



Genotoxische Verunreinigungen

Besser vorbeugen als nachsorgen

Bei der Herstellung pharmakologisch wirksamer Substanzen können unter ungünstigen Bedingungen alkylierende Sulfonate entstehen, die das Erbgut schädigen und Krebs hervorrufen können. Gemäß FDA und Europäischem Arzneibuch sind potenziell belastete Arzneimittel auf Kontaminationen zu untersuchen. Die Gaschromatographie erweist sich dafür als Trenntechnik der Wahl. Wie die beiden in diesem Beitrag zusammengefassten Anwendungen aus den USA und Europa zeigen, bietet das Prozedere der Probenvorbereitung gute Ansätze, die Methode zu optimieren und die Analyse den individuellen Anforderungen anzupassen.

In Gegenwart niedermolekularer Alkohole können unter ungünstigen Bedingungen aus Sulfonsäuren Alkylsulfonate entstehen, etwa Methylmethansulfonat (MMS) in methanolischer Lösung, Ethylmethansulfonat (EMS) unter Einfluss von Ethanol, Isopropylmethansulfonat (IPMS) in Anwesenheit von Isopropanol. Die auch als Mesylate bezeichneten Verbindungen sind selten erwünscht, besitzen sie doch allesamt eine mehr oder weniger ausgeprägte genotoxische Wirkung, das heißt MMS, EMS und IPMS greifen die DNS an, können Zellmutationen hervorrufen und Krebserkrankungen auslösen, paradoxerweise infolge der Einnahme gesundheitsfördernder Präparate.

Sulfonsäuren werden häufig für die Salzbildung während der Synthese und Produktion der aktiven pharmazeutischen Inhaltsstoffe (API) eingesetzt. Die Pharmaindustrie hat große Anstrengungen unternommen, die Entstehung von Alkylsulfonaten zu begreifen und ihr Aufkommen in Medikamenten

zu minimieren. Ungeachtet dessen bleibt – je nach Herstellungsprozess – das Restrisiko einer Kontamination, dem man allerdings mit analytischen Mitteln zu begegnen weiß und so den Schutz des Verbrauchers gewährleistet.

Der Gesetzgeber reagierte folgerichtig: Im Jahr 2006 wurde von der Europäischen Arzneibuch-Kommission eine „Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities“ beschlossen, wonach Arzneimittel auf eine Belastung mit genotoxischen Verunreinigungen zu untersuchen sind. Von der European Medicines Agency (EMA) wurde in diesem Zuge ein offizieller Grenzwert festgelegt (TTC = threshold of toxicological concern), der die Aufnahme genotoxischer Verunreinigungen auf maximal 1,5 µg pro Person und Tag beschränkt. [1]

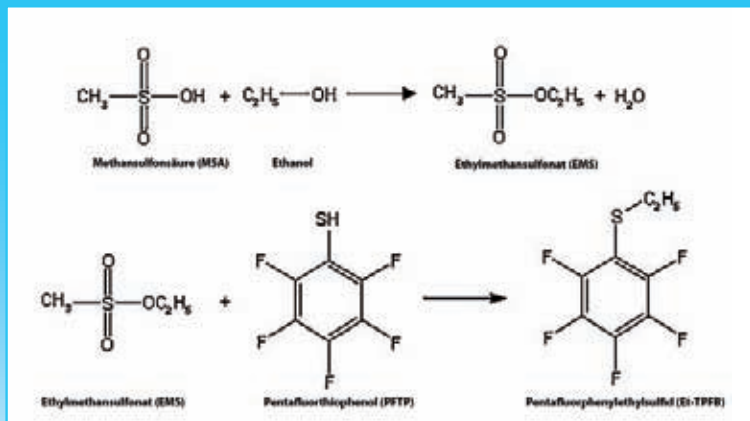
Alkylsulfonate im Fokus

Für die Bestimmung genannter Alkylsulfonate wurden in der Vergangenheit verschie-

