

Bestimmung von Verunreinigungen im Wirkstoff Clindamycinphosphat

On-line Analytik in der pharmazeutischen Qualitätskontrolle und Bioprozesstechnik

In der pharmazeutischen Analytik ist die Kontrolle der Wirkstoffreinheit ein sehr wichtiges Anwendungsgebiet für die HPLC, um gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten. Die vorgestellte Methode beschreibt eine schnelle, isokratische UHPLC-Trennung von Clindamycinphosphat zur Beurteilung von Prozessverunreinigungen mit den Ausgangsstoffen Lincomycin und Clindamycin. Ausgangspunkt ist die Analysenvorschrift für Clindamycinphosphat in der europäischen Pharmakopöe 6.0. Durch den Einsatz einer geeigneten UHPLC-Säule und die Anpassung der HPLC-Methodenparameter kann die Analytik innerhalb von drei Minuten durchgeführt werden. Im Vergleich dazu benötigt die entsprechende HPLC-Analytik mehr als 20 Minuten. Somit ist die UHPLC-Methode prädestiniert für die pharmazeutische Qualitätskontrolle, um ein hohes Probenaufkommen mit der geforderten Schnelligkeit und hoher Verlässlichkeit zu bearbeiten.



► Dr. Silvia Marten

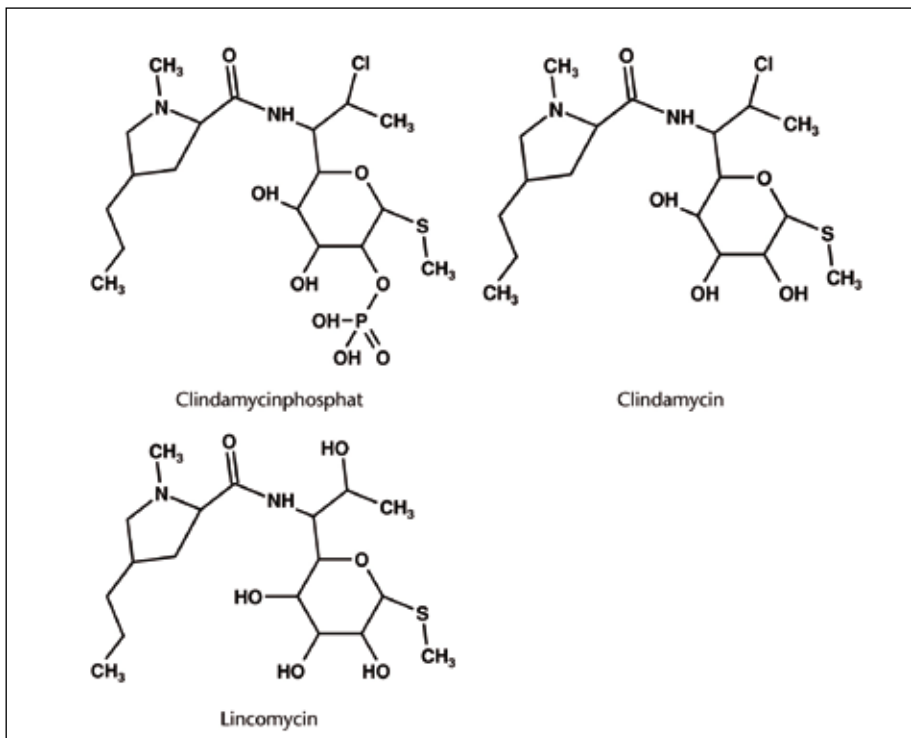


Abb. 1: Chemische Strukturen

Ob eine analytische Methode zur Bestimmung des Gehaltes und der Reinheit von pharmazeutischen Wirkstoffen angewendet wird, ist abhängig von verschiedenen Kriterien. Die Analysenzeit und die Kosten spielen eine ebenso große Rolle wie Empfindlichkeit, Selektivität und Robustheit. Wenn es im Labor zusätzlich um die Einführung neuer Bestimmungsmethoden geht, stehen meist Verbesserungen der Methode und Effizienzsteigerungen im Mittelpunkt, letztere vor allem wegen der Kostensparung. Mehr und mehr kommt aber auch die Umweltverträglich-

keit der eingesetzten Analysenverfahren selbst auf den Prüfstand und bietet eine Chance zur Optimierung. Eine Umstellung etablierter HPLC-Methoden kann sich unter Berücksichtigung wichtiger HPLC-Einflussparameter vorteilhaft auf die geforderten Ansprüche auswirken. Zuverlässige Analysendaten helfen dabei, eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten, worauf der Hersteller, zuallererst aber der Patient, angewiesen ist.

