

# Vergleich der Verunreinigung zweier Analyse- Standards von Carbamazepin mittels DSC

Jannik Küspert, Life Science Division, und Dr. Ligia de Souza, Sector Manager Pharma & Cosmetics

## Einleitung

Die Reinheitsbestimmung ist eine wichtige Maßnahme der Qualitätskontrolle. Damit lässt sich sicherstellen, dass eine Substanz sicher, zuverlässig und für die beabsichtigte Anwendung geeignet ist. Sie bestätigt die Identität und Qualität der gewünschten Verbindung nach der Isolierung, Synthese oder Herstellung und sorgt dafür, dass die Verbindung frei von nennenswerten Verunreinigungen, wie nicht umgesetzten Ausgangsstoffen, Nebenprodukten und Fremdstoffen, ist. Diese Analyse trägt dazu bei, die Effektivität eines Synthese- oder Herstellungsprozesses zu bewerten, zeigt an, ob eine weitere Reinigung erforderlich ist und unterstützt die Konsistenz zwischen Produktionschargen.

Ist eine Substanz für therapeutische Anwendungen vorgesehen, gewinnt die Reinheitsbestimmung noch mehr an Bedeutung. Die Reinheit pharmazeutischer Wirkstoffe ist entscheidend für ihre Eignung zur pharmazeutischen Verwendung. Verunreinigungen können toxische Wirkungen hervorrufen oder die Stabilität und Bioverfügbarkeit des Wirkstoffs während der Formulierung und Verarbeitung beeinträchtigen. Aus Sicht der Qualitätssicherung ist dies besonders relevant für analytische Standards, die als Referenzmaterialien für die Methodenentwicklung, Kalibrierung und Routinekontrolle verwendet werden.

## Eutektische Verunreinigungen

Eine Verunreinigung kann mit einer Substanz ein eutektisches System bilden, wenn sie in der flüssigen Phase löslich, in der festen Phase jedoch unlöslich ist. Bei der dynamischen Differenz-Kalorimetrie (DSC) können solche Verunreinigungen das Schmelzverhalten eines Materials beeinflussen. Sie senken die beobachtete Schmelztemperatur und verbreitern den endothermen Schmelzeffekt mit steigendem Verunreinigungsgehalt. Diese Schmelzpunktniedrigung bildet die Grundlage für die Reinheitsbestimmung nach der van't-Hoff-Theorie [3]. Eutektische Verunreinigungen sind

daher besonders kritisch, da sie das Schmelzverhalten beeinflussen und die Verarbeitbarkeit beeinträchtigen. Eine schnelle thermische Reinheitsanalyse ist deshalb für die Qualitätskontrolle unerlässlich [4].

Durch die Analyse des Onsets des Schmelzpeaks in Abhängigkeit vom geschmolzenen Anteil lässt sich die Reinheit einer Substanz unter Verwendung der van't-Hoff-Gleichung (Gl. 1) abschätzen, wie in Methode A der Norm ASTM E928 [5] beschrieben. Die Gleichung stellt einen Zusammenhang zwischen dem Grad der Schmelzpunktniedrigung und der Konzentration eutektischer Verunreinigungen her.

$$\text{Gleichung 1: } T_s = T_0 - \frac{RT_0^2 x}{\Delta H_f} \times \frac{1}{F}$$

mit:

$T_s$ : Probestemperatur [K]

$T_0$ : Schmelztemperatur der reinen Substanz [K]

$R$ : Gaskonstante (= 8,314 J/mol<sup>1</sup>·K<sup>1</sup>)

$x$ : Molanteil der Verunreinigung

$H_f$ : Schmelzwärme [J·mol<sup>1</sup>], berechnet aus der Peakfläche

$F$ : Schmelzanteil

$$F = \frac{\text{Teilpeakfläche}}{\text{Gesamtpeakfläche}}$$

Um die Konzentration der Verunreinigung in einer Probe bestimmen zu können, werden folgende Bedingungen vorausgesetzt:

- Die Substanz muss kristallin sein.
- Die Substanz und die Verunreinigung dürfen keine festen Lösungen bilden, das heißt, sie sind in der festen Phase nicht mischbar.
- Die Substanz bildet mit der Verunreinigung ein eutektisches System, d. h., die Substanz und die Verunreinigung bilden ein homogenes Gemisch, das wie eine reine Substanz schmilzt und erstarrt.
- Verbindungen, die Polymorphismus aufweisen, müssen vollständig in ein einziges Polymorph umgewandelt werden.
- Die Substanz darf sich beim Schmelzen nicht zersetzen.

