

GIT SONDERDRUCK

LABOR- FACHZEITSCHRIFT

47. Jahrgang
Februar 2003
S. 141-145

2



REGINA SCHLINK
CLAUDIA DENGLER
DR. PETER KIRSCHENBÜHLER
DR. KARL-HEINZ SURBORG

Automatische Karl-Fischer- Wasserbestimmung in Arzneistoffen

GIT VERLAG
A Wiley Company
www.gitverlag.com

Automatische Karl-Fischer-Wasserbestimmung in Arzneistoffen



Regina Schlink



Peter Kirschenbühler



Claudia Dengler



Karl-Heinz Surborg

Keywords

Wasserbestimmung, Arzneistoffe, European Pharmacopoeia, Karl-Fischer-Titration, KF-Ofenmethode, Automation

Die European Pharmacopoeia lässt den Wassergehalt vieler Arzneistoffe durch Ermittlung des Trocknungsverlustes im Trockenschrank oder Exsikkator bestimmen. In der Regel handelt es sich hierbei um Substanzen, die mittels direkter Karl-Fischer-Titration nicht analysiert werden können. Wir haben für die Wasserbestimmung anstelle der Trockenschrank-Methode ein automatisiertes Karl-Fischer-Ofensystem – bestehend aus dem Oven Sample Processor 774 und einem KF-Coulometer – eingesetzt. Die mit diesem System erhaltenen Werte liegen durchweg innerhalb der im Arzneibuch spezifizierten Intervalle und zeichnen sich durch hervorragende Wiederholbarkeit aus.

Viele pharmazeutische Wirk- und Hilfsstoffe enthalten Wasser in adsorbierter Form (Oberflächenwasser) oder als Hydrat gebunden (Kristallwasser). Da der Wassergehalt die Qualität, Haltbarkeit, Stabilität und Wirkstoff-Freisetzung von Medikamenten wesentlich beeinflusst, kommt der Wasserbestimmung in der pharmazeutischen Analytik grosse Bedeutung zu.

In der European Pharmacopoeia, 4th Edition (2002), werden verschiedene Verfahren zur Bestimmung des Wassergehalts von Arzneistoffen beschrieben. Die mit Abstand wichtigste Methode ist die Karl-Fischer-Titration. In der Regel wird eine volumetrische KF-Titration (Halbmikrobestimmung) durchgeführt, bei Substanzen mit sehr geringem Wassergehalt erfolgt die Titration coulometrisch (Mikrobestimmung).

KF-Ofenmethode für schwierige Proben

Viele Substanzen geben ihr Wasser nur sehr langsam oder erst bei hohen Temperaturen ab. Sie sind daher für die direkte Karl-Fischer-Titration nicht geeignet. Ein weiteres Problem ist die geringe Löslichkeit gewisser Proben in Alkoholen. Traditionelle Methoden empfehlen hier die Verwendung gesundheitsschädlicher Lösungsvermittler oder eine aufwändige Probenvorbereitung. Andere Substanzen

reagieren mit den KF-Reagenzien unter Wasserfreisetzung oder Iodverbrauch, wodurch das Ergebnis verfälscht wird. Für derartige Arzneistoffe schreibt die European Pharmacopoeia anstelle der Karl-Fischer-Titration die Ermittlung des Trocknungsverlustes im Trockenschrank oder Exsikkator (gegebenenfalls unter Vakuum) vor. Mit dieser Methode werden jedoch alle bei der betreffenden Temperatur flüchtigen Verbindungen (z.B. Verunreinigungen) erfasst und nicht spezifisch der Wassergehalt der Substanz.

Die genannten Probleme können durch Anwendung



Abb. 1: Das für die Untersuchungen eingesetzte automatisierte Analysensystem, bestehend aus Oven Sample Processor 774 und KF-Coulometer 756.

der KF-Ofenmethode umgangen werden. Dabei wird die zu untersuchende Substanz in einem vorgeschalteten Ofen erhitzt, das freigesetzte Wasser mittels eines Trägergases in die Titrierzelle überführt und dort durch Karl-Fischer-Titration bestimmt. Da nur das Wasser in die Vorlage gelangt, die Probe selbst dagegen nicht mit dem KF-Reagenzien in Kontakt kommt, sind unerwünschte Nebenreaktionen und Matrixeffekte ausgeschlossen.

