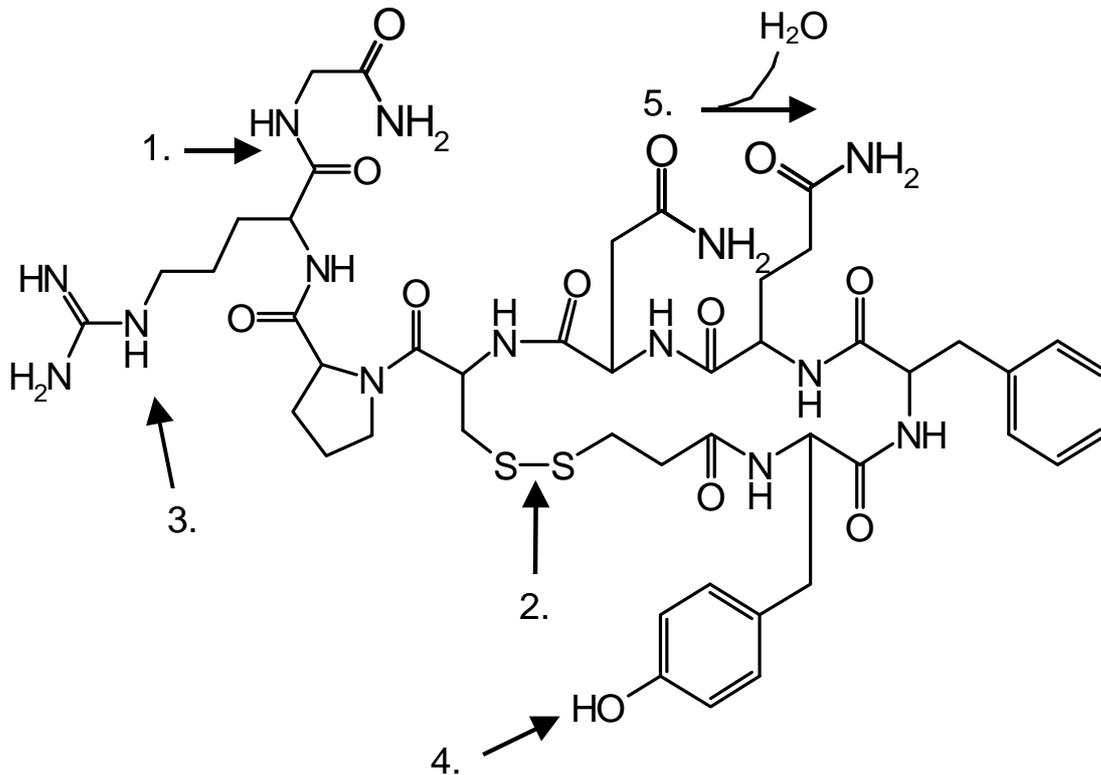
Eine weitere Reaktion, die eventuell als Folge einer Hydrolyse anzunehmen ist, ist die Kondensation.

Mittels HPLC-MS wurde eine Masse von 1054 gefunden, welche durch eine Kondensation an vielen Positionen im Desmopressin-Molekül möglich wäre.

Mit Hilfe von Molecular Modelling (4.2.7.) wurde die Konformation von Desmopressin errechnet, die hilfreich sein kann bei der Ermittlung, wie nah sich manche funktionelle

Gruppen u.a. innerhalb des Moleküls kommen können, so daß dort eine chemische Reaktion möglich wäre.

Abb. 81: Weitere Reaktionsmöglichkeiten des Desmopressins:



Reaktion	$\Delta m/z$
1. Spaltung von Peptidbindungen	+18
Abspaltung von Glycin	-74
2. Reduktive Spaltung der Disulfidbrücke	+2
Oxidation zur Sulfonsäure, je Thiol	+48
3. Abspaltung von Guanidin	-58
4. Oxidation der phenolischen Hydroxylgruppe	-2
5. Kondensation (an vielen Positionen möglich)	-18

Es sind diese entsprechenden Massen ($\Delta m/z$) mittels HPLC-MS-Analytik gefunden worden. Ob es sich dabei tatsächlich um die o.g. Zersetzungsprodukte handelt, kann nur mit Hilfe umfangreicherer Analysenverfahren (MS-MS-Kopplung, HPLC-NMR, u.a.) ermittelt werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen.

4.2.3. log k / pH – Profil

In Kapitel 3.4.5 wurde die Methode und die Vorgehensweise beschrieben.

Die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RGK) erfolgte nach statistischen Methoden, die in Kapitel 3.5. beschrieben sind.

Im ersten Schritt wurde die Reaktionsordnung anhand der Kurvenverläufe aus Desmopressin-Flächenwert gegen Zeit ermittelt. Es ist in allen Kurven ein exponentieller Verlauf der Desmopressin-Fläche (HPLC), entsprechend dem Desmopressin-Gehalt, über die Zeit zu beobachten, so daß von einer Reaktion erster Ordnung auszugehen ist. Eine Abweichung davon stellt das in Puffer pH 5.5 hergestellte Desmopressin-Lyophilisat dar. Hierbei ist die Änderung der HPLC-Fläche über den untersuchten Zeitraum sehr klein, so daß anhand der geringen Meßpunkte (fünf Untersuchungszeitpunkte) der Verlauf sich von einer Geraden nicht unterscheidet. Betrachtet man hingegen den Verlauf der HPLC-Flächen der Zusatzpeaks, die unter dem Einfluß des Puffersalzes pH 5.5 entstehen, so ist ein exponentieller Verlauf zu erkennen. Aus diesem Grund wurde auch für dieses System eine Reaktion erster Ordnung angenommen.

Mit den Flächenwerten (sieben pH-Werte, fünf Zeitpunkte, zwei Proben, drei Einspritzungen) wurde jeweils für jeden pH-Wert eine Nichtlineare Regression durchgeführt, wobei als Startwerte die aus der Linearen Regression (Desmopressin-Fläche gegen Zeit) erhaltenen Werte (Ordinatenabschnitt, Steigung) benutzt wurden. Durch drastische Veränderung der Startwerte wurde auf ein stationäres Optimum der Lösung geprüft. Es kam bei keinem Ergebnis für die RGK zu einer Änderung bei Variation der Anfangswerte, so daß eine stabile Lösung angenommen werden kann. Desweiteren liegen die Werte der Korrelationsmatrix (asymptotic correlation matrix) nicht allzu hoch (ca. 0.65), was ebenfalls positiv ist, da das verwendete Modell dann offenbar nicht durch eines mit weniger Parametern ersetzt werden kann.

Die pH-Werte in Tab. 3 und Abb. 82 sind die der Lösungsmittel vor Lyophilisation. Welcher pH-Wert sich mit der Lagerung in der molekularen Umgebung der Desmopressin-Moleküle ergibt, ist nicht bekannt. Grobe lokale Unterschiede sind zumindest nach den DSC-Ergebnissen (Abb. 56, Kapitel 4.1.3.3) nicht wahrscheinlich.

Zur Erstellung des log k / pH – Profiles wurden die RGK-Schätzwerte aus der Nichtlinearen Regression, sowie der asymptotische Standardfehler (ase) verwendet.

Tab. 3: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten (RGK) und der asymptotische Standardfehler (ase) der Zersetzungsreaktion von gepufferten Desmopressin- Lyophilisaten in Abhängigkeit des pH-Wertes

pH	RGK [w^{-1}]	ase
2,0	0,0687	0,0050
3,0	0,0245	0,0045
4,0	0,3607	0,0128
5,5	0,0185	0,0013
6,8	0,0123	0,0017
8,0	0,0193	0,0036
10,0	0,0196	0,0021

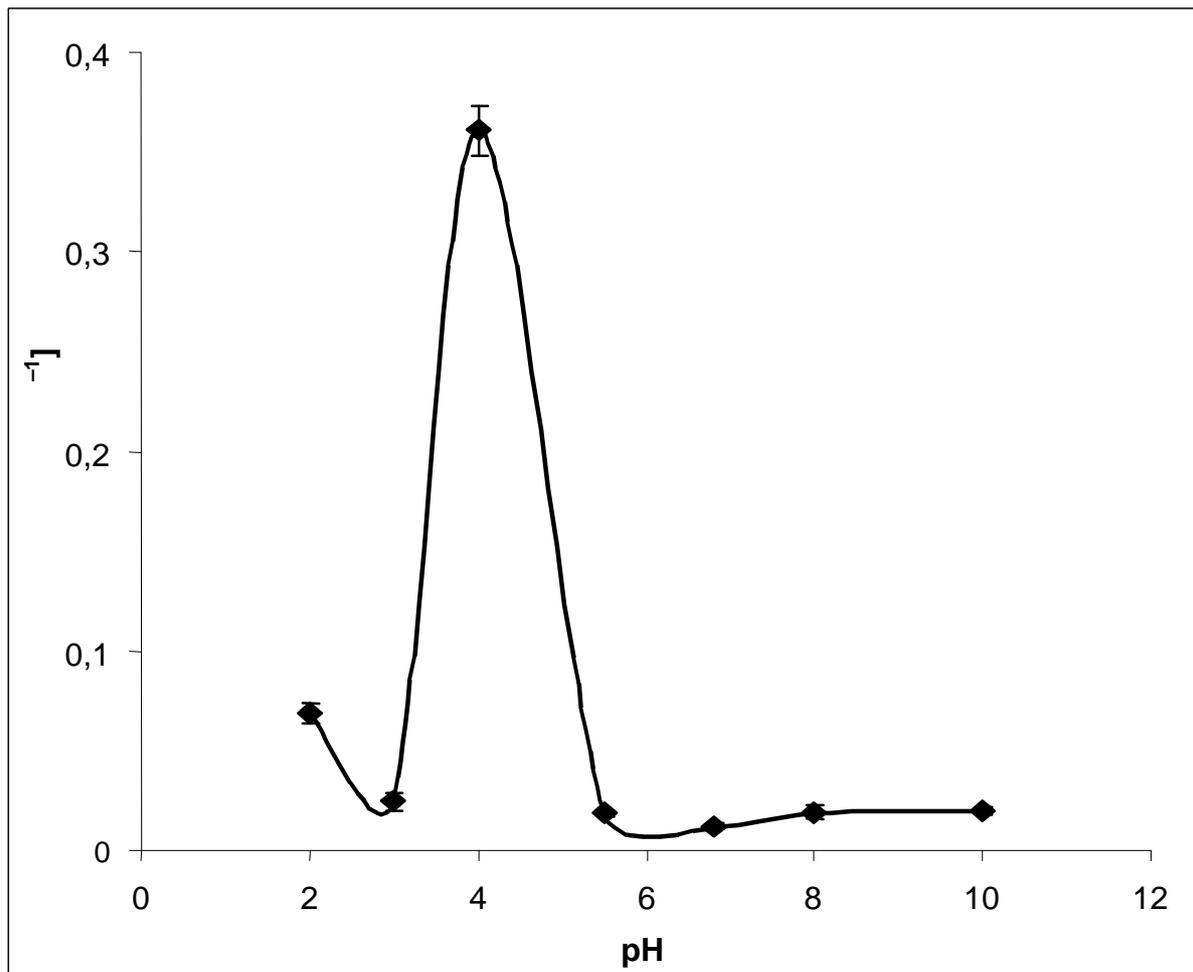


Abb. 82: Log k / pH – Profil von gepufferten Desmopressin-Lyophilisaten bei 74 °C / 30 % r.F.

Ergebnisse und Diskussion: log k / pH - Profil

Das Stabilitätsoptimum von Desmopressin-Lyophilisat liegt bei einem pH-Wert um pH 6. Bei diesem pH-Wert ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante am geringsten. Dieser pH-Wert liegt nahe dem isoelektrischen Punkt von Desmopressin, der rechnerisch $pH_i = 6.2 (\pm 0.1)$ beträgt. Dieser Wert wurde aus der Summe der pH_i -Werte aller enthaltenen Aminosäuren und aus der Summe aller pK-Werte der sauren und basischen Gruppen der Aminosäuren berechnet. Es ergaben sich, je nach Rechenmethode (pH_i - oder pK-Wert-Methode) geringfügige Unterschiede in dem resultierenden Wert des isoelektrischen Punktes für Desmopressin, weshalb davon der Mittelwert angegeben wurde.

Es könnte demnach ein Zusammenhang zwischen der Stabilität von Desmopressin in fester Form (Lyophilisat) und dem isoelektrischen Punkt bestehen. Am isoelektrischen Punkt sind die Ladungen im Desmopressin-Molekül ausgeglichen und das Peptid besitzt bei diesem pH seine geringste Löslichkeit.

Damit das Peptid durch Hydrolyse angegriffen werden kann, muß es neben dem Lyophilisat auch gelöst vorliegen. Ist die Löslichkeit bei einem bestimmten pH-Wert verringert, so ist die Gefahr einer hydrolytischen Zersetzung geringer.

Ein weiterer Grund für die pH-abhängigen Unterschiede in den Zersetzungsgeschwindigkeiten besteht in der pH-Abhängigkeit des Reaktionsmechanismus, d.h. ist die Reaktion der Zersetzung eher säure- oder eher basekatalysiert.

Der obigen Graphik (Abb. 82) kann entnommen werden, daß ein pH-Wert von 4.0 der pH ist, an dem die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Desmopressin-Zersetzung am größten sind (Desmopressin ist am instabilsten).

Bei den Zersetzungsprodukten ist auffällig, daß entsprechende HPLC-Peakflächen für Lyophilisate, die in sauren Puffern hergestellt wurden (pH 2, 3 und 4.0), bereits nach einer Woche Lagerungsdauer drastisch zunehmen (15-40 %, bezogen auf die Desmopressin-Ausgangsfläche), während bei denen, die in neutralem bis basischem Puffer hergestellt wurden (inkl. pH 5.5), nur sehr kleine Peakflächen an Zersetzungsprodukten detektiert werden konnten (< 2%).

Bei allen Systemen kam es jedoch zwischen vier und 12 Wochen Lagerdauer zu einem drastischen Anstieg an Zersetzungsprodukten.

Das mittels HPLC erkennbare Zersetzungsschema der Desmopressin-Reaktion scheint in allen Lyophilisaten vergleichbar zu sein. In den Chromatogrammen besitzen die neben Desmopressin auftretenden Peaks die gleichen Retentionszeiten, so daß auch vermutet werden könnte, daß es sich um die gleichen Zersetzungsprodukte handelt.

Allerdings ist die Anzahl an auftretenden Zersetzungsprodukten pH-abhängig. Bei niedrigem pH des Puffers ist die Anzahl und das Ausmaß (HPLC-Fläche) an Zusatzpeaks größer, verglichen mit den Lyophilisaten, die neutrale bis basische Puffersalze enthielten.

Folgender Graphik (Abb.83) ist zu entnehmen, daß die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Zersetzungsreaktion von Demopressin in Lyophilisaten pH-abhängig ist und diese in Gegenwart von sauren Puffern (pH 2.0) vergleichsweise größere Werte liefert, als in Gegenwart von basischen Puffersystemen (pH 10.0).

Eine tabellarische Darstellung des Desmopressin-Gehaltes und der Zersetzungsprodukte (aufgeteilt nach Rt) über die Zeit sind im Anhang zu ersehen.

Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Zersetzung von Desmopressin in Lyophilisaten nach Herstellung in sauren, neutralen und basischen Puffersystemen:

In (Fläche DDAVP)

Lagerzeit [Wochen]	2.0	pH 6.8	10.0
0	10,045	10,151	10,139
1	9,784	10,068	10,027
2	9,757	10,097	9,989
4	9,685	10,111	10,037
12	9,209	9,976	9,858

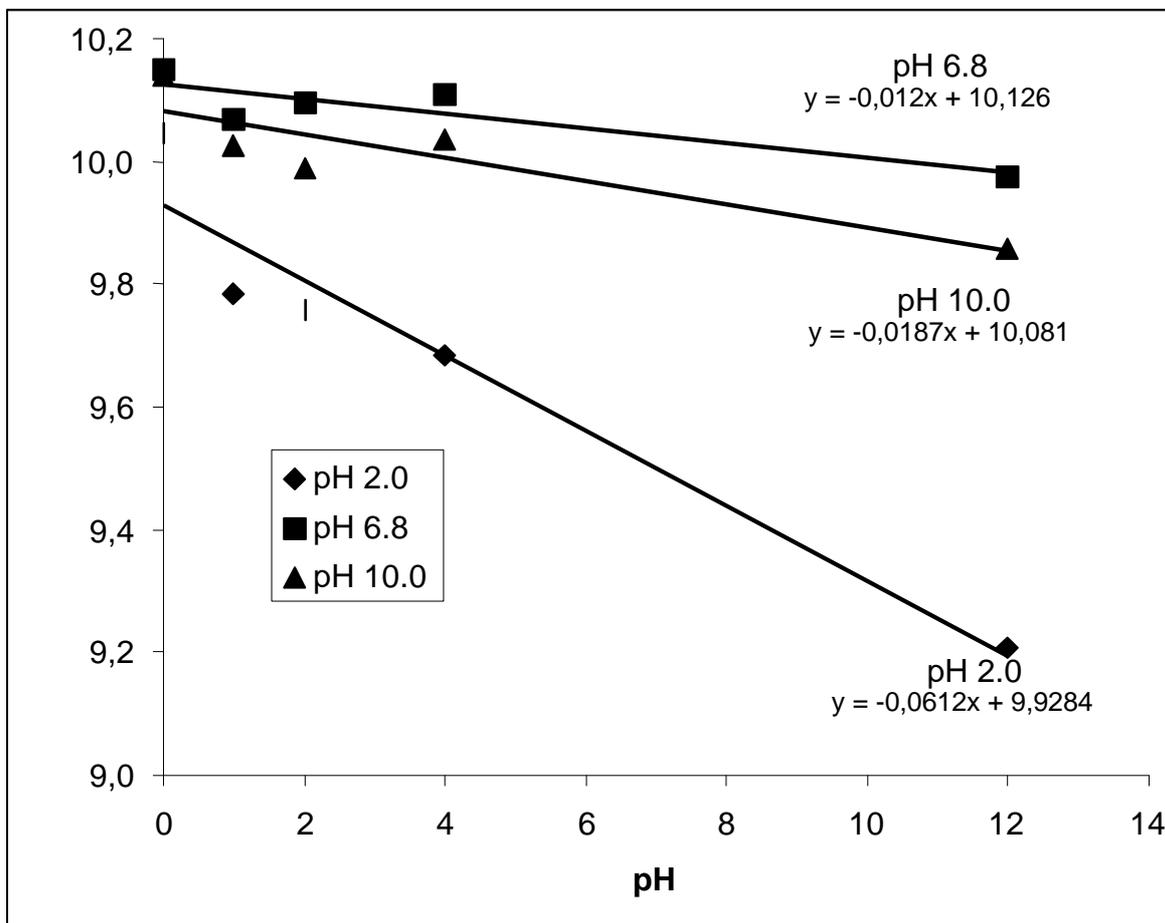


Abb. 83: Stabilität von Desmopressin in Lyophilisaten, am Beispiel pH 2, 6.8 und 10

4.2.4 Faktoren, welche die Stabilität beeinflussen

Die Vorgehensweise ist im Kapitel 3.5.1 umfangreich beschrieben worden.

Es wurde das Statistikprogramm SPSS Version 8.0 verwendet.

Betrachtet wurde die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (RGK) für die Zersetzung von Desmopressin während der Lagerung über 24 Wochen bei verschiedenen Bedingungen (Temperatur und Feuchte), sowie der Vergleich der Systeme (pH-Wert und Polymergegenwart).

Nach statistischer Auswertung der Daten aus der Langzeiteinlagerung ergibt sich folgendes Resultat:

Wechselwirkung auf der 3. Stufe (alle Faktoren) sind signifikant ($\alpha=0.05$)

Jeder einzelne Faktor zeigt einen signifikanten Einfluß ($\alpha=0.05$)

Ergebnis:

Es besteht eine signifikante Wechselwirkung ($\alpha=0.05$) zwischen allen Einflußgrößen, die in den Versuchsplan einbezogen wurden, d.h. die Wirkung jeder einzelnen Einflußgröße hängt von der Ausprägung der anderen Einflußgröße ab. Jedoch kann der mittleren Varianzschätzung (TYP III) entnommen werden, daß die Feuchte die wichtigste Einflußgröße darstellt, gefolgt von pH, Temperatur und Polymer.

Reihenfolge der Wichtigkeit des Faktors auf die Geschwindigkeit der Zersetzung von Desmopressin:

Feuchte > pH > Temperatur > Polymer

4.2.5 Haltbarkeit

Auf die Vorgehensweise zur Abschätzung der Haltbarkeit von Desmopressin in verschiedenen Systemen wurde bereits in Kapitel 3.5.2 eingegangen.