Am Beispiel von Clindamycinphosphat, einem Wirkstoff aus der Gruppe der Lincosamid-

Antibiotika, wird der Methodenübertrag nach Vorgaben der europäischen Pharmakopöe 6.0 [1] demonstriert. Produkte mit dem Wirkstoff Clindamycinphosphat werden besonders bei Penicillin-Unverträglichkeit verschrieben und können in einem weiten Bereich von Erkrankungen wirksam sein, wie z.B. bei Entzündungen der unteren Atemwege, Lungenabszessen, Hautinfektionen und Knochen- sowie Gelenkentzündungen [2]. Dieses breite Anwendungsspektrum unterstreicht die hohe Relevanz von Clindamycinphosphat als pharmazeutisches Produkt. Laut der europäischen Pharmakopöe wird für die Qualitätskontrolle unter anderem die HPLC-Analytik vorgeschrieben. Um die geforderte Auflösung von 6,0 zwischen den Peaks von Clindamycinphosphat und Clindamycin(hydrochlorid) zu erreichen, benötigen konventionelle HPLC-Methoden bei Einsatz einer 250 mm langen HPLC-Säule, gefüllt mit 5 bzw. 10 µm Partikeln, mehr als 20 Minuten pro Analyse. Für eine Routineanalytik mit hohem Durchsatz ist dieser Zeitaufwand heutzutage nicht mehr angemessen. Mit Hilfe kurzer, leistungsfähiger Trennsäulen und entsprechend angepasster Gerätetechnik für die schnelle HPLC kann die Analyse in einem Bruchteil der Zeit und mit deutlich weniger Lösungsmittelbedarf durchgeführt werden.

Experimenteller Teil

Herstellung der Standardlösung

Alle Standardlösungen wurden entsprechend der europäischen Pharmakopöe [2] mit der mobilen Phase als Lösungsmittel hergestellt, die aus 20 % Acetonitril und 80 % Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (13,6 g/l, mit Phosphorsäure auf pH 2,5 eingestellt) bestand. Für die Referenzlösung A wurden 75 mg Clindamycinphosphat gelöst und auf 25 ml verdünnt. Für die Re-

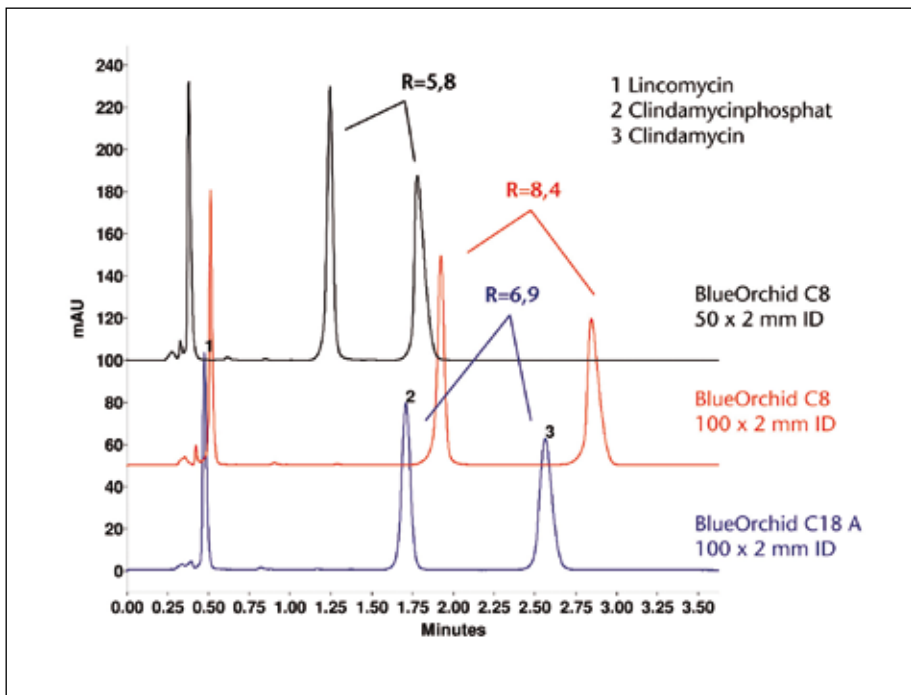


Abb. 2: Chromatogramme der Referenzlösung B (Vergleich der Auflösung bei Verwendung verschiedener Säulentypen)

