

Quantitative NMR-Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik

–

Identität, Reinheit und Gehalt von Arzneistoffen

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Tanja Beyer
aus Crailsheim

Würzburg 2011

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für meine Eltern und Jörg

So eine Arbeit wird eigentlich
nie fertig, man muss sie für
fertig erklären, wenn man nach
der Zeit und den Umständen
das Möglichste getan hat.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2006 bis September 2010 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

Frau Prof. Ulrike Holzgrabe.

Ihr danke ich für die sehr freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis, die interessante und abwechslungsreiche Themenstellung, ihre Förderung und Unterstützung, für vielseitige Anregungen und Gespräche, ihr stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit und nicht zuletzt für das in mich gesetzte Vertrauen, das mir den Freiraum zum selbstständigen und eigenverantwortlichen Arbeiten gab. Zudem möchte ich Ihr herzlich für die Möglichkeit danken, an verschiedenen internationalen Fachtagungen sowie Sitzungen der Heparin-Expertengruppe des EDQM in Straßburg teilzunehmen.

Dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (BMWi), der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) "Otto von Guericke" e.V. sowie dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Curd Schollmayer, der mir nicht nur mit zahlreichen Tipps den Einstieg in die Welt der NMR-Spektroskopie ungemein erleichtert hat, sondern mich auch während meiner gesamten Doktorarbeit stets tatkräftig unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern der einzelnen Teilprojekte für die gute Zusammenarbeit, die freundliche Unterstützung und den wissenschaftlichen Austausch bedanken: Herrn Frank Malz für die Externen-Standard-Messungen, Herrn Bernd Diehl für die Bereitstellung zertifizierter Referenzsubstanzen und die Durchführung NMR-spektroskopischer 600 MHz-Experimente, Herrn Stefan Almeling für die HPLC-Analyse der Alanin-Modellmischung, Herrn Jochen Norwig für die Bereitstellung der Heparin-Muster sowie deren Untersuchung und statistische Auswertung der IR- und Raman-Spektren, Herrn Eberhard Humpfer sowie Prof. Knut Baumann und Magnus Matz für die statistische Auswertung der Heparin-NMR-Daten, Prof. Susanne Alban, Susanne Lühn und Simone Schiemann für die Durchführung neuentwickelter Gerinnungstests, Herrn Bernhard Wolf und Herrn

Oliver Rädler für die Bestimmung der biologischen Aktivität ausgewählter Heparin-Muster und Daniela Brinz für die kapillarelektrophoretische und chromatographische Untersuchung der Heparin-Muster.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine ehemaligen “Büro-Kollegen” Carina, Johannes und Steffi, die mich nicht nur mit zahlreichen wissenschaftliche Diskussionen tatkräftig unterstützt haben, sondern mich auf mancher Durststrecke stets aufmuntert und zum Lachen gebracht haben.

Das größte Dankeschön geht an meine Eltern und Jörg, die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und aufgemuntert haben und somit sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

T. Beyer, U. Holzgrabe

Investigation of multi-component drugs by NMR spectroscopy

In: U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl (Hrsg.), *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, Elsevier, Amsterdam, S. 141-155, 2008

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

J. Pharm. Biomed. Anal. 48:1-19 (2008)

I. McEwen, B. Mulloy, E. Hellwig, L. Kozerski, T. Beyer, U. Holzgrabe, A. Rodomonte, R. Wanko, J.M. Spieser

Determination of oversulphated chondroitin sulphate and dermatan sulphate in unfractionated heparin by ^1H -NMR. Collaborative study for quantification and analytical determination of LoD

Pharmeuropa Bio 1:31-39 (2008)

J. Norwig, T. Beyer, D. Brinz, U. Holzgrabe, M. Diller, D. Manns

Prediction of the oversulphated chondroitin sulphate contamination of unfractionated heparin by ATR-IR spectroscopy

Pharmeuropa Sci. Notes 1:17-24 (2009)

T. Beyer, C. Schollmayer, U. Holzgrabe

The role of solvents in the signal separation for quantitative ^1H NMR spectroscopy

J. Pharm. Biomed. Anal. 52:51-58 (2010)

T. Beyer, M. Matz, D. Brinz, O. Rädler, B. Wolf, J. Norwig, K. Baumann, S. Alban, U. Holzgrabe

Composition of OSCS contaminated heparin occurring in 2008 in batches on the German market

Eur. J. Pharm. Sci. 40:297-304 (2010)

U. Holzgrabe, C.J. Nap, T. Beyer, S. Almeling

Alternatives to amino acid analysis for the purity control of pharmaceutical grade L-alanine

J. Sep. Sci. 33:2402-2410 (2010)

T. Beyer, B. Diehl, U. Holzgrabe

Quantitative NMR spectroscopy of biologically active substances and excipients

Bioanal. Rev. 2:1-22 (2010)

S. Alban, S. Lühn, S. Schiemann, T. Beyer, J. Norwig, C. Schilling, O. Rädler, B. Wolf, M. Matz, K. Baumann, U. Holzgrabe

Comparison of established and novel purity tests for the quality control of heparin by means of a set of 177 heparin samples

Anal. Bioanal. Chem. 399:605-620 (2011)

Posterpräsentationen

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 2007, Straßburg, Frankreich

T. Beyer, U. Holzgrabe

Quantitative NMR spectroscopy in multi-component drug analysis

DPhG Jahrestagung 2007, Erlangen

T. Beyer, U. Holzgrabe

Investigation of multi-component drugs by NMR spectroscopy

19th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Danzig, Polen, 2008

T. Beyer, U. Holzgrabe

Heparin and its impurities investigated by nuclear magnetic resonance spectroscopy

DPhG-Jahrestagung 2008, Bonn

T. Beyer, B. Diehl, G. Randel, C. Schollmayer, U. Holzgrabe

Heparin contaminants investigated by NMR spectroscopy

32. Bruker NMR-Benutzertagung 2008, Ettlingen

T. Beyer, D. Brinz, J. Norwig, M. Matz, M. Doelker, K. Baumann, U. Holzgrabe

Statistical analysis of IR/Raman/NMR spectra, optical rotation, HPLC/CZE, and biological data of pure and OSCS contaminated heparin

3rd Workshop on characterization of heparin products, Rockville, USA, 2009

J. Norwig, B. Dippel, G. Koske, T. Beyer, D. Brinz, U. Holzgrabe

IR and Raman fingerprints of the oversulfated chondroitin sulfate contamination in unfractionated heparin

3rd Workshop on characterization of heparin products, Rockville, USA, 2009

T. Beyer, U. Holzgrabe

NMR spectroscopy detects glycolic impurities in contaminated glycerin

DPhG-Jahrestagung 2009, Jena

M. Matz, T. Beyer, U. Holzgrabe, K. Baumann
Classification of pure and OSCS contaminated heparin samples - benchmarking spectroscopic methods
DPhG-Jahrestagung 2009, Jena

S. Schiemann, S. Lühn, T. Beyer, U. Holzgrabe, S. Alban
Detection of counterfeit heparin: Comparison of two novel assays with ^1H NMR spectroscopy
54. GTH-Jahrestagung 2010, Nürnberg

S. Schiemann, S. Lühn, T. Beyer, U. Holzgrabe, S. Alban
Comparison of three methods for the determination of OSCS in falsified heparin
DPhG-Jahrestagung 2010, Braunschweig

Vorträge

T. Beyer
Methodische Weiterentwicklung und Anwendung der quantitativen NMR-Spektroskopie für die pharmazeutische Analytik von Arzneistoffen
Sitzung des Projektbegleitenden Ausschusses zum AiF-Vorhaben Nr. 14842 N, Würzburg 2007, Bonn 2007, Bonn 2008, Darmstadt 2008, Darmstadt 2009

T. Beyer
NMR-Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik - Heparin und mehr
FAH-Informationsveranstaltung "Quantitative NMR - Innovatives Verfahren in der Analytik von Arzneistoffen", Köln 2009

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1. Orthogonale Methoden in der pharmazeutischen Analytik	3
2. Die NMR-Spektroskopie	9
2.1. Theoretischer Hintergrund	9
2.1.1. Kerndrehimpuls und magnetisches Moment	10
2.1.2. Kerne im statischen Magnetfeld	10
2.1.3. Kernresonanz-Übergänge	12
2.1.4. Relaxation	14
2.1.5. Erfassung des Frequenzspektrums	16
2.1.6. Das Inversion-Recovery-Experiment	17
2.2. Die chemische Verschiebung	19
2.2.1. Ladungsdichte	20
2.2.2. Nachbargruppeneffekte	20
2.3. Grundlagen quantitativer NMR-Spektroskopie	22
2.3.1. Aufnahme des Spektrums	23
2.3.2. Prozessierung des Spektrums	30
2.4. Optimierung der Signalseparation	33
2.4.1. Lösungsmittel	34
2.4.2. pH-Wert	37
2.4.3. Konzentration	38
2.4.4. Hilfsreagenzien	40
2.4.5. Temperatur	42
2.4.6. Magnetfeldstärke	45
2.5. Quantifizierungsmethoden	45
2.5.1. Relativbestimmung	46
2.5.2. Absolutbestimmung mittels Interner-Standard-Methode	47
2.5.3. Alternative Methoden zur Absolutbestimmung	51
2.6. Allgemeine Aspekte der quantitativen ¹³ C-NMR-Spektroskopie	55
2.7. Methodenvalidierung	58

3. Motivation und Zielsetzung	63
Allgemeiner Teil	66
1. Quantitative Analyse von Mehrkomponentengemischen	69
1.1. Aufgabenstellung	69
1.2. Allgemeine Aspekte	70
1.2.1. Methodenentwicklung in der NMR-Spektroskopie	70
1.2.2. Methodvalidierung	72
1.2.3. Quantitative Analyse	74
1.3. Codergocrinmesilat	75
1.3.1. ^1H -NMR-Spektroskopie	76
1.3.1.1. Methodenentwicklung	76
1.3.1.2. Methodvalidierung	82
1.3.1.3. Quantitative Analyse	86
1.3.2. ^{13}C -NMR-Spektroskopie	87
1.3.3. HPLC	89
1.3.3.1. Arzneibuchanalytik von Codergocrinmesilat	89
1.3.3.2. Quantitative Analyse	90
1.4. Clomifencitrat	91
1.4.1. ^1H -NMR-Spektroskopie	92
1.4.1.1. Methodenentwicklung	92
1.4.1.2. Methodvalidierung	98
1.4.1.3. Quantitative Analyse	102
1.4.2. HPLC	103
1.4.2.1. Arzneibuchanalytik von Clomifencitrat	103
1.4.2.2. Quantitative Analyse	104
1.5. Flupentixoldihydrochlorid	105
1.5.1. ^1H -NMR-Spektroskopie	106
1.5.1.1. Methodenentwicklung	106
1.5.1.2. Methodvalidierung	111
1.5.1.3. Quantitative Analyse	116
1.5.2. ^{19}F -NMR-Spektroskopie	117
1.5.2.1. Methodenentwicklung	118
1.5.2.2. Methodvalidierung	122
1.5.2.3. Quantitative Analyse	124
1.5.2.4. Vergleich von ^1H - und ^{19}F -NMR-Spektroskopie . . .	125
1.5.3. HPLC	126
1.5.3.1. Arzneibuchanalytik von Flupentixoldihydrochlorid .	126

1.5.3.2. Quantitative Analyse	127
1.6. Vergleich der Quantifizierungsmethoden	127
1.6.1. Interner Standard versus Externer Standard	127
1.6.2. Interne-Standard-Methode versus ERETIC-Verfahren	128
1.6.3. NMR versus HPLC	129
1.7. Zusammenfassung	130
2. Reinheitsprüfung von L-Alanin	133
2.1. Aufgabenstellung	133
2.2. Herstellung von L-Alanin und mögliche Verunreinigungen	134
2.2.1. Allgemeine Herstellungsverfahren von Aminosäuren	134
2.2.2. Mögliche Verunreinigungen von Aminosäuren	136
2.2.3. Aminosäuren im Arzneibuch	137
2.2.4. Herstellung von L-Alanin	138
2.3. Untersuchung von Alanin mittels ^1H -NMR-Spektroskopie	140
2.3.1. Signalzuordnung	140
2.3.2. pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung	142
2.3.3. Bestimmung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1	147
2.3.4. Bestimmungsgrenze	148
2.3.5. Linearität	151
2.3.6. Quantitative Reinheitsprüfung auf Verwandte Substanzen	152
2.4. Vergleich NMR-Spektroskopie versus HPLC	157
2.4.1. HPLC-Methode	157
2.4.2. Vergleichskriterium Quantitative Analyse	158
2.4.3. Vergleichskriterium Bestimmungsgrenze	159
2.4.4. Vergleichskriterium Linearität	161
2.5. Zusammenfassung	162
3. Reinheitsprüfung von unfraktioniertem Heparin-Natrium	165
3.1. Aufgabenstellung	165
3.2. Struktur, Eigenschaften und Wirkung von Heparin	166
3.3. Gewinnung von Heparin-Natrium und mögliche Verunreinigungen	170
3.4. Übersulfatiertes Chondroitinsulfat als Kontaminante von Heparin	171
3.5. ^1H -NMR-Spektroskopie	172
3.5.1. Identifizierung von Glykosaminoglykan-Verunreinigungen	173
3.5.2. Nachweisgrenze	177
3.5.3. Quantitative Analyse	180
3.5.4. Identifizierung weiterer Verunreinigungen	186
3.5.5. Reinheitsanalyse von Heparin-Mustern	190
3.6. Weitere ein- und zweidimensionale NMR-Experimente	191

3.7. Alternative Reinheitsprüfungen	196
3.7.1. Arzneibuchanalytik von Heparin	196
3.7.2. Infrarot- und Raman-Spektroskopie	201
3.7.3. Kapillarelektrophorese	203
3.7.4. SAX-HPLC	207
3.8. Revision der Heparin-Monographie	209
3.9. Zusammenfassung	211
4. Reinheitsprüfung von Glycerin	223
4.1. Aufgabenstellung	223
4.2. Untersuchung von Glycerin mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie .	225
4.2.1. Variation des Lösungsmittels	225
4.2.2. Signalzuordnung	228
4.2.3. Bestimmung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1	229
4.2.4. Nachweis- und Bestimmungsgrenze	231
4.2.5. Quantitative Analyse	235
4.3. Zusammenfassung	236
5. Abschließende Bewertung	239
6. Zusammenfassung	245
7. Summary	249
Experimenteller Teil	252
1. Material	255
1.1. Technische Geräte	255
1.2. Verbrauchsmaterialien	255
1.3. HPLC-Säulen	255
1.4. Chemikalien	256
2. Methoden	259
2.1. Standard-NMR-Experimente	259
2.2. "Inversion-Recovery-Experimente"	259
2.3. Quantitative NMR-Experimente	261
2.4. HPLC-Experimente	261
2.5. Spezifische Drehung	261

Einleitung

1. Orthogonale Methoden in der pharmazeutischen Analytik

Arzneimittel sind nützlich und gefährlich zugleich: zum einen haben sie die Eigenschaft, Krankheiten zu heilen, zum anderen können sie aber auch die Gesundheit von Patienten gefährden, u. a. dann, wenn sie Qualitätsmängel aufweisen. Somit stellt die Qualität eines Arzneistoffes neben Wirksamkeit und Unbedenklichkeit ein weiteres essentielles Anforderungsmerkmal an Arzneimittel dar [1].

Die Qualität eines “active pharmaceutical ingredient”, kurz API, wird durch die Parameter Identität, Reinheit und Gehalt definiert. Als Qualitätsmaßstab wird der Übereinstimmungsgrad mit den geforderten Qualitätsmerkmalen eines API festgelegt. Diese Anforderungen werden in einer Qualitätsspezifikation, der sogenannten Arzneibuchmonographie, festgelegt und bilden die Basis der Qualitätsprüfung. Die Einhaltung der im Arzneibuch festgelegten Spezifikationen gewährleistet eine angemessene Qualität der APIs für den medizinischen Gebrauch. Voraussetzung ist allerdings, dass alle relevanten Verunreinigungen mit den vorgeschriebenen Prüfverfahren erfasst werden können. Verunreinigungen werden definiert als “jeder Bestandteil in einer Substanz zur pharmazeutischen Verwendung, mit Ausnahme der chemischen Verbindung, die die Substanz ist” [2, 3].

Die in den Arzneibuchmonographien aufgeführten Reinheitsprüfungen sind auf die Erfassung potentieller Verunreinigungen eines bestimmten Herstellungsverfahrens abgestimmt. Wird nun Syntheseweg und/oder Aufreinigungsprozess verändert bzw. ein Alternativverfahren eingesetzt, kann dies ein abweichendes Verunreinigungsprofil zur Folge haben. Neue, bis dahin unbekannte Verunreinigungen, die mit den routinemäßig eingesetzten Arzneibuchmethoden oftmals nicht erfasst werden können, sowie unerwartete Kontaminanten, die für eine Prüfung nicht vorgesehen sind, werden beobachtet. Demzufolge werden potentielle Verunreinigungen im Rahmen der routine-

mäßig durchgeführten Qualitätskontrolle nach Europäischem Arzneibuch (Ph. Eur.) nicht aufgedeckt bzw. die geforderten Akzeptanzkriterien nicht erfüllt.

In der Vergangenheit wurde über eine Vielzahl an “kontaminierten” Arzneimitteln berichtet, die aufgrund alternativer bzw. abgeänderter Herstellungsverfahren den Anforderungen der Monographie nicht entsprachen bzw. bisher unbekannte, mittels gültiger Arzneibuchmethoden nicht erfassbare Verunreinigungen enthielten (siehe Tabelle 1.1). Während mit Hilfe des unempfindlichen und unselektiven Dün-

Tabelle 1.1: Historische Fallbeispiele kontaminierter Arzneimittel.

Jahr	Arznei-/Hilfsstoff	Verunreinigung(en)	Literatur
1987	Pethidin	MPTP ¹	[4]
1990	Tryptophan	diverses Verunreinigungsprofil	[5–11]
1995	Dequaliniumchlorid	quartäre Nebenprodukte	[12]
1997	Fluoxetin	diverses Verunreinigungsprofil	[13, 14]
1998	Erythromycin	verschiedene Lösungsmittel	[15]
1999	Trimethoprim	diverses Verunreinigungsprofil	[16]
2000	Diclofenac-Natrium	N-Phenyl-2,6-dichloranilin	[17]
2000	Gentamicin	“Off-Label-Use”	[18–22]
2001	Indometacin	diverses Verunreinigungsprofil	[23]
2007/08	Heparin	OSCS ²	³
2009	Glycerin	Diethylenglycol	⁴

¹ MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

² OSCS: übersulfatiertes Chondroitinsulfat

³ siehe Allgemeiner Teil, Kapitel 3

⁴ siehe Allgemeiner Teil, Kapitel 4

schichtchromatographie-Nachweises (DC) für viele Arzneistoffe häufig keine weiteren Verunreinigungen detektiert werden konnten, zeigte der Einsatz von modernen Verfahren wie Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Gaschromatographie (GC), Kapillarelektrophorese (CE) und Kernresonanzspektroskopie (NMR) oftmals weitere Verwandte Substanzen. So wurden bei der Untersuchung von Trimethoprim-Chargen fünf verschiedener Hersteller aus drei Ländern unter Einsatz einer Reversed-Phase-HPLC-Methode mit Gradientenelution zwei neue Verunreinigungen erfasst, die mit Hilfe der DC-Arzneibuchmethode nicht detektiert werden konnten [16]. Ähnliche Ergebnisse zeigte die Untersuchung von 38 Indometacin-Chargen; während alle analysierten Proben der Spezifikation der Monographie mittels DC-Nachweis ent-

sprachen, wurden mittels HPLC-UV und NMR-Spektroskopie bis dahin unbekannte Verunreinigungen detektiert, zudem entsprachen 42 % der untersuchten Indometacin-Chargen nicht den Anforderungen der Pharmakopöe [23]. Am Beispiel von Fluoxetinhydrochlorid deckten jedoch selbst empfindliche HPLC-Methoden nicht zwangsläufig jede Verunreinigung ab. Für den Arzneistoff sind mehrere Herstellungswege mit unterschiedlichem Verunreinigungsprofil bekannt. Während eine Vielzahl der erwarteten Verunreinigungen mit der in der “United States Pharmacopoeia” (USP) beschriebenen isokratischen HPLC-Methode erfasst werden konnten, wurden andere nur mit Hilfe einer optimierten Gradienten-HPLC-Methode bzw. mittels GC detektiert [13, 14].

Das Auftreten neuer Verunreinigungen ist stets mit der Gefahr von möglicherweise schwerwiegenden, unerwünschten Arzneimittelwirkungen und einer Gefährdung der Arzneimittelsicherheit verbunden, da die pharmakologisch-toxischen Eigenschaften und somit die Unbedenklichkeit der bis dahin unbekannteten Verunreinigungen oftmals nicht bekannt sind. Eines der bekanntesten Beispiele ist wohl die sogenannte Tryptophan-Affäre. Bei der Anwendung von Tryptophan erkrankten im Jahre 1989 eine Vielzahl an Patienten am sogenannten Eosinophilie-Myalgie-Syndrom; etwa 30 Patienten verstarben [5, 6]. Untersuchungen ergaben, dass alle Betroffenen Präparate mit einer Tryptophan-Charge eines bestimmten japanischen Herstellers eingenommen hatten. Dieser hatte den Wirkstoff nicht wie bis dahin üblich auf synthetischem Wege, sondern mittels Fermentation gewonnen; zudem wurde das aufwendige Aufreinigungsverfahren verändert, indem die Aktivkohle-Menge reduziert wurde. Die Änderung des Produktionsschrittes hatte das Auftreten neuer Verunreinigungen zur Folge, die mit den damals gültigen Arzneibuchmethoden wie Prüfung auf Ninhydrin-positive Substanzen und optischer Drehung nicht erkannt werden konnten. Als mögliche “Verursacher” wurden drei Verunreinigungen, der “Peak E”, der als 1,1'-Ethylidenbistryptophan identifiziert wurde [7–9], der “Peak UV-5”, dem 3-Phenylamino-L-alanin [10] zugeordnet wurde, und das 2-(3-Indolylmethyl)-L-tryptophan [11] mit den berichteten Zwischenfällen in Zusammenhang gebracht; nachdem die entsprechende Charge vom Markt genommen wurde, wurden keine weiteren Erkrankungen beobachtet. Im Zuge dieser Vorfälle wurde die Tryptophan-Monographie mit einer geeigneten HPLC-Methode, die eine Erfassung der erwähnten Verunreinigungen bis in den ppm-Bereich ermöglicht, ergänzt [24].

Die Gefahr einer Tryptophan-Affäre besteht jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt auch für eine Vielzahl anderer Aminosäuren, deren Reinheit trotz neuer, alternativer Herstellungsverfahren wie der Fermentation weiterhin mittels DC-Nachweis und optischer Rotation geprüft werden und somit die Erfassung einer Vielzahl an potentiellen Verunreinigungen durch die Monographie nicht abgedeckt ist. Alternative Reinheitsprüfungen zeigten, dass Aminosäuren, die den Anforderungen der jeweiligen Monographie entsprachen, bei der Untersuchung mittels mizellarer elektrokinetischer Chromatographie (MEKC), einer Sonderform der CE, weitere, mit den alten Methoden nicht erfassbare Verwandte Substanzen wie beispielsweise Aminosucker, Di-/Tripeptide und Nukleinsäuren nachgewiesen werden konnten [25].

Die aufgezeigten Beispiele stehen repräsentativ für eine Vielzahl anderer Arzneistoffe. Unterschiedliche Herstellungsverfahren resultieren in der Regel in unterschiedlichen Verunreinigungsprofilen, die nicht zwangsläufig von den entsprechenden Prüfverfahren der Arzneibücher abgedeckt werden können; folglich besteht eine Gefährdung der Arzneimittelsicherheit. Ein weiteres Problem im Zuge der Kostenreduktion von Arzneistoffen ist die Produktion von Wirkstoffen in Ländern wie China oder Indien, die oftmals veränderte Herstellungsverfahren einsetzen und nicht über die nötige Ausstattung zur Produktion sowie die Kenntnis zur Qualitätskontrolle verfügen [17]. Zudem besteht hier die große Gefahr möglicher Arzneimittelfälschungen wie aktuelle Fälle von kontaminiertem Heparin, Glycerin und melaminhaltigem Milchzucker beweisen. Hier wurden Wirkstoffe, Hilfsstoffe sowie Nahrungsmittel bewusst mit oft schädlich wirkenden Substanzen versetzt, die mit den gültigen Prüfmethode internationaler Arzneibücher in der Qualitätskontrolle nicht nachgewiesen werden konnten.

Somit ist der Einsatz zusätzlicher, alternativer Methoden, sogenannte orthogonale Methoden, von großer Bedeutung, ja sogar notwendig. Methoden werden als orthogonal bezeichnet, wenn sie unabhängig voneinander sind, d. h. ihr zugrundeliegender physikalischer Mechanismus unterscheidet sich. Ein orthogonales Verfahren ermöglicht folglich die Bestätigung des Ergebnisses einer alternativen Methode bzw. die Erfassung neuer Verunreinigungen.

Wurde die Reinheit von Arzneistoffen im Arzneibuch in der Vergangenheit überwiegend mittels Dünnschichtchromatographie geprüft, ist die Arzneibuchkommission bemüht, diese durch moderne chromatographische Verfahren zu ersetzen; so wird

heutzutage im Arzneibuch eine Prüfung auf Verwandte Substanzen in vielen Fällen mittels HPLC vorgeschrieben. Da die potentiellen Verunreinigungen oftmals eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit zur Hauptkomponente aufweisen, werden diese u. a. vom Hauptpeak schlecht abgetrennt bzw. von diesem sogar überlagert, so dass mögliche Verunreinigungen übersehen werden können [26, 27]. Dieses Phänomen zeigte sich beispielsweise am bereits erwähnten Fluoxetin-Beispiel; hier wurde der Nachweis von zwei Verunreinigungen erst mittels einer optimierten HPLC-Methode ermöglicht.

Eine Vielzahl an Untersuchungen von Arzneistoffen mit mindestens zwei unterschiedlichen Verfahren hat die Notwendigkeit des Einsatzes orthogonaler Methoden im Rahmen der Qualitätskontrolle sowie eine Auswahl geeigneter Alternativverfahren aufgezeigt. Geeignete orthogonale Methoden zu konventionell eingesetzten HPLC-Methoden sind Verfahren wie CE, GC und NMR-Spektroskopie. Eine Reihe von Studien zum Thema "orthogonale Methoden" konnten aufzeigen, dass diese Methoden die Ergebnisse der HPLC-Reinheitsanalytik bestätigten bzw. sogar die Detektion bisher nicht detektierbarer Verunreinigungen ermöglichten [22, 28–33].

Als Beispiel ist Gentamicin zu nennen; während die vorgeschriebene HPLC-Methode breite, nicht vollständig basisliniengetrennte Peaks für die fünf Hauptkomponenten aufweist [34], konnten mittels Kapillarelektrophorese und NMR-Spektroskopie neben den Hauptkomponenten selbst potentielle Verunreinigungen wie Sisomicin und Netilmicin qualitativ und quantitativ erfasst werden [19–22]. Ähnliche Ergebnisse lassen sich für kontaminiertes Heparin aufzeigen. Während die Kontaminante "Übersulfatiertes Chondroitinsulfat" mit Hilfe der vorgeschriebenen Arzneibuchmethoden nicht erfasst werden konnte, erwies sich hier vor allem die NMR-Spektroskopie als geeignete Methode [35, 36].

Die NMR-Spektroskopie bietet als ein schnell und einfach durchzuführendes Screening-Verfahren die Möglichkeit, neue Verunreinigungen zu erfassen und gleichzeitig strukturell zu identifizieren. Da ein NMR-Spektrum meistens aus einer Vielzahl an Signalen besteht und die chemische Verschiebung, d. h. die Lage eines Signals, von der chemischen Struktur des Moleküls abhängt, können mit Hilfe dieses Verfahrens selbst strukturell sehr ähnliche Moleküle erfasst werden; hierzu ist einzig ein vollständig separiertes Signal für die Verwandte Substanz notwendig. Die NMR-Spektroskopie bietet den Vorteil, dass die Methode nicht wie bei chromatographischen Methoden auf

ein bestimmtes Verunreinigungsprofil hin optimiert wird, so dass hier die Wahrscheinlichkeit neue Verunreinigungen zu erfassen deutlich höher liegt. Heutzutage wird daher in vielen pharmazeutischen Unternehmen von neuen Arzneistoffchargen routinemäßig ein NMR-Spektrum aufgenommen [17]; zusätzliche Signale können Hinweise sowohl auf alternative Herstellungswege als auch auf bewusste Kontaminierungen darstellen. Die NMR-Spektroskopie ist somit nicht nur ein geeignetes Verfahren zur Strukturaufklärung von neu synthetisierten Substanzen, sondern sie ist ebenfalls im Rahmen der Qualitätskontrolle von Arzneistoffen sowie auf dem Gebiet des “Impurity Profiling” zur Suche neuer Verunreinigungen ein geeignetes, jedoch bis heute oftmals zu selten eingesetztes Verfahren.

2. Die NMR-Spektroskopie

2.1. Theoretischer Hintergrund

Nach der Entdeckung des Kernspins durch Pauli [37], sowie der Möglichkeit, das magnetische Moment eines Kerns, eine Folge seines Kernspins, zu messen [38], gelang im Jahre 1946 den beiden Arbeitsgruppen Purcell, Torrey und Pound [39] sowie Bloch, Hansen und Packard [40] unabhängig voneinander der erste Nachweis von Kernresonanzsignalen an festen und flüssigen Substanzen. Seitdem unterlag diese Technik einer stetigen Weiterentwicklung – Einführung der Fourier-Transformation, Übergang von Continuous-Wave-Spektrometern zur Impuls-Spektroskopie, stetige Erhöhung der Magnetfeldstärke, Einführung mehrdimensionaler Messtechniken, Kopplung mit anderen Verfahren etc. – so dass dieses leistungsstarke Verfahren heutzutage ein breit gefächertes Einsatzgebiet aufweist.

Bis heute hat kaum eine andere physikalische Methode die Chemie so nachhaltig beeinflusst wie die NMR-Spektroskopie. Ihre zwei wichtigsten Parameter, die chemische Verschiebung und die Spin-Spin-Kopplung, bilden bis heute die Grundlage für eines ihrer Hauptanwendungsgebiete, die Strukturaufklärung von organischen Molekülen. Jedoch ist diese Technik längst in andere Gebiete vorgedrungen: Beispielsweise können in der Biologie heutzutage durch ihren Einsatz biochemische Prozesse *in vivo* sowie physiologische Vorgänge studiert werden, die Kernspintomografie ermöglicht durch Bilderzeugung eine medizinische Diagnose bei Patienten und ihr Einsatz als quantitative Messmethode bietet eine geeignete Alternativmethode zu konventionell eingesetzten Verfahren im Rahmen der Qualitätskontrolle von Arzneistoffen.

2.1.1. Kerndrehimpuls und magnetisches Moment

Der Drehimpuls \mathbf{P} ist neben Masse und Ladung eine weitere grundlegende Eigenschaft eines quantenmechanischen Teilchens. Speziell der Drehimpuls eines Atomkerns, auch Kernspin genannt, verhält sich so, als würde sich der geladene, kugelförmig angenommene Kern um eine bestimmte Kernachse drehen. An kleinen physikalischen Systemen wie dem Atom zeigt sich, dass der Drehimpuls gequantelt ist, d. h. die Drehimpulsquantenzahl I , die u. a. seinen Betrag P bestimmt, kann nur halbzahlige oder ganzzahlige Werte annehmen:

$$P = \sqrt{I(I + 1)} \cdot \hbar, \quad I \in \{0, 1/2, 1, 3/2, \dots\} \quad (2.1)$$

Hier bedeutet $\hbar = h/2\pi$ mit dem Planckschen Wirkungsquantum h . Bereits aus der klassischen Physik ist bekannt, dass rotierende Ladungen Magnetfelder erzeugen. Entsprechend ist mit dem Drehimpuls \mathbf{P} ein magnetisches Moment $\boldsymbol{\mu}$ verknüpft, das, analog zur Ladung bei elektrischen Feldern, die Quelle eines atomaren bzw. nuklearen Magnetfeldes darstellt:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \cdot \mathbf{P} \quad (2.2)$$

Die Proportionalitätskonstante γ stellt für jedes Isotop der verschiedenen Elemente eine charakteristische Konstante dar, welche die Nachweisempfindlichkeit eines Kerns festlegt. Während Kernisotope mit großem gyromagnetischem Verhältnis γ wie ^1H - und ^{19}F -Atome als empfindlich gelten, weisen Kerne mit kleinem γ wie beispielsweise ^{13}C - und ^{15}N -Kerne eine geringe Empfindlichkeit auf.

Kerne mit verschwindendem Kernspin $I = 0$ sind dagegen NMR-spektroskopisch nicht nachweisbar, da sie keinen Drehimpuls \mathbf{P} und folglich auch kein magnetisches Moment $\boldsymbol{\mu}$ besitzen. Die beiden Hauptbausteine organischer Moleküle, das Kohlenstoff-Isotop ^{12}C und das Sauerstoff-Isotop ^{16}O können somit NMR-spektroskopisch nicht erfasst werden.

2.1.2. Kerne im statischen Magnetfeld

Wird nun ein Kern mit einem Drehimpuls \mathbf{P} und einem magnetischen Moment $\boldsymbol{\mu}$ in ein statisches Magnetfeld \mathbf{B}_0 in z -Richtung gebracht, richtet sich der Drehimpuls so

aus, dass für seine Komponente in Feldrichtung P_z gilt:

$$P_z = m \cdot \hbar, \quad m = -I, -I + 1, \dots, I \quad (2.3)$$

Analog zur Quantelung des Betrags ist also auch die Richtung des Kernspins quantelt; es gibt $(2I + 1)$ mögliche Werte für die magnetische Quantenzahl m und ebenso viele Orientierungsmöglichkeiten von Drehimpuls und magnetischem Moment im Magnetfeld. Für Protonen mit einem Kernspin $I = 1/2$ ergeben sich somit zwei mögliche Zustände, $m = +1/2$ und $m = -1/2$.

Gemäß der klassischen Betrachtungsweise führt die Lorentz-Kraft zu einer Präzession des magnetischen Moments um die Magnetfeld-Achse mit der Larmorfrequenz ν_L ; folglich zeigt der Drehimpuls also nie genau in die Richtung des Magnetfeldes. Die Larmorfrequenz ν_L ist proportional zur magnetischen Flussdichte B_0 :

$$\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| \cdot B_0 \quad (2.4)$$

Das Magnetfeld \mathbf{B}_0 wechselwirkt also mit dem magnetischen Moment $\boldsymbol{\mu}$; die entsprechende Energie des magnetischen Dipols im Magnetfeld ist gegeben durch:

$$E = -\boldsymbol{\mu}_z \cdot B_0 \quad (2.5)$$

Damit ergeben sich für einen Kern mit $(2I + 1)$ Orientierungsmöglichkeiten ebenso viele Energieniveaus. Für Protonen erhält man im Magnetfeld entsprechend der beiden Einstellmöglichkeiten $m = +1/2$ und $m = -1/2$ zwei Energieniveaus. Die Komponente des magnetischen Moments in Feldrichtung steht dabei entweder parallel (α , energetisch günstiger Zustand) oder antiparallel (β , energetisch ungünstiger Zustand) zum Magnetfeld \mathbf{B}_0 . Im thermischen Gleichgewichtszustand verteilen sich die Kerne auf die verschiedenen Energieniveaus. Das Verhältnis der Anzahl der Kernspins in den verschiedenen Zuständen N_α und N_β ist dann gegeben durch die Boltzmann-Verteilung:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\Delta E/k_B T} \quad (2.6)$$

mit der absoluten Temperatur T und der Boltzmann-Konstanten k_B .

Der Energieunterschied $\Delta E = E(\beta) - E(\alpha)$ ist sehr klein im Vergleich zur middle-

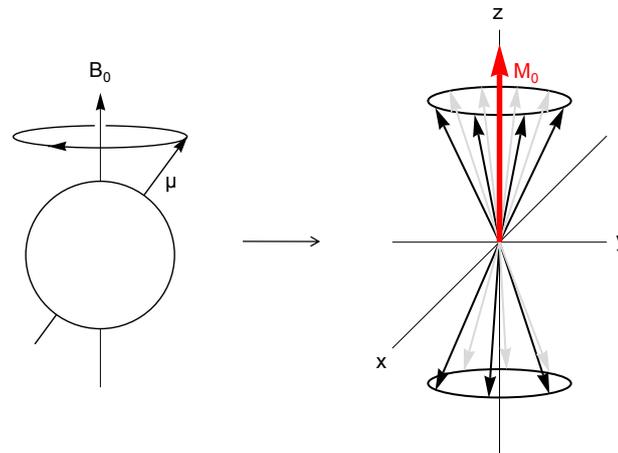


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Bildung der makroskopischen Magnetisierung \mathbf{M}_0 durch Superposition der magnetischen Kernmomente $\boldsymbol{\mu}$.

ren Energie der Wärmebewegung $k_B T$, so dass beide Energieniveaus nahezu gleich besetzt sind. Der Besetzungsüberschuss im energieärmeren Niveau α liegt bei Raumtemperatur im Bereich von tausendstel Promille. Dieser Besetzungsunterschied führt zu einer messbaren makroskopischen Magnetisierung \mathbf{M}_0 in Feldrichtung, die sich aus der Summe der z -Komponenten aller Kernspins ergibt (siehe Abbildung 2.1).

2.1.3. Kernresonanz-Übergänge

Übergänge zwischen verschiedenen Energie-Niveaus werden durch die Einstrahlung eines Zusatzfeldes der richtigen Frequenz ν_1 induziert, das mit den Kerndipolen in Wechselwirkung tritt. Bei der folgenden Ausführung beschränken wir uns auf Kerne mit einem Kernspin $I = 1/2$. Entspricht die Energie des Impulses $h\nu_1$ genau dem Energieunterschied ΔE der beiden Niveaus, sind Kernspin-Übergänge möglich:

$$h\nu_1 = \Delta E \quad (2.7)$$

Die Resonanzbedingung ist also erfüllt, wenn die eingestrahelte Frequenz ν_1 mit der Larmorfrequenz ν_L übereinstimmt:

$$\nu_L = \nu_1 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| \cdot B_0 \quad (2.8)$$

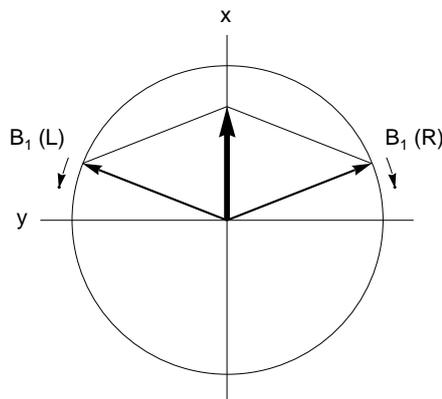


Abbildung 2.2: Zerlegung des linear oszillierenden Magnetfeldvektors in zwei zirkular polarisierte Komponenten.

Messprinzip

Wie in Abschnitt 2.2 erläutert wird, ist der genaue Wert der Larmorfrequenz für Kerne einer bestimmten Sorte in Abhängigkeit ihrer chemischen Umgebung jeweils leicht unterschiedlich. Um nun alle diese Kerne einer Sorte gleichzeitig anzuregen, wird der Hochfeldgenerator im sogenannten Impuls-Verfahren mit einer festen Frequenz ν_1 nur für eine kurze Zeitdauer τ_P eingeschaltet, was einen Hochfrequenz-Impuls mit kontinuierlichem Frequenzband erzeugt, welches symmetrisch zur Frequenz ν_1 liegt. Die Wahl der Generatorfrequenz ν_1 wird durch die zu untersuchenden Kerne und die Flussdichte B_0 bestimmt. Die Impulslänge τ_P wird durch die spektrale Breite festgelegt und liegt für NMR-Experimente in der Größenordnung von einigen μs .

Das entsprechende, in x -Richtung linear oszillierende Magnetfeld wird gedanklich in zwei um die z -Achse entgegengesetzt rotierende Komponenten $\mathbf{B}_1(R)$ und $\mathbf{B}_1(L)$ zerlegt (Abbildung 2.2), wobei nur diejenige Komponente mit der gleichen Drehrichtung wie die präzedierenden Kernspins mit diesen in Wechselwirkung treten kann; diese wird im Folgenden mit \mathbf{B}_1 bezeichnet.

Da sowohl die Kernspins als auch das Zusatzfeld \mathbf{B}_1 synchron um die z -Achse rotieren, führt man für eine vereinfachte Beschreibung ein rotierendes Koordinatensystem (x', y', z) ein, in dem \mathbf{B}_1 ruht. Dieses Koordinatensystem rotiert also mit derselben Frequenz wie das Zusatzfeld \mathbf{B}_1 . Die x' -Achse des rotierenden Koordinatensystems wird im Allgemeinen als Richtung des Zusatzfeldes \mathbf{B}_1 definiert. Analog zur Wirkung

des statischen Magnetfeldes \mathbf{B}_0 auf die Kernspins wirkt durch \mathbf{B}_1 ein Drehmoment, das die makroskopische Magnetisierung \mathbf{M}_0 aus der z -Richtung in der (y', z) -Ebene senkrecht zu \mathbf{B}_1 auslenkt. Der Impulswinkel gibt das Ausmaß der Auslenkung an und wird durch die Flussdichte B_1 und die Pulsdauer τ_P festgelegt:

$$\Theta = \gamma \cdot B_{1i} \cdot \tau_P \quad (2.9)$$

Demnach ist der Winkel Θ umso größer, je höher die Amplitude B_{1i} der für einen bestimmten Kernresonanzübergang verantwortlichen Frequenzkomponente ν_i des eingestrahlten Impulses ist, und je länger der Impuls eingestrahlt wird.

Im Folgenden soll kurz auf die beiden wichtigsten Impulse, den 90° - und 180° -Impuls, eingegangen werden. Die resultierende Quermagnetisierung $M_{y'}$ ist nach einem 90° -Impuls maximal; im Gleichgewichtszustand sowie nach Auslenkung der makroskopischen Magnetisierung \mathbf{M}_0 um 180° nimmt diese den Wert Null an (Abbildung 2.3). Diese Quermagnetisierung wird mit einer Empfängerspule detektiert, die in der y -Achse angeordnet ist; die Querkomponente $M_{y'}$ ist also entscheidend für den Nachweis von Kernresonanzsignalen. Somit werden Signale mit maximaler Intensität nach Einstrahlen eines 90° -Impulses erzielt, während beim Einsatz eines 180° -Impulses kein Signal im NMR-Spektrum detektiert wird.

2.1.4. Relaxation

Das Einstrahlen des resonanten Querfeldes \mathbf{B}_1 führt zu einer Störung des thermischen Gleichgewichts des Spinsystems. Nach Abschalten des Impulses erfolgt die Relaxation der Kerne, bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist, d. h., M_z wächst wieder auf M_0 an und die Quermagnetisierung $M_{y'}$ verschwindet. Unterschieden wird zwischen zwei Relaxationsvorgängen mit entsprechenden Zeitskalen: Spin-Gitter-Relaxation (Relaxationszeit T_1) und Spin-Spin-Relaxation (Relaxationszeit T_2).

Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1

Die auch als longitudinal bezeichnete Relaxation bestimmt nach einer Störung die Rückkehr der makroskopischen Magnetisierung in z -Richtung M_z zum Gleichgewichtswert M_0 . Dabei wird die Änderung der z -Komponente durch das Geschwindig-

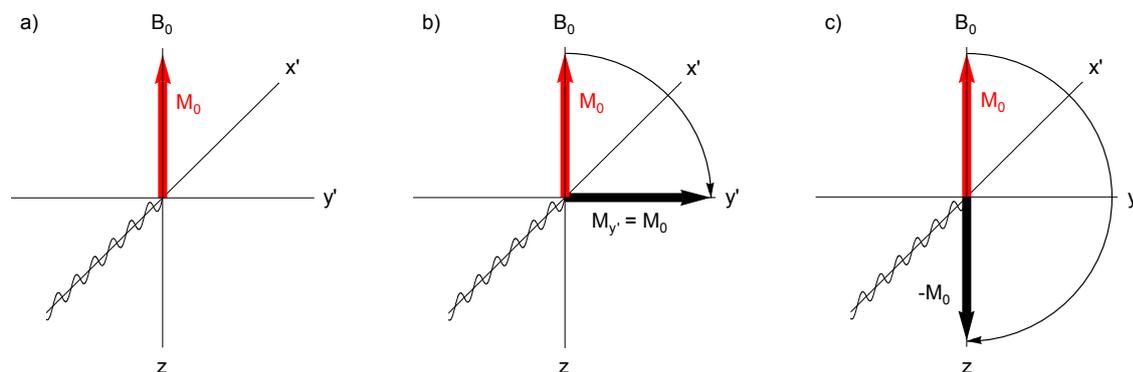


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Auslenkung der makroskopischen Magnetisierung M_0 aus dem Gleichgewicht (a) nach einem 90° -Impuls (b) bzw. einem 180° -Impuls (c).

keitsgesetz erster Ordnung bestimmt:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (2.10)$$

M_z bezeichnet hierbei die Magnetisierung in z -Richtung zum Zeitpunkt t , M_0 ist der Gleichgewichtswert und $1/T_1$ die Geschwindigkeitskonstante.

Dieser Relaxationsprozess ist mit einer Energieänderung des Spinsystems verbunden, da die vom eingestrahlteten Impuls aufgenommene Energie an die Umgebung, das sogenannte “Gitter”, abgegeben wird. Dieses Gitter steht stellvertretend für Nachbarmoleküle in Lösung oder für die Gefäßwand des NMR-Röhrchens.

Die Länge der T_1 -Relaxationszeit ist abhängig von der chemischen Struktur des Moleküls, dem Einfluss der benachbarten Kerne und der Molekülgröße bzw. Beweglichkeit. Die Bedeutung der Relaxation der betrachteten Kerne im Hinblick auf die Durchführung quantitativer NMR-Experimente wird in Abschnitt 2.3 ausführlich diskutiert.

Spin-Spin-Relaxationszeit T_2

Die transversale Relaxation bestimmt den Zerfall der Quermagnetisierung $M_{y'}$. Dieser Relaxationsprozess beruht auf einem Energieaustausch zwischen benachbarten Atomkernen. Die Gesamtenergie des Spinsystems und damit die Besetzungsverhältnisse der einzelnen Energieniveaus ändern sich dabei nicht; es handelt sich um einen reinen

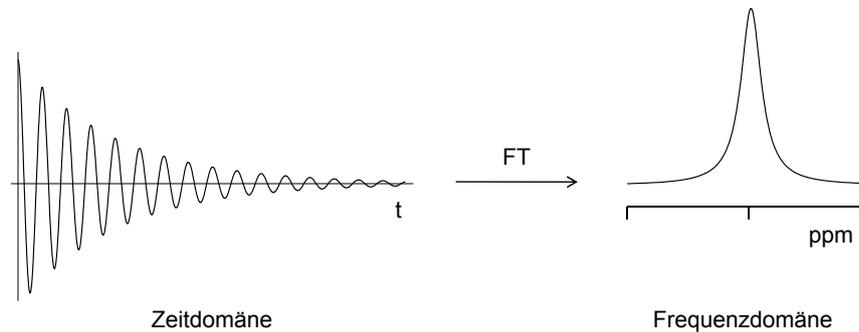


Abbildung 2.4: Fourier-Transformation (FT) des Freien Induktionsabfalls (FID) eines einzelnen Kernresonanzübergangs von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne.

Entropieprozess mit einem Verlust der Phasenkohärenz zwischen den einzelnen Spins. Die hiermit verknüpfte T_2 -Relaxationszeit ist für die quantitative NMR-Spektroskopie eine vernachlässigbare Größe. Ihre praktische Bedeutung liegt jedoch in der Beeinflussung der Linienbreite; sie stellt somit ein Maß für die spektrale Auflösung dar.

2.1.5. Erfassung des Frequenzspektrums

Nach der Pulsanregung wird im Empfänger die Abnahme der Quermagnetisierung in Form des Freien Induktionsabfalls, kurz FID (“Free Induction Decay”) genannt, registriert. Dabei wird für jede einzelne Kernresonanzlinie ein Freier Induktionsabfall beobachtet, d. h. die Abklingkurven nicht-äquivalenter Kerne interferieren. Die FID-Kurve stellt eine Zeitfunktion dar, die die gesamte Information enthält, um die Lage des NMR-Signals auf der Frequenzskala sowie dessen Intensität und Linienform zu charakterisieren. Die Analyse des Interferogramms erfolgt üblicherweise in der Frequenzdomäne. Die Konversion eines zeitabhängigen Signals $f(t)$ in ein frequenzabhängiges Spektrum $g(\omega)$ erfolgt durch eine mathematische Operation, die Fourier-Transformation:

$$g(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt \quad (2.11)$$

In Abbildung 2.4 ist diese Transformation schematisch für die Abklingkurve eines einzelnen und somit nicht-interferierenden Kerns dargestellt. Dabei ist die Fläche der Resonanz in der Frequenzdomäne proportional zur Amplitude des Signals in der

Zeitdomäne und damit ebenfalls proportional zur Anzahl der entsprechenden Kerne; des Weiteren ist die Resonanz umso breiter, je kürzer deren T_2 -Relaxationszeit ist.

2.1.6. Das Inversion-Recovery-Experiment

Die Bestimmung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 erfolgt mit Hilfe des sogenannten “Inversion-Recovery-Experiments” nach folgender Impulsfolge:

$$5 T_1 - 180^\circ_{x'} - \tau - 90^\circ_{x'} - \text{FID} \quad (2.12)$$

Die Wartezeit τ zwischen den beiden Impulsen wird für jedes Experiment schrittweise erhöht, da sich die Amplitude eines Signals in Abhängigkeit der Wartezeit τ verändert.

Zu Beginn des Experiments wird durch Einstrahlen eines 180° -Impulses die makroskopische Magnetisierung \mathbf{M}_0 in $(-z)$ -Richtung ausgelenkt (Abbildung 2.5 a). Als Folge des Relaxationsvorgangs nimmt die Magnetisierung während der Wartezeit τ ab, geht durch Null und beginnt danach wieder in positive z -Richtung anzusteigen, bis sie schließlich den Gleichgewichtswert \mathbf{M}_0 erreicht hat. Da die Komponente M_z keine direkt messbare Größe darstellt, wird durch Einstrahlen eines 90° -Impulses die verbleibende M_z -Magnetisierung auf die y' -Achse gedreht und die beobachtete Quermagnetisierung $M_{y'}$ im Empfänger als Signal detektiert. Die Intensität eines Signals ist hierbei proportional zu $M_{y'}$.