## APPLICATIONNOTE Vergleich der Verunreinigung zweier Analyse-Standards von Carbamazepin mittels DSC

Das Verfahren zur Bestimmung der Reinheit mittels DSC ist in den Arzneibüchern USP <891> und Ph. Eur. 2.2.34 sowie in verschiedenen Normen wie ASTM E928 und DIN 51007 beschrieben.

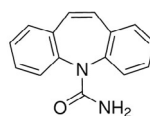
Insbesondere ASTM E928 beschreibt und standardisiert das Verfahren, legt die Kriterien für deren Anwendung auf hochreine Materialien (Konzentration > 98,5 mol-%, inkrementelle Enthalpiekorrektur  $c < 20$  %, Abweichung < 0,5 mol-% gegenüber Referenzmethoden) fest und definiert die spezifischen Bedingungen, unter denen die DSC-Messungen durchgeführt werden müssen.

Carbamazepin (CBZ) ist ein synthetisches krampflösendes Mittel, das 1953 von der Novartis-Gruppe entdeckt wurde und seit 1962 im Handel erhältlich ist (siehe Abbildung 1). Die reine Substanz ist ein weißes, kristallines, polymorphes Pulver (Formen I–IV, Dihydrat) mit einem Schmelzbereich von 191–192 °C (Form I) und einer Molmasse von 236,27 g/mol. Der Wirkmechanismus von CBZ beruht auf der Hemmung spannungsgesteuerter Na<sup>+</sup>-Kanäle. CBZ wird primär zur Behandlung von Epilepsie, Trigeminusneuralgie (chronische Schmerzkrankung von Gehirnnerven) und bipolaren Störungen eingesetzt. CBZ kann jedoch auch während des Alkoholentzugs oder zur Behandlung neuropathischer Schmerzen eingesetzt werden [7, 8].

In dieser Studie wandten wir das van't-Hoff-Diagramm an, um den Gesamtgehalt an Verunreinigungen in zwei Carbamazepin-Analysestandards mit unterschiedlichen, mittels HPLC bestimmten Reinheitsgraden zu bestimmen. In Anlehnung an die Norm ASTM E928 bewerteten wir die Anwendbarkeit und Zuverlässigkeit der DSC-Methode zur Erkennung kleiner Unterschiede im Reinheitsgrad solcher Referenzmaterialien.

### Experimenteller Teil

Für die Reinheitsbestimmung mittels DSC wurden zwei unterschiedliche, sekundäre Analysestandards desselben pharmazeutischen Wirkstoffs, Carbamazepin (CBZ), ausgewählt. Beide Produkte wurden von Sigma-Aldrich



1 Chemische Struktur von Carbamazepin (CBZ) [1,2]

(Merck KGaA) hergestellt und entsprechen den in Tabelle 1 aufgeführten Herstellerspezifikationen.

Die HPLC-Analyse des Herstellers ergab einen Reinheitsunterschied von 0,9 % zwischen den beiden CBZ-Proben. Dieser Reinheitsunterschied kann mithilfe der NETZSCH DSC 300 *Caliris*<sup>®</sup> *Supreme* und der Funktion *Purity Determinatio*<sup>™</sup> der NETZSCH *Proteus*<sup>®</sup> 9-Software thermisch validiert werden.

Die NETZSCH DSC 300 *Caliris*<sup>®</sup> *Supreme* inkl. *Proteus*<sup>®</sup>-Software erlauben ein ASTM-konformes DSC-Screening der Verunreinigung als Schnelltest. Dies ist insbesondere für die Überwachung analytischer Referenzstandards zur Qualitätskontrolle von großem Wert.

### Messprotokoll

Vor der Analyse mit der NETZSCH DSC 300 *Caliris*<sup>®</sup> *Supreme*, wurden die Aluminium-Tiegel (*Concavus*<sup>®</sup>) in Isopropanol gereinigt und eine Minute lang bei 425 °C thermisch konditioniert. Anschließend wurden die Proben (ca. 1,5 mg) in die gereinigten Tiegel gefüllt und die Tiegel hermetisch verschlossen.

