

**Methodische Weiterentwicklung und Anwendung der quantitativen
NMR Spektroskopie für die pharmazeutische Analytik von Arznei-
stoffen**

Laufzeit	01.08.2006 - 30.04.2009
Forschungs- stelle 1	bis 01/2008 Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) Zweiggelände Adlershof Richard-Willstätter-Straße 11 12489 Berlin
Projektleitung	Prof. Dr. Christian Jäger
Forschungs- stelle 2	Universität Würzburg Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie Am Hubland 97074 Würzburg
Projektleitung	Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe
Forschungs- stelle 3	ab 02/2008 Deutsche Kunststoff-Institut (DKI) Schlossgartenstr. 6 64289 Darmstadt
Projektleitung	Dr. Frank Malz
Förderung	Das IGF-Vorhaben 14842 N der Forschungsvereini- gung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), Bürger- straße 12, 53173 Bonn wurde über die AiF im Rah- men des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundes- tages gefördert.



Problemstellung/Zielsetzung

Um die Qualität eines Arzneistoffs sicherzustellen, ist es heute aufgrund der Globalisierung der Märkte und des REACH-Systems von größter Bedeutung, orthogonale Methoden zur Qualitätskontrolle einzusetzen. Zu den etablierten Routineverfahren wie HPLC und GC ist die quantitative NMR (qNMR) eine solche Methode. Die allgemeine Anwendbarkeit der qNMR ist

bei Einsatz eines internen Standards jedoch limitiert (Lösungsmittelprobleme, komplexe Viellinienspektren des Analyten). Daher war es das Ziel des Vorhabens, die qNMR für die pharmazeutische Analytik derart weiterzuentwickeln, so dass sie universell zur Reinheitsbestimmung von Arzneistoffen eingesetzt werden kann. In diesem Zusammenhang ist die Anwendung der externen Standardisierung bei der qNMR ein wichtiger Beitrag. Speziell mit der methodischen Weiterentwicklungen der externen Standardisierung mittels eines elektronisch erzeugten Kalibriersignals, einer erst seit 1999 entwickelten Technik (ERETIC), kann ein innovativer Beitrag geleistet werden. Anhand systematischer Untersuchungen an repräsentativen Arzneistoffen und Arzneistoffgemischen war die allgemeingültige Anwendbarkeit der externen Standardisierung zu erkunden und in ihren Genauigkeitskenngrößen (Richtigkeit und Präzision) zu beschreiben. Parallel zu den NMR-Methoden wurde die konventionelle Analytik (HPLC, CE) durchgeführt, um die Ergebnisse vergleichen und somit validieren zu können.

Ergebnisse

Für die Laufzeit des vorliegenden Vorhabens stellte die Herstellerfirma Bruker BioSpin GmbH die ERETIC-Technik zur Verfügung. Nach erfolgreicher Installation wurde sie zuerst anhand von Modellsystemen (Maleinsäure in DMSO-d₆, 1,3,5-Trioxan in DMSO-d₆ und Dimethylsulfon in DMSO-d₆) systematisch evaluiert. Dabei zeigte sich bereits, dass die ERETIC-Technik, so wie sie in der Literatur beschrieben und von Bruker ausgeliefert wird, nicht ausreichend robust ist. Unterschiedliche Abstimmungsgrade des Probenkopfes (wie sie in der Routine generell vorkommen), eine Änderungen der Analytenkonzentration oder die Verwendung eines Kalibrierstandards, der nicht identisch ist mit dem zu untersuchenden Analyten, führten zu falschen Resultaten. Eine universelle Anwendung dieser ERETIC-Technik, wie sie das Ziel dieses Vorhabens war, war somit nicht möglich. Erst die Weiterentwicklung der ERETIC-Technik in Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma Bruker BioSpin lieferte eine in weiten Bereichen robuste Variante. Hierbei wird das elektronische Kalibrier-signal nicht mehr über eine Spule im Probenkopf eingespeist, sondern direkt beim Protonenempfänger detektiert. Im Gegensatz zur Originalkonfiguration kann nun jeder beliebige Kalibrierstandard unabhängig von der zu untersuchenden Substanz verwendet werden. Jedoch muss der 90°-Anregungsimpuls für jede Probe bestimmt und für eine konstante Temperierung des Probenkopfes und des Raumes gesorgt werden, um akkurate Messergebnisse zu erzielen. Diese Erkenntnisse wurden anschließend auf Realproben übertragen. Die Gehaltsbestimmungen von ausgewählten Arzneistoffen (Codergocrinmesilat, Clomifencitrat, Flupentixoldihydrochlorid und Atracuriumbesilat) mittels der ERETIC-Technik lieferten korrekte Ergebnisse. Parallel dazu wurde die traditionelle Variante der externen Standardisierung an denselben Proben systematisch evaluiert. Auch hierbei wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Dabei erfolgte die Überprüfung der Richtigkeit der NMR-Resultate sowohl mittels validierter HPLC-Verfahren als auch mit der quantitativen NMR unter Verwendung eines Internen Standards. Die dabei erreichten Messunsicherheiten von < 2% liegen innerhalb des geforderten Toleranzbereiches.

