



CE in der pharmazeutischen Analytik

Bestimmung der Stereoisomerenreinheit und verwandter Substanzen

Gerhard K. E. Scriba

Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Pharmazie

ICH guideline Q3A

Impurities in New Drug Substances



➤ Verwandte Substanzen (drug-related impurities)

Maximum Daily Dose¹	Reporting Threshold^{2,3}	Identification Threshold³	Qualification Threshold³
≤ 2g/day	0.05%	0.10% or 1.0 mg per day intake (whichever is lower)	0.15% or 1.0 mg per day intake (whichever is lower)
> 2g/day	0.03%	0.05%	0.05%

➤ **Ausnahmen**

- Verunreinigungen, die nach GMP nicht vorkommen dürfen
- polymorphe Formen
- enantiomere Verunreinigungen

ICH guideline Q6A - *Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances*



- Where a new drug substance is predominantly one enantiomer, the opposite enantiomer is excluded from the qualification and identification thresholds given in the ICH guidelines on Impurities in New Drug Substances and Impurities in New Drug Products because of practical difficulties in quantifying it at those levels.
- Identification testing should optimally be able to discriminate between compounds of closely related structure.
- New drug substances which are optically active may also need specific identification testing or performance of a chiral assay.
- For chiral drug substances which are developed as a single enantiomer, control of the other enantiomer should be considered in the same manner as for other impurities. However, technical limitations may preclude the same limits of quantification or qualification from being applied.



Prüfung auf Reinheit des Arzneibuchs

- Prüfung auf verwandte Substanzen
 - Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)
 - Gaschromatographie (GC)
 - Dünnschichtchromatographie (DC)
 - Kapillarelektrophorese (CE)

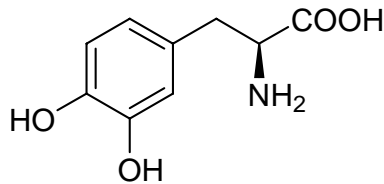
- Prüfung auf Stereoisomerenreinheit
 - Spezifische Drehung
 - Stereoselektive Hochdruckflüssigkeitschromatographie
 - Stereoselektive Kapillarelektrophorese

- Prüfung auf weiterer organische und anorganische Verunreinigungen
 - Einzelprüfungen
 - Sulfatasche

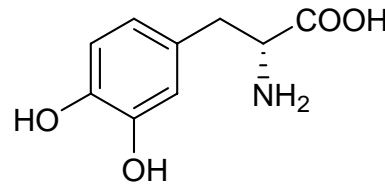
Levodopa



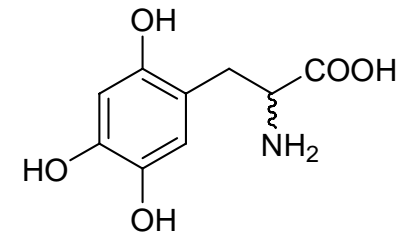
- Europäisches Arzneibuch
 - Verwandte Substanzen: Umkehrphasenchromatographie
 - Enantiomerenreinheit: Ligandenaustauschchromatographie



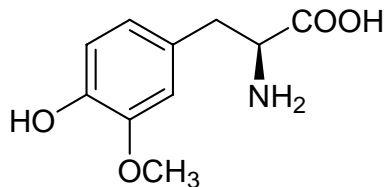
Levodopa



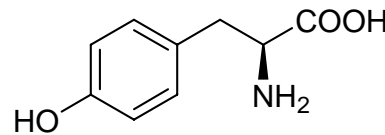
D-DOPA



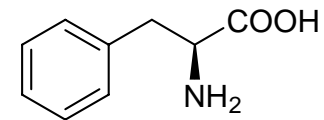
6-OH-DOPA



3-OMe-Tyrosin



Tyrosin

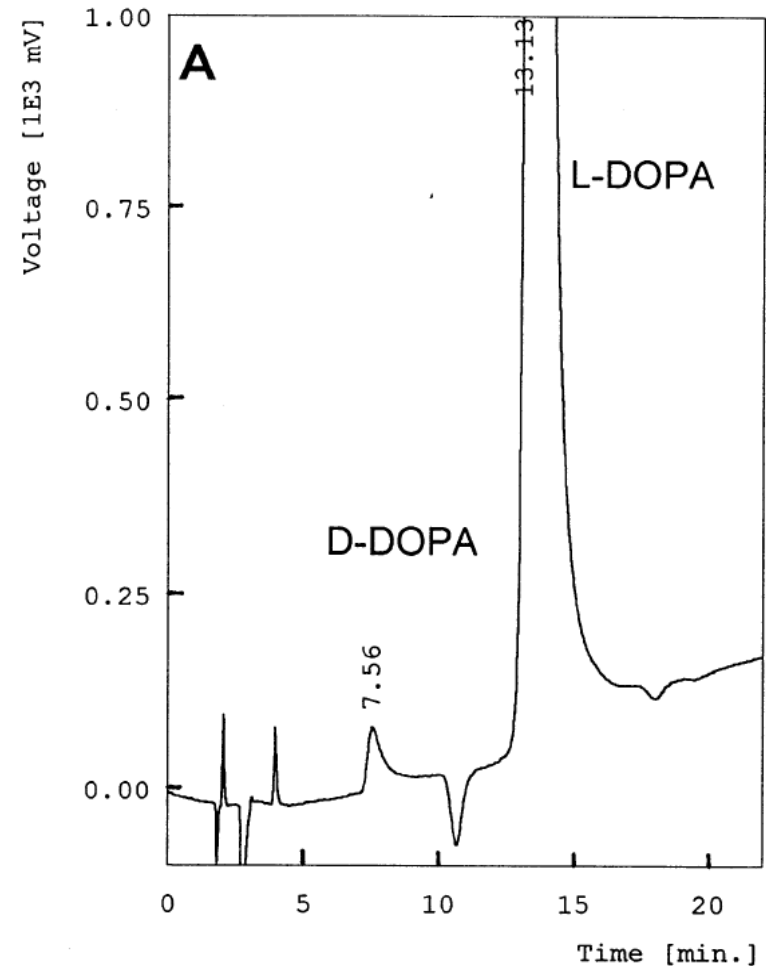


Phenylalanin (IS)

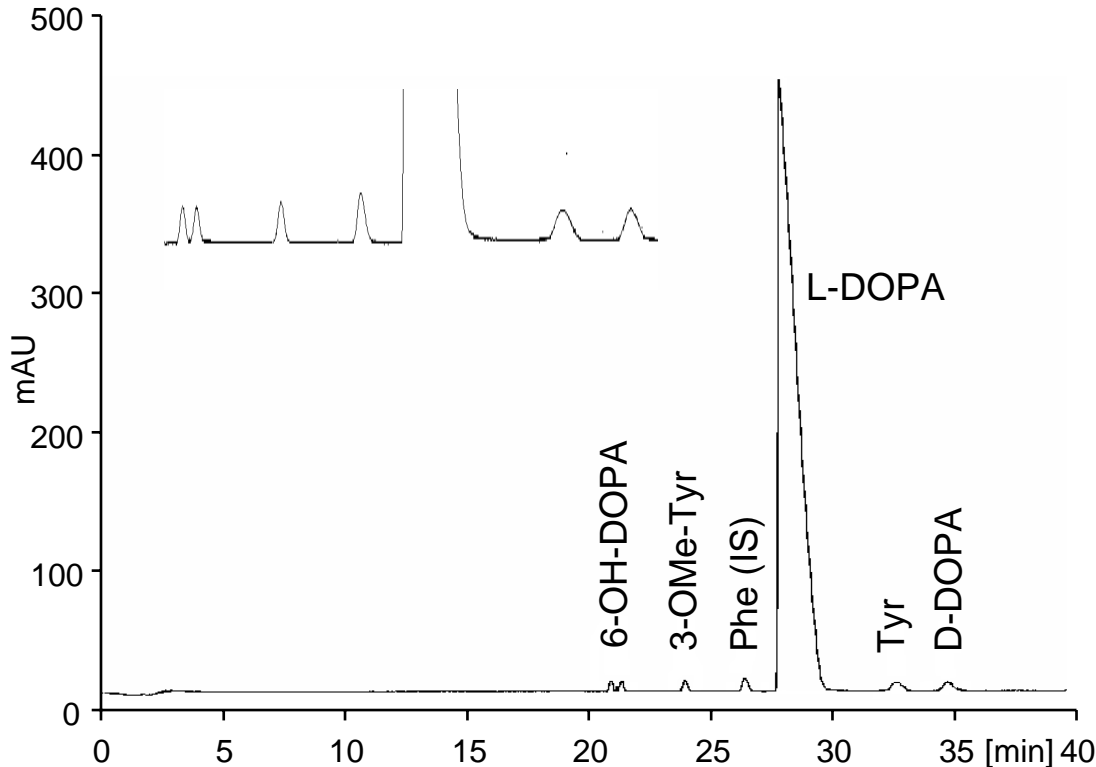
Levodopa – Ligandenaustauschchromatographie



