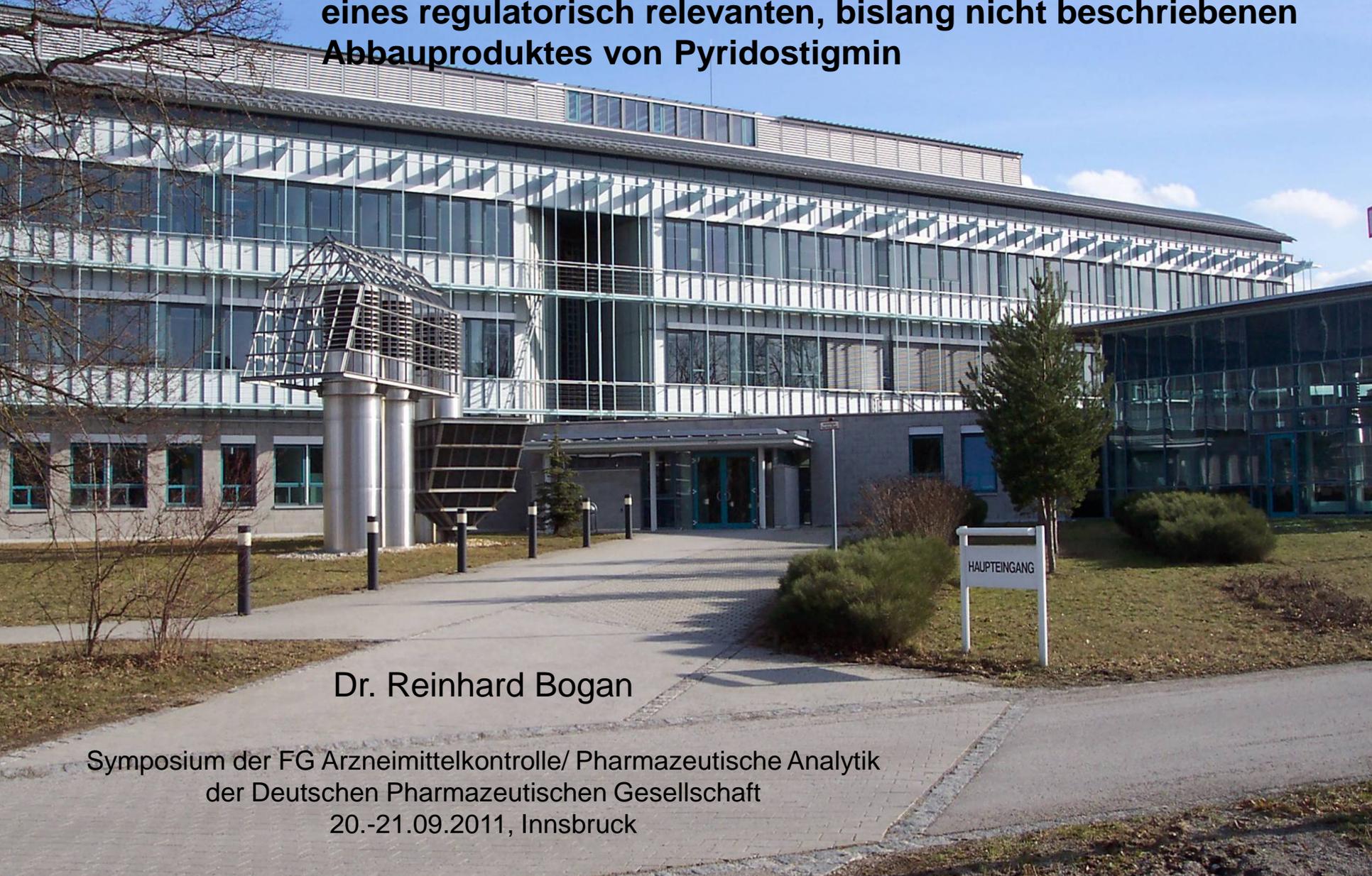


**HPLC-DAD / GC-MS Untersuchungen zur  
Arzneimittelsicherheit von Notfallvorräten -  
Nachweis, Identifizierung und toxikologische Bewertung  
eines regulatorisch relevanten, bislang nicht beschriebenen  
Abbauproduktes von Pyridostigmin**



Dr. Reinhard Bogan

Symposium der FG Arzneimittelkontrolle/ Pharmazeutische Analytik  
der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft  
20.-21.09.2011, Innsbruck



