

# **Entwicklung stabilitätsindizierender chromatographischer Methoden unter Anwendung orthogonaler Systeme und Stresstests**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Stefanie Rall**

aus Spremberg

Mai 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 01.02.2006 bis 01.02.2009 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ronald Gust vom Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Analytischen Entwicklung der Bayer Schering Pharma AG angefertigt und vor Ort durch Herrn Dr. rer. nat. Thomas Storm und Herrn Dr. rer. nat. Michael Pfeffer betreut.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ronald Gust

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Otto

Datum der Disputation: 07. Oktober 2009

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ronald Gust möchte ich für die Unterstützung und die Ermöglichung dieser Arbeit herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Matthias Otto möchte ich für die Bereitschaft, die Dissertation zu begutachten und für die fachliche Unterstützung danken.

Herr Dr. rer. nat. Thomas Storm möchte ich zum einen für die Überlassung des interessanten Themas sowie zum anderen für die großartige fachliche und menschliche Betreuung und die vielen Diskussionen über die Arbeit danken.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Pfeffer gilt mein Dank für die gewinnbringenden Gespräche und für die engagierte und stets motivierende Betreuung in der letzten Phase meiner Arbeit nach dem Weggang von Herrn Dr. Storm.

Vielen Dank an Herrn Dr. rer. nat. Michael Gottfried für die anregenden Diskussionen sowie die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. rer. nat. Gert Brandl für die permanente Unterstützung meiner Arbeit während der ganzen drei Jahre.

Vielen Dank an Martin Schmitz und Marion Schelensky für die kompetente fachliche Unterstützung bei sämtlichen Fragestellungen zum Thema Massenspektroskopie.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der ehemaligen Abteilung Analytical Development 3 und jetzigen Abteilung Specialized Analytics, für die tolle Integration in die Abteilung und das nette kollegiale Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich Malgorzata Pilch und Aviva Martin danken.

Bei Herrn Norbert Krebs möchte ich mich für die Hilfe beim Aufbau und der Inbetriebnahme der HPLC-Säulenschaltung ganz herzlich bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Katrin Roth für die Unterstützung bei allen statistischen und den damit verbundenen softwaretechnischen Problemen und Fragen, insbesondere für die Hilfe bei der Umsetzung bzw. Übersetzung meiner Vorstellungen in die Software R.

Danke an meine Mitdoktoranden in der Pharmazeutischen Entwicklung bei Bayer Schering Pharma für die schöne Zeit und die vielen fachlichen und auch nicht fachlichen Gespräche. Ein ganz großes Dankeschön geht an Maren Müller-Späth für die tolle gemeinsame Zeit bei Specialized Analytics und die große Hilfe auch im Labor, besonders an stressigen und kritischen Tagen.

Bedanken möchte ich mich bei der Bayer Schering Pharma AG für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung aller Arbeitsmaterialien.

Herzlichen Dank auch an Magnus Krüger für die vielen fachlichen und anderen aufbauenden Gespräche.

Danke an Stefan Conradi und Jan Elsner für die Tipps zum Layout und der bereitwilligen Durchsicht meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an meine Eltern, die immer an mich geglaubt und mir seelisch während dieser Zeit beigestanden haben.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Matthias Lehmann für seine Geduld und sein unermüdliches Zuhören bei Problemen als auch bei Erfolgserlebnissen und die stets aufbauenden Worte während dieser Zeit.

VIELEN DANK

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Regulatorische Anforderungen an die Stabilität von Arzneistoffen und an die pharmazeutische Analytik .....	1
1.2 Stabilitätsindizierende Methoden im Kontext der Entwicklung neuer Arzneistoffe .....	4
1.2.1 Anforderungen an stabilitätsindizierende Methoden .....	4
1.2.2 Selektivität und die Entwicklung orthogonaler Methoden .....	5
1.3 Chemometrische Methoden zur Identifizierung orthogonaler chromatographischer Systeme .....	8
1.3.1 Hierarchische Clusteranalyse .....	8
1.3.2 Color map .....	11
1.4 Stresstests in der Entwicklung neuer Arzneistoffe .....	11
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	13
<b>2 ENTWICKLUNG ORTHOGONALER CHROMATOGRAPHISCHER SYSTEME</b> .....	<b>16</b>
2.1 Methodenscreening für die Identifizierung orthogonaler chromatographischer Systeme für HPLC .....	16
2.1.1 Auswahl der Modellsubstanzen .....	16
2.1.2 Auswahl der HPLC-Säulen .....	18
2.1.3 Analytische Bedingungen .....	20
2.1.4 Aufbau und Durchführung des Screenings .....	23
2.1.5 Chemometrische Auswertung .....	24
2.2 Anwendung der HPLC-Color map für die Entwicklung einer orthogonalen Methode eines Arzneistoffkandidaten mit etablierter HPLC-Analytik .....	31
2.2.1 Arzneistoffkandidat und etablierte Methode .....	31
2.2.2 Verwendung der Color map für die Auswahl der HPLC-Systeme .....	34
2.2.3 Analytische Screeningbedingungen .....	38
2.2.4 Chemometrische Auswertung .....	42
2.2.5 Optimierung des orthogonalen Systems .....	45
2.3 Methodenscreening für die Identifizierung orthogonaler chromatographischer Systeme für die UPLC .....	47
2.3.1 Auswahl der Modellsubstanzen .....	47
2.3.2 Auswahl der UPLC-Säulen .....	48
2.3.3 Analytische Bedingungen .....	49
2.3.4 Aufbau und Durchführung des Screenings .....	52
2.3.5 Chemometrische Auswertung .....	53
2.4 Anwendung der UPLC-Color map für die Entwicklung einer orthogonalen Methode eines Arzneistoffkandidaten mit etablierter HPLC-Analytik .....	59

2.4.1	Arzneistoffkandidat und etablierte HPLC-Methode.....	59
2.4.2	Methodenadaptation: Entwicklung einer UPLC-Methode mit flüchtiger mobiler Phase .....	60
2.4.3	Verwendung der Color map für die Auswahl der UPLC-Systeme .....	62
2.4.4	Analytische Screeningbedingungen.....	65
2.4.5	Chemometrische Auswertung .....	66
2.4.6	Optimierung der orthogonalen Systeme.....	69
2.4.7	Überprüfung der orthogonalen Methoden mit einer verunreinigten Charge des Arzneistoffkandidaten .....	70
<b>3</b>	<b>STRESSTESTS .....</b>	<b>72</b>
3.1	Oxidative Stresstests.....	72
3.1.1	Auswahl des Arzneistoffkandidaten .....	72
3.1.2	Auswahl der Reagenzien und Bedingungen für Stresstests .....	73
3.1.3	Experimentelle Durchführung .....	74
3.1.4	Analytische Bedingungen .....	78
3.1.5	Ergebnisse .....	79
3.1.6	Anwendung orthogonaler Systeme zur Interpretation von Stresstestdaten .....	84
3.2	Vergleich von Stresstestdaten mit Stabilitätsdaten von Formulierungen.....	87
3.2.1	Auswahl des Arzneistoffkandidaten .....	87
3.2.2	Auswahl der Reagenzien und Bedingungen für den Stresstest mit BAY .....	87
3.2.3	Experimentelle Durchführung des Stresstests .....	88
3.2.4	Analytische Bedingungen .....	89
3.2.5	Ergebnisse .....	91
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK .....</b>	<b>99</b>
4.1	Entwicklung orthogonaler chromatographischer Systeme .....	99
4.2	Stresstests.....	105
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>113</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>115</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>117</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>122</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: System A und B (links) haben eine ähnliche Selektivität und sind somit hoch korreliert. System C und D (rechts) haben unterschiedliche Selektivität und zeigen eine schwache Korrelation. Der Grad der Orthogonalität ist demzufolge hoch. .....	10
Abb. 2: Etappen des Konzeptes zur Methodenentwicklung neuer Arzneistoffe .....	14
Abb. 3: Allgemeine Strukturformel der Sulfonamide .....	17
Abb. 4: Historische Entwicklung von HPLC-RP-Materialien [53] .....	19
Abb. 5: Dendrogramm der 50 HPLC-Systeme .....	25
Abb. 6: Color map der 50 HPLC-Systeme .....	26
Abb. 7: Matrix der Streudiagramme der Systeme 28, 45 und 6. Blau ist das Streudiagramm der orthogonalen Systeme 28 und 45. Rot ist das Streudiagramm der ähnlichen Systeme 28 und 6. ....	28
Abb. 8: Chromatogramme der orthogonalen Systeme 28 und 45.....	29
Abb. 9: Chromatogramme der ähnlichen Systeme 28 und 6 .....	29
Abb. 10: Optimierte Chromatogramme der orthogonalen Systeme 28 und 45.....	30
Abb. 11: Strukturformel von ASTAR [54] .....	32
Abb. 12: Chromatogramm der etablierten HPLC-Methode von ASTAR .....	33
Abb. 13: Die markierten Systeme (vertikal) zeigen mit Ausnahme des Systems 12 den größten Selektivitätsunterschied zum System 21 (horizontal). ....	35
Abb. 14: Vertikaler Schnitt durch die Color map [s. Abb. 13] an der Stelle des etablierten Systems 21. Die selektierten Systeme aus der Color map sind markiert (pink).....	36
Abb. 15: Matrix der Streudiagramme der Systeme 21, 32, 14, 16, 40, 12. Die Diagramme sind mit den gleichen Farben wie in der Color map markiert.....	38
Abb. 16: Dendrogramm der sechs HPLC-Systeme vom Screening mit ASTAR .....	43
Abb. 17: Color map des Screening mit ASTAR .....	44
Abb. 18: Matrix der Streudiagramme der Systeme 1-6. Die Diagramme sind mit den gleichen Farben wie in der Color map von ASTAR markiert. ....	45
Abb. 19: Chromatogramme der orthogonalen Systeme von ASTAR .....	46
Abb. 20: Dendrogramm der 52 UPLC-Systeme .....	54
Abb. 21: Color map der 52 UPLC-Systeme .....	55
Abb. 22: Chromatogramme der orthogonalen UPLC-Systeme 20 und 48 .....	57
Abb. 23: Chromatogramme der ähnlichen UPLC-Systeme 20 und 2 .....	58
Abb. 24: Matrix der Streudiagramme der Systeme 20, 48 und 2. Blau ist das Streudiagramm der orthogonalen Systeme 20 und 48. Rot ist das Streudiagramm der ähnlichen Systeme 20 und 2.....	58
Abb. 25: Die markierten Systeme (vertikal) zeigen den größten Selektivitätsunterschied zum System 34 (horizontal).....	63
Abb. 26: Vertikaler Schnitt durch die Color map [s. Abb. 25] an der Stelle des etablierten Systems 34. Die 19 selektierten Systeme aus der Color map sind markiert (pink). ....	64
Abb. 27: Dendrogramm der 20 UPLC-Systeme des BAY-Screenings.....	67
Abb. 28: Color map der 20 UPLC-Systeme des BAY-Screening .....	68

Abb. 29: Matrix der Streudiagramme der Systeme 1, 6 und 10. Die Diagramme sind mit den gleichen Farben wie in der Color map von BAY (s. Abb- 25) markiert .....	68
Abb. 30: Chromatogramme der optimierten orthogonalen Systeme der ID-Lösung.....	70
Abb. 31: Chromatogramme der orthogonalen Systeme der Tox-Charge mit neuer Verunreinigung P1 .....	71
Abb. 32: Chromatogramme von System 1 des Stresstests mit ABAP. Chromatogramm A ist die Referenzprobe von ASTAR zum Zeitpunkt Null. Chromatogramm B ist die Referenzprobe von ASTAR und Hydrochinon nach 24 h und Chromatogramm C ist die Stressprobe mit ABAP nach 24 h.....	82
Abb. 33: Chromatogramme von System 1 des Stresstests mit Wasserstoffperoxid im wässrigen Milieu. Chromatogramm A ist die Referenzprobe von ASTAR zum Zeitpunkt t=0. Chromatogramm B ist die Stressprobe mit Wasserstoffperoxid nach 1 h.....	83
Abb. 34: Massenspektrum von VU2 des Chromatogramm B (pink markiert) aus Abb. 33.....	83
Abb. 35: Chromatogramme der orthogonalen Systeme der 24hProbe des Stresstests mit ABAP. Die drei unbekanntenen Abbauprodukte (P1-P3) sind pink markiert.....	85
Abb. 36: ESI-Spektren von P1 auf den orthogonalen Systemen.....	85
Abb. 37: ESI-Spektren von P2 auf den orthogonalen Systemen.....	86
Abb. 38: ESI-Spektren von P3 auf den orthogonalen Systemen.....	86
Abb. 39: UV-Chromatogramme der orthogonalen Systeme der Tablette A mit der Lagerbedingung 3 .....	97
Abb. 40: UV-Chromatogramme des Systems 1 von Chromatogramm A: Probe der Tablette A nach Lagerung unter Bedingung 3. Chromatogramm B: Stresslösung von AIBN 50 mol% nach 24 h. Chromatogramm C: Stresslösung von 3 % H2O2 (wässrig) nach 2 h. ....	98
Abb. 41: Vermutliche Entstehung von VU2: Radikalische Oxidation der benzyllischen Gruppe von ASTAR .....	106
Abb. 42: Vergleich der schematisierten Chromatogramme eines Stabilitätsmusters mit Chromatogrammen der Stresstestproben von BAY. In den Chromatogrammen sind nur die relevanten Abbauprodukte dargestellt, die mit MetaboLynx erfasst wurden. ....	111
Abb. 43: Konzept zur Methodenentwicklung neuer Arzneistoffe .....	113



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Grenzen für organische Verunreinigungen in neuen Arzneistoffen [3] .....	2
Tab. 2: Lagerbedingungen der Chargen in den regulatorischen Stabilitätsstudien.....	3
Tab. 3: Modellsubstanzen des Methodenscreenings für HPLC-Systeme .....	17
Tab. 4: Im Methodenscreening verwendete HPLC-RP-Säulen .....	20
Tab. 5: Stammlösung der Einzelsubstanzen .....	21
Tab. 6: Zusammensetzung der Gemische .....	22
Tab. 7: Chromatographische Bedingungen des HPLC-Methodenscreenings .....	23
Tab. 8: Eluenten des Methodenscreenings .....	24
Tab. 9: Legende der HPLC-Color map.....	27
Tab. 10: Chromatographische Bedingungen der orthogonalen Systeme nach der Optimierung .....	30
Tab. 11: Verunreinigungen von ASTAR .....	32
Tab. 12: Etablierte HPLC-Analytik von ASTAR.....	33
Tab. 13: Legende der markierten System in der Color map Abb. 13.....	37
Tab. 14: Neue Bezeichnung der Systeme im Screening mit ASTAR.....	39
Tab. 15: Eluenten des Screening mit ASTAR .....	40
Tab. 16: Analytische Bedingungen für die Systeme 1- 4 .....	41
Tab. 17: Analytische Bedingungen für die Systeme 5 und 6 .....	41
Tab. 18: MS-Bedingungen für das Screening .....	42
Tab. 19: Analytische Bedingungen nach der Optimierung .....	46
Tab. 20: Modellsubstanzen des Methodenscreenings für UPLC-Systeme .....	48
Tab. 21: Im Methodenscreening verwendete UPLC-RP-Säulen .....	49
Tab. 22: Zusammensetzung der Gemische für das UPLC-Screening .....	51
Tab. 23: Analytische Bedingung im Screening.....	51
Tab. 24: MS-Bedingungen im Screening.....	52
Tab. 25: Eluenten des UPLC-Screenings .....	52
Tab. 26: Legende der UPLC-Color map .....	56
Tab. 27: Etablierte HPLC-Methode von BAY .....	59
Tab. 28: Phaseneigenschaften der hydrophoben HPLC- und UPLC-Säulen.....	60
Tab. 29: MS-Bedingungen für BAY.....	61
Tab. 30: Analytische Bedingungen für BAY im Screening .....	62
Tab. 31: Markierte UPLC-System aus der Color map Abb. 25 .....	65
Tab. 32: Neue Bezeichnung der Systeme im Screening mit BAY .....	66
Tab. 33: Eluenten des Screenings mit BAY.....	66
Tab. 34: Optimierte analytische Bedingungen der orthogonalen Systeme .....	69
Tab. 35: Verwendete Reagenzien für den oxidativen Stresstest mit ASTAR.....	74
Tab. 36: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit AIBN und ABAP .....	75
Tab. 37: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit Wasserstoffperoxid.....	76
Tab. 38: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit Fenton-Reagenz.....	77

Tab. 39: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit den Schwermetallsalzen.....	77
Tab. 40: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit Rose Bengal .....	78
Tab. 41: Relative Intensität von VU2 in den oxidativen Stresstests .....	80
Tab. 42: Lagerbedingungen der Formulierungen von BAY .....	87
Tab. 43: Reagenzien und Bedingungen für den Stresstest mit BAY .....	88
Tab. 44: Zusammensetzung der hydrolytischen Stresslösungen .....	89
Tab. 45: Herstellung der Probelösung der Tabletten.....	90
Tab. 46: MS-Einstellungen der Referenzlösung.....	91
Tab. 47: Gruppe 1 der relevanten Abbauprodukte von BAY .....	94
Tab. 48: Gruppe 2 der relevanten Verunreinigungen in BAY .....	95
Tab. 49: Gruppe 3 der relevanten Verunreinigungen in BAY .....	96
Tab. A-1: Hersteller der Modellsubstanzen für HPLC- und UPLC-Methodenscreening.....	122
Tab. A-2: Strukturformeln der Modellsubstanzen.....	123
Tab. A-3: RP-Säulen des HPLC-Methodenscreenings.....	124
Tab. A-4: RP-Säulen des UPLC-Methodenscreenings.....	124
Tab. A-5: Retentionsfaktoren des HPLC-Methodenscreening.....	125
Tab. A-6: Retentionsfaktoren des UPLC-Methodenscreening.....	126
Tab. A-7: Retentionsfaktoren des HPLC-Methodenscreenings mit ASTAR.....	127
Tab. A-8: Retentionsfaktoren des UPLC-Methodenscreenings mit BAY .....	127
Tab. A-9: Eingesetzte Substanzen und Eluenten in der Chromatographie .....	128
Tab. A-10: Eingesetzte Substanzen für den Stresstest .....	128
Tab. A-11: Verwendete Geräte .....	129
Tab. A-12: Verwendete Software.....	130

## Abkürzungsverzeichnis

ABAP	2,2'-Azobis-(2-aminopropan)
AIBN	2,2'-Azobisisobutyronitril
AU	Absorbance Units (Absorbanzeinheiten)
BEH	Bridged-Ethylene-Hybrid
CAD	Charged Aerosol Detector
CE	Kapillarelektrophorese
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use
CLND	Chemical Luminescence Nitrogen Detector
DAD	Dioden Array Detector (Photodiodenarraydetektor)
$d_c$	Säulendurchmesser
$d_p$	mittlerer Teilchendurchmesser
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Verdampfungs-Lichtstreuendetektor)
EMA	European Medicines Agency
ESI	Elektrospray Ionisation
F	Fluss (Volumenstrom)
FE	Flächeneinheiten
GC	Gaschromatographie
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDPE	High Density Polyethylene
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ICH	International Conference on Harmonization
ID	Identität
k. A.	keine Angaben
L	Säulenlänge
LC	Liquid Chromatography
max.	maximal
mM	millimolar
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MS	Massenspektrometrie
NaOH	Natronlauge
mg	Milligramm
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SFC	Super Critical Fluid Chromatography

## Abkürzungsverzeichnis

---

t	time (Zeit)
$t_0$	Totzeit ( $t_m$ : Durchflusszeit)
TOF-MS	Time of Flight Massspectrometer (Flugzeitmassenspektrometer)
$t_R$	Retentionszeit
UPLC	Ultra Pressure Liquid Chromatography (Ultrahochdruckflüssigchromatographie)
UV	Ultraviolett
V/V	Volumen zu Volumen
$V_c$	Säulenvolumen

# **1 Einleitung und Zielsetzung**

## **1.1 Regulatorische Anforderungen an die Stabilität von Arzneistoffen und an die pharmazeutische Analytik**

Bei der Entwicklung neuer Arzneimittel hat deren Sicherheit für den Patienten eine zentrale Bedeutung. Dementsprechend muss durch so genannte Stabilitätsstudien sichergestellt werden, dass sich die Qualität eines einmal hergestellten Präparates während der Lagerung nicht verändert. Die Anforderungen an die Qualität von neuen Arzneistoffen, die in Europa, den USA und Japan zugelassen werden, sind durch die Richtlinien der ICH geregelt, die in nationales Recht umgesetzt werden. Darin enthalten sind allgemeine Vorgaben für Stabilitätsprüfungen [1], die während der Entwicklung von neuen Arzneistoffen durchgeführt werden. Die Prüfungen sollen Veränderungen aufzeigen, die während der Lagerung entstehen und Einfluss auf die Qualität, die Wirksamkeit und die Unbedenklichkeit des Arzneistoffes haben. Die Richtlinie empfiehlt, chemische, physikalische, biologische und mikrobiologische Parameter zu betrachten. Zur Datenerhebung werden sogenannte validierte stabilitätsindizierende analytische Methoden angewendet. Anhand der Daten sollen die Lagerbedingungen, Nachprüfungsintervalle und Laufzeiten des Arzneistoffs festgelegt werden.

In den Richtlinien [1] wird zwischen Stresstests und formalen Stabilitätsstudien unterschieden. Mittels Stresstests können mögliche Abbauprodukte und -wege identifiziert werden. Das Thema Stresstest wird in dieser Arbeit in Kapitel 1.4 noch detaillierter behandelt. Die formalen Stabilitätsstudien liefern den Nachweis, dass Spezifikationen nach Ablauf festgelegter Lagerzeiten innerhalb der empfohlenen Lagerbedingungen eingehalten werden. Eine Spezifikation [2] ist eine Liste von Parametern, in der bezogen auf analytische Methoden geeignete Akzeptanzkriterien zusammengefasst sind. Sie charakterisiert den Arzneistoff und sichert seine Qualität im Hinblick auf seine Unbedenklichkeit und Wirksamkeit. In einer Spezifikation werden unter anderem Prüfparameter und Grenzen für Aussehen, Identität, Gehalt und Verunreinigungen des Arzneistoffs festgelegt. Es wird in Freigabe- und Laufzeitspezifikationen unterschieden. Die Laufzeitspezifikationen orientieren sich an den Freigabespezifikationen, können aber z. B. im Gehalt weiter gesetzte Grenzen enthalten. Verunreinigungen können in drei Klassen unterteilt werden [3]. Die erste Klasse bilden die organischen Verunreinigungen. Sie sind flüchtig oder nicht flüchtig und stammen aus dem Herstellungsprozess oder entstehen während

der Lagerung des Arzneistoffs. Zu ihnen zählen Ausgangsstoffe, Nebenprodukte, Zwischenprodukte, Abbauprodukte, Reagenzien, Liganden und Katalysatoren. Die zweite Klasse stellen die anorganischen Verunreinigungen dar. Sie sind normalerweise bekannt und identifiziert. Dazu zählen ebenfalls Reagenzien, Liganden und Katalysatoren sowie Schwermetalle und andere Metalle, anorganische Salze und andere Materialien. Die dritte Klasse bilden die Restlösemittel, die sowohl organisch als auch anorganisch sein können. Der Umgang mit Restlösemitteln wird in einer separaten Richtlinie [4] geregelt. Zur Überwachung der organischen Verunreinigungen wird (basierend auf der maximalen Tagesdosis des Arzneistoffs) zwischen Berichtsgrenzen, Identifikationsgrenzen und Qualifizierungsgrenzen [s. Tab. 1] unterschieden [3].

**Tab. 1: Grenzen für organische Verunreinigungen in neuen Arzneistoffen [3]**

Maximale Tagesdosis	Berichtsgrenze	Identifikationsgrenze	Qualifizierungsgrenze
≤ 2 g / Tag	0.05 %	0.10 % oder Einnahme von 1.0 mg pro Tag (kleinere Grenze gilt)	0.15 % oder Einnahme von 1.0 mg pro Tag (kleinere Grenze gilt)
> 2 g / Tag	0.03 %	0.05 %	0.05 %

Alle Verunreinigungen, deren prozentualer Anteil größer als die Berichtsgrenze ist, müssen berichtet werden. Ist der Anteil größer als die Identifikationsgrenze, muss die Struktur dieser Substanz aufgeklärt werden. Wenn die Qualifizierungsgrenze überschritten wird, muss die biologische Unbedenklichkeit für den spezifizierten Gehalt der Verunreinigung nachgewiesen werden. Alle Abbauprodukte, die während der formalen Stabilitätsstudien entstehen und die Identifikationsgrenze überschreiten, müssen ebenfalls identifiziert werden. Diese Grenzen gelten nicht für toxische Verunreinigungen, bei denen die Grenze deutlich kleiner sein kann. In der EMEA CHMP Richtlinie [5] wird empfohlen, genotoxische Verunreinigungen zu kontrollieren und eine substanzspezifische Risikoabschätzung durchzuführen. Die Grenze für unbekannte toxische Substanzen liegt bei 1.5 µg pro Tag. Davon sind wegen ihres hohen toxischen Potenzials Aflatoxin-ähnliche Substanzen, N-Nitroso und Azoxyverbindungen ausgenommen.

In regulatorischen Stabilitätsstudien [1] werden mindestens drei Chargen untersucht. Sie sollen die gleiche Qualität wie die Chargen der Klinikmuster und der Marktprodukte haben. Die primäre Verpackung muss die spätere Lagerung und Transportform simulieren. Die Chargen werden verschiedenen Lagerbedingungen ausgesetzt, um die thermische Stabilität des Stoffes und seine Empfindlichkeit gegenüber Feuchtigkeit zu prüfen.

Es sollen extreme Bedingungen simuliert werden, die während des Lagerns, Verschiffens und des anschließenden Gebrauchs auftreten können. Dabei wird zwischen drei Lagerbedingungen [s. Tab. 2] unterschieden [1].

**Tab. 2: Lagerbedingungen der Chargen in den regulatorischen Stabilitätsstudien**

Lagerbedingung	Klimazone	Temperatur	Relative Luftfeuchtigkeit	Lagerzeit
Langzeitlagerbedingung	I und II	25 °C	60 %	mindestens 12 Monate
	III und IV	30 °C	65 %	
Beschleunigte Lagerbedingungen (beschleunigte Stabilitätstests)	I - IV	40 °C	75 %	mindestens 6 Monate
Mittlere Lagerbedingung	I und II	30 °C	65 %	

Die mittlere Lagerbedingung wird aber nur angewendet, wenn nach sechs Monaten deutliche Veränderungen bei den beschleunigten Lagerbedingungen aufgetreten sind. Zur Bewertung des Effekts bei kurzfristiger Exposition des Arzneistoffs oberhalb der empfohlenen Lagertemperatur dienen die Daten der beschleunigten und mittleren Lagerbedingungen. Die Prüfintervalle für die Langzeitlagerung betragen im ersten Jahr alle drei Monate, im zweiten Jahr alle sechs Monate und anschließend meist jährlich, je nachdem wie die jeweiligen Nachprüfintervalle es festlegen.

Weiterhin ist die Prüfung der Photostabilität des Arzneistoffes ein integraler Bestandteil der Stabilitätsstudien, der in einer separaten ICH-Richtlinie [6] geregelt ist. Diese Richtlinie unterscheidet für die Photostabilitätstests zwischen Stresstests und Bestätigungsstudien. Stresstests werden in der Entwicklungsphase des Arzneistoffs durchgeführt, untersuchen dessen generelle Photostabilität und versuchen Abbauewege zu erklären. Bestätigungsstudien zeigen die Photostabilität des Stoffes unter standardisierten Bedingungen. Diese Tests werden nur an einer Charge durchgeführt. Das Ziel der Studie ist die Identifizierung der Notwendigkeit bei lichtinstabilen Stoffen, vorbeugende vor Licht schützende Maßnahmen in der Herstellung oder Formulierung des Arzneistoffs zu treffen, sowie eine geeignete Verpackung zu wählen.

Das Stabilitätsprogramm von Arzneistoffformulierungen leitet sich von den Ergebnissen für den Wirkstoff ab und ist ebenfalls durch entsprechende Richtlinien [1] geregelt. Für diese Prüfungen werden drei Chargen einer Rezeptur bzw. Dosis verwendet, von denen in der Regel zwei dem pilot-scale entsprechen. Die Formulierungen sollen nach Lage-

rung in der primären Marktverpackung untersucht werden. Die Prüfungen und Anforderungen sind mit denen des Arzneistoffs vergleichbar. Bei Formulierungen werden meist noch zusätzliche Prüfungen wie z. B. visuelle Prüfungen, Prüfungen an Konservierungsmitteln und Freisetzungsforschungen durchgeführt.

## **1.2 Stabilitätsindizierende Methoden im Kontext der Entwicklung neuer Arzneistoffe**

Eine stabilitätsindizierende Methode ist ein analytisches Verfahren, das den Wirkstoff genau quantifiziert, wobei Abbauprodukte, Syntheseverunreinigungen, Hilfsstoffe oder andere potenzielle Verunreinigungen nicht mit dem Signal des Wirkstoffs interferieren sollen [7]. Eine Methode wird auch als stabilitätsindizierend betrachtet, wenn sie signifikante Zersetzungsprodukte genau quantifiziert [7].

### **1.2.1 Anforderungen an stabilitätsindizierende Methoden**

Es ist wichtig, die Verunreinigungen eines neuen Wirkstoffs zu charakterisieren, um den Patienten vor unerwünschten Nebenwirkungen zu schützen. Während der Entwicklung eines neuen Arzneistoffs kann sich dessen Verunreinigungsprofil ändern. Dies kann durch Änderungen in der Synthese oder den Wechsel der Hersteller von Ausgangsstoffen verursacht werden. Die analytische Methode muss in jedem Fall den Wirkstoff von seinen Verunreinigungen trennen und quantifizieren. Zu Beginn einer Methodenentwicklung ist es wichtig festzulegen, welche chemischen Verbindungen getrennt und quantifiziert werden müssen. Um die Entscheidung hinsichtlich der Methodenwahl zu erleichtern, wird empfohlen, schon zu Beginn der Entwicklung Stresstests durchzuführen, um Schlüsselzersetzungsprodukte zu identifizieren [8]. In den Proben soll der Wirkstoff nur max. zu 5-20 % zersetzt sein [7]. Die Proben sollen vorwiegend primäre Abbauprodukte enthalten. Primäre Abbauprodukte sind größer oder gleich 10 % des gesamten Abbaus. Auf Grundlage dieser Schlüsselzersetzungsprodukte wird die stabilitätsindizierende analytische Methode überprüft und bestätigt [8]. In der ICH Richtlinie [3] wird gefordert, dass die entsprechenden Nachweisgrenzen der Methode nicht größer oder gleich der Berichtsgrenze sein dürfen.



### 1.2.2 Selektivität und die Entwicklung orthogonaler Methoden

Die Methode sollte hoch selektiv sein, weil insbesondere zu Beginn der Methodenentwicklung die chemischen und physikalischen Eigenschaften eines neuen Wirkstoffs meist noch nicht vollständig bekannt sind und die Synthese noch nicht kontrolliert wird. Die Sicherheit der klinischen Versuche des Arzneistoffs hängt daher von der Fähigkeit der analytischen Methode ab, unbekannte Verunreinigungen zu detektieren und zu quantifizieren [9]. Das Verunreinigungsprofil eines Wirkstoffs kann sehr komplex sein. In diesem Fall ist es schwer, alle Verunreinigungen vom Wirkstoff abzutrennen und eine adäquate Auflösung aller Substanzen zu garantieren [10]. Die Entwicklung orthogonaler chromatographischer Methoden erhöht die Selektivität, Peakkapazität und Auflösungsleistung, um damit die Abbauprodukte von den Verunreinigungen des Wirkstoffs sicher zu unterscheiden [11]. Die Methoden sind demzufolge ein Schlüsselaspekt für die Detektion und Trennung von Verunreinigungen [10].

Das Wort „orthogonal“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet rechtwinklig. [12]. Zwei Geraden sind orthogonal, wenn der Winkel zwischen ihnen  $90^\circ$  beträgt und ihr Kosinus gleich Null ist. Im übertragenen Sinne sind damit linear unabhängige Systeme oder auch analytische Methoden gemeint. Allerdings wird der Begriff orthogonal in der pharmazeutischen Analytik nicht im strikt mathematischen Sinn verwendet [13]. Hierbei sind Methoden orthogonal, wenn sie einen deutlichen Selektivitätsunterschied aufzeigen. Das Prinzip ähnelt den mehrdimensionalen Trennsystemen, weil die Dimensionen unabhängig sind und nicht miteinander korrelieren [10]. Aufgrund des Selektivitätsunterschiedes kann jede Methode das Verunreinigungsprofil unterschiedlich auftrennen. Das bedeutet, dass die Methoden verschiedene Verunreinigungen erfassen können. Somit ergänzen sie sich in ihrem Informationsgehalt. Orthogonale Methoden können auch zur Validierung bestehender analytischer Methoden angewendet werden. Zeigt die orthogonale Methode vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Zusammensetzung der Probe, so ist die Selektivität der bestehenden Methode bestätigt. Zusätzlich kann damit auch die Peakreinheit belegt werden. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Methodenentwicklung. Die Verunreinigungen haben oft ähnliche Strukturen und Eigenschaften wie der Wirkstoff und können somit zusammen mit dem Wirkstoff oder anderen Verunreinigungen eluieren.

In der Literatur sind zwei Strategien zur Entwicklung orthogonaler Methoden für die vollständige Charakterisierung von Arzneistoffen beschrieben:

Die erste Option ist die „wahre“ orthogonale Strategie, die so bezeichnet wird, weil die Selektivitätsunterschiede der analytischen Methoden auf alternierenden Trennmechanismen und Detektionssystemen beruhen [10]. Das können analytische Methoden wie z. B. LC-Methoden, CE-Methoden, SFC-Methoden oder GC-Methoden sein. Diese können darüberhinaus mit verschiedenen Detektionssystemen wie z. B. UV, ELSD, CLND, CAD und MS oder auch NMR kombiniert sein. In den ICH Richtlinien [2] wird ebenfalls empfohlen, für die Identifizierung des Arzneistoffs zwei chromatographische Methoden zu nutzen, die auf verschiedenen Trennprinzipien beruhen oder Tests innerhalb eines Verfahrens zu kombinieren, um strukturähnliche Substanzen abzutrennen.

Die zweite Option für die Entwicklung orthogonaler Systeme ist die Maximierung der Selektivitätsunterschiede durch Modifikationen von HPLC-Methoden [10]. Hierbei sind die Systeme HPLC-Methoden, die durch eine stationäre und mobile Phase definiert sind. HPLC ist eine bekannte und etablierte chromatographische Technik zur Analyse von Verunreinigungen in der pharmazeutischen Industrie [11,14]. Zwei chromatographische Methoden sind orthogonal, wenn die Systeme deutlich unterschiedliche Selektivitäten besitzen, weil die Retention der zu bestimmenden Stoffe auf verschiedenen Mechanismen, Wechselwirkungen oder Substanzeigenschaften der Eluenten bzw. stationären Phasen (z. B. verschieden geladene eluierte Substanzen) beruht [13-19]. Die Variation der stationären Phase, der organischen mobilen Phase oder des pH-Wertes der wässrigen mobilen Phase hat den größten Einfluss auf die Orthogonalität [15,16].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellen orthogonale Systeme immer zwei HPLC- bzw. zwei UPLC-Methoden mit definierten mobilen und stationären Phasen dar, die unterschiedliche Selektivitäten aufweisen.

In der Literatur werden verschiedene Wege zur Bestimmung der Orthogonalität beschrieben. Liu [20] beschreibt eine geometrische Methode zur Messung der Orthogonalität und der praktischen Peakkapazität von zweidimensionalen Systemen. Er verwendet Korrelationsmatrizen. Die Korrelation berechnet sich aus dem Kosinus der Einheitsvektoren der Retentionsdaten. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Orthogonalität ist die Anwendung chemometrischer Methoden. Die Chemometrie ist eine chemische Teildisziplin, die mathematische und statistische Verfahren z. B. für die Auswertung analytischer Daten oder zum Planen chemischer Experimente verwendet. E. van Gysegem untersucht verschiedene chemometrische Methoden zur Identifizierung von orthogonalen und ähnlichen chromatographischen HPLC-Systemen. Sie vergleicht verschiedene

hierarchische Clusteralgorithmen wie single linkage, complete linkage, unweighted-average-linkage und weighted-average-linkage [18]. Bei diesen wählt sie als Distanz  $1-|r|$ , wobei  $r$  der Pearson-Korrelationskoeffizient zwischen den Retentionsfaktoren zweier Systeme ist. Für die Algorithmen centroid linkage und Ward's Methode ist die Distanz zwischen den Systemen (Objekten) die euklidische Distanz. Weiterhin betrachtet sie den Kennard / Stone-Algorithmus [13], univariate und auto-associative multivariate Regressionsbäume (AAMRT) [14] sowie generalisierte paarweise Korrelationsmethoden (GPCM). Als Visualisierungstechnik verwendet sie Dendrogramme und Color maps [13,14,16-19]. In [17] beschreibt sie auch die PCA und OPTICS (Clusteralgorithmus, der auf der Datendichte basiert [21]). E. van Gyseghem zeigt, dass der hierarchische Clusteralgorithmus weighted-average-linkage mit dem Unähnlichkeitsmaß  $1-|r|$  (Weighted Pair Group Method algorithm (WPGMA)) und den Visualisierungstechniken Dendrogramm und Color map die bevorzugte Methode zur Identifizierung von orthogonalen und ähnlichen chromatographischen Systemen ist. Außerdem legt E. van Gyseghem eine Grenze für die Unterscheidung zwischen ähnlichen und orthogonalen Systemen im Dendrogramm fest. Als Unähnlichkeitsmaß wählt sie  $1-|r| = 0.4$ , d. h., alle Systeme, die im Dendrogramm in Clustern mit einer Distanz kleiner 0.4 agglomeriert sind, werden als ähnlich betrachtet. Ist ihre Distanz  $> 0.4$ , dann sind sie orthogonal [18]. Das Ziel von E. van Gyseghem ist es, Gruppen von orthogonalen Systemen mit guter Trennleistung zu identifizieren. Die Systeme können dann als Initialbedingung für die Methodenentwicklung neuer Arzneistoffe oder als Startbedingungen für die Entwicklung einer finalen Trennmethode für die späte Entwicklung verwendet werden.

Ein anderer Ansatzpunkt für die Entwicklung orthogonaler Systeme ist in [22] von J. Pellett beschrieben. Hier wird von einer bereits bestehenden HPLC-Methode ausgegangen, und es wird versucht, dazu eine orthogonale Methode zu entwickeln. Dabei wird zuerst der organische Teil der mobilen Phase verändert und dann eine HPLC-Säule gewählt, die eine andere Selektivität hat. Dafür wird eine Datenbank (Column Match<sup>®</sup>) genutzt. Sie enthält ca. 300 HPLC-Säulen und schlägt dem Anwender Phasen vor, die entweder eine ähnliche Selektivität haben oder eine deutlich andere Selektivität verglichen mit der vorgegebenen Phase aufweisen. Die Datenbank enthält fünf Selektivitätsparameter zu jeder Säule und errechnet daraus für jeweils zwei Säulen einen sogenannten  $F_s$ -Wert [23,24]. Je größer dieser Wert ist, desto unterschiedlicher sind die Trennprinzipien der stationären Phasen. Der  $F_s$ -Wert ist die berechnete Distanz zwischen den zwei Säulen in einem fünfdimensionalen Raum, der durch die fünf Selektivitätsparameter der einzelnen Säulen aufgespannt wird. Die Selektivitätsparameter werden experimentell

bestimmt. Sie setzen sich aus der Hydrophobizität (H), dem sterischen Widerstand gegen das Eindringen sperriger gelöster Moleküle in die stationäre Phase (S\*), der Wasserstoffbrückenbindung durch Säulenazidität (A), Wasserstoffbrückenbindung (Basizität) (B) und der Kationenaustauschaktivität an dissoziierten Silanolgruppen (C) zusammen [23-28]. Als nächster Schritt werden verschiedene HPLC-Läufe gefahren, die in die Software DryLab<sup>®</sup> eingegeben werden. Die Software optimiert die Läufe und schlägt eine finale Trennmethode vor. Der Grad der Orthogonalität wird durch das Bestimmtheitsmaß [ $r^2$ ] überprüft. Der Wert sollte möglichst klein sein. Er wird aus den logarithmierten Retentionsfaktoren der Systeme berechnet. Weiterhin sollte für alle Peakpaare eine adäquate Trennleistung mit der orthogonalen Methode gewährleistet werden [22]. Falls nicht alle Peaks getrennt sind, können zusätzlich noch der pH-Wert, der Gradient, die Temperatur oder die stationäre Phase geändert werden.

### **1.3 Chemometrische Methoden zur Identifizierung orthogonaler chromatographischer Systeme**

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, gibt es verschiedene chemometrische Methoden zur Identifizierung orthogonaler chromatographischer Systeme. In diesem Kapitel wird die in dieser Arbeit verwendete Vorgehensweise näher beschrieben. Die chemometrische Auswertung der chromatographischen Daten orientiert sich an einer von E. van Gysegem publizierten Methode [13,14,16-19]. Sie besteht aus zwei Schritten, die im folgenden genauer beschrieben werden.

#### **1.3.1 Hierarchische Clusteranalyse**

Die hierarchische Clusteranalyse ist eine Klassifizierungsmethode. Sie gruppiert die Objekte durch hierarchische Aggregation. Die Objekte werden in verschiedenen Clustern entsprechend ihres Abstandes zueinander bzw. ihrer Ähnlichkeit zusammengefasst [29]. Das Ziel ist die Clusterbildung von ähnlichen Objekten. Diese haben definitionsgemäß einen kleinen Abstand zueinander und bilden ein Cluster. Unterschiedliche Objekte haben einen größeren Abstand und befinden sich demzufolge in anderen Clustern [30]. Die agglomerative Clusterung beginnt mit Einzelobjekten und fusioniert sie zu größeren Objektgruppen [29]. D. h., die Clusterbildung beginnt mit den zwei Objekten, die den kleinsten Abstand zueinander haben, und ist beendet, wenn alle Objekte des Datensatzes zu einem großen Cluster fusioniert sind.

Im ersten Schritt der chemometrischen Auswertung der chromatographischen Daten wird eine Clusteranalyse durchgeführt. Die Objekte stellen die einzelnen chromatographischen Systeme dar. Die Variablen entsprechen den Retentionsfaktoren  $k$  (s. Gleichung 1.1) [31] der eluierten Substanzen auf den jeweiligen Systemen. Die  $k$ -Werte können auch als normierte Retentionszeiten betrachtet werden, weil die jeweilige Retentionszeit der Substanz bezogen auf die Totzeit des jeweiligen Chromatogramms normiert wird. Das gewählte Unähnlichkeitsmaß zwischen den Objekten ist  $1-|r|$ , wobei  $r$  dem Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizienten (s. Gleichung 1.2) [32] (Werte von -1 bis +1) entspricht. Dieses Unähnlichkeitsmaß stellt die Distanz zwischen den Objekten bzw. Systemen dar. Es ist gleichzeitig auch das Maß für den Grad der Orthogonalität zweier Systeme. Das bedeutet, je größer der Selektivitätsunterschied zweier Systeme ist, desto größer ist ihre Distanz. Demzufolge weisen Systeme mit einer großen Distanz einen hohen Grad der Orthogonalität auf. Dagegen besitzen Systeme mit einer kleinen Distanz eine ähnliche Selektivität und sind in einem Cluster agglomeriert. Bezogen auf den  $|r|$ -Wert bedeutet das, dass orthogonale Systeme eine geringe Korrelation ihrer  $k$ -Werte aufweisen und somit einen kleinen  $|r|$ -Wert haben. Hingegen ist der  $|r|$ -Wert bei ähnlichen Systemen groß, weil ihre  $k$ -Werte hoch korreliert sind. Die Abb. 1 zeigt die Korrelation zwischen jeweils zwei Systemen im kartesischen Koordinatensystem.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.1)$$

$t_R$ : Retentionszeit (min);  $t_0$ : Totzeit (min)

$$r = \frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\left( \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_i^n (y_i - \bar{y})^2 \right)^{\frac{1}{2}}} \quad (1.2)$$

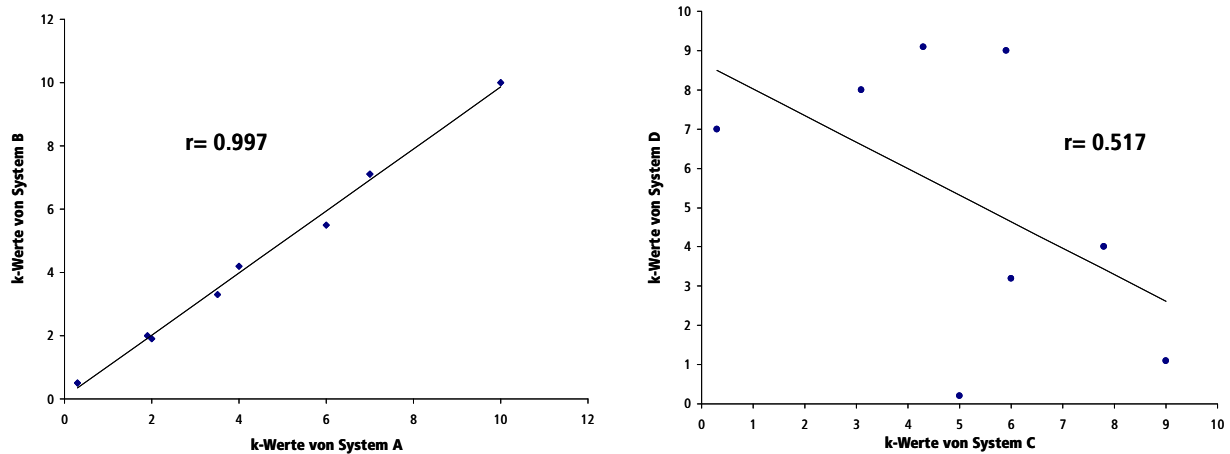


Abb. 1: System A und B (links) haben eine ähnliche Selektivität und sind somit hoch korreliert. System C und D (rechts) haben unterschiedliche Selektivität und zeigen eine schwache Korrelation. Der Grad der Orthogonalität ist demzufolge hoch.

Der Korrelationskoeffizient ist ein Maß für den linearen Zusammenhang. Weisen Systeme eine hohe Korrelation auf, wie die Systeme A und B in Abb. 1, dann liegen die Variablen annähernd auf einer Geraden. Würden die Variablen genau auf einer Geraden verlaufen, dann würde ein perfekter positiver oder negativer linearer Zusammenhang zwischen den Systemen bestehen und die  $r$ -Werte würden  $+1$  oder  $-1$  ergeben. Das tritt z. B. auf, wenn die Systeme mit sich selbst korreliert sind. Dies entspräche dem höchsten Grad an Korrelation. Die Systeme C und D in Abb. 1 sind schwach korreliert und haben einen hohen Grad an Orthogonalität. Demzufolge ist der  $r$ -Wert klein und die Variablen bilden eine Punktwolke im Koordinatensystem. Ergibt der Korrelationskoeffizient gleich null, bestünde kein linearer Zusammenhang zwischen den Systemen. Das bedeutet aber keinesfalls, dass die Systeme voneinander unabhängig sind. Es könnte beispielsweise ein perfekter quadratischer Zusammenhang zwischen den Variablen bestehen [33].

Der Korrelationskoeffizient kann nur zwischen zwei Objekten bestimmt werden. Demzufolge wird für die Berechnung der Distanz zwischen zwei Clustern oder einem Objekt und einem Cluster ein Fusionierungsalgorithmus genutzt. Es wird das unweighted-average-linkage Verfahren verwendet. Dabei tritt keine Deformierung des Clusters auf. Es entstehen zum Teil kleine Cluster mit Ausreißern. Zur Gewichtung der Clusterabstände  $[d]$  wird die Zahl  $[n]$  der Objekte in einem Cluster verwendet. Der Clusterabstand zwischen einem Cluster A und B berechnet sich wie folgt [29]:

$$d_{ki} = \frac{n_A}{n} d_{Ai} + \frac{n_B}{n} d_{Bi}; \text{ mit } n = n_A + n_B \quad (1.3)$$

Grafisch wird die Clusteranalyse durch ein Dendrogramm (z. B. Abb. 5) dargestellt. Es handelt sich dabei um ein Baumdiagramm, in dem sich die Reihenfolge, in der die Objekte zu einem Cluster vereint werden, erkennen lässt. Weiterhin ist die Distanz zwischen den jeweils zusammengefassten Clustern an einer links stehenden Skala ablesbar [33].

### 1.3.2 Color map

Der zweite Schritt der chemometrischen Auswertung ist die Generierung einer Color map. Die Color map (z. B. Abb. 6) dient als Visualisierungswerkzeug zur Identifizierung orthogonaler und ähnlicher Systeme [13,14,16-19]. Die Color map ist eine symmetrische Korrelationsmatrix. Das bedeutet, dass die Werte an einer Diagonalen gespiegelt sind. Somit enthält eine Color map jeden Korrelationswert eines Systempaares doppelt. Davon ausgenommen sind die Werte der Diagonalen. Diese betragen immer Eins, weil dort jedes System mit sich selbst korreliert ist. Die Korrelationsmatrix wird auch als r-Color map bezeichnet, weil sie aus den Beträgen der Korrelationskoeffizienten der Systeme besteht. Diese geben den Grad der Korrelation zwischen den Systemen an. Würde die Matrix aus den Werten  $1-|r|$  bestehen, dann entspräche sie der Distanzmatrix der Clusteranalyse. Zur Visualisierung sind die Beträge des Korrelationskoeffizienten in der Color map durch Farben kodiert. Die Farbskala verläuft von rot (hoch korreliert) über orange, gelb, grün bis blau (schwach korreliert). Demzufolge sind Systempaare mit ähnlicher Selektivität rot gefärbt und Systempaare mit dem größten Selektivitätsunterschied sind dunkelblau gefärbt. Die Systeme in der Color map haben die gleiche Reihenfolge wie im Dendrogramm. Aufgrund dieser Reihenfolge sind die einzelnen Cluster aus dem Dendrogramm als rot gefärbte Flächen erkennbar. Diese strukturierte Anordnung vereinfacht die Auswertung der Matrix.