- RP-18 Säule, endcapped
- Mobile Phase
 - 200 mg Kupferacetat
 - 387 mg N,N-Dimethyl-L-phenylalanin
 - 50 mL Methanol
 - in 1000 mL Wasser
- 1 mL/min
- 280 nm
- Limit: 0.5%



Levodopa – CE Trennung der Nebenprodukte



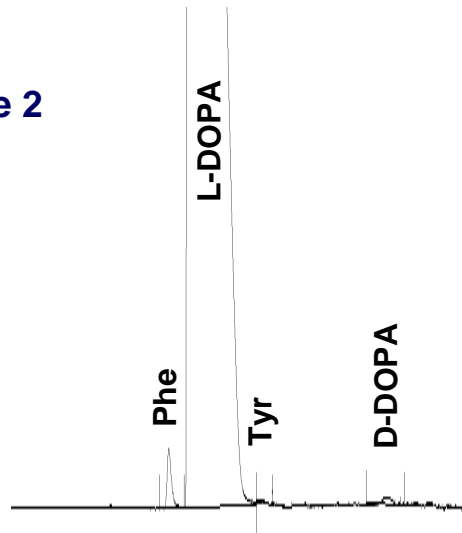
- Validierungsdaten
 - Bereich: 0.1 – 1.0 %
(2.0 – 20 $\mu\text{g/mL}$)
 - LOD: 0.03 – 0.04%
(0.6 – 0.8 $\mu\text{g/mL}$)
 - Wiederholpräzision
 - Intraday
 - 0.1%: < 9.05%
 - 0.9%: < 3.75%
 - Interday
 - 0.1%: < 10.09%
 - 0.9%: < 6.11%

- 45.2/35 cm, 50 μm ID fused-silica Kapillare, 0.1 M Natriumphosphatpuffer, pH 2.0, 6 mg/mL sulfatiertes β -CD, 20 kV, 18°C, 200 nm
- 2 mg/mL Levodopa, 0.5% der verwandten Substanzen, 20 $\mu\text{g/mL}$ Phenylalanin (IS)

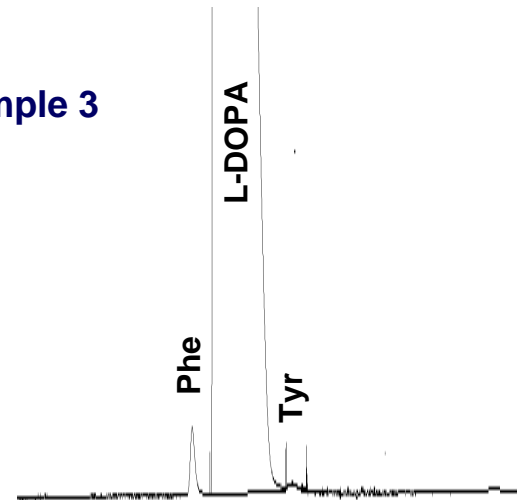


Levodopa – CE-Analyse von Chargen

Sample 2



Sample 3

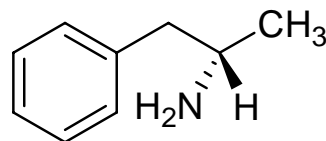


Compound		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Limit Ph.Eur.
6-OH-DOPA	enantiomer1	ND	ND	ND	0.1
	enantiomer 2	ND	ND	ND	
3-OMe-tyrosine		ND	ND	ND	0.2
Tyrosine		0.07	0.05	0.09	0.5
D-DOPA		0.08	0.15 ± 0.01	ND	0.5

Dexamphetaminsulfat



- (2S)-1-Phenylpropan-2-amin



- Spezifische Drehung

- USP: + 20 bis + 23.5 (c = 4 in Wasser)
- BP: + 19.5 bis + 22.0 (c = 8 in Wasser)
- Pharm. Helv.: + 20.0 bis + 24.0 (c = 4 in Wasser)
- DAC: + 20 bis + 24 (c = 4 in Wasser)

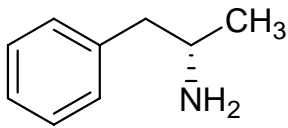
- Verwandte Substanzen (HPLC):

- USP: 0.1 % Einzelsubstanz, 0.5 % Summe
- BP: keine Angaben
- Pharm. Helv.: keine Angaben
- DAC: 0.1 % Einzelsubstanz, 0.5 % Summe

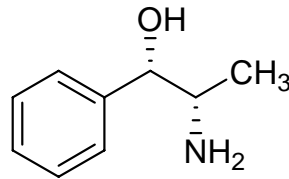
Dexamphetamin – potentielle verwandte Substanzen



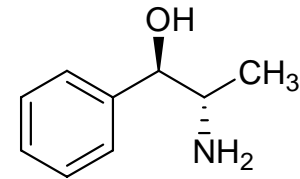
- Synthese aus stereoisomerenreinen Vorstufen
- Synthese racemischer Substanz und Racematspaltung mit L-(+)-Weinsäure



