

**Verbundene  
Unternehmen:**



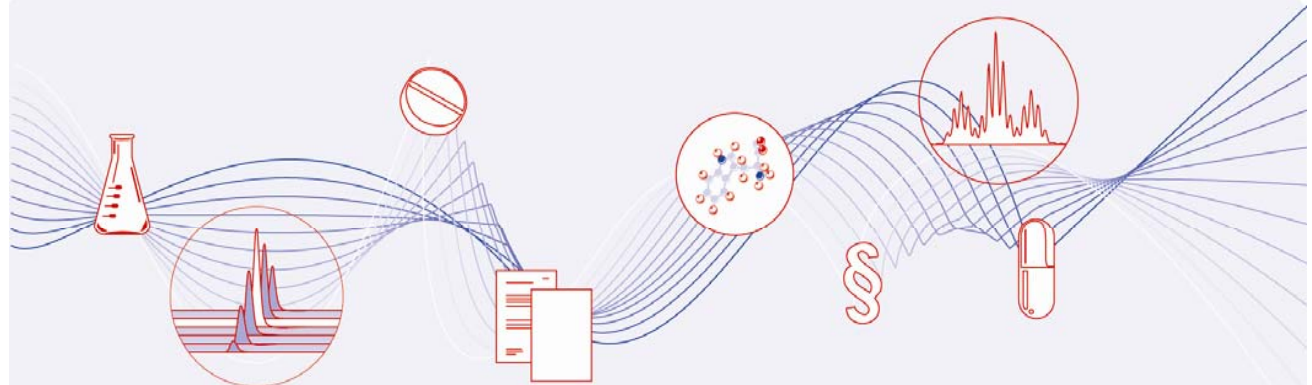
## **Citius, altius, fortius – wie schnell muss man in der HPLC werden?**

**Erfahrungen eines pharmazeutischen Dienstleisters**

***Dr. Frank Michel***

***HWI Analytik GmbH – [f.michel@hwi-analytik.de](mailto:f.michel@hwi-analytik.de)***

***Jahrestagung der DPhG 2009 - Jena - 28.09.2009***



# Wer ist die HWI Analytik GmbH?

---

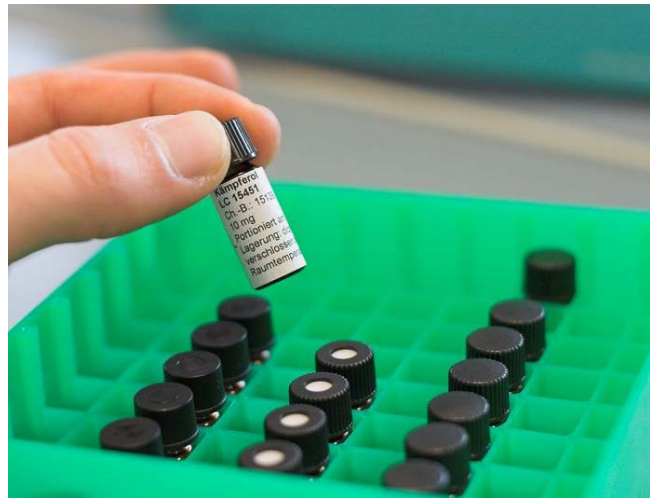
- Entwicklung und Validierung von Prüfmethoden
- Stabilitätsprüfungen
- Prüfungen nach Arzneibüchern
- Freisetzungsuntersuchungen
- Extractables/Leachables
- Spezialanalytik



# Wer ist die HWI Analytik GmbH?

---

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



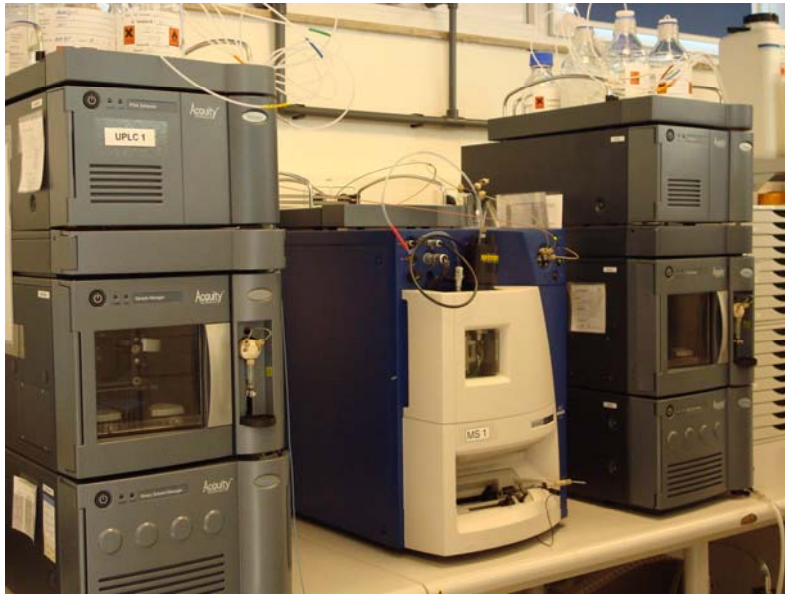
## Vorteile durch Schnelle Chromatographie?

