

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 404 529**

51 Int. Cl.:

A61K 47/10 (2006.01)

G01N 33/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2010** **E 10175300 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013** **EP 2433651**

54 Título: **Método de determinación para aldehídos y cetonas en glicerina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2013

73 Titular/es:

AUG. HEDINGER GMBH & CO. KG (100.0%)
Heiligenwiesen 26
70327 Stuttgart, DE

72 Inventor/es:

MILEK, FRANK, DR. y
ROUVEN, JOSL, DR.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 404 529 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de determinación para aldehídos y cetonas en glicerina

La invención se refiere a un procedimiento para la determinación cuantitativa de impurezas en forma de aldehídos y cetonas en glicerina que sirve para la fabricación de fármacos, en el que la glicerina que contiene las impurezas se hace reaccionar en una disolución de muestra con un reactivo de derivatización y se determina la cantidad de impurezas derivatizadas.

Tal como es conocido, los fármacos deben cumplir unos estrictos requisitos de calidad, para poder dispensarse al consumidor o al paciente. Las sustancias contenidas en los fármacos y sus formas de administración deben corresponder a las reglas farmacéuticas reconocidas, que están definidas entre otros en las farmacopeas.

La glicerina pertenece a las sustancias de partida que se utilizan a menudo en la fabricación de fármacos. Para este producto químico, glicerina, existen monografías en diferentes farmacopeas, por ejemplo en la farmacopea europea (Ph. Eur.), la farmacopea estadounidense (USP) y la farmacopea japonesa (JP). La glicerina debe corresponder a las especificaciones expuestas en estas farmacopeas.

Sin embargo, la glicerina es sensible a la oxidación. Tanto durante la fabricación como durante el almacenamiento de glicerina pueden producirse aldehídos y cetonas. La aparición de tales impurezas en la glicerina puede conducir a problemas de calidad durante la utilización de glicerina para la fabricación de fármacos.

Sin embargo, los procedimientos descritos en las monografías mencionadas anteriormente para la determinación de impurezas en forma de aldehídos y cetonas son insuficientes. Únicamente la farmacopea europea contiene una especificación explícita para aldehídos. Según esta especificación, el contenido en aldehído se determina mediante derivatización con cloruro de pararosnilina y mediante medición por UV/VIS posterior, sirviendo el formaldehído como referencia. Según esta especificación el contenido en aldehído sólo puede ascender como máximo a 10 ppm.

En la USP sólo se detectan los aldehídos mediante el estudio por cromatografía de gases en "Related Compounds"; el límite de especificación se encuentra a este respecto a como máximo el 0,1%.

La glicerina puede contener aldehídos y cetonas en contenidos de hasta más de 60 ppm y aún así cumplir los requisitos de prueba según la farmacopea europea. Esto se debe a que el método de la farmacopea europea es impreciso y únicamente detecta formaldehído, sin embargo los otros aldehídos y cetonas sólo de manera insuficiente. Por tanto, el fabricante de fármacos corre el riesgo de que si bien la sustancia de partida adquirida por él, glicerina, pase la prueba según la farmacopea europea, sin embargo el contenido real en aldehídos y cetonas no ascienda únicamente a 10 ppm, sino que se encuentre considerablemente por encima. Por consiguiente, el fabricante de fármacos no llega a tener conocimiento de este alto contenido en aldehídos y cetonas. Sin embargo, debido a la reactividad de los aldehídos y las cetonas esto puede tener efectos negativos sobre la calidad del fármaco acabado.

Esta problemática se comenta también en el documento EP 1 242 121 B1. En éste se encuentra una exposición a modo de resumen de los diferentes planteamientos de problemas y también un procedimiento de prueba para determinar el contenido en aldehídos reactivos en muestras de glicerina.

En el caso de este procedimiento se trata de un ensayo colorimétrico, en el que se utiliza glicerinaldehído como patrón. En este procedimiento conocido se utiliza clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolinon-hidrazona (MBTH). Tras haber tenido lugar la conversión se mide espectrofotométricamente la absorción de la disolución de reacción a 624 nm.

En este documento se compara también esta prueba de MBTH con otras pruebas conocidas. En estos procedimientos conocidos resulta desventajosa la circunstancia de que con ellos sólo puedan detectarse cuantitativamente sólo algunas de las impurezas de la glicerina.

Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento con el que puedan determinarse de manera cuantitativa mejor el mayor número de impurezas y en particular todas las impurezas en forma de aldehídos y cetonas en glicerina.

Este objetivo se soluciona mediante un procedimiento según la enseñanza de las reivindicaciones.