Automatisierung bringt klare Vorteile

Der Oven Sample Processor 774 ist die Weiterentwicklung des konventionellen Karl-Fischer-Trockenofens. Er gestattet die Automatisierung der KF-Ofenmethode. Die Proben werden nicht mehr mittels Wägeschiffchen in den Ofen eingebracht, sondern es kommt die Vial-Technik zum Einsatz. Die zu untersuchenden Substanzen werden direkt in Probenvials eingewogen, diese dicht verschlossen und auf dem Rack des Oven Sample Processors platziert. Bei der Analyse wird das Probengefäß vom Drehteller oberhalb des Ofens positioniert und dann automatisch in den Heizblock abgesenkt. Dabei durchsticht eine Doppelhohlnadel das Septum des Gefäßes. Über die Einlassnadel wird ein trockener Trägergasstrom (Luft oder Inertgas) durch die erhitzte Probe geleitet. Das mit der ausgetriebenen Feuchtigkeit beladene Trägergas strömt dann durch die Ablufnadel weiter über einen beheizten Transfer Schlauch direkt in die Titrierzelle, in der die Karl-Fischer-Wasserbestimmung erfolgt.

Diese kann je nach Wassergehalt der Probe volumetrisch oder, im Spurenbereich, coulometrisch durchgeführt werden.

Die Automatisierung der Karl-Fischer-Wasserbestimmung mit dem Oven Sample Processor 774 bringt entscheidende Vorteile:

- Identische, reproduzierbare Analysenbedingungen für alle Proben, was sich in einer deutlich verbesserten Wiederholbarkeit der Resultate niederschlägt.
- Deutlich erhöhter Probenumsatz und damit verbesserte Wirtschaftlichkeit.
- Reduktion der manuellen Probenvorbereitung auf ein Minimum.
- Beträchtliche Zeitersparnis.
- Keine Kontamination von Ofen und Titrierzelle, folglich auch keine Verschleppungs- und Memory-Effekte.
- Viel geringerer Reagenzienverbrauch, da die Titriervorlage nur noch selten ausgetauscht werden muss.
- Verbesserte Wasserfreisetzung aus der Probe, weil das Trägergas nicht über die Probe, sondern direkt durch diese hindurchgeleitet wird.

Der Oven Sample Processor bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Temperaturgradienten zu fahren. Anhand der registrierten Wasserfreisetzungskurve kann die für die jeweilige Probe optimale Ausheiztemperatur bestimmt werden. Die Kurve erlaubt zudem Aussagen über die Kinetik der Wasserfreisetzung in Abhängigkeit von der Temperatur.

Beschreibung der durchgeführten Untersuchungen

Unter Anwendung der KF-Ofenmethode wurden rund 40 Arzneistoffe aus der European Pharmacopoeia analysiert. Zum Einsatz kam dabei der Oven Sample Processor 774 in Kombination mit einem KF-Coulometer 756. Bei den untersuchten Arzneistoffen handelt es sich um Substanzen mit definiertem Wassergehalt, die mit den KF-Reagenzien zum Teil störende Nebenreaktionen eingehen und daher mittels direkter Karl-Fischer-Titration nicht analysiert werden können. Gemäss Arzneibuch ist ihr Wassergehalt durch Ermittlung des Trocknungsverlustes im Trockenschrank oder Exsikkator (gegebenenfalls unter Vakuum) zu bestimmen.

Verwendete Geräte und Zubehör

- Oven Sample Processor 774
- KF-Coulometer 756, inklusive diaphragmaloser KF-Zelle
- Magnetrührer 728
- Zusatzausrüstung 6.5617.000 für den automatischen Reagenzwechsel
- Dosino 700
- PC mit Metrodata-Software Vesuv 3.0 für die Datenaufnahme, -sicherung und -nachbearbeitung

Verwendete Reagenzien

- Hydranal Coulomat AG Oven, Riedel-de Haën Nr. 34739
- Hydranal Water Standard KF Oven (Kaliumcitrat-Monohydrat), Riedel-de Haën Nr. 34748
- Stickstoff als inertes Trägergas

Analysenablauf

Jeweils 15 bis 30 mg der zu untersuchenden Arzneistoffe werden in die Probenvials eingewogen und diese mittels PTFE-beschichteten Septen hermetisch verschlossen. Pro Substanz wird mindestens eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Vor Beginn jeder Bestimmung wird das Gesamtsystem konditioniert, bis eine konstante niedrige Drift (ca. 10 µg/min) erreicht ist. Dabei befindet sich die Nadel in einem speziellen Konditioniergefäß auf dem Rack des Oven Sample Processors.