Im Verlauf des Relaxationsprozesses verändert sich die Magnetisierung M_z und somit die beobachtete Signalamplitude. Charakterisieren wir die Zustände (b), (c) und (d) in Abbildung 2.5 durch die entsprechenden Wartezeiten τ_1 , τ_0 und τ_2 , wird nach Einstrahlen eines 90° -Impulses für $\tau_1 = 0$ ein Signal mit negativer Amplitude beobachtet, während für $\tau_2 \geq 5 T_1$ die Signalamplitude positiv ist. Zum Zeitpunkt τ_0 kann kein Signal nachgewiesen werden, da M_z den Wert Null annimmt und folglich die Probe nicht im magnetisierten Zustand vorliegt. Für den Nulldurchgang gilt:

$$\tau_0 = T_1 \cdot \ln 2 = T_0 \quad (2.13)$$

Mit dieser Gleichung kann für jedes Signal im NMR-Spektrum über die T_0 -Zeit die entsprechende T_1 -Relaxationszeit bestimmt bzw. abgeschätzt werden.

Die nachfolgend dargestellte Auswertemethode erlaubt hingegen eine genauere

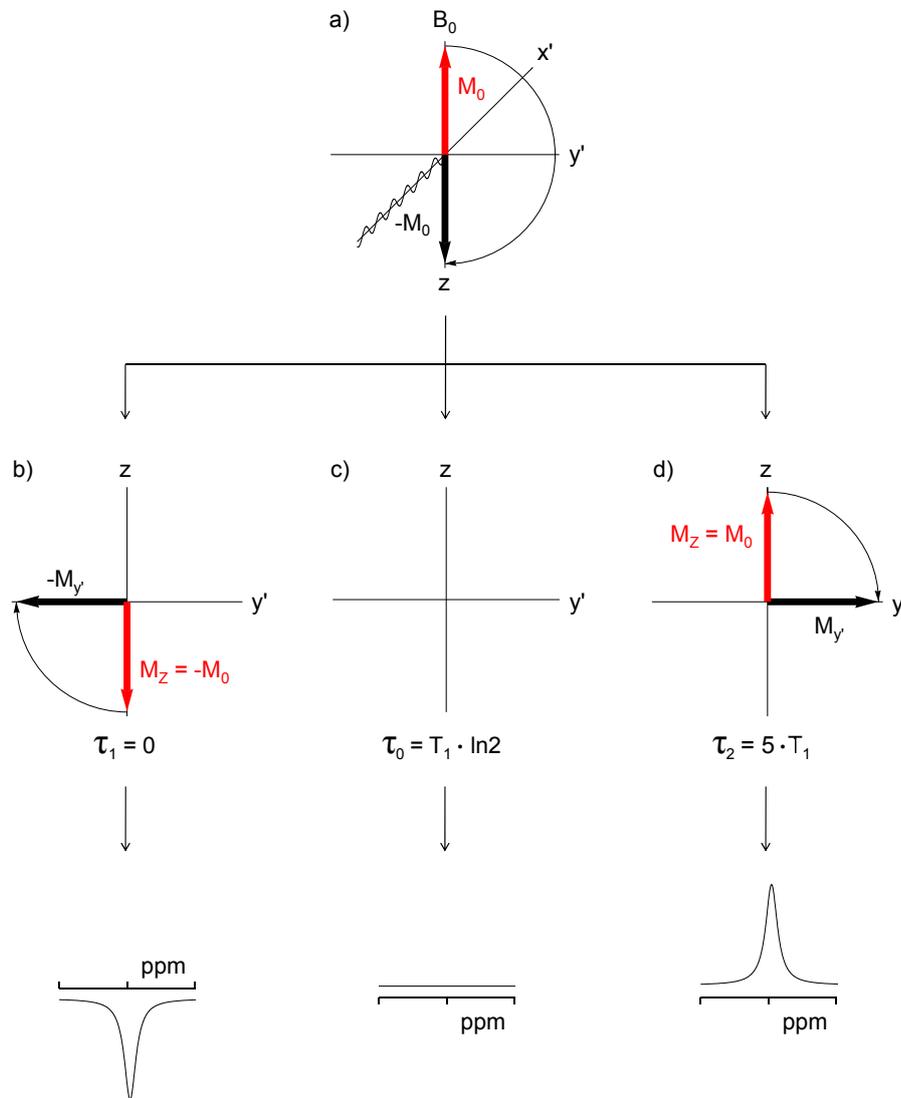


Abbildung 2.5: Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit nach dem “Inversion-Recovery-Experiment”.

Ermittlung der T_1 -Relaxationszeit. Trägt man die Änderung der Signalintensität $I_0 - I_z$ logarithmisch gegen die Wartezeit τ auf, erhält man eine Gerade mit der Steigung $-1/T_1$:

$$\ln(I_0 - I_z) = \ln(2 I_0) - \frac{\tau}{T_1} \quad (2.14)$$

I_0 entspricht der maximal messbaren Signalintensität zum Zeitpunkt $\tau = 0$ bzw. $\tau \geq 5 T_1$, I_z der Intensität nach einer Wartezeit τ . Da für ein NMR-Spektrum in der

Regel viele FIDs akkumuliert werden, muss vor der Wiederholung der Impulsfolge eine Wartezeit von mindestens $5T_1$ eingehalten werden (Gleichung (2.12)), wobei die T_1 -Zeit des am langsamsten relaxierenden Kerns im Molekül berücksichtigt werden muss, um eine vollständige Relaxation des Spinsystems zu ermöglichen. Erst nach dieser Zeitdauer werden richtige Signalintensitäten und somit auch richtige Relaxationszeiten gemessen.

2.2. Die chemische Verschiebung

In einem Molekül ist jeder Atomkern von Elektronen und anderen Atomen umgeben, die die Resonanzfrequenz des beobachteten Kerns beeinflussen; die daraus resultierende, strukturabhängige chemische Verschiebung δ der Resonanzfrequenz ist ein Maß für die Stärke dieses Einflusses:

$$\delta_{\text{Substanz}} [\text{ppm}] = \frac{\nu_{\text{Substanz}} - \nu_{\text{Standard}}}{\nu_1} \frac{[\text{Hz}]}{[\text{MHz}]} \quad (2.15)$$

Sie ist relativ zur Betriebsfrequenz ν_1 des Spektrometers definiert und somit unabhängig von B_0 . Des Weiteren ist die chemische Verschiebung auf die Frequenz eines Standardsignals ν_{Standard} bezogen; häufig wird hierfür Tetramethylsilan (TMS) eingesetzt.

Bedingt durch eine unterschiedliche chemische Umgebung ist in Molekülen die am Kernort wirkende Flussdichte B_{eff} stets um einen Betrag σB_0 kleiner als das von außen angelegte Magnetfeld der Flussdichte B_0 :

$$B_{\text{eff}} = B_0 - \sigma B_0 = (1 - \sigma) \cdot B_0 \quad (2.16)$$

Man sagt, die Kerne sind abgeschirmt. Das Maß für diesen Effekt ist die Abschirmungskonstante σ ; diese Molekül-Konstante wird durch die elektronische und magnetische Umgebung der betrachteten Kerne bestimmt, jedoch nicht vom angelegten Magnetfeld B_0 . Der Effekt der Abschirmung ändert die Resonanzfrequenz ν_L eines Kerns und somit die in Gleichung (2.8) aufgezeigte Resonanzbedingung:

$$\nu_L = \nu_1 = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| \cdot (1 - \sigma) \cdot B_0 \quad (2.17)$$

Das heißt, chemisch nicht-äquivalente Kerne sind abhängig von ihren jeweiligen Nachbaratomen unterschiedlich stark abgeschirmt und zeigen im NMR-Spektrum getrennte Resonanzsignale. Wie bereits erwähnt, werden im Impuls-Verfahren alle diese Kerne, deren Resonanzen innerhalb des durch die Impulslänge τ_P festgelegten Frequenzbands um ν_1 liegen, gleichzeitig angeregt.

Die Abschirmungskonstante σ und damit die Verschiebung der Resonanzen im Spektrum wird hauptsächlich durch die Elektronendichteverteilung und den Einfluss der Nachbargruppen im Molekül beeinflusst. Auf diese beiden Effekte soll im Folgenden im Detail eingegangen werden.

2.2.1. Ladungsdichte

Jedes Atom ist von einer Elektronenhülle umgeben, welche die magnetische Abschirmung größtenteils bestimmt. Im Magnetfeld \mathbf{B}_0 wird eine Elektronenbewegung in dieser Hülle induziert, die am Kernort ein Gegenfeld erzeugt, welches das äußere Feld abschwächt. Substituenten mit induktivem und mesomerem Effekt besitzen einen erheblichen Einfluss auf das Ausmaß der Abschirmung, da diese eine Änderung der Ladungsdichte am Kern hervorrufen. Während elektronegative Substituenten die Abschirmung aufgrund ihres $-I$ -Effekts verringern, wird diese durch elektropositive Gruppen erhöht. Gleiches gilt für Substituten mit einem M -Effekt: Gruppen mit einem $-M$ -Effekt verringern die Elektronendichte in der Nähe des betrachteten Kerns aufgrund der Ausbildung mesomerer Grenzstrukturen; Substituenten mit einem $+M$ -Effekt erhöhen dagegen die Ladungsdichte am Kern und führen folglich zu einer niedrigeren Resonanzfrequenz.

2.2.2. Nachbargruppeneffekte

Neben der Ladungsverteilung im Molekül muss zusätzlich der Einfluss der Nachbargruppen auf das Ausmaß der Abschirmung berücksichtigt werden:

- **Magnetische Anisotropie:** Im Allgemeinen sind chemische Bindungen magnetisch anisotrop. Bringt man ein Molekül in ein äußeres Magnetfeld, unterscheiden sich die induzierten magnetischen Momente in den verschiedenen

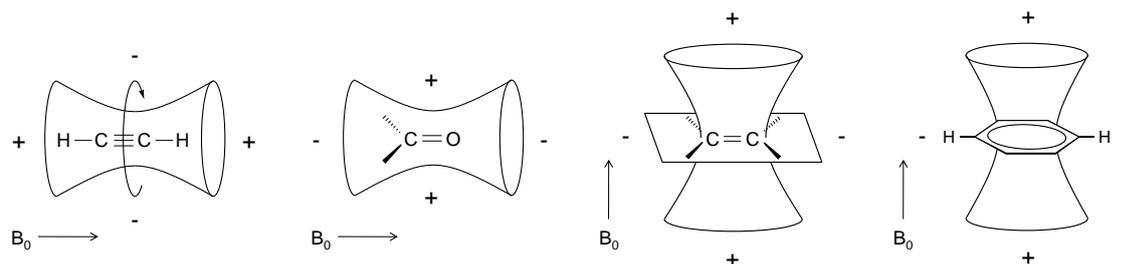


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des magnetischen Anisotropie-Effekts der Dreifachbindung, der Carbonylgruppe und der Doppelbindung sowie des diamagnetischen Ringstromeffekts in Benzol. (+) kennzeichnet Bereiche höherer Abschirmung, (-) kennzeichnet Bereiche niedrigerer Abschirmung.

Raumrichtungen; die Abschirmung eines Kerns ist somit von seiner geometrischen Anordnung im Molekül abhängig. Der in Abbildung 2.6 dargestellte Anisotropiekegel trennt Bereiche hoher und niedriger Abschirmung.

- **Ringstromeffekt:** In aromatischen Systemen wird aufgrund der Anwesenheit delocalisierter π -Elektronen beim Anlegen eines Magnetfelds B_0 ein diamagnetischer Ringstrom induziert, der das äußere Feld teilweise abschwächt. Somit findet man in der Umgebung des Aromaten Bereiche höherer und niedrigerer Abschirmung. Protonen, die direkt an den Aromaten binden, liegen im Bereich niedriger Abschirmung. Umgekehrt sind Protonen im Bereich ober- und unterhalb der Ringebene stärker abgeschirmt (siehe Abbildung 2.6).
- **Elektrischer Feldeffekt:** In Molekülen mit stark polaren Substituenten existiert ein intramolekulares elektrisches Feld, welches die Ladungsdichte im Molekül beeinflusst; folglich wird am entsprechenden Kernort eine Abschirmung bzw. Entschirmung beobachtet. Die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom pH-Wert der Untersuchungslösung in ionisierbaren Molekülen mit einer Carbonsäure- bzw. Aminogruppe ist ebenfalls eine Folge elektrischer Feldeffekte.
- **Intermolekulare Wechselwirkungen:** Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen führt zu einer besonders schwachen Abschirmung; die Signale austauschbarer Protonen in OH-, NH- und SH-Gruppen werden im Allgemeinen deutlich in Richtung Tieffeld verschoben. Wechselwirkt die gelöste Substanz

mit dem Lösungsmittel, kann dies ebenfalls zu deutlichen Signalverschiebungen im NMR-Spektrum führen (siehe Abschnitt 2.4.1).

2.3. Grundlagen quantitativer NMR-Spektroskopie

Die Intensität eines Signals I_X ist direkt proportional zur Anzahl der Kerne N_X , die diese Resonanz im NMR-Spektrum hervorrufen:

$$I_X = K_S \cdot N_X \quad (2.18)$$

K_S steht stellvertretend für die Spektrometerkonstante und wird von Spektrometerparametern und Eigenschaften der Probe beeinflusst. Diese Proportionalität bildet die Grundlage für den Einsatz der NMR-Spektroskopie im Rahmen der quantitativen Analyse von Reinsubstanzen, Mehrkomponentengemischen und Verunreinigungen, da durch die Integration von Resonanzen und anschließendem Flächenvergleich zweier Signale eine quantitative Information aus dem NMR-Spektrum gewonnen wird.

Voraussetzung für den Einsatz der quantitativen NMR-Spektroskopie ist neben dem Vorliegen vollständig separierter Signale die eindeutige Zuordnung der quantitativ auszuwertenden Resonanzen; eine vollständige Zuordnung aller Signale im NMR-Spektrum ist dagegen nicht erforderlich [41]. Zudem muss sichergestellt werden, dass die zu integrierenden Signale nicht mit anderen Resonanzen der zu analysierenden Hauptkomponente selbst, potentieller Verunreinigungen, von Lösungsmitteln oder Internem Standard überlagern [42]. Die somit geforderte Selektivität der NMR-Methode, die die Reinheit der zu integrierenden Signale sicherstellt, kann u. a. mittels ergänzender ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente durch die Abwesenheit von Korrelationspeaks überprüft werden, sowie durch die Aufnahme von ^1H -NMR-Spektren mit Spektrometern höherer Magnetfeldstärke, bei erhöhter Temperatur bzw. unter Einsatz unterschiedlicher Lösungsmittel [42–45]. Um somit präzise und richtige Ergebnisse im Rahmen der quantitativen Analyse zu erhalten, muss die Signalreinheit während der Methodenentwicklung durch weitere NMR-Experimente belegt werden.

Um nun präzise und richtige Ergebnisse zu erhalten, müssen für die Durchführung quantitativer NMR-Experimente gewisse Schlüsselparameter, die sowohl die Akquisition der Datenpunkte als auch die Prozessierung des NMR-Spektrums betref-

fen, beachtet werden, da sonst die in Gleichung (2.18) hergestellte Proportionalität zwischen Signalintensität und Kernanzahl nicht besteht. Diese Schlüsselparameter sollen im folgenden Abschnitt näher erörtert werden.

2.3.1. Aufnahme des Spektrums

Für die Akquisition des Spektrums spielen unterschiedliche Messparameter eine Rolle. Diese werden im Folgenden besprochen.

Rotation

Um eine möglichst hohe Homogenität des statischen Magnetfelds \mathbf{B}_0 zu erreichen, lässt man die Probe zum Zweck der Strukturaufklärung oftmals gleichmäßig im Spektrometer rotieren. Im Rahmen der quantitativen Analyse erfolgt die Aufnahme von NMR-Spektren jedoch üblicherweise ohne Rotation der Probe, um hierdurch auftretende Rotationsseitenbanden aus dem NMR-Spektrum zu eliminieren [46, 47]. Diese Artefakte entstehen durch die Modulation des Magnetfeldes mit der Rotationsfrequenz und erscheinen im NMR-Spektrum im Abstand der Rotationsfrequenz ν_{Rot} auf beiden Seiten des Hauptsignals (Abbildung 2.7); die Intensität dieser Seitenbanden ist proportional zur Intensität der entsprechenden Hauptresonanz. Rotationsseitenbanden können aufgrund ihrer geringen Signalintensität fälschlicherweise Verunreinigungen vortäuschen, zudem wird, bedingt durch Überlagerungen mit anderen Resonanzen, die Signalform sowie die Richtigkeit der Integrale negativ beeinflusst [48].

^{13}C -Satelliten

In den ^1H -NMR-Spektren organischer Moleküle sind neben den Kopplungen benachbarter Protonen (H,H-Kopplung) auch Kopplungen mit anderen Kernen zu beobachten. Mögliche C,H-Kopplungen zwischen Protonen und ^{13}C -Atomen lassen sich im ^1H -NMR-Spektrum durch die Detektion von sogenannten ^{13}C -Satelliten nachweisen. Diese erscheinen als Signale geringer Intensität rechts und links von der entsprechenden Protonenresonanz (Abbildung 2.7). Die Intensität der ^{13}C -Satelliten beträgt aufgrund einer natürlichen Häufigkeit der ^{13}C -Kerne von 1.1 % jeweils 0.55 % des Hauptsignals. Die Entfernung der beiden ^{13}C -Satelliten zueinander wird durch

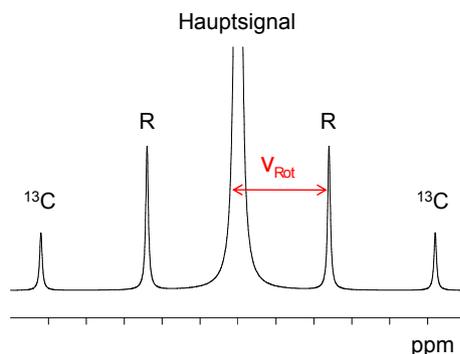


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung eines Protonensignals (Hauptsignal) mit potentiellen “Störsignalen”, den Rotationsseitenbanden (R) und ^{13}C -Satelliten (^{13}C).

die C,H-Kopplungskonstante $^1J_{\text{C,H}} \sim 100\text{--}200$ Hz bestimmt.

Im Rahmen der quantitativen Bestimmung muss deshalb die Anwesenheit von ^{13}C -Satelliten sorgfältig beachtet werden, da aufgrund möglicher Überlagerungen mit ^1H -Signalen der Hauptkomponente bzw. potentieller Verunreinigungen das Integral der betrachteten Resonanz und somit das Ergebnis verfälscht wird [49]. Richtige Ergebnisse werden erhalten, wenn bei auftretenden Überlappungen die Fläche des störenden ^{13}C -Satelliten von der entsprechenden Gesamtfläche subtrahiert wird, bzw. wenn durch den Einsatz von ^{13}C -Entkopplungsexperimenten (z. B. GARP [50], Waltz-16 [51], WURST [52], STUD [53]) alle bzw. bestimmte ^{13}C -Satelliten aus dem ^1H -NMR-Spektrum eliminiert werden [48, 54]. Zudem kann durch den Einsatz von Spektrometern unterschiedlicher Magnetfeldstärke aufgrund einer variierenden Signaldispersion und somit einer unterschiedlichen Entfernung der ^{13}C -Satelliten zum Hauptsignal eine Überlagerung verhindert werden [49, 55].

Der Integrationsbereich sollte bei der quantitativen Auswertung von ^1H -NMR-Spektren bei gleichzeitiger Anwesenheit von ^{13}C -Satelliten so gewählt werden, dass für die zu integrierenden Resonanzen von Analyt und Internem Standard diese Satelliten stets außerhalb bzw. innerhalb des festgelegten Integrationsintervall liegen, um eine richtige und reproduzierbare Gehaltsbestimmung zu ermöglichen [29, 41, 43].

Im Rahmen der quantitativen Bestimmung von Verunreinigungen mit geringer Konzentration ($< 1\%$) kann durch die Integration eines separierten ^{13}C -Satelliten und dem anschließenden Signalflächenvergleich mit einer möglichen Verunreinigung, deren Gehalt in Anwesenheit der Hauptkomponente bestimmt werden. Der ^{13}C -Satellit

wird in diesem Fall aufgrund der bekannten natürlichen Häufigkeit der ^{13}C -Kerne als Interner Standard eingesetzt [55, 56].

“Relaxation Delay”

Der “Relaxation Delay“ ist definiert als die Zeitspanne zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen. Diese Wartezeit ist für die quantitative NMR-Spektroskopie von entscheidender Bedeutung, da nur nach vollständiger Relaxation des Spinsystems richtige Integrale ermittelt werden können [57]. Die Länge des “Relaxation Delay“ ist abhängig vom eingestrahlten Impulswinkel sowie von der längsten Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 der zur Integration herangezogenen Signale. Bei der Anregung der Kerne mit Hilfe eines 90° -Impulses wird der makroskopische Magnetisierungsvektor von seiner Gleichgewichtslage in z -Richtung in die y', z -Ebene ausgelenkt; für die vollständige Rückkehr dieses Vektors in seine ursprüngliche Lage wird für quantitative NMR-Experimente eine Zeitspanne von $\tau = 5 \cdot T_1$ festgelegt, da in diesem Fall 99.3 % der Gleichgewichtsmagnetisierung erreicht ist [57]. Impulse mit geringerem Anregungswinkel erlauben dagegen eine deutlich verkürzte Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen [48, 58]; so beträgt der “Relaxation Delay“ beim Einsatz eines 30° -Impulses nur $\tau = 3 \cdot T_1$.

Spektrale Breite

Die spektrale Breite ist definiert als der Frequenzbereich, der für die Anregung der zu analysierenden Kerne eingesetzt wird. Signale, deren Frequenz innerhalb des spektralen Fensters liegen, können im NMR-Spektrum detektiert werden, während Resonanzen außerhalb dieses Bereiches herausgefiltert werden und somit im aufgenommenen Spektrum nicht auftreten. Die spektrale Breite ist somit abhängig von der zu vermessenden Probe und richtet sich nach der Lage der jeweiligen Signale im NMR-Spektrum.

Für die Durchführung quantitativer ^1H -NMR-Experimente wird das spektrale Fenster so gewählt, dass an beiden Enden der spektralen Breite der Probe ein Bereich von mindestens 2 ppm hinzugefügt wird (Abbildung 2.8). Dieser Sicherheitsbereich gewährleistet, dass bei der Integration am Rand liegender Resonanzen richtige Signalflächen erhalten werden [48].

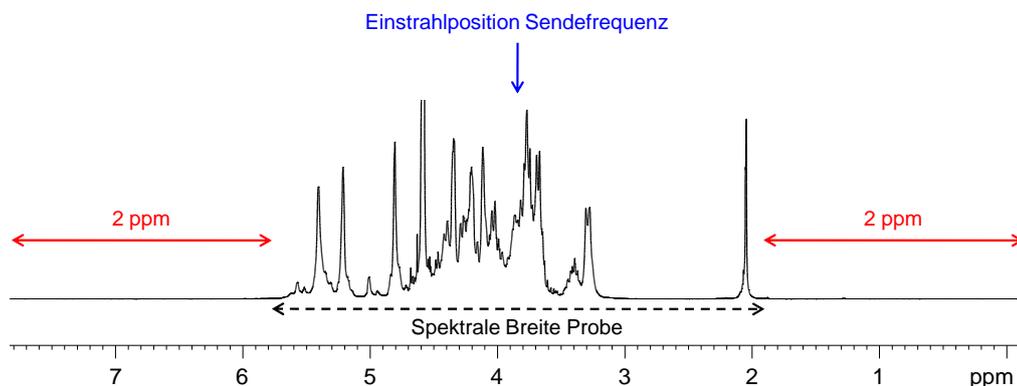


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung zur Ermittlung der optimalen spektralen Breite sowie der Einstrahlposition der Sendefrequenz.

Zu Beginn der ^1H -NMR-Methodenentwicklung wird als Ausgangspunkt eine große spektrale Breite von 20 ppm empfohlen, u. a. um sicherzustellen, dass in Abhängigkeit vom eingesetzten Lösungsmittel alle Signale erfasst werden. Im Anschluss kann die spektrale Breite an die jeweilige Bestimmungsmethode angepasst werden [48]. Bei der Festlegung der spektralen Breite ist ihre Abhängigkeit von geforderter spektraler Auflösung und Länge der Akquisitionszeit zu berücksichtigen (siehe unten). So ermöglicht eine Verkleinerung des spektralen Fensters eine Verbesserung der spektralen Auflösung mit einem gleichzeitigen Anstieg der Akquisitionszeit.

Position der Sendefrequenz

Nach Festlegung der spektralen Breite wird der “Offset” der Sendefrequenz bestimmt; dieser befindet sich in der Regel im Zentrum des Spektrums (siehe Abbildung 2.8) und wird heutzutage nach Eingabe der jeweiligen spektralen Breite von den meisten Spektrometern automatisch gesetzt.

Pulslänge

Die Anregung der Kerne muss über die zu betrachtende spektrale Breite gleichmäßig verlaufen, um einen genauen Flächenvergleich auch von weit auseinanderliegenden Signalen zu ermöglichen; dies setzt den Einsatz von kurzen Impulsen voraus [59]. Für quantitative ^1H -NMR-Experimente werden üblicherweise Impulse mit einer Länge von etwa 10 μs eingesetzt.

Pulswinkel

Der Pulswinkel gibt das Ausmaß der Auslenkung der makroskopischen Magnetisierung aus ihrer Gleichgewichtslage in z -Richtung in die y', z -Ebene an, die die Kerne durch die Anregung erfahren. Der Einsatz eines 90° -Impulses ermöglicht im NMR-Spektrum Signale maximaler Intensität, da für die Detektion nur der Anteil der Magnetisierung messtechnisch zugänglich ist, der in der y' -Achse liegt. Der Gewinn an Empfindlichkeit ist jedoch mit einem deutlich verlängerten "Relaxation Delay" ($\tau = 5 \cdot T_1$) verbunden, da die Auslenkung des Magnetisierungsvektors nach einem 90° -Impuls maximal ist. Bei der routinemäßigen Durchführung quantitativer NMR-Bestimmungen werden oftmals Impulse mit geringerem Anregungswinkel eingesetzt. So kann beispielsweise in Abhängigkeit der längsten T_1 -Relaxationszeit der Einsatz eines 30° -Impulses von Vorteil sein, da hier aufgrund des deutlich verkürzten "Relaxation Delay" von $\tau = 3 \cdot T_1$ bei gleichbleibender Dauer des NMR-Experiments die Anzahl der Scans deutlich erhöht und damit für bestimmte Anwendungsbeispiele ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis erzielt werden kann als beim Einsatz eines 90° -Impulses [44]. Die Wahl des geeigneten Pulswinkels muss somit im Zuge der Methodenentwicklung für jede Substanz individuell ermittelt werden, um NMR-Spektren mit optimalen Signalintensitäten zu erhalten.

Akquisitionszeit

Nach der Anregung der Kerne wird während der Akquisitionszeit die im Empfänger registrierte Abnahme der Quermagnetisierung in Form des Freien Induktionsabfalls aufgenommen. Die Länge der Akquisitionszeit AQ wird u. a. durch die Anzahl der Datenpunkte TD und die spektrale Breite SW bestimmt:

$$AQ = \frac{TD}{2 \cdot SW} \quad (2.19)$$

Im Allgemeinen wird für die quantitative ^1H -NMR-Spektroskopie eine spektrale Auflösung von maximal 0.25 Hz/Punkt [54] bzw. mindestens fünf Signalpunkte über der Halbwertsbreite der Resonanz [57] gefordert. Diese kann u. a. durch eine Erhöhung der Datenpunkte und/oder Reduzierung der spektralen Breite verbessert werden, da das Spektrum, das aus einer Vielzahl an miteinander verbundenen Linien besteht,

umso genauer wiedergegeben wird, je kleiner der Wert der spektralen Auflösung ist. Dieser Gewinn an Auflösung geht einher mit einer verlängerten Aufnahmezeit:

$$R_S = \frac{1}{AQ} \quad (2.20)$$

d. h. die entsprechende Akquisitionszeit ist umso länger, je mehr Datenpunkte aufgenommen werden.

Scan-Anzahl

Die Scan-Anzahl, d. h. die Anzahl aufzusummierender FIDs, die zur Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums eingesetzt werden, variiert deutlich je nach Aufgabenstellung des gegebenen quantitativen NMR-Experimentes. Während für die quantitative Bestimmung von Hauptkomponenten oftmals eine geringe Scan-Anzahl genügt, muss im Rahmen der Reinheitsanalytik für eine empfindliche Erfassung von Verunreinigungen geringer Konzentration ($< 1\%$) diese deutlich erhöht werden; die Anzahl der Wiederholungsmessungen beeinflusst also das Signal-Rausch-Verhältnis und somit die Empfindlichkeit der NMR-Methode. Jedoch ist zu beachten, dass das Signal-Rausch-Verhältnis nur proportional mit der Wurzel der Scan-Anzahl zunimmt [43]:

$$S/N \propto \sqrt{\text{Scan-Anzahl}} \quad (2.21)$$

Die Richtigkeit des NMR-Experimentes wird u. a. durch das Signal-Rausch-Verhältnis beeinflusst. Für die Gehaltsbestimmung von Hauptkomponenten wird ein Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens $S/N \geq 250 : 1$ für die zu integrierenden ^1H -Signale gefordert [58, 60], da in diesem Fall eine Messunsicherheit von deutlich unter 1% erzielt werden kann (Abbildung 2.9).

“Receiver Gain”

Der “Receiver Gain”, d. h. die Empfängerverstärkung, wird in der Regel vom eingesetzten NMR-Spektrometer vor Beginn der Datenaufnahme automatisch bestimmt, um die Amplitude des Freien Induktionsabfalls dem dynamischen Bereich des “Digitizers” anzupassen. Eine manuelle Einstellung kann ebenfalls vorgenommen werden, jedoch

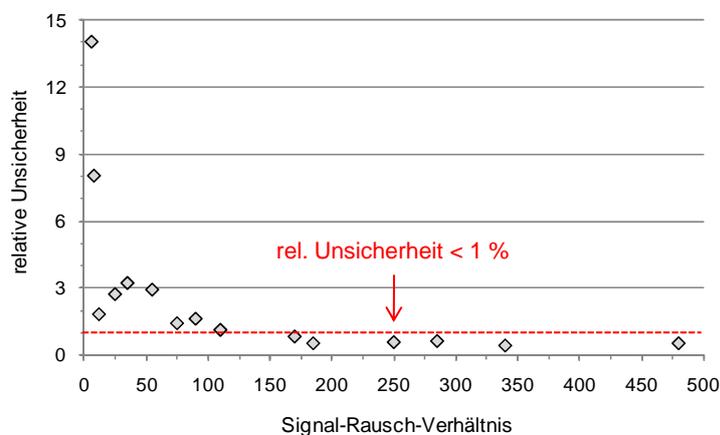


Abbildung 2.9: Darstellung der resultierenden Messunsicherheit quantitativer ^1H -NMR-Experimente in Abhängigkeit des Signal-Rausch-Verhältnisses.

muss hier die Bestimmung der jeweiligen Verstärkung durch die Analyse des Freien Induktionsabfalls sorgfältig durchgeführt werden, um eine zu hohe Verstärkung zu vermeiden [61]. Wird mit einem zu hoch eingestellten “Receiver Gain” gearbeitet, werden eine Absättigung des Receivers, eine Abschwächung der Signalintensitäten bis hin zur Eliminierung von Resonanzen aus dem Spektrum sowie schwerwiegende Basislinienverformungen verursacht; dies kann zu signifikanten Abweichungen des ermittelten Gehalts vom “wahren” Gehalt führen. Bei zu niedrig eingestellter Empfängerverstärkung wird der Bereich des “Digitizers” nicht genügend ausgenutzt, was eine erhebliche Reduzierung des Signal-Rausch-Verhältnisses zur Folge hat. Um das geforderte Signal-Rausch-Verhältnis dennoch zu erreichen, müsste die Scan-Anzahl erhöht werden, was eine deutliche Verlängerung der Messzeit zur Folge hat.

“Dummy Scans”

Der Einsatz sogenannter “Dummy Scans” zu Beginn eines jeden NMR-Experiments ermöglicht vor der eigentlichen Datenaufnahme das Einstellen eines Gleichgewichtszustands der zu vermessenden Probe [48]. Zu Beginn der Messung wird die Pulssequenz zur Anregung der Kerne mehrmals übertragen, jedoch ohne Aufnahme und Speicherung der emittierten Resonanzen. Die Anzahl der “Dummy Scans” ist abhängig vom durchzuführenden NMR-Experiment und Eigenschaften der zu analysierenden Proben substanz wie beispielsweise T_1 -Relaxationszeit und Suszeptibilität. Ihre Aufgabe

ist es, die Reproduzierbarkeit zu erhöhen und mögliche Schwankungen in den aufgenommenen Datenpunkten zu minimieren. Im Rahmen von quantitativen ^1H -NMR-Untersuchungen sind in der Regel zwei bis vier “Dummy Scans” ausreichend, um eine Gleichgewichtseinstellung sicherzustellen [48].

2.3.2. Prozessierung des Spektrums

Nach der Aufnahme des NMR-Spektrums ist vor der Integration der entsprechenden Signale eine Nachbearbeitung des Linienspektrums in Form einer Phasen- und Basislinienkorrektur erforderlich, um richtige Signalintensitäten zu erhalten. Durch eine geeignete Anpassung der Fensterfunktion sowie eine Erhöhung der Datenpunkte in Form des “Zero-Filling” können wichtige Parameter wie spektrale Auflösung und Signal-Rausch-Verhältnis nachträglich optimiert und somit die Messunsicherheit der Methode beeinflusst werden.

Fensterfunktion

Der im Empfänger registrierte Freie Induktionsabfall wird vor der Fourier-Transformation mit einer Apodisationsfunktion mathematisch bearbeitet, um das Signal-Rausch-Verhältnis bzw. die Linienbreite der Signale im Frequenzspektrum nachträglich zu beeinflussen. In der ^1H -NMR Spektroskopie wird üblicherweise als Apodisationsfunktion eine exponentielle Multiplikation mit einem “Line broadening”-Faktor von $Lb = 0.3 \text{ Hz}$ eingesetzt [44].

Hohe Lb -Faktoren führen zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei gleichzeitiger Verbreiterung der Resonanzen. Der hieraus resultierende Verlust an Auflösung kann für die Integration von nahe beieinanderliegenden Signalen von Nachteil sein, da aufgrund der Linienverbreiterung die Integration erschwert und/oder die Richtigkeit des Integrals beeinflusst wird. Durch eine geeignete Anpassung des “Line broadening”-Faktors kann im Fall von Signalen ähnlicher chemischer Verschiebung in umgekehrter Form eine Verkleinerung der Linienbreite die Auflösung erhöhen und folglich den Integrationsvorgang erleichtern; jedoch ist die gleichzeitige Verringerung des Signal-Rausch-Verhältnis zu beachten.

“Zero-Filling”

Im Zuge der Fourier-Transformation wird das Spektrum in der Zeitdomäne, der FID, in die Frequenzdomäne überführt, wo es sowohl reelle Absorptions- als auch imaginäre Dispersions-Anteile besitzt, deren Signalphasen um 90° verschoben sind. Die Tatsache, dass der Freie Induktionsabfall nur rein reelle Anteile besitzt – der imaginäre Anteil ist also gleich Null – führt zu einer Reduktion des Informationsgehalts der Datenpunkte in der Frequenzdomäne um den Faktor 2; die Hälfte der Datenpunkte ergibt sich durch Spiegelung aus der anderen Hälfte der Datenpunkte und ist somit redundant. Mit Hilfe des sogenannten “Zero-Filling” können nun vor der Fourier-Transformation die verlorengegangenen Datenpunkte in Form von Punkten mit dem Wert Null an das Ende des FID addiert werden, um die ursprüngliche Auflösung des Freien Induktionsabfalls auch in der Frequenzdomäne zu erhalten. Diese addierten Datenpunkte enthalten keine “neue” Information, so dass im Rahmen des “Zero-Filling” keine Veränderung der chemischen Verschiebungen im Spektrum erfolgt. Für die nachträgliche Verbesserung der spektralen Auflösung wird ein “Zero-Filling” mit dem Faktor 2 empfohlen [54, 57]; eine weitere Erhöhung der Datenpunkte im Spektrum ist erlaubt, hat aber keinen Effekt.

Phasenkorrektur

Phasenverschiebungen von Signalen sind meist unvermeidbar und müssen nach der Durchführung der Fourier-Transformation automatisch bzw. manuell korrigiert werden, um so den Dispersionsanteil aus dem Spektrum zu entfernen und reine Absorptionslinien zu gewährleisten. Eine sorgfältige Phasenkorrektur ist für quantitative NMR-Experimente nötig, da mögliche Verzerrungen bzw. Formänderungen der zu integrierenden Resonanzen falsche Signalflächen liefern und somit Validierungsparameter wie Richtigkeit und Präzision der Methode negativ beeinflusst werden (Abbildung 2.10). So führt beispielsweise eine Phasenabweichung von 5° zu einer Integraländerung von etwa 1 % [42, 60]. Auffällig ist, dass in der Literatur die manuelle Korrektur der Phase bevorzugt wird [33, 41–44, 58], da die automatisch durchgeführte Phasenkorrektur im Vergleich meist deutlich höhere Streuungen aufweist und somit den Anforderungen der quantitativen NMR-Spektroskopie nicht genügt.

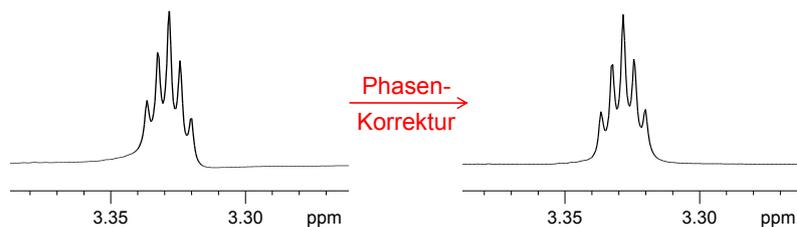


Abbildung 2.10: Auswirkung der Phasenkorrektur auf ein Absorptionssignal mit dispersiven Anteilen.

Basislinienkorrektur

Mögliche Abweichungen von einer idealen Basislinie in Form von auftretenden Krümmungen müssen nach Durchführung der Fourier-Transformation und anschließender Phasenkorrektur korrigiert werden, da diese die Signalflächen verfälschen und ebenfalls die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode beeinflussen können. Vor Integration der entsprechenden Signale kann die Korrektur der Basislinie durch Anpassung eines Polynoms fünften Grades über die gesamte spektrale Breite des NMR-Spektrums und/oder über die Teilbereiche erfolgen, innerhalb welcher die zu integrierenden Resonanzen liegen [42, 43].

Integration

NMR-Signale weisen ein Lorentzprofil auf, das im Vergleich zum Gaussprofil durch ein scharfes Signalmaximum mit weitläufigen Flanken gekennzeichnet ist (Abbildung 2.11). Im Idealfall wird für die Bestimmung der Signalfläche das 64-fache der Halbwertsbreite der zu betrachtenden Resonanz als Integrationsbereich herangezogen, um mindestens 99 % der Gesamtsignalfläche zu erfassen [62]. In vielen Fällen ist das Einhalten dieser großen Integrationsintervalle aufgrund angrenzender Signale nicht möglich. Für komplexe Spektren muss deshalb der Integrationsbereich für die zu integrierenden Signale in gleichem Maße verkleinert werden, da nur dann keine Auswirkung auf die Richtigkeit der Ergebnisse zu erwarten ist [45]. Jedoch ist bis heute keine standardisierte Integrationsvorschrift für komplexe NMR-Spektren in der Literatur zu finden.

Ein weiteres Kriterium für die Auswahl zur Integration geeigneter Resonanzen spielt neben den bereits erwähnten Punkten wie ausreichende Signalseparation

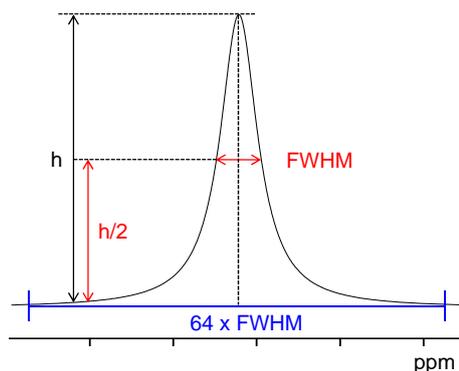


Abbildung 2.11: Lorentzprofil mit Halbwertsbreite (“full width at half maximum”, FWHM) eines einzelnen NMR-Signals.

und kurze T_1 -Relaxationszeiten auch die Form der zu integrierenden Signale. Zur Vereinfachung des Integrationsvorgangs wird die Integration von Singulett empfohlen; die Ermittlung der Peakfläche über die Integration breiter Signale von OH-, NH- und COOH-Protonen sollte vermieden werden, da hier die Reproduzierbarkeit der Integrationsergebnisse beeinträchtigt wird [41, 45].

2.4. Optimierung der Signalseparation

Eine grundlegende Voraussetzung für den Einsatz der quantitativen NMR-Spektroskopie als analytische Messmethode ist die vollständige Separation von Signalen. Diese wird erfüllt, wenn für jede zu analysierende Komponente mindestens eine basisliniengetrennte Resonanz im NMR-Spektrum gefunden werden kann [31, 63]. Da ein NMR-Spektrum im Allgemeinen aus einer Vielzahl an Signalen besteht, ist die Wahrscheinlichkeit, eine separierte Resonanz zu finden, selbst für strukturell sehr ähnliche Moleküle deutlich erhöht im Vergleich zu konventionellen Verfahren wie HPLC, GC und CE, bei denen eine Komponente durch einen einzigen Peak dargestellt wird. Ist eine quantitative NMR-Analyse aufgrund störender Signalüberlagerungen nicht direkt möglich, kann durch die Anpassung gewisser Parameter eine Separation erzielt werden, da die chemische Verschiebung u. a. vom eingesetzten Lösungsmittel, dem pH-Wert der Untersuchungslösung, der Probenkonzentration, dem Zusatz von Hilfsreagenzien, der Messtemperatur sowie der Magnetfeldstärke des NMR-Spektro-

Tabelle 2.1: Auswahl gängiger Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie.

apolar		polar	
aromatisch	nicht-aromatisch	aprotisch	protisch
C ₆ D ₆	CDCl ₃	DMSO-d ₆	D ₂ O
Pyridin-d ₅	CD ₂ Cl ₂	ACN-d ₃	CD ₃ OD

mers abhängt. Der Einfluss dieser Parameter auf die chemische Verschiebung soll in den folgenden Abschnitten verdeutlicht werden.

2.4.1. Lösungsmittel

Wie bereits in Abschnitt 2.2 erwähnt, werden in Molekülen in Abhängigkeit des Lösungsmittels spezifische Änderungen der Resonanzfrequenzen und damit der chemischen Verschiebung einzelner Kerne beobachtet [64, 65]. Daneben beeinflusst das Lösungsmittel ebenso das Kopplungsmuster, die Resonanzform, die Signaldispersion und die Komplexität des NMR-Spektrums [66].

Die Beeinflussung der Signalseparation durch eine gezielte Wahl des Lösungsmittels ist oftmals das einfachste und schnellste Mittel der Wahl im Rahmen der qNMR-Methodenentwicklung, da in den meisten Fällen durch den Einsatz von Lösungsmitteln unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften überlappende Resonanzen vollständig getrennt werden können [31, 67]; jedoch wird dieser Lösungsmittelleffekt heutzutage meist vernachlässigt [31]. Stattdessen kommen komplizierte Pulssequenzen und “Line-Shape-Fitting”-Techniken zum Einsatz [68], um aus überlagerten Signalbereichen eine quantitative Information zu ermitteln.

Lösungsmittelleffekte werden beobachtet, wenn das Solvent mit dem Analyt in Wechselwirkung tritt; das gelöste Molekül bildet dann mit dem Lösungsmittel einen Komplex. Lösungsmittelbedingte Signalverschiebungen werden vorwiegend durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken, magnetische Anisotropie- und Ringstromeffekte, Van-der-Waals-Wechselwirkungen und polare Effekte hervorgerufen [69, 70].

In Tabelle 2.1 sind die gängigsten Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie aufgeführt; Einteilungskriterien sind neben Polarität auch protische bzw. aprotische Eigenschaften sowie ein möglicher aromatischer Charakter des Lösungsmittels. In einigen Studien wurde für eine Vielzahl unterschiedlicher organischer Moleküle die

Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom Lösungsmittel für Protonen und ^{13}C -Atome näher untersucht. Am Beispiel einer von Abraham et al. durchgeführten Untersuchung von 124 Substanzen mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen konnte der Lösungsmittelleffekt von zwei Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität aufgezeigt werden; eingesetzt wurden hierfür DMSO- d_6 und CDCl_3 [70]. Während für apolare Moleküle (z. B. Alkane, Aromaten) keine erkennbaren Signalverschiebungen und für polar aprotische Substanzen (z. B. tertiäre Amine, Ester) geringe Unterschiede in der chemischen Verschiebung von durchschnittlich $\Delta\delta = \pm 0.1$ ppm beobachtet werden konnten, wurden für protische Moleküle wie primäre und sekundäre Amine bzw. Alkohole deutliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung von $\Delta\delta = 1\text{--}4$ ppm beobachtet. Diese deutliche Signalverschiebung ist durch die Fähigkeit von DMSO- d_6 bedingt, mit polaren Molekülen Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, die eine schwache Abschirmung und somit eine Signallage im Tieffeld hervorrufen. Ähnliche Daten wurden von den beiden Arbeitsgruppen um Jones et al. und Gottlieb et al. experimentell ermittelt [71, 72]. In beiden Studien wurde die Anzahl der verwendeten deuterierten Lösungsmittel deutlich erhöht, um unterschiedliche Lösungsmittelleffekte an einer Vielzahl an Molekülen aufzeigen zu können. Beide Studien zeigten, dass sich die chemischen Verschiebungen von Protonen und ^{13}C -Atomen von Lösungsmittel zu Lösungsmittel erheblich unterscheiden können.

Am Beispiel des Chloroform-Protons konnten abhängig vom Lösungsmittel signifikante Unterschiede in der chemischen Verschiebung von 6.15 ppm in C_6D_6 bis zu 7.58 ppm in $\text{ACN-}d_3$ und 8.32 ppm in DMSO- d_6 beobachtet werden [72]. Zurückführen lässt sich diese Signalverschiebung auf die unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Analyt, die somit auf den beobachteten Kern eine unterschiedlich starke abschirmende Wirkung ausüben. Im aromatischen Lösungsmittel C_6D_6 wird das Chloroform-Proton aufgrund des induzierten Ringstromeffekts stark abgeschirmt. Das Proton liegt hier über dem aromatischen Ring (Abbildung 2.12 a), was zu einer Signallage im Hochfeld führt. Dieser Effekt wird in der Literatur auch als ASIS-Effekt (“aromatic solvent induced shift”) bezeichnet [65]. In $\text{ACN-}d_3$ wird das Proton durch den magnetischen Anisotropie-Effekt der Nitrilgruppe abgeschirmt, da das Chloroform-Proton im Doppelkegelmodell im abschirmenden Bereich der Dreifachbindung liegt (Abbildung 2.12 b). In DMSO- d_6 wird das acide Proton dagegen nur sehr schwach abgeschirmt und somit tieffeldverschoben, da das Chloroform-Proton

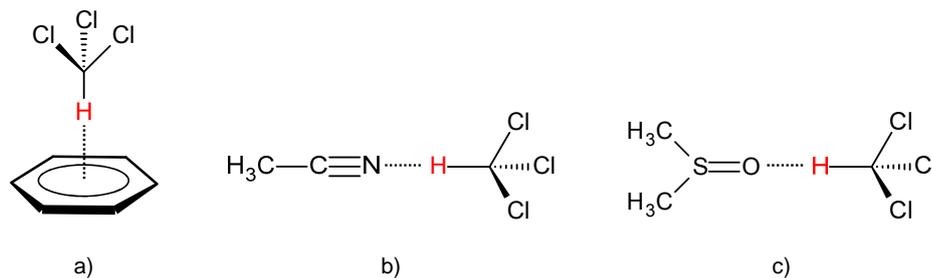


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Analyt-Lösungsmittel-Wechselwirkungen von Chloroform mit a) C₆D₆, b) ACN-d₃ und c) DMSO-d₆.

mit dem Wasserstoffbrücken-Akzeptor DMSO-d₆ intermolekular wechselwirkt (Abbildung 2.12 c). Für Moleküle wie beispielsweise Cyclohexan wurden dagegen in allen Lösungsmitteln gleiche chemische Verschiebungen für die betrachteten CH₂-Protonen ermittelt [72], da hier außer ähnlich schwachen Van-der-Waals-Wechselwirkungen keine anderen spezifischen Wechselwirkungen in Lösung beobachtet werden [73].

Allgemein gilt, dass für die Ausbildung von Analyt-Lösungsmittel-Wechselwirkungen polarer Moleküle vorwiegend Wasserstoffbrückenbindungen sowie die Wechselwirkung mit aromatischen Lösungsmitteln von Bedeutung sind. So werden hier beim Wechsel von einem apolaren zu einem polaren Lösungsmittel deutliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung beobachtet; gleiches gilt für den Wechsel zu aromatischen Lösungsmitteln. Apolare Moleküle bilden hingegen keine spezifischen Wechselwirkungen mit Lösungsmitteln aus; somit wird die chemische Verschiebung dieser Verbindungen bei einem Lösungsmittelwechsel nicht beeinflusst.

Der Einsatz geeigneter Lösungsmittel spielt eine entscheidende Rolle, um überlappende Resonanzen zu verschieben und diese somit vollständig zu isolieren. Als limitierender Faktor kann die Unlöslichkeit des zu untersuchenden Moleküls den Einsatz bestimmter Lösungsmittel verhindern, da für die quantitative NMR-Spektroskopie die vollständige Löslichkeit des Analyten im verwendeten Lösungsmittel vorausgesetzt wird [55]. Löst sich der Analyt nicht vollständig im reinen Lösungsmittel, wird deshalb häufig ein Gemisch aus zwei Lösungsmitteln eingesetzt. Das zweite Lösungsmittel, das meist nur in geringen Mengen zugesetzt wird, dient in erster Linie als Lösungsvermittler [31, 74], kann jedoch auch selbst die Signalseparation beeinflussen [31]. Weiterhin können störende Signalüberlagerungen des Lösungsmit-

telsignals bzw. der HOD-Resonanz (Restwasser des Lösungsmittels) mit Signalen der Hauptkomponente den Einsatz bestimmter Lösungsmittel unterbinden.