En el procedimiento según la invención para la determinación cuantitativa de aldehídos y cetonas se utiliza como reactivo de derivatización PFBHA. Se trata a este respecto de clorhidrato de O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina.

Por consiguiente, según la invención se mezcla una disolución de muestra, que contiene la glicerina que va a someterse a prueba, con dicho reactivo de derivatización, que preferiblemente se encuentra en una disolución de derivatización acuosa tamponada.

5 Además se añade un solubilizante en forma de un disolvente orgánico polar en particular soluble en agua. A este respecto puede tratarse por ejemplo de alcoholes con de 1 a 5 átomos de C, en particular de monoalcoholes con de 1 a 5 átomos de C, así como de acetonitrilo, prefiriéndose acetonitrilo.

En el procedimiento según la invención se hacen reaccionar la glicerina y las impurezas contenidas en la misma en una disolución de muestra con el reactivo de derivatización.

10 En esta conversión o reacción se transforman las impurezas mencionadas anteriormente en los correspondientes derivados. La disolución de muestra obtenida tras la conversión y por consiguiente las impurezas derivatizadas se separan entonces mediante cromatografía de líquidos.

15 La derivatización o conversión tiene lugar preferiblemente en un espacio termostatzado. En el caso de este espacio se trata preferiblemente de un muestreador automático. La derivatización puede realizarse por ejemplo a una temperatura de 0 - 76°C, preferiblemente a 0 - 60°C, más preferiblemente a 20-35°C y de manera particularmente preferible a aproximadamente 25°C.

20 Los intervalos de temperatura indicados 0-76°C comprenden todos los valores de temperatura incluidos en los mismos, en particular enteros, por ejemplo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 y 76. Lo mismo es válido de manera análoga para los intervalos de temperatura preferidos de 0 - 60 así como 20-35°C.

La concentración del solubilizante en la disolución de muestra que va a estudiarse asciende preferiblemente al 1 - 80% en volumen y de manera particularmente preferible a aproximadamente el 20% en volumen.

25 También en el caso de estos datos de intervalos están comprendidos y se dan a conocer todos los valores incluidos en el intervalo y en particular los valores enteros. Así, el intervalo del 1 - 80% en volumen comprende y da a conocer al menos los siguientes valores individuales enteros: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 y 80.

30 La concentración de glicerina en la disolución de muestra que va a estudiarse puede ascender a 1 - 90 m/V, preferiblemente a 5 - 50 m/V y más preferiblemente a aproximadamente 40 m/V. También en este caso los intervalos indicados comprenden todos los valores incluidos en los intervalos indicados y en particular los valores enteros. Así, el intervalo para la concentración de glicerina de 5 - 50 comprende y da a conocer al menos los siguientes valores enteros: 5, 6, 7, 8, 9, 1, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50.

35 La duración de reacción de la conversión o reacción de derivatización puede ascender a 10 minutos - 10 días y asciende preferiblemente a 10 - 20 horas, por ejemplo 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 20 horas, de manera particularmente preferible 15 horas.

40 La concentración del reactivo de derivatización, por ejemplo PFBHA, en la disolución de muestra asciende preferiblemente a de 0,01 mg/ml a 100 mg/ml, de manera particularmente preferible a 0,2 mg/ml. También en este caso están comprendidos y se dan a conocer todos los valores incluidos en los intervalos, por ejemplo 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3 etc. hasta 100.

La conversión/derivatización tiene lugar preferiblemente a un valor de pH de desde 2 hasta 7, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 ó 7.

45 En la separación cromatográfica (procedimiento de HPLC) se utiliza una fase móvil, que presenta dos o más líquidos, en particular una fase móvil A, en cuyo caso se trata (preferiblemente) de agua o de una fase acuosa tamponada, y una fase móvil B, en cuyo caso se trata de un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos.

Como tampones pueden utilizarse aquéllos que se conocen y se utilizan habitualmente en el campo de la cromatografía.

50 Como disolvente orgánico puede utilizarse un disolvente prótico polar tal como ácido acético, metanol, etanol, n-propanol o isopropanol o un disolvente aprótico polar tal como acetona, acetonitrilo, dimetoxietano, DMF, DMSO,

1,4-dioxano, piridina o THF. Preferiblemente se usa acetonitrilo.

El gradiente en la separación cromatográfica se selecciona de tal manera que las concentraciones relativas de la fase móvil o de los líquidos A y B en los primeros de 1 a 100 minutos se encuentran entre el 100% de A:el 0% de B y el 60% de A:el 40% de B y varían en el plazo de desde 0 hasta 200 minutos de tal manera que se encuentran entre el 60% de A:el 40% de B y el 0% de A:el 100% de B.

