

Apotheke des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Germany

## Untersuchungen zur Stabilität der Busulfan-Stammlösung (Busilvex<sup>®</sup>, Busulfex<sup>™</sup>) in BİBraun Injekt<sup>®</sup> Einmalspritzen

A. KARSTENS, I. KRÄMER

Eingegangen am 21. 12. 2005, angenommen am 23. Januar 2006

Astrid Karstens, Apotheke des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Langenbeckstr. 1, D-55131 Mainz

Pharmazie 61: 845–850 (2006)

Die chemische Stabilität des Busulfan-Infusionslösungskonzentrats wurde mittels einer modifizierten HPLC-Methode mit UV-Detektion bestimmt. Als Derivatisierungsreagenz diente Diethyldithiocarbamat. Die Busulfan-Stammlösung (Busilvex<sup>®</sup>, Busulfex<sup>™</sup>) erwies sich aufgezogen in BİBraun Injekt<sup>®</sup> Einmalspritzen sowohl lichtgeschützt bei 2–8 °C, als auch ohne Lichtschutz bei 18–20 °C gelagert als über mindestens 28 Tage stabil. Anbrüche vom Busilvex<sup>®</sup> bzw. Busulfex<sup>™</sup> Infusionslösungskonzentrat können aufgezogen in zweiteiligen Einmalspritzen 28 Tage bevorzugt kühl gelagert und verwendet werden.

### Stability of busulfan injection solution (Busilvex<sup>®</sup>, Busulfex<sup>™</sup>) in BİBraun Injekt<sup>®</sup> syringes

Stability of busulfan injection was determined by a modified stability-indicating HPLC method with UV detection. Diethyldithiocarbamate was used as derivatization agent. The stability tests revealed that busulfan injection (Busilvex<sup>®</sup>, Busulfex<sup>™</sup>) stored in BİBraun Injekt<sup>®</sup> syringes at 18–20 °C without light protection or refrigerated are stable for up to 28 days. Unused busulfan injection (Busilvex<sup>®</sup>, Busulfex<sup>™</sup>) is not necessarily to be discarded, but can be stored for a prolonged period of time in a rubber free syringe, preferably under refrigeration.

### 1. Einleitung

Busulfan (1,4-Bis-methansulfonyloxy-butan) ist ein bifunktionell alkylierendes Zytostatikum. Es wird seit den 80iger Jahren hochdosiert in Kombination mit Cyclophosphamid zur Konditionierung der Patienten vor Blutstammzelltransplantationen eingesetzt (Tutschka et al. 1987; Santos et al. 1983). Die Dosierung für die Konditionierung beträgt bei Erwachsenen körperlsgewichtsbezogen bei oraler Applikation 1 mg/kg Körpergewicht (KG) und bei parenteraler Applikation 0,8 mg/kg KG, jeweils viermal täglich über vier Tage. Es gibt neuerdings Studien, die zeigen, dass bei parenteraler Gabe die Aufteilung der Busulfan Tagesdosis auf eine 1- bzw. 2-mal tägliche Gabe eine Therapiealternative zum herkömmlichen Dosierungsschema darstellt (Fernandez et al. 2002; Mamlouk et al. 2005).

Seit Dezember 2003 ist zur parenteralen Applikation das Infusionslösungskonzentrat Busilvex<sup>®</sup> (Hersteller Pierre Fabre Pharma), das vorher bereits aus den USA (Busulfex<sup>™</sup>, Hersteller Orphan Medical) importiert werden konnte, in Deutschland zugelassen und erhältlich. Weitere parenterale Formulierungen von Busulfan wie liposomale Zubereitungen, Rezepturen mit Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel und eine Busulfan-Mikrosuspension werden in Studien eingesetzt (Deeg et al. 1999; Ehninger et al. 1995; Hassan et al. 1998, 2001, 2002; Olavarria et al. 2000; Schuler et al. 1998).

Eine Glasbrechampulle Busilvex<sup>®</sup> mit 10 mL wasserfreiem Infusionslösungskonzentrat enthält 60 mg Busulfan gelöst

in dem Lösungsmittel bzw. Lösungsvermittler *N,N*-Dimethylacetamid (DMA, 33% G/G) bzw. Polyethylenglycol 400 (PEG 400, 67% G/G), da Busulfan eine sehr schwer wasserlösliche Substanz ist und in wässriger Lösung hydrolysiert (Bhagwatwar et al. 1996; Feit und Rastrup-Andersen 1973). Vor Applikation muss die patientenindividuell berechnete Menge des Busulfan-Konzentrats (6 mg/mL) mit 0,9% Natriumchlorid- oder 5% Glucoselösung auf die Konzentration von 0,5 mg/mL verdünnt werden (Fachinformation Busilvex<sup>®</sup> 2003). Restmengen des Konzentrats können aus hygienischen und technischen Gründen nicht in der Glasbrechampulle, sondern allenfalls in verschlossenen Einmalspritzen aufbewahrt werden. Angaben zur Stabilität des Busulfan-Infusionslösungskonzentrats nach Anbruch der Ampullen wurden bisher nicht publiziert. Wir untersuchten daher dessen Stabilität sowohl bei Raum- als auch bei Kühltemperatur in BİBraun Injekt<sup>®</sup> Einmalspritzen über einen Zeitraum von 28 Tagen. Für die Aufbewahrung der Stammlösung wurden zweiteilige Injekt<sup>®</sup> Einmalspritzen gewählt, die aus Polypropylen bestehen und kompatibel mit DMA sind (Krämer und Maas 1999).

