

Abschlussbericht zu dem Projekt

Rezepturfit

-

Forschungsprojekt „Validierung von Rezepturprozessen“

Gefördert durch

Apothekerstiftung Westfalen-Lippe

Bismarckallee 25

48151 Münster

Ausführende Stelle

Westfälische Wilhelms-Universität (WWU)

Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

Corrensstraße 48

48161 Münster

Justin Stella

ju.stella@uni-muenster.de

Prof. Dr. Klaus Langer

k.langer@uni-muenster.de

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung.....	1
B	Material und Methoden.....	3
1	Chemikalien, Materialien und Geräte.....	3
1.1	Chemikalien.....	3
1.2	Verbrauchsmaterialien.....	4
1.3	Geräte und Software.....	5
1.4	Pufferrezepturen und Lösungen.....	6
1.5	Fließmittel.....	6
2	Validierung einer HPLC-Analytik zur Hydrochlorothiazid-Quantifizierung.....	7
2.1	Festlegung der Parameter für die HPLC-Analytik des Hydrochlorothiazids.....	7
2.2	Herstellung der Hydrochlorothiazid-Kalibrierproben.....	8
2.3	Herstellung der Hydrochlorothiazid-Wiederfindungsproben.....	8
2.4	Herstellung der Hydrochlorothiazid-Kapselproben.....	8
3	Validierung einer HPLC-Analytik zur Eisen(III)-oxid-Quantifizierung.....	9
3.1	Festlegung der Parameter für die HPLC-Analytik des Eisen(III)-oxids.....	9
3.2	Herstellung der Eisen(III)-oxid-Kalibrierproben.....	10
3.3	Herstellung der Eisen(III)-oxid-Wiederfindungsproben.....	11
3.4	Herstellung der Eisen(III)-oxid-Kapselproben.....	11
3.5	Vermessung der HPLC-Proben.....	12
4	Prüfung auf Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen.....	12
5	Validierung einer HPLC-Analytik zur simultanen Gehaltsbestimmung von Triamcinolonacetonid und DAMC.....	13
5.1	Festlegung der Parameter für die HPLC-Analytik.....	14
5.2	Extraktionsverfahren zur Abtrennung der Cremegrundlage.....	14
5.3	Herstellung der DAMC-TAA-Kalibrierproben.....	15

5.4	Herstellung der DAMC-TAA-Wiederfindungsproben	15
6	Herstellung der Cremeproben in Abhängigkeit der Rührmethode	16
6.1	Herstellung der DACM-TAA-Creme mittels Topitec®-Rührsystem	16
6.2	Herstellung der DACM-TAA-Creme mittels Unguator®-Rührsystem	17
6.3	Herstellung der DAMC-TAA-Creme mittels manueller Rührmethode.....	17
6.4	Extraktion der Analyten aus der DAMC-TAA-Cremeprobe.....	17
6.5	Vermessung der HPLC-Proben.....	18
C	Ergebnisse und Diskussionen	19
1	Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Hydrochlorothiazid	19
1.1	Messparameter der HCT-Analytik	20
1.2	Linearität der HCT-Analytik	21
1.3	Präzision und Richtigkeit der HCT-Analytik.....	22
1.4	Wiederfindung in HCT-Kapselproben.....	22
2	Methodenentwicklung zur Quantifizierung des Eisen(III)-oxids	23
2.1	Messparametern der Eisen(III)-oxid-Analytik.....	23
2.2	Linearität der Eisen(III)-oxid-Analytik.....	25
2.3	Präzision und Richtigkeit der Eisen(III)-oxid-Analytik	26
2.4	Wiederfindung in Eisen(III)-oxid-Kapselproben	26
3	Prüfungen der Kapselproben.....	27
4	Schüttdichte-Bestimmung (DAC-Probe 21).....	29
5	Wirkstoffverteilung in Abhängigkeit der Herstellungsmethode.....	29
5.1	Prüfung auf Gleichförmigkeit des Hydrochlorothiazid-Gehalts	30
5.2	Vergleich der Wirkstoff-Homogenität gemäß der Herstellungsmethode..	33
5.3	Prüfung auf Gleichförmigkeit des Eisen(III)-oxid-Gehalts.....	33
5.4	Vergleich der Indikator-Homogenität gemäß der Herstellungsmethode..	36
5.5	Korrelation der Indikator-Wirkstoff-Verteilung.....	37
6	HPLC-Analytik zur simultanen Quantifizierung von DAMC neben TAA.....	38

6.1	Festlegung der Parameter für die HPLC-Analytik.....	38
6.2	Linearität der TAA- und DAMC-Analytik.....	40
6.3	Präzision und Richtigkeit der DAMC-TAA-Wiederfindungsproben	42
7	Wirkstoffverteilung in der Creme in Abhängigkeit der Herstellungsmethode ..	43
7.1	Prüfung auf Gleichförmigkeit des Triamcinolonacetonid-Gehalts.....	44
7.2	Vergleich der Wirkstoffverteilung in Abhängigkeit der Herstellungsmethode.....	47
7.3	Prüfung auf Gleichförmigkeit des Fluoreszenzindikator-Gehalts.....	48
7.4	Vergleich der Indikatorverteilung in Abhängigkeit der Herstellungsmethode.....	50
7.5	Korrelation der Indikator-Wirkstoff-Verteilung.....	51
8	Wirkstoff- und Indikatorverteilung im Rührverlauf.....	52
8.1	Wirkstoffverteilung im Rührverlauf.....	52
8.2	Indikatorverteilung im Rührverlauf.....	53
8.3	Korrelation der Indikator-Wirkstoff-Verteilung im Rührprozesses	56
D	Zusammenfassung.....	58
E	Anhang.....	60
1	Literaturverzeichnis	60

A Einleitung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung von einfachen analytischen Methoden zur Qualitätsbewertung von Rezepturen unter Apothekenbedingungen, sowie die Etablierung von Konzepten zur Verfahrensvalidierung, mit denen die herstellende Person in der Apotheke Gehalt und Gleichförmigkeit verschiedener Arzneiformen leicht überprüfen kann.

Im Rahmen von Ringversuchen und bei Testkäufen von Rezepturarzneimitteln im Kammerbezirk Westfalen-Lippe fallen immer wieder Schwankungen im Wirkstoffgehalt als auch eine unzureichende Gleichförmigkeit der Wirkstoffeinzeldosierung auf. Ein Grund für die mangelnde Homogenität der Wirkstoffverteilung kann in der unzureichenden Verfügbarkeit von apothekenanwendbaren Prüfmöglichkeiten bei den Inprozesskontrollen gesehen werden. Hierbei ist es oft schwierig, eine gleichmäßige Wirkstoffverteilung in einer Verreibung festzustellen, wenn sowohl Wirkstoff als auch Grundlage die gleiche Farbe aufweisen. Das Universitätsklinikum Heidelberg arbeitet schon seit längerer Zeit an Methoden zur Qualitätssicherung von Rezepturarzneimitteln. Eine dieser Methoden ist die Zugabe von Eisenoxid als Indikatorsubstanz in Feststoffmischungen. Der Indikator soll durch eine gleichmäßige Färbung einer Pulvermischung, wie sie zum Beispiel in einer Kapselzubereitung verwendet wird, die Homogenität der Wirkstoffverteilung optisch belegen. Im Rahmen des vorliegenden Projekts sollte analytisch nachgewiesen werden, dass eine optisch wahrzunehmende homogene Verteilung einer Indikatorsubstanz auch mit einer gleichförmigen Verteilung des verarbeiteten Wirkstoffs korreliert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde jeweils eine HPLC-Analytik zur Quantifizierung eines Modellarzneistoffes sowie von Eisen(III)-oxid als Indikatorsubstanz validiert. Im Anschluss wurden mittels dieses Verfahrens im DAC/NRF beschriebene Methoden zur Dosierung von Kapseln bewertet. Zu den Prüfkriterien zählten der Gehalt und die Verteilung der beiden Substanzen. Anhand dieser Ergebnisse sollte eine Aussage darüber getroffen werden, inwiefern die Verteilungen der beiden Analyten Wirkstoff und Indikatorsubstanz in der Pulvermischung korrelieren.

Im zweiten Teil des Projekts wurde dasselbe Prinzip auf eine halbfeste Zubereitung angewendet. Da die Anwendung von Pigmenten in einer halbfesten Darreichungsform zu ästhetischen Problemen führen würde, wurde hierbei mit dem hautverträglichen

Fluoreszenzfarbstoff 7-Diethylamino-4-methylcoumarin (DAMC) als Indikatorsubstanz gearbeitet. Der Indikator wurde auch diesmal zu gleichen Teilen wie der Wirkstoff in die Grundlage eingearbeitet. Unter der Annahme, dass sich Wirkstoff und Indikatorsubstanz in gleicher Weise in der Grundlage verteilen, würde eine homogene Fluoreszenz einen Hinweis auf eine homogene Wirkstoffverteilung liefern. Hierzu wurde zunächst eine HPLC-Analytik zur simultanen Quantifizierung eines Modellarzneistoffes neben dem 7-Diethylamino-4-methylcoumarin validiert. Auf Grundlage der validierten HPLC-Analytik wurden drei apothekenübliche Rührmethoden hinsichtlich der Wirkstoff- und Indikatorverteilung gegenübergestellt. Mit Hilfe der ermittelten Ergebnisse sollte die zuvor getroffene Annahme über die Verteilung der beiden Stoffe in der Grundlage bestätigt werden. Aus den erzielten Ergebnissen ergibt sich ein wichtiges Prüfinstrument zur Qualitätssicherung von halbfesten Zubereitungen.

B Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden alle für die Arbeit verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte dargestellt. Ferner werden die Methoden und die Vorgehensweisen für die Validierung der nachstehenden Analysemethoden zur quantitativen Bestimmung mittels HPLC aufgeführt.

1 Chemikalien, Materialien und Geräte

Das folgende Kapitel beschreibt die Chemikalien, Materialien und Geräte, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

1.1 Chemikalien

Die im Rahmen dieses Projekts verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Substanz	Hersteller
Acetonitril p.a.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ammoniak 25%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Basiscreme DAC 2011	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Ethylendiamin-tetraessigsäure- Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Eisenoxid (rot)	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
7-Diethylamino-4-methylcoumarin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Gelatine-Kapseln Größe 1	WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co. KG (Hillscheid, Deutschland)
Hydrochlorothiazid, mikronisiert	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Mannitol	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Mannitol 99,5% & Siliciumdioxid, hochdisp. 0,5% - Kapselfüllstoff	Fagron GmbH & Co. KG (Barsbüttel, Deutschland)

Salzsäure (HCl) 12 N	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Siliciumdioxid, hochdispers	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Trifluoressigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Triamcinolonacetonid, mikronisiert	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
Wasser, gereinigt (Reinstwasser)	Wasseraufbereitungsanlage PURELAB flex

1.2 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 sind die Materialien aufgeführt, die für die Durchführung des Projekts eingesetzt wurden.

Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
HPLC-Vials	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
Messkolben 2 – 1.000 mL	Schott AG (Mainz, Deutschland)
Nitril-Schutzhandschuhe	HANSA-TRADING HTH GmbH & Co. KG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1.000 µL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße 2,0 mL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
TOPITEC®-Kruke 30 g	WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co. KG (Hillscheid, Deutschland)
TOPITEC®-Mischscheiben (Kruke 30 g)	WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co. KG (Hillscheid, Deutschland)
Transferpipetten 3,5 mL	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
UNGUATOR® Spender-Kruke 30 g	WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co. KG (Hillscheid, Deutschland)

1.3 Geräte und Software

Nachfolgend sind die Geräte und die Software aufgelistet, die für die Durchführung des Projekts eingesetzt wurden.

Tabelle 3. Übersicht der verwendeten Geräte und Software.

Geräte / Software	Hersteller
Analysenwaage ED22AS	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
HPLC-Säulen Säule; Gemini [®] -NX C18 (110 Å, 5 µm, 250 x 4,6 mm)	Phenomenex Inc. (Aschaffenburg, Deutschland)
High Performance Liquid Chromatography 1200 Series Vierkanalpumpe G1311A Entgaser G1322 Autosampler G1329A Säulenofen G1316A Diodenarray-Detektor G1315D Software: Chemstation 4.01	Agilent Technologies GmbH (Böblingen, Deutschland)
Microsoft [®] Office 2017	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte GmbH (Berlin, Deutschland)
Pipetten Reference [®] 10 µL, 100 µL, 1.000 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Präzisionswaage ED3202S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
TOPITEC [®] Automatic-Rührsystem	WEPA Apothekenbedarf GmbH & Co. KG (Hillscheid, Deutschland)
UNGUATOR [®] QMS-Rührsystem	Gako Konietzko GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ultramikrowaage SE2-OCE	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Ultraschallbad Sonorex Super RK 102 H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
Vortex-Schüttler VV3	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Wasseraufbereitungsanlage PURELAB flex	ELGA LabWater VWS Deutschland GmbH (Celle, Deutschland)
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

1.4 Pufferrezepturen und Lösungen

In Tabelle 4 sind die verwendeten Pufferrezepturen und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 4. Übersicht der Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösungen	Chemikalie	Zusammensetzung
Na ₂ H ₂ -EDTA-Lösung	Na ₂ H ₂ -EDTA-Dihydrat Reinstwasser	93,34 mg ad 10,0 mL
Phosphatpuffer pH 7,2 0,02 M	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O NaOH-Lösung 1 N Reinstwasser	13,80 g q.s. ad 5000,0 mL
Kaliumdihydrogenphosphat- Lösung (0,2 M) R	KH ₂ PO ₄ Reinstwasser	27,22 g ad 1000,0 mL
Natriumhydroxid-Lösung (0,2 M) R	NaOH Reinstwasser	8,00 g ad 1000,0 mL

1.5 Fließmittel

Die für die chromatographische Verfahren genutzten Fließmittel sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5. Übersicht der Fließmittel für die HPLC-Analytik.

Analytische Substanz	Chemikalien	Zusammensetzung
Hydrochlorothiazid (HCT) (HPLC)	Acetonitril 0,1% (V/V) Trifluoressigsäure in Reinstwasser	50% 50%
Eisen(III)-oxid (HPLC)	Phosphatpuffer pH 7,2 KH ₂ PO ₄ NaOH Reinstwasser	13,61 g 2,78 g ad 2.000,0 mL
Triamcinolonacetonid (HPLC)	Acetonitril 0,1% (V/V) Trifluoressigsäure in Reinstwasser	50% 50%
7-Diethylamino-4- methylcoumarin (HPLC)	Acetonitril 0,1% (V/V) Trifluoressigsäure in Reinstwasser	50% 50%

2 Validierung einer HPLC-Analytik zur Hydrochlorothiazid-Quantifizierung

Der erste experimentelle Teil dieser Arbeit befasst sich damit, eine HPLC-Methode zur quantitativen Erfassung des Wirkstoffes Hydrochlorothiazid (HCT) zu entwickeln. Die Methode wurde nach den Vorgaben der ICH-Guideline Q2(R1) [ICH-Guideline, 2005] validiert. Das HCT diente hierbei als Modellarzneistoff, da es sehr häufig als Rezeptursubstanz für pädiatrische Darreichungsformen, wie z.B. Kapseln, verarbeitet wird. Es soll daher stellvertretend für die üblich angewendeten Rezeptursubstanzen stehen. Des Weiteren wurde es wegen seiner guten Stabilität, Löslichkeit, Verarbeitbarkeit und seiner kostengünstigen Anschaffung ausgewählt.

2.1 Festlegung der Parameter für die HPLC-Analytik des Hydrochlorothiazids

In Anlehnung an eine bereits publizierte Methode zur quantitativen Bestimmung des HCTs [Abd El-Hay et al., 2016] wurden einzelne Parameter übernommen. Zu diesen gehören das Säulenmaterial, das Injektionsvolumen der Proben und die Detektionswellenlänge von 220 nm. Alle weiteren Parameter wurden während der Validierung der HPLC-Methode festgelegt. Die Parameter der HPLC-Methode sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6. Parameter der HPLC-Analytik für die HCT-Quantifizierung.

Säule	Gemini®-NX C18; 110 Å; 250 x 4,6 mm
Fließmittel	50% Acetonitril 50% wässrige Trifluoressigsäure (0,1% (V/V))
Injektionsvolumen	15,0 µL (mit <i>needle wash</i>)
Flussrate	1,0 mL/min
Elutionsmethode	isokratisch
Säulenofentemperatur	30°C
Laufzeit	5 Minuten
Detektion	DAD-Detektor; 220 nm

2.2 Herstellung der Hydrochlorothiazid-Kalibrierproben

Für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt, indem 20,0 mg HCT in 20,0 mL Acetonitril (MeCN) mittels Ultraschallbehandlung gelöst wurde. Aus dieser Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL wurde eine Sechspunkt-Kalibrierung über einen Konzentrationsbereich von 10 bis 125 µg/mL erstellt. Nach Abschluss der chromatographischen Trennung wurden die einzelnen Läufe mit Hilfe der „Agilent Chemstation“-Software ausgewertet.

2.3 Herstellung der Hydrochlorothiazid-Wiederfindungsproben

Zur Prüfung der Wiederfindung des HCT wurden drei getrennt voneinander hergestellte Stammlösungen der Konzentration 1 mg/mL verwendet. Diese wurden, durch einen weiteren Verdünnungsschritt mit MeCN, auf drei unterschiedliche Konzentrationsniveaus zwischen 15 – 115 µL/mL eingestellt, um den gesamten linearen Prüfbereich abzudecken.

2.4 Herstellung der Hydrochlorothiazid-Kapselproben

Hartgelatine-Kapseln mit einem Sollgehalt von 1,0 mg HCT wurden gemäß DAC/NRF hergestellt. Aufgrund der geringen Wirkstoffdosierung wurde ein Produktionszuschlag von 10% gewählt. Um die Gehaltsbestimmung des HCTs aus der Matrix des Kapselfüllstoffes durchzuführen, wurden die Bestandteile des Kapselinhalts auf Grundlage des massenbasierten Verfahrens [DAC/NRF: I.9. Kapseln] abgewogen und in einer Fantaschale homogenisiert. Hierzu wurde das Gemisch mit einem Pistill für dreimal 30 s, unter Abschaben mit Hilfe eines Kartenblattes, gerührt. Die homogen verteilte Pulvermischung wurde mittels eines Kapselfüllgeräts in Hartgelatine-Kapseln der Größe 1 überführt. Es wurden per Zufallsprinzip fünf Einheiten ausgewählt. Die zu prüfenden Kapseln, mit einer durchschnittlichen Füllmasse von 245 mg, wurden geöffnet und jeweils in ein 2,0 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Abtrennung des HCTs von den übrigen Kapselbestandteilen wurde 1,0 mL Acetonitril zur Probe hinzugegeben. Die Probe wurde dann bis zur vollständigen Auflösung des HCTs im Ultraschallbad behandelt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 30.000 g abgetrennt. Im Anschluss wurde das sich in der organischen Phase gelöste HCT vollständig abpipettiert und in ein weiteres Reaktionsgefäß

überführt. Die so erhaltene Probenkonzentration des HCTs von idealerweise 1,1 mg/mL (1 mg HCT + 10% Zuschlag in 1,0 mL MeCN) wurde durch einen weiteren Verdünnungsschritt mit MeCN auf eine nominale Konzentration von 110 µg/mL eingestellt. Die HCT-Kapselproben wurden im gleichen HPLC-Lauf wie die HCT-Kalibrierproben und die HCT-Wiederfindungsproben vermessen und mittels der „Agilent Chemstation“-Software ausgewertet.