# Arzneimittelsicherheit

AMG/ WHO/ Dir 2001/83/EC

- Pharmazeutische Qualität
- Wirksamkeit
- Unbedenklichkeit



# Arzneimittelsicherheit

AMG/ WHO/ Dir 2001/83

- Pharmazeutische Qualität
- Wirksamkeit
- Unbedenklichkeit



# Arzneimittelsicherheit

AMG/ WHO/ Dir 2001/83

- Pharmazeutische Qualität
- Wirksamkeit
- Unbedenklichkeit





# Pyridostigminbromid als Teil der Notfallbevorratung

Pyridostigminbromid 30 mg



- Indirektes Parasympathomimetikum
- Wirkungsmechanismus: reversible Hemmung der Acetylcholinesterase
- Blockade des aktiven Zentrums gegenüber Angriff Organophosphat/Nervenkampfstoff
- 30% Restaktivität (5% beatmet) für Überleben hinreichend
- Nervenkampfstoffe sehr reaktiv (elektrophil) toxisches Wirkungsprinzip → Gewinn eines Zeitfensters  
Überleben initiale Anflutphase  
Nervenkampfstoff
- Bindung an Makromoleküle (Proteine), kurze  $t_{1/2}$



# EDQM - Reflection Group on Quality Monitoring of Stockpiled Medicines

## OMCL Network

**PA/PH/OMCL (09) 94 3R  
Monitoring of Stockpiled  
Medicines – Development of  
Technical Guidelines**

**PA/PH/OMCL (09) 05 R  
Stockpiling of Medicines –  
Monitoring –  
General Considerations**



- Risikoorientierte Untersuchung
- Nutzen-Risiko Bewertung
- Verfügbarkeit im Krisenfall



# Ausgangslage Notfallbevorratung

Pyridostigminbromid 30 mg



Produktunterlagen  
Stand 1986



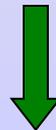
Analytisch/technische  
Weiterentwicklung



Keine Zulassung



Arzneimittelsicherheit



Notfallvorrat aus 1988



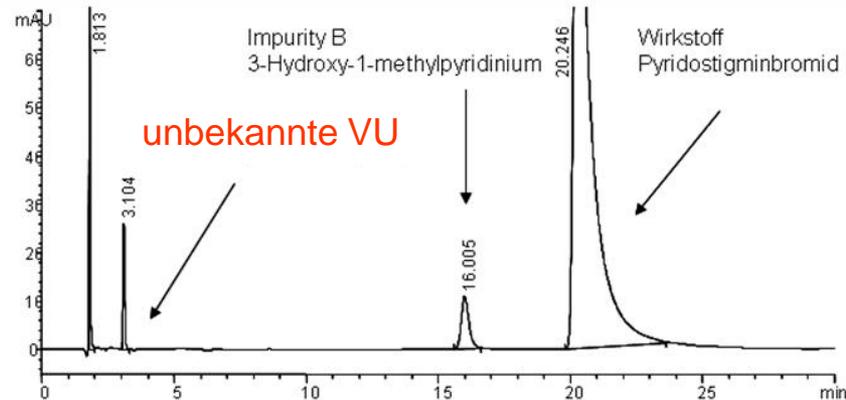
Alterungs-/lagerungsbedingte  
Veränderungen



**Untersuchungen nach aktuellem Stand  
von Wissenschaft und Technik**



# Primärbefund



Chromatogramm Prüflösung  
Pyridostigminbromid 30 mg, Methode BP 2008

Unbekannte Verunreinigung:

- **Flächenteil bez. auf Wirkstoff 1,6 % +/- 0,3 %**  
(MW +/- SD, 8 untersuchte Chargen)
- **Spezifikation Summe Nebenpeaks 0,5 % [1, 2]**
- **Qualification Threshold**  
(MTD 10 mg -100 mg: 0,5 % oder 200 µg) [3]

1. British Pharmacopoeia 2008, Vol. III
2. Europäisches Arzneibuch 6.0, Band 3
3. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q3B, Impurities in New Drug Products



