

Deutsches Kunststoff-Institut
Name der Forschungsstelle(n)

14842 N / 5
AiF-Vorhaben-Nr. / GAG
01.08.2006 - 30.04.2009
Bewilligungszeitraum

Schlussbericht für den Zeitraum : 01.08.2006 - 30.04.2009

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWA über die



geförderten IGF-Forschungsvorhaben

- Normalverfahren
 Fördervariante ZUTECH

Forschungsthema :

Methodische Weiterentwicklung und Anwendung der quantitativen
NMR-Spektroskopie für die pharmazeutische Analytik von Arzneistoffen

Für ein ZUTECH-Vorhaben sind folgende zusätzliche Angaben zu machen:

Der fortgeschriebene Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

- ist beigefügt
 liegt bereits vor
 wird fristgerecht nachgereicht

Darmstadt, 24.06.2009

Ort, Datum

Dr. Frank Malz

Unterschrift der/des Projektleiter(s)

Universität Würzburg
Name der Forschungsstelle(n)

14842 N / 5
AiF-Vorhaben-Nr. / GAG

01.08.2006 - 30.04.2009
Bewilligungszeitraum

Schlussbericht für den Zeitraum : 01.08.2006 - 30.04.2009

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWA über die



geförderten IGF-Forschungsvorhaben

Normalverfahren

Fördervariante ZUTECH

Forschungsthema :

Methodische Weiterentwicklung und Anwendung der quantitativen
NMR-Spektroskopie für die pharmazeutische Analytik von Arzneistoffen

Für ein ZUTECH-Vorhaben sind folgende zusätzliche Angaben zu machen:

Der fortgeschriebene Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

ist beigefügt

liegt bereits vor

wird fristgerecht nachgereicht

Würzburg 24.6.09
Ort, Datum

U. Holzgrabe
Unterschrift der/des Projektleiter(s)
Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe
Institut für Pharmazie und LMC
Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie
Am Hubland
D-97074 Würzburg

Danksagung

Das IGF-Vorhaben 14842 N der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e. V. (FAH), Bürgerstraße 12, 53173 Bonn zum Thema

„Methodische Weiterentwicklung und Anwendung der quantitativen NMR-Spektroskopie für die pharmazeutische Analytik von Arzneistoffen“

wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Für diese Förderung sei gedankt.

Weiterhin danken wir den im projektbegleitenden Ausschuss vertretenen Unternehmen für ihre fachliche Unterstützung.

Der vorliegende Bericht ist der Abschlussbericht zu diesem Forschungsvorhaben.

Thema: Methodische Weiterentwicklung und Anwendung der quantitativen NMR-Spektroskopie für die pharmazeutische Analytik von Arzneistoffen

Zusammenfassung

Um die Qualität eines Arzneistoffs sicherzustellen, ist es heute aufgrund der Globalisierung der Märkte und des REACH-Systems von umso größter Bedeutung, orthogonale Methoden zur Qualitätskontrolle einzusetzen. Zu den etablierten Routineverfahren wie HPLC und GC ist die quantitative NMR (qNMR) eine solche Methode. Die allgemeine Anwendung der qNMR als Verfahren mittels eines internen Standardrads ist jedoch limitiert (Lösungsmittelprobleme, komplexe Vielinienspektren des Analyten). Eine Lösung dieses Problems würde hier die Möglichkeit der Anwendung der externen Standardisierung sowie der ERETIC-Technik (Electronic Reference to access in vivo concentrations) bringen.

Bei der Bearbeitung des Projekts zeigte sich, dass die patentierte und vom Hersteller vertriebene ERETIC-Technik mit Einspeisung des elektronischen Kalibriersignals über die C13-Spule nicht ausreichend robust ist. Die Weiterentwicklung der ERETIC-Technik über die Einspeisung direkt in den Protonen-Empfänger lieferte hingegen ein geeignetes, ausreichend robustes Verfahren. An insgesamt 4 ausgesuchten, für die pharmazeutische Analytik relevanten Arzneistoffen (Cocergocinmesilat, Clomifencitrat, Flupentixoldihydrochlorid und Atracuriumbesilat) wurde die metrologische Qualität, und damit die Eignung für die pharmazeutische Analytik, der quantitativen hochauflösenden ^1H - und beispielhaft auch der ^{19}F -NMR untersucht. Bei allen Substanzen wurden die im Rahmen des Projekts an die qNMR gestellten Forderungen (Messunsicherheit $\leq 2\%$) erfüllt. Zur Gewährleistung der Robustheit der Methode wurden verschiedenste Einflussgrößen wie Temperatur, Abstimmen des Probenkopfes, Optimieren der spektralen Auflösung, Analytkonzentration, Magnetfeldstärken, NMR-Röhrchen-Qualitäten, usw. systematisch evaluiert und optimale Messbedingungen festgehalten. Jedoch erforderte diese Weiterentwicklung einen nicht unerheblichen Zeitaufwand, so dass die im Projektantrag vorgesehenen Studien zur 2D-NMR, Organisation eines Ringversuches sowie die Evaluierung von Computermethoden für die automatische Auswertung von NMR-Spektren mit zeitlich nicht mehr möglich waren.

Aufgrund der aktuellen Situation Ende 2007 (800 Patienten in Amerika an schweren Nebenwirkungen erkrankt) wurde zusätzlich die Substanzklasse der Heparine mit ins Programm aufgenommen. Hier wurde ein NMR-Verfahren entwickelt, mit dem erstmalig der erfolgreiche Nachweis und die erfolgreiche Quantifizierung von übersulfatiertem Chondroitinsulfat und Dermatan-sulfat in Heparin akkurat und präzise möglich ist. Parallel dazu wurden erfolgreich orthogonale CE- und HPLC-Verfahren erarbeitet, um die NMR-Ergebnisse in ihrer Richtigkeit zu unterstützen.

Somit steht den klein- und mittelständigen Herstellern von Arzneimitteln mit der qNMR bei Anwendung der ERETIC-Technik ein universelles Verfahren zur Verfügung, mit dem sie normkonform die Qualität ihrer Arzneistoffe mit Hilfe zweier orthogonaler Verfahren kontrollieren können. Dieses führt zu einer effizienteren Qualitätskontrolle ihrer Produkte. Ferner kann dieses Verfahren als Referenzverfahren eingesetzt werden, um die vorhandenen, routinemäßig eingesetzten chromatographischen Verfahren in den kmUs zu kalibrieren, zu verbessern und evtl. neue Anwendungsfelder zu eröffnen. Somit erfahren auch diejenigen kmU einen Wettbewerbsvorteil, die kein NMR-Spektrometer besitzen bzw. sich leisten können. Dienstleister, die die ERETIC-Technik zur quantitativen Anwendung der NMR mit in ihr Repertoire aufnehmen, sparen an Kosten für Beschaffung und Lagerung von primären und sekundären Referenzsubstanzen.

Die Bewertung des Projekts lautet daher:

„Das Ziel des Vorhabens wurde zum Teil erreicht.“

1	Motivation und Problemstellung.....	5
2	Grundlagen der quantitativen NMR.....	8
2.1	Externe Standardisierung	9
2.2	ERETIC-Methode	10
3	Methodenentwicklung und Evaluierung von ERETIC	13
3.1	Experimentelle Parameter	14
3.2	Substanzen.....	15
3.3	Ergebnisse	17
3.3.1	Abhängigkeit der Signalintensität von der Impulszeit	17
3.3.2	Reproduzierbarkeit der Spektrenbearbeitung.....	19
3.3.3	Das überarbeitete ereticphase-Makro	20
3.3.4	Abhängigkeit vom verwendeten NMR-Röhrchen.....	21
3.3.5	Abhängigkeit von der Temperatur	22
3.3.5.1	Originalkonfiguration (ERETIC-Signal über die ¹³ C-Spule).....	22
3.3.5.2	Konfiguration 1HV1 (ERETIC-Signals direkt in den Empfänger).....	27
3.3.5.3	Konfiguration 1HV2 (ERETIC-Signal über die ¹ H-Spule).....	27
3.3.6	Abhängigkeit vom Tuning und Matching	28
3.3.7	Anwendbarkeit zur Gehaltsbestimmung	33
3.4	Diskussion und Zusammenfassung	37
4	Quantifizierung von Arzneistoffen	40
4.1	Auswahl der untersuchten Arzneistoff.....	40
4.1.1	Phytomenadion.....	41
4.1.2	Spectinomycindihydrochlorid-Pentahydrat.....	43
4.1.3	Iohexol.....	44
4.1.4	Teicoplanin.....	45
4.2	Experimentelle Parameter	46
4.3	Interne und Externe Standards	47
4.4	Codergocrinmesilat	47
4.4.1	Struktur.....	47
4.4.2	¹ H-NMR-Spektroskopie.....	48
4.4.2.1	Optimierung des Lösungsmittels.....	48
4.4.2.2	Quantitative Bestimmung von Codergocrinmesilat mittels Internem und Externem Standard	52
4.4.2.3	Quantitative Bestimmung von Codergocrinmesilat mittels ERETIC	53

4.4.3	¹³ C-NMR-Spektroskopie.....	54
4.4.4	HPLC.....	55
4.4.4.1	Arzneibuchanalytik von Codergocrinmesilat.....	55
4.4.4.2	Quantitative Bestimmung von Codergocrinmesilat mittels HPLC	57
4.4.5	Vergleich der Ergebnisse NMR-Spektroskopie versus HPLC.....	58
4.4.5.1	Ergebnisse der absoluten Bestimmungsmethode	58
4.4.5.2	Ergebnisse der relative Bestimmungsmethode	59
4.5	Clomifencitrat.....	60
4.5.1	Struktur.....	60
4.5.2	¹ H-NMR-Spektroskopie.....	61
4.5.2.1	Optimierung des Lösungsmittels.....	61
4.5.2.2	Quantitative Bestimmung von Clomifencitrat mittels Internem und Externem Standard	64
4.5.2.3	Quantitative Bestimmung von Clomifencitrat mittels ERETIC.....	66
4.5.3	HPLC.....	66
4.5.3.1	Arzneibuchanalytik von Clomifencitrat.....	66
4.5.3.2	Quantitative Bestimmung von Clomifencitrat mittels HPLC	67
4.5.4	Vergleich der Ergebnisse ¹ H-NMR-Spektroskopie versus HPLC	68
4.5.4.1	Ergebnisse der absoluten Bestimmungsmethode	68
4.5.4.2	Ergebnisse der relativen Bestimmungsmethode.....	69
4.6	Flupentixoldihydrochlorid.....	70
4.6.1	Struktur.....	70
4.6.2	¹ H-NMR-Spektroskopie.....	70
4.6.2.1	Optimierung des Lösungsmittels.....	70
4.6.2.2	Quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl mittels Internem und Externem Standard	73
4.6.2.3	Quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl mittels ERETIC	74
4.6.3	¹⁹ F-NMR-Spektroskopie	75
4.6.3.1	Optimierung des Lösungsmittels.....	75
4.6.3.2	Interner Standard	78
4.6.4	Quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl mittels Internem Standard.....	79
4.6.5	HPLC.....	80
4.6.5.1	Arzneibuchanalytik von Flupentixoldihydrochlorid	80
4.6.5.2	Quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl mittels HPLC	81

4.6.6	Vergleich der Ergebnisse NMR versus HPLC.....	82
4.6.6.1	Ergebnisse der absoluten Bestimmungsmethode	82
4.6.6.2	Ergebnisse der relativen Bestimmungsmethode.....	83
4.7	Atracuriumbesilat	84
4.7.1	Struktur.....	84
4.7.2	¹ H-NMR-Spektroskopie	84
4.7.2.1	Optimierung des Lösungsmittels.....	84
4.7.2.2	Quantitative Bestimmung von Atracuriumbesilat mittels Internem und Externem Standard	87
4.7.2.3	Quantitative Bestimmung von Atracuriumbesilat mittels ERETIC	88
4.7.3	HPLC.....	88
4.7.3.1	Arzneibuchanalytik von Atracuriumbesilat	88
4.7.3.2	Quantitative Bestimmung von Atracuriumbesilat mittels HPLC.....	89
4.7.4	Vergleich der Ergebnisse NMR versus HPLC.....	90
5	Heparin-Natrium	92
5.1	Struktur.....	93
5.2	Charakterisierung der untersuchten Heparin-Chargen.....	93
5.3	¹ H-NMR-Spektroskopie	96
5.3.1	Signalzuordnung.....	96
5.3.2	Quantitative Bestimmung von OSCS mittels ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	96
5.3.2.1	Quantitative Bestimmung von OSCS mittels Signalintegration	98
5.3.2.2	Quantitative Bestimmung von OSCS mittels Signalhöhen.....	99
5.3.2.3	Quantitative Bestimmung von OSCS mittels Internem Standard	99
5.4	Kapillarelektrophorese	100
5.5	HPLC.....	102
5.5.1	Quantitative Bestimmung von OSCS mittels HPLC.....	102
5.6	Vergleich der Ergebnisse ¹ H-NMR-Spektroskopie versus HPLC	103
6	Weitere im Projektantrag vorgesehene Arbeitspakete.....	105
7	Zusammenfassung der Ergebnisse und kmU-Relavanz.....	106
8	Literaturverzeichnis	111
9	Anhang.....	115
9.1	Allgemeiner Leitfaden (Interner Standard).....	115
9.2	Allgemeiner Leitfaden (ERETIC).....	120
6.1.	Lösungsmittelgemisch	123

6.2. Probenpräparation	123
9.3 Programm der FAH-Informationsveranstaltung am 12. Februar 2009	125
9.4 Teilnehmer der FAH-Informationsveranstaltung am 12. Februar 2009	126
10 Veröffentlichung der Projektergebnisse	127
Publikationen.....	127
Posterbeiträge	127
Vorträge.....	128

1 Motivation und Problemstellung

Zum Schutze der Verbraucher werden an Arzneimittel strenge Anforderungen hinsichtlich Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit gestellt. In Deutschland werden diese durch das deutsche Arzneimittelgesetz (AMG) festgelegt [1] und mit Hilfe der in den Europäischen Arzneibüchern (Ph. Eur.) definierten Methoden überprüft. Dabei erfolgt die Bestimmung der Reinheit und der Art der Inhaltsstoffe generell mit chromatographischen Methoden, wie Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) oder Gaschromatographie (GC). Diese in den Arzneibüchern beschriebenen Methoden sind jedoch stetes auf einen bestimmten, meist den zum Zeitpunkt der Zulassung gängigen Syntheseweg des Arzneistoffes abgestimmt. Wird der Herstellungsweg später verändert, ist zwar seine Zulassung nicht in Frage gestellt, es kann aber dennoch ein verändertes Verunreinigungsprofil auftreten, was dann möglicherweise erhebliche Probleme bei der Qualitätskontrolle nach sich zieht. Der Nachweis neuer Verunreinigungen ist im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrolle nach Ph. Eur. dann nicht mehr sichergestellt. Diese Problematik spielt vor allem bei fermentativ hergestellten Arzneistoffen wie z. B. Aminoglykosid- und Makrolid-Antibiotika eine entscheidende Rolle. Hier können bereits geringste Veränderungen im Herstellungs- oder Aufreinigungsprozess die Zusammensetzung des Arzneistoffes erheblich beeinflussen. Die in den Arzneibüchern beschriebenen Evaluationsmethoden sind häufig selbst bei gleich bleibender Qualität nur teilweise geeignet, diese zu kontrollieren. Noch viel schwieriger ist es, suboptimale Produkte quantitativ zu charakterisieren. Hinzu kommt, dass aufgrund der Globalisierung der Märkte Arzneistoffe nur noch selten von der Firma hergestellt werden, die die Substanz erstmals auf den Markt gebracht hat. So werden z. B. ca. 80 % aller Antibiotika vor allem in Indien und China hergestellt. Nicht immer werden in diesen Ländern die in Europa geltenden Qualitätsstandards eingehalten. Auch die Audits der europäischen Zulassungsbehörden sind keine Garantie für eine gleich bleibende Qualität, da die Überprüfungen natürlich nur punktuell durchgeführt werden können.

Dies betrifft vor allem klein- und mittelständische Hersteller von Arzneimitteln (kmUs), die aufgrund ihrer Laborausstattung für die Qualitätskontrolle ihrer Arzneistoffe im Allgemeinen nur chromatographische Verfahren einsetzen können. Sie sind somit nicht in der Lage, z. B. aufgrund eines abweichenden Herstellungs- bzw. Aufreinigungsprozesses eingetretene Veränderungen in der Zusammensetzung ihrer zugelieferten Rohstoffe zu erkennen. Dies führt immer wieder zu Fehlproduktionen und Kundenreklamationen. In Diskussionen mit

kmUs, die solche Arzneimittel herstellen, stellte sich heraus, dass man mit den dort etablierten chromatographischen Verfahren in vielen Fällen prinzipiell überhaupt nicht in der Lage ist, alle mit Hilfe der heute meist noch viel aufwändigeren spektroskopischen Methoden durchaus identifizierbaren Nebenkomponenten z. B. fermentativ hergestellter Arzneistoffe zu detektieren. Diesem Fehlen geeigneter Analysenverfahren stehen jedoch die immer strengen Richtlinien zum Schutz der Verbraucher gegenüber. Damit ist es den klein- und mittelständischen Herstellern auch nicht möglich, den strengen Auflagen des 2003 europaweit in Kraft getretenen REACH-Systems akkurat nachzukommen, das die zentrale Erfassung von chemischen Substanzen mit einem jährlichen Umsatz von mehr als 10 Tonnen regelt [2]. Denn hierfür ist eine genaue Charakterisierung auch aller darin vorliegenden Nebenprodukte notwendig. Dies führt zu einem deutlich Wettbewerbsnachteil für die kmUs.

Um die Qualität eines Arzneistoffes und damit auch die der hieraus hergestellten Arzneimittel sicherzustellen, ist es somit erforderlich, im Rahmen der Qualitätskontrolle zusätzlich zur Chromatographie so genannte „orthogonale“ Methoden einzusetzen. Hierbei handelt es sich um Methoden, die sich in ihrer Funktionsweise von der Chromatographie unterscheiden, d. h. deren Ergebnisse unabhängig voneinander sind.

Die Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) gehört zu den wichtigsten spektroskopischen Methoden zur Strukturaufklärung in der analytischen Chemie. Selbst geringste Änderungen in der chemischen Struktur sind mit ihr erkennbar. Daher wird sie in jedem forschenden Labor, aber auch bei Herstellern von chemischen Substanzen routinemäßig zur Strukturaufklärung und qualitativen Kontrolle eingesetzt. Auch in der pharmazeutischen Analytik wird die NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung rege verwendet und ist ferner fester Bestandteil von Validierungsprotokollen für pharmazeutische Produkte. Die NMR-Spektroskopie liefert darüber hinaus auch quantitative Aussagen. Bei Verwendung einer Referenzsubstanz mit bekanntem Reinheitsgrad können Absolutgrößen wie Gehalt, Reinheit oder Konzentration bestimmt werden. Vor allem in den letzten Jahren stieg die Zahl der Anwendungen der quantitativen NMR-Spektroskopie (qNMR) in der chemischen, vor allem aber in der pharmazeutischen Analytik drastisch an. Dies liegt u. a. daran, dass mit heutigen modernen NMR-Spektrometern aufgrund der hohen Magnetfeldstärken und der homogenen Magnetfelder Nachweisgrenzen und Messunsicherheiten erreicht werden, die den Anforderungen der chemischen und pharmazeutischen Analytik entsprechen. Dieses konnte im vorangegangenen AiF-Vorhaben (AiF-Projekt Nr. 13843) bei der Gehaltsbestimmung von pharmazeutischen Referenzsubstanzen mittels qNMR durch Interne Standardisierung eindeutig gezeigt werden. Im Vergleich zu den bisher routinemäßig eingesetzten Methoden

bietet die qNMR die Vorteile, dass (i) sie orthogonal zu chromatographischen Verfahren ist, (ii) verschiedene Substanzen keine unterschiedlichen Responsefaktoren aufweisen (die durch Integration bestimmte Signalfläche ist direkt proportional zur Anzahl der vorliegenden Moleküle) und (iii) die Richtigkeit der Analysewerte durch die Rückführung der Ergebnisse auf SI-Einheiten gewährleistet ist (Prinzip der „primären Methoden“ [3]). Die Ergebnisse des AiF-Projektes 13843 zeigten jedoch auch, dass eine Vielzahl von Referenzsubstanzen notwendig ist, um für die Analyse eines jeden Arzneistoffes einen geeigneten Internen Standard einsetzen zu können. Wechselwirkungen zwischen Analyt und Standard, Überlagerungen von Resonanzsignalen im Spektrum, aber auch das Problem eines geeigneten Lösungsmittels, in dem Analyt und Standard gleichermaßen löslich sind, behindern die universelle Anwendung dieses ansonsten exzellenten Verfahrens zur Reinheitsbestimmung.

Eine Möglichkeit, um diese Probleme zu lösen, ist die getrennte NMR-Messung von Analyt und Standard. Dieses Verfahren wird als Externe Standardisierung bezeichnet. Hier kommt es zu keinen Interaktionen zwischen beiden, und auch das Problem der Überlagerungen von Analyt- und Standard-Resonanzsignalen ist nicht mehr gegeben. Dadurch kann die Anzahl der notwendigen Referenzsubstanzen auf ein Minimum reduziert werden. Das Problem ist dann jedoch zu gewährleisten, dass die Signalintensitäten der beiden nun unabhängig voneinander aufgenommenen NMR-Spektren dennoch direkt miteinander verglichen werden dürfen. Dieser Aspekt hat bisher die routinemäßige praktische Anwendung der Externen Standardisierung weitestgehend verhindert, im Bereich der Arzneimittel und -stoffe ist diese Anwendung der qNMR sogar gänzlich unbekannt.

Optimal wäre es, wenn man den Vorteil der Internen Standardisierung (Vergleich der Signalintensitäten innerhalb nur eines einzigen Spektrums) mit den Vorteilen der Externen Standardisierung (keine Wechselwirkungen und Signalüberlagerungen zwischen Analyt- und Standard-Signalen) kombinieren könnte. Mit der Einführung der ERETIC-Technik (Electronic Reference To Access In Vivo Concentrations) im Jahr 1998 scheint ein wichtiger Schritt in diese Richtung erfolgt zu sein [4-6]. Durch die Verwendung eines elektronischen Kalibriersignals, welches in Intensität, Linienbreite und Signallage beliebig an das NMR-Spektrum des Analyten angepasst werden kann, besteht völlige Handlungsfreiheit für die quantitative Auswertung. Bei diesem höchst innovativen Ansatz werden die Signalintensitäten von Analyt- und Standardlösung auf das Kalibriersignal jeweils intern referenziert. Der Abgleich zwischen den beiden Spektren erfolgt mittels des ERETIC-Signals, welches bei beiden Messungen in gleicher Art und Weise eingestrahlt wurde. Die in der Literatur beschriebenen Standardabweichungen dieser Technik von ca. 1 % sind für die

pharmazeutische Analytik grundsätzlich akzeptabel. Eine umfangreiche Evaluierung dieser Technik für die Charakterisierung von Arzneistoffen steht jedoch noch aus.

Mit der erfolgreichen Etablierung der ERETIC-Technik für die pharmazeutische Analytik von Arzneistoffen wären die klein- und mittelständischen Hersteller von Arzneimitteln somit bei ihrer Qualitätskontrolle erstmals in der Lage, Abweichungen in der Zusammensetzung der Arzneistoffe, hervorgerufen z. B. durch Änderungen des Herstellungs- oder Aufbereitungsprozesses, nicht nur vage festzustellen, sondern sogar zu quantifizieren. Ebenso könnten sie damit normkonform ihre Arzneistoffe mittels zweier voneinander unabhängiger Verfahren charakterisieren.

2 Grundlagen der quantitativen NMR

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist eine der wichtigsten und am weitesten verbreiteten Methoden zur Strukturaufklärung von flüssigen oder gelösten Substanzen. Ihre ausgezeichneten selektiven Fähigkeiten in der Strukturanalytik haben sie in fast jedem forschenden chemischen Labor unabhömmlich gemacht. Darüber hinaus entwickelt sich die hochauflösende ^1H -NMR-Spektroskopie immer mehr zu einer unverzichtbaren Methode auch für die quantitative Analytik, vor allem im pharmazeutischen Bereich. Die gegenwärtigen Applikationen der qNMR-Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik sind in einer Serie von Übersichtsartikeln [7-9] dargestellt worden. Dabei zählt die Gehaltsbestimmung von Natur- und Arzneistoffen zu den wichtigsten Anwendungen der qNMR im Pharmabereich.

Bei der ^1H -NMR-Spektroskopie werden selektiv alle Protonen der zu untersuchenden Probenlösung mittels eines Radiofrequenz-Impulses angeregt. Das daraus resultierende NMR-Spektrum zeigt eine Vielzahl an Resonanzlinien, die aufgrund der unterschiedlichen chemischen Umgebungen der einzelnen Protonen innerhalb eines Moleküls (also einer Substanz) verschiedene chemische Verschiebungen im Spektrum aufweisen. Die normierte Intensität eines jeden Signals (Fläche eines Signals unter Berücksichtigung der Anzahl der Protonen der zu diesem Signal zugehörigen Struktureinheit) ist dabei direkt proportional zur Stoffmenge der Substanz in der Probe. Umso mehr ist es von großer Bedeutung, dass die Responsefaktoren für alle Signale innerhalb eines Spektrums, und damit auch für alle Substanzen, identisch sind [12]. Daraus ergibt sich einer der wichtigsten Vorteile der qNMR gegenüber chromatographischen Methoden: Aus dem normierten Intensitätsverhältnis zweier Resonanzsignale, die jeweils zu einer Substanz A bzw. B gehören, kann direkt und ohne Kalibrierung das Stoffmengenverhältnis der beiden Substanzen berechnet werden. Diese

Tatsache ist die Grundlage aller quantitativen Messungen. In anderen Worten: Die NMR ist zwar intrinsisch quantitativ, das Spektrum aber liefert nur relative Aussagen, wie z. B. die Bestimmung von Stoffmengenanteilen oder -fraktionen.

Um so genannte Absolutgrößen wie Gehalt, Reinheit oder Konzentration mit der NMR-Spektroskopie zu bestimmen, muss eine Kalibrierung mittels einer Referenzsubstanz erfolgen. Da die Methode jedoch wie erläutert linear ist, reicht eine Ein-Punkt-Kalibrierung aus, d. h. eine komplette Kalibrierkurve ist hierfür nicht notwendig. Dieser Standard kann entweder direkt zu der zu untersuchenden Probensubstanz dazu gewogen werden (Interner Standard) oder aber separat gemessen werden. Letzteres wird als Externe Standardisierung bezeichnet. Generell hat sich die Anwendung der Internen Standardisierung bei der qNMR durchgesetzt, da sie von der Handhabung und vom Zeitaufwand (nur eine Messung) deutlich einfacher zu praktizieren ist. Umfangreiche Evaluierungsstudien der qNMR bei Verwendung eines Internen Standards zu Gehalts- und Reinheitsbestimmungen belegen, dass das Verfahren linear, robust, spezifisch und selektiv ist [8,10,11]. Die dabei ermittelten Messunsicherheiten von maximal 1 % sind vergleichbar mit denen der heute routinemäßig angewendeten Verfahren der Chromatographie. Für pharmazeutische Referenzmaterialien konnte im AiF-Projekt Nr. 13843 erfolgreich der Nachweis erbracht werden, dass die qNMR die strengen Richtlinien der pharmazeutischen Analytik hinsichtlich Präzision und Richtigkeit prinzipiell erfüllt. Dieses Projekt zeigte aber auch die Grenzen der Internen Standardisierung auf. Speziell bei komplizierten Molekülen erhält man sehr linienreiche und komplexe ^1H -NMR-Spektren, bei denen trotz der i. A. sehr guten Auflösung die Auswahl eines geeigneten Internen Standards schwierig ist. So sind bei der Wahl einer geeigneten Referenzsubstanz Überlagerungen der auszuwertenden Signale von Analyt und Standard im Spektrum zu vermeiden. Außerdem ist ein Lösungsmittel notwendig, in dem sich die Probe ohne Wechselwirkungen mit dem Standard lösen lässt. Es ist also für die Interne Standardisierung eine Vielzahl an Referenzsubstanzen zu bevorraten, um je nach Analysenprobe einen geeigneten Standard einsetzen zu können. Ebenso kann dieses Verfahren nicht angewendet werden, wenn eine Kontamination der Analysenprobe vermieden werden soll. Abhilfe liefert hier die Anwendung der Externen Standardisierung.

2.1 Externe Standardisierung

Bei der Verwendung eines Externen Standards zur Gehaltsbestimmung mittels qNMR werden zwei Lösungen hergestellt, eine mit der zu untersuchenden Probe, die andere mit der Referenzsubstanz. Man kann zwischen zwei Vorgehensweisen der Externen Standardisierung

unterscheiden. Im ersten Fall werden die Probe- und Standardlösung in je ein NMR-Röhrchen überführt und anschließend separat gemessen. Dabei ist es von großer Bedeutung, dass beide Spektren unter identischen Bedingungen aufgenommen werden. Darunter ist zu verstehen, dass für beide Proben die Abstimmung des Probenkopfes in ähnlicher Weise erfolgt und die gleichen Aufnahmeparameter verwendet werden. Bei der zweiten Variante wird eine mit einer Standardlösung gefüllte Kapillare im Messröhrchen platziert (Abbildung 2-1).

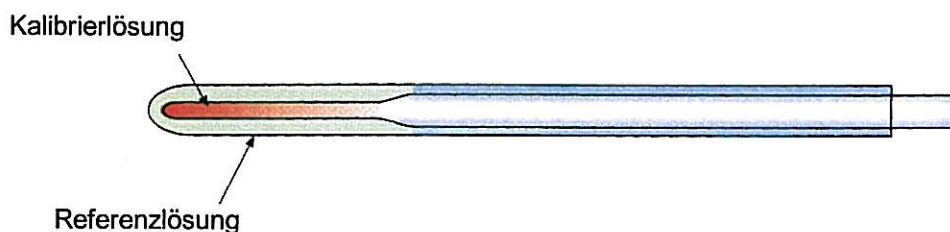


Abbildung 2-1: Schema eines Messröhrchens, das mit einer Kapillare für den Externen Standard versehen ist.

Diese Option hat im Gegensatz zur ersten Variante den Vorteil, dass nur ein Spektrum aufgenommen werden muss. Hingegen kann hierbei das Problem einer möglichen Überlagerung der Resonanzlinien von Analyt und Standard nicht behoben werden. Aus diesem Grund wird generell bei der qNMR mittels eines Externen Standards die Variante 1 angewendet. Die Tatsache, dass nur mit dieser Variante alle oben beschriebenen Probleme der Internen Standardisierung behoben werden können, macht diese Methode so attraktiv, dass der damit verbundene doppelte Zeitaufwand zur Aufnahme von zwei Spektren (Probe und Standard) gerne in Kauf genommen wird. In der Literatur finden sich dennoch nur wenige praktische Anwendungsbeispiele [12,13]. Dies liegt u. a. daran, dass der Vergleich der Intensitäten zweier Spektren, auch wenn sie mit identischen Aufnahmeparametern gemessen wurden, nicht trivial ist. Einflussgrößen wie z. B. die Abstimmung des Probenkopfes auf die jeweilige Probe, die Qualität der verwendeten NMR-Röhrchen [14] oder unterschiedliche Lösungsmittel können bei Nichtbeachtung zu Fehlern bei der Quantifizierung führen.

2.2 ERETIC-Methode

Als alternative Methode zu den Externen Standards wurde 1998 das ERETIC-Verfahren (Electronic Reference To Access In Vivo Concentrations) [4,5] publiziert. Diese Technik basiert im Prinzip auf der Verwendung eines Internen Standards. In diesem Fall wird jedoch der chemische Standard durch ein elektronisch erzeugtes Signal ersetzt, welches beliebig im Spektrum platziert werden kann. Somit kann es zu keinen Überlagerungen mit den

Resonanzlinien der Analysensubstanz oder zu Wechselwirkungen kommen. Durch Wahl der Parameter kann die Intensität und die Linienbreite des ERETIC-Signals an die übrigen Signale im Spektrum angepasst werden. Dieses elektronisch erzeugte Signal muss jedoch ebenfalls kalibriert werden. Hierzu ist ein Externer Standard notwendig, gegen den das ERETIC-Signal unter identischen Aufnahmeparametern möglichst zeitnah kalibriert wird. Somit kann man dieses Verfahren als Kombination beider Standardisierungsvarianten ansehen, bei der man sich der Vorteile beider Methoden bedient. Zurzeit befindet sich die ERETIC-Technik bei der Fa. Bruker im Versuchsstadium und erlaubt gegenwärtig Langzeitstabilitäten von ca. 1-3 %.

Die physikalische Funktionsweise der ERETIC-Technik kann vereinfacht wie folgt beschrieben werden: In einem Frequenzgenerator wird ein sinusförmiges Hochfrequenz-Signal erzeugt, welches mit einem ebenfalls in einem Frequenzgenerator erzeugten Niederfrequenzsignal (exponentiell abfallend) multipliziert wird. Diese künstlich erzeugte, zeitlich abfallende Sinusschwingung entspricht der NMR-Response eines simulierten Kerns. Man spricht daher auch von einem pseudo-FID (Free Induction Decay, freier Induktionsabfall). Dieses Signal wird anschließend während der Aufnahmezeit dem eigentlichen Responsesignal der Probe überlagert. Bei der in der Literatur beschriebenen und bisher verwendeten Konfiguration wird das ERETIC-Signal über die ^{13}C -Spule des Probenkopfes eingestrahlt und anschließend zusammen mit den Protonensignalen der Probe über die Protonenspule empfangen (Abbildung 2-2).

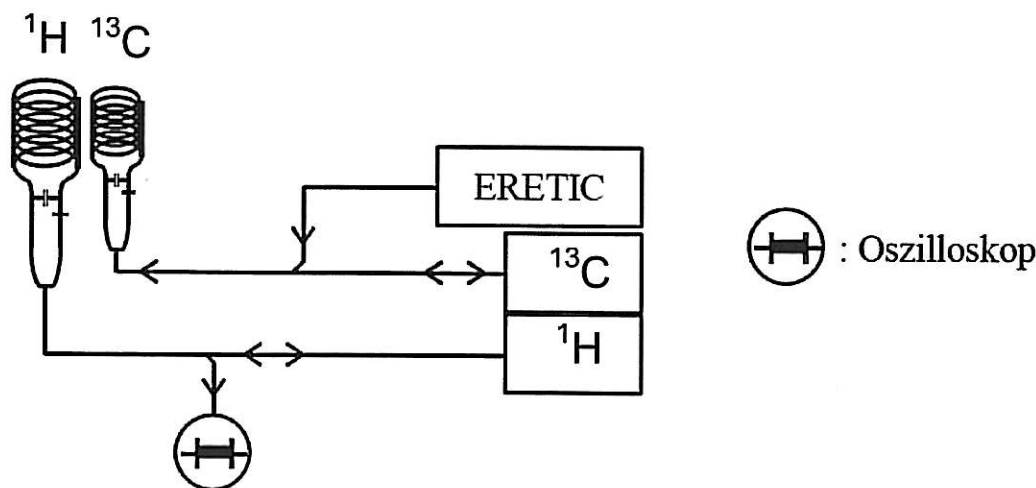


Abbildung 2-2: Original ERETIC-Konfiguration.

Diese Konfiguration weist jedoch einige Probleme auf:

- Die ^{13}C -Spule ist bauartbedingt auf das Senden von ^{13}C -Signalen (hier 100 MHz) ausgelegt und kann somit nicht auf die Protonenfrequenz von hier 400 MHz des ERETIC-Signals abgestimmt werden.
- Das ERETIC-Signal wird über den Probenkopf gesendet und ist deshalb von allen Komponenten der Messanordnung (Probe, Probenkopf, Probenrohr) abhängig. Das hat den Vorteil, dass Einflüsse, die das gesamte Messsystem beeinträchtigen, in gleichem Maße das ERETIC-Signal und die Analytsignale betreffen, aber den Nachteil, dass mehr Fehlerquellen bestehen.

Die Gehaltsbestimmung bei Anwendung der ERETIC-Technik erfolgt in ähnlicher Weise wie bei der Externen Standardisierung. Mittels einer Ein-Punkt-Kalibrierung gegen einen Externen Standard wird zuerst für eine festgelegte Intensität des ERETIC-Signals (definiert durch entsprechende Impulsleistung des ERETIC-Senders) ein simulierter Kerngehalt bestimmt:

$$n_{\text{ERETIC}} = K_{\text{Std}} \cdot \frac{I_{\text{ERETIC}}}{I_{\text{Std}}} \cdot \frac{N_{\text{Std}}}{M_{\text{Std}}} \quad (1)$$

n_{ERETIC} : Simulierter Kerngehalt in $\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$

K_{Std} : Festgelegter Gehalt eines Kalibrierstandards $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

I_x : Intensität

N_{Std} : Anzahl der Protonen, die der Struktureinheit des herangezogenen Signals zuzuordnen ist

M_{Std} : Molare Masse des Standards

Anschließend wird die Analysenprobe unter denselben Aufnahmebedingungen wie zum Zeitpunkt der Kalibrierung gemessen. Mit Hilfe folgender Gleichung kann dann der Gehalt jeder Komponente in der Probe anhand eines ausreichend selektiven Signals bestimmt werden:

$$K_A = n_{\text{ERETIC}} \cdot \frac{I_A}{I_{\text{ERETIC}}} \cdot \frac{M_A}{N_A} \quad (2)$$

K_A : Gehalt des Analyten in der Probe in $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

3 Methodenentwicklung und Evaluierung von ERETIC

Ausgangspunkt dieses Projekt waren Probleme, die bei der Internen Standardisierung für quantitative NMR-Messungen im vorangegangenen AiF-Vorhaben 13843 deutlich geworden waren. Um diese zu lösen, sollte die Anwendbarkeit der 1998 veröffentlichten ERETIC-Technik für die pharmazeutische Analytik untersucht werden. Eine systematische Evaluierung sollte die Robustheit und die Messunsicherheit dieser Methode bestimmen. Mit Hilfe von gravimetrisch hergestellten Modellösungen wurden die wichtigsten Einflussgrößen wie z. B. Temperatur, Qualität der NMR-Röhrchen, Konzentration, Abstimmung des Probenkopfes sowie Variation des Analyten bei Beibehaltung der Kalibriersubstanz untersucht und auf ihren Einfluss auf die Richtigkeit der Analysenergebnisse bewertet. Im Verlaufe des Projektes zeigte jedoch die systematische Evaluierung, dass die ERETIC-Technik, so wie sie von der Fa. Bruker verkauft wird und in der Literatur publiziert ist, tatsächlich nicht robust ist. So verursachen z. B. schon Änderungen der Analytkonzentration oder ein Wechsel des Analyten falsche Resultate. Ebenso ist die äußerst sorgfältige Abstimmung des Probenkopfes an die jeweilige Messprobe ein Muss für korrekte Messergebnisse. Dieser Parameter ist jedoch in der Praxis nie so exakt einstellbar. Aus diesem Grunde wurden in Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma Bruker BioSpin zwei weitere Varianten entwickelt, die der Originalkonfiguration im Rahmen der Evaluierung gegenübergestellt wurden. Bei der Version 1HV1 wird das ERETIC-Signal unter Umgehung aller Spulen direkt in den Empfänger eingekoppelt,

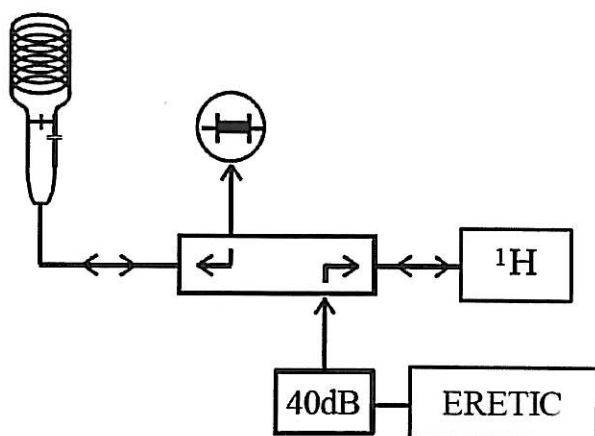


Abbildung 3-1: Überarbeitete ERETIC-Konfiguration (1HV1).

während bei Version 1HV2 das ERETIC-Signal über die Protonenspule des Probenkopfes gesendet und empfangen wird.

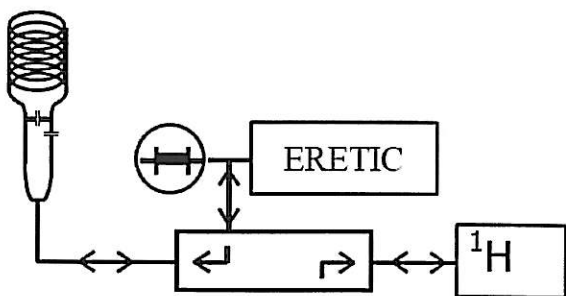


Abbildung 3-2: ERETIC-Konfiguration (1HV2).

Im Verlauf des Projektes zeigte die Evaluierung der drei Varianten, dass nur die Konfiguration 1HV1 (Einspeisung des ERETIC-Signals direkt in den Empfänger) die notwendige Robustheit aufweist, die es für einen späteren Routinebetrieb benötigt. Die mit dieser Methode erreichte Messunsicherheit von 1 %, bestimmt durch Mehrfachmessungen an verschiedenen Modelllösungen, ist akzeptabel für die pharmazeutische Analytik von Arzneistoffen. Im Folgenden werden die Ergebnisse detailliert dargestellt und diskutiert.

3.1 Experimentelle Parameter

Alle Messungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, an einem Bruker DMX 400 Spektrometer ($B_0 = 9,4 \text{ T}$; $(^1\text{H}) = 400,13 \text{ MHz}$) mit einem tbi-Probenkopf (Inverser Triple-Breitband-Probenkopf) bei Temperierung auf 303 K durchgeführt.

Die Versuche zur Variation der Impulszeit $p1$ wurden untemperiert mit folgenden Parametern durchgeführt: $ns = 4$; $td = 16 \text{ k}$; $sw = 5 \text{ ppm}$; $aq = 4 \text{ s}$; $d1 = 60 \text{ s}$; $rg = 256$; $p11 = 5,0 \text{ dB}$. Die Impulszeit $p1$ wurde von $7,5 \mu\text{s}$ bis $11,5 \mu\text{s}$ in $0,1 \mu\text{s}$ Schritten variiert. Als Probe fand eine entgaste und zugeschmolzene Standardprobe von 3 % CHCl_3 und 0,2 % TMS in Aceton- d_6 mit einer longitudinalen Relaxationszeit (T_1) von 187,3 s (nach inversion recovery bestimmt) Verwendung.

Die Versuche zur Reproduzierbarkeit der Spektrenbearbeitung wurden anhand der temperierten Langzeitversuche der Originalkonfiguration und der Konfiguration 1HV1 durchgeführt (siehe unten).

Die Parameter bei der Untersuchung auf Abhängigkeit von der Qualität des verwendeten Röhrchens lauteten: $ns = 8$; $td = 64 \text{ k}$; $sw = 16 \text{ ppm}$; $aq = 3,4 \text{ s}$; $d1 = 60 \text{ s}$; $rg = 64$; $p112 = 10 \text{ dB}$; $p1 = 2,33 \mu\text{s}$; $p11 = 2,9 \text{ dB}$; $o2 = -1 \text{ ppm}$. Bei der Variation der ERETIC-Impulsleistung wurde $p112$ entsprechend der in der Auswertungstabelle angegebenen Werte variiert.

Die erste Untersuchung zur Langzeitstabilität wurde noch ohne Temperierung und mit folgenden Parametern durchgeführt: $ns = 16$; $td = 64$ k; $sw = 16$ ppm; $aq = 5$ s; $d1 = 120$ s; $rg = 64$; $pl12 = 3$ dB; $p1 = 9,0$ μ s; $pl1 = 5,0$ dB; $o2 = -1$ ppm. Die darauf folgenden Langzeituntersuchungen wurden mit den Parametern: $ns = 8$; $td = 128$ k; $sw = 16$ ppm; $aq = 10$ s; $d1 = 60$ s; $rg = 64$; $pl12 = 3$ dB; $p1 = 9,0$ μ s; $pl1 = 5,0$ dB; $o2 = -1$ ppm durchgeführt. Dadurch konnte die Dauer einer Messung von 30 min auf 10 min gesenkt werden. Bei allen Messungen unter Temperierung hatten die Proben 10 min Zeit, um die Temperatur auf 303 K anzugleichen.

Die Vorversuche zur Abhängigkeit vom Tuning wurden mit folgenden Parametern vorgenommen: $ns = 8$; $td = 64$ k; $sw = 15$ ppm; $aq = 3,6$ s; $d1 = 60$ s; $rg = 4$; $pl12 = 0$ dB; $p1 = 7,25$ μ s; $pl1 = 2,9$ dB; $o2 = -1$ ppm. Für den erweiterten Test auf Abhängigkeit vom Tuning unter Verwendung der integrierten Methode wurde $ns = 4$ gesetzt, die restlichen Parameter blieben unverändert. Zur Bestimmung der Gehalte lauteten die Parameter $ns = 8$; $td = 128$ k; $sw = 16$ ppm; $aq = 10$ s; $d1 = 60$ s; $rg = 64$; $pl12 = 3$ dB; $p1 = 9,0$ μ s; $pl1 = 5,0$ dB; $o2 = -1$ ppm. Bei der Gehaltsbestimmung im Routinebetrieb wurde $ns = 4$ gesetzt. Die restlichen Parameter blieben unverändert.

3.2 Substanzen

Als Substanzen für die Modelllösungen wurden Referenzsubstanzen ausgewählt, deren Reinheiten bereits zuvor auf ein zertifiziertes Referenzmaterial (Benzoessäure, CRM350a, NIST) zurückgeführt worden waren.

Tabelle 3-1: Die Reinheit der verwendeten Substanzen wurde auf ein zertifiziertes Referenzmaterial zurückgeführt.

Substanz	Reinheit
Maleinsäure	99,91 %
Trioxan	99,6 %
Dimethylsulfon	99,5 %

Für die Untersuchung der Auswirkungen der ERETIC-Impulsleistung wurden vier Modelllösungen von Maleinsäure in DMSO- d_6 mit unterschiedlichen Gehalten gravimetrisch hergestellt:

Tabelle 3-2: Einwaagen der Proben zur Untersuchung des Einflusses des Probenröhrchens und der ERETIC-Impulsleistung

Probe	$m_{\text{Maleinsäure}}$ in mg	m_{DMSO} in g	Gehalt in $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
1	484,83	15,17950	0,0309
2	18,06	1,19317	0,0149
3	15,93	2,97583	0,0053
4	11,27	5,14084	0,0022

Die Probe 1 wurde außerdem bei der Evaluierung des Einflusses der Qualität verschiedener NMR-Röhrchen sowie zur Kalibrierung der ersten Konzentrationsbestimmungen verwendet. Bei den ersten Versuchen zur Untersuchung des Einflusses der Spektrometerabstimmung fand eine Standardprobe von 10 % Ethylenbenzol in CDCl_3 Verwendung.

Die Überprüfung der Robustheit der ERETIC-Technik, wenn unterschiedliche Analytkonzentrationen oder verschiedene Analyten vorliegen, wurde an den folgenden gravimetrisch hergestellten Modelllösungen durchgeführt:

Tabelle 3-3: Einwaagen zur Gehaltsbestimmung. Mal100 bis Mal10 sind Lösungen von Maleinsäure, Trioxan ist eine Lösung von Trioxan und Sulfon ist eine Lösung von Dimethylsulfon, alle in 2 ml DMSO.

Probe	m_{Analyt} in mg	m_{DMSO} in g	Gehalt in $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Mal100	100,02	2,38316	0,0402
Mal50	49,35	2,38631	0,0202
Mal20	20,31	2,38246	0,0085
Mal10	9,94	2,38179	0,0042
Trioxan	50,69	2,37032	0,0209
Sulfon	51,07	2,37296	0,0210

Die Probe Mal50 wurde ebenfalls bei der Gehaltsbestimmung zur Kalibrierung verwendet. Außerdem wurden alle Versuche zur Langzeitstabilität und zur Abhängigkeiten von Faktoren wie Temperatur und Abstimmung des Spektrometers anhand dieser Probe durchgeführt. Sämtliche Proben wurden 30 Minuten im Ultraschallbad bei 30 °C gelöst und bis zu einer Füllhöhe von ca. 8 cm (vollständiger sichtbarer Bereich) in 5 mm NMR-Röhrchen vom Typ Schott® Scientific gefüllt. Alle gefüllten Probenröhrchen wurden mit handelsüblichen Teflon-Kappen geschlossen und mit Parafilm (American National Can™) versiegelt.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Abhängigkeit der Signalintensität von der Impulszeit

Die Intensität der NMR-Signale wird vom Auslenkungswinkel beeinflusst [15-17]. Da die quantitative NMR-Spektroskopie unmittelbar von der Genauigkeit der Signalintensitäten abhängig ist, musste die Stärke des Einflusses von Abweichungen des Impulswinkels von 90° auf die Signalintensität überprüft werden. In der theoretischen Betrachtung geht man davon aus, dass ein 180°-Impuls genau die doppelte Zeit eines 90°-Impulses beansprucht. Da ein Nulldurchgang genauer ermittelt werden kann als ein Maximum, wird häufig der 180°-Impuls bestimmt. Für die übrigen Werte geht die Theorie davon aus, dass die Signalintensität in Abhängigkeit vom Impulswinkel – und damit von der Impulszeit – einer Sinuskurve folgt.

$$I_{rel} = \sin(\theta) \quad (3)$$

I_{rel} : relative, auf eins als Maximum normierte Intensität

θ : Impulswinkel, linear von der Impulszeit abhängig

Die Impulswinkel und -zeiten sind dabei linear voneinander abhängig. Die Richtigkeit dieser Aussagen wurde an einer Chloroformprobe in Aceton-d₆ überprüft. Zuerst wurde der 90°-Impuls über die Bestimmung des 180°-Nulldurchganges grob zu 9,5 µs berechnet. Anschließend wurde die Impulszeit systematisch in 0,1 µs-Schritten im Bereich von 7,5 µs bis zu 11,5 µs variiert. Die Signalintensitäten der erhaltenen Spektren wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Durch Bilden des Arcussinus der auf eins als Maximum normierten relativen Intensitäten konnte der 90°-Impuls viel genauer bestimmt werden.