Busulfan kann gaschromatographisch (GC) oder auch mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit unterschiedlichen Detektionsmethoden bestimmt werden (Tabelle 1). Die Methoden unterscheiden sich bezüglich der Sensitivität und des Zeitaufwandes. Diese Kriterien sind besonders relevant bei der Methodenwahl zur Etablierung des Therapeutischen Drug Monitorings (TDM) von Busulfan in der Hochdosis-Therapie. Die Durchführung

**Tabelle 1: Übersicht über die Bestimmungsmethoden von Busulfan in Plasmaproben und in wässrigen Lösungen**

Busulfan-Bestimmungsmethoden	Derivatisierungsmittel	Publikationen
Gaschromatographie (GC)		
GC-MS (Massenspektrometrie)	Natriumjodid	Ehrsson et al. (1983)
	Natriumjodid	Vassal et al. (1988)
	Natriumjodid	Lai et al. (1998)
	2,3,5,6-Tetrafluorothiophenol	Quernin et al. (1998)
	Natriumjodid	Abdel-Rehim et al. (2003)
GC-ECD (Elektroneneinfang-Detektion)	Natriumjodid	Hassan et al. (1983)
	2,3,5,6-Tetrafluorothiophenol	Chen et al. (1988)
	2,3,5,6-Tetrafluorothiophenol	Embree et al. (1993)
Flüssigkeitschromatographie (LC)		
HPLC, Derivatisierung von Busulfan	Diethyldithiocarbamat	Henner et al. (1987)
	Thiokresol	Grochow et al. (1989)
	Diethyldithiocarbamat	McKichan et al. (1990)
	Diethyldithiocarbamat	Bhagwatwar et al. (1996)
	Diethyldithiocarbamat	Xu et al. (1996)
	Diethyldithiocarbamat	Chow et al. (1997)
	Diethyldithiocarbamat	Heggie et al. (1997)
	Diethyldithiocarbamat	Rifai et al. (1997)
	2,3,5,6-Tetrafluorothiophenol	Quernin et al. (1999)
	Diethyldithiocarbamat	Bleyzac et al. (2000)
HPLC, Photolyse	Natriumjodid	Blanz et al. (1990)
	Natriumjodid	Jenke et al. (2004)
HPLC, on-line Derivatisierung	Diethyldithiocarbamat	Funakoshi et al. (1994)
HPLC, Fluoreszenz	8-Mercaptoquinolin	Peris et al. (1999)
HPLC-MS, ohne Derivatisierung	—	Pichini et al. (1992)
	—	Mürdter et al. (2001)
	—	Quernin et al. (2001)
	—	dos Reis et al. (2005)

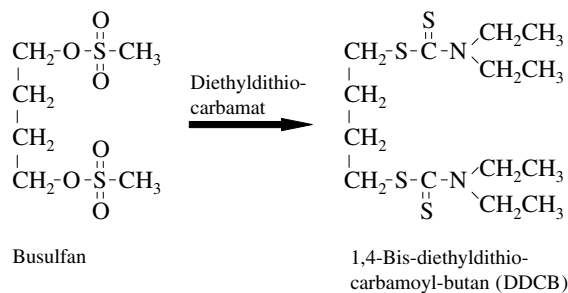
des TDM von Busulfan wird, v. a. nach der oralen Applikation, sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen, zur Reduktion der Toxizität insbesondere der mit hoher Mortalität assoziierten Lebervenenverschlusskrankheit (hepatic venoocclusive disease) und zur Effektivitätssteigerung der Therapie empfohlen (Bleyzac et al. 2001; Bolinger et al. 2001; Dix et al. 1996; Grochow et al. 1989, 1993; Ljungman et al. 1997; McCune et al. 2002; Slattery et al. 1995, 1997). GC-MS/-ECD Methoden haben eine hohe Sensitivität und Spezifität, sind aber nicht in jedem Labor verfügbar und in der Routine nicht einfach zu handhaben. Am häufigsten sind in der Literatur HPLC-Methoden zur Busulfan-Plasmaspiegelbestimmung beschrieben. Da Busulfan kein Chromophor aufweist, ist zur UV-Detektion eine Derivatisierung erforderlich und mit verschiedenen Substanzen möglich. Die vorliegenden Untersuchungen behandeln die Etablierung und Evaluierung einer für die Stabilitätsprüfungen von Busulfan-Infusionslösungskonzentrat und von applikationsfertigen verdünnten Busulfan-Infusionslösungen geeigneten HPLC-Methode mittels UV-Detektion. In der Folge sollte mit dieser HPLC-Methode das routinemäßige TDM von Busulfan ermöglicht werden. Für die Untersuchungen zur Stabilität des Busulfan-Infusionslösungskonzentrats werden hier die Ergebnisse dargestellt.

## 2. Untersuchungen und Ergebnisse

### 2.1. Etablierung, Validierung und Kalibrierung der HPLC-Methode

In Anlehnung an zwei bekannte HPLC-Methoden wurde eine modifizierte HPLC-Methode mit UV-Detektion zur quantitativen Bestimmung von Busulfan in wässrigen Lösungen (Bleyzac et al. 2000; Xu et al. 1996) entwickelt.

### Schema



Busulfan wird mit Diethyldithiocarbamat (DDCB) derivatisiert (Schema). Nach einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat wird das Reaktionsprodukt 1,4-Bis-diethyldithiocarbamoyl-butan (DDCB) bei 280 nm quantitativ bestimmt (Henner et al. 1987). Als interner Standard dient 1,6-Bis-methansulfonyloxy-hexan. Die Retentionszeit des DDCB beträgt ca. 6,2 min und die des Reaktionsproduktes des internen Standards ca. 11,2 min (Abb.).

