

Abteilung: Sektion Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin und
Apotheke des Universitätsklinikums
Leiter: PD Dr. H. Hummler und
Dr. L. Maier
Universität Ulm

Entwicklung und Anwendung einer Gehaltsbestimmungsmethode für 17- β -Estradiol und Progesteron in einer innovativen Hormon-Emulsion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
- Dr. biol. hum. -
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Judith Kunze
geboren in Ulm

2006

Amtierender Dekan: Professor Dr. K. M. Debatin
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. A. Trotter
2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Beyer
Tag der Promotion: 02. Juni 2006

Soli Deo Gloria

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Priv.-Doz. A. Trotter für die Überlassung des Themas und die gute Unterstützung und Förderung meiner Arbeit

Herrn Professor C. Beyer für die schnelle Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen und diese Arbeit auf dem letzten Stück zu begleiten

Herrn Professor W. Seeling und Herrn Professor L. Kinzl für die Teilnahme am Prüfungsverfahren

Frau Dr. S. Brömer von der Firma B. Braun Melsungen AG für die ausgezeichnete fachliche und kollegiale Betreuung in der Endphase

der Firma Ratiopharm für die unkomplizierte und freundliche Bereitschaft zur Nutzung ihrer Klimakammern

Herrn Dr. L. Maier und allen meinen Kolleginnen und Kollegen der Apotheke des Universitätsklinikums Ulm für die Ermöglichung und Unterstützung dieser Arbeit

meinem Bruder Michael und Frau U. Zimmer für ihre Hilfe bei EDV-Fragen

meiner Familie und meinen Freundinnen Jacqueline, Christine, Bettina und Anja und

vor allem meinem Mann Christoph, der mich in allem und durch alles hindurch begleitet und ermutigt hat.

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	3
2	ALLGEMEINE GRUNDLAGEN	4
2.1	MEDIZINISCHER HINTERGRUND	4
2.2	ANALYTIK MIT HILFE DER HPLC	5
2.3	VALIDIERUNG EINER ANALYTISCHEN METHODE	6
2.4	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN	7
3	ANALYTISCHE BETRACHTUNGEN: GEHALTSBESTIMMUNGSMETHODE FÜR 17-β-ESTRADIOL UND PROGESTERON IN EINER FETTEMULSION MITTELS HPLC	8
3.1	METHODE A	8
3.1.1	<i>Methodenentwicklung</i>	8
3.1.2	<i>Methodenbeschreibung</i>	13
3.1.3	<i>Vorgaben zur Validierung</i>	15
3.1.4	<i>Validierung</i>	16
3.2	METHODE B	26
3.2.1	<i>Methodenentwicklung</i>	26
3.2.2	<i>Methodenbeschreibung</i>	29
3.2.3	<i>Vorgaben zur Validierung</i>	31
3.2.4	<i>Validierung</i>	31
4	STABILITÄTSDATEN DER HORMON-EMULSION	42
4.1	VORGABEN ZUR AUFSTELLUNG EINES STABILITÄTSPROGRAMMS	42
4.1.1	<i>Versuchsbedingungen</i>	42
4.1.2	<i>Chargenauswahl</i>	43
4.1.3	<i>Prüfparameter</i>	43
4.1.4	<i>Verpackungsmaterial</i>	43
4.2	METHODIK ZUR DURCHFÜHRUNG DER STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN	44
4.2.1	<i>Probenvorbereitung nach Methode A</i>	44
4.2.2	<i>Probenvorbereitung nach Methode B</i>	44
4.2.3	<i>Aussehen und Homogenität</i>	44
4.2.4	<i>pH-Wert</i>	44
4.2.5	<i>Öltropfengröße</i>	45
4.2.6	<i>Gehaltsbestimmung und Identität mittels HPLC</i>	45
4.2.7	<i>Abbauprodukte</i>	45
4.3	STABILITÄTSDATEN AUS DEN DURCHGEFÜHRTEN UNTERSUCHUNGEN	45
4.3.1	<i>Ergebnisse aus der Lagerung bei 25 °C / 60 % RF über 12 Monate</i>	46
4.3.2	<i>Ergebnisse aus der Lagerung bei 30 °C / 65 % RF über 6 Monate</i>	48
4.3.3	<i>Ergebnisse aus der Lagerung bei 40 °C / 75 % RF über 6 Monate</i>	49
4.3.4	<i>Ergebnisse aus Beschleunigungsversuchen</i>	51
4.3.5	<i>Ergebnisse aus Langzeituntersuchungen</i>	54
4.3.6	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	55
5	DISKUSSION	57
5.1	ENTWICKLUNG VON METHODE A ZU METHODE B	57
5.2	GEGENÜBERSTELLUNG DER METHODEN A UND B	60
5.2.1	<i>Systempräzision</i>	60
5.2.2	<i>Funktionstüchtigkeit des Systems</i>	60
5.2.3	<i>Robustheit</i>	61
5.3	VERGLEICH DER ANALYSENERGEBNISSE MIT METHODE A UND B	61

5.3.1	<i>Beobachtungen im Lauf der Anwendung</i>	63
5.3.2	<i>Voraussetzung für die Gehaltsbestimmungsmethode</i>	64
5.3.3	<i>Besonderheiten</i>	65
5.3.4	<i>Fazit</i>	65
5.4	STABILITÄTSUNTERSUCHUNGEN	65
5.4.1	<i>Ergebnisse nach Lagerung bei 25 °C / 60 % RF</i>	65
5.4.2	<i>Ergebnisse nach Lagerung bei 30 °C / 65 % RF</i>	66
5.4.3	<i>Ergebnisse nach Lagerung bei 40 °C / 75 % RF</i>	66
5.4.4	<i>Robustheit der Emulsion</i>	67
5.4.5	<i>pH-Wert</i>	67
5.4.6	<i>Abbauprodukte</i>	67
5.4.7	<i>Vorläufige Mindesthaltbarkeit und Laufzeit</i>	68
6	ZUSAMMENFASSUNG	69
7	LITERATURANGABEN	70
8	ANHANG	75
8.1	GENAUIGKEIT BEI WÄGUNGEN UND VOLUMENABMESSUNGEN	75
8.2	AUSWERTUNG UND BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	75
8.3	FEHLERABSCHÄTZUNG	76
8.4	HALTBARKEIT DER VERWENDETEN LÖSUNGEN	78
8.4.1	<i>Haltbarkeit der Standardlösungen B</i>	78
8.4.2	<i>Haltbarkeit der 17-β-Estradiol-Aufstocklösung</i>	78
8.4.3	<i>Haltbarkeit der Probelösung B</i>	79
8.5	SPEZIFIKATION DER NEUEN HORMON-EMULSION	80
8.6	LISTEN UND VERZEICHNISSE	81
8.6.1	<i>Reagenzienliste</i>	81
8.6.2	<i>Geräteliste</i>	82
8.6.3	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	84
8.6.4	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	85
8.6.5	<i>Tabellenverzeichnis</i>	86

1 Einleitung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Validierung einer geeigneten Methode zur Gehaltsbestimmung einer in der Apotheke des Universitätsklinikums Ulm in Zusammenarbeit mit der Universitätskinderklinik Ulm entwickelten Emulsion zur intravenösen Anwendung, die 17- β -Estradiol und Progesteron enthält. Des Weiteren soll ein Stabilitätsprogramm aufgestellt und durchgeführt werden, um Aussagen über die Stabilität und Haltbarkeit der neuen Emulsion machen zu können.

Zunächst muss eine Methode zur Gehaltsbestimmung etabliert werden. Als Instrument wurde die Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) gewählt. Vor dem routinemäßigen Einsatz einer Gehaltsbestimmungsmethode ist es notwendig, diese zu validieren. Dazu werden verschiedene Prüfungen durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Methode zuverlässig ist und reproduzierbare Werte liefert. Grundpfeiler der Methodenentwicklung in der HPLC sind eine geeignete Probenaufbereitung, die Auswahl von Säulenmaterial und mobiler Phase nach den Eigenschaften der zu analysierenden Substanz und die Festlegung der chromatographischen Bedingungen. Diese sollten im Laufe der Entwicklung so verändert und etabliert werden, dass die Methode möglichst optimal den Anforderungen entspricht.

Im zweiten Schritt ist ein Stabilitätsprogramm ausgearbeitet worden, das orientierend an den internationalen Leitlinien zur Stabilitätsprüfung [22, 23, 24, 25] die Überprüfung der neuen Hormon-Emulsion beinhaltet. Je nach Entwicklungsstand unterscheiden sich Umfang und Inhalt der vorgesehenen Prüfungen. Hier handelt es sich um Beschleunigungs- und Langzeitprüfungen mit einer neu entwickelten Formulierung, die noch keine Zulassung als Arzneimittel hat.

2 Allgemeine Grundlagen

2.1 Medizinischer Hintergrund

Während der Schwangerschaft produziert die Plazenta im Vergleich zu nicht schwangeren Frauen bis zu 100-fach höhere Mengen an 17- β -Estradiol (E2) und Progesteron (P) [5, 6]. Der Fetus wird mit diesen Hormonen versorgt, was möglicherweise für die fetale Entwicklung verschiedener Organsysteme wichtig sein könnte [1, 2, 55]. Nach der Geburt fällt der Spiegel dieser beiden Hormone binnen 24 Stunden bei Mutter und Kind durch den Wegfall der Plazenta stark ab [1, 7, 8].

Extrem kleine Frühgeborene werden im Gegensatz zum reif geborenen Kind zu einem sehr frühen Zeitpunkt ihrer Entwicklung von der Versorgung mit diesen Hormonen abgeschnitten. Basierend auf diesem Hintergrund wurde eine erste Pilotstudie bei Frühgeborenen (< 29 Schwangerschaftswochen) durchgeführt mit dem Ziel, intrauterin vorkommende Plasmakonzentrationen durch eine postnatale Substitution von 17- β -Estradiol und Progesteron aufrechtzuerhalten. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die postnatale Substitution dieser beiden Hormone einen positiven Einfluss auf die Knochenmineralisierung, die Lungenreifung und die neurologische Entwicklung der Frühgeborenen hat [2, 56].

Eine orale Zufuhr von Sexualhormonen ist bei Frühgeborenen wegen der Unreife des Darmes nicht sicher möglich. Außerdem ist bei oraler Applikation mit Nebenwirkungen wie beispielsweise Hypertension und Hyperlipidämie [9] zu rechnen. Deshalb ergibt sich die Notwendigkeit, eine Form der parenteralen Applikation zu finden. In Deutschland sind nur zwei ölige Injektionslösungen zur intramuskulären Verabreichung als Arzneimittel zugelassen und auf dem Markt erhältlich (Estradiol-Depot 10 mg Jenapharm[®] und Progynon[®]-Depot-10, Fa. Schering). Wegen des Depoteffektes von i.m.-Applikationen und der damit schlecht kontrollierbaren Plasmaspiegel sind sie jedoch für Frühgeborene nicht geeignet.

Eine 17- β -Estradiol und Progesteron enthaltende Lösung zur intravenösen Applikation gibt es bisher nicht auf dem Markt. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften der beiden Steroidhormone E2 und P ist es nicht möglich, eine wässrige Lösung zur parenteralen Applikation herzustellen, da sich die Hormone in diesem Medium nicht lösen. In der Apotheke des Universitätsklinikums Ulm wurde daher eine lipophile Formulierung zur intravenösen Gabe entwickelt (Self-Made-Emulsion). Dazu wurde eine 20%ige Fettemulsion (Intralipid[®], Firma Pharmacia & Upjohn) mit Wasser für Injektionszwecke auf 5% Fettgehalt verdünnt und kristalloides 17- β -Estradiol und Progesteron in 98%igem Ethanol gelöst (verdünnt auf die Konzentrationen von 6,6 pg/ml bis 0,17 mg/ml für E2 und 0,4 ng/ml bis 1,25 mg/ml für P [3] je nach Substitutionsmenge) und zur Fettemulsion dazugegeben.

Ein bei der Anwendung zu berücksichtigendes Problem stellt die Adsorption von Steroiden an Kunststoffmaterialien wie beispielsweise Infusionssystemen dar [3, 4]. Die Self-Made-Emulsion zeigte nach Passage durch das Infusionssystem eine Wiederfindungsrate von 80% für E2 und 60% für P [5]. Damit wurde die untere Grenze der angestrebten Plasmakonzentration (E2 2000 pg/ml und P 300 ng/ml) nur zu 64% bzw. 43% erreicht oder überschritten [3]. Aus diesem Grund wurde eine weitere Emulsion entwickelt, die von der Firma B. Braun Melsungen AG hergestellt wurde. 17- β -Estradiol und Progesteron werden in Sojabohnenöl gelöst und das Öl mit Hilfe von Phospholipiden in Wasser emulgiert. Diese Emulsion war Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit.

2.2 Analytik mit Hilfe der HPLC

Das chromatographische Trennverfahren der Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie ist eine Form der Säulenchromatographie, bei der die Analyse mithilfe von Pumpen mit hohem Druck durch die Trennsäule gedrückt wird. Sie eignet sich vor allem für Substanzen, die schwer flüchtig oder nicht flüchtig sind, für stark polare oder ionische Substanzen, für Substanzen mit hohem Molekulargewicht oder thermisch labile und leicht zersetzbare Substanzen. Sie wird u.a. eingesetzt zur Analyse von Arzneistoffen (Bestimmung von Identität und Gehalt), zur Reinheits- und Produktkontrolle von Industrieprodukten, zur Bestimmung von Wirkstoffen in biologischen Matrices, sowie zur Analyse von Schadstoffen [10]. Sie ist das wichtigste Analysenverfahren zur Quantifizierung von Wirkstoffen, wird für analytische Trennungen eingesetzt und kann zugleich Aufschluss über Abbauprodukte geben. Sofern im Labor eine Anlage vorhanden ist, stellt sie einen relativ geringen apparativen und zeitlichen Aufwand dar.

Die Apparatur für dieses Verfahren besteht aus einer Versorgungseinheit mit einem Fließmittelreservoir und einer Pumpe, einer Dosiervorrichtung, der Trennsäule, der eventuell eine Vorsäule vorgeschaltet sein kann, und einem Detektor mit Auswertungssystem. Die Substanzen werden über die Dosiervorrichtung auf die Säule aufgebracht und mit der mobilen Phase, dem Fließmittel, mit konstanter Fließgeschwindigkeit durch die Säule transportiert. Dabei werden die Substanzen im Vergleich zum Fließmittel entsprechend ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften an der stationären Phase festgehalten und können auf diese Weise getrennt werden. Bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während des gesamten Analysenvorganges konstant, so spricht man von isokratischen Bedingungen, wird die mobile Phase im Laufe der Analyse verändert, spricht man von einem Gradienten [11].

Die Trennung selbst erfolgt auf der Säule. Diese enthält die Säulenpackung (Säulenbett), die aus einem dichten Verband von porösen Teilchen, meist Kieselgel (poröses Siliciumoxid), besteht. Das Packungsmaterial kann an der Oberfläche durch chemische Reaktion gezielt verändert werden, so dass es gewissermaßen vom einem dünnen Film überzogen wird. Dieser Film bzw. die Grenzschicht an den Porenwänden der porösen Teilchen wird als stationäre Phase bezeichnet.

Das Fließmittel strömt durch das Volumen zwischen den Körnern und steht in den Hohlräumen der porösen Partikel. Die Verzögerung einer Substanz kommt dadurch zustande, dass diese in der stationären Phase länger verweilt als das Fließmittel. Die Verweildauer wiederum richtet sich nach der Affinität der Substanz zur stationären Phase. Entsprechend der Eigenschaften der zu analysierenden Substanz muss die Wahl der Säule erfolgen. Dabei muss die chemische Struktur der stationären Phase ähnlich der Struktur der Analysesubstanz sein. Kieselgel ist ein hydrophiles Trägermaterial, das an seiner Oberfläche Hydroxylgruppen trägt. Daher ist es zur Analyse von Substanzen mit hydrophilen Eigenschaften geeignet. Um lipophile Substanzen wie z.B. Steroidhormone analysieren zu können, muss das Trägermaterial (Kieselgel) chemisch so verändert werden, dass es an seiner Oberfläche nicht mehr die hydrophilen Hydroxylgruppen, sondern lipophile Kohlenstoffketten trägt. Chemisch modifizierte Kieselgele, die hydrophobe funktionelle Gruppen tragen, werden unter dem Begriff Reversed-Phase-Kieselgele (RP-) zusammengefasst. Die Hydroxylgruppen werden dabei mit einem Silanisierungsreagenz (z.B. n-Octadecyldimethylmonochlorsilan) umgesetzt. Mit zunehmender Kettenlänge der hydrophoben funktionellen Gruppe nimmt der hydrophobe Charakter der stationären Phase zu. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer Umkehrphasen- oder RP-Chromatographie.

Ein wichtiger Bestandteil der Analyse mittels HPLC ist die Probenaufbereitung. Sie bestimmt die Reproduzierbarkeit der Analyse und kann die nachfolgende Trennung erheblich erleichtern. Die Probe wird vom Fließmittel durch das chromatographische System

transportiert und dabei in einzelne Komponenten getrennt. Der Gehalt der Komponenten kann dann bestimmt werden.

Während der Entwicklung einer Methode sind grundsätzlich einige Parameter entscheidend, die mit mehr oder weniger Aufwand verändert werden können, um die Methode zu optimieren. Im Folgenden sollen die einzelnen Parameter kurz erklärt werden. Die stationäre Phase dient zusammen mit der mobilen Phase dazu, die Substanzen in der richtigen Reihenfolge und zum gewünschten Zeitpunkt zu eluieren. Sie werden im Chromatogramm, dem optisch dargestellten Ergebnis, sichtbar. Die Flussrate ist dafür verantwortlich, wie schnell die mobile Phase durch die Säule gepumpt wird. Je nach Flussrate erscheint eine Substanz zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt im Chromatogramm. Die Detektion stellt die Erkennung der Substanzen sicher. In dieser Arbeit wurde ein UV-Spektralphotometer zur Detektion verwendet. Die Erkennung beruht also auf der Absorption des vom Photometer eingestrahlten Lichtes einer bestimmten Wellenlänge. Die Wellenlänge kann dabei verändert werden, so dass die Absorption der Substanz und damit das Signal, das im Chromatogramm erscheint, möglichst groß ist. Schließlich ist es möglich, die Temperatur, bei der die Substanz durch die Säule gepumpt wird, zu verändern. Durch eine Temperaturerhöhung wird die Analysenzeit verkürzt und durch die niedrigere Viskosität der mobilen Phase der Stoffaustausch verbessert. Das Injektionsvolumen (Probenmenge, die auf die Säule aufgebracht wird) muss so gewählt werden, dass Form (Gauß-Form) und Intensität des Signals möglichst geeignet sind und die Säule dennoch nicht überladen ist. Die Säulenkapazität darf durch die aufgetragene Menge Substanz nicht erschöpft sein.

2.3 Validierung einer analytischen Methode

Eine neu entwickelte analytische Methode muss auf ihre Eignung für die beabsichtigte Anwendung hin überprüft werden. Dies erfolgt mit Hilfe der Methodvalidierung, die gewissermaßen den Beleg dafür liefert, dass die Methode für den vorgesehenen Bereich eingesetzt werden kann [12]. Als Grundlage und Orientierung für die Durchführung einer Validierung dienen verschiedene Regelwerke, z.B. die Vorgaben der Europäischen Zulassungsbehörde für Arzneimittel EMEA (European Medicines Evaluation Agency) oder der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA (Food and Drug Administration) [13, 14, 15, 16, 17]. Um die teilweise verschiedenen Anforderungen zu vereinheitlichen, haben sich Vertreter aus Europa, den USA und Japan zusammengeschlossen und allgemein gültige Vorgaben entwickelt. Diese sind in den ICH-Richtlinien (International Conference on Harmonisation) zusammengefasst. Die für die Validierung einer analytischen Methode besonders wichtigen Richtlinien sind ICH Q2A „Text on Validation of Analytical Procedures“ und ICH Q2B „Validation of Analytical Procedures: Methodology“ [18, 19]. In diesen beiden Richtlinien sind die typischen Validierungsparameter, die es zu untersuchen gilt, beschrieben. Für eine Gehaltsbestimmungsmethode sind das die Spezifität, die eine eindeutige Zuordnung des Signals gewährleistet, die Linearität und der lineare Arbeitsbereich (funktionaler Zusammenhang zwischen Mess- und Mengengröße), die Richtigkeit, die Genauigkeit bzw. Präzision, die Robustheit (Ergebnisveränderung bei Variation von Versuchsparametern) und der Systemeignungstest, welcher den jeweils aktuellen Beleg für die Arbeitsfähigkeit des Systems darstellt.

Vor der Durchführung einer Validierung muss zunächst die Methode genau beschrieben sein mit Angaben zu den Analysenparametern wie z.B. verwendete Trennsäule, Zusammensetzung der mobilen Phase, Flussgeschwindigkeit und Angaben zur Herstellung der Standardlösungen und der Probenaufbereitung. Im nächsten Schritt werden im Validierungsplan der Umfang der durchzuführenden Untersuchungen und die jeweiligen Akzeptanzkriterien festgelegt. Der Umfang der Untersuchungen geht aus den ICH-Richtlinien hervor. Er unterscheidet sich je

nach Entwicklungsstufe. Dabei kann die Validierung orientierend (Phase I), vorläufig (Phase II/III) oder vollständig (Registrierung) sein [20]. Bei der Aufstellung der Akzeptanzkriterien müssen sowohl der Stand von Wissenschaft und Technik als auch der Einzelfall berücksichtigt werden [12]. Als Orientierung können Angaben aus der pharmazeutischen Industrie oder von Inspektoraten dienen, welche von behördlicher Seite die Qualifizierung und Validierung in der pharmazeutischen Herstellung und Qualitätskontrolle überprüfen [21].

2.4 Stabilitätsuntersuchungen

Die Grundlage zur Entwicklung des Stabilitätsprogramms sind wie bei der Validierung die Leitlinien der ICH, speziell ICH Q1A „Stability testing of new drug substances and products“ [22, 23]. Sie stellen die Richtlinien für pharmazeutische Hersteller dar. Zusätzliche Orientierung bieten die Anforderungen der Europäischen Union, der USA und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) [24, 25].

Bis in die 70er Jahre gab es keine behördlichen Anforderungen an Inhalt und Umfang von Stabilitätsprüfungen. Erst in den folgenden Jahren wurden Grundlagen definiert, so dass 1985 die erste Stability-Guideline durch die Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik (APV) verfasst wurde. Diese Arbeitsgemeinschaft hat sich eine internationale Standardisierung und Vereinheitlichung der Anforderungen zum Ziel gesetzt. So kam es ab 1987 zur ersten ICH-Konferenz mit Vertretern aus Europa, Japan und den USA. Der Aufwand der Stabilitätsuntersuchungen ist in den einzelnen Entwicklungsstufen unterschiedlich. Es werden zunächst Stress- und Beschleunigungsversuche mit dem Wirkstoff und später mit der ausgewählten Formulierung durchgeführt (Entwicklungsstabilität). Anschließend folgen Beschleunigungs- und Langzeitprüfungen bis zum Zulassungstag, denen eine On-going-Stabilitätsprüfung folgt. Die letzte Stufe stellt die Follow-up-Stabilitätsprüfung dar, die während der laufenden Produktion stattfindet [20]. Dennoch gibt es Grundprinzipien, die in veränderter Ausprägung für alle Entwicklungsstufen gleichermaßen gelten. Diese sind

- Auswahl der Chargen und Prüfmuster
- Festlegung der Chargenzahl
- Prüfparameter, Analysenverfahren und Akzeptanzkriterien aus der Spezifikation
- Lagerungsbedingungen
- Lagerdauer
- Untersuchungsfolge
- Auswertung eventuell verbunden mit einer Haltbarkeitsaussage.

3 Analytische Betrachtungen: Gehaltsbestimmungsmethode für 17- β -Estradiol und Progesteron in einer Fettemulsion mittels HPLC

Auf der Grundlage von Angaben aus dem amerikanischen Arzneibuch (USP, U.S. Pharmacopeia) [26] wurde zunächst eine Methode erarbeitet, die dann im Laufe der Untersuchungen optimiert wurde. Auf diese Weise sind zwei Methoden entstanden, die im Folgenden unter Methode A und Methode B näher beschrieben werden sollen. Alle verwendeten Reagenzien und Geräte sind im Anhang in der Reagenzien- und Geräteliste (siehe Kapitel 8.6.1 und 8.6.2) aufgeführt.

3.1 Methode A

3.1.1 Methodenentwicklung

Es wurde mit einer HPLC-Anlage der Firma Sykam gearbeitet, die mit einem automatischen Probengeber und einem variablen UV-Spektralphotometer zur Detektion ausgestattet ist. Die Ausgangssituation der Methodenentwicklung stellen leicht verändert die Angaben zur Gehaltsbestimmung mittel HPLC aus den in der USP beschriebenen Applikationen für die Substanzen 17- β -Estradiol und Progesteron dar [26]. Für die möglichst optimale Analyse des Gehalts der beiden Arzneistoffe aus der neuen Hormon-Emulsion müssen die Bedingungen jedoch individuell verändert und ausprobiert werden. Bei der Säulenwahl sind die lipophilen Eigenschaften der nicht flüchtigen Substanzen 17- β -Estradiol und Progesteron zu berücksichtigen. Ihre chemische Struktur ist in Abbildung 1 dargestellt.

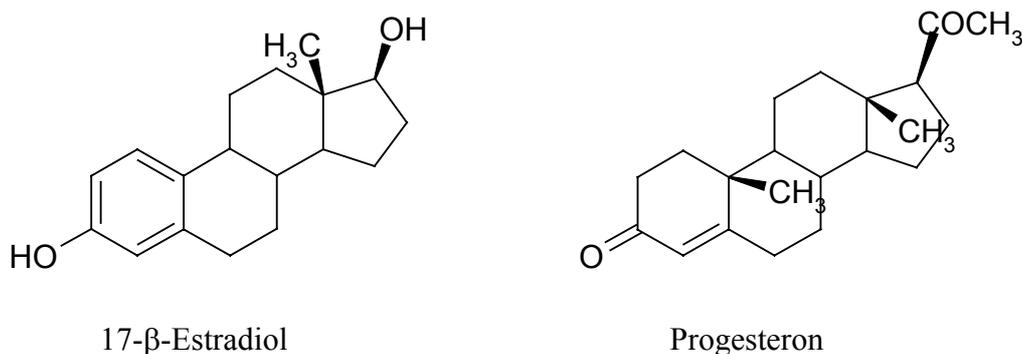


Abbildung 1: Strukturformel von 17- β -Estradiol und Progesteron

Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von 17- β -Estradiol und Progesteron wurde eine RP-Säule verwendet. Die genauen Angaben zur eingesetzten Säule sowie deren Bezugsquelle finden sich im Anhang in der Geräteliste. Während der Methodenentwicklung wurden die Fließmittelzusammensetzung, die Wellenlänge, bei der die Substanzen detektiert werden, die Säulentemperatur, die Flussrate, mit der die Probe durch das System gepumpt wird, die Analysenzeit und das Injektionsvolumen variiert. Nachfolgend wird die Entwicklung exemplarisch anhand einiger Beispiele dargestellt.

Eine Messung unter den in Tabelle 1 aufgeführten Analysenbedingungen ergab das Chromatogramm in Abbildung 2.

Trennsäule	Nucleosil 120 C18, 3 μm , 125x4,6 mm
Mobile Phase	Acetonitril / Wasser 1:1; isokratisch
Flussrate	1,5 ml/min
Messwellenlänge	280 nm für 17- β -Estradiol und 240 nm für Progesteron
Säulentemperatur	40 °C
Injektionsvolumen	10 μl
Analysenzeit	10 Minuten

Tabelle 1: HPLC-Analysenparameter der Ausgangseinstellungen

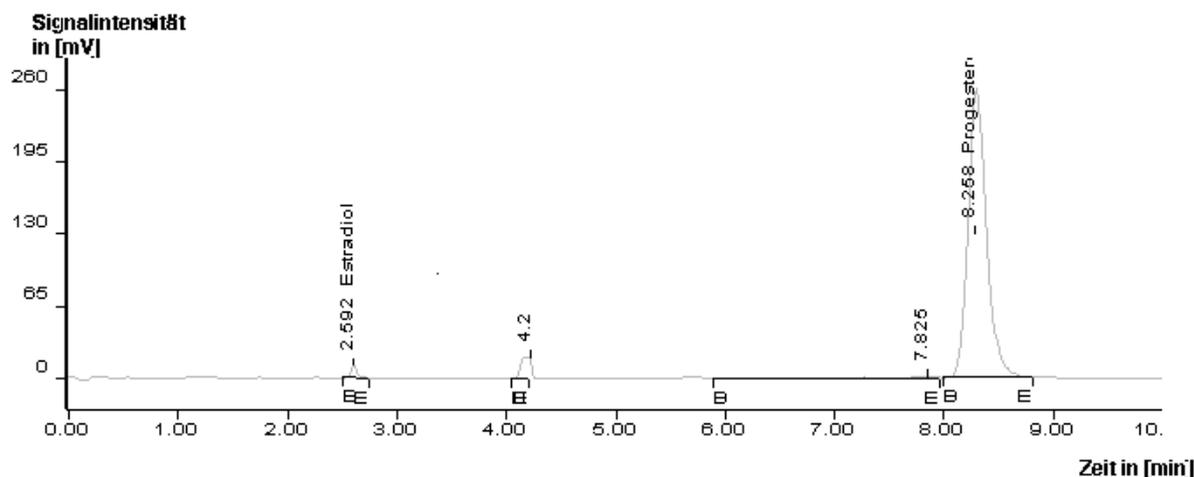


Abbildung 2: Chromatogramm von 17- β -Estradiol mit Detektion bei 280 nm und von Progesteron bei 240 nm, mobile Phase: ACN / H₂O 1:1

Abbildung 2 zeigt das Signal für 17- β -Estradiol bei 2,59 Minuten mit einer relativ kleinen Intensität von ca. 15 mV und das Signal für Progesteron bei 8,25 Minuten mit ca. 260 mV. In der Probelösung ist Progesteron zwar in zehnfach höherer Konzentration als 17- β -Estradiol enthalten, dennoch ist das Verhältnis der Signalintensitäten nicht ausgewogen, da diese für 17- β -Estradiol sehr gering ist. Damit ist die Gehaltsbestimmung anfälliger für mögliche Fehler. Die Veränderung der Basislinie bei 4,2 Minuten kommt durch die Wellenlängenschaltbox zustande, mit deren Hilfe der erste Teil der Analyse (17- β -Estradiol) bei 280 nm und der zweite Teil (Progesteron) bei 240 nm vermessen werden kann.

Um die geringe Signalintensität für 17- β -Estradiol zu verbessern, wurde zunächst die Messwellenlänge für 17- β -Estradiol von 280 nm auf 220 nm verändert. 17- β -Estradiol weist laut Dibbern-Atlas für UV- und IR-Spektren [27] bei 280 nm ein Maximum auf, bei 220 nm jedoch eine noch größere Absorption. Abbildung 3 zeigt die Veränderung. Die übrigen Bedingungen entsprechen denen aus Tabelle 1. Es konnte eine deutliche Vergrößerung des Signals für 17- β -Estradiol erzielt werden.