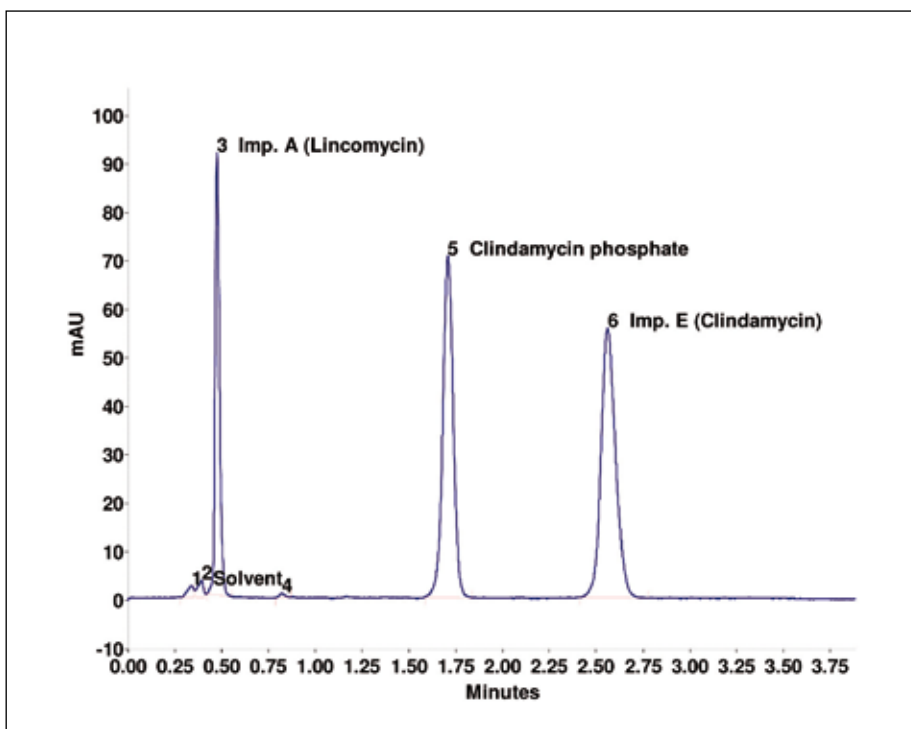


Abb. 3: Chromatogramm der Referenzlösung B auf der ausgewählten BlueOrchid C18A Säule und Report zur Referenzlösung B

Pk #	Name	Retentionszeit	Fläche	Auflösung (USP)	S/N (ASTM)	Asymmetrie
1	Solvent	0,338	6423	0,0	4,5	0,000
3	Imp. A (Lincomycin)	0,475	60519	0,0	368,0	1,300
5	Clindamycin phosphate	1,710	237372	17,1	377,8	0,988
6	Imp. E (Clindamycin)	2,562	259800	6,9	373,4	1,130
Total			634850			

ferenzlösung B wurden 5 mg Lincomycin und 15 mg Clindamycin in 5 ml der Referenzlösung A gelöst und auf 100 ml verdünnt. Referenzlösung C wurde durch Verdünnen eines Milliliters von Referenzlösung A auf 100 ml hergestellt.

Experimenteller Teil

Probenvorbereitung

Eine Testlösung wurde hergestellt, indem 75 mg Clindamycinphosphat-Probe inklusive unterschiedlicher Prozessverunreinigungen in der mobilen Phase gelöst und auf 25 ml Nennvolumen aufgefüllt wurde.

Ergebnisse

Um die geforderte Auflösung zwischen Clindamycinphosphat und Clindamycin zu erreichen, wurde die Methodenausarbeitung mit Hilfe der Referenzlösung B und unterschiedlicher Säulentypen/-längen realisiert. Laut der europäischen Pharmakopöe [2] muss darüber hinaus der Lösungsmittelpeak, der vor Lincomycin eluiert, klar abgetrennt werden. Eine weitere Forderung an die Analytik ist die Peak-Symmetrie. So darf für die Zielsubstanz Clindamycinphosphat ein Wert von 1,5 nicht überschritten werden.