Beobachtungen:

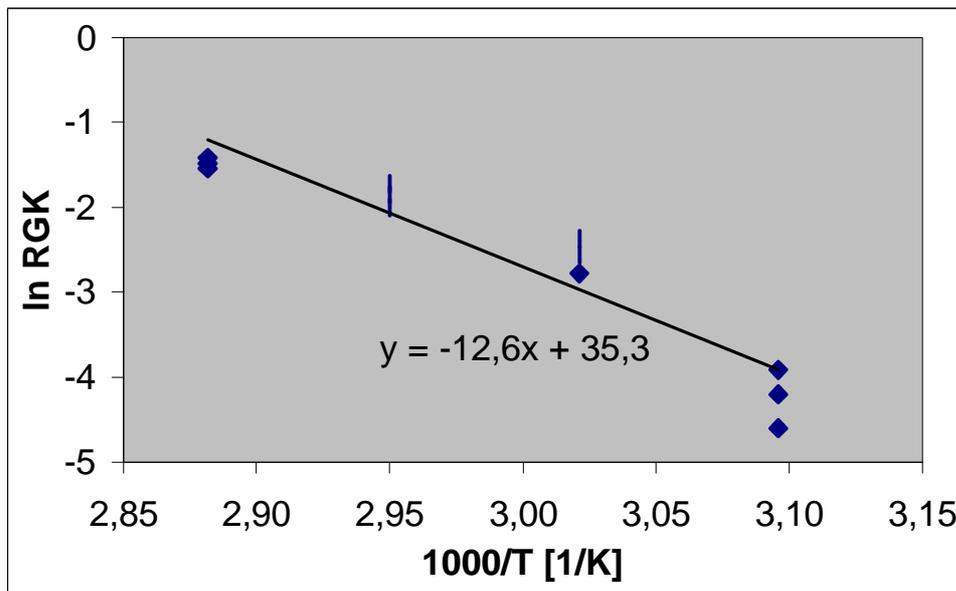


Abb. 84: Zusammenhang zwischen RGK und Temperatur am Bsp. D4

→ Bei niedrigerer Temperatur (50 °C) knickt die Kurve ab.

→ Die Streuung nimmt mit abnehmender Temperatur zu. Diese Zunahme ergibt sich als Artefakt, da bei geringeren Temperaturen die Flächenänderung im untersuchten Zeitraum im Vergleich zu höheren Temperaturen viel geringer ist, deutlich weniger Halbwertzeiten werden durchlaufen als bei drastischeren Bedingungen.

Durch die logarithmische Transformation ändert sich die Fehlerverteilung der Daten:

Aus der Normalverteilung wird eine rechtsschiefe Verteilung und es ist eine „Fächerstruktur“ zu beobachten.

Warum die Kurve (ln RGK gegen $1/T$) zu niedrigeren Temperaturen hin überproportional abfällt, läßt sich mit dieser Untersuchung nicht klären.

Solche Verläufe schließen eine Änderung im Reaktionsmechanismus nicht aus. Anhand der Chromatogramme der HPLC- und HPLC-MS-Untersuchungen konnten jedoch bei 50 °C keine anderen Zersetzungsprodukte beobachtet werden, als bei höheren Temperaturen. Um der Ursache des gekrümmten Verlaufes aus ln RGK gegen $1/T$ auf den Grund zu gehen, müßte ein größerer Temperaturbereich, verbunden mit längerer Lagerdauer (Durchschreiten der Halbwertzeiten möglich) untersucht werden.

Der Vertrauensbereich der Regressionsgeraden aus ln RGK gegen $1/T$ ist relativ groß, da die Regressionsgerade mit nur vier Temperaturen (50, 58, 66 und 74 °C) erstellt wurde. Es sei darauf hingewiesen (Vergleich auch Kapitel 3.5.2), daß bei diesen Untersuchungen Temperaturdifferenzen $< 8^{\circ}\text{C}$ nicht sinnvoll sind, weil die Unterschiede in der Lagertemperatur dann immer weniger signifikant werden [80].

Das Ergebnis für die Haltbarkeit der einzelnen Systeme sollte deshalb nur als grobe Schätzung dienen.

Die Ergebnisse aus der Regressionsrechnung, extrapoliert auf 25 °C, und die aus der Untersuchung der bei 25 °C gelagerten Proben (24 Wochen) weichen voneinander ab:

Aus den Daten der Langzeiteinlagerung konnte für kein System eine Desmopressin-Gehaltsabnahme bei 25 °C detektiert werden.

Die ermittelte RGK aus dem Verlauf Fläche gegen Zeit aus der Langzeiteinlagerung war nicht signifikant von Null verschieden ($\alpha=0.05$).

Die mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung errechnete Haltbarkeit bei 25 °C ist deshalb kritisch zu betrachten, da

1. über 6 Monate keine Gehaltsabnahme bei 25 °C detektiert werden konnte und
2. der Zusammenhang zwischen ln RGK und $1/T$ nicht linear ist, und die Regressionskurve zu geringeren Temperaturen hin überproportional abfällt.

Es sollte jedoch nicht auf die Untersuchung bei niedrigerer Temperatur (25 °C) verzichtet werden, um eine breitere Beurteilungsmöglichkeit zu erhalten und um zu prüfen, ob der Reaktionsmechanismus unter Normalbedingungen (25 °C) der gleiche ist, wie unter verschärften Bedingungen.

Die Parameter der Regressionsgleichung (RGK, E_a , A) und die mittels RGK errechnete Haltbarkeit ($t_{90\%}$) dürfen nur als grobe Schätzwerte betrachtet werden.

Übersicht der Parameter der Arrhenius-Gleichung für die verschiedenen Systeme bei **30 % relativer Luftfeuchte**:

D4 (Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0)

RGK [Wochen⁻¹]

°C	50	58	66	74
K	323	331	339	347
RGK	0,0149	0,0775	0,1568	0,2274
uG	0,0100	0,0619	0,1353	0,2129
oG	0,0199	0,0931	0,1783	0,2419
1/T	0,00310	0,00302	0,00295	0,00288
ln RGK	-4,2064	-2,5575	-1,8528	-1,4810
uG	-4,6052	-2,7822	-2,0003	-1,5469
oG	-3,9170	-2,3741	-1,7243	-1,4192

ln RGK _{oG} - ln RGK _{uG} :	0,6881	0,4082	0,2760	0,1277
n_g	1	2	4	8

T [°C]	T [K]	1/T [1/K]	- ln RGK	Differenz ln RGK _{oG} - ln RGK _{uG}	1/Differenz n_g
50	323	0,00310	4,2064	0,6881	1
58	331	0,00302	2,5575	0,4082	2
66	339	0,00295	1,8528	0,2760	4
74	347	0,00288	1,4810	0,1277	8

→ Regressionsgleichung : $\ln \text{RGK} = 28,2 - 10271 \cdot x$

RGK _{25°C} [s ⁻¹]	E_a [kJ/mol]	A [s ⁻¹]	$t_{90\%}$ [Jahre]
$3 \cdot 10^{-9}$ 1 - 8 $\cdot 10^{-9}$	85,4 +/- 17,7	$1,78 \cdot 10^{12}$ +/- 512,0	1,1 0,4 - 2,9

DP4 (Feste Dispersion, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0)

°C	50	58	66	74
K	323	331	339	347
RGK	0,0417	0,0931	0,1796	0,2107
uG	0,0329	0,0778	0,1570	0,1973
oG	0,0505	0,1084	0,2022	0,2241

1/T	0,00310	0,00302	0,00295	0,00288
ln RGK	-3,1773	-2,3741	-1,7170	-1,5573
uG	-3,4143	-2,5536	-1,8515	-1,6230
oG	-2,9858	-2,2219	-1,5985	-1,4957

ln RGK _{oG} - ln RGK _{uG} :	0,4285	0,3317	0,2530	0,1274
n _g	2	3	4	8

T	T	1/T	- ln RGK	Differenz	1/Differenz
[°C]	[K]	[1/K]		ln RGK _{oG} - ln RGK _{uG}	n _g
50	323	0,00310	3,1773	0,4285	2
58	331	0,00302	2,3741	0,3317	3
66	339	0,00295	1,7170	0,2530	4
74	347	0,00288	1,5573	0,1274	8

→ Regressionsgleichung : $\ln \text{RGK} = 18,6 - 6973 \cdot x$

RGK _{25°C}	E _a	A	t _{90%}
[s ⁻¹]	[kJ/mol]	[s ⁻¹]	[Jahre]
1,4 * 10⁻⁸	58,0	1,2 * 10⁸	0,24
0,9-2,1*10 ⁻⁸	+/- 9,1	+/- 25,0	0,15 - 0,37

D6 (Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8)

°C	50	58	66	74
K	323	331	339	347
RGK	0	0	0,0059	0,0143
uG	0	0	0,0020	0,0114
oG	0	0	0,0098	0,0173

Der Vertrauensbereich der Steigung der Regressionskurven (entsprechend RGK) bei 50 und 58 °C schließt den Wert Null mit ein, d.h. mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit ist ein signifikanter Unterschied der Steigung von Null nicht nachweisbar.

Das System Desmopressin lyophilisiert pH 6.8 ist über den untersuchten Zeitraum bei den gewählten Temperaturen so stabil, daß bei 50 und 58 °C kein signifikanter Abfall im Desmopressin-Gehalt nachweisbar ist. Unterhalb von 66 °C hat innerhalb von 24 Wochen praktisch keine Gehaltsabnahme stattgefunden.

Damit ist eine kinetische Berechnung, verbunden mit einer Voraussage zur Haltbarkeit von Desmopressin in diesem System (D6) nicht möglich.

DP6 (Feste Dispersion, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8)

°C	50	58	66	74
K	323	331	339	347
RGK	0,0412	0,0554	0,0537	0,0792
uG	0,0265	0,0348	0,0357	0,0583
oG	0,0558	0,0760	0,0718	0,1001

Die Vertrauensbereiche der Steigungen der Regressionskurven (entsprechend RGK) sind derart groß, daß sie sich fast alle überschneiden. Somit können keine signifikanten Unterschiede ($\alpha=0.05$) zwischen den RGKs der verschiedenen Temperaturen nachgewiesen werden. Nur die Vertrauensbereiche der RGK bei 50

und 74 °C Lagertemperatur überschneiden sich nicht, jedoch sind dies viel zu wenig Datenpunkte, um eine Regressionsgerade zu legen.

Die Streuungen zwischen den Proben sind sehr groß und die relativen Standardabweichungen zwischen den Proben einer Temperatur liegen nicht selten bei 30 %, in manchen Fällen sogar bei 50 %.

Innerhalb einer Probe sind die Streuungen jedoch gering.

Diese Tatsache spricht dafür, daß sich das System mit Polycarbophil (in Gegenwart von Phosphatpuffer pH 6.8) physikalisch verändert und somit die

- Freigabe und
- Zersetzungsgeschwindigkeit

des Desmopressins über die Zeit und zwischen den Temperaturen stark schwanken kann. In Abhängigkeit der Lagertemperatur und -dauer konnte bei diesen Festen Dispersionen eine physikalische Veränderung festgestellt werden: die Systeme waren immer schwerer zentrifugierbar.

Dies ist möglicherweise auf eine Veränderung der Polycarbophil-Ketten zurückzuführen. So könnten Änderungen in der Kettenlänge oder im Vernetzungsgrad zu einem verändertem physikalischen Verhalten führen.

Folgende Desmopressin-Gehalte lagen nach 24 Wochen Lagerdauer in Abhängigkeit der Lagertemperatur im System DP6 vor (n=6):

25 °C ---> ca. 100 %

50 °C ---> ca. 50 %

58 °C ---> ca. 35 %

66 °C ---> ca. 30 %

74 °C ---> ca. 18 % bezogen auf den Ausgangsgehalt.

Es ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Lagertemperatur und dem prozentualen Desmopressin-Gehalt zu erkennen, jedoch sind die Schwankungen zwischen den Proben einer Temperatur so groß, daß die Vertrauensbereiche der Steigungen der Regressionskurven (entspr. RGK) bei den unterschiedlichen Temperaturen, ermittelt aus der Nichtlinearen Regression, keinen signifikanten

Unterschied ($\alpha=0.05$) erkennen lassen.

Dadurch ist eine kinetische Berechnung mit einer Schätzung von E_a , A und der Haltbarkeit bei 25 °C für dieses System (DP6) nicht möglich.

Aus der Betrachtung des Desmopressin-Gehaltes der bei 25 °C gelagerten Probe kann jedoch angenommen werden, daß Desmopressin bei dieser Temperatur relativ stabil ist und nur wenig zersetzt wird.

Für die Lyophilisate und Festen Dispersionen, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 sowie für alle Systeme, die bei 11 % r.F. gelagert wurden, ist die Angabe der kinetischen Parameter (RGK, E_a , A) wenig sinnvoll.

Für Lyophilisate, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 (D6) und für alle Systeme, die bei 11 % r.F. gelagert wurden, ist die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Zersetzung, über den untersuchten Zeitraum betrachtet, zu gering.

Für Feste Dispersionen, hergestellt in Puffer pH 6.8 und Lagerung bei 30 % r.F. liegen andere Gründe vor, weshalb eine kinetische Berechnung nicht möglich ist. Bei diesem System (DP6, 30 % r.F.) sind die Streuungen zwischen den Proben so groß, daß signifikante Unterschiede in den RGKs der verschiedenen Temperaturen nicht nachweisbar waren.

Für vergleichende kinetische Betrachtungen zwischen 11 und 30 % r.F. bzw. pH 4.0 und 6.8 bei gleichen Temperaturen müßte ein längerer Zeitraum, gegebenenfalls verbunden mit noch höheren Lagertemperaturen, untersucht werden.

Es können demnach nur die Endgehalte von Desmopressin als grober Vergleich der Stabilität in Abhängigkeit der Feuchte und des pH-Wertes des Dispersionsmediums betrachtet werden.

Als gesichert kann jedoch angenommen werden, daß bei geringerer Feuchte (11 % r.F.) die Zersetzungsreaktionen sehr viel langsamer ablaufen als bei 30 % r.F. .

Mit Hilfe des Programmpaketes SPSS <1> konnte durch eine Varianzanalyse die Wichtigkeit des Einflusses der Feuchte auf die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante gezeigt werden. Danach konnte die Feuchte als die wichtigste Einflußgröße gefolgt von dem pH, der Temperatur und dem Polymer ermittelt werden.

Tab. 4: **Desmopressin-Gehalt [%]** in den verschiedenen Systemen bei 74 °C und 11 bzw. 30 % r.F. nach 24 Wochen Lagerung (n=6) :

Feuchte [%]	D4	DP4	D6	DP6
11	43	26	89	87
30	9	3	77	19

4.2.6 Identifizierung von Zersetzungsprodukten

Die Methoden sind in Kapitel 3.6. beschrieben worden.

Überlegungen zu möglichen Zersetzungsprodukten von
Desmopressin (m/z 1069) :

Reaktion	Δ m/z (entstehende Masse)
• Deamidierung der Säureamide	+1 je Deamidierung (1070, 1071, 1072)
• Spaltung der Peptidbindung nach Deamidierung (nur Asn, Gln)	Fragmente entsprechender Masse
• Reduktion der Disulfid-Brücke	+2 (1071)
• Oxidierung von Thiol zu SO ₃ H	+ 48 je SH (1117)
• Bruch am Guanidin	- 58 (1072--->1014)
• Abspaltung von Glycin (Amidspaltung)	- 74 + 17 = - 57 (1071--->1014)*
• Abspaltung von Glycin n. Kondens.	- 74 + 17 = - 57 (1054 --->997)*
• Kondensation nach Säurebildung	- 18 pro H ₂ O (1072 --->1054) [⊕]
• Oxidation von phenolischen OH d.Tyr	- 2 (1072 ---> 1070)

* es konnte eine Masse von 74 im MS gefunden werden
(Fragmentierungsspannung 325 V, Probe D4 Vb 24 Wochen).

[⊕] Kondensationsreaktionen wären denkbar und sollten mittels Molecular Modelling
(Kapitel 4.2.7) überprüft werden.

Während der Lagerung kam es in einigen Proben, in Abhängigkeit der Temperatur und Feuchte zur Bildung von Zersetzungsprodukten.

Einige Zusatzpeaks traten relativ schnell in unterschiedlichem Ausmaß in Erscheinung, je nachdem, welches System vorlag (Lyophilisat oder Feste Dispersion, pH 4.0 oder 6.8).

Es sollten nun die in allen Formulierungen auftretenden Zusatzpeaks strukturell aufgeklärt werden.

In manchen Proben konnten noch weitere Zusatzpeaks detektiert werden, die jedoch aufgrund der großen Anzahl nicht alle chemisch identifiziert wurden, da

1. diese Zersetzungsprodukte nur bei drastischen Bedingungen und
2. nur bei den Lyophilisaten und Festen Dispersionen, hergestellt in pH 4.0 auftraten.

Es sollten demnach nur die Zersetzungsprodukte identifiziert werden, die in jedem System aufgetreten sind und als Primärprodukte einer chemischen Zersetzung von Desmopressin angesehen werden können.

In manchen Proben (Herstellung in pH 4.0, 74 °C / 30 % r.F.) konnte eine weitere Zersetzung dieser Primärprodukte beobachtet werden.

Es wurden Vermutungen über mögliche Hydrolysemechanismen bereits in Kapitel 4.2.2 erläutert. Eine reduktive Spaltung der Disulfidbrücke ist desweiteren ebenfalls nicht auszuschließen und kommt nicht selten als Reaktionsmechanismus bei Peptiden, die über eine Disulfidbrücke verfügen, vor. Deshalb sollte auf diese Reaktionsmöglichkeit geprüft werden.

Für die vermuteten Reaktionsmechnismen (Hydrolyse der endständigen Säureamide, reduktive Spaltung der Disulfidbrücke) wurden spezielle Reagenzien ausgewählt, die genau diese Reaktionen selektiv hervorrufen.

Diese Reagenzien und der daraus resultierende Reaktionsmechanismus wurde bereits in Kapitel 3.6. beschrieben.

Die Identifizierung der Massen der Zusatzpeaks erfolgte mit Hilfe der LC-MS-Kopplungstechnik.

Materialien: 1) Desmopressin Ch.B. 1485-1-1

2) Dithiothreitol-Lsg. 1 M (DTT)

---> Reduktive Spaltung von Disulfidrücken

3) Amberlyst 15 -Perlen (AMB)

---> Deamidierung endständiger Amidgruppen
zur Carbonsäure

- Proben:
- 1) Desmopressin (DDAVP) in wässriger Lösung mit Dithiothreitol (DTT)
Konzentration DDAVP: 0.0206 %
 - 2) Desmopressin in wässriger Lösung mit Amberlyst 15-Perlen (AMB)
Konzentration DDAVP : 0.0206 %
1) +2) je 19 h gelagert bei Raumtemperatur
 - 3) Desmopressin in wässriger Lösung ---> dann Zusatz von DTT
Konzentration DDAVP : 0.01364 %
 - 4) Desmopressin in wässriger Lösung ---> dann Zusatz von AMB
Konzentration DDAVP : 0.01516 %

Die Aufstellung der Kinetik erfolgte mit den Proben 3+4 nach folgendem Probenzeitplan:

1. VOR Zugabe der Reagenzien
2. NACH 10, 60, 120, 180, 240, 360 Minuten und 24 h
Reaktionszeit mit dem entsprechenden Reagenz

Desweiteren wurde die Probe 2) zusätzlich nach 47 h analysiert.

Methode: siehe Kapitel 3.1.2. mit <2>

Zur Aufklärung der Zersetzungsprodukte wurden folgende Parameter herangezogen:

<u>Parameter</u>	<u>Sinn</u>
MS - Spektren	Erfassung der Massen der Zusatzpeaks
Peak-Purity der MS-Peaks	Reinheit des Signals (mehr Substanzen unter einem Peak ?)
Fragmentierung bei 325 V	Entstehung der Zusatzpeaks im MS ?

4.2.6.1 Reaktion mit DTT und Amberlyst

Als erstes wurden die Proben 1 und 2 (19 h Reaktionsdauer) untersucht:

System	Anzahl Peaks	Fläche (n. DAD)	Rt (min)	Masse	Molekül
DDAVP/DTT	1	2858	9.09	1071	red.DDAVP
DDAVP/AMB	1	1514	8.54	1069	DDAVP

Es sind auch jeweils die Isotope und die Natriumaddukte im MS erkennbar (Masse 1068 $\Delta=22$ m/z).

Danach erfolgte der eigentliche Versuch, die Erstellung einer Zersetzungs kinetik von Desmopressin mit DTT respektive Amberlyst. Dazu wurden zu den Braunglasvials, die die eingewogene Menge an Desmopressin enthielten, 5000 μ l destilliertes Wasser gegeben.

Untersuchung VOR Zugabe der Reagenzien:

System	Anzahl Peaks	Fläche (n. DAD)	Rt (min)	Masse	Molekül
DDAVP/DTT	1	2350	8.32	1069	DDAVP
DDAVP/AMB	1	2460	8.23	1069	DDAVP

4.2.6.1.1 Kinetik

Zu den wässrigen Desmopressin-Lösungen wurden jeweils die Reagenzien DTT (Zugabe von 10 µl) und Amberlyst 15 - Perlen (Zugabe von 0.02112 g) gegeben (Proben 3. + 4.). Nach folgenden Reaktionszeiten wurden Proben gezogen (500 µl) und mittels HPLC-MS untersucht (Reaktion bei Raumtemperatur):

DDAVP / DTT

Zeit [min]	Anzahl Peaks	DDAVP- Fläche (n. DAD) <i>ZP</i>	Rt (min)	Masse m/z	Molekül
10	2	2108 389	8.23 9.03	1069 1071	DDAVP <i>red.DDAVP</i>
60	2	1499 1130	8.23 8.90	1069 1071	DDAVP <i>red.DDAVP</i>
120	2	612 1796	8.24 8.68	1069 1071	DDAVP <i>red.DDAVP</i>
180	2	178 2010	8.21 8.58	1069 1071	DDAVP <i>red.DDAVP</i>
240	1	n.d. 2103	(MSD) 8.57	1069 1071	DDAVP <i>red.DDAVP</i>
360	1	n.d. 2112	- 8.49	- 1071	- <i>red.DDAVP</i>
24 h	1	n.d. 2017	- 8.59	- 1071	- <i>red.DDAVP</i>

ZP = Zusatzpeaks

Beobachtung:

- Bei der Zersetzung von Desmopressin mit DTT handelt es sich um eine Reaktion erster Ordnung, da ein exponentieller Abfall des Desmopressin-Gehaltes beobachtet werden konnte (siehe Abb. 86).
- Es entsteht ein Produkt mit der Masse 1071 (1069 +2 H; *red. DDAVP*), was auf das Reduktionsprodukt von Desmopressin durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücke hinweist.
- Der Desmopressin-Peak (Flächenwert) ist bereits 10 Minuten nach Zugabe von DTT deutlich kleiner.
- Nach 4 Stunden (240 min) ist kein Desmopressin im DAD (UV-Detektor) nachweisbar, sondern nur noch im MSD (ganz geringe Menge).
- Nach 6 Stunden (360 min) Reaktionszeit ist kein Desmopressin mehr detektierbar.