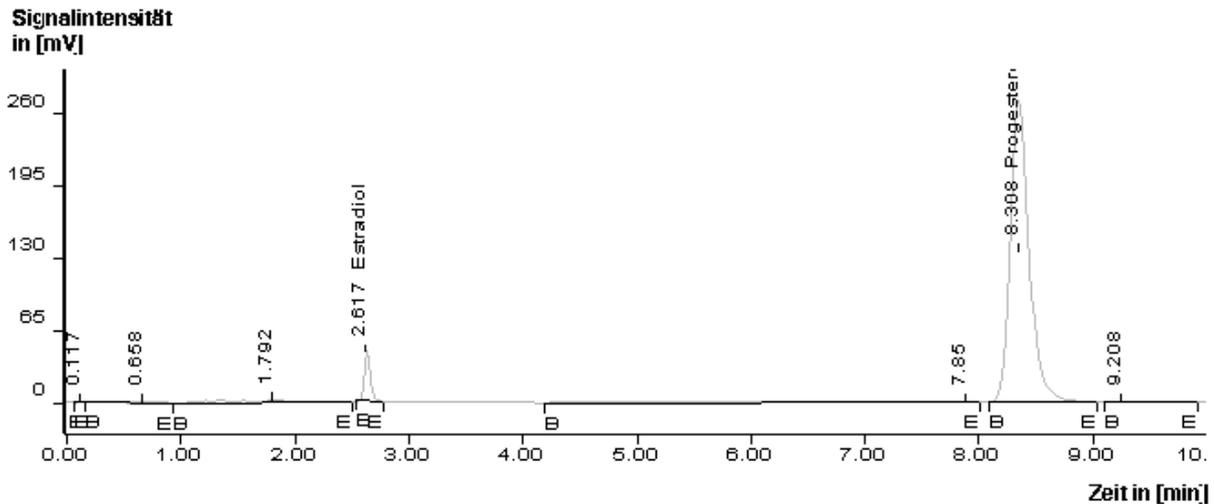


Abbildung 3: Chromatogramm von 17- β -Estradiol bei 220 nm und Progesteron bei 240 nm, mobile Phase: ACN / H₂O 1:1

In einem weiteren Schritt wurde durch eine Variation der mobilen Phase versucht, die Retentionszeiten der beiden Substanzen zu optimieren. Je nach Grad der Affinität der mobilen Phase (auch als Stärke des Fließmittels bezeichnet [11]) zu den apolaren Kohlenstoffketten des Packmaterials in der RP-Säule werden die Substanzen früher oder später eluiert. Ein starkes Fließmittel mit großer Affinität zu den Kohlenstoffketten tritt in hohem Maße mit der stationären Phase in Wechselwirkung. Es blockiert freie Plätze für 17- β -Estradiol und Progesteron, so dass diese weniger in Wechselwirkung mit der stationären Phase treten können und folglich früher eluiert werden. In der RP-Chromatographie ist Wasser das schwächste Elutionsmittel. Es kann die apolaren Kohlenstoffketten der stationären Phase nicht benetzen und in keinerlei Wechselwirkung mit ihnen treten. Lipophile Substanzen können deshalb durch Wasser kaum von der lipophilen Oberfläche der Säule verdrängt werden. Apolare Lösungsmittel sind stärkere Elutionsmittel und verdrängen die lipophilen Substanzen von der Säule. Folglich werden sie früher eluiert, wodurch die Retentionszeit verkürzt wird. Ziel ist es nun, eine Fließmittelmischung zu finden, die beide Substanzen 17- β -Estradiol und Progesteron möglichst optimal eluiert. Dabei sollte der Peak der zuerst eluierten Substanz (17- β -Estradiol) möglichst zwischen 3 und 5 Minuten liegen, um sie von den Lösungsmittelpeaks der ersten Minuten zu trennen und klar erfassen zu können. Die zweite Substanz (Progesteron) sollte ca. 3 bis 5 Minuten später eluiert werden, damit die Gesamtanalysenzeit nicht zu lange ist, beide Substanzen aber gut getrennt sind und somit analysiert werden können.

Die in der RP-Chromatographie am häufigsten verwendete mobile Phase ist ein Gemisch aus Acetonitril (ACN) und Wasser oder Methanol (MeOH) und Wasser [10, 11]. Dabei ist es von Vorteil, wenn sich die Probe im Fließmittel löst. Dies stellt für die vorliegende Analyse ein Problem dar, da die Hormon-Emulsion weder in einem Wassergemisch von ACN und MeOH noch in den reinen Lösungsmitteln selbst eine klare Lösung ergibt. Die Lösungseigenschaften der einzelnen Bestandteile wurden in Versuchen ermittelt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Lösungsmittel	17-β-Estradiol	Progesteron	Hormon-Emulsion
Isopropanol 99 %	ja	ja	ja
Ethanol 99 %	wenig löslich	ja	nein (zwei Phasen)
Aceton	ja	wenig löslich	nein (zwei Phasen)
Acetonitril	wenig löslich	ja	nein (trübe „Lösung“)
Methanol	ja	ja	nein (Emulsion)
Ethylacetat	wenig löslich	ja	nein (trübe „Lösung“)
Hexan	nein	schwer löslich	nein
Pentan	nein	nein	nein
ACN/H ₂ O (1:1)	nein	Ja	nein (Emulsion)
ACN/H ₂ O/Iso 99 % (4:5:1)	nein	ja	nein (Emulsion)
Tetrahydrofuran (THF)	ja	ja	ja
Dimethylsulfoxid	ja	ja	ja

Tabelle 2: Löslichkeitstabelle

Das geeignetste Lösungsmittel für die Substanzen 17-β-Estradiol, Progesteron und die Hormon-Emulsion ist Isopropanol. Als mobile Phase ist es alleine jedoch nicht geeignet, beide Substanzen wie oben beschrieben optimal zu trennen. In diesem Fall ist es folglich nicht möglich, eine geeignete mobile Phase zu finden, in der sich die Probe löst. Deshalb wurde eine mobile Phase gesucht, die optimal eluiert, und ein Lösungsmittel, in dem sich die Emulsion löst (Isopropanol).

Um eine spätere Elution von 17-β-Estradiol zu erhalten, wurde der Wassergehalt der mobilen Phase um 10 % erhöht (ACN / H₂O 45:55) und die Analysenzeit damit auf 15 Minuten verlängert. Die verbleibenden Analysenparameter wurden bis auf die Messwellenlänge für 17-β-Estradiol (von 280 nm auf 220 nm) nicht verändert (siehe Tabelle 1). Das Ergebnis dieser erneuten Messung ist in Abbildung 4 dargestellt.

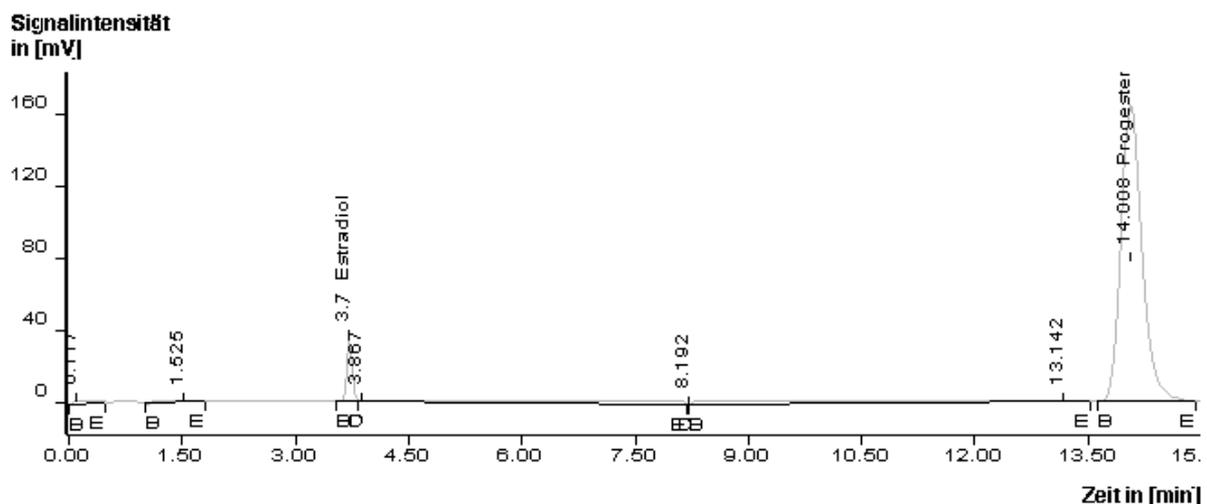


Abbildung 4: Chromatogramm von 17-β-Estradiol bei 220 nm und Progesteron bei 240 nm, mobile Phase: ACN / Wasser 45:55

Die Retentionszeit von 17-β-Estradiol liegt mit 3,7 Minuten im oben beschriebenen Bereich. Allerdings ist die Gesamtanalysenzeit mit 15 Minuten und vor allem auch der Abstand von

über 10 Minuten zwischen den beiden Substanzen zu lang. Zur Verbesserung wurde eine Mischung aus Acetonitril, Wasser und Isopropanol in verschiedener Zusammensetzung ausprobiert. Als beste Mischung erwies sich ein Verhältnis von 4:5:1 für Acetonitril, Wasser und Isopropanol. Die restlichen Analysenparameter wurden bis auf die Messwellenlänge von 220 nm für 17- β -Estradiol nicht verändert (siehe Tabelle 1). Das Ergebnis ist in Abbildung 5 zu sehen.

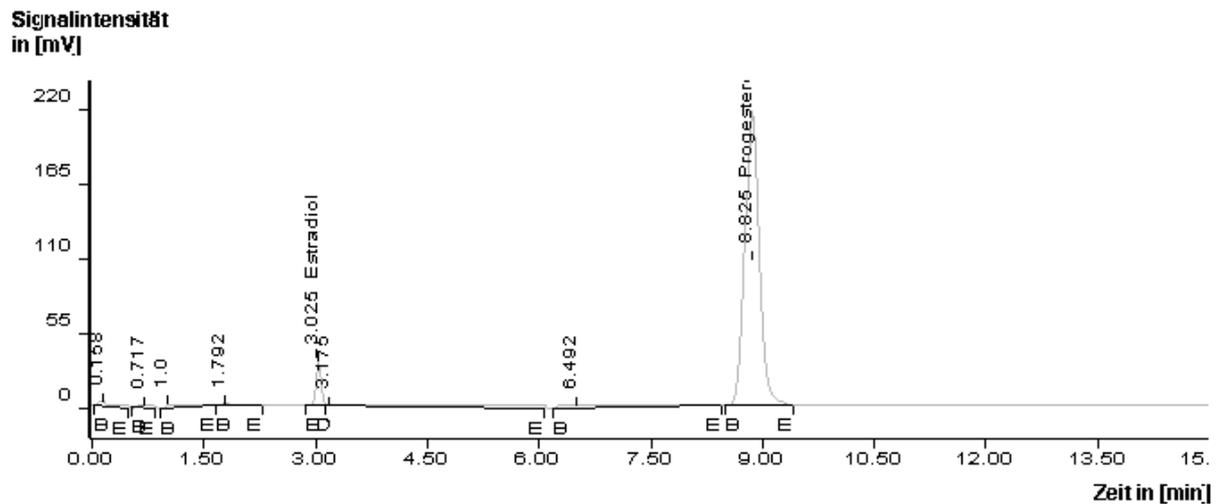


Abbildung 5: Chromatogramm von 17- β -Estradiol bei 220 nm und Progesteron bei 240 nm, mobile Phase: ACN/Wasser/Isopropanol 4:5:1

Die Verwendung von Methanol in der mobilen Phase wurde ebenfalls getestet. Verglichen mit der Fließmittelmischung von Acetonitril, Wasser und Isopropanol bringt das Gemisch mit Methanol jedoch keinen Vorteil. Als mobile Phase wurde deshalb fortan mit Acetonitril, Wasser und Isopropanol im Verhältnis von 4:5:1 gearbeitet.

Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 45 °C wurde versucht, die Retentionszeiten noch zu verkürzen. Zusätzlich wurde zur Vereinfachung die Messwellenlänge für beide Substanzen auf 230 nm festgelegt. Die letztendlich gewählten Analysenbedingungen für Methode A sind in Tabelle 3 und das damit erzielte Chromatogramm in Abbildung 6 dargestellt.

Trennsäule	Nucleosil 120 C18, 3 μ m, 125x4,6 mm
Mobile Phase	Acetonitril, Wasser, Isopropanol 4:5:1; isokratisch
Flussrate	1,5 ml/min
Messwellenlänge	230 nm
Säulentemperatur	45 °C
Injektionsvolumen	10 μ l
Analysenzeit	10 Minuten

Tabelle 3: Gewählte Analysenparameter für die Gehaltsbestimmungsmethode A

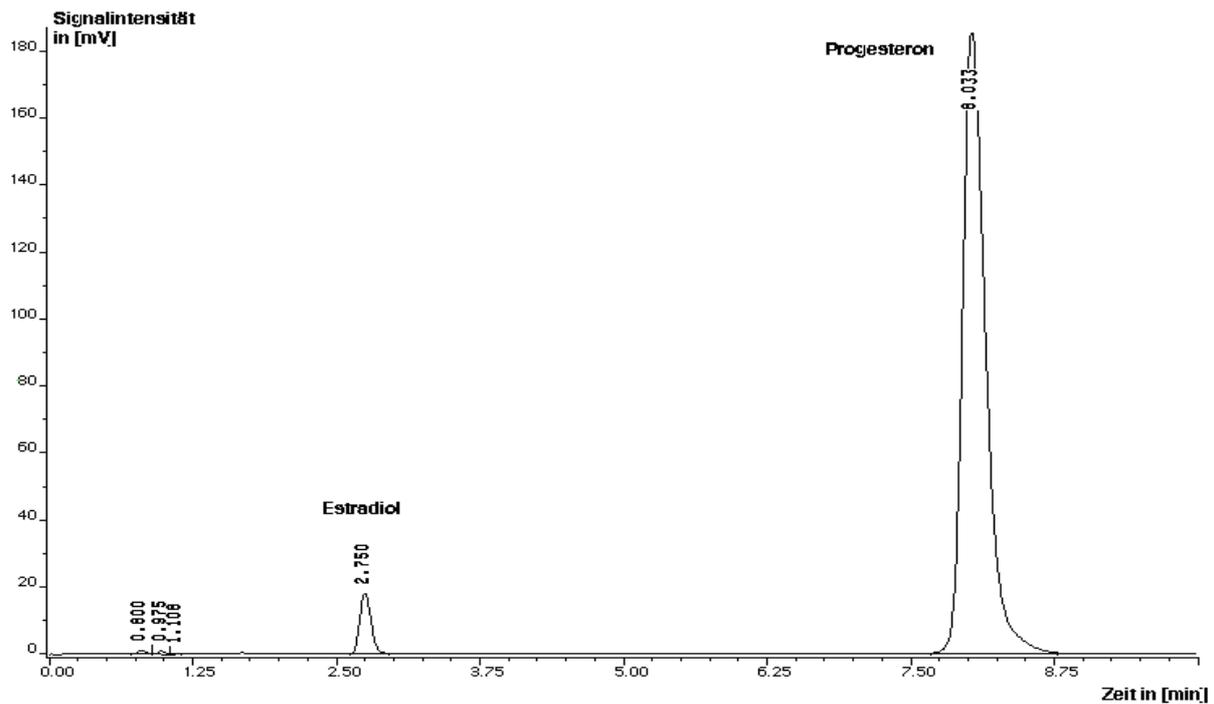


Abbildung 6: Chromatogramm von 17- β -Estradiol und Progesteron mit den für die Gehaltsbestimmungsmethode A gewählten Bedingungen¹

3.1.2 Methodenbeschreibung

Unter 3.1.1 wurde die Entwicklung der Methode A dargestellt. Hier soll nun die Methode A beschrieben werden, wie sie in dieser Arbeit nach der Entwicklung Anwendung gefunden hat. Die verwendeten HPLC-Analysenparameter zeigt Tabelle 3.

3.1.2.1 Herstellung der mobilen Phase

Die mobile Phase ist eine Mischung aus Acetonitril, Wasser und Isopropanol im Verhältnis 4:5:1. Das Fließmittel wird vor der Anwendung zunächst drei bis fünf Minuten mit Helium begast, um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen.

3.1.2.2 Herstellung von Stammlösung und Standardreihe

Zur Herstellung der Standard-Stammlösung (nachfolgend als Stammlösung A bezeichnet) werden 0,0264 g 17- β -Estradiol abgewogen und mit Hilfe eines Glastrichters in einen 100 ml Messkolben überführt. Anschließend werden 0,240 g Progesteron abgewogen, in denselben 100 ml Messkolben gegeben und mit Isopropanol auf ca. 50 ml aufgefüllt. Um den Lösungsvorgang der beiden Stoffe zu beschleunigen, wird der Messkolben ca. 1 Minute in ein Ultraschallbad gestellt (keine Erwärmung). Danach wird mit Isopropanol auf 100 ml aufgefüllt. Die Konzentration dieser Standard-Stammlösung beträgt für 17- β -Estradiol 0,264 mg/ml und für Progesteron 2,4 mg/ml.

Diese Stammlösung A wird zur Erstellung einer Standardreihe (Verdünnungsreihe) aus unterschiedlichen Konzentrationen nach dem in Tabelle 4 gezeigten Schema weiterverdünnt. Verwendet wurde eine variable 1000 μ l Eppendorfpipette. Die Messkolben werden gut geschüttelt. Es wird jeweils ca. 1 ml entnommen und in ein HPLC-Vial überführt. Die auf

¹ Optische Veränderung der Chromatogrammdarstellung gegenüber den ersten Schritten der Methodenentwicklung durch eine neue Software (siehe Geräteliste).

diese Weise hergestellten Lösungen werden nachfolgend als Standardlösung A 50 % bzw. 100 % usw. bezeichnet. Es wurde genau diese Konzentration für die Standard-Stammlösung gewählt, damit sie sich einfach zur Standardlösung A 100 % weiter verdünnen lässt und der Konzentration der aufbereiteten Probe (siehe Kapitel 3.1.2.3) entspricht.

Für die Probenbestimmung wurde täglich eine neue Kalibriergerade erstellt, die sich aus drei Punkten, 90 %, 100 % und 110 % bezogen auf die aufbereitete Probe, zusammensetzt.

Konzentration [%] bezogen auf die aufbereitete Probe	Konzentration 17- β -Estradiol [mg/ml]	Konzentration Progesteron [mg/ml]	Stammlösung A [μ l]	Verdünnung mit Isopropanol in einem Messkolben auf [ml]
50	0,01320	0,120	500	10,0
70	0,01848	0,168	700	10,0
80	0,02112	0,192	800	10,0
90	0,02376	0,216	900	10,0
100	0,02640	0,240	1000	10,0
110	0,02904	0,264	1100	10,0
120	0,03168	0,288	1200	10,0
130	0,03432	0,312	1300	10,0

Tabelle 4: Herstellung einer Standardreihe nach Methode A

3.1.2.3 Zusammensetzung der Probe und Probenaufbereitung

Die zu untersuchende neu entwickelte Hormon-Emulsion, hergestellt durch die Firma B. Braun Melsungen AG, ist wie folgt zusammengesetzt:

Estradiol-Hemihydrat (Ph.Eur)	0,660 g
Progesteron (Ph.Eur.)	6,000 g
Sojabohnenöl	200,00 g
Eilecithin	12,00 g
Glycerol	25,00 g
Natriumoleat	0,300 g
Wasser für Injektionszwecke ad	1000 ml

Zur Probenaufbereitung wird die Analysenprobe verdünnt, damit sie in die HPLC-Anlage als klare Lösung eingespritzt werden kann. Als beste Konzentration hat sich eine Verdünnung von 400 μ l Emulsion auf 10 ml Isopropanol erwiesen. Die Konzentration dieser Lösung beträgt für 17- β -Estradiol 0,0264 mg/ml und für Progesteron 0,24 mg/ml. Wird mehr als 400 μ l Emulsion verwendet, so ergibt die Verdünnung auf 10 ml keine klare Lösung mehr; wird weniger verwendet, so wird die ohnehin schon geringe Intensität des 17- β -Estradiol-Peaks im Chromatogramm der Probelösung A noch geringer und damit fehleranfälliger. Es wird ca. 1 ml der verdünnten, klaren Lösung (Probelösung A) in ein HPLC-Vial gegeben.

3.1.2.4 HPLC-Bedingungen

Die Analysenparameter wurden bereits in Tabelle 3, Kapitel 3.1.1 beschrieben. Zu beachten ist allerdings, dass sowohl die Trennsäule als auch die gesamte HPLC-Anlage durch die Probenaufbereitung, bei der die Hormon-Emulsion lediglich verdünnt wird, mit Triglyceriden (Fetten) aus der Probe verunreinigt wird. Dies stellt in der Methodenentwicklung ein

erhebliches Problem dar, da die Triglyceride die apolaren Kohlenstoffketten der stationären Phase belegen und sich zum Teil auch an anderen Stellen der HPLC-Anlage ablagern. Mögliche Folgen sind beispielsweise ein Zusetzen des Injektionssystems, so dass kein gleichmäßiges Einspritzen der Probelösung mehr möglich ist, eine Schwankung der Fließgeschwindigkeit, mit der die Probe durch das System gepumpt wird, oder die Verschleppung der Substanzen, so dass die darauffolgende Analyse kein exaktes Ergebnis liefert [10, 42]. Als Lösungsansatz für dieses Problem wurde versucht, einen geeigneten Spülschritt zu etablieren. Wie in Tabelle 2 dargestellt, kommen als Lösungsmittel Isopropanol oder Tetrahydrofuran (THF) in Frage. Da sich Isopropanol als zu wenig effektiv erwies, wurde mit THF gearbeitet. Als Spülschritt wird nach jeder Injektion und sowohl vor als auch nach jedem Vial das Injektionssystem mit THF zweifach gespült. Nach jedem Probenvial ist ein Spülvial mit THF einzusetzen, das zweifach eingespritzt wird. Zusätzlich muss das System nach ca. 10 Messungen durch fünfmalige Injektion von 50 µl THF gereinigt werden, wobei der Spülvorgang nach jeder Injektion und jedem Vial erhalten bleibt. Nach 50-70 Probenmessungen wird das komplette System mit THF als Fließmittel bei einer Flussrate von 1,5 ml/min ca. 20-30 Minuten gespült. Um die Lebensdauer der Trennsäule durch die Verunreinigung mit Triglyceriden nicht allzu sehr herabzusetzen, wird ihr eine Vorsäule vorgeschaltet. Die Vorsäule sollte nach einem Probendurchsatz von ca. 50 bis 60 Proben ausgetauscht werden.

3.1.2.5 Auswertung

Die Auswertung der Analyse mit einem externen Standard bestehend aus einzelnen Standardkonzentrationen, die in einer Kalibriergeraden zusammengefasst sind, erfolgt über die ChromStar light 6.0 Software der HPLC-Anlage der Firma Sykam. Die Fläche der einzelnen Peaks wird mit Hilfe des Programms errechnet und mit der Fläche der Standardpeaks verglichen, deren Konzentration bekannt ist. So kann über die Größe der errechneten Fläche des Probenpeaks der Gehalt der Probe bestimmt werden. Näheres dazu ist im Anhang in Kapitel 8.2 zu finden.

3.1.3 Vorgaben zur Validierung

In diesem Abschnitt werden der festgelegte Umfang für die Validierung der neu entwickelten Methode A und die Akzeptanzkriterien der einzelnen Validierungsparameter dargestellt. Als Entscheidungsgrundlage dienen die Angaben in der Literatur, wobei die Validierung dem Entwicklungsstand gemäß als eine vorläufige eingestuft wurde (siehe Kapitel 2.3) [30,21].

3.1.3.1 Spezifität

Es soll mit einem repräsentativen Chromatogramm die chromatographische Auflösung der einzelnen Komponenten gezeigt werden. Dies bedeutet, dass die zu analysierenden Peaks gut voneinander getrennt sind. Dazu wird der Kapazitätsfaktor k' bestimmt, der die Retentionszeit in einer dimensionslosen, vergleichbaren Größe angibt. So können Retentionszeiten von Substanzen, deren Chromatogramme mit Säulen unterschiedlicher Länge und Durchmesser bei anderen Fließgeschwindigkeiten ermittelt wurden, verglichen werden. k' wird wie in Formel 1 dargestellt berechnet [28]. Um die Spezifität gewährleisten zu können, sollte $k' > 1$ sein.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Formel 1: Ermittlung des Kapazitätsfaktors k'

Erläuterung zu Formel 1:

k' : Kapazitätsfaktor

t_R : Retentionszeit der Substanz in Minuten

t_0 : Totzeit: Zeit, die das Fließmittel oder eine nicht verzögerte Substanz braucht, um durch die Trennsäule zu wandern.

3.1.3.2 Linearität und linearer Bereich

Zur Überprüfung der Linearität sind mindestens 5 verschiedene Standardkonzentrationen in äquidistanter Verteilung zum späteren Analysenergebnis gefordert. Die Messergebnisse müssen linear zu den Konzentrationen der Standards sein, d.h. sie müssen auf einer Kalibriergeraden liegen. Der lineare Bereich muss die Spanne abdecken, in der ein Messwert erwartet wird, wenigstens jedoch die Spanne von 80-120 % des Sollwertes. Der Korrelationskoeffizient der Kalibriergeraden sollte dabei $\geq 0,99$ sein.

3.1.3.3 Richtigkeit durch Wiederfindung

Die Richtigkeit soll über den ermittelten Arbeitsbereich (linearer Bereich) des Analysenverfahrens abgesichert werden. In diesem Fall wird sie durch Zugabe einer bekannten Wirkstoffmenge zur Matrix in mindestens drei verschiedenen Konzentrationen, z.B. 80 %, 100 % und 120 %, überprüft. Dabei sollte die Wiederfindungsrate zwischen 95 % und 105 % liegen.

3.1.3.4 Präzision

Mit Hilfe der Präzision wird beschrieben wie genau das System, das Gerät und die Methode arbeiten. Entsprechend kann von der System-, Geräte- und Methodenpräzision gesprochen werden. Die Systempräzision wird durch mindestens sechs Standardlösungen und deren Analyse abgesichert. Es gilt die Vorgabe, dass der Variationskoeffizient < 2 % betragen sollte. Die Gerätepräzision wird durch wiederholte Messung eines aufgearbeiteten Standards oder einer Probe ermittelt. Der Variationskoeffizient sollte < 1 % sein. Zum Nachweis der Methodenpräzision wird die Wiederholbarkeit des gesamten Analysenvorgangs ausgehend von derselben homogenen Probe durch Mehrfachbestimmung von mindestens sechs Analysen durchgeführt. Das bedeutet, dass die Probe sechsmal aufbereitet und gegen den Standard vermessen wird. Der Variationskoeffizient der sechs Einzelbestimmungen sollte dabei < 2 % betragen.

3.1.3.5 Robustheit

Die Robustheit einer Methode zeigt deren Anfälligkeit gegenüber kleinen Veränderungen einzelner Analysenparameter wie beispielsweise Flussrate, Säulentemperatur, Zusammensetzung der mobilen Phase usw.. Um sie zu überprüfen, werden kleine Änderungen der Analysenparameter vorgenommen und die Probe unter den jeweils geänderten Bedingungen vermessen. Die Hauptpeaks müssen in Form und Lage der ursprünglichen Analyse entsprechen.

3.1.4 Validierung

3.1.4.1 Spezifität

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen ein typisches Chromatogramm für 17- β -Estradiol und Progesteron aus einer Standardlösung A 100 % und einer Probelösung A aufgenommen mit Methode A. Der Kapazitätsfaktor k' beträgt für 17- β -Estradiol 2,4 und für Progesteron 8,9 (berechnet nach Formel 1, Kapitel 3.1.3.1). Die Retentionszeiten sind für den Injektionspeak

0,75 Minuten (min), für 17- β -Estradiol 2,58 min und für Progesteron 7,42 min. Der Injektionspeak stellt die mobile Phase dar, der Lösungsmittelpeak von Isopropanol ist bei 0,93 min zu beobachten. In Abbildung 9 ist eine Blindprobe dargestellt, die nur das Lösungsmittel Isopropanol enthält, Abbildung 10 zeigt die Matrix der Probe, welche mit Lipovenös® 20 % ermittelt wurde. Beim Betrachten der Abbildungen 8 bis 10 ist auf die unterschiedliche Skalierung der y-Achse zu achten. Die Hauptpeaks werden nicht durch Lösungsmittel- oder Matrixpeaks überlagert. Die Methode ist für 17- β -Estradiol und Progesteron spezifisch.

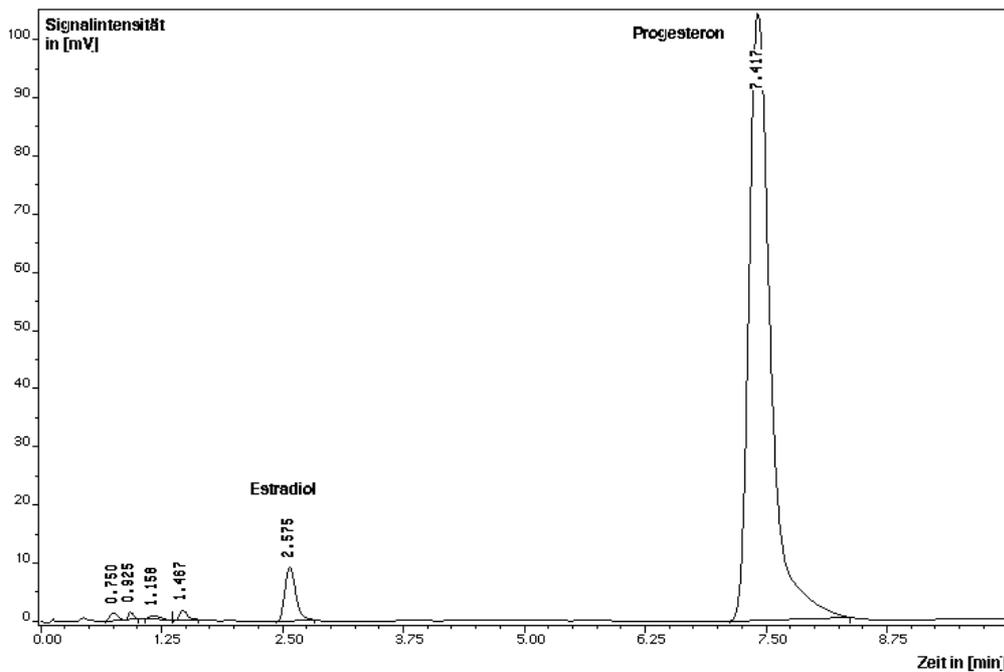


Abbildung 7: Chromatogramm von 17- β -Estradiol und Progesteron in Standardlösung A 100 %

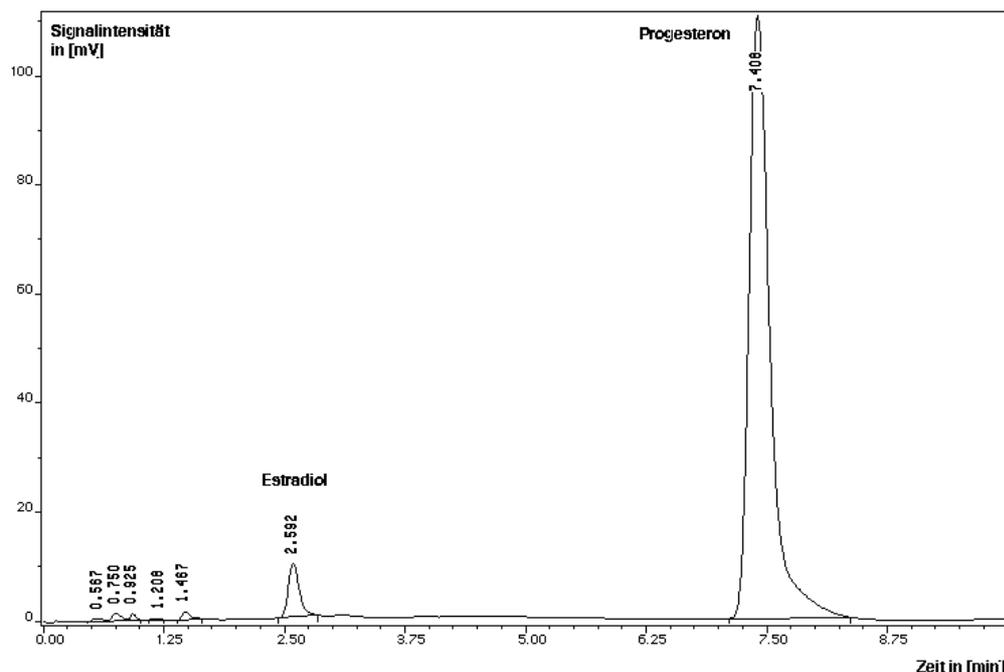


Abbildung 8: Chromatogramm von 17- β -Estradiol und Progesteron in Probelösung A

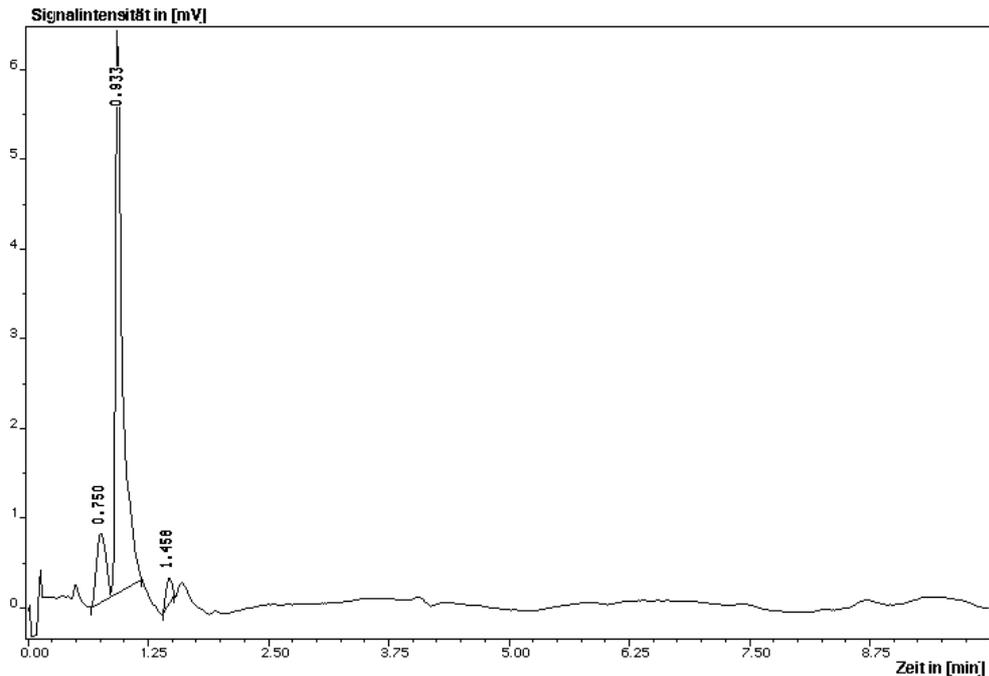


Abbildung 9: Chromatogramm der Blindprobe mit reinem Lösungsmittel Isopropanol (Methode A)

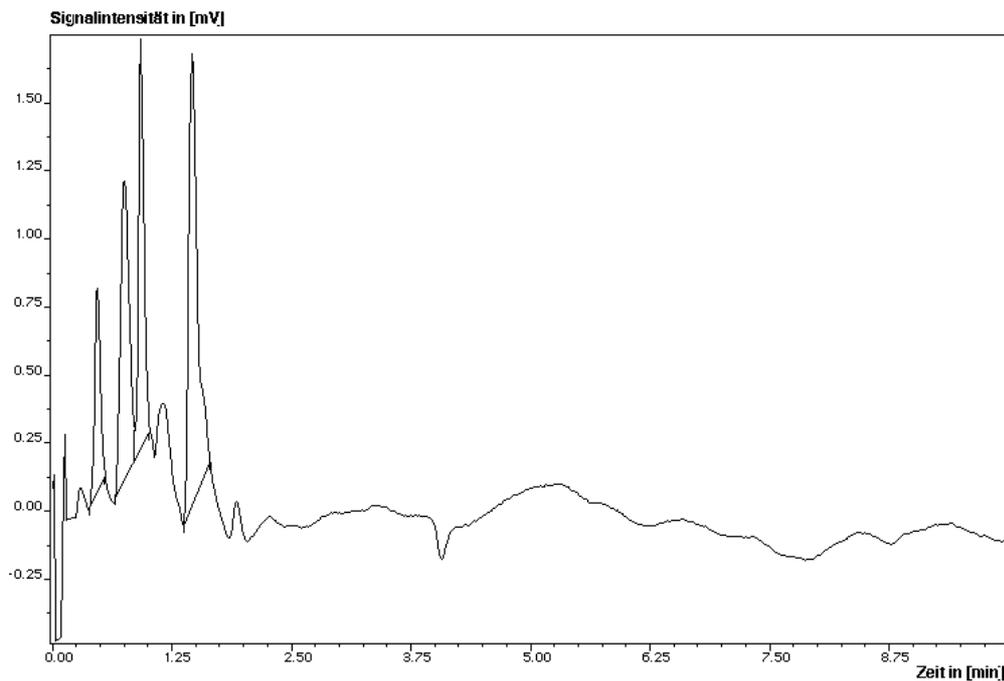


Abbildung 10: Chromatogramm der Matrix Lipovenös® 20% (Methode A)

3.1.4.2 Linearität und linearer Bereich

3.1.4.2.1 Linearität des Standards (Linearität des Systems)

Der lineare Zusammenhang zwischen der Konzentration von 17- β -Estradiol und Progesteron in der Standardlösung und der ermittelten Peakfläche wurde durch eine Reihe von

Standardlösungen unterschiedlicher Konzentrationen ermittelt, die nach dem unter 3.1.2.2 beschriebenen Verfahren hergestellt wurden. Wie die Abbildungen 11 und 12 zeigen, wurde ein linearer Zusammenhang beobachtet. In Tabelle 5 sind die ermittelten Daten und die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden für 17- β -Estradiol und Progesteron dargestellt. Der lineare Bereich erstreckt sich von 50 bis 130 % bezogen auf die Konzentration in der aufbereiteten Probe.