3 Validierung einer HPLC-Analytik zur Eisen(III)-oxid-Quantifizierung

In einem weiteren Teil dieses Projekts wurde eine HPLC-Methode zur Gehaltsbestimmung von Eisenoxid nach der ICH-Guideline validiert [ICH-Guideline, 2005]. Rotes Eisenoxid wurde wegen seiner intensiven roten Farbe als Indikatorsubstanz zur Färbung des Kapselfüllguts genutzt. Eine optisch wahrzunehmende Homogenität der Indikatorsubstanz sollte eine gleichmäßige Wirkstoffverteilung in der Kapselfüllmischung für die herstellende Person erkennbar machen und so eine Prüfmöglichkeit zur Qualitätssicherung von Kapselrezepturen darstellen. Einerseits wurde das Eisen(III)-oxid wegen seiner inerten Eigenschaft gegenüber den restlichen Kapselbestandteilen ausgewählt und andererseits besitzt es in den eingesetzten Mengen keinen toxischen Einfluss auf den menschlichen Körper. Eisenoxide und -hydroxide werden als Farbpigmente zur Färbung von Lebensmitteln (EG-Nr. E172) und Arzneimitteln eingesetzt. Im Anhang I der Farbstoff-Richtlinie 94/36/EG sind Eisenoxide unter der EG-Nr. E172 aufgeführt und über die Arzneimittelfarbstoffverordnung (AMFarbV), die sich auf die EG-Richtlinie bezieht, zur Färbung von Arzneimitteln zugelassen.

3.1 Festlegung der Parameter für die HPLC-Analytik des Eisen(III)-oxids

Die Quantifizierung des Eisen(III)-oxids wurde in Anlehnung an eine Publikation zur analytischen Erfassung von Na₂H₂EDTA durchgeführt [Cagnasso et al., 2007]. In der Veröffentlichung dienen Eisen-Ionen in Form von Eisen(III)-chlorid dem Zweck einer Komplexierung von Na₂H₂EDTA, um dieses als FeNaEDTA-Komplex mit Hilfe der HPLC zu quantifizieren. Dasselbe Prinzip wird in dieser Arbeit zur Quantifizierung des

Eisen(III)-oxids genutzt. Hierbei wurden die Beschaffenheit der Säule sowie die Detektionswellenlänge von 257 nm übernommen. Alle weiteren Analysenparameter wurden während der Validierung des Verfahrens bestimmt und festgelegt. Die Parameter der HPLC-Methode sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7. Parameter der HPLC-Analytik für die Quantifizierung von Eisen(III)-oxid.

Säule	Gemini®-NX C18; 110 Å; 250 x 4,6 mm
Fließmittel	Phosphatpuffer pH 7,2
Injektionsvolumen	20,0 µL (mit <i>needle wash</i>)
Flussrate	1,0 mL/min
Elutionsmethode	isokratisch
Säulenofentemperatur	30°C
Laufzeit	5 Minuten
Detektion	DAD-Detektor; 257 nm

3.2 Herstellung der Eisen(III)-oxid-Kalibrierproben

Das zu bestimmende Eisen(III)-oxid musste zunächst in eine lösliche Form überführt werden, damit diese mittels HPLC erfasst werden konnte. Hierzu wurde konzentrierte Salzsäure (12 M) genutzt, die mit dem inerte Eisen(III)-oxid zum wasserlöslichen Eisen(III)-chlorid reagiert. Für die Erstellung einer Kalibriergeraden wurde zunächst eine Stammlösung der Konzentration 2,0 mg/mL angefertigt, indem 20,0 mg Eisenoxid in 10,0 mL konzentrierter Salzsäure über 30 min im Ultraschallbad gelöst wurden. Aus dieser Stammlösung wurden über einen Verdünnungsschritt mit Salzsäure (12 M) sechs Vorproben im Konzentrationsbereich zwischen 100 - 1250 µg/mL hergestellt. Diesen wurde zur Komplexierung der Eisen(III)-Ionen eine Na₂H₂-EDTA-Lösung (9,33 mg/mL) hinzugegeben. Um eine ausreichende Komplexstabilität zu gewährleisten wurde eine 25%ige Ammoniak-Lösung beigefügt. Die Messproben setzten sich aus 100 µL Vorprobe, 150 µL Na₂H₂EDTA-Lösung, 125 µL 25%iger Ammoniak-Lösung sowie 625 µL Reinstwasser zusammen. Aus den Messproben wurde so eine Sechspunkt-Kalibrierung über einen Konzentrationsbereich von 10 - 125 µg/mL erstellt. Die Proben wurden für eine ausreichende Komplexstabilität auf einen pH-Bereich zwischen 7,6 - 8,2 eingestellt. Die unterschiedlichen Konzentrationsniveaus wurden unter Zuhilfenahme der „Agilent Chemstation“-Software ausgewertet.

3.3 Herstellung der Eisen(III)-oxid-Wiederfindungsproben

Wie schon bei den HCT-Wiederfindungsproben wurden auch diesmal drei getrennt voneinander hergestellte Stammlösungen angefertigt. Hierzu wurden 20,0 mg Eisenoxid in 10,0 mL konzentrierter Salzsäure (12 M) gelöst, um eine Konzentration von 2,0 mg/mL zu erzielen. Die drei Stammlösungen wurden durch einen weiteren Verdünnungsschritt mit Salzsäure (12 M) auf einen Konzentrationsbereich zwischen 375 – 1125 µg/mL eingestellt. Ein Volumen von 100 µl Vorprobe wurde durch Zugabe von 150 µL Na₂H₂-EDTA-Lösung (9,33 mg/mL), 125 µL 25%iger Ammoniak-Lösung sowie 625 µL Reinstwasser auf drei verschiedene Konzentrationsstufen zwischen 37,5 und 112,5 µg/mL verdünnt, um den festgelegten Kalibrierbereich zwischen 10 und 125 µg/mL abzudecken.

3.4 Herstellung der Eisen(III)-oxid-Kapselproben

Wie schon für das HCT beschrieben, war es das Ziel auch die Indikatorsubstanz Eisen(III)-oxid direkt aus der Kapselmatrix eindeutig und quantitativ mittels HPLC detektieren zu können. Die Kapseln wurden gemäß DAC/NRF, Kapitel I.9. „Kapseln“ hergestellt. Für die Herstellung wurde Kapselfüllstoff (99,5% Mannitol; 0,5% Siliciumdioxid) nach der Vorschrift des NRF S.38. [DAC/NRF-Stammzubereitungen, 2018] verwendet. Für einen Ansatz von 30 Kapseln wurden 33,0 mg HCT, 15,0 mg Eisen(III)-oxid, sowie 7,302 g Füllstoff eingewogen. Die Kapselbestandteile Mannitol, Siliciumdioxid sowie HCT und Eisen(III)-oxid wurden nach dem massenbasierten Verfahren verarbeitet und nach Anweisung des DAC/NRF in einer Fantaschale mittels Pistill zu einer homogenen Masse vermischt. Es wurden 30 Kapseln befüllt, aus diesen wurden nach dem Zufallsprinzip fünf Kapseln entnommen und auf deren Eisenoxid-Gehalt geprüft. Hierzu wurde der Kapselinhalt vollständig in ein 2,0 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Abtrennung des HCTs wurde die Probe nach der Zugabe von 1,0 mL MeCN im Ultraschallbad behandelt und im Anschluss bei 30.000 g über 10 min zentrifugiert. Das gelöste HCT wurde durch vollständiges Abpipettieren des klaren Überstandes entfernt und zur separaten HPLC-Quantifizierung in einem 2,0 mL Reaktionsgefäß aufbewahrt. Zur Erstellung der Vorprobe wurde das Eisen(III)-oxid im Pellet der Zentrifugation in 1,0 mL konzentrierter Salzsäure (12 M) unter Verwendung des Ultraschallbades über 30 min gelöst. Anschließend wurde die

gesamte Eisen(III)-chlorid-Lösung in ein 2,0 mL Messkolben überführt und mit konzentrierter Salzsäure auf 2,0 mL aufgefüllt. Unter Einsatz eines Vortex-Mischers wurden die Vorproben homogenisiert. Die Vorproben besitzen eine nominale Fe₂O₃-Konzentration von 250 µg/mL. Zu 100 µL der jeweiligen Vorprobe wurden 150 µL Na₂H₂-EDTA-Lösung (9,33 mg/mL), 125 µL 25%ige Ammoniak-Lösung sowie 625 µL Reinstwasser gegeben. Die Messproben wurden durch diesen Verdünnungsschritt auf eine nominale Konzentration von 25 µg/mL eingestellt. Die Eisen(III)-oxid-Kapselproben wurden im gleichen HPLC-Lauf wie die Kalibrierproben und die Wiederfindungsproben vermessen.

3.5 Vermessung der HPLC-Proben

Bei jedem HPLC-Lauf zur Validierung wurden zuerst die Kalibrierproben, dann die Wiederfindungsproben und zuletzt die Kapselproben analysiert. Nach der Kalibrierung sowie nach den Wiederfindungs- und Kapselproben wurde mit reinem Acetonitril gespült.

4 Prüfung auf Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen

Gemäß der Monographie Ph.Eur. 2.9.40 „Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen“ ist die Prüfung „Gleichförmigkeit des Gehalts“ bei Hartkapseln erforderlich, deren Einzeldosis unter 25 mg Wirkstoff bzw. deren Wirkstoffanteil an der Masse des Kapselinhalts weniger als 25% beträgt. Für die Gegenüberstellung der Dosierverfahren wurden Kapseln in einer pädiatrischen Dosierung mit einem Wirkstoffgehalt von 1,0 mg Hydrochlorothiazid hergestellt. Gemäß DAC/NRF wurde aufgrund der geringen Einzeldosierung ein Rezepturzuschlag von 10% entsprechend 0,1 mg pro Kapseln eingesetzt. Es wurden für jedes Dosierverfahren 30 Kapseln hergestellt.

Für die Prüfung auf „Gleichförmigkeit des Gehalts“ wurden bei festen Darreichungsformen, zunächst 30 Einheiten, per Zufallsprinzip ausgewählt. An zehn der ausgewählten Einheiten wurde jeweils der Einzelgehalt mit Hilfe einer geeigneten analytischen Methode bestimmt. Hierzu wurde das oben beschriebene validierte HPLC-Verfahren zur Quantifizierung des HCTs sowie des Eisen(III)-oxids verwendet. Nach der Trennung des Wirkstoffes von der Indikatorsubstanz wurden beide Analyten

jeweils in einem separaten HPLC-Lauf quantifiziert. Aus den experimentell ermittelten Kapselgehalten wurde der Akzeptanzwert (Acceptance value, AV) nach folgender Gleichung berechnet.

$$|M - \bar{X}| + k * s = AV$$

Für zehn geprüfte Kapseln (n=10) beträgt der Wert für die Akzeptanzkonstante (k) 2,4. Für einen deklarierten Einzelgehalt (T) von 100% und einen prozentualen Mittelwert der Einzelgehalte $\bar{X} > 101,5\%$ wurde ein Referenzwert (M) von 101,5% festgelegt. Zudem wurde die Standardabweichung (s) der Probe mit einbezogen. Damit die Prüfung entspricht, muss der Akzeptanzwert $AV \leq 15$ betragen.

5 Validierung einer HPLC-Analytik zur simultanen

Gehaltsbestimmung von Triamcinolonacetonid und DAMC

Im zweiten Teil dieses Projekts sollte ein Fluoreszenzindikator in einer apothekenüblichen Cremerezeptur verarbeitet werden, um deren Wirkstoffverteilung mittels einer UV-Lampe optisch sichtbar machen zu können. Als Fluoreszenzindikator wurde der Stoff 7-Diethylamino-4-methylcoumarin (DAMC) ausgewählt. Das Coumarin-Derivat findet bereits Anwendung als Zusatzstoff in Desinfektionsmitteln, mit denen bei Hygieneschulungen die ordnungsgemäße Händedesinfektion unter der UV-Lampe optisch überprüft werden kann. Nach Sicherheitsdatenblatt ist dieser Stoff für die dermale Anwendung als ungefährlich eingestuft, dennoch besitzt er keine Zulassung als Hilfsstoff für die arzneiliche Anwendung. DAMC diente lediglich als Modellindikator, da es nach Recherche zurzeit keinen zugelassenen fluoreszierenden Hilfsstoff für den Einsatz in Arzneimitteln gibt. Der Wirkstoff Triamcinolonacetonid (TAA) ist in mehrerlei Hinsicht für die Verteilungsuntersuchung geeignet. Neben der kostengünstigen Anschaffung des Wirkstoffes, zeichnen sich Kortikoide dadurch aus, dass diese in sehr geringen Konzentrationen zwischen 0,025 und 0,1% (m/m) eingesetzt werden. Dies stellt eine Herausforderung für die richtige Verteilung des Wirkstoffes in einer halbfesten Zubereitung dar. Fluoreszenzindikator und Wirkstoff wurden in gleicher Menge verarbeitet, sodass eine Korrelation zwischen Wirkstoffverteilung und optisch sichtbarer Fluoreszenz mittels UV-Lampe hergestellt werden konnte.

Im folgenden Teil wird eine HPLC-Methode zur simultanen Quantifizierung des Wirkstoffes Triamcinolonacetonid und des Fluoreszenzindikators 7-Diethylamino-4-

methylcoumarin beschrieben. Die Methode wurde nach der ICH-Guideline Q2(R1) validiert [ICH-Guideline, 2005].

5.1 Festlegung der Parameter für die HPLC-Analytik

Für die Entwicklung der HPLC-Analytik, bei der TAA und DAMC gleichzeitig quantifiziert werden sollten, wurde zunächst die Monographie des Triamcinolonacetons aus dem Europäischen Arzneibuch [Ph.Eur. 8. Ausgabe, Grundwerk 2014] herangezogen. Für die Gehaltsbestimmung des Fluoreszenzindikators DAMC wurde sich an der HPLC-Analytik des Wirkstoffes orientiert. Einige analytische Parameter der monographierten Analytik wurden für das Coumarin-Derivat angepasst. Zu den übernommenen Parametern gehören das Säulenmaterial, das Injektionsvolumen, die Flussrate und die Detektionswellenlänge. Alle weiteren Parameter wurden während der Validierung der HPLC-Methode festgelegt. Die Parameter der HPLC-Methode sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8. Parameter der HPLC-Analytik für die simultane Quantifizierung von TAA und DAC.

Säule	Gemini [®] -NX C18; 110 Å; 250 x 4,6 mm
Fließmittel	50% Acetonitril 50% wässrige Trifluoressigsäure (0,1% (V/V))
Injektionsvolumen	20,0 µL (mit <i>needle wash</i>)
Flussrate	1,0 mL/min
Elutionsmethode	isokratisch
Säulenofentemperatur	30°C
Laufzeit	10 Minuten
Detektion	DAD-Detektor; 254 nm

5.2 Extraktionsverfahren zur Abtrennung der Cremegrundlage

Eine Quantifizierung der Analyten mit Hilfe der HPLC kann nur nach vorangegangener Abtrennung der Grundlage stattfinden. Bei der Vorgehensweise des Extraktionsverfahrens von Wirkstoffen aus halbfesten Grundlagen wurde nach einer bereits bewährten Methode von Griessmann et al. [2007] gearbeitet. Die Verfahrensparameter wurden im Laufe des Validierungsprozesses für die benutzte Grundlage (Basiscreme DAC) angepasst und optimiert. Das Verfahren wurde bei der Herstellung der Wiederfindungs- und Cremeproben angewendet.

5.3 Herstellung der DAMC-TAA-Kalibrierproben

Zur Erstellung der Stammlösung wurden jeweils 20,0 mg DAMC sowie 20,0 mg TAA abgewogen. Die Substanzen wurden in einen 20,0 mL Messkolben überführt, anschließend wurde reines MeCN dazugegeben. Zur Homogenisierung der Kalibrierlösung wurde diese für 15 min im Ultraschallbad bei 45°C behandelt. Nach Abkühlung der Lösung wurde mit Acetonitril auf 20,0 mL entsprechend dem Kalibriervolumen aufgefüllt, sodass eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/mL vorlag. Aus dieser Stammlösung wurden durch Verdünnung mit MeCN sechs Kalibrierlösungen hergestellt, die einen Konzentrationsbereich von 5 bis 125 µg/mL abdecken. Diese wurden in HPLC-Vials pipettiert und nach aufsteigender Konzentration vermessen. Nach Abschluss der chromatographischen Trennung wurden die einzelnen Läufe mit Hilfe der „Agilent Chemstation“-Software ausgewertet.

5.4 Herstellung der DAMC-TAA-Wiederfindungsproben

Zur Prüfung der Wiederfindung der beiden Analyten TAA und DAMC wurden zunächst drei getrennt voneinander hergestellte Stammlösungen angefertigt. Hierzu wurde, analog zur Herstellung der Kalibrierlösung jeweils 20,0 mg DAMC sowie 20,0 mg TAA eingewogen. Diese wurden in ein 20,0 mL Messkolben überführt und mit MeCN in Lösung gebracht. Nach 15 min im Ultraschallbad bei 45°C wurde die Lösung zum Abkühlen stehen gelassen und anschließend auf das Kalibriervolumen aufgefüllt. Die Wiederfindungs-Stammlösung besaß eine Konzentration von 1 mg/mL. Über einen weiteren Verdünnungsschritt mit MeCN wurden die drei Stammlösungen auf die drei Konzentrationsniveaus 15 µg/mL, 65 µg/mL und 115 µg/mL eingestellt, um den gesamten Kalibrierbereich abzudecken.