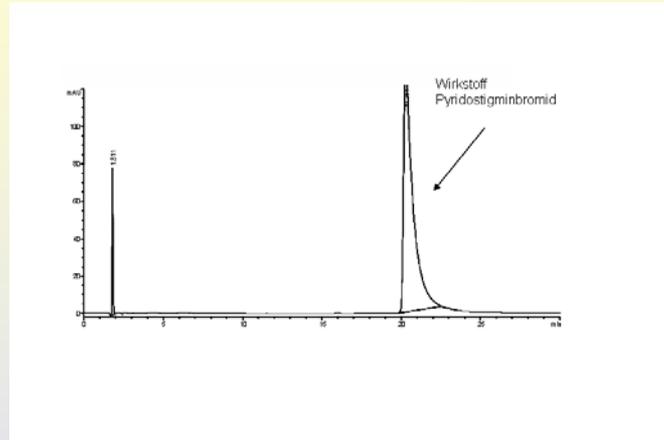
# Lösungsansatz Stressversuche

**Stressversuche** mit  
Primärpackmittel,  
Wirkstoff und Hilfsstoffen  
(Temperatur, Oxidation, pH)

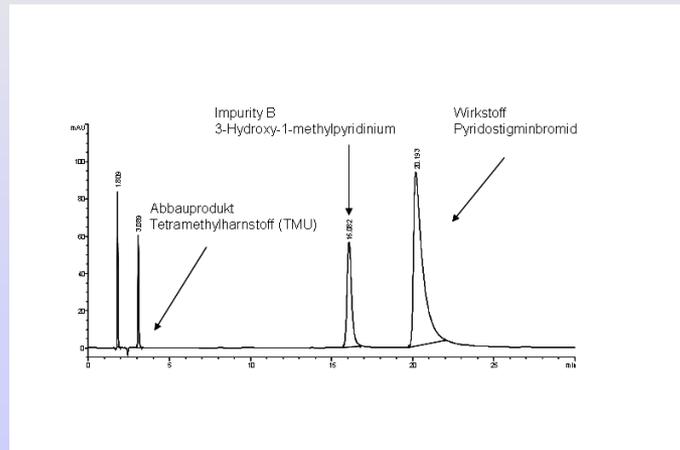


# Ergebnis Stressversuch

**Wirkstoff  
unbelastet**

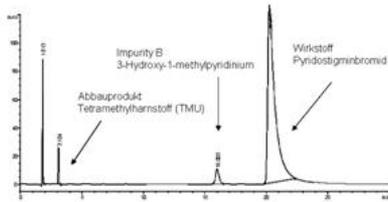


**Wirkstoff  
3 h pH 11  
40° C**

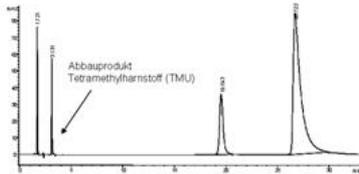




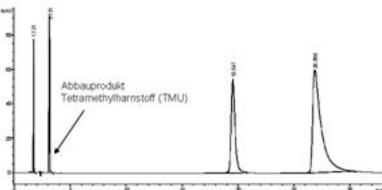
# Kinetik des Abbaus



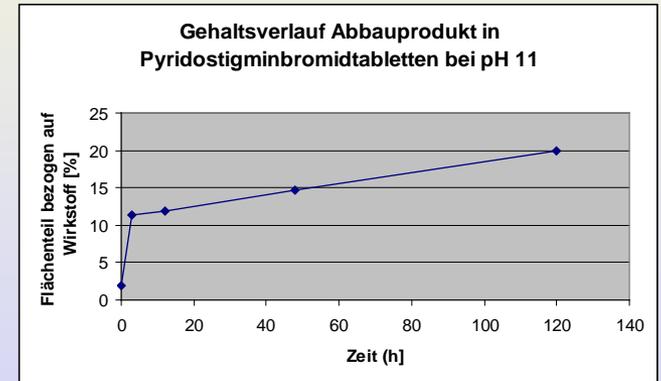
**Pyridostigminbromidtablette  
langzeitgelagert,  
unbelastet, Ausgangswert**



**Pyridostigminbromidtablette  
langzeitgelagert, pH 11, 40°C,  
3h**



**Pyridostigminbromidtablette  
langzeitgelagert, pH 11, 40°C,  
12h**



pseudo-erster Ordnung



# Matrixeinflüsse

Probe Bedingung	Matrix	Matrix + Wirkstoff	Wirkstoff	Tablette
unbehandelt	kein Peak	0,05 %	0,012 %	1,9 %
pH 11, 40° C, 3h	kein Peak	1,6 %	11,4 %	5,4 %

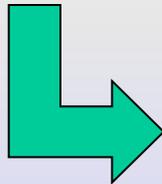
**Bildung eines Abbauproduktes unter alkalischen Bedingungen**