Tras la separación cromatográfica tiene lugar una detección de los productos de reacción obtenidos, con lo que se lleva a cabo una determinación cuantitativa. En el caso de esta detección se trata preferiblemente de una detección de UV.

La detección por UV se lleva a cabo preferiblemente a una longitud de onda de desde 180-400 nm, más preferiblemente a 190-250 nm y lo más preferiblemente a aproximadamente 200 nm. También estos intervalos dan a conocer o comprenden todos los valores incluidos en los intervalos, al menos los enteros. Así, el intervalo 190-250 nm comprende y da a conocer al menos los siguientes valores enteros: 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249 y 250.

Mediante el procesamiento cromatográfico y la detección seleccionados es posible separar el exceso de reactivo de derivatización de los derivados de cetona y aldehído. Además, los derivados de cetona y aldehído pueden separarse unos de otros. De este modo se hace posible una determinación selectiva de cada derivado conocido (por ejemplo glicerinaldehído (GA), dihidroxiacetona (DHA), hidroxiacetona (HA) y formaldehído (FA)) y otros derivados posibles de producto de oxidación en la glicerina.

El procedimiento según la invención sirve en particular para la determinación cuantitativa de glicerinaldehído, dihidroxiacetona, hidroxiacetona y formaldehído así como otros productos de oxidación posibles en forma de aldehídos y cetonas en glicerina. Estos aldehídos y cetonas pueden encontrarse naturalmente en la glicerina estudiada unos al lado de otros.

Los contenidos en las diferentes impurezas se calculan preferiblemente mediante la comparación con una disolución de calibración o muestra de calibración derivatizada, que contiene estas impurezas. En otras palabras, una disolución conocida con contenidos en las impurezas que van a determinarse establecidos de manera exacta se trata y se derivatiza de igual manera que una muestra o disolución de muestra líquida que va a estudiarse.

Con ayuda del procedimiento según la invención es posible, en el caso de una glicerina de matriz dada, conseguir una conversión completa de las impurezas en la matriz, sin que quede ningún componente. Además es posible conseguir una conversión completa de las impurezas, sin provocar reacciones de descomposición.

También es objeto de la invención el uso de glicerina, en la que por medio del procedimiento descrito en la presente solicitud se determinó un contenido en impurezas de 9 ppm o inferior, por ejemplo 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 y 1, para la fabricación de un fármaco, en particular de un polipéptido descrito en el documento EP 1242121 B1, en particular insulina.

A continuación se explica más detalladamente el procedimiento según la invención mediante un ejemplo concreto.

Para la realización del procedimiento se preparan los siguientes reactivos:

Fases móviles:

A: 100 µl de ácido fosfórico al 85% en 1 l de agua (1 l para aproximadamente 40 pasadas)

B: acetonitrilo

Disolución de derivatización:

Se disuelven 0,25 g de PFBHA (clorhidrato de O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina en un matraz graduado en 25,0 ml de disolución tampón pH = 4 (por ejemplo citrato/NaOH/HCl Certipur, empresa Merck).

Disolución madre 1 (1000 ppm):

A un matraz graduado de 100 ml se le añaden aproximadamente 95 ml de agua. En cada caso se añadieron mediante pesaje aproximadamente 100 mg de glicerinaldehído y dihidroxiacetona así como en cada caso 100 µl de

hidroxiacetona y disolución de formaldehído (al 35%). Se llena el matraz con agua hasta 100,0 ml. Se disuelven completamente los sólidos, para ello pueden usarse ultrasonidos.

Disolución madre 2 (10 ppm):

Se pipetea 1,0 ml de la disolución madre 1 en un matraz graduado de 100 ml y se llena con agua hasta 100,0 ml.

5 Patrón de calibración Glic-PFBHA-0.40:

Se llenan 1,0 ml de la disolución madre 2, 5,0 ml de acetonitrilo y 0,5 ml de disolución de derivatización en un matraz graduado de 25 ml con agua hasta 25,0 ml.

Patrón de calibración Glic-PFBHA-4.00:

10 Se llenan 10,0 ml de la disolución madre 2, 5,0 ml de acetonitrilo y 0,5 ml de disolución de derivatización en un matraz graduado de 25 ml con agua hasta 25,0 ml.

Disolución de blanco:

Se llenan 5,0 ml de acetonitrilo y 0,5 ml de disolución de derivatización en un matraz graduado de 25 ml con agua hasta 25,0 ml.

Disolución de muestra:

15 Se llenan 10 g de muestra, 5,0 ml de acetonitrilo y 0,5 ml de disolución de derivatización en un matraz graduado de 25 ml con agua hasta 25,0 ml.

