

ANALYTICS

N° 3
Novembre 2020



Pharma 

**L'élucidation structurale des
substances inconnues dans
les produits pharmaceutiques**



L'élucidation structurale des substances inconnues dans les produits pharmaceutiques

Auteur: Fabian Schwizer

Introduction

L'effet potentiellement toxique d'une contamination inconnue dans les produits pharmaceutiques nécessite une étude plus approfondie si la concentration de la contamination dépasse une certaine valeur cible^{[1][2]}. Afin de pouvoir effectuer les études toxicologiques correspondantes, la structure chimique de l'impureté doit d'abord être déterminée. La technique la plus courante pour clarifier la structure d'une contamination inconnue est une combinaison de spectrométrie de masse à haute résolution (LC-HRMS) et de spectroscopie RMN bidimensionnelle^{[3][4]}.

Les principes actifs et les excipients des produits pharmaceutiques peuvent se décomposer de diverses manières, notamment par hydrolyse, oxydation ou processus photochimique. De plus, les ingrédients peuvent réagir entre eux et former des produits d'addition^[5]. En outre, des contaminations inconnues sont généralement incorporées dans une matrice de produit très complexe. L'élucidation structurale des contaminations inconnues dans les produits pharmaceutiques pose donc un défi analytique.

Procédure

La procédure générale d'élucidation de la structure sera décrite ici en utilisant l'exemple d'une contamination inconnue dans un médicament contenant des opioïdes. Le processus peut être divisé en six étapes:

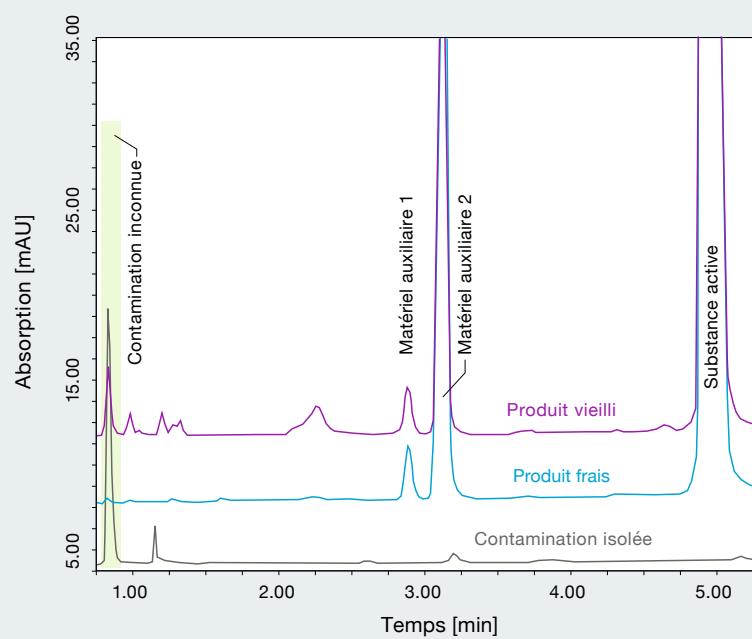
1. Dans une première étape, la méthode analytique du client est mise en œuvre et les différents composants de la préparation (principes actifs, excipients et impuretés) sont identifiés en comparant les temps de rétention respectifs et les spectres UV dans le chromatogramme HPLC-UV.
2. Dans une deuxième étape, quelques microgrammes de la contamination sont isolés par HPLC analytique (voir le chromatogramme HPLC-UV dans la figure 1). Cette

petite quantité d'impureté est utilisée pour l'analyse LC-HRMS ultérieure et sert également de substance de référence pour tout développement de méthode (voir étape 5)

