Einfluß verschiedener Variablen auf die In-vitro-Freisetzung eines Theophyllin-Retardpräparates

Walter S. Fuchs[a], Ralf Jakobs[b], Petra Grunenberg[a], Gerd Weiß[a], Thomas Profitlich[a], Alexander von Nieciecki[a], Fritz-Heini Klemm[a], Arnim Laicher[a] und Fritz Stanislaus[a]

Klinge Pharma GmbH[a], München, und Klinikum der Stadt Ludwigshafen[b], Medizinische Klinik C (Direktor: Prof. Dr. J. F. Riemann), Ludwigshafen

Zusammenfassung

Neben ihrer unbestrittenen Bedeutung für die Beurteilung von Qualität und Stabilität werden In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen auch für eine Prognose der In-vivo-Situationen herangezogen. Aus diesem Grund wurden die bekannten In-vitro-Variablen pH-Wert, Osmolarität, Rührgeschwindigkeit und Zusatz von Tensiden für ein Theophyllin (CAS 58-55-9)-Retardpräparat (Bronchoretard®) untersucht. Darüber hinaus wurde durch Wechsel des pH-Wertes und den Zusatz von Humangalle zu bestimmten Zeitpunkten ein der physiologischen Situation des Gastro-Intestinal-Traktes näher angepaßtes Modell gewählt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die In-vitro-Freisetzung des Retardpräparates hinsichtlich der Parameter pH-Wert, Osmolarität und Rührgeschwindigkeit innerhalb der in vivo verifizierten Freisetzungsgrenzen nur geringfügige Unterschiede aufwiesen. Nach Zusatz von Natriumlaurylsulfat waren Unterschiede im Freisetzungsverhalten festzustellen, nicht aber beim Zusatz der unter physiologischen Bedingungen oberflächenaktiv wirkenden Gallenflüssigkeit.

Durch den Vergleich mit In-vivo-Daten wurde belegt, daß der Zusatz synthetischer Tenside zum Freisetzungsmedium keine relevanten Aussagen über das Pharmakokinetikprofil der Arzneiform gewährleistet. Nur der physiologischen Situation angepaßte Modelle erlauben aussagekräftige Prognosen für die In-vivo-Situation. Die Bedeutung von In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen bleibt daher insbesondere auf die Entwicklung von Arzneiformen und die Beurteilung von Qualität und Stabilität von Arzneimitteln beschränkt. Für die Beurteilung des In-vivo-Verhaltens müssen die In-vitro-Ergebnisse durch Pharmakokinetikstudien belegt werden.

Summary

Influence of Different Variables on the in vitro Dissolution of a Sustained Release Theophylline Dosage Form

In vitro dissolution studies are valuable tools to judge quality and stability of sustained release dosage forms and are often utilised to predict the in vivo performance. For this reason, in vitro dissolution experiments with varying pH, osmolarity, rotation speed, and with addition of surfactants were performed with a sustained release theophylline (CAS 58-55-9) dosage form (Bronchoretard®). In order to mimic the physiological situation of the gastrointestinal tract more closely, the pH of the dissolution media was changed and human bile was added at different time points.

The results obtained show that the in vitro dissolution of the dosage form differs only slightly for the parameters pH, osmolarity and stirring speed and always lies within in vivo verified dissolution limits. However, the addition of sodium dodecyl sulphate to the dissolution medium markedly altered the dissolution rate whereas addition of the physiologically surface active human bile did not change the dissolution rate.

A comparison with in vivo results indicated, that only the physiologically adapted model guarantees reliable results whereas the addition of synthetic surfactants cannot allow for the prediction of bile or food effects. The meaning of in vitro dissolution tests thus is limited to development studies of dosage forms and to routine quality and stability control testing. For judging the in vivo characteristics in vitro studies have only limited value and have to be verified by pharmacokinetic studies.