Um auch den Einfluss der Extraktion der zwei Analyten aus der Cremegrundlage zu berücksichtigen, wurden die Wiederfindungsproben zunächst mit reiner Grundlage gemischt und für die Quantifizierung mit Hilfe des nachfolgenden Extraktionsverfahrens getrennt. Hierzu werden 500 mg Grundlage in einem 5 mL Messkolben eingewogen. Anschließend wurden 500 µL der entsprechenden Wiederfindungsprobe und 4 mL Acetonitril hinzu pipettiert. Der Messkolbeninhalt wurde für 15 min bei 45°C im Ultraschallbad erwärmt, sodass sich die Grundlage

vollständig lösen konnte. Der Messkolben wurde zur Abkühlung für 30 min stehen gelassen und anschließend mit weiterem Lösungsmittel auf das Eichvolumen eingestellt. Nun wurde der Inhalt auf dem Vortex homogenisiert und für 15 min im Eisbad stehen gelassen. Die Cremegrundlage fiel dabei aus und es bildete sich ein klarer Überstand im Messkolben. Ein Aliquot von 1,0 mL wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei -8°C und 30.000 g zentrifugiert. Die Creme erstarrte hierbei an der Wand des Reaktionsgefäßes und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Das nun erhaltene Aliquot wurde unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes mit einer 1 mL Spritze aufgezogen und direkt über einen Sterilfilter der Porengröße 0,2 µm filtriert. Das Filtrat wurde zuletzt in ein HPLC-Vial pipettiert.

6 Herstellung der Cremeproben in Abhängigkeit der Rührmethode

Unter Zugabe des Fluoreszenzindikators wurden drei Cremes nach der Herstellungsanweisung der DAC/NRF-Rezeptur „Hydrophile Triamcinolonacetonid-Creme 0,1% (NRF 11.38)“ angefertigt. Hierbei wurden jeweils 30 g Zubereitung zunächst per Hand sowie mit den vollautomatischen Rührsystemen Topitec® und Unguator® gerührt. Bei einer Konzentration von 0,1% beinhalten 30 g der Zubereitung 30 mg Triamcinolonacetonid. Für die Einarbeitung in die Basiscreme wurden hierzu 30 mg Wirkstoff sowie 30 mg Fluoreszenzindikator auf der Ultramikrofein-Waage abgewogen. Diese wurden nach dem „Sandwich-Verfahren“ in die „Basiscreme DAC“ eingearbeitet.

6.1 Herstellung der DACM-TAA-Creme mittels Topitec®-Rührsystem

Die Herstellung der Creme erfolgte in 30 g-Topitec®-Kruken. Nach Einwaage der Rezepturbestandteile wurde die Kruke in das Topitec®-Rührsystem eingespannt. Für die „Basiscreme DAC“ wird vom Hersteller eine Rührzeit von 2 min bei 1.500 rpm vorgeschlagen.

6.2 Herstellung der DACM-TAA-Creme mittels Unguator®-Rührsystem

Das Unguator®-Rührsystem verfügt über eine interne Datenbank, in der für jede DAC/NRF-Rezeptur ein eigenes Rührprogramm hinterlegt ist. Im Fall der DAC/NRF-Rezeptur „Hydrophile Triamcinolonacetonid-Creme 0,1% (NRF 11.38)“ wird ein Anreibeprogramm mit einem Drittel der Cremegrundlage vorgeschlagen. Hierzu wurden TAA und DACM zunächst in 10 g Grundlage mittels „Sandwich-Verfahren“ eingearbeitet. Nach dem Anreibeprogramm wurden die restlichen 20 g Grundlage zugeben und das Hauptprogramm gestartet.

6.3 Herstellung der DAMC-TAA-Creme mittels manueller Rührmethode

Zunächst wurden 15 g Basiscreme DAC in der Fantaschale vorgelegt. Nach Zugabe des Wirkstoffes sowie des Indikators wurde mit weiterer Grundlage auf 30 g im „Sandwich-Verfahren“ ergänzt. Es wurde 3 min bei etwa 60 Röhreinheiten pro Minute unter Abschaben der Fantaschale gerührt. Anschließend wurde die Zubereitung in eine Unguator®-Kruke überführt.

6.4 Extraktion der Analyten aus der DAMC-TAA-Cremeprobe

Um die Wirkstoffhomogenität der Zubereitung im Primärpackmittel zu prüfen, wurden an drei verschiedenen Stellen im Abgabegefäß Proben entnommen. Dazu wurden mittels einer 1 mL-Spritze im oberen, mittleren und unteren Drittel des Abgabegefäßes Cremeprobe gezogen. Die Probe im oberen Drittel wurden durch reguläre Handhabung der Kruke entnommen. Die Proben im mittleren und unteren Drittel wurden durch Entfernung des Schraubverschlusses und anschließendem Einsatz der Spritze entnommen.

Eine Probenmasse von 500 mg wurde mittels der 1 mL-Spritze in einen auf der Feinwaage tarierten 5 mL-Messkolben überführt. Nach Zugabe von 4 mL MeCN wurde die Probe für 15 min bei 45°C im Ultraschallbad behandelt. Der Messkolben wurde nun für 30 min zum Abkühlen auf Raumtemperatur stehen gelassen. Das fehlende Volumen bis zur Kalibriermarkierung wurde mit MeCN ergänzt. Die Probe wurde mittels Vortex-Mischer homogenisiert und anschließend für 15 min im Eisbad gekühlt, wodurch die Grundlage ausfiel. Mittels einer Transferpipette wurden 2 mL des klaren Überstands entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde nun in

einer auf -8°C vorgekühlten Zentrifuge für 30 min bei 30.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das klare Aliquot der Probe in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Das Aliquot wurde ein zweites Mal unter den gleichen Bedingungen für 30 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit einer 1 mL-Spritze aufgenommen und durch einen Sterilfilter der Porengröße $0,22\ \mu\text{m}$ in ein neues Reaktionsgefäß filtriert. Es wurde 1 mL des Filtrats in ein HPLC-Vial pipettiert.

6.5 Vermessung der HPLC-Proben

Bei jedem HPLC-Lauf zur Validierung sowie zum Vergleich der Herstellungsverfahren wurden zuerst die Kalibrierproben, dann die Wiederfindungsproben und zuletzt die Cremeproben vermessen. Nach der Kalibrierung sowie nach den Wiederfindungs- und Cremeproben wurde mit reinem Acetonitril gespült.

C Ergebnisse und Diskussion

Bei der rezepturmäßigen Herstellung von Arzneimitteln in der Apotheke hat ein Apotheker auf Basis von durchgeführten Inprozesskontrollen in Kombination mit einer organoleptische Prüfung das fertig hergestellte Arzneimittel freizugeben. Aufgrund des teilweise hohen analytischen Aufwands von Inprozesskontrollen gemäß Ph.Eur., können diese unter Apothekenbedingungen kaum durchgeführt werden. Das vorliegende Projekt setzt sich die Etablierung von vereinfachten Analysenverfahren zur Beurteilung der Rezepturqualität zum Ziel. Eine Etablierung solcher Verfahren und deren Einsatz in Apotheken leistet einen wesentlichen Beitrag zur Arzneimittelsicherheit bei in Apotheken hergestellten Arzneimitteln.

Im Rahmen des Projekts wurde ein Schwerpunkt einerseits auf die Dosierung pädiatrischer Kapselrezepturen und andererseits auf niedrig dosierte halbfeste Zubereitungen gelegt. Im Falle der festen Arzneiform wurden Hydrochlorothiazid-Kapseln in einer Einzeldosierung von 1,0 mg hergestellt, während als Modell für halbfeste Arzneiformen eine „Hydrophile Triamcinolonacetonid-Creme 0,1% (NRF 11.38)“ herangezogen wurden. In beiden Fällen wurde die Hypothese zugrunde gelegt, dass ein einfach visuell zu detektierender Indikatorstoff neben dem Wirkstoff geeignet sein könnte, die Homogenität der resultierenden Zubereitung optisch zu beurteilen. Im Rahmen der Kapsel-Rezeptur wurde dazu Eisenoxid als Indikatorsubstanz verarbeitet, während bei der Creme-Zubereitung ein bei Tageslicht nicht sichtbarer Fluoreszenzfarbstoff genutzt wurde, dessen Verteilung unter UV-Licht leicht zu detektieren ist. Bei beiden Arzneiformen sollte eine analytische Korrelation zwischen Wirkstoff- und Indikatorstoff-Verteilung durchgeführt werden, um die Arbeitshypothese zu belegen. Für alle zu untersuchenden Stoffe wurde zunächst eine HPLC-Analytik etabliert und validiert. Nach Herstellung der Arzneiformen wurde basierend auf dieser Analytik der jeweilige Gehalt an Wirkstoff und Indikator ermittelt, um die angestrebte Korrelation zwischen Wirkstoff- und Indikator-Gehalt zu überprüfen.

1 Methodenentwicklung zur Quantifizierung von Hydrochlorothiazid

Am Anfang der Arbeit stand die Etablierung eines Verfahrens zur Quantifizierung von Hydrochlorothiazid (HCT). Hierzu wurde eine HPLC-Analytik etabliert und validiert.

1.1 Messparameter der HCT-Analytik

Zur quantitativen Bestimmung des HCTs wurde das UV-Signal herangezogen. Die Abbildung 1 zeigt ein exemplarisches HPLC-Chromatogramm von HCT mit einem Gehalt von 100 µg/mL.

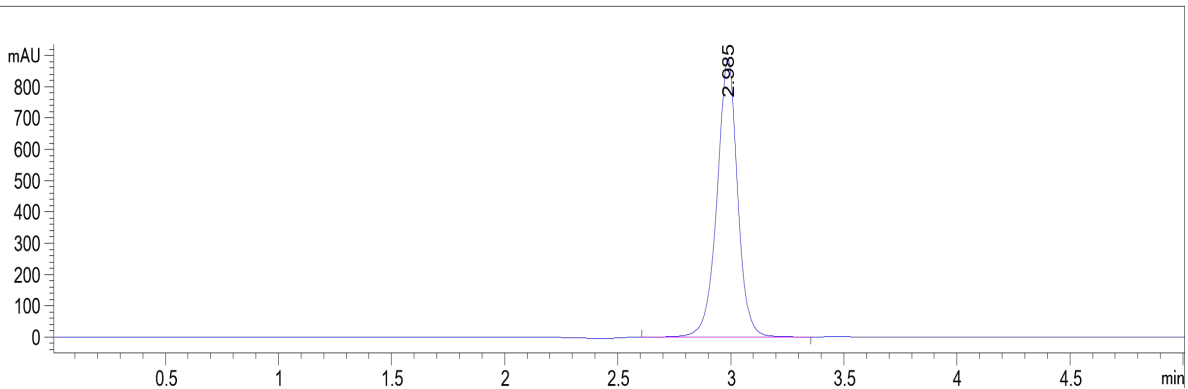


Abbildung 1. HPLC-Chromatogramm einer HCT-Kalibrierprobe (100 µg/mL), die Messparameter sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Die Abbildung 2 zeigt das HPLC-Chromatogramm einer Kapselprobe nach Extraktion des HCTs aus dem Kapselfüllstoff mittels Acetonitril.

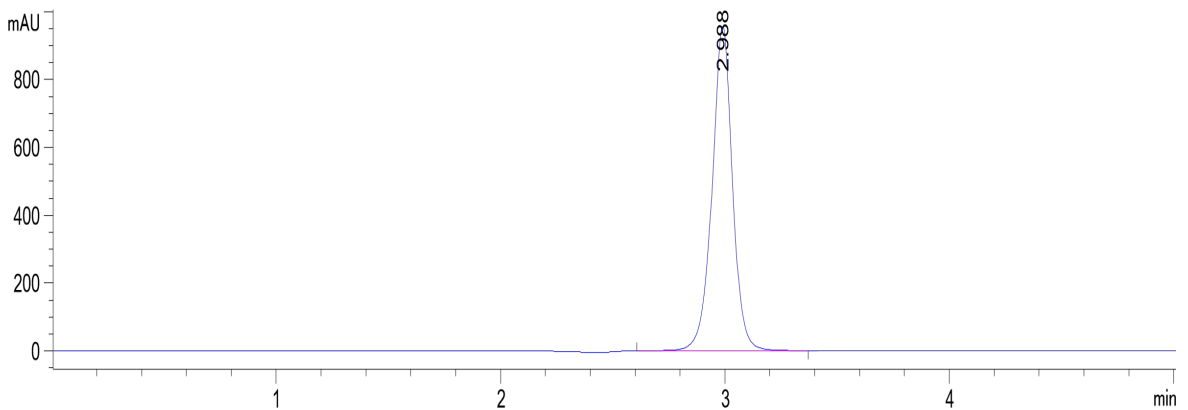


Abbildung 2. HPLC-Chromatogramm einer HCT-Kapselprobe (nominal 110 µg/mL) nach Extraktion mit Acetonitril.

Die beiden HPLC-Chromatogramme zeigen einen klar definierten und symmetrischen Peak. Dies weist auf eine gute chromatographische Trennung unter den gewählten Bedingungen hin. Des Weiteren sind in Abbildung 2 keine Signale von weiteren

Kapselbestandteilen zu erkennen. Dies lässt auf eine selektive Extraktion des HCTs durch Acetonitril schließen.

1.2 Linearität der HCT-Analytik

Zur Testung auf Linearität wurde ein Konzentrationsbereich von 10 bis 125 µg/mL festgelegt. Vermessen wurden die Proben mittels eines Photodiodenarray-Detektors (DAD) bei einer Wellenlänge von 220 nm. Die Ergebnisse der Kalibrierung sind in Abbildung 3 dargestellt.

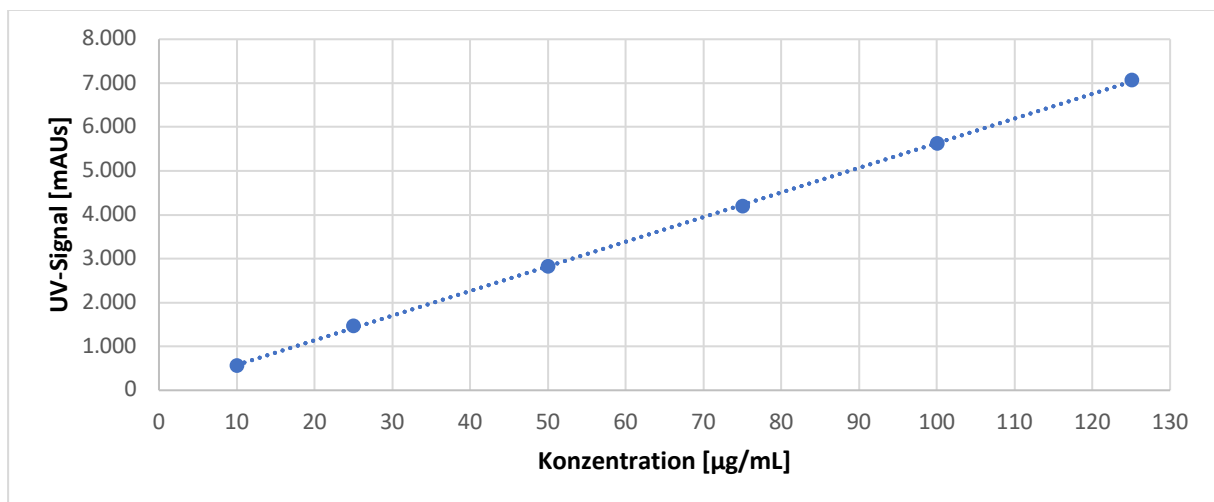


Abbildung 3. Kalibriergerade erstellt aus den HCT-Kalibrierproben im Bereich von 10 -125 µg/mL bei 220 nm.

In Tabelle 9 sind die Parameter für die lineare Regression aufgeführt.

Tabelle 9. Lineare Regression für die Quantifizierung des Hydrochlorothiazids mittels HPLC bei UV-Detektion.

Parameter	UV-Detektion
Steigung m	56,115 mL/µg
Achsenabschnitt b	15,701
Korrelationskoeffizient r	0,9998
Anzahl an Kalibrierproben	6

Mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,9998 ist die Linearität in dem zu prüfenden Konzentrationsbereich sehr hoch. Der Bereich 10 bis 125 µg/mL ist damit für eine Quantifizierung geeignet. Für die Detektion wurde eine Nachweisgrenze von 0,0111 µg/mL und eine Bestimmungsgrenze von 1,11 µg/mL ermittelt.

1.3 Präzision und Richtigkeit der HCT-Analytik

Mit der oben genannten Kalibrierung wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Werte für die Wiederfindung erhalten.

Tabelle 10. Wiederfindung des HCTs bei Quantifizierung mittels HPLC und UV-Detektion (n=3).

Parameter	Konzentrationen [$\mu\text{g/mL}$]		
	15,0	65,0	115,0
Wiederfindung [%]	101,16	101,46	101,01
Standardabweichung [%]	1,34	0,57	0,71
Vertrauensbereich ($p=0,95$)			
Obere Grenze [%]	104,44	102,84	102,77
Untere Grenze [%]	97,87	100,07	99,25
Maximum [%]	102,05	101,86	101,64
Minimum [%]	99,62	100,81	100,23
Probenzahl	3	3	3

Mit einer Wiederfindung von annähernd 100% und einer relativen Standardabweichung von durchschnittlich 0,87% waren sowohl Richtigkeit als auch Präzision der Methode sehr hoch. Diese beiden Kriterien sprechen für die Eignung der HPLC-Methode zur Quantifizierung von Hydrochlorothiazid.

1.4 Wiederfindung in HCT-Kapselproben

Im selben HPLC-Lauf, in dem die Wiederfindungsproben vermessen wurden, wurden auch die Kapselproben untersucht. In der Tabelle 11 ist die Wiederfindung für die Kapselproben aufgeführt.

Tabelle 11. Wiederfindung des HCTs in den Kapselproben bei Quantifizierung mittels HPLC (n=4).

Parameter	Konzentrationen [$\mu\text{g/mL}$] nominal
	110,0
Wiederfindung [%]	100,12
Standardabweichung [%]	1,15
Vertrauensbereich ($p=0,95$)	

Obere Grenze [%]	101,54
Untere Grenze [%]	98,70
Maximum [%]	101,39
Minimum [%]	98,74
Probenzahl	5

Im Durchschnitt wurde das durch Acetonitril extrahierte HCT zu 100,12% wiedergefunden. Das ist eine hohe Wiederfindung und lässt darauf schließen, dass das HCT quantitativ aus dem Kapselinhalt extrahiert werden konnte. Die Standardabweichung ist mit 1,15% ebenfalls gering.

