

5 Untersuchungen von Carboplatin-Infusionslösungen

5.1. Allgemeiner Hintergrund

Carboplatin (*[cis-Diammin(cyclobutan-1,1-dicarboxylat)]platin(II)*) zählt zur Reihe der zweiten Platinkomplexgeneration und hat sich im Vergleich zu Cisplatin in Wirkung und Toxikologie bei einigen Tumortypen als überlegen erwiesen. Es gehört zu den Verbindungen mit d^8 -Struktur, welche bevorzugt quadratisch-planare Geometrie um das Zentralatom besitzen. Die Substitution der beiden Chloridionen des Cisplatins durch den Cyclobutan-dicarboxylatliganden im Carboplatin erhöht die Wasserlöslichkeit um mehr als das 10-fache [102].

Dieser Chelatsechsring ist gewellt und unterliegt in Lösung einer dynamischen Bewegung. Dabei bewegt sich der Cyclobutanring auf das Metallzentrum zu, und ein Nukleophilangriff wird behindert. Das Molekül ist somit widerstandsfähiger gegen Hydrolyse. Bei Stabilitätsuntersuchungen zeigte sich Carboplatin gegenüber Cisplatin um den Faktor 100 überlegen. Die Hydrolyse-Geschwindigkeitskonstante von Carboplatin beträgt bei $20^\circ\text{C} = 8.14 \times 10^{-8} \text{s}^{-1}$ und bei $37^\circ\text{C} = 4.67 \times 10^{-7} \text{s}^{-1}$. Letzteres ist demnach durch die chelatgebundene Dicarbonsäure-Abgangsgruppe bedeutend unreaktiver und somit länger stabil als Cisplatin [103]. Die Werte von Cisplatin liegen bei 20°C bei $3.96 \times 10^{-6} \text{s}^{-1}$. Wird die Temperatur auf 37°C erhöht, wird die Geschwindigkeitskonstante 10x größer: $4.16 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$.

In wässriger Lösung bestimmt die Hydrolyse den alleinigen Abbau. Hierbei erfolgt zunächst eine Ringöffnung durch angreifendes Wasser und im zweiten Schritt die Freisetzung von Cyclobutandicarbonsäure (CBDC). Dies ist in **Abb.5.1** dargestellt; beide Schritte sind reversibel. Die Hydrolyserate ist abhängig von der Temperatur und der H^+ -Ionenkonzentration (s. auch Kap.6).

Parallel dazu läuft der Nukleophilweg ab, welcher z.B. in chloridhaltiger Lösung durch direkten Angriff von Chlorid stattfinden kann oder nach Aktivierung durch körpereigene S-Donor-Liganden [104].

Die hohe Löslichkeit in Wasser und die gute Stabilität darin begünstigen die Herstellung und den Vertrieb von Infusionslösungen. Üblicherweise liegen Zytostatika in gefriergetrockneter Form vor und werden durch Zugabe geeigneter Lösungsmittel zur Applikation bereitgestellt. Carboplatin kann dagegen bereits gelöst vorliegen. Der pH-Wert in diesen gebrauchsfertigen Infusionslösungen liegt zwischen 4 und 6, die Konzentration beträgt üblicherweise 10 mg/ml.

Es kann entweder direkt verabreicht oder mit Wasser oder Glucoselösung verdünnt werden. Durch die geringe Hydrolyseempfindlichkeit sollte eine gleich bleibende Qualität gewährleistet sein. Sind keine störenden Bestandteile in der Lösung enthalten, sollten nur der Aquaplatin(II)-Komplex und die freie Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure nach langsamer Hydrolyse vorliegen. Nach einem Patent von 2000 soll ein Zusatz von CBDC die Stabilität erhöhen und das Gleichgewicht zugunsten des nicht-hydrolysierten Carboplatins verschieben [256].

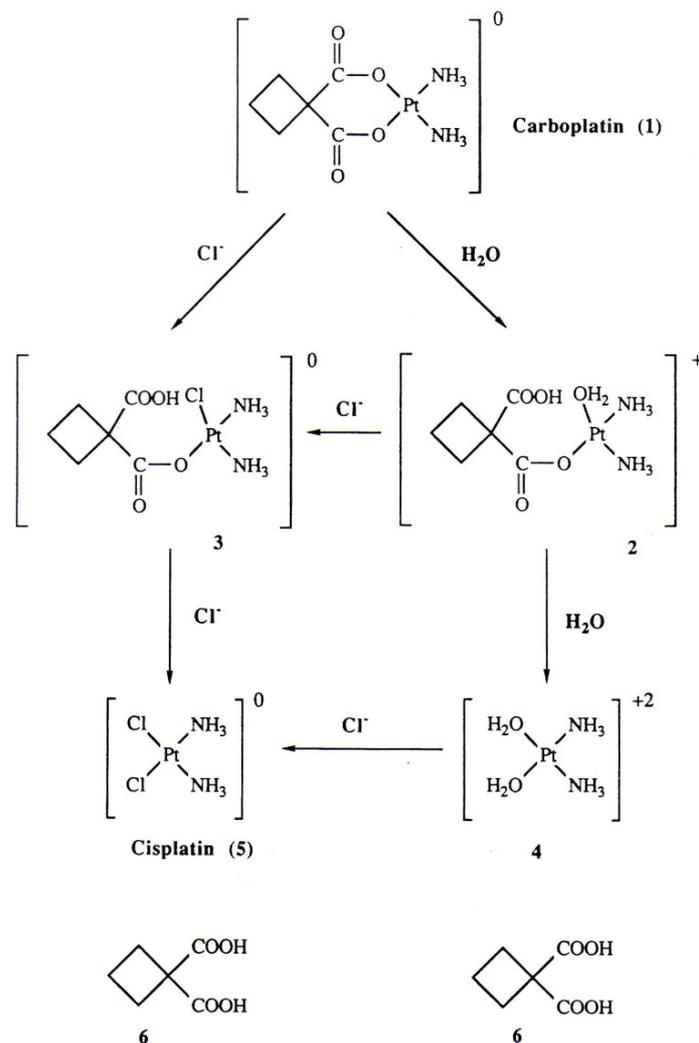


Abb.5.1 Hydrolyse von Carboplatin mit Chlorid in wässriger Lösung

Es existieren einige Studien, welche sich mit dieser Stabilitätssteigerung in verschiedenen Trägerlösungen und biologischen Körperflüssigkeiten beschäftigt haben [103,105-107]. Brandsteterova et al [108] untersuchten den Einfluss auf die Hydrolyse von Carboplatin und bestimmten die Geschwindigkeitskonstanten der Aquaplatin(II)-Komplexbildungsreaktion bei

20°C und 37°C. Die Werte in Glucose 5%, Natriumcitrat und Natriumchlorid waren höher als in Wasser. In wässrigen Lösungen betrug der Gehaltsverlust während der Lagerung bei 37°C nach drei Stunden bereits 6% und nach 24 Stunden 8.6%. In 5%iger Glucose-Lösung zur Infusion und Wasser erwies sich bei 4°C eine Lagerzeit von bis zu einem Monat als optimal. Kochsalzlösungen sollten nicht angewandt werden, da eine Umwandlung in reaktives Cisplatin stattfindet.

Es wurden verschiedene Gehaltsverluste ermittelt, wobei auch die Temperatur entscheidend war. Bei 2-8°C kam es zu einem Abbau von 3.4-5% [102], bei einer Stabilität von etwa einem Jahr. Knox et al [10] bestimmten die Halbwertszeit von Cis- und Carboplatin in chloridfreiem Puffer bei pH=7 und 37°C mit 2.4 Stunden für Cisplatin sowie 11.17 Tagen für Carboplatin.

Da in der Chemotherapie eine Dosierung streng nach der Körperoberfläche erfolgt, berechnet über Größe und Gewicht des Patienten, ist eine genaue Einschätzung des Carboplatinabbaus von großer Wichtigkeit. Untersuchungen belegen, dass sich neben den Verbindungen, welche durch Hydrolyse entstehen, weitere, unbekannte Nebenprodukte bilden [109,110]. Hierbei zeigte sich ein Abbau zwischen 3.09% und 7.28% (0.311 mg/ml; 0.746 mg/ml) in einem Lagerzeitraum von 5-78 Monaten sowie das Auftreten hydrophiler Zersetzungsprodukte. Ein CBDC-Zusatz zur Infusionslösung erscheint entgegen früheren Studien als nicht geeignet, da die Stabilität herabgesetzt wurde und sogar ein höherer Anteil an Zerfallsprodukt entstand.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Fertiginfusionslösungen hinsichtlich ihres Nebenproduktespektrums untersucht. Es sollte eine Strukturaufklärung dieser Verbindungen erfolgen sowie nach Isolierung und Charakterisierung eine Bestätigung durch Synthese durchgeführt werden. Das gesuchte Nebenprodukt wird im Folgenden mit **NP** abgekürzt; daneben dienten zwei Fertigarzneimittel **FAM 1** sowie **FAM 2** zu parallelen Untersuchungen (genaue Angaben s. Kap.9). Die Konzentration von Carboplatin betrug in beiden Fällen 10 mg/ml.