# Herkunft der Abbauprodukte

## Lösungsansatz

Stressversuche mit  
Primärpackmittel,  
Wirkstoff und Hilfsstoffen



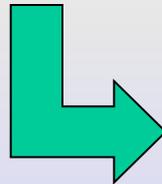
Unbekannter Peak  
**Abbauprodukt des Wirkstoffes**  
Mechanismus alkalische Hydrolyse



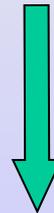
# Aufstellung Arbeitshypothese

## Lösungsansatz

Stressversuche mit  
Wirkstoff und Hilfsstoffen



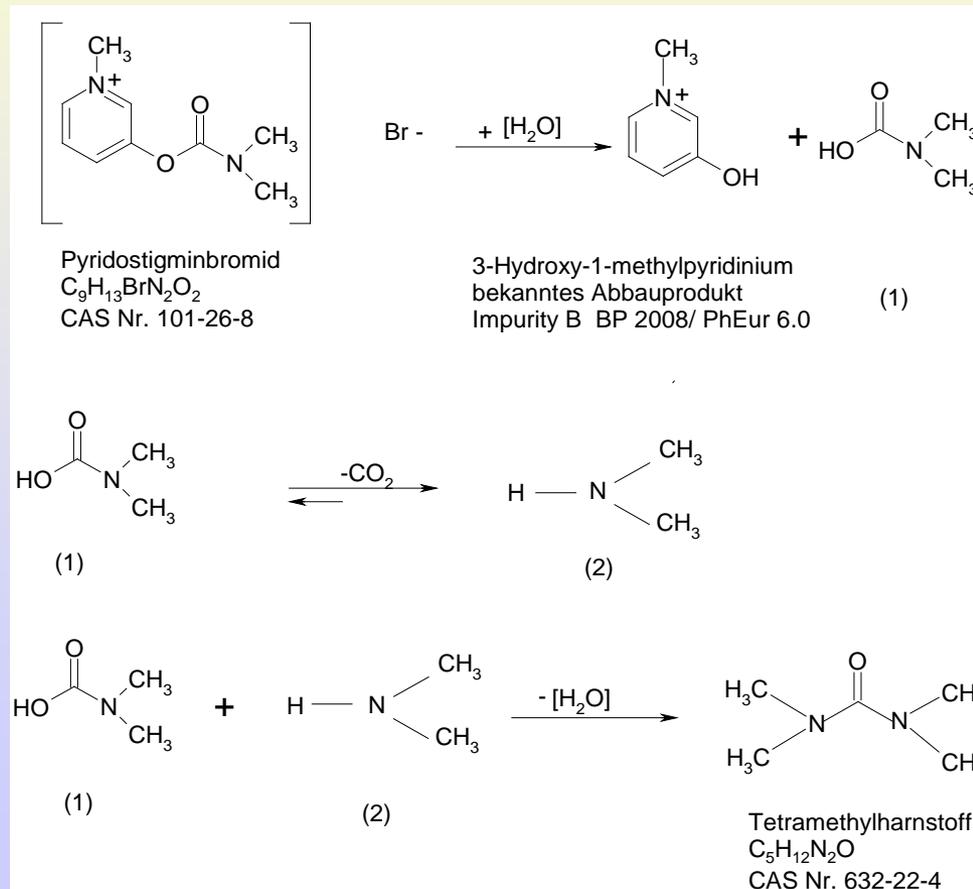
Unbekannter Peak  
Abbauprodukt des Wirkstoffes



**Arbeitshypothese** zum  
chemischen Degradationsverhalten



# Arbeitshypothese zum chemischen Degradationsverhalten

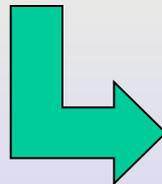




# Tetramethylharnstoff potentielles Abbauprodukt

## Lösungsansatz

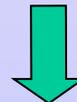
Stressversuche mit  
Primärpackmittel  
Wirkstoff und Hilfsstoffen



Unbekannter Peak  
Abbauprodukt des Wirkstoffes



Arbeitshypothese zum  
chemischen Degradationsverhalten



Tetramethylharnstoff **potentielles Abbauprodukt**

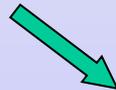


# Identifizierung Verifikation

Entwicklung einer MS-kompatiblen  
HPLC-Methode zur Isolierung und  
Anreicherung der Verunreinigung