2 Methodenentwicklung zur Quantifizierung des Eisen(III)-oxids

Neben dem Wirkstoff Hydrochlorothiazid sollte auch für das rote Eisen(III)-oxid eine Methode zur quantitativen Analyse mittels HPLC entwickelt werden. Hierzu wurden dasselbe Modell der HPLC sowie der Säule verwendet.

2.1 Messparametern der Eisen(III)-oxid-Analytik

Zur Gehaltsbestimmung des Eisen(III)-oxids wurde das UV-Signal bei 257 nm verwendet. Die Abbildung 4 zeigt ein exemplarisches HPLC-Chromatogramm einer Kalibrierprobe von komplexierten Eisen(III)-Ionen mit $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$, welches als FeNaEDTA eluiert. Abbildung 5 zeigt den Retentionsverlauf von komplexierten Eisen(III)-Ionen einer aufgereinigten Kapselprobe.

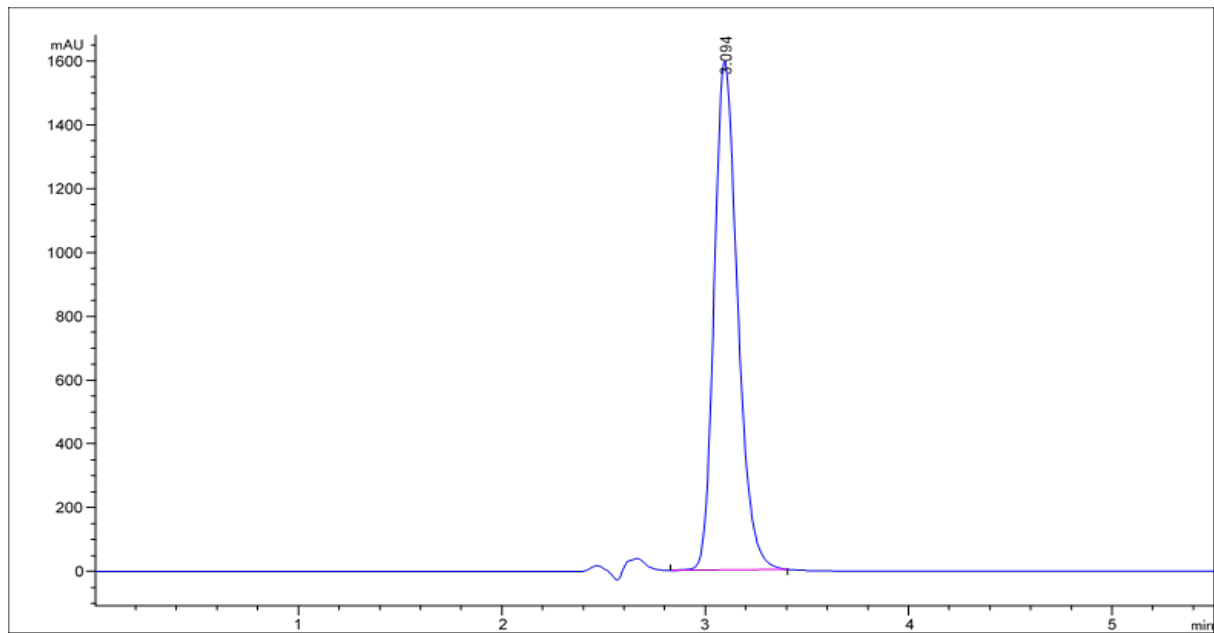


Abbildung 4. HPLC-Chromatogramm einer Eisen(III)-chlorid-Kalibrierprobe (100 µg/mL), die Messparameter sind in Tabelle 7 aufgelistet.

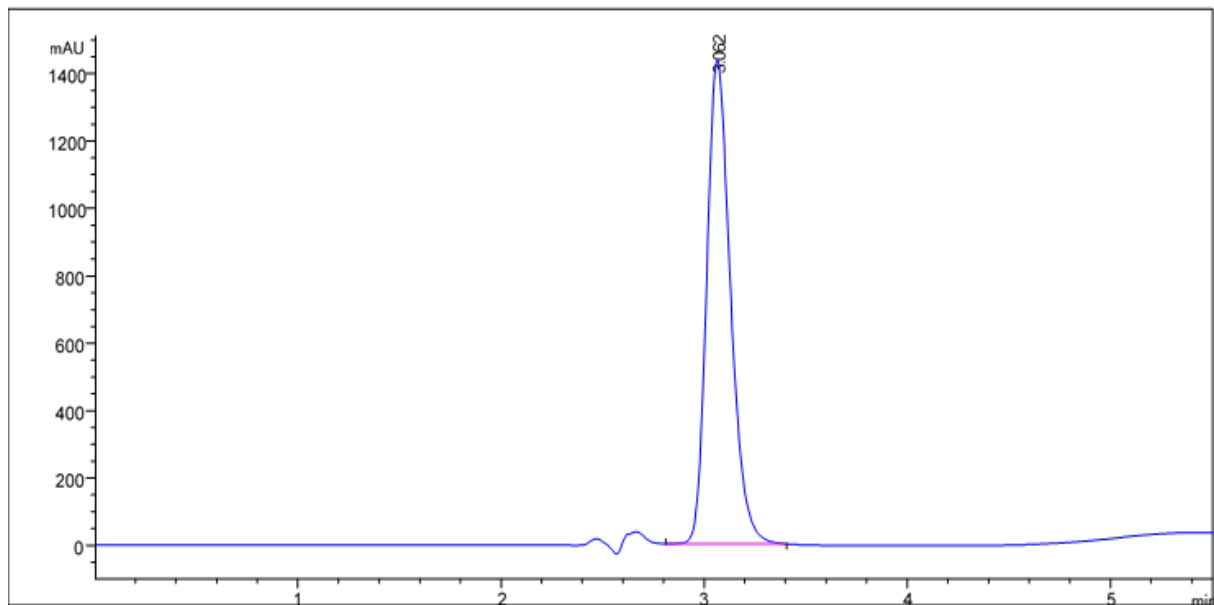


Abbildung 5. HPLC-Chromatogramm einer Eisen(III)-chlorid-Kapselprobe (100 µg/mL) nach Extraktion des HCTs mittels Acetonitril, die Messparameter sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Die Peaks in den Chromatogrammen weisen eine ausreichende Höhe und Symmetrie auf. Die gute Auswahl der Messparameter drückt sich auch durch einen sehr schmalen Peak mit einem schnellen An- und Abstieg des Detektionssignals aus. Außerdem

erscheint in Abbildung 5 kein HCT-Peak, sodass eine ausreichende Abtrennung stattgefunden hat.

2.2 Linearität der Eisen(III)-oxid-Analytik

Zur Testung auf Linearität wurden Kalibrierproben in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 125 µg/mL erstellt. Die Kalibrierproben wurden mittels eines DAD-Detektors bei einer Wellenlänge von 257 nm vermessen. Die Ergebnisse der Kalibrierung sind in Abbildung 6 dargestellt.

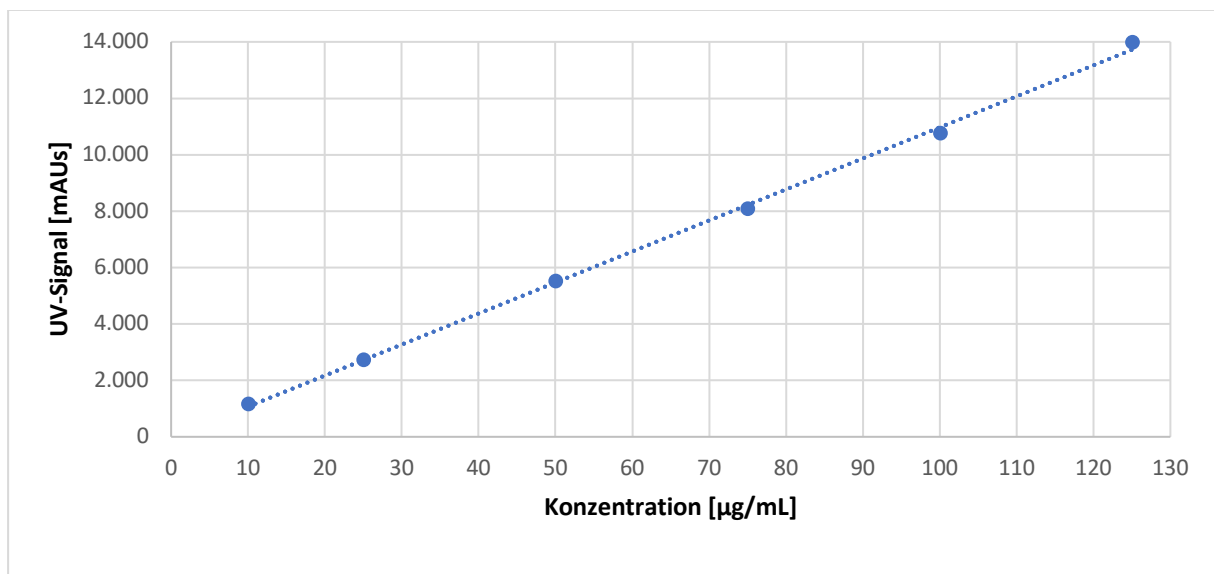


Abbildung 6. Kalibriergerade erstellt aus den Eisen(III)-oxid-Kalibrierproben im Bereich von 10 – 125 µg/mL.

In der Tabelle 12 sind die Parameter für die lineare Regression aufgeführt.

Tabelle 12. Lineare Regression für die Quantifizierung des Eisen(III)-oxids mittels HPLC bei UV-Detektion.

Parameter	UV-Detektion
Steigung m	110,00 mL/µg
Achsenabschnitt b	-29,298
Korrelationskoeffizient r	0,9988
Anzahl an Kalibrierproben	6

Ein Korrelationskoeffizient von 0,9988 spricht für eine gute Linearität des ausgewählten Messbereichs. Der Bereich 10 bis 125 µg/mL ist damit für eine Quantifizierung des Eisen(III)-chlorids geeignet.

2.3 Präzision und Richtigkeit der Eisen(III)-oxid-Analytik

Mit dieser Detektionsmethode konnte bei den Wiederfindungsproben eine hohe Präzision und Richtigkeit erzielt werden wie Tabelle 13 zu entnehmen ist.

Tabelle 13. Wiederfindung des Eisen(III)-oxids bei Quantifizierung mittels HPLC und UV-Detektion (n=3).

Parameter	Konzentrationen [µg/mL]		
	37,5	75,0	112,5
Wiederfindung [%]	100,66	101,29	101,34
Standardabweichung [%]	3,18	0,25	1,39
Vertrauensbereich (p=0,95)			
Obere Grenze [%]	108,50	101,92	104,75
Untere Grenze [%]	92,81	100,66	97,94
Maximum [%]	103,10	101,59	102,45
Minimum [%]	97,06	101,11	99,78
Probenzahl	3	3	3

Mit einer durchschnittlichen Wiederfindung von 101,10% ist die Richtigkeit dieser Methode sehr hoch. Die Standardabweichung ist auf allen drei Konzentrationsniveaus zwischen 37,5 bis 112,5 µg/mL in einem akzeptablen Bereich. Hinsichtlich Richtigkeit und Präzision ist die angewendete HPLC-Methode zur Quantifizierung des Eisen(III)-chlorids geeignet.

2.4 Wiederfindung in Eisen(III)-oxid-Kapselproben

In der Tabelle 14 sind die Wiederfindungswerte für die Fe₂O₃-Kapselproben aufgeführt, die im gleichen HPLC-Lauf wie die Kalibrier- und Wiederfindungsproben vermessen wurden.

Tabelle 14. Wiederfindung des Eisen(III)-oxids bei Quantifizierung mittels HPLC (n=5) nach der Aufreinigung.

Parameter	Konzentrationen [$\mu\text{g/mL}$]
	100,0
Wiederfindung [%]	99,85
Standardabweichung [%]	1,46
Vertrauensbereich (p=0,95)	
Obere Grenze [%]	101,48
Untere Grenze [%]	98,03
Maximum [%]	101,67
Minimum [%]	98,11
Probenzahl	5

Die durchschnittliche Wiederfindung des Eisen(III)-oxids aus den aufgereinigten Kapselproben ist mit 99,85% als sehr gut zu bewerten. Eine relativ niedrige Standardabweichung von 1,46% spricht für eine gute Präzision der Methode.

3 Prüfungen der Kapselproben

Die Grundlage jeder quantifizierten Kapselprobe ist die ordnungsgemäße Herstellung nach Vorschrift des DAC/NRF. Um eine gleichmäßige Qualität hinsichtlich des Gehalts sowie der Massenverteilung zu gewährleisten, wurden die Kapseln der Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse einzeldosierter Arzneiformen unterzogen. Für diese Prüfung wurde die nicht zerstörende Methode gewählt. Es wurden 20 nach dem Zufallsprinzip entnommene Einheiten gewogen. Anschließend wurde von diesen Massen die durchschnittliche Masse der Kapselhüllen abgezogen. Die nach dem massenbasierten Verfahren bestimmte ideale Masse des Kapselinhalts richtet sich nach der Schüttdichte des Füllstoffs. Es wurde experimentell ein Wert von 0,49 g/mL ermittelt, sodass eine nominale Schüttdichte von 0,5 g/mL festgelegt wurde. Die nominale Masse des Kapselinhalts beträgt somit 245 mg. In der Tabelle 15 sind die Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse des Kapselinhaltes aufgeführt.

Tabelle 15. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse einzeldosierter Arzneiformen. Die Kapseln wurden nach dem massenbasierten Verfahren dosiert.

Kapselprobe	Masse des Kapselinhaltes [mg]	Relative Abweichung vom Mittelwert [%]
1	230,3	4,12
2	235,8	1,83
3	239,0	0,50
4	243,1	1,21
5	234,0	2,58
6	240,1	0,04
7	242,9	1,13
8	241,1	0,38
9	246,7	2,71
10	242,2	0,84
11	242,5	0,96
12	243,4	1,34
13	240,0	0,08
14	240,6	0,17
15	249,1	3,71
16	234,4	2,41
17	234,5	2,37
18	249,9	4,04
19	238,3	0,79
20	235,9	1,79
Mittelwert	240,19	1,65

Bei einer durchschnittlichen Masse des Kapselinhaltes von weniger als 300 mg dürfen nach dem Europäischen Arzneibuch höchstens zwei der 20 Einheiten die Einzelmasse um mehr als 10% von der Durchschnittsmasse abweichen. Jedoch darf keine Einheit um mehr als 20% abweichen. Keiner der ermittelten Kapselinhalte weichte von der durchschnittlichen Masse um mehr als 10% ab. Die Prüfung auf Gleichförmigkeit der Masse war somit erfüllt.

4 Schüttdichte-Bestimmung (DAC-Probe 21)

In Abhängigkeit der zugesetzten Eisen(III)-oxid-Menge wurden drei unterschiedliche Füllmittel hergestellt. Das reine Mannitol-SiO₂-Gemisch diente dem Vergleich. Die Tabelle 16 enthält die experimentell ermittelten Ergebnisse der Schüttdichten-Bestimmung nach DAC (Probe 21). Die Schüttdichte jedes Füllstoffes wurde dreimal bestimmt. Anschließend wurde der jeweilige Mittelwert gebildet.

Tabelle 16. Ergebnisse der Schüttdichte-Bestimmung (DAC-Probe 21) in Abhängigkeit der Eisenoxidmenge.

Probenart	Leerprobe ohne Fe ₂ O ₃	0,25 mg Fe ₂ O ₃ pro Kapsel	1,0 mg Fe ₂ O ₃ pro Kapsel
Probennummer	Schüttdichte [g/mL]		
1	0,4927	0,4242	0,4306
2	0,4952	0,4250	0,4233
3	0,4956	0,4102	0,4171
Mittelwert	0,4945	0,4198	0,4237

Die Schüttdichten der beiden Füllmittel, in denen rotes Eisenoxid eingearbeitet wurde, waren gegenüber der Dichte des reinen Mannitol-SiO₂-Gemisches deutlich erniedrigt. Dies wiederum hat zur Folge, dass die eisenoxidhaltigen Füllstoffe ein größeres Volumen in der Kapsel einnehmen und somit diese schwerer aufzufüllen sind. Bei den Schüttdichten der beiden eisenoxidhaltigen Füllstoffgemische ist allerdings keine eindeutige Tendenz zwischen der eingesetzten Menge Eisenoxid und der Schüttdichtenerniedrigung zu erkennen.

5 Wirkstoffverteilung in Abhängigkeit der Herstellungsmethode

Neben dem bereits angewendeten Herstellungsverfahren von Kapseln, der gravimetrischen Methode, gibt es noch drei weitere Methoden, die im DAC/NRF monographiert sind. Zwei in der Praxis etablierte Herstellungsverfahren basieren auf der Volumenergänzung. Hierzu zählen zum einen die „Volumenergänzungsmethode“ und zum anderen die „Messzylindermethode“, die sich je nach Wirkstoffanteil in eine Methode A und B gliedert. Bei der Volumenergänzungsmethode wird das Wirkstoff-Füllmittel-Gemisch, das nur aus einem Teil der gesamten Füllmittelmenge besteht, in die im Kapselfüllgerät fixierten Unterteile gleichmäßig verteilt, mit reinem Füllmittel

aufgefüllt, homogenisiert und schließlich endgültig in die Kapseln überführt. Bei der Messzylindermethode wird stattdessen zunächst reiner Füllstoff in die fixierten Kapselunterteile gefüllt, um anschließend mittels Messzylinder das Kalibriervolumen ablesen zu können. Die dritte Herstellungsmethode ist die Lösemethode, die besonders bei geringen Wirkstoffmengen angewendet wird, da Validierungsstudien gezeigt haben, dass sich mit dieser Methode eine gleichmäßigere Wirkstoffverteilung im Pulver erzielen lässt als bei der bisher üblichen Verreibung. Die Lösemethode ist an die Methode B der Messzylindermethode angelehnt. Bei den Herstellungsmethoden, die auf einer Volumenergänzung basieren, sind häufige Umfüllvorgänge und die damit einhergehenden Pulververluste unvermeidlich. Die gravimetrische Methode reduziert Verluste durch Senkung der Umfüllvorgänge, indem Wirkstoff und Füllmittel für die Ansatzmasse gewogen und in einer glatten Schale ohne Druck vermengt werden. Generell vermieden werden können Pulververluste jedoch nicht und daher sind Gehaltsminderungen bezüglich des Wirkstoffs zwangsläufig die Folge.