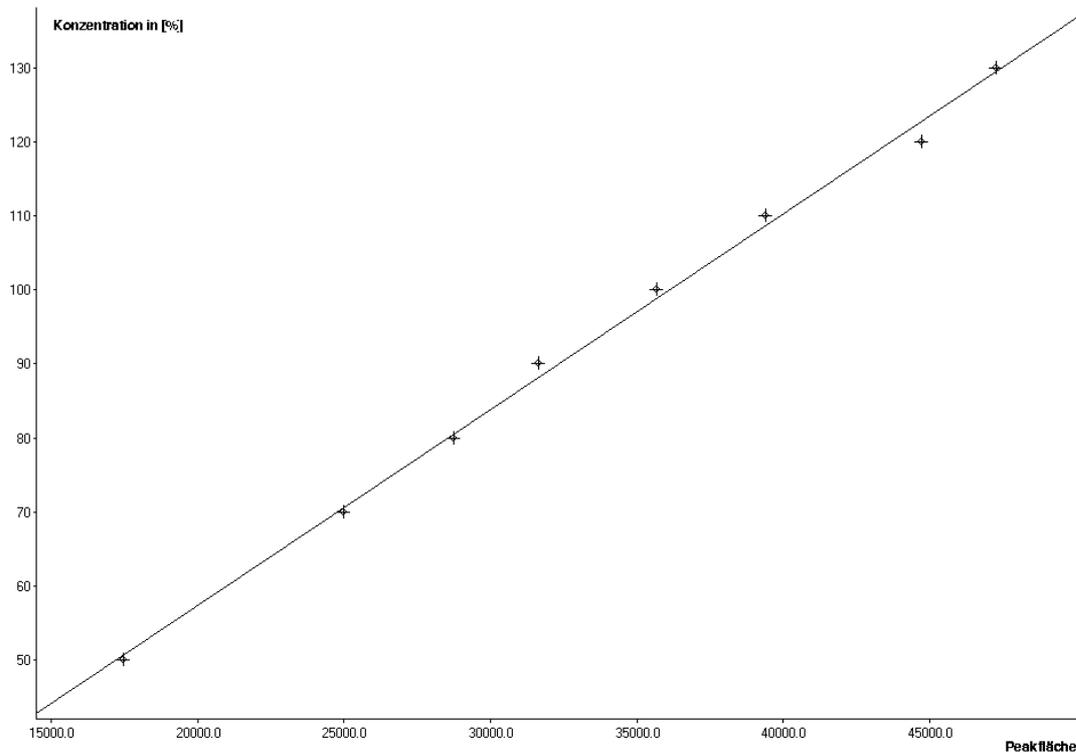


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Linearität von 17- β -Estradiol in der Verdünnungsreihe von Standardlösung A

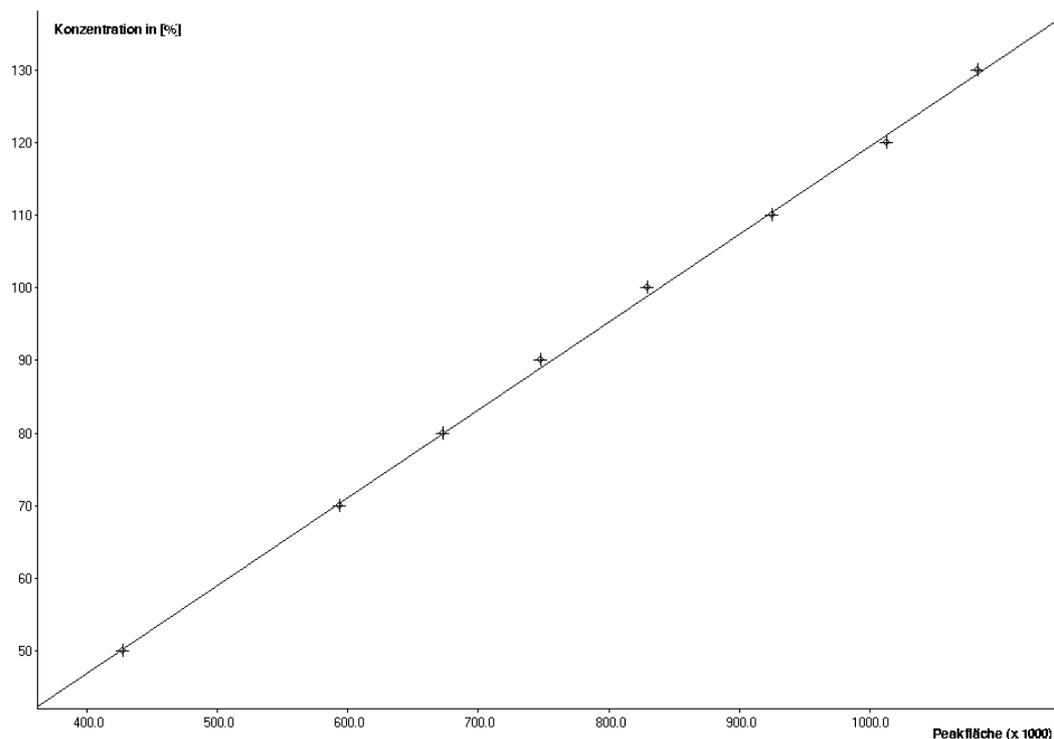


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Linearität von Progesteron in der Verdünnungsreihe von Standardlösung A

Konzentration [%] bezogen auf die aufbereitete Probe	Konzentration 17- β -Estradiol [mg/ml]	Fläche 17- β -Estradiol [msmV]	Konzentration Progesteron [mg/ml]	Fläche Progesteron [msmV]
50	0,01320	17453	0,120	427650
70	0,01848	24970	0,168	594108
80	0,02112	28734	0,192	672673
90	0,02376	31661	0,216	747886
100	0,02640	35670	0,240	829789
110	0,02904	39392	0,264	924975
120	0,03168	44714	0,288	1012666
130	0,03432	47293	0,312	1082507
Korrelationskoeffizient nach Pearson		0,998501		0,999610
Schnittpunkt mit der y-Achse		4,5561		-1,4667
Steigung der Geraden		0,0026439		0,00012106

Tabelle 5: Linearität von 17- β -Estradiol und Progesteron in der Verdünnungsreihe von Standardlösung A

3.1.4.2.2 Linearität der gespickten Matrix (Linearität der Methode)

Zur Matrix der Hormon-Emulsion (Lipovenös® 20%) wurde eine definierte Menge der Wirkstoffe gegeben (gespickte Matrix) und diese gegen den Standard vermessen. Dafür

wurden 0,0132 g 17- β -Estradiol und 0,120 g Progesteron abgewogen und in 2 ml Isopropanol in einem 20 ml Messkolben mit Hilfe des Ultraschallbades gelöst. Die Lösung wurde auf 20 ml mit Lipovenös® 20 % aufgefüllt. Die auf diese Weise hergestellte Stammemulsion hat eine Konzentration von 0,66 mg/ml für 17- β -Estradiol und von 6 mg/ml für Progesteron. Die Stammemulsion wurde nach dem in Tabelle 6 aufgeführten Schema weiterverdünnt, um die aufbereiteten Modelllösungen der verschiedenen Konzentrationen zu erhalten.

Konzentration [%] bezogen auf die aufbereitete Probe	Konzentration 17- β -Estradiol der aufbereiteten Modelllösung [mg/ml]	Konzentration Progesteron der aufbereiteten Modelllösung [mg/ml]	Stammemulsion [μ l]	Verdünnung mit Isopropanol in einem Messkolben auf [ml]
80	0,02112	0,192	320	10,0
100	0,02640	0,240	400	10,0
120	0,03168	0,288	480	10,0

Tabelle 6: Herstellung einer Modelllösung in verschiedenen Konzentrationen

Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration der Modelllösungen und der Peakfläche über den Bereich von 80-120 % bezogen auf die aufbereitete Probe festgestellt werden. Dieser ist in den Abbildungen 13 und 14 graphisch dargestellt. Die Daten zur Linearität der gespickten Matrix finden sich in Tabelle 7.

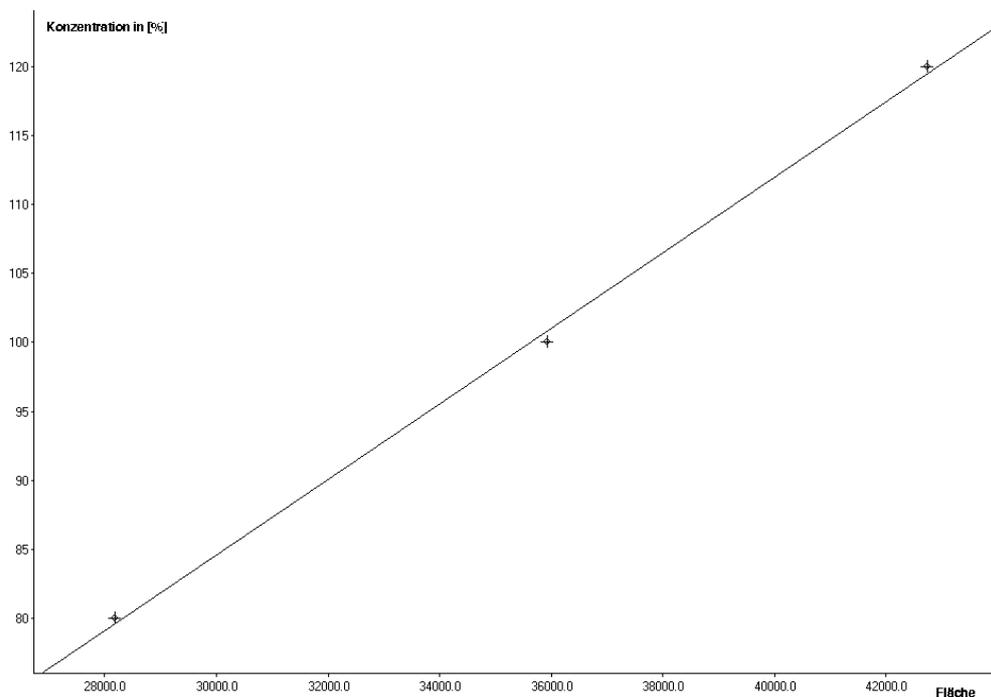


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Linearität von 17- β -Estradiol in gespickter Matrix (Methode A)

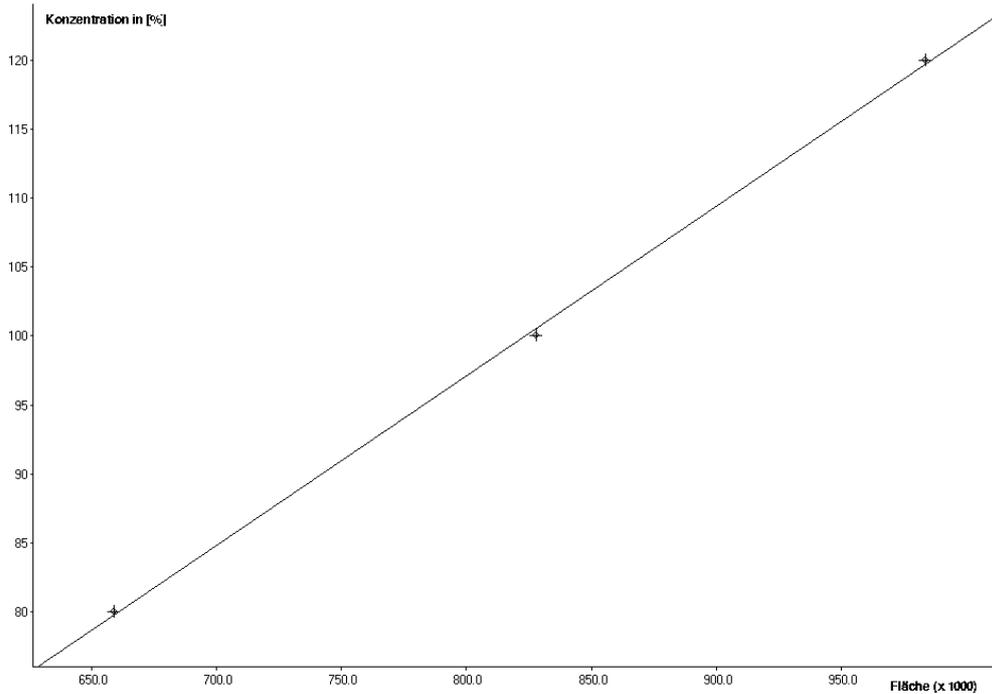


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Linearität von Progesteron in gespickter Matrix (Methode A)

Konzentration [%] bezogen auf die aufbereitete Probe	Konzentration 17- β -Estradiol [mg/ml]	Fläche 17- β -Estradiol [msmV]	Konzentration Progesteron [mg/ml]	Fläche Progesteron [msmV]
80	0,02112	28176	0,192	658812
100	0,02640	35931	0,240	828017
120	0,03168	42747	0,288	983890
Korrelationskoeffizient nach Pearson		0,999308		0,999720
Schnittpunkt mit der y-Achse		2,3549		-1,2819
Steigung der Geraden		0,0027414		0,00012298

Tabelle 7: Linearität von 17- β -Estradiol und Progesteron in gespickter Matrix mit Methode A

3.1.4.3 Richtigkeit durch Wiederfindung

Um die Richtigkeit der Methode zu bestimmen, wurde zur Matrix eine definierte Menge Wirkstoff gegeben und diese gegen den Standard vermessen. Dafür wurde wie unter 3.1.4.2.2 beschrieben verfahren. Das Verdünnungsschema ist in Tabelle 6 dargestellt. Bei jeder Konzentration der gespickten Matrix wurden drei Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 8. Die Wiederfindungsrate beträgt für 17- β -Estradiol 100,5 +/- 2,4 % und für Progesteron 98,8 +/- 2,2 Prozent.

Konzentra- tion [%] bezogen auf die aufbereitete Probe	Konzentra- tion 17- β - Estradiol der Modell- lösung [mg/ml]	Gefundene Konzentra- tion 17- β - Estradiol [mg/ml]	Wieder- findungsrate 17- β - Estradiol [%]	Konzentra- tion Progesteron der Modell- lösung [mg/ml]	Gefundene Konzentra- tion Progesteron [mg/ml]	Wieder- findungsrate Progesteron [%]
80	0,02112	0,02191	103,74	0,192	0,188	97,92
80	0,02112	0,02136	101,14	0,192	0,193	100,52
80	0,02112	0,02107	99,76	0,192	0,192	100,0
100	0,02640	0,02698	102,20	0,240	0,238	99,17
100	0,02640	0,02706	102,50	0,240	0,244	101,67
100	0,02640	0,02672	101,21	0,240	0,230	95,83
120	0,03168	0,03028	95,58	0,288	0,274	95,14
120	0,03168	0,03171	100,09	0,288	0,287	99,65
120	0,03168	0,03126	98,67	0,288	0,286	99,31
Mittelwert			100,5			98,8
Standardabweichung			2,41			2,14
Variationskoeffizient			2,40 %			2,17 %
Vertrauensbereich 95 %			99,0 bis 102,1			97,4 bis 100,2

Tabelle 8: Ergebnisse der Richtigkeit durch Wiederfindung (Methode A)

3.1.4.4 Präzision

3.1.4.4.1 Systempräzision

Die Systempräzision wird durch sechsfache Verdünnung einer Stammlösung A zur Standardlösung A 100 % und deren Vermessung gegen einen Standard nach Kalibrierung ermittelt. Es werden die Peakflächen und die Retentionszeiten verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die Systempräzision ist für Progesteron ausreichend nachgewiesen, für 17- β -Estradiol entspricht der Variationskoeffizient mit 2,29 % nicht der Empfehlung von < 2 %, was in der Diskussion aufgegriffen wird.

	Fläche 17-β-Estradiol [msmV] (0,0264 mg/ml)	Retentionszeit 17-β-Estradiol [min]	Fläche Progesteron [msmV] (0,24 mg/ml)	Retentionszeit Progesteron [min]
	34970	2,56	833343	7,33
	36772	2,56	853666	7,33
	35958	2,55	834366	7,28
	37165	2,54	858893	7,27
	36688	2,54	855744	7,24
	35598	2,55	832795	7,27
Mittelwert	36191,8	2,55	844801,2	7,29
Standardabweichung	828,25	0,0089	12499,9	0,0361
Variationskoeffizient	2,29 %	0,35 %	1,48 %	0,5 %
Vertrauensbereich 95 %	35529,1 bis 36854,6	2,54 bis 2,56	834799,3 bis 854803,0	7,26 bis 7,32

Tabelle 9: Ergebnisse der Systempräzision (Methode A)

3.1.4.4.2 Gerätepräzision

Aus einer Ampulle Hormon-Emulsion wurde nach dem unter 3.1.2.3 beschriebenen Vorgehen eine Probenaufbereitung durchgeführt. Die Probe wurde zehnmal gegen einen Standard nach Kalibrierung vermessen. Die Ergebnisse, die eine ausreichende Gerätepräzision belegen, sind in Tabelle 10 aufgelistet.

	17-β-Estradiol [mg/ml]	Retentionszeit 17-β-Estradiol [min]	Progesteron [mg/ml]	Retentionszeit Progesteron [min]
	0,665	2,58	5,86	7,37
	0,663	2,55	5,80	7,33
	0,662	2,53	5,80	7,29
	0,662	2,54	5,77	7,27
	0,655	2,53	5,74	7,23
	0,656	2,58	5,80	7,28
	0,657	2,53	5,76	7,27
	0,660	2,53	5,78	7,25
	0,651	2,53	5,75	7,22
	0,656	2,51	5,74	7,16
Mittelwert	0,659	2,54	5,78	7,27
Standardabweichung	0,0044	0,0228	0,0368	0,0583
Variationskoeffizient	0,66 %	0,90 %	0,64 %	0,80 %
Vertrauensbereich 95 %	0,656 bis 0,662	2,53 bis 2,56	5,76 bis 5,80	7,23 bis 7,30

Tabelle 10: Ergebnisse der Gerätepräzision (Methode A)

3.1.4.4.3 Methodenpräzision

Zur Bestimmung der Methodenpräzision wird die Probenaufbereitung aus einer einzigen Ampulle der neuen Hormon-Emulsion sechsmal durchgeführt und die sechs Probelösungen A gegen den Standard nach dessen Kalibrierung vermessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 11. Es wurde eine ausreichende Methodenpräzision nachgewiesen.

	17-β-Estradiol [mg/ml]	Retentionszeit 17-β-Estradiol [min]	Progesteron [mg/ml]	Retentionszeit Progesteron [min]
	0,678	2,59	5,93	7,41
	0,674	2,58	5,89	7,38
	0,662	2,57	5,80	7,33
	0,663	2,58	5,78	7,38
	0,674	2,58	5,84	7,33
	0,678	2,57	5,83	7,36
Mittelwert	0,672	2,58	5,85	7,37
Standardabweichung	0,0072	0,0075	0,06	0,0315
Variationskoeffizient	1,07 %	0,29 %	0,96 %	0,43 %
Vertrauensbereich 95 %	0,666 bis 0,678	2,574 bis 2,586	5,80 bis 5,90	7,345 bis 7,395

Tabelle 11: Ergebnisse der Methodenpräzision (Methode A)

3.1.4.5 Robustheit

Die Robustheit wurde hier durch optischen Vergleich der Chromatogramme, die unter veränderten Bedingungen durch Variation von Flussrate und Säulentemperatur erhalten wurden, überprüft. Aus einer Ampulle Hormon-Emulsion wurde die Probenaufbereitung durchgeführt und die Probelösung A unter verschiedenen Bedingungen vermessen. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird.

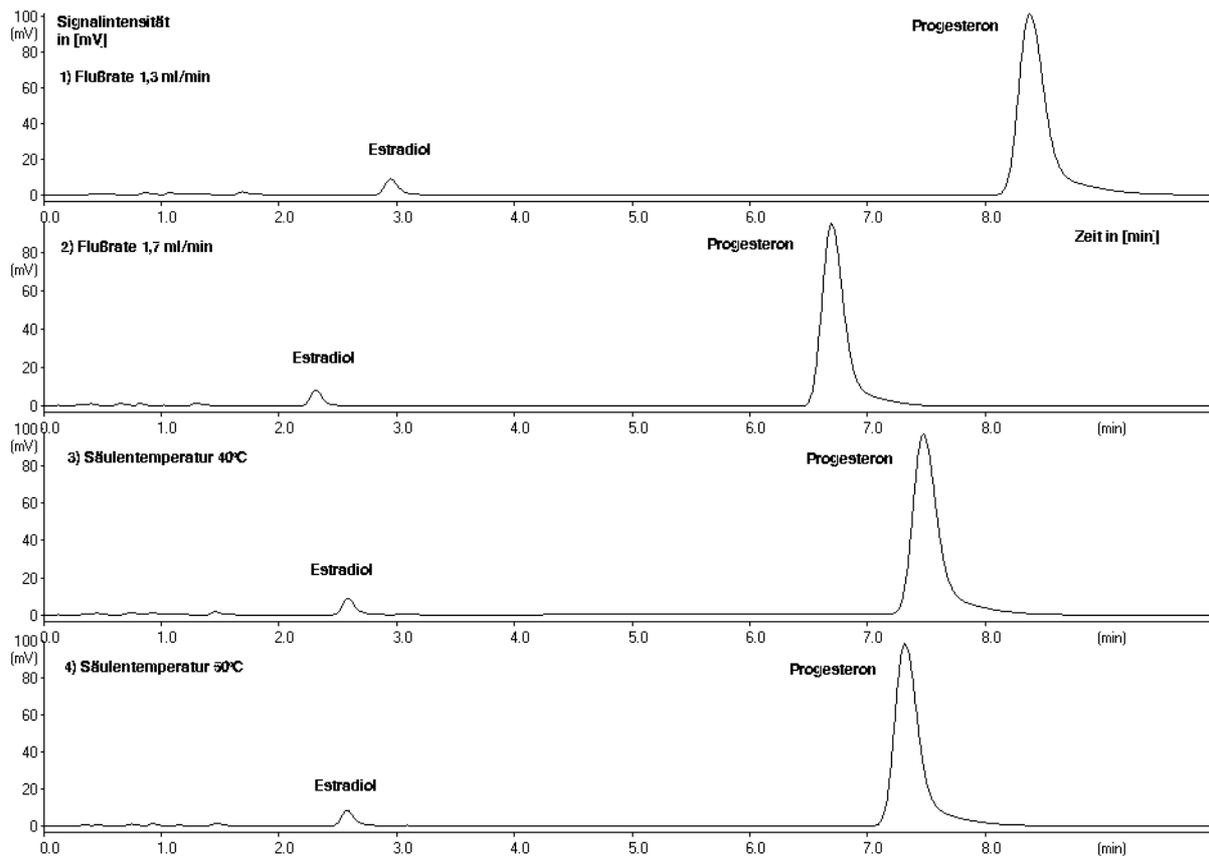


Abbildung 15: Optische Darstellung der Robustheit von Methode A; im ersten Chromatogramm beträgt die Flussrate 1,3 ml/min, im zweiten 1,7 ml/min; im dritten Chromatogramm ist die Säulentemperatur 40 °C, im vierten 50 °C

3.2 Methode B

3.2.1 Methodenentwicklung

Methode A zeigte während der Anwendung einige Phänomene, die durch die Injektion der Matrix in die HPLC-Anlage, die geringe Signalintensität für 17- β -Estradiol und die Standardherstellung zustande kommen. Daraufhin wurde sie überarbeitet und optimiert. Kernpunkte wie die Standardherstellung und die Probenaufbereitung wurden verändert.

3.2.1.1 Standardherstellung

Es wurden verschiedene Verfahren zur Herstellung einer Stammlösung und einer Standardreihe ausprobiert. Dabei ist jeweils die Konzentration der aufbereiteten Probe zu beachten. Der Genauigkeit wegen wurde versucht, keine zu geringe Menge Standard einzuwiegen, gleichzeitig sollte die eingewogene Menge aber nicht zu groß sein, um den Lösungsmittel- und Substanzverbrauch möglichst gering zu halten. Als problematisch hat sich die geringe Intensität des 17- β -Estradiol-Peaks bei Methode A erwiesen. Eine Standardlösung A wurde dreimal gegen einen frisch hergestellten Standard vermessen, wobei die Ergebnisse bei 17- β -Estradiol erheblich voneinander abwichen. Sie sind in Tabelle 12 dargestellt. Für Progesteron wurden gute Werte erzielt.

	Gehalt 17- β -Estradiol [%]	Gehalt Progesteron [%]
Messung 1	104,05	99,81
Messung 2	93,54	99,99
Messung 3	100,0	100,0
Mittelwert	99,2	99,93
Standardabweichung	5,3009	0,1069
Variationskoeffizient	6,00 %	0,12 %
Vertrauensbereich 95%	93,2 bis 105,2	99,8 bis 100,1

Tabelle 12: Vergleich verschiedener Messungen einer einzigen Standardlösung A ohne Aufstockung für 17- β -Estradiol

Es wurde versucht, das erläuterte Problem durch Aufstockung der in der aufbereiteten Probe enthaltenen Menge 17- β -Estradiol zu verbessern. Dabei wird der aufbereiteten Probe eine definierte Menge 17- β -Estradiol zugesetzt. Die Stammlösung und damit gleichzeitig auch die Standardreihe wurde folglich in einer höheren Konzentration an 17- β -Estradiol hergestellt. Eine Standardlösung mit der höheren 17- β -Estradiolkonzentration (Herstellung siehe Kapitel 3.2.2.1) wurde erneut dreimal gegen einen in seiner Konzentration veränderten Standard vermessen. Dabei verbesserten sich die Werte für 17- β -Estradiol erheblich wie aus Tabelle 13 hervorgeht.

	Gehalt 17- β -Estradiol [%]	Gehalt Progesteron [%]
Messung 1	97,02	97,05
Messung 2	98,88	99,16
Messung 3	99,82	100,17
Mittelwert	98,6	98,8
Standardabweichung	1,425	1,592
Variationskoeffizient	1,45 %	1,61 %
Vertrauensbereich 95%	97,0 bis 100,2	97,0 bis 100,6

Tabelle 13: Vergleich verschiedener Messungen einer einzigen Standardlösung B mit Aufstockung für 17- β -Estradiol

3.2.1.2 Probenaufbereitung

Bei Methode A wurde die Hormon-Emulsion in der Probenaufbereitung lediglich mit Isopropanol verdünnt. Es wurden also mit der Probe auch viele Störsubstanzen (Fette aus der Matrix der Emulsion) in die HPLC-Anlage gebracht. Dies kann erhebliche Probleme verursachen. Daher wurde bei der Entwicklung der Methode B vor allem Wert auf die Probenaufbereitung gelegt. Es wurde versucht, ein Verfahren zu entwickeln, bei dem die Matrix von den zu untersuchenden Substanzen 17- β -Estradiol und Progesteron abgetrennt wird. Bei einer Emulsion ist dies ein sehr schwieriger Arbeitsschritt, da die Wirkstoffe fest in die Lipidphase eingeschlossen sind. Es wurden verschiedene Möglichkeiten ausprobiert, wobei sich die Festphasenextraktion als die geeignetste erwies. Die Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) ist ein Verfahren, bei dem die Probe analog zur HPLC auf eine mit Packmaterial unterschiedlichster Art befüllte Säule gegeben wird. Dort werden im Idealfall z.B. die Matrixbestandteile vollständig zurückgehalten, während die zu

analysierenden Substanzen mit einem Elutionsmittel vollständig eluiert werden. Im beschriebenen Beispiel wurde durch Aufbereitung mit einer SPE-Säule die Fettphase abgetrennt.

In der Entwicklung der Probenaufbereitung müssen das geeignete Säulenmaterial, die Säulengröße, auch als Kartuschengröße bezeichnet, und das richtige Verhältnis von Kartuschengröße und Probenaufgabe, sowie das geeignete Elutionsmittel gefunden werden. Im Folgenden werden die Entwicklungsschritte, die zur Probenaufbereitung der Methode B geführt haben, kurz vorgestellt.

