

Gyógyszeranalitika a fejlesztő szemével

BABJÁK Mónika,* CZIPÓNÉ TAKÁCS Timea és MESZLÉNYI Gábor

Richter Gedeon Nyrt. Kutatási Analitikai Osztály

1103 Budapest, Gyömrői u. 19-21.

1. Bevezetés

Az analitika szerepe kiemelkedő jelentőségű a gyógyszeriparban a gyógyszerkutatástól kezdve a készítmények rutin vizsgálataig. Feladata mindenütt ugyanaz: elősegíteni az anyagok megismerését, minőségi és mennyiségi jellemzését, továbbá a kapcsolódó folyamatok megértését abból a célból, hogy a gyógyszerek biztonságosságát biztosítsuk.

Természetesen más az analitika fókusza és mások az alkalmazott módszerek a kutatás/fejlesztési fázisban, más a klinikai vizsgálatokban és megint más a termék állandó minőségét igazoló rutin méréseknél. Az alábbiakban egy rövid áttekintést kívánunk adni és néhány példán keresztül bemutatni, hogy a Richter Gedeon Nyrt.-ben, a hatóanyagok fejlesztési fázisában melyek az analitika főbb feladatai, és milyen megoldásokat alkalmazunk a Kutatási Analitikai Osztályon.

2. A hatóanyagok fejlesztési fázisa

Akár originális, akár generikus fejlesztést végzünk a feladat azonos: a laboratóriumban néhány grammos mennyiségben előállított hatóanyagtól a végleges, akár 100 kg-os nagyságrendű üzemi gyártásig követni a folyamatot, analitikai támogatást adva a szintézist végző vegyésznek illetve a méretnövelő, ipari technológiát kialakító technológusnak. Mindeközben részletesen megismerni egyrészt a hatóanyagot, annak fizikai, fizikai-kémiai, kémiai tulajdonságait, feltárni azokat a körülményeket, amelyekre az anyag érzékeny, másrészt az előállítási folyamatot, és annak hatását a termék minőségére.

A fejlesztési fázisban folyó detektívmunkához igénybe vesszük a lehető legtöbb analitikai megközelítést, módszert. A módszerek kiválasztása három alapvető pilléren áll:

1. A gyógyszerkönyvek módszerei és általános előírásai a forgalomba hozott termékek esetén kötelezőek, ezért ezeket célszerű már a fejlesztési fázisban alkalmazni: az előírt módszerek megfelelőségét, alkalmazhatóságát tanulmányozni, illetve saját fejlesztési módszerek esetén az általános előírásokat figyelembe venni.

2. A gyógyszerek minőségével, analitikájával több hatósági ajánlás, ún. guideline is foglalkozik. Az ICH (International Council for Harmonisation, korábban International Conference on Harmonisation) Q (quality, minőség) kategóriában több szempontból is iránymutatást ad a hatóanyagok vizsgálatára. Ezek az ajánlások részben metodikai megközelítéseket, részben követelményrendszert is tartalmaznak.

3. A termék jellemzését tudományos alapon megközelítve, a szakmai szabályoknak megfelelően, a legkorszerűbb eszközöket és metodikákat alkalmazzuk. A fejlesztőnek mindig szem előtt kell tartania, hogy az általa kidolgozott/kiválasztott módszert a jövőben fogják használni, ezért lehetőleg a legkorszerűbb, ma még talán csak ritkán használt, de a jövőben várhatóan széleskörűen elterjedő megoldásokat alkalmazzuk.

Mindezek alapján a fejlesztési fázisban folyamatosan változnak, fejlődnek mind számosságban, mind mélységben az analitikai módszerek. Célunk, hogy a fejlesztési folyamat végére, a végleges gyártástechnológia kidolgozása után meg tudjuk állapítani, hogy melyek a termék kritikus minőségi jellemzői, ezek milyen módszerrel mérhetők, milyen lesz a hatóanyag állandó minősége („a minőséget nem mérjük, hanem beépítjük a termékbe”), amit a rutin gyártáskor, minőségellenőrzéskor mindig igazolunk. Ezek a módszerek kerülnek a hatóanyag specifikációjába.

A fejlesztési folyamat során számos olyan mérést is végzünk, amelyet rutiban később nem kívánunk alkalmazni („un. kiegészítő mérések”), ezekhez akár a legkülönlegesebb, legrágább metodikákat is alkalmazhatjuk. Ugyanakkor a rutin módszerek esetén a meglévő analitikai lehetőségeket illetve gazdaságossági szempontokat is célszerű figyelembe venni. Ezért a rutin módszerek esetén törekszünk a legegyszerűbb, leggazdaságosabb módszerek (pl. egyszerűen kivitelezhető, gyors, kis mintaignyú stb.) kidolgozására.

3. Az analitikai módszer megfelelőségének igazolása

A fejlesztési folyamatban nemcsak szakmai szempontok alapján, hanem minőségbiztosítási szempontból is fokozódó elvárás az analitikai módszerek megfelelőségének igazolása, a módszerek validálása. A hollisztikus validálási szemlélet alapján a módszer megszületésétől, alkalmazásától kezdve folyamatosan, a felhasználásnak megfelelő mértékben kell igazolnunk a módszer megfelelőségét. A végleges módszereket a vonatkozó előírások és ajánlások figyelembevételével validálnunk kell, amely folyamatban előre eltervezett mérőszorozattal, az eredmények statisztikai értékelésével igazoljuk, hogy a módszerünk alkalmas a felhasználási célra. Ezen cikk keretein belül nem foglalkozunk a validálás elméletével és gyakorlatával, csupán hangsúlyozni kívánjuk, hogy a validálási tevékenység mind időben, mind a mérések számában eléri, sőt gyakran meghaladja a módszerfejlesztésre fordított munka mennyiségét, és mint ilyen, a fejlesztő analitikusok egyik fő feladata.

