

Wiederfindungsuntersuchungen von Arzneistoffen an definierten Edelstahloberflächen

S. KLOSS, U. MÜLLER, H. OELSCHLÄGER

Eingegangen am 25. Oktober 2004, angenommen am 3. November 2004

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Herbert Oelschläger, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

Pharmazie 60: 661–664 (2005)

Anlagen zur Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe im Technikums- und Produktionsmaßstab, wie Reaktoren und Aufarbeitungsgefäße bestehen hauptsächlich aus legiertem Edelstahl. Der Einfluss der Legierungszusammensetzung und der Oberflächenbeschaffenheit, das heißt der Rauigkeit der Edelstahlmaterialien, auf die Adsorption strukturell unterschiedlicher steroidaler Wirksubstanzen und folglich auf die Qualität der Produkte wurde untersucht. Edelstahllegierungen mit glatten, wenig rauhen Oberflächen ist als Reaktormaterial im allgemeinen der Vorrang zu geben. Jedoch wurde innerhalb dieser Studie gezeigt, dass mechanisch geschliffene Materialien mit mittleren Rauigkeiten bis zu ca. 0,4 µm an Stelle der wesentlich kostenintensiveren elektrochemisch polierten Edelstahloberflächen auf Grund der geringen Wechselwirkung zwischen Wirksubstanzen und Stahlmaterialien eingesetzt werden können. Die Art der Oberflächenveredlung bis zu einer definierten Rauigkeit hat also keinen Einfluss auf die Qualität dieser pharmazeutischen Produkte. Substanzen, die auf Grund ihrer Molekülstruktur in Anwesenheit polarer Lösungsmittel als ‚Anionen‘ fungieren können, werden an sehr glatten, mit Hilfe elektrochemischer Methoden erzeugten Oberflächen unter Bildung eines amorphen Oberflächenfilms adsorbiert. Für Wirkstoffe mit diesem Strukturmerkmal sollten ausschließlich die kostengünstigen mechanisch geschliffenen Reaktormaterialien mit mittleren Rauigkeiten bis zu ca. 0,5 µm verwendet werden.

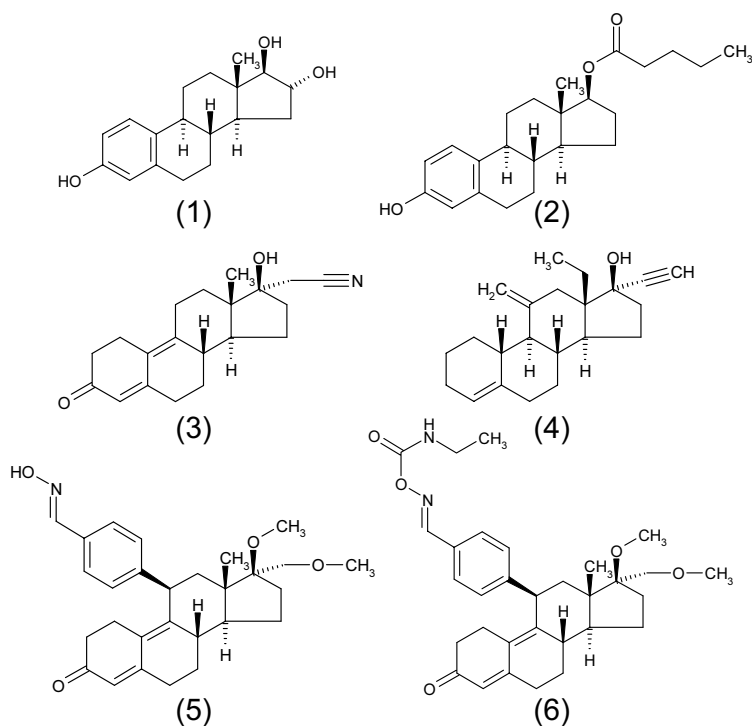
Studies on the recovery of pharmaceutical drug substances from surfaces made of defined stainless-steel alloys

Facilities for the manufacturing of pharmaceutical drug substances on the pilot-plant and the industrial scale as well as chemical reactors and vessels used for chemical work-up mainly consist of alloyed stainless steel. The influence of the alloy composition and the surface condition, i.e. of the roughness of the stainless-steel materials, on the adsorption of structurally diverse steroidal substances and, hence, on the quality of the products was studied. In general, stainless-steel alloys with smooth, not so rough surfaces are to be favored as reactor material. However, it was demonstrated in this study that, on account of the weak interaction between active substances and steel materials, mechanically polished materials of a medium roughness up to approx. 0.4 µm can be employed instead of the considerably more cost-intensive electrochemically polished stainless-steel surfaces. The type of surface finishing up to a defined roughness, then, has no influence on the quality of these pharmaceutical products. Substances that, because of their molecular structure, can function as “anions” in the presence of polar solvents, are adsorbed on very smooth surfaces prepared by electrochemical methods, forming an amorphous surface film. For substances with this structural characteristics, the lower-cost mechanically polished reactor materials of a medium roughness up to approx. 0.5 µm should be used exclusively.

