

**Stabilität von Atropinsulfat-
Injektionslösungen in unterschiedlichen
Primärpackmitteln**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Sandra Jüttemeyer
aus Hanau

2011

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2009 bis September 2011 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Johannes Peter Surmann vom Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Laborabteilung IV – Pharmazie, Laborgruppe Arzneimitteluntersuchung, des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr (ZInstSanBw) München angefertigt und vor Ort von Herrn Oberstapotheker Dr. Thomas Zimmermann betreut.

1. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Peter Surmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber

Disputation am: 21.02.2012

Meinem Mann

Meinen Eltern

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Johannes Peter Surmann für die Annahme des Promotionsthemas, die fachliche Betreuung der Arbeit und die wertvolle wissenschaftliche Diskussion, die auch über die Entfernung zwischen München und Berlin problemlos möglich war.

Herrn Professor Dr. Gerhard Wolber danke ich für die freundliche Übernahme und Erstellung des zweiten Gutachtens.

Ein großer Dank geht an Herrn Oberstapotheker Dr. Thomas Zimmermann für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Bereitstellung der Laborkapazitäten, Geräte und Materialien am ZInstSanBw München, Laborabteilung IV. Vielen Dank für die engagierte Betreuung und unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Oberstapotheker Klaus Schad, der es mir als Dienststellenleiter am ZInstSanBw München ermöglichte, die Arbeit dort durchzuführen.

Mein herzlicher Dank geht an die Mitarbeiter der Laborabteilung IV des ZInstSanBw München, die bei Problemen immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonders danken möchte ich Herrn Oberfeldwebel Thomas Manthei für die Unterstützung und das Troubleshooting im Bereich der HPLC-Analytik von Atropin, Herrn Oberfeldwebel Tristan Bechmann für die tatkräftige Hilfe in Zusammenhang mit der Stresslagerung und Frau Adele Thomasberger für die anregenden Gespräche über ihre jahrelange Erfahrung mit den Atropinautoinjektoren.

Großer Dank geht an Herrn Leutnant zur See André Dimmel für die engagierte Arbeit im Rahmen der Methodenentwicklung und –validierung.

Mein Dank gilt Frau Flottillenapotheker Dr. Cornelia Eggert-Bury und ihren Mitarbeitern in der Laborgruppe Medizinprodukteuntersuchung für die Unterstützung bei der IR-spektroskopischen Bestimmungen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Oberfeldapotheker Dr. Holla und den Mitarbeitern der Rezeptur, der Sterilisation und der aseptischen Herstellung in der Apotheke des Bundeswehrkrankenhaus Ulm, die mir die Herstellung der Prüfmuster in ihren Räumlichkeiten ermöglichten und mich dabei tatkräftig unterstützten.

Bei Herrn Dr. Sebastian Eibl vom Wehrwissenschaftlichen Institut für Werk-, Explosiv- und Betriebsstoffe (WIWeB) in Erding möchte ich mich für die Untersuchungen und die Erstellung des Gutachtens zur Identifizierung der Elastomerbasis der verwendeten Stopfen bedanken.

Mein größter Dank geht an meine Familie. Vor allem möchte ich meinem Mann für sein Durchhaltevermögen, seine Geduld, seine aufmunternden Worte und seine Unterstützung in allen Lebenslagen herzlich danken. Meinen Eltern danke ich für ihr Verständnis, wenn einmal keine Zeit für einen persönlichen Besuch da war und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Euch allen möchte ich dafür danken, dass ihr nie an mir gezweifelt habt und immer ein paar liebevolle Worte für mich hattet, die mich dazu gebracht haben, nicht aufzugeben.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen als die im Text aufgeführten Hilfsmittel verwendet.

Ein Promotionsverfahren wurde zu keinem früheren Zeitpunkt an einer anderen Hochschule oder bei einem anderen Fachbereich beantragt.

München, Oktober 2011

Sandra Jüttemeyer

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2	THEORETISCHER TEIL	5
2.1	Stabilität und Stabilitätsuntersuchungen.....	5
2.2	Aktuelle Datenlage zur Stabilität von Atropinsulfatlösungen	11
2.3	Atropinsulfathaltige Autoinjektoren und Injektionslösungen.....	21
2.4	Primärpackmittel	24
2.4.1	Allgemeines.....	24
2.4.2	Verwendete Materialien	28
2.5	Aufbau der verwendeten Primärpackmittel.....	42
2.5.1	Glaskarpulen.....	42
2.5.2	Metallkarpulen	43
2.5.3	Kunststoffkarpulen	44
3	BESTIMMUNG DER PHARMAZEUTISCHEN QUALITÄT VON ATROPINSULFAT MITTELS RAPID-RESOLUTION-LC (RRLC)	46
3.1	Allgemeines	46
3.2	Methodenentwicklung.....	49
3.3	Validierung	54
3.3.1	Allgemeines.....	54
3.3.2	Linearität	55
3.3.3	Richtigkeit	56
3.3.4	Präzision	59
3.3.5	Selektivität.....	61
3.3.6	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	62
3.4	Material, Methoden und Software.....	65
4	VORBEREITUNG UND DURCHFÜHRUNG DER STABILITÄTSUNTERSUCHUNG ..	67
4.1	Eingangsuntersuchung des Atropinsulfat-Rohstoffs	67
4.1.1	Prüfung gemäß Europäischem Arzneibuch.....	67
4.1.2	Gehalts und Reinheitsbestimmung mittels RRLC	68
4.1.3	Geräte und Material.....	69
4.2	Bestimmung der stofflichen Zusammensetzung der Primärpackmittel	69
4.2.1	IR-Spektroskopie.....	69
4.2.2	Materialprüfung.....	70
4.3	Herstellung der Prüfmuster	71
4.3.1	Vorbereitung der Primärpackmittel.....	71
4.3.2	Herstellung der Modelllösungen	73
4.3.3	Abfüllen der Lösungen.....	74

4.3.4	Besondere Beobachtungen	75
4.3.5	Material und Geräte	76
4.4	Stresslagerung	76
4.4.1	Lagerung und Temperaturüberwachung	76
4.4.2	Probenahme	78
4.4.3	Material, Geräte und Software	78
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	81
5.1	Ermittlung des Wasserverlustes	81
5.1.1	Masseverlust	82
5.1.2	Sulfatbestimmung mittels Ionenchromatographie	83
5.1.3	Korrektur über Citratpeak	85
5.2	Aussehen und Färbung	87
5.2.1	Glaskarpulen	87
5.2.2	Metallkarpulen	90
5.2.3	Kunststoffkarpulen	93
5.2.4	Zusammenfassung	95
5.3	pH-Wert	102
5.3.1	Glaskarpulen	103
5.3.2	Metallkarpulen	105
5.3.3	Kunststoffkarpulen	110
5.3.4	Zusammenfassung	112
5.4	Gehalt	114
5.4.1	Glaskarpulen	117
5.4.2	Metallkarpulen	121
5.4.3	Kunststoffkarpulen	128
5.4.4	Zusammenfassung	132
5.5	Reinheit	137
5.5.1	Tropasäure	137
5.5.2	Apoatropin	143
5.5.3	Summe Abbauprodukte	149
5.6	Nachweis von Leachables	154
5.6.1	Phenol	154
5.6.2	Konservierungsstoffe	162
5.6.3	Weitere Verunreinigungen	169
5.6.4	Zusammenfassung	171
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	172
7	SUMMARY AND OUTLOOK	174
8	LITERATUR	176

Abkürzungsverzeichnis

AChE	Acetylcholinesterase
AMG	Arzneimittelgesetz
API	active pharmaceutical ingredient
As	Symmetriefaktor
BIIR	Brombutylkautschuk
BP	British Pharmacopoeia
DAD	Diodenarray Detektor
EDX	Energy Dispersive X-Ray Analysis/ Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (seit Dezember 2009 EMA - European Medicines Agency)
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
GC	Gaschromatographie
HPLC	High performance liquid chromatography/ Hochleistungsflüssigchromatographie
IC	Ionenchromatographie
ICH	International conference on harmonisation
ICP	Induktivgekoppeltes Plasma
IIR	Isobuten-Isopren-Kautschuk/ Butylkautschuk
INN	International Nonproprietary Name/ Internationaler Freiname
IR	Infrarot(spektroskopie)
ISER	Informationsstelle Edelstahl Rostfrei

LC	Liquid chromatography
LOD	Limit of detection/ Nachweisgrenze
LOQ	Limit of quantification/ Bestimmungsgrenze
MS	Massenspektrometrie
OES	optische Emissionsspektroskopie
OOS	Out of specification
PDMS	Polydimethylsiloxan
PE	Polyethylen
pHB-Ester	para-Hydroxybenzoesäureester
Ph.Eur.	Pharmacopoeia Europea
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
RP	Reversed Phase/ Umkehrphase
RRLC	Rapid resolution liquid chromatography
RSD	relative standard deviation/ relative Standardabweichung
SLEP	Shelf Life Extension Program
U.S.P	United States Pharmacopoeia
UV	Ultraviolett
WIWeB	Wehrwissenschaftliche Institut für Werk-, Explosiv- und Betriebsstoffe
ZInstSanBw	Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr

1 Einleitung und Zielsetzung

Den Standard bei einer Vergiftung durch Organophosphate stellt die Therapie mit einer Kombination aus einem Anticholinergikum und einem Acetylcholinesterase-Reaktivator (Oxim) dar. Als Anticholinergikum ist das Parasympatholytikum Atropin in Form intravenös oder intramuskulär applizierbarer Lösungen das Mittel erster Wahl. Es besitzt neben peripheren auch Effekte auf das Zentralnervensystem, die auf seiner antimuscarinergen Wirkung durch kompetitive Hemmung postsynaptischer Rezeptoren beruhen. Ein Einfluss an nicotinerger Synapsen ist nur durch den Einsatz von Oximen zu erzielen, die durch Reaktivierung des Neurotransmitter-abbauenden Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) die Konzentration im synaptischen Spalt und somit die Wirkung des Acetylcholins an allen Rezeptoren verringern.

Organophosphatvergiftungen können Folge unbeabsichtigter oder in suizidaler Absicht erfolgter Inkorporation von Insektiziden wie Parathion (E 605) oder eines militärischen oder terroristischen Einsatzes von Nervenkampfstoffen wie Tabun, Sarin, Soman oder VX sein. Obwohl bereits während des Zweiten Weltkriegs erhebliche Mengen an einsetzbaren Kampfstoffen zur Verfügung standen, kam es zu keiner Verwendung der Gifte. Während des Kalten Krieges produzierte Russland immense Vorräte an waffenfähigen Kampfstoffen und im Laufe der beiden Golfkriege wurde immer wieder der Einsatz von Nervenkampfstoffen befürchtet. Ein kriegerischer Einsatz von Nervenkampfstoffen fand im Zuge des Ersten Golfkrieges auf die hauptsächlich von Kurden bewohnten Städte Sardasht (Iran) sowie Halabdscha (Irak) statt. Welche Kampfstoffe hier ausgebracht wurden, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. In Japan kam es bereits zwei Mal zu einem terroristischen Einsatz von Sarin durch die Aum Shinryko Sekte, nämlich 1994 in Matsumoto und 1995 in der Tokyoter U-Bahn.

Neben der suizidalen Vergiftung mit Insektiziden aus der Gruppe der Organophosphate ist heutzutage daher eine terroristische Verwendung der entsprechenden Nervenkampfstoffe durchaus denkbar.

Aus diesem Grund werden in Deutschland durch Bund und Länder Notfallvorräte an Antidoten vorgehalten, die im Falle einer Massenvergiftung zum Einsatz kommen können. Die Bundeswehr bevorratet zum Beispiel für ihre Soldaten atropinhaltige Antidote in Form sogenannter Autoinjektoren, die im Notfall auch durch nicht medizinisches Personal verabreicht werden können und bei entsprechender Gefahrenlage zur persönlichen Ausstattung der Soldaten gehören.

Inzwischen befinden sich in den Vorräten der Bundeswehr drei zugelassene Arzneimittel für die Anwendung bei einer Nervenkampfstoffvergiftung (s. auch Kapitel 2.4 und 2.5). Sie unterscheiden sich in der Art des verwendeten Primärpackmittels sowie der eingesetzten Hilfsstoffe. Zudem enthalten zwei dieser Arzneimittel neben Atropinsulfat den Cholinesterasereaktivator Obidoximchlorid, eines jedoch in Form eines Zwei-Kammer-Injektors mit getrennten Reservoirs für beide Wirkstoffe. Das dritte Präparat ist ein Atropinsulfat-Monopräparat.

Gemäß § 71 Abs. 1 AMG [1] kann auf die Angabe des Verfalldatums bei solchen Arzneimitteln verzichtet werden, die an die Bundeswehr abgegeben werden. Die Bundeswehr hat demnach jedoch für diesen Fall sicherzustellen, dass Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit auch bei diesen Arzneimitteln gewährleistet sind. Hierzu werden die entsprechenden Arzneimittel regelmäßigen Qualitätskontrolluntersuchungen unterzogen, um Chargen, die den Anforderungen bezüglich der Arzneimittelqualität nicht mehr entsprechen, rechtzeitig austauschen zu können. Zum Untersuchungsumfang gehören hierbei die Parameter pH-Wert, Arzneistoffgehalt, Reinheit, Färbung und Aussehen,

Sterilität sowie mechanische Parameter wie Auslösekraft sowie Injektionszeit und -volumen.

Auf Grund der großen Anzahl verschiedener bevorrateter Arzneimittel und Chargen, aus denen wiederkehrend eine festgelegte Anzahl von Arzneimitteln auf die genannten Parameter untersucht werden muss, war zunächst die bis dato für die Bestimmung von Reinheit und Gehalt atropinhaltiger Injektabilia verwendete HPLC-Methode zu optimieren, um die bisherige Laufzeit für eine Untersuchung von 45 Minuten unter Beibehaltung der Auflösung zu verkürzen. Hierzu sollte die unter Verwendung eines Ionenpaarreagenzes erfolgende Trennung an einer stationären Phase mit einer Partikelgröße von 5 µm auf eine Ionenpaarreagenz-freie RP-Chromatographie an einer stationären Phase mit einer Partikelgröße von 1,8 µm umgestellt werden.

Weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Stabilität wässriger Atropinsulfat-Injektionslösungen in unterschiedlichen Primärpackmitteln zu untersuchen und Faktoren zu identifizieren, die zu einer Beeinflussung der Stabilität und damit der Haltbarkeit und der Verwendbarkeit der untersuchten Arzneistofflösung führen. Zwar sind durch die Hersteller zur Erlangung der Zulassung der Arzneimittel bereits Stabilitätsstudien vorzulegen, diese dienen jedoch ausschließlich zur Festlegung einer Laufzeit für das entsprechende Arzneimittel, bis zu deren Ablauf die pharmazeutische Qualität mit der durch den Hersteller festzulegenden Spezifikation übereinstimmt. Eine Lagerung und Verwendung über diesen Zeitraum hinaus, wie sie für Notfallmedikamente der Bundeswehr möglich ist, decken diese Studien jedoch nicht ab. Des Weiteren lassen sich aus diesen zulassungsbegründenden Stabilitätsstudien Einflüsse des gewählten Primärpackmittels nur schwer entnehmen, da unterschiedliche Formulierungen sowie Behältnisse vorliegen. Auftretende Phänomene können daher nur bedingt dem vorliegenden Primärpackmittel zugeordnet und mögliche Befunde nicht auf Arzneimittel in anderen Behältnis-

Verschlussystemen übertragen werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit an Hand identischer Modellösungen der Einfluss unterschiedlicher Primärpackmittel auf die Stabilität des Arzneistoffs und die Verwendbarkeit des Arzneimittels nach Langzeitlagerung ermittelt. Hierzu erfolgte eine Stresslagerung der Prüfmuster bei erhöhter Temperatur und eine Extrapolation der zu erwartenden Lagerdauer bei Raumtemperatur bis zum Eintreten von OOS-Ergebnissen (Out of specification) für die Prüfparameter Gehalt oder Reinheit.

2 Theoretischer Teil

2.1 Stabilität und Stabilitätsuntersuchungen

Stabilität ist „die Beständigkeit eines stofflichen Systems, das gegenüber einer Störung oder verschiedenen Störungen sein Gleichgewicht zu wahren imstande ist oder in der Lage ist, die Störung zu bewältigen, indem es selbstständig in den Zustand seines Gleichgewichts zurückkehrt“ [2]. Auf Grund des 2. Hauptsatzes der Thermodynamik ist es jedoch praktisch nicht möglich, eine absolut stabile Arzneiform herzustellen, da dieses System ein erzwungenes darstellt und somit thermodynamisch unausgeglichen ist. Somit wird es sich so lange verändern, bis es den Zustand der größten Unordnung, also der größten Entropie erreicht hat und damit die geringste freie Energie besitzt. Daher wird der Stabilitätsbegriff in der Pharmazie indirekt über die Instabilität beschrieben und ein Arzneimittel so lange als stabil betrachtet, wie es bestimmte Anforderungen erfüllt. Diese Anforderungen sind entweder in den entsprechenden Arzneibüchern oder aber in Spezifikationen festgelegt, die eine Auflistung von Untersuchungsparametern, zugehörigen Analysemethoden sowie Akzeptanzkriterien darstellen. Ein Arzneimittel gilt daher so lange als stabil wie Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit gegeben sind.

Zur Abschätzung der Größe und Art des Einflusses äußerer sowie innerer Faktoren auf die Stabilität von Arzneimitteln werden im Rahmen der Arzneimittelentwicklung zahlreiche Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Als äußere Faktoren werden hier vor allem Temperatur und Luftfeuchtigkeit sowie Licht untersucht. Die in einer Studie geprüften inneren Faktoren hängen stark von der jeweiligen Arzneiform und deren Zusammensetzung ab. Innere Faktoren sind zum Beispiel pH-Wert, Ionenstärke und Inkompatibilitäten zwischen Arznei- und Hilfsstoff oder zwischen Hilfsstoffen sowie Wechselwirkungen von Arznei- oder Hilfsstoffen mit Verpackungsbestandteilen.

Ziel von Stabilitätsuntersuchungen ist die Festlegung einer Laufzeit (auch Haltbarkeitsfrist, Verwendbarkeitsdauer oder Verwendungsdauer) für Medikamente, innerhalb welcher das Arzneimittel eine gleichbleibende Qualität aufweist und während der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit gewährleistet werden können, sowie die Ermittlung von Lagerbedingungen unter denen dieses Ziel erreichbar ist. Die Stabilitätsuntersuchung von Wirkstoffen dient der Festlegung einer Retestperiode, nach welcher ihre pharmazeutische Qualität und ihre Verwendbarkeit als Ausgangsstoff für die Arzneimittelherstellung erneut überprüft werden muss.

Erstmals wurde 1975 in der U.S.P. (United States Pharmacopeia) XIX eine Monographie bezüglich Stabilität und Stabilitätsprüfungen veröffentlicht [2]. Heute gelten die Richtlinien Q1A bis F der ICH (International Conference on Harmonization) als harmonisierte Richtlinien bezüglich zulassungsbedingender Stabilitätsstudien für den europäischen sowie den US-amerikanischen und japanischen Arzneimittelmarkt. Darin wird klar definiert, dass die Stabilitätsprüfung von Beginn der Arzneimittelentwicklung an in der Verantwortung des Herstellers liegt. Allerdings sind diese Leitlinien formal für den pharmazeutischen Unternehmer unverbindlich und er kann in begründeten Fällen davon abweichen, muss dies jedoch dann im Zulassungsantrag begründen. Da die Richtlinien einem ständigen Revisionsprozess unterworfen sind, spiegeln sie den Stand von Wissenschaft und Technik wider, sodass sich die zuständigen Behörden und die pharmazeutischen Unternehmer daran orientieren.

In der *ICH-Richtlinie Q1A Stabilitätsuntersuchungen neuer Arzneistoffe und Arzneimittel* [3] ist der Umfang der Stabilitätstests für die Zulassung neuer Wirkstoffe oder Arzneimittel innerhalb der EU, den USA und Japans festgelegt. Neben allgemeinen Anforderungen werden Regelungen zu Stressversuchen, der Chargenauswahl, dem Behältnis- und

Verschlusssystem, zu Spezifikationen, Prüfintervalen sowie der Auswertung der erhobenen Daten getroffen. Zudem ist eine Stabilitätsprüfungsverpflichtung enthalten, die erläutert, unter welchen Voraussetzungen eine Stabilitätsprüfung als abgeschlossen angesehen werden kann.

Spezielle Regelungen der Richtlinie betreffen Arzneimittel in semipermeablen Behältnissen sowie kühl (5 bis 8°C) oder im Gefrierschrank ($\leq -20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) zu lagernde Arzneimittel. Obwohl in der Richtlinie keine Hinweise für Stabilitätstests einzelner Darreichungsformen in ihrem Primärpackmittel enthalten sind, wird eine Durchführung der Stabilitätsstudien in der für die Vermarktung bestimmten Verpackung, also sowohl Primär- als auch Sekundärpackmittel, gefordert.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die nach *ICH Q1A* zu untersuchenden Lagerbedingungen.

Tab. 1: Übersicht über die Lagerbedingung für eine Stabilitätsuntersuchung gemäß ICH Q1A

Studie	Lagerbedingungen	Minstdauer
Langzeitstudie ²	25°C ± 2°C/ 60% RH ¹ ± 5% RH	12 Monate
	oder 30°C ± 2°C/ 65% RH ± 5% RH	
Intermediärstudie ³	30°C ± 2°C/ 65% RH ± 5% RH	6 Monate
Kurzzeit-/ beschleunigte Studie	40°C ± 2°C/ 75% RH ± 5% RH	6 Monate

¹ RH = relative humidity = relative Luftfeuchte

² bei der Langzeitstudie kann zwischen den beiden angegebenen Bedingungen frei gewählt werden

³ die Intermediärstudie entfällt, wenn bei der Langzeitstudie die Kombination 30°C ± 2°C/ 65% RH ± 5% RH gewählt wurde

ICH-Richtlinie Q1B Stabilitätsuntersuchungen: Untersuchungen zur Photostabilität neuer Arzneistoffe und Arzneimittel [4] trifft Regelungen zu Photostabilitätsprüfungen neuer Wirkstoffe und damit hergestellter Fertigarzneimittel. Diese dienen dazu, sicherzustellen, dass Licht keinen negativen Einfluss auf Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit des Wirkstoffs und des Fertigarzneimittels ausübt. Die Regelungen dieser Richtlinie umfassen das systematische Vorgehen, die zu verwendenden Lichtquellen und zu prüfenden Wellenlängen sowie Grundlagen der Durchführung und Auswertung von Photostabilitätsstudien.

ICH-Richtlinie Q1C Stabilitätsuntersuchungen neuer Darreichungsformen [5] ergänzt die ICH-Richtlinie Q1A bezüglich der Stabilitätsuntersuchung bereits registrierter Arzneimittel, die in Form eines neuen Produkts auf den Markt gebracht werden sollen. Hierunter fallen Produkte mit anderem Applikationsweg, Produkte mit neuer funktioneller Darreichungsform, wie zum Beispiel bei dem Wechsel von sofort freisetzenden zu retardierten oralen Darreichungsformen, sowie veränderte Darreichungsformen mit dem selben Applikationsweg. ICH Q1C legt lediglich fest, dass hier die Stabilitätsuntersuchung ebenfalls den Prinzipien der ICH Q1A entsprechen soll.

Die *ICH-Richtlinie Q1D Bracketing und Matrixing Designs bei Stabilitätsuntersuchungen für neue Arzneistoffe und Arzneimittel* [6] beschäftigt sich mit reduzierten Studiendesigns, dem sogenannten Bracketing und Matrixing von Stabilitätsstudien. Diese Verfahren dürfen gemäß ICH Q1A bei der Stabilitätsuntersuchung neuer Arzneistoffe und Arzneimittel angewandt werden, es werden jedoch dort keine genaueren Anleitungen und Voraussetzungen für die Verwendung dieser Techniken gegeben.

ICH Q1D definiert eine Vollstudie als eine Stabilitätsstudie, bei der alle Parameter bei allen Bedingungen zu jedem Untersuchungszeitpunkt bestimmt werden. Abweichend davon

werden bei einem reduzierten Studiendesign nicht zu jedem Zeitpunkt in der Studie alle Faktoren bei allen Bedingungen untersucht.

Im Falle des sogenannten **Bracketings** werden nur die jeweiligen Extreme der einzelnen Faktoren, wie zum Beispiel Dosierung oder Größe des Behältnisses, zu jedem Zeitpunkt untersucht. Anschließend wird auf die dazwischen liegenden Werte interpoliert.

Beim **Matrixing** werden zu jedem Zeitpunkt während der Studie nur bestimmte, jedoch wechselnde, Kombinationen an Parametern und Einflussgrößen untersucht. So reduziert sich die Gesamtzahl der durchzuführenden Analysen gegenüber einer Vollstudie, es lässt sich am Ende der reduzierten Studie durch Interpolation jedoch trotzdem ein vollständiges Bild über den Einfluss einzelner Faktoren auf alle untersuchten Qualitätsmerkmale ableiten.

ICH-Richtlinie Q1E Auswertung von Stabilitätsdaten [7] ergänzt den Abschnitt Auswertung der ICH Richtlinie Q1A und gibt weitergehende Informationen darüber, wie die nach ICH Q1A erhobenen Stabilitätsdaten auszuwerten und daraus Retestperiode oder Laufzeit abzuleiten sind. Außerdem wird geregelt, in welchen Fällen eine begrenzte Extrapolation über die belegte Lagerdauer hinaus möglich ist.

Nach dieser Richtlinie ist für quantitative chemische Parameter wie Arzneistoffgehalt, Gehalt an Zersetzungsprodukten oder an Konservierungsstoffen die Annahme einer Kinetik nullter Ordnung und somit eine vereinfachte Regressionsrechnung möglich. Außerdem werden Regelungen zur statistischen Auswertung der Primärdaten für das Zulassungsdossier getroffen.

Die *ICH-Richtlinie Q1F Stabilitätsdaten für das Zulassungsdossier in Klimazonen III und IV* wurde am 8. Juni 2006 zurückgenommen [8], da einige Staaten in diesen Klimazonen neue Berechnungen und Diskussionen für größere Sicherheitsspielräume für den Vertrieb von Arzneimitteln gefordert haben. Die Festlegung von Lagerbedingungen für die

Stabilitätsuntersuchungen zur Zulassung eines Arzneimittels für die Klimazonen III (heiß und trocken) sowie IV (heiß und feucht) wurde mit der Rücknahme der Richtlinie den entsprechenden Staaten in diesen Klimazonen sowie der WHO überlassen.

Die WHO hat in der *Technical Report Series No. 953* [9] ebenfalls Richtlinien für Stabilitätsuntersuchungen im Zuge der Arzneimittelentwicklung und -zulassung veröffentlicht. Diese orientieren sich zum Einen an den oben beschriebenen ICH Guidelines, führen jedoch zum Anderen auch spezielle Anforderungen einzelner Staaten bezüglich Stabilitätsuntersuchungen für eine nationale Arzneimittelzulassung auf. Außerdem wird eine Übersicht über relevante Untersuchungsparameter für einzelne Darreichungsformen gegeben.

2.2 Aktuelle Datenlage zur Stabilität von Atropinsulfatlösungen

Atropin ist die Bezeichnung für das Racemat aus R- und S-Hyoscyamin. Als Tropasäureester des Tropins ist es anfällig für eine pH-abhängige, sowohl durch Säuren als auch Basen katalysierte, Hydrolyse.

In kinetischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Reaktion im Sauren deutlich langsamer verläuft, als im basischen Milieu und Erstere daher für den Abbau von Atropinsulfat in Lösungen nur eine untergeordnete Rolle spielt [10, 11, 12]. Für beide Mechanismen konnte jedoch eine Temperaturabhängigkeit der Reaktion gezeigt werden. Eine Änderung des Reaktionsmechanismus findet bei Änderung der Temperatur nicht statt.

Zvirblis et al. untersuchten 1956 [10] die durch Hydroxylionen katalysierte Hydrolyse des Atropins im pH-Bereich von 7 bis 13 bei Temperaturen von 25 bis 60°C. Hierbei sind zwei Reaktionsmechanismen zu unterscheiden, je nach dem, ob als Edukt die freie Base oder die protonierte Form vorliegt. Beide Reaktionen verlaufen bei konstanter Temperatur und konstantem pH-Wert als Reaktionen 1. Ordnung ab. Es konnte gezeigt werden, dass oberhalb eines pH-Wertes von 11,5 ausschließlich die Hydrolyse der freien Base erfolgt, wohingegen unter pH 8,5 allein die protonierte Form als Edukt für die Reaktion dient. Zwischen diesen beiden pH-Werten laufen beide Reaktionen nebeneinander ab.

Kondritzer und *Zvirblis* zeigten 1957 [11] durch kinetische Untersuchungen an Atropinsulfat in 0,1- bis 0,4-normaler Perchlorsäure bei 70, 80 und 90°C, dass die durch Protonen katalysierte Hydrolyse eine Reaktion 1. Ordnung darstellt. Außerdem fanden sie eine Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes, an dem die protonenkatalysierte Hydrolyse minimal ist. Das Stabilitätsoptimum von Atropinsulfat gegenüber einer protonenkatalysierten Hydrolyse variiert zwischen pH 4,11 bei 0°C und pH 3,24 bei 100°C.

Weiterhin wird festgestellt, dass bei pH-Werten über 4,5 die durch Hydroxylionen katalysierte Hydrolyse vorherrscht, wohingegen bei pH-Werten unter 3 die Säurekatalyse dominiert.

Reich schränkt die Erkenntnis von *Zvirblis et al.* sowie *Kondritzer* und *Zvirblis* 1967 in seiner Arbeit [13] insoweit ein, als dass sie nur Gültigkeit besitzen, wenn die Hydrolyse in Form einer spezifischen Säure-Base-Katalyse durch Protonen und Hydroxylionen verursacht wird. Liegt, wie in den meisten Arzneimitteln, ein Puffersystem vor, wird die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der dann vorliegenden allgemeinen Säure-Base-Katalyse neben dem pH-Wert von Art und Stärke des Puffers beeinflusst. Weiterhin führt er bereits 1965 [14] an, dass, wie auch in verschiedenen anderen Studien [15, 16, 17] berichtet, neben dem hydrolytischen auch ein thermischer Abbau des Atropins in Form einer Wasserabspaltung unter Bildung von Apoatropin möglich ist. Zudem beschreibt *Reich* die Möglichkeit einer Dimerisierung des Apoatropins zum sogenannten Belladonnin, welches auf Grund möglicher Isomerisierung in der α -/trans- oder β -/cis-Form vorliegen kann.

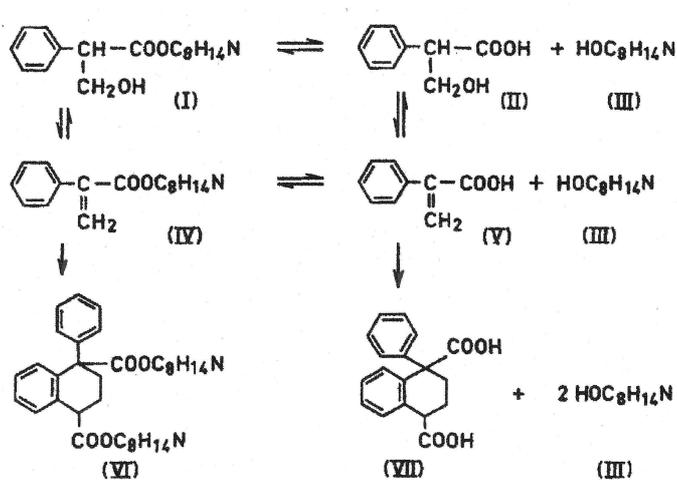
Die verschiedenen zum Abbau von Atropin führenden Reaktionen wurden durch *Lund* und *Waalder* 1968 [12] im pH-Bereich 1 bis 6 und bei 80, 90 und 100 °C untersucht. Hierbei wurde, anders als bei *Zvirblis*, *Socholitsky* und *Kondritzer* [10] oder *Kondritzer* und *Zvirblis* [11], der zeitgleiche Ablauf beider Degradationsreaktionen in Betracht gezogen und daher die Störung der quantitativen, UV-spektroskopischen Bestimmung von Atropin durch Apoatropin, welches bei den verwendeten Wellenlängen einen etwa 20-fach höheren Extinktionskoeffizienten besitzt, bei der Auswertung rechnerisch berücksichtigt.

Lund und *Waalder* konnten durch ihre Untersuchungen sowohl die Hydrolyse des Atropins zu Tropasäure und Tropanol als auch die Dehydratisierung zu Apoatropin bestätigen. Des

Weiteren zeigten sie, dass Apotropin zum Einen durch Hydrolyse weiter zu Atropasäure und Tropanol abgebaut, zum Anderen aber auch zu Belladonnin dimerisiert werden kann. Die Bildung von Atropasäure ist außerdem durch Wasserabspaltung aus Tropasäure möglich. Ebenfalls beschrieben ist eine Dimerisierung der Atropasäure zur sogenannten Isatropasäure. Zudem wird für die zur Bildung von Tropasäure, Apotropin und Atropasäure führenden Reaktionen die Möglichkeit der Rückreaktion und somit der Rückbildung der Edukte beobachtet.

Nach *Lund* und *Waal* ergibt sich für den Abbau von Atropin das in Abbildung 1 dargestellte Reaktionsschema.

Abb. 1: Reaktionsschema des Atropin-Abbaus nach *Lund* und *Waal* (aus [12], modifiziert)



- | | | | | | | | |
|-----|-------------|------|-------------|-------|---------------|------|-----------|
| (I) | Atropin | (II) | Tropasäure | (III) | Tropanol | (IV) | Apotropin |
| (V) | Atropasäure | (VI) | Belladonnin | (VII) | Isatropasäure | | |

Lund und *Waal* bestimmten außerdem die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der oben beschriebenen Reaktionen und fanden sowohl eine Temperatur- als auch eine pH-Abhängigkeit. Für die Hydrolyse führt die Auftragung des Logarithmus der

Geschwindigkeitskonstanten ($\log k$) gegen den pH-Wert zu einem parabolischen Kurvenverlauf mit zwei linearen Bereichen bei pH 1 bis 2 sowie 4 bis 6. In diesen Bereichen liegt, ähnlich wie bereits durch *Kondritzer* und *Zvirblis* [11] beschrieben, entweder eine reine Protonenkatalyse (pH 1-2) oder eine reine Hydroxylionenkatalyse (pH 4-6) vor, wohingegen im nicht linearen Bereich zwischen pH 2 und 4 beide Reaktionsmechanismen parallel ablaufen.

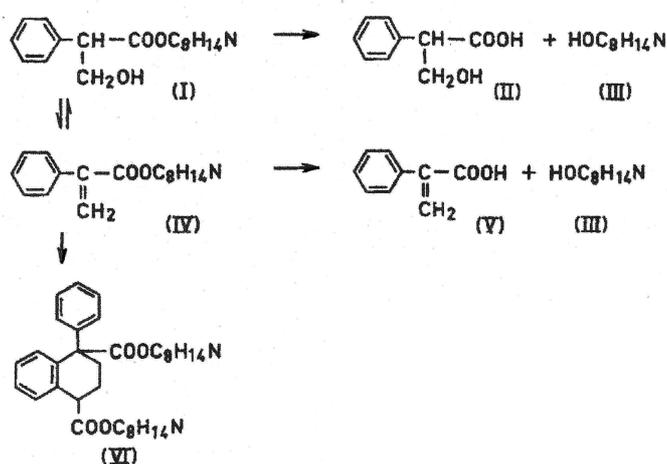
Bjerkelund et. al beschäftigten sich 1969 erneut mit der Aufklärung der beim Abbau des Atropins ablaufenden Reaktionen und untersuchten dafür die Stabilität von Tropasäure, Atropasäure, Belladonnin, Apotropin sowie Atropin bei pH 7,0 und 80°C [16]. Sie konnten bei den gewählten Bedingungen jedoch lediglich die Hydrolyse von Atropin und Apotropin zu Tropasäure bzw. Atropasäure sowie die Dimerisierung von Apotropin zu Belladonnin und die Rehydratisierung von Apotropin zu Atropin beobachten. Außerdem vermuteten sie, die Isomerisierung vom primär gebildeten α -Belladonnin zu β -Belladonnin beobachten zu können. Das von *Lund* und *Waalder* aufgestellte Reaktionsschema (s. Abb. 1) vereinfacht sich somit zu dem in Abbildung 2 dargestellten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Stabilitätsoptimum des Atropins in Bezug auf die Hydrolyse zu Tropasäure im Bereich von pH 3 bis 4 liegt [12, 17]. Hier ist die Rate der Dehydratisierung zu Apotropin jedoch am größten [17]. Ausgehend von Apotropin kann unter extremen Bedingungen eine Dimerisierung nach Art einer Diels-Alder-Reaktion zu Belladonnin als auch eine Rehydratisierung zu Atropin erfolgen. Des Weiteren ist eine protonenkatalysierte, hydrolytische Spaltung von Apotropin zu Atropasäure und Tropanol zu beobachten [16, 17].

Sowohl die Hydrolyse als auch die Dehydratisierung des Atropins stellen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen Reaktionen erster Ordnung dar und sind temperatur- und pH-abhängig.

Die Hydrolyseprodukte des Atropins (Tropasäure und Tropanol) sind nicht toxisch, besitzen jedoch keine anticholinerge Wirkung [18]. Das durch Wasserabspaltung aus Atropin hervorgehende Apoatropin hingegen ist toxischer als der Arzneistoff selbst [15, 65].

Abb. 2: Reaktionsschema des Atropin-Abbaus nach *Bjerkelund* und *Waal* (aus [12], modifiziert)



- | | | | | | | | |
|-----|-------------|------|-------------|-------|----------|------|------------|
| (I) | Atropin | (II) | Tropasäure | (III) | Tropanol | (IV) | Apoatropin |
| (V) | Atropasäure | (VI) | Belladonnin | | | | |

Alle oben beschriebenen Studien wurden an einfachen, gegebenenfalls gepufferten Lösungen bei verhältnismäßig hohen Temperaturen (> 60°C) durchgeführt. Teilweise lagen extreme, für ein Arzneimittel unrealistische, pH-Werte vor. Des Weiteren sind die verwendeten Analysemethoden (DC, UV-Photometrie) für die Analyse von in Spuren vorkommenden Degradationsprodukten nur bedingt geeignet. Einflüsse von Licht oder eines Primärpackmittels auf die Stabilität der API-Lösung (active pharmaceutical ingredient) wurden in keiner Studie betrachtet.

Neuere Untersuchungen zur Stabilität von Atropinsulfatlösungen befassen sich mit der Verwendbarkeit entsprechender Arzneimittel über ihr Verfalldatum hinaus [18, 19] sowie dem Einfluss verschiedener Behältnismaterialien [20 - 22] oder Lagerungstemperaturen [23, 24] und der Kommissionierung preanästhetischer Arzneistoffmischungen in Form von Fertigspritzen für den OP [25, 26] auf die Stabilität des Arzneistoffs beziehungsweise der Arzneistoffe.

Schier et al. [18] untersuchten 2004 die Stabilität von Atropinsulfat-Injektionslösungen mittels GC-MS nach unterschiedlich langer Lagerung unter nicht kontrollierten Bedingungen (innerhalb der Verwendbarkeitsfrist und bis zu 12 Jahre darüber hinaus) im Hinblick auf eine Verwendbarkeit abgelaufener Medikamente im Falle eines terroristischen Nervenkampfstoff-Angriffs mit einer Vielzahl Verletzter. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass auch langzeitgelagerte Arzneistofflösungen bei einem solchen Angriff problemlos zum Einsatz kommen können, da die gefundene Menge an Abbauprodukten der API sehr gering ist. Allerdings liegen die ermittelten Konzentrationen des Arzneistoffs bis zu 27,5% unter den deklarierten. Diesen Umstand sehen die Autoren als unbedeutend und begründen dies damit, dass Atropin allein auf Grund des klinischen Ansprechens des Patienten auf das Antidot dosiert wird.

Lyon et al. haben 2006 Daten aus dem US-amerikanischen SLEP (Shelf Life Extension Program), welches im Auftrag des Verteidigungsministeriums durch die FDA (Food and Drug Administration) durchgeführt wird, veröffentlicht [19]. Bei diesem Programm geht es um die Ausnutzung des wirtschaftlichen Potentials einer chargenabhängigen Verlängerung der Nutzungsdauer der durch die US-Streitkräfte bevorrateten Arzneimittel über das Verfalldatum hinaus. Grundlage hierfür bildet ein regelmäßiges, chargenspezifisches Qualitätsmonitoring.

Alle fünf der in das Programm aufgenommenen Chargen eines Atropin-Pralidoxim-Autoinjektors konnten auf Grund ihrer pharmazeutischen Qualität zwischen 25 und 38 Monate länger verwendet werden, als ihr Verfalldatum zugelassen hätte.

Von den 27 in das Programm aufgenommenen Chargen einer Atropinsulfat-Injektionslösung lagen 24 nach Ablauf des Verfalldatums noch innerhalb der Spezifikation. Die Laufzeitverlängerung dieser Chargen betrug zwischen 19 und 216 Monaten. Zwei der nicht verlängerten Chargen mussten auf Grund von Abweichungen des pH-Wertes, eine wegen vermindertem API-Gehalt ausgesondert werden.

Weiterhin waren 687 Chargen eines Atropin-Autoinjektors Gegenstand des SLEP. Hiervon konnte in 495 Fällen eine Verlängerung der Laufzeit vorgenommen werden, die beim Auftreten von OOS-Ergebnissen bei der regelmäßigen Untersuchung zwischen 12 und 135 Monaten lag. Bei Veröffentlichung der Daten waren noch 119 Chargen aktiv im Programm, deren Nutzungszeit bereits zwischen 13 und 129 Monaten über ihr Verfalldatum hinaus verlängert werden konnte. Hauptursache für das Ausscheiden einzelner Chargen aus dem Programm war ein OOS-Ergebnis im Bereich „Aussehen der Lösung“ (279 Chargen). Am häufigsten traten hier braune Niederschläge (245 Chargen) auf, gefolgt von Trübungen (31 Chargen) und Färbung (3 Chargen). Am zweit häufigsten lagen verminderte Arzneistoffgehalte vor (152 Chargen). In der Gruppe der zunächst in ihrer Laufzeit verlängerten Chargen konnte bei 52 Chargen auf Grund eines Minderbefundes bezüglich des als Konservierungsmittel eingesetzten Phenols die Laufzeit nicht weiter verlängert werden. Für 7 Chargen traf dies bereits bei Ablauf des Verfalldatums zu.

Zusammenfassend wird durch *Lyon et al.* festgestellt, dass bei vielen Arzneimitteln eine Verwendung auch über das Verfalldatum hinaus aus pharmazeutischer Sicht möglich ist, aber auf Grund der, vor allem bei den Atropinsulfat-Autoinjektoren stark ausgeprägten, Interchargenvariabilität die Ausweitung der Nutzungsdauer nur bei regelmäßiger, chargenbezogener Untersuchung erfolgen darf.

Durch *Loch* und *Zimmermann* wurden bei der Untersuchung der bis zu 19 Jahre gelagerten Autoinjektoren AtroPen® und Kombinationsautoinjektor ebenfalls Verfärbung und Partikelbildung in der Lösung beobachtet [27]. Mittels HPLC-UV wurden die Abbauprodukte Tropasäure und Apotropin bestimmt und ein signifikanter Unterschied bezüglich der Konzentration an Tropasäure in den beiden untersuchten Produkten festgestellt. Des Weiteren wurden mittels ICP-MS in beiden Arzneimitteln Schwermetalle in unterschiedlichen Mengen nachgewiesen. Eine Bildung von Tropasäure wurde nicht nachgewiesen.

Zvirblis und *Ellin* verglichen 1982 die Stabilität einer Zubereitung aus Trimedoximbromid, Atropinsulfat und Benactyzinhydrochlorid in Glas- und Kunststoffspritzen [20]. Die verwendete Kunststoffspritze bestand aus Polypropylen und besaß einen Elastomerstopfen aus Butylkautschuk. Nach der bis zu vier Monate dauernden Lagerung konnte kein statistisch signifikanter Abbau von Atropin, weder in Glas noch in Plastik, festgestellt werden. Auf Grund der geringeren Flüssigkeitsverluste, der weniger häufig auftretenden Färbungen und einem in Kunststoff bei 80°C beobachteten abnormen pH-Verhalten kamen die Autoren jedoch zu dem Schluss, dass für diese Zubereitung Glas als Primärpackmittel einer Polypropylenspritze mit Elastomerstopfen vorzuziehen sei.

Lewis et al. [21] berichten 1994 nach viertägiger Lagerung einer Atropinsulfat-Injektionslösung in Polypropylenspritzen im OP von einer Reduktion des API-Gehalts um 43 bis 52%. Bei den als Vergleich herangezogenen Glasspritzen nahm der Atropingehalt im selben Zeitraum nur um 11 bis 35% ab. Da im HPLC-Chromatogramm keine zusätzlichen Peaks identifiziert wurden, gehen die Autoren von einer Verminderung des freien Wirkstoffs durch Adsorption an das Spritzenmaterial aus. Daher raten sie von der im OP

gängigen Praxis der Lagerung von Atropinsulfat-Injektionslösung in Polypropylen-Spritzen ab.

Driver et al. führten 1999 eine vergleichbare Studie zur Stabilität von Atropinsulfat-Injektionslösung durch [22]. Sie konnten nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur eine Reduktion des API-Gehalts um ein bis zwei Prozent feststellen, der durch weitere Lagerung jedoch nicht weiter abnahm. Auf Grund eines zu Beginn der Studie über dem deklarierten Wert liegenden Arzneistoffgehalts wurde auch nach acht Tagen der deklarierte Gehalt nicht unterschritten. Aus Sicht der Autoren ist Atropinsulfat daher ausreichend stabil, wenn es bis zu acht Tage in Kunststoffspritzen aufbewahrt wird. Als Ursache für die abweichenden Ergebnisse bei *Lewis, Jarvi* und *Cady* [21] diskutieren sie unterschiedliche Verfahren bei der Befüllung der Spritzen (volumen- bzw. massebasiert) und Unterschiede der verwendeten HPLC-Methoden.

Weitere Arbeiten zur Stabilität von Atropinsulfatlösungen, die für die Verwendung im OP in Kunststoffspritzen abgefüllt wurden, stammen von *Stanaszek* und *Pan* [25] sowie von *Rhodes et al.* [26], wobei in der Studie von *Rhodes et al.* neben Atropinsulfat noch Promethazinhydrochlorid und Meperidinhydrochlorid in der Zubereitung enthalten waren. In beiden Untersuchungen wurden in Glasspritzen abgefüllte Zubereitungen als Vergleich herangezogen.

Stanaszek und *Pan* konnten über eine Dauer von zehn Tagen keine Unterschiede zwischen den in Glas und den in Kunststoff abgefüllten Lösungen feststellen. Außerdem fanden sie, dass eine Lagerung im Kühlschrank bei 5°C keinen Vorteil gegenüber einer Lagerung bei Raumtemperatur (25°C) bringt.

Rhodes et al. konnten nachweisen, dass eine Lösung aus Meperidinhydrochlorid, Promethazinhydrochlorid und Atropinsulfat in Kunststoffspritzen über 24 Stunden stabil ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Datenlage zur Stabilität von Atropinsulfatlösungen in verschiedenen Primärpackmitteln uneindeutig ist. Es können sowohl Studien gefunden werden, die auf Inkompatibilitäten zwischen Atropin und Kunststoffbehältnissen hindeuten, als auch solche, bei denen kein Unterschied zwischen Lösungen aus Kunststoff- und Glasbehältnissen festgestellt werden kann. Des Weiteren treffen die vorgestellten Studien überwiegend Aussagen über die Kurzzeit-Lagerfähigkeit entsprechender Arzneimittel im Primärpackmittel. Lediglich *Schier et al.* [18], *Lyone et al.* [19] sowie *Loch* und *Zimmermann* [27] stellen Daten zu langzeitgelagerten Arzneimitteln vor. Hier sind jedoch keine Arzneimittel erfasst, die ein Primärpackmittel aus Kunststoff besitzen.

2.3 Atropinsulfathaltige Autoinjektoren und Injektionslösungen

Atropinsulfat-Injektionslösungen werden von der Bundeswehr als Antidote bei Vergiftungen mit Nervenkampfstoffen in Form verschiedener Autoinjektionssysteme zur Selbst- und Kameradenhilfe bevorratet. Durch die Bereitstellung dieser Notfallmedikamente, die auch durch medizinische Laien beim Eintreten entsprechender Symptome einer Nervenkampfstoffvergiftung angewendet werden können, ist im Falle einer Vergiftung von Soldaten mit Nervenkampfstoffen ein sofortiges Handeln vor Ort und somit eine Stabilisierung des Patienten bis zur Übergabe an eine medizinische Einrichtung möglich. Hier kann die Atropintherapie dann mit Hilfe der Atropin-Injektionslösung, die durch die Bundeswehr in ihren Krankenhausapotheken hergestellt wird, entsprechend dem individuellen Zustand des Patienten fortgeführt werden. Des Weiteren kommt die Atropinsulfat-Injektionslösung im Klinikbetrieb als Parasympatholytikum zum Beispiel zur Narkosevorbereitung, als Kurzzeittherapie bei bradykarden Herzrhythmusstörungen oder als Antidot bei Vergiftungen mit Parasympathomimetika zum Einsatz.

Als Autoinjektor bezeichnet man Arzneimittel zur intramuskulären Verabreichung einzeldosierter Injektionen. Sie werden überwiegend zum Einsatz durch medizinische Laien wie zum Beispiel Patienten oder Ersthelfer entwickelt. Der Aufbau eines Autoinjektors ähnelt dem einer Spritze. Die Injektionsnadel befindet sich jedoch im Inneren des Gehäuses und wird erst nach Aktivierung und Auslösen des Injektors, das üblicherweise durch Aufdrücken auf die Injektionsstelle erfolgt, mittels eines Federmechanismus freigegeben. Das Arzneistoffreservoir, auch Injektionskarpule genannt, kann aus verschiedenen Materialien bestehen und wird in der Regel durch Elastomerstopfen an beiden Enden nach außen hin abgeschlossen.

Zur Applikation mehrerer Arzneistoffe mit einem einzigen Autoinjektor kommen sowohl Ein- als auch Zweikammer-Injektoren zum Einsatz. Die letzt genannten Systeme bieten die Möglichkeit, mit einer Injektion mehrere Arzneistoffe zu injizieren, diese jedoch bis zu diesem Zeitpunkt zur Verbesserung der Stabilität und zur Verhinderung von Inkompatibilitäten getrennt voneinander aufzubewahren. Nach der Aktivierung und Auslösung des Autoinjektors werden entweder die beiden Lösungen gemischt oder ein lyophilisierter Arzneistoff durch die Flüssigkeit in der zweiten Kammer, die sowohl reines Wasser für Injektionszwecke als auch eine gelöste zweite API enthalten kann, in Lösung gebracht.

Als atropinhaltige Autoinjektoren stehen bei der Bundeswehr der AtroPen[®], der sogenannte Kombinationsautoinjektor gegen Nervenkampfstoffvergiftungen und der Autoinjektor ComboPen[®] ATOX II zur Verfügung.