* Tel.: +36-1431-4653 ; fax: +36-1431-6000 ; e-mail: m.babjak@richter.hu

4. A hatóanyagok vizsgálatának módszerei

A hatóanyag sohasem tiszta száz százalékban. Kismértékben mindig tartalmaz(hat) szennyezőket, amelyeket elsősorban mérés-technikai szempontból az alábbi csoportokba sorolhatjuk. (Vonatkozó guideline: Q3A: Impurities in new drug substances)

4.1. Víztartalom

A hatóanyagot legtöbbször szennyezi a gyártási folyamatban használt víz. Ez a víz nem jelent egészségügyi kockázatot, ugyanakkor pontos mennyiségének ismerete fontos. A víztartalom meghatározására elterjedt Karl Fischer (KF) titrálás módszert alkalmazunk. Amennyiben a termék víz tartalma alacsony, a KF titrálás módszer érzékenysége, illetve pontossága nem megfelelő, termogravimetriára visszavezethető összes nedvességtartalmat határozzuk meg (szárítási veszteség).

4.2. Szervetlen szennyezők

Ebbe a csoportba elsősorban a szervetlen sók tartoznak. A gyógyszerkönyvek előírása a mérés kivitelezésszempontjából megegyezik: 600 ± 50°C-on a mintát kénsavval roncsoljuk és a visszamaradó szulfáthamut visszamerjük.

4.3. Fém-szennyezők

A fém-szennyezők vizsgálatának új megközelítését a 2014-ben életbelépő új, ICH Q3D guideline foglalja össze. (Q3D: Guideline for elemental impurities) Az eddig az osztályunkon is sokszor alkalmazott módszert (a vizsgálandó mintából roncsolást követően tioacetamidral szulfidot képzünk, aminek a színét vizuálisan értékeljük) felváltja a specifikus és érzékeny induktív csatolású plazma atomspektroszkópiai (ICP-AS) mérés.

4.4. Illékony szennyezők

A hatóanyagot az előállításához használt oldószerek és a szintézis során keletkező általában kis molekulatömegű, illékony szerves komponensek szennyezhetik. A használt oldószerek listája ismert a gyártástechnológiából, a keletkező anyagok pedig a reakcióegyenletekből levezethetők (pl. észterek hidrolizisekor felszabaduló alkoholok, stb.). A vonatkozó ICH guideline (Q3C: Impurities for residual solvents) alapján azonban nemcsak ezeket a komponenseket kell vizsgálnunk, hanem a mérést ki kell terjesztenünk az alkalmazott oldószerek potenciális szennyezőseire is, különösen akkor, ha azok toxikológiai szempontból veszélyesek. A Q3C guideline az oldószereket 3 fő osztályba sorolja, és szabályozza az egyes osztályokba sorolt vegyületek megengedett mennyiségét.

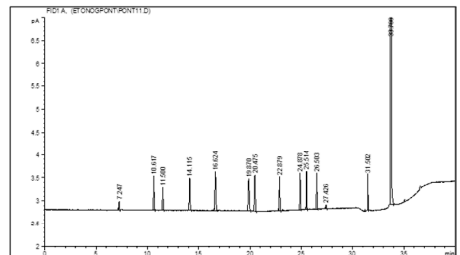
A 3. osztályban a nem veszélyes („solvents with low toxic potential”) komponensek találhatóak. Ide tartozik többek között a gyógyszergyártásban oldószerként elterjedt használt etanol, aceton, etil-acetát, i-propanol. Megengedett mennyiségük a hatóanyagban 5000 ppm.

A 2. osztály („solvents to be limited”) oldószereinek megengedett mennyisége alacsonyabb. Pl. az acetonitril megengedett mennyisége 410 ppm, míg a metanolé 3000 ppm, vagy a diklórometáné 600 ppm.

Az 1. osztály („solvents to be avoided”) oldószerei ma már előállításához nem használhatók, de mennyiségüket akkor is vizsgálni kell, ha valamelyik alkalmazott oldószert szennyezhetik. Leggyakrabban vizsgált komponens ebből az osztályból a benzol, amely az előállítás oldószereként használt toluol vagy a metanol potenciális szennyezője lehet. Megengedett mennyisége a hatóanyagban legfeljebb 2 ppm.

Ezen komponensek mennyiségét alapvetően gázkromatográfiás módszerrel (GC) határozzuk meg. A vizsgálandó vegyület illékonyága alapján alkalmazhatunk gőztérinjektálást vagy folyadékinjektálást.

Gondolhatnánk, hogy kidolgozható egy teljesen általános módszer, amellyel hatóanyagtól függetlenül mérhetőek ezek a komponensek. A gyakorlat azonban azt mutatja, hogy a hatóanyag fizikai-kémiai tulajdonsága, netalán a gázkromatográf injektorban elszorított bomlása miatt mindenre jó módszer nem létezik, mindegyik módszert optimalálni kell.



1. Ábra. Referencia oldat gázkromatogramja.

Komponensek: 10,617 perc metanol, 11,500 perc metil-formiát;

14,115 perc etanol; 16,624 perc aceton;

19,870 perc diklórometán, 20,475 perc terc-butanol;

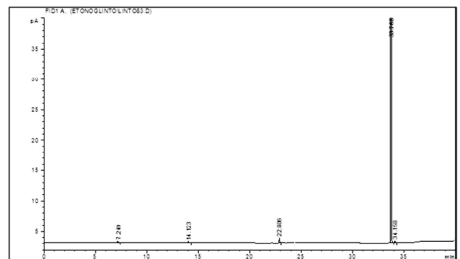
22,879 perc diizopropiléter; 24,878 perc etilacetát;

25,514 perc tetrahidrofurán; 26,503 perc ciklohexán; 27,426 perc benzol;

31,502 perc toluol, 33,700 perc dimetil-szulfoxid (alap-oldószér).

A kromatogramon látható többi csúcs a dimetil-szulfoxidból származik.

Általában 30–60 m hosszú kvarc kapillárisokat alkalmazunk. A kapilláris bevonata/állófázisa többféle lehet attól függően, hogy egyszerűen forráspont alapján el tudjuk választani a mérendőket, vagy másodlagos kölcsönhatásokat is ki kell használnunk. A legelterjedtebb a lángionizációs detektor (FID) alkalmazása, de egyes esetekben szükség lehet a



2. Ábra. Hatóanyag minta oldat gázkromatogramja.

specifikus és még nagyobb érzékenységű elektronbefogásos (ECD) vagy akár tömegspektrometriás (MS) detektálásra is.

Az előzőek értelmében az általunk kidolgozott GC módszer jóval többet tud, mint amennyi a hatóanyag minőségéből következne. Példaként bemutatunk két kromatogramot. Az első a referencia oldat kromatogramja, míg a második a hatóanyagé, ez utóbbitól látható, hogy magát a hatóanyagot csak nyomokban szennyezik illékony komponensek.