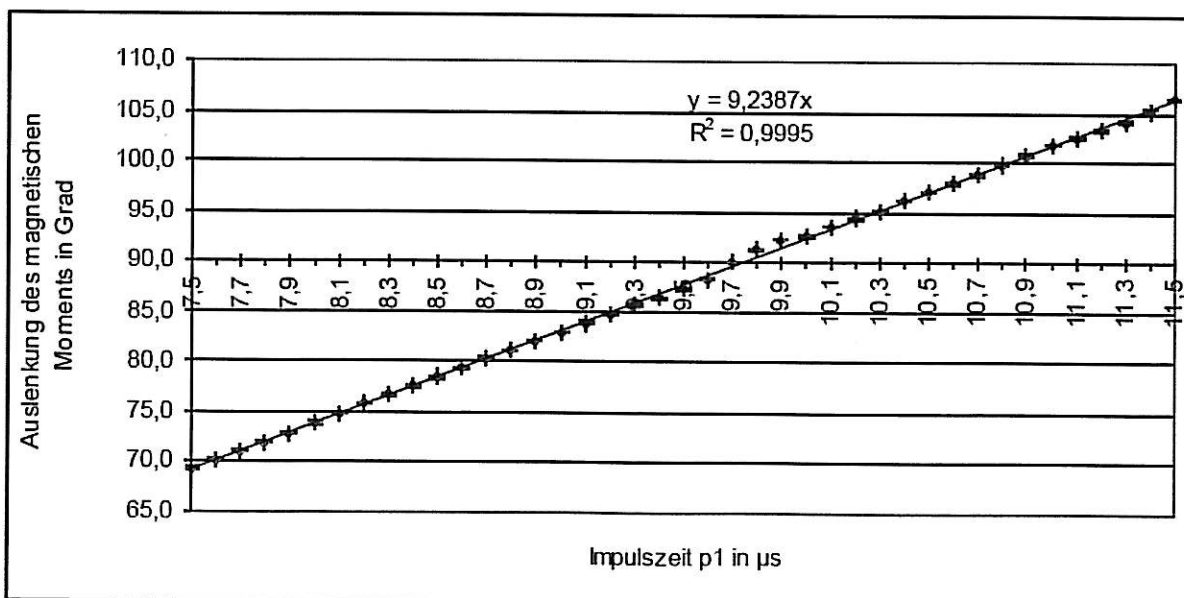


Abbildung 3-3: Bestimmung des 90°-Impulses.

Die Werte für diese Gerade wurden mit Hilfe der folgenden Formeln ermittelt:

$$\theta = \sin^{-1}\left(\frac{I_{p1}}{I_{max}}\right) \text{ bzw. } \theta = 180 - \sin^{-1}\left(\frac{I_{p1}}{I_{max}}\right) \quad (4)$$

I_{p1} : Signalintensität bei einer bestimmten Impulszeit $p1$

I_{max} : Maximale Signalintensität in der Messreihe (zur Normierung)

Hierbei dient die zweite Variante der Gleichung zur Bestimmung des Impulswinkels für Werte nach dem Maximum. Aus der Steigung von $9,24^\circ \mu\text{s}^{-1}$ kann die Impulszeit für einen 90° -Impuls von $9,74 \mu\text{s}$ ermittelt werden.

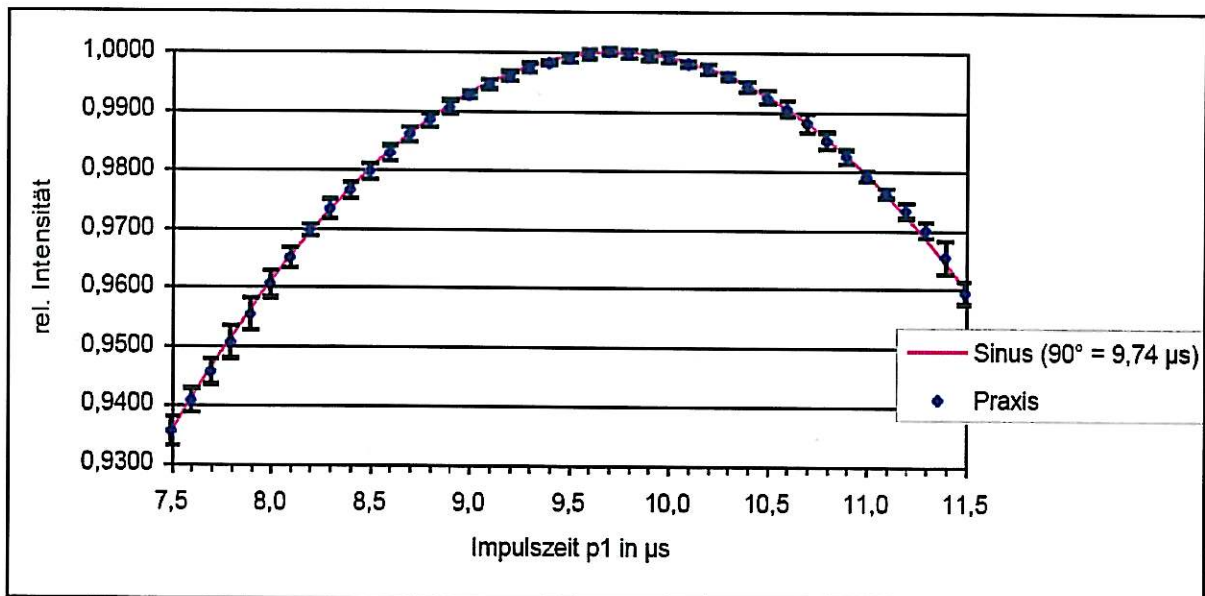


Abbildung 3-4: Übereinstimmung der experimentellen Werte und der Theorie.

Es zeigte sich, dass die Bestimmung des 90° -Impulses über den 180° -Impuls (Nulldurchgang) bei der gleichen Anzahl an Messungen zwar eine schnelle, dafür aber nicht sehr genaue Methode ist. Hier ist es naturgemäß genauer, aber auch zeitaufwändiger, den 90° -Impuls in vielen Messungen direkt zu bestimmen. Aus diesem Grunde wurde von der Firma Bruker BioSpin eine Pulssequenztechnik entwickelt, die es ermöglicht, mit geringstem Zeitaufwand den 90° -Impuls akkurat zu bestimmen. Diese Pulssequenz wird von Bruker als „pulsca“ bezeichnet.

Es konnte gleichzeitig festgestellt werden, dass die Intensitäten im gesamten untersuchten Bereich von 69° - 106° ($7,5 \mu\text{s}$ - $11,5 \mu\text{s}$) analog der Theorie einer Sinusfunktion folgen. Dieses Erkenntnis macht es möglich, einmal bestimmte Werte leicht nachträglich auf das erwartete Maximum zu korrigieren und damit vergleichbar zu machen.

3.3.2 Reproduzierbarkeit der Spektrenbearbeitung

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Integrale der Signale stark von der Spektrenbearbeitung und damit ebenso stark von der Person abhängen, welche die Auswertung durchführt [10,12]. Wie stark diese personenbezogene Ungenauigkeit bei der Verwendung der publizierten Konfiguration der ERETIC-Methode ist, wurde an einer Messreihe mit Mehrfachmessungen einer Probe (Mal50) bei Temperierung auf 303 K untersucht. Verglichen wurden die Ergebnisse zweier Bearbeiter bei der unabhängigen Auswertung einer Langzeitmessung. Dabei wichen die Resultate um bis zu 0,4 % voneinander ab.

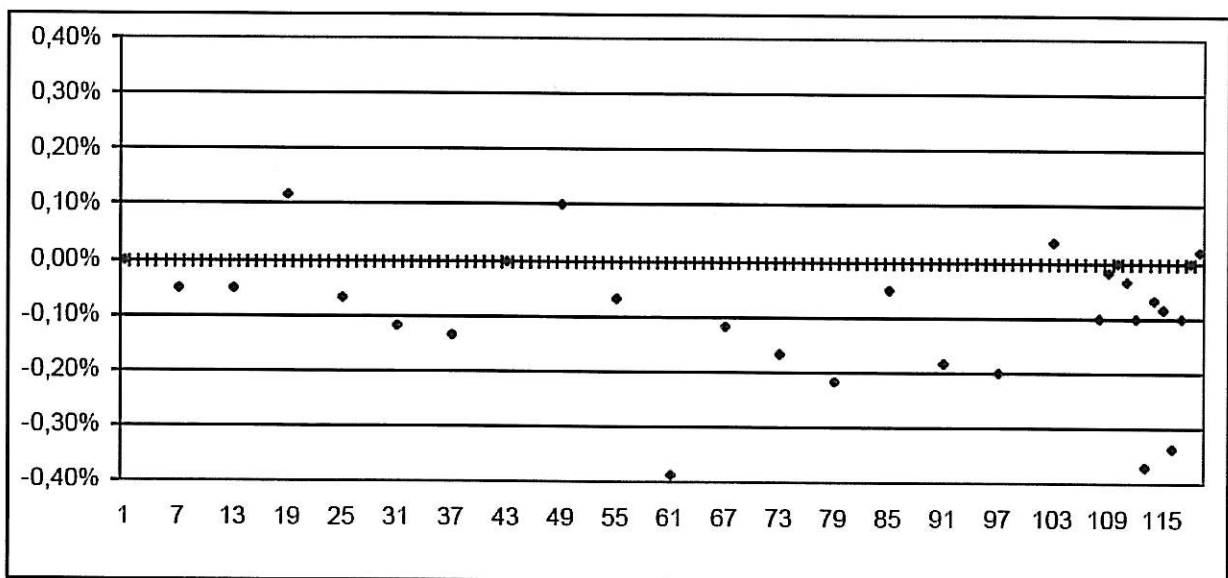


Abbildung 3-5: Relative Abweichung der Messwerte zweier Bearbeiter voneinander, ohne vorherige Absprache der Bearbeitungsprozedur.

Dabei ist zu vermerken, dass die Standardabweichungen innerhalb einer Messreihe von je einem Bearbeiter ähnliche Werte aufweisen: 0,26 % bzw. 0,25 %. Daraus folgt, dass die Auswertungen für sich betrachtet in ihrer Aussagekraft gleichwertig sind und aufgrund dieser Informationen keine Aussage darüber getroffen werden kann, welche Bearbeitung richtig oder falsch ist. Zur Verbesserung wurde eine einheitliche Bearbeitungsprozedur eingeführt:

1. Fourier-Transformation zuzüglich einer exponentiellen Korrektur für den FID.
2. Manuelle Phasenkorrektur des zu untersuchenden Analytsignals als Phase nullter Ordnung.
3. Manuelle Phasenkorrektur aller anderen Signale, unter Ignorierung des ERETIC-Signals, mit der Phase erster Ordnung.
4. Automatische Phasenkorrektur des ERETIC-Signals mit dem überarbeiteten ereticphase-Makro.

5. Eventuelle manuelle Nachkorrektur der ERETIC-Phase, falls erforderlich und möglich (Funktioniert nur, wenn nur ein Analytsignal ausgewertet werden soll. Sonst müssen alle zu untersuchenden Signale einzeln korrigiert werden).
6. Manuelle Basislinienkorrektur über den Bereich, innerhalb dessen Integrale bestimmt werden sollen, durch Anpassen eines Polynoms fünften Grades.
7. Integration innerhalb festgelegter Grenzen, wobei die Intensität des ERETIC-Signals als 1 kalibriert wird.

3.3.3 Das überarbeitete ereticphase-Makro

Das ERETIC-Signal ist häufig zu den NMR-Signalen phasenverschoben. Deshalb kann das ERETIC-Signal nicht gleichzeitig mit den NMR-Signalen phasenkorrigiert werden. Standardmäßig bietet Bruker hierfür ein Makro an, welches den Bereich im Spektrum, in welchem sich das ERETIC-Signal befindet, separiert und getrennt phasenkorrigiert. Diese automatische Phasenkorrektur erfolgt allerdings nicht immer exakt genug und erfordert deshalb manchmal eine manuelle Nachkorrektur. Die Genauigkeit der automatischen Phasenkorrektur konnte in einem ersten Schritt verbessert werden, indem der Bereich, den das Makro für die Phasenkorrektur betrachtet, vergrößert wurde. Ein weiteres Problem des Makros ist, dass es der Phasenkorrektur eine automatische Basislinienkorrektur folgen lässt. Dadurch wird eine manuelle Nachbearbeitung der Phase, falls erforderlich, stark erschwert und sehr ungenau. Diese automatische Basislinienkorrektur wurde aus dem Makro entfernt. Die Überarbeitung des Makros sowie die einheitlichen Prozedur zur Spektrenbearbeitung führten zu einer deutlichen Verbesserung der Übereinstimmung der Ergebnisse.

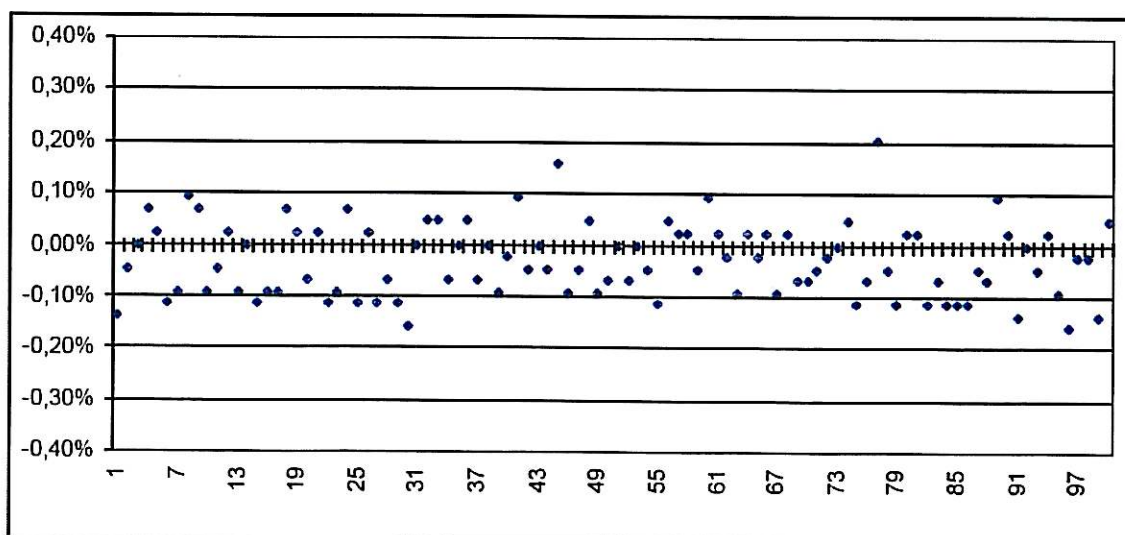


Abbildung 3-6: Relative Abweichung der Messwerte zweier Bearbeiter voneinander, bei Einhaltung der beschriebenen Prozedur zur Spektrenbearbeitung.

Beide Bearbeiter erzielten nun eine relative Standardabweichung von 0,14 % über alle Spektren, wobei die Abweichungen zwischen den Ergebnissen beider Bearbeiter nur noch maximal 0,2 % betragen. Das Vorgehen und die subjektive Einschätzung des Bearbeiters bei manuellen Operationen wie der Phasenkorrektur bleiben jedoch ein Unsicherheitsfaktor. Es empfiehlt sich daher weiterhin, dass eine Messreihe immer vollständig von einer Person ausgewertet wird, um Systematiken bei der Bearbeitung identisch zu halten und so den Spektrenvergleich zu erleichtern.

3.3.4 Abhängigkeit vom verwendeten NMR-Röhrchen

Probenröhrchen für die NMR-Spektroskopie werden von den verschiedenen Herstellern in unterschiedlichen Qualitäten angeboten. Eine hohe Qualität bedeutet in diesem Fall eine geringe Variation der Innendurchmesser, damit konstante Volumina und vergleichbare Signalintensitäten. Der Innendurchmesser bestimmt, wie viele Spins bei einem Impuls angeregt und detektiert werden können. Einige Anbieter wie Schott machen Angaben zu den Variationsbreiten der Innendurchmesser ihrer Produkte. Wo diese Angaben jedoch fehlen, ist eine Vorhersage der Reproduzierbarkeit und Standardabweichung von Ergebnissen nicht möglich.

Verglichen wurden die 5 mm NMR-Röhrchentypen Schott Economy (Eco), Schott Professional (Pro), Schott Scientific (Sci), Wilmad scl 505 ps, Wilmad scl 507 pp und Norrel 507 hp. Es wurden jeweils identische Lösungen von Maleinsäure in DMSO (Probe 1) in je fünf Röhrchen jeden Typs abgefüllt und nacheinander bei immer neu optimierten Geräteeinstellungen mit der originalen ERETIC-Konfiguration gemessen.

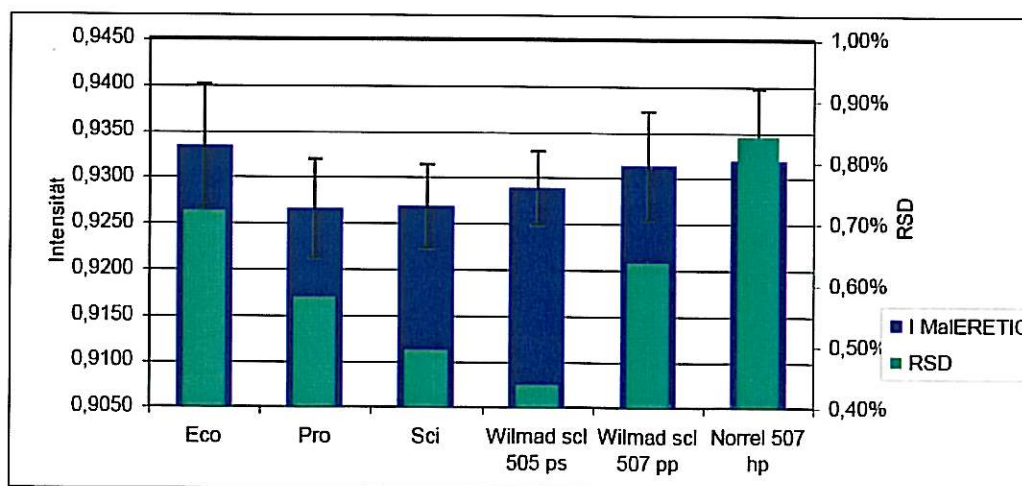


Abbildung 3-7: Ausmaß der Standardabweichung im Verhältnis zur Abweichung der einzelnen Röhrchen untereinander.

Der Vergleich zeigt, dass die relativen Standardabweichungen für die resultierende Signalintensität I MalERETIC (Intensität des Maleinsäuresignals relativ zu der des ERETIC-

Signals) geringer wird, je höher die vom Hersteller angegebene Güte des NMR-Röhrchentyps ist (Abbildung 3-7). Am besten sind die Ergebnisse für die Typen Schott Scientific und Wilmad scl 505 ps. Aufgrund ihrer guten Ergebnisse wurden für alle weiteren Messungen NMR-Röhrchen vom Typ Schott Scientific verwendet.

3.3.5 Abhängigkeit von der Temperatur

Die Langzeitmessungen wurden stets mit einer Lösung von 50 mg Maleinsäure in 2 ml deuteriertem Dimethylsulfoxid (DMSO-d₆) (Mal50) durchgeführt. Zur besseren Veranschaulichung der beobachtbaren Entwicklung wurden alle Intensitäten normiert ($I_{max}=1$) und die Diagramme identisch skaliert. Die einzelnen Datenpunkte wurden miteinander verbunden, die Verbindungen entsprechen jedoch keinen realen Messwerten oder mathematischen Interpolationen, sondern dienen ausschließlich dazu, die Entwicklung besser erkennen zu können.

3.3.5.1 Originalkonfiguration (ERETIC-Signal über die ¹³C-Spule)

Bei den ersten Experimenten zur Bestimmung der Stabilität der mittels ERETIC ermittelten Signalintensitäten in der Originalkonfiguration konnte ein Anstieg des ERETIC-Signals über Nacht mit anschließender Rückentwicklung beobachtet werden (Abbildung 3-11). Hingegen blieb das Signal der Maleinsäure vergleichsweise stabil. Somit ergibt sich für das Intensitätsverhältnis Maleinsäure/ERETIC eine relative Standardabweichung von 1,4 %.

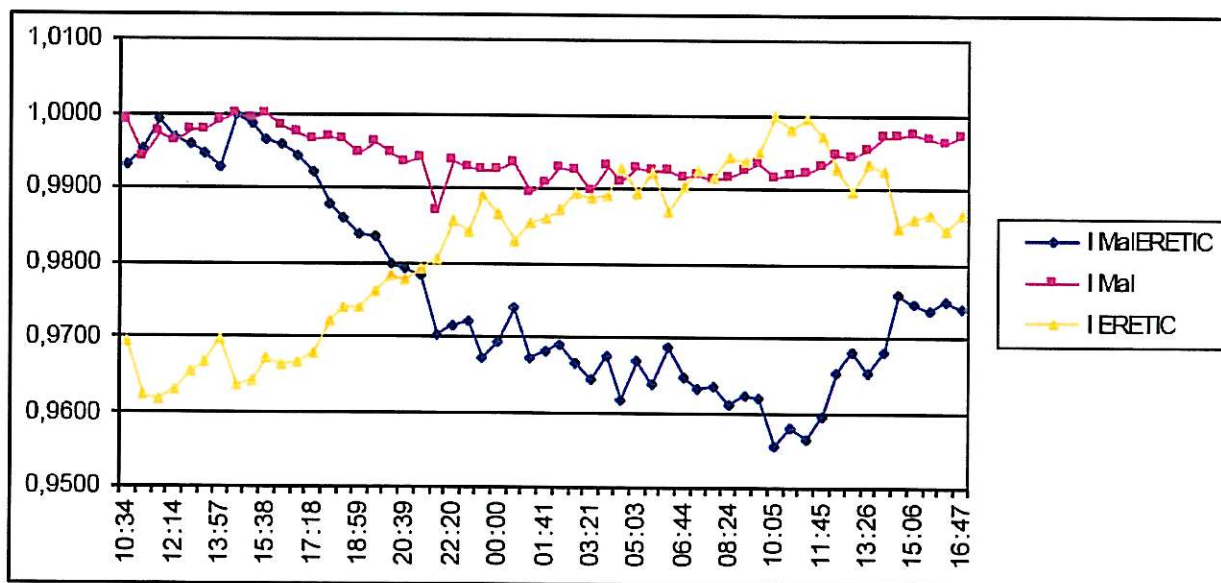


Abbildung 3-8: Mehrfachmessung von Mal50 über Nacht.

Aufgrund der niedrigen Nachttemperatur wurde vermutet, dass es sich bei der beobachteten systematischen Entwicklung der Signalintensitäten um einen Temperatureffekt handelt. Um

dies zu überprüfen, wurde das Spektrometer mit einem Thermoelement ausgestattet. Hierdurch wird eine konstante Temperatur im Probenkopf erzielt. Bei der wiederholten Messung traten zwei Effekte deutlich hervor (Abbildung 3-9). Dabei wurden die Messzeiten der einzelnen Experimente von 120 s auf 60 s verkürzt.

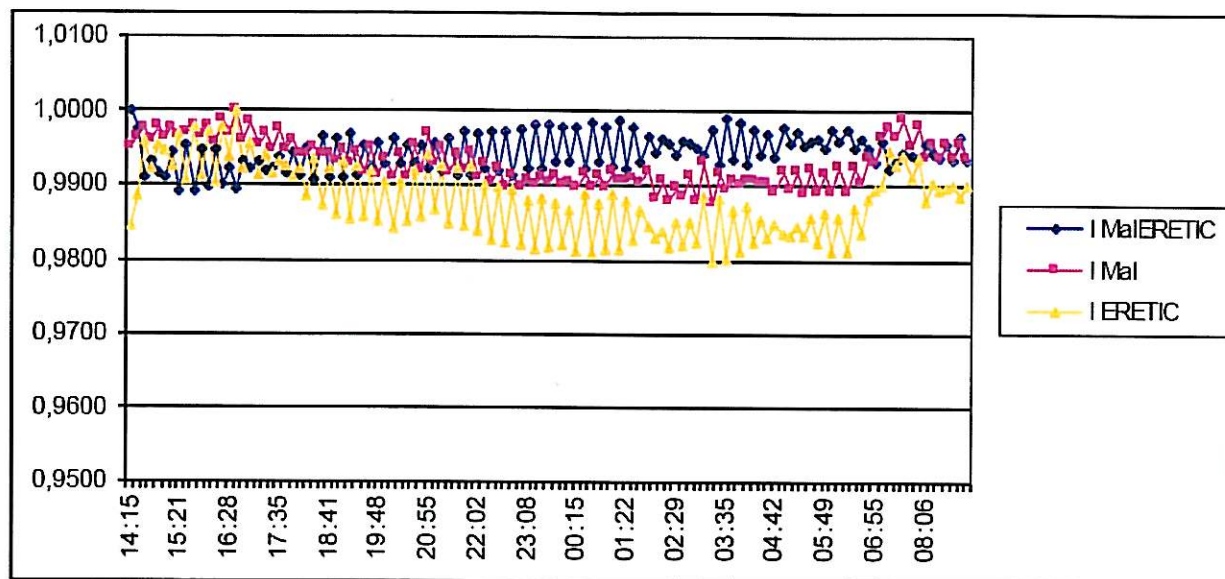


Abbildung 3-9: Mehrfachmessung von Mal50 bei Temperierung auf 303 K.

Der Trend, welcher in der vorangegangenen Messung auftrat, findet nur noch sehr viel schwächer statt. Das hat zur Folge, dass sich die relativen Standardabweichungen der Intensität des Maleinsäuresignals relativ zum ERETIC-Signal bzw. des ERETIC-Signals selbst auf 0,3 % bzw. 0,5 % verbesserten. Außerdem zeigt sich aufgrund von verkürzten Messzeiten eine neu auftretende alternierende Schwankung der Intensitäten aller gemessenen Signale.

Dazu können zwei Erklärungsmodelle diskutiert werden. Erstens kann sich durch thermisches Verformen der Spulen im Probenkopf oder anderer Teile der Messeinrichtung deren Induktivität ändern. Zweitens steigt bei niedriger Temperatur die Dichte des Lösemittels. So werden im Messbereich mehr Spins angeregt, was wiederum intensivere Signale zur Folge hat. Die Tatsache, dass der beobachtete Einfluss beim untemperierten Experiment auf das ERETIC-Referenzsignal stärker ausgeprägt ist als auf das Analytsignal, ist nur durch temperaturbedingte Veränderung der Messeinrichtung zu erklären. Denn eine Veränderung der Dichte der Probe kann sich nur auf die Intensität des Maleinsäuresignals auswirken, nicht aber auf das ERETIC-Signal. Letzteres ist nämlich von der Probe unabhängig. Um zu überprüfen, ob die Veränderungen tatsächlich von der Temperatur und nicht von Parametern wie z. B. dem Luftstrom abhängen, wurde erneut eine Langzeitstudie durchgeführt. Dieses Mal war das Thermoelement zwar installiert, aber nicht eingeschaltet. Dadurch ist das für die

Anbringung des Thermoelements vorgesehene Loch geschlossen und es kann keine Luft durch das Spektrometer strömen (im Gegensatz zur ersten Messreihe.)

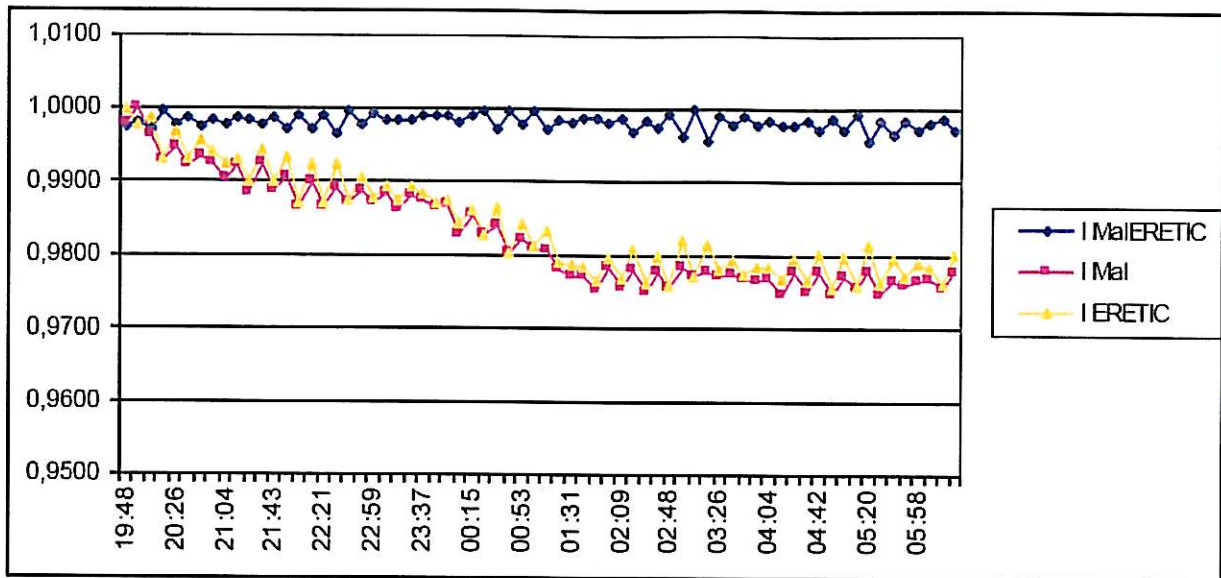


Abbildung 3-10: Entwicklung der beobachteten NMR-Signale im geschlossenen Spektrometer über Nacht.

Auch bei dieser Messreihe konnte wieder eine Entwicklung der Signalintensitäten beobachtet werden (Abbildung 3-10). Erstaunlich ist, dass der Trend für das ERETIC-Signal jedoch in entgegen gesetzter Richtung zu dem ersten Experiment (Abbildung 3-8) ist. Dieses deutete sich jedoch bereits schon bei der temperierten Messung an (Abbildung 3-9). Zudem wird bei den beiden letzten Versuchsreihen eine zeitliche Veränderung der Intensität des Maleinsäuresignals (I Mal) beobachtet. Im ursprünglichen Experiment mit unkontrollierten Luftströmungen und Temperaturschwankungen war dies jedoch nicht der Fall. Daraus kann geschlossen werden, dass die Luftströmung und damit verbundene Temperaturunterschiede bzw. unterschiedlich schnell erfolgende Temperatúrausgleiche innerhalb des Probenkopfes ebenfalls eine Rolle spielen. Offensichtlich sind die Komponenten des Messsystems unterschiedlich stark den Luftströmungen ausgesetzt. Mit den Luftströmungen kommt damit auch der Raumtemperatur eine wichtige Rolle zu. Ferner fällt auf, dass die Periodizität des Schwankens in den letzten beiden Versuchsreihen identisch ist (Abbildung 3-11).

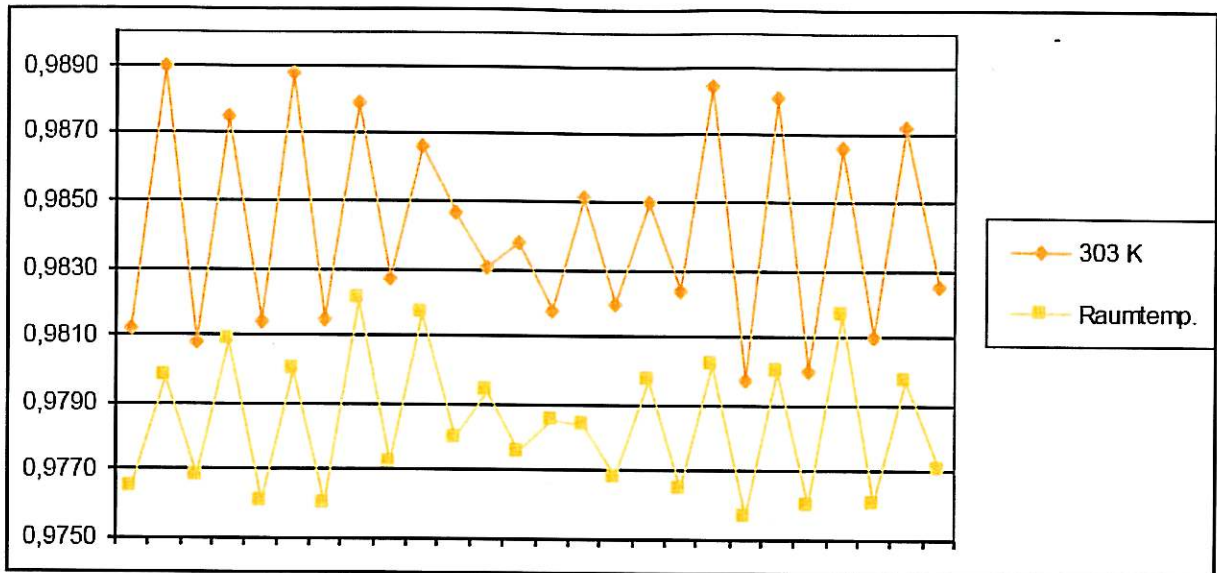


Abbildung 3-11: Alternieren der ERETIC-Signale unter unterschiedlichen Bedingungen bei Wiederholungsmessungen. (Ausschnitte aus den bereits gezeigten Abbildungen zum besseren Vergleich).

Diese Schwankungen können jedoch nicht durch das eingebaute Thermoelement ausgelöst worden sein, da in einem der beiden Fälle nicht geheizt wurde. Trotzdem ist ein genaueres Beleuchten dieser Einflussgröße erforderlich, um sie besser einschätzen zu können. Zu diesem Zweck wurde die Temperatur im Probenkopf gezielt variiert, ohne das Tuning und Matching oder den Shimzustand wieder anzupassen. Dadurch konnte eine ungewollte Veränderung der Temperatur im Probenkopf am besten simuliert werden. Hierbei wurden die Signalintensitäten bei den unterschiedlichen Temperaturen direkt miteinander verglichen (Abbildung 3-12). Um statistische Betrachtungen zu ermöglichen, wurden je sechs Wiederholungsmessungen durchgeführt.

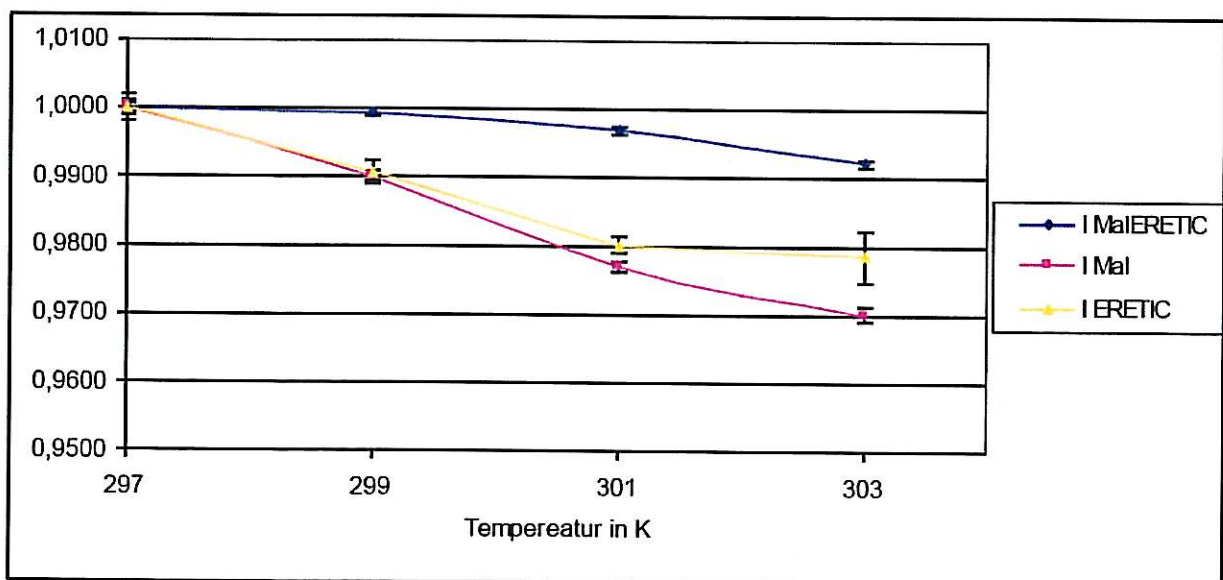


Abbildung 3-12: Veränderung der Intensitäten und die dazugehörigen Standardabweichungen in der Probe Mal50 bei unterschiedlichen Temperaturen.

Der gesamte Verlauf entspricht dem beobachteten Fall eines geschlossenen, nicht temperierten Spektrometers, sofern in diesem die Temperatur ansteigt. Das beobachtete Ausmaß des Temperaturanstiegs im Probenkopf würde allerdings nicht ausreichen, um die Stärke der beobachteten Entwicklung zu erklären. Hierfür hätte ein Temperaturanstieg von ca. 4 °C erfolgen müssen. Der beobachtete Effekt, dass die Intensität des ERETIC-Signals bei niedriger Temperatur größer ausfällt, entspricht tendenziell den Erwartungen für eine kalte Nacht, wie sie im ersten Fall vorherrschte. Die alternierende Schwankung der Signalintensität kann damit allerdings noch nicht erklärt werden. Zudem wurde in der ersten Langzeitstudie keine Abhängigkeit des Maleinsäuresignals beobachtet. Eine kontinuierliche Überwachung der Temperatur im Probenkopf bei einem normalen Messbetrieb ohne Temperierung der Probe zeigte nur minimale, nicht zyklische Veränderungen der Temperatur im Bereich von 0,4 °C. Das kann die schnelle und starke Intensitätsschwankung nicht erklären. Die nahe liegende Folgerung ist, dass nicht die Temperatur im Probenkopf, sondern die Raumtemperatur die entscheidende Rolle spielt. Tatsächlich konnte bei einer einstündigen Temperaturmessung im normalen Messbetrieb des Spektrometers eine Schwankung der Raumtemperatur am Spektrometer im 12 min-Rhythmus um 3 °C beobachtet werden (Messung alle 2 min).

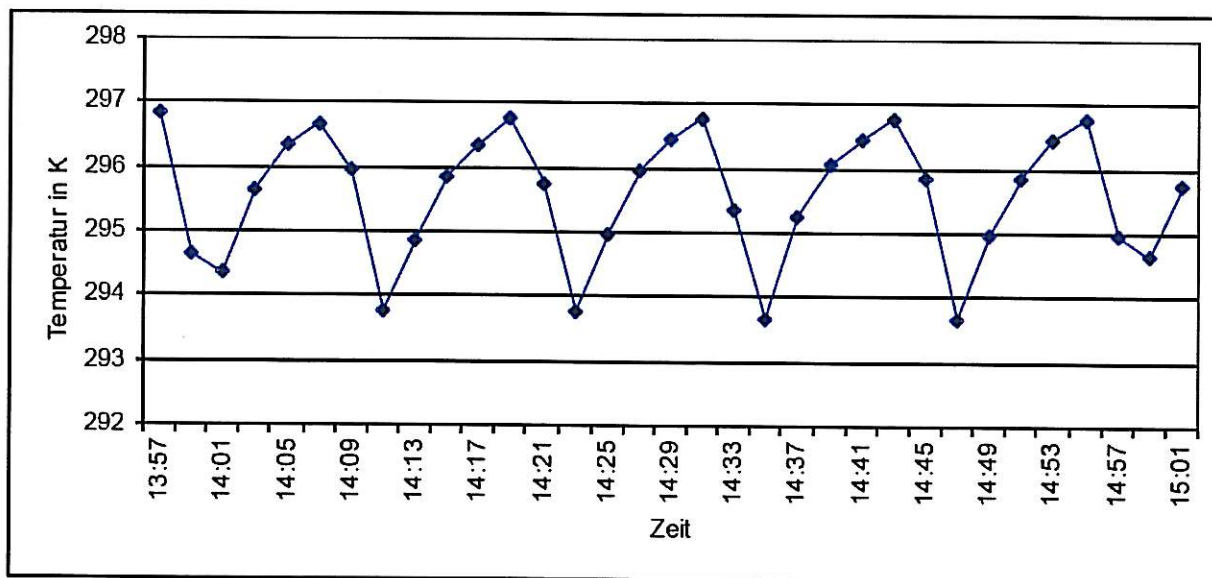


Abbildung 3-13: Schwankung der Raumtemperatur in der Nähe des Spektrometers.

Das kann direkt auf den Arbeitszyklus der Klimaanlage zurückgeführt werden und erklärt das beobachtete Alternieren aller Signalintensitäten. Außerdem reicht die Stärke dieser Schwankungen aus, um auch die Stärke der beobachteten Intensitätsdrift in den vorangegangenen Messungen zu ermöglichen.

3.3.5.2 Konfiguration 1HV1 (ERETIC-Signal direkt in den Empfänger)

Auch die Variante, in welcher das ERETIC-Signal direkt in den Empfänger eingespeist wird, unterliegt den oben beschriebenen Schwankungen und langfristigen Abweichungen.

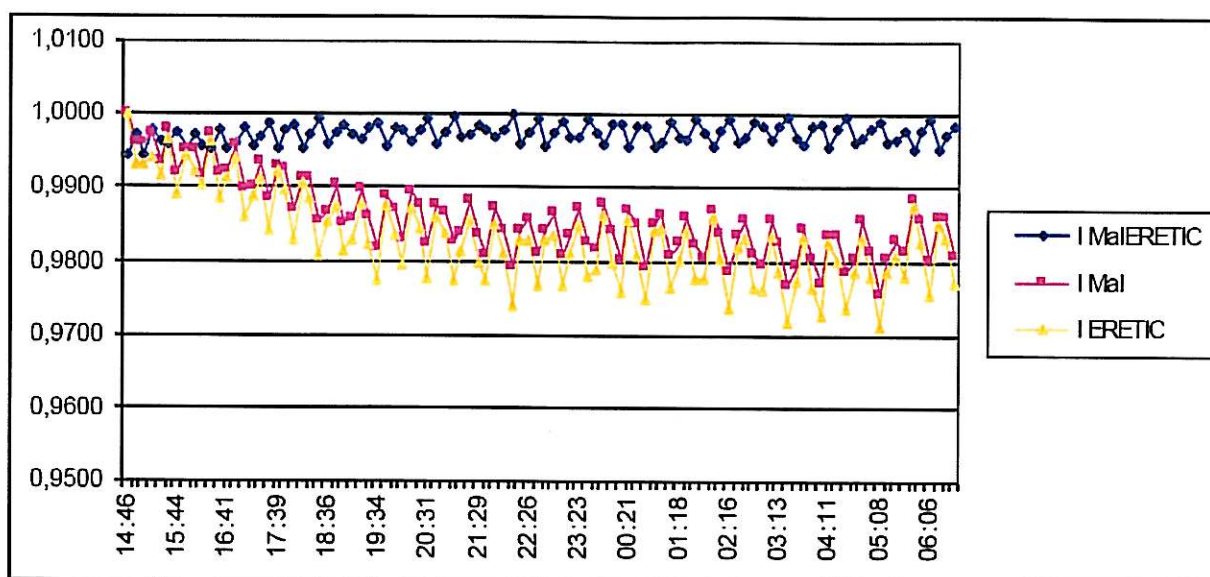


Abbildung 3-14: Verlauf der Messwerte der Konfiguration 1HV1 bei Wiederholungsmessungen über Nacht bei Temperierung des Probenkopfes auf 303 K.

Hier weist das auf die Intensität des ERETIC-Signals normierte Maleinsäuresignal eine relative Standardabweichung von 0,14 % auf, berechnet über alle Messwerte. Für das ERETIC-Signal selbst ergibt sich eine relative Standardabweichung von 0,6 %. Im Vergleich zur Studie bei der Originalkonfiguration unter identischen Bedingungen (Abbildung 3-9) ist die Standardabweichung für das normiert Maleinsäure kleiner geworden, obwohl die des ERETIC-Signals schlechter geworden ist. Dies kann nur durch die veränderte Konfiguration, Einspeisung des ERETIC-Signals direkt in den Empfänger, erklärt werden. Anscheinend wirken sich die Temperatureffekte auf die Intensitäten der ERETIC-Signale in ähnlicher Weise aus wie auf die der Maleinsäuresignale. Dadurch heben sich die Schwankungen gegenseitig auf und die Streuung der Messwerte wird für das Verhältnis der beiden Signale insgesamt klein.

3.3.5.3 Konfiguration 1HV2 (ERETIC-Signal über die ¹H-Spule)

Diese Konfiguration unterlag bei allen durchgeführten Versuchen starken Schwankungen. Deshalb wurde auf eine Auswertung der Untersuchungen zur Langzeitstabilität verzichtet. Auf diese Instabilität wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

Vergleicht man nun die Ergebnisse miteinander, lassen sich folgende Erkenntnisse zum Temperatureinfluss auf die Signalintensität feststellen:

- Die Standardabweichung des ERETIC-Signals nimmt bei Temperierung zu. Hingegen nimmt die der normierten Signalintensitäten $I_{\text{MalERETIC}}$ nimmt ab.
- Das Alternieren der Intensitäten ist bei Temperierung des Probenkopfs auf 303 K stärker ausgeprägt als im untemperierten Fall (ca. 298 K).
- Die Periodizität des Schwankens der Signalintensitäten in den Spektren stimmt gut mit der Periodizität der Schwankung der Raumtemperatur überein.

Die hier beschriebenen Effekte treten sowohl bei der Originalkonfiguration als auch bei der Konfiguration 1HV1 auf. Das Ausmaß ist ähnlich. Man kann davon ausgehen, dass es sich um ein komplexeres Problem handelt, das nicht nur den Probenkopf, sondern das gesamte Messsystem betrifft. Nur das kann erklären, warum die Temperaturabhängigkeit auch bei den ERETIC-Signalen der Konfiguration 1HV1 auftritt, die den Probenkopf gar nicht passieren. Allerdings betrifft das Problem im Falle der Konfiguration 1HV1 alle übertragenen Intensitäten gleichermaßen, mit der Folge, dass sie relativ zueinander gesehen stabil sind.

3.3.6 Abhängigkeit vom Tuning und Matching

Für quantitative Messungen ist es unbedingt erforderlich, dass der Messimpuls immer gleich stark eingestrahlt und aufgenommen wird. Nur so kann gewährleistet werden, dass die erhaltenen Spektren vergleichbar sind. Zu diesem Zweck muss die Spule im Probenkopf ideal auf die Probe eingestellt werden. Dieses erfolgt über zwei regelbare Kondensatoren (Abbildung 3-15) und wird als so genanntes „Tuning“ und „Matching“ bezeichnet.

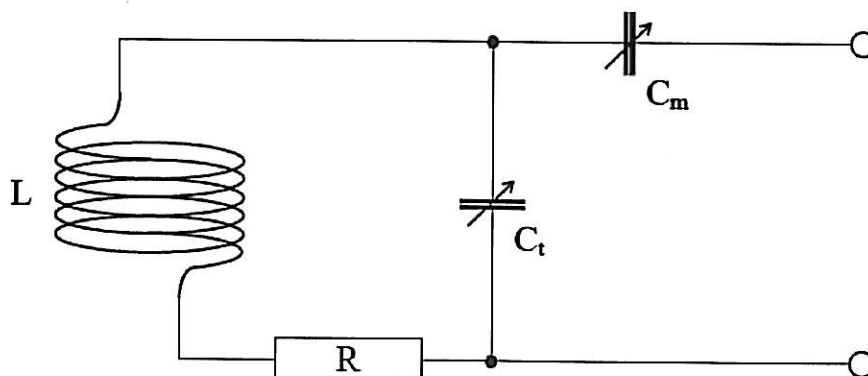


Abbildung 3-15: Prinzipieller Aufbau einer Spule im Probenkopf eines NMR-Spektrometers. Der Anschluss erfolgt über ein Koaxialkabel. Über den regelbaren Kondensator C_m erfolgt das Matching, über den regelbaren Kondensator C_t das Tuning.

Beim Matching wird die Impedanz der Spule an die Impedanz des Koaxialkabels angepasst, da es sonst zu Reflexionen am Anschluss und damit zu Leistungsminderungen und Resonanzerscheinungen kommen kann. Beim Tuning wird der Schwingkreis der Spule an die genaue Resonanzfrequenz der jeweiligen Probe angepasst. Dieser Abgleich muss für jede Probe und jedes Lösemittel neu vorgenommen werden. Die aktuellen Einstellungen können auf zwei Arten nachverfolgt werden [18]. Das Spektrometer verfügt über ein integriertes System, um den aktuellen Zustand wiederzugeben. Hierbei wird an einer rf-Brücke (ein Bauteil der Hochfrequenztechnik zur Messung von Impedanzen, analog einer Wheatstoneschen Brücke zur Messung von Widerständen) ein Testsender, der kontinuierlich einen bestimmten Frequenzbereich durchläuft, der entsprechende Empfänger und der abzustimmende Probenkopf angebracht. Als Referenz findet eine bekannte Impedanz (meist 50Ω) Verwendung. Wenn die Impedanz der Spule im Probenkopf mit der vorgegebenen Impedanz übereinstimmt, ist das gemessene Signal minimal. Diese Methode ist jedoch nicht genau genug, da hier eine optimale Impedanz von 50Ω vorausgesetzt wird, welche im Realfall aber variieren kann. In der Durchführung ist diese Methode jedoch einfacher als die zweite Variante, da der Effekt von Tuning und Matching separat ersichtlich ist. Exakter werden die Ergebnisse, wenn ein dem eigentlichen Messimpuls entsprechendes Signal verwendet wird und die tatsächlich reflektierte Impulsleistung als von der Spule zurückgeworfene Spannung mittels Oszilloskop verfolgt wird. Hierbei ist mehr Übung erforderlich, um das Signal zu minimieren, da im Detektor keine offensichtliche Unterscheidung des Effektes von Tuning und Matching zu erkennen ist. Auf einem dieser Wege muss jedoch die Spule an jede Probe neu angepasst werden. Für die quantitative NMR-Spektroskopie ist hierbei unbedingt erforderlich, dass die durch nicht optimales Tuning und Matching (100 % Aufnahme des Impulses wird nie erreicht) verlorene Impulsleistung für jede Messung identisch ist, da die Signalintensität im Spektrum direkt davon abhängt. Es ist in diesem Fall sogar wichtiger, in einer Messreihe gute, identische Einstellungen zu treffen, als für jede einzelne Probe die optimalen Einstellungen zu finden.

In welchem Ausmaß die Spektren der drei Konfigurationen vom Tuning abhängen, wurde in einer Reihe von Messungen anhand der beiden genannten Tuning-Methoden mit unterschiedlichen Proben untersucht. Zum Vergleich wurden alle Signalintensitäten einer Konfiguration auf die maximale Intensität 1 normiert.