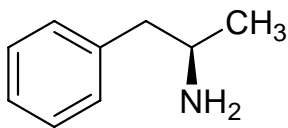
S-Amphetamin



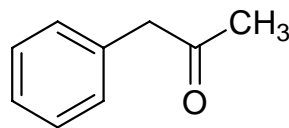
1S,2S-(+)-Norpseudoephedrin



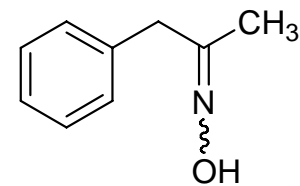
1R,2S-(-)-Norephedrin



R-Amphetamin



Phenylacetone

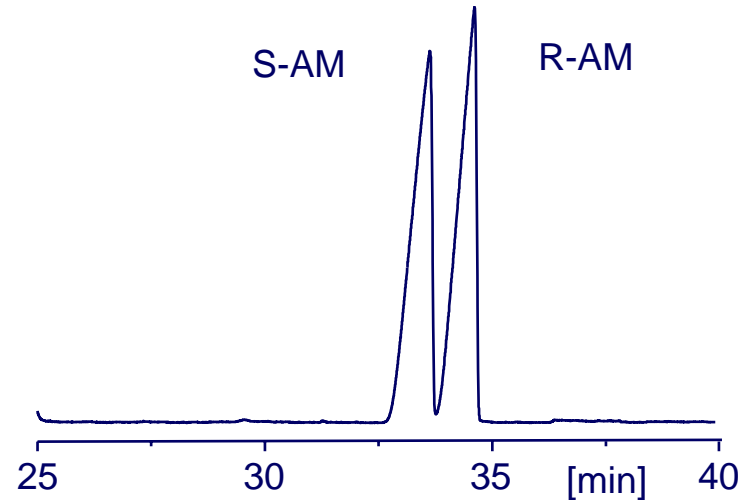


Phenylacetone oxime

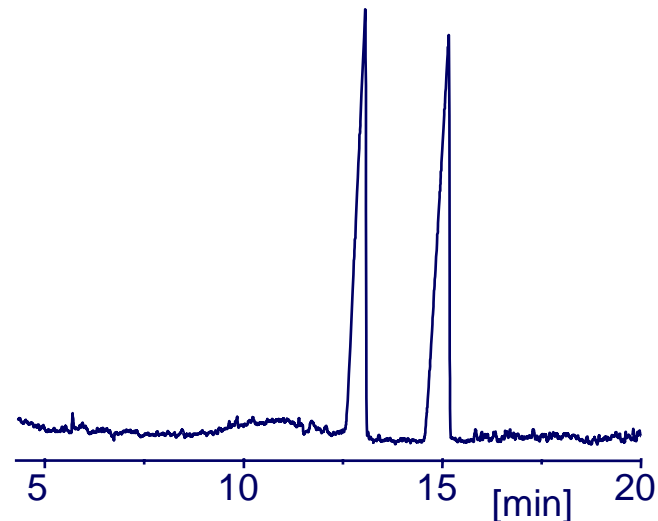


Enantiomerenentrennung von Amphetamin

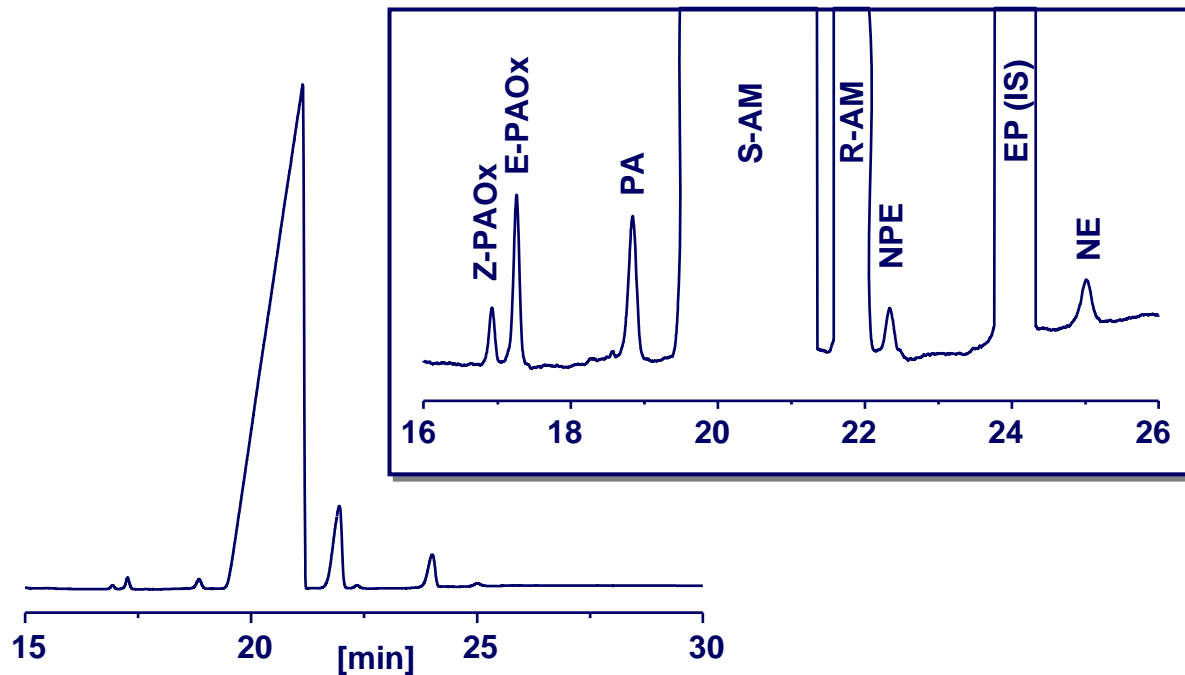
- **Sulfobutylether- β -CD**
 - 50.2/45 cm, 50 μ m ID fused-silica capillary
 - 50 mM sodium phosphate, pH 2.5
 - 80 mg/mL SBE- β -CD
 - -10 kV, 20°C, 200 nm
 - 1 mg/mL amphetamine



- **Sulfated β -CD**
 - 50.2/45 cm, 50 μ m ID fused-silica capillary
 - 50 mM sodium phosphate, pH 2.5
 - 20 mg/mL S- β -CD
 - -10 kV, 20°C, 200 nm
 - 1 mg/mL amphetamine

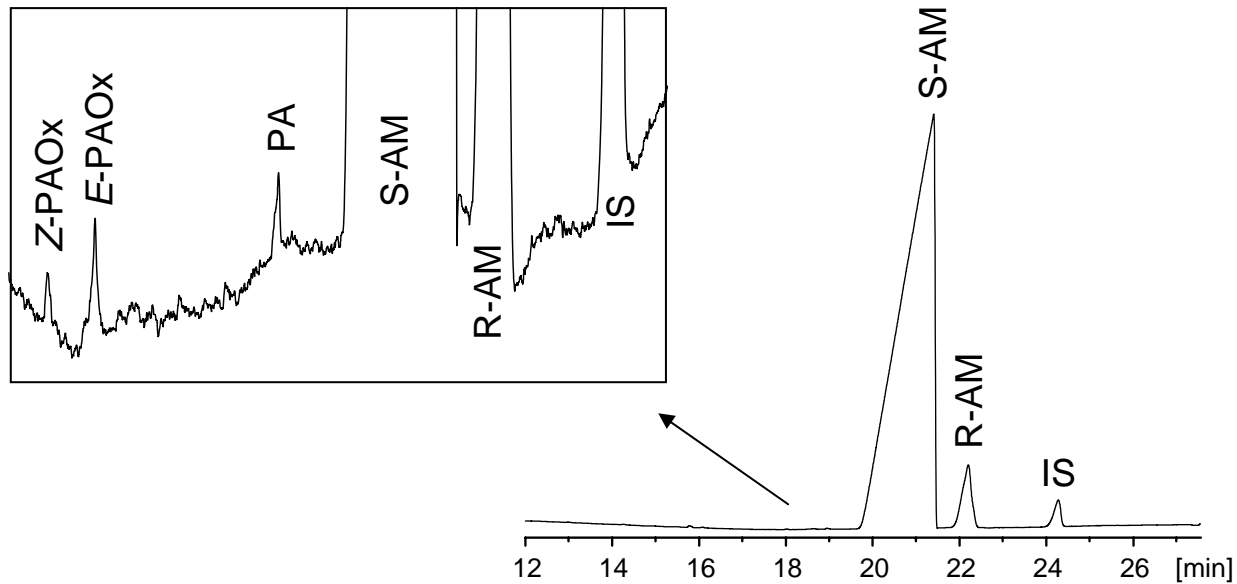


Dexamphetamin – optimiertes duales CD System



- 40.2/35 cm, 50 μm ID fused-silica capillary
- 50 mM sodium phosphate, pH 3.0
- 80 mg/mL SBE- β -CD, 25 mg/mL S- β -CD
- -10 kV, 20°C, 200 nm
- 5 mg/mL dexamphetamine sulfate containing 0.1% of the impurities and 70 $\mu\text{g/mL}$ ephedrine (IS)
- Calibrated range
 - rel. subst. 0.05 - 1.0%
 - D-AM: 0.05 - 5.0%
- LOD: 0.01 - 0.02%
- LOQ: 0.05%
- Precision < 7.5%