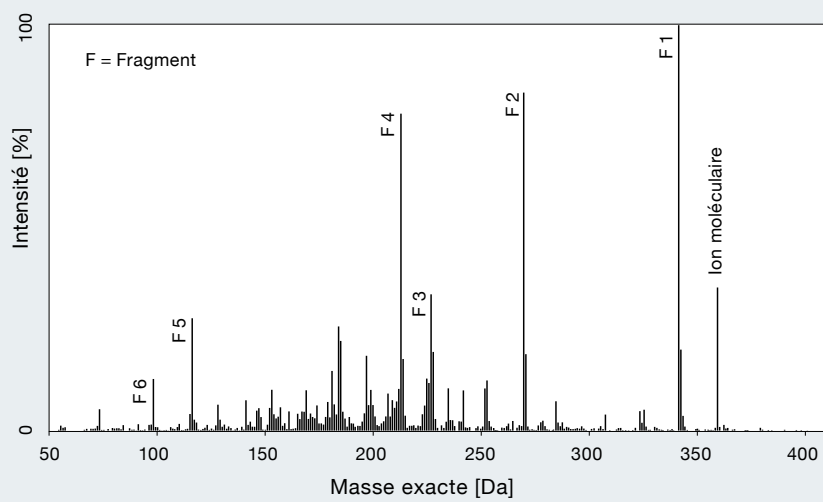
3. Un spectre de masse à haute résolution (LC-HRMS) de la contamination isolée est enregistré. Cela permet de déterminer les éventuelles compositions élémentaires de la contamination inconnue. Grâce à la connaissance des différents ingrédients de la préparation et des réactions de décomposition possibles qui en résultent, le nombre de compositions élémentaires de l'impureté mathématiquement concevables peut être limité. Les propositions structurales peuvent maintenant être imaginées.
4. Dans l'étape suivante, une analyse MS/MS de la contamination isolée est effectuée (voir le spectre des fragments MS/MS dans la figure 2). Les compositions élémentaires possibles peuvent également être calculées pour les fragments individuels mesurés de l'impureté. La comparaison des fragments détectés avec les fragments attendus d'une structure hypothétique permet de vérifier leur plausibilité. Dans le cas idéal, une structure valable avec une probabilité élevée peut déjà être envisagée à ce stade.
5. Cinquièmement, une méthode pour l'isolation de grandes quantités d'impuretés par HPLC semi-préparative est en cours de développement. La quantité de contamination nécessaire pour les mesures RMN 2D (environ 3 à 5 mg) est ensuite isolée de la préparation du médicament. Selon la concentration de la contamination inconnue dans le produit, des quantités assez importantes du médicament sont nécessaires.
6. La spectroscopie RMN bidimensionnelle (¹H, ¹³C, COSY, NOESY, HSQC, HMBC) peut être utilisée pour vérifier la plausibilité de la structure proposée. En outre, il est possible de déterminer les éventuelles doubles liaisons, les groupes résiduels (R1 - R4) et la configuration absolue des centres stéréo (voir la structure de l'opioïde dans la figure 3).



1 Chromatogramme HPLC-UV

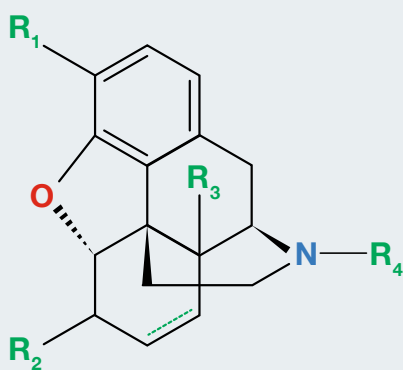


2 Spectre des fragments MS/MS





3 Structure supposée de l'opioïde inconnu.



En utilisant une combinaison de spectrométrie de masse à haute résolution (composition élémentaire, fragments de structure) et de spectroscopie RMN bidimensionnelle (groupes fonctionnels, composés à l'intérieur de la molécule, configuration stéréo) et de spectres UV, la structure envisagée d'une contamination inconnue peut généralement être confirmée.

En plus de la structure, il est possible d'étudier le mécanisme de formation des impuretés dans les produits pharmaceutiques:

7. Pour étudier le mécanisme de réaction de la formation d'une contamination (maintenant connue), le produit frais et vieilli est analysé et comparé par HPLC-UV/MS et/ou GC-MS. Les différences constatées ainsi que la présence de petites molécules (blocs de construction, catalyseurs) peuvent fournir des informations sur le chemin de la formation de la contamination. Des mélanges binaires de principes actifs et d'excipients sont également incubés les uns avec les autres dans des conditions de réaction sélectionnées pour accélérer la formation de l'impureté. De cette façon, les composés impliqués dans la formation ou les impuretés provenant des auxiliaires peuvent être identifiés.