Beim Tuning, unter Verwendung der integrierten Methode, beobachtet man bei der Originalkonfiguration und bei der Konfiguration 1HV2 eine starke Variation der Intensitäten

des Maleinsäuresignals in Abhängigkeit vom ERETIC-Signal, im Gegensatz zur Konfiguration 1HV1 (Abbildung 3-16):

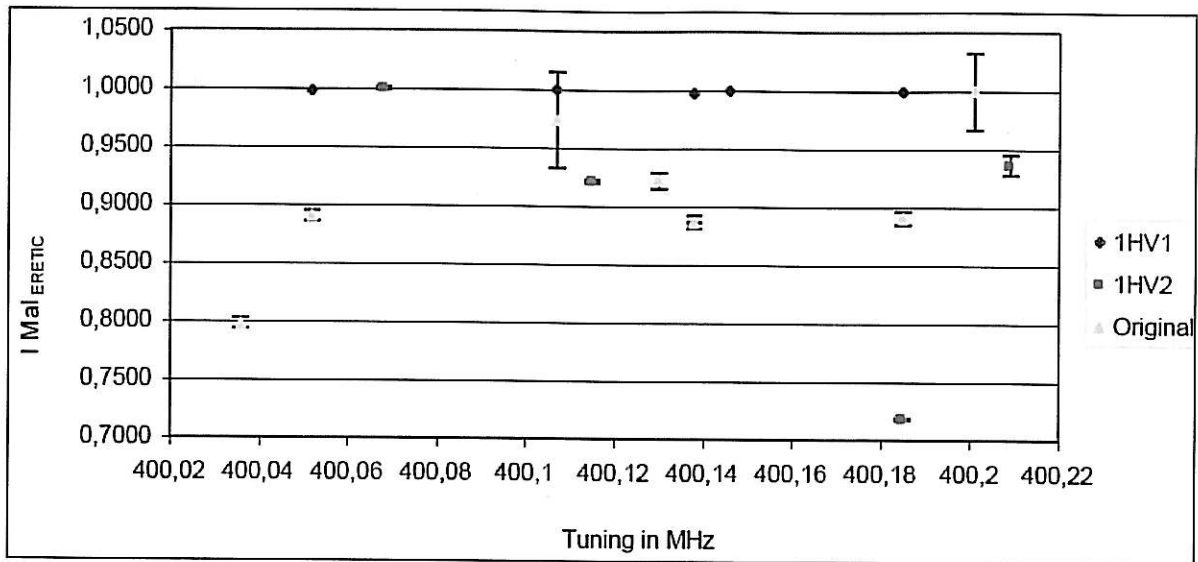


Abbildung 3-16: Abhängigkeit der Signalintensität vom Tuning über das im Spektrometer integrierte System bei allen drei untersuchten ERETIC-Konfigurationen.

Hingegen bleiben die Signalintensitäten für die Maleinsäure bei allen Konfigurationen relativ stabil (Abbildung 3-17). Die dabei im geringen Maße auftretenden Schwankungen haben jedoch für alle Konfigurationen auch das gleiche Ausmaß. Daher wurde für die weiteren Stabilitätsuntersuchungen nur das ERETIC-Signal herangezogen (Abbildung 3-18). Das hat zudem den Vorteil, dass auf diesem Weg auch mehrere Proben unterschiedlicher Konzentrationen und mit unterschiedlichen Analyten miteinander verglichen werden können. Voraussetzung dafür ist aber ein probenunabhängiges ERETIC-Signal.

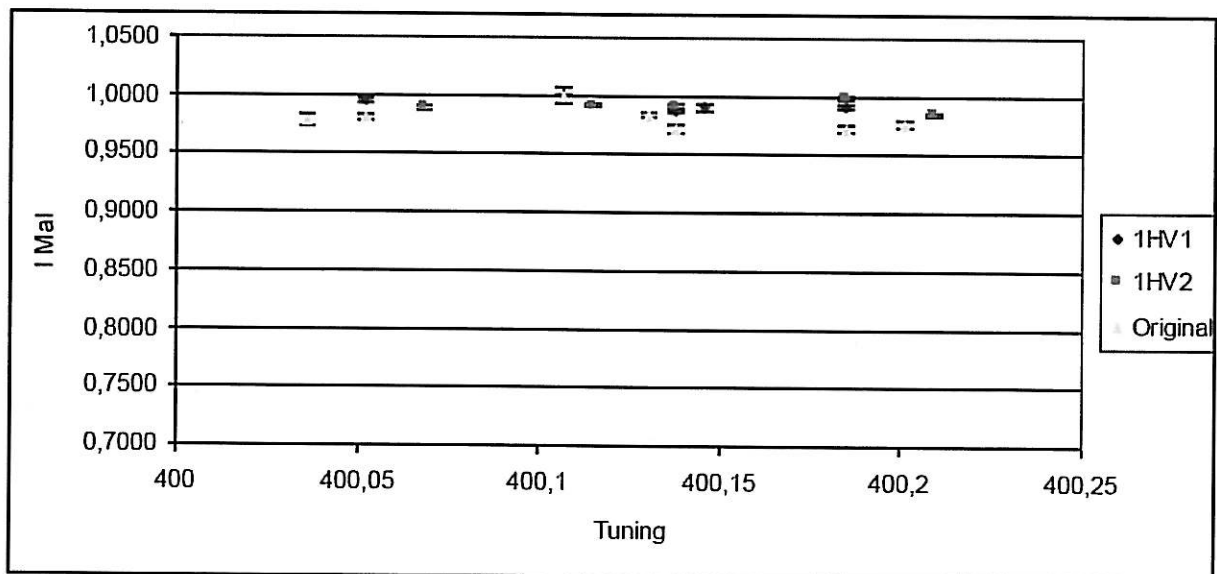


Abbildung 3-17: Abhängigkeit der Intensität des Maleinsäuresignals vom Tuning bei allen drei Konfigurationen.

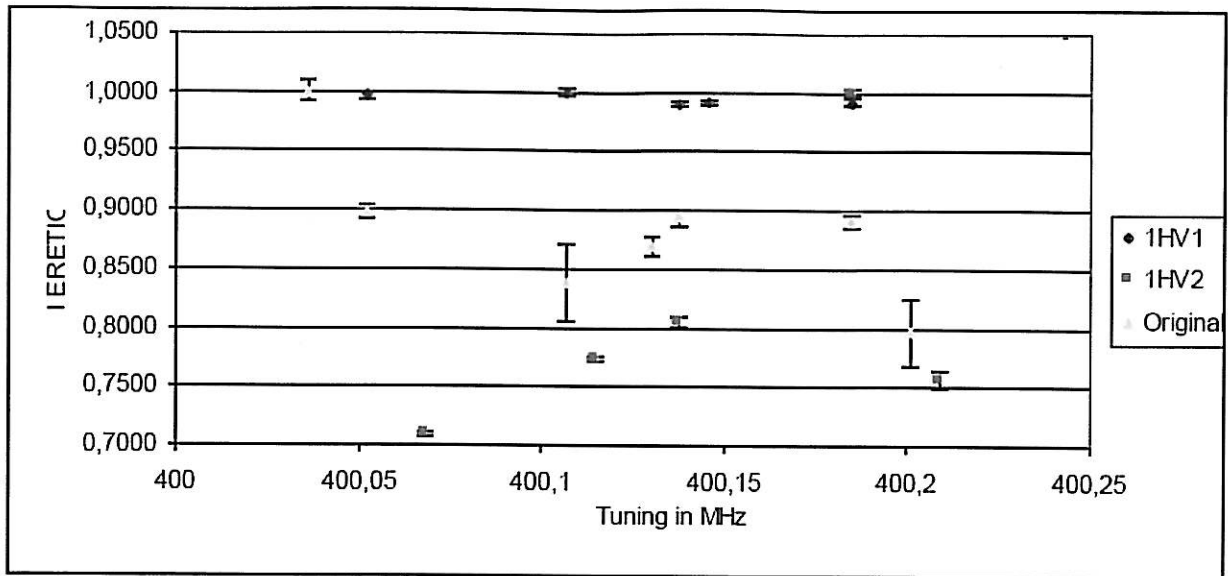


Abbildung 3-18: Abhängigkeit der Intensität des ERETIC-Signals vom Tuning bei allen drei Konfigurationen.

Führt man das Tuning und Matching mit Hilfe eines Oszilloskops durch, beobachtet man eine deutliche Verbesserung der Signalstabilität für die Originalkonfiguration und eine leichte Verbesserung bei der Konfiguration 1HV1. Das gilt selbst dann, wenn die Probe nach jeder Messung gewechselt und die Einstellungen für das Tuning neu vorgenommen werden, wie es bei der Gehaltsbestimmung der Fall ist (Abbildung 3-19).

Die Werte für die Intensität des ERETIC-Signals bei der Konfiguration 1HV2 schwanken über einen Bereich von unter 1 bis über 3 und werden deshalb separat in Abbildung 3-20 dargestellt.

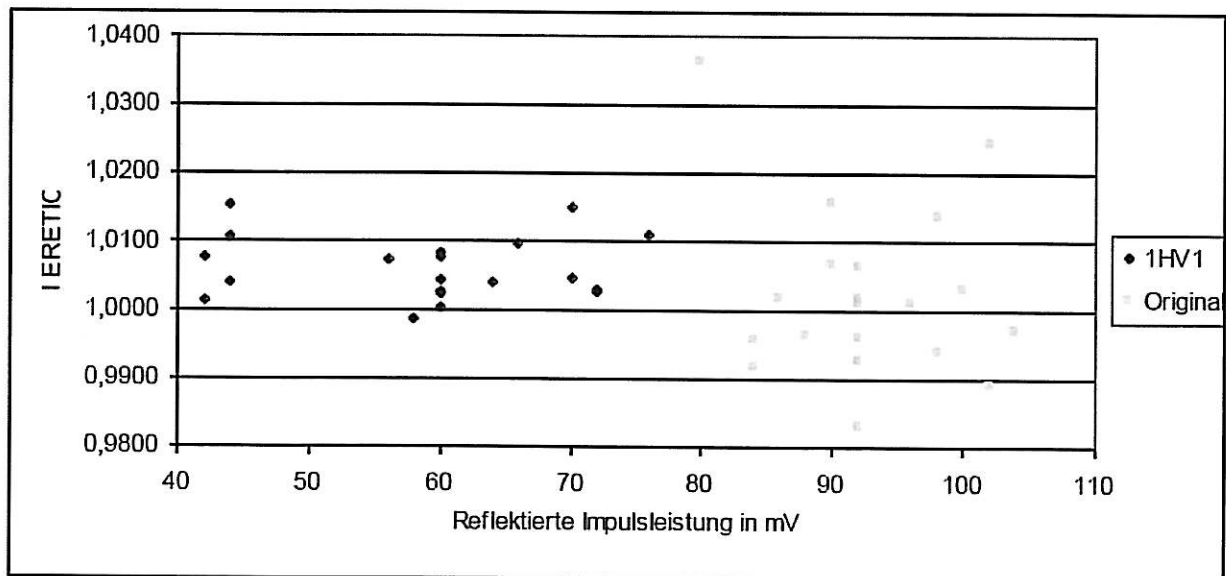


Abbildung 3-19: Abhängigkeit der Intensität des ERETIC-Signals der Originalkonfiguration und der Konfiguration 1HV1 vom Tuning und Matching über die reflektierte Impulsleistung bei ständigem Probenwechsel.

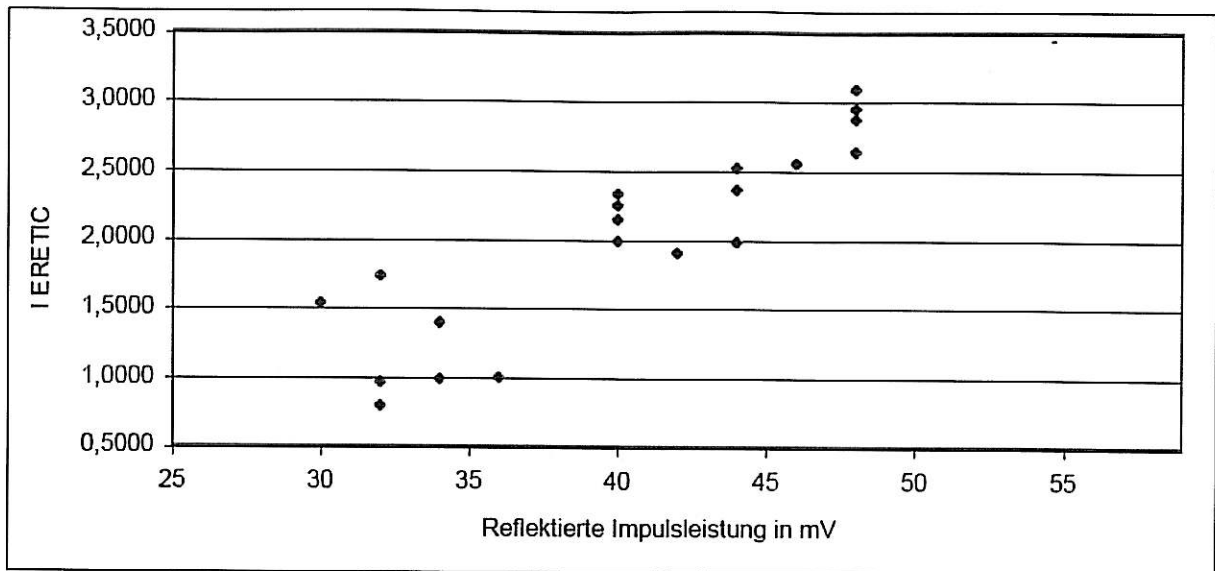


Abbildung 3-20: Abhängigkeit der Intensität des ERETIC-Signals der Konfiguration 1HV2 vom Tuning und Matching über die reflektierte Impulsleistung bei ständigem Probenwechsel.

Damit konnte gezeigt werden, dass mit der Konfiguration 1HV1 eine Variante entwickelt wurde, bei der die Messwerte in einem deutlich geringeren Maß vom Tuning und Matching abhängen, als bei den anderen betrachteten Konfigurationen. Das lässt sich darauf zurückführen, dass in diesem Fall das ERETIC-Signal nicht die Spule passiert und sämtliche Einstellungen an dieser Stelle keinen direkten Einfluss auf das Signal ausüben können. Die Einstellungen der Protonenspule betreffen nur die Analytsignale, und das im selben Ausmaß für alle drei Konfigurationen.

Die beobachteten Effekte auf das Analytsignal stimmen somit auch bei allen Konfigurationen überein. Die Konfiguration 1HV1 zeigt die besten Ergebnisse. Bei beiden Abstimmungsmethoden wurden konstante Ergebnisse mit niedrigen Standardabweichungen erhalten, d. h. die Konfiguration weist eine große Toleranz im Hinblick auf Tuningfehler auf. Hingegen verwendet die Originalkonfiguration die Protonenspule für das Empfangen des ERETIC-Signals und weist dementsprechend auch eine diesbezügliche Abhängigkeit auf. Im Falle der Konfiguration 1HV2 übt die Protonenspule sowohl beim Senden als auch beim Empfangen einen Einfluss auf das ERETIC-Signal aus. Entsprechend stark schwanken die so erzeugten Signalintensitäten. Jedoch wird die daraus resultierende Standardabweichung geringer, je schlechter das Tuning und Matching, also je größer die reflektierte Leistung ist (Abbildung 3-21).

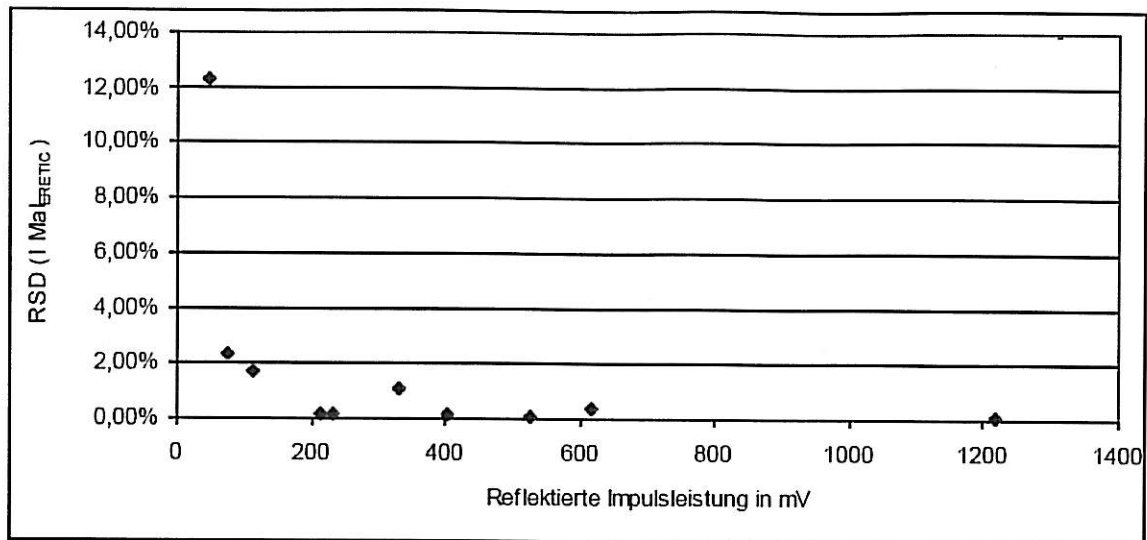


Abbildung 3-21: Abhängigkeit der relativen Standardabweichung der Intensität des Maleinsäuresignals normiert auf das ERETIC-Signal von der reflektierten Impulsleistung im Falle der Konfiguration 1HV2.

Der in Abbildung 3-21 gezeigte Verlauf ist nachvollziehbar, da der Verlauf mit der so genannten „Wobble-Kurve“ (geräteinterne Abstimmung, Abbildung 3-22) übereinstimmt. In der Nähe des Minimums ist der Betrag der Steigung der reflektierten Leistung am größten. Somit haben bereits geringe Tuningfehler in diesem Bereich einen starken Einfluss auf die gemessene Signalintensität. Hingegen wirken sich bei genügend Abstand zum Minimum Abstimmungsfehler nur im geringen Maße auf die gemessenen Signalintensitäten aus.

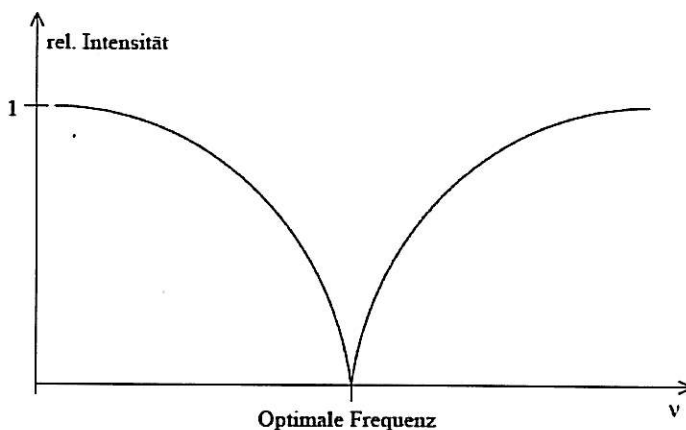


Abbildung 3-22: Schematischer Verlauf der Wobble-Kurve, wie sie beim Abstimmen über die integrierte Methode verwendet wird.

Der Verlauf dieser Kurve hat natürlich auch für das Abstimmen über die reflektierte Impulsleistung seine Gültigkeit.

3.3.7 Anwendbarkeit zur Gehaltsbestimmung

Ziel dieses Projektes war es zu zeigen, dass die ERETIC-Methode dafür geeignet ist, zur Gehaltsbestimmung im Standardbetrieb eingesetzt zu werden. Dazu muss sie auch bei ständigem Probenwechsel und immer neu erfolgendem Abstimmen des Spektrometers

vergleichbare Ergebnisse liefern. Nach diesem Gesichtspunkt wurden alle drei ERETIC-Konfigurationen auf die Lösungen Mal10, Mal20, Mal50 und Mal100 angewendet, die immer nach jeder Messung ausgewechselt wurden. Bei jedem Probenwechsel mussten das Tuning und Matching sowie der Shimzustand nachgestellt werden. Die beiden besten Konfigurationen (Originalkonfiguration und 1HV1) wurden außerdem verwendet, um die Gehalte unterschiedlicher Substanzen (Trioxan bzw. Sulfon) bei gleich bleibendem Lösungsmittel zu bestimmen. In allen Fällen wurde die Probe Mal50 zur Kalibrierung verwendet.

Die Versuche zur Gehaltsbestimmung wurden zweimal durchgeführt. Beim ersten Durchgang erfolgte die Abstimmung des Spektrometers unter optimalen Bedingungen mittels Oszilloskop (Tabelle 3-3). Beim zweiten wurde die integrierte Methode verwendet (Tabelle 3-4), um die Anwendbarkeit als Standardmethode im Laboralltag zu testen.

Tabelle 3-3: Ergebnisse der Gehaltsmessungen mit allen drei Konfigurationen unter Abstimmung mit Hilfe eines Oszilloskops. Die Probe Mal50 diente zur Kalibrierung.

	Original		1HV1		1HV2	
	Abw%	RSD	Abw%	RSD	Abw%	RSD
Mal100	-1,1 %	1,5 %	-1,1 %	0,14 %	-44,4 %	21,8 %
Mal50	-	0,6 %	-	0,25 %	-	19,8 %
Mal20	0,8 %	0,8 %	0,22 %	0,15 %	22,6 %	12,4 %
Mal10	0,8 %	1,3 %	1,0 %	0,26 %	49,8 %	10,9 %
Sulfon	5,3 %	0,4 %	0,9 %	0,15 %		
Trioxan	8,4 %	0,3 %	-0,06 %	0,13 %		

Diese Versuche zur Gehaltsbestimmung haben deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden aufgezeigt. Sowohl die Originalkonfiguration als auch die Konfiguration 1HV1 liefern bei optimaler Abstimmung über die reflektierte Impulsleistung gute Ergebnisse, wenn die Kalibrierung des ERETIC-Signals mit derselben Substanz erfolgte (Tabelle 3-3). Dabei sind die mit der Originalkonfiguration erzielten relativen Standardabweichung (0,6 % - 1,5 %) generell größer als die, die mit der Konfiguration 1HV1 erreicht wurden (0,14 % - 0,26 %). In einem zweiten Schritt wurde der realistische Fall nachgestellt, dass die zur Kalibrierung verwendete Referenzsubstanz nicht identisch ist mit dem Analyten. Hier zeigten sich für beide Konfigurationen deutliche Unterschiede. Während die Methode 1HV1 auch hier gute Ergebnisse mit geringen Standardabweichungen liefert, weichen die mittels

Originalkonfiguration bestimmten Gehalte zu stark vom gravimetrischen Referenzwert ab (bis zu 9 %).

Die Konfiguration 1HV2 hat sich bei Abstimmung über die reflektierte Impulsleistung als gänzlich ungeeignet erwiesen. Die damit ermittelten Gehalte weichen bis zu 50 % von den gravimetrisch bestimmten Gehalten ab, und auch die relativen Standardabweichungen der einzelnen Messwerte liegen zwischen 11 % und 22 %. Deshalb wurde sie nicht auf die Proben Trioxan und Sulfon angewendet.

Wird unter Verwendung des integrierten Systems, welches bei Routinemessungen verwendet wird, abgestimmt, zeigen sich für die Originalkonfiguration und die Konfiguration 1HV1 schlechtere Ergebnisse als vorher (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Ergebnisse der Gehaltsmessungen mit allen drei Konfigurationen unter Abstimmung mit Hilfe der integrierten Methode. Die Probe Mal50 diente zur Kalibrierung.

	Original		1HV1		1HV2	
	Abw%	RSD	Abw%	RSD	Abw%	RSD
Mal100	-0,4 %	7,3 %	-0,9 %	0,3 %	-17,4 %	24,7 %
Mal50	-	5,5 %	-	0,4 %	-	3,1 %
Mal20	0,6 %	5,0 %	0,4 %	0,28 %	-5,5 %	2,9 %
Mal10	-3,4 %	4,6 %	1,0 %	0,25 %	-4,2 %	3,3 %
Sulfon	-1,9 %	5,5 %	-0,3 %	0,11 %	-9,0 %	8,6 %
Trioxan	-4,7 %	2,4 %	0,3 %	0,4 %	-1,7 %	5,4 %

Ebenso verwundert es nicht, dass dieser Effekt bei der Originalkonfiguration stärker ausgeprägt ist, da bei dieser das ERETIC-Signal von den Einstellungen der Spule abhängt. Im Gegensatz dazu liefert die Variante 1HV2 hier bessere Ergebnisse als bei Abstimmung mit Hilfe eines Oszilskops. Dieser Effekt ist dadurch zu erklären, dass die Abstimmung des Probenkopfes mittels der integrierten Methode ungenauer ist. Dieses führt zu größeren Werten der reflektierten Impulsleistungen und somit zu geringeren Standardabweichungen. Hierdurch können die Gehalte zwar genauer bestimmt werden, die Messunsicherheit dieser Methode (im Sinne von Richtigkeit und Präzision) ist jedoch signifikant höher als bei den anderen Konfigurationen. Trägt man den bestimmten Gehalt aller vier Maleinsäureproben gegen den vorgegebenen Gehalt auf, kann eine Aussage über die Linearität der Konfigurationen bei der Verwendung der unterschiedlichen Abstimmungsmethoden gemacht werden (Abbildungen 3-23 und 3-24).

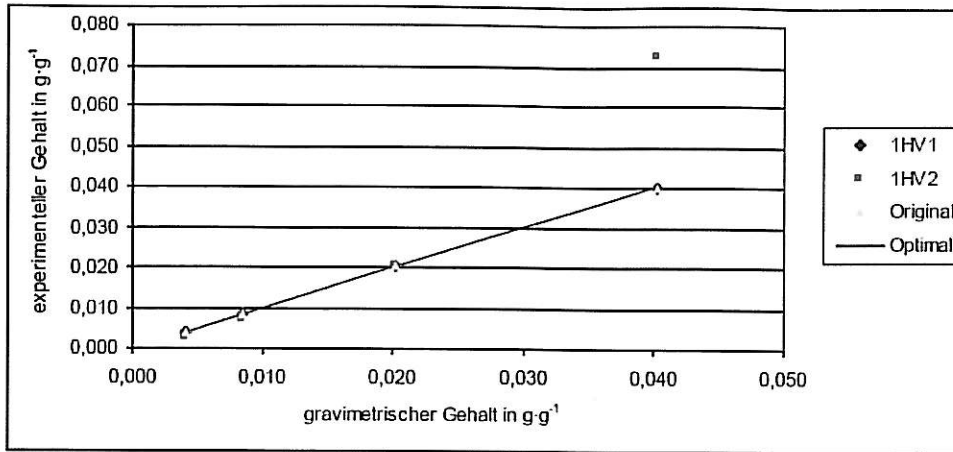


Abbildung 3-23: Linearität der Gehaltmessung von vier Maleinsäureproben mit allen drei Konfigurationen beim optimalen Abstimmen über die reflektierte Impulsleistung.

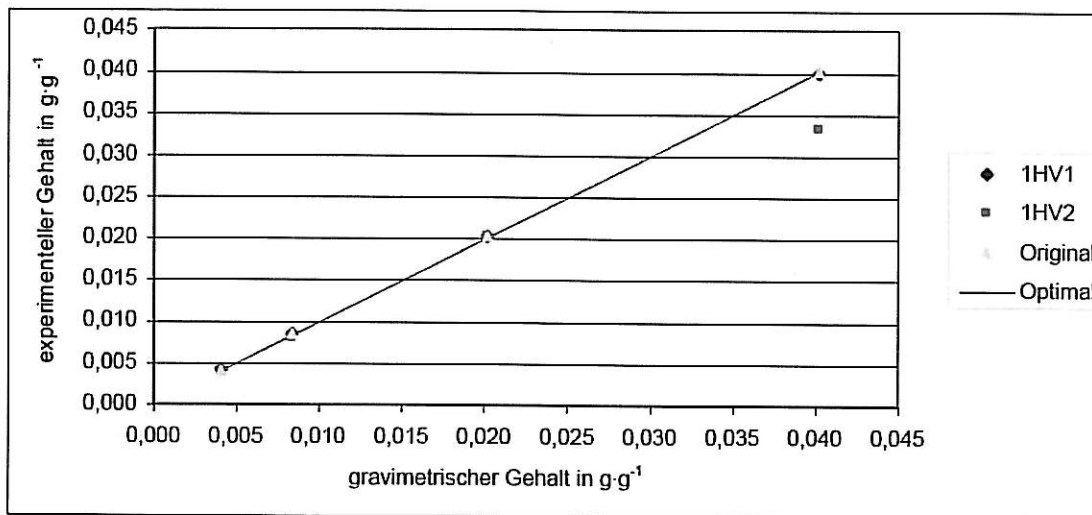


Abbildung 3-24: Linearität der Gehaltmessung von vier Maleinsäureproben mit allen drei Konfigurationen beim Abstimmen nach der Standardmethode.

Sowohl für die Originalkonfiguration als auch für die Konfiguration 1HV1 wurden für beide Abstimmungsmethoden hohe Linearitäten im untersuchten Gehaltsbereich von $4,15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ bis $40,24 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ beobachtet. Hingegen zeigt die Konfiguration 1HV2 keine ausreichende Linearität. In Tabelle 3-5 sind die berechneten Bestimmtheitsmaße dargestellt.

Tabelle 3-5: Bestimmtheitsmaß (R^2) aller Konfigurationen für die Auftragung der mittels ERETIC bestimmten Gehalte gegen den wahren Gehalt.

Konfiguration	Optimalbedingungen	Standardbedingungen
Original	0,99997	0,99997
1HV1	0,99998	0,99998
1HV2	0,96041	0,98646

Somit können die Konfiguration 1HV1 und die Originalkonfiguration im gesamten untersuchten Bereich für die qNMR mit hoher Genauigkeit und Linearität verwendet werden.

3.4 Diskussion und Zusammenfassung

Im Rahmen der Evaluierung einer Methode werden die Einflussgrößen aller Parameter beleuchtet, um Arbeitsvorschriften und Hinweise formulieren zu können, die international vergleichbare Ergebnisse von Messungen ermöglichen. Mit dieser Arbeit wurden zwei neue Konfigurationen der ERETIC-Methode vorgestellt und getestet. Während bei der Originalkonfiguration das ERETIC-Signal über die ^{13}C -Spule eingestrahlt wird, verwendet die neue Konfiguration 1HV2 dafür die Protonenspule. Damit wird das Problem vermieden, dass die ^{13}C -Spule nur auf 100 MHz abgestimmt werden kann, das ERETIC-Signal aber ein Protonensignal von 400 MHz ist. Einflüsse durch die Probe bleiben hier berücksichtigt, da das Signal tatsächlich in den Probenkopf gesendet wird. Dagegen vermeidet die Konfiguration 1HV1 alle Einflüsse des Probenkopfes und der Probe auf das ERETIC-Signal, indem dieses direkt in den Empfänger eingekoppelt wird.

Alle drei Konfigurationen wurden darauf angewendet, die Gehalte in unterschiedlich konzentrierten Proben von Maleinsäure und von unterschiedlichen Analyten (Trioxan und Dimethylsulfon) gleicher Konzentration zu bestimmen. Die in dieser Arbeit erzielten prozentualen Abweichungen des mit der Originalkonfiguration bestimmten Gehalts sind mit den Werten in der Literatur vergleichbar [4]. Dort wurden im Betrag für die prozentuale Abweichung Werte im Bereich von 0,7 % - 1,1 % erzielt (hier: 0,8 % - 1,1 %). Allerdings muss bei dieser Konfiguration mit der Substanz kalibriert werden, die später gemessen wird. Andernfalls treten signifikante Abweichungen der ermittelten Gehalte von 5,3 % für Sulfon bzw. 8,4 % für Trioxan auf, verglichen zu den gravimetrischen Referenzwerten.

In der Realität ist es aber nicht immer möglich, den Analyten zur Kalibrierung zu verwenden. Deshalb ist eine der wichtigsten Verbesserungen, die mit der Einführung der Konfiguration 1HV1 gelungen ist, dass Kalibrierstandard und Analyt unterschiedliche Substanzen sein können. Die Abweichungen der Gehalte von Sulfon bzw. Trioxan betragen hier nur noch 0,9 % bzw. 0,06 %. Gleichzeitig bewegen sich die Abweichungen für identische Substanzen im Bereich von 0,2 % - 1,1 %. Die in der Literatur angegebene Gleichung zur Berechnung des Gehalts wurde angepasst, da diese nicht geeignet war, Ergebnisse für Messungen mit unterschiedlichen Substanzen zu liefern. Mit der Einführung von Konfiguration 1HV1 ist es außerdem gelungen, die relative Standardabweichung aller Messungen mit ERETIC von 0,3 % - 1,5 % auf 0,13 % - 0,26 % zu senken.

Damit ist die ERETIC-Methode mit der Konfiguration 1HV1 eine wertvolle Alternative zu Internen Standards. Das gilt insbesondere für die Fälle, in denen die Probe nicht kontaminiert werden darf, die Gefahr einer Wechselwirkung besteht oder kein geeigneter Interner Standard zur Verfügung steht. Aufgrund der Unabhängigkeit dieser neuen Konfiguration von der Spule im Probenkopf sind Anwendungen für alle Kerne denkbar. Hierfür muss das künstlich generierte ERETIC-Signal nur an die magnetischen Eigenschaften des jeweiligen Kerns (Resonanzfrequenz, Relaxationszeit) angepasst werden, um direkt in den Empfänger gekoppelt zu werden. Der technische Aufwand für die Umsetzung der Konfiguration 1HV1 ist derselbe, wie für die Originalkonfiguration; die Generierung des ERETIC-Signals erfolgt auf identischem Weg.

In der Literatur wird in der Regel nicht beschrieben, wie jeweils die Abstimmung des Spektrometers erfolgt ist. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass die integrierte Standard-Methode Verwendung findet. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass das Abstimmen über die reflektierte Impulsleistung genauer ist [18]. Es wurde gezeigt, dass das für die Originalkonfiguration in besonderem Maße zutrifft. Da hierfür aber noch keine standardmäßige Implementierung erfolgt ist und diese Methode häufig als schwierig empfunden wird, bleiben derartig durchgeführte Arbeiten wohl noch die Ausnahme. Bei Verwendung der Konfiguration 1HV1 kann das Spektrometer auch mit Standardmethoden abgestimmt werden, da die Ergebnisse nur geringfügig ungenauer sind, als beim Abstimmen über die reflektierte Impulsleistung. Die prozentuale Abweichung bleibt ungefähr gleich (0,3 % - 1,0 %), die relative Standardabweichung steigt lediglich auf 0,11 % - 0,4 %. Dagegen steigt die relative Standardabweichung der Originalkonfiguration beim Abstimmen über die Standardmethode auf 2,4 % - 7,3 % an. Für einen Routinebetrieb empfiehlt sich somit die Verwendung der neuen Konfiguration 1HV1, da sie bezüglich der Spektrometerabstimmung wesentlich robuster ist als die Originalkonfiguration. Die ebenfalls untersuchte Konfiguration 1HV2 zeigt sehr stark abweichende Ergebnisse bei der Konzentrationsbestimmung und unterliegt zusätzlich einer hohen Standardabweichung. Sie ist daher nicht zur Anwendung geeignet.

Viele neuere Spektrometer sind inzwischen standardmäßig temperiert. Im Rahmen der hier angestellten Langzeituntersuchungen wurde gezeigt, dass das auch notwendig ist, da die ERETIC-Methode sehr stark von der Temperatur abhängt. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen aber auch, dass es nicht reicht, nur den Probenkopf zu temperieren. Vielmehr ist eine konstante Temperierung des ganzen Spektrometerraumes notwendig, da die Elektronik

ebenfalls eine Abhängigkeit von der Temperatur aufweist. Dieser Effekt ist unabhängig von der gewählten Konfiguration, mit der das ERETIC-Signal übermittelt wird.

Der Effekt von Impulswinkel und -zeit ist allgemein bekannt [16,17] und die Kenntnis des 90°-Impulses ist eine grundlegende Voraussetzung der meisten NMR-Experimente [19]. Das Ergebnis der hier angestellten Untersuchungen ist, dass Abweichungen der gemessenen Intensitäten durch einen falsch gewählten 90°-Impuls mathematisch korrigiert werden können.

Eine Abhängigkeit der ermittelten Intensitäten vom Bearbeiter einer Messreihe ist schon häufig beobachtet worden [10,20]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Prozedur entworfen und eingeführt, die für die hier durchgeführten Messungen eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit mit sich brachte. Diese berücksichtigt die Reihenfolge der Anwendung automatischer Bearbeitungsschritte und gibt vor, an welchen Stellen manuelle Bearbeitungsschritte erlaubt bzw. notwendig sind. Außerdem wurde das Makro, welches die Phase des ERETIC-Signals automatisch korrigiert, verbessert. Die prozentualen Abweichungen der von zwei Personen ermittelten Intensitäten sind damit sowohl im Durchschnitt als auch in ihren Maxima deutlich geringer als ohne die vorgestellte Vorschrift. Der subjektive Faktor Mensch bleibt zwar nach wie vor ein wichtiger Unsicherheitsfaktor, aber mit der Einführung der hier vorgestellten Prozedur fällt der Beitrag deutlich geringer aus. In jeder Arbeit zur NMR-Spektroskopie ist es eine Selbstverständlichkeit, dass genaue Angaben zu den Eigenschaften des verwendeten Spektrometers gemacht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass für die quantitative NMR-Spektroskopie nicht nur das Spektrometer, sondern auch das verwendete Probenröhrchen von Bedeutung ist. Derartige Angaben finden sich zwar schon in einigen Arbeiten, vor allem in Arbeiten zu Externen Standards (z. B. [12]), jedoch bei weitem nicht in allen. Zudem sind bisher keine Arbeiten erschienen, die den Einfluss des Probenröhrchens auf das ERETIC-Signal untersuchen und mit den Einflüssen des Röhrchens auf die Probe in Relation setzen. In der Literatur zur ERETIC-Methode [5,6] wird das ERETIC-Signal als Interner Standard angenommen. Da die ERETIC-Methode aber mit einer externen Kalibrierung arbeitet, sind solche Untersuchungen von Wichtigkeit. Es wurde hier gezeigt, dass die Wahl von Probenröhrchen mit einer geringen Variation der Innendurchmesser (wie Schott Scientific und Wilmad scl 505 ps) tatsächlich zu einer Verbesserung der Standardabweichung der Messung führt.

Zusammenfassend ist es gelungen, die sich als nicht robuste Original-ERETIC-Technik derart weiterzuentwickeln, so dass nun eine für die Routine ausreichend robuste und mit einer

geringen Messunsicherheit behaftete Variante für die Bestimmung von Absolutgrößen zur Verfügung steht. Hierbei erfolgt die Einkopplung des ERETIC-Signals direkt in den Protonenempfänger (Variante 1HV1).

4 Quantifizierung von Arzneistoffen

Nach der erfolgreichen Evaluierung der ERETIC-Technik mittels Modell-Lösungen sollte die Variante 1HV1 an realen Arzneistoffen auf ihre Praxistauglichkeit ausgetestet und ihre Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) bestimmt werden. Parallel dazu sollte die traditionelle Technik der Externen Standardisierung (zwei NMR-Röhrchen) evaluiert und die Ergebnisse mit den Resultaten der qNMR mittels Interner Standardisierung und validierter HPLC-Methoden auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

4.1 Auswahl der untersuchten Arzneistoff

Im Rahmen des Projektes wurde der Schwerpunkt auf die quantitative Analyse komplexer Arzneistoffgemische wie beispielsweise Naturstoffe und Mehrkomponentengemische gelegt. Diese weisen aufgrund komplexer Kopplungsmuster und Überlappungen von Signalen verschiedener Komponenten eines Gemisches meist komplizierte Viellinien-NMR-Spektren auf.

Im Zuge der Arzneistoffauswahl wurden das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 5.0) und dessen Nachträge auf komplexe Arzneistoffgemische hin näher untersucht. Aus einer Vielzahl von Arzneistoffen wurden Substanzgemische ausgewählt, die aus mindestens zwei verschiedenen Komponenten bestehen und im Idealfall in einem äquimolaren Verhältnis vorliegen. Ausgeschlossen wurden Gemische mit einem Hauptkomponentenanteil von deutlich über 90 % bzw. Gemische mit Nebenkomponten, deren Gehalt deutlich unter 2 % liegt. Die ausgewählten Arzneistoffe wurden in zwei große Gruppen unterteilt; die erste Gruppe zeigt geometrische Isomere, d. h. Arzneistoffe mit E/Z-, cis/trans- und exo/endo-Isomerie, die zweite Gruppe beinhaltet Arzneistoffgemische mit chemisch ähnlichen Komponenten, die geringe strukturelle Unterschiede aufweisen. In Tabelle 4-1 sind die ausgewählten Substanzen zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Zusammenstellung der ausgewählten Arzneistoffe.

Geometrische Isomere		Gemische hoher struktureller Ähnlichkeit
E/Z-Isomerie	Flupentixoldihydrochlorid	Codergocrinmesilat
	Clomifencitrat	Spectinomycindihydrochlorid-Pentahydrat
cis/trans-Isomerie	Phytomenadion	Teicoplanin
	Atracuriumbesilat	Heparin-Natrium
exo/endo-Isomerie	Iohexol	

Im Anschluss wurde für die ausgewählten Arzneistoffgemische eine intensive Literaturrecherche hinsichtlich NMR-Untersuchungen und orthogonaler Quantifizierungsmethoden mittels chromatographischer oder elektroforetischer Verfahren wie beispielsweise HPLC oder Kapillarelektrophorese durchgeführt. Im Rahmen eines großen Screenings wurden alle Arzneistoffe mittels NMR-Spektroskopie unter dem Gesichtspunkt der eindeutigen Signalzuordnung und Festlegung auswertbarer Signale näher untersucht. Voraussetzung für die quantitative Bestimmung einer Substanz mittels ¹H-NMR-Spektroskopie ist neben einer vollständigen Basislinientrennung der Signale die eindeutige Zuordnung der zu integrierenden Signale; zusätzlich muss mittels weiterer ein- und zweidimensionaler NMR-Techniken sichergestellt werden, dass das auszuwertende Analytensignal frei von Signalen anderer Komponenten bzw. Verunreinigungen ist. Für die quantitative Auswertung werden solche Signale ausgeschlossen, die zu mehr als einer Komponente gehören und somit nicht vollständig voneinander separiert sind. Durch den Einsatz von Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen unterschiedlicher Eigenschaften konnte für die meisten Arzneistoffgemische eine vollständige Separation der zu integrierenden Signale erreicht werden.

Die Mitglieder des projektbegleitenden Ausschusses beschlossen, anhand von vier Substanzen die Eignung der quantitativen NMR-Spektroskopie hinsichtlich Interner und Externer Standardisierungsmethoden im Vergleich zu routinemäßig eingesetzten Verfahren wie beispielsweise HPLC näher aufzuzeigen. Im Folgenden soll für die nicht weiter untersuchten Substanzen eine kurze Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse gegeben werden.

4.1.1 Phytomenadion

Phytomenadion gehört zur Gruppe der K-Vitamine und liegt in natürlich vorkommender Form als cis/trans-Gemisch vor; der Anteil des trans-Isomers überwiegt (Abbildung 4-1). Als Nebenkomponekte erlaubt das Europäische Arzneibuch in geringen Konzentrationen ein Epoxid-Derivat, das trans-Epoxyphytomenadion.

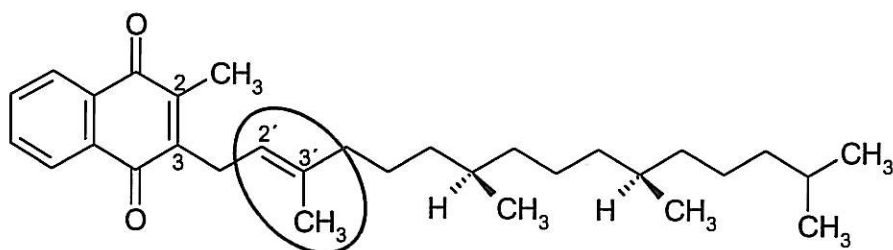


Abbildung 4-1: Chemische Struktur von trans-Phytomenadion.

Phytomenadion, eine klare, intensiv gelb gefärbte, viskose, ölige Flüssigkeit zeigt in eher apolaren Lösungsmitteln wie Chloroform und Benzol eine hohe Löslichkeit; in polaren Lösungsmitteln ist Vitamin K₁ praktisch unlöslich. Im Rahmen des Screenings wurde der Analyt in apolaren Lösungsmitteln wie CDCl₃ und C₆D₆ mittels ¹H-NMR-Spektroskopie näher untersucht. In beiden Lösungsmitteln kann eine Signalseparation der Protonen der Methylgruppe in Position 3' für cis- und trans-Phytomenadion erreicht werden. Experimente in CDCl₃ zeigen im Vergleich zu C₆D₆ als Lösungsmittel deutlich bessere Trennergebnisse; eine vollständige Basislinientrennung wird erzielt (Abbildung 4.2). In den beiden untersuchten Phytomenadion-Chargen konnte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie kein trans-Epoxyphytomenadion nachgewiesen werden. Um die Eignung der Methode hinsichtlich einer simultanen Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Epoxid-Komponente zu überprüfen, wurde der Analyt mit trans-Epoxyphytomenadion gespikt. Experimente in CDCl₃ zeigen für die Nebenkomponeute deutlich separierte Signale (nicht abgebildet), so dass eine Aussage über die Anwesenheit von trans-Epoxyphytomenadion getroffen werden kann; eine vollständige Basislinientrennung der Signale der Methylgruppe in Position 3' der drei Komponenten wird aufgrund leichter Signalüberlagerungen jedoch nicht erreicht.

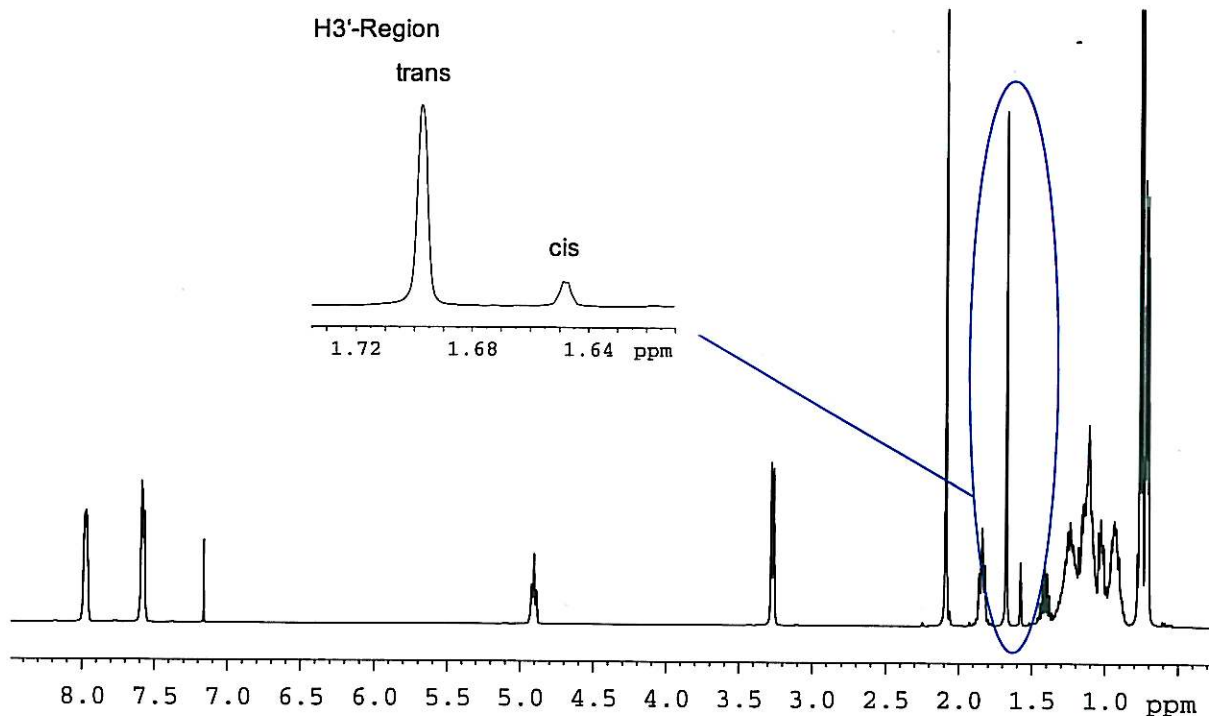


Abbildung 4-2: ^1H -NMR-Spektrum von Phytomenadion in CDCl_3 .

4.1.2 Spectinomycindihydrochlorid-Pentahydrat

Spectinomycindihydrochlorid-Pentahydrat setzt sich zusammen aus der Hauptkomponente Spectinomycin und der Nebenkomponente (4R)-Dihydrospectinomycin, die die gleiche mikrobiologische Aktivität aufweist. Die beiden Komponenten unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur unwesentlich; während die Hauptkomponente in Position 4 eine Keto-Gruppe besitzt, ist bei der Nebenkomponente das entsprechende Kohlenstoffatom mit einer OH-Gruppe in R-Konfiguration substituiert (Abbildung 4-3).

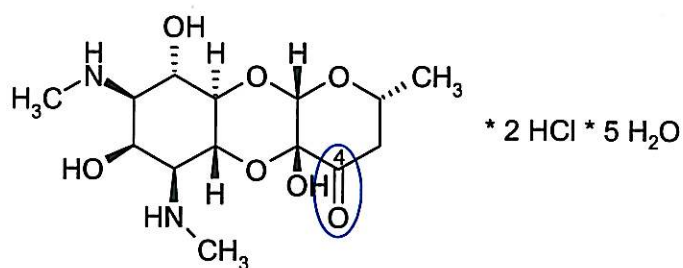


Abbildung 4-3: Chemische Struktur von Spectinomycindihydrochlorid-Pentahydrat.

In der Ph. Eur. 5.4 wurde im Rahmen einer Monographieüberarbeitung der maximale Gehalt der Nebenkomponente von höchstens 1,0 % auf 9,0 % erhöht. Die im Handel erhältlichen Spectinomycin-Chargen wiesen jedoch sehr geringe Mengen an (4R)-Dihydrospectinomycin auf. Zudem erlaubt das Europäische Arzneibuch eine Reihe weiterer, strukturell sehr

ähnlicher Verunreinigungen, so dass eine eindeutige Zuordnung der entsprechenden Resonanzen der Nebenkompente im ^1H -NMR-Spektrum erschwert wird.

4.1.3 Iohexol

In Iohexol, einem Röntgenkontrastmittel, ist aufgrund der voluminösen Iod-Substituenten die freie Drehbarkeit der Acetamidbindung stark eingeschränkt, so dass je nach Lage der Methylgruppe zwischen *exo*- und *endo*-Isomeren unterschieden werden kann (Abbildung 4-4). Bei Raumtemperatur überwiegt das *exo*-Isomer, das entsprechende *endo*-Isomer liegt zu etwa 20 % vor.

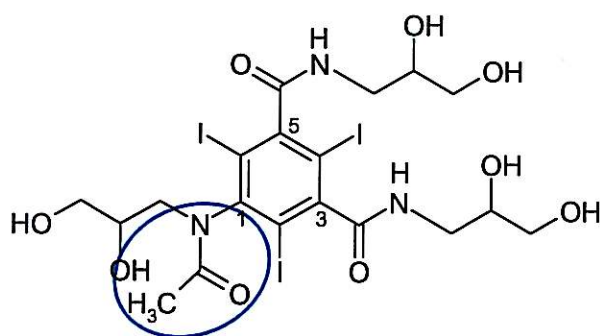


Abbildung 4-4: Chemische Struktur von Iohexol.