5.1.2. Verwendung einer geeigneten Messmethode zur Bestimmung des Nebenproduktes

Als Analysenmethode zur Bestimmung des Nebenprodukteprofils war die Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC = *high pressure liquid chromatography*) die Methode der Wahl. Mit den Messbedingungen, die hier angewandt wurden, sollte mit hoher Reproduzierbarkeit, geringen Analysenzeiten und hoher Genauigkeit eine quantitative Bestimmung von **NP** aus den Fertigarzneimitteln möglich sein. Grundsätzlich wird die

Eignung und Leistungsfähigkeit dieser Trennmethode durch die stationäre Phase, die Fließmittel und ihre Zusammensetzung sowie die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase bestimmt. Je nach den gewünschten Anforderungen an das Analysensystem und die zu untersuchenden Proben müssen diese Bedingungen variiert und angepasst werden. In diesem Falle wurde auf ein von Müller speziell zur Analyse von Platin(II)-Komplexen entwickeltes System zurückgegriffen, das entsprechend abgeändert wurde [147].

Mit der HPLC sind selbst noch kleinste Verunreinigungen in einer Probe zu erfassen. Die hier untersuchten Fertigarzneimittel besaßen je nach Lagerzeit einen Abbau des enthaltenen Carboplatins zu gesuchtem NP von maximal 5%, so dass eine zuverlässige Analysenmethode gegeben war.

5.1.2.1. Reversed-Phase Chromatographie

Bei der *reversed-phase* Chromatographie ist die mobile Phase im Gegensatz zur klassischen Säulenchromatographie polarer als die stationäre Phase. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Absorption der zu untersuchenden Substanzen an das Trägermaterial [146]. Lipophilere Komponenten werden demnach stärker an die stationäre Phase gebunden als hydrophile und daher später von der Säule eluiert.

5.1.2.2. Die stationäre Phase

Zur Auftrennung der Verbindungen wurde eine Vor- und Hauptsäule mit Nucleosil C₁₈ als Packungsmaterial verwendet. Die Vorsäule besitzt eine Schutzfunktion, indem sie nicht eluierbare Komponenten zurückhält und somit die Lebensdauer der Hauptsäule erheblich verlängert [146]. Zusätzlich wird die mobile Phase durch die Vorsäule mit Kieselsäure gesättigt, da sich in jedem Lösungsmittel geringe Mengen Säulenmaterial lösen.

Nucleosil C₁₈ ist regelmäßiges, kugelförmiges Trägermaterial aus Kieselgel. Hierdurch lassen sich Trennung und Selektivität optimieren, da die Teilchengröße eng fraktioniert ist. An dieses Material sind Oktadecylsilanylgruppen (ODS, -O-Si-(CH₂)₁₇-CH₃), C₁₈-Körper, kovalent gebunden. Die noch freien Silanolgruppen sind zusätzlich verethert, „endcapped“, um elektrostatische Wechselwirkungen der OH-Gruppen mit geladenen Spezies zu verhindern.

Die Bindung von Substanzen mit lipophilem Charakter an die C₁₈-Ketten erfolgt durch van der Waals-Kräfte.

Die stationäre Phase mit den Si-O-Si-Gruppen ist stabil gegenüber Wasser und erwies sich als geeignet für die Trennung von Platinkomplexen.

5.1.2.3. Die mobile Phase

Mit der mobilen Phase muss eine vollständige Elution der aufgetragenen Verbindungen gewährleistet sein und zum anderen ein starkes Peaktailing vermieden werden [146,147]. Für eine optimale Trennung muss die prozentuale Zusammensetzung der mobilen Phase individuell gewählt werden, da sie die Retentionszeiten der zu eluierenden Substanzen beeinflusst. Diese sollten möglichst kurz sein, um sinnvolle Analysenzeiten zu erreichen. Durch einen niedrigen pH-Wert der Fließmittelzusammensetzung werden restliche OH-Gruppen des Säulenmaterials protoniert, um eventuelle nukleophile Wechselwirkungen mit der stationären Phase zurück zu drängen.

Zur Untersuchung der verschiedenen Fertigarzneimittel wurde anfangs eine Fließmittelzusammensetzung einer Methanol-Na₂SO₄-Puffer-Mischung (pH=3) im Verhältnis 5% zu 95% (V/V) gewählt.

Vor der Verwendung muss die mobile Phase durch kurzzeitiges Ultraschallen entgast werden, da Wasser und Alkohole relativ viel Gas lösen können. Gase führen durch Komprimierung zu einer starken Inhomogenität der Fließmittel.

5.1.2.4. Identifizierung der Peaks

Die zu untersuchenden Substanzen ließen sich durch UV-Detektion bei Wellenlängen von 210 und 220 nm erfassen.

Charakteristische Größe einer Substanz ist die Zeit, welche sie zum Durchlaufen der Säule benötigt. Sie wird als Bruttoretentionszeit t_R bezeichnet. Unter Berücksichtigung der für jede Säule spezifischen Totzeit t_0 läßt sich die Nettoretentionszeit t'_R berechnen.

$$t'_R = t_R - t_0$$

Die Totzeit ist die Zeit, welche die mobile Phase benötigt, durch das System zu laufen, d.h. vom Ort der Injektion zum Detektor zu gelangen. t_R ist also abhängig von t_0 , aber auch von der Länge der Trennsäule sowie der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase.

Die Verbindungen wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,6 ml/min mit einer Empfindlichkeit zwischen 0,01 und 1,0/5 sec vermessen.

Die spektroskopische Charakterisierung des gesuchten NP erfolgte mittels

Atomabsorptionsspektroskopie, Massenspektrometrie, IR-Spektroskopie und NMR-Messung.

Als Referenz dienten CBDC, Na₂CBDC sowie Carboplatin.

5.2. Identifizierung der unbekanntem Verunreinigung NP in Carboplatin-Infusionslösungen

5.2.1. Isolierung des Nebenproduktes

Injiziert man eine handelsübliche, für die HPLC auf 0.5 mg/ml verdünnte, Injektionslösung mit einem Carboplatin-Gehalt von 10 mg/ml, erhält man bei einer Fließmittelzusammensetzung Methanol-Na₂SO₄-Puffer 5%:95% (V/V) ein Chromatogramm, wie es in **Abb.5.2** an den Beispielen von **FAM 1** und **FAM 2** dargestellt ist. Die Retentionszeit von Carboplatin beträgt 6.35 min. Bei 3.74 min zeigt sich ein Peak, der deutlich hydrophiler ist und im Falle von **FAM 2** einen Gehalt von 1.61% bezogen auf den Platin(II)-Komplex aufweist. Vermisst man als Vergleich dazu **FAM 1**, zeigt sich das gleiche Bild, allerdings beträgt der Flächenanteil an **NP** nur 0.44%. Dies beruht auf unterschiedlicher Lagerzeit der Fertiglösungen vor der HPLC-Messung. Zusätzliche Peaks von Zersetzungsprodukten zeigten sich bei **FAM 2** in geringer Menge bei 4.47 min, 5.65 min und 8.57 min.

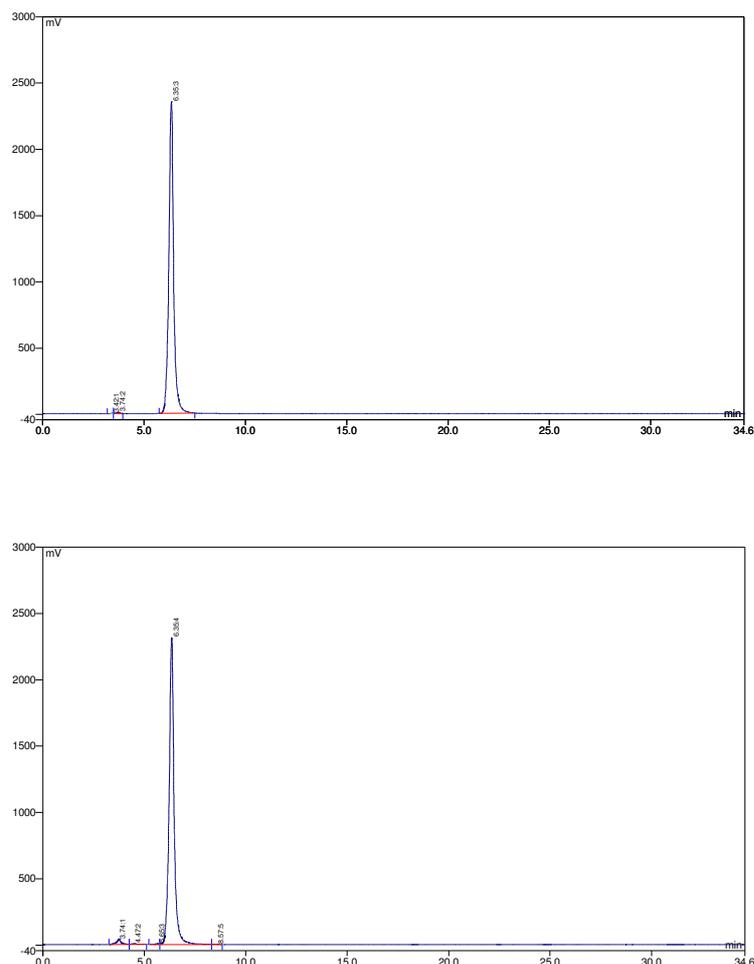


Abb.5.2 Vermessung von **FAM 1** (oben) und **FAM 2** (unten) mit einer t_R von **NP** von 3.74 min

Da Carboplatin und **NP** zwei saubere Peaks mit Basislinientrennung aufwiesen, wurde versucht, das Zersetzungsprodukt zu isolieren. Dazu wurde die gesamte Lösung von **FAM 2** gefriergetrocknet, der in Wasser unlösliche Rückstand von Carboplatin durch Zentrifugation entfernt und das Filtrat in unverdünnter Form mithilfe der HPLC getrennt. Sobald der gesuchte Peak auftrat, wurde das Eluat aufgefangen. Zur Kontrolle einer sauberen Isolierung von **NP** wurde dieses dann erneut injiziert.