Um korrekte Ergebnisse zu erzielen, ist es erforderlich, den Blindwert der Probenvials – d.h. die an Gefäßwandung, Verschlusskappe und Septum anhaftende Feuchtigkeit – zu bestimmen und bei der Berechnung des Wassergehalts der Proben entsprechend zu berücksichtigen. Hierfür werden drei leere Vials bei der für die jeweilige Probe benötigten Ofentemperatur analysiert.

Zur Überprüfung des Gesamtsystems wird in regelmäßigen Abständen ein zertifizierter KF-Standard (Hydranal Water Standard KF Oven) analysiert.

Ermittlung der Ausheiztemperaturen

Bei der Wahl der Ausheiztemperatur muss einerseits die Thermostabilität (Labilität) des jeweiligen Arzneistoffs beachtet werden, andererseits ist zu berücksichtigen, dass Wasser nur bei Temperaturen um oder über 100 °C ausreichend schnell freigesetzt wird. Die Ofentemperatur sollte also so hoch wie möglich gewählt werden, um kurze Bestimmungszeiten zu gewährleisten, aber noch 20 bis 30 °C unterhalb der Zersetzungstemperatur liegen.

Die Festlegung der Ausheiztemperaturen erfolgt anhand der Wasserfreisetzungskurven, die für alle untersuchten Arzneistoffe im Temperaturbereich 50 ... 250 °C aufgenommen wurden. Abb. 3 zeigt eine solche Wasserfreisetzungskurve für Metamizol-Natrium. Zusätzlich wurden sämtliche Arzneistoffe mittels Kofler-Mikroskop untersucht und ihre Schmelzpunkte ermittelt. Das Gerät gestattet ein genaues Beobachten der Substanz während der Auf-

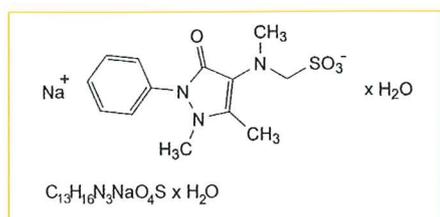


Abb. 2: Strukturformel und Summenformel von Metamizol-Natrium, das als Monohydrat vorliegt.

Tab. 1: Resultate der Karl-Fischer-Wasserbestimmung in ausgewählten Arzneistoffen der European Pharmacopoeia, berechnete Wassergehalte sowie Arzneibuchangaben zum Trocknungsverlust.