---

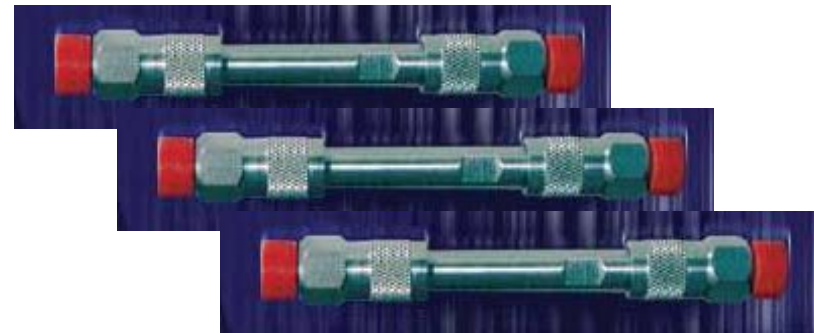
- Dienstleistungsbereich: in der Regel breites Spektrum unterschiedlicher Proben in relativ kleiner Probenzahl
- UHPLC-Anlagen bei Auftraggebern und Lohnherstellern als relativ neue Technik noch nicht umfassend etabliert
- Aufwändige Probenvorbereitung ist oft limitierender als HPLC-Analytik

# Vorteile durch Schnelle Chromatographie!

---