## 1.4 Stresstests in der Entwicklung neuer Arzneistoffe

Stresstests spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer Arzneistoffe. Die Durchführung von Stresstests soll mögliche Abbauprodukte von Wirkstoffen und Formulierungen simulieren, die während der Lagerung entstehen könnten. Die Stabilität des Arzneistoffes und seiner Formulierung besser beurteilen zu können und somit die

Methodenentwicklung zu erleichtern, sind die Ziele [7]. Die stereochemische Stabilität des Arzneistoffes, sowie physikalische und chemische Eigenschaften wichtiger Kristallformen und der Aspekt der Massenbilanz stehen nicht in direktem Zusammenhang mit der Durchführung von Stresstests, sollten aber berücksichtigt werden [7,34,35]. Die Ergebnisse der Stresstests tragen zur Bestätigung der stabilitätsindizierenden analytischen Methode und zur Identifizierung von Abbauprodukten und -wegen bei. Weiterhin liefern sie Aussagen über die intrinsische Stabilität des Wirkstoffmoleküls und helfen bei der Unterscheidung und Strukturaufklärung von mit dem Wirkstoff verwandten und nicht verwandten Abbauprodukten und Verunreinigungen die z. B. durch Reaktionen mit Hilfsstoffen entstehen können [1,7,34,36].

In den Richtlinien ist keine detaillierte Anleitung zur Durchführung von Stresstests vorgegeben. Diese ist abhängig von der Art des Arzneistoffs und der Formulierung. Es wird lediglich gefordert, die Substanz thermischer Belastung (in 10 °C Schritten), erhöhter Luftfeuchtigkeit, geeignetem oxidativen und photolytischen Stress auszusetzen sowie die Hydrolyseempfindlichkeit über einen weiten pH-Bereich zu testen [1].

In einer Benchmarkingstudie [37] wurden 20 Unternehmen zu ihrer Durchführung von Stresstests befragt. Das Ergebnis zeigt eine große Variation der Reagenzien und Konzentrationen für die oxidativen Tests, der Auswahl des pH-Bereiches für den Test der Hydrolyseempfindlichkeit, sowie generell verwendete Temperaturen in den Tests und die Dauer des Stresstests. Die Unternehmen legen die Zersetzung des Wirkstoffes von 5-20 % als Endpunkt des Versuches fest. Dieses recht uneinheitliche Ergebnis ist bedenklich, weil der Stresstest ein kritischer Punkt in der Entwicklung ist und einen deutlichen Einfluss auf die Qualität der analytischen Methode hat [37].

Stresstests sollten sowohl mit dem Wirkstoff als auch mit der Formulierung durchgeführt werden. Der Wirkstoff ist dabei als Feststoff und als Lösung oder Suspension zu testen [7]. Tests mit der Formulierung liefern Informationen über Wechselwirkungen mit Hilfsstoffen und die Unterscheidung von nicht substanzverwandten Abbauprodukten. Es wird in der Regel nur eine Charge des Wirkstoffes gestresst [1]. Die Hauptquelle für Abbauprodukte in der Bulkware des Wirkstoffes und der Formulierung entsteht durch chemische Instabilität des Wirkstoffes. Diese Produkte bilden sich während der Herstellung, Isolierung, Reinigung, Trocknung, Lagerung, Transport und durch Wechselwirkungen mit anderen chemischen Stoffen in der Formulierung [38]. Die Tests sollten wiederholt werden, wenn sich die Methode, das Herstellverfahren oder die Formulierung



ändert [7]. Die Versuchsbedingungen sollten außerhalb der ICH-Bedingungen für die beschleunigten Stabilitätsstudien liegen [1,7,34-36,39]. Jedoch sollten die Bedingungen nicht zu drastisch gewählt sein, weil sie sonst zu irrelevanten Abbauprodukten oder zu sekundären Zersetzungsprodukten führen könnten [35,40]. Letztere entstehen durch Folgereaktionen der primären Abbauprodukte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hydrolytische und diverse oxidative Stresstests mit dem gelösten Wirkstoff durchgeführt.

## **1.5 Zielsetzung der Arbeit**

Ein wichtiger aber auch kritischer Punkt in der Entwicklung neuer Arzneistoffe ist eine komplette Identifizierung des Verunreinigungsprofils des Wirkstoffes und der Formulierung. Das stellt hohe Anforderungen an die Selektivität der analytischen Methode. Die HPLC ist das meist verwendete chromatographische Verfahren in der pharmazeutischen Industrie für die Entwicklung stabilitätsindizierender Methoden. Sie kann mit diversen Detektoren gekoppelt sein. Am gängigsten ist eine Kopplung mit UV-Absorptions-Detektoren. Die Entwicklung orthogonaler chromatographischer Methoden und die Durchführung von Stresstests sind ideale Konzepte zur Bestätigung oder Verbesserung der Trennleistung und der damit verbundenen Selektivität der Methode.

Die Grundidee der Arbeit ist die Entwicklung eines neuen empirischen Konzeptes (s. Abb. 2) zur Vorgehensweise in der Methodenentwicklung neuer Arzneistoffe.

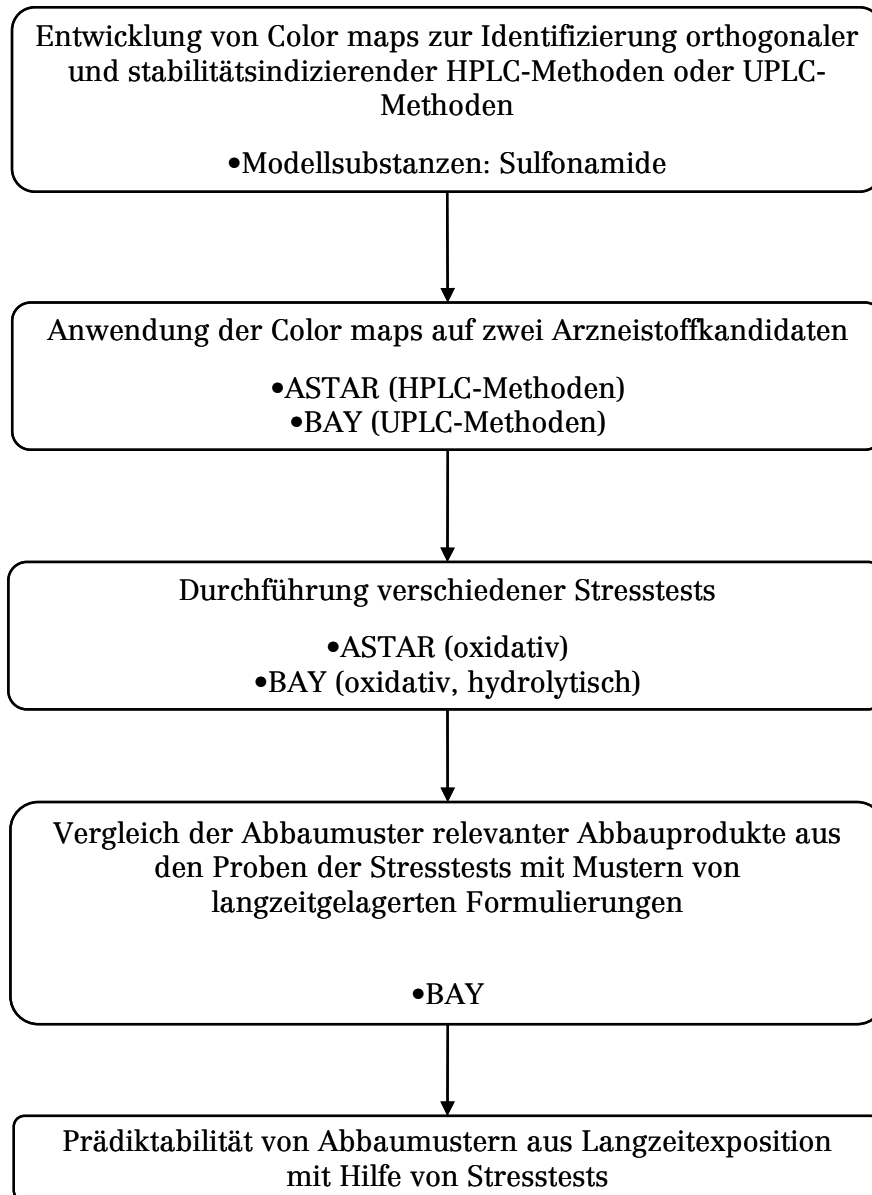


Abb. 2: Etappen des Konzeptes zur Methodenentwicklung neuer Arzneistoffe

In der ersten Etappe des Konzeptes sollen orthogonale chromatographische Systeme mit polaren organischen Modellsubstanzen wie z. B. den Sulfonamiden entwickelt werden. Der Grad des Selektivitätsunterschiedes bzw. der Orthogonalität zwischen den Systemen wurde mittels des Bravais-Pearson-Korrelationskoeffizienten bestimmt und in einer Color map visualisiert. Diese Color map kann auch als Basis-Color map bezeichnet werden, weil sie als Grundlage verwendet wird, um eine orthogonale chromatographische Methode zu einer bereits bestehenden chromatographischen Methode eines Arzneistoffs zu entwickeln. In der Arbeit wurden zwei Color maps entwickelt. Die Erste beruht auf HPLC-Systemen und die zweite auf UPLC-Systemen.

In der zweiten Etappe wird die Anwendung der Basis-Color maps zur Entwicklung orthogonaler chromatographischer Systeme an zwei Arzneistoffkandidaten demonstriert.

In der dritten Etappe werden hydrolytische und verschiedene oxidative Stresstests an den zwei Entwicklungssubstanzen durchgeführt und anschließend mit den orthogonalen chromatographischen Methoden analysiert. Dadurch sollen die Vorteile einerseits der Verwendung von verschiedenen Reagenzien für den oxidativen Stress und andererseits einer Anwendung orthogonaler Methoden deutlich werden.

In der vierten und der daraus resultierenden fünften Etappe werden zusätzlich Formulierungen, die unter beschleunigten Lagerbedingungen und bei 5 °C über 39 Monate eingelagert waren, untersucht. Diese Proben werden mit dem TOF-MS detektiert. Die MS-Daten werden mit einem speziellen Softwareelement ausgewertet. Die Software ist in der Lage, sehr kleine Signale aus dem Rauschen der MS-Daten zu filtern. Somit wurden die relevanten Massen identifiziert, deren Signal während der Lagerung zunahm. Das Ziel war ein Vergleich der Abbaumuster der Stresstests und der eingelagerten Formulierungen, um die Vorhersagekraft der Stresstests in Hinblick auf relevante Abbau-muster von Langzeitstabilitätsmustern zu beurteilen.

## 2 Entwicklung orthogonaler chromatographischer Systeme

Das nachfolgende Kapitel beschreibt zwei Methodenscreenings zur Identifizierung orthogonaler und auch ähnlicher chromatographischer Systeme mit einer Color map. Ein Methodenscreening umfasst die Durchführung mehrerer chromatographischer Läufe mit unterschiedlichen stationären und mobilen Phasen, den sogenannten Systemen. Auf den Systemen wird immer das gleiche Gemisch getrennt, um die Selektivitätsunterschiede der Systeme zu beurteilen. Weiterhin wird die jeweilige Anwendung der entstandenen Color map zur Entwicklung einer orthogonalen Methode an zwei Entwicklungssubstanzen demonstriert. Die verwendeten Geräte, Materialien und Softwareelemente sind im Anhang tabellarisch dargestellt.

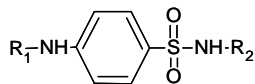
### 2.1 Methodenscreening für die Identifizierung orthogonaler chromatographischer Systeme für HPLC

Die HPLC ist das bevorzugte chromatographische Verfahren in der Arzneistoffanalytik von kleinen Molekülen. Das Methodenscreening wurde mit RP-Phasen und mittels einer HPLC-DAD Anlage durchgeführt. Die detektierten Peaks in den Chromatogrammen wurden mit Spektrenbibliotheken verglichen und dementsprechend zugeordnet.

#### 2.1.1 Auswahl der Modellsubstanzen

Die polaren Modellsubstanzen im Screening sollen Arzneistoff-Verunreinigungsprofile simulieren. Sie sollen zur Gruppe der kleinen Moleküle gehören, ähnliche Strukturen haben und ein Chromophor besitzen, um sie mit UV-Detektion erfassen zu können. Die 14 ausgewählten Substanzen [s. Tab. 3] erfüllen diese Voraussetzungen. Acht Substanzen (Sulfanilamid, Sulfacetamid, Dapson, Sulfaguanidin, Sulfamethazin, Sulfisomidin, Sulfadiazin, Sulfamerazin) gehören zur Arzneistoffgruppe der Sulfonamid-Chemotherapeutika und haben mit Ausnahme des Dapsons die gleiche Grundstruktur [s. Abb. 3]. Es sind Amide der Sulfanilsäure. Dapson gehört zu den Sulfonen und kann als phenyloges Sulfonamid betrachtet werden. Die bakteriostatische Wirkung der Sulfonamide beruht auf der Sulfonamidgruppe und der in p-Stellung befindlichen Aminogruppe. Es wurden auch Substanzen gefunden, die sulfonamidartig wirken, aber strukturell abweichen. Sulfonamide sind Folsäureantagonisten. Sie hemmen kompetitiv die Folsäurebiosynthese in Mikroorganismen sowie die Zellatmung [41]. Es wird zwischen kurz-,

mittel- und langwirksamen Sulfonamiden unterschieden. 4-Acetamidobenzenesulfonamid gehört nicht zu den Sulfonamid-Chemotherapeutika simuliert aber ein an Position R2 acetyliertes Produkt [s. Abb. 3] von Sulfanilamid.



**Abb. 3: Allgemeine Strukturformel der Sulfonamide**

Die Sulfanilsäure ist die Sulfonsäure der Sulfonamide. Sie hat keine pharmakologische Bedeutung. Die vier kleinen aromatischen Amine [s. Tab. 3] 6a-9a (2-Amino-4,6-dimethylpyrimidin, 4-Amino-2,6-dimethylpyrimidin, 2-Aminopyrimidin und 2-Amino-4-methylpyrimidin) sind die aromatischen Reste (R<sub>2</sub>) [s. Abb. 3] der dazugehörigen Sulfonamide. Die Strukturen der Modellschubstanzen sind im Anhang [s. Tab. A-2] aufgeführt.

**Tab. 3: Modellschubstanzen des Methodenscreenings für HPLC-Systeme**

Substanzname	Bezeichnung im Screening	pK <sub>s</sub> -Werte (berechnet mit ADC/Labs)	molare Masse in g/mol
Sulfanilsäure	1	3.01	173.19
Sulfanilamid	2	10.10 1.85	214.24
Sulfacetamid	3	5.62 0.93	214.25
Dapson	4	1.24 0.93	172.21
Sulfaguanidin	5	11.22 1.88	250.28
Sulfamethazin	6	7.45 1.95	214.24
2-Amino-4,6-dimethylpyrimidin	6a	4.68	278.33
Sulfisomidin	7	7.35 3.54	95.1
4-Amino-2,6-dimethylpyrimidin	7a	6.46	264.31
Sulfadiazin	8	6.5 1.64	278.33
2-Aminopyrimidin	8a	3.86	109.13
Sulfamerazin	9	6.98 1.64	248.31
2-Amino-4-methylpyrimidin	9a	4.18	123.16
4-Acetamidobenzenesulfonamid	10	14.67 9.88	123.16

Die ausgewählten Modellsubstanzen haben unterschiedliche Polaritäten und sind geeignet, Wirkstoff-Verunreinigungsprofile zu simulieren. In einem realen Arzneistoff-Verunreinigungsprofil haben die Substanzen auch unterschiedliche Polaritäten. Z. B. haben die durch Oxidation oder Hydrolyse entstandenen Abbauprodukte des Arzneistoffs eine andere Polarität als das Arzneistoffmolekül. Weiterhin weisen viele Verunreinigungen und Abbauprodukte Strukturähnlichkeiten mit dem Wirkstoff auf.

### 2.1.2 Auswahl der HPLC-Säulen

Für das Screening wurden aus weltweit mehr als 700 kommerziell erhältlichen RP-Phasen [25] zehn ausgewählt. Die Phasen sollten sich in ihrer Säulenchemie unterscheiden, um ein möglichst großes Selektivitätsspektrum für das Screening zu erhalten.

In der Literatur [23,24,26-28,42-51] gibt es mehrere Ansätze und Studien zur Charakterisierung und Klassifizierung von silicabasierten RP-Phasen. Die Säulenauswahl in dieser Arbeit orientiert sich an einer Studie von Kromidas [25,52], über Vergleich und Auswahl von kommerziellen HPLC RP-Säulen. In Abb. 4 wird die historische Entwicklung von RP-Säulen dargestellt. Im Laufe der Entwicklung hat sich die Reproduzierbarkeit, Qualität und Stabilität der Säulenmaterialien stark verbessert. Durch Erhöhung der Stabilität der Materialien sind viele RP-Phasen jetzt auch bei basischen pH-Werten einsetzbar. Deshalb wurden im Methodenscreening ausschließlich RP-Säulen der dritten Generation verwendet.

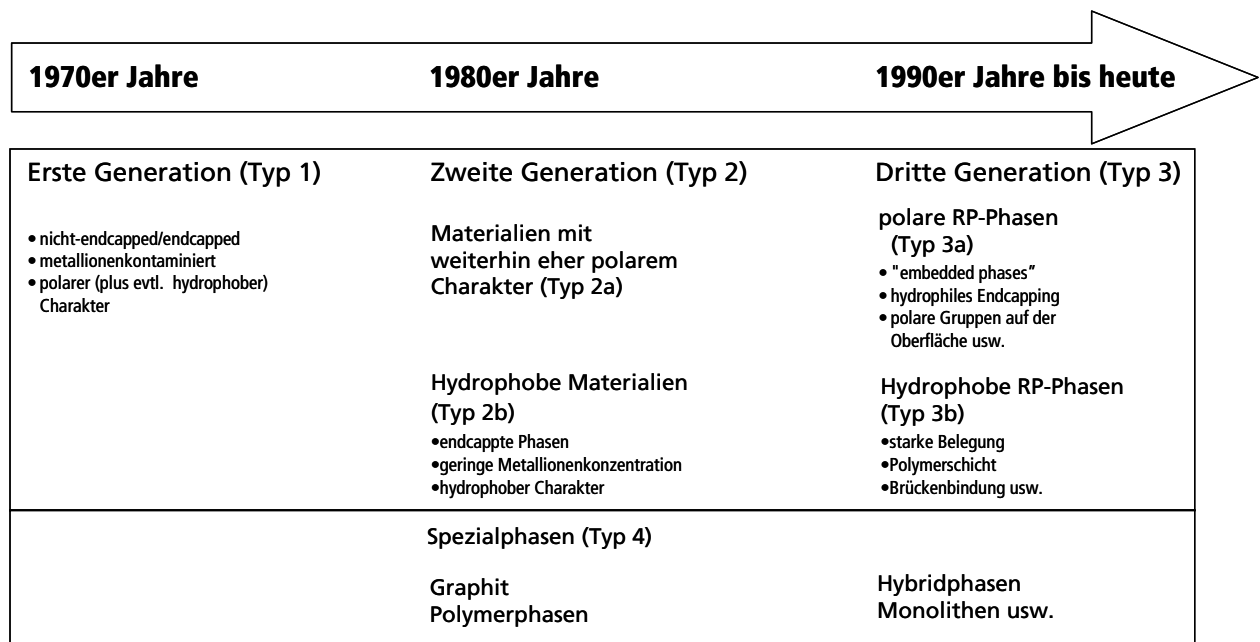


Abb. 4: Historische Entwicklung von HPLC-RP-Materialien [53]

Das Methodenscreening beinhaltet eine große Bandbreite verschiedener RP-Säulen. Kromidas [25] teilt die Säulen entsprechend ihrer Phasentypen (hydrophob bis polar) in vier Gruppen ein: hydrophobe Phasen, „polare“ Phasen aus der Gruppe der Hydrophoben, „hydrophobe“ aus der Gruppe der Polaren und polare Phasen. Zusätzlich zeigt er auch eine Klassifizierung der RP-Säulen entsprechend ihrer Retentionsmechanismen. Die in Tab. 4 gewählten Phasen stellen ein repräsentatives Spektrum aus den von Kromidas vorgeschlagenen Einteilungen dar. Fünf (S1, S2, S6, S7, S8) von den hier eingesetzten zehn Phasen hatte er auch in seiner ursprünglichen Studie verwendet.

Tab. 4: Im Methodenscreening verwendete HPLC-RP-Säulen

Säulenbezeichnung	Säulename	Materialeigenschaften	Klasse
S1	Chromolith Performance	hydrophobe monolithische Säule	Hydrophobe Phase (Spezialphasen)
S2	Atlantis dC18	Geringe Belegung, hydrophober plus polarer Charakter	Mittel polare Phase
S3	Hypersil Gold PFP	Fluorphase	Polare Phase
S4	BetaMax Acid	C12-Phase mit eingebetteter Harnstoff-Gruppe	Polare Phase
S5	YMC-Pack Cyano	Cyano-Propyl-Phase	Polare Phase
S6	YMC-Pack Pro C18 RS	Besonders Hydrophob	Hydrophobe Phase
S7	SynergiMAX-RP	stark hydrophobe Phase	Hydrophobe Phase
S8	xBridgeShield RP 18	Hybridmaterial mit Silicium-Ethan-Gruppen, stark hydrophil (Carbamt-Gruppe eingebettet)	Polare Phase (Spezialphasen)
S9	Gemini Hexyl Phenyl	Hybridmaterial mit siliciumorganischer Schicht, (Phenyl Hexyl)	Polare Phase (Spezialphasen)
S10	Cogent Bidentate C18™	Hybridphase	Hydrophobe Phase (Spezialphasen)

Die Auswahl beinhaltet hydrophobe Phasen in verschiedenen Abstufungen (S6, S7), eine mittlere polare Phase (S2), polare Phasen (S3, S4, S5) und hydrophobe (S1, S10) als auch polare (S8, S9) Spezialphasen. Weiterhin weisen die Phasen Porendurchmesser von 60 Å bis 175 Å, unterschiedliche Kohlenstoffgehalte und unterschiedliche spezifische Oberflächen auf. Diese drei Eigenschaften haben den größten Einfluss auf die Retention und das Trennverhalten [25]. Die Säulen haben ähnliche Dimensionen (Länge, Durchmesser und Partikelgröße), damit die Chromatogramme untereinander besser vergleichbar sind. Weitere Kennzahlen der verwendeten RP-Säulen sind im Anhang tabellarisch dargestellt.

### 2.1.3 Analytische Bedingungen

Die analytischen Rahmenbedingungen für das Methodenscreening sollten für alle Säulen möglichst ähnlich sein, damit die Ergebnisse vergleichbar sind. D. h., alle Läufe wurden auf der gleichen HPLC-DAD Anlage gefahren und alle Proben wurden aus den jeweils gleichen Vials injiziert. Die Proben wurden im Autosampler bei 10°C gekühlt, um ihre Haltbarkeit zu erhöhen. Es wurden je fünf Säulen in einem separaten Säulenofen bei 20°C temperiert. Die Säulen waren im Ofen über ein externes Motorschaltventil an einen Kontaktschluss des Autosamplers mit der Anlage verbunden. Die Schaltung wurde über



die Software gesteuert. Für die Auswertung des Screenings wurden nur die Retentionsdaten der Substanzen verwendet. Die Peakflächen in den Chromatogramme waren nicht relevant, da auf eine Quantifizierung verzichtet wurde.

#### *Probenvorbereitung*

Als Lösemittel der Substanzen kamen Methanol, Acetonitril und Wasser infrage. Es wurden keine weiteren Lösemittel oder Puffer verwendet, um zusätzliche Signale (Systempeaks) in den Chromatogrammen zu vermeiden. Nach Lösungsversuchen stellte sich das Lösemittelgemisch Methanol/Wasser (60/40 (V/V)) als geeignet für alle 14 Substanzen heraus. Die max. Konzentration der Substanzen in den Proben richtete sich nach der Höhe der Absorption bei 240 nm. Das Signal sollte im linearen Bereich des Detektors (max 1.2 AU (Absorption Units) laut Qualifizierungsunterlagen des Detektors) liegen.

Zunächst wurden Stammlösungen [s. Tab. 5] der Einzelsubstanzen hergestellt. Ihre Konzentration betrug 1 mg/ml. Bei Bedarf wurden sie im Ultraschallbad vollständig in Lösung gebracht.

**Tab. 5: Stammlösung der Einzelsubstanzen**

Einwaage	Lösungsmittel	Injektionsvolumen
10 mg auf 10 ml	60/40 (Methanol/Wasser) (V/V)	1 $\mu$ l

Nach Injektion eines Gesamtgemisches (alle 14 Substanzen) war die Peakzuordnung aufgrund von Koelutionen einiger Substanzen nicht eindeutig. Zusätzlich hatten die Substanzen wegen ihrer Strukturähnlichkeit auch ähnliche UV-Spektren. Somit war auch die Zuordnung über einen DAD schwierig. Eine Einzelinjektion aller Substanzen auf allen Säulen hätte einen erheblichen Zeitaufwand bedeutet. Daher wurden vier Mischungen und das Gesamtgemisch injiziert. Die Zusammensetzung der Mischungen richtete sich nach dem Elutionsverhalten der Substanzen. Es wurde versucht die Mischung so zu wählen, dass eine Peaküberlappung möglichst vermieden wurde und die Substanzen über ihre Spektren eindeutig zuzuordnen waren.

Aus den Stammlösungen wurden vier Mischungen und ein Gesamtgemisch [s. Tab. 6] hergestellt. In Mischung I-IV wurden jeweils 450  $\mu$ l der einzelnen Stammlösung in ein Vial pipettiert. bei Mischung II und IV wurden noch je 450  $\mu$ l Lösemittel dazu pipettiert.

Das Gesamtvolumen pro Vial betrug somit 1800  $\mu\text{l}$ . Für das Gesamtgemisch wurden je 128  $\mu\text{l}$  jeder Stammlösung in ein Vial pipettiert. Somit betrug sein Gesamtvolumen 1792  $\mu\text{l}$ .

Tab. 6: Zusammensetzung der Gemische

Name des Gemisches	Zusammensetzung	Injektionsvolumen
<b>Mischung I</b>	Sulfanilamid	4 $\mu\text{l}$
	Sulfacetamid	
	Sulfamerazin	
	4-Acetamidobenzenesulfonamid	
<b>Mischung II</b>	Sulfamethazin	
	2-Aminopyrimidin	
	2-Amino-4-methylpyrimidin	
<b>Mischung III</b>	Sulfanilsäure	
	Dapson	
	4-Amino-2,6-dimethylpyrimidin	
	Sulfadiazin	
<b>Mischung IV</b>	Sulfaguanidin	
	2-Amino-4,6-dimethylpyrimidine	
	Sulfisomidin	
<b>Gesamtgemisch</b>	alle 14 Substanzen	7 $\mu\text{l}$

Das Injektionsvolumen der Stammlösungen als auch das von Mischung I-IV wurde so gewählt, dass immer 1  $\mu\text{g}$  je Substanz auf die Säule gegeben wurde. Im Fall des Gesamtgemisches wurden 0.5  $\mu\text{g}$  je Substanz auf die Säule gebracht.

#### *HPLC-DAD-System*

Die Läufe erfolgten grundsätzlich bei den gleichen chromatographischen Bedingungen [s. Tab. 7]. Bei S1 und S10 wurde die Flussrate verdoppelt, weil diese Säulen einen größeren Innendurchmesser hatten. Dabei wurde lediglich darauf geachtet, dass alle Substanzen innerhalb von zehn Minuten eluieren.

Tab. 7: Chromatographische Bedingungen des HPLC-Methodenscreenings

<b>Gradient</b>	5-95 % (B)
<b>Laufzeit</b>	10 min
<b>Äquilibrierzeit</b>	10 min
<b>Fluss</b>	0.6 ml/min (Säule 2 - 9) 1.2 ml/min (Säule 1, 10)
<b>Säulentemperatur</b>	20 °C
<b>Wellenlängenbereich (DAD)</b>	210-400 nm
<b>Detektionswellenlänge</b>	240 nm

Im Verlauf des Screenings wurden insgesamt fünf Spektrendatenbanken im Bereich von 210-400 nm erstellt. Dazu wurde jede Substanz in jedem der fünf Eluenten der Screeningläufe 1-5 [s. Tab. 8] einzeln auf nur einer Säule injiziert und ihr UV-Spektrum aufgenommen. Die Datenbanken wurden dann zur Auswertung der jeweiligen Screeningläufe verwendet. Die Spektrendatenbank, die mit den Eluenten des Laufes 3 erstellt wurde, eignete sich auch für die Auswertung der Läufe des Screeninglaufes 6 [s. Tab. 8]. Von jedem Chromatogramm wurde das gesamte DAD-Spektrum von 210-400 nm aufgenommen.

#### 2.1.4 Aufbau und Durchführung des Screenings

Die Eluenten sollten ebenso für eine MS-Detektion geeignet sein, weshalb nur mobile Phasen mit flüchtigen Puffern und geringer Salz- bzw. Pufferkonzentration verwendet wurden. Zuerst wurden die ersten fünf Säulen S1-S5 in den externen Säulenofen eingebaut. Es wurden vier Screeningläufe (1, 2, 4, 5) [s. Tab. 8] unter den Bedingungen gefahren. Auf jede Säule wurden bei jedem Lauf acht Injektionen gegeben. Die ersten drei Injektionen waren immer Blankinjektionen bestehend aus dem Lösemittel (Methanol/Wasser). Sie dienten zur Bestimmung der Totzeit des Laufes und zur Überprüfung der Eluenten, des Gradienten und der Säule. Hat der jeweilige Lauf Systempeaks aufgrund der Eluenten erzeugt, waren sie im Blank zu sehen. Eventuelle Verunreinigungen oder Verschleppungen auf der Säule wurden sichtbar. Zusätzlich dienten diese Injektionen zum Einlaufen des Gradienten. Danach folgten die Injektionen der fünf Gemische. Bevor die fünf Säulen getauscht wurden, sind sie mit einer Acetonitril/Wasser-Mischung (70/30 (V/V)) pufferfrei gespült worden, um sie zu lagern.

Tab. 8: Eluenten des Methodenscreenings

Screeninglauf	Eluent A (wässrige Phase)	pH-Wert	Eluent B (organische Phase)	Verwendete Säulen	Bezeichnung
1	Ammoniumacetat 10 mM	6.8	Methanol	S1-S10	M7
2	0.1 % Ameisensäure (V/V)	2.7	Methanol	S1-S10	M3
3	Ammoniumbicarbonatpuffer 10 mM (Einstellung mit Ammoniak)	9.0	Methanol	S6-S10	M9
4	Ammoniumacetat 10 mM	6.8	Acetonitril	S1-S10	A7
5	0.1 % Ameisensäure (V/V)	2.7	Acetonitril	S1-S10	A3
6	Ammoniumbicarbonatpuffer 10 mM (Einstellung mit Ammoniak)	9.0	Acetonitril	S6-S10	A9

Auf den Säulen S6-S10 wurden zunächst ebenfalls die vier Screeningläufe (1, 2, 4, 5) mit je acht Injektionen pro Säule gefahren. Danach wurden die neutralen und sauren Eluenten A gegen den basischen Eluenten A und Wasser getauscht. Zuletzt wurden die basischen Screeningläufe (3, 6) gefahren und nach jedem Laufe wurden die Säulen mit Acetonitril/Wasser (70/30 (V/V)) gespült. Die ersten fünf Säulen sind nicht stabil bei basischen pH-Werten und wurden daher nicht für die Screeningläufe 3 und 6 verwendet.

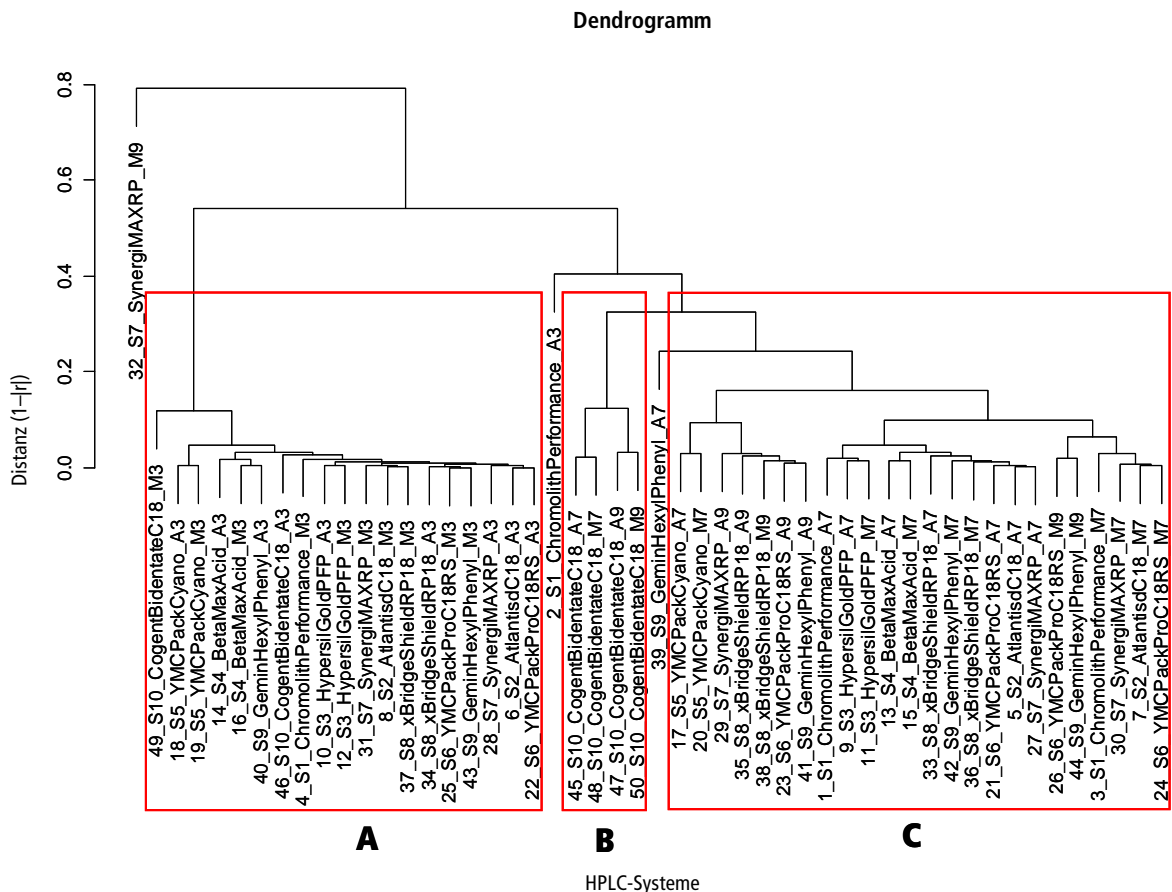
### 2.1.5 Chemometrische Auswertung

Es wurden die 50 Chromatogramme des Gesamtgemisches für die chemometrische Auswertung des Methodenscreenings verwendet. Zuerst wurden mithilfe der Spektrendatenbanken, die Peaks in den Chromatogrammen der vier Gemische, den einzelnen Substanzen zugeordnet. Danach wurden die Retentionszeiten der Substanzen ermittelt und die zugehörigen  $k$ -Werte errechnet.

Als erster Schritt erfolgte die Clusteranalyse wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben. Die  $k$ -Werte entsprechen den normierten Retentionszeiten und stellen die Variablen der Clusteranalyse dar. Die 50 Chromatogramme sind die dazugehörigen Objekte, die durch die Variablen definiert sind. Die Abb. 5 zeigt das Dendrogramm der Clusteranalyse des HPLC-Methodenscreenings. Das Dendrogramm bildet einen Zwischenschritt für die Generierung der Color map und wird für die spätere Auswertung nicht benötigt.

Im Dendrogramm sind ähnliche Systeme in einem Cluster aggregiert. In Abb. 5 sind drei Cluster (A, B, C) erkennbar. Die Gruppierung in drei Cluster ist anhand der Baumstruktur

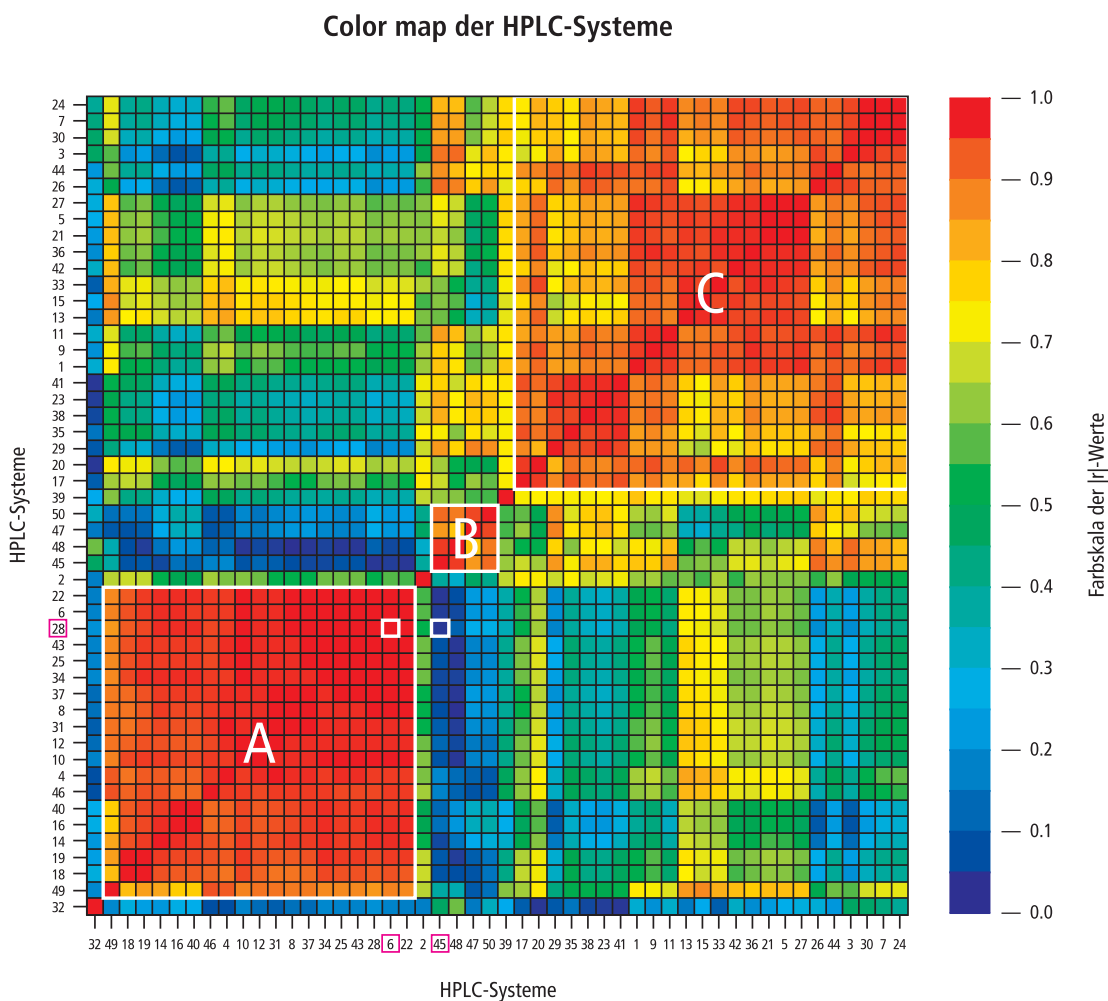
tur des Dendrogramms festgelegt worden. Das Cluster A besteht ausschließlich aus sauren Systemen und enthält (mit Ausnahme des Systems 2) alle sauren Systeme des Screenings. Demzufolge bewirkt ein saurer pH-Wert der mobilen Phase auf den RP-Säulen eine ähnliche Auftrennung der Substanzen, weil ihr Selektivitätsunterschied verloren geht. Das System 2 unterscheidet sich von allen anderen Systemen und kann keinem Cluster richtig zugeordnet werden, das trifft analog auf die Systeme 32 und 39 zu. Im Cluster B befinden sich die basischen und neutralen Systeme von S10. Die Säule S10 nimmt somit eine Sonderstellung ein, weil sie ein separates Cluster für diese pH-Werte bildet. Im Cluster C befinden sich die restlichen neutralen und basischen Systeme des Screenings. Die neutralen und basischen Eluenten, sowohl Methanol als auch Acetonitril, scheinen die Selektivitätsunterschiede der Systeme nicht zu beeinflussen, weil sie keine separaten Cluster bilden.



**Abb. 5: Dendrogramm der 50 HPLC-Systeme**

Der zweite Schritt der chemometrischen Auswertung ist die in Kapitel 1.3.2 beschriebene Visualisierung der orthogonalen und ähnlichen Systeme mit einer Color map. Abb. 6

zeigt die Color map zum Dendrogramm in Abb. 5. Die Tab. 9 stellt die Legende der HPLC-Systeme der Color map dar. In der Color map sind ebenfalls die drei im Dendrogramm beschriebenen Cluster A, B und C zu erkennen. Die Beträge des Korrelationskoeffizienten sind das Maß der Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit der Systeme. Er ist entsprechend der rechts stehenden Farbskala kodiert. Die hohe Korrelation der Systeme in jedem Cluster wird durch die Rotfärbung deutlich. In der Color map sind auch Systeme mit kleiner Korrelation gut erkennbar. Die Blaufärbung lässt erkennen, dass alle Systeme im Cluster B einen großen Selektivitätsunterschied im Vergleich zu den Systemen in Cluster A zeigen. Der Grad der Orthogonalität wird durch die Farben deutlich.



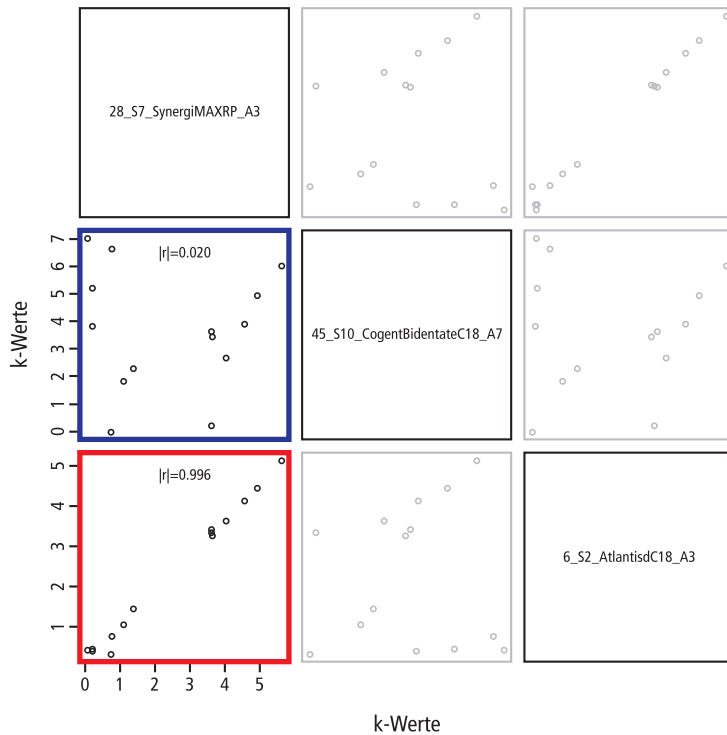
**Abb. 6: Color map der 50 HPLC-Systeme**

Zur Veranschaulichung der Selektivitätsunterschiede wurden drei Systeme (pink umrandet in Abb. 6 und hervorgehoben in Tab. 9) ausgewählt. Die orthogonalen Systeme sind die Systeme 28 und 45. Sie sind niedrig korreliert und ihr  $|r|$ -Wert ist demnach blau gefärbt. Das System 45 wurde im Dendrogramm dem Cluster B und das System 28 dem

Cluster A zu geordnet. Die Systeme 28 und 6 sind dagegen hoch korreliert, mit einem rot gefärbten  $|r|$ -Wert. Beide stammen aus dem Cluster A und haben eine ähnliche Selektivität.

Tab. 9: Legende der HPLC-Color map

Bezeichnung in Color map	System	Bezeichnung in Color map	System
1	S1_Chromolith Performance_A7	26	S6_YMC-PackPro C18RS_M9
2	S1_Chromolith Performance_A3	27	S7_SynergiMAX-RP_A7
3	S1_Chromolith Performance_M7	28	S7_SynergiMAX-RP_A3
4	S1_Chromolith Performance_M3	29	S7_SynergiMAX-RP_A9
5	S2_Atlantis dC18_A7	30	S7_SynergiMAX-RP_M7
6	S2_Atlantis dC18_A3	31	S7_SynergiMAX-RP_M3
7	S2_Atlantis dC18_M7	32	S7_SynergiMAX-RP_M9
8	S2_Atlantis dC18_M3	33	S8_x-BridgeShield RP18_A7
9	S3_Hypersil Gold PFP_A7	34	S8_x-BridgeShield RP18_A3
10	S3_Hypersil Gold PFP_A3	35	S8_x-BridgeShield RP18_A9
11	S3_Hypersil Gold PFP_M7	36	S8_x-BridgeShield RP18_M7
12	S3_Hypersil Gold PFP_M3	37	S8_x-BridgeShield RP18_M3
13	S4_BetaMaxAcid_A7	38	S8_x-BridgeShield RP18_M9
14	S4_BetaMaxAcid_A3	39	S9_Gemin Hexyl Phenyl_A7
15	S4_BetaMaxAcid_M7	40	S9_Gemin Hexyl Phenyl_A3
16	S4_BetaMaxAcid_M3	41	S9_Gemin Hexyl Phenyl_A9
17	S5_YMC-PackCyano_A7	42	S9_Gemin Hexyl Phenyl_M7
18	S5_YMC-PackCyano_A3	43	S9_Gemin Hexyl Phenyl_M3
19	S5_YMC-PackCyano_M3	44	S9_Gemin Hexyl Phenyl_M9
20	S5_YMC-PackCyano_M7	45	S10_CogentBidentateC18™_A7
21	S6_YMC-PackPro C18RS_A7	46	S10_CogentBidentateC18™_A3
22	S6_YMC-PackPro C18RS_A3	47	S10_CogentBidentateC18™_A9
23	S6_YMC-PackPro C18RS_A9	48	S10_CogentBidentateC18™_M7
24	S6_YMC-PackPro C18RS_M7	49	S10_CogentBidentateC18™_M3
25	S6_YMC-PackPro C18RS_M3	50	S10_CogentBidentateC18™_M9



**Abb. 7:** Matrix der Streudiagramme der Systeme 28, 45 und 6. Blau ist das Streudiagramm der orthogonalen Systeme 28 und 45. Rot ist das Streudiagramm der ähnlichen Systeme 28 und 6.

Die Abb. 7 stellt die Streudiagramme der zwei Systempaare dar. Das orthogonale Paar zeigt eine Punktwolke. Das ist ein Hinweis auf eine geringe Korrelation. Die  $k$ -Werte des ähnlichen Systempaares liegen im Diagramm annähernd auf einer Geraden, was auf eine hohe Korrelation hindeutet.

Die Abb. 8 und Abb. 9 zeigen die Chromatogramme der Systempaare. Die Elutionsreihenfolge der Substanzen ändert sich bei den orthogonalen Systemen deutlich [s. Abb. 8]. Dies zeigt den Selektivitätsunterschied der Systeme. Im System 28 koeluieren die polaren Substanzen 1, 6a, 7a, 8a und 9a zu Beginn des Chromatogramms. Diese Substanzen werden in der sauren mobilen Phase nicht retardiert. Jedoch zeigen 6a-9a eine deutliche Retardierung in System 45. Weiterhin kommt es zu einer Trennung der Substanzen 3 und 10 in System 45 und die Substanzen 8 und 7 zeigen einen Elutionswechsel. Die ähnlichen Systeme in Abb. 8 zeigen die gleiche Peakreihenfolge. In beiden Systemen überlappen in der Elutionsreihenfolge dieselben Substanzen. Diese Systeme weisen eine sehr ähnliche Selektivität auf.



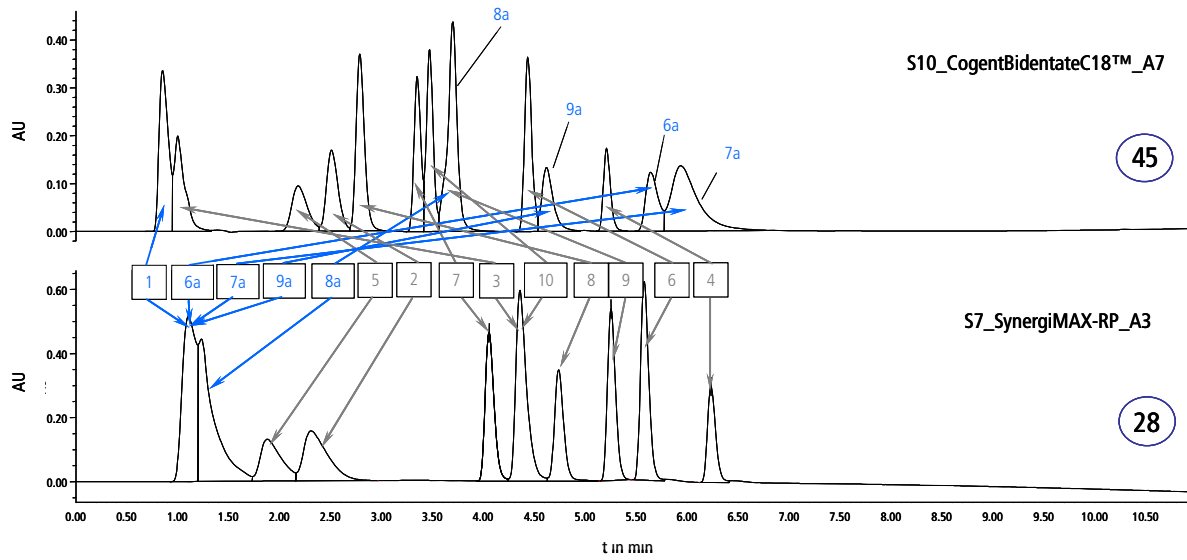


Abb. 8: Chromatogramme der orthogonalen Systeme 28 und 45

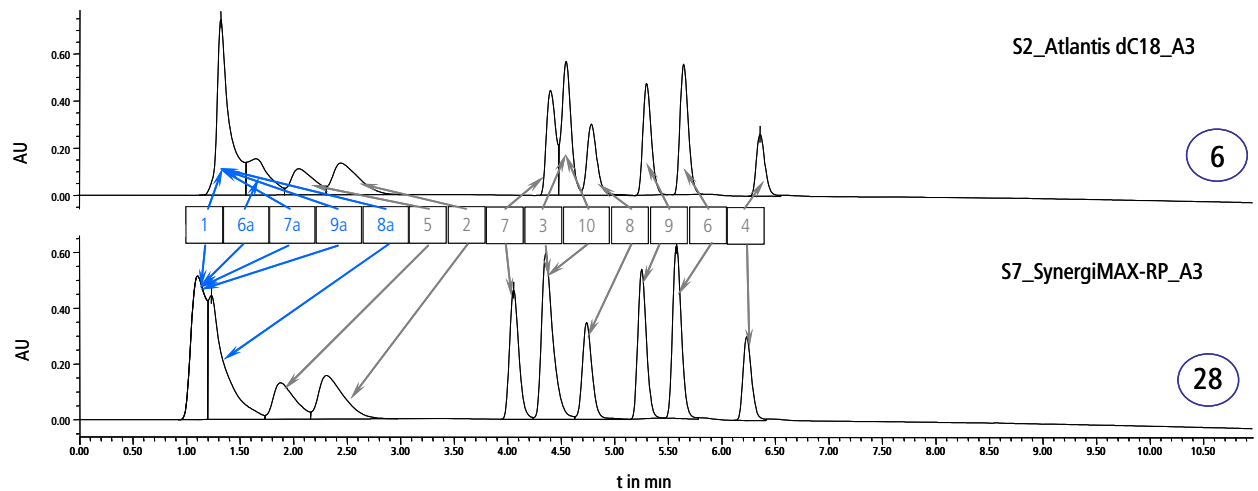


Abb. 9: Chromatogramme der ähnlichen Systeme 28 und 6

Für die Systeme im Screening wurden keine optimierten Methoden verwendet. D. h., dass alle Systeme mit denselben Gradienten gelaufen sind, ohne alle Substanzen voneinander zu trennen. Der nächste Schritt nach der Identifizierung der orthogonalen Systeme war die Optimierung der Systeme hinsichtlich ihrer Trennleistung. Um den Selektivitätsunterschied der Systeme zu erhalten, durften die Eluenten der mobilen Phase dabei nicht verändert werden.