Als Fließmittel diente in diesem Fall reines Wasser, um eine anschließende Gefriertrocknung durchführen zu können.

Als Vergleich dazu wurde CBDC allein vermessen, um feststellen zu können, ob auch hier das gesuchte Zersetzungsprodukt auftritt. CBDC eluiert mit $t_R=30.33$ min deutlich später als Carboplatin (s. **Abb.5.3**). Das Natriumsalz der Säure, Na_2CBDC , dagegen bei 30.53 min (**Abb.5.4**).

Da CBDC eine zweiprotonige Säure mit pK_s -Werten von $\text{pK}_{s1}=3.01$ und $\text{pK}_{s2}=5.55$ ist, zeigt sich eine starke pH-Abhängigkeit im Hinblick auf die Peakform. Bei niedrigem pH von ca. 2-3 wurde ein Einfachpeak erhalten, bei pH-Werten größer als 4.5 sind Doppelpeaks zu erkennen, die mit steigendem pH immer breiter werden (s. **Abb.5.5**).

Die fertigen Infusionslösungen wurden ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und dem Aussehen der Peaks hin untersucht. Dabei konnte keine Änderung der Peakform des Nebenproduktespektrums festgestellt werden.

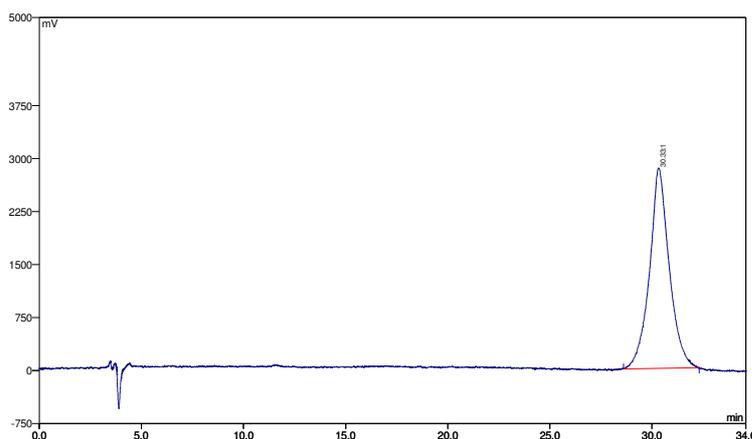


Abb.5.3 HPLC-Chromatogramm der CBDC mit $t_R = 30.33$ min

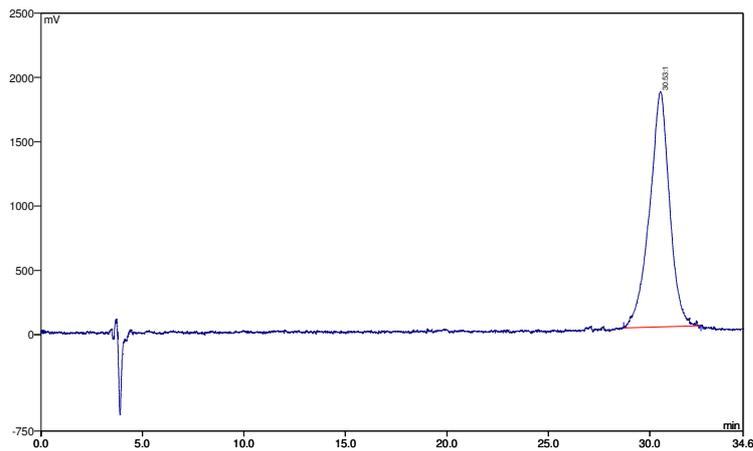


Abb.5.4 HPLC-Chromatogramm von Na_2CBDC mit $t_R = 30.53$ min

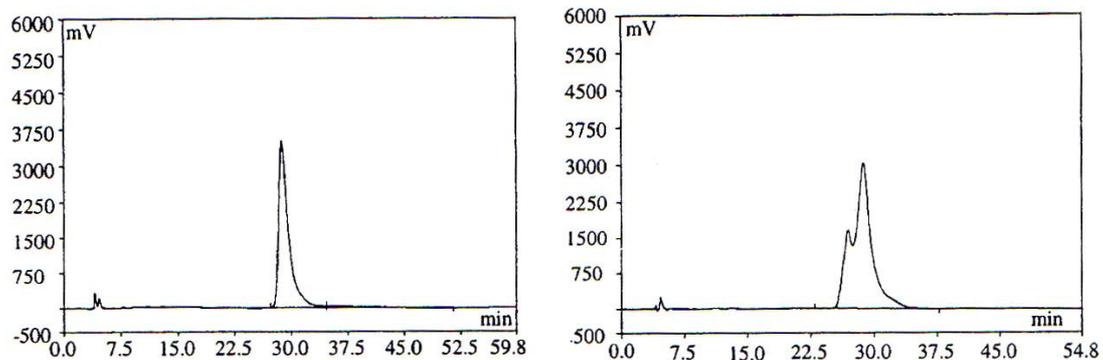


Abb.5.5 pH-Abhängigkeit des CBDC-Peaks: Einfachpeak bei pH = 2.63 (links), Doppelpeak bei pH = 5.50 (rechts)

Die Trennung über die HPLC brachte allerdings nicht die gewünschten Ergebnisse. **NP** konnte nicht in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden.

Daher wurde für eine bessere Auftrennung der gefriergetrockneten Fertigarzneimittel auf die Mitteldruckanlage zurückgegriffen. Ein bedeutender Vorteil der MPLC (*Middle pressure liquid chromatography*) ist hier die Injektion größerer Substanzmengen. Niedrigere Drücke als bei der HPLC führen bei dieser Methode zu einer langsameren Elution und damit zu besseren Voraussetzungen für eine Isolierung einzelner Peaks.

Es wurde reines Wasser als Laufmittel und ebenfalls eine RP18-Säule verwendet.

Anschließendes Vermessen mit der HPLC diente der Überprüfung einer sauberen, erfolgreichen Trennung. Gelang dies, wurde das gesammelte Eluat gefriergetrocknet und analytisch durch IR, MS- und NMR-Spektroskopie untersucht.

Die Isolierung erbrachte eine ausreichende Reinheit zwischen 90-100%, und aus beiden Infusionslösungen, **FAM 1** und **FAM 2**, zeigte das gesuchte Nebenprodukt identische Retentionszeiten, was **Abb.5.6** verdeutlicht.

In **Abb.5.7** ist ein HPLC-Chromatogramm-3d-Plot dargestellt, der solch eine versuchte Trennung an der Mitteldruckanlage mit nachfolgender HPLC-Messung darstellt.

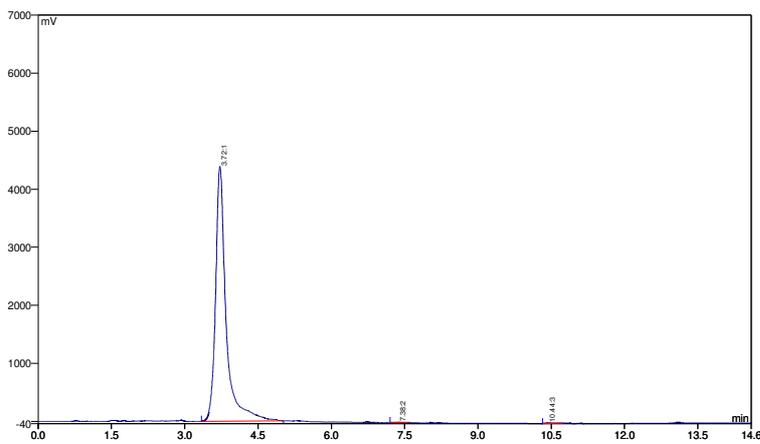
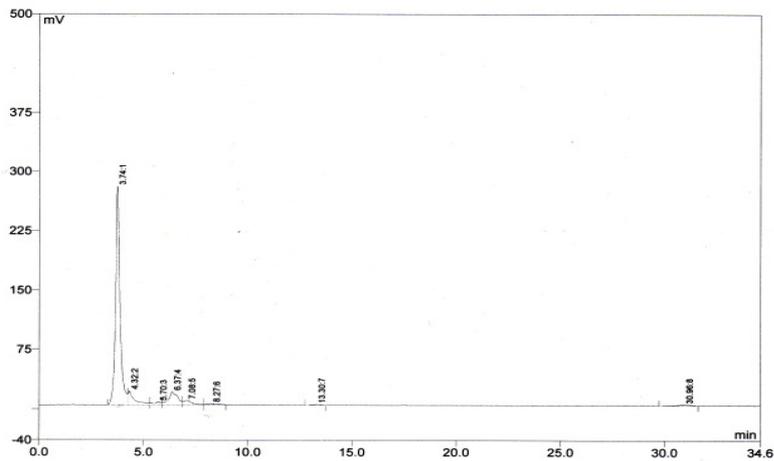