Der AtroPen[®] stellt ein Monopräparat mit einer Atropinsulfatlösung (2 mg/ 0,7 ml) in einer durch Silikonisierung inaktivierten Metallkarpule dar. Der Kombinationsautoinjektor enthält 2 ml einer Lösung von 2 mg Atropinsulfat und 150 mg Obidoximchlorid in einem Glaszylinder. Der Autoinjektor ComboPen[®] ATOX II ist ein Zwei-Kammersystem mit einer Atropinsulfat- (2 mg/ 0,7 ml) und einer Obidoximchloridlösung (220 mg/ 2 ml), die getrennt voneinander in je einer Kammer der aus Kunststoff bestehenden Injektionskarpule enthalten sind.

Der genaue Aufbau dieser drei für die vorliegende Arbeit verwendeten Primärpackmittel ist in Kapitel 2.5 beschrieben.

Weitere Arzneimittel, die in Form von Autoinjektoren zur Verfügung stehen, sind Morphin-Injektoren, die den Soldaten im Einsatz eine Erstversorgung mit schmerzstillenden Mitteln

ermöglichen, sowie Adrenalin-Injektoren für Allergiker, die im Falle eines anaphylaktischen Schocks zur Anwendung kommen.

Da Autoinjektoren im Zuge der Selbst- und Kameradenhilfe nicht durch medizinisches Personal sondern durch medizinische Laien angewendet werden, kann ein zu geringer Arzneistoffgehalt zur lebensbedrohlichen Gefährdung der vergifteten Personen führen. Die Verabreichung der anticholinergen Arzneimittel durch Ersthelfer ist bei der Bundeswehr durch die Ausgabe einer fixen Anzahl an Injektoren pro Soldat begrenzt. Daher kann einer Unterversorgung durch Arzneimittel, die auf Grund von Abbauvorgängen durch lange Lagerungszeiten auftreten können nicht durch zusätzliche Verabreichung einer weiteren Dosis entgegengewirkt werden.

2.4 Primärpackmittel

2.4.1 Allgemeines

Das Primärpackmittel bildet zusammen mit der Darreichungsform und der Sekundärverpackung das Arzneimittel. Das Primärpackmittel umfasst sowohl das Behältnis als auch Verschlüsse, Dichtungen sowie andere Teile, die im direkten Kontakt mit dem Arzneimittel stehen. Daher werden sie häufig auch Behälter-Verschluss-Systeme (engl. container closure systems) genannt.

Aufgabe des Primärpackmittels ist der Schutz der Darreichungsform vor negativen Einflüssen, die Instabilitäten bedingen. Um die Arzneimittelsicherheit zu gewährleisten darf die Verpackung dabei selbst keine negativen Einflüsse auf die Darreichungsform ausüben oder inkompatibel mit dem Arznei- oder einem der Hilfsstoffe sein. Durch *Grimm* werden unter anderem folgende Wechselwirkungen zwischen Zubereitung und Verpackung beschrieben [28]:

- Verminderte Wirksamkeit durch Adsorption oder Absorption des Wirkstoffs
- Zersetzung des Wirkstoffs durch Substanzen, die aus dem Verpackungsmaterial herausgelöst werden (Migrationsstoffe)
- Verringerung der Konzentration von Hilfsstoffen durch Adsorption, Absorption oder Interaktion mit Migrationsstoffen
- Ausfällungen von Arznei- oder Hilfsstoffen
- Verfärbungen des Inhaltes oder von Verpackungsbestandteilen
- Versprödung der Verpackung oder einzelner Bestandteile

Ein weiterer Aspekt, der bei der Wahl eines Primärpackmittels eine Rolle spielt, ist dessen Performance, also das anwendungsgerechte Funktionieren. Hierfür sind eine zuverlässige, optimale Entnahme des Arzneimittels aus der Verpackung sowie ein zuverlässiges Verschlusssystem unerlässlich. Nach *Grimm* [28] sind die für flüssige Darreichungsformen am häufigsten auftretenden Instabilitäten, die durch ungeeignete Behältnis-Verschluss-Systeme verursacht werden:

- Permeation von Feuchtigkeit
- Permeation von Sauerstoff
- Sorption von Konservierungsmitteln
- Wechselwirkungen mit Glas
- Verschiebung des pH-Wertes
- Ausfällungen
- Penetration von Licht
- Wechselwirkung mit Elastomeren in Form von Desorption, Permeation und/oder Sorption.

Daher sollte bereits in einem frühen Stadium der Arzneimittelentwicklung auch Augenmerk auf mögliche Interaktionen zwischen der Zubereitung und einem möglichen Packmittel gelegt werden (s. auch Kapitel 2.1).

Im Europäischen Arzneibuch [29] sind in Kapitel 3.1. Anforderungen an die bei der Herstellung von Behältnissen verwendeten Materialien sowie in Kapitel 3.2. Anforderungen an die Behältnisse selbst festgelegt. Demnach müssen Behältnisse so beschaffen sein, dass

der Inhalt in geeigneter Weise entnommen werden kann und dieser außerdem vor Verlust und Veränderung geschützt ist. Die Qualität des Inhalts darf durch den Kontakt mit dem Behältnis nicht so verändert werden, dass die geforderten Grenzwerte überschritten werden und es darf keine physikalischen oder chemischen Einwirkungen auf den Inhalt ausüben [29].

Auf Grund des direkten Kontakts zwischen Darreichungsform und Primärpackmittel kann eine Beeinflussung des Arzneimittels nie vollständig ausgeschlossen werden. Sie darf jedoch zur Wahrung der Arzneimittelsicherheit ein kritisches Maß nicht überschreiten. Bei geeigneter Wahl sowohl des Primär- als auch des Sekundärpackmittels können diese jedoch einen beachtlichen Beitrag zur Arzneimittelstabilität leisten, indem sie das Arzneimittel zum Beispiel in Form einer einfachen Faltschachtel vor Licht schützen.

Art und Ausmaß der Beeinflussung der Arzneimittelqualität durch das Primärpackmittel sowie die Eignung des Packmittels für den vorhergesehenen Gebrauch sind gemäß *ICH-Richtlinie Q8 Pharmazeutische Entwicklung* [30] während der Arzneimittelentwicklung zu prüfen und durch die Wahl geeigneter Materialien zu minimieren. Außerdem ist die Eignung des Primärpackmittels für den vorgesehenen Zweck an Hand der erhobenen Daten im Rahmen des Zulassungsantrags nachzuweisen. Nach *ICH-Richtlinie Q1A* [3] sind neben dem Primärpackmittel selbst auch Einflüsse der auf den Primärpackmitteln aufgebrauchten Etiketten, deren Klebstoffe und Bedruckung sowie der Sekundärverpackung auf den Inhalt zu ermitteln.

Für die Zulassung flüssiger Arzneimittel zur oralen und parenteralen Applikation sind nach *ICH-Richtlinie Q6A Spezifikationen: Prüfverfahren und Grenzwerte für neue Arzneistoffe und Arzneimittel: chemische Substanzen* [31] die Berücksichtigung der Ergebnisse von Extraktionsstudien bei der Beschreibung des Primärpackmittels im Rahmen von

Spezifikationen vorgeschrieben. Für die Zulassung parenteral zu applizierender Lösungen, die in Form von Fertigspritzen oder vergleichbaren Applikationseinrichtungen wie zum Beispiel Autoinjektoren zugelassen werden sollen, sind in eine Spezifikation außerdem Parameter bezüglich der Funktionsfähigkeit des Applikationssystems aufzunehmen. Hierzu zählen beispielsweise für Autoinjektoren eine Überprüfung der Auslösekraft, des Abgabevolumens sowie der Injektionszeit [32].

Nach *ICH-Richtlinie Q3B Verunreinigungen in neuen Arzneimitteln* [33] unterscheidet sich die Art der Berichterstattung bei der Einreichung der Zulassungsunterlagen bezüglich Verunreinigungen, die Reaktionsprodukte zwischen Primärpackmittel und Arzneistoff bzw. Hilfsstoffen darstellen, nach dem prozentualen Anteil der Verunreinigung, bezogen auf die maximale tägliche Dosis des Arzneistoffes. Entsprechend diesen Anteils müssen Verunreinigungen berichtet, identifiziert oder toxikologisch beurteilt werden. Verunreinigungen aus Hilfsstoffen, deren Abbauprodukte sowie Stoffe aus dem Behältnis-Verschluss-System werden in dieser Richtlinie nicht berücksichtigt.

Die EMEA fordert in ihrer *Leitlinie zu Primärpackmitteln aus Kunststoff* [34] im Rahmen von Neuzulassungen umfassende Prüfungen der Kunststoffe, die als Primärpackmittel verwendet werden. Diese Richtlinie schließt jedoch alle bei der Herstellung von Primärpackmitteln verwendeten Elastomere aus. Abhängig von der Darreichungsform werden Extraktions- und Interaktionsstudien gefordert, wobei letztere sowohl Migrations- als auch Sorptionsstudien umfassen.

Im Laufe von Extraktionsstudien wird durch geeignete Lösungsmittel bei erhöhter Temperatur der maximale Umfang an Stoffen (**Extractables**) bestimmt, die vom Packmittel an das Füllgut abgegeben werden können. Migrationsstudien hingegen werden unter Bedingungen durchgeführt, die dem vorhergesehenen Gebrauch entsprechen. Die dabei

identifizierten Stoffe werden **Leachables** genannt. Sie können im Rahmen der normalen Stabilitätsuntersuchungen als Verunreinigungen detektiert werden.

Die FDA fordert in ihren *Richtlinie für die Industrie: Behältnis-Verschluss-Systeme als Packmittel für Humanarzneimittel und Biologika* [35] bei einem Antrag auf Zulassung unterschiedliche Angaben zur verwendeten Primärpackung, abhängig von Art der Zubereitung sowie Applikationsort und -weg. So sind zum Beispiel im Zulassungsantrag für ein zu injizierendes Arzneimittel detailliertere Informationen über Art und Zusammensetzung des Primärpackmittels vorzulegen als für die Zulassung einer oral zu verabreichenden Formulierung. Da bei flüssigen Zubereitungen Interaktionen zwischen Zubereitung und Behältnis wahrscheinlicher sind als bei festen, pulverförmigen sind hier ebenfalls die im Zulassungsantrag für eine flüssige Arzneiform enthaltenen Informationen an diese besonderen Gegebenheiten anzupassen. Des Weiteren müssen die Informationen geeignet sein nachzuweisen, dass das gewählte Primärpackmittel und seine Komponenten für den vorhergesehenen Verwendungszweck geeignet sind.

2.4.2 Verwendete Materialien

Je nach Darreichungs- und Anwendungsform des Arzneimittels kommen Werkstoffe wie Glas, Metalle, Kunststoffe und Elastomere bei der Herstellung von Primärpackmitteln zum Einsatz. Häufig werden Kombinationen dieser Werkstoffe verwendet, um ein Arzneimittel adäquat zu verpacken und so vor äußeren Einflüssen zu schützen sowie eine sichere Anwendung zu gewährleisten.

Im Folgenden sollen Hintergrundinformationen über die in der vorliegenden Arbeit als Bestandteile von Primärpackmitteln genutzten Werkstoffe gegeben werden. Besonderes

Augenmerk wird hierbei auf mögliche Interaktionen mit Arznei- oder Hilfsstoffen sowie die Eignung als Werkstoff zur Herstellung von Primärpackmitteln für Injektabilia gelegt. Außerdem soll ein kurzer Überblick über die Regularien gegeben werden, die den Einsatz des Materials in der pharmazeutischen Industrie bestimmen.

2.4.2.1 Glas

Behältnisse aus Glas finden in der pharmazeutischen Industrie vor allem für die Verpackung von flüssigen Zubereitungen breite Verwendung. Sie kommen als Flaschen für oral applizierbare Zubereitungen wie Säfte und Tropfen, mit entsprechendem Applikationsaufsatz in Form von Nasensprays oder -tropfen oder als Flaschen für Infusionen sowie Ampullen für Injektionen zum Einsatz. Gläser dienen auf Grund ihrer hohen Resistenz gegenüber Feuchtigkeit vor allem in den Ländern der Klimazonen III und IV auch als Sammelbehältnis für einzeldosierte, feste Zubereitungen wie Kapseln oder Tabletten.

Für die pharmazeutische Verwendung ist vor allem das sogenannte Neutralglas von Bedeutung. Hierbei handelt es sich um ein Borosilikatglas, das wesentliche Mengen an Bor-, Aluminium-, Alkali- und/ oder Erdalkalioxiden enthält [36]. Es besitzt eine große Resistenz gegenüber Temperaturschocks sowie eine große hydrolytische Resistenz. Weiterhin findet Natronkalk-Silikatglas in der Pharmazie Verwendung als Behältnismaterial. Da dieses Silikatglas Alkali- sowie Erdalkalioxide und hier hauptsächlich Natrium- und Calciumoxid enthält, besitzt es nur eine geringe hydrolytische Resistenz [36]. Diese kann jedoch durch geeignete Verfahren der Oberflächenbehandlung (Passivierung) soweit gesteigert werden, dass die hydrolytische Resistenz der eines Neutralglases ähnelt [37].

Gemäß dem Europäischen Arzneibuch Abschnitt 3.2.1. werden Glasbehältnisse zur pharmazeutischen Verwendung entsprechend ihrer hydrolytischen Resistenz und ihrer Zusammensetzung in drei Güteklassen eingeteilt [36]. Die hydrolytische Beständigkeit ergibt sich aus der Menge löslicher mineralischer Substanzen, die vom Glas unter den für die Prüfung angegebenen Bedingungen in Wasser abgegeben werden. Diese werden durch Titration der entstandenen Hydroxylionen in der Lösung bestimmt.

Einen Überblick über die Einteilung gemäß Europäischem Arzneibuch und die Anwendungsgebiete gibt Tabelle 2.

Tab. 2: Übersicht über Glasart, hydrolytische Beständigkeit und Eignung für bestimmte Zubereitungen der drei Glastypeen nach [36]

Typ	Glasart	Hydrolytische Beständigkeit	Eignung
I	Neutralglas	groß ¹	Pharmazeutische Zubereitungen allgemein, einschließlich Parenteralia
II	Natronkalk-Silikatglas	groß ²	saure und neutrale wässrige Zubereitungen, einschließlich Parenteralia
III	Natronkalk-Silikatglas	gering	nicht wässrige Zubereitungen zur parenteralen Anwendung, Pulver zur Herstellung von Parenteralia (nicht gefriergetrocknet), Zubereitungen zur nicht parenteralen Anwendung

¹auf Grund der chemischen Zusammensetzung

²auf Grund geeigneter Oberflächenbehandlung

Inkompatibilitäten mit Arzneimitteln treten bei Glasbehältnissen sehr selten auf [20, 25, 26].

Abhängig vom pH-Wert und der Anwesenheit organischer Säuren kann es beim

Autoklavieren flüssiger Zubereitungen in Glasbehältnissen zur Freisetzung von Silikationen kommen [28]. In vielen Stabilitätsstudien werden jedoch in Glas gelagerte Arzneistofflösungen als Null- oder Vergleichswert herangezogen [21, 25, 26].

Häufig sind bei beobachteten Wechselwirkungen zwischen Arzneizubereitung und Primärpackmitteln aus Glas nicht die Glasbehältnisse sondern weitere Bestandteile des Behältnis-Verschluss-Systems verantwortlich für die Inkompatibilität. So fanden *Solomon et al.* 2008, dass der verwendete Elastomerstopfen und nicht das verwendete Glasbehältnis ursächlich für eine pH-Veränderung bei gefriergetrockneten, mit ihrem Lösungsmittel in einer Zwei-Kammer-Ampulle verpackten Injektabilia war [38].

2.4.2.2 Nichtrostender Stahl

Nichtrostender Stahl ist die Bezeichnung für eine Gruppe korrosions- und säurebeständiger Stahlsorten. Umgangssprachlich wird auch von „rostfreiem“ Stahl gesprochen. Synonyme sind außerdem Edelstahl, rostfrei, Inox, Cromargan (Handelsname von WMF), Nirosta (Markenname der Nirosta Thyssen Krupp Stainless) oder VA-Stahl. Charakteristisch für nichtrostenden Stahl ist ein Anteil von mehr als 10,5% Chrom, das in einem austenitischen oder ferritischen Mischkristall gelöst ist, sowie einem Kohlenstoffgehalt von maximal 1,2% [39]. Dieser hohe Chromanteil führt zur Ausbildung einer Passivschicht aus Chromoxid an der Materialoberfläche, die sich nach mechanischer Beschädigung spontan erneuert. Weitere Legierungsbestandteile wie Nickel, Molybdän, Mangan und Niob verbessern die Korrosionsbeständigkeit zusätzlich.

Die am häufigsten verwendete Legierung ist X5CrNi 18-10, auch bekannt als V2A (Werkstoffnummer 1.4301). Hierbei handelt es sich um einen austenitischen Chrom-Nickel-Stahl mit einem Chrom-Gehalt von 18% und einem Nickel-Anteil von 10%. Diese Legierung

ist jedoch nicht in Gegenwart chlorhaltiger Medien wie Meerwasser oder der chlorhaltigen Atmosphäre in Schwimmbädern beständig. Als Folge treten örtliche Korrosionen wie Loch- oder Spaltkorrosion auf. Andere Anionen wie zum Beispiel Sulfat verbessern die Beständigkeit hingegen [40].

Eine verbesserte Chloridbeständigkeit besitzt hingegen der sogenannte V4A-Stahl (X5CrNiMo17-12-2, Werkstoffnummer 1.4401) durch seinen Gehalt an Molybdän von 2%.

Die Chloridbeständigkeit von V2A-Stahl, wie er in der vorliegenden Arbeit als Werkstoff zur Herstellung der Injektionskarpulen aus Metall verwendet wird, lässt sich jedoch auch durch eine Passivierung der Oberfläche durch Silikonisierung erhöhen.

In der pharmazeutischen Industrie finden nichtrostende Stähle vor allem als Werkstoff zur Herstellung von Produktionseinrichtungen Verwendung. Hier wird V2A-Stahl in wenig aggressiven Umgebungen eingesetzt und bei Chloridkonzentrationen bis 200 mg/l verwendet. V4A-Stahl kommt bei Chloridkonzentrationen von bis zu 500 mg/l zum Einsatz. Bei Chloridkonzentrationen über 500 mg/l oder für die Verwendung bei erhöhten Temperaturen sind sogenannte Duplex-Stähle mit entsprechenden Eigenschaften notwendig [41].

Ein Einsatz von nichtrostendem Stahl als Primärpackmittel in der pharmazeutischen Industrie hingegen ist heutzutage wenig üblich. Hier kommt Aluminium wegen seines geringeren Gewichts und der leichteren Verformbarkeit größere Bedeutung zu. Daher existieren kaum Studien zur Risikoabschätzung in Hinblick auf eine Migration von Legierungsbestandteilen in das Arzneimittel. Spezielle regulatorische Vorschriften sind für Edelstahl ebenfalls nicht vorhanden.

Auf Grund entsprechender Untersuchungen aus dem Bereich der Lebensmittelindustrie und der Trinkwasserversorgung kann jedoch auch für die Verwendung von nichtrostendem Stahl als Primärpackmittel in der pharmazeutischen Industrie davon ausgegangen werden,

dass bei Wahl einer für die vorliegenden Bedingungen geeigneten Legierung ein Übergang von Legierungsbestandteilen auf das Arzneimittel nur eine untergeordnete Rolle spielt und daher kein gesundheitliches Risiko für den Patienten darstellt [41].

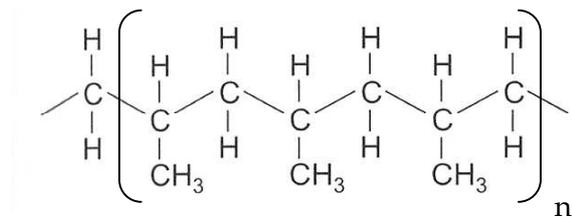
Da jedoch gerade in Hinblick auf das sensibilisierende Potential von Nickel keine unbedenkliche Konzentration angegeben werden kann, bei der eine allergische Reaktion ausgeschlossen werden kann, ist gerade die Herstellung parenteral zu verabreichender Arzneimittel mit Chrom-Nickel-Stahl als Hauptbestandteil des Primärpackmittels als kritisch anzusehen. Hilfsweise können zur Beurteilung des verwendeten Werkstoffs jedoch gesetzliche Höchstmengen für die Migration von Nickel aus Gegenständen, die unmittelbar und länger mit der menschlichen Haut in Berührung kommen, herangezogen werden. Diese sind in Anlage 5a der Bedarfsgegenständeverordnung [42] festgelegt. Nickelhaltige Bedarfsgegenstände, die unmittelbar und länger mit der Haut in Berührung kommen dürfen demnach maximal $0,5 \mu\text{g Nickel/ cm}^2/\text{ Woche}$ freisetzen. Ein Höchstwert von $0,2 \mu\text{g Nickel/ cm}^2/\text{ Woche}$ gilt für Stäbe jedweder Form, die in durchstochene Ohren oder andere durchstochene Körperpartien eingeführt werden (Ohringe und Piercings).

2.4.2.3 Polypropylene

Polypropylene gehören zur Gruppe der Polyolefine. Mit Polyethylen (PE) und Polypropylen (PP) stellen die Polyolefin-Kunststoffe die beiden am häufigsten verwendeten Kunststoffe dar [43]. Sie werden durch Polymerisation mit Hilfe spezieller Ziegler-Natta-Katalysatoren hergestellt. Die Wahl des Katalysators beeinflusst hierbei maßgeblich die Taktizität (stereochemische Anordnung der Seitenketten) und damit die thermo-mechanischen Eigenschaften des erhaltenen Polymers. Bei isotaktischer Anordnung zeigen alle Methylreste in die selbe Richtung. Bei syndiotaktischer Anordnung liegen die Methylgruppen alternierend auf den beiden Seiten des Polymerrückgrates. Bei ataktischen Polymeren sind

die Methylgruppen zufällig verteilt. Die größte Bedeutung besitzt heute das isotaktische Polymer (s. Abb. 3).

Abb. 3: Isotaktisches Polypropylen



Eine Polymerisation von Propen allein führt zum Polypropylen-Homopolymer, welches in der vorliegenden Arbeit Ausgangsmaterial für die Kunststoffkarpule des ATOX II-Injektors sowie für die im ATOX II und im AtroPen[®] eingesetzten Nadelführungen ist. Eine Polymerisation von Propen mit Comonomeren wie Ethen, 1-Buten oder höheren α -Olefinen führt zu Copolymeren mit veränderten Eigenschaften. Die thermo-mechanischen Eigenschaften von Polypropylen können neben der Taktizität oder der Verwendung von Comonomeren außerdem durch die mittlere molare Masse, deren Verteilung oder die Verwendung mineralischer Füllstoffe wie Talkum, Kreide oder Glasfasern in einem weiten Bereich variiert werden. Im Folgenden werden die Eigenschaften des Polypropylen-Homopolymers dargestellt.

Polypropylen ist ein teilkristalliner, thermoplastischer Kunststoff. Der Grad der Kristallinität wird maßgeblich durch die Taktizität des Polymers beeinflusst. So besitzt isotaktisches Polymer den größten kristallinen, ataktisches Polymer dagegen den größten amorphen Anteil. Die Glasübergangstemperatur von Polypropylen liegt bei 0 bis -10°C , weshalb es in diesem Temperaturbereich spröde und bruchanfällig wird. Eine kurzfristige Erwärmung bis

zu 140°C hingegen ist problemlos möglich. Die Dauerwärmebeständigkeit liegt bei 100°C [43]. Es ist jedoch nur nach entsprechender Stabilisierung UV-beständig. Polypropylen besitzt auf Grund seiner unpolaren Natur eine große Beständigkeit gegenüber polaren Lösungsmitteln, Säuren, Laugen und wässrigen Lösungen. Da es Mikroorganismen nicht als Nährboden dient, wird es von diesen nicht angegriffen. Steifigkeit, Härte und Festigkeit sind höher als bei Polyethylen. Außerdem neigt es im Vergleich zu Polyethylen weniger zu Spannungsrissen [28, 43]. Im Vergleich zu PVC (Polyvinylchlorid) weist Polypropylen eine geringere Dampfdurchlässigkeit auf, ist jedoch stärker permeabel für Gase wie Sauerstoff, Kohlendioxid und Stickstoff [28].

Für die Verwendung im Lebensmittelbereich und der Pharmazie ist Polypropylen geeignet, da es physiologisch unbedenklich sowie geruchlos und hautverträglich ist. Für die medizinische Verwendung werden spezielle Polypropylen-Zubereitungen angeboten, bei denen Dampf-, Ethylenoxid- oder Gammastrahlensterilisation möglich ist.

Im Europäischen Arzneibuch [29] ist in Abschnitt 3.1.3. (*Polyolefine*) festgelegt, welche Zusatzstoffe bis zu welchen Höchstmengen bei der Produktion von Polyolefin-Kunststoffen verwendet werden dürfen. Außerdem sind hier Identitäts- und Reinheitsprüfung für den zur Herstellung von Behältnissen verwendeten Rohstoff aufgeführt.

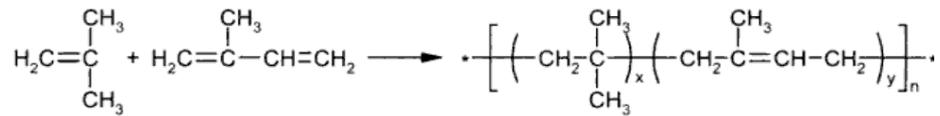
Polypropylen für Behältnisse und Verschlüsse zur Aufnahme parenteraler und ophthalmologischer Zubereitungen ist im Europäischen Arzneibuch [29] außerdem in Abschnitt 3.1.6. monographiert. Auch hier werden zulässige Additive mit Höchstmenge sowie Identitäts- und Reinheitsprüfungen für den Rohstoff festgelegt.

Die Monographie *Kunststoffbehältnisse und -verschlüsse für pharmazeutische Zwecke* (Abschnitt 3.2.2. in [29]) stellt weiterführende Anforderungen an das fertige Behältnis sowie die Wahl des geeigneten Materials für das Behältnis. So dürfen die verwendeten Materialien keine Substanzen enthalten, die durch das Füllgut in solchem Maße herausgelöst werden, dass Wirksamkeit oder Haltbarkeit des Füllguts verändert werden oder ein toxikologisches Risiko besteht, noch dürfen Bestandteile des Füllguts an der Oberfläche adsorbiert oder durch den Kunststoff absorbiert werden, um die Wirksamkeit und Sicherheit des Arzneimittels nicht nachteilig zu beeinflussen. Die Auswahl des Materials hat durch eine praktische Prüfung an Musterbehältnissen unter Bedingungen zu erfolgen, die einer späteren Verwendung entsprechen.

2.4.2.4 Butylkautschuk

Butylkautschuk (Kurzzeichen IIR), auch Isobuten-Isopren-Kautschuk, ist ein Elastomer, welches zu den Synthesekautschuken gezählt wird. Er ist ein Copolymerisat von 95–99 Mol% Isobuten und 1–5 Mol% Isopren (s. Abb. 4). Die Polymerisation erfolgt in Gegenwart von Aluminiumchlorid in Methylchlorid bei sehr tiefen Temperaturen (ca. -100°C) [43]. Durch die Höhe des Isoprenanteils wird die Anzahl der Doppelbindungen bestimmt, die nach der Polymerisation vorhanden ist und daher zur Vulkanisation oder zur Modifizierung durch Halogene (Chlorobutyl, Bromobutyl) zur Verfügung steht. Auf diese Weise können die verschiedenen Eigenschaften des erhaltenen Elastomers gesteuert werden. Die Vulkanisation von Halogenkautschuk erfolgt üblicherweise mit Schwefel, Zinkoxiden oder Peroxiden [43].

Abb. 4: Polymerisation von Isobuten und Isopren zu Butylkautschuk (aus [44])



IIR-Elastomere zeichnen sich durch eine geringe Gas- und Wasserdampfdurchlässigkeit sowie eine hohe Witterungs- und Alterungsbeständigkeit aus. Auf Grund ihres unpolaren Charakters quellen Butylkautschuke nur wenig in anorganischen und organischen Säuren sowie Heißwasser und Dampf bei bis zu 120°C [43]. Sie können im Temperaturbereich von – 40 bis +150°C eingesetzt werden. Die Hitzebeständigkeit wird durch eine Halogenierung noch weiter erhöht.

Im Europäischen Arzneibuch [29] ist in Abschnitt 3.2.9. die Monographie Gummistopfen für Behältnisse zur Aufnahme wässriger Zubereitungen zur parenteralen Anwendung, von Pulvern und gefriergetrockneten Pulvern abgefasst. Demnach müssen Verschlüsse so beschaffen sein, dass Bestandteile des Füllguts nicht an ihrer Oberfläche adsorbiert werden oder in den Verschluss hinein oder durch ihn hindurch diffundieren, sodass der Inhalt nachteilig verändert wird. Außerdem dürfen Verschlüsse keine Stoffe an das Füllgut abgeben, die dieses in Wirksamkeit oder Haltbarkeit verändern oder die ein toxikologisches Risiko darstellen.

Mögliche extrahierbare Bestandteile sind hier nach [28]:

- Antioxidantien
- Hilfsstoffe zur Herstellung
- Monomere niederen Molekulargewichts
- Polymerstabilisatoren
- Reaktionsnebenprodukte
- Weichmacher

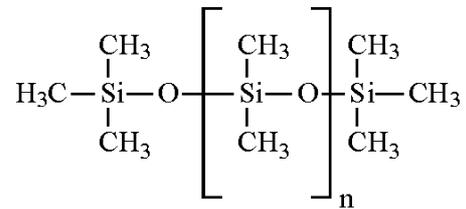
Zudem muss sichergestellt sein, dass Verschlussmaterial und Füllgut über die gesamte Laufzeit des Arzneimittels kompatibel sind.

Die in der vorliegenden Arbeit als Bestandteile der Primärpackmittel verwendeten Elastomerstopfen bestehen sämtlich aus Bromobutylkautschuk (BIIR) (s. Kapitel 4.2.).

2.4.2.5 Polydimethylsiloxan

Polydimethylsiloxan (PDMS) ist ein Polymer, bei dem Dimethylsilyl-Gruppen miteinander über Sauerstoffbrücken verbunden sind. Abhängig vom Ausmaß der Vernetzung bei der Polymerisation werden Silikonöle (linearer Aufbau, s. Abb. 5), Silikonharze (verzweigter Aufbau) oder Silikonelastomere (vernetzter Aufbau) erhalten. Im Folgenden sollen jedoch ausschließlich die Silikonöle genauer betrachtet werden.

Abb. 5: Struktur des unverzweigten PDMS



Silikonöle sind klare, farblose, neutrale, geruchsfreie, hydrophobe Flüssigkeiten deren Viskosität maßgeblich durch ihr Molekulargewicht beeinflusst wird. Sie sind als Reinsubstanzen oder in Form wässriger Emulsionen mit einer Konzentration von ca. 36% erhältlich. Letztere enthalten als weitere Bestandteile nichtionische Emulgatoren sowie häufig p-Hydroxybenzoesäure und deren Ester als Konservierungsmittel [45].

Neben der therapeutischen Verwendung als Entschäumer unter dem INN (International Nonproprietary Name) Dimeticon finden Silikonöle und deren Emulsionen in der pharmazeutischen Industrie breite Verwendung als Hilfsstoffe. Einen Überblick über die verschiedenen Einsatzgebiete, die erzielten Effekte und die verwendete Technik liefert Tabelle 3.

Des Weiteren besitzen Silikone eine Bedeutung für die medizinische Verwendung im Bereich der rekonstruktiven oder kosmetischen Chirurgie.

Tab. 3: Einsatzgebiete von Silikonölen als Hilfsstoffe in der pharmazeutischen Industrie

Einsatzgebiet	Erzielte Effekte	Technik
Überzüge fester Arzneiformen	<ul style="list-style-type: none"> • Verbesserung der Lagerbeständigkeit • Verringerung der Wasserdurchlässigkeit 	
Tablettierung	<ul style="list-style-type: none"> • Formentrennmittel 	Verdüsungsverfahren
Hydrophobisierung von Glas und Kunststoff	<ul style="list-style-type: none"> • Verringerung der Wandhaftung • Verbesserung des Ablaufverhaltens, Optimierung der Entnehmbarkeit • Verringerung der Adsorption von Arznei- und Hilfsstoffen an der Glaswand 	Einbrennsilikonisierung bei Glas, Verdüsungsverfahren bei Kunststoffen
Gleitmittel in Fertigspritzen und Kartuschen aus Glas oder Kunststoff	<ul style="list-style-type: none"> • Reduktion der Haft- und Gleitreibung zwischen Wand und Elastomerstopfen • Gewährleistung von Funktionalität und Sicherheit • Erhöhung der Bruchsicherheit 	Einbrennsilikonisierung bei Glas, Verdüsungsverfahren bei Kunststoffen
(Formen-) Trennmittel für Elastomerstopfen	<ul style="list-style-type: none"> • Erleichterung des HerauslöSENS aus der Produktionsform • Verhinderung des Zusammenklebens bei Bulkware • Verbesserung der Verarbeitbarkeit • Reduktion der Haft- und Gleitreibung 	Waschverfahren

Bei der Einbrennsilikonisierung wird eine wässrige Silikonemulsion mit einem PDMS-Gehalt von 0,5 bis 1,5% als Spülung oder durch Aufsprühen auf den Glaskörper aufgebracht und anschließend bei Temperaturen oberhalb 250°C für ein bis zwei Stunden ausgehärtet [46]. Die so aufgebrachte Silikonschicht kann jedoch unter Anwendung extremer Bedingungen, wie das Einwirken ethanolischer Kalium- oder Natriumhydroxidlösung, teilweise wieder entfernt werden [47]. Eine Aufbringung der Silikonschicht durch Tauchbäder ist für definierte technische Prozesse auf Grund der geringen Reproduzierbarkeit nicht anwendbar.

Da eine Einbrennsilikonisierung bei Kunststoffen und Elastomeren auf Grund der fehlenden Beständigkeit gegenüber den dabei herrschenden Temperaturen nicht möglich ist, erfolgt die Silikonisierung hier in Form eines Verdünnungs- oder Waschverfahrens. Beim Verdünnungsverfahren wird eine wässrige Silikonemulsion mit Hilfe von Sprühdüsen in dünnem Film aufgebracht und anschließend, gegebenenfalls unter Verwendung von Heißluft, getrocknet. Im Waschverfahren werden die zu silikonisierenden Produkte in eine Silikonemulsion gegeben und anschließend die überschüssige Waschflüssigkeit ablaufen lassen. Die „Fixierung“ des Silikonfilms erfolgt ebenfalls durch Trocknung mit Hilfe von Heißluft oder bei Raumtemperatur.

Die so aufgebrachten Silikonschichten besitzen nur geringe Bindung zur passivierten Oberfläche und können daher durch Reibung oder Abwaschen mit geeigneten Lösungsmitteln, wie eigene Versuche zeigten bei Einsatz von Ultraschall auch durch Wasser, wieder entfernt werden. Daher ist bei der Verwendung entsprechend silikonisierter Primärpackmittel zur Herstellung parenteral zu applizierender Arzneiformen immer von der Injektion geringer Mengen des verwendeten Silikonöls auszugehen. Die toxikologische Bewertung flüssiger Silikone ist jedoch nicht eindeutig. Akute sowie schwerwiegende

Komplikationen sind auf Grund der chemischen Inertheit sowie der sehr geringen applizierten Mengen jedoch nicht zu erwarten.

Im Europäischen Arzneibuch [29] existieren Monographien für Silikonöle sowohl zur therapeutischen Verwendung (Dimeticon) als auch zur Verwendung als Gleitmittel (Abschnitt 3.1.8 in [29]). Zur Verwendung als Gleitmittel ist danach nur PDMS mit einem Polymerisationsgrad von 400 bis 1200 und einer Viskosität von 1000 bis 30.000 cSt zu verwenden, das den in der Monographie aufgeführten Reinheits- und Identitätsprüfungen entspricht.

2.5 Aufbau der verwendeten Primärpackmittel

2.5.1 Glaskarpulen

Im Kombinationsautoinjektor liegt die Injektionslösung in einer Glaskarpule vor, welche zur Bruchsicherung mit einer Kunststofffolie überspannt ist. Die Injektionsnadel befindet sich außerhalb des Arzneistoffreservoirs, wird von diesem durch ein Septum aus Brombutylkautschuk abgetrennt und durch einen Elastomerüberzug, ebenfalls aus Brombutylkautschuk, geschützt. Am hinteren Ende ist die Karpule durch einen Stopfen aus Brombutylkautschuk verschlossen.

Abbildung 6 zeigt eine mit der originalen Arzneistofflösung gefüllte Injektionskarpule.

Für die vorliegende Untersuchung wurden entsprechend dem Probenahmeplan Injektionskarpulen aus Glas nach dem Autoklavieren mit den unter 4.3.2 beschriebenen Modelllösungen sowie Wasser für Injektionszwecke unter sterilen Bedingungen befüllt.

Abb. 6: gefüllte Injektionskarpule aus dem Kombinationsautoinjektor

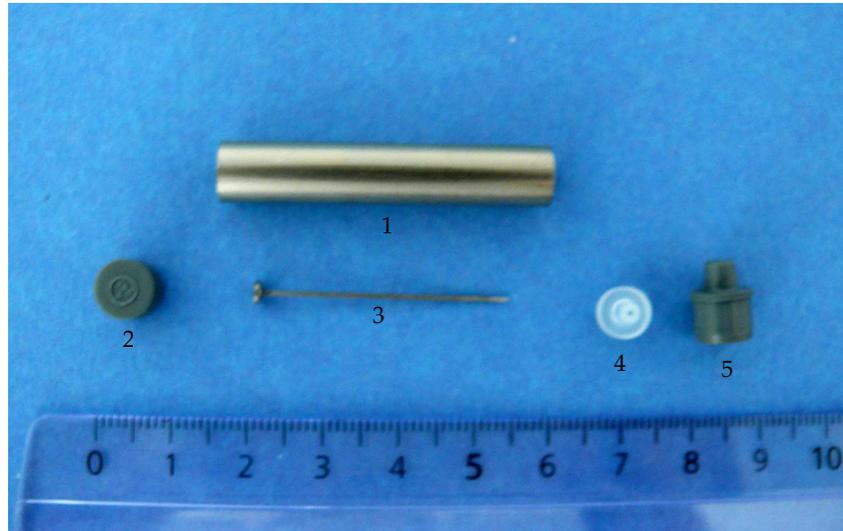


- 1: Elastomerstopfen
- 2: Injektionskarpule aus Glas mit Atropinsulfat-Obidoximchlorid-Lösung (hier ohne Bruchsicherungsfolie)
- 3: Bördelverschluss aus Aluminium, darunter befindet sich ein Septum zur Trennung von Arzneimittelreservoir und Injektionsnadel
- 4: Injektionsnadel mit Nadelschutz aus Latexgummi

2.5.2 Metallkarpulen

Im AtroPen[®] befindet sich die Injektionslösung in einer Stahlhülse aus V2A-Stahl (s. Kapitel 2.4.2.2.), welche mit einer Silikonemulsion passiviert ist. In der Karpule befindet sich neben der Arzneistofflösung die Injektionsnadel, welche ebenfalls aus passiviertem V2A-Stahl besteht, sowie eine Nadelführung aus Polypropylen. Die Hülse ist an beiden Enden durch einen Elastomerstopfen aus Brombutylkautschuk verschlossen. Abbildung 7 zeigt die einzelnen Bauteile.

Abb. 7: Bauteile des AtroPen® - Autoinjektors



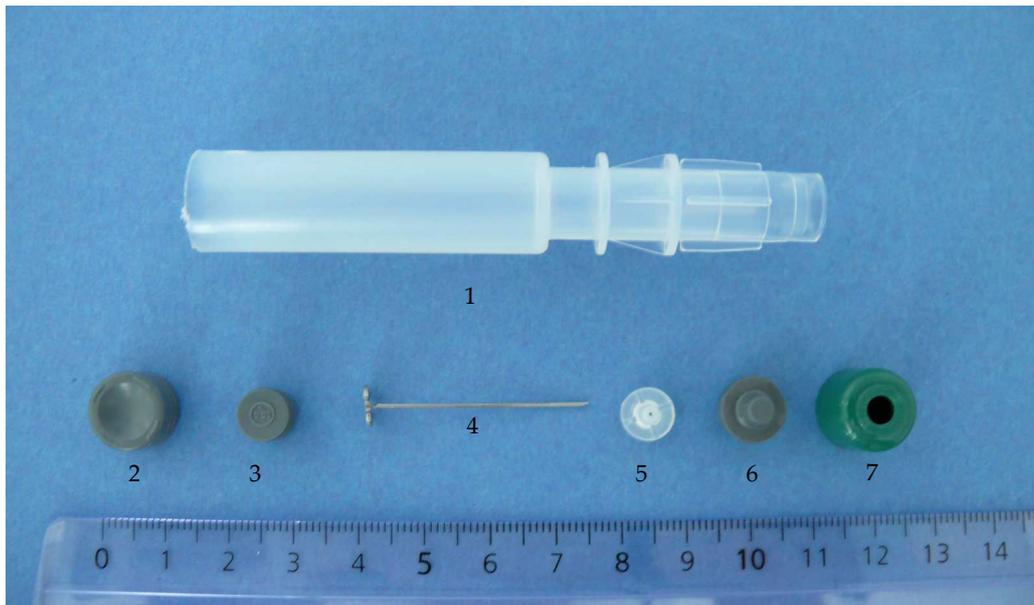
- 1: Injektionskarpule aus passiviertem Edelstahl
- 2: hinterer Elastomerstopfen
- 3: Injektionsnadel
- 4: Nadelführung
- 5: vorderer Elastomerstopfen

2.5.3 Kunststoffkarpulen

Das Arzneistoffreservoir des Zwei-Kammer-Injektors ATOX II besteht aus Polypropylen, welches durch Tauchen in eine Silikonemulsion passiviert wurde. In der vorderen Kammer befindet sich neben der Atropin-Injektionslösung die passivierte Injektionsnadel aus V2A-Stahl und eine Nadelführung aus Polypropylen. Die Kammern sind voneinander durch einen Elastomerstopfen aus Brombutylkautschuk getrennt und nach außen hin durch Elastomerstopfen aus Brombutylkautschuk verschlossen. Der vordere Stopfen ist durch eine

Kunststoffkappe gegen Herausrutschen gesichert. Abbildung 8 zeigt die Bauteile des ATOX-II-Autoinjektors.

Abb. 8: Bauteile des ATOX-II-Autoinjektors



- 1: Injektionskarpule aus Kunststoff
- 2: hinterer Elastomerstopfen
- 3: mittlerer Elastomerstopfen, Trennung der beiden Kammern
- 4: Injektionsnadel
- 5: Nadelführung
- 6: vorderer Elastomerstopfen
- 7: Kunststoffkappe, die vorderen Stopfen vor dem Herausrutschen sichert

3 Bestimmung der pharmazeutischen Qualität von Atropinsulfat mittels Rapid-Resolution-LC (RRLC)

3.1 Allgemeines

Mit dem 1. Nachtrag zur 6. Ausgabe des Europäischen Arzneibuchs nahm die HPLC (High performance liquid chromatography) Einzug in die Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat [48]. Bis dahin wurde diese Bestimmung gemäß der Monographie mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Ein weiterer, ebenfalls älterer Ansatz zur Gehalts- und Reinheitsbestimmung ist die UV-photometrische Bestimmung von Atropin und seinen Abbauprodukten, wie sie beispielsweise von *Zvirblis, et. al* [10], *Kondritzer* und *Zvirblis* [11] sowie *Lund* und *Waalder* [12, 49] bei ihren Studien zu Stabilität und Abbau des Atropins in Lösung genutzt wurde. Hier hat es sich jedoch gezeigt, dass auf Grund unterschiedlicher molarer Extinktionskoeffizienten von Atropin und Apoatropin eine differenzierte Analyse in einigen Fällen nicht möglich ist.

Im Zuge der Instrumentalisierung der pharmazeutischen Analytik wurden zunächst mehr und mehr gaschromatographische Methoden zur Bestimmung der pharmazeutischen Qualität atropinhaltiger Arzneimittel etabliert [50]. Hierbei wird üblicherweise ein Flammenionisations-Detektor (FID) verwendet, der gegenüber der UV-photometrischen Detektion den Vorteil bietet, dass auch nicht oder nur wenig UV-aktive Abbau- und Nebenprodukte des Atropins detektierbar sind. Heute findet vor allem die GC-MS-Kopplung Anwendung bei der Atropinanalytik in Pflanzenextrakten sowie für die toxikologische Analyse.

Ein häufig veröffentlichter Ansatz zur flüssigchromatographischen Bestimmung der Reinheit und des Gehalts von Atropinsulfatlösungen ist eine Umkehrphasen-

chromatographie unter Verwendung von Ionenpaarbildnern [51–55]. Auch die im Europäischen Arzneibuch monographierte Methode zur Bestimmung der Reinheit von Atropinsulfat stellt eine Ionenpaarchromatographie (IPC) dar [48].

Der Zusatz eines Ionenpaarreagens ermöglicht die Trennung stark basischer Moleküle, die sonst durch die Protonierung im neutralen oder leicht sauren Milieu eines HPLC-Fließmittels zu starken Tailingscheinungen im Chromatogramm führen. Durch Zusatz eines Gegenions, das die positive Molekülladung der Analyten ausgleicht, wird das Tailing verringert. Da die meisten stationären Phasen gegenüber alkalischer Pufferlösungen nicht ausreichend stabil sind, ist eine Elution des deprotonierten Moleküls auf diese Weise meist nicht möglich.

Nachteil der Ionenpaarchromatographie ist eine äußerst lange Equilibrierungszeit der Säule, die bei der Verwendung von Gradientenelutionen zu einer Verlängerung der Laufzeit durch die nur langsam ablaufende Reequilibrierung der Säule führt. Zudem sind IPC-Methoden oft wenig robust.

Kirchhoff und *Bitar* [56] stellten fest, dass bei Verwendung von HPLC-Trennsäulen mit C₁₈-endcapped-Material auf einen Zusatz von Ionenpaarreagenz verzichtet werden kann, da dieses Material in gleichem Maße dazu in der Lage ist mit geladenen wie auch mit ungeladenen Molekülen in Wechselwirkung zu treten. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit, auch für stark basische Moleküle HPLC-Methoden ohne die für Ionenpaarchromatographie typische lange Equilibrierungszeit zu entwickeln und so den Zeitaufwand für die routinemäßige Arzneimitteluntersuchung zu verkürzen.

Weiteres Optimierungspotential hinsichtlich der Analysendauer und dem damit verbundenen Lösungsmittelverbrauch bieten neuere flüssigchromatographische Techniken

wie die sogenannte Rapid Resolution Liquid Chromatography (RRLC) oder die Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC).

Bei der RRLC-Technik ist durch die Verwendung kurzer Säulen (50 mm) eine schnelle oder ultraschnelle Trennung im Minuten- beziehungsweise Sekundenbereich möglich. Bei Verwendung entsprechend langer Säulen kann ebenfalls eine hochauflösende Chromatographie durchgeführt werden. Die Trennleistung wird bei der schnellen oder ultraschnellen Chromatographie trotz Verwendung kurzer Säulen durch den Einsatz stationärer Phasen mit einer Partikelgröße von unter zwei Mikrometern (sub2micron) erhalten. Diese führen zu einer Erhöhung der Trennstufenzahl, da sich durch das verringerte Partikelvolumen der C-Term der van-Deemter-Gleichung (Masseübergang zwischen mobiler und stationärer Phase; s. Gleichung 1) zwischen und in den Partikeln auf Grund verkürzter Diffusionswege verringert. Die hieraus resultierende Verringerung der Peakbreite ermöglicht eine Basislinientrennung auch bei kurz nacheinander eluierenden Molekülen. Des Weiteren führt eine Verringerung des Massetransfers an der stationären Phase dazu, dass die Trennstufenzahl in geringerem Maße von der Flussrate der mobilen Phase beeinflusst wird. Daher besitzen Sub2micron-Materialien auch bei höheren Flussraten eine gute Trennleistung und die Analysendauer kann durch Einsatz höherer Flussraten weiter reduziert werden.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (1)$$

H:	Trennstufenhöhe	A:	Streudiffusion	B:	Longitudinaldiffusion
C:	Massenübergangsterm	u:	Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase		

Der limitierende Faktor bei der Reduktion der Partikelgröße ist der entstehende Säulendruck. Durch Anpassung der Korngrößenverteilung kann hier in gewissem Maße

entgegengewirkt werden. Zur Ausnutzung aller Möglichkeiten der Einsparung von Analysenzeit und Lösungsmittel sind jedoch spezielle HPLC-Systeme notwendig, die Drücke von bis zu 600 bar bewältigen können. Diese Anlagen sind außerdem hinsichtlich etwaiger Totvolumina so optimiert, dass diese sich nicht negativ auf die erzielte, hocheffektive Trennung auswirken.

Die UHPLC-Technik zeichnet sich gegenüber der konventionellen HPLC- sowie der RRLC-Technik vor allem durch den Einsatz extrem hoher Flussraten aus. Auch hier kommen spezielle stationäre Phasen mit Sub2micron-Material zum Einsatz, die das Arbeiten bei einem Säulendruck von bis zu 1200 bar ermöglichen.

Aehle und *Dräger* [50] haben 2010 ein Review über chromatographische und elektrophoretische Techniken zur Analyse von Tropaalkaloiden veröffentlicht. Eine Verwendung von Sub2micron-Material in der Analytik von Atropinsulfat ist hiernach bisher noch nicht beschrieben.

3.2 Methodenentwicklung

Mit dem Ziel, eine weniger zeitaufwändige und im Lösungsmittelverbrauch günstigere Methode zur Bestimmung der pharmazeutischen Qualität von atropinhaltigen Injektabilia mittels HPLC zur Verfügung zu haben, wurde ausgehend von der Prüfvorschrift eines Herstellers der von der Bundeswehr bevorrateten Atropinautoinjektoren eine Rapid-Resolution-LC-Methode entwickelt und validiert.

Die zu Grunde gelegte Herstellervorschrift beruht, vergleichbar zu der durch *Kirchhoff et al.* [56] 2004 veröffentlichten Methode, auf einer Trennung an einer C₁₈-endcapped-Säule

(250 x 4,6 mm) mit einer Partikelgröße von 5 µm. Die mobile Phase setzt sich aus Wasser und Acetonitril zusammen, die jeweils 0,1% Phosphorsäure zur pH-Wert-Einstellung enthalten. Die Detektion erfolgt UV-photometrisch bei 220 nm. Die Analysendauer beträgt mit dieser Methode 45 Minuten. Weitere Methodenparameter können aus Gründen der Vertraulichkeit hier nicht veröffentlicht werden.