Tab. 10: Chromatographische Bedingungen der orthogonalen Systeme nach der Optimierung

System 45		System 28	
Gradient	3-70 % (B)	Stufengradient	3 min: 3-5 % (B) 4 min: 5-30 % (B) 3 min: 30-60 % (B)
Laufzeit	10 min	Laufzeit	10 min
Äquilibrierzeit	10 min	Äquilibrierzeit	10 min
Fluss	0.6 ml/min	Fluss	0.6 ml/min
Säulentemperatur	45 °C	Säulentemperatur	20 °C
Wellenlängenbereich (DAD)	210-400 nm	Wellenlängenbereich (DAD)	210-400 nm
Detektionswellenlänge	240 nm	Detektionswellenlänge	240 nm

Durch die Änderung des Gradienten und der Säulentemperatur wurden die in Tab. 10 dargestellten chromatographischen Bedingungen für die orthogonalen Systeme 45 und 28 erhalten. In Abb. 10 sind die aus den Optimierungsschritten resultierenden Chromatogramme dargestellt.

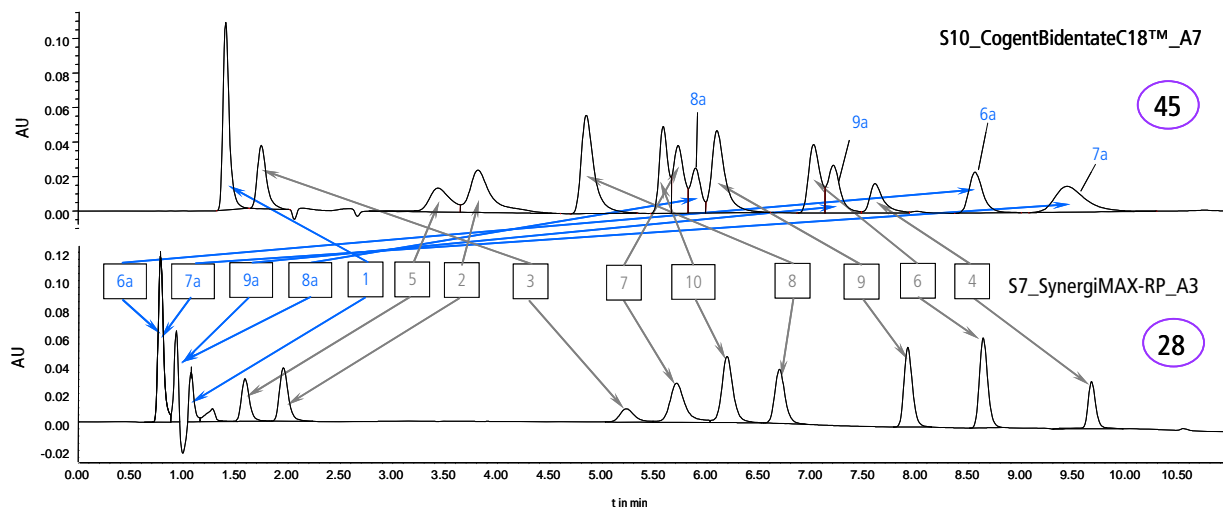


Abb. 10: Optimierte Chromatogramme der orthogonalen Systeme 28 und 45

Durch die Optimierung konnte eine verbesserte Trennleistung der Systeme erzielt werden. In System 45 konnten die Substanzen 8a und 9 getrennt werden. Die Peaks sind zwar nicht alle basisliniengetrennt, aber es wurden alle 14 Peaks zumindest angetrennt. Im System 28 konnten die Substanzen 3 und 10 mit dem Stufengradienten getrennt werden. Jedoch wurden 6a und 7a sowie 8a und 9a nicht getrennt. Sie eluierten sogar noch vor dem Totzeitpeak. Die Substanz 1 eluierte in der Totzeit. Trotzdem konnte das Chromatogramm unter diesen Bedingungen als optimiert betrachtet werden, weil nur

eine Änderung des pH-Wertes des Eluenten eine Retardierung dieser Substanzen bewirken könnte. Es kann sehr zeitaufwendig sein, zwei orthogonale Systeme zu entwickeln, die beide eine optimale Trennleistung zeigen. Dies ist nicht notwendig, wenn ein System eine gute Trennleistung zeigt. Das orthogonale System muss zur Bestätigung der Selektivität keine optimale Trennung der Peaks aufweisen. In dem oben gezeigten Beispiel war System 45 das optimale System mit einer durchschnittlich besseren Auflösung für alle Substanzen. Jedoch zeigte System 28 eine bessere Auflösung für die Substanzen 7 und 10 sowie 5 und 2 als System 45. Insgesamt sind alle Peaks, abgesehen von den koeluierten Peaks am Anfang des Chromatogramms, basisliniengetrennt.

## **2.2 Anwendung der HPLC-Color map für die Entwicklung einer orthogonalen Methode eines Arzneistoffkandidaten mit etablierter HPLC-Analytik**

Das Kapitel zeigt die Anwendung der aus 50 HPLC-Systemen bestehenden Color map [s. Abb. 6]. Sie wurde als Basis für die Auswahl verschiedener HPLC-Systeme zur Entwicklung einer zweiten orthogonalen HPLC-Methode für einen Arzneistoffkandidaten mit etablierter HPLC-Analytik verwendet.

### **2.2.1 Arzneistoffkandidat und etablierte Methode**

ASTAR [s. Abb. 11] war ein Arzneistoffkandidat mit teilweise bekanntem Verunreinigungsprofil [s. Tab. 11] und einer etablierten HPLC-Analytik [s. Tab. 12] mit UV-Detektion bei 254 nm. ASTAR gehörte zu den kleinen Molekülen und hatte eine gewisse Polarität aufgrund seiner Heteroatome. Alle elf Verunreinigungen konnten durch MS-Detektion eindeutig zugeordnet werden. Von VU1, VU2, VU5, VU7 und VU9 waren die Summenformel und die Struktur identifiziert, wohingegen von VU3, VU4, VU6, VU8, VU10 und VU11 lediglich der ionisierte Molekülpeak ( $[M+H]^+$ ) bekannt war.

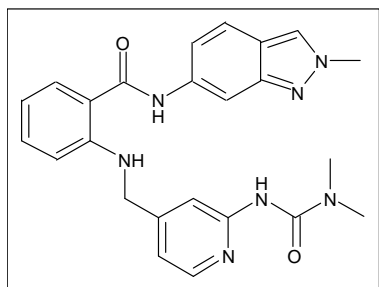


Abb. 11: Strukturformel von ASTAR [54]

Tab. 11: Verunreinigungen von ASTAR

Name	Summenformel	Molare Masse in g/mol
<b>ASTAR</b>	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	443.51
<b>VU1</b>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O	372.43
<b>VU2</b>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O	266.30
<b>VU3</b>	unbekannt	549
<b>VU4</b>	unbekannt	620
<b>VU5</b>	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	429.48
<b>VU6</b>	unbekannt	841
<b>VU7</b>	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	457.54
<b>VU8</b>	unbekannt	430
<b>VU9</b>	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	444.50
<b>VU10</b>	unbekannt	562
<b>VU11</b>	unbekannt	664

ASTAR befand sich noch in einem frühen Stadium der Entwicklung. Die Ausarbeitung der Wirkstoffsynthese war noch nicht abgeschlossen und das Verunreinigungsprofil noch nicht vollständig charakterisiert. Die Abb. 10 zeigt das Chromatogramm der etablierten HPLC-Analytik.

2.2 Anwendung der HPLC-Color map für die Entwicklung einer orthogonalen Methode eines  
Arzneistoffkandidaten mit etablierter HPLC-Analytik

Tab. 12: Etablierte HPLC-Analytik von ASTAR

Einwaage	2 mg auf 10 ml
Lösungsmittel	1 : 1 (Ammoniumacetatpuffer 20mM pH 5 (Eisessig) : Acetonitril)
Säule	YMC- Pack Pro C18 RS, 3 µm, 150 x 4.6 mm
Mobile Phase	A: Ammoniumacetatpuffer 20 mM pH 5 (Einstellung mit Eisessig) B: Acetonitril
Gradient	10- 80 % (B)
Laufzeit	30 min
Äquilibrierzeit	10 min
Fluss	1.0 ml/min
Säulentemperatur	20 °C
Wellenlängenbereich (DAD)	190-600 nm
Detektionswellenlänge	254 nm
Injektionsvolumen	10 µl

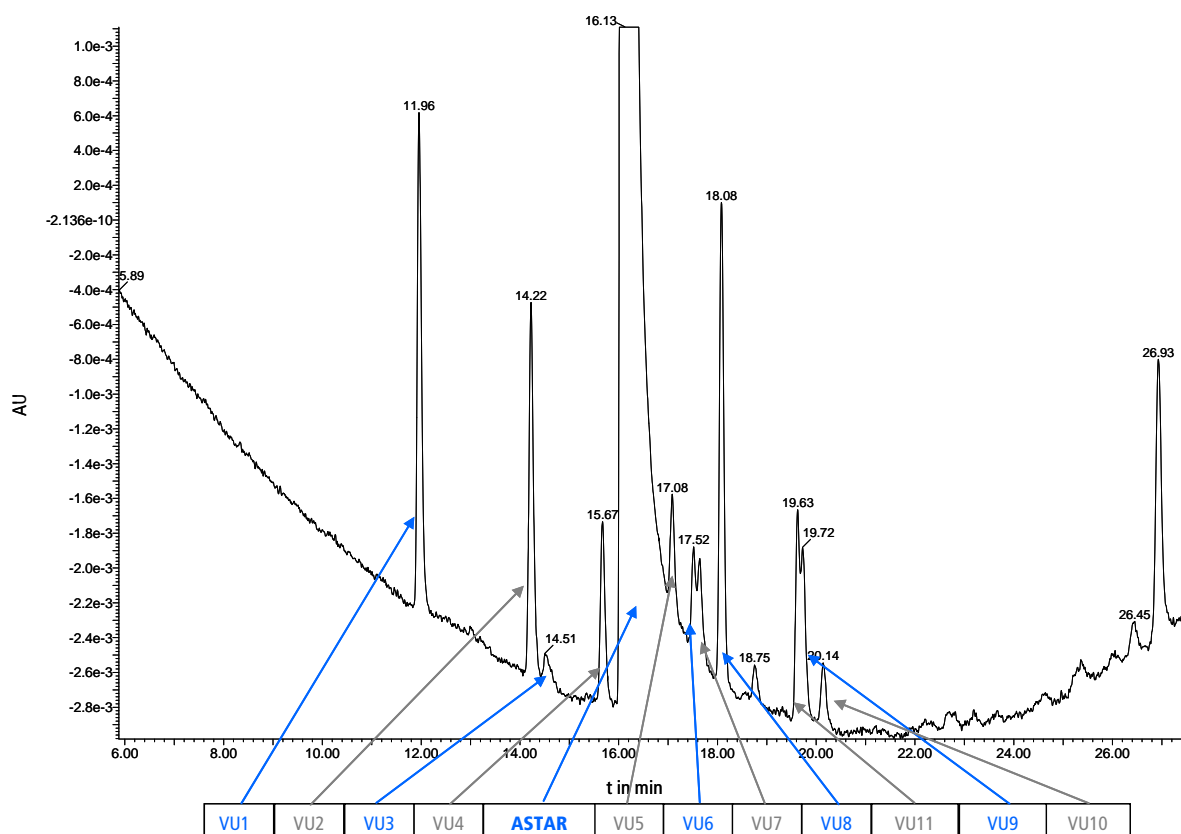


Abb. 12: Chromatogramm der etablierten HPLC-Methode von ASTAR

Der Hauptpeak wurde im Chromatogrammausschnitt nicht in voller Höhe dargestellt, weil das Verunreinigungsprofil der Substanz im Mittelpunkt stand. Die unbeschrifteten Peaks sind Systempeaks, die z. B. durch den Gradienten und den Eluenten entstehen.

Sie waren in der Blankinjektion ebenfalls zu sehen und gehörten somit nicht zum Verunreinigungsprofil. Deshalb waren sie für die Auswertung nicht relevant.

### 2.2.2 Verwendung der Color map für die Auswahl der HPLC-Systeme

Die etablierte HPLC-Methode von ASTAR sollte hinsichtlich ihrer Selektivität überprüft werden. Dazu wurde eine orthogonale HPLC-Methode entwickelt. Ausgangspunkte waren zum einen die etablierte HPLC-Methode und zum anderen die Color map, die die Selektivitätsunterschiede von 50 HPLC-Systemen darstellte. Nun sollte ihre Anwendbarkeit auf ASTAR geprüft werden.

Die RP-Phase der etablierten Methode wurde auch im HPLC-Methodenscreening verwendet. Die RP-Säule S6 des Screenings hatte allerdings kleinere Dimensionen als die RP-Säule der etablierten Methode von ASTAR. Weiterhin wurden andere Eluenten als im HPLC-Methodenscreening verwendet. Somit war das HPLC-System von ASTAR mit keinem HPLC-System der Color map direkt vergleichbar. Der erste Schritt war deshalb die Bestimmung eines ähnlichen Systems. Der Eluent A der ASTAR-Methode war auf pH 5 eingestellt. Im Screening wurden aber nur pH 2.7 und pH 6.8 verwendet. Die Entscheidung, welcher pH-Werte für die weitere Betrachtung günstiger wäre, fiel auf den pH 6.8, weil er näher am pH 5 liegt als an pH 2.7. Demzufolge wurde das System 21 dem ASTAR-System gleichgesetzt. Die HPLC-Systeme wurden nun so ausgewählt, dass sie einen möglichst großen Selektivitätsunterschied zu System 21 in der Color map [s. Abb. 13] zeigten. Die Abb. 14 zeigt einen vertikalen Schnitt durch die Color map an der Stelle des Systems 21. In dieser Darstellung sind die selektierten Systeme mit den kleinsten  $|r|$ -Werten (Ausnahme System 12) hervorgehoben (pink).

### Color map der HPLC-Systeme

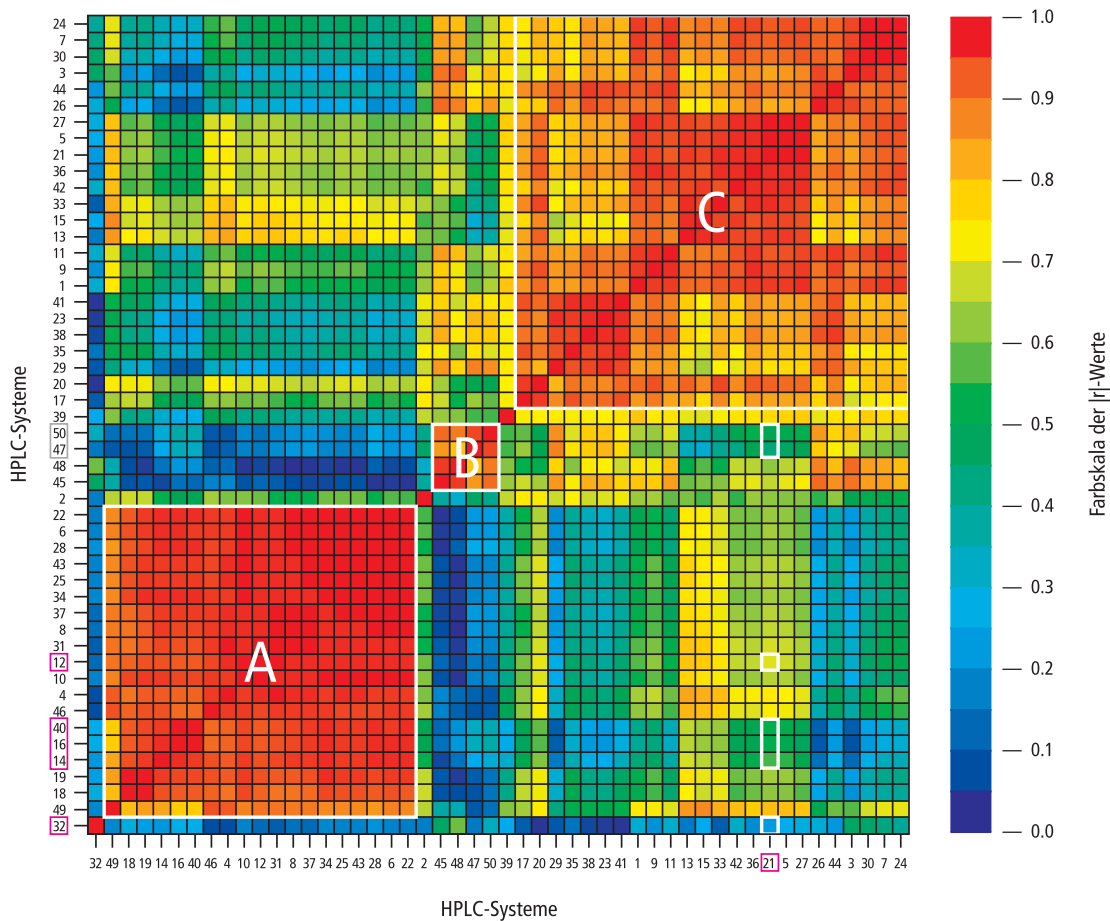


Abb. 13: Die markierten Systeme (vertikal) zeigen mit Ausnahme des Systems 12 den größten Selektivitätsunterschied zum System 21 (horizontal).

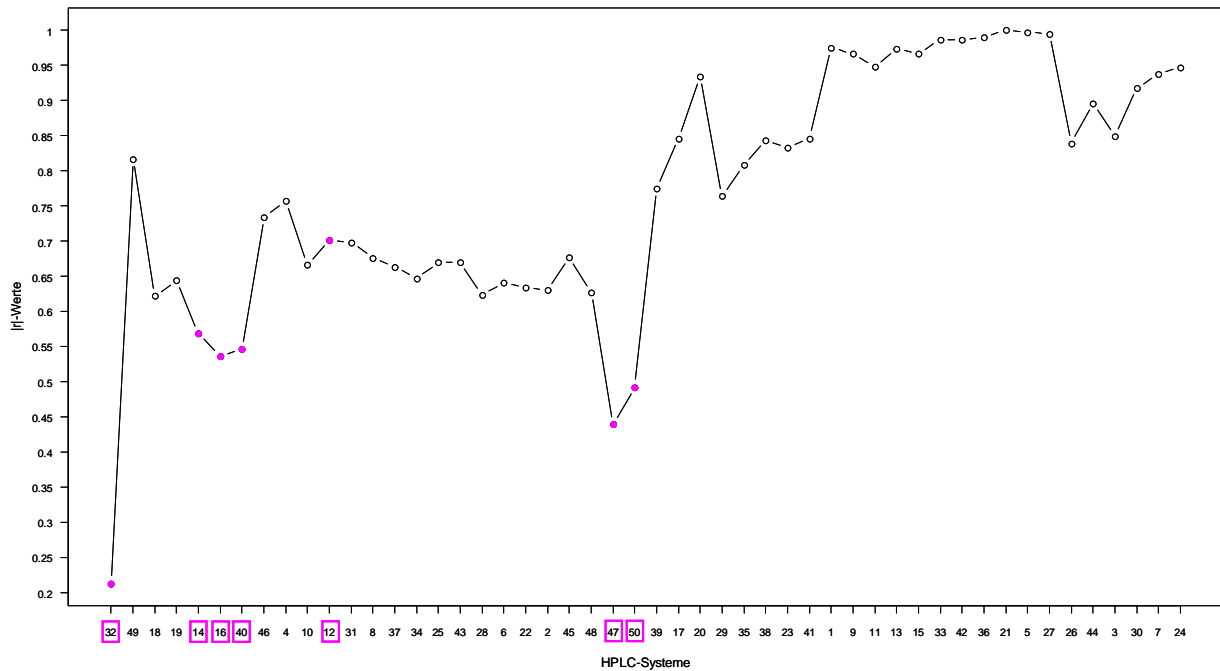


Abb. 14: Vertikaler Schnitt durch die Color map [s. Abb. 13] an der Stelle des etablierten Systems 21. Die selektierten Systeme aus der Color map sind markiert (pink).

System 21 zeigt in der Color map [s. Abb. 13] nur gegenüber dem System 32 einen sehr großen Selektivitätsunterschied (blau). Um eine größere Auswahl an möglichen orthogonalen Systemen zu erhalten, wurden auch fünf stärker korrelierte Systeme (dunkelgrün) ausgewählt. Zusätzlich wurde das System 12 in die Auswahl aufgenommen. Die Phase S3 des Systems weist eine andere Selektivität als die anderen gewählten Phasen auf. Jedoch ist der Korrelationskoeffizient der Systeme 12 und 21 in der Color map hellgrün gefärbt. Somit zeigt dieses System den geringsten Selektivitätsunterschied zum System 21. Die Aufnahme des Systems in die Auswahl prüft die Eignung der Color map als Grundlage zur Identifizierung möglicher orthogonale Systeme zu einem bereits bestehenden System. Ihre Anwendung wäre bedenklich, wenn sich System 12 nun als das System mit dem größten Selektivitätsunterschied zum ASTAR-System herausstellen würde. Die Beträge der Korrelationskoeffizienten der gewählten Systeme sind in Tab. 13 aufgeführt.



Tab. 13: Legende der markierten System in der Color map Abb. 13

Bezeichnung in Color map	System	$r_f$ -Werte mit System 21
21	S6_YMC-PackPro C18RS_A7	1
32	S7_SynergiMAX-RP_M9	0.213
14	S4_BetaMaxAcid_A3	0.536
16	S4_BetaMaxAcid_M3	0.569
40	S9_Gemin Hexyl Phenyl_A3	0.546
12	S3_Hypersil Gold PFP_M3	0.666
47	S10_CogentBidentateC18™_A9	0.492
50	S10_CogentBidentateC18™_M9	0.439

Die Systeme 47 und 50 wiesen zwar in der Color map den größten Selektivitätsunterschied nach dem System 32 auf, aber sie wurden für die Entwicklung der orthogonalen Methode nicht berücksichtigt. Diese Systeme bestanden aus der gleichen RP-Säule (S10), und die Chromatogramme der Systeme zeigten für ASTAR keine Trennung der einzelnen Verunreinigungen. Die Selektivität konnte nicht weiter verbessert werden und daher wurde diese RP-Phase ausgeschlossen. Die Abb. 15 stellt die Streudiagramme der fünf verbliebenen Systeme in Form einer symmetrischen Matrix dar.

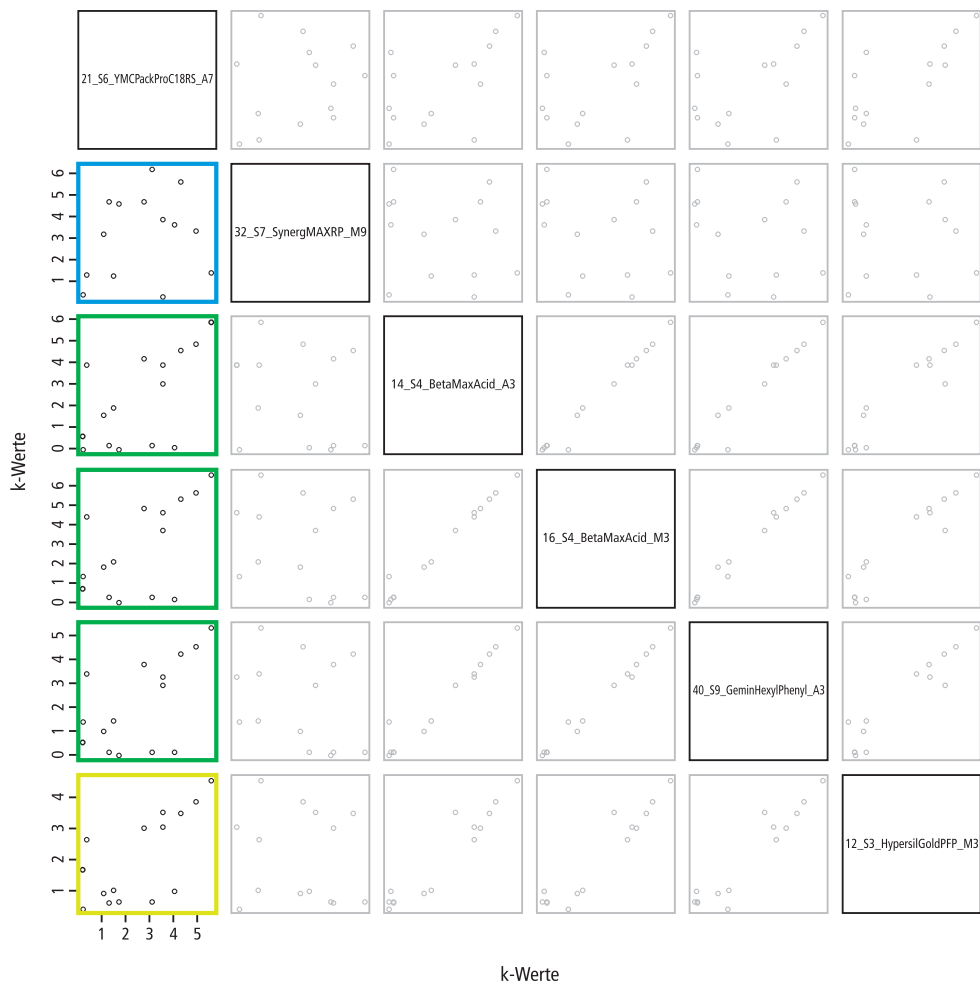


Abb. 15: Matrix der Streudiagramme der Systeme 21, 32, 14, 16, 40, 12. Die Diagramme sind mit den gleichen Farben wie in der Color map markiert.

Alle markierten Diagramme der Abb. 15 zeigen eine Punktwolke. D. h., dass die  $k$ -Werte gering korreliert sind, und der Grad der Orthogonalität der Systeme zum System 21 groß ist. Um eine orthogonale Methode für ASTAR zu entwickeln, wurde ein Screening mit den fünf ausgewählten Systemen durchgeführt. ASTAR wurde auf allen Systemen analysiert und die Retentionszeiten für das gesamte Verunreinigungsprofil wurden ausgewertet.

### 2.2.3 Analytische Screeningbedingungen

Für die Auswertung der Chromatogramme im Screening mit ASTAR war eine DAD-Detektion nicht ausreichend. Die Erstellung einer Spektrendatenbank war nicht möglich, weil nicht alle Verunreinigungen als Substanzen verfügbar waren. Die UV-Spektren der Verunreinigungen in den Chromatogrammen von ASTAR waren nicht geeignet, weil die Peaks z. T. überlappten oder die Intensitäten zu gering waren. Aus diesen Gründen wur-

de das Screening auf einer HPLC-Anlage gekoppelt mit einem TOF-MS durchgeführt. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrospray (positiv). Die Peaks konnten eindeutig über ihre bekannten ionisierten Molekülpeaks  $[M+H]^+$ , Kaliumaddukte  $[M+K]^+$  oder Ammoniumaddukte  $[M+NH_4]^+$  zu geordnet werden. Zusätzlich wurden die Proben aber auch mit einem DAD detektiert. Einerseits sollten die erfassten Signale im UV-Chromatogramm bestätigt werden und andererseits wird die UV-Detektion in der Routineanalytik angewendet und soll auch nach Entwicklung und Optimierung der orthogonalen Systeme genutzt werden.

Der technische Aufbau des Screenings war ähnlich wie im Methodenscreening [s. Kapitel 2.1.4]. Es wurden die gleiche Säulenschaltung sowie der gleiche Säulenofen verwendet. Der Autosampler der Anlage war nicht temperierbar und somit lagerten die Proben bei Raumtemperatur. Im Screening mit ASTAR erhielten die Systeme zur Vereinfachung einen neuen Systemnamen und eine neue Nummer, siehe Tab. 14. Das System 1 war die etablierte HPLC-Methode von ASTAR und die Systeme 2-6 entsprachen den ausgewählten Systemen der Color map. Es wurden die gleichen Säulen wie im Methodenscreening verwendet. Der saure wässrige Eluent der mobilen Phase der Systeme 2-5 unterschied sich vom Eluenten des Methodenscreenings. Für das Screening von ASTAR wurde ein 10mMammoniumformiatpuffer gewählt. Sein pH-Wert entsprach jedoch annähernd dem des Methodenscreenings. Die mobile Phase des Systems 6 bestand aus den Eluenten des Methodenscreenings [s. Tab. 15].

**Tab. 14: Neue Bezeichnung der Systeme im Screening mit ASTAR**

System (alt)	System (neu)	Systemnummer im Screening
S6_YMC-PackPro C18RS_A7	YMC_ref_Ac_pH5_20	1
S4_BetaMaxAcid_A3	BetaMax_Ac_pH3_20	2
S9_Gemin Hexyl Phenyl_A3	Phenyl_Ac_pH3_20	3
S3_Hypersil Gold PFP_M3	PFP_Ac_pH3_20	4
S4_BetaMaxAcid_M3	BetaMax_Me_pH3_45	5
S7_SynergiMAX-RP_M9	MaxRP_Me_pH9_45	6

Tab. 15: Eluenten des Screening mit ASTAR

System	Eluent A (wässrige Phase)	pH-Wert	Eluent B (organische Phase)
1	Ammoniumacetatpuffer 20 mM (Einstellung mit Eisessig)	5	Acetonitril
2 -4	Ammoniumformiatpuffer 10 mM (Einstellung mit Ameisensäure)	3	Acetonitril
5	Ammoniumformiatpuffer 10 mM (Einstellung mit Ameisensäure)	3	Methanol
6	Ammoniumbicarbonatpuffer 10 mM (Einstellung mit Ammoniak)	9	Methanol

Die chromatographischen Bedingungen [s. Tab. 16, Tab. 17] unterschieden sich bedingt durch die unterschiedlichen mobilen Phasen. Für die Skalierung der Flussrate (System 2-6) wurden die Säulenquerschnitte normiert [s. Gleichung 1.4] [55]:

$$(d_2)^2 / (d_1)^2 \times F_1 = F_2 \quad (1.4)$$

**d<sub>1</sub>** bzw. **d<sub>2</sub>**: Säulendurchmesser in mm; **F<sub>1</sub>** bzw. **F<sub>2</sub>**: Flussrate in ml/min

Die Laufzeit von 30 min war für alle Systeme gleich. Die Systeme 2-4 hatten, wie auch das etablierte System 1, Acetonitril als organische Phase,. Deshalb hatten diese vier Systeme die gleiche Säulentemperatur von 20 °C. Die Systeme 5 und 6 hatten Methanol als organischen Eluenten. Ihre Säulentemperatur betrug 45 °C. Diese Temperatur wurde gewählt, weil während der Methodenentwicklung für die etablierte Methode auch Methoden mit Methanol getestet wurden. Dabei stellte sich die Säulentemperatur von 45 °C als vorteilhaft heraus. Die Gradienten der Systeme wurden so gewählt, dass alle Verunreinigungen in der Laufzeit angemessen eluierten. Dabei war es nicht erforderlich, dass sich alle Verunreinigungen voneinander trennten. Das Injektionsvolumen der Systeme 2-6 wurde ebenfalls verringert, sodass eine ausreichende Intensität der Signale erzielt wurde. Weiterhin wurde der Fluss vor dem Einlass in die MS-Quelle gesplittet.

2.2 Anwendung der HPLC-Color map für die Entwicklung einer orthogonalen Methode eines  
Arzneistoffkandidaten mit etablierter HPLC-Analytik

Tab. 16: Analytische Bedingungen für die Systeme 1- 4

System 1	
Gradient	10-80 % (B)
Laufzeit	30 min
Äquilibrierzeit	10 min
Flussrate	1.0 ml/min
Säulentemperatur	20 °C
Wellenlängenbereich (DAD)	190-600 nm
Detektionswellenlänge	254 nm
ESI positiv	[M+H] <sup>+</sup> , [M+K] <sup>+</sup> , [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
Injektionsvolumen	20 µl

System 2- 4	
Gradient	10-75 % (B)
Laufzeit	30 min
Äquilibrierzeit	10 min
Flussrate	0.43 ml/min
Säulentemperatur	20 °C
Wellenlängenbereich (DAD)	190-600 nm
Detektionswellenlänge	254 nm
ESI positiv	[M+H] <sup>+</sup> , [M+K] <sup>+</sup> , [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
Injektionsvolumen	15 µl

Tab. 17: Analytische Bedingungen für die Systeme 5 und 6

System 5	
Gradient	20-85 % (B)
Laufzeit	30 min
Äquilibrierzeit	10 min
Flussrate	0.43 ml/min
Säulentemperatur	45 °C
Wellenlängenbereich (DAD)	190-600 nm
Detektionswellenlänge	254 nm
ESI positiv	[M+H] <sup>+</sup> , [M+K] <sup>+</sup> , [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
Injektionsvolumen	15 µl

System 6	
Gradient	30-85 % (B)
Laufzeit	30 min
Äquilibrierzeit	10 min
Flussrate	0.43 ml/min
Säulentemperatur	45 °C
Wellenlängenbereich (DAD)	190-600 nm
Detektionswellenlänge	254 nm
ESI positiv	[M+H] <sup>+</sup> , [M+K] <sup>+</sup> , [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
Injektionsvolumen	15 µl

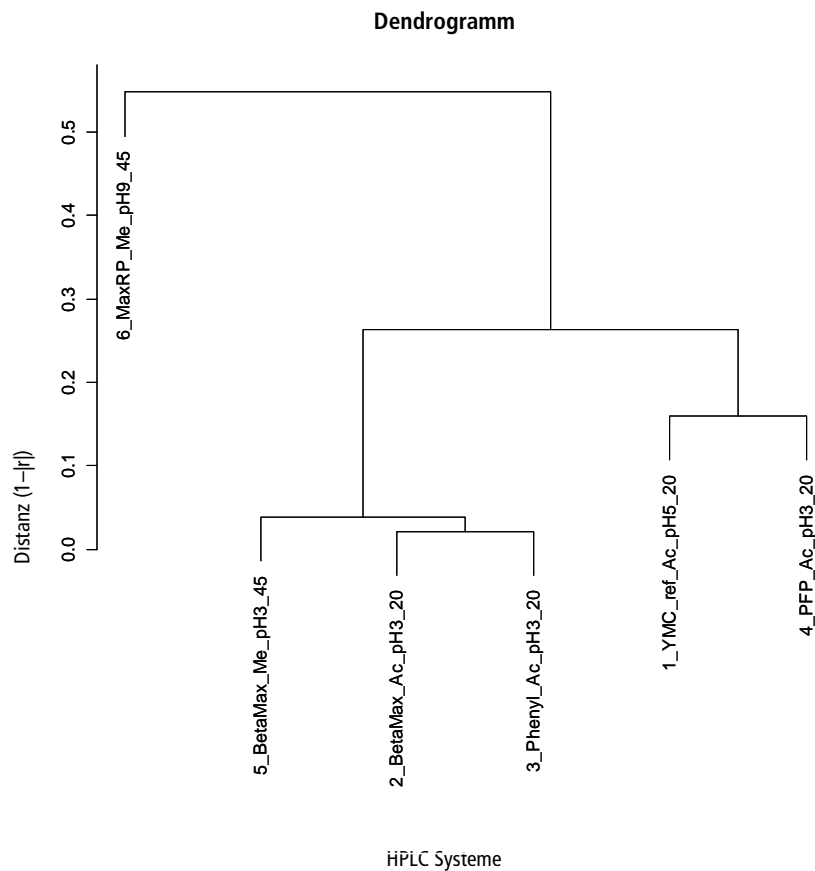
Die MS-Bedingungen sind in der Tab. 18 aufgelistet. Sie wurden für die Hauptsubstanz ASTAR optimiert und es wurde angenommen, dass sich die Verunreinigungen aufgrund der strukturellen Verwandtschaft unter diesen MS-Bedingungen ähnlich verhalten wie ASTAR.

Tab. 18: MS-Bedingungen für das Screening

Ionisierungsmodus	ESI positiv	
Zerstäubergas [l/h]	ca. 100	
Desolvatationsgas [l/h]	ca. 1000	
Kapillarspannung [V]	4000 (System 1-4)	3500 (System 5, 6)
Konusspannung (Sample Cone) [V]	20	
Aperture Spannung [V]	7	
Scandauer [s]	0.5	
Massenbereich [m/z]	100-1000	
Desolvatationstemperatur [°C]	350	
Quellentemperatur [°C]	110	

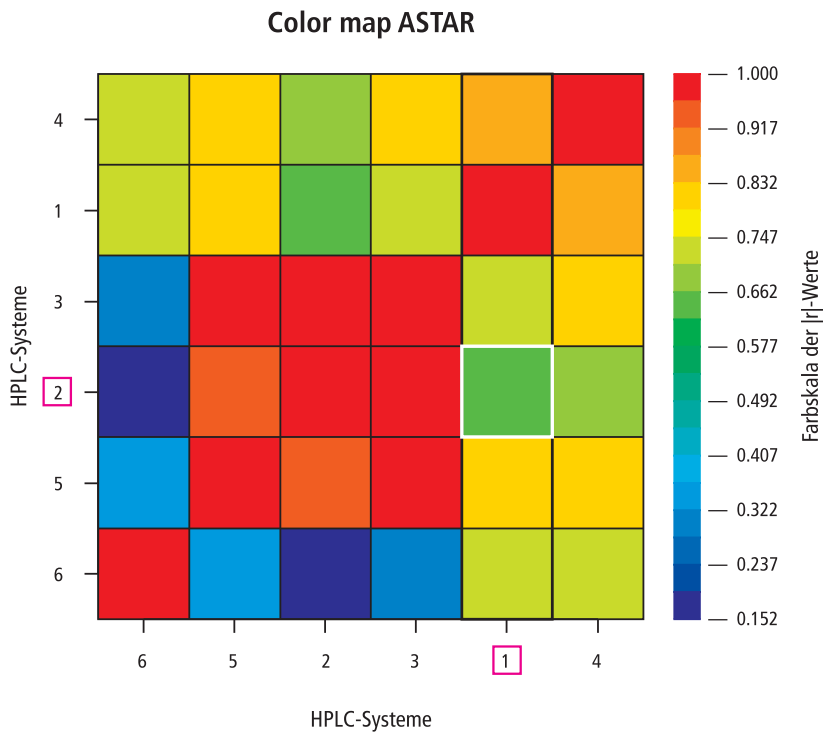
#### 2.2.4 Chemometrische Auswertung

Das Ziel der chemometrischen Auswertung war die Identifizierung eines orthogonalen Systems zum bereits bestehenden System 1. Die chemometrische Auswertung des Screenings erfolgte wie in Kapitel 1.3 beschrieben in zwei Schritten. Der erste Schritt war die Generierung eines Dendrogramms [s. Abb. 16] aus den Retentionsfaktoren der fünf Systeme (2-6), sowie des etablierten Systems 1. Jedes System war durch den  $k$ -Wert von ASTAR und den zehn  $k$ -Werten seiner Verunreinigungen definiert. Die Verunreinigung VU3 konnte nicht in allen Systemen eindeutig detektiert werden und wurde deshalb von der Clusteranalyse ausgeschlossen. Die Peakzuordnung erfolgte ausschließlich über die ESI-Spektren.



**Abb. 16:** Dendrogramm der sechs HPLC-Systeme vom Screening mit ASTAR

Im Dendrogramm sind zwei Cluster zu erkennen. Das System 6 nimmt eine Sonderstellung ein und das System 4 bildet mit System 1 ein Cluster. Es wird vermutet, dass System 6 zu allen Systemen den größten Selektivitätsunterschied zeigen müsste und somit auch das orthogonale System zum etablierten System 1 wäre.



**Abb. 17: Color map des Screening mit ASTAR**

Jedoch wurde in der Color map [s. Abb. 17] deutlich, dass System 2 das gesuchte orthogonale System zum System 1 war. Alle Systeme zeigten generell eine höhere Korrelation mit den Systemen 1 und 4 (keine blauen Felder). Die Sonderstellung von System 6 war durch seine geringe Korrelation mit den Systemen 2, 3 und 5 zu erklären. In Abb. 18 sind die relevanten Streudiagramme der fünf Systeme dargestellt.



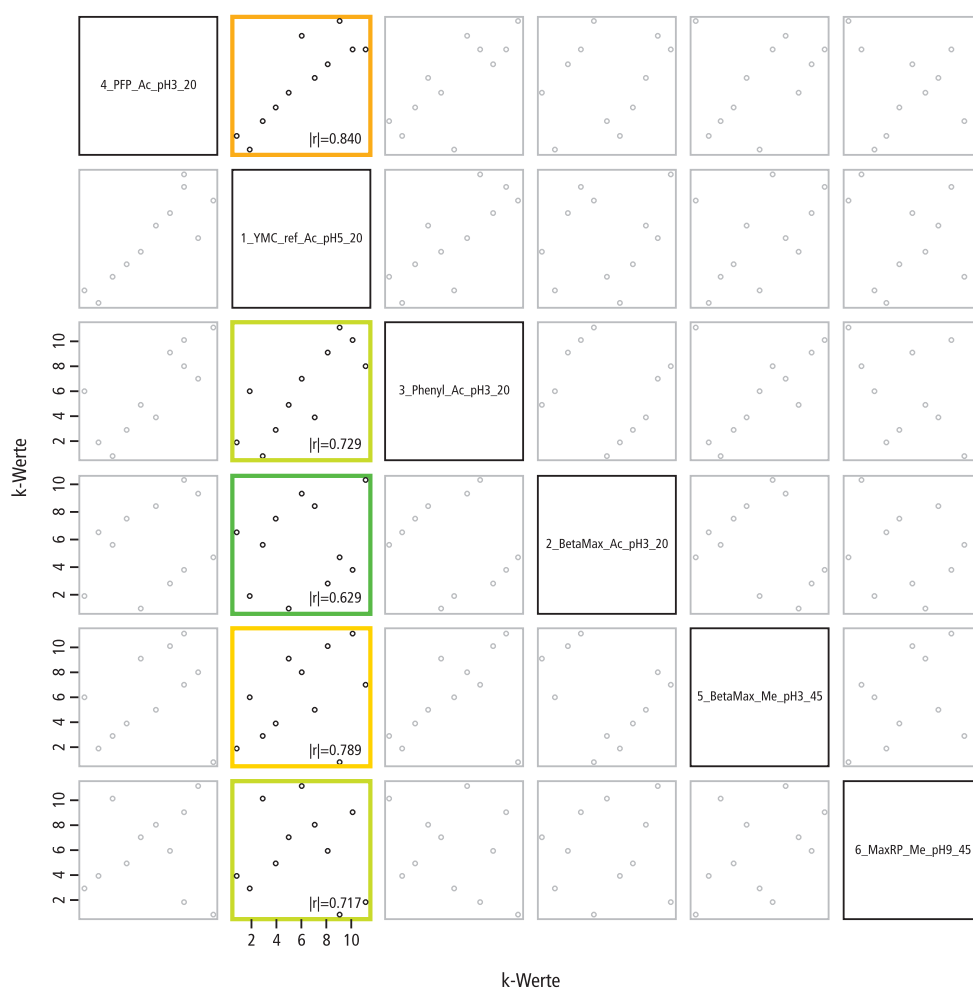


Abb. 18: Matrix der Streudiagramme der Systeme 1-6. Die Diagramme sind mit den gleichen Farben wie in der Color map von ASTAR markiert.

Die Systeme waren höher korreliert als die ehemaligen Systeme der HPLC-Color map [s. Tab. 13]. Dieses Ergebnis war nicht überraschend, weil die Strukturähnlichkeit sowie die damit verbundenen Substanzeigenschaften bei ASTAR und seinen Verunreinigungen größer waren als bei den Sulfonamiden.

### 2.2.5 Optimierung des orthogonalen Systems

Durch Optimierung der chromatographischen Bedingungen konnte die Selektivität des Systems 2 aus dem Screening verbessert werden. Dabei blieben die Eluenten gleich, um den Selektivitätsunterschied zu erhalten. Es erfolgte eine Änderung des Gradienten, der Flussrate und der Säulentemperatur [s. Tab. 19]. Die MS-Bedingungen wurden nicht verändert. Die Abb. 19 zeigt die aus der Optimierung resultierenden Chromatogramme der orthogonalen Systeme.

Tab. 19: Analytische Bedingungen nach der Optimierung

System 1		System 2	
Gradient	10-80 % (B)	Gradient	5-70 % (B)
Laufzeit	30 min	Laufzeit	30 min
Äquilibrierzeit	10 min	Äquilibrierzeit	10 min
Flussrate	1.0 ml/min	Flussrate	0.6 ml/min
Säulentemperatur	20 °C	Säulentemperatur	45 °C
Wellenlängenbereich (DAD)	190-600 nm	Wellenlängenbereich (DAD)	190-600 nm
Detektionswellenlänge	254 nm	Detektionswellenlänge	254 nm
ESI positiv	[M+H] <sup>+</sup> , [M+K] <sup>+</sup> , [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	ESI positiv	[M+H] <sup>+</sup> , [M+K] <sup>+</sup> , [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
Injektionsvolumen	20 µl	Injektionsvolumen	15 µl

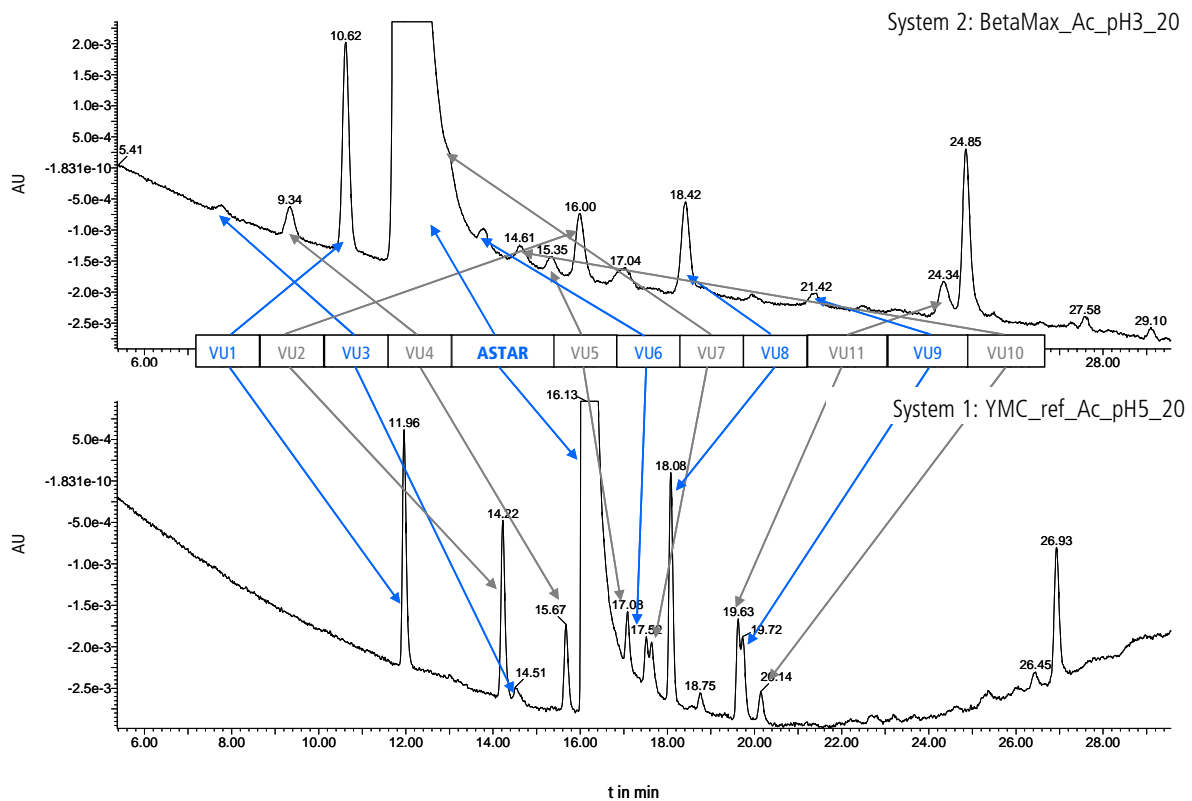


Abb. 19: Chromatogramme der orthogonalen Systeme von ASTAR

In den Chromatogrammen ist eine unterschiedliche Elutionsreihenfolge zu erkennen. Die Peakpaare VU6 und VU7 sowie VU11 und VU9 konnten mit der orthogonalen Methode getrennt werden. Allerdings liegt VU7 in diesem System unter dem Hauptpeak. Jedoch spielt das bei einer MS-Detektion keine Rolle, weil VU7 eindeutig neben dem Hauptpeak identifiziert werden kann. Die Peakflächen in den UV-Chromatogrammen

sind unterschiedlich groß, weil die Substanzen bei den verschiedenen Eluenten der Systeme andere Extinktionskoeffizienten haben. Die Flächen sind nicht vergleichbar. Gleiches trifft auch auf die MS-Spektren zu. Die Substanzen lassen sich in Abhängigkeit des Eluenten unterschiedlich gut ionisieren und erzeugen somit unterschiedliche Intensitäten. Somit können einige Substanzen gut und andere nur schlecht detektiert werden, weil sie nur sehr schwache Signale im MS erzeugen.