Key words Antiasthmatics · Bronchoretard® · CAS 58-55-9 · Theophylline, in vitro dissolution, sustained release

Arzneim.-Forsch./Drug Res. **48 (I),** 552–556 (1998)

1. Einleitung

In-vitro-Untersuchungen von Arzneiformen sind seit 1925 wichtige Instrumente der pharmazeutischen Technologie und werden für vielfältige Fragestellungen eingesetzt [1]. Unbestritten ist ihre Bedeutung bei der Entwicklung von Arzneiformen, bei der Validierung von Prozeßparametern sowie für die Beurteilung von Qualität und Stabilität von Arzneiformen [2].

Darüber hinaus wurde bei Theophyllin (CAS 58-55-9) 1950 als erster Substanz erkannt, daß In-vitro-Freisetzungsprofile mit dem Verhalten im menschlichen Organismus in Verbindung stehen können [3]. Die Aussagekraft von In-vitro-Untersuchungen bezüglich der Erforschung und Interpretation von Wirksamkeit und Sicherheit in vivo bleibt allerdings bis heute umstritten. Einerseits werden In-vitro-Untersuchungen als effektive Mittel zur Beurteilung des In-vivo-Verhaltens bestimmter retardierter Arzneiformen eingestuft [4, 5]. Dem steht die Auffassung gegenüber, daß In-vitro-Untersuchungen zwar wertvolle Hinweise über den Freisetzungsmechanismus der Arzneiform geben, aber nur unzureichende Informationen über die Beurteilung der In-vivo-Situation wie z. B. Nahrungsmitteleinflüsse liefern [6, 7].

Limitiert wird die Aussagekraft derartiger In-vitro-Untersuchungen prinzipiell dadurch, daß einfach aufgebaute In-vitro-Untersuchungen die physiologischen Vorgänge im Gastrointestinaltrakt nicht oder nur grob vereinfacht wiedergeben. Aus diesem Grund wurden im Lauf der letzten Jahre verschiedene Testmodelle entwickelt, die besser an die In-vivo-Situation adaptiert sind. So wurden standardisierte Flüssignahrung [8], Milch [9], verschiedene pH-Gradienten und Tenside [10] sowie die Vorbehandlung der Arzneiform mit Fettsäuren [11] eingesetzt, um die In-vitro-Modelle besser an die physiologische Situation anzupassen. All diese Verbesserungen waren dennoch nicht in der Lage, mögliche Nahrungsmitteleffekte in vivo vorherzusagen [12].

Aufgrund dieser unbefriedigenden Situation wird in dieser Arbeit von einer Weiterentwicklung der In-vitro-Systeme unter Einsatz von nativer Humangalle berichtet. Entsprechend dem gastrointestinalen pH-Gradienten wurde die untersuchte Arzneiform von Theophyllin[1)] die ersten beiden Stunden einem pH von 1,2 und im Anschluß daran einem pH von 6,8 ausgesetzt. Analog einer physiologischen Gallenkontraktion verbunden mit der Ausschüttung von Gallensalzen in die basische Dünndarmflüssigkeit wurde dem Freisetzungsmedium Humangalle zu verschiedenen Zeitpunkten zugesetzt.

Die Gesamtheit der durchgeführten In-vitro-Untersuchungen wird schließlich in Zusammenhang mit den In-vivo-Daten des Prüfpräparates gebracht, um die Aussagekraft der verschiedenen In-vitro-Testsysteme zu beurteilen.

[1)] Bronchoretard®; Hersteller: Klinge Pharma GmbH, München.

2. Material und Methoden

2.1. In-vitro-Untersuchungen

Als Prüfmodell für das gesamte Untersuchungsprogramm wurde die Drehkörbchenapparatur nach DAB 10 eingesetzt. Versuchsbedingungen und verwendete Geräte sind in Tab. 1 aufgeführt, die Zusammensetzung der verwendeten Puffer zeigt Tab. 2. Eine detaillierte Beschreibung der eingesetzten Analytik bei Verwendung von Humangalle ist an anderer Stelle [13] publiziert. Die Freisetzungsprüfung erfolgte entweder über den gesamten Prüfzeitraum im gleichen Medium oder mit Medienwechsel nach 2 h von pH 1,2 zu pH 6,8 für den restlichen Untersuchungszeitraum. Zur Herstellung der Prüfmedien (Tab. 2) wurden KH_2PO_4 zur Pufferung und verschiedene Mengen NaCl zur Einstellung des osmotischen Drucks eingesetzt. Die Überprüfung des osmotischen Druckes erfolgte mit einem Halbmikro-Osmometer (Knauer GmbH, Berlin). Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit HCl bzw. NaOH mit einer Genauigkeit von ± 0,05 pH-Einheiten. Zur Variation der Oberflächenspannung wurde das anionische Tensid Natriumlaurylsulfat (SDS, Fluka AG, Neu-Ulm) verwendet. Die Wahl der Konzentration (0,1 %) folgte publizierten Empfehlungen [18]. Bei den In-vitro-Untersuchungen unter Verwendung von Humangalle wurde ein auf 0,1 mmol Gesamtgallensäure standardisiertes Volumen dem Freisetzungsmedium pH 6,8 nach 2, 4 und 6 h zugesetzt.