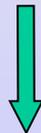
GC-MS-Charakterisierung der  
erhaltenen Fraktion



Gesamtextrakt  
Tablette



GC-MS-Charakterisierung der  
erhaltenen Fraktion



Untersuchung mit gültiger  
Arzneibuchmethode



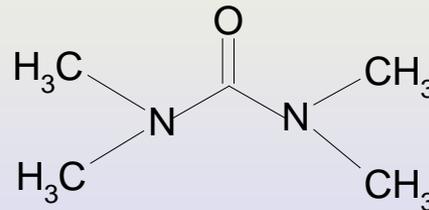
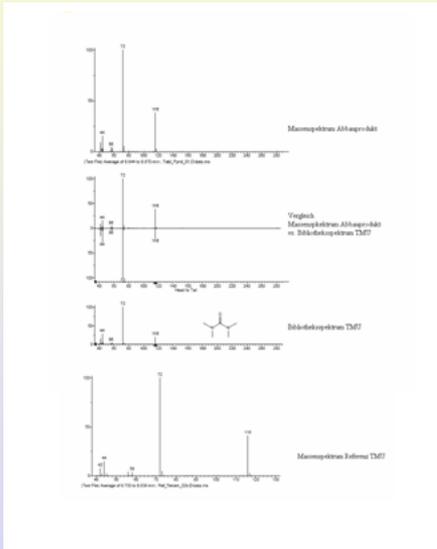
Chromatographischer Vergleich  
mit Referenz



**Identifizierung  
Verifikation**

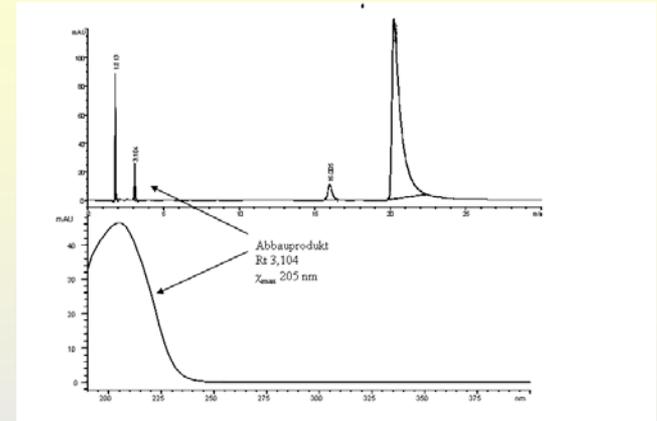


# Nachgewiesenes Abbauprodukt: Tetramethylharnstoff

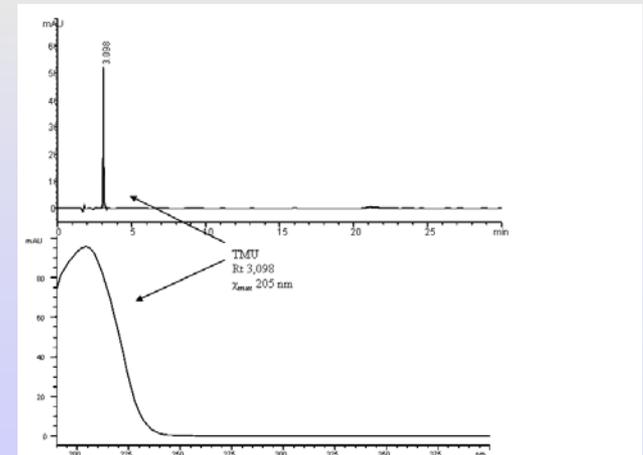


**Tetramethylharnstoff**

$C_5H_{12}N_2O$   
CAS Nr. 632-22-4



Tablette



Referenz TMU

Methode: GC-MS  
Gesamtauszug  
(Fraktion analog)

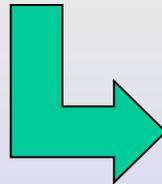
Methode BP 2008



# Nutzen-Risiko Bewertung

## Lösungsansatz

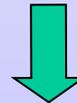
Stressversuche mit  
Primärpackmittel  
Wirkstoff und Hilfsstoffen



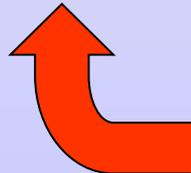
Unbekannter Peak  
Abbauprodukt des Wirkstoffes