1. Einleitung

Die Produktion von pharmazeutischen Wirkstoffen bzw. Arzneimitteln erfolgt vorzugsweise in Mehrzweckanlagen, das heißt, in ein und derselben Anlage werden nacheinander Substanzen bzw. Produkte mit unterschiedlichen toxi-

kologischen und pharmakologischen Eigenschaften hergestellt. Zur Vermeidung von Kreuzkontamination beim Wechsel von einem Produkt zu einem Folgeprodukt ist effizient zu reinigen und der Nachweis zu erbringen, dass die in der Produktionsanlage verbliebenen Rückstände kein potentielles Risiko darstellen. Der Nachweis der Effi-



Estriol (1), Estradiolvalerat (2), Dienogest (3), Desogestrel (4) Oxim J-867 (5), Carbatam J-956 (6)

zienz von Reinigungsverfahren ist also ein wesentlicher Aspekt der Qualitätssicherung in der pharmazeutischen Herstellung und ein notwendiger Beitrag zur Erhöhung der Arzneimittelsicherheit. Eine Herstellungsanlage gilt als rein, wenn ein zuvor festgelegtes und wissenschaftlich begründetes Akzeptanzlimit eingehalten wird. Bei der Festlegung der Akzeptanzkriterien, die in der Verantwortung des pharmazeutischen Herstellers liegt, sind die Chargengröße, die Dosierung, toxikologische Eigenschaften und die Größe der Herstellungsanlagen zu berücksichtigen (PDA 1998). Die Wahl einer bestimmten Probenahmetechnik von Oberflächen nach erfolgter Reinigung hängt sowohl von den Eigenschaften der zu reinigenden Substanz, z. B. der Löslichkeit, als auch von der Anlagenkonfiguration ab. Anlagenteile in der Wirkstoffproduktion sind im allgemeinen wenig zugänglich. Somit ist hier das Final-Rinse-Verfahren Methode der Wahl, bei dieser Methode wird die gesamte Herstellungsanlage gespült und das letzte Spülwasser analytisch untersucht.

Die Anwendung einer analytischen Methode zur Bestimmung des Wirkstoffgehalts in den Reinigungslösungen hängt in erster Linie davon ab, welches Akzeptanzlimit für den zu bestimmenden Substanrückstand vom Hersteller festgelegt wurde. Allgemein üblich ist die Verwendung

chromatografischer Methoden wie Hochleistungsflüssig- und Dünnschichtchromatografie und spektroskopischer Techniken, z. B. UV-Spektroskopie, wobei die Hochleistungsflüssigchromatografie die empfindlichste, allerdings auch kostenaufwändigste Methode ist. Analysenmethoden, die zur Bewertung von Reinigungsproben verwendet werden, sind vollständig zu validieren, das heißt, es ist neben dem Nachweis der Reproduzierbarkeit, Präzision, Richtigkeit und Robustheit auch zu zeigen, dass innerhalb des Arbeitsbereiches eine lineare Abhängigkeit zwischen Substanzkonzentration und Messsignal existiert und dass die ermittelten Nachweis- und quantitativen Bestimmungsgrenzen weit unter den für das Reinigungsverfahren festgelegten Akzeptanzlimits liegen (ICH).

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der steroidalen Wirkstoffe **1–6** wurden Wiederfindungsstudien auf Edelstahl mit definierter Zusammensetzung und bekannten Oberflächeneigenschaften durchgeführt.