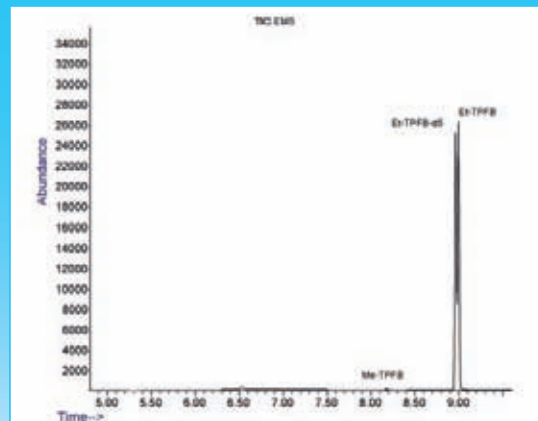
dene Methoden entwickelt; wie der Blick in die Fachliteratur offenkundig macht, basieren die heute wichtigsten auf der Gaschromatographie in Verbindung mit der massenselektiven Detektion. Auf die GC/MS-Methode zum Nachweis u. a. von Ethylmethansulfonat (EMS) aus der Medikamentenmatrix setzen auch die Experten unterschiedlicher international namhafter Pharmafirmen wie AstraZeneca, Pfizer, GlaxoSmithKline und Roche Pharma AG.

In einem unternehmens- bzw. konzernübergreifenden Projekt in Zusammenarbeit mit dem Research Institute for Chromatography (RIC) unternahmen sie den Versuch, Mechanismen und Kinetik der Bildung von Sulfonsäureestern in der Wirkstoffmatrix besser zu verstehen. Ihren Fokus legten sie zu Anfang der Experimente auf die Reaktion von Methansulfonsäure und Ethanol zu Ethylmethansulfonat (EMS).

Im Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [2] schildern sie u. a. das



In Gegenwart niedermolekularer Alkohole können unter ungünstigen Bedingungen aus Sulfonsäuren Alkylsulfonate entstehen (obere Reaktionsgleichung). Die untere Reaktionsgleichung demonstriert den Prozess der Umsetzung von EMS mit PFTP.



Ergebnis der MPS-HS-GC/MS: Das durch die Umsetzung von EMS mit PFTP entstandene Pentafluorphenylethylsulfid (Et-TPFB) eluierte bei 9 min, der deuterierte Standard (Et-TPFB-d5) kurz zuvor.

Manko bisher gängiger GC/MS-Methoden. Diese besäßen zwar eine hohe Sensitivität im ppm-Bereich ($\mu\text{g/g}$), litten aber darunter, dass etwa eine unmittelbare Injektion der Medikamentenmatrix zu einer Kontamination des GC-Inlets oder auch zu einer Stoffzerstörung führe. Obendrein sei beobachtet worden, dass sich im beheizten GC-Inlet durch thermische Zersetzung oder unter Einfluss des verwendeten Lösungsmittels Sulfonsäureester bilden könnten, deren Gegenwart die Richtigkeit des resultierenden Messergebnisses infrage stellt.

Als zuträglich für die Stabilität der Substanzen und deren Nachweis im unteren ppm-Bereich hingegen erwies sich die In-situ-Derivatisierung, gefolgt von der statischen Headspace, dank der eine Kontamination des GC/MS-Systems verhindert wird. Damit war die Richtung für die weitere Arbeit vorgegeben.

erfolgte im Agitator bei 105°C für eine Dauer von 15 min, wobei die Probe mit einer Drehzahl von 600 pro Minute geschüttelt wurde. Die Aufgabe von 1 mL Headspace geschah mit einer gasdichten Spritze im Splitmodus 1:10 bei einer Temperatur des Injektors von 250°C . Für die Trennung der Analyten wurde eine DB-VRX-Säule ($20\text{ m} \times 0,18\text{ mm ID} \times 1\text{ }\mu\text{m df}$) von Agilent Technologies verwendet. Beim Trägergas handelte es sich um Helium, das mit $0,8\text{ mL/min}$ durch die Säule strömte. Der GC-Ofen wurde von 60°C (1 min) mit 10°C/min auf 130°C aufgeheizt und von diesem Punkt aus mit 30°C/min auf die Endtemperatur von 250°C . Die massenselektive Erfassung erfolgte im SIM-Modus.