**Ascentis<sup>®</sup> Express**

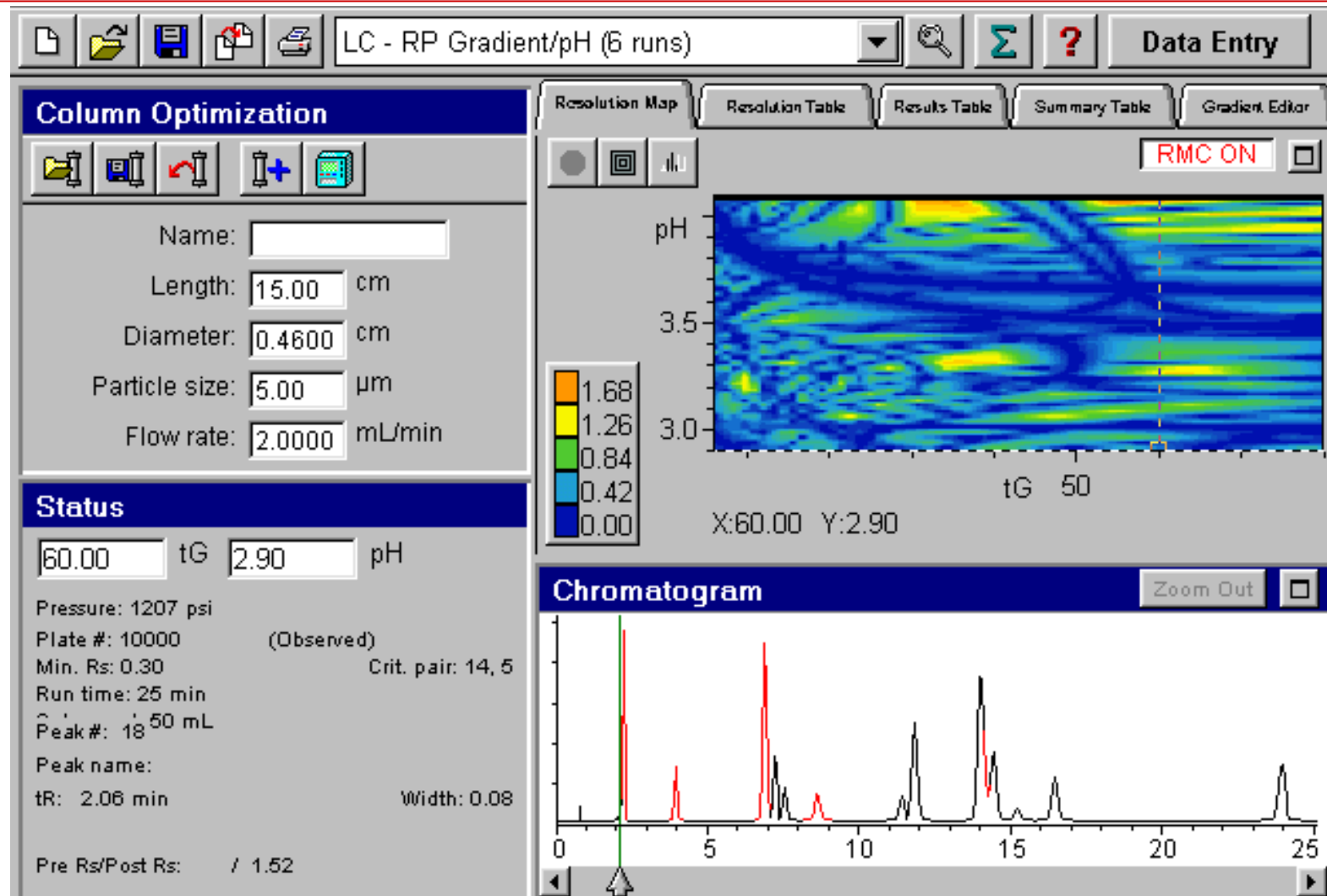


# Methodenentwicklung

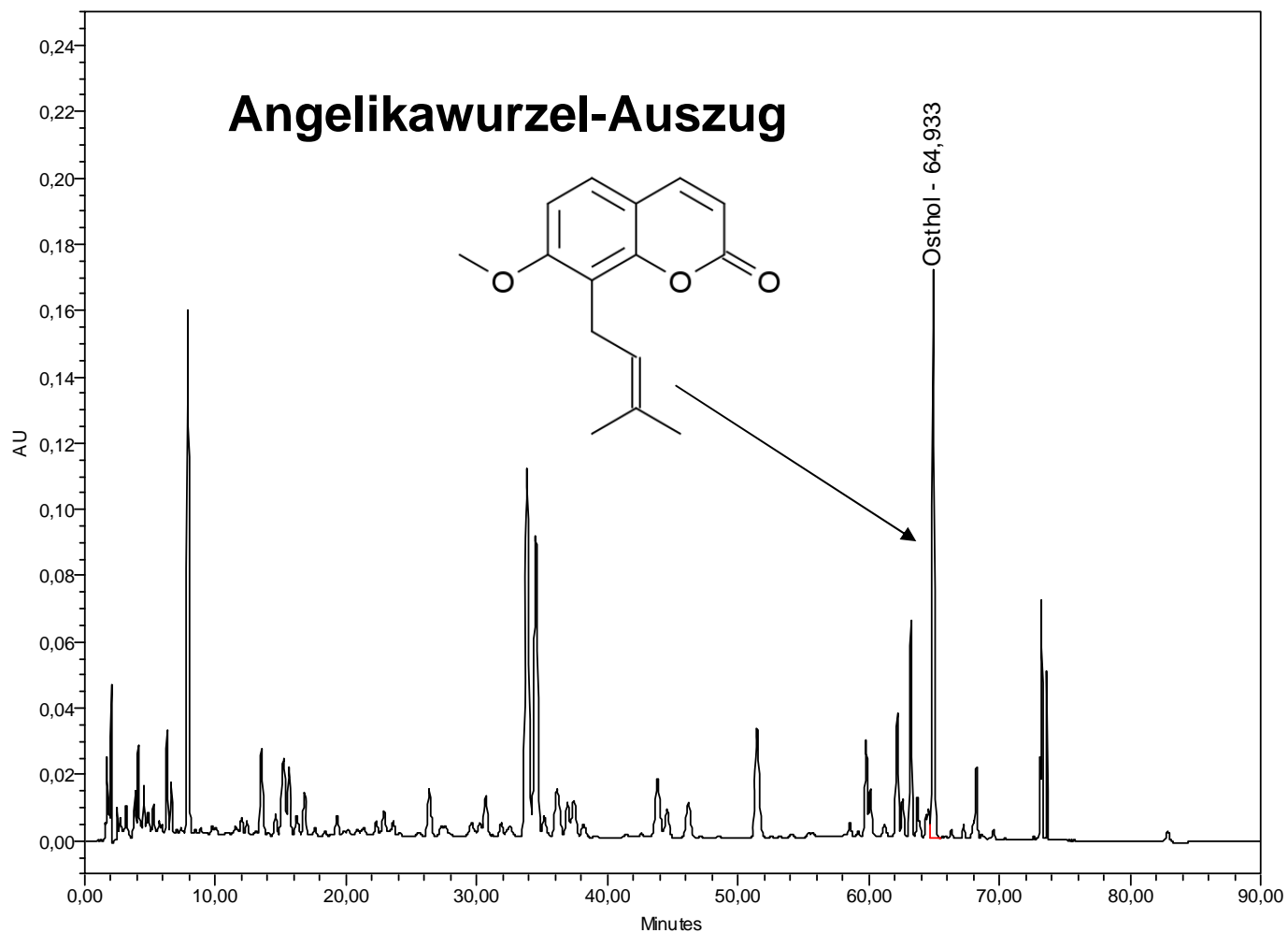
---

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

# Methodenentwicklung



# 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



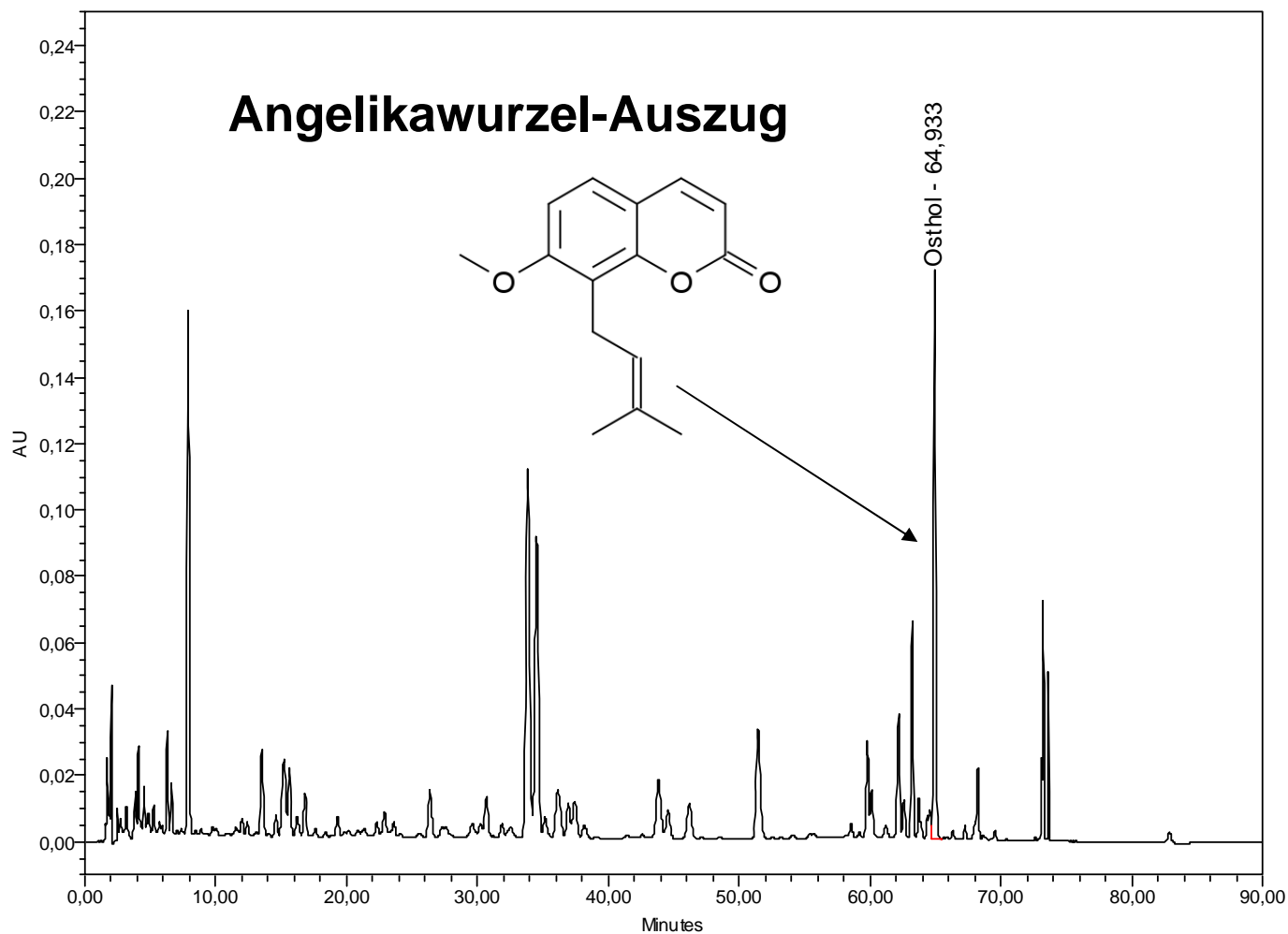
# Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – „normale“ HPLC

