DENSITOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOTOSTABILITÄT VON MELOXICAM[#]

H.Bartsch*, A.Eiper, B.Göls und H.Kopelent-Frank

Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Wien
A-1090 Wien, Althanstraße 14

Densitometric Investigations on the Photostability of Meloxicam[#]

Summary

Photodegradation of meloxicam is studied placing special emphasis on the investigation of the correlation between the sample concentration and the stability. For quantitation a HPTLC assay was developed. The stability indicating capability of the assay is proved using a sample solution exposed to artificial irradiation from a xenon source, the peak of meloxicam was well separated from all degradation products. For quantitation external calibration is employed. Sample solutions of meloxicam of three different concentrations (2 mg ml⁻¹; 250 µg ml⁻¹; 40 µg ml⁻¹) are subjected to simulated sunlight and tested for stability.

Keywords: meloxicam, HPTLC, densitometry, photostability

Einleitung

Meloxicam ist ein nicht-steroidales Antirheumatikum der Oxicamklasse mit spezifischer COX-2-inhibitorischer Aktivität. Die Substanz erbrachte im Vergleich von ulzerogener und anti-inflammatorisch wirksamer Dosis eine überlegene therapeutische Breite gegenüber Standard-NSAR.

Meloxicam

[#] Herrn em.o.Univ.Prof.Dr.Wilhelm Fleischhacker mit den besten Wünschen zum 70.Geburtstag gewidmet

Bisher publizierte Studien zur Analytik von Meloxicam umfassten bislang vor allem Nachweis in biologischem Material [z.B. 1,2] sowie chromatographische Differenzierung von weiteren Oxicamen [3]. Die Bestimmung von Meloxicam neben zwei seiner Abbauprodukte sowie Tetracain mittels eines derivativspektroskopischen Verfahrens wurde beschrieben [4].

Untersuchungen zum Verhalten von Tenoxicam [5], Piroxicam [6] und Isoxicam [7] bei Lichtexposition zeigten für alle drei Substanzen einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Konzentration der Probelösung und deren Stabilität. Im Rahmen dieser umfassenden Studie zur Photostabilität von Oxicamen lag daher nahe, auch die Lichtstabilität von Meloxicam eingehender zu untersuchen. Dabei sollte vor allem geklärt werden, in welchem Ausmaß diese Konzentrationsabhängigkeit auch bei Meloxicam gegeben ist, wobei analog zu den vorangegangenen Untersuchungen Exposition an simuliertem Sonnenlicht zur Standardisierung der Bedingungen gewählt wird. Zur selektiven Bestimmung des Wirkstoffes neben seinen Abbauprodukten war die Entwicklung eines geeigneten chromatographischen Trennsystems notwendig.

Experimentelles

Meloxicam wurde freundlicherweise von der Fa. Boehringer-Ingelheim, Wien zur Verfügung gestellt. Simulierte Sonnenlichtexposition im Suntest CPS Heraeus Schnellbelichtungsgerät: Xenon-Strahler NXE 1500, Abstand zum Probenstisch: 22 cm, Schwarztafeltemperatur: 49°C bei maximaler Bestrahlungsintensität ($\sim 1300 \text{ W/m}^2$); Fensterglasfilter; Zeitfaktor: 15 (4 min Suntest $\approx$ 1 h an natürlichem Sonnenlicht); Luxmeter: XenoCal/XenoSoft

Trockenschrank: Heraeus Instruments, Temperierung $50^\circ \pm 1^\circ \text{C}$

Densitometer: SHIMADZU CS-9301 PC; HPTLC-Platten: MERCK HPTLC-Platten 20x10 cm, Kieselgel 60 F₂₅₄; Entwicklungskammer: CAMAG Horizontalentwicklungskammer für 20x10 cm Chromatographieplatten; Auftragen der Probelösung: CAMAG Linomat IV

Mobile Phase: CHCl_3 - Methanol - 96% Essigsäure (9,5/0,5/0,5 v/v/v) (CHCl_3 p.A. und 96% ige Essigsäure p.A. von MERCK, Methanol p.A. von Baker)

Detektion: $\lambda=280 \text{ nm}$

Untersuchsbedingungen: Suntest: simuliertes Sonnenlicht im Belichtungsgerät, Probenahme bei $t= 0, 144, 288, 432, 576, 720$ und 864 Minuten; 50°C /Lichtschutz: Lagerung in einem auf 50°C thermostatisierten Trockenschrank, Probenahme bei $t= 0, 144, 288, 432, 576, 720$ und 864 Minuten

Probenvorbereitung: Probelösung 40 $\mu\text{g/ml}$: 4 mg Meloxicam werden mit 2,5% ammoniakalischer Lösung pH 11,60 auf 100,00 ml aufgefüllt. Probelösung 250 $\mu\text{g/ml}$: 12,5 mg Meloxicam werden mit 2,5% ammoniakalischer Lösung pH 11,60 auf 50,00 ml aufgefüllt. Probelösung 2 mg/ml: 100 mg Meloxicam werden mit 10% ammoniakalischer Lösung pH 12,57 auf 50,00 ml aufgefüllt.

