



WHITE PAPER

Empfehlungen für die Validierung von Titrationsmethoden

Zielsetzung der Validierung einer analytischen Methode ist es den Nachweis zu erbringen, dass die ausgewählte Verfahrensweise für den beabsichtigten Zweck geeignet ist. Empfehlungen für die Validierung analytischer Methoden können zum einen im ICH Guidance Q2 (R1) „Validation of

“Analytical Procedures: Text and Methodology” [1] und auch im allgemeinen Kapitel der USP „Validation of Compendial Procedures“ gefunden werden. [2] Das vorliegende White Paper soll Ihnen weitere Empfehlungen geben.

STANDARDISIERUNG

Um möglichst zuverlässige Ergebnisse zu bekommen, ist der erste Schritt bei der Validierung einer Titration die Standardisierung (Titerbestimmung) des Titriermittels. Verdünnung und Einwaagefehler können bereits bei der Herstellung des Titriermittels zu Abweichungen der Nominalkonzentration von der real vorliegenden Titriermittelkonzentration führen. Weiterhin unterliegen alle Titriermittel einer Alterung, was zu einer Abweichung von der ursprünglichen Ausgangskonzentration führt. Daher ist die Standardisierung des Titriermittel von größter Wichtigkeit, selbst wenn kommerziell erworbene Reagenzien verwendet werden. Zusätzlich kann das Ergebnis einer Titerbestimmung zur Bewertung der Systemeignung (Systemeignungstest) herangezogen werden.

Für die Titerbestimmung können entweder Primärstandards oder bereits vorab standardisierte Titriermittel verwendet werden. In beiden Fällen muss die Titerbestimmung bei der gleichen Temperatur durchgeführt werden wie die Titration der Proben, da die Temperatur Einfluss auf die Dichte des Titriermittels hat. Titriermittel dehnen sich mit zunehmender Temperatur aus, dementsprechend verändert sich der Wert des Titers.

Standardisierungen verschiedenster Titriermittel werden im Kapitel „Volumetric Solution section“ der USP – NF beschrieben [3].

Primärstandards erfüllen einige Kriterien, die sie ideal für den Einsatz zur Titerbestimmung von Titriermitteln machen.

Primärstandards haben eine hohe Reinheit und Stabilität, geringe hygrokopische Eigenschaften (um Einwaageveränderungen zu minimieren) und ein hohes Molekulargewicht (um Einwaagefehler zu reduzieren). Zusätzlich lassen sie sich auf Standardreferenzmaterialien zurückführen, wie zum Beispiel auf NIST Standards.

SPEZIFITÄT

Spezifität ist die Eigenschaft, einen Analyten ohne Beeinflussung durch möglicherweise vorhandene andere Komponenten bewerten zu können. Andere Komponenten könnten Verunreinigungen, Zusatzstoffe oder Abbauprodukte enthalten. Daher ist es notwendig nachzuweisen, dass die gewählte analytische Vorgehensweise nicht durch derartige Komponenten beeinflusst wird. Nachgewiesen werden kann dies dadurch, dass ein Zusatz von Verunreinigungen oder Zusatzstoffen zur Probe keinerlei Einfluss auf das Analysenergebnis hat.

Für die Titration bedeutet dies, dass entweder der gefundene Äquivalenzpunkt (EP) durch die zugesetzten Verunreinigungen oder Hilfsstoffe nicht verschoben wird oder dass, falls er verschoben ist, ein zweiter EP beobachtet werden kann, der diesen zugesetzten Komponenten entspricht, wenn ein potentiometrischer Sensor zur Anzeige verwendet wird. Werden Farbindikatoren zur Endpunktbestimmung verwendet und wird dabei eine Verschiebung des Endpunktes beobachtet, kann die Spezifität durch eine zweite Titration mit einem anderen geeigneten Farbindikator nachgewiesen werden.