Zunächst wurden Kartuschen der Firma Macherey-Nagel auf Kieselgelbasis ausprobiert, deren Oberfläche so verändert wurde, dass sie nahezu vollständig mit Kohlenstoffketten einer Länge von 18 Kohlenstoffatomen (C18-Kette) bedeckt sind. Es wurden zwei unterschiedliche Kartuschengrößen mit 100 mg und 200 mg Packmaterial getestet. Dazu wurden 100 µl Hormon-Emulsion auf die Kartuschen aufgetragen. Als Elutionsmittel wurde Methanol gewählt, da sich beide Substanzen 17-β-Estradiol und Progesteron darin gut lösen, die Lipide aus der Matrix jedoch nicht (siehe Tabelle 2, Kapitel 3.1.1). Diese SPE-Kartuschen auf RP-18-Kieselgelbasis erwiesen sich jedoch als nicht geeignet. Das Eluat war trübe, folglich wurden die Lipide von der Kartusche nicht ausreichend zurückgehalten und gelangten mit dem Elutionsmittel in das Eluat.

Im Gegensatz dazu lieferten die Kartuschen der Firma Waters auf Polymerbasis bessere Ergebnisse. Verwendet wurden Oasis[®] HLB Kartuschen unterschiedlicher Größe. Es wurde nach folgendem Prinzip vorgegangen: Probenaufgabe mit Hilfe einer Eppendorfpipette, wobei die pipettierte Menge auch als Einwaage in Gramm notiert wurde, anschließend schrittweise Elution der Hormone mit dem Elutionsmittel (meist Methanol). Die kleinsten Kartuschen mit 60 mg Packmaterial waren nicht in der Lage, ein Emulsionsvolumen von 100 µl zurückzuhalten. Das Eluat war trübe, die Matrix war also mit darin enthalten.

Auf die nächst größeren Kartuschen mit 200 mg Packmaterial wurden zunächst auch 100 µl Emulsion aufgebracht, die anschließend mit dreimal 1000 µl Methanol eluiert und in drei verschiedenen HPLC-Vials gesammelt wurden. Alle drei Eluate waren klar. Die gefundenen Mengen 17-β-Estradiol und Progesteron waren jedoch mit 115 % und 109 % Wiederfindung theoretisch mehr als auf die Kartusche aufgegeben wurde. Dies lag vermutlich daran, dass das Volumen des Eluats nicht jeweils genau einen Milliliter betrug, sondern weniger (möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Benetzung und Elution). Dadurch wird die Konzentration der Lösung höher und damit auch der letztlich gemessene Gehalt.

Um das Volumenproblem zu lösen, wurde das Eluat direkt in einem 5 ml Messkolben aufgefangen. Es wurde so lange Methanol auf die Kartusche aufgegeben, bis der Messkolben genau gefüllt war. Das eluierte Volumen war damit immer genau 5 ml, in dem die auf die SPE-Kartusche aufgegebene Menge an 17-β-Estradiol und Progesteron enthalten war. Die Konzentration der Lösung ist folglich immer dieselbe. Das Ergebnis mit dieser Vorgehensweise war für Progesteron mit 103 % Wiederfindung durchaus akzeptabel, wobei für 17-β-Estradiol mit 122 % wieder zu viel Substanz gefunden wurde.

Es wurde vermutet, dass dies auch auf das in der Standardherstellung unter 3.2.1.1 beschriebene Problem der geringen Intensität des 17-β-Estradiol-Peaks zurückzuführen ist. Daher wurde zunächst eine Kartusche mit 500 mg Packmaterial verwendet, um eine größere Menge Probenaufgabe möglich zu machen, ohne dass die Matrixbestandteile in das Eluat durchbrechen. Damit war das Ergebnis schon wesentlich besser mit 99,5 % Wiederfindungsrate für 17-β-Estradiol und 99,4 % für Progesteron. Allerdings war bei einer Mehrfachbestimmung von vier Messungen der Variationskoeffizient für 17-β-Estradiol mit 3,24 % gegenüber 0,24 % bei Progesteron relativ schlecht. Eine Verbesserung wurde durch die bereits unter 3.2.1.1 beschriebene Methode der Aufstockung erzielt. Dazu wurde vor der Elution eine definierte Menge 17-β-Estradiol in den 5 ml Messkolben gegeben (genaue Erklärung erfolgt in Kapitel 3.2.2 Methodenbeschreibung). Vier erneute Messungen ergaben

für 17- β -Estradiol einen Variationskoeffizienten von 0,4 % (versus 3,24 % ohne Aufstockung).

Die letzte Stufe der Entwicklung stellte die Überprüfung der Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse dar. Sie wurde durch eine sechsfache Probenaufbereitung mit anschließender Vermessung abgesichert. Die Ergebnisse ergaben für 17- β -Estradiol eine Wiederfindungsrate von 103 % mit einem Variationskoeffizienten von 0,65 % und für Progesteron 99 % mit einem Variationskoeffizienten von 1,2 %. Die neue Probenaufbereitung wurde damit als ausgearbeitet und reproduzierbar angesehen.

3.2.2 Methodenbeschreibung

Methode A unterscheidet sich von Methode B in zwei wesentlichen Punkten, der Standardherstellung und der Probenaufbereitung. Im Folgenden werden nur die Parameter erläutert, die in Methode B verändert wurden. Alles weitere ist in Kapitel 3.1.2 schon beschrieben und gilt für Methode B gleichermaßen.

3.2.2.1 Herstellung von Stammlösung und Standardreihe

Für die Herstellung der Standardreihe wird zunächst eine Stammlösung zubereitet. Sie enthält 17- β -Estradiol und Progesteron und wird entsprechend weiterverdünnt. Zur Bereitung der Stammlösung werden 0,165 g 17- β -Estradiol und 0,300 g Progesteron in ein kleines Becherglas eingewogen. Dazu werden ca. 20 ml Methanol gegeben, und die Substanzen werden im mit Parafilm abgedeckten Becherglas während ca. 1 Minute im Ultraschallbad gelöst (keine thermische Erwärmung). Die Lösung wird vorsichtig in einen 100 ml Messkolben überführt. Das Becherglas wird dreimal mit ca. 10 ml Methanol nachgespült, die in den 100 ml Messkolben dazugegeben werden. Zum Schluss wird der Messkolben auf 100 ml mit Methanol aufgefüllt. Die auf diese Weise erhaltene Stammlösung B hat für 17- β -Estradiol eine Konzentration von 1,65 mg/ml und für Progesteron eine Konzentration von 3 mg/ml. Die Stammlösung B wird nach dem in Tabelle 14 dargestellten Schema weiterverdünnt. Es wurden Glasvollpipetten verwendet. Die Messkolben werden gut geschüttelt, anschließend wird jeweils ca. 1 ml entnommen und in ein HPLC-Vial überführt. Diese Standardlösungen werden nachfolgend als Standardlösung B 50 % bzw. 100 % usw. bezeichnet.

Die Kalibriergerade, die vor der Probenbestimmung täglich neu erstellt wird, setzt sich aus drei Messpunkten zusammen, 80 %, 100 % und 120 % bezogen auf die aufbereitete Probe. Sie stellt den Standard dar, gegen den die Probe vermessen wird.

Konzentration [%] bezogen auf die aufbereitete Probe	Konzentration 17- β -Estradiol [mg/ml]	Konzentration Progesteron [mg/ml]	Stammlösung B [ml]	Verdünnung mit Methanol in einem Messkolben auf [ml]
50	0,0825	0,15	5,0	100,0
70	0,1155	0,21	7,0	100,0
80	0,1320	0,24	8,0	100,0
90	0,1485	0,27	9,0	100,0
100	0,1650	0,30	10,0	100,0
110	0,1815	0,33	11,0	100,0
120	0,1980	0,36	12,0	100,0
130	0,2145	0,39	13,0	100,0

Tabelle 14: Herstellung einer Standardreihe nach Methode B

3.2.2.2 Probenaufbereitung

Zur Probenaufbereitung wurden SPE-Kartuschen der Firma Waters auf Polymerbasis (Oasis[®] HLB) mit 500 mg Packmaterial verwendet. Diese werden zunächst mit 5 ml Methanol konditioniert. Dazu wird das trockene Packmaterial mit dem Elutionsmittel benetzt. Anschließend werden mit der variablen 1000 μ l Eppendorfpipette 250 μ l Hormon-Emulsion auf die Kartusche, die bereits auf einen 5 ml Messkolben aufgesetzt ist, aufgegeben und gewogen (Dokumentation des Gewichtes des pipettierten Volumens). Nach Zusatz von 1 ml (mit einer Glasvollpipette) 17- β -Estradiol-Aufstocklösung (Herstellung siehe unten) werden mit einer Glasmesspipette 4 ml Methanol zur Elution aufgetragen. Sobald der 5 ml Messkolben genau gefüllt ist, wird die Kartusche entfernt. Das Eluat wird durch Umschütteln des Messkolbens gemischt.

Die Konzentration dieser Lösung beträgt für 17- β -Estradiol 0,165 mg/ml und für Progesteron 0,3 mg/ml. Dabei sind bei 17- β -Estradiol 0,033 mg/ml aus der Probe und 0,132 mg/ml aus der 17- β -Estradiol-Aufstocklösung, d.h. 20 % der gesamten Menge 17- β -Estradiol, die vermessen wird, stammen aus der Probe und 80 % aus der 17- β -Estradiol-Aufstocklösung.

Zur Herstellung der 17- β -Estradiol-Aufstocklösung werden 0,066 g in ein kleines Becherglas abgewogen. Anschließend wird wie bei der Herstellung der Stammlösung B verfahren, wobei keine Verdünnung mehr erfolgt. Die Endkonzentration der 17- β -Estradiol-Aufstocklösung beträgt 0,66 mg/ml.

Das Eluat aus dem 5 ml Messkolben ist die messfertige Probelösung B und kann direkt in ein HPLC-Vial gegeben werden.

Durch die Dokumentation des Gewichtes des mit der Eppendorfpipette aufgetragenen Probenanteils kann die Menge der zu analysierenden Substanz im Endergebnis genau berücksichtigt und um die Einwaage korrigiert werden. Schwankungen des Ergebnisses durch unterschiedliche Volumina der aufgetragenen Emulsion können minimiert werden. Die Berechnung wird im Anhang in Kapitel 8.3 erläutert.

3.2.2.3 HPLC-Bedingungen

Die HPLC-Bedingungen entsprechen bis auf den Spülschritt denen der Methode A (siehe Tabelle 3, Kapitel 3.1.1). In der Methodenentwicklung für Methode B hat sich gezeigt, dass ein Spülschritt sowohl zwischen den Standards als auch zwischen den einzelnen Proben, wie dies bei Methode A vorgenommen wird, nicht erforderlich ist. Das Injektionssystem wird lediglich nach jeder Injektion einfach mit Isopropanol gespült. Dies erwies sich als

ausreichend effektiv. Dadurch wird gegenüber Methode A eine erhebliche Zeitersparnis möglich.

3.2.2.4 Systemeignungstest

Es werden Kriterien festgelegt, mit denen täglich die Funktionstüchtigkeit des Systems vor dem Probendurchlauf überprüft werden kann. Es soll gezeigt werden, dass das aktuelle Trennsystem der validierten Methode gleichwertig ist und eine ausreichende Gerätepräzision erreicht wird. Dazu wird zunächst ein Blindwert mit dem Lösungsmittel (Methanol für Methode B) ermittelt. Anschließend werden sechs 100 % Standards und eine Standardverdünnungsreihe, die zur Erstellung der Kalibriergeraden dient, vermessen. Der Variationskoeffizient der Flächen der sechs Standards soll $< 2 \%$ und der Variationskoeffizient ihrer Retentionszeiten $< 1 \%$ sein [26]. Um den Verlauf der Messungen überwachen zu können, werden zwischen die einzelnen Proben 100 % Kontrollstandards gesetzt. Deren Gehalt darf um 2 % bezogen auf die Standardlösung B 100 % abweichen.

3.2.3 Vorgaben zur Validierung

Die Vorgaben zur Validierung entsprechen denen, die bereits in Kapitel 3.1.3 für Methode A beschrieben wurden. Lediglich bei der Absicherung der Robustheit der Methode wurde eine Änderung vorgenommen. Es wurden wie für Methode A kleine Änderungen von drei wichtigen HPLC-Parametern, der Flussrate, der Säulentemperatur und der Zusammensetzung der mobilen Phase vorgenommen. Dabei wurde jeweils eine Messserie von acht Messungen einer Probe unter den variierten Bedingungen aufgenommen. Der Variationskoeffizient des Gehaltes der Analysenserie sollte kleiner 2 % sein. Eine Differenz von 2,5 % zwischen den Mittelwerten der unter den einzelnen Variationen ermittelten Messwerte und der theoretisch angegebenen Konzentration wurde akzeptiert.

3.2.4 Validierung

3.2.4.1 Spezifität

Ein Chromatogramm für 17- β -Estradiol und Progesteron aus Standardlösung B 100 % und Probelösung B, aufgenommen mit Methode B ist in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt. Der Kapazitätsfaktor k' beträgt für 17- β -Estradiol 2,1 und für Progesteron 7,7 und wird der Anforderung > 1 für beide Hormone gerecht. Die Retentionszeiten betragen für den Injektionspeak 0,85 min, für den Lösungsmittelpeak von Methanol 0,9 min, für 17- β -Estradiol ca. 2,6 min und Progesteron 7,6 min. In Abbildung 18 ist eine Blindprobe dargestellt, die nur das Lösungsmittel Methanol enthält. Abbildung 19 zeigt die Matrix der Probe, welche mit Lipovenös® 20 % ermittelt wurde. Die Hauptpeaks im Chromatogramm der Probelösung B bei 2,6 min und 7,5 min werden nicht durch Lösungsmittel- oder Matrixpeaks überlagert. Die Spezifität der Methode B für 17- β -Estradiol und Progesteron wurde damit gezeigt.

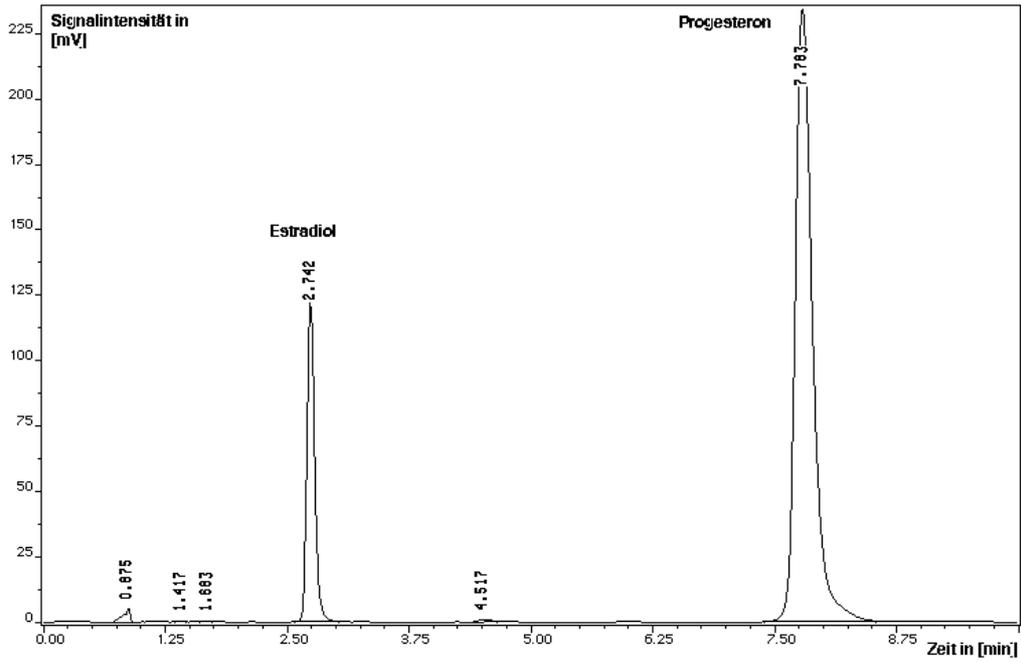


Abbildung 16: 17-β-Estradiol und Progesteron in Standardlösung B 100 %

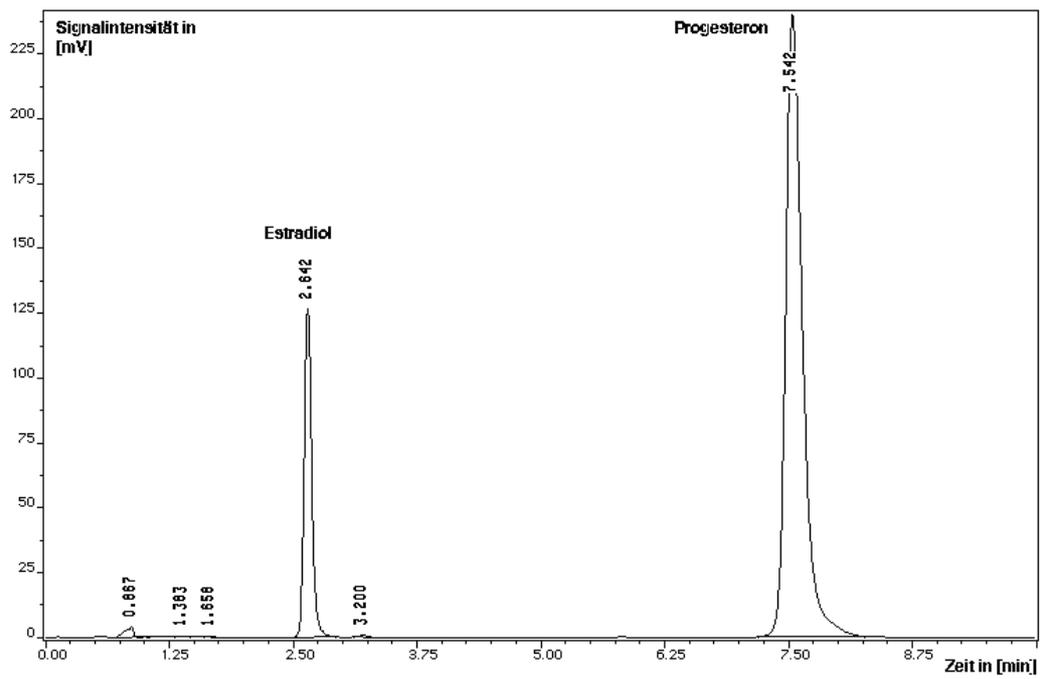


Abbildung 17: 17-β-Estradiol und Progesteron in Probelösung B

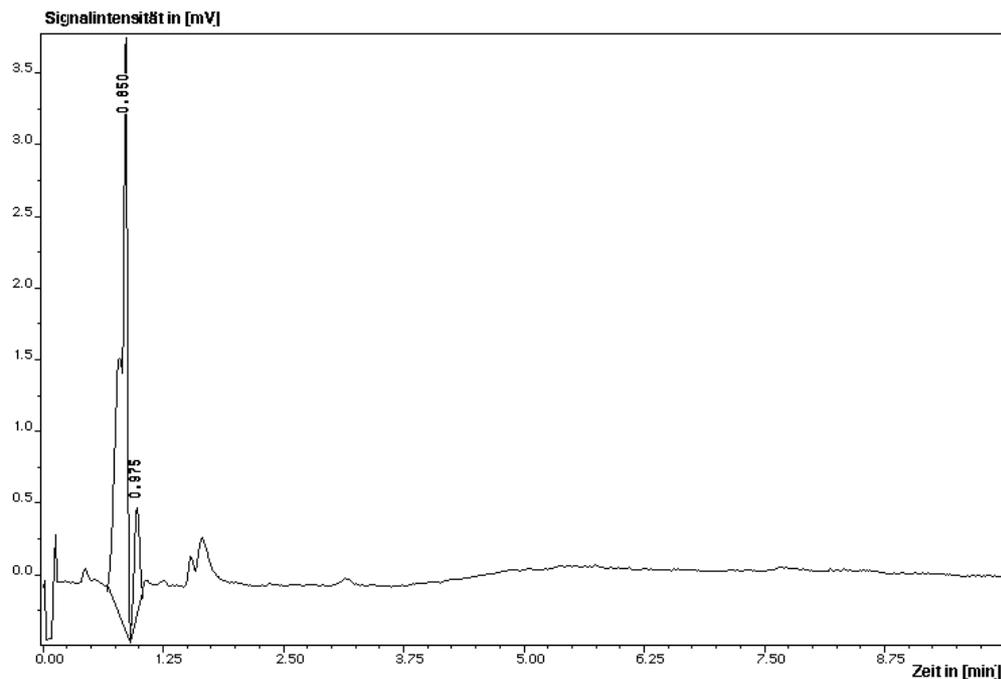


Abbildung 18: Blindprobe mit reinem Lösungsmittel Methanol (Methode B)

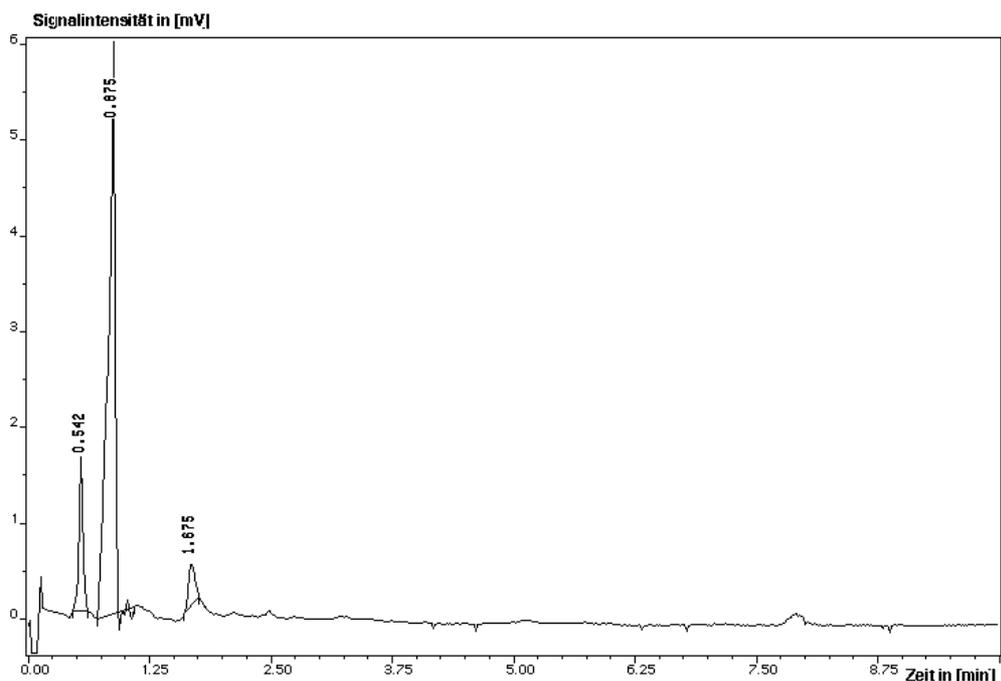


Abbildung 19: Chromatogramm der Matrix Lipovenös® 20 % (Methode B)

3.2.4.2 Linearität und linearer Bereich

3.2.4.2.1 Linearität des Standards (Linearität des Systems)

Wie für Methode A wurden Standardlösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt (siehe Tabelle 14, Kapitel 3.2.2.1) und deren Fläche ermittelt. Die Abbildungen 20 und 21 zeigen den linearen Zusammenhang zwischen Konzentration und Peakfläche graphisch, die ermittelten Daten sind in Tabelle 15 aufgeführt.

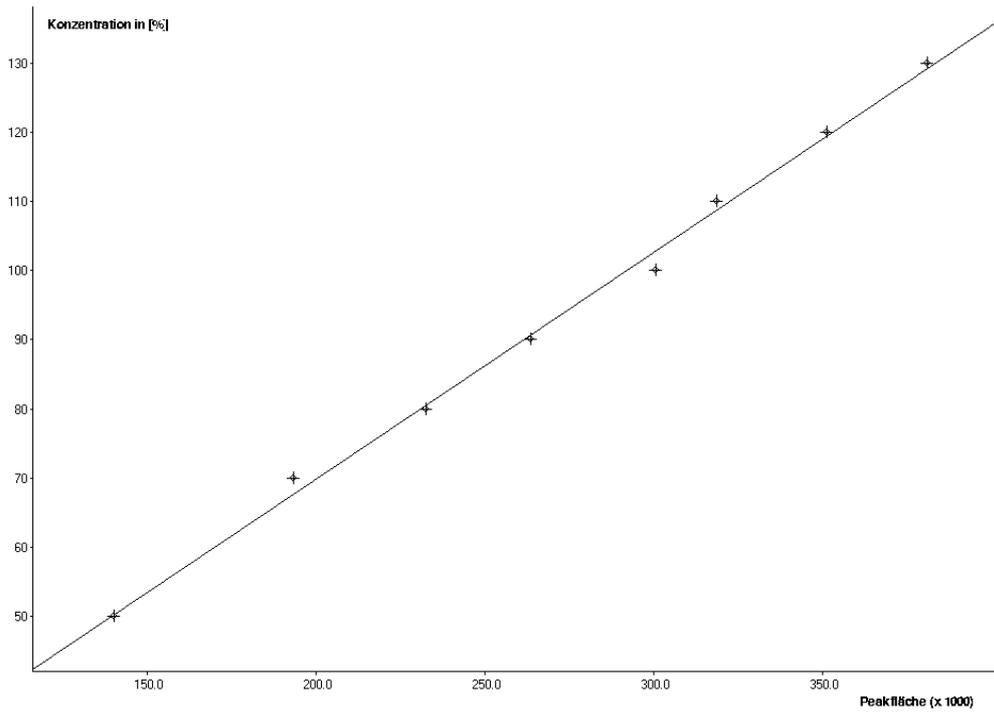


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Linearität von 17-β-Estradiol in der Verdünnungsreihe von Standardlösung B

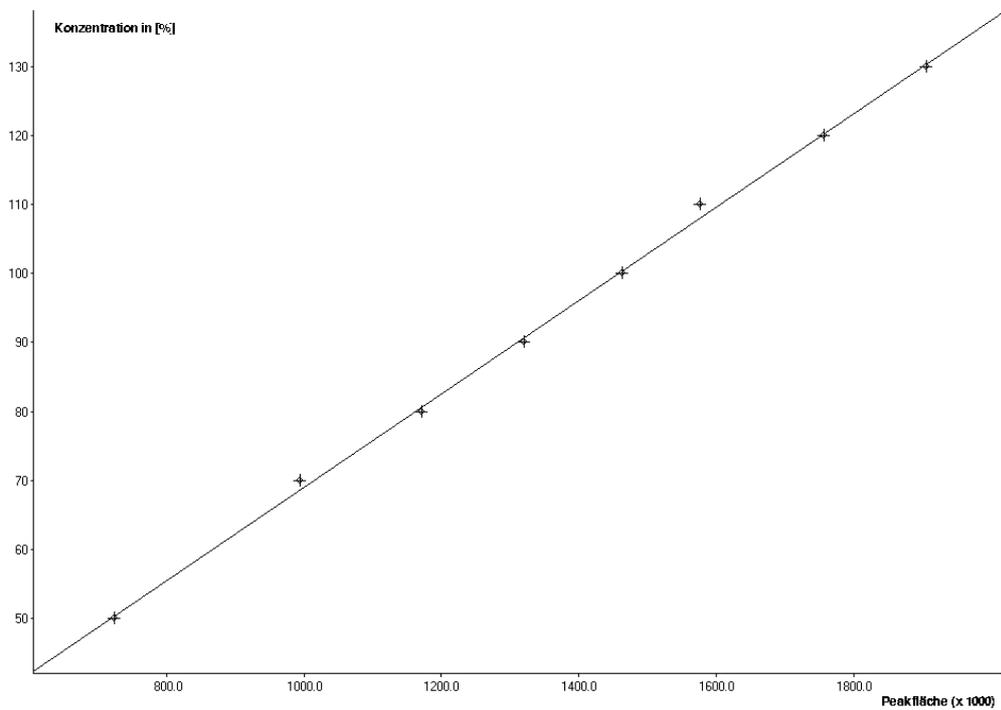


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Linearität von Progesteron in der Verdünnungsreihe von Standardlösung B

Konzentration [%] bezogen auf die aufbereitete Probe	Konzentration 17- β -Estradiol [mg/ml]	Fläche 17- β -Estradiol [msmV]	Konzentration Progesteron [mg/ml]	Fläche Progesteron [msmV]
50	0,0825	140004	0,15	723749
70	0,1155	193436	0,21	993886
80	0,1320	232538	0,24	1172043
90	0,1485	263670	0,27	1320650
100	0,1650	300499	0,30	1464064
110	0,1815	318577	0,33	1576541
120	0,1980	351216	0,36	1757808
130	0,2145	381078	0,39	1906667
Korrelationskoeffizient nach Pearson		0,998349		0,999275
Schnittpunkt mit der y-Achse		4,4899		1,5384
Steigung der Geraden		0,00032741		0,000067583

Tabelle 15: Linearität von 17- β -Estradiol und Progesteron in der Verdünnungsreihe von Standardlösung B

3.2.4.2.2 Linearität der gespickten Matrix (Linearität der Methode)

Der Zusatz der Substanzen 17- β -Estradiol und Progesteron zur Matrix erfolgt bei Methode B auf andere Weise als bei Methode A. Es wurde zunächst eine Stammlösung (nachfolgend als Stammlösung M bezeichnet) hergestellt, indem 0,165 g 17- β -Estradiol und 1,500 g Progesteron in einen 50 ml Messkolben eingewogen wurden. Dieser wurde mit Methanol auf 50 ml aufgefüllt und die Substanzen darin gelöst (evtl. unter Zuhilfenahme des Ultraschallbads). Die Stammlösung M hat für 17- β -Estradiol eine Konzentration von 3,3 mg/ml und für Progesteron von 30 mg/ml. Sie wurde nach dem in Tabelle 16 gezeigten Verfahren weiterverdünnt, um die gespickte Matrix in verschiedenen Konzentrationen zu erhalten.

Konzentration [%] bezogen auf die Probe	Konzentration 17- β -Estradiol der gespickten Matrix in [mg/ml]	Konzentration Progesteron der gespickten Matrix [mg/ml]	Stammlösung M [ml]	Verdünnung mit Lipovenös® 20% in einem Messkolben auf [ml]
80	0,528	4,8	8,0	50,0
100	0,660	6,0	10,0	50,0
120	0,792	7,2	12,0	50,0

Tabelle 16: Herstellung einer gespickten Matrix in verschiedenen Konzentrationen (Methode B)

Da bei Methode B 17- β -Estradiol aufgestockt wird, muss diese Aufstockung für die Bestimmung der gespickten Matrix unterschiedlicher Konzentration angepasst werden. Deshalb wurden zwei 17- β -Estradiol-Aufstocklösungen hergestellt, die zum einen 80 % und zum anderen 120 % der Original-17- β -Estradiol-Aufstocklösung enthalten. Für die 80 % Aufstocklösung wurden 0,264 g und für die 120 % Aufstocklösung 0,396 g 17- β -Estradiol in

einen 100 ml Messkolben eingewogen, der auf 100 ml mit Methanol aufgefüllt wurde (Vorlösung 80 % bzw. 120 %). Diese Vorlösungen wurden 1:5 mit Methanol weiterverdünnt. Die Konzentration der 80 % Aufstocklösung beträgt damit 0,528 mg/ml und der 120 % Aufstocklösung 0,792 mg/ml.

Die Probenaufbereitung der gespickten Matrix erfolgte nach demselben Schema wie für die Originalprobe (Kapitel 3.2.2.2) mit dem Unterschied, dass für die gespickte Matrix der Konzentration 80 % bzw. 120 % die 80 % bzw. 120 % 17- β -Estradiol-Aufstocklösung verwendet wurde.

Die Ergebnisse der Linearität der Probe sind graphisch in den Abbildungen 22 und 23, sowie die Werte in Tabelle 17 dargestellt. Über den Bereich von 80 - 120 % bezogen auf die Konzentration von 17- β -Estradiol und Progesteron in der aufbereiteten Probe besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und gemessener Peakfläche.