Analyse von Dexamphetaminsulfat Proben

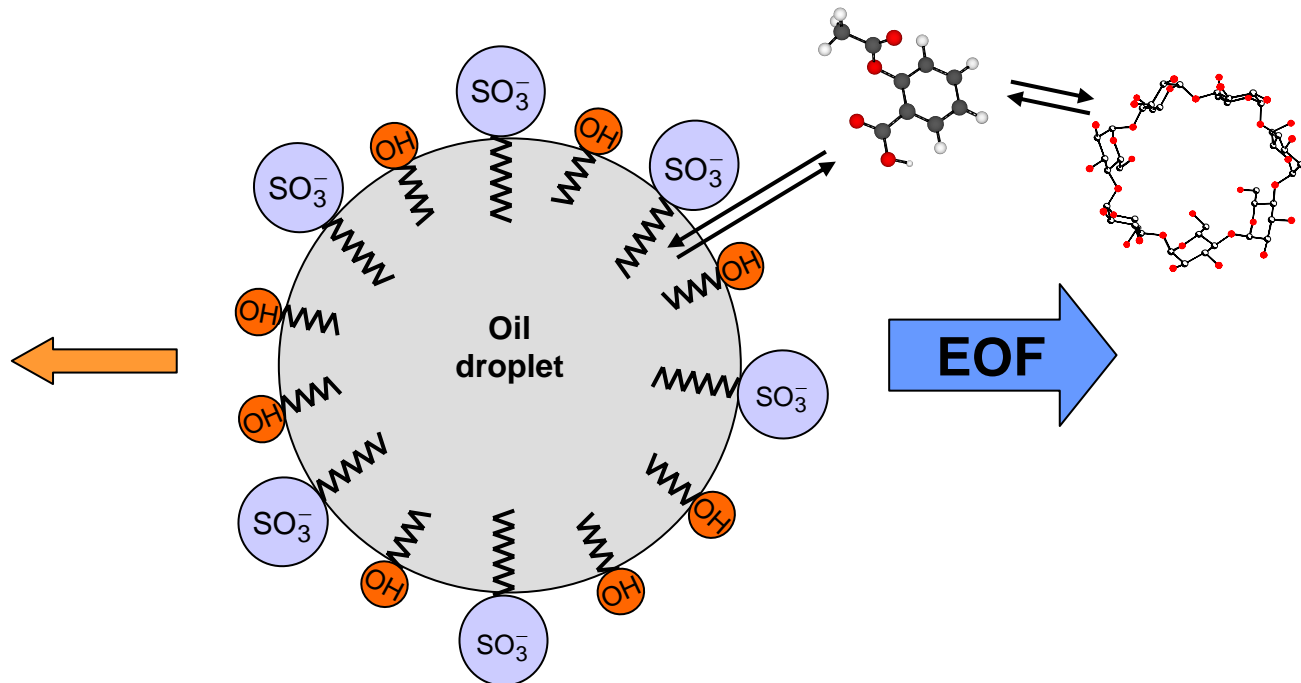


Substanz	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Phenylacetone-Z-oxim	ND	LOD	LOD	LOD
Phenylacetone-E-oxim	LOD	LOD	LOD	LOD
Phenylacetone	LOD	LOD	LOD	LOD
1S,2S-(+)-Norpseudoephedrin	ND	ND	ND	ND
1R,2S(-)-Norephedrin	ND	ND	ND	ND
Levoamphetamin	3.23 ± 0.02	3.70 ± 0.15	3.38 ± 0.09	3.36 ± 0.06

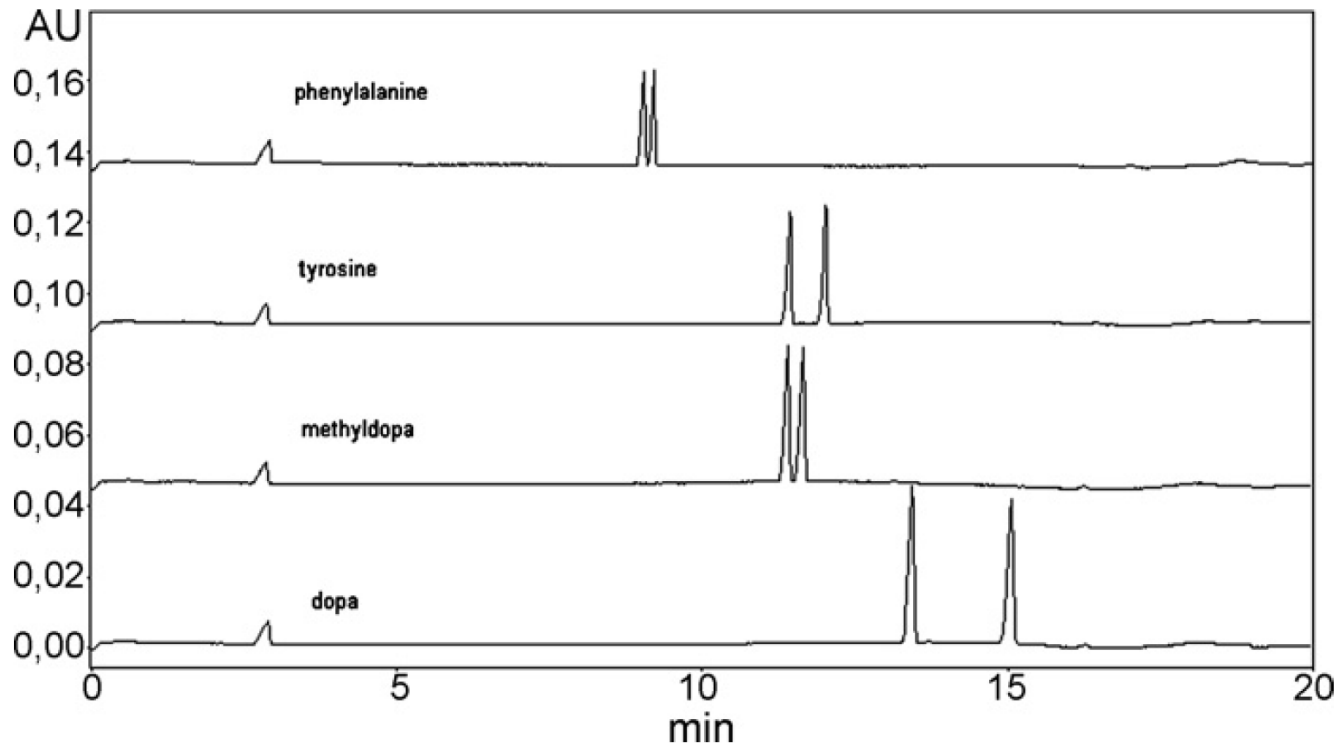


MEEKC in Gegenwart von CDs

- Erhöhte Stabilität von Microemulsionen verglichen mit Mizellen
- Analyse geladener und ungeladener (elektroneutraler) Verbindungen
- Enantiomerentrennung in Gegenwart chiraler Selektoren



MEEKC-CD Enantiomerentrennung von Aminosäuren



0.5% ethyl acetate, 1.5% SDS, 3.0% 1-butanol, 2.0% 2-propanol,
93.0% 50 mM sodium phosphate, pH 2.5, 4.0% sulfated β -CD
40.2/30 cm, 50 mm ID fused-silica capillary, -15 kV, 20°C, 200nm