Während der Reaktion des DTT mit Desmopressin konnten Veränderungen in den Peakflächen, die vom Reagenz stammten, beobachtet werden. Es kann davon ausgegangen werden, daß das Reagenz durch die Reduktion des Desmopressins selbst oxidiert wird, so daß der Flächenwert der oxidierten Substanz (ox. DTT) über den Reaktionsverlauf zunehmen wird.

Diese Vermutung konnte bestätigt werden:

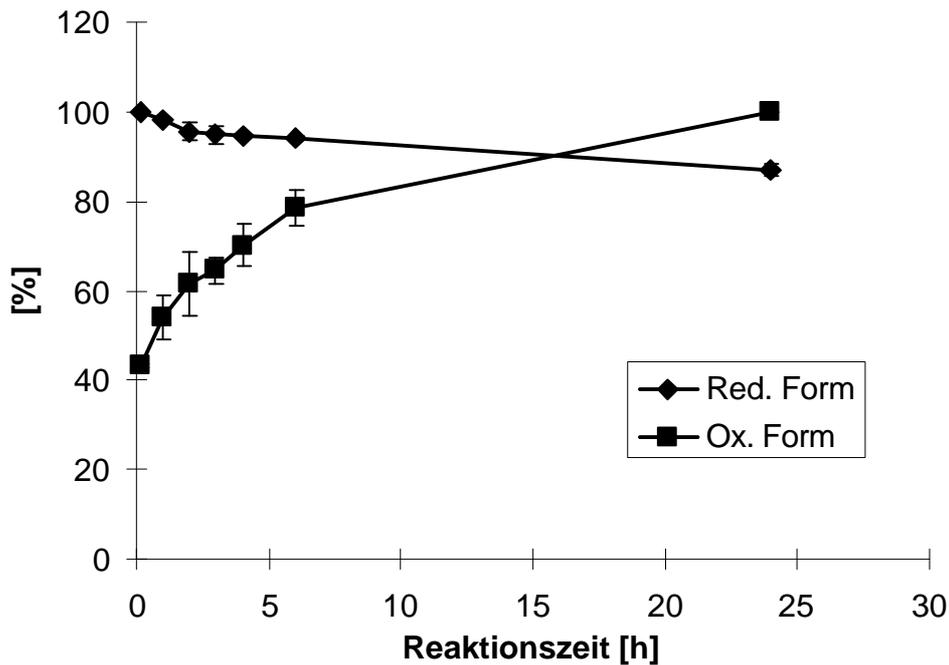


Abb. 85: Reaktion von Dithiothreitol mit Desmopressin - Änderung von DTT -

In obiger Graphik ist zu erkennen, daß es während der Reaktion von DTT mit Desmopressin zu einer Erhöhung des Anteiles an DTT in oxidierte Form kommt, während der Anteil an DTT in reduzierter Form abnimmt.

DDAVP / AMBERLYST

Zeit [min]	Anzahl Peaks	DDAVP-Fläche (n. DAD)	Rt (min)	Masse	Molekül
10	1	2385	8.19	1069	DDAVP
60	1	2310	8.13	1069	DDAVP
120	1	1917	8.11	1069	DDAVP
180	1	1709	8.08	1069	DDAVP
240	1	1474	8.13	1069	DDAVP
360	1	1089	8.11	1069	DDAVP
24 h	1	92	8.34	1069	DDAVP

Beobachtung:

- Es ist eine deutliche Abnahme des Desmopressin-Peaks über die Reaktionszeit mit Amberlyst erkennbar.
- Es sind keine Zusatzpeaks detektierbar.
- Ein bei ca. 25 min auftretender Peak (im DAD) kann mittels MSD nicht erkannt werden, was darauf hindeutet, daß diese Substanz nicht ionisierbar ist. Nach Prüfung auf ein mögliches Dimerisierungsprodukt durch Erhöhung der Fragmentorspannung und Erweiterung des Molekülmassenbereiches auf Massen bis 2500 konnte keine Masse gefunden werden.
- Eine mögliche Ursache für die Erniedrigung des Desmopressin-Gehaltes ohne daß entsprechende Zusatzpeaks detektiert werden können, ist die Sorption der

Zersetzungsprodukte an die Oberfläche der Amberlyst-Perlen. Desmopressin liegt in protonierter Form vor (pH der Amberlyst-Lösung gemessen pH=2.4), so daß eine Aminogruppe des Arginins protoniert vorliegt. Diese kann dann an die negativ geladene Sulfonsäuregruppe des Amberlyst über ionische Wechselwirkungen gebunden werden. Erst ab einer bestimmten Konzentration der Zersetzungsprodukte können diese in der Untersuchungslösung nachgewiesen werden.

Untersuchungen zu dieser Vermutung (Sorption an Amberlyst-Perlen) siehe folgendes Kapitel 4.2.6.3 .

Zur Absicherung der Ergebnisse wurde die Probe 2) nach 47 h Inkubationszeit untersucht. Außerdem konnten bei DDAVP / Amberlyst in der Probe 4) keine Zusatzpeaks detektiert werden, denen man eine Masse zuordnen könnte. Im ersten Versuch konnten nach 24 h Reaktionszeit zusätzliche Peaks im Chromatogramm detektiert werden. Dies blieb bei diesem zweiten Versuch aus, d.h. es konnten nach 24 h Reaktionszeit keine zusätzlichen Peaks detektiert werden, obwohl der Desmopressin-Gehalt sank. Deshalb sollte auch noch die Probe (24 h Reaktionszeit) aus dem ersten Versuch untersucht werden bei der seinerzeit drei zusätzliche Peaks im Chromatogramm erfaßt werden konnten.

System	Anzahl Peaks	DDAVP-Fläche (n. DAD)	Rt (min)	Masse	Molekül
DDAVP/AMB 47 h	4	282	8.42	1069	DDAVP
			9.06	1070	deam.DDAVP I
			11.71	1071	deam.DDAVP II
			15.97	1072	deam.DDAVP III
DDAVP/AMB 24 h -aus 1.Versuch -	4	301	8.29	1069	DDAVP
			8.91	1070	deam.DDAVP I
			dto.*	1071	deam.DDAVP II
			10.44	1070	deam.DDAVP I
			11.56	1071	deam.DDAVP II

* bei dem Peak mit der Retentionszeit von 8.91 Minuten konnten im MS zwei Substanzen ermittelt werden.

Beobachtung:

- Desmopressin ist auch nach dieser langen Reaktionszeit noch detektierbar.
- Die Zusatzpeaks sind im MSD, jedoch nicht im DAD, detektierbar.
- Nach der Reaktion von Desmopressin mit Amberlyst 15 -Perlen treten Peaks mit den folgenden Massen auf:
 - 1070 (zwei Peaks)
 - 1071 (zwei Peaks)
 - 1072 (ein Peak)
- Das Zersetzungsprodukt mit einer Masse von 1072 deutet auf eine vollständige Hydrolyse aller endständigen Säureamidgruppen (Asparagin, Glutamin, Glycinamid) hin.

Diese Massen mit den entsprechenden Retentionszeiten der Zusatzpeaks sind ebenfalls in den Proben aus der Langzeiteinlagerung (D4 und D6) zu finden (siehe Abb. 89 und 90).

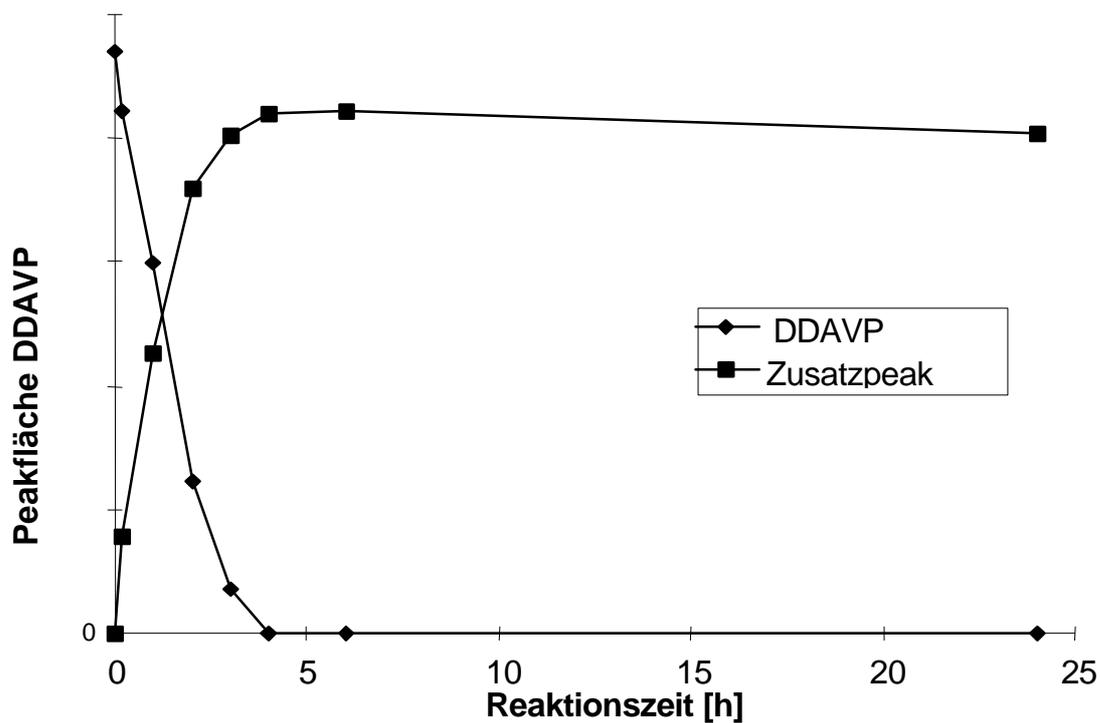


Abb. 86: Reaktion von Desmopressin mit Dithiothreitol

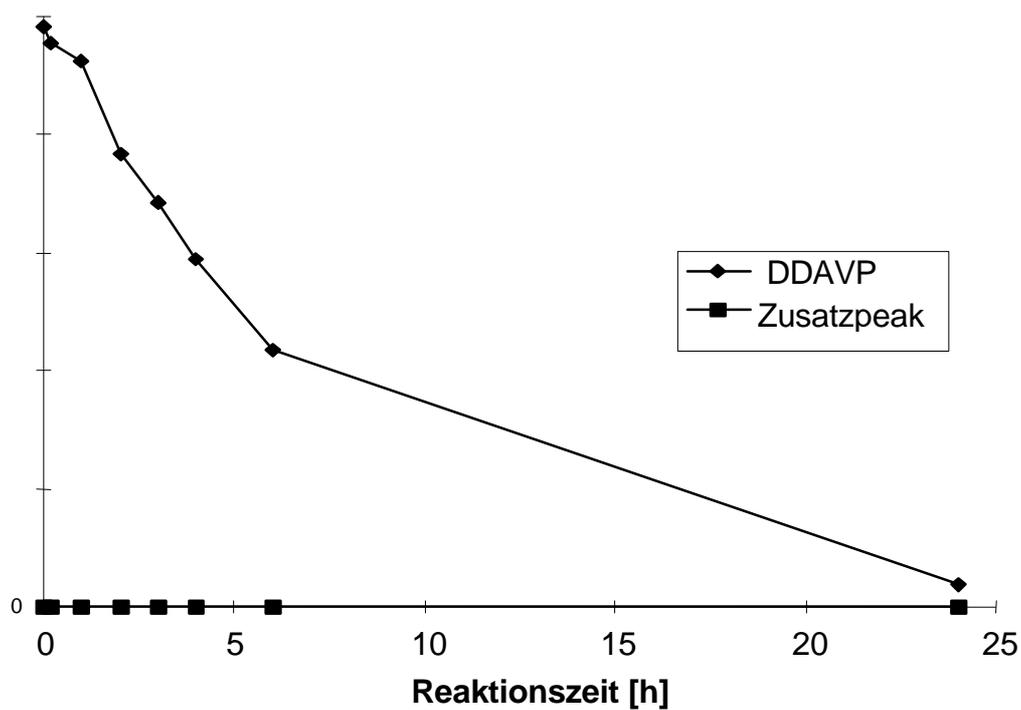


Abb. 87: Reaktion von Desmopressin mit Amberlyst 15 -Perlen

Zeit [h]	Gehalt DDAVP [%]	
	DDAVP/DTT	DDAVP/AMB
0	100.00	100.00
0.16	89.70	96.95
1	63.79	93.90
2	26.04	77.93
3	7.57	69.47
4	0.00	59.92
6	0.00	44.27
24	0.00	3.74

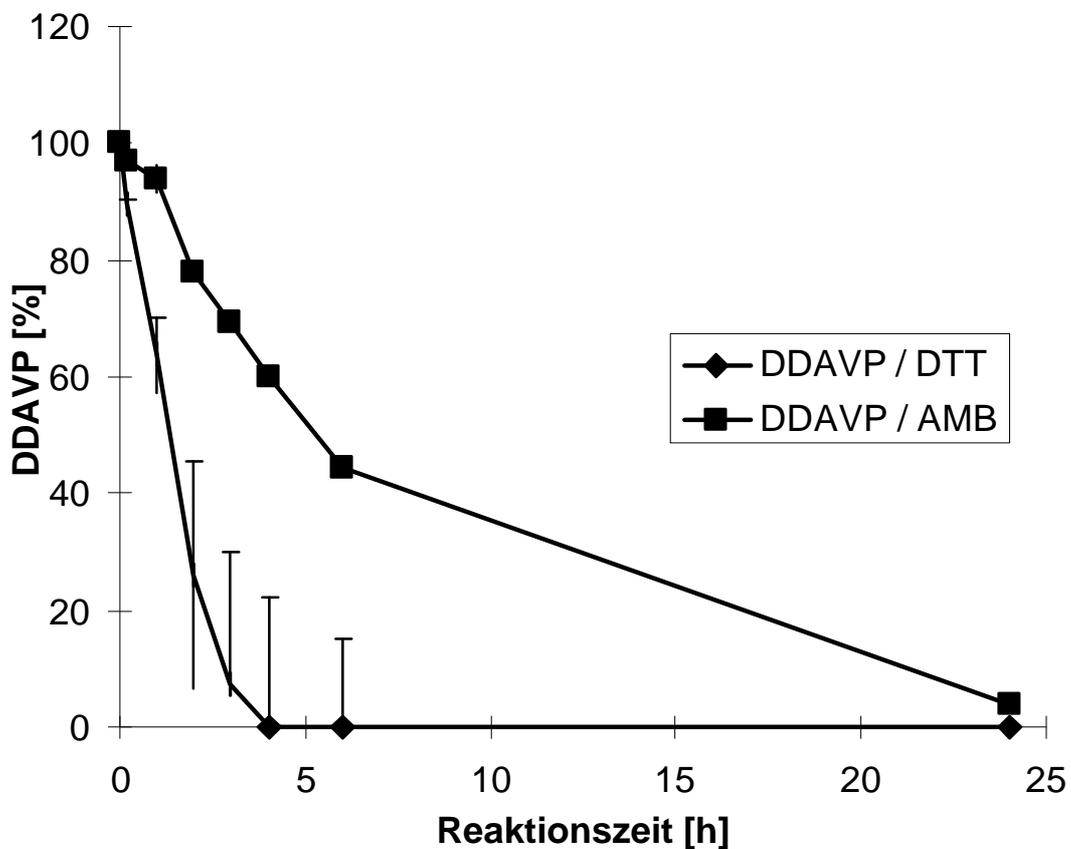


Abb. 88: Desmopressin-Gehalte [%] bei Reaktionen von Desmopressin mit Dithiothreitol (DTT) und Amberlyst 15 (AMB), (Mittelwerte aus n=2)

Zusammenfassung der Untersuchungen zur Identifizierung von Desmopressin-Zersetzungsprodukten:

1. Schnelle Spaltung der Disulfidbrücke von Desmopressin mittels Dithiothreitol (innerhalb 10 min.).

Es konnte eine Masse von 1071 (1069 $\Delta=2$ m/z) nachgewiesen werden.

Die Retentionszeit des reduzierten Desmopressins liegt ca. 0.5 Minuten hinter dem Desmopressinpeak und kommt in den Chromatogrammen aus der Langzeiteinlagerung bei beiden Systemen (D4 und D6) vor.

Während der Langzeitlagerung der Lyophilisate und der Festen Dispersionen konnte relativ schnell ein Peak, der eine Masse von 1071 zeigte, erkannt werden. Ob es sich dabei um das Reduktionsprodukt handelt ist jedoch nicht sicher zu sagen, da auch bei dieser Retentionszeit das Deamidierungsprodukt (1070) und z.T. auch ein Deamidierungsprodukt, bei dem zwei endständige Amidgruppen reagiert haben (1071) detektiert werden konnten. Die Masse 1071 ist jedoch nicht immer zu finden, tritt aber auch bei der Reaktion von Desmopressin mit Amberlyst auf.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Disulfidbrücke eine labile Stelle im Desmopressin-Molekül ist und daß die Möglichkeit, daß sich das Desmopressin reaktiv spaltet, durchaus besteht.

Eine Reduktion der Disulfidbrücke des Desmopressins ist jedoch unter den Bedingungen der Probenlagerung und der Abwesenheit von reduzierenden Substanzen in den Formulierungen wenig wahrscheinlich.

2. Deamidierung von Desmopressin mittels Amberlyst 15 an drei Positionen (Glycinamid, Asparagin und Glutamin).

Die dabei entstehenden Zersetzungsprodukte sind erst nicht zu erfassen, wobei vermutet werden kann, daß sie sich an den Kationenaustauscher (AMB) binden und erst ab einer höheren Konzentration in der Untersuchungslösung erscheinen.

Während der Langzeitlagerung der Lyophilisate und Festen Dispersionen konnten analoge Peaks (gleiche Retentionszeit, gleiche Massen) ermittelt werden.

Es entstanden Peaks mit den Massen 1070 , 1071 und 1072, was die jeweiligen

Deamidierungsschritte des Desmopressins signalisiert.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine Deamidierung an allen drei endständigen Säureamidgruppen möglich ist und sogar mehrere Deamidierungen, bis hin zur vollständigen Deamidierung der im Desmopressin vorkommenden endständigen Amidgruppen, stattfinden können.

Zusammenhang mit den Zersetzungsprodukten von Desmopressin in Lyophilisaten und Festen Dispersionen, die während der Langzeitlagerung entstehen:

- Deamidierungsprodukte resultieren aus der Hydrolyse an allen drei endständigen Säureamidgruppen (Masse 1070).
- Die Deamidierung erfolgt an weiteren endständigen Amidgruppen, so daß die Massen 1071 und 1072 entstehen.
- Deamidierungen finden bei allen Systemen (Lyophilisate und Feste Dispersionen, pH 4.0 und 6.8) und bei beiden relativen Feuchten (11 resp. 30 % r.F., betrachtet für 74 °C) statt !
- Eine Reduktion der Disulfidbrücke (Masse 1071) wäre denkbar. Die Reaktion mit DTT zeigt eine Labilität des Desmopressins an dieser Stelle.
Dieser Reaktionsmechanismus ist jedoch für die gelagerten Proben (Feste Dispersionen und Lyophilisate) durch Abwesenheit von reduzierenden Substanzen auszuschließen.

4.2.6.1.2 Sorption von Desmopressin und deren Zersetzungsprodukte an die Oberfläche von Amberlyst 15 -Perlen

Untersuchungen zum Nachweis der Sorption von Desmopressin und deren Zersetzungsprodukten an Amberlyst 15 – Perlen.

Sinn dieser Untersuchungen ist es, zu prüfen, ob die Desmopressin-Zersetzungsprodukte, die während der Reaktion mit den Amberlyst-Perlen entstehen, an die Oberfläche der Amberlyst-Perlen adsorbiert werden und sich somit der Lösung entziehen.

Dazu wurde folgende Überlegung angestellt:

In einer Lösung, in der eine ausreichende Konzentration an Zersetzungsprodukten vorliegt, wird der Gehalt bestimmt (Flächenwert). Dann werden zu dieser Lösung Amberlyst-Perlen gegeben und nach 60 min erneut der Gehalt ermittelt. Falls die Zersetzungsprodukte an die Oberfläche der Amberlyst-Perlen adsorbiert werden, so würde eine geringere Konzentration (Flächenwerte) an Zersetzungsprodukten resultieren. Wäre eine Sorption auszuschließen, so würden die Flächenwerte der Zersetzungsprodukte gleichbleiben oder erhöhen, falls es zu einer weiteren Zersetzung durch das Amberlyst käme.

Es ist anzunehmen, daß die Anhaftung der Zersetzungsprodukte an die Oberfläche der Amberlyst-Perlen pH-abhängig ist: Bei einem niedrigen pH wird die Guanidin-Gruppe des Desmopressins protoniert und es erfolgt der Austausch von H^+ -Ionen des Kationenaustauschers (Amberlyst 15) gegen protonierte Wirkstoff- und Zersetzungsprodukt-Ionen. Die Moleküle würden sich demnach der Untersuchungslösung entziehen. Erst bei Voranschreiten der Zersetzung und Erhöhung auf eine bestimmte Konzentration an Zersetzungsprodukten und Einstellung eines Gleichgewichtes sind Zersetzungsprodukte detektierbar.