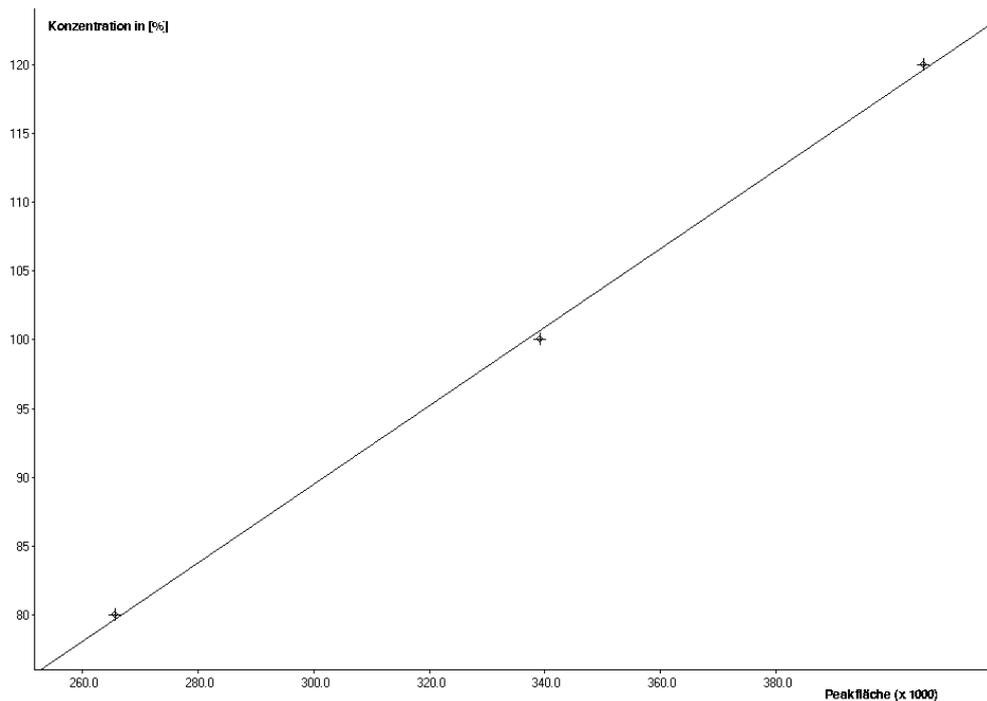


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Linearität von 17- β -Estradiol in der gespickten Matrix (Methode B)

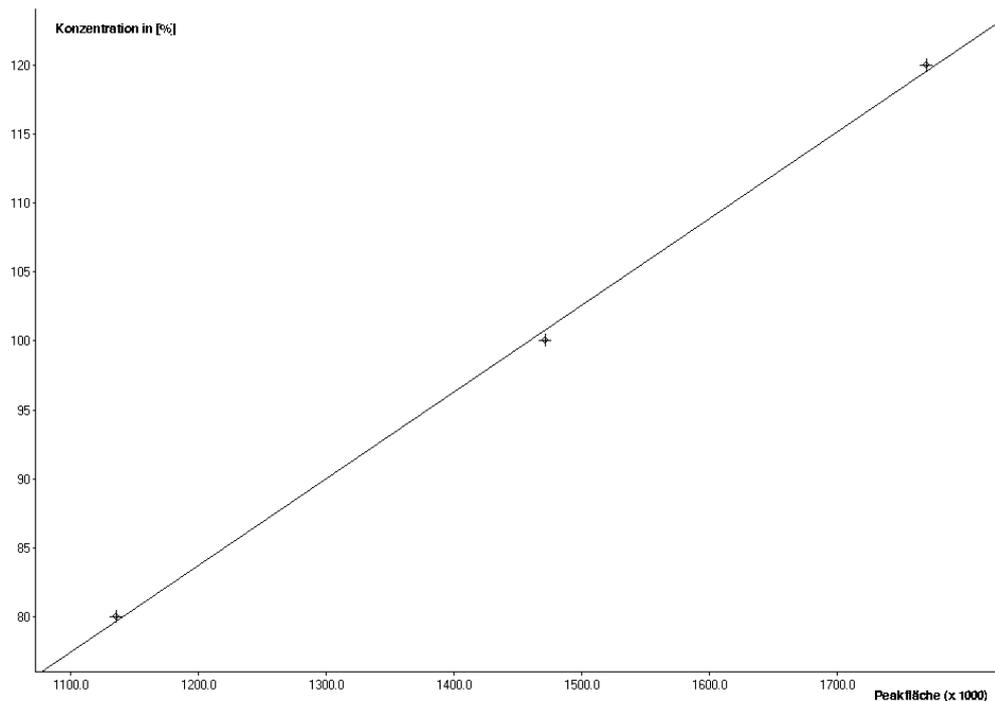


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Linearität von Progesteron in der gespickten Matrix (Methode B)

Konzentration [%] bezogen auf die aufbereitete Probe	Konzentration 17- β -Estradiol [mg/ml]	Fläche 17- β -Estradiol [msmV]	Konzentration Progesteron [mg/ml]	Fläche Progesteron [msmV]
80	0,132	265583	0,24	1135209
100	0,165	339098	0,30	1471645
120	0,198	405594	0,36	1770725
Korrelationskoeffizient nach Pearson		0,999581		0,999425
Schnittpunkt mit der y-Achse		3,8714		8,2625
Steigung der Geraden		0,00028545		0,000062869

Tabelle 17: Linearität von 17- β -Estradiol und Progesteron in der gespickten Matrix (Methode B)

3.2.4.3 Richtigkeit durch Wiederfindung

Die Herstellung der Modelllösungen und deren Aufarbeitung wurde bereits in Kapitel 3.2.4.2.2 beschrieben. Es wurde wie bei Methode A jede Konzentration der gespickten Matrix dreimal gegen den Standard vermessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 18. Die Wiederfindungsrate beträgt für 17- β -Estradiol 99,7 +/- 1,3 Prozent und für Progesteron 98,4 +/- 1,4 Prozent.

Konzentra- tion [%] bezogen auf die aufbereitete Probe	Konzentra- tion E2 aufberei- tete ge- spickte Matrix [mg/ml]	Gefundene Konzentra- tion E2 [mg/ml]	Wieder- findungsrate E2 [%]	Konzentra- tion Progesteron aufbereitete gespickte Matrix [mg/ml]	Gefundene Konzentra- tion Progesteron [mg/ml]	Wieder- findungsrate Progesteron [%]
80	0,132	0,135	102,27	0,240	0,238	99,17
80	0,132	0,130	98,48	0,240	0,236	98,33
80	0,132	0,131	99,24	0,240	0,241	100,42
100	0,165	0,164	99,39	0,300	0,297	99,0
100	0,165	0,165	100,0	0,300	0,290	96,67
100	0,165	0,165	100,0	0,300	0,295	98,33
120	0,198	0,197	99,49	0,360	0,347	96,39
120	0,198	0,193	97,47	0,360	0,358	99,44
120	0,198	0,199	100,51	0,360	0,351	97,50
Mittelwert			99,7			98,4
Standardabweichung			1,33			1,34
Variationskoeffizient			1,34 %			1,36 %
Vertrauensbereich 95 %			98,8 bis 100,5			97,5 bis 99,2

Tabelle 18: Ergebnisse der Richtigkeit durch Wiederfindung (Methode B)

3.2.4.4 Präzision

3.2.4.4.1 Systempräzision

Zur Ermittlung der Systempräzision wurden sechs verschiedene Stammlösungen B hergestellt und daraus jeweils die Standardlösung B 100 %. Die Standardlösungen B 100 % wurden gegen den Standard vermessen. Die Ergebnisse in Tabelle 19 sichern die Systempräzision hinreichend ab.

	Fläche E2 [msmV] (0,165 mg/ml)	Retentionszeit E2 [min]	Fläche P [msmV] (0,3 mg/ml)	Retentionszeit P [min]
	279282	2,71	1409079	7,82
	281392	2,73	1429005	7,83
	289193	2,71	1432570	7,83
	288730	2,73	1447836	7,84
	290034	2,71	1440728	7,83
	292316	2,73	1460947	7,84
Mittelwert	286824,5	2,72	1436694,2	7,83
Standardabweichung	5217,27	0,011	17705,0	0,01
Variationskoeffizient	1,82 %	0,4 %	1,23 %	0,1 %
Vertrauensbereich 95 %	282649,9 bis 29099,1	2,71 bis 2,73	1422527,5 bis 1450860,9	7,82 bis 7,84

Tabelle 19: Ergebnisse der Systempräzision (Methode B)

3.2.4.4.2 Gerätepräzision

Die Hormon-Emulsion wird einmal auf die unter 3.2.2.2 beschriebene Weise aufbereitet und zehnmal gegen den Standard vermessen. Wie Tabelle 20 zeigt wurde eine gute Gerätepräzision nachgewiesen.

	E2 [mg/ml]	Retentionszeit E2 [min]	P [mg/ml]	Retentionszeit P [min]
	0,683	2,63	5,79	7,48
	0,682	2,65	5,80	7,52
	0,688	2,64	5,82	7,51
	0,686	2,65	5,84	7,55
	0,690	2,64	5,81	7,50
	0,688	2,63	5,83	7,48
	0,693	2,64	5,84	7,49
	0,693	2,65	5,83	7,52
	0,689	2,65	5,84	7,52
	0,691	2,64	5,83	7,52
Mittelwert	0,688	2,64	5,82	7,51
Standardabweichung	0,0038	0,0079	0,0177	0,0218
Variationskoeffizient	0,55 %	0,30 %	0,30 %	0,29 %
Vertrauensbereich 95 %	0,686 bis 0,690	2,64 bis 2,65	5,81 bis 5,83	7,50 bis 7,52

Tabelle 20: Ergebnisse der Gerätepräzision (Methode B)

3.2.4.4.3 Methodenpräzision

Aus einer Ampulle Hormon-Emulsion wurde die Probenaufbereitung sechsmal durchgeführt und die Probelösungen B gegen den Standard vermessen. Die Ergebnisse zeigen eine gute Methodenpräzision. Sie werden von Tabelle 21 zusammengefasst.

	17- β -Estradiol [mg/ml]	Retentionszeit 17- β -Estradiol [min]	Progesteron [mg/ml]	Retentionszeit Progesteron [min]
	0,677	2,69	5,89	7,70
	0,687	2,68	5,95	7,68
	0,685	2,68	6,04	7,69
	0,687	2,68	6,05	7,63
	0,688	2,67	5,94	7,61
	0,689	2,66	5,86	7,61
Mittelwert	0,686	2,68	5,96	7,65
Standardabweichung	0,0044	0,0103	0,0771	0,0413
Variationskoeffizient	0,64 %	0,39 %	1,29 %	0,54 %
Vertrauensbereich 95 %	0,683 bis 0,690	2,67 bis 2,69	5,90 bis 6,02	7,62 bis 7,68

Tabelle 21: Ergebnisse der Methodenpräzision (Methode B)

3.2.4.5 Robustheit

Die Anfälligkeit der Methode B gegenüber kleinen Veränderungen der chromatographischen Bedingungen wurde dadurch überprüft, dass drei wichtige HPLC-Parameter, die Flussrate, die Säulentemperatur und die Zusammensetzung der mobilen Phase, variiert wurden und die Messwerte einer aufbereiteten Probe nach Kalibrierung unter den veränderten Bedingungen ermittelt wurden. Die Probe wurde jeweils achtmal gegen den Standard vermessen. Die Ergebnisse für 17- β -Estradiol sind in Tabelle 22, für Progesteron in Tabelle 23 aufgeführt.

Veränderung:	Flussrate		Säulentemperatur		Mobile Phase
	1,4 ml/min	1,6 ml/min	43 °C	47 °C	ACN / H ₂ O / Iso 180:250:45
	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]
	0,659	0,665	0,666	0,679	0,652
	0,657	0,655	0,666	0,673	0,667
	0,630	0,670	0,668	0,670	0,671
	0,657	0,653	0,671	0,669	0,650
	0,655	0,673	0,671	0,676	0,665
	0,657	0,671	0,671	0,687	0,666
	0,654	0,669	0,671	0,676	0,677
	0,653	0,670	0,672	0,680	0,674
Mittelwert	0,653	0,666	0,670	0,676	0,665
Standardabweichung	0,0094	0,0076	0,0024	0,0058	0,0097
Variationskoeffizient	1,44 %	1,14 %	0,37 %	0,87 %	1,46 %
Vertrauensbereich 95%	0,647 bis 0,660	0,661 bis 0,671	0,668 bis 0,672	0,672 bis 0,680	0,658 bis 0,672

Tabelle 22: Robustheit der Methode B für 17- β -Estradiol

Veränderung:	Flussrate		Säulentemperatur		Mobile Phase
	1,4 ml/min	1,6 ml/min	43 °C	47 °C	ACN / H ₂ O / Iso 180:250:45
	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]
	5,95	6,01	6,01	6,07	5,97
	5,93	5,85	6,01	6,07	6,08
	5,70	6,05	6,01	6,06	6,08
	5,92	5,92	6,05	6,09	5,92
	5,91	6,07	6,04	6,03	6,04
	5,92	6,07	6,05	6,17	6,07
	5,90	6,05	6,05	6,10	6,15
	5,89	6,05	6,06	6,12	6,14
Mittelwert	5,89	6,01	6,04	6,09	6,06
Standardabweichung	0,0789	0,0808	0,0214	0,0426	0,0787
Variationskoeffizient	1,34 %	1,34 %	0,35 %	0,70 %	1,30 %
Vertrauensbereich 95%	5,84 bis 5,95	5,95 bis 6,07	6,03 bis 6,06	6,06 bis 6,12	6,01 bis 6,12

Tabelle 23: Robustheit der Methode B für Progesteron

Um die Einschätzung der Robustheit von Methode B zu erleichtern, werden in den Tabellen 24 und 25 die Ergebnisse nochmals zusammengefasst und die Mittelwerte der Messwerte unter veränderten Bedingungen mit dem angegebenen theoretischen Gehalt einer Ampulle Hormon-Emulsion für 17- β -Estradiol und Progesteron verglichen. Dabei ist die Abweichung unter veränderten Bedingungen für 17- β -Estradiol gegenüber dem theoretisch angegebenen Gehalt nicht größer als 2,4 % und für Progesteron nicht größer als 1,8 %. Bezieht man eine analytische Streuung von 2-3 % mit ein [29], so kann Methode B als ausreichend robust bezeichnet werden.

	Mittelwert [mg/ml]	Variationskoeffizient [%]	Abweichung des Mittelwertes vom angegebenen Gehalt [%]
Flussrate 1,4 ml/min	0,653	1,44 %	1,1 %
Flussrate 1,6 ml/min	0,666	1,14 %	0,9 %
Temperatur 43 °C	0,670	0,37 %	1,5 %
Temperatur 47 °C	0,676	0,87 %	2,4 %
Mobile Phase verändert	0,665	1,46 %	0,8 %

Tabelle 24: Zusammenfassung der Robustheit von Methode B für 17- β -Estradiol

	Mittelwert [mg/ml]	Variationskoeffizient [%]	Abweichung des Mittelwertes vom angegebenen Gehalt [%]
Flussrate 1,4 ml/min	5,89	1,34 %	1,8 %
Flussrate 1,6 ml/min	6,01	1,34 %	0,2 %
Temperatur 43 °C	6,04	0,35 %	0,7 %
Temperatur 47 °C	6,09	0,70 %	1,5 %
Mobile Phase verändert	6,06	1,30 %	1,0 %

Tabelle 25: Zusammenfassung der Robustheit von Methode B für Progesteron

3.2.4.6 Haltbarkeit der verwendeten Lösungen

Die Haltbarkeit der mobilen Phase beträgt 6 Monate [30], die der Standardlösungen und der 17- β -Estradiol-Aufstocklösung zwei Tage, sowie die der Probelösung B 24 Stunden (Belege siehe Kapitel 8.4 im Anhang).

4 Stabilitätsdaten der Hormon-Emulsion

4.1 Vorgaben zur Aufstellung eines Stabilitätsprogramms

Die Grundprinzipien der Stabilitätsprüfung, die aus den Leitlinien (ICH, FDA, WHO) entnommen werden können [22, 23, 24, 25], dienen als Grundlage für den Aufbau und den Ablauf der Untersuchungen. Sie geben Hinweise zur Chargenauswahl und Spezifikation, zu den Prüfparametern sowie -verfahren und -intervallen, den Akzeptanzkriterien, zu den Lagerungsbedingungen und zur Lagerungsdauer und schließlich zur Auswertung der Ergebnisse.

Für die neue Hormon-Emulsion wurde ein Programm entwickelt, nach dem das Produkt eingelagert und untersucht wurde. Es dient zur Erhebung orientierender Daten aus verschiedenen Beschleunigungs- und Langzeitversuchen mit dem Ziel,

- das Analysenverfahren zu optimieren,
- die Robustheit der Formulierung zu beurteilen,
- vorläufige Mindesthaltbarkeitsfristen und eventuelle Lagerungshinweise zu ermitteln,
- Probleme, die möglicherweise bei der Lagerung und beim Versand auftreten, identifizieren zu können und
- die vorläufige Laufzeit der neuen Formulierung abzuleiten [20].

In den folgenden Kapiteln werden die gewählten Vorgaben für das Stabilitätsprogramm der neuen Hormon-Emulsion dargelegt. Alle verwendeten Reagenzien und Geräte sind im Anhang in der Reagenzien- und Geräteleiste zu finden.

4.1.1 Versuchsbedingungen

Es wurden die Standardlagerungsbedingungen aus den ICH-Leitlinien [23] für die drei Regionen Europa, Japan und USA gewählt. Diese sind für Langzeitprüfungen 25 °C und 60 % relative Luftfeuchte (RF), für Beschleunigungsversuche 30 °C und 65 % relative Luftfeuchte sowie 40 °C und 75 % relative Luftfeuchte. Zusätzlich wurden Beschleunigungsversuche bei hohen Temperaturen von 60 °C und 80 °C ohne definierte Luftfeuchte und unter Frostbedingungen bei - 20 °C durchgeführt [20]. Als Beschleunigungsversuche werden solche Versuche bezeichnet, die unter extremen Temperaturen durchgeführt werden, mit dem Ziel in relativ kurzer Zeit Daten für die Stabilität und Haltbarkeit einer Zubereitung zu gewinnen.

Die Schwankung der Temperatur sollte nach ICH nicht mehr als +/- 2°C und die der relativen Feuchte nicht mehr als +/- 5 % betragen [22]. Dies wird sowohl für die Lagerung in den Klimakammern der Firma Ratiopharm als auch für die Trockenschränke und das Arzneimittellager (Raumtemperatur) der Apotheke des Universitätsklinikums Ulm gewährleistet. Die Lagerungsdauer betrug für 25 °C / 60% RF 12 Monate, für die Beschleunigungsversuche bei 30°C / 65 % RF und 40 °C / 75 % RF 6 Monate und für die Beschleunigungsversuche bei 60 °C und 80 °C 3 Monate, sowie bei - 20°C zwei Tage. Bezüglich der Überprüfungszeitpunkte ist für eine Lagerungsdauer von 12 Monaten nach ICH eine Frequenz von 3 Monaten gefordert, für die Beschleunigungsversuche über 6 Monate sind drei Überprüfungszeitpunkte vorgeschrieben [22]. Eine Übersicht sowohl über die Lagerungsbedingungen als auch über die Überprüfungszeitpunkte gibt Tabelle 26. Sie stellt den Prüfplan dar.

	Ausgangs- wert	Nach 1 Monat	Nach 2 Monaten	Nach 3 Monaten	Nach 4 Monaten	Nach 6 Monaten	Nach 9 Monaten	Nach 12 Monaten
25 °C 60 % RF	×			×		×	×	×
30°C 65 % RF	×		×		×	×		
40 °C 75 % RF	×		×		×	×		
60 °C	×	×	×	×				
80 °C	×	×	×	×				

Tabelle 26: Prüfplan für die Stabilitätsuntersuchungen der neuen Hormon-Emulsion

4.1.2 Chargenauswahl

Für die Stabilitätsprüfung während der Entwicklung gibt es keine Vorschrift über die Anzahl der Chargen, die eingelagert und untersucht werden müssen. Es gibt eine Empfehlung, dass je nach Stufe der Entwicklung ein bis zwei Chargen überprüft werden sollen [20]. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Chargen mit unterschiedlichen Herstellungszeitpunkten untersucht. Die Charge 2 wurde im Oktober 2003, die Charge 1 im September 2002 und die Charge 3, die lediglich bei 40 °C und 75 % RF zusätzlich eingelagert wurde, im Mai 1999 hergestellt. Der Beginn der Einlagerung war im Juli 2004. Zu diesem Zeitpunkt kann keine der verwendeten Chargen als neu hergestellt bezeichnet werden wie es optimalerweise der Fall sein sollte. Die Möglichkeiten im Rahmen dieser Arbeit waren in der Hinsicht jedoch begrenzt.

Für jeden Versuch wurden pro Überprüfungszeitpunkt vier Ampullen Hormon-Emulsion einer Charge eingelagert.

4.1.3 Prüfparameter

Die zu untersuchenden Parameter sind mit den jeweiligen Analysenverfahren und Akzeptanzkriterien in der Spezifikation, die für die neue Hormon-Emulsion entwickelt wurde, in Kapitel 8.5 im Anhang hinterlegt. Die Spezifikation soll wichtige Prüfparameter enthalten, die zur Beurteilung der Qualität einer Zubereitung dienen. Die wesentlichen Parameter sind in diesem Fall Aussehen, Identität und Gehalt, pH-Wert, die mikroskopische Beurteilung der Emulsion und Abbauprodukte.

4.1.4 Verpackungsmaterial

Die Hormon-Emulsion wird in ihrem Primärpackmittel Glasampulle (Glasart I, welche die höchste Güte unter den Glasarten darstellt und für Injektabilia verwendet wird [31]) eingelagert. Da die Primärverpackung wasserundurchlässig ist, kann auf die Lagerung unter definierter Luftfeuchtigkeit verzichtet werden. Sie wird aus logistischen Gründen dennoch durchgeführt, da die Bedingungen 25°C / 60% RF, 30°C / 65% RF und 40°C / 75% RF in den Klimakammern der Firma Ratiopharm vorgegeben sind.

4.2 Methodik zur Durchführung der Stabilitätsuntersuchungen

4.2.1 Probenvorbereitung nach Methode A

Es werden je vier Ampullen pro Überprüfungszeitpunkt untersucht. Sie werden dabei zunächst makroskopisch auf Aussehen und Homogenität geprüft und anschließend durch Schütteln gemischt und redispergiert. Dadurch wird die Fettphase wieder fein in der Wasserphase verteilt. Mit Hilfe einer Kanüle und einer Einmalspritze wird der Inhalt der Ampulle entnommen, wobei ca. 5 ml in ein Braunglasfläschchen zur Gehaltsbestimmung und ca. 5 ml in ein Falconröhrchen zur pH-Messung und Öltropfengrößenbestimmung gegeben werden. Die 5 ml jeder Ampulle werden in einem einzigen Braunglasfläschchen zur Gehaltsbestimmung gesammelt und am Ende durch vorsichtiges Umschütteln gemischt. Die 5 ml zur pH-Messung und Öltropfengrößenbestimmung werden in vier einzelne Falconröhrchen gegeben und separat analysiert.

4.2.2 Probenvorbereitung nach Methode B

Die vier Ampullen werden wie bei Methode A makroskopisch auf Aussehen und Homogenität überprüft und anschließend durch Schütteln gemischt und redispergiert. Die Probenentnahme aus der Ampulle erfolgt bei Methode B mit Hilfe einer Kanüle und einer Einmalspritze. Die gesamte Probe wird in einen Glaserlenmeyerkolben mit Schliff oder in eine Braunglasflasche gegeben und mit einem Stopfen bzw. Schraubverschluss verschlossen. Aus der Probe wird zunächst die Menge entnommen, die für die Gehaltsbestimmung mittels HPLC nötig ist. Anschließend wird die pH-Wertbestimmung bzw. die Öltropfengrößenbestimmung durchgeführt.

4.2.3 Aussehen und Homogenität

Die Emulsion wird makroskopisch auf ihr Aussehen hin überprüft. Je nach makroskopischem Aussehen wird die Emulsion mit unterschiedlichen Begriffen beschrieben. Homogen ist sie, wenn sie milchig weiß und opaque ist und keine Anzeichen von Fällungen, Bodensatz oder Instabilität zeigt. Es können vereinzelt weiße Schlieren vorkommen, und die Emulsion kann eine leichte, redispergierbare Aufrahmung zeigen. Aufrahmung bedeutet das Anreichern der meist spezifisch leichteren dispergierten Ölphase im oberen Teil von Emulsionen [32]. Eine leichte Aufrahmung liegt vor, wenn an der Oberfläche eine dichte weiße Schicht von weniger als 5 mm Höhe zu sehen ist, die jedoch leicht aufschüttelbar (redispergierbar) ist. Eine starke Aufrahmung ist dann gegeben, wenn die weiße Schicht an der Oberfläche größer als 5 mm ist. Es liegt eine Flocculation vor, wenn die Aufrahmschicht geflockt ist und sich wässrige Lagen am Grunde der Rahmschicht gebildet haben. Eine Phasentrennung ist eingetreten, wenn Öltropfen, -schlieren oder ein -film auf der Oberfläche sichtbar sind. Dann spricht man von einer gebrochenen Emulsion, bei der Öl- und Wasserphase getrennt und nicht redispergierbar sind [33].

4.2.4 pH-Wert

Bei jeder untersuchten Ampulle wird der pH-Wert bestimmt. Dafür wird ein pH-Meter mit einer für Emulsionen geeigneten Elektrode verwendet. Vor Beginn der Messreihe wird das pH-Meter mit den vorgeschriebenen Kalibrierlösungen kalibriert. Vor jeder Messung wird die Elektrode gründlich mit gereinigtem Wasser gespült. In regelmäßigen Abständen wird die

Elektrode mit Ethanol 99% gereinigt. Danach wird mit gereinigtem Wasser nachgespült. Jede Ampulle wird einmal vermessen und der Mittelwert aus den vier Ampullen pro Überprüfungszeitpunkt gebildet.

4.2.5 Öltropfengröße

Die Öltropfengröße wird mikroskopisch bestimmt. Als Grundlage dazu dient die im Arzneibuch beschriebene Methode, die zur Beurteilung einer Emulsion variiert wird [28]. Es wird ein Binokular-Mikroskop mit 10-facher Vergrößerung durch das Okular und 100-facher Vergrößerung durch das Objektiv verwendet. Für die beiden Okulare werden Okularmikrometer eingesetzt, zum einen mit einem quadratischen Gitter (ein Kästchen entspricht bei der vorgegebenen Vergrößerung $10 \times 10 \mu\text{m}$) und zum anderen mit einer linearen Skala, wobei der Abstand von einem Skalenteil zum anderen $1 \mu\text{m}$ entspricht. Der zu analysierende Bildausschnitt wird definiert als gesamte Fläche des Gitters mit einer Größe von $100 \times 100 \mu\text{m}$ (immer betrachtet bei der oben angegebenen Vergrößerung). Sowohl Skala als auch Gitter werden mit einem geeichten Objektmikrometer kalibriert. Dabei wird ein Fehler von $\pm 2\%$ der linearen Skalenteile akzeptiert.

Aus der zu analysierenden Ampulle wird nach Durchmischung durch Umschütteln ein Tropfen mit Hilfe einer Einmalpipette entnommen und auf einen Objektträger aufgebracht. Der Emulsionstropfen wird mit einem Deckglas abgedeckt, auf das ein Tropfen Immersionsöl gegeben wird. Dadurch wird die Ablenkung der aus dem Deckglas austretenden Lichtstrahlen verringert und das Auflösungsvermögen verbessert [32]. Mit Hilfe des Objektivs und der beiden Okularmikrometer wird die Probe analysiert. Sie wird auf die größten vorhandenen Öltropfen und auf die Anzahl der Tropfen, die zwischen zwei und zehn Mikrometer liegen, untersucht. Es werden fünf Sichtfelder pro Ampulle betrachtet. Die genauen Parameter und Akzeptanzkriterien sind in der Spezifikation in Kapitel 8.5 im Anhang hinterlegt.

4.2.6 Gehaltsbestimmung und Identität mittels HPLC

Die Gehaltsbestimmung erfolgt über die HPLC nach den beiden neu entwickelten Methoden A und B. Bei Methode A wurden aus der Mischung der vier Ampullen vier Proben gezogen und diese aufbereitet und einmal gegen den Standard vermessen. Bei Methode B wurde die Probe jeweils aus der einzelnen Ampulle entnommen und anschließend wie beschrieben aufbereitet. Jede aufbereitete Probe wurde viermal in die HPLC-Anlage eingespritzt und gegen den Standard vermessen.

Die Identität wird über die Retentionszeiten der Substanzen 17- β -Estradiol und Progesteron ermittelt.

4.2.7 Abbauprodukte

Das Chromatogramm wird optisch auf zusätzlich auftretende Peaks untersucht.

4.3 Stabilitätsdaten aus den durchgeführten Untersuchungen

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse aus den Beschleunigungs- und Langzeitversuchen vorgestellt. Da die Entwicklung der beiden Gehaltsbestimmungsmethoden und die Einlagerung der Ampullen zeitlich ineinandergreifen, sind die Gehaltsergebnisse zum Teil mit unterschiedlichen Methoden erzielt worden. Die Ergebnisse, die mit Methode A aufgenommen wurden, sind mit (A), die mit Methode B aufgenommenen mit (B)

gekennzeichnet. Eine zeitliche Übersicht über die gewonnenen Ergebnisse und deren Generierung mit Methode A oder B zeigt zudem Abbildung 25 in Kapitel 5.3 Die Werte, die den Anforderungen der Spezifikation entsprechen und folglich innerhalb der dort angegebenen Grenzen liegen, sind dick gedruckt. Die Bezeichnung „entspricht“ bedeutet, dass die Zubereitung für den betreffenden Parameter den Anforderungen der Spezifikation nachkommt. Die Herstellungsdaten zu den eingesetzten Chargen finden sich in Kapitel 4.1.2 und in der Reagenzienliste im Anhang.

4.3.1 Ergebnisse aus der Lagerung bei 25 °C / 60 % RF über 12 Monate

Die Untersuchungsergebnisse der Hormon-Emulsion werden für die Chargen 1 und 2 separat in den Tabellen 27 und 28 dargestellt.

Parameter	Akzeptanzgrenze	Ausgangswert	3 Monatswert	6 Monatswert	9 Monatswert	12 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,8	7,5	7,4	7,3	7,2
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤1µm: ≥99%, < 5 Tropfen zwischen 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 - 0,693 P: 5,70 - 6,30	E2: 0,654 (A) P: 5,98 (A)	E2: 0,638 (A) P: 5,87 (A)	E2: 0,669 (A) P: 6,19 (A)	E2: 0,628 (A) P: 5,82 (A)	E2: 0,654 (A) P: 5,94 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 27: Ergebnisse der Charge 1 bei 25 °C / 60 % RF

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	3 Monatswert	6 Monatswert	9 Monatswert	12 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,9	7,7	7,6	7,5	7,4
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤1µm: ≥99%, < 5 Tropfen zwischen 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechend	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 - 0,693 P: 5,70 - 6,30	E2: 0,646 (A) P: 5,83 (A)	E2: 0,647 (A) P: 5,83 (A)	E2: 0,655 (A) P: 5,99 (A)	E2: 0,615 (A) P: 5,63 (A)	E2: 0,638 (A) P: 5,66 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 28: Ergebnisse der Charge 2 bei 25 °C / 60 % RF

Nach 12 Monaten Lagerung bei 25 °C und 60 % relativer Luftfeuchte entsprechen die untersuchten Ampullen der Hormon-Emulsion über den gesamten Untersuchungszeitraum in allen Parametern der Spezifikation mit Ausnahme des Gehalts von 17-β-Estradiol und Progesteron der Charge 2 nach 9 Monaten und von Progesteron nach 12 Monaten.

4.3.2 Ergebnisse aus der Lagerung bei 30 °C / 65 % RF über 6 Monate

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt nach dem gleichen Schema wie unter 4.3.1.

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	2 Monatswert	4 Monatswert	6 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,5	7,5	7,4	7,3
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht	nicht belegt	entspricht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,659 (A) P: 5,97 (A)	E2: 0,665 (A) P: 6,09 (A)	E2: 0,664 (B) P: 5,81 (B)	E2: 0,659 (A) P: 6,12 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 29: Ergebnisse der Charge 1 bei 30 °C / 65 % RF

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	2 Monatswert	4 Monatswert	6 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,9	7,7	7,6	7,5
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht	nicht belegt	entspricht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,638 (A) P: 5,70 (A)	E2: 0,657 (A) P: 5,98 (A)	E2: 0,658 (B) P: 5,51 (B)	E2: 0,647 (A) P: 5,90 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 30: Ergebnisse der Charge 2 bei 30 °C / 65 % RF

Über den gesamten Zeitraum von sechs Monaten unter einer Lagerung bei 30 °C und 65 % relativer Luftfeuchte entsprechen die analysierten Ampullen in allen Parametern der Spezifikation. Anzumerken ist, dass der vier Monatswert für Progesteron der Charge 2 nicht der Spezifikation entspricht. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen.