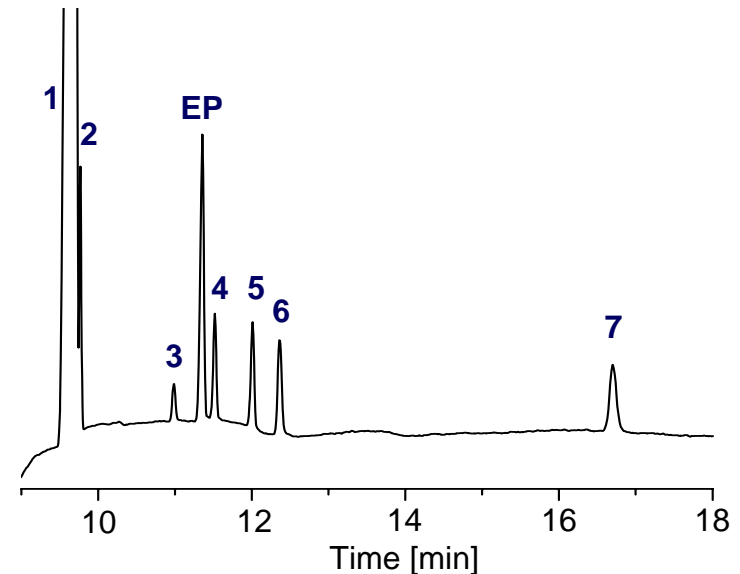
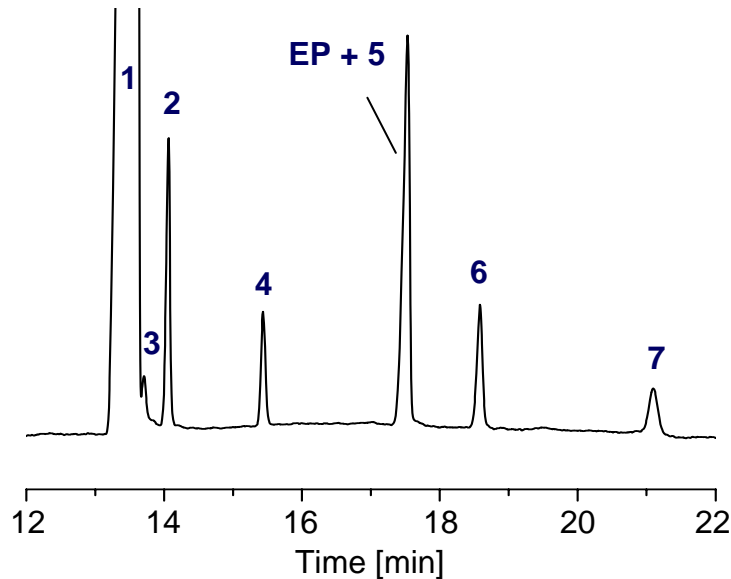


MEEKC-CD Analytik von Dexamphetamin

➤ Zusammensetzung der Mikroemulsion

1.0% Ethylacetat, 1.4% SDS,
4.0% 1-Butanol, 2.8% 2-Propanol,
90.8% Phosphatpuffer, pH 3.0,
4% sulfatiertes β -CD

0:5% Ethylacetat, 1.5% SDS,
3.0% 1-Butanol, 2.0% 2-Propanol,
93.0% Phosphatpuffer, pH 3.0,
4% sulfatiertes β -CD



1 – Dexamphetamin

4 – Phenylacetone-E-oxim

7 – Phenylacetone

2 – Levoamphetamin

5 – Norpseudoephedrin

EP – Ephedrin (IS)

3 – Phenylacetone-Z-oxim

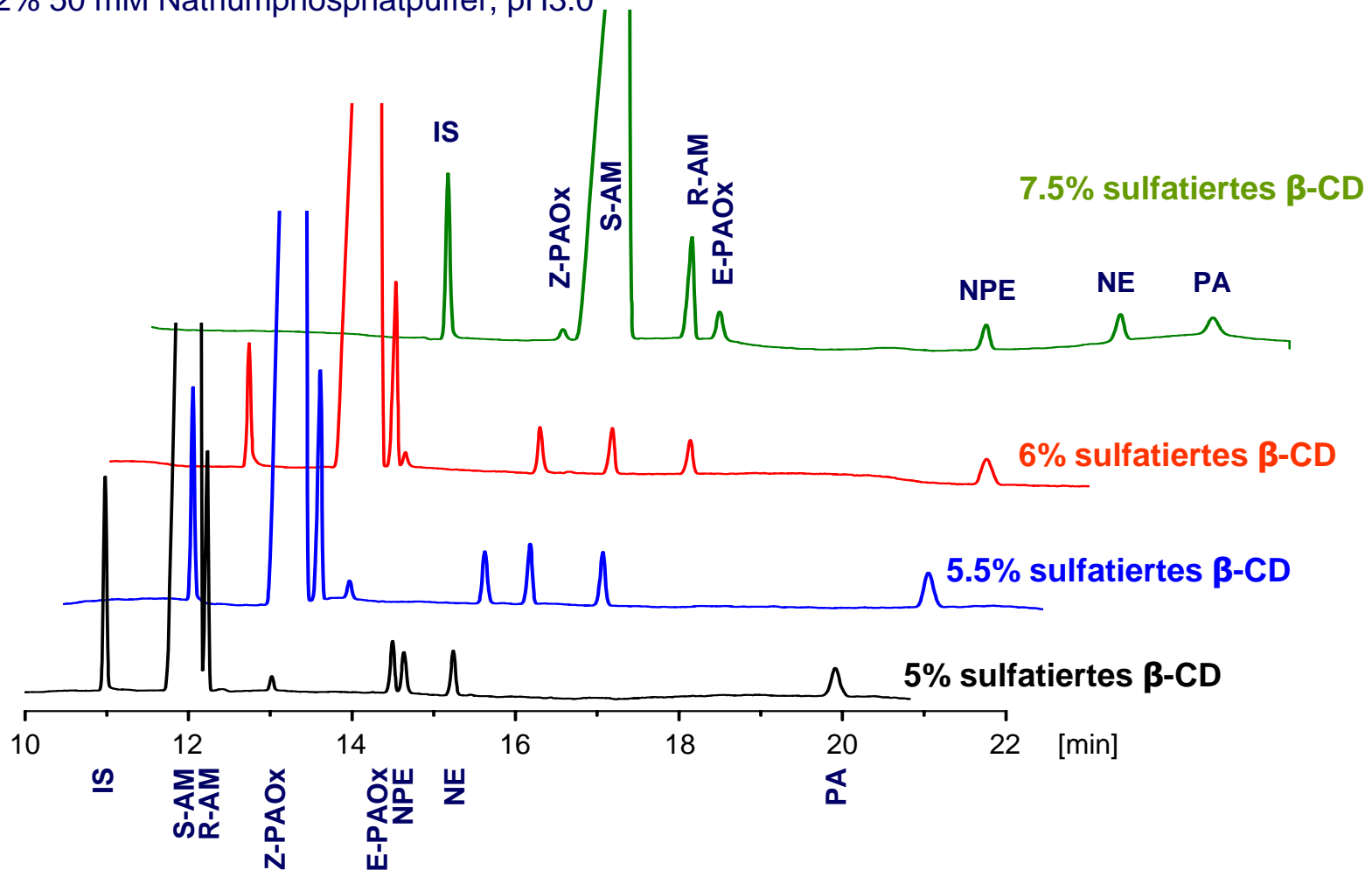
6 – Norephedrin

MEEKC-CD Analytik von Dexamphetamin



➤ CD Konzentration

- 0.5% Ethylacetat, 1.5% SDS, 3.5% 1-Butanol, 2.5% 2-Propanol, 92% 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH3.0