Je basischer die Lösung ist, desto geringer müßte demnach das Ausmaß der Sorption sein. Würde man zu der Untersuchungslösung, in der sich die Amberlyst-Perlen befinden und in der eine Reduzierung der Flächenwerte durch Sorption nachgewiesen werden konnte, Alkalilauge (1 N NaOH) geben, so müßte eine Desorption der Moleküle stattfinden, da diese deprotoniert werden. Die

nachzuweisende Konzentration (Fläche) an Zersetzungsprodukten in der Untersuchungslösung müßte wieder ansteigen.

Materialien:

- 1) Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Citratpuffer pH 4.0 ,
Lagerung über 12 Monate bei 50 °C / 30 % r.F. (D4 II)
- 2) Desmopressin-Lyophilisat, hergestellt in Phosphatpuffer pH 6.8 ,
Lagerung über 12 Monate bei 74 °C / 30 % r.F. (D6 Vb)
- 3) Amberlyst 15, Perlen 20-50 mesh
- 4) 1N Natronlauge, Ch.B. 70262569 , Fa. Merck, D-Darmstadt

Vorgehensweise:

Lyophilisate + 1000 µl dest.Wasser → HPLC File Desm0001 (D4) und Desm0002
(D6) (siehe folgende Chromatogramme)

Zugabe von Amberlyst-Perlen (ca. 0.004 g) und Probenzug nach

→ 60 min Reaktionszeit

→ 15 h Reaktionszeit

→ 20 h Reaktionszeit

dann: → Zugabe von 10 µl NaOH *

* im Vorversuch wurde die für die Neutralisation der Amberlyst-Lösung notwendige NaOH-Menge ermittelt.

<u>D4 (50 °C / 30 % r.F.)</u>							
	Peak- Flächen DDAVP	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Summe ZP
<u>Vor</u> AMB- Zug.	1617592	827004	576913	644442	83793	81528	2213680
<u>Nach</u>	1313674	712563	457881	527160	60726	62966	1821296
Differenz [%]	-18,79	-13,84	-20,63	-18,20	-27,53	-22,77	-17,73
20 h Ink.zeit + NaOH 10 µl	853808	533845	353316	406492	43568	54734	1391955
	892503	568698	371371	437435	49188	62115	1488807
Differenz [%]	4,53	6,53	5,11	7,61	12,90	13,49	6,96
<u>D6 (74 °C / 30 % r.F.)</u>							
<u>Vor</u> AMB- Zug.	1612651	608113	420222	413886	62994	36152	1541367
<u>Nach</u>	1388612	604340	410593	397002	59978	52332	1524245
Differenz [%]	-13,89	-0,62	-2,29	-4,08	-4,79	44,76	-1,11
20 h Ink.zeit + NaOH 10 µl	879805	634396	459104	412643	64572	54727	1625442
	902699	645409	465284	404363	70416	50172	1635644
Differenz [%]	2,60	1,74	1,35	-2,01	9,05	-8,32	0,63

Achtung: Peak 5 bei D6 vor Amberlyst-Zugabe wurde im Chromatogramm abgeschnitten, so daß der Flächenwert zu niedrig ist !

Chromatogramme der Proben vor Zugabe des Amberlyst 15 - Perlen :

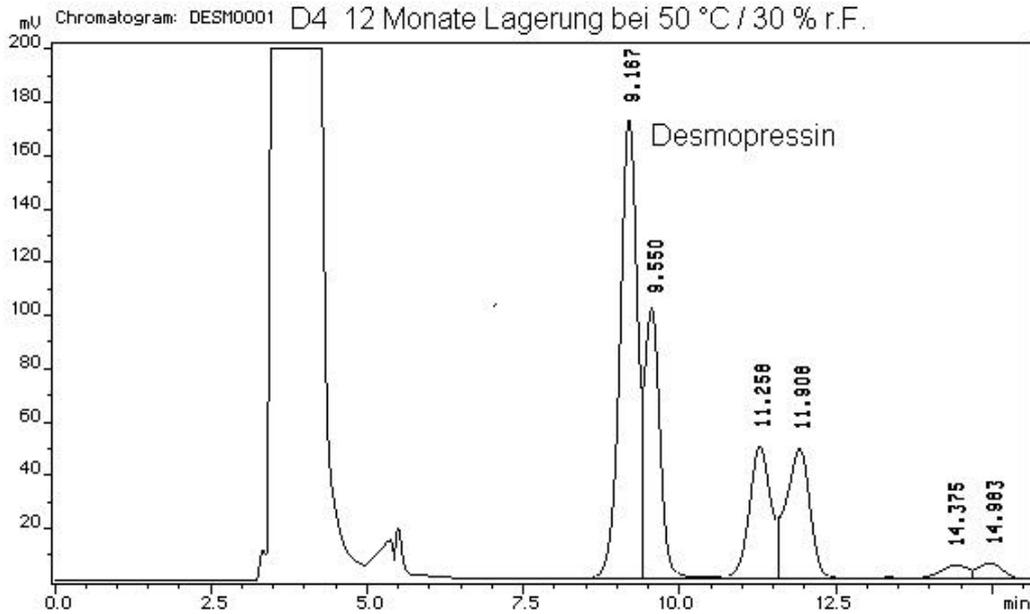


Abb. 89: Chromatogramm von D4, Lagerung bei 50 °C / 30 % r.F. 12 Monate

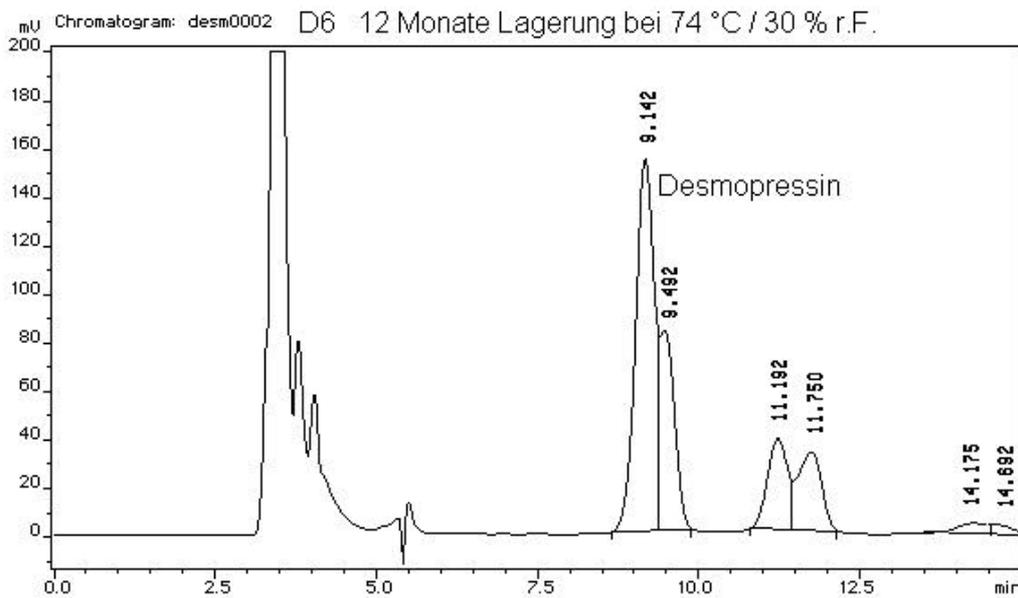


Abb. 90: Chromatogramm von D6, Lagerung bei 74 °C / 30 % r.F. 12 Monate

Peak Retentionszeit [min]	Masse
9.1	1069
9.5	1070
11.2	1070
11.9	1070 + 1071
14.3	1071
14.9	1072

In den Chromatogrammen ist das typische Muster von Desmopressin und deren Zersetzungsprodukte zu erkennen.

Erst erscheint der Hauptpeak (Desmopressin, hier Rt 9.1 min) und dahinter in Abstufung der Massen die Deamidierungsprodukte.

Nach Zugabe der Amberlyst-Perlen zu diesen Desmopressin-Lösungen verringern sich die Flächenwerte jedes einzelnen Peaks, entsprechend jedes Hydrolyseproduktes.

Theoretisch sind folgende Deamidierungsstufen möglich:

Deamidierung an einer Aminosäure → 3 Produkte
 Deamidierung an zwei Aminosäuren → 3 Produkte
 Deamidierung an drei Aminosäuren → 1 Produkt
 7 Produkte

Es sind, falls alle Deamidierungsstufen in Lösung vorliegen, sieben Hydrolyseprodukte detektierbar.

Diese sind jedoch nicht immer zu finden, da entweder nicht alle Deamidierungen in ausreichendem (detektierbaren) Maße stattgefunden haben oder zwei Zusatzpeaks koeluiert werden (siehe 3. Zusatzpeak bei Rt 11.9 min.: Massen 1070 + 1071 wurden koeluiert).

Zur Identifizierung aller Massen der auftretenden Peaks ist die Analyse mittels HPLC-MS-Kopplung mit einer Peak-Purity-Option notwendig (in Hewlett® Packard Series 1100 vorhanden).

Ergebnis: Untersuchung der Sorption von Desmopressin an Amberlyst 15 -Perlen

- Deutliche Abnahme in den Flächenwerten bei Zugabe von Amberlyst bei beiden Proben.
- pH-abhängige Abnahme in den Flächenwerten nach Zusatz von Amberlyst 15 - Perlen. Bei höherem pH ist die Abnahme der Flächenwerte erwartungsgemäß geringer.
- Zunahme der Flächenwerte bei Zugabe von NaOH (10 µl).

Dadurch kann bestätigt werden, daß die Anhaftung der Moleküle pH-abhängig ist. Bei niedrigem pH liegen Desmopressin und deren Hydrolyseprodukte (Deamidierung) in protonierter Form vor. Es kommt zum Austausch von H⁺-Ionen des sauren Kationenaustauschers (Amberlyst) gegen protonierte Desmopressin- und Zusatzproduktmoleküle, die sich somit der Lösung entziehen. Durch Zugabe von Natronlauge wird die Lösung basischer und es kommt zur Desorption der anhaftenden Moleküle, so daß diese in der Lösung nachweisbar sind (Zunahme der Flächenwerte).

Gesamtbeurteilung:

Mit dieser Untersuchung konnte belegt werden, daß Amberlyst 15 -Perlen Desmopressin und deren Zersetzungsprodukte an ihre Oberfläche durch ionische Wechselwirkungen bindet.

Das Ergebnis erklärt das Fehlen der Zusatzpeaks in der Untersuchungslösung bei der Reaktion von Desmopressin mit Amberlyst.

Ähnliches Verhalten konnte bereits bei der Adsorption von Desmopressin an Glas- und PP-Oberflächen beobachtet werden.

Bei der Adsorption von Desmopressin an Glasoberflächen liegt wahrscheinlich der gleiche Mechanismus (Austausch von Kationen, im Falle des Glases von

Natriumionen) zugrunde wie bei der Adsorption an die Oberfläche von Amberlyst-Perlen.

Bei der Adsorption von Desmopressin an Polypropylen-Oberflächen spielen eher hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle. Die hydrophoben Gruppen des Desmopressin-Moleküls (Benzolring des Phenylalanins und Tyrosins) liegen außerhalb des hydrophilen Grundkörpers, so daß hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen hydrophoben Gruppen möglich sind.

Ein entscheidender Faktor bei der Adsorption von Desmopressin an hydrophile Oberflächen ist der pH der Lösung. Bei saurem pH (pH 4.0) liegen bestimmte Gruppen des Desmopressins undissoziiert vor (saure Gruppen), während basische Gruppen im Molekül dissoziiert vorliegen (Guanidin-Gruppe des Arginins). Die Guanidingruppe des Arginins ist jedoch so basisch, daß sie auch bei einem pH von 6.8 protoniert vorliegt ($pK_a = 12,5$). Bei einem pH von 6.8 liegen demnach die sauren endständigen Amid- bzw. bei den Zersetzungsprodukten die sauren endständigen Carbonsäuregruppen dissoziiert vor, während die basische Guanidingruppe des Arginins überwiegend protoniert und somit ebenfalls z.T. dissoziiert vorliegt. Werden zu einer Lösung mit diesem pH Amberlyst-Perlen gegeben, so kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den protonierten Guanidingruppen des Desmopressins und den sauren Sulfonsäuregruppen des Amberlyst, die bei diesem pH ebenfalls dissoziiert vorliegen. Je mehr Guanidingruppen dabei protoniert wurden, und das ist in saurer Umgebung stärker der Fall, desto mehr ionische Wechselwirkungen zwischen der basischen Gruppe des Desmopressins und den Sulfonsäuregruppen des Amberlyst können stattfinden. Als Folge dieser ionischen Wechselwirkungen kommt es zu einer Verminderung der Konzentrationen der Moleküle (Desmopressin und Hydrolyseprodukte) in der Untersuchungslösung. Da jedoch bei einem pH von 6.8 die endständigen sauren Säureamid- bzw. Carbonsäuregruppen z.T. negativ geladen sind (Deprotonierung), können nicht unbegrenzt alle aktiven Zentren der Amberlyst-Oberfläche belegt werden, da sich die Moleküle aufgrund ihrer negativen Partialladung gegenseitig abstoßen und sich somit an der Adsorption behindern. Außerdem ist die Anzahl protonierter Guanidingruppen, die für das Ausmaß der Wechselwirkungen verantwortlich sind, bei pH 6.8 geringer als bei pH 4.0.

Dagegen liegen bei einem pH von 4.0 die endständigen Säureamid- bzw. Carbonsäuregruppen undissoziiert vor, d.h. es liegen an diesen Gruppen keine negativen Ladungen vor. Somit ist eine gegenseitige Behinderung der Moleküle durch Abstoßung nicht gegeben und es können mehr Desmopressin- und Hydrolyseprodukt-Moleküle an die Oberfläche der Amberlyst-Perlen adsorbiert werden (über ionische Wechselwirkung der bei pH 4.0 ebenfalls protonierten Guanidingruppe).

Erhöht man nun die Basizität der sauren Lösung, z.B. durch *ausreichende Zugabe* von Natronlauge, so werden ähnliche Bedingungen wie bei pH 6.8 geschaffen, d.h. die endständigen Säureamid- bzw. Carbonsäuregruppen werden deprotoniert, stoßen sich ab, so daß einige adsorbierte Moleküle ihre Position an der Oberfläche der Amberlyst-Perlen wieder verlassen. Als Folge davon steigt die Konzentration des Desmopressin und der Hydrolyseprodukte in der Untersuchungslösung wieder an. Man sollte jedoch darauf achten, daß genügend Natronlauge zugegeben wird, um den pH ausreichend in Richtung höherer Basisizität der Lösung zu verschieben und daß die HPLC-Untersuchung nach Zugabe der Natronlauge genügend schnell vorgenommen wird, um eine Zersetzung der Moleküle durch die Natronlauge auszuschließen.

Die Zunahme der Konzentration an Desmopressin und dessen Hydrolyseprodukte nach Zugabe von Natronlauge ist erwartungsgemäß ebenfalls vom pH der Lösung vor Zugabe der Natronlauge abhängig. Je saurer die Lösung vor Zugabe war, desto größer ist die Zunahme der Konzentration (Differenz vor und nach Zugabe der Natronlauge). Der Grund liegt darin, daß nach Zugabe der Natronlauge der pH der sauren Lösung (pH 4.0) drastisch zum basischen hin verschoben wird, die endständigen Säureamide- bzw. Carbonsäuregruppen der Moleküle nun deprotoniert vorliegen, sich abstoßen und somit die Moleküle teilweise wieder desorbiert werden. Die Konzentration in der Untersuchungslösung steigt als Folge davon wieder an.

Das Ausmaß der Desorption ist natürlich bei dem vorher niedrigeren pH (4.0) größer, verglichen mit dem höheren pH (6.8), da bei pH 6.8 ohnehin weniger Moleküle adsorbiert wurden.

Desmopressin und deren Hydrolyseprodukte (Hydrolyse der endständigen Säureamidgruppen zur endständigen Carbonsäure) unterscheiden sich im Ausmaß

der Ad- und Desorption etwas, da deren pK_a -Werte erwartungsgemäß unterschiedlich sein werden.

System	Konz. [%]		Differenz [%]	Zunahme [%] nach Zugabe von NaOH
	VOR Zugabe von Amberlyst	NACH		
<u>D4</u>				
DDAVP	100	81	19	5
Σ ZP	100	82	18	7
<u>D6</u>				
DDAVP	100	86	14	3
Σ ZP	100	99	1	1

4.2.7 Konformation von Desmopressin

Die Vorgehensweise ist in dem Kapitel 3.7. beschrieben worden.

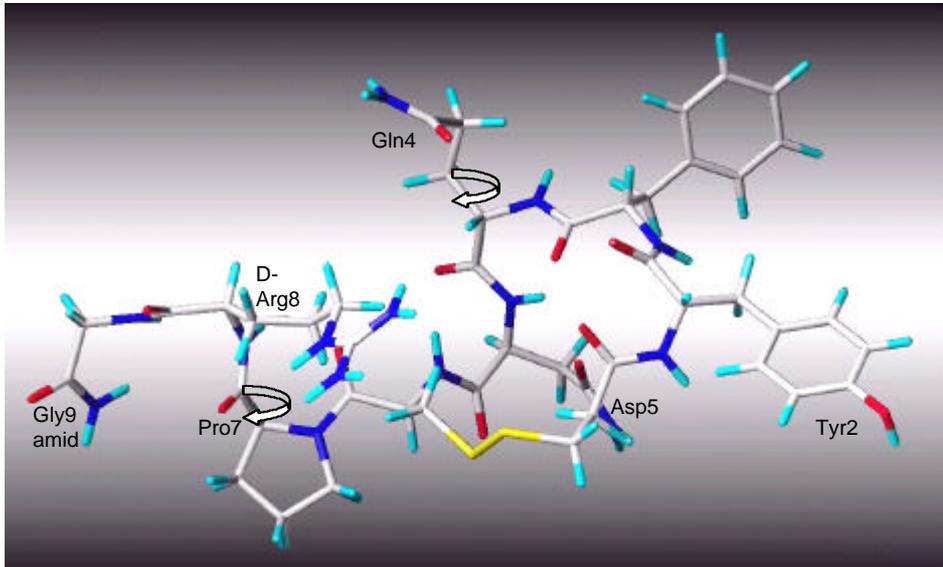


Abb. 91 : Konformation von Desmopressin in Lösung nach Walse et al., 1998

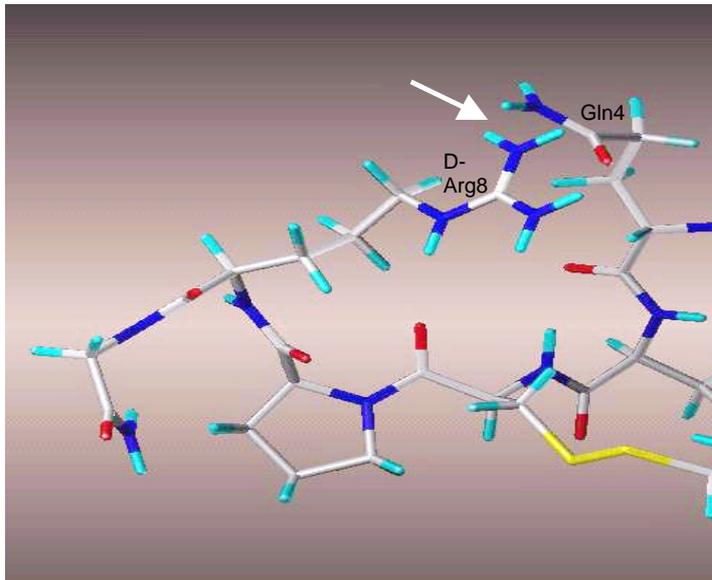
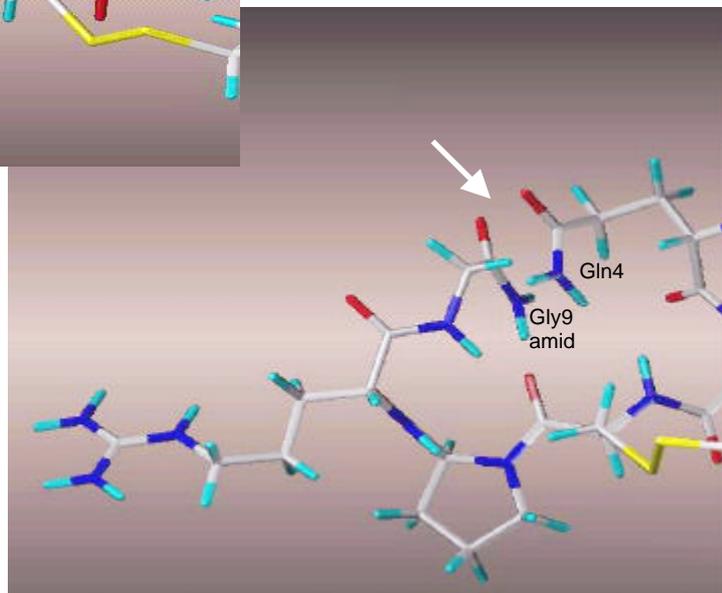


Abb. 92: Konformation von DDAVP
nach Molecular Modelling
- Annäherung von **Gln** und **Arg** -

Abb.93: Konformation von DDAVP
nach Molecular Modelling
- Annäherung von **Gln** und **Gly** -



Anmerkung: Die mittels Molecular Modelling ermittelten Konformationen sind ohne das komplette Ringsystem dargestellt, da es nicht verändert wurde.

Ausgehend von einer experimentell ermittelten energiearmen Konformation des Desmopressins in Lösung (Abb. 91) sind in den unteren Abbildungen die mittels Molecular Modelling errechneten energiearmen Konformationen dargestellt (Abb. 92 und Abb. 93).