4.3.3 Ergebnisse aus der Lagerung bei 40 °C / 75 % RF über 6 Monate

Die Ergebnisse der drei eingelagerten Chargen werden getrennt in den Tabellen 31 bis 33 vorgestellt.

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	2 Monatswert	4 Monatswert	6 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,6	7,4	7,3	7,0
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht	nicht belegt	entspricht nicht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,652 (A) P: 5,89 (A)	E2: 0,668 (A) P: 6,08 (A)	E2: 0,667 (B) P: 5,89 (B)	E2: 0,657 (A) P: 6,12 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 31: Ergebnisse der Charge 1 bei 40 °C / 75 % RF

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	2 Monatswert	4 Monatswert	6 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,9	7,6	7,5	7,2
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht	nicht belegt	entspricht nicht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,638 (A) P: 5,70 (A)	E2: 0,665 (A) P: 5,92 (A)	E2: 0,663 (B) P: 5,51 (B)	E2: 0,647 (A) P: 5,98 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 32: Ergebnisse der Charge 2 bei 40 °C / 75 % RF

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	2 Monatswert	4 Monatswert	6 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,1	6,9	6,9	6,7
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht	nicht belegt	entspricht nicht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,594 (A) P: 5,62 (A)	E2: 0,596 (A) P: 5,80 (A)	E2: 0,661 (B) P: 5,63 (B)	E2: 0,584 (A) P: 6,06 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 33: Ergebnisse der Charge 3 bei 40 °C / 75 % RF

Über einen Zeitraum von sechs Monaten Lagerung bei 40 °C und 75 % relativer Luftfeuchte entspricht die Emulsion nach vier Monaten nicht mehr den Anforderungen der Spezifikation. Der Gehalt für 17-β-Estradiol ist für die beiden im September 2002 und im Oktober 2003 hergestellten Chargen 1 und 2 zu jedem Zeitpunkt spezifikationskonform (ausgenommen

einem Wert für Progesteron der Charge 2). Für die im Mai 1999 hergestellte Charge kommt der Gehalt nur teilweise den Anforderungen nach.

Die Zubereitung entspricht nach sechs Monaten Lagerung bei 40 °C und 75 % relativer Luftfeuchte nicht mehr der Spezifikation.

4.3.4 Ergebnisse aus Beschleunigungsversuchen

Die Beschleunigungsversuche wurden zum einen bei 60 °C und 80 °C im Trockenschrank über drei Monate und zum anderen bei - 20 °C im Gefrierschrank über 48 Stunden durchgeführt. Insbesondere die Versuche bei höheren Temperaturen (60 °C und 80 °C) sind nicht definierten Anforderungen aus Leitlinien entnommen. Diese sind als Beschleunigungsversuche durchgeführt worden und sollen zudem Hinweise auf mögliche Veränderungen beim Transport oder bei einer kurzzeitigen Lagerung bei extremen Temperaturen geben. Dies schließt eine Abschätzung mit ein, ob Zersetzungsprodukte entstehen. Die ICH-Leitlinie Q3B zu Verunreinigungen in neuen Produkten unterscheidet drei verschiedene Stufen. Für jede Stufe ist ein bestimmtes Verfahren (Identifizierung, Quantifizierung) vorgesehen [54].

Nachfolgend werden die Ergebnisse aus den Beschleunigungsversuchen vorgestellt.

4.3.4.1 Ergebnisse aus der Lagerung bei 60 °C über 3 Monate

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	1 Monatswert	2 Monatswert	3 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht	entspricht nicht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,6	7,2	7,2	6,6
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht	entspricht nicht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,638 (A) P: 5,99 (A)	E2: 0,655 (A) P: 5,89 (A)	E2: 0,667 (A) P: 6,23 (A)	E2: 0,569 (A) P: 6,02 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 34: Ergebnisse der Charge 1 bei 60 °C

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	1 Monatswert	2 Monatswert	3 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht	entspricht nicht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,9	7,4	7,0	6,6
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht	entspricht nicht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,630 (A) P: 5,68 (A)	E2: 0,624 (A) P: 5,59 (A)	E2: 0,627 (A) P: 6,01 (A)	E2: 0,591 (A) P: 5,90 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 35: Ergebnisse der Charge 2 bei 60 °C

Nach einer Lagerung bei 60 °C über einen Untersuchungszeitraum von drei Monaten entspricht die Emulsion nicht der Spezifikation.

4.3.4.2 Ergebnisse aus der Lagerung bei 80 °C über 3 Monate

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	1 Monatswert	2 Monatswert	3 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht	entspricht nicht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,6	6,3	5,7	5,3
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht	entspricht nicht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,675 (A) P: 6,10 (A)	E2: 0,557 (A) P: 5,75 (A)	E2: 0,324 (A) P: 5,73 (A)	E2: 0,129 (A) P: 5,94 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 36: Ergebnisse der Charge 1 bei 80 °C

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	1 Monatswert	2 Monatswert	3 Monatswert
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht	entspricht nicht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,9	6,3	5,8	5,4
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht	entspricht nicht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,641 (A) P: 5,76 (A)	E2: 0,551 (A) P: 5,61 (A)	E2: 0,344 (A) P: 5,63 (A)	E2: 0,149 (A) P: 5,82 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 37: Ergebnisse der Charge 2 bei 80 °C

Die Emulsion entspricht nach drei Monaten Lagerung bei 80 °C nicht den Anforderungen der Spezifikation. Für 17-β-Estradiol lässt Methode A eine Gehaltsabnahme vermuten. Nach drei Monaten Lagerung werden nur noch ca. 20 % des ursprünglichen Gehalts gefunden.

4.3.4.3 Ergebnisse aus der Lagerung bei -20 °C über zwei Tage

Parameter	Akzeptanzgrenzen	Ausgangswert	48 h-Wert	Ausgangswert	48 h-Wert
		Charge 1		Charge 2	
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens u. Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht nicht	entspricht	entspricht nicht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,6	7,4	7,9	7,5
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht nicht	entspricht	entspricht nicht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	E2: 0,627 bis 0,693 P: 5,70 bis 6,30	E2: 0,674 (A) P: 6,05 (A)	E2: 0,629 (A) P: 5,77 (A)	E2: 0,638 (A) P: 5,73 (A)	E2: 0,642 (A) P: 5,66 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 38: Ergebnisse der Chargen 1 und 2 bei -20 °C

Nach zwei Tagen Aufbewahrung bei - 20 °C zeigt die Zubereitung schon makroskopisch durch einen leichten Gelbstich eine Veränderung. Sie entspricht nicht mehr den Akzeptanzkriterien der Spezifikation.

Zusammenfassend kann für die neue Hormon-Emulsion festgehalten werden, dass bei einer Lagerung bei Temperaturen ab 40 °C oder unter dem Gefrierpunkt die Emulsion selbst den limitierenden Faktor für die Haltbarkeit darstellt. Die Stabilität der Hormone 17-β-Estradiol und Progesteron an sich scheint gewährleistet zu sein. Die Unregelmäßigkeiten der Gehaltsergebnisse sind auf analytische Probleme zurückzuführen, die in der Diskussion aufgezeigt werden.

4.3.5 Ergebnisse aus Langzeituntersuchungen

Von jeder Charge wurden vier Ampullen bei Raumtemperatur (20 °C +/- 2 °C) in der Apotheke des Universitätsklinikums aufbewahrt und nach zwei, drei bzw. sechs Jahren vermessen.

Bei einer Lagerung von bis zu zwei Jahren bei Raumtemperatur (20 +/- 2 °C) zeigen sich keine qualitätsbeeinträchtigenden Veränderungen der neuen Zubereitung. Eine Ausnahme bildet der Gehalt für Progesteron, was jedoch speziell auf die Charge 2 zurückgeführt wird. Nach drei und sechs Jahren weist die Emulsion selbst gewisse Mängel auf, die den Einsatz der Zubereitung limitieren. Nach sechs Jahren ist mit Methode A eine Gehaltsabnahme für 17-β-Estradiol und Progesteron zu verzeichnen, auf die in der Diskussion Bezug genommen wird. Die Einzelergebnisse der Langzeituntersuchungen sind in Tabelle 39 aufgezeigt.

Parameter	Akzeptanzgrenzen aus der Spezifikation	2 Jahreswert (Charge 2)	3 Jahreswert (Charge 1)	6 Jahreswert (Charge 3)
Aussehen	milchig weiße Flüssigkeit	entspricht	entspricht	entspricht
Homogenität	keine Koaleszens und Flocculation, keine Phasentrennung	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht
pH-Wert	6,5 bis 8,5	7,4	7,2	7,0
Mikroskopische Beurteilung der Emulsion	≤ 1 µm: ≥ 99 %, < 5 Tropfen zw. 2 und 10 µm, kein Tropfen > 10 µm	entspricht	entspricht nicht	entspricht nicht
Identität	Retentionszeiten müssen entsprechen	entspricht	entspricht	entspricht
Gehalt [mg/ml]	17-β-Estradiol: 0,627 bis 0,693 Progesteron: 5,7 bis 6,3	E2: 0,661 (B) P: 5,610 (B)	E2: 0,657 (B) P: 5,838 (B)	E2: 0,560 (A) P: 5,532 (A)
Abbauprodukte	keine weiteren Peaks	entspricht	entspricht	entspricht

Tabelle 39: Ergebnisse aus Langzeituntersuchungen

4.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Kapitel 4.1 wurden Ziele formuliert, die mit den Ergebnissen aus den Stabilitätsuntersuchungen erreicht werden sollten. Die Optimierung des Analysenverfahrens ist eines dieser Ziele. Parallel zu den Einlagerungsversuchen wurde anhand der mit Methode A gewonnenen Ergebnisse Methode B entwickelt und deren Validierung durchgeführt. Die beiden Methoden werden in der Diskussion gegenübergestellt.

Die Bewertung der Robustheit der Emulsion ergibt sich vor allem aus den Beschleunigungsversuchen. Daraus ist abzuleiten, dass die chemisch physikalische Stabilität der Emulsion nach hohen (ab 40 °C) und sehr niedrigen (unter dem Gefrierpunkt) Temperatureinflüssen nicht mehr gewährleistet ist. Die Formulierung ist also gegenüber diesen Einflüssen labil. Die Veränderungen der Formulierung wirken sich negativ auf die Wiederfindung von 17-β-Estradiol und Progesteron mit den entwickelten Gehaltsbestimmungsmethoden A und B aus. Die Wirkstoffe selbst sind stabil [45, 46].

Aus diesen Ergebnissen leiten sich vor allem zwei Lagerungshinweise ab, um die Laufzeit der Zubereitung zu gewährleisten: „Nicht über 25 °C lagern“ (da die Hormon-Emulsion bei 30 °C nur über 6 Monate und keine 24 Monate getestet wurde, wird bezüglich des Lagerungshinweises eine Sicherheit miteinbezogen) und „Nicht einfrieren“. Probleme, die beim Transport und beim Versand auftreten können, betreffen ebenfalls in erster Linie die Emulsion selbst, die durch Temperaturen über 40 °C und nach Einfrieren irreversibel beeinträchtigt wird. Die Veränderung der Luftfeuchtigkeit hat keinen Einfluss auf die

Zubereitung, da die Emulsion in Glasampullen dicht verschlossen und von Sauerstoff und Feuchte unbeeinflusst ist.

Aufgrund der in den Beschleunigungs- und Langzeituntersuchungen erzielten Ergebnisse wird für die neue Zubereitung eine Mindesthaltbarkeit von einem Jahr festgelegt. Die vorläufige Laufzeit der Hormon-Emulsion wird mit zwei Jahren angesetzt.

5 Diskussion

5.1 Entwicklung von Methode A zu Methode B

Zur Gehaltsbestimmung der Hormone 17- β -Estradiol und Progesteron aus der neuen Hormon-Emulsion wurde zunächst Methode A entwickelt. Im Laufe der Untersuchungen fiel bei der Anwendung von Methode A auf, dass die ermittelten Einzelwerte der vier Probenaufbereitungen vor allem für 17- β -Estradiol zum Teil erheblich voneinander abwichen (Variationskoeffizienten von bis zu 4,6 %, siehe Tabelle 43, Kapitel 5.3.1). Für die Bestimmung der jeweiligen Proben ist jedoch ein Variationskoeffizient von < 2 % gefordert (Methodenpräzision). Diese Ergebnisse warfen die Frage auf, ob Methode A zuverlässig richtige Werte liefert und ob die Präzision der Methode in der Anwendung gewährleistet ist. Methode A wurde daraufhin auf mögliche Fehlerquellen untersucht.

Eine erste Schwierigkeit stellt die Herstellung von Stammlösung und Standardreihe dar. Die Einwaage der geringen Menge 17- β -Estradiol (0,0264 g) hat bereits für den Standard einen Fehler von ca. 2 % zur Folge (Näheres siehe Kapitel 8.1 im Anhang). Die weitere Verdünnung ist mit einem Pipettierfehler behaftet. Die Eppendorfpipetten werden zwar regelmäßig von einem externen Labor (Firma KDL) überprüft und kalibriert, weisen aber dennoch den Ergebnissen nach nicht die erforderliche Genauigkeit auf. Dies stellt ein generelles Problem dar, da die gleiche pipettierte Menge je nach ausführender Person sehr unterschiedlich sein kann.

Ein zweites Problem ist die Probenaufbereitung. Wie bereits erwähnt ist das Pipettieren mit Eppendorfpipetten ein kritischer Arbeitsschritt. In besonderem Maße gilt dies für Emulsionen. Ein reproduzierbares Pipettieren ist kaum möglich, da kleinere und größere Luftblasen im Inneren der Pipette das Volumen verändern, aber meist nicht sichtbar sind. Somit kann die in einer zu untersuchenden Probe eingesetzte Menge an 17- β -Estradiol und Progesteron eine Schwankungsbreite von bis zu 1,36 % aufzeigen (siehe Kapitel 8.3). Die in der aufbereiteten Probe enthaltenen Grund- und Hilfsstoffe der Emulsion (die Matrix) verursachen Probleme beim Arbeiten mit der HPLC-Anlage. Die Triglyceride aus der Matrix können sich in der Anlage festsetzen und somit zu Ablagerungen und Verstopfungen führen. Eine ungleichmäßige Flussrate ist die Folge. Gleichzeitig können die Wirkstoffe an diesen mit Fett besetzten Stellen unkontrolliert festgehalten und später wieder eluiert werden. Infolgedessen kann es zu Carry-over, das heißt zu Verschleppungen der Wirkstoffe und zu Geisterpeaks kommen. Geisterpeaks sind unregelmäßig an irgendeiner Stelle im Chromatogramm auftretende Peaks, die keiner Substanz aus der Analyse zugeordnet werden können. Ihnen können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen [11]. Bei einer Verschleppung wird eine Substanz in eines oder mehrere der folgenden Chromatogramme hinübergetragen. Dadurch wird das Ergebnis verfälscht (siehe Abbildung 24).

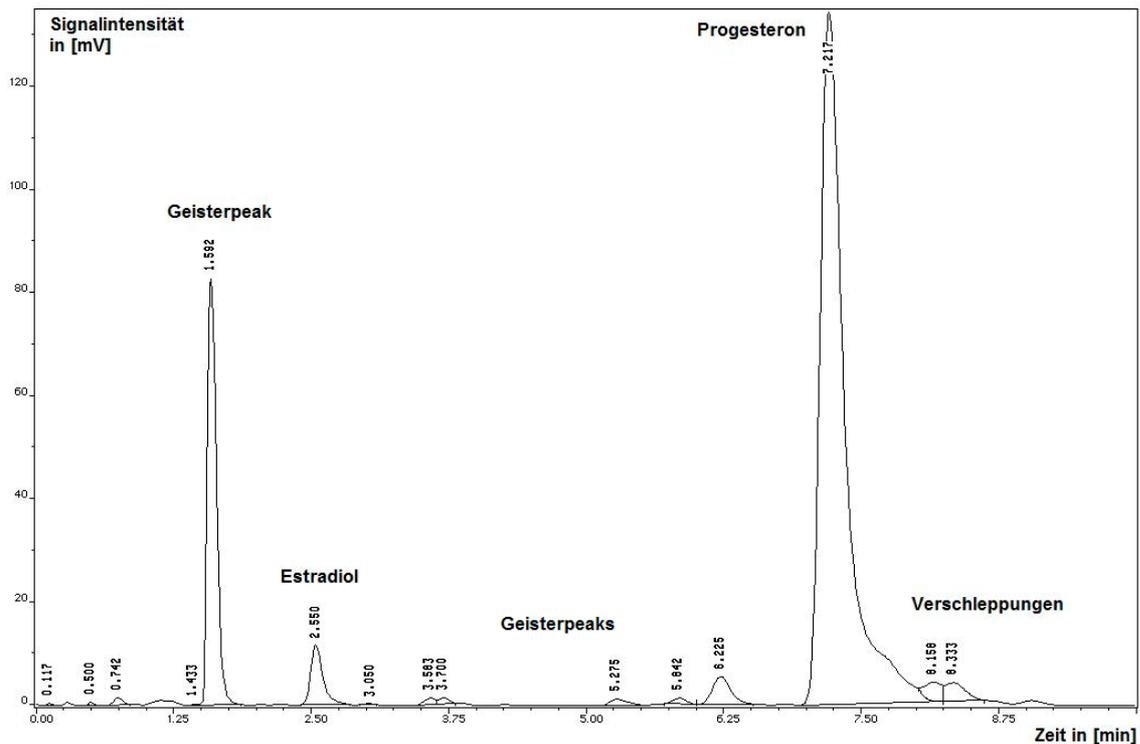


Abbildung 24: Chromatogramm von 17- β -Estradiol und Progesteron mit Geisterpeaks und Verschleppungen

Als Lösungsansatz für diese Probleme wurden verschiedene Spülschritte eingebaut. Als einziges dafür geeignetes Lösungsmittel mit ausreichender Effektivität hat sich wie bereits erwähnt THF erwiesen. Dieses hat aufgrund seiner apolaren Eigenschaften und möglicherweise durch die Etherstruktur eine gute Elutionskraft für lipophile Stoffe. Es hat den entscheidenden Nachteil, dass es das Material der in die HPLC-Anlage eingebauten Dichtungen sehr stark angreift. Somit wird ein großer Dichtungsabrieb verursacht. Die makroskopisch sichtbaren Partikel der Dichtung im Pumpenkopf sind beim Durchfluss durch die Pumpe die Ursache für eine ungleichmäßige Förderung des Fließmittels. Gleichzeitig verstopfen diese den Vorsäuleneingang, was einen erhöhten Druck und eine ungleichmäßige Förderung der mobilen Phase nach sich zieht.

Die Schwankung der Einzelwerte, die sich in hohen Variationskoeffizienten äußert, stellt ein drittes Problem dar. Die Anzahl der Variationskoeffizienten außerhalb der 2 % Grenze ist bei 17- β -Estradiol größer als bei Progesteron. Das gemessene Signal für 17- β -Estradiol weist aufgrund der um eine Zehnerpotenz geringeren Wirkstoffmenge (verglichen mit Progesteron) in der Probe eine sehr kleine Intensität von ca. 10 Millivolt auf, wohingegen für Progesteron ca. 100 Millivolt gemessen werden. Kleine Veränderungen während der Analyse verursachen folglich bei 17- β -Estradiol einen sehr viel größeren Messfehler als bei Progesteron. Dasselbe Problem zeigt sich auch beim Vermessen der Standardlösung A 100 % wie in Kapitel 3.2.1.1 und Tabelle 12 bereits beschrieben wurde.

Daraufhin wurde eine zweite Methode (Methode B) entwickelt, bei der die beschriebenen Probleme verbessert oder möglichst behoben werden sollten. Eine Übersicht über die veränderten Parameter von Methode B im Vergleich zu Methode A gibt Tabelle 40.

	Parameter	Methode A	Methode B
Herstellung Standard	Stammlösung	Sehr geringe Einwaage von 17- β -Estradiol (0,0264 g)	Einwaage von 17- β -Estradiol deutlich höher (0,165 g)
	Standardreihe	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendung von Eppendorfpipetten • abgedeckter Bereich: 90 - 110 % bezogen auf die aufbereitete Probe 	<ul style="list-style-type: none"> • Verwendung von Glasvollpipetten • abgedeckter Bereich: 80 - 120 % bezogen auf die aufbereitete Probe
Proben	Probenaufbereitung	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsion wird verdünnt → Matrixbestandteile in der Probe • Verwendung von Eppendorfpipetten 	<ul style="list-style-type: none"> • Abtrennung der Matrixbestandteile durch Festphasenextraktion • Probenaufgabe mit Eppendorfpipette und Wägung
	Probenvermessung	<ul style="list-style-type: none"> • Vier Ampullen werden gemischt und daraus vier Proben gezogen, die je einmal vermessen werden • direkte Mittelwertbestimmung, keine Aussage über einzelne Ampullen möglich • Grundlage des Endergebnisses sind vier Bestimmungen 	<ul style="list-style-type: none"> • Jede Ampulle wird separat untersucht, zu jeder aufbereiteten Probe gibt es vier Messwerte • statistische Mittelwertbestimmung durch Auswertung der Einzelmessungen, jede Ampulle kann beurteilt werden • Grundlage des Endergebnisses sind 16 Messungen
	Aufstockung	keine	Die Probelösung wird mit 17- β -Estradiol aufgestockt und dadurch die Intensität des 17- β -Estradiolsignals erhöht, aber die Methode ist bezüglich kleiner Änderungen des Gehaltes aus der Probe weniger sensibel
Analysenparameter	Spülschritt	THF, zweifach nach jeder Injektion sowie vor und nach jedem Vial	Isopropanol, einfach nach jeder Injektion

Tabelle 40: Unterschiede der Methoden A und B

5.2 Gegenüberstellung der Methoden A und B

5.2.1 Systempräzision

Methode A:

Die Systempräzision entspricht für 17- β -Estradiol bei der Validierung von Methode A nicht der Anforderung (Variationskoeffizient $< 2\%$, siehe Tabelle 9). Zum Zeitpunkt der Validierung von Methode A wurde als Akzeptanzkriterium die Standardabweichung verwendet, die $< 2\%$ sein sollte. Die Gehaltswerte wurden in Prozent angegeben. Damit lag die Standardabweichung genau bei 2% und wurde akzeptiert. Werden dieselben Werte nicht in Prozent sondern mit der Fläche der aufgenommenen Peaks ausgedrückt und der Variationskoeffizient bestimmt, entspricht das Ergebnis mit einem Variationskoeffizienten von $2,29\%$ nicht den Anforderungen. Letztere Art der Angabe ist die gängigere, deshalb wurde sie für die Präsentation der Ergebnisse und für Methode B gewählt.

Die Ungenauigkeit der Standardherstellung von Methode A, insbesondere für 17- β -Estradiol, stellt demnach ein Problem dar. Als Gründe hierfür kommen wie bereits in Kapitel 5.1 diskutiert die sehr kleine Einwaage von 17- β -Estradiol und die anschließende Verdünnung mit Hilfe von Eppendorfpipetten in Betracht. Beim Nachweis der Systempräzision für Methode A wurde die Stammlösung nur einmal hergestellt und daraus sechs unterschiedliche Verdünnungen zubereitet. Das bedeutet, dass die Systempräzision nur den Pipettierschritt und nicht den Wägeschritt abdeckt. Unter Umständen wäre der Variationskoeffizient noch größer, würden sechs verschiedene Stammlösungen und daraus je eine Verdünnung hergestellt. Da der Standard die Bezugsgröße ist, mit deren Hilfe die Werte der Proben bestimmt werden, sollte der Fehler, mit dem der Standard durch die Herstellung behaftet ist, möglichst gering sein.

Methode B:

Bei Methode B ist die Standardherstellung durch die größere Einwaage von 17- β -Estradiol und das Arbeiten mit Glasvollpipetten genauer. Im Gegensatz zu Methode A wurde bei Methode B die Systempräzision durch sechsmaliges Herstellen einer Stammlösung, die zu sechs Standardlösungen B 100% weiterverdünnt wurden, ermittelt. Sie umfasst damit beide Arbeitsschritte (Wiegen und Pipettieren) und entspricht mit einem Variationskoeffizienten von $1,82\%$ den Vorgaben der Validierung.

Die Standardherstellung wird deshalb für Methode B im Gegensatz zu Methode A als weniger fehlerbehaftet und damit als exakter betrachtet.

5.2.2 Funktionstüchtigkeit des Systems

Methode A:

Vor Beginn der Messung wird die Funktionstüchtigkeit des Systems durch den Systemeignungstest (siehe Kapitel 3.2.2.4) überprüft und nachgewiesen. Bei Methode A fehlt dieser Schritt. Überdies ist während der Messung eine Kontrolle, ob das System richtig arbeitet, nicht möglich, da Methode A jede aufbereitete Probe aus der Mischung der vier Ampullen nur einmal vermisst. Es kann daher nicht auf einfache Weise nachvollzogen werden, ob Schwankungen, wie sie in Tabelle 43 (Kapitel 5.3.1) dargestellt werden, durch das System oder durch die Proben selbst verursacht werden.

Methode B:

Bei Methode B wird dagegen vor jeder Probenmessung die Eignung des Systems überprüft. Durch das Einfügen von Kontrollstandards kann die Funktionstüchtigkeit des Systems während des gesamten Messzeitraums überprüft werden. Unregelmäßigkeiten, zum Beispiel durch Schwankungen der Flussrate oder des Drucks, können so bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Dies macht den Ablauf der Messungen, die zum Teil über einen langen Zeitraum durchgeführt wurden, transparent.

Dadurch, dass bei Methode B jede Ampulle separat aufbereitet und viermal vermessen wird, ist zum einen eine Aussage über die einzelnen Ampullen möglich und durch die Betrachtung der Variationskoeffizienten der Einzelmessungen jeder Ampulle eine Bewertung des Systems, bzw. der Gerätepräzision. Liegen die Variationskoeffizienten unter einem Prozent, kann von einem einwandfreien Arbeiten des Systems ausgegangen werden. Es kann also überprüft werden, ob das Gerät bei einer Probe zuverlässig und den Kriterien der Validierung entsprechend gearbeitet hat.

Methode B sichert die Übereinstimmung des aktuellen Systems mit den Anforderungen der Validierung am Beginn eines jeden Messtages ab. Zusätzlich wird der Verlauf der Messungen kontrolliert. Dadurch können Fehler erkannt werden, die durch das System zustande kommen. Methode B ist deshalb in diesem Punkt Methode A überlegen.

5.2.3 Robustheit

Methode A:

Ein Problem bei der Durchführung der Validierung von Methode A stellt die Bestimmung der Robustheit dar. Es wurden zwar wichtige HPLC-Parameter wie Flussrate, Säulentemperatur oder Zusammensetzung der mobilen Phase variiert und die Probe vermessen. Da der Standard unter den veränderten Bedingungen jedoch nicht mitbestimmt wurde, kann keine Aussage über den unter veränderten Bedingungen ermittelten Gehalt der Probe gemacht werden. Dies ist aber entscheidend für die Beurteilung der Robustheit einer Methode. Es kann daher in diesem Bereich keine Aussage zu Methode A gemacht werden.

Methode B:

Für Methode B wurde der Standard bei den Messungen unter veränderten Bedingungen mitbestimmt und in Kapitel 3.2.4.5 eine ausreichende Robustheit nachgewiesen.

5.3 Vergleich der Analyseergebnisse mit Methode A und B

Nach erfolgreicher Entwicklung und Validierung von Methode B wurden exemplarisch einige Untersuchungen mit beiden Methoden durchgeführt. Abbildung 25 gibt einen Überblick über den parallelen Einsatz von Methode A und B. Dabei sind nur die Untersuchungen (Temperaturen) in den Kästchen angegeben, bei denen mit beiden Methoden gearbeitet wurde.

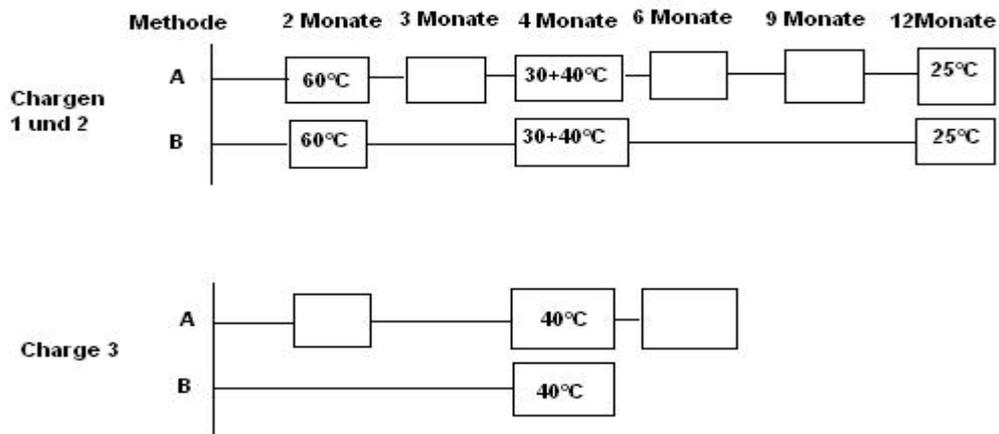


Abbildung 25: Paralleler Einsatz der Methoden A und B bei den in den Kästchen angegebenen Versuchen

In den Tabellen 41 und 42 werden die Ergebnisse, die mit beiden Gehaltsbestimmungsmethoden parallel ermittelt wurden, gegenübergestellt. Der Übersichtlichkeit halber werden die Werte nur in % angegeben. Dick gedruckt sind die Werte, die der Spezifikation entsprechen. Eine Differenz von 2 - 3 % zwischen Methode A und B kann toleriert werden. Dies entspricht der analytischen Streuung [29].

Versuch	Charge	Gehalt 17-β-Estradiol [%]		
		Methode A	Methode B	Differenz Methode A abzüglich Methode B [%]
25 °C 12 Monate	1	99,1%	99,6 %	- 0,5
	2	96,7 %	99,1 %	- 2,4
30°C 4 Monate	1	90,5 %	100,6 %	- 10,1
	2	90,0 %	99,7 %	- 9,7
40°C 4 Monate	1	91,4 %	101,0 %	- 9,6
	2	89,9 %	100,5 %	- 10,6
	3	81,5 %	100,1 %	- 18,6
60°C 2 Monate	1	65,5 %	96,2 %	- 30,8
	2	67,6 %	95,7 %	- 28,1
- 20°C 2 Tage	2	97,3 %	94,7 %	+ 2,6
		92,2 %	86,9 %	+ 5,3
	4 ²	103,5 %	87,4 %	+ 16,1
		99,3 %	86,7 %	+ 12,6
2 Jahre bei Raumtemperatur	2	94,2 %	100,1 %	- 5,9
3 Jahre bei Raumtemperatur	1	97,0 %	99,6 %	- 2,6

Tabelle 41: Parallel mit Methode A und B ermittelte Ergebnisse für 17-β-Estradiol

² Herstellung der Charge 4 im Februar 2005

Versuch	Charge	Gehalt Progesteron [%]		
		Methode A	Methode B	Differenz Methode A abzüglich Methode B [%]
25 °C 12 Monate	1	99,0%	99,9 %	- 0,9
	2	94,4 %	93,7 %	+ 0,7
30°C 4 Monate	1	95,9 %	96,8 %	- 0,9
	2	93,3 %	91,9 %	+ 1,0
40°C 4 Monate	1	96,8 %	98,2 %	- 1,4
	2	93,7 %	91,9 %	+ 1,8
	3	93,7 %	93,9 %	- 0,2
60°C 2 Monate	1	98,0 %	99,0 %	+ 1,0
	2	93,9 %	92,8 %	+ 1,1
- 20°C 2 Tage	2	94,3 %	72,1 %	+ 25,0
		94,0 %	20,6 %	+ 73,4
	4	104,5 %	18,6 %	+ 85,9
		99,4 %	17,3 %	+ 82,1
2 Jahre bei Raumtemperatur	2	92,5 %	93,5 %	- 1,0
3 Jahre bei Raumtemperatur	1	98,3 %	97,3 %	+ 1,0

Tabelle 42: Parallel mit Methode A und B ermittelte Ergebnisse für Progesteron

5.3.1 Beobachtungen im Lauf der Anwendung

Für Methode A fallen beim Betrachten der Ergebnisse in ihrer Gesamtheit einige Ausreißer auf, die in allen Versuchen zu finden sind und für die es keine plausible Erklärung gibt. Dies betrifft zum Beispiel den 9 Monatswert bei 25 °C (siehe Tabelle 28, Kapitel 4.3.1), die Versuche bei 40 °C (Tabelle 33, Kapitel 4.3.3) und die Beschleunigungsversuche. Nach 9 Monaten Lagerung bei 25 °C entspricht der Gehalt an 17-β-Estradiol für die Charge 2 nicht mehr der Spezifikation, wohingegen die darauffolgende Untersuchung nach 12 Monaten einen spezifikationskonformen Gehalt liefert.