## 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

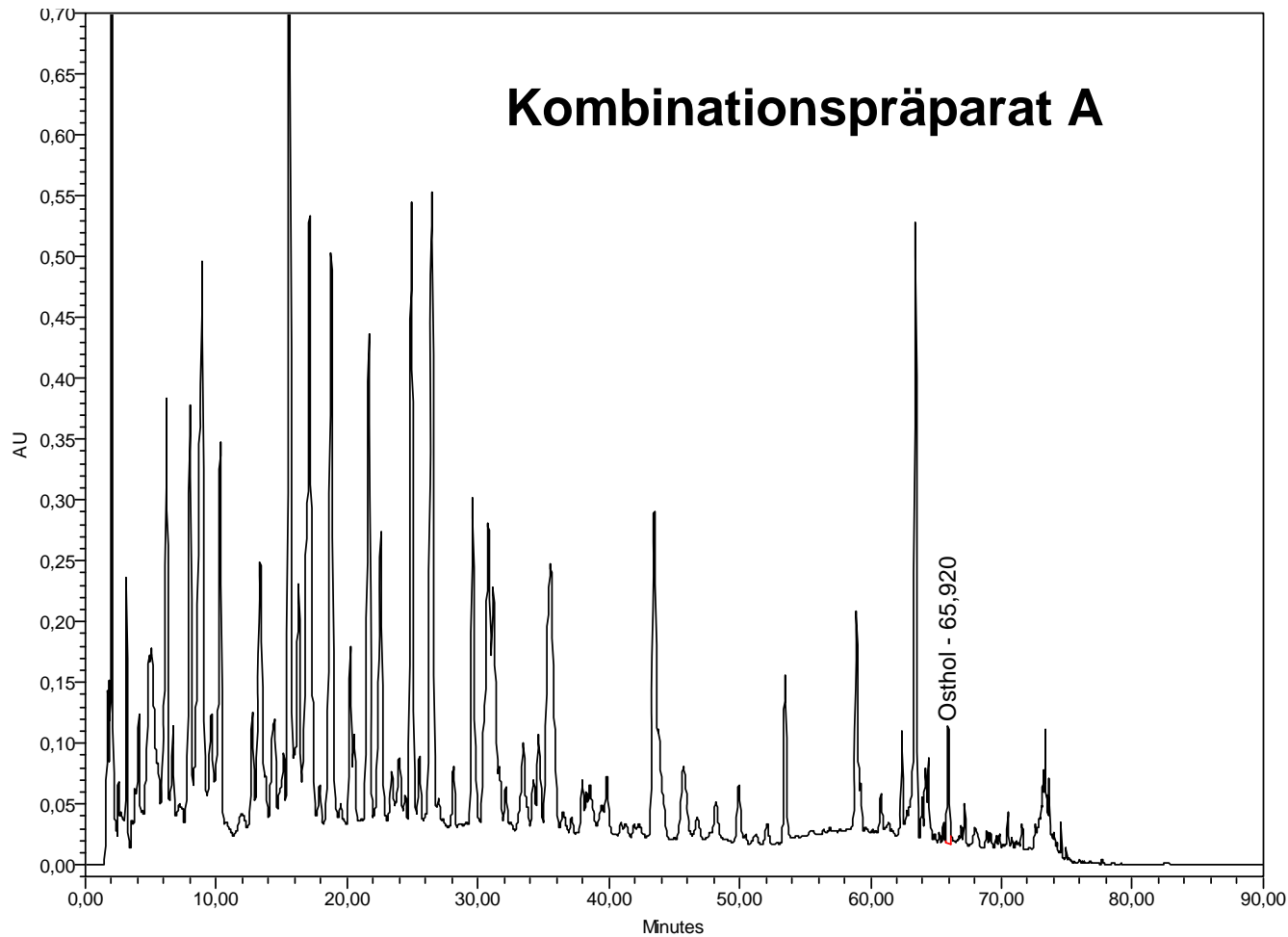
**Fluss:**  
1,0 ml/min

**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  $\mu$ m

**Mob. Phase:**

Wasser/TFA/ACN/MeOH,  
Gradient

**Fluss:**

1,0 ml/min

**Temperatur:**

45 °C

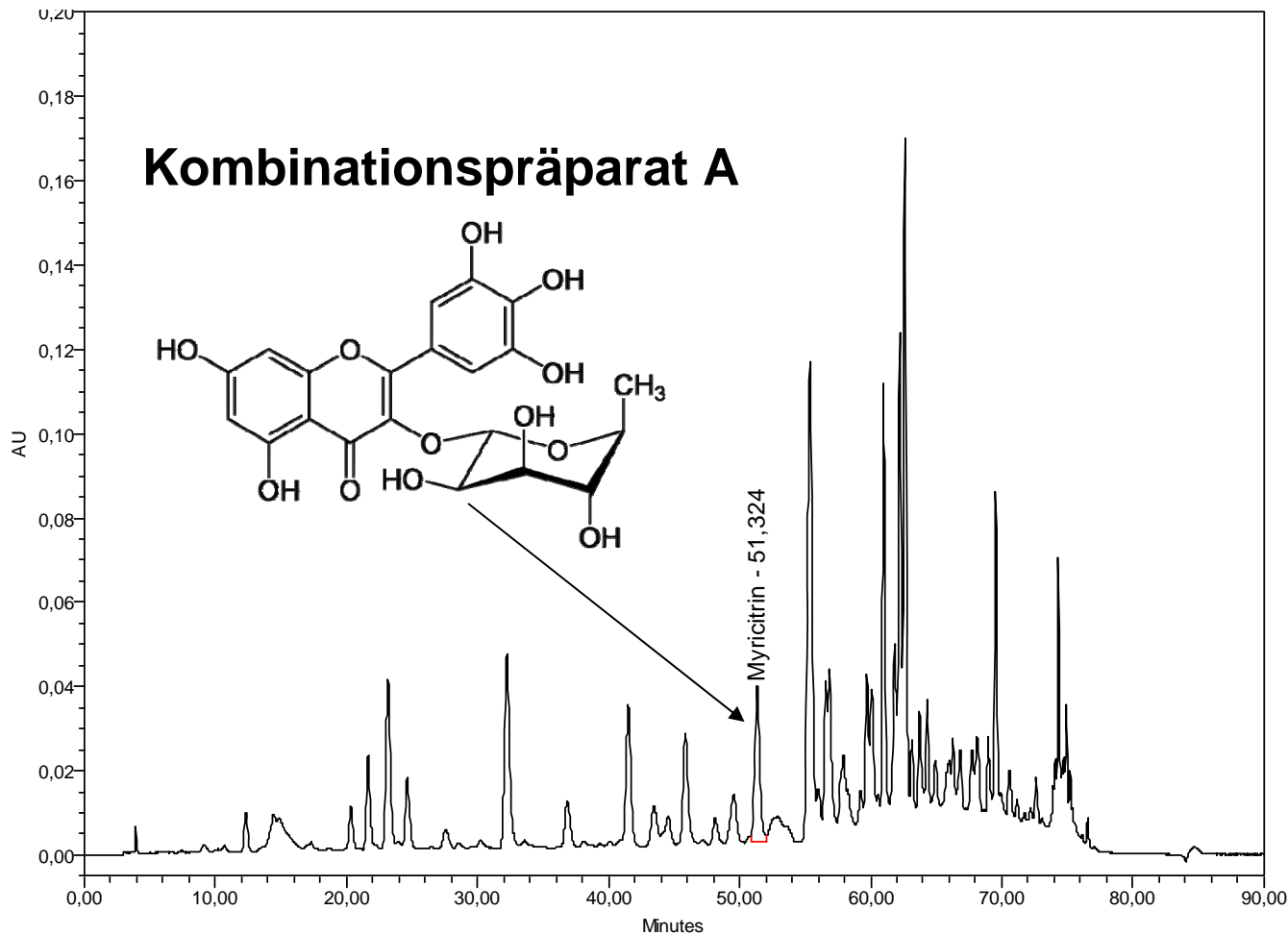