Zur Herstellung von Anlagen für die pharmazeutische Industrie kommen nur legierte Edelstähle auf Grund ihrer

Tabelle 1: Chrom-Nickelstahllegierung, kupferhaltig, chemische Zusammensetzung in %^a

Si	Mn	Cr	Ni	Mo	Cu	Co	Fe
0,53	1,1	17,5	11,1	2,1	0,37	0,14	67,1

^a Gehalt an Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel, Niob, Bor; Phosphor ist kleiner als 0,05%

Tabelle 2: Chrom-Nickelstahllegierung, titanhaltig, chemische Zusammensetzung in %

Si	Mn	Cr	Ni	Mo	Ti	Fe
0,42	1,1	16,9	10,5	2,0	0,38	68,6

Korrosionsbeständigkeit und thermodynamischen Eigenschaften, z. B. geringen thermischen Ausdehnungskoeffizienten, in Betracht. Die Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit erfolgten mit Chrom-Nickelstahllegierungen (Tabelle 1, Tabelle 2).

Im folgenden Text werden beide Legierungen vereinfacht als Kupferstahl bzw. Titanstahl bezeichnet. Die Rauigkeit einer Edelstahloberfläche kann durch Bearbeitungsverfahren wie mechanisches, chemisches und elektrochemisches Polieren beeinflusst werden und lässt sich durch mehrere Kenngrößen, wie die Rautiefe R_t , die mittlere Rauheit R_a und die mittlere Rautiefe R_M beschreiben (Schorsch 1971).

$$R_a = \frac{1}{n} \sum |y_{OF} - y_M| \quad (1)$$

R_a : Mittlere Rauheit, y_{OF} : Oberflächen-Istprofil, y_M : Mittleres Profil, n : Anzahl der Einzelmessungen

Die mit Hilfe eines Perthometers gemessenen mittleren Rauigkeiten R_a der Einzelplatten (Schorsch 1971) lagen für mechanisch geschliffene Platten zwischen 0,2 und 1,2 μm und für elektrochemisch polierte Materialien zwischen 0,2 und 0,8 μm und waren erwartungsgemäß nach mechanischer Oberflächenbehandlung mit einer relativ großen Varianz behaftet (Tabelle 3).

Sowohl für die Estrogene Estriol und Estradiolvalerat als auch für das Gestagen Dienogest wurden Wiederfindungsraten von mehr als 90% ermittelt, unabhängig von der Legierungszusammensetzung und der Oberflächenbeschaffenheit der Stahlplatten. Der Abfall der Wiederfindungsraten in Abhängigkeit von der Zunahme der Rauigkeit der Oberflächen ist mit maximal 6% vernachlässigbar klein (Abb. 1, Abb. 2).

Auf Kupferstahl wurden ca. 10–25% der Substanzen Desogestrel, Oxim J-867 und Carbamat J-956 an rauheren Oberflächen (0,8–1,2 μm) zurückgehalten.

Edelstahlmaterialien mit besonders glatten Oberflächen, die nur mit Hilfe elektrochemischer Verfahren realisiert werden können, sind gegenüber mechanisch geschliffenen Oberflächen im allgemeinen zu bevorzugen. Für alle untersuchten Substanzen mit Ausnahme von Desogestrel betragen die Wiederfindungsraten sowohl bei Verwendung kupferhaltiger als auch titanhaltiger Stähle mehr als 90% (Abb. 3).

Das Wiederfindungsverhalten von Desogestrel auf beiden Edelstahlegierungen weicht von dem der anderen untersuchten Substanzen ab. Desogestrel bleibt bei Verwendung von Methanol als Spüllösungsmittel auf elektrochemisch polierten Edelstahloberflächen, insbesondere auf Titanstahl, wesentlich stärker haften als auf mechanisch geschliffenen Platten. Der Unterschied beträgt bei geringen Rauigkeiten ($\sim 0,2 \mu\text{m}$) ca. 40% für Titanstahl und ca. 20% für Kupferstahl. Glatte graufreie Oberflächen verbun-

Tabelle 3: Mittlere Rauigkeiten R_a in μm ; Mittelwerte in Klammern

Sollwert	Mechanisch geschliffen	Elektropoliert
Titan-Stahl		
0,2	0,11–0,26 (0,17)	0,16–0,23 (0,19)
0,8	0,53–0,85 (0,72)	0,70–0,86 (0,77)
1,2	0,99–1,4 (1,2)	–
Kupfer-Stahl		
0,2	0,16–0,21 (0,17)	0,18–0,22 (0,19)
0,8	0,45–0,85 (0,72)	0,74–0,84 (0,79)
1,2	1,1–1,4 (1,2)	–