Für die Entwicklung der RRLC-Methode wurde zunächst an Hand der U.S.P.-Säulen-Datenbank [57] ein Säulenmaterial ermittelt, dessen Eigenschaften mit denen der in der Herstellervorschrift verwendeten Säule vergleichbar sind. Zusätzlich musste eine stationäre Phase gefunden werden, die auch in Form kurzer Säulen mit Sub2micron-Partikeln erhältlich ist. Diese Voraussetzungen werden durch die von der Firma Agilent angebotene Säule Zorbax StableBond C18 erfüllt. Das Zorbax StableBond C18-Material stellt keine stationäre Phase mit hydrophilem Endcapping dar, sondern besitzt raumgreifende Diisobutyl-Seitenketten, die die Hydrolyseneigung der Alkylsilylgruppen verringern und freie Silanolgruppen abschirmen sollen. Es ist jedoch für die Trennung polarer Moleküle in einem pH-Bereich von 1 bis 8 sowie für die Verwendung mit mobilen Phasen mit hohem wässrigen Anteil geeignet, sodass die weitere Methodenentwicklung mit der Zorbax StableBond C18 RRHT Säule (4,6 x 50 mm, 1,8 µm) durchgeführt wurde.

Da nach *Bitar* [58] eine isokratische Trennung von Atropin und seiner Abbauprodukte nicht möglich ist, wurde der in der Herstellervorschrift angegebene Gradient mit Hilfe eines Computerprogramms für die Umstellung konventioneller HPLC-Methoden auf RRLC-Anwendungen an die veränderten Säulendimensionen angepasst. Durch Testläufe mit Lösungen der relevanten Einzelsubstanzen (s. Tab. 4) und verschiedener Mischungen daraus (s. Tab. 5) wurde zunächst die generelle Eignung des ausgewählten Säulenmaterials

für die vorliegende Anwendung geprüft. Die Retentionsreihenfolge entspricht der in Tabelle 4 angegebenen.

Tab. 4: Relevante Substanzen für die flüssigchromatographische Bestimmung der pharmazeutischen Qualität von atropinsulfathaltigen Injektabilia

Substanz	Konzentration Stammlösung
Citronensäure/ Natriumcitrat	3,5 mg/ml
Scopolamin	0,48 mg/ml
Noratropin	0,48 mg/ml
Atropin (Base)	0,48 mg/ml
Tropasäure	0,48 mg/ml
Phenol	0,11 mg/ml
Apoatropin	0,48 mg/ml
p-Hydroxybenzoesäuremethylester	0,07 mg/ml
Atropasäure	0,48 mg/ml

Tab. 5: Mischungen zur Überprüfung der Säuleneignung und zur Methodenentwicklung

	Substanzen	Konzentration
Mischung 1	Atropin + Tropasäure	jeweils 2,4 µg/ml
Mischung 2	Atropin + Apoatropin	jeweils 2,4 µg/ml
Mischung 3	Atropin + Atropasäure	jeweils 2,4 µg/ml
Working Standard 1	Atropin + Tropasäure + Apoatropin + Atropasäure	jeweils 2,4 µg/ml
Working Standard 2	Atropin + Tropasäure + Apoatropin + Atropasäure + Scopolamin + Noratropin + Phenol + pHB-Methylester	jeweils 1,2 µg/ml

Es stellte sich heraus, dass auf Grund der Leistungsfähigkeit und Auflösung der Methode sowohl Atropin und Tropasäure als auch Apotropin und p-Hydroxybenzoesäuremethylester (pHB-Methylester) kritische Peakpaare mit geringen Unterschieden in den Retentionszeiten darstellen. Unter den verwendeten Bedingungen zeigt Atropin zudem starkes Tailing. Des Weiteren fällt der Peak des als Puffer in den zu untersuchenden Arzneimitteln enthaltenen Natriumcitrats mit dem Injektionspeak zusammen. Daher wurden Versuche zur Optimierung der mobilen Phase unternommen, die zu einer Verbesserung der Auflösung zwischen den beiden kritischen Peakpaaren, der Verbesserung der Symmetrie des Atropinpeaks sowie der Trennung des Citrat- vom Injektionspeak führen sollten. Hierzu gehörte die Erhöhung des Phosphorsäureanteils auf 3% und daraus folgend eine Herabsetzung des pH-Wertes in der mobilen Phase sowie eine Anpassung des Gradienten.

Zur Verringerung des Drucks wurde die Säulentemperatur auf 50°C heraufgesetzt, woraufhin eine Reduktion der Flussrate der mobilen Phase von 1,5 auf 1,0 ml/min nötig war. Hierdurch kann zusätzlich weiteres Einsparungspotential im Bereich des Lösungsmittelverbrauchs ausgenutzt werden. Außerdem führte die Temperaturerhöhung zu einer Reduktion der Peakhalbwertsbreiten. Da Tropasäure und Atropin hinsichtlich Retentionszeit und Peakhalbwertsbreite unterschiedlich stark beeinflusst werden, konnte so eine Verbesserung der Auflösung zwischen diesen Molekülen erzielt werden.

Durch Anpassung des aufgegebenen Probenvolumens an die geringere Säulenkapazität konnte die Peaksymmetrie des Atropins weiter verbessert werden.

Die unzureichende Auflösung zwischen Apotropin und pHB-Methylester konnte durch die Fließmittelzusammensetzung, Änderung des Gradienten oder Temperaturerhöhung nicht

ausreichend verbessert werden. Allerdings kann durch Detektion bei 256 nm die Anwesenheit des pHB-Esters eindeutig festgestellt werden, da Apoptropin hier einen sehr geringen Extinktionskoeffizienten besitzt und daher bei den üblicherweise nach Atropinabbau auftretenden Mengen kein Signal verursacht. Der pHB-Methylester zeigt bei 256 nm ein gegenüber 220 nm um ein Vielfaches größeres Signal, was ebenfalls zur Unterscheidung der beiden Substanzen herangezogen werden kann.

Nach der Ausschöpfung des Optimierungspotentials kann die Analysendauer für die Untersuchung einer Probe gegenüber der zu Grunde liegenden Herstellermethode um fast ein Fünftel von 45 auf 10 Minuten verkürzt und der Lösungsmittelverbrauch entsprechend verringert werden. Die finale Methode basiert auf folgenden Parametern:

Gerät:	LC 1100 Agilent Technologies	
Trennsäule:	Zorbax®SB C ₁₈ RRHT, 4,6 x 50 mm, 1,8 µm, 80 Å	
Elutionsmittel:	A: 3% (V/V) Phosphorsäure (85%) in Wasser B: 3% (V/V) Phosphorsäure (85%), 90% (V/V) Acetonitril in Wasser	
Gradient:	t [min]	B [%]
	0	16
	0,2	16
	2,2	40
	6	16
	8	16
Fluss:	1,0 ml/min	
Detektionswellenlänge:	220 und 256 nm	
Injektionsvolumen:	2 µl	
Temperatur:	50°C	
Laufzeit:	10 min	

3.3 Validierung

3.3.1 Allgemeines

Die Validierung einer Analysenmethode dient der Feststellung, ob diese Methode für den vorgesehenen Verwendungszweck geeignet ist. Hierbei genügt jedoch nicht nur die Feststellung dieser Tatsache durch entsprechende Untersuchungen, sondern die Führung des entsprechenden Nachweises durch Dokumentation der Ergebnisse ist integraler Bestandteil einer Validierung.

Für die Methodvalidierung in der pharmazeutischen Analytik harmonisiert die *ICH-Richtlinie Q2 (R1) Validierung analytischer Methoden: Text und Methodik* [59] die durch die europäische (EMA), US-amerikanische (FDA) und japanische Arzneimittelzulassungsbehörde gestellten Bestimmungen und Anforderungen an validierte, analytische Methoden. Außerdem ist die Validierung in der EN ISO/IEC 17025:2005 [60] als Werkzeug der Qualitätssicherung verankert. In der U.S.P existiert, anders als im Europäischen Arzneibuch, eine Monographie zur Validierung von Methoden [61].

Im Folgenden sollen die zur Validierung der unter 3.2. beschriebenen Methode erhobenen Parameter definiert und die erhaltenen Validierungsergebnisse vorgestellt und bewertet werden. Eine vollständige Übersicht über die Validierungsergebnisse geben Tabelle A-1 und A-3 im Anhang.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Methodvalidierung gemäß ICH-Richtlinie Q2 (R1).

3.3.2 Linearität

Bei der Prüfung auf Linearität wird der mathematische Zusammenhang zwischen Messsignal und Konzentration oder Menge des Analyten ermittelt. Bei einem linearen Zusammenhang ist das erhaltene Signal direkt proportional zur Konzentration. Bei den meisten Analysemethoden existiert jedoch nur ein bestimmter Konzentrationsbereich, für den dieser lineare Zusammenhang besteht, sodass der **Arbeitsbereich** der Methode hierdurch beschränkt wird. Im Arbeitsbereich sind zudem Richtigkeit und Präzision für den vorgesehenen Verwendungszweck geeignet.

Für die Bestimmung des linearen Arbeitsbereiches und die Überprüfung der Linearität wurden sechs unabhängige Standardlösungen im Bereich 0,3 bis 0,7 mg Atropin/ ml durch Einwaage entsprechender Mengen Standardsubstanz Atropinsulfat-Monohydrat hergestellt, einer Doppelbestimmung unterzogen und nach linearer Regression sowie der Regression 2. Grades ein Anpassungstest nach Mandel mit $P = 99\%$ durchgeführt.

Beim Test nach Mandel werden für die Regression ersten und zweiten Grades jeweils die Summe der Abweichungsquadrate berechnet. Anschließend wird ein F-Test durchgeführt, indem die Differenz dieser Summen durch die Restvarianz aus der quadratischen Anpassung geteilt und der so erhaltene Wert mit dem Tabellenwert der F-Verteilung verglichen wird. Ist der berechnete Wert kleiner als der Tabellenwert, liegt ein linearer Zusammenhang von Eingangs- und Ausgangsgröße vor [62].

In der vorliegenden Arbeit wurde bei nachgewiesener Linearität für den Korrelationskoeffizienten der Geradengleichung das Akzeptanzkriterium mit $R^2 > 0,998$ festgelegt.

Auf Grund des Mandel-Tests mit F ($f_1 = 1, f_2 = 3, P = 99\%$) kann für die vorliegende Methode im Bereich von 0,31 mg/ml bis 0,74 mg/ml ein linearer Zusammenhang zwischen Atropinsulfatkonzentration und Peakfläche festgestellt werden. Die Kalibrierfunktion 1. Grades weist einen Korrelationskoeffizienten von 0,999 auf.

3.3.3 Richtigkeit

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung des mit der Methode ermittelten mit dem als richtig angesehenen Wert. Die Richtigkeit wird maßgeblich durch systematische Fehler in einer Methode beeinflusst. Im Falle von Trennverfahren wie der HPLC kann Richtigkeit nur bei vorhandener Selektivität und bekannter Wiederfindungsrate vorliegen [63].

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurde zum Einen die Wiederfindung nach Aufstockung einer Atropinsulfat-Injektionslösung aus dem ATOX-II-Autoinjektor sechsfach bestimmt. Zum Anderen wurden die Richtigkeit durch parallele Bestimmung von Atropin und Abbauprodukten in stressgelagerten ATOX-II-Injektoren sowohl mit der neu entwickelten als auch mit der validierten Herstellermethode überprüft. Hierzu wurden die mit beiden Methoden ermittelten Ergebnisse für Atropin und eventuell auftretende Abbauprodukte mittels Differenz- t -Test ($P = 95\%$) auf signifikante Unterschiede überprüft.

3.3.3.1 Wiederfindung

Zur Herstellung der Wiederfindungsansätze werden folgende Lösungen verwendet:

Analysenlösung: Atropinlösung aus ATOX II ComboPen[®], Verdünnung 1:5 mit Wasser, entspricht 0,48 mg/ml Atropin (Base)

Kalibrierlösung: Atropinsulfat-Standard in Wasser, 0,73 mg/ml Atropin (Base)

Lösungsmittel: Millipore-Wasser

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Methode werden folgende Mischungen aus den oben angegebenen Lösungen hergestellt:

Lösung 1: 0,5 ml Analysenlösung + 0,1 ml Kalibrierlösung
entspricht 0,52 mg/ml Atropin (Base)

Lösung 2: 0,5 ml Analysenlösung + 0,1 ml Lösungsmittel
entspricht 0,4 mg/ml Atropin (Base)

Lösung 3: 0,5 ml Lösungsmittel + 0,1 ml Kalibrierlösung
entspricht 0,12 mg/ml Atropin (Base)

Die Wiederfindungsrate berechnet sich aus den Peakflächen dieser Lösungen gemäß Gleichung 2. Die Peakflächen werden jeweils doppelt bestimmt. Die Wiederfindungsrate soll zwischen 95 und 105% betragen.

$$W = \frac{S_1 - S_2}{S_3} \cdot 100\% \quad (2)$$

W: Wiederfindungsrate

S₁: Peakfläche des Atropinpeaks in Lösung 1

S₂: Peakfläche des Atropinpeaks in Lösung 2

S₃: Peakfläche des Atropinpeaks in Lösung 3

Durch Doppelbestimmung der oben beschriebenen Lösungen wird für Atropinsulfat eine Wiederfindungsrate von 98% ermittelt. Die Richtigkeit der Methode ist damit nachgewiesen.

3.3.3.2 Methodenvergleich

Für den Methodenvergleich zur Überprüfung der Richtigkeit der neu entwickelten RRLC-Methode werden ATOX II ComboPen[®]-Injektoren für zwei beziehungsweise vier Monate bei 40°C und 75% relativer Luftfeuchte gelagert. Anschließend werden die enthaltenen Atropinsulfatlösungen sowohl mit der RRLC- als auch mit der Herstellermethode auf ihren Atropinsulfatgehalt und etwaige auftretende Abbauprodukte hin untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden mit Hilfe eines Differenz-*t*-Tests mit *P* = 95% auf signifikante Unterschiede geprüft.

Im Konzentrationsbereich von 0,46 bis 0,51 mg/ml Atropin können zwischen den beiden Methoden keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Quantifizierung des Arzneistoffs oder die Bestimmung seiner Abbauprodukte Tropasäure und Apotropin festgestellt werden. Eine Bildung von Atropasäure wird nicht beobachtet.

3.3.4 Präzision

Die Präzision einer Methode ist ein Maß für die durch zufällige Fehler verursachten Schwankungen der erhaltenen Messwerte. Auf Grund der Ursache dieser systematischen Fehler lassen sich die System- und die Methodenpräzision unterscheiden.

In die Systempräzision gehen alle Schwankungen der Analysenwerte ein, die allein durch das Analysengerät verursacht werden können, während in der Methodenpräzision alle im Laufe der gesamten Analyse, einschließlich Probennahme und –vorbereitung, auftretenden zufälligen Fehler enthalten sind.

Außerdem werden Wiederhol-, Labor- und Vergleichspräzision unterschieden.

Für die vorliegende Arbeit wurde die System-, die Methoden- sowie die Wiederholpräzision der Methode ermittelt.

Für die Bestimmung der Präzision wurden die Atropinlösungen aus drei ATOX-II-Injektoren gepoolt und aus dieser Lösung die verschiedenen Präzisionsversuche durchgeführt.

3.3.4.1 Systempräzision

Zur Ermittlung der Systempräzision wurde ein Aliquot der gepoolten Atropinlösung kurz hintereinander sechsfach bestimmt. Die sich daraus ergebende intraserielle relative Standardabweichung (RSD) darf nicht größer als 2% sein.

Die intraserielle relative Standardabweichung der Methode in Bezug auf die Quantifizierung von Atropin beträgt 0,57%.

3.3.4.2 Methodenpräzision

Zur Überprüfung der Methodenpräzision wurde der gesamte Analysengang an Hand der gepoolten Atropinlösungen aus den ATOX-II-Injektoren kurz hintereinander sechsfach durchgeführt und der Atropingehalt jeder so erhaltenen unabhängigen Probe doppelt bestimmt.

Die hieraus ermittelte interserielle relative Standardabweichung muss ebenfalls kleiner 2% sein.

Die interserielle relative Standardabweichung der Methode in Bezug auf die Quantifizierung von Atropin beträgt 0,65%.

3.3.4.3 Wiederholpräzision

Für die Bestimmung der Wiederhol- oder auch Mehrtagespräzision wurde der gesamte Analysengang an der gepoolten Atropinlösung aus den ATOX-II-Injektoren sechs Mal an sechs unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Die so erhaltenen unabhängigen Proben wurden ebenfalls doppelt bestimmt.

Die relative Standardabweichung der ermittelten Werte muss kleiner 2% sein.

Die relative Standardabweichung des Wiederholversuchs beträgt 0,8%.

3.3.5 Selektivität

Die Selektivität einer Methode entspricht ihrer Eignung, verschiedene Komponenten störungsfrei nebeneinander bestimmen und daher eindeutig identifizieren zu können.

Um die Selektivität der Methode zu überprüfen, wurde die Probenmatrix, eine wässrige Natriumcitrat-Lösung, sowie eine atropinhaltige Lösung aus einem AtroPen[®]-Injektor dem gesamten Analysengang unterzogen und die erhaltenen Chromatogramme mit denen der Referenz-Chromatogramme des Atropinsulfats sowie seiner bekannten Verunreinigungen verglichen. Dabei dürfen im Chromatogramm der Probenmatrix keine Peaks mit den Retentionszeiten des Arzneistoffs oder seiner Abbauprodukte auftreten.

Die Chromatogramme der Citratlösung und der Lösung aus dem AtroPen[®]-Injektor sind in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

Abb. 9: Chromatogramm der Atropinlösung aus dem AtroPen[®]-Autoinjektor

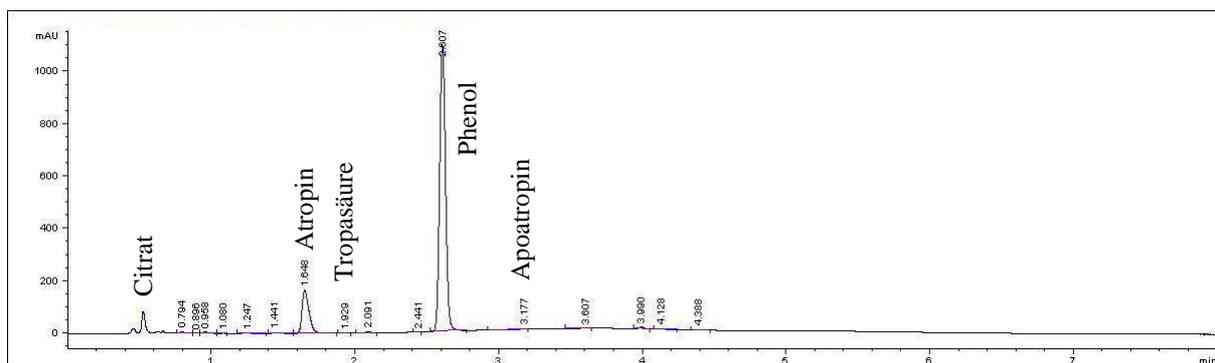
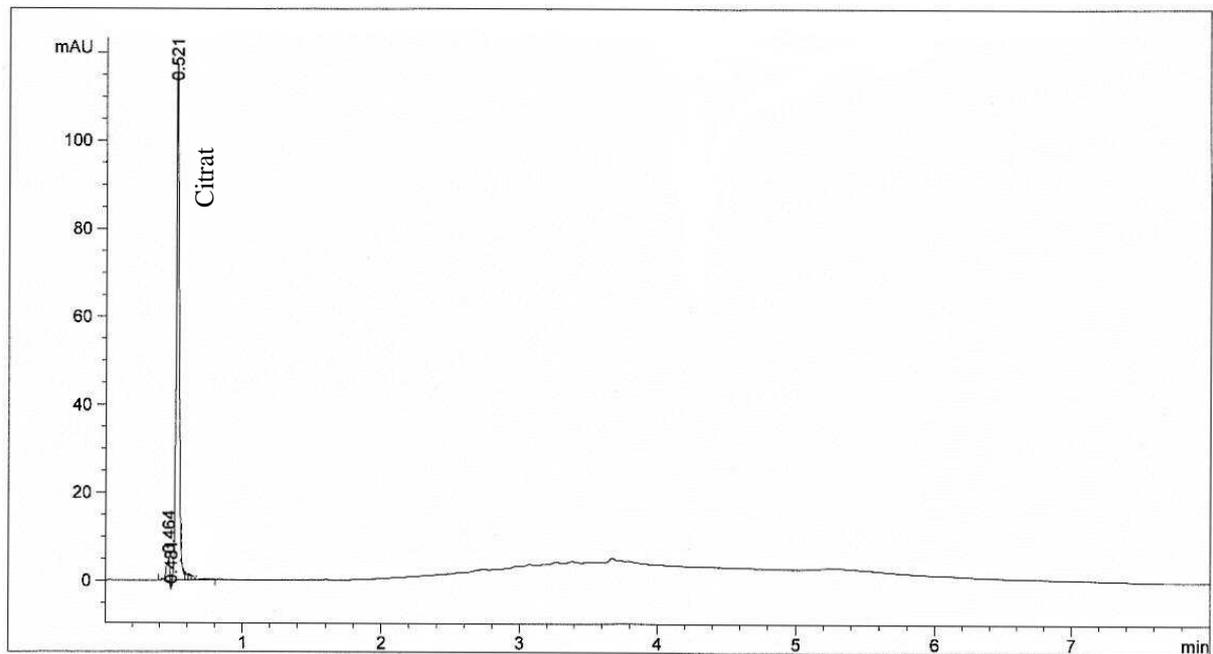


Abb. 10: Chromatogramm der Natriumcitratlösung



Es können in der wirkstofffreien Matrixlösung keine Peaks bei den Retentionszeiten des Atropins oder seiner relevanten Abbauprodukte festgestellt werden.

3.3.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die **Nachweisgrenze** (Limit of detection: LOD) einer Methode bezeichnet die geringste noch eindeutig identifizierbare Menge einer Substanz. Das Signal-Rausch-Verhältnisses beträgt hier 2:1.

Die **Bestimmungsgrenze** (Limit of quantification: LOQ) entspricht der Substanzmenge, die gerade noch mit ausreichender statistischer Sicherheit (üblicherweise $P = 95\%$) sicher quantifiziert werden kann. Sie entspricht einem Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1.

Die ICH Q2 gibt drei Möglichkeiten zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze an:

visuelle Auswertung einer Verdünnungsreihe zur Ermittlung der Konzentration, bei der die Anwesenheit einer Substanz im Chromatogramm nicht mehr eindeutig festgestellt werden kann

Berechnung aus der Standardabweichung des Blindwertes (Leerwertmethode)

Berechnung aus der Kalibrierfunktion (Kalibriergeradenmethode)

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurde in der vorliegenden Arbeit die Kalibriergeradenmethode herangezogen. Da LOQ und LOD vor allem für die Verunreinigungen in der Atropinlösung und nicht für den Wirkstoff selbst von Belang sind, werden LOQ und LOD nur für die in Tabelle 4 angegebenen Substanzen bestimmt. Die angegebenen Werte entsprechen dem Verhältnis der Peakflächen der jeweiligen Substanz zu der des Atropins im selben Chromatogramm, gegebenenfalls unter Berücksichtigung etwaiger Responsefaktoren.

Aus einer 0,2%-igen Stammlösung (Zusammensetzung s. Tabelle 5) werden Lösungen mit den Gehalten 0,175%, 0,15%, 0,125%, 0,1%, 0,075%, 0,05% und 0,025% hergestellt.

Zu Berechnung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze wird ein Signifikanzniveau von $P = 95\%$ festgelegt.

Tab. 5: Zusammensetzung der 0,2%-igen Stammlösung

Substanz	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Atropin	0,96
Tropasäure	0,96
Apoatropin	0,96
Atropasäure	0,96
pHB-Methylester	0,96
Phenol	1,08

Die Verunreinigungen Phenol und pHB-Methylester können als Migrationsstoffe nach der Lagerung des ATOX-II-Autoinjektors in der Arzneistofflösung nachgewiesen werden.

3.3.6.1 Zusammenfassung

Mit der unter 3.2. beschriebenen Methode ist eine Bestimmung von Gehalt und Reinheit einer Atropinsulfat-Injektionslösung im Arbeitsbereich von 0,31 bis 0,74 mg/ml Atropin möglich. Linearität, Selektivität und Richtigkeit konnten für diesen Konzentrationsbereich nachgewiesen werden. Mit der entwickelten Methode kann der Gehalt an Atropinsulfat in entsprechenden Injektabilia präzise bestimmt werden und auftretende Abbauprodukte des Wirkstoffs oder aus dem Primärpackmittel stammende Migrationsstoffe frühzeitig nachgewiesen werden.

3.4 Material, Methoden und Software

Geräte

HPLC-Anlage:	1100 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, USA mit binärer Gradientenpumpe, Autosampler, Vacuumdegaser und Säulenofen
Detektor:	DAD SL, 80 Hz full-spectral ultra fast LC, Agilent Technologies, Santa Clara, USA mit Standarddurchflusszelle (10 mm, 13 µl)
HPLC-Säule:	Zorbax®SB C ₁₈ RRHT, 4.6 x 50 mm, 1.8 µm, 80 Å Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Auswertesoftware:	ChemStation for LC 3D Systems Rev. B 01.03, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Methodentransformation: (Software)	Agilent Technologies Method Translator and Cost Savings Calculator, 2008
Waagen:	Analysenwaage CP 225 D-OCE Sartorius AG, Göttingen Analysenwaage KC BA 100 Sartorius AG, Göttingen

Chemikalien

Acetonitril, gradient grade	VWR Prolabo, Leuven, Belgien
o-Phosphorsäure 85%, p.a.	Merck, Darmstadt
Peak Identity Standard EDQM	Promochem, Wesel

Atropinsulfat-Monohydrat Ph. Eur.	Fagron, Barsbüttel
Tropasäure	Promochem, Wesel
Apoatropin	CAT, Mainz
Atropasäure	Promochem, Wesel
Phenol p.a.	Merck, Darmstadt
p-Hydroxybenzoesäuremethylester p.a.	Sigma Aldrich, Steinheim
p-Hydroxybenzoesäurepropylester p.a.	Merck, Darmstadt
p-Hydroxybenzoesäure p.a.	Merck, Darmstadt
Benzoessäure p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat-Dihydrat p.a.	Fagron, Barsbüttel

4 Vorbereitung und Durchführung der Stabilitätsuntersuchung

4.1 Eingangsuntersuchung des Atropinsulfat-Rohstoffs

4.1.1 Prüfung gemäß Europäischem Arzneibuch

Als Ausgangssubstanz für die Herstellung der Arzneistofflösung wird Atropinsulfat der Firma Fagron in Arzneibuch-Qualität verwendet. Um die Qualität der Ausgangssubstanz zu überprüfen, wird diese gemäß Europäischem Arzneibuch [48] auf Identität, Reinheit und Gehalt untersucht. Zusätzlich werden Reinheit und Gehalt mittels der unter Kapitel 3.2 beschriebenen RRLC-Methode bestimmt.

Die Ergebnisse der Eingangsuntersuchung sind in Tabelle A-2 im Anhang aufgeführt.

Mit Ausnahme des Gehalts an Apotropin entspricht der verwendete Rohstoff der Arzneibuchmonographie des Europäischen Arzneibuchs, Ausgabe 6.1. Apotropin übersteigt mit einem Gehalt von 0,31%, bezogen auf Atropin, den nach Monographie zulässigen Höchstwert von 0,20%.

Seit der Version 6.1. ist für die Reinheitsbestimmung von Atropinsulfat-Monohydrat im Europäischen Arzneibuch eine HPLC-Methode mit UV-Detektion monographiert. Auf Grund der veränderten Analysenmethode und der damit herabgesetzten Nachweisgrenze wurden hier auch die Grenzwerte für die im Arzneistoff enthaltenen Abbauprodukte und Nebenalkaloide angepasst.

Das Zertifikat des Lieferanten, in dem die Konformität in Bezug auf die Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs bestätigt wird, legt die Version 6.0 des Europäischen Arzneibuchs zu Grunde, in der auf Grund der Reinheitsuntersuchung mittels Dünnschichtchromatographie noch höhere Grenzwerte für die Verunreinigungen gelten.

Da es sich beim Verwendungszweck des untersuchten Atropinsulfats nicht um die Herstellung von Arzneimitteln zum tatsächlichen Gebrauch handelt, ist die Abweichung der Reinheitsprüfung von der geforderten Spezifikation vernachlässigbar.

4.1.2 Gehalts und Reinheitsbestimmung mittels RRLC

Die Reinheitsbestimmung der Atropinsulfat-Ausgangssubstanz mittels RRLC lieferte die bereits unter 4.1.1. beschriebenen und diskutierten Ergebnisse, sodass die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode als gleichwertig zur Arzneibuchmethode angesehen werden kann.

Bei der Bestimmung des Gehalts ergibt die gemäß Europäischem Arzneibuch anzuwendende potentiometrische Titration einen Wert von 100,64% wohingegen mittels RRLC ein Gehalt von 101,74% ermittelt wird. Letzterer übersteigt die obere Grenze der Arzneibuchspezifikation von 101%.

Beide Methoden beruhen auf zwei völlig unterschiedlichen Prinzipien. Bei der potentiometrischen Titration wird das Gegenion des Atropins, nämlich Sulfat, erfasst und seine Konzentration im Ansatz durch Säure-Base-Titration bestimmt. Daraus wird anschließend auf den Gehalt an Atropin zurückgerechnet. Bei der chromatographischen Methode wird Atropin selbst bestimmt. Daher wird eine Abweichung zwischen den beiden Methoden von 1,1% als praktisch nicht relevant angesehen.

4.1.3 Geräte und Material

Geräte

pH-Meter	Titroprocessor 672, Metrohm Deutschland GmbH, Filderstadt
pH-Elektrode	Unitrode, Metrohm Deutschland GmbH, Filderstadt
Polarimeter	Automatic Polarimeter AA-10R, Optical Activity Ltd., GB

4.2 Bestimmung der stofflichen Zusammensetzung der Primärpackmittel

4.2.1 IR-Spektroskopie

Die Identifizierung der zur Herstellung der einzelnen Primärpackmittelbestandteile verwendeten Kunststoffe und Elastomere erfolgte mit Hilfe der IR-Spektroskopie durch Vergleich der erhaltenen Spektren mit Spektrenbibliotheken. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Im Falle der Bruchsicherung des Kombinationsautoinjektors konnte mittels IR-Spektroskopie PVC als ein Bestandteil identifiziert werden. Das Spektrum lässt darauf schließen, dass es sich hier um eine Verbundfolie handelt. Der mit PVC verbundene Kunststoff konnte jedoch nicht identifiziert werden.

Der Nadelschutz des Kombinationsautoinjektors enthält neben Polyisopren als Hauptbestandteil ebenfalls weitere Bestandteile, die mittels IR nicht identifiziert werden konnten.

Tab. 6: Ergebnisse der Charakterisierung der Packmittel mittels IR-Spektroskopie

Bauteil	Polymer
AtroPen® Nadelführung	PP ¹
ATOX II Nadelführung	PP ¹
ATOX II Karpule	PP ¹
Kombinationsautoinjektor Nadelschutz	Polyisopren (Latex Gummi) ¹
Kombinationsautoinjektor Bruchsicherung	PVC, Verbundfolie ¹
Kombinationsautoinjektor Septum	Butyl-Gummi EB150 ²

4.2.2 Materialprüfung

Die Charakterisierung der Elastomerstopfen erfolgte durch das Wehrwissenschaftliche Institut für Werk-, Explosiv- und Betriebsstoffe (WIWeB) in Erding mittels Infrarotspektroskopie (IR), optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES), Ionenchromatographie (IC) und Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS), die der Metallkarpulen mit Hilfe von Röntgenmikroanalyse (REM/EDX).

Durch IR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass alle Stopfen Butylkautschuk (IIR) als Elastomerbasis enthalten. Des Weiteren konnte Silicium nachgewiesen werden. Hierbei kann es sich einerseits um einen anorganischen Füllstoff der Stopfen handeln, andererseits ist Silicium Bestandteil der zur Herabsetzung der Gleitreibung auf die Stopfen aufgetragenen Silikonschicht. Ein Nachweis weiterer anorganischer Füllstoffe war nicht

¹ Zuordnung über Golden Gate Bibliothek

² Zuordnung über Monomers and Polymers Package Library Volume 1

eindeutig möglich, da die für die Elemente Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium und Aluminium ermittelten Gehalte im Bereich des Blindwertes liegen und somit auch aus dem für die Probenvorbereitung verwendeten Glas stammen können. Eine Untersuchung auf Lithium, Strontium, Barium, Blei, Arsen, Antimon, Bismut, Cadmium, Chrom, Kupfer, Nickel, Zink, Mangan, Cobalt und Molybdän lieferte Konzentrationen unterhalb der mittels ICP-OES erzielbaren Nachweisgrenze von 10 mg/kg bezogen auf die Masse des Elastomerstopfens.

Mittels IC wurden in den Elastomerstopfen Phosphat und Sulfat nachgewiesen, bei denen es sich möglicherweise um Bestandteile der in den Elastomeren enthaltenen Füllstoffe handelt. Fluorid, Nitrit und Nitrat konnten nicht nachgewiesen werden (< 10 mg/kg).

Mittels GC/MS wurde im Methanolextrakt des Verschlussstopfen des Kombinationsautoinjektors ein nicht im Detail identifizierbares Kohlenwasserstoffgemisch nachgewiesen.

Die Untersuchung der aus dem AtroPen[®] stammenden Metallkarpulen zeigte, dass diese aus Chrom-Nickel-Stahl hergestellt sind. Auf Grund der mittels REM/EDX festgestellten durchschnittlichen Zusammensetzung der Legierung von 19% Chrom, 9% Nickel und 72% Eisen handelt es sich um einen Stahl der Werkstoffgruppe 1.4301 (V2A).

4.3 Herstellung der Prüfmuster

4.3.1 Vorbereitung der Primärpackmittel

Für die vorliegende Arbeit wurden die Primärpackmittel der drei in der Bundeswehr bevorrateten Atropinautoinjektoren (s. Kapitel 2.5.) verwendet. Da keine neuen,

unbenutzten Behältnisse erhältlich waren, wurde eine dem Probenplan entsprechende Anzahl bevorrateter Injektoren wie folgt für die Herstellung der Prüfmuster vorbereitet.

Zunächst wurden die noch gefüllten Injektoren entleert, in ihre Bauteile zerlegt und diese getrennt nach Bauteil und Injektionssystem mehrfach für je 10 Minuten in vollentsalztem Wasser im Ultraschallbad gereinigt. Die Reinigung wurde so oft wiederholt, bis sich im Waschwasser mittels RRLC keine Substanzen mehr nachweisen ließen.

Im Falle der Elastomerstopfen wurde auf eine Reinigung bis zum vollständigen Verschwinden des Phenol-Peaks im Chromatogramm des Waschwassers verzichtet, da sich dieses als Weichmacher in den Stopfen befindet und nicht vollständig entfernt werden sollte, um eine Versprödung des Materials und damit eine erhöhte Durchlässigkeit zu vermeiden. Hier wurde die Reinigung so oft wiederholt, bis sich mit Ausnahme des Phenols keine weiteren Substanzen mehr im Waschwasser nachweisen ließen.

Die Injektionsnadeln wurden zusätzlich zwei Mal je 10 Minuten mit Isopropanol im Ultraschallbad behandelt, da nur so eine vollkommene Entfernung aller Rückstände möglich war.

Zur Gewährleistung einer intakten Passivierung der zum Einsatz kommenden Metall- und Kunststoffkarpulen wurden diese nach der Reinigung erneut silikonisiert. Die Kunststoffkarpulen wurden hierzu in eine 50%-ige Mischung aus Dow Corning® 365 Dimeticon Emulsion getaucht, überschüssige Emulsion ablaufen und die Karpulen anschließend an der Luft trocknen lassen. Die Metallkarpulen wurden durch Tauchen in eine 40%-ige Mischung der Dimeticonemulsion mit Wasser für Injektionszwecke, ablaufen lassen, vortrocknen an der Luft und Härtung der Silikonschicht im Trockenschrank bei 230°C für drei Stunden passiviert.

Ein Teil der Injektionskarpulen wurde nicht erneut silikonisiert, um den Einfluss der verwendeten Emulsion auf die Stabilität der stressgelagerten Lösungen und das Auftreten

bestimmter Verunreinigungen in Zusammenhang mit der Silikonemulsion ermitteln zu können.

4.3.2 Herstellung der Modelllösungen

Für die vorliegende Untersuchung wurden Modelllösungen hergestellt, um den Einfluss der unterschiedlichen Zusammensetzung der originären Injektionslösungen zu eliminieren. An Hand einer arzneistofffreien Blindlösung sollte eine Zuordnung Packmittel-assoziiertes Signale im HPLC-Chromatogramm erleichtert werden.

Auf Grund des Stabilitätsoptimums des Arzneistoffs sowie des üblicherweise in den Injektionslösungen der zugelassenen Arzneimittel vorherrschenden pH-Werte wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine citratgepufferte Lösung eingesetzt. Der zur Osmolarisierung von Injektionslösungen übliche Zusatz von Natriumchlorid fand hier ebenfalls statt, um trotz der Untersuchung von Modelllösungen eine möglichst authentische Situation darzustellen.

Das verwendete Wasser entspricht den Anforderungen des Europäischen Arzneibuchs an Wasser für Injektionszwecke.

Folgende Modelllösungen wurden hergestellt.

Lösung A:

Substanz	Einwaage [g]	Konzentration [mg/ml]
Atropinsulfat-Monohydrat	1,456	2,08
Natriumcitrat-Dihydrat	3,146	4,49
Citronensäure-Monohydrat	3,516	5,02
Natriumchlorid	3,789	5,41
Wasser für Injektionszwecke	ad 700,022	

Lösung B:

Substanz	Einwaage [g]	Konzentration [mg/ml]
Natriumcitrat-Dihydrat	1,744	4,36
Citronensäure-Monohydrat	2,022	5,05
Natriumchlorid	2,166	5,41
Wasser für Injektionszwecke	ad 400,088	

Des Weiteren wurde reines Wasser für Injektionszwecke als Füllgut verwendet.

4.3.3 Abfüllen der Lösungen

Nach dem Autoklavieren der Packmittel bei 121°C wurden diese unter Laminar-Air-Flow gemäß der Prüfmusterplanung mit den Modelllösungen A oder B oder mit Wasser für Injektionszwecke befüllt. Hierzu wurde das abzufüllende Volumen mit einer Einwegspritze aufgenommen und durch einen Membranfilter mit der Porengröße 0,2 µm in die

vormontierte Karpule injiziert. Zur Vermeidung von Adsorptionsverlusten wurden die verwendeten Spritzen und Filter zunächst mit der entsprechenden Lösung vorgespült. Anschließend wurden die Karpulen mit den Elastomerstopfen verschlossen. Bei den Kunststoffkarpulen wurde der vordere Stopfen durch die im ATOX-II-Injektor vorhandene grüne Kunststoffkappe zusätzlich fixiert. Bei den Glas- und Metallkarpulen fand keine Fixierung der Stopfen statt.

4.3.4 Besondere Beobachtungen

Durch das Autoklavieren konnte bei den Glaskarpulen eine Schrumpfung der als Bruchsicherung um die Injektionshülsen geschweißten Kunststofffolie beobachtet werden, die teilweise zur Ablösung vom Glaskörper führte.

In den Sterilisationsbeuteln in welchen sich silikonisierte Kunststoffkarpulen befanden konnten nach dem Autoklavieren braune Rückstände beobachtet werden, die sich vermutlich durch Einwirkung höherer Temperaturen auf das aufgebrauchte Silikonöl gebildet haben.

Beim Verschließen der Metall- und Kunststoffkarpulen mit dem vorderen Verschlussstopfen traten vereinzelt Flüssigkeitstropfen durch diese hindurch. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass zur Herstellung der Prüfmuster auch Packmittelsysteme verwendet wurden, die durch Auslösen des Autoinjektors entleert wurden und deren vorderer Stopfen daher bereits mit einer Injektionsnadel perforiert wurde. Da es jedoch nicht möglich war, ausreichend Packmaterial mit unversehrten Stopfen zu erhalten, war ein Austausch der bereits durchstochenen nicht möglich. Vom Hersteller konnten zudem keine neuen Stopfen bezogen werden.

4.3.5 Material und Geräte

Ultraschallbad	Sonorex Digital DK 255 P, Bandelin, Berlin
Atropinsulfat-Monohydrat	Fagron, Barsbüttel
Natriumcitrat-Dihydrat	Fagron, Barsbüttel
Citronensäure-Monohydrat	Caelo, Hilden
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Dimeticon-Emulsion	Dow Corning® 365, 35% Dimeticone NF Emulsion

4.4 Stresslagerung

4.4.1 Lagerung und Temperaturüberwachung

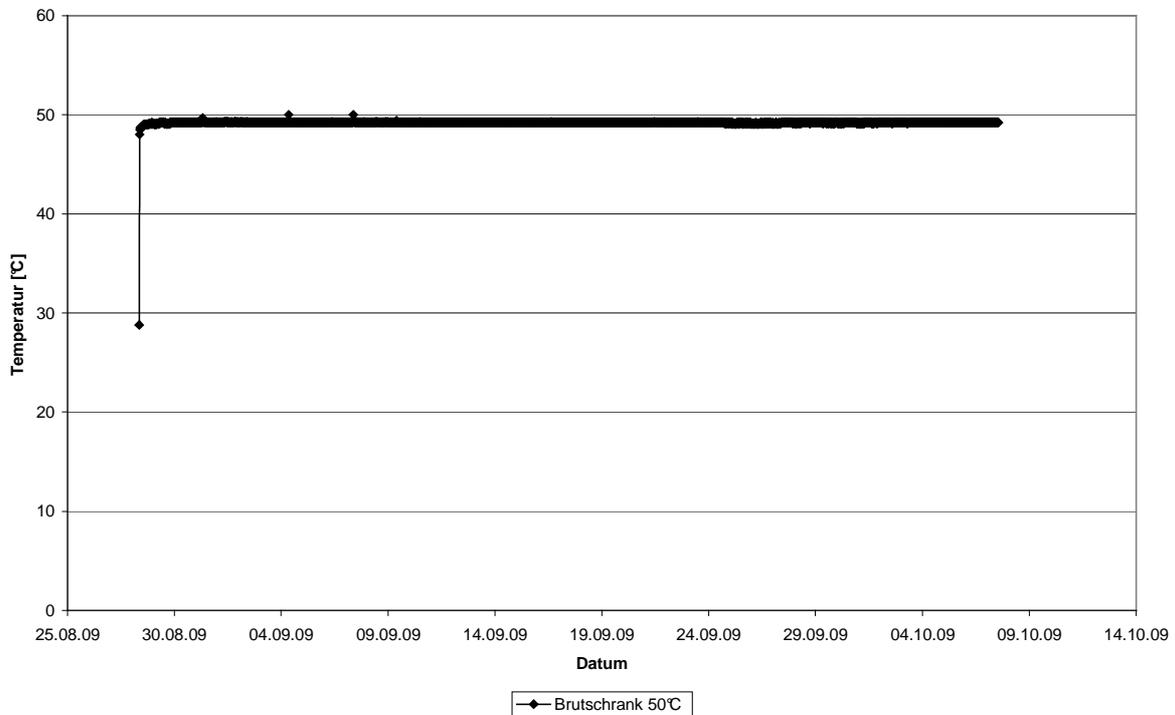
Vor der Einlagerung wurde von jedem Kollektiv, das einer bestimmten Probennahme zugeordnet wurde (z.B. alle sechs für die erste Probennahme vorgesehenen Glaskarpulen mit Arzneistofflösung) die Masse bestimmt, um durch Rückwiegen nach der Probennahme die im Laufe der Lagerungszeit aufgetretenen Flüssigkeitsverluste erkennen zu können.

Anschließend wurden die Karpulen wie in Tabelle 7 angegeben eingelagert. Die Karpulen standen aufrecht mit der Injektionsnadel nach oben.

Tab. 7: Lagerungsbedingungen

Lagertemperatur	Einlagerungsort
40°C	Klimaprüfraum
50°C	Brutschrank
60°C	Trockenschrank

Abb. 11: Temperaturverlauf im 50°C-Brutschrank während eines Monats



Der Temperaturverlauf an den einzelnen Einlagerungsorten wurde mittels Datenloggern aufgezeichnet. So konnte nachgewiesen werden, dass die bei der Stresslagerung vorherrschenden Temperaturen während des gesamten Versuchszeitraums konstant gehalten werden konnten, obwohl keine speziellen Klimaprüfschränke für die vorliegende Untersuchung verwendet wurden. Exemplarisch ist in Abbildung 11 der Temperaturverlauf in dem für die 50°C-Lagerung verwendeten Brutschrank im Laufe eines Monats dargestellt. Der negative Ausschlag zu Beginn des Aufzeichnungszeitraums ist auf eine Abkühlung im Gerät durch die zum Austausch des Loggers geöffnete Tür zurückzuführen.

Die Temperaturverläufe in den anderen zur Stresslagerung verwendeten Einrichtungen und Geräten entsprechen dem gezeigten Bild.

4.4.2 Probenahme

Nach einem, drei, fünf und zwölf Monaten Lagerung wurde jeweils die in Tabelle 8 angegebene Anzahl an Prüfmustern entnommen und die Masse der entsprechenden Kollektive bestimmt. Anschließend wurden die Karpulen in Glasvials entleert, in denen die Messung des pH-Wertes und die visuelle Untersuchung auf auftretende Färbung, Trübung oder Partikelbildung durchgeführt wurde bevor ein Aliquot zur Herstellung der Verdünnung für die HPLC-Untersuchung entnommen wurde.

Tab. 8: Anzahl der bei der Probenahme entnommenen Prüfmuster

	Glas	Metall	Metall, nicht passiviert	Kunststoff
Lösung A	6	6	9	6
Lösung B	3	4	6	4
Wasser	3	3	3	3

Nach 12-monatiger Lagerung wurden nur Glas-, Metall- und Kunststoffkarpulen untersucht. Eine Untersuchung der nicht passivierten Metallkarpulen nach 12 Monaten war auf Grund der zu erwartenden starken Degradation laut Probenplan nicht mehr vorgesehen.

4.4.3 Material, Geräte und Software

Stresslagerung

Für die Stresslagerung der hergestellten Prüfmuster wurden folgende Geräte verwendet.

Klimaraum (40°C):	Heizlüfter Robust H, Fa. Trenker
Brutschrank (50°C):	UT 6760, Heraeus, Hanau
Trockenschrank (60°C):	VacuTherm VT 6060M, Heraeus, Hanau
Temperaturlogger 40°C:	EcoLog-Net LP4, Elpro Messtechnik GmbH Schorndorf
Auswertesoftware:	ElproLog V.30.40
Temperaturlogger 50°C:	CelsiPick CK-ECO-TR, Spirig Ernest Raperswil, Schweiz
Auswertesoftware:	Spirig Ernest V2.00.63, Raperswil, Schweiz
Temperaturlogger 60°C:	ThermoScan Datenlogger, Delta T Medizinprodukte Gießen
Auswertesoftware:	über Windows Excel via V.3,20 1.WireNetport

pH-Wert-Bestimmung

pH-Meter:	Titroprocessor 672, Metrohm Deutschland GmbH, Filderstadt
pH-Elektrode:	LL Biotrode (kleine Volumina), Metrohm, Filderstadt
Kalibrierlösungen:	Hamilton Duracal Puffer (pH 2,00, pH 7,00 und pH 9,21), Bonaduz, Schweiz

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe der Software WINStat[®] für Microsoft[®] Excel, Version 2009.1.

Es wurde ein Test auf Ausreißer mit n -Sigma > 4 und $P < 0,05$, der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung, der Bartlett-Test auf Varianzhomogenität sowie eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) zum Vergleich der verschiedenen Gruppen durchgeführt. Wenn die Voraussetzung der Varianzhomogenität für die Durchführung der ANOVA nicht erfüllt war erfolgte der Signifikanztest unter Verwendung des parameterfreien Tests nach Kruskal-

Wallis (H-Test). Im Falle mittels ANOVA festgestellter signifikanter Unterschiede wurde mit Hilfe multiplen Vergleichs nach der LSD-Methode festgestellt, welchen der untersuchten Gruppen zu einer Gruppe ohne signifikante Unterschiede zusammengefasst werden konnten und welche sich von diesen signifikant unterschieden.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Ermittlung des Wasserverlustes

Im Rahmen der ersten Probenahme konnten vor allem bei den in Kunststoffkarpulen abgefüllten Injektionslösungen deutliche Flüssigkeitsverluste beobachtet werden, die sich aus Undichtigkeiten der Primärpackung in Zusammenhang mit den bei der Stresslagerung herrschenden erhöhten Temperaturen von 40 bis 60°C ableiten lassen. Diese ergeben sich aus der Tatsache, dass für die vorliegende Untersuchung zum Teil Primärpackmittel bereits ausgelöster Autoinjektoren verwendet werden mussten, bei denen die Dichtigkeit der Elastomerstopfen nicht mehr in ausreichendem Maße gegeben war. Da es nicht möglich war, diese Undichtigkeiten durch zusätzliche Abdichtung zu beheben, ohne weitere Komponenten zur Primärpackung hinzuzufügen, die sich unter Umständen negativ auf die Stabilität des Arzneistoffs auswirken oder unerwünschte Substanzen in die Lösung abgeben, wurde der Verlust an Flüssigkeit nachträglich ermittelt und rechnerisch bei der Auswertung berücksichtigt (s. Kapitel 5.1.3).

Die Ermittlung des Flüssigkeitsverlustes und die nachträgliche rechnerische Berücksichtigung ist nur für die in Kunststoff und Metall gelagerte Lösung A relevant, da nur hier wesentliche Flüssigkeitsverluste beobachtet wurden (s. Anhang Tabelle A-4). Zudem werden quantitative Auswertungen nur in Bezug auf die arzneistoffhaltige Lösung A durchgeführt. Die Prüfmuster mit Blindlösung und Wasser für Injektionszwecke werden rein qualitativ in Bezug auf neu auftretende Peaks im Chromatogramm ausgewertet, sodass hier auftretende Verluste an Wasser während der Lagerung unberücksichtigt bleiben können.

Es wurden die drei unter Kapitel 5.1.1. bis 5.1.3. beschriebenen Verfahren zur Bestimmung und Korrektur des auftretenden Wasserverlustes durchgeführt.

5.1.1 Masseverlust

Bereits bei Herstellung der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Prüfmuster, wurden die einzelnen Karpulen zu Prüfkollektiven zusammengefasst, die nach einer festgesetzten Dauer der thermischen Belastung entnommen und untersucht wurden. Die Masse der für die einzelnen Probenahmen bestimmten Prüfmusterkollektive mit wirkstoffhaltiger Lösung wurden vor der Einlagerung und nach der jeweiligen Probenahme bestimmt. Der Masseverlust wurde als Prozentsatz der Differenz beider Wägungen, bezogen auf die Ausgangsmasse, errechnet.

Die erhaltenen Mittelwerte für die einzelnen Probenahmen sind Tabelle A-4 im Anhang zu entnehmen.