Da in der europäischen Pharmakopöe eine Octylsilylphase (C8) vorgeschlagen wird, die gegenüber den stärker verbreiteten Octadecylsilylphasen (C18) deutlich polarer ist, wurde sowohl eine C8-Phase als auch eine polare C18A Phase ausgewählt. Mit den an die Säulendimension angepassten Methodenparametern konnte auf allen drei Säulen eine Basislinientrennung der Zielsubstanz und ihrer Verunreinigungen erreicht werden (Abb. 2). Allerdings erreichte die kürzere C8-Säule (50 x 2 mm) mit einer Auflösung von 5,8 zwischen den Peaks von Clindamycinphosphat und Clindamycin unter den gewählten Bedingungen die Vorgabe von 6,0 nicht ganz, wodurch der Einsatz einer längeren 100 x 2 mm C8-Säule erforderlich wurde. Diese Säule erreichte mit einem Wert von 8,4 die höchste Auflösung. Unter konstanten Bedingungen konnte durch die Verwendung einer 100 x 2 mm C18A Säule der beste Kompromiss zwischen Auflösung (6,9) und Geschwindigkeit erreicht werden. Somit wurde die C18A Säule für die nachfolgenden Analysen verwendet.

Die Ergebnisse der Analyse der Referenzlösung C werden in Abbildung 4 und in der angefügten Auswertung gezeigt.

Die zur Verfügung gestellte Clindamycinphosphat-Probe wurde analysiert, um Verunreinigungen des pharmazeutischen Wirkstoffes zu quantifizieren. Das resultierende Chromatogramm und die Auswertung sind in Abbildung 5 dargestellt.

Als Ausschlusskriterium für die Probe ist definiert, dass jeder zusätzliche Peak in der Flächenauswertung das 2,5fache des Clindamycinphosphat-Peaks in Referenzlösung B nicht überschreiten darf. Der Analysenreport zeigt,

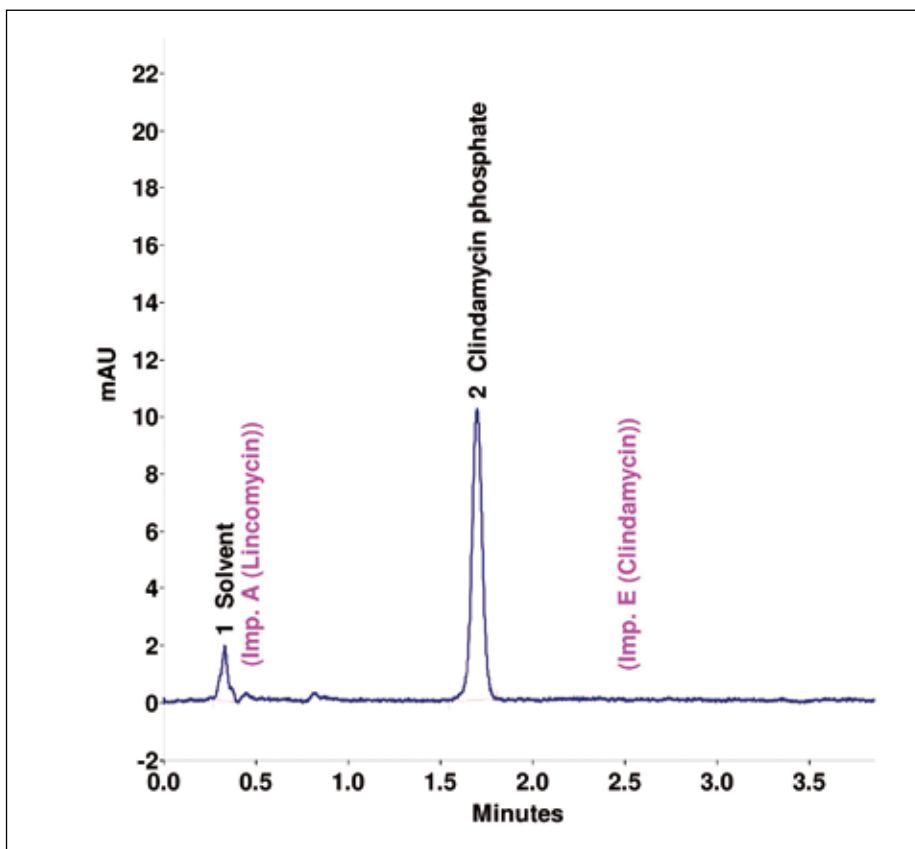


Abb. 4: Chromatogramm der Referenzlösung C mit Report zur Referenzlösung C

Pk #	Name	Retentionszeit	Fläche	Auflösung (USP)	S/N (ASTM)	Asymmetrie
1	Solvent	0,331	7110	0,0	8,7	1,106
2	Clindamycin phopspate	1,700	43227	0,0	136,4	0,982
Total			50337			