### **2.3 Methodenscreening für die Identifizierung orthogonaler chromatographischer Systeme für die UPLC**

Dieses Kapitel beschreibt das Methodenscreening zur Identifizierung orthogonaler UPLC-Systeme. Das allgemeine Vorgehen orientiert sich am Methodenscreening für HPLC-Systeme [s. Kapitel 2.1]. Die UPLC-Analytik bietet durch hohen Durchsatz (kurze Analysenzeiten), hohe Produktivität (hohe Bodenzahl) und hohe Auflösung (große Peakkapazität) Vorteile gegenüber der konventionellen HPLC-Analytik [56]. Das wird durch Verwendung spezieller RP-Säulen mit Partikelgrößen kleiner 2 µm bei hoher linearer Strömungsgeschwindigkeit ermöglicht. Die UPLC-Anlage unterscheidet sich damit in ihrer Leistungsfähigkeit von herkömmlichen HPLC-Anlagen. Sie kann bei Drücken von bis zu 1000 bar gefahren werden, was eine wesentliche Voraussetzung für die Ausnutzung des Potenzials der kleinen Partikel ist. Weiterhin hat die Anlage ein sehr kleines Systemvolumen von ca. 80 µl. Auch die Detektoren, die mit der UPLC gekoppelt sind, sind diesen Bedingungen angepasst. Sie haben hohe Datenaquisitionsraten und kurze Umschaltzeiten.

#### **2.3.1 Auswahl der Modellsubstanzen**

Die Modellsubstanzen sollten ebenfalls ein Arzneistoff-Verunreinigungsprofil simulieren. Dafür wurden zehn Substanzen [s. Tab. 20] aus den 14 Substanzen [s. Tab. 3] des HPLC-Screenings [s. Kapitel 2.1.1] ausgewählt. Das UPLC-Screening wurde auf einer UPLC-DAD-MS Anlage durchgeführt. Die Substanzen wurden hinsichtlich ihrer Ionisierbarkeit (ESI positiv) ausgewählt. Sie sollten eindeutig mit MS-Detektion identifiziert werden können. Eine Zuordnung der Peaks mittels UV-Spektrendatenbank war aufgrund der verwendeten Software nicht möglich.

Tab. 20: Modellsubstanzen des Methodenscreenings für UPLC-Systeme

Substanzname	Bezeichnung im Screening	molare Masse in g/mol	[M+H] <sup>+</sup>
Sulfacetamid	3	214.0412	215.0490
Dapson	4	248.0619	249.0698
Sulfaguanidin	5	214.0524	215.0603
Sulfamethazin	6	278.0837	279.0916
2-Amino-4,6-dimethylpyrimidin	6a	123.0796	124.0875
Sulfisomidin	7	278.0837	279.0916
4-Amino-2,6-dimethylpyrimidin	7a	123.0796	124.0875
Sulfadiazin	8	250.0524	251.0603
Sulfamerazin	9	264.31	265.31
4-Acetamidobenzesulfonamid	10	214.0412	215.0490

### 2.3.2 Auswahl der UPLC-Säulen

Momentan ist die Auswahl kommerziell erhältlicher UPLC-RP-Phasen im Vergleich zu HPLC-RP-Phasen deutlich geringer. Das Charakteristische an UPLC-Phasen sind die sehr kleinen Partikeldurchmesser ( $\leq 2 \mu\text{m}$ ). Die Auswahl [s. Tab. 21] umfasst ein breites Spektrum an unterschiedlichen Phasenselektivitäten. Auch die UPLC-Phasen lassen sich wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben in verschiedene Klassen einteilen. Die Säulenmaterialien stammen alle aus der dritten Generation [s. Abb. 4]. Fast alle Materialien sind ebenfalls als HPLC-Phasen erhältlich (ausgenommen S10). Die BEH-Säulen (S2, S3, S5) haben das gleiche Hybridmaterial wie die xBridge-Säulen aus dem HPLC-Methodenscreening [s. Tab. 4].

Tab. 21: Im Methodenscreening verwendete UPLC-RP-Säulen

Säulenbezeichnung	Säulenname	Materialeigenschaften	Klasse
S1	Hypersil Gold	Hydrophober und polarer Charakter durch freie Silanol-Gruppen	Mittel polare Phase
S2	BEH Shield RP18	Hybridmaterial mit Silicium-Ethan-Gruppen, stark hydrophil (Carbamatgruppe eingebettet, monofunktional gebunden)	Polare Phase (Spezialphase)
S3	BEH C18	Hybridmaterial mit Silicium-Ethan-Gruppen, stark trifunktional gebundenes C <sub>18</sub>	Hydrophobe Phase (Spezialphase)
S4	YMC-UltraHT Pro C18	Stark hydrophobe Oberfläche	Hydrophobe Phase
S5	BEH Phenyl	Hybridmaterial mit Silicium-Ethan-Gruppen, stark hydrophil, trifunktional gebundenes C <sub>6</sub> -Phenyl	Polare Phase (Spezialphase)
S6	Zorbax SB-CN	Sterisch geschützte Phase mit Cyano-Gruppe	Polare Phase
S7	Zorbax Extent-C18	Brückenbindungen	Hydrophobe Phase (Spezialphase)
S8	Hypersil Gold PFP	Fluorphase	Polare Phase
S9	Hypersil Gold aq	hydrophiles endcapping	Polare Phase
S10	HSS T3	Trifunktional gebunden reines Silicamaterial	Mittel polare Phase (Spezialphase)

Insgesamt beinhaltet die UPLC-Säulenauswahl RP-Phasen und Spezialphasen unterschiedlicher Selektivität. Somit sind die Auswahlkriterien mit denen des HPLC-Methodenscreenings vergleichbar. Weiterhin haben alle UPLC-Säulen die gleiche Dimension (50 mm x 2.1 mm), aber unterschiedliche Porendurchmesser, Oberflächenbedeckung und Kohlenstoffgehalt. Im Anhang (s. Tab. A-3) sind diese Eigenschaften tabellarisch dargestellt.

### 2.3.3 Analytische Bedingungen

Die analytischen Bedingungen für das Methodenscreening sollten wieder für alle Säulen ähnlich sein. Die Proben wurden auf einer UPLC-MS Anlage mit zusätzlichem DAD analysiert. Das Massenspektrometer war ein TOF-MS mit zwei Analysenmodi, dem sogenannten V-Modus und dem W-Modus. Im V Modus wurden die Moleküle im Reflektron nur einmal reflektiert, wohingegen sie im W-Modus zweimal reflektiert wurden. Der V-Modus war deshalb empfindlicher und der W-Modus hatte eine bessere Auflösung und führte daher zu schärferen Signalen. Im Screening wurde aus diesem Grund der W-Modus verwendet. Die Proben lagerten während des Screenings bei 10 °C im Auto-

sampler, um ihre Haltbarkeit zu erhöhen. Im UPLC-Screening simulierte das Substanzgemisch die Konzentrationsverhältnisse eines Arzneistoff-Verunreinigungsprofils. Sulfadiazin (Substanz 8) stellte dabei die Hauptsubstanz dar, die anderen neun Substanzen die Verunreinigungen. Die Peakzuordnung erfolgte ausschließlich über die Massenspektren und die Auswertung erfolgte nur qualitativ.

### *Probenvorbereitung*

Die Substanzen wurden wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben in Methanol-Wasser gelöst. Es wurden drei Mischungen (I-III) [s. Tab. 22] hergestellt, weil einige Substanzen die gleichen Massen hatten und somit nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Sulfadiazin wurde als Hauptsubstanz gewählt, weil sie im HPLC-Screening eine gute Peakform zeigte, auf allen Systemen retardiert wurde und die molare Masse im mittleren Bereich der zehn Substanzen lag. Das Gesamtgemisch simulierte das Arzneistoff-Verunreinigungsprofil. Jede der neun Substanzen stellte eine einprozentige Verunreinigung dar. Es wurden Stammlösungen von 1 mg/ml von jeder Substanz hergestellt. Für die Herstellung der Mischungen wurden je 200 µl der jeweiligen Stammlösung in ein Vial gegeben und für Mischung I und III wurden die Vials mit Lösungsmittel auf 1000 µl aufgefüllt. Das Gesamtgemisch wurde in einem 10 ml Messkolben hergestellt, in dem 10 mg Sulfadiazin vorgelegt wurden und dann 0.1 ml der neun Stammlösungen dazu pipettiert wurden und im Anschluss auf 10 ml mit Lösungsmittel aufgefüllt wurde.

Tab. 22: Zusammensetzung der Gemische für das UPLC-Screening

	Zusammensetzung	Injektionsvolumen
<b>Mischung I</b>	Sulfacetamid	2 µl
	Sulfadiazin	
	Sulfamerazin	
	Dapson	
	4-Amino-2,6-dimethylpyrimidin	
<b>Mischung II</b>	Sulfaguanidin	
	4-Acetamidobenzesulfonamid	
	2-Amino-4,6-dimethylpyrimidin	
	Sulfisomidin	
	Sulfamethazin	
<b>Mischung III</b>	4-Acetamidobenzesulfonamid	
	Sulfamethazin	
<b>Gesamtgemisch</b>	Sulfadiazin (1 mg/ml) Restlichen Substanzen (0.01 mg/ml)	

*UPLC-DAD-MS*

Für alle Läufe im Screening wurden die gleichen analytischen Bedingungen [s. Tab. 23] verwendet. Die MS-Bedingungen [s. Tab. 24] wurden mit Sulfadiazin optimiert. Anschließend wurde geprüft, ob die anderen Substanzen auch ausreichend ionisiert wurden. Der Fluss wurde vor dem Einlass in das Interface des MS-Detektors gesplittet. Von jedem Lauf wurde zusätzlich ein DAD-Spektrum von 200-500 nm aufgezeichnet.

Tab. 23: Analytische Bedingung im Screening

<b>Gradient</b>	3-30 % (B)
<b>Laufzeit</b>	3 min
<b>Äquilibrierzeit</b>	1 min
<b>Fluss</b>	0.5 ml/min
<b>Säulentemperatur</b>	45 °C
<b>Wellenlängenbereich (DAD)</b>	200-500 nm
<b>Detektionswellenlänge</b>	240 nm
<b>ESI positiv</b>	[M+H] <sup>+</sup>

Tab. 24: MS-Bedingungen im Screening

Ionisierungsmodus	ESI positiv
Analysenmodus	W-Modus
Zerstäubergas [l/h]	60
Desolvatationsgas [l/h]	1000
Kapillarspannung [V]	3500
Konusspannung (Sample Cone) [V]	30
Aperture 1 Spannung [V]	5
Scandauer [s]	0.1
Massenbereich [m/z]	100-1000
Desolvatationstemperatur [°C]	400
Quellentemperatur [°C]	110

### 2.3.4 Aufbau und Durchführung des Screenings

Im UPLC-Screening wurden dieselben Eluenten verwendet wie im HPLC-Screening. In Tab. 25 sind die verwendeten Eluenten aufgelistet. Da die Säulen S4, S6, S8 und S10 bei pH 9 nicht stabil sind, wurden sie nicht für die Läufe 3 und 6 verwendet. Die UPLC-Anlage verfügte über einen Säulenofen mit integriertem Schaltventil, so konnten vier Säulen in einer Serie getestet werden.

Tab. 25: Eluenten des UPLC-Screenings

Screeninglauf	Eluent A (wässrige Phase)	pH-Wert	Eluent B (organische Phase)	Verwendete Säulen	Bezeichnung
1	Ammoniumacetat 10 mM	6.8	Methanol	S1-S10	M7
2	0.1 % Ameisensäure (V/V)	2.7	Methanol	S1-S10	M3
3	Ammoniumbicarbonatpuffer 10 mM (Einstellung mit Ammoniak)	9.0	Methanol	S1, S2, S3, S5, S7, S9	M9
4	Ammoniumacetat 10 mM	6.8	Acetonitril	S1-S10	A7
5	0.1 % Ameisensäure (V/V)	2.7	Acetonitril	S1-S10	A3
6	Ammoniumbicarbonatpuffer 10 mM (Einstellung mit Ammoniak)	9.0	Acetonitril	S1, S2, S3, S5, S7, S9	A9

Die Injektion der jeweiligen Probe erfolgte immer aus den gleichen Vials. Auf jede Säule wurden pro Lauf acht Proben injiziert. Die ersten drei Injektionen waren Blankinjektionen des Lösemittels, gefolgt von zwei Injektionen des Gesamtgemisches und dann je einer Injektion der drei Mischungen. Nach den Screeningläufen wurden die Säulen mit Acetonitril/Wasser (70/30 (V/V)) gespült.



Das Screening begann mit den sauren und neutralen Läufen auf S4, S6, S8 und S10. Dann folgten, nach dem Austausch der Säulen, die soeben genannten Läufe auf dem Säulen S1, S2, S3 und S5. Als nächstes wurden der basische Puffer angehängt und die Läufe 3 und 6 gefahren. Zuletzt erfolgte der Einbau der Säulen S7 und S9 für die Läufe 3 und 6. Im Anschluss wurde wieder die saure und neutrale Phase für die restlichen Läufe 1, 2, 4 und 5 angehängt. Die Peakzuordnung erfolgte über die entsprechenden Massensignale der Mischungen (I-III).

### 2.3.5 Chemometrische Auswertung

Die Identifizierung und Visualisierung orthogonaler UPLC-Systeme erfolgte über die in Kapitel 1.3 beschriebenen Schritte. Für die chemometrische Auswertung des Methodenscreenings wurden die zehn Retentionsfaktoren der 52 Chromatogramme verwendet. Jedes Chromatogramm entsprach einem UPLC-System.

Abb. 20 zeigt das aus dem ersten Schritt der chemometrischen Auswertung resultierende Dendrogramm der Clusteranalyse. Im Dendrogramm sind drei Cluster (A, B, C) erkennbar. Sie resultieren aus seiner Baumstruktur. Im Cluster A befinden sich alle sauren, in B alle neutralen und in C fast alle basischen Systeme. Das basische System 15 nimmt eine Sonderstellung ein. An dieser Gruppierung wird deutlich, dass der pH-Wert den größten Einfluss auf den Selektivitätsunterschied der Systeme hat. Die sauren Systeme sind untereinander am ähnlichsten, da sie die kleinsten Distanzen haben. Die neutralen und auch die basischen Systeme lassen sich nochmals unterteilen.

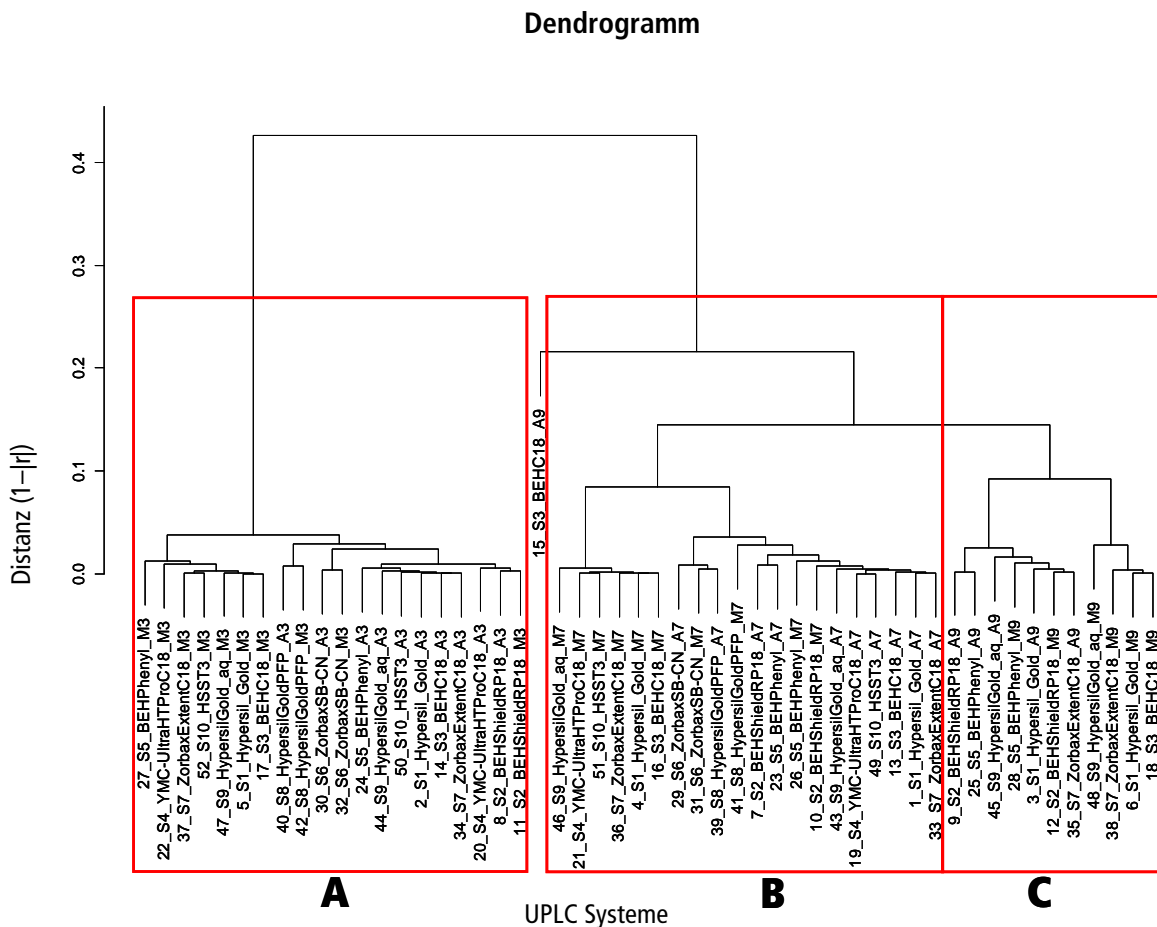


Abb. 20: Dendrogramm der 52 UPLC-Systeme

Die Abb. 21 zeigt die Color map des zweiten Schrittes der chemometrischen Auswertung. Die Legende der Systeme der Color map ist in Tab. 26 aufgelistet. In der Color map sind wieder die drei Cluster A, B und C zu erkennen. Weiterhin lässt sich der Grad der Korrelation bzw. der Orthogonalität anhand der Farben in der Color map ablesen. Im HPLC-Screening sind die Systeme mit einem höheren Grad an Orthogonalität enthalten als im UPLC-Screening. Das wird an der Farbskala sichtbar. Der kleinste  $|r|$ -Wert des HPLC-Screenings ist 0.02, wohingegen er im UPLC-Screening 0.12 beträgt.

Color map der UPLC-Systeme

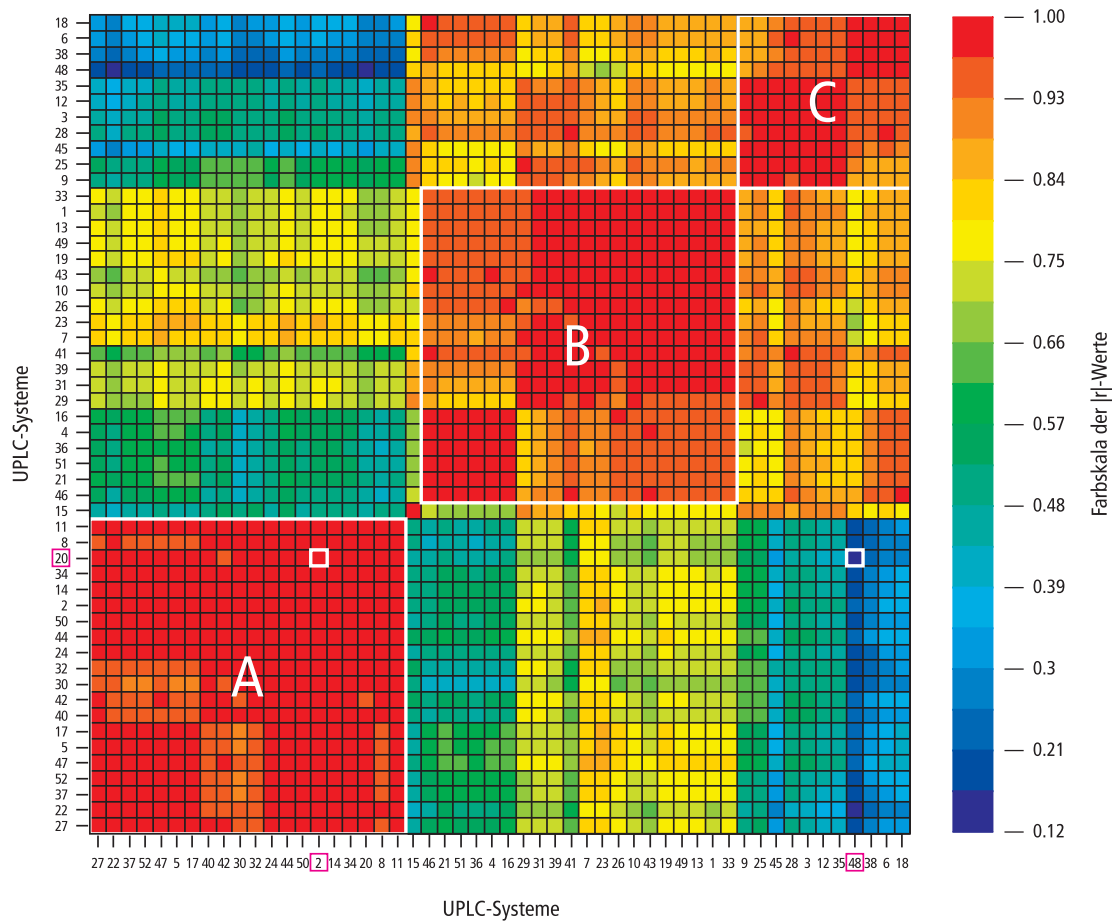


Abb. 21: Color map der 52 UPLC-Systeme

Tab. 26: Legende der UPLC-Color map

Bezeichnung in Color map	System	Bezeichnung in Color map	System
1	S1_Hypersil Gold_A7	27	S5_BEH Phenyl_M3
2	S1_Hypersil Gold_A3	28	S5_BEH Phenyl_M9
3	S1_Hypersil Gold_A9	29	S6_Zorbax SB-CN_A7
4	S1_Hypersil Gold_M7	30	S6_Zorbax SB-CN_A3
5	S1_Hypersil Gold_M3	31	S6_Zorbax SB-CN_M7
6	S1_Hypersil Gold_M9	32	S6_Zorbax SB-CN_M3
7	S2_BEH Shield RP18_A7	33	S7_Zorbax Extent-C18_A7
8	S2_BEH Shield RP18_A3	34	S7_Zorbax Extent-C18_A3
9	S2_BEH Shield RP18_A9	35	S7_Zorbax Extent-C18_A9
10	S2_BEH Shield RP18_M7	36	S7_Zorbax Extent-C18_M7
11	S2_BEH Shield RP18_M3	37	S7_Zorbax Extent-C18_M3
12	S2_BEH Shield RP18_M9	38	S7_Zorbax Extent-C18_M9
13	S3_BEH C18_A7	39	S8_Hypersil Gold PFP_A7
14	S3_BEH C18_A3	40	S8_Hypersil Gold PFP_A3
15	S3_BEH C18_A9	41	S8_Hypersil Gold PFP_M7
16	S3_BEH C18_M7	42	S8_Hypersil Gold PFP_M3
17	S3_BEH C18_M3	43	S9_Hypersil Gold aq_A7
18	S3_BEH C18_M9	44	S9_Hypersil Gold aq_A3
19	S4_YMC-UltraHT ProC18_A7	45	S9_Hypersil Gold aq_A9
20	S4_YMC-UltraHT ProC18_A3	46	S9_Hypersil Gold aq_M7
21	S4_YMC-UltraHT ProC18_M7	47	S9_Hypersil Gold aq_M3
22	S4_YMC-UltraHT ProC18_M3	48	S9_Hypersil Gold aq_M9
23	S5_BEH Phenyl_A7	49	S10_HSST3_A7
24	S5_BEH Phenyl_A3	50	S10_HSST3_A3
25	S5_BEH Phenyl_A9	51	S10_HSST3_M7
26	S5_BEH Phenyl_M7	52	S10_HSST3_M3

Zur Veranschaulichung der Selektivitätsunterschiede zweier UPLC-Systeme wurde je ein Beispiel für orthogonale Systeme und eines für ähnliche Systeme aus der Color map ausgewählt. Sie sind farblich hervorgehoben [s. Abb. 21 und Tab. 26]. Die Systeme 20 und 48 weisen große Selektivitätsunterschiede auf. In der Color map ist ihr  $|r|$ -Wert blau gefärbt. Die Abb. 22 zeigt die Chromatogramme dieser zwei Systeme. Die Chromatogramme haben eine unterschiedliche Elutionsreihenfolge, bedingt durch den Selektivitätsunterschied der Systeme. System 48 gehört ins Cluster C und System 20 ins Cluster A. Im sauren System 20 eluieren die polaren Substanzen 7a und 6a in der Totzeit des Chromatogramms. Das gleiche Verhalten zeigten sie auch in sauren HPLC-Systemen [s. Abb. 8 und Abb. 9]. Im basischen System 48 werden sie retardiert. Substanz 3, 8 und 5

eluierten dort allerdings mit der Totzeit. Die Chromatogramme der ähnlichen Systeme 2 und 20 sind in Abb. 23 dargestellt. Sie haben die gleiche Elutionsreihenfolge mit Ausnahme der Substanzen 7 und 10. Diese Systeme sind hoch korreliert. Ihr Korrelationskoeffizient in der Color map ist rot gefärbt. Beides sind saure Systeme aus dem Cluster A. Sie haben ähnliche Selektivitäten. Die Abb. 24 zeigt die Streudiagramme der orthogonalen und ähnlichen Systeme. Sie verdeutlichen noch einmal den Grad der Korrelation. Die Retentionsfaktoren der orthogonalen Systeme bilden eine Punktwolke und die Retentionsfaktoren der ähnlichen Systeme bilden fast eine Gerade im Streudiagramm.

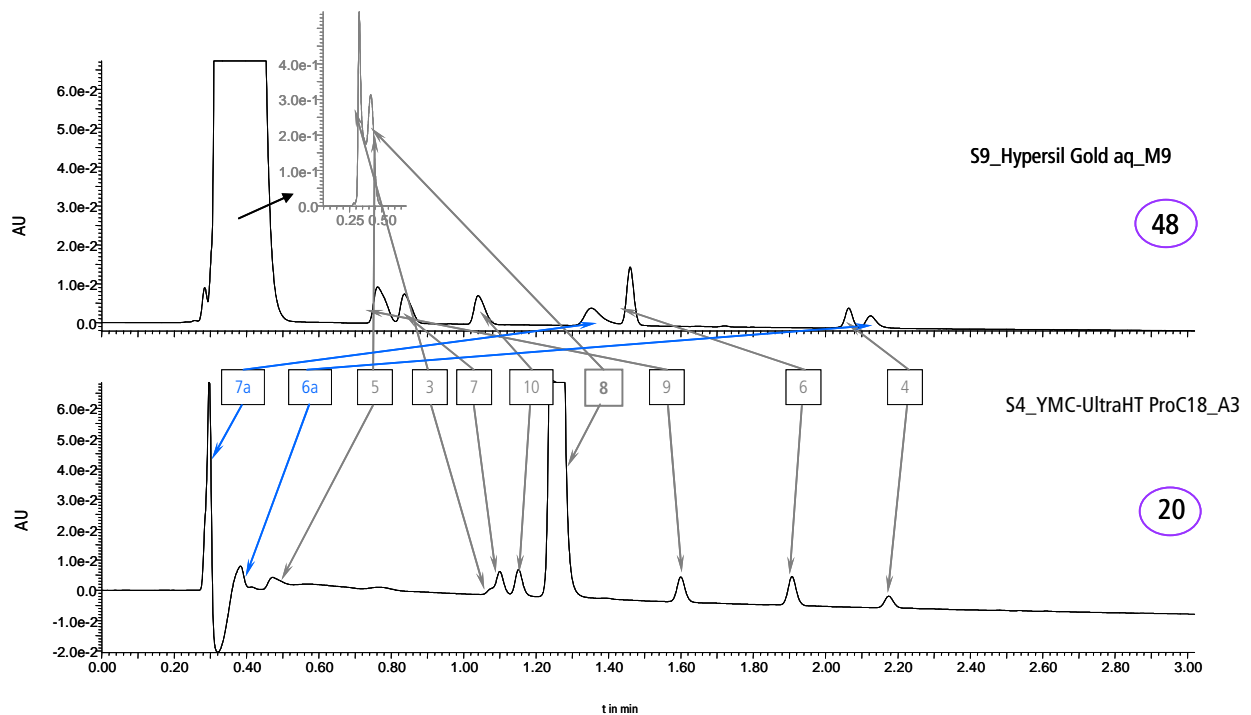


Abb. 22: Chromatogramme der orthogonalen UPLC-Systeme 20 und 48

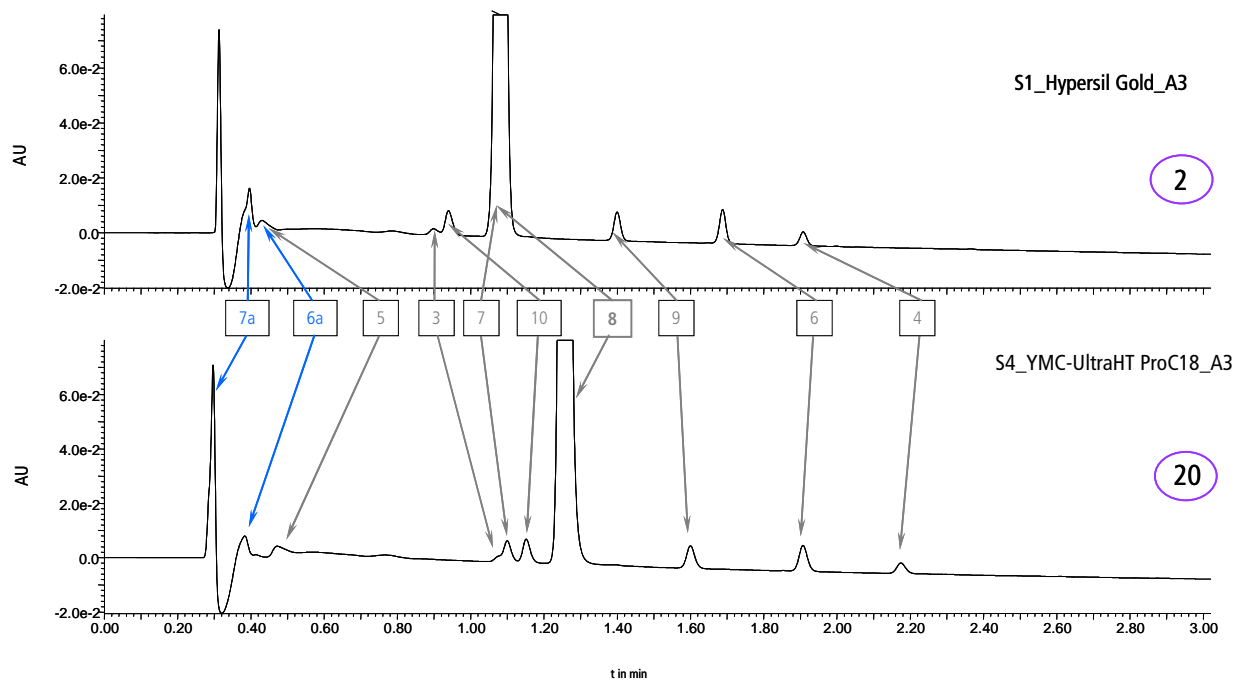


Abb. 23: Chromatogramme der ähnlichen UPLC-Systeme 20 und 2

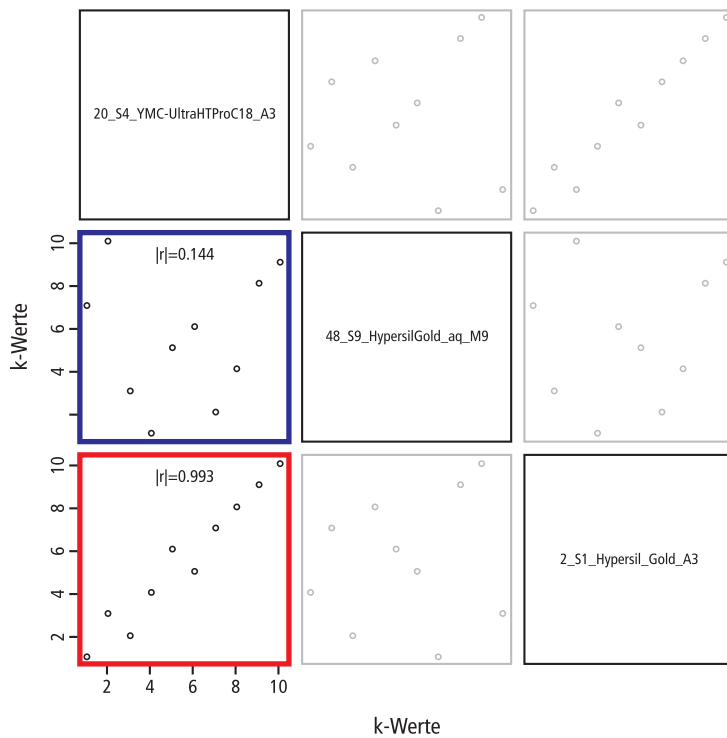


Abb. 24: Matrix der Streudiagramme der Systeme 20, 48 und 2. Blau ist das Streudiagramm der orthogonalen Systeme 20 und 48. Rot ist das Streudiagramm der ähnlichen Systeme 20 und 2.

## 2.4 Anwendung der UPLC-Color map für die Entwicklung einer orthogonalen Methode eines Arzneistoffkandidaten mit etablierter HPLC-Analytik

In diesem Kapitel wird die Anwendung der UPLC-Color map [s. Abb. 21] für die Entwicklung einer orthogonalen UPLC-Methode anhand eines Arzneistoffkandidaten demonstriert. Für die Entwicklungssubstanz existierte bereits eine etablierte HPLC-Analytik. Nach Adaption der HPLC-Methode auf eine UPLC-Methode wurden auf Basis der Color map orthogonale Systeme identifiziert und für die Entwicklung einer orthogonalen UPLC-Methode verwendet.

### 2.4.1 Arzneistoffkandidat und etablierte HPLC-Methode

Für den Arzneistoffkandidaten BAY existierten ein bekanntes Verunreinigungsprofil und eine etablierte HPLC-Methode [s. Tab. 27]. Die Struktur und alle damit verbundenen Informationen des Arzneistoffkandidaten (z. B. molare Masse) dürfen nicht veröffentlicht werden [57]. Die HPLC-Methode wurde unter Berücksichtigung von acht zu dem Zeitpunkt bekannten und isolierten Verunreinigungen (VU1-VU8) entwickelt. Die wässrige mobile Phase enthielt Phosphorsäure und war nicht flüchtig. Sie diente auch als Lösungsmittel für die Substanz. Detektiert wurde mittels UV-Detektor bei 210 nm.

Tab. 27: Etablierte HPLC-Methode von BAY

<b>Einwaage</b>	1 mg auf 10 ml
<b>Lösungsmittel</b>	20 % Acetonitril 80 % Wasser pH 1.60 (pH-Einstellung mit 85 % Phosphorsäure)
<b>Säule</b>	Symmetry C18, 3.5 µm, 100 x 4.6 mm, 100 Å
<b>Mobile Phase</b>	A: Wasser pH 1.60 (pH-Einstellung mit 85 % Phosphorsäure) B: Acetonitril
<b>Stufengradient</b>	20 min: 15-27 % (B) 5 min: 27-60 % 2 min: 60 %
<b>Laufzeit</b>	27 min
<b>Equilibrierzeit</b>	5 min
<b>Fluss</b>	1.5 ml/min
<b>Säulentemperatur</b>	50 °C
<b>Detektionswellenlänge</b>	210 nm
<b>Injektionsvolumen</b>	5 µl

### 2.4.2 Methodenadaptation: Entwicklung einer UPLC-Methode mit flüchtiger mobiler Phase

Eine Voraussetzung für die Anwendung der UPLC-Color map war eine bereits bestehende UPLC-Methode. Weiterhin sollte für die Detektion ein Massenspektrometer verwendet werden. Diese Kriterien erforderten eine Methodenadaptation der etablierten HPLC-Methode. In der künftigen UPLC-Methode sollten nur flüchtige Lösemittel verwendet werden. Es wurde dieselbe UPLC-MS Anlage wie in Kapitel 2.3.3 verwendet.

Im ersten Schritt der Adaptation wurde eine UPLC-Säule mit ähnlicher Selektivität, wie die HPLC-Säule gewählt. Es gab keine UPLC-Phase mit demselben Säulenmaterial. Die Symmetry C18 ist eine hydrophobe C18 Phase der dritten Generation. Aus dem UPLC-Screening wurden drei hydrophobe Säulen (S3, S7, S10) [s. Tab. 28] ausgewählt. Die Phasen hatten unterschiedliche Porendurchmesser, spezifische Oberflächen und Kohlenstoffgehalte.

**Tab. 28: Phaseneigenschaften der hydrophoben HPLC- und UPLC-Säulen**

Säule	Porendurchmesser [Å]	Spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Kohlenstoffgehalt [C%]
Symmetry C18	100	335	19
BEH C18 (S3)	130	185	18
Zorbax Extent-C18 (S7)	80	180	Keine Angaben
HSS Column T3 (S10)	100	Keine Angaben	Keine Angaben

Als nächster Schritt musste die Phosphorsäure in der etablierten Methode, mit der ein pH-Wert von 1.60 eingestellt wurde, durch eine flüchtige Substanz ersetzt werden. Häufig verwendete flüchtige Säuren sind: Ameisensäure, Essigsäure und Trifluoressigsäure (TFA). Die stärkste Säure war TFA. Sie wurde anstelle der Phosphorsäure für die wässrige mobile Phase und als Lösungsmittel eingesetzt. Die Konzentration der TFA als mobile Phase für eine MS-Detektion ist begrenzt (0.02-0.1 %) [58], weil sie auch eine Ionensuppression hervorrufen kann. Der pH-Wert konnte daher nur auf 1.74 eingestellt werden. Die TFA-Konzentration betrug ca. 0.15 %. Die MS-Bedingungen [s. Tab. 29] wurden mit einer Identitätslösung (ID-Lösung) optimiert. Sie enthielt 0.1 mg/ml BAY und je 0.0005 mg/ml der acht Verunreinigungen. Das Signal von VU3 zeigte dabei eine sehr schlechte Intensität, deshalb wurden VU3 separat gelöst und die MS-Bedingungen nochmals optimiert. Es wurde versucht, die Bedingungen so einzustellen, dass alle Substanzen ein deutliches Signal im ESI-Spektrum zeigten.



Tab. 29: MS-Bedingungen für BAY

Ionisierungsmodus	ESI positiv
Analysenmodus	W Modus
Zerstäubergas [l/h]	30
Desolvatationsgas [l/h]	800
Kapillarspannung [V]	3000
Konusspannung (Sample Cone) [V]	8
Aperture 1 Spannung [V]	30
Scandauer [s]	0.1
Massenbereich [m/z]	100-1000
Desolvatationstemperatur [°C]	350
Quellentemperatur [°C]	100

Der Stufengradient der HPLC-Methode wurde zunächst mit einem Programm der Firma Waters geometrisch skaliert. Danach wurde die ID-Lösung auf der BEH C18 Phase getestet und der Gradient derart angepasst, dass alle Verunreinigungen zu sehen und möglichst vom Hauptpeak abgetrennt waren. Die Substanzen zeigten eine andere Elutionsreihenfolge als in der etablierten HPLC-Methode, weil TFA verwendet wurde und auch ein anderer pH-Wert eingestellt war. Als Detektionswellenlänge wurden 260 nm gewählt. Die Chromatogramme der HPLC- und der UPLC-Methode waren somit nicht mehr direkt vergleichbar. Alle drei UPLC-Säulen wurden mit dieser Methode getestet. Die Zorbax Extent-C18 Säule zeigte dabei die beste Trennung und wurde als UPLC-Säule für die neue etablierte Methode ausgewählt. Auf der BEH C18 Säule war VU4 mit einem Systempeak koeluiert und auf der HSS T3 Säule waren VU5 und VU6 koeluiert. Der Gradient wurde nun abschließend optimiert. In Tab. 30 sind die finalen analytischen Bedingungen, die auch im anschließenden Screening verwendet wurden, aufgelistet.

Tab. 30: Analytische Bedingungen für BAY im Screening

<b>Einwaage</b>	1 mg auf 10 ml
<b>Lösungsmittel</b>	20 % Acetonitril 80 % 0.15 % Trifluoressigsäure (pH-Wert 1.74)
<b>Säule</b>	Zorbax Extent-C18, 50 x 2.1 mm, 1.8 µm
<b>Mobile Phase</b>	A: 0.15 % Trifluoressigsäure (pH-Wert 1.74) B: Acetonitril
<b>Stufengradient</b>	8.3 min: 15-80 % (B) 1 min: 80 %
<b>Laufzeit</b>	9.3 min
<b>Equilibrierzeit</b>	0.7 min
<b>Fluss</b>	0.6 ml/min
<b>Säulentemperatur</b>	50 °C
<b>Wellenlängenbereich (DAD)</b>	210-500 nm
<b>Detektionswellenlänge</b>	260 nm
<b>ESI positiv</b>	[M+H] <sup>+</sup>
<b>Injektionsvolumen</b>	2.5 µl

### 2.4.3 Verwendung der Color map für die Auswahl der UPLC-Systeme

Die UPLC-Color map [s. Abb. 21] wurde als Basis für die Entwicklung eines orthogonalen UPLC-Systems genutzt. Die in Kapitel 2.4.2 entwickelte UPLC-Methode stellte die etablierte Methode dar, für die eine orthogonale Methode entwickelt werden sollte. Diese Methode wird dem sauren System 34 des UPLC-Screenings gleichgesetzt. Diese Vorgehensweise entspricht der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Systematik zur Identifizierung der orthogonalen HPLC-Systeme aus der HPLC-Color map. In der Color map [s. Abb. 25] sind die 19 ausgewählten Systeme mit dem größeren Selektivitätsunterschied (dunkelgrün) zum System 34 pink markiert. Die Abb. 26 zeigt den vertikalen Schnitt durch die Color map an der Stelle des Systems 34. In der Darstellung wird noch einmal sichtbar, dass die 19 selektierten Systeme (pink markiert) einen kleinen  $|r|$ -Wert mit dem etablierten System aufweisen. In Tab. 31 sind die dazu gehörigen Beträge der Korrelationskoeffizienten aufgelistet.

Color map der UPLC-Systeme

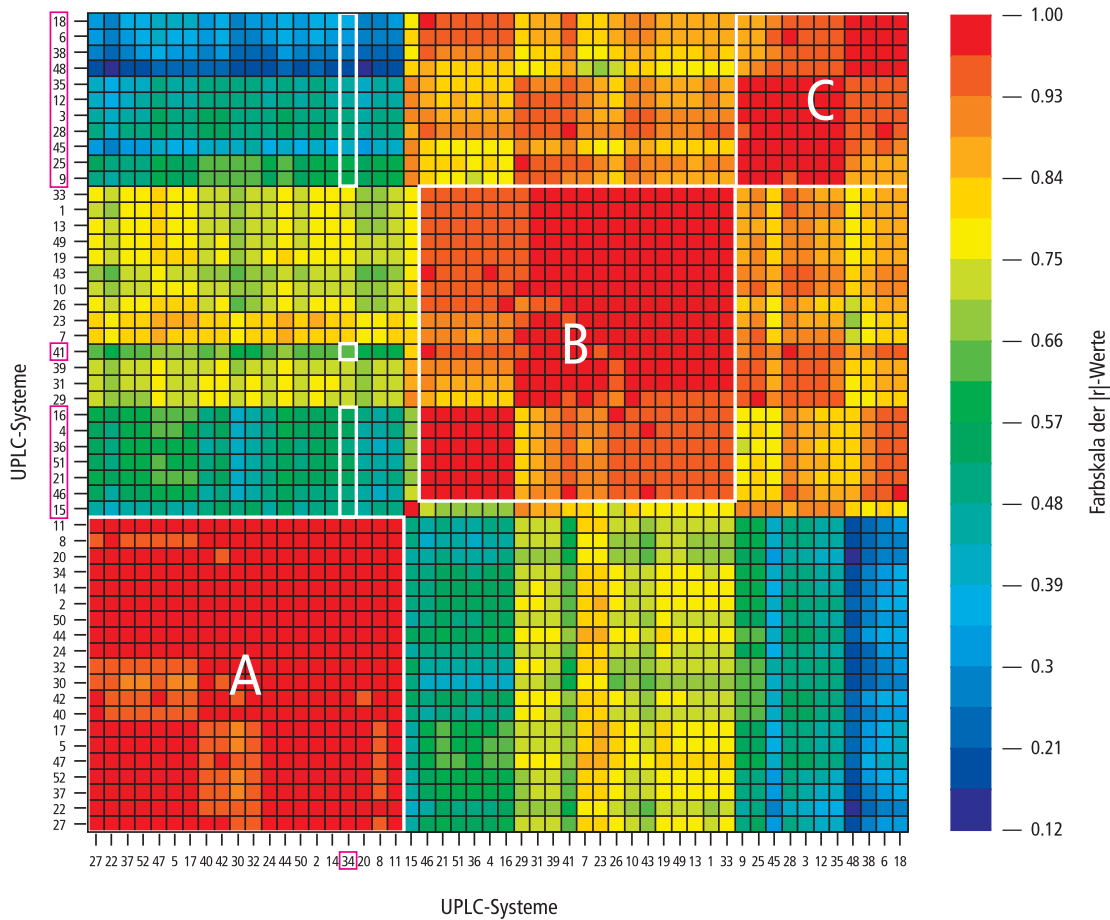


Abb. 25: Die markierten Systeme (vertikal) zeigen den größten Selektivitätsunterschied zum System 34 (horizontal).

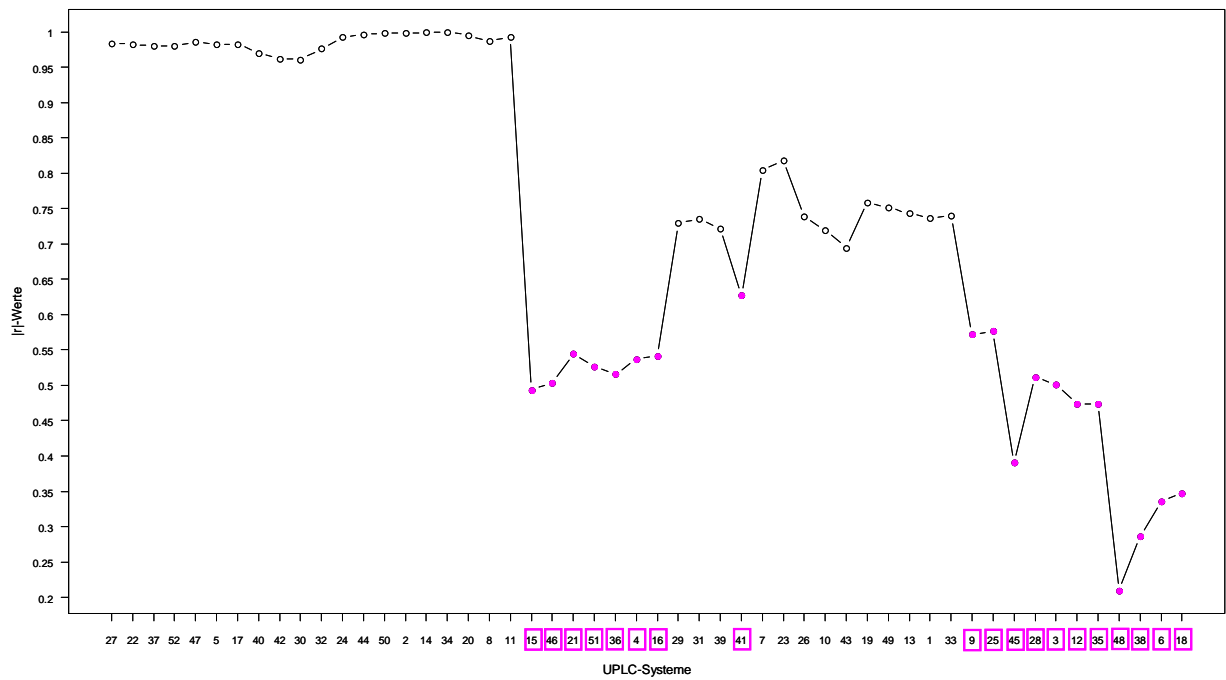


Abb. 26: Vertikaler Schnitt durch die Color map [s. Abb. 25] an der Stelle des etablierten Systems 34. Die 19 selektierten Systeme aus der Color map sind markiert (pink).

**Tab. 31: Markierte UPLC-System aus der Color map Abb. 25**

Bezeichnung in Color map	System	$k'$ -Werte mit System 34
34	S7_Zorbax Extent-C18_A3	1
3	S1_Hypersil Gold_A9	0.501
4	S1_Hypersil Gold_M7	0.537
6	S1_Hypersil Gold_M9	0.336
9	S2_BEH Shield RP18_A9	0.572
12	S2_BEH Shield RP18_M9	0.474
15	S3_BEH C18_A9	0.493
16	S3_BEH C18_M7	0.541
18	S3_BEH C18_M9	0.348
21	S4_YMC-UltraHT ProC18_M7	0.545
25	S5_BEH Phenyl_A9	0.576
28	S5_BEH Phenyl_M9	0.512
35	S7_Zorbax Extent-C18_A9	0.474
36	S7_Zorbax Extent-C18_M7	0.516
38	S7_Zorbax Extent-C18_M9	0.287
41	S8_Hypersil Gold PFP_M7	0.627
45	S9_Hypersil Gold aq_A9	0.390
46	S9_Hypersil Gold aq_M7	0.504
48	S9_Hypersil Gold aq_M9	0.209
51	S10_HSST3_M7	0.526

#### 2.4.4 Analytische Screeningbedingungen

Im Screening erhielten die 20 Systeme neue Systemnamen und Systemnummern [s. Tab. 32]. Die analytischen Bedingungen für die 19 Systeme (2-20) waren dieselben wie für das etablierte System 1 [s. Tab. 30]. Für das Screening wurde die ID-Lösung verwendet. Die Eluenten des Screenings sind in Tab. 33 aufgeführt. Für die Systeme 2-20 entsprachen sie denen des UPLC-Screenings [s. Tab. 25]. Auf jedem System wurden vier Proben injiziert. Die ersten zwei Injektionen waren Blanklösungen und die anderen zwei waren ID-Lösungen. Die Peakzuordnung erfolgte ausschließlich über die MS-Spektren.

