

**Verbundene
Unternehmen:**



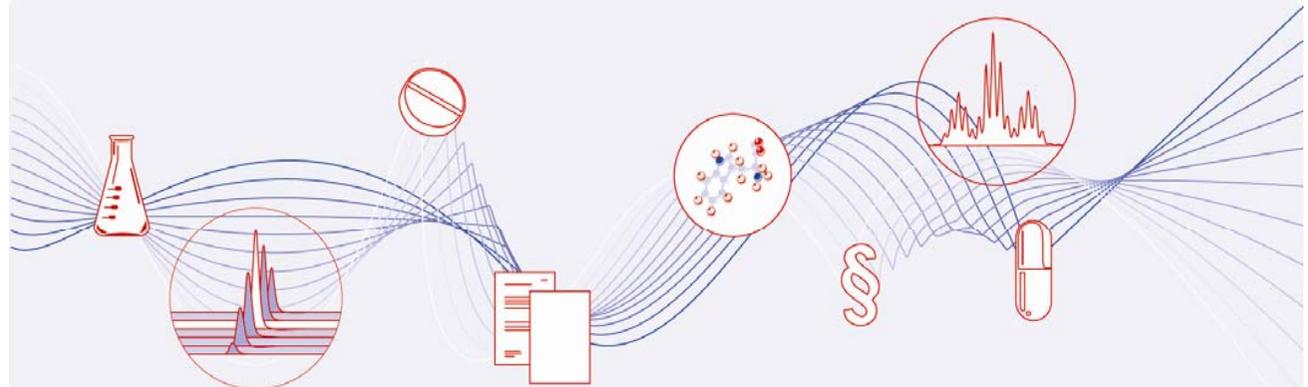
Citius, altius, fortius – wie schnell muss man in der HPLC werden?

Erfahrungen eines pharmazeutischen Dienstleisters

Dr. Frank Michel

HWI Analytik GmbH – f.michel@hwi-analytik.de

Jahrestagung der DPhG 2009 - Jena - 28.09.2009



Wer ist die HWI Analytik GmbH?

- Entwicklung und Validierung von Prüfmethoden
- Stabilitätsprüfungen
- Prüfungen nach Arzneibüchern
- Freisetzungsuntersuchungen
- Extractables/Leachables
- Spezialanalytik



Wer ist die HWI Analytik GmbH?

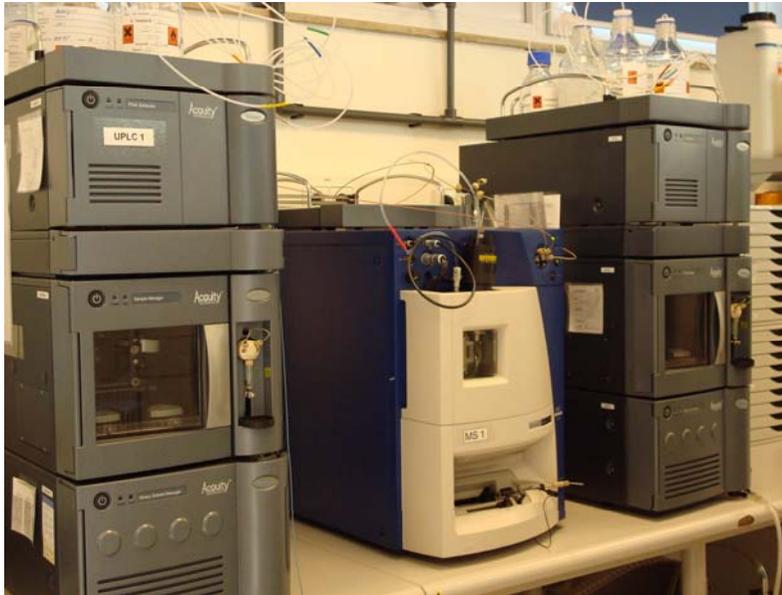
- Isolierung, Synthese & Aufreinigung
- Zertifizierung von Referenzstandards für chemisch definierte Wirkstoffe und Verunreinigungen
- Markerverbindungen für pflanzliche Arzneimittel



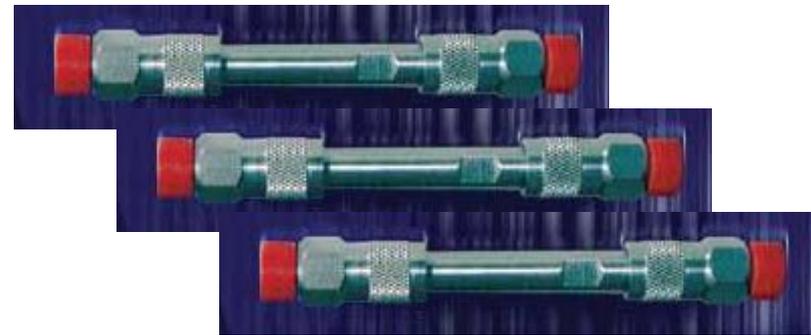
Vorteile durch Schnelle Chromatographie?

- Dienstleistungsbereich: in der Regel breites Spektrum unterschiedlicher Proben in relativ kleiner Probenzahl
- UHPLC-Anlagen bei Auftraggebern und Lohnherstellern als relativ neue Technik noch nicht umfassend etabliert
- Aufwändige Probenvorbereitung ist oft limitierender als HPLC-Analytik

Vorteile durch Schnelle Chromatographie!