Die Ergebnisse, die mit Methode A erzielt werden, sind demnach uneinheitlich und lassen dafür keine Erklärung durch eine Veränderung der Probe selbst zu. Vielmehr sind diese Unregelmäßigkeiten den bereits diskutierten Phänomenen von Methode A zuzuschreiben, wie der Ungenauigkeit des Standards, den Problemen, die eine Injektion der Matrix in die HPLC-Anlage nach sich zieht, und der geringen Signalintensität für 17-β-Estradiol.

Ein weiteres bereits vorgestelltes Problem stellen die großen Schwankungen der Einzelwerte bei Methode A dar. Sie treten unregelmäßig auf und lassen die Richtigkeit des Ergebnisses fragwürdig erscheinen. Anhand eines Beispiels (siehe Tabelle 43) soll dieses Phänomen verdeutlicht werden. Gegenübergestellt werden die Ergebnisse von Methode A (nach 2 Monaten) und B (nach 4 Monaten) für 17-β-Estradiol bei 30°C. Auffallend ist der hohe

Variationskoeffizient für Methode A. Entsprechend ist der Bereich, in dem 95 % der Werte zu liegen kommen (Vertrauensbereich 95 %), breit.

Für Methode B liegen sowohl die Variationskoeffizienten der Mehrfachbestimmungen (Gerätepräzision) aus einer Ampulle als auch die Mittelwerte der Ampullen untereinander innerhalb der in der Validierung gezeigten und geforderten Grenzen. Der Vertrauensbereich 95 % ist dementsprechend eng.

Dieses Beispiel zeigt exemplarisch eine Schwachstelle von Methode A auf, die durch Optimierung in Methode B beseitigt werden konnte.

	Gehalt 17-β-Estradiol [mg/ml]		Gehalt 17-β-Estradiol [mg/ml]
	Methode A		Methode B
Messung 1	0,638	Mittelwert aus 4 Messungen von Ampulle 1	0,672
		Variationskoeffizient	0,04 %
Messung 2	0,639	Mittelwert aus 4 Messungen von Ampulle 1	0,689
		Variationskoeffizient	0,15 %
Messung 3	0,696	Mittelwert aus 4 Messungen von Ampulle 1	0,659
		Variationskoeffizient	0,3 %
Messung 4	0,686	Mittelwert aus 4 Messungen von Ampulle 1	0,665
		Variationskoeffizient	0,3 %
Mittelwert	0,665		0,671
Standardabweichung	0,0306		0,0130
Variationskoeffizient	4,60 %		1,93 %
Vertrauensbereich 95 %	0,635 bis 0,695		0,658 bis 0,684

Tabelle 43: Exemplarischer Vergleich von Methode A und B für 17- β -Estradiol nach statistischer Auswertung

5.3.2 Voraussetzung für die Gehaltsbestimmungsmethode

Den Ergebnissen von Methode A nach zu urteilen, findet für 17- β -Estradiol bei 40 °C, 60 °C und 80 °C eine deutliche Gehaltsabnahme statt (siehe Tabelle 41). Bei - 20°C verzeichnen beide Methoden für beide Hormone zum Teil einen Gehaltsverlust (siehe Tabelle 41 und 42). Da 17- β -Estradiol und Progesteron relativ stabile Wirkstoffe darstellen [45, 46, 35, 36], ist nicht zu erwarten, dass tatsächlich eine derartige Wirkstoffabnahme stattfindet. Für höhere Temperaturen (> 30°C) scheint also Methode A keine zuverlässigen Ergebnisse zu liefern. Erklären lässt sich dieses Phänomen damit, dass die Emulsion bei diesen Temperaturen in der Weise verändert wird, dass freie Fettsäuren und Peroxide entstehen (chemische Veränderung

der Emulsion) [43, 44, 47, 48, 49, 50]. Diese verteilen sich auf der stationären Phase und im System der HPLC-Anlage und machen eine einwandfreie quantitative Bestimmung der Hormone 17- β -Estradiol und Progesteron unmöglich. Methode B liefert einheitlich gute Ergebnisse. Die freien Fettsäuren und Peroxide werden durch die SPE-Probenaufbereitung abgetrennt und stören die Gehaltsbestimmung nicht.

Nach Einfrieren der Emulsion wird die disperse Verteilung der Emulsion durch Ausfrieren der Wasserphase zerstört. Durch das Zusammenfließen der Ölphase entstehen große Fetttropfen (physikalische Veränderung der Emulsion). Diese Veränderung ist im Mikroskop deutlich zu beobachten. Auch die Hormone werden zum Teil aus dem Fett ausgefrozen, und es bilden sich Hormonkristalle. Infolgedessen liegt keine homogene Verteilung der Wirkstoffe mehr vor. Sie ist auch durch Aufschütteln der Emulsion nicht mehr erreichbar. Da bei der Probenaufbereitung nur ein Teil aus der Ampulle entnommen wird, kann der darin enthaltene Wirkstoffanteil erheblich variieren und damit auch die Wiederfindungsrate bei der Probenbestimmung mittels HPLC.

Die obigen Ausführungen belegen, dass eine intakte Emulsion die Voraussetzung für eine Bestimmung der Hormone 17- β -Estradiol und Progesteron in der neuen Hormon-Emulsion ist.

5.3.3 Besonderheiten

Bei Progesteron fällt auf, dass der Gehalt der Charge 2 zu keinem der in Tabelle 42 angegebenen Zeitpunkte der Spezifikation entspricht, wobei Charge 1 zu jedem Zeitpunkt den erforderlichen Gehalt aufweist. Es besteht die Vermutung, dass diesem Phänomen ein chargenspezifisches Problem zugrunde liegt.

5.3.4 Fazit

Die Ausführungen in den Kapiteln 5.2 und 5.3 zeigen, dass Methode B Methode A sowohl methodisch als auch bezüglich der erzielten Ergebnisse überlegen ist. Sie stellt damit eine klare Verbesserung und Weiterentwicklung dar.

5.4 Stabilitätsuntersuchungen

5.4.1 Ergebnisse nach Lagerung bei 25 °C / 60 % RF

Für eine Lagerung bei 25 °C und 60 % relativer Luftfeuchte entspricht die Zubereitung über den gesamten Untersuchungszeitraum von 12 Monaten in allen Parametern der Spezifikation. Betrachtet man nur die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung in Tabelle 28 (Kapitel 4.3.1), so müssten der obigen Feststellung drei Ergebnisse ausgenommen werden: Der 9 Monatswert für 17- β -Estradiol und Progesteron (Charge 2) und der 12 Monatswert für Progesteron (Charge 2). Bei der Diskussion der beiden Gehaltsbestimmungsmethoden A und B in Kapitel 5.1 und 5.3 wurde bereits deren Zuverlässigkeit erörtert. Ergebnis ist, dass mit Methode A bei allen Versuchen für 17- β -Estradiol Ausreißer zu beobachten sind, die nicht direkt nachvollziehbar sind. Deshalb, und aufgrund der erläuterten analytischen Probleme (geringe Signalintensität für 17- β -Estradiol, in der Probe enthaltene Matrixbestandteile und Standardungenauigkeit), wurde sie als weniger zuverlässig gewertet als Methode B. Diese

zeigt eine Konstanz der Ergebnisse sowohl für 17- β -Estradiol als auch für Progesteron. Die Gehaltsabweichung für 17- β -Estradiol nach 9 Monaten wird demnach als Ausreißer gewertet, der aufgrund von analytischen Problemen und nicht durch Veränderungen in der Zubereitung entstanden ist. Deshalb wird er im Endergebnis nicht berücksichtigt.

Die Abweichungen von Progesteron sind aller Wahrscheinlichkeit nach auf ein chargenbezogenes Problem zurückzuführen, das in Kapitel 5.3.3 bereits erläutert wurde. Sie betreffen demnach nicht die Zubereitung selbst. Es ist auffallend, dass für beide Methoden immer nur die Charge 2 nicht den Anforderungen entspricht. Der Gehalt an Progesteron ist deshalb für Charge 2 nicht einwandfrei nachgewiesen.

Aus den dargelegten Gründen werden die Ausreißer für den Gehalt an 17- β -Estradiol und Progesteron nicht in das Endergebnis mit einbezogen. Die Zubereitung weist also nach 12 Monaten Lagerung bei 25°C und 60 % relativer Feuchte die Qualität auf, die in der Spezifikation definiert und gefordert wird.

5.4.2 Ergebnisse nach Lagerung bei 30 °C / 65 % RF

Nach einer Lagerung bei 30 °C und 65 % relativer Luftfeuchte über sechs Monate ist während des gesamten Untersuchungszeitraums die Qualität der Zubereitung in allen untersuchten Parametern gewährleistet. Die Charge 2 muss davon aus den bereits dargelegten Gründen wieder ausgenommen werden.

5.4.3 Ergebnisse nach Lagerung bei 40 °C / 75 % RF

Die Ergebnisse aus der Lagerung bei 40 °C über sechs Monate liefern hauptsächlich Informationen über die Emulsionsstabilität. Bei der mikroskopischen Beurteilung der Emulsion werden spätestens nach sechs Monaten die Akzeptanzkriterien nicht mehr erreicht. Damit entspricht die Zubereitung nicht mehr den Qualitätsanforderungen, die in der Spezifikation festgelegt sind. Die Emulsionsstabilität soll anschließend in Kapitel 5.4.4 separat betrachtet werden.

Bezüglich des Gehaltes sind keine Auffälligkeiten festzustellen. Für die Charge 2 ist wie nach der Lagerung bei 30 °C für Progesteron teilweise ein Gehaltsverlust zu verzeichnen, der aber nur diese Charge betrifft und damit nicht für die Bewertung des Gehaltes der Zubereitung herangezogen wird. Die älteste Charge 3 zeigt für 17- β -Estradiol und Progesteron je nach Gehaltsbestimmungsmethode unterschiedliche Ergebnisse. Für 17- β -Estradiol wird mit Methode A zu keinem Zeitpunkt die Spezifikation erfüllt, wohingegen Methode B nach vier Monaten einen spezifikationskonformen Wert liefert. Wie bereits diskutiert wurde, wird dies auf Methode A zurückgeführt, die nach einer Lagerung bei höheren Temperaturen (ab 30 °C) nicht mehr geeignet ist, den Gehalt der Hormone zu bestimmen. Für Progesteron sind die Ergebnisse uneinheitlich. Da die Charge 3 im Mai 1999 hergestellt wurde und damit zum Untersuchungszeitpunkt für eine Emulsion schon verhältnismäßig alt war, kann davon ausgegangen werden, dass die Matrix zum Teil schon vor der Einlagerung, also vor Beginn der Untersuchungen, Veränderungen aufwies. Durch den Temperatureinfluss von 40 °C sind diese Veränderungen sicherlich noch verstärkt worden. Bei den abweichenden Ergebnissen von Charge 3 handelt es sich also um ein analytisches Problem, welches aufgrund des Alters der Charge 3 zustande kommt. Die Gehaltsergebnisse beider Methoden sind deshalb bei dieser ältesten Charge nicht aussagekräftig.

Letztlich entspricht die Zubereitung nach sechs Monaten Lagerung bei 40 °C nicht mehr der Spezifikation, was vielmehr an den Mängeln der Emulsion als an der Stabilität der beiden Hormone 17- β -Estradiol und Progesteron liegt.

5.4.4 Robustheit der Emulsion

Eine Emulsion stellt immer ein System dar, das die Tendenz zur Instabilität zeigt [33, 38]. Verglichen beispielsweise mit einer Tablette, die als eine relativ stabile Formulierung bezeichnet werden kann, ist eine Emulsion ein sogenanntes disperses System, das leicht durch Einflüsse von außen destabilisiert werden kann. Um die Verteilung der Öl- in der Wasserphase möglichst lange zu erhalten, wird die Emulsion mit einer oberflächenaktiven Substanz, einem Emulgator, stabilisiert. Bei der neuen Zubereitung wurden Phospholipide verwendet, die verglichen mit anderen Emulgatoren eine gute Stabilität der Emulsion gewährleisten [37]. Emulsionen werden in ihrer Stabilität durch Wärme beeinträchtigt, was ihre Haltbarkeit herabsetzt [37, 38]. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen zeigen, dass die neue Hormon-Emulsion ab 40 °C nicht mehr den Anforderungen der Spezifikation entspricht. Auch der Prozess des Einfrierens hat weitreichende Auswirkungen auf eine Emulsion. Es kommt zur Phasentrennung, was bedeutet, dass die Emulsion irreversibel zerstört wird [37, 38]. Folglich ist die Formulierung der neuen Zubereitung gegen Temperatureinflüsse sensibel. Daraus leiten sich die Hinweise für die Lagerung ab, die in Kapitel 4.3.6 festgelegt wurden.

Die Einflüsse auf die Emulsion, die durch unterschiedliche Bedingungen bei der Herstellung zustande kommen, sind in dieser Arbeit nicht untersucht worden. Die Beurteilung der Robustheit der Emulsion beschränkt sich damit auf den Temperatureinfluss bei der Lagerung der Ampullen.

Zur Beurteilung der Emulsion wurde eine Modifikation der Analysenmethode zur mikroskopischen Partikelzählung aus dem Europäischen Arzneibuch gewählt [28]. Gängige und geeignete Methoden zur Charakterisierung von Lipidemulsionen sind die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), die Bestimmung der Tröpfchengröße nach dem Prinzip des Coulter Counters, die Bestimmung des Zeta-Potentials und schließlich die mikroskopische Untersuchung [37, 39, 40]. Hier wurde die mikroskopische Untersuchung als Analysenmethode gewählt. Sie stellt eine einfache und schnelle Methode dar, Emulsionen auf ihre Qualität zu überprüfen.

5.4.5 pH-Wert

Ein wesentlicher Abfall des pH-Wertes unter die in der Spezifikation angegebene Grenze von 6,5 ist nur bei einer Lagerung bei 80 °C zu beobachten. Dies ist ein Beleg für die postulierte Entstehung von freien Fettsäuren unter hohen Temperaturen, der pH-Wert verschiebt sich folglich in Richtung sauer. Alle anderen Werte entsprechen den Akzeptanzkriterien der Spezifikation.

5.4.6 Abbauprodukte

Die Feststellung und Qualifizierung von Abbauprodukten ist ein sehr aufwendiger und zeitintensiver Prozess. Da die Möglichkeiten, die Zubereitung nach den Stressversuchen auf Abbauprodukte hin zu untersuchen, begrenzt waren, wurde lediglich das Chromatogramm auf eventuelle zusätzliche Peaks ausgewertet. Auf weitere Nachforschungen bezüglich Abbauprodukten wurde verzichtet, da weder nach einer Lagerung bei 60 °C und 80 °C noch nach Einfrieren der Ampullen zusätzliche Peaks zu erkennen waren.

Die einzige bisher bekannte Methode zur Bestimmung von Abbauprodukten von 17- β -Estradiol ist eine von Nygaard et al. entwickelte HPLC-Methode zur Identifizierung von Abbauprodukten und Syntheseverunreinigungen von 17- β -Estradiol aus Vagifem[®] Tabletten. Dabei werden als Abbauprodukte von Vagifem[®] 6-Keto-E2 und 6-Dehydro-E2 genannt. Die gefundene Konzentration beträgt im Durchschnitt bei 6-Keto-E2 0,9 % und bei 6-Dehydro-E2

0,57 % bezogen auf die Ausgangsmenge von 17- β -Estradiol [41]. Diese Ergebnisse sind aber nicht auf die neue Hormon-Emulsion übertragbar, da es sich um unterschiedliche Darreichungsformen handelt. In den Monographien des europäischen Arzneibuchs finden sich Angaben zu möglichen Verunreinigungen (Abbauprodukte und Syntheseausgangsstoffe) für 17- β -Estradiol und Progesteron [28]. Es ist jedoch derzeit nicht geklärt, ob sie in der neuen Hormon-Emulsion überhaupt entstehen und falls Abbauprodukte anfallen, welche dies sind. Mit den in dieser Arbeit entwickelten Gehaltsbestimmungsmethoden (HPLC) konnten keine Abbauprodukte detektiert werden.

5.4.7 Vorläufige Mindesthaltbarkeit und Laufzeit

Aufgrund der Ergebnisse aus den Beschleunigungs- und Langzeitversuchen wurde in Kapitel 4.3.6 eine vorläufige Mindesthaltbarkeit von einem Jahr angegeben, die durch die Untersuchung der Ampullen bei 25 °C und 60 % relativer Luftfeuchte über 12 Monate ausreichend abgesichert ist. Den limitierenden Faktor für die vorläufige Laufzeit der neuen Zubereitung stellt nicht der Gehalt der beiden Hormone 17- β -Estradiol und Progesteron dar, sondern die Stabilität der Emulsion. Die Angabe der vorläufigen Laufzeit der neuen Hormon-Emulsion stützt sich auf die Ergebnisse aus den Langzeituntersuchungen bei Raumtemperatur, die über einen Zeitraum von 24 und 36 Monaten gewonnen wurden.

Andere bereits im Handel befindliche Emulsionen mit lipophilen Wirkstoffen zur i.v. Anwendung (Darreichungsform vergleichbar mit der neuen Hormon-Emulsion) der Firma B. Braun Melsungen AG (Propofol-[®]Lipuro und Diazepam-[®]Lipuro) und der Firma Astra Zeneca GmbH (Disoprivan[®]) haben laut Fachinformation eine Laufzeit von zwei Jahren [51, 52, 53].

6 Zusammenfassung

Sehr kleine Frühgeborene werden im Gegensatz zu reif geborenen Kindern zu einem sehr frühen Zeitpunkt ihrer Entwicklung von der intrauterinen Versorgung mit 17- β -Estradiol und Progesteron abgeschnitten. Dieser offensichtliche Mangel könnte mit ursächlich sein für nach der Geburt häufig auftretende Komplikationen wie beispielsweise das Atemnotsyndrom oder eine gestörte neurologische Entwicklung. Die neue Hormon-Emulsion zur intravenösen Substitution soll diesem Mangel und den eventuellen Folgen entgegenwirken. Auf dem Weg zur Zulassung als Arzneimittel sind vielfältige Untersuchungen notwendig. Neben der Absicherung der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit in klinischen Studien ist die Entwicklung und der Nachweis über die Qualität der neuen Zubereitung ein wichtiger Bestandteil. Die Qualitätskontrolle erbringt diesen Nachweis, indem sie durch die Freigabe die Übereinstimmung mit der entwickelten Spezifikation bestätigt. Ein wichtiger Punkt zur Beurteilung der Qualität einer Zubereitung ist die Abklärung der Stabilität und die Festlegung der Haltbarkeit.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Spezifikation für die neue Hormon-Emulsion entwickelt, deren wichtigster Inhalt die Entwicklung einer Gehaltsbestimmungsmethode für die Hormone 17- β -Estradiol und Progesteron in der neuen Zubereitung ist. Des Weiteren wurde ein Stabilitätsprogramm für die neue Hormon-Emulsion durchgeführt mit dem Ziel, orientierende Hinweise für die Dauer der Haltbarkeit zu gewinnen und Aussagen über die Robustheit der Emulsion machen zu können.

Als Grundlage für die Entwicklung der Gehaltsbestimmungsmethode wurden Angaben aus dem amerikanischen Arzneibuch verwendet, das ein Verfahren mit Hilfe der HPLC beschreibt [26]. Die zunächst entwickelte Methode A wurde für die Ausgangsbestimmungen und die Untersuchungen der Zubereitung im Stabilitätsprogramm angewendet. Im Zuge ihres Einsatzes stellte sich heraus, dass sie Schwachstellen aufweist und deshalb für den routinemäßigen Einsatz keine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit liefert. Durch die Weiterentwicklung zur Methode B wurde das Verfahren optimiert. Exemplarisch wurden einige Untersuchungen mit beiden Analysemethoden A und B durchgeführt. Dabei erwies sich Methode B als die zuverlässigere, vor allem für die Bestimmung des Gehaltes nach einer Lagerung bei Temperaturen von mehr als 30 °C. Beide Verfahren haben ihre Grenze in der Bestimmung der Hormone aus einer nicht intakten Emulsion, wobei dies für Methode B lediglich nach irreversibler Veränderung der Emulsion durch Einfrieren gilt.

Das Stabilitätsprogramm wurde für die vorhandenen Möglichkeiten anhand der internationalen Leitlinien zu Stabilitätsuntersuchungen erarbeitet. Es wurden zwei Chargen in fünf verschiedenen Beschleunigungs- und vier Langzeitversuchen überprüft. Grundlage für die Untersuchungen der eingelagerten Ampullen war die Spezifikation der neuen Hormon-Emulsion. Die Ergebnisse lassen sich in den Lagerungshinweisen und der Angabe der vorläufigen Mindesthaltbarkeit und Laufzeit für die neue Zubereitung zusammenfassen: Die Hormon-Emulsion darf nicht über 25 °C gelagert und nicht eingefroren werden, da sonst die Stabilität der Emulsion nicht gewährleistet ist. Eine vorläufige Mindesthaltbarkeit von 12 Monaten ist durch die Ergebnisse aus den Langzeituntersuchungen abgesichert. Die vorläufige Laufzeit der Zubereitung wird auf 24 Monate festgelegt. Es ist anzumerken, dass für die Haltbarkeit nicht die Stabilität der Hormone 17- β -Estradiol und Progesteron den limitierenden Faktor darstellen, sondern die Emulsion selbst. Für die abschließende Beurteilung der Zubereitung mit dem Ziel der Zulassung sind noch weiterreichende Untersuchungen aufbauend auf den bereits gewonnenen Ergebnissen angezeigt.

7 Literaturangaben

- [1] Trotter, A.; Pohlandt F.
The replacement of estradiol and progesterone in very premature infants
Annals of Medicine, 2000; 32
- [2] Trotter, A.; Maier, L.; Grill, H-J.; Kohn, T.; Heckmann, M.; Pohlandt, F.
Effects of postnatal estradiol and progesterone replacement in extremely preterm infants
Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1999; Vol. 84, No. 12,
- [3] Trotter, A.; Maier, L.; Grill, H-J.; Wudy, S.A.; Pohlandt, F.
17- β -Estradiol and progesterone supplementation in extremely low-birth-weight infants
Pediatric Research, 1999; Vol. 45, No. 4
- [4] Trotter, A.; Maier, L.; Pohlandt, F.
Management of the extremely preterm infant
Paediatric Drugs, 2001; 3 (9): 629-637
- [5] Tulchinsky, D.; Hobel, C.J.; Yeager, E. et al
Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy (I): normal pregnancy
American Journal of Obstetrics & Gynecology, 1972; 112: 1095-10100
- [6] Hercz, P.
Quantitative changes in steroid and peptide hormones in the maternal-fetoplacental system between the 28th-40th weeks of pregnancy
Acta Medica Hungarica, 1985; 42: 29-39
- [7] Dvoracek, E.; Kassai, Z.; Torok, I. et al.
Sexual steroid levels and their clinical significance in the early neonatal age
Acta Physiologica Hungarica, 1990; 76: 151-158
- [8] Conly, P.W.; Morrison, T.; Sandberg, D.H. et al.
Concentrations of progesterone in the plasma of mothers and infants at time of birth
Pediatric Research, 1970; 4: 76-81
- [9] Geola, F.; Furmar, A.; Tataryn, I. et al.
Biological effects of various doses of conjugated equine estrogens in postmenopausal women
Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1980; 51: 620-625
- [10] Unger, K.K.
Handbuch der HPLC, Teil 1 Leitfaden für Anfänger und Praktiker
GIT Verlag GmbH, 1989
- [11] Meyer, V.
Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, Reihe Laborbücher Chemie
Verlage Diesterweg, Salle, Sauerländer, 4. Auflage 1986

- [12] Trantow, T.
FDA-konforme Validierung analytischer Methoden
Pharmazeutische Industrie, 2005; 67, 4
- [13] Food and Drug Administration
Validation of analytical procedures for type C medicated feeds, Draft Guidance
U.S. Department of Health and Human Services, 2004
- [14] Furman, W.B.; Layloff, T.P.
Validation of computerized liquid chromatographic systems
U.S. Food and Drug Administration, 1993
- [15] Food and Drug Administration
Validation of chromatographic methods, Reviewer Guidance
U.S. Center for Drug Evaluation and Research, 1994
- [16] Hiob, M.
Qualifizierung und Validierung nach Annex 15 des EG-GMP-Leitfadens
Pharmazeutische Industrie 2001; 63, 6
- [17] ICH Steering Committee
Text on validation of analytical procedures, ICH harmonised tripartite guideline
International Conference on Harmonisation, 1994
- [18] ICH
ICH Topic Q 2 A, Validation of analytical methods: definitions and terminology
The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1995
- [19] ICH
ICH Topic Q 2 B, Validation of analytical procedures: methodology
The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 1996
- [20] Grimm W.; Harnischfeger, G.; Tegtmeier, M.
Stabilitätsprüfung in der Pharmazie, Theorie und Praxis
Editio Cantor Verlag, 2 Auflage 2004
- [21] Hiob, M.
Inspektion von Qualifizierung und Validierung in pharmazeutischer Herstellung und
Qualitätskontrolle
Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und
Medizinprodukten, 2001
- [22] ICH Steering Committee
Stability testing of new drug substances and products
International Conference on Harmonisation, 1999
- [23] ICH
ICH Q 1 A (R2), Stability testing guidelines: stability testing of new drug substances
and products
The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2003

- [24] Food and Drug Administration
Stability testing for medicated premixes, final guidance
U.S. Department of Health and Human Services, 2000
- [25] World Health Organization
Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established
drug substances in conventional dosage forms, Annex 5
WHO Technical Report Series, 1996; No. 863
- [26] U.S. Pharmacopeia, National Formulary, 2005; 28
- [27] Dibbern, H.W.
UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe
Editio Cantor, Aulendorf, 1978
- [28] Europäisches Arzneibuch, Grundwerk, 5. Ausgabe 2005
- [29] Wätzig, H.; Ermer, J.
Analytische Unsicherheit und rationale Entwicklung von Akzeptanzkriterien bei
Gehaltsbestimmungen für Wirkstoffe und Fertigprodukte
Pharmazeutische Industrie, 2003; 65, 11
- [30] Künzle, J.
Umgang mit Laborreagenzien
Pharmazeutische Industrie, 2004; 66, 5
- [31] Lingenberg, B.
Glas als Primärpackmittel für pharmazeutische Produkte
Pharmazeutische Industrie, 2003; 65, 9a
- [32] Ammon, H.P.T.
Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch
De Gruyter Verlag, 9. Auflage 2004
- [33] Bauer, K.H.; Frömming, K.H.; Führer C.
Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 6. Auflage 1999
- [34] Rücker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G.G.
Instrumentelle pharmazeutische Analytik
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 3. Auflage 2001
- [35] Kotiyan, P.N.; Vavia, P.R.
Stability indicating HPTLC method for the estimation of estradiol
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000; 22: 667-671
- [36] Owyang, R. in: Djerassi, C.
Steroid reactions
Holden-Day, Oakland, CA, 1963; 227-260

- [37] Jumaa, M.; Müller, B.W.
Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660-12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2002; 54: 207-212
- [38] Voigt, R.
Pharmazeutische Technologie
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 9. Auflage 2000
- [39] Peeters, M.; Lange, R.; Aarts, L.; Talsma, H.; Knibbe, C.
Stability of an intravenous fat emulsion containing 6 % propofol and a low amount of emulsifier
European Journal of Hospital Pharmacy, 2004; 10, 1
- [40] Müller, R.H.; Heinemann, S.
Fat emulsions for parenteral nutrition. IV. Lipofundin MCT/LCT regimens for total parenteral nutrition (TPN) with high electrolyte load
International Journal of Pharmaceutics, 1994; 107: 121-132
- [41] Nygaard, L.; Kilde, H.D.; Andersen, S.G.; Hendriksen, L.; Overby, V.
Development and validation of a reversed-phase liquid chromatographic method for analysis of degradation products of estradiol in Vagifem[®] tablets
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004; 34: 265-276
- [42] Meyer, V.R.
Fallstricke und Fehlerquellen der HPLC in Bildern
Hüthig Verlag Heidelberg, 1996
- [43] Herman, C.J.; Groves, M.J.
Hydrolysis kinetics of phospholipids in thermally stressed intravenous lipid emulsion formulations
Journal of Pharmacy & Pharmacology, 1992, 44 (7): 539-542
- [44] Groves, N.J.; Herman, C.J.
Influence of the source of soyoil on the degradation kinetics of thermally stressed phospholipids in intravenous emulsions
Journal of Pharmacy & Pharmacology, 1991; Supplement 43, 13
- [45] Albert, K.
Verwendbarkeitsfristen von Ausgangsstoffen in Apotheken
Govi Verlag, 2. Auflage 2005
- [46] Arzneibuchkommentar
Wissenschaftliche Erläuterungen zum Arzneibuch
Grundwerk mit 21. Ergänzungslieferung, 2005
- [47] Helbock, H.J.; Motchnik, P.A.; Ames, B.N.
Toxic hydroperoxides in intravenous lipid emulsions used in preterm infants
Journal of Pediatrics, 1993; 91 (1 I): 83-87

- [48] Neuzil, J.; Darlow, B.A.; Inder, T.E.; Sluis, K.B.; Winterbourn, C.C.; Stocker, R.
Oxidation of parenteral lipid emulsion by ambient and phototherapy lights: Potential toxicity of routine parenteral feeding
Journal of Pediatrics, 1995; 126 (5 1): 785-790
- [49] Steger, P.J.K.; Muhlebach, S.F.
Lipid peroxidation of i.v. lipid emulsions in TPN bags: The influence of tocopherols
Journal of Nutrition, 1998; 14 (2): 179-185
- [50] Gräflein, C.
Parenterale Ernährung mit stabilitätsgeprüften, modularen Standardlösungen in der Neonatologie
Inauguraldissertation, Zürich, 2004
- [51] Firma B. Braun Melsungen AG
Fachinformation zu Propofol-®Lipuro
September 2003
- [52] Firma B. Braun Melsungen AG
Fachinformation zu Diazepam-®Lipuro
März 1996
- [53] Firma Astra Zeneca GmbH
Fachinformation zu Disoprivan®
Januar 2004
- [54] ICH
ICH Q 3 B (R), Impurities in new drug products
The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2003
- [55] Beyer, C.; Kuppers, E.; Karolczak, M.; Trotter, A.
Ontogenetic expression of estrogen and progesterone receptors in the mouse lung
Biology of the Neonate, 2003; 84 (1): 59-63
- [56] Trotter, A.; Bokelmann, B.; Sorgo, W.; Bechinger-Kornhuber, D.; Heinemann, H.; Schmucker, G.; Oesterle, M.; Kohntop, B.; Brisch, K.H.
Follow-up examination at the age of 15 months of extremely preterm infants after postnatal estradiol and progesterone replacement
Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001; 86 (2): 601-603

8 Anhang

8.1 Genauigkeit bei Wägungen und Volumenabmessungen

Die in dieser Arbeit verwendete Analysenwaage der Firma Mettler Toledo (siehe Geräteliste Kapitel 8.6.2) ist für die Verwendung im Labor der Apotheke des Universitätsklinikums Ulm unter den dort vorherrschenden Bedingungen kalibriert worden. Danach wird eine Mindesteinwaage festgelegt, ab der die Wägung bei einem Sicherheitsfaktor von 5 mit einem Fehler von 0,5 % behaftet ist (Anforderungen für Labore). Die Mindesteinwaage für die genannten Bedingungen im Labor der Apotheke des Universitätsklinikums Ulm beträgt 0,1165 g. Der Wägefehler kann demnach mit 0,5 % angenommen werden, sofern mindestens 0,1165 g einer Substanz unter den genannten Bedingungen eingewogen werden. Die verwendete Analysenwaage weist bei einer Mindesteinwaage von 0,1165 g eine erreichbare Genauigkeit von +/- 0,5 mg auf.