Methodenparameter	
Säule	BlueOrchid C18A, 1.8 µm, 100 x 2 mm
Eluent A	Puffer (13,6 g/l KH ₂ PO ₄) pH 2,5 eingestellt mit Phosphorsäure
Eluent B	Acetonitril
Gradient	isokratisch, 80 % A, 20 % B
Flussrate	0,7 ml/min
Injektionsvolumen	5 µl
Säulentemperatur	30 °C
Detektion	UV bei 210 nm (50 Hz, 10 mm Zelle, 2 µl)
Analysenzeit	3 min

das keine Verunreinigung in der analysierten Probe das kalkulierte Flächenlimit von 59430 überschreitet. Der festgelegte Grenzwert für die Summe aller Verunreinigungen darf maximal 4 mal der Fläche des Clindamycinphosphat-Peaks in Referenzlösung B entsprechen und wird mit dem kalkulierten Wert von 33893 ebenfalls nicht überschritten. Bei einer zulässigen Vernachlässigung der Peaks, deren Fläche unter dem Limit von 10% der Fläche des größten

Peaks im Chromatogramm von Referenzlösung B liegen, reduzieren sich die kalkulierten Werte für die Produktverunreinigung noch einmal deutlich. Somit ist eine Produktfreigabe der untersuchten Produktionsprobe von Clindamycinphosphat nach den genannten Richtlinien vertretbar.

Abbildung 5 zeigt deutlich, dass die verwendete UHPLC-Methodik empfindlich genug ist, um eine Vielzahl unterschiedlicher Pro-

duktbegleitstoffe in der vorhandenen Realprobe zu analysieren. Da diese als Einzelstandards nicht vorlagen, konnte keine LOD-Bestimmung durchgeführt werden.

Die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Analytik wurde anhand von 10 Wiederholungsmessungen der Referenzlösung B berechnet. Die Auswertung der Retentionszeitabweichung ergab für den Clindamycin-Peak mit der längsten Retentionszeit ($t_R=2,562$ min) eine relative Standardabweichung von 0,279%. Die Peakflächenabweichung für diesen Peak wurde mit 0,474% bestimmt.

Fazit

Die vorgestellten Ergebnisse präsentieren eine schnelle UHPLC-Methode zur Bestimmung der Reinheit von Clindamycinphosphat. Sie resultiert aus dem erfolgreichen Transfer einer HPLC- zu einer UHPLC-Methode, die quantitativ und präzise ist und eine Reihe nah verwandter Moleküle vom Zielprodukt abtrennen kann. Unter Verwendung des Knauer Platinblue UHPLC Systems und einer BlueOrchid C18A 1.8 µm Säule können die Zielsubstanz Clindamycinphosphat und zwei Hauptverunreinigungen in weniger als drei Minuten erfolgreich getrennt werden, mehr als sechs mal schneller als mit der konventionellen HPLC-Methode. Durch Optimierung der von der europäischen Pharmakopöe definierten Parameter konnte die geforderte Auflösung leicht erreicht werden.

Die UHPLC-Methode benötigt nur ¼ des Probenvolumens bei gleichzeitiger Verringerung des Eluentenverbrauchs pro Probe um mehr als 92%. Falls die von der europäischen Pharmakopöe geforderte hohe Auflösung nicht benötigt wird, kann auf eine kürzere C8-Säule zurückgegriffen werden, wodurch erneut Zeit und Eluent eingespart werden. Wird dagegen an der Octylsilylphase festgehalten, so empfehlen wir den Einsatz einer 100 mm langen Säule, gefüllt mit BlueOrchid C8-Material.

Die sehr schnelle Analyse von Clindamycinphosphat und seinen auftretenden Prozessverunreinigungen zeigt wie die Qualitätskontrolle von pharmazeutischen Wirkstoffen vom Übergang von der klassischen HPLC zur UHPLC profitieren kann. Hervorzuheben sind hierbei die deutlich reduzierten Analysenzeiten, die hohe Auflösung trotz kürzerer Säulen, die gesteigerte Empfindlichkeit und der signifikant reduzierte Eluentenverbrauch im Vergleich zu klassischen HPLC Methoden.

All diese Fakten illustrieren anschaulich, dass die vorgestellte Methode prädestiniert ist für die On-line Analytik in der Qualitätskontrolle der pharmazeutischen Produktion, in der ein hoher Probendurchsatz selbstverständlich ist.