4.5. Rokon szerkezetű szerves szennyezők

A hatóanyagfejlesztés során az analitikus számára a legnagyobb kihívás a rokon szerkezetű szerves szennyezők mérésére alkalmas kromatográfias módszer kidolgozása jelenti. A gyógyszermolekulák fizikai-kémiai tulajdonsága valamint a módszertől megkívánt érzékenység miatt az esetek nagy részében ez folyadékkromatográfias (HPLC) módszert jelent. Általánosságban feladatunk kimutatni minden olyan szennyezőt, ami a gyártási folyamat során (a gyártás köztes termékei, melléktermékei, a felhasznált kiindulási anyagok, ezek szennyezéseiből az előállítás során keletkező ún. „carry over” szennyezések stb.) illetve magából a hatóanyagból keletkezik (bomlástermékek). Az elv minden esetben ugyanaz, de a gyakorlati megvalósítás mindig egyedi. A vizsgálni kívánt vegyületek minden hatóanyagnál mások, ezért minden hatóanyagra, sőt azonos hatóanyag esetén akár az eltérő gyártási lépések miatt is egyedi, a feladatra optimált módszert/módszereket kell kidolgoznunk.

Egy tisztaságvizsgálati módszer kidolgozása előtt összegyűjtjük és vegyész illetve technológus kollégák bevonásával elemezzük az elérhető információkat a szintézis lépéseiről. A módszerfejlesztéshez gyakran nem végleges tisztaság, hanem szennyezett vagy akár elrontott előállításból származó anyagokat is felhasználunk. A módszerfejlesztés kezdetén általában még nem ismertek a hatóanyag bomlástermékei, ezért az optimálás kezdetén ezeket in situ állítjuk elő a gyógyszerhatóanyag bomlasztásával (szilárdan hő, pára, fény terheléssel illetve oldatban savas/lúgos/peroxidos közegben).

Annak kiválasztására, hogy milyen elválasztási módot alkalmazzunk, segít az elválasztandó komponensek bizonyos fizikai-kémiai jellemzőinek ismerete, amelyekre mindenképp szükség van a hatékony és robusztus módszer fejlesztéséhez. Ilyen például az oldhatóság, a pK_a , azaz a savi disszociációs állandó negatív logaritmus, a molekulák lipofilitását becsül $\log P$ (semleges molekulákra) illetve a $\log D$ (ionos molekulákra).¹ Az adott molekula kromatográfias viselkedésének jellemzésére jól használható a $\log D$ -pH diagram, ami a molekula lipofilitásának változását jellemzi a pH függvényében.

A fizikai-kémiai adatokon kívül az elválasztandó vegyületek ismert szerkezetét is figyelembe kell venni, ha a szerkezeti izomerektől a nagyon eltérő polaritású vegyületekig minden szennyezőt egy kromatográfias rendszerben kívánunk elválasztani és detektálni.

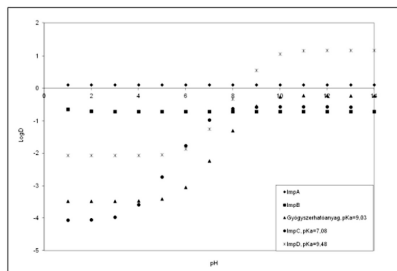
Az adatok birtokában tudjuk kiválasztani a folyadékkromatográfias elválasztási módot (fordított fázis, normál fázis, HILIC stb.), illetve a szerencsére már nagyszámban rendelkezésre álló kromatográfias oszlopok

közül mindazokat, amelyek elméleti, irodalmi adatok illetve saját tapasztalataink alapján alkalmasak lehetnek a mérésre.

A fejlesztés és a végső módszer kidolgozása során esetenként számos kromatográfias oszlop kipróbálása és a paraméterek optimalizálása szükséges. Az egyfajta fordított fázisú oszlopon elvégzett módszerfejlesztés folyamatát az alábbi példán mutatjuk be.

A módszerfejlesztés kezdetén rendelkezésre állt a gyógyszerhatóanyag és a szintézisútra jellemző négy potenciális szennyező, továbbiakban: ImpA, ImpB, ImpC, ImpD.

A 3. ábrán ábrázoltuk a gyógyszerhatóanyagnak és a négy ismert szennyezésének $\log D$ -pH görbét, a jelmagyarzatban feltüntetve a releváns pK_a értékeket is (ChemDesk szoftverrel meghatározva).



3. Ábra. A hatóanyag és négy potenciális szennyezésének $\log D$ -pH összefüggése.

A módszerben mindenképp pH kontrollt kellett használnunk, hiszen a gyógyszerhatóanyag, az ImpC, az ImpD változtatják molekuláris formájukat a pH függvényében. A $\log D$ -pH görbék lefutásából az is látható, hogy a gyógyszerhatóanyag, az ImpC, és az ImpD bázikus funkció csoportokat tartalmaznak. Ezek a vegyületek $pH \geq pK_a + 2$ (azaz esetünkben $pH \geq 11$) értékeknél lúgosabb tartományban vannak fordított fázis szempontjából kedvezőbb ion-visszaszorított, apolárisabb formában. Ez a pH tartomány számunkra mégsem volt kedvező, mert az előzetes stabilitási vizsgálatokból kiderült, hogy a gyógyszerhatóanyag lúgos közegben már szobahőmérsékleten is pillanatszerűen bomlik. Ha el akartuk kerülni a gyógyszerhatóanyag mérés közbeni degradációját mindenképp a $pH \leq 7$ tartományban kellett maradnunk.

A robusztusság szempontjából kedvezőnek tűnő $pH \leq pK_a - 2$ (estünkben $pH \leq 5$) tartományt is ki kellett zárunk, mert itt a bázikus komponensek ionos formában vannak jelen, ezért visszatartásuk fordított fázison kicsi. A $pH \leq 5$ értékű savasabb tartományban kérdéses, hogy a k (retenció tényező) ≥ 1 kritérium teljesül-e, hiszen a főkomponens $\log D$ értéke még $pH = 7$ -en sem éri el a (-2)-t. Hasonlóképpen gond lehet a savas/lúgos/oxidatív bomlástermékekkel, amelyek ugyan fejlesztés kezdetén nem voltak a kezünkben, de valószínűleg legalább olyan, vagy még polárisabbak, mint a vizsgálandó főkomponens. A fentieket figyelembe véve, mivel ragaszkodtunk a fordított fázis alkalmazásához

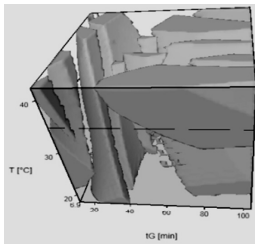
a mozgófázis pH-jának $\text{pH}=7$ -hez minél közelebb eső értéket kellett választanunk, így az említett példában az optimáláshoz $\text{pH}=6-7$ tartomány tűnt megfelelőnek.