Überlagern bzw. stören austauschbare Protonen der Probe wie beispielsweise OH-, NH- und SH-Gruppen die Integration anderer Resonanzen, können diese Signale durch den Einsatz polarer, protischer Lösungsmittel wie D₂O und CD₃OD, die einen schnellen Protonenaustausch ermöglichen, aus dem NMR-Spektrum eliminiert werden und dieses erheblich vereinfachen. In aprotischen Lösungsmitteln wie DMSO-d₆ wird dagegen der Protonenaustausch durch die Ausbildung starker Wasserstoffbrücken stark verlangsamt, so dass die Signale austauschbarer Protonen weiterhin im Spektrum detektiert werden können.

Das allgemeine Vorgehen bezüglich der Optimierung des Lösungsmittels während der Methodenentwicklung sowie die Beeinflussung der chemischen Verschiebung einzelner Protonen durch das jeweilige Lösungsmittel bzw. -gemisch wird im Allgemeinen Teil in Kapitel 1 am Beispiel unterschiedlicher Mehrkomponentengemische näher aufgezeigt.

2.4.2. pH-Wert

Die chemische Verschiebung von NMR-aktiven Kernen wie beispielsweise Wasserstoff, Kohlenstoff, Fluor und Phosphor ist abhängig von der Ladung im Molekül [75]. NMR-Signale in räumlicher Nähe zu basisch oder sauer reagierenden Substituenten reagieren empfindlich auf die Änderung des pH-Wertes der Untersuchungslösung, da aufgrund der Protonierung bzw. Deprotonierung funktioneller Gruppen das Ladungsverhältnis im Molekül verändert wird [76]. Diese Abhängigkeit zwischen chemischer Verschiebung und pH-Wert ermöglicht zum einen die Bestimmung von pK_a -Werten sowie Zuordnung und Quantifizierung der Protonierung bzw. Deprotonierung [77–79], zum anderen kann im Rahmen der qNMR-Methodenentwicklung durch eine gezielte Änderung des pH-Wertes der Untersuchungslösung die Signalseparation positiv beeinflusst werden (siehe Allgemeiner Teil, Kapitel 2).

Am Beispiel des Fluorochinolons Norfloxacin, das sowohl eine sauer reagierende Carbonsäuregruppe als auch einen basischen Stickstoff im Piperazinring besitzt (Abbildung 2.13), kann der Einfluss der Protonierung bzw. Deprotonierung der beiden funktionellen Gruppen auf die chemische Verschiebung bestimmter Protonen und

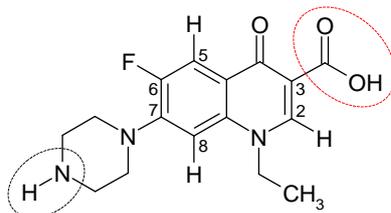


Abbildung 2.13: Chemische Struktur von Norfloxacin.

Tabelle 2.2: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung charakteristischer Protonen in Norfloxacin vom pH-Wert der Untersuchungslösung.

	H2	H5	H8	Piperazin-H
0.01 M NaOD	8.37	7.78	6.92	3.07; 3.19
0.01 M DCl	8.75	7.72	7.14	3.52; 3.62
5 M DCl	9.34	8.15	7.37	3.58; 3.86

^{13}C -Atome aufzeigt werden [80, 81]. Die Deprotonierung der Carbonsäuregruppe in 0.01 M NaOD beeinflusst maßgeblich die chemische Verschiebung des benachbarten Protons H2; die Signale der entfernt liegenden Chinolon-Protonen H5 und H8 werden dagegen kaum in Richtung Hochfeld verschoben. ^1H -NMR-Experimente in saurem Milieu (0.01 M DCl) zeigen aufgrund des nun positiv geladenen Piperazin-Stickstoffs eine Tieffeldverschiebung der Ringprotonen. Bedingt durch den $-I$ -Effekt der protonierten Carbonsäuregruppe wird das Proton H2 im Vergleich zu Experimenten in NaOD ebenfalls tieffeldverschoben; die Signallage der Protonen H5 und H8 wird dagegen kaum beeinflusst. Experimente in stark saurem Milieu (5 M DCl) zeigen für alle Protonen eine erhebliche Tieffeldverschiebung (siehe Tabelle 2.2).

In Analogie zu den ^1H -NMR-Experimenten werden die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoff-Atome in direkter Nachbarschaft eines basisch oder sauer reagierenden Substituenten durch den pH-Wert der Untersuchungslösung deutlich beeinflusst, während sich die Signallage entfernt liegender Kohlenstoff-Atome ebenfalls nur geringfügig ändert [81].

2.4.3. Konzentration

Wie bereits erwähnt, lassen sich die genauen Verschiebungswerte austauschbarer Protonen von OH-, NH- und SH-Gruppen aufgrund ihrer Konzentrationsabhängigkeit

nicht angeben. Jedoch wird auch für nicht-austauschbare Protonen eine konzentrationsabhängige Signallage im Spektrum beobachtet. Da Moleküle die Fähigkeit besitzen, Dimere und höhere Molekülverbunde aus identischen Untereinheiten zu bilden, unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen einzelner Kerne in Monomerform deutlich von denen in Molekül ASSOZIATEN. Das Ausmaß der Signalverschiebung unterscheidet sich je nach entsprechender chemischer Umgebung des jeweiligen Kerns, so dass dieser Effekt bei Molekülen mit Kernen, deren chemische Verschiebung konzentrationsabhängig ist, gezielt für die Signalseparation eingesetzt werden kann. Die ASSOZIATE werden durch schwach wirkende nicht-kovalente Kräfte stabilisiert; hierzu zählen intermolekulare Wasserstoffbrücken, aromatische π - π -Wechselwirkungen und elektrostatische sowie Kation- π -Wechselwirkungen [82, 83].

Konzentrationsabhängige Signalverschiebungen sollen im Folgenden an verschiedenen Beispielen aufgezeigt und näher diskutiert werden. Bereits in der Anfangszeit der hochauflösenden NMR-Spektroskopie wurde dieses Phänomen an Coffein und anderen Xanthin-Derivaten beobachtet [84]. Mit ansteigender Coffein-Konzentration wird für alle vier nicht-austauschbaren Protonen eine unterschiedlich starke Hochfeldverschiebung im NMR-Spektrum beobachtet. Mitra et al. konnten für eine Vielzahl aromatischer Moleküle wie beispielsweise Chinolon-, Acridin-, Indol-, Benzofuran- oder Naphthalin-Derivate eine konzentrationsabhängige Verschiebung ermitteln [82]. In Abhängigkeit der Chinolon-Konzentration können aufgrund der unterschiedlichen Beeinflussung der Signallage einzelner Protonen Signalüberlappungen, Signalseparationen und "Cross-Over"-Verschiebungen beobachtet werden (Abbildung 2.14). Während für niedrige Probenkonzentrationen die Resonanzen der beiden Protonen H5 und H7 basisliniengetrennt vorliegen, nähern sich die Signale bei schrittweiser Erhöhung der Chinolon-Konzentration an, bis sie vollständig überlappen. Das Proton H4 erfährt die größte Beeinflussung; aufgrund der starken Tieffeldverschiebung von H4 und der gleichzeitig schwachen Hochfeldverschiebung der benachbarten H8-Resonanz ändert sich die Signalreihenfolge der beiden Protonen ("Cross-Over"-Verschiebung). Verursacht werden die konzentrationsabhängigen Signalverschiebungen durch die Dimerisierung zweier Chinolon-Moleküle (π - π -Wechselwirkung).

Der Einfluss der Probenkonzentration auf die chemische Verschiebung kann jedoch nicht nur dazu genutzt werden, im Rahmen der Methodenentwicklung eine vollständige Signalseparation zweier Resonanzen zu erzielen; diese Abhängigkeit kann

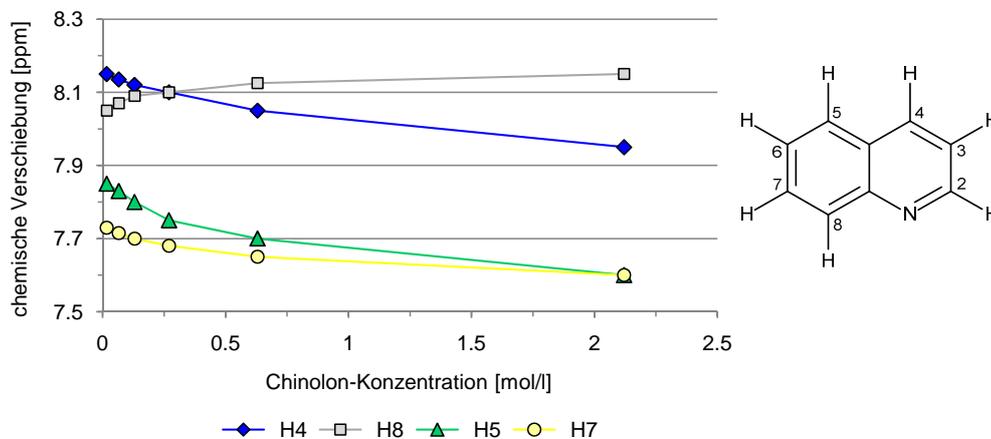


Abbildung 2.14: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung charakteristischer Protonen in Chinolon von der Konzentration der Untersuchungslösung (nach [82]).

zudem gezielt für die quantitative Analyse von Molekülen mit Kernen konzentrationsabhängiger chemischer Verschiebung wie z. B. in Fluorochinolonen eingesetzt werden, da aufgrund einer bestehenden Korrelation zwischen Probenkonzentration und chemischer Verschiebung die Konzentration und somit der Gehalt eines Moleküls direkt über die chemische Verschiebung ermittelt werden kann [83].

2.4.4. Hilfsreagenzien

Paramagnetische Hilfsreagenzien besitzen neben der Eigenschaft, Relaxationszeiten deutlich zu verkürzen, die Fähigkeit, Signale zu verschieben. Da nicht alle Signale eines Moleküls gleichmäßig vom Verschiebungsreagenz beeinflusst werden, wird dieser Effekt gezielt zur Analyse von NMR-Spektren mit stark überlappenden Regionen eingesetzt. Im Idealfall können durch die Zugabe von Lanthanoiden-Shift-Reagenzien (LSR) komplexe NMR-Spektren vereinfacht, überlappende Signale getrennt, eindeutig zugeordnet und integriert werden. Oftmals überwiegt jedoch die starke Linienverbreiterung, eine Folge der nun sehr kurzen Relaxationszeiten, den positiven Verschiebungseffekt. Hervorgerufen wird diese Signalverschiebung durch die Komplexbildung zwischen Analyt und paramagnetischem Metall-Ion. Die Beeinflussung der Protonenverschiebung erfolgt hierbei als dipolare Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Dipol des ungepaarten Elektrons des stark anisotrop paramagnetischen

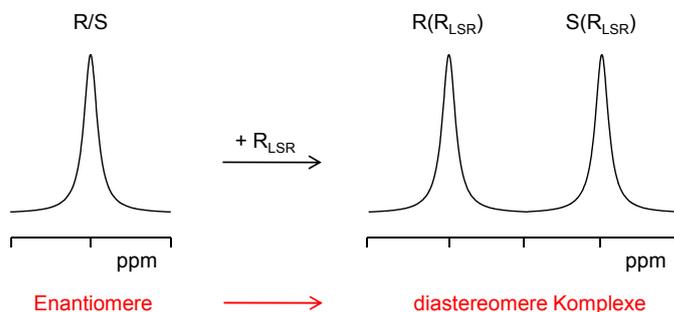


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der NMR-spektroskopischen optischen Reinheitskontrolle eines Enantiomerengemisches (Racemat R/S) mit Hilfe des chiralen, enantiomerenreinen Lanthanoid-Verschiebungsreagenz (R_{LSR}).

Hilfsreagenzes und dem des betrachteten Kerns; diese Pseudokontakt-Wechselwirkung erfolgt über den Raum. In der Praxis werden überwiegend paramagnetische Ionen des Europiums Eu^{3+} und Praseodyms Pr^{3+} in Form von löslichen Chelaten eingesetzt. Das Ausmaß der Signalverschiebung ist u. a. vom Konzentrationsverhältnis Analyt/LSR und der Komplexbildungsstärke des Analyten abhängig [85, 86].

Dieser Verschiebungseffekt kann nun ebenfalls gezielt zur Separation überlappender Resonanzen im Rahmen der qNMR-Methodenentwicklung eingesetzt werden. Haupteinsatzgebiet ist hier die Bestimmung der optischen Reinheit von Enantiomerengemischen. NMR-spektroskopisch ist eine Unterscheidung zwischen dem reinen Enantiomer und dem Racemat nicht möglich, da beide Enantiomere identische Spektren zeigen. Diastereomere, die sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden, weisen dagegen unterschiedliche NMR-Spektren auf. Überführt man nun die Enantiomere durch die Zugabe eines chiralen, enantiomerenreinen LSR in diastereomere Komplexe, erfolgt prinzipiell eine Verdopplung der Signale im NMR-Spektrum; die Bestimmung der Enantiomerenreinheit wird ermöglicht (Abbildung 2.15). Unter optimalen Bedingungen sind die beiden Resonanzen des beobachteten Kerns vollständig separiert. Oftmals unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen einzelner Protonen jedoch nur geringfügig, so dass Signalüberlagerungen beobachtet werden. Der induzierte Verschiebungseffekt lässt sich allerdings durch das Anpassen des Konzentrationsverhältnisses Analyt/LSR, der Temperatur und des Lösungsmittels beeinflussen und somit optimieren.

Bis heute wird die Bestimmung der optischen Reinheit oftmals durch den Zusatz

chiraler, enantiomerenreiner Verschiebungsreagenzien mittels NMR-Spektroskopie kontrolliert, wie zahlreiche Anwendungsbeispiele zeigen [85, 87–92]. Ein großer Nachteil dieser Verschiebungsreagenzien ist jedoch die häufig auftretende starke Signalverbreiterung, die den Einsatz hoher Feldstärken verbietet, da die Signalverbreiterung mit der Feldstärke zusätzlich zunimmt. Eine geeignete Alternative bietet in diesem Fall der Zusatz von Cyclodextrinen. Wie bereits aus der Chromatographie bekannt, können Cyclodextrine mit dem Analyt sogenannte Einschlusskomplexe bilden. Die beiden Enantiomere binden mit unterschiedlich hoher Affinität an die polaren Seitenketten und den hydrophoben Hohlraum, was das Retentionsverhalten dieser Moleküle beeinflusst und die Enantiomerentrennung ermöglicht. Das Grundprinzip der enantioselektiven NMR-Spektroskopie basiert auf der Ausbildung diastereomerer Einschlusskomplexe der beiden Enantiomere mit dem chiralen Cyclodextrin-Selektor. Eingesetzt werden natürlich vorkommende Cyclodextrine (z. B. α -, β - und γ -Cyclodextrin) sowie ihre modifizierten Derivate [89, 93–97]. Cyclodextrine besitzen gegenüber Lanthonoid-Verschiebungsreagenzien den Vorteil, dass keine störenden Linienverbreiterungen im NMR-Spektrum beobachtet werden; zudem kann aufgrund ihrer meist guten Wasserlöslichkeit auch im wässrigen Milieu gearbeitet werden [89]. Störende Signalüberlagerungen zwischen Analyt und Hilfsstoff werden dagegen kaum beobachtet, da die Cyclodextrin-Signale im ^1H -NMR-Spektrum im Bereich zwischen $\delta \approx 3.5\text{--}5.1$ ppm liegen und somit die Detektion einer Vielzahl an Protonen (z. B. aromatische und im Hoch- bzw. Tieffeld liegende Alkyl-Protonen) nicht behindern [89].

Neben den bereits erwähnten Hilfsreagenzien kann die Enantiomerenreinheit ebenfalls durch den Zusatz chiraler Derivatisierungsreagenzien (z. B. (R)-(-)-O-Methylmandelsäurechlorid, Moshers' Reagenz, Anderson-Shapiro Reagenz) und chiraler Lösungsmittel (z. B. α -Naphthylethylamin, α -Phenylethylamin) NMR-spektroskopisch bestimmt werden [98].

2.4.5. Temperatur

Die chemische Verschiebung und die Linienform eines Resonanzsignals kann durch den Parameter "Temperatur" ebenfalls beeinflusst werden. Ein klassisches Beispiel für eine temperaturabhängige Signallage ist das HOD-Signal von Deuteriumoxid. Erhöht bzw. senkt man die Messtemperatur, wird diese Resonanz relativ zu den anderen

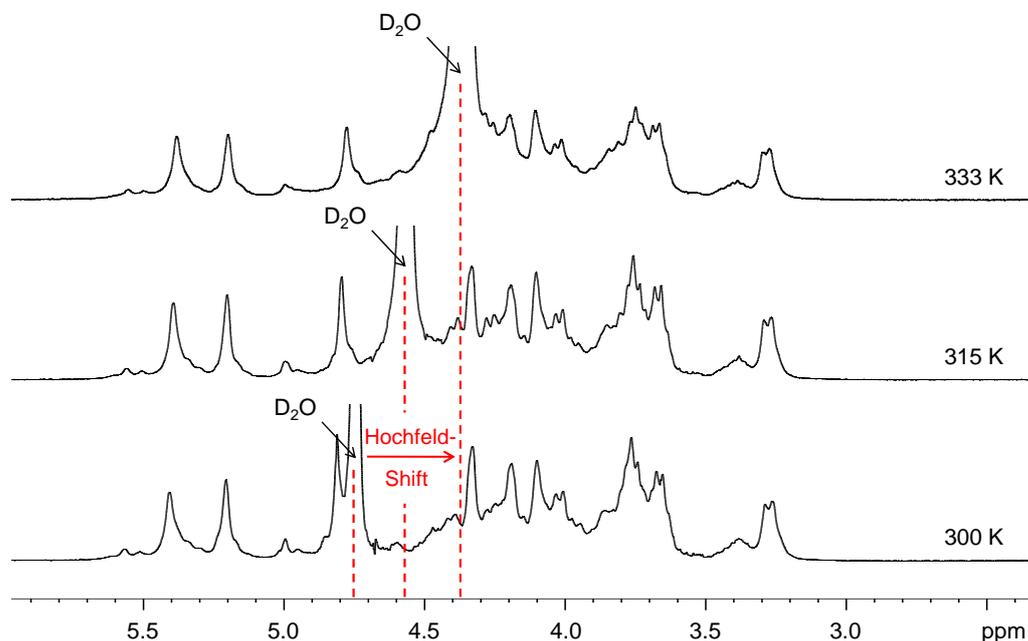


Abbildung 2.16: Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung des HOD-Signals von Deuteriumoxid.

Signalen der gelösten Probensubstanz hoch- bzw. tieffeldverschoben (Abbildung 2.16). Bei einem 500 MHz-Spektrometer beträgt die Signalverschiebung etwa 5 Hz/K [99]. Verunreinigungen, deren Signale bei Raumtemperatur im Bereich der HOD-Resonanz liegen, können somit durch eine gezielte Änderung der Temperatur qualitativ und quantitativ erfasst werden.

Eine temperaturabhängige Signalverschiebung wird jedoch auch für Protonen der zu analysierenden Substanz beobachtet. Wie bereits erwähnt, zeigt die chemische Verschiebung austauschbarer Protonen eine starke Temperaturabhängigkeit. Am Beispiel von Methanol kann dieser Effekt für die Hydroxyl-Resonanz aufgezeigt werden; erhöht man die Temperatur, wird die relative chemische Verschiebung zwischen dem OH-Signal und der Methyl-Resonanz verkleinert. Neben dieser Änderung der Signallage geht die Linienform der Hydroxyl-Resonanz aufgrund eines beschleunigten H,H-Austausches verloren. Während bei geringer Temperatur das zu erwartende Quartett deutlich zu erkennen ist, verschwindet die durch die Spin-Spin-Kopplung bedingte Feinstruktur bei höherer Temperatur [100]. In Fluorochinolonen wie beispielsweise Norfloxacin und Ciprofloxacin wird auch für nicht-austauschbare Protonen

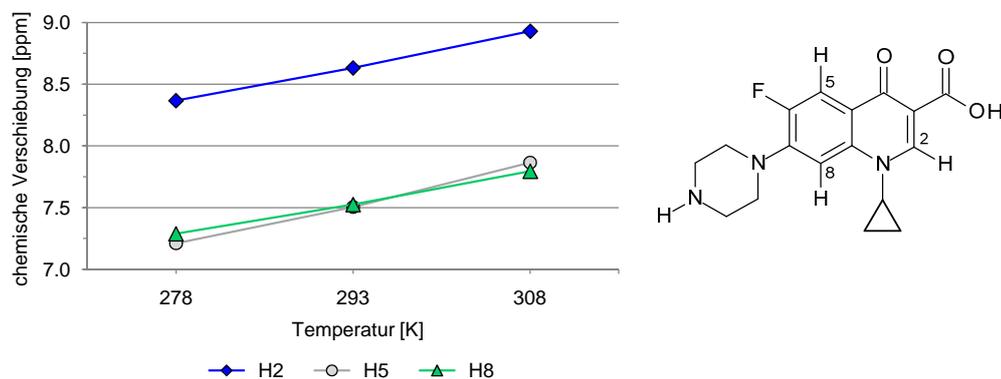


Abbildung 2.17: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung charakteristischer Protonen in Ciprofloxacin von der Messtemperatur (nach [83]).

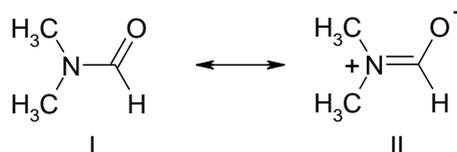


Abbildung 2.18: Die mesomeren Grenzstrukturen von Dimethylformamid verdeutlichen den hohen Doppelbindungscharakter der C,N-Bindung. Bei niedrigen Temperaturen und entsprechend gehinderter Rotation sind die beiden CH₃-Signale nicht äquivalent.

eine temperaturabhängige chemische Verschiebung beobachtet [83] (Abbildung 2.17). Dieser Effekt ist in der Regel ein Hinweis auf Molekülassoziate.

Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der chemischen Verschiebung kann die NMR-Spektroskopie auch zur Verfolgung schneller, reversibler Reaktionen eingesetzt werden. Rotationsisomere wie z. B. *N,N*-Dimethylformamid zeigen bei Raumtemperatur zwei getrennte Resonanzen für die beiden CH₃-Gruppen. Wird die Temperatur erhöht, verbreitern sich die beiden Signale und koaleszieren bei hohen Temperaturen zu einem breiten CH₃-Signal, welches bei weiterer Erhöhung wieder eine scharfe Signalform aufweist [101]. Die Fähigkeit, die beiden Isomere NMR-spektroskopisch zu unterscheiden, geht verloren. Ursache ist der hohe Doppelbindungscharakter der C-N-Bindung, der bei Raumtemperatur die Rotation um die Bindungsachse hemmt; die beiden Methylgruppen befinden sich in verschiedenen chemischen Umgebungen und werden folglich unterschiedlich stark abgeschirmt (Abbildung 2.18). Erhöht man die Temperatur, wird die hohe Rotationsbarriere von etwa 90 kJ/mol überwunden

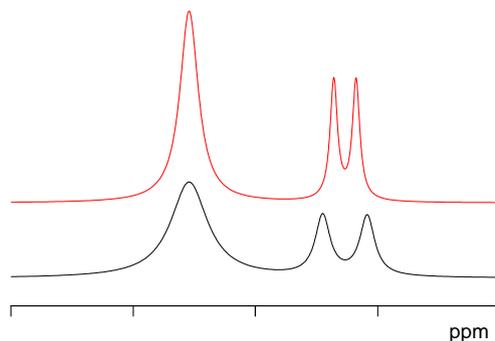


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung eines Singulett- und Dublett-Signals für niedrige (schwarz) und hohe (rot) Magnetfeldstärken.

und die Aufenthaltsdauer der beiden Methylgruppen in den Positionen verschiedener Larmorfrequenz wird verkürzt [101], was eine Vielzahl an Platzwechseln ermöglicht, so dass beide Gruppen nun äquivalent sind.

2.4.6. Magnetfeldstärke

Die chemische Verschiebung δ ist als relative, dimensionslose Größe unabhängig von der Flussdichte B_0 des NMR-Spektrometers. Folglich wird die Signallage der betrachteten Kerne im NMR-Spektrum in Abhängigkeit der Feldstärke nicht verändert; der ppm-Wert bleibt gleich. Dennoch kann der Einsatz von Spektrometern höherer Magnetfeldstärke die Signalseparation überlappender Resonanzen positiv beeinflussen, da sich die Signaldispersion und die spektrale Auflösung, gemessen in Hz, proportional zum äußeren Feld verhalten [102, 103], was einer Verringerung der Peakbreite auf der ppm-Achse entspricht. Wie in Abbildung 2.19 dargestellt, können somit durch die Erhöhung der Magnetfeldstärke auftretende Signalüberlagerungen besser aufgelöst werden.

2.5. Quantifizierungsmethoden

Bereits im Jahre 1963 wurden die ersten quantitativen NMR-Experimente sowohl an Reinsubstanzen als auch an Substanzgemischen durchgeführt [104, 105]. Das Prinzip der quantitativen NMR-Spektroskopie beruht auf der Messung und dem anschlie-

ßenden Vergleich von Signalintensitäten. Diese spektroskopische Technik erlaubt zum einen die Bestimmung des Stoffmengenverhältnisses zweier Komponenten, zum anderen die Ermittlung absoluter Messgrößen wie den Gehalt einer Hauptkomponente oder potentieller Verunreinigungen. Die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden – Relativbestimmung, Absolutbestimmung mittels Internem Standard sowie alternative Methoden zu Absolutbestimmung – sollen im folgenden Abschnitt näher erörtert werden.

2.5.1. Relativbestimmung

Die quantitative NMR-Spektroskopie stellt als “relative primäre Methode” [106–108] eine einfach durchzuführende Anwendungsmöglichkeit zur Ermittlung quantitativer Messwerte dar. So erfolgt die Bestimmung des Stoffmengenverhältnisses n_A/n_B zweier Komponenten A und B eines Mehrkomponentengemisches durch den Vergleich der Signalintensitäten I_A/I_B unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Kernanzahl N nach Gleichung (2.22); Voraussetzung ist lediglich die Anwesenheit eines vollständig separierten und eindeutig zugeordneten Signals für jede zu analysierende Komponente im NMR-Spektrum.

$$\frac{n_A}{n_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{N_B}{N_A} \quad (2.22)$$

Die Bestimmung des Stoffmengenanteils einer Komponente A eines Mehrkomponentengemisches bestehend aus x Komponenten erfolgt nach Gleichung (2.23):

$$\frac{n_A}{\sum_{i=1}^x n_i} = \frac{I_A/N_A}{\sum_{i=1}^x I_i/N_i} \cdot 100 \% \quad (2.23)$$

Dieses Normalisierungsverfahren ist geeignet zur Bestimmung der quantitativen Zusammensetzung von Mehrkomponentengemischen und Isomerengemischen wie Diastereomeren und Enantiomeren.

Vorteil dieser quantitativen Methode ist die schnell und einfach durchzuführende Probenvorbereitung, das Lösen einer erforderlichen Substanzmenge in einem geeigneten deuterierten Lösungsmittel; Angaben zu Molekulargewicht und exakter Einwaage sowie der Einsatz zertifizierter Referenzsubstanzen sind bei der relativen Bestimmungsmethode nicht erforderlich.

2.5.2. Absolutbestimmung mittels Interner-Standard-Methode

Die quantitative Bestimmung erfolgt mit Hilfe der Internen-Standard-Methode direkt über die Erfassung der Hauptkomponente selbst; eine vollständige Aufklärung des Verunreinigungsprofils ist somit nicht erforderlich [63, 109]. Der Gehalt der Hauptkomponente wird durch den Zusatz eines geeigneten Referenzmaterials definierter Reinheit bestimmt; in diesem Fall werden Analyt und Interner Standard abgewogen, die Untersuchungslösung mittels NMR-Spektroskopie vermessen und jeweils ein vollständig separiertes Signal von Analyt und Internem Standard integriert. Der Gehalt wird dann über den Vergleich der Signalintensitäten $I_{\text{Analyt}}/I_{\text{IS}}$ unter Berücksichtigung der Kernanzahl N , des Molekulargewichtes M und der Einwaage m von Analyt und Referenzsubstanz sowie der Reinheit des Internen Standards P_{IS} bestimmt:

$$P_{\text{Analyt}} = \frac{I_{\text{Analyt}}}{I_{\text{IS}}} \cdot \frac{N_{\text{IS}}}{N_{\text{Analyt}}} \cdot \frac{M_{\text{Analyt}}}{M_{\text{IS}}} \cdot \frac{m_{\text{IS}}}{m_{\text{Analyt}}} \cdot P_{\text{IS}} \quad (2.24)$$

Die Messunsicherheit der Internen-Standard-Methode wird maßgeblich bestimmt von Wägefehler, Integrationsfehler und Reinheit des Internen Standards [29, 41, 45].

Wägefehler

Die beiden Validierungsparameter "Präzision" und "Richtigkeit" sind abhängig von der Güte der Probenvorbereitung [41, 42, 45]. Die NMR-Spektroskopie zeichnet sich durch eine einfache und schnell durchzuführende Probenvorbereitung aus; Analyt und Standardsubstanz werden eingewogen, im entsprechenden Lösungsmittel gelöst und in ein NMR-Röhrchen überführt, um anschließend vermessen zu werden. Selbst komplexe Proben wie Körperflüssigkeiten sowie Zell- und Gewebeextrakte können ohne eine aufwendige Probenaufarbeitung direkt NMR-spektroskopisch vermessen werden [58].

Die Gehaltsbestimmung basiert auf der direkten Einwaage des Analyten gegen eine zertifizierte Referenzsubstanz, den Internen Standard. Um die Messunsicherheit des Einwaagevorgangs möglichst gering zu halten, sollten kleine Einwaage-Mengen von Analyt und Internem Standard vermieden werden; alternativ wird für geringe Probenkonzentrationen der Einsatz von Stammlösungen empfohlen, da trotz zusätzlicher Verdünnungsschritte die resultierende Messunsicherheit kleiner ausfällt als der

entstehende Wägefehler für geringe Einwaagen [110, 111]. Die Einordnung “geringe Einwaage“ ist in diesem Fall abhängig vom zulässigen Arbeitsbereich der eingesetzten Analysenwaage.

Übliche Einwaagen für die Gehaltsbestimmung von Hauptkomponenten mittels ^1H -NMR-Spektroskopie liegen im Bereich von etwa 10–50 mg; für die quantitative Erfassung unempfindlicher Kerne wie z. B. ^{13}C -Atome sowie für die Reinheitsprüfung auf Verwandte Substanzen geringer Konzentration ($\leq 1\%$) können sogar höhere Einwaagen notwendig sein. Somit spielt der Wägefehler bei routinemäßig eingesetzten Analysenwaagen mit einer Mindesteinwaage von 1 mg eine untergeordnete Rolle. Die resultierende Messunsicherheit der Probenvorbereitung wird durch die vom Hersteller angegebene Unsicherheit der Waage selbst und durch auftretende Fehler beim Einwiegen der Substanzen beeinflusst.

Integrationsfehler

In der Regel wird für quantitative NMR-Experimente die manuelle Integration der automatisch durchgeführten vorgezogen, da so Ergebnisse mit deutlich geringerer Streuung erhalten werden können [41, 44, 49, 110]. Die Richtigkeit eines Integrals wird bei richtig gewählten Aufnahmeparametern, neben ungenügend ausgeprägter Signalseparation bzw. Überlagerungen mit ^{13}C -Satelliten oder Verunreinigungen, vorwiegend durch die manuelle Nachbearbeitung des NMR-Spektrums, durchgeführt durch den Prüfer, bestimmt. Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, wird der Betrag der Signalintensität von der Korrektur der Phase und Basislinie sowie von der Integration geeigneter Resonanzen und folglich von der Präzision des Prüfers selbst beeinflusst [41, 54]. So treten bei der Nachbearbeitung eines Spektrums durch zwei verschiedene Prüfer in gegebenenfalls verschiedenen Laboratorien Unterschiede im Ergebnis auf, die für vollständig isolierte Signale bei gleichzeitigem Vorliegen einer detaillierten Arbeitsanweisung jedoch minimal sind [44, 112, 113]; auftretende Schwankungen werden durch die Labor- bzw. Vergleichspräzision erfasst. Liegt dagegen keine vollständige Basislinientrennung der zu integrierenden Signale vor, lassen sich zum Teil deutliche Abweichungen vom “wahren” Gehalt beobachten; diese werden durch den Einsatz von NMR-Spektrometern unterschiedlicher Magnetfeldstärke zusätzlich erhöht [114].

Wird die Einwaage des Internen Standards so gewählt, dass die zu integrierenden Resonanzen von Analyt und Referenzmaterial ähnliche Intensitäten aufweisen, wird bei korrekt durchgeführter Integration eine geringere Unsicherheit erhalten als beim Vergleich deutlich unterschiedlicher Signalintensitäten. Zudem kann die Richtigkeit des Integrationsvorgangs für Moleküle mit mindestens zwei vollständig separierten Signalen direkt während der eigentlichen Gehaltsbestimmung durch den Vergleich zweier Peakflächen der Hauptkomponente bzw. des Internen Standards ermittelt werden [41].

Reinheit des Internen Standards

Trotz präziser Probenvorbereitung und Prozessierung des NMR-Spektrums werden falsche Ergebnisse erhalten, wenn die Angabe des Reinheitsgrades des Internen Standards zum Zeitpunkt der quantitativen Analyse nicht mit der Angabe des Analysenzertifikats übereinstimmt. Abweichungen vom “wahren” Gehalt der Referenzsubstanz werden durch die eigentliche Quantifizierung bzw. durch ihre Veränderung während der Lagerung verursacht. Um nun quantitative Ergebnisse mit einer hohen Richtigkeit ermitteln zu können, muss die momentane Reinheit zum Zeitpunkt der Analyse bekannt oder die Stabilität des Referenzmaterials über eine gewisse Zeitdauer sichergestellt sein [110].

Eine Studie der schwedischen Arzneimittelbehörde konnte aufzeigen, dass häufig eingesetzte Referenzsubstanzen, obwohl unter geeigneten Bedingungen in Originalgefäßen gelagert, dennoch einen geringeren Gehalt aufwiesen als bei ihrer Lieferung [115]. Somit ist eine Verifizierung der Gehaltsangabe durch Nachprüfungen nötig, um präzise und richtige Ergebnisse zu erhalten. Zudem konnte im Rahmen dieser Untersuchungen aufgezeigt werden, dass bei der quantitativen Bestimmung eines Arzneistoffes, im vorliegenden Beispiel einer Paracetamol-Tablette, mit unterschiedlichen Referenzsubstanzen leichte Ergebnisabweichungen beobachtet wurden. Die Reinheit der potentiellen Standardsubstanzen wurde zuvor mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und Dynamischer Differenz-Kalorimetrie (DSC) gegen hochreines Acetanilid experimentell bestimmt. Da bereits die Reinheitsbestimmungen der Internen Standardsubstanzen mittels NMR und DSC für ein und dasselbe Referenzmaterial leichte Unterschiede im Gehalt aufwiesen, konnten die geringen Abweichungen im Gehalt der Paracetamol-

Tablette mit Hilfe der Messunsicherheit der Reinheitsbestimmung des Internen Standards erklärt werden. Die Firma Sigma, die selbst seit Sommer 2009 die Reinheit verschiedener organischer Moleküle mittels NMR-Spektroskopie bestimmt, kann die meisten dieser Verbindungen mit Gehaltsunsicherheiten von etwa 0.2 % zertifizieren [113]. Diese Messunsicherheiten konnten in anderen Studien bestätigt werden; hier wurden für die Reinheitsangabe des Referenzmaterials Unsicherheiten von bis zu 0.5 % erhalten [29, 110].

Auswahl geeigneter Interner Standards

Prinzipiell stellt jedes organische Molekül einen potentiellen Internen Standard für die quantitative NMR-Spektroskopie dar, wenn dessen Reinheit bekannt ist und mindestens ein Signal im Spektrum quantitativ ausgewertet werden kann. Da die Intensität eines Signals direkt proportional zur Anzahl der Kerne ist, ist für quantitative NMR-Experimente der Signalflächenbezug auf eine völlig andere Substanz möglich; die Bestimmung von "Response-Faktoren", wie dies in der HPLC beim Einsatz eines vom Analyt unterschiedlichen Referenzmaterials erforderlich ist, entfällt [63].

Potentielle Referenzsubstanzen sollten folgende Eigenschaften aufweisen: (i) erhältlich in reiner Form, (ii) preiswert, (iii) stabil und chemisch inert, (iv) nicht flüchtig und nicht hygroskopisch, (v) vollständig löslich in den meisten organischen und wässrigen NMR-Lösungsmitteln, (vi) einfache Handhabung beim Wägevorgang (somit sind Feststoffe Flüssigkeiten vorzuziehen), (vii) geeignetes Molekulargewicht, vergleichbar mit dem des Analyt, um geringe Einwaagen zu vermeiden, (viii) vorzugsweise einfaches NMR-Spektrum und (ix) kurze Spin-Gitter-Relaxationszeiten [41]. Letztgenanntes Auswahlkriterium, die Länge der T_1 -Relaxationszeit, wird in der Literatur in der Regel jedoch nicht als Auswahlkriterium berücksichtigt, obwohl die Dauer eines NMR-Experiments direkt von der längsten T_1 -Relaxationszeit der quantitativ beobachteten Kerne abhängt. In der Literatur sind zahlreiche Substanzen für die quantitative NMR-Spektroskopie aufgeführt, die die beschriebenen Anforderungen erfüllen [54, 58, 109, 115].

Die in der Literatur beschriebenen Referenzsubstanzen weisen meist nur ein Signal, vorzugsweise ein schmales Singulett, im ^1H -NMR-Spektrum auf. Dadurch wird das Auftreten möglicher Überlagerungen mit Probensignalen minimiert und gleichzeitig

ein breiter Anwendungsbereich gewährleistet. Diese Verbindungen besitzen jedoch meist lange T_1 -Relaxationszeiten von bis zu 10 s, die lange Messzeiten zur Folge haben und dementsprechend für den Routinebetrieb eher ungeeignet sind. Dennoch sind Verbindungen wie Maleinsäure trotz ihrer langen T_1 -Relaxationszeit und ihres geringen Molekulargewichts eine der am häufigsten eingesetzten Referenzsubstanzen in der quantitativen NMR-Spektroskopie [54, 116–118].

Organische Moleküle wie 4-Dimethylaminobenzoesäureethylester (DMABE), Nicotinamid, Thymol und Kaliumhydrogenphthalat weisen im ^1H -NMR-Spektrum zwar mehrere Resonanzen auf, jedoch weisen diese Verbindungen ähnlich kurze T_1 -Zeiten wie die meisten Analyten selbst auf. Diese potentiellen Internen Standardsubstanzen bieten den Vorteil, aufgrund ihrer kurzen Spin-Gitter-Relaxationszeiten bei erhöhter Scan-Anzahl kurze Messzeiten pro NMR-Experiment zu ermöglichen, was für ihren routinemäßigen Einsatz in der Qualitätskontrolle von APIs zwingend nötig ist [45].

2.5.3. Alternative Methoden zur Absolutbestimmung

100 %-Methode

Die quantitative Bestimmung der Hauptkomponente erfolgt unter Verwendung der 100 %-Methode indirekt über die Erfassung aller Verwandten Substanzen [63]. Folglich wird der Reinheitsgrad der Hauptkomponente, wie in Gleichung (2.25) dargestellt, durch die Subtraktion aller organischen und anorganischen Verunreinigungen von 100 % ermittelt [29, 111]:

$$P_{\text{Analyt}} = 100 \% - \sum P_{\text{organisch}} - \sum P_{\text{anorganisch}} \quad (2.25)$$

Der Gehalt der organischen Verunreinigungen wird relativ zur Hauptkomponente mittels NMR-Spektroskopie ermittelt, während der anorganische Anteil (anorganische Salze, Trocknungsverlust, Sulfatasche) aufgrund fehlender NMR-aktiver Kerne gesondert durch geeignete Verfahren bestimmt werden muss.

Der Einsatz dieser quantitativen Methode setzt voraus, dass alle Signale im NMR-Spektrum, die nicht durch die Hauptkomponente selbst hervorgerufen werden, eindeutig potentiellen Verunreinigungen zugeordnet werden können. Die Durchführung weiterer ein- und/oder zweidimensionaler NMR-Experimente ermöglicht den Aus-

schluss bzw. die Detektion und Identifizierung weiterer Verwandter Substanzen, die aufgrund ähnlicher chemischer Verschiebungen von den großen Signalen der Hauptkomponente überlagert werden und mit dieser Methode nicht erfasst werden können. Richtige Ergebnisse werden erzielt, wenn jede organische Verunreinigung mindestens ein vollständig separiertes Signal im Spektrum aufweist, welches mittels Integration quantitativ erfasst werden kann.

Die 100 %-Methode eignet sich vorzugsweise für die quantitative Bestimmung von Substanzen mit einfacher Molekülstruktur, da diese nur wenige Signale im Spektrum aufweisen und somit die Wahrscheinlichkeit für störende Signalüberlagerungen sehr gering ist. Bei der Analyse komplexer Moleküle werden dagegen deutliche Abweichungen zum "wahren" Gehalt bzw. zu Ergebnissen alternativer Bestimmungsmethoden wie der Internen Standardisierung beobachtet, da die Identifizierung und anschließende Quantifizierung aller Verunreinigungen in komplexen NMR-Spektren meist schwierig bis unmöglich ist [63].

Standard-Additionsverfahren

Beim Standard-Additionsverfahren wird der zu untersuchenden Analysesubstanz mehrmals eine bekannte Menge einer Kalibriersubstanz, es handelt sich hier um den Analyten selbst, zugesetzt, die Probe nach jeder Zugabe vermessen und der Zuwachs des Analytensignals bestimmt (siehe Abbildung 2.20). Mit Hilfe der linearen Regression kann dann der ursprüngliche Gehalt des Analyten in der Probe bestimmt werden. Trägt man Menge bzw. Konzentration der hinzugefügten Kalibriersubstanz gegen die Zunahme der Signalfäche auf, wird im Idealfall eine Gerade mit der Funktion $y = mx + n$ erhalten. Der Gehalt des Analyten in der Probe ergibt sich aus der Nullstelle dieser Funktion gemäß $|x| = n/m$. Der hinzugefügte Anteil des Analyten sollte etwa in der gleichen Größenordnung wie die Konzentration des Analyten in der zu untersuchenden Probe liegen; dies erfordert jedoch eine gewisse Vorkenntnis des Gehalts [45, 109].

In der Regel wird zur Aufnahme einer Kalibrierkurve eine Serie von Kalibrierlösungen unterschiedlicher Konzentration vermessen und der Gehalt des Analyten anhand der Kalibrierfunktion ermittelt. Ist die Aufnahme einer Kalibrierkurve aufgrund von störenden Matrixeffekten, d. h. von Effekten weiterer Bestandteile der Probe, die

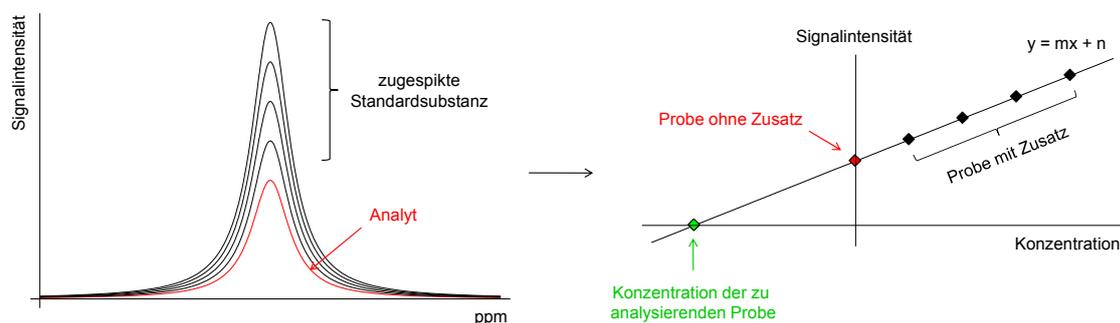


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung des Standard-Additionsverfahrens.

nicht direkt analysiert werden, mit matrixfreien Kalibrierproben nicht möglich bzw. der Aufwand mit matrixangepassten Kalibrierstandards nicht gerechtfertigt, kann mit diesem Aufstockungsverfahren die Kalibrierfunktion in der matrixbehafteten Realprobe ermittelt und Matrixeffekte somit minimiert werden. Nachteil der Standard-Additionsmethode ist ihr beträchtlicher Zeitaufwand, da für jede Realprobe eine eigene Kalibrierfunktion erstellt werden muss; zudem sind oftmals teure Referenzsubstanzen bekannter Reinheit von Hauptkomponente bzw. Verunreinigung notwendig.

Externe-Standard-Methode

Alternativ kann der Gehalt eines organischen Moleküls mit Hilfe der Externen-Standard-Methode bestimmt werden. Dieses Verfahren eignet sich besonders dann, wenn die zu analysierende Substanz nach der Messung durch Entfernen des Lösungsmittels zurückgewonnen und somit ihre Kontaminierung mit einem Internen Standard vermieden werden soll [109]. Die Externe Standardisierung kann hier auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen: (i) Einsatz eines speziellen Messröhrchens mit einer zusätzlichen Kapillare [119, 120] oder (ii) Einsatz von zwei getrennten NMR-Röhrchen [121, 122]. Bei der ersten Variante enthält das NMR-Röhrchen eine abgetrennte Kapillare, die mit dem Externen Standard gefüllt ist. Analyt und Referenzsubstanz werden simultan vermessen, so dass analog zur Internen Standardisierung auf störende Signalüberlagerungen zwischen Analyt und Externem Standard geachtet werden muss; zudem muss die Referenzsubstanz im selben Lösungsmittel wie der Analyt löslich sein. Bei der zweiten Variante werden Analyt und Referenzsubstanz getrennt voneinander in

zwei NMR-Röhrchen nacheinander unter denselben Messbedingungen (Abstimmung des Probenkopfes, Aufnahmeparameter, gleiches Lösungsmittel) vermessen, d. h. die Spektrometerkonstante K_s muss für beide Experimente übereinstimmen ($K_{S1} = K_{S2}$). Die "Zwei-Röhrchen-Methode" hat den Vorteil, dass störende Signalüberlagerungen zwischen Analyt und Standard vermieden werden können und die Auswahl der Referenzsubstanzen unter Berücksichtigung ihrer Löslichkeit und T_1 -Relaxationszeit erfolgen kann. Beide Vorgehensweisen sind jedoch im Vergleich zur Internen-Standard-Methode aufwendiger, da sowohl das Füllvolumen der eingesetzten Röhrchens kalibriert als auch beim Einsatz von zwei NMR-Röhrchen ein zusätzliches NMR-Experiment durchgeführt werden muss. Damit erweist sich die Externe-Standard-Methode in der Praxis als störanfälliger im Vergleich zur Quantifizierung mittels Internem Standard, was sich auch in einer erhöhten Messunsicherheit ausdrückt.

Das ERETIC-Verfahren. Im Jahre 1997 wurde eine alternative Methode, das sogenannte ERETIC-Verfahren (Electronic Reference To access In vivo Concentrations), zu den beiden bereits bestehenden Externen-Standard-Methoden eingeführt [123]. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass das Referenzsignal elektronisch erzeugt wird und an jeder beliebigen Stelle im NMR-Spektrum platziert werden kann. Das entsprechende FID-Signal wird über einen Frequenzgenerator künstlich erzeugt, zeitgleich mit dem FID der zu analysierenden Probe aufgenommen und diesem überlagert. Bei der klassischen Konfiguration wird das ERETIC-Signal über die ^{13}C -Spule des Probenkopfes eingestrahlt und anschließend mit den Protonensignalen der Probe über die Protonenspule empfangen [123–126]. Die chemische Verschiebung, die Intensität und die Breite des ERETIC-Signals können durch entsprechende Parameter wie Frequenz und Dämpfung durch den Prüfer festlegen werden. Eine quantitative Bestimmung gegen das simulierte ERETIC-Signal kann nach Kalibrierung dieses Signals gegen eine Referenzsubstanz bekannter Reinheit erfolgen. Für die simulierte Stoffmengenkonzentration n_{ERETIC} in [mol/g] gilt:

$$n_{\text{ERETIC}} = K_{\text{Std}} \cdot \frac{I_{\text{ERETIC}}}{I_{\text{Std}}} \cdot \frac{N_{\text{Std}}}{M_{\text{Std}}} \quad (2.26)$$

K_{Std} ist hierbei definiert als die bekannte Konzentration der Referenzsubstanz in [g/g], I als Intensität der erzeugten Signale, N_{Std} als Anzahl der Protonen, die das Signal

hervorrufen und M_{Std} als das Molekulargewicht des eingesetzten Kalibrierstandards.

Erfolgt die quantitative Analyse der Probe unter denselben Bedingungen wie zum Zeitpunkt der Kalibrierung der Intensität des ERETIC-Signals, kann der absolute Gehalt der zu analysierenden Probe P_{Analyt} in [g/g] nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$P_{\text{Analyt}} = n_{\text{ERETIC}} \cdot \frac{I_{\text{Analyt}}}{I_{\text{ERETIC}}} \cdot \frac{M_{\text{Analyt}}}{N_{\text{Analyt}}} \quad (2.27)$$

Neben den bereits erwähnten Vorteilen der Externen Standardisierung sollen nun noch kurz weitere Vorteile des ERETIC-Verfahrens angesprochen werden: Im Vergleich zur "Zwei-Röhrchen-Methode" ist für die Quantifizierung von Molekülen nur ein Experiment nötig, da das Referenzsignal simuliert wird. Zudem wird die Messzeit des NMR-Experimentes nur von der entsprechenden T_1 -Relaxationszeit des Analyten bestimmt, da die Intensität des ERETIC-Signals unabhängig von der T_1 -Zeit ist. Mittlerweile sind einige quantitative Anwendungsbeispiele für das ERETIC-Verfahren in der Literatur beschrieben; neben der ^1H -NMR-Spektroskopie [127] findet diese Methode auch in der ^{13}C -NMR- [128] und zweidimensionalen NMR-Spektroskopie [129–131] sowie in der Festkörper-NMR-Spektroskopie [132, 133] und Magnetresonanztomographie (MRI) [134–138] Anwendung. Für den analytischen Routinebetrieb ist diese Technik jedoch aufgrund ihrer hohen Fehleranfälligkeit, geringen Robustheit und Automatisierungsmöglichkeiten sowie der erforderlichen Expertise des Prüfers im Vergleich zur Internen-Standard-Methode eher ungeeignet [112].