Das Temperaturprogramm wurde deutlich unterhalb des erwarteten Schmelzbegins gestartet, um eine durch Verunreinigungen verursachte Schmelzpunktniedrigung zu berücksichtigen. Es wurde ein zweistufiges Heizprofil gewählt mit einer anfänglichen schnellen Aufheizung von 20 °C auf 160 °C mit 20 K/min, gefolgt von einem langsamen Temperaturanstieg von 0,7 K/min von 160 °C auf 200 °C. Die Messung wurde unter Stickstoffgas mit einer Spülgasrate von 40 ml/min durchgeführt, um während des gesamten Experiments eine inerte Atmosphäre in der Messzelle aufrechtzuerhalten

Tabelle 1 Vergleich der Herstellerspezifikationen für die beiden Carbamazepin-Qualitäten [1,2]

Parameter	Carbamazepin (CBZ-I)	Carbamazepin (CBZ-II)
Produktnummer	94496	C4024
Batch	BCCM1539	MKCT3831
HPLC-Reinheit	99,9 % (Spec: $\geq 99,0$ %)	99 % (Spec: $\geq 98,0$ %)
Beschaffenheit	Weißes Pulver	Weißes Pulver
Schmelzpunkt	191 bis 192 °C	191 bis 192 °C

## Messergebnisse

Abbildung 2 zeigt die DSC-Kurven für die jeweils erste Aufheizung von CBZ-I und CBZ-II. Die extrapolierten Onsettemperaturen betragen für CBZ-I 190,2 °C und für CBZ-II 190 °C. Sie stimmen mit den Literaturwert für CBZ (190,2 °C laut Lide, D. R. [9]) überein. Im Fall von CBZ-II liegt die Temperatur jedoch 0,2 °C höher als bei CBZ-I.

Wie bereits erwähnt, erniedrigt eine Verunreinigung der Probe den Schmelzpunkt und verbreitert die DSC-Kurve. Aus der DSC-Kurve berechnet die Reinheitssoftware das van't-Hoff-Diagramm und liefert eine grafische Darstellung der DSC-Reinheitsanalysedaten (siehe Abbildung 3): Hier ist die Schmelztemperatur gegen den Kehrwert des geschmolzenen Anteils (1/F) dargestellt, wobei F den Anteil an der gesamten Schmelzpeakfläche repräsentiert.

Der Plot ist typischerweise nicht linear. Eine größere Nichtlinearität weist auf einen höheren Verunreinigungsgrad hin. Diese Abweichung entsteht durch Vorschmelzeffekte, die mit DSC nicht erfasst werden können. Darüber hinaus können auch das Messprogramm und die Datenanalyse die Linearität des Diagramms beeinflussen. Wenn beispielsweise der Abschnitt mit langsamer Temperaturerhöhung zu nahe am Schmelzbeginn beginnt, ergibt sich eine falsche Schmelztemperatur (T<sub>2</sub>). Wurde der Temperaturbereich richtig gewählt, kann eine

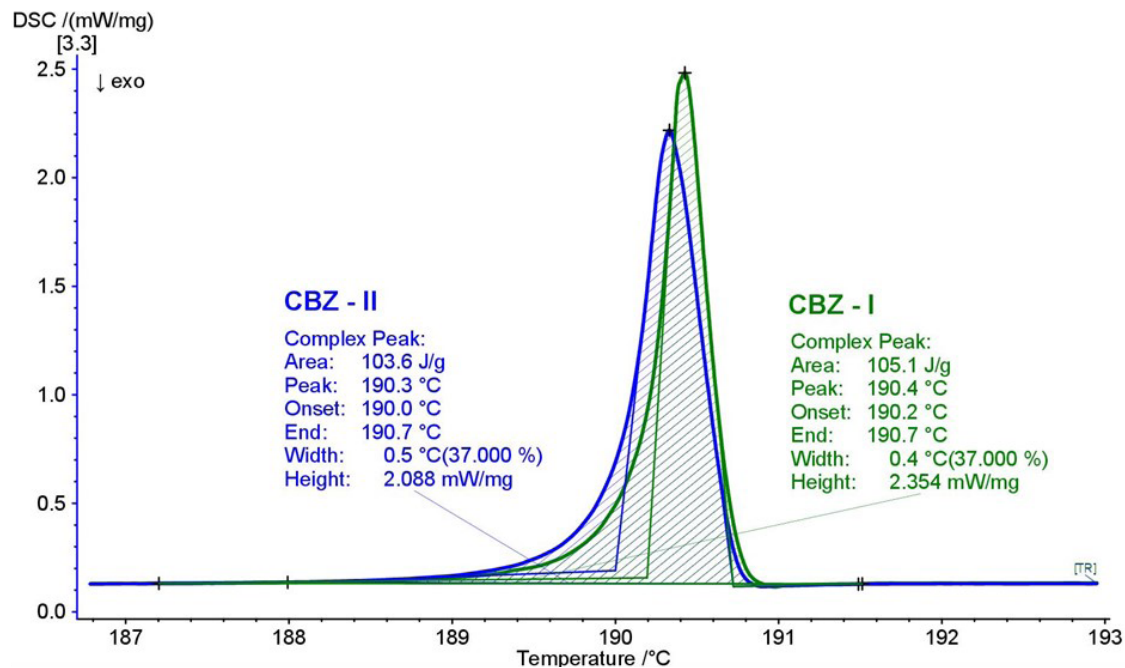
falsche Festlegung der Peakfläche die Grenzen der Peakintegration stören, was sich auf die berechnete Schmelzwärme ΔH<sub>f</sub> auswirkt. Beide Situationen verstärken die Nichtlinearität der Kurve.