Ez az a tartomány, amint az a $\log D$ - pH függvények lefutásából is látható, ahol kis pH változásra nagy $\log D$ változás következik be, ezért a retenció állandóságához, azaz robusztus módszerhez kiemelten fontos volt a pontos, tömegmérésre visszavezetett pH beállítás.

A pH beállításhoz a foszfát puffer tűnt kedvezőnek, mert egyrészt a $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ rendszer puffer kapacitása a $\text{pK}_a \pm 1$, azaz 5,8-7,8 tartományban maximális. Másrészt alacsony UV cut off értéke miatt (195 nm) a foszfát az egyik legalkalmasabb, ha alacsony hullámhosszon kell detektálnunk (esetünkben sem a gyógyszerhatóanyag, sem az ismert szennyezések nem tartalmaznak $\lambda > 220$ nm magasabb hullámhosszon elnyelő kromofor csoportot).

Az oszlopválasztásnál figyelembe vettük az elválasztandó komponensek poláris jellegét és olyan oszlopokat választottunk a módszerfejlesztéshez, ahol a visszatartást és szelektivitást a poláris kölcsönhatások (hidrogénhid, dipól-dipól) is befolyásolják. A kezdeti kísérletek alapján hamar kiderült, hogy a pH 6-7 tartományban a foszfát ion nagyon lecsökkentette az oszlopok élettartamát. Így az oszlopválasztásnál az elsődleges szempont az állófázis pH túrése lett. Ennek alapján a további fejlesztés Gemini C18 (150-4,6 mm, 3 μm , gyártó: Phenomenex (ajánlott pH : 1-12)) oszlopokon folyt.

Az állófázis, a puffer, a pH tartomány, detektálási hullámhossz megválasztása után a fejlesztést optimáló szoftverek, pl. DryLab® szoftver használatával tehetjük hatékonyabbá és gyorsabbá. A DryLab® (forgalmazó: Molnár-Institute) napjaink egyik intelligens optimáló szoftvere, amely segítségével a próbálkozásokon alapuló módszerfejlesztést felválthatjuk pontos, beállított kísérleti adatokon alapuló kísérlettervezésre.^{2,3} Nemcsak időt, vegyszert spórolhatunk, de segítségével a módszer robusztussága, illetve érzékenysége a változtatható paraméterekre is vizsgálható.

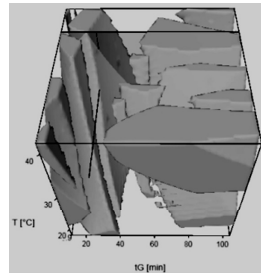


4. Ábra. DryLab® szoftverrel számolt háromdimenziós felbontás térkép

A 2009-ben megjelent DryLab® 3.9-es verzió már képes akár három faktor (gradiens idő, hőmérséklet, pH vagy terner eluens összetétele) egyidejű kezelésére és háromdimenziós felbontás térképek számolására. A szakirodalom az így létrejött három-dimenziós modellt „Cube”-nek vagyis kockának nevezi. A példánkban a DryLab® szoftver (verzió:4.2.0.7.) alkalmazásával 12 alapfutásból határoztuk

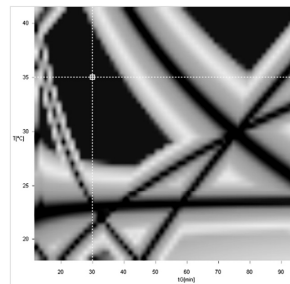
meg az optimális pH -t, a hőmérsékletet és gradienst. A DryLab® szoftver három dimenzióban, a pH , a hőmérséklet, és a gradiens idő (t_G) függvényében ábrázolja, és jelöli a minimum $R_s=1,5$ elválasztást jelentő kísérleti pontokat. A térbeli ábrán az összefüggő területek jelentik a robusztus tartományokat. (4. Ábra)

A „DryLab® kockából” az optimum kiválasztása lényegében szubjektív szempontok alapján történik. Rendszerint arra törekszünk, hogy az elválasztás lehetőleg rövid legyen, az oszlop élettartamának növelése céljából a hőmérséklet minél alacsonyabb legyen és a választott optimum pedig egy robusztus tartomány belsejébe essen.



5. Ábra. Választott optimum 3D-ben szemléltetve.

Az 5. és 6. ábrákon a választott optimum látható 3D-ben illetve a szoftverrel számolt kétdimenziós felbontás térképen ($\text{pH}=6,2$) szemléltetve.

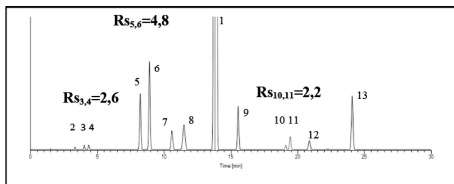


6. Ábra. DryLab® szoftverrel számolt kétdimenziós felbontás térkép. ($\text{pH}=6,2$).

Az optimált HPLC-s paraméterekkel a DryLab® szoftver által előre jelzett elválasztás a 7. ábrán, a megvalósult elválasztás jellemzésére pedig a modell oldat kromatogramja a 8. ábrán látható.

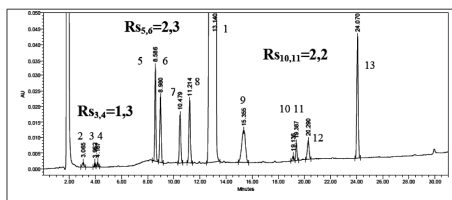
Tapasztalataink szerint a jósolt és a gyakorlatban kapott kromatogramok általában jó egyezést mutatnak, a retenció idők eltérése $< 5\%$.