8. À partir du mécanisme de réaction (par exemple, les impuretés provenant des excipients) et des conditions de réaction (par exemple, la température ou l'humidité), le client peut définir des mesures correctives et préventives (CAPA's) pour optimiser le processus de fabrication du produit afin d'empêcher complètement la formation de l'impureté dans le meilleur des cas.

D'une part, l'élucidation du mécanisme de réaction sous-entend la structure de la contamination précédemment envisagée, d'autre part, elle peut aider à définir des mesures appropriées pour empêcher la formation de l'impureté. Il est donc fortement recommandé d'élucider non seulement la structure d'une contamination inconnue, mais aussi son cheminement d'origine.

L'étude d'un éventuel mécanisme de réaction (étape 7) peut également aider à clarifier la structure d'une contamination elle-même. Si les substances impliquées dans la formation de l'impureté et les conditions de réaction sont connues, on peut généralement tirer des conclusions sur la structure. En outre, la formation de l'impureté peut être accélérée dans des conditions de réaction correctes, ce qui peut simplifier son isolement à l'étape 5. Pour des projets spécifiques, il peut donc être utile d'inclure des études du mécanisme de réaction (étape 7) entre les étapes 4 et 5.

Procédure générale (Etapes 1 à 6)

Contamination inconnue



1. Mise en œuvre de la méthode client:

- Reproduction des chromatogrammes HPLC-UV
- Identification substance active/excipients/contamination



2. Purification pour le LC-HRMS:

- Isolement de contamination (microgrammes)
- Référence pour l'analyse des EM et la purification à grande échelle



3. Analyse LC-HRMS:

- Détermination de la composition élémentaire
- Liste des propositions structurales



4. Analyse des fragments MS/MS:

- Analyse de fragments de molécules individuelles
- Examen des propositions structurales envisagées



5. Purification à grande échelle pour la RMN 2D:

- Développement d'une méthode pour la HPLC semi-préparative
- Isolement de quelques milligrammes de contamination



6. Analyse RMN en deux dimensions:

- Contrôle de la plausibilité des propositions structurales
- Identification des groupes résiduels (R1 – R4)
- Détermination de la configuration absolue

Formation de la contamination et optimisation du processus (Etapes 7 à 8)

Structure confirmée



7. Mécanisme de réaction:

- Mécanisme de formation des impuretés
- Mélanges binaires de substances actives et d'excipients
- Comparaison des produits frais et des produits vieilliss



Mécanisme de réaction possible



8. Optimisation des processus:

- Définition des CAPA par le client pour prévention de la formation de la contamination

Conclusion

L'élucidation de la structure des contaminations inconnues des produits pharmaceutiques est un processus à plusieurs étapes et nécessite des méthodes analytiques sophistiquées telles que la spectrométrie de masse à haute résolution. Le schéma de base pour l'élucidation de la structure doit être adapté individuellement pour chaque produit pharmaceutique et nécessite un savoir-faire analytique étendu. Cela inclut une connaissance détaillée des processus de décomposition des substances pharmaceutiquement actives et des réactions secondaires possibles avec les excipients. Il est donc conseillé de développer une stratégie appropriée pour l'élucidation structurale des impuretés inconnues dans les produits pharmaceutiques à un stade précoce. □

Références

- [1] *Ph.Eur. 01/2018:2034 "substances for pharmaceutical use"*.
- [2] *Ph.Eur. 04/2012:51000 "control of impurities in substances for pharmaceutical use"*.
- [3] *M.-M. Cid, J. Bravo (Eds.), Structure Elucidation in Organic Chemistry: The Search for the Right Tools, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2015.*
- [4] *B. N. Pramanik, M. S. Lee, G. Chen (Eds.), Characterization of Impurities and Degradants using Mass Spectrometry, John Wiley & Sons, New Jersey, 2011.*
- [5] *M. Li, D. Thurston (Eds.), Organic Chemistry of Drug Degradation, RSC Drug Discovery Series No. 29, Cambridge, 2012.*

Auteur



Fabian Schwizer
Assistant de
recherche R&D

INTERLABOR
BELP AG



Interlabor Belp AG

Aemmenmattstrasse 16
3123 Belp, Suisse
Tél. +41 (0)31 818 77 77
Fax +41 (0)31 818 77 78
www.interlabor.ch
info@interlabor.ch

Heures d'ouverture

Du lundi au vendredi
07.30 – 12.00 heures
13.30 – 17.00 heures