^1H -NMR-Experimente in polaren Lösungsmitteln wie D_2O und DMSO-d_6 zeigen für die beiden Isomere deutliche Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der Protonen der Methylgruppe (Abbildung 4-5). Auch mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie kann eine vollständige Separation der ^{13}C -NMR-Signale der Methylgruppe erzielt werden. Nach Integration der entsprechenden Spektren wird das in der Literatur angegebene Isomerenverhältnis von etwa 80:20 erreicht [21]. Die Zusammensetzung der beiden Isomere ist vor allem von der Temperatur und dem Lösungsmittel abhängig, so dass ein quantitativer Vergleich mittels NMR-Spektroskopie und HPLC nur unter definierten Bedingungen möglich ist.

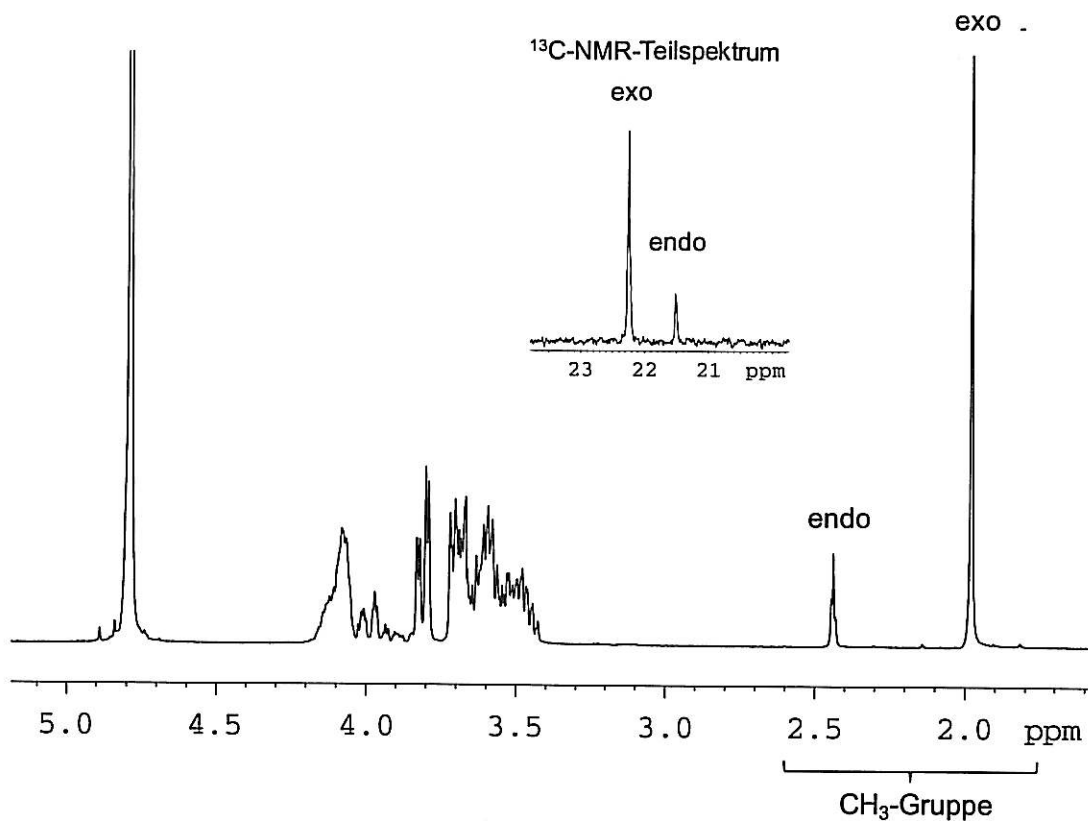


Abbildung 4-5: ^1H -NMR-Spektrum von Iohexol in D_2O bei einer Temperatur von 300 K. Zudem ist die Signalregion des ^{13}C -NMR-Spektrums der beiden CH_3 -Resonanzen von Iohexol als Vergrößerung eingefügt.

4.1.4 Teicoplanin

Teicoplanin ist ein Gemisch aus sechs strukturell sehr ähnlichen Glycopeptid-Komponenten, die sich in den Fettsäureresten am N-Acylglucosaminteil unterscheiden (Abbildung 4-6).

Im Rahmen des Screenings zeigte sich, dass eine Bestimmung des Glycopeptid-Gemisches mittels ^1H -NMR-Spektroskopie aufgrund starker Signalüberlagerungen im Fettsäurebereich nicht möglich ist. Alternativ wurde die Substanz mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie näher untersucht, da die Resonanzen der Fettsäurereste sich deutlich von den chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome des Peptid- und aromatischen Grundgerüsts unterscheiden. Experimente in D_2O und DMSO-d_6 lieferten selbst bei hohen Teicoplanin-Einwaagen und langen Messzeiten am 400 MHz-Spektrometer aufgrund sehr geringer Signalintensitäten keine quantitativ auswertbaren Spektren.

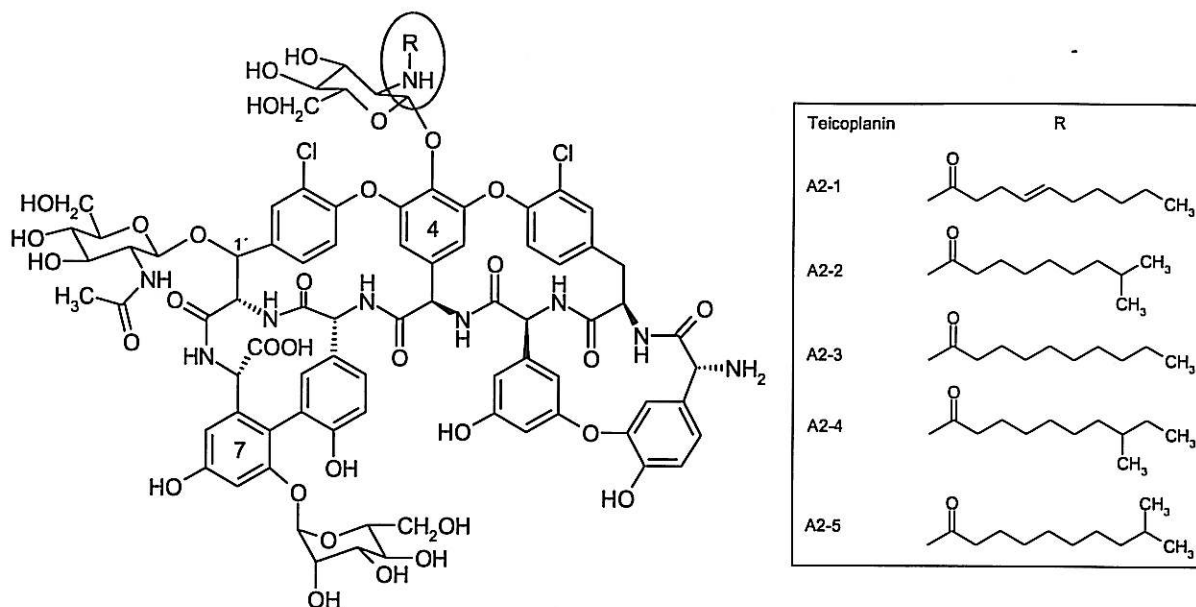


Abbildung 4-6: Chemische Struktur von Teicoplanin. Die sechste Komponente A₃ stellt ein Hydrolyseprodukt dar.

4.2 Experimentelle Parameter

Alle NMR-Messungen an der Forschungsstelle Würzburg wurden an einem Bruker Avance 400 MHz Spektrometer, ausgerüstet mit einem BBO-Messkopf, durchgeführt. Folgende Parameter wurden, sofern nicht anders beschrieben, verwendet: Impulswinkel=90°, Datenpunkte=64 k, Aufnahmezeit=5,1 s, Spektrale Breite=16 ppm, Temperatur=300 K.

An der Forschungsstelle DKI standen zwei NMR-Spektrometer zur Verfügung. Die ERETIC-Messungen erfolgten an einem Bruker Avance 400 MHz, BBI-Messkopf mit folgenden Parametern: Impulswinkel=90°C, Datenpunkte=64 k, Spektrale Breite=16 ppm, Anzahl der akkumulierten Experimente (ns)=32, Pulsabstand=10,1 s (Analyt) bzw. 60,1 s (Kalibriersubstanz), Einstrahlfrequenz des ERETIC-Kalibriersignals=-400 Hz, Pulsstärke des ERETIC-Signals (Dämpfung)=78 dB, Aufnahmezeit=5,1 s, Temperatur=300 K.

Die Messungen mittels Internem und Externem Standard erfolgten an einem Varian Mercury-VX 400 MHz Spektrometer und einem Inverse Detection-Probenkopfs. Folgende Parameter wurden verwendet: Impulswinkel=90°, Datenpunkte=64 k, Aufnahmezeit= 5,1, Spektrale Breite=16 ppm, Temperatur= 298 K.

Nach Aufnahme des NMR-Spektrums wurden die Phase sowie die Basislinie sorgfältig manuell korrigiert und die zur Quantifizierung herangezogenen Signale manuell integriert. Die absoluten Gehalte der Arzneistoffe wurde mit Hilfe des zugesetzten Internen oder Externen Standards deklarierten Gehalts ermittelt und die Zusammensetzung des Mehrkomponentengemisches mittels Normalisierung bestimmt.

4.3 Interne und Externe Standards

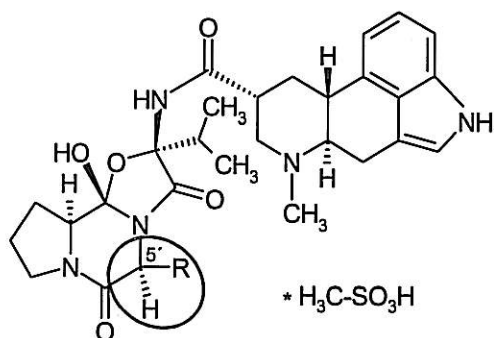
Zur Bestimmung des absoluten Gehalts von Arzneistoffen mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wird ein Interner oder Externer Standard definierter Reinheit zugesetzt. Zum Einsatz kamen verschiedene in der Literatur beschriebene Substanzen wie beispielsweise Maleinsäure, 1,3,5-Tricarboxybenzol und 2,5-Dimethylfuran, die sich in der Regel durch ein oder zwei Singulett in signalfreien Regionen auszeichnen [8]. Ein entscheidender Nachteil dieser Substanzen ist ihre deutlich erhöhte T_1 -Zeit (etwa 4-10 s) der zur Quantifizierung herangezogenen Signale im Vergleich zu den hier untersuchten Mehrkomponentengemischen (etwa 1-3 s). Aus diesen hohen T_1 -Zeiten resultieren deutlich verlängerte Messzeiten von bis zu über einer Stunde pro Probe. Im Rahmen der routinemäßigen Durchführung sollte eine Analysendauer von maximal 30 Minuten nicht überschritten werden. Zudem ist aufgrund des teilweise niedrigen Molekulargewichts dieser Substanzen eine direkte Einwaage nicht möglich, so dass mit Stammlösungen gearbeitet werden muss.

Substanzen wie beispielsweise 4-Dimethylaminobenzoesäureethylester, Thymol und Nicotinamid weisen im Vergleich zu den oben beschriebenen Standards stark verkürzte T_1 -Zeiten auf. Zudem sind für diese Referenzsubstanzen mehrere Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum detektierbar und ihr Molekulargewicht ist im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Standardsubstanzen deutlich erhöht, was eine direkte Einwaage ermöglicht.

4.4 Codergocrinmesilat

4.4.1 Struktur

Codergocrinmesilat, ein Gemisch aus drei Dihydroergopeptidalkaloiden im Verhältnis 1:1:1, besteht aus Dihydroergocornin (Cor), Dihydroergocristin (Cr) und Dihydroergocryptin. Dihydroergocryptin liegt in zwei stereoisomeren Formen vor, dem α -Dihydroergocryptin (α) und β -Dihydroergocryptin (β). Die vier Komponenten weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit auf; sie unterscheiden sich einzig in ihrer Seitenkette in Position 5' (Abbildung 4-7).



Codergocrinmesilat		-R	Gehalt
Dihydroergocomin	Cor		30,0 - 35,0 %
Dihydroergocristin	Cr		30,0 - 35,0 %
α-Dihydroergocryptin	α		20,0 - 25,0 %
β-Dihydroergocryptin	β		10,0 - 13,0 %

Abbildung 4-7: Chemische Struktur des Mehrkomponentengemisches Codergocrinmesilat.

4.4.2 ¹H-NMR-Spektroskopie

4.4.2.1 Optimierung des Lösungsmittels

Für eine optimale Trennung der Signale der vier Codergocrinmesilat-Komponenten wurde eine Vielzahl an Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen unterschiedlicher Eigenschaften eingesetzt (Tabelle 4-2), um den Einfluss des jeweiligen Lösungsmittels auf die chemische Verschiebung bestimmter Protonen aufzeigen zu können.

Tabelle 4-2: Eingesetzte Lösungsmittel für die Signalseparation von Codergocrinmesilat sowie dessen Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

Löslichkeit	apolare LM		polare LM	
	aromatisch	nicht-aromatisch	protisch	aprotisch
gering	C ₆ D ₆	CDCl ₃ CD ₂ Cl ₂	D ₂ O	
hoch			CD ₃ OD	DMSO-d ₆

Codergocrinmesilat ist in Methanol, Aceton und DMSO vollständig löslich. In Lösungsmitteln wie Wasser, Acetonitril, Chloroform, Dichlormethan und Benzol zeigt die Substanz eine sehr geringe Löslichkeit. Somit werden für eine vollständige Löslichkeit des Analyten geringe Mengen an DMSO-d₆ bzw. CD₃OD zugesetzt.

Voraussetzung für die quantitative Bestimmung eines Stoffes mittels NMR-Spektroskopie ist die eindeutige Zuordnung der zu integrierenden Signale. Für die Zuordnung der Signale in den ¹H- bzw. ¹³C-NMR-Spektren wurden zusätzlich DEPT-, COSY-, HMQC- und HMBC-Experimente durchgeführt.

Erste Experimente in DMSO-d₆ zeigen, dass eine Bestimmung der vier Komponenten von Codergocrinmesilat aufgrund der unterschiedlichen Seitenketten in Position 5' nicht möglich ist. In Folge starker Signalüberlagerungen der CH-, CH₂- und CH₃-Gruppen (Abbildung 4-8: CH_x) sowie der aromatischen Protonen von Dihydroergocristin eignen sich diese Signale nicht zur Quantifizierung.

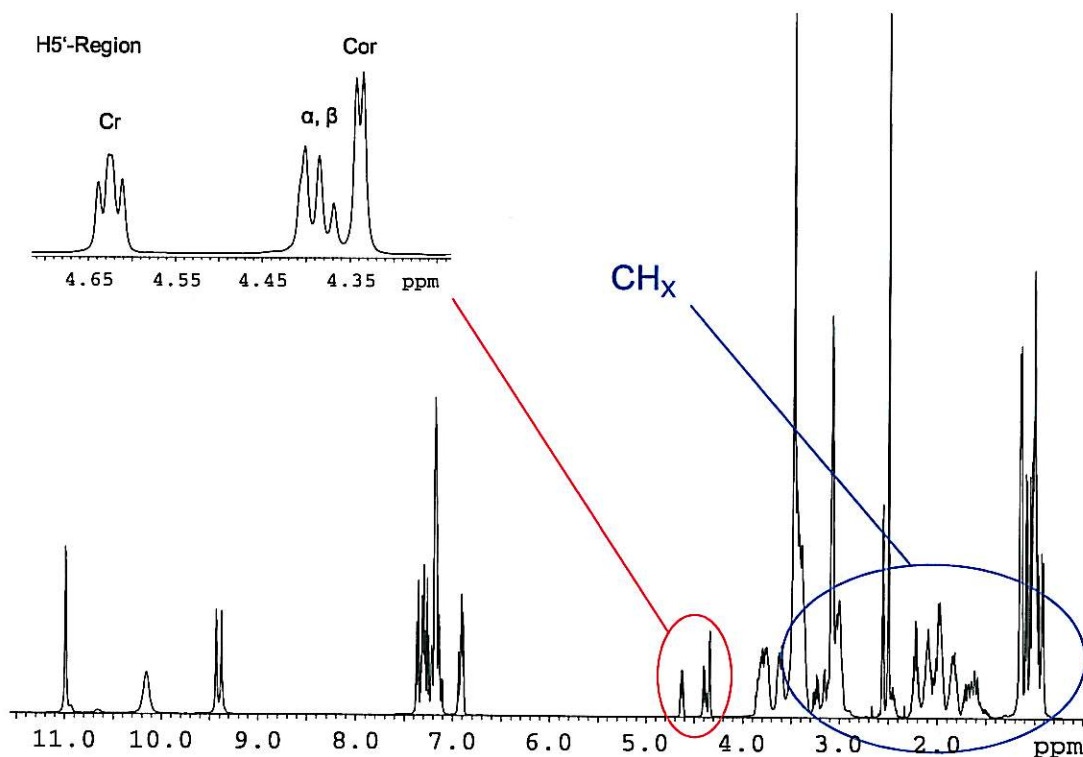


Abbildung 4-8: ¹H-NMR-Spektrum von Codergocrinmesilat in DMSO-d₆.

Erste Messungen in DMSO-d₆ zeigen jedoch, dass die Signale des Protons in Position 5' für die Quantifizierung mittels NMR-Spektroskopie geeignet sind. Die Signale der Protonen in Position 5' von Dihydroergocornin und Dihydroergocristin sind basisliniengetrennt, einzig die Signale von α- und β-Dihydroergocryptin überlappen (Abbildung 4-8: Vergrößerung). Ziel ist es, durch Änderung des Lösungsmittels eine optimale Trennung der H5'-Signale der vier Komponenten zu erzielen.

Der Einsatz von CD₃OD oder D₂O anstelle von DMSO-d₆ führt zu keiner Verbesserung der Signalseparation der Protonen in Position 5'; die entsprechenden Signale von α- und β-Dihydroergocryptin überlappen, die H5'-Resonanzen von Dihydroergocornin und Dihydroergocristin sind deutlich als Duplett und Triplet zu erkennen (Abbildung 4-9a).

Verwendet man CD_3OD , wird keine vollständige Basislinientrennung zwischen dem HOD-Signal von CD_3OD und der Dihydroergocristin-Resonanz erreicht; beim Einsatz von D_2O überlappt das Lösungsmittelsignal mit dem Triplet von Dihydroergocristin. Der Einsatz von DMSO-d_6 als Lösungsmittel ist zu bevorzugen, da dieses, im Gegensatz zu den beiden anderen polaren Lösungsmitteln, nicht zu störenden Lösungsmittelsignalen in der $\text{H5}'$ -Region führt.

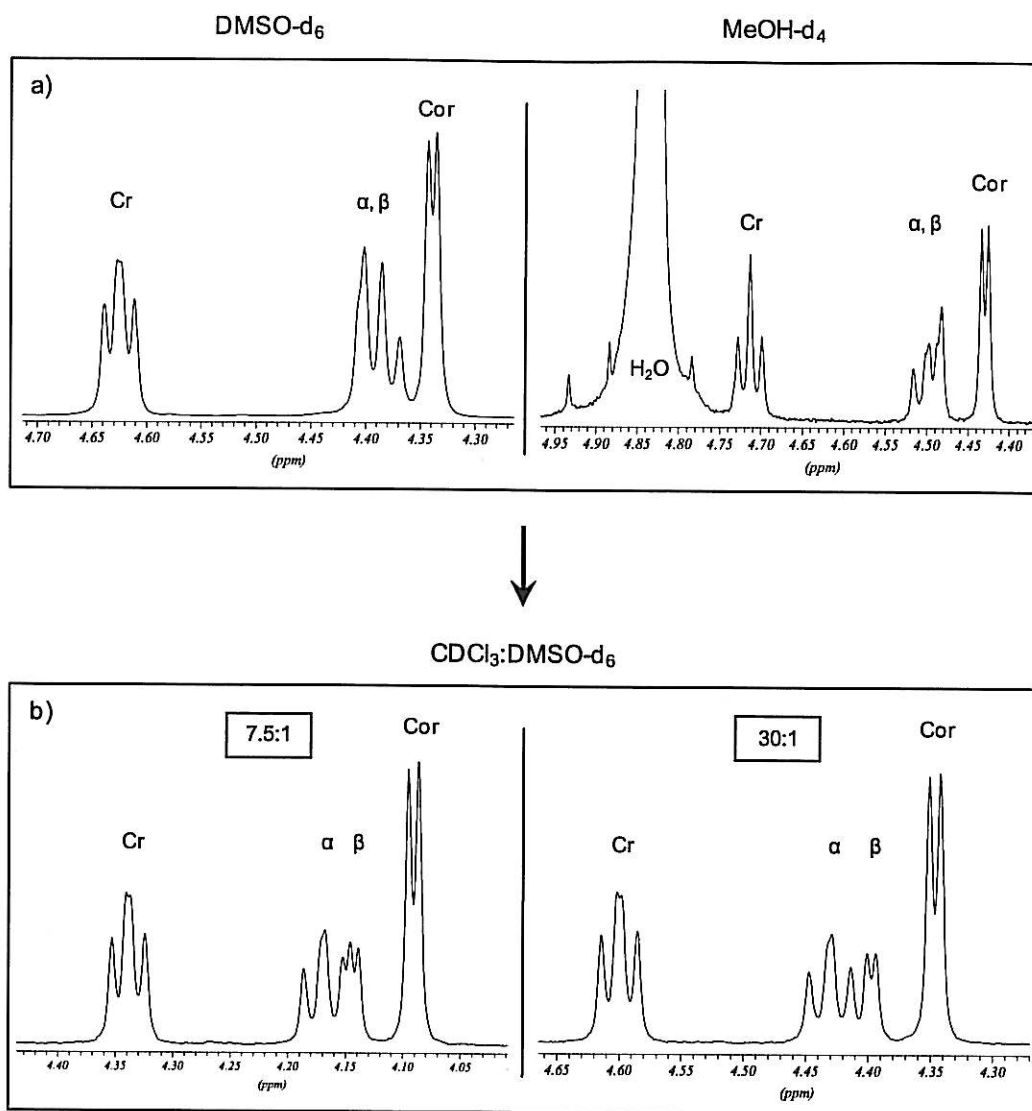
Beim Einsatz von CDCl_3 ist eine Trennung der Protonen in Position $5'$ von α - und β -Dihydroergocryptin sichtbar. Die $\text{H5}'$ -Signale von Dihydroergocornin und Dihydroergocristin sind vollständig basisliniengetrennt. Variiert man nun den Anteil des Lösungsvermittlers DMSO-d_6 im Lösungsmittelgemisch, beobachtet man eine umso bessere Trennung der $\text{H5}'$ -Signale von α - und β -Dihydroergocryptin, je geringer der Anteil an DMSO-d_6 gewählt wird (Abbildung 4-9b). Eine vollständige Basislinientrennung der $\text{H5}'$ -Signale von α - und β -Dihydroergocryptin kann jedoch nicht erreicht werden. Der Austausch von DMSO-d_6 gegen CD_3OD als Lösungsvermittler liefert vergleichbare Ergebnisse.

Ähnliche $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erhält man, wenn CDCl_3 gegen CD_2Cl_2 ersetzt wird; es wird keine Verbesserung der Signalseparation gegenüber CDCl_3 erreicht.

Beim Einsatz von C_6D_6 -Lösungsmittelgemischen mit geringen Anteilen an DMSO-d_6 kann eine Trennung der $\text{H5}'$ -Resonanzen von α - und β -Dihydroergocryptin erzielt werden (Abbildung 4-9c). Bedingt durch C_6D_6 wird das $\text{H5}'$ -Signal von α -Dihydroergocryptin relativ zu den anderen Resonanzen des Protons in Position $5'$ tieffeld-verschoben. Unter Verwendung von Lösungsmittelgemischen mit geringen Anteilen an DMSO-d_6 ist eine Überlappung der $\text{H5}'$ -Signale von α -Dihydroergocryptin und Dihydroergocristin zu beobachten. Erhöht man nun den Anteil an DMSO-d_6 schrittweise, wird das Signal von α -Dihydroergocryptin relativ zu den anderen Resonanzen hochfeld-verschoben, bis sich die $\text{H5}'$ -Signale von α - und β -Dihydroergocryptin ab einem gewissen Mischungsverhältnis der beiden Lösungsmittel wieder überlagern. Die optimale Signalseparation der vier Komponenten von Codergocrinmesilat wird unter Verwendung einer Mischung von C_6D_6 und DMSO-d_6 im Verhältnis 10:1 (v/v) erzielt.

Ein ähnliches Trennverhalten wird beim Einsatz von CD_3OD als Lösungsvermittler beobachtet, jedoch zeigen gleiche Mischungsverhältnisse einen unterschiedlichen Einfluss auf die Trennung der Komponenten. So ist bei Lösungsmittelgemischen von C_6D_6 und CD_3OD im Verhältnis 1:1 (v/v) eine vollständige Signaltrennung der vier Komponenten erkennbar, während mit DMSO-d_6 als Lösungsvermittler die Signale von α - und β -Dihydroergocryptin

überlappen. Aufgrund der Lage des störenden HOD-Signals von CD₃OD in der H_{5'}-Region werden Lösungsmittelgemische von C₆D₆ und DMSO-d₆ bevorzugt.



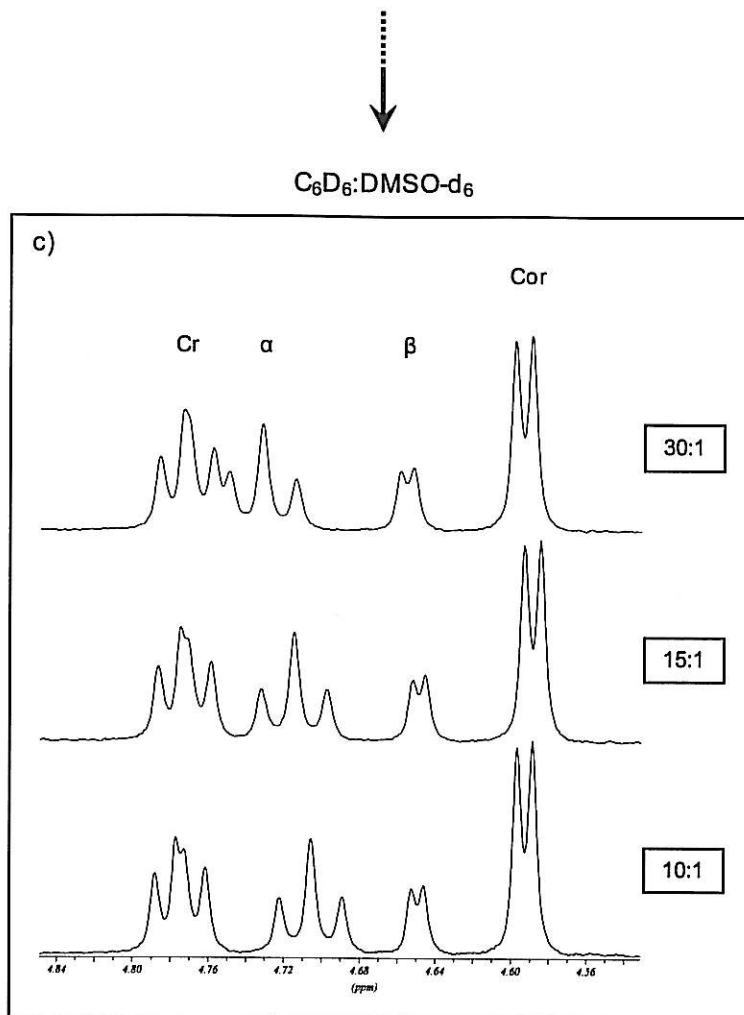


Abbildung 4-9: 1H -NMR-Teilspektren der H5'-Region von Codergocrinmesilat (400 MHz), geordnet nach verbesserter Signalseparation, für folgende Lösungsmittel: a) DMSO- d_6 (links), Methanol- d_4 (rechts), b) $CDCl_3:DMSO-d_6$, c) $C_6D_6:DMSO-d_6$. Eine optimale Signaltrennung wird in $C_6D_6:DMSO-d_6$ im Verhältnis 10:1 (v/v) erzielt. Beim Einsatz von Lösungsmittelgemischen sind die entsprechenden Mischungsverhältnisse angegeben.

4.4.2.2 Quantitative Bestimmung von Codergocrinmesilat mittels Internem und Externem Standard

Zur Quantifizierung von Codergocrinmesilat wurde 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester als geeigneter Interner und Externer Standard ermittelt; für die Integration wird das Quartettsignal der CH_2 -Protonen herangezogen. Diese Resonanz liegt in einer signalfreien Region in direkter Nachbarschaft zu den H5'-Signalen des Analyten. Alternativ kann das Duplett der beiden aromatischen Protonen in Position 3 und 5 integriert werden; diese Resonanz weist ähnlich kurze T_1 -Zeiten auf und wird hier im Rahmen des Richtigkeitsnachweises durch einen direkten Vergleich der beiden Signalintensitäten verwendet (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: Auflistung der entsprechenden T_1 -Zeiten der zur Quantifizierung herangezogenen Signale von Codergocrinmesilat und des Internen Standards 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester (DMABE).⁷

Proton Arzneistoff	T_1 -Zeit AS in s	Protonen Interner Standard	T_1 -Zeit IS in s
Codergocrinmesilat H5'	1,3	DMABE CH ₂ -Signal	2,7

Das Mischungsverhältnis von Analyt zu Standard wird so gewählt, dass die zur Integration herangezogenen Signale ähnliche Intensitäten aufweisen (Abb. 4-10).

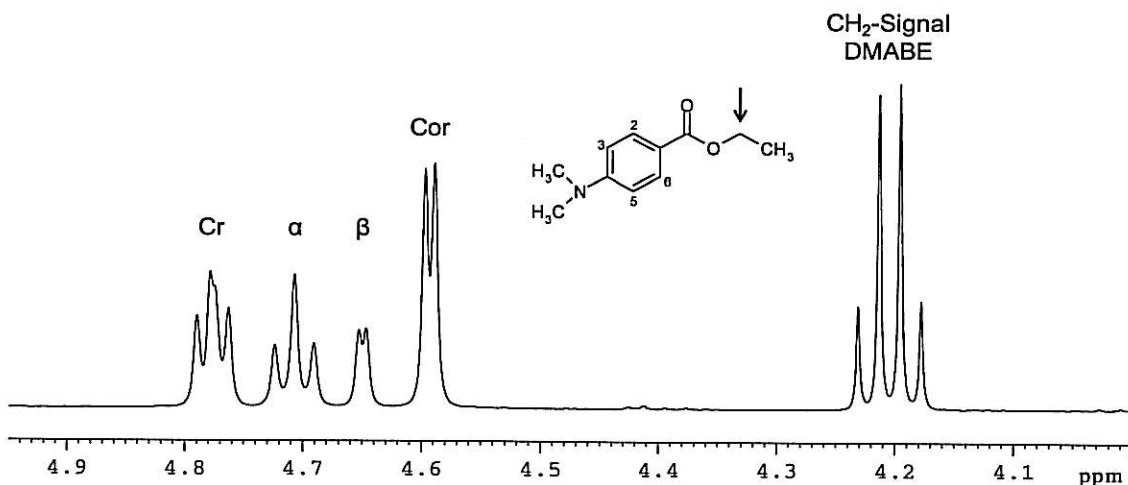


Abbildung 4-10: ¹H-NMR-Teilspektrum der H5'-Region von Codergocrinmesilat mit dem zur Integration herangezogenen Signal des Internen Standards 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester (Verhältnis Analyt/Standard 15:1, 400 MHz, C₆D₆-DMSO-d₆ 10:1 (v/v)).

Zur Quantifizierung des Mehrkomponentengemisches Codergocrinmesilat mittels Internem Standard wurden sechs bzw. fünf unabhängige Einwaagen des Analyten und des Internen bzw. Externen Standards DMABE (99,6 % (g/g)) mittels Einfachbestimmung am NMR-Spektrometer analysiert..

Die Anzahl der Scans (ns=64) wurde so gewählt, dass das Signal-Rausch-Verhältnis des H5'-Signals von β-Dihydroergocryptin mindestens 250:1 beträgt; somit liegt die Messunsicherheit der Signalintegration deutlich unter 1 % [22]. Die Impulswiederholzeit wurde zu 13,6 s (Repetition time = 5*T₁) gesetzt.

4.4.2.3 Quantitative Bestimmung von Codergocrinmesilat mittels ERETIC

Als Kalibriersubstanz für das ERETIC-Signal wurde das zertifizierte Referenzmaterial (ZRM) Benzoessäure verwendet (ca. 10 mg ZRM in 0,7 ml Lösungsmittel). Fünf voneinander unabhängige Einwaagen von ca. 10 mg Analyt in 0,7 ml Lösungsmittel wurden jeweils einmal

gemessen und gegen das ERETIC-Signal (-1.1 ppm) ausgewertet. Die herangezogenen Integrale sind in Abbildung 4-11 dargestellt.

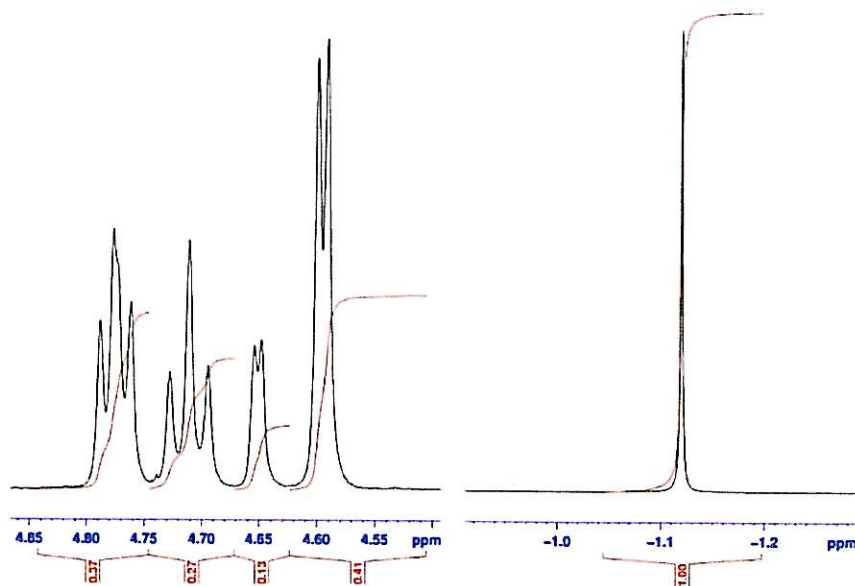


Abbildung 4-11: ¹H-NMR-Spektrenauszüge der relevanten Signale zur Integration.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden fünf unabhängige Einwaagen von je ca. 10 mg Codergocrinmesilat und 10 mg Benzoesäure als Internem Standard je einmal gemessen.

4.4.3 ¹³C-NMR-Spektroskopie

In der Literatur ist beschrieben, dass die Alkaloid-Zusammensetzung von Codergocrinmesilat mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie über den Vergleich der Signalintensitäten des Kohlenstoffatoms C5' analysiert werden kann [23].

Eine vollständige Signalseparation des Kohlenstoffatoms in Position 5' der vier Komponenten von Codergocrinmesilat kann in Lösungsmitteln wie DMSO-d₆ sowie Gemischen von CDCl₃ bzw. Benzol-d₆ mit DMSO-d₆ als Lösungsvermittler erreicht werden (Abbildung 4-12).

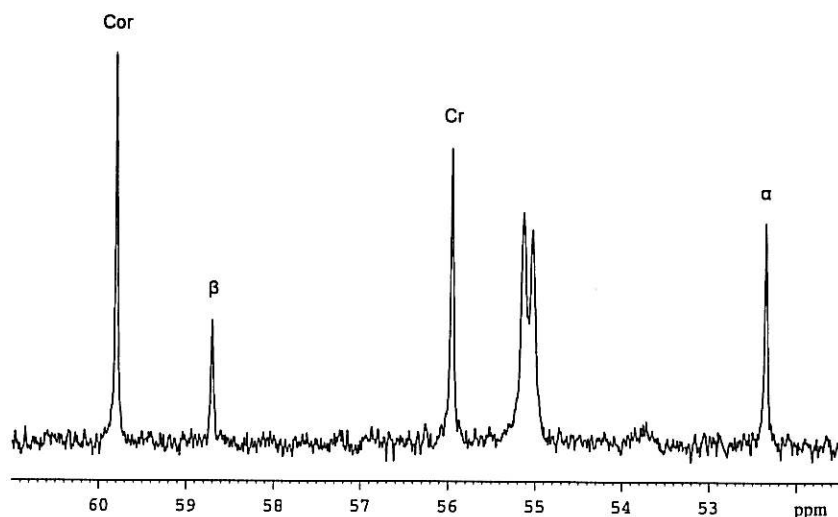


Abbildung 4-12: ^{13}C -NMR-Teilspektrum der C5'-Region von Codergocrinmesilat in DMSO-d_6 .

Aufgrund des Kern-Overhauser-Effekts (NOE), der im Zusammenhang mit den ^1H -Entkopplungstechniken in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie beobachtet wird, ist die Integration der ^{13}C -Signale und ein anschließender Vergleich von Intensitäten nicht direkt möglich, da dieses Phänomen die Intensität eines Signals um bis zu 200% erhöhen kann [19]. Die Grundvoraussetzung für quantitatives Arbeiten ist somit nicht mehr erfüllt und der Einsatz der ^{13}C -NMR-Spektroskopie auf dem Gebiet der quantitativen Analyse limitiert.

Am vorliegenden Beispiel Codergocrinmesilat wird im Rahmen der quantitativen Bestimmung für jede der vier Komponenten das Signal des Kohlenstoffatoms in Position 5' integriert. Unter der Annahme, dass die Signalintensität des C5'-Atoms für alle Komponenten in gleicher Weise durch den NOE beeinflusst wird, kann eine quantitative Aussage über die Alkaloid-Zusammensetzung getroffen werden.

Zur Quantifizierung von Codergocrinmesilat mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurden vier unabhängige Einwaagen des Analyten in DMSO-d_6 bzw. CDCl_3 mit geringen Anteilen an DMSO-d_6 im Verhältnis 7,5:1 (v/v) gelöst und mittels Einfachbestimmung am NMR-Spektrometer analysiert. Nach manueller Korrektur von Phase und Basislinie wurden die entsprechenden Signale integriert. Die Zusammensetzung des Mehrkomponentengemisches wurde mittels Normalisierung bestimmt.

4.4.4 HPLC

4.4.4.1 Arzneibuchanalytik von Codergocrinmesilat

Zur Gehaltsbestimmung des Mehrkomponentengemisches Codergocrinmesilat wird im Amerikanischen Arzneibuch (USP) eine isokratische Trennmethode auf octadecylsilyliertem

Säulenmaterial vorgeschrieben [24]. Die mobile Phase besteht aus einer Mischung von Wasser, Acetonitril und Triethylamin im Verhältnis 80/20/2,5 (v/v/v)). Die vier Komponenten werden mit einer RP18-Säule (300 x 4,0 mm, 5 µm) bei einer Flussrate von 1,0 ml/min getrennt und bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert. Die Komponenten eluieren in folgender Reihenfolge: Dihydroergocornin, α-Dihydroergocryptin, Dihydroergocristin und β-Dihydroergocryptin (Abbildung 4-13). Für die Eignung des Testsystems setzt die USP folgende Kriterien: Auflösung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Peaks, Symmetriefaktor und theoretische Bodenzahl für definierte Peaks sowie eine maximale relative Standardabweichung bei wiederholter Injektion fest. Die Quantifizierung erfolgt mittels „Externer-Standard“-Methode unter Verwendung einer Referenzsubstanz. Der prozentuale Anteil der einzelnen Alkaloide wird mittels Normalisierungsverfahren berechnet.

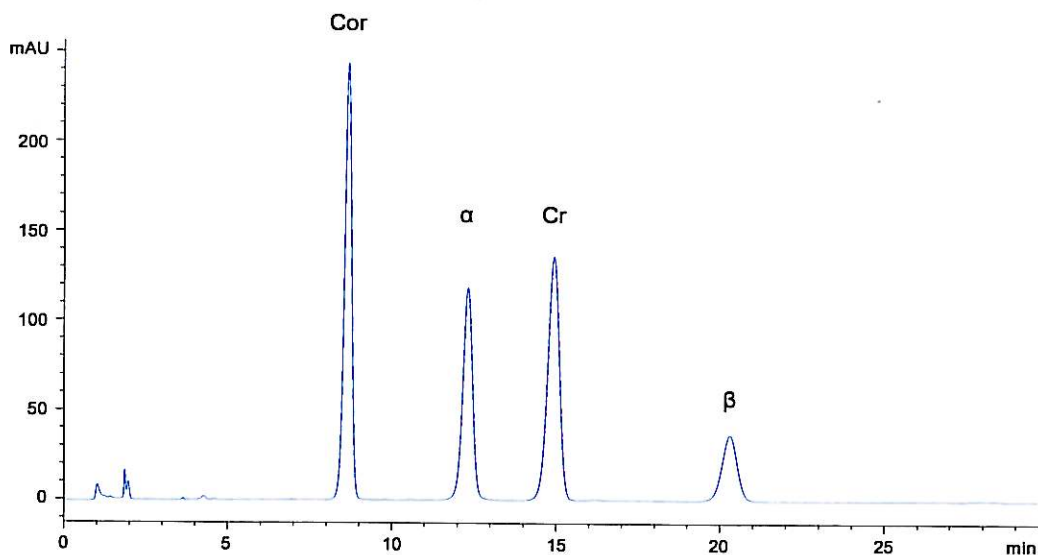


Abbildung 4-13: HPLC-Chromatogramm von Codergocrinmesilat nach USP 31. HPLC-Bedingungen: Gerät: Agilent HPLC (Serie1200); Säule: Hypersil Gold (150 x 4,6 mm, 5 µm); mobile Phase: Wasser, Acetonitril und Triethylamin im Verhältnis 80/20/2,5 (v/v/v); Fluss: 1,0 ml/min; Injektion: 20 µl; Detektion: 280 nm; Probenkonzentration: 1,0 mg/ml. Peakzuordnung: Cor: Dihydroergocornin, α: α-Dihydroergocryptin, Cr: Dihydroergocristin, β: β-Dihydroergocryptin.

Das Europäische Arzneibuch bestimmt die Alkaloid-Zusammensetzung in Codergocrinmesilat mittels HPLC; ausgewertet wird mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens. Der Gesamtgehalt der Alkaloidmesilate wird weiterhin als schwache Kationensäure mit NaOH-Maßlösung unter potentiometrischer Endpunktanzeige bestimmt.

Die HPLC-Trennmethode des Ph. Eur. 6.0 ähnelt stark der oben beschriebenen quantitativen Bestimmungsmethode des USP; als mobile Phase wird ebenfalls eine Mischung aus Wasser, Acetonitril und Triethylamin verwendet, allerdings in einer anderen quantitativen Zusammensetzung (75/25/2,5 (v/v/v)). Aufgrund des leicht erhöhten Acetonitril-Anteils kann

die Chromatographiedauer im Vergleich zur USP-Methode verkürzt werden, jedoch wird eine Verringerung der Auflösung zwischen zwei aufeinander folgenden Peaks beobachtet; die im Rahmen des Eignungstests geforderte Auflösung von mindestens 3,0 wird erreicht. Am Beispiel des Codergocrinmesilat-Musters der Firma Shire soll gezeigt werden, dass beide Methoden mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens vergleichbare Ergebnisse liefern (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Ergebnisse der Alkaloid-Zusammensetzung des Codergocrinmesilat-Shire-Musters mittels HPLC nach Ph. Eur. 6.0 und USP 31 unter Angabe der jeweiligen Standardabweichung.

Codergocrinmesilat Shire	Cor [%]	α [%]	Cr [%]	β [%]
Ph. Eur. 6.0	35,1 \pm 0,1	22,4 \pm 0,1	31,4 \pm 0,1	11,1 \pm 0,1
USP 31	34,7 \pm 0,1	22,9 \pm 0,1	31,3 \pm 0,1	11,1 \pm 0,1

Für die quantitative Analyse des Gesamtgehalts beider Muster wurde aufgrund der deutlich besseren Auflösung die Methode des USP ausgewählt.

4.4.4.2 Quantitative Bestimmung von Codergocrinmesilat mittels HPLC

Zur Quantifizierung von Codergocrinmesilat wurden für beide Arzneistoffmuster jeweils sechs unabhängige Einwaagen des Analyten und der zertifizierten Referenzsubstanz mittels Dreifachbestimmung an der HPLC nach USP analysiert. Die geforderten Systemeignungskriterien wurden erfüllt, so dass eine quantitative Auswertung möglich war (Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5: Systemeignungskriterien nach USP 31, bestimmt mit einer Referenzlösung von Codergocrinmesilat CRS.

Systemeignungskriterium	Vorgabe USP 31	ermittelter Wert
Auflösung zwischen α und Cr	$\geq 1,35$	4,4
Auflösung zwischen Cr und β	$\geq 1,0$	7,2
Symmetriefaktor des β -Peaks	$\leq 2,5$	1,1
theoretische Bodenzahl des β -Peaks	≥ 950	9230
relative Standardabweichung bei wiederholter Injektion	$\leq 1,5 \%$	0,1 %

Die Bestimmung des absoluten Gehalts von Codergocrinmesilat wurde mit Hilfe einer zertifizierten Referenzsubstanz (USP Ergoloid Mesylates RS: 96,55 % (g/g)) nach Externer Standardisierung bestimmt. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung der Alkaloid-Zusammensetzung mittels Normalisierungsverfahren.

4.4.5 Vergleich der Ergebnisse NMR-Spektroskopie versus HPLC

4.4.5.1 Ergebnisse der absoluten Bestimmungsmethode

Der absolute Gehalt von Codergocrinmesilat wurde mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und HPLC bestimmt. Die Quantifizierung mittels NMR-Spektroskopie erfolgte durch Zusatz eines Internen Standards; eingesetzt wurden hier zertifizierte Substanzen mit deklariertem Gehalt wie 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester und Benzoessäure. Zudem wurde der Gehalt mittels Externer Standardisierung unter Verwendung von DMABE als Referenzsubstanz sowie des elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) bestimmt. Um eine Aussage über die Richtigkeit dieser ermittelten Ergebnisse treffen zu können, wurde die Quantifizierung mit einem zweiten, unabhängigen Verfahren, der HPLC, durchgeführt. Eingesetzt wurde hier die in der aktuellen Monographie des USP beschriebene Methode (siehe 4.4.4.1), die validiert ist und somit als richtig gilt. Tabelle 4-6 fasst die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von Codergocrinmesilat mittels NMR-Spektroskopie und HPLC zusammen.

Die zwei Arzneistoff-Muster wurden an beiden Forschungsstellen mittels Interner Standardisierung am NMR-Spektrometer vermessen; eingesetzt wurden zertifizierte Referenzsubstanzen, die sich in der Länge ihrer T_1 -Zeiten deutlich voneinander unterscheiden. Der Gesamtgehalt des Mehrkomponentengemisches zeigt beim Einsatz der langsam relaxierenden Benzoessäure eine deutliche Übereinstimmung mit den entsprechenden Ergebnissen, die mit Hilfe des kurz relaxierenden Standards 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester erzielt wurden; die Dauer der Relaxationszeit T_1 zeigt somit keinen signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse.

Vergleicht man die ermittelten ^1H -NMR-Ergebnisse mittels Interner Standardisierung mit den Ergebnissen unter Einsatz des Externen Standards DMABE, zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung der Messergebnisse beider NMR-Verfahren.

Am vorliegenden Beispiel konnte aufgezeigt werden, dass die Quantifizierung von Codergocrinmesilat mittels ^1H -NMR-Spektroskopie als orthogonale Methode zu routinemäßig eingesetzten Verfahren wie HPLC bezeichnet werden kann.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Externen Standardisierung mit Hilfe des elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) innerhalb des geforderten Toleranzbereiches von $\pm 2\%$ relativer Abweichung bezüglich des HPLC-Referenzwertes liegen; das ERETIC-Verfahren ist somit zur quantitativen Analyse von Codergocrinmesilat geeignet.

Tabelle 4-6: Zusammenstellung der Ergebnisse mittels NMR-Spektroskopie – Interne Standardisierung (IS) mit DMABE bzw. Benzoesäure, Externe Standardisierung (ES) mit DMABE sowie ERETIC – und HPLC unter Angabe des absoluten Gehalts von Codergocrinmesilat (MW; in % (g/g)) und der entsprechenden relativen Standardabweichung (RSD; in %). Beide Muster wurden an beiden Forschungsstellen mittels Internem Standard analysiert (Universität Würzburg¹ und DKI²).

Codergocrinmesilat Shire	Cor [%]	α [%]	Cr [%]	β [%]	Gehalt	
					MW [%]	RSD [%]
IS DMABE ¹	32,4	21,5	31,1	10,5	95,5	0,1
IS Benzoesäure ²	31,9	21,8	30,8	10,6	95,1	0,2
ES DMABE	32,2	21,6	31,2	10,8	95,8	0,5
ERETIC	32,2	21,8	30,7	10,9	95,6	0,2
HPLC	33,4	21,9	30,1	10,6	96,0	0,5
Codergocrinmesilat Novartis	Cor [%]	α [%]	Cr [%]	β [%]	Gehalt	
					MW [%]	RSD [%]
IS DMABE ¹	32,2	21,5	32,3	10,8	96,8	0,1
IS Benzoesäure ²	31,3	21,4	33,1	10,9	96,7	0,2
ES DMABE	31,4	21,3	33,0	10,9	96,6	0,4
ERETIC	31,8	21,8	32,0	10,7	96,4	0,3
HPLC	32,9	22,0	30,8	10,8	96,5	0,5

4.4.5.2 Ergebnisse der relativen Bestimmungsmethode

Die Europäische sowie Amerikanische Pharmacopoeia fordern die quantitative Bestimmung der Zusammensetzung des Mehrkomponentengemisches mittels HPLC; ausgewertet wird mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens [25].

Aufgrund der direkten Proportionalität zwischen der Intensität eines Signals und der zur Resonanzlinie beitragenden Kernanzahl in der NMR-Spektroskopie kann direkt das Verhältnis zweier Komponenten zueinander bestimmt werden. Dieses Verfahren stellt somit eine der wichtigsten Bestimmungsmethoden zur quantitativen Analyse der Verhältnisse von Isomeren, Diastereomeren und Enantiomeren sowie der Zusammensetzung von Mehrkomponentengemischen dar.

Am Beispiel von Codergocrinmesilat sollte nun näher untersucht werden, ob die Ergebnisse der NMR-Spektroskopie mittels Normalisierungsverfahren zu denen konventioneller Verfahren wie HPLC vergleichbar sind. Dafür wurden die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren sowie die entsprechenden HPLC-Chromatogramme von Codergocrinmesilat zusätzlich mittels Normalisierung ausgewertet. Die entsprechenden Ergebnisse sind für beide Arzneistoffmuster in Tabelle 4-7 zusammengefasst.

Tabelle 4-7: Zusammenfassung der Ergebnisse mittels NMR-Spektroskopie und HPLC unter Angabe der prozentualen Alkaloid-Zusammensetzung von Codergocrinmesilat nach Normalisierung unter Angabe der jeweiligen Standardabweichung.