Tab. 32: Neue Bezeichnung der Systeme im Screening mit BAY

System (alt)	System (neu)	Systemnummer im Screening
S7_Zorbax Extent-C18_A3	Zorbax Extent-C18_A2	1
S1_Hypersil Gold_A9	Hypersil Gold_A9	2
S1_Hypersil Gold_M7	Hypersil Gold_M7	3
S1_Hypersil Gold_M9	Hypersil Gold_M9	4
S2_BEH Shield RP18_A9	BEH Shield RP18_A9	5
S2_BEH Shield RP18_M9	BEH Shield RP18_M9	6
S3_BEH C18_A9	BEH C18_A9	7
S3_BEH C18_M7	BEH C18_M7	8
S3_BEH C18_M9	BEH C18_M9	9
S4_YMC-UltraHT ProC18_M7	YMC-UltraHT ProC18_M7	10
S5_BEH Phenyl_A9	BEH Phenyl_A9	11
S5_BEH Phenyl_M9	BEH Phenyl_M9	12
S7_Zorbax Extent-C18_A9	Zorbax Extent-C18_A9	13
S7_Zorbax Extent-C18_M7	Zorbax Extent-C18_M7	14
S7_Zorbax Extent-C18_M9	Zorbax Extent-C18_M9	15
S8_Hypersil Gold PFP_M7	Hypersil Gold PFP_M7	16
S9_Hypersil Gold aq_A9	Hypersil Gold aq_A9	17
S9_Hypersil Gold aq_M7	Hypersil Gold aq_M7	18
S9_Hypersil Gold aq_M9	Hypersil Gold aq_M9	19
S10_HSST3_M7	HSST3_M7	20

Tab. 33: Eluenten des Screenings mit BAY

System	Eluent A (wässrige Phase)	pH-Wert	Eluent B (organische Phase)
1	0.15 % Trifluoressigsäure	1.74	Acetonitril
3, 8, 10, 14, 16, 18, 20	Ammoniumacetat 10 mM	6.8	Methanol
4, 6, 9, 12, 15, 19	Ammoniumbicarbonatpuffer 10 mM (Einstellung mit Ammoniak)	9.0	Methanol
2, 5, 7, 11, 13, 17	Ammoniumbicarbonatpuffer 10 mM (Einstellung mit Ammoniak)	9.0	Acetonitril

### 2.4.5 Chemometrische Auswertung

Für die chemometrische Auswertung wurden die neun Retentionsfaktoren von BAY und seinen acht Verunreinigungen auf den 20 Systemen verwendet. Sie erfolgte in zwei Schritten [s. Kapitel 1.3]. Die Abb. 27 zeigt das Dendrogramm der Clusteranalyse. Das etablierte System 1 befindet sich in keinem Cluster. Es hat die größte Distanz im

Dendrogramm und somit auch den größten Selektivitätsunterschied zu allen anderen Systemen. Dies entspricht den Erwartungen, da ja aus der UPLC-Color map orthogonale Systeme ausgewählt wurden.

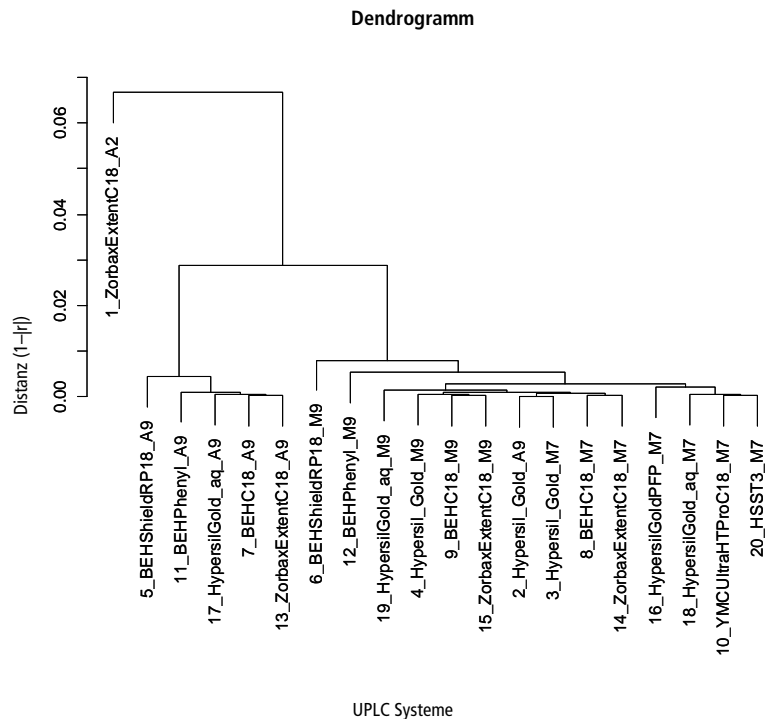


Abb. 27: Dendrogramm der 20 UPLC-Systeme des BAY-Screenings

Die Abb. 28 zeigt die aus dem Dendrogramm resultierende Color map. Auf der Farbskala wird deutlich, dass alle Systeme der Color map relativ hoch korreliert sind. Der kleinste  $|r|$ -Wert der Korrelationsmatrix beträgt 0.895. Das System 6 wurde als das System mit dem höchsten Grad an Orthogonalität zum System 1 in der Map identifiziert. Jedoch war die Substanz VU3 komplett mit dem Hauptpeak koeluiert und VU6 war ebenfalls z. T. koeluiert mit BAY. Das System 10 war das nächst gering korrelierte System zum System 1 in der Color map. VU3 war in diesem System leicht angetrennt vom Hauptpeak und VU6 sogar basisliniengetrennt. In Abb. 29 sind die Streudiagramme und die Beträge der Korrelationskoeffizienten der beiden Systeme dargestellt.

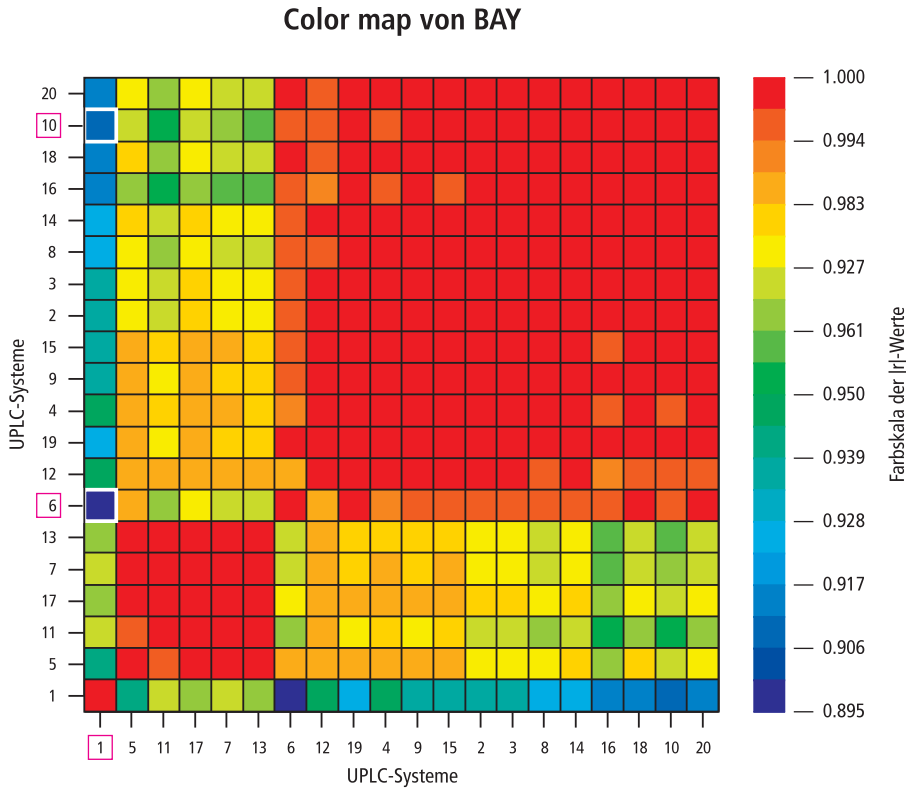


Abb. 28: Color map der 20 UPLC-Systeme des BAY-Screening

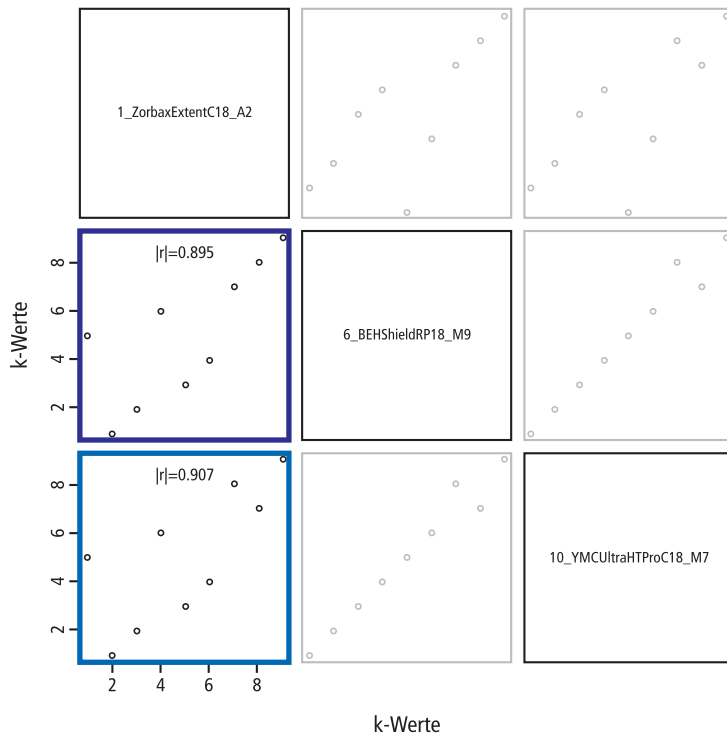


Abb. 29: Matrix der Streudiagramme der Systeme 1, 6 und 10. Die Diagramme sind mit den gleichen Farben wie in der Color map von BAY (s. Abb- 25) markiert



Die Streudiagramme von System 6 und 1 sowie 10 und 1 waren sehr ähnlich. Demzufolge sind auch die Chromatogramme der Systeme ähnlich. Aufgrund der besseren Trennleistung wurde das System 10 als orthogonales System ausgewählt und chromatographisch optimiert.

#### 2.4.6 Optimierung der orthogonalen Systeme

Die orthogonalen Systeme wurden hinsichtlich ihrer Analysenzeit und Trennleistung optimiert [s. Tab. 34]. Die MS-Bedingungen sind beibehalten worden. Die Systeme haben eine Analysenzeit von 5 min einschließlich der Äquilibrzeit. In Abb. 30 sind Chromatogramme der optimierten Systeme bei 260 nm zu sehen. In beiden Systemen eluiert VU8 unter dem Hauptpeak und VU3 eluiert in System 10 in der Flanke des Hauptpeaks. Die Signale der Substanzen lassen sich aber eindeutig in den MS-Spektren vom Hauptpeak unterscheiden. Deshalb sind diese Trennprobleme im UV-Chromatogramm akzeptabel. Die unbeschrifteten Peaks in den Chromatogrammen sind Systempeaks.

Tab. 34: Optimierte analytische Bedingungen der orthogonalen Systeme

System1: Zorbax Extent-C18_A2		System10: YMC-UltraHT ProC18_M7	
<b>Gradient</b>	20-45 % (B)	<b>Stufengradient</b>	2 min: 33-47 % (B) 2 min: 47-85 % (B) 0.3 min: 85-33 % (B)
<b>Laufzeit</b>	4 min	<b>Laufzeit</b>	4.3 min
<b>Äquilibrzeit</b>	1 min	<b>Äquilibrzeit</b>	0.7 min
<b>Fluss</b>	0.6 ml/min	<b>Fluss</b>	0.6 ml/min
<b>Säulentemperatur</b>	50 °C	<b>Säulentemperatur</b>	50 °C
<b>Wellenlängenbereich (DAD)</b>	200-500 nm	<b>Wellenlängenbereich (DAD)</b>	200-500 nm
<b>Detektionswellenlänge</b>	260 nm	<b>Detektionswellenlänge</b>	260 nm
<b>ESI positiv</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>ESI positiv</b>	[M+H] <sup>+</sup>
<b>Injektionsvolumen</b>	2.5 µl	<b>Injektionsvolumen</b>	2.5 µl

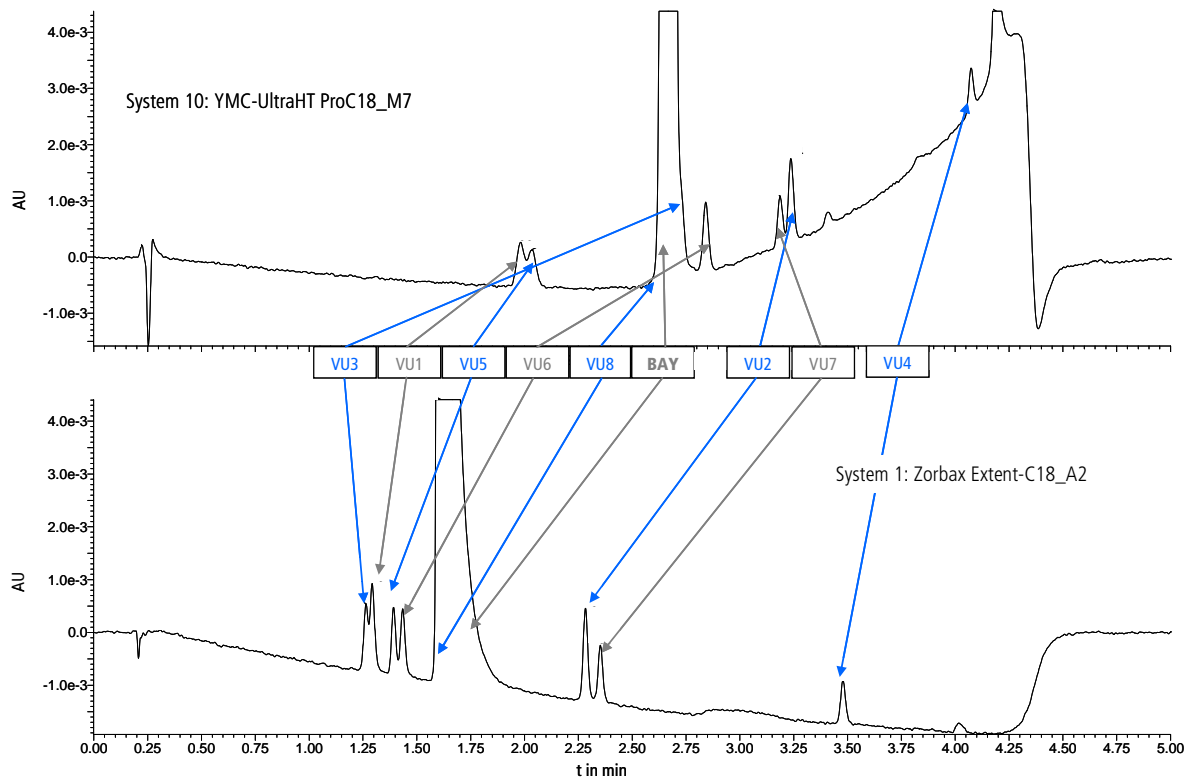


Abb. 30: Chromatogramme der optimierten orthogonalen Systeme der ID-Lösung

### 2.4.7 Überprüfung der orthogonalen Methoden mit einer verunreinigten Charge des Arzneistoffkandidaten

Zur Überprüfung und Bestätigung der orthogonalen Methoden wurde eine verunreinigte Charge von BAY verwendet. In dieser Charge sind alle Verunreinigungen in höheren Konzentrationen vorhanden als in anderen Chargen. Sie wird aufgrund ihres Verwendungszwecks auch als Tox-Charge bezeichnet. In Abb. 31 sind die Chromatogramme dargestellt. VU3, VU8, VU5 und VU4 haben eine geringere Konzentration als in der ID-Lösung. Ihre Signale sind sehr klein und im UV-Chromatogramm von System 1 ist VU3 neben VU1 nicht zu erkennen. Deutlich zu erkennen ist ein zusätzlicher Peak (P1) in System 10. Dem Peak kann auch ein Massensignal zugeordnet werden. Dieses Massensignal befindet sich im System 1 unter VU6. D. h. diese zusätzliche neue Verunreinigung P1 koeluiert mit VU6 in System 1, aber sie ist basisliniengetreunt im orthogonalen System 10. Das ist eine Bestätigung der Selektivitätsunterschiede der Systeme und des Vorteils von orthogonalen Systemen.

2.4 Anwendung der UPLC-Color map für die Entwicklung einer orthogonalen Methode eines  
Arzneistoffkandidaten mit etablierter HPLC-Analytik

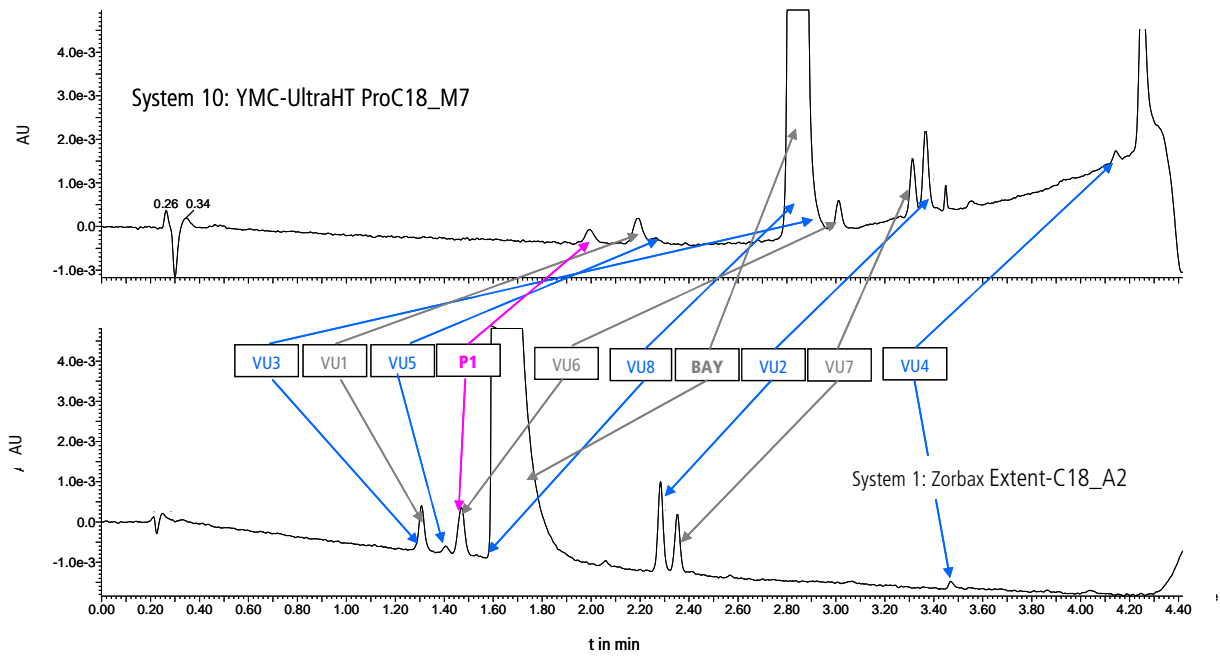


Abb. 31: Chromatogramme der orthogonalen Systeme der Tox-Charge mit neuer Verunreinigung P1

## 3 Stresstests

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der verschiedenen oxidativen Stresstests und die Anwendung der orthogonalen Systeme am Arzneistoffkandidaten ASTAR vorgestellt. Weiterhin wurden hydrolytische und oxidative Tests mit BAY durchgeführt und ebenfalls mit den orthogonalen Methoden analysiert. Um relevante Abbauprodukte zu identifizieren, die während der Lagerung zunehmen, wurden zusätzlich eingelagerte Formulierungen von BAY analysiert und mittels eines Softwareelements (MetaboLynx) ausgewertet. Die Software war geeignet, sehr kleine Massensignale aus dem Rauschen zu filtern. Die Ergebnisse wurden mit den Stresstestdaten verglichen, um die Prädiktabilität der Tests in Bezug auf relevante Abbauprodukte besser zu beurteilen. Die verwendeten Geräte, Materialien und Softwareelemente sind im Anhang tabellarisch dargestellt.

### 3.1 Oxidative Stresstests

Die oxidativen Stresstests sind ein Bestandteil des in Kapitel 1.4 beschriebenen Stresstests. Die oxidative Zersetzung von Arzneistoffen kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Es gibt z. B. spontane Autoxidationen, radikalindizierte Autoxidationen und Oxidationen aufgrund eines Elektronentransfers [36]. Diese Reaktionen werden oft von Verunreinigungen katalysiert. Durch verschiedene Reagenzien können in oxidativen Stresstests unterschiedliche Mechanismen simuliert werden.

#### 3.1.1 Auswahl des Arzneistoffkandidaten

Für die Untersuchung verschiedener oxidativer Stresstests wurde ASTAR ausgewählt. Nach der Durchführung von Tests mit Wasserstoffperoxid war bekannt, dass ASTAR oxidationsempfindlich ist. Diese Tests zeigten eine starke Zersetzung der Hauptschubstanz sowie aller Verunreinigungen. Jedoch stellte sich VU2 in anschließenden toxikologischen Untersuchungen als relevantes Zersetzungsprodukt heraus [59]. Die Zunahme von VU2 beruhte vermutlich auf der Oxidation von ASTAR. Diese Reaktion konnte aber nicht in den Tests mit Wasserstoffperoxid simuliert werden.

### 3.1.2 Auswahl der Reagenzien und Bedingungen für Stresstests

Für den oxidativen Stresstest werden in der Literatur mehrere Reagenzien vorgeschlagen. In dieser Arbeit wurde eine Auswahl von bekannten Reagenzien getroffen [s. Tab. 35]. Die Konzentration von ASTAR während der Tests war 1 mg/ml. Es wurden zwei Radikalstarter verwendet, um die radikalische Autoxidation zu simulieren. AIBN ist ein wasserunlöslicher und ABAP ein wasserlöslicher Initiator. Zum Stoppen der Reaktion wurde Hydrochinon verwendet. Für die Simulation der Oxidation mit Peroxiden wurde Wasserstoffperoxid mit einer Konzentration von 3 % im wässrigen und organischen Milieu und Fenton-Reagenz in drei Konzentrationen verwendet. Je zwei anorganische und organische Schwermetallsalze wurden zur Simulation von Metallionen induzierten Oxidation genutzt, und das Reagenz Rose Bengal simulierte eine Photooxidation mit Singulett-Sauerstoff als Oxidans. Weiterhin wurde ein Gemisch aus Tween® 80 und Eisen(II)-Ionen verwendet, welches Peroxiradikale generierte [60]. Diese Radikale werden auch mit den Radikalstartern (AIBN und ABAP) gebildet und spielen bei der Oxidation von Arzneistoffen eine wichtige Rolle. Tween® 80 ist der Handelsname von Polysorbat 80. Das ist ein häufig verwendeter Hilfsstoff in der Arzneistoffformulierung. Er ist mit organischen Hydroperoxidgruppen verunreinigt. Diese Peroxidverunreinigungen bildeten mit Eisen(II)-Ionen Peroxiradikale, die für die Stressreaktion genutzt wurden. Die in der Literatur aufgeführten Reaktionsbedingungen für die Tests waren sehr unterschiedlich. Die Konzentrationen und Temperaturen in den Tests sowie die Probenahmezeitpunkte wurden anhand der erwarteten Reaktionsverläufe gewählt.

Tab. 35: Verwendete Reagenzien für den oxidativen Stresstest mit ASTAR

Oxidativer Stress	Nr.	Referenz	Reagenz		Stressbedingungen	Probenahmezeitpunkte
Radikalstarter	1	[7,8,36,37,40,60-65]	AIBN	1542 mol%	40 °C dunkel	1, 2, 3, 5, 6, 7, 24 h
	2	[8,36,61,64,66,67]	ABAP	50 mol%		2, 4, 5, 24, 26, 27 h
100 mol%						
Wasserstoffperoxid	3	[7,8,35-40,60,62-65,67-69]	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	wässrig		1, 4, 5, 24, 26, 28, 48, 72 h
				organisch		
	4	[7,36,61]	Fenton-Reagenz: (Eisen(II)-Sulfat Heptahydrat/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1 mM / 0.3 % 5 mM / 0.3 % 5 mM / 3 %		3, 4, 8, 24 h
Schwermetallsalze	5	[36-39,61,62,64]	Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat	1000 ppm		
			Eisen(III)-Acetylacetonat			
			Kupfer(II)-Nitrat Trihydrat			
			Kupfer(II)-Acetylacetonat			
Singuletsauerstoff	6	[7,36,38,61,70]	Rose Bengal	0.1 mg/ml	10000-20000 lx (Lichtschrank)	15, 30, 40, 50, 60 min
Tween® 80 /Fe <sup>3+</sup>	7	[60]	Tween® 80	10 %	Rühren bei Raumtemperatur	2, 6, 24 h
			Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat	10 mM		

### 3.1.3 Experimentelle Durchführung

Die Reaktionen Nr. 1-7 [s. Tab. 35] wurden jeweils an verschiedenen Tagen durchgeführt und analysiert. Der Probenzug erfolgte für alle Lösungen auf gleiche Weise. Es wurden 0.4 ml entnommen und dann im Vial auf 1.8 ml mit Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V)) aufgefüllt. Im Fall der Radikalstarter wurde vor der Analyse zusätzlich noch die Hydrochinonlösung zugegeben. Von der Stresslösung wurden immer zwei Proben gleichzeitig gezogen. Um eine weitere Zersetzung der zweiten Probe bis zur Analyse mit der orthogonalen Methode zu verhindern, wurde sie im Kühlschrank aufbewahrt. Die Referenzproben wurden immer aus dem gleichen Vial auf beide Systeme injiziert. Die Reaktionen Nr. 1-5 [s. Tab. 35] wurden in 10ml Reagenzgläsern durchgeführt. Sie befanden sich in einem Heizblock bei 40 °C und waren mit einem Glasstopfen verschlossen. Während der Reaktion waren sie zum Lichtschutz mit Alufolie umwickelt. Die Reagenzgläser waren mit 6 ml Lösung befüllt. Die Reaktion Nr. 6 fand im Lichtschrank in 20ml-Szintillationsvials statt. Die Reaktion Nr. 7 wurde in 50ml Erlenmeyerkolben durchge-

führt. Für die Reaktionen (1-6) wurden ASTAR-Stammlösungen verwendet. Zur Herstellung der Stammlösungen wurde Wasser anstelle des Ammoniumacetatpuffers verwendet, um den eventuellen Einfluss des Puffers in der Reaktion auszuschließen. ASTAR wurde in Acetonitril bzw. Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V)) gelöst. Die jeweilige Stammlösung wurde für die Reaktionen Nr. 1-6 zur Herstellung der Stresslösung und der Referenzlösung verwendet. Es wurden zu allen Reaktionen Referenz- und Kontrolllösungen angesetzt. Die Kontrolllösungen bestanden aus den Stressreagenzien ohne die Zugabe von ASTAR. Alle Referenzlösungen wurden wie Stresslösungen behandelt und bestanden wie die dazugehörige Stresslösung aus derselben ASTAR-Lösung. Im Folgenden werden die Zusammensetzung und Durchführung der einzelnen Stressreaktion genauer beschrieben.

#### *Radikalstarter (Nr. 1-2)*

Ursprünglich sollte die Kinetik bei den Stressreaktionen mit den Radikalstartern betrachtet werden. Deshalb wurde durch Zugabe von einer Hydrochinonlösung nach dem Probenzug die Reaktion gestoppt, um eine unerwünschte Fortführung in den HPLC-Vials auszuschließen. Hydrochinon war ein Radikalfänger, der überschüssige Radikale abfangen sollte. Das Molverhältnis von Hydrochinon zu AIBN betrug 1:1 und bei ABAP 2:1. Die Kinetik wurde jedoch nicht untersucht, weil letztendlich keine quantitative Auswertung durchgeführt wurde. Somit war die Anwesenheit von Hydrochinon in den Proben nicht relevant. Eine detaillierte Zusammensetzung der Stress- und Referenzlösungen befindet sich in Tab. 36.

**Tab. 36: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit AIBN und ABAP**

	Lösemittel	Stresslösungen in ml			Referenzlösungen ASTAR in ml	
		AIBN	ABAP		AIBN	ABAP
		1542 mol%	100 mol%	50 mol%		
<b>AIBN (22.8 mg/ml)</b>	Acetonitril	1.5	---	---	---	---
<b>ABAP (12.22 mg/ml)</b>	Wasser	---	0.3	0.15	---	---
<b>ASTAR (2 mg/ml)</b>	Acetonitril	3	---	---	3	---
	Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V))		3	3	---	3
<b>Lösemittel</b>	Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V))	1.5	---	---	3	---
	Wasser	---	2.7	2.85	---	3

*Wasserstoffperoxid (Nr. 3-4)*

Wasserstoffperoxid hatte in den Stresslösungen eine Konzentration von 3 %. In der Literatur werden Konzentrationen von 0.3-3 % empfohlen. Es wurden zwei Stresslösungen hergestellt. Sie unterschieden sich in ihrem Wasseranteil. Dadurch wurde die Oxidation im wässrigen und im organischen Milieu simuliert. Dazu wurde eine wässrige Wasserstoffperoxidlösung (30 %) einmal mit Acetonitril und einmal mit Wasser auf 6 % verdünnt. Eine detaillierte Zusammensetzung der Stress- und Referenzlösungen befindet sich in Tab. 37.

**Tab. 37: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit Wasserstoffperoxid**

	Lösemittel	Stresslösung in ml		Referenzlösung ASTAR in ml
		wässrig	organisch	
<b>6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasser	3	---	---
	Acetonitril	---	3	---
<b>ASTAR (4 mg/ml)</b>	Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V))	1.5	---	---
<b>ASTAR (2 mg/ml)</b>	Acetonitril	---	3	3
<b>Lösemittel</b>	Wasser	1.5	---	3

In der Literatur sind keine genauen Angaben für eine geeignete Konzentration des FentonReagenzes während des Stresstests angegeben. Es werden lediglich Konzentrationsbereiche vorgeschlagen. Für Wasserstoffperoxid wird eine Konzentration von 0.3-3 % und für die Eisen(II)-Ionen wird 1-5 mM empfohlen. Im Stresstest mit ASTAR wurden drei Konzentrationen verwendet. Zur Herstellung der verwendeten Wasserstoffperoxidlösung (9 %) wurde eine wässrige Wasserstoffperoxidlösung (30 %) mit Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V)) verdünnt. Die Stresslösung wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, um ein für die Reaktion erforderliches saures Milieu zu schaffen. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in Tab. 38 genauer aufgeführt.



Tab. 38: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit Fenton-Reagenz

	Lösemittel	Stresslösung in ml			Referenzlösung ASTAR in ml
		1 mM / 0.3 %	5 mM / 0.3 %	5 mM / 3 %	
Eisen(II)-Sulfat Heptahydrat (5 mM)	Wasser	0.4	2	2	---
9 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V))	0.2	0.2	2	---
ASTAR (3 mg/ml)		2	2	2	2
Lösemittel		3.4	1.8	---	4

*Schwermetallsalze (Nr. 5)*

Für die Stressreaktion mit den Schwermetallsalzen wurden organische und anorganische Salze ausgewählt. Die 2000 ppm Schwermetallionenlösungen wurden über einen Verdünnungsschritt hergestellt. Zuerst wurde eine 100 ml Stammlösung hergestellt. Dann wurde 0.1 ml der Stammlösung auf 10 ml zu 2000 ppm verdünnt. Die weitere Zusammensetzung der Lösungen ist in Tab. 39 aufgeführt.

Tab. 39: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit den Schwermetallsalzen

	Lösemittel	Stresslösung in ml				Referenzlösung ASTAR in ml
		Fe <sup>3+</sup>		Cu <sup>2+</sup>		
		anorganisch	organisch	anorganisch	organisch	
Eisen(III)-Chlorid- Hexahydrat (2000 ppm)	Wasser	3	---	---	---	---
Eisen(III)- Acetylacetonat (2000 ppm)	Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V))	---	3	---	---	---
Kupfer(II)-Nitrat Tri- hydrat (2000 ppm)	Wasser	---	---	3	---	---
Kupfer(II)- Acetylacetonat (2000 ppm)	Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V))	---	---	---	3	---
ASTAR (2 mg/ml)	Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V))	3	3	3	3	3
Lösemittel		---	---	---	---	3

*Singulett-Sauerstoff (Nr. 6)*

Für die Simulation der Oxidation mit Singulett-Sauerstoff wurde das Reagenz Rose Bengal als Sensitizer eingesetzt. Die Entstehung von Singulett-Sauerstoff wurde im Wellen-

längenbereich des sichtbaren Lichts bei einer Intensität von 10000-20000 lx angeregt. Die Lösungen waren in Szintillationsvials abgefüllt und wurden im Lichtschrank gelagert. Sie waren mit teflonbeschichteten Plastikkappen verschlossen und wurden während der Reaktion auf den Kopf gestellt, damit das Licht auch von oben einstrahlen konnte. Im Schrank herrschte während der Exposition eine konstante Temperatur von 20 °C. Die Dunkelkontrollen von ASTAR, Rose Bengal und ASTAR mit Rose Bengal lagerten auch im Lichtschrank. Die Vials waren mit Alufolie umwickelt. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in Tab. 40 aufgeführt.

Tab. 40: Zusammensetzung der Lösungen für die Stressreaktionen mit Rose Bengal

	Lösemittel	Stresslösung in ml	Referenzlösung ASTAR in ml
Rose Bengal (0.2 mg/ml)	Wasser/Acetonitril (50/50 (V/V))	5	---
ASTAR (2 mg/ml)		5	5
Lösemittel		---	5

#### *Tween® 80 und Eisen(III)-Ionen (Nr. 7)*

Die Reaktionen mit Tween® 80 und Eisen(III)-Ionen mit und ohne ASTAR fanden in 50 ml Erlenmeyerkolben statt. Die zwei Kolben standen während der Reaktion offen und die Lösungen wurden mit einem Magnetrührer gerührt. Für diese Stressreaktion wurde weder eine ASTAR-Stammlösung noch eine Referenzlösung mit ASTAR verwendet. Als Referenz wurde in diesem Fall die Probe der Stresslösung zum Zeitpunkt null verwendet. Im ersten Schritt wurden 25 ml zehnpromtente wässrige Tween®-Lösung in beide Kolben vorgelegt. Dazu wurde Tween® 80 unter Rühren in Wasser gelöst, bis sich Luftblasen (Schaum) bildeten. Als nächstes wurden 25 mg ASTAR unter Rühren im Kolben der Stresslösung aufgelöst und dann wurden je 67.6 mg Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat in beiden Kolben gelöst.

#### 3.1.4 Analytische Bedingungen

Die Proben wurden mit den orthogonalen HPLC-Systemen auf eine HPLC-DAD-MS Anlage analysiert. Es wurde dieselbe Anlage wie in Kapitel 2.2.3 verwendet. Als analytische Bedingungen wurden die RP-Säulen und Einstellungen [s. Tab. 19] der Methodenentwicklung von ASTAR [s. Kapitel 2.2] angewandt.

### 3.1.5 Ergebnisse

Generell ist zu sagen, dass ASTAR eine recht oxidationsempfindliche Substanz ist und z. T. sehr stark mit den Reagenzien reagiert hat. Es sind zahlreiche unbekannte Massensignale als Folge der Reaktionen detektiert worden. Die Signale konnten jedoch nicht eindeutig in beiden Systemen gefunden oder zugeordnet werden. Die Intensitäten der Signale waren aufgrund der verschiedenen analytischen Bedingungen der beiden Systeme unterschiedlich. Daher kam es vor, dass ein Signal nur in einem System gefunden wurde. In dem orthogonalen System war z. B. die Intensität zu gering oder das Signal war mit einem größeren Signal koeluiert. Dann kam es zur Ionensuppression und somit war das Signal vom Rauschen nicht zu unterscheiden. Hinzu kam, dass ASTAR instabil ist, d. h., es zersetzte sich bei Lagerung im Licht, bei Wärme und in Lösung. Dieses Verhalten war deutlich in den Referenzproben von ASTAR zu erkennen, die nach dem Probenzug bei Raumtemperatur im Autosampler lagerten. Die Proben konnten auf beiden Systemen nicht zeitnah vermessen werden. Deshalb konnte eine weitere Zersetzung während der Lagerung im Kühlschrank oder Autosampler nicht ausgeschlossen werden.

Das Ziel des oxidativen Stresstests war es, relevante Abbauprodukte zu identifizieren. Zur Beurteilung der verschiedenen oxidativen Stresstests wurde nur das Verhalten der VU2 betrachtet. VU2 war eine bekannte Verunreinigung sowie ein relevantes Abbauprodukt, das während der Lagerung zunahm. Es wurde vermutet, dass die Bildung von VU2 auf einer Oxidation beruhte. Diese Vermutung konnte durch die oxidativen Stresstests bestätigt werden. Dazu wurden nur die Proben ausgewertet, bei denen ASTAR zu 5-20 % zersetzt war. Dieser Zersetzungsgrad wird im allgemeinen als Endpunkt des Stresstests gewählt, weil stärker zersetzte Proben meist irrelevante Abbauprodukte enthalten. Die Ergebnisse des Tests beruhen auf Einfachmessungen und wurden nicht quantifiziert. Sie sollten lediglich Tendenzen der Reaktionen aufzeigen. Die Flächen von ASTAR stammten aus dem UV-Chromatogramm bei 254 nm. Die Auswertung des Massenchromatogramms hätte zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen geführt, weil die Konzentration von ASTAR sehr hoch gewählt wurde, um auch Verunreinigungen in sehr kleinen Konzentrationen erfassen zu können. Die Flächen von VU2 stammten jedoch aus dem Massenchromatogramm des ionisierten Moleküls ( $M + H^+$ ) von VU2. Alle Flächen wurden durch automatische Integration erhalten. Z. T. wurden die Peaks manuell nachintegriert. Die Zahlenwerte der Flächenangaben von ASTAR und VU2 waren aufgrund der verschiedenen analytischen Bedingungen der Systeme auf dem System 2 immer größer und deshalb nicht mit denen von System 1 vergleichbar. Auch Die Flächenwerte

von VU2 der einzelnen Stressproben waren auf dem gleichen System nicht vergleichbar, weil die Proben verschiedene Ionen (Reagenzien) enthielten und an verschiedenen Tagen vermessen wurden.

Die Ergebnisse [s. Tab. 41] zeigten, dass nicht alle Stressreaktionen die relative Intensität von VU2 erhöhten. In Tab. 41 wurden relative Intensitäten von ASTAR als auch von VU2 angegeben. Sie bezogen sich bei den Probennr. 1-6 [s. Tab. 41] auf die Referenzprobe von ASTAR zum Zeitpunkt Null. Für die Probennr. 7 [s. Tab. 35] bezogen sich die Werte auf die Werte der Probe zum Zeitpunkt Null. Die Probennr. 4 und 7 [s. Tab. 35] wurden nur auf dem System 1 gemessen. Die Proben erzeugten viele Massensignale. Die Reaktion mit Fenton-Reagenz war sehr unselektiv und führte vermutlich zu irrelevanten Abbauprodukten. Die Probe mit Tween® 80 zeigte ein sehr großes Rauschen im MS. Aufgrund der vorhergehenden Untersuchungen ist davon auszugehen, dass weitere Messungen zu keinem Erkenntnisgewinn geführt hätten.

Tab. 41: Relative Intensität von VU2 in den oxidativen Stresstests

Stressreagenz	Probennr.	Probennahmezeitpunkt	YMC_ref_Ac_pH5_20 (System 1)			BetaMax_Ac_pH3_20 (System 2)		
			Relative Intensität ASTAR% (254 nm)	Flächeneinheiten (MS) von VU2	Relative Intensität VU2%	Relative Intensität ASTAR% (254 nm)	Flächeneinheiten (MS) von VU2	Relative Intensität VU2%
AIBN (1542 mol %)	1	5 h	109	71	580	89	974	414
ABAP (50 mol %)	2	24 h	84	133	847	91	2360	1035
Wasserstoffperoxid in Wasser	3a	1 h	30	4	29	43	80	110
Wasserstoffperoxid in Acetonitril	3b	1 h	57	8	48	68	97	134
Fenton-Reagenz (1 mM / 0.3 %)	4	5 h	84	318	949	Keine Angaben (wurde nicht analysiert)		
Schwermetallsalze	5a-d	14 d	88-103	41-48	256-295	83-90	298-328	130-143
Singuletsauerstoff	6	50 min	90	314	2703	87	1462	905
Tween® 80 und Fe <sup>3+</sup>	7	6 h	98	2175	408	Keine Angaben (wurde nicht analysiert)		

Eine deutliche Zunahme der relativen Intensität von VU2 wurde in den Probennr. 1, 2, 4, 6 und 7 [s. Tab. 41] detektiert. In der Probennr. 1 [s. Tab. 41] auf System 1 scheint sich ASTAR während der Reaktion nicht zersetzt zu haben. Das kann auf eine Pipettiergenauigkeit bei der Probennahme zurückzuführen sein, diese ist aber für die Auswertung des Versuches nicht relevant. Daher bestand keine Veranlassung das Experiment zu

wiederholen. Die Injektion der Referenzprobe (Lagerung bei Raumtemperatur im Autosampler) für das System 2 erfolgte aus dem gleichen Vial wie für das System 1. Die Messung auf dem System 2 zeigt jedoch eine Zersetzung von ASTAR. Die Probe für diese Messung war separat in ein Vial pipettiert worden und wurde im Gegensatz zur Referenzprobe im Kühlschrank gelagert, um einer weiteren Zersetzung vorzubeugen. Die Ergebnisse der Tests mit den Schwermetallsalzen [s. Probennr. 5 in Tab. 41] wurden zusammengefasst. Diese Proben zeigten zwar eine Zunahme, aber diese entsprach der Zunahme von VU2 in den Referenzproben von ASTAR nach einer Reaktionszeit von 14 Tagen. Die Probennr. 3a und 3b [s. Tab. 41] mit Wasserstoffperoxid zeigten eine extreme Zersetzung von ASTAR. Die Zersetzung war im wässrigen Milieu stärker als im organischen Milieu. Mit dem System 1 wurde eine starke Zersetzung von VU2 mit Wasserstoffperoxid detektiert, wohingegen mit dem System 2 weder eine deutliche Zunahme noch eine Zersetzung von VU2 detektiert wurde. Dieses Ergebnis kann an dieser Stelle eindeutig nicht erklärt werden. Vermutlich bildet sich auch bei dieser Reaktion VU2. Es wird aber weiter zu irrelevanten Abbauprodukten zersetzt. Allein mit dieser Stressreaktion wäre die Relevanz von VU2 nicht zu erkennen. In Fall von ASTAR war es wichtig, weitere Stressreaktionen wie z. B. die Reaktion mit den Radikalstartern durchzuführen, um die Bedeutung von VU2 als relevantes Abbauprodukt richtig einzuschätzen.

In Abb. 32 sind exemplarisch drei UV-Chromatogramme des Systems 1 des Stresstests mit ABAP dargestellt. In den Chromatogrammen sind nur die Peaks der bekannten Verunreinigungen beschriftet. Es ist eine deutliche Zunahme von VU2 im Chromatogramm C zu erkennen (pink markiert). VU1 gehört ebenfalls zu den relevanten Verunreinigungen, weil es im Chromatogramm C stark zunahm. Jedoch scheint seine Bildung nicht auf einer Oxidation zu beruhen, weil VU1 auch im Chromatogramm B der Referenzprobe stark anstieg. Worauf die Bildung tatsächlich beruht, musste in dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

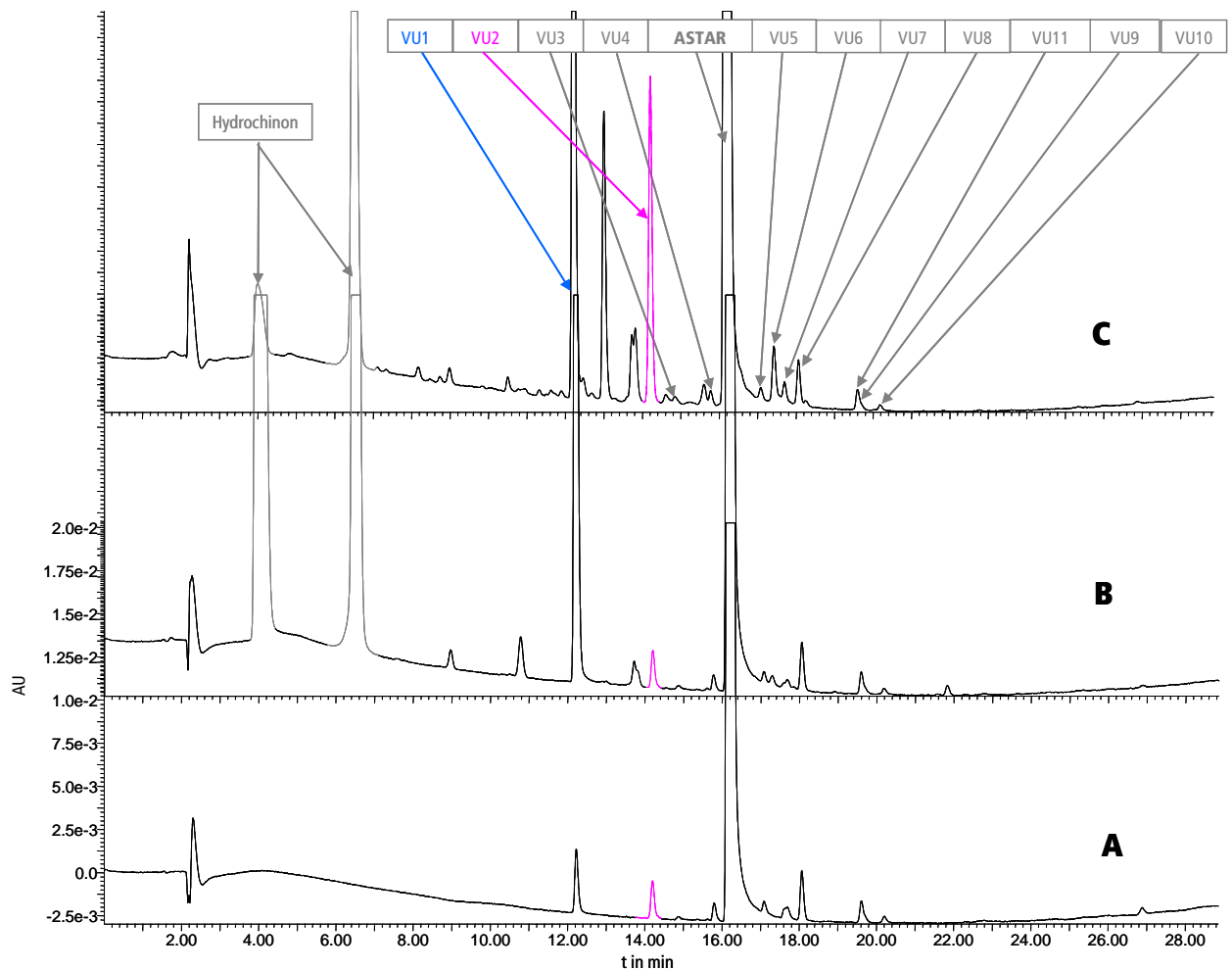


Abb. 32: Chromatogramme von System 1 des Stresstests mit ABAP. Chromatogramm A ist die Referenzprobe von ASTAR zum Zeitpunkt Null. Chromatogramm B ist die Referenzprobe von ASTAR und Hydrochinon nach 24 h und Chromatogramm C ist die Stressprobe mit ABAP nach 24 h.

In Abb. 33 sind die Chromatogramme von System 1 des Stresstests mit Wasserstoffperoxid im wässrigen Milieu dargestellt. Der Peak von VU2 (pink markiert) scheint im UV-Chromatogramm B größer zu sein. Jedoch nimmt die relative Intensität von VU2 deutlich ab [s. Tab. 41]. Dieses Ergebnis lässt sich durch eine Koelution von VU2 mit einem unbekanntem Signal erklären. Das Signal ist deutlich im MS-Spektrum zu erkennen [s. Abb. 34]. VU1 zersetzt sich in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. In der Referenzprobe (Chromatogramm A) ist VU1 deutlich größer als in der Referenzprobe bei ABAP. Das ist auf eine längere Standzeit der Probe vor der Analyse zurückzuführen. In den Chromatogrammen der Abb. 32 und Abb. 33 sind nur die bekannten Verunreinigungen gekennzeichnet. Z. T. sind die Peaks der Chromatogramme B und C mit unbekanntem Abbauprodukten koeluiert.

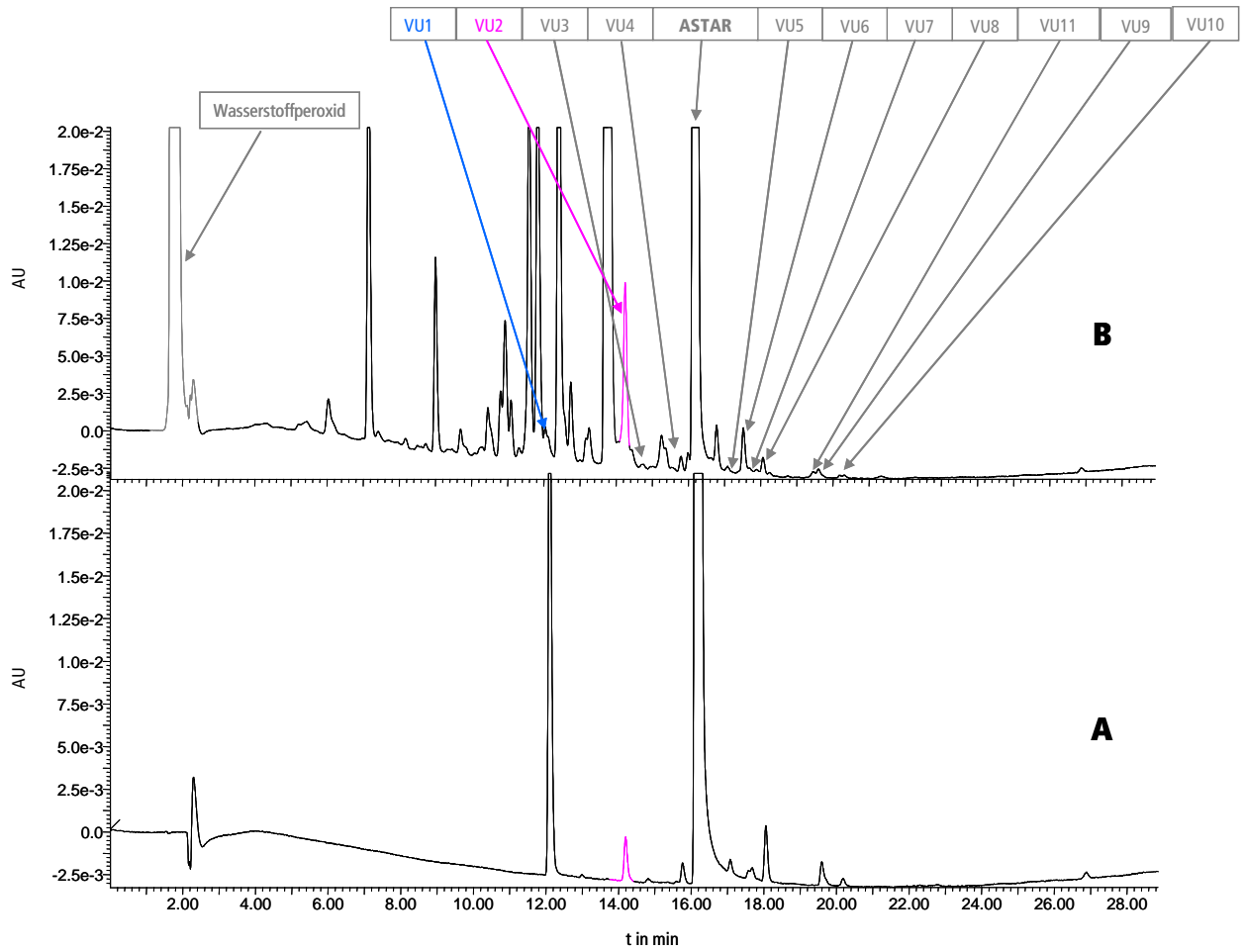


Abb. 33: Chromatogramme von System 1 des Stresstests mit Wasserstoffperoxid im wässrigen Milieu. Chromatogramm A ist die Referenzprobe von ASTAR zum Zeitpunkt  $t=0$ . Chromatogramm B ist die Stressprobe mit Wasserstoffperoxid nach 1 h.