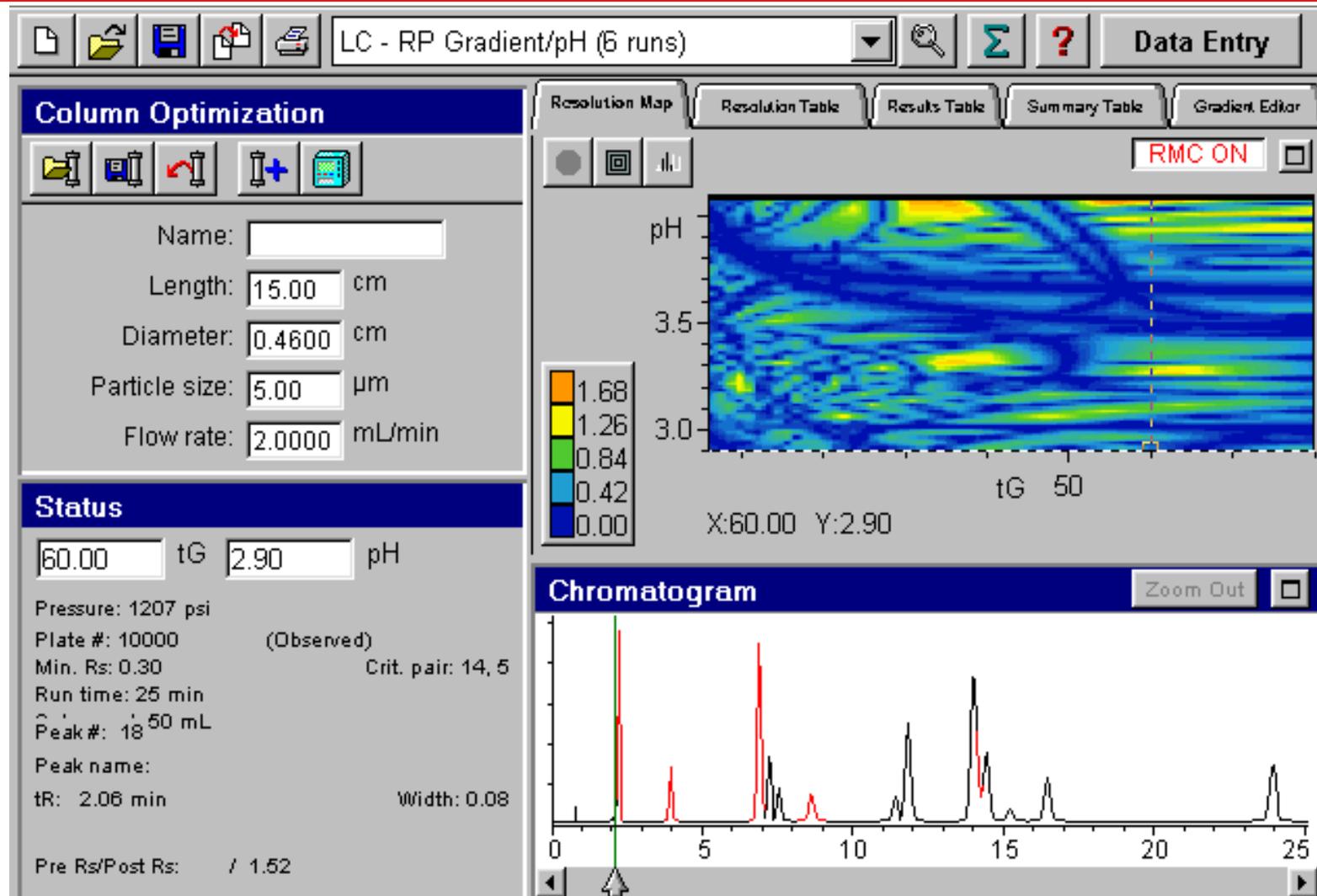
Ascentis[®] Express



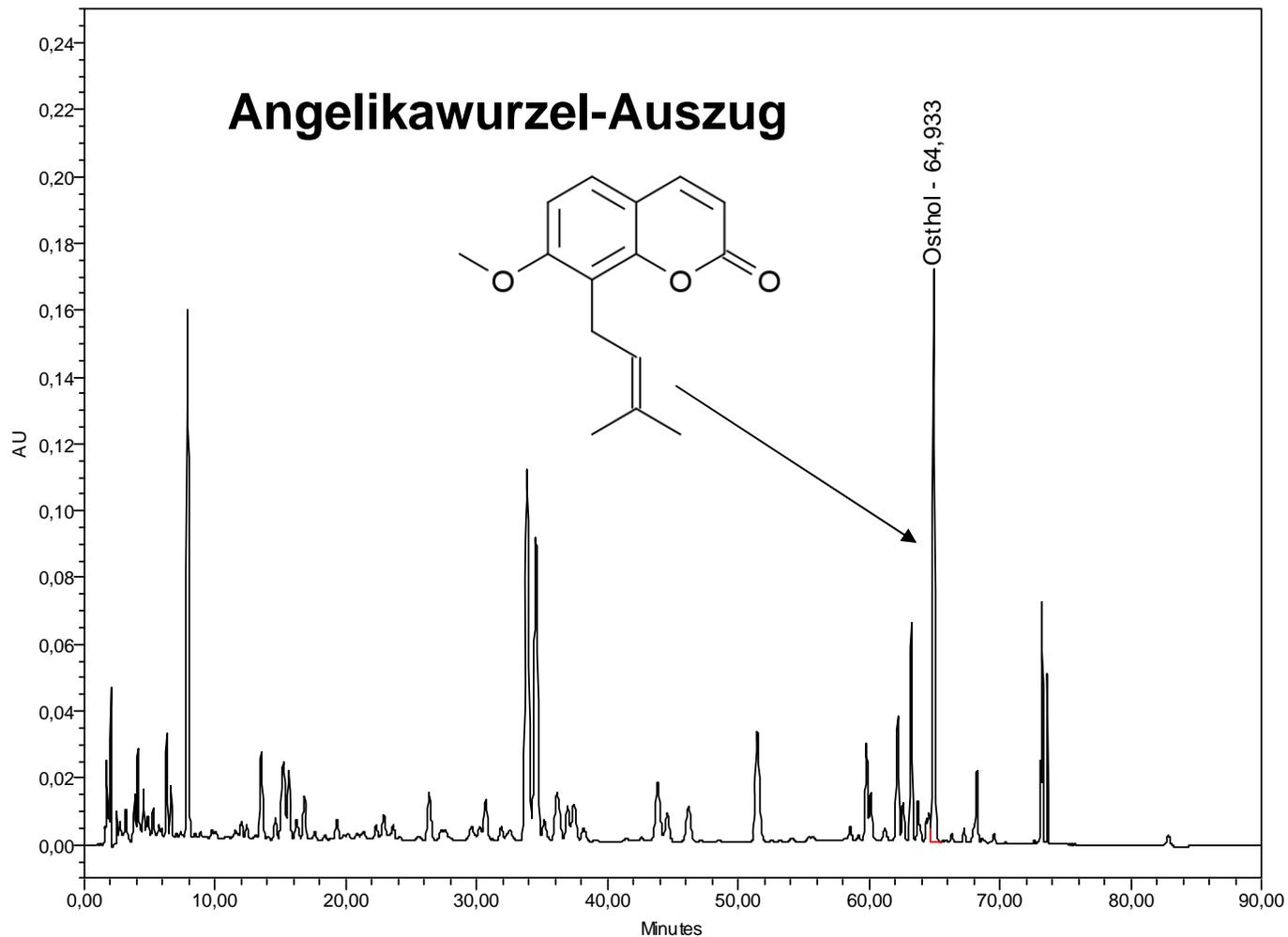
Methodenentwicklung

- Literaturrecherche
- Auswahl der stationären Phase je nach Molekülstruktur und Matrix des Präparates
- Optimierung von
 - Zusammensetzung der mobilen Phase (organischer Modifier, Organik-Anteil, pH-Wert, ggf. Gradient)
 - Fluss & Temperatur
- Systematische Optimierung mit Unterstützung durch Software „DryLab“