5.1 Prüfung auf Gleichförmigkeit des Hydrochlorothiazid-Gehalts

In dem folgenden Teil sollen die vier beschriebenen Herstellungsmethoden hinsichtlich ihrer Gleichförmigkeit des Gehalts gegenübergestellt werden, um eine Aussage über deren Eignung für pädiatrische Kapselrezepturen treffen zu können. Zur Beurteilung der Wirkstoffverteilung wird die Prüfung auf „Gleichförmigkeit des Gehalts“ nach der Vorschrift „2.9.40 Gleichförmigkeit einzeldosierter Arzneiformen“ des Europäischen Arzneibuches [Ph.Eur. 8. Ausgabe, Grundwerk 2014] durchgeführt. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des HCT-Gehaltes für die vier Herstellungsmethoden zusammengestellt (Tabelle 17 bis Tabelle 20).

Tabelle 17. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des HCT-Gehalts von Kapseln, die nach der Volumenergänzungsmethode hergestellt wurden.

Probennummer	Probengehalt [µg/mL]	HCT-Menge pro Kapsel [mg]	Prozentsatz des angestrebten Kapselgehalts [%]
1	106,54	1,065	106,54
2	108,02	1,080	108,02
3	106,59	1,066	106,59
4	106,85	1,068	106,85

5	105,43	1,054	105,43
6	105,24	1,052	105,24
7	108,14	1,081	108,14
8	103,70	1,037	103,70
9	105,09	1,051	105,09
10	107,48	1,075	107,48
Durchschnitt	106,31	1,063	106,31
Referenzwert M	-	-	101,50
Standardabweichung	-	-	1,43
Akzeptanzwert AV	-	-	8,23

Tabelle 18. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des HCT-Gehalts von Kapseln, die nach der Messzylindermethode hergestellt wurden.

Probennummer	Probengehalt [µg/mL]	HCT-Menge pro Kapsel [mg]	Prozentsatz des angestrebten Kapselgehalts [%]
1	102,21	1,022	102,21
2	103,68	1,037	103,68
3	105,95	1,059	105,95
4	104,98	1,050	104,98
5	102,60	1,026	102,60
6	104,51	1,045	104,51
7	104,81	1,042	104,81
8	103,01	1,030	103,01
9	102,24	1,022	102,24
10	101,47	1,015	101,47
Durchschnitt	103,48	1,035	103,48
Referenzwert M	-	-	101,5
Standardabweichung	-	-	1,42
Akzeptanzwert AV	-	-	5,39

Tabelle 19. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des HCT-Gehalts von Kapseln, die nach der Lösemethode hergestellt wurden.

Probennummer	Probengehalt [µg/mL]	HCT-Menge pro Kapsel [mg]	Prozentsatz des angestrebten Kapselgehalts [%]
1	101,00	1,010	101,00
2	103,34	1,033	103,34
3	102,98	1,030	102,98
4	102,39	1,024	102,39
5	102,42	1,024	102,42
6	104,18	1,042	104,18
7	102,17	1,022	102,17
8	100,38	1,004	100,38
9	103,99	1,040	103,99
10	104,31	1,043	104,31
Durchschnitt	102,72	1,027	102,72
Referenzwert M	-	-	101,5
Standardabweichung	-	-	1,32
Akzeptanzwert AV	-	-	4,38

Tabelle 20. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des HCT-Gehalts von Kapseln, die nach der gravimetrischen Methode hergestellt wurden.

Probennummer	Probengehalt [µg/mL]	HCT-Menge pro Kapsel [mg]	Prozentsatz des angestrebten Kapselgehalts [%]
1	106,20	1,062	106,20
2	105,99	1,060	105,99
3	105,71	1,057	105,71
4	108,40	1,084	108,40
5	105,66	1,057	105,66
6	102,30	1,023	102,30
7	106,13	1,061	106,13
8	103,47	1,035	103,47
9	102,52	1,025	102,52
10	104,91	1,049	104,91
Durchschnitt	105,13	1,051	105,13

Referenzwert M	-	-	101,5
Standardabweichung	-	-	1,88
Akzeptanzwert AV	-	-	8,14

Die Akzeptanzwerte aller Herstellungsmethoden liegen unter dem maximal zulässigen Akzeptanzwert von 15. Die Prüfung auf Gleichförmigkeit des Hydrochlorothiazid-Gehalts ist somit für alle Verfahren bestanden.

5.2 Vergleich der Wirkstoff-Homogenität gemäß der Herstellungsmethode

Laut dem DAC/NRF soll, wegen Pulververlusten bei der Herstellung, für Kapselrezepturen, bei denen der Einzelgehalt unter 25 mg liegt, ein Produktionszuschlag von 10% ($f_P = 1,10$) verwendet werden. Bei allen geprüften Herstellungsmethoden wurde ein Zuschlag von 10% auf die Wirkstoff-Einwaage verwendet. Der deklarierte Gehalt der Kapseln beträgt 1,0 mg bzw. 1,1 mg unter Berücksichtigung des Produktionszuschlags. Der Einzelgehalt, der in der Offizin hergestellten Kapseln, darf um maximal 10% vom deklarierten Gehalt abweichen. Dies bedeutet eine Gehaltsspanne von 0,9 - 1,1 mg. Alle der hier geprüften Kapseln weisen einen Gehalt innerhalb der Grenzen von 1,0 - 1,1 mg auf und entsprechen somit dem Kriterium. Des Weiteren haben alle vier Kapsel-Chargen die Prüfung auf Gleichförmigkeit des Gehalts bestanden. Mit einer Standardabweichung um 1,5% ist die Homogenität der Wirkstoffverteilung bei jeder Herstellungsmethode sehr gut gelungen, sodass sich jedes der geprüften Verfahren zur Herstellung einer pädiatrischen Kapselrezeptur eignet. Die Messergebnisse zeigen des Weiteren, dass ein Produktionszuschlag von 2,5% bzw. 5% auf die Wirkstoff-Einwaage ebenfalls ausgereicht hätte, damit die Anforderung an den Kapselgehalt erfüllt worden wäre.

5.3 Prüfung auf Gleichförmigkeit des Eisen(III)-oxid-Gehalts

Um eine Korrelation zwischen dem detektierten Wirkstoff und der Indikatorsubstanz herzustellen, wurde neben dem Arzneistoff Hydrochlorothiazid ebenfalls die Indikatorsubstanz Eisen(III)-oxid quantifiziert. Hierzu wurden dieselben Kapselproben, aus denen bereits das HCT extrahiert wurde, verwendet. Im folgenden Teil wird die

„Prüfung auf Gleichförmigkeit des Gehalts“ auf den Eisen(III)-oxid-Gehalt angewendet. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des Eisen(III)-oxid-Gehalts für die vier Herstellungsmethoden zusammengestellt (Tabelle 21 bis Tabelle 24).

Tabelle 21. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des Eisen(III)-oxid-Gehalts von Kapseln, die nach der Volumenergänzungsmethode hergestellt wurden.

Probennummer	Probengehalt [µg/mL]	Fe₂O₃-Menge pro Kapsel [mg]	Prozentsatz des angestrebten Kapselgehalts [%]
1	24,03	0,481	96,13
2	24,08	0,482	96,34
3	23,62	0,472	94,47
4	23,26	0,465	93,03
5	23,77	0,475	95,06
6	22,99	0,460	91,94
7	24,34	0,487	97,35
8	23,31	0,466	93,22
9	23,44	0,469	93,76
10	24,47	0,489	97,90
Durchschnitt	23,73	0,475	94,92
Referenzwert M	-	-	98,5
Standardabweichung	-	-	1,98
Akzeptanzwert AV	-	-	8,32

Tabelle 22. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des Eisen(III)-oxid-Gehalts von Kapseln, die nach der Messzylindermethode hergestellt wurden.

Probennummer	Probengehalt [µg/mL]	Fe₂O₃-Menge pro Kapsel [mg]	Prozentsatz des angestrebten Kapselgehalts [%]
1	22,36	0,447	89,46
2	22,34	0,447	89,37
3	22,91	0,458	91,65
4	22,96	0,459	91,84
5	22,70	0,454	90,81
6	22,49	0,450	89,97
7	22,36	0,447	89,44

8	22,28	0,446	89,10
9	22,50	0,450	89,99
10	21,77	0,435	87,08
Durchschnitt	22,47	0,449	89,87
Referenzwert M	-	-	98,5
Standardabweichung	-	-	1,37
Akzeptanzwert AV	-	-	11,92

Tabelle 23. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des Eisen(III)-oxid-Gehalts von Kapseln, die nach der Lösemethode hergestellt wurden.

Probennummer	Probengehalt [µg/mL]	Fe ₂ O ₃ -Menge pro Kapsel [mg]	Prozentsatz des angestrebten Kapselgehalts [%]
1	23,69	0,474	94,75
2	24,00	0,480	95,99
3	23,62	0,472	94,46
4	23,02	0,460	92,07
5	23,69	0,474	94,78
6	23,74	0,475	94,95
7	23,70	0,474	94,79
8	23,05	0,461	92,21
9	23,81	0,476	95,23
10	23,45	0,469	93,78
Durchschnitt	23,58	0,472	94,30
Referenzwert M	-	-	98,5
Standardabweichung	-	-	1,27
Akzeptanzwert AV	-	-	7,24

Tabelle 24. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des Eisen(III)-oxid-Gehalts von Kapseln, die nach der gravimetrische Methode hergestellt wurden.

Probennummer	Probengehalt [µg/mL]	Fe ₂ O ₃ -Menge pro Kapsel [mg]	Prozentsatz des angestrebten Kapselgehalts [%]
1	23,16	0,463	92,64
2	23,07	0,461	92,28
3	22,85	0,457	91,39

4	23,59	0,472	94,37
5	22,91	0,458	91,64
6	22,54	0,451	90,16
7	23,18	0,464	92,73
8	22,85	0,457	91,41
9	23,19	0,464	92,76
10	23,79	0,476	95,16
Durchschnitt	23,11	0,462	95,45
Referenzwert M	-	-	98,5
Standardabweichung	-	-	1,47
Akzeptanzwert AV			6,57

Die Akzeptanzwerte aller Herstellungsmethoden liegen unter dem maximal zulässigen Akzeptanzwert von 15. Die Prüfung auf Gleichförmigkeit des Eisen(III)-oxid-Gehalts ist somit für alle Verfahren bestanden.

5.4 Vergleich der Indikator-Homogenität gemäß der Herstellungsmethode

Wie bereits oben erwähnt, wurde wegen Pulververlusten bei der Kapselherstellung ein Rezepturzuschlag von 10% auf die Wirkstoff-Einwaage gewährt. Der Eisen(III)-oxid-Gehalt bezieht sich im Verhältnis 1:2 direkt auf den deklarierten Wirkstoffgehalt von 1,0 mg pro Kapsel und soll damit im direkten Zusammenhang zum angestrebten Einzelgehalt der Kapsel stehen. Die Abnahme des Indikatorgehalts soll somit direkt den Verlust an Wirkstoff durch die Herstellungsmethode widerspiegeln. Eine zulässige Abweichung des deklarierten Wirkstoffgehalts von 10% bedeutet eine Gehaltsspanne von 0,9 - 1,1 mg pro Kapsel. Der im Verhältnis 1:2 eingesetzte Eisen(III)-oxid-Indikator hat somit eine Gehaltsspanne von 0,45 - 0,55 mg pro Kapsel. Einzig die Messzylindermethode unterschreitet die mindestens geforderten 450 µg nur geringfügig mit einem durchschnittlichen Indikatorgehalt von 449 µg pro Kapsel. Alle Kapseln der restlichen Herstellungsmethoden besitzen einen Gehalt von mehr als 450 µg und liegen damit über 90% des angestrebten Indikatorgehalts. In diesem Zusammenhang sei allerdings angemerkt, dass für die Indikatorsubstanz im Gegensatz zu dem Wirkstoff kein 10%iger Produktionszuschlag eingesetzt wurde.

5.5 Korrelation der Indikator-Wirkstoff-Verteilung

Um einen Zusammenhang zwischen der Homogenität des Eisen(III)-oxids und der Wirkstoffverteilung herzustellen, wurden die Prozentsätze des angestrebten Kapselgehalts an Indikator- und Wirkstoffsubstanz verglichen. Hierzu wurden exemplarisch die Kapseln, die mittels „Gravimetrischer Methode“ hergestellt wurden, herangezogen; die weiteren Dosierverfahren lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die Werte für den Kapselgehalt an Hydrochlorothiazids bzw. Eisen(III)-oxids können Tabelle 20 und Tabelle 24 entnommen werden. Die Abbildung 7 zeigt eine Gegenüberstellung der Prozentsätze des angestrebten Kapselgehalts an Hydrochlorothiazid und Eisen(III)-oxid.

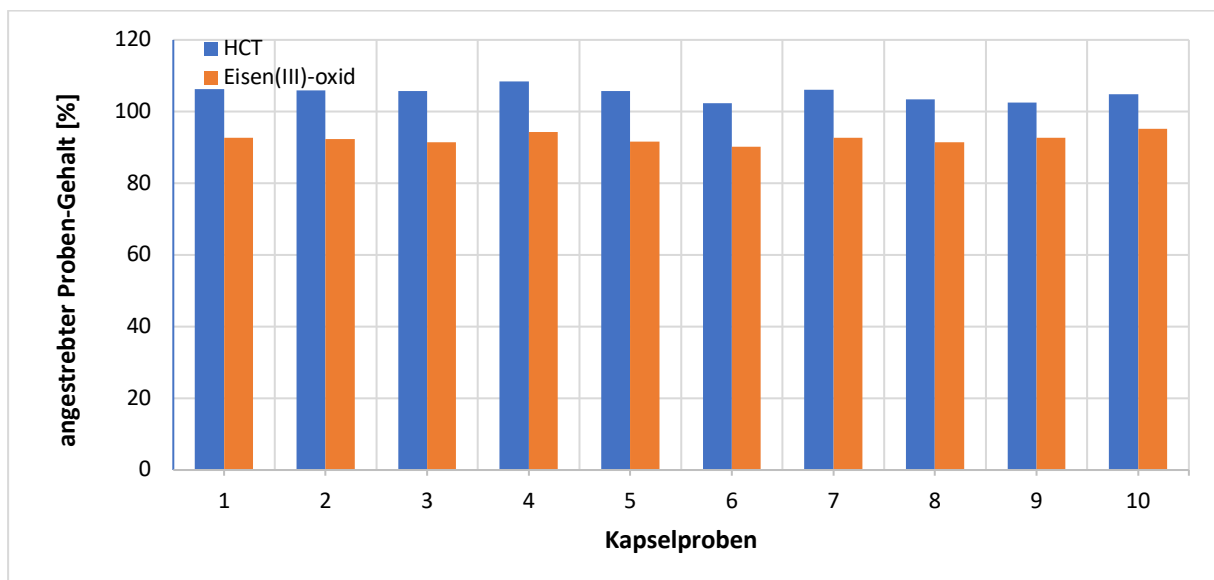


Abbildung 7. Das Diagramm vergleicht die Prozentsätze der angestrebten Proben-Gehälter des HCTs und des Eisen(III)-oxids aus den Kapselproben. Die Kapselproben sind nach der Nummer der Kapselproben aufgelistet.

Für die HCT-Einwaage wurde ein Produktionszuschlag von 10% auf den deklarierten Wirkstoffgehalt angewendet. Aus diesem Grund liegen die für das HCT ermittelten Werte über 100%. Für das Eisen(III)-oxid wurden pro Kapsel 0,5 mg Substanz ohne Produktionszuschlag eingesetzt. Durch den Verzicht auf den Zuschlag wurden hier Werte zwischen 90 und 95% erzielt. Sowohl Wirkstoff als auch Indikator liegen homogen verteilt vor. Für eine optisch homogen aussehende und durch das Eisen(III)-oxid leicht rötlich gefärbte Pulvermischung lässt sich analytisch sowohl eine homogene

Indikator- als auch Wirkstoffverteilung belegen. Entsprechend ist das Farbpigment bei der Verarbeitung in Pulvermischungen eine gute Indikatorsubstanz, um optisch die Mischungsgüte und somit die Gleichförmigkeit der Wirkstoffdosierung zu belegen.

6 HPLC-Analytik zur simultanen Quantifizierung von DAMC neben TAA

In einem zweiten Teil des Projekts sollten die Untersuchungen zur Verwendung von Indikatorsubstanzen auf halbfeste Arzneiformen übertragen werden. Hierbei kam mit dem Fluoreszenzindikator 7-Diethylamino-4-methylcoumarin (DAMC) neben dem Wirkstoff Triamcinolonacetonid (TAA) eine Substanz zum Einsatz, die bei Tageslicht nicht sichtbar ist und entsprechend keine visuelle Verfärbung der Zubereitung hervorruft, allerdings unter UV-Licht auf einfach Art und Weise zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Zur simultanen Quantifizierung des DAMCs und des TAAs wurde wiederum die HPLC-Analytik herangezogen.

In diesem Teil werden die Ergebnisse des Validierungsprozesses zur Quantifizierung des Triamcinolonacetonids und des 7-Diethylamino-4-methylcoumarins vorgestellt.

6.1 Festlegung der Parameter für die HPLC-Analytik

Für die quantitative Bestimmung der beiden Analyten wurden die Flächen der UV-Signale nach chromatographischer Trennung ausgewertet. Hierbei ist eine ausreichende zeitliche Trennung in der Elution der Substanzen von entscheidender Bedeutung. Die Abbildung 8 zeigt ein exemplarisches HPLC-Chromatogramm von DAMC und TAA mit einem Gehalt von jeweils 100 µg/mL.