Codergocrinmesilat Shire	Cor [%]	α [%]	Cr [%]	β [%]
$^1\text{H-NMR}$	$34,9 \pm 0,1$	$22,7 \pm 0,1$	$31,3 \pm 0,1$	$11,1 \pm 0,1$
$^{13}\text{C-NMR}$	$34,8 \pm 0,2$	$22,4 \pm 0,5$	$31,7 \pm 0,3$	$11,1 \pm 0,2$
HPLC	$34,7 \pm 0,1$	$22,9 \pm 0,1$	$31,3 \pm 0,1$	$11,1 \pm 0,1$
Codergocrinmesilat Novartis	Cor [%]	α [%]	Cr [%]	β [%]
$^1\text{H-NMR}$	$34,3 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,2$	$32,0 \pm 0,2$	$11,3 \pm 0,1$
HPLC	$34,2 \pm 0,4$	$22,8 \pm 0,2$	$31,9 \pm 0,3$	$11,1 \pm 0,1$

Am vorliegenden Beispiel konnte gezeigt werden, dass die ermittelten Ergebnisse beider Verfahren übereinstimmen. Während der Aufnahme der $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren wurde im Zusammenhang mit der ^1H -Breitbandentkopplung das Auftreten des NOE beobachtet, der in diesem Fall vernachlässigt werden konnte. Die Ergebnisse dieser zeitaufwendigen Technik zeigen ebenfalls eine hohe Übereinstimmung mit den HPLC-Referenzwerten.

Die NMR-Spektroskopie stellt somit auf dem Gebiet der Quantifizierung mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens eine gute Alternative zu den konventionellen Verfahren wie beispielsweise HPLC dar.

4.5 Clomifencitrat

4.5.1 Struktur

Clomifencitrat, ein Triphenylethylen-Derivat, liegt aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Anordnung des Chlorsubstituenten bezüglich der Doppelbindung als E- und Z-Isomer zu etwa gleichen Teilen vor (Abbildung 4-14).

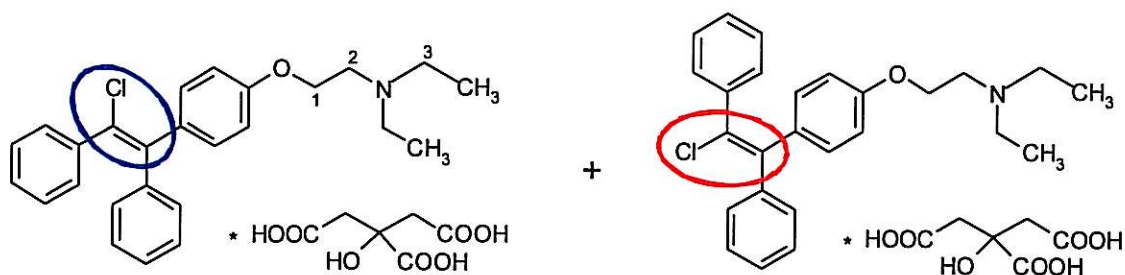


Abbildung 4-14: Chemische Struktur von Clomifencitrat: Z-Isomer (links) und E-Isomer (rechts).

4.5.2 ^1H -NMR-Spektroskopie

4.5.2.1 Optimierung des Lösungsmittels

In der Literatur ist beschrieben, dass die beiden Isomere von Triphenylethylen-Derivaten im aromatischen Bereich hinsichtlich ihrer chemischen Verschiebung deutliche Unterschiede aufweisen [26]. Während die ortho- und metaständigen Protonen des substituierten Aromaten des E-Isomeres relativ zu den restlichen aromatischen Protonen deutlich hochfeld-verschoben sind und basisliniengetrennt vorliegen, werden die entsprechenden Protonensignale des Z-Isomers tieffeld-verschoben und überlappen teilweise mit anderen Signalen. Eigene NMR-Messungen von Clomifencitrat in DMSO-d_6 konnten diese Ergebnisse bestätigen (Abbildung 4-15, Vergrößerung).

Erste Messungen in DMSO-d_6 zeigen, dass eine quantitative Bestimmung des Isomerengemisches mittels der Signale der Protonen der Seitenkette möglich ist (Abbildung 4-15). Während die Protonen in Position 1 der beiden Isomere deutlich basisliniengetrennte Signale aufweisen, unterscheiden sich die Resonanzen der Protonen von E- und Z-Clomifencitrat mit steigender Entfernung zum aromatischen System nur noch geringfügig.

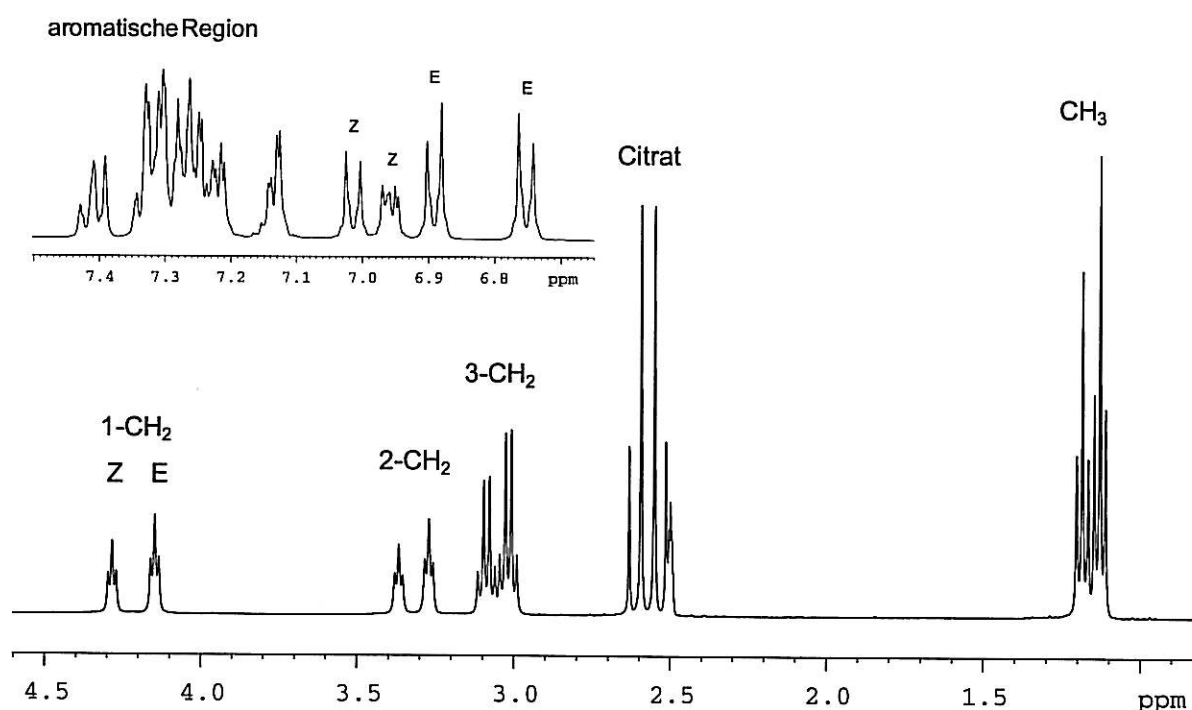


Abbildung 4-15: ^1H -NMR-Spektrum von Clomifencitrat in DMSO-d_6 (400 MHz).

Im Zuge der Methodenentwicklung wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf die Signalseparation der sekundären Protonen in Position 1 sowie der aromatischen Protonen näher untersucht (Tabelle 4-8).

Tabelle 4-8 Eingesetzte Lösungsmittel für die Signalseparation von Clomifencitrat sowie dessen Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

Löslichkeit	apolare LM		polare LM	
	aromatisch	nicht-aromatisch	protisch	aprotisch
gering	C ₆ D ₆	CDCl ₃	D ₂ O	
hoch			CD ₃ OD	DMSO-d ₆

Clomifencitrat ist in Methanol und DMSO vollständig löslich. In Lösungsmitteln wie Wasser, Chloroform und Benzol zeigt die Substanz eine sehr geringe Löslichkeit. Somit wurden zur vollständigen Lösung des Analyten geringe Mengen an Methanol als Lösungsvermittler zugesetzt.

Der Einsatz von CD₃OD zeigt keinen Unterschied in der Signalseparation der Protonen in Position 1 gegenüber DMSO-d₆; die beiden Triplets sind vollständig basisliniengetrennt (Abbildung 4-16d unten). Beim Einsatz von D₂O wird im Gegensatz zu den anderen beiden polaren Lösungsmitteln keine vollständige Signalseparation erzielt (Abbildung 4-16d oben); zusätzlich wird eine erhebliche Signalverbreiterung beobachtet.

Der Wechsel von polaren zu apolaren Lösungsmitteln wie CDCl₃ zeigt keine verbesserte Signaltrennung der Protonen in Position 1 (Abbildung 4-16a); aufgrund der schlechten Löslichkeit des Analyten in CDCl₃ wird CD₃OD als Lösungsvermittler zugesetzt. Die beiden Resonanzen weisen einen Unterschied von etwa 53 Hz in ihren chemischen Verschiebungen auf; dies ist vergleichbar mit den Messungen in DMSO-d₆ und CD₃OD (55 Hz).

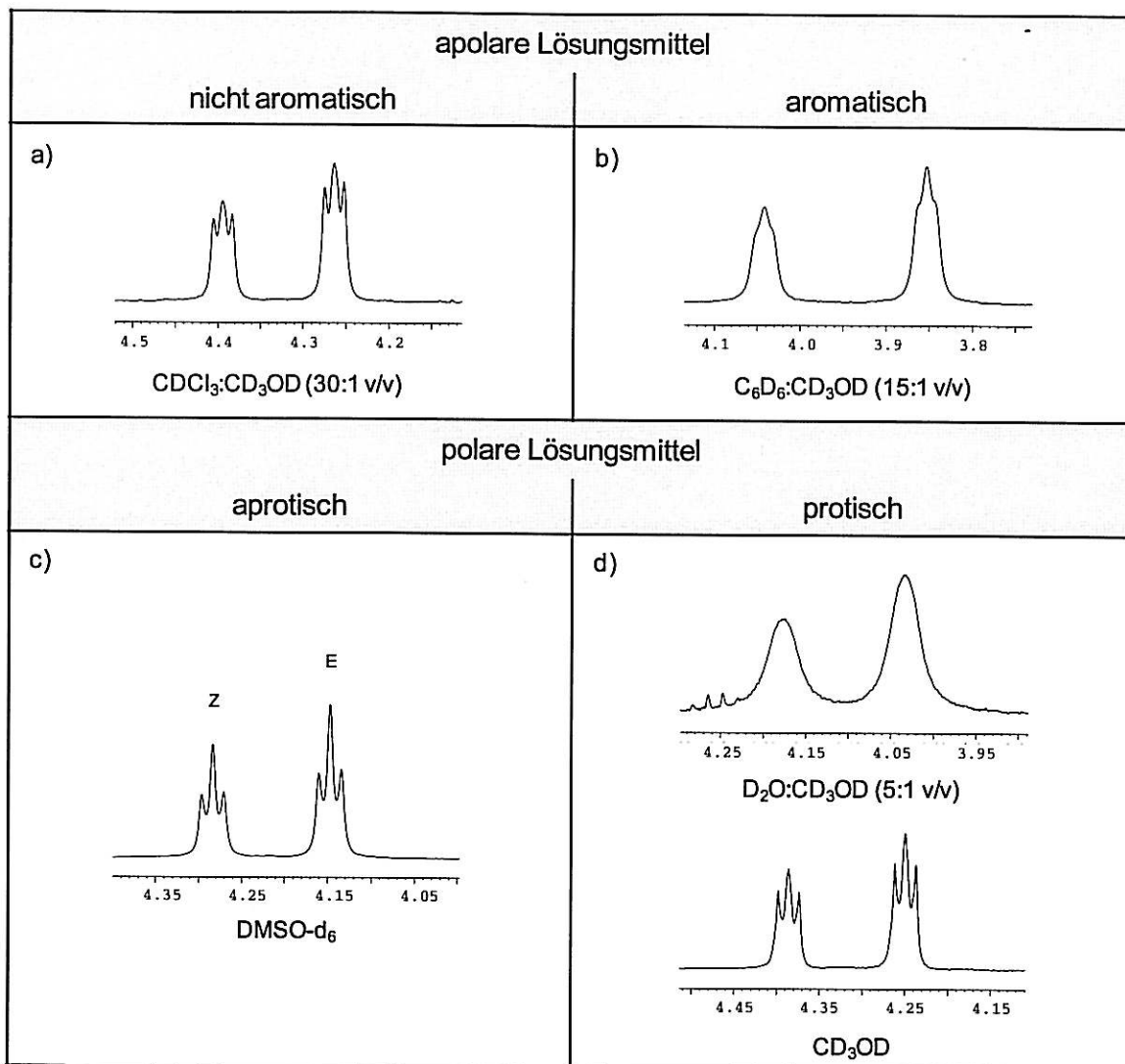


Abbildung 4-16: ¹H-NMR-Teilspektren der H1-Region von Clomifencitrat (400 MHz), geordnet nach Lösungsmittelgruppen unterschiedlicher Eigenschaften: a) CDCl₃:CD₃OD, b) C₆D₆:CD₃OD, c) DMSO-d₆ und d) D₂O-CD₃OD (oben), CD₃OD (unten). Eine optimale Signaltrennung wird in DMSO-d₆ im Verhältnis erzielt. Beim Einsatz von Lösungsmittelgemischen sind die entsprechenden Mischungsverhältnisse angegeben.

Beim Einsatz von C₆D₆ mit geringen Mengen an CD₃OD als Lösungsvermittler wird ebenfalls eine Basislinientrennung der beiden H1-Signale erzielt (Abbildung 4-16). Aufgrund der unvollständigen Löslichkeit der Substanz in C₆D₆ müssen je nach Clomifencitratkonzentration unterschiedliche Anteile an CD₃OD als Lösungsvermittler zugesetzt werden, was den Einsatz von C₆D₆ als Lösungsmittel limitiert. Des Weiteren sind die Triplet-Signale nicht aufgelöst. In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf die Signalseparation von E- und Z-Clomifencitrat im aromatischen Bereich näher untersucht (Abbildung 4-17). Die Messungen in D₂O wurden nicht berücksichtigt. In den restlichen Lösungsmitteln sind die zum Sauerstoff ortho-ständigen Protonen des Phenoxyringes des E-Isomers (E_o) relativ zu den

anderen aromatischen Signalen hochfeld-verschoben und vollständig basisliniengetrennt, und somit zur Quantifizierung geeignet. In den beiden apolaren Lösungsmitteln CDCl_3 und C_6D_6 sowie CD_3OD ist der aromatische Bereich des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums durch starke Signalüberlagerungen der beiden Isomere gekennzeichnet; für Z-Clomifencitrat findet man kein vollständig separiertes Signal zur Integration. Einzig beim Einsatz von DMSO-d_6 liegen für beide Isomere vollständig getrennte Signale im aromatischen Bereich vor.

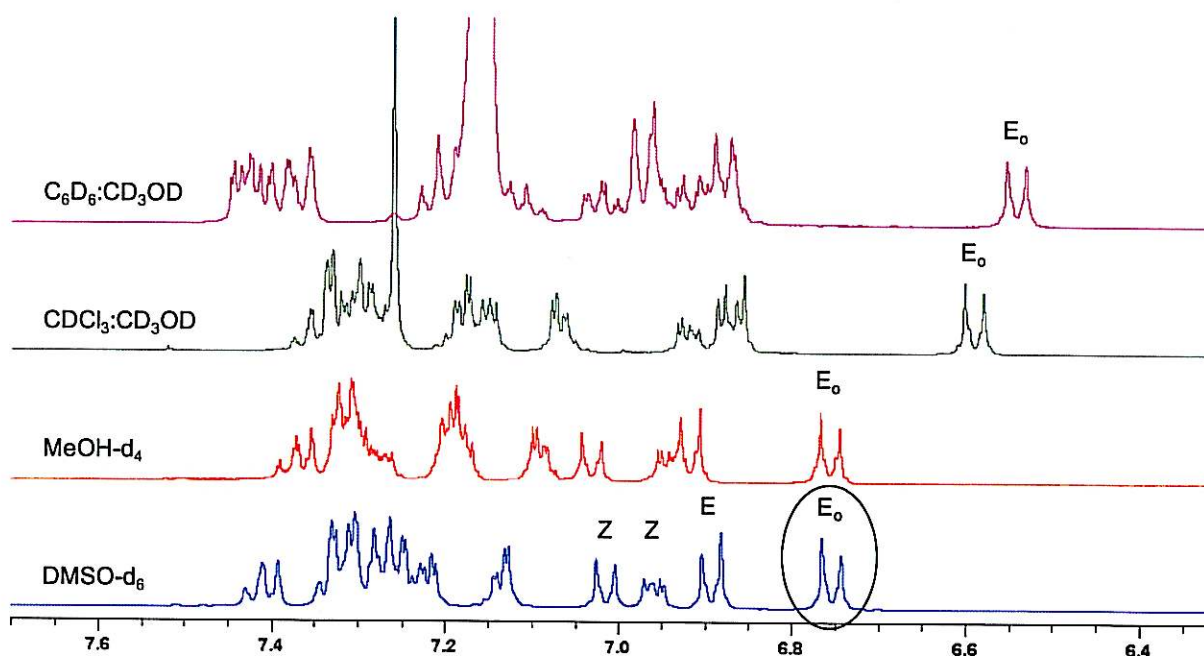


Abbildung 4-17: $^1\text{H-NMR}$ -Teilspektren des aromatischen Bereiches von Clomifencitrat aufgenommen in unterschiedlichen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen.

Eine optimale Signalseparation der beiden geometrischen Isomere wird in DMSO-d_6 erzielt. Zur Quantifizierung von Clomifencitrat werden Signale der Protonen in Position 1 herangezogen. Die Richtigkeit dieser Methode kann durch einen Vergleich der Signalintensitäten zwischen aromatischen und aliphatischen Protonen für beide Isomere bestimmt werden.

4.5.2.2 Quantitative Bestimmung von Clomifencitrat mittels Internem und Externem Standard

Zur Bestimmung des absoluten Gehalts von Clomifencitrat mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurden Nicotinamid und Thymol als geeignete Interne Standards ermittelt (Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: Auflistung der entsprechenden T_1 -Zeiten der zur Quantifizierung herangezogenen Signale von Clomifencitrat und der getesteten Internen Standards.

Protonen Arzneistoff	T_1 -Zeit AS [s]	Protonen Interner Standard	T_1 -Zeit IS [s]
Clomifencitrat H1	0,3	Nicotinamid H2	2,6
Clomifencitrat aromat. H	1,1 – 1,6	Thymol 5-CH ₃	1,3

Die quantitative Bestimmung unter Zusatz von Thymol kann durch Integration des vollständig separierten OH-Signals bzw. der Resonanz der Methylgruppe in Position 5 erfolgen. Nicotinamid zeigt zwei Signale, die aufgrund ihrer Signallage im Spektrum zur quantitativen Auswertung geeignet sind. Bedingt durch eine kürzere T_1 -Zeit des Protons in Position 2 im Vergleich zum Proton in Position 6 ($T_1 \sim 3,2$ s), wird das Integral der H2-Resonanz bestimmt. Das Mischungsverhältnis von Analyt zu Standard wurde so gewählt, dass die zur Integration herangezogenen Signale ähnliche Intensitäten aufweisen (Abbildung 4-18). Beim Einsatz von Thymol als Internem Standard beträgt das Verhältnis von Analyt zu Standard etwa 10:1, wohingegen beim Einsatz von Nicotinamid etwa 3,5 Teile Clomifencitrat auf einen Teil Standard entfallen. Um den Wägefehler möglichst gering zu halten, wurde im Rahmen der quantitativen Bestimmung von Clomifencitrat mit Nicotinamid als Internem Standard gearbeitet.

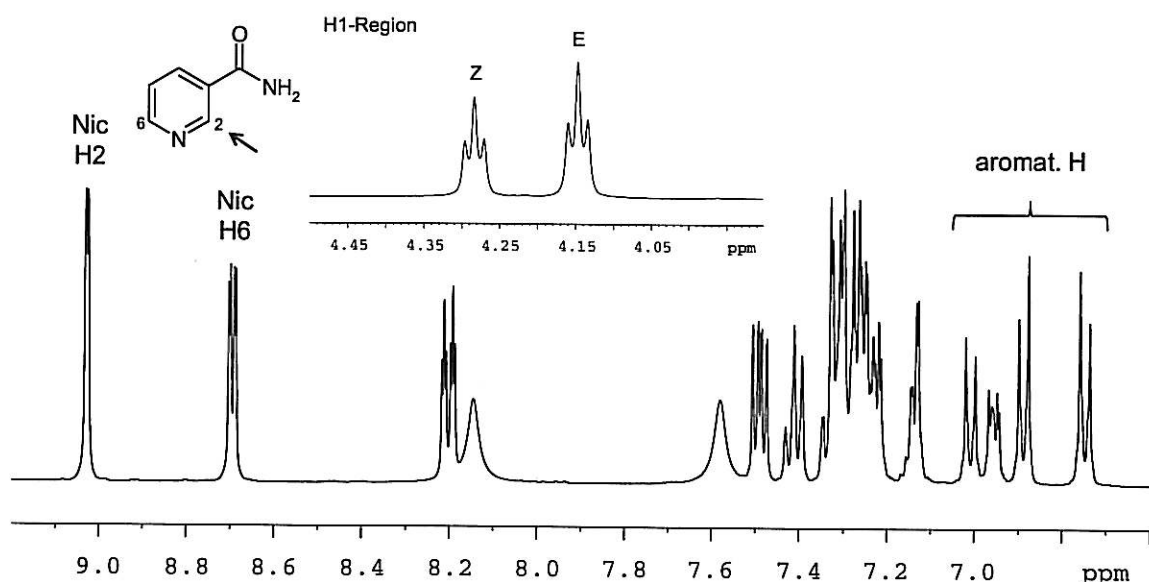


Abbildung 4-18: ¹H-NMR-Teilspektrum von Clomifencitrat mit dem zur Integration herangezogenen Signal des Internen Standards Nicotinamid (Nic) (Verhältnis Analyt/Standard 3,5:1, 400 MHz, DMSO-d₆).

Zur Quantifizierung des Isomerengemisches Clomifencitrat wurden sechs unabhängige Einwaagen des Analyten nach Zusatz des Internen Standards Nicotinamid (99,5 % (g/g)) bzw.

fünf unabhängige Einwaagen des Analyten bei Verwendung von Thymol (99,0 % (g/g)) als Externen Standards mittels Einfachbestimmung am NMR-Spektrometer analysiert. Das geforderte Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 250:1 wird bei 32 akkumulierten Scans und einem Impulsabstand von 20,1 s deutlich überschritten.

4.5.2.3 Quantitative Bestimmung von Clomifencitrat mittels ERETIC

Zur Kalibrierung des elektronischen ERETIC-Signal wurde eine Lösung aus ca. 10 mg ZRM Benzoessäure in 0,7 ml Lösungsmittel verwendet. Die eigentliche Analyse des Analyten erfolgte durch Einfachmessungen von fünf voneinander unabhängigen Einwaagen von jeweils ca. 10 mg Analyt in 0,7 ml Lösungsmittel. Das NMR-Spektrum zur Auswertung gegen das ERETIC-Signal ist in Abbildung 4-19 dargestellt.

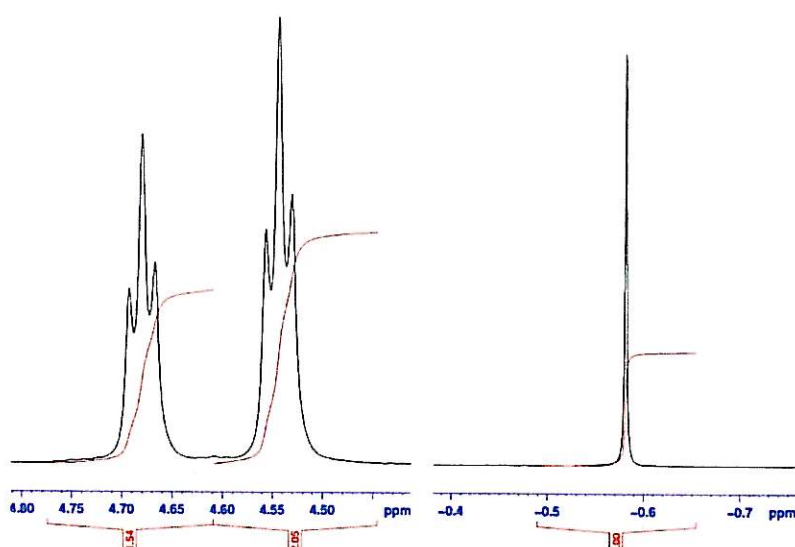


Abbildung 4-19: ¹H-NMR-Spektrenauszüge der relevanten Signale zur Integration.

Ferner wurden fünf unabhängige Einwaagen von je ca. 10 mg Clomifencitrat und 10 mg Benzoessäure zur Auswertung über die Interne Standardisierung vermessen, um die Richtigkeit der ERETIC-Messwerte zu gewährleisten.

4.5.3 HPLC

4.5.3.1 Arzneibuchanalytik von Clomifencitrat

Zur Gehaltsbestimmung des E/Z-Isomerengemisches Clomifencitrat wird im Amerikanischen Arzneibuch (USP) eine isokratische Trennmethode auf butylsilyliertem Säulenmaterial vorgeschrieben [27]. Die mobile Phase besteht aus einer Mischung aus Methanol, Wasser und Triethylamin im Verhältnis 55/45/0,3 (v/v/v) und wird mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellt. Die zwei Isomere werden mit einer RP4-Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm) bei

einer Flussrate von 1,0 ml/min getrennt, die Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 233 nm. Die beiden Isomere eluieren in folgender Reihenfolge: Z-Clomifencitrat, E-Clomifencitrat (Abbildung 4-20). Für die Überprüfung der Systemeignung setzt die USP die Kriterien Auflösung zwischen zwei aufeinanderfolgende Peaks, Symmetriefaktor und theoretischen Bodenzahl sowie maximale relative Standardabweichung bei dreifacher Injektion fest.

Die Quantifizierung von Clomifencitrat erfolgt mittels Externer Standardisierung unter Verwendung einer Referenzsubstanz.

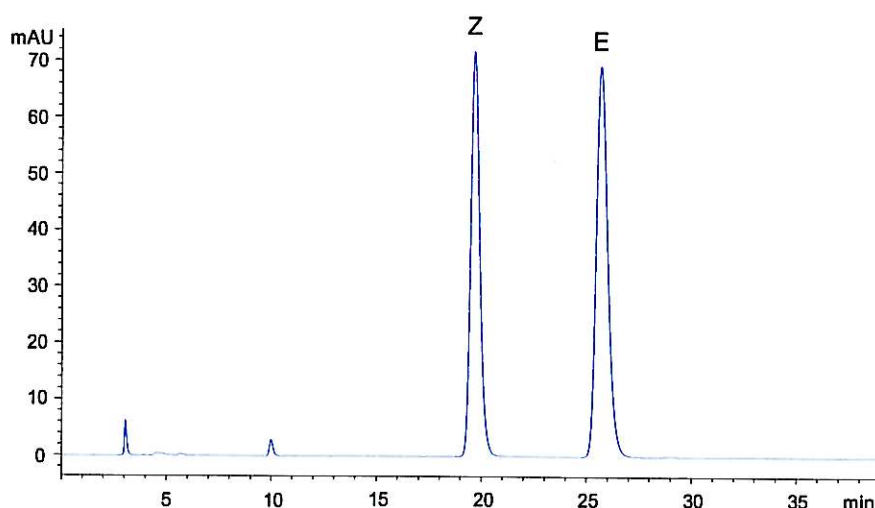


Abbildung 4-20: HPLC-Chromatogramm des E/Z-Isomerengemisches Clomifencitrat nach USP 31. Bedingungen: Gerät: Agilent HPLC (Serie1200); Säule: BetaBasic-4 (250 x 4,6 mm, 5 µm); mobile Phase: Methanol, Wasser und Triethylamin (eingestellt mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2,5) im Verhältnis 55/45/0,3 (v/v/v); Fluss: 1,0 ml/min; Injektion: 50 µl; Detektion: 233 nm; Probenkonzentration: 0,05 mg/ml. Peakzuordnung: Z: Z-Clomifencitrat, E: E-Clomifencitrat.

4.5.3.2 Quantitative Bestimmung von Clomifencitrat mittels HPLC

Zur Quantifizierung von Clomifencitrat wurden sechs unabhängige Einwaagen des Analyten sowie der zertifizierten Referenzsubstanz mittels Dreifachbestimmung an der HPLC nach USP analysiert. Die geforderten Systemeignungskriterien wurden erfüllt, so dass eine quantitative Auswertung möglich war (Tabelle 4-10).

Tabelle 4-10: Systemeignungskriterien nach USP 31, bestimmt mit einer Referenzlösung aus Clomifencitrat.

Systemeignungskriterium	Vorgabe USP 31	ermittelter Wert
Auflösung zwischen E- und Z-Isomer	≥ 1,5	6,8
Symmetriefaktor des E-Peaks	≤ 3,0	0,7
theoretische Bodenzahl des E-Peaks	≥ 2000	10922
relative Standardabweichung bei wiederholter Injektion	≤ 2,0 %	0,2 %

Die Bestimmung des absoluten Gehalts von Clomifencitrat wurde mit Hilfe einer zertifizierten Referenzsubstanz (USP Clomiphene Citrate RS 99,2 % (g/g)) mittels Externer Standardisierung durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung des Isomerenverhältnisses mittels Normalisierungsverfahren.

4.5.4 Vergleich der Ergebnisse ¹H-NMR-Spektroskopie versus HPLC

4.5.4.1 Ergebnisse der absoluten Bestimmungsmethode

Der absolute Gehalt von Clomifencitrat wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und HPLC bestimmt. Die Quantifizierung mittels NMR-Spektroskopie erfolgte durch Zusatz eines Internen Standards; eingesetzt wurden hier zertifizierte Substanzen mit deklariertem Gehalt wie Nicotinamid und Benzoesäure. Zudem wurde der Gehalt mittels Externer Standardisierung unter Verwendung von Thymol als Referenzsubstanz sowie des elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) bestimmt. Um eine Aussage über die Richtigkeit der ermittelten Ergebnisse treffen zu können, wurde die Quantifizierung mit einem zweiten, unabhängigen Verfahren, der HPLC, durchgeführt. Eingesetzt wurde hier die Methode der aktuellen Monographie des USP; diese ist validiert und gilt somit als richtig. Tabelle 4-11 fasst die Ergebnisse der Quantifizierung des Isomergemisches Clomifencitrat mittels NMR-Spektroskopie und HPLC zusammen.

Tabelle 4-11: Zusammenstellung der Ergebnisse mittels NMR-Spektroskopie – Interne Standardisierung (IS) mit Nicotinamid bzw. Benzoesäure, Externe Standardisierung (ES) mit Thymol sowie ERETIC – und HPLC unter Angabe des absoluten Gehalts von Clomifencitrat (Clom MW; in % (g/g)) und der entsprechenden relativen Standardabweichung (RSD; in %). Die Charge wurde an beiden Forschungsstellen mittels Internem Standard analysiert (Universität Würzburg¹ und DKI²).

Clomifencitrat	Z-Clomifencitrat [%]	E-Clomifencitrat [%]	Gehalt	
			MW [%]	RSD [%]
IS Nicotinamid ¹	41,3	56,1	97,4	0,3
IS Benzoesäure ²	41,3	55,8	97,1	0,5
ES Thymol	41,5	55,5	96,9	0,6
ERETIC	41,2	54,8	96,0	0,6
HPLC	40,7	56,4	97,1	0,5

Der Arzneistoff wurde an beiden Forschungsstellen mittels ¹H-NMR-Spektroskopie unter Zugabe eines Internen Standards analysiert. Eingesetzt wurden hierfür zwei zertifizierte Referenzsubstanzen, die sich in der Länge ihrer T₁-Zeiten deutlich voneinander unterscheiden; während Nicotinamid kurze T₁-Zeiten aufweist, ist für die Benzoesäure die Relaxationszeit deutlich länger. Unter Berücksichtigung der optimalen NMR-Messparameter

wurden für beide Standardsubstanzen vergleichbare Ergebnisse erzielt; die Dauer der Relaxationszeit T_1 hat somit keinen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis.

Vergleicht man die ermittelten $^1\text{H-NMR}$ -Ergebnisse unter Zugabe eines Internen Standards mit den Ergebnissen der Externen Standardisierung mit Thymol, zeigt sich eine deutliche Übereinstimmung der Messergebnisse beider Verfahren.

Am vorliegenden Beispiel konnte aufgezeigt werden, dass die Quantifizierung von Clomifencitrat mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durch den Einsatz von Internen bzw. Externen Standardsubstanzen eine orthogonale Methode zu konventionell eingesetzten Techniken wie HPLC darstellt.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Externen Standardisierung mit Hilfe des elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) deutlich innerhalb des geforderten Toleranzbereiches von $\pm 2\%$ relativer Abweichung liegen und somit korrekte Werte erhalten werden.

4.5.4.2 Ergebnisse der relativen Bestimmungsmethode

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bietet die Möglichkeit, durch direkten Vergleich der Signalintensitäten, den prozentualen Anteil einzelner Komponenten im Arzneistoffgemisch quantitativ zu bestimmen. Am Beispiel von Clomifencitrat soll zusätzlich näher untersucht werden, ob mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens vergleichbare Ergebnisse zwischen NMR-Spektroskopie und konventionellen Verfahren wie HPLC erzielt werden. Dafür wurden die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren sowie die entsprechenden HPLC-Chromatogramme von Clomifencitrat zusätzlich mittels Normalisierung ausgewertet. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 4-12 zusammengefasst.

Tabelle 4-12: Zusammenfassung der Ergebnisse mittels NMR-Spektroskopie und HPLC unter Angabe der prozentualen Anteile der beiden Isomere von Clomifencitrat nach Normalisierung unter Angabe der jeweiligen Standardabweichung.

Clomifencitrat	Z-Clomifencitrat [%]	E-Clomifencitrat [%]
$^1\text{H-NMR}$	$41,2 \pm 0,1$	$58,8 \pm 0,1$
HPLC	$41,9 \pm 0,1$	$58,1 \pm 0,1$

Am vorliegenden Beispiel konnte aufgezeigt werden, dass die NMR-Spektroskopie auf dem Gebiet der Quantifizierung mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens eine gute Alternative zu routinemäßig eingesetzten Verfahren wie HPLC darstellt.

4.6 Flupentixoldihydrochlorid

4.6.1 Struktur

Flupentixoldihydrochlorid, ein Thioxanthen-Derivat, zählt zur Gruppe der geometrischen Isomere und liegt zu etwa gleichen Teilen als E- und Z-Flupentixol vor (Abbildung 4-21).

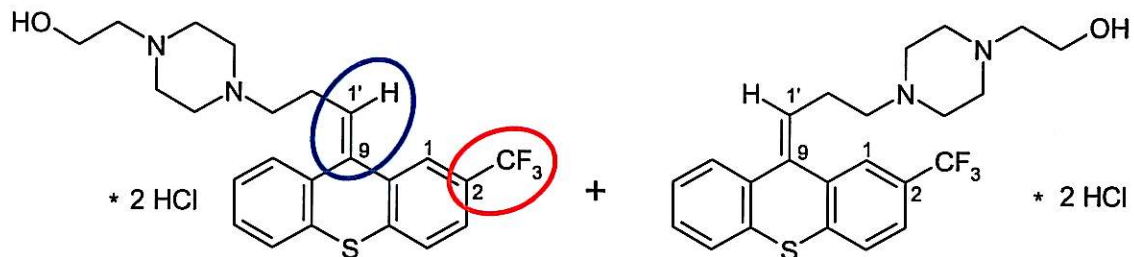


Abbildung 4-21: Chemische Struktur von Flupentixol-2HCl: E-Isomer (links), Z-Isomer (rechts).

4.6.2 ¹H-NMR-Spektroskopie

4.6.2.1 Optimierung des Lösungsmittels

Für eine optimale Trennung der Signale der zwei Isomere von Flupentixoldihydrochlorid wurden eine Vielzahl an Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen unterschiedlicher Eigenschaften eingesetzt (Tabelle 4-13), um den Einfluss des jeweiligen Lösungsmittels auf die chemische Verschiebung bestimmter Protonen aufzeigen zu können.

Tabelle 4-13: Eingesetzte Lösungsmittel für die Signalseparation von Flupentixoldihydrochlorid, sowie dessen Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

Löslichkeit	apolare LM		polare LM	
	aromatisch	nicht-aromatisch	protisch	aprotisch
gering	C ₆ D ₆ Toluol-d ₈	CDCl ₃		ACN-d ₃
hoch			D ₂ O CD ₃ OD	DMSO-d ₆

Flupentixol-2HCl ist in Wasser, Methanol und DMSO vollständig löslich. In Lösungsmitteln wie Acetonitril, Chloroform, Toluol und Benzol zeigt die Substanz eine sehr geringe Löslichkeit. Deshalb wurden für eine vollständige Löslichkeit des Analyten geringe Mengen an CD₃OD bzw. DMSO-d₆ zugesetzt.

Erste Messungen in D₂O zeigen, welche Protonen für die quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl geeignet sind. Die chemischen Verschiebungen der Protonen der Seitenkette weisen für die beiden Isomere nur geringfügige Unterschiede auf, zudem ist diese Region durch Signalüberlagerungen gekennzeichnet. Die aromatische Region im Spektrum

eignet sich infolge starker Signalüberlagerungen ebenfalls nicht zur quantitativen Bestimmung. Einzig das Signal des Protons in Position 1 des E-Isomers ist relativ zu den restlichen aromatischen Signalen deutlich tieffeld-verschoben und vollständig basisliniengetrennt. Erste Messungen in D₂O zeigen jedoch, dass die Signale des Protons in Position 1' für die Quantifizierung mittels NMR-Spektroskopie geeignet sind (Abbildung 4-22). Die Resonanzen des Protons in Position 1' der beiden Isomere unterscheiden sich deutlich voneinander, jedoch sind die beiden Triplets nicht vollständig basisliniengetrennt. Ziel ist es, durch Änderung des Lösungsmittels eine optimale Trennung der H1'-Signale von E- und Z-Flupentixoldihydrochlorid zu erzielen.

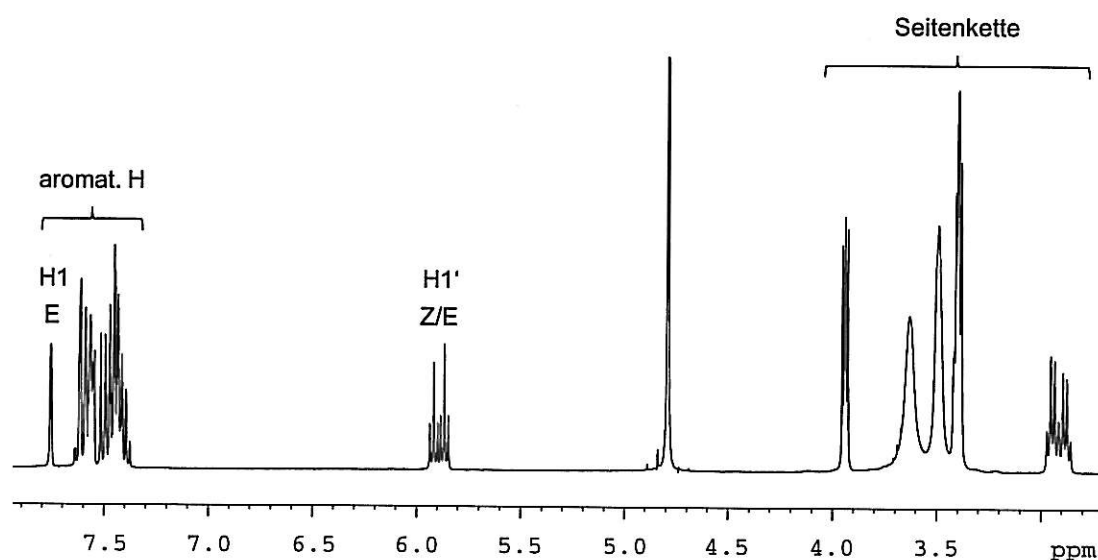


Abbildung 4-22: ¹H-NMR-Spektrum von Flupentixoldihydrochlorid in D₂O (400 MHz).

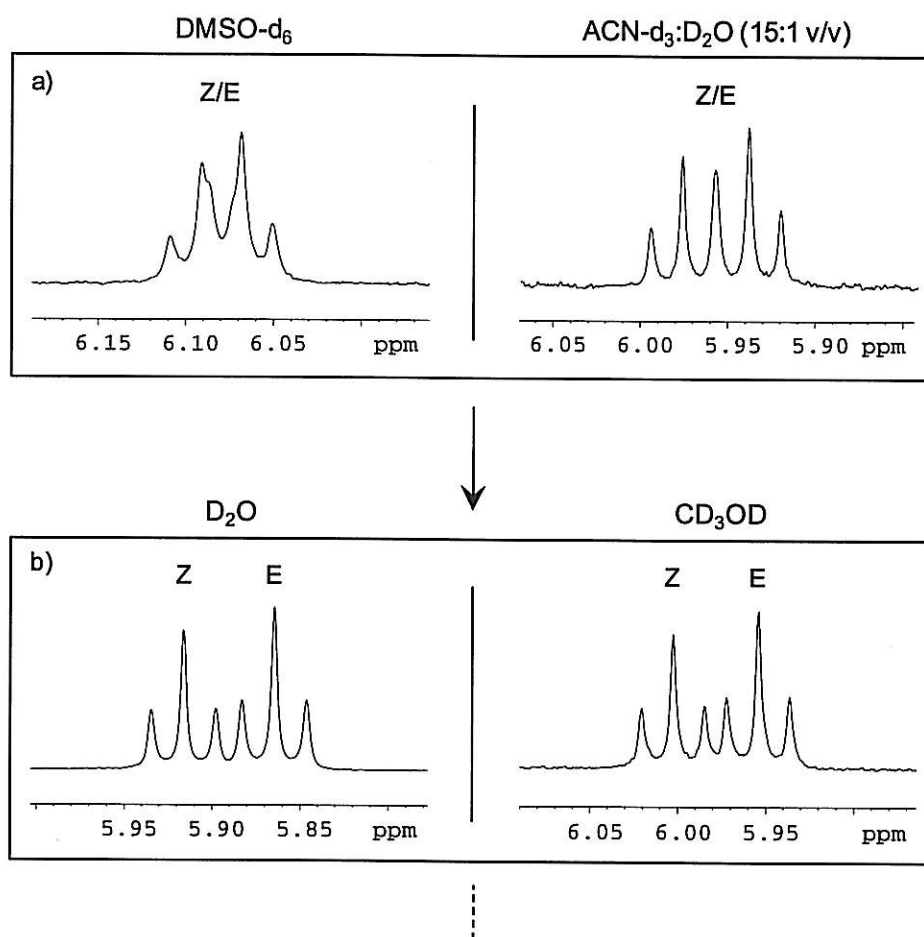
Der Einsatz von CD₃OD zeigt keinen Unterschied in der Signalseparation der Protonen in Position 1' gegenüber D₂O; die beiden H1'-Signale sind nicht vollständig basisliniengetrennt (Abbildung 4-23b).

Beim Einsatz von polaren, aprotischen Lösungsmitteln wie Acetonitril-d₃ oder DMSO-d₆ ist aufgrund der sehr ähnlichen chemischen Verschiebungen der beiden H1'-Resonanzen die Tripletsignalform infolge starker Signalüberlagerung nicht mehr zu erkennen (Abbildung 4-23a).

Eine vollständige Basislinientrennung der beiden H1'-Signale wird beim Einsatz von CDCl₃ mit geringen Mengen an CD₃OD bzw. DMSO-d₆ als Lösungsvermittler erzielt (Abbildung 4-23c). Jedoch sind hier vor allem im aromatischen Bereich zusätzliche Signale geringer Intensität sichtbar, die auf eine Wechselwirkung zwischen Analyt und Lösungsmittel hindeuten.

Beim Einsatz von Toluol- d_8 -Lösungsmittelgemischen mit CD_3OD als Lösungsvermittler kann eine vollständige Trennung der Signale in Position 1' erzielt werden (Abbildung 4-23d). Die Signalseparation zeigt ein robustes Verhalten hinsichtlich der Variation des CD_3OD -Anteils. Eine optimale Signalseparation von E- und Z-Flupentixol wird in Toluol- d_8 - CD_3OD -Lösungsmittelgemischen im Verhältnis 5:1 (v/v) erzielt.

Ähnliche 1H -NMR-Spektren erhält man nach Austausch von Toluol- d_8 gegen C_6D_6 . Jedoch ist der Einsatz von Toluol- d_8 als Lösungsmittel zu bevorzugen, da die Tripletform der beiden $H_{1'}$ -Signale in C_6D_6 -Gemischen nicht mehr vollständig zu erkennen ist (nicht dargestellt).



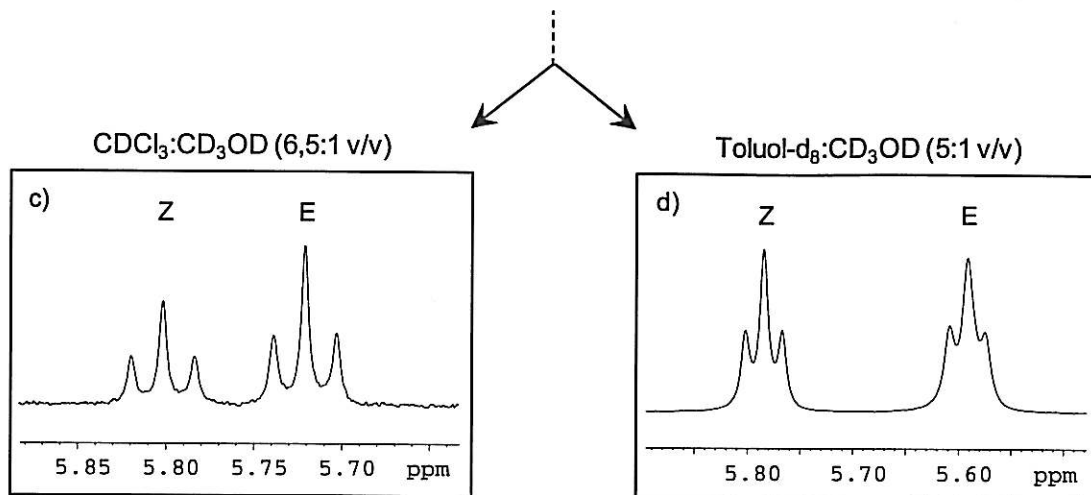


Abbildung 4-23: ^1H -NMR-Teilspektrum der $\text{H1}'$ -Region von Flupentixoldihydrochlorid (400 MHz), geordnet nach verbesserter Signalseparation, für folgende Lösungsmittel: a) DMSO-d_6 (links), $\text{ACN-d}_3\text{:D}_2\text{O}$ (rechts), b) D_2O (links), CD_3OD (rechts), c) $\text{CDCl}_3\text{:CD}_3\text{OD}$, d) $\text{Toluol-d}_8\text{:DMSO-d}_6$. Eine optimale Signaltrennung wird in $\text{Toluol-d}_8\text{:CD}_3\text{OD}$ 5:1 (v/v) erzielt. Beim Einsatz von Lösungsmittelgemischen sind die entsprechenden Mischungsverhältnisse angegeben.

4.6.2.2 Quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl mittels Internem und Externem Standard

Zur Bestimmung des absoluten Gehalts von Flupentixol-2HCl mittels ^1H -NMR-Spektroskopie wurden verschiedene Interne Standards näher untersucht, die aufgrund ihrer vollständigen Löslichkeit im verwendeten Lösungsmittelgemisch, ihrer Signallage im ^1H -NMR-Spektrum und ihrer kurzen T_1 -Zeit für die Quantifizierung geeignet sind. Dabei wurde 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester als geeigneter Interner Standard ermittelt; für die Integration wird das Signal der aromatischen Protonen H3/H5 herangezogen. Diese Resonanz liegt in einer signalfreien Region in direkter Nachbarschaft zu den $\text{H1}'$ -Signalen des Analyten. Alternativ kann das Duplett der beiden aromatischen Protonen in Position 2 und 6 integriert werden, aufgrund der deutlich längeren T_1 -Zeit ($T_1 \gg 2,5$ s) wird die Messdauer pro Probe erhöht (Tabelle 4-14).

Tabelle 4-14: Auflistung der entsprechenden T_1 -Zeiten der zur Quantifizierung herangezogenen Signale von Flupentixol-2HCl und des Internen Standards 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester (DMABE).

Proton Arzneistoff	T_1 -Zeit AS [s]	Protonen Interner Standard	T_1 -Zeit IS [s]
Flupentixol $\text{H1}'$	0,9	DMABE H3/H5	2,5
Flupentixol arom. H	1,2		

Das Verhältnis von Analyt zu Standard wird so gewählt, dass die zur Integration herangezogenen Signale ähnliche Intensitäten aufweisen (Abbildung 4-24). Beim Einsatz von DMABE als Interner Standard beträgt das Verhältnis von Analyt zu Standard etwa 10:1.

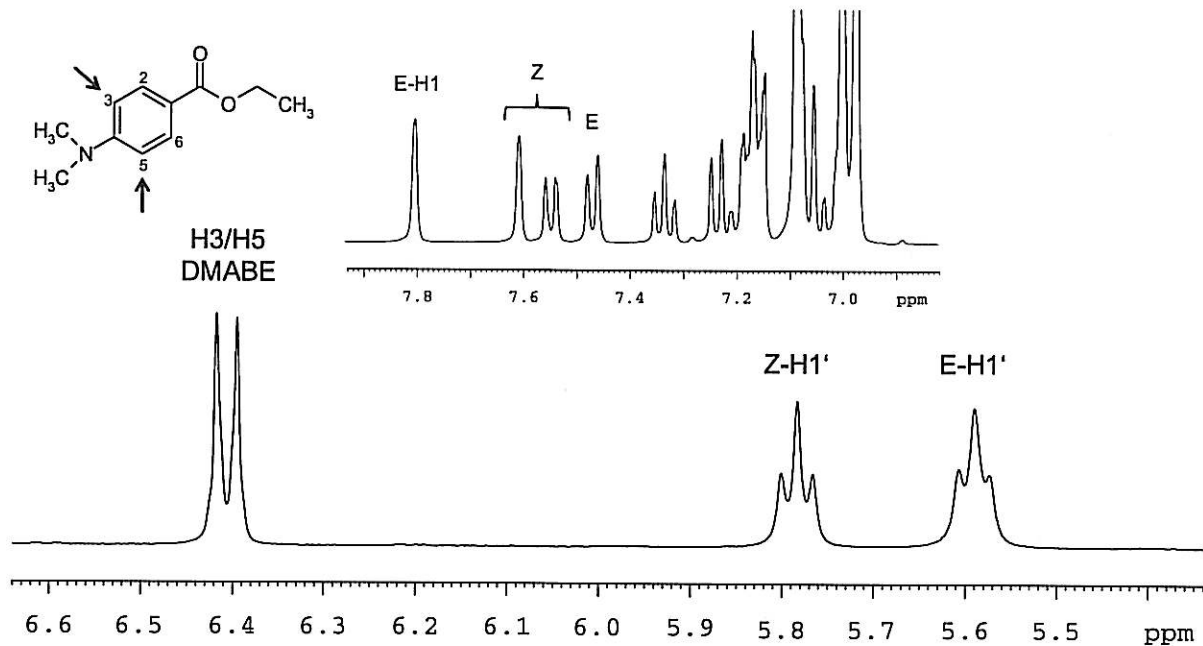


Abbildung 4-24: ¹H-NMR-Teilspektrum von Flupentixoldihydrochlorid mit dem zur Integration herangezogenen Signal des Internen Standards 4-Dimethylaminobenzoesäureethylester (DMABE) (Verhältnis Analyt/Standard 10:1, 400 MHz, Toluol-d₈:CD₃OD 5:1 (v/v)).