**Wellenlänge:**

323 nm

**HPLC-Anlage:**

Waters Alliance 2695

# Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – „normale“ HPLC



**Stat. Phase:**  
Synergi Polar-RP,  
250 x 4,6 mm, 4 µm

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

**Fluss:**  
1,0 ml/min

**Temperatur:**  
35 °C

**Wellenlänge:**  
349 nm

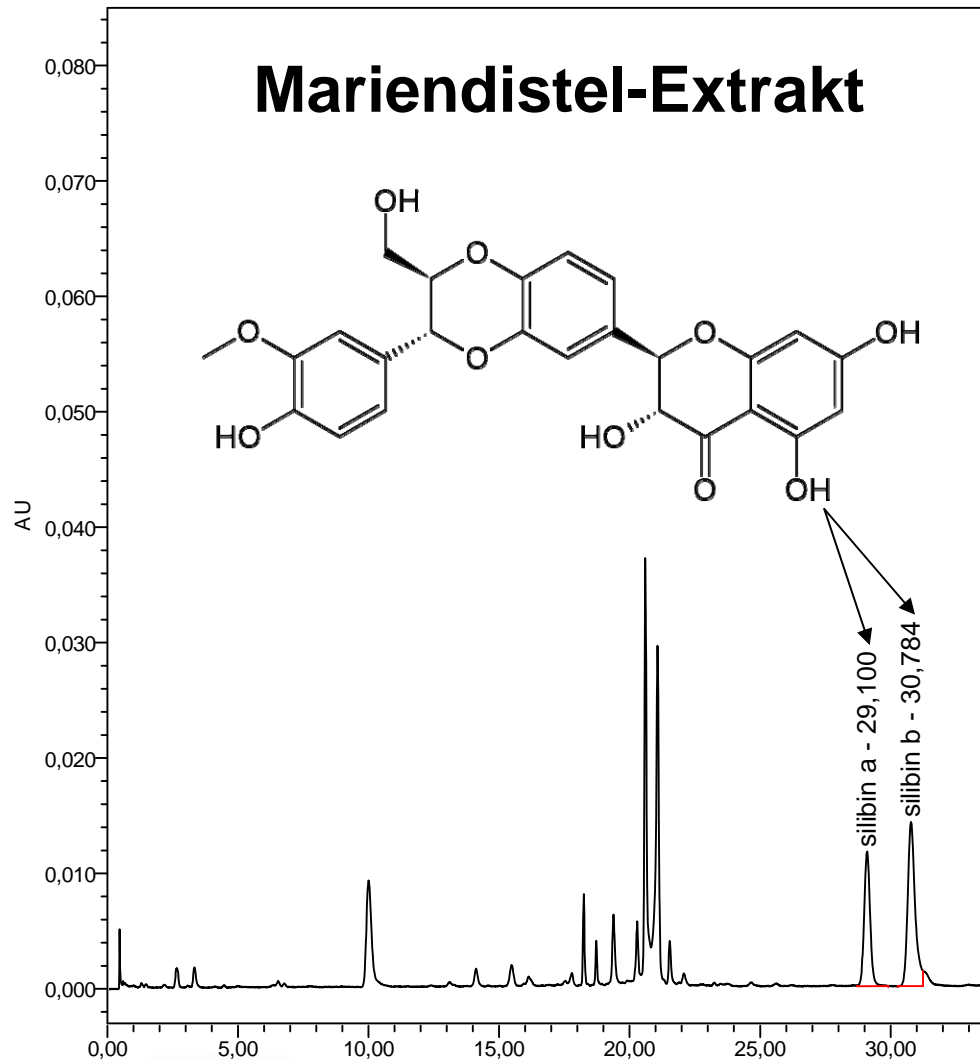
**HPLC-Anlage:**  
Waters Alliance 2695

# 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  $\mu$ m)

**Mob. Phase:**

Wasser/TFA/ACN/MeOH,  
Gradient

**Fluss:**

0,4 ml/min

**Temperatur:**

30 °C

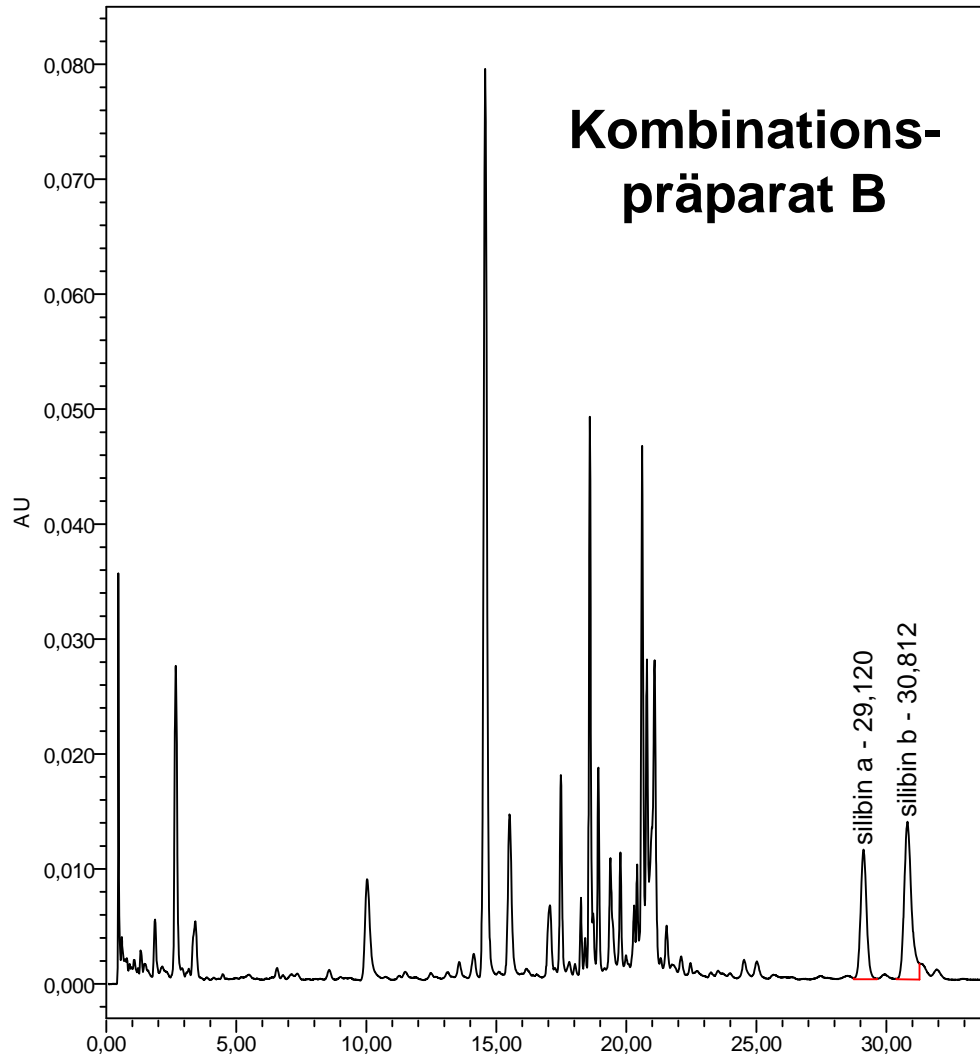
**Wellenlänge:**

287 nm

**HPLC-Anlage:**

Waters Acquity UPLC

# Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – Schnelle HPLC



**Stat. Phase:**

Ascentis Express C18,  
100 x 2.1 mm (2.7  $\mu$ m)

**Mob. Phase:**

Wasser/TFA/ACN/MeOH,  
Gradient

**Fluss:**

0,4 ml/min

**Temperatur:**

30 °C

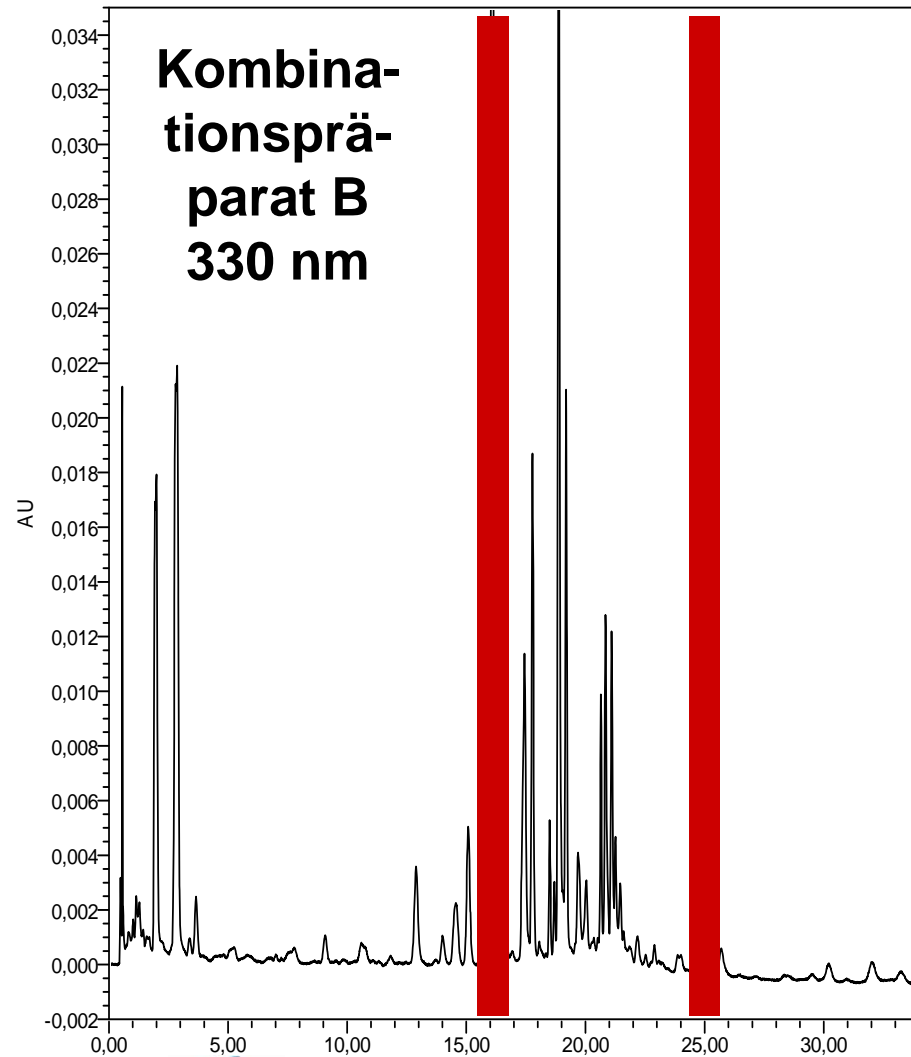
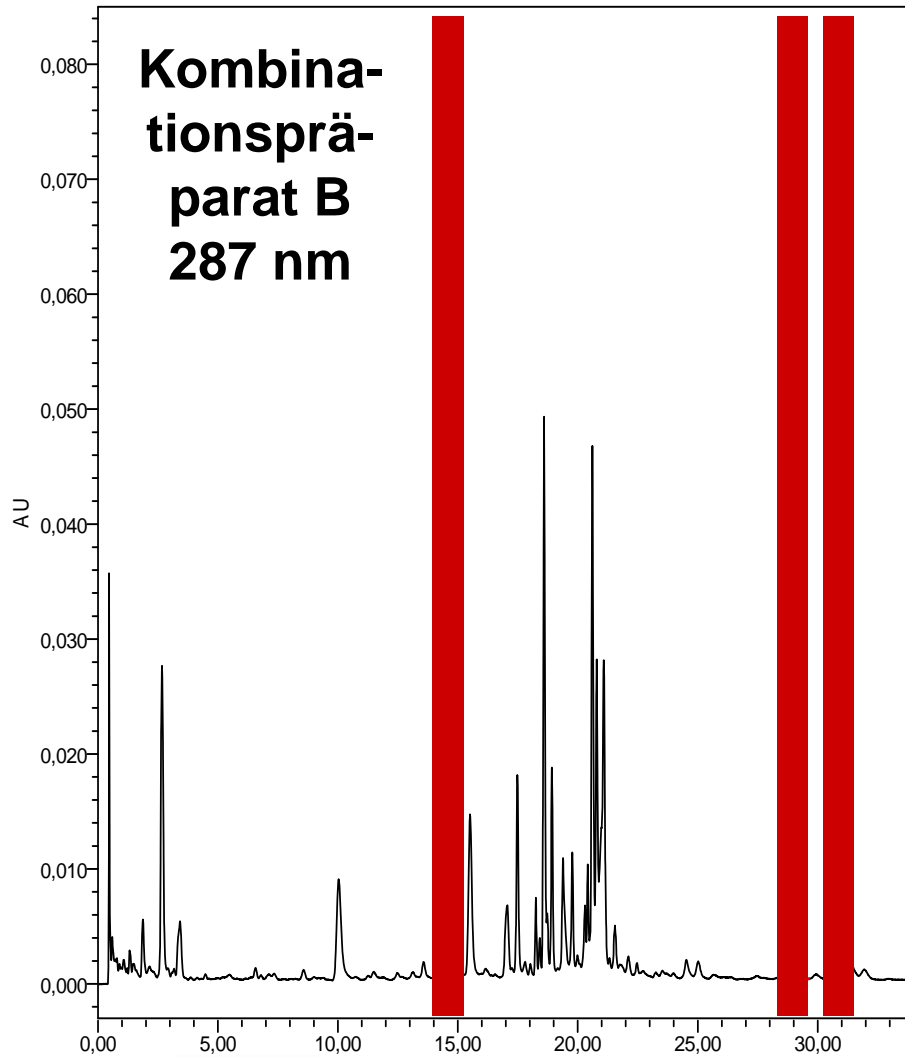
**Wellenlänge:**