Bei den in Glas gelagerten Lösungen kann mit max. 0,6% nach 12-monatiger Lagerung bei 60°C nur eine sehr geringe Abnahme der Masse während der Lagerung beobachtet werden. Dieser Wert bezieht sich zudem auf den Verlust des gesamten für diese Probenahme vorgesehenen Prüfkollektivs von sechs Injektionskarpulen, sodass die einzelne Karpule einem noch geringeren Masseverlust unterliegt, die sich im Bereich üblicher Messunsicherheiten bewegt. Daher besitzt die festgestellte Verringerung des Gewichts in diesem Fall keine Relevanz für die weitere Auswertung und einer Korrektur der für die in Glas gelagerten Lösungen findet im Folgenden nicht statt.

Da bei den in Metall gelagerten Lösungen nach der Probenahme beim Öffnen und Entleeren der Prüfmuster große Unterschiede im enthaltenen Volumen festgestellt werden konnten, wird hier trotz eines Masseverlusts, der im Bereich des bei den Glaskarpulen beobachteten liegt, eine Korrektur der ermittelten Gehalte an Arzneistoff vorgenommen.

Bei den in Kunststoff gelagerten Lösungen ist eine Korrektur der ermittelten Werte auf Grund des gravierenden Flüssigkeitsverlusts während der thermischen Belastung unerlässlich.

Da der Masseverlust jedoch nur für das gesamte für die jeweilige Probenahme vorgesehene Kollektiv bestimmt wurde, muss zur Ermittlung des Korrekturfaktors für die einzelnen Lösungen ein anderes Verfahren herangezogen werden. Im Folgenden sollen zwei mögliche Methoden dargestellt und bewertet werden.

5.1.2 Sulfatbestimmung mittels Ionenchromatographie

Eine Methode, die zur Ermittlung des während der Lagerung auftretenden Flüssigkeitsverlustes herangezogen werden kann, ist die Quantifizierung des als Gegenion des Atropins in die Lösung eingebrachten Sulfats mittels Ionenchromatographie. Über die Erhöhung des auf diese Weise bestimmten Sulfatgehalts gegenüber dem theoretischen, aus der Atropinsulfat-Einwaage zu berechnenden Gehalt, kann auf das Ausmaß des Flüssigkeitsverlustes während der Lagerung geschlossen werden.

Der theoretische Sulfatgehalt der Lösung beträgt 284 mg/l. Für diese Berechnung wurde die Einwaage an Atropinsulfat-Monohydrat (s. 4.3.2.) sowie der Sulfat- und Wassergehalt der Ausgangssubstanz zu Grunde gelegt. Letztere wurden bei der Eingangskontrolle des Rohstoffes nach Europäischem Arzneibuch bestimmt (s. 4.1.1.).

Es wurde ein Testlauf mit einer aus einer Glaskarpule stammenden, drei Monate bei 40°C gelagerten Lösung durchgeführt. Auf Grund des bestimmten Masseverlustes des zugehörigen Prüfkollektivs (s. Anhang Tab A-4) sollte der hier ermittelte Sulfatgehalt dem theoretisch berechneten entsprechen.

Die Lösung wurde zur Bestimmung mit Millipore-Wasser im Verhältnis 1:20 verdünnt und durch ein PTFE-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert.

Folgendes System kam zum Einsatz

Säule:	Metrosep A Supp 5 – 100; 4,0 x 100 mm, 5 µm
Eluent:	3,2 mM Na ₂ CO ₃ / 1,0 mM NaHCO ₃
Fluss:	0,70 ml/ min
Temperatur:	20°C
Druck:	5,3 MPa
Injektionsvolumen:	1,0 µl
Detektion:	Leitfähigkeitsdetektor

Durch Doppelbestimmung wurde ein Sulfatgehalt von 376 mg/l bestimmt, was einem Wasserverlust von 32% entspricht.

In Anbetracht des ebenfalls ermittelten Masseverlustes des entsprechenden Kollektivs von nur 0,07% ist dieser Wert nicht plausibel. Möglicherweise treten hier Interferenzen zwischen dem zu bestimmenden Sulfat und dem in der Lösung vorhandenen Citrat auf, die mit der vorhandenen Multimethode zur Bestimmung von Fluorid, Nitrat, Nitrit, Chlorid und Sulfat in Trinkwasser nicht getrennt werden können. Weiterhin konnte der nach Herstellung der Lösung vorliegende Sulfatgehalt nur nachträglich aus der Eingangskontrolle des verwendeten Atropinsulfats sowie dem Herstellungsprotokoll berechnet, nicht jedoch mittels IC praktisch bestimmt werden, sodass die beiden verglichenen Werte auf zwei unterschiedlichen Analysemethoden mit unterschiedlicher Genauigkeit beruhen. Daher sind die Werte nur bedingt vergleichbar. Eine Abweichung zwischen beiden Methoden von

32% wird jedoch als unverhältnismäßig hoch angesehen. Des Weiteren traten nach der Bestimmung der Probe Geräteprobleme auf, die sich möglicherweise auf die hohe Natriumchloridkonzentration und das vorhandene Atropin zurückführen lassen. Auch eine Bestimmung der aus Metallkarpulen stammenden Lösungen ist im Hinblick auf die möglicherweise in die Lösung übergetretenen Eisenionen als problematisch anzusehen. Daher wurde von einer weiteren Ermittlung des Flüssigkeitsverlustes mit Hilfe dieser Methode abgesehen.

5.1.3 Korrektur über Citratpeak

Das als Puffersubstanz in der Injektionslösung enthaltene Citrat kann bei der zur Gehalts- und Reinheitsbestimmung der Lösung angewendeten RRLC-Methode mit einer Retentionszeit von 0,52 Minuten detektiert werden. Über eine Zunahme der Peakfläche dieses Peaks gegenüber der nach Herstellung der Lösung ermittelten kann auf einen Flüssigkeitsverlust während der Stresslagerung rückgeschlossen werden.

Zu beachten ist hierbei, dass strenggenommen nur auf identischen HPLC-Anlagen erhaltene Chromatogramme miteinander verglichen werden können, da den abweichenden Detektorresponses verschiedener, auch baugleicher, Detektoren Rechnung zu tragen ist. Aus diesem Grund dürfte das hier beschriebene Verfahren nicht auf die nach drei Monaten Lagerung erhaltenen Daten angewandt werden. Hier erfolgte die Gehalts- und Reinheitsbestimmung aus organisatorischen Gründen auf einer anderen HPLC-Anlage als die Ermittlung des Ausgangswertes.

Vergleiche der Peakflächen von Atropin-Standardlösungen auf den beiden verwendeten Anlagen zeigten jedoch, dass keine relevanten Abweichungen der Detektorresponses bei 220 nm bestehen, sodass auch für die Probenahme nach drei Monaten Lagerung eine Ermittlung des Wasserverlustes nach dieser Methode durchgeführt wurde.

Aus den Flächen der Citrat-Peaks vor und nach Stresslagerung wurde nach Gleichung 3 ein Faktor ermittelt, um den der jeweils durch externe Kalibration ermittelte Gehalt korrigiert und so der aufgetretene Wasserverlust berücksichtigt wurde.

$$F = \frac{A_{vor}}{A_{nach}} \quad (3)$$

A_{vor} : Peakfläche vor Stresslagerung (frisch hergestellte Lösung)

A_{nach} : Peakfläche nach Stresslagerung

Die ermittelten Korrekturfaktoren sind dem Anhang, Tabelle A-5, zu entnehmen. Angegeben ist der Übersichtlichkeit halber jeweils der Mittelwert für die aufgeführten Lagerbedingungen, zusammen mit dem 95%-Vertrauensbereich. Die Korrektur erfolgte jedoch jeweils mit dem für das entsprechende Prüfmuster ermittelten Faktor.

5.2 Aussehen und Färbung

Die thermisch belasteten Prüfmuster wurden in Bezug auf Farbe und Aussehen durch eine einfache Sichtprüfung gemäß Ph. Eur. 2.2.1., 2.2.2 (Methode I) sowie 2.9.20 im Vergleich zu unbelasteten Vergleichslösungen untersucht. Die Anzahlen der Abweichungen in Farbe und/oder Klarheit der Lösungen wurden für die einzelnen Probenahmezeitpunkte aufsummiert.

5.2.1 Glaskarpulen

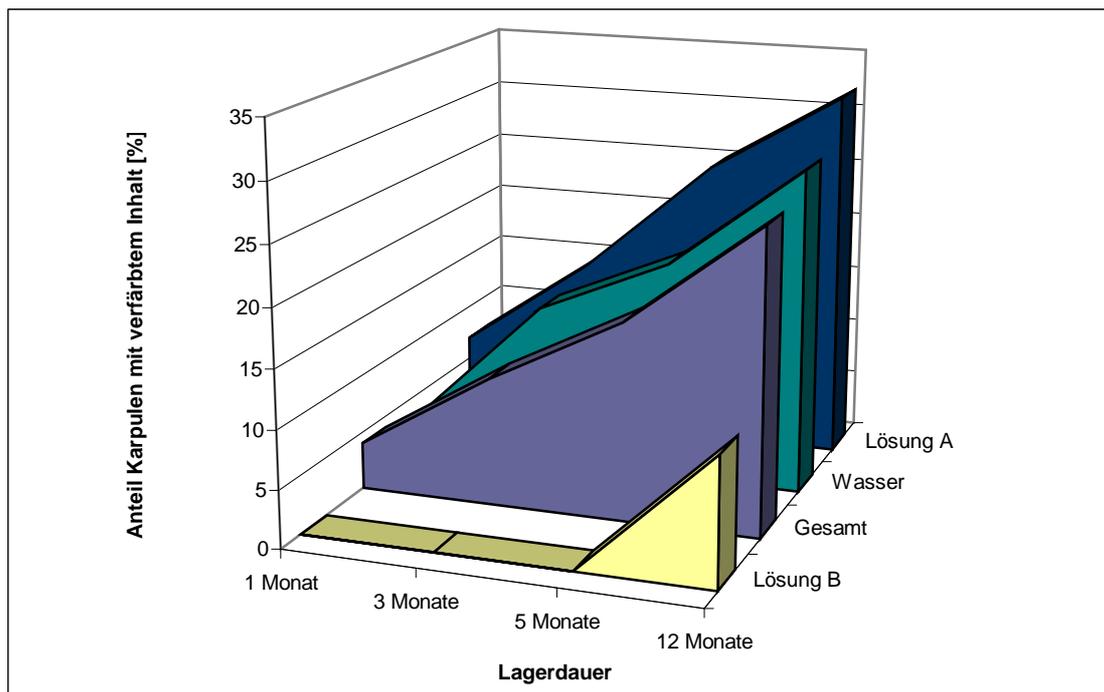
Abbildung 12 gibt einen Überblick über die nach thermischer Belastung in Glaskarpulen auftretenden Färbungen der untersuchten Modelllösungen. In Tabelle 9 sind die zugehörigen Werte sowie deren Anteil am jeweiligen Prüfkollektiv aufgeführt.

Tab. 9: Anteil der Glaskarpulen mit verfärbtem Inhalt nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C
 Absolute Anzahl verfärbter Karpulen in Klammern
 Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung

Glas	1 Monat	3 Monate	5 Monate	12 Monate
Lösung A	7% (5)	15% (11)	25% (18)	32% (23)
Lösung B	0	0	0	11% (4)
Wasser	3% (1)	14% (5)	19% (7)	28% (10)
Gesamt	4% (6)	11% (16)	17% (25)	26% (37)

Im Falle auftretender Verfärbungen bewegte sich das zu beobachtende Farbspektrum im Bereich von hellgelb bis gelblich-braun. Trübungen der Lösungen oder Partikelbildungen wurden nicht festgestellt.

Abb. 12: Anteil der Glaskarpulen mit verfärbtem Inhalt nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C
Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung



Auf Grund der Bauweise der verwendeten Injektionskarpulen aus Glas kommt die darin enthaltene Lösung mit der Karpulenwandung, am Ende dieser mit einem Stopfen aus Brombutyl-Elastomer und am vorderen Ende mit einem Septum aus dem selben Material in Kontakt. Eine Gelb- bis Braunfärbung der Lösung auf Grund von Korrosionserscheinungen durch Bildung von z.B. Eisenoxiden oder ähnlichen Verbindungen ist daher auszuschließen. Auch ein Herauslösen färbender Bestandteile aus mit der Flüssigkeit in Kontakt stehenden Bauteilen ist unwahrscheinlich, da hierfür lediglich Bestandteile der Stopper sowie des Septums in Frage kommen. An diesen Bauteilen des Primärpackmittels sind keine

Veränderung feststellbar und die Kontaktflächen sind so gering, dass eine Lösung relevanter Mengen in Frage kommender Substanzen praktisch unmöglich ist, ohne dass dies an den Bauteilen zu Veränderungen führt.

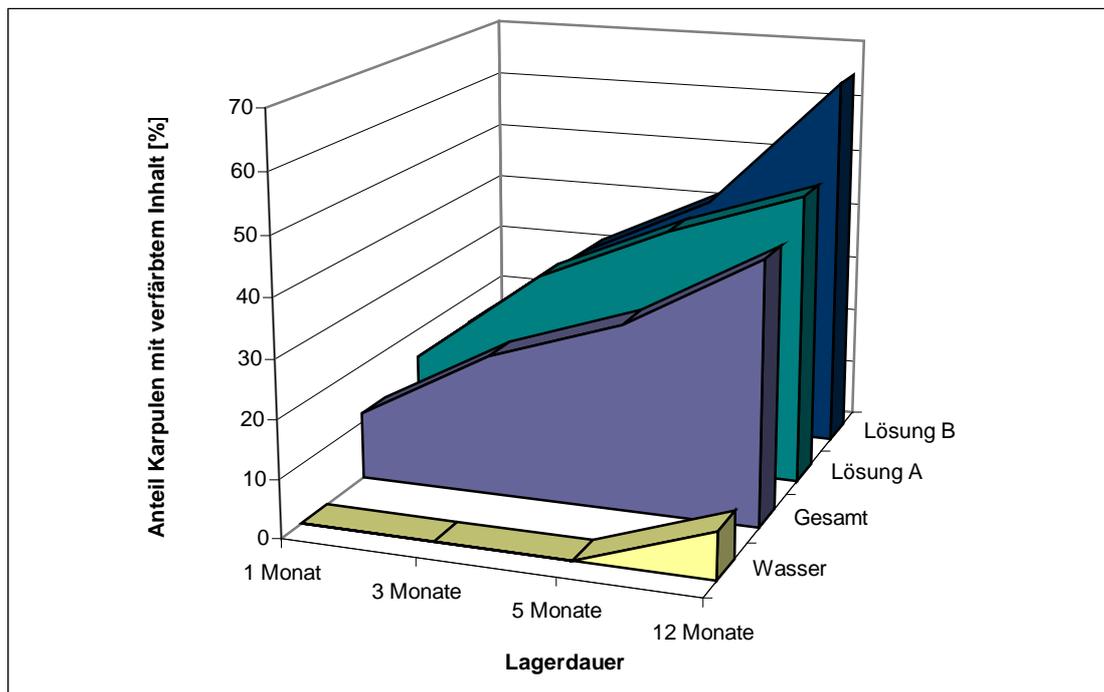
Nicht zu erwarten war, dass im Vergleich zur arzneistofffreien Blindlösung die Anzahl der verfärbten Karpuleninhalte bei den mit Wasser gefüllten Prüfmustern erhöht ist, da hier keinerlei Substanzen enthalten sind, die im Laufe der Stresslagerung verändert werden und damit zu Färbungen führen könnten.

Durch erneute Auswertung der bei der Reinheits- und Gehaltsbestimmung erhaltenen Chromatogramme wurde bei dem thermisch belasteten Wasser aus Glaskarpulen ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer Färbung und dem eines Peaks bei 0,44 Minuten festgestellt. Der Vergleich mit Standardsubstanz zeigte, dass es sich hierbei um ein durch Obidoxim verursachtes Signal handelt. Dieser Acetylcholinesterase-Reaktivator wird in Kombination mit Atropin bei der Therapie von Vergiftungen mit Nervenkampfstoffen oder Insektiziden der Organophosphor-Gruppe eingesetzt und befindet sich in der Injektionslösung des Kombinationsautoinjektors, aus dem die verwendeten Glaskarpulen stammen. Bei dem in der vorliegenden Untersuchung vorherrschenden pH-Wert von etwa 4 sind Lösungen des Obidoximchlorids gelblich-braun gefärbt. Es scheinen nach der Reinigung der Karpulen Reste des Arzneistoffs im Packmittel verblieben zu sein, vermutlich am vorderen Ende zwischen Karpulenwandung und Septum, die sich auf Grund der erhöhten Temperaturen während der Studie in der eingefüllten Flüssigkeit lösten und hier auf Grund des pH-Wertes zu gelblich-braunen Verfärbungen führten. Ein Herausnehmen des Septums aus der Injektionskarpule zur Reinigung und Durchspülung des Packmittels vor dem Befüllen mit den Modellösungen erfolgte nicht, da es nicht möglich war, das Packmittel im Anschluss daran wieder so zusammensetzen, dass eine vollständige Abdichtung möglich war.

5.2.2 Metallkarpulen

Abbildungen 13 und 14 geben einen Überblick über die nach thermischer Belastung in passivierten beziehungsweise nicht passivierten Metallkarpulen auftretenden Färbungen der untersuchten Modelllösungen. In Tabelle 10 und 11 sind die jeweils zugehörigen Werte sowie deren Anteil am jeweiligen Prüfkollektiv aufgeführt.

Abb.13: Anteil der passivierten Metallkarpulen mit verfärbtem Inhalt nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C
Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung



Tab.: 10: Anteil der passivierten Metallkarpulen mit verfärbtem Inhalt nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C

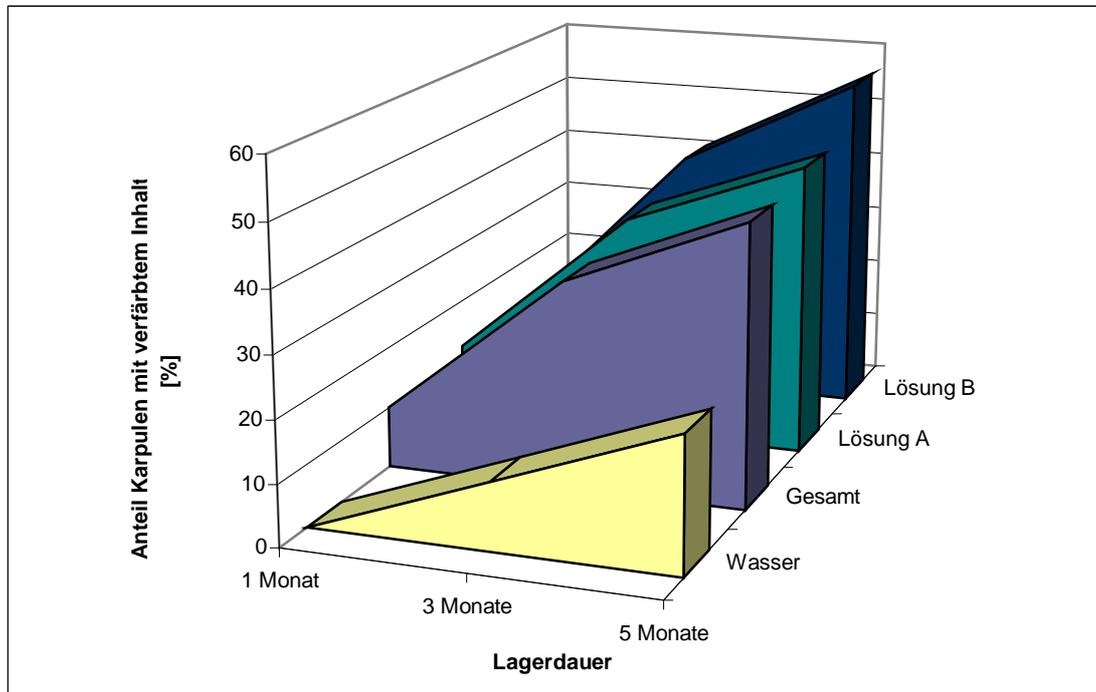
Absolute Anzahl verfärbter Karpulen in Klammern

Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung

Metall	1 Monat	3 Monate	5 Monate	12 Monate
Lösung A	15% (11)	32% (23)	42% (30)	50% (36)
Lösung B	15% (7)	31% (15)	42% (20)	65% (31)
Wasser	0	0	0	8% (3)
Gesamt	11,5% (18)	24,4% (38)	32% (50)	45% (70)

Auffällig ist zunächst, dass die graphische Auswertung der unterschiedlich oberflächenbehandelten Primärpackmittel vergleichbare Bilder und Anzahlen an Karpulen mit verfärbten Inhalten liefert. Allerdings wird der Anteil von 93% des gesamten Prüfkollektivs mit verfärbtem Inhalt im Falle der nicht passivierten Injektionshülsen bereits nach 5 Monaten Stresslagerung erreicht, wohingegen bei den silikonisierten Primärpackmitteln dafür 12 Monate Lagerungszeit erforderlich sind. Auf Grund dieser Beobachtung kann daher festgestellt werden, dass die Silikonisierung der mit der Injektionslösung in Kontakt stehenden Oberfläche außer zu einer Verringerung der Gleitreibung bei Auslösung der Injektion und einem verbesserten Abfließverhalten der Flüssigkeit an der Oberfläche auch zu einer Stabilisierung der enthaltenen Lösung gegenüber Reaktionen führt, die zu gefärbten Produkten führen. Welche Produkte im vorliegenden Fall jedoch für die Färbung der Lösung verantwortlich sind, ist noch unklar. Da außer bei den atropinhaltigen Injektionslösungen auch bei den wirkstofffreien Lösungen Färbungen auftreten, muss angenommen werden, dass für die Bildung der farbigen Produkte nicht ausschließlich Abbauprodukte des Atropins verantwortlich sind.

Abb. 14: Anzahl der nicht passivierten Metallkarpulen mit verfärbtem Inhalt nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C
 Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung



Tab. 11: Anzahl der nicht passivierten Metallkarpulen mit verfärbtem Inhalt nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C
 Absolute Anzahl verfärbter Karpulen in Klammern
 Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung

Metall nativ	1 Monat	3 Monate	5 Monate
Lösung A	12% (10)	37% (30)	48% (39)
Lösung B	11% (6)	41% (22)	56% (30)
Wasser	0	11% (3)	22% (6)
Gesamt	10% (16)	34% (55)	46% (75)

Im Vergleich zu den wirkstofffreien Injektionslösungen (Lösung B) sind bei thermisch belastetem Wasser, welches in Metallkarpulen gelagert wurde, deutlich weniger Karpulen mit verfärbtem Inhalt zu beobachten. Bei den erneut silikonisierten Injektionskarpulen werden sogar erst nach 12 -monatiger Lagerung Verfärbungen bei den mit Wasser gefüllten Karpulen beobachtet.

Die geschilderten Beobachtung lassen den Schluss zu, dass die Ursache der Verfärbungen eine thermisch induzierte und vermutlich durch Metallionen katalysierte Degradationsreaktion unter Beteiligung von Pufferbestandteilen der Injektionslösung ist, die zu gefärbten Produkten führt.

5.2.3 Kunststoffkarpulen

Abbildung 15 gibt einen Überblick über die nach thermischer Belastung in Kunststoffkarpulen auftretenden Färbungen der untersuchten Modelllösungen. In Tabelle 12 sind die zugehörigen Werte sowie deren Anteil am jeweiligen Prüfkollektiv aufgeführt.

Tab. 12: Anzahl der Kunststoffkarpulen mit verfärbtem Inhalt nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C

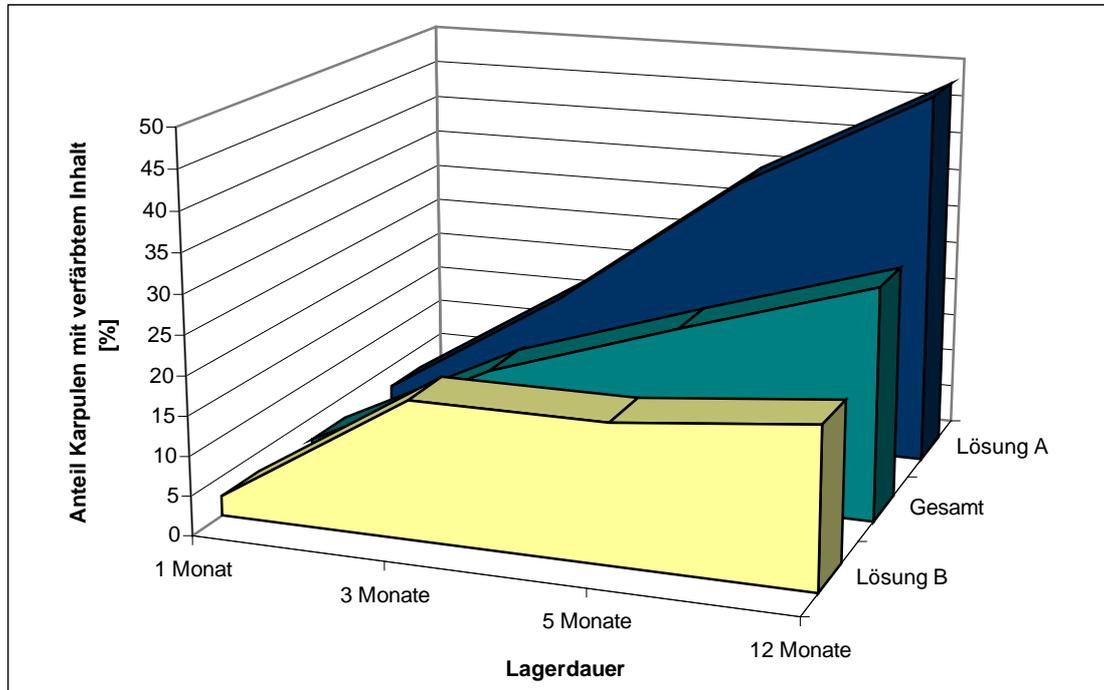
Absolute Anzahl verfärbter Karpulen in Klammern

Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung

Kunststoff	1 Monat	3 Monate	5 Monate	12 Monate
Lösung A	2% (1)	17% (11)	35% (22)	48% (30)
Lösung B	2,5% (1)	17,5% (7)	17,5% (7)	20% (8)
Wasser	0	0	0	0
Gesamt	2% (2)	14% (18)	22% (29)	29,5% (39)

Abb. 15: Anzahl der Kunststoffkarpulen mit verfärbtem Inhalt nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C

Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung



Bei der Stresslagerung von Wasser für Injektionszwecke in Kunststoffkarpulen konnten über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Verfärbungen beobachtet werden. Die Anzahl der verfärbten Pufferlösungen (Lösung B) in Kunststoff sind im Vergleich zu Metall deutlich geringer. Sie treten gehäuft nach drei Monaten Lagerung auf und ihre Zahl nimmt dann praktisch nicht mehr zu. Bei den mit Lösung A befüllten Karpulen liegt die Anzahl der zu beobachtenden Verfärbungen höher als bei den anderen beiden untersuchten Modelllösungen, ist aber mit 48% verfärbter Lösungen nach 12 Monaten signifikant geringer als im Falle der in Metall gelagerten Prüfmuster, wo nach 12 Monaten Lagerung 97% verfärbte Karpulen beobachtet werden konnten.

Aus den Beobachtungen kann die Schlussfolgerung abgeleitet werden, dass die Verfärbung im Falle der in Kunststoff gelagerten Prüfmuster auf die Degradation von Bestandteilen der arzneistoffhaltigen Lösung zurückzuführen ist. Auf Grund der geringeren Häufigkeit von Verfärbungen bei den arzneistofffreien Pufferlösungen ist eine Beteiligung des Atropinmoleküls an der Bildung gefärbter Produkte wahrscheinlich. Unter Berücksichtigung der für die in Metallkarpulen gelagerten Lösungen gemachten Beobachtungen besteht die Vermutung, dass es sich in beiden Fällen (Metall und Kunststoff als Primärpackmittel) um unterschiedliche Mechanismen handelt, die zu Verfärbungen führen.

5.2.4 Zusammenfassung

Abbildung 16 stellt zusammen mit Tabelle 13 eine Übersicht über die in den vier untersuchten Primärpackmitteln zu beobachtenden Verfärbungen dar.

Tab. 13: Anteil aller verfärbter Karpulen nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C

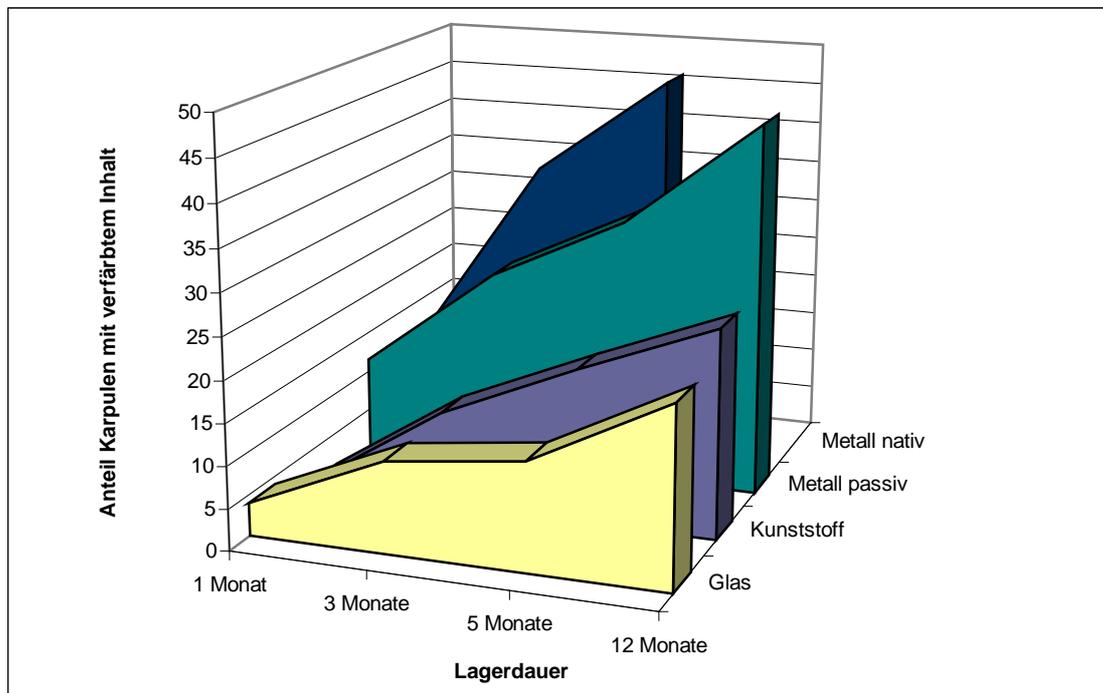
	1 Monat	3 Monate	5 Monate	12 Monate
Glas¹	4% (6)	11% (16)	13% (19)	21,5% (31)
Kunststoff²	1% (2)	11,5% (18)	18,5% (29)	25% (39)
Metall passiv²	11,5% (18)	24% (38)	32% (50)	45% (70)
Metall nativ³	10% (16)	34% (55)	46% (75)	

¹ n = 144

² n = 156

³ n = 162

Abb. 16: Anteil verfärbter Karpulen nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C in Summe



Der Anteil an Karpulen mit verfärbtem Inhalt ist bei den beiden metallischen Packmaterialien gegenüber Glas und Kunststoff deutlich erhöht. In den nicht silikonisierten Metallkarpulen ist zudem gegenüber den passivierten eine schnellere Zunahme der Anzahl von Verfärbungen zu verzeichnen. Hieraus lässt sich ein Einfluss der aus der Karpulenoberfläche löslichen Metallionen auf die Bildung gefärbter Produkte ableiten.

Die verhältnismäßig große Zahl an verfärbten Prüfmustern aus Glaskarpulen lässt sich auf Obidoximchlorid-Rückstände aus der ursprünglich enthaltenen Zubereitung zurückführen, die bei dem vorliegenden pH-Wert eine gelb-braune Verfärbung der enthaltenen Lösungen verursachen. Vernachlässigt man die so entstandenen Verfärbungen, kann festgestellt werden, dass es unter den untersuchten Bedingungen bei den hier verwendeten Glaskarpulen zu keinen anders verursachten Verfärbungen der enthaltenen Lösungen kommt. Da auf Grund der Bauart der verwendeten Injektionskarpulen kein Kontakt der

Lösungen mit metallischen Bauteilen stattfindet, wird durch diese Beobachtung die Theorie der Metallionen-katalysierten Bildung gefärbter Produkte unterstützt.

Im Falle der bei den in Kunststoff gelagerten Prüfmustern auftretenden Verfärbungen ist eine Beteiligung der oben diskutierten Metallionen-Katalyse durch den Kontakt der Lösungen mit der in der Kammer befindlichen Injektionsnadel möglich. Des Weiteren ist ein Einfluss der zur Verringerung der Gleitreibung aufgetragenen Silikonschicht zu diskutieren. Diese wird hier im Gegensatz zu Karpulen aus Metall oder Glas auf Grund der thermischen Instabilität der Kunststoffkarpule nicht durch Einbrennen fixiert, sondern wird nach Eintauchen in die Silikonlösung nur bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem Autoklavieren der so vorbereiteten Kunststoffkarpulen waren vereinzelt braune Rückstände an solchen Stellen der Karpulen zu beobachten, an denen auf Grund der Geometrie der verwendeten Zwei-Kammer-Karpulen die Silikonlösung beim Trocknungsvorgang nicht ungehindert bis zur Ausbildung eines dünnen Films ablaufen konnte. Zwar wurden diese Rückstände vor Einfüllen der Testlösungen entfernt. Es kann jedoch durch die bei der Stresslagerung verwendeten erhöhten Temperaturen und die eingefüllten Lösungen während der Lagerung zur Ablösung der aufgetragenen Silikonschicht und einer mit der beim Autoklavieren beobachteten vergleichbaren Reaktion gekommen sein. Dieses Phänomen müsste jedoch dann unabhängig von der Art der enthaltenen Lösung auftreten und somit zu einer Gleichverteilung der auftretenden Färbungen über alle untersuchten Modelllösungen führen. Diese kann jedoch in der vorliegenden Studie nicht festgestellt werden.

In wie weit die beobachteten Verfärbungen in Zusammenhang mit aus Atropin gebildeten Produkten steht, wird aus den Abbildungen 17 bis 19 ersichtlich. Hier wird ein Überblick über die Anzahl der jeweils bei den Atropin- und Blindlösungen sowie bei Wasser als

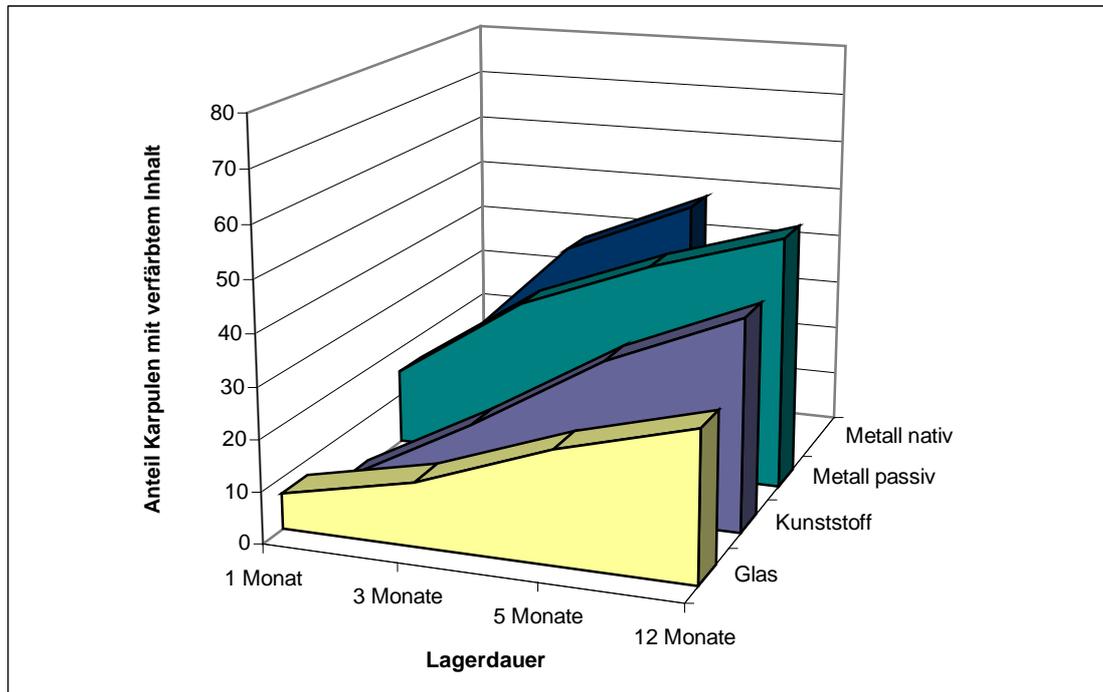
Füllgut auftretenden Verfärbungen gegeben. Die zugehörigen Werte sind in den Tabellen 14 bis 16 dargestellt.

Der Anteil mit Wasser befüllter Karpulen an den insgesamt auftretenden Färbungen ist bei den in Metall gelagerten Prüfmustern vernachlässigbar klein. Bei den Kunststoffkarpulen liegen keine Verfärbungen des darin enthaltenen Wassers vor. Die im Vergleich zu den restlichen untersuchten Packmitteln bei Glas deutlich erhöhte Anzahl auftretender Verfärbungen des thermisch belasteten Wassers ist, wie oben beschrieben, auf Obidoximchlorid-Rückstände zurückzuführen.

Im Falle der in Kunststoff gelagerten Prüfmuster sind Verfärbungen hauptsächlich bei der atropinhaltigen Lösung A zu beobachten. Verfärbungen der Lösung B leisten nur einen geringen Beitrag zur Gesamtzahl beobachteter Verfärbungen und treten vor allem nach drei Monaten auf. Bei weiterer Stresslagerung weist nur eine weitere, mit Lösung B befüllte Karpule nach 12 Monaten eine Färbung auf.

Im Falle der in passiviertem und nicht passiviertem Metall gelagerten Lösungen weisen annähernd gleich viele Karpulen mit Lösung A wie mit Lösung B Verfärbungen auf. Daher ist eine Beteiligung des Arzneistoff-Moleküls bei der Bildung gefärbter Produkte unwahrscheinlich. Hierbei hätten in Lösung A Verfärbungen gegenüber Lösung B häufiger auftreten müssen.

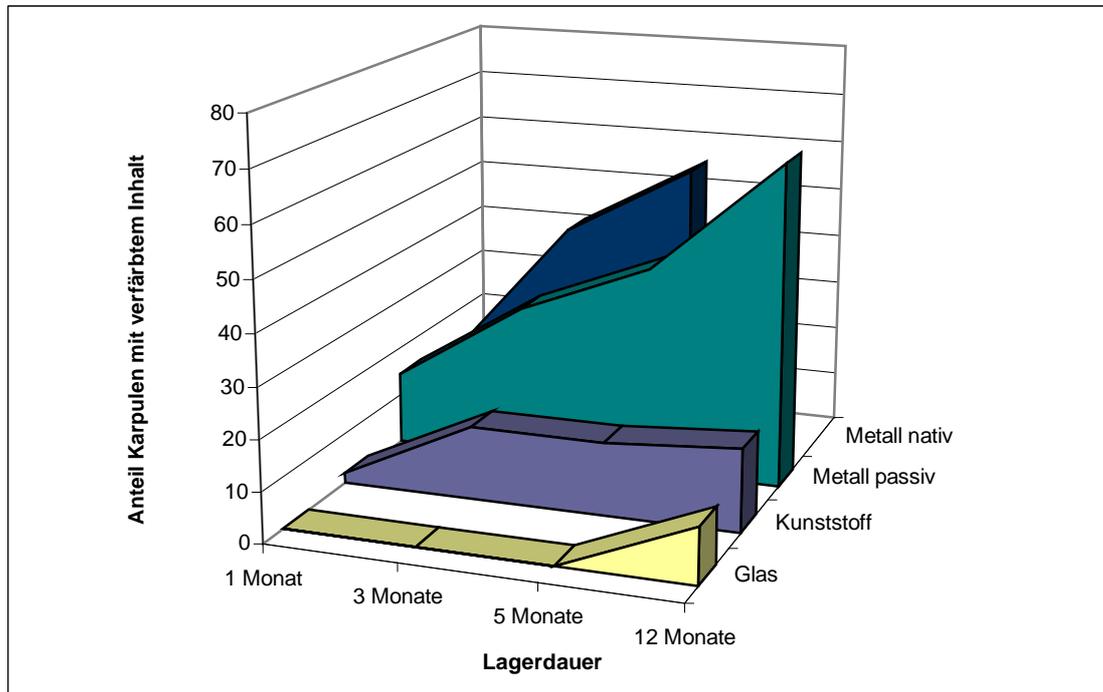
Abb. 17: Anteil verfärbter Karpulen mit Lösung A nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C



Tab. 14: Anteil der mit Lösung A befüllten Karpulen mit Verfärbungen nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C

	1 Monat	3 Monate	5 Monate	12 Monate
Glas	7% (5)	12,5% (9)	22% (16)	29% (21)
Kunststoff	1% (1)	15% (11)	30,5% (22)	41,5% (30)
Metall passiv	15% (11)	32% (23)	42% (30)	50% (36)
Metall nativ	12% (10)	37% (30)	48% (39)	

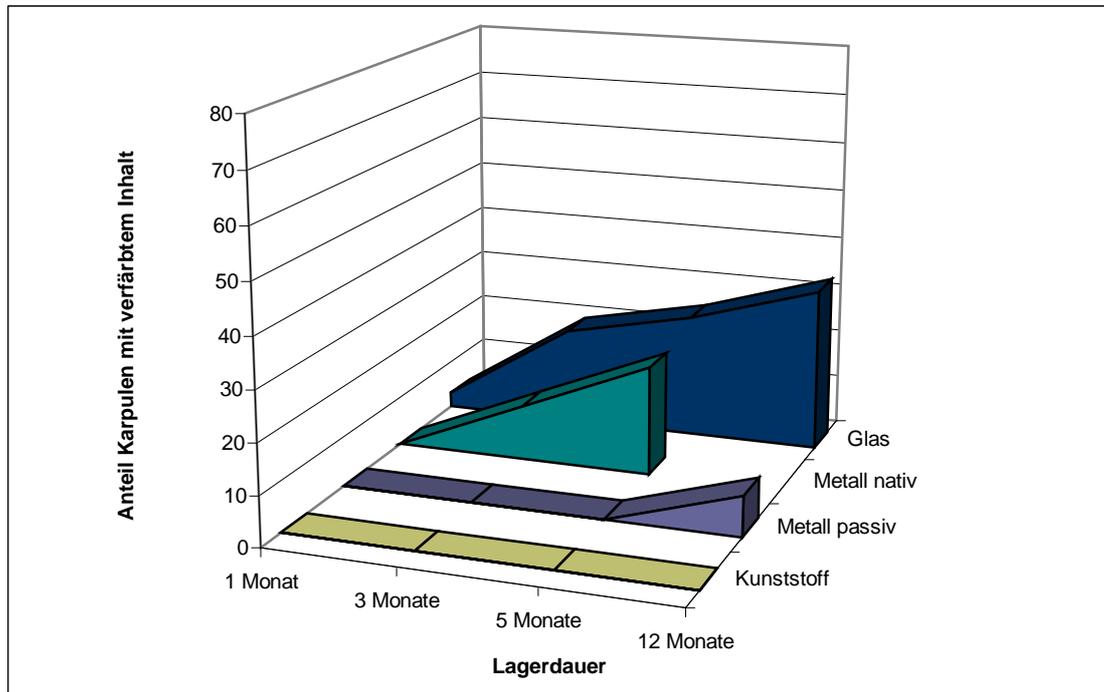
Abb. 18: Anteil verfärbter Karpulen mit Lösung B nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C



Tab. 15: Anteil der mit Lösung B gefüllten Karpulen mit Verfärbungen nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C

	1 Monat	3 Monate	5 Monate	12 Monate
Glas	0	0	0	11% (4)
Kunststoff	2% (1)	14,5% (7)	14,5% (7)	16,5% (8)
Metall passiv	14,5% (7)	31% (15)	41,5% (20)	64,5% (31)
Metall nativ	11% (6)	41% (22)	55,5% (30)	

Abb. 19: Anteil verfärbter Karpulen mit Wasser nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C



Tab. 16: Anteil der Karpulen mit verfärbtem Wasser nach Lagerung bei 40, 50 und 60°C

	1 Monat	3 Monate	5 Monate	12 Monate
Glas	3% (1)	19,5% (7)	25% (9)	33% (12)
Kunststoff	0	0	0	0
Metall passiv	0	0	0	8% (3)
Metall nativ	0	11% (3)	22% (6)	

5.3 pH-Wert

Nach der Prüfung der Färbung wurde der pH-Wert der einzelnen Prüfmuster nach thermischer Belastung bestimmt und mit dem der frisch hergestellten Lösungen verglichen. Veränderungen des pH-Wertes im Verlauf der Lagerung können als Hinweise auf mögliche ablaufende Reaktionen gewertet werden.

Zur Bestimmung des pH-Wertes der bei der vorliegenden Untersuchung anfallenden, sehr kleinen Volumina von 0,7 bis 2 ml wurde eine spezielle pH-Glaselektrode der Firma Metrohm verwendet, deren dünne Spitze es ermöglicht, auch in diesen kleinen Volumina den pH-Wert zu bestimmen.

Der pH-Wert der Atropinlösung vor thermischer Belastung lag bei 3,92, der der wirkstofffreien Pufferlösung bei 3,88.

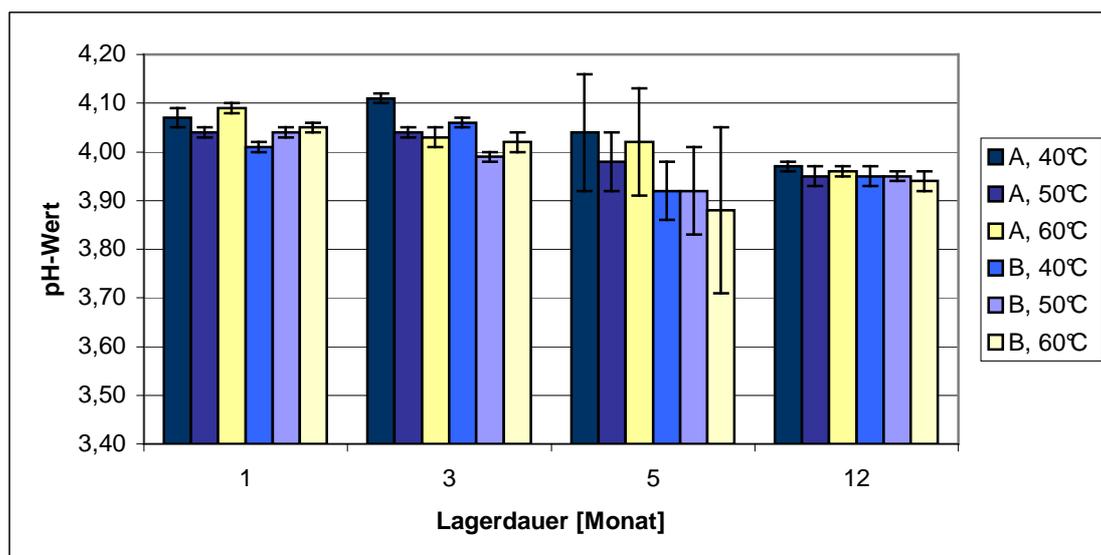
Die Auswertung der ermittelten Werte erfolgte zunächst graphisch durch Auftragen der pH-Werte gegen die Lagerdauer. Außerdem wurde ebenfalls graphisch auf eine mögliche Korrelation zwischen pH-Wert und Atropinkonzentration bzw. pH-Wert und Konzentration des Abbauprodukte Tropasäure und Apotropin sowie zwischen pH-Wert und Summe der Abbauprodukte untersucht. Hierzu wurde auf der x-Achse der pH-Wert und auf der y-Achse die zweite entsprechende Größe abgetragen und durch optische Auswertung auf Linearität der erhaltenen Diagramme geprüft.

5.3.1 Glaskarpulen

In Abbildung 20 ist der pH-Wert sowie das 95%-Konfidenzintervall der untersuchten Lösungen A und B in Abhängigkeit von der Lagerdauer dargestellt. Die zugehörigen Messwerte sind Tabelle A-6 im Anhang zu entnehmen.

Die pH-Werte der Lösungen A und B weichen im Laufe der Stresslagerung nur geringfügig von den ursprünglich eingestellten pH-Werten ab. Es können nach drei Monaten gegenüber dem Ausgangswert geringfügig erhöhte Werte festgestellt werden, die mit zunehmender Lagerdauer wieder absinken und den ursprünglichen Wert sogar am Ende der Lagerzeit unterschreiten. Nach 12 Monaten scheinen sich die Unterschiede der pH-Werte der verschiedenen Lösungen bei allen Lagertemperaturen nivelliert zu haben.

Abb. 20: pH-Wert-Verlauf nach Lagerung in Glas bei 40, 50 und 60°C
A: Atropinlösung; B: wirkstofffreie Pufferlösung



Die Abbildungen 21 bis 24 stellen den Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und dem Gehalt an Atropin, Tropasäure, Apoatropin sowie der Summe der beiden Abbauprodukte graphisch dar. Sie dienen der Prüfung bezüglich einer Korrelation zwischen pH-Wert und Arzneistoffabbau.