2.6. Allgemeine Aspekte der quantitativen ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Grundsätzlich kann durch die Integration von ^{13}C -Resonanzen und einem anschließenden Flächenvergleich zweier Signale eine quantitative Information aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum gewonnen werden, die aufgrund der direkten Proportionalität zwischen Signalintensität und Anzahl der Kerne eine Gehaltsbestimmung von Haupt- und Nebenkomponente(n) ermöglicht. Aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit von etwa 1.1 %, einer niedrigen Nachweisempfindlichkeit, bedingt durch ein kleines magnetisches Moment μ und gyromagnetisches Verhältnis γ sowie überwiegend

langer T_1 -Relaxationszeiten der ^{13}C -Kerne, spielt die quantitative ^{13}C -NMR-Spektroskopie jedoch im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Qualitätskontrolle von Arzneistoffen nur eine untergeordnete Rolle [86, 92, 99, 139, 140]. Zudem werden bei routinemäßig durchgeführten ^{13}C -NMR-Experimenten, d. h. Spektrenaufnahme unter gleichzeitiger Protonen-Breitband-Entkopplung, Störeffekte beobachtet, die eine Auswirkung auf die Signalintensität besitzen. Als Hauptfehlerquelle ist hier der Kern-Overhauser-Effekt (NOE) zu nennen, der im Zusammenhang mit der ^1H -Breitband-Entkopplung in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie beobachtet wird und die Signalintensität deutlich um bis zu 200 % verstärkt [86]; die Intensitätszunahme ist hierbei abhängig von der Zahl der direkt gebundenen H-Atome sowie der Dipol-Dipol-Relaxation. Quantitative ^{13}C -NMR-Experimente sind dann möglich, wenn der NOE – auf Kosten der Messzeit – unterdrückt bzw. ausgeschaltet werden kann. Dies gelingt u. a. durch die Zugabe paramagnetischer Ionen der Lanthanoiden-Gruppe, wie beispielsweise Chrom(III)acetonacetat $\text{Cr}(\text{acac})_3$, die die Fähigkeit besitzen, die Spin-Gitter-Relaxationszeit erheblich zu verkürzen, so dass der Aufbau des störenden Kern-Overhauser-Effekts verhindert wird; von Nachteil ist die daraus resultierende Linienverbreiterung, die die Signalauflösung herabsetzt und gegebenenfalls die Separation nahe beieinanderliegender Resonanzen verschlechtert [86, 92, 141, 142]. In der Regel wird dieses Verfahren deshalb nicht eingesetzt; stattdessen finden "Inverse-Gated-Decoupling-Experimente" Einsatz [92, 139, 141–150]. Hier werden ungekoppelte ^{13}C -NMR-Spektren mit korrekten Signalintensitäten erhalten, da die Protonen-Breitband-Entkopplung nur während der Akquisitionszeit erfolgt und sich somit kein NOE aufbauen kann; um eine vollständige Unterdrückung des NOE zu gewährleisten, muss mit kurzen Akquisitionszeiten gearbeitet werden [139, 143].

Neben der NOE-Problematik weist die ^{13}C -NMR-Spektroskopie gegenüber der ^1H -NMR-Spektroskopie einige weitere Nachteile auf. Die Messzeit wird hier maßgeblich durch die häufig langen T_1 -Zeiten bestimmt. Während die Spin-Gitter-Relaxationszeiten für Protonen meist im Bereich von einer Sekunde liegen, weisen ^{13}C -Kerne häufig lange T_1 -Zeiten von bis zu einigen hundert Sekunden auf [86]. Die Folge sind lange Wartezeiten zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen, weshalb häufig auf ^{13}C -Intensitätsmessungen verzichtet wird. In diesem Fall bietet sich bei ausreichend großer Signalseparation die Zugabe paramagnetischer Verbindungen bzw. die Durchführung quantitativer DEPT-Experimente (**D**istortionless **E**nhancement

by Polarization Transfer) an. Der Einsatz von DEPT-Pulssequenzen bietet den Vorteil, dass hier ebenfalls ^{13}C -Signale im Spektrum detektiert werden, die Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen jedoch von den direkt an das C-Atom gebundenen Protonen bestimmt wird [143, 151]. Die Länge des “Relaxation Delay” wird somit von den meist rasch relaxierenden Protonen bestimmt, wodurch ein schnelles Akkumulieren und somit eine Verkürzung der Messzeit gewährleistet wird. Diese kann beim Einsatz von DEPT-Experimenten im Vergleich zu ^{13}C -Messungen aufgrund einer deutlich empfindlicheren Erfassung der C-Atome zusätzlich verkürzt werden [150–152].

Die Richtigkeit der ^{13}C -Signalfläche wird außerdem von der vergleichsweise niedrigen digitalen Auflösung und der Impulsleistung beeinflusst [86]. Die Resonanzlinie wird durch die aufgenommenen Datenpunkte festgelegt; das Integral nimmt dabei umso genauere Werte an, je enger die Punkte liegen, d. h. je höher die digitale Auflösung ist. Für eine präzise und richtige Integralbestimmung wird deshalb eine Auflösung von $R_S \ll 1 \text{ Hz/Punkt}$ gefordert [146]; der Gewinn an Auflösung durch eine Erhöhung der Datenpunkte ist jedoch mit einer verlängerten Analysenzeit verbunden. Zudem kann die Punktdichte durch die Aufnahme von Spektren mit geringerer spektraler Breite erhöht werden. Da die Amplitude der Frequenzkomponenten eines Impulses mit zunehmendem Abstand zur Sendefrequenz abnimmt, müssen für quantitative ^{13}C -Experimente Impulse hoher Stärke eingesetzt werden, um eine gleichmäßige Anregung aller Kerne zu gewährleisten; nur dann können ein Intensitätsabfall der Frequenzkomponenten über die gesamte spektrale Breite vernachlässigt und richtige Integrale ermittelt werden.

Heutzutage können durch den Einsatz von NMR-Spektrometern hoher Magnetfeldstärke, Kryomagneten und modernen Probenköpfen unter Berücksichtigung der aufgezeigten Fehlerquellen in einer für den Routinebetrieb angemessenen Messzeit präzise und richtige Ergebnisse mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie ermittelt werden. Einsatz findet diese Technik vor allem in der Fettsäure- und Polymeranalytik [45, 139, 142, 143, 146–148, 151, 153, 154], da hier aufgrund einer deutlich vergrößerten spektralen Breite sowie der ausschließlichen Detektion von Singulett das Auftreten störender Signalüberlagerungen, wie sie in den entsprechenden ^1H -NMR-Spektren beobachtet werden, minimiert wird.

2.7. Methodvalidierung

Ziel der Validierung einer analytischen Methode ist es, zu zeigen, dass sie für den beabsichtigten Einsatzzweck geeignet ist und die an sie gestellten Anforderungen erfüllt. Die Methodvalidierung stellt somit ein wichtiges Kriterium für die Verlässlichkeit der Ergebnisse dar und ist ausschlaggebend für die Qualitätssicherung von Arzneimitteln. Die geforderten Prüfparameter sind in der ICH-Richtlinie Q2(R1) "Validation of analytical procedures: text and methodology" [155] zusammengefasst. Im Rahmen der Gehaltsbestimmung von Wirkstoffen wird die Überprüfung folgender Parameter gefordert: Richtigkeit, Präzision, Selektivität und Linearität mit Arbeitsbereich. Für die Reinheitsprüfung eines Arzneistoffes wird neben den bereits aufgeführten Prüfparametern zusätzlich der Nachweis der Bestimmungs- und Nachweisgrenze der jeweiligen Verunreinigungen gefordert.

Richtigkeit

Die Richtigkeit ist das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Ergebnis und einem als richtig angesehenen Wert [155]; der Abstand des statistischen Mittelwerts vom richtigen Wert wird durch den systematischen Fehler bestimmt. Als Maß für die Richtigkeit gilt die systematische Ergebnisabweichung. Im Idealfall wird die Richtigkeit einer Methode durch ein zertifiziertes Referenzmaterial, dessen Gehalt als bekannt und richtig gilt, überprüft. Ist ein solcher Referenzstandard nicht verfügbar, kann die Überprüfung der Richtigkeit alternativ durch einen Vergleich mit einer unabhängigen, validierten Referenzmethode, durch Wiederfindungsexperimente nach Zusatz bekannter Mengen an Analyt, durch eine indirekte Überprüfung über die Massenbilanz sowie mit Hilfe einer Plausibilitätsbetrachtung erfolgen [156].

Präzision

Die Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander. Sie gibt den Grad der Streuung einzelner Werte um den Mittelwert an und ist somit das Ergebnis von zufälligen Fehlern; als Streuungsmaß wird die Standardabweichung (SD) bzw. die relative Standardabweichung (RSD) verwendet. Im

Rahmen der Methodenvalidierung wird nach ICH-Richtlinie Q2(R1) die Überprüfung von drei unterschiedlichen Präzisionsarten gefordert:

- **Wiederholpräzision:** Präzision unter Wiederholbedingungen: gleiche Probe, gleicher Prüfer, gleiches Gerät, gleiches Labor, kurzer Zeitabstand, identische Reagenzien.
- **Laborpräzision:** Präzision unter bewusster Änderung eines Parameters, z. B. Prüftag, Prüfer, Gerät oder Reagenzien-Charge, unter Beibehaltung der Probe.
- **Vergleichspräzision:** Präzision unter Vergleichsbedingungen, d. h. verschiedene Prüfer, Geräte und Reagenzien-Chargen in unterschiedlichen Laboratorien, unter Beibehaltung der Probe.

Selektivität

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer Methode, *verschiedene* Komponenten ohne gegenseitige Störung nebeneinander zu erfassen. Die Spezifität ermöglicht hingegen die Erfassung *einer* Substanz bzw. Substanzklasse ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten [155, 156]. Während der Prüfparameter Selektivität erhöht werden kann und somit ein wichtiges Validierungselement darstellt, kann die Spezifität prinzipiell nicht verbessert werden. Grundsätzlich gilt, dass eine zu 100 % selektive Methode eine spezifische Methode darstellt. Zwischen den beiden Begriffen wird heutzutage in der Praxis kaum unterschieden. Wurde die Richtigkeit der Methode im Rahmen der Validierung bereits eindeutig bewiesen, kann auf die Überprüfung der Selektivität verzichtet werden, da nur mit einer selektiven Methode richtige Ergebnisse erzielt werden können [156].

Die NMR-Spektroskopie bietet verschiedene Möglichkeiten, die Selektivität einer Methode zu überprüfen. Eine verbesserte Auflösung beim Einsatz von NMR-Spektrometern höherer Magnetfeldstärke oder die Variation der Messtemperatur kann das Erkennen von potentiellen Signalüberlagerungen ermöglichen. Alternativ können durch die Aufnahme von 2D-NMR-Spektren wie COSY (**C**orrelated **S**pectroscopy), HMQC (**H**eteronuclear **m**ultiple **q**uantum **c**oherence) und HMBC (**H**eteronuclear **m**ultiple **b**ond **c**orrelation) mit Hilfe von Kreuzsignalen Signalüberlagerungen mit anderen Komponenten erkannt werden. Eine dritte, häufig eingesetzte

Überprüfungsmethode ist der direkte Vergleich von Signalintensitäten zweier bzw. mehrerer separierter Resonanzen der zu bestimmenden Komponente bzw. des Internen Standards; Abweichungen deuten auf nicht zu erkennende Signalüberlagerungen hin.

Linearität

Die Linearität ist definiert als die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind [155]; für die quantitative Auswertung der NMR-Spektren muss eine lineare Korrelation zwischen der Signalfläche und der Konzentration des Analyten bzw. der Verunreinigung bestehen, um den Messwert in das Analysenergebnis umrechnen zu können. Für die Gehaltsbestimmung von Wirkstoffen wird für den Linearitätstest ein Konzentrationsbereich von mindestens 80 bis 120 % der Spezifikation gefordert, mit mindestens fünf Konzentrationsniveaus, um eine Krümmung der Geraden feststellen zu können. Für die quantitative Reinheitsprüfung von Verunreinigungen wird der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalfläche über einen Konzentrationsbereich von der Bestimmungsgrenze bis 120 % der Spezifikation überprüft. Der Arbeitsbereich der Kalibriergeraden sollte so gewählt werden, dass die zu erwartende Konzentration der Probe etwa in der Mitte der Kalibriergeraden liegt [156].

Robustheit

Die Robustheit ist die Fähigkeit einer Methode, ein Ergebnis zu liefern, das von kleinen, aber realistisch und eindeutig definierbaren Änderungen der Methodenparameter unbeeinflusst bleibt [155]; dieser Prüfparameter gibt somit die Störanfälligkeit des Ergebnisses durch variierende Bedingungen wieder.

Laut ICH ist die Robustheit kein Prüfparameter einer Methodenvalidierung, sondern ein Aspekt der Methodenentwicklung [156]. Da eine Qualitätsbestimmungsmethode des Arzneibuches jedoch von verschiedenen Prüfern in verschiedenen Laboratorien mit unterschiedlicher Ausstattung und variierenden Reagenzien durchgeführt wird, ist die Überprüfung dieses Parameters von entscheidender Wichtigkeit, um vergleichbare

Ergebnisse gewährleisten zu können.

Wichtige bzw. kritische Parameter, die einen zum Teil signifikanten Einfluss auf Datenaufnahme und Prozessierung von NMR-Spektren und somit auf die Verfälschung des Ergebnisses besitzen, wurden für den Einsatz der quantitativen ^1H -NMR-Spektroskopie ausführlich durch schrittweise Veränderung untersucht [44]. Unterschieden wurde hier zwischen Parametern, die keinen signifikanten Einfluss haben, solchen, die einen signifikanten Einfluss auf das Signal-Rausch-Verhältnis besitzen, und solchen, die eine signifikante Änderung der Signalfläche hervorrufen. Die Studie konnte aufzeigen, dass die meisten Parameter keinen relevanten Einfluss auf das Ergebnis haben; Parameter wie Impulswinkel, Scan-Anzahl, Lb -Faktor und exponentielle Fensterfunktion beeinflussen zwar das Signal-Rausch-Verhältnis und somit die Richtigkeit des Ergebnisses, werden aber nur Resonanzen mit $S/N \geq 250:1$ integriert, kann der Einfluss dieser Parameter vernachlässigt werden. Andere Parameter wie Länge des "Relaxation Delay", digitale Auflösung, Korrektur der Phase und Integrationsgrenzen beeinflussen dagegen direkt die Signalfläche. Während die ersten beiden Parameter durch das Festlegen von Mindestgrenzen – "Relaxation Delay" mindestens $5 \cdot T_1$ und digitale Auflösung $R_S \leq 0.25 \text{ Hz/Punkt}$ – ebenfalls vernachlässigt werden können, beeinflusst die meist manuell durchgeführte Phasenkorrektur und Integration die Richtigkeit des Ergebnisses deutlich; von Vorteil sind hier genaue Angaben in Prozessierungsprotokollen [44].

Stabilität

Die Stabilität ist definiert als die Fähigkeit einer Methode, über einen vorgesehenen Zeitraum (z. B. Laufzeit einer Analysenserie) vergleichbare Ergebnisse zu liefern. Dieser die Robustheit beeinflussende Prüfparameter sollte nach Ausarbeitung der Methode überprüft werden. Hierfür wird eine Kontrollprobe über einen zuvor definierten Zeitraum mehrmals gegen eine frisch hergestellte Vergleichsprobe der im Kühlschrank aufbewahrten bzw. tiefgefrorenen Probe vermessen. Die ermittelte Gehaltsdifferenz gilt als Maß für die Verfahrensstabilität. Die Kontrollprobe gilt so lange als stabil, wie der zuvor festgelegte Schwellenwert der Gehaltsdifferenz bei definierten Lagerbedingungen (z. B. Raumtemperatur, Kühlschranktemperatur, Lichtschutz) nicht überschritten wird.

Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Bestimmungsgrenze, häufig auch als “Limit of Quantification” (LOQ) bezeichnet, ist definiert als die kleinste quantifizierbare Menge, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision erfasst werden kann; die Nachweisgrenze, auch als “Limit of Detection” (LOD) bezeichnet, gibt die kleinste noch nachweisbare Menge einer Verunreinigung wieder [155]. Die experimentelle Ermittlung der Bestimmungs- bzw. Nachweisgrenze erfolgt üblicherweise über das Signal-Rausch-Verhältnis der quantitativ bzw. qualitativ auszuwertenden Signale. Hierfür werden reale Proben der Hauptkomponente mit immer kleineren Konzentrationen der zu erwartenden Verunreinigungen versetzt, bis kein Signal mehr erkennbar ist. Der Verunreinigungsgrad mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 wird als Nachweisgrenze definiert; für die Bestimmungsgrenze wird ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 festgelegt [156].

3. Motivation und Zielsetzung

Kaum ein anderes physikalisches Verfahren hat die Chemie so nachhaltig beeinflusst wie die NMR-Spektroskopie. Bis heute hat diese Technik ihr Hauptanwendungsgebiet in der Strukturaufklärung von organischen Molekülen. Inzwischen ist dieses Verfahren aus chemischen Laboratorien nicht mehr wegzudenken, da es eine schnelle Reaktionskontrolle sowie die Prüfung auf Identität und Reinheit synthetisch hergestellter Moleküle ermöglicht. Seit einigen Jahren nimmt die Bedeutung der NMR-Spektroskopie jedoch auch auf dem Gebiet der quantitativen Analyse stetig zu, was durch zahlreiche Publikationen im qNMR-Bereich belegt wird [29–31, 33, 42, 43, 48, 56, 58, 139, 157–164]. Eingesetzt wird die NMR-Spektroskopie hier v. a. zur Quantifizierung von Hauptkomponenten und Verwandter Substanzen unterschiedlichster Substanzklassen. Eine Vielzahl an Beispielen belegt die Eignung dieses Verfahrens als quantitative, analytische Messmethode, die oftmals im Vergleich zu routinemäßig eingesetzten Verfahren wie HPLC und GC Ergebnisse mit höherer Präzision und Richtigkeit liefert; zudem lassen sich, wie im Verlauf der Arbeit an verschiedenen Beispiele dargestellt werden wird, gegenüber chromatographischen Verfahren zahlreiche Vorteile aufführen. Dennoch ist der Einsatz der NMR-Spektroskopie in internationalen Arzneibüchern nur für einige wenige Arzneistoffe beschrieben. Wie in Tabelle 3.1 aufgezeigt, wird diese Methode überwiegend zur Identitätsprüfung eingesetzt, indem die zu analysierende Probe mit einem Referenzspektrum der zertifizierten Referenzsubstanz verglichen wird; Reinheitsprüfungen auf Verwandte Substanzen sowie Gehaltsbestimmungen finden dagegen kaum Einsatz.

Ziel dieser Arbeit ist nun, die Eignung der quantitativen NMR-Spektroskopie im Rahmen der Qualitätskontrolle insbesondere auch für komplexe Arzneistoffgemische aufzuzeigen, mit den entsprechenden Arzneibuchmethoden zu vergleichen sowie Vor- und Nachteile dieses Verfahrens hervorzuheben.

Tabelle 3.1: Einsatzgebiete der NMR-Spektroskopie im Arzneibuch.

Prüfung auf Identität	
Tobramycin, Buserelin, Haemophilus-Typ-B-Impfstoff (konjugiert), Meningokokken-Gruppe-C-Impfstoff (konjugiert), Pneumokokken-Polysaccharid-Adsorbat-Impfstoff (konjugiert), Heparin-Natrium/-Calcium, Amylnitrit, Hydrocortison-Natriumphosphat	$^1\text{H-NMR}$
Goserelin, Niedermolekulare Heparine, Lachsöl vom Zuchtlachs, Lebertran	$^{13}\text{C-NMR}$
Prüfung auf Reinheit	
Poloxamer Hydroxypropylbetadex Lauromacrogol 400	Verhältnis Propylenoxid-/Ethylenoxid-Einheiten molare Substitution mittlere Kettenlänge des Fettalkohols und Ethoxylierungsgrad
Medronsäure für radioaktive Arzneimittel Tetra-O-acetylmannosetriphat für radioaktive Arzneimittel	Verunreinigung A + B Verunreinigung B
Lebertran Orphenadrincitrat	Anteil der $\beta(2)$ -Acyl-Position bei Fettsäuren Verhältnis meta-/para-Isomere
Gehaltsbestimmung	
Amylnitrit Lachsöl vom Zuchtlachs	Interne-Standard-Methode (Benzylbenzoat) Anteil der $\beta(2)$ -Acyl-Position bei Fettsäuren

Gehaltsbestimmung

Am Beispiel von drei Arzneistoffgemischen – Codergocrinmesilat, ein strukturell ähnliches Mehrkomponentengemisch, sowie Clomifencitrat und Flupentixoldihydrochlorid, zwei E/Z-Isomerengemische – sollen geeignete NMR-Methoden entwickelt, validiert und der absolute Gehalt mittels Interner und Externer Standardisierung bestimmt werden, um abschließend die NMR-Ergebnisse mit der aktuell gültigen HPLC-Arzneibuchmethode vergleichen und bewerten zu können.

Reinheitsprüfung

Am Beispiel der Aminosäure L-Alanin soll aufgezeigt werden, dass, selbst mit einer eher “unempfindlichen” spektroskopischen Methode wie der NMR-Spektroskopie, die

quantitative Erfassung von potentiellen Verunreinigungen geringer Konzentration ($\leq 1\%$) ermöglicht wird. Anhand einer Modellmischung sollen alle Verwandten Substanzen quantifiziert, Validierungsparameter wie Linearität und Bestimmungsgrenze ermittelt und mit den Ergebnissen einer validierten HPLC-Alternativmethode sowie dem "wahren" Gehalt, der durch die Einwaage der Modellmischung bekannt ist, verglichen werden. Anschließend soll mit Hilfe eines Vergleichs der beiden unabhängigen Methoden, die Eignung der quantitativen NMR-Spektroskopie im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrolle überprüft und aufgezeigt werden.

Aufdeckung von Arzneimittelfälschungen

Da im NMR-Spektrum zusätzliche, nicht zum Analyt gehörende Signale leicht erkannt und potentiellen Verunreinigungen zugeordnet werden können, soll, nicht zuletzt aus gegebenem, aktuellem Anlass, die Eignung der NMR-Spektroskopie im Hinblick auf die Erkennung von Arzneimittelfälschungen an einem kontaminiertem Arzneistoff, dem Heparin, und einem kontaminierten Hilfsstoff, dem Glycerin, näher untersucht werden. Ziel soll sein, die entsprechenden Kontaminanten sowie weitere Verwandte Substanzen mittels NMR-Spektroskopie zu identifizieren und quantifizieren sowie Vor- und Nachteile zu alternativen Methoden aufzuzeigen.

Allgemeiner Teil

1. Quantitative Analyse von Mehrkomponentengemischen

1.1. Aufgabenstellung

Während für strukturell einfache Moleküle mit nur wenigen Signalen im NMR-Spektrum meist eine vollständig separierte Resonanz für die zu bestimmende(n) Hauptkomponente(n) und den zugesetzten Internen Standard gefunden werden kann, welche sich zur quantitativen Auswertung eignet, trifft dies für komplexe Mehrkomponentengemische mit sehr ähnlichen Molekülstrukturen oftmals nicht zu; hier sind die Spektren meist durch starke Signalüberlagerungen gekennzeichnet, die die Integration und die Auswahl geeigneter Interner Referenzsubstanzen erschweren oder sogar unmöglich machen. Meist kann jedoch durch den Einsatz geeigneter Lösungsmittel bzw. -gemische oder durch die Optimierung bestimmter Parameter wie beispielsweise pH-Wert der Untersuchungslösung, Konzentration der Probelösung, Messtemperatur, Magnetfeldstärke oder Zusatz von Hilfsreagenzien die chemische Verschiebung einzelner Resonanzen so beeinflusst werden, dass eine vollständige Signalseparation erzielt werden kann, die die Bestimmung des absoluten Gehalts der Hauptkomponente(n) ermöglicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll am Beispiel von drei komplexen Mehrkomponentengemischen – Codergocrinmesilat, ein Gemisch strukturell verwandter Komponenten, sowie Clomifencitrat und Flupentixoldihydrochlorid, zwei E/Z-Isomergemische – mit Hilfe der quantitativen NMR-Spektroskopie alternative Gehaltsbestimmungsmethoden unter Einsatz Interner und Externer Standards entwickelt und diese auf ihre Richtigkeit hin mit validierten HPLC-Methoden internationaler Arzneibücher überprüft werden. In einem anschließenden Vergleich dieser unabhän-

gigen Verfahren sollen dann Vor- und Nachteile untersucht und die Eignung der quantitativen NMR-Spektroskopie im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Gehaltsbestimmung mit Hilfe von Validierungsdaten bewertet werden.

1.2. Allgemeine Aspekte

In diesem Abschnitt werden Aspekte betrachtet und im Detail diskutiert, die für die Gehaltsbestimmung der drei im Anschluss besprochenen Mehrkomponentengemische von Bedeutung sind.

1.2.1. Methodenentwicklung in der NMR-Spektroskopie

Im Rahmen der Methodenentwicklung der drei untersuchten Mehrkomponentengemische wurden zunächst die für die Integration geeigneten Signale ausgewählt, eindeutig zugeordnet und gegebenenfalls durch Variation der Parameter "Lösungsmittel" und "Interner Standard" die Signalseparation optimiert.

Signalzuordnung

Eine eindeutige Zuordnung der zur quantitativen Analyse herangezogenen Signale ist eine Grundvoraussetzung für die quantitative NMR-Spektroskopie; eine vollständige Interpretation des NMR-Spektrums der zu analysierenden Probe ist hingegen nicht erforderlich. Die Zuordnung der Einzelkomponenten in Mehrkomponentengemischen erfolgte durch Vergleichsspektren der Einzelkomponenten, 2D-NMR-Experimente, das Kopplungsmuster sowie über den Vergleich von Signalintensitäten.

Variation des Lösungsmittels

Ein einfaches und schnell durchführbares Mittel, die Signalseparation überlappender Resonanzen zu beeinflussen, ist die gezielte Wahl des Lösungsmittels. Im Rahmen der Methodenentwicklung der drei Mehrkomponentengemische wurde deshalb der Lösungsmittelleffekt auf die chemische Verschiebung einzelner Kerne im Detail untersucht und das Lösungsmittel an die Signalseparation optimal angepasst.

Interner Standard und T_1 -Relaxationszeiten

Wie in der Einleitung im Abschnitt 2.5 beschrieben, ermöglicht die quantitative NMR-Spektroskopie die Ermittlung absoluter Messgrößen, wie den Gehalt von Hauptkomponenten, durch den Zusatz eines geeigneten Referenzmaterials definierter Reinheit. Gängige Standardsubstanzen wie Maleinsäure, Benzol-1,3,5-tricarbonsäure und 2,5-Dimethylfuran, die im ^1H -NMR-Spektrum ein bis zwei Signale zeigen, weisen zwar vollständig separierte Resonanzen in signalfreien Bereichen der Mehrkomponentengemische auf, jedoch sind ihre T_1 -Relaxationszeiten von bis zu 10 s deutlich erhöht im Vergleich zu den meist rasch relaxierenden Protonen des Analyten. Diese hohen T_1 -Zeiten haben eine deutliche Verlängerung der Messzeit zur Folge; für die Gehaltsbestimmung von Codergocrinmesilat würde sich die Messzeit beispielsweise von etwa 15 min auf über eine Stunde erhöhen. Um für den routinemäßigen Einsatz auch im Vergleich zu konventionellen Verfahren wie HPLC geeignet zu sein, sollte jedoch eine Analysendauer von 30 min nicht überschritten werden. Zusätzlich ist aufgrund des teilweise geringen Molekulargewichts dieser Referenzsubstanzen eine direkte Einwaage nicht möglich, was den Einsatz von Stammlösungen nötig macht.

Aufgrund dieser Nachteile wurden anstelle der genannten Substanzen organische Substanzen wie 4-Dimethylaminobenzoesäureethylester (DMABE), Thymol, Nicotinamid und Kaliumhydrogenphthalat als Interne Standards im Rahmen der quantitativen Analyse herangezogen; diese besitzen im Vergleich zu den beschriebenen und in der Literatur empfohlenen Referenzmaterialien stark verkürzte T_1 -Relaxationszeiten, die in der Regel im Bereich der Relaxationszeiten der zu analysierenden Moleküle liegen. Deutlich höhere Molekulargewichte erlauben zudem in den meisten Fällen eine direkte Einwaage des Internen Standards. Da diese Moleküle mehrere Signale im ^1H -NMR-Spektrum aufweisen, sind Signalüberlagerungen von Analyt und Standard oftmals nicht zu vermeiden; jedoch ist für die quantitative Auswertung ein einziges basisliniengetrenntes Signal für Analyt und Internen Standard ausreichend.

Die vollständige Relaxation des Spinsystems ist für die quantitative NMR-Spektroskopie von entscheidender Bedeutung, da nur durch eine ausreichend lange Wartezeit von mindestens $5 T_1$ zwischen zwei aufeinanderfolgenden 90° -Impulsen richtige Signalflächen ermittelt werden können. Mit Hilfe des in der Einleitung in Abschnitt 2.1.6 beschriebenen "Inversion-Recovery-Experiments" wurden für alle Protonen der zu in-

tegrierenden Resonanzen von Analyt und Internem Standard die T_1 -Relaxationszeiten über die Bestimmung der T_0 -Zeit abgeschätzt. Hierfür wurde die Wartezeit zwischen den beiden Impulsen der “Inversion-Recovery-Impulsfolge” für jedes Ein-Scan-Experiment schrittweise erhöht, der Nulldurchgang bestimmt und mittels Gleichung (2.13) die entsprechenden T_1 -Relaxationszeiten berechnet; die Konzentration der Mehrkomponenten-Untersuchungslösung wurde jeweils analog zur quantitativen Analyse gewählt. Für die Festlegung des “Relaxation Delay” wurde die Spin-Gitter-Relaxationszeit des am langsamsten relaxierenden ^1H -Kerns eingesetzt.

1.2.2. Methodvalidierung

Im Rahmen der Methodvalidierung der drei untersuchten Mehrkomponentengemische wurde eine Überprüfung folgender Prüfparameter durchgeführt: Richtigkeit, Präzision, Selektivität, Linearität, Robustheit und Stabilität. Die Durchführung dieser Überprüfung soll im Folgenden aufgezeigt werden.

Richtigkeit

Der Nachweis der Richtigkeit der im Anschluss beschriebenen NMR-Methoden zur Gehaltsbestimmung der drei untersuchten Mehrkomponentengemische erfolgte jeweils mit Hilfe eines Methodenvergleichs gegen eine unabhängige, validierte Referenzmethode, deren Ergebnis als konventionell richtig gilt. Als Vergleichsmethoden wurden die in internationalen Arzneibüchern (USP, Ph. Eur.) beschriebenen Gehaltsbestimmungen mittels HPLC eingesetzt [165–167]. Der Gehalt des zu analysierenden Mehrkomponentengemisches wurde jeweils zeitnah mit beiden Verfahren bestimmt; hierfür wurden jeweils sechs unabhängige Experimente unter Wiederholbedingungen durchgeführt und die Gleichwertigkeit der NMR-Methode mit Hilfe des Differenzen- t -Tests überprüft. Die Bestimmung des t -Wertes erfolgt über die Bildung der Differenzen der erhaltenen Werte aus beiden Methoden durch den Mittelwert $\bar{\Delta\bar{x}}$ sowie die Standardabweichung s_{Δ} dieser Differenzen und durch die Anzahl der durchgeführten Experimente n nach folgender Formel:

$$t = \frac{|\bar{\Delta\bar{x}}|}{s_{\Delta}} \cdot \sqrt{n} \quad (1.1)$$

Ist der ermittelte t -Wert größer als der tabellierte Wert t_{tab} – entsprechend einem Konfidenzintervall von 95 % bei $f = n - 1$ Freiheitsgraden – ist ein systematischer Unterschied zwischen den beiden Messreihen mit der vorgegebenen Wahrscheinlichkeit erkennbar; folglich liefert die Methode keine richtigen Ergebnisse. Ist der erhaltene t -Wert dagegen kleiner als der tabellierte t -Wert, sind beide Methoden innerhalb der vorgegebenen Wahrscheinlichkeit gleichwertig. Die Methode gilt als richtig, wenn die Richtigkeit der Vergleichsmethode bereits nachgewiesen wurde.

Präzision

Im Rahmen der Methodvalidierung wurden für die Gehaltsbestimmung der untersuchten Mehrkomponentengemische Wiederhol- sowie – mit Ausnahme der ^{19}F -NMR-Methode von Flupentixoldihydrochlorid – Labor- und Vergleichspräzision bestimmt. Für die Bestimmung der Wiederholpräzision wurden jeweils sechs unabhängige Einwaagen unter Wiederholbedingungen NMR-spektroskopisch mittels Einfachbestimmung vermessen. Für die Bestimmung der Laborpräzision wurde jeweils die quantitative Analyse derselben Probe im gleichen Labor, jedoch an verschiedenen Tagen unter Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel-Chargen durchgeführt. Die quantitative Analyse derselben Probe in einem zweiten Labor mit derselben NMR-Methode, jedoch von einem anderen Prüfer und an einem anderen NMR-Spektrometer unter Einsatz anderer Reagenzien-Chargen ermöglichte jeweils die Überprüfung der Vergleichspräzision und damit den Nachweis der Übertragbarkeit bzw. Reproduzierbarkeit der jeweiligen Methode.

Selektivität

Die Selektivität der drei ^1H -NMR-Methode wurde jeweils mit Hilfe von zweidimensionalen NMR-Experimenten wie COSY, HMQC und HMBC, einem direkten Flächenvergleich zweier basisliniengetrennter Resonanzen sowie durch Variation von Messparametern überprüft.

Linearität

Im Rahmen der Methodvalidierung konnte für alle untersuchten Mehrkomponentengemische stets ein linearer Zusammenhang zwischen Signalfäche und Konzentration

ermittelt werden, wobei der Arbeitsbereich der Kalibriergerade so gewählt wurde, dass die zu erwartende Konzentration der Probe sich in der Mitte der Kalibriergeraden befindet. Der lineare Zusammenhang wurde zusätzlich durch weitere Akzeptanzkriterien wie Korrelationskoeffizient r , y -Achsenabschnitt b und Reststandardabweichung s_y belegt. (Die Reststandardabweichung gibt die Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade an und ist somit ein Präzisionsmaß für die Kalibrierung).

Robustheit

Die Methodenrobustheit der entwickelten ^1H -NMR-Methoden wurde durch Variation verschiedener Parameter bestimmt; unterschieden wurde hier zwischen Parametern, die das Signal-Rausch-Verhältnis (Scan-Anzahl, Impulswinkel), die Signalseparation (Lösungsmittelzusammensetzung, Temperatur) bzw. die Signalfäche (“Relaxation Delay”) beeinflussen. Um eine Aussage über den Einfluss einzelner Variationen machen zu können, wurde bei der Überprüfung pro NMR-Experiment immer nur ein Prüfparameter verändert.

Stabilität

Die Stabilität der eingesetzten Untersuchungslösungen wurde für jede NMR-Methode über eine Zeitspanne von mindestens 72 h überprüft. Hierfür wurde der Gehalt der untersuchten Charge aus sechs unabhängigen Einwaagen unter Wiederholbedingungen zu Beginn der Messreihe bestimmt und als Kontrollgehalt definiert. Anschließend wurden die entsprechenden Untersuchungslösungen bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz gelagert und über einen zuvor definierten Zeitraum mehrmals NMR-spektroskopisch vermessen und die jeweilige Gehaltsdifferenz zur Kontrollprobe ermittelt.

1.2.3. Quantitative Analyse

Die Bestimmung von absoluten Messgrößen wie beispielsweise dem Gehalt einer Substanz erfordert beim Einsatz der quantitativen NMR-Spektroskopie mittels Interner-Standard-Methode die Zugabe eines zertifizierten Referenzmaterials bekannter Reinheit. Alternativ kann der Gehalt eines organischen Moleküls mit Hilfe der Externen

Standardisierung auf zwei verschiedenen Wegen – “Zwei-Röhrchen-Methode” bzw. ERETIC-Verfahren – erfolgen (siehe Einleitung, Abschnitt 2.5).

Die quantitative Analyse der drei Mehrkomponentengemische erfolgte durch den Zusatz einer geeigneten Internen Referenzsubstanz, gegen einen Externen Standard (“Zwei-Röhrchen-Methode”) sowie mit Hilfe der ERETIC-Technik.¹ Da die in der Literatur beschriebene Originalkonfiguration des ERETIC-Verfahrens u. a. kein robustes Verhalten gegenüber einer Änderung der Probenkonzentration, dem Wechsel von unterschiedlichen Analyten bzw. der automatischen Abstimmung des Probenkopfes zeigt, wurde im Rahmen dieses Projektes eine ERETIC-Variante entwickelt, die die notwendige Robustheit mit einer Messunsicherheit von maximal 1 % für einen späteren Routinebetrieb aufweist. Bei dieser modifizierten Variante wird das ERETIC-Signal unter Umgehung aller Spulen direkt in den Protonenempfänger eingekoppelt [112]. Vor den quantitativen NMR-Experimenten ist eine zeitnahe Kalibrierung des elektronisch erzeugte Referenzsignals unter identischen Aufnahmeparametern gegen einen Externen Standard deklarerter Reinheit nötig; für die quantitative Analyse der Mehrkomponentengemische wurde Benzoesäure als Externer Standard ausgewählt.

1.3. Codergocrinmesilat

Codergocrinmesilat, ein Gemisch aus drei Dihydroergopeptidalkaloiden im Verhältnis 1:1:1, besteht aus Dihydroergocornin (Cor), Dihydroergocristin (Cr) und Dihydroergocryptin. Letzteres liegt in zwei stereoisomeren Formen vor, bezeichnet mit α und β . Das Lysergsäure-Grundgerüst ist über die freie Carbonsäure in Position 8 mit einem tricyclischen Tripeptidrest säureamidartig verknüpft, der aus drei Aminosäuren, dem Prolin und dem α -Hydroxyvalin aufgebaut ist; die dritte Aminosäure ist variabel. Die vier Komponenten weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit auf; sie unterscheiden sich einzig in ihrer Seitenkette in Position 5' (Abbildung 1.1). Bei Dihydroergocornin findet man als variable Aminosäure Valin, bei Dihydroergocristin Phenylalanin und bei den beiden Stereoisomeren α - bzw. β -Dihydroergocryptin Leucin bzw. Isoleucin.

¹Die quantitative Analyse mit Hilfe der Externen-Standard-Methode wurde unter Leitung von Dr. Frank Malz in den Laboratorien des Deutschen Kunststoff-Instituts (DKI) in Darmstadt durchgeführt.

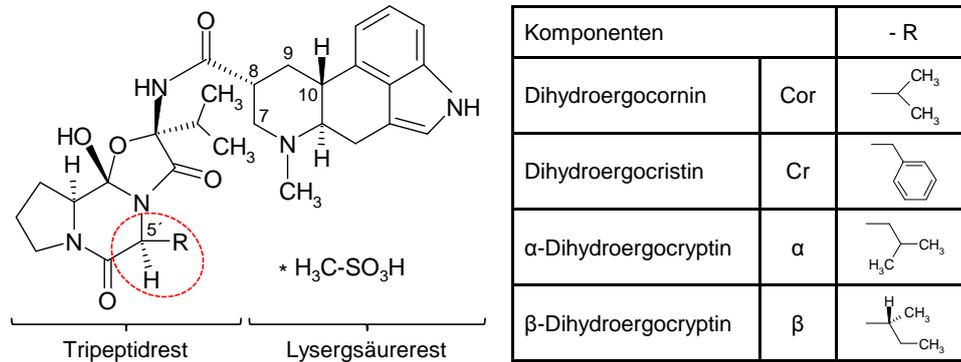


Abbildung 1.1: Chemische Struktur von Codergocrinmesilat.

Ergotoxin wird in den Sklerotien des auf Süßgräsern, vorzugsweise auf Roggen, wachsenden Pilzes *Claviceps purpurea* gebildet. Nach Isolierung und Aufreinigung des nativen Mutterkorn-Peptidalkaloidgemisches wird das partialsynthetisch hergestellte Codergocrinmesilat durch Hydrierung der 9/10-Doppelbindung des Lysergsäurerestes mit Wasserstoff über Palladium als Katalysator gewonnen [168].

Das Dihydroergotoxingemisch zeichnet sich durch seine pluripotente Wirkung aus. Codergocrinmesilat ist ein Noradrenalin-Antagonist mit einer hohen Affinität zu den Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur, was in einer Abnahme des Gefäßtonus resultiert. Zudem wirkt der Arzneistoff, jedoch in geringerem Ausmaß, agonistisch an dopaminergen und serotonergen Rezeptoren und verbessert die Fließeigenschaften des Blutes durch die Hemmung der Adrenalin-induzierten Thrombozytenaggregation. Eingesetzt wird der Arzneistoff heutzutage zur Behandlung der moderaten Demenz sowie zur Blutdrucksenkung bei älteren Patienten [169].

1.3.1. ^1H -NMR-Spektroskopie

1.3.1.1. Methodenentwicklung

Signalzuordnung. Charakteristische Resonanzen, wie beispielsweise die Signale im Bereich von $\delta = 4\text{--}5$ ppm, konnten mit Hilfe zusätzlicher ein- bzw. zweidimensionaler Experimente eindeutig bestimmten Protonen zugeordnet werden. Die getroffene Signalzuordnung wurde durch die in der Literatur angegebenen chemischen Verschiebungen der Protonen des Mehrkomponentengemisches bestätigt [170–174].

Tabelle 1.1: Eingesetzte Lösungsmittel für die Signalseparation von Codergocrinmesilat sowie dessen Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

Löslichkeit	apolar		polar	
	aromatisch	nicht-aromatisch	aprotisch	protisch
gering	C_6D_6	$CDCl_3$ CD_2Cl_2		D_2O
hoch			DMSO- d_6	CD_3OD

Vergleichsspektren der Einzelkomponenten [170], 2D-NMR-Experimente sowie das Kopplungsmuster der charakteristischen $H5'$ -Resonanzen im Bereich von $\delta = 4\text{--}5$ ppm ermöglichten eine eindeutige Zuordnung der vier Komponenten.

Variation des Lösungsmittels. Erste Experimente in DMSO- d_6 zeigen, dass eine Bestimmung der vier Komponenten von Codergocrinmesilat über die unterschiedlichen Seitenketten-Substituenten in Position $5'$ nicht möglich ist. In Folge starker Signalüberlagerungen der CH-, CH_2 - und CH_3 -Gruppen (Abbildung 1.2) sowie der aromatischen Protonen von Dihydroergocristin im aromatischen Bereich des NMR-Spektrums eignen sich diese Resonanzen nicht zur quantitativen Bestimmung.

Jedoch zeigen diese Messungen in DMSO- d_6 , dass die Signale des Protons in Position $5'$ für die Quantifizierung mittels NMR-Spektroskopie prinzipiell geeignet sind. Die Protonensignale von Dihydroergocornin und Dihydroergocristin sind basisliniengetrennt, einzig die Resonanzen von α - und β -Dihydroergocryptin überlappen (Abbildung 1.2). Ziel ist es, durch eine Änderung des Lösungsmittels eine optimale Separation der $H5'$ -Signale der vier Komponenten zu erzielen; hierfür wurden eine Vielzahl an Lösungsmitteln bzw. -gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung eingesetzt (Tabelle 1.1). Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit der Substanz in apolaren Lösungsmitteln und Wasser [170, 175] mussten für eine vollständige Lösung der Probe geringe Mengen an DMSO- d_6 oder CD_3OD zugesetzt werden; diese Lösungsmittel dienen hier als Lösungsvermittler [31].

Der Einsatz von polaren Lösungsmitteln wie CD_3OD oder D_2O -DMSO- d_6 -Gemischen anstelle von DMSO- d_6 führt zu keiner Verbesserung der Signalseparation; die entsprechenden Signale von α - und β -Dihydroergocryptin überlappen, die

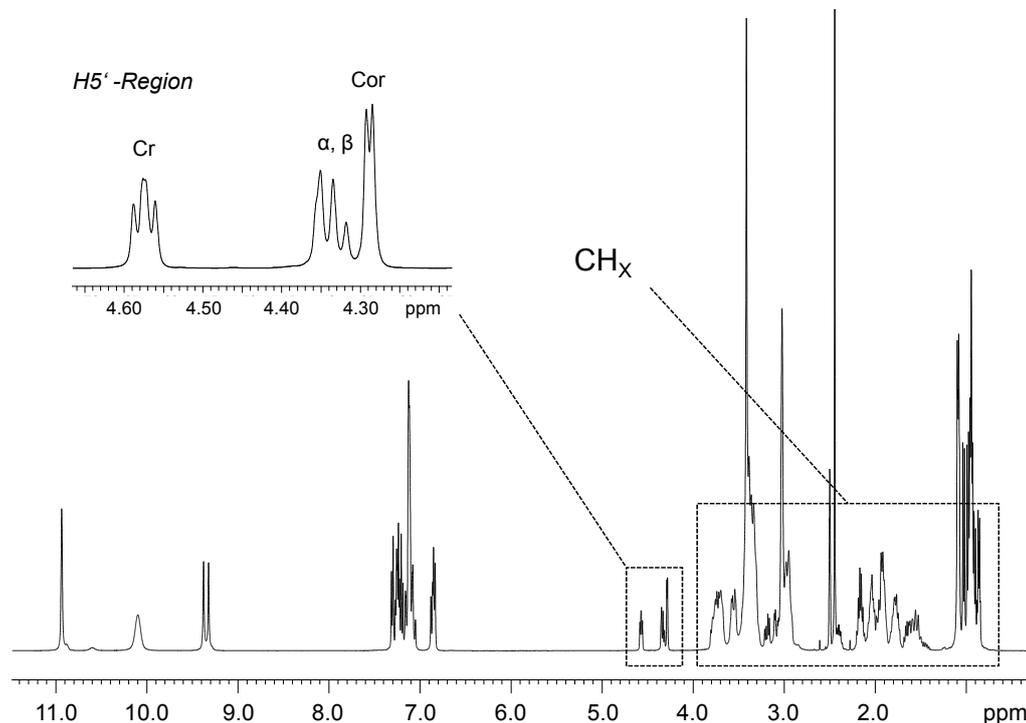


Abbildung 1.2: ¹H-NMR-Spektrum von Codergocrinmesilat in DMSO-d₆. Die mit CH_x bezeichnete Region weist starke Signalüberlagerungen der CH-, CH₂- und CH₃-Gruppen auf. Die H5'-Region ist zusätzlich vergrößert dargestellt.

H5'-Resonanzen von Dihydroergocornin und Dihydroergocristin sind deutlich als Dublett und Triplet zu erkennen (Abbildung 1.3 a). Verwendet man CD₃OD, wird keine vollständige Basislinientrennung zwischen dem HOD-Signal des Lösungsmittels und der Dihydroergocristin-Resonanz erreicht; beim Einsatz von D₂O überlappt das Lösungsmittelsignal mit dem Triplet von Dihydroergocristin. Der Einsatz von DMSO-d₆ als Lösungsmittel ist somit zu bevorzugen, da dieses, im Gegensatz zu den beiden anderen polaren Lösungsmitteln, keine störenden Lösungsmittelsignale in der H5'-Region aufweist.

Beim Einsatz von CDCl₃ ist eine Trennung der Protonen in Position 5' von α- und β-Dihydroergocryptin sichtbar; die H5'-Signale von Dihydroergocornin und Dihydroergocristin sind weiterhin vollständig basisliniengetreunt. Variiert man nun den Anteil des Lösungsvermittlers DMSO-d₆ im Lösungsmittelgemisch, beobachtet man eine umso bessere Trennung der beiden H5'-Resonanzen, je geringer der Anteil

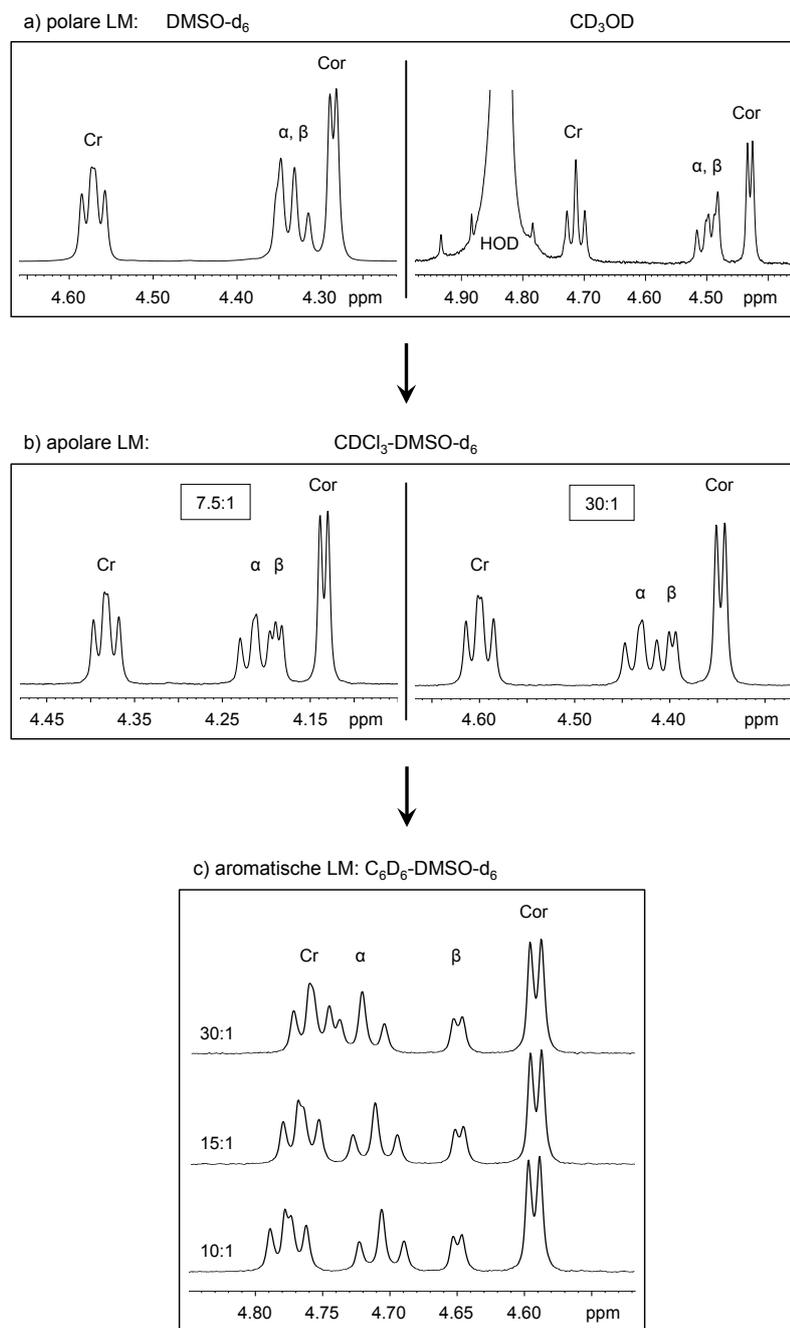


Abbildung 1.3: ¹H-NMR-Teilspektren der H5'-Region von Codergocrinmesilat, geordnet nach verbesserter Signalseparation, für folgende Lösungsmittel: a) DMSO-d₆ (links), CD₃OD (rechts), b) CDCl₃-DMSO-d₆, c) C₆D₆-DMSO-d₆. Eine optimale Signalseparation wird in C₆D₆-DMSO-d₆ im Verhältnis 10:1 (V/V) erzielt. Beim Einsatz von Lösungsmittelgemischen sind die entsprechenden Mischungsverhältnisse angegeben.