Um Linearität zu erreichen, verwendet die Analysesoftware einen Korrekturfaktor c, der sowohl zur gesamten Peakfläche als auch zu jeder Teilfläche F addiert wird. Durch diese iterative Anpassung ergibt sich ein korrigierter F-Wert, der eine lineare Beziehung in der Gleichung  $T_s = f(1/F)$  liefert.

$$\frac{1}{F} = \frac{\text{total peak area} + c}{\text{partial peak area} + c}$$

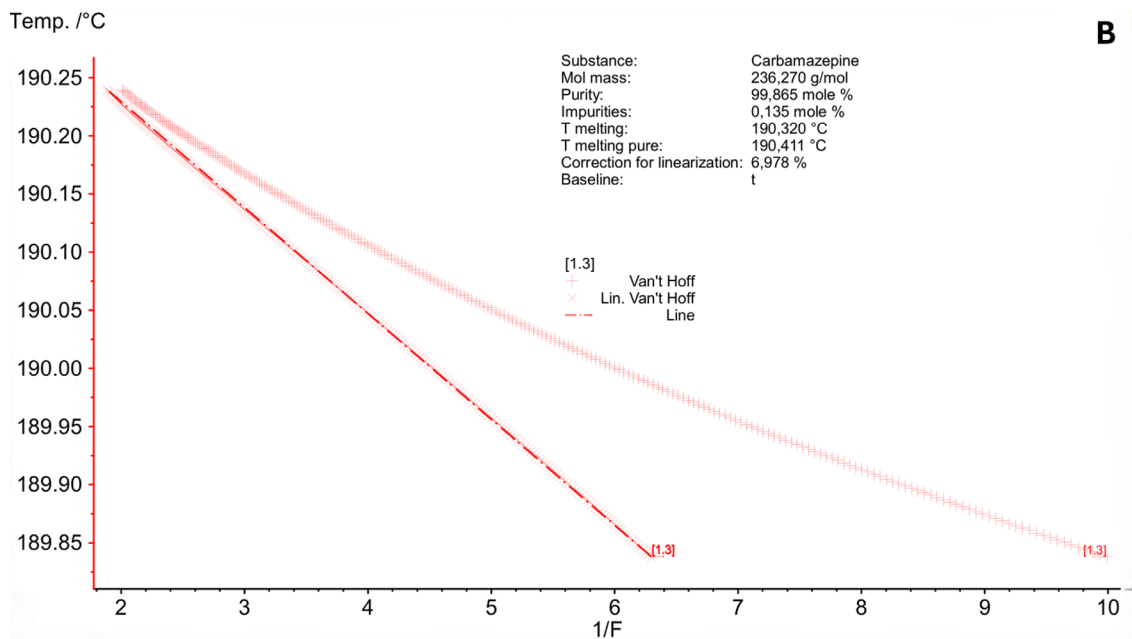
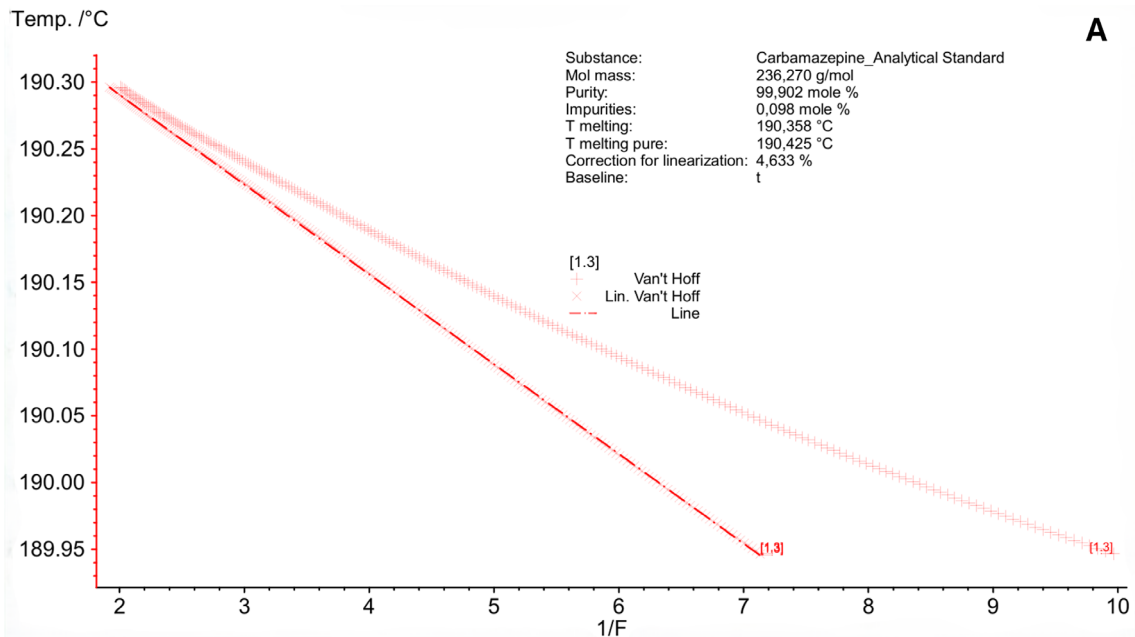
Zusätzlich zur erfassten DSC-Kurve benötigt die Softwarefunktion Reinheitsbestimmung das Molekulargewicht der reinen Substanz, um Angaben der Ergebnisse in Mol-% zu liefern. Die endgültige Reinheit wird aus der Steigung der linearisierten Daten ermittelt. Die Extrapolation auf 1/F = 0 liefert die theoretische Schmelztemperatur des 100-prozentig reinen Materials (T<sub>0</sub>). Die Ergebnisse sind nur dann zuverlässig, wenn die angepassten Daten linear sind, der Reinheitsgrad über 98,5 % und der Korrekturfaktor c unter 20 % liegt [4].