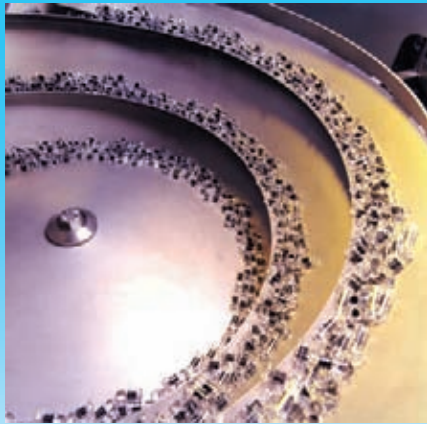
Das Resultat der MPS-HS-GC/MS: Das durch die Umsetzung von EMS mit PFTP gebildete Pentafluorphenylethylsulfid (Et-TPFB) eluierte bei 9 min, der deuterierte Standard (Et-TPFB-d5) kurz zuvor. Beide Signale ließen sich mittels der extrahierten Ionenchromatogramme bei m/z 228 bzw. 233 quantifizieren. In ihrem Beitrag schlussfolgern die Wissenschaftler, dass sie mit der von ihnen verwendeten Methode und dem eingesetzten GC/MS-System überaus zufriedenstellende Resultate erzielt haben, sprich: eine exzellente Linearität ($R^2 = 0,999$) und Wiederholbarkeit sowie eine Robustheit, die kinetische Studien hinsichtlich der Bildung von

GC/MS mit Derivatisierung und automatisierter Headspace-Technik

Für ihre Messung verwendeten die Wissenschaftler eine Gerätekombination, bestehend aus einem Agilent GC 6890 und Agilent MSD 5973. Sämtliche Schritte, von der Dosierung des internen Standards (deuterierter Alkohol) über die Zugabe des Derivatisierungsreagenz (6,4 mg/L Pentafluorthiophenol [PFTP] und 20 mg/mL Natriumhydroxid in Wasser) bis zur statischen Headspace-Extraktion und -Probenaufnahme, erfolgten vollständig automatisiert mit dem GERSTEL-MultiPurpose-Sampler (Dual-Rail-MPS), der aufgrund seiner Bauweise zwei unterschiedliche Spritzen handhaben kann – für die Dosierung von Flüssigkeiten wie auch für die Aufgabe gasförmiger Headspace-Proben. Die Äquilibrierung der statischen Headspace-Extraktion

Mit dem Dual-Head-GERSTEL-MPS lässt sich die Dosierung von Flüssigkeiten sowie die Aufgabe gasförmiger Headspace-Proben komfortabel und sicher automatisieren.





Herstellung von Arzneimitteln bei AstraZeneca



Qualitätssicherung bei AstraZeneca



Verpackung von Arzneimitteln bei AstraZeneca

Fotos Seite 19: AstraZeneca

Sulfonaten aus Sulfonsäuren erlaubt. Die Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD) von EMS lag bei $< 0,5 \mu\text{g/L}$, die relative Standardabweichung (RSD) bei 3,5 %.

Autosampler für die leichte Handhabung unterschiedlicher Volumina

Von ähnlich erfreulichen Resultaten berichten Johanna Ubben, Amy Birch und Fenghe Qiu von der Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc. in Ridgefield, Connecticut/USA [3]. Ebenso wie ihre europäischen Kollegen setzten die US-Experten beim Nachweis von Methylmethansulfonat (MMS) auf die GC/MS, allerdings bei der Probenvorbereitung nicht auf die statische Headspace-Technik, sondern auf die Flüssig-flüssig-Extraktion, wobei sie die Dual-Head-Variante des GERSTEL-MPS einsetzten, und zwar unter Verwendung von zwei Spritzen: zur Handhabung großer Flüssigkeitsmengen ($250 \mu\text{L}$) für die Dosierung der Reagenzien und für die Probenaufgabe von Mikrolitermengen ins GC/MS-System ($10 \mu\text{L}$).

Das grundlegende Ziel der Wissenschaftler war es, die relative Reaktivität von Methansulfonsäure (MSA) und Natriummethansulfonat (MSA-Na) in methanolischer Umgebung auf die Bildung von MMS zu untersuchen. Hierzu kann man sich der Flüssig-flüssig-Extraktion (FFE) bedienen; manuell ein überaus arbeits- und zeitintensives Verfahren, das obendrein nur einen geringen Probendurchsatz erlaubt. Dieser Sachverhalt war Johanna Ubben und ihren Kollegen offenbar bewusst, denn es bestand der Plan, die bislang praktizierte manuelle FFE quasi eins zu eins auf den MPS-Laborroboter zu übertragen und damit die Effizienz der Probenvorbereitung nachhaltig zu steigern. Besonders bestach der Aspekt, dass sich die Proben mit dem MPS rühren lassen, was die automatisierte Durchführung von In-situ-Extraktionen erlaube.