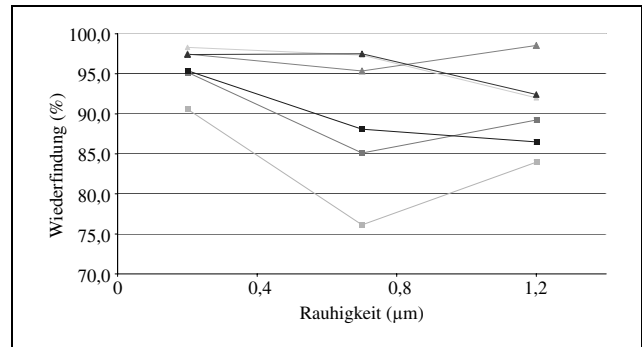


Abb. 1: Wiederfindungsraten (%) der Wirkstoffe auf Kupferstahl in Abhängigkeit von der Rauigkeit R_a (μm), Konzentration: 0,01 mg/ml (Methanol)
 ▲ Estriol; ▲ Estradiolvalerat; ● Dienogest;
 □ Desogestrel; ■ Oxim J-867; ◆ Carbamat J-956

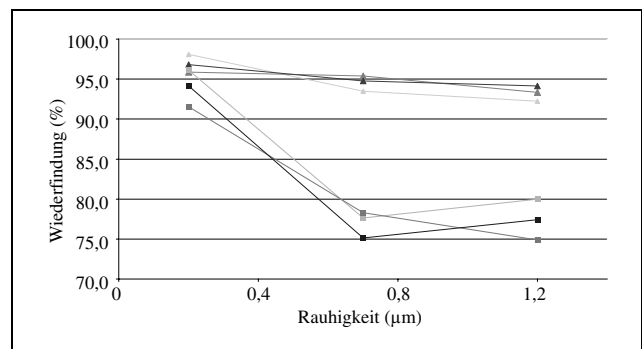


Abb. 2: Wiederfindungsraten (%) der Wirkstoffe auf Titanstahl in Abhängigkeit von der Rauigkeit R_a (μm), Konzentration: 0,01 mg/ml (Methanol)
 ▲ Estriol; ▲ Estradiolvalerat; ● Dienogest;
 □ Desogestrel; ■ Oxim J-867; ◆ Carbamat J-956

den mit einer höheren Retention der Substanzen: dieser scheinbare Widerspruch deutet auf eine Chemisorption der betreffenden Substanz an der Edelstahloberfläche hin. Bemerkenswert ist, dass auf elektropolierten Oberflächen mit geringerer mittlerer Rauigkeit eine größere Desogestrelmenge bei Verwendung von Methanol zurückgehalten wurde als auf Flächen mit höheren R_a -Werten (Abb. 4).

Auf rauhen, grathaltigen Oberflächen können sich Desogestrelkristalle mechanisch in Ecken und Winkeln anreichern. Auf der betreffenden Platte ($5,6 \times 5,6 \text{ cm}$) befinden sich noch ca. 2,2 μg Substanz (Abb. 5-1). Auf elektrochemisch polierten Edelstahloberflächen ($5,6 \times 5,6 \text{ cm}$) mit sehr

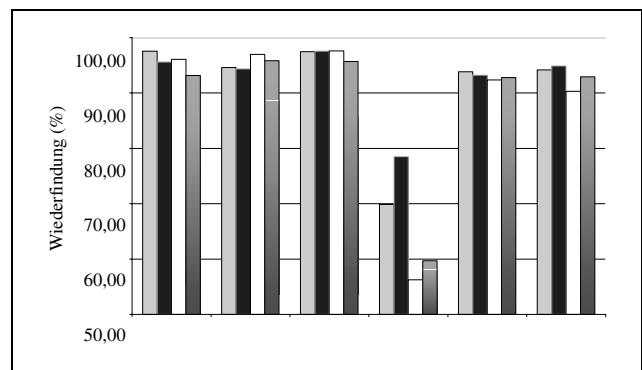


Abb. 3: Wiederfindungsraten (%) der Wirkstoffe auf Titan- und Kupferstahl (elektropoliert) in Abhängigkeit von der Rauigkeit R_a (μm)
 Konzentration: 0,01 mg/ml (Methanol)
 □ Kupferstahl $R_a = 0,2 \mu\text{m}$; ■ Kupferstahl $R_a = 0,8 \mu\text{m}$;
 □ Titanstahl $R_a = 0,2 \mu\text{m}$; ■ Titanstahl $R_a = 0,8 \mu\text{m}$