Der berechnete theoretische Schmelzpunkt von 100 % reinem CBZ (T melting pure, T<sub>0</sub>) beträgt 190,425 °C für CBZ-I und 190,411 °C für CBZ-II, verglichen mit den berechneten Schmelztemperaturen der vorliegenden



2 DSC-Kurven von CBZ-I und CBZ-II

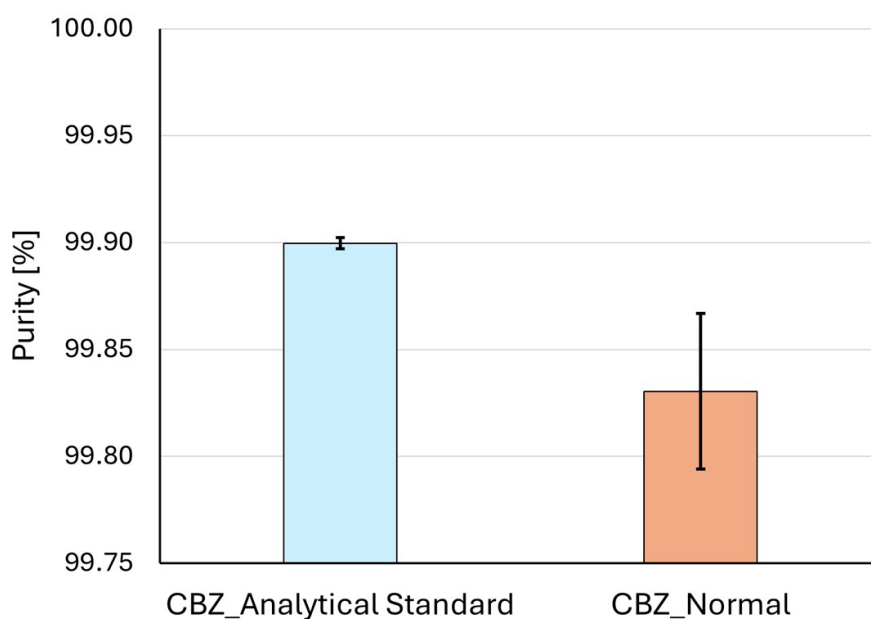
## APPLICATIONNOTE Vergleich der Verunreinigung zweier Analyse-Standards von Carbamazepin mittels DSC