**Tabelle 2: Intra- und Inter-day-Präzision der HPLC-Methode**

	Theoretische Konzentration [mg/mL]	Injektion pro Probe	Mittelwert der gemessenen Konz. [mg/mL]*	Rel. Standardabweichung [%]
Intraday	0,1	1	0,1022	2,98
	0,03	1	0,0294	4,61
Interday	0,1	3	0,1008	4,23
	0,03	3	0,0293	3,13

\* Arithmetischer Mittelwert von jeweils 10 Proben

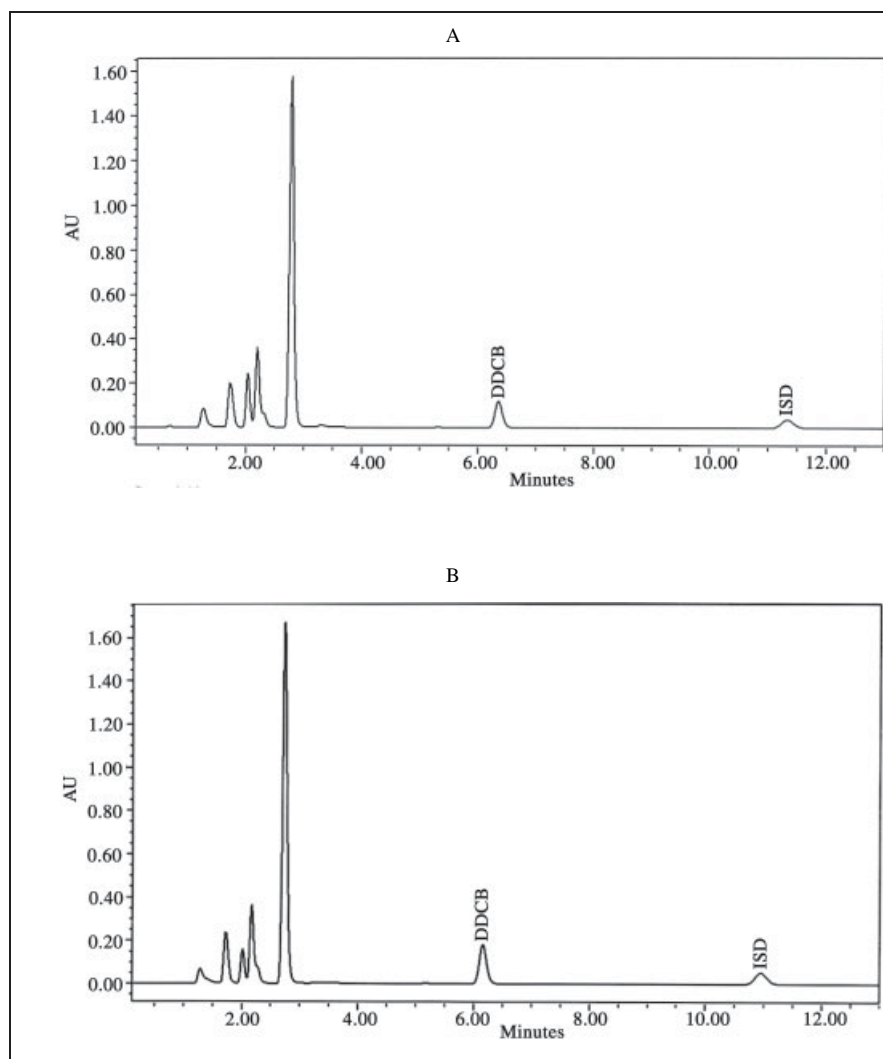


Abb.:  
2D Chromatogramme (280 nm), Busulfex™  
Infusionslösungskonzentrat 6 mg/mL (A) An-  
bruch der Ampullen (Tag 0) und (B) Lage-  
rung in B Braun Injekt® Einmalspritzen bei  
18–20 °C und Tages- bzw. Fluoreszenzlicht  
am Tag 31

Die Kalibrierung der Methode erfolgte mittels externer Standards. Aus dem Busulfan-Standard von 1,0 mg/mL in Acetonitril wurden durch Verdünnung mit 0,9% Natriumchloridlösung sechs Kalibrierstandards unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Jede Probe wurde fünffach chromatographiert. Die resultierenden Quotienten aus den Peakflächen des DDCB und des internen Standards wurden gegen die jeweiligen Busulfan-Konzentrationen aufgetragen. Zur Kontrolle der Kalibrierung wurde an jedem Untersuchungstag der Gehalt frisch hergestellter Busulfan-Lösungen der Konzentrationen 0,03 mg/mL und 0,1 mg/mL bestimmt.

Im Bereich von 0,03 mg/mL bis 0,12 mg/mL betrug der Korrelationskoeffizient der errechneten Regressionsgeraden 0,997.

Zur Überprüfung der Präzision der Methode wurde eine genau eingewogene Busulfan-Lösung der Konzentration 1,0 mg/mL in Acetonitril mit 0,9% Natriumchloridlösung auf die theoretischen Konzentrationen von 0,03 mg/mL und 0,1 mg/mL verdünnt. Pro Konzentration wurden zweimal 5 Proben am gleichen Tag parallel aufbereitet und einmal chromatographiert (Intra-day-Variabilität). Die Reproduzierbarkeit der Methode wurde ebenfalls mit Busulfan-Lösungen nach Verdünnung des Busulfan-Standards auf die theoretischen Konzentrationen 0,03 mg/mL und 0,1 mg/mL überprüft. An 10 verschiedenen Tagen wurden jeweils die Busulfan-Proben der beiden Konzentrationen frisch herge-

stellt, parallel aufbereitet und jeweils dreifach analysiert (Inter-day-Variabilität).