Ergebnisse und Diskussion :

- Die im Ringsystem beteiligten Aminosäuren Asparagin (Asp) und Tyrosin (Tyr) liegen beide unterhalb des Ringsystems. Dadurch wäre theoretisch eine Annäherung dieser beiden Aminosäuren möglich. Eine Variation der χ_1 – und χ_2 – Winkel der beiden Aminosäuren führt jedoch nicht zu einer Annäherung auf einen Bindungsabstand.
- Eine Reaktion zwischen Tyrosin und Glycin(amid) bzw. zwischen Tyrosin und Arginin ist trotz Variation der jeweiligen Bindungswinkel der beteiligten Aminosäuren unter Beibehaltung der bestehenden Ringkonformation auszuschließen, da deren Abstände sich nicht auf Bindungsabstände annähern lassen.
- Eine Reaktion zwischen Tyrosin und Glutamin ist nicht möglich, da diese beiden Aminosäuren sich auf unterschiedlichen Seiten der Ringebene befinden und trotz vielfacher Variation der Bindungswinkel des Tyrosins und Glutamins keine Annäherung auf eine mögliche Bindungslänge ergibt. Das gleiche gilt für die Seitenkette, bestehend aus Pro, D-Arg und Glycin(amid), die ebenfalls wie das Glutamin oberhalb der Ringebene liegt. Trotz umfangreicher Versuche durch Variation der Bindungswinkel von Prolin, D-Arginin, Glycin(amid) und Tyrosin konnte kein Bindungsabstand erhalten werden, der eine Kondensationsreaktion möglich machen würde.
- Durch Variation der ψ - Winkel des Prolins von $+84^\circ$ auf $+140^\circ$ und des χ_1 -Winkels des Glutamins von auf -50 auf -60° wurde die Guanidin-Gruppe des Arginins und der Säure(amid)- Gruppe des Glutamins auf einen Bindungsabstand von ca. 2 Å gebracht, so daß eine Kondensationsreaktion möglich ist (Abb. 92).
- Eine Veränderung des ψ - Winkel des Prolins von $+84$ auf -40° sowie des χ_1 - und χ_2 – Winkels des Glutamins auf 180° und $+60^\circ$ führt zu einer Annäherung der

Aminosäuren Glycin(amid) und Glutamin, so daß deren endständige Säure(amid)-Gruppen miteinander unter Ammoniak-Abspaltung reagieren können (Abb. 93).

Durch Optimierung der mittels NMR-Spektroskopie experimentell [90] bestimmten Konformation des Desmopressins unter Beibehaltung der Ringform konnte belegt werden, daß Annäherungen an bestimmten Gruppierungen im Molekül möglich sind, so daß Kondensationsreaktionen stattfinden könnten.

Damit wird die Vermutung bekräftigt, daß es sich bei den im Massenspektrum auftretenden Substanzen mit den Massen 1052 (1070 - Δ 18m/z), 1053 (1071 - Δ 18m/z) bzw. 1054 g/mol (1072 - Δ 18m/z) um Kondensationsprodukte handelt.

4.2.8 Permeation von Desmopressin aus festen Systemen durch eine Polyethylen-Membran von Transwell® - Systemen

Die Vorgehensweise wurde in Kapitel 3.8. beschrieben.

Hovgaard et al. (1995) [Lit.] beschrieb bereits die Permeation von Desmopressin durch Polycarbonat-Membranen, die in weiteren Versuchen mit CaCo-II-Zellen beschichtet wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch Membranen aus Polyethylen verwendet, da diese klar durchsichtig sind und somit für gegebenenfalls folgende Permeationsstudien mit Zell-Linien mikroskopierbar wären.

Es wurde auf die Darstellung nach 480 Minuten Penetrationsdauer verzichtet, damit die Kurvenverläufe zu Beginn der Permeation deutlicher zu erkennen sind.

Prozentual permeierte Menge an **Desmopressin [%]** aus den verschiedenen Systemen (Lyophilisate und Feste Dispersionen) bezogen auf die apikal applizierte Menge an Desmopressin:

Zeit [Minuten]	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	0,5	0,0	1,0	0,0
30	21,6	12,2	16,6	2,8
60	29,5	17,0	23,6	9,5
90	31,1	21,1	27,0	11,6
120	29,8	21,3	30,3	15,7
180	34,8	23,1	33,7	21,0
240	34,4	25,9	35,7	23,9

Zeit [Minuten]	<u>relative Standardabweichung</u>			
0	0,84	0,00	0,96	0,00
30	5,43	1,28	2,19	0,67
60	8,28	2,38	5,06	2,88
90	9,93	4,88	3,56	2,58
120	5,47	2,90	6,12	1,93
180	7,56	3,55	3,08	3,03
240	7,44	1,70	2,47	4,19

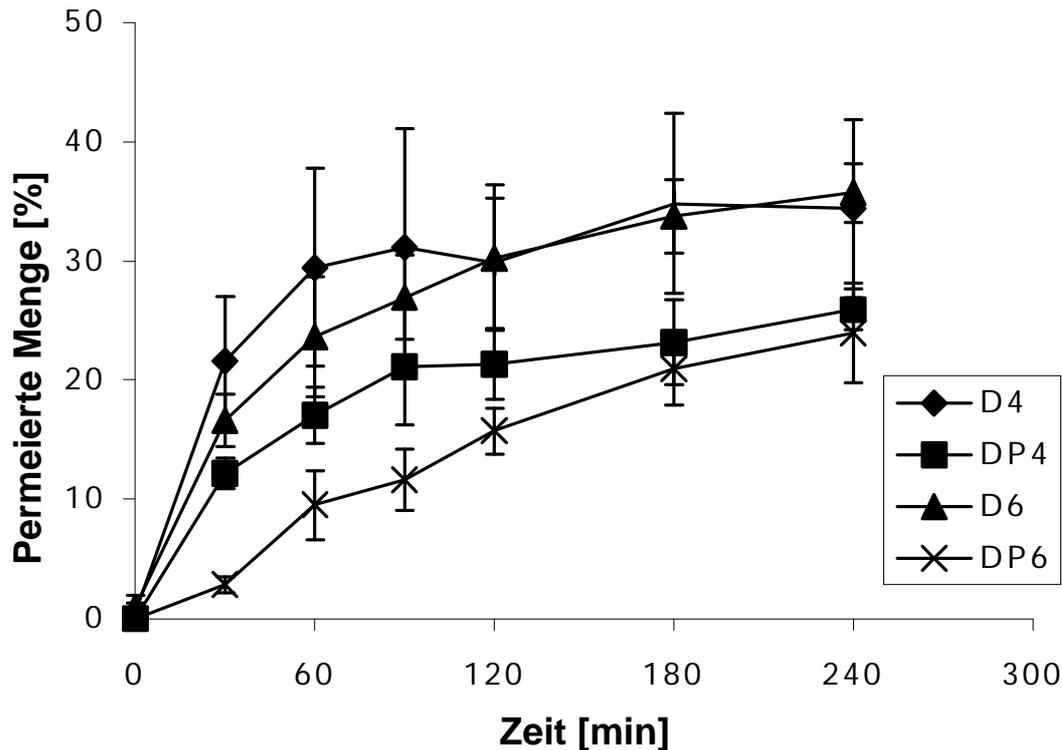


Abb. 94: Permeationsrate von Desmopressin aus Lyophilisaten und Festen Dispersionen

Ergebnisse:

1. Die permeierte Menge an Desmopressin ist bei den Festen Dispersionen über den untersuchten Zeitraum geringer (ca. 10 %), verglichen mit den Polycarbophil-freien Systemen. Nach vier Stunden (240 Minuten) ist aus den Lyophilisaten ca. 35 % an Desmopressin durch die Membran diffundiert, während aus den Festen Dispersionen nur ca. 25 % permeiert sind. Daraus kann geschlossen werden, daß Desmopressin in den Festen Dispersionen fester gebunden wird, so daß über den untersuchten Zeitraum ca. 10 % weniger Desmopressin permeieren kann, verglichen mit den Lyophilisaten.
2. Die Lyophilisate und Festen Dispersionen, die in Citratpuffer (pH 4.0) hergestellt wurden, zeigen einen steileren Kurvenanstieg als die jeweiligen in Phosphatpuffer (pH 6.8) hergestellten Systeme. Allerdings ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Lyophilisaten (D4 resp. D6) nicht zu erkennen, da sich die Standardabweichungen der Werte überschneiden. Bei den Festen Dispersionen ist jedoch ein Unterschied in den Kurvenanstiegen zu beobachten, d.h. daß das

Desmopressin in Abhängigkeit der Puffersalze (pH 4.0 resp. 6.8) unterschiedlich schnell aus dem Polycarbophil-Gerüst diffundieren kann. Im Falle der Herstellung der Festen Dispersion in Phosphatpuffer pH 6.8 wird das Desmopressin verzögert freigegeben, was sich in einem flacheren Kurvenanstieg zu Beginn der Permeation zeigt. Dies hängt damit zusammen, daß die Festen Dispersionen, die in Phosphatpuffer pH 6.8 hergestellt wurden, eine längere Quellungszeit benötigen; eine wichtige Voraussetzung, damit das Desmopressin gelöst werden und daraufhin in Richtung Konzentrationsgefälle (basolaterale Seite) diffundieren kann.

3. Bei den Lyophilisaten und Festen Dispersionen, hergestellt in Citratpuffer, hat sich bereits nach 90 Minuten ein Gleichgewicht eingestellt. Dies ist bei den Systemen, hergestellt in Phosphatpuffer, nicht der Fall. Bei diesen Formulierungen ist die Gleichgewichtslage noch nicht erreicht und es kommt zur weiteren Diffusion von Desmopressin durch die Membran hin zur basolateralen Seite.
4. In allen Systemen kommt es zwischen 240 und 480 Minuten noch zu einem Zuwachs an permeierter Menge an Desmopressin von ca. 10 %. Dies könnte mit einer möglichen Verdunstung des Puffers in den Transwell[®] v.a. auf der apikalen Seite zusammenhängen, wodurch dort die Konzentration steigt und es zur weiteren Diffusion in Richtung basolaterale Seite kommt.

Eine Permeationsstudie mit CaCo-II-Zelllinien dürfte nach diesen Untersuchungen keine Probleme bereiten, da in diesem Versuch gezeigt werden konnte, daß die PE-Membran keine Barriere für die Desmopressin-Diffusion darstellt.

Wichtig wäre nun, zu untersuchen, inwieweit eine auf die PE-Membran aufgebrachte Zell-Linie eine Barriere darstellen würde, und ob es in Gegenwart von Polycarbophil (Feste Dispersionen) zu einer Verbesserung in der Permeationsrate, durch öffnen der tight junction zwischen den Zellen, kommt.

Der pH-Wert, in dem die Systeme hergestellt wurden, hat sicherlich ebenfalls einen Einfluß auf die Desmopressin-Diffusion durch CaCo-II-Zellen, da die Quelleigenschaften sowie das Ausmaß der Öffnung der tight junction von dem Dissoziationsgrad des Polycarbophils abhängig sind. Bei höherem pH, bei dem die Carboxylgruppen des Polycarbophils vor allem dissoziiert vorliegen, sind die

Bindungskapazitäten für Ca^{2+} -Ionen erhöht. Desweiteren ist die Quellungsgeschwindigkeit der Festen Dispersion, hergestellt in pH 6.8, geringer als bei den in pH 4.0 hergestellten Festen Dispersionen. Die Folge ist eine im Vergleich verzögerte Freigabe des Peptides.

In Kapitel 4.1.2.4 sind die Quellungseigenschaften der beiden Systeme (P4 resp. P6) beschrieben.

Weitere Untersuchungen an CaCo-II-Zellen könnten zur Klärung dieser Fragestellungen (Einfluß von pH und Polycarbophil) führen.

5. Zusammenfassung und Ausblicke

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Herstellung von Festen Dispersionen, bestehend aus dem Modellpeptid Desmopressin und einem mucoadhäsiven Polymer (Polycarbophil) zu entwickeln und die Stabilität dieses Systems im Hinblick auf verschiedene Einflußfaktoren zu untersuchen.

Ausgangspunkt sind die in den vergangenen Jahren voranschreitenden Bemühungen, die Wirkstoffklasse Peptide oral applizierbar zu machen und damit dem Patienten eine Alternative zu den bisherigen Darreichungsformen (Injektionslösung, Lösung zur nasalen Applikation) für Peptidarzneistoffe zu bieten. Feste orale Arzneiformen sind für den Patienten bezüglich der Einnahme und Aufbewahrung des Arzneimittels die angenehmste Applikationsform.

Allerdings stellt der Gastrointestinaltrakt eine wirksame Barriere gegen die Peptidabsorption dar.

Um in die Ursachen für die geringe orale Verfügbarkeit von Peptiden einzugreifen, wurden in letzter Zeit multifunktionale Polymere untersucht. Das Polyacrylsäure-Derivat Polycarbophil hat sich nach Junginger als besonders günstig herausgestellt, da es unterschiedliche Fähigkeiten, wie die Hemmung von proteolytischen Enzymen, die Bio(muco)adhäsion und die Verbesserung der parazellulären Peptid-Absorption besitzt. Polycarbophil sollte deshalb als Träger in Festen Dispersionen von Peptiden dienen.

Das Modellpeptid Desmopressin wurde in eine Feste Dispersion mit Polycarbophil eingebracht, wofür eine geeignete, peptidschonende Herstellungsmethode entwickelt wurde. Die Herstellungsweise wurde möglichst einfach gehalten, damit sie aus industrieller Sicht leicht realisiert werden kann.

Es sollte eine Polycarbophil-Konzentration gewählt werden, die in Arbeiten nach Lueßen et al. zur Verringerung des enzymatischen Abbaus der Peptide (Konzentrationsbereich zwischen 0.01 und 0.5 %) sowie zur erwünschten Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptiden (untersuchte Polymer-Konzentration 0.5 % und höher) führte. Andererseits mußte darauf geachtet werden, daß eine hohe

Viskosität der Polymersysteme die Handhabung bei der Herstellung nicht zu sehr erschwerte. Deshalb wurden während der Entwicklung der Herstellungsmethode in Anlehnung an Lueßen et al. sieben verschiedene Polymerkonzentrationen untersucht (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.35 und 0.5 %).

Eine Polymerkonzentration von 0.25 % erschien unter beiden Aspekten als optimal. Der pH-Wert spielt für die Ausprägung der funktionellen Eigenschaften des Polycarbophils eine wichtige Rolle. Nach Lueßen et al. sind die Bindungskapazitäten für mehrwertige Kationen (Enzyminhibierung, Öffnen der tight junction) bei höherem pH (z.B. pH 6.8), bei dem das Polycarbophil vor allem dissoziiert vorliegt, erhöht, während die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen und damit Mucoadhäsion bei undissoziiertem Polycarbophil (z.B. pH 4.0) verbessert ist. Aus diesem Grund wurde die Stabilität des dispergierten Peptides bei diesen beiden pH-Werten (pH 4.0 und 6.8) untersucht.

Eine physikalische und physikochemische Charakterisierung des Polycarbophils war unerlässlich, um mehr Informationen über dieses Polymer zu erhalten, und daraufhin die Herstellungstechnologie und das Lagerungsklima abzustimmen. Dazu wurden Untersuchungen zur Löslichkeit, den rheologischen Eigenschaften (inkl. Untersuchung zu möglichen Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten), dem Wasseraufnahmevermögen und Schmelzverhalten von festem Polymer durchgeführt.

Eine selektive und empfindliche HPLC-Methode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Desmopressin wurde entwickelt.

Desweiteren wurde eine HPLC-MS-Kopplungen eingesetzt, mit deren Hilfe die Massen der während der Lagerung auftretenden Zusatzpeaks (Zersetzungsprodukte) ermittelt werden konnten.

Da der Wirkstoff während der Herstellung und der Analytik mit einer Reihe von Oberflächen in Kontakt kommt und Peptide allgemein die Eigenschaft besitzen, an diesen Oberflächen zu adsorbieren, wurden die Geschwindigkeit und das Ausmaß der Adsorption von Desmopressin an Oberflächen von Glas und Polypropylen ermittelt.

Peptid-Lyophilisate und Feste Dispersionen mit Polycarbophil wurden aus Lösungen durch Gefriertrocknung gewonnen, deren pH-Wert durch verschiedene Puffer variiert wurde. Präparativ wurden die pH-Werte 4.0 und 6.8 gewählt, für ein log k / pH – Profil der Zersetzung unter klimatischer Belastung ein breiteres pH-Spektrum untersucht (Bereich pH 2-10).

Feste Dispersionen wurden bei sechs verschiedenen Temperaturen (-20, 25, 50, 58, 66 und 74 °C) und 30 % r.F., ab 58 °C zusätzlich auch bei 11 % r.F. eingelagert, und die Stabilität des Desmopressins in diesen Systemen über 24 Wochen untersucht.

Analog wurden Polycarbophil-freie Systeme (Lyophilisate) hergestellt und untersucht, um den Einfluß des Polymers auf die Stabilität von Desmopressin beurteilen zu können. Zusätzlich wurden Desmopressin-freie Polycarbophil-Lyophilisate als Blindwerte eingelagert und analysiert.

In Vorversuchen wurde die maximal mögliche relative Feuchte während der Lagerung ermittelt, um zu verhindern, daß es durch eine zu hohe relative Feuchte zu einer Verflüssigung der eingelagerten Lyophilisate kommt.

Desweiteren wurden zwei verschiedene Desmopressin-Chargen vergleichend auf deren Stabilität in Fester Dispersion bei 50 °C / 30 % r.F. über 12 Wochen untersucht. Dadurch ergab sich eine höhere Sicherheit in der Interpretation der Daten, da zwei verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Desmopressin-Chargen das gleiche Ergebnis hinsichtlich der Stabilität und des Auftretens von Zersetzungsprodukten lieferten.

Die hergestellten Festen Dispersionen waren ausreichend stabil: Bei 25 °C Lagertemperatur und 30 % r.F. konnte über 24 Wochen kein signifikanter Abfall im Desmopressin-Gehalt nachgewiesen werden.

Während der Lagerung der Systeme bei drastischen Bedingungen konnte die hydrolytische Deamidierung der endständigen Säureamidgruppen des Glycinamids, Asparagins und des Glutamins nachgewiesen werden. Mit Hilfe spezieller Reagenzien, die selektiv die vermutete Hydrolyse des Peptides simulierten, konnten unter Einsatz der HPLC und der HPLC-MS-Kopplungstechnik die vermuteten Zersetzungsprodukte bestätigt werden.

Sowohl die einzelnen Deamidierungsstufen einzelner Aminosäuren als auch die teilweise und vollständige Deamidierung aller endständigen Säureamidgruppen des Desmopressins wurden bewiesen.

Eine Deamidierung der endständigen Säureamidgruppen des Desmopressins kann zu einem Wirkungsverlust des Peptides führen, weshalb die Identifizierung und Aufklärung dieser Zersetzungsprodukte in den Formulierungen als besonders wichtig anzusehen ist.

Mit Hilfe von Molecular Modelling konnten Berechnungen zur Konformation des Peptides Desmopressin durchgeführt werden. Dies gibt Auskunft darüber, wie nah sich manche funktionelle Gruppen im Molekül überhaupt kommen können, so daß dort eine chemische Reaktion möglich wäre. Diesen Konformationsberechnungen vorausgegangen war die Vermutung, daß es während der Lagerung zu einer Kondensationsreaktion kommt. Dies wäre jedoch nur möglich, wenn sich bestimmte, wasserabspaltbare Gruppen des Desmopressins ausreichend annähern könnten.

Die Berechnungen mittels Molecular Modelling ergaben, daß der aus sechs Aminosäuren bestehende Ring des Desmopressins relativ unflexibel zu sein scheint, da innerhalb dessen Wasserstoffbrücken-Bindungen auftreten. Die aus drei Aminosäuren bestehende Seitenkette ist jedoch frei beweglich und in der Lage, sich dem Ringsystem anzunähern und mit den daraus herausragenden Aminosäure-Seitenketten Wechselwirkungen einzugehen.

Mittels statistischer Methoden wurden die unterschiedlichen Einflußfaktoren für die Stabilität von Desmopressin ermittelt und eine Gewichtung vorgenommen. Die Berechnungen erfolgten mittels statistischem Software-Programm SPSS Version 8.0. Danach ist für die Stabilität von Desmopressin die wichtigste Einflußgröße die relative Feuchte, gefolgt vom pH-Wert, der Temperatur und dem Polymer.

Alle Einflußfaktoren beeinflussen sich in ihrer Größe gegenseitig.

Als richtungsweisende Voruntersuchung wurden Permeationsstudien von Festen Dispersionen an Transwell[®]-Systemen durchgeführt. Dabei war zu beobachten, daß die Polyethylen-Membran des Transwell keine Barriere für die Permeation von Desmopressin darstellt und die Festen Dispersionen das Desmopressin ausreichend

wieder freigeben. Dies ist eine wichtige Erkenntnis im Hinblick auf weitere Untersuchungen mit auf der Polyethylen-Membran aufzubringenden CaCo-II-Zell-Linien, die eine Aussage zur oralen Verfügbarkeit von Desmopressin in diesen Festen Dispersionen mit Polycarbophil zulassen würden.