Tab. 1: Geräte und Versuchsbedingungen.

Gerät:	HP Automated Dissolution Testing System (HP8452A)
Volumen:	1000 ml
Temperatur:	37 °C (± 0,5 °C)
Umdrehungsgeschwindigkeit:	100 min^{-1} (± 1 min^{-1})
Probenzug:	nach 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7 h
Gehaltsbestimmung:	spektralphotometrisch bei 290 nm

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Freisetzungsmedien.

pH-Wert	Zusammensetzung (osmot. Druck)
1,2	+ 2 g NaCl/l (255 mosmol/kg)
3,5	0,05 molarer KH_2PO_4-Puffer + NaCl (280 mosmol/kg)
4,5	0,05 molarer KH_2PO_4-Puffer + NaCl (280 mosmol/kg)
6,8	0,05 molarer KH_2PO_4-Puffer + NaCl (280 mosmol/kg)

2.2. Gewinnung von Humangalle

Die Gewinnung von Humangalle erfolgte im Klinikum Ludwigshafen nach ausführlicher Aufklärung und Einwilligung der Patienten. Zum Abschluß einer endoskopisch-retrograden Cholangiopankreatographie (ERCP) wurde eine nasobiläre Sonde (Durchmesser 5 French) transpapillär in den Gallengang eingeführt und anschließend über die Nase ausgeleitet. Die über die Sonde abfließende Gallenflüssigkeit wurde in Standardbehältern aufgefangen und diese zwölfstündlich in einen kühl gelagerten (4 °C) Sammelbehälter entleert. Im Anschluß daran wurde die gewonnene Gallenflüssigkeit physikalisch-chemisch charakterisiert, wobei Volumen, pH-Wert, Oberflächenspannung, Osmolarität, Cholesteringehalt und die Konzentration an Gesamtgallensäuren nach [14] bestimmt wurden.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Humangalle

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv wurden 400–600 ml reine Gallenflüssigkeit mit einem pH-Wert von 6,5–7,0 und einer Osmolarität von 300–330 mosmol gewonnen. Die Oberflächenspannung betrug 30–40 mN/m. Die gewonnenen Gallenproben enthielten eine Gallensäurekonzentration von 1–10 mmol/l.

3.2. In-vitro-Freisetzung

Den Einfluß unterschiedlicher pH-Bedingungen, Osmolaritäten, Rührgeschwindigkeiten, Tensidzusatz (0,1 % SDS) und Humangalle auf die In-vitro-Freisetzung des untersuchten Theophyllin-Retardpräparates zeigen Abb. 1–5.

Änderungen des In-vitro-Freisetzungsprofiles bei unterschiedlichen pH-Werten wurden nicht beobachtet (Abb. 1). Ebenso blieben unterschiedliche Osmolarität (Abb. 2) und Rührgeschwindigkeiten (Abb. 3) ohne nennenswerte Auswirkungen auf die Retardierung der Wirkstofffreigabe.

Der Zusatz des Tensides SDS verändert die In-vitro-Freisetzungkurve hingegen drastisch (Abb. 4). Innerhalb von 1 h nach Freisetzungsbeginn waren über 80 % Theophyllin aus der Pellet-Arzneiform freigesetzt. Humangalle als physiologisches Tensid beeinflußt das Freisetzungsprofil hingegen nicht (Abb. 5). Hier wurden analoge Freisetzungskurven im Vergleich zur Kontrollmessung gefunden.