Die Intra- und Inter-day-Variabilität, berechnet aus dem arithmetischen Mittelwert von jeweils 10 Proben als relative Standardabweichung, lag für die Konzentrationen 0,03 mg/mL und 0,1 mg/mL jeweils unter 5% (Tabelle 2).

## 2.2. Stabilitätsuntersuchungen

Der Gehalt der Busulfan-Stammlösung betrug auch nach 28 Tagen Lagerung über 94% des an Tag 0, unmittelbar nach Überführung der Stammlösung aus der Glasampulle in die Einmalspritze, gemessenen Gehalts (Tabelle 3). Aus methodischen Problemen resultierende extrem abweichende Untersuchungsergebnisse gingen nicht in die Auswertung ein. Auch unter Berücksichtigung der Standardabweichung der Methode kann die Stammlösung als physikalisch-chemisch stabil über 28 Tage bezeichnet werden. Eine Veränderung des UV-Spektrums der Lösung wurde über den Untersuchungszeitraum nicht beobachtet. Bei visueller Prüfung mit bloßem Auge wurden keine farblichen Veränderungen und keine Auskristallisationen der Lösungen festgestellt. Somit erwies sich das Busulfan-Infusionslösungskonzentrat, aufgezogen in B Braun Injekt® Einmalspritzen und lichtgeschützt bei 2–8 °C und ohne Lichtschutz bei 18–20 °C gelagert als über mindestens 28 Tage stabil.

**Tabelle 3: Chemische Stabilität der Busulfan-Stammlösung, aufgezogen in B Braun Injekt® Einmalspritzen und Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen**

Lagerungsbedingungen	Initiale Busulfan-Konzentrationen [mg/mL] ± rel. SD [%]		[%] des initialen Busulfan-Gehaltes ± rel. Standardabweichung [%] als Mittelwert <sup>a</sup> aus 3 Bestimmungen von jeweils mind. 1 Probe aus 3 oder 6 <sup>†</sup> Untersuchungslösungen (n ≥ 9)									
	nominell	gemessen	Tag 1 n	Tag 3 n	Tag 7 n	Tag 14 n	Tag 21 n	Tag 25 n	Tag 28 n			
2–8 °C	6	6,033 ± 2,5*	18	100,1 ± 2,5	12	97,7 ± 3,4	30 <sup>‡</sup>	96,0 ± 4,1	30 <sup>‡</sup>	100,1 ± 5,5	21	96,2 ± 1,8
18–20 °C	6	5,983 ± 2,0**	18	96,5 ± 3,2	24	99,1 ± 2,0	21	98,4 ± 2,3	21	97,1 ± 3,7	15	99,9 ± 2,0 <sup>z</sup>

<sup>a</sup> Initialer Busulfan-Gehalt zum Zeitpunkt  $t_0$  wurde als 100% definiert

\* 3 Bestimmungen von jeweils 1 Probe aus 6 Untersuchungslösungen

\*\* 3 Bestimmungen von jeweils 2 Proben aus 3 Untersuchungslösungen (n = 18)

<sup>†</sup> Für 3 von 7 Proben nur 1 Bestimmung

<sup>‡</sup> 6 Untersuchungslösungen

<sup>z</sup> Messung am Tag 31 aus technischen Gründen

n = Anzahl ausgewerteter Bestimmungen

### 3. Diskussion

Die etablierte HPLC-Methode mit UV-Detektion erwies sich als geeignet zur quantitativen Busulfan-Bestimmung des unverdünnten Infusionslösungskonzentrats. Zur Durchführung der Bestimmung bedarf es mit Routine 1,5 Stunden für die zeitgleiche Aufbereitung von sechs Proben. Die Nutzung eines internen Standards ist unumgänglich, da z. B. Probenverluste beim Abnehmen der lipophilen Phase nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion auftreten können. Auf Überprüfung der Eignung der Methode durch forcierte Zersetzung wurde verzichtet, da die Methode von Xu et al. entsprechend geprüft und zusätzlich der interne Standard nach der Methode von Bleyzac et al. mitgeführt wurde (Bleyzac et al. 2000; Xu et al. 1996).