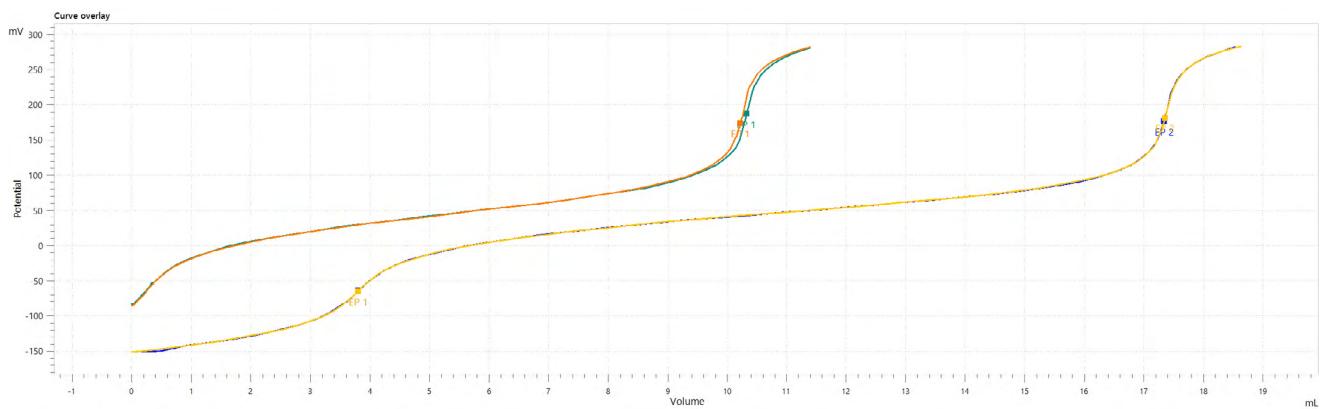


Abbildung 1. Kurvenüberlagerung des Spezifitätstests unter Verwendung von 1 g KHCO₃ mit und ohne 0.5 g K₂CO₃ (grün und orange = kein K₂CO₃ hinzugefügt; blau und gelb = K₂CO₃ hinzugefügt).

In einigen Fällen ist die Titration nicht spezifisch. Dies ist z. B. der Fall, wenn die Bestimmung einer Substanz durch nichtwässrige Titration erfolgt und Verunreinigungen oder Abbauprodukte einen ähnlichen pK_a -Wert haben, wie die interessierende Substanz. In solchen Fällen muss die Spezifität durch andere Techniken ergänzt werden.

Am Beispiel der Bestimmung von Kalumbicarbonat durch Titration mit Salzsäure [4] zeigt sich, dass die erwartete Verunreinigung Kaliumcarbonat ist. Die pK_b -Werte für Kaliumcarbonat liegen bei etwa 8,3 und 3,69, d. h. es ist möglich, beide Spezies während einer Säure-Base-Titration zu trennen. Um dies zu demonstrieren, wurden sowohl reines Kalumbicarbonat als auch eine mit Kaliumcarbonat versetzte Probe mit 1 N Salzsäure VS (1 N hydrochloric acid VS) titriert. **Abbildung 1** zeigt im Vergleich die Überlagerung der Titrationskurven von Kalumbicarbonat mit und ohne Zusatz von Kaliumcarbonat als Verunreinigung. Die Titrationskurven für Kalumbicarbonat allein weisen eindeutig nur einen EP für Kalumbicarbonat auf, während die Titrationskurven für die Lösung mit Kalumbicarbonat und Kaliumcarbonat zwei EPs aufweisen. Der erste Äquivalenzpunkt entspricht dem zugesetzten Kaliumcarbonat, während der zweite der Summe aus Kalumbicarbonat und Kaliumcarbonat entspricht.

LINEARITÄT

Die Ergebnisse eines linearen Analyseverfahrens sind proportional zur Konzentration des Analyten, entweder direkt oder durch eine präzis definierte mathematische Transformation innerhalb eines bestimmten Bereichs. Da es sich bei der Titration um eine absolute Methode handelt, kann die Linearität in der Regel direkt ermittelt werden. Dazu werden mindestens fünf verschiedene Konzentrationen titriert und eine lineare Regression des Probenumfangs gegen das verbrauchte Titrationsvolumen aufgestellt. Zur Bewertung der Linearität wird das Bestimmtheitsmaß (R^2) herangezogen. Es wird empfohlen, einen Konzentrationsbereich von 80 % bis 120 % des vorgesehenen Gehalts zu verwenden [2].

Für das Beispiel Kalumbicarbonat wurden fünf verschiedene Einwaagen im Bereich von 50 % bis 150 % der Einwaage in Doppelbestimmung analysiert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 1** aufgeführt, und die lineare Regressionskurve ist in **Abbildung 2** dargestellt. Mit einem R^2 von 0,9999 über einen Gewichtsbereich von 50 % bis 150 % ist die Bestim-

mung von Kalumbicarbonat durch Titration mit Salzsäure sehr linear.