Abb.5.6 Isoliertes Nebenprodukt aus **FAM 1** (oben) und **FAM 2** (unten), erhalten nach Trennung an der MPLC

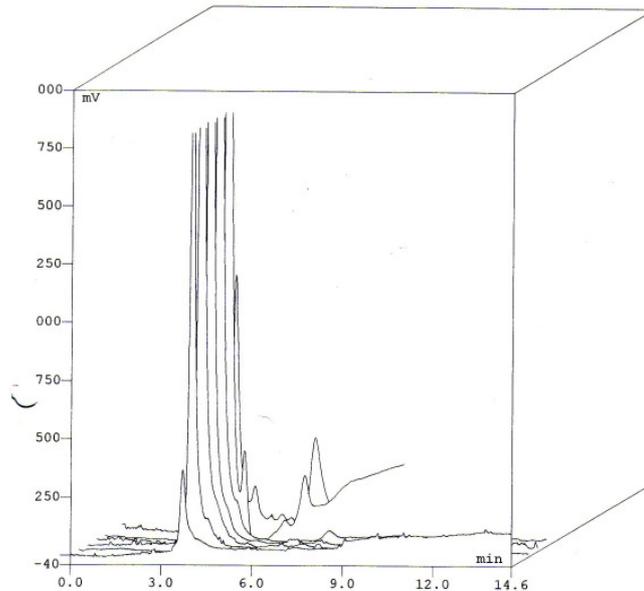


Abb.5.7 Chromatogramm 3d-Plot einer Trennung nach HPLC-Messung mit erfolgreicher Isolierung von NP

Um größere Mengen an **NP** erhalten zu können, wurde in einem anschließenden Schritt das Nebenprodukt angereichert. Dazu wurden erneut Fertiginfusionslösungen gefriergetrocknet und der Rückstand in 1ml Wasser gelöst. So war eine Erhöhung von **NP** von bis zu knapp 34% bezogen auf Carboplatin möglich (s. **Abb.5.8**). In den Trennungen an der MPLC konnten nun deutlich höhere Ausbeuten erzielt werden.

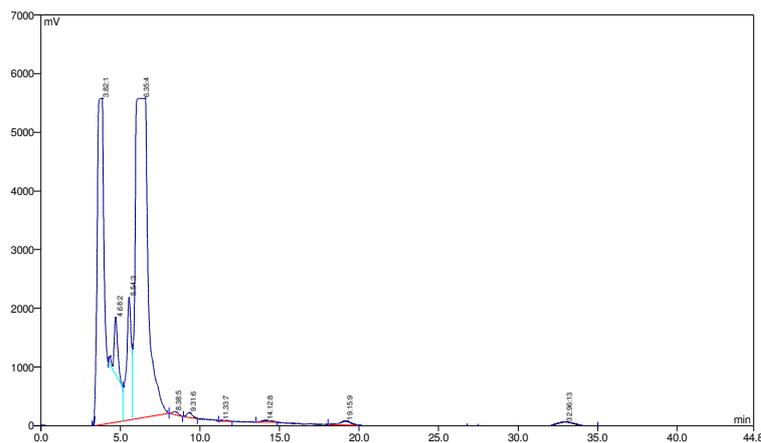


Abb.5.8 Anreicherung eines FAM mit Nebenprodukt nach Gefrier Trocknung und Zentrifugation

5.2.2. Spektroskopische Charakterisierung des Nebenproduktes

5.2.2.1. Atomabsorptionsspektroskopie, AAS

Bei der Hydrolyse von Carboplatin entsteht im zweiten Reaktionsschritt Diamminäquaplatin(II) unter Freisetzung von Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure. In einem weiteren, pH-abhängigen Reaktionsschritt können Hydroxy- bzw. Dihydroxyplatin(II)-Verbindungen entstehen, welche hydrophiler als die Ausgangsverbindung wären. Solche hydrophileren Substanzen müssten im HPLC-Chromatogramm demnach früher eluieren. Um nachzuweisen, ob **NP** eine dieser Verbindungen ist, wurde die AAS herangezogen. Mit ihrer Hilfe könnte dann die enthaltene Platinmenge bestimmt werden.

Der ermittelte Gehalt lag unter 3%, so dass ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei **NP** um einen Platinkomplex handelt.

5.2.2.2. Massenspektrometrie

Ebenfalls ließ sich kein Platin bei der FAB-Massenspektrometrie finden. Neben den Matrix-Peaks (Glycerin-Methanol-DMSO) bei $M/z = 92$ und 78 zeigte sich ein mit CBDC identischer Molpeak bei $M/z = 143$ sowie eine typische Fragmentierung einer CO_2 -Abspaltung aus diesem Molekül bei $M/z = 99$ resultierend aus $[\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2]^-$. Solch ein CO_2 -Verlust ist bei der Massenspektrometrie typisch für Carbonsäuren.

5.2.2.3. Infrarot-Spektroskopie

In den IR-Spektren von CBDC, Na_2CBDC und Carboplatin finden sich charakteristische Banden, aus denen sich strukturelle Eigenschaften für das gesuchte Nebenprodukt ableiten lassen:

CBDC: Die freie Carboxylgruppe ist erkennbar durch die breite OH-Valenzschwingung bei 3500 bis 2400 cm^{-1} . Die Valenzschwingung der Carbonylgruppe liegt bei $\nu = 1699\text{ cm}^{-1}$.

Na_2CBDC : Das Na-Salz zeigt keine verbreiterte OH-Schwingung. Die Schwingung der C=O-Gruppe verschiebt sich zu niedrigeren Wellenzahlen: 1577 cm^{-1} .

Carboplatin: Durch die chelatgebundene Dicarbonsäure CBDC ist ebenfalls keine OH-Valenzschwingung mehr vorhanden. Die Carbonylgruppe findet sich bei 1637 cm^{-1} .

Nebenprodukt NP: Die isolierte Verbindung zeigt eine scharfe OH-Bande bei $\nu = 3426\text{ cm}^{-1}$ und $\nu(\text{C}=\text{O})$ bei 1635 und 1580 cm^{-1} . Es existiert keine für Carbonsäuren typische breite OH-Schwingung. Zusätzlich sind einige Banden im Fingerprintbereich bei $\nu = 1371, 1312, 1130$ und 1082 cm^{-1} erkennbar.

Daraus lässt sich ableiten, dass die gesuchte Verbindung durchaus ein Isomeres der Cyclobutan-1,1-dicarbonsäure sein kann. CBDC selbst ist auszuschließen, da diese im HPLC-Chromatogramm eine deutlich spätere Retentionszeit als **NP** besitzt.

5.2.3. Strukturvorschlag für das Nebenprodukt NP

Die Fragmentierung in der FAB-Massenspektrometrie und ein Molpeak mit $M/z = 99$ deutet auf eine CO_2 -Abspaltung aus NP hin.

Ein analoges Fragmentierungsmuster fand man für CBDCA. Demnach könnte das Zersetzungsprodukt durchaus ein Isomeres dieser Dicarbonsäure sein. Geht man von einem Ab- bzw. Umbau von Carboplatin, katalysiert durch geringe Restmengen an Platin, aus, könnte folgende Isomerisierung ablaufen (s. **Abb.5.9**):

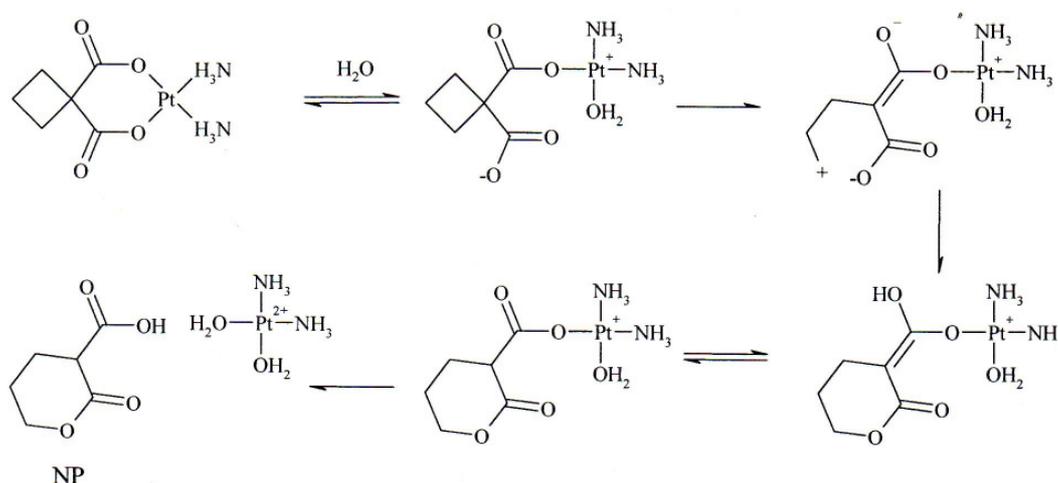


Abb.5.9 Mögliche Umlagerung von Carboplatin

Das positiv geladene Platin reduziert demzufolge die Elektronendichte an einer Carboxylgruppe so stark, dass es zur Ausbildung einer Enolat/Enol-Struktur kommt, welche die Umlagerung ermöglicht. Die hohe Ringspannung des Cyclobutanringes scheint ebenfalls in diese Richtung zu steuern.