Muestra enriquecida:

Se llenan 10 g de muestra (glicerina), 5,0 ml de la disolución madre 2, 5,0 ml de acetonitrilo y 0,5 ml de disolución de derivatización en un matraz graduado de 25 ml con agua hasta 25,0 ml.

20 La derivatización de las diferentes disoluciones tiene lugar en un muestreador automático de una instalación de HPLC a 25°C. La derivatización se ha completado, cuando la desviación estándar relativa de tres mediciones consecutivas del patrón de calibración Glic-PFBHA-4.00 asciende a no más del 2%.

La determinación analítica tiene lugar mediante cromatografía de líquidos fijando las siguientes condiciones de HPLC:

Columna: Discovery C18, 25 cm x 4 mm, 5 µm

Volumen de inyección: 20 µl

Duración del análisis: 85 min.

Temperatura de la columna: 25°C

Temperatura del muestreador automático: 25°C

Detector: Detector por red de diodos

Longitud de onda: 200 nm

25 Gradiente: rampas lineales

Tiempo (min.) % de B

0 20

2 20

60 100

75 100

78 20

Tiempo (min.) Flujo (ml/min.)

0 0,5

60 0,5

65 1,0

79 1,0

80 0,5

La secuencia de las inyecciones es la siguiente:

Disolución	Número de inyecciones
Glic-PFBHA-4.0	hasta que la desviación estándar relativa de GA, DHA y HA de 3 mediciones consecutivas es inferior al 2% (aproximadamente 10 mediciones)
Disolución de blanco	1 medición
Glic-PFBHA-0.4 (calibración)	1 medición
Glic-PFBHA-4.0 (calibración)	1 medición
Muestra enriquecida	1 medición
Muestra	1 medición
Muestras adicionales	x mediciones
Glic-PFBHA-4.0 (<i>drift check</i> , comprobación de derivación)	1 medición

- 5 Basándose en los datos anteriores se calculan rectas de calibración. Los contenidos en gliceraldehído, dihidroxiacetona, hidroxiacetona y formaldehído así como otros productos de oxidación posibles en la muestra o en las muestras se calculan mediante las rectas de calibración determinadas.

Este método está validado según ICH¹ Q2 (R1) (VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY).

- 10 Con ayuda del procedimiento según la invención se detectan las impurezas y los productos de degradación contenidos en la glicerina de manera considerablemente más precisa que según los métodos conocidos hasta el momento, descrito en las monografías de farmacopeas. Esto aumenta la seguridad en la fabricación de fármacos sensibles.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la determinación cuantitativa de impurezas en forma de aldehídos y cetonas en glicerina que sirve para la fabricación de fármacos, en el que la glicerina que contiene las impurezas se hace reaccionar en una disolución de muestra con un reactivo de derivatización y se determina la cantidad de impurezas derivatizadas, caracterizado porque como reactivo de derivatización se utiliza PFBHA, clorhidrato de O-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina, la derivatización se realiza en presencia de un solubilizante en forma de un disolvente orgánico polar y se llevan a cabo una separación por cromatografía de líquidos así como una detección de las impurezas separadas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en el caso de las impurezas se trata de gliceraldehído, dihidroxiacetona, hidroxiacetona y formaldehído.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se utiliza acetonitrilo como solubilizante y/o tras la separación por cromatografía de líquidos se lleva a cabo una detección de UV.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la detección por UV se lleva a cabo a una longitud de onda de desde 180 hasta 400 nm.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la detección por UV se lleva a cabo a una longitud de onda de desde 190 hasta 250 nm, en particular a aproximadamente 200 nm.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la derivatización se realiza en un espacio termostatzado.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la derivatización se realiza a de 0 a 76°C.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque la derivatización se lleva a cabo a aproximadamente 25°C.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la concentración del solubilizante en la disolución de muestra asciende a del 1 al 80% en volumen.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la concentración del solubilizante en la disolución de muestra asciende a aproximadamente el 20% en volumen.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la concentración de glicerina en la disolución de muestra asciende a del 5 al 50% (m/V) y en particular a aproximadamente el 40% (m/V).
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la duración de reacción de la reacción de derivatización asciende a de 10 minutos a 20 horas.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque en la separación por cromatografía de líquidos se utilizan dos fases móviles A y B, como fase móvil A se utiliza agua o una disolución acuosa tamponada y como fase móvil B se utiliza un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos y, en particular acetonitrilo.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los contenidos en impurezas pueden calcularse comparando con una disolución de calibración derivatizada que contiene estas impurezas.