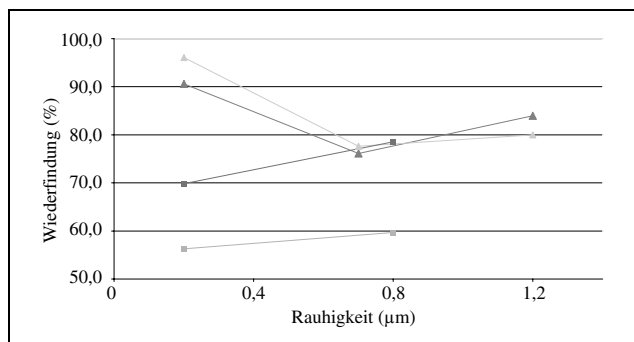


Abb. 4: Wiederfindungsraten (%) von Desogestrel auf Titan- und Kupferstahl in Abhängigkeit von der Oberflächenbehandlung, Konzentration: 0,01 mg/ml (Methanol)

—▲— Kupferstahl; —△— Titanstahl;
—■— Kupferstahl; —□— Titanstahl

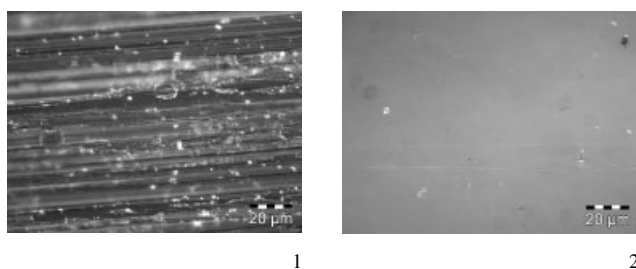


Abb. 5: 1: Desogestrel auf Titanstahl (mechanisch poliert) ($R_a \sim 0,8 \mu\text{m}$), 2: Desogestrel auf Titanstahl (elektrochemisch poliert) ($R_a \sim 0,2 \mu\text{m}$), Aufnahme mit System-Mikroskop BX52 der Olympus Optical Co. GmbH im Aufsicht mit Nutzung der Polarisationsoptik

glatter Oberflächenstruktur (Abb. 5-2) haben sich dagegen keine Kristalle fixiert, auf dieser Fläche haftet ein gleichmäßig verteilter Film von ca. $4,4 \mu\text{g}$ Substanz, verursacht durch chemische Wechselwirkung mit der Metalloberfläche. Desogestrel besitzt als spezielles Strukturmerkmal eine Ethingruppe, deren Proton in polaren Lösungsmitteln möglicherweise abgespalten wird. Es kann angenommen werden, dass das deprotonierte Desogestrel an die positiv geladenen Chromionen adsorbiert wird. Dieser Effekt wird höchstwahrscheinlich durch das Vorhandensein einer benachbarten Hydroxylgruppe im Desogestrel forciert.

3. Experimenteller Teil

3.1. Edelstahlmaterialien

Für die Untersuchungen wurden 0,8 mm dicke Edelstahlmetallplatten der Größe $5,6 \times 5,6 \text{ cm}$ der Johannes Ohlendorf GmbH Stahl, Gütersloh, verwendet, deren Oberflächen einseitig mechanisch geschliffen bzw. elektroliert wurden.

3.2. Probenvorbereitung und Durchführung

Je 1 mg der Steroide, genau eingewogen, wurde in Methanol zu 100,0 ml gelöst (Konz.: 0,01 mg/ml). Mit Hilfe einer 1 ml-Vollpipette wurden die Edelstahloberflächen vollständig benetzt. Die kontaminierten Materialien wurden ca. 15 h bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Substanzrückstände wurden mit 10 ml Methanol ohne mechanische Berührung der Materialoberflächen abgespült, anschließend erfolgte die Gehaltsbestimmung der Substanzlösungen ohne weitere Probenvorbereitung mittels HPLC (Abschnitt 3.3). Der Prozess des Benetzens und anschließenden Abspülens wurde pro Substanz mit jeweils drei Stahlplatten gleicher Oberflächengüte durchgeführt. Die berechneten relativen Standardabweichungen betragen für drei Wiederholprüfungen unabhängig von Wirkstoff und Oberflächenbehandlung generell weniger als 1%.