Daraus ließe sich die 2-Oxo-tetrahydropyran-3-carbonsäure, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$, mit einer mit CBDC identischen molaren Masse von 144 g/mol ableiten.

Im Folgenden wurde versucht, diese postulierte Substanz durch Synthese zugänglich zu machen und als Vergleich mit dem Nebenprodukt heranzuziehen. Als Edukt diente hierbei δ -Valerolacton, das unter Kühlung mit Natriummethanolat, einer starken Base und Nukleophil, umgesetzt wurde. Anschließend erfolgte die Reaktion mit Diethylcarbonat zum 2-Oxo-tetrahydropyran-3-carbonsäureethylester. Nach Reinigung durch fraktionierte Destillation

wurde eine Esterspaltung im Alkalischen mit KOH/Ethanol durchgeführt. Das Kaliumsalz der erhaltenen Carbonsäure, **Syn-NP**, ließ sich als weißer Feststoff isolieren. Charakterisiert wurde es mittels MS-, IR- und NMR-Spektroskopie. Die Reaktionsabfolge ist in **Abb.5.10** dargestellt.

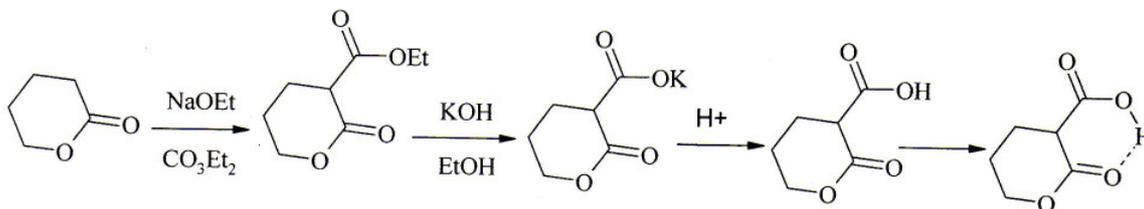


Abb.5.10 Synthese des postulierten Nebenproduktes, **Syn-NP**

Eine Vermessung von **Syn-NP** unter identischen HPLC-Bedingungen wie bei der Charakterisierung von **NP** erbrachte eine Retentionszeit bei 3.64 min. **Syn-NP** ist somit deutlich hydrophiler als CBDC (s. **Abb.5.11**).

Das postulierte Nebenprodukt **Syn-NP** sollte schließlich in die freie Säure überführt und an der semipräparativen RP18-Säule mittels MPLC vermessen werden. Hierzu wurden 50mg Salz in 2ml Wasser gelöst und mit 0.1N HCl auf pH=2 gebracht. Im HPLC-Chromatogramm dieser Lösung sind zwei Peaks bei 3.42 und 3.74 min zu beobachten (**Abb.5.12**). Letzterer entspricht hinsichtlich der Retentionszeit dem gesuchten Nebenprodukt **NP** aus den Carboplatin-Infusionslösungen.

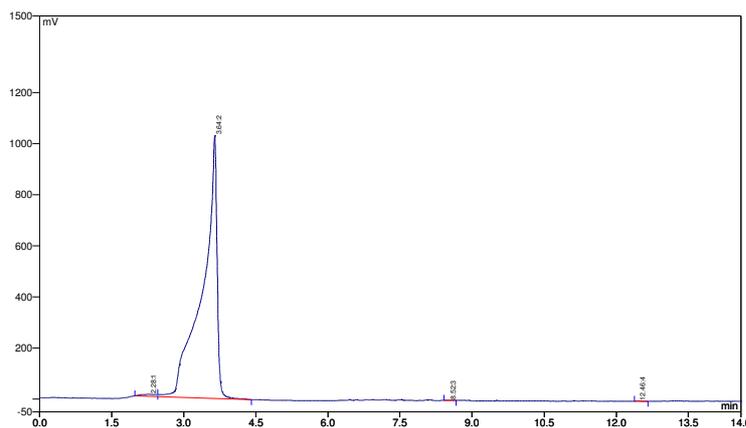


Abb.5.11 **Syn-NP** als Kaliumsalz

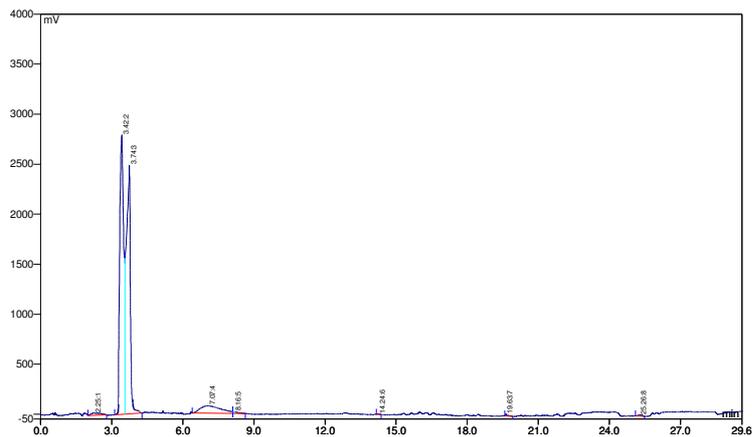


Abb.5.11 Syn-NP bei Messung einer Lösung mit pH=2

Es wurde versucht, die beiden Verbindungen durch MPLC mit Wasser als Elutionsmittel zu trennen. Zunächst ließ sich keine vollständige Aufspaltung erreichen (s. **Abb.5.13**). Es erscheint in der ersten Fraktion zu 86% ein Peak mit einer Retentionszeit von 3.74 min, ein zweiter bei 3.96 min, der in den folgenden Fraktionen dann vorherrschend ist. Vermutlich entstehen aus dem reinen Kaliumsalz **Syn-NP** bei pH=2-3 zwei Produkte, die sich in einem Gleichgewicht befinden, wobei der Peak bei 3.74 min mit der gesuchten Verbindung **NP** identisch zu sein scheint.

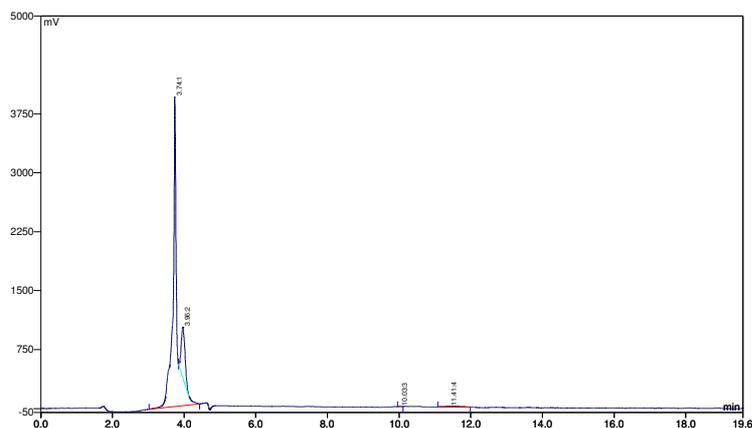


Abb.5.13 Getrennte erste Fraktion des Kaliumsalzes **Syn-NP** bei pH=2-3

Um das Ergebnis zu optimieren und die freie Säure erhalten zu können, wurde die MPLC-Trennung mehrmals durchgeführt. Parallel dazu erfolgte die Isolierung des Nebenproduktes aus den Fertigarzneimitteln unter identischen Bedingungen bei pH=2-3. Die getrennten Fraktionen wurden erneut zur Überprüfung durch HPLC vermessen, geeignete Fraktionen

gefriergetrocknet und analytisch charakterisiert. Es ließ sich wiederholt ein zweimaliges Ansteigen der Absorptionen an der MPLC beobachten, was auf zwei unterschiedliche Substanzen hindeutet. Die gesammelten Proben waren offensichtlich in zwei Verbindungen aufspaltbar, sowohl aus **Syn-NP** als auch aus den fertigen Infusionslösungen. Beide Formen schienen während der Trennung im Gleichgewicht vorzuliegen. **Abb.5.14** zeigt eine solche Aufspaltung. Das Eluat entspricht dem in **Abb.5.13** dargestellten Aufspaltungsverhältnis in Säure und Salz aus dem Kaliumsalz, **Syn-NP**.