Für eine Meßreihe wurden die Probelösungen der jeweiligen Konzentration wie oben beschrieben bereit. Aus den 100,00 bzw. 50,00 ml Meßkolben wurden jeweils vier mal 10 ml Probelösung in 10,00 ml Meßkolben übergeführt. Drei davon wurden im Suntest forcierter Lichtbelastung

ausgesetzt, die vierte Probe wurde im Trockenschrank (50°C) unter Lichtschutz gelagert. Bei jeder Probenahme wurden exakt 500 µl Lösung entnommen. Es wurden für jede Konzentration zwei solcher Meßreihen untersucht, wobei jede der gezogenen Probelösungen 2 mal auf die entsprechende HPTLC-Platte aufgetragen wurde. Das Auftragevolumen betrug bei 40 µg/ml 10 µl, bei 250 µg/ml 3 µl und bei 2 mg/ml 1 µl.

Die Quantifizierung des Wirkstoffes erfolgte mittels externer Kalibrierung. Es wurden für jede der drei Konzentrationen und für jede entwickelte HPTLC-Platte eigene Eichkurven erstellt.

Standardkonzentrationen: Konzentration 40 µg/ml: 44,0; 35,2; 26,4; 17,6 und 8,8 µg/ml; Konzentration 250 µg/ml: 300, 240, 180, 120 und 60 µg/ml; Konzentration 2 mg/ml: 2,20; 1,76; 1,32; 0,88 und 0,44 mg/ml. Die Eichfunktionen aller drei Konzentrationsbereiche waren linear ($r \geq 0,996$).

Validierung: Die Bestimmung der Wiederholpräzision der verwendeten Methode erfolgte bei fünf unterschiedlichen Konzentrationen. Die hergestellten Lösungen wurden je 6 mal auf eine HPTLC-Platte aufgetragen (2,2 mg/ml: 1 µl; 275 µg/ml und 165 µg/ml: 3 µl; 44 µg/ml und 26,4 µg/ml: 10 µl), die Platten wurden gemäß der verwendeten Methode entwickelt und ausgewertet. Es wurden sowohl die intra-day als auch die inter-day Standardabweichungen an drei unterschiedlichen Tagen bestimmt. Die Nachweisgrenze (LOD) und die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurden an Hand des Signal/Rauschverhältnisses von Chromatogrammen verdünnter Arzneistofflösungen bestimmt (S/N: LOD 3/1; LOQ 10/1).

Ergebnisse und Diskussion

In der vorliegenden Studie wird die Photostabilität von Meloxicam in ammoniakalisch-wäßrigen Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (40 µg/ml, 250 µg/ml und 2 mg Arzneistoff/ml) untersucht. Zur selektiven quantitativen Bestimmung von Meloxicam in Gegenwart seiner Abbauprodukte wurde ein stabilitätsspezifisches HPTLC/densitometrisches-System unter Verwendung einer im Suntest forciert abgebauten Arzneistofflösung entwickelt. Die entstehenden Abbauprodukte weisen geringere R_f -Werte als die Reinsubstanz auf, wobei die quantitativ größte Menge der Abbauprodukte am Start verbleibt. Unmittelbar nacheinander vermessene Remissionsspektren der Meloxicampeaks einer frisch bereiteten sowie der bestrahlten Lösungen auf einer HPTLC-Platte zeigen gute Übereinstimmung. Die Chromatogramme einer 6 h und einer 12 h im Suntest abgebauten Lösung von Meloxicam der Konzentration 250 µg/ml zeigen Abb. 1 und Abb. 2.

Als Detektionswellenlänge wurde zunächst das längstwellige Maximum der Verbindung bei 360 nm gewählt. Bei der Validierung mit diesen Bedingungen wurden jedoch unbefriedigende Ergebnisse erzielt. Ein Vergleich der entsprechenden Remissionsspektren (vgl. Abb. 3) zeigte eine starke Abnahme der Extinktion bei 360 nm mit zunehmender Lagerungsdauer des Chromatogrammes, welche auf bei Lagerung eintretende Artefaktbildung zurückzuführen ist. Wie der Abbildung zu entnehmen ist ergibt sich bei einer Detektionswellenlänge von 280 nm eine vom Scanzeitpunkt unabhängige Extinktion, sodaß diese Wellenlänge für die quantitativen Bestimmungen besser geeignet ist.