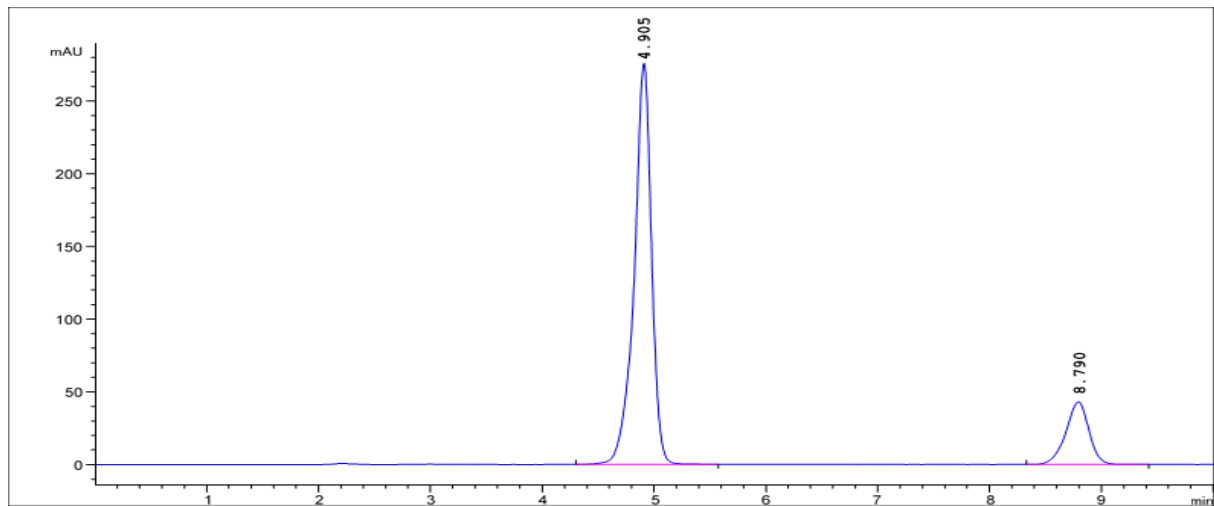


Abbildung 8. HPLC-Chromatogramm einer DAMC-TAA-Kalibrierprobe (100 µg/mL). Das DAMC eluiert nach etwa 5 min, gefolgt vom TAA, welches nach etwa 9 min detektiert wird. Die Messparameter sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

In Abbildung 8 sind zwei klar voneinander getrennte Peaks zu erkennen. Das Ziel einer guten Trennung der Analyten ist somit erfüllt. Unter den gewählten Bedingungen konnten weitgehend symmetrische Peaks erhalten werden. Die Substanzen liefen in einem engen Elutionsfenster und die gewählte Wellenlänge ermöglichte eine ausreichend sensitive Detektion der Komponenten. Das wesentlich lipophilere Triamcinolonacetonid konnte wie zu erwarten durch seine Steroid-Struktur deutlich später detektiert werden. Im direkten Vergleich zu DACM führt die gleiche Menge TAA zu einer geringeren Absorption.

Die Abbildung 9 zeigt ein HPLC-Chromatogramm einer DAMC-TAA-Cremeprobe (100 µg/mL) nach Abtrennung der Cremegrundlage.

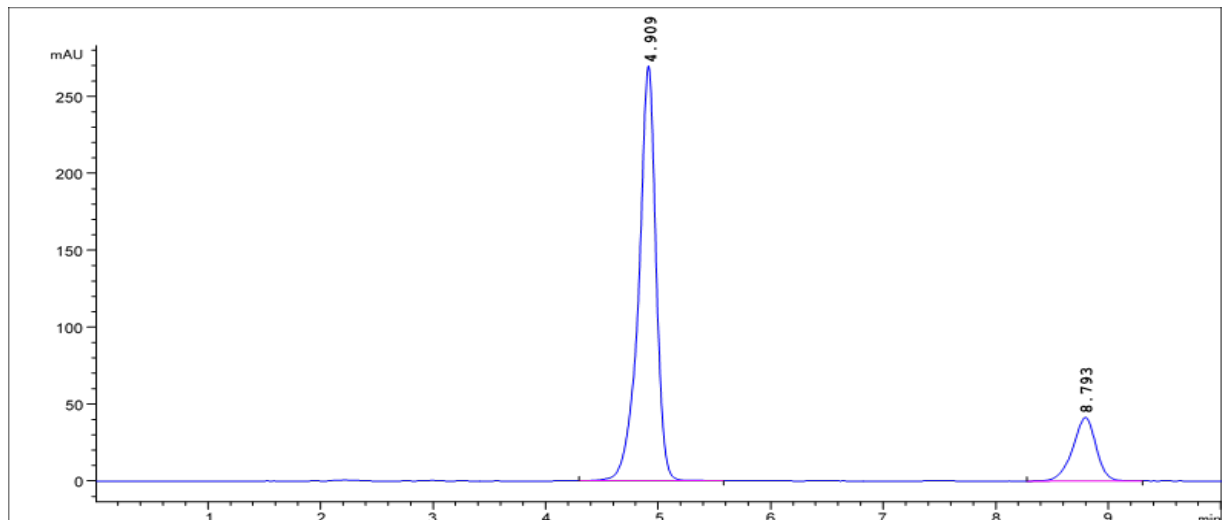


Abbildung 9. HPLC-Chromatogramm einer DAMC-TAA-Cremeprobe (100 µg/mL) nach Extraktion der beiden Analyten aus der Cremegrundlage. Die Messparameter sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Es ist gut ersichtlich, dass die Analyten auch nach der Extraktion aus der Cremegrundlage getrennt voneinander eluieren. Außerdem sind die Flächen der UV-Signale vergleichbar mit den Signalen der reinen Kalibrierlösung, die den gleichen Soll-Gehalt von 100 µg/mL aufweisen. Des Weiteren bleiben die Retentionszeiten auch nach Extraktion aus der Grundlage unverändert. Es treten keine weiteren Signale auf, die Komponenten der Grundlage zuzuordnen wären. Dies spricht für eine sehr gute Abtrennung der weiteren Cremebestandteile durch das angewendete Extraktionsverfahren.

6.2 Linearität der TAA- und DAMC-Analytik

Zur Testung auf Linearität der Analysenmethode wurde ein Konzentrationsbereich von 5 bis 125 µg/mL festgelegt. Vermessen wurden die Proben mittels eines Photodiodenarray-Detektors (DAD) bei einer Wellenlänge von 254 nm. Die Ergebnisse der Kalibrierung sind in Abbildung 10 dargestellt.

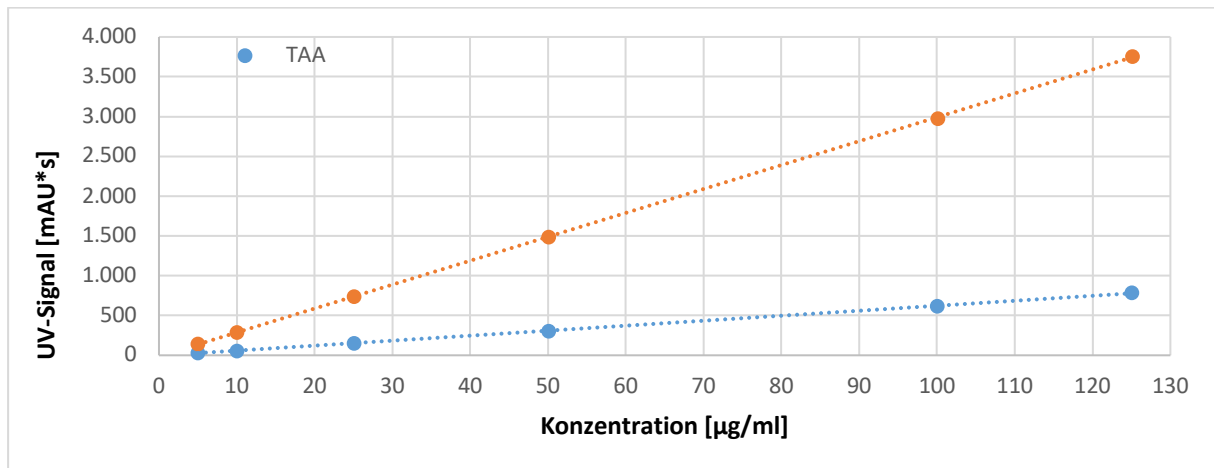


Abbildung 10. TAA- (blau) und DAMC-Kalibriergerade (orange), erstellt aus sechs DAMC-TAA-Kalibrierlösungen im Konzentrationsbereich von 5 – 125 µg/mL, detektiert bei 254 nm. Jedes Konzentrationsniveau beinhaltet zu gleichen Teilen 7-Diethylamino-4-methylcoumarin und Triamcinolonacetamid.

Die Tabelle 25 listet die Parameter für die lineare Regression der DAMC-Kalibrierung auf.

Tabelle 25. Parameter der linearen Regression für die Quantifizierung von DAMC mittels HPLC. Die Messung wurde nach den HPLC-Einstellungen, die in Tabelle 8 aufgeführt sind, durchgeführt.

Parameter	UV-Detektion
Steigung m	30,04 mL/µg
Achsenabschnitt b	-13,313
Korrelationskoeffizient r	0,9999
Anzahl an Kalibrierproben	6

Die Tabelle 26 listet die Parameter für die lineare Regression der TAA-Kalibrierung auf.

Tabelle 26. Parameter der linearen Regression für die Quantifizierung von TAA mittels HPLC. Die Messung wurde nach den HPLC-Einstellungen, die in Tabelle 8 aufgeführt sind, durchgeführt.

Parameter	UV-Detektion
Steigung m	6,2615 ml/µg
Achsenabschnitt b	-3,6303
Korrelationskoeffizient r	0,9999
Anzahl an Kalibrierproben	6

Beide Kalibrierungen weisen mit einem Wert von 0,9999 einen hohen Korrelationskoeffizienten auf. Die Linearität der DAMC-TAA-Kalibrierproben ist damit bestätigt. Der Bereich 5 – 125 µg/mL ist damit für eine Quantifizierung der beiden Analyten geeignet.

6.3 Präzision und Richtigkeit der DAMC-TAA-Wiederfindungsproben

Die Gehalte der DAMC-TAA-Wiederfindungsproben wurden unter Verwendung der oben aufgeführten Kalibrierung für DAMC und TAA ausgewertet. Zur Prüfung des Extraktionsverfahrens als Teil des Validierungsprozesses wurden die Analyten zunächst in die Grundlage eingebettet und anschließend aus dieser extrahiert. Die Tabelle 27 listet die Wiederfindungswerte des DAMCs für die drei ausgewählten Konzentrationsniveaus auf.

Tabelle 27. Wiederfindung des DAMCs bei Quantifizierung mittels HPLC (n=3). Die Messung wurde nach den HPLC-Einstellungen der Tabelle 8 durchgeführt.

Parameter	Konzentrationen [µg/mL]		
	15,0	65,0	115,0
Wiederfindung [%]	101,07	97,18	98,20
Standardabweichung [%]	0,70	0,45	0,21
Vertrauensbereich (p=0,95)			
Obere Grenze [%]	102,79	98,33	98,73
Untere Grenze [%]	99,36	96,03	97,67
Maximum [%]	101,67	97,56	98,42
Minimum [%]	100,31	96,68	98,01
Probenzahl	3	3	3

Die Wiederfindungswerte des DAMCs befinden sich auf allen drei Konzentrationsniveaus nahe 100% und die Standardabweichungen liegen unter 1%. Sowohl Präzision als auch Richtigkeit der Methode sind damit gegeben. Das Verfahren besitzt somit die Eignung zur Quantifizierung von DAMC.

Die Tabelle 28 listet die Wiederfindungswerte des TAAs für die drei ausgewählten Konzentrationsniveaus auf.

Tabelle 28. Wiederfindung des TAAs bei Quantifizierung mittels HPLC (n=3). Die Messung wurde nach den HPLC-Einstellungen der Tabelle 8 durchgeführt.

Parameter	Konzentrationen [$\mu\text{g/mL}$]		
	15,0	65,0	115,0
Wiederfindung [%]	100,45	98,29	97,06
Standardabweichung [%]	0,24	0,43	0,24
Vertrauensbereich ($p=0,95$)			
Obere Grenze [%]	101,98	99,38	97,69
Untere Grenze [%]	98,92	97,19	96,44
Maximum [%]	101,16	98,79	97,26
Minimum [%]	100,00	98,03	96,79
Probenzahl	3	3	3

Die prozentuale Wiederfindung des TAAs ist bei der niedrigsten Konzentration mit 100,45% am größten und nimmt dann bis zur höchsten Konzentration auf 97,06% ab. Die Wiederfindungswerte sind trotzdem alle in einem akzeptablen Bereich. Die niedrige Standardabweichung von unter 0,5% spricht für eine gute Reproduzierbarkeit der detektierten Konzentrationen. Das Triamcinolonacetonid erzielt somit ebenfalls gute Werte für die Präzision und Richtigkeit der HPLC-Methode. Das analytische Verfahren ist somit für die Quantifizierung des Triamcinolonacetonids geeignet.

7 Wirkstoffverteilung in der Creme in Abhängigkeit der Herstellungsmethode

Der überwiegende Teil der Rezepturarztneimittel, die in der Apotheke angefertigt werden, sind halbfeste Darreichungsformen wie Salben, Cremes und Lotionen. Im heutigen Apothekenalltag sind an die Stelle des händischen Rührens einer halbfesten Zubereitung der Umgang mit halb- bzw. vollautomatischen Rührsystemen wie das Topitec[®]- oder das Unguator[®]-Rührsystem getreten. Dennoch garantieren auch diese Systeme keine optimale Wirkstoffverteilung und gesicherte Produktqualität. Gemäß Apothekenbetriebsordnung §7 Abs. 1c ist es die Aufgabe des Apothekers, die Qualität des Rezepturarztneimittels abschließend zu bewerten und eine Freigabe-Entscheidung zu treffen.

Im Rahmen des Projekts wurde die „Hydrophile Triamcinolonacetonid-Creme 0,1% (NRF 11.38)“ als Modellrezeptur ausgewählt. In der NRF-Monographie wird als Inprozesskontrolle vorgeschlagen: „Die Creme muss weiß aussehen, gleichmäßig beschaffen und von weicher Konsistenz sein“. Eine Beurteilung der Wirkstoff-Homogenität nach Herstellung lässt sich anhand dieser Parameter kaum treffen, da sowohl Creme als auch Wirkstoff weiß gefärbt sind und sich Pulveragglomerate erst dann zeigen, wenn diese von ausreichender Größe sind. Je größer das Verhältnis zwischen dem Wirkstoff und der eingesetzten Grundlage ist und entsprechend je geringer der Wirkstoff dosiert ist, desto größer ist die Gefahr, dass es zu Gehaltsschwankungen innerhalb der Zubereitung kommt. In diesem Fall würde eine falsche Ausführung der Herstellungsanweisung oder auch kleinste Wirkstoffagglomerate zu einer deutlichen Inhomogenität der Zubereitung führen. Als Beispiel sind hier vor allem kortikosteroidhaltige Zubereitungen zur dermalen Anwendung zu nennen, da Glucocorticoide nur in sehr geringer Mengen der Grundlage zugesetzt werden. Als Cremerezeptur wurde daher die „Hydrophile Triamcinolonacetonid-Creme 0,1% (NRF 11.38)“ als Glucocorticoid-haltige Zubereitung ausgewählt, da diese zum einen eine gängige Zubereitung in der Apotheke darstellt und zum anderen eine NRF-Rezeptur mit festgelegten Herstellungsparametern ist. Des Weiteren beschreibt das NRF in der Monographie 11.38 neben der konventionellen Herstellung per Hand ebenfalls die Herstellung mittels halb- bzw. vollautomatischer Rührsysteme.

7.1 Prüfung auf Gleichförmigkeit des Triamcinolonacetonid-Gehalts

In diesem Teil des Projekts sollten die drei oben genannten Herstellungsmethoden hinsichtlich ihrer Wirkstoffverteilung beurteilt werden. Der Fluoreszenzstoff DAMC wurde in gleicher Menge wie der Wirkstoff zugeben und sollte an seiner Stelle eine optische Kontrolle der Wirkstoffverteilung ermöglichen. Die Extraktion der Analyten aus der Grundlage sowie deren Quantifizierung mittels HPLC wurde nach dem im Methodenteil validierten Verfahren durchgeführt. Die Prüfung auf Gleichförmigkeit der Wirkstoffverteilung erfolgt nach eigenen Prüfkriterien. Die Ergebnisse der Wirkstoffverteilung für die drei zu prüfenden Rührmethoden sind in den nachfolgenden Tabellen getrennt nach der Herstellungscharge und dem Ort der Probenziehung zusammengestellt (

Tabelle 29 bis Tabelle 31).

Tabelle 29. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des TAA-Gehalts der DAMC-TAA-Cremes, die mittels der manuellen Rührmethode hergestellt wurden.

Creme-charge	Ort Proben-zug	Probengehalt [µg/mL]	TAA-Menge pro Cremeprobe [mg]	Prozentsatz des angestrebten Cremeproben-Gehalts [%]
1	oben	97,05	0,485	97,05
1	mittig	98,01	0,490	98,01
1	unten	97,70	0,488	97,70
2	oben	93,37	0,467	93,37
2	mittig	98,11	0,491	98,11
2	unten	94,49	0,472	94,49
3	oben	98,03	0,490	98,03
3	mittig	96,56	0,483	96,56
3	unten	97,86	0,489	97,86
\bar{x}	-	96,80	0,484	96,80
s	-	-	-	1,73

Für jede Cremeprobe zu 500 mg wurde ein Triamcinolonacetonid-Gehalt von 0,5 mg angenommen. Im Durchschnitt wurden 0,484 mg bzw. 96,80% des eingesetzten Kortikoids wiedergefunden. Dies liegt im Rahmen der festgelegten Abweichungen von 10% um den deklarierten Gehalt. Die relative Standardabweichung ist mit 1,73% als akzeptabel zu bewerten.

Tabelle 30. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des TAA-Gehalts der DAMC-TAA-Cremes, die mittels des Topitec®-Rührsystem hergestellt wurden.

Creme-charge	Ort Proben-zug	Probengehalt [µg/mL]	TAA-Menge pro Cremeprobe [mg]	Prozentsatz des angestrebten Cremeproben-Gehalts [%]
1	oben	97,52	0,488	97,52
1	mittig	98,31	0,492	98,31
1	unten	98,90	0,495	98,90
2	oben	99,48	0,497	99,48
2	mittig	99,45	0,497	99,45
2	unten	100,56	0,503	100,56

3	oben	99,12	0,496	99,12
3	mittig	99,54	0,498	99,54
3	unten	99,42	0,497	99,42
\bar{x}	-	99,15	0,496	99,15
s	-	-	-	0,85

Die Cremeproben, die mittels des Topitec®-Rührsystems hergestellt wurden, zeigten eine durchschnittliche Wiederfindung von 99,15%. Dieser Wiederfindungswert spricht für eine sehr gute Extraktion des Wirkstoffes und für einen geringen Wirkstoffverlust während der Herstellung. Die Standardabweichung lag bei 0,85%. Das verwendete Rührsystem verteilte den Wirkstoff somit gleichmäßig in der Grundlage.

Tabelle 31. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des TAA-Gehalts der DAMC-TAA-Cremes, die mittels des Unguator®-Rührsystems hergestellt wurden.