Methodenentwicklung



Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – „normale“ HPLC



Stat. Phase:

Reposil-Pur ODS-3,
150 x 4,6 mm, 3 µm

Mob. Phase:

Wasser/TFA/ACN/MeOH,
Gradient

Fluss:

1,0 ml/min

Temperatur:

45 °C

Wellenlänge:

323 nm

HPLC-Anlage:

Waters Alliance 2695

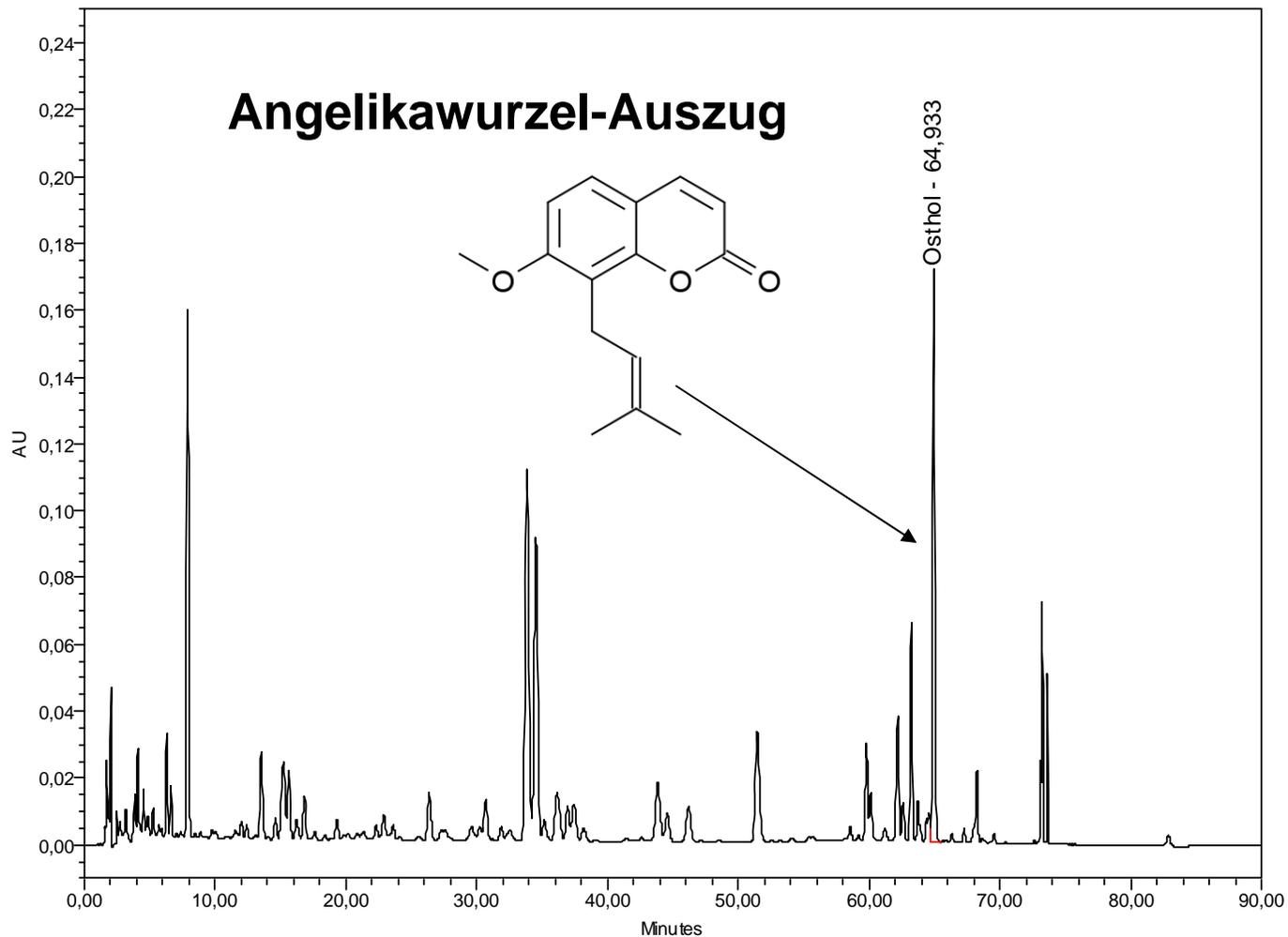
Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – „normale“ HPLC