Wir danken Herrn Dr. Christian Langfermann vom „Arzneimitteluntersuchungsinstitut-Nord“ (AMI) für die Bereitstellung der Clindamycin-Standards und -Proben.

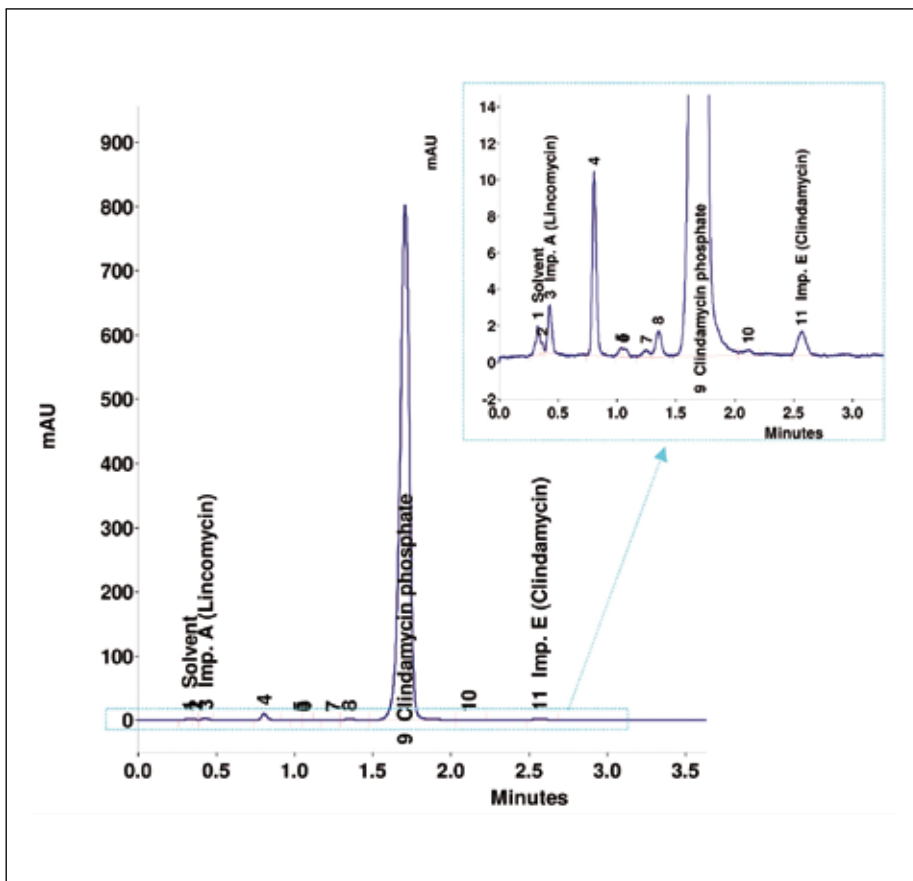


Abb. 5: Chromatogramm der Probelösung

Pk #	Name	Retentionszeit	Fläche	Auflösung (USP)	S/N (ASTM)	Asymmetrie
1	Solvent	0,330	5943		26,8	
2	n.n.	0,367	504		8,9	
3	Imp. A (Lincomycin)	0,430	7410	0,0	27,6	1,100
4	n.n.	0,806	24570		142,8	1,171
5	n.n.	1,040	754		6,7	
6	n.n.	1,061	890		6,7	
7	n.n.	1,247	1456		11,25	0,808
8	n.n.	1,353	5239		23,8	1,118
9	Clindamycin phoposphate	1,708	3469070	14,5	10962	0,873
10	n.n.	2,115	480		4,1	0,939
11	Imp. E (Clindamycin)	2,565	6853	6,9	22,4	1,251
Total			3523349			

Literatur

- [1] European Pharmacopoeia; 6. Edition (23. Juli 2007), Seiten 1570–1571
- [2] RxList: The Internet Drug Index, <http://www.rxlist.com/cleocin-iv-drug.htm#ids> (Recherchedatum: 08.12.2010)

Autoren: Dr. Silvia Marten, Leitung Abteilung Säulen, Phasen, Applikationen, Knauer
 Mareike Naguschewski, Abteilung Säulen, Phasen, Applikationen, Knauer

KONTAKT

Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH
 Wissenschaftliche Gerätebau
 Tel.: 030 809727-0
 Fax: 030 /8015010
 info@knauer.net
 www.knauer.net