Tabelle 4: Zusammensetzung der mobilen Phase und Wellenlänge (WL) zur Bestimmung von 1: Estriol, 2: Estradiol-valerat, 3: Dienogest, 4: Desogestrel, 5: Oxim J-867, 6: Carbatat J-956

	1	2	3	4	5	6
CH ₃ CN/H ₂ O	3/7	7/3	35/65	8/2	1/1	1/1
WL (nm)	280	280	240	215	300	300

Flussrate: 1 ml/min; Säulentemperatur: ca. 40 °C; Detektionsmethode: UV (DAD); Wellenlängenbereich 190–800 nm)

3.3. HPLC

Die quantitative Untersuchung der Steroidlösungen erfolgte mittels Umkehrphasenchromatografie an einer unpolaren modifizierten Kieselgelphase (RP18). Folgende chromatografische Bedingungen wurden gewählt: Säule: Hypersil® ODS, Länge: 125 mm, Durchmesser: 4 mm, Mittlere Korngröße: 5 µm, Lieferant: Wissenschaftlicher Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin; Mobile Phase: Gemisch aus Acetonitril und Wasser (v/v) (Tabelle 4).

3.4. Validierung und quantitative Auswertung

Die verwendeten Analysenverfahren wurden hinsichtlich der Parameter Selektivität, Präzision, Linearität, Nachweis- und quantitative Bestimmungsgrenze, Richtigkeit und Robustheit für alle sechs betrachteten Wirkstoffe innerhalb des Konzentrationsbereichs 0,001 und 0,12 mg/ml validiert. Die Validierung erfolgte entsprechend der ICH-Richtlinien Q2A ‚Validierung von Analysemethoden: Definitionen und Terminologie‘ und Q2B ‚Validierung von Analysemethoden: Vorgehensweise‘. Die Nachweis- und quantitativen Bestimmungsgrenzen als wichtigste Kriterien lagen weit unter den geforderten Akzeptanzlimits für Reinigungsprozeduren (FDA 1993). (Nachweisgrenzen (Photodiodenarraydetektor) für Estriol, Oxim J-867, Carbatat J-956: 0,01 µg/ml; für Estradiolvalerat, Dienogest, Desogestrel: 0,1 µg/ml). Da innerhalb des oben beschriebenen Konzentrationsbereichs lineare Abhängigkeit zwischen Konzentration und Messsignal nachgewiesen wurde, erfolgte die quantitative Bewertung der Spüllösungen mittels Einpunktkalibrierung (Konzentration: 0,01 mg/ml). Die Berechnung der Wiederfindungsraten der Wirksubstanzen auf den Edelstahlmaterialien erfolgte mit Hilfe von Gl. (2).

$$WF = GS/GA \cdot 100 \quad (2)$$

WF: Wiederfindungsrate (%), GS: mittels HPLC bestimmter Gehalt an Wirksubstanz pro ml in der Spüllösung (mg), GA: bekannter Gehalt an Wirkstoff (0,01 mg/ml) in der Kontaminationslösung

3.5. Reagenzien und Lösungsmittel

Die folgenden Lösungsmittel wurden von der Firma Merck KGaA, Darmstadt bezogen: Acetonitril gradient grade für die Flüssigkeitschromatografie, Qualität LiChrosolv®; Methanol für die Spektroskopie, Qualität Uvasol®.

Wasser für die mobile Phase wurde durch Nachbehandlung von Permeatwasser in einem Reinstwasserbereiter ‚Nowapure select‘, Hersteller: KSN Wassertechnik, Nistertal, hergestellt: Leitfähigkeit $\leq 0,06 \mu\text{S/cm}$ (20 °C), organischer Gesamtkohlenstoffgehalt (TOC) < 500 ppb.

3.6. Geräte

HPLC-Apparatur: Hochdruckgradientenanlage der Firma Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, bestehend aus folgenden Modulen: 2 Hochdruckpumpen LC-10A, automatischer Probengeber SIL-10A, Säulenofen CTO-10A, Entgasungsmodul DGU-14A, Photodiodenarraydetektor SPD-M10A, Systemcontroller SCL-10AV. Die Ansteuerung der Anlage erfolgte mit Hilfe der Chromatografiesoftware Class VP V.5.0, mit der ebenfalls die Chromatogramme ausgewertet wurden.

Literatur

- FDA (1993) Guide to inspection of validation and cleaning processes. Maryland. www.fda.gov/ora/inspect
 ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2: Validation of Analytical Procedures. ICH Secretariate www.ich.org
 PDA (1998) Technical Report No. 29: Points to consider for cleaning validation. PDA J Pharm Sci Technol 52: Supplement.
 Schorsch H (1971) Gütebestimmung an technischen Oberflächen. Stuttgart, S. 9–15.