Creme-charge	Ort Proben-zug	Probengehalt [µg/mL]	TAA-Menge pro Cremeprobe [mg]	Prozentsatz des angestrebten Cremeproben-Gehalts [%]
1	oben	96,55	0,483	96,55
1	mittig	99,56	0,498	99,56
1	unten	98,53	0,493	98,53
2	oben	98,18	0,491	98,18
2	mittig	98,27	0,491	98,27
2	unten	100,38	0,502	100,38
3	oben	98,87	0,494	98,87
3	mittig	97,48	0,487	97,48
3	unten	98,09	0,490	98,09
\bar{x}	-	98,43	0,492	98,43
s	-	-	-	1,11

Die mit dem Unguator®-Rührsystem hergestellten Cremeproben wiesen eine durchschnittliche Wirkstoffwiederfindung von 98,43% auf. Dieser Wiederfindungswert ist damit im Gesamtkontext als gut zu bewerten. Die kleine Standardabweichung von 1,11% steht für eine gute Wirkstoffverteilung in der Cremegrundlage.

7.2 Vergleich der Wirkstoffverteilung in Abhängigkeit der Herstellungsmethode

Im Folgendem sollten die oben aufgeführten Ergebnisse der Cremezubereitungen bezüglich der Qualität ihrer Wirkstoffverteilung und -wiederfindung verglichen werden, um eine Aussage über die Güte der Rührmethoden für den Apothekenalltag zu treffen. Vergleicht man die manuelle Rührmethode, mittels Pistill und Fantaschale, mit den beiden maschinellen Methoden, so fallen geringe Unterschiede in der Wirkstoffverteilung und -wiederfindung auf. Die durchschnittliche Wiederfindung des TAAs der beiden automatisierten Verfahren beträgt für das Unguator®-Rührsystem 98,27% bzw. für das Topitec®-Rührsystem sogar 99,15%. Diese Werte sind als gut bis sehr gut anzusehen und zeigen keinen signifikanten Unterschied (ANOVA). Die Wiederfindung des manuellen Herstellungsverfahrens ist signifikant niedriger (ANOVA) und beträgt lediglich 96,80%. Sie weist somit zwar den niedrigsten Wert auf, liegt allerdings hinsichtlich einer zulässigen Gehaltsschwankung von 10% in einem guten Bereich. Der geringere Wiederfindungswert lässt sich möglicherweise damit erklären, dass die fertiggerührte Cremezubereitung nicht, wie bei den maschinellen Methoden, im Abgabefäß homogenisiert wird, sondern dass diese aus der Fantaschale noch in die Kruke überführt werden muss. Bei der Verarbeitung bieten sowohl Fantaschale, Pistill als auch Kartenblätter eine deutlich größere Adsorptionsfläche für den eingearbeiteten Wirkstoff und könnten somit eine mögliche Ursache für den detektierten Wirkstoffverlust sein. Zum Vergleich der Wirkstoffverteilung sollen nun die prozentualen Standardabweichungen der drei Herstellungsmethoden gegenübergestellt werden. Das Topitec®-Rührsystem liefert mit einer Standardabweichung von 0,85% die homogenste Wirkstoffverteilung. Darauf folgt das Unguator®-Rührsystem mit einer minimal höheren Standardabweichung von 1,11%. Zuletzt folgt die händische Rührmethode mit der höchsten Standardabweichung von 1,73%. Stellt man die Rührsysteme gegenüber, so führt das Anreibeprogramm des Unguator®-Rührsystems zu keiner besseren Wirkstoffverteilung als das Topitec®-Rührsystem. Unter den gewählten Bedingungen sind beide Rührsysteme hinsichtlich der Wirkstoffverteilung der händischen Methode überlegen. Alle Rührmethoden entsprechen jedoch den Anforderungen an die Wirkstoffverteilung und die resultierenden Zubereitungen sind für die Abgabe eines Patienten geeignet.

7.3 Prüfung auf Gleichförmigkeit des Fluoreszenzindikator-Gehalts

Im vorangegangenen Teil sind drei Herstellungsmethoden bezüglich ihrer Wirkstoffverteilung ausgewertet worden. Nachfolgend wurde der Gehalt des Fluoreszenzindikators ausgewertet, der in gleichen Massenanteilen wie der Wirkstoff in die Grundlage eingearbeitet wurde. Das Ziel war es, durch eine ähnliche Wiederfindung und Verteilung des Fluoreszenzindikators, einen Zusammenhang zwischen homogener Fluoreszenz der gerührten Grundlage und der homogenen Wirkstoffverteilung zu belegen. Die Extraktion der Analyten aus der Grundlage, sowie deren Quantifizierung mittels HPLC wurde nach dem im Methodenteil validierten Verfahren durchgeführt. Das DAMC und TAA wurden aus der gleichen Probe und im gleichen HPLC-Lauf simultan quantifiziert. Die Prüfung auf Gleichförmigkeit der Indikatorverteilung erfolgt nach eigenen Prüfkriterien. Die Ergebnisse der Indikatorverteilung für die drei zu prüfenden Rührmethode sind in den nachfolgenden Tabellen nach der Herstellungscharge und dem Ort des Probenzugs zusammengestellt (Tabelle 32 bis Tabelle 34).

Tabelle 32. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des DACM-Gehalts der DAMC-TAA-Cremes, die mittels der manuellen Rührmethode hergestellt wurden.

Creme-charge	Ort Probenzug	Probengehalt [µg/mL]	TAA-Menge pro Cremeprobe [mg]	Prozentsatz des angestrebten Cremeproben-Gehalts [%]
1	oben	97,12	0,486	97,12
1	mittig	97,76	0,489	97,76
1	unten	97,36	0,487	97,36
2	oben	93,53	0,468	93,53
2	mittig	98,21	0,491	98,21
2	unten	94,56	0,473	94,56
3	oben	98,11	0,491	98,11
3	mittig	96,48	0,482	96,48
3	unten	97,67	0,488	97,67
\bar{x}	-	96,75	0,484	96,75
s	-	-	-	1,64

Als Soll-Gehalt jeder Cremeprobe von 500 mg wurde ein Indikator-Gehalt von 0,5 mg festgelegt. Der Fluoreszenzindikator 7-Diethylamino-4-methylcoumarin wurde im

Durchschnitt zu 96,75% wiedergefunden. Dies entspricht einer Masse von 0,484 mg. Mit einer Abweichung von 3,25% vom deklarierten Gehalt liegt die Verteilung, wenn man Sie nach den gleichen Ansprüchen wie an den Wirkstoff beurteilt, in einem akzeptablen Rahmen. Die relative Standardabweichung kann mit 1,64% als annehmbar bewertet werden.

Tabelle 33. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des DAMC-Gehalts der DAMC-TAA-Cremes, die mittels des Topitec®-Rührsystems hergestellt wurden.

Creme-charge	Ort Probenzug	Probengehalt [µg/mL]	TAA-Menge pro Cremeprobe [mg]	Prozentsatz des angestrebten Cremeprobengehalts [%]
1	oben	97,30	0,487	97,30
1	mittig	97,58	0,488	97,58
1	unten	98,46	0,492	98,46
2	oben	98,65	0,493	98,65
2	mittig	98,43	0,492	98,43
2	unten	99,04	0,495	99,04
3	oben	97,89	0,489	97,89
3	mittig	98,10	0,490	98,10
3	unten	98,16	0,491	98,16
\bar{x}	-	98,18	0,491	98,18
s	-	-	-	0,54

Die durchschnittliche Wiederfindung der Cremeproben, die mittels des Topitec®-Rührsystems hergestellt wurden, betrug 98,18%. Dies ist ein Hinweis auf ein funktionierendes Extraktionsverfahren sowie auf geringe Substanzverluste während der Herstellung. Mit einer Standardabweichung von 0,54% war der Indikator sehr gleichmäßig in der Grundlage verteilt.

Tabelle 34. Ergebnisse der Prüfung auf Gleichförmigkeit des DAMC-Gehalts der DAMC-TAA-Cremes, die mittels des Unguator®-Rührsystems hergestellt wurden.

Creme-charge	Ort Probenzug	Probengehalt [µg/mL]	TAA-Menge pro Cremeprobe [mg]	Prozentsatz des angestrebten Cremeprobengehalts [%]
1	oben	96,88	0,484	96,88
1	mittig	99,21	0,496	99,21
1	unten	98,28	0,491	98,28

2	oben	98,86	0,494	98,86
2	mittig	98,50	0,492	98,50
2	unten	99,93	0,500	99,93
3	oben	98,90	0,494	98,90
3	mittig	97,69	0,488	97,69
3	unten	98,13	0,491	98,13
\bar{x}	-	98,49	0,492	98,49
s	-	-	-	0,89

Die mit dem Unguator®-Rührsystem hergestellten Cremeproben zeigten durchschnittlich 98,49% des deklarierten Gehalts an Indikatorsubstanz. Dies bedeutet eine sehr gute Extraktion aus der Cremegrundlage. Die Standardabweichung des Indikator-Gehalts lag mit 0,89% recht niedrig, was für eine sehr gleichmäßige Substanzverteilung spricht.

7.4 Vergleich der Indikatorverteilung in Abhängigkeit der Herstellungsmethode

Im vorangegangenen Teil wurden bereits die Wirkstoffverteilungen der Cremeproben in Abhängigkeit der Herstellungsmethode geprüft. Nach dem gleichen Prinzip wurden die Verteilungen des Fluoreszenzindikators hinsichtlich der Herstellungsmethode verglichen. Das Unguator®-Rührsystem erreichte durchschnittlich 98,49% der deklarierten Indikatormenge; das Topitec®-Rührsystem erzielte mit einem unwesentlich niedrigeren Wert von durchschnittlich 98,18% die angestrebte Indikatormenge. Das Homogenisieren der Cremezubereitung mit der Hand führte wie bereits beim Wirkstoff zum niedrigsten Wert von 96,75% des Soll-Gehalts an 7-Diethylamino-4-methylcoumarin. Dieser im Vergleich zu den Rührsystemen signifikant erniedrigte Gehalt an Indikatorsubstanz kann zumindest teilweise, wie bereits im Zusammenhang mit dem Wirkstoffverlust genannt, mit den größeren Adsorptionsflächen der Fantaschale sowie mit dem Überführungsschritt in das Abgabegefäß begründet werden. Die Indikatorverteilung wird durch die Standardabweichung der geprüften Cremeproben ausgedrückt. Das Topitec®-Verfahren verteilte das DAMC am homogensten, da es mit 0,54% die geringste Standardabweichung aufweist. Die Cremeproben, die mit Hilfe des Unguator®-

Rührsystems hergestellt wurden, zeigten eine Standardabweichung von 0,89%. Das manuelle Rührverfahren verteilte den Fluoreszenzindikator mit der größten Standardabweichung von 1,64% am inhomogensten, wobei dies im Gesamtkontext immer noch eine gute bis sehr gute Substanz-Verteilung darstellt.

7.5 Korrelation der Indikator-Wirkstoff-Verteilung

Die zu bewertenden Cremeprouben wurden mit Hilfe des manuellen Verfahrens hergestellt; vergleichbare Ergebnisse wurden auch unter Verwendung der Rührsysteme erzielt. Die Abbildung 11 stellt die Prozentsätze des angestrebten Cremeprouben-Gehalts für Triamcinolonacetonid (

Tabelle 29) und 7-Diethylamino-4-methylcoumarin (Tabelle 32) gegenüber.

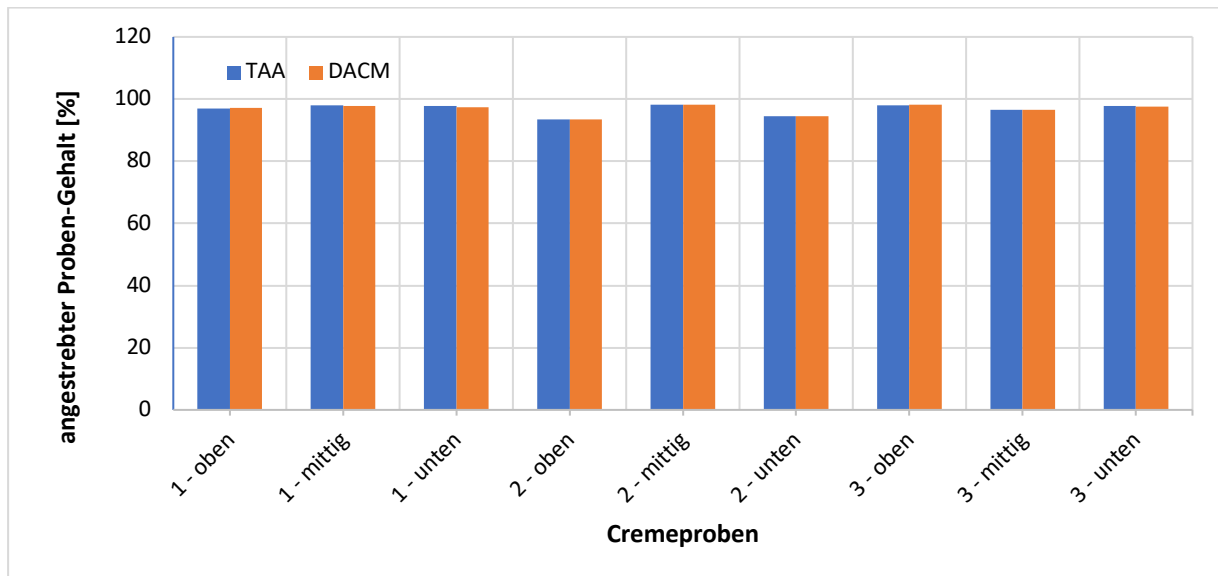


Abbildung 11. Das Diagramm stellt die Proben-Gehälter an TAA und DACMs aus der manuellen Rührmethode gegenüber. Die Cremeprouben sind nach Herstellungscharge und Ort des Probenzugs gekennzeichnet.

Es ist eine sehr gute Korrelation zwischen dem Wirkstoffgehalt in dem jeweiligen Aliquot der Cremeproube und dem Gehalt an Indikatorsubstanz DACM zu erkennen. Somit repräsentiert die Verteilung des Indikators hinreichend gut die Wirkstoffverteilung.

8 Wirkstoff- und Indikatorverteilung im Rührverlauf

Um einen genaueren Blick auf die Verteilungsvorgänge für Wirk- und Indikatortsubstanz während des manuellen Rührprozesses zu erhalten, wurden innerhalb des Rührverlaufes Cremeproben zur Quantifizierung des TAA- und DAMC-Gehalts gezogen. Gleichzeitig wurden nach festgelegten Rühreinheiten Bilder von der Cremegrundlage unter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm aufgenommen, um den Indikator zu visualisieren. Die Quantifizierung des TAAs und des DAMCs wurde nach dem im Methodenteil beschriebenen HPLC-Verfahren durchgeführt.

8.1 Wirkstoffverteilung im Rührverlauf

In der Tabelle 35 sind die Ergebnisse der Wirkstoffverteilung für die manuelle Rührmethode nach der Anzahl der Rühreinheiten und dem Ort des Probenzugs zusammengestellt. Der Begriff „Rand“ bedeutet dabei am Rand der Fantaschale, „Seitlich“ bedeutet in der Mitte zwischen Rand und Zentrum der Schale und „Zentrum“ bedeutet zentral in der Schale.

Tabelle 35. Ergebnisse des TAA-Gehalts der DAMC-TAA-Creme, die nach der manuellen Rührmethode hergestellt wurde. Der aufgeführte Mittelwert sowie die Standardabweichung beziehen sich ausschließlich auf die drei Cremeproben, die nach 180 Rühreinheiten gezogen wurden.

Anzahl der Rühr-einheiten	Ort Proben-zug	Probengehalt [µg/mL]	TAA-Menge pro Cremeprobe [mg]	Prozentsatz des angestrebten Cremeproben-Gehalts [%]
3	Rand	19,42	0,097	19,42
3	Seitlich	73,21	0,366	73,21
3	Zentrum	192,92	0,965	192,92
6	Rand	57,26	0,286	57,26
6	Seitlich	83,56	0,418	83,56
6	Zentrum	140,08	0,700	140,08
180	Rand	101,93	0,510	101,93
180	Seitlich	99,50	0,497	99,50
180	Zentrum	99,55	0,498	99,55
\bar{x}	-	100,41	0,502	100,33
s	-	-	-	1,39

Die Wirkstoffverteilung in den Cremeproben ist nach drei Rühreinheiten mittels Pistills, wie zu erwarten war, noch sehr inhomogen. Hierbei wird am Cremerand der niedrigste Wert mit 19,42% des angestrebten Wirkstoffgehalts gemessen. Der Triamcinolonacetonid-Gehalt steigt stark mit Annäherung an den Mittelpunkt der Fantaschale. So befindet sich im Zentrum der Schale mit 192,92% des deklarierten Gehalts zehn Mal so viel Wirkstoff wie am Rand der Creme bzw. doppelt so viel in Bezug auf die angestrebte Wirkstoffmenge. Nach drei weiteren Rühreinheiten bleibt diese Verteilungstendenz weiterhin bestehen, auch wenn sich das Konzentrationsgefälle mit 57,26% am Rand zu 140,08% am Zentrum der Creme stark verringert. Nach insgesamt 180 Rühreinheiten ist eine Cremezubereitung mit homogener Wirkstoffverteilung entstanden. Hierbei wurde von den Cremeproben, die nach 180 Rühreinheiten gezogen wurden, ein durchschnittlicher prozentualer Wirkstoff-Gehalt von 100,33% bei einer Standardabweichung von 1,39% ermittelt. Diese Werte belegen eine gute Wirkstoffextraktion sowie eine gute Wirkstoffhomogenität der Cremezubereitung.

Der Gehalt der homogenisierten Cremeproben ist nicht mit dem Gehalt der Cremeproben aus den zuvor vorgestellten Rührmethoden zu vergleichen. Durch den Probenzug nach drei und sechs Rühreinheiten wurde der Creme jeweils ein Anteil des Wirkstoffs entzogen. Für die über 180 Rühreinheiten homogenisierten Cremeproben ergibt sich daraus ein erhöhter oder reduzierter Wirkstoff-Gehalt, je nachdem ob bei den Probenzügen nach drei und sechs Rühreinheiten bevorzugt Cremegrundlage mit geringem oder hohem Wirkstoffanteil entnommen wurde.

8.2 Indikatorverteilung im Rührverlauf

In der Tabelle 36 sind die Ergebnisse der Indikatorverteilung für die manuelle Rührmethode nach der Anzahl der Rühreinheiten und dem Ort des Probenzugs aufgeführt. Der Begriff „Rand“ bedeutet dabei am Rand der Fantaschale, „Seitlich“ bedeutet in der Mitte zwischen Rand und Zentrum der Schale und „Zentrum“ bedeutet zentral in der Schale.