Zur Quantifizierung des Isomerengemisches Flupentixol-2HCl wurden sechs bzw. fünf unabhängige Einwaagen des Analyten nach Zusatz des Internen bzw. bei Verwendung des Externen Standards 4-Dimethylaminobenzoesäureethylester (99,6 % (g/g)) mittels Einfachbestimmung am NMR-Spektrometer analysiert. Das Signal-Rausch-Verhältnis der H1'-Resonanz von E-Flupentixol-2HCl liegt mit etwa 400:1 über dem geforderten Grenzwert (Anzahl der Scans=64, Impulsabstand=12,8 s).

4.6.2.3 Quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl mittels ERETIC

Als Kalibriersubstanz für das ERETIC-Signal wurde Maleinsäure verwendet (ca. 10 mg Maleinsäure in 0,7 ml Lösungsmittel). Fünf voneinander unabhängige Einwaagen von ca. 10 mg Analyt in 0,7 ml Lösungsmittel wurden jeweils einmal gemessen und gegen das ERETIC-Signal ausgewertet (Abbildung 4-25).

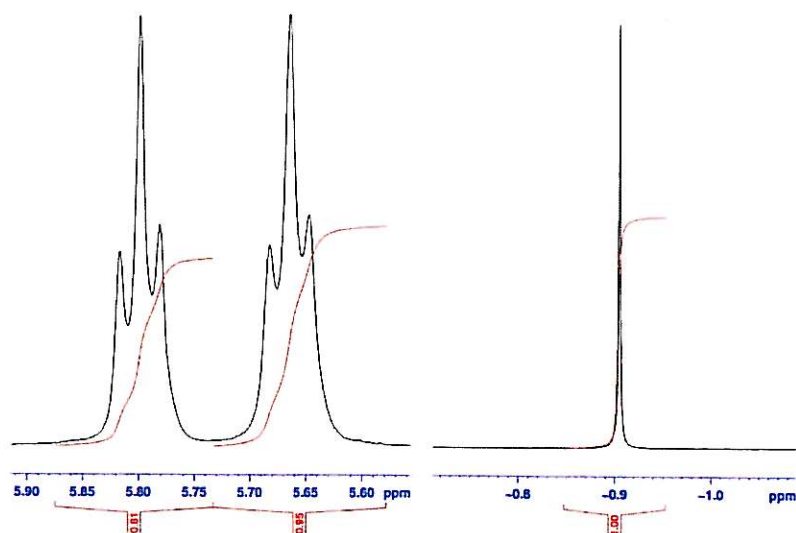


Abbildung 4-25: ^1H -NMR-Spektrenauszüge der relevanten Signale zur Integration.

Die Richtigkeit der Resultate der ERETIC-Messung wurde mittels Interner Standardisierung parallel überprüft. Hierzu wurden fünf unabhängige Einwaagen von je ca. 10 mg Flupentixoldihydrochlorid und 10 mg Maleinsäure als Internem Standard je einmal gemessen.

4.6.3 ^{19}F -NMR-Spektroskopie

Neben der ^1H -NMR-Spektroskopie eignet sich die Detektion von ^{19}F -Kernen aufgrund der natürlichen ^{19}F -Häufigkeit von 100 % und einer nahezu gleichen NMR-Empfindlichkeit ebenfalls zur quantitativen Analyse [28]. Aufgrund der geringen Verbreitung von fluorhaltigen Substanzen spielt die ^{19}F -NMR-Spektroskopie jedoch eine untergeordnete Rolle. Ein großer Vorteil dieser Methode ist ihr wesentlich größerer Verschiebungsbereich von bis zu 1200 ppm im Vergleich zur ^1H -NMR-Spektroskopie. Die ^{19}F -NMR-Spektren sind im Allgemeinen viel einfacher als die entsprechenden Protonenspektren, da nur ^{19}F -Kerne detektiert werden können, die sich in ihren chemischen Verschiebungen meist deutlich unterscheiden; Signalüberlagerungen treten somit selten auf, wodurch eine einfache und genaue Integration ermöglicht wird.

4.6.3.1 Optimierung des Lösungsmittels

In der Literatur wird beschrieben, dass die Konzentration des aktiven Z-Isomers im menschlichen Serum selektiv mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie quantitativ erfasst werden kann; als Lösungsmittel der Wahl wird eine Mischung aus ACN-d_3 und CD_3OD im Verhältnis 2:1 v/v eingesetzt [29].

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die chemischen Verschiebungen der Fluoratome näher zu untersuchen, wurde eine Vielzahl an Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen unterschiedlicher Eigenschaften eingesetzt (Tabelle 4-15).

Tabelle 4-15: Eingesetzte Lösungsmittel für die Signalseparation von Flupentixoldihydrochlorid, sowie dessen Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

Löslichkeit	apolare LM		polare LM	
	aromatisch	nicht-aromatisch	protisch	Aprotisch
gering		CDCl ₃		ACN-d ₃
hoch			D ₂ O CD ₃ OD	DMSO-d ₆

Beim Einsatz von D₂O wird eine Signalseparation der beiden Singulets erzielt (Abbildung 4-26a); die beiden Resonanzen weisen einen Unterschied von etwa 15 Hz in ihren chemischen Verschiebungen auf. Für eine genaue und leicht durchführbare Integration der Signale wäre jedoch eine bessere Trennung von Vorteil.

Eine deutliche Verbesserung der Signaltrennung wird beim Wechsel des Lösungsmittels zu CD₃OD beobachtet (Abbildung 4-26b); hier wird eine vollständige Basislinientrennung von Z- und E-Flupentixol erzielt. Die Differenz der chemischen Verschiebungen beträgt etwa 84 Hz.

Beim Einsatz von aprotischen Lösungsmitteln wie DMSO-d₆ zeigt sich im Vergleich zu Experimenten in D₂O eine deutlich verbesserte Signalseparation, jedoch weisen die beiden Singulets deutliche Unterschiede in Signalform und -höhe auf (Abbildung 4-26c). Während die Resonanz des E-Isomers eine scharfe Signalform zeigt, ist das Z-Signal stark verbreitert. Die Linienbreite des Z-Isomers bei halber Signalamplitude beträgt in DMSO-d₆ 8,6 Hz, während die entsprechende Halbwertsbreite bei Experimenten in D₂O bei 2,3 Hz liegt. Durch den Zusatz geringer Mengen an D₂O beobachtet man eine deutliche Verringerung der Halbwertsbreite des Z-Signals. Experimente in DMSO-D₂O-Gemischen im Verhältnis 7,5:1 (v/v) liefern Fluorsignale mit vergleichbaren Halbwertsbreiten für E- und Z-Flupentixol (Abbildung 4-26c: rotes Spektrum). Bedingt durch den Zusatz an D₂O wird das Z-Signal relativ zur E-Resonanz hochfeld-verschoben.

Ähnliche ¹⁹F-NMR-Spektren erhält man beim Einsatz von ACN-d₃ im Vergleich zu DMSO-D₂O-Lösungsmittelgemischen (Abbildung 4-26d). Aufgrund der geringen Löslichkeit des Analyten in ACN-d₃ werden geringe Mengen an D₂O als Lösungsvermittler zugesetzt.

Beim Einsatz von apolaren Lösungsmitteln wie CDCl₃ wird eine ähnliche Signaltrennung wie in aprotischen Lösungsmitteln mit geringen Mengen an D₂O beobachtet. Jedoch werden hier

zwei zusätzliche Signale geringer Intensität detektiert (Abbildung 4-26e); auch in $^1\text{H-NMR}$ -Experimenten sind in $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ -Lösungsmittelgemischen zusätzliche Signale sichtbar.

Eine optimale Separation der Fluorsignale von Z- und E-Flupentixol-2HCl wird unter Verwendung von CD_3OD erzielt.

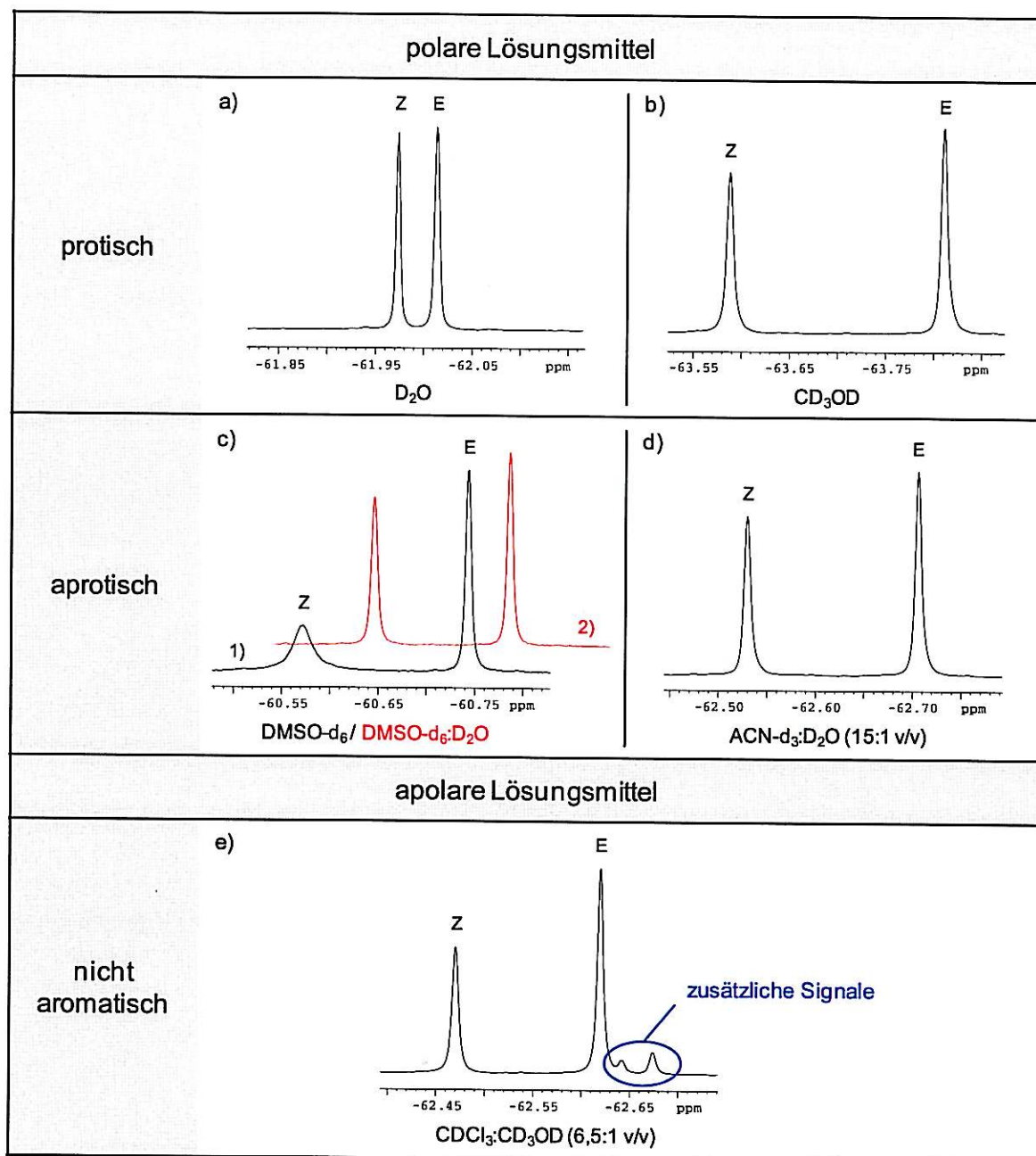


Abbildung 4-26: $^{19}\text{F-NMR}$ -Spektren von Flupentixol-2HCl (400 MHz), geordnet nach Lösungsmitteln unterschiedlicher Eigenschaften: a) D_2O , b) CD_3OD , c) 1) DMSO-d_6 , 2) rot: $\text{DMSO-d}_6:\text{D}_2\text{O}$ 7,5:1 (v/v), d) $\text{ACN-d}_3:\text{D}_2\text{O}$ und e) $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$. Eine optimale Signaltrennung der beiden Isomere wird in CD_3OD erzielt. Beim Einsatz von Lösungsmittelgemischen sind die entsprechenden Mischungsverhältnisse angegeben.

4.6.3.2 Interner Standard

Zur Bestimmung des absoluten Gehalts von Flupentixol-2HCl mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie wird ein Interner Standard definierter Reinheit zugesetzt. In der Literatur werden vor allem Substanzklassen wie aromatische Fluorkohlenwasserstoffe (z. B. 4-Fluortoluol, 4-Trifluormethylbenzaldehyd) oder anorganische fluorhaltige Verbindungen eingesetzt [30]. Diese unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur und ihrem Molekulargewicht häufig von den zu bestimmenden Arzneistoffen und zeigen im wässrigen Milieu meist eine geringe Löslichkeit bzw. aufgrund der sehr großen Verschiebungsbereiche von bis zu 1200 ppm deutliche Unterschiede in ihrer chemischen Verschiebung im Vergleich zur untersuchten Substanz.

Zur Bestimmung des absoluten Gehalts von Flupentixol-2HCl mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie wurden verschiedene Interne Standards ausgewählt und näher untersucht, die folgende Auswahlkriterien erfüllen: die Referenzsubstanz muss vollständig im ausgewählten Lösungsmittel löslich sein, Analyt und Standard sollen ähnliche chemische Verschiebungen und T_1 -Zeiten aufweisen, und die Standardsubstanz soll ein hohes Molekulargewicht aufweisen, um eine direkte Einwaage zu ermöglichen.

Drei strukturell unterschiedliche Arzneistoffe mit ein bzw. zwei Trifluormethylsubstituenten wurden näher untersucht. Das Fluorsignal von Fluphenazindihydrochlorid weist aufgrund seiner hohen strukturellen Ähnlichkeit zum zu untersuchenden Analyt eine ähnliche chemische Verschiebung wie das Signal des E-Isomers auf; eine vollständige Basislinientrennung wird nicht erreicht (Abbildung 4-27). Die Resonanzen von Fluvoxaminmaleat und Flecainidacetat sind relativ zu den Flupentixolsignalen hochfeld-verschoben und vollständig basisliniengetrennt.

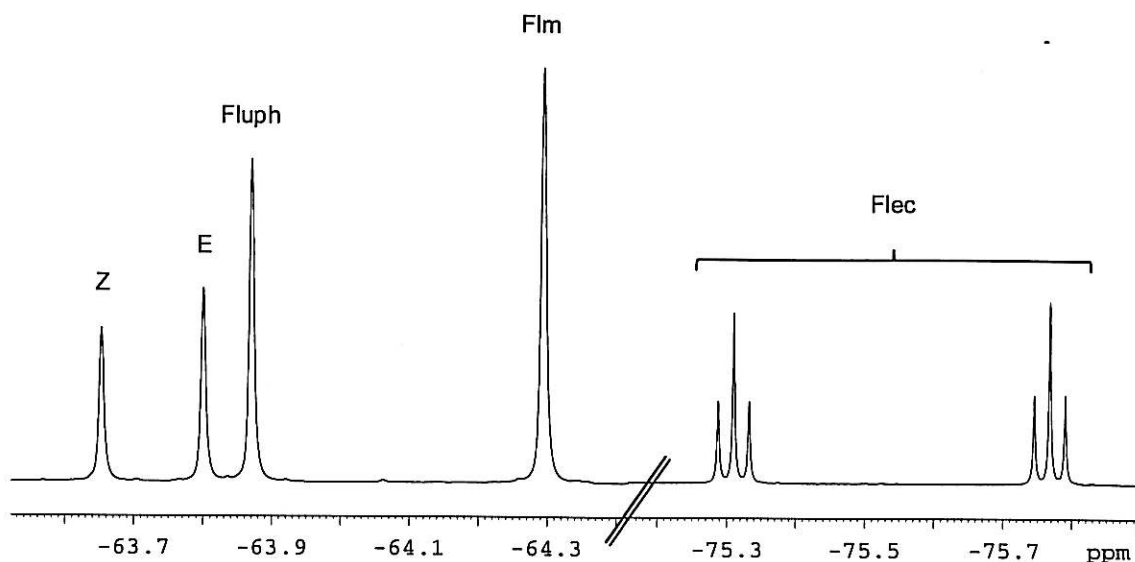


Abbildung 4-27: ^{19}F -NMR-Spektrum von Flupentixol-2HCl mit den drei näher untersuchten Internen Standards Fluphenazin-2HCl (Fluph), Fluvoxaminmaleat (Flm) und Flecainidacetat (Flec) (400 MHz, DD_3OD).

Als geeignete Interne Standards wurden Fluvoxaminmaleat und Flecainidacetat ermittelt. Die Referenzsubstanzen weisen wie der Analyt kurze T_1 -Zeiten auf (Tabelle 4-16). Das Verhältnis von Analyt zu Standard beträgt in beiden Fällen etwa 2:1.

Tabelle 4-16: Auflistung der entsprechenden T_1 -Zeiten der zur Quantifizierung herangezogenen Signale von Flupentixol-2HCl und verschiedener Interner Standards.

Proton Arzneistoff	T_1 -Zeit AS [s]	Protonen Interner Standard	T_1 -Zeit IS [s]
Flupentixol	1,3	Fluvoxaminmaleat	1,3
			1,5
		Flecainidacetat	1,7

4.6.4 Quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl mittels Internem Standard

Zur Quantifizierung des Isomerengemisches Flupentixol-2HCl wurden fünf unabhängige Einwaagen des Analyten nach Zusatz des Internen Standards Fluvoxaminmaleat (99,5 % (g/g)) mittels Einfachbestimmung am NMR-Spektrometer analysiert. Tabelle 4-17 fasst die wichtigsten Messparameter zusammen. Die Anzahl der Scans wurde so gewählt, dass das Signal-Rausch-Verhältnis des Fluor-Signals von Z-Flupentixol-2HCl mindestens 300:1 beträgt; unter diesen Bedingungen liegt die Messunsicherheit der Signalintegration deutlich unter 1 % [22].

Tabelle 4-17: Zusammenstellung der Messparameter für die quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl (Probenkonzentration 4 mg/ml).

Parameter Aufnahme	
Spektrometer, NMR-Messkopf	Bruker Avance 400 MHz Spektrometer, Fluor-Messkopf
Impulswinkel	90°
Datenpunkte	64 K
Anzahl der Scans	32 → S/N (Z) ~ 800:1
Spektrale Breite	30 ppm
Aufnahmezeit (Acquisition time)	5,8 s
Impulsabstand (Repetition time (RT = 5 · T ₁))	9,8 s
Temperatur	300 K

Nach Aufnahme des NMR-Spektrums wurden die Phase sowie die Basislinie manuell korrigiert und die zur Quantifizierung herangezogenen Signale manuell integriert. Der absolute Gehalt von Flupentixol-2HCl wurde mit Hilfe des zugesetzten Internen Standards deklarierten Gehalts ermittelt und die prozentualen Anteile der beiden Isomere mittels Normalisierung bestimmt.

4.6.5 HPLC

4.6.5.1 Arzneibuchanalytik von Flupentixoldihydrochlorid

Zur Gehaltsbestimmung des E/Z-Isomerengemisches Flupentixoldihydrochlorid wird im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) das pharmakologisch aktive Z-Isomer mittels Normalphasenchromatographie quantitativ erfasst [31]. Die mobile Phase besteht aus einer Mischung aus Wasser, konzentrierter Ammoniaklösung R, 2-Propanol und Heptan im Verhältnis 2/4/150/850 (v/v/v/v). Die beiden Isomere werden an einer unmodifizierten Kieselgelphase (250 x 4,0 mm, 5 µm) bei einer Flussrate von 1,5 ml/min getrennt und bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Zur Überprüfung der Systemeignung wird die Referenzlösung mit Flupentixoldihydrochlorid CRS vermessen und die Bedingungen gegebenenfalls so verändert, dass die Auflösung zwischen dem Z-Flupentixol-Peak und dem E-Isomer-Peak mindestens 3,0 beträgt (Abbildung 4-28). Der Gehalt des Z-Isomers wird mit Hilfe des deklarierten Gehalts an Z-Isomer in der Referenzsubstanz bestimmt.

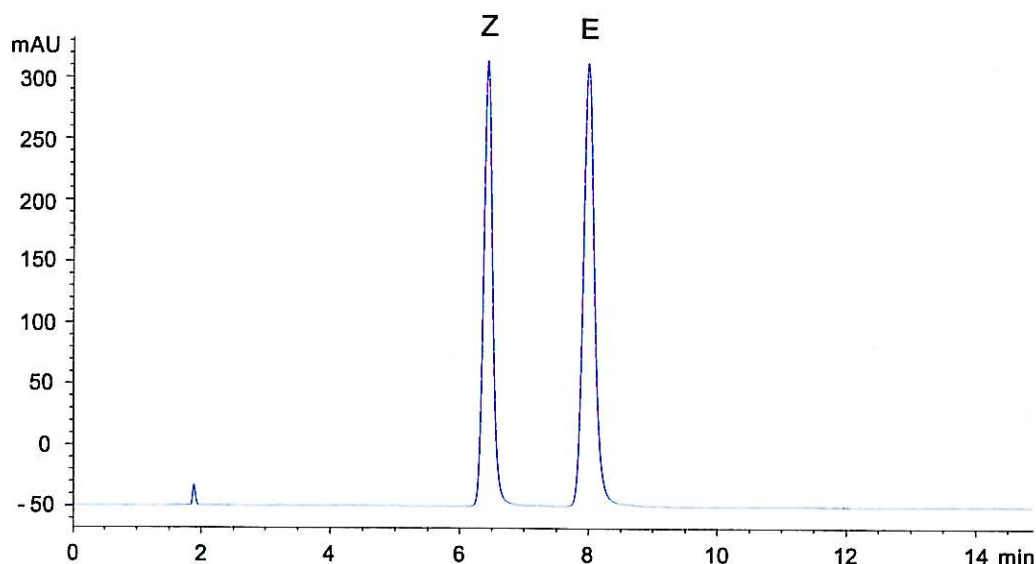


Abbildung 4-28: HPLC-Chromatogramm des E/Z-Isomerengemisches Flupentixoldihydrochlorid nach Ph. Eur. 6.0. HPLC-Bedingungen: Gerät: Agilent HPLC (Serie1200); Säule Betasil Silica-100 (250 x 4,0 mm, 5 µm); mobile Phase: Wasser, konzentrierte Ammoniaklösung R, 2-Propanol und Heptan im Verhältnis 2/4/150/850 (v/v/v/v); Fluss: 1,5 ml/min; Injektion: 20 µl; Detektion: 254 nm; Probenkonzentration: 0,4 mg/ml. Peakzuordnung: Z: Z-Flupentixol-2HCl, E: E-Flupentixol-2HCl.

4.6.5.2 Quantitative Bestimmung von Flupentixol-2HCl mittels HPLC

Zur Quantifizierung von Flupentixoldihydrochlorid wurden sechs unabhängige Einwaagen des Analyten sowie der zertifizierten Referenzsubstanz mittels Dreifachbestimmung an der HPLC nach Ph. Eur. 6.0 analysiert. Das geforderte Systemeignungskriterium wurde erfüllt, so dass eine quantitative Auswertung möglich war (Tabelle 4-18).

Tabelle 4-18: Systemeignungskriterien nach Ph. Eur. 6.0, bestimmt mit einer Referenzlösung aus Flupentixoldihydrochlorid CRS.

Systemeignungskriterium	Vorgabe Ph. Eur. 6.0	ermittelter Wert
Auflösung zwischen E- und Z-Isomer	≥ 3,0	5,6

Die Bestimmung des absoluten Gehalts von Flupentixoldihydrochlorid sowie der beiden Isomere wurde mit Hilfe einer zertifizierten Referenzsubstanz (Flupentixoldihydrochlorid CRS; Z-Isomer 43,6 % (g/g)) mittels Externer Standardisierung bestimmt. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung des Isomerenverhältnisses mittels Normalisierungsverfahren.

4.6.6 Vergleich der Ergebnisse NMR versus HPLC

4.6.6.1 Ergebnisse der absoluten Bestimmungsmethode

Der absolute Gehalt von Flupentixol-2HCl wurde mittels ^1H -NMR-Spektroskopie, ^{19}F -NMR-Spektroskopie sowie HPLC bestimmt. Die Quantifizierung mittels NMR-Spektroskopie erfolgte zum einen durch Zusatz eines Internen Standards; eingesetzt wurden hier zertifizierte Substanzen mit deklariertem Gehalt wie Maleinsäure und 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester für die Bestimmung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und Fluvoxaminmaleat für die quantitative Bestimmung mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie. Zudem wurde der Gehalt mittels Externer Standardisierung unter Verwendung von 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester als ^1H -NMR-Referenzsubstanz sowie des elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) bestimmt. Um eine Aussage über die Richtigkeit der ermittelten Ergebnisse treffen zu können, wurde die Quantifizierung mit einem zweiten, unabhängigen Verfahren, der HPLC, durchgeführt. Eingesetzt wurde hier die Methode der aktuellen Monographie des Ph. Eur. 6.0, die validiert ist und somit als richtig gilt. In Tabelle 4-19 werden die Ergebnisse der Quantifizierung von Flupentixol-2HCl mit NMR-Spektroskopie und HPLC zusammengefasst.

Tabelle 4-19: Zusammenstellung der Ergebnisse mittels ^1H -NMR-Spektroskopie – Interne Standardisierung (IS) mit DMABE bzw. Maleinsäure, Externe Standardisierung (ES) mit DMABE sowie ERETIC – ^{19}F -NMR-Spektroskopie unter Zusatz des Internen Standards Fluvoxaminmaleat (Flm) und HPLC unter Angabe des absoluten Gehalts von Flupentixol-2HCl (MW; in % (g/g)) und der entsprechenden relativen Standardabweichung (RSD; in %). Die Charge wurde an beiden Forschungsstellen mittels Internem Standard analysiert (Universität Würzburg¹ und DKI²).

Flupentixol-2HCl	Z-Flupentixol [%]	E-Flupentixol [%]	Gehalt	
			MW [%]	RSD [%]
^1H -NMR IS DMABE ¹	41,7	49,8	91,5	0,2
^1H -NMR IS Maleinsäure ²	41,7	49,4	91,1	0,3
^1H -NMR ES DMABE	41,5	49,3	90,8	0,5
^1H -NMR ERETIC	42,0	49,4	91,4	0,8
^{19}F -NMR IS Flm	41,8	50,0	91,8	0,3
HPLC	41,2	50,7	91,9	0,2

Flupentixol-2HCl wurde an beiden Forschungsstellen mittels ^1H -NMR-Spektroskopie unter Zusatz eines Internen Standards analysiert, die sich deutlich in der Länge ihrer T_1 -Zeiten voneinander unterscheiden. Während DMABE ähnlich kurze T_1 -Zeiten wie der Analyt aufweist, ist für die Maleinsäure die Relaxationszeit deutlich verlängert. Am vorliegenden Beispiel konnte aufgezeigt werden, dass die Länge der Relaxationszeit T_1 keinen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis hat. Zudem wurde bei der Detektion anderer NMR-aktiver Kerne wie z. B. ^{19}F und anschließender quantitativer Auswertung mittels

Interner Standardisierung eine hohe Übereinstimmung mit den entsprechenden ¹H-NMR-Ergebnissen beobachtet.

Vergleicht man die ermittelten ¹H-NMR-Ergebnisse unter Zugabe eines Internen Standards mit den Ergebnissen der Externen Standardisierung mit DMABE, zeigt sich ebenfalls eine deutliche Übereinstimmung der Messergebnisse beider Methoden.

Am vorliegenden Beispiel konnte aufgezeigt werden, dass die Quantifizierung von Flupentixol-2HCl mittels NMR-Spektroskopie durch den Einsatz von Internen bzw. Externen Standardsubstanzen eine orthogonale Methode zu konventionell eingesetzten Techniken wie HPLC darstellt.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Externen Standardisierung mit Hilfe des elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) innerhalb des geforderten Toleranzbereiches von ± 2 % relativer Abweichung liegen und somit korrekte Werte erhalten werden.

4.6.6.2 Ergebnisse der relativen Bestimmungsmethode

Die NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, durch direkten Vergleich der Signalintensitäten zueinander, den prozentualen Anteil einzelner Komponenten im Arzneistoffgemisch quantitativ zu bestimmen. Am Beispiel von Flupentixol-2HCl soll näher untersucht werden, ob mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens vergleichbare Ergebnisse zwischen NMR-Spektroskopie und konventionellen Verfahren wie HPLC erzielt werden. Dafür wurden die NMR-Spektren sowie die entsprechenden HPLC-Chromatogramme von Flupentixol-2HCl zusätzlich mittels Normalisierung ausgewertet. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 4-20 zusammengefasst.

Tabelle 4-20: Zusammenfassung der Ergebnisse mittels NMR-Spektroskopie und HPLC unter Angabe der prozentualen Anteile der beiden Isomere von Flupentixol-2HCl nach Normalisierung.

Flupentixol-2HCl	Z-Flupentixol-2HCl [%]	E-Flupentixol-2HCl [%]
¹ H-NMR	45,6 ± 0,1	54,4 ± 0,1
¹⁹ F-NMR	45,5 ± 0,2	54,5 ± 0,2
HPLC	44,8 ± 0,1	55,2 ± 0,1

Am vorliegenden Beispiel Flupentixol-2HCl konnte aufgezeigt werden, dass mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens bei der Detektion unterschiedlicher NMR-aktiver Kerne vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Vergleicht man die NMR-Resultate mit den entsprechenden HPLC-Ergebnissen, liefern beide Verfahren ähnliche Werte. Jedoch wird

aufgrund der unsymmetrischen Peakformen von Z- und E-Flupentixol, welche ein ausgeprägtes Tailing zeigen, die Integration der Peaks erschwert.

4.7 Atracuriumbesilat

4.7.1 Struktur

Atracuriumbesilat besitzt pro Tetrahydropapaverin-Einheit zwei chirale Zentren; am Kohlenstoff-Atom in Position 1 sowie am dazu benachbarten Stickstoff. Je nach Lage der sperrigen Substituenten bezüglich der C₁-N-Bindung unterscheidet man drei geometrische Isomere: cis-cis-, cis-trans- sowie trans-trans-Atracuriumbesilat (Abbildung 4-29).

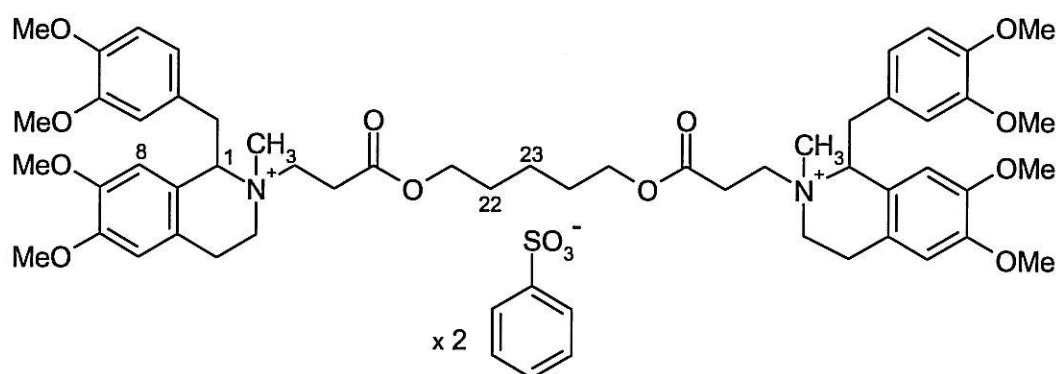


Abbildung 4-29: Chemische Struktur von Atracuriumbesilat.

4.7.2 ¹H-NMR-Spektroskopie

4.7.2.1 Optimierung des Lösungsmittels

In der Literatur ist beschrieben, dass sowohl die ¹H-NMR- als auch die ¹³C-NMR-Spektroskopie eine Bestimmung des cis-trans-Verhältnisses von Atracuriumbesilat erlaubt; die ermittelten Ergebnisse sind mit den entsprechenden der HPLC vergleichbar [32]. Die quantitative Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums erfolgt über die Signale des aromatischen Protons in Position 8; die entsprechenden chemischen Verschiebungen von cis- und trans-Atracuriumbesilat unterscheiden sich deutlich. Im ¹³C-NMR-Spektrum sind die Kohlenstoffsignale der cis- und trans-Komponenten der am quaternären Stickstoff sitzenden Methylgruppe deutlich voneinander separiert. Experimente in CDCl₃ erlauben zudem eine Differenzierung von cis-cis- und cis-trans-Atracuriumbesilat über das cis-Signal des Protons in Position 8; die entsprechenden trans-Resonanzen sind dagegen weniger gut aufgelöst und zeigen eine deutliche Signalüberlagerung. Im Folgenden soll der Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf die Lage der H8-Resonanzen im ¹H-NMR-Spektrum näher aufgezeigt werden.

Erste Messungen in CDCl_3 konnten die in der Literatur aufgezeigten Ergebnisse bezüglich der Signalseparation des Protons in Position 8 sowie die Angaben des geforderten cis-trans-Verhältnisses von etwa 3:1 bestätigen (Abbildung 4-30c).

Atracuriumbesilat ist in Chloroform, Acetonitril, DMSO, Methanol und Wasser vollständig löslich; in Benzol zeigt der Analyt eine geringe Löslichkeit und muss mit geringen Mengen an CDCl_3 als Lösungsvermittler versetzt werden.

Experimente in den polaren Lösungsmitteln DMSO-d_6 , ACN-d_3 , D_2O und CD_3OD zeigen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zwei deutlich voneinander abgetrennte H8-Signale, die den entsprechenden cis- und trans-Komponenten zugeordnet werden können (Abbildung 4-30a); eine Signalseparation der drei Isomere in cis-cis-, cis-trans- und trans-trans-Atracuriumbesilat wird jedoch nicht erreicht. Beim Einsatz von D_2O bzw. $\text{D}_2\text{O-ACN-d}_3$ -Gemischen zeigt sich im aliphatischen Bereich des Spektrums für die Protonen in Position 22 und 23 eine Signalaufspaltung in die drei Einzelisomere; eine vollständige Basislinientrennung der entsprechenden Signale wird jedoch nicht erzielt (nicht gezeigt).

Beim Einsatz von CDCl_3 -Gemischen mit unterschiedlichen Mengen an C_6D_6 kann eine verbesserte Separation der trans-Signale des Protons in Position 8 in die jeweiligen trans-trans- und cis-trans-Isomere erreicht werden. Hohe C_6D_6 -Anteile im Lösungsmittelgemisch ($\text{CDCl}_3:\text{C}_6\text{D}_6$ 1:3 (v/v)) führen zu einer Überlagerung der trans-Resonanzen (Abbildung 4-30b); wird der Anteil an C_6D_6 schrittweise gesenkt, wird das trans-trans-Signal tieffeld-verschoben und eine Separation der beiden trans-Signale erreicht (Abbildung 4-30d). Beim Einsatz von $\text{CDCl}_3\text{-C}_6\text{D}_6$ -Lösungsmittelgemischen im Verhältnis 4:1 (v/v) wird eine Trennung der H8-Signale in cis-cis-, cis-trans- und trans-trans-Atracuriumbesilat erreicht; aufgrund der fehlenden Basislinientrennung ist die Integration jedoch fehlerbehaftet. Ähnliche $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erhält man, wenn C_6D_6 gegen Toluol- d_8 ersetzt wird, jedoch wird auch hier keine Verbesserung der Signalseparation gegenüber $\text{CDCl}_3\text{-C}_6\text{D}_6$ -Gemischen erreicht.

Im Rahmen von Robustheitsmessungen zeigt sich, dass die Konzentration des Analyten vor allem auf die Signalseparation der trans-H8-Resonanzen einen erheblichen Einfluss besitzt; je geringer die Atracuriumbesilat-Konzentration gewählt wird, desto besser sind die beiden Signale getrennt.

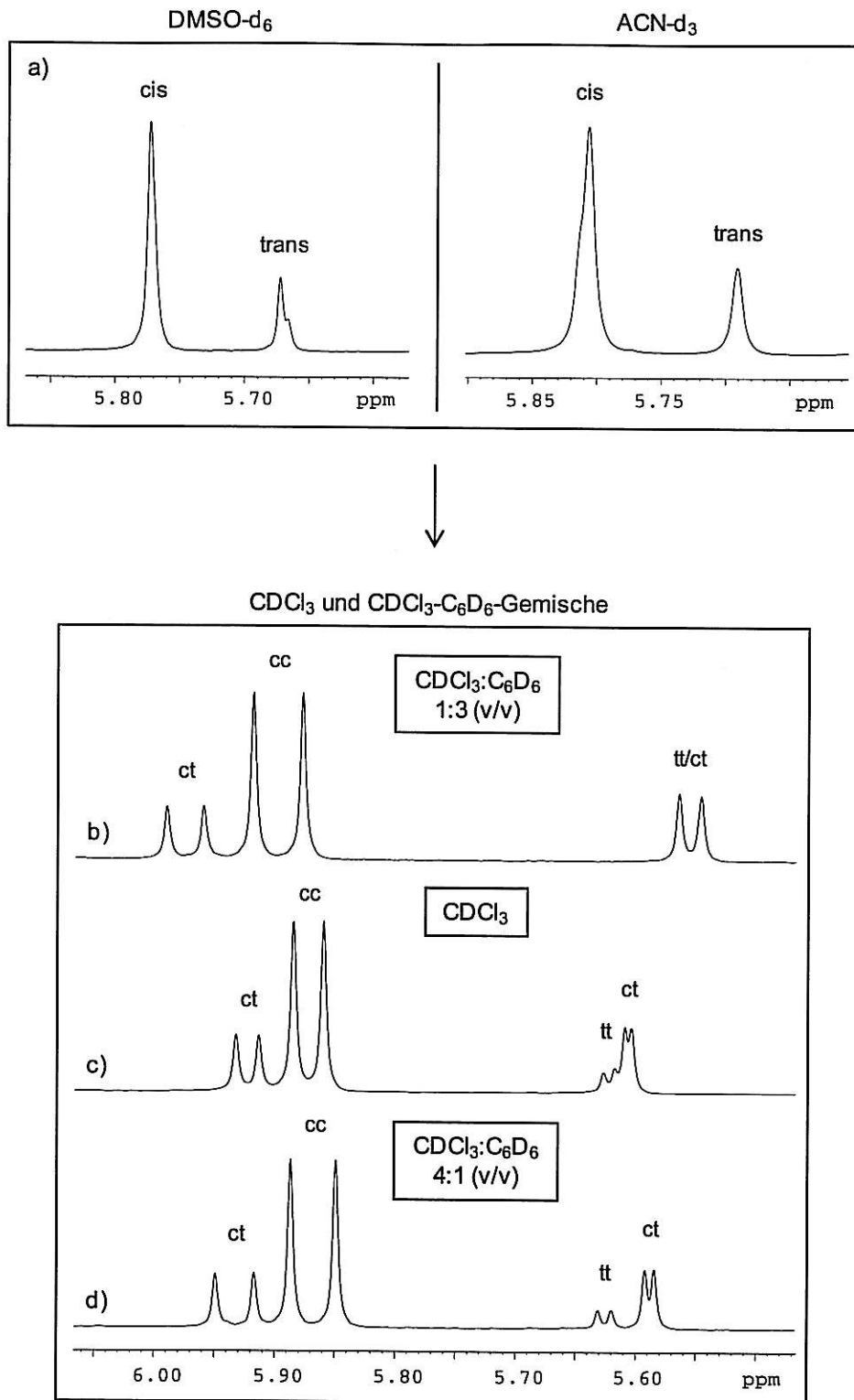


Abbildung 4-30: ¹H-NMR-Teilspektrum der H8-Region von Atracuriumbesilat (400 MHz), geordnet nach verbesserter Signalseparation, für folgende Lösungsmittel: a) DMSO-d₆ (links), ACN-d₃ (rechts), b) CDCl₃:C₆D₆ 1:3 (v/v), c) CDCl₃, d) CDCl₃:C₆D₆ 4:1 (v/v). Eine optimale Signaltrennung wird in CDCl₃:C₆D₆ 4:1 (v/v) erzielt.

4.7.2.2 Quantitative Bestimmung von Atracuriumbesilat mittels Internem und Externem Standard

Zur Bestimmung des absoluten Gehalts von Atracuriumbesilat mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurden verschiedene Interne Standards näher untersucht, die aufgrund ihrer vollständigen Löslichkeit im verwendeten Lösungsmittelgemisch, ihrer Signallage im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und ihrer kurzen T_1 -Zeit für die Quantifizierung geeignet sind. Dabei wurde Thymol als geeigneter Interner Standard ermittelt (Tabelle 4-22).

Tabelle 4-22: Auflistung der entsprechenden T_1 -Zeiten der zur Quantifizierung herangezogenen Signale von Atracuriumbesilat und des Internen Standards Thymol.

Proton Arzneistoff	T_1 -Zeit AS [s]	Protonen Interner Standard	T_1 -Zeit IS [s]
Atracuriumbesilat H8	0,7	Thymol 5-CH ₃	1,9

Das Verhältnis von Analyt zu Standard wird so gewählt, dass die zur Integration herangezogenen Signale ähnliche Intensitäten aufweisen (Abbildung 4-31). Beim Einsatz von Thymol als Interner Standard beträgt das Verhältnis von Analyt zu Standard etwa 20:1.

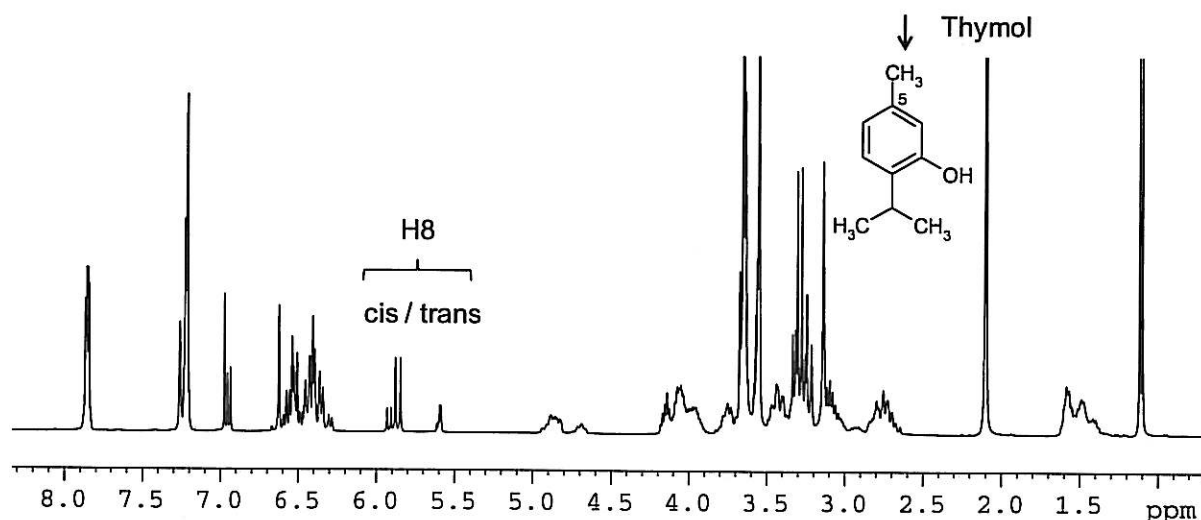


Abbildung 4-31: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Atracuriumbesilat mit Thymol als Internem Standard (Verhältnis Analyt/Standard 20:1, $\text{CDCl}_3:\text{C}_6\text{D}_6$ 4:1 (v/v)). Die zur Integration herangezogenen Signale von Analyt und Standard sind markiert.

Zur Quantifizierung von Atracuriumbesilat wurden drei unabhängige Einwaagen des Analyten nach Zusatz des Internen Standards Thymol (99,9 % (g/g)) bzw. bei Verwendung des Externen Standards Benzoesäure mittels Einfachbestimmung am NMR-Spektrometer analysiert. Das geforderte Signal-Rausch-Verhältnis der H8-Resonanz von trans-trans-Atracuriumbesilat wird nach 128 akkumulierten Einzelerperimenten mit etwa 250:1 erreicht; der Impulsabstand betrug 10,3 s.

4.7.2.3 Quantitative Bestimmung von Atracuriumbesilat mittels ERETIC

Als Kalibriersubstanz für das ERETIC-Signal wurde das ZRM Benzoesäure verwendet (ca. 10 mg ZRM in 0,7 ml Lösungsmittel). Fünf voneinander unabhängige Einwaagen von ca. 10 mg Analyt in 0,7 ml Lösungsmittel wurden jeweils einmal gemessen und gegen das ERETIC-Signal ausgewertet (Abbildung 4-32).

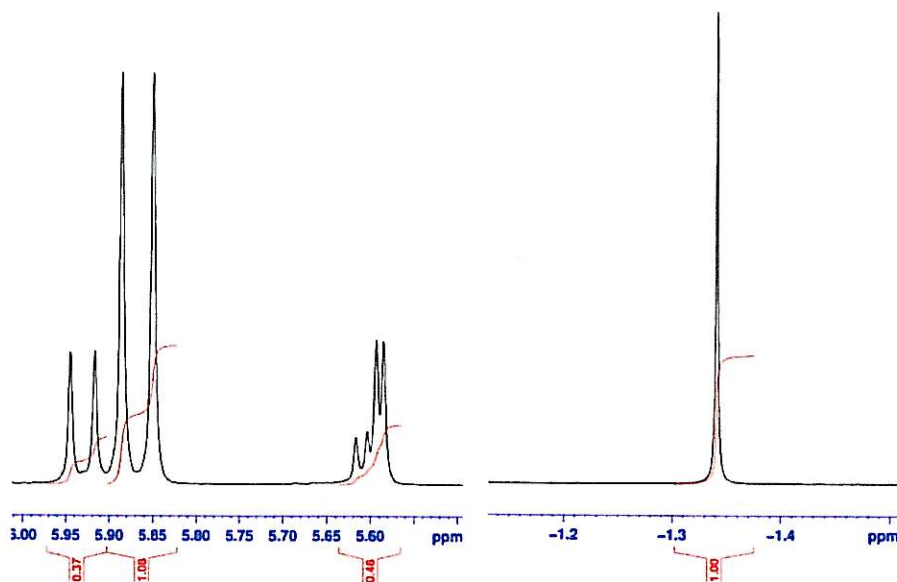


Abbildung 4-32: ¹H-NMR-Spektrenauszüge der relevanten Signale zur Integration.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden fünf unabhängige Einwaagen von je ca. 10 mg Atracuriumbesilat und 10 mg Benzoesäure als Internem Standard je einmal gemessen.

4.7.3 HPLC

4.7.3.1 Arzneibuchanalytik von Atracuriumbesilat

Zur Gehaltsbestimmung des Isomerengemisches Atracuriumbesilat wird sowohl im Europäischen Arzneibuch als auch im Amerikanischen Arzneibuch eine Trennmethode auf octadecylsilyliertem Säulenmaterial unter Gradientenelution vorgeschrieben [33,34]. Die mobile Phase besteht aus einer Mischung aus Methanol, Acetonitril und Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (10,2 g/l), welcher zuvor mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3,1 eingestellt wurde. Die drei Isomere werden mit einer RP18-Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm) bei einer Flussrate von 1 ml/min getrennt, die Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Isomere eluieren in folgender Reihenfolge: trans-trans-Isomer, cis-trans-Isomer und cis-cis-Isomer von Atracuriumbesilat (Abbildung 4-33). Zur Überprüfung der Systemeignung werden die Mindestauflösung zwischen zwei

aufeinanderfolgenden Hauptpeaks von Atracuriumbesilat, sowie die maximale relative Standardabweichung bei wiederholter Injektion der Atracuriumbesilat-Referenzlösung, gefordert. Die Quantifizierung erfolgt mittels Externer Standardisierung unter Verwendung einer Referenzsubstanz.

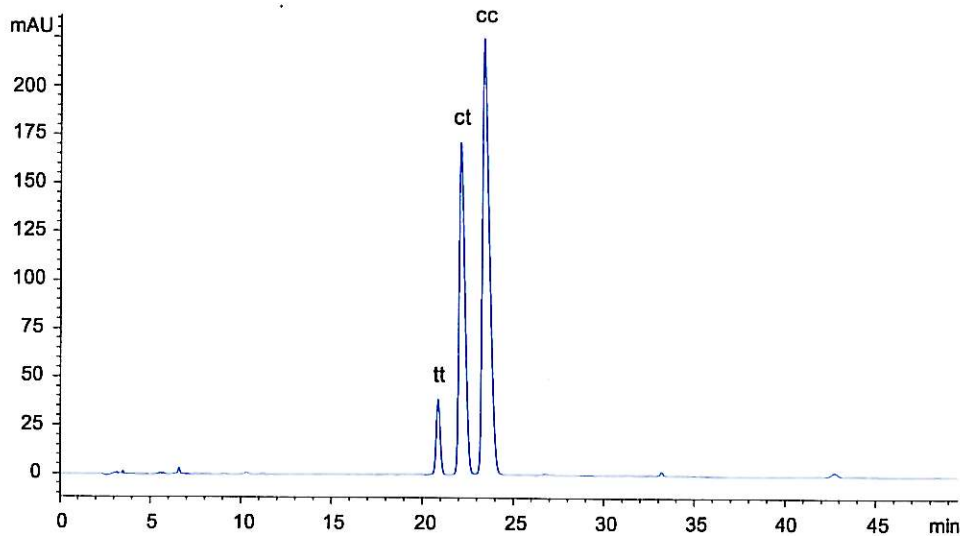


Abbildung 4-33: HPLC-Chromatogramm des Isomergemisches Atracuriumbesilat nach Ph. Eur. 6.0. HPLC-Bedingungen: Gerät: Agilent HPLC (Serie1200); Säule: Hypersil Gold (250 x 4,6 mm, 5 µm); mobile Phase: Methanol, Acetonitril und Kaliumdihydrogenphosphatpuffer (10,2 g/l; eingestellt mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3,1); Gradientenelution, Fluss: 1,0 ml/min; Injektion: 20 µl; Detektion: 280 nm; Probenkonzentration: 1,0 mg/ml. Peakzuordnung: tt: trans-trans-Atracuriumbesilat, ct: cis-trans-Atracuriumbesilat, cc: cis-cis-Atracuriumbesilat.