A fejlesztés során több, a rokon szerkezetű szennyezések meghatározására alkalmas módszert is kidolgozunk abból a célból, hogy meggyőződjünk arról, hogy a későbbiekben rutin tisztaságvizsgálatra alkalmazandó módszerünk



7. Ábra. DryLab által jósolt kromatogram /modell oldat.

alkalmas-e minden szennyezés kimutatására. Ezek egy része eltérő elválasztási mechanizmuson alapul (elválasztás más típusú állófázison, eltérő pH-n, stb), más része alkalmas folyadékkromatográf-tömegspektrométer (LC-MS) kapcsolt



8. Ábra. Mért kromatogram /modell oldat.

technika megvalósítására. Az LC-MS módszerek alapvetően fontosak fejlesztési fázisban a hatóanyagok rokon szerkezetű szerves szennyezőinek és bomlástermékeinek azonosításához is.

4.6. Királis szennyezők

A forgalomba kerülő gyógyszer hatóanyagoknak több mint fele tartalmaz (legalább) egy királításcentrumot, azaz elvileg két optikai izomerjük létezik. Az optikai izomerek minden fizikai-kémiai tulajdonsága megegyezik (kivéve, hogy a polarizált fény síkját eltérő irányban forgatják el), így akirális közegben nem különböztethetők meg. Kromatográfias módszerekkel elválasztásuk királis környezetben valósítható meg (vagy a kromatográfias állófázis vagy a mozgófázis tartalmaz királis szelektort),⁴ vagy előzetes származékképzést követően az enantiomereket eltérő fizikai-kémiai tulajdonságú diasztereomer párokká alakítjuk,⁵ amelyek így elválaszthatók. A gyakorlatban mindig az egyszerűbben kivitelezhető megoldást választjuk.

Vannak olyan gyógyszerhatóanyagok, amelyek racém formában kerülnek forgalomba, ami azt jelenti, hogy a két optikai izomerjük közel egyforma mennyiségben van jelen. Ez esetben a fejlesztő analitikus feladata a megfelelő arány igazolása. Előfordulhat azonban, hogy az optikai izomereknek eltérő farmakológiai tulajdonságuk van, azaz csak az egyik enantiomerjük hatásos, míg a másik hatástalan, esetleg toxikus. Erre, és egyben a királis tisztaságvizsgálatok fontosságára az 50-es években kirobant Contergan-botrány hívta fel a gyógyszerkutatók figyelmét. (A Contergan esetében a racém formában forgalomba hozott talidomid hatóanyagának csak egyik enantiomerje volt nyugtató hatása, a másik enantiomerje súlyos magzatkárosodást

okozott). A hasonló balesetek elkerülése végett napjainkban világszerte előtérbe került a tiszta enantiomerek fejlesztése, és az enantiomer arány meghatározása helyett a királis tisztaságvizsgálat.

Az enantiomerarány meghatározásnál illetve a tisztaságvizsgálatnál más-más a feladat, így más az analitikai módszer, amivel célszerű a megoldást keresnünk.

Racém gyógyszerhatóanyag vizsgálatához a legideálisabb megoldást a nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis (HPCE) nyújtja. A háttér elektroliothoz adható királis szelektorok (ciklodextrinek (natív és származékolt) koronaéterek, epesavak, stb.) termékpalettája egyre bővülő, így jó eséllyel találunk közöttük olyat, amellyel a két enantiomer elválasztható. A módszer általában gyors, mintagénye és a méréshez felhasznált vegyszerigénye kicsi. Ugyanakkor napjainkban még problémás a módszer robusztussága valamint a detektálás érzékenysége, ezért ezt a korszerű metodikát elterjedten, rutinszerűen nem tudjuk alkalmazni királis tisztaságvizsgálatokban.

A gyógyszeriparban a királis oszlopokon végzett elválasztások terjedtek el annak ellenére, hogy ezek a speciális kromatográfias oszlopok igen drágák, és elméleti alapon a vizsgálendő vegyület szerkezetének ismeretében nem tudunk optimálni. Még mindig próbálkozásos alapon választjuk ki az ígéretesnek tűnő oszlopokat, amikhez a módszerfejlesztés nehezsége miatt az oszlopgyártók általában részletes módszerfejlesztési tematikát javasolnak, amelynek követésével jó esetben tudunk eredményt felmutatni. A feladat bonyolultságát jelzi, hogy az adott kromatográfias rendszerben nemcsak az enantiomereket kell elválasztani egymástól, hanem a módszernek specifikusnak kell lennie egyéb, nem királis izomerekre is.

4.7. Egyéb szennyezők

Az eddig tárgyalt szempontok szerinti mérések szinte rutinszerűen állnak össze a fejlesztés folyamán, de hatóanyagtól és eljárástól függően előfordulhat, hogy nem alkalmasak minden potenciális szennyező kimutatására. Az alábbiakban a teljesség igénye nélkül mutatunk be néhány példát ezekre:

A kis molekulatömegű szerves savak és bázisok általában nem gázkromatografálhatók származékképzés nélkül, illetve HPLC-vel sem detektálhatók kromofór csoportok hiányában. Ezen komponensek vizsgálatára célszerűen külön módszereket dolgozunk ki (pl. gázkromatográfias mérés származékképzést követően, folyadékinjektálással, vagy HPLC ionpárokromatográfia indirekt UV detektálással, stb).

A hatóanyaghoz szerkezetileg nagyon hasonló szennyezők, az izomerek vizsgálata különös figyelmet igényel. Részben azért, mert hasonló fizikai kémiai tulajdonságuk miatt kromatográfias elválasztásuk problémás lehet. Részben pedig azért, mert azonosításuk megegyező molekulatömegű és fragmentációjuk miatt MS detektálással is komoly feladatot jelent. Ezért (is) szükséges a tisztaságvizsgálatot nem egy, hanem legalább kettő, eltérő elválasztási mechanizmuson alapuló kromatográfias módszerrel végezni a fejlesztés során.

Napjaink egyik legnagyobb kihívása a *potenciálisan genotoxikus, nyomokban előforduló, rokon szerkezetű vegyületek* vizsgálata. Ezen komponensek mérése szinte kizárólag kapcsolt technikás kromatográfias módszerrel történik, mivel megengedett mennyiségük általában legfeljebb 10-100 ppm között van. Ezt az érzékenységet a tömegspektrometriás MS/MS detektorok, rendkívül érzékeny és kiemelkedően specifikus módban (MRM) képesek biztosítani.