3 1/F-Plot von Carbamazepin (A: CBZ\_I / B: CBZ\_II) für die Reinheitsbestimmung

Proben ( $T_{melting}$  /  $T_s$ ) von 190,358 °C bzw. 190,320 °C. Der berechnete Verunreinigungsgehalt der CBZ-I-Probe betrug 0,098 Mol-%, der der CBZ-II-Probe 0,135 Mol-%. Der Korrekturfaktor für beide Proben liegt mit 4,633 % für CBZ-I bzw. 6,978 % für CBZ-II unter 10 %, was die hohe Qualität der Daten und die Übereinstimmung mit der ASTM-Norm belegt. Nach der Messung wurde die

Probe erneut gewogen; es wurde kein Massenverlust festgestellt. Dies bestätigt, dass während der Messung weder eine Zersetzung der Probe noch eine Verdampfung stattfand. Dies entspricht ebenfalls dem in der ASTM-Norm festgelegten maximalen Massenverlust von 1 %.



4 Statistische Analyse der Messdaten: Zweiseitiger t-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,05  
 Probengröße = 3, t-Wert = 3.04 und p-Wert = 0038

Die berechnete Reinheit von CBZ-I (99,9 % HPLC) beträgt 99,902 Mol-%, die von CBZ-II (99 % HPLC) 99,865 Mol-%. Der Unterschied von 0,037 % wird als geringfügig, aber signifikant angesehen (siehe Abbildung 4). Der niedrigere c-Wert von CBZ-I (4,8 % gegenüber 6,2 %) deutet auf ein geringeres Vorschmelzen hin, was auf einen höheren Reinheitsgrad zurückzuführen sein könnte [6].

Die vorliegenden Ergebnisse entsprechen den Herstellerspezifikationen und bestätigen somit die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit dieser thermoanalytischen Methode. Die Differenz in der mittels DSC bestimmten Reinheit von 0,037 % (CBZ-I gegenüber CBZ-II) spiegelt ausschließlich eutektische Verunreinigungen wider, d.h. die Art von Verunreinigungen, die mit DSC nachgewiesen werden können. Dies liegt innerhalb des von der ASTM definierten Bereichs von <1,5 mol% und überschreitet die quantitative Nachweisgrenze von 0,001 mol%.

### Fazit

Diese Untersuchung kommt zu dem Schluss, dass sich die NETZSCH DSC 300 *Caliris*® *Supreme* in Kombination mit dem Software-Feature *Purity Determination* der NETZSCH *Proteus*®-Software für DSC ideal dazu eignet, Verunreinigungen herauszufiltern, die den Schmelzprozess beeinflussen. Damit lässt sich die Reinheit zahlreicher Arzneimittel bestimmen, einschließlich der Unterscheidung zwischen Reinheitsklassen verschiedener analytischer Standards.

### Literatur

- [1] Certificate of Analysis 94496-BULKCCM1536.pdf, Sigma-Aldrich, 16.08.2024
- [2] Certificate of Analysis C4024-BULKMKCT3831.pdf, Sigma-Aldrich, 16.04.2023
- [3] Thermal Analysis in the Pharmaceutical Field. NETZSCH Pharmabook, 2021, p. 68 to 84
- [4] VAN DOOREN, A. A.; MÜLLER, B. W. Purity determinations of drugs with differential scanning calorimetry (DSC)—a critical review. *International journal of pharmaceuticals*, 1984, 20. Jg., Nr. 3, S. 217-233.
- [5] ASTM E928-19, Standard Test Method for Purity by Differential Scanning Calorimetry
- [6] NETZSCH AN 112 Purity Determination of Nipagin by Means of DSC, Claire Strasser →[Link](#)
- [7] SNEADER, W. A. L. T. E. R. (2006) "Drugs Originating from the Screening of Organic Chemicals," *Drug Discovery*. John Wiley & Sons, Ltd.
- [8] SHORVON, S.D. (2009), Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The second 50 years, 1959–2009. *Epilepsia*, 50: 93-130. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02042.x>
- [9] Lide, D.R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* 86<sup>th</sup> Edition 2005-2006. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, FL 2005, p. 3-140

### Danksagung

Ein großes Dankeschön an Dr. Gabriele Kaiser and Dr. Stefan Schmolzer für ihre wertvollen Beiträge zur technischen Auswertung und Interpretation der Ergebnisse.