Tabelle 1. Linearitätsbestimmung für den Test von Kalumbicarbonat

Probenge- wicht (%) für die Linearität	Proben- gewicht (g)	Äquivalenz- punkt- volumen (mL)	Gehalt (%)
50	0.5022	5.1897	102.21
50	0.5023	5.1482	101.37
75	0.7520	7.7571	102.03
75	0.7506	7.6197	100.41
100	1.0012	10.1627	100.40
100	1.0026	10.1881	100.51
125	1.2599	12.8030	100.51
125	1.2534	12.7439	100.57
150	1.5030	15.1888	99.95
150	1.5007	15.2459	100.48

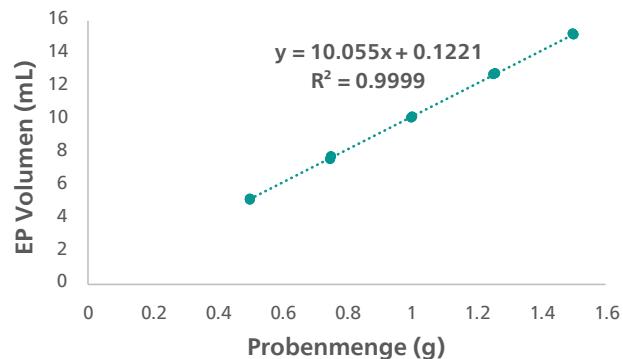


Abbildung 2. Lineare Regressionskurve für die Prüfung von Kalumbicarbonat.

GENAUIGKEIT UND PRÄZISION

Die Genauigkeit ist definiert als die Abweichung des Ergebnisses zum wahren Wert. Die Genauigkeit enthält Informationen über die Verzerrung einer Methode und sollte über den gesamten Bestimmungsbereich ermittelt werden. Außerdem unterscheidet sich die Bestimmung der Genauigkeit bei Gehaltsbestimmungen von der Bestimmung von Verunreinigungen. Bei Gehaltsbestimmungen wird eine Referenzsubstanz mit bekannter Reinheit analysiert, während bei Verunreinigungstests die Probe mit bekannten Mengen der Verunreinigung versetzt wird. Die Genauigkeit wird dann anhand der Wiederfindung des Analyten berechnet.

Die Präzision gibt Auskunft darüber, wie gut die einzelnen Ergebnisse bei der Analyse einer homogenen Probe übereinstimmen. Die Präzision wird normalerweise als Standardabweichung (SD) oder relative Standardabweichung (RSD) angegeben. Die Präzision wird in drei Stufen bewertet: Wiederholbarkeit, mittlere Präzision und Reproduzierbarkeit. Die Wiederholbarkeit bezieht sich auf die Präzision, die von einem einzelnen Analytiker für dieselbe Probe in einem kurzen Zeitraum und mit derselben Ausrüstung für alle Bestimmungen erzielt wird. Die Zwischenpräzision kann durch die Analyse derselben Probe an verschiedenen Tagen, von verschiedenen Analytikern und mit verschiedenen Geräten, wenn möglich im selben Labor, bestimmt werden. Die Reproduzierbarkeit bezieht sich auf die Präzision, die durch die Analyse der gleichen Probe in verschiedenen Laboratorien erzielt wird. Die Reproduzierbarkeit wird in der Regel durch die Durchführung von Laborvergleichsstudien (Ringversuche) ermittelt. Für die Bestimmung der Präzision ist es wichtig, dass nicht nur die Analyse selbst, sondern auch alle Probenvorbereitungsschritte bei jeder Analyse unabhängig voneinander durchgeführt werden.

Die Bestimmung sowohl der Genauigkeit als auch der Präzision ist erforderlich, da nur die Kombination beider Faktoren gewährleistet, dass korrekte Ergebnisse erzielt werden (**Abbildung 3**).

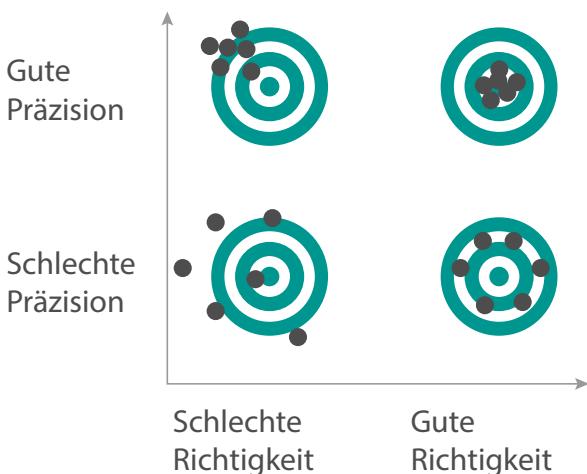


Abbildung 3. Nur wenn sowohl die Präzision als auch die Genauigkeit hoch sind, können korrekte Ergebnisse erzielt werden, da eine hohe Präzision nicht unbedingt eine gute Genauigkeit bedeutet und umgekehrt.