Markersubstanzen

- „constituents with known therapeutic activity“, Bestandteile mit bekannter therapeutischer Wirkung
- „active markers“, tragen zur therapeutischen Wirkung bei, aber nicht vollständig
- „analytical markers“ für rein analytische Zwecke

OH,

Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – „normale“ HPLC



Stat. Phase:

Reprosil-Pur ODS-3,
150 x 4,6 mm, 3 µm

Mob. Phase:

Wasser/TFA/ACN/MeOH,
Gradient

Fluss:

1,0 ml/min

Temperatur:

45 °C

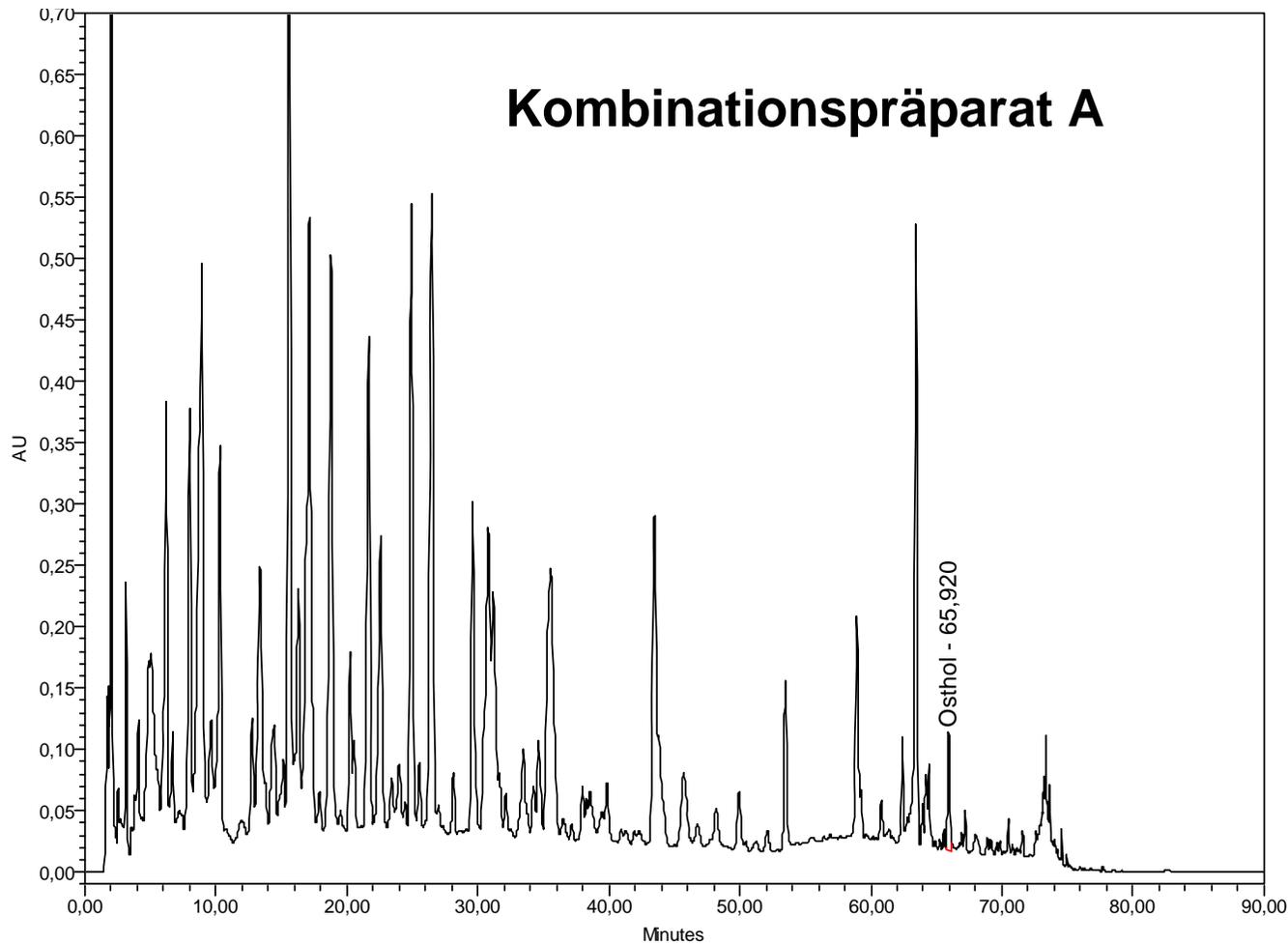
Wellenlänge:

323 nm

HPLC-Anlage:

Waters Alliance 2695

Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – „normale“ HPLC



Stat. Phase:

Reprosil-Pur ODS-3,
150 x 4,6 mm, 3 μ m

Mob. Phase:

Wasser/TFA/ACN/MeOH,
Gradient

Fluss:

1,0 ml/min

Temperatur:

45 °C

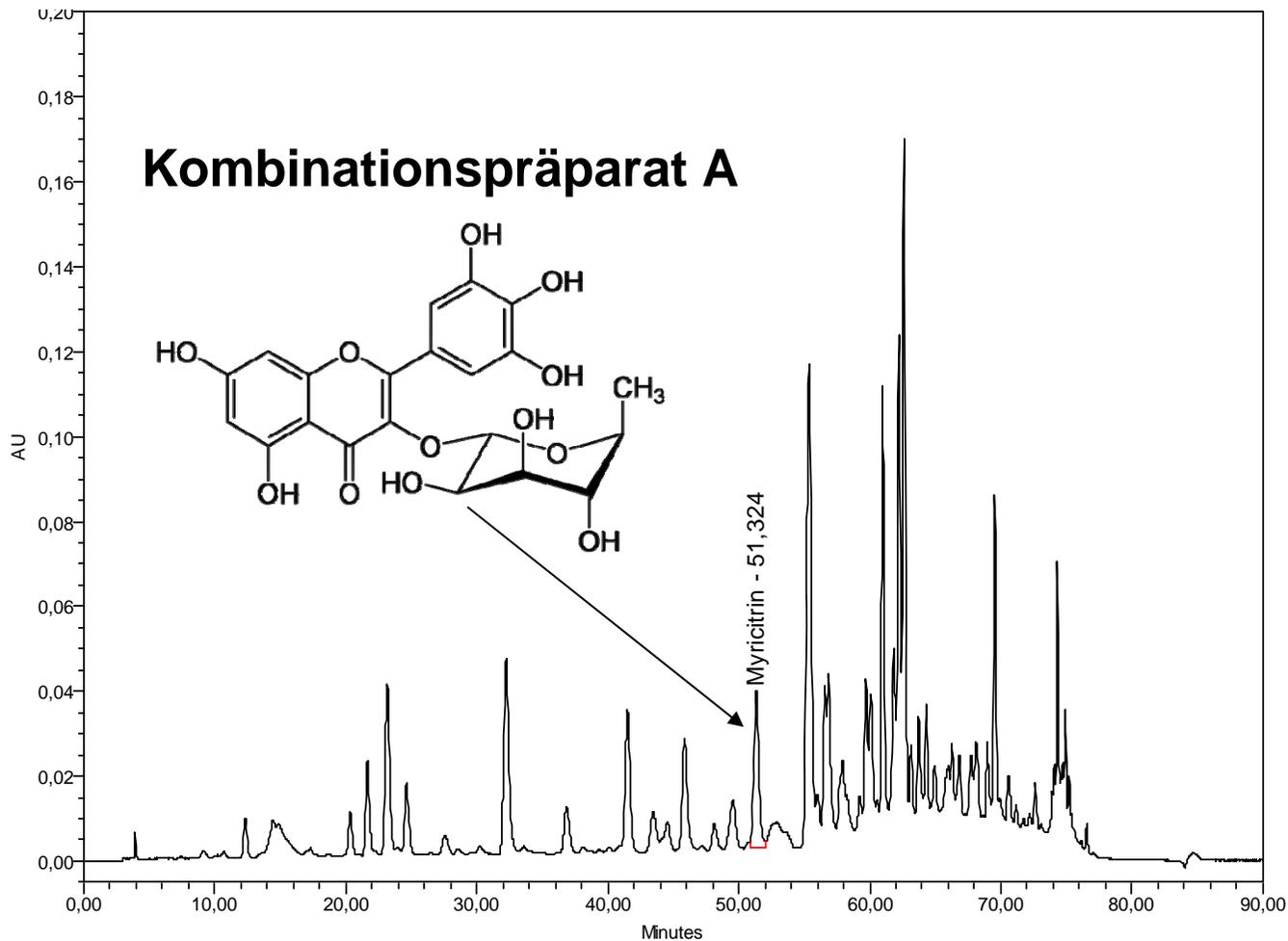
Wellenlänge:

323 nm

HPLC-Anlage:

Waters Alliance 2695

Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – „normale“ HPLC



Stat. Phase:
Synergi Polar-RP,
250 x 4,6 mm, 4 μ m

Mob. Phase:
Wasser/TFA/ACN/MeOH,
Gradient

Fluss:
1,0 ml/min

Temperatur:
35 °C

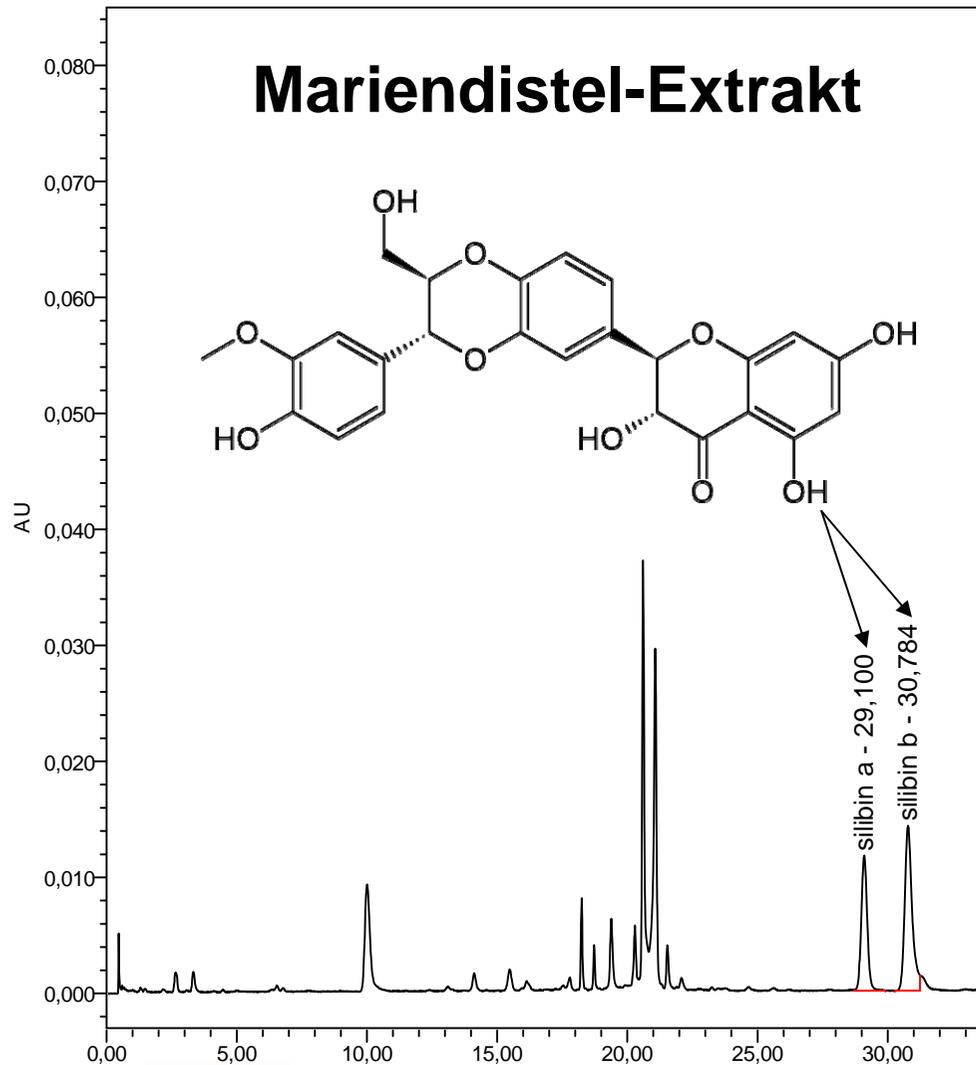
Wellenlänge:
349 nm

HPLC-Anlage:
Waters Alliance 2695

Pflanzliches Kombinationspräparat: Betrachtung Methodenentwicklung – „normale HPLC“

- Laufzeit 1,5h
- Ermittlung der stationären Phase:
 - 2-3 Läufe auf acht stationären Phasen à 1,5h => 2-3 Tage
- Optimierung von 5 Parametern auf vier stationären Phasen:
 - Gradient, organischer Modifier, Puffer, Temp., Fluss
 - 10-15 Läufe auf vier stationären Phasen à 1,5h => 2 Wochen
- **Gesamtdauer Methodenentwicklung 3 Wochen**

Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – Schnelle HPLC



Stat. Phase:

Ascentis Express C18,
100 x 2.1 mm (2.7 μ m)

Mob. Phase:

Wasser/TFA/ACN/MeOH,
Gradient

Fluss:

0,4 ml/min

Temperatur:

30 °C

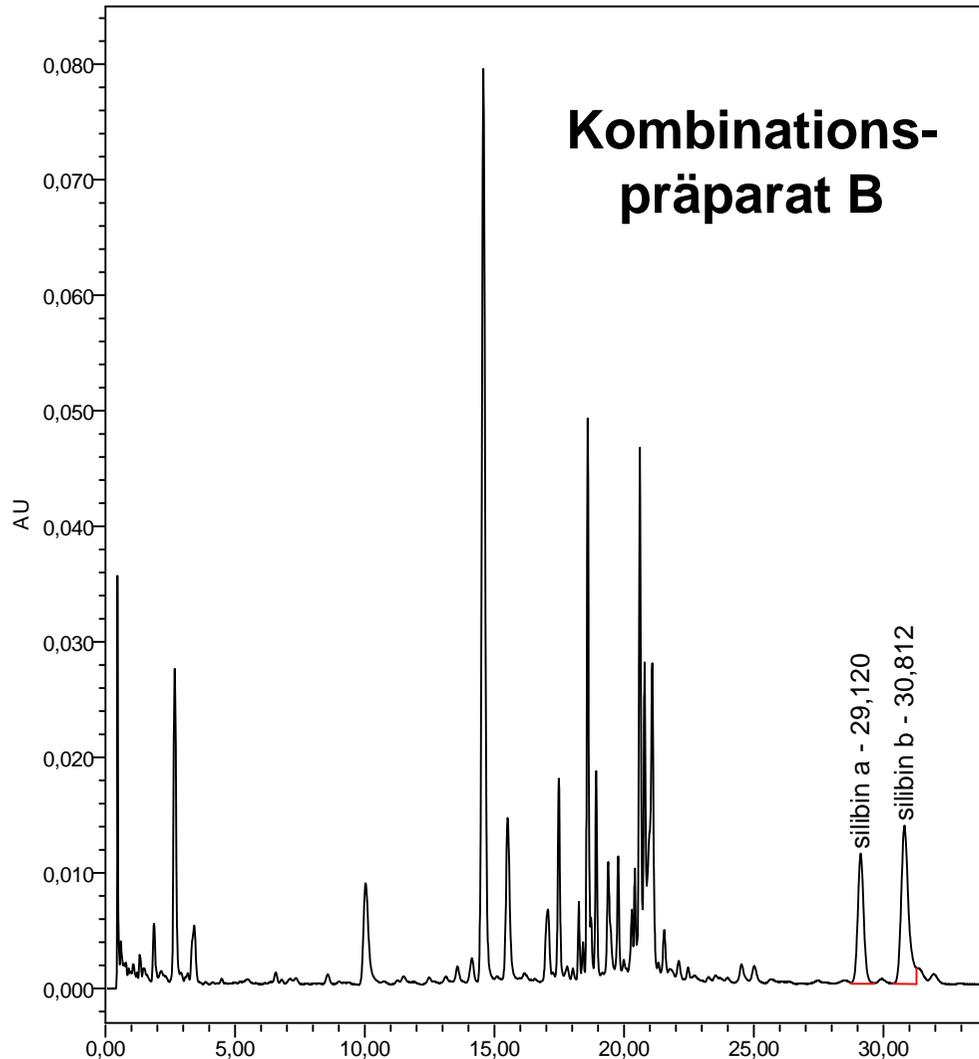
Wellenlänge:

287 nm

HPLC-Anlage:

Waters Acquity UPLC

Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – Schnelle HPLC



Stat. Phase:

Ascentis Express C18,
100 x 2.1 mm (2.7 μ m)

Mob. Phase:

Wasser/TFA/ACN/MeOH,
Gradient

Fluss:

0,4 ml/min

Temperatur:

30 °C

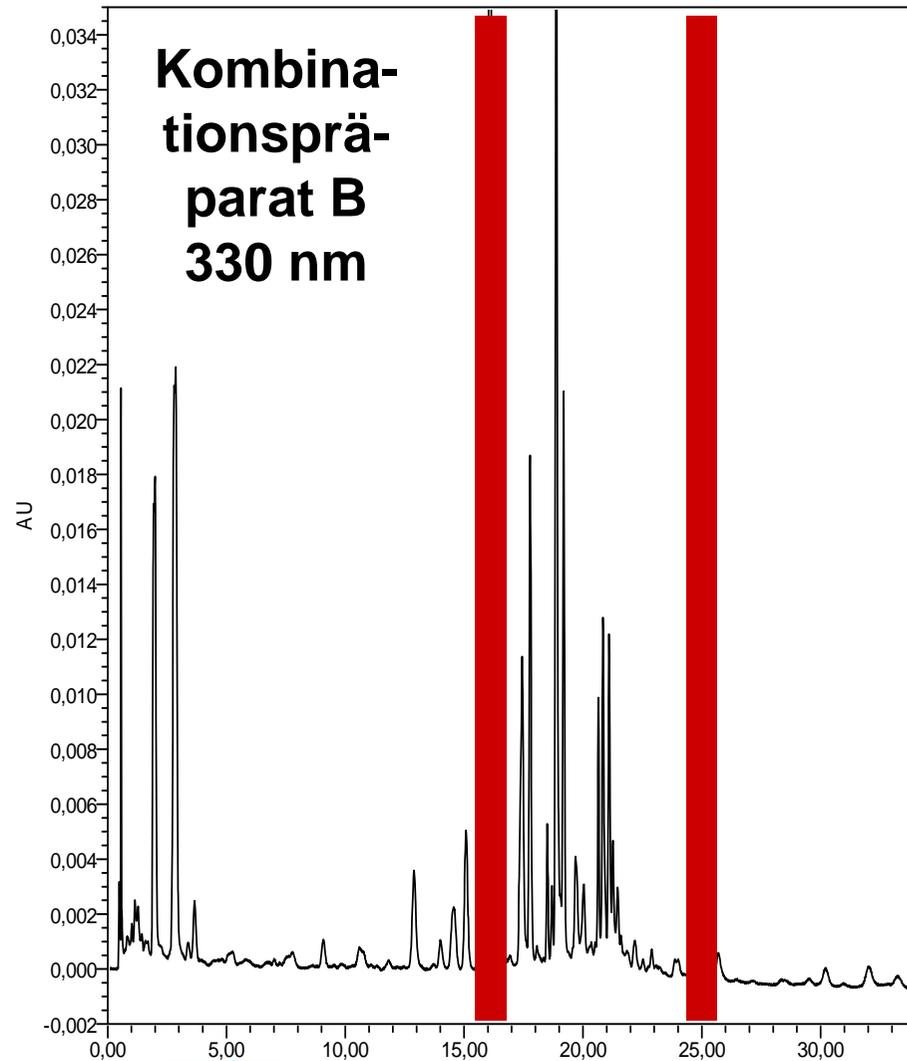
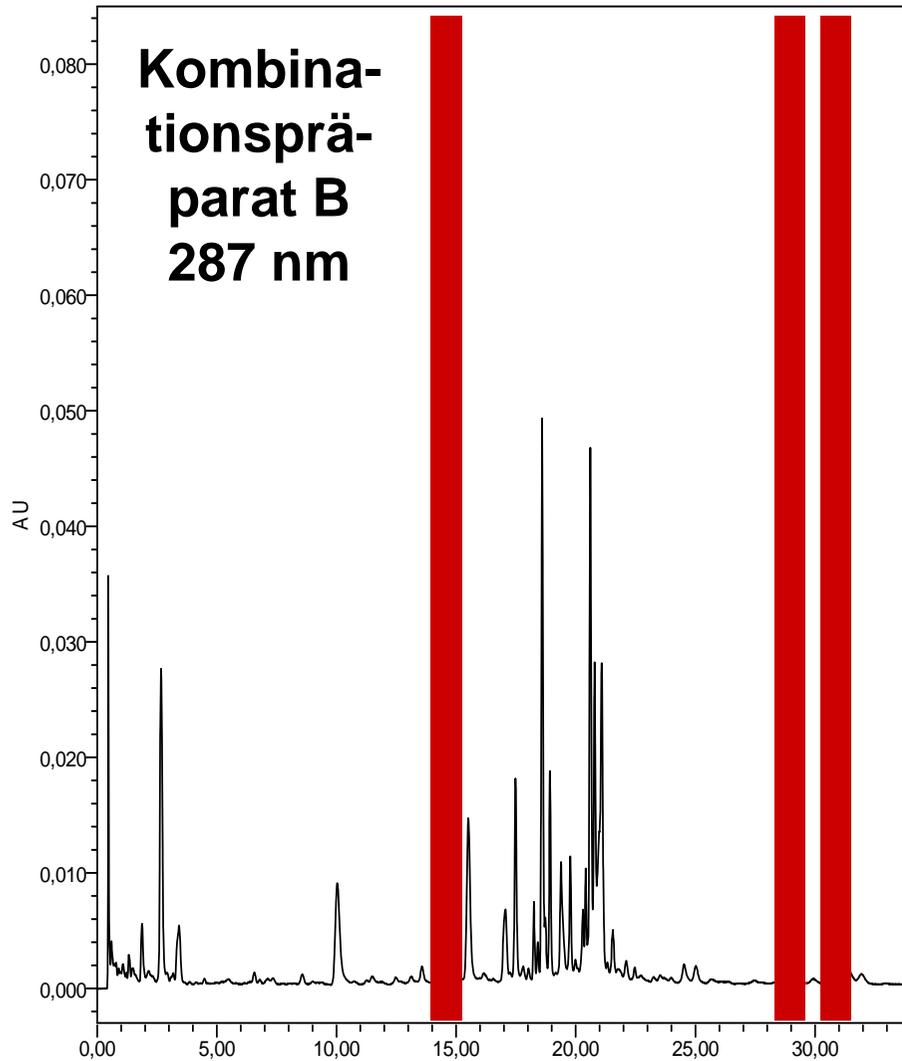
Wellenlänge:

287 nm

HPLC-Anlage:

Waters Acquity UPLC

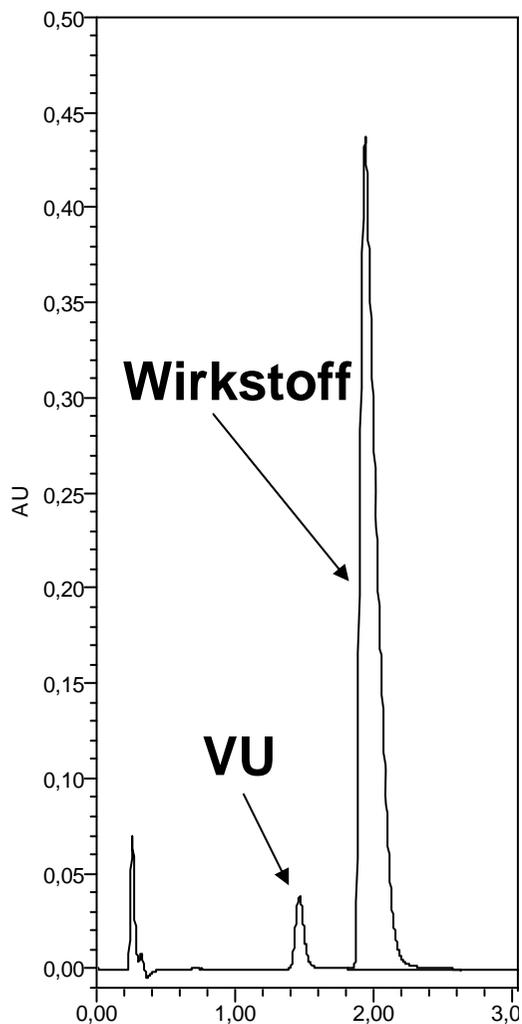
Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – Schnelle HPLC



Pflanzliches Kombinationspräparat: Betrachtung Methodenentwicklung – Schnelle HPLC

- Laufzeit 35 min
- Ermittlung der stationären Phase:
 - 2 Läufe auf 3 stationären Phasen à 35 min => 0,5 Tage
- Optimierung von 5 Parametern auf der stationären Phase:
 - Gradient, organischer Modifier, Puffer, Temp., Fluss
 - 10-15 Läufe auf einer stationären Phase à 35 min => 2 Tage
- **Gesamtdauer Methodenentwicklung 0,5 Wochen**

Methodenentwicklung chem. def. Produkt – Schnelle HPLC



Stat. Phase:

Acquity BEH C18
50 x 2.0 mm (1.7 μ m)

Mob. Phase:

0,02 m NaHCO₃/ACN 90/10 (v/v), pH = 10,5

Fluss:

0,5 ml/min

Temperatur:

30 °C

Wellenlänge:

221 nm

HPLC-Anlage:

Waters Acquity UPLC

Arzneimittel mit chemisch definiertem Wirkstoff: Betrachtung Methodenentwicklung – Schnelle HPLC

- Schnelle Gehalts- und Reinheitsbestimmung
 - Probenvorbereitung
- Verkürzung der Gesamtdauer der Methodenentwicklung nicht so groß
 - Initiale Analysendauer kurz
- Herausforderung Zersetzung des WS auf der Säule gelöst

Zusammenfassung

- Schnelle HPLC im Dienstleistungsbereich
 - Vorteile:
 - Methodenentwicklung
 - Phytopharma-Analytik
 - Instabile Substanzen
 - Einschränkungen
 - relativ kleine Probenzahl
 - Probenvorbereitung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt
 - Geringe Verbreitung der UHPLC-Anlagen

Firmen und Dienstleistungen



Pharmazeutische Analytik, Referenzstandards,
Drug Safety & Non-Clinical Assessment

www.hwi-analytik.com



Regulatory Affairs

www.i-dras.com



Mikrobiologie, Pharmazeutische Analytik

www.laz-labor.com



Pharmazeutische F&E, Produktentwicklung

www.sercona.org