Das Fertigarzneimittel Busilvex<sup>®</sup> enthält zur Lösung des sehr schwer wasserlöslichen und hydrolyseempfindlichen Busulfans das für die parenterale Gabe geeignete, wasserfreie DMA als Lösungsmittel und als Lösungsvermittler PEG 400 (Bhagwatwar et al. 1996). Busulfan hydrolysiert im wässrigen Milieu über das als Zwischenprodukt entstehende monofunktionelle Alkylans 4-Methansulfonyloxybutanol zu Tetrahydrofuran und Methansulfonsäure (Feit und Rastrup-Andersen 1973). Auf Grund der sehr kurzen Halbwertszeit von 12 min bei 37 °C kann dem Zwischenprodukt keine zytotoxische Wirkung zugeschrieben werden (Feit und Rastrup-Andersen 1973). Hydrolyseprodukte von Busulfan im wässrigen Milieu können mangels Derivatisierung mit DEDC bzw. kurzer Halbwertszeit des Zwischenproduktes mit der etablierten HPLC-Methode nicht detektiert werden (Xu et al. 1996). Der Peak bei ca. 2,8 min ist dem Derivatisierungsreagenz Diethyldithiocarbamat zuzuordnen (Xu et al. 1996). Die kleinen zusätzlichen Peaks in den HPLC-Chromatogrammen sind wahrscheinlich auf das Derivatisierungsreagenz und Nebenprodukte zurückzuführen (Abb.). Andere Zersetzungsreaktionen als die Hydrolyse sind offenbar nicht relevant, da auch nach Ph. Eur. die Gehaltsbestimmung von Busulfansubstanz mittels der Hydrolysereaktion erfolgt. Der Zutritt von Sauerstoff beim Aufziehen des Infusionslösungskonzentrats fördert den Abbau von Busulfan nicht und Hydrolyse findet durch unbeabsichtigt aus der Umgebungsluft eingedrungenes Wasser, wenn überhaupt, nur minimal statt. Ohnehin ist bekannt, dass die Hydrolyse von Busulfan in wässrigem Milieu stark konzentrations- und temperaturabhängig verläuft (Partin et al. 1988; Xu et al. 1996). Es sind hier keine fördernden Bedingungen gegeben.

Da keine unterschiedliche Stabilität des Busulfans bei Kühl- und Raumtemperatur-Lagerung gefunden wurde, sind eine versehentliche Lagerung von Anbrüchen in den B Braun Injekt<sup>®</sup> Einmalspritzen bei Raumtemperatur und eine Unterbrechung der Kühlung für den Transport des Fertigarzneimittels bei mitteleuropäischen Temperaturen unproblematisch.

Über die Stabilitätsfrage hinaus stellt sich nach Überführung des Busulfex<sup>™</sup> bzw. Busilvex<sup>®</sup> Infusionslösungskonzentrats aus der Glasampulle in die Einmalspritze die Frage der Kompatibilität von DMA und PEG 400 mit dem Spritzenmaterial. Interaktionen von DMA mit Plastikmaterialien wie Polyvinylchlorid (PVC) und Gummi wurden beschrieben. DMA kann den Weichmacher DEHP (Di-(2-ethylhexyl)phthalat) aus PVC-Beuteln herauslösen und Gummistopfen angreifen (Vishnuvajjala und Cradock 1984, Gödecke). Es wurde von uns bereits früher gezeigt, dass die Injekt<sup>®</sup> Einmalspritzen der Firma B. Braun Melsungen AG für die Lagerung DMA-haltiger Lösungen geeignet sind (Krämer und Maas 1999). Der Spritzen-Zylinder der

zweiteiligen Spritzen besteht aus Polypropylen und 0,1% Ölsäureamid als inneres Gleitmittel, die Spritzen-Kolbenstange aus Polyethylen, welche mit Masterbatch grün eingefärbt ist (B. Braun 1996). Die Busulfan-Stammlösung ist in BiBraun Injekt® Einmalspritzen vorzugsweise bei Kühltemperatur aufzubewahren, da Wärme das Herauslösen von Ölsäureamid durch das in hoher Konzentration enthaltene Lösungsmittel DMA fördert (Krämer und Maas 1999). Es sind allerdings weder toxische Eigenschaften von Ölsäureamid in der Literatur beschrieben noch sind Expositionsgrenzen für Ölsäureamid beim Menschen definiert. Die BiBraun Injekt® Einmalspritzen entsprechen den Anforderungen der Klasse VI Biological Reactivity Tests *in vivo* der United States Pharmacopeia (USP 23, B. Braun 1996). Den Testvorgaben entsprechende Untersuchungen mit PEG 400 haben gezeigt, dass die BiBraun Injekt® Einmalspritzen zur Lagerung von PEG 400-haltigen Lösungen geeignet sind.

Unter Nutzung der nachgewiesenen mikrobiologischen und physikalisch-chemischen 28-tägigen Stabilität des Busulfan-Infusionslösungskonzentrats können bei zentraler Zytostatikaherstellung in der Apotheke die Kosten für parenterale Busulfantherapien erheblich reduziert werden. Pro nicht zu verwerfendem Milliliter Busulfan-Infusionslösungskonzentrat ergibt sich eine Kosteneinsparung von rund 36 € (Ampulle ca. 362 €).

Die Stabilität applikationsfertiger Busulfan-Infusionslösungen mit 0,9% Natriumchloridlösung als Trägerlösung mit der in der Fachinformation vorgeschriebenen Konzentration von 0,5 mg/mL wird mit 12 h bei Kühlschranktemperatur und anschließend 3 h bei Raumtemperatur, die als Aufwärmzeit und für die zweistündige Applikation genutzt werden sollen, angegeben (Fachinformation Busilvex® 2003). Über eigene Untersuchungen zur physikalisch-chemischen Stabilität der applikationsfertigen Infusionslösungen berichten wir an anderer Stelle.

## 4. Experimenteller Teil

### 4.1. Materialien

Die Bestimmungen wurden mit Busulfex™ (Orphan Medical, USA, Ch.-B.: 200148) durchgeführt. Als externer Standard diente Busulfan von Fährhaus (Artikel-Nr.: 210690, Ch.-B.: 0039160001). Der interne Standard 1,6-Bis-methansulfonyloxy-hexan wurde von Sugaris GmbH (Münster, Deutschland) und das Derivatisierungsreagenz Diethyldithiocarbamat-Natrium von Sigma-Aldrich Supelco (Artikel-Nr.: D3506) bezogen. Als weitere Reagenzien wurden eingesetzt: Acetonitril HPLC grade von Promochem (Artikel-Nr.: 9128), Ethylacetat (Artikel-Nr.: 1.00868.1000) und Tetrahydrofuran (Artikel-Nr.: 1081011000) jeweils HPLC grade von VWR und Wasser HPLC grade von J. T. Baker (Artikel-Nr.: 4218). Die Injekt® Einmalspritzen (Nennvolumen 10 mL, Artikel-Nr.: 4606108) und Combi-Stopper (Artikel-Nr.: 4495101) wurden von B. Braun Melsungen AG (Deutschland) bezogen.