Substanz	Summenformel	Molmasse [g/mol]	Schmelzpunkt [°C]	Berechneter Wassergehalt [%]	European Pharmacopoeia Trocknungsverlust [%]	Probeneinwaage [g], Temperatur [°C]	Karl-Fischer-Wasserbestimmung		
							Wassergehalt [%]	Relative Standardabweichung [%]	Temperatur Ofen 774 [°C]
Bupivacainhydrochlorid	$C_{18}H_{29}ClN_2O \times H_2O$	342,91	241 ... 244	5,25	4,5 ... 6,0	1,000, 100 ... 105	5,30	0,82	200
Carbidopa	$C_{10}H_{14}N_2O_4 \times H_2O$	244,25	203 ... 205	7,37	6,9 ... 7,9	1,000, 100 ... 105	7,17	0,35	150
Chinidinsulfat	$C_{40}H_{50}N_4O_8S \times 2 H_2O$	782,96	205 ... 208 (Zers.)	4,60	3,0 ... 5,0	1,000, 130	4,68	1,92	180
Chininhydrochlorid	$C_{20}H_{25}ClN_2O_2 \times 2 H_2O$	396,91	144 ... 155	9,07	6,0 ... 10,0	1,000, 100 ... 105	8,78	1,35	135
Chininsulfat	$C_{40}H_{50}N_4O_8S \times 2 H_2O$	782,96	225 ... 229 (Zers.)	4,60	3,0 ... 5,0	1,000, 100 ... 105	4,63	0,33	130
Cyproheptadinhydrochlorid	$C_{21}H_{22}ClN \times 1,5 H_2O$	350,89	252 ... 253 (Zers.)	7,69	7,0 ... 9,0	1,000, Vac. max. 0,7 kPa, 100 ... 105	7,65	1,02	150
Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	$C_3H_8ClNO_2S \times H_2O$	175,64	≥170 (Zers.)	10,25	8,0 ... 12,0	1,000, 24 h Vac. max. 0,7 kPa	10,33	0,30	150
Dihydralazinsulfat, wasserhaltig	$C_8H_{12}N_6O_4S \times 2,5 H_2O$	333,31	≥160 (Zers.)	13,51	13,0 ... 15,0	1,000, 5 h Vac. max. 0,7 kPa, 50	14,47	0,33	120
Ethacridinlactat-Monohydrat	$C_{18}H_{21}N_3O_4 \times H_2O$	361,40	≥180 (Zers.)	4,98	4,5 ... 5,5	1,000, Vac., 100 ... 105	5,05	0,59	180
Histidinhydrochlorid-Monohydrat	$C_6H_{10}ClN_3O_2 \times H_2O$	209,63	≥240 (Zers.)	8,59	7,0 ... 10,0	1,000, 145 ... 150	8,68	0,59	200
Levothyroxin-Natrium	$C_{15}H_{10}I_4NNaO_4 \times x H_2O$	798,86 (wasserfreie Substanz)	–	–	6,0 ... 12,0	0,100, 100 ... 105	9,68	1,30	150
Metamizol-Natrium	$C_{13}H_{16}N_3NaO_4S \times H_2O$	351,36	220 ... 221 (Zers.)	5,12	4,9 ... 5,3	1,000, 100 ... 105	5,14	0,30	150
Metixenhydrochlorid	$C_{20}H_{24}ClNS \times H_2O$	363,95	215 ... 217	4,94	4,0 ... 6,0	0,500, 138 ... 142	4,00	2,01	180
Morphinhydrochlorid	$C_{17}H_{20}ClNO_3 \times 3 H_2O$	375,85	≥200 (Zers.)	14,37	12,0 ... 15,0	0,500, 130	13,83	0,44	180
Niclosamid-Monohydrat	$C_{13}H_8Cl_2N_2O_4 \times H_2O$	345,13	225 ... 230	5,07	4,5 ... 6,0	1,000, 4h 100 ... 105	5,22	1,27	130

Zers. = Schmelzen unter Zersetzung
Vac. = im Vakuum

heiz- und Schmelzphase, etwaige Farbänderungen, Sublimation oder Zersetzungsreaktionen lassen sich leicht erkennen.

Metamizol-Natrium, dessen Struktur- und Summenformel in Abb. 2 dargestellt sind, schmilzt bei 220 bis 221 °C unter Zersetzung. Eine Wasserbestimmung mittels direkter volumetrischer oder coulometrischer KF-Titration ist nicht möglich, da die Substanz ganz oder teilweise durch Iod oxidiert wird.

Die Aufnahme der Wasserfreisetzungskurve in Abb. 3 erfolgte bei einer Heizrate von 2 °C/min, d.h. Metamizol-Natrium wurde in 100 min (= 6000 s) von 50 auf 250 °C erhitzt. Die rote Kurve entspricht der absoluten Wassermenge, die blaue Kurve kennzeichnet die zugehörige Drift. Die Oberflächenfeuchtigkeit sowie das Kristallwasser der Substanz entweichen im Bereich 0 ... 1600 s (50 ... 103 °C), was sich am stetigen Anstieg der roten Kurve in diesem Bereich wie

auch am Auftreten des „Drift-Peaks“ zeigt. Anschliessend sinkt die Drift auf ihren Ausgangswert von ca. 10 µg/min und ist dann während 3800 s nahezu konstant. Ab 5400 s (230 °C) erfolgt ein steiler Anstieg beider Kurven, offensichtlich wird ab dieser Temperatur Wasser durch Zersetzung frei. Als Ofentemperatur für die Wasserbestimmung in Metamizol-Natrium wurde eine Temperatur aus dem mittleren Bereich des Plateaus der roten Kurve gewählt (150 °C). Damit

ist gewährleistet, dass das Wasser rasch und vollständig freigesetzt wird, aber noch keine Zersetzung stattfindet.