In der Titration werden Genauigkeit und Wiederholbarkeit in der Regel gemeinsam bestimmt. Für die Bestimmung beider Parameter werden mindestens neun Bestimmungen bei drei verschiedenen Konzentrationen empfohlen. Im Falle von Kalumbicarbonat wurden 80 %, 100 % und 120 % der für die Prüfung vorgeschlagenen Einwaage verwendet. Für die Analyse wurde eine Kalumbicarbonatprobe mit bekannter Reinheit verwendet, und jede Einwaage wurde in dreifacher Ausführung titriert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 2** dargestellt. Mit einer relativen Standardabweichung von 0,43 % über alle neun Bestimmungen ist die geforderte Präzision erfüllt. Das erhaltene Resultat liegt mit einem Mittelwert von 100,40 % nahe am Analysenzertifikat des Herstellers (99,9 %) und erfüllt damit die Anforderungen an die Genauigkeit. Um die Zwischenpräzision für den Kalumbicarbonat-Test zu bestimmen, wurden die Präzisions- und Richtigkeitsbestimmungen an einem anderen Tag mit einem anderen Gerät wiederholt. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3** dargestellt. Die geforderte Präzision ist mit einer relativen Standardabweichung von 0,43 % über alle neun Bestimmungen erfüllt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Methodenvalidierung einer Titration stellt sicher, dass die gewählte Titrationsmethode und die verwendeten Parameter ein zuverlässiges und robustes Ergebnis liefern. Vor der Methodenvalidierung ist es notwendig, das Titrermittel zu standardisieren, um genaue Ergebnisse zu erzielen. Die Methodenvalidierung für die Titration sollte die Bestimmung der Spezifität, Linearität, Richtigkeit und Präzision umfassen, um ein vollständiges Bild von der Eignung der Methode für die Analyse des interessierenden Analyten zu erhalten. In Fällen, in denen die Spezifität mit der Titration nicht erreicht werden kann, ist es notwendig, die Titration durch andere Techniken zu ergänzen.

Tabelle 2. Ergebnisse der Genauigkeits- und Präzisionsbestimmungen für Kaliumbicarbonat

Bestimmung	Probengewicht (%) für die Linearität	Probengewicht (g)	Äquivalenzpunktvolumen (mL)	Gehalt (%)
1	80	0.8066	8.1476	99.91
2	80	0.8092	8.2710	101.10
3	80	0.8069	8.1987	100.50
4	100	0.9978	10.1069	100.19
5	100	0.9953	10.1654	101.02
6	100	1.0072	10.1869	100.04
7	120	1.2094	12.3060	100.64
8	120	1.2067	12.2102	100.08
9	120	1.2171	12.3238	100.15
MW				100.40
SD				0.436
RSD				0.43%

Tabelle 3. Ergebnisse der Zwischenpräzision für Kaliumbicarbonat

Bestimmung	Probengewicht (%) für die Linearität	Probengewicht (g)	Äquivalenzpunktvolumen (mL)	Gehalt (%)
1	80	0.8023	8.2194	101.33
2	80	0.8011	8.1468	100.59
3	80	0.8051	8.1834	100.54
4	100	1.0065	10.1819	100.06
5	100	1.0103	10.2640	100.49
6	100	1.0344	10.5486	100.87
7	120	1.2030	12.1670	100.03
8	120	1.2023	12.1789	100.19
9	120	1.2039	12.1819	100.08
MW				100.46
SD				0.433
RSD				0.43%

Referenzen

- [1] ICH Guidance Q2(R1) – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, ICH, 2005. www.ich.org
- [2] USP. <1225> Validation of Compendial Procedures. In: USP 43 – NF 38. Rockville, MD: USP; 2020.
- [3] USP. Volumetric Solutions. In: USP 43 – NF 38, First Supplement. Rockville, MD: USP; 2020.
- [4] USP. Potassium Bicarbonate. In: USP 43 – NF 38, First Supplement. Rockville, MD: USP; 2020.

Autoren

Margareth R. C. Marques¹, Horacio Pappa¹, Michael Chang¹, Lori Spafford², Michael Klein³, Lucia Meier³

¹ U. S. Pharmacopeia

² Metrohm USA

³ Metrohm International Headquarters, Switzerland

Kontakt

Lucia Meier

Metrohm International Headquarters; Herisau, Switzerland

info@metrohm.com