Abb. 21: Atropingehalt in Abhängigkeit vom pH-Wert nach Lagerung in Glas

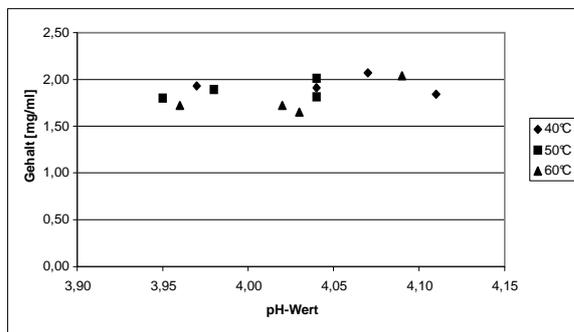


Abb. 22: Gehalt an Abbauprodukten in Abhängigkeit vom pH-Wert nach Lagerung in Glas

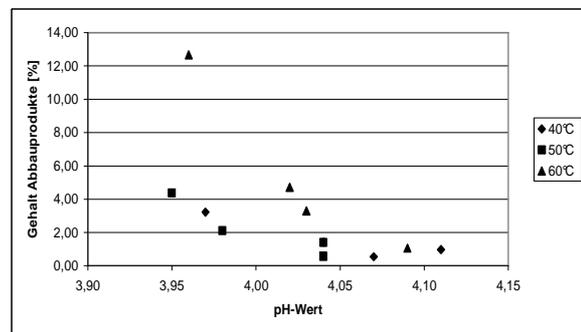


Abb. 23: Abhängigkeit des Tropasäuregehalt vom pH-Wert nach Lagerung in Glas

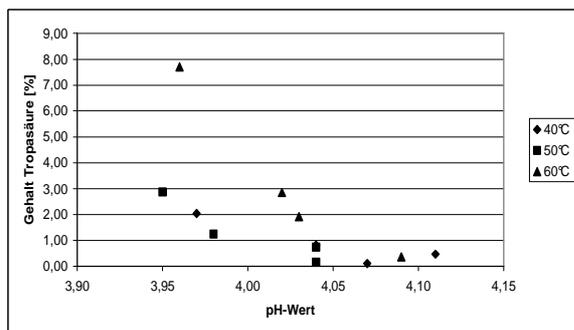
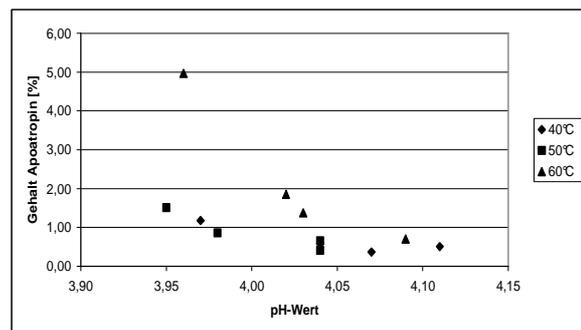


Abb. 24: Abhängigkeit des Apoatropingehalt vom pH-Wert nach Lagerung in Glas



Graphisch kann keine Korrelation zwischen dem pH-Wert und dem Gehalt an Atropin, Tropasäure, Apoatropin oder der Summe dieser beiden Abbauprodukte festgestellt werden. Es liegt allerdings ein Trend zu höherem Atropingehalt beziehungsweise geringerem Gehalt an Abbauprodukten mit steigendem pH-Wert vor. Nach Überschreiten eines pH-Wertes von

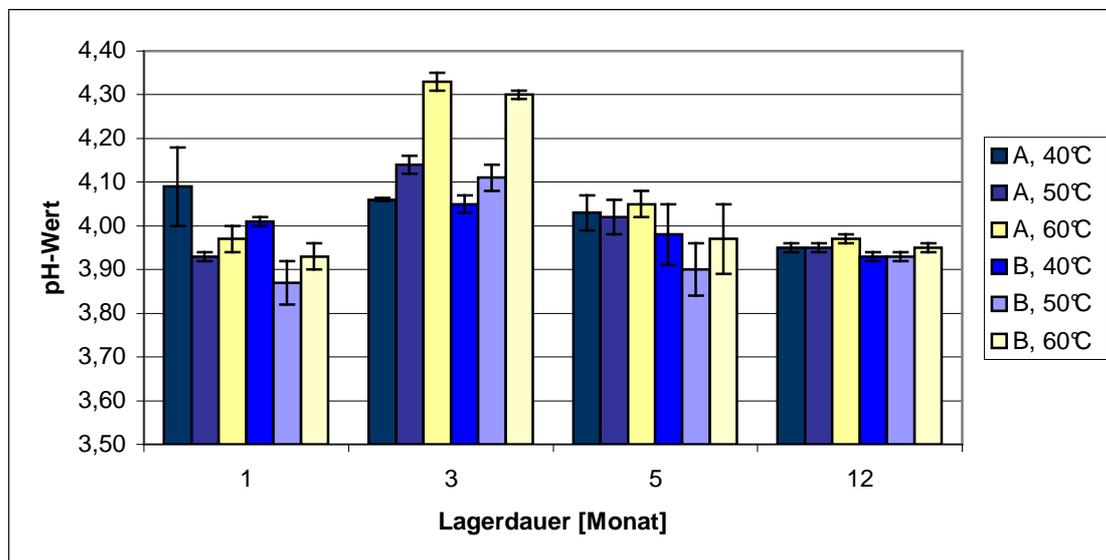
4 kehrt sich dieser Trend um und der Einfluss des pH-Wertes auf die genannten Parameter wird geringer.

5.3.2 Metallkarpulen

In Abbildung 25 ist der pH-Wert sowie das 95%-Konfidenzintervall der verschiedenen untersuchten Lösungen nach Lagerung in passiviertem Metall in Abhängigkeit von der Lagerdauer dargestellt. Die zugehörigen Messwerte sind Tabelle A-7 im Anhang zu entnehmen.

Abb. 25: pH-Wert nach Lagerung in passiviertem Metall

A: Atropinlösung; B: wirkstofffreie Lösung



Der pH-Wert der Lösung A steigt nach einmonatiger Lagerung bei 40°C zunächst stark vom Ausgangswert 3,92 auf einen pH-Wert von 4,09 an, wohingegen bei 50 und 60°C nur eine geringe Veränderung des pH-Werts zu beobachten ist. Der pH-Wert der Lösung B verhält

sich nach einmonatiger Lagerung vergleichbar dem der Lösung A. Die ermittelten Werte sind jedoch jeweils kleiner als die der Lösung A. Nach dreimonatiger Lagerung sind sowohl die pH-Wert der Lösung A als auch die der Lösung B mit Ausnahme der bei 40°C gelagerten Lösung A deutlich erhöht. Die zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung bestimmten pH-Werte nehmen außerdem mit steigender Temperatur zu.

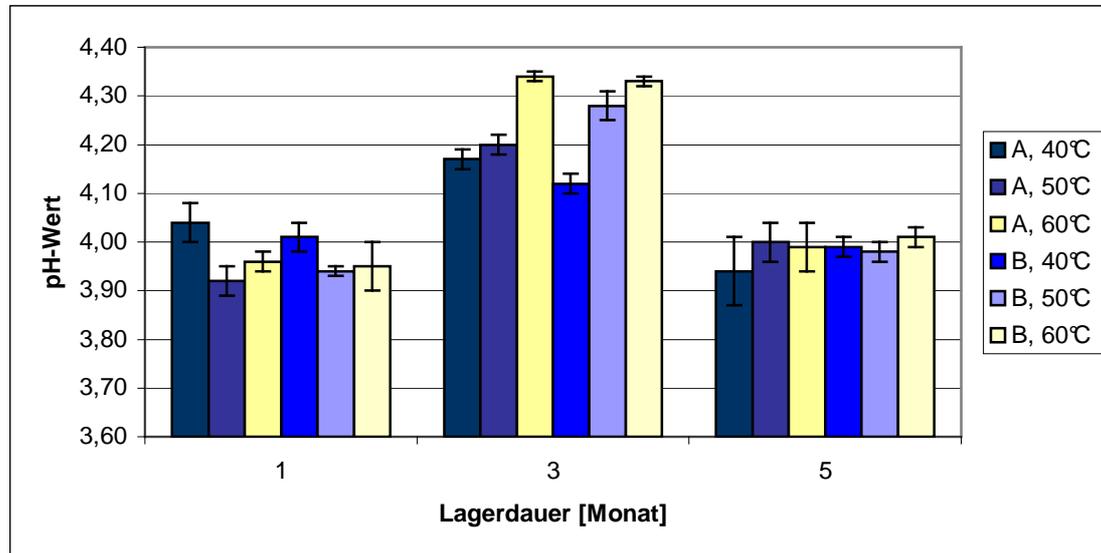
Nach fünfmonatiger Lagerung werden für Lösung A pH-Werte ermittelt, die gegenüber den Drei-Monats-Werten wiederum deutlich verringert sind und die Ein-Monats-Werte nur noch geringfügig überschreiten. Eine Abhängigkeit der bestimmten Werte von der Temperatur lässt sich nicht mehr feststellen.

Nach 12 Monaten Stresslagerung ist der Ausgangswert von 3,92 für Lösung A annähernd wieder erreicht. Der Ausgangswert der Lösung B von 3,88 wird hingegen nicht wieder erreicht. Die pH-Werte der 12 Monate thermisch belasteten Lösung B liegen wie die der entsprechenden Lösung A im Bereich von 3,9. Es erfolgte somit eine Angleichung der beiden Lösungen bezüglich ihres pH-Wertes. Auch im Laufe der Untersuchung wurde bezüglich der pH-Wert-Änderungen ein vergleichbares Verhalten der Lösungen A und B beobachtet, sodass festgestellt werden kann, dass der in Lösung A enthaltene Arzneistoff offensichtlich nicht maßgeblich an der Veränderung des pH-Wertes beteiligt ist. Da jedoch die Hydrolyse des Atropins zu sauren Produkten (Tropasäure) führt, ist eine pH-Wert-Änderung in Abhängigkeit vom Atropinabbau zu erwarten.

In Abbildung 26 sind der pH-Wert sowie das 95%-Konfidenzintervall der untersuchten Lösungen A und B nach Lagerung in nicht passiviertem Metall in Abhängigkeit von der Lagerdauer dargestellt. Die zugehörigen Messwerte sind Tabelle A-8 im Anhang zu entnehmen.

Abb. 26: pH-Wert der Lösungen A und B bei Lagerung in nicht passiviertem Metall

A: Atropinlösung; B: wirkstofffreie Pufferlösung



Die in nicht passivierten Metallkarpulen eingelagerten Prüfmuster zeigen bezüglich ihres pH-Wertes einen mit den in passivierten Metallkarpulen gelagerten Lösungen vergleichbaren Verlauf. Auch hier ist zwischen einem und drei Monaten Lagerung ein deutlicher Anstieg der pH-Werte zu beobachten. Zudem werden bei den Drei-Monats-Werten mit steigender Lagertemperatur auch höhere Werte bestimmt. Nach fünf Monaten thermischer Belastung liegen die pH-Werte beider Lösungen mit Ausnahme der bei 40°C gelagerten Lösung A auf dem Niveau der Ausgangswerte. Die zu Beginn der Untersuchung feststellbaren Unterschiede zwischen den beiden Lösungen sind nivelliert.

Abbildungen 27 bis 30 stellen den Zusammenhang zwischen pH-Wert und dem Gehalt an Atropin, Tropasäure, Apoatropin und der Summe der beiden Abbauprodukte nach Lagerung in passivierten Metallkarpulen graphisch dar. Sie dienen der Feststellung einer Korrelation zwischen pH-Wert und Arzneistoffabbau.

Abb. 27: Abhängigkeit des Atropingehalts vom pH-Wert nach Lagerung in passiviertem Metall

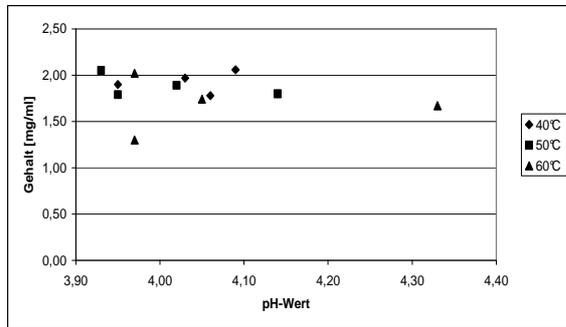


Abb. 28: Abhängigkeit des Gehalts an Abbauprodukten vom pH-Wert nach Lagerung in passiviertem Metall

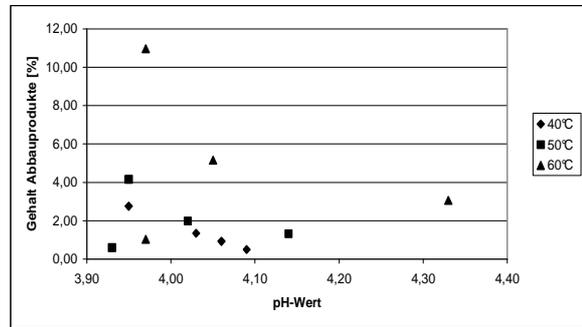


Abb. 29: Abhängigkeit des Tropasäuregehalts vom pH-Wert nach Lagerung in passiviertem Metall

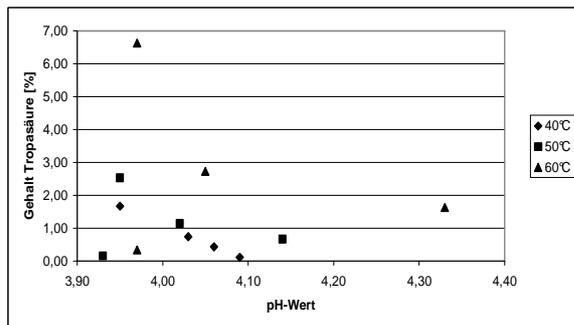
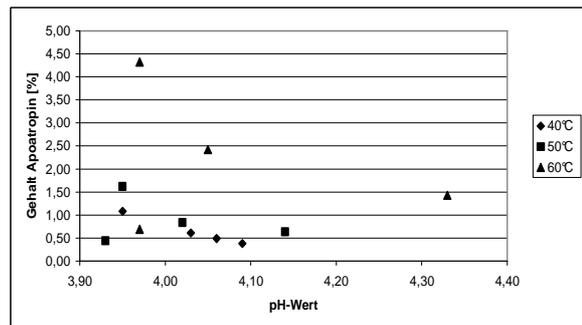


Abb. 30: Abhängigkeit des Apoatropingehalts vom pH-Wert nach Lagerung in passiviertem Metall



Nach der Lagerung bei 40°C besteht eindeutig ein linearer Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und dem Gehalt an Abbauprodukten (s. Abb. 28 bis 30). Mit steigendem pH werden nur geringere Gehalte an Tropasäure, Apoatropin beziehungsweise der Summe an diesen beiden Produkten bestimmt. Bezüglich des Gehalts an Atropin kann diese Korrelation nicht festgestellt werden. Auch für 50 und 60°C kann keine Korrelation zwischen dem pH-Wert und dem Gehalt an Atropin, Tropasäure, Apoatropin oder der Summe dieser beiden Abbauprodukte festgestellt werden.

Abbildungen 31 bis 34 stellen den Zusammenhang zwischen pH-Wert und dem Gehalt an Atropin, Tropasäure, Apoatropin und der Summe der beiden Abbauprodukte nach

Lagerung in nicht passivierten Metallkarpulen graphisch dar. Sie dienen der Feststellung einer Korrelation zwischen pH-Wert und Arzneistoffabbau.

Abb. 31: Abhängigkeit des Atropingehalts vom pH-Wert nach Lagerung in nicht passiviertem Metall

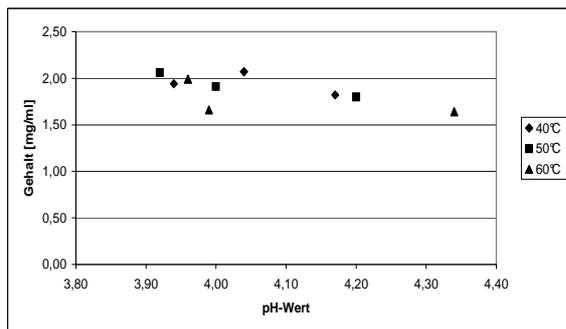


Abb. 32: Abhängigkeit des Gehalt an Abbauprodukten vom pH-Wert nach Lagerung in nicht passiviertem Metall

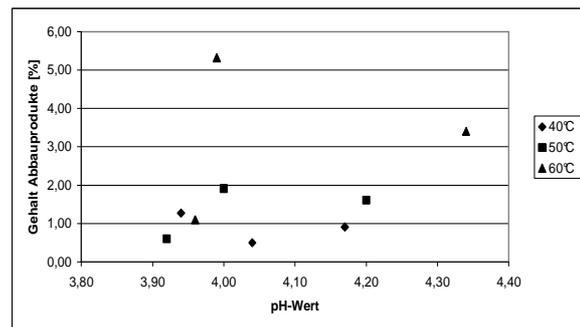


Abb. 33: Abhängigkeit des Tropasäuregehalts vom pH-Wert nach Lagerung in nicht passiviertem Metall

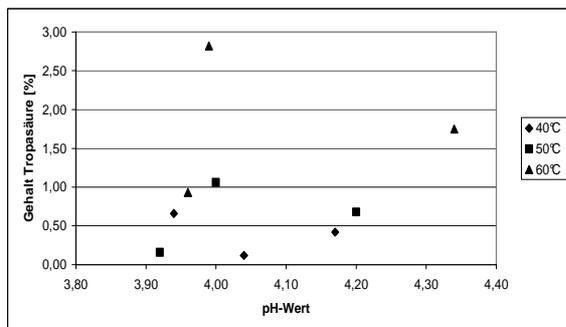
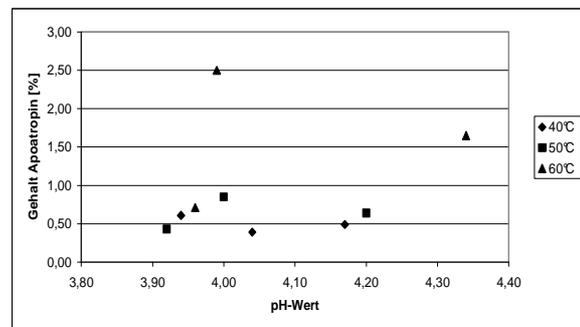


Abb. 34: Abhängigkeit des Apotrotingehalts vom pH-Wert nach Lagerung in nicht passiviertem Metall



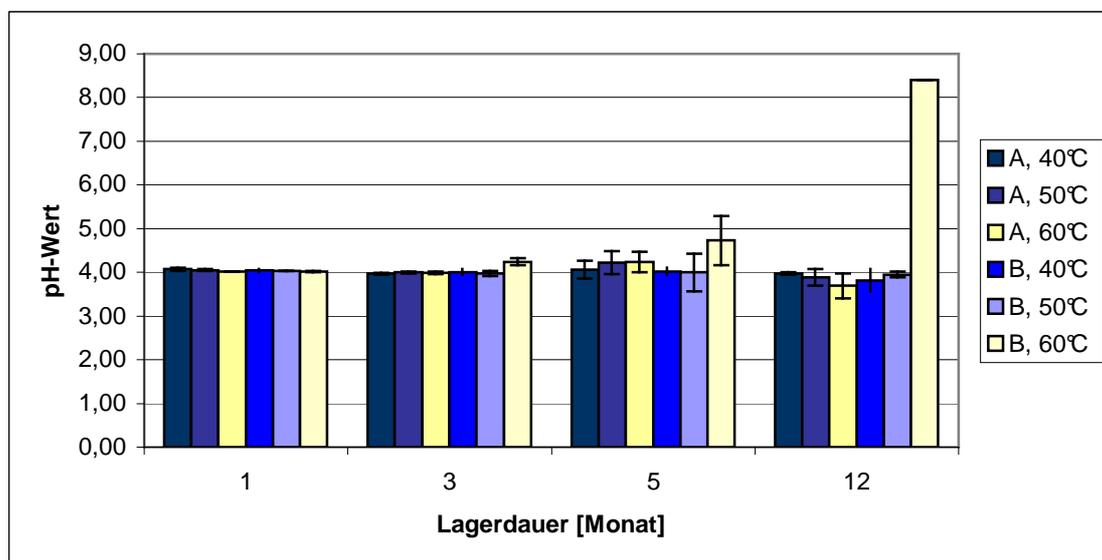
Graphisch kann keine Korrelation zwischen dem pH-Wert und dem Gehalt an Atropin, Tropasäure, Apotrope oder der Summe dieser beiden Abbauprodukte festgestellt werden. Es liegt allerdings mit steigendem pH-Wert ein Trend zu niedrigeren Atropingehalten vor.

5.3.3 Kunststoffkarpulen

In Abbildung 35 ist der pH-Wert sowie das 95%-Konfidenzintervall der in Kunststoff thermisch belasteten Lösungen A und B in Abhängigkeit von der Lagerdauer abgebildet. Die zugehörigen Messwerte sind in Tabelle A-9 im Anhang aufgeführt.

Abb. 35: pH-Wert der Lösungen A und B nach Lagerung in Kunststoff

A: Atropinlösung; B: wirkstofffreie Pufferlösung



Bei den in Kunststoffkarpulen thermisch belasteten Lösungen ist in den ersten drei Monaten der Untersuchung nur eine geringfügige Veränderung des pH-Wertes zu beobachten. Alle ermittelten Werte liegen im Bereich von pH 4. Nach dreimonatiger Lagerung bei 60°C kann ein leichter Anstieg des pH-Wertes der Lösung B beobachtet werden, der nach fünf Monaten noch verstärkt wird. Auch bei Lösung A kann nach fünf Monaten der Lagerung bei erhöhten Temperaturen ein Anstieg des pH-Wertes festgestellt werden, der bei höherer Lagertemperatur stärker ausgeprägt ist. Die gemessenen Werte sind jedoch nie um mehr als

0,5 pH-Einheiten höher als der Ausgangswert. Nach 12-monatiger Lagerung werden wieder Werte unter pH 4 gemessen. Ausnahme ist hier jedoch die bei 60°C gelagerte Lösung B mit einem pH-Wert von 8,4. Da es sich hier jedoch um einen einzigen bestimmten Wert handelt ist von einem Ausreißer auszugehen, der im Weiteren nicht bewertet wird.

Abbildungen 36 bis 39 stellen den Zusammenhang zwischen pH-Wert und dem Gehalt an Atropin, Tropasäure, Apoatropin und der Summe der beiden Abbauprodukte nach Lagerung in Kunststoffkarpulen graphisch dar. Sie dienen der Feststellung einer Korrelation zwischen pH-Wert und Arzneistoffabbau.

Abb. 36: Abhängigkeit des Atropingehalts vom pH-Wert nach Lagerung in Kunststoff

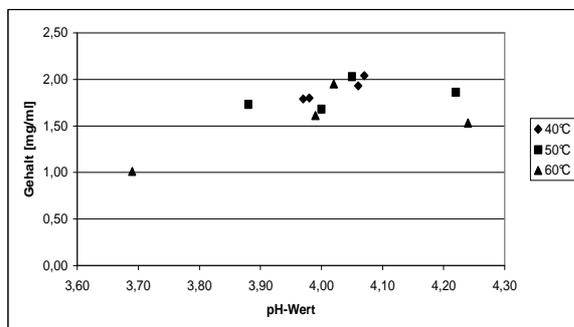


Abb. 37: Abhängigkeit des Gehalts an Abbauprodukten vom pH-Wert nach Lagerung in Kunststoff

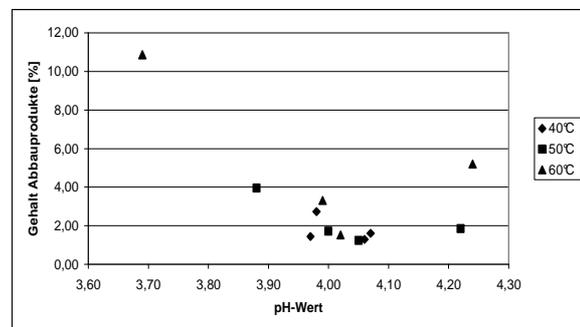


Abb. 38: Abhängigkeit des Tropasäuregehalts vom pH-Wert nach Lagerung in Kunststoff

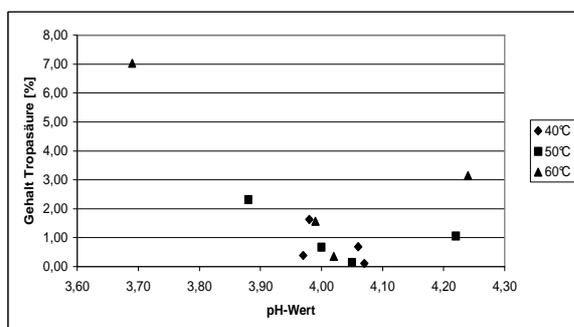
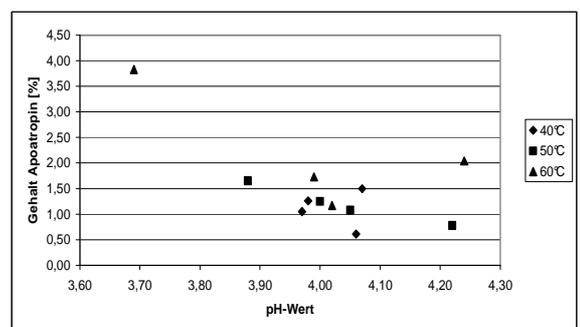


Abb. 39: Abhängigkeit des Apoatropingehalts vom pH-Wert nach Lagerung in Kunststoff



Graphisch kann keine Korrelation zwischen dem pH-Wert und dem Gehalt an Atropin, Tropasäure, Apotropin oder der Summe dieser beiden Abbauprodukte festgestellt werden. Es liegt mit steigendem pH-Wert jedoch ein Trend zu niedrigeren Atropingehalten vor.

Der Gehalt an Tropasäure und die Summe der Abbauprodukte zeigen nach Lagerung bei 50 und 60°C bis zu einem pH-Wert von 4,1 mit zunehmendem pH-Wert einen Trend zu geringeren Gehalten. Über pH 4,1 steigen die Gehalte wieder an. Auch für Apotropin lassen sich vergleichbare Beobachtungen machen. Hier besteht nach Lagerung bei 50°C ein linearer Zusammenhang zwischen pH-Wert und Konzentration.

5.3.4 Zusammenfassung

Bei allen untersuchten Primärpackmitteln wurde zwischen der Probenahme nach einmonatiger und nach dreimonatiger thermischer Belastung ein Anstieg des pH-Wertes der Lösungen A und B sowie des Wassers für Injektionszwecke festgestellt. Die nach drei Monaten erhöhten pH-Werte verringerten sich im Laufe der weiteren Untersuchung so weit, dass nach 12-monatiger Lagerung wieder pH-Werte im Bereich der Ausgangswerte bestimmt wurden. Zu diesem Zeitpunkt bestehen auch zwischen den einzelnen Lagertemperaturen und den beiden Modelllösungen praktisch keine Unterschiede mehr bezüglich des pH-Wertes.

Die für die untersuchten Primärpackmittel bestimmten pH-Werte können mit Hilfe von multiplen Vergleichen zu den in Tabelle 17 dargestellten Gruppen zusammenfasst werden, bei denen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des pH-Wertes ermittelt werden. Fehlt eine Temperatur-Zeit-Kombination in der Auflistung, können alle untersuchten

Primärpackmittel zu einer Gruppe ohne signifikante Unterschiede zusammengefasst werden.

Hierbei fällt auf, dass zwischen den in passivierten und den in nicht passivierten Metallkarpulen gelagerten Lösungen mit Ausnahme der Drei-Monats-Werte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des pH-Wertes festgestellt werden können. Außer nach einmonatiger Lagerung bei 60°C weichen zudem die pH-Werte der Lösungen aus Kunststoffkarpulen signifikant von denen der übrigen untersuchten Primärpackmittel ab. Die für die aus Glaskarpulen stammenden Lösungen ermittelten pH-Werte lassen sich zumeist in einer Gruppe mit den Werten der Lösungen aus Metallkarpulen zusammenfassen.

Tab. 17: Gruppen ohne signifikant unterschiedliche pH-Werte

G: Glaskarpulen; Mp: passivierte Metallkarpulen; Mn: nicht passivierte Metallkarpulen

K: Kunststoffkarpulen; S: signifikante Unterschiede zwischen allen Primärpackmitteln;

Lagerbedingung	Gruppe 1	Gruppe 2
40°C/ 3 Monate		S
40°C/ 12 Monate	G + Mp	K
50°C/ 1 Monat	Mp + Mn	G + K
50°C/ 3 Monate		S
50°C/ 5 Monate	G + Mp + Mn	K
60°C/ 1 Monat	Mp + Mn + K	G
60°C/ 3 Monate		S
60°C/ 5 Monate	Mp + Mn + G	Mp + K
60°C/ 12 Monate	K	G + Mp

5.4 Gehalt

Die Gehaltsbestimmung des Arzneistoffs erfolgte mittels HPLC-UV an Hand einer durch Standardlösung erhaltenen externen Kalibriergeraden (Methode s. Kapitel 3.2.).

Im Verlauf der thermischen Belastung war auf Grund der Degradation des Arzneistoffs einer Verringerung seiner Konzentration in der Prüflösung zu erwarten. Eine Temperaturabhängigkeit als Folge einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit bei erhöhter Lagertemperatur ist ebenfalls anzunehmen.

Die Ausgangskonzentration an Atropinsulfat beträgt 2,0 mg/ml. Nach einer Monographie der United States Pharmacopoeia [64] sollen am Ende der Laufzeit noch mindestens 93% des deklarierten Arzneistoffgehalts im Arzneimittel vorhanden sein. Dies entspricht einer Atropinsulfatkonzentration von 1,85 mg/ml.

Durch die Auftragung des Logarithmus des Gehalts gegen die Zeit sowie des Kehrwerts des Gehalts gegen die Zeit kann eine Aussage über die dem Abbau zu Grunde liegende Reaktionsordnung getroffen werden. Die Kenntnis der Reaktionsordnung ist Voraussetzung für die anschließende Abschätzung der Haltbarkeit des Arzneimittels mit Hilfe des Arrhenius-Plots.

Die Umformung des einer Reaktion 1. Ordnung zu Grunde liegenden Geschwindigkeitsgesetzes (Gleichung 4) führt zu Gleichung 5 bzw. 6. Daraus ergibt sich, dass bei einer Reaktion 1. Ordnung der Logarithmus des Gehalts aufgetragen gegen die Zeit eine Gerade mit der Steigung $-k$ ergibt.

$$v = -\frac{dc}{dt} = k \cdot c \quad (4)$$

$$c = c_0 \cdot e^{-kt} \quad (5)$$

$$\ln c = c_0 - kt \quad (6)$$

t	Zeit [Monat]
C ₀	Ausgangsaktivität (näherungsweise Ausgangskonzentration)
C	Aktivität zur Zeit t
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

Die Umformung des einer Reaktion 2. Ordnung zu Grunde liegenden Geschwindigkeitsgesetzes (Gleichung 7) führt zu Gleichung 8. Diese kann für kleine kt weiter zu Gleichung 9 vereinfacht werden. Daraus ergibt sich, dass bei einer Reaktion 2. Ordnung der Kehrwert des Gehalts aufgetragen gegen die Zeit eine Gerade mit der Steigung $[B]_0/[A]_0 \cdot k$ ergibt.

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [B] \quad (7)$$

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + \frac{[B]_0}{[A]_0} \cdot \frac{e^{k([B]_0 - [A]_0)t} - 1}{[B]_0 - [A]_0} \quad (8)$$

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + \frac{[B]_0}{[A]_0} \cdot kt \quad (9)$$

t	Zeit [Monat]
[A] ₀	Ausgangsaktivität (näherungsweise Ausgangsgehalt) Verbindung A
[B] ₀	Ausgangsaktivität (näherungsweise Ausgangsgehalt) Verbindung B
[A]	Aktivität Verbindung A zur Zeit t
[B]	Aktivität Verbindung B zur Zeit t
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

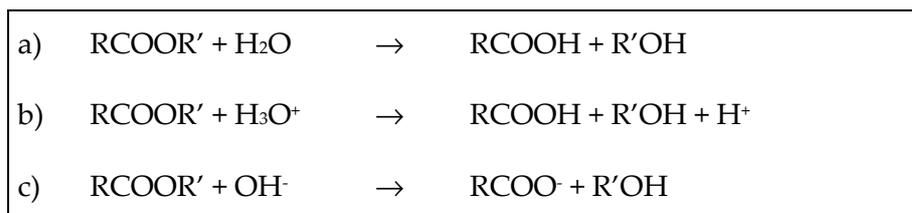
Bei dem Quotienten $[B]_0/[A]_0$ handelt es sich um das Verhältnis der Ausgangsaktivitäten der beiden an der Reaktion teilnehmenden Moleküle. Da alle in der vorliegenden Studie analysierten Prüfmustern aus der selben Lösung hergestellt wurden, ist dieses Verhältnis für alle Prüfmuster gleich. Daher kann der Quotient $[B]_0/[A]_0$ als Konstante angesehen und in die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante einbezogen werden. Gleichung 9 kann daher nochmals weiter zu Gleichung 10 vereinfacht werden.

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + k't \quad (10)$$

t	Zeit [Monat]
$[A]_0$	Ausgangsaktivität (näherungsweise Ausgangsgehalt) Verbindung A
$[A]$	Aktivität Verbindung A zur Zeit t
k'	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

Für die Hydrolyse eines Esters, wie zum Beispiel Atropin, existieren drei mögliche Reaktionsmechanismen, die jeweils unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten besitzen (s. Abb. 40).

Abb. 40: Schematische Darstellung der Reaktionsmechanismen einer Esterhydrolyse



Bei diesen Reaktionen kann es sich sowohl um Reaktionen erster als auch zweiter Ordnung handeln, abhängig davon, ob die Konzentration an H_2O , H_3O^+ oder OH^- die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst. Vor allem bei der in Abbildung 40 unter c) dargestellten Hydroxyl-katalysierten Hydrolyse kann ein Einfluss der Hydroxylionenaktivität auf die Reaktionsgeschwindigkeit diskutiert werden, da hier rein mechanistisch OH^- während der Reaktion verbraucht wird. Da sich bei einer Hydrolyse in wässriger Lösung die Wasserkonzentration $[B]$ praktisch fast nicht ändert, kann sie als Konstante in die Geschwindigkeitskonstante k einbezogen werden. Das Geschwindigkeitsgesetz der Reaktion 2. Ordnung (Gl. 7) vereinfacht sich daher wie in Gleichung 11 dargestellt. Da es sich hierbei formal um eine Reaktion 1. Ordnung handelt, wird sie auch Reaktion pseudo-erster Ordnung genannt.

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [H_2O] = k' \cdot [A] \quad (11)$$

t Zeit [Monat]

[A] Aktivität Verbindung A zur Zeit t (Näherungsweise Konzentration von A)

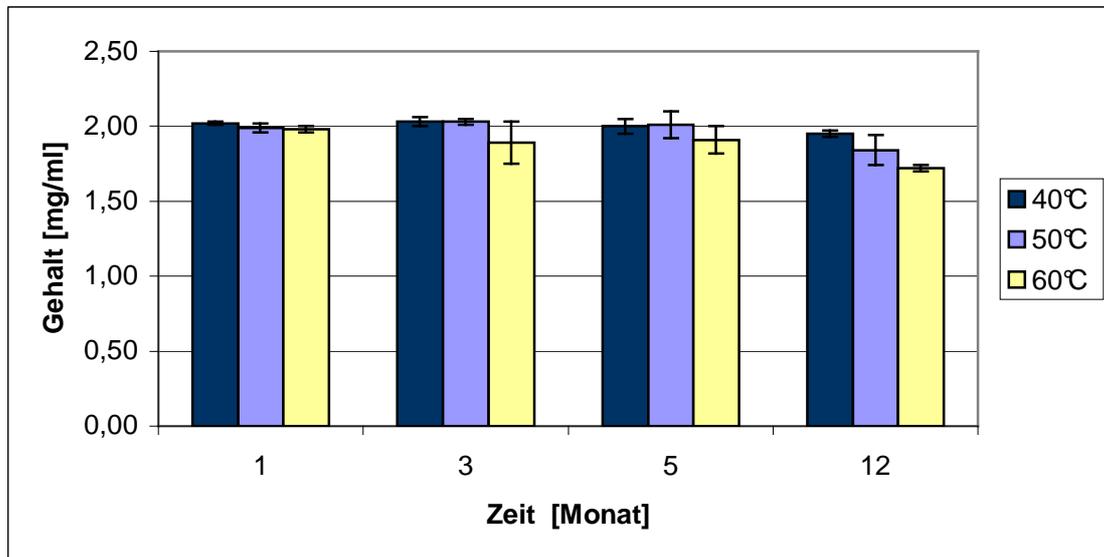
[H_2O] Aktivität H_2O zur Zeit t (Näherungsweise Konzentration H_2O)

k Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

5.4.1 Glaskarpulen

Abbildung 41 stellt die für die jeweilige Lagerdauer ermittelten Konzentrationen an Atropinsulfat für die in Glas gelagerte Lösung A sowie das zugehörige 95%-Konfidenzintervall dar. Für die Berechnung des Konfidenzintervalls war jeweils $n = 6$ anzusetzen. Die ermittelten Messwerte sind Tabelle A-7 im Anhang zu entnehmen.

Abb. 41: Atropinsulfatkonzentration nach Lagerung in Glaskarpulen unter den angegebenen Bedingungen

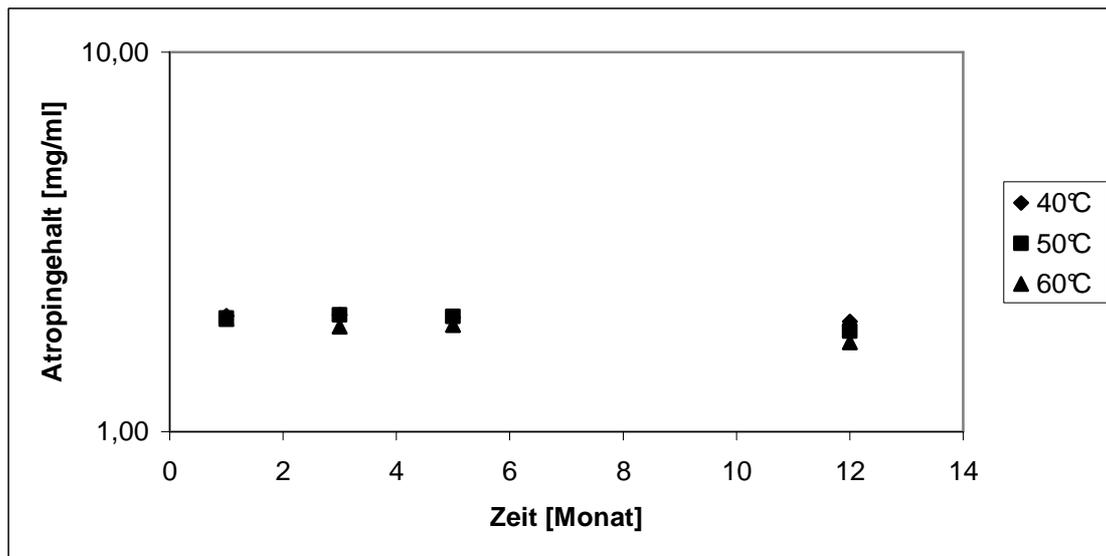


Wie erwartet ist über die Dauer der Stresslagerung eine temperaturabhängige Abnahme der Atropinkonzentration zu beobachten. Der Einfluss der Lagertemperatur wird hierbei mit zunehmender Lagerdauer verstärkt. Zu Beginn der Untersuchung sind daher zwischen den bei unterschiedlichen Temperaturen gelagerten Kollektiven kaum Unterschiede im Hinblick auf ihren Arzneistoffgehalt festzustellen, wohingegen sich bereits nach drei Monaten Lagerung in den bei 60°C gelagerten Lösungen eine stärkere Verringerung der Arzneistoffkonzentration als in den bei niedrigeren Temperaturen gelagerten Lösungen abzeichnet.

Zwischen der Arzneistoffkonzentration und der Zeit lässt sich keine Proportionalität feststellen. Für die Ermittlung der Reaktionsordnung wird auf eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Konzentration und der Zeit sowie zwischen dem Kehrwert der Konzentration und der Zeit geprüft.

Abbildung 42 stellt den Zusammenhang zwischen Konzentration und Zeit in logarithmischer Skala dar.

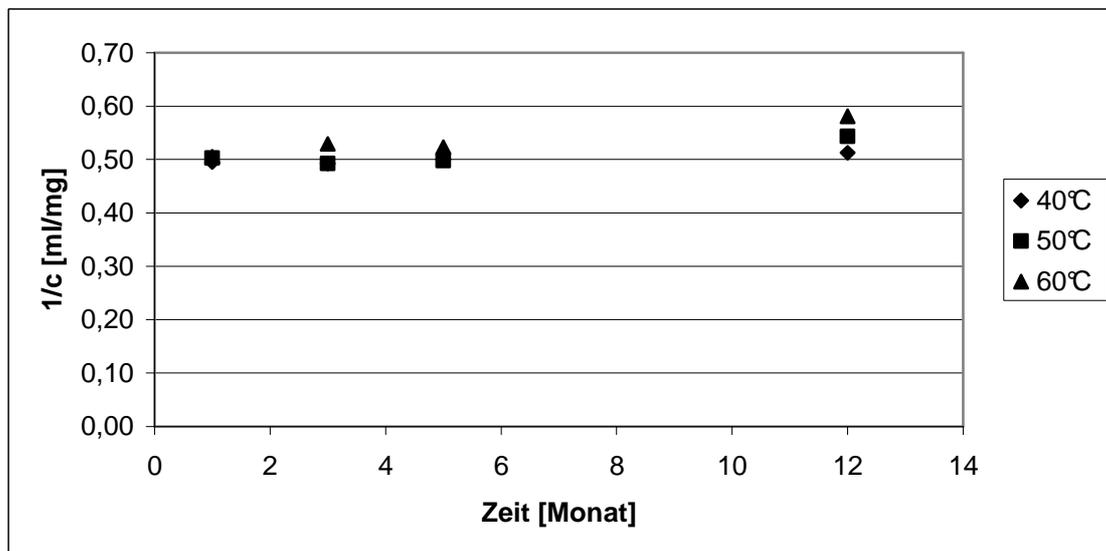
Abb. 42: Atropinsulfatkonzentration nach Lagerung in Glaskarpulen unter den angegebenen Bedingungen
halblogarithmische Darstellung



Eine logarithmische Auftragung der ermittelten Konzentrationen gegen die Zeit ergibt für die bei 40 und 60°C gelagerten Lösungen eine Gerade mit einem Korrelationskoeffizienten größer 0,9. Die Gerade für die bei 50°C gelagerten Lösungen besitzt einen Korrelationskoeffizienten von 0,8. Es ist eine Proportionalität erkennbar. Eine Regression 2. Ordnung liefert zudem keine signifikant bessere Anpassung, sodass der geringe Korrelationskoeffizient vermutlich auf die größere Streuung der Werte zurückzuführen ist.

Abbildung 43 stellt den Zusammenhang zwischen dem Kehrwert der Konzentration und der Zeit graphisch dar.

Abb. 43: Kehrwert des Atropingehalts nach Lagerung in Glaskarpulen unter den angegebenen Bedingungen



Eine Auftragung des Kehrwertes der Atropinsulfatkonzentration gegen die Zeit liefert keine bessere Anpassung der Werte an die Ausgleichsgerade. Für die Abschätzung der Haltbarkeit des Modell-Arzneimittels kann daher über das Geschwindigkeitsgesetz einer Reaktion 1. Ordnung eine ausreichende Näherung erzielt werden.

Die für die beiden Reaktionsordnungen ermittelten Werte sind in Tabelle 18 dargestellt.

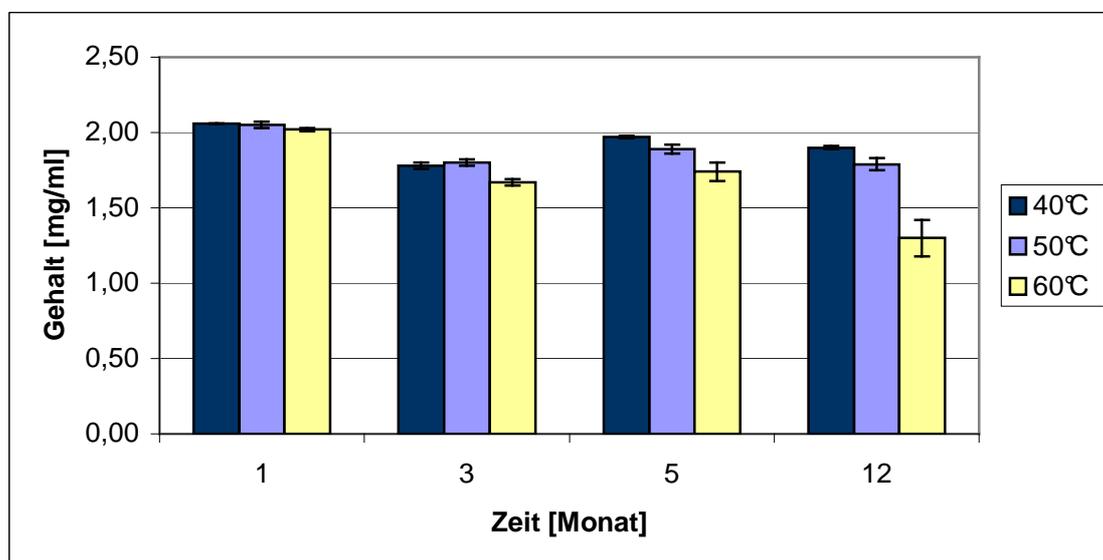
Tab. 18: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Korrelationskoeffizienten für den Atropinabbau in Glaskarpulen nach Kinetik erster und zweiter Ordnung

Temperatur	1. Ordnung		2. Ordnung	
	k [s ⁻¹]	R ²	k [l·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]	R ²
40°C	0,004	0,92	0,002	0,92
50°C	0,008	0,80	0,004	0,80
60°C	0,012	0,94	0,007	0,94

5.4.2 Metallkarpulen

Abbildung 44 stellt die für die jeweilige Lagerdauer ermittelten Gehalte an Atropinsulfat für die in passiviertem Metall gelagerte Lösung A sowie das zugehörige 95% - Konfidenzintervall dar. Für die Berechnung des Konfidenzintervalls war jeweils $n = 6$ anzusetzen. Die zugehörigen Messwerte sind in Tabelle A-11 im Anhang aufgeführt.

Abb. 44: Atropingehalt nach Lagerung in passivierten Metallkarpulen unter den angegebenen Bedingungen



Auch bei den in passivierten Metallkarpulen thermisch belasteten Lösungen ist ein temperatur- und zeitabhängiger Rückgang der Atropinsulfatkonzentration zu beobachten. Auffällig sind hier jedoch die nach drei Monaten der thermischen Belastung ermittelten Werte. Diese sind deutlich geringer, als auf Grund der Lagerbedingungen und der Lagerzeit zu erwarten war. Sie entsprechen bereits einer Degradation von ca. 15% des ursprünglich eingesetzten Arzneistoffs. Auf Grund der für vergleichbare zugelassene Arzneimittel festgesetzten Haltbarkeitsdauer von zwei Jahren kann dieser Wert als deutlich überhöht angesehen werden. Eine Extrapolation auf Lagerung bei Raumtemperatur würde keine

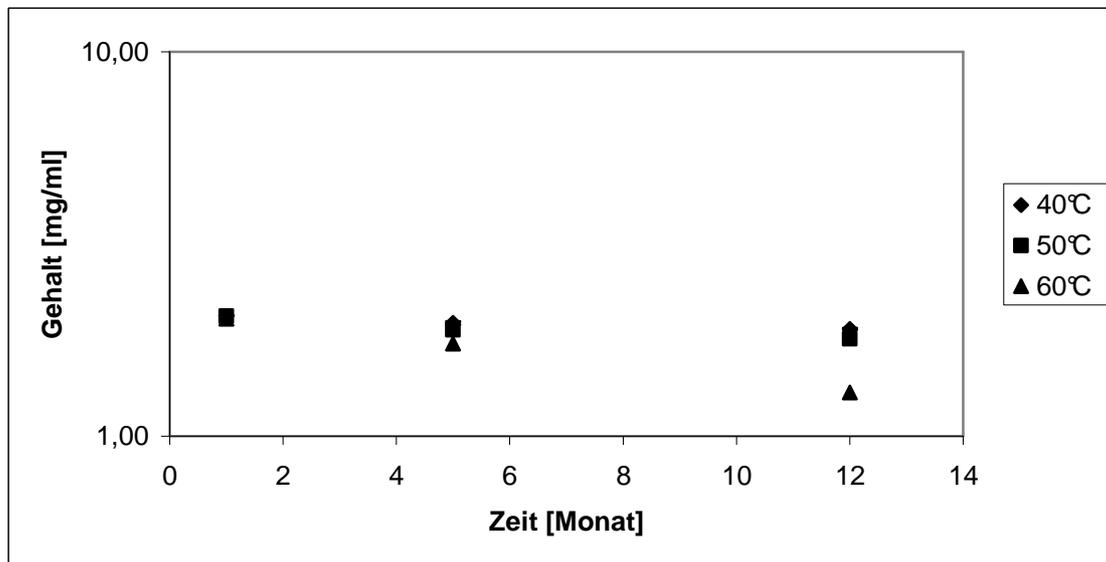
Laufzeit von zwei Jahren möglich machen, um den Anforderungen eines Arzneistoffgehalts von mindestens 93% am Ende dieser Laufzeit gewährleisten zu können. Außerdem werden im weiteren Verlauf der Untersuchung wieder höhere Werte für den Gehalt des Atropinsulfats ermittelt. Da jedoch durch länger andauernde thermische Belastung ein Abbau des Arzneistoffs weiter voranschreitet, muss davon ausgegangen werden, dass die nach drei Monaten bestimmten Werte durch Fehler bei der Bestimmung des Arzneistoffgehalts verursacht wurden.

Zur Untersuchung der Lösungen wurde nach dreimonatiger Lagerung eine andere HPLC-Anlage verwendet, als bei den übrigen Probenahmen. Unterschiedliche Empfindlichkeit der Detektoren beider Geräte wird durch die vor den Analysesequenzen durchgeführten externen Kalibrierungen ausgeglichen. Außerdem sind die auf den beiden Anlagen ermittelten Peakflächen der Kalibrierniveaus gleich groß, sodass ein Unterschied in der Detektorresponse der beiden Geräte als Ursache für die Schwankung der Werte ausgeschlossen werden kann.

Da die Abweichung der Werte von den erwarteten nicht erklärt werden kann und von Analysefehlern wie etwa Verdünnungsfehlern ausgegangen werden muss, findet eine weitere Berücksichtigung der nach dreimonatiger Lagerung erhobenen Daten für die weitere Auswertung nicht statt. Eine Nachuntersuchung der Drei-Monats-Proben nach Feststellung des Fehlers wurde nicht durchgeführt, da die Lösungen bis zu dieser Feststellung zwei Monate, zwar unter Lichtausschluss im Kühlschrank, gelagert wurden, eine weitere Zersetzung des Atropins jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte.

Zur Ermittlung der dem Abbau des Arzneistoffs zu Grunde liegenden Reaktionsordnung erfolgt eine logarithmische Auftragung des ermittelten Gehalts gegen die Zeit. Diese ist in Abbildung 45 dargestellt.

Abb. 45: Atropingehalt nach Lagerung in passivierten Metallkarpulen unter den angegebenen Bedingungen;
halblogarithmische Darstellung



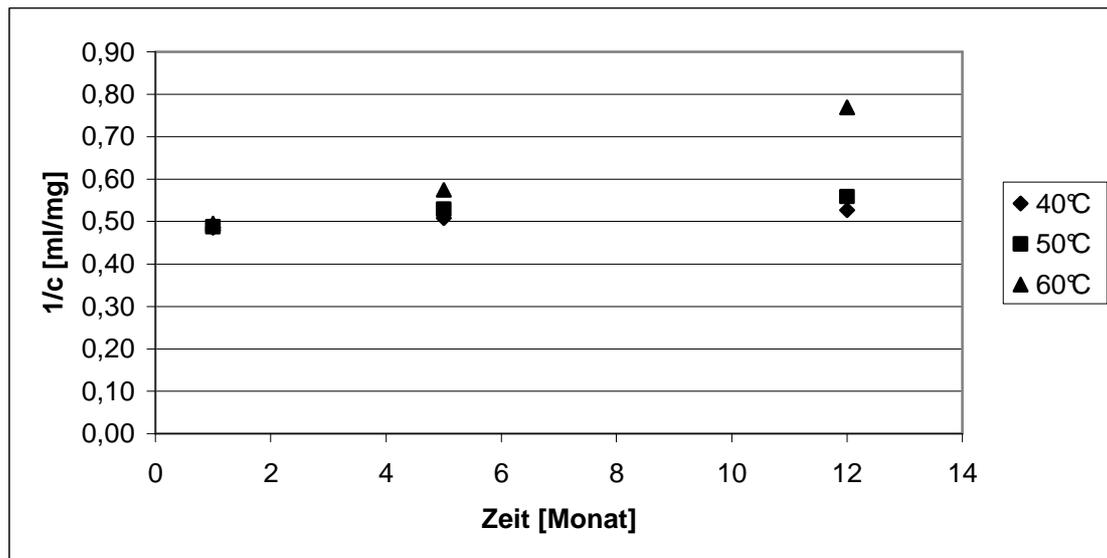
Die logarithmische Auftragung des Gehalts gegen die Zeit liefert bei allen drei für die Studie verwendeten Lagertemperaturen eine Gerade. Die Steigung dieser Geraden, welche der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante $-k$ entspricht, nimmt mit steigender Temperatur während der Lagerung zu. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tab. 19: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Korrelationskoeffizienten für den Atropinabbau in passivierten Metallkarpulen nach Kinetik erster Ordnung

Temperatur	k [s ⁻¹]	R ²
40°C	0,007	0,95
50°C	0,012	0,93
60°C	0,040	1,00

Abbildung 46 stellt den Zusammenhang zwischen dem Kehrwert des Gehalts und der Zeit graphisch dar.

