

ANALYTICS

N° 3
November 2020



Pharma 

**Strukturaufklärung von
unbekannten Substanzen
in Pharmazeutika**



Strukturaufklärung von unbekanntem Substanzen in Pharmazeutika

Autor: Fabian Schwizer

Einleitung

Die potentiell toxische Wirkung einer unbekanntem Verunreinigung in pharmazeutischen Produkten bedarf einer weiterführenden Untersuchung, sofern die Konzentration der Verunreinigung einen bestimmten Sollwert überschreitet^{[1][2]}. Um die entsprechenden toxikologischen Abklärungen durchführen zu können, muss zunächst die chemische Struktur der Verunreinigung eruiert werden. Die gängigste Technik zur Aufklärung der Struktur einer unbekanntem Verbindung ist eine Kombination aus hochauflösender Massenspektrometrie (LC-HRMS) und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie^{[3][4]}.

Wirkstoffe und Hilfsstoffe in Pharmazeutika können in den verschiedensten Weisen zerfallen, unter anderem durch Hydrolyse, Oxidation oder photochemische Prozesse. Ferner können die Inhaltsstoffe miteinander reagieren und Addukte bilden^[5]. Zudem sind unbekanntem Verunreinigungen meist in eine sehr komplexe Produktmatrix eingebettet. Die Strukturaufklärung von unbekanntem Verunreinigungen in Pharmazeutika stellt folglich eine analytische Herausforderung dar.

Vorgehensweise

Das generelle Vorgehen zur Strukturaufklärung soll hier exemplarisch am Beispiel einer unbekanntem Verunreinigung in einem opioidhaltigen Arzneimittel beschrieben werden. Der Prozess kann hierbei in sechs Schritte unterteilt werden:

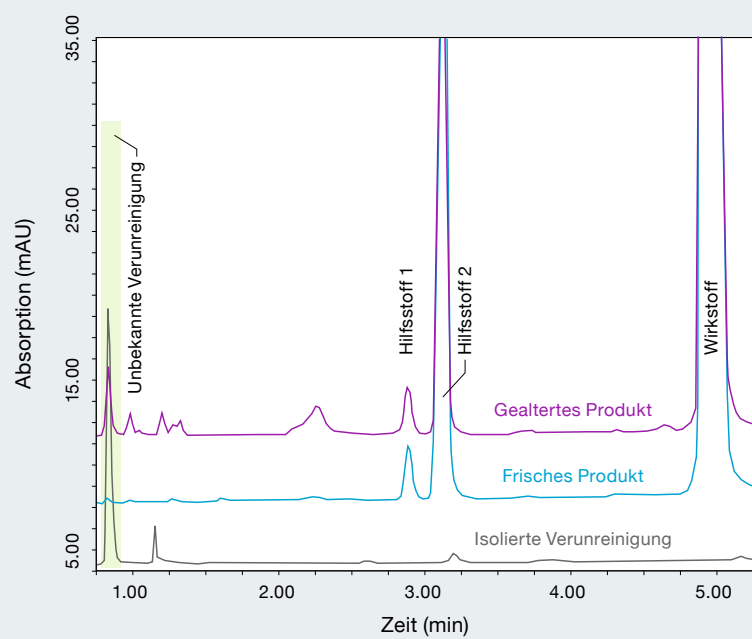
1. In einem ersten Schritt wird die Analysenmethode des Kunden implementiert und die einzelnen Komponenten des Präparats (Wirkstoffe, Hilfsstoffe und Verunreinigungen) werden mittels des Vergleichs der jeweiligen Retentionszeiten und der UV-Spektren im HPLC-UV-Chromatogramm identifiziert.
2. In einem zweiten Schritt werden mithilfe analytischer HPLC einige Mikrogramm der Verunreinigung isoliert (siehe HPLC-UV-Chromatogramm in Grafik 1). Diese Kleinmenge an Verunreinigung wird für die nachfol-

gende LC-HRMS-Analyse verwendet und dient zugleich als Referenzsubstanz für etwaige Methodenentwicklungen (siehe Schritt 5).