4.8. Hatóanyagtartalom meghatározása

Miközben egy kiserelt gyógyszerkészítmény (tabletta, kapszula, stb.) hatóanyagtartalmának meghatározása teljesen evidens, a hatóanyagok rutin tartalmi mérése régóta vitatott koncepcionális kérdés.⁶ A legpontosabb tartalmi eredményt úgy tudnánk meghatározni, ha ismernénk a hatóanyag összes szennyezését, validált módszerekkel mennyiségüket a megfelelő pontossággal megmérnénk, és ezekből az adatokból ún. számított tartalmat határoznánk meg.

Ezzel szemben a hatósági elvárásoknak megfelelően minden hatóanyagból kell tartalmi meghatározást végeznünk. A hatóanyagtartalmi mérések két csoportba sorolhatók. A relatív mérések során valamely ismert tartalmú referencia anyagra vonatkoztatva mérjük és számítjuk, míg az ún. abszolút tartalmi mérések során a kapott jel nagyságból számítjuk ki a tartalmat. Leggyakrabban alkalmazott relatív mérések a kromatográfias és az UV spektrofotometriás módszerek, abszolút módszerek a napjainkban egyre fontosabbá váló NMR illetve titrimetriás módszerek.

Gyakorlati példákat a titrimetriás tartalmi mérésekre mutatunk be, kiemelve, hogy ez a klasszikus módszer még mindig fontos szerepet tölt be a gyógyszeranalitikában.⁷

A gyógyszerhatóanyagok egy része valamilyen só formájában kerül előállításra. A szokásos (hidroklorid, hidrobromid, szulfát, acetát stb.) sók tartalmi mérése, vagy más oldalról megvilágítva, a sóképzés megfelelőségének, az elméleti sav:bázis arány igazolásának szinte kizárólagos módszere a sav/bázis titrálás.

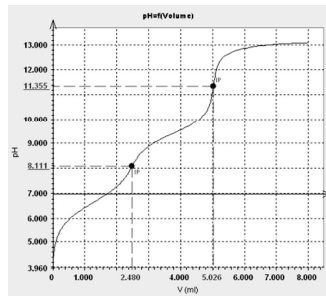
A mérés elve

A mérőoldat sav, illetve bázis, ami a megfelelő közegben pillanatszerűen reagál az adott hatóanyaggal. Az elektród a reakció végét potenciálugrás formájában érzékeli. A számítógéppel vezérelt automata titrator a kért eredményt (pl. mérőoldat fogyás, hatóanyagkoncentráció) kiszámítja és tárolja. A sav-bázis titrálások kivitelezését tekintve kétfajta módszert használunk: vizes-félvizes közegű, és nemvizes közegű titrálások.

A félvizes közegű titrálások esetében vízzel korlátlanul elegyedő szerves oldószer (pl. metanol, etanol, acetone, acetonitril, 1,4-dioxán, tetrahidrofuran) és víz elegye a titráló közeg. A választást az oldhatóság és a titrálási görbe jellege határozza meg. Hasonló oldhatóság esetében azt az oldószert választjuk, ahol meredekebb a potenciálugrás, így jobban értékelhető az inflexiós pont.

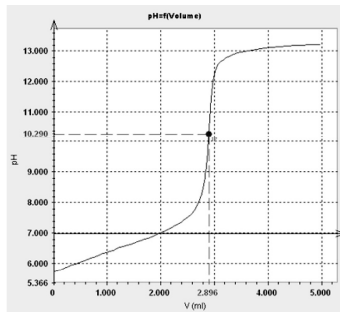
Érdekes példák félvizes közegű titrálásokra

Hatóanyag sók titrálásakor nem várt eredmények is tapasztalhatók. Példaként az egymással izomer maleát és fumarát sók titrálását mutatjuk be. Titráló közeg acetone és víz elegye, a mérőoldatunk 0,1 M-os, vizes nátrium-hidroxid volt. Nem várt módon a két anyag eltérő titrálási görbét eredményezett.



9. Ábra. A maleát só titrálási görbéje.

A maleát szerkezetéből következően, ahogy várható volt, két lépcsőt kaptunk. Az első lépcső a szabad karboxilcsoporthoz rendelhető, a második a bázisról történő leszorításhoz.



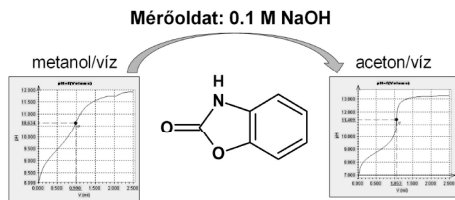
10. Ábra. A fumarát só titrálási görbéje.

A fumarát só és fumarásv titrálási görbéje előre nem várt módon eltérő volt, egy lépcsőt kaptunk.

Az a feltételezésünk, hogy maleinsav esetében a közelség miatt az egyik karboxilcsoport karbonilja hidszerkezetet alkot a másik karboxilcsoport protonjával és ez okozza a két disszociációs állandó egymástól való eltávolodását, míg fumarásv esetében a karboxilcsoportok olyan távol vannak, hogy „egyenértékűvé” válnak egymással.

Másik érdekes példánk a titráló közeg hatása. Ezt szemléletesen mutatja be a 2-benzoxazolinon molekularészlet tartalmazó hatóanyag példája. A vegyületcsalád nem látszik savnak. A savasság oka a molekulán belüli elektrondelokalizáció, konjugáció és a karbonil-és o-fenilén csoport negatív induktív effektusa.

Ha a metanol – víz rendszer helyett aceton – víz rendszert használunk a titráláskor, akkor a csekély meredekségű potenciálugrás (rossz értékelhetőség) már jól értékelhető titrálási görbévé válik és így az eredményünk is pontosabb, jobban reprodukálható.



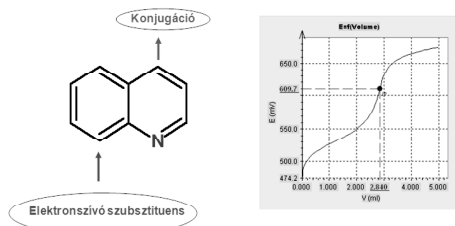
11. Ábra. A közeg hatása a titrálási görbére.