### 4.2. Chromatographische Bedingungen

Die Messungen erfolgten mit einer Waters HPLC-Anlage bestehend aus einer 510 HPLC-Pumpe, einem 717 plus Autosampler und einem Photodiodearray Detektor 996. Wellenlänge: 280 nm, Fließmittel: Acetonitril/Tetrahydrofuran/Wasser, 65:5:30 (V/V/V), Flussrate: 1,2 mL/min, Säule: Hypersil ODS C<sub>18</sub>, 3 µm, 4,6 × 10 cm (MZ Analysentechnik, Mainz, Deutschland), Injektionsvolumen: 20 µL, Temperatur im Autosampler: 10 °C. Die Auswertung erfolgte durch automatische Peakflächenintegration.

### 4.3. Probenaufbereitung

Proben des Busulfex™ Infusionslösungskonzentrats der Konzentration 6 mg/mL und Busulfan 1,0 mg/mL in Acetonitril als externer Standard wurden mit 0,9% Natriumchloridlösung auf die theoretische Konzentration von 0,1 mg/mL verdünnt. Zu 500 µL der verdünnten Busulfan-Proben wurden 30 µL der 1,6-Bis-methansulfonyloxy-hexan-Lösung (interner Standard, ISD, 1,0 mg/mL in Acetonitril) hinzugefügt und 10 s gevortext. Zur Derivatisierung des Busulfans und des internen Standards wurden 2 mL DEDC-Lösung (Diethyldithiocarbamat-Natrium 100 mg/mL in Wasser) hin-

zugefügt, 30 s gevortext und 10 Minuten geschüttelt. Die Reaktionsprodukte wurden mit 2 mL Ethylacetat extrahiert. Die Mischung wurde 1 min gevortext und bei 2000 g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. 1 mL der Ethylacetatschicht wurde abgenommen und unter Stickstoff bei 40 °C eingedampft. Der Rückstand wurde mit 1 mL der mobilen Phase rekonstituiert.

### 4.4. Stabilitätsuntersuchungen

Das Busulfan-Infusionslösungskonzentrat wurde, aufgezogen in jeweils 3 BiBraun Injekt® Einmalspritzen des Nennvolumens 10 mL und verschlossen mit Combi-Stoppern (BiBraun), jeweils über 28 Tage bei 18–20 °C und Tages- bzw. Fluoreszenzlicht sowie bei 2–8 °C unter Lichtschutz gelagert. Es wurden pro Spritze mind. 1 Probe an den Tagen 0 (Anbruch der Ampullen), 1, 3, 7, 14, 21, 25, 28 bzw. 31 (aus technischen Gründen) entnommen, aufbereitet und jeweils dreifach chromatographiert. Zusätzlich wurden die in BiBraun Injekt® Einmalspritzen aufgezogenen Busulfan-Stammlösungen über den gesamten Untersuchungszeitraum visuell mit bloßem Auge auf Veränderungen geprüft. Stabilität wird definiert als Gehalt von 90–105% des Nenngehalts sowie als Freiheit von Auskristallisationen in den Prüflösungen.

Anerkennung: Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise durch das Amgen-Stipendium zur Förderung der Klinischen Pharmazie unterstützt.