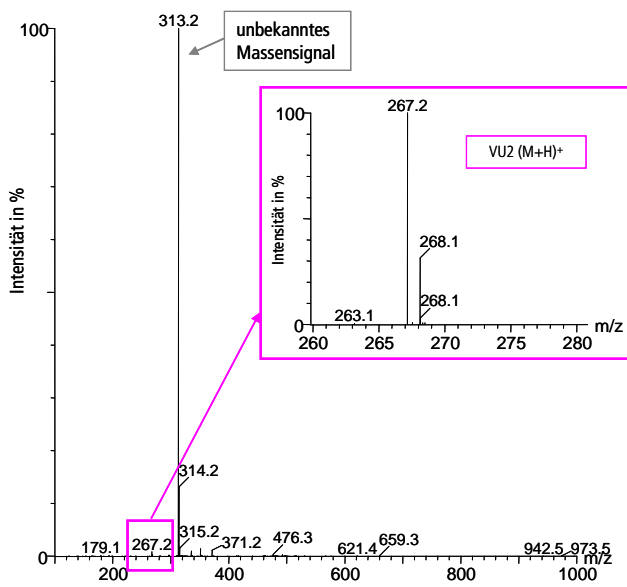


Abb. 34: Massenspektrum von VU2 des Chromatogramm B (pink markiert) aus Abb. 33

### 3.1.6 Anwendung orthogonaler Systeme zur Interpretation von Stresstestdaten

Die Anwendung orthogonaler Systeme kann die Interpretation der Stresstestdaten erleichtern. Der Selektivitätsunterschied der Systeme führt zu verschiedenen Elutionsmustern einer Probe. Demzufolge könnten in einem System z. B. zwei Substanzen koeluiert sein und nur als einzelner Peak erfasst werden. Hingegen könnten diese Substanzen im orthogonalen System mit erhöhter Wahrscheinlichkeit anders retardiert werden und dann zwei Peaks bilden. Weiterhin ist die Intensität eines Peaks in Abhängigkeit der analytischen Bedingungen unterschiedlich. Deshalb könnten auch relevante Abbauprodukte evtl. aufgrund ihres schwachen Signals in einem System übersehen werden. Das Signal kann im orthogonalen System jedoch deutlich größer sein.

Zur Veranschaulichung wurden exemplarisch drei unbekannte Abbauprodukte (P1, P2 und P3) von ASTAR aus dem Stresstest mit ABAP (Probe nach 24 h) ausgewählt. In den Stressproben sind noch deutlich mehr unbekannte Signale detektiert worden. Die Zuordnung der drei Peaks erfolgte über das MS-Spektrum und das Massenchromatogramm. Das bedeutet, dass zwischen den orthogonalen Systemen die Peaks über die MS-Spektren zugeordnet wurden. Im einzelnen System wurde der Peak im UV-Chromatogramm über die Retentionszeit des Peaks im Massenchromatogramm identifiziert. Die Struktur der Substanzen wurde nicht weiter aufgeklärt. Über die Relevanz der Abbauprodukte konnte keine Aussage getroffen werden, weil dazu die Daten der Langzeitstabilität fehlten. In Abb. 35 sind die Chromatogramme der orthogonalen Systeme dargestellt. Alle bekannten Verunreinigungen sowie die drei unbekanntesten Abbauprodukte wurden gekennzeichnet. Die ESI-Spektren der einzelnen Abbauprodukte in den orthogonalen Systemen sind in den Abb. 36, Abb. 37 und Abb. 38 abgebildet. Beim Vergleich der Spektren ist die Koelution des Abbauproduktes mit jeweils einer bekannten Verunreinigung in jeweils einem System erkennbar, wohingegen im orthogonalen System keine Koelution vorliegt. P1 wurde im System 1 von anderen Verunreinigungen abgetrennt. Es hatte ein deutliches Signal sowohl im UV-Chromatogramm als auch im MS-Spektrum. Im System 2 eluierte P1 als Schulter der Hauptsubstanz und war mit VU7 koeluiert. Dadurch erschien VU7 im UV-Chromatogramm größer. P2 eluierte im System 1 als Schulter von VU4 und im System 2 als Schulter von VU10. Es war in keinem System basisliniengetrennt. P3 war im System 1 mit VU6 koeluiert, so das VU6 im UV-Chromatogramm größer erschien. Im System 2 war P3 ein deutliches Signal sowohl im UV-Chromatogramm als auch im MS-Spektrum, und es war basisliniengetrennt.



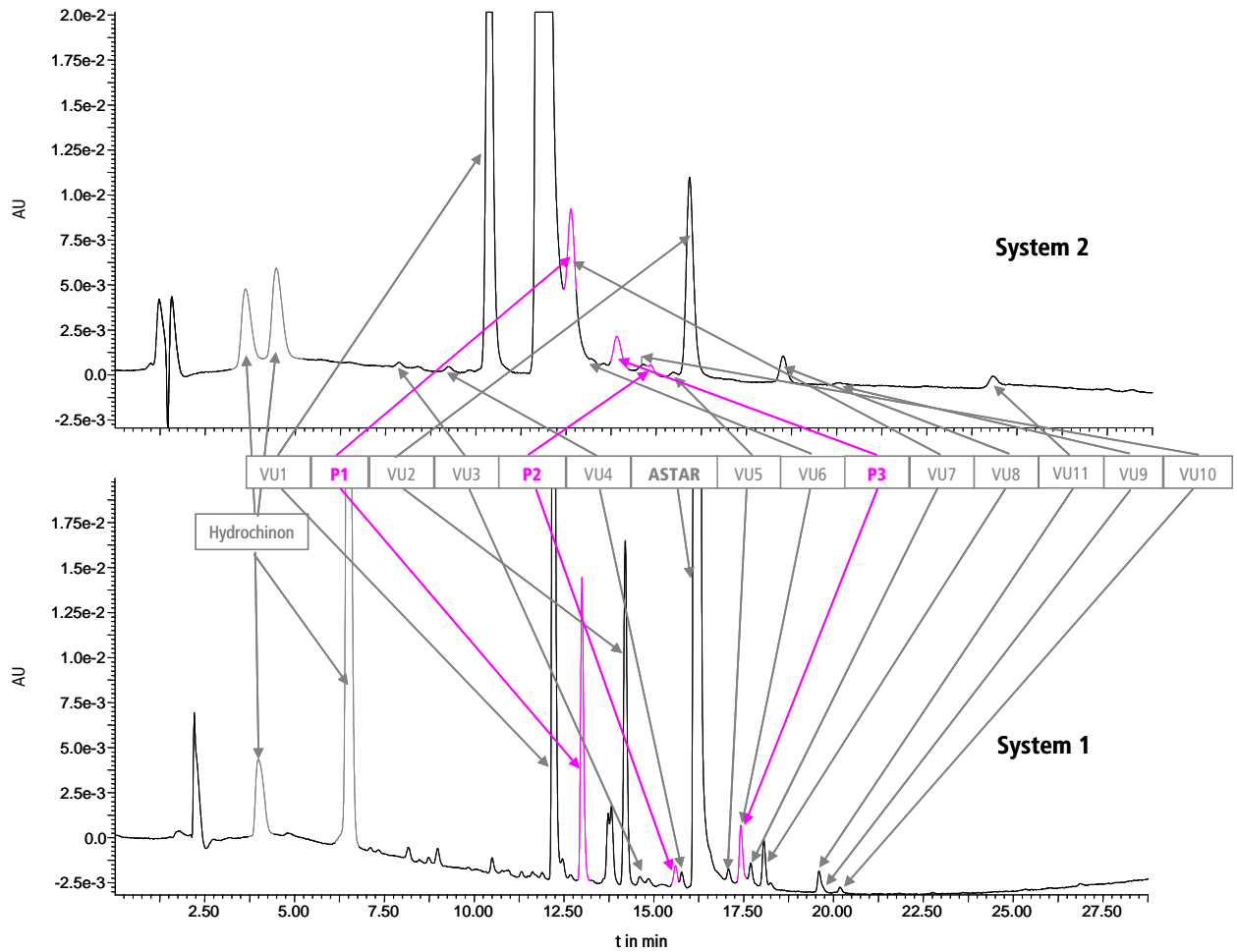


Abb. 35: Chromatogramme der orthogonalen Systeme der 24hProbe des Stresstests mit ABAP. Die drei unbekannt Abbauprodukte (P1-P3) sind pink markiert.

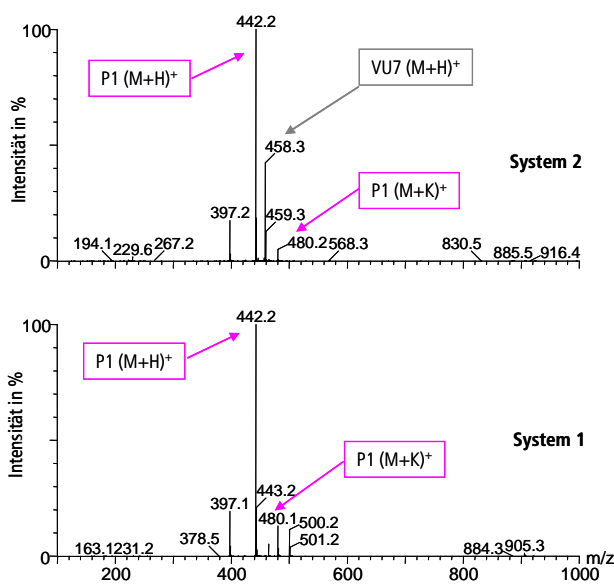


Abb. 36: ESI-Spektren von P1 auf den orthogonalen Systemen

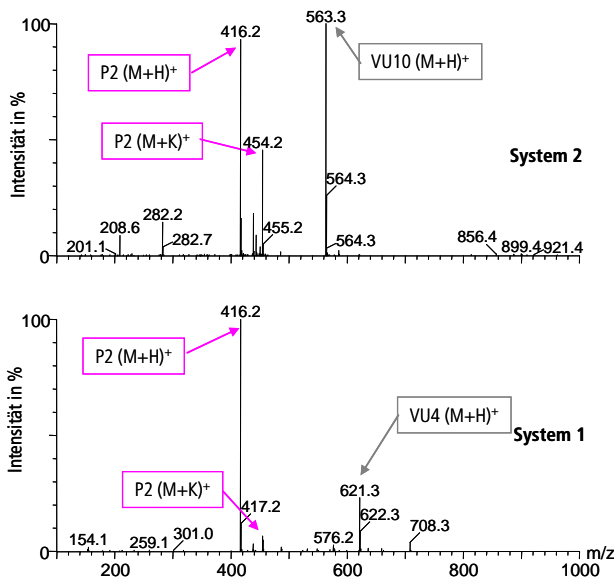


Abb. 37: ESI-Spektren von P2 auf den orthogonalen Systemen

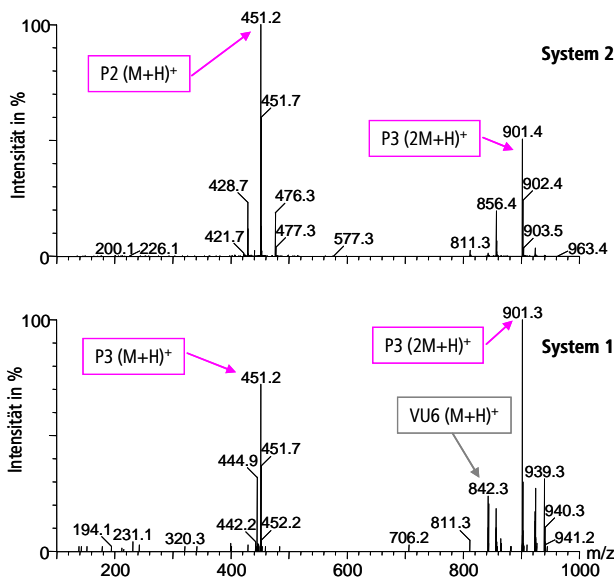


Abb. 38: ESI-Spektren von P3 auf den orthogonalen Systemen

## 3.2 Vergleich von Stresstestdaten mit Stabilitätsdaten von Formulierungen

Das Ziel von Stresstests ist zum einen die Beurteilung der Stabilität von Arzneistoffen und zum anderen die Identifizierung von relevanten Abbauprodukten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unbekannte und bekannte Verunreinigungen bzw. Abbauprodukte, die sich während der Lagerung bildeten oder angestiegen waren, als relevant betrachtet. Um die Relevanz eines Peaks in den Stresstestproben wirklich beurteilen zu können, wurden zwei Formulierungen untersucht, die unter verschiedenen Bedingungen eingelagert waren. Die Ergebnisse wurden dann mit den Stresstestproben verglichen.

### 3.2.1 Auswahl des Arzneistoffkandidaten

Für den Stresstest wurde die Entwicklungssubstanz BAY ausgewählt. Es war bekannt, dass BAY eine sehr stabile Substanz ist [71]. In der Annahme, dass in Gegenwart von Verunreinigungen ein vermehrter Abbau der Substanz erfolgen kann, wurde die stärker verunreinigte Tox-Charge gestresst. Weiterhin existierten von BAY eingelagerte Formulierungen und Placebotabletten, die ebenfalls für eine Analyse zur Verfügung standen. Die Formulierung hatte zwei unterschiedliche Dosierungen und wurde 39 Monate bei drei verschiedenen Lagerbedingungen eingelagert [s. Tab. 42]. Die Filmtabletten wurden in einer 45mlHDPE-Flasche gelagert.

Tab. 42: Lagerbedingungen der Formulierungen von BAY

Formulierung	Dosierung in mg	Bedingung 1	Bedingung 2		Bedingung 3	
		T in °C (Kühlschrank)	T in °C	relative Luftfeuchtigkeit in %	T in °C	relative Luftfeuchtigkeit in %
Tablette A	0.5	5	25	60	40	75
Tablette B	2.5					

### 3.2.2 Auswahl der Reagenzien und Bedingungen für den Stresstest mit BAY

Der oxidative Stresstest wurde mit denselben Reagenzien durchgeführt wie bei ASTAR [s. Kapitel 3.1.2]. Die Konzentrationen und Bedingungen der Tests [s. Tab. 43] mit BAY unterschieden sich z. T. von den Bedingungen der Tests mit ASTAR [s. Tab. 35]. Es wurden nur die Reaktionen durchgeführt, von denen vermutet wurde, dass die Reaktionsstärke angemessen war. Demzufolge wurden extreme Bedingungen z. B. von Fenton-

Reagenz und den Radikalstartern weggelassen. Zusätzlich wurde BAY noch einem hydrolytischen Stresstest unterzogen.

Tab. 43: Reagenzien und Bedingungen für den Stresstest mit BAY

	Nr.	Reagenz	Stressbedingungen	Probenahmezeitpunkte	
Radikalstarter	1	AIBN	10 mol%	0, 8, 24, 48 h	
			50 mol%	0, 2, 4, 8, 24 h	
	2	ABAP	10 mol%	0, 8, 24, 48 h	
			50 mol%	0, 2, 4, 8, 24 h	
Wasserstoffperoxid	3	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	wässrig	0, 1, 2, 4, 8, 24 h	
			organisch		
	4	Fenton-Reagenz: (Eisen(II)-Sulfat Heptahydrat/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1 mM / 0.3 %	40 °C und Raumtemperatur im Braunglasreagenzglas	
			5 mM / 0.3 %		0, 1, 2, 4, 8, 24 h
Schwermetallsalze	5	Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat	1000 ppm	40 °C im Braunglasreagenzglas	
		Eisen(III)-Acetylacetonat			
		Kupfer(II)-Nitrat Trihydrat			
		Kupfer(II)-Acetylacetonat			
Singulett-Sauerstoff	6	Rose Bengal	0.1 mg/ml	10000-20000 lx (Lichtschrank)	0, 15, 30, 60 min
Tween® 80 und Fe <sup>3+</sup>	7	Tween® 80	10 %	Rühren bei Raumtemperatur	0, 1, 2, 4, 8, 24 h
		Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat	10 mM		
Hydrolyse	8	HCl	1 N	40 °C im Braunglasreagenzglas	0, 1, 2, 4, 8, 24, 30 h
	9	NaOH	1 N		

### 3.2.3 Experimentelle Durchführung des Stresstests

Die Konzentration von BAY betrug während der Reaktionen [s. Tab. 43] Nr. 1-6, 8 und 9 immer 1.0 mg/ml. Für die Reaktion Nr. 7 betrug die Konzentration 0.5 mg/ml. Alle Reaktionen außer Nr. 6 und 7 fanden in 10ml Braunglasreagenzgläsern im Heizblock bei 40 °C statt. Die Hälfte der Stresslösungen von Nr. 4 wurde bei Raumtemperatur gestresst. Für die Reaktionen Nr. 1-3, 5, 6, 8 und 9 wurde die gleiche Stammlösung von BAY für die Herstellung der Stresslösungen verwendet. Sie hatte eine Konzentration von 2.0 mg/ml. Dazu wurde BAY in Acetonitril/Wasser (20/80 (V/V)) gelöst. Anstatt der 0.15 %igen TFA-Lösung wurde Wasser verwendet, um zusätzliche, durch den niedrigen pH-Wert bedingte Reaktionen auszuschließen. Weiterhin wurden nur zwei BAY-Referenzlösungen verwendet. Sie wurden ebenfalls aus der Stammlösung hergestellt. Sie

setzten sich aus 3 ml Stammlösung und 3 ml Acetonitril bzw. Wasser zusammen. Die BAY-Stammlösung für Nr. 4 wurde mit Acetonitril/0.15 % TFA (20/80 (V/V)) hergestellt, weil die Reaktion einen sauren pHWert erforderte. Sie wurde zur Herstellung der Stresslösungen und einer Referenzlösung verwendet. Die Herstellung der Stresslösungen der Reaktionen Nr. 1-7 entsprach weitestgehend der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Vorgehensweise. Weiterhin wurden auch Referenz- bzw. Kontrolllösungen der Reagenzien hergestellt und analysiert. Im Unterschied zum Stresstest mit ASTAR wurde beim Stresstest mit den Radikalstartern kein Hydrochinon nach dem Probenzug dazugegeben und die zwei Reagenzien wurden jeweils in zwei Molverhältnissen eingesetzt. Die Zusammensetzung der hydrolytischen Stresslösungen ist in Tab. 44 aufgeführt.

**Tab. 44: Zusammensetzung der hydrolytischen Stresslösungen**

	Lösemittel	Stresslösung in ml	
		1 N HCl	1 N NaOH
2 N HCl	Wasser	3	---
2 N NaOH		---	3
2.0 mg/ml BAY-Stammlösung	Acetonitril/Wasser (20/80 (V/V))	3	3

Die Probennahme war für die Reaktionen Nr. 1-6, 8 und 9 gleich. Es wurden 100 µl in ein Braunglasvial pipettiert und mit Acetonitril/0.15 % TFA (20/80 (V/V)) auf 1000 µl aufgefüllt. Bei der Reaktion Nr. 7 wurden 200 µl Probe gezogen und auf 1000 µl aufgefüllt. Somit hatte BAY während der Analyse eine Konzentration von 0.1 mg/ml. Es wurde zu jedem Zeitpunkt immer nur eine Probe gezogen. Die Vials wurden bis zur Analyse im Kühlschrank gelagert.

### 3.2.4 Analytische Bedingungen

Die Proben des Stresstests wurden mit den orthogonalen Systemen 1 und 10 [s. Tab. 34] auf der UPLC-DAD-MS Anlage analysiert. Es wurde die gleiche UPLC-DAD-MS Anlage wie in 2.3.3 verwendet. Das Injektionsvolumen wurde allerdings auf 4 µl erhöht, weil die zu erwartenden Peaks aufgrund der Stabilität der Substanz sehr klein waren. Die Stresslösungen und Referenzlösungen mit BAY wurden jeweils zweimal auf jedem System injiziert. Die Kontrolllösungen der Reagenzien wurden nur einmal injiziert. Die Injektionen erfolgten für beide Systeme immer aus dem gleichen Vial. Während der Analyse wurden die Vials bei 10 °C im Autosampler gekühlt.

Zusätzlich wurden Proben der Formulierungen aus Tab. 42 und Placebotabletten mit den orthogonalen Systemen vermessen. Dazu wurden eine entsprechende Anzahl von Filmtabletten in einen Messkolben gegeben [s. Tab. 45], der zu ca. 70 % mit Acetonitril/0.15 % TFA (20/80 (V/V)) aufgefüllt wurde. Der Kolben wurde ca. 1 h auf einem Laborschüttler geschüttelt, bis die Tabletten vollständig zerfallen waren. Dann wurden der Kolben aufgefüllt und die Lösung zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein Vial gefüllt und vermessen. Die Konzentration von BAY betrug 0.1 mg/ml. Es wurde zweimal je System aus demselben Vial injiziert.

Tab. 45: Herstellung der Probelösung der Tabletten

Formulierung	Anzahl der Tabletten	Messkolben in ml
Tablette A	5	25
Tablette B	4	100
Placebo	2	20

Die MS-Bedingungen für die Systeme wurden nicht verändert. Sie sind in Tab. 29 aufgeführt. Für die Auswertung der MS-Daten ist ein spezielles Softwareelement (MetaboLynx) verwendet worden. Das Tool benötigte zur Berechnung genaue Daten mit einer sehr hohen Massengenauigkeit, um Massenchromatogramme in 0.05 Da-Schritten zu screenen. Das wurde durch die Bestimmung der exakten Masse erreicht. Diese Bestimmung war nur auf der UPLC-DAD-MS-Anlage möglich. Dazu wurde während der Messung über eine externe Pumpe mit einem Fluss von 10 µl/min eine Referenzlösung über den Referenzsprayer eingesprüht. Die Messung der Analyt- und der Referenzlösung erfolgte im Wechsel, d. h., bei jedem fünften Scan wurde die Referenzlösung vermessen. Als Referenzsubstanz wurde Folsäure gewählt. Dazu wurde 20 mg Folsäure Dihydrat in Acetonitril /Wasser (50/50 (V/V)) gelöst. Die Referenzsubstanz wurde durch die sogenannte LockMasse und die attenuierte Masse definiert. Die LockMasse war das <sup>13</sup>C-Isotop des ionisierten Moleküls (M+H)<sup>+</sup> und die attenuierte Masse war das ionisierte Molekül (M+H)<sup>+</sup> der Folsäure. Die Referenzsubstanz fungierte als eine Art innerer Standard. Die MS-Bedingungen [s. Tab. 46] für die Referenzlösung wurden mit Hilfe der Software ermittelt. Vor der Messung wurde der MS-Detektor kalibriert. Die Software ermittelte die exakte Masse durch Abgleich der Massen gegen die Referenzsubstanz. Aufgrund der sehr hohen Massengenauigkeit war es auch möglich, genaue Summenformeln zu berechnen.

Tab. 46: MS-Einstellungen der Referenzlösung

Scanfrequenz	5
Konusspannung (Sample Cone) [V]	8
Referenz Aperture 1 Spannung [V]	14

### 3.2.5 Ergebnisse

Um die Stressproben hinsichtlich ihrer Relevanz und Aussagekraft beurteilen zu können, mussten relevante Peaks bzw. Massen in den Stabilitätsproben identifiziert werden. Die Stabilitätsproben wurden mit MetaboLynx ausgewertet. Das ist ein Softwareelement der MS-Software MassLynx. Es wurde für eine automatische Auswertung von Metabolismusdaten entwickelt. MetaboLynx ist ein spektraler/chromatographischer Suchalgorithmus. Er ist in der Lage, Massensignale mit sehr kleinen Intensitäten zu identifizieren. Vor der Auswertung muss eine Kontrollprobe und mindestens eine Analytprobe benannt werden. Während der Auswertung werden alle Massenchromatogramme der Analytprobe mit denen der Kontrollprobe verglichen, um Systempeaks oder durch die Matrix bedingte Signale zu erkennen. Es werden nur die Signale in der Analytprobe erfasst, die nicht in der Kontrollprobe vorkommen. Weiterhin muss eine sogenannte Parent mass vorgegeben werden. Sie ist die Bezugsgröße zur Interpretation der gefundenen Massen (Metaboliten) in den Analytproben. MetaboLynx unterscheidet zwischen erwarteten (bekannten) und unerwarteten (unbekannten) Metaboliten. Die bekannten Metabolite werden in der MetaboLynx Methode in Form von Summenformeln vorgegeben. Zusätzlich werden auch unbekannte Signale (Metabolite) erfasst. In der Methode wird eine Vielzahl von Parametern eingestellt.

Die MS-Daten der Proben waren keine Metabolismusdaten. Demzufolge wurden auch keine Metabolite erfasst und die Massensignale konnten nicht mit der Software interpretiert werden. Anstelle des Arzneistoffs wurde lediglich ein Kohlenstoffatom als Parent mass vorgegeben. Für die Auswertung der Stabilitätsproben wurden die Injektionen der Placebotabletten als Kontrolle verwendet. Die Analytproben waren die Proben der eingelagerten Tabletten A und B. Es wurden die MS-Daten jeweils beider Systeme ausgewertet. Die bekannten acht Verunreinigungen und die Hauptsubstanz BAY waren die erwarteten Metabolite. Dazu wurden die neun Summenformeln um ein Kohlenstoffatom (Parent mass) reduziert und die entsprechende Retentionszeit der Substanz in die MetaboLynx Methode eingegeben. Für jedes System wurde eine separate Methode geschrie-

ben. Zur Überprüfung der Einstellung der Methodenparameter wurde auch jeweils eine Injektion der ID-Lösung prozessiert. In dieser Injektion mussten alle bekannten Verunreinigungen erfasst werden. Eine ausreichende Empfindlichkeit der Methode wurde mit den Injektionen der Tabletten A und B für die Bedingungen 2 und 3 [s. Tab. 42] überprüft. Es war bekannt, dass VU3 eine relevante Verunreinigung war. Somit musste sie in diesen Proben detektiert werden. VU3 war nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden und zeigte eine schlechte Empfindlichkeit im Massenspektrometer. Deshalb wurden die Parameter für das Rauschen sehr klein gewählt, um das Signal zu erfassen. Das hatte zur Folge, dass nach der Prozessierung sehr viele Signale aus dem Rauschen als unbekannte Metabolite deklariert wurden. Deshalb mussten die Ergebnisse einzeln geprüft werden, um wirkliche unbekannte Metabolite zu identifizieren. Dieser Prozess war sehr zeitaufwendig. Im Folgenden werden nur Signale betrachtet, die während der Lagerung angestiegen waren. Die Signale mussten mindestens einen Flächenwert von 0.1 FE haben. D. h., alle Signale, die kleiner bzw. konstant geblieben waren, wurden nicht berücksichtigt. Die unter Bedingung 1 gelagerten Proben wurden hierbei als Referenzproben betrachtet. Die Proben der Bedingung 3 simulierten die Proben am Ende der Lagerung. Als Zwischenwert dienten die Proben der Bedingung 2. Die Proben wurden nicht quantitativ ausgewertet.

BAY hat sich als sehr stabile Substanz erwiesen. Alle relevanten Abbauprodukte, die im Rahmen der Auswertung mit MetaboLynx detektiert wurden, lagen in sehr geringen Konzentrationen vor. Die Ergebnisse demonstrieren die Eignung der Software, sehr kleine relevante Signale aus dem Rauschen der Daten zu filtern. Es wurden 13 relevante Abbauprodukte erfasst, die in den Stabilitätsmustern zunahmen. Diese ließen sich in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bestand aus drei bekannten Verunreinigungen (VU1, VU3 und VU6). Die zweite Gruppe enthielt unbekannte Abbauprodukte, die mit M1-M4 bezeichnet wurden. Sie waren z. T. auch in den Stresslösungen erfasst worden. Die dritte Gruppe beinhaltete unbekannte Abbauprodukte, die mit F1-F6 bezeichnet wurden. Diese wurden ausschließlich in den Stabilitätsmustern detektiert. In den folgenden Tabellen [s. Tab. 47-49] wurden die relevanten Abbauprodukte und ihre relative Veränderung während der Lagerung bzw. Stressreaktion bezogen auf eine Probe zum Zeitpunkt Null aufgelistet. War das Abbauprodukt zum Zeitpunkt Null noch nicht vorhanden, wurde ein Flächenwert von 0.1 FE als Bezugswert festgelegt. Die Flächen der Abbauprodukte in den Stresstestdaten und Stabilitätsmustern wurden mit dem Softwareelement QuanLynx ermittelt. In der Prozessierungsmethode wurden die gesuchten Massen und Retentionszeiten vorgegeben. Die Werte stammten aus der Auswertung der



Stabilitätsmuster mit MetaboLynx. Die Flächen von BAY wurden ebenfalls mit QuanLynx bestimmt, dazu wurde der BAY-Peak im UV-Chromatogramm bei 260 nm integriert. Das Signal im Massenchromatogramm konnte nicht verwendet werden, weil es sehr groß war und zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen geführt hätte. In den Tabellen wurde nur die Tablette A aufgeführt. Die Tablette B zeigte in diesem Fall ein vergleichbares Verunreinigungsprofil. Sie unterschied sich lediglich in ihrer Dosierung. Weiterhin wurden die Stressreaktionen hervorgehoben (fett), die einen deutlichen Anstieg des Abbauprodukts zeigten und somit zur Prädiktabilität relevanter Abbauprodukte geeignet waren. Stressreaktionen, die keine Veränderungen des Verunreinigungsprofils zeigten oder eine sehr starke Zersetzung von BAY aufwiesen, waren nicht relevant und wurden nicht in den Ergebnistabellen 45-47 aufgelistet. Die drei Referenzproben zum Zeitpunkt null der Tox-Charge sind blau hervorgehoben. Anhand größerer Flächenwerte der bekannten Verunreinigungen (VU1, VU3, VU6) wird bestätigt, dass die Tox-Charge von vornherein stärker verunreinigt war als die BAY-Charge, die für die Formulierungen verwendet wurde. Demzufolge konnten die Flächenangaben der Abbauprodukte in den Stressproben nicht direkt mit denen in der Formulierung verglichen werden.

Tab. 47: Gruppe 1 der relevanten Abbauprodukte von BAY

Formulierung / Stresslösung	Lagerbedingung / Probenahme	BAY <sub>(System3)</sub>		VU1 <sub>(System1)</sub>		VU3 <sub>(System1)</sub>		VU6 <sub>(System1)</sub>		BAY <sub>(System2)</sub>		VU1 <sub>(System2)</sub>		VU3 <sub>(System2)</sub>		VU6 <sub>(System2)</sub>		BAY <sub>(System3)</sub>		VU1 <sub>(System3)</sub>		VU3 <sub>(System3)</sub>		VU6 <sub>(System3)</sub>				
		t <sub>1</sub> (min)	% (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	% (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	% (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	% (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	% (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	
Tablette A	1	1.61	100	1.34	1.93	100	1.31	0.19	187	1.48	2.17	100	2.95	100	2.4	0.84	100	3.15	1.49	100	3.15	1.49	100	3.15	1.49	100	3.15	1.49
	2	1.61	97	1.34	2.38	123	1.31	0.19	187	1.48	2.00	92	3.00	101	2.46	1.11	133	3.1	0.41	406	3.1	0.41	406	3.1	0.41	406	3.1	0.41
	3	1.61	97	1.34	2.91	151	1.31	1.59	1586	1.48	2.97	137	3.00	98	2.46	2.21	264	3.11	5.15	5148	3.2	2.39	160	3.2	2.39	160	3.2	2.39
Referenz Tox-Charge	organisch	1.61	100	1.33	12.27	100	1.31	0.18	100	1.48	4.65	100	2.84	100	2.23	6.52	100	2.96	0.24	100	2.96	0.24	100	2.96	0.24	100	2.96	0.24
	wässrig	1.61	100	1.33	12.65	100	1.31	0.11	100	1.48	4.09	100	3.03	100	2.51	6.46	100	3.14	0.25	100	3.14	0.25	100	3.14	0.25	100	3.14	0.25
ABAP 10 mol%	Acetonitril / TFA	1.73	100	1.45	26.88	100	1.45	0.14	100	1.57	1.31	100	2.85	100	2.27	3.29	100	3.02	0.06	100	3.02	0.06	100	3.02	0.06	100	3.02	0.06
	0h	1.62	100	1.34	10.67	100	1.32	0.09	100	1.48	4.11	100	3.02	100	2.49	4.55	100	3.12	0.23	100	3.12	0.23	100	3.12	0.23	100	3.12	0.23
ABAP 50 mol%	8h	1.62	102	1.34	9.44	88	1.32	0.04	44	1.48	3.85	94	3.03	103	2.51	3.63	80	3.15	0.26	116	3.15	0.26	116	3.15	0.26	116	3.15	0.26
	24h	1.62	88	1.33	7.88	74	1.31	0.12	144	1.48	4.33	105	3.05	90	2.53	3.04	67	3.14	0.22	97	3.14	0.22	97	3.14	0.22	97	3.14	0.22
ABAP 50 mol%	48h	1.61	117	1.34	12.72	119	1.32	0.10	120	1.49	5.55	135	3.02	112	2.49	3.95	87	3.12	0.15	65	3.12	0.15	65	3.12	0.15	65	3.12	0.15
	0h	1.61	100	1.34	13.51	100	1.32	0.21	100	1.48	4.65	100	3.03	100	2.49	6.00	100	3.13	0.33	100	3.13	0.33	100	3.13	0.33	100	3.13	0.33
AIBN 50 mol%	2h	1.61	93	1.33	10.66	79	1.31	0.08	38	1.49	5.28	113	3.03	94	2.49	4.22	70	3.14	0.26	77	3.14	0.26	77	3.14	0.26	77	3.14	0.26
	4h	1.61	82	1.34	9.19	68	1.31	0.14	65	1.48	4.70	101	3.03	81	2.49	3.04	51	3.14	0.22	66	3.14	0.22	66	3.14	0.22	66	3.14	0.22
AIBN 50 mol%	8h	1.61	86	1.33	9.24	68	1.31	0.07	33	1.49	4.59	99	3.04	86	2.51	3.41	57	3.14	0.26	80	3.14	0.26	80	3.14	0.26	80	3.14	0.26
	0h	1.61	100	1.34	13.14	100	1.31	0.14	100	1.48	4.63	100	2.84	100	2.22	5.71	100	2.93	0.30	100	2.93	0.30	100	2.93	0.30	100	2.93	0.30
Kupfer(II)-Acetylacetonat	2h	1.61	82	1.34	11.24	86	1.31	0.08	57	1.48	4.45	96	3.03	86	2.50	3.58	63	3.14	0.20	66	3.14	0.20	66	3.14	0.20	66	3.14	0.20
	4h	1.61	79	1.33	10.18	78	1.31	0.14	99	1.48	4.76	103	3.03	80	2.49	3.46	61	3.13	0.17	55	3.13	0.17	55	3.13	0.17	55	3.13	0.17
Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat	8h	1.61	83	1.34	10.04	76	1.32	0.17	127	1.48	5.22	113	3.04	88	2.51	3.62	63	3.14	0.17	55	3.14	0.17	55	3.14	0.17	55	3.14	0.17
	0h	1.61	100	1.33	11.19	100	1.31	0.12	100	1.48	4.45	100	3.01	100	2.48	5.87	100	3.12	0.25	100	3.12	0.25	100	3.12	0.25	100	3.12	0.25
Fenton 1mM Fe <sup>2+</sup> (RT)	24h	1.62	83	1.33	8.99	80	1.31	0.16	135	1.48	4.40	99	3.05	81	2.53	3.29	56	3.15	0.24	95	3.15	0.24	95	3.15	0.24	95	3.15	0.24
	48h	1.61	94	1.33	11.22	100	1.31	0.07	58	1.48	4.37	98	3.03	89	2.51	3.10	53	3.14	0.20	80	3.14	0.20	80	3.14	0.20	80	3.14	0.20
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (organisch)	0h	1.61	100	1.33	11.42	100	1.32	0.11	100	1.48	4.19	100	3.02	100	2.49	5.08	100	3.13	0.25	100	3.13	0.25	100	3.13	0.25	100	3.13	0.25
	24h	1.62	78	1.34	8.69	76	1.32	0.06	55	1.48	3.70	88	3.05	79	2.53	2.99	59	3.15	0.26	104	3.15	0.26	104	3.15	0.26	104	3.15	0.26
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (wässrig)	48h	1.62	79	1.34	5.25	46	1.32	0.08	71	1.48	2.23	53	2.84	88	2.26	3.42	34	3.14	0.17	55	3.14	0.17	55	3.14	0.17	55	3.14	0.17
	0h	1.73	100	1.44	14.46	100	1.45	0.14	100	1.57	0.99	100	2.88	100	2.31	3.44	100	3.11	0.73	100	3.11	0.73	100	3.11	0.73	100	3.11	0.73
1N NaOH	1h	1.73	81	1.44	10.72	74	1.44	0.07	48	1.58	0.36	36	2.86	81	2.30	2.93	85	3.08	0.69	94	3.08	0.69	94	3.08	0.69	94	3.08	0.69
	0h	1.61	100	1.34	12.09	100	1.31	0.13	100	1.48	4.28	100	3.01	100	2.47	4.79	100	3.12	0.27	100	3.12	0.27	100	3.12	0.27	100	3.12	0.27
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (wässrig)	1h	1.62	85	1.33	7.94	66	1.31	0.14	105	1.50	2.37	55	3.03	83	2.49	3.49	73	3.13	0.31	113	3.13	0.31	113	3.13	0.31	113	3.13	0.31
	0h	1.61	100	1.33	12.08	100	1.32	0.14	100	1.48	4.37	100	2.87	100	2.30	3.78	100	2.96	0.16	100	2.96	0.16	100	2.96	0.16	100	2.96	0.16
1N NaOH	1h	1.62	82	1.34	7.38	61	1.32	0.13	92	1.50	2.50	57	3.03	99	2.51	3.71	98	3.13	0.18	115	3.13	0.18	115	3.13	0.18	115	3.13	0.18
	2h	1.62	65	1.33	4.46	37	1.33	0.06	44	1.50	1.32	30	3.03	79	2.50	2.78	74	3.14	0.24	153	3.14	0.24	153	3.14	0.24	153	3.14	0.24
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (wässrig)	0h	1.64	100	1.34	3.13	100	1.31	0.04	100	1.45	2.00	100	3.03	100	2.37	5.72	100	3.13	0.10	100	3.13	0.10	100	3.13	0.10	100	3.13	0.10
	1h	1.64	101	1.35	4.64	148	1.28	0.10	250	1.45	3.76	188	3.03	102	2.36	9.66	169	3.13	0.27	285	3.13	0.27	285	3.13	0.27	285	3.13	0.27
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (wässrig)	2h	1.65	55	1.36	5.23	167	1.29	0.11	273	1.46	5.45	273	3.03	55	2.36	12.25	214	3.13	0.20	213	3.13	0.20	213	3.13	0.20	213	3.13	0.20
	4h	1.65	45	1.36	9.36	299	1.29	0.11	273	1.47	6.48	324	3.04	43	2.37	22.28	390	3.15	0.30	316	3.15	0.30	316	3.15	0.30	316	3.15	0.30
1N NaOH	8h	1.64	105	1.38	21.91	700	1.31	0.17	430	1.49	8.55	427	3.03	98	2.36	58.59	1024	3.12	0.37	394	3.12	0.37	394	3.12	0.37	394	3.12	0.37
	24h	1.64	184	1.38	40.00	1278	1.31	0.26	653	1.48	16.67	833	3.05	190	2.41	88.90	1554	3.16	0.60	636	3.16	0.60	636	3.16	0.60	636	3.16	0.60
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (wässrig)	30h	1.64	215	1.38	39.74	1269	1.31	0.17	428	1.49	16.91	845	3.05	219	2.41	91.22	1595	3.15	0.51	533	3.15	0.51	533	3.15	0.51	533	3.15	0.51
	0h	1.64	100	1.34	3.13	100	1.31	0.04	100	1.45	2.00	100	3.03	100	2.37	5.72	100	3.13	0.10	100	3.13	0.10	100	3.13	0.10	100	3.13	0.10

Tab. 48: Gruppe 2 der relevanten Verunreinigungen in BAY

Formulierung / Stresslösung	Lagerbedingung / Probenahme	M1 <sub>System1</sub>		M2 <sub>System1</sub>		M3 <sub>System1</sub>		M4 <sub>System1</sub>		M1 <sub>System10</sub>		M2 <sub>System10</sub>		M3 <sub>System10</sub>		M4 <sub>System10</sub>				
		t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	t <sub>1</sub> (min)	Fläche [FE] % (relativ)	
Tablette A	1	1.50	0.13	131	1.76	0.29	289	1.45	0.36	100	0.35	0.18	180	3.33	0.17	170	2.19	0.17	100	
	2	1.50	<b>0.94</b>	940	1.76	<b>2.91</b>	2909	1.45	1.51	416	0.36	<b>0.72</b>	717	3.32	<b>1.36</b>	1363	2.23	1.03	617	
	3							1.45	<b>9.86</b>	2725	0.36	<b>1.36</b>	1363	3.32	<b>1.36</b>	1363	2.23	<b>9.54</b>	5748	
Referenz Tox- Charge organisch wässrig Acetonitril/TFA	0h																			
	8h																			
	24h																			
ABAP 10 mol%	0h																			
	8h							1.45	0.20	196										
	24h							1.45	0.96	964										
ABAP 50 mol%	0h							1.45	<b>2.37</b>	2372										
	2h	1.50	<b>0.30</b>	301				1.45	0.29	294										
	4h	1.50	<b>0.34</b>	339				1.45	0.64	641										
AIBN 50 mol%	0h	1.50	<b>0.28</b>	278				1.45	1.25	1249	0.35	0.16	158	3.36	<b>0.35</b>	350	2.27	<b>2.10</b>	1021	
	2h	1.50	0.20	197				1.43	0.07	65										
	4h	1.50	<b>0.67</b>	671				1.45	0.22	223										
Kupfer(II)- Acetylacetonat	0h	1.50	<b>0.78</b>	778				1.45	0.39	391										
	2h							1.45	0.96	961										
	48h							1.45	0.33	328										
Eisen(III)-Chlorid- Hexahydrat	0h																			
	24h							1.76	<b>0.10</b>	98										
	48h							1.74	<b>0.17</b>	165										
Fenton 1mM Fe <sup>2+</sup> (RT)	0h	1.57	0.18	184				1.48	<b>66.83</b>	66831	0.37	<b>8.49</b>	8493	3.23	0.27	268	2.26	<b>14.57</b>	14565	
	1h	1.58	0.25	254				1.48	<b>87.02</b>	87024	0.37	<b>11.77</b>	11768	3.20	0.26	260	2.24	<b>30.53</b>	30530	
	0h							1.45	5.55	5553										
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (organisch)	0h							1.45	<b>82.85</b>	82850	0.35	<b>1.28</b>	1284				3.10	0.12	124	
	1h							1.45	<b>18.97</b>	18967										
	0h							1.45	<b>83.77</b>	83771	0.35	<b>2.08</b>	2078							
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (wässrig)	1h							1.43	<b>108.40</b>	108401	0.35	<b>4.44</b>	4439	3.36	0.12	124	2.28	<b>89.91</b>	89907	
	2h							1.43	<b>108.40</b>	108401	0.35	<b>4.44</b>	4439	3.36	0.12	124	2.28	<b>89.91</b>	89907	
	0h							1.45	0.19	100										
1N NaOH	1h							1.45	0.21	109										
	2h							1.45	0.20	102										
	4h							1.45	0.26	133										
	8h							1.45	0.18	93										
	24h							1.45	0.23	116										
	30h							1.45	0.27	141										

Tab. 49: Gruppe 3 der relevanten Verunreinigungen in BAY

Formulierung / Stresslösung	Lagerbedingung / Probenahme	F1 <sub>System1</sub>			F2 <sub>System1</sub>			F3 <sub>System1</sub>			F4 <sub>System1</sub>			F5 <sub>System1</sub>			F6 <sub>System1</sub>		
		t, [min]	Fläche [FE]	% (relativ)	t, [min]	Fläche [FE]	% (relativ)	t, [min]	Fläche [FE]	% (relativ)	t, [min]	Fläche [FE]	% (relativ)	t, [min]	Fläche [FE]	% (relativ)	t, [min]	Fläche [FE]	% (relativ)
Tablette A	1	0.91	1.02	1024	1.27	0.15	151	2.21	0.49	100									
	2	0.91	<b>7.82</b>	7815	1.27	<b>1.67</b>	1670	2.21	1.25	253									
	3	0.91	<b>7.82</b>	7815	1.27	<b>1.67</b>	1670	2.21	<b>1.83</b>	370	0.61	<b>0.48</b>	478	2.01	<b>0.59</b>	589	0.75	<b>0.57</b>	565

Formulierung / Stresslösung	Lagerbedingung / Probenahme	F1 <sub>System10</sub>			F2 <sub>System10</sub>			F3 <sub>System10</sub>			F4 <sub>System10</sub>			F5 <sub>System10</sub>			F6 <sub>System10</sub>		
		t, [min]	Fläche	% (relativ)	t, [min]	Fläche	% (relativ)	t, [min]	Fläche	% (relativ)	t, [min]	Fläche	% (relativ)	t, [min]	Fläche	% (relativ)	t, [min]	Fläche	% (relativ)
Tablette A	1							3.91	0.39	87									
	2				2.92	0.80	798	3.93	0.79	178									
	3	3.69	<b>2.94</b>	2942	2.93	<b>6.61</b>	6613	3.93	<b>1.44</b>	324	1.74	<b>1.67</b>	1668	3.34	<b>0.83</b>	829	1.95	<b>0.88</b>	881

Eine deutliche Zunahme der bekannten Verunreinigungen der Gruppe 1 [s. Tab. 47] konnte mit den oxidativen Stresstests nicht gezeigt werden. Nur die Hydrolyse mit NaOH führte zu einer Erhöhung aller drei Verunreinigungen. Die Hydrolyse generierte viele irrelevante Abbauprodukte und war sehr unselektiv. Die Fläche von BAY hatte sich im Laufe der Reaktion erhöht. Vermutlich waren eine oder mehrere unbekannte Substanzen unter dem Hauptpeak eluiert. Dieses Phänomen führte evtl. zu einer Ionensuppression und demzufolge wurden die Substanzen nicht mittels MS erfasst.

Die relevanten Verunreinigungen der Gruppe 2 [s. Tab. 48] wurden ebenfalls mit einigen Stressreagenzien generiert. M1 wurde mit den Radikalstartern erzeugt. Die Konzentration von M1 in den Stresslösungen war allerdings kleiner als in den Formulierungen. Spuren von M2 konnten mit Kupfer(II)-Acetylacetonat erzeugt werden. M3 war die Verunreinigung mit der größten Fläche und sie wurde in deutlichen Konzentrationen mit Wasserstoffperoxid und Fenton-Reagenz erzeugt. In deutlich geringerer Konzentration ist sie auch bei den Reaktionen mit den Radikalstartern und Eisen(III)-Chlorid Hexahydrat erfasst worden. Diese Konzentrationen waren jedoch zu vernachlässigen. M4 wurde ebenfalls mit Wasserstoffperoxid und Fenton-Reagenz in deutlichen Konzentrationen erzeugt.

Die relevanten Verunreinigungen der Gruppe 3 [s. Tab. 49] wurden nur in den Formulierungen erfasst. Ihre Entstehung kann mit den verwendeten Hilfsstoffen zusammenhängen. Die Abb. 39 zeigt die UV-Chromatogramme der orthogonalen Systeme der Tablette A mit der Lagerbedingung 3.