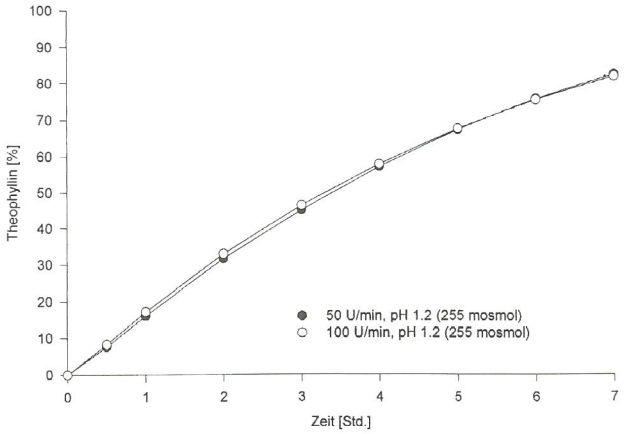

Abb. 3: In-vitro-Freisetzung bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten (Basket, 1000 ml, 37 °C).

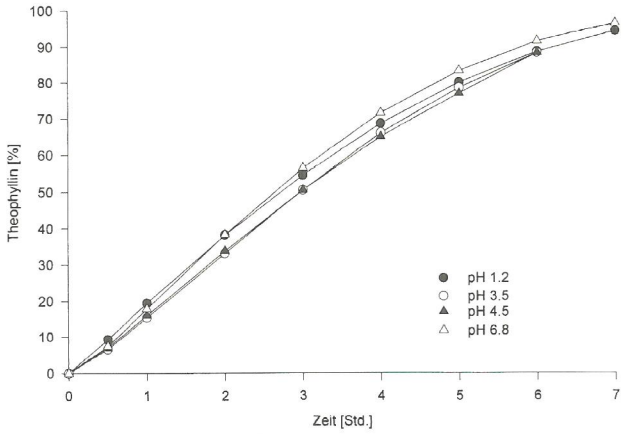

Abb. 1: In-vitro-Freisetzung bei unterschiedlichen pH-Bedingungen (Basket, 1000 ml, 37 °C, 100 U/min).

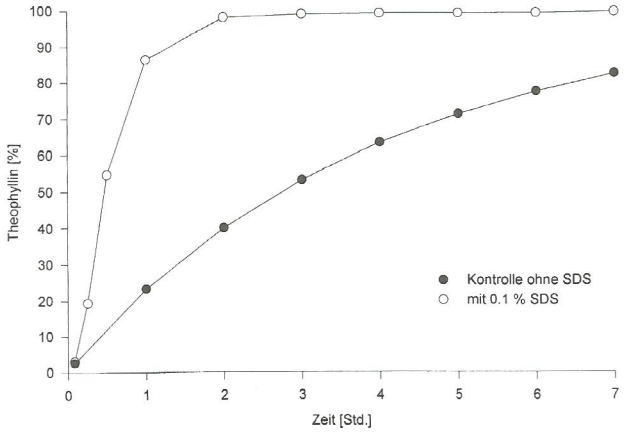

Abb. 4: In-vitro-Freisetzung mit und ohne Zusatz von Natriumlaurylsulfat (SDS) (Basket, 1000 ml, 37 °C, 100 U/min, pH 6,8, gepuffertes Medium).

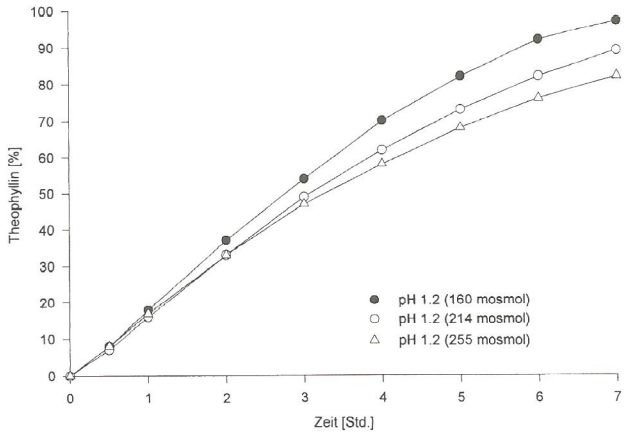

Abb. 2: In-vitro-Freisetzung bei unterschiedlicher Osmolarität (Basket, 1000 ml, 37 °C, 100 U/min).