4.7.3.2 Quantitative Bestimmung von Atracuriumbesilat mittels HPLC

Zur Quantifizierung von Atracuriumbesilat wurden für das Muster von Hexal fünf unabhängige Einwaagen des Analyten und der zertifizierten Referenzsubstanz, sowie für die Atracuriumbesilat-Charge von GSK drei unabhängige Einwaagen mittels Dreifachbestimmung an der HPLC nach der Monographievorschrift des Europäischen Arzneibuches analysiert. Die geforderten Systemeignungskriterien wurden erfüllt, so dass eine quantitative Auswertung möglich war (Tabelle 4-22).

Tabelle 4-22: Systemeignungskriterien nach Ph. Eur. 6.0¹ bzw. USP 31², bestimmt mit einer Referenzlösung von Atracuriumbesilat CRS.

Systemeignungskriterium	Vorgabe Ph. Eur. 6.0 ¹ , USP 31 ²	ermittelter Wert
Auflösung zwischen tt- und ct-Isomer	$\geq 1,5^1$ $\geq 1,1^2$	2,5
Auflösung zwischen ct- und cc-Isomer	$\geq 1,5^1$ $\geq 1,1^2$	1,9
relative Standardabweichung bei wiederholter Injektion	$\leq 2,0\%^2$	0,1 %

Die Bestimmung des absoluten Gehalts von Atracuriumbesilat wurde mit Hilfe einer zertifizierten Referenzsubstanz (Atracuriumbesilat CRS 98,9 % (g/g)) nach Externer Standardisierung bestimmt. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung des Isomerenverhältnisses mittels Normalisierungsverfahren.

4.7.4 Vergleich der Ergebnisse NMR versus HPLC

Der absolute Gehalt von Atracuriumbesilat wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und HPLC bestimmt. Die Quantifizierung mittels NMR-Spektroskopie erfolgte durch den Zusatz von Thymol als Internem Standard. Zudem wurde der Gehalt mittels Externer Standardisierung unter Verwendung von Benzoesäure als Referenzsubstanz sowie des elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) bestimmt. Um eine Aussage über die Richtigkeit der ermittelten Ergebnisse treffen zu können, wurde die Quantifizierung mit einem zweiten, unabhängigen Verfahren, der HPLC, durchgeführt. Eingesetzt wurde hier die Methode der aktuellen Monographie des Europäischen Arzneibuches; diese ist validiert und liefert somit richtige Werte. Tabelle 4-23 fasst die Ergebnisse der Quantifizierung von Atracuriumbesilat mittels NMR-Spektroskopie und HPLC zusammen.

Tabelle 4-23: Zusammenstellung der Ergebnisse mittels ¹H-NMR-Spektroskopie – Interne Standardisierung (IS) mit Thymol, Externe Standardisierung (ES) mit Benzoesäure sowie ERETIC – und HPLC unter Angabe des absoluten Gehalts Atracuriumbesilat (MW; in % (g/g)) und der entsprechenden relativen Standardabweichung (RSD; in %). Zusätzlich wurden die prozentualen Anteile der Isomere mittels Normalisierung bestimmt.

Muster GSK	cis-cis [%]	cis-trans [%]	trans-trans [%]	Gehalt	
				MW [%]	RSD [%]
IS Thymol	52,2	34,8	6,5	93,5	0,2
ES	52,4	36,2	6,0	94,6	
ERETIC	51,6	35,6	5,9	93,1	
HPLC	53,7	34,0	5,5	93,2	0,3
Normalisierung IS	55,8	37,2	7,0		
Normalisierung ES	55,4	38,2	6,3		
Normalisierung HPLC	57,6	36,5	5,9		

Die verschiedenen Bestimmungsmethoden liefern vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Gesamtgehalts von Atracuriumbesilat; es sind jedoch starke Schwankungen im Gehalt der Einzelkomponenten erkennbar. Die Abweichungen der ¹H-NMR-Ergebnisse im Vergleich zu den HPLC-Referenzwerten beruhen vor allem auf der unvollständigen Signalseparation der Protonen in Position 8. Die HPLC-Experimente erfüllen dagegen die geforderten Systemeignungskriterien und gelten somit als valide. Messungen an Spektrometern unterschiedlicher Feldstärke (400, 500 und 600 MHz) zeigten, dass die Intensitäten eines

definierten Signals bei der Untersuchung derselben Atracuriumbesilatprobe bei gleichen Integrationsbereichen aufgrund unterschiedlich starker Signalüberlagerungen deutliche Unterschiede im Integral aufweisen (Abbildung 4-34).

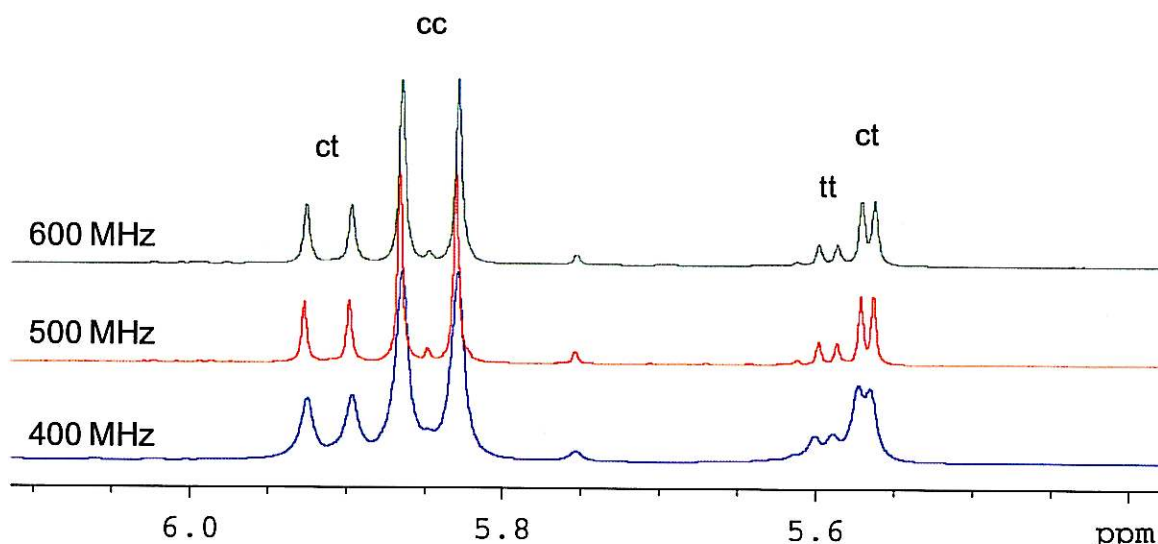


Abbildung 4-34: ^1H -NMR-Teilspektren der H8-Region von Atracuriumbesilat, aufgenommen an NMR-Spektrometern unterschiedlicher Feldstärke.

Eine quantitative Analyse hinsichtlich der Zusammensetzung von Atracuriumbesilat mittels Normalisierung ist aufgrund der unvollständigen Signalseparation nicht geeignet; die NMR-Ergebnisse zeigen sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den HPLC-Ergebnissen deutliche Abweichungen.

Bei der Bestimmung des Gehalts von Atracuriumbesilat wird die Gesamtfläche der einzelnen Signale in Relation zum entsprechenden Signal des Internen Standards bzw. des elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) gesetzt. Eine unvollständige Trennung der Signale in Position 8 beeinflusst somit das Ergebnis des Gesamtgehalts von Atracuriumbesilat nicht. Eine quantitative Aussage bezüglich des Gehalts des Analyts kann mittels NMR-Spektroskopie nach Zusatz eines Internen Standards bekannter Reinheit und mittels Externer Standardisierung mit Hilfe des elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) getroffen werden; die Ergebnisse beider NMR-Verfahren liegen innerhalb des geforderten Toleranzbereiches im Vergleich zu den entsprechenden HPLC-Resultaten und liefern somit korrekte Werte.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Übertragung des an Modellsystemen evaluierten Verfahrens der Anwendung der ERETIC-Technik auf die hier untersuchten realen Arzneistoffe erfolgreich verlief. QNMR-Messungen mittels Internem oder Externem Standard

sowie mittels ERETIC liefern übereinstimmende Ergebnisse. Die Richtigkeit der Resultate wurde zusätzlich durch die Ergebnisse von validierten HPLC-Verfahren bestätigt. Die von der pharmazeutischen Analytik geforderte maximale Messunsicherheit von $\pm 2\%$ konnte bei allen Varianten der qNMR eingehalten werden.

Am Beispiel von Codergocrinmesilat wurden Leitfäden (im Sinne von Standardarbeitsanweisungen) erarbeitet für quantitative NMR-Analysen mittels Internem Standard sowie bei Anwendung der ERETIC-Technik (siehe Anhang).

5 Heparin-Natrium

Ende 2007 traten in Amerika nach intravenöser Gabe von unfraktioniertem Heparin schwerwiegende Nebenwirkung bei über 800 Patienten auf. Ausgelöst waren diese durch Heparin, welches mit übersulfatiertem Chondroitinsulfat verunreinigt war [35]. Diese Verunreinigung konnte mit den Nachweismethoden der damals aktuellen Monographie des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 5.0) nicht erfasst werden [36]. Durch den Einsatz der NMR-Spektroskopie und Kapillarelektrophorese (CE) gelang es, OSCS sowie weitere natürlich vorkommende Verunreinigungen wie Dermatansulfat und Chondroitinsulfat A/C qualitativ bzw. quantitativ in Heparin zu erfassen. Im Rahmen der Identitätsprüfung von niedermolekularen Heparinen wie beispielsweise Enoxaparin-Natrium schreibt das Europäische Arzneibuch bereits die Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie vor [37]; hier erfolgt ein visueller Vergleich des ^{13}C -NMR-Spektrums der zu untersuchenden Heparin-Probe mit dem entsprechenden CRS-Spektrum. Zusätzlich ist eine Unterscheidung der verschiedenen Niedermolekularen Heparin mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie möglich.

5.1 Struktur

Heparin und mögliche Verunreinigungen wie übersulfatiertes Chondroitinsulfat (OSCS), Dermatansulfat (DS) und Chondroitinsulfat A/C (CS A/C) gehören zur Gruppe der sulfatierten Glucosaminglycane. Die Polysaccharide weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf; sie unterscheiden sich einzig in der Zusammensetzung der Disaccharid-Einheiten und in ihrem Sulfatierungsgrad (Abbildung 5-1).

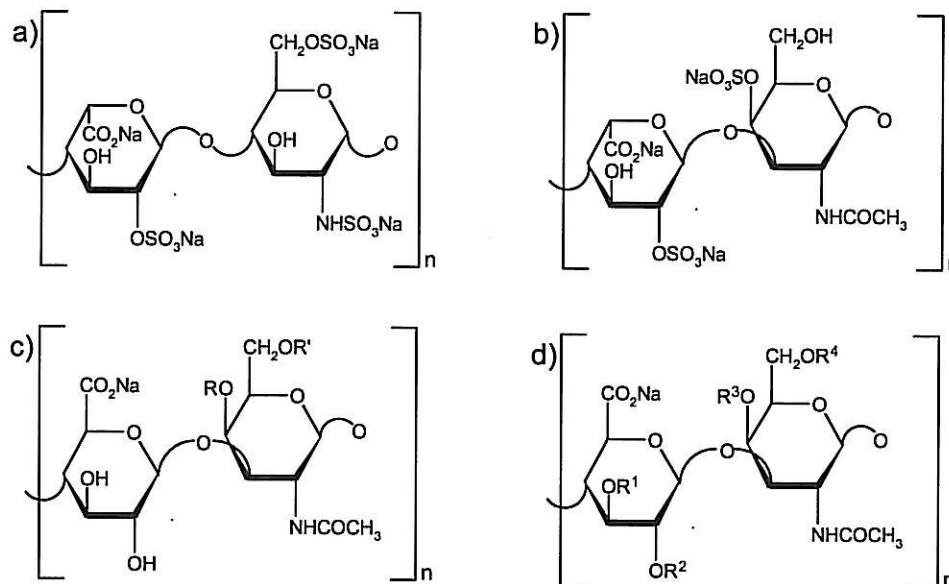


Abbildung 5-1: Chemische Struktur von Heparin (a), Dermatansulfat (b), Chondroitinsulfat A/C (c) und OSCS (d). Für Chondroitinsulfat A ist der Rest R sulfatiert, für Chondroitinsulfat C ist R' sulfatiert. Für OSCS steht R¹-R⁴ stellvertretend für die NaSO₃-Reste.

5.2 Charakterisierung der untersuchten Heparin-Chargen

Im Rahmen der Heparin-Untersuchungen wurden insgesamt 208 Chargen Heparin-Natrium verschiedener Hersteller und Lieferanten des internationalen Marktes mittels ¹H-NMR-Spektroskopie [38], Kapillarelektrophorese [39,40] und HPLC [41] im Hinblick auf ihr Verunreinigungsprofil näher analysiert. Alle Verfahren ermöglichen eine Einteilung der untersuchten Chargen in die folgenden vier Hauptgruppen:

- reines Heparin
- Heparin + Dermatansulfat
- Heparin + übersulfatiertes Chondroitinsulfat
- Heparin + übersulfatiertes Chondroitinsulfat + Dermatansulfat.

Die Kontamination der verunreinigten Heparin-Proben variiert stark zwischen sehr geringen Mengen an OSCS bzw. DS von deutlich unter 1 % bis hin zu einem hohen

Verunreinigungsanteil von etwa 25 %. Eine Detektion der natürlich vorkommenden Verunreinigung CS A/C in den untersuchten Chargen wurde nicht beobachtet. In Tabelle 5-1 ist die Klassifizierung der Heparin-Chargen zusammengefasst.

Tabelle 5-1: Einteilung der untersuchten Heparin-Chargen nach Analyse mittels CE, HPLC und ¹H-NMR-Spektroskopie.

	¹ H-NMR	CE [39]	CE [40]	HPLC
Heparin sauber	90	66	30	32
Hep + DS	87	60	52	53
Hep + OSCS	6	4	4	5
Hep + OSCS + DS	25	11	17	13
Heparin-Chargen	208	141	103	103

Die Einteilung der untersuchten Heparin-Chargen in die vier Hauptgruppen zeigt für alle Verfahren eine deutliche Übereinstimmung. Aufgrund der starken Peaküberlagerungen in der von der FDA beschriebenen CE-Methode [39] können jedoch geringe Mengen an OSCS oder DS nicht erfasst werden; Experimente mittels ¹H-NMR-Spektroskopie, HPLC und CE [40] ermöglichen aufgrund einer verbesserten Signal- bzw. Peakseparation einen Nachweis von etwa 0,1 % OSCS, zudem liegt die Detektionsgrenze für DS deutlich unter 1 %.

Abbildung 5-2 zeigt für jede der vier Hauptgruppen ein repräsentatives ¹H-NMR-Spektrum, Chromatogramm und Elektropherogramm. Zur Charakterisierung der Heparin-Chargen mittels ¹H-NMR-Spektroskopie wurde die N-Acetyl-Region herangezogen.

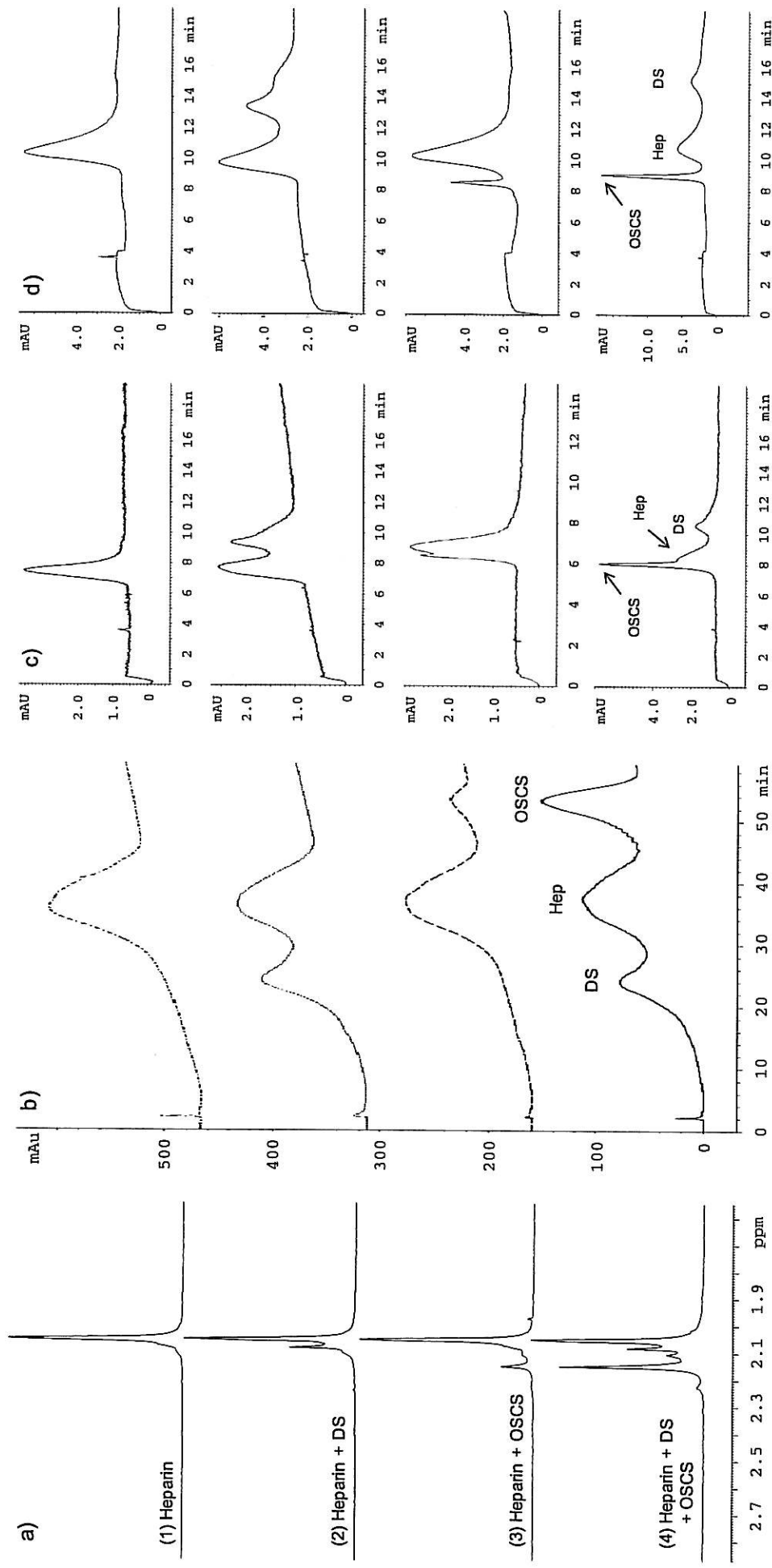


Abbildung 5-2: Repräsentative $^1\text{H-NMR}$ -Teilspektren der N-Acetyl-Region (a), HPLC-Chromatogramme (b) und CE-Elektropherogramme ((c): FDA-Methode [39], (d): optimierte CE-Methode [40]) der untersuchten Heparin-Chargen.

5.3 $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$

5.3.1 Signalzuordnung

Der Identitätsnachweis von Heparin und möglichen Verunreinigungen wie OSCS, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat A/C ist aufgrund der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen des N-Acetyl-Signals möglich [38]. Die entsprechenden Signale können im $^1\text{H-NMR-Spektrum}$ bei 2,04 ppm (CS A/C), 2,05 ppm (Heparin), 2,08 ppm (DS) sowie 2,15 ppm (OSCS) detektiert werden (Abbildung 5-3).

Der Fingerprint-Bereich ist durch starke Signalüberlagerungen gekennzeichnet; in stark kontaminierten Heparin-Chargen ist eine Identifizierung von OSCS und DS ebenfalls über entsprechende Signale im Fingerprint möglich.

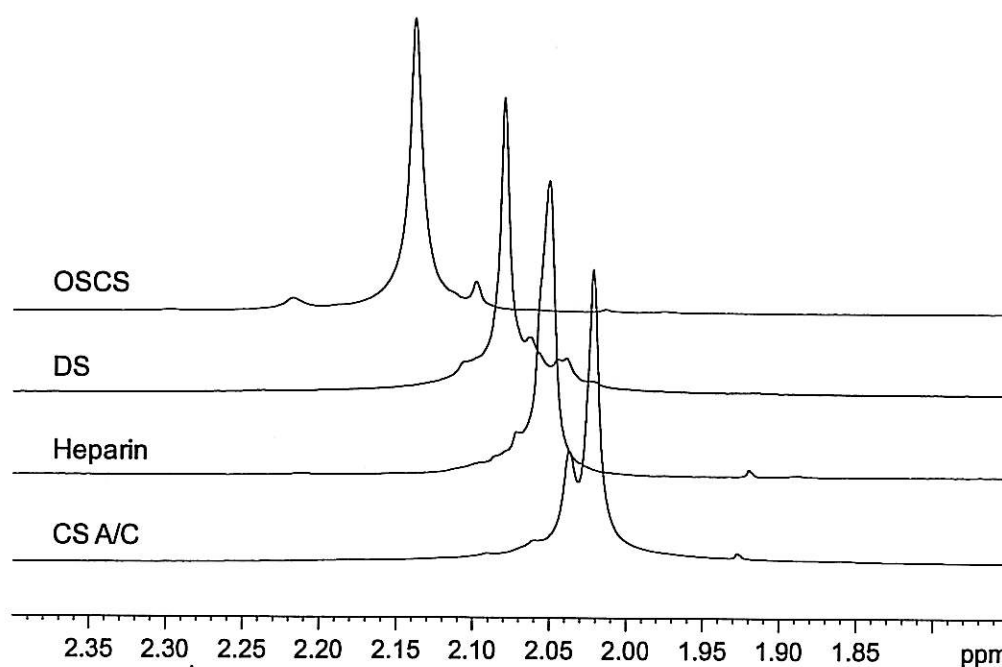


Abbildung 5-3: $^1\text{H-NMR-Teilspektren}$ der N-Acetyl-Region von Heparin und seinen möglichen Verunreinigungen (400 MHz, D_2O , 315 K).

5.3.2 Quantitative Bestimmung von OSCS mittels $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$

Wie bereits erwähnt ist eine quantitative Analyse von Arzneistoffen mittels NMR-Spektroskopie durch einen direkten Vergleich von Signalintensitäten möglich. Eine quantitative Auswertung nach dem Normalisierungsverfahren erfordert einzig die Kenntnis der zur Resonanzlinie beitragenden Kernanzahl. Durch Zusatz eines Internen Standards bekannter Reinheit oder mittels Externer Standardisierung kann durch den Bezug auf eine Referenzsubstanz eine absolute Messgröße wie beispielsweise der Gehalt ermittelt werden. Neben Signalintensität, Kernanzahl, Reinheit des Standards und Einwaage von Analyt und Standard muss das Molekulargewicht der untersuchten Verbindung bekannt sein [9].

Heparin ist ein komplexes Gemisch aus polyanionischen Disacchariden mit einer großen Streuung in der molekularen Masse in Abhängigkeit von Herkunft und Gewinnung. Neben der stark variierenden Kettenlänge zeigen sich deutliche Unterschiede in der Disaccharidverteilung und dem Sulfatierungsgrads pro Tetrasaccharideinheit. Eine quantitative Bestimmung von komplexen Naturstoffen wie beispielsweise Heparin erschwert bzw. limitiert den Einsatz der NMR-Spektroskopie mittels Interner und Externer Standardisierung.

Im Folgenden werden verschiedene Möglichkeiten aufgezeigt, um den Gehalt an OSCS in Heparin mittels NMR-Spektroskopie zu bestimmen.

Für eine quantitative Analyse wird das N-Acetylsignal von Heparin und OSCS berücksichtigt (Abbildung 5-4). Die Bestimmung von OSCS in Heparin kann mittels ^1H -NMR-Spektroskopie durch Vergleich von Signalintensitäten (5.3.2.1) bzw. Signalhöhen (5.3.2.2) durchgeführt werden [42].

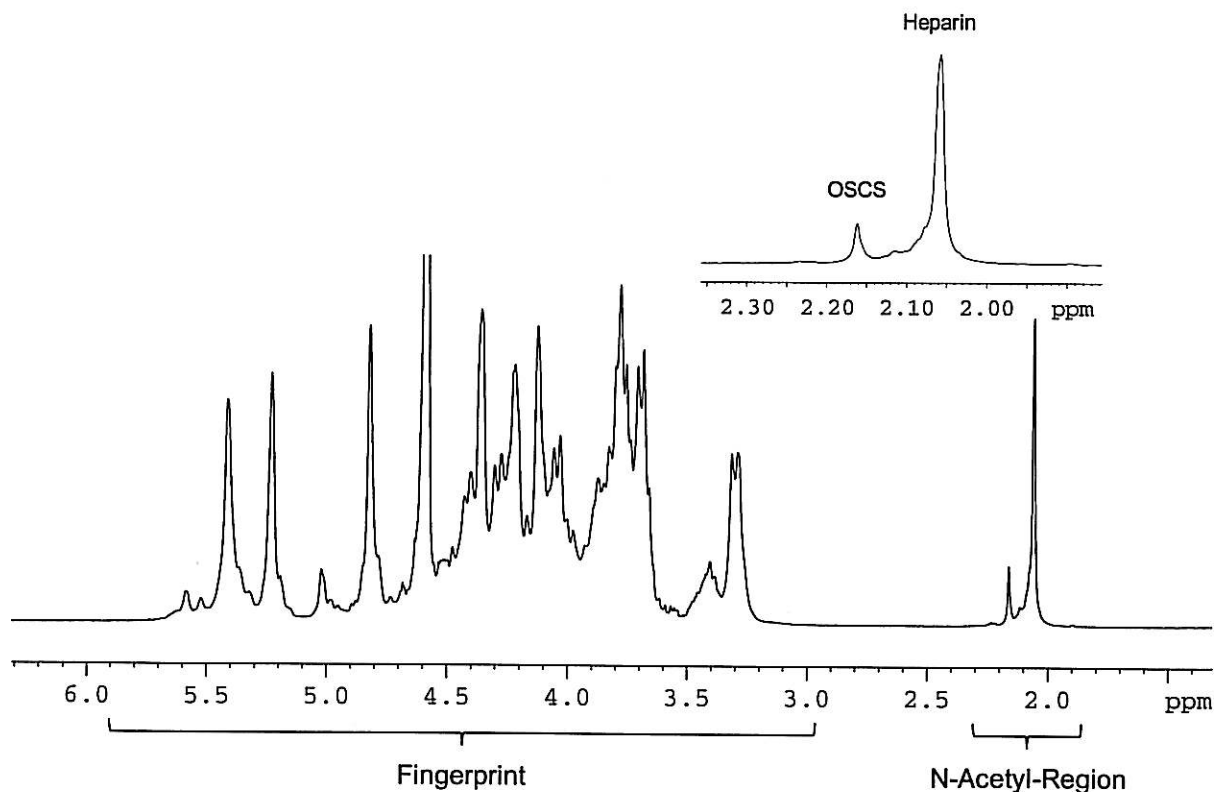


Abbildung 5-4: ^1H -NMR-Spektrum von OSCS verunreinigtem Heparin (400 MHz, 315 K, D_2O).

Weitere Verunreinigungen wie beispielsweise Acetat oder Restlösungsmittel wie Ethanol und Aceton werden bei dieser Bestimmungsmethode nicht berücksichtigt. Eine weitere Möglichkeit für eine quantitative Erfassung der Kontaminante OSCS kann durch Standard-Addition erfolgen. Bei diesem zeitintensivem Verfahren werden unterschiedliche

Konzentrationen OSCS-Reinsubstanz zur untersuchten Heparinprobe gespielt und mittels Linearer Regression der anfängliche Gehalt an OSCS bestimmt [38].

5.3.2.1 Quantitative Bestimmung von OSCS mittels Signalintegration

Zur quantitativen Bestimmung von OSCS in Heparin werden die Signalintensitäten der N-Acetylsignale von Analyt und Kontaminante [42] mittels manueller Integration ermittelt und im ersten Schritt über das Normalisierungsverfahren die Flächenprozentage an OSCS bestimmt. Da in Heparin im Vergleich zu OSCS durchschnittlich nur jeder fünfte Stickstoff acetyliert ist, wird zur Bestimmung der Molprozent (X) von OSCS der zuvor ermittelte Wert (Flächenprozentage) mit dem Faktor 5 korrigiert. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichts der verschiedenen Disaccharid-Einheiten von OSCS (809 g/mol) und Heparin (637 g/mol) können mittels unten aufgeführter Formel die Gewichtsprozentage von OSCS in Heparin quantitativ erfasst werden:

$$OSCS (\%) = \frac{X \cdot 809}{(X \cdot 809) + (100 - X) \cdot 637} \cdot 100 \quad (10)$$

Zur Quantifizierung von OSCS in Heparin wurden sechs unabhängige Einwaagen des Analyten mittels Einfachbestimmung am NMR-Spektrometer analysiert. Tabelle 5-2 fasst die wichtigsten Messparameter zusammen. Die Anzahl der Scans wurde so gewählt, dass das Signal-Rausch-Verhältnis der N-Acetyl-Resonanz von Heparin mindestens 1000:1 beträgt; somit ist eine Detektion von bis zu 0,1 % OSCS in Heparin möglich [38].

Tabelle 5-2: Zusammenstellung der Messparameter für die quantitative Bestimmung von Heparin (Probenkonzentration 40 mg/700 µl).

Parameter	
Spektrometer, NMR-Messkopf	Bruker Avance 400 MHz Spektrometer, BBO-Messkopf
Impulswinkel	90°
Datenpunkte	64 K
Anzahl der Scans	32 → S/N (Heparin CH ₃) ~ 1200:1
Spektrale Breite	16 ppm
Aufnahmezeit (Acquisition time)	5,1 s
Impulsabstand (Repetition time (RT = 5 · T ₁))	10,0 s
Temperatur	300 K

Nach Korrektur von Phase und Basislinie wurden die beiden N-Acetylsignale von OSCS (2,15 ppm \pm 0,02 ppm) und Heparin (2,05 ppm \pm 0,01 ppm) manuell integriert und der Gehalt an OSCS nach oben beschriebener Formel bestimmt.

5.3.2.2 Quantitative Bestimmung von OSCS mittels Signalhöhen

Zur quantitativen Bestimmung von OSCS in Heparin werden die Signalhöhen der beiden N-Acetyl-Signale ermittelt, um anschließend das Verhältnis der Signalhöhen zu bestimmen [42]. Für die Höhenbestimmung wird für beide Signale von einer gemeinsamen Basislinie ausgegangen. Aufgrund des unterschiedlichen Acetylierungsgrades am Stickstoff von Heparin und OSCS sowie einer unvollständigen Signalseparation muss das ermittelte Signalhöhenverhältnis mit einem Response Faktor (RF) von 0,047 korrigiert werden [42]. Dieser Faktor wurde zuvor mit Hilfe eines Spike-Experimentes von OSCS zu einer reinen Heparinprobe ermittelt. Der Gehalt an OSCS in Heparin wird nach folgender Formel bestimmt:

$$OSCS (\%) = \frac{\text{Höhe OSCS}}{\text{Höhe Heparin} \cdot RF} \quad (11)$$

Zur Quantifizierung von OSCS in Heparin werden die Signalhöhen der N-Acetyl-Resonanzen von Heparin und OSCS bestimmt und der Gehalt an OSCS nach oben beschriebener Formel ermittelt.

5.3.2.3 Quantitative Bestimmung von OSCS mittels Internem Standard

Aufgrund des geringen Anteils an OSCS in Heparin wurde eine Nicotinamid-Stammlösung (4,16 mg Nicotinamid in 1657,60 mg D₂O) hergestellt. Fünf unabhängige Einwaagen zu je ca. 10 mg Heparin und ca. 90 mg Nicotinamid-Stammlösung (Interner Standard) wurden in je 0,7 ml D₂O gelöst und homogenisiert. Einfachmessungen mittels optimierter Parameter (Impulsabstand = 60 s, Aufnahmezeit = 5 s, Spektrale Breite = 16 ppm, Datenpunkte = 64 k, Anzahl der Scans = 1440) wurden zur Auswertung des OSCS-Gehalts herangezogen. Die Basislinie des OSCS-Signals bei 2,15 ppm, welches auf der Flanke des Heparin-Signals sitzt, wurde sorgfältig korrigiert. Die für die Auswertung relevanten Bereiche des so erhaltenen ¹H-NMR-Spektrums sind ausschnittsweise in Abbildung 5-5 dargestellt.

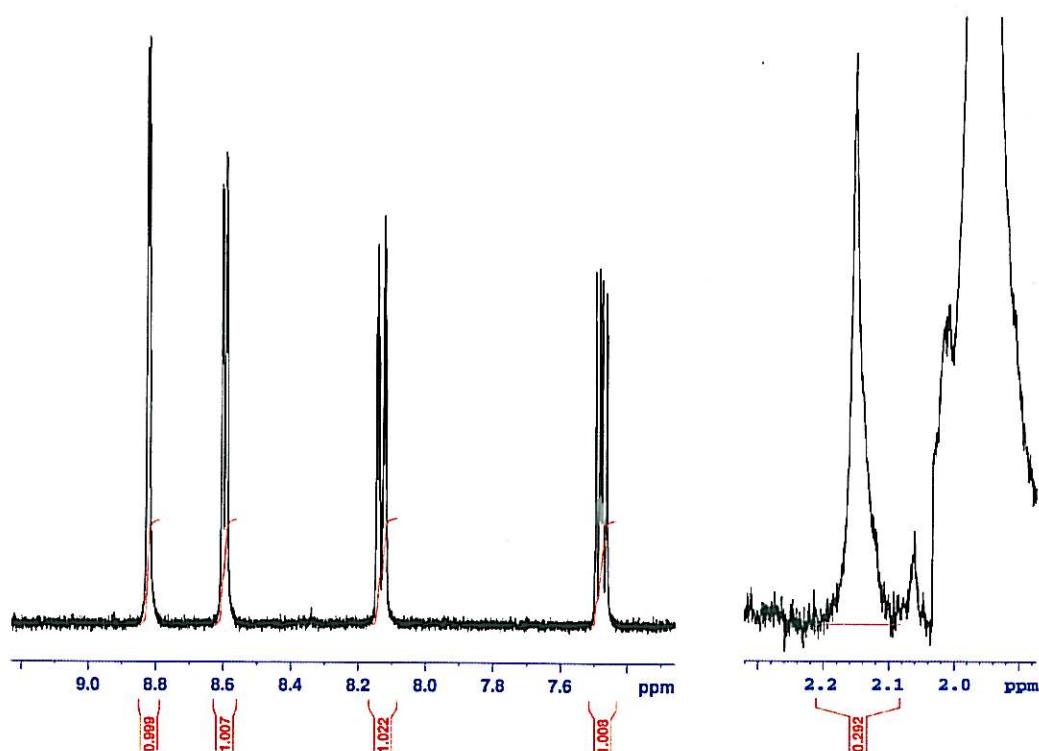


Abbildung 5-5: Für die quantitative Auswertung relevanten Ausschnitte des ^1H -NMR-Spektrums von Heparin mit OSCS.

5.4 Kapillarelektrophorese

Der Einsatz der Kapillarelektrophorese (CE) im Rahmen der Reinheitsuntersuchung von Heparin bietet aufgrund des unterschiedlichen Ladungs-zu-Größen-Verhältnisses eine weitere Möglichkeit, verwandte Substanzen wie OSCS und DS qualitativ bzw. quantitativ zu erfassen. Im vierten Nachtrag des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur. 6.0) wurde die Reinheitsprüfung von Heparin u. a. durch kapillarelektrophoretische Untersuchungen ergänzt [43]; eingesetzt wurde hier eine von der FDA vorgeschlagene CE-Methode, die eine Unterscheidung zwischen Heparin und möglichen Verunreinigungen wie OSCS und DS erlaubt [44]. Die Trennung der polyanionischen Substanzen erfolgt in einer Quarzkapillare, die einen Innendurchmesser von $50\ \mu\text{m}$, eine Gesamtlänge von $64,5\ \text{cm}$ und eine effektive Länge von $56\ \text{cm}$ aufweist. Der Hintergrundelektrolyt besteht aus $36\ \text{mM}$ Natriumdihydrogenphosphatpuffer, der zuvor mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von $3,5$ eingestellt wurde. Zur Herstellung der Probelösung werden etwa $10\ \text{mg}$ Heparin in $1\ \text{ml}$ Milli-Q-Wasser gelöst, mittels eines Celluloseacetat-Membranfilters ($0,22\ \mu\text{m}$) filtriert und unter hydrodynamischer Injektion bei einem Druck von $50\ \text{mbar}$ über eine Zeitspanne von $10\ \text{s}$ injiziert. Die Trennung der Polysaccharide erfolgt bei einer Temperatur von $25\ ^\circ\text{C}$, die

Detektion bei einer Wellenlänge von 200 nm. Die Migration der beiden Komponenten erfolgt in folgender Reihenfolge: OSCS, Heparin (Abbildung 5-6). Zwischen zwei CE-Läufen wird die Kapillare zuerst für zwei Minuten mit Milli-Q-Wasser und anschließend für zwei Minuten mit Trennpuffer gespült. Eine quantitative Auswertung der Elektropherogramme ist aufgrund der starken Peaküberlagerungen nicht möglich; die von der FDA beschriebene CE-Methode dient einzig als schnell durchzuführendes Screeningverfahren, welches eine Unterscheidung zwischen nicht-kontaminiertem und kontaminiertem Material erlaubt. OSCS-Peaks geringer Konzentration werden jedoch vom breiten Heparinpeak überdeckt und somit nicht erfasst. Eine Quantifizierung ist damit nicht möglich.

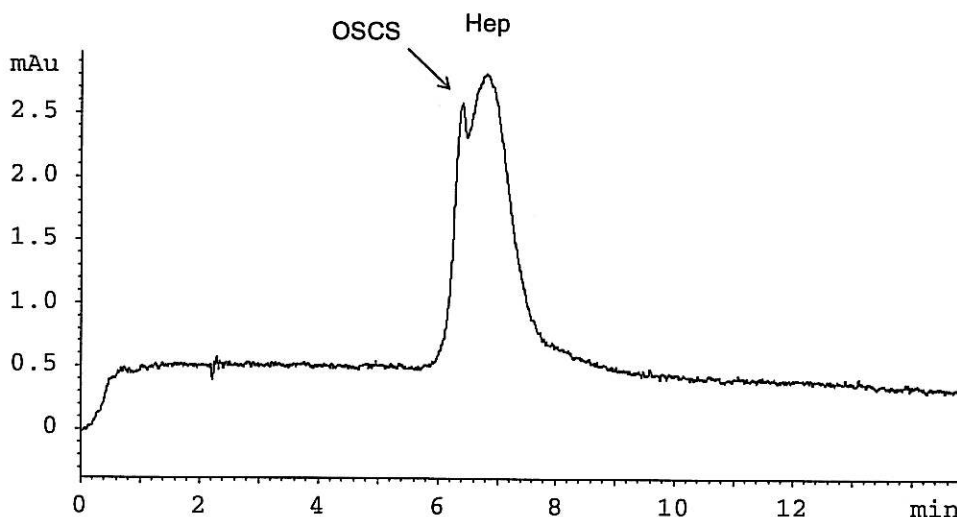


Abbildung 5-6: CE-Elektropherogramm von Heparin mit OSCS. CE-Bedingungen: Gerät: Beckman Coulter P/ACE MDQ, Kapillare: Quarzkapillare, 64,5 cm Gesamtlänge, 56 cm effektive Länge, 50 μm ; Elektrolytlösung: 36 mM Phosphatpuffer pH 3,5; Spannung: 30 kV; Injektion: 50 mbar, 10 s; Temperatur: 25°C; Detektion: 200 nm; Probenkonzentration: 10 mg/ml. Peakzuordnung: Hep: Heparin, OSCS: übersulfatiertes Chondroitinsulfat.

Im Rahmen der Methodenoptimierung wurden von uns der Elektrolyt und die Pufferkonzentration verändert, Kapillaren mit unterschiedlichen Innendurchmessern eingesetzt, die Messtemperatur, die Probenkonzentration und das Injektionsvolumen variiert. Die Gruppe von Somsen publizierte die bisher beste CE-Methode [41]. CE-Experimente unter optimierten Bedingungen zeigen eine deutliche Verbesserung der Peakseparation von Heparin, OSCS und DS, zudem konnte die Nachweisgrenze von OSCS und DS im Vergleich zur FDA-Methode deutlich gesenkt werden. Die Trennung von Analyt und Kontaminante erfolgt mit Hilfe einer Quarzkapillare mit einer Gesamtlänge von 60 cm, einer effektiven Länge von 50 cm und einem Innendurchmesser von 25 μm bei einer Temperatur von 35°C. Als Hintergrundelektrolyt wird ein hochmolarer Trispuffer (850 mM) eingesetzt, der zuvor mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt wurde. Zur Herstellung der

Probelösung werden etwa 50 mg Heparin in 1 ml Milli-Q-Wasser gelöst und bei einem Druck von 2 psi über eine Zeitdauer von 48 s injiziert. Aufgrund des hohen Injektionsvolumens der hochkonzentrierten Heparinlösung kann trotz der schwachen UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 200 nm eine Nachweisgrenze von etwa 0,1 % OSCS erreicht werden. Die Migration der beiden Komponenten erfolgt in folgender Reihenfolge: OSCS, Heparin (Abbildung 5-7). Zu Beginn der Messung wird die Kapillare im Zuge der Konditionierung für 30 Minuten mit 1 M NaOH-Lösung und anschließend für 10 Minuten mit Milli-Q Wasser bei einem Druck von 50 psi gespült. Zwischen zwei CE-Läufen wird die Quarzkapillare zuerst für 5 Minuten mit Milli-Q Wasser und anschließend für zwei Minuten mit Trennpuffer gespült.

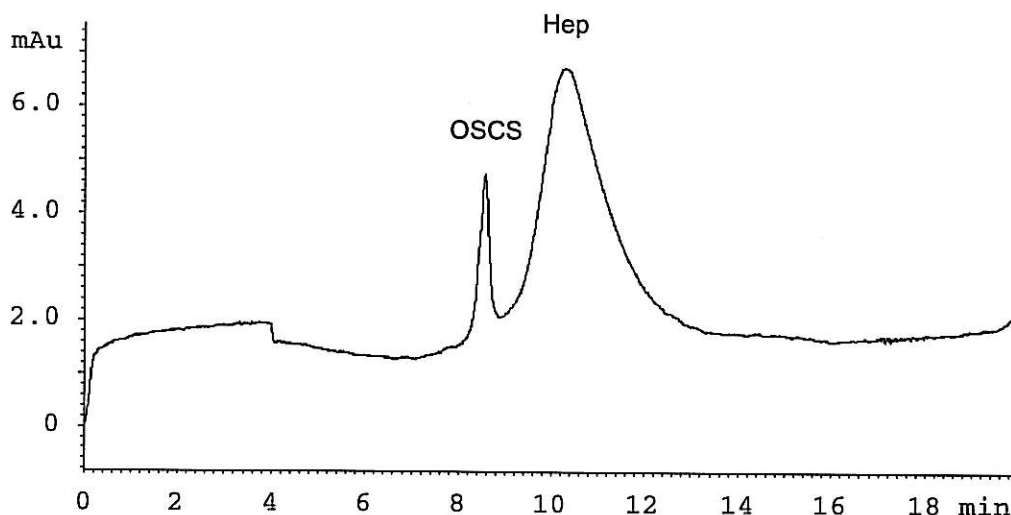


Abbildung 5-7: CE-Elektropherogramm von Heparin mit OSCS. CE-Bedingungen: Gerät: Beckmann Coulter P/ACE MDQ, Kapillare: Quarzkapillare, 60 cm Gesamtlänge, 50 cm effektive Länge, 25 μ m; Elektrolytlösung: 850 mM Tris-Puffer pH 3,0; Spannung: 30 kV; Injektion: 2,0 psi, 48 s; Temperatur: 35°C; Detektion: 200 nm; Probenkonzentration: 50 mg/ml. Peakzuordnung: Hep: Heparin, OSCS: übersulfatiertes Chondroitinsulfat.

5.5 HPLC

5.5.1 Quantitative Bestimmung von OSCS mittels HPLC

Zur Gehaltsbestimmung von OSCS in Heparin wird die von der Firma Sanofi-Aventis erarbeitete Trennmethode mittels Anionenaustauschchromatographie durchgeführt [45]. Die mobile Phase A besteht aus einem 2,5 mM Natriumdihydrogenphosphat-Puffer, für die mobile Phase B wird Natriumperchlorat (1 M) zum Phosphatpuffer zugesetzt; beide Puffer werden mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt. Heparin und OSCS werden mit einer SAX-Säule bei einer Flussrate von 0,22 ml/min unter Gradientenelution bei einer Temperatur von 40°C getrennt. Das Trennprinzip der Anionenaustauschchromatographie basiert auf der Wechselwirkung der stark negativ geladenen Polysaccharide mit den quaternären Hydroxyalkylammoniumgruppen der stationären Phase. Die Detektion erfolgt bei

einer Wellenlänge von 202 nm. Die beiden Verbindungen eluieren nach folgender Reihenfolge: Heparin, OSCS (Abbildung 5-8). Aufgrund der komplexen Molekülstruktur dieser Glucosaminoglycane werden sehr breite Peaks im HPLC-Chromatogramm beobachtet; eine vollständige Basislinientrennung der beiden Verbindungen wird nicht erreicht. Die quantitative Bestimmung von OSCS kann mittels Externer Standardisierung gegen eine OSCS-Referenzsubstanz bekannter Reinheit erfolgen oder analog zur OSCS-Bestimmung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie unter Berücksichtigung der Molekularmassen (siehe 5.3.2.1).

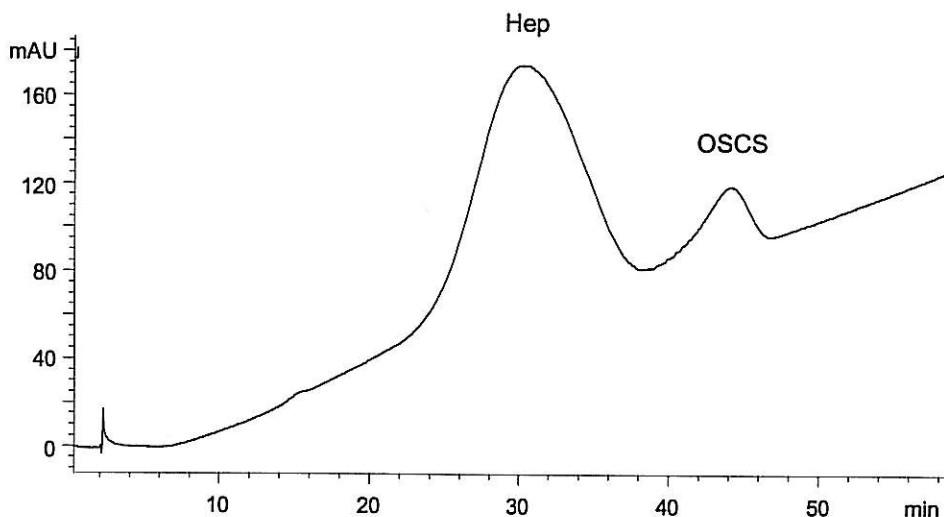


Abbildung 5-8: HPLC-Chromatogramm von Heparin mit OSCS. HPLC-Bedingungen: Gerät: Agilent HPLC (Serie1100); Säule: Dionex IonPac AS 11 2 x 250 mm, Vorsäule: Dionex IonPac AG 11 2 x 50 mm; mobile Phase: (A) 2,5 mM NaH_2PO_4 -Puffer pH 3,0, (B) 2,5 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/1\text{ M NaClO}_4$ -Puffer pH 3,0; Temperatur: 40°C; Fluss: 0,22 ml/min; Injektion: 10 μl ; Detektion: 202 nm; Probenkonzentration: 20 mg/ml. Peakzuordnung: Hep: Heparin, OSCS: übersulfatiertes Chondroitinsulfat.

Zur Quantifizierung von OSCS in Heparin wurden fünf unabhängige Einwaagen des Analyten mittels Doppelbestimmung an der HPLC analysiert.

5.6 Vergleich der Ergebnisse $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie versus HPLC

Der Gehalt an OSCS in Heparin wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und HPLC bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte zum einen mittels Interner und Externer Standardisierung, zum anderen mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens.

Der absoluten Gehalt von OSCS wurde mittels NMR-Spektroskopie nach Zusatz von Nicotinamid als Internem Standard bestimmt, als orthogonales Verfahren wurde die quantitative Analyse mittels Externer Standardisierung unter Einsatz von OSCS-Reinsubstanz an der HPLC durchgeführt.

Die quantitative Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren mittels Normalisierung erfolgte über einen direkten Vergleich von Signalintensitäten unter Berücksichtigung der molekularen

Masse der Disaccharid-Einheiten von Heparin und OSCS, sowie über einen Vergleich der Signalhöhen der N-Acetyl-Resonanzen von Analyt und Kontaminante. Zusätzlich wurden die entsprechenden HPLC-Chromatogramme unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der Disaccharid-Einheiten mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens ausgewertet.

Die durch Integration der Signale ermittelten NMR-Ergebnisse unterscheiden sich von den Ergebnissen, die sich auf Basis der Signalhöhe ergeben (Tabelle 5-3). Aufgrund der unvollständigen Separation der beiden N-Acetyl-Signale ist die Integration stark fehlerbehaftet; zusätzlich wird das Ergebnis durch die Abschätzung des N-Acetylierungsgrades in Heparin beeinflusst. Im Zuge eines vom EDQM organisierten Ringversuches zur Quantifizierung von OSCS mittels ^1H -NMR-Spektroskopie zeigte sich, dass die Vorbearbeitung des Spektrums sowie die anschließende Integration von überlappenden Signalen stark vom jeweiligen Experimentator abhängig sind [42]. Zudem konnte im Rahmen des Ringversuches gezeigt werden, dass bei der Vermessung von OSCS-gespikten Heparin-Proben bekannten Gehalts die Methode über die Messung der Signalhöhen genauere Ergebnisse liefert als nach Integration der entsprechenden Resonanzen. Die Referenzmethode mittels HPLC liefert vergleichbare Ergebnisse bezüglich des NMR-Experimentes nach Vergleich der Signalhöhen zwischen Heparin und OSCS (Tabelle 5-3).

Gegenüber HPLC ist die NMR-Methode zu bevorzugen; eine vollständige Basislinientrennung der beiden Peaks wird mittels HPLC nicht erreicht, zudem sind im Chromatogramm sehr breite Peaks sowie eine ansteigende Basislinie vorhanden, welche die Integrationsergebnisse beeinflussen. Die Quantifizierung mittels HPLC ist mit einer Laufzeit von etwa 75 Minuten pro Probe im Vergleich zum NMR-Verfahren sehr zeitaufwendig. Zudem erfordert die HPLC im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie eine Mehrfachbestimmung der Probe und eine Äquilibrierung der Säule. Des Weiteren können UV-inaktive Verunreinigungen wie Acetat, Ethanol oder Aceton mittels ^1H -NMR-Spektroskopie zusätzlich identifiziert und quantifiziert werden.