Ausblicke

- Die entwickelten Festen Dispersionen, bestehend aus Peptid und Polycarbophil, könnten eine gute Möglichkeit bieten, um die orale Verfügbarkeit von Peptiden zu verbessern. Nun wäre es sinnvoll, diese Festen Dispersionen an lebenden Systemen zu untersuchen, wobei Permeationsstudien an CaCo-II-Zell-Linien als erster Schritt anzusehen wären.
- Desweiteren könnte die Herstellung der Festen Dispersionen auch auf weitere Peptide und Polymere ausgedehnt werden, wobei beachtet werden sollte, daß die verwendeten Polymere für Arzneimittel registriert worden sind. Die Untersuchung der Stabilität von Peptiden in Festen Dispersionen könnte auf weitere anionogene aber auch kationogene oder nichtionogene Polymere erweitert werden, um den Einfluß der Basizität bzw. Azidität des Polymers und der Polymerart auf die Stabilität von Peptiden in diesen Polymeren beurteilen zu können. Als anionogene Polymere seien hier die Carbomere, als kationogenes, mucoadhäsives Polymer das Chitosan und als nichtionogene Polymere verschiedene Cellulosen (z.B. Methylcellulose), genannt. Chitosan ist jedoch zur Zeit für Arzneimittel noch nicht zugelassen.

Als weitere mögliche Peptid-Kandidaten könnten Peptide ähnlicher Größe des Desmopressins dienen, wie z.B. das Octreotid.

- Außerdem wäre es sehr wichtig, aus den entwickelten Festen Dispersionen, die ja ein Zwischenprodukt darstellen, eine fertige Arzneiform, z.B. eine Tablette oder Kapsel zu formulieren. Erste Ansätze zur Tablettierung von lyophilisiertem Polycarbophil in einer üblich verwendeten Tablettiermischung, bestehend aus Cellactose[®] und Magnesiumstearat, zu Minitabletten waren problemlos möglich.

6. Summary and Future Perspectives

The aim of this work was the development of a solid dispersion containing a model peptide (Desmopressin) and a multifunctional polymer (Polycarbophil) and to test the stability of this system under different climates and influencing factors.

During recent years, efforts have been undertaken to develop formulations for the oral application of peptides, since an oral solid formulation is the most comfortable application system for the patient.

However, the gastrointestinal tract is an efficient barrier against absorption of peptides. Therefore, multifunctional polymers were investigated to increase the oral bioavailability of peptides. Polycarbophil proved to be a polymer with excellent properties, e.g. inhibition of peptide-degrading enzymes, mucoadhesion and increase of paracellular peptide absorption. Therefore Polycarbophil was used as a carrier for solid dispersion of the peptide.

A method to prepare the solid dispersions was developed preserving the sensitive peptide but requiring procedures as simple as possible for industrial production.

Lueßen et al. reported a decrease in degradation of peptides by enzymes at concentrations of Polycarbophil between 0.01 and 0.5 % and an increase in bioavailability of peptides evaluated at a concentration of Polycarbophil of 0.5 % and more. However, high concentration of the polymer will cause problems in handling during the preparation of solid dispersions. Therefore, a range of concentrations of Polycarbophil (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.35, 0.5 %) was investigated. An optimum concentration according to both aspects was found to be 0.25 %.

The pH value influences the properties of Polycarbophil. After Lueßen et al. the binding capacity for Ca^{2+} - and Zn^{2+} -cations (inhibition of enzymes, opening of the tight junction) is higher at a higher pH (6.8), while the mucoadhesive properties are better at pH 4.0. For this reason the stability of Desmopressin was investigated at both these pH values (4.0 and 6.8).

A physical characterization of the polymer (solubility, rheological properties including interaction of polymer chains, water-uptake from the atmosphere and melting

behaviour of the solid polymer) was necessary to consider the physical behaviour during development, manufacture and storage of a solid preparation.

A selective and sensitive HPLC method for qualitative and quantitative analysis of Desmopressin was developed. Furthermore a HPLC-MS coupling technique was used to identify degradation products of the peptide.

During the manufacture, packaging and analysis of pharmaceutical products the drug comes into contact with a variety of surfaces. Peptides interact with these surfaces resulting in substantial loss from solution due to normally low peptide concentrations. Therefore the rate and extent of the adsorption of Desmopressin to surfaces of glass and polypropylene, respectively, was investigated.

Peptide lyophilisates and solid dispersions with Polycarbophil were prepared from solutions by freeze drying, where the pH in the solution was adjusted to 4.0 and 6.8, respectively, by adding buffers. To investigate the influence of the pH on the chemical stability of Desmopressin, additional pH values were used (pH 2 to 10) and a $\log k / \text{pH}$ – profile was constructed.

Solid dispersions were stored for 24 weeks under all combinations of - 20, 25, 50, 58, 66 and 74 °C, and 11 and 30 % relative humidity.

Additionally, Polycarbophil-free lyophilised Desmopressin and Desmopressin-free lyophilised Polycarbophil samples were prepared and stored at the same climates.

The relative humidity of 30 % was the maximum suitable for storage of solid dispersions, as obtained from the physical characterization of the polymer.

Two different batches of Desmopressin were compared concerning stability at 50 °C / 30 % r.H.. A significant difference in the stability between both batches could not be detected.

The prepared solid dispersions have shown a sufficient stability at 25 ° / 30 % relative humidity, no significant decrease in the content of Desmopressin was detectable during six months.

During storage under extreme climates, glycinamide, asparagine and glutamine were deamidated by hydrolysis. This was proven by a selective chemical reaction by Amberlyst 15 specific catalysis, by HPLC and by the HPLC-MS coupling technique.

A calculation of the conformation of Desmopressin was performed by molecular modelling. Important information was obtained about how close some chemical groups in the molecule can come to so that an intramolecular reaction could occur. A condensation reaction was supposed because a loss in molecular mass of 18 was found in the mass-spectra of stored samples. The result of these investigations is that the ring in the molecule is relatively inflexible because of hydrogen bonding, where the side chain (three amino acids) could interact with side chains of the amino acids of the ring system resulting in a condensation reaction and in a loss of mass of 18 g/mol.

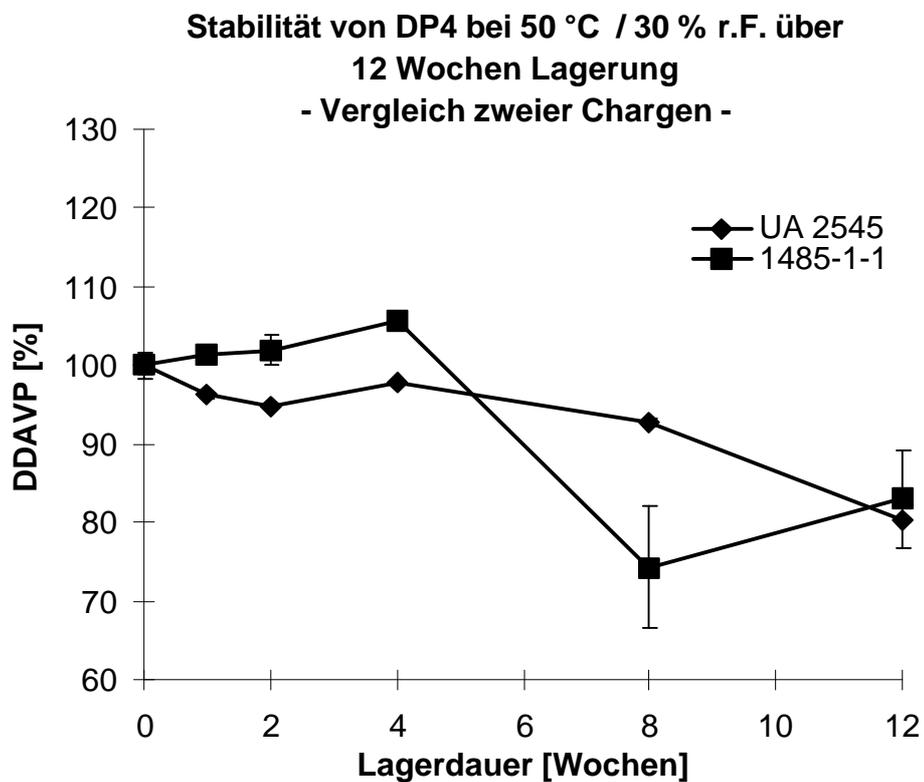
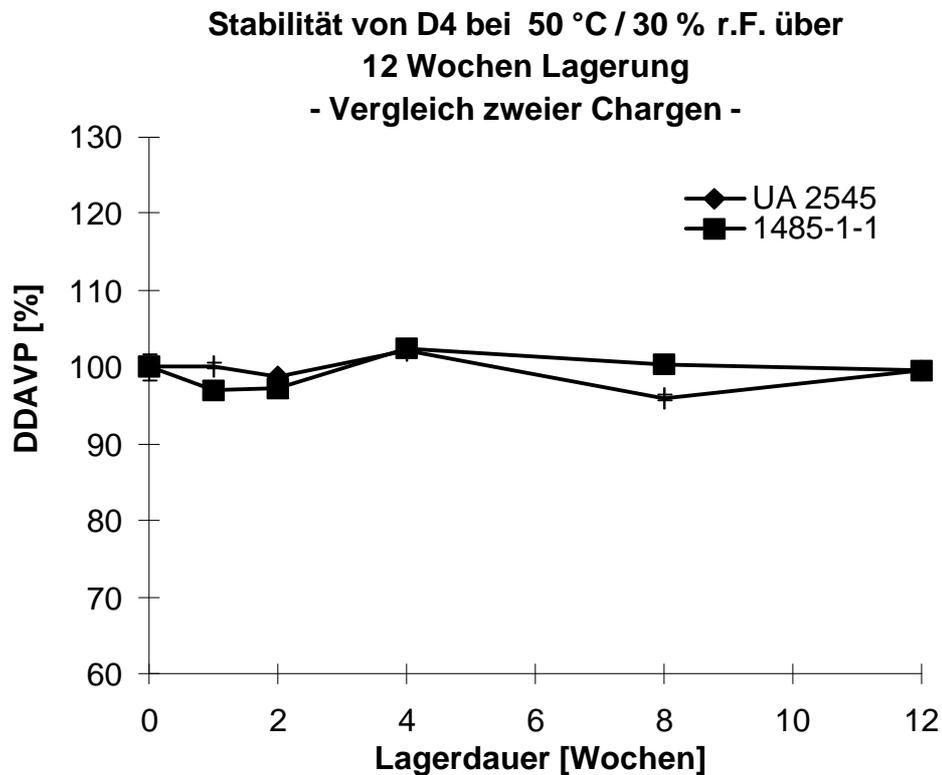
By statistical methods the importance of different factors which influence the stability of Desmopressin was analysed: the most important factor is the humidity followed by the pH value, the temperature and the presence of the polymer. However, all these factors interact with each other.

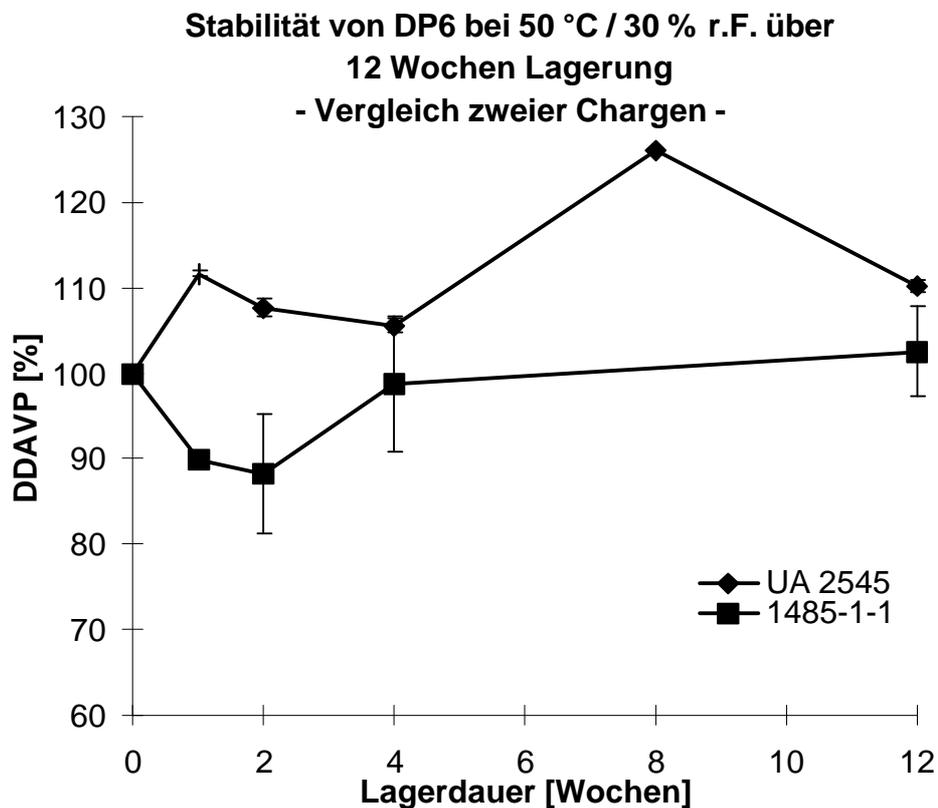
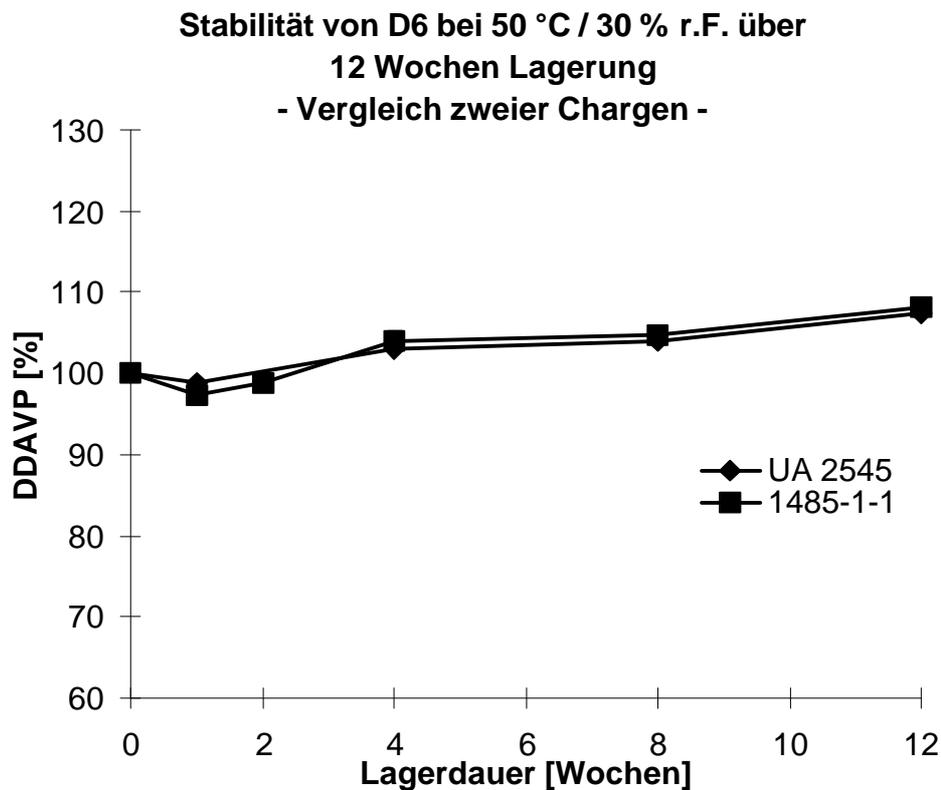
For further investigations of possible oral absorption of Desmopressin from the solid dispersion, permeation studies with Transwell[®] systems were performed. No difficulties in the release of Desmopressin from solid dispersion and in permeation of the peptide through a polyethylene membrane resulted.

Future Perspectives

- Solid dispersions containing peptide and Polycarbophil seem to be a good possibility for an increase in peptide absorption from oral dosage forms. Confirmation of this concept by studies with an in-vitro cell system (CaCo-II cell line) seems promising prior to in-vivo studies.
- The investigation of manufacture and stability of solid dispersions should be extended to other peptides (e.g. Octreotide) and to other multifunctional polymers (neutral, cationic or acidic, e.g. cellulose ethers, chitosan or carbomer).
- An applicable pharmaceutical formulation containing the solid dispersion in a capsule or tablet should be prepared. First trials on compression of the solid dispersion in a mixture with common tableting excipients such as Cellactose[®] and magnesium stearate to minitablets was possible without problems.

Kapitel 4.2.1.1 Vergleich der Stabilität zweier Desmopressin-Chargen





Zu Kapitel 4.2.1 : Stabilität von Desmopressin in fester Form

Gehalt Desmopressin [%]**-20 °C**

<u>Zeit [w]</u>	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
24	102,44	107,61	105,04	102,89

25 °C / 30 % r.F.

<u>Zeit [w]</u>	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
6	107,51	113,71	107,34	101,02
12	105,97	104,00	106,67	107,25
18	117,71	122,66	119,07	-
24	102,16	104,92	103,66	101,51

50 °C / 30 % r.F.

<u>Zeit [w]</u>	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
1	96,89	101,42	97,26	89,79
2	97,10	101,90	98,77	88,20
4	102,38	105,77	103,91	98,71
8	100,33	74,27	104,75	
12	99,66	83,03	108,21	102,52
16	88,90	75,66	109,40	66,35
20	76,54	44,96	100,09	53,97
24	73,65	54,65	98,10	49,90

58 °C / 11 % r.F.

<u>Zeit [w]</u>	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
6	103,73	108,76	105,45	107,13
12	100,64	108,57	103,35	100,91
18	112,81	111,83	118,60	100,66
24	93,32	87,42	99,38	95,31

58 °C / 30 % r.F.

<u>Zeit [w]</u>	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
1	95,85	100,17	96,34	89,42
2	92,06	96,86	97,52	93,54
4	96,10	76,20	104,11	-
8	63,64	65,88	102,02	105,45
12	46,79	49,66	101,44	98,53
16	31,02	36,28	109,49	46,59
20	29,75	12,10	94,77	34,45
24	13,21	16,43	96,48	30,14

66 °C / 11 % r.F.

<u>Zeit [w]</u>	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
6	97,44	100,04	104,37	107,24
12	81,74	78,57	99,27	105,53
18	81,95	67,86	110,60	98,75
24	63,29	54,34	96,36	100,68

66 °C / 30 % r.F.

<u>Zeit [w]</u>	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
1	92,05	91,20	97,83	93,25
2	67,76	71,35	96,64	78,26
3	59,26	*		
4	55,04	54,70	101,76	78,00
8	14,96	23,02	96,67	100,59
12	18,20	4,58	93,19	33,09
16	0,00	0,00	103,98	89,33
20	0,00	0,00	85,97	40,16
24	0,00	0,00	88,10	40,61

* Anmerkung: 3-Wochen-Werte weggelassen, da systematisch zu niedrig !

74 °C / 11 % r.F.

<u>Zeit [w]</u>	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
6	80,47	74,79	101,55	104,73
12	63,17	52,71	96,02	71,67
18	59,66	35,98	103,51	91,82
24	43,29	25,83	89,05	86,90

74 °C / 30 % r.F.

<u>Zeit [w]</u>	<u>D4</u>	<u>DP4</u>	<u>D6</u>	<u>DP6</u>
0	100,00	100,00	100,00	100,00
0,5	89,83	87,66	97,08	86,72
1	60,75	73,00	93,50	81,65
1,5	56,59	62,47	92,02	62,14
2	43,82	53,18	94,73	51,88
2,5	38,14	46,01	90,34	67,85
3	*			
4	24,31	29,91	96,07	76,70
6	7,28	14,38	91,05	67,43
8	7,17	7,37	82,21	82,06
12	4,15	1,27	83,95	26,81
16	0,00	0,00	95,02	35,83
20	0,00	0,00	77,35	16,40
24	9,26	2,48	77,24	18,57

* Anmerkung: 3-Wochen-Werte weggelassen, da systematisch zu niedrig !

Zusatzpeaks

Peak	R _t [min]	Masse (n)
a	7.17	1070 + 1071
I	8.67	1070
II	8.81	1071 + 1014
IIa	9.11	1071
III	10.73	1071
IV	11.23	1054 + 1072
V	12.33	1072 + 1015
VI	14.33	1054 + 997
VII	15.63	1054 + 997

Zusatz-Peak-Flächenwerte**-20 °C**

- Es konnten keine Zusatzpeaks detektiert werden –

25 °C / 30 % r.F.

Zeit [w]	<u>D4</u>		<u>DP4</u>		<u>D6</u>		<u>DP6</u>	
	I	I	I	I	I	I	I	I
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	66	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	68	132	n.d.	122	n.d.	122	n.d.	n.d.
18	123	158	310	n.d.	310	n.d.	n.d.	n.d.
24	151	166	71	53	71	53	n.d.	n.d.

50 °C / 30 % r.F.

Zeit [w]	<u>D4</u>				<u>DP4</u>				<u>D6</u>			<u>DP6</u>		
	a	I	II	IIa	a	I	II	IIa	I	I	II	I	I	II
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	108	n.d.	n.d.	n.d.	188	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	362	n.d.	n.d.	n.d.	447	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	632	259	n.d.	n.d.	764	218	n.d.	n.d.	80	171	n.d.	80	171	n.d.
8	1008	309	n.d.	n.d.	1039	354	n.d.	n.d.	168	182	n.d.	168	182	n.d.
12	2062	162	n.d.	n.d.	2993	2561	302	n.d.	244	495	n.d.	244	495	n.d.
16	2768	2126	974	n.d.	3766	2446	1309	n.d.	289	637	180	289	637	180
20	3026	2169	1331	n.d.	2783	1749	1219	n.d.	353	315	n.d.	353	315	n.d.
24	3414	3322	773	107	4675	3734	969	147	550	827	n.d.	550	827	n.d.

58 °C / 11 % r.F.