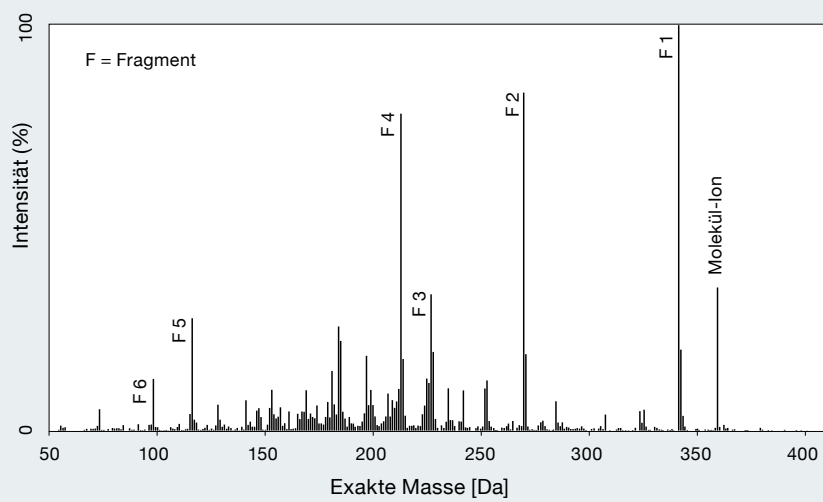
3. Von der isolierten Verunreinigung wird ein hochauflösendes Massenspektrum (LC-HRMS) aufgenommen. Dies erlaubt die Bestimmung möglicher Elementarzusammensetzungen der unbekanntem Verunreinigung. Dank der Kenntnis der einzelnen Inhaltsstoffe des Präparats und daraus resultierender möglicher Zerfallsreaktionen, kann die Anzahl der mathematisch denkbaren Elementarzusammensetzungen der Verunreinigung eingeschränkt werden. Strukturvorschläge können nun postuliert werden.
4. Im nächsten Schritt wird von der isolierten Verunreinigung eine MS/MS-Analyse durchgeführt (siehe MS/MS-Fragment-Spektrum in Grafik 2). Für die gemessenen individuellen Fragmente der Verunreinigung können ebenfalls mögliche Elementarzusammensetzungen berechnet werden. Der Vergleich der detektierten Fragmente mit den zu erwartenden Fragmenten einer postulierten Struktur ermöglicht, deren Plausibilität zu überprüfen. Im Idealfall kann zu diesem Zeitpunkt bereits eine mit hoher Wahrscheinlichkeit gültige Struktur postuliert werden.
5. Fünftens wird eine Methode für die Isolierung grösserer Mengen an Verunreinigung mittels semi-präparativer HPLC entwickelt. Die für die 2D-NMR-Messungen benötigte Menge an Verunreinigung (ca. 3 – 5 mg) wird anschliessend aus dem Arzneimittelpräparat isoliert. Je nach Konzentration der unbekanntem Verunreinigung im Produkt, werden recht grosse Mengen des Arzneimittels benötigt.
6. Mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (¹H, ¹³C, COSY, NOESY, HSQC, HMBC) kann die Plausibilität der einzelnen Strukturvorschläge schliesslich überprüft werden. Des Weiteren können so mögliche Doppelbindungen, Restgruppen (R1 – R4) sowie die absolute Konfiguration von Stereozentren bestimmt werden (siehe Struktur des Opioids in Grafik 3).



HPLC-UV-Chromatogramm

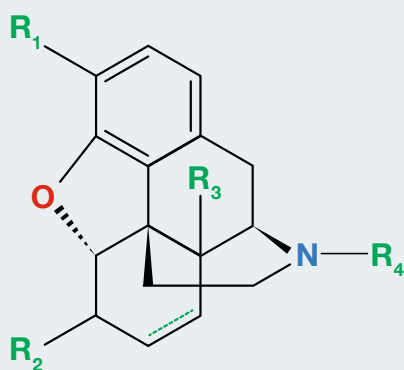


MS/MS-Fragment-Spektrum





8 Postulierte Struktur des unbekanntes Opioids.



Mittels einer Kombination aus hochauflösender Massenspektrometrie (Elementarzusammensetzung, Strukturfragmente) und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie (funktionelle Gruppen, Verbindungen innerhalb des Moleküls, Stereokonfiguration) sowie UV-Spektren kann in der Regel die postulierte Struktur einer unbekanntes Verunreinigung bestätigt werden.

Optional kann zusätzlich zur Struktur der Mechanismus der Bildung einer Verunreinigung in Pharmazeutika untersucht werden:

7. Um den Reaktionsmechanismus der Bildung einer (nun bekannten) Verunreinigung zu untersuchen, wird frisches und gealtertes Produkt mittels HPLC-UV/MS und/oder GC-MS analysiert und miteinander verglichen. Die eruierten Unterschiede sowie die Anwesenheit kleiner Moleküle (Bausteine, Katalysatoren) können Aufschluss über den Weg der Bildung der Verunreinigung geben. Binäre Mischungen aus Wirkstoff und Hilfsstoffen werden ebenfalls unter ausgewählten Reaktionsbedingungen miteinander inkubiert, um derart die Bildung der Verunreinigung zu forcieren. Dadurch können an der Bildung beteiligte Hilfsstoffe oder Verunreinigungen aus den Hilfsstoffen identifiziert werden.

8. Aus dem Reaktionsmechanismus (z. B. Verunreinigungen aus Hilfsstoffen) und den Reaktionsbedingungen (z. B. Temperatur oder Feuchtigkeit) kann der Kunde Korrektur- und Präventivmassnahmen (CAPA's) definieren, um den Herstellungsprozess des Produkts zu optimieren, um die Bildung der Verunreinigung im besten Fall gänzlich zu verhindern.