Az előző példából látjuk, hogy a titráló közeg nagymértékben befolyásolja a titrálhatóságot és a titrálási görbét. A gyógyszerhatóanyagok nagy része gyenge bázikusságú nitrogént tartalmaz. Ebben az esetben semmilyen félvízes közegű titrálással nem tudjuk a problémát megoldani. A gyenge bázikusság oka, hogy bizonyos molekulán belüli hatások miatt a nitrogénnel nincs stabilan kötött elektronpár. Az ilyen típusú gyógyszermolekulákat csak *nemvízes közegű titrálással* lehet meghatározni. A téma terület elismert kutatója és továbbfejlesztője Társaságunk egyik szaktektintéje, a kutatási analitikai terület egyik vezetője volt. Dr. Gyenes István hosszú ideig vezette a Társaság Alkalmazott Fizikai-kémiai kutató laboratóriumát. A magyarul, angolul és németül megjelent „Titrálás nemvízes közegben” című műve Magyarországon és külföldön még ma is elismert szakkönyv.⁸

Nem vízes titrálás esetén a titráló közeg általában jégecet, de saját tapasztalatunk szerint a koncentrált ecetsav ugyanúgy megfelel közegként. A mérőoldat jégecetes perklórsav. A perklórsav a legerősebb laboratóriumi szervesen sav, de ebben a közegben egy, sokszorosan erősebb sav keletkezik, az acetacidium-perklorát.

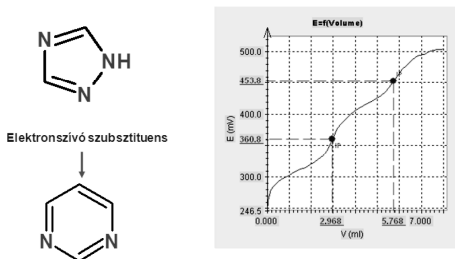
Néhány, a Richter jelenlegi portfóliójában szereplő hatóanyag vizsgálatának bemutatásával szeretnénk rámutatni a módszer jelentőségére.

Egy elektronszívó szubsztituens tartalmazó, konjugatív hatásnak kitett kinolin-származékot ezzel a módszerrel sikerült pontosan, reprodukálhatóan megmérni (12. Ábra).



12. Ábra. Egy nagyon gyenge bázis perklórsavas titrálása.

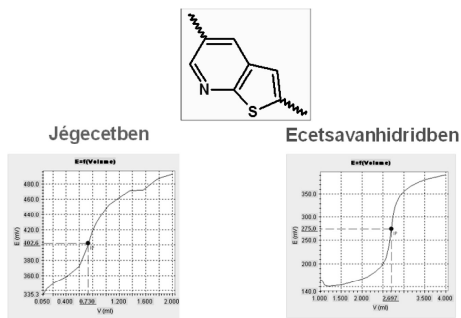
A módszer ún. „nivelláló” módszer (általában nem kapunk külön lépcsőket, a félvízes közegű titrálásokkal szemben, melyek ún. differenciáló módszerek). Egyik gyógyszerhatóanyagunk (amely pirimidin illetve triazolcsoportot is tartalmaz) esetében viszont a perklórsavas titrálással két lépcsőt kaptunk (13. Ábra).



13. Ábra. Elkülönült lépcsők nemvízes közegben (differenciáló hatás).

A kísérleti tapasztalatok alapján az első lépcsőhöz a pirimidin-rész, a másodikhoz a triazolcsoport rendelhető.

A nemvízes közegű titrálásoknál a báziserősséget lehet még növelni. Ha közegként jégecet vagy koncentrált ecetsav helyett ecetsavanhidridet alkalmazunk, akkor nő a báziserősség. A 14. ábrán egy olyan molekula bázisrészlete van, ami annyira gyenge, hogy jégecetben csak gyenge inflexió pont látszik, de ecetsavanhidridben a titrálási görbe minden szempontból ideális.



14. Ábra. A báziserősség növelése.

Annak a magyarázata csak elméleti szintű, hogy az ecetsavanhidrid miért fokozza a báziserősséget. Feltételezhetően acetyl-perchlorate complex keletkezik, mely csak ecetsavanhidridben létezik, eddig még senkinek nem sikerült kinyerni.

Az irodalom szerint a „legradikálisabb” közeg” a koncentrált hangyasav és ecetsavanhidrid 1 – 1 térfogatarányú elegye. Ezt saját mérésel még nem sikerült igazolnunk. Ha egy bázis már olyan gyenge, hogy ecetsavanhidridben is megtitrálhatatlan volt, akkor a koncentrált hangyasav alkalmazása sem növelte meg a báziserősséget.

5. Összefoglalás

A hatóanyagok vizsgálati módszereinek fejlesztése a különböző technikákat művelő analitikusok speciális szakmai tudásán és a hatóanyag előállításához kapcsolódó egységek (szintetikus laborok, technológiai egységek, üzemek, minőségbiztosítás, stb.) szakembereinek együttes gondolkodásán alapul. A fejlesztés során célunk az anyagok és folyamatok minél részletesebb megismerése, és a hatóanyag vizsgálatára alkalmas korszerű, a gyógyszerhatóságok elvárásainak is megfelelő módszerek kidolgozása. Ebből a rövid összefoglalóból is reméljük kiderült, hogy bár az elvárások és az elvek minden hatóanyag esetén megegyeznek, de a megvalósítás módja mindig különböző és a fejlesztési folyamat számtalan izgalmas tudományos feladatot tartogat.

Köszönetnyilvánítás

A hatóanyagok analitikájának modern, tudományos és minőségbiztosítási alapokon álló megközelítése majdnem három évtizedre nyúlik vissza. Hálás köszönettel tartozunk elődeinknek, különösen Dr. Görög Sándornak és Dr. Gazdag Máriaának, akiknek köszönhetően kialakult Társaságunknál a korszerű gyógyszeranalitikai kutatás. Az ő innovatív kezdeményezőképességük és szakmai tudásuk vezetett a mai szilárd tudás alapon nyugvó rendszerhez, ami nélkül a Richter nem tartozna a világ élvonalába a gyártás, a fejlesztés és a kutatás területén.

Drug analysis from a developer's point of view

From original explorative research to the release qualification of drug products, the need for modern analytical support comes up in a large variety of activities in the pharmaceutical industry. The fundamental aim of the analytical work however is the same in the different fields: promoting a deeper knowledge and the qualitative and quantitative characterization of the materials, helping the understanding of the processes in order to guarantee the safety of the drugs.