Zeit [w]	<u>D4</u>		<u>DP4</u>		<u>D6</u>		<u>DP6</u>	
	I	II	I	II	I	II	I	II
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	809	n.d.	703	n.d.	320	216	163	192
12	1315	n.d.	1360	n.d.	750	n.d.	593	n.d.
18	2264	n.d.	2295	n.d.	1016	n.d.	1045	n.d.
24	2133	332	2408	2585	1205	n.d.	878	n.d.

58 °C / 30 % r.F.

Zeit [w]	<u>D4</u>						<u>DP4</u>				
	a	I	II	III	IV	VII	a	I	II	III	IV
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	414	93	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	492	121	n.d.	n.d.
2	n.d.	932	320	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	944	278	n.d.	n.d.
4	n.d.	1606	502	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1822	1186	n.d.	n.d.
8	4144	2982	1955	n.d.	120	n.d.	4750	3283	2052	109	n.d.
12	6355	5138	2335	392	275	n.d.	5304	4763	1883	292	157
16	6867	4381	6554	84	744	n.d.	6670	3840	4808	358	246
20	5569	3690	5462	76	653	n.d.	3036	1663	3045	482	611
24	6079	3713	8499	128	960	177	5293	3273	5515	580	1000

Zeit [w]	<u>D6</u>		<u>DP6</u>	
	I	II	I	II
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	108	n.d.	n.d.	256
4	247	n.d.	n.d.	155
8	409	n.d.	n.d.	656
12	625	n.d.	n.d.	687
16	861	n.d.	n.d.	1562
20	754	338	n.d.	218
24	1246	n.d.	n.d.	567

66 °C / 11 % r.F.

Zeit [w]	<u>D4</u>					<u>DP4</u>				
	a	I	II	III	IV	a	I	II	III	IV
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	1861	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1882	n.d.	n.d.	n.d.
12	2759	2657	446	1987	n.d.	3289	3353	541	n.d.	n.d.
18	4073	4934	n.d.	181	91	5107	4300	1311	236	115
24	4419	3962	1411	233	146	5679	4447	2163	333	176

Zeit [w]	<u>D6</u>		<u>DP6</u>
	I	II	I
0	n.d.	n.d.	n.d.
6	n.d.	726	355
12	n.d.	1353	913
18	278	2044	1867
24	2019	n.d.	1729

66 °C / 30 % r.F.

Zeit [w]	<u>D4</u>									
	a	I	II	III	IV	V	VI	VII	Unbek.	
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	1020	348	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	3263	2408	966	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	3914	2641	1681	n.d.	204	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	5327	3728	2897	334	150	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	5717	3382	8200	223	1137	1773	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	4588	3814	2464	983	417	2344	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16	5273	3253	7112	2728	1502	3031	894	n.d.	279	n.d.
20	2696	119	5134	3628	1406	3571	1961	1337	436	154
24	4296	2669	6528	150	1139	2110	100	305	n.d.	n.d.

Zeit [w]	<u>DP4</u>						<u>D6</u>		<u>DP6</u>			
	a	I	II	III	IV	V	I	II	I	II	III	IV
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	n.d.	958	286	n.d.	n.d.	n.d.	66	n.d.	162	n.d.	n.d.	n.d.
2	3156	2068	836	n.d.	n.d.	n.d.	236	n.d.	188	n.d.	n.d.	n.d.
3	2523	1706	951	n.d.	n.d.	n.d.	261	n.d.	210	n.d.	n.d.	n.d.
4	5188	3349	2554	233	139	n.d.	592	n.d.	499	n.d.	n.d.	n.d.
8	6589	3636	6438	344	740	828	1061	326	1155	429	n.d.	n.d.
12	3106	1905	3989	378	1026	99	1612	n.d.	584	n.d.	n.d.	n.d.
16	3241	1125	5875	99	2550	179	1963	848	2065	n.d.	n.d.	n.d.
20	1890	598	5122	181	3005	286	1687	993	765	452	n.d.	n.d.
24	1003	349	3086	476	1788	173	2906	142	3203	2332	1184	443

74 °C / 11 % r.F.

Zeit [w]	<u>D4</u>								
	a	I	II	Ila	III	IV	V	VI	
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	2776	2396	982	n.d.	n.d.	62	n.d.	n.d.	
12	4760	3968	1329	221	n.d.	157	n.d.	n.d.	
18	5448	4039	3549	436	n.d.	451	n.d.	n.d.	
24	5353	4352	3975	499	n.d.	721	n.d.	n.d.	

Zeit [w]	<u>DP4</u>								
	a	I	II	Ila	III	IV	V	VI	
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
6	3583	2615	1002	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
12	6244	4807	1685	294	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
18	6140	3836	4329	528	n.d.	445	n.d.	n.d.	
24	6843	4029	6073	671	n.d.	920	355	n.d.	

Zeit [w]	<u>D6</u>			<u>DP6</u>		
	I	II	IIa	I	II	IIa
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	1056	n.d.	192	708	n.d.	n.d.
12	2235	n.d.	156	1314	n.d.	n.d.
18	2697	104	n.d.	2103	143	n.d.
24	3229	n.d.	n.d.	2377	1469	775

74 °C / 30 % r.F.

D4

Zeit [w]	a	I	II	IIa	III	IV	V	VI	Unbek.		
0	n.d.	n.d.	n.d.								
0,5	n.d.	1230	392	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	3910	2837	1700	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,5	4386	3351	2139	n.d.	282	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	5506	3830	3081	n.d.	308	220	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,5	5588	3810	4104	n.d.	87	746	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	4863	3299	3541	107	416	350	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	5711	3895	5684	154	666	856	88	143	n.d.	n.d.	n.d.
6	5063	2824	9220	324	1315	2579	121	395	n.d.	n.d.	n.d.
8	4319	2056	8508	278	1529	2805	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
12	2716	6307	3374	3023	1098	186	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16	3544	1597	6785	169	2572	3650	1074	637	855	n.d.	n.d.
20	281	4518	278	130	3807	3958	1782	773	942	92	2383
24	n.d.	4396	450	n.d.	3651	3195	260	1687	737	67	229

DP4											
Zeit [w]	a	I	II	IIa	III	IV	V	VI	Unbek.		
0	n.d.	n.d.	n.d.								
0,5	n.d.	969	338	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1	3103	2061	944	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,5	3739	2708	1329	n.d.	127	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	5205	3374	2308	n.d.	192	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,5	5370	3275	2925	n.d.	227	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	3992	2393	2417	72	263	155	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	6211	3895	5339	n.d.	660	510	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	5884	3245	7333	481	1082	1390	n.d.	127	n.d.	n.d.	n.d.
8	4979	2376	8901	249	1063	2377	n.d.	243	n.d.	n.d.	n.d.
12	1440	667	3892	398	1766	221	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16	2090	637	6681	194	4932	480	n.d.	n.d.	144	n.d.	n.d.
20	185	3770	127	1171	3291	439	n.d.	n.d.	269	n.d.	864
24	n.d.	n.d.	1805	801	1910	304	287	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Zeit [w]	D6		DP6	
	I	II	I	II
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0,5	144	n.d.	273	n.d.
1	302	n.d.	319	n.d.
1,5	369	n.d.	554	n.d.
2	466	n.d.	237	n.d.
2,5	455	193	363	208
3	518	n.d.	838	561
4	922	n.d.	743	n.d.
6	1298	n.d.	1677	n.d.
8	1187	448	1755	1020
12	2212	n.d.	718	n.d.
16	3617	n.d.	1257	1392
20	2332	2087	375	467
24	4728	480	988	1031

Zu Kapitel 4.2.3. : Log k / pH – Profil

Anmerkung: Die Werte für pH 4.0 und 6.8 siehe Stabilität von Desmopressin in fester Form.

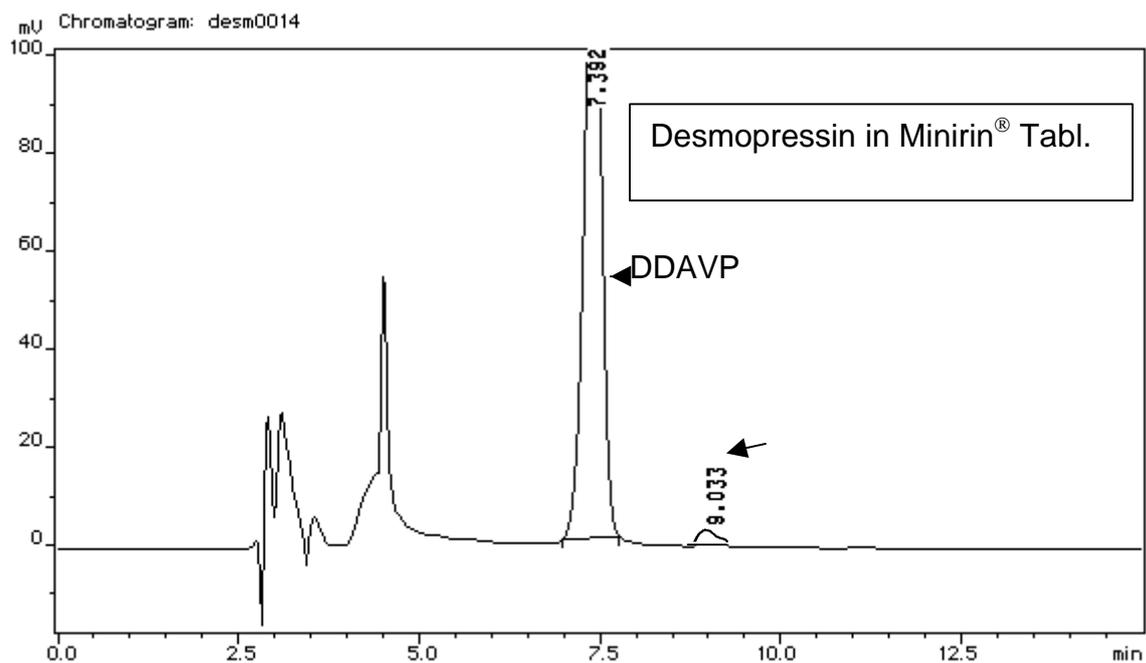
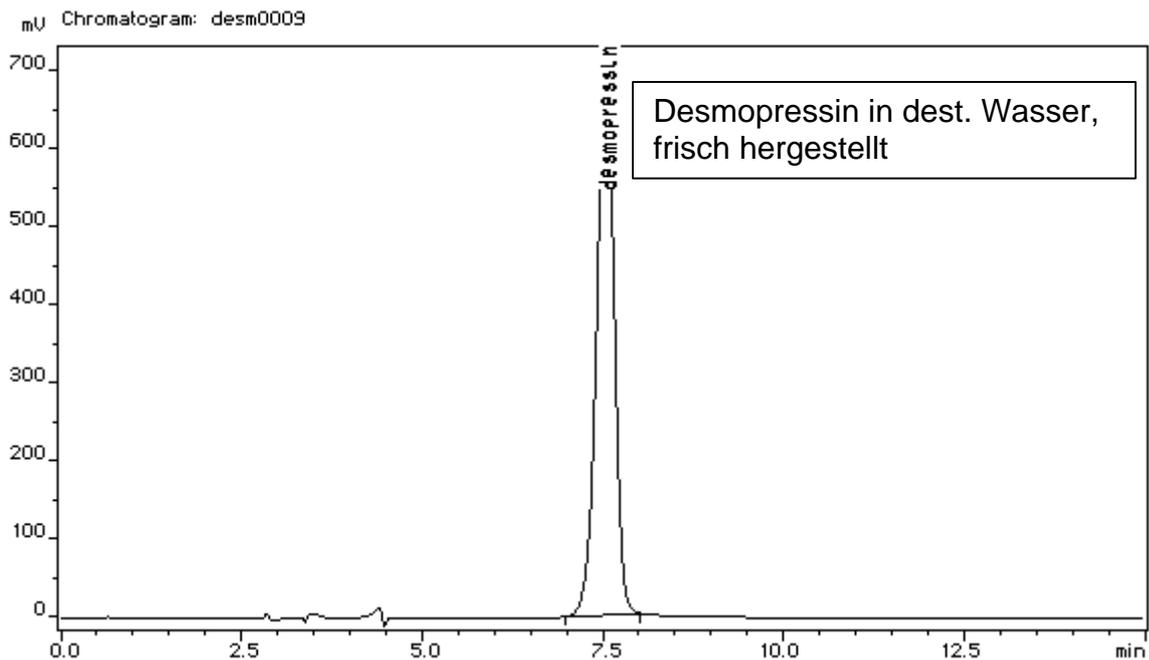
Desmopressin-Gehalt [%]

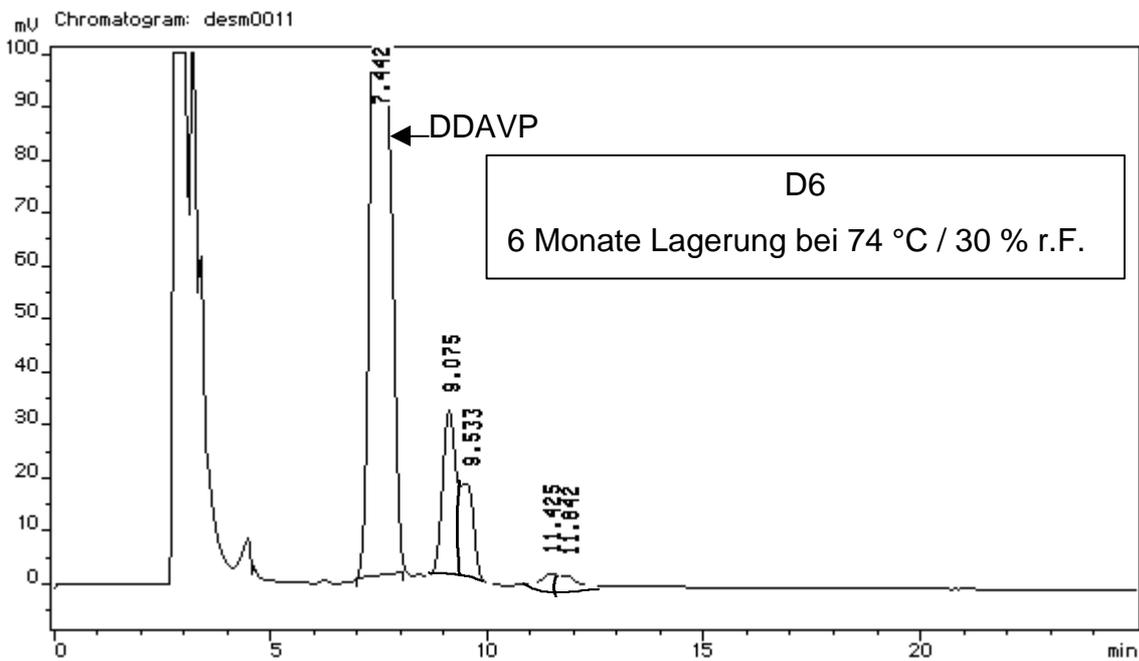
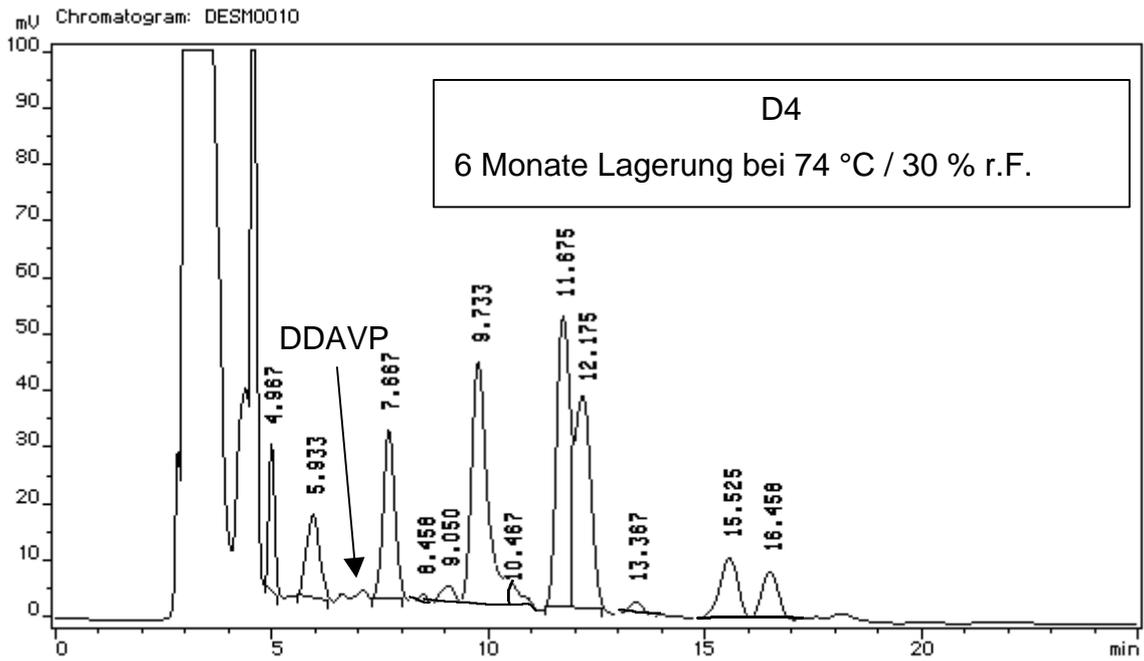
Zeit [w]	pH-Wert				
	2.0	3.0	5.5	8.0	10.0
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1,5	77,01	84,11	98,91	89,04	89,40
2	75,01	87,25	98,34	85,32	86,13
4	69,80	96,44	95,84	82,37	90,28
12	43,33	69,26	80,53	75,78	75,52

Zusatzpeaks (Flächenwerte)

Zeit [w]	<u>pH 2.0</u>					<u>pH 3.0</u>			<u>pH 5.5</u>			
	I	II	III	IV	V	I	II	III	I	II	III	IV
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,5	1526	996	1584	n.d.	n.d.	746	494	373	n.d.	245	n.d.	n.d.
2	1760	1046	1669	607	n.d.	1212	569	379	n.d.	666	341	n.d.
4	n.d.	1655	2118	2023	n.d.	1295	997	416	n.d.	1405	n.d.	n.d.
12	6991	3650	1182	874	498	4172	1719	782	4223	1768	1468	632

Zeit [w]	<u>pH 8.0</u>			<u>pH 10.0</u>			
	I	II	III	I	II	III	IV
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
1,5	n.d.	53	n.d.	n.d.	193	n.d.	n.d.
2	n.d.	232	343	n.d.	494	78	n.d.
4	n.d.	312	n.d.	n.d.	952	n.d.	n.d.
12	562	2497	2177	3182	1844	650	1722





8. Literaturverzeichnis

[1] Ahern, T.J., Manning, M.C.

Stability of Protein Pharmaceuticals

Plenum Press, New York, 1992

[2] Akiyama, Y., Lueßen, H.L., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E.

Novel peroral dosage forms with protease inhibitory activities. I. Design of capsules with fast gel-forming and fast drug-releasing properties

Int. J. Pharm. 136 (1996), 37-41

[3] Akiyama, Y., Lueßen, H.L., de Boer, A.G., Verhoef, J.C., Junginger, H.E.

Novel peroral dosage forms with protease inhibitory activities. II. Design of fast dissolving poly(acrylate) and controlled drug-releasing capsule formulations with trypsin inhibiting properties.

Int. J. Pharm. 136 (1996), 155-163

[4] Bailey, P.D.

Peptide chemistry

John Wiley & Sons, Inc., 1990

[5] Bernkop-Schnürch, A., Humenberger, C., Valenta, C.

Basic studies on bioadhesive delivery systems for peptide and protein drugs

Int. J. Pharm. 165 (1998), 217-225

[6] Brønsted, H., Nielsen, H.M., Hovgaard, L.

Drug delivery studies in CaCo-2 monolayers. III. Intestinal transport of various vasopressin analogues in the presence of lysophosphatidylcholine

Int. J. Pharm. 114 (1995), 151-157

[7] Bühl, A., Zöfel, P.

SPSS Version 8.0

Addison-Wesley, 5. Auflage, 1999

- [8] Chiou, W. L., Riegelman, S.
Pharmaceutical applications of solid dispersion systems
J. Pharm. Sci. 60 (9) (1971), 1281-1302
- [9] Cleland, J.L., Langer, R.
Formulation and delivery of proteins and peptides - Design and development strategies -
ACS Symposium 567, 1994
- [10] Connors, K.A., Amidon, G.L., Stella, V.J.
Vasopressin
Chemical Stability of Pharmaceuticals, John Wiley & Sons, Inc., 1986
- [11] Craig, D.Q.M., Royall, P.G., Kett, V.L., Hopton, M.L.
The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems
Int. J. Pharm. 179 (1999), 179-207
- [12] Czaplewski, C., Kazmierkiewicz, R., Ciarkowski, J.
Molecular modelling of the human vasopressin V2 receptor/agonist complex
J. Comput. Aided Mol. Des. 12 (3) (1998), 275-287
- [13] Dargel, E., Mielck, J.B.
Chemical stability of drugs in solid dispersions: Accelerated tests of reserpine dispersed in Kollidon[®] and in Eudragit[®]E
Acta Pharm. Technol. 34 (1989), 197-209
- [14] Deutsches Arzneibuch, 10. Ausgabe
Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 1991
- [15] Dittgen, M., Dittrich, F., Kunze, H.
Untersuchung der Bioadhäsion von Polyacrylaten
Pharmazie 43 (12) (1988), 870-871

[16] Duncan, M.R., Lee, J.M., Warchol, M.P.

Influence of surfactants upon protein/peptide adsorption to glass and polypropylene

Int. J. Pharm. 120 (1995), 179-188

[17] Essig, D., Oschmann, R.

Lyophilisation

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1993

[18] Evers, D.

Aufbau und Optimierung einer HPLC-DAD-MSD-Kopplung und ihr Einsatz in der Pharmazeutischen Analytik

Diplomarbeit Fachhochschule Hamburg, 1998

[19] Fjellestad-Paulsen, A., Paulsen, O., dAgay-Abensour, L., Lundin, S., Czernichow, P.

Central diabetes insipidus: oral treatment with dDAVP

Regulatory Peptides 45 (1993), 303-307

[20] Ford, J. L.

The current status of solid dispersions

Pharm. Acta Helv. 61 (3) (1986)

[21] Franks, F.

Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practise

Eur. J. Pharm. Biopharm. 45 (1998), 221-229

[22] Fredholt, K., Ostergaard, J., Savolainen J., Friis, G.J.

alpha-chymotrypsin-catalyzed degradation of desmopressin (dDAVP): influence of pH, concentration and various cyclodextrins

Int. J. Pharm. 178 (1999), 223-229

[23] Frontinti, R., Mielck, J.B.

Interactions between bendroflumethiazide and water soluble polymers: I. Solubility of bendroflumethiazide in water from solid dispersions and formation of associates under climatic stress

Eur. J. Pharm. Biopharm. 43 (1997), 185-191

[24] Grunenberg, A.

Polymorphie und Thermische Analyse pharmazeutischer Wirkstoffe

Pharmazie in unserer Zeit 26 (5) (1997)

[25] Gurny, R., Junginger, H.E.

Bioadhesion – Possibilities and Future Trends

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 1990

[26] Hagler, A.T., Osguthorpe, D.J., Dauber-Osguthorpe, P., Hempel, J.C.

Dynamics and conformational energetics of a peptide hormone: vasopressin

Science 227 (1985), 1309-1315

[27] Hammer, M., Vilhardt, H.

Peroral treatment of diabetes insipidus with polypeptide hormone analog, desmopressin

J. Pharmacol. Experim. Therap., 234 (3) (1985), 754-760

[28] Hemminger, W., Höhne, G.

Grundlagen der Kalorimetrie

Verlag Chemie, Weinheim, 1979

[29] Hesse M., Meier, H., Zeeh, B.

Spektroskopische Untersuchungen in der organischen Chemie

Gustav Thieme Verlag, 1995

[30] Horbett, T.A.

Adsorption of proteins and peptides at interfaces

Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A, Plenum Press, New York, 1992

[31] Hosny, E.A.

Formulation and comparative evaluation of bioadhesive containing diclofenac sodium and commercial enteric coated tablets in-vitro and in dogs

Int. J. Pharm. 133 (1996), 149-153

[32] Hosny, E.A., Niazy, E.M., El-Dardari, M.M.

Effect of Polycarbophil concentration on diclofenac sodium bioavailability from suppositories in beagle dogs

Int. J. Pharm. 136 (1996), 37-41

[33] Hovgaard, L., Brønsted, H., Nielsen, H.M.

Drug delivery studies in CaCo-2 monolayers. II. Absorption enhancer effects of lysophosphatidylcholines

Int. J. Pharm. 114 (1995), 141-149

[34] Jakubke, H.D., Jeschkeit, H.

Aminosäuren-Peptide-Proteine

Verlag Chemie, Weinheim, 1982

[35] Jans-Frontini, H., Mielck, J.B.

Stability of drugs in solid dispersions: Effect of glass transition on degradation kinetics under stress in systems of reserpine and PVP

Eur. J. Pharm. Biopharm. 42 (1995), 303-312

[36] Junginger, H.E.

Mucoadhesive Hydrogels

Pharm. Ind. 53 (11) (1991), 1056-1065

[37] Junginger, H.E.

Bioadhesive polymer systems for peptide delivery

Acta Pharm. Technol. 36 (3) (1990), 110-126

[38] Kihlberg, J., Ahman, J., Walse, B., Drakenberg, T., Nilsson, A., Söderberg-Ahlm, C., Bengtsson, B., Olsson, H.

Glycosylated peptide hormones: Pharmacological properties and conformational studies of analogues of [1-desamino, 8-D-arginine]vasopressin

J. Med. Chem. 38 (1995), 161-169

[39] Kriwet, B., Kissel, T.

Interactions between bioadhesive poly(acrylic acid) and calcium ions

Int. J. Pharm. 127 (1996), 135-145

[40] Kriwet, B., Kissel, T.

Poly(acrylic acid) microparticles widen the intercellular spaces of CaCo-2 cell monolayers: An examination by confocal laser scanning microscopy

Eur. J. Biopharm. 42 (4) (1996), 233-240

[41] Kulicke, W.-M.

Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen

Hüthig & Wepf, 1986

[42] Law, S.L., Shih, C.L.

Adsorption of calcitonin to glass

Drug Dev. Indust. Pharm., 25 (2) (1999), 253-256

[43] Lee, V.H.L.

Peptide and Protein Drug Delivery

Marcel Dekker, Inc., 1991

[44] Lehr, C.-M.

Bioadhesive drug delivery systems for oral application

Thesis NL-Leiden, 1991

[45] Lehr, C.-M.

Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract

Crit. Rev. Therap. Drug Car. Syst. 11 (2&3) (1994), 119-160

[46] Lehr, C.-M., Boddé, H.E., Bouwstra, J.A., Junginger, H.E.

A surface energy analysis of mucoadhesion II. Prediction of mucoadhesive performance by spreading coefficients

Eur. J. Pharm. Sci. 1 (1993), 19-30

[47] Lehr, C.-M., Bouwstra, J.A., Boddé, H.E., Junginger, H.E.

A surface energy Analysis of mucoadhesion: Contact angle measurements on Polycarbophil and pig intestinal mucosa in physiologically relevant fluids

Pharm. Res. 9 (1992), 70-75

[48] Lehr, C.-M., Bouwstra, J.A., Kok, W., de Boer, A.G., Tukker, J.J., Verhoef, J.C., Breimer, D.D., Junginger, H.E.

Effects of the mucoadhesive polymer polycarbophil on the intestinal absorption of a peptide drug in the rat

J. Pharm. Pharmacol. 44 (1992), 402-407

[49] Lehr, C.-M., Bouwstra, J.A., Spies, F., Onderwater, J., van het Noordeinde, J., Vermeij-Keers, C., van Munsteren, C., Junginger, H.E.

Visualization studies of the mucoadhesive interface

J. Controlled Release 18 (1992), 249-260

[50] Lehr, C.-M., Bouwstra, J.A., Tukker, J.J., Junginger, H.E.

Intestinal Transit of Bioadhesive Microspheres in an in-situ loop in the rat

- a comparative study with copolymers and blend based on poly(acrylic acid)

J. Controlled Release 13 (1990), 51-62

[51] Lehr, C.-M., Bouwstra, J.A., Tukker, J.J., Junginger, H.E.

Design and testing of a bioadhesive drug delivery system for oral application

S.T.P. Pharma, 5 (12) (1989), 857-862

[52] Lehr, C.-M., Lee, Y.-H., Lee, V.H.L.

Improved ocular penetration of gentamicin by mucoadhesive polymer Polycarbophil in the pigmented rabbit

Invest.Opht.&Visual Sci. 35 (1994), 2809-2814

[53] Liwo, A., Tempczyk, A., Oldziej, S., Shenderovich, M., Hruby, V., Talluri, S., Ciarkowski, J., Kasprzykowski, F., Lankiewicz, L., Grzonka, Z.

Exploration of the conformational space of oxytocin and arginine-vasopressin using the electrostatically driven Monte Carlo and molecular dynamics methods

Biopolymers 38 (1996), 157-175

[54] Lueßen, H.L.

Multifunctional polymers for peroral peptide drug absorption

Thesis NL-Leiden, 1996

[55] Lueßen, H.L., Akiyama, Y., Verhoef, J.C., de Boer, A.G., Junginger, H.E.

Design of fast dispersing poly(acrylate) and controlled drug releasing capsule formulations with trypsin inhibiting properties

Proceed.Intern.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater. 23 (1996)

[56] Lueßen, H.L., Akiyama, Y., Verhoef, J.C., de Boer, A.G., Junginger, H.E.

Design of capsules with fast gel-forming poly(acrylate) and fast drug-releasing properties for peroral peptide drug delivery

Proceed.Intern.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater. 23 (1996)

[57] Lueßen, H.L., Bohner, V., Pérard, D., Langguth, P., Verhoef, J.C., de Boer, A.G., Merkle, H.P., Junginger, H.E.

Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. V. Effect of poly(acrylates) on the enzymatic degradation of peptide drugs by intestinal brush border membrane vesicles

Int. J. Pharm. 141 (1996), 39-52

[58] 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 Release 29 (1994), 329-338

[59] Lueßen, H.L., Verhoef, J.C., Borchard, G., Lehr, C.-M., de Boer, A.B., Junginger, H.E.

Mucoadhesive Polymers in Peroral Peptide Delivery. II. Carbomer and Polycarbophil are Potent Inhibitors of the Intestinal Proteolytic Enzyme Trypsin

Pharm. Res. 12 (1995), 1293-1298

[60] Lundin, S., Artursson, P.

Absorption of a vasopressin analogue, 1-deamino-8-D-arginine-vasopressin (dDAVP), in a human intestinal epithelial cell line, CaCo-2

Int. J. Pharm. 64 (1990), 181-186

[61] Mager, H.

Moderne Regressionsanalyse

Sauer + Sauerländer, 1982

[62] Manning, M., Balaspiri, L., Moehring, J., Haldar, J., Sawyer, W.

Synthesis and some pharmacological properties of deamino[4-threonine, 8-D-arginine]vasopressin and deamino[8-D-arginine]vasopressin, highly potent and specific antidiuretic peptides, and [8-D-arginine]vasopressin and deamino-arginine-vasopressin

J. Med. Chem. 19 (6) (1976), 842-845

[63] Martindale 27th edition

Desmopressin

Pharmaceutical Press, London, 1978

[64] Meister, A.

Biochemistry of the amino acids

Academic Press Inc., New York, 1965

[65] Meyer, H.-Ch.

Charakterisierung und Beeinflussung der Lösungseigenschaften von 6-Bromcip
Dissertation Universität Hamburg, 1995

[66] Mielck, J.B.

Möglichkeiten und Grenzen der beschleunigten Untersuchung zur Vorhersage der
Haltbarkeit

Acta Pharm. Technol. 21 (1) (1975), 43-71

[67] Montag, A.

Statistische Methoden zur Bewertung analytischer Meßdaten

Wolfgang Frede (Hrsg.) Taschenbuch für Lebensmittelchemiker und – technologen
(Band 1), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1991, 107-124

[68] Nakanishi, T., Kaiho, F., Hayashi, M.

Use of sodium salt of Carbopol 934P in oral peptide delivery

Int. J. Pharm. 171 (1998), 177-183

[69] NBS, Washington (Info über die Fa. Schulz Electronic, D-Höhenkirchen)

Feuchtwerte im vergrößerten Temperatur-Bereich

[70] Neau, S.H., Chow, M.Y., Durrani, M.J.

Fabrication and characterization of extruded and spheronized beads containing
Carbopol 974P, NF resin

Int. J. Pharm. 131 (1996), 47-55

[71] Nyqvist, H.

Saturated salt solutions for maintaining specified relative humidities

Int. J. Pharm. Tech. & Prod. 4 (2) (1983), 47-48

[72] Park, H., Robinson, J.R.

Physico-chemical properties of water insoluble polymers important to mucin/epithelial
adhesion

J. Control. Rel. 2 (1985), 47-57

[73] Patel, K.

Stability of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and pathways of deamidation of asparaginy residue in hexapeptide segments

Stability and characterization of protein and peptide drugs: Case histories, Y. John Wang and Rodney Pearlman. Plenum Press, New York, 1993

[74] Richardson, D.W., Robinson, A.G.

Desmopressin

Ann. Inter. Med. 103 (1985), 223-239

[75] Riesen, R., Wiedmann, G.

Thermoanalyse

Dr. Alfred Hüting Verlag, D-Heidelberg, 1984

[76] Sachs, L.

Angewandte Statistik

Springer Verlag, Heidelberg-New York, 1984

[77] Saffran, M., Bedra, C., Kumar, G.S., Neckers, D.C.

Vasopressin: A model for the study of effects of additives on the oral and rectal administration of peptide drugs

J. Pharm. Sci. 77 (1) (1988), 33-38

[78] Schepky, G.

Ein Hygrostat mit einfacher und störungsarmer Probenauswaage

Acta Phar. Technol. 28 (1982), 87-88

[79] Schmidt, J.M., Ohlenschläger, O., Rüterjans, H., Grzonka, Z., Kojro, E., Pavo, I., Fahrenholz, F.

Conformation of [8-D]vasopressin and V1 antagonists in dimethyl sulfoxide solution derived from two-dimensional NMR spectroscopy and molecular dynamics simulation

Eur. J. Biochem. 201 (1991), 355-371

[80] Schwetlick, K.

Kinetische Methoden zur Untersuchung von Reaktionsmechanismen

VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1971

[81] Shamblin, S.L., Hancock, B.C., Zografi, G.

Water vapor sorption by peptides, proteins and their formulation

Eur. J. Pharm. Biopharm. 45 (1998), 239-247

[82] Stahl, P.H.

Feuchtigkeit und Trocknen in der pharmazeutischen Technologie

D. Steinkopff-Verlag, Darmstadt, 1980

[83] Tur, K.M., Ch`ng, H.-S.

Evaluation of possible mechanism(s) of bioadhesion

Int. J. Pharm. 160 (1998), 61-74

[84] United States Pharmacopeia XXIII

U.S. Pharmacopeial Convention Inc., Rockville MD, 1995

[85] van Breemen, R.B., Davis, R.G.

Rates of peptide proteolysis measured using liquid chromatography and continuous-flow fast atom bombardment mass spectrometry

Anal. Chem. 64 (1992), 2233-2237

[86] Vilhardt, H.

Basic pharmacology of desmopressin

Drug Investigation 2 (5) (1990), 2-8

[87] Vilhardt, H., Bie, P.

Antidiuretic effect of perorally administered DDAVP in hydrated humans

Acta Endocrinologica 105 (1984), 474-476

[88] Vilhardt, H., Lundin, S.

Biological effect and plasma concentrations of DDAVP after intranasal and peroral administration to humans

Gen. Pharmac. Vol. 17 (4) (1986), 481-483

[89] Voß, W.

Praktische Statistik mit SPSS

Carl Hanser Verlag, 1997

[90] Walse, B., Kihlberg, J., Drakenberg, T.

Conformation of desmopressin, an analogue of the peptide hormone vasopressin, in aqueous solution as determined by NMR spectroscopy

Eur. J. Biochem. 252 (1998), 428-440

[91] Zaoral, M., Kolc, J., Sorm, F.

Synthesis of 1-deamino-8-D-Aminobutyrene-vasopressin, 1-deamino-8-D-lysine-vasopressin, and 1-deamino-8-D-arginine-vasopressin

Coll. Czech. Chem. Commun. 32 (1967), 1250-1257

9. Geräteliste

- <1> HPLC-Anlage mit Software <S3> und <S4>
Pumpe P1000, Fa. TSP, D-Darmstadt
Autosampler 360, Fa. Kontron, D-Neufahrn
Detektor Uvikon 720 LC, Fa. Kontron, D-Neufahrn
Degasser X-Act 4 Channel, Fa. Jour Research, S-Onsala
Säule Prodigy ODS (3), RP 18, 5 μm , 100 \AA , 250-4.6 mm, Fa. Phenomenex,
USA-Torrance, California
Vorsäule Prodigy ODS (3), RP 18, 5 μm , 100 \AA , 30-4.6 mm,
Fa. Phenomenex, USA-Torrance, California
Vorsäulenfilter A 103x, stainless steel mit PEEK, 0,5 μm mittlerer
Porendurchmesser, Fa. Upchurch, USA-Oak Harbor
- <2> HPLC / MS-Kopplung
Series 1100, Fa. Hewlett[®] Packard, D-Waldbronn
inkl. Software
- <3> Spektralphotometer PU 8730, Fa. Philips, D-Kassel
- <4> Küvetten Quarzglas, Fa. Hellma, D-Müllheim
<4a> Typ 110-QS , d= 0.2 cm
<4b> Typ 104B-QS, d= 1.0 cm
- <5> Infrarot -Trockenwaage Moisture Analyzer MA 30, Fa. Sartorius, D-Göttingen
Ablesegenauigkeit (Feuchtegehalt): 0.01 %
mit Software TW03 (GW Basic)
- <6> Thermowaage TG 760, Fa. Stanton Redcroft, GB-London
Wägebereich 1-10 mg
Stickstoffatmosphäre, 30 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, Wasser-Kühlung 100 $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$
Aluminium-Tiegel Stanton Redcroft TG 7668

-
- <7> Thermogravimetrie-Apparatur TG 7, Fa. Perkin Elmer, D-Überlingen
mit Controller TAC 7 / DX
Aluminium-Tiegel

 - <8> Karl-Fischer-Titrator, Fa. Radiometer, DK-Copenhagen
Autobürette: ABU 80
Titrator: TTT 60
pH-Meter: PHM 62

 - <9> Differential Scanning Calorimeter DSC 7, Fa. Perkin Elmer, D-Überlingen
mit Controller TAC 7 / DX

 - <10> Rotationsviskosimeter UDS 200, Fa. Physica Meßtechnik, D-Stuttgart
 - <11> Meßsysteme MK 22, MK 24, MP 31

 - <12> Mikroskop Orthoplan, Fa. Leitz, D-Wetzlar
Vergrößerungen 40, 100 und 400 fach

 - <13> Heiztisch FP 52, Fa. Mettler, D-Gießen

 - <14> Ultra Turrax TP 18/10, Fa. Janke & Kunkel, D-Staufen
mit Aufsatz N10
inkl. Regler Voltron 10, Fa. Messner Emtronic, D-Dettenhausen

 - <15> Schüttler KS.B, Fa. E. Bühler, D-Tübingen

 - <16> Gefriertrockner Freeze Dryer E1 PTC, Fa. Edwards Alto vuoto, I-Trezzano
mit Meßwertscanner LSB36-III, Fa. Linseis, D-Selb

 - <17> Zentrifuge Mistral 6L, Fa. MSE, GB-Crawley

 - <18> Braunglasvial 1 ml, N11-1, Fa. Macherey & Nagel, D-Düren

-
- <19> Polypropylenvial SR 78843-PM, Fa. ICT, D-Bad Homburg

 - <20> Wärmeschranke B 5050 E, Fa. Heraeus, D-Hanau
50, 58, 66 und 74 °C

 - <21> Wärmeschrank Typ 2105, Fa. Köttermann, D-Hännigsen-Hannover
25 °C

 - <22> Feuchte- und Temperaturfühler Humidat IC II, Fa. Novasina, CH-Zürich
mit Meßkopf enBS-4/ IC

 - <23> Analysenwaage MT 5, Fa. Mettler-Toledo, D-Gießen

 - <24> Analysenwaage M 500 P, Fa. Sartorius, D-Göttingen

 - <25> Analysenwaage 1712, Fa. Sartorius, D-Göttingen

 - <26> Analysenwaage 2474, Fa. Sartorius, D-Göttingen

 - <27> Transwell[®] System, PE-TC, Artikel Nr. 3460, Fa. Corning Costar, D-
Bodenheim

 - <28> pH-Meter E 512, Fa. Metrohm, CH-Herisau

10. Software

<S1> SPSS Version 8.0, SPSS Inc., GB-Woking

<S2> TOCCATA Version 910226, Dr. R. Frontini, 1993 [23]
Statistikprogramm zur Auswertung der Linearen Regression

<S3> Chromatographie Software Thermochrom Modell II Axxiom 727 Version 3.86,
LCD Analytical Inc., USA-Riviera Beach

<S4> Chromatographie Software ChromStar 4.06, Fa. SCPA, D-Stuhr

<S5> Sybyl 6.5
Trypos Inc., 1699 South Hanley Rd.
St. Louis, Missouri, 63144, USA

11. Lebenslauf

Geburtsdatum	24. August 1968
Geburtsort	Dortmund
1974 bis 1978	Grundschule Tonndorf, Hamburg
1978 bis 1987	Gymnasium Barenkrug, Hamburg Abschluß Abitur
01. April 1988 bis 01. April 1992	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
01. Mai 1992 bis 31. Oktober 1992	Erste Hälfte des Praktischen Jahres in der Berliner Bär Apotheke in Hamburg
01. November 1992 bis 30. April 1993	Zweite Hälfte des Praktischen Jahres in der Pharmazeutischen Entwicklung der Beiersdorf-Lilly GmbH, Hamburg
Juni 1993	Erteilung der Approbation zum Apotheker
01. Mai 1993 bis 31. Dezember 1994	Tätigkeit in der Pharmazeutischen Entwicklung der Beiersdorf-Lilly GmbH, Hamburg
01. März 1995	Beginn der Promotionsarbeit in der Abteilung Pharmazeutische Technologie des Institutes für Pharmazie an der Universität Hamburg
01. April 1995 bis 31. März 1999	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin in dieser Abteilung

Veröffentlichungen / Präsentationen

Wratschko, S.C., Mielck, J.B., 1998

Stability of the peptide Desmopressin in solid dispersion with a multifunctional polymer (Polycarbophil)

Proc. 2nd World Meeting APGI/APV, Paris

Wratschko, S.C., Mielck, J.B., 1998

Sorption of a small peptide (Desmopressin) to surfaces of glass and polypropylene

Proc. 2nd World Meeting APGI/APV, Paris

Wratschko, S., Brunner, H., 1999

Implementation and use of a LC-PDA-MSD system in PPD

Lilly Research Meeting Worldwide, Indianapolis

Wratschko, S., 1999

Orale Applikation von Peptiden ? Feste Dispersion in multifunktionalem Polymer; Herstellung und Stabilität

Tag der Pharmazie, Universität Hamburg