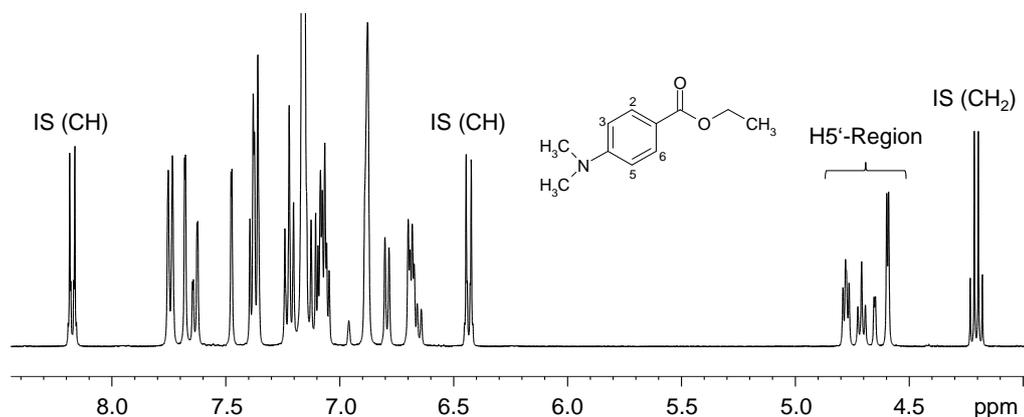


Abbildung 1.4: ^1H -NMR-Teilspektrum von Codergocrinmesilat mit dem Internen Standard DMABE unter Verwendung einer Mischung von C_6D_6 und DMSO-d_6 im Verhältnis 10:1 (V/V).

an DMSO-d_6 gewählt wird (Abbildung 1.3 b). Eine vollständige Basislinientrennung der $\text{H5}'$ -Signale von α - und β -Dihydroergocryptin konnte jedoch nicht erreicht werden. Ähnliche ^1H -NMR-Spektren erhält man, wenn CDCl_3 gegen CD_2Cl_2 ersetzt wird; es wurde keine Verbesserung der Signalseparation gegenüber CDCl_3 erzielt.

Beim Einsatz von C_6D_6 -Gemischen mit geringen Anteilen an DMSO-d_6 konnte eine Separation der $\text{H5}'$ -Resonanzen von α - und β -Dihydroergocryptin erzielt werden (Abbildung 1.3 c). Bedingt durch C_6D_6 wird das $\text{H5}'$ -Signal von α -Dihydroergocryptin relativ zu den anderen Resonanzen des Protons in Position 5' tieffeldverschoben. 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 den Anteil an DMSO-d_6 schrittweise, wird das Signal von α -Dihydroergocryptin relativ zu den anderen Resonanzen hochfeldverschoben, bis sich die $\text{H5}'$ -Signale von α - und β -Dihydroergocryptin ab einem gewissen Mischungsverhältnis wieder überlagern. Die optimale Signalseparation der vier Komponenten von Codergocrinmesilat wurde unter Verwendung einer Mischung von C_6D_6 und DMSO-d_6 im Verhältnis 10:1 (V/V) erzielt.

Interner Standard und T_1 -Relaxationszeiten. Für die quantitative Bestimmung von Codergocrinmesilat wurde 4-Dimethylaminbenzoesäureethylester (DMABE) als geeigneter Interner Standard ermittelt. Wie in Abbildung 1.4 dargestellt, eignet

Tabelle 1.2: Bestimmung von T_1 -Relaxationszeiten der zu integrierenden ^1H -Signale von Codergocrinmesilat und dem Internem Standard DMABE.

Komponente	^1H -Signal	T_1 -Zeit [s]
Cod	CH (Pos. 5')	1.3
DMABE (IS)	CH_2	2.7
	aromat. H (Pos. 3/5)	2.6

Tabelle 1.3: Messparameter.

Spektrometer	Bruker Avance 400 MHz
NMR-Messkopf	BBI-Messkopf
Temperatur	300 K
Datenpunkte	64 K
Impuls	90°
Akquisitionszeit	5.11 s
Relaxation Delay	$13.61 \text{ s} \rightarrow \text{AQ} + \text{D1} \geq 5 \cdot T_1$
Spektrale Breite	16 ppm
Spektrale Auflösung	0.2 Hz/Punkt
Scan-Anzahl	$64 \rightarrow \text{S/N}(\text{H5}'(\beta)) \approx 350:1$
Lb -Wert	0.3
Referenzierung	C_6D_6 -Signal = 7.16 ppm

sich das CH_2 -Quartett ($\delta = 4.21$ ppm), welches in direkter Nachbarschaft zu den $\text{H5}'$ -Resonanzen des Mehrkomponentengemisches liegt, für die quantitative Analyse; alternativ kann das weiter im Tieffeld liegende aromatische CH-Dublett in Position 3/5 ($\delta = 6.43$ ppm) integriert werden. Das Verhältnis von Analyt zu Referenzmaterial wurde so gewählt, dass die zur Integration herangezogenen Resonanzen ähnliche Signalintensitäten aufweisen (Verhältnis Analyt/Interner Standard $\approx 15:1$). Die Länge des "Relaxation Delay" wurde durch den am langsamsten relaxierenden Kern, die CH_2 -Resonanz von DMABE, bestimmt (siehe Tabelle 1.2).

^1H -NMR-Methode. Für die Gehaltsbestimmung von Codergocrinmesilat wurden etwa 15 mg des Mehrkomponentengemisches genau eingewogen und in 750 μl eines Lösungsmittelgemisches von DMSO-d_6 - C_6D_6 im Verhältnis 10:1 (V/V) gelöst. Da die Konzentration des Internen Standards DMABE in der Untersuchungslösung nur

etwa 1 mg/ml beträgt, erfolgte der Zusatz des Internen Standards in Form eines definierten Volumens einer Stammlösung, um so den Wägefehler aufgrund der sonst sehr geringen Einwaage möglichst klein zu halten. Anschließend wurde ein definiertes Volumen von 700 μl der Untersuchungslösung in ein NMR-Röhrchen überführt und NMR-spektroskopisch mittels Einfachbestimmung vermessen. Die wichtigsten Messparameter sind in Tabelle 1.3 zusammengefasst; diese wurden, wie in der Einleitung in Abschnitt 2.3 beschrieben, an die NMR-Methode optimal angepasst. Nach Aufnahme des NMR-Spektrums wurde die Phase manuell korrigiert, die Basislinie im Bereich der zu integrierenden Signale korrigiert und die entsprechenden Resonanzen von Analyt und Internem Standard manuell integriert. Die Bestimmung des absoluten Gehalts von Codergocrinmesilat erfolgte, wie in der Einleitung in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, nach Gleichung (2.24).

1.3.1.2. Methodvalidierung

Richtigkeit. Der Nachweis der Richtigkeit der ^1H -NMR-Methode zur Gehaltsbestimmung von Codergocrinmesilat erfolgt mit Hilfe eines Methodenvergleichs gegen die in der USP beschriebene Gehaltsbestimmung mittels HPLC [165] (siehe Abschnitt 1.3.3.2). Da der experimentell ermittelte t -Wert $t = 0.13$ kleiner als der tabellierte t -Wert $t_{\text{tab}} = 2.57$ ist, kann kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen festgestellt werden; somit liefert die ^1H -NMR-Methode mit der vorgegebenen Wahrscheinlichkeit von 95 % ebenfalls richtige Ergebnisse.

Präzision. Wie in Abbildung 1.5 dargestellt, streuen die Einzelmesswerte bei der Bestimmung der Wiederholpräzision mit einer relativen Standardabweichung von $\text{RSD} = 0.1\%$ nur geringfügig um den Mittelwert. Die Bestimmung der Laborpräzision an drei aufeinanderfolgenden Tagen liefert vergleichbare Mittelwerte und Variationskoeffizienten (siehe Tabelle 1.4). Der im Pharmabereich bei der Gehaltsbestimmung von Hauptkomponenten zulässige bzw. akzeptierte Grenzwert der relativen Standardabweichung von 1 bis 2 % wird am vorliegenden Beispiel deutlich unterschritten. Vergleicht man die ermittelten Variationskoeffizienten mit der von Horwitz anhand zahlreicher Ringversuche entwickelten empirischen Gleichung für die maximal erwartete Streuung unter Wiederholbedingungen, wird die übliche relative Stan-

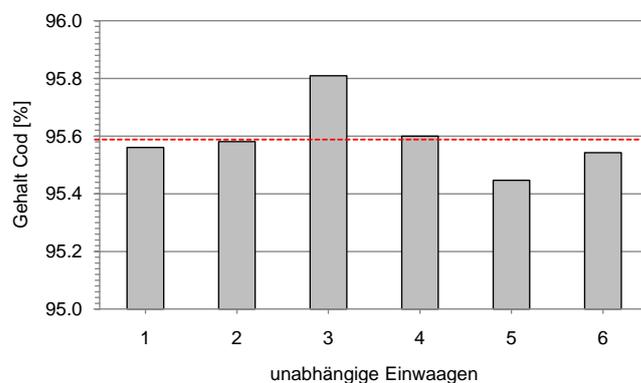


Abbildung 1.5: Graphische Darstellung der sechs Einzelergebnisse zur Bestimmung der Wiederholpräzision. Der Mittelwert der Einzelwerte wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

Tabelle 1.4: Überprüfung der Labor- und Vergleichspräzision der $^1\text{H-NMR}$ -Methode von Codergocrinmesilat. Aufgelistet sind die Mittelwerte des Gehalts der untersuchten Charge aus jeweils sechs unabhängigen Einwaagen (Cod) an drei aufeinanderfolgenden Tagen sowie in zwei Laboratorien unter Angabe der jeweiligen relativen Standardabweichung (RSD).

	Cod [%]	RSD [%]
Tag 1	95.6	0.1
Tag 2	95.5	0.1
Tag 3	95.6	0.2
Labor 1	95.6	0.1
Labor 2	95.2	0.3

dardabweichung von 1.34 % für Hauptkomponentenbestimmungen ebenfalls deutlich unterschritten [156].

Zur Überprüfung der Vergleichspräzision wurden, wie in Tabelle 1.4 zusammengefasst, in zwei Laboratorien unter Wiederholbedingungen vergleichbare Ergebnisse mit ähnlich schwacher Streuung erzielt, die deutlich unter der von Horwitz maximal erwarteten Streuung von 2.0 % liegen.

Selektivität. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde durch die Variation von Temperatur und Zusammensetzung des C_6D_6 -DMSO- d_6 -Gemisches keine Signalüberlagerung mit den anderen Komponenten bzw. potentiellen Verunreinigungen festgestellt. Die Auswertung der 2D-NMR-Spektren bestätigt diese Annahme, da

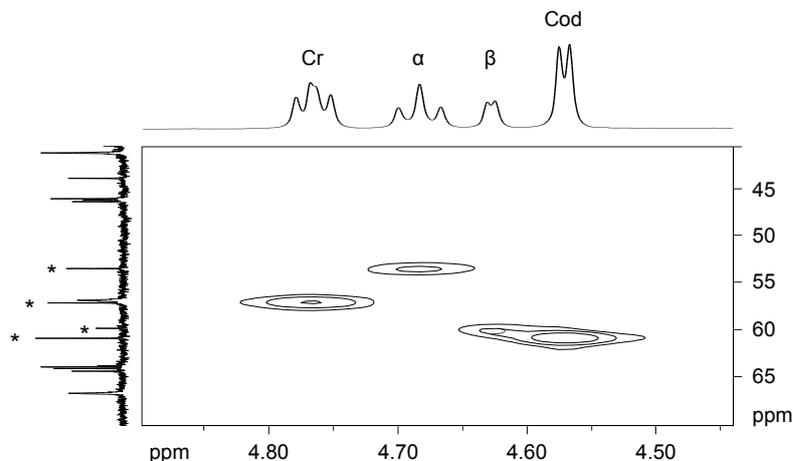


Abbildung 1.6: HMQC-Teilspektrum der CH5'-Region von Codergocrinmesilat in DMSO-d₆-C₆D₆ (10:1 (V/V)). Die zugehörigen ¹³C-Signale sind mit “*” gekennzeichnet.

das Fehlen zusätzlicher Kreuzsignale im H5'-Bereich die Anwesenheit weiterer Signale unter den betrachteten Resonanzen ausschließt (siehe Abbildung 1.6). Zudem wurden durch die Aufnahme des ¹H-NMR-Spektrums des reinen Lösungsmittelgemisches Wechselwirkungen mit Signalen des Lösungsmittels bzw. darin enthaltener Verunreinigungen ausgeschlossen.

Mit Hilfe des direkten Flächenvergleichs zweier vollständig isolierter Signale von Dihydroergocristin und DMABE konnte mit einem experimentell ermittelten Signalverhältnis von jeweils 1.003:1 mit einer relativen Standardabweichung RSD = 0.36 % der Prüfparameter Selektivität bestätigt werden.

Linearität. Zur experimentellen Überprüfung der Linearität wurden reale Codergocrinmesilat-Proben NMR-spektroskopisch im geforderten Konzentrationsbereich vermessen. Für das Mehrkomponentengemisch wird im Ph. Eur. ein Gesamtgehalt von 98 bis 102 %, bezogen auf die getrocknete Substanz, gefordert [176]; somit muss die Linearität für Konzentrationen zwischen 78.4 % und 122.4 % geprüft werden. Hierfür wurden sieben verschiedene Konzentrationsniveaus im Bereich von 70 bis 130 % gewählt, entsprechend einer Einwaage von 10.5 mg bis 19.5 mg Codergocrinmesilat. Wie in Abbildung 1.7 dargestellt, konnte im angegebenen Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Signalfäche und Konzentration ermittelt werden. Die Akzeptanzkriterien sind in Tabelle 1.5 aufgelistet.

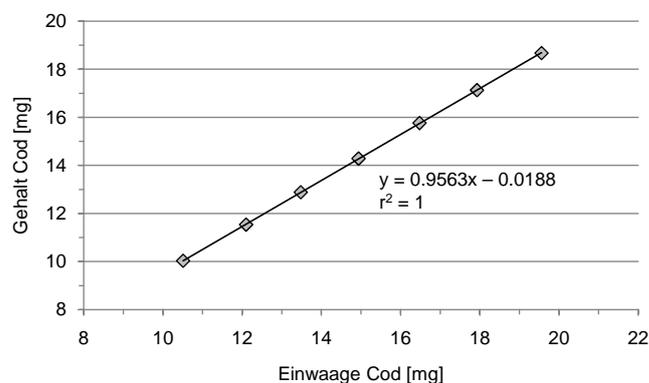


Abbildung 1.7: Graphische Darstellung des ermittelten Gehalts gegen die tatsächliche Einwaage von Codergocrinmesilat unter Angabe von Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß (r^2).

Tabelle 1.5: Geforderte Akzeptanzkriterien für eine lineare Kalibrierfunktion bei der Gehaltsbestimmung von Wirkstoffen am Beispiel von Codergocrinmesilat.

Akzeptanzkriterien	ermittelte Werte
$r \geq 0.999$	$r = 1$
$b \leq 2\%$ des Sollwertes	$b = 0.0188 \leq 0.3$
$s_y \leq 1.5\%$	$s_y = 0.02\%$

Robustheit. Die Zusammensetzung des C_6D_6 -DMSO- d_6 -Lösungsmittelgemisches besitzt einen signifikanten Einfluss auf die Signalseparation der vier H_5' -Resonanzen, da das entsprechende α -Dihydroergocryptin-Signal mit steigendem DMSO- d_6 -Anteil hochfeldverschoben wird (siehe Abschnitt 1.3.1.1). Der Einsatz von Lösungsmittelgemischen mit leicht variierendem DMSO- d_6 -Anteil (8:1, 12:1 (V/V)) besitzt jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Signalauflösung; in beiden Fällen wird eine vollständige Signalseparation beobachtet. Wie in Abbildung 1.8 dargestellt, zeigen variierende Lösungsmittelzusammensetzungen sowie die Erhöhung der Messtemperatur ($T = 305\text{ K}$) bzw. der Scan-Anzahl ($NS = 256$) keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis.

Stabilität. Die Stabilität der Codergocrinmesilat-Untersuchungslösung wurde jeweils nach 24, 48 und 144 h geprüft; hierfür wurde die Kontrollprobe in dicht verschlossenen NMR-Röhrchen bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz gelagert.

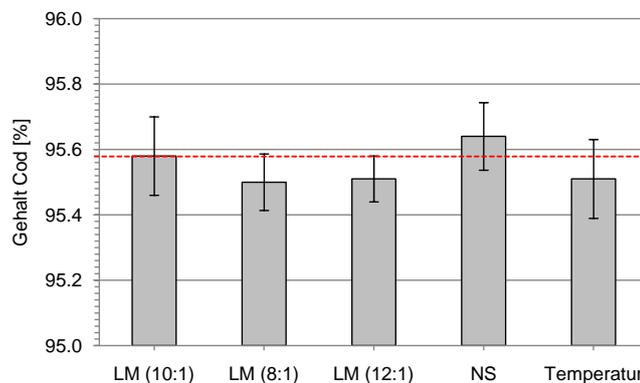


Abbildung 1.8: Einfluss variierender Messparameter wie Lösungsmittelzusammensetzung, Temperatur und Scan-Anzahl auf den Gehalt von Codergocrinmesilat. Die gestrichelte Linie stellt den Sollwert dar.

Tabelle 1.6: Stabilitätsprüfung der $^1\text{H-NMR}$ -Methode von Codergocrinmesilat. Aufgelistet sind die Mittelwerte des Gehalts der untersuchten Charge aus sechs unabhängigen Experimenten (Cod) zum Zeitpunkt $t = 0, 24, 48$ und 144 h, die dazugehörige relative Standardabweichung (RSD) und die jeweilige Änderung zum Kontrollgehalt.

Zeitraum [h]	Cod [%]	RSD [%]	Veränderung [%]
0	95.6	0.1	–
24	95.5	0.1	0.1
48	95.6	0.1	0.0
144	95.5	0.1	0.1

Der zu Beginn der Messreihe unter Wiederholbedingungen erhaltene Gehalt wurde als Kontrollgehalt definiert. Wie in Tabelle 1.6 aufgezeigt, ist die Stabilität der Kontrollprobelösung selbst nach einer Zeitdauer von 144 h gewährleistet. Die Abweichung von maximal 0.1 % zum Kontrollwert ist einzig auf die Streuung der sechs unter Wiederholbedingungen vermessenen Proben pro Zeitpunkt zurückzuführen.

1.3.1.3. Quantitative Analyse

Für die Gehaltsbestimmung der beiden Codergocrinmesilat-Muster wurden jeweils sechs unabhängige Einwaagen der Probe nach Zusatz der Internen Referenzsubstanz DMABE (99.6 %) NMR-spektroskopisch mittels Einfachbestimmung nach der in Abschnitt 1.3.1.1 beschriebenen $^1\text{H-NMR}$ -Methode analysiert. Alternativ wurde der

Tabelle 1.7: Ergebnisse der quantitativen Analyse der beiden Codergocrinmesilat-Muster mittels ^1H -NMR-Spektroskopie unter Einsatz von DMABE als Internen (IS) und Externen Standard (ES) sowie des ERETIC-Verfahrens (ERETIC) unter Angabe des Mittelwertes (MW) und der relativen Standardabweichung (RSD).

Muster	Methode	Cor [%]	α [%]	Cr [%]	β [%]	Gehalt	
						MW [%]	RSD [%]
Cod-M1	IS	32.4	21.5	31.1	10.5	95.5	0.1
	ES	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
Cod-M2	IS	32.2	21.5	32.3	10.8	96.8	0.1
	ES	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

Gehalt des Mehrkomponentengemisches gegen DMABE als Externen Standard bzw. das elektronisch erzeugte ERETIC-Signal unter identischen Aufnahmeparametern bestimmt. In Tabelle 1.7 sind die ermittelten Ergebnisse der quantitativen Analyse zusammengefasst.

1.3.2. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Eine geeignete Alternativmethode zu der im Europäischen Arzneibuch beschriebenen Reinheitsprüfung mittels HPLC [176] bietet die ^{13}C -NMR-Spektroskopie [170]. Die Signale des C-Atoms in Position 5' weisen für die vier Komponenten des Mehrkomponentengemisches deutlich unterschiedliche chemische Verschiebungen auf (Abbildung 1.9), so dass die Zusammensetzung des Alkaloidgemisches nach Bestimmung der entsprechenden Signalfächen mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens berechnet werden kann.

Eigene Untersuchungen unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel bzw. -gemische belegen, dass die vier C5'-Resonanzen deutlich separiert im ^{13}C -NMR-Spektrum vorliegen und somit grundsätzlich zur quantitativen Relativbestimmung geeignet sind. Die ^{13}C -NMR-Spektroskopie bietet aufgrund einer deutlich vergrößerten spektralen Breite im Vergleich zur ^1H -NMR-Spektroskopie den Vorteil, dass sich selbst chemisch ähnliche C-Atome in der Regel in ihrer chemischen Verschiebung deutlich unterscheiden. Während im Protonenspektrum die Signale der CH-, CH₂- und CH₃-

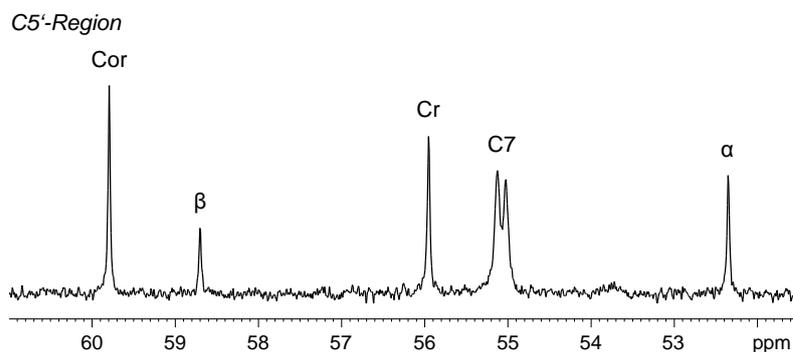


Abbildung 1.9: ^{13}C -NMR-Teilspektrum der C5'-Region von Codergocrinmesilat in DMSO-d_6 .

Tabelle 1.8: Messparameter.

Spektrometer	Bruker Avance 400 MHz
NMR-Messkopf	BBO-Messkopf
Temperatur	300 K
Datenpunkte	64 K
Impuls	30°
Akquisitionszeit	1.37 s
Relaxation Delay	3.37 s
Spektrale Breite	238.35 ppm
Spektrale Auflösung	0.73 Hz/Punkt
Scan-Anzahl	4096
<i>Lb</i> -Wert	1.0
Referenzierung	DMSO-d_6 -Signal = 39.5 ppm

Substituenten der Seitenketten überlappen, sind diese Signale im ^{13}C -Spektrum meist vollständig separiert.

Am Beispiel eines Codergocrinmesilat-Musters wurde der Einfluss des NOE auf die Signalintensität (siehe Einleitung, Abschnitt 2.6) und somit auf die Richtigkeit des Ergebnisses überprüft. Unter der Annahme, dass die Signalintensitäten der C5'-Resonanzen für alle vier Komponenten in gleichem Ausmaß durch den NOE verstärkt werden, wird die quantitative Auswertung der ^{13}C -Signale und somit die Bestimmung der Zusammensetzung des Mehrkomponentengemisches unter Einsatz von ^1H -Breitband-Entkopplungsexperimenten mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens

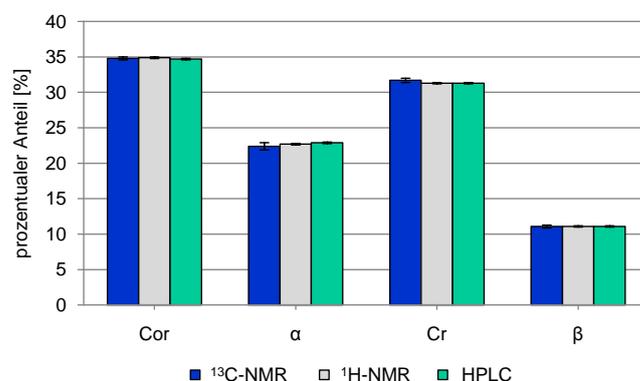


Abbildung 1.10: Vergleich der Alkaloid-Zusammensetzung von Codergocrinmesilat-Muster Cod-M1, untersucht mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie sowie HPLC.

ermöglicht. Hierzu wurden vier unabhängige Einwaagen des Mehrkomponentengemisches (80 mg) in 750 µl DMSO-d₆ gelöst und mittels Einfachbestimmung am NMR-Spektrometer analysiert und ausgewertet. Die wichtigsten Messparameter sind in Tabelle 1.8 zusammengefasst. Die ¹³C-NMR-spektroskopisch erhaltenen Ergebnisse zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den entsprechenden ¹H-NMR- und HPLC-Ergebnissen (siehe Abbildung 1.10). Die Annahme einer gleichmäßigen Intensitätsverstärkung durch den NOE konnte mit Hilfe der durchgeführten quantitativen Messungen bestätigt, die Richtigkeit der mit Hilfe der ¹H-NMR-Methode ermittelten Ergebnisse überprüft und die Eignung der quantitativen ¹³C-NMR-Spektroskopie aufgezeigt werden. Jedoch ist dieses eher unempfindliche Verfahren im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Qualitätskontrolle aufgrund der langen Messzeiten nur bedingt einsetzbar.

1.3.3. HPLC

1.3.3.1. Arzneibuchanalytik von Codergocrinmesilat

Zur Gehaltsbestimmung des Mehrkomponentengemisches Codergocrinmesilat wird in der United States Pharmacopöe (USP) eine isokratische Trennmethode auf octadecylsilyliertem Säulenmaterial vorgeschrieben [165]. Die mobile Phase besteht hier aus einer Mischung von Wasser, Acetonitril und Triethylamin im Verhältnis 80/20/2.5 (V/V/V). Die Komponenten werden mit einer RP18-Säule (300 × 4.0 mm,

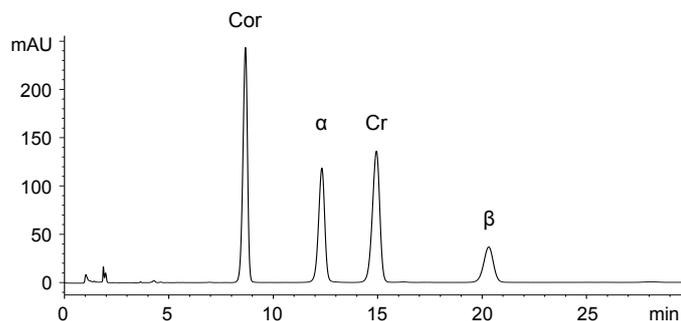


Abbildung 1.11: HPLC-Chromatogramm von Codergocrinmesilat nach USP 31.

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 (siehe Abbildung 1.11). Für die Eignung des Testsystems setzt die USP folgende Kriterien fest: Auflösung zwischen zwei aufeinanderfolgenden Peaks, Symmetriefaktor und theoretische Bodenzahl für definierte Peaks sowie eine maximale relative Standardabweichung bei wiederholter Injektion. Die Quantifizierung erfolgt mittels Extern-Standard-Methode unter Verwendung einer Codergocrinmesilat-Referenzsubstanz bekannter Reinheit. Der prozentuale Anteil der einzelnen Alkaloide wird mit Hilfe des Normalisierungsverfahrens bestimmt.

Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 6.0) bestimmt die prozentuale Alkaloid-Zusammensetzung ebenfalls unter Einsatz der Flüssigkeitschromatographie; die Methode ähnelt stark der beschriebenen USP-Methode. Der Gesamtgehalt der Alkaloidmesilate wird dagegen weiterhin als schwache Kationensäure mit NaOH-Maßlösung unter potentiometrischer Endpunktanzeige bestimmt [176].

1.3.3.2. Quantitative Analyse

Zur Überprüfung der Richtigkeit der NMR-spektroskopisch ermittelten Ergebnisse wurde der Gehalt der beiden Codergocrinmesilat-Muster mit einem zweiten, unabhängigen Messverfahren, der HPLC, bestimmt und die erhaltenen Ergebnisse miteinander verglichen. Als Referenzverfahren findet hier die in der USP beschriebene Quantifizierungsmethode Einsatz; diese wurde im Zuge der Monographie-Erarbeitung validiert, gilt für die Gehaltsbestimmung als qualifiziert und liefert somit präzise

Tabelle 1.9: Systemeignungskriterien nach USP 31, bestimmt mit der Referenzlösung von "USP Ergoloid Mesylates RS".

Systemeignungskriterien	Vorgabe USP 31	ermittelter Wert
Auflösung zwischen α und Cr	≥ 1.35	4.4
Auflösung zwischen Cr und β	≥ 1.0	7.2
Symmetriefaktor des β -Peaks	≤ 2.5	1.1
theoretische Bodenzahl des β -Peaks	≥ 950	9230
RSD bei wiederholter Injektion	$\leq 1.5\%$	0.1%

Tabelle 1.10: Ergebnisse der quantitativen Analyse der beiden Codergocrinmesilat-Muster nach USP 31 mittels Externer-Standard-Methode (ES) unter Angabe des Mittelwertes (MW) und der relativen Standardabweichung (RSD).

Muster	Methode	Cor [%]	α [%]	Cr [%]	β [%]	Gehalt	
						MW [%]	RSD [%]
Cod-M1	ES	33.4	21.9	30.1	10.6	96.0	0.5
Cod-M2		32.9	22.0	30.8	10.8	96.5	0.5

und richtige Ergebnisse. Zur Quantifizierung von Codergocrinmesilat wurden jeweils sechs unabhängige Einwaagen des Analyten und der zertifizierten Referenzsubstanz (USP Ergoloid Mesylates RS: 96.55%) mittels Dreifachbestimmung analysiert. Die geforderten Systemeignungskriterien wurden erfüllt, so dass eine quantitative Auswertung ermöglicht wurde (Tabelle 1.9). Die Ergebnisse der Externen-Standard-Methode sind in Tabelle 1.10 zusammengestellt. Eine abschließende Bewertung der Ergebnisse mittels NMR-Spektroskopie und HPLC erfolgt in Abschnitt 1.6.

1.4. Clomifencitrat

Clomifencitrat, ein Stilben-Derivat, liegt aufgrund der unterschiedlichen räumlichen Anordnung des Chlor-Substituenten bezüglich der Doppelbindung zu etwa gleichen Teilen als E- und Z-Isomer vor (Abbildung 1.12). Der Arzneistoff zählt zur Gruppe der Antiöstrogene; diese Substanzgruppe vermag die Östrogenwirkung ganz bzw. teilweise aufzuheben. Meist handelt es sich hier um partielle Antagonisten, d. h. Stoffe, die nur noch eine schwach agonistische, also östrogene Wirkungskomponente aufweisen; hierzu zählt auch das Isomerengemisch Clomifencitrat. Das pharmakologische

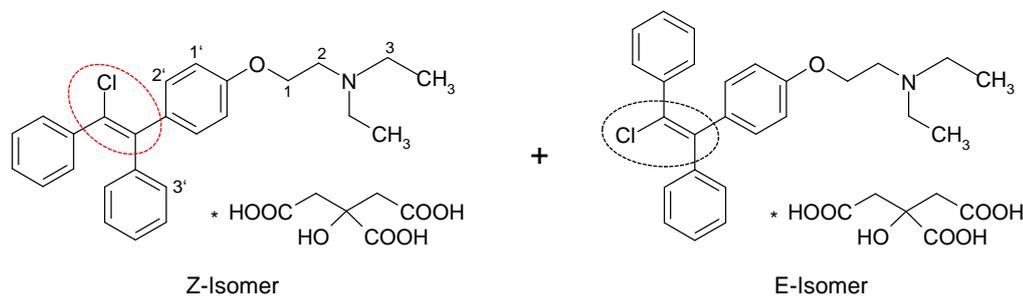


Abbildung 1.12: Chemische Struktur von Clomifencitrat.

aktive E-Isomer weist antiestrogene Aktivität auf, während das Z-Isomer schwach estrogene Wirkung zeigt [177]. Der Wirkungsmechanismus beruht auf einer durch Clomifencitrat hervorgerufenen Aufhebung des negativen Rückkopplungseffekts der Estrogene im Hypothalamus durch Blockade der Rezeptoren. Dies führt zu einer vermehrten Freisetzung von Gonadoliberin und somit zu einer erhöhten Ausschüttung von Gonadotropin; bei Frauen mit anovulatorischen Zyklen kann so eine Ovulation ausgelöst werden. Eingesetzt wird Clomifencitrat zur Ovulationsauslösung bei Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch infolge anovulatorischer Zyklen [178].

1.4.1. $^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$

1.4.1.1. Methodenentwicklung

Signalzuordnung. Eine eindeutige Zuordnung der ^1H -Signale erfolgte mit Hilfe zusätzlicher ein- und zweidimensionaler Experimente für alle aliphatischen Protonen sowie für vollständig separierte Resonanzen im aromatischen Bereich; in Abbildung 1.14 sind die Signale den entsprechenden Protonen zugeordnet. Das zweidimensionale (H,H)-korrelierte COSY-Experiment ermöglicht die Einteilung der Signale entsprechend ihrer Zugehörigkeit in zwei Gruppen – E- und Z-Isomer – mit Hilfe sogenannter Diagonal- und Korrelationspeaks. Die Korrelationssignale treten immer dann auf, wenn zwei oder mehrere Kerne über eine skalare Kopplung miteinander verknüpft sind; sie bilden mit den Diagonalpeaks die Ecken eines Quadrats (siehe Abbildung 1.13). Aliphatische und aromatische Protonen, die im Abschirmungskegel der beiden Phenyl-Substituenten liegen, werden hochfeldverschoben; folglich liegen die Protonen des substituierten Phenylrings sowie der aliphatischen Seitenkette

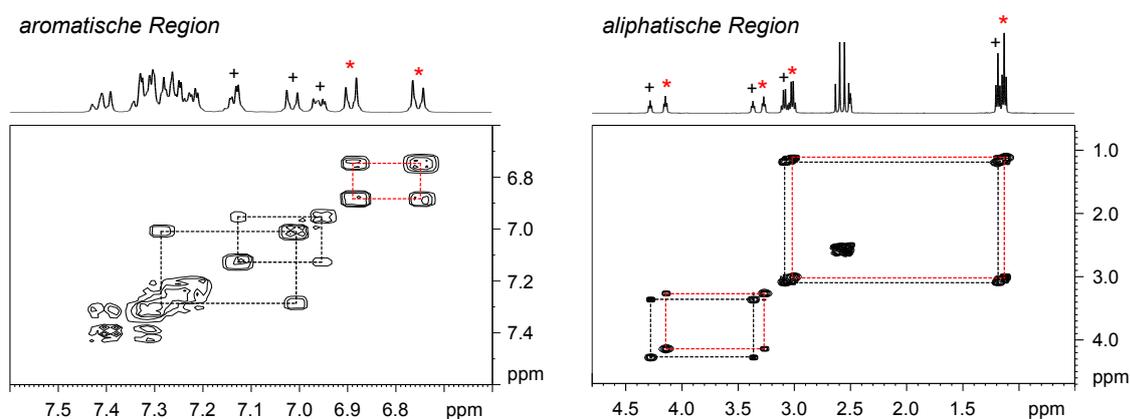


Abbildung 1.13: Zweidimensionales (H,H)-korreliertes COSY-Spektrum von Clomifencitrat in DMSO-d₆. Die durch Hilfslinien verbundenen Diagonal- und Korrelationspeaks zeigen an, welche Protonen skalar gekoppelt sind und ermöglichen die Einteilung der Resonanzen entsprechend ihrer Isomeren-Zugehörigkeit. Dabei bezeichnet “+” das Z-Isomer und “*” das E-Isomer von Clomifencitrat.

von E-Clomifencitrat im Vergleich zum Z-Isomer im Hochfeld. Dies konnte durch Vergleichsspektren der Einzelkomponenten [179] und “Spiking-Experimente” von Z-Clomifencitrat zum Isomerengemisch bestätigt werden.

Variation des Lösungsmittels. Diastereomere besitzen unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften und weisen dementsprechend unterschiedliche NMR-Spektren auf; oftmals unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen eines definierten Protons jedoch nur geringfügig, so dass Signalüberlagerungen beobachtet werden.

Für Triphenylethylen-Derivate konnte im Rahmen detaillierter ¹H-NMR-spektroskopischer Untersuchungen aufgezeigt werden, dass sich die chemischen Verschiebungen der aromatischen Protonen in Position 1' und 2' für die beiden Isomere deutlich voneinander unterscheiden [179–183]. Die entsprechenden Signale des E-Isomers werden aufgrund des Abschirmungseffekts der beiden benachbarten, unsubstituierten Phenylringe deutlich hochfeldverschoben; die Resonanzen des Z-Isomers liegen aufgrund ihrer räumlichen Nähe zum stark elektronegativen Chlor-Substituenten weit im Tieffeld. Eigene NMR-Experimente von Clomifencitrat in DMSO-d₆ konnten diese in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bestätigen; die entsprechenden Resonanzen der

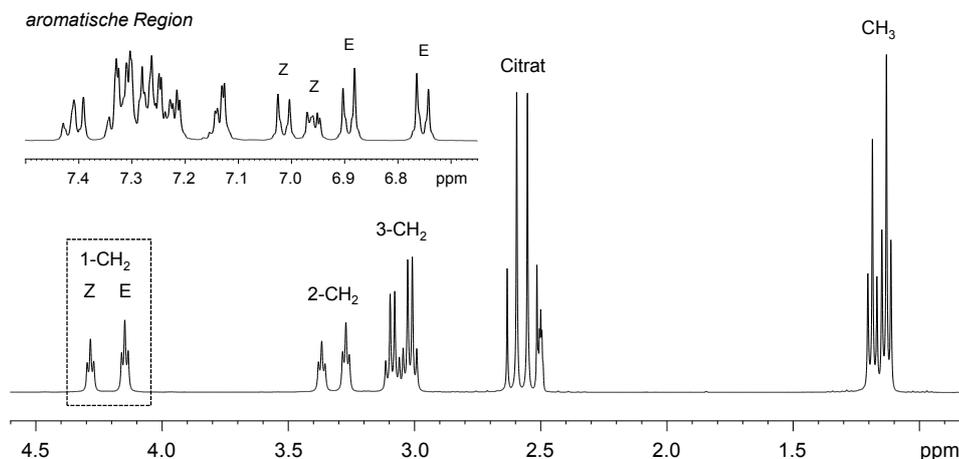


Abbildung 1.14: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Clomifencitrat in DMSO-d_6 .

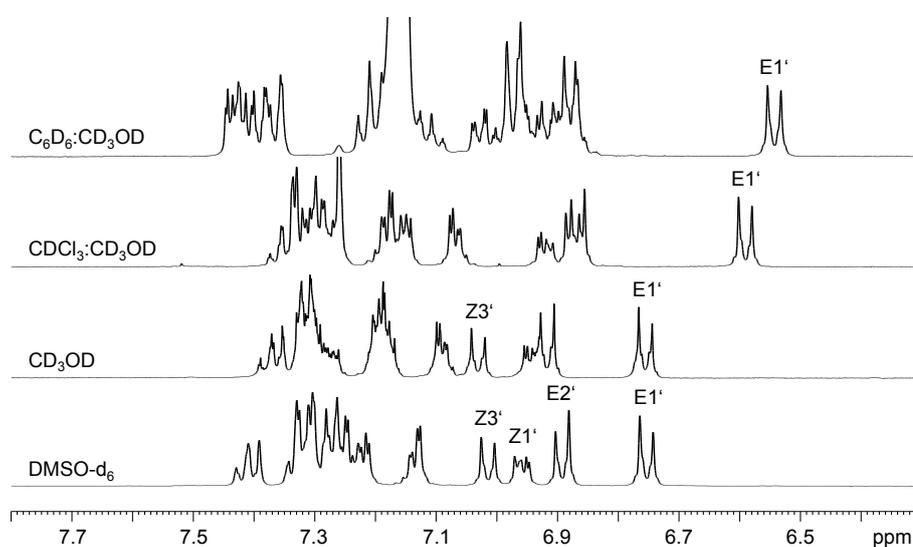
beiden Isomere zeigen deutlich voneinander abweichende chemische Verschiebungen auf und können zur quantitativen Analyse herangezogen werden (Abbildung 1.14). Erste Experimente in DMSO-d_6 zeigten zudem, dass eine quantitative Bestimmung des Isomerengemisches auch über die Integration von Signalen aliphatischer Protonen der Seitenkette möglich ist (Abbildung 1.14). Während die aliphatischen Protonen (H1) in direkter Nähe zum Phenylring deutlich basisliniengetrennte Signale aufweisen, unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen der aliphatischen Protonen für beide Isomere mit zunehmender Entfernung vom aromatischen Ringsystem nur noch geringfügig; die Signalseparation nimmt ab und es sind Signalüberlagerungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu beobachten (Abbildung 1.14).

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde nun der Einfluss des Lösungsmittels auf die chemische Verschiebung bestimmter Protonen näher untersucht; der Schwerpunkt wurde hier auf die E/Z-Signaltrennung der aliphatischen Protonen in Position 1 und der aromatischen Protonen in Position 1' gelegt (siehe Abbildung 1.12). Aufgrund der geringen Löslichkeit der Substanz in apolaren Lösungsmitteln und Wasser [184, 185] mussten für eine vollständige Löslichkeit der Probe geringe Mengen an CD_3OD als Lösungsvermittler zugesetzt werden (Tabelle 1.11).

Mit Ausnahme von D_2O konnte in allen anderen Lösungsmitteln bzw. -gemischen eine Separation der H1-Signale der beiden Isomere erzielt werden. Während der Signalabstand zwischen den beiden Triplets in CD_3OD und $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ -Gemischen

Tabelle 1.11: Eingesetzte Lösungsmittel für die Signalseparation von Clomifencitrat sowie dessen Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

Löslichkeit	apolar		polar	
	aromatisch	nicht-aromatisch	aprotisch	protisch
gering	C ₆ D ₆	CDCl ₃		D ₂ O
hoch			DMSO-d ₆	CD ₃ OD

**Abbildung 1.15:** ¹H-NMR-Teilspektren der aromatischen Region von Clomifencitrat in unterschiedlichen Lösungsmitteln.

zu DMSO-d₆ vergleichbare Werte liefert ($\Delta\delta = \delta_{Z1} - \delta_{E1} \approx 55$ Hz), konnte diese beim Wechsel zu aromatischen Lösungsmittelgemischen wie C₆D₆-CD₃OD gesteigert werden ($\Delta\delta \approx 75$ Hz). Jedoch muss hier, bedingt durch eine geringe Löslichkeit der Probe in C₆D₆, der Anteil des Lösungsvermittlers in Abhängigkeit der Clomifencitrat-Konzentration variiert werden, wodurch die Robustheit der Methode beeinträchtigt wird.

Des Weiteren wurde der Lösungsmittelleffekt auf die Signalverschiebung der aromatischen Protonen, insbesondere H1', in den verwendeten Lösungsmitteln näher untersucht (Abbildung 1.15); die Messungen in D₂O-CD₃OD wurden hier aufgrund breiter, überlappender Resonanzen nicht berücksichtigt. In allen vier Lösungsmitteln

Tabelle 1.12: Bestimmung von T_1 -Relaxationszeiten der zu integrierenden ^1H -Signale von Clomifencitrat und dem Internem Standard Nicotinamid.

Komponente	^1H -Signal	T_1 -Zeit [s]
Clomifencitrat	CH (Pos. 1)	0.3
	aromat. H	1.1–1.6
Nicotinamid (IS)	CH (Pos. 2)	3.9
	CH (Pos. 6)	4.8

wurde für die beiden zum Sauerstoff ortho-ständigen Protonen (H1') des Phenoxy-rings eine deutliche Hochfeldverschiebung des E-Isomers beobachtet; diese ist in apolaren Lösungsmitteln besonders ausgeprägt. Bedingt durch starke Signalüberlagerungen im aromatischen Bereich ist beim Einsatz apolarer Lösungsmittel eine quantitative Bestimmung von Z-Clomifencitrat nicht möglich. In polaren Lösungsmitteln, insbesondere beim Einsatz von DMSO-d_6 , wird dagegen für beide Isomere mindestens eine separierte Resonanz im NMR-Spektrum gefunden (Abbildung 1.15). Die optimale Signalseparation der beiden geometrischen Isomere von Clomifencitrat wird in DMSO-d_6 erzielt.

Interner Standard und T_1 -Relaxationszeiten. Für die quantitative Bestimmung von Clomifencitrat wurde Nicotinamid (NA) als geeigneter Interner Standard ermittelt. Wie in Abbildung 1.16 dargestellt, eignet sich das Proton in Position 2 ($\delta = 9.03$ ppm) sowie das Proton in Position 6 ($\delta = 8.69$ ppm) für die quantitative Analyse. Da das aromatische Proton H2 eine deutlich kürzere T_1 -Relaxationszeit als das Proton H6 aufweist (Tabelle 1.12), wurde für die Gehaltsbestimmung die H2-Resonanz zur Integration herangezogen. Das Verhältnis von Analyt zu Referenzmaterial wurde so gewählt, dass die zur Integration herangezogenen Resonanzen ähnliche Signalintensitäten aufweisen (Verhältnis Analyt/Interner Standard $\approx 3.5:1$). Die Länge des "Relaxation Delay" wurde durch den am langsamsten relaxierenden Kern, die H2-Resonanz von Nicotinamid, bestimmt (siehe Tabelle 1.12).

^1H -NMR-Methode. Für die Gehaltsbestimmung von Clomifencitrat wurden etwa 14 mg des Isomeregemisches und 4 mg des Internen Standards Nicotinamid genau abgewogen und in 750 μl DMSO-d_6 gelöst. Anschließend wurde ein definiertes Vo-

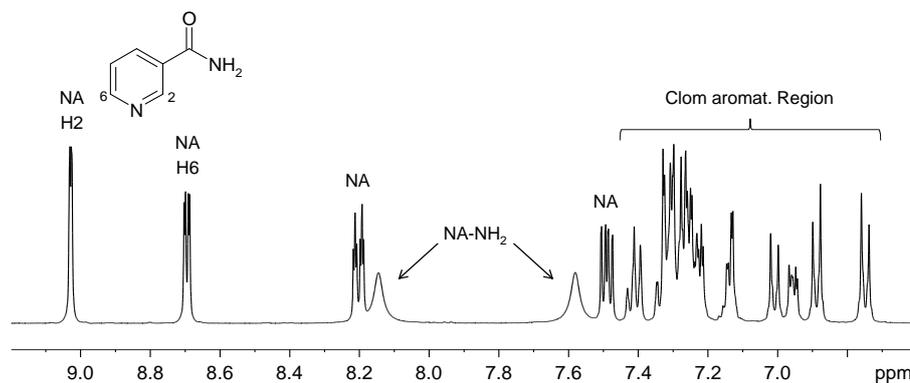


Abbildung 1.16: ^1H -NMR-Teilspektrum von Clomifencitrat mit dem internen Standard Nicotinamid (NA) in DMSO-d_6 .

Tabelle 1.13: Messparameter.

Spektrometer	Bruker Avance 400 MHz
NMR-Messkopf	BBO-Messkopf
Temperatur	300 K
Datenpunkte	64 K
Impuls	90°
Akquisitionszeit	5.11 s
Relaxation Delay	$20.11 \text{ s} \rightarrow \text{AQ} + \text{D1} \geq 5 \cdot T_1$
Spektrale Breite	16 ppm
Spektrale Auflösung	0.2 Hz/Punkt
Scan-Anzahl	$32 \rightarrow \text{S/N(Z)} \approx 750:1$
<i>Lb</i> -Wert	0.3
Referenzierung	DMSO-d_6 -Signal = 2.5 ppm

lumen von 700 μl der Untersuchungslösung in ein NMR-Röhrchen überführt und NMR-spektroskopisch vermessen. Die wichtigsten Messparameter sind in Tabelle 1.13 zusammengefasst; diese wurden an die entwickelte NMR-Methode optimal angepasst. Nach Aufnahme des NMR-Spektrums wurde die Phase manuell angepasst, die Basislinie im Bereich der zu integrierenden Signale korrigiert und die entsprechenden Resonanzen von Analyt und Internem Standard manuell integriert. Die Bestimmung des absoluten Gehalts von Clomifencitrat erfolgte, wie in der Einleitung in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, nach Gleichung (2.24).

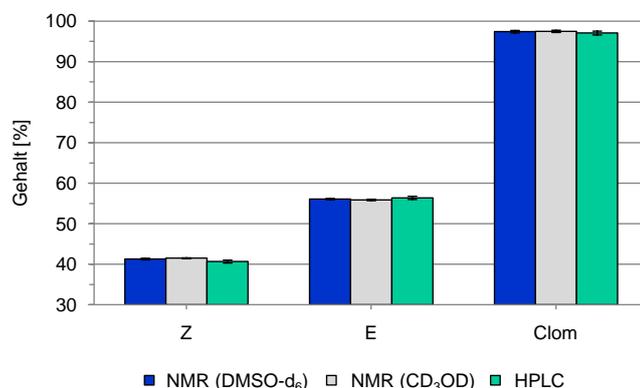


Abbildung 1.17: Richtigkeitsnachweis der ^1H -NMR-Methode von Clomifencitrat. Graphisch dargestellt ist der Gehalt von Clomifencitrat (Clom) sowie der beiden Einzelisomere (Z, E) mittels ^1H -NMR-Spektroskopie unter Einsatz von DMSO- d_6 bzw. CD_3OD sowie HPLC als zweites, unabhängiges Verfahren.