Resultate

In Tab. 1 sind für die 15 wichtigsten der rund 40 untersuchten Arzneistoffe die Resultate der Karl-Fischer-Wasserbestimmung mit dem Oven Sample Processor 774 und KF-Coulometer 756 zusammengefasst (die angegebenen Wassergehalte sind Mittelwerte von

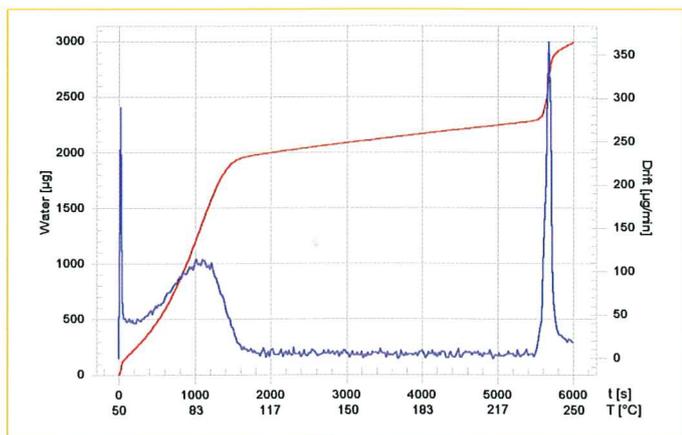


Abb. 3: Wasserfreisetzungskurve für Metamizol-Natrium im Temperaturbereich 50 ... 250 °C. Dargestellt sind die absolute Wassermenge sowie die Drift als Funktion der Zeit bzw. Ofentemperatur.

Dreifachbestimmungen). Zu Vergleichszwecken enthält Tab. 1 auch die theoretischen (berechneten) Wassergehalte der einzelnen Arzneistoffe sowie die Angaben der European Pharmacopoeia zum Trocknungsverlust.

Abb. 4 zeigt exemplarisch die Titrationskurve für Morphinhydrochlorid bei einer Ofentemperatur von 180 °C. Die rote Kurve entspricht wiederum der absoluten Wassermenge und die blaue Kurve der zugehörigen Drift. Die drei „Drift-Peaks“ zeigen sehr deutlich, dass Morphinhydrochlorid als Trihydrat vorliegt. Des Weiteren ist am Verlauf beider Kurven erkennbar, dass die Wasserfreisetzung aus der Substanz nach rund 180 s beendet ist. Der nachfolgende leichte Anstieg der roten Kurve ist auf die geringfügige Drift (Leerverbrauch) zurückzuführen. Allgemein wird empfohlen, mit bestimmten (fest einprogrammierbaren) Extraktionszeiten zu arbeiten (z.B. 5 bis 10 min), um sicherzustellen, dass die Bestimmung nicht zu früh abgebrochen wird. Dies gilt insbesondere für Proben,

die ihr Kristallwasser nur zögerlich abgeben.

Diskussion und Ausblick

Die mit dem Oven Sample Processor 774 und KF-Coulometer 756 bestimmten Wassergehalte liegen durchweg innerhalb der in der European Pharmacopoeia spezifizierten Intervalle. Das Arzneibuch gibt für den Trocknungsverlust meist einen sehr breiten Wiederfindungsbereich an. Im Falle von Chininhydrochlorid liegt dieser – bezogen auf den theoretischen (berechneten) Wassergehalt – z.B. zwischen 66,2 und 110,3 %. Demgegenüber liefert das Ofensystem für diese Substanz eine sehr gute Wiederfindungsrate von 96,8 %. Betrachtet man alle untersuchten Arzneistoffe, so ergibt sich bei Anwendung der KF-Ofenmethode stets eine Wiederfindungsrate zwischen 90 und 110 %.

Auch die Wiederholbarkeit der mit dem Ofensystem gefundenen Werte ist hervorragend. Dies zeigt sich an den relativen Standardabweichungen, die durchweg zwischen 0,30 und maximal 2,0 % liegen.