Als im Jahr 2007 ca. 800 Menschen in den USA an schweren Nebenwirkungen bei Medikation mit Heparin erkrankten und sämtliche in den Arzneibüchern beschriebenen Methoden nicht in der Lage waren, übersulfatiertes Chondroitinsulfat und Dermatansulfat von Heparin zu separieren, wurde in Übereinstimmung mit dem Projektbegleitenden Ausschuss diese Problemstellung mit in das Aufgabenspektrum dieses Vorhabens aufgenommen. An über 200 verschiedenen Heparin-Chargen wurde systematisch nach Lösungswegen für den Nachweis und die Quantifizierung dieser beiden Substanzen in Heparin geforscht. Schließlich gelang es erstmals, mit der NMR-Spektroskopie beide Komponenten im ¹H-NMR-Spektrum nachzuweisen und mit Hilfe eines ausgearbeiteten Normalisierungsverfahrens akkurat zu quantifizieren. Pa-

rallel dazu wurden erfolgreich orthogonale CE- und HPLC-Verfahren erarbeitet, um die NMR-Ergebnisse in ihrer Richtigkeit zu unterstützen.

Insgesamt zeigen die in diesem vorliegenden Vorhaben erarbeiteten Ergebnisse auf eindrucksvolle Weise, wie leistungsstark und aussagekräftig die quantitative ^1H -NMR-Spektroskopie für die Gehaltsbestimmung von Arzneistoffen in der pharmazeutischen Analytik ist. Daher wurde zum Ende der Laufzeit des Projektes am 12. Februar 2009 seitens der FAH eine Informationsveranstaltung organisiert, auf der u.a. die im vorliegenden Projekt erzielten Ergebnisse vorgestellt und mit den Teilnehmern aus Industrie, Forschungseinrichtungen, Dienstleistungsanbietern und Behörden ausgiebig diskutiert wurden. Somit ist zu erwarten, dass die qNMR zukünftig sowohl mittels der ERETIC-Technik als auch der externen Standardisierung bei Validierungsstudien, bei der Qualitätskontrolle und auch bei der Schadensanalytik eingesetzt wird. Damit wird es den klein- und mittelständigen Unternehmen nunmehr ermöglicht, ihre Arzneistoffe besser zu charakterisieren. Denn die hier weiterentwickelten Methoden können dazu verwendet werden, die Resultate der chromatographischen Verfahren im Rahmen der Qualitätssicherung durch eine unabhängige Methode zu überprüfen.

Aufgrund der zeitaufwendigen Weiterentwicklung der ERETIC-Technik konnten nicht alle im Projektantrag vorgesehenen Arbeitspakete bearbeitet werden. Diese waren: (i) Einsatz der ERETIC-Technik für quantitative 2D-NMR-Experimente, (ii) Organisation und Auswertung eines nationalen Ringversuchs und (iii) Evaluierung von Computermethoden (Amix und Unscrambler™) zur automatisierten Auswertung von NMR-Spektren im Routinebetrieb.

Projektbezogene Veröffentlichungen

Diehl, B.; Malz, F.; Holzgrabe, U.

Quantitative NMR-Spectroscopy in quality evaluation of active pharmaceutical ingredients (APIs) and excipients

Spectroscopy Europe (2007); 19, 15-19

Beyer, T.; Diehl, B.; Randel, G.; Humpfer, E.; Schäfer, H.; Spraul, M.; Schollmeyer, C.; Holzgrabe, U.

Quality assessment of unfractionated heparin using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2008), 48, 13-19

McEwen, I.; Mulloy, B.; Hellwig, E.; Kozerski, L.; Beyer, T.; Holzgrabe, U.; Rodomonte, A.; Wanke, R.; Speiser, J.-M.

Determination of Oversulfated Chondroitin Sulphate and Dermatan Sulphate in unfractionated Heparin by ^1H NMR

Pharmeuropa Bio 2008-1, 31-39

Beyer, T.; Holzgrabe, U.