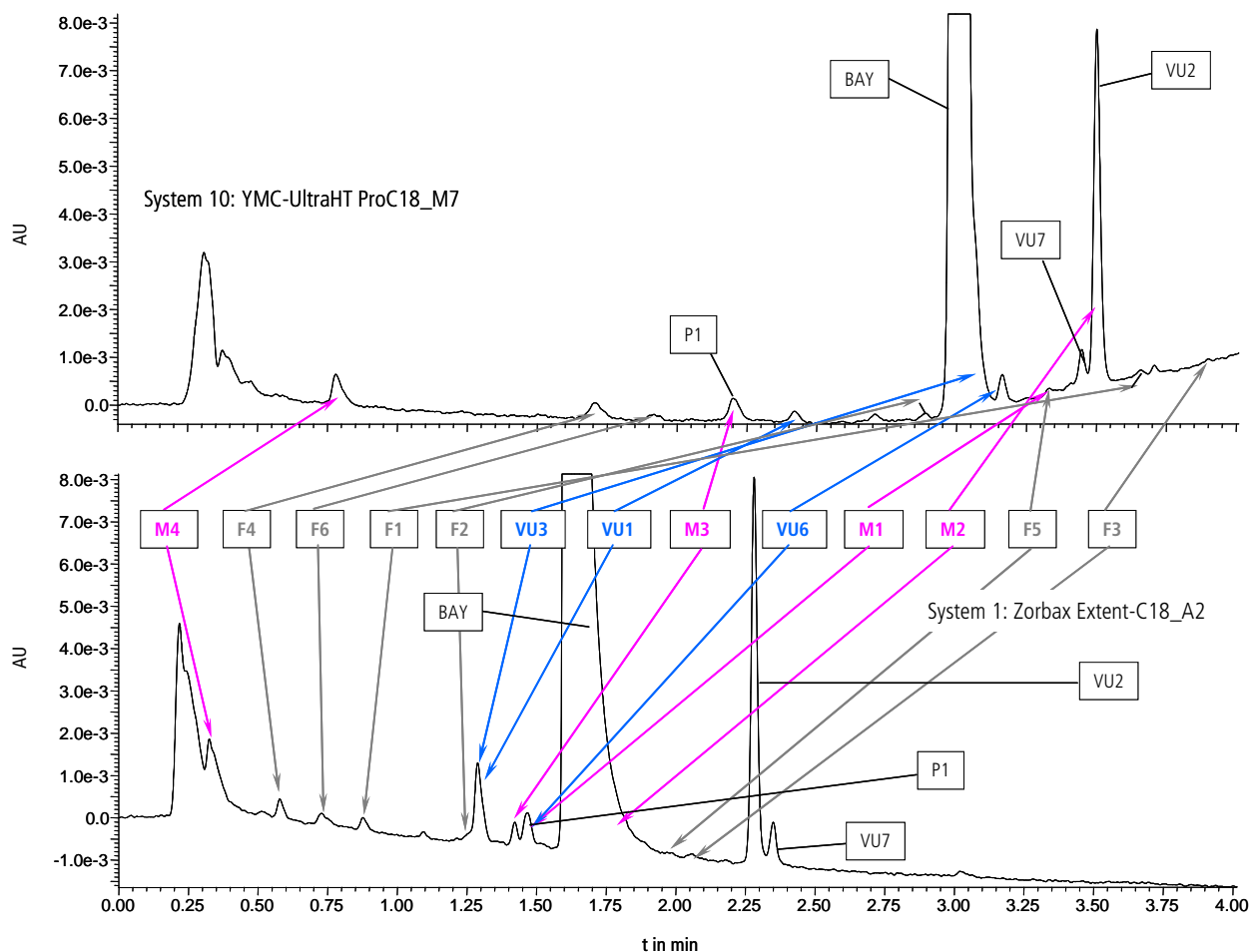
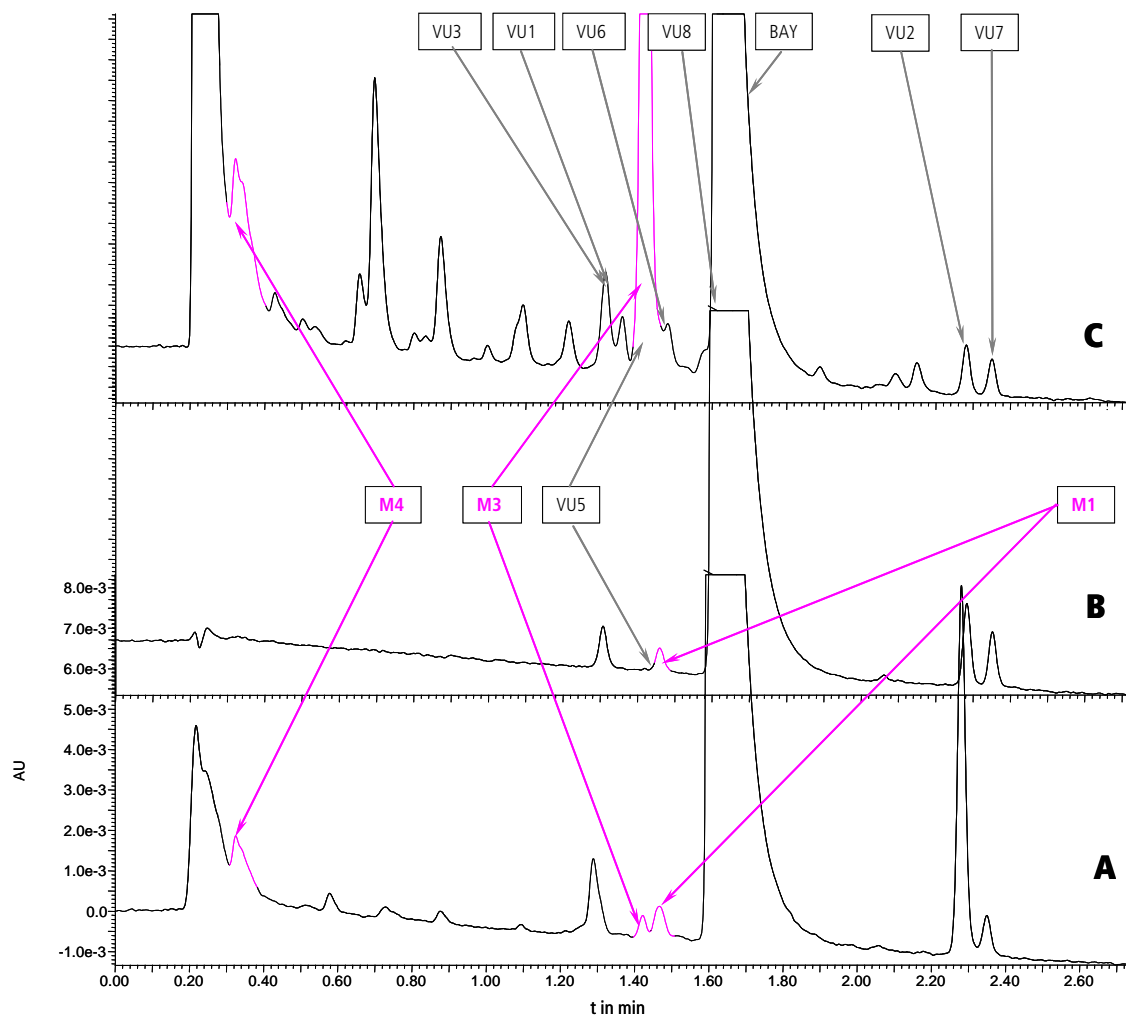


Abb. 39: UV-Chromatogramme der orthogonalen Systeme der Tablette A mit der Lagerbedingung 3

In den Chromatogrammen wird deutlich, wie klein die Signale waren. Zusätzlich koeluierten die Substanzen zum Teil mit anderen (bekannte oder unbekannte) Verunreinigungen. Z. B. koeluierte M2 in beiden Systemen mit jeweils anderen Substanzen. Weiterhin zeigten die Verunreinigungen im MS und UV unterschiedliche Empfindlichkeiten. F4 hatte ein starkes Signal im UV. Im MS war es jedoch sehr schwach. Das Signal von F3 hingegen war im MS etwas stärker als F4, aber im UV war es kaum sichtbar. Die Verunreinigung M4 zeigte im UV ein deutliches Signal, aber es war keine Peakreinheit gegeben. M3 gab auch im UV ein deutliches Signal, allerdings war es im System 10 mit P1 koeluiert. Im System 1 eluiert es zur gleichen Zeit wie VU5, aber in der BAY-Charge der Formulierung war die Verunreinigung nicht enthalten. Die Tox-Charge enthielt VU5, jedoch wurde keine Zunahme von VU5 erfasst. M3 bildete sich im Laufe der Lagerung bzw. im Verlauf der Reaktionen Nr. 3 und 4. In den Chromatogrammen von 3 und 4 war M3 in System 1 mit VU5 koeluiert. Die Abb. 40 zeigt die Chromatogramme von Wasserstoffperoxid, AIBN und Tablette A. Im Chromatogramm C ist deutlich zu erkennen, dass sich viele nicht relevante Produkte während der Reaktion mit Wasserstoffperoxid

gebildet haben. Beim Vergleich der Retentionszeiten (Chromatogramm A und C) könnte vermutet werden, dass sich noch weitere relevante Verunreinigungen gebildet haben. Diese Vermutung wurde aber durch den Vergleich der Massenspektren widerlegt. Weiterhin ist ein deutliches Signal von M3 im Chromatogramm A und C detektiert worden. In der Reaktion mit AIBN wurde das Produkt nicht gebildet (siehe Chromatogramm B). Es bildete sich aber in sehr geringen Mengen M1. Das Signal war aber nur im Massenchromatogramm sichtbar, weil M1 mit VU6 koeluierte.



**Abb. 40:** UV-Chromatogramme des Systems 1 von Chromatogramm A: Probe der Tablette A nach Lagerung unter Bedingung 3. Chromatogramm B: Stresslösung von AIBN 50 mol% nach 24 h. Chromatogramm C: Stresslösung von 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (wässrig) nach 2 h.

Die Stressproben mit dem Fenton-Reagenz führten ebenfalls zu vielen irrelevanten Abbauprodukten. In den Reaktionen 6-8 und den Reaktionen der Schwermetallsalzen [s. Tab. 43] wurden relevante Verunreinigungen nicht detektiert.

## 4 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

### 4.1 Entwicklung orthogonaler chromatographischer Systeme

Ein Ziel dieser Arbeit war es, eine generelle Vorgehensweise für die Entwicklung orthogonaler chromatographischer Systeme zu einer bereits etablierten chromatographischen Methode aufzuzeigen. Die chromatographischen Methoden hängen von den Eigenschaften der zu trennenden Stoffe ab. Es konnte die schrittweise Entwicklung von orthogonalen Methoden anhand einer Substanzklasse gezeigt werden. Während der Entwicklung stand die Praktikabilität im Vordergrund.

Als Modellsubstanzen wurden die Sulfonamide gewählt. Sie gehören zu den kleinen Molekülen, besitzen ein chromophores System und lassen sich deshalb mittels UV-Detektoren erfassen. Die unterschiedlichen Säure-Base-Eigenschaften dieser Moleküle spiegeln sich in ihren pKs-Werten wieder. Daraus resultiert ein verschiedenartiger Protonierungsgrad der Substanzen bei entsprechendem pH-Wert der Lösung. Der verschiedenartige Protonierungsgrad spielt eine entscheidende Rolle für die Selektivität der chromatographischen Systeme. Zunächst wurde mit den Modellsubstanzen eine Color map entwickelt. Sie kann auch als Basis-Color map bezeichnet werden. Sie setzte sich aus verschiedenen HPLC- bzw. UPLC-Systemen zusammen und visualisierte den Selektivitätsunterschied der Systeme durch die gefärbten  $|r|$ -Werte, die auf der Korrelation der Retentionsfaktoren der Substanzen auf den Systemen basierten. Die Selektivitätsunterschiede beruhen einerseits auf dem Einsatz verschiedener Säulenmaterialien, organischer Eluenten und andererseits auf der Verwendung unterschiedlicher Puffersysteme des wässrigen Eluenten. Säulentemperatur und Gradient wurden bewusst konstant gehalten. Ihre Veränderung hätte ebenfalls einen – obgleich geringeren – Einfluss auf die Selektivität. Jedoch haben die stationäre Phase und der pH-Wert der mobilen Phase den größten Einfluss auf die Selektivität in der Gradientenelution [16,17]. Die Säulen wurden auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit, polare Substanzen zu trennen, ausgewählt.

Im HPLC-Methodenscreening waren unterschiedlichere Säulen verwendet worden als im UPLC-Methodenscreening. Dieser Sachverhalt wurde in den Dendrogrammen deutlich. Mit den UPLC-Systemen bildeten sich die Cluster [s. Abb. 20] entsprechend der pH-Werte der wässrigen Eluenten, wohingegen die Cluster [s. Abb. 5] im Dendrogramm der HPLC-Systeme sich anders zusammensetzten. Hier spielte auch das Säulenmaterial eine

größere Rolle. Das Cluster B bestand aus Systemen einer Säule (S10). Diese Systeme hatten einen größeren Selektivitätsunterschied zu anderen Systemen, d. h., die  $|r|$ -Werte waren kleiner. Im UPLC-Screening war dieses Säulenmaterial nicht verfügbar. E. vanGysegheem [16] beobachtete ebenfalls, dass spezielle Säulenmaterialien die Orthogonalität erhöhen. Bei ihren Beobachtungen handelte es sich um auf Zirkonium basierende Säulen. Weiterhin bestätigte sie, dass der organische Eluent und die Temperatur einen geringeren Einfluss auf die Selektivität haben. Sie entwickelte Dendrogramme und Color maps mit der Absicht, eine Gruppe von orthogonalen Systemen für die Methodenentwicklung zu identifizieren. Dafür verwendete sie zwei Gruppen von Substanzen.

Die erste Gruppe bestand aus 68 Substanzen, die sich in ihren Strukturen (funktionale Gruppen, Ringstrukturen, Molgewichte),  $pK_s$ - und  $\log P$ - Werten sowie pharmakologischen Klassen unterschieden. Die zweite Gruppe setzte sich aus 15 strukturähnlichen Substanzen zusammen. Mit beiden Gruppen wurden ähnliche Gruppen von orthogonalen Systemen identifiziert. Sie variierte in den HPLC-Methoden für eine Säule auch die Temperatur. Weiterhin nutzte sie verschiedene Puffer und Gradienten. Diese Ergebnisse von E. vanGysegheem bestätigten die Wahl strukturähnlicher Modellsubstanzen wie den Sulfonamiden für die Generierung der Basis-Color map im Rahmen dieser Arbeit. Die Modellsubstanzen zeigen jedoch einen größeren Strukturunterschied als die später verwendeten Arzneistoffkandidaten (ASTAR und BAY) und ihre Verunreinigungen. Das wird in der Skalierung der  $|r|$ -Werte der Color maps deutlich. Die Basis-Color maps beinhalten Systempaare mit deutlich kleineren  $|r|$ -Werten als die Color maps der Arzneistoffkandidaten. Die orthogonalen chromatographischen Systeme zeigen einen größeren Selektivitätsunterschied bzw. Grad der Orthogonalität, je größer der Unterschied der Eigenschaften der zu trennenden Substanzen ist.

Die Generierung des Dendrogramms ist besonders bei großen Datensätzen vorteilhaft. Nach seinem Vorbild werden die Systeme in der Color map sortiert und bilden Cluster. Somit wird die Color map übersichtlich und Gruppen von ähnlichen und orthogonalen Systemen werden sichtbar.

Im nächsten Schritt wurde die Basis-Color map auf Arzneistoffkandidaten und ihre Verunreinigungen angewandt. Die Stoffe gehörten wie die Modellsubstanzen zu den kleinen Molekülen und waren hinreichend UV-aktiv. Weiterhin wurde eine teilweise Ionisierbarkeit der unbekannt Substanzen angenommen. Das unterschiedliche Elutionsverhalten der Substanzen bei verschiedenen pH-Werten war eine Voraussetzung für die Anwend-



barkeit der Basis-Color map. Für die Arzneistoffkandidaten sollte jeweils eine orthogonale Methode zu einer bereits etablierten chromatographischen Methode entwickelt werden. Die Basis-Color map vereinfacht die Auswahl der möglichen orthogonalen Systeme, indem eine gezielte Vorauswahl aus den Systemen der Color map getroffen werden kann. Zuerst erfolgt die Festlegung eines Systems in der Basis-Color map, das als etabliertes System betrachtet wird. Das ist ein kritischer Punkt in der Anwendung der Color map, weil mit diesem System die möglichen orthogonalen Systeme für das nachfolgende Screening mit dem Arzneistoffkandidaten bestimmt werden. Bei der Festlegung des Systems in der Basis-Color map wurden nur das Säulenmaterial, der pH-Wert des wässrigen Eluenten und der organische Eluent berücksichtigt. Die Art und Konzentration des Puffers des vorgegebenen etablierten Systems wurden nicht betrachtet, weil diese Parameter einen geringeren Einfluss auf die Selektivität der Systeme haben. Durch diese Vorgehensweise wird auch das Spektrum der Anwendbarkeit der Color map vergrößert. Für die Basis-Color map wurden z. B. nur flüchtige Puffer verwendet. Jedoch wird die Art des Puffers aber für die Anwendung der Basis-Color map nicht berücksichtigt. Somit kann sie auch für Arzneistoffkandidaten verwendet werden, die eine etablierte Methode mit nicht flüchtigen Puffern (z. B. Phosphatpuffer) aufweisen.

In der Arbeit wurde das jeweilige etablierte System in der Basis-Color map mit gleichem oder ähnlichem Säulenmaterial und mit ähnlichem pH-Wert wie beim etablierten System des Arzneistoffkandidaten gewählt. Im Beispiel mit ASTAR [s. Kapitel 2.2.2] war zwar dasselbe Säulenmaterial verfügbar, aber der pH-Wert der wässrigen Phase sowie die Konzentration des Puffers waren in der Color map nicht verwendet worden. Für BAY [s. Kapitel 2.4] waren weder das Säulenmaterial noch der pH-Wert oder die Pufferart des wässrigen Eluenten verfügbar. In beiden Fällen wurde trotzdem ein etabliertes System in der jeweiligen Basis-Color map festgelegt. Im Fall von ASTAR wurde sich dem ursprünglichen pH-Wert des etablierten Systems angenähert. Für ASTAR als auch für BAY wäre es möglich, mehrere etablierte Systeme in der Basis-Color map festzulegen. Dies hätte zur Folge, dass auch mehrere mögliche orthogonale Systeme identifiziert würden und das anschließende Methodenscreening komplexer ausfallen würde. Das Ziel bei der Entwicklung des Konzeptes zur Identifizierung orthogonaler Systeme war es aber, möglichst einfach und schnell ein orthogonales System zu entwickeln. Dabei war es nicht wichtig, ob dieses System auch das System mit dem größten Selektivitätsunterschied zum etablierten System war. Demzufolge wurde, um die Zeit zusätzlicher Analysen zu sparen, nur ein etabliertes System in der Basis-Color map für die Auswahl möglicher orthogonaler Systeme festgelegt.

Im darauffolgenden Schritt wurden die identifizierten Systeme für ein individuelles Screening mit dem Arzneistoffkandidaten und seinen Verunreinigungen eingesetzt. Hier erfolgte eine grobe Anpassung der Methoden. Alle Substanzen sollen in der Laufzeit eluieren, jedoch müssen die Peaks noch nicht vollständig voneinander getrennt sein. Für die Auswertung des Screenings ist es aber wichtig, dass die bekannten Verunreinigungen, den Peaks in den Chromatogrammen durch geeignete Detektion zugeordnet werden können. Die Auswertung der erzeugten Color map aus dem Screening führte dann zu der gesuchten orthogonalen Methode. Im letzten Schritt erfolgt erst die Optimierung hinsichtlich einer ausreichenden Trennung der Substanzen. Das erhaltene orthogonale System wurde auf der Grundlage der empirisch entwickelten Basis-Color map identifiziert.

In der Arbeit wurde gezeigt, dass es möglich ist, orthogonale Systeme zu einem bereits etablierten chromatographischen System auf Grundlage einer Basis-Color map in drei Schritten zu entwickeln. Im ersten Schritt wird wie vorher beschrieben ein etabliertes System, welches dem bestehenden System des Arzneistoffs entsprechen soll, in der Color map festgelegt. Damit werden mögliche orthogonale Systeme zu diesem System in der Basis-Color map identifiziert. Im zweiten Schritt werden die identifizierten Systeme einem individuellen Screening mit dem Arzneistoffkandidaten unterzogen und chemometrisch ausgewertet. In der entstandenen Color map wird nun das am besten geeignete orthogonale System identifiziert. Im dritten Schritt wird das orthogonale System hinsichtlich seiner Trennleistung optimiert. Es ist durchaus denkbar, dass eine Optimierung nur eingeschränkt möglich ist, weil die mobile Phase des Systems nicht verändert werden kann. Diese Einschränkung ist aber zulässig, weil bereits ein etabliertes System existiert. Das orthogonale System dient als zusätzliche Überprüfung der Selektivität des etablierten Systems. Außerdem ist es vorteilhaft bei der Beurteilung von Stabilitätsmustern und Stresstests [s. Kapitel 3.1.6].

Die Systeme der Basis-Color maps müssen nicht validiert oder hinsichtlich ihrer Robustheit untersucht werden. Das ist für ihre Anwendung im Rahmen dieser Arbeit nicht nötig, weil sie nur eine Zwischenstufe darstellen, aus der weitere Systeme entwickelt werden. Somit werden sie nicht direkt für die Methodenentwicklung genutzt. Der Selektivitätsunterschied der Systeme in der Color map wird nicht durch Robustheit und Validierung beeinflusst.

Der Korrelationskoeffizient spielt eine wichtige Rolle für die Beurteilung des Selektivitätsunterschieds in der Color map. Er ist das Maß für die Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit der Systeme. Ein kleiner Korrelationskoeffizient bedeutet eine geringe Korrelation der Systeme. Er sagt aber nichts über die Trennleistung der Systeme aus. Demzufolge kann z. B. das System A eine geringe Korrelation mit dem etablierten System aufweisen als das System B. Jedoch zeigt System A eine schlechte Trennleistung, wohingegen die Auflösung der Peaks mit System B durch einfache Optimierungsschritte verbessert werden kann. In diesem Fall würde das System B als orthogonales System zum etablierten System ausgewählt werden, weil eine schnelle und effiziente Entwicklung von orthogonalen Systemen im Vordergrund steht. Daher sollten die Chromatogramme des Screenings für die Beurteilung der Eignung als orthogonales System immer mit einbezogen werden. Weiterhin lässt sich auch kein Grenzwert, ab dem zwei Systeme als orthogonal betrachtet werden können, für den Korrelationskoeffizienten festlegen. Wie klein der Korrelationskoeffizient der orthogonalen Systeme ist, hängt sehr stark von den zu trennenden Substanzen ab. Je ähnlicher die Strukturen der Substanzen sind, desto weniger Selektivitätsunterschiede haben die Systeme und desto größer ist der Korrelationskoeffizient. Das wird bei dem Vergleich der Korrelationskoeffizienten und den daraus resultierenden Color maps deutlich.

Mit den Sulfonamiden entstehen orthogonale Systeme mit sehr kleinen Korrelationskoeffizienten ( $|r|=0.02$  oder  $|r|=0.12$ ). Diese Substanzen haben zwar ähnliche Strukturen, aber sie variieren stärker als die Strukturen realer Wirkstoff-Verunreinigungsprofile. Das zeigt sich im Vergleich zum Methodenscreening von ASTAR und seinen Verunreinigungen. Aus diesem Screening resultieren stärker korrelierte Systeme als beim Screening der Sulfonamide, weil die Substanzen vermutlich strukturähnlicher sind. Das entwickelte orthogonale System 2 aus dem Screening von ASTAR korreliert mit dem bestehenden System 1 sogar bei einem Wert von  $|r|=0.63$ . Dieser Korrelationskoeffizient wäre in der Basis-Color map der Sulfonamide hellgrün gefärbt, weil dort Systempaare mit deutlich kleineren  $|r|$ -Werten vorkommen. Trotzdem hat das System 2 eine andere Selektivität als das System 1 und wird als orthogonal angesehen. Der Selektivitätsunterschied wird in der veränderten Elutionsreihenfolge der Peaks deutlich. Das ist ein entscheidendes Kriterium für die Eignung der orthogonalen Methode. Dadurch werden mit der orthogonalen Methode unbekannte Peaks sichtbar, die in der etablierten Methode mit anderen Peaks koeluiert waren.

Für BAY und seine Verunreinigungen trifft Ähnliches zu wie für ASTAR, nur dass die Systeme des Methodenscreenings noch stärker korrelieren und der Korrelationskoeffizient der orthogonalen Systeme einen Wert von 0.907 hat. Dieser Wert wäre in der Sulfonamid Color map sogar rot gefärbt. D. h., die Systeme sind sich sehr ähnlich. Im Fall von BAY ist der Selektivitätsunterschied des Systems zum etablierten System von BAY jedoch ausreichend, um eine Veränderung der Peakreihenfolge zu bewirken. Der erforderliche Grad der Orthogonalität zweier Systeme ist somit nicht mit Zahlenwerten definierbar. Für die zwei Arzneistoffkandidaten ASTAR und BAY können vermutlich auch andere Systeme entwickelt werden, die einen höheren Grad an Orthogonalität aufweisen und auch eine ausreichende Trennleistung erzielen könnten. Jedoch bestand das Ziel in dieser Arbeit darin, ein Konzept zu entwickeln und in der Praxis zu verifizieren, mit dem systematisch und mit überschaubarem Aufwand eine zu einem bestehenden System orthogonale chromatographische Methode gefunden werden kann.

Ob der Korrelationskoeffizient das optimale Maß für den Grad der Orthogonalität zweier Systeme ist, bleibt noch zu prüfen. Es ist bekannt, dass er anfällig für Ausreißer ist. Das sollte seine Eignung jedoch nicht beeinflussen, weil die Werte der normierten Retentionszeiten keine Ausreißer im mathematischen Sinne darstellen. Die Retentionszeit einer Substanz sollte sich auf einem System nur geringfügig ändern und somit wären alle Werte, die in die Korrelation eingehen, reproduzierbar. Jedoch kann ein kleiner Koeffizient erzeugt werden, obwohl sich die Peakreihenfolge nur geringfügig ändert, wenn eine oder zwei Substanzen stark unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen. Andererseits kann auch ein großer Wert errechnet werden, obwohl sich bei vielen Peaks die Reihenfolge geringfügig ändert. Diese Eigenschaft des Korrelationskoeffizienten wäre jedoch nicht zu erkennen. Sie spielt aber vermutlich keine große Rolle bei Substanzen wie z. B. BAY und seinen Verunreinigungen, bei denen generell alle Systeme stärker korreliert sind. Ein anderes alternatives Maß für die Orthogonalität wäre die Bestimmung des Kosinus` des Winkels zwischen den Systemen. Das ist der Kosinus des Winkels der Vektoren die sich aus den Retentionsfaktoren zusammensetzen würden. Es wäre ein geometrisches Maß und würde den Fehler des Korrelationskoeffizienten nicht aufweisen. Sein Vorteil und die Anwendbarkeit müssen jedoch noch geprüft werden.

Die entwickelten Basis-Color maps können durch weitere Systeme ergänzt werden. Dazu könnten zusätzliche Säulenmaterialien oder auch andere mobile Phasen verwendet werden. Somit kann die Auswahl von Systemen erweitert werden. Weiterhin können für spezifische Stoffklassen, wie z. B. Steroide oder nicht ionisierbare Substanzen, neue Ba-

sis-Color maps entwickelt werden. Die besonderen Eigenschaften der Stoffklasse sollten dann auch bei der Auswahl der verwendeten Säulenmaterialien und mobilen Phasen berücksichtigt werden. Es wäre auch denkbar, die Entwicklung orthogonaler Systeme mittels Basis-Color maps in die automatisierte Methodenentwicklung (z. B. ChromSword® [25]) zu integrieren. D. h., zuerst würden orthogonale Systeme in der Basis-Color map identifiziert werden. Als nächster Schritt würde das Methodenscreening der Systeme erfolgen. Dieser Schritt könnte bereits mit ChromSword® stattfinden. Nach Identifizierung des orthogonalen Systems würde dann die Optimierung der Methode ebenso mit ChromSword® durchgeführt werden. Diese Vorgehensweise wäre sehr effektiv, weil durch Anwendung der Color map die Auswahl der möglichen Systeme stark eingeschränkt ist und durch ChromSword® die finale Optimierung des Systems zeitsparend und effizient erfolgt. Damit ist die Color map ein sehr gutes Hilfsmittel für die Methodenentwicklung in der HPLC.

## 4.2 Stresstests

Ein Ziel der Arbeit war es, den Vorteil der Verwendung verschiedener oxidativer Reagenzien im Stresstest aufzuzeigen. Im Folgenden werden die einzelnen Stressreaktionen diskutiert.

Das am häufigsten eingesetzte Oxidans ist Wasserstoffperoxid. Der Oxidationsmechanismus ist ionisch und die entstehenden Abbauprodukte erscheinen in Langzeitstabilitätstests oft als Abbauprodukte in sehr kleinen Konzentrationen [36]. Bestimmte Strukturen werden jedoch besonders gut mit Wasserstoffperoxid oxidiert. Dazu gehören N-Oxide, Sulfoxide, Sulfone oder Amine [36]. Wasserstoffperoxid ist nicht geeignet, um Reaktionen mit molekularem Sauerstoff oder radikalische Kettenreaktion (z. B. Autoxidation) vorherzusagen [61]. In geringen Konzentrationen können sich auch Hydroxylradikale bilden. Ihre Reaktionen sind sehr unselektive starke Wasserstoffatomabspalter [60] und führen meist zu irrelevanten Abbauprodukten. Die Verwendung von Wasserstoffperoxid sollte aber auf jeden Fall genutzt werden, weil auch viele Hilfsstoffe mit Peroxiden verunreinigt sein können. Im Rahmen der Arbeit wurde es in einer Konzentration von 3 % in zwei verschiedenen Milieus eingesetzt. Zum einem wurde ein möglichst wässriges und zum anderen ein möglichst organisches Milieu gewählt, wodurch die verschiedenen Löslichkeiten der entstehenden Produkte berücksichtigt werden sollten. Mit beiden Arzneistoffkandidaten führte die Reaktion zu zahlreichen irrelevanten Abbauprodukten. Bei ASTAR waren sowohl der Abbau als auch die Vielzahl der entstandenen Abbaupro-

dukte stärker ausgeprägt als bei BAY, weil es oxidationsempfindlicher war. Die Hauptsubstanz hatte sich sehr stark zersetzt und auch die relevante Verunreinigung VU2 war abgebaut. Die verschiedenen Milieus (wässrig oder organisch) spielten in dem Fall keine Rolle. Es wäre daher zu empfehlen, ein mittleres Milieu für diese Reaktion zu wählen. Bei BAY führte die Reaktion mit Wasserstoffperoxid neben zahlreichen irrelevanten Produkten auch zu relevanten Produkten [s. Tab. 48]. Ob die Reaktion auch bei ASTAR zu relevanten Abbauprodukten geführt hat, bleibt ungeklärt, weil zu dem Zeitpunkt keine Langzeitstabilitätsmuster zur Verfügung standen und somit die relevanten Abbauprodukte nicht bekannt waren.

Das Peroxyradikal spielt eine große Rolle für die radikalische Oxidation von Arzneistoffen. Es wird auch als „natürliches“ Oxidans bezeichnet [36]. Um diese Reaktion zu simulieren, wurden die Radikalstarter AIBN und das wasserlösliche ABAP verwendet. Das Hydroxylradikal bzw. Alkoxyradikale ist reaktiver als das Peroxyradikal. Es reagiert mit C-H Bindungen mit Bindungsenergien kleiner oder gleich 105 kcal/mol. Dazu gehört die Mehrheit aller C-H-Bindungen mit Ausnahme der aromatischen und olefinischen C-H Bindungen. Das Peroxyradikal reagiert hingegen nur mit C-H Bindungen mit Bindungsenergien kleiner oder gleich 89 kcal/mol. Somit ist es wesentlich selektiver [60]. Dadurch ließen sich auch die Ergebnisse des Stresstests mit ASTAR und den Radikalstartern erklären. Die Entstehung von VU2 beruht vermutlich auf einer radikalischen Oxidation der benzylichschen Gruppe [s. Abb. 41]. Die C-H-Bindungsenergie ist 84 kcal/mol [60].

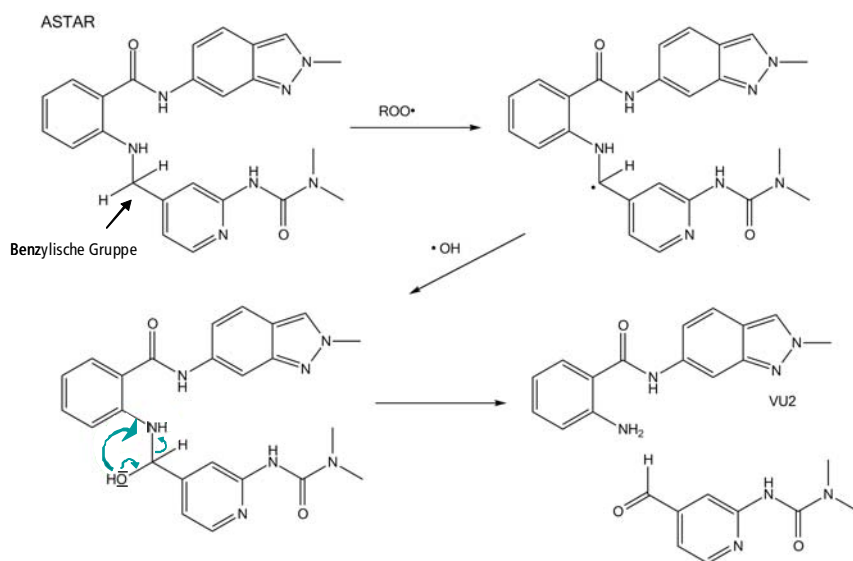


Abb. 41: Vermutliche Entstehung von VU2: Radikalische Oxidation der benzylichschen Gruppe von ASTAR

Beide Radikalstarter führten zu einer Erhöhung der Konzentration von VU2. Die Zunahme von VU2 war mit ABAP etwas stärker als mit AIBN. Bei BAY wurden ebenfalls, wenn auch in sehr geringen Konzentrationen, relevante Abbauprodukte mit den Radikalstartern erzeugt. In dem Fall waren die Konzentrationen der Produkte mit AIBN geringfügig größer. Es waren jedoch andere Abbauprodukte als in der Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  entstanden. Durch die Verwendung beider Radikalstarter im Stresstest können die gefundenen Abbauprodukte gegenseitig bestätigt werden. Es wäre durchaus denkbar, dass sie eine unterschiedliche Konzentrationsverteilung in den Reaktionen haben. In dieser Arbeit hat sich die Konzentration von 50 mol% Radikalstarter während der Reaktion als geeignet für eine adäquate Zersetzung des Wirkstoffs zur Simulation relevanter Abbauprodukte erwiesen.

Die Verwendung von Tween<sup>®</sup> 80 und Eisen(III)-Ionen im Stresstest ist eine weitere Möglichkeit, um Peroxyradikale zu erzeugen [60]. Die Reaktion führte auch bei ASTAR, vermutlich aufgrund der Peroxyradikale, zu einer deutlichen Zunahme von VU2. Jedoch hat sie bei BAY keine relevanten Abbauprodukte erzeugt. In [60] empfiehlt P. A. Harmon, zusätzlich Reaktionen mit AIBN durchzuführen, weil die Abbauprodukte eine unterschiedliche Konzentrationsverteilung aufweisen. Somit können beide Reaktionen ergänzend sein. Vermutlich ist die geringe Konzentration der relevanten Abbauprodukte der Grund, warum sie bei BAY mit Tween<sup>®</sup> 80 nicht detektiert wurden. Tween<sup>®</sup> 80 ist ein komplexes Gemisch und erzeugt im MS aufgrund der zahlreichen Massensignale ein deutliches Rauschen. Deshalb kann die Auswertung von sehr kleinen Signalen in den MS-Daten erschwert sein. Im UV-Chromatogramm ist dies kein Problem, weil Polysorbat nicht UV-aktiv ist.

Eine weitere Reaktion im Stresstest war die Reaktion mit dem Fenton-Reagenz. Das Fenton-Reagenz ist eine Mischung aus Wasserstoffperoxid und Eisen(II)-Ionen im sauren Milieu. Es bewirkt eine radikalische Oxidation, in der Wasserstoffperoxid durch die Metallionen katalysiert wird. Das eigentliche Oxidans ist das sehr reaktive Hydroxylradikal [36]. Es ist wie schon oben beschrieben sehr unselektiv und führt zu irrelevanten Abbauprodukten. Das wurde auch in Stresstests bestätigt. Bei ASTAR führte die Reaktion sehr schnell zu einer starken Zersetzung der Probe. Es bildete sich zwar VU2 in größerer Konzentration, aber die Relevanz war in Anbetracht der zahlreichen neuen Abbauprodukte nicht zu erkennen. Bei BAY kam es ebenfalls zu einem deutlichen Abbau der Hauptschubstanz und zur Bildung vieler irrelevanter Abbauprodukte. Es wurden dieselben relevanten Abbauprodukte gebildet, die auch mit Wasserstoffperoxid entstanden

waren. Allerdings war die Probe insgesamt viel stärker zersetzt. Daher ist der Stresstest mit Fenton-Reagenz im Allgemeinen nicht zu empfehlen, weil sich die Proben zu stark zersetzt haben und zu keiner zusätzlichen Informationen geführt haben.

Die Stressreaktion mit den Schwermetallsalzen und Komplexen sollte Metallionen katalysierte Oxidationen simulieren. Es wurden zum einen die anorganischen Salze und zum anderen organische Komplexe verwendet. Sie waren besser im organischen Lösemittel löslich [36]. Eisen(III)- und Kupfer(II)-Ionen kommen ubiquitär vor und sind typische Autoxidationskatalysatoren [36]. Arzneistoffe können mit Schwermetallionen in sehr geringen Konzentrationen verunreinigt sein. Weiterhin lassen sich aktive Methylengruppen und elektronenreiche Gruppen leicht durch Schwermetallionen oxidieren. Deshalb hat dieser Stresstest auch eine gewisse Relevanz und zudem ist er leicht durchführbar [36]. Im Beispiel von ASTAR führte er allerdings zu keinen neuen Erkenntnissen. Die Substanz reagierte nicht mit den Schwermetallionen. Mit BAY allerdings entstanden sehr geringe Mengen von relevanten Abbauprodukten mit Kupfer(II)-Acetylacetonat und Eisen(III)-Chlorid. Das Abbauprodukt, das bei der Reaktion mit dem Kupferkomplex entstand, wurde bei keiner anderen Reaktion gebildet. Das lässt vermuten, dass dieser Reaktion ein anderer Mechanismus zugrunde liegen könnte. Vermutlich bildet sich das Produkt auch mit dem Kupfersalz, aber ist aufgrund seiner geringen Konzentration nicht detektiert worden.

Die Reaktion mit Rose Bengal simuliert die Oxidation mit Singulett-Sauerstoff. Rose Bengal fungiert dabei als Photosensitizer. Singulett-Sauerstoff kann auch in thermischen Reaktionen gebildet werden [36]. Bei ASTAR führte die Reaktion mit Rose Bengal zu einer deutlichen Zunahme von VU<sub>2</sub>, wohingegen bei BAY diese Reaktion keine Rolle spielte.

Die Durchführung von Stresstests kann sehr aufwendig sein. Deshalb wäre eine Automatisierung z. B. mit einem Syntheseroboter vorteilhaft. Es ist auch vorstellbar, alle Reaktionen bis auf die mit Tween<sup>®</sup> 80 und Rose Bengal im Autosampler einer HPLC-Anlage mit vorgegebener Injektionszeit durchzuführen. D. h. die Stresslösungen und Referenzlösungen befinden sich in Vials, die zur Reaktion bei der entsprechenden Temperatur im Autosampler gelagert werden. Die Probe würde gleich analysiert werden können und es würde keine zeitliche Verzögerung zwischen Probenahme und Analyse entstehen. Allerdings würde die Reaktion im Mikromaßstab (ca. 1.8 ml Lösung pro Vial) stattfinden. Somit würde die Verdünnung der Probe mit Lösemittel wegfallen und die Konzentrationen der Reagenzien während der Reaktion wären auch geringer. Ob eine Automatisie-



rung des oxidativen Stresstests in der vorgeschlagenen Vorgehensweise möglich ist, müsste daher geprüft werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in jedem Fall oxidative Stresstests mit Wasserstoffperoxid, Radikalstartern und Schwermetallionen durchgeführt werden sollten. Diese Reaktionen können Aufschluss über die Oxidationsempfindlichkeit einer Substanz geben, weil sie verschiedene relevante Reaktionen simulieren. Die Reaktionen mit Tween<sup>®</sup> 80 und Rose Bengal könnten zusätzlich im präparativen Maßstab durchgeführt werden, um die Isolierung eines Abbauproduktes zu vereinfachen und die Struktur oder den Reaktionsmechanismus aufzuklären. Es ist wichtig, darauf zu achten, dass die Reaktionsbedingungen mild sind. D. h., der Endpunkt der Reaktion sollte nach 10-20 % iger Zersetzung des Hauptproduktes gewählt werden, um relevante Abbauprodukte zu simulieren. Es gibt keinen universell einsetzbaren Stresstest. Der Grund für irrelevante Abbauprodukte ist die unterschiedliche Thermodynamik der Stressreaktionen verglichen mit Reaktionen, die unter realen Lagerbedingungen auftreten [39].

Ein anderer Aspekt in Bezug auf Stresstests ist ihre analytische Durchführung und Auswertung. Es ist bekannt, dass die Kombination von UV oder DAD- und MS-Detektion sehr vorteilhaft für die Auswertung der Stresstests ist [72], da es sich um technologisch orthogonale Detektionssysteme unterschiedlicher Selektivität handelt. Im MS werden auch Substanzen erfasst, die keine chromophoren Strukturen haben. Weiterhin sind nicht alle Substanzen, die UV-aktiv sind, auch im MS sichtbar. Die zwei Detektionsmethoden ergänzen sich und bestätigen somit die gefunden unbekanntes Abbauprodukte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine spezielle Software (MetaboLynx) zur Identifizierung von relevanten Abbauprodukten in eingelagerten Formulierungen verwendet. MetaboLynx ist besonders geeignet, um unbekanntes und bekannte Substanzen in sehr kleinen Konzentrationen zu erfassen [72]. Diese Substanzen sind im UV- oder Massenchromatogramm nicht ohne weiteres sichtbar. MetaboLynx scannt die Daten in sehr kleinen Massenschritten (0.05 Da) und vergleicht die Signale der Kontrollprobe unter Berücksichtigung des m/z Verhältnisses der Intensität und der Retentionszeit mit denen der Analytprobe. Somit werden die Signale sehr effektiv aus dem Rauschen gefiltert. In den eingelagerten Formulierungen von BAY konnten auf diese Weise relevante Abbauprodukte, die sich während der Lagerung bildeten, in sehr geringen Konzentrationen bestimmt werden. Durch die Anwendung der orthogonalen Methoden wurden die

Abbauprodukte zusätzlich bestätigt. Das war sehr wichtig, weil mit MetaboLynx zahlreiche Massensignale integriert wurden, die aber meist nicht relevant waren und zum Rauschen gehörten. Durch Vergleich der gefundenen Signale in beiden Systemen konnten die relevanten Massensignale identifiziert werden.

Generell hat sich herausgestellt, dass sowohl die orthogonalen Systeme von ASTAR als auch die von BAY für die Interpretation der Stresstests vorteilhaft waren. Bei ASTAR wird dieser Sachverhalt in Abb. 35 deutlich. Die unbekanntesten Produkte P1-P3 eluieren in den Systemen in unterschiedlicher Reihenfolge und sind teilweise mit verschiedenen Massensignalen koeluiert. Durch die Wiederfindung der Signale in beiden Systemen wird das Signal bestätigt. Über die Relevanz der Massensignale für die Langzeitstabilität kann für ASTAR keine Aussage gemacht werden, weil keine eingelagerten Muster der Substanz oder seiner Formulierung für eine Analyse zur Verfügung standen. Die Notwendigkeit der Untersuchung dieser Muster ist bei BAY deutlich geworden. Obwohl BAY eine sehr stabile Substanz ist, konnten in den Stresstests mit einigen Reagenzien mehrere unbekannteste Signale detektiert werden. Die Relevanz der einzelnen Signale für die Langzeitstabilität ist aber erst nach der Analyse der Stabilitätsmuster mit MetaboLynx und anschließendem Vergleich dieser Signale mit den Signalen der Stresstests veranschaulicht worden. Die Abb. 42 zeigt schematisch die Übereinstimmungen zwischen den durchgeführten Stresstests und den Stabilitätsmustern von BAY, in Bezug auf relevante Abbauprodukte, die in den Stabilitätsmustern mit MetaboLynx erfasst wurden.

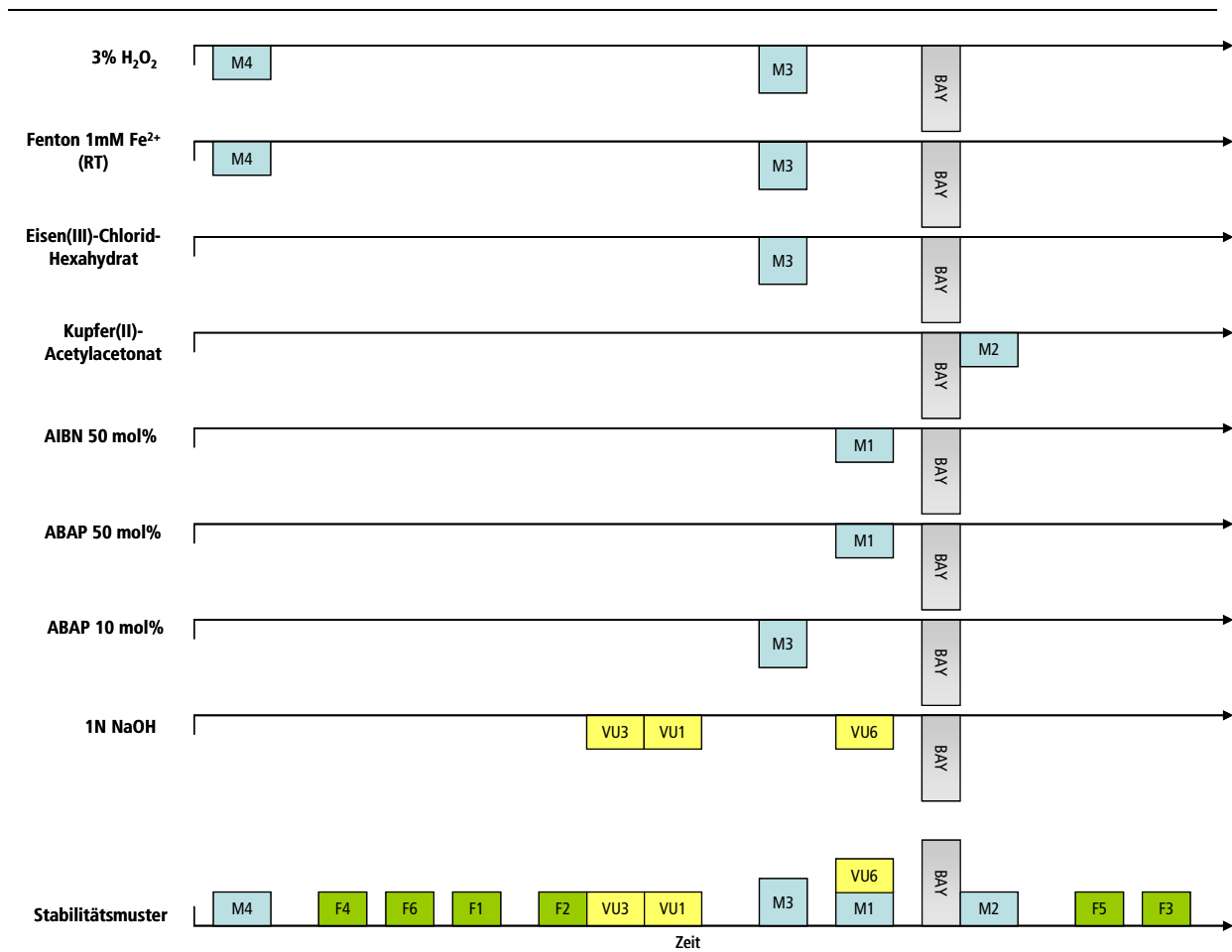


Abb. 42: Vergleich der schematisierten Chromatogramme eines Stabilitätsmusters mit Chromatogrammen der Stressstestproben von BAY. In den Chromatogrammen sind nur die relevanten Abbauprodukte dargestellt, die mit MetaboLynx erfasst wurden.

In dem Schema wird deutlich, dass ein bis drei von insgesamt 13 relevanten Abbauprodukten mit einem Stresstest erzeugt werden konnten. VU1, VU3 und VU6 waren bekannte Verunreinigungen, deren Zunahme während der Lagerung aber nur mit NaOH erreicht wurde. Von den verbliebenen zehn unbekannt relevanten Abbauprodukten konnten nur vier Produkte (M1-M4) in den Stresstests simuliert werden. Ein Grund dafür war, dass nur die oxidativen Stresstests und zwei hydrolytische Tests durchgeführt wurden. D. h., es wurde nur ein begrenzter Teil an möglichen Stresstests durchgeführt. Des Weiteren ist nur der Arzneistoffkandidat als Substanz und nicht in der Formulierung gestresst worden. In den einzelnen Stressstestproben wurden jedoch auch z. T. zahlreiche andere Massensignale erfasst (diese sind nicht im Schema dargestellt). D. h., ein großer Anteil an unbekannt relevanten Massensignalen in den Stressdaten war für die Langzeitstabilität nicht relevant. Weiterhin war erkennbar, dass nicht alle relevanten Abbauprodukte von BAY durch Stresstests identifiziert wurden. Die gefundenen unbekannt relevanten Abbauprodukte F1-F6 könnten von Reaktionen mit den verwendeten Hilfsstoffen und BAY herrühren oder auch direkte Abbauprodukte der Hilfsstoffe sein. Das kann durch

Analyse von eingelagerten oder auch gestressten Placebotabletten überprüft werden. Die Vorhersage der Stabilität der Formulierung ist somit durch den alleinigen Stresstest des Wirkstoffs nicht realisierbar [7]. Insgesamt gesehen ist es jedoch gelungen, das Abbau-muster aus den Stabilitätsproben partiell mit den angewandten Stresstests zu reproduzieren.

Durch die Identifizierung der relevanten Abbauprodukte in den Stresstestproben besteht die Möglichkeit, die Abbauprodukte mit diesen Reaktionen gezielt in größeren Mengen zu erzeugen und anschließend, nach Isolation mit präparativer HPLC, die Struktur aufzuklären.

Die Software MetaboLynx ist zwar ein sehr effektives Werkzeug zur Identifizierung relevanter Abbauprodukte in geringen Konzentrationen, ist aber für die Anwendung in der Routineanalytik nicht geeignet. Die Prozessierung der Daten ist sehr zeitaufwendig. Weiterhin müssen die Parameter der Prozessiermethode von MetaboLynx für jede Probe einzeln optimiert werden. Die Ergebnisse von MetaboLynx müssten zusätzlich noch manuell geprüft werden, weil viele Signale zwar erkannt, aber nicht automatisch berichtet werden. Ebenso werden viele Signale aus dem Rauschen integriert, die dann wieder manuell aus den Ergebnissen entfernt werden müssen. Eine Anwendung der Software auf die Stressproben wäre jedoch sehr zeitaufwendig, weil aller Voraussicht nach nur wenige Massensignale in den Stressproben für die Langzeitstabilität eine Rolle spielen. Es ist daher empfehlenswert, die Stresstestdaten nach Identifizierung der relevanten Abbauprodukte mittels Stabilitätsmustern noch einmal gezielt auf diese Abbauprodukte hin zu untersuchen (z. B. mit QuanLynx). Denn es ist durchaus denkbar, dass die Signale bei erstmaliger Auswertung der Daten übersehen wurden, weil sie zu klein oder mit anderen Signalen koeluierten und es zur Ionensuppression kam. Dieses Vorgehen setzt allerdings eine MS-Detektion der Stresstestproben voraus. Trotz der Nachteile von MetaboLynx wäre die Anwendung in Kombination mit orthogonalen Systemen zur effektiven Identifizierung relevanter Abbauprodukte in Stabilitätsmustern denkbar.