## Literatur

- Abdel-Rehim M, Hassan Z, Blomberg L, Hassan M (2003) On-line derivatization utilizing solid-phase microextraction (SPME) for determination of busulfan in plasma using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Ther Drug Monit* 25: 400–406.
- B. Braun Melsungen AG (1996) Persönliche Mitteilung.
- Bhagwatwar HP, Phadungpojina S, Chow DS-L, Andersson BS (1996) Formulation and stability of busulfan for intravenous administration in high-dose chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 37: 401–408.
- Blanz J, Rosenfeld C, Proksch B, Ehninger G (1990) Quantification of busulfan in plasma by high-performance liquid chromatography using postcolumn photolysis. *J Chromatogr* 532: 429–437.
- Bleyzac N, Barou P, Aulagner G (2000) Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for busulfan assay in plasma. *J Chromatogr B* 742: 427–432.
- Bleyzac N, Souillet G, Magron P, Janoly A, Martin P, Bertrand Y, Galambun C, Dai Q, Maire P, Jelliffe RW, Aulagner G (2001) Improved clinical outcome of paediatric bone marrow recipients using a test dose and Bayesian pharmacokinetic individualization of busulfan dosage regimens. *Bone Marrow Transplant* 28: 743–751.
- Bolinger AM, Zangwill AB, Slatery JT, Risler LJ, Sultan DH, Glidden DV, Norstad D, Cowan MJ (2001) Target dose adjustment of busulfan in pediatric patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28: 1013–1018.
- Chen T-L, Grochow LB, Hurowitz LA, Brundrett RB (1988) Determination of busulfan in human plasma by gas chromatography with electron-capture detection. *J Chromatogr* 425: 303–309.
- Chow DS-L, Bhagwatwar HP, Phadungpojina S, Andersson BS (1997) Stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay of busulfan in aqueous and plasma samples. *J Chromatogr B* 704: 277–288.
- Deeg HJ, Schuler US, Shulman H, Ehrsam M, Renner U, Yu C, Storb R, Ehninger G (1999) Myeloablation by intravenous busulfan and hematopoietic reconstitution with autologous marrow in a canine model. *Biol Blood Marrow Transplant* 5: 316–321.
- Dix SP, Wingard JR, Mullins RE, Jerkunica I, Davidson TG, Gilmore CE, York RC, Lin LS, Devine SM, Geller RB, Heffner LT, Hillier CD, Holland HK, Winton EF, Saral R (1996) Association of busulfan area under the curve with veno-occlusive disease following BMT. *Bone Marrow Transplant* 17: 225–230.
- dos Reis EO, Vianna-Jorge R, Suarez-Kurtz G, da Silva Lima EL, de Almeida Azevedo D (2005) Development of a rapid and specific assay for detection of busulfan in human plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19: 1666–1674.
- Ehninger G, Schuler U, Renner U, Ehrsam M, Zeller KP, Blanz J, Storb R, Deeg HJ (1995) Use of a water-soluble busulfan formulation – Pharmacokinetic studies in a canine model. *Blood* 85: 3247–3249.
- Ehrsson H, Hassan M (1983) Determination of busulfan in plasma by GC-MS with selected-ion monitoring. *J Pharm Sci* 72: 1203–1205.
- Embree L, Burns RB, Heggie JR, Phillips GL, Reece DE, Spinelli JJ, Hartley DO, Hudon NJ, Goldie JH (1993) Gas-chromatographic analysis of busulfan for therapeutic drug monitoring. *Cancer Chemother Pharmacol* 32: 137–142.
- Fachinformation (2003) Busilvex®. Pierre Fabre Pharma.
- Feit PW, Rastrup-Andersen N (1973) 4-Methanesulfonyloxybutanol: Hydrolysis of busulfan. *J Pharm Sci* 62: 1007–1008.
- Fernandez HF, Tran HT, Albrecht F, Lennon S, Caldera H, Goodman MS (2002) Evaluation of safety and pharmacokinetics of administering intra-