1.4.1.2. Methodvalidierung

Richtigkeit. Der Nachweis der Richtigkeit der ^1H -NMR-Methode zur Gehaltsbestimmung von Clomifencitrat erfolgte mit Hilfe eines Methodenvergleichs gegen die in der USP beschriebene Gehaltsbestimmung mittels HPLC [166] (siehe Abschnitt 1.4.2.2). Da der experimentell ermittelte t -Wert mit $t = 2.35$ kleiner als der tabellierte t -Wert $t_{\text{tab}} = 2.57$ ist, kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden; somit liefert die ^1H -NMR-Methode richtige Ergebnisse (siehe Abbildung 1.17).

Da beim Einsatz anderer Lösungsmittel wie beispielsweise CD_3OD ebenfalls eine vollständige Separation der beiden H1-Resonanzen erzielt werden konnte, kann die Richtigkeit der DMSO- d_6 -Methode durch weitere quantitative Experimente in anderen Lösungsmitteln bestätigt und gegebenenfalls systematische Fehler erkannt werden. Der Gehalt der Clomifencitrat-Probe wurde dafür zeitnah mit CD_3OD als Lösungsmittel NMR-spektroskopisch mit sechs unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Messparameter wurden für diese Bestimmung nicht verändert; einzig der “Relaxation Delay” wurde an die in CD_3OD ermittelten T_1 -Relaxationszeiten von Analyt und Internem Standard aufgrund einer langsameren Relaxation des H2-Protons von Nicotinamid angepasst ($T_1 \approx 4.6$ s; somit RD = 23.1 s). Beide NMR-Methoden liefern vergleichbare Ergebnisse (siehe Abbildung 1.17).

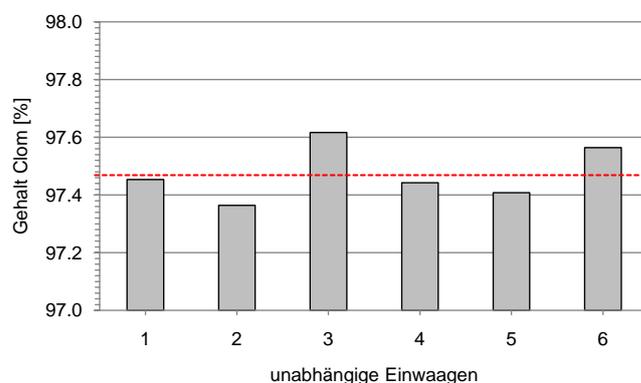


Abbildung 1.18: Graphische Darstellung der sechs Einzelergebnisse zur Bestimmung der Wiederholpräzision. Der Mittelwert der Einzelwerte wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

Tabelle 1.14: Überprüfung der Labor- und Vergleichspräzision der $^1\text{H-NMR}$ -Methode von Clomifencitrat. Aufgelistet ist der ermittelte Gehalt der untersuchten Charge aus jeweils sechs unabhängigen Einwaagen (Clom) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen sowie in zwei Laboratorien unter Angabe der jeweiligen relativen Standardabweichung (RSD).

	Clom [%]	RSD [%]
Tag 1	97.5	0.2
Tag 2	97.6	0.2
Labor 1	97.4	0.3
Labor 2	97.1	0.5

Präzision. Wie in Abbildung 1.18 dargestellt, streuen die Einzelmesswerte bei der Bestimmung der Wiederholpräzision mit einer relativen Standardabweichung von $\text{RSD} = 0.2\%$ nur geringfügig um den Mittelwert. Die Bestimmung der Laborpräzision an zwei unterschiedlichen Tagen liefert vergleichbare Mittelwerte und Variationskoeffizienten (siehe Tabelle 1.14); die nach Horwitz maximal erwartete Streuung von maximal 1.34% wird deutlich unterschritten.

Zur Überprüfung der Vergleichspräzision wurden, wie in Tabelle 1.14 zusammengefasst, in zwei Laboratorien unter Wiederholbedingungen vergleichbare Ergebnisse mit ähnlich geringer Streuung erzielt, die deutlich unter der von Horwitz maximal erwarteten Streuung von 2.0% unter Vergleichsbedingungen liegen.

Tabelle 1.15: Geforderte Akzeptanzkriterien für eine lineare Kalibrierfunktion bei der Gehaltsbestimmung von Wirkstoffen am Beispiel von Clomifencitrat.

Akzeptanzkriterien	ermittelte Werte
$r \geq 0.999$	$r = 0.9999$
$b \leq 2\%$ des Sollwertes	$b = 0.0692 \leq 0.28$
$s_y \leq 1.5\%$	$s_y = 0.04\%$

Selektivität. Die Variation von Temperatur und Lösungsmittel hat im Rahmen der Methodenentwicklung keine Signalüberlagerung mit anderen Komponenten bzw. potentiellen Verunreinigungen ergeben. Die Auswertung von 2D-NMR-Spektren bestätigt diese Annahme, da das Fehlen zusätzlicher Kreuzsignale im H1-Bereich die Anwesenheit weiterer Signale unter den betrachteten Resonanzen ausschließt. Zudem wurden durch die Aufnahme des ^1H -NMR-Spektrums des reinen Lösungsmittels DMSO- d_6 Wechselwirkungen mit Signalen des Lösungsmittels bzw. darin enthaltener Verunreinigungen ausgeschlossen. Mit Hilfe des direkten Flächenvergleichs der beiden H1-Signale mit den vollständig separierten aromatischen Resonanzen E1' und Z3' konnte für beide Isomere mit einem experimentell ermittelten Signalverhältnis von 1.007:1 (RSD = 0.33 %) für E-Clomifencitrat und 1.017:1 (RSD = 0.31 %) für das Z-Isomer die Reinheit der zur quantitativen Analyse herangezogenen H1-Signale bestätigt werden. Somit ist die Selektivität der Methode gezeigt.

Linearität. Zur experimentellen Überprüfung der Linearität wurde eine reale Clomifencitrat-Probe unter quantitativen Bedingungen NMR-spektroskopisch im geforderten Konzentrationsbereich vermessen. Für das Isomeregemisch wird im Europäischen Arzneibuch ein Gesamtgehalt von 98 bis 101 % gefordert, bezogen auf die getrocknete Substanz [176]; somit muss die Linearität für Konzentrationen zwischen 78.4 % und 121.2 % geprüft werden. Hierfür wurden sieben verschiedene Konzentrationsniveaus im Bereich von 70 bis 130 % gewählt, entsprechend einer Einwaage von 9.8 mg bis 18.2 mg Clomifencitrat.

Wie in Abbildung 1.19 dargestellt, konnte im angegebenen Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Signalfäche und Konzentration ermittelt werden; die Akzeptanzkriterien sind in Tabelle 1.15 aufgelistet.

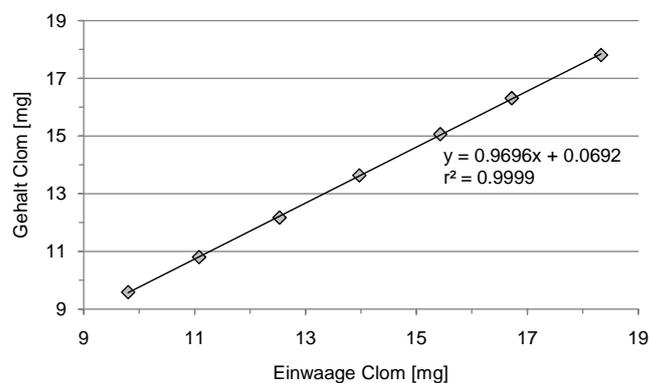


Abbildung 1.19: Graphische Darstellung des ermittelten Gehalts gegen die tatsächliche Einwaage von Clomifencitrat unter Angabe von Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß (r^2).

Robustheit. Wie in Abbildung 1.20 dargestellt, sind die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von Clomifencitrat robust gegenüber einer Variation von Scan-Anzahl und Impulswinkel; dies gilt, solange das Signal-Rausch-Verhältnis mindestens 250:1 beträgt. Die Einzelergebnisse bei Variation der Scan-Anzahl weisen vergleichbare Streuungen im Bereich von 0.1 und 0.2% auf. Durch eine Verkleinerung des Pulswinkels, unter Berücksichtigung des geforderten Signal-Rausch-Verhältnisses, konnten zudem vergleichbare Ergebnisse in einer kürzeren Messdauer erzielt werden. Auch die Quantifizierung bei 315 K anstelle von 300 K zeigt keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis; die Temperaturänderung hat zudem keinen sichtbaren Effekt auf die Signalseparation.

NMR-Experimente liefern, wie in Abbildung 1.21 dargestellt, mit einem “Relaxation Delay” $< 5 \cdot T_1$ aufgrund einer unvollständigen Relaxation des Spinsystems falsche Ergebnisse; so weist beispielsweise der Gehalt der Probe bei einem zu kurz gewählten “Relaxation Delay” von 6 s eine signifikante Abweichung von etwa 27% zum “wahren” Clomifencitrat-Gehalt auf; vergleichbare Ergebnisse werden erst ab einer ausreichend langen Wartezeit von mindestens $5 \cdot T_1$ erhalten.

Stabilität. Die Stabilität der Clomifencitrat-Untersuchungslösung wurde nach 24, 48, 72 und 96 h geprüft; hierfür wurde die Kontrollprobe in dicht verschlossenen NMR-Röhrchen bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz gelagert. Der zu Beginn der

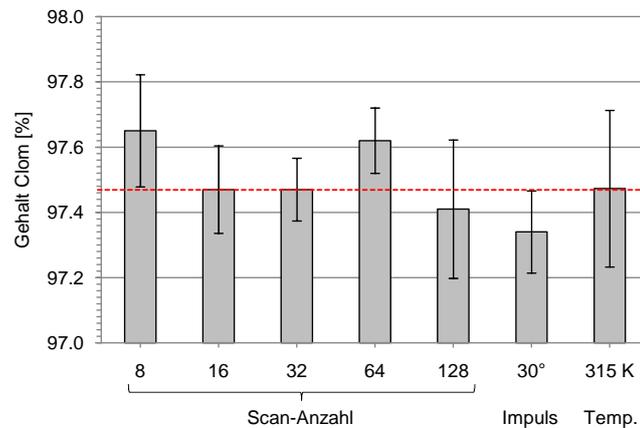


Abbildung 1.20: Einfluss variierender Messparameter wie Scan-Anzahl (8, 16, 32, 64, 128), Impulswinkel (30°) und Temperatur (315 K) auf die Gehaltsbestimmung von Clomifencitrat. Der Sollwert wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

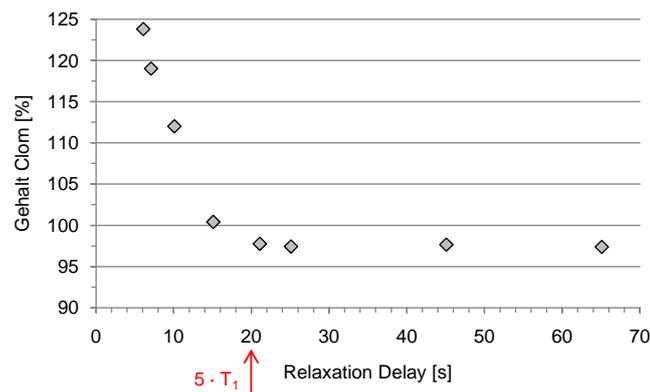


Abbildung 1.21: Abhängigkeit des ermittelten Gehalts von Clomifencitrat von der Länge des “Relaxation Delay”.

Messreihe unter Wiederholbedingungen erhaltene Gehalt wurde als Kontrollgehalt definiert. Wie in Tabelle 1.16 aufgezeigt, ist die Stabilität der Kontrollprobelösung über eine Zeitdauer von 96 h gewährleistet, da keine signifikanten Abweichungen beobachtet werden konnten.

1.4.1.3. Quantitative Analyse

Für die Gehaltsbestimmung des Clomifencitrat-Musters wurden sechs unabhängige Einwaagen der Probe nach Zusatz des Internen Standards Nicotinamid (99.5%)

Tabelle 1.16: Stabilitätsprüfung der $^1\text{H-NMR}$ -Methode von Clomifencitrat. Aufgelistet sind die Mittelwerte (Clom) des Gehalts der untersuchten Charge aus sechs unabhängigen Experimenten zum Zeitpunkt $t = 0, 24, 48, 72$ und 96 h, die dazugehörige relative Standardabweichung (RSD) und die jeweilige Änderung zum Kontrollgehalt.

Zeitraum [h]	Clom [%]	RSD [%]	Veränderung [%]
0	97.5	0.1	–
24	97.6	0.1	0.1
48	97.4	0.2	0.1
72	97.5	0.2	0.0
96	97.2	0.2	0.3

Tabelle 1.17: Ergebnisse der quantitativen Analyse des Clomifencitrat-Musters mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie unter Einsatz von Nicotinamid als Internen (IS) und Thymol als Externen Standard (ES) sowie unter Einsatz des ERETIC-Verfahrens (ERETIC) unter Angabe des Mittelwertes (MW) und der relativen Standardabweichung (RSD).

Methode	Z-Clom [%]	E-Clom [%]	Gehalt	
			MW [%]	RSD [%]
IS	41.3	56.1	97.4	0.3
ES	41.5	55.5	96.9	0.6
ERETIC	41.2	54.8	96.0	0.6

NMR-spektroskopisch mittels Einfachbestimmung nach der in Abschnitt 1.4.1.1 beschriebenen $^1\text{H-NMR}$ -Methode analysiert. Alternativ wurde der Gehalt des Mehrkomponentengemisches gegen Thymol (99.9%) als Externen Standard bzw. das elektronisch erzeugte ERETIC-Signal unter identischen Aufnahmeparametern bestimmt. In Tabelle 1.17 sind die ermittelten Ergebnisse der quantitativen Analyse zusammengefasst.

1.4.2. HPLC

1.4.2.1. Arzneibuchanalytik von Clomifencitrat

Zur Gehaltsbestimmung des E/Z-Isomerengemisches Clomifencitrat wird in der United States Pharmakopöe (USP) eine isokratische Trennmethode auf butylsilyliertem Säulenmaterial vorgeschrieben [166]. Die mobile Phase besteht aus einer Mischung aus Methanol, Wasser und Triethylamin im Verhältnis 55/45/0.3 (V/V/V) und

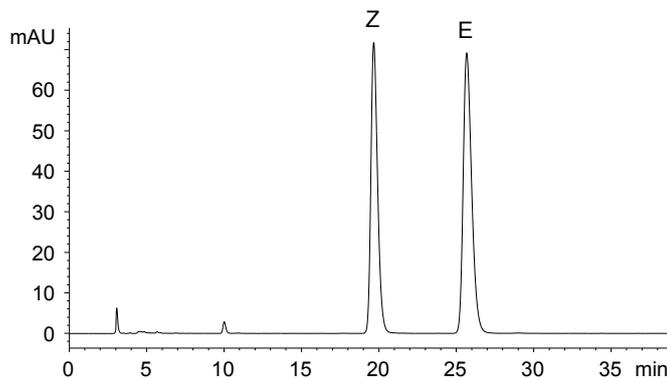


Abbildung 1.22: HPLC-Chromatogramm von Clomifencitrat nach USP 31.

wird mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 2.5 eingestellt. Die zwei Isomere werden mit einer RP4-Säule (250×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$) bei einer Flussrate von 1.0 ml/min getrennt, die Detektion erfolgt bei einer Wellenlänge von 233 nm. Zunächst eluiert Z-Clomifencitrat, danach E-Clomifencitrat (Abbildung 1.22). Für die Überprüfung der Systemeignung setzt die USP die Kriterien Auflösung zwischen zwei aufeinanderfolgende Peaks, Symmetriefaktor und theoretische Bodenzahl sowie maximale relative Standardabweichung bei dreifacher Injektion fest. Die Quantifizierung erfolgt mittels Externer-Standard-Methode unter Verwendung einer Clomifencitrat-Referenzsubstanz bekannter Reinheit.

Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 6.0) limitiert den Gehalt des pharmakologisch inaktiven Z-Isomers im Rahmen der Prüfung auf Reinheit durch den Einsatz der Flüssigkeitschromatographie an einer unmodifizierten Kieselgelphase mit Triethylamin-haltigem Eluens; der deklarierte Gehalt des Z-Isomers in Clomifencitrat *CRS* ermöglicht die Berechnung des Prozentgehalts an Z-Clomifencitrat im Isomerenmisch. Der Gesamtgehalt von Clomifencitrat wird dagegen weiterhin in wasserfreier Essigsäure mit Perchlorsäure-Maßlösung unter potentiometrischer Endpunktanzeige bestimmt [184].

1.4.2.2. Quantitative Analyse

Zur Überprüfung der Richtigkeit der NMR-spektroskopisch ermittelten Ergebnisse wurde der Gehalt des Clomifencitrat-Musters mit der in der USP beschriebenen Gehaltsbestimmung mittels HPLC bestimmt, die im Zuge der Monographie-Erarbeitung

Tabelle 1.18: Systemeignungskriterien nach USP 31, bestimmt mit der Referenzlösung von "USP Clomiphene Citrate RS".

Systemeignungskriterien	Vorgabe USP 31	ermittelter Wert
Auflösung zwischen Z- und E-Clom	≥ 1.5	6.8
Symmetriefaktor des E-Peaks	≤ 3.0	0.7
theoretische Bodenzahl des E-Peaks	≥ 2000	10922
RSD bei wiederholter Injektion	$\leq 2.0\%$	0.2%

Tabelle 1.19: Ergebnisse der quantitativen Analyse des Clomifencitrat-Musters nach USP 31 mittels Externer-Standard-Methode (ES) unter Angabe des Mittelwertes (MW) und der relativen Standardabweichung (RSD).

Methode	Z-Clom [%]	E-Clom [%]	Gehalt	
			MW [%]	RSD [%]
ES	41.3	56.1	97.4	0.3

validiert wurde und somit konventionell präzise und richtige Ergebnisse liefert. Zur Quantifizierung von Clomifencitrat wurden jeweils sechs unabhängige Einwaagen des Analyten und der zertifizierten Referenzsubstanz (USP Clomiphene Citrate RS: 99.2 %) mittels Dreifachbestimmung analysiert. Die geforderten Systemeignungskriterien wurden erfüllt, so dass eine quantitative Auswertung ermöglicht wurde (siehe Tabelle 1.18). Die Ergebnisse der Externen-Standard-Methode sind in Tabelle 1.19 zusammengestellt. Eine abschließende Bewertung der Ergebnisse, die mittels NMR-Spektroskopie und HPLC erhalten wurden, wird in Abschnitt 1.6 vorgenommen.

1.5. Flupentixoldihydrochlorid

Flupentixoldihydrochlorid liegt, bedingt durch eine asymmetrisch substituierte Doppelbindung im Molekül, zu etwa gleichen Teilen in zwei stereoisomeren Formen vor, dem E- und Z-Flupentixol (Abbildung 1.23). Der Arzneistoff zählt als hochpotentes Neuroleptikum der Thioxanthen-Reihe zu den klassischen, trizyklischen Neuroleptika. Die pharmakologisch aktive Komponente ist hier das Z-Flupentixol; das E-Isomer weist eine um den Faktor 50 bis 700 geringere Aktivität auf [186]. Die antipsychotische Wirkung beruht auf der Blockade von verschiedenen Neurotransmitter-

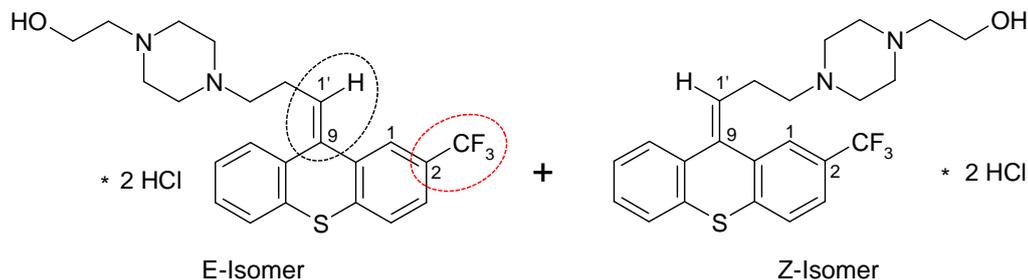


Abbildung 1.23: Chemische Struktur von Flupentixoldihydrochlorid.

Rezeptoren; vorwiegend wird die Bindung endogener Agonisten an dopaminerge D_1 - und D_2 -Rezeptoren gehemmt. Des Weiteren bindet Flupentixol an serotonerge 5-HT_2 -Rezeptoren, mit geringerer Affinität auch an histaminerge H_1 - und adrenerge α_1 -Rezeptoren. Eingesetzt wird Flupentixoldihydrochlorid sowohl bei akuten psychotischen Syndromen wie z. B. paranoider und paranoid-halluzinatorischer Zustände als auch zur Langzeitbehandlung von schizophrenen Psychosen. Das klinische Wirkprofil ist charakterisiert durch antipsychotische Wirkungen wie Reduktion von Wahn, Halluzinationen, schizophrene Ich-Störungen und Denkzerfahrenheit sowie Dämpfung psychomotorischer Erregung und affektiver Gespanntheit [178].

1.5.1. ^1H -NMR-Spektroskopie

1.5.1.1. Methodenentwicklung

Signalzuordnung. Eine eindeutige Zuordnung der ^1H -Signale erfolgte mit Hilfe ein- und zweidimensionaler Experimente für alle aliphatischen Protonen sowie für vollständig separierte Resonanzen im aromatischen Bereich; in Abbildung 1.24 sind die Signale den entsprechenden Protonen zugeordnet. Das zweidimensionale (H,H)-korrelierte COSY-Experiment erlaubt hier die Einteilung der Signale entsprechend ihrer Zugehörigkeit in zwei Gruppen (E- und Z-Isomer); “Spiking-Experimente” mit den Einzelkomponenten ermöglichen die Komponentenzuordnung.

Variation des Lösungsmittels. Erste NMR-spektroskopische Untersuchungen der beiden Einzelkomponenten in D_2O zeigen, dass die beiden Diastereomere zwar unterschiedliche Spektren aufweisen, sich die beiden chemischen Verschiebungen eines

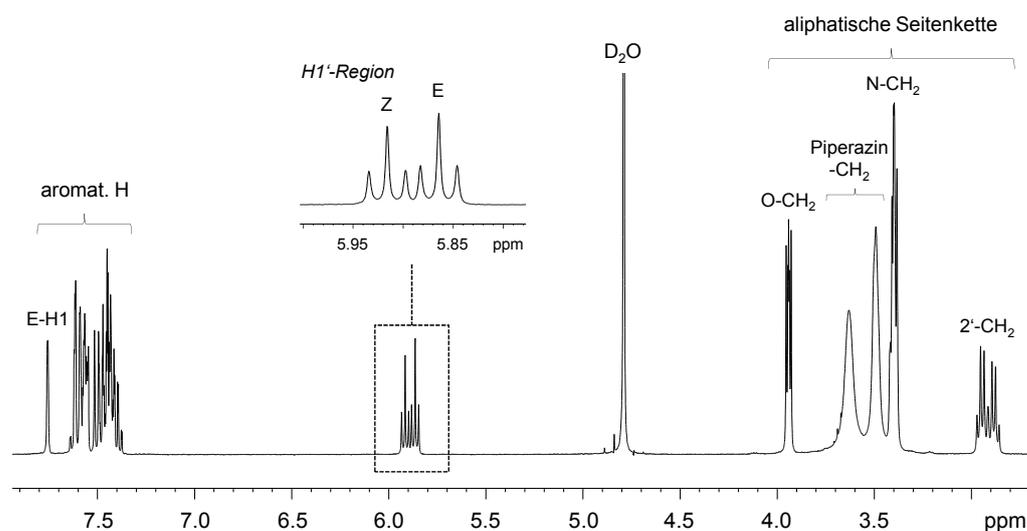


Abbildung 1.24: ^1H -NMR-Spektrum von Flupentixoldihydrochlorid in D_2O .

definierten Protons jedoch meist nur geringfügig unterscheiden, so dass partielle bzw. vollständige Signalüberlagerungen beobachtet werden; diese sind für die aliphatischen Resonanzen erwartungsgemäß umso ausgeprägter, je größer die Entfernung zur Doppelbindung ist. Das direkt an die Doppelbindung gebundene Wasserstoffatom $\text{H}1'$ weist somit für beide Komponenten die am deutlichsten ausgeprägte Signalseparation auf; die beiden Triplets sind zu erkennen, jedoch wird keine vollständige Signalseparation erzielt (Abbildung 1.24). Auch der aromatische Bereich des ^1H -NMR-Spektrums ist durch starke Signalüberlagerungen gekennzeichnet; einzig die $\text{H}1$ -Resonanz von E-Flupentixol ist aufgrund der starken Tieffeldverschiebung vollständig separiert und eignet sich für die quantitative Analyse. Da für das Z-Isomer beim Einsatz von D_2O keine vollständig isolierte Resonanz gefunden werden konnte, ist dessen quantitative Bestimmung nur indirekt mittels Subtraktion der bekannten Signalfläche der aromatischen $\text{H}1$ -Resonanz von E-Flupentixol von der Gesamtfläche der überlappenden $\text{H}1'$ -Signale möglich.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde durch den Einsatz unterschiedlicher Lösungsmittel bzw. -gemische (Tabelle 1.20) die Signalseparation der $\text{H}1'$ -Resonanzen optimiert. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Substanz in Acetonitril sowie apolaren Lösungsmitteln wie Chlorform, Benzol und Toluol [167, 187] mussten für eine vollständige Lösung der Probe geringe Mengen an polaren Lösungsvermittlern wie

Tabelle 1.20: Eingesetzte Lösungsmittel für die Signalseparation von Flupentixoldihydrochlorid sowie dessen Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

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

CD₃OD bzw. DMSO-d₆ zugesetzt werden.

Der Einsatz von CD₃OD zeigt im Vergleich zu Experimenten in D₂O keine Verbesserung der H1'-Signalseparation (Abbildung 1.25 b). In polaren, aprotischen Lösungsmitteln wie DMSO-d₆ und ACN-d₃-D₂O-Gemischen ist sogar eine deutliche Verschlechterung der E/Z-Trennung zu beobachten; sehr ähnliche chemische Verschiebungen verhindern infolge der starken Signalüberlagerung das Erkennen der Triplettform (Abbildung 1.25 a). Der Wechsel von polaren zu apolaren Lösungsmitteln wie CDCl₃ ermöglicht hingegen eine vollständige Separation der H1'-Signale der beiden Isomere (Abbildung 1.25 c). Beim Einsatz von aromatischen Lösungsmittelgemischen wie C₆D₆ und Toluol-d₈ mit geringen Mengen des Lösungsvermittlers CD₃OD wird die Separation der beiden Signale verbessert (Abbildung 1.25 d). Der Einsatz von Toluol-d₈ ist aufgrund der deutlich besseren Feinstrukturauflösung gegenüber C₆D₆ zu bevorzugen. Eine optimale Signalseparation der beiden Isomere von Flupentixoldihydrochlorid wird in einem Lösungsmittelgemisch von Toluol-d₈ und CD₃OD im Verhältnis 5:1 (V/V) erzielt.

Interner Standard und T₁-Relaxationszeiten. Für die quantitative Bestimmung von Flupentixoldihydrochlorid wurde DMABE als geeigneter Interner Standard ermittelt. Wie in Abbildung 1.26 dargestellt, eignen sich die Protonen in Position 3/5 ($\delta = 6.40$ ppm) sowie die Protonen in Position 2/6 ($\delta = 8.02$ ppm) für die quantitative Analyse. Da die aromatischen Protonen H3/H5 eine deutlich kürzere T₁-Relaxationszeit als die Protonen H2/H6 aufweisen (Tabelle 1.21), wurde für die Gehaltsbestimmung die H3/H5-Resonanz zur Integration herangezogen. Das Verhältnis von Analyt zu Referenzmaterial wurde so gewählt, dass die zur Integration

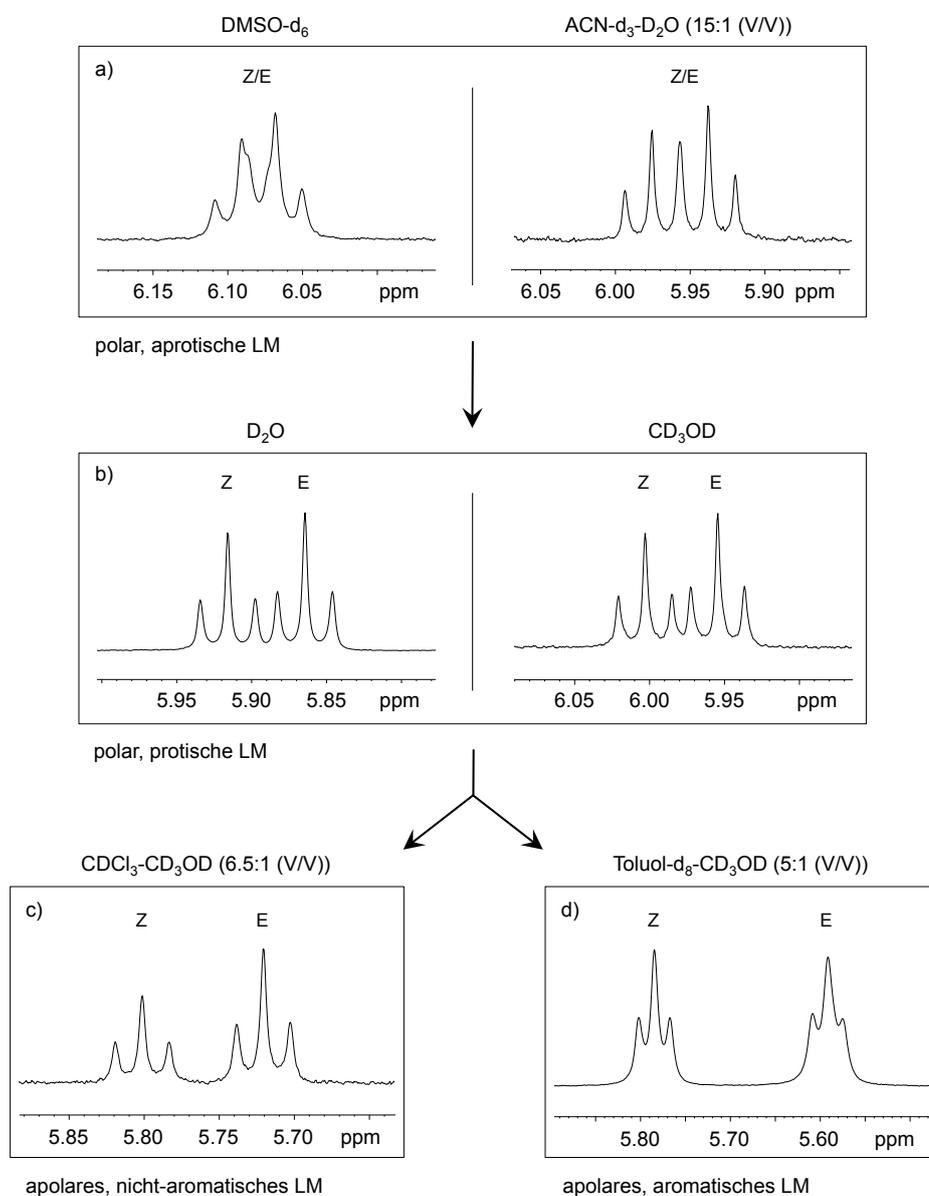


Abbildung 1.25: ^1H -NMR-Teilspektrum der $\text{H}1'$ -Region von Flupentixoldihydrochlorid, geordnet nach verbesserter Signalseparation, für folgende Lösungsmittel: a) DMSO- d_6 (links), ACN- d_3 -D $_2$ O (rechts), b) D $_2$ O (links), CD $_3$ OD (rechts), c) CDCl $_3$ -CD $_3$ OD, d) Toluol- d_8 -DMSO- d_6 . Eine optimale Signaltrennung wird in Toluol- d_8 -CD $_3$ OD 5:1 (V/V) erzielt. Beim Einsatz von Lösungsmittelgemischen sind die entsprechenden Mischungsverhältnisse angegeben.

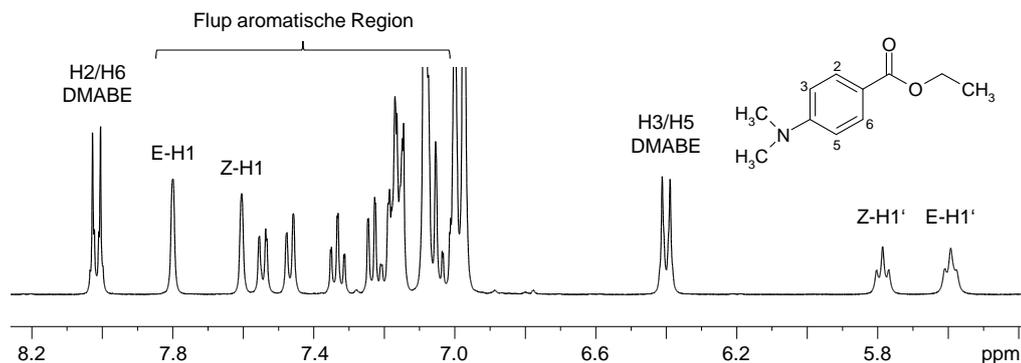


Abbildung 1.26: ^1H -NMR-Teilspektrum von Flupentixoldihydrochlorid mit dem internen Standard DMABE in Toluol- d_8 - CD_3OD im Verhältnis 5:1 (V/V).

Tabelle 1.21: Bestimmung von T_1 -Relaxationszeiten der zu integrierenden ^1H -Signale von Flupentixoldihydrochlorid und dem internen Standard DMABE.

Komponente	^1H -Signal	T_1 -Zeit [s]
Flupentixol	CH (Pos. 1')	0.9
	aromat. H	1.2
DMABE (IS)	aromat. H (Pos. 3/5)	2.5
	aromat. H (Pos. 2/6)	> 3.6

herangezogenen Resonanzen ähnliche Signalintensitäten aufweisen (Verhältnis Analyt/Interner Standard \approx 5:1). Die Länge des "Relaxation Delay" wurde durch den am langsamsten relaxierenden Kern, die H3/H5-Resonanz von DMABE, bestimmt (siehe Tabelle 1.21).

^1H -NMR-Methode. Für die Gehaltsbestimmung von Flupentixoldihydrochlorid wurden etwa 7.5 mg des Isomerengemisches genau eingewogen und in 750 μl eines Lösungsmittelgemisches von Toluol- d_8 - CD_3OD im Verhältnis 5:1 (V/V) gelöst. Da die Konzentration des internen Standards in der Untersuchungslösung nur etwa 2 mg/ml beträgt, erfolgte der Zusatz des internen Standards in Form eines definierten Volumens einer Stammlösung, um so den Wägefehler aufgrund der sonst sehr geringen Einwaage möglichst klein zu halten. Anschließend wurde ein definiertes Volumen von 700 μl der Untersuchungslösung in ein NMR-Röhrchen überführt und NMR-spektroskopisch vermessen. Die wichtigsten Messparameter sind in Tabelle 1.22 zusammengefasst. Nach Aufnahme des NMR-Spektrums wurde die Phase manuell

Tabelle 1.22: Messparameter.

Spektrometer	Bruker Avance 400 MHz
NMR-Messkopf	BBO-Messkopf
Temperatur	300 K
Datenpunkte	64 K
Impuls	90°
Akquisitionszeit	6.84 s
Relaxation Delay	12.8 s \rightarrow AQ + D1 \geq 5 \cdot T ₁
Spektrale Breite	12 ppm
Spektrale Auflösung	0.17 Hz/Punkt
Scan-Anzahl	64 \rightarrow S/N(E) \approx 280:1
<i>Lb</i> -Wert	0.3
Referenzierung	Toluol-d ₈ -Signal (CH ₃) = 2.09 ppm

korrigiert, die Basislinie im Bereich der zu integrierenden Signale korrigiert und die entsprechenden Resonanzen von Analyt und Internem Standard manuell integriert. Die Bestimmung des absoluten Gehalts von Flupentixoldihydrochlorid erfolgte, wie in der Einleitung in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, nach Gleichung (2.24).

1.5.1.2. Methodvalidierung

Richtigkeit. Der Nachweis der Richtigkeit der ¹H-NMR-Methode zur Gehaltsbestimmung von Flupentixoldihydrochlorid erfolgte mit Hilfe eines Methodenvergleichs gegen die im Ph. Eur. beschriebene Gehaltsbestimmung mittels HPLC [167] (siehe Abschnitt 1.5.3.2). Da der experimentell ermittelte *t*-Wert *t* = 2.45 kleiner als der tabellierte *t*-Wert *t*_{tab} = 2.571 ist, kann kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen festgestellt werden; somit liefert die ¹H-NMR-Methode mit der vorgegebenen Wahrscheinlichkeit richtige Ergebnisse.

Da für die quantitative Bestimmung mittels HPLC eine zertifizierte Flupentixol-Referenzsubstanz mit deklariertem Gehalt an Z-Isomer als Externer Standard eingesetzt wurde, konnte durch eine zusätzliche NMR-spektroskopische Analyse dieses Referenzstandards über den Vergleich des experimentell ermittelten Gehalts mit dem angegebenen Sollwert an Z-Flupentixol zudem die Richtigkeit der quantitativen Bestimmung der Z-Komponente überprüft werden. Der Ist-Gehalt an Z-Flupentixol

wurde durch sechs unabhängige Einwaagen der Referenzsubstanz unter Wiederholbedingungen ermittelt. Mit Hilfe des Sollwert- t -Tests kann überprüft werden, ob der Sollwert innerhalb des Vertrauensbereiches des NMR-Ergebnisses liegt. Die Bestimmung des t -Werts erfolgt über den experimentell ermittelten Mittelwert \bar{x} und die dazugehörige Standardabweichung s nach folgender Formel:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n} \quad (1.2)$$

mit dem Sollwert μ und der Anzahl an Wiederholmessungen n .

Da der experimentell ermittelte t -Wert $t = 1.025$ kleiner als der tabellierte t -Wert $t_{\text{tab}} = 2.571$ (Konfidenzintervall 95 %, Anzahl der Freiheitsgrade $f = n - 1$) ist, liegt der Sollwert mit der vorgegebenen Wahrscheinlichkeit innerhalb des Vertrauensbereiches des NMR-Ergebnisses. Die Richtigkeit der NMR-spektroskopischen Bestimmung ist somit belegt, da der Gehalt des zertifizierten Referenzmaterials als konventionell richtig gilt. Zusätzlich konnten mit Hilfe des Doerffel-Tests für die quantitative ^1H -NMR-Methode von Z-Flupentixol systematische Fehler ausgeschlossen werden, da die Bedingung $|\bar{x} - \mu| < 1.5 \cdot s / \sqrt{n}$ in diesem Fall mit $0.04 < 0.06$ erfüllt wurde [156].

Präzision. Wie in Abbildung 1.27 dargestellt, streuen die Einzelmesswerte bei der Bestimmung der Wiederholpräzision mit einer relativen Standardabweichung von $\text{RSD} = 0.1\%$ nur geringfügig um den Mittelwert. Die Bestimmung der Laborpräzision an zwei unterschiedlichen Tagen liefert vergleichbare Mittelwerte und Variationskoeffizienten (siehe Tabelle 1.23); die nach Horwitz maximal erwartete Streuung von maximal 1.34 % wird deutlich unterschritten.

Zur Überprüfung der Vergleichspräzision wurden, wie in Tabelle 1.23 zusammengefasst, in zwei Laboratorien unter Wiederholbedingungen vergleichbare Ergebnisse mit ähnlich starker Streuung erzielt, die deutlich unter der von Horwitz maximal erwarteten Streuung von 2.0 % unter Vergleichsbedingungen liegen.

Selektivität. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde durch die Variation der Zusammensetzung des Toluol- d_8 - CD_3OD -Lösungsmittelgemisches keine Signalüberlagerung mit dem anderen Isomer bzw. potentiellen Verunreinigungen festgestellt.

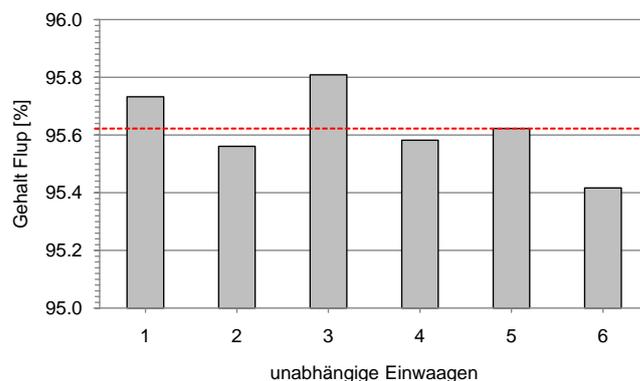


Abbildung 1.27: Graphische Darstellung der sechs Einzelergebnisse zur Bestimmung der Wiederholpräzision. Der Mittelwert der Einzelwerte wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

Tabelle 1.23: Überprüfung der Labor- und Vergleichspräzision der $^1\text{H-NMR}$ -Methode von Flupentixoldihydrochlorid. Aufgelistet ist der ermittelte Gehalt der untersuchten Charge aus jeweils sechs unabhängigen Einwaagen (Flup) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen sowie in zwei Laboratorien unter Angabe der jeweiligen relativen Standardabweichung (RSD).

	Flup [%]	RSD [%]
Tag 1	95.6	0.1
Tag 2	95.5	0.2
Labor 1	91.5	0.2
Labor 2	91.1	0.3

Die Auswertung der 2D-NMR-Spektren bestätigte diese Annahme, da das Fehlen zusätzlicher Kreuzsignale im $\text{H1}'$ -Bereich die Anwesenheit weiterer Signale unter den betrachteten Resonanzen ausschließt. Zudem wurden durch die Aufnahme des NMR-Spektrums des reinen Lösungsmittelgemisches Wechselwirkungen mit Signalen des Lösungsmittels bzw. darin enthaltener Verunreinigungen ausgeschlossen. Der direkte Flächenvergleich der beiden $\text{H1}'$ -Signale mit den beiden vollständig separierten aromatischen H1 -Resonanzen konnte für beide Isomere mit einem experimentell ermittelten Signalverhältnis von 1.02:1 (RSD = 0.09 %) für E-Flupentixol und 1.04:1 (RSD = 0.2 %) für das Z-Isomer die Reinheit der zur quantitativen Analyse herangezogenen $\text{H1}'$ -Signale bestätigen. Somit ist die Selektivität der Methode gezeigt.

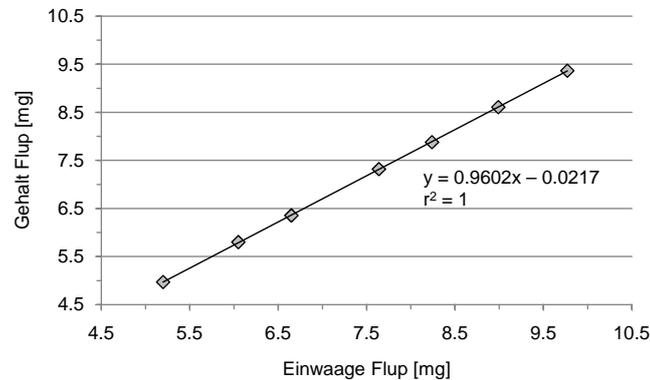


Abbildung 1.28: Graphische Darstellung des ermittelten Gehalts gegen die tatsächliche Einwaage von Flupentixoldihydrochlorid unter Angabe von Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß (r^2).

Tabelle 1.24: Geforderte Akzeptanzkriterien für eine lineare Kalibrierfunktion bei der Gehaltsbestimmung von Wirkstoffen am Beispiel von Flupentixoldihydrochlorid.

Akzeptanzkriterien	ermittelte Werte
$r \geq 0.999$	$r = 1$
$b \leq 2\%$ des Sollwertes	$b = 0.15 \leq 0.0217$
$s_y \leq 1.5\%$	$s_y = 0.01\%$

Linearität. Zur experimentellen Überprüfung der Linearität wurden reale Flupentixoldihydrochlorid-Proben unter quantitativen Bedingungen NMR-spektroskopisch im geforderten Konzentrationsbereich vermessen. Für das Isomerengemisch wird im Europäischen Arzneibuch ein Gesamtgehalt von 98 bis 101.5%, bezogen auf die getrocknete Substanz, gefordert [176]; somit muss die Linearität für Konzentrationen zwischen 78.4% und 121.8% geprüft werden. Hierfür wurden sieben verschiedene Konzentrationsniveaus im Bereich von 70 bis 130% gewählt, entsprechend einer Einwaage von 5.25 mg bis 9.0 mg Flupentixoldihydrochlorid. Wie in Abbildung 1.28 dargestellt, konnte im angegebenen Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Signalfäche und Konzentration mit entsprechenden Akzeptanzkriterien (siehe Tabelle 1.24) ermittelt werden.

Robustheit. NMR-Experimente mit variierender Scan-Anzahl zeigen für die Gehaltsbestimmung von Flupentixoldihydrochlorid eine deutliche Übereinstimmung

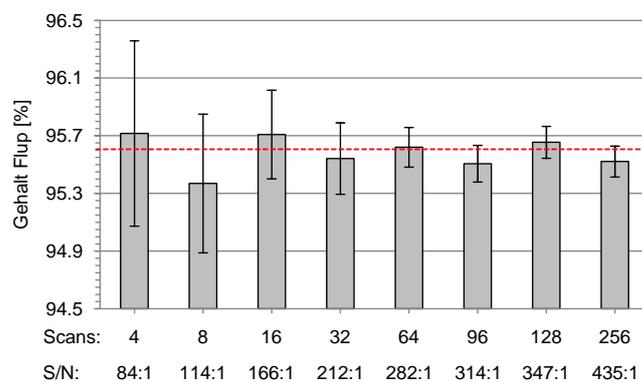


Abbildung 1.29: Einfluss der Scan-Anzahl auf die Gehaltsbestimmung von Flupentixoldihydrochlorid unter Angabe des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N) der H1'-Resonanz des E-Isomers. Der Sollwert ist durch die gestrichelte Linie dargestellt.

der Ergebnisse, jedoch mit stark variierender Streuung (siehe Abbildung 1.29), die mit zunehmender Scan-Anzahl abnimmt und ab einem Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 250:1, entsprechend einer Scan-Anzahl von 64, weitgehend konstant bleibt. Wie in Abbildung 1.30 gezeigt, werden zudem richtige Ergebnisse für einen "Relaxation Delay" $\geq 5 \cdot T_1$ erhalten.

Die Zusammensetzung des Toluol- d_8 - CD_3OD -Lösungsmittelgemisches beeinflusst die Auflösung zwischen den beiden H1'-Resonanzen, da mit steigendem Toluol- d_8 -Anteil das entsprechende Signal des E-Isomers hochfeldverschoben und somit die Signalseparation verbessert wird. Der Einsatz von Lösungsmittelgemischen mit leicht variierendem Toluol- d_8 -Anteil (3:1, 4:1, 6:1 (V/V)) besitzt jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Signalseparation; in allen drei Fällen wird eine vollständige Signalseparation und die gleiche quantitative Zusammensetzung des Isomerengemisches erhalten (Abbildung 1.31).

Stabilität. Die Stabilität der Flupentixoldihydrochlorid-Probeflösung wurde nach 24 und 72 h geprüft; hierfür wurde die Kontrollprobe in dicht verschlossenen NMR-Röhrchen bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz gelagert. Der zu Beginn der Messreihe unter Wiederholbedingungen erhaltene Gehalt wurde als Kontrollgehalt definiert. Wie in Tabelle 1.25 aufgezeigt, ist die Stabilität der Kontrollprobeflösung über eine Zeitdauer von 72 h gewährleistet. Die Abweichung von maximal 0.1 % zum

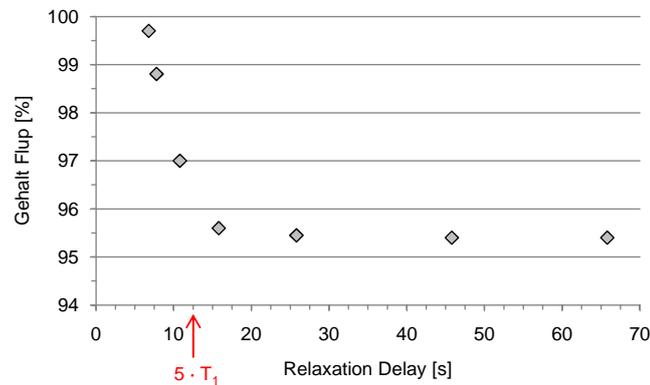


Abbildung 1.30: Abhängigkeit des ermittelten Gehalts von Flupentixoldihydrochlorid von der Länge des “Relaxation Delay”.

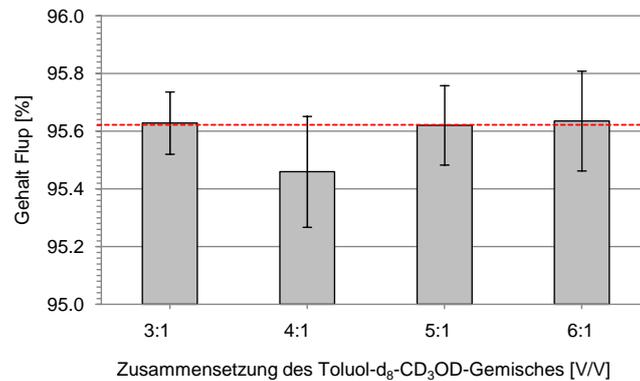


Abbildung 1.31: Einfluss der Zusammensetzung des Toluol-d₈-CD₃OD-Lösungsmittelgemisches auf den ermittelten Gehalt von Flupentixoldihydrochlorid. Der Sollwert ist durch die gestrichelte Linie dargestellt.

Kontrollwert ist auf die Streuung der sechs unter Wiederholbedingungen vermessenen Proben pro Zeitpunkt zurückzuführen.

1.5.1.3. Quantitative Analyse

Für die Gehaltsbestimmung des Flupentixoldihydrochlorid-Musters wurden sechs unabhängige Einwaagen der Probe nach Zusatz des Internen Standards DMABE (99.6 %) NMR-spektroskopisch mittels Einfachbestimmung nach der ¹H-NMR-Methode analysiert, die in Abschnitt 1.5.1.1 beschrieben wurde. Alternativ wurde

Tabelle 1.25: Stabilitätsprüfung der ^1H -NMR-Methode von Flupentixoldihydrochlorid. Aufgelistet sind die Mittelwerte (Flup) des Gehalts der untersuchten Charge aus sechs unabhängigen Experimenten zum Zeitpunkt $t = 0, 24$ und 72 h, die dazugehörige relative Standardabweichung (RSD) und die jeweilige Änderung zum Kontrollgehalt.