## 5 Zusammenfassung

In diese Arbeit wurde ein neuartiges Konzept zur Vorgehensweise in der Methodenentwicklung neuer Arzneistoffe vorgestellt und anhand von zwei Arzneistoffkandidaten in der Praxis überprüft, wie folgende Abbildung verdeutlicht:

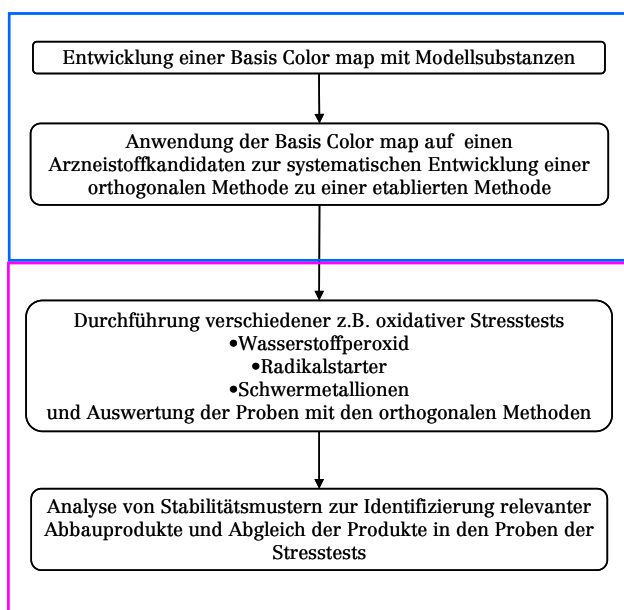


Abb. 43: Konzept zur Methodenentwicklung neuer Arzneistoffe

Das Konzept setzt sich aus zwei Teilen zusammen. Im ersten Teil wird mit Hilfe von Modellschubstanzen ein HPLC-Methodenscreening durchgeführt und mit chemometrischen Methoden ausgewertet. Das Ergebnis ist eine sogenannte Basis-Color map, die ähnliche und orthogonale Systeme abbildet. Sie wird nun als Hilfsmittel für die Methodenentwicklung eines orthogonalen Systems zu einem etablierten System eines Arzneistoffs und seinen Verunreinigungen verwendet. Mit der Basis-Color map werden mögliche orthogonale Systeme zum etablierten System selektiert. Aus diesen Systemen wird nach einem individuellen Methodenscreening und anschließender chemometrischer Auswertung ein geeignetes orthogonales System identifiziert und optimiert. Auf diese Weise kann schnell und systematisch ein orthogonales System mit deutlich anderer Selektivität als das etablierte System entwickelt werden.

Im zweiten Teil des Konzepts werden verschiedene Stresstests mit Arzneistoffkandidaten durchgeführt und mit den zuvor entwickelten orthogonalen Methoden ausgewertet. Insbesondere wurden verschiedene Reagenzien für den oxidativen Stresstest betrachtet.

Als Ergebnis zur Überprüfung der Oxidationsempfindlichkeit von Arzneistoffen wird die Durchführung verschiedener oxidativer Stresstests, die auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen beruhen, empfohlen. Dazu zählen Tests mit Wasserstoffperoxid, Radikalstartern und Schwermetallionen. Einen universellen Stresstest für alle Arzneistoffe, der die relevanten Abbauprodukte simuliert, gibt es jedoch nicht. Die Anwendung hochselektiver Methoden bei Stressproben stellt sicher, dass bei regulären Stabilitätsstudien mit hoher Wahrscheinlichkeit alle realen Abbauprodukte erfasst werden. Zur Beurteilung der Relevanz der entstandenen Abbauprodukte im Stresstest wurden eingelagerte Stabilitätsmuster untersucht und mit den Stressproben verglichen. Die Auswertung der MS-Daten der Stabilitätsmuster erfolgte mit einer speziellen Software (MetaboLynx), die in der Lage war, sehr kleine Massensignale aus dem Rauschen zu filtern. Somit wurden relevante Abbauprodukte, die während der Lagerung zunahmen, identifiziert. Diese Abbauprodukte konnten mit beiden orthogonalen Systemen erfasst werden und ihre Relevanz wurde somit bestätigt. Sie wurden teilweise in den Stressproben detektiert und könnten nun gezielt mit den jeweiligen Reaktionen erzeugt und danach isoliert und charakterisiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mit dieser Arbeit gelungen ist zu zeigen, dass mit der vorgestellten Vorgehensweise Hinweise auf die Langzeitstabilität und auf das Abbaumuster von Arzneistoffen in Formulierungen erzielt werden können.

## 6 Abstract

In this thesis a new concept was presented as an approach for the method development of new drug products. It was verified and reduced to practice with two drug candidates.

The concept consists of two main parts. In the first part a HPLC-method screening is performed with the help of model substances. The screening is evaluated with chemometric methods, which are resulting in a so called Basic Color map visualizing similar and orthogonal systems. The Color map is an implement for the method development of orthogonal systems based on an established system of a drug product and its impurities. A subset of orthogonal systems is selected referring to the Basic Color map. After an individual method screening of these systems and chemometric evaluation an appropriate orthogonal system is identified and optimised. Following this approach it is possible to develop an orthogonal system with a distinct different selectivity compared to the established system fast and systematically.

In the second part of the concept different stress tests are performed with drug candidates and evaluated with orthogonal methods, which are developed beforehand. Particularly different reagents for oxidative stress testing are considered. As a result for the examination of the oxidative susceptibility of drug products, the performance of different oxidative stress tests is recommended. These stress tests are based on different reaction mechanisms. Tests with hydrogen peroxide, radical initiators and heavy metal ions are counted among the commonly used oxidative stress tests. An universal stress test for all drug products which simulates relevant degradation products does not exist. The application of high selective methods for stress samples ensures that in regular stability studies every real degradation product is covered. For estimation of the relevance of arising degradation products during stress test, stored stability samples were analysed and compared with the stress test samples. The evaluation of the MS-data is carried out with a special software (MetaboLynx). This software is able to filter very small mass signals from threshold signals. Therefore relevant degradation products, which increase during storage are identified. These degradation products are detected with both orthogonal methods. In this way the products are verified. In parts some products are recovered in the stress samples and can be detected and reproduced with the respective reagent. Afterwards they can be isolated and characterised.

In summary, the present work shows that the described approach is capable to provide indications concerning long term stability and degradation profiles of active pharmaceutical ingredients and drug products.



## Literaturverzeichnis

- [1] ICH Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products; (2003);
- [2] ICH Q6A: Specifications : Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products : Chemical Substances; (1999);
- [3] ICH Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances; (2006);
- [4] ICH Q3C(R3): Impurities: Guideline for Residual Solvents; (2005);
- [5] EMEA CHMP: Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities (CPMP/SWP/5199/02); (2006);
- [6] ICH Q1B: Photostability Testing of New Drug Substances and Products; (1996);
- [7] Alsante, K. M.; Ando, A.; Brown, R.; Ensing, J.; Hatajik, T. D.; Kong, W.; Tsuda, Y.; The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products; *Advanced Drug Delivery Reviews*; 59, 1 (2007); 29-37
- [8] Alsante, K. M.; Friedmann, R. C.; Hatajik, T. D.; Lohr, L. L.; Sharp, T. R.; Snyder, K. D.; Szczesny, E. J., Degradation and impurity analysis for pharmaceutical drug candidates; Kapitel: 4 in *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*; Academic Press; (2001); 85-172.
- [9] Wang, X.; Li, W.; Rasmussen, H. T.; Orthogonal method development using hydrophilic interaction chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of pharmaceuticals and impurities; *Journal of Chromatography A*; 1083, (2005); 58-62
- [10] Argentine, M. D.; Owens, P. K.; Olsen, B. A.; Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances; *Advanced Drug Delivery Reviews*; 59, 1 (2007); 12-28
- [11] Xue, G.; Bendick, A. D.; Chen, R.; Sekulic, S. S.; Automated peak tracking for comprehensive impurity profiling in orthogonal liquid chromatographic separation using mass spectrometric detection; *Journal of Chromatography A*; 1050, (2004); 159-171
- [12] Wittstock, O., Latein und Griechisch im deutschen Wortschatz; Volk und Wissen Volkseigener Verlag, Berlin 1979; (1982)
- [13] Van Gyseghem, E.; Jimidar, M.; Sneyers, R.; Redlich, D.; Verhoeven, E.; Massart, D. L.; Vander Heyden, Y.; Orthogonality and similarity within silica-based reversed-phased chromatographic systems; *Journal of Chromatography A*; 1074, (2005); 117-131
- [14] Put, R.; Van Gyseghem, E.; Coomans, D.; Vander Heyden, Y.; Selection of orthogonal reversed-phase HPLC systems by univariate and auto-associative multivariate regression trees; *Journal of Chromatography A*; 1096, (2005); 187-198
- [15] Van Gyseghem, E.; Jimidar, M.; Sneyers, R.; Redlich, D.; Verhoeven, E.; Massart, D. L.; Vander Heyden, Y.; Selection of reversed-phase liquid chromatographic columns with diverse selectivity towards the potential separation of impurities in drugs; *Journal of Chromatography A*; 1024, (2004); 69-80

- [16] Van Gyseghem, E.; Crosiers, I.; Gourvéneć, S.; Massart, D. L.; Vander Heyden, Y.; Determining orthogonal and similar chromatographic systems from the injection of mixtures in liquid chromatography-diode array detection and the interpretation of correlation coefficients color maps; *Journal of Chromatography A*; 1026 (2004); 117-128
- [17] Van Gyseghem, E.; Van Hemelryck, S.; Daszykowski, M.; Questier, F.; Massart, D. L.; Vander Heyden, Y.; Determining orthogonal chromatographic systems prior to the development of methods to characterise impurities in drug substances; *Journal of Chromatography A*; 988, (2003); 77-93
- [18] Van Gyseghem, E.; Dejaegher, B.; Puta, R.; Forlay-Frick, P.; Elkihel, A.; Daszykowski, M.; Heberger, K.; Massart, D. L.; Vander Heyden, Y.; Evaluation of chemometric techniques to select orthogonal chromatographic systems; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 41, (2006); 141-151
- [19] Van Gyseghem, E.; Elkihel, A.; Jimidar, M.; Sneyers, R.; Vander Heyden, Y.; Chemometric selection of a small set of pharmaceutical active substances used in determining the orthogonality and similarity of chromatographic systems; *Analytica Chimica Acta*; 562, 1 (2006); 73-84
- [20] Kucera, R.; Sochor, J.; Klimes, J.; Dohnal, J.; Use of the zirconia-based stationary phase for separation of ibuprofen and its impurities; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 38, 4 (2005); 609-618
- [21] Daszykowski, M.; Walczak, B.; Massart, D. L.; Density-based clustering for exploration of analytical data; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 380, (2004); 370-372
- [22] Pellett, J.; Lukulay, P.; Yun Mao, Y.; Bowen, W.; Reed, R.; Ma, M.; Munger, R. C.; Dolan, J. W.; Wrisley, L.; Medwid, K.; Toltl, N. P.; Chanf, C. C.; Skibic, M.; Biswas, K.; Wells, K. A.; Snyder, L. R.; "Orthogonal" separations for reversed-phase liquid chromatography; *Journal of Chromatography A*; 1101, (2006); 122-135
- [23] Dolan, J. W.; Snyder, L. R.; Our Expanding Understanding and Use of Reversed-Phase Column Selectivity Phase; *LC Resources*; (2004); 1-26
- [24] Dolan, J. W.; Maule, A. B. D.; Wrisley, L.; Chan, C. C.; Angod, M.; Lunte, C.; Krisko, R.; Winston, J. M.; Homeier, B. A.; McCalley, D. V.; Snyder, L. R.; Choosing an equivalent replacement column for a reversed-phase liquid chromatographic assay procedure; *Journal of Chromatography A*; 1057, (2004); 59-74
- [25] Kromidas, S., HPLC richtig optimiert: Ein Handbuch für den Praktiker; WILEY-VCH GmbH & Co.KGaA; (2006); ISBN: 3-527-31470-9
- [26] Wilson, N. S.; Nelson, M. D.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R.; Wolcott, R. G.; Carr, P. W.; Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography I. A general quantitative relationship; *Journal of Chromatography A*; 961, (2002); 171-193
- [27] Wilson, N. S.; Nelson, M. D.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R.; Carr, P. W.; Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography II. Effect of a change in conditions; *Journal of Chromatography A*; 961, (2002); 195-215
- [28] Wilson, N. S.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R.; Carr, P. W.; Sander, L. C.; Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography III. The physico-chemical basis of selectivity; *Journal of Chromatography A*; 961, (2002); 217-236
- [29] Otto, M., Mustererkennung und Klassifizierung; Kapitel: 5 in *Chemometrie: Statistik und Computereinsatz in der Analytik*; WILEY-VCH GmbH & Co.KGaA; (1997); 135-195.

- 
- [30] Massart, D. L.; Smeyers-Verbeke, J.; Vander Heyden, Y.; Classifying Chromatographic Systems by Clustering; LCGC Europe; 1, (2006);
- [31] Meyer, V. R., Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie; WILEY-VCH GmbH & Co.KGaA; Vol.: 9 (2004); ISBN: 3-527-30726-5
- [32] Vandeginste, B. G. M.; Massart, D. L.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J., Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B; Elsevier; Vol.: 20B (1998); ISBN: 0-444-82853-2
- [33] Brosius, F., SPSS 14; mitp, REDLINE GmbH; Vol.: 1 (2006); ISBN: 3-8266-1634-0
- [34] Reynolds, W. D.; Facchine, K. L.; Mullaney, J. F.; Alsante, K. M.; Hatajik, T. D.; Motto, M. G.; Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies; Pharmaceutical Technology; (2002); 48-56
- [35] Reynolds, W. D.; Forced Degradation of Pharmaceuticals; American pharmaceutical review; 7, 3 (2004); 56-61
- [36] Baertschi, S. W., Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation; Taylor&Francis Group, LLC; Vol.: 153 (2005); ISBN: 0-8247-4021-1
- [37] Alsante, K. M.; Baertschi, S. W.; Martin, L.; A Stress Testing Benchmarking Study; Pharmaceutical Technology; (2007); 60-72
- [38] Qui, F.; Norwood, D. L.; Identification of Pharmaceutical Impurities; Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies; 30, 5 (2007); 877-935
- [39] Klick, S.; Mujiselaar, P. G.; Waterval, J.; Eichinger T.; Kron, C.; Gerding, T. K.; Debets, A. J.; Sänger-van de Griend, C.; Van de Beld, C.; Somsen, G. W.; De Jong, G. J.; Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products; Pharmaceutical Technology; (2005); 48-66
- [40] Ruan, J.; Tattersall, P.; Lozano, R.; Shah, P.; The Role of Forced Degradation Studies in Stability Indicating HPLC Method Development; American pharmaceutical review; 9, (2006); 46-53
- [41] Burger, A.; Wachter, H., Hunnius: Pharmazeutisches Wörterbuch; Walter de Gruyter & Co.; Vol.: 8 (1998); ISBN: 3-11-015792-6
- [42] Neue, U. D.; VanTran, K.; Iraneta, P. C.; Alden, B. A.; Characterization of HPLC packings; Journal of Separation Science; 26, (2003); 174–186-
- [43] Neue, U. D.; O’Gara, J. E.; Mendez, A.; Selectivity in reversed-phase separations Influence of the stationary phase; Journal of Chromatography A; 1127, (2006); 161-174
- [44] Dehouck, P.; Visky, D.; Van den Bergh, G.; Haghedooren, E.; Adams, E.; Kerner, A.; Vander Heyden, Y.; Massart, D. L.; Kovács, Z.; Noszálc, B.; Hoogmartens, J.; Facilitated Column Ranking and Selection in Reversed-Phase Liquid Chromatographic Analysis; LCGC Europe; (2004); 2-8
- [45] Le Mapihan, K.; Vial, J.; Jardy, A.; Reversed-phase liquid chromatography column testing and classification: Physico-chemical interpretation based on a wide set of stationary phases; Journal of Chromatography A; 1144, 2 (2007); 183-196

- [46] Euerby, M. R.; Petersson, P.; Campbell, W.; Roe, W.; Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis; *Journal of Chromatography A*; 1154, 1-2 (2007); 138-151
- [47] Lesellier, E.; West, C.; Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification; *Journal of Chromatography A*; 1158, 1-2 (2007); 329-360
- [48] Benatti, C. T.; Tavares, C. R. G.; Guedes, T. A.; Optimization of Fenton's oxidation of chemical laboratory wastewaters using the response surface methodology; *Journal of Environmental Management*; 80, 1 (2006); 66-74
- [49] Visky, D.; Vander Heyden, Y.; Ivanyi, T.; Baten, P.; De Beer, J.; Kovács, Z.; Noszál, B.; Dehouck, P.; Roets, E.; Massart, D. L.; Hoogmartens, J.; Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Evaluation of 36 test parameters: repeatability, reproducibility and correlation; *Journal of Chromatography A*; 977, 1 (2002); 39-58
- [50] Neue, U. D.; Alden, B. A.; Walter, T. H.; Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: II. Classification of reversed-phase packings; *Journal of Chromatography A*; 849, 1 (1999); 101-116
- [51] Neue, U. D.; Serowik, E.; Iraneta, P.; Alden, B. A.; Walter, T. H.; Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: I. Assessment of the reproducibility of reversed-phase packings; *Journal of Chromatography A*; 849, 1 (1999); 87-100
- [52] Kromidas, S.; Eigenschaften von kommerziellen HPLC RP-Säulen im Vergleich; letztes Update: 2001; 1-126.; <http://www.analytik.de/inhalte/kromidas/RPsaehlen.pdf>
- [53] Kromidas, S.; RP-Explorer 2007; Version 1.0.1; (2007);
- [54] Patent; 11.5.2006; PCT International Patent Application No.: PCT/EP2005/011712; Publication No.: WO 2006/048251;
- [55] Ferse, F.-T.; Sievers, D.; Swartz, M.; Methodenumstellung von HPLC auf UPLC; letztes Update: 5.12.2005; 1-3.; <http://www.laborpraxis.vogel.de/analytik/chromatographie/duenschichtchromatographie/articles/106122/>
- [56] Chesnut, S. M.; Sallsbury, J. J.; The role of UHPLC in pharmaceutical development; *Journal of Separation Science*; 30, 8 (2007); 1183-1190
- [57] Bayer AG; Bayer interne Richtlinie; (2003);
- [58] Waters Corporation; XBridge Columns Care and Use Manual; letztes Update: 25.9.2007; <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720001366EN.pdf>
- [59] Storm, T.; Persönliche Mitteilung; (2007);
- [60] Harmon, P. A.; Kosuda, K.; Nelson, E.; Mowery, M.; Reed, R.; A Novel Peroxy Radical Based Oxidative Stressing System for Ranking the Oxidizability of Drug Substances; *Journal of Chromatographic Science*; 95, 9 (2006); 2014-2028

- 
- [61] Waterman, K. C.; Adami, R. C.; Alsante, K. M.; Hong, J.; Landis, M. S.; Lombardo, F.; Roberts, C. J.; Stabilization of Pharmaceuticals to Oxidative Degradation; *Pharmaceutical Development and Technology*; 7, 1 (2002); 1-32
- [62] Boccardi, G.; Deleuze, C.; Gachon, M.; Palmisano, G.; Vergnaud, J. P.; Autoxidation of Tetrazepam in Tablets: Prediction of Degradation Impurities from the Oxidative Behavior in Solution; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 81, 2 (1992); 183-185
- [63] Eric, D. N.; Evaluation of solution oxygenation requirements for azonitrile-based oxidative forced degradation studies of pharmaceutical compounds; *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 95, 7 (2006); 1527-1539
- [64] Hovorka, S. W.; Schöneich, C.; Oxidative Degradation of Pharmaceuticals: Theory, Mechanisms and Inhibition; *Journal of Chromatographic Science*; 90, 3 (2001); 253-269
- [65] Lombardo, F.; Campos, G., How Do We Study Oxidative Chemical Stability in Discovery? Some Ideas, Trials, and Outcomes; Kapitel: 3 in *Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery for Lead Selection*; (2004); 183-194.; ISBN: 0971176795
- [66] Martini, M.; Termini, J.; Peroxy Radical Oxidation of Thymidine; *Chemical Research in Toxicology*; 10, (1997); 234-241
- [67] Chen, X.-Q.; Antman, M. D.; Gesenberg, C.; Gudmundsson, O. S.; Discovery Pharmaceuticals-Challenges and Opportunities; *AAPS Journal*; 8, 2 (2006); 402-408
- [68] Mizuguchi, T.; Sadaka, S.; Ogasawara, C.; Shimada, K.; Determination of the Effect of Hydrogen Peroxide on Photocatalytic Degradation of Estrogen Using HPLC; *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*; 29, (2006); 903-911
- [69] Bhutani, H.; Singh, S.; Vir, S.; Bhutani, K. K.; Kumar, R.; Chakraborti, A. K.; Jindal, K. C.; LC and LC-MS study of stress decomposition behaviour of isoniazid and establishment of validated stability-indicating assay method; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 43, 4 (2007); 1213-1220
- [70] Asker, A. F.; Photostability Studies of Solutions and Methods of Preventing Photodegradation; *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*; 163, 17 (2007); 345-378
- [71] Storm, T.; Persönliche Mitteilung; (2008);
- [72] Freed, A. L.; Kale, U.; Ando, H.; Rossi, D. T.; Kingsmill, C. A.; Improving the detection of degradants and impurities in pharmaceutical drug products by applying mass spectral and chromatographic searching; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 35, 4 (2004); 727-738

## Anhang

Tab. A-1: Hersteller der Modellsubstanzen für HPLC- und UPLC-Methodenscreening

Substanz	Bezeichnung im Screening	Cas.-Nr.	Gehalt [%]	Chargennr.	Hersteller / Lieferant
Sulfanilsäure	1	121-57-3	98-102	LOT 106Q1	Alfa Aesar GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
Sulfanilamid	2	63-74-1	98	LOT D6322C	
Sulfacetamid	3	144-80-9	98	LOT J6817A	
Dapson	4	80-08-0	98	LOT H3388A	
Sulfaguanidin	5	57-67-0	99.	030K0629	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deutschland
Sulfamethazin	6	35762-76-6	99	LOT D7312A	Alfa Aesar GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
2-Amino-4,6-dimethylpyrimidin	6a	767-15-7	98	LOT J4808A	
Sulfisomidin	7	515-64-0	98	L.GE01-BL	ABCR GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
4-Amino-2,6-dimethylpyrimidin	7a	461-98-3	98	LOT 10117648	Alfa Aesar GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
Sulfadiazin	8	68-35-9	99	LOT F6945A	
2-Aminopyrimidin	8a	109-12-6	98	LOT 10113623	
Sulfamerazin	9	127-79-7	98	LOT 10108433	ABCR GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
2-Amino-4-methylpyrimidin	9a	108-52-1	98	LOT 10000110	Alfa Aesar GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
4-Acetamidobenzenesulfonamid	10	121-61-9	98	L.FBV01-BL	ABCR GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland

Tab. A-2: Strukturformeln der Modellsubstanzen

Substanz	Strukturformel
Sulfanilsäure	
Sulfanilamid	
Sulfacetamid	
Dapson	
Sulfaguanidin	
Sulfamethazin	
2-Amino-4,6-dimethylpyrimidin	
Sulfisomidin	
4-Amino-2,6-dimethylpyrimidin	
Sulfadiazin	
2-Aminopyrimidin	
Sulfamerazin	
2-Amino-4-methylpyrimidin	
4-Acetamidobenzenesulfonamid	

Tab. A-3: RP-Säulen des HPLC-Methodenscreenings

Säulenbezeichnung	Säulenname	L [mm]	d <sub>c</sub> [mm]	d <sub>p</sub> [µm]	V <sub>c</sub> [ml]	Endcapped	Porendurchmesser [Å]	Spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Kohlenstoffgehalt [C%]	Hersteller / Lieferant
S1	Chromolith Performance	100	4.6		1.06	ja	130	300	18	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
S2	Atlantis dC18	100	3	3	0.45	ja	100	330	12	Waters Corp.; Milford, USA
S3	Hypersil Gold PFP	100	3	3	0.45	ja	175	220	10	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
S4	BetaMax Acid	100	3	5	0.45	ja	60	540	15	
S5	YMC-Pack Cyano	100	3	3	0.45	ja	120	k. A.	7	YMC Europe GmbH; Dinslaken, Deutschland
S6	YMC-Pack Pro C18 RS	100	3	3	0.45	ja	80	k. A.	22	
S7	Phenomenex Synergi MAX-RP	100	3	4	0.45	ja	80	475	15	Phenomenex Ltd.; Aschaffenburg, Deutschland
S8	x-Bridge Shield RP 18	100	3	3.5	0.45	ja	135	185	16.6	Waters Corp.; Milford, USA
S9	Gemini Hexyl Phenyl	100	3	3	0.45	ja	110	375	14	Phenomenex Ltd.; Aschaffenburg, Deutschland
S10	Cogent Bidentate C18™	100	4.6	4	1.06	k. A.	100	k. A.	k. A.	MicroSolv Technology Corporation; Eatontown, USA

Tab. A-4: RP-Säulen des UPLC-Methodenscreenings

Säulenbezeichnung	Säulenname	L [mm]	d <sub>c</sub> [mm]	d <sub>p</sub> [µm]	V <sub>c</sub> [ml]	Endcapped	Porendurchmesser [Å]	Spezifische Oberfläche [m <sup>2</sup> /g]	Kohlenstoffgehalt [C%]	Hersteller / Lieferant
S1	Hypersil Gold	50	2.1	1.9	0.110	ja	175	220	10	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
S2	BEH Shield RP18	50	2.1	1.7	0.110	ja	130	185	17	Waters Corp.; Milford, USA
S3	BEH C18	50	2.1	1.7	0.110	ja	130	185	18	
S4	YMC-UltraHT Pro C18	50	2	2	0.100	ja	120	330	17	YMC Europe GmbH; Dinslaken, Deutschland
S5	BEH Phenyl	50	2.1	1.7	0.110	ja	130	185	15	Waters Corp.; Milford, USA
S6	Zorbax SB-CN	50	2,1	1.8	0.110	nein	80	k. A.	k. A.	Agilent Technologies; Waldbronn, Deutschland
S7	Zorbax Extent-C18	50	2.1	1.8	0.110	ja	80	180		
S8	Hypersil Gold PFP	50	2.1	1.9	0.110	ja	175	k. A.	8	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
S9	Hypersil Gold aq	50	2.1	1.9	0.110	ja (hydrophil)	175	k. A.	k. A.	
S10	HSS Column T3	50	2.1	1.8	0.110	ja	100	k. A.	k. A.	Waters Corp.; Milford, USA



Tab. A-5: Retentionsfaktoren des HPLC-Methodenscreening

System	Sulfanisäure	Sulfanilamid	Sulfacetamid	Dapson	Sulfaguainidin	Sulfamethazin	2-Amino-4,6-dimethylpyrimidin	Sulfisomidin	4-Amino-2,6-dimethylpyrimidin	Sulfadiazin	2-Aminopyrimidin	Sulfamerazin	2-Amino-4-methylpyrimidin	4-Acetamido-benzensulfonamid
S1_ChromolithPerformance_A7	0.095	0.688	0.174	2.844	0.507	2.389	2.245	1.567	1.258	1.260	0.995	1.937	1.680	1.581
S1_ChromolithPerformance_A3	0.137	0.596	1.515	2.799	0.415	1.414	1.067	1.120	0.424	0.497	1.063	1.897	1.535	1.578
S1_ChromolithPerformance_M7	0.107	0.681	0.222	2.930	0.551	2.979	3.657	2.125	2.294	1.520	1.790	2.362	2.753	1.999
S1_ChromolithPerformance_M3	0.108	0.575	1.564	2.855	0.437	2.862	1.959	0.288	0.790	1.949	0.452	2.442	0.455	1.986
S2_AtlantisC18_A7	0.223	1.587	0.482	5.187	1.206	4.529	3.772	3.341	2.006	2.900	1.539	4.014	2.993	3.383
S2_AtlantisC18_A3	0.211	1.371	0.311	5.129	0.981	4.441	0.671	3.239	0.324	3.610	0.290	4.107	0.354	3.384
S2_AtlantisC18_M7	0.276	1.668	0.637	5.493	1.474	5.508	5.670	3.458	3.718	4.143	2.777	4.770	4.345	4.131
S2_AtlantisC18_M3	0.289	1.399	3.551	5.386	1.135	5.352	1.153	3.958	0.459	4.143	0.385	4.813	0.580	4.100
S3_HypersilGoldPP_A7	0.026	0.830	0.126	3.885	0.695	3.077	2.697	2.363	1.855	1.218	0.913	2.532	1.836	2.278
S3_HypersilGoldPP_A3	0.204	0.735	2.132	3.852	0.577	2.961	0.413	2.521	0.206	2.382	0.237	2.730	2.292	3.060
S3_HypersilGoldPP_M7	0.057	0.964	0.197	4.731	0.898	4.119	4.063	3.402	2.862	1.936	1.627	3.379	2.913	3.033
S3_HypersilGoldPP_M3	0.180	0.818	2.588	4.672	0.723	3.947	0.801	3.568	0.438	3.025	0.406	3.542	0.409	3.033
S4_BetaMaxAcid_A7	0.916	2.126	1.411	5.881	1.951	5.004	1.411	3.957	2.420	3.663	1.479	4.552	2.798	3.782
S4_BetaMaxAcid_A3	-0.103	1.835	3.807	5.800	1.477	4.770	-0.023	2.927	-0.102	4.094	0.078	4.511	0.079	3.808
S4_BetaMaxAcid_M7	1.455	2.550	2.383	6.782	2.377	6.226	5.123	5.403	3.460	5.115	2.403	5.917	3.897	4.725
S4_BetaMaxAcid_M3	1.294	2.045	4.383	6.603	1.765	5.670	0.034	3.685	-0.094	4.858	0.161	5.361	0.160	4.614
S5_YMC-PackCyano_A7	-0.008	0.862	0.052	4.009	0.678	2.315	1.613	1.237	1.295	0.542	0.621	1.233	0.989	1.745
S5_YMC-PackCyano_A3	0.177	0.739	1.752	3.913	0.529	2.168	0.111	1.356	0.058	1.758	0.100	1.975	0.107	1.731
S5_YMC-PackCyano_M3	0.053	0.817	2.209	4.641	0.598	2.916	0.129	1.906	0.089	2.255	0.118	2.606	0.120	2.207
S5_YMC-PackCyano_M7	0.064	1.008	0.163	4.838	0.787	3.236	2.233	2.147	1.240	1.046	0.758	2.347	1.306	2.347
S6_YMC-PackProC18RS_A7	0.217	1.511	0.377	5.636	1.063	4.999	4.085	3.570	1.712	2.776	1.320	4.351	3.131	3.595
S6_YMC-PackProC18RS_A3	0.208	1.296	3.575	5.555	0.885	4.905	0.246	3.338	0.245	3.904	0.246	4.517	0.246	3.574
S6_YMC-PackProC18RS_A9	0.200	1.469	0.227	5.648	1.053	3.721	4.112	2.102	2.857	0.705	1.314	1.970	3.144	3.536
S6_YMC-PackProC18RS_M7	0.234	1.342	0.521	5.796	1.058	5.983	6.253	4.532	3.468	3.467	2.410	5.006	4.555	4.266
S6_YMC-PackProC18RS_M3	0.259	1.041	3.248	6.120	0.823	5.147	0.345	3.597	0.258	3.776	0.268	4.564	0.267	3.951
S6_YMC-PackProC18RS_M9	0.236	1.343	0.338	5.792	1.082	5.217	6.282	3.856	4.564	1.404	2.411	3.615	4.562	4.202
S7_PhenomenexSynergiMAXRRP_A7	0.250	1.630	0.408	5.532	1.193	4.886	4.114	3.524	2.153	2.935	1.837	4.325	3.381	3.525
S7_PhenomenexSynergiMAXRRP_A3	0.765	1.397	3.528	5.468	1.133	4.786	0.800	3.565	0.142	3.918	0.273	4.451	0.273	3.523
S7_PhenomenexSynergiMAXRRP_A9	0.171	1.647	0.214	5.562	1.218	3.444	4.221	1.961	3.205	0.746	1.913	1.646	3.445	3.475
S7_PhenomenexSynergiMAXRRP_M7	0.290	1.437	0.627	5.755	1.237	5.816	6.324	4.458	3.610	3.609	3.328	4.956	4.921	4.046
S7_PhenomenexSynergiMAXRRP_M3	0.388	1.202	3.557	5.876	1.299	5.840	1.319	4.339	0.571	4.538	0.491	5.025	0.701	4.037
S7_PhenomenexSynergiMAXRRP_M9	0.353	1.244	1.294	1.408	3.263	3.384	3.707	3.974	4.703	4.823	4.825	5.777	6.344	0.256
S8_xBridgeShieldRP18_A7	0.204	1.119	0.369	5.282	0.887	4.350	3.301	3.008	1.199	2.103	0.849	3.663	1.893	3.072
S8_xBridgeShieldRP18_A3	0.196	0.969	2.900	5.261	0.706	4.248	0.190	2.718	0.195	3.248	0.158	3.856	0.157	3.093
S8_xBridgeShieldRP18_A9	0.181	1.180	0.206	5.314	0.887	3.135	3.319	1.521	1.903	0.433	0.849	1.179	1.883	2.984
S8_xBridgeShieldRP18_M7	0.213	1.096	0.420	5.881	0.931	5.084	4.578	3.779	2.134	2.470	1.226	4.179	2.911	3.724
S8_xBridgeShieldRP18_M3	0.195	1.162	3.471	5.526	0.872	5.509	0.599	3.770	0.194	4.139	0.421	4.908	0.420	3.940
S8_xBridgeShieldRP18_M9	0.198	1.066	0.264	5.888	0.921	4.096	4.593	2.859	3.263	0.656	1.214	2.066	2.909	3.636
S9_GeminiHexylPhenyl_A7	0.275	1.741	0.527	5.482	1.312	4.730	3.613	3.499	1.355	3.338	3.146	1.164	4.249	2.626
S9_GeminiHexylPhenyl_A3	1.372	1.416	3.479	5.454	0.963	4.642	0.064	2.980	-0.045	3.887	0.076	4.346	0.075	3.333
S9_GeminiHexylPhenyl_A9	0.230	1.540	0.265	5.500	1.243	3.443	3.633	2.389	2.438	0.728	1.174	1.799	2.591	3.171
S9_GeminiHexylPhenyl_M7	0.428	1.678	0.819	6.212	1.504	6.078	5.395	4.759	2.637	4.048	1.901	5.327	3.847	3.916
S9_GeminiHexylPhenyl_M3	0.141	0.854	2.867	5.478	0.653	4.591	0.217	3.170	0.140	3.347	0.149	4.061	0.148	3.508
S9_GeminiHexylPhenyl_M9	0.320	1.629	0.446	6.225	1.497	5.069	5.438	3.972	3.800	1.479	1.902	3.431	3.871	3.808
S10_CogentBidentateC18_A7	0.139	2.340	0.340	5.940	1.905	4.907	6.501	3.463	6.883	2.700	3.828	3.916	5.145	3.623
S10_CogentBidentateC18_A3	0.300	2.115	3.808	5.944	1.597	5.132	2.213	3.711	0.973	4.196	1.377	4.744	1.561	3.403
S10_CogentBidentateC18_A9	0.059	2.023	0.077	5.559	1.727	2.569	5.708	1.153	5.140	0.237	3.361	0.559	4.544	3.403
S10_CogentBidentateC18_M7	0.213	2.615	0.739	6.684	2.396	6.636	9.244	5.292	9.200	4.176	6.084	5.652	7.804	4.745
S10_CogentBidentateC18_M3	0.360	2.420	4.393	6.701	2.081	6.659	3.795	5.133	2.427	5.356	3.336	6.107	3.335	4.763
S10_CogentBidentateC18_M9	0.076	2.263	0.127	6.268	2.033	3.936	7.997	2.925	7.199	0.561	4.907	2.261	6.561	4.340

Tab. A-6: Retentionsfaktoren des UPLC-Methodenscreening

System	Sulfacetamid	Dapson	Sulfaguainidin	Sulfamethazin	2-Amino-4,6-dimethylpyrimidin	Sulfisomidin	4-Amino-2,6-dimethylpyrimidin	Sulfadiazin	Sulfamerazin	4-Acetamido-benzensulfonamid
S1_Hypersil_Gold_A7	0,054	4,459	0,432	3,811	2,865	2,000	1,054	1,432	2,676	1,730
S1_Hypersil_Gold_A3	1,595	4,297	0,351	3,757	0,886	2,027	0,243	2,081	2,919	1,730
S1_Hypersil_Gold_A9	0,000	4,459	0,432	2,568	2,946	1,324	1,459	0,405	1,270	1,486
S1_Hypersil_Gold_M7	0,135	4,676	0,378	5,135	5,081	2,973	1,784	1,784	3,486	2,162
S1_Hypersil_Gold_M3	1,703	4,514	0,324	4,892	0,892	2,730	0,297	2,514	3,703	2,135
S1_Hypersil_Gold_M9	0,000	4,703	0,459	4,135	5,054	2,216	2,622	0,703	2,027	2,081
S2_BEHShieldRP18_A7	0,167	5,306	0,528	3,944	2,500	2,083	0,917	1,417	2,694	2,000
S2_BEHShieldRP18_A3	1,778	5,167	0,389	3,722	0,028	1,917	-0,028	2,250	3,222	2,167
S2_BEHShieldRP18_A9	0,000	5,361	0,556	2,500	2,444	1,333	1,333	1,139	1,833	1,833
S2_BEHShieldRP18_M7	0,111	5,778	0,556	4,667	3,694	2,778	1,333	1,583	3,167	2,500
S2_BEHShieldRP18_M3	1,833	5,528	0,417	4,389	0,028	2,306	-0,028	2,417	3,417	2,361
S2_BEHShieldRP18_M9	0,028	5,778	0,611	3,361	3,750	1,889	2,111	0,417	1,444	2,306
S3_BEHC18_A7	0,083	4,611	0,472	4,083	2,972	2,139	1,083	1,556	2,889	1,472
S3_BEHC18_A3	1,722	4,444	0,389	3,972	0,900	2,167	0,222	2,111	3,167	1,861
S3_BEHC18_A9	0,000	4,611	0,361	2,833	1,583	1,417	3,028	0,472	1,444	1,806
S3_BEHC18_M7	-0,024	3,976	0,762	4,548	4,357	2,571	1,452	1,429	3,024	1,905
S3_BEHC18_M3	1,778	4,806	0,417	5,194	0,917	2,972	0,278	2,611	3,917	2,361
S3_BEHC18_M9	0,028	4,778	0,472	4,472	5,222	2,306	2,750	0,806	2,250	2,306
S4_YMC-UltraHProC18_A7	0,278	5,389	0,667	4,611	3,361	2,583	1,389	1,917	3,361	2,581
S4_YMC-UltraHProC18_A3	2,167	5,194	0,500	4,444	0,333	2,222	-0,056	2,667	3,611	2,361
S4_YMC-UltraHProC18_M7	0,389	5,583	0,722	6,167	5,972	3,833	2,389	2,417	4,361	3,194
S4_YMC-UltraHProC18_M3	2,306	5,389	0,556	5,833	0,611	3,111	0,028	3,194	4,528	3,167
S5_BEHPhenyl_A7	0,250	5,194	0,611	4,250	2,639	2,361	0,944	1,750	3,056	1,722
S5_BEHPhenyl_A3	1,972	5,111	0,528	4,139	0,556	2,556	0,028	2,583	3,417	1,806
S5_BEHPhenyl_A9	0,028	5,222	0,694	2,694	2,639	1,444	1,389	0,500	1,361	1,778
S5_BEHPhenyl_M7	0,222	6,561	0,722	6,222	4,472	3,694	1,417	2,222	4,333	2,306
S5_BEHPhenyl_M3	2,250	6,167	0,611	6,028	0,833	3,833	0,250	3,556	4,667	2,306
S5_BEHPhenyl_M9	0,083	6,361	0,611	4,333	4,383	2,250	2,194	2,722	2,000	2,167
S6_ZorbaxSB-CN_A7	0,057	5,200	0,686	3,200	2,171	2,057	1,514	1,171	2,286	1,914
S6_ZorbaxSB-CN_A3	1,714	4,971	0,514	2,971	0,114	1,686	-0,029	2,114	2,600	1,914
S6_ZorbaxSB-CN_M7	0,114	6,686	0,771	4,514	3,143	3,057	1,886	1,543	3,143	2,486
S6_ZorbaxSB-CN_M3	2,000	6,429	0,600	4,229	0,143	2,429	0,057	2,800	3,543	2,457
S7_ZorbaxExtentC18_A7	0,063	5,219	0,469	4,594	3,375	2,375	1,188	1,625	3,188	1,844
S7_ZorbaxExtentC18_A3	1,844	5,000	0,375	4,438	0,438	2,219	0,000	2,250	3,469	2,031
S7_ZorbaxExtentC18_A9	0,031	5,188	0,438	2,844	3,375	1,375	1,688	0,375	1,156	1,969
S7_ZorbaxExtentC18_M7	0,125	5,344	0,438	6,125	6,031	3,531	2,281	2,063	4,125	2,656
S7_ZorbaxExtentC18_M3	1,938	5,156	0,375	5,875	0,813	3,125	0,063	2,969	4,406	2,625
S7_ZorbaxExtentC18_M9	0,063	5,375	0,469	4,688	6,094	2,406	3,188	0,469	2,250	2,563
S8_HypersilGoldPPP_A3	0,081	5,027	0,622	3,568	2,730	2,406	2,770	1,405	2,676	2,054
S8_HypersilGoldPPP_A7	2,027	4,973	0,566	3,432	0,703	2,784	0,378	2,297	2,892	2,081
S8_HypersilGoldPPP_M7	0,135	6,757	0,757	5,270	4,811	3,676	2,432	1,838	3,730	2,946
S8_HypersilGoldPPP_M3	2,486	6,730	0,676	5,027	1,054	4,432	0,514	3,054	4,054	2,973
S9_HypersilGold_aq_A7	0,028	4,417	0,389	3,750	3,056	1,972	1,194	1,389	2,356	1,667
S9_HypersilGold_aq_A3	1,472	4,167	0,361	3,500	0,556	2,083	0,222	1,917	2,722	1,639
S9_HypersilGold_aq_A9	-0,083	4,472	0,389	2,111	2,972	0,917	1,667	0,222	0,806	1,639
S9_HypersilGold_aq_M7	0,028	4,806	0,444	4,917	5,028	2,833	1,639	2,139	3,278	2,139
S9_HypersilGold_aq_M3	1,583	4,556	0,361	4,667	0,889	2,722	0,361	2,361	3,500	2,111
S9_HypersilGold_aq_M9	-0,028	4,917	0,444	3,222	5,111	1,500	2,972	0,278	1,333	2,056
S10_HSS13_A7	0,216	5,486	0,757	4,757	3,432	2,622	1,486	1,946	3,459	2,459
S10_HSS13_A3	2,324	5,351	0,622	4,676	0,811	2,649	0,378	2,838	3,838	2,459
S10_HSS13_M7	0,297	5,784	0,811	6,378	6,216	3,946	2,676	2,514	4,486	3,243
S10_HSS13_M3	2,486	5,730	0,676	6,297	1,351	3,730	0,595	3,459	4,865	3,243

**Tab. A-7: Retentionsfaktoren des HPLC-Methodenscreenings mit ASTAR**

System	ASTAR	VU1	VU2	VU4	VU5	VU6	VU7	VU8	VU9	VU10	VU11
YMC_ref_AC_pH5_20	6.514	4.588	5.634	6.306	6.958	7.153	7.213	7.417	8.185	8.375	8.130
BetaMax_Ac_pH3_20	7.596	6.645	10.461	5.745	10.035	8.908	8.348	12.177	13.262	9.518	16.411
Phenyl_Ac_pH3_20	5.483	4.845	6.169	4.512	6.116	6.406	5.937	7.531	8.285	6.546	9.304
PFP_Ac_pH3_20	5.673	5.273	4.995	5.641	5.932	7.491	6.450	6.623	7.182	7.177	8.341
BetaMax_Me_pH3_45	4.961	3.010	6.263	3.898	7.693	7.220	5.966	8.605	9.405	7.137	11.571
MaxRP_Me_pH9_45	8.071	7.320	4.178	9.523	8.878	9.909	8.975	8.376	9.457	10.843	10.091

**Tab. A-8: Retentionsfaktoren des UPLC-Methodenscreenings mit BAY**

System	BAY	VU1	VU2	VU3	VU4	VU5	VU6	VU7	VU8
Zorbax Extent-C18_A2	15.321	11.679	22.643	11.286	28.679	12.607	12.929	23.500	15.000
Hypersil Gold_A9	14.250	11.607	17.750	14.214	23.429	11.607	14.643	17.536	13.964
Hypersil Gold_M7	16.250	13.607	19.750	16.214	25.429	13.607	16.643	19.536	15.964
Hypersil Gold_M9	14.250	11.607	17.750	13.821	23.464	11.607	14.393	17.500	13.964
BEH Shield RP18_A9	7.857	6.036	10.357	6.321	17.821	5.643	6.964	10.500	7.464
BEH Shield RP18_M9	13.821	11.179	17.036	14.214	25.857	11.286	14.679	17.143	13.536
BEH C18_A9	7.857	6.107	10.679	6.071	16.429	5.607	6.643	10.500	7.500

Tab. A-9: Eingesetzte Substanzen und Eluenten in der Chromatographie

Material	Verwendung	Hersteller / Lieferant
Ammoniumacetat	Herstellung Eluenten bzw. Lösemittel für HPLC oder UPLC-Analytik	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Ammoniumhydrogencarbonat	Herstellung Eluenten für HPLC oder UPLC-Analytik	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deutschland
Ameisensäure (50 %)		
Ammoniaklösung (25 %)		Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Herstellung Eluenten und Lösemittel für HPLC-Analytik	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Ammoniumformiat	Herstellung Eluenten für HPLC-Analytik	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deutschland
Trifluoressigsäure (98 %)	Herstellung Eluenten und Lösemittel für UPLC-Analytik	
Wasser aus Millipore Anlage	Herstellung Eluenten und Lösemittel für HPLC-Analytik	Millipore Corporation; Billerica, USA
Wasser ULC/MS	Herstellung Eluenten und Lösemittel für UPLC-Analytik	Biosolve B.V.; Valkenswaard, Niederlande
Acetonitril Chromasolv® für Flüssigkeitschromatographie	Herstellung Eluenten und Lösemittel für HPLC-Analytik	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deutschland
Acetonitril LC-MS	Herstellung Eluenten und Lösemittel für UPLC-Analytik	Biosolve B.V.; Valkenswaard, Niederlande
LiChrosolv®, Methanol für Flüssigkeitschromatographie	Herstellung Eluenten und Lösemittel für HPLC-Analytik	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Methanol absolute ULC/MS	Herstellung Eluenten und Lösemittel für UPLC-Analytik	Biosolve B.V.; Valkenswaard, Niederlande
Folsäure Dihydrat	Referenzsubstanz für die exakte Massebestimmung mit der UPLC-DAD-MS Anlage	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deutschland

Tab. A-10: Eingesetzte Substanzen für den Stresstest

Material	Hersteller / Lieferant
2,2'-Azobis-(2-aminopropan) (ABAP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Deutschland
2,2'-Azobisisobutyronitril (AIBN)	
Rose Bengale	
Eisen(III)-Acetylacetonat	ABCR GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
Kupfer(II)-Acetylacetonat	Alfa Aesar GmbH & Co KG; Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland
Eisen(III)- Chlorid-Hexahydrat	
Kupfer(II)nitrat Trihydrat	
Tween® 80	Merck Schuchardt OHG; Hohenbrunn, Deutschland

Tab. A-11: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller/ Lieferant
<b>Säulenofen und Schaltventil für die Screeningläufe</b>		
Externer Säulenofen	Jetstream 2	VDS Optilab Chromatographietechnik GmbH; Berlin, Deutschland
Motorschaltventil	LATEK-HMV-6-DUO	LATEK; Eppelheim, Deutschland
<b>HPLC-DAD-Anlage für das HPLC-Methodenscreening mit den Sulfonamiden</b>		
HPLC 1100 Serie		Agilent Technologies; Waldbronn, Deutschland
Dioden-Array-Detektor	G1315A	
Autosampler / Thermostat	G1329A / G1330B	
Binäre Pumpe	G1312A	
Micro Vacuum Degaser	G1379A	
<b>HPLC-DAD-MS-Anlage für das HPLC-Methodenscreening mit ASTAR und den Stresstest</b>		
HPLC 1100 Serie		Agilent Technologies; Waldbronn, Deutschland
Autosampler	G1313A	
HPLC 1200 Serie		
Dioden-Array	G1315B	
Quarternäre Pumpe	G1311A	
Micro Vacuum Degaser	G1322A	
Massenspektrometer (TOF-MS)	Micromass LCT	Waters Corp.; Milford, USA
<b>UPLC-DAD-MS-Anlage für das UPLC-Methodenscreening mit den Sulfonamiden, BAY und den Stresstests</b>		
Acquity™ UPLC System		Waters Corp.; Milford, USA
Dioden Array Detektor	PDA Manager	
Säulenofen mit Schaltventil	Column Manager	
Temperierbarer Autosampler	Sample Manager	
Binäre Pumpe mit Degaser	Binary Solvent Manager	
Massenspektrometer (TOF-MS)	LCT Premier XE	
Lock Spray Pumpe	Rheos 2200	Flux Instruments AG; Reinach, Schweiz
<b>Sonstige verwendete Geräte</b>		
Zentrifuge	Labofuge A	Heraeus; Düsseldorf, Deutschland
Lichtschrank (Photostabilitätstest-schrank)	VP 500-L	Vötsch Industrietechnik; Balingen, Deutschland
Laborschüttler	KS 501 Digital	IKA-Werke GmbH & Co.; Staufen, Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 510 H	Schalltec GmbH & Co.; Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Einkanal Eppendorfpipetten	Research Pro	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH; Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Analysenwaage	AT261	Mettler-Toledo GmbH; Greifensee, Schweiz
Mikrowaage	MT 5	
Labor-pH-Meter	765 Calimatic®	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG; Deutschland
pH-Elektrode	Sen Tix 61	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH; Weilheim, Deutschland

**Tab. A-12: Verwendete Software**

<b>Software</b>	<b>Anwendung</b>
ACD/pKa DB Version 9.03 (ACD/Labs)	Bestimmung der pK <sub>s</sub> -Werte der Sulfonamide
Empower 2 (Waters)	HPLC-Methodenscreening der Sulfonamide
MassLynx Version 4.1 (Waters)	HPLC-Methodenscreening von ASTAR, UPLC-Methodenscreening Sulfonamide und BAY und Analyse der Stresstests
QuanLynx (MassLynx Plug-in)	Auswertung der MS-Daten
MetaboLynx (MassLynx Plug-in)	Auswertung des Stresstests mit BAY
R Version 2.7.1	Chemometrische Auswertung
WinEdit	Editor für R