Eine quantitative NMR-Bestimmung von OSCS und Heparin mittels Interner bzw. Externer Standardisierung ist aufgrund des unbekanntes Molekulargewichtes nicht geeignet. Die Ergebnisse der Internen Standardisierung unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der Disaccharid-Einheit von OSCS unterscheiden sich deutlich von den HPLC-Werten nach Externer Standardisierung mit OSCS-Reinsubstanz (Tabelle 5-3).

Die oben beschriebenen NMR-Methoden, ausgewertet mittels Normalisierungsverfahren, stellen eine gute Alternative zur Interner bzw. Externer Standardisierung dar, welche in der Heparin-Analytik nur bedingt einsetzbar sind.

Tabelle 5-3: Zusammenfassung der Ergebnisse der OSCS-Bestimmung (OSCS, in % (g/g)) erzielt mittels NMR-Spektroskopie und HPLC – Interne Standardisierung (IS) mit Nicotinamid, Externe Standardisierung (ES) mit OSCS sowie Normalisierungsverfahren (N) – unter Angabe der Standardabweichung (SD) und relativen Standardabweichung (RSD; in %).

OSCS in Heparin	Methode	OSCS [%]	SD	RSD [%]
¹ H-NMR IS	IS/ES	1,4	0,1	3,0
HPLC ES		3,2	0,2	5,1
¹ H-NMR Intensität	N	3,2	0,1	2,8
¹ H-NMR Höhe		4,0	0,1	1,9
HPLC Normalisierung		4,0	0,1	2,7

6 Weitere im Projektantrag vorgesehene Arbeitspakete

Im Projektantrag war noch die Bearbeitung der folgenden Arbeitspakete vorgesehen: (i) Einsatz der ERETIC-Technik für quantitative 2D-NMR-Experimente, (ii) Organisation und Auswertung eines nationalen Ringversuchs und (iii) Evaluierung von Computermethoden (Amix und Unscrambler™) zur automatisierten Auswertung von NMR-Spektren im Routinebetrieb.

Die inakzeptabel geringe Robustheit der Original-ERETIC-Technik machte eine zeitaufwendige Modifikation dieser Technik (sowohl seitens der Forschungsinstitute als auch der Herstellerfirma Bruker BioSpin) und eine akkurate Evaluierung notwendig. Auch bis kurz vor Ende des Projektzeitraums zeigten sich noch Probleme bei Verwendung von leichtflüchtigen Lösungsmitteln, die sowohl bei der ERETIC-Technik als auch bei der Externen Standardisierung mit zwei NMR-Röhrchen zu gravierenden Abweichungen führten. Erst Anfang 2009 konnte diese Problematik gelöst werden, so dass nun beide Verfahren unabhängig vom zu verwendenden Lösungsmittel, für die Quantifizierung eingesetzt werden können. Solange keine erfolgreiche Evaluierung unter Berücksichtigung aller möglichen Störeinflüsse dieser Technik an ausgewählten Arzneistoffen vorlag, war es nicht sinnvoll, einen Ringversuch zu organisieren. Zudem kommt die Tatsache, dass es sich bei der ERETIC-Technik als auch bei der Anwendung Externer Standards um Methoden handelt, die zurzeit nicht routinemäßig in NMR-Laboratorien eingesetzt werden. Aus diesen Gründen wäre ein erfolgreiches Abschließen eines solchen Ringversuchs nicht denkbar gewesen.

Die Übertragung der weiterentwickelten ERETIC-Technik von der ^1H -NMR-Spektroskopie auf die 2D-NMR-Technik war somit zeitlich nicht mehr akkurat möglich. Ebenso konnte daher auch die Evaluierung der automatisierten quantitativen Auswertung von NMR-Spektren mittels Computermethoden nicht mehr erfolgen. Hinsichtlich des letzten Punktes ist jedoch ein neues Projekt bereits in Planung.

7 Zusammenfassung der Ergebnisse und kmU-Relavanz

Zur Qualitätskontrolle von Arzneistoffen und -mitteln werden in der pharmazeutischen Analytik routinemäßig chromatographischen Methoden eingesetzt. Aus Kostengründen werden heute jedoch Arzneistoffe vielfach in Billiglohnländern wie Indien und China hergestellt, d. h. Ländern, in denen nicht immer die in Europa gelten Qualitätsstandards eingehalten werden. So kann es vorkommen, dass Herstellungs- oder Aufreinigungsprozesse geändert werden, was zu einer erheblichen Veränderung der Zusammensetzung des Arzneistoffes führt. Oftmals ist es dann mit den in den Arzneibüchern definierten chromatographischen Methoden nicht möglich, neue Verunreinigungen bei der Qualitätskontrolle zu identifizieren. Diese Problematik wurde bereits mehrfach von klein- und mittelständigen Herstellern von Arzneimitteln an die FAH herangetragen und gemeinsam diskutiert. Inhaltsstoffe, die mit spektroskopischen Methoden identifiziert werden, können nicht immer mit den chromatographischen Techniken separiert werden. Aus diesem Grunde werden heute spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung bei Validierungsstudien von Arzneistoffen herangezogen. Hierbei ist besonders die Kernresonanzspektroskopie (NMR) hervorzuheben. Aufgrund ihrer exzellenten Selektivität ist sie in der Lage, selbst geringste Unterschiede in der chemischen Struktur aufzuzeigen. Dass sie darüber hinaus auch für die Quantifizierung von Referenzsubstanzen eingesetzt werden kann, wurde im Rahmen des AiF-Projekts 13843 N eindeutig gezeigt. Entsprechend den Anforderungen der pharmazeutischen Analytik wurden mit Hilfe eines Internen Standards die Gehalte einer Reihe von pflanzlichen Referenzsubstanzen quantitativ bestimmt. Dabei wurden sowohl die Leistungsfähigkeit der qNMR als ihr Potential als weitere Methode zur Qualitätskontrolle mehrfach vom projektbegleitenden Ausschuss (PA) hervorgehoben. Andererseits zeigten sich beim AiF-Projekt 13843 auch die Grenzen der Anwendbarkeit der Internen Standardisierung, welche vom PA detailliert diskutiert wurden. Dabei kam die Frage auf, ob nicht die qNMR mit Hilfe der Externen Standardisierung universell in der pharmazeutischen Analytik angewendet werden könnte. Somit würde zur Qualitätskontrolle eine zweite, von den

chromatographischen Methoden unabhängige Technik zur Verfügung stehen. Darüber hinaus wäre man dann in der Lage, neue Verunreinigungen nachzuweisen, zu identifizieren und zu quantifizieren.

Die Lösung dieser Fragestellung war das Ziel des vorliegenden Forschungsvorhabens. Hierzu musste die Anwendbarkeit der Externen Standardisierung bei der qNMR zur Gehaltsbestimmung von Arzneistoffen in der pharmazeutischen Analytik evaluiert werden. Insbesondere sollte dabei der Einsatz eines elektronisch erzeugten Kalibriersignals (ERETIC) anstelle stofflicher Standards untersucht werden. Diese höchst innovative Technik ist zwar schon seit 1998 bekannt, hat sich bisher jedoch noch nicht in der chemischen als auch pharmazeutischen Analytik durchgesetzt. Somit wäre mit der Etablierung dieser Technik im Pharmabereich ein wichtiger und innovativer Schritt in Richtung Wettbewerbsvorteil auf den globalen Märkten getan. Für die Laufzeit des vorliegenden Vorhabens stellte die Herstellerfirma Bruker BioSpin GmbH die ERETIC-Technik zur Verfügung. Nach erfolgreicher Installation wurde sie zuerst anhand von Modellsystemen (Maleinsäure in DMSO-d₆, 1,3,5-Trioxan in DMSO-d₆ und Dimethylsulfon in DMSO-d₆) systematisch evaluiert. Dabei zeigte sich bereits, dass die ERETIC-Technik, so wie sie in der Literatur beschrieben und von Bruker ausgeliefert wird, nicht ausreichend robust ist. Unterschiedliche Abstimmungsgrade des Probenkopfes (wie sie in der Routine generell vorkommen), eine Änderungen der Analytenkonzentration oder die Verwendung eines Kalibrierstandards, der nicht identisch ist mit dem zu untersuchenden Analyten, führten sofort zu falschen Resultaten. Eine universelle Anwendung dieser ERETIC-Technik, wie sie das Ziel dieses Vorhabens war, war somit nicht möglich. Erst die Weiterentwicklung der ERETIC-Technik in Zusammenarbeit mit der Herstellerfirma Bruker BioSpin lieferte eine in weiten Bereichen robuste Variante. Hierbei wird das elektronische Kalibriersignal nicht mehr über eine Spule im Probenkopf eingespeist, sondern direkt beim Protonenempfänger detektiert. Im Gegensatz zur Originalkonfiguration kann nun jeder beliebige Kalibrierstandard unabhängig von der zu untersuchenden Substanz verwendet werden. Jedoch muss der 90°-Anregungsimpuls für jede Probe bestimmt und für eine konstante Temperierung des Probenkopfes und des Raumes gesorgt werden, um akkurate Messergebnisse zu erzielen. Diese Erkenntnisse wurden anschließend auf Realproben übertragen. Die Gehaltsbestimmungen von ausgewählten Arzneistoffen (Codergocrinmesilat, Clomifencitrat, Flupentixoldihydrochlorid und Atracuriumbesilat) mittels der ERETIC-Technik lieferten korrekte Ergebnisse. Parallel dazu wurde die traditionelle Variante der Externen Standardisierung an denselben Proben systematisch evaluiert. Auch hierbei wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Dabei erfolgte

die Überprüfung der Richtigkeit der NMR-Resultate sowohl mittels validierter HPLC-Verfahren als auch mit der quantitativen NMR unter Verwendung eines Internen Standards. Die dabei erreichten Messunsicherheiten von $< 2 \%$ liegen innerhalb des geforderten Toleranzbereiches.

Als im Jahr 2007 ca. 800 Menschen in den USA an schweren Nebenwirkungen bei Medikation mit Heparin erkrankten, und sämtliche in den Arzneibüchern beschriebenen Methoden nicht in der Lage waren, übersulfatiertes Chondroitinsulfat und Dermatansulfat von Heparin zu separieren, wurde in Übereinstimmung mit dem PA diese Problemstellung mit in das Aufgabenspektrum dieses Vorhabens aufgenommen. An über 200 verschiedenen Heparin-Chargen wurde systematisch nach Lösungswegen für den Nachweis und die Quantifizierung dieser beiden Substanzen in Heparin geforscht. Schließlich gelang es erstmals, mit der $^1\text{H-NMR}$ beide Komponenten im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nachzuweisen und mit Hilfe eines ausgearbeiteten Normalisierungsverfahrens akkurat zu quantifizieren.

Insgesamt zeigen die in diesem vorliegenden Vorhaben erarbeiteten Ergebnisse auf eindrucksvolle Weise, wie leistungsstark und aussagekräftig die quantitative $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie für die Gehaltsbestimmung von Arzneistoffen in der pharmazeutischen Analytik ist. Daher wurde zum Ende der Laufzeit des Projektes am 12. Februar 2009 seitens der FAH eine Informationsveranstaltung organisiert, auf der u. a. die im vorliegenden Projekt erzielten Ergebnisse vorgestellt und mit den Teilnehmern aus Industrie, Forschungseinrichtungen, Dienstleistungsanbietern und Behörden ausgiebig diskutiert wurden (Programm und Liste der Teilnehmer siehe Anhang). Somit ist zu erwarten, dass die qNMR zukünftig sowohl mittels der ERETIC-Technik als auch der Externen Standardisierung bei Validierungsstudien, bei der Qualitätskontrolle und auch bei der Schadensanalytik eingesetzt wird. Damit wird es den klein- und mittelständigen Unternehmen nunmehr ermöglicht, ihre Arzneistoffe besser zu charakterisieren. Denn die hier weiterentwickelten Methoden können nun dazu verwendet werden, die Resultate der chromatographischen Verfahren im Rahmen der Qualitätssicherung durch eine unabhängige Methode zu überprüfen. Durch eine Verbesserung der Qualitätskontrolle können dann fehlerhafte Gehaltsbestimmungen und somit Fehlproduktionen vermieden werden. Die somit abgewendeten finanziellen Verluste bedeuten zwangsläufig eine Steigerung der Wettbewerbsfähigkeit der Unternehmen. So werteten z.B. die Mitglieder des PA, die als Arzneimittelhersteller bereits über ein NMR-Spektrometer verfügen oder im Dienstleistungsgewerbe tätig sind, die Übernahme der Ergebnisse in ihre eigene Laborpraxis als außerordentlich wertvoll. Nach ihrer Meinung lassen die unkomplizierte Handhabbarkeit als auch die hohe Robustheit beider hier

untersuchten Techniken (ERETIC und Externe Standardisierung) generell eine gute Aufnahme in die Laborpraxis erwarten. Sie wiesen ferner darauf hin, dass mittels der Externen Standardisierung und vor allem mit der ERETIC-Technik insgesamt nun eine größere Anwendungsbreite der quantitativen NMR in der pharmazeutischen Analytik zur Analyse von Arzneistoffen möglich ist. Jedoch wurden von kmU-Seite die zurzeit noch hohen Anschaffungskosten der ERETIC-Technik hervorgehoben. Bei der Frage nach der Notwendigkeit der Anschaffung der ERETIC-Technik, wenn mit einem Externen chemischen Kalibriersignal übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden können, kam man übereinstimmend zum Fazit, dass bei den hier untersuchten Anwendungen der qNMR die Anwendung der Externen Standardisierung zwar ausreichend ist, für den Routinebetrieb mit hohem Probandendurchsatz die Vergleichbarkeit der einzelnen Spektren mit einem internen Referenzsignal genauer ist. Dies ist vor allem dann wichtig, wenn die Untersuchungen unter GLP- und GMP-Bedingungen erfolgen müssen. Zudem ist damit zu rechnen, dass mit steigender Nachfrage der Preis für die ERETIC-Technik geringer wird.

Ein weiterer wichtiger Wettbewerbsvorteil für die kmUs, die ein NMR-Spektrometer besitzen oder sich anschaffen wollen, ergibt sich aus der Tatsache, dass die Etablierung der Externen Standardisierung bzw. der ERETIC-Technik zu einer deutlichen Einsparung an Kosten für die Beschaffung und Lagerung von notwendigen Referenzsubstanzen führt. Dies ist umso wichtiger, als dass durch Einführung des REACH-Systems zukünftig einige Referenzsubstanzen nur noch schwerer bzw. deutlich teurer als heute verfügbar sein werden. Und dies betrifft nicht nur die qNMR mittels Interner Standardisierung, sondern vor allem auch die chromatographischen Methoden, die zur Kalibrierung Referenzsubstanzen mit hohem Reinheitsgrad benötigt. Alternativ zu den dann sehr teuren Referenzsubstanzen kann die qNMR als Referenzverfahren nun universal zur Kalibrierung von chromatographischen Verfahren eingesetzt werden. Somit können kmUs dann ihre chromatographischen Anlagen besser nutzen und ihre Produkte besser charakterisieren.

Andererseits muss aber auch erwähnt werden, dass die NMR-Spektroskopie eine sehr teure Methode vor allem in der Anschaffung ist. Und es ist nicht zu erwarten, dass aufgrund der hier erzielten Ergebnisse sich nun alle klein- und mittelständige Hersteller von Arzneistoffen und -mitteln ein NMR-Spektrometer anschaffen werden. Doch auch für diese kmUs sind die Resultate von hoher wirtschaftlicher Bedeutung sind. Denn viele dieser kmUs lassen schon heute ihre Arzneistoffe extern mittels NMR qualitativ charakterisieren. Und viele dieser externen Dienstleistungsanbieter führen bieten schon heute quantitative NMR-Messungen als Dienstleistung an. Somit haben dann auch diese kmUs erstmalig die Möglichkeit, mittels

externer qNMR-Messung ihre Qualitätskontrollen bei Arzneistoffe durch eine zweite unabhängige Methode zu verbessern. Dieses ist je nach jährlichem Probenumfang deutlich günstiger, als sich ein neues NMR-Spektrometer zu kaufen und zu betreiben.

Folglich haben also kmU, die quantitative NMR-Analysen als Dienstleistung anbieten, ebenfalls mit einem wirtschaftlichen Zugewinn als auch mit einem Wettbewerbsvorteil zu rechnen, da sie diese qNMR-Verfahren mit in ihren Angebotskatalog aufnehmen können. Ebenfalls profitieren auch die klein- und mittelständigen Lieferanten von NMR-Zubehör (z. B. Notwendigkeit von qualitativ hochwertigen NMR-Röhrchen zur Anwendung der qNMR mittels Externer Standardisierung bzw. ERETIC-Technik) und diejenigen kmUs, die Hardware und Zubehör von chromatographischen Anlagen vertreiben. Denn die bessere Ausnutzung von HPLC- und GC-Verfahren zur Qualitätskontrolle von Arzneistoffen in der pharmazeutischen Analytik wird sich durch einen entsprechenden Bedarf an solchen Techniken und Zubehörteilen ebenfalls widerspiegeln.

Abschließend sei noch zu bemerken, dass die hier erzielten Ergebnisse sich nicht nur auf die Produkte aus dem Pharmabereich beziehen. Sie können auch allgemeingültig auf andere Bereiche wie z. B. Agrartechnik, Kosmetik, Lebensmittelindustrie, etc. übertragen werden. Somit erfahren auch die kmUs aus diesen Branchen einen Wettbewerbsvorteil, wenn sie die qNMR zur Qualitätskontrolle ihrer Rohstoffe und Produkte einsetzen.

Der Einsatz der im Rahmen dieses Vorhabens beschäftigten Mitarbeiter erfolgte entsprechend den Erfordernissen der zu leistenden Arbeit. Die geleistete wissenschaftliche Arbeit war notwendig und angemessen.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz AMG) vom 24.08.1976, in der Fassung vom 12.12.2005; Änderung vom 14.06.2007 (BGBl. I 1066).
- [2] Europäische Chemikalienagentur (ECHA)
Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien (REACH, Registration, Evaluation and Authoristaion of Chemicals)
Verordnung (EG) Nr. 1907/2006.
- [3] Milton, M.J., Quinn, T.J.
Primary methods for measurement of amount of substance.
Metrologia 38 (2001) 289-296.
- [4] Akoka, S., Barantin, K., Trierweiler, M.
Concentration Measurement by Proton NMR Using the ERETIC Method.
Anal. Chem. 71 (1999) 2554-2557.
- [5] Silvestri, V., Goupry, S., Trierweiler, M., Robins, R., Akoka, S.
Determiation of Substrate and Product Concentration in Lactic Acid Bacterial Fermentation by Proton NMR Using the ERETIC Method.
Anal. Chem. 73 (2001) 1862-1868.
- [6] Billault, I., Robins, R., Akoka, S.
Determination of Deuterium Isotope Ratios by Quantitative ^2H NMR Spectroscopy Using the ERETIC Method As a Generic Reference Signal.
Anal. Chem. 74 (2002) 5902-5906.
- [7] U. Holzgrabe
Quantitative NMR Spectroscopy - principles and applications
J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005).
- [8] Pauli, G.F., Jaki, B.U., Lankin, D.C.
Quantitative ^1H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis, *J. Nat. Prod.* 68 (2005), 133-149.
- [9] Holzgrabe, U., Wawer, I., Diehl, B.
NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis
Elsevier, Amsterdam, 2008.
- [10] Malz, F., Jancke, H.
Validation of quantitative NMR
J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005) 813-823.
- [11] Saed Al-Deen, T.
Validation of Quantitative Nuclear Magnetic Resonance (QNMR) Spectroscopy as Primary Ratio Analytical Method for Assessing the Purity of Organic Compounds: A

Metrological Approach
Dissertation. Sydney 2002.

- [12] Quilliam, M.A., Burton, I.W., Walter, J.A.
Quantitative ^1H -NMR with External Standards: Use in Preparation of Calibration Solutions for Algal Toxins and other Natural Products
Analytical Chemistry 77 (2005) 3123-3131.
- [13] Fulton, D., Sayer, B., Bain, A., Malle, H.
Detection and Determination of Dilute, Low Molecular Weight Organic Compounds in Water by 500 MHz Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
Analytical Chemistry 64 (1992) 349-353.
- [14] Peters, J., Majer, H.
Garantiert NMR reproduzierbare Spektren
Labor Praxis 24 (2000) 54-57.
- [15] Abragam, A.
Principles of Nuclear Magnetism
Oxford University Press 1961.
- [16] Bain, A.
Radiofrequency pulses: Response of nuclear spins. *Encyclopedia of nuclear magnetic resonance*, ed. R. Harris D. Grant. Vol. 6
West Sussex, England: Wiley. 1996, 3944-3949.
- [17] Keifer, P.
90° Pulse Width Calibrations: How to Read a Pulse Width Array
Concepts Magn. Reson. 11 (1999) 165-180.
- [18] Derome, A.
Modern NMR-Techniques for Chemistry Research. 1 ed.
Tetrahedron Organic Chemistry Series, ed. J.E.Baldwin. Vol. 6.: Pergamon Press Ltd. 1987.
- [19] Friebolin, H.
Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung. 4 ed.
Weinheim: Wiley-VCH 2006.
- [20] Henderson, T.
Quantitative NMR Spectroscopy Using Coaxial Inserts Containing a Reference Standard: Purity Determinations for Military Nerve Agents.
Analytical Chemistry 74 (2002) 191-198.
- [21] Sahlberg, C., Luthman, K., Claesson, A.
Synthesis of radioactively labelled allenic MAO-inhibitors
Acta. Pharm. Suec. 20 (1983) 233-238.

- [22] Diehl, B., Malz, F., Holzgrabe, U.
Quantitative NMR spectroscopy in quality evaluation of active pharmaceutical ingredients (APIs) and excipients
Spectroscopy Europe 19 (2007) 15-19.
- [23] Schoenleber, W.D., Jacobs, A.L., Brewer Jr., G.A.
Florey 7 (1978) 81-147.
- [24] Monographie „Ergoloid Mesylates“,
United States Pharmacopoeia 31, United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD, 2007.
- [25] Monographie „Codergocrinmesilat“
Europäisches Arzneibuch, 6. Auflage, EDQM, Strasbourg, 2008.
- [26] Fields, S.M., Huber, E.W., Vaz, R.J.
Unusual Maxima in HPLC Retention of an Homologous Series Consisting of Longer Alkyl Chain Substitutions
Anal. Chem. 68 (1996) 2379-2385.
- [27] Monographie „Clomiphene Citras“
United States Pharmacopoeia 31, United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD, 2007.
- [28] Berger, S., Braun, S., Kalinowski, H.O.
NMR-Spektroskopie von Nichtmetallen, Band 4, ¹⁹F-NMR-Spektroskopie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1994.
- [29] Talebpour, Z., Haghgoo, S., Shamsipur, M.
A selective ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopic method for the assay of the neuroleptic drug *cis*(Z)-flupentixol in human serum
Anal. Biochem. 323 (2003) 205-210.
- [30] Martino, R., Gilard, V., Desmoulin, F., Malet-Martino, M.
Fluorine-19 or phosphorus-31 NMR spectroscopy: A suitable analytical technique for quantitative in vitro metabolic studies of fluorinated or phosphorylated drugs
J. Pharm. Biomed. Anal. 38 (2005) 871-891.
- [31] Monographie „Flupentixoldihydrochlorid“
Europäisches Arzneibuch, 6. Auflage, EDQM, Strasbourg, 2008.
- [32] Stenlake, J.B., Waigh, R.D., Dewar, G.H., Dhar, N.C.
Eur. J. Med. Chem. –Chim. Ther. 19 (1984) 441-450.
- [33] Monographie „Atracuriumbesilat“
Europäisches Arzneibuch, 6. Auflage, EDQM, Strasbourg, 2008.
- [34] Monographie „Atracurium Besylates“
United States Pharmacopoeia 31, United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD, 2007.

- [35] Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., Naggi, A., Viswanathan, K., Bisio, A., Capila, I., Lansing, J.C., Guglieri, S., Frase, B., Al-Hakim, A., Gunay, N.S., Zhang, Z., Robinson, L., Buhse, L., Nasr, M., Woodcock, J., Langer, R., Venkataraman, G., Linhardt, R.J., Casu, B., Torri, G., Sasisekharan, R.
Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events
Nat. Biotechnol. 26 (2008) 669-675.
- [36] Monographie „Heparin Natrium“
Europäisches Arzneibuch, 5. Auflage, EDQM, Strasbourg, 2005.
- [37] Monographie „Niedermolekulare Heparine“
Europäisches Arzneibuch, 5. Auflage, EDQM, Strasbourg, 2005.
- [38] Beyer, T., Diehl, B., Randel, G., Humpfer, E., Schäfer, H., Spraul, M., Schollmayer, C., Holzgrabe, U.
Quality assessment of unfractionated heparin using ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48 (2008) 13-19.
- [39] Monographie “Heparin-Natrium”
Europäisches Arzneibuch, 6. Auflage, 4.Nachtrag, EDQM, Straßbourg, 2008.
- [40] Impurity Evaluation of Heparin Sodium by Capillary Electrophoresis
FDA, Rockville, MD, 2008.
- [41] Somsen, G.W., Tak, Y.H., Torano, J.S., Jongen, P.M.J.M., de Jong, G.J.
Determination of oversulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate impurities in heparin by capillary electrophoresis
J. Chromatogr. A1216 (2009) 4107-4112.
- [42] McEwen, I., Mulloy, B., Hellwig, E., Kozerski, L., Beyer, T., Holzgrabe, U., Rodomonte, A., Wanko, R., Spieser, J.M.

Pharmeuropa Bio 2008-1 (2008) 31-39.
- [43] Monographie “Heparin-Natrium”
Europäisches Arzneibuch, 6. Auflage, 4.Nachtrag, EDQM, Straßbourg, 2008.
- [44] Impurity Evaluation of Heparin Sodium by Capillary Electrophoresis
FDA, Rockville, MD, 2008.
- [45] Houiste, C., Martin, C., Anger, P.
HPLC assay of heparin like contaminants - Quantification of highly sulfated chondroitin sulfate
EDQM-Bericht PA/PH/Exp. 6/T (08) 31, 06.06.2008

9 Anhang

9.1 Allgemeiner Leitfaden (Interner Standard)

Quantitative Bestimmung eines Mehrkomponentengemisches mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bei Verwendung eines Internen Standards am Beispiel von Codergocrinmesilat

1. Zweck

Dieser Leitfaden definiert die wichtigsten Anforderungen beim Einsatz der ^1H -NMR-Spektroskopie im Rahmen der quantitativen Analytik von Arzneistoffen.

2. Einsatzbereich

Quantitative Bestimmung eines Mehrkomponentengemisches mittels ^1H -NMR-Spektroskopie.

3. Geräte

Bruker Avance 400 MHz-Spektrometer

4. Material und Chemikalien

4.1. Material

- NMR-Röhrchen 5 mm, 527-PP-7 (Wilmar Lab Glass)
- Präparateglas
- Mikroliter-Pipette 100 μl , 1000 μl und 5000 μl

4.2. Chemikalien

- deuterierte Lösungsmittel wie DMSO-d_6 , CD_3OD , D_2O , CDCl_3 , CD_2Cl_2 , C_6D_6

5. Methodenentwicklung

Voraussetzung für die quantitative Bestimmung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ist eine vollständige Basislinientrennung der zu integrierenden Signale. Zudem muss mittels weiterer ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente (1D: ^{13}C , DEPT sowie

2D: COSY, HMQC, HMBC) sichergestellt werden, dass die auszuwertenden Resonanzen frei von Signalen von Verunreinigungen sind.

5.1. Optimierung des Lösungsmittels

Lösungsmittel unterschiedlicher Eigenschaften (apolar ↔ polar, protisch ↔ aprotisch, aromatisch ↔ nicht aromatisch) zeigen einen unterschiedlichen Einfluss auf die chemische Verschiebung bestimmter Signale. Somit kann durch den Austausch eines Lösungsmittels eine Verbesserung der Signalseparation erzielt werden. Aufgrund der Schwerlöslichkeit des Analyten in bestimmten Lösungsmitteln ist häufig die Zugabe geringer Mengen eines Lösungsvermittlers notwendig; zudem kann durch eine Variation der Lösungsmittelzusammensetzung eine Trennung der Signale erreicht werden.

Am vorliegenden Beispiel konnte in polaren Lösungsmitteln keine vollständige Separation der beiden H5'-Signale von α - und β -Dihydroergocryptin erreicht werden. Beim Einsatz apolarer, nicht aromatischer Lösungsmittel konnte eine verbesserte Trennung der beiden Signale erzielt werden. Aufgrund der Schwerlöslichkeit des Analyten in CDCl_3 wurden geringe Mengen an DMSO-d_6 als Lösungsvermittler zugegeben; man beobachtet eine umso bessere Trennung der H5'-Signale je geringer der Anteil an DMSO-d_6 gewählt wurde. In aromatischen Lösungsmitteln wie C_6D_6 kann eine deutliche Trennung der H5'-Resonanzen von α - und β -Dihydroergocryptin beobachtet werden; erhöht man nun den Anteil an DMSO-d_6 schrittweise, wird unter Verwendung einer Mischung von C_6D_6 und DMSO-d_6 im Verhältnis 10:1 (v/v) eine vollständige Basislinientrennung der vier H5'-Signale erzielt.

5.2. Interner Standard

Um für die quantitative Bestimmung des Analyten einen geeigneten Internen Standard auszuwählen, werden verschiedene Substanzen, die folgende Kriterien erfüllen, getestet:

- vollständige Löslichkeit des Internen Standards im eingesetzten Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch
- Signale des Internen Standards in signalfreien Regionen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum

- kurze T_1 -Zeit des zur Integration herangezogenen Signals.

Das Mischungsverhältnis von Analyt zu Standard wird so gewählt, dass die zur Integration herangezogenen Signale ähnliche Intensitäten aufweisen.

5.3. Parametereinstellungen

- Anzahl der Scans

Die Anzahl der Scans sollte so gewählt werden, dass das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) des auszuwertenden Signals mit der geringsten Signalhöhe mindestens 250:1 beträgt. Das Rauschen wird in einer signalfreien Region über mindestens 200 Hz bestimmt.

- Spektrale Breite

Die Spektrale Breite des ^1H -NMR-Spektrums wird so gewählt, dass zur spektralen Breite der Probe auf jeder Seite des Spektrums etwa 3 ppm hinzugefügt werden.

- Anregungsfrequenz

Die Anregungsfrequenz wird in die Mitte des Spektrums gelegt.

- Impulsabstand (Repetition time)

Im Rahmen einer quantitativen Bestimmung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie muss die Rückkehr des Spinsystems in den Gleichgewichtszustand gewährleistet werden. Die Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen ist von der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 abhängig:

- beim Einsatz eines 90° -Impulses beträgt die Wartezeit mindestens $5 \times T_1$
- beim Einsatz eines 30° -Impulses beträgt die Wartezeit mindestens $3 \times T_1$.

- Akquisitionszeit

Die Länge der Aufnahmezeit wird durch die Spektrale Breite, die eingesetzten Datenpunkte und die digitale Auflösung beeinflusst. Die digitale Auflösung sollte für ^1H -NMR-Experimente $\leq 0,25$ Hz betragen.

- Temperatur

Die Messung muss bei einer zuvor definierten, konstanten Temperatur durchgeführt werden.

- Rotation

Beim Auftreten störender Rotationsbanden kann das NMR-Experiment ohne Rotation des NMR-Röhrchens durchgeführt.

In Tabelle 1 sind am Beispiel des Mehrkomponentengemisches Codergocrinmesilat die wichtigsten Messparameter für die quantitative Bestimmung zusammengefasst. Beim Einsatz von NMR-Spektrometern unterschiedlicher Feldstärke müssen die Aufnahmeparameter entsprechend angepasst werden.

Tabelle 1: Zusammenstellung der Messparameter für die quantitative Bestimmung von Codergocrinmesilat (Probenkonzentration 20 mg/ml) mittels ^1H -NMR-Spektroskopie.

Parameter	
Spektrometer, NMR-Messkopf	Bruker Avance 400 MHz Spektrometer, BBI-Messkopf
Impulswinkel	90°
Datenpunkte	64 K
Anzahl der Scans	64 → S/N (β) ~350:1
Spektrale Breite	16 ppm
Aufnahmezeit (Acquisition time)	5,1 s
Impulsabstand (Repetition time (RT = 5 · T ₁))	13,6 s
Temperatur	300 K
Lb-Faktor	0,3 Hz

6. Probenpräparation

6.1. Lösungsmittelgemisch

Zur Herstellung des Lösungsmittelgemisches C_6D_6 -DMSO- d_6 (10:1 (v/v)) werden 10 Volumenteile C_6D_6 mit 1 Volumenteil DMSO- d_6 versetzt und anschließend durch leichtes Schütteln gemischt.

6.2. Probenpräparation

Die zu untersuchende Charge Codergocrinmesilat und der Interne Standard DMABE werden in ein Präparateglas abgewogen und mit einem definierten Volumen des Lösungsmittelgemisches C_6D_6 -DMSO- d_6 (10:1 (v/v)) versetzt und unter leichtem

Schütteln gelöst. Anschließend wird ein konstantes Volumen an Probelösung in ein 5 mm-NMR-Röhrchen überführt.

7. Durchführung der Messung

Die zu analysierende Probe wird auf das Lösungsmittelsignal von C₆D₆ gelockt, anschließend wird der Shim sowie die Wobbelkurve überprüft und gegebenenfalls korrigiert und mit dem entwickelten Datensatz (Tabelle 6-1) mittels Einfachbestimmung am NMR-Spektrometer vermessen.

8. Auswertung der ¹H-NMR-Daten

8.1. Prozessierung

Nach einer Fourier-Transformation mit vorheriger exponentieller Multiplikation des FIDs wird eine manuelle Korrektur der Phase sowie eine automatische Korrektur der Basislinie über die zu integrierende Region durchgeführt.

8.2. Integration

Die zur Quantifizierung herangezogenen Signale des Analyten Codergocrinmesilat (H5'-Signale im Bereich zwischen 4,5 und 4,9 ppm) und des Internen Standards DMABE (CH₂-Signal bei etwa 4,2 ppm) werden manuell integriert.

8.3. Berechnung des absoluten Gehalts

Der Gehalt der vier Einzelkomponenten des Mehrkomponentengemisches wird mit Hilfe des zugesetzten Internen Standards definierter Reinheit unter Berücksichtigung der aufgeführten Formel berechnet.

$$P_{Cod} = \frac{I_{Cod}}{I_{IS}} \cdot \frac{N_{IS}}{N_{Cod}} \cdot \frac{M_{Cod}}{M_{IS}} \cdot \frac{m_{IS}}{m_{Cod}} \cdot P_{IS}$$

I_{Cod}, I_{IS}	Signalintensität
N_{Cod}, N_{IS}	Kernanzahl
M_{Cod}, M_{IS}	Molekulargewicht [g/mol]
m_{Cod}, m_{IS}	Einwaage [mg]
P_{Cod}, P_{IS}	Gehalt [% (g/g)]

Der Gesamtgehalt an Codergocrinmesilat wird nach Addition der zuvor ermittelten Gehalte der vier Komponenten ermittelt.

9.2 Allgemeiner Leitfaden (ERETIC)

Quantitative Bestimmung eines Mehrkomponentengemisches mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bei Anwendung der ERETIC-Technik am Beispiel von Codergocrinmesilat

1. Zweck

Dieser Leitfaden definiert die wichtigsten Anforderungen beim Einsatz der ^1H -NMR-Spektroskopie im Rahmen der quantitativen Analytik von Arzneistoffen.

2. Einsatzbereich

Quantitative Bestimmung eines Mehrkomponentengemisches mittels ^1H -NMR-Spektroskopie.

3. Geräte

Bruker Avance 400 MHz-Spektrometer

4. Material und Chemikalien

4.1. Material

- 2 NMR-Röhrchen 5 mm, 527-PP-7 (Wilmard Lab Glass)
- 2 Präparategläser
- Mikroliter-Pipette 100 μl , 1000 μl und 5000 μl

4.2. Chemikalien

- deuterierte Lösungsmittel wie DMSO-d_6 , CD_3OD , D_2O , CDCl_3 , CD_2Cl_2 , C_6D_6

5. Methodenentwicklung

Voraussetzung für die quantitative Bestimmung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ist eine vollständige Basislinientrennung der zu integrierenden Signale. Zudem muss mittels weiterer ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente (1D: ^{13}C , DEPT sowie 2D: COSY, HMQC, HMBC) sichergestellt werden, dass die auszuwertenden Resonanzen frei von Signalen von Verunreinigungen sind.

5.1. Optimierung des Lösungsmittels

Lösungsmittel unterschiedlicher Eigenschaften (apolar ↔ polar, protisch ↔ aprotisch, aromatisch ↔ nicht aromatisch) zeigen einen unterschiedlichen Einfluss auf die chemische Verschiebung bestimmter Signale. Somit kann durch den Austausch eines Lösungsmittels eine Verbesserung der Signalseparation erzielt werden. Aufgrund der Schwerlöslichkeit des Analyten in bestimmten Lösungsmitteln ist häufig die Zugabe geringer Mengen eines Lösungsvermittlers notwendig; zudem kann durch eine Variation der Lösungsmittelzusammensetzung eine Trennung der Signale erreicht werden.

Am vorliegenden Beispiel konnte in polaren Lösungsmitteln keine vollständige Separation der beiden H5'-Signale von α - und β -Dihydroergocryptin erreicht werden. Beim Einsatz apolarer, nicht aromatischer Lösungsmittel konnte eine verbesserte Trennung der beiden Signale erzielt werden. Aufgrund der Schwerlöslichkeit des Analyten in CDCl_3 wurden geringe Mengen an DMSO-d_6 als Lösungsvermittler zugegeben; man beobachtet eine umso bessere Trennung der H5'-Signale je geringer der Anteil an DMSO-d_6 gewählt wurde. In aromatischen Lösungsmitteln wie C_6D_6 kann eine deutliche Trennung der H5'-Resonanzen von α - und β -Dihydroergocryptin beobachtet werden; erhöht man nun den Anteil an DMSO-d_6 schrittweise, wird unter Verwendung einer Mischung von C_6D_6 und DMSO-d_6 im Verhältnis 10:1 (v/v) eine vollständige Basislinientrennung der vier H5'-Signale erzielt.

5.2. Kalibrierstandard

Für die Kalibrierung des ERETIC-Signals kann jeder beliebige Standard bekannter Reinheit verwendet werden.

Das eingesetzte Stoffmengenverhältnis von Analyt zu Standard wird so gewählt, dass die zur Integration herangezogenen Signale ähnliche Intensitäten aufweisen.

5.3. Parametereinstellungen

- Anzahl der Scans

Die Anzahl der Scans sollte so gewählt werden, dass das Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) des auszuwertenden Signals mit der geringsten Signalthöhe

mindestens 250:1 beträgt. Das Rauschen wird in einer signalfreien Region über mindestens 200 Hz bestimmt.

- Spektrale Breite

Die Spektrale Breite des ^1H -NMR-Spektrums wird so gewählt, dass zur spektralen Breite der Probe auf jeder Seite des Spektrums etwa 3 ppm hinzugefügt werden.

- Anregungsfrequenz

Die Anregungsfrequenz wird in die Mitte des Spektrums gelegt.

- ERETIC-Signal

Die Frequenz des ERETIC-Signals wird auf -1 ppm gesetzt. Die Dämpfung wird so angepasst, dass das ERETIC-Signal und die auszuwertenden Signale von Analyt und Standard ähnlich Intensitäten aufweisen.

- Impulsabstand (Repetition time)

Im Rahmen einer quantitativen Bestimmung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie muss die Rückkehr des Spinsystems in den Gleichgewichtszustand gewährleistet werden. Die Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen ist von der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 abhängig:

- beim Einsatz eines 90° -Impulses beträgt die Wartezeit mindestens $5 \times T_1$
- beim Einsatz eines 30° -Impulses beträgt die Wartezeit mindestens $3 \times T_1$.

- Akquisitionszeit

Die Länge der Aufnahmezeit wird durch die Spektrale Breite, die eingesetzten Datenpunkte und die digitale Auflösung beeinflusst. Die digitale Auflösung sollte für ^1H -NMR-Experimente $\leq 0,25$ Hz betragen.

- Temperatur

Die Messung muss bei einer zuvor definierten, konstanten Temperatur durchgeführt werden.

- Rotation

Quantitative Messungen sollten generell ohne Rotation aufgenommen werden.

In Tabelle 1 sind am Beispiel des Mehrkomponentengemisches Codergocrinmesilat die wichtigsten Messparameter für die quantitative Bestimmung zusammengefasst. Beim Einsatz von NMR-Spektrometern unterschiedlicher Feldstärke müssen die Aufnahmeparameter entsprechend angepasst werden.

Tabelle 1: Zusammenstellung der Messparameter für die quantitative Bestimmung von Codergocrinmesilat (Probenkonzentration 20 mg/ml) mittels ¹H-NMR-Spektroskopie.

Parameter	
Spektrometer, NMR-Messkopf	Bruker Avance 400 MHz Spektrometer, BBI-Messkopf
Pulsprogramm	ereticzg
Impulswinkel	90°
Datenpunkte	64 K
Anzahl der Scans	64 → S/N (β) ~350:1
Spektrale Breite	16 ppm
Aufnahmezeit (Acquisition time)	5,1 s
Impulsabstand (Repetition time (RT = 5 · T ₁))	13,6 s
Frequenz des ERETIC-Signals	-1 ppm
Dämpfung des ERETIC-Signals	78 dB
Temperatur	300 K
Lb-Faktor	0,3 Hz

6. Probenpräparation

6.1. Lösungsmittelgemisch

Zur Herstellung des Lösungsmittelgemisches C₆D₆-DMSO-d₆ (10:1 (v/v)) werden 10 Volumenteile C₆D₆ mit 1 Volumenteil DMSO-d₆ versetzt und anschließend durch leichtes Schütteln gemischt.

6.2. Probenpräparation

Die zu untersuchende Charge Codergocrinmesilat und der Kalibrierstandard DMABE werden in je ein Präparateglas abgewogen und mit einem definierten Volumen bekannter Masse des Lösungsmittelgemisches C₆D₆-DMSO-d₆ (10:1 (v/v)) versetzt und unter leichtem Schütteln gelöst. Anschließend wird ein konstantes Volumen an Analyt- und Kalibrierlösung in je ein 5 mm-NMR-Röhrchen überführt.

7. Durchführung der Messung

Die zu analysierenden Proben werden auf das Lösungsmittelsignal von C₆D₆ gelockt, anschließend wird der Shim sowie die Wobbelkurve überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Beide Lösungen werden mit dem entwickelten Datensatz (Tabelle 6-1) mittels Einfachbestimmung unter identischen Bedingungen am NMR-Spektrometer vermessen.

8. Auswertung der ¹H-NMR-Daten

8.1. Prozessierung

Nach einer Fourier-Transformation mit vorheriger exponentieller Multiplikation des FIDs wird eine manuelle Korrektur der Phase sowie eine automatische Korrektur der Basislinie über die zu integrierende Region durchgeführt.

8.2. Integration

Die zur Quantifizierung herangezogenen Signale des Analyten Codergocrinmesilat (H^{5'}-Signale im Bereich zwischen 4,5 und 4,9 ppm), des Kalibrierstandards DMABE (CH₂-Signal bei etwa 4,2 ppm) und des ERETIC-Signals werden manuell integriert.

8.3. Berechnung des absoluten Gehalts

Der Gehalt der vier Einzelkomponenten des Mehrkomponentengemisches wird mit Hilfe des kalibrierten ERETIC-Signals berechnet. Die dazu benötigten Formeln lauten wie folgt:

$$n_{ERETIC} = \frac{m_{Std} \cdot P_{Std}}{m_{Std} + m_{LM}} \cdot \frac{I_{ERETIC}}{I_{Std}} \cdot \frac{N_{Std}}{M_{Std}}$$

$$P_{Cod} = \left(n_{ERETIC} \cdot \frac{I_{Cod}}{I_{ERETIC}} \cdot \frac{M_{Cod}}{N_{Cod}} \right) / \left(\frac{m_{Cod}}{m_{Cod} + m_{LM}} \right)$$

$I_{Cod}, I_{Std}, I_{ERETIC}$	Signalintensität
N_{Cod}, N_{Std}	Kernanzahl
M_{Cod}, M_{Std}	Molekulargewicht [g/mol]
m_{Cod}, m_{Std}, m_{LM}	Masse [mg]
P_{Cod}, P_{Std}	Gehalt [% g/g]
n_{ERETIC}	Simulierter Kerngehalt [mol/g]

Der Gesamtgehalt an Codergocrinmesilat wird nach Addition der zuvor ermittelten Gehalte der vier Komponenten ermittelt.

Programm der FAH-Informationsveranstaltung

Quantitative NMR

Innovatives Verfahren in der Analytik von Arzneistoffen

am 12. Februar 2009

**in den Geschäftsräumen des Unternehmens Spectral Service
Laboratorium für Auftragsanalytik GmbH, Köln**

Begrüßung

Dr. Bernd Diehl, Spectral Service Laboratorium für Auftragsanalytik GmbH, Köln

Referate

- **NMR-Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik – Heparin und mehr**
Tanja Beyer, Universität Würzburg, Würzburg
- **ERETIC – eine Methode der quantitativen NMR**
Dr. Frank Malz, Deutsches Kunststoff-Institut DKI, Darmstadt
- **Statistische Auswertung von NMR-Spektren in der Gemischanalytik**
Dr. Rainer Kerssebaum, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
- **Routine Usage of Quantitative NMR in Industry**
Dr. Winfried Etzel, Bayer CropScience AG, Monheim
- **The Use of Proton NMR as an alternative for the Amino Acid Analysis for the Identity of Peptides**
Dr. Edwin R. Kellenbach, Schering-Plough, BH Oss, Niederlande
- **Quantitative NMR mit Cryo-Probenköpfen**
Dr. Bernd Diehl, Spectral Service Laboratorium für Auftragsanalytik GmbH, Köln

Podiumsdiskussion mit den Referenten

Besichtigung der NMR-Laboratorien des Unternehmens Spectral Service Laboratorium für Auftragsanalytik GmbH

9.4 Teilnehmer der FAH-Informationsveranstaltung am 12. Februar 2009

Frau S. Engel (BfArM, Bonn), Frau U. Fischer (BfArM, Bonn), Herr R. Hegendörfer (EXCELLA GmbH, Feucht), Herr H. Heusler (HHAC Labor Dr. Heussler GmbH, Stutensee), Frau R. Hühne (BfArM, Bonn), Herr M. Janik (AQura GmbH, Hanau-Wolfgang), Herr F. Jung (LIGA.NRW, Zentrum für Öffentliche Gesundheit - Arzneimittel, Münster), Herr. H. Keck (Regierung von Oberbayern, München), Herr M. Kiesel (AQura GmbH, Hanau-Wolfgang), Herr L. Kopanski (BfArM, Bonn), Herr G. Krack (BASF SE, Ludwigshafen), Herr K. Kuchta (Universität Leipzig), Herr T. Lehmann (EXCELLA GmbH, Feucht), Herr U. Lipke (BfArM, Bonn), Frau P. Lohmann (Almirall Hermal GmbH, Reinbeck), Herr J. Meyer (InfraServ GmbH & Co. Knapsack KG, Hürth), Herr W. Ockels (Spectral Service Laboratorium für Auftragsanalytik GmbH, Köln), Herr C. Schollmeyer (Universität Würzburg), Herr W. Seitz (InfraServ GmbH & Co Knapsack KG, Hürth), Herr R. Staab (DOLORGIET GmbH & Co. KG, Sankt Augustin), Herr H. van Lishaut (Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen), Frau I. Wawer (Universität Warschau, Polen), Herr G. Wöhrle (Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen), Herr A. Zängerlein (Klosterfrau Berlin GmbH, Berlin), Frau B. Grohs (FAH, Bonn), Frau M. Saul (FAH, Bonn)

10 Veröffentlichung der Projektergebnisse

Folgende Veröffentlichungen in Form von Publikationen, Postern und Vorträgen sind bereits erfolgt:

Publikationen

- B. Diehl, F. Malz, U. Holzgrabe: "Quantitative NMR spectroscopy in quality evaluation of active pharmaceutical ingredients (APIs) and excipients", *Spectroscopy Europe*, 19 (2007) 15-19.
- F. Malz: "Quantitative NMR in the solution state NMR"; in: U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2008, 43-62.
- U. Holzgrabe: "qNMR spectroscopy in drug analysis – a general view"; in: U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2008, 131-137.
- T. Beyer, U. Holzgrabe: "Investigation of multi-component drugs by NMR spectroscopy"; in: U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl, *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2008, 141-155.
- T. Beyer, B. Diehl, G. Randel, E. Humpfer, H. Schäfer, M. Spraul, C. Schollmayer, U. Holzgrabe: "Quality assessment of unfractionated heparin using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 13-19.

Posterbeiträge

- U. Holzgrabe, T. Beyer, B. Diehl, F. Malz: "ERETIC – a tool for assay determinations in the pharmaceutical analysis by quantitative NMR", *New Frontiers in the Qualities of Medicines*, EDQM, Strasbourg, Frankreich, 13.-15.06.2007
- T. Beyer, U. Holzgrabe: "Quantitative NMR spectroscopy in multi-component drug analysis", *DPhG-Jahrestagung 2007*, Erlangen, 10.-13.10.2007
- T. Beyer, U. Holzgrabe: "Investigation of multi-component drugs by NMR spectroscopy", *19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Danzig, Polen, 9.-11.06.2008.

- T. Beyer, U. Holzgrabe: "Heparin and its impurities investigated by nuclear magnetic resonance spectroscopy", DPhG-Jahrestagung 2008, Bonn, 8.-11-10.2008
- T. Beyer, B. Diehl, G. Randel, C. Schollmayer, U. Holzgrabe: "Heparin contaminants investigated by NMR spectroscopy", 32. Bruker NMR Benutzertagung, Ettlingen, 4.-5.11.2008.

Vorträge

- F. Malz, C. Jäger: "Quantitative NMR – eine mag(net)ische Methode zur Gehaltsbestimmung für die pharmazeutische Analytik", Fa. Boehringer, 18.06.2007.
- U. Holzgrabe: "Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis", 19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Danzig, Polen, 9.-11.06.2008.
- F. Malz: "ERETIC – eine Methode der quantitativen NMR" , FAH- Informationsveranstaltung "Quantitative NMR – Innovatives Verfahren in der Analytik von Arzneistoffen", Köln, 12.02.2009.
- T. Beyer: "NMR-Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik - Heparin und mehr", FAH-Informationsveranstaltung "Quantitative NMR – Innovatives Verfahren in der Analytik von Arzneistoffen", Köln, 12.02.2009.
- U. Holzgrabe: "Quantitative NMR in pharmaceutical analysis", The 2nd International Meeting on NMR and Quantitative Analysis, Stockholm, Schweden, 21.-22.04.2009.

Weiterhin wurden die jeweils erarbeiteten Ergebnisse auf 5 Sitzungen des projektbegleitenden Ausschusses vorgestellt.