Abb. 46: Kehrwert des Atropingehalts nach Lagerung in passivierten Metallkarpulen unter den angegebenen Bedingungen



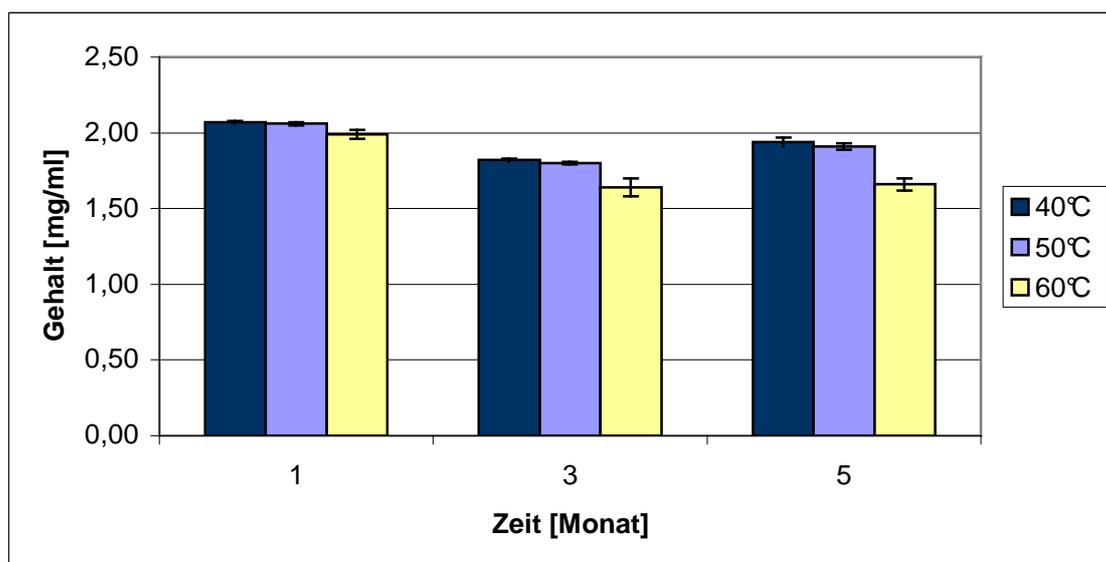
Auch die Auftragung des Kehrwertes des Gehalts an Atropinsulfat führt für alle untersuchten Temperaturen zu einer Geraden. Hier nimmt die Geradensteigung und damit die Geschwindigkeitskonstante mit steigender Temperatur entsprechend dem Reaktionsgeschwindigkeitsgesetz zu (s. Tabelle 20). Die Geraden steigen jedoch flacher an, als bei Zugrundelegung einer Reaktion 1. Ordnung, was einer langsamer ablaufenden Reaktion entspräche. Eine bessere Anpassung der Werte an eine Gerade ist zudem nicht festzustellen. Daher kann hier zur Abschätzung der Haltbarkeit des Arzneimittels eine Reaktion 1. Ordnung angenommen werden.

Tab. 20: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Korrelationskoeffizienten für den Atropinabbau in passivierten Metallkapseln nach Kinetik zweiter Ordnung

Temperatur	k [l·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]	R ²
40°C	0,004	0,96
50°C	0,006	0,94
60°C	0,025	0,99

Abbildung 47 stellt die für die jeweilige Lagerdauer ermittelten Gehalte an Atropinsulfat für die in nicht passiviertem Metall gelagerte Lösung A sowie das zugehörige 95% - Konfidenzintervall dar. Für die Berechnung des Konfidenzintervalls war jeweils n = 9 anzusetzen. Die zugehörigen Messwerte sind Tabelle A-11 im Anhang zu entnehmen.

Abb. 47: Atropingehalt nach Lagerung in nicht passiviertem Metall unter den angegebenen Bedingungen



Bei den in nicht passiviertem Metall gelagerten Injektionslösungen ist ebenfalls eine Gehaltsabnahme im Laufe der Zeit zu beobachten. Die nach drei Monaten Lagerung ermittelten Werte liegen jedoch, wie bei den in passiviertem Metall gelagerten Lösungen, unter den nach fünf Monaten ermittelten Werten. Auf Grund der geringeren Anzahl an Probenahmen für die in nicht passivierten Metallkarpulen gelagerten Lösungen kann eine Elimination der Drei-Monats-Werte hier nicht ohne Weiteres erfolgen. Für die weitere Auswertung würden dann nur noch zwei Zeitpunkte verbleiben, aus denen kein Zusammenhang zwischen Konzentration und Zeit im Hinblick auf die Ermittlung einer Reaktionskinetik erfolgen kann.

Da nach Varianzanalyse oder dem bei Varianzinhomogenität alternativ durchzuführendem H-Test keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Gehalts zwischen den in passiviertem und nicht passiviertem Metall gelagerten Lösungen festgestellt wurden, wurde für die kinetische Auswertung der in nicht passiviertem Metall gelagerten Lösungen eine Reaktion 1. Ordnung wie bei den in passiviertem Metall gelagerten Lösungen angenommen.

Der Vollständigkeit halber sind die logarithmische Auftragung der Konzentration gegen die Zeit und des Kehrwerts der Konzentration gegen die Zeit in den Abbildungen 48 und 49 sowie die dazugehörigen Werte der Geschwindigkeitskonstanten und Korrelationskoeffizienten in Tabelle 21 dargestellt.

Auf Grund der gezeigten Abbildungen kann die Annahme einer Reaktionskinetik 1. Ordnung für die in nicht passiviertem Metall gelagerten Lösungen bestätigt werden. Trotz der Abweichungen der Drei-Monats-Werte kann bei Auftragung des Kehrwertes der Konzentration gegen die Zeit keine bessere Anpassung an eine Gerade erzielt werden, als bei logarithmischer Auftragung.

Abb. 48: Atropingehalt nach Lagerung in nicht passivierten Metallkarpulen unter den angegebenen Bedingungen, halblogarithmische Auftragung

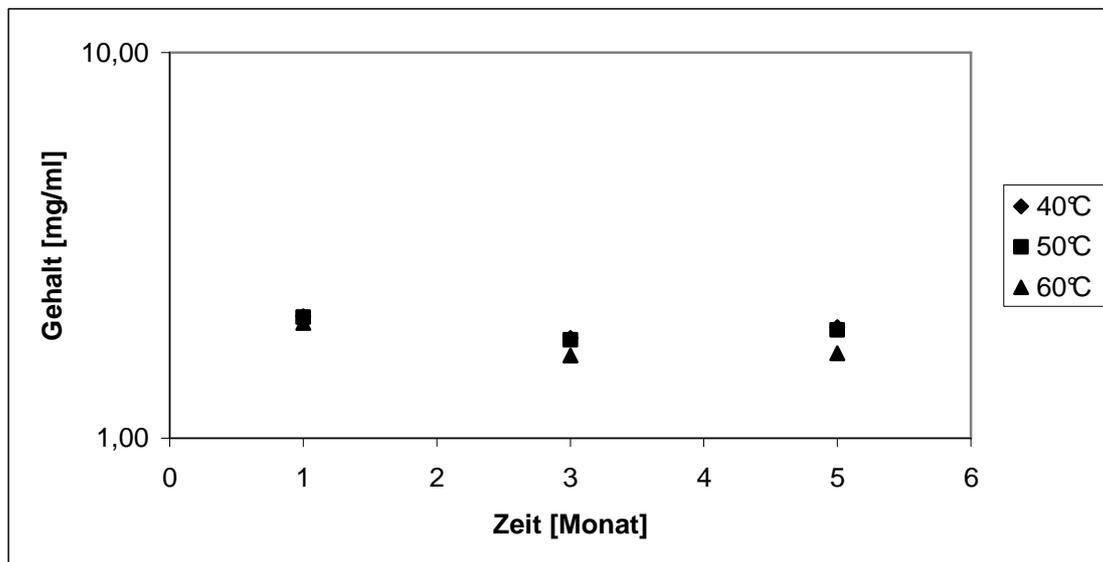
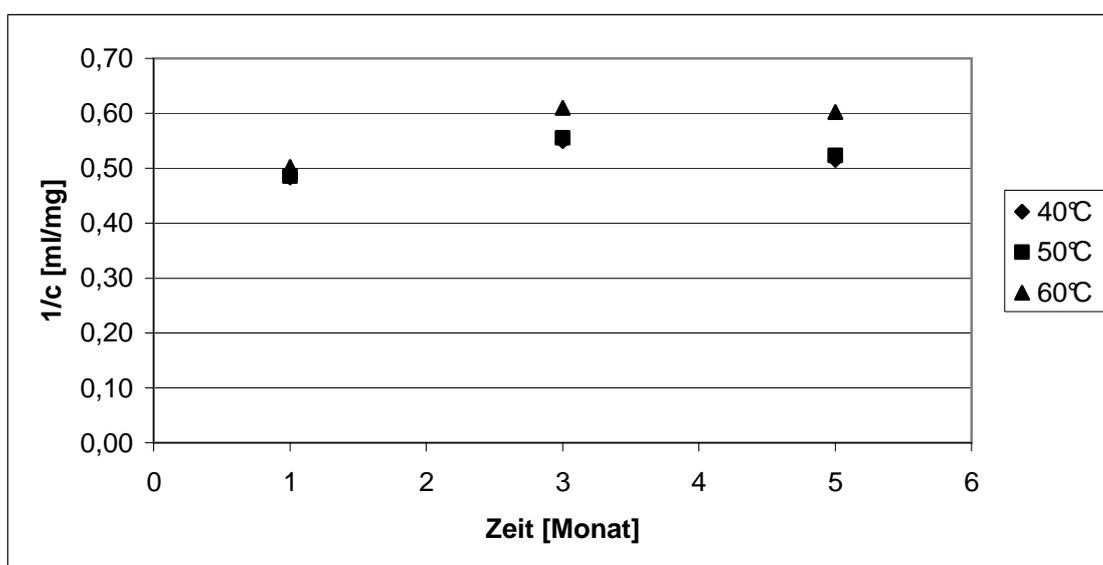


Abb. 49: Kehrwert des Atropingehalts nach Lagerung in nicht passivierten Metallkarpulen unter den angegebenen Bedingungen



Tab. 21: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Korrelationskoeffizienten für den Atropinabbau in nicht passivierten Metallkarpulen nach Kinetik erster und zweiter Ordnung

Temperatur	1. Ordnung		2. Ordnung	
	k [s ⁻¹]	R ²	k [l·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]	R ²
40°C	0,016	0,25	0,008	0,24
50°C	0,019	0,31	0,010	0,29
60°C	0,045	0,70	0,025	0,70

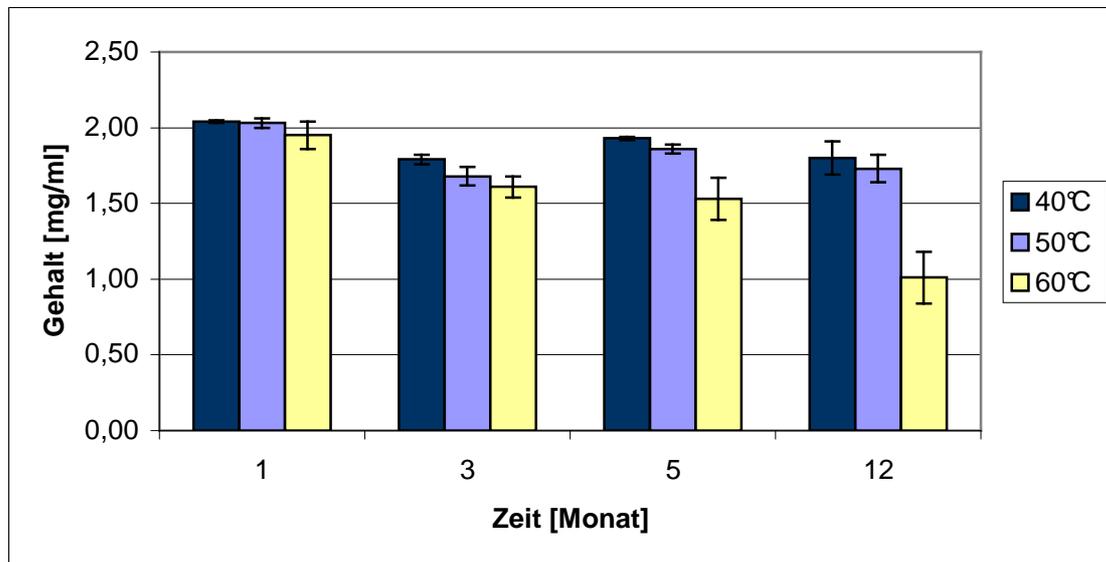
5.4.3 Kunststoffkarpulen

Abbildung 50 stellt die über den Untersuchungszeitraum ermittelten Gehalte an Atropinsulfat mit dem zugehörigen 95%-Konfidenzintervall graphisch dar.

Tabelle A-12 im Anhang gibt einen Überblick über die nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen gemessenen Gehalte an Atropinsulfat sowie das 95%-Konfidenzintervall. Für die Berechnung des Konfidenzintervalls war jeweils der in der Tabelle angegebene Wert für n anzusetzen.

Die unterschiedliche Anzahl der in die jeweilige Mehrfachbestimmung eingehenden Einzelwerte ist auf die bei der Lagerung auftretenden Wasserverluste zurückzuführen. Hierdurch kam es dazu, dass aus einzelnen Prüfmustern keine Lösung mehr entnommen werden konnte. Zum Ausgleich der während der Lagerperiode ungleichmäßig auftretenden Wasserverluste wurden die mittels HPLC bestimmten Arzneistoffgehalte wie unter Kapitel 5.1.3. beschrieben korrigiert.

Abb. 50: Atropingehalt nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

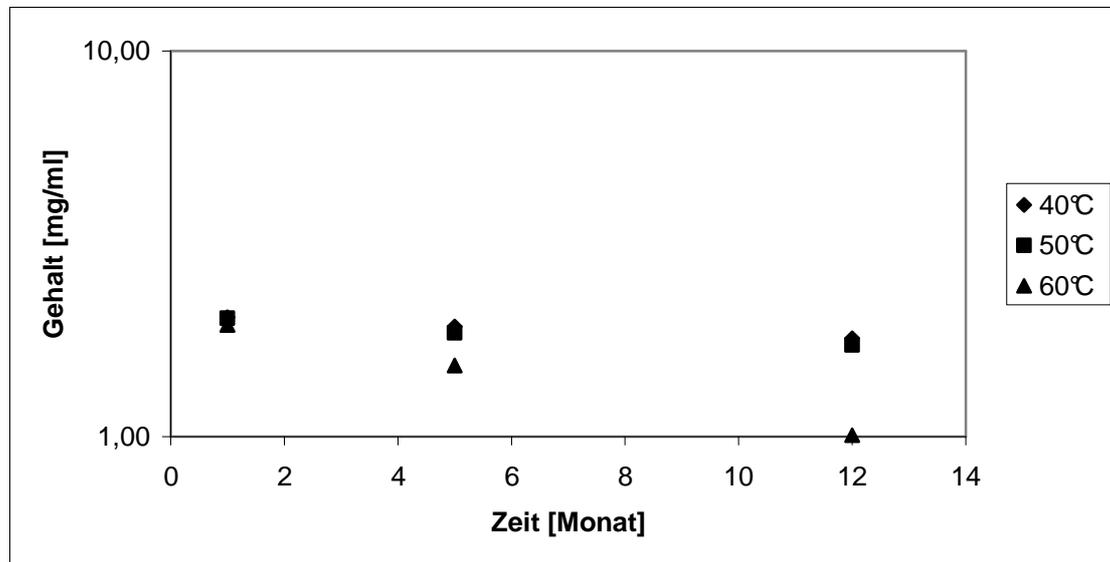


Wie bei den in Glas- und Metallkarpulen thermisch belasteten Lösungen kann auch bei den in Kunststoffkarpulen gelagerten Lösungen ein temperatur- und zeitabhängiger Abbau des Atropinsulfats festgestellt werden. Zudem wird auch hier nach dreimonatiger Lagerung ein Wert für den Gehalt ermittelt, der zu gering erscheint und welcher in der folgenden Probenahme wieder überschritten wird. Hier wird ebenfalls auf Grund möglicher analytischer Fehler im Folgenden auf einer weiteren Berücksichtigung der nach dreimonatiger Lagerung ermittelten Werte verzichtet.

Abbildung 51 stellt den Zusammenhang zwischen Atropinsulfatgehalt und Zeit in halblogarithmischer Auftragung dar.

Die für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante einer Reaktion 1. Ordnung ermittelten Werte sowie die Korrelationskoeffizienten der bei unterschiedlichen Temperaturen erhaltenen Geraden sind in Tabelle 22 dargestellt.

Abb. 51: Atropingehalt nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen;
Halblogarithmische Auftragung



Tab. 22: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Korrelationskoeffizienten für den Atropinabbau in Kunststoffkarpulen nach Kinetik erster Ordnung

Temperatur	k [s ⁻¹]	R ²
40°C	0,011	0,99
50°C	0,014	0,96
60°C	0,060	1,00

Unter Vernachlässigung der nach drei Monaten erhobenen Werte wird ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Konzentration und der Zeit festgestellt. Die Korrelationskoeffizienten der drei erhaltenen Geraden im Konzentrations-Zeit-Diagramm spiegeln diese Linearität deutlich wider. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten steigen erwartungsgemäß mit zunehmender Temperatur an, wobei die Zunahme der

Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 50° und 60°C stärker ausgeprägt ist, als zwischen 40° und 50°C.

Abbildung 52 stellt den Zusammenhang zwischen dem Kehrwert des Atropinsulfatgehalts und der Zeit dar.

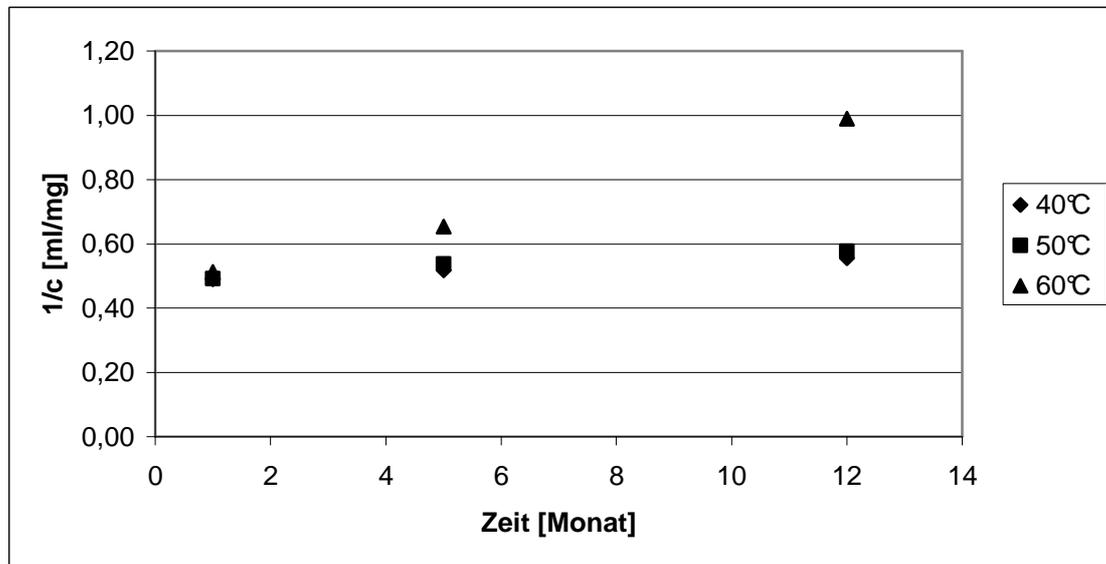
Die für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante einer Reaktion 2. Ordnung ermittelten Werte sowie die Korrelationskoeffizienten der bei unterschiedlichen Temperaturen erhaltenen Geraden sind in Tabelle 23 dargestellt.

Auch zwischen dem Kehrwert der Arzneistoffkonzentration und der Zeit kann ein linearer Zusammenhang festgestellt werden. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten der erhaltenen Geraden unterscheiden sich nicht von denen einer Reaktion 1. Ordnung. Daher kann auch für den in Kunststoffkarpulen ablaufenden Atropinabbau eine Reaktionskinetik 1. Ordnung angenommen werden. Für die sich aus der Geradensteigung ergebenden Geschwindigkeitskonstanten gilt ebenfalls die Abhängigkeit von der Temperatur.

Tab. 23: Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Korrelationskoeffizienten für den Atropinabbau in Kunststoffkarpulen nach Kinetik zweiter Ordnung

Temperatur	k [l·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]	R ²
40°C	0,006	0,99
50°C	0,008	0,97
60°C	0,044	0,99

Abb. 52: Kehrwert des Atropingehalts nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen



5.4.4 Zusammenfassung

Nach der Monographie für Atropinsulfat des Europäischen Arzneibuchs [48] soll der Arzneistoffgehalt zwischen 99,0 und 101,0% liegen. Diese Anforderungen lassen sich jedoch nicht direkt auf die hier vorliegende Untersuchung von Arzneistoffzubereitungen übertragen, da sich die Monographie auf den reinen Arzneistoff bezieht. In der United States Pharmacopoeia (U.S.P) existieren neben den Monographien für die einzelnen Arzneistoffe auch solche für typische Zubereitungen, die diese Arzneistoffe enthalten. So ist hier neben Atropinsulfat auch eine Atropinsulfat-Injektionslösung [64] beschrieben. Der tatsächliche Arzneistoff-Gehalt muss nach dieser Monographie zwischen 93,0% und 107,0% des deklarierten Gehalts an Atropinsulfat-Monohydrat liegen. Für die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Injektionslösungen bedeutet dies bei einem deklarierten Gehalt von 2,0 mg/ml Atropinsulfat - entsprechen 2,05 mg/ml Atropinsulfat-Monohydrat - einen Gehalt von 1,91 bis 2,19 mg/ml Atropinsulfat-Monohydrat bzw. 1,85 bis 2,14 mg/ml

Atropinsulfat. Dementsprechend erfüllen alle untersuchten Lösungen mit einem Atropinsulfatgehalt von weniger als 1,85 mg/ml nicht mehr die Spezifikation dieser Monographie.

Der sich aus der U.S.P.-Monographie zu Atropinsulfat-Injektionslösung ergebende untere zu akzeptierende Gehalt wird für die in Glas gelagerten Lösungen nach 12 Monaten bei einer Lagertemperatur von 50°C unterschritten. Bei den in Kunststoffkarpulen thermisch belasteten Lösungen sind bereits 12 Monate Lagerung bei 40°C ausreichend, um einen Abbau des Arzneistoffs bis zu einem Gehalt von unter 1,85 mg/ml zu erzielen. Die untere Grenze der Spezifikation wird bei den in passiviertem Metall gelagerten Lösungen ähnlich wie bei den Lösungen aus Glaskarpulen nach einer Lagerung bei 50°C über 12 Monaten erreicht. Für die in nicht passivierten Metallkarpulen thermisch belasteten Lösungen ist kein Gehalt nach 12 Monaten Lagerung bestimmt. Auf Grund der nach einem, drei und fünf Monaten Lagerung ermittelten Werte kann jedoch kein signifikanter Unterschied zu den in passiviertem Metall gelagerten Lösungen festgestellt werden, sodass für die nicht passivierten Metallkarpulen eine Extrapolation auf einen Gehalt nach 12 Monaten thermischer Belastung vorgenommen werden kann. Der erste tatsächlich für Lösungen aus nicht passiviertem Metall bestimmte Gehalt unterhalb der Spezifikationsgrenze der U.S.P.-Monographie wurde nach 5 Monaten Lagerung bei 60°C erhalten.

Dem Atropinabbau folgt bei allen untersuchten Packmitteln eine Reaktionskinetik 1. Ordnung. Auf Grund der graphischen Auswertung kann zwar in allen Fällen auch eine Reaktion 2. Ordnung angenommen werden, da hier jedoch im Konzentrations-Zeit-Diagramm keine besser Anpassung der Werte an eine Gerade festzustellen ist, wird für die weitere Auswertung eine Reaktion 1. Ordnung zu Grunde gelegt. Aus den jeweils für die verschiedenen untersuchten Primärpackmittel berechneten Geschwindigkeitskonstanten

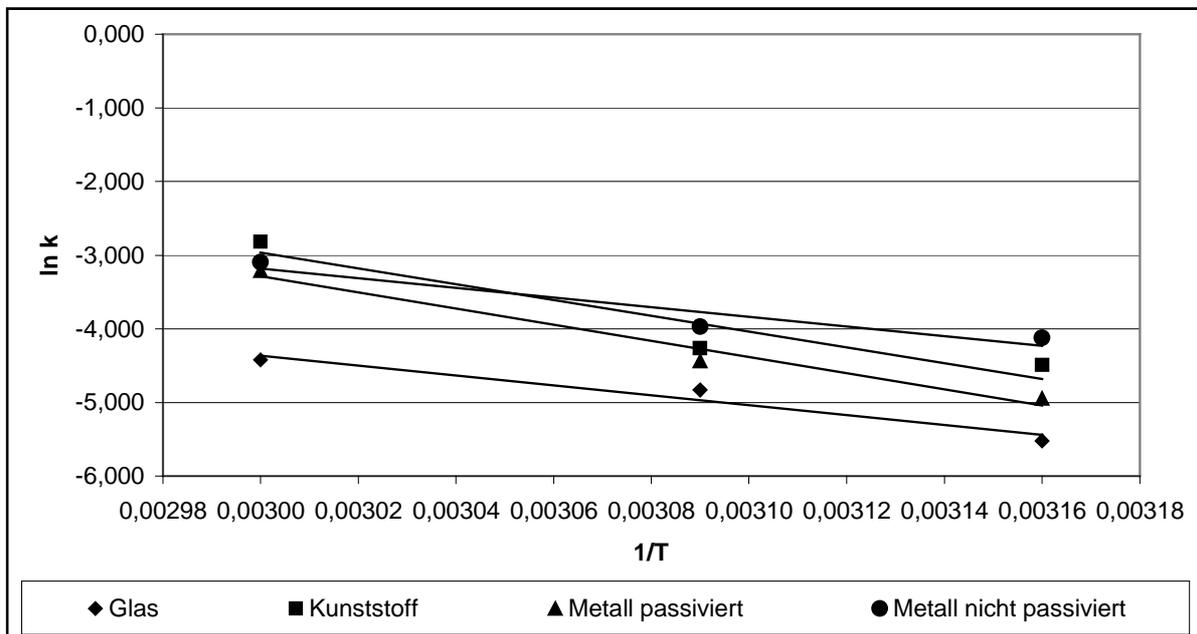
lässt sich mit Hilfe des Arrhenius-Plots (Auftragung von $\ln k$ gegen $1/T$) die Geschwindigkeitskonstante für den Abbau des Atropins bei beliebiger Lagertemperatur bestimmen. Hieraus kann wiederum die entsprechende Laufzeit bis zum Unterschreiten der unteren Spezifikationsgrenze von 1,85 mg/ml Atropinsulfat abgeleitet werden.

Die Anwendbarkeit der Arrheniusgleichung für die vorliegende Esterhydrolyse ergibt sich aus der Tatsache, dass auf Grund des herrschenden sauren pH-Wertes angenommen werden kann, dass die Reaktion ausschließlich in Form einer säurekatalysierten Hydrolyse (Mechanismus b) in Abb. 40) abläuft und daher eine einzige Geschwindigkeitskonstante bestimmt wird.

In Abbildung 53 ist das entsprechende Arrhenius-Plot für die drei in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Temperaturen dargestellt.

Durch Einsetzen einer beliebigen absoluten Temperatur T in die Geradengleichung und Auflösen nach k kann aus dem Arrhenius-Plot die für diese Temperatur entsprechende Reaktionsgeschwindigkeitskonstante k ermittelt werden. Auflösung des Geschwindigkeitsgesetzes einer Reaktion erster Ordnung (Gl. 7) nach t und Einsetzen der zugehörigen Werte liefert die mögliche Laufzeit bei dieser Temperatur bis zum Erreichen der unteren Spezifikationsgrenze (Gl. 12).

Abb. 53: Arrhenius-Plot für den Abbau von Atropinsulfat in den angegebenen Primärpackmitteln



$$t = -\frac{\ln[A] - \ln[A_0]}{k} \quad (12)$$

t	Haltbarkeitsdauer [Monat]
[A ₀]	Ausgangsaktivität (näherungsweise –gehalt)
[A]	Untere Spezifikationsgrenze
k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante

Somit ergeben sich für die untersuchten Packmittel bei 25°C und 15°C die in Tabelle 24 aufgeführten Laufzeiten bis zum unterschreiten eines Gehalts von 93% des deklarierten Gehalts.

Tab. 24: Geschwindigkeitskonstanten und Laufzeitabschätzungen für die Lagerung von Atropin-injektionslösungen in den angegebenen Primärpackmitteln bei 25 und 15°C

Packmittel	Geradengleichung	$k_{25^{\circ}\text{C}}$	$t_{93\%,25^{\circ}\text{C}}$	$k_{15^{\circ}\text{C}}$	$t_{93\%,15^{\circ}\text{C}}$
		[Monat ⁻¹]	[Monat]	[Monat ⁻¹]	[Monat]
Glas	$\ln k = -6756,2/ T + 15,907$	0,0012	65	0,0005	156
Kunststoff	$\ln k = -10716/ T + 29,184$	0,0012	65	0,0003	260
Metall passiviert	$\ln k = -10969/ T + 29,622$	0,0008	97	0,0002	390
Metall nativ	$\ln k = -6578,7/ T + 16,556$	0,0040	19,5	0,0019	41

Auf Grund der auf diese Weise berechneten Laufzeiten kann festgestellt werden, dass bei 25°C die Lagerstabilität der Lösungen in Glas- und Kunststoffkarpulen vergleichbar ist, wohingegen die in passivierten Metallkarpulen abgefüllten Lösungen eine um 32 Monate längere Lagerstabilität bis zum Erreichen der unteren Spezifikationsgrenze von 93% des deklarierten Gehalts besitzen. Bei den in nicht passiviertem Metall gelagerten Lösungen ist die Stabilität gegenüber den anderen untersuchten Packmitteln stark, auf etwa ein Drittel, verringert.

Durch eine Lagerung bei niedrigeren Temperaturen lässt sich die Lagerdauer bis zum Erreichen der unteren Spezifikationsgrenze für den Gehalt verlängern. Exemplarisch wurde dies in Tabelle 24 für eine Lagerung bei 15°C gegenüber 25°C dargestellt. Bei einer Lagerung bei 15°C können die Zeiträume, während denen die Lösungen der Spezifikation bezüglich des Arzneistoffgehalts entsprechen, verdoppelt (nicht passivierte Metallkarpulen) bis vervierfacht (passivierte Metallkarpulen und Kunststoffkarpulen) werden.

5.5 Reinheit

Zur Bestimmung der Degradation des Arzneistoffs wurden die aufgenommenen Chromatogramme bezüglich des Auftretens und des Gehalts an den beiden bekannten Abbauprodukten Tropasäure und Apoatropin ausgewertet. Die Peakflächen der beiden Substanzen wurden zur Quantifizierung unter Berücksichtigung des zuvor experimentell ermittelten Responsefaktors auf die des enthaltenen Arzneistoffs bezogen.

5.5.1 Tropasäure

Tropasäure wird neben dem nicht UV-aktiven Tropanol bei der Hydrolyseprodukte von Atopin gebildet. Nach *Kondritzer* und *Zvirblis* [11] stellt diese Hydrolyse die hauptsächliche Abbaureaktion des Alkaloids dar. Das temperaturabhängige Stabilitätsoptimum des Arzneistoffs gegenüber dieser Hydrolyse liegt demnach bei pH 3,24 (100°C) bis 4,11 (0°C). Zwar ist der pH-Wert der bei der vorliegenden Untersuchung verwendeten Lösung zur Erzielung größtmöglicher Stabilität in diesem Bereich eingestellt, eine Hydrolyse ist jedoch auch bei diesen Bedingungen möglich und auf Grund der erhöhten Temperaturen bei der Lagerung wahrscheinlich. Daher stellt die Ermittlung der Konzentration des mit der verwendeten Analysenmethode erfassbaren Hydrolyseprodukts Tropasäure einen unerlässlichen Parameter für die Abschätzung der Haltbarkeit der Zubereitung in den untersuchten Primärpackmitteln dar.

Der Verlauf der Tropasäurekonzentration in den drei untersuchten Materialien soll im Folgenden dargestellt und bewertet werden. Die jeweils angegebenen Gehalte beziehen sich jeweils auf die in der entsprechenden Probe ermittelten Peaks des Atropins und

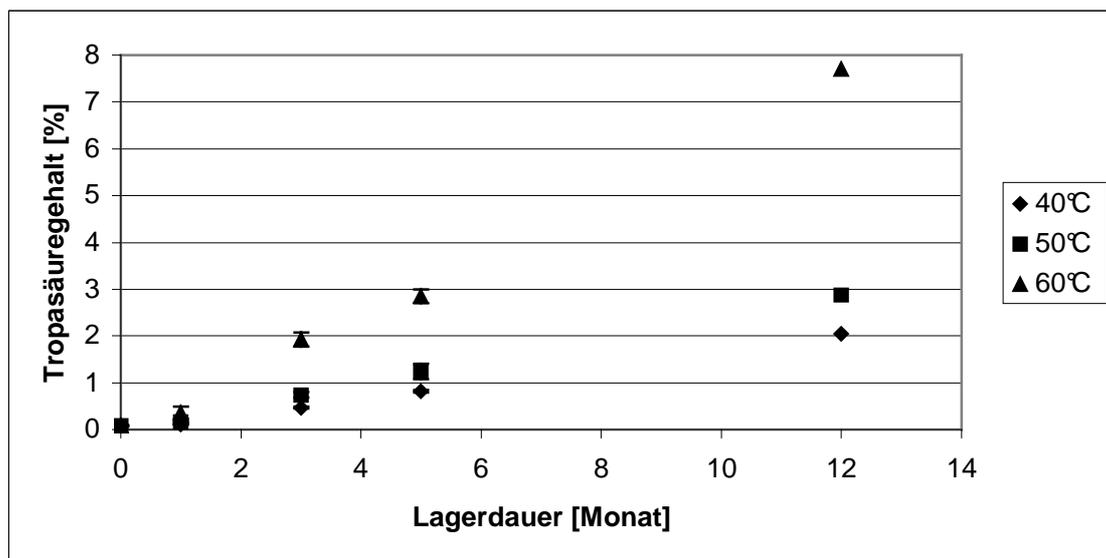
berücksichtigen eine Responsefaktor von 0,6 zwischen Atropin und Tropasäure, der sich aus der unterschiedlichen UV-Aktivität der beiden Substanzen ergibt.

Bereits vor Herstellung der Prüflösungen wurde in der Atropinsulfat-Ausgangssubstanz ein Tropasäuregehalt von 0,08% ermittelt.

5.5.1.1 Glaskarpulen

Abbildung 54 gibt einen graphischen Überblick über die Tropasäuregehalte nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen. Die Mittelwerte der nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen ermittelten Tropasäuregehalte sowie den dazugehörigen 95%-Vertrauensbereich sind Tabelle A-13 im Anhang zu entnehmen.

Abb. 54: Tropasäuregehalt der Lösung A nach Lagerung in Glaskarpulen bei 40, 50 und 60°C



Bei den in Glaskarpulen thermisch belasteten Proben wird im Verlauf der Lagerzeit und mit zunehmender Temperatur eine Zunahme der Hydrolyse durch das Auftreten immer größerer Konzentrationen des Hydrolyseprodukts Tropasäure verzeichnet. Die Schwankungen zwischen den parallel bestimmten Proben sind sehr gering. Statistisch lässt sich eine hoch signifikante Zunahme des Tropasäuregehalts mit der Lagertemperatur und –dauer feststellen. Die Temperaturabhängigkeit der Reaktion ist jedoch nicht proportional zum Gehalt des Abbauproduktes. Bereits nach drei Monaten Lagerung kann beim Vergleich der drei untersuchten Lagertemperaturen ein starker Anstieg des Tropasäuregehalts bei 60°C gegenüber denen bei 40 und 50°C festgestellt werden. Dieser Effekt wird im weiteren Verlauf der Untersuchung noch verstärkt, sodass nach 12 Monaten thermischer Belastung der Tropasäuregehalt in den bei 60°C gelagerten Lösungen gegenüber den bei 40°C gelagerten Lösungen etwa um den Faktor vier erhöht ist. Die Differenz der Gehalte an Tropasäure bei 40°C und 50°C hingegen ist nicht so groß, wie zwischen 50°C und 60°C. Hier sind in den bei 50°C gelagerten Prüfmustern nur um etwa Faktor 2 erhöhte Werte feststellbar.

Das Ausmaß der Hydrolyse ist proportional zur Zeit ($R^2 = 0,99$). Die Steigungen der einzelnen Geraden nach Lagerung bei den verschiedenen Temperaturen nehmen mit steigender Temperatur zu.

5.5.1.2 Metallkarpulen

Abbildungen 55 und 56 geben einen graphischen Überblick über die Tropasäuregehalte nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen. Die Mittelwerte der nach Stresslagerung

bestimmten Tropasäuregehalte sowie die dazugehörigen 95%-Vertrauensbereiche sind Tabelle A-14 im Anhang zu entnehmen.

Abb. 55: Tropasäuregehalt der Lösung A nach Lagerung in passivierten Metallkarpulen

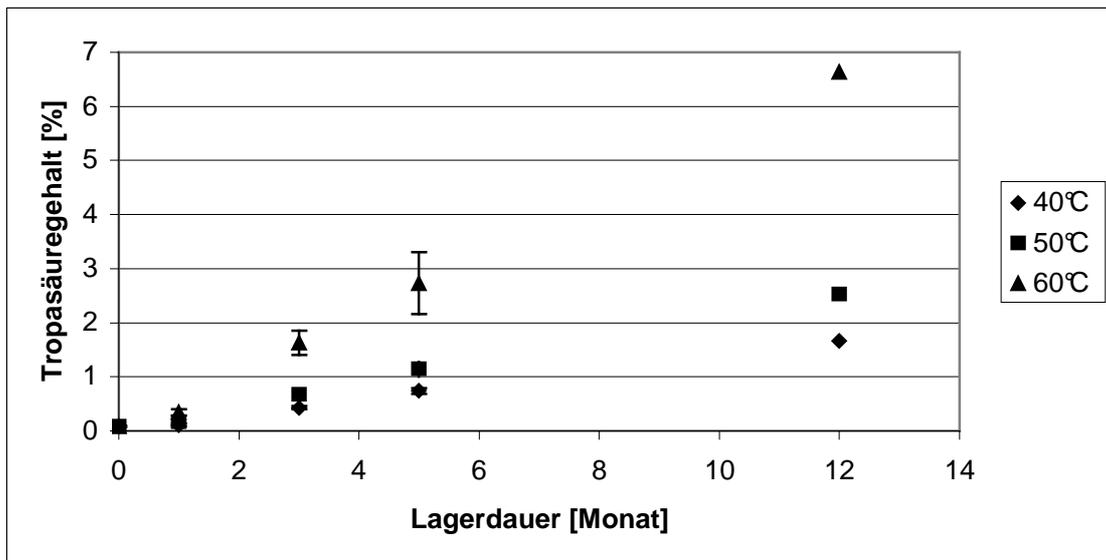
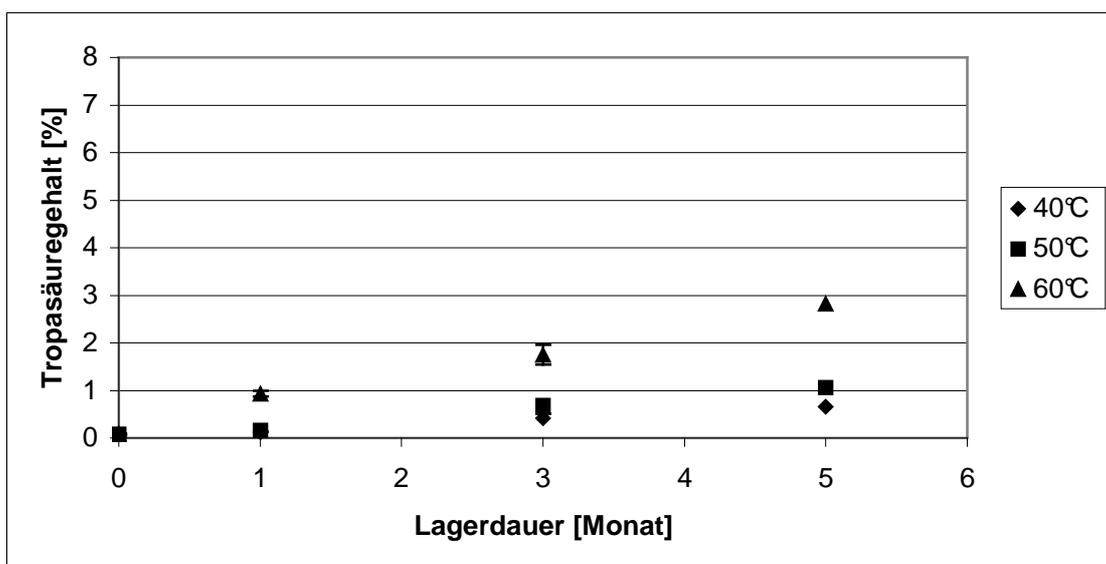


Abb. 56: Tropasäuregehalt der Lösung A nach Lagerung in nicht passivierten Metallkarpulen



Auch in den in Metallkarpulen gelagerten Lösungen kann eine zeit- und temperaturabhängige Zunahme des Hydrolyseprodukts in den Lösungen beobachtet werden. Ebenfalls liegt hier eine nicht-lineare Abhängigkeit von der Temperatur vor, die beim Übergang von 50 nach 60°C deutlicher ausgeprägt ist, als bei dem von 40 nach 50°C. Die lineare Abhängigkeit der Hydrolysereaktion von der Zeit ist ebenso wie bei den in Glas gelagerten Lösungen zu beobachten.

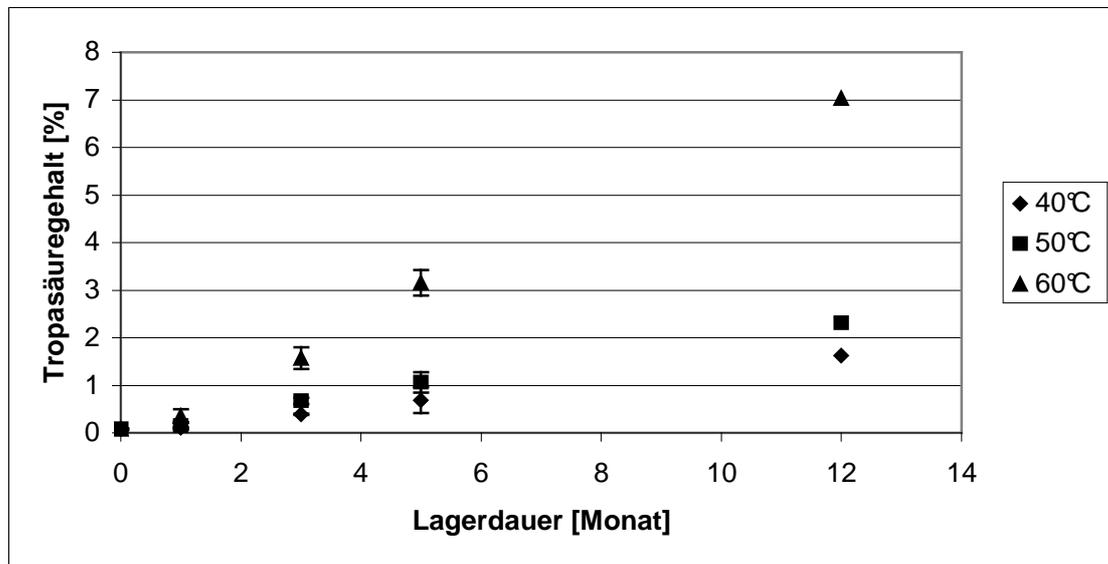
Des Weiteren ist kein Unterschied zwischen den in passivierten und den in nicht passivierten Karpulen gelagerten Lösungen feststellbar. Nach gleicher Lagerdauer und identischer thermischer Belastung werden in beiden Kollektiven vergleichbare Gehalte an Tropasäure bestimmt. Nur nach einmonatiger Lagerung bei 60°C wird in den nicht passivierten Karpulen ein um Faktor 2 größerer Tropasäuregehalt als in den entsprechenden Lösungen aus passivierten Karpulen bestimmt.

Da die Voraussetzungen für die Hydrolyse in den beiden Kollektiven hinsichtlich Zusammensetzung, Temperatur und Dauer der thermischen Belastung identisch waren, war ein vergleichbarer Verlauf der Tropasäuregehalte zu erwarten. Aus den gemachten Beobachtungen kann zudem gefolgert werden, dass die Passivierung der Karpulenoberfläche offensichtlich nicht zur Stabilisierung der enthaltenen Lösungen im Hinblick auf eine erfolgende Hydrolyse beiträgt.

5.5.1.3 Kunststoffkarpulen

Abbildung 57 gibt einen graphischen Überblick über die Tropasäuregehalte nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen. Die Mittelwerte der nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen ermittelten Tropasäuregehalte sowie der dazugehörigen 95%-Vertrauensbereich sind Tabelle A-15 im Anhang zu entnehmen.

Abbildung 46: Tropasäuregehalt der Lösung A nach Lagerung in Kunststoffkarpulen



Auch bei den in Kunststoffkarpulen thermisch belasteten Lösungen lässt sich die zuvor beschriebene Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Hydrolysereaktion beobachten. Auch die Schwankungsbreite der einzelnen bestimmten Werte ist vergleichbar mit den in Glas und Metall ermittelten. Ebenfalls lässt sich ein stärkerer Temperatureffekt beim Übergang von 50 nach 60°C als beim Übergang von 40 nach 50°C feststellen.

5.5.1.4 Zusammenfassung

Nach Ph.Eur. 6.1. [48] ist eine Verunreinigung des reinen Arzneistoffs mit Tropasäure von maximal 0,2 % zulässig. Diese Anforderungen lassen sich jedoch nicht direkt auf die hier vorliegende Untersuchung von Arzneistoffzubereitungen übertragen. In der Monographie zu Atropinsulfat-Injektionslösungen nach U.S.P [64] werden keine speziellen Grenzwerte für die Abbauprodukte sondern nur für den Arzneistoffgehalt in der Zubereitung festgelegt. In der Injektionslösung sind daher Verunreinigungen durch Abbauprodukte des

Arzneistoffs bis zum Erreichen der unteren Spezifikationsgrenze für den Gehalt (93%) zulässig.

Nach einmonatiger Lagerung weisen die Lösungen aus allen untersuchten Primärpackmitteln vergleichbare Gehalte an Tropasäure auf. Bereits nach dreimonatiger Lagerung können jedoch bei den in Glaskarpulen gelagerten Lösungen gegenüber den restlichen Materialien statistisch signifikant erhöhte Gehalte festgestellt werden. Dieser Trend ist auch bei den Probenahmen nach fünf und zwölf Monaten feststellbar. Eine Ausnahme bildet hier lediglich der nach fünf Monaten bei 60°C ermittelte Wert. Dieser liegt im Bereich der bei den anderen Packmitteln festgestellten Gehalte.

Es kann daher festgestellt werden, dass die in der vorliegenden Studie untersuchten Primärpackmittel nur geringen Einfluss auf die Hydrolysestabilität der darin enthaltenen Atropinsulfatlösungen haben. Die einzigen relevanten Einflussfaktoren, die die Verwendbarkeit des Arzneimittels auf Grund zu starker Abbauvorgänge determinieren, sind Lagerdauer und die bei der Lagerung vorherrschende Temperatur.

5.5.2 Apotropin

Neben der Hydrolyse ist eine weitere Reaktion, die zum Abbau des Atropinmoleküls in Lösung führt, die Bildung von Apotropin durch Wasserabspaltung. Diese Abbaureaktion ist dahingehend von besonderem Interesse, als dass Apotropin nach *Rosenblum* und *Taylor* [15] etwa sechs Mal, nach *Ellin et al.* [65] gar 16 Mal toxischer als Atropin selbst ist und damit ein Abbau der API auf diesem Wege nicht nur zu einem Wirksamkeitsverlust des Arzneimittels sondern auch zu einer toxikologischen Gefährdung des Patienten führt.

Im Folgenden soll der Verlauf der Gehalte von Apotropin in den verschiedenen untersuchten Primärpackmitteln betrachtet werden, um Packmittel-assoziierte Bedingungen

zu ermitteln, die die Dehydratisierungsreaktion begünstigen. Ein Überblick über den Zusammenhang zwischen Atropinkonzentration, Hydrolyse und Dehydratisierung während des Untersuchungszeitraums erfolgt in Kapitel 5.5.3.

Die jeweils angegebenen Gehalte beziehen sich auf die in der entsprechenden Probe ermittelten Peaks des Atropins und berücksichtigen einen Responsefaktor von 0,6 zwischen Atropin und Apoatropin, der sich aus der unterschiedlichen UV-Aktivität der beiden Substanzen ergibt.

Bereits in der zur Herstellung der Prüflösung verwendeten Atropinsulfat-Ausgangssubstanz wurde ein Apoatropingehalt von 0,33% ermittelt.