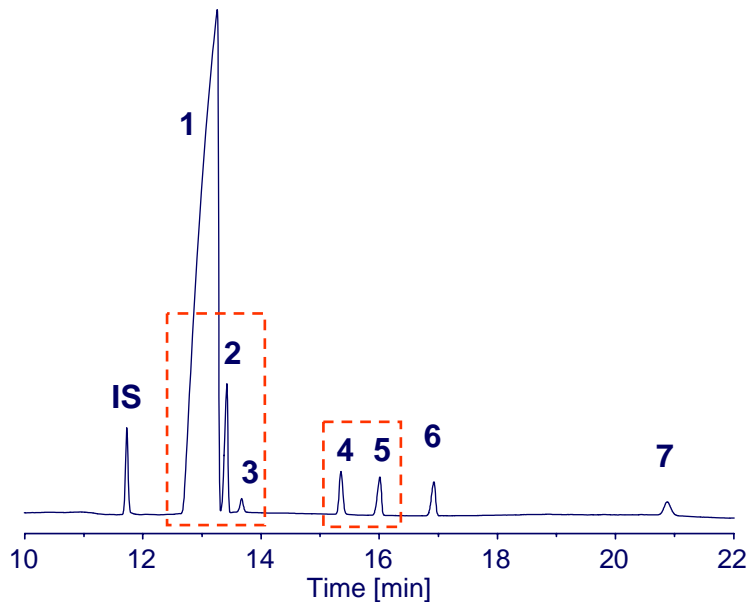


Effekt der Herstellung der Mikroemulsion

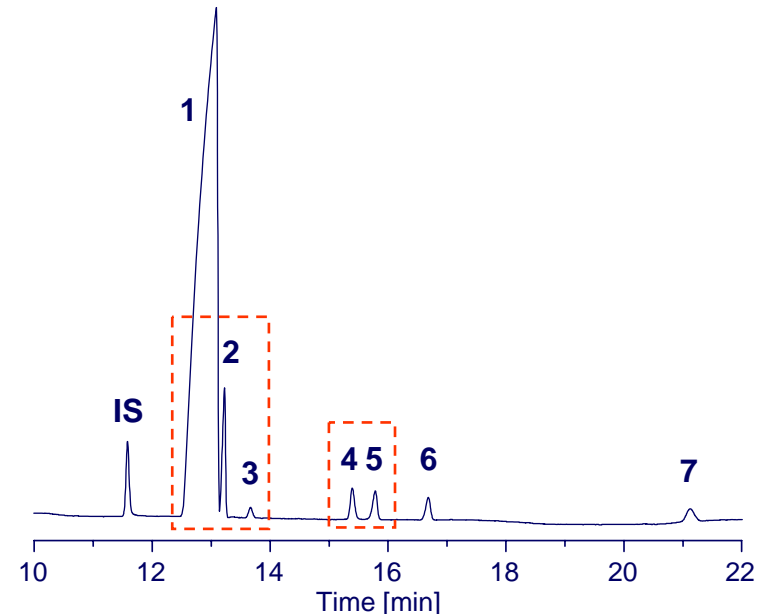
➤ Mikroemulsion

- 0.5% Ethylacetat, 1.5% SDS, 3.5% 1-Butanol, 2.5% 2-Propanol, 92.0% 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 3.0, 5.5% sulfatiertes β -CD
- Herstellung: Mischen von Ethylacetat, SDS und 1-Butanol, Zugabe der wässrigen Pufferlösung (Ultraschallbad 20 min), Zugabe von 2-Propanol, Mischen/Ultraschallbad

Zugabe von S- β -CD zum Puffer vor der Herstellung der ME



Zugabe von S- β -CD nach Herstellung der ME



1 – Dexamphetamin

4 – Phenylacetone-E-oxim

7 – Phenylacetone

2 – Levoamphetamin

5 – Norpseudoephedrin

IS – Carbamazepin

3 – Phenylacetone-Z-oxim

6 – Norephedrin

Dexamphetamin – Vergleich der CE Verfahren



	Single CD	Dual CD	CD-mediated MEEKC
Selector	HDAS- β -CD	SBE- β -CD, S- β -CD	S- β -CD
Buffer	phosphate buffer, pH 2.5	phosphate buffer, pH 3.0	ME in phosphate buffer, pH 3.0
Range	0.06 – 5.0 %	0.05 – 1.0% 0.05 – 5.0% (R-AM)	0.1 – 1.0% to 0.5 – 1.0% 0.1 – 5.0% (R-AM)
LOD	0.02 – 0.03%	0.01 – 0.02%	0.05 – 0.2%
Precision	< 6.7%	< 7.5%	< 8.2%
Comments	only charged impurities expensive CD	charged and uncharged impurities expensive CD	charged and uncharged impurities inexpensive CD

HDAS- β -CD, heptakis-(2,3-di-O-acetyl-6-O-sulfo)- β -CD

SBE- β -CD, sulfobutylether- β -CD

S- β -CD, sulfated β -CD

Dexamphetaminsulfat – chirale CE versus Polarimetrie



Zusatz Racemat	CE		Polarimetrie	
	Sollwert [%]	gef. Wert [%]	ee [%]	Spez. Drehwert
0 %	3.79	3.79 ± 0.12	92.4	21.5 ± 0.43
2 %	4.70	4.66 ± 0.40	90.6	21.3 ± 0.13
4 %	5.57	5.50 ± 0.27	88.9	21.1 ± 0.17

- Die spezifische Drehwert $[\alpha]_D^{20} = 20$ entspricht einem ee von ca. 79.2 % (10.4 % (*R*)-Amphetamin).

Calciumlevofolinat Pentahydrat



Prüfung auf Reinheit

➤ Spezifische Drehung

➤ – 10 bis – 15 ($c = 1$, Tris-Puffer, pH 8.1)

➤ Verwandte Substanzen

➤ HPLC an RP-18 Phase

➤ Methanol / Tetrabutylammoniumhydroxid-Phosphat-Puffer, pH 7.8

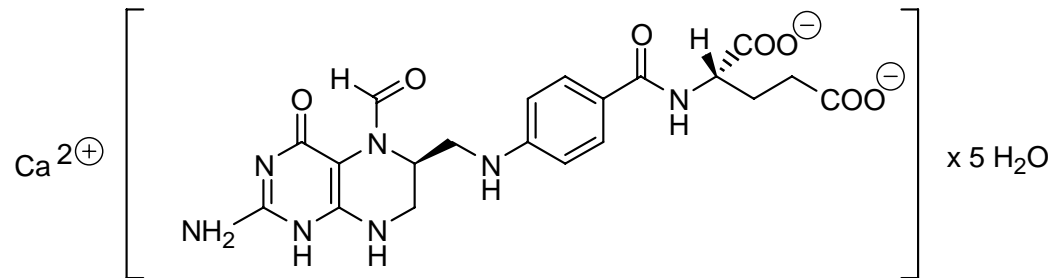
➤ Grenzwerte: 0.8% Einzelsubstanz, 2.0% Summe der Verunreinigungen

➤ Verunreinigung H [(6R,2'S)-Folinsäure]

➤ HPLC an Human-Serumalbumin-Phase

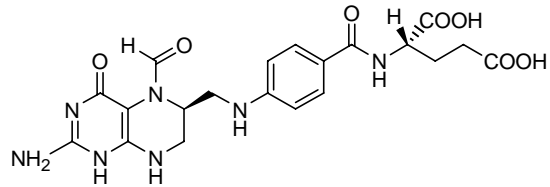
➤ 2-Propanol / Acetonitril / Phosphatpuffer, pH 5.0