The selection of the applied methods and techniques is based on three pillars:

1. Applying the methods and general chapters of pharmacopeias is essential in the case of drugs, therefore it is practical to use them during the development.
2. There are important ICH guidelines (International Council for Harmonisation, previously International Conference on Harmonisation) relating to the quality of the drugs. The objective of these guidances is to recommend both methodological approaches and acceptance criteria.
3. The characterization of the product should be based on scientific considerations. The analyst has to keep in view that the method developed today will be applied in the future, so state-of-the-art solutions are preferred.

Methods are in progress in the development phase, therefore the number and nature of the applied methods are continuously changing. Our aim is to find out what the critical quality attributes of the products are, and which methods are suitable for measuring them. Suitability of the method is very important from a quality assurance point of view. Validation of the methods is also the task of the method developer.

Köszönjük a fejlesztési folyamat számos területén dolgozó munkatársaink együttműködését.

Külön köszönet a Kutatási Analitikai Osztály jelenlegi munkatársainak munkájáért, amivel hozzájárulnak az osztály eredményeihez. (Dr. Varga Katalin, Dravecz Ferenc, Gáspár Bernadett, Dr. Kalmár Éva, Dr. Kovács Máté, Kövesné Dr. Fitz Mónika, Nagy Ádám, Dr. Osztheimer Éva, Dr. Szabovik Gabriella, Dr. Tarnai Máté illetve Asztalosné Haluszka Csilla, Bokor Irén, Cserhátiné Bódi Rózsa, Horváth Edit, Kériné Kisfaludy Katalin, Perutec Dorottya, Szentes Zsófia)

Hivatkozások

1. Kah, M.; Brown, C.D. *Chemosphere* **2008**, *72*, 1401-1408.
2. DryLab® User Manual and Reference Guide, **2010**.
3. Molnár, I. J. *Chromatography A* **2002**, *125*, 129-156.
4. Szepesi, G.; Gazdag, M. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1988**, *6*, 623-639.
5. Görög, S.; Gazdag, M. *Journal of Chromatography B* **1994**, *659*, 51-84.
6. Görög, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, *36*, 931-937.
7. Japanese Pharmacopoeia (JP), 16th Edition, **2016**.
8. Gyenes, I. *Titrálás nemvízes közegben*, Műszaki Könyvkiadó, Budapest, **1960**.

The authors have surveyed in detail the different considerations of quality monitoring during the development process. The drug substance always contains impurities originating from the synthesis and/or the applied materials. According to the pertinent guideline (Q3A: Impurities in new drug substances) the impurities are classified as inorganic impurities, residual solvents, and organic impurities.

Inorganic impurities are normally known and include water, inorganic salts, and heavy metals. The methods to be applied are well known general methods such as "Karl Fisher titration" or "Loss on drying" or "Sulphated ash".

The control of residues of the solvents (and its potential impurities) is carried out according to the guideline (Q3C: Impurities for residual solvents). The used technique in most cases is gas chromatography (GC) with head space or liquid injection.

The most challenging work is to find out what the potential organic impurities of the drug substance are, which can arise during synthesis, purification and storage ("impurity profile"). According to the physical-chemical characteristics of the drug substances, the generally applied method is high performance liquid chromatography (HPLC). Collection of physical chemical attributes of the sample and known impurities (such as solubility, pK and logD-pH relation) is necessary for choosing the separation mode and its optimization. Separation of degradation products is also expected. The degradation products usually are not known and available at the beginning of the method development, therefore these components are "produced" by different stress tests (effect of temperature, humidity, light in solid form and/or effect of acidic, basic, and oxidative circumstances in solution). The detailed example shows how we select the pH of the mobile phase on the basis of the log D-pH relationship, and what are the other parameters which have to be taken into consideration to choose the right buffer. The polarity of the components determines the suitable column.

DryLab software is used for the optimization using the principle "Quality by Design". The robustness map, the "cube" predicted by DryLab represents a design space where robust separation can be achieved.

Among the related substances chiral impurities represent a very important problem. Racemic drug substances are usually characterized by capillary electrophoresis (HPCE). Enantiomeric purity can be measured with chiral HPLC, but the method development is a very challenging job even today.

The routinely applied method for the content determination of a drug substance is titrimetric assay. Examples and some interesting observations are shown to demonstrate that this classical method plays an important role in drug analysis.

The principle of the method is the instantaneous reaction of the volumetric solution with the active pharmaceutical substance in the proper medium. The end of the reaction is indicated by a potential jump when using electrodes. The computer of the automatic titrator calculates the results and stores them. With regard to the medium we use two main types of acid-base titration: aqueous-half aqueous and non-aqueous.

In the case of half-aqueous titration the organic solvent must mix with water unlimitedly. The solvents most frequently used are 1,4-dioxane, tetrahydrofuran, methanol, ethanol, acetone, acetonitrile. The choice of solvent determines the solubility of the substance to be measured and the character of the titration curve. The steeper the potential jump, the more accurately the inflection point can be evaluated.

We have highlighted some interesting examples in the field of half-aqueous titration. Interestingly, the titration curves of the isomeric maleate and fumarate salts differ in an acetone – water mixture when using a volumetric solution of 0.1 M sodium hydroxide. The titration curve of the maleate salt contains two inflection points, whereas that of the fumarate salt contains one inflection point. The article explains this phenomenon. The medium can also have some interesting effects. For example, the 2-benzoxazolinone moiety that is present in some drug substances does not seem to be acidic (the inflection point is barely visible) when using a mixture of methanol and water for the titration. However, in an acetone –water mixture we obtain an excellent titration curve.

We have also discussed some examples of non-aqueous titration. Many drug substances contain a weakly basic nitrogen atom due to electron delocalization, conjugation, and negative inductive effects within the molecule. In such cases only non-aqueous titrations can be used. The medium is glacial or concentrated acid, the volumetric solution is perchloric acid in glacial acetic acid. In this case a peculiar acid forms that is much stronger than aqueous perchloric acid. A renowned expert of this method was dr. István Gyenes who worked at Richter for many years and whose seminal book on the subject was published internationally. Quinolone derivatives (many drug substances contain this moiety) can only be titrated in this way, and an interesting example is given in our paper. If the organic base is so weak that the non-aqueous titration with perchloric acid does not give a proper titration curve, the glacial or concentrated acetic acid has to be changed to acetic anhydride. We give an example of this case.