- venous busulfan in a twice-daily or daily schedule to patients with advanced hematologic malignant disease undergoing stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 8: 486–492.
- Funakoshi K-i, Yamashita K, Chao W-f, Yamaguchi M, Yashiki T (1994) High-performance liquid chromatographic determination of busulfan in human serum with on-line derivatization, column switching and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B* 660: 200–204.
- Gödecke. Amsidyl® Wissenschaftliches Prospekt. S. 42. Gödecke AG, 10562 Berlin.
- Grochow LB (1993) Busulfan disposition: the role of therapeutic monitoring in bone marrow transplantation induction regimens. *Semin Oncol* 20 (Suppl 4): 18–25.
- Grochow LB, Jones RJ, Brundrett RB, Braine HG, Chen T-L, Saral R, Santos GW, Colvin OM (1989) Pharmacokinetics of busulfan: correlation with veno-occlusive disease in patients undergoing bone marrow transplantation. *Cancer Chemother Pharmacol* 25: 55–61.
- Hassan M, Ehrsson H (1983) Gas chromatographic determination of busulfan in plasma with electron-capture detection. *J Chromatogr* 277: 374–380.
- Hassan M, Hassan Z, Nilsson C, Rehim MA, Kumlien S, Elfsson B, Kallber N (1998) Pharmacokinetics and distribution of liposomal busulfan in the rat: a new formulation for intravenous administration. *Cancer Chemother Pharmacol* 42: 471–478.
- Hassan M, Nilsson C, Hassan Z, Gungor T, Aschan J, Winiarski J, Hentschke P, Ringdén O, Eber S, Seger R, Ljungman P (2002) A phase II trial of liposomal busulfan as an intravenous myeloablative agent prior to stem cell transplantation: 500 mg/m<sup>2</sup> as a optimal total dose for conditioning. *Bone Marrow Transplant* 30: 833–841.
- Hassan Z, Ljungman P, Ringdén O, Winiarski J, Nilsson C, Aschan J, Rosengren Whitley H, Hassan M (2001) Pharmacokinetics of liposomal busulfan in man. *Bone Marrow Transplant* 27: 479–485.
- Heggie JR, Wu M, Burns RB, Ng CS, Fung HC, Knight G, Barnett MJ, Spinelli JJ, Embree L (1997) Validation of a high-performance liquid chromatographic assay method for pharmacokinetic evaluation of busulfan. *J Chromatogr B* 692: 437–444.
- Henner WD, Furlong EA, Flaherty MD, Shea TC (1987) Measurement of busulfan in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 416: 426–432.
- Jenke A, Renner U, Schuler US, Wauer S, Leopold T, Schleyer E, Ehninger G (2004) Improved assay for determination of busulfan by liquid chromatography using postcolumn photolysis. *J Chromatogr B* 805: 147–153.
- Krämer I, Maas B (1999) Compatibility of amsacrine (Amsidyl®) concentrate for infusion with polypropylene syringes. *Pharmazie* 54: 538–541.
- Lai W-K, Pang C-P, Law L-K, Wong R, Li C-K, Yuen PM-P (1998) Routine analysis of plasma busulfan by gas chromatography-mass fragmentography. *Clin Chem* 44: 2506–2510.
- Ljungman P, Hassan M, Békássy AN, Ringdén O, Öberg G (1997) High busulfan concentrations are associated with increased transplant-related mortality in allogeneic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 20: 909–913.
- MacKichan JJ, Bechtel TP (1990) Quantification of busulfan in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 532: 424–428.
- Mamlouk K, Saracino G, Berryman RB, Fay JW, Pineiro LA, Vance III EA, White M, Sandler I, Agura ED (2005) Modification of the Bu/Cy myeloablative regimen using daily parenteral busulfan: reduced toxicity without the need for pharmacokinetic monitoring. *Bone Marrow Transplant* 35: 747–754.
- McCune JS, Gooley T, Gibbs JP, Sanders JE, Petersdorf EW, Appelbaum FR, Anasetti C, Risler L, Sultan D, Slattery JT (2002) Busulfan concentration and graft rejection in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 30: 167–173.
- Mürdter TE, Coller J, Claviez A, Schönberger F, Hofmann U, Dreger P, Schwab M (2001) Sensitive and rapid quantification of busulfan in small plasma volumes by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Clin Chem* 47: 1437–1442.
- Olavarria E, Hassan M, Eades A, Nilsson C, Timms A, Matthews J, Craddock C, Kanfer E, Apperley J, Goldman J (2000) A phase I/II study of multiple-dose intravenous busulfan as myeloablation prior to stem cell transplantation. *Leukemia* 14: 1954–1959.
- Partin JM, Poust RI, Cox FO (1988) Stability of busulfan in suspension. *Pharm Res* 5: S-74.
- Peris J-E, Latorre J-A, Castel V, Verdeguer A, Esteve S, Torres-Molina F (1999) Determination of busulfan in human plasma using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr B* 730: 33–40.
- Pichini S, Altieri I, Bacosi A, Di Carlo S, Zuccaro P (1992) High-performance liquid chromatographic-mass spectrometric assay of busulfan in serum and cerebrospinal fluid. *J Chromatogr* 581: 143–146.
- Qermin M-H, Duval M, Litalien C, Vilmer E, Aigrain EJ (2001) Quantification of busulfan in plasma by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. Application to pharmacokinetic studies in children. *J Chromatogr B* 763: 61–69.
- Qermin M-H, Poonkuzhali B, Médard Y, Dennison D, Srivastava A, Krishnamoorthy R, Chandy M, Jacqz-Aigrain E (1999) High-performance liquid chromatographic method for quantification of busulfan in plasma after derivatization by tetrafluorothiophenol. *J Chromatogr B* 721: 147–152.
- Qermin M-H, Poonkuzhali B, Montes C, Krishnamoorthy R, Dennison D, Srivastava A, Vilmer E, Chandy M, Jacqz-Aigrain E (1998) Quantification of busulfan in plasma by gas chromatography-mass spectrometry following derivatization with tetrafluorothiophenol. *J Chromatogr B* 709: 47–56.
- Rifai N, Sakamoto M, Lafi M, Guinan E (1997) Measurement of plasma busulfan concentration by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Ther Drug Monit* 19: 169–174.
- Santos GW, Tutschka PJ, Brookmeyer R, Saral R, Beschoner WE, Bias WB, Braine HG, Burns WH, Elfenbein GJ, Kaizer H, Mellits D, Sensenbrenner LL, Stuart RK, Yeager AM (1983) Marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N Engl J Med* 309: 1347–1353.
- Schuler US, Ehrsam M, Schneider A, Schmidt H, Deeg J, Ehninger G (1998) Pharmacokinetics of intravenous busulfan and evaluation of the bioavailability of the oral formulation in conditioning for haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 22: 241–244.
- Slattery JT, Clift RA, Buckner CD, Radich J, Storer B, Bensinger WI, Soll E, Anasetti C, Bowden R, Bryant E, Chauncey T, Deeg HJ, Doney KC, Flowers M, Gooley T, Handen JA, Martin PJ, McDonald GB, Nash R, Petersdorf EW, Sanders JE, Schoch G, Stewart P, Storb R, Sullivan KM, Thomas ED, Witherspoon RP, Appelbaum FR (1997) Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: The influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood* 89: 3055–3060.
- Slattery JT, Sanders JE, Buckner CD, Schaffer RL, Lambert KW, Langer FP, Anasetti C, Bensinger WI, Fisher LD, Appelbaum FR, Hansen JA (1995) Graft-rejection and toxicity following bone marrow transplantation in relation to busulfan pharmacokinetics. *Bone Marrow Transplant* 16: 31–42.
- Tutschka PJ, Copelan EA, Klein JP (1987) Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood* 70: 1382–1388.
- United States Pharmacopeial Convention: (1995) (88) Biological Reactivity Tests, In Vivo. In: *United States Pharmacopeia*, 23<sup>rd</sup> rev./national formulary, 18<sup>th</sup> ed., Rockville MD, p. 1699.
- Vassal G, Re M, Gouyette A (1988) Gas chromatographic-mass spectrometric assay for busulfan in biological fluids using a deuterated internal standard. *J Chromatogr* 428: 357–361.
- Vishnuvajjala BR, Craddock JC (1984) Compatibility of plastic infusion devices with diluted *N*-methylformamide and *N,N*-dimethylacetamide. *Am J Hosp Pharm* 41: 1160–1163.
- Warwick GP (1963) The mechanism of action of alkylating agents. *Cancer Res* 23: 1315–1333.
- Xu QA, Zhang Y-P, Trissel LA (1996) Stability of busulfan injection admixtures in 5% dextrose injection and 0.9% sodium chloride injection. *J Oncol Pharm Practice* 2: 101–105.