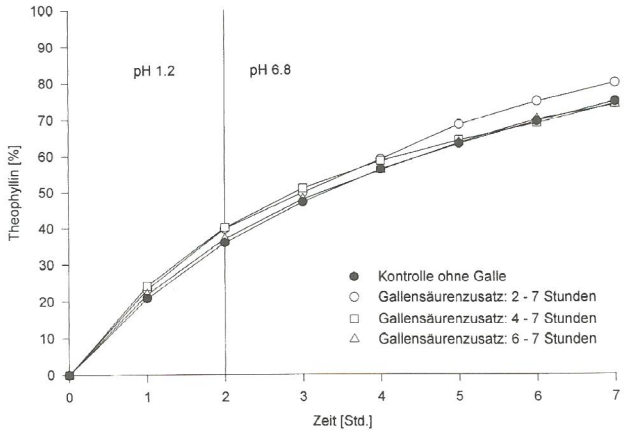

Abb. 5: In-vitro-Freisetzung mit und ohne Zusatz von Humangalle (0,1 mmol) (Basket, 1000 ml, 37 °C, 100 U/min).

4. Diskussion

Mit Ausnahme der Untersuchungen mit Humangalle folgen die durchgeführten In-vitro-Freisetzungsuntersuchungen den Empfehlungen für die In-vitro-Charakterisierung von Theophyllin-Retardpräparaten gemäß dem AAPS/FDA/FIP/USP Workshop, der Japanischen Guideline und dem ZL Expertentreffen [15].

Diesen Empfehlungen liegt die Modellvorstellung zugrunde, daß unterschiedliche In-vitro-Bedingungen je einer physiologischen Variable des Gastrointestinaltraktes zugeordnet werden können [2]. Unterschiedliche pH-Werte der Freisetzungsmedien entsprechen demzufolge dem pH-Profil des Magen-Darm-Traktes und erlauben somit den Rückschluß auf Unabhängigkeit der Wirkstofffreisetzung während der Magen-Darm-Passage und evtl. auch von Nahrungsmitteleffekten. Die unterschiedlichen In-vitro-Rührgeschwindigkeiten simulieren die Peristaltik und Scherkräfte des Magen-Darm-Traktes und sollen die mechanische Robustheit und Belastbarkeit der Arzneiform beurteilen helfen. Der Zusatz oberflächenaktiver Substanzen wie SDS soll die Ausschüttung von Gallensalzen in den Dünndarm simulieren, die in vivo nach fettreicher Kost durch das endogene Hormon Cholecystokinin ausgelöst wird. Aus unterschiedlichen In-vitro-Freisetzungsprofilen wird dann auf Bioverfügbarkeitsdifferenzen, auf Einflüsse durch Nahrungsmitteleinnahme („food effects") und nicht zuletzt auf unterschiedliche Sicherheitsprofile der getesteten Arzneiformen geschlossen [2]. In-vivo-Daten als Beleg der angeführten Thesen liegen allerdings nicht vor, ebenso fehlen auch allgemeinverbindliche Maßstäbe zur Interpretation derartiger In-vitro-Freisetzungsdaten.

Für das untersuchte Präparat lieferten die durchgeführten In-vitro-Untersuchungen mit den Variablen pH-Wert, Osmolarität, Rührgeschwindigkeit und Humangalle Freisetzungskurven innerhalb eines eng begrenzten Bereichs. In einer Bioäquivalenzstudie mit Chargen an der oberen, mittleren und unteren Grenze der Freigabespezifikation konnte zusätzlich ein Freisetzungsbereich definiert werden, der in vivo bioäquivalente Konzentrations-/Zeitprofile garantiert [16]. Eine beschleunigte In-vitro-Freisetzung wurde nur bei Zusatz hoher Konzentrationen von Natriumlaurylsulfat beobachtet.