Zeitraum [h]	Flup [%]	RSD [%]	Veränderung [%]
0	95.6	0.1	–
24	95.7	0.1	0.1
72	95.6	0.2	0.0

Tabelle 1.26: Ergebnisse der quantitativen Analyse des Flupentixoldihydrochlorid-Musters mittels ^1H -NMR-Spektroskopie unter Einsatz von DMABE als Internen (IS) und Externen Standard (ES) sowie des ERETIC-Verfahrens (ERETIC) unter Angabe des Mittelwertes (MW) und der relativen Standardabweichung (RSD).

Methode	Z-Flup [%]	E-Flup [%]	Gehalt	
			MW [%]	RSD [%]
IS	41.7	49.8	91.5	0.2
ES	41.5	49.3	90.8	0.5
ERETIC	42.0	49.4	91.4	0.8

der Gehalt des Mehrkomponentengemisches gegen DMABE (99.6 %) als Externen Standard bzw. das elektronisch erzeugte ERETIC-Signal unter identischen Aufnahmeparametern bestimmt. In Tabelle 1.26 sind die ermittelten Ergebnisse der quantitativen Analyse zusammengefasst.

1.5.2. ^{19}F -NMR-Spektroskopie

Eine natürliche Häufigkeit von 100 % sowie ein großes gyromagnetisches Verhältnis γ und magnetisches Moment μ ermöglichen einen empfindlichen Nachweis und die quantitative Analyse von fluorhaltigen Molekülen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie; die Empfindlichkeit des ^{19}F -Kerns bezogen auf Protonen beträgt bei konstanter Magnetfeldstärke und gleicher Kernzahl etwa 83 % [86]. Die ^{19}F -NMR-Spektroskopie besitzt gegenüber der ^1H -NMR-Spektroskopie den Vorteil, dass Signalüberlagerungen selbst für strukturell ähnliche Substanzen eher selten beobachtet werden, da der chemische Verschiebungsbereich mit etwa 1200 ppm deutlich größer ausfällt [188] und ^{19}F -NMR-Spektren im Allgemeinen viel einfacher als die entsprechenden Protonen-

spektren strukturiert sind; oftmals weist das NMR-Spektrum nur wenige Resonanzen auf. Aufgrund der geringen Verbreitung fluorhaltiger Arzneistoffe spielt die ^{19}F -NMR-Spektroskopie trotz ihres beachtlichen Potentials im Rahmen der Qualitätskontrolle eine untergeordnete Rolle; eingesetzt wird sie vor allem zur direkten Erfassung fluorhaltiger Komponenten in biologischen Proben, da fluorfreie Matrixbestandteile nicht detektiert werden können und somit keine aufwendige Aufarbeitung der Probe nötig ist [58, 189].

1.5.2.1. Methodenentwicklung

Signalzuordnung. Die ^{19}F -NMR-Spektroskopie ermöglicht aufgrund der Einfachheit des Spektrums mit nur wenigen Signalen eine einfache und schnelle Zuordnung der Resonanzen. Unter Aufnahme der Vergleichsspektren der Einzelkomponenten sowie durch "Spiking-Experimente" von einer Komponente zum Isomergemisch wurde eine eindeutige Zuordnung der zu analysierenden Flupentixol-Probe gewährleistet. Die getroffene Signalzuordnung konnte durch die in der Literatur angegebenen chemischen Verschiebungen [189] sowie durch den Vergleich der normierten Flächen der CF_3 -Signale mit den entsprechenden $\text{H}1'$ -Resonanzflächen des zu analysierenden Flupentixol-Musters bestätigt werden.

Variation des Lösungsmittels. Bereits in der Vergangenheit wurde die Eignung der ^{19}F -NMR-Spektroskopie als quantitative Messmethode zur Bestimmung der Serumkonzentration von E- und Z-Flupentixoldihydrochlorid in realen Blutproben ohne aufwendige Probenvorbereitung aufgezeigt [189]. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde nun der Einfluss des Lösungsmittels auf die chemische Verschiebung der Trifluormethylgruppe näher untersucht; die verwendeten Lösungsmittel sind in Tabelle 1.27 aufgelistet.

Alle eingesetzten Lösungsmittel ermöglichen eine vollständige Separation der beiden Resonanzen, jedoch sind deutliche Unterschiede in der Signalauflösung zu erkennen (Abbildung 1.32). Die erzielte Auflösung zwischen den beiden Fluor-Resonanzen ist beim Einsatz von D_2O mit einem Signalabstand von 15 Hz am geringsten; für eine präzise und leicht durchzuführende Integration ist eine ausgeprägtere Signalseparation jedoch von Vorteil. Der Einsatz von CD_3OD ermöglicht eine deutliche Verbesserung

Tabelle 1.27: Eingesetzte Lösungsmittel für die Signalseparation von Flupentixoldihydrochlorid sowie dessen Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

Löslichkeit	apolar		polar	
	aromatisch	nicht-aromatisch	aprotisch	protisch
gering		CDCl ₃	ACN-d ₃	
hoch			DMSO-d ₆	D ₂ O CD ₃ OD

der Signalseparation (84 Hz). Der Wechsel von protischen zu aprotischen Lösungsmitteln wie DMSO-d₆ und ACN-d₃-D₂O-Gemischen zeigt im Vergleich zu Experimenten in D₂O ebenfalls eine deutliche Verbesserung der Signalseparation, jedoch sind beim Einsatz von DMSO-d₆ charakteristische Unterschiede in Form und Höhe der beiden Resonanzen zu erkennen; eine deutliche Erhöhung der Halbwertsbreite des nun sehr breiten Z-Signals beeinträchtigt den Integrationsvorgang. Durch den Zusatz geringer Mengen an D₂O wurde eine deutliche Verringerung der Signalbreite beobachtet, gleichzeitig sank die Auflösung mit steigenden D₂O-Anteil im Lösungsmittelgemisch (siehe Abbildung 1.32). In aprotischen Lösungsmitteln wie CDCl₃ mit geringen Mengen an CD₃OD als Lösungsvermittler wird eine ähnliche gute Signalseparation wie beim Einsatz von polaren, aprotischen Lösungsmittelgemischen erreicht. Reine Lösungsmittel wie CD₃OD bieten jedoch im Vergleich zu Lösungsmittelgemischen den Vorteil, dass die Signalseparation und somit die Robustheit der Methode nicht durch eine sich zeitlich verändernde Zusammensetzung der Mischung – beispielsweise durch Verdampfen eines leicht flüchtigen Lösungsmittels – beeinflusst wird und potentielle Fehler bei der Herstellung des Lösungsmittelgemisches vermieden werden. Als geeignetes Lösungsmittel wurde deshalb CD₃OD gewählt.

Interner Standard und T₁-Relaxationszeiten. Für die quantitative Analyse fluorhaltiger Moleküle mittels ¹⁹F-NMR-Spektroskopie wird häufig der Zusatz von aromatischen Fluorkohlenwasserstoffen (z. B. Trifluoressigsäure, p-Fluorbenzoesäure, p-Fluorphenylalanin, 4-Fluortoluol) und anorganischen Fluorverbindungen (z. B. Natriumfluoracetat) als potentiell Referenzmaterial beschrieben [189–194]. Jedoch eignet sich auch jedes andere fluorhaltige Molekül als Interner Standard, wenn dessen

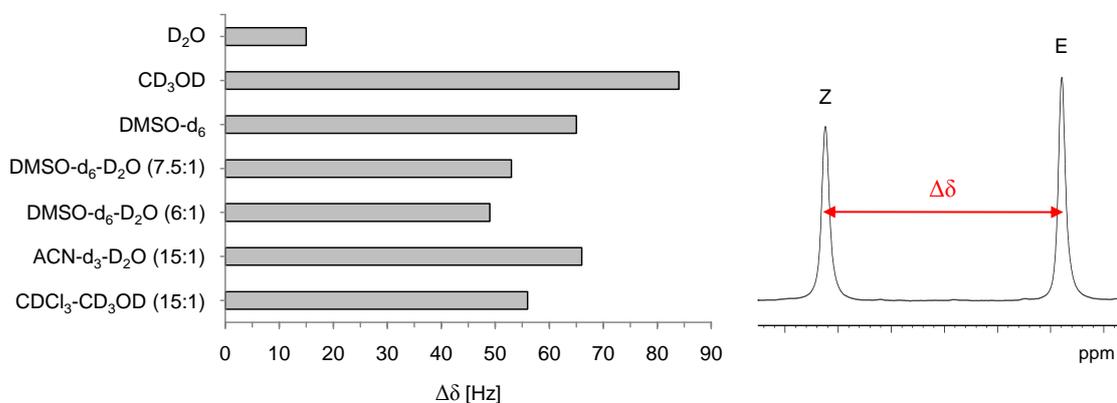


Abbildung 1.32: Graphische Darstellung des Lösungsmiteleinflusses auf die Signalauflösung der beiden CF₃-Resonanzen von E- und Z-Flupentixol. Abgebildet ist der jeweilige Signalabstand $\Delta\delta$ in den eingesetzten Lösungsmitteln bzw. -gemischen.

Reinheit bekannt ist, dieses vollständig im verwendeten Lösungsmittel löslich ist und mindestens ein separiertes Signal im Spektrum quantitativ ausgewertet werden kann.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden drei Arzneistoffe – Fluphenazindihydrochlorid, Fluvoxaminmaleat und Flecainidacetat – auf ihre Eignung als Interner Standard überprüft. Auswahlkriterien wie chemische Verschiebungen im Bereich der zu analysierenden Probe, vollständige Lösung in CD₃OD, kurze T_1 -Relaxationszeiten sowie ein hohes Molekulargewicht – geeignet für eine direkte Einwaage – wurden hier im Gegensatz zu vielen in der Literatur genannten Referenzsubstanzen erfüllt. Alle drei Substanzen zeigen im ¹⁹F-NMR-Spektrum mindestens eine basisliniengetrennte Resonanz, jedoch ist das strukturell verwandte Fluphenazin aufgrund einer ähnlichen chemischen Verschiebung wie das Signal des E-Isomers für eine einfache und präzise Integration ungeeignet (Abbildung 1.33). Die beiden Referenzsubstanzen Fluvoxaminmaleat und Flecainidacetat ermöglichen hingegen eine präzise quantitative Bestimmung des Isomerengemisches; beide Verbindungen zeigen ähnlich kurze T_1 -Relaxationszeiten wie der Analyt selbst (Tabelle 1.28). Während Fluvoxaminmaleat ein Singulett aufweist, welches eine einfache Signalintegration ermöglicht, besitzt Flecainidacetat aufgrund von zwei isolierten CF₃-Resonanzen den Vorteil, mit Hilfe eines direkten Signalflächenvergleichs die Richtigkeit der Integration überprüfen zu können.

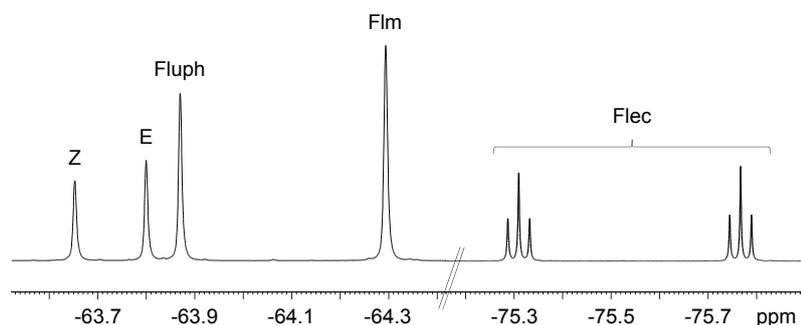


Abbildung 1.33: ^{19}F -NMR-Spektrum von Flupentixoldihydrochlorid mit drei potentiellen Referenzsubstanzen Fluphenazindihydrochlorid (Fluph), Fluvoxaminmaleat (Flm) und Flecainidacetat (Flec) in CD_3OD .

Tabelle 1.28: Bestimmung von T_1 -Relaxationszeiten der zu integrierenden ^{19}F -Signale von Flupentixoldihydrochlorid und den beiden möglichen Internen Standards Fluvoxaminmaleat und Flecainidacetat.

Komponente	T_1 -Zeit [s]
Flupentixol	1.3
Fluvoxamin (IS)	1.3
Flecainid (IS)	1.5 ($\delta = -65.3$ ppm)
	1.7 ($\delta = -65.7$ ppm)

^{19}F -NMR-Methode. Für die Gehaltsbestimmung von Flupentixoldihydrochlorid wurden etwa 3 mg des Isomereingemisches genau abgewogen und in 750 μl CD_3OD gelöst. Da die Konzentration des Internen Standards Flecainidacetat in der Flupentixolhaltigen Untersuchungslösung nur etwa 1.5 mg/ml beträgt, erfolgte der Zusatz des Internen Standards in Form eines definierten Volumens einer Stammlösung, um so den Wägefehler aufgrund der sonst sehr geringen Einwaage möglichst klein zu halten. Anschließend wurde ein definiertes Volumen von 700 μl der Untersuchungslösung in ein NMR-Röhrchen überführt und NMR-spektroskopisch vermessen. Die wichtigsten Messparameter sind in Tabelle 1.29 zusammengefasst. Nach Aufnahme des NMR-Spektrums wurde die Phase manuell angepasst, die Basislinie im Bereich der zu integrierenden Signale korrigiert und die entsprechenden Resonanzen von Analyt und Internem Standard manuell integriert. Die Bestimmung des absoluten Gehalts von Flupentixoldihydrochlorid erfolgte, wie in der Einleitung in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, nach Gleichung (2.24).

Tabelle 1.29: Messparameter.

Spektrometer	Bruker Avance 400 MHz
NMR-Messkopf	selektiver Fluor-Messkopf
Temperatur	300 K
Datenpunkte	64 K
Impuls	90°
Akquisitionszeit	5.86 s
Relaxation Delay	9.86 s \rightarrow AQ + D1 \geq 5 \cdot T ₁
Spektrale Breite	30 ppm
Spektrale Auflösung	0.17 Hz/Punkt
Scan-Anzahl	32 \rightarrow S/N(Z) \approx 800:1
Lb-Wert	0.3

1.5.2.2. Methodvalidierung

Richtigkeit. Der Nachweis der Richtigkeit der ¹⁹F-NMR-Methode zur Gehaltsbestimmung von Flupentixoldihydrochlorid erfolgte mit Hilfe eines Methodenvergleichs gegen die validierte HPLC-Referenzmethode des Ph. Eur. [167] (siehe Abschnitt 1.5.3.2), deren Ergebnis als konventionell richtig gilt. Da der experimentell ermittelte *t*-Wert mit $t = 0.43$ kleiner als der tabellierte *t*-Wert $t_{\text{tab}} = 2.571$ ist, kann kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen festgestellt werden; somit liefert die ¹⁹F-NMR-Methode mit der vorgegebenen Wahrscheinlichkeit richtige Ergebnisse.

Präzision. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde für die Gehaltsbestimmung von Flupentixoldihydrochlorid die Wiederholpräzision bestimmt. Hierfür wurden sechs unabhängige Einwaagen unter Wiederholbedingungen NMR-spektroskopisch mittels Einfachbestimmung vermessen. Wie in Abbildung 1.34 dargestellt, streuen die Einzelwerte mit einer relativen Standardabweichung von $\text{RSD} = 0.2\%$ nur geringfügig um den Mittelwert; das geforderte Akzeptanzkriterium von $\text{RSD} \leq 1\%$ wird somit erfüllt.

Selektivität. Da beim Einsatz der ¹⁹F-NMR-Spektroskopie nur Fluoratome detektiert werden können, ermöglicht dieses Verfahren eine selektive Erfassung fluorhaltiger

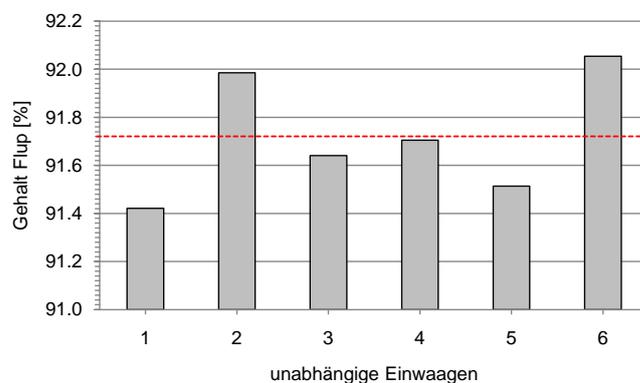


Abbildung 1.34: Graphische Darstellung der sechs Einzelergebnisse zur Bestimmung der Wiederholpräzision. Der Mittelwert der Einzelwerte wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

Substanzen; folglich können für die Gehaltsbestimmung von Flupentixoldihydrochlorid Signalüberlagerungen mit dem Lösungsmittel CD_3OD sowie nicht-fluorhaltiger Verunreinigungen grundsätzlich ausgeschlossen werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung konnten durch den Einsatz unterschiedlicher Lösungsmittel bzw. -gemische, die die Signalaufösung in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen, keine potentiellen Signalüberlagerungen mit fluorhaltigen Verunreinigungen identifiziert werden; belegt wurde dies durch vergleichbare Signalfächen der CF_3 - und $\text{H}1'$ -Resonanzen von E- und Z-Flupentixol.

Linearität. Zur experimentellen Überprüfung der Linearität wurden reale Flupentixoldihydrochlorid-Proben unter quantitativen Bedingungen NMR-spektroskopisch im geforderten Konzentrationsbereich von 80 bis 120 % vermessen. Hierfür wurden fünf verschiedene Konzentrationsniveaus gewählt, entsprechend einer Einwaage von 2.4 mg bis 3.6 mg Flupentixoldihydrochlorid.

Wie in Abbildung 1.35 dargestellt, konnte im angegebenen Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Signalfäche und Konzentration ermittelt werden. Die zugehörigen Werte der Akzeptanzkriterien sind in Tabelle 1.30 aufgelistet.

Stabilität. Die Stabilität der Flupentixoldihydrochlorid-Probeflösung wurde nach 24 und 96 h geprüft; hierfür wurde die Kontrollprobe in dicht verschlossenen NMR-

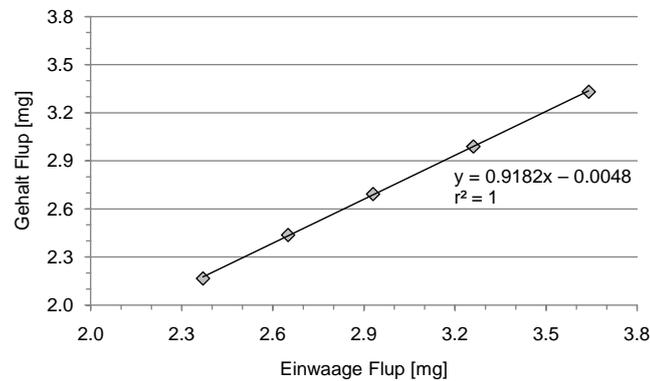


Abbildung 1.35: Graphische Darstellung des ermittelten Gehalts gegen die tatsächliche Einwaage von Flupentixoldihydrochlorid unter Angabe von Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß (r^2).

Tabelle 1.30: Geforderte Akzeptanzkriterien für eine lineare Kalibrierfunktion bei der Gehaltsbestimmung von Wirkstoffen am Beispiel von Flupentixoldihydrochlorid.

Akzeptanzkriterien	ermittelte Werte
$r \geq 0.999$	$r = 1$
$b \leq 2\%$ des Sollwertes	$b = 0.0048 \leq 0.06$
$s_y \leq 1.5\%$	$s_y = 0.01\%$

Röhrchen bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz gelagert. Der zu Beginn der Messreihe unter Wiederholbedingungen erhaltene Gehalt wurde als Kontrollgehalt definiert. Wie in Tabelle 1.31 aufgezeigt, ist die Stabilität der Kontrollprobelösung über eine Zeitdauer von 96 h gewährleistet.

1.5.2.3. Quantitative Analyse

Für die Gehaltsbestimmung des Flupentixoldihydrochlorid-Musters wurden fünf unabhängige Einwaagen der Probe nach Zusatz des Internen Standards Flecaïnacetat (99.5%) NMR-spektroskopisch mittels Einfachbestimmung nach der in Abschnitt 1.5.2.1 beschriebenen ^{19}F -NMR-Methode analysiert. In Tabelle 1.32 sind die ermittelten Ergebnisse der quantitativen Analyse zusammengefasst. Quantitative NMR-Experimente mit Fluvoxaminmaleat als Interne Referenzsubstanz zeigen vergleichbare Ergebnisse.

Tabelle 1.31: Stabilitätsprüfung der ^{19}F -NMR-Methode von Flupentixoldihydrochlorid. Aufgelistet sind die Mittelwerte (Flup) des Gehalts der untersuchten Charge aus sechs unabhängigen Experimenten zum Zeitpunkt $t = 0, 24$ und 96 h, die dazugehörige relative Standardabweichung (RSD) und die jeweilige Änderung zum Kontrollgehalt.

Zeitraum [h]	Flup [%]	RSD [%]	Veränderung [%]
0	91.7	0.2	–
24	91.8	0.3	0.1
96	91.7	0.2	0.0

Tabelle 1.32: Ergebnisse der quantitativen Analyse des Flupentixoldihydrochlorid-Muster mittels Interner-Standard-Methode (IS) unter Angabe des Mittelwertes (MW) und der relativen Standardabweichung (RSD).

Methode	Z-Flup [%]	E-Flup [%]	Gehalt	
			MW [%]	RSD [%]
IS	41.8	50.0	91.8	0.3

1.5.2.4. Vergleich von ^1H - und ^{19}F -NMR-Spektroskopie

Der Vergleich der beiden NMR-Methoden zeigt für die quantitative Analyse von Flupentixoldihydrochlorid mit einem Gehalt von 91.5% (^1H -NMR) und 91.8% (^{19}F -NMR) eine deutliche Übereinstimmung der Ergebnisse, die zudem mit 99.6% bzw. 99.9% eine sehr hohe Wiederfindungsrate zum mittels HPLC ermittelten Wert aufweisen. Beide NMR-Methoden ermöglichen mit einer Wiederholpräzision von etwa $0.2\text{--}0.3\%$ eine präzise quantitative Bestimmung des Isomerengemisches, zudem erfüllen beide Methoden die an sie gestellten Anforderungen bezüglich Linearität, Robustheit und Stabilität. Jedoch zeigt der Methodenvergleich auch einige Vorteile der ^{19}F -NMR-Spektroskopie auf; zu nennen ist hier die selektive Erfassung fluorhaltiger Moleküle, aufgrund der die Signalseparation und die quantitative Analyse nicht durch anwesende fluorfreie Verunreinigungen in der Untersuchungslösung beeinflusst werden. Des Weiteren erhält man in der Regel einfache NMR-Spektren mit nur wenigen Resonanzen, die aufgrund eines deutlich vergrößerten Verschiebungsbereichs selbst für strukturell ähnliche Moleküle nur selten Signalüberlagerungen aufweisen und somit eine schnelle und einfache Methodenentwicklung und -validierung sowie Integration der quantitativ auszuwertenden ^{19}F -Signale ermöglichen.

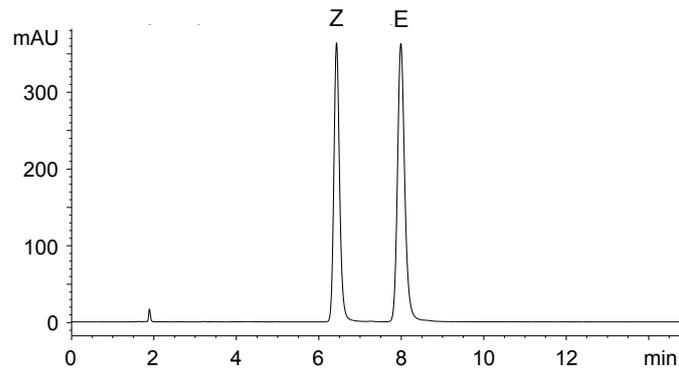


Abbildung 1.36: HPLC-Chromatogramm von Flupentixoldihydrochlorid nach dem Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur. 6.0).

1.5.3. HPLC

1.5.3.1. Arzneibuchanalytik von Flupentixoldihydrochlorid

Die quantitative Bestimmung der pharmakologisch aktiven Komponente, das Z-Flupentixol, wird im Europäischen Arzneibuch gesondert unter Prüfung auf Reinheit mittels Normalphasenchromatographie erfasst [167]. 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 × 4.0 mm, 5 µm) bei einer Flussrate von 1.5 ml/min getrennt und bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert. Zunächst eluiert Z-Flupentixol, danach E-Flupentixol (Abbildung 1.36). Für die Überprüfung der Systemeignung setzt das Ph. Eur. eine Auflösung von mindestens 3.0 zwischen den beiden Hauptpeaks fest; andernfalls sind die Anteile an 2-Propanol und Heptan zu ändern. Die quantitative Analyse von Z-Flupentixol erfolgt mittels Externer-Standard-Methode unter Verwendung einer Flupentixol-Referenzsubstanz mit deklariertem Gehalt an Z-Isomer. Der Gesamtgehalt von Flupentixoldihydrochlorid wird hingegen weiterhin mit wässriger Natriumhydroxid-Maßlösung unter potentiometrischer Endpunktanzeige ermittelt [167]. Unklar ist, warum im Rahmen der HPLC-Reinheitsanalytik nicht auch der Gehalt an E-Flupentixol bestimmt wird, wodurch der Gesamtgehalt aus der Summe beider Isomere berechnet werden könnte.

Tabelle 1.33: Ergebnisse der quantitativen Analyse des Flupentixol-Musters nach Ph. Eur. 6.0 mittels Externer-Standard-Methode (ES) unter Angabe des Mittelwertes (MW) und der relativen Standardabweichung (RSD).

Methode	Z-Flup [%]	E-Flup [%]	Gehalt	
			MW [%]	RSD [%]
ES	41.2	50.7	91.9	0.2

1.5.3.2. Quantitative Analyse

Zur Überprüfung der Richtigkeit der NMR-spektroskopisch ermittelten Ergebnisse wurde der Gehalt der Flupentixoldihydrochlorid-Probe mittels der im Ph. Eur. aufgeführten HPLC-Reinheitsanalytik bestimmt. Die validierte HPLC-Methode gilt für die Gehaltsbestimmung als qualifiziert und liefert somit präzise und richtige Ergebnisse. Zur Quantifizierung von Flupentixoldihydrochlorid wurden sechs unabhängige Einwaagen des Analyten und der zertifizierten Referenzsubstanz (Z-Flupentixoldihydrochlorid *CRS*: 43.6 %) mittels Dreifachbestimmung analysiert. Die geforderte Auflösung von mindestens 3.0 zwischen dem zuerst eluierenden Z-Isomer und dem folgenden E-Isomer wurde mit $R_S = 5.6$ erfüllt, so dass eine quantitative Auswertung möglich war. Die Ergebnisse der Externen-Standard-Methode sind in Tabelle 1.33 zusammengestellt. Eine abschließende Bewertung der Ergebnisse mittels NMR-Spektroskopie und HPLC erfolgt in Abschnitt 1.6.

1.6. Vergleich der Quantifizierungsmethoden

1.6.1. Interner Standard versus Externer Standard

Wie in Tabelle 1.34 dargestellt, zeigt die Externe-Standard-Methode unter Einsatz der "Zwei-Röhrchen-Methode" im Rahmen der quantitativen Analyse der drei untersuchten Mehrkomponentengemische keinen signifikanten Unterschied zur Absolutbestimmung mittels Internem Standard auf. Jedoch unterliegen die unabhängigen Einzelergebnisse der Externen-Standard-Methode aufgrund einer größeren relativen Standardabweichung einer stärkeren Streuung um den Mittelwert des Analyseergebnisses. Als Ursache ist hierfür die bereits in der Einleitung in Abschnitt 2.5.3 erwähnte

Fehleranfälligkeit der Externen-Standard-Methode zu nennen. Nicht vollständig identische Messbedingungen (Spektrometer-Konstante $K_{S1} \neq K_{S2}$, Abstimmung des Probenkopfes etc.) bei den getrennt voneinander durchgeführten qNMR-Experimenten von Analyt und Externem Standard, die Qualität der verwendeten NMR-Röhrchen sowie der Einsatz flüchtiger Lösungsmittel wie beispielsweise CD_3OD und CDCl_3 können die Messunsicherheit des Analysenergebnisses wesentlich beeinflussen. Abweichungen zur tatsächlichen Konzentration der Untersuchungs- bzw. Referenzlösung bedingt durch variierende Innendurchmesser der eingesetzten NMR-Röhrchen sowie eine durch das Verdampfen des Lösungsmittels unterschiedlich starke Aufkonzentrierung der beiden Lösungen können durch eine zuvor durchgeführte Kalibrierung des Füllvolumens bzw. durch den Einsatz dicht schließender Verschlusskappen minimiert werden. Der Einsatz Externer Referenzsubstanzen erfordert aufgrund dieser Vielzahl an möglichen Fehlerquellen eine entsprechende Expertise des Prüfers. Jedoch ist diese Externe Bestimmungsmethode eine geeignete Alternativmethode zur Internen Standardisierung, wenn die Kontaminierung der zu analysierenden Substanz mit einem Internen Standard vermieden und/oder aufgrund störender Signalüberlagerungen bzw. einer unvollständigen Lösung der Referenzsubstanz im Lösungsmittel kein geeigneter Interner Standard gefunden werden kann.

1.6.2. Interne-Standard-Methode versus ERETIC-Verfahren

Die quantitative Bestimmung der drei zu analysierenden Mehrkomponentengemische zeigt beim Einsatz des ERETIC-Verfahrens, wie in Tabelle 1.34 dargestellt, im Vergleich zur Absolutbestimmung mittels Internem Standard eine deutlich erhöhte relative Standardabweichung der unter Wiederholbedingungen ermittelten Einzelergebnisse auf; unter Anwendung der ERETIC-Technik wird jedoch die im Rahmen der Qualitätskontrolle von Arzneistoffen akzeptierte Streuung der unabhängigen Einzelmesswerte im Bereich von 1 bis 2% gewährleistet. Der Nachweis der Richtigkeit der für Codergocrinmesilat und Flupentixoldihydrochlorid ermittelten Analysenergebnisse zeigt, dass das ERETIC-Verfahren als Absolutbestimmungsmethode prinzipiell für die quantitative Analyse organischer Moleküle geeignet ist (Abbildung 1.37); allerdings zeigt eine signifikante Ergebnisabweichung vom richtigen Wert am Beispiel der Gehaltsbestimmung von Clomifencitrat die Fehleranfälligkeit und geringe Robust-

Tabelle 1.34: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von Codergocrinmesilat (Cod-M1 bzw. -M2), Clomifencitrat (Clom) und Flupentixoldihydrochlorid (Flup) mittels NMR-Spektroskopie – Interne-Standard-Methode (IS), Externe-Standard-Methode (ES) sowie ERETIC-Verfahren (ERETIC) – und HPLC unter Angabe des Mittelwertes (MW; in [%]) und der relativen Standardabweichung (RSD; in [%]).

Methode	Cod-M1		Cod-M2		Clom		Flup	
	MW	RSD	MW	RSD	MW	RSD	MW	RSD
¹ H-NMR/IS	95.5	0.1	96.8	0.1	97.4	0.3	91.5	0.2
¹ H-NMR/ES	95.8	0.5	96.6	0.4	96.9	0.6	90.8	0.5
¹ H-NMR/ERETIC	95.6	0.6	96.4	0.3	96.0	0.6	91.4	0.8
¹⁹ F-NMR/IS	–	–	–	–	–	–	91.8	0.3
HPLC/ES	96.0	0.5	96.5	0.5	97.1	0.5	91.9	0.2

heit dieser komplexen Kalibrierungstechnik auf. Für die routinemäßig durchgeführte Qualitätskontrolle von Arznei- und Hilfsstoffen ist diese Technik aufgrund ihrer hohen Fehleranfälligkeit, geringen Robustheit und Automatisierungsmöglichkeit sowie der erforderlichen Expertise der Prüfperson ungeeignet. Erfordert die quantitative Analyse den Einsatz eines Externen Standards, können mit Hilfe der “Zwei-Röhrchen-Methode” präzise und richtige Ergebnisse ermittelt werden.

1.6.3. NMR versus HPLC

Als konventionell eingesetztes und validiertes Verfahren stellt die Flüssigkeitschromatographie die Methode der Wahl dar, gegenüber der die Eignung und Richtigkeit der NMR-spektroskopisch durchgeführten quantitativen Bestimmung überprüft werden muss. Die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse im Rahmen der Gehaltsbestimmung der drei Mehrkomponentengemische bestätigt die Eignung der quantitativen NMR-Spektroskopie unter Zusatz eines geeigneten Internen Standards (siehe Tabelle 1.34 und Abbildung 1.37) als orthogonale Methode zu routinemäßig eingesetzten Verfahren für die Qualitätskontrolle von Arzneimitteln. Eine Vielzahl an Vorteilen wie geringer Mess- und Zeitaufwand für die quantitative Analyse, Methodenentwicklung und -validierung, Verzicht auf teure, zertifizierte Referenzsubstanzen, Wegfall von Korrekturfaktoren, geringer Lösungsmittelverbrauch sowie simultane Prüfung auf Identität, Reinheit und Gehalt belegt die Eignung dieser spektroskopischen Technik gegenüber chromatographischer Verfahren; jedoch sind bis heute hohe Anschaffungs- und War-

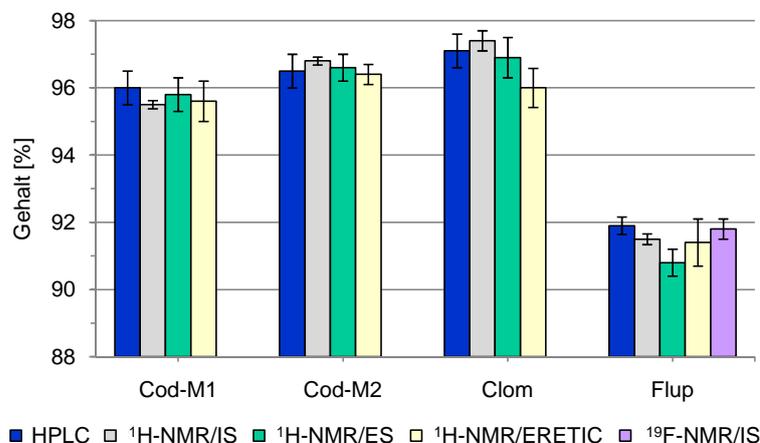


Abbildung 1.37: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Gehaltsbestimmung der untersuchten Mehrkomponentengemische, ermittelt mittels NMR-Spektroskopie – Interne-Standard-Methode (IS), Externe-Standard-Methode (ES) sowie ERETIC-Verfahren (ERETIC) – und HPLC.

tungskosten sowie die Bevorzugung etablierter Methoden Gründe für die geringe Verbreitung dieser Methode im Rahmen der Gehaltsbestimmung von Arzneimitteln.

1.7. Zusammenfassung

Für einen breiten Einsatz der quantitativen NMR-Spektroskopie im Bereich der Gehaltsbestimmung organischer Moleküle ist die Anwendbarkeit dieses Verfahrens auch für die Analyse komplex strukturierter Substanzgemische zu klären. In diesem Zusammenhang wurde im vorliegenden Kapitel die Eignung der ¹H-NMR-Spektroskopie als quantitative Absolutbestimmungsmethode für Arzneistoffgemische, die aus strukturell ähnlichen Komponenten oder Isomeren zusammengesetzt sind, anhand von drei ausgewählten Beispielsubstanzen untersucht: Codergocrinmesilat weist als komplexer Naturstoff vier strukturell verwandte Einzelkomponenten auf; Clomifencitrat zählt zur Gruppe der E/Z-Isomere, ebenso wie Flupentixoldihydrochlorid, welches bedingt durch die Anwesenheit eines zusätzlichen NMR-aktiven Kerns, dem Fluoratom, eine selektive Quantifizierung mittels ¹⁹F-NMR-Spektroskopie erlaubt.

Um die Eignung der NMR-Spektroskopie als innovative, quantitative Messmethode aufzeigen zu können, muss diese Technik bezüglich verschiedener Aspekte

– Methodenentwicklung, Validierung und quantitative Analyse – mit etablierten und konventionell richtig geltenden Verfahren verglichen werden. Hierfür wurden die ausgewählten Mehrkomponentengemische zusätzlich mit den in internationalen Arzneibüchern (USP, Ph. Eur.) beschriebenen und als konventionell richtig geltenden HPLC-Methoden analysiert. Der Vergleich der Analyseergebnisse belegt, dass die NMR-spektroskopische Gehaltsbestimmung unter Zusatz eines geeigneten Internen Standards bezüglich Präzision und Richtigkeit als gleichwertiges Verfahren zu routinemäßig eingesetzten HPLC-Methoden gilt. Neben der Internen-Standard-Methode konnte ebenfalls die Eignung der quantitativen NMR-Bestimmung gegen einen Externen Standard mit Hilfe der “Zwei-Röhrchen-Methode” aufgezeigt werden; im Vergleich zur Internen Standardisierung zeigt diese Methode jedoch eine höhere Fehleranfälligkeit. Das ebenfalls untersuchte ERETIC-Verfahren erweist sich für die routinemäßige Durchführung dagegen als ungeeignet.

2. Reinheitsprüfung von L-Alanin

2.1. Aufgabenstellung

Heutzutage zählen Aminosäuren zu einer der am häufigsten eingesetzten biologischen Substanzgruppen, deren jährliche Produktion mehrere Tonnen umfasst [195, 196]. Neben ihrem Hauptanwendungsgebiet als Zusatzstoff in Nahrungsmitteln und Futtermitteln weisen Aminosäuren ein breit gefächertes Einsatzgebiet auf: Kosmetik, Landwirtschaft, Technik, chemische Synthese, parenterale Ernährung und Arzneimittel [195, 197, 198].

Aufgrund des medizinischen Einsatzes von Aminosäuren am Menschen spielt der Qualitätsnachweis dieser Substanzen im Hinblick auf die Gewährleistung der Patientensicherheit eine entscheidende Rolle. So fordert die ICH-Richtlinie Q3A [199] sowie die Allgemeine Monographie 2034 des Europäischen Arzneibuches [200] für “Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung”, deren tägliche Dosis 2 g überschreitet, einen Berichtsgrenzwert von 0.03 %; Verunreinigungen, die diesen Grenzwert überschreiten, müssen im Rahmen der Reinheitsprüfung mit geeigneten Methoden detektiert und quantitativ erfasst werden.

Die Analytik von Aminosäuren, vor allem die Prüfung auf Reinheit von Verwandten Substanzen geringer Konzentration, stellt, bedingt durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Substanzgruppe, eine Herausforderung für jeden Analytiker dar. Aufgrund des fehlenden Chromophors in den meisten Aminosäuren und möglichen Verunreinigungen ist eine empfindliche Reinheitsanalytik mittels UV-Detektion ohne vorherige Derivatisierung ungeeignet. Der polare Charakter, das geringe Molekulargewicht sowie die große strukturelle Ähnlichkeit von Hauptkomponente und Verwandter Substanz erschweren den Einsatz chromatographischer Verfahren [63, 201]. Zudem wird durch den Einsatz von grundsätzlich vier möglichen

Herstellungsverfahren eine Vielzahl an Verunreinigungen erhalten, die abhängig vom jeweiligen Herstellungsprozess mit Hilfe individueller Reinheitsprüfungen erfasst werden müssen. Diese Problematik trägt dazu bei, dass in den aktuell gültigen Monographien des Europäischen Arzneibuches im Rahmen der Reinheitskontrolle von Aminosäuren statt heutzutage üblicher, moderner chromatographischer Verfahren zum Großteil "veraltete", unspezifische und unempfindliche Nachweismethoden wie Dünnschichtchromatographie-Nachweis auf Ninhydrin-positive Substanzen, spezifische Drehung und Ammoniumbestimmung eingesetzt werden, die eine Vielzahl möglicher Verunreinigung nicht abdecken [17].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll nun am Beispiel der Aminosäure L-Alanin mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie eine alternative Reinheitsanalytik zu den bekannten Arzneibuch-Methoden entwickelt werden und diese auf ihre Eignung im Vergleich zu konventionell eingesetzten Verfahren wie HPLC im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrolle überprüft werden.

2.2. Herstellung von L-Alanin und mögliche Verunreinigungen

Während Aminosäuren bis Mitte des letzten Jahrhunderts vorwiegend durch chemische Synthese und Extraktion aus Proteinhydrolysaten gewonnen wurden, spielen heutzutage durch die Fortschritte in Bio- und Gentechnologie die enzymatische Synthese und fermentative Verfahren eine bedeutende Rolle in der industriellen Herstellung von Aminosäuren (Abbildung 2.1) [195, 202–206]. Die unterschiedlichen Verfahren sowie ihre individuellen Verunreinigungsprofile und entsprechende Arzneibuch-Nachweismethoden werden im Folgenden vorgestellt. Im Anschluss wird auf die Herstellung von L-Alanin im Speziellen eingegangen.

2.2.1. Allgemeine Herstellungsverfahren von Aminosäuren

Chemische Synthese

Aminosäuren werden im industriellen Maßstab ausgehend von den entsprechenden Aldehyden mit Ammoniak und Cyanwasserstoff nach Strecker bzw. Bucherer

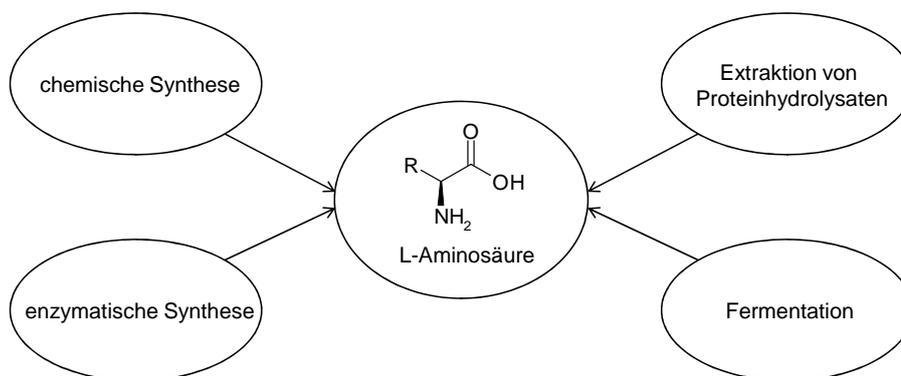


Abbildung 2.1: Verfahren zur Herstellung und Gewinnung von Aminosäuren.

hergestellt [202]. Bei diesen synthetischen Verfahren werden die Aminosäuren in racemischer Form gebildet, so dass im Anschluss eine Enantiomerentrennung der D,L-Aminosäuren durchgeführt werden muss, um das proteinogene L-Enantiomer zu erhalten.

Wirtschaftliche Bedeutung haben diese synthetischen Verfahren nur dann, wenn, wie im Fall von Methionin, das Racemat verwendet wird oder die D,L-Aminosäure sich nach Acetylierung mittels Acylase-katalysierter, stereoselektiver Hydrolyse in die entsprechenden optischen Antipoden spalten lässt [203]. Asymmetrische Synthesen unter Verwendung von chiralen Rhodium-Komplexen oder chiralen Ausgangssubstanzen sind für die industrielle Produktion dagegen nur von geringer Bedeutung [202].

Extraktion aus Proteinhydrolysaten

Eine Vielzahl an proteinogenen L-Aminosäuren kann mit Hilfe hydrolytischer Verfahren aus Proteinen (z. B. Keratin, Kollagen, Pflanzenproteine) gewonnen werden [195, 202]. Unter Säurehydrolyse werden die Peptidbindungen im Protein gespalten und die freigesetzten Aminosäuren mittels chromatographischer Verfahren isoliert und aufgereinigt. Die Ausbeute einzelner Aminosäuren wird durch ihre natürliche Häufigkeit im eingesetzten Ausgangsmaterial begrenzt und kann je nach Protein-Rohstoff stark variieren; jedoch kann durch den Einsatz geeigneter Rohstoffe die Ausbeute einzelner Aminosäuren beträchtlich gesteigert werden.

Enzymatische Synthese

Für die industrielle Herstellung einiger Aminosäuren werden enzymatische Verfahren eingesetzt, die im Gegensatz zur chemischen Synthese mit Hilfe stereoselektiver Enzymkatalyse enantiomerenreine L- oder D-Aminosäuren liefern. Eingesetzt werden hierfür immobilisierte Enzyme oder Zellsysteme in sogenannten Enzym-Membran-Reaktoren. Technische Bedeutung besitzen hier die bereits erwähnte Racematspaltung der N-Acetyl-D,L-Aminosäuren durch L-Aminoacylasen (L-Methionin, L-Valin, L-Phenylalanin, L-Alanin und L-Tryptophan), die Umwandlung von Fumarsäure in L-Asparaginsäure mit Hilfe des Enzyms Asparatase sowie die enzymkatalysierte Decarboxylierung von L-Asparaginsäure zu L-Alanin [195, 198, 202].

Fermentation

Während die fermentative Herstellung von Aminosäuren früher auf wenige Aminosäuren wie L-Glutaminsäure und L-Lysin beschränkt war, wird heutzutage ein Großteil der Aminosäuren mit Hilfe dieser Technologie gewonnen [196, 202]. Bei diesem Verfahren wird die Fähigkeit von Mikroorganismen ausgenutzt, unter geeigneten Bedingungen organische Substanzen unterschiedlichster Stoffklassen in hoher Geschwindigkeit zu produzieren. So besitzt der Bakterienstamm *Corynebacterium glutamicum* die Fähigkeit, aus 1 kg D-Glucose etwa 500 g Glutaminsäure zu produzieren [202]. Besonders bemerkenswert ist, dass im Falle der fermentativen Aminosäureproduktion einzig das biologisch wertvolle L-Enantiomer gebildet wird. Durch den Einsatz gentechnisch veränderter Mikroorganismen (auxotrophe Mutante) können im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen wesentlich höhere Ausbeuten bestimmter Aminosäuren erzielt werden, so dass durch den Einsatz relativ preiswerter Kohlenstoff- und Stickstoffquellen als Ausgangsstoffe, automatisierter Produktionsverfahren sowie optimierter Aufreinigungsprozesse heutzutage fermentative Verfahren aus wirtschaftlicher Sicht der chemischen Synthese überlegen sind.

2.2.2. Mögliche Verunreinigungen von Aminosäuren

Bedingt durch wechselnde Rohstoffpreise und Verfügbarkeiten von Ausgangsstoffen werden Aminosäuren heutzutage abwechselnd mit den vier beschriebenen Verfah-

ren industriell gewonnen. Ihr Verunreinigungsprofil ist somit stark vom jeweiligen Herstellungsprozess abhängig. Als Folge wechselnder Herstellungsverfahren wird eine Vielzahl an Verunreinigungen erhalten, die teilweise mit der bisher eingesetzten Arzneibuch-Analytik nicht erfasst werden können. Ein typisches Beispiel hierfür ist das Auftreten toxischer Verunreinigungen in L-Tryptophan nach Änderung des fermentativen Herstellungsverfahrens [5–11].

Bei enzymatischen und chemischen Synthesen von Aminosäuren treten als mögliche Verunreinigungen Edukte, Zwischenprodukte sowie Nebenprodukte auf. Bei hydrolytischen Verfahren von Proteinen werden vor allem andere Aminosäuren als mögliche Verunreinigungen erwartet. Das Verunreinigungsprofil von biotechnologisch hergestellten Aminosäuren ist dagegen komplex und schwer vorhersagbar. Da hier der gesamte Biosyntheseweg eines Mikroorganismus für die Aminosäureproduktion ausgenutzt wird, kann eine Vielzahl unterschiedlicher Verunreinigungen auftreten. Kohlenstoff- und stickstoffhaltige Inhaltsstoffe der Kulturbrühe wie Melasse, Zucker, organische Säuren, Pepton, Hefeextrakt etc., Komponenten des Kulturmediums wie z. B. Wachstumsfaktoren (Vitamine, Aminosäuren) und Antibiotika (Tetracycline, Aminoglykoside, Chloramphenicol), Ausscheidung von "Overflow-Metaboliten" wie Acetat, Lactat, Pyruvat und Aminosäuren bei ungünstiger Nährstoffzufuhr, Überreste von Mikroorganismen (Biomasse, DNA, Proteine), Neben- und Zwischenprodukte der Stoffwechselwege, unerwünschte Umwandlungsprodukte von Substraten und Vorläufersubstanzen, Endotoxine, Bakterien und Viren zählen zu den möglichen Verunreinigungen [207].

2.2.3. Aminosäuren im Arzneibuch

Die aktuell gültigen Reinheitsprüfungen der Aminosäure-Monographien im Europäischen Arzneibuch sind vorwiegend auf synthetisch und aus Proteinhydrolysaten gewonnene Aminosäuren abgestimmt. So zielt die DC-Reinheitsprüfung auf die Detektion Ninhydrin-positiver Substanzen ab, also anderer Aminosäuren, die bei der Herstellung aus Proteinhydrolysaten nicht vollständig entfernt wurden; zusätzlich kann durch den Einsatz geeigneter anderer Detektionsverfahren auf Nebenprodukte geprüft werden, die in synthetisch oder fermentativ hergestellten Aminosäuren enthalten sind. Da die IR-Spektroskopie keine Unterscheidung zwischen L- und

D-Enantiomer ermöglicht und nur für das Racemat ein abweichendes Spektrum zeigt, kann mit Hilfe der spezifischen Drehung der Gehalt der D-Aminosäure, einem Hauptnebenprodukt der chemischen Synthese, begrenzt werden. Zusätzlich wird der Gehalt von Ammonium-Ionen, die aus dem NH_3 -Spülschritt der Ionenaustauschersäule bei der chromatographischen Aufarbeitung stammen, limitiert.

Da heutzutage ein Großteil der Aminosäuren auf biotechnologischem Weg gewonnen wird, wird der Nachweis potentieller Verunreinigungen durch die aktuell gültigen Arzneibuchprüfungen nur unzureichend gewährleistet; jedoch legt die Allgemeine Monographie "Fermentationsprodukte" besondere Anforderungen an die Reinheit fermentativ gewonnener Aminosäuren fest, die zusätzlich zu den entsprechenden Einzelmonographien gelten [208]. Diese allgemeine Vorschrift fordert, dass die eingesetzten Aufreinigungsprozesse Überreste der Mikroorganismen, Kulturmedien, Substrate, Vorläufersubstrate sowie unerwünschte Umwandlungsprodukte von Substraten und Vorläufersubstraten weitgehend oder vollständig entfernen, um somit die Qualität des Produktes zu gewährleisten.

2.2.4. Herstellung von L-Alanin

Die proteinogene Aminosäure L-Alanin wird heutzutage im industriellen Maßstab vorwiegend auf drei unterschiedlichen Herstellungswegen gewonnen: chemische Synthese, enzymatische Synthese und Extraktion aus Proteinhydrolysaten [195, 205, 207]. Der Großteil der L-Alanin-Gewinnung erfolgt durch den Einsatz der enzymatischen Synthese.