➤ Grenzwert: 0.5%

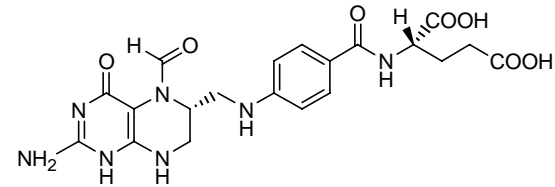




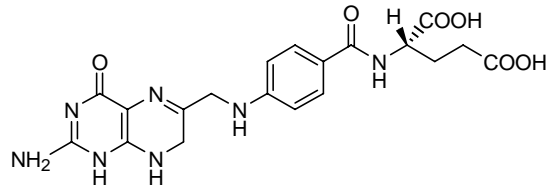
Levofolinsäure und verwandte Substanzen



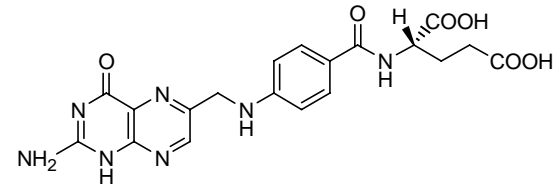
Levofolinsäure (6*S*,2'*S*)



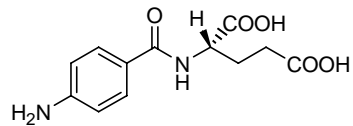
(6*R*,2'*S*)-Folinsäure



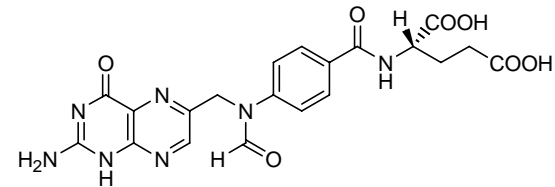
Dihydrofolsäure



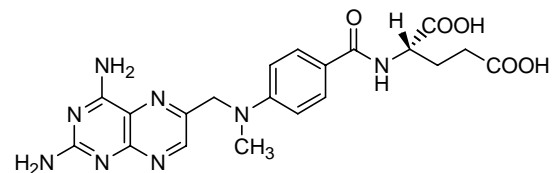
Folsäure



N-(4-aminobenzoyl)-L-glutaminsäure



10-Formylfolsäure



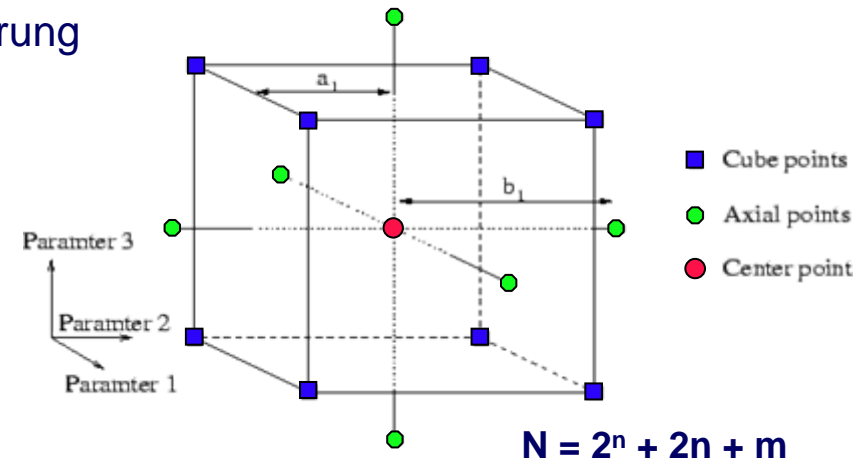
Methotrexat (IS)

Entwicklung einer CE Methode zur Reinheitsprüfung von Calciumlevofolinat

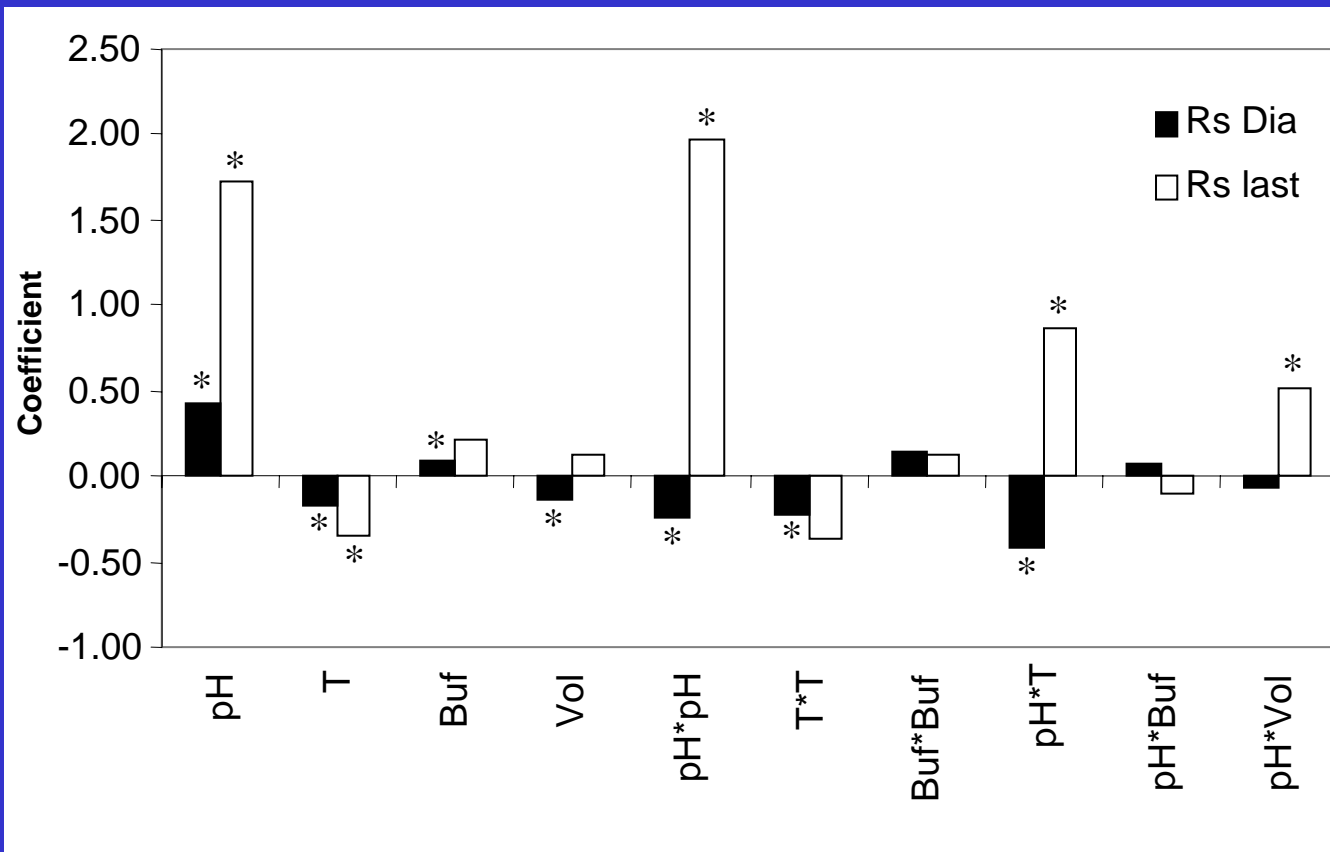


- Screening von Trennbedingungen
 - Puffer pH, Cyclodextrin

- Einsatz der Chemometrie zur Methodenoptimierung
 - central composite design ($2^4 + 8 + 3$)
 - Variable
 - Puffer pH (8.9 - 9.9)
 - Pufferkonzentration (40 - 60 mM)
 - Temperatur (15 - 25°C)
 - Spannung (15 - 25 kV)
 - Zielgrößen
 - Auflösung zwischen Levofolinsäure und dem (6R,2'S)-Diastereomer
 - Auflösung zwischen N-(4-Aminobenzoyl)-S-glutaminsäure und 10-Formylfolsäure
 - Migrationszeit der Levofolinsäure
 - Migrationszeit der 10-Formylfolsäure