Arbeitshypothese zum  
chemischen Degradationsverhalten



Tetramethylharnstoff **nachgewiesenes** Abbauprodukt



Orientierende toxikologische Qualifizierung  
**Nutzen-Risiko Bewertung** des Arzneimittels



# Quantifizierung Dosisabschätzung

Charge	03945 3	03945 4	03945 5	03945 6	03945 8	03945 9	03946 0	03946 2
TMU [%] <sup>1)</sup>	1,3	1,6	1,7	1,6	1,3	1,4	1,4	2,3
TMU [µg/Tabl.] <sup>2)</sup>	230	298	300	283	246	251	250	391

<sup>1)</sup> Flächenprozent bezogen auf Wirkstoffpeak Pyridostigminbromid

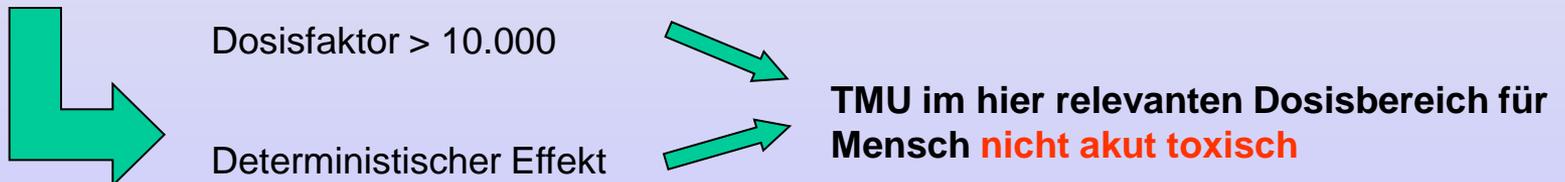
<sup>2)</sup> Absolutgehalte berechnet mit Responsefaktor TMU nach Identifizierung der Substanz

- Tagesdosis p.o. 1200 µg TMU = 17 µg / kg KG
- TMU im pH Bereich des Gastrointestinaltraktes 2 h stabil



# Qualifizierung Akute Toxizität

- Keine Humandaten zur Toxizität
- Sicherheitsdatenblatt TMU Risikomerkmale (R-Satz) 22 perorale Giftigkeit [1]
- LD50 (oral) Ratte 794 mg/kg KG [1]
- 150 mg/kg i.v. 5 Tage nur leichte Gewichtsverluste bei Hund, Affe und Maus [2]
- Üblicher Sicherheitsfaktor Speziesextrapolation für akute Effekte 100 [3]

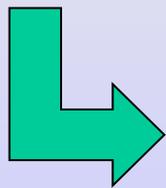


1. Merck Sicherheitsdatenblatt gemäß EG Richtlinie 91/155/EWG Stand 10.11.2006 für Tetramethylharnstoff zur Synthese
2. Dixon RL, Adamson RH, Ben M, Rall DP, Arch. Int. Pharmacodyn Ther 1966; 160, 333-341
3. Edler L, Poirier K, Dourson M, et al., Food and chemical toxicology 2002; 40, 283-326



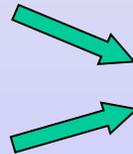
# Qualifizierung Teratogenität

- Sicherheitsdatenblatt Risikomerkmale (R Satz) 61 „Kann das Kind im Mutterleib schädigen“ [1]
- 10 d p.o. (Ratte) 100 – 2500 ppm TMU keine Teratogenität [2]
- ED p.o. 500 mg/kg KG (Maus), 1000 mg/kg KG (Ratte) teratogene Wirkung [3].



Dosisfaktor > 10.000

Stochastischer Effekt



**Teratogenität** TMU im hier relevanten  
Dosisbereich für Mensch **nicht auszuschließen**

1. Merck Sicherheitsdatenblatt gemäß EG Richtlinie 91/155/EWG Stand 10.11.2006 für Tetramethylharnstoff zur Synthese
2. Munley SM, O'Neill AJ, Tyler DL, Hurtt ME, Kennedy GL, Drug. Chem Toxicol 2001; 24, 259-271
3. Teramoto S, Kaneda M, Aoyama H, Shirasu Y, Teratology 1981; 23, 335-342



# Schlussfolgerungen

Risikoorientierte Untersuchungen von Notfallvorräten:

- Können Abbauwege und Abbauprodukte aufdecken über die z.T. keine Daten vorliegen
- Liefern Daten für eine wissenschaftlich basierte Risikoabschätzung
- Stellen die Arzneimittelsicherheit im Krisenfall sicher

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit