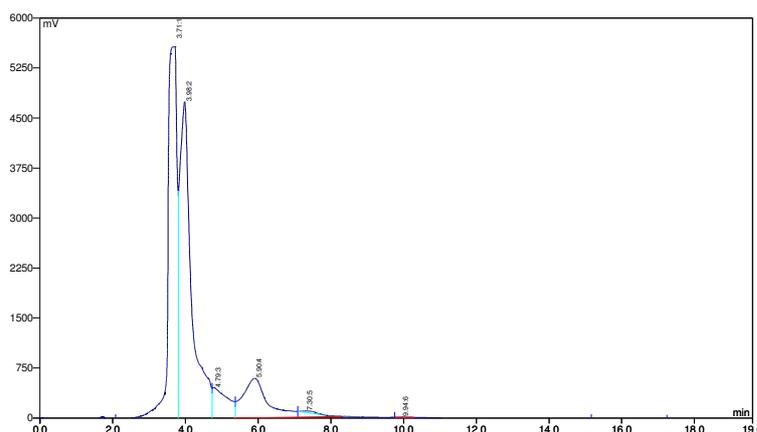


Abb.5.14 Aufspaltung von Fraktion 2 in Salz und Säure, isoliert aus **FAM 2**

Die IR-Spektren von **Syn-NP** zeigten identische Valenzschwingungen besonders in der ersten Fraktion mit Banden der freien Säure bei $\nu = 1633$ und 1629 cm^{-1} sowie Schwingungen für das Kaliumsalz $\nu = 1733 \text{ cm}^{-1}$. Ferner fanden sich Banden im Fingerprintbereich bei 1073 cm^{-1} und Banden bei 3429 und 3424 cm^{-1} . Eine Schwingung bei 1633 cm^{-1} könnte auf eine intramolekulare H-Brücke zwischen der Carboxylgruppe und dem Carbonylsauerstoffs des Valerolaktons hindeuten. Diese H-Brücken schienen sich im Fall **Syn-NP** erst bei bzw. nach Chromatographie und anschließender Gefriertrocknung einzustellen. **Syn-NP** aus Fraktion 1 kann eindeutig der Struktur in **Abb. 5.10** zugeordnet werden. Ein Vergleich der Spektren des synthetisierten Kaliumsalzes **Syn-NP** und den getrennten Fraktionen **Syn-NP-Fr.2/3** brachten große Übereinstimmung. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Fraktionen 2 und 3 um das Carboxylat von **Syn-NP** handelt.

Tab.5.1 zeigt eine solche Gegenüberstellung der gesammelten Fraktionen und **Abb.5.15** ein Beispiel eines IR-Spektrums.

Erkennbar ist die gute Vergleichbarkeit der essentiellen Banden.

	C=O		Fingerprintbereich				
Syn Fr. 1	1633			1383			1073
Syn Fr.2		1578	1417		1559		1064
Syn Fr.3		1576	1417		1359		1064
FAM Fr.1	1628	1587	1417	1383	1362		1074
FAM Fr.2	1643	1586		1374		1309	1095
FAM Fr.3	1646	1595		1374		1313	1063
FAM Fr.4	1635	1577		1383		1338	1079

Tab.5.1 Charakteristische IR-Banden für Kaliumsalz und Fertigarzneimittel aus den einzelnen Fraktionen

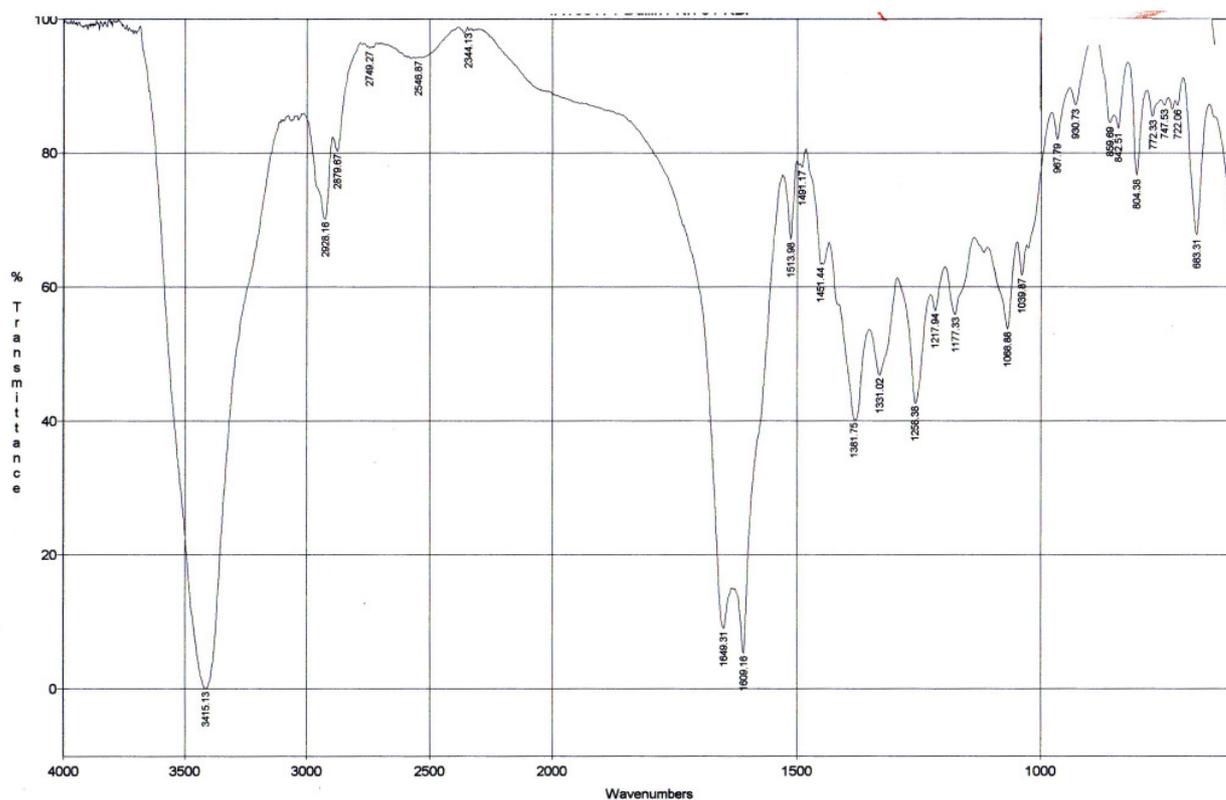


Abb.5.15 IR-Spektrum der freien Säure, isoliert aus dem Kaliumsalz

Das Verhältnis von Salz und Säure zueinander in den IR-Spektren entspricht in etwa den auf der HPLC gemessenen Peaks mit unzureichender Basislinientrennung.

Da eine ausreichende Trennung der detektierbaren Peaks mit der verwendeten mobilen Phase von Methanol- Na_2SO_4 -Puffer nicht möglich war, wurde eine Variation des Fließmittels durchgeführt.

Es wurden das postulierte Nebenprodukt **Syn-NP** sowie die daraus isolierten Fraktionen auf diese Weise erneut überprüft.

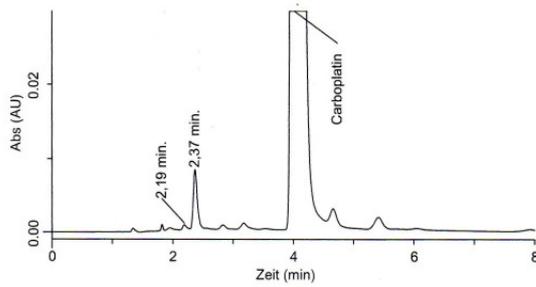
Die Detektion erfolgte ebenfalls mittels UV-Detektor bei 210 nm. Die Fließgeschwindigkeit wurde von 0,6 ml/min auf 1,0 ml/min erhöht. Als Fließmittel selbst dienten 100% Kaliumdihydrogenphosphatpuffer mit Natriumheptansulfonsäure und einem pH von 3.55 sowie zur Isolierung entweder 100% Wasser oder Methanol-Wasser-Mischungen von 10%: 90% (V/V) und 20%: 80% (V/V).

5.3. Messergebnisse mit einem Phosphat/Sulfonsäure-Puffer

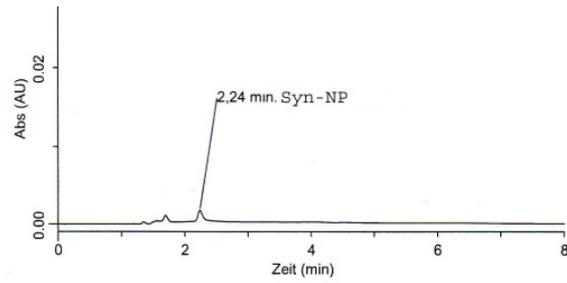
Die Ergebnisse der Messung mit dem Methanol- Na_2SO_4 -Puffer-Gemisch konnte leider nicht bestätigt werden. Es wurden verschiedene Prüflösungen (*a*) und *b*), s. Kap.9) hergestellt, welche dann mit der HPLC vermessen wurden. In Fall a) diente ein KH_2PO_4 -Puffer als mobile Phase, in Fall b) ein NaH_2PO_4 -Puffer, jeweils mit Zusatz von NaHeptansulfonsäure. Der pH-Wert betrug jeweils 3.55.

Es wurden sowohl verschieden konzentrierte Lösungen als auch solche mit verschiedenen Lagerungszeiten vermessen.

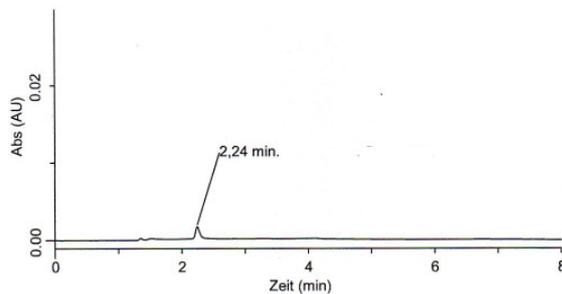
Das Vermessen der Prüflösungen a) und b) zeigte z.T. unterschiedliche Ergebnisse. Bei a) betrug die Retentionszeit des Nebenproduktes NP in der Carboplatin-Infusionslösung 2.37 min, **Syn-NP** eluierte sowohl in Wasser als auch in mobiler Phase bei 2.24 min. Im Aufspikeversuch allerdings (Chromatogramm 4) wurde neben NP bei 2.34 min eine Zeit von 2.19 min für **Syn-NP** erhalten, was dem kleineren, hydrophileren Peak von 2.19 min, gemessen im Fertigarzneimittel, entsprechen würde. Der Aufspikeversuch bestätigte dies, da die Fläche dieser Verunreinigung entsprechend der zugesetzten Menge zunahm. **Syn-NP** eluierte demnach unabhängig vom pH-Wert der Prüflösung ca. 0.15 min vor dem Hauptteil des Nebenproduktes NP. Der Flächengehalt liegt bei 0.41% bezogen auf Carboplatin. Diese Ergebnisse sind in **Abb.5.16** verdeutlicht.