Die Aufklärung des Reaktionsmechanismus untermauert einerseits die zuvor postulierte Struktur der Verunreinigung, andererseits kann sie dazu beitragen, geeignete Massnahmen zu definieren, um die Bildung der Verunreinigung zu verhindern. Es ist daher unbedingt empfehlenswert, neben der Struktur einer unbekanntes Verunreinigung auch deren Entstehungsweg aufzuklären.

Die Untersuchung eines möglichen Reaktionsmechanismus (Schritt 7) kann auch selbst zur Aufklärung der Struktur einer Verunreinigung beitragen. Sind die an der Bildung der Verunreinigung beteiligten Stoffe und die Reaktionsbedingungen bekannt, können daraus meist Rückschlüsse auf die Struktur gezogen werden. Zudem kann unter den richtigen Reaktionsbedingungen die Bildung der Verunreinigung forciert werden, was deren Isolierung in Schritt 5 zu vereinfachen vermag. Projektspezifisch kann es deshalb sinnvoll sein, Untersuchungen bezüglich des Reaktionsmechanismus (Schritt 7) zwischen den Schritten 4 und 5 einzubauen.

Generelle Vorgehensweise (Schritt 1-6)

Unbekannte Verunreinigung



1. Implementierung Kundenmethode:

- Reproduktion HPLC-UV-Chromatogramm
- Identifikation Wirkstoff/Hilfsstoffe/Verunreinigung



2. Kleine Aufreinigung für LC-HRMS:

- Isolierung einiger Mikrogramm Verunreinigung
- Referenz für MS-Analyse und grosse Aufreinigung



3. LC-HRMS-Analyse:

- Bestimmung der Elementarzusammensetzung
→ Postulierung von Strukturvorschlägen



4. MS/MS-Fragment-Analyse:

- Analyse von einzelnen Molekülfragmenten
→ Überprüfung der postulierten Strukturvorschläge



5. Grosse Aufreinigung für 2D-NMR:

- Methodenentwicklung für semi-präparative HPLC
- Isolierung einiger Milligramm Verunreinigung



6. 2-Dimensionale NMR-Analyse:

- Überprüfung der Strukturvorschläge auf Plausibilität
- Identifizierung der Restgruppen (R1 – R4)
- Bestimmung der absoluten Konfiguration

Verunreinigungsbildung & Prozessoptimierung (Schritt 7-8)

Bestätigte Struktur



7. Reaktionsmechanismus:

- Mechanismus der Bildung der Verunreinigung
- Binäre Mischungen aus Wirkstoff und Hilfsstoffen
- Vergleich von frischem und gealtertem Produkt



Möglicher Reaktionsmechanismus



8. Prozessoptimierungen:

- Definierung von CAPA's durch den Kunden zur Verhinderung der Bildung der Verunreinigung

Fazit

Die Strukturaufklärung unbekannter Verunreinigungen aus Pharmazeutika ist ein mehrstufiger Prozess und benötigt anspruchsvolle analytische Verfahren wie hochauflösende Massenspektrometrie. Das Grundschemata für die Strukturaufklärung muss für jedes Arzneiprodukt individuell angepasst werden und erfordert grosses analytisches Know-how. Dies schliesst detaillierte Kenntnisse über Zerfallsprozesse von pharmazeutisch aktiven Substanzen und mögliche Nebenreaktionen mit Hilfsstoffen mit ein. Es ist daher anzuraten, sich frühzeitig eine geeignete Strategie für die Strukturaufklärung unbekannter Verunreinigungen in Pharmazeutika zu erarbeiten. □

Referenzen

- [1] *Ph.Eur. 01/2018:2034 "substances for pharmaceutical use"*.
- [2] *Ph.Eur. 04/2012:51000 "control of impurities in substances for pharmaceutical use"*.
- [3] *M.-M. Cid, J. Bravo (Eds.), Structure Elucidation in Organic Chemistry: The Search for the Right Tools, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2015.*
- [4] *B. N. Pramanik, M. S. Lee, G. Chen (Eds.), Characterization of Impurities and Degradants using Mass Spectrometry, John Wiley & Sons, New Jersey, 2011.*
- [5] *M. Li, D. Thurston (Eds.), Organic Chemistry of Drug Degradation, RSC Drug Discovery Series No. 29, Cambridge, 2012.*

Autor



Fabian Schwizer
Wissenschaftlicher
Mitarbeiter F&E

INTERLABOR BELP AG



Interlabor Belp AG

Aemmenmattstrasse 16
3123 Belp, Schweiz
Tel. +41 (0)31 818 77 77
Fax +41 (0)31 818 77 78
www.interlabor.ch
info@interlabor.ch

Öffnungszeiten

Montag bis Freitag
07.30 – 12.00 Uhr
13.30 – 17.00 Uhr