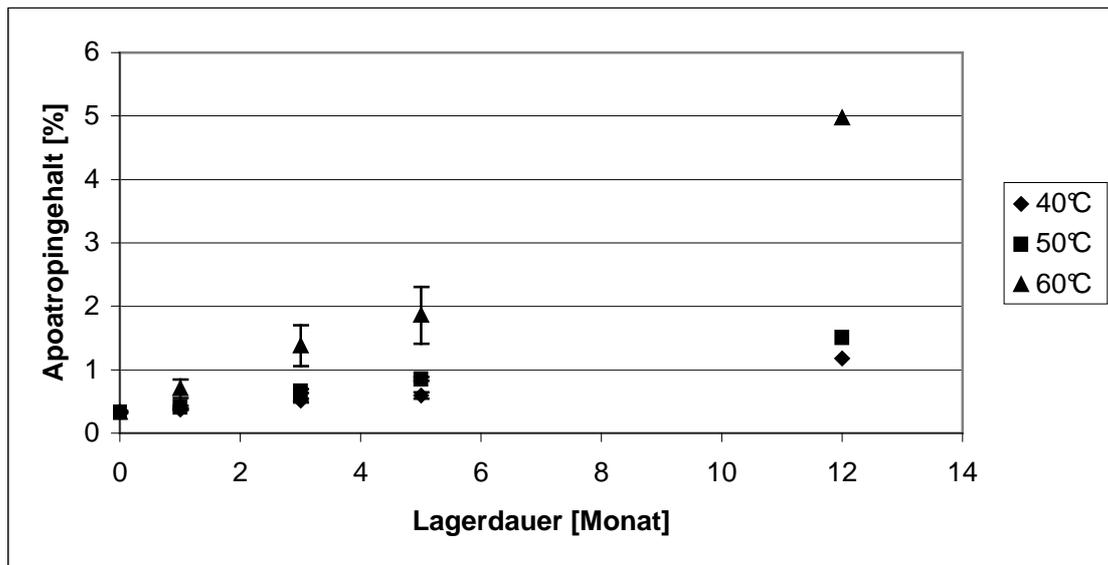
5.5.2.1 Glaskarpulen

Abbildung 58 gibt einen graphischen Überblick über die ermittelten Apoatropingehalte nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen. Die Mittelwerte der nach Stresslagerung ermittelten Apoatropingehalte sowie die dazugehörigen 95%-Vertrauensbereiche sind in Tabelle A-16 im Anhang aufgeführt.

Der Verlauf der Apoatropinkonzentration in den in Glas gelagerten Injektionslösungen ist vergleichbar mit dem der Tropasäure. Auf Grund der höheren Grundbelastung des für die Herstellung der Prüflösung verwendeten Ausgangsstoffs in Bezug auf Apoatropin, sind die ermittelten Gehalte des Apoatropins mit Ausnahme der 12-Monats-Werte höher als die der Tropasäure. Nach 12 Monaten thermischer Belastung können jedoch vergleichbare Gehalte an Hydrolyse- wie an Dehydratisierungsprodukt gefunden werden. Auch bei der

Dehydratisierungsreaktion ist der Temperatureinfluss bei Vergleich der Lagerung bei 50°C gegenüber der bei 60°C stärker ausgeprägt als zwischen 40°C und 50°C.

Abb. 58: Apoatropingehalt der Lösung A nach Lagerung in Glaskarpulen



Der Gehalt an Apoatropin steigt linear mit der Lagerdauer an ($R^2 = 0,99$). Die Steigung der resultierenden Geraden nimmt mit zunehmender Temperatur zu, was einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur gleichzusetzen ist.

5.5.2.2 Metallkarpulen

Abbildungen 59 und 60 geben einen graphischen Überblick über die ermittelten Apoatropingehalte nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen. Die Mittelwerte der nach Stresslagerung bestimmten Apoatropingehalte sowie die dazugehörigen 95%-Vertrauensbereiche sind in Tabelle A-17 im Anhang aufgeführt.

Abb. 49: Apoatropingehalt der Lösung A nach Lagerung in passivierten Metallkarpulen

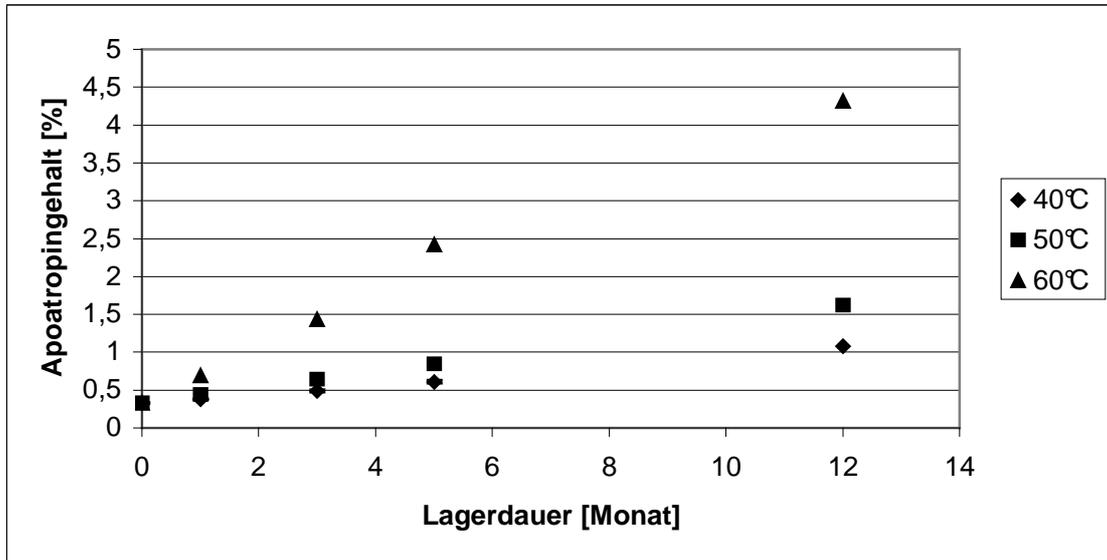
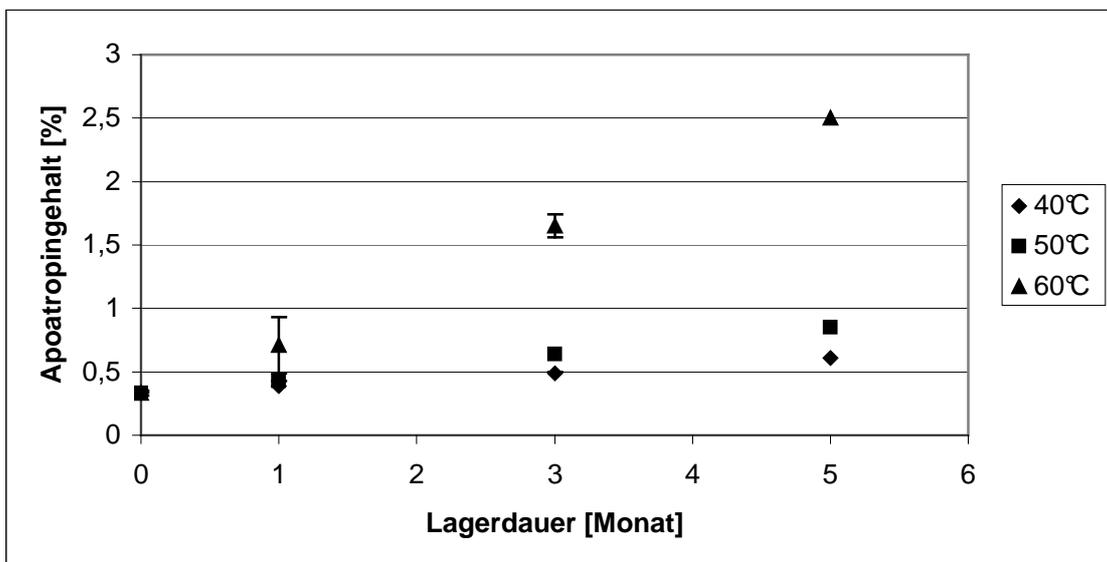


Abb. 50: Apoatropingehalt der Lösung A nach Lagerung in nicht passivierten Metallkarpulen



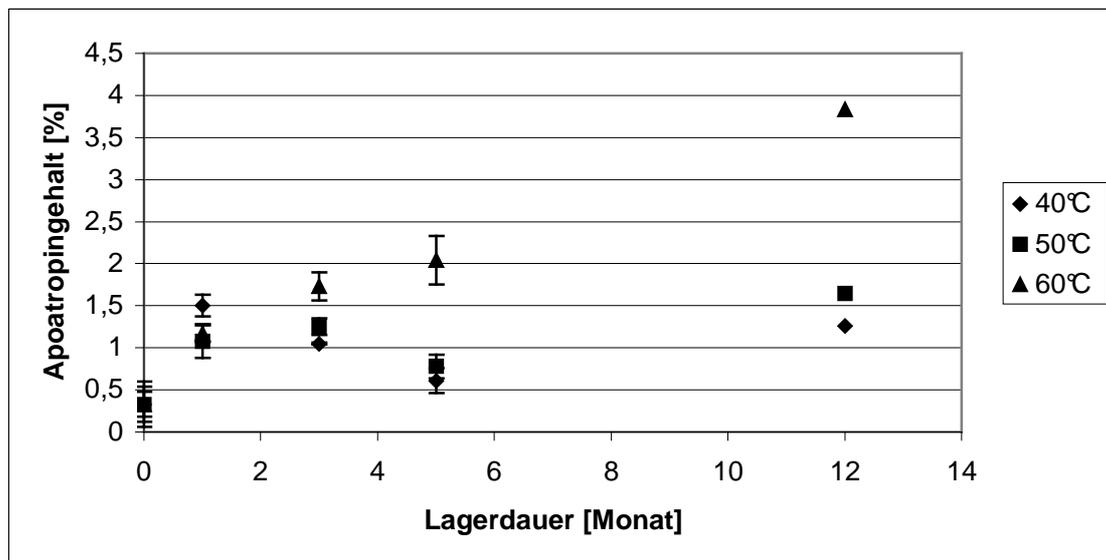
Bei den in passivierten und nicht passivierten Metallkarpulen thermisch belasteten Lösungen lässt sich wie zuvor für die Glaskarpulen beschrieben ein temperatur- und zeitabhängiger Verlauf der Gehaltszunahme des Apoatropins beobachten.

Die Steigung der erhaltenen Geraden wird mit zunehmender Lagertemperatur größer, entsprechend der bei erhöhter Temperatur gestiegenen Reaktionsgeschwindigkeit.

5.5.2.3 Kunststoffkarpulen

Abbildung 61 gibt einen graphischen Überblick über die ermittelten Apoatropingehalte nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen. Die Mittelwerte der nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen ermittelten Apoatropingehalte sowie die dazugehörigen 95%-Vertrauensbereiche sind in Tabelle A-18 im Anhang aufgeführt.

Abb. 61: Apoatropingehalt der Lösung A nach Lagerung in Kunststoffkarpulen



Bei den in Kunststoffkarpulen thermisch belasteten Lösungen weicht der Verlauf des Apoatropingehalts bei 40 und 50°C von den bisher beschriebenen Beobachtungen ab. Nach Lagerung bei 60°C ist ein linearer Anstieg im Verlauf der Untersuchung zu beobachten. In den bei 40 und 50°C gelagerten Lösungen wird nach fünf Monaten ein Apoatropingehalt bestimmt, der unter den nach ein und drei Monaten bestimmten Werten liegt, obwohl hier die Reaktion weiter fortgeschritten sein müsste. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann nicht gegeben werden.

5.5.2.4 Zusammenfassung

Wie bereits in Kapitel 5.5.1.4 beschrieben, lassen sich die Anforderungen der Ph.Eur. 6.1. [48] bezüglich der Verunreinigung des reinen Arzneistoffs mit Apoatropin von max. 0,2% nicht direkt auf die hier vorliegende Untersuchung einer Arzneistoffzubereitung übertragen. Auch für die Dehydratisierung gilt daher eine Zulässigkeit bis zur Unterschreitung des Gehalts an Arzneistoff in der Lösung gemäß der U.S.P-Monographie zu Atropinsulfat-Injektionslösungen [64].

Die Dehydratation zu Apoatropin ist neben der Esterhydrolyse zu Tropasäure die maßgeblich für den Atropinabbau in Lösung verantwortliche Reaktion. Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Gehalte an Apoatropin liegen nach einjähriger Stresslagerung bei 60°C in Glaskarpulen bei ca. 5%, in Kunststoff und Metallkarpulen bei ca. 4%. Bei einer Lagertemperatur von 40°C werden nach 12 Monaten Gehalte von 1 bis 1,2% gefunden.

Die Apoatropinbildung verläuft im Untersuchungszeitraum in den Glas- und Metallkarpulen linear. In den bei 40 und 50°C gelagerten Kunststoffkarpulen ist nach

fünfmonatiger Lagerung eine Verringerung des Gehalts an Apoatropin gegenüber den vorhergehenden Probenahmen zu beobachten, die nicht erklärt werden kann.

Ein Vergleich der in unterschiedlichen Packmitteln thermisch belasteten Lösungen zeigt praktisch keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Apoatropingehalts. Einzig die in Kunststoffkarpulen gelagerten Lösungen unterscheiden sich in ihrem Apoatropingehalt meist signifikant von den in den übrigen Primärpackmitteln thermisch belasteten. Daher kann festgestellt werden, dass das Primärpackmittel bedingt Einfluss auf die Stabilität der darin enthaltenen Atropinlösung ausübt. Die Silikonisierung der Metallkarpulen trägt jedoch nicht wesentlich zur Verbesserung der Stabilität bei, da sich die in den nicht passivierten Metallkarpulen bestimmten Apoatropingehalte nicht von denen in passiviertem Metall unterscheiden.

5.5.3 Summe Abbauprodukte

Eine Auswertung im Hinblick auf die Summe der beiden bekannten Abbauprodukte in Korrelation zur Abnahme des Gehalts an Atropinsulfat gibt Hinweise darauf, in wieweit andere Reaktionen als die oben beschriebene Hydrolyse oder Dehydratation für den Abbau des Arzneistoffs verantwortlich sind. Sind Tropasäure und Apoatropin die unter den vorliegenden Bedingungen einzigen Degradationsprodukte, muss sich hier ein linearer Zusammenhang zwischen ihrem Gehalt und der Zeit feststellen lassen. Besteht dieser Zusammenhang nicht, existieren womöglich weitere Abbauewege des Atropins in wässriger Lösung, die zu weiteren, nicht bekannten, Produkten führen.

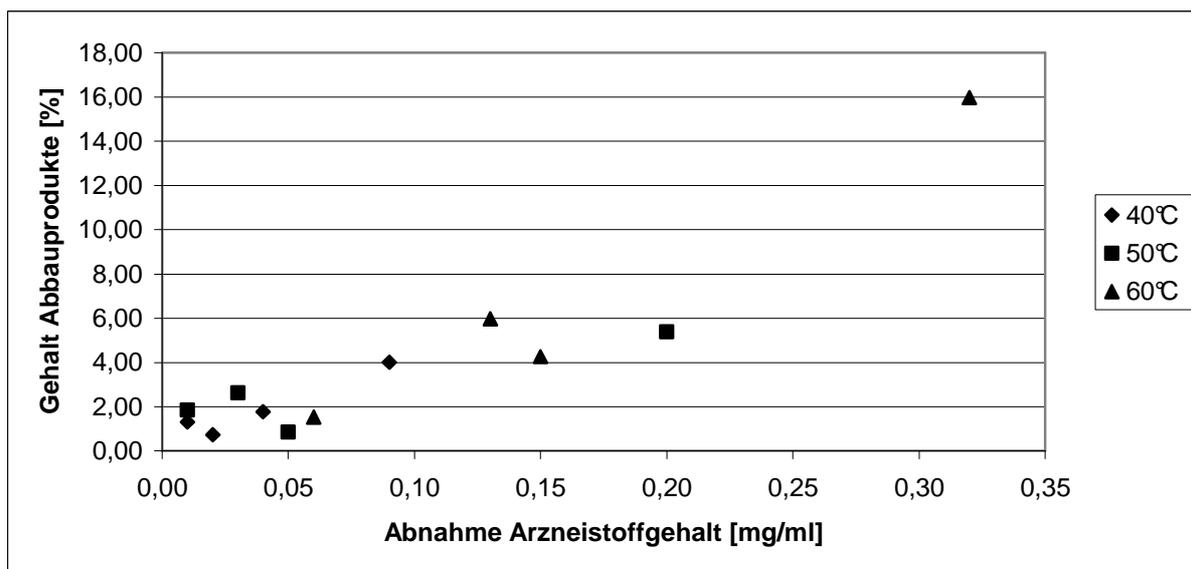
Nach Ph.Eur. 6.1. [48] sind im Arzneistoff Abbauprodukte bis zu einem Gehalt von 0,5% zulässig. Dieser Wert beinhaltet sowohl bekannte als auch unbekannt Verunreinigungen. Für Zubereitungen liegt keine Monographie vor, die den Gehalt an Abbauprodukten im

Einzelnen oder in der Summe beschränkt. Die entsprechende Monographie der U.S.P [64] legt nur einen Mindestgehalt an Arzneistoff (93% des deklarierten Gehalts) fest, der am Ende der Laufzeit nicht unterschritten werden darf.

5.5.3.1 Glaskarpulen

Abbildung 62 stellt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an den bekannten Abbauprodukten Tropasäure und Apoatropin und der Abnahme des Atropingehalts graphisch dar. Einen Überblick über die bestimmten Werte gibt Tabelle A-19 im Anhang. Des Weiteren ist dort ebenfalls das 95%-Vertrauensintervall der aus sechs Einzelbestimmungen berechneten Mittelwerte angegeben.

Abb. 62: Zusammenhang zwischen dem Auftreten bekannter Abbauprodukte und der Abnahme des Arzneistoffgehalts nach Lagerung in Glaskarpulen bei den angegebenen Bedingungen



Die Auftragung des Gehalts der beiden bekannten Abbauprodukte gegen die Abnahme des Gehalts des Atropins ergibt für die drei untersuchten Temperaturen eine Verteilung, die an eine Gerade angenähert ist. Die einzelnen Werte streuen jedoch deutlich, erkennbar an den in Tabelle A-19 aufgeführten Spannen des Vertrauensbereichs. Im Kurvenverlauf weist jedoch nichts darauf hin, dass bei dem Abbau des Atropins weitere nicht erfasste Abbauprodukte gebildet werden. Die Streuung der einzelnen Werte scheint eher zufällig als durch systematische Faktoren bedingt zu sein.

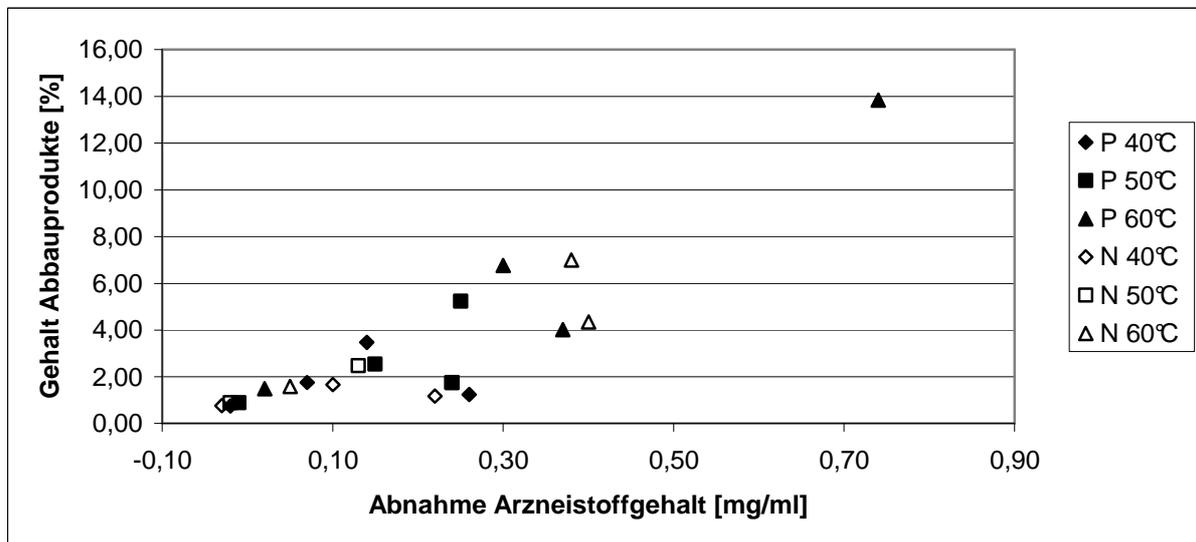
5.5.3.2 Metallkarpulen

Abbildung 63 stellt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an bekannten Abbauprodukten und der Abnahme des Atropingehalts graphisch dar. Einen Überblick über die ermittelten Werte gibt Tabelle A-20 im Anhang. Des Weiteren ist dort das 95%-Vertrauensintervall der aus sechs bzw. neun Einzelbestimmungen berechneten Mittelwerte angegeben.

Bezüglich des Zusammenhangs zwischen Abbau des Arzneistoffs und Auftreten der bekannten Abbauprodukte lässt sich für die in Metallkarpulen gelagerten Lösungen ein proportionaler Zusammenhang feststellen. Für jede untersuchte Temperatur weicht jedoch eines der Wertepaare stark von einer Geraden ab, die mit guter Anpassung durch die übrigen Wertepaare gelegt werden kann. Hierbei handelt es sich jeweils um das nach drei Monaten Lagerung bestimmte Wertepaar. In Kapitel 5.4.2. wurde eine starke Abweichung der ermittelten Gehalte von den erwarteten beschrieben und diskutiert. Aus den dort beschriebenen Gründen kann dieses Wertepaar auch im vorliegenden Fall als Ausreißer vernachlässigt werden, der vermutlich durch analytische Fehler zu Stande kam. Die übrigen Werte spiegeln einen linearen Zusammenhang zwischen der Abnahme des

Arzneistoffgehalts und dem Auftreten der bekannten Abbauprodukte wieder. Daher ist zu folgern, dass der Arzneistoffabbau bei Lagerung in Metallkarpulen keine weiteren unbekanntem Produkte in nennenswertem Umfang liefert.

Abb. 63: Zusammenhang zwischen dem Auftreten bekannter Abbauprodukte und der Abnahme des Arzneistoffgehalts nach Lagerung in Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen
 P: passivierte Metallkarpulen; N: nicht passivierte Metallkarpulen

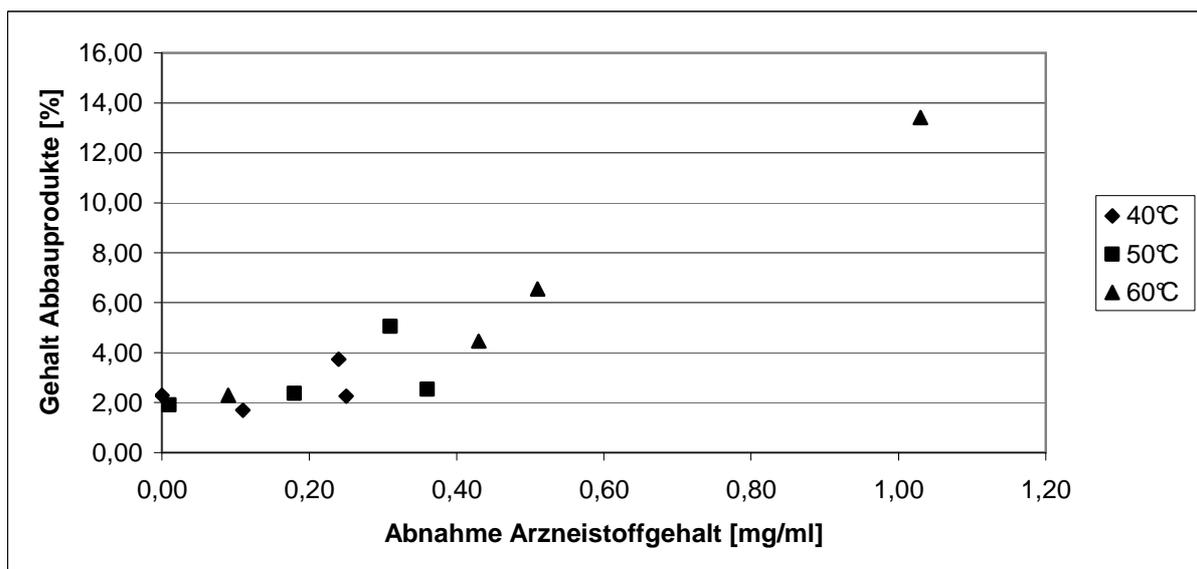


5.5.3.3 Kunststoffkarpulen

Abbildung 64 stellt den Zusammenhang zwischen dem Gehalt an bekannten Abbauprodukten und der Abnahme des Atropingehalts graphisch dar. Einen Überblick über die ermittelten Werte gibt Tabelle 34 im Anhang. Des Weiteren ist dort das 95%-Vertrauensintervall der berechneten Mittelwerte angegeben.

Auch bei den in Kunststoffkarpulen thermisch belasteten Lösungen ist eine Annäherung an einen linearen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an bekannten Abbauprodukten und der Abnahme des Arzneistoffgehalts zu beobachten. Hier ist ebenfalls eine starke Streuung der Wertepaare um die gedachte Ausgleichsgerade festzustellen. Es liegt jedoch kein Hinweis darauf vor, dass bei dem Abbau des Arzneistoffs in Lösung bei Lagerung in Kunststoffkarpulen unbekannte Reaktionen beteiligt sind oder nicht identifizierte Abbauprodukte entstehen.

Abb. 64: Zusammenhang zwischen dem Auftreten bekannter Abbauprodukte und der Abnahme des Arzneistoffgehalts nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen



5.6 Nachweis von Leachables

5.6.1 Phenol

Phenol wird bei der Herstellung von Elastomeren, wie sie als Stopfen in den für die vorliegende Untersuchung eingesetzten Injektionskarpulen verwendet werden, als Weichmacher eingesetzt. Auf Grund seiner guten Wasserlöslichkeit (84 g/l bei 20°C¹) kam es jedoch während der Lagerung zur Migration aus dem Elastomerstopfen und Phenol konnte in den enthaltenen Lösungen nachgewiesen werden. Mit zunehmender Lagertemperatur wird wegen der zu Grunde liegenden thermodynamischen Prozesse eine vermehrte Migration des Weichmachers in die Modelllösungen erwartet.

Phenol findet neben seinen weichmachenden auch wegen seinen konservierenden Eigenschaften direkte Verwendung in pharmazeutischen Zubereitungen. So enthält die in den als AtroPen[®] zugelassenen Atropinautoinjektoren eingesetzte Injektionslösung üblicherweise 4,0 mg Phenol / ml. Auf Grund seiner akuten und chronischen Toxizität und seines toxischen sowie möglicherweise mutagenen Potentials wird jedoch heute in der Regel auf die Verwendung von Phenol in Arzneimitteln zur Konservierung verzichtet. Eine Verwendung als Weichmacher in Stopfen für pharmazeutische Zwecke ist jedoch dennoch aktuell.

Im Folgenden soll das Ausmaß der bei den verschiedenen untersuchten Primärpackmitteln auftretenden Migration von Phenol dargestellt und hinsichtlich Unterschieden zwischen den verschiedenen Generationen an Autoinjektoren ausgewertet werden.

Da sich bei Untersuchungen langzeitgelagerter AtroPen[®]-Autoinjektoren die Vermutung ergab, dass das darin enthaltene Phenol an der Verfärbung der Lösungen und an der

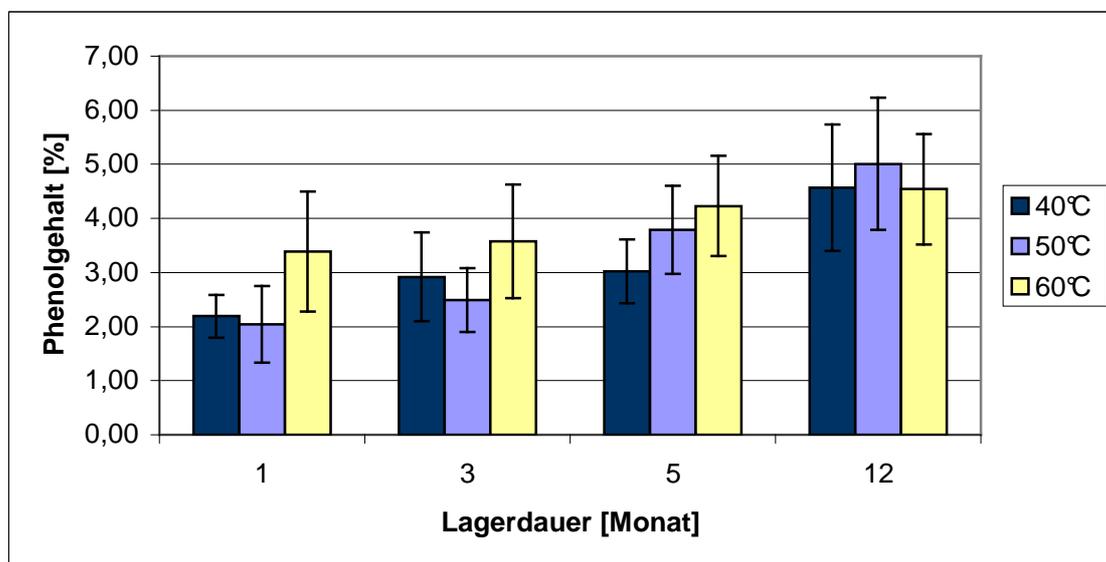
¹ Lt. GESTIS-Stoffdatenbank

Bildung dunkel gefärbter Partikel beteiligt sein könnte, werden die in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Daten zu diesen Parametern in Korrelation gesetzt, um einen möglichen Zusammenhang klären zu können.

5.6.1.1 Glaskarpulen

Abbildung 65 stellt den Zusammenhang zwischen den ermittelten Phenolkonzentrationen und der Lagerdauer bei den verschiedenen untersuchten Temperaturen für die Lösungen aus Glaskarpulen graphisch dar. Zudem ist das 95%-Vertrauensintervall der angegebenen Mittelwerte aus sechs Einzelbestimmungen dargestellt. Die zugehörigen Mittelwerte sind in Tabelle A-22 im Anhang aufgeführt.

Abb. 65: Phenolgehalt nach Lagerung in Glaskarpulen bei den angegebenen Bedingungen



Wie aus den in Abbildung 65 graphisch dargestellten Vertrauensbereichen der ermittelten Phenolgehalte entnommen werden kann, unterliegen diese starken Schwankungen. Zwar ist

im Verlauf der vorliegenden Untersuchung ein stetiger Anstieg der in den Lösungen nachweisbaren Phenolmengen zu beobachten, ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Phenolmigration und Temperatur wird jedoch nicht festgestellt. In den ersten drei Monaten der Lagerung werden in den bei 60°C gelagerten Prüfmustern die höchsten Phenolkonzentrationen bestimmt, Lagerung bei 50°C führt jedoch scheinbar zu einer weniger ausgeprägten Migration des Elastomerbestandteils in die Lösung als Lagerung bei 40°C. Nach fünfmonatiger Lagerung nimmt die in den Lösungen nachweisbare Menge Phenol mit der Lagertemperatur zu. Nach 12 Monaten thermischer Belastung weisen die bei 50°C gelagerten Prüfmuster im Mittel höhere Phenolkonzentrationen auf, als die bei 40°C und 60°C gelagerten.

Die maximal bestimmte Phenolkonzentration beträgt nach 12 Monaten Lagerung bei 60°C 5% bezogen auf Atropin.

5.6.1.2 Metallkarpulen

Abbildung 66 stellt den Zusammenhang zwischen den ermittelten Phenolkonzentrationen und der Lagerdauer bei Lagerung in passivierten Metallkarpulen graphisch dar. Weiterhin ist hier das 95%-Vertrauensintervall dargestellt. Tabelle A-23 im Anhang führt die Mittelwerte aus sechs Einzelbestimmungen sowie das Vertrauensintervall auf.

Bei den in erneut silikonisierten Metallkarpulen gelagerten Lösungen wird im Gegensatz zu den Lösungen aus Glaskarpulen innerhalb der ersten fünf Monate des Untersuchungszeitraums ein deutlicher Zusammenhang zwischen Phenolkonzentration und Zeit sowie dem Ausmaß der Phenolmigration und der Temperatur während der Lagerung festgestellt. Sowohl mit längerer Lagerdauer als auch mit höherer Lagertemperatur werden

größere Mengen Phenol in den Lösungen nachgewiesen. Nach 12 Monaten der thermischen Belastung geht die Phenolkonzentration in den Lösungen gegenüber den nach fünf Monaten erhobenen Werten zurück. Dieses Phänomen ist umso stärker ausgeprägt, je höher die bei der Lagerung vorherrschende Temperatur ist.

Bemerkenswert ist weiterhin das Ausmaß der zu beobachtenden Phenolmigration. So liegen die ermittelten Gehalte nach fünf Monaten thermischer Belastung etwa bei 40% bezogen auf die Atropinkonzentration.

Die für die passivierten Metallkarpulen ermittelten Vertrauensbereiche sind absolut gesehen ebenfalls größer als bei den Glaskarpulen. Bezogen auf die mittleren Phenolgehalte ist die Streuung jedoch geringer ausgeprägt.

Abb. 66: Phenolgehalt nach Lagerung in passivierten Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

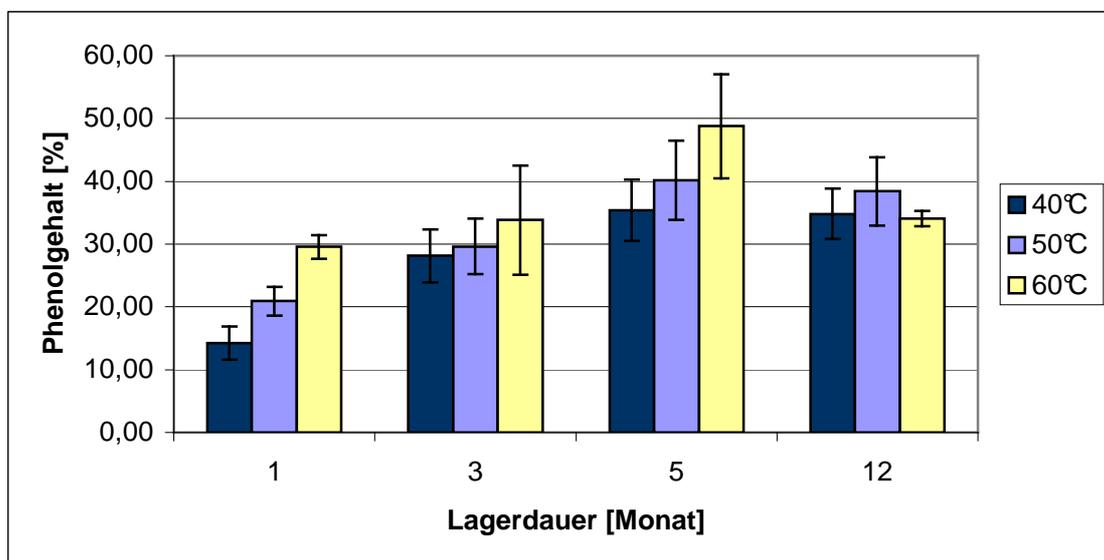
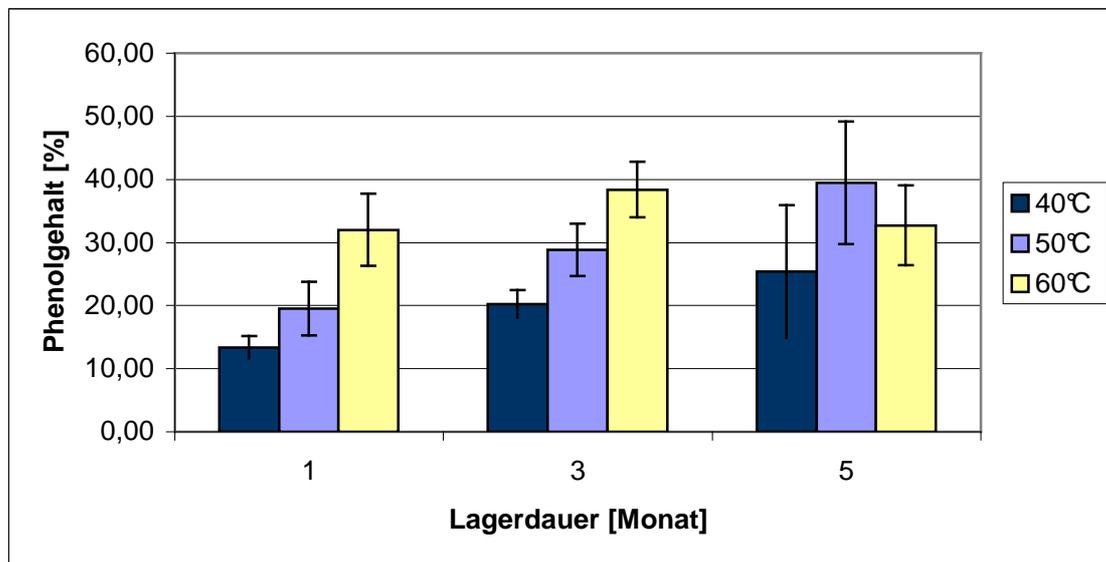


Abbildung 67 stellt den Zusammenhang zwischen den ermittelten Phenolkonzentrationen und der Lagerdauer bei Lagerung in nicht passivierten Metallkarpulen graphisch dar. Auch hier ist zudem das 95%-Vertrauensintervall der angegebenen Mittelwerte aus neun Einzelbestimmungen dargestellt. Die zugehörigen Werte sind Tabelle A-23 im Anhang zu entnehmen.

Abb. 67: Phenolgehalt nach Lagerung in nicht passivierten Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen



Bei den Prüfmustern, deren Metallkarpulen nicht vor dem Befüllen mit den Modelllösungen erneut silikonisiert wurden, kann nach einem und drei Monaten der thermischen Belastung ebenfalls eine Zunahme der in der Lösung nachweisbaren Menge an Phenol mit der Lagerdauer und -temperatur beobachtet werden. Mit weiter fortschreitender thermischer Belastung steigt die Phenolkonzentration bei 40 und 50°C weiter an, wohingegen bei 60°C eine Verringerung beobachtet wird. Die Streuung der Einzelwerte ist vergleichbar mit der in den passivierten Karpulen. Das Ausmaß der Phenolmigration in die Lösung ist ebenfalls ähnlich dem der passivierten Metallkarpulen. Da zwischen diesen beiden Packmitteln im

Hinblick auf die verwendeten Elastomerstopfen kein Unterschied besteht, sondern lediglich der eine Teil der Metallkarpulen vor dem Abfüllen der Prüflösungen silikonisiert wurde und der andere nicht, waren auch keine Unterschiede bezüglich der Migration von Phenol aus dem Primärpackmittel in die Injektionslösung zu erwarten.

5.6.1.3 Kunststoffkarpulen

Bei den in Kunststoffkarpulen gelagerten Lösungen wurde mit Ausnahme von vier Karpulen im gesamten Untersuchungszeitraum keine Migration von Phenol in die Lösung beobachtet. Die für diese Prüfmuster bestimmten Werte können Tabelle 25 entnommen werden.

Tab. 25: Phenolgehalt in Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Phenol [%] ¹
40°C/ 3 Monate	0,69
40°C/ 12 Monate	0,35
50°C/ 12 Monate ²	0,23 ± 0,05

Da es sich bei den zu Herstellung dieser Prüfmuster verwendeten Packmitteln um die der neuesten Generation an atropinhaltigen Notfallmedikamenten in Form von Autoinjektoren handelt, kann angenommen werden, dass hier die Zusammensetzung der verwendeten Elastomerstopfen gegenüber denen der älteren Generationen hinsichtlich des enthaltenen Weichmachers verändert wurde, sodass keine Abgabe des toxikologisch kritischen Phenols

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

² n = 2

mehr in die Injektionslösung erfolgen kann. Die vier Phenol-positiven Prüfmuster, die während der vorliegenden Untersuchung identifiziert wurden, sind möglicherweise auf Reste des bei der Elastomerherstellung als Lösungsmittel verwendeten Phenols in den einzelnen Stopfen zurückzuführen. Auf Grund der langen Lagerdauer bis zum Auftreten der Phenolpeaks in den in Kunststoff gelagerten Lösungen besteht weiterhin die Möglichkeit, dass dieses aus den gemeinsam mit den Kunststoffkarpulen gelagerten Prüfmustern mit phenolhaltigen Elastomerstopfen stammt. Auf Grund der größeren Porosität des Karpulenmaterials erfolgt bei den Kunststoffkarpulen möglicherweise Diffusion des in der Umgebungsluft befindlichen Phenols durch die Wandung. Auf Grund der geringen nachweisbaren Mengen war es weiterhin nicht möglich, die Identität des hier detektierten Stoffs neben der Retentionszeit noch durch das UV-Spektrum abzuklären, zumal das Spektrum des unsubstituierten Phenols mit Maxima bei 210 und 270 nm wenig charakteristisch ist.

5.6.1.4 Zusammenfassung

Bei der Untersuchung der in Glas und Metall stressgelagerten Prüflösungen wurde bereits nach einem Monat Lagerung das Auftreten eines Peaks bei 2,54 Minuten (relative Retention bezogen auf Atropin: 1,54) beobachtet. Die Substanz, die dieses Signal verursacht, wurde mit Hilfe eines Standards auf Grund ihrer Retentionszeit und ihres UV-Spektrums als Phenol identifiziert.

Bei den in Kunststoff thermisch belasteten Lösungen kann der Phenolpeak erst nach fünf Monaten Lagerung und dann jedoch nur in Spuren (0,02 - 0,1%) detektiert werden. Bei den mit phenolhaltigen Elastomerstopfen verschlossenen Karpulen liegt der Phenolgehalt bezogen auf den Wirkstoff Atropin zu diesem Zeitpunkt bereits bei 4% (Glaskarpulen)

beziehungsweise 40% (Metallkarpulen). Nach 12 Monaten Lagerung ist bei den in Metall gelagerten Lösungen eine Verringerung des Phenolgehalts auf ca. 35% zu beobachten.

Möglicherweise sind die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Kunststoffkarpulen durchlässig für Phenol, sodass das in den darin enthaltenen Lösungen nachgewiesene Phenol aus den Elastomerstopfen der gemeinsam mit ihnen gelagerten Prüfmuster mit phenolhaltigen Stopfen stammt.

Die beobachtete Verringerung des in den Lösungen nachweisbaren Phenols nach Überschreitung eines Maximums nach fünfmonatiger Lagerung in passivierten Metallkarpulen kann nicht mit der Bildung gefärbter Produkte aus Bestandteilen der Lösung und Phenol korreliert werden. Generell lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Färbungen in den Lösungen und dem Phenolgehalt feststellen.

Bei der Migration des Phenols scheint es sich um keinen reproduzierbaren Prozess zu handeln, dessen Kinetik thermodynamischen Regeln unterliegt. Eine nicht zu vernachlässigende Rolle bei der Migration des Phenols spielt mit Sicherheit das Alter der zur Herstellung der Prüfmuster verwendeten Brombutylelastomer-Stopfen. Auf Grund der Anzahl der hergestellten Prüfmuster konnte nicht auf die Primärpackmittel einer einzigen Charge an Autoinjektoren zurückgegriffen werden, sodass in der vorliegenden Untersuchung Packmittel mit unterschiedlichem Produktionsdatum zum Einsatz kamen. Diese wurden bewusst nicht in separaten Prüfkollektiven zusammengefasst, um mögliche Unterschiede zwischen den verwendeten Packmittel-Chargen bei den jeweiligen Probenahmen statistisch auszugleichen. Je nach Alter der enthaltenen Elastomerstopfen besitzen diese unterschiedliche Restgehalte an Phenol, da die hier beobachtete Migration auch während der Lagerung bei Raumtemperatur abläuft und sich der Phenolrestgehalt

somit im Laufe des „Lebens“ eines Stopfens verringert. Bei höheren Ausgangskonzentrationen an Phenol in den Stopfen ist auf Grund des größeren Konzentrationsgefälles zwischen Packmittel und enthaltener Lösung eine vergrößerte Migrationsrate im Vergleich zu Packmitteln mit geringerer Phenolkonzentration im Elastomer zu erwarten.

5.6.2 Konservierungsstoffe

Den Herstellerangaben der Firma Dow Corning [45] lassen sich die Inhaltsstoffe der zur Passivierung der Glas- und Kunststoffkarpulen verwendeten Silikonemulsion entnehmen. Demnach sind als Konservierungsstoffe, p-Hydroxybenzoesäuremethylester, p-Hydroxybenzoesäurepropylester sowie Natriumbenzoat zugesetzt. Auf Grund der Wasserlöslichkeit der genannten Substanzen können diese aus der auf die Karpulenwandung aufgetragenen Passivierungsschicht in die Injektionslösung migrieren. Dort ist auf Grund des vorherrschenden pH-Werts von ca. 4 eine Hydrolyse der p-Hydroxybenzoesäureester in p-Hydroxybenzoesäure und den entsprechenden Alkohol möglich, sodass in der Lösung neben den Estern auch die freie Säure anwesend ist.

Durch Vergleich mit Standardsubstanzen wurden die Retentionszeiten der Verbindungen ermittelt und die Chromatogramme der Prüfmuster auf das Auftreten dieser Signale hin ausgewertet. Hierzu wurde zusätzlich die relative Retentionszeit der einzelnen Signale bezogen auf Atropin errechnet, um Schwankungen der Retentionszeiten zwischen den verschiedenen Probennahmen auszugleichen.

Die möglicherweise in die Lösungen migrierten Substanzen besitzen die in Tabelle 26 aufgeführten Retentionszeiten sowie die angegebenen relativen Retentionszeiten.

Da das Atropin-Abbauprodukt Apoatropin, das durch Dehydratisierung während der Lagerung aus dem Arzneistoff entsteht, eine Retentionszeit von 3,14 Minuten (rel. Retentionszeit 1,90) aufweist, kann bei gleichzeitigem Atropinabbau und Migration des Konservierungsstoffs aus der Passivierungsschicht durch Detektion bei 220 nm nicht zwischen den beiden Substanzen unterschieden werden. Als Anhaltspunkt zur Unterscheidung kann hier lediglich der Vergleich der in der Blindlösung bei gleichen Lagerungsbedingungen nachweisbaren Menge an Konservierungsstoff mit dem in der Atropinlösung auftretenden Signalgröße dienen. Da beide Lösungen denselben pH-Wert und vergleichbare Zusammensetzung besitzen, ist davon auszugehen, dass bei gleicher Lagertemperatur und –dauer auch vergleichbare Mengen an Konservierungsstoff in die Lösungen migrieren.

Tab. 26: Absolute und relative Retentionszeiten der möglichen Migrationsstoffe aus der Silikonisierungsemulsion

Substanz	Retentionszeit [min]	Rel. Retentionszeit ¹
p-Hydroxybenzoesäure	1,20	0,73
Atropin	1,65	1,00
Natriumbenzoat	3,03	1,84
p-Hydroxybenzoesäuremethylester	3,16	1,92
p-Hydroxybenzoesäurepropylester	5,16	3,13

p-Hydroxybenzoesäureester besitzen im Gegensatz zu Apoatropin ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 256 nm. Der Extinktionskoeffizient für Apoatropin ist hier

¹ bezogen auf Atropin

hingegen sehr gering. Daher kann durch parallele Detektion bei 220 und 256 nm eine Identifizierung beider Substanzen vorgenommen werden. Liegt Apotropin vor, kann nur bei 220 nm ein Signal detektiert werden. Bei 256 nm hingegen ist kein deutliches Signal sichtbar. Verursacht jedoch pHB-Methylester das Signal bei 3,1 Minuten, ist eine Vergrößerung der Peakfläche bei 256 nm gegenüber 220 nm feststellbar.

Neben der Stresslagerung der kompletten mit den Modellösungen gefüllten Injektionskarpulen, wurden die einzelnen Bauteile der Injektoren, die in Kontakt mit dem Karpulinhalt stehen, einen Monat bei 60°C thermisch belastet, um feststellen zu können, welches unbekanntes Signal durch Bestandteile welchen Bauteils verursacht wird.

5.6.2.1 Glaskarpulen

In den in Glas bei 60°C gelagerten Lösungen ist bereits nach einem Monat ein Signal bei 3,05 Minuten (rel. Retentionszeit 1,85; entspricht Benzoat) detektierbar, dessen Peaks in Wasser für Injektionszwecke im Vergleich zu Atropin- und Blindlösung um etwa den Faktor 3 größer sind. Ab einer Lagerdauer von drei Monaten ist dieses Signal in allen Lösungen und bei allen Lagertemperaturen detektierbar. Die regelmäßig innerhalb der Untersuchungssequenz eingefügten Blank- und Standardinjektionen weisen dieses Signal nicht auf, sodass ausgeschlossen werden kann, dass es sich hierbei um ein methodisches Störsignal handelt.

Nach fünf Monaten Lagerung ist eine Zunahme der Peakfläche mit steigender Lagertemperatur von 0,6 mAU*s bei 40°C über 1,0 mAU*s bei 50°C nach 3,0 mAU*s bei 60°C zu beobachten.

Die in der Blindlösung stressgelagerten Stopfen des Kombinationsautoinjektors, dessen Karpulen zur Untersuchung der Stabilität in Glaskarpulen dienen, weisen ebenfalls ein Signal bei 3,03 Minuten (rel. Retentionszeit 1,84; entspricht Benzoat) auf. Somit kann angenommen werden, dass die als Natriumbenzoat identifizierte Substanz, welche hier dieses Signal verursacht, aus den Stopfen stammt.

Die zu Lagerung verwendeten Glaskarpulen wurden lediglich durch Auswaschen mit Wasser im Ultraschallbad gereinigt. Die durch Einbrennsilikonisierung auf die Glaswandung aufgebrauchte Passivierungs- und Gleitschicht wird durch dieses Verfahren nicht zerstört, sodass diese auch bei den für die vorliegenden Versuche hergestellten Prüfmustern vorhanden ist. Nach *Mundry* [47] können jedoch nach erfolgter Einbrennsilikonisierung keine Hilfsstoffe aus der eingesetzten Silikonemulsion wie Emulgatoren oder auch Konservierungsstoffe mehr nachgewiesen werden. Letztere werden demnach auf Grund ihrer Empfindlichkeit gegenüber Hydrolyse gespalten und bei den während des Einbrennvorgangs vorherrschenden Temperaturen von 250-350°C abdestilliert. Die zum Verschließen der Karpule verwendeten Stopfen sind jedoch ebenfalls zur Verringerung der Gleitreibung während des Injektionsvorgangs silikonisiert. Auf Grund der thermischen Instabilität des Materials erfolgt hier jedoch keine thermische Fixierung der Silikonschicht sondern lediglich eine Trocknung bei Raumtemperatur. Daher ist davon auszugehen, dass die der Silikonemulsion zugesetzten Hilfsstoffe in der auf den Stopfen aufgebrauchten Silikonschicht noch enthalten sind und in die Injektionslösung migrieren können.

5.6.2.2 Metallkarpulen

Im vorliegenden Versuch wurden zur Stabilitätsuntersuchung sowohl nach der Reinigung erneut durch Tauchen und Hitzebehandlung bei 230°C passivierte Karpulen und solche verwendet, bei denen die Silikonisierungsschicht durch Lösungsmittelextraktion weitgehend entfernt wurde.

Wie bei den Glaskarpulen ist auf Grund der Hitzebehandlung bei der nachträglichen Passivierung zu erwarten, dass die in der Silikonemulsion enthaltenen Konservierungsstoffe abgebaut werden und nicht in der Injektionslösung nachweisbar sind. Lediglich eine Migration der Konservierungsstoffe aus den nicht hitzebehandelten, passivierten Bauteilen des Injektors, Elastomerstopfen und Nadelführung, ist hier möglich.