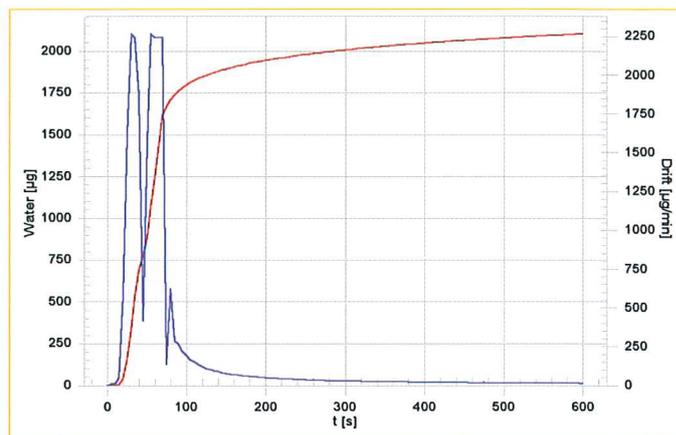


Abb. 4: Titrationskurve für Morphinhydrochlorid bei einer Ofentemperatur von 180 °C. Dargestellt sind die absolute Wassermenge sowie die Drift als Funktion der Zeit.

Gegenüber der Trockenschrank-Methode bietet die Karl-Fischer-Wasserbestimmung mit dem Oven Sample Processor 774 und KF-Coulometer 756 aber noch weitere klare Vorteile:

So lassen sich Bestimmungen, die normalerweise mehrere Stunden dauern, auf 10 bis 12 min verkürzen. Der Analysenablauf ist zudem vollständig automatisiert.

Ein weiterer Pluspunkt ist die Spezifität der beschriebenen Methode. Es wird ausschließlich das aus der Substanz freigesetzte Wasser bestimmt und nicht alle bei der betreffenden Temperatur flüchtigen Komponenten.

Schliesslich ist auch der geringe Substanzeinsatz als Vorteil zu nennen, dies insbesondere bei der Untersuchung sehr teurer Arzneistoffe. Während zur Ermittlung des Trocknungsverlustes in der Regel eine Einwaage von 1 g erforderlich ist, kommt die KF-Ofenmethode in Verbindung mit dem KF-Coulometer mit 15 bis 30 mg aus. Da die Substanz bei der Wasserbestimmung nicht zerstört wird, kann sie auch noch für wei-

tere Untersuchungen eingesetzt werden.

Literatur

- [1] European Pharmacopoeia, 4th Edition (2002)
- [2] Surborg, K.-H.; Junkersdorf, A.: Krankenhauspharmazie 22/6, 271–273 (2001)
- [3] Surborg, K.-H.; Junkersdorf, A.: Dtsch. Apoth. Ztg. 141/28, 61–63 (2001)
- [4] Metrohm AG: Metrohm Information 30/3, 3–4 (2001)

Die Autoren

Regina Schlink
Claudia Dengler
Dr. Peter Kirschenbühler

Metrohm AG
Oberdorfstrasse 68
CH-9101 Herisau
www.metrohm.com

Dr. Karl-Heinz Surborg

Pharmazeutisches Institut
der Universität Bonn
An der Immenburg 4
53121 Bonn

Falls hier
Wasser
vorhanden ist,
Metrohms
KF-Titratoren
finden es

 **Metrohm**
Ionenanalytik

Metrohm AG
CH-9101 Herisau/Schweiz
Telefon +41 71 353 85 85
Fax +41 71 353 89 01
www.metrohm.ch
info@metrohm.ch



KFD-Titrino 758
Volumetrischer KF-Titrator
mit "Live-Kurve" und
Speicherkarte; ist zudem
pH-Meter und Endpunkt-
Titrator



KFT-Titrino 795
Volumetrischer KF-Titrator
mit "Live-Kurve"; hier
mit Flaschenhalter

KF-Titrino 787
Volumetrischer KF-Titrator,
preisgünstig und kompakt



KF-Coulometer 756
Mit integriertem Drucker
und Zusatzausrüstung
für den automatischen
Reagenzwechsel

KF-Coulometer 831
Preisgünstiges Modell
ohne integrierten Drucker



KF-Ofenmodule
Zur Freisetzung der
Feuchtigkeit in Substanzen,
deren Wassergehalt nicht
direkt bestimmt werden kann

KF-Thermoprep 832
Einwaage der Probe in Vials

KF-Ofen 768
Einwaage der Probe in
Glasschiffchen



Oven Sample Processor 774
Probenwechsler zur
Freisetzung der Feuchtigkeit
in Substanzen, die direkt in
ein Probenvial eingewogen
werden