Investigation of multi-component drugs by NMR spectroscopy
in:

Holzgrabe, U.; Wawer, I.; Diehl, B. (Hrsg.)

NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis

Elsevier Science, 2008

Malz, F.
Quantitative NMR in the solution state NMR
in:
Holzgrabe, U.; Wawer, I.; Diehl, B. (Hrsg.)
NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis
Elsevier Science, 2008

Holzgrabe, U.
qNMR spectroscopy in drug analysis - a general review
in:
Holzgrabe, U.; Wawer, I.; Diehl, B. (Hrsg.)
NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis
Elsevier Science, 2008

Beyer, T.; Schollmayer, C.; Holzgrabe, U.
The role of solvents in the signal separation for quantitative ^1H NMR spectroscopy
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2010); 52, 51-58

Holzgrabe, U.
Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications
Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (2010), 57, 229-240

Holzgrabe, U.; Beyer, T.; Diehl, B.; Malz, F.
ERETIC – a tool for assay determinations in the pharmaceutical analysis by quantitative NMR spectroscopy
Posterbeitrag auf "New Frontiers in the Qualities of Medicines", EDQM, Straßburg, Frankreich, 13.-15.06.07

Malz, F.; Beyer, T.; Holzgrabe, U.; Jäger, C.
Quantitative NMR spectroscopy - a precise and accurate tool for assay determinations in the pharmaceutical analysis
Poster auf der RDPA-Tagung 2007, 12th International Meeting on recent developments in pharmaceutical analysis, 23.-26. September 2007, Elba, Italien

Beyer, T.; Holzgrabe, U.
Quantitative NMR spectroscopy in multi-component drug analysis
Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG vom 10.-13. Oktober 2007 in Erlangen

Beyer, T.; Holzgrabe, U.
Investigation of multi-component drugs by NMR spectroscopy
Poster auf dem 19th Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis vom 8.-12. Juni 2008 in Danzig

Beyer, T.; Holzgrabe, U.
Heparin and its impurities investigated by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft DPhG vom 8.-11. Oktober 2008 in Bonn

Beyer, T.; Diehl, B.; Randel, G.; Schollmayer, C.; Holzgrabe, U.
Heparin contaminants investigated by NMR spectroscopy

Poster auf der 32. NMR Benutzertagung der Firma Bruker vom 4.-5. November 2008 in Ettlingen

Malz, F.; Jäger, C.

Quantitative NMR – eine mag(net)ische Methode zur Gehaltsbestimmung für die pharmazeutische Analytik

Vortrag bei Fa. Boehringer, Ingelheim, 18.06.07

Holzgrabe, U.

Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis

Vortrag auf dem 19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Danzig, Polen, 9.-11.06.2008

Malz, F.

ERETIC – eine Methode der quantitativen NMR

Vortrag auf der FAH-Informationsveranstaltung "Quantitative NMR – Innovatives Verfahren in der Analytik von Arzneistoffen", Köln, 12.02.2009

Beyer, T.

NMR Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik - Heparin und mehr

Vortrag auf der FAH-Informationsveranstaltung "Quantitative NMR – Innovatives Verfahren in der Analytik von Arzneistoffen", Köln, 12.02.2009

Holzgrabe, U.

Quantitative NMR in pharmaceutical analysis

Vortrag auf dem 2nd International Meeting on NMR and Quantitative Analysis, Stockholm, Schweden, 21.-22.04.2009

Holzgrabe, U.

NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis

Vortrag bei PBA 2008, Gdansk, Polen

Holzgrabe, U.; Diehl, B.

NMR Spectroscopic Evaluation of Heparin for Pharmacopoeial Purposes

Vortrag bei dem 2nd Workshop on the Characterization of Heparin Products, Strasburg, Frankreich, 2008

Holzgrabe, U.

Gefahren von Arzneimittelfälschungen für Patienten

Vortrag auf der Veranstaltung Arzneimittelvertrieb, Euroforum-Konferenz, Köln, 2008

Holzgrabe, U.

NMR Spectroscopic Evaluation of Heparin and Beyond?

Vortrag auf dem International Laboratory Forum on Counterfeit Medicines, Berlin, 2008

Holzgrabe, U.

Tryptophan, Gentamicin, Heparin - What happens next

Vortrag bei Sanofi-Aventis, Paris, Frankreich, 2009

Holzgrabe, U.

Tryptophan, Gentamicin, Heparin - What happens next

Vortrag bei der 2nd Anticounterfeiting Pharma Conference IQOC, Wiesbaden, 2009