Bereits nach einem Monat Lagerung wird das Auftreten eines Signals bei 3,05 Minuten (rel. Retentionszeit 1,85; entspricht Natriumbenzoat) beobachtet, es ist bei Untersuchung der nicht verdünnten Lösungen jedoch deutlich sichtbar. Dieses Signal ist in Wasser für Injektionszwecke am stärksten ausgeprägt. Zwischen den erneut passivierten und den nicht passivierten Metallkarpulen kann kein Unterschied im Auftreten dieses Signals festgestellt werden.

Nach drei Monaten Lagerung bei 40°C wird in den Lösungen aus den erneut passivierten Karpulen ein deutlich erkennbares Signal bei 3,14 Minuten (rel. Retentionszeit 1,79) festgestellt, das in den Lösungen aus nicht passivierten Karpulen nicht nachweisbar ist. Auf Grund des UV-Spektrums konnte dieses Signal als Benzoat identifiziert werden, obwohl die relative Retentionszeit von der mittels Standard bestimmten abweicht.

Nach drei Monaten bei 50°C ist dieses Signal nur in Wasser für Injektionszwecke, jedoch sowohl aus erneut passivierten und nicht passivierten Karpulen, detektierbar. Bei 60°C

hingegen ist es nur in den Lösungen aus nicht passivierten Karpulen nachweisbar. Das Signal verschwindet nach fünf Monaten Lagerung bei allen Temperaturen aus allen Lösungen, taucht nach 12 Monaten jedoch in allen Lösungen bei allen untersuchten Temperaturen wieder auf. Bei 40°C ist es nur noch in Spuren detektierbar.

Nach fünf Monaten Lagerung bei 40°C wird zusätzlich ein Signal bei 3,36 Minuten (rel. Retentionszeit 1,97; entspricht pHB-Methylester oder Apoatropin) in Lösung B und in Wasser für Injektionszwecke beobachtet. Dieses Signal wurde bei 50°C in keiner Lösung und bei 60°C nur in Wasser für Injektionszwecke detektiert. Auf Grund der Detektion bei 256 nm kann festgestellt werden, dass pHB-Methylester nur in Spuren in der Lösung enthalten ist. Das Signal wird hauptsächlich durch Apoatropin verursacht.

Des Weiteren kann nach 12 Monaten bei 50°C in der Blindlösung und bei 60°C in der Atropin- und Blindlösung ein Signal bei 1,24 Minuten (rel. Retentionszeit 0,75; entspricht p-Hydroxybenzoesäure) detektiert werden.

Nach Lagerung der Nadelführungen aus den Metallkarpulen in Lösung B kann ebenfalls ein Signal bei 3,03 Minuten (rel. Retentionszeit 1,84; entspricht Benzoat) detektiert werden. Bei der Lagerung der entsprechenden Injektionsnadeln in Blindlösung tritt dieses Signal mit sehr geringen Peakflächen auf. Die Lagerung der weiteren verwendeten Bauteile in Blindlösung führte nicht zum Auftreten entsprechender Signale.

Es kann somit festgestellt werden, dass es bei der Stresslagerung der verwendeten Lösungen in Metallkarpulen zu einer Migration von Benzoat aus den auf die Elastomerstopfen aufgetragenen Silikonschicht kommt. Die nach 12 Monaten nachweisbare p-Hydroxybenzoesäure ist Hydrolyseprodukt der in der Silikonemulsion enthaltenen pHB-Ester.

5.6.2.3 Kunststoffkarpulen

Bereits nach einem Monat Lagerung bei 40°C wird ein Signal bei 3,05 Minuten (rel. Retentionszeit 1,85; entspricht Benzoat) beobachtet, das eine Peakfläche von bis zu 4,5 mAU*s aufweist. Diese Fläche entspricht in Bezug auf Atropin einem Gehalt von 0,8%. In Wasser für Injektionszwecke ist dieses Signal mit einer Peakfläche von 16 mAU*s deutlicher ausgeprägt. Das Signal wird in vergleichbarer Intensität bei allen weiteren untersuchten Lösungen beobachtet, wobei ein geringfügiger Trend zu kleineren Peakflächen festzustellen ist. Das Signal ist jedoch in allen Fällen in Wasser für Injektionszwecke stärker ausgeprägt als in den vergleichbaren Lösungen A und B.

In bei 40°C gelagerter Lösung B und Wasser für Injektionszwecke ist bereits nach einem Monat zudem ein Signal mit Retentionszeit 3,2 Minuten (rel. Retentionszeit 1,94; entspricht pHB-Methylester) zu detektieren. Dieses Signal ist zwar auch in der atropinhaltigen Lösung zu beobachten, kann hier jedoch sowohl durch p-Hydroxybenzoesäuremethylester als auch durch Apotropin verursacht werden. Auf Grund des Auftretens des Peaks in der arzneistofffreien Lösung B kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es auch in der Injektionslösung zu einer Migration von pHB-Methylester aus der Passivierungsschicht in die Lösung gekommen ist und das Signal hier von beiden Substanzen durch Überlagerung verursacht wird. Die Detektion bei 256 nm bestätigt die Anwesenheit des pHB-Methylesters, allerdings, wie in den Lösungen aus Metallkarpulen, nur in Spuren. Auch im weiteren Verlauf der Stabilitätsprüfung werden identische Beobachtungen gemacht.

In Wasser für Injektionszwecke wird nach einem Monat Lagerung, in den Lösungen A und B ab einer Lagerdauer von drei Monaten bei 60°C, ein zusätzliches Signal mit einer

Retentionszeit von 1,23 Minuten (rel. Retentionszeit 0,75; entspricht p-Hydroxybenzoesäure) festgestellt.

Die zur Prüfung verwendeten Injektionskarpulen aus Kunststoff wurden nach der Reinigung mit Wasser im Ultraschallbad erneut durch Tauchen in Silikonemulsion und Trocknen bei Raumtemperatur passiviert. Hier kam es im Gegensatz zu den Glas- und Metallkarpulen zu keiner Hitzefixierung der Passivierungsschicht. Somit sind in der Silikonschicht noch alle in der verwendeten Silikonemulsion verwendeten Hilfsstoffe unverändert enthalten und können in die eingefüllten Lösungen migrieren. Es war daher im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Primärpackmitteln ein verstärkter Übergang von Konservierungsstoffen in die Injektionslösungen zu erwarten.

5.6.3 Weitere Verunreinigungen

5.6.3.1 Glaskarpulen

In allen in Glas gelagerten atropinhaltigen Injektionslösungen wurden bereits nach einem Monat thermischer Belastung Signale bei 0,80 und 0,98 Minuten beobachtet. Nur nach drei Monaten ist ein Signal bei 0,66 Minuten in Lösung A und B detektierbar. Insgesamt sind bei den in Glaskarpulen gelagerten Prüflösungen deutlich weniger unbekannte Signale detektierbar als bei den anderen untersuchten Primärpackmitteln.

Nach thermischer Belastung der Elastomerstopfen in Lösung B wird ein Signal bei 1,42 Minuten detektiert.

5.6.3.2 Metallkarpulen

In allen Injektionslösungen werden bereits nach einem Monat Lagerung in passivierten und nicht passivierten Metallkarpulen Signale bei 0,80 und 0,98 Minuten beobachtet. Nur nach drei Monaten Lagerung wird ein Signal bei 0,66 Minuten in Lösung A und B detektiert.

Nach fünfmonatiger Lagerung bei 50 und 60°C ist in Lösung B bei 1,41 Minuten (rel. Retentionszeit 0,83) ein Signal detektierbar, welches auch nach thermischer Belastung der passivierten Metallkarpulen, der Elastomerstopfen sowie der Nadelführung in Lösung B nachgewiesen werden kann.

Auffällig ist des Weiteren ein Peakpaar bei 4,1 und 4,4 Minuten (rel. Retentionszeit¹ 2,41 und 2,58). Dieses tritt nur bei den Primärpackmitteln mit Metallkarpulen auf und die Signalgröße nimmt im Laufe der Untersuchung deutlich zu. Diese Signale werden auch in den in Lösung B thermisch belasteten passivierten Injektionskarpulen sowie den Elastomerstopfen und den Nadelführungen detektiert. In den Lösungen der thermisch belasteten nicht passivierten Metallkarpulen sowie den Injektionsnadeln wird das Peakpaar nicht detektiert.

5.6.3.3 Kunststoffkarpulen

In allen Injektionslösungen werden bereits nach einem Monat Lagerung Signale bei 0,80 und 0,98 Minuten beobachtet. Bei höherer Temperatur und längerer Lagerzeit werden diese Signale auch in der Blindlösung detektiert, in Wasser jedoch nie.

Ab drei Monaten Lagerung ist des Weiteren in der atropinhaltigen Injektionslösung ein Signal bei 1,10 Minuten detektierbar.

¹ Bezogen auf den Atropinpeak

Nur nach drei Monaten Lagerung kann ein Signal bei 0,66 Minuten in allen untersuchten Lösungen festgestellt werden.

5.6.4 Zusammenfassung

Bei der HPLC-Untersuchung der thermisch in den in Kapitel 2.5. beschriebenen Primärpackmitteln belasteten Modelllösungen kommt es zum Auftreten verschiedener Signale, die nicht dem Arzneistoffabbau zuzuschreiben sind. Ein Teil dieser Signale kann auf Konservierungsstoffe zurückgeführt werden, die aus der auf die verschiedenen Packmittelbauteile aufgetragenen Silikonschicht stammen. Hierbei ist vor allem Benzoesäure sowie p-Hydroxybenzoesäuremethylester nachweisbar. Es kann außerdem ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Konservierungsstoff-Peaks und der Hitzefixierung der Silikonschicht festgestellt werden. Nach erfolgter Hitzefixierung können keine Konservierungsstoffe in den Lösungen nachgewiesen werden.

Des Weiteren treten im Laufe der vorliegenden Untersuchung im Chromatogramm der Lösungen Peaks auf, bei denen bisher nicht geklärt werden konnte, wodurch sie verursacht werden. Auf Grund der in Kapitel 5.5.3. beschriebenen Zusammenhänge zwischen dem Atropinsulfatgehalt und dem Gehalt an bekannten Abbauprodukten in den Lösungen ist jedoch davon auszugehen, dass es sich hierbei um weitere Leachables aus dem Primärpackmittel und nicht um unbekannte Abbauprodukte des Arzneistoffs handelt. Außerdem konnten die betreffenden Signale zumeist auch in Modelllösungen nachgewiesen werden, die keinen Arzneistoff enthalten.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Durch Stresslagerung von Atropinsulfat-Modelllösungen in den Primärpackmitteln dreier zugelassener Atropinautoinjektoren wurde der Einfluss des Primärpackmittels auf die Stabilität des enthaltenen Arzneistoffs ermittelt. Für die flüssigchromatographische Bestimmung des Gehalts und der Abbauprodukte in den Lösungen wurde eine Rapid-Resolution-LC-Methode entwickelt und validiert, durch die die Analysendauer und damit der Lösungsmittelverbrauch um etwa ein Fünftel reduziert werden konnte.

Durch Abschätzung der Laufzeit der Modellarzneimittel bis zum Erreichen einer unteren Spezifikationsgrenze von 93% des deklarierten Gehalts mit Hilfe der Arrhenius-Gleichung können Unterschiede bezüglich der Stabilität der Lösung in den verwendeten Primärpackmitteln festgestellt werden. Bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (25°C) ist die Laufzeit der Lösungen in Glas- und Kunststoffkarpulen mit 65 Monaten geringer als die der Lösungen in Metallkarpulen (97 Monate). Die stark verkürzte theoretische Laufzeit der in nicht passivierten Metallkarpulen gelagerten Modelllösungen weist deutlich auf eine Stabilisierung des Arzneistoffs durch die Passivierungsschicht hin.

Bezüglich der nachgewiesenen Abbauprodukte kann festgestellt werden, dass hier das Primärpackmittel keinen relevanten Einfluss besitzt. Bei keinem der untersuchten Materialien kann ein Hinweis auf die Bildung anderer als der bekannten Abbauprodukte Tropasäure und Apotropin gefunden werden.

Deutliche Unterschiede weisen die drei untersuchten Primärpackmittel jedoch im Auftreten von Leachables in der Lösung auf. So ist die Migration von Phenol aus den Elastomerstopfen bei den Metallkarpulen wesentlich stärker ausgeprägt als bei den

Glaskarpulen, wohingegen bei den Kunststoffkarpulen praktisch kein Phenol in den Lösungen nachgewiesen wird.

Des Weiteren werden die in der zur Passivierung der Bauteile der Injektionskarpulen verwendeten Silikonemulsion enthaltenen Konservierungsstoffe Natriumbenzoat und p-Hydroxybenzoesäuremethylester sowie dessen Hydrolyseprodukt p-Hydroxybenzoesäure in unterschiedlichem Maße in den Lösungen nachgewiesen. Durch Migrationsversuche der einzelnen Packmittelkomponenten in citratgepufferter Lösung kann ein Zusammenhang zwischen der Hitzefixierung der Passivierungsschicht und dem Fehlen eines Übergangs dieser Konservierungsstoffe in die Lösung, wie er bereits durch *Mundry* [47] festgestellt wurde, bestätigt werden.

Neben diesen Migrationsstoffen sind je nach Dauer der Lagerung und der dabei herrschenden Temperatur sowie abhängig vom Primärpackmittel im HPLC-Chromatogramm Signale detektierbar, die bisher keiner Substanz zugeordnet werden konnten. Vermutlich sind hierfür weitere aus den Packmaterialien stammende Stoffe verantwortlich. Diese sind durch weitere Untersuchungen zu identifizieren und den einzelnen Packmittelbestandteilen zuzuordnen.

7 Summary and Outlook

The influence of the container closure system on the stability of an atropine sulfate solution was studied. Therefore a model-solution was filled into different container closure systems similar to those used by the German armed forces as autoinjectors against nerve agent poisoning. These containers were stored at 40, 50 and 60°C for up to twelve months. Samples were removed from the stock and analysed after 1, 3, 5, and 12 months. Data obtained were used to calculate the maximum shelf life of atropine solution stored at ambient temperature in the three reviewed container closures.

For the analysis of assay and degradation products a new rapid resolution liquid chromatography (RRLC) method was established. So the analysis time could be shortened to a fifth, from 45 to ten minutes, which makes it a time and solvent saving method.

Differences concerning stability of atropine solutions stored in glass, plastic or steel were found. Regarding the shelf life of storing at ambient temperature atropine proved to be more stable in metal- than in glass- or plastic-cartridges. By testing siliconized as well as not siliconized metal-cartridges, it could be demonstrated that the silicone film also improved drug stability. No influence of the intermediate packaging material could be detected concerning formation of degradation products. There is no evidence of formation of other degradation products than tropic acid and apoatropine.

Great differences were noticed concerning the leachables found in the atropine solution. For example the migration of phenol from the rubber stoppers of the metal-cartridge is much more distinct than from the rubber stopper of the glass-cartridge. The stoppers of the plastic-cartridge, in contrary, do not release phenol. In addition, different amounts of the preservatives from the silicone emulsion used for passivation of the cartridges can be detected in the atropine solutions. But in general there can be found only traces of them. By

storing the components of the container closure systems in a citrate buffer which is like that used for the atropine solution the findings of *Mundry* [47], that those parts that had been heated after siliconization do not release constituents of the silicone emulsion to the buffer solution, can be confirmed.

Besides those leachables, other signals can be detected in the HPLC chromatograms of the tested solutions that could not be identified yet. Their presence depends on the duration of storage, the storage temperature and on the container closure. Presumably, these signals are caused by leachables from the packaging material but they still have to be identified during further analyses.

8 Literatur

- [1] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz - AMG), neugefasst durch Bek. v. 12.12.2005 I 3394; zuletzt geändert durch Art. 1 V v. 19.7.2011 I 1398
- [2] Göber B., Surmann P.: Arzneimittelkontrolle, Drug Control, Grundlagen und Methoden der Prüfung und Standardisierung von Arzneimitteln, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2005
- [3] ICH-Guideline Q1A (R2): Stability testing of new drug substances and products, 2003
- [4] ICH Guideline Q1B: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products, 1996
- [5] ICH Guideline Q1C: Stability Testing of New Dosage Forms, 1996
- [6] ICH Guideline Q1D: Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2002
- [7] ICH Guideline Q1E: Evaluation of Stability Data, 2003
- [8] ICH Explanatory Note to Guideline Q1F (2006)
- [9] WHO Technical Report Series, No. 953, Annex 2: Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products, 2009
- [10] Zvirblis P. et. al: The Kinetics of the Hydrolysis of Atropine
J Am Pharm Assoc 45 (7): 450-54, 1956
- [11] Kondritzer A., Zvirblis P.: Stability of Atropine in Aqueous Solution
J Am Pharm Assoc 46(9): 531-35, 1957
- [12] Lund W., Waaler T.: The Kinetics of Atropine and Apoatropine in Aqueous Solutions, Acta Chem. Scand. 22 (10): 3085-97, 1968

-
- [13] Reich G.: Die Stabilität von Arzneizubereitungen und deren Nachweis, dargestellt am Beispiel der Atropinsulfat-Injektionslösungen
Wehrmed 5 (8/9): 155- 61, 1967
- [14] Reich G.: Chemische Veränderungen wässriger Atropinlösungen während der Lagerung, Dissertation, Würzburg, 1965
- [15] Rosenblum E.I., Taylor W.S.: The detection of apoatropine and belladonnine in atropine
J. Pharm. Pharmacol. 7: 1067- , 1955
- [16] Bjerkelund E. et. al: Über die Stabilität wässriger Atropin-Injektionslösungen
Pharm Acta Helv 44: 745-54, 1969
- [17] Roth H., Eger K., Troschütz R.: Pharmazeutische Chemie II – Arzneistoffanalyse, Reaktivität, Stabilität, Analytik, 1. korrigierter Nachdruck der 3. Auflage, 1997, Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- [18] Schier J.G., Ravikumar P.R. et.al.: Preparing for Chemical Terrorism: Stability of Injectable Atropine Sulfate,
ACAD Emerg Med 11(4): 329-34, 2004
- [19] Lyon R.C. et al.: Stability Profiles of Drug Products Extended beyond Labeled Expiration Dates
J Pharm Sci 95 (7): 1549-60, 2006
- [20] Zvirblis P., R.I. Ellin: Kinetics and Stability of a Multicomponent Organophosphate Antidote Formulation in Glas and Plastic
J Pharm Sci 71 (3): 321-5, 1982
- [21] Lewis B., Jarvi, E., Cady P.: Atropine and ephedrine adsorption to syringe plastic
AANA J 62 (3): 257-60, 1994

- [22] Driver R.P. et al.: The Stability of Atropine Sulfate Solutions Stored in Plastic Syringes in the Operating Room
Anesth Analg 89: 1056-8, 1999
- [23] Dix J. et al.: Stability of Atropine Sulfate Prepared for Mass Chemical Terrorism
J Tox Clin Tox 41 (6): 771-5, 2003
- [24] Gill M.A. et al.: Stability of advanced life support drugs in the field
Am J Health Syst Pharm 61: 597-602, 2004
- [25] Stanaszek W.F., Pan I.-H.: Analysis of Hydroxyzine Hydrochloride, Meperidine Hydrochlorid and Atropine Sulfate in Glass and Plastic Syringes
Am J Hosp Pharm 35 (9): 1084-7, 1978
- [26] Rhodes R.S., Rhodes P.J., McCurdy H.H.: Stability of meperidine hydrochloride, promethazine hydrochloride and atropine sulfate in plastic syringes
Am J Hosp Pharm 42 (1): 112-5, 1985
- [27] Zimmermann T., Loch M. Atropine degradation products and trace heavy metal content in AtroPen[®] and ComboPen[®] autoinjectors
Toxicology 233: 229-30, 2006
- [28] Grimm W., Harnischfeger H., Tegtmeier M.: *Stabilitätsprüfung in der Pharmazie - Theorie und Praxis*, Edition Cantor Verlag, Aulendorf, 2. Auflage, 2004
- [29] *Europäisches Arzneibuch*, 6. Ausgabe Grundwerk, Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, 2008
- [30] ICH-Guideline Q8(R2): Pharmaceutical Development, 2009
- [31] ICH-Guideline Q6A: Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances (2000)
- [32] Zimmermann T., Eggert-Bury K.: Functional quality testing of Bundeswehr autoinjectors: AtroPen[®], ComboPen[®] and morphine autoinjectors
J. Toxicology 233 (1): 238-9, 2007

-
- [33] ICH-Guideline Q3B (R2): Impurities in new drug products (2006)
- [34] EMEA Guideline on plastic immediate packaging materials (CPMP/QWP/4359/03)
- [35] Guidance for Industry Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 1999
- [36] Europäisches Arzneibuch, 6. Ausgabe, 6. Nachtrag, Kapitel 3.2.1., Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, 2010
- [37] von Czetsch-Lindenwald H., Abdine H., Adel Sakr H.: Silikonisieren von Arzneiflaschen
Pharm Ind 23 (9): 427-30, 1961
- [38] Solomun L. et al.: The impact of primary packaging on the quality of parenteral products
J Pharm Biomed Anal 48: 744-8, 2008
- [39] Informationsstelle Edelstahl Rostfrei (ISER): Merkblatt 803 – Was ist nichtrostender Stahl?, Düsseldorf, 1. Auflage, 2008
- [40] Informationsstelle Edelstahl Rostfrei (ISER): Merkblatt 830 - Edelstahl Rostfrei in chloridhaltigen Wässern, Düsseldorf, 2. Auflage, 1997
- [41] Informationsstelle Edelstahl Rostfrei (ISER): Merkblatt 914 – Nichtrostender Stahl – Wenn die Gesundheit zählt, Düsseldorf, 2. Auflage, 1997
- [42] Bedarfsgegenständeverordnung, neugefasst durch Bek. v. 23.12.1997 (BGBl I S. 5); zuletzt geändert durch Art. 1 V v. 7.2.2011 (BGBl. I S. 226)
- [43] Domininghaus: Kunststoffe – Eigenschaften und Anwendungen, 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 2008
- [44] Röthemeyer F., Sommer F.: Kautschuktechnologie – Werkstoffe, Verarbeitung, Produkte; 2. Auflage, Hanser Verlag, München, 2006

- [45] Dow Corning® 365, 35% Dimeticone NF Emulsion, Frequently Asked Questions, erhältlich unter <http://www.dowcorning.com/content/publishedlit/52-1040-01.pdf>
- [46] Kuntscher H.: Silikonisierung von Arzneifläschchen in der betrieblichen Praxis
Pharm Ind 24 (11a): 543-46, 1962
- [47] Mundry T., Einbrennsilikonisierung bei pharmazeutischen Glaspackmitteln – Analytische Studien eines Produktionsprozesses; Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin 1999
- [48] Europäisches Arzneibuch, 6. Ausgabe, 1. Nachtrag, Monographie Atropinsulfat-Monohydrat, Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, 2009
- [49] Lund W., Waaler T.: The quantitative determination of atropine in presence of its hydrolysis and dehydration products
Pharm. Acta Helv. 45: 701-7, 1970
- [50] Aehler E., Dräger B.: Tropane alkaloid analysis by chromatographic and electrophoretic techniques – an update
J Chromatogr B 878: 1391-1406, 2010
- [51] Paddle B.M., Dowling M.H.: Simple high-performance liquid chromatographic method for assessing the deterioration of atropine-oxime mixtures employed as antidotes in the treatment of nerve agent poisoning
J Chromatogr 648: 373-80, 1993
- [52] Brown N.D., Sleeman H.K.: Ion-pair high-performance liquid chromatographic method for the determination of atropine sulfate and tropic acid
J Chromatogr 150: 225-28, 1978
- [53] Fell A.F. et al.: The Analysis of Atropine Sulfate and its Degradation Products by Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography
J Phar. Pharmacol. 31 (Suppl.): 20P, 1979

-
- [54] Richard A., Andermann G.: Simultaneous Determination of Atropine Sulphate and Tropic Acid by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography
Pharmazie 39 (7): 866-70, 1984
- [55] Li-Yi H. et al: Reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic separation and determination of tropane alkaloids in Chinese solanaceous plants
J Chromatogr. 481: 428-33, 1989
- [56] Kirchhoff C. et al.: Analysis of atropine, its degradation products and related substances of natural origin by means of reversed-phase high-performance liquid chromatography;
J Chromatogr A 1046: 115 – 20, 2004
- [57] U.S.P-Säulen-Datenbank unter <http://www.usp.org/USPNF/columnsDB.html>
- [58] Bitar Y.: Entwicklung und Validierung chromatographischer bzw. elektro-phoretischer Methoden zur Reinheitsprüfungen von Arzneistoffen, Dissertation, Würzburg, 2007
- [59] ICH-Guideline Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005
- [60] EN ISO/IEC 17025:2005 (Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien)
- [61] <1225> Validation of Compendial Procedures in The United States Pharmacopeia, U.S.P 31, U.S.P Convention, Inc., Rockville, MD
- [62] Neitzel V.: Die Kalibrierung von Anaylsenmethoden (1) – Lineare Kalibrationsfunktionen
CLB Chemie in Labor und Biotechnik 53 (1): 9-13,2002
- [63] Kromidas S.: Validierung in der Analytik, 2. überarbeitete Auflage, Wiley-VCH Verlag & Co. KgaA, Weinheim, 2011

- [64] *Atropinesulfate Injection* in The United States Pharmacopeia, U.S.P 31, U.S.P Convention, Inc., Rockville, MD
- [65] Ellin R.I., Kaminski A., Zvirblis P., Sultan W.E., Shutz M.B., Matthews R.: Leaching of zinc compound from rubber stoppers into the content of automatic atropine injectors J. Pharm. Sci. 74(7): 788-90, 1985

Tab. A-1: Validierungsergebnisse

Parameter	Prüfverfahren	Grenzwert	Ergebnis
Linearität	Doppelbestimmung von Standards im Bereich von 0,3 bis 0,7 mg Atropin/ml	$R^2 > 0,998$ F-Test-Prüfgröße: 15,05 $F(f_1 = 1, f_2 = 3, P = 99\%) = 34,12$	$R^2 = 0,999$ Keine signifikant bessere Anpassung durch Regression 2. Grades
Richtigkeit	a) Wiederfindung nach Aufstockung b) Methoden-Vergleich	a) Wiederfindung 95 – 105% b) keine signifikante Abweichung der Ergebnisse ($P = 95\%$)	a) Wiederfindung 97,96% b) Keine signifikante Abweichung der Ergebnisse
Systempräzision	Mehrfachinjektion der selben Lösung	RSD < 2%	RSD = 0,57%
Methodenpräzision	Mehrfache Durchführung der gesamten Analyse	RSD < 2%	RSD = 0,50%
Mehrtagespräzision	Gesamte Analyse durch einen zweiten Mitarbeiter	RSD < 2%	RSD = 0,80%
Systemeignung	Mehrfachinjektion einer Probe	RSD < 2% $0,5 < A_s < 1,5$	RSD = 0,57% $A_s = 0,47$
Selektivität	Wirkstofffreie Probenmatrix	Keine Peaks zur t_R der API oder der Verunreinigungen	entspricht
Nachweis- und Bestimmungsgrenze	Kalibriergeradenmethode DIN 32645		s. Tabelle A-2

Tab. A-2: Ergebnisse der Eingangsuntersuchung des Atropinsulfats der Fa. Fagron

Prüfung/ Prüfparameter	Methode	Spezifikation	Ergebnis
Aussehen	Visuell	Weißes, kristallines Pulver	entspricht
pH-Wert	Ph.Eur. 6.1/ 2.2.3.	4,5 –6,2	6,18
Optische Drehung	Ph.Eur. 6.0/ 2.2.7	-0,50° - + 0,05°	+ 0,03°
Wassergehalt	Ph.Eur. 6.0/ 2.5.12	2,0 – 4,0%	3,56%
Identität	IR-Spektroskopie Ph.Eur. 6.0/ 2.2.24	Spektrenvergleich	entspricht
Identität	Identitätsreaktion auf Sulfat Ph.Eur. 6.1/ 2.3.1	Weißer Niederschlag mit BaCl ₂ -Lsg., gelbe Färbung mit Iod-Lsg., Entfärbung durch SnCl ₂ -Lsg., kein gefärbter Niederschlag bei Erhitzen zum Sieden	entspricht
Identität	HPLC Ph.Eur. 6.1./ Atropinsulfat	Retentionszeitvergleich mit Standard	entspricht
Reinheit	HPLC	Tropasäure < 0,20%	Tropasäure = 0,08%
Fremde Alkaloide und Zersetzungsprodukte	Ph.Eur. 6.1./ Atropinsulfat	Apoatropin < 0,20%	Apoatropin = 0,31%
		Unbekannte < 0,10%	Unbekannte = 0,08%
		Gesamt < 0,50%	Gesamt = 0,47%
Gehalt	Potentiometrische Titration Ph.Eur. 6.0/ 2.2.20	99 –101%	100,64%
Reinheit	RRLC	Tropasäure < 0,20%	Tropasäure = 0,08%
Fremde Alkaloide und Zersetzungsprodukte		Apoatropin < 0,20%	Apoatropin = 0,31%
		Unbekannte < 0,10%	Unbekannte = 0,08%
		Gesamt < 0,50%	Gesamt = 0,47%
Gehalt	RRLC	99-101%	101,74%

II

Tab. A-3: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Substanz	Nachweisgrenze relativ¹ [%]	Bestimmungsgrenze relativ¹ [%]
Scopolamin	0,028	0,089
Noratropin	0,077	0,325
Tropasäure	0,005	0,019
Phenol	0,017	0,056
pHB-Methylester	0,010	0,036
Apoatropin	0,012	0,041
Atropasäure	0,028	0,157

Tab. A-4: Masseverlust der Prüfkollektive nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen

Packmaterial	Lagerbedingung [Temperatur/ Zeit]	Masseverlust ² [%]
Glas (n =6)	40°C/ 1 Monat	0,04
	40°C/ 3 Monate	0,07
	40°C/ 12 Monate	0,20
	50°C/ 1 Monat	0,05
	50°C/ 3 Monate	0,72
	50°C/ 12 Monate	0,31
	60°C/ 1 Monat	0,09
	60°C/ 3 Monate	0,19
	60°C/ 12 Monate	0,61

Tab. A-4 Fortsetzung

¹ bezogen auf die Peakfläche des Atropin-Peaks bei einer Konzentration von 0,48 mg/ml

² Mittelwert

Packmaterial	Lagerbedingung [Temperatur/ Zeit]	Masseverlust ¹ [%]
Kunststoff	40°C/ 1 Monat	1,50
	40°C/ 3 Monate	2,07
	50°C/ 1 Monat	2,36
	50°C/ 3 Monate	2,73
	60°C/ 1 Monat	4,39
	60°C/ 3 Monate	5,88
Metall passiviert (n = 6)	40°C/ 1 Monat	0,05
	40°C/ 3 Monate	0,64
	40°C/ 12 Monate	5,62
	50°C/ 1 Monat	0,12
	50°C/ 3 Monate	1,80
	50°C/ 12 Monate	0,30
	60°C/ 1 Monat	0,87
	60°C/ 3 Monate	0,18
60°C/ 12 Monate	0,44	
Metall nativ (n = 9)	40°C/ 1 Monat	0,01
	40°C/ 3 Monate	0,31
	50°C/ 1 Monat	0,51
	50°C/ 3 Monate	0,11
	60°C/ 1 Monat	0,54
	60°C/ 3 Monate	0,17

¹ Mittelwert

Tab. A-5: Korrekturfaktoren für die Gehaltsbestimmung nach Lagerung bei den angegebenen Bedingungen

Packmaterial	Lagerbedingung [Temperatur/ Zeit]	Korrekturfaktor ± Vertrauensbereich
	40°C/ 3 Monate	0,86 ± 0,02
	40°C/ 5 Monate	0,98 ± 0,05
	40°C/ 12 Monate	0,96 ± 0,02
	50°C/ 1 Monat	1,01 ± 0,01
	50°C/ 3 Monate	0,89 ± 0,02
	50°C/ 5 Monate	0,98 ± 0,01
	50°C/ 12 Monate	0,98 ± 0,01
	60°C/ 1 Monat	1,02 ± 0,01
	60°C/ 3 Monate	0,86 ± 0,004
	60°C/ 5 Monate	0,96 ± 0,08
	60°C/ 12 Monate	0,97 ± 0,01
Metall nativ	40°C/ 1 Monat	1,03 ± 0,02
	40°C/ 3 Monate	0,89 ± 0,03
	40°C/ 5 Monate	0,94 ± 0,06
	50°C/ 1 Monat	1,03 ± 0,01
	50°C/ 3 Monate	0,89 ± 0,01
	50°C/ 5 Monate	0,97 ± 0,03
	60°C/ 1 Monat	1,02 ± 0,01
	60°C/ 3 Monate	0,86 ± 0,01
	60°C/ 5 Monate	0,92 ± 0,13

Tab. A-5 Fortsetzung

Packmaterial	Lagerbedingung [Temperatur/ Zeit]	Korrekturfaktor \pm Vertrauensbereich
Kunststoff	40°C/ 1 Monat	0,99 \pm 0,04
	40°C/ 3 Monate	0,85 \pm 0,02
	40°C/ 5 Monate	0,91 \pm 0,01
	40°C/ 12 Monate	0,83 \pm 0,02
	50°C/ 1 Monat	0,98 \pm 0,05
	50°C/ 3 Monate	0,80 \pm 0,03
	50°C/ 5 Monate	0,87 \pm 0,03
	50°C/ 12 Monate	0,77 \pm 0,03
	60°C/ 1 Monat	0,97 \pm 0,05
	60°C/ 3 Monate	0,75 \pm 0,05
	60°C/ 5 Monate	0,77 \pm 0,03
	60°C/ 12 Monate	0,40 \pm 0,05

Tab. A-6: pH-Werte und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Glaskarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung

Lagerbedingung	Lösung A ¹	Lösung B ²
40°C/ 1 Monat	4,07 ± 0,02	4,01 ± 0,01
40°C/ 3 Monate	4,11 ± 0,01	4,06 ± 0,01
40°C/ 5 Monate	4,04 ± 0,12	3,92 ± 0,06
40°C/ 12 Monate	3,97 ± 0,01	3,95 ± 0,02
50°C/ 1 Monat	4,04 ± 0,01	4,04 ± 0,01
50°C/ 3 Monate	4,04 ± 0,01	3,99 ± 0,01
50°C/ 5 Monate	3,98 ± 0,06	3,92 ± 0,09
50°C/ 12 Monate	3,95 ± 0,02	3,95 ± 0,01
60°C/ 1 Monat	4,09 ± 0,01	4,05 ± 0,01
60°C/ 3 Monate	4,03 ± 0,02	4,02 ± 0,02
60°C/ 5 Monate	4,02 ± 0,11	3,88 ± 0,17
60°C/ 12 Monate	3,96 ± 0,01	3,94 ± 0,02

¹ n = 6

² n = 3

Tab. A-7: pH-Werte und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in passivierten Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung

Lagerbedingung	Lösung A ¹	Lösung B ²
40°C/ 1 Monat	4,09 ± 0,09	4,01 ± 0,01
40°C/ 3 Monate	4,06 ± 0,00	4,05 ± 0,02
40°C/ 5 Monate	4,03 ± 0,04	3,98 ± 0,07
40°C/ 12 Monate	3,95 ± 0,01	3,93 ± 0,01
50°C/ 1 Monat	3,93 ± 0,01	3,87 ± 0,05
50°C/ 3 Monate	4,14 ± 0,02	4,11 ± 0,03
50°C/ 5 Monate	4,02 ± 0,04	3,90 ± 0,06
50°C/ 12 Monate	3,95 ± 0,01	3,93 ± 0,01
60°C/ 1 Monat	3,97 ± 0,03	3,93 ± 0,03
60°C/ 3 Monate	4,33 ± 0,02	4,30 ± 0,01
60°C/ 5 Monate	4,05 ± 0,03	3,97 ± 0,08
60°C/ 12 Monate	3,97 ± 0,01	3,95 ± 0,01

¹ n = 6

² n = 4

Tab. A-8: pH-Werte und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in nicht passivierten Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen
Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung

Lagerbedingung	Lösung A ¹	Lösung B ²
40°C/ 1 Monat	4,04 ± 0,04	4,01 ± 0,03
40°C/ 3 Monate	4,17 ± 0,02	4,12 ± 0,02
40°C/ 5 Monate	3,94 ± 0,07	3,99 ± 0,02
50°C/ 1 Monat	3,92 ± 0,03	3,94 ± 0,01
50°C/ 3 Monate	4,20 ± 0,02	4,28 ± 0,03
50°C/ 5 Monate	4,00 ± 0,04	3,98 ± 0,02
60°C/ 1 Monat	3,96 ± 0,02	3,95 ± 0,05
60°C/ 3 Monate	4,34 ± 0,01	4,33 ± 0,01
60°C/ 5 Monate	3,99 ± 0,05	4,01 ± 0,02

¹ n = 9

² n = 6

Tab. A-9: pH-Werte und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lösung A: atropinhaltige Injektionslösung; Lösung B: wirkstofffreie Injektionslösung

Lagerbedingung	Lösung A	Lösung B
40°C/ 1 Monat	4,07 ± 0,04 ¹	4,04 ± 0,03 ²
40°C/ 3 Monate	3,97 ± 0,02 ³	4,01 ± 0,06 ²
40°C/ 5 Monate	4,06 ± 0,20 ⁴	4,02 ± 0,08 ²
40°C/ 12 Monate	3,98 ± 0,03 ⁵	3,82 ± 0,25 ²
50°C/ 1 Monat	4,05 ± 0,02 ²	4,03
50°C/ 3 Monate	4,00 ± 0,02 ⁴	3,97 ± 0,06 ³
50°C/ 5 Monate	4,22 ± 0,26 ⁵	4,00 ± 0,43 ²
50°C/ 12 Monate	3,88 ± 0,19 ⁵	3,95 ± 0,07 ³
60°C/ 1 Monat	4,02	4,02 ± 0,01 ³
60°C/ 3 Monate	3,99 ± 0,03 ³	4,24 ± 0,08 ¹
60°C/ 5 Monate	4,24 ± 0,23 ⁵	4,73 ± 0,56 ²
60°C/ 12 Monate	3,69 ± 0,28 ⁵	8,40

¹ n = 4

² n = 2

³ n = 5

⁴ n = 6

Tab. A-10: Atropinsulfatkonzentration sowie der 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Glaskarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Konzentration [mg/ml]
40°C/ 1 Monat	2,02 ± 0,01
40°C/ 3 Monate	2,03 ± 0,03
40°C/ 5 Monate	2,00 ± 0,05
40°C/ 12 Monate	1,95 ± 0,02
50°C/ 1 Monat	1,99 ± 0,03
50°C/ 3 Monate	2,03 ± 0,02
50°C/ 5 Monate	2,01 ± 0,09
50°C/ 12 Monate	1,84 ± 0,10
60°C/ 1 Monat	1,98 ± 0,02
60°C/ 3 Monate	1,89 ± 0,14
60°C/ 5 Monate	1,91 ± 0,09
60°C/ 12 Monate	1,72 ± 0,02

Tab. A-11: Gehalt an Atropinsulfat sowie der 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Gehalt [mg/ml]	
	Passiviert	Nicht passiviert
40°C/ 1 Monat	2,06 ± 0,002	2,07 ± 0,01
40°C/ 3 Monate	1,78 ± 0,02	1,82 ± 0,01
40°C/ 5 Monate	1,97 ± 0,01	1,94 ± 0,03
40°C/ 12 Monate	1,90 ± 0,01	
50°C/ 1 Monat	2,05 ± 0,02	2,06 ± 0,01
50°C/ 3 Monate	1,80 ± 0,02	1,80 ± 0,01
50°C/ 5 Monate	1,89 ± 0,03	1,91 ± 0,02
50°C/ 12 Monate	1,79 ± 0,04	
60°C/ 1 Monat	2,02 ± 0,01	1,99 ± 0,03
60°C/ 3 Monate	1,67 ± 0,02	1,64 ± 0,06
60°C/ 5 Monate	1,74 ± 0,06	1,66 ± 0,04
60°C/ 12 Monate	1,30 ± 0,12	

Tab. A-12: Atropingehalt sowie der 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen;

n = Anzahl der Mehrfachbestimmungen

Lagerbedingung	Gehalt [mg/ml]	n
40°C/ 1 Monat	$2,04 \pm 0,01$	6
40°C/ 3 Monate	$1,79 \pm 0,03$	5
40°C/ 5 Monate	$1,93 \pm 0,01$	6
40°C/ 12 Monate	$1,80 \pm 0,11$	6
50°C/ 1 Monat	$2,03 \pm 0,03$	5
50°C/ 3 Monate	$1,68 \pm 0,06$	5
50°C/ 5 Monate	$1,86 \pm 0,03$	6
50°C/ 12 Monate	$1,73 \pm 0,09$	6
60°C/ 1 Monat	$1,95 \pm 0,09$	3
60°C/ 3 Monate	$1,61 \pm 0,07$	2
60°C/ 5 Monate	$1,53 \pm 0,14$	6
60°C/ 12 Monate	$1,01 \pm 0,17$	6

Tab. A-13: Tropasäuregehalt der Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Glaskarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Gehalt [%] ¹²
40°C/ 1 Monat	0,11 ± 0,003
40°C/ 3 Monate	0,47 ± 0,004
40°C/ 5 Monate	0,82 ± 0,02
40°C/ 12 Monate	2,04 ± 0,03
50°C/ 1 Monat	0,16 ± 0,01
50°C/ 3 Monate	0,74 ± 0,01
50°C/ 5 Monate	1,24 ± 0,06
50°C/ 12 Monate	2,87 ± 0,16
60°C/ 1 Monat	0,36 ± 0,01
60°C/ 3 Monate	1,92 ± 0,13
60°C/ 5 Monate	2,85 ± 0,15
60°C/ 12 Monate	7,70 ± 0,15

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

² n = 6

Tab. A-14: Tropasäuregehalt der Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Gehalt [%] ¹	
	Passiviert ²	Nicht passiviert ³
40°C/ 1 Monat	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,004
40°C/ 3 Monate	0,43 ± 0,03	0,42 ± 0,01
40°C/ 5 Monate	0,74 ± 0,03	0,66 ± 0,09
40°C/ 12 Monate	1,67 ± 0,05	
50°C/ 1 Monat	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,004
50°C/ 3 Monate	0,67 ± 0,02	0,68 ± 0,02
50°C/ 5 Monate	1,14 ± 0,08	1,06 ± 0,04
50°C/ 12 Monate	2,53 ± 0,14	
60°C/ 1 Monat	0,34 ± 0,01	0,93 ± 0,02
60°C/ 3 Monate	1,63 ± 0,06	1,75 ± 0,06
60°C/ 5 Monate	2,73 ± 0,22	2,82 ± 0,21 ⁴
60°C/ 12 Monate	6,63 ± 0,57	

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

² n = 6

³ n = 9

⁴ n = 5

Tab. A-15: Tropasäuregehalt der Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

n = Anzahl der Mehrfachbestimmungen

Lagerbedingung	Gehalt [%] ¹	n
40°C/ 1 Monat	0,11 ± 0,004	6
40°C/ 3 Monate	0,39 ± 0,01	5
40°C/ 5 Monate	0,69 ± 0,01	6
40°C/ 12 Monate	1,63 ± 0,27	6
50°C/ 1 Monat	0,15 ± 0,01	5
50°C/ 3 Monate	0,67 ± 0,08	5
50°C/ 5 Monate	1,06 ± 0,07	6
50°C/ 12 Monate	2,31 ± 0,21	6
60°C/ 1 Monat	0,35 ± 0,02	3
60°C/ 3 Monate	1,57 ± 0,14	2
60°C/ 5 Monate	3,15 ± 0,23	6
60°C/ 12 Monate	7,03 ± 0,27	6

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

Tab. A-16: Apotrotingehalt der Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Glaskarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Gehalt [%] ¹²
40°C/ 1 Monat	0,37 ± 0,002
40°C/ 3 Monate	0,51 ± 0,01
40°C/ 5 Monate	0,59 ± 0,03
40°C/ 12 Monate	1,18 ± 0,05
50°C/ 1 Monat	0,41 ± 0,01
50°C/ 3 Monate	0,66 ± 0,02
50°C/ 5 Monate	0,86 ± 0,03
50°C/ 12 Monate	1,51 ± 0,32
60°C/ 1 Monat	0,70 ± 0,02
60°C/ 3 Monate	1,38 ± 0,15
60°C/ 5 Monate	1,86 ± 0,32
60°C/ 12 Monate	4,97 ± 0,45

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

² n = 6

Tab. A-17: Apoatropingehalt der Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Gehalt [%] ¹	
	Passiviert ²	Nicht passiviert ³
40°C/ 1 Monat	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,005
40°C/ 3 Monate	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,04
40°C/ 5 Monate	0,61 ± 0,02	0,61 ± 0,01
40°C/ 12 Monate	1,08 ± 0,02	
50°C/ 1 Monat	0,44 ± 0,002	0,43 ± 0,01
50°C/ 3 Monate	0,64 ± 0,02	0,64 ± 0,02
50°C/ 5 Monate	0,84 ± 0,01	0,85 ± 0,01
50°C/ 12 Monate	1,62 ± 0,05	
60°C/ 1 Monat	0,69 ± 0,01	0,71 ± 0,02
60°C/ 3 Monate	1,43 ± 0,04	1,65 ± 0,22
60°C/ 5 Monate	2,42 ± 0,11	2,50 ± 0,09
60°C/ 12 Monate	4,32 ± 0,23	

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak² n = 6³ n = 9

Tab. A-18: Apotrotingehalt der Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

n = Anzahl der Mehrfachbestimmungen

Lagerbedingung	Gehalt [%] ¹	n
40°C/ 1 Monat	1,50 ± 0,21	6
40°C/ 3 Monate	1,05 ± 0,13	5
40°C/ 5 Monate	0,61 ± 0,01	6
40°C/ 12 Monate	1,26 ± 0,15	6
50°C/ 1 Monat	1,08 ± 0,27	5
50°C/ 3 Monate	1,25 ± 0,20	5
50°C/ 5 Monate	0,78 ± 0,10	6
50°C/ 12 Monate	1,65 ± 0,14	6
60°C/ 1 Monat	1,17 ± 0,15	3
60°C/ 3 Monate	1,73 ± 0,10	2
60°C/ 5 Monate	2,04 ± 0,17	6
60°C/ 12 Monate	3,83 ± 0,29	6

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

Tab. A-19: Gehalt der bekannten Atropinabbauprodukte in Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Glaskarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Gehalt [%] ¹²
40°C/ 1 Monat	0,54 ± 0,12
40°C/ 3 Monate	0,97 ± 0,01
40°C/ 5 Monate	1,41 ± 0,01
40°C/ 12 Monate	3,22 ± 0,04
50°C/ 1 Monat	0,57 ± 0,01
50°C/ 3 Monate	1,40 ± 0,01
50°C/ 5 Monate	2,10 ± 0,07
50°C/ 12 Monate	4,38 ± 0,19
60°C/ 1 Monat	1,06 ± 0,01
60°C/ 3 Monate	3,30 ± 0,07
60°C/ 5 Monate	4,71 ± 0,18
60°C/ 12 Monate	12,67 ± 0,51

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

² n = 6

Tab: A-20: Gehalt der bekannten Atropinabbauprodukte in Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Gehalt [%] ¹	
	Passiviert ²	Nicht passiviert ³
40°C/ 1 Monat	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01
40°C/ 3 Monate	0,92 ± 0,02	0,91 ± 0,04
40°C/ 5 Monate	1,35 ± 0,04	1,27 ± 0,09
40°C/ 12 Monate	2,75 ± 0,06	
50°C/ 1 Monat	0,60 ± 0,004	0,60 ± 0,01
50°C/ 3 Monate	1,32 ± 0,03	1,31 ± 0,03
50°C/ 5 Monate	1,98 ± 0,07	1,91 ± 0,03
50°C/ 12 Monate	4,15 ± 0,16	
60°C/ 1 Monat	1,03 ± 0,01	1,10 ± 0,02
60°C/ 3 Monate	3,06 ± 0,07	3,40 ± 0,21
60°C/ 5 Monate	5,16 ± 0,27	5,32 ± 0,26
60°C/ 12 Monate	10,96 ± 0,44	

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

² n = 6

³ n = 9

Tab. A-21: Gehalt der bekannten Atropinabbauprodukte in Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Kunststoffkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Gehalt [%] ¹
40°C/ 1 Monat	1,61 ± 0,21
40°C/ 3 Monate	1,44 ± 0,13
40°C/ 5 Monate	1,29 ± 0,01
40°C/ 12 Monate	2,73 ± 0,37
50°C/ 1 Monat	1,24 ± 0,27
50°C/ 3 Monate	1,71 ± 0,50
50°C/ 5 Monate	1,85 ± 0,04
50°C/ 12 Monate	3,96 ± 0,12
60°C/ 1 Monat	1,52 ± 0,17
60°C/ 3 Monate	3,31 ± 0,24
60°C/ 5 Monate	5,20 ± 0,17
60°C/ 12 Monate	10,86 ± 0,25

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

Tab. A-22: Phenolgehalt in Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Glaskarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Phenol [%] ¹
40°C/ 1 Monat	2,19 ± 0,40
40°C/ 3 Monate	2,92 ± 0,82
40°C/ 5 Monate	3,02 ± 0,59
40°C/ 12 Monate	4,57 ± 1,17
50°C/ 1 Monat	2,04 ± 0,71
50°C/ 3 Monate	2,49 ± 0,59
50°C/ 5 Monate	3,79 ± 0,81
50°C/ 12 Monate	5,01 ± 1,22
60°C/ 1 Monat	3,39 ± 1,11
60°C/ 3 Monate	3,58 ± 1,05
60°C/ 5 Monate	4,23 ± 0,93
60°C/ 12 Monate	4,54 ± 1,02

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

Tab. A-23: Phenolgehalt in Lösung A und zugehöriger 95%-Vertrauensbereich nach Lagerung in Metallkarpulen bei den angegebenen Bedingungen

Lagerbedingung	Phenol [%] ¹	
	Passiviert ²	Nicht passiviert ³
40°C/ 1 Monat	14,24 ± 2,63	13,39 ± 1,76
40°C/ 3 Monate	28,16 ± 4,22	20,26 ± 2,16
40°C/ 5 Monate	35,39 ± 4,86	25,38 ± 10,53
40°C/ 12 Monate	34,83 ± 4,03	
50°C/ 1 Monat	20,94 ± 2,29	19,51 ± 4,28
50°C/ 3 Monate	29,63 ± 4,45	28,83 ± 4,11
50°C/ 5 Monate	40,19 ± 6,33	39,48 ± 9,72
50°C/ 12 Monate	38,39 ± 5,39	
60°C/ 1 Monat	29,57 ± 1,86	32,01 ± 5,70
60°C/ 3 Monate	33,82 ± 8,68	38,37 ± 4,42
60°C/ 5 Monate	48,77 ± 8,26	32,72 ± 6,36
60°C/ 12 Monate	34,07 ± 1,26	

¹ Peakfläche bezogen auf Atropinpeak

² n = 6

³ n = 9