287 nm

**HPLC-Anlage:**

Waters Acquity UPLC

# Pflanzliches Kombinationspräparat: Methodenentwicklung – Schnelle HPLC



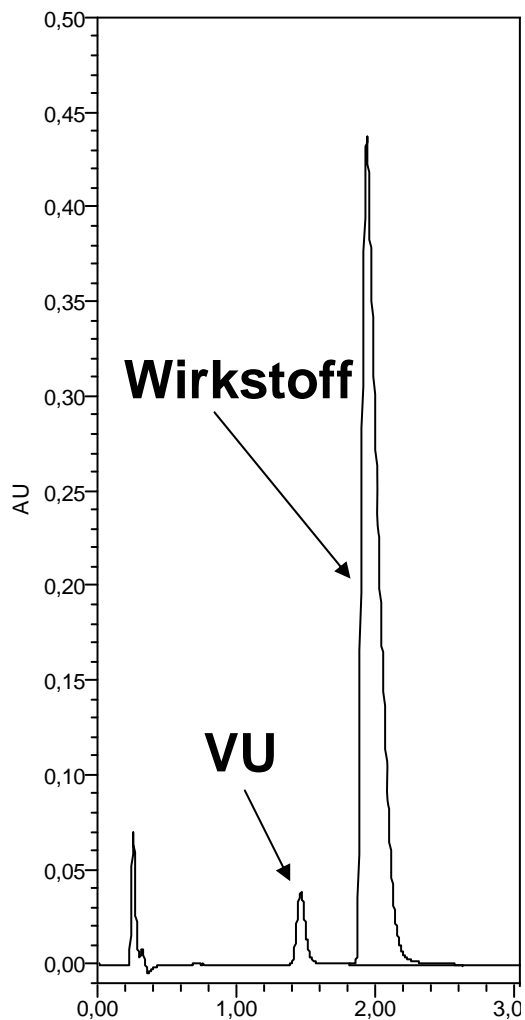


# Pflanzliches Kombinationspräparat: Betrachtung Methodenentwicklung – Schnelle HPLC

---

- 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  $\mu$ m)

**Mob. Phase:**

0,02 m NaHCO<sub>3</sub>/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](http://www.hwi-analytik.com)



Regulatory Affairs

[www.i-dras.com](http://www.i-dras.com)



Mikrobiologie, Pharmazeutische Analytik

[www.laz-labor.com](http://www.laz-labor.com)



Pharmazeutische F&E, Produktentwicklung

[www.sercona.org](http://www.sercona.org)