Im europäischen Arzneibuch ist die Genauigkeit für Wägungen definiert. Demnach darf eine Abweichung höchstens +/- 5 Einheiten nach der letzten angegebenen Ziffer betragen. Für eine vorgeschriebene Einwaage von 0,165 Gramm bedeutet dies, dass eine Einwaage von 0,1645 bis 0,1655 Gramm eine ausreichende Genauigkeit aufweist [28].

Einwaagen, die im Labor der Apotheke des Universitätsklinikums Ulm mit einer ausreichenden Genauigkeit (Fehler 0,5 %) durchgeführt werden können, müssen also mehr als 0,1165 g betragen und sollten auf maximal die dritte Nachkommastelle angegeben sein.

Volumina können mit unterschiedlichen Hilfsmitteln abgemessen werden. In dieser Arbeit wurden Messzylinder, Messpipetten, Vollpipetten, Eppendorfpipetten und Messkolben verwendet. Die genaueste Volumenmessung kann mit Vollpipetten oder Messkolben durchgeführt werden. Soll bei der Herstellung eine Vollpipette oder ein Messkolben verwendet werden, um eine entsprechende Genauigkeit zu erreichen, so wird das Volumen mit einem Komma und einer Null dahinter angegeben (10,0 ml). Die 10 ml müssen dann mit einer Vollpipette oder einem Messkolben abgemessen werden. Messpipetten und Messzylinder sind weniger genau. Die Angabe einer Null nach dem Komma ist dann nicht nötig. Für Eppendorfpipetten gilt, dass sie regelmäßig überprüft und kalibriert werden müssen. Dennoch erfordert das reproduzierbare Pipettieren viel Übung, was bereits erläutert wurde.

8.2 Auswertung und Berechnung der Ergebnisse

Wie in Kapitel 3.1.2.5 beschrieben wird zur Auswertung der Analysen die Software Chromstar light 6.0 der Sykam HPLC-Anlage verwendet. Aus den drei Standardlösungen unterschiedlicher Konzentration, die jeweils einer bestimmten Peakfläche im Chromatogramm entsprechen, wird eine Kalibriergerade nach dem Modell $y = a + bx$ erstellt, wobei a den y-Achsenabschnitt und b die Steigung der Geraden darstellt. Über die Kalibriergerade kann für jede beliebige Peakfläche die entsprechende Konzentration errechnet werden.

Die Software wurde so eingestellt, dass die Konzentration in Prozent angegeben wird. In der jeweiligen Konzentration 17- β -Estradiol bzw. Progesteron, die die aufbereitete Probe enthält, wird eine Standardlösung hergestellt und dieser die Konzentrationsangabe 100 % zugeordnet. Für Methode B bedeutet das beispielsweise, dass die Probe nach der Aufbereitung eine Konzentration von 0,165 mg/ml für 17- β -Estradiol und eine Konzentration von 0,3 mg/ml für

Progesteron aufweist. Folglich wurde die Standardlösung so hergestellt, dass diese eine Konzentration von 0,165 mg/ml für 17-β-Estradiol und von 0,3 mg/ml für Progesteron enthält. Diese Standardlösung wurde als Standardlösung B 100 % bezeichnet und ihre Peakflächen wurden jeweils der Konzentration 100 % zugeordnet. Das von der Software errechnete Ergebnis der einzelnen Probelösung wird folglich in Prozent bezogen auf die Konzentration der Hormone in der aufbereiteten Probe angegeben. Die Einstellung der Software hätte auch so erfolgen können, dass direkt die Konzentration entweder bezogen auf die aufbereitete oder auch auf die Ausgangsprobe (Ampulle) angegeben wird. Hier wurde zunächst mit der Konzentrationsangabe % gearbeitet, da auf diese Weise Abweichungen mit einem Blick erfasst und eingeschätzt werden können. Speziell für die Phase der Methodenentwicklung war dies von Vorteil. Die Umrechnung des Gehaltes m von % in mg/ml erfolgt nach Formel 2 und 3.

$$m(\text{Estra})[\text{mg/ml}] = \frac{m[\%] \cdot 0,66[\text{mg/ml}]}{100[\%]}$$

Formel 2: Umrechnung des Gehaltes für 17-β-Estradiol

$$m(\text{Pro})[\text{mg/ml}] = \frac{m[\%] \cdot 6,0[\text{mg/ml}]}{100[\%]}$$

Formel 3: Umrechnung des Gehaltes für Progesteron

8.3 Fehlerabschätzung

Um die Exaktheit der erhaltenen Ergebnisse einschätzen zu können, sollten die möglichen Fehler, die während der Analyse auftreten können und gemacht werden, bekannt sein. Beispiele für Fehler, die gemacht werden, sind der Wägefehler, der Pipettier- und der Verdünnungsfehler. In Kapitel 8.1 wurde die Genauigkeit von Wägungen erläutert. Für die Herstellung der Stammlösung B bedeutet dies beispielsweise, dass sich die tatsächliche Einwaage für 17-β-Estradiol nur im Fenster von 0,1645 bis 0,1655 g bewegen darf. Wird weniger als 0,1645 oder mehr als 0,1655 eingewogen, so muss das Ergebnis um die Abweichung von 0,165 korrigiert werden. Die Einwaage von 17-β-Estradiol und Progesteron wurde für alle Stammlösungen so vorgenommen, dass die nach dem europäischen Arzneibuch geforderte Genauigkeit gewährleistet ist und keine Korrektur vorgenommen werden muss.

Die Substanzen 17-β-Estradiol und Progesteron, die für die Herstellung des Standards verwendet wurden, sind keine Referenzsubstanzen mit einem einheitlichen Gehalt von 100 %. Der tatsächliche Gehalt der Substanz muss dem Analysenzertifikat entnommen werden. Wie in der Reagenzienliste ersichtlich ist wurden die Substanzen Estradiol-Hemihydrat und Progesteron der Firma Synopharm verwendet, die im Laufe der Untersuchungen zur Firma Fagron fusionierte. Der angegebene Gehalt beträgt für Estradiol-Hemihydrat der Firma Synopharm 99,0 % und der Firma Fagron 98,6 %, für Progesteron der Firma Synopharm 100,3 % und der Firma Fagron 98,6 %. Es wurde beispielhaft eine Berechnung durchgeführt, um den Unterschied zu den unkorrigierten Werten einschätzen zu können.

Ferner ist für die Proben der Wäge- bzw. Pipettierfehler zu beachten, der bei der Probenaufgabe gemacht wird. Für Methode A ist der Fehler unbekannt, da das pipettierte Volumen nicht gewogen wurde, und kann deshalb auch nicht korrigiert werden. Für Methode B ist das jeweilige Gewicht des pipettierten Volumens bekannt. Damit kann ein Faktor ermittelt werden. Als Grundlage dafür wurde eine Kontrolle des Pipettierens

durchgeführt, indem 250 µl 100-mal pipettiert und ausgewogen wurden. So wurde das Durchschnittsgewicht von 250 µl pipettierter Hormon-Emulsion ermittelt. Um den Fehler, der mit Methode A beim Pipettieren gemacht wurde, einschätzen zu können, wurden nachträglich 50 Pipettiervorgänge durchgeführt, die jeweils gewogen wurden. Die statistische Auswertung der 100 und 50 Pipettiervorgänge zeigt Tabelle 44. Auf die Auflistung der Einzelwerte wurde verzichtet. Für Methode B ist der Bereich, in dem 95 % der pipettierten Werte zu liegen kommen, sehr eng. Er entspricht ungefähr der Genauigkeit, die für Wägungen im europäischen Arzneibuch gefordert sind, wenn man von einer Solleinwaage von 0,245 ausgeht. Die Solleinwaage ist der Mittelwert der 100 Pipettiervorgänge. Es wurde deshalb keine Korrektur der Einzelwerte durchgeführt, sofern der pipettierte Wert in dem in Tabelle 44 angegebenen Vertrauensbereich lag. Bei Methode A ist der Vertrauensbereich von 95 % erheblich größer und der Variationskoeffizient deutlich schlechter als bei Methode B. Da keine Wägung durchgeführt wurde, ist eine Korrektur des pipettierten Volumens nicht möglich. Der potentielle Fehler, der gemacht wird, kann mit Hilfe des Variationskoeffizienten von 1,36 % eingeschätzt werden.

	Statistische Auswertung des Gewichtes [g] von 100 Pipettierungen mit 250 µl Hormon-Emulsion	Statistische Auswertung des Gewichtes [g] von 50 Pipettierungen mit 400 µl Hormon-Emulsion
Mittelwert	0,2451	0,4026
Standardabweichung	0,0009	0,0055
Variationskoeffizient	0,37 %	1,36 %
Vertrauensbereich 95 %	0,2445 bis 0,2457	0,3978 bis 0,4074

Tabelle 44: Statistische Auswertung des Pipettierens der Hormon-Emulsion mit einer variablen Eppendorfpipette

Die letzte zu betrachtende eventuelle Fehlerquelle bezieht sich auf die Wiederfindungsrate der Substanzen mit den einzelnen Gehaltsbestimmungsmethoden. Für 17-β-Estradiol wurde auf eine Korrektur verzichtet, da die Wiederfindungsrate für beide Methoden nur um maximal 0,5 % von 100 % abweicht. Für Progesteron beträgt die Wiederfindungsrate bei Methode A 98,8 % und bei Methode B 98,4 %.

Anhand fünf verschiedener Werte aus unterschiedlichen Untersuchungen wurde exemplarisch die Auswirkung der Korrekturen auf das Endergebnis ermittelt. Dabei wurden alle Faktoren berücksichtigt, d.h. für 17-β-Estradiol und Progesteron der Gehalt des Standards aus dem Analysenzertifikat und - sofern erforderlich - die Einwaage des pipettierten Volumens bezogen auf das Sollgewicht von 0,245 g und für Progesteron zusätzlich die Berücksichtigung der Wiederfindungsrate. Für 17-β-Estradiol betrug die Abweichung zum unkorrigierten Wert + 0,14 % und für Progesteron + 0,46 %. Wurden für Progesteron nur der Gehalt des Standards und die Wiederfindungsrate berücksichtigt, so ergibt sich bei Verwendung der Standardsubstanz der Firma Fagron eine Abweichung von + 2,6 %, bei Verwendung der Substanz der Firma Synopharm hingegen nur eine Abweichung von + 0,91 % des korrigierten zum unkorrigierten Wert. Die Standardsubstanz der Firma Fagron wurde nur bei den letzten Untersuchungen im Jahr 2005 eingesetzt.

Auf der Grundlage dieser Beispielrechnung wurde entschieden, die Korrekturfaktoren nicht einzusetzen. Während eines Analysenvorgangs werden immer eine Reihe von Fehlern gemacht, die sich teilweise verstärken und teilweise auch aufheben.

8.4 Haltbarkeit der verwendeten Lösungen

8.4.1 Haltbarkeit der Standardlösungen B

Die fertig zubereiteten Standardlösungen B 80 %, 100 % und 120 % wurden zwei Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend gegen einen frisch hergestellten Standard vermessen. Alle Standardlösungen zeigen keinen Verlust für die Hormone 17- β -Estradiol und Progesteron. Die Abweichungen bewegen sich innerhalb der analytischen Unsicherheit von 2 - 3 % [29]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 45 dargestellt.

	Konzentration in [%] bezogen auf 0,165 mg/ml bei 17- β -Estradiol und 0,3 mg/ml bei Progesteron					
	80%		100 %		120 %	
	E2	P	E2	P	E2	P
	80,69	82,07	101,31	101,67	121,13	121,48
	82,60	82,07	101,82	102,30	121,17	121,46
	81,67	82,39	100,89	102,46	121,00	121,65
	81,55	82,48	101,84	102,13	121,51	122,11
	81,62	82,44	101,57	102,05	121,22	121,77
	81,72	82,38	100,78	102,06	121,55	121,81
Mittelwert	81,64	82,31	101,37	102,11	121,26	121,71
Standardabweichung	0,6066	0,1856	0,4573	0,2678	0,2194	0,2419
Variationskoeffizient	0,74 %	0,23 %	0,45 %	0,26 %	0,18 %	0,2 %
Vertrauensbereich 95 %	81,2 bis 82,1	82,2 bis 82,5	101,0 bis 101,7	101,9 bis 102,3	121,1 bis 121,4	121,5 bis 121,9

Tabelle 45: Haltbarkeit der Standardlösungen B

8.4.2 Haltbarkeit der 17- β -Estradiol-Aufstocklösung

Nach Zubereitung der 17- β -Estradiol-Aufstocklösung wurde diese bei Raumtemperatur zwei Tage aufbewahrt und danach gegen einen neu hergestellten Standard vermessen. Die Abweichung des Mittelwertes zur Ausgangskonzentration von 0,66 mg/ml beträgt 2,5 % nach unten. Dies ist mit der Messungenauigkeit analytischer Methoden von 2-3 % erklärbar [29]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 46 dargestellt.

	Konzentration 17-β-Estradiol [mg/ml]
	0,641
	0,644
	0,644
	0,643
	0,645
	0,645
Mittelwert	0,644
Standardabweichung	0,0015
Variationskoeffizient	0,23 %
Vertrauensbereich 95 %	0,643 bis 0,645

Tabelle 46: Haltbarkeit der 17- β -Estradiol-Aufstocklösung

8.4.3 Haltbarkeit der Probelösung B

Mit einer Ampulle Hormon-Emulsion wurde die Probenaufbereitung durchgeführt und die aufbereitete Probelösung B in einem HPLC-Vial 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Für 17- β -Estradiol ist gegenüber der theoretisch angegebenen Konzentration eine Zunahme von 3 % und für Progesteron von 2 % zu verzeichnen. Die Werte bewegen sich wie bei den bereits vorgestellten Standardlösungen innerhalb der analytischen Unsicherheit von 2 - 3 % [29]. Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 zusammengefasst.

	Konzentration 17-β-Estradiol [mg/ml]	Konzentration Progesteron [mg/ml]
	0,680	6,11
	0,682	6,12
	0,683	6,13
	0,679	6,12
	0,679	6,11
	0,683	6,12
Mittelwert	0,681	6,12
Standardabweichung	0,0019	0,0075
Variationskoeffizient	0,28 %	0,12 %
Vertrauensbereich 95 %	0,680 bis 0,683	6,11 bis 6,12

Tabelle 47: Haltbarkeit der Probelösung B

8.5 Spezifikation der neuen Hormon-Emulsion

Die Spezifikation fasst wichtige Charakteristika einer Zubereitung zusammen und soll deren Qualität absichern. Sie besteht immer aus drei Elementen: Den relevanten Prüfparameter, den Analysemethoden und den Akzeptanzkriterien für die jeweiligen Prüfparameter. Die Spezifikation der neuen Hormon-Emulsion wird in Tabelle 48 vorgestellt.

Prüfparameter	Analysemethode	Akzeptanzkriterien
Aussehen und Beschreibung	visuell	milchig weiße Flüssigkeit
Homogenität	visuell	keine Koaleszenz und Flocculation, keine Phasentrennung
Öltropfengröße	mikroskopisch	≤ 1 µm: ≥ 99 %, nicht mehr als 5 Tropfen zwischen 2 und 10 µm pro Bildausschnitt (0,1 x 0,1 mm), kein Tropfen > 10 µm
pH-Wert	pH-Meter	6,5 bis 8,5
Identität	HPLC	die Retentionszeiten der Hauptpeaks der Probe müssen denen der Standardlösung entsprechen
Gehalt	HPLC	95 % ≤ gemessener Gehalt ≤ 105 %: für 17-β-Estradiol: 0,627 bis 0,693 mg/ml, für Progesteron: 5,70 bis 6,30 mg/ml
Abbauprodukte	HPLC	keine weiteren Peaks im Chromatogramm sichtbar

Tabelle 48: Spezifikation der neuen Hormon-Emulsion

8.6 Listen und Verzeichnisse

8.6.1 Reagenzienliste

Substanzname	Qualität	Hersteller und ggf. Artikelnummer
Estradiol-Hemihydrat (17- β -Estradiol)	Ph.Eur. ³	Fa. Synopharm Art.Nr.: 700137
Estradiol-Hemihydrat (17- β -Estradiol), mikronisiert	Ph.Eur.	Fa. Fagron Art.Nr.: 701634
Progesteron, mikronisiert	Ph.Eur.	Fa. Synopharm Art.Nr.: 200650
Progesteron, mikronisiert	Ph.Eur.	Fa. Fagron Art.Nr.: 200650
Neue Hormon-Emulsion	Charge 1: hergestellt September 2002 Charge 2: hergestellt Oktober 2003 Charge 3: hergestellt Mai 1999 Charge 4: hergestellt Februar 2005	Fa. B. Braun Melsungen AG
Lipovenös® 20 % LCT		Fa. Fresenius Kabi Art.Nr.: 0578171/00
Acetonitril für HPLC	Reinheitsgehalt $\geq 99,9$ %	Fa. Sigma-Aldrich Art.Nr.: 34851
Ampuwa für Spülzwecke (gereinigtes Wasser)		Fa. Fresenius Kabi Art.Nr.: 0573361/00
2-Propanol (Isopropanol)	p.a. (pro analysi ⁴), Reinheitsgehalt $\geq 99,8$ %	Fa. Fluka Art.Nr.: 59300, oder 33539
Methanol	p.a., Reinheitsgehalt $\geq 99,9$ %	Fa. Fluka Art.Nr.: 65543, oder 32213
Tetrahydrofuran für die HPLC	Reinheitsgehalt $\geq 99,8$ %	Fa. AppliChem Art.Nr.: A1595,1000
Ethanol	p.a., Reinheitsgehalt $\geq 99,8$ %	Fa. Riedel-de Haen Art.Nr.: 32205
Kalibrierlösungen: pH-Pufferlösungen der Fa. Mettler Toledo	pH 7,00 pH 4,01 pH 9,21	Best.Nr.: 51340229 Best.Nr.: 51340228 Best.Nr.: 51340230
Immersionöl für die Mikroskopie		Fa. Merck Art.Nr.: 1.004699.0100

³ Die Angabe Ph.Eur. bedeutet, dass die Qualität des Produktes der im Europäischen Arzneibuch geforderten Qualität entspricht

⁴ Reinheitsangabe für Lösungsmittel; das Lösungsmittel ist für die Analyse geeignet und hat einen Reinheitsgehalt von $\geq 99,0$ %

8.6.2 Geräteliste

Gerätename	Typenbezeichnung	Hersteller
HPLC-Anlage mit	S1121 Solvent Delivery System S7121 Reagent Organizer mit Helium- begasung S8111 Low Pressure Gradient Mixer S4011 Column Thermo Controller S5200 Sample Injector S3310 UV-Detektor S2290 Wavelength Selector ChromStar light 6.0 (neu) und Pyramid 2000 2.09 (alt) Software	Fa. Sykam
HPLC-Fließmittel- vorratsflasche	500 bis 2000 ml	Fa. Sykam
Trennsäule Nucleosil	Nucleosil 120 C18, 3 µm; 125 x 4,6 mm	Fa. Maisch GmbH Order-No.: n23.9e.s1246
Vorsäule Nucleosil	Nucleosil 120 C18, 5 µm; 5 x 4,6 mm	Fa. Maisch GmbH Order-No.: n25.9e.v0046
Analysenwaage	AB 204-S, Classic	Fa. Mettler Toledo
Binokular-Mikroskop	473011-9901 mit zwei Okularen Carl Zeiss 464043-9902	Fa. Zeiss West Germany
Glasobjektträger und Deckgläser	(ca. 76 x 26 mm) (15 x 15 mm)	Fa. Menzel-Gläser
pH-Meter	MP 230 mit Elektrode für Emulsionen InLab® 418	Fa. Mettler Toledo
Ultraschallbad	Transsonic T570H	Fa. Bender & Hobein
Kühlschrank	KT 173300/01, Typ KT 3L 17; 5 +/- 2 °C	Fa. Siemens
Gefrierschrank	Typ 3108 Nr. 15708, -15 bis -35 °C; eingestellt auf -20 +/- 2 °C	Fa. Liebherr
Trockenschrank	Typ 3108, Nr. 15078, 1400, 40 bis 240 °C	Fa. Ehret
Bechergläser in verschiedenen Größen		
Messkolben	Klasse A (Blaubrand®, Duran®), justiert auf „In“ bei 20 °C, NS-Schliff 5,0 +/- 0,04 ml 10,0 +/- 0,04 ml 20,0 +/- 0,04 ml 50,0 +/- 0,06 ml 100,0 +/- 0,10 ml	Fa. Brand Art.Nr.: 612-5073 Art.Nr.: 612-5074 Art.Nr.: 612-5075 Art.Nr.: 612-5077 Art.Nr.: 612-5078
Stopfen für NS-Schliff		Fa. VWR Art.Nr.: 217-9262 und 217-9263
Erlenmeyerkolben	50 ml mit Schliff und Stopfen	
Messzylinder	Duran® justiert auf „In“ bei 20 °C, Toleranz +/- 2,5 ml	Fa. Hirschmann Art.Nr.: 612-1391

Gerätename	Typenbezeichnung	Hersteller
Metallspatel		
Glastrichter		
Glassmesspipetten	justiert auf „Ex“ bei 20 °C, 10 +/- 0,05 ml und 20 +/- 0,1 ml	Fa. Brand Art.Nr.: 612-1114 und Art.Nr.: 612-1115
Glasvollpipetten	justiert auf „Ex“ bei 20 °C 0,5 +/- 0,005 ml 1,0 +/- 0,007 ml 2,0 +/- 0,01 ml 3,0 +/- 0,01 ml 5,0 +/- 0,015 ml 10,0 +/- 0,02 ml	Fa. Brand Art.Nr.: 612-1201 Art.Nr.: 612-1202 Art.Nr.: 612-1203 Art.Nr.: 612-1205 Art.Nr.: 612-1207 Art.Nr.: 612-1212
Mikropipetten	ependorf Reference 100-1000 µl und 10-100 µl	Fa. Eppendorf, kalibriert durch Fa. KDL
Tropfflasche aus Braunglas	10 und 30 ml (Glasart III, nach Ph.Eur.) mit Schraubverschluss	Fa. Zscheile & Klinger, Art.Nr.: 34010 und 34030
Peleusball		Fa. D & N
Reagenzglasständer		
HPLC-Vial	Gewindeflasche 1,5 ml, Klarglas mit Schraubkappe mit Septum	Fa. Sykam KatalogNr.: 7004003 KatalogNr.: 7004103
Einmalspritzen	BD Plastipak Luer-Lok, 20 ml und 30 ml	Fa. BD Art.Nr.: 300629 Art.Nr.: 301229
Kanülen	BD Microlance™ ₃ , 18G x 1 ½“, 1,2 x 40 mm	Fa. BD Art.Nr.: 304622
Falcon	14 ml	Fa. Becton Dickinson Labware Art.Nr.: 4-2059-3
Einmalpipette		Fa. Alpha Laboratories Ltd KatalogNr.: LW 4336
Parafilm „M“	Laboratory Film	Fa. American Can Company, Greenwich
Festphasenextraktions- kartusche	Oasis® HLB 3 cc, 60 mg 6 cc, 200 mg 6 cc, 500 mg	Fa. Waters ArtNr.: WAT094226 ArtNr.: WAT106202 ArtNr.: 186000115
Festphasenextraktions- kartusche	Chromabond® C18 ec f 100 mg 200 mg	Fa. MachereyNagel ArtNr.: 730 260.Muster Art.Nr.: 730.Muster

8.6.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ACN	Acetonitril
APV	Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik
ArtNr.	Artikelnummer
Best.Nr.	Bestellnummer
bzw.	beziehungsweise
ca.	ungefähr
cm	Zentimeter
EG	Europäische Gemeinschaft
EMA	European Medicines Evaluation Agency (europäische Zulassungsbehörde)
Estra (E2)	17-β-Estradiol
Fa.	Firma
FDA	Food and Drug Organisation
g	Gramm
GMP	good manufacturing practice (gute Herstellungspraxis)
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie
ICH	International Conference on Harmonisation
i.m.	intramuskulär
IR	infrarot
Iso	Isopropanol
i.v.	intravenös
k'	Kapazitätsfaktor
LCT	langkettige Triglyceride
m	Masse bzw. Gehalt
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
nm	Nanometer
p.a.	pro analysi (Reinheitsangabe für Lösungsmittel)
pH	pH-Wert
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch (Pharmacopoea Europaea)
Pro (P)	Progesteron
RF	relative Luftfeuchte
RP	Reversed-Phase
SPE	Solid phase extraction (Festphasenextraktion)
THF	Tetrahydrofuran
u.a.	unter anderem
USP	Amerikanisches Arzneibuch (United States Pharmacopeia)
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation

8.6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von 17- β -Estradiol und Progesteron.....	8
Abbildung 2: Chromatogramm von 17- β -Estradiol mit Detektion bei 280 nm und von Progesteron bei 240 nm, mobile Phase: ACN / H ₂ O 1:1.....	9
Abbildung 3: Chromatogramm von 17- β -Estradiol bei 220 nm und Progesteron bei 240 nm, mobile Phase: ACN / H ₂ O 1:1.....	10
Abbildung 4: Chromatogramm von 17- β -Estradiol bei 220 nm und Progesteron bei 240 nm, mobile Phase: ACN / Wasser 45:55.....	11
Abbildung 5: Chromatogramm von 17- β -Estradiol bei 220 nm und Progesteron bei 240 nm, mobile Phase: ACN/Wasser/Isopropanol 4:5:1.....	12
Abbildung 6: Chromatogramm von 17- β -Estradiol und Progesteron mit den für die Gehaltsbestimmungsmethode A gewählten Bedingungen.....	13
Abbildung 7: Chromatogramm von 17- β -Estradiol und Progesteron in Standardlösung A 100 %.....	17
Abbildung 8: Chromatogramm von 17- β -Estradiol und Progesteron in Probelösung A.....	17
Abbildung 9: Chromatogramm der Blindprobe mit reinem Lösungsmittel Isopropanol (Methode A).....	18
Abbildung 10: Chromatogramm der Matrix Lipovenös [®] 20 % (Methode A).....	18
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Linearität von 17- β -Estradiol in der Verdünnungsreihe von Standardlösung A.....	19
Abbildung 12: Graphische Darstellung der Linearität von Progesteron in der Verdünnungsreihe von Standardlösung A.....	20
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Linearität von 17- β -Estradiol in gespickter Matrix (Methode A).....	21
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Linearität von Progesteron in gespickter Matrix (Methode A).....	22
Abbildung 15: Optische Darstellung der Robustheit von Methode A; im ersten Chromatogramm beträgt die Flussrate 1,3 ml/min, im zweiten 1,7 ml/min; im dritten Chromatogramm ist die Säulentemperatur 40 °C, im vierten 50 °C.....	26
Abbildung 16: 17- β -Estradiol und Progesteron in Standardlösung B 100 %.....	32
Abbildung 17: 17- β -Estradiol und Progesteron in Probelösung B.....	32
Abbildung 18: Blindprobe mit reinem Lösungsmittel Methanol (Methode B).....	33
Abbildung 19: Chromatogramm der Matrix Lipovenös [®] 20 % (Methode B).....	33
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Linearität von 17- β -Estradiol in der Verdünnungsreihe von Standardlösung B.....	34
Abbildung 21: Graphische Darstellung der Linearität von Progesteron in der Verdünnungsreihe von Standardlösung B.....	34
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Linearität von 17- β -Estradiol in der gespickten Matrix (Methode B).....	36
Abbildung 23: Graphische Darstellung der Linearität von Progesteron in der gespickten Matrix (Methode B).....	37
Abbildung 24: Chromatogramm von 17- β -Estradiol und Progesteron mit Geisterpeaks und Verschleppungen.....	58
Abbildung 25: Paralleler Einsatz der Methoden A und B bei den in den Kästchen angegebenen Versuchen.....	62

8.6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HPLC-Analysenparameter der Ausgangseinstellungen.....	9
Tabelle 2: Löslichkeitstabelle.....	11
Tabelle 3: Gewählte Analysenparameter für die Gehaltsbestimmungsmethode A.....	12
Tabelle 4: Herstellung einer Standardreihe nach Methode A.....	14
Tabelle 5: Linearität von 17- β -Estradiol und Progesteron in der Verdünnungsreihe von Standardlösung A.....	20
Tabelle 6: Herstellung einer Modelllösung in verschiedenen Konzentrationen.....	21
Tabelle 7: Linearität von 17- β -Estradiol und Progesteron in gespickter Matrix mit Methode A.....	22
Tabelle 8: Ergebnisse der Richtigkeit durch Wiederfindung (Methode A).....	23
Tabelle 9: Ergebnisse der Systempräzision (Methode A).....	24
Tabelle 10: Ergebnisse der Gerätepräzision (Methode A).....	24
Tabelle 11: Ergebnisse der Methodenpräzision (Methode A).....	25
Tabelle 12: Vergleich verschiedener Messungen einer einzigen Standardlösung A ohne Aufstockung für 17- β -Estradiol.....	27
Tabelle 13: Vergleich verschiedener Messungen einer einzigen Standardlösung B mit Aufstockung für 17- β -Estradiol.....	27
Tabelle 14: Herstellung einer Standardreihe nach Methode B.....	30
Tabelle 15: Linearität von 17- β -Estradiol und Progesteron in der Verdünnungsreihe von Standardlösung B.....	35
Tabelle 16: Herstellung einer gespickten Matrix in verschiedenen Konzentrationen (Methode B).....	35
Tabelle 17: Linearität von 17- β -Estradiol und Progesteron in der gespickten Matrix (Methode B).....	37
Tabelle 18: Ergebnisse der Richtigkeit durch Wiederfindung (Methode B).....	38
Tabelle 19: Ergebnisse der Systempräzision (Methode B).....	38
Tabelle 20: Ergebnisse der Gerätepräzision (Methode B).....	39
Tabelle 21: Ergebnisse der Methodenpräzision (Methode B).....	39
Tabelle 22: Robustheit der Methode B für 17- β -Estradiol.....	40
Tabelle 23: Robustheit der Methode B für Progesteron.....	40
Tabelle 24: Zusammenfassung der Robustheit von Methode B für 17- β -Estradiol.....	41
Tabelle 25: Zusammenfassung der Robustheit von Methode B für Progesteron.....	41
Tabelle 26: Prüfplan für die Stabilitätsuntersuchungen der neuen Hormon-Emulsion.....	43
Tabelle 27: Ergebnisse der Charge 1 bei 25 °C / 60 % RF.....	46
Tabelle 28: Ergebnisse der Charge 2 bei 25 °C / 60 % RF.....	47
Tabelle 29: Ergebnisse der Charge 1 bei 30 °C / 65 % RF.....	48
Tabelle 30: Ergebnisse der Charge 2 bei 30 °C / 65 % RF.....	48
Tabelle 31: Ergebnisse der Charge 1 bei 40 °C / 75 % RF.....	49
Tabelle 32: Ergebnisse der Charge 2 bei 40 °C / 75 % RF.....	50
Tabelle 33: Ergebnisse der Charge 3 bei 40 °C / 75 % RF.....	50
Tabelle 34: Ergebnisse der Charge 1 bei 60 °C.....	51
Tabelle 35: Ergebnisse der Charge 2 bei 60 °C.....	52
Tabelle 36: Ergebnisse der Charge 1 bei 80 °C.....	52
Tabelle 37: Ergebnisse der Charge 2 bei 80 °C.....	53
Tabelle 38: Ergebnisse der Chargen 1 und 2 bei -20 °C.....	54
Tabelle 39: Ergebnisse aus Langzeituntersuchungen.....	55
Tabelle 40: Unterschiede der Methoden A und B.....	59
Tabelle 41: Parallel mit Methode A und B ermittelte Ergebnisse für 17- β -Estradiol.....	62

Tabelle 42: Parallel mit Methode A und B ermittelte Ergebnisse für Progesteron.....	63
Tabelle 43: Exemplarischer Vergleich von Methode A und B für 17- β -Estradiol nach statistischer Auswertung.....	64
Tabelle 44: Statistische Auswertung des Pipettierens der Hormon-Emulsion mit einer variablen Eppendorfpipette	77
Tabelle 45: Haltbarkeit der Standardlösungen B	78
Tabelle 46: Haltbarkeit der 17- β -Estradiol-Aufstocklösung.....	79
Tabelle 47: Haltbarkeit der Probelösung B	79
Tabelle 48: Spezifikation der neuen Hormon-Emulsion	80