Chemische Synthese

Bei der chemischen Synthese von L-Alanin wird ausgehend von Acetaldehyd das entsprechende Cyanhydrin gebildet, welches entweder direkt oder nach Umsetzung mit CO_2 zum Hydantoin mit Säure oder Base zum D,L-Alanin hydrolysiert wird (Abbildung 2.2). Nach Umsetzung zum N-Acetyl-Derivat erfolgt eine Lyase-katalysierte Hydrolyse der Amidbindung des N-Acetyl-L-Alanins. Das Reaktionsgemisch aus L-Alanin, Natriumacetat und N-Acetyl-D-Alanin kann unter Ausnutzung der unterschiedlichen Löslichkeiten und/oder mit Hilfe von Ionenaustauschern getrennt werden [202].

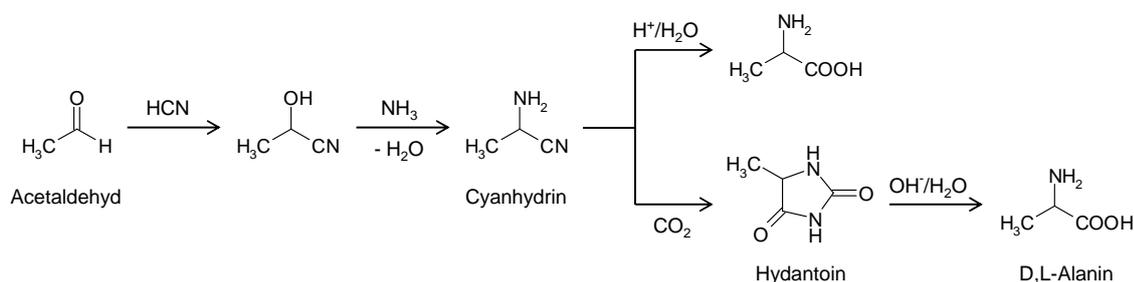


Abbildung 2.2: Chemische Synthese von D,L-Alanin.

Als mögliche Verunreinigung wird vorwiegend das D-Alanin beobachtet. Der Gehalt des D-Enantiomers wird in der Monographie durch die Bestimmung der spezifischen Drehung limitiert [209]; ein empfindlicher Enantiomerennachweis ist jedoch mit dieser Methode nicht möglich.

Extraktion aus Proteinhydrolysaten

Ausgehend von Alanin-reichen Protein-Rohstoffen wie Kollagen oder Blutmehl erfolgt nach saurer Hydrolyse der Proteine eine Fraktionierung der Aminosäuren mit Hilfe von Kunstharzionenaustauschern. Für die Isolierung von L-Alanin wird die mit neutralen Aminosäuren angereicherte Fraktion einer chromatographischen Feintrennung unterworfen. Die Fraktion, die nur noch L-Alanin enthält, wird eingedampft und zur Kristallisation gebracht [202].

Als mögliche Verunreinigungen werden vorwiegend andere neutrale Aminosäuren wie beispielsweise das strukturell sehr ähnliche Glycin erwartet; diese werden als Ninhydrin-positive Substanzen mit der vorgeschriebenen DC-Methode ($\text{LOD} \geq 0.5\%$) erfasst. Ein Systemeignungstest stellt hier den Nachweis kritischer Aminosäurepaare wie Alanin und Glycin sicher [209].

Enzymatische Synthese

Bei der enzymatischen Synthese wird durch die stereospezifische Umsetzung von Fumarsäure mit Ammoniak in Gegenwart des Enzyms L-Aspartase die Aminosäure L-Asparaginsäure gewonnen, die in einem weiteren enzymkatalysierten Schritt durch Decarboxylierung zu L-Alanin umgesetzt wird (Abbildung 2.3) [210–212].

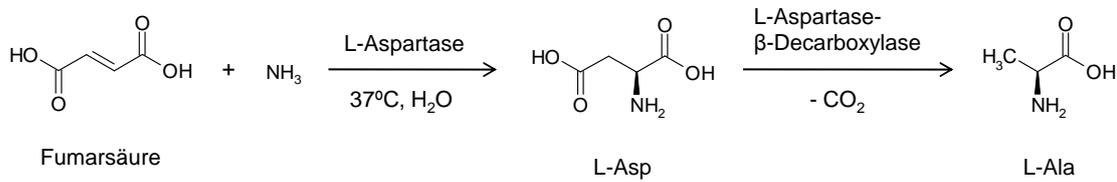


Abbildung 2.3: Enzymatische Synthese von L-Alanin.

Als mögliche Verunreinigungen werden bei der enzymatischen Synthese das Edukt Fumarsäure und das Zwischenprodukt L-Asparaginsäure erwartet. Zu den weiteren Verwandten Substanzen zählen Äpfelsäure, Maleinsäure und L-Glutaminsäure. Während Äpfelsäure und Maleinsäure im Zuge der enzymatischen Synthese als Nebenprodukte ausgehend von der Fumarsäure gebildet werden, wird die L-Glutaminsäure zur Beschleunigung eines Kristallisationsprozesses von außen zugesetzt.

Während die beiden Aminosäuren als Ninhydrin-positive Substanzen mit Hilfe des in der Monographie beschriebenen Dünnschichtchromatographie-Nachweises auf eine Konzentration von jeweils 0.5 % begrenzt werden können, werden die organischen Säuren im Rahmen der Reinheitsprüfung nicht erfasst [209].

2.3. Untersuchung von Alanin mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

2.3.1. Signalzuordnung

Eine eindeutige Zuordnung der zur quantitativen Analyse herangezogenen Signale ist eine Grundvoraussetzung der quantitativen NMR-Spektroskopie. Unter Aufnahme der jeweiligen Einzelspektren sowie durch "Spiking-Experimente" von einer bzw. mehreren Verunreinigungen zur Hauptkomponente L-Alanin (Ala) wird eine eindeutige Signalzuordnung der zu analysierenden Alanin-Probe im Lösungsmittel D₂O gewährleistet (Abbildung 2.4). In Tabelle 2.1 sind die chemischen Verschiebungen der entsprechenden NMR-Signale der Hauptkomponente L-Alanin und ihrer möglichen Verunreinigungen L-Glutaminsäure (Glu), L-Asparaginsäure (Asp), Äpfelsäure (ÄS) und Fumarsäure (FS) zusammengefasst [213]. Auffällig ist, dass bei der Analyse von Modellmischungen mit unterschiedlichem Verunreinigungsgrad Abweichungen in den

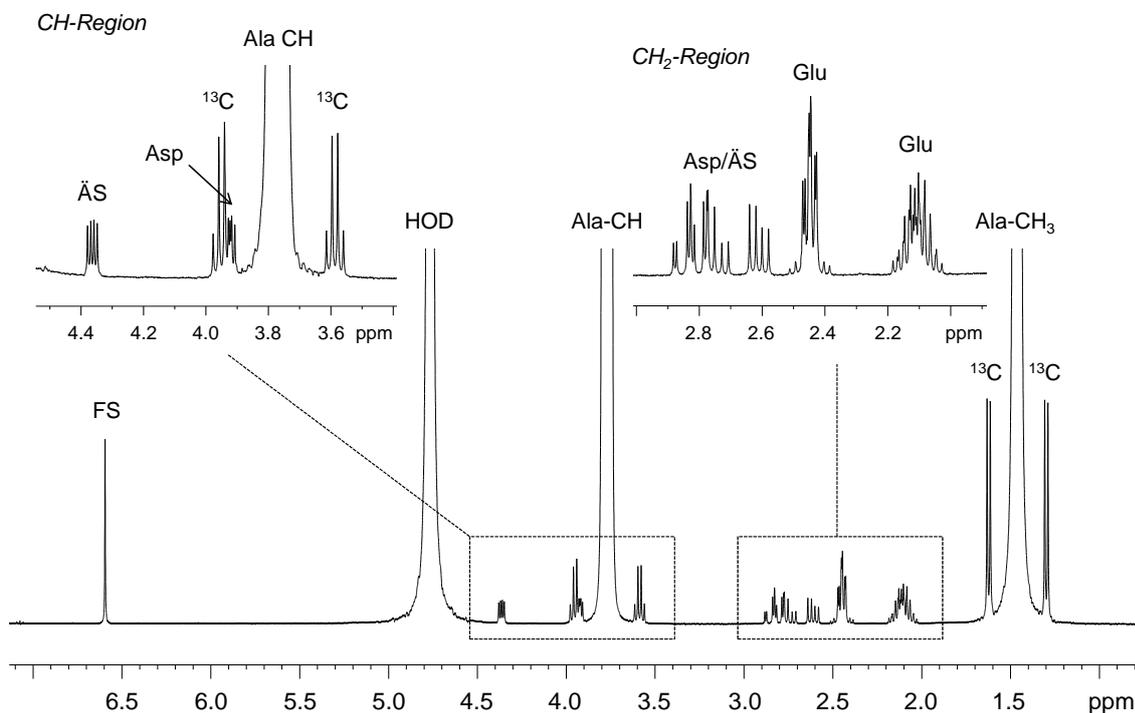
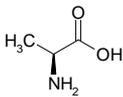
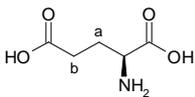
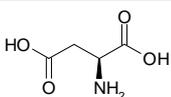
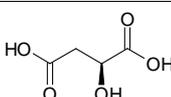
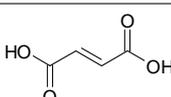


Abbildung 2.4: ^1H -NMR-Spektrum von L-Alanin (Ala) in D_2O , gespikt mit den möglichen Verunreinigungen L-Glutaminsäure (Glu), L-Asparaginsäure (Asp), Äpfelsäure (ÄS) und Fumarsäure (FS).

aufgeführten chemischen Verschiebungen zu beobachten sind; diese werden durch variierende pH-Werte der Untersuchungslösung hervorgerufen (siehe Abschnitt 2.3.2).

Im Vergleich zu routinemäßig eingesetzten Verfahren wie HPLC oder GC liefert die NMR-Spektroskopie nicht nur einen Peak pro Komponente, sondern meist eine Vielzahl an Signalen; jedoch ist für die quantitative Analyse einzig ein basisliniengetrenntes Signal pro Komponente erforderlich. Am vorliegenden Beispiel konnte mit Ausnahme von Asparaginsäure für jede Verunreinigung mindestens ein vollständig isoliertes Signal im ^1H -NMR-Spektrum gefunden werden. Während die CH_2 -Resonanzen von Asparaginsäure und Äpfelsäure überlappen, weist das entsprechende CH-Signal eine ähnliche chemische Verschiebung wie ein ^{13}C -Satellit der CH-Resonanz der Hauptkomponente auf, so dass auch dieses Signal nicht zur quantitativen Bestimmung geeignet ist (Abbildung 2.4). Jedoch können durch den Einsatz geeigneter ^{13}C -Entkopplungspulssequenzen die störenden ^{13}C -Satelliten aus dem

Tabelle 2.1: Chemische Verschiebungen der Komponenten der Alanin-Modellmischung (50 mg/750 μ l) in D₂O.

Komponente	Strukturformel	H-Atom	δ [ppm]
Alanin		CH ₃ CH	1.46 3.77
Glutaminsäure		CH ₂ (a) CH ₂ (b) CH	2.00–2.20 2.35–2.55 überlagert von CH-Ala
Asparaginsäure		CH ₂ CH	2.69–2.90 überlagert von ¹³ C-Satellit (3.89–3.95)
Äpfelsäure		CH ₂ CH	2.55–2.85 4.36
Fumarsäure		CH	6.59

Spektrum entfernt werden, so dass eine Integration des CH-Signals von Asparaginsäure möglich ist. Alternativ kann der Asparaginsäure-Gehalt durch Subtraktion der Peakfläche des CH-Signals der Äpfelsäure von der Gesamtpeakfläche der sich überlappenden CH₂-Resonanzen von Asparaginsäure und Äpfelsäure bestimmt werden (siehe Abschnitt 2.3.6).

2.3.2. pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung

Bei der Analyse von Modellmischungen mit unterschiedlichem Kontaminierungsgrad ist bei Anwesenheit geringer Verunreinigungsmengen eine deutliche Hochfeldverschiebung der Signale im Vergleich zu entsprechenden NMR-Spektren stärker kontaminierter Proben zu erkennen (Abbildung 2.5). Dieses Phänomen der Signalverschiebung beruht auf der pH-Abhängigkeit der chemischen Verschiebung. Wie in Abbildung 2.6 dargestellt, führt bereits eine geringe Kontaminierung mit sauer reagierenden Verunreinigungen zu einer deutlichen Änderung des pH-Wertes der Untersuchungslösung und folglich zu einer Signalverschiebung, jedoch für jedes Proton in unterschiedlichem Ausmaß. Während die Hochfeldverschiebung im Rahmen der

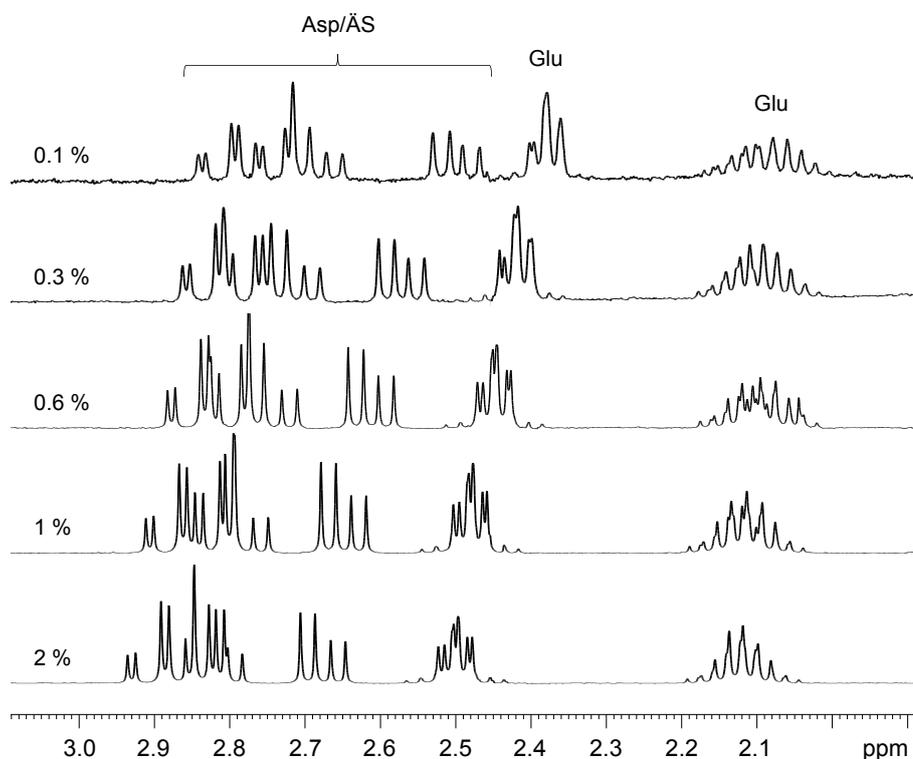


Abbildung 2.5: $^1\text{H-NMR}$ -Teilspektren der CH_2 -Region von Alanin-Modellmischungen mit unterschiedlichem Verunreinigungsgrad an Glutamin- (Glu), Asparagin- (Asp), Äpfel- (ÄS) und Fumarsäure (FS) (0.1–2% pro Verunreinigung) in D_2O .

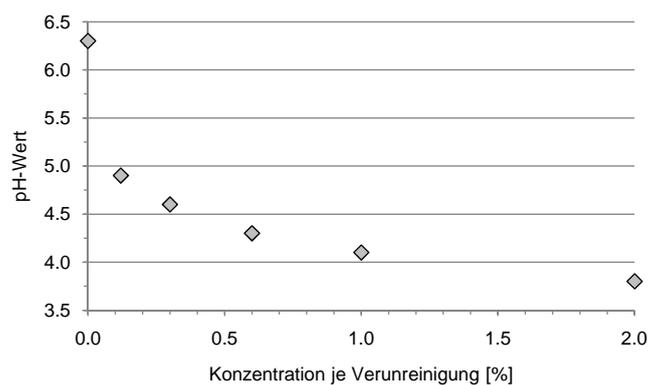


Abbildung 2.6: Änderung des pH-Wertes der Alanin-Untersuchungslösung mit steigendem Verunreinigungsgrad an Glutamin-, Asparagin-, Äpfel- und Fumarsäure (0.1–2% pro Verunreinigung).

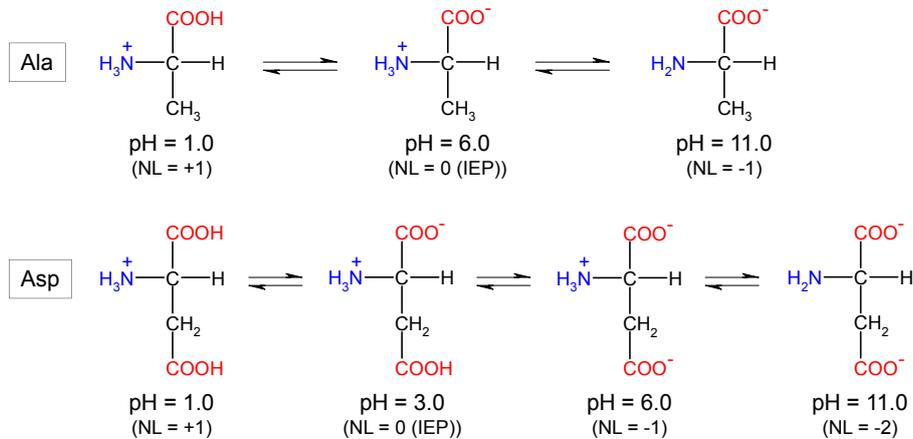


Abbildung 2.7: Dissoziationsverhalten der Carbonsäure- und Aminogruppen von Alanin und Asparaginsäure bei verschiedenen pH-Werten unter Angabe der jeweiligen Nettoladung (NL) und des isoelektrischen Punktes (IEP).

quantitativen Bestimmung der Fumarsäure, Äpfelsäure und Glutaminsäure aufgrund vollständiger Signalseparation keinen Einfluss hat, ändert sich die Signallage der überlappenden CH_2 -Resonanzen von Asparaginsäure und Äpfelsäure in Abhängigkeit des Verunreinigungsgrads deutlich und muss bei der Integration beachtet werden.

Verändert man nun gezielt den pH-Wert der Untersuchungslösung durch die Zugabe von Säure bzw. Base, erfolgt eine Protonierung der Amine bzw. eine Deprotonierung der Carbonsäuren; bedingt durch eine Ladungsänderung im Molekül kann nun eine deutliche Tief- bzw. Hochfeldverschiebung bestimmter Signale im Spektrum beobachtet werden. Das Ausmaß der Protonierung bzw. Deprotonierung und somit der Signalverschiebung hängt hierbei von den jeweiligen pK_a -Werten der funktionellen Gruppen ab. Da die zu untersuchenden Substanzen sich in der Anzahl ihrer Carbonsäure- und Aminogruppen sowie in den entsprechenden pK_a -Werten unterscheiden, zeigen die Moleküle bei einem definierten pH-Wert, wie in Abbildung 2.7 am Beispiel von Alanin und Asparaginsäure dargestellt, ein unterschiedliches Dissoziationsverhalten, wodurch die chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonen in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst werden. Dieser Effekt kann von Vorteil sein, wenn, wie im vorliegenden Beispiel, unter Einsatz von D_2O die CH_2 -Signale von Asparaginsäure und Äpfelsäure überlappen oder die CH -Resonanz von Asparaginsäure mit dem ^{13}C -Satelliten der Hauptkomponente Alanin interferiert.

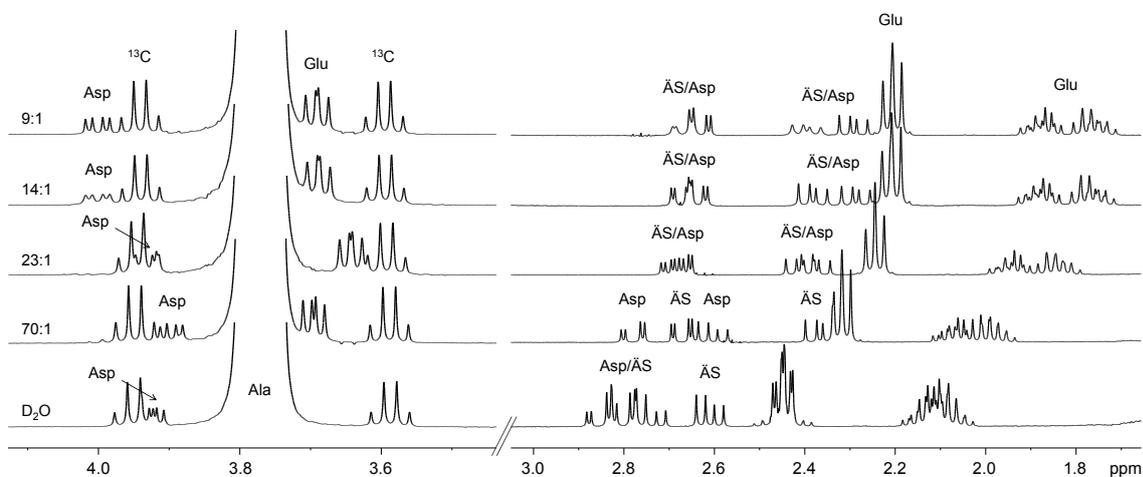


Abbildung 2.8: ^1H -NMR-Spektren der Alanin-Modellmischung bei steigendem pH-Wert der Untersuchungslösung durch den Zusatz von NaOD. Beim Einsatz von D_2O -NaOD-Mischungen sind die entsprechenden Mischungsverhältnisse angegeben.

D_2O -NaOD-Gemische

Steigert man den Anteil an NaOD schrittweise, verändert sich die chemische Verschiebung bestimmter Resonanzen deutlich im Vergleich zu Experimenten in reinem D_2O (Abbildung 2.8). Protonen, die in räumlicher Nähe zur nun negativ geladenen Carbonsäuregruppe liegen, werden aufgrund erhöhter Abschirmung mit steigendem pH-Wert hochfeldverschoben. Vor allem die CH_2 -Signale von Asparaginsäure und Äpfelsäure sowie die CH -Resonanzen der beiden sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure zeigen deutliche Unterschiede in der Lage ihrer Signale im Spektrum auf (siehe Abbildungen 2.8 und 2.9). Während beim Einsatz von stark basischen D_2O -NaOD-Mischungen im Verhältnis 9:1 (V/V) eine vollständige Signalseparation zwischen dem ^{13}C -Satelliten und Asparaginsäure erzielt werden kann (Abbildung 2.8), wird für die entsprechenden CH_2 -Signale der Asparagin- und Äpfelsäure trotz erheblicher Veränderung der chemischen Verschiebung keine Basislinientrennung ermöglicht.

Auffällig ist, dass für alle Aminosäuren im basischen Milieu eine deutliche Signalverschiebung der CH -Resonanzen in Richtung Hochfeld zu beobachten ist, während die entsprechende chemische Verschiebung der Äpfelsäure nicht beeinflusst wird (siehe Abbildung 2.9). Dieser Effekt ist auf die in der Äpfelsäure fehlende NH_2 -Gruppe zu-

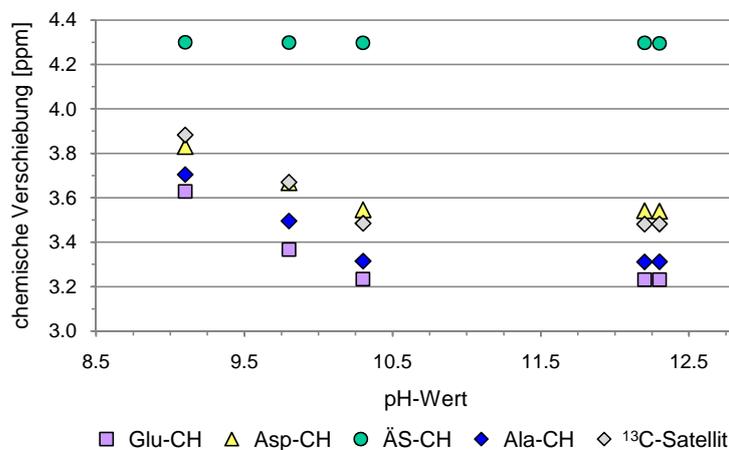


Abbildung 2.9: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der CH-Resonanzen von Glutamin- (Glu-CH), Asparagin- (Asp-CH) und Äpfelsäure (ÄS-CH) sowie Alanin (Ala-CH) und dessen ¹³C-Satellit vom pH-Wert der Untersuchungslösung der Alanin-Modellmischung aus Abbildung 2.8.

rückzuführen, die in stark basischem Milieu ($\text{pH} \geq 11$), bedingt durch die vollständige Deprotonierung dieses Substituenten, eine Änderung der Ladungsdichte im Molekül hervorruft, welche für die Hochfeldverschiebung der CH-Signale verantwortlich ist.

D₂O-DCl-Gemische

Bei analogen NMR-Experimenten mit DCl ist der Einfluss des pH-Wertes auf die chemische Verschiebung von Protonen, die in räumlicher Nähe zur nun protonierten NH₂-Gruppe liegen, ebenfalls deutlich erkennbar; die Signale werden mit sinkendem pH-Wert tieffeldverschoben (Abbildung 2.10). Im Hinblick auf eine vollständige Separation überlappender Signale in D₂O wirkt sich ein niedriger pH-Wert vor allem auf die auf die beiden Resonanzen der Asparaginsäure positiv aus.

Aufgrund der leicht unterschiedlichen pK_a-Werte der α -ständigen Carbonsäurefunktion von Alanin und Asparaginsäure [205] wird in Abhängigkeit des pH-Wertes der Untersuchungslösung die Signaltrennung zwischen dem ¹³C-Satelliten von Alanin und Asparaginsäure deutlich beeinflusst (siehe Abbildung 2.11 a). Eine maximale Signalseparation der beiden CH-Resonanzen wird beim Einsatz einer D₂O-DCl-Mischung im Verhältnis 9:1 (V/V) erreicht. In ähnlicher Weise wird bei sinkendem pH-Wert der Untersuchungslösung eine deutliche Signalverschiebung hin zu höheren

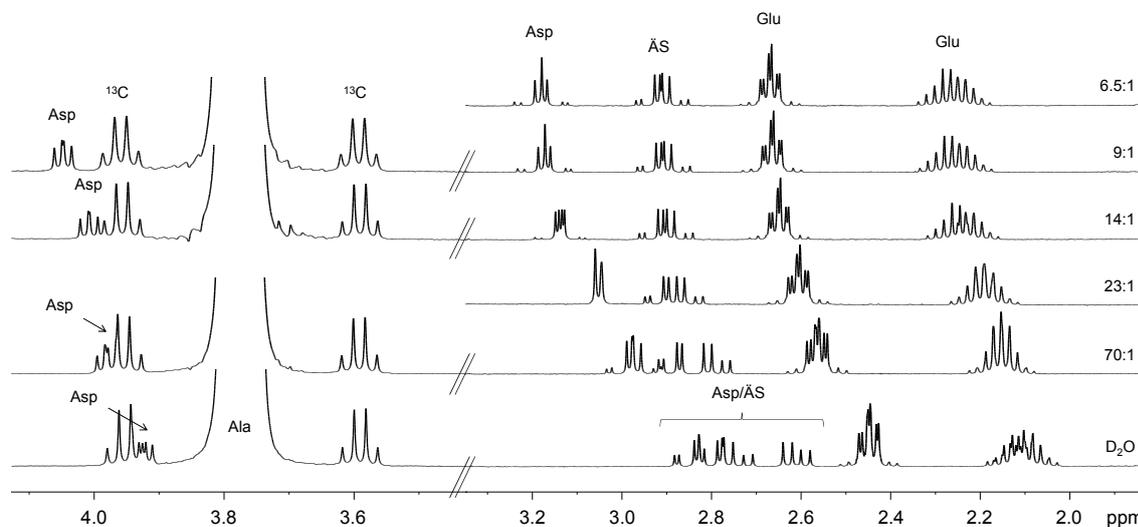


Abbildung 2.10: ^1H -NMR-Spektren der Alanin-Modellmischung bei sinkendem pH-Wert der Untersuchungslösung durch den Zusatz von DCl. Beim Einsatz von D_2O -DCl-Mischungen sind die entsprechenden Mischungsverhältnisse angegeben.

chemischen Verschiebungen für die CH_2 -Protonen von Asparaginsäure beobachtet (Abbildung 2.10). Wie in Abbildung 2.11 b dargestellt, wird aufgrund deutlich unterschiedlicher pK_a -Werte der Carbonsäuregruppen von Asparagin- und Äpfelsäure [185, 205] sowie der fehlenden NH_2 -Substituierung am C-Atom in α -Position die Lage des CH_2 -Signals der Äpfelsäure im Vergleich zur entsprechenden Asparaginsäure-Resonanz in stark saurem Milieu in geringerem Maße tieffeldverschoben.

2.3.3. Bestimmung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1

Vor den quantitativen NMR-Experimenten müssen die T_1 -Relaxationszeiten der zur Integration herangezogenen Signale ermittelt werden, da nur durch eine vollständige Relaxation der untersuchten Kerne die geforderte Proportionalität zwischen der Intensität und der zugehörigen Kernanzahl eines Signales gewährleistet ist. Für das entsprechende "Inversion-Recovery-Experiment" wurde die zu analysierende Alanin-Modellmischung eingesetzt; die Konzentration der Lösung (50 mg/750 ml) sowie bestimmte NMR-Aufnahmeparameter wie Scan-Anzahl (NS = 128) und spektrale Breite (14 ppm) wurden analog zur quantitativen Analyse gewählt. Da bereits in Vorversuchen zur groben Abschätzung der T_1 -Relaxationszeit deutliche Unterschiede

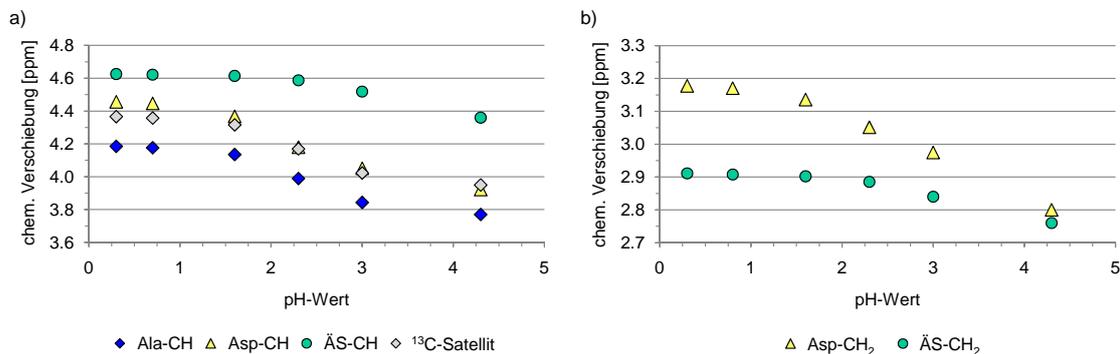


Abbildung 2.11: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der CH-Resonanzen von Asparagin- und Äpfelsäure sowie Alanin und dessen ¹³C-Satellit (a), sowie der CH₂-Resonanzen von Asparagin- und Äpfelsäure (b), vom pH-Wert der Untersuchungslösung der Alanin-Modellmischung aus Abbildung 2.10.

im Relaxationsverhalten der Protonen der einzelnen Verunreinigungen aufgezeigt werden konnten, wurden für die Bestimmung der entsprechenden T_1 -Relaxationszeiten von Haupt- und Nebenkompone 17 Experimente mit ansteigender Wartezeit von 0,5 s bis 10 s zwischen den beiden aufeinanderfolgenden 180°- und 90°-Impulsen durchgeführt (Abbildung 2.12). In Tabelle 2.2 sind die ermittelten T_1 -Zeiten in den eingesetzten Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen zusammengefasst. Während die CH₃- und CH₂-Signale durch kurze T_1 -Zeiten gekennzeichnet sind, erfolgt die Rückkehr des Spinsystems der CH-Protonen in den Gleichgewichtszustand erheblich langsamer; die Messzeit pro Probe wird durch die sehr langsam relaxierende Fumarsäure bestimmt und somit erheblich verlängert. Aufgrund einer um den Faktor 1,5 verbesserten Empfindlichkeit beim Einsatz eines 90°-Impulses im Vergleich zu einem 30°-Impuls bei gleicher Messdauer, jedoch unterschiedlicher Scan-Anzahl, beträgt der "Relaxation Delay" mit $\tau = 5 \cdot T_1$ für Experimente in D₂O 43,5 s, in NaOD- bzw. DCl-D₂O-Gemischen liegt er aufgrund der längeren T_1 -Zeit der Fumarsäure bei 50,5 s bzw. 57,5 s; die Messzeit pro Probe liegt somit zwischen 100 min und 130 min.

2.3.4. Bestimmungsgrenze

Im Rahmen der Reinheitskontrolle von Arzneistoffen spielt die Bestimmungsgrenze von Verunreinigungen eine wichtige Rolle, da diese die Empfindlichkeit der jeweiligen Methode widerspiegelt. Die Bestimmungsgrenze ist definiert als die kleinste quantifi-

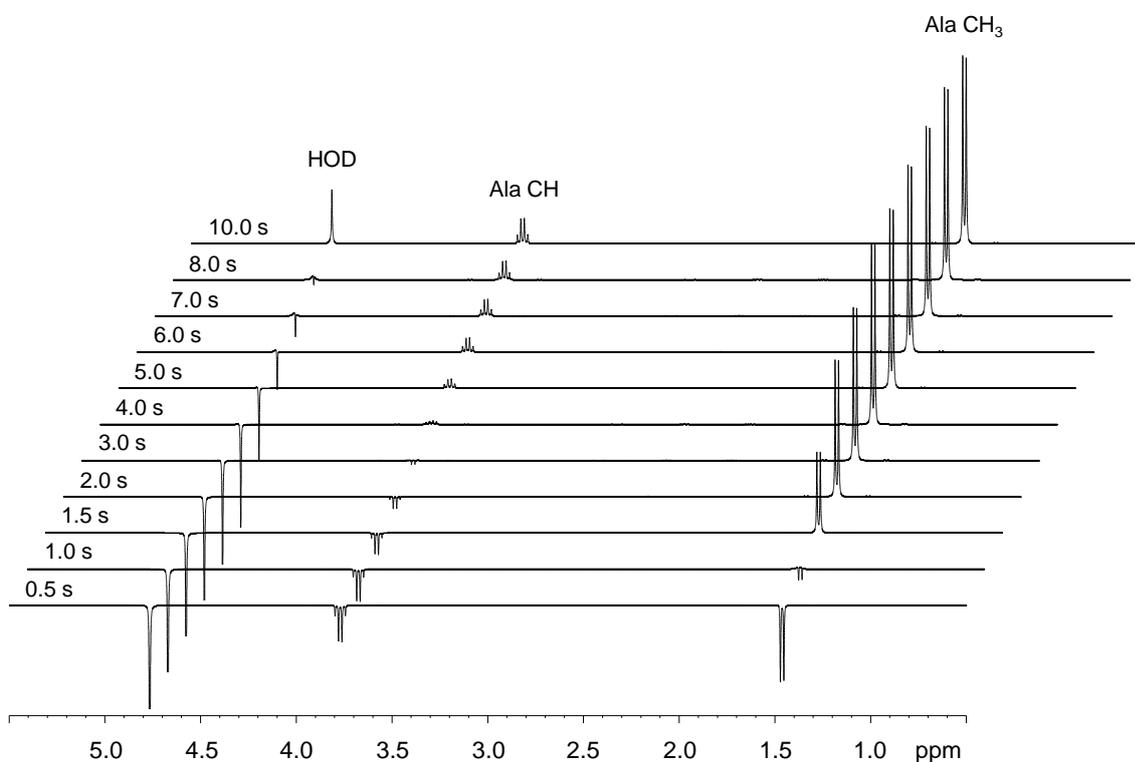


Abbildung 2.12: Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit von Alanin und seinen möglichen Verunreinigungen in D_2O . Zur besseren Übersicht ist nur eine Auswahl der durchgeführten 17 Experimente dargestellt.

Tabelle 2.2: T_1 -Relaxationszeiten von Alanin und potentiellen Verunreinigungen in den eingesetzten Lösungsmitteln (D_2O) bzw. Lösungsmittelgemischen (D_2O -NaOD und D_2O -DCl, je 9:1 (V/V)).

Komponente	Atom	T_1 in D_2O [s]	T_1 in NaOD [s]	T_1 in DCl [s]
Alanin	CH_3	2.2	1.5	1.5
	CH	7.2	5.0	5.8
Glutaminsäure	CH_2	1.5	1.5	1.1
	CH	–	2.9	–
Asparaginsäure	CH_2	1.5	1.5	1.1
	CH	3.6	4.3	5.8
Äpfelsäure	CH_2	1.5	0.3	1.5
	CH	3.6	0.3	5.8
Fumarsäure	CH	8.7	10.1	11.5

Tabelle 2.3: Bestimmungsgrenze der Verunreinigungen Glutamin-, Asparagin-, Äpfel- und Fumarsäure mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bei einer Magnetfeldstärke von 400 MHz unter Einsatz gespikter Alanin-Modellmischungen mit einer Konzentration von 50 mg/750 μl D_2O .

Verunreinigung	H-Atom	LOQ [%]	LOQ [mg/750 μl]
Glutaminsäure	CH_2 (a)	0.05	0.025
	CH_2 (b)	0.02	0.010
Asparaginsäure	CH_2	0.03	0.015
Äpfelsäure	CH	0.04	0.020
Fumarsäure	CH	0.004	0.002

zierbare Menge, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann [155, 156]. Somit sollte die Bestimmungsgrenze der angewandten Methode vorzugsweise den quantitativen Nachweis potentieller Verunreinigungen nach den Anforderungen der ICH-Richtlinie Q3A(R2) gewährleisten; für pharmazeutisch eingesetzte Aminosäuren mit einer durchschnittlichen täglichen Dosis von mindestens 2 g Wirkstoff liegt der geforderte Grenzwert bei maximal 0.03 % pro Verunreinigung [199].

Während mit Hilfe von Vorversuchen die Bestimmungsgrenze der einzelnen Verunreinigungen anhand des Signal-Rausch-Verhältnisses der entsprechenden Resonanzen grob abgeschätzt werden konnte, wurden zur Überprüfung verschiedene Modellmischungen mit definierter Konzentration an Verunreinigung (0.002 % bis 0.1 % Verunreinigung) in Anwesenheit der Hauptkomponente Alanin (50 mg/750 ml) unter quantitativen NMR-Bedingungen vermessen. In Tabelle 2.3 sind die experimentell ermittelten Bestimmungsgrenzen der zu erwartenden Verunreinigungen, bestimmt über ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1, zusammengefasst. Die NMR-Ergebnisse zeigen, dass trotz der häufig diskutierten Unempfindlichkeit dieser Technik im Vergleich zu anderen spektroskopischen Methoden der nach ICH geforderte Grenzwert erreicht wird.

Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens kann jedoch durch eine Erhöhung der Scan-Anzahl und/oder der Konzentration der Untersuchungslösung sowie durch den Einsatz von NMR-Spektrometern höherer Magnetfeldstärke und/oder modernen Probenköpfen deutlich verbessert werden. Um beispielsweise gleiche Signal-Rausch-Verhältnisse

zu erhalten, wird beim Einsatz eines 400 MHz-Spektrometers im Vergleich zu einem 600 MHz-Spektrometer mindestens die dreifache Scan-Anzahl benötigt; weiterhin kann die Empfindlichkeit beim Einsatz eines Kryomagneten um den Faktor 4 gesteigert werden [99]. Eigene Experimente, das Signal-Rausch-Verhältnis betreffend, zeigen, dass beim Einsatz eines 600 MHz-Kryomagneten die Scan-Anzahl von 128 auf 16 und somit die Messzeit von etwa 100 min auf 15 min gesenkt werden konnte bzw. bei gleichbleibender Experimentdauer die Empfindlichkeit erheblich gesteigert werden konnte. Da für die quantitative Analyse mittels NMR-Spektroskopie die vollständige Löslichkeit des Analyten und seiner Verunreinigungen im eingesetzten Lösungsmittel gefordert wird, ist eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses durch eine Erhöhung der Probenkonzentration am vorliegenden Beispiel bedingt durch die schlechte Löslichkeit von Asparagin-, Glutamin- und Fumarsäure im eingesetzten Lösungsmittel D_2O begrenzt.

2.3.5. Linearität

Zur experimentellen Überprüfung der Linearität wurden reale Modellmischungen mit definiertem Gehalt der zu erwartenden Verunreinigungen durch unabhängige Einwaagen der Referenzsubstanzen bzw. durch Pipettieren unterschiedlicher Volumina aus einer Stammlösung hergestellt und unter quantitativen Bedingungen vermessen. Da im vorliegenden Fall ein deutlich größerer Konzentrationsbereich für den Linearitätstest ausgewählt wurde (LOQ bis 2% Verunreinigung), wurde die Anzahl der Konzentrationsniveaus von fünf auf vierzehn erhöht. Im angegebenen Konzentrationsbereich konnte für alle Verunreinigungen ein linearer Zusammenhang zwischen Signalfläche und Konzentration ermittelt werden (Abbildung 2.13). Das geforderte Bestimmtheitsmaß $r^2 \geq 0.96$ für die Prüfung auf Verwandte Substanzen [156] wird mit einem Bestimmtheitsmaß $r^2 \geq 0.999$ für alle vier potentiellen Verunreinigungen erreicht.

In einem weiteren Experiment wurde anhand der leicht wasserlöslichen Äpfelsäure die Linearität über einen deutlich vergrößerten Konzentrationsbereich (0.02 mg bis 50 mg; das entspricht einem Bereich von LOQ bis 100%) überprüft, um die geforderte lineare Abhängigkeit auch über den festgelegten Arbeitsbereich hinaus aufzeigen zu können. Wie in Abbildung 2.14 dargestellt, wird die Korrelation von Signalfläche

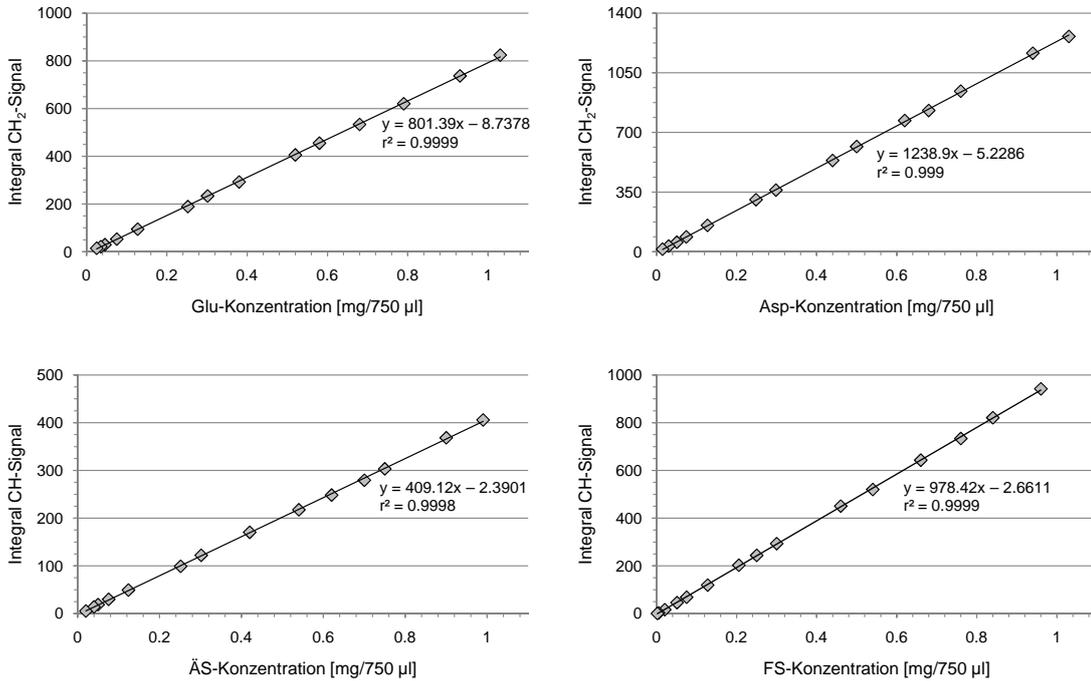


Abbildung 2.13: Graphische Darstellung der Signalfläche (Integral) gegen die Konzentration für die Verunreinigungen Glutamin-, Asparagin-, Äpfel- und Fumarsäure unter Angabe von Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß (r^2).

und Konzentration durch eine Gerade mit einem Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0.9996$ beschrieben. Aufgrund des linearen Zusammenhangs über einen großen Konzentrationsbereich wird die gleichzeitige quantitative Erfassung von Hauptkomponente und potentiellen Verunreinigungen in einem NMR-Experiment ermöglicht.

2.3.6. Quantitative Reinheitsprüfung auf Verwandte Substanzen

Herstellung der zu untersuchenden Alanin-Modellmischung

Die Eignung der quantitativen ¹H-NMR-Spektroskopie zur Reinheitsprüfung von Aminosäuren wurde anhand einer Alanin-Probe mit bekanntem Kontaminierungsgrad untersucht. Zur Herstellung dieser Alanin-Modellmischung wurden 19.94 g Alanin, 195.6 mg Glutaminsäure (0.98 %), 76.6 mg Asparaginsäure (0.39 %), 91.3 mg Äpfelsäure (0.46 %) und 81.9 mg Fumarsäure (0.41 %) eingewogen, in 200 ml Millipore-Wasser gelöst und anschließend mittels Sprühtrocknung in Pulverform überführt.

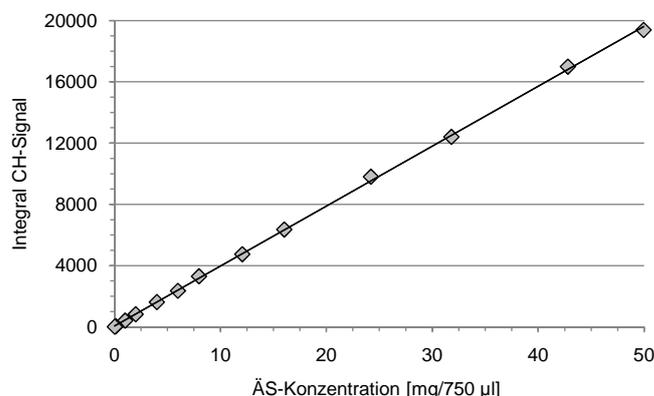


Abbildung 2.14: Graphische Darstellung der Signalfläche (Integral) gegen die Konzentration für die Verunreinigung Äpfelsäure über einen Konzentrationsbereich von 0.04–100 %.

Quantitative NMR-Analyse

Die quantitative Reinheitsprüfung der Aminosäure L-Alanin erfolgt durch die NMR-spektroskopische Bestimmung der Alanin-Modellmischung in den drei unterschiedlichen Lösungsmitteln D_2O bzw. Lösungsmittelgemischen D_2O -NaOD und D_2O -DCl (jeweils 9:1 (V/V)). Dazu wurden jeweils sechs unabhängige Einwaagen der zu analysierenden Probe (50 mg/750 μl) mittels Einfachbestimmung am 400 MHz-Spektrometer vermessen. Die wichtigsten Messparameter sind in Tabelle 2.4 angegeben. Dabei wurde die Scan-Anzahl so gewählt, dass die für die Integration herangezogenen Signale den Anforderungen der ICH-Richtlinie mit einer Bestimmungsgrenze von 0.03 % genügen.

Die quantitative Bestimmung der Verunreinigungen erfolgt ohne den Einsatz einer zertifizierten Referenzsubstanz. Der Signalfächenvergleich einer vollständig separierten Resonanz der jeweiligen Verunreinigung I_{VS} mit dem Methyl-Signal der Hauptkomponente Alanin I_{Ala} ermöglicht unter Berücksichtigung der Anzahl der Kerne N , die die Resonanzen hervorrufen, und des jeweiligen Molekulargewichtes M den quantitativen Reinheitsnachweis:

$$P_{\text{VS}} = \frac{I_{\text{VS}}}{I_{\text{Ala}}} \cdot \frac{N_{\text{Ala}}}{N_{\text{VS}}} \cdot \frac{M_{\text{VS}}}{M_{\text{Ala}}} \cdot 100 \% \quad (2.1)$$

Da unter Verwendung von D_2O als Lösungsmittel kein vollständig separiertes Signal für Asparaginsäure im Spektrum gefunden werden konnte, kann die quantitative

Tabelle 2.4: Messparameter.

Spektrometer	Bruker Avance 400 MHz
NMR-Messkopf	BBO-Messkopf
Temperatur	300 K
Datenpunkte	64 K
Impuls	90°
Akquisitionszeit	5.86 s
Relaxation Delay	44.86 s (D ₂ O)
	55.86 s (D ₂ O-NaOD, 9:1 (V/V))
	57.86 s (D ₂ O-DCl, 9:1 (V/V))
Spektrale Breite	14 ppm
Spektrale Auflösung	0.17 Hz/Punkt
Scan-Anzahl	128
<i>Lb</i> -Wert	0.3
Rotation	keine Rotation
Referenzierung	TSP-d ₄ -Signal = 0.00 ppm

Analyse dieser Verunreinigung auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Der Einsatz von ¹³C-Entkopplungsexperimenten ermöglicht durch die Eliminierung des störenden ¹³C-Satelliten aus dem Spektrum eine direkte Bestimmung von Asparaginsäure über die Integration des entsprechenden CH-Signals (Abbildung 2.15 a). Alternativ kann der Gehalt durch eine indirekte Bestimmung mittels Subtraktion der bekannten Signalfäche der CH-Resonanz der Äpfelsäure von der Gesamtpeakfläche der überlappenden CH₂-Signale von Asparagin- und Äpfelsäure bestimmt werden (Abbildung 2.15 b). Die quantitative Untersuchung der Alanin-Modellmischung liefert für beide Methoden vergleichbare Ergebnisse mit einer hohen Wiederfindungsrate von 95 % (¹³C-Entkopplung) bzw. 97 % (Differenz-Methode).

Die Quantifizierung der Verwandten Substanzen in der Alanin-Modellmischung beim Einsatz von D₂O als Lösungsmittel zeigt mit einer Wiederfindungsrate von mindestens 96 % eine geringe relative Abweichung zum tatsächlichen Gehalt der jeweiligen Verunreinigung (siehe Tabelle 2.5). Beim Einsatz von Lösungsmitteln mit stark basischem bzw. saurem pH-Wert wie NaOD bzw. DCl kann im entsprechenden NMR-Spektrum für jede Verunreinigung mindestens ein vollständig separiertes Signal zur direkten quantitativen Bestimmung gefunden werden (Abbildung 2.16).