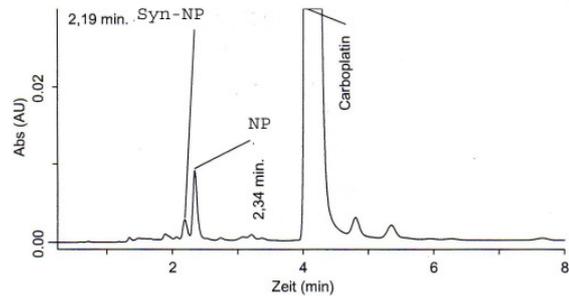
1. FAM 25°C, 7 Monate
Messkonzentration 1.0 mg/ml



2. Syn-NP in H₂O
Messkonzentration 0.01 mg/ml



3. Syn-NP, in KH₂PO₄-Puffer
Messkonzentration 0.01 mg/ml



4. Aufspikeversuch: FAM 25°C, 7 Monate
mit 1.5% Syn-NP

Abb.5.16 HPLC-Chromatogramme mit **Syn-NP** und Fertigarzneimittel a)

Betrachtet man demgegenüber die Prüflösungen b), zeigten Chromatogramm 1 und 2 bei unterschiedlichen Verdünnungen keine identischen Retentionszeiten. In der Konzentration 2.1 mg/ml besaß **Syn-NP** zwei Peakmaxima bei $t_R = 1.76$ und 1.81 min (Chromatogramm 1). In einer Konzentration von 0,15 mg/ml (Chromatogramm 2) verschob sich t_R allerdings zu 1.92 min., wobei die Reproduzierbarkeit fraglich zu sein scheint. Die Verbindung eluierte demnach früher als bei den Prüflösungen a). Eventuell liegt es an der Verwendung des Natrium- anstelle des Kaliumsalzes für die Herstellung des Puffers. Es könnte ein Austausch in dem Sinne stattfinden, dass aus **Syn-NP** das entsprechende Natriumsalz entsteht, welches evtl. bei früheren Retentionszeiten erscheint. Das Nebenprodukt aus Carboplatin-Infusionslösungen wurde allerdings ebenfalls früher detektiert und variierte je nach Lagerungszeit. Nach 24 Monaten bei 25°C zeigte sich die gesuchte Substanz bei $t_R = 2.17$ min (Chromatogramm 3), nach 36 Monaten bei $t_R = 2.16$ min (Chromatogramm 4) (**Abb.5.17**).

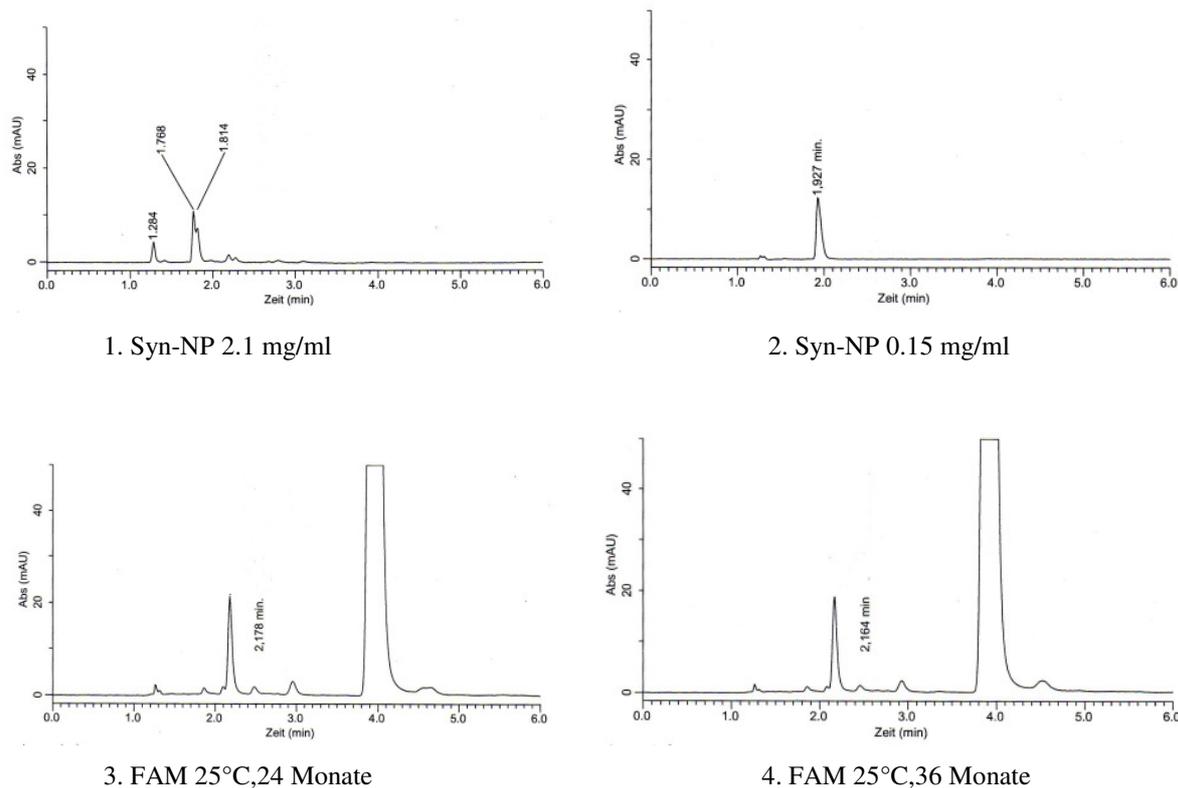


Abb.5.17 HPLC-Chromatogramme mit **Syn-NP** und Fertigarzneimittel b)

Nach diesen Ergebnissen muss demnach ausgeschlossen werden, dass es sich bei **Syn-NP** unter den neu gewählten Bedingungen um die gesuchte Verunreinigung NP handelt.

Diese variierten Messbedingungen sollten nun zu einer erneuten Isolierung und Charakterisierung von **NP** verwendet werden.

5.3.1. Isolierung des Nebenproduktes NP und Charakterisierung mit einem KH_2PO_4 -Puffer/NaHeptansulfonsäure-Fließmittel

Die Verwendung eines Eluenten mit hohem Pufferanteil erfordert aufgrund des deutlichen Wassergehalts eine gut konditionierte Säule.

Um die Untersuchung optimal zu gestalten, wurde eine neue HPLC-Säule plus Vorsäule verwendet, um die Reproduzierbarkeit zu erhöhen. Die alte Säule wurde unter Methanol-Wasser 50%:50% (V/V) gelagert, die neue unter Aceton-Wasser 70%:30% (V/V).

Durch längere Aufbewahrung legen sich die C_{18} -Ketten an das Packungsmaterial an und besitzen eine höhere Wechselwirkung mit den zu vermessenden Substanzen als eine alte Säule mit eventuell zusammengebrochener Phase. Bei diesem *phase collapsing* lassen sich die Alkylketten auch durch hohe Anteile organischer Lösungsmittel nicht wieder aufrichten, eine

Trennung erfolgt nur ungenügend. Die Ermittlung von t_0 kann durch Injektion von Harnstoff erfolgen, da dieser von der Säule nicht zurückgehalten wird [146]. Dessen Retentionszeit liegt zwischen 1.70 und 1.80 min.

Zur Kalibrierung wurde die Säule ca. zwei Stunden von Aceton-Wasser 70%:30% zu 100% Wasser gespült, die Basislinie wurde anschließend mit Pufferlösung eingestellt.

Die Vermessung erfolgte analog 5.3 mit einem Kaliumdihydrogenphosphat/Natrium-Heptansulfonsäure-Puffer mit eingestelltem pH-Wert von 3.55.

Anfangs wurden erneut **Syn-NP** sowie Carboplatin-Infusionslösungen an der HPLC vermessen. Hierzu wurden einige Fertigarzneimittel mit längeren Lagerzeiten herangezogen, um erhöhte Mengen an Nebenprodukt erhalten zu können. Die Lösungen wurden mit Wasser verdünnt:

<u>Fertigarzneimittel:</u>	<u>Abbau in %/bezogen auf Carboplatin:</u>
a) Ribocarbo L, 50 mg (Verfall 1995)	3.98% / 0.36%.
b) Carboplat, 50 mg (Verfall 1999)	3.67% / 0.83%
c) Pharmalink (Verfall 2002)	3.03% / 0.41%
d) Cycloplatin, 150 mg (Verfall 1999)	4.80% / 0.93%

Man erhielt ein Nebenproduktespektrum mit Peaks mit Retentionszeiten von 2.59, 2.63, 2.83 und 3.85 min. Carboplatin eluierte nach 6.56 min. Interessanterweise hatte nicht das FAM mit der längsten Lagerzeit den höchsten Anteil an Zersetzungsprodukt. In Cycloplatin[®]-Lösungen ist vom Hersteller ein stabilisierender Zusatz von Cyclobutan-1,1-dicarbonensäure vorgenommen worden, ebenso in Ribocarbo L[®]-Lösungen. Wie aus früheren Studien bekannt ist [109], erweist sich solch ein Zusatz als nicht geeignet, sondern wirkt sich nachteilig auf die Stabilität aus. Das gemessene Ergebnis ist daher nicht verwunderlich.