Daten aus der Literatur belegen, daß SDS-Zusatz die In-vitro-Freisetzung von Retardformulierungen mit Polymethacrylaten als Diffusionsmembran in Abhängigkeit von der zugesetzten Konzentration sowohl verlangsamen als auch beschleunigen kann [17–19]. Für diesen Effekt wird eine ionische Wechselwirkung von Tensid und Polymer diskutiert, die eine verminderte Quellung des Polymers bzw. eine Zerstörung des Retardfilms zur Folge haben kann [17].

Daß dieser „artifizielle" In-vitro-Effekt mit dem Tensid Natriumlaurylsulfat keine Relevanz für die In-vivo-Situation besitzt, zeigt das physiologisch optimierte Modell mit dem Zusatz von Humangalle, bei dem keine Beeinflussung des In-vitro-Freisetzungsprofils beobachtet wurde. Darüber hinaus belegen In-vivo-Daten des untersuchten Präparates, daß die Ausschüttung von Gallenflüssigkeit keine relevanten Veränderungen des Pharmakokinetikprofils nach sich zieht [20]. An 12 gesunden Probanden wurde eine physiologische Gallenblasenkontraktion von circa 50 % durch ein Standardfrühstück und eine maximale Gallenblasenkontraktion von ca. 95 % durch die intramuskuläre Applikation von Cholecystokinin ausgelöst. Auch unter diesen Extrembedingungen und der damit verbundenen Ausschüttung der oberflächenaktiven Gallensalze in das Duodenum blieben die gemessenen Konzentrations-/Zeitprofile dieser Arzneiform unbeeinflußt (Abb. 6).

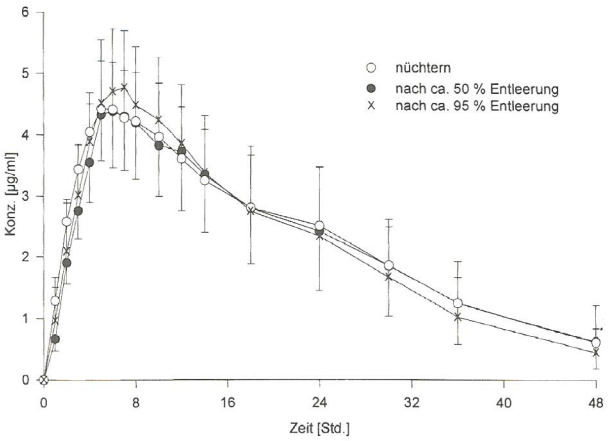

Abb. 6: Theophyllin-Konzentrationen (arith. Mittel ± SA, n = 12) im Plasma nach einmaliger Gabe von 500 mg Theophyllin nüchtern, bei ca. 50 % und ca. 95 % Entleerung der Gallenblase.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß das vereinfachte In-vitro-Modell mit dem Zusatz von Natriumlaurylsulfat irreführende Vorhersagen zur In-vivo-Situation liefert. Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell mit dem Zusatz von Humangalle liefert hingegen beim untersuchten Prüfpräparat analoge Ergebnisse zur In-vivo-Situation. Nur eine Annäherung des In-vitro-Freisetzungsmodells an die komplexen physiologischen Vorgänge des Gastrointestinalsystems ermöglicht somit im Falle des Tensidzusatzes eine aussagekräftige Information über das In-vivo-Verhalten der Arzneiform. Aufgrund des komplizierten Versuchsaufbaus, der umständlichen Gallegewinnung und der schwierigen Standardisierung bietet das vorgeschlagene In-vitro-Modell allerdings keinen befriedigenden Ersatz für die Beurteilung der Qualität einer Retardarzneiform in vivo. Nur durch entsprechende pharmakokinetische Untersuchungen können schlüssige Aussagen über Wirksamkeit und Sicherheit getroffen werden.