Der MPS füllte $100 \mu\text{L}$ der Probe in ein Röhrchen mit $500 \mu\text{L}$ deionisiertem Wasser und $500 \mu\text{L}$ Methylenchlorid. Es folgte die Extraktion bei 600 Umdrehungen pro Minute für die Dauer von einer Minute. Für die Phasentrennung wurden 20 Minuten veranschlagt; durch stündliche Injektion ins GC/MS-System wurde die MMS-Bildung verfolgt.

Ihre Analyse führten die Wissenschaftler auf einem GC 7890A in Kombination mit einem MSD 5975C, beide von Agilent Technologies, durch. Die Trennung erfolgte auf einer Kapillarsäule von Restek (Rtx-VRX, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$, $1,4 \mu\text{m}$). Als Trägergas diente Helium mit einem konstanten Fluss von $1,0 \text{ mL/min}$. Der GC-Ofen wurde temperaturprogrammiert von $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min) mit $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ auf $160 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgeheizt. Die Injektion der Probe ($1 \mu\text{L}$) erfolgte mit einem Splitverhältnis von 10:1, die massenselektive Detektion nach Elektronenstoßionisierung im SIM-Modus, wobei folgende Parameter berücksichtigt wurden: für Methylmethansulfonat (MMS) Retentionszeitraum 3,0-5,0 min, Target-Ion 80 (m/z), Qualifier-Ion 110 (m/z), Verweilzeit 100 ms; für Ethylmethansulfonat (EMS) Retentionszeitraum 5,0-7,0 min, Target-Ion 109 (m/z), Qualifier-Ion 79, Verweilzeit 100 ms.

Ende gut, alles gut? So oder ähnlich darf wohl die Aussage von Johanna Ubben, Amy Birch und Fenghe Qiu von der Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc. in Ridgefield, Connecticut/USA gewertet werden. Die Wissenschaftler fanden nämlich heraus, dass sich mehr Methylmethansulfonat bildet, je weiter sich das Verhältnis von MSA/MSA-Na in Richtung Methansulfonsäure verschiebt: „Die MMS-Bildung beschleunigte sich in der Lösung mit 50 % oder mehr MSA“, bringen es Ubben und Kollegen auf den Punkt. Erstes Ziel erreicht, auf zum nächsten: Darüber hinaus habe die Automatisierung der Methode auf dem MPS

eine unkomplizierte stündliche Datenerfassung ermöglicht. Sie wurde validiert und habe sich als selektiv und linear erwiesen; die statistischen Daten für Wiederfindung und Wiederholbarkeit überzeugten, und die Lösung war über einen Zeitraum von 24 Stunden stabil. Während die manuelle Methode die Präsenz eines Anwenders erforderte, bot der MPS die Chance, Proben unbeobachtet auch über Nacht zu vermessen. Auf den Punkt gebracht, schreiben die Wissenschaftler, habe der MPS die Probenvorbereitung auf ein Viertel der bislang üblichen Zeit reduziert. Sie schließen ihre Arbeit mit einem Verweis auf die Möglichkeit der In-situ-Extraktion: „Dieser neue Prozess macht nicht nur die Forschung effizienter, sondern reduziert auch die Variabilität der Resultate, was wiederum zu einer robusteren Analyse führt.“

Klingt, wie schon mal gehört, ...

Literatur

- [1] Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
- [2] K. Jacq, E. Delaney, A. Teasdale, S. Eyley, K. Tayler-Worth, A. Lipczynski, V. D. Reif, D. P. Elder, K. L. Facchine, S. Golec, R. Schult Oesterich, P. Sandra, F. David: Development and validation of an automated static headspace gas chromatography-mass spectrometry (SHS-GC-MS) method for monitoring the formation of ethyl methane sulfonate from ethanol and methane sulfonic acid. J. Pharm. Biomed. Anal. 48(5) (2008) 1339-44.
- [3] J. Ubben, A. Birch, F. Qui: Use of the GERSTEL Multi-Purpose Sampler (MPS) as a sample preparation tool to enhance the efficiency of mesylate formation studies. Posterpräsentation.