Syn-NP zeigte demgegenüber eine Retentionszeit von 2.22 min. Bei einem pH-Wert von 2.3 bei Verwendung des Phosphatpuffers verschob sich t_R auf 2.58 min. Unter den abgeänderten Bedingungen scheint nicht mehr das mit dem Na₂SO₄-Puffer erhaltene vergleichbare Ergebnis mit $t_R = 3.42, 3.74$ und 3.96 min für Syn-NP vorzuliegen.

Erneut wurde die MPLC zur Identifizierung von **NP** aus den fertigen Lösungen herangezogen. Eine semipräparative RP18-Säule ließ sich mit der HPLC-Anlage in der Art verknüpfen, dass die Trennungen im Chromatogramm aufgezeichnet werden konnten.

Methanol-Mischung von 80%:20% (V/V). Die Retentionszeiten des Na^+ -Monoanions lagen bei 2.94 min (s. **Abb.5.19**), die des FAM nun bei 2.68, 2.73 und 2.98 min.

Abschließend erfolgten Trennungen des in gleicher Weise hergestellten K^+ -Monoanions, des Na^+ -Dianions sowie der reinen CBDC. Bei allen vier Lösungen erschienen zwei Peaks sowohl nach ungefähr 80 min als auch nach etwa 300 min. Um zu untersuchen, ob zwischen diesen beiden ein Gleichgewicht existiert, wurde nur Peak 1 aufgetragen, was zu keinem befriedigenden Ergebnis führte. Peak 2 erschien nach 300 min nicht mehr. Die Retentionszeiten zeigten sich unabhängig von der Ausgangslösung nahezu identisch und lagen zwischen 2.86 und 2.92 min. Sie sind somit nicht mit dem FAM äquivalent.

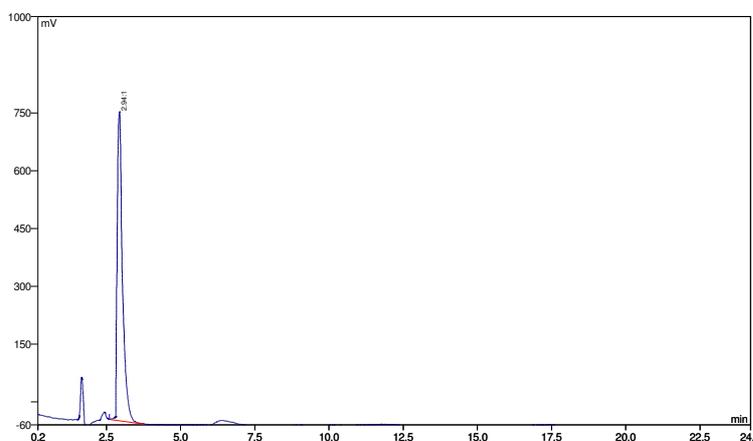


Abb.5.19 Isolierter Peak mit $t_R = 2.94$ min des Na^+ -Monoanions der CBDC

Ein Vergleich der erhaltenen IR-Spektren brachte wenig Übereinstimmung. Eine relativ breite Valenzschwingung für eine OH-Gruppe bei $3500 - 2400 \text{ cm}^{-1}$ besaßen alle Verbindungen. Die C=O-Bande war am besten erkennbar beim Na^+ - und K^+ -Monoanion der CBDC sowie dem FAM bei $\nu = 1630$ und 1631 cm^{-1} . Im Fingerprintbereich ließen sich Valenzschwingungen für die Monoanionen und das FAM besonders bei $\nu = 1081, 1082$ und 1084 cm^{-1} finden.

Anhand dieser Untersuchungen kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei der unbekanntem Verbindung um CBDC oder davon abgeleitete Anionen handelt.

Interessanterweise wurde mittels MS/FAB-Spektrometrie erneut eine molare Masse von 144 g/mol ermittelt. Eine Isomerisierung des Carboplatins durch Abbau- oder Umbaureaktionen wäre eventuell doch nicht auszuschließen, allerdings nicht analog **Abb.5.9**, wie es Syn-NP entsprach.

In der Literatur finden sich zahlreiche Verbindungen mit identischer Masse, wobei aber keine Hinweise auf eventuelle Umlagerungen, möglicherweise katalysiert durch Reste von Platin, gefunden werden konnten, die im Zusammenhang mit der CBDC stehen könnten.

Chelatbildende Eigenschaften von Monoanionen wie Na^+ und K^+ , wie sie beim Mg^{2+} oder Cu^{2+} mit EDTA (=Ethyldiamintetraessigsäure) als Komplexbildner vorhanden sind, sind nicht bekannt.

Wegen geringer im FAM enthaltener Mengen und der notwendigen relativ schwierigen Reinigung nach der Isolierung war ein Strukturvorschlag leider nicht eindeutig zu beweisen. Möglicherweise ist die Substanz **NP** im Eluat hydrolyseempfindlich.

Ob der verwendete KH_2PO_4 -Puffer eine Auswirkung auf die Auftrennung hat, bleibt zu untersuchen. Ein Phosphatpuffer könnte sich in diesem Fall für Platinverbindungen als ungünstig erweisen, da er eine Eigenabsorption bei 220nm aufweist. Zudem ist eine Reaktion mit den Komplexen möglich [111]. Diese Addukte können eine quantitative Bestimmung unmöglich machen und durch zusätzlich auftretende Peaks ein verfälschtes Nebenprodukteprofil vortäuschen. Auch ist eine durch Verschleiß verursachte Pumpenbelastung nicht zu vernachlässigen. Solch ein Verschleiß würde zu schlecht reproduzierbaren Retentionszeiten führen.

Aufgrund der vorliegenden interessanten Ergebnisse wären fortführende Untersuchungen hinsichtlich des Nebenproduktes NP von Relevanz.

5.4. Zusammenfassung

- Es wurden gebrauchsfertige Carboplatin-Infusionslösungen mit unterschiedlichen Lagerungszeiten mithilfe der HPLC untersucht. Es zeigte sich ein Abbau der Ausgangsverbindung zwischen 0.44 und 4.80%. In allen Fällen war ein hydrophilerer Peak mit einer Retentionszeit $t_R = 3.74$ min gegenüber einer t_R von Carboplatin bei 6.35 min detektierbar. Diese unbekannte Verbindung **NP** sollte näher charakterisiert werden.
- Die Untersuchungen wurden mit zwei Fließmittelgemischen durchgeführt: einer Methanol- Na_2SO_4 -Puffer-Lösung 5%:95% (V/V) und KH_2PO_4 /NaHeptansulfonsäure 100%. Daraus ergaben sich reproduzierbare Retentionszeiten der zu untersuchenden Peaks.
- Eine Isolierung von **NP** geschah mit einer semipräparativen RP18-Säule an einer MPLC-Anlage. Bei einer analytischen Charakterisierung ließ sich bei **NP** kein Platingehalt nachweisen. In IR-Spektren waren Valenzschwingungen für OH- und C=O-Gruppen zu erkennen.
- Als mögliches Isomeres der CBDC ließ sich 2-Oxo-tetrahydropyran-3-carbonsäure mit der molaren Masse von 144 und der Summenformel $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_4$ synthetisieren. Diese Verbindung **Syn-NP** zeigte in saurer Lösung zwei anscheinend miteinander im Gleichgewicht vorliegende Peaks mit $t_R = 3.74$ und 3.96 min. Diese Aufspaltung war auch im Fertigarzneimittel unter identischen Messbedingungen zu beobachten und zeigte außerdem Übereinstimmung im IR-Spektrum mit Banden für freie Säure und dem entsprechenden Salz.
- Bei Verwendung des KH_2PO_4 -Puffers war jedoch kein übereinstimmendes Ergebnis im Hinblick auf die Retentionszeit von **Syn-Np** und **NP** mit dem der Messungen des Na_2SO_4 -Puffers zu erhalten. Sowohl für das Fertigarzneimittel mit **NP** als auch für **Syn-NP** ließen sich keine identischen Retentionszeiten beobachten. Nach einer Isolierung von **NP** über die MPLC traten Peaks bei $t_R = 2.83$ min und beim postulierten Nebenprodukt **Syn-NP** bei $t_R = 2.22$ min sowie in angesäuerter Lösung bei $t_R = 2.58$ min auf. Ein möglicherweise entstehendes Na^+ -Monoanion der CBDC eluierte nach 2.94 min.
- Im IR zeigten sich sowohl im FAM als auch im Monoanion identische Banden bei $\nu = 1630$ und 1631 cm^{-1} sowie im Fingerprintbereich bei 1081 und 1084 cm^{-1} .

- Diese Ergebnisse lassen schlussfolgernd noch keine eindeutige Charakterisierung des gesuchten Nebenproduktes **NP** aus Carboplatin-Infusionslösungen zu. Weitere Untersuchungen wären daher von großem Interesse.