Central composite face centered design



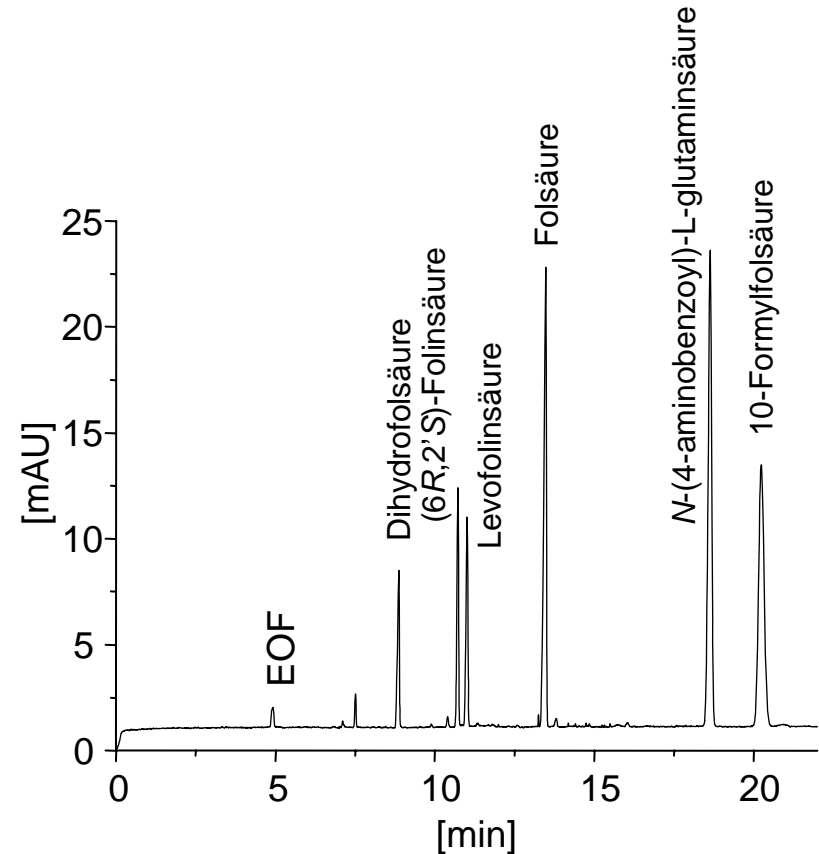
Calciumlevofolinat - chemometrisch optimierte Methode



Bedingungen

40/50 cm Kapillare, 50 μm
40 mM Natriumtetraboratpuffer, pH 9.9
20 mg/mL DM- β -CD
Spannung 16 kV
Kapillartemperatur 16°C

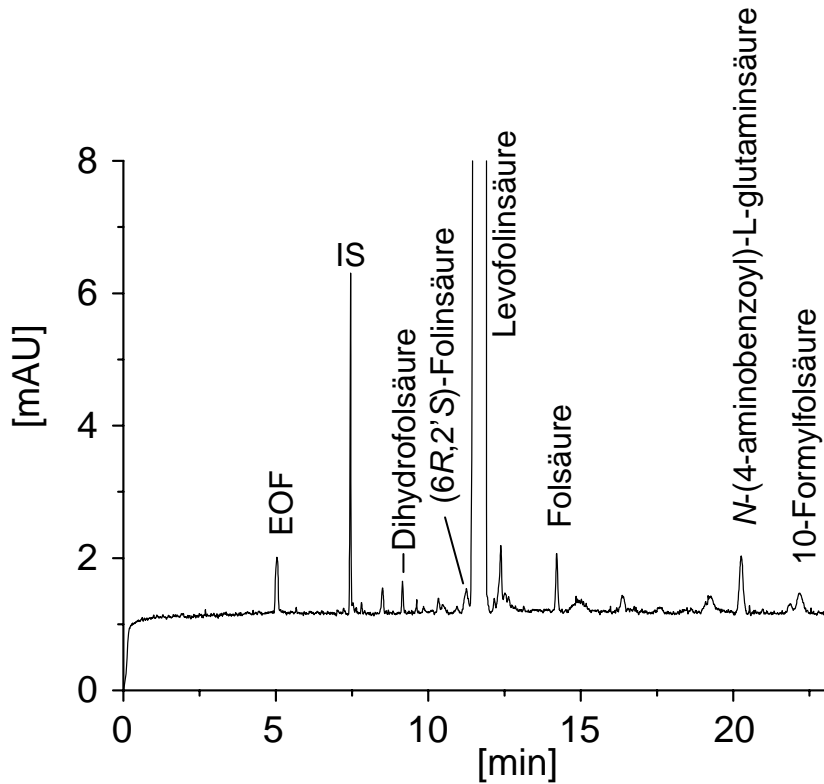
	Vorhersage	Experiment
R_s Diastereomere	2.8	2.8
MT Levofolinsäure	11.5	11.0
R_s "letzte" Peaks	6.1	6.1
MT "letzter" Peak	20.7	20.2



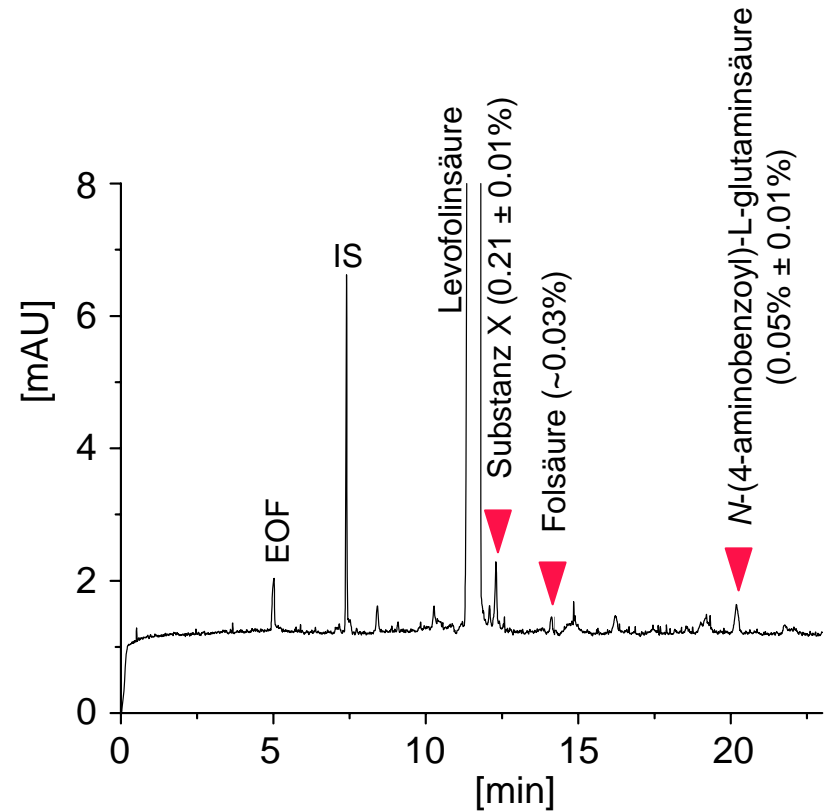
Reinheitsprüfung Calciumlevofolinat



Calciumlevofolinat 4 mg/mL
mit 0.1% Verunreinigungen



Calciumlevofolinat 4 mg/mL





- Die Kapillarelektrophorese ist aufgrund der hohen Trennleistung ein ideales Verfahren nicht nur zur Analyse chiraler Substanzen.
- Die Kapillarelektrophorese erlaubt die simultane Bestimmung chiraler und achiraler Substanzen.
- Durch Wahl geeigneter Selektoren kann ein "fine-tuning" der Trennung erreicht werden.
- MEEKC in Gegenwart chiraler Selektoren ist ein vielseitiges Verfahren zur simultanen chiralen und achiralen Arzneistoffanalytik.
- Chemometrische Verfahren eignen sich zur Optimierung und Validierung kapillarelektrophoretischer Methoden.