5. Literatur

[1] Skelly, J. P., Shiu, G. F., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. **18,** 121 (1993)

[2] Siewert, M., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. **18,** 7 (1993)

[3] Nelson, E., J. Am. Pharm. **46,** 606 (1957)

[4] Hunter, B. M., Ganderton, D., J. Pharm. Pharmacol. **25** (Suppl.), 71 (1973)

[5] Buckton, G., J. Biopharm. Sci. **2,** 81 (1991)

[6] Davies, S. S., J. Controlled Release **2,** 27 (1985)

[7] Dietrich, R., Brausse, R., Benedikt, G. et al., Arzneim.-Forsch./Drug Res. **38 (II),** 1229 (1988)
[8] Junginger, H. E., Verhoeven, J., Peschier, L. J. C., Acta Pharm. Technol. **36,** 150 (1990)
[9] Macheras, P., Koupparis, M., Antimisiaris, S., Int. J. Pharm. **36,** 73 (1987)
[10] Esbelin, B., J. Pharm. Sci. **80,** 991 (1991)
[11] Wearly, L., Karim, A., Pagone, F. et al., Drug Dev. Ind. Pharm. **14,** 13 (1988)
[12] Krämer, J., Lindauer, R. F., Siewert, M. et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. **18,** 37 (1993)
[13] Weiß, G., Klemm, F. H., Fuchs, W. S. et al., Arzneim.-Forsch./Drug Res. **48 (I),** 604 (1998)
[14] Mashige, F., Tanaka, N., Maki, A. et al., Clin. Chem. **27,** 1352 (1981)
[15] Siewert, M., in: Controlled Modified Release Products, H. Blume, U. Gudnert-Remy, H. Möller (eds.), pp. 155–190, Wiss. Verlagsges., Stuttgart (1991)
[16] von Nieciecki, A., Fuchs, W. S., Pabst, G. et al., Arzneim.-Forsch./Drug Res. **48 (I),** 580 (1998)
[17] Knop, K., Eur. J. Pharm. Biopharm. **42** (Suppl.) 39 (1996)
[18] Blume, H. (ed.), Bioäquivalenzbewertung retardierter Theophyllin-Fertigarzneimittel, pp. 51–63, Govi Verlag, Frankfurt/Main (1990)
[19] Feely, L. C., Davis, S. S., Int. J. Pharm. **41,** 83 (1988)
[20] Fuchs, W. S., von Nieciecki, A., Molz, K.-H. et al., Arzneim.-Forsch./Drug Res. **46 (II),** 1120 (1996)

Korrespondenz: Dr. Alexander von Nieciecki, Klinge Pharma GmbH, Abteilung Biopharmazie und Pharmakokinetik, Postf. 80 10 63, D-81610 München

Anforderungen an die Produktqualität von Theophyllin-Retardpräparaten

Walter S. Fuchs, Claudia Hens und Alexander von Nieciecki

Klinge Pharma GmbH, München

Zusammenfassung

Unter Berücksichtigung des engen therapeutischen Bereiches und der Pharmakologie von Theophyllin (CAS 58-55-9) kommt der galenischen Qualität von Retardpräparaten besondere Bedeutung zu. Als Qualitätskriterien zur Beurteilung der Produktqualität haben sich die folgenden klinisch-pharmakokinetischen Studien zur Überprüfung von Reproduzierbarkeit und Sicherheit einerseits und für ein optimales Konzentrationsprofil andererseits durchgesetzt: Bioäquivalenz von Charge zu Charge, Unabhängigkeit der Resorption von Nahrungsmitteleinflüssen, Unabhängigkeit der Resorption von Magen-pH-Wert und Gallensäuren, Pharmakokinetikprofil bei Einmalgabe und Zweimalgabe sowie Pharmakokinetik in Spezialkollektiven mit beschleunigter Clearance.

Nur die Handelspräparate, die allen Anforderungen genügen, können für sich in Anspruch nehmen, kalkulierbare, reproduzierbare und sichere Theophyllin-Konzentrationen sicherzustellen und individuelle Resorptionsunterschiede weitgehend auszugleichen. Mit derart qualitativ hochwertigen galenischen Formulierungen kann bei einer bronchodilatatorischen Therapie das Drug Monitoring auf ein Minimum beschränkt und bei einer antientzündlichen Therapie im niederen Konzentrationsbereich u. U. ganz auf Drug Monitoring verzichtet werden. Damit steht dem Arzt ein unkompliziertes und sicheres Antiasthmatikum zur Verfügung.