Tabelle 36. Ergebnisse des DAMC-Gehalts der DAMC-TAA-Creme, die nach der manuellen Rührmethode hergestellt wurde. Der aufgeführte Mittelwert sowie die Standardabweichung beziehen sich ausschließlich auf die drei Cremeproben, die nach 180 Rühreinheiten gezogen wurden.

Anzahl der Rühr-einheiten	Ort Proben-zug	Probengehalt [$\mu\text{g/mL}$]	TAA-Menge pro Cremeprobe [mg]	Prozentsatz des angestrebten Cremeproben-Gehalts [%]
3	Rand	19,11	0,096	19,11
3	Seitlich	74,19	0,371	74,19
3	Zentrum	190,31	0,952	190,31
6	Rand	57,59	0,288	57,59
6	Seitlich	84,23	0,421	84,23
6	Zentrum	139,62	0,698	139,62
180	Rand	102,05	0,510	102,05
180	Seitlich	99,51	0,498	99,51
180	Zentrum	99,66	0,498	99,66
\bar{x}	-	100,33	0,502	100,41
s	-	-	-	1,43

Die Verteilung des Fluoreszenzindikators im Verlauf des Rührprozesses ist vergleichbar mit der Wirkstoffverteilung. Zu Rührbeginn befindet sich der Großteil der Indikatorsubstanz noch in der Mitte der Schale. Am Cremerand hingegen wird nur ein Bruchteil des angestrebten Cremeproben-Gehalts gemessen. Mit steigender Anzahl der Rühreinheiten sinkt die Differenz zwischen den Probengehältern, die in der Schalenmitte bzw. am Cremerand gezogen wurden. Der Mittelwert des angestrebten Cremeproben-Gehalts beträgt 100,41% nach 180 Rühreinheiten. Die Standardabweichung der drei zuletzt gezogenen Proben beträgt 1,43% und spricht für eine gute Homogenisierung des Fluoreszenzindikators. Die Abbildung 12 stellt visuell die Verteilung des Fluoreszenzindikators im Verlauf des Rührprozesses dar.

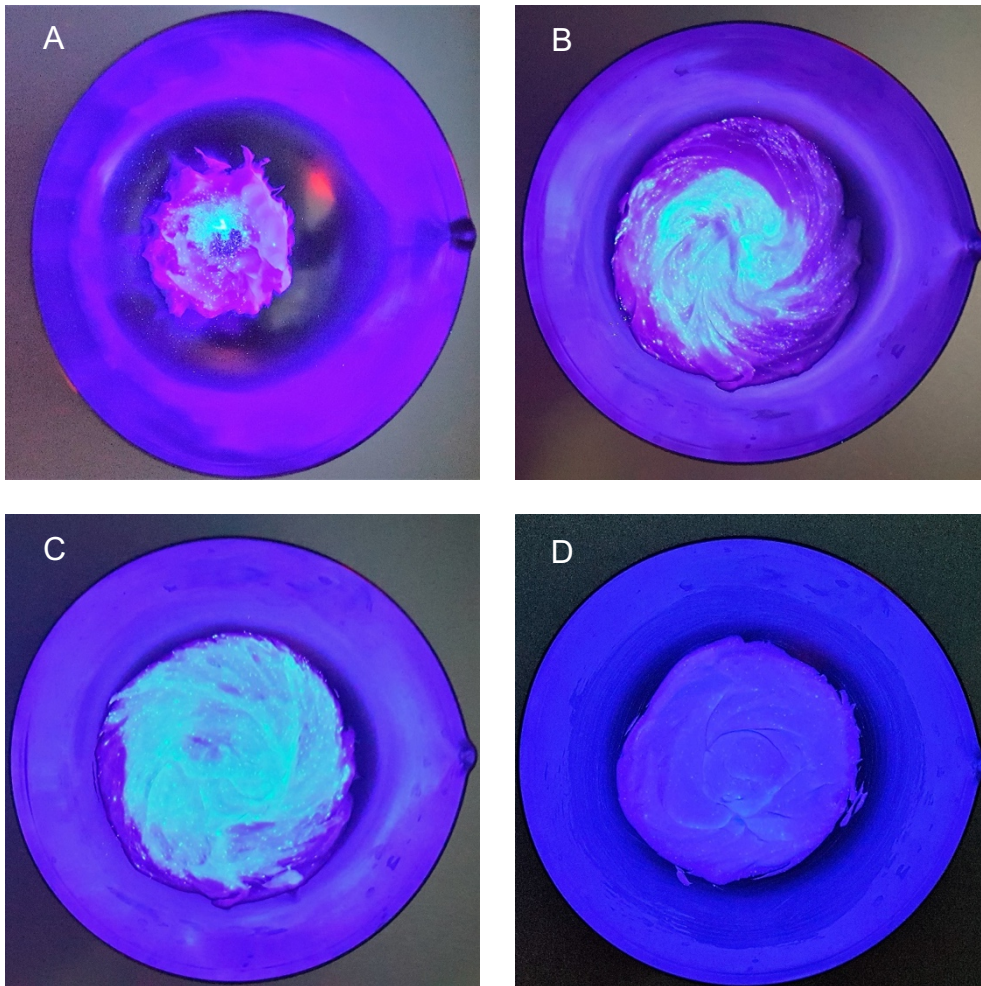


Abbildung 12. TAA-DAMC-Cremezubereitung in einer Edelstahl-Fantaschale unter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. Die Bilderreihe zeigt die Verteilung des Fluoreszenzindikators im Verlauf des Homogenisierungsprozesses nach (A) 0, (B) 3, (C) 6 und (D) 180 Röhreinheiten.

Zur Visualisierung der Farbstoffverteilung wurden weiterhin Petrischalen jeweils zur Hälfte mit reiner Cremegrundlage „Basiscreme DAC“ und zur Hälfte mit der Wirkstoff- und Indikator-haltigen Formulierung befüllt (Abbildung 13).

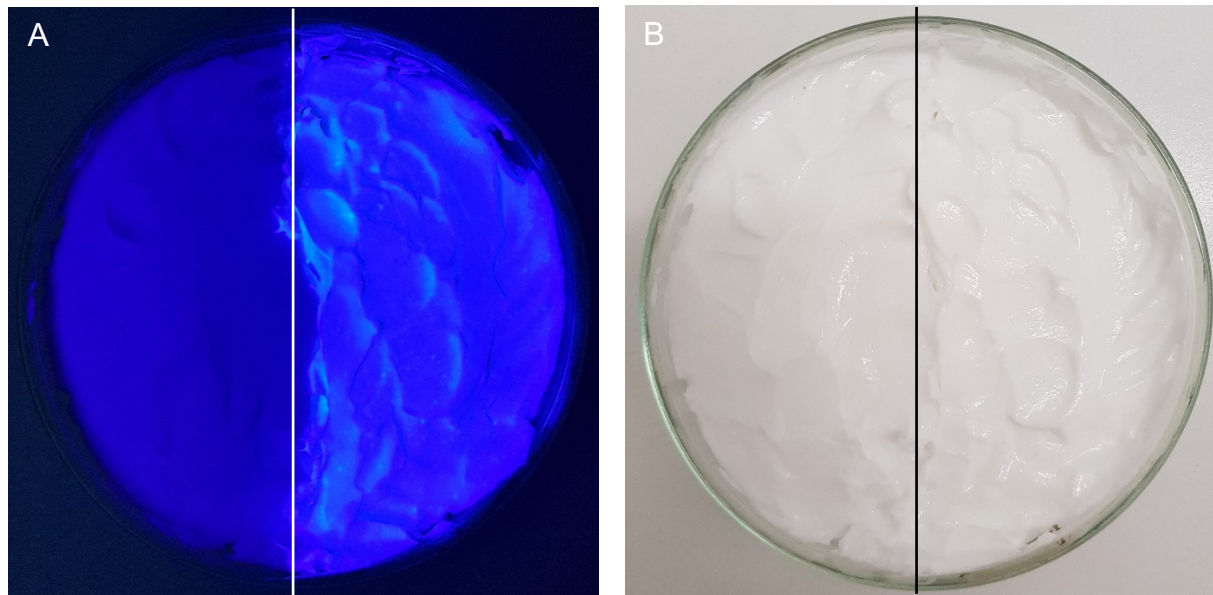


Abbildung 13. Vergleich der reinen Grundlage (Basiscreme DAC) auf der linken Seite der Petrischale mit der homogenisierten TAA-DACM-Cremezubereitung auf der rechten Seite unter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (A) und unter Tageslicht (B).

Bei der Betrachtung der Petrischalen unter Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm erkennt man eine klare Abgrenzung zwischen der reinen Basiscreme DAC auf der linken Seite der Petrischale und der Cremezubereitung, die den Fluoreszenzindikator 7-Diethylamino-4-methylcoumarin enthält. Die Fluoreszenz ist sehr stark ausgeprägt. Es würden daher wahrscheinlich auch deutlich geringere Mengen des Indikators ausreichen, um eine gleichmäßige Fluoreszenz in halbfesten Zubereitungen zu erzielen. Betrachtet man die Petrischale bei Tageslicht, so sind keine optisch wahrzunehmenden Unterschiede zwischen der reinen Grundlage und der Cremezubereitung erkennbar. Der Indikator führt somit zu keiner sichtbaren Verfärbung der Grundlage. Diese Eigenschaft des DAMCs war eine Voraussetzung, die an einen einzuarbeitenden Indikator gestellt wurde. In diesem Zusammenhang ist allerdings anzumerken, dass die verwendete Indikatorsubstanz nicht als Hilfsstoff für Arzneimittel zur Anwendung auf der Haut zugelassen ist, sondern bisher lediglich für Schulungszwecke zur Oberflächendesinfektion eingesetzt wird.

8.3 Korrelation der Indikator-Wirkstoff-Verteilung im Rührprozesses

Der bereits nachgewiesene Zusammenhang in der Indikator-Wirkstoff-Verteilung wurde abschließend im Verlauf des Rührprozesses geprüft. Hierzu wurden die

Prozentsätze des angestrebten Cremeprobe-Gehalts aus Tabelle 35 und Tabelle 36 für die beiden Analyten verglichen und grafisch dargestellt (Abbildung 14).

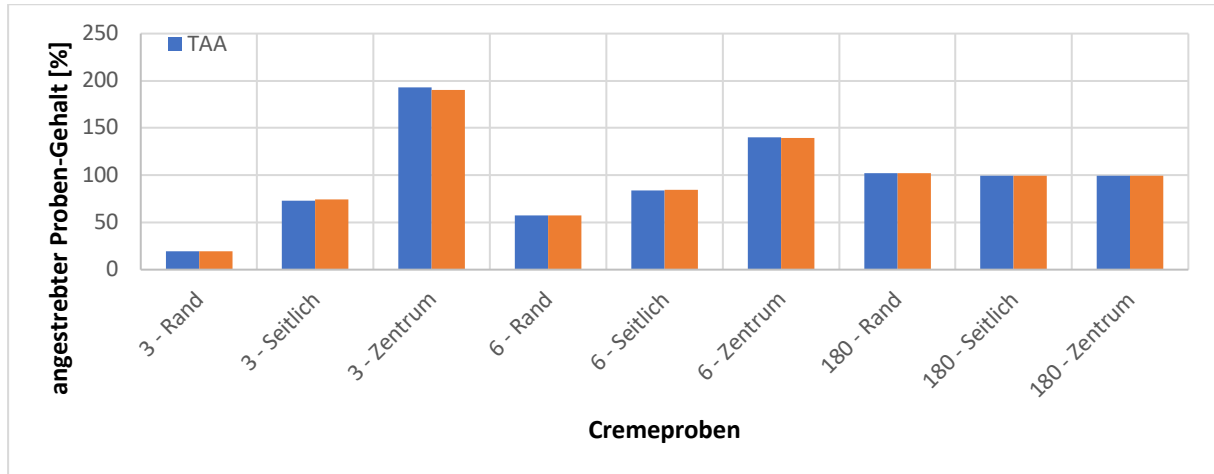


Abbildung 14. Das Diagramm stellt die Prozentsätze der angestrebten Proben-Gehälter an TAA und DACM aus den Cremeprobe gegenüber, die während des Herstellungsprozesses gezogen wurden. Die Cremeprobe sind nach Anzahl der Röhreinheiten und Ort des Probenzugs gekennzeichnet.

Das Diagramm zeigt den TAA- bzw. den DACM-Gehalt in der Cremeprobe in Abhängigkeit der Anzahl an Röhreinheiten. Der Gehalt der beiden Substanzen stimmt in jeder Probe weitgehend überein. Die Korrelation bezüglich der Verteilung ist damit gegeben. Eine gleichmäßige Fluoreszenz der Creme unter UV-Licht ist somit ein Hinweis auf eine homogene Wirkstoffverteilung.

D Zusammenfassung

Das Ziel dieses Projekts war es, einfach anwendbare Methoden zur Qualitätsbewertung von Rezepturen unter Apothekenbedingungen zu entwickeln sowie Konzepte zur Verfahrensvalidierung zu formulieren. Es sollten Hilfestellungen zur Qualitätssicherungen erarbeitet werden, anhand derer die herstellende Person in der öffentlichen Apotheke Gehalt und Gleichförmigkeit verschiedener Arzneiformen verlässlich überprüfen kann.

Zunächst sollten zwei geeignete HPLC-Methoden zur Quantifizierung des Modellarzneistoffes Hydrochlorothiazid (HCT) sowie der Indikatorsubstanz Eisen(III)-oxid validiert werden. Hierbei nahm die Entwicklung einer Gehaltsbestimmungsmethode für das Eisen(III)-oxids, wegen einer relativ aufwendige Probenaufarbeitung, einen Großteil der Projektzeit in Anspruch. Das Hydrochlorothiazid hingegen ließ sich verglichen damit sehr schnell und leicht quantifizieren. Nach erfolgreicher Etablierung der HPLC-Methoden galt es, diese zur Bewertung und Gegenüberstellung gängiger Kapsel-Herstellungsmethoden des DAC/NRF zu verwenden. Zu den Methoden gehörten die Volumenergänzungsmethode, die Messzylindermethode, die Lösemethode und die gravimetrische Methode. Exemplarisch hierfür wurde mit der NRF-Rezeptur 26.3. „Hydrochlorothiazid-Kapseln 1 mg“ eine pädiatrische Kapselrezeptur mit niedrigdosiertem Diuretikum ausgewählt. Die Prüfung auf Gleichförmigkeit des Gehalts wurde für das HCT und für das Eisen(III)-oxid durchgeführt. Eine Gegenüberstellung der HCT-Gehälter konnte nachweisen, dass prinzipiell alle Herstellungsverfahren zur Anfertigung von Kapselrezepturen als gleichwertig zu betrachten sind. Die Methoden unterscheiden sich lediglich in der eingesetzten Füllstoffmenge und im zeitlichen Rahmen der Durchführung. Anhand der quantifizierten Eisen(III)-oxid-Gehälter konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Verteilung des HCTs und des Eisenoxids nachgewiesen werden. Unter der Voraussetzung der Verwendung gleicher Mengen an Wirkstoff und Indikatorsubstanz kann eine durch Eisenoxid einheitlich rot gefärbte Pulvermischung als Nachweis für eine homogene Wirkstoffverteilung dienen.

Im zweiten Abschnitt des Projekts sollte selbiges Prinzip mittels des Fluoreszenzfarbstoffes 7-Diethylamino-4-methylcoumarin (DAMC) auf eine halbfeste Darreichungsform angewendet werden. Die erste Aufgabe war die Validierung einer HPLC-Analytik zur simultanen Quantifizierung des Arzneistoffes Triamcinolonacetonid neben dem Fluoreszenzindikator DAMC. Zusätzlich musste ein Extraktionsverfahren zur Abtrennung der Cremegrundlage etabliert werden, damit die Analyten mittels HPLC quantifiziert werden konnten. Das validierte Verfahren wurde anschließend zur Prüfung dreier apothekenüblicher Rührmethoden angewendet. Also Modellrezeptur wurde dazu die NRF-Rezeptur 11.38. „Hydrophile Triamcinolonacetonid-Creme 0,1%“ ausgewählt. Die manuelle Rührmethode wurde dabei mit zwei automatisierten Rührsystemen der Marken Topitec® und Unguator® verglichen. Hierbei wurden Gehalt und Verteilung des TAA sowie des DAMCs mit Hilfe der validierten HPLC-Analysemethode ermittelt und verglichen. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Präzision und Richtigkeit der Dosierung wurden dabei mit den beiden elektrischen Rührsystemen erzielt, wobei zwischen den Systemen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten. Die manuelle Methode schnitt hinsichtlich des Gehalts und der Verteilung der Analyten nur minimal schlechter ab. Durch den Vergleich der TAA- und DAMC-Gehaltswerte konnte auch hier eine Korrelation in der Verteilung der beiden Analyten in der Grundlage nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich durch die zusätzliche Einarbeitung einer Indikatorsubstanz eine gute Möglichkeit bietet, die Qualität bezüglich Gehalt und Gleichförmigkeit fester sowie halbfester Rezepturzneimittel zuverlässiger zu sichern. Die Übertragbarkeit der Indikatorverteilung auf andere Wirkstoffe, Grundlagen und Darreichungsformen bleibt zu prüfen. Das Eisenoxid findet im DAC/NRF bereits Erwähnung als Indikatorsubstanz. Es kann als zugelassener Hilfsstoff ein gutes Prüfinstrument bei der Erkennung inhomogener Pulvermischungen sein. Andererseits ist anzumerken, dass der verwendete Fluoreszenzindikator DAMC keine Zulassung als arzneilicher Hilfsstoff besitzt und somit gegenwärtig nur als Modellsubstanz für die Eignung der Methode angesehen werden darf.

E Anhang

1 Literaturverzeichnis

Abd El-Hay, S.S. et al., 2016. High performance liquid chromatography for simultaneous determination of xipamide, triamterene and hydrochlorothiazide in bulk drug samples and dosage forms. *Acta Pharm.* 66, 109-118.

Cagnasso, C.E. et al., 2007. Development and validation of a method for the determination of EDTA in non-alcoholic drinks by HPLC. *J. Food Compost. Anal.* 20, 248-251.

DAC/NRF, 2018. DAC/NRF-Rezepturhinweise "Kapseln". *Deutscher Arzneimittel-Codex, Neues Rezeptur-Formularium*, 1-15.

ICH, 2005. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 1-13.

Griessmann, K. et al., 2007. A rapid HPLC-UC method for the quantification of erythromycin in dermatological preparations. *Pharmazie* 62, 668-671.

Pharm. Eur. 8. Ausgabe, Grundwerk 2014. Monographie "Triamcinolonacetonid", Gehaltsbestimmung, 5106-5108.