Abb. 1: Chromatogramm einer 6 h im Suntest bestrahlten Meloxicamlösung (250 µg/ml)

Abb. 2: Chromatogramm einer 12 h im Suntest bestrahlten Meloxicamlösung (250 µg/ml)

Die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Standardabweichung der Wiederholpräzision der Methode sowohl intra- als auch inter-day gibt Tab. 1 wieder. Die Nachweisgrenze (LOD; S/N 3:1) des Systems lag bei 7 µg/ml und die Bestimmungsgrenze (LOQ; S/N 10:1) bei 15 µg/ml.

Abb. 3: Veränderung des Remissionsspektrums von Meloxicam bei Lagerung der entwickelten DC-Platte ($t = 0, 2$ und 17 h)

Tab. 1: Wiederholpräzision

Probelösungen		R.S.D. (%)	
Konz. [$\mu\text{g/ml}$]	Auftragevol.	Intra-day (n=6)	Inter-day (n=18)
2200,0	1 μl	0,80-1,73	3,12
275,0	3 μl	0,81-1,17	1,39
165,0	3 μl	0,44-1,59	4,54
44,0	10 μl	0,97-2,18	5,20
26,4	10 μl	1,10-1,37	3,12

Meloxicam wurde in unterschiedlichen Konzentrationen Lichtbelastung im Suntest ausgesetzt. Es zeigte sich, daß Lichtexposition zu Wirkstoffverlust führt, der umso größer ist je verdünnter die entsprechende Probelösung ist (vgl. Tab. 2). Dies korreliert mit den Ergebnissen, welche bei Studien mit anderen Verbindungen dieser Substanzklasse festgestellt wurden [5-7], wobei Meloxicam von den untersuchten Oxicamen die höchste Photostabilität aufweist.

Um sicherzustellen, daß die Konzentrationsabnahme auf die Sonnenlichtexposition zurückzuführen ist und nicht der hohe pH-Wert der Lösungen oder die im Bestrahlungsgerät etwas erhöhte Temperatur mit einflußgebend ist, wird ein vergleichender Versuch bei entsprechender Lagerung bei 50°C im Trockenschrank durchgeführt, welcher eindeutig beweist, daß der Wirkstoffgehalt der Lösungen unter Lichtausschluß konstant bleibt (vgl. Tab.3).

Tab. 2: Meloxicam / Bestrahlung im **Suntest**

t [min]	2 mg/ml		250 µg/ml		40 µg/ml	
	Konz. [mg/ml]	% von t=0	Konz. [µg/ml]	% von t=0	Konz. [µg/ml]	% von t=0
0	1,963	100,0	240,2	100,0	41,73	100,0
144	1,930	98,3	215,7	89,8	27,98	67,1
288	1,907	97,1	191,0	79,5	17,17	41,1
432	1,867	95,1	157,8	65,7	---	0,0
576	1,843	93,9	128,4	53,5	---	0,0
720	1,778	90,6	89,4	37,2	---	0,0
864	1,719	87,6	57,4	23,9	---	0,0

--- = nicht detektierbar

Tab. 3: Lagerung bei **50°C/Lichtschutz**

Zeit [min]	% vom Ausgangswert (n=4)		
	2 mg/ml	250 µg/ml	40 µg/ml
0	100,00	100,00	100,00
144	105,14	95,71	92,52
288	106,32	96,44	95,82
432	105,97	93,73	96,14
576	104,40	95,19	92,79
720	102,55	98,23	96,05
864	107,34	97,00	109,10

Literatur

- [1] Velpandian T., Jaiswal J., Bhadwaj R., Gupta S. (2000), J.Chromatogr., B: Biomed.Sci.Appl. 738: 431
- [2] Sane R., Surve V., Francis M. (2000) Indian Drugs 37: 251
- [3] Joseph-Charles J., Bertucat M. (1999) J.Liqu.Chromatogr. Relat.Technol. 22: 2009
- [4] Bebawy L. (1998) Spectrosc.Lett. 31: 797
- [5] Bartsch H., Eiper A., and Kopelent-Frank H. (1997), 21th International Symposium on Column Liquid Chromatography and Related Techniques, Abstr.Vol. B: 137
- [6] Bartsch H., Eiper A., Kopelent-Frank H. (1999), J. of Pharm. Biomed. Anal. 20: 531
- [7] H. Bartsch, A. Eiper, K. Habiger and H. Kopelent-Frank (1999), J. Chromatogr. A 846: 207

Eingelangt am 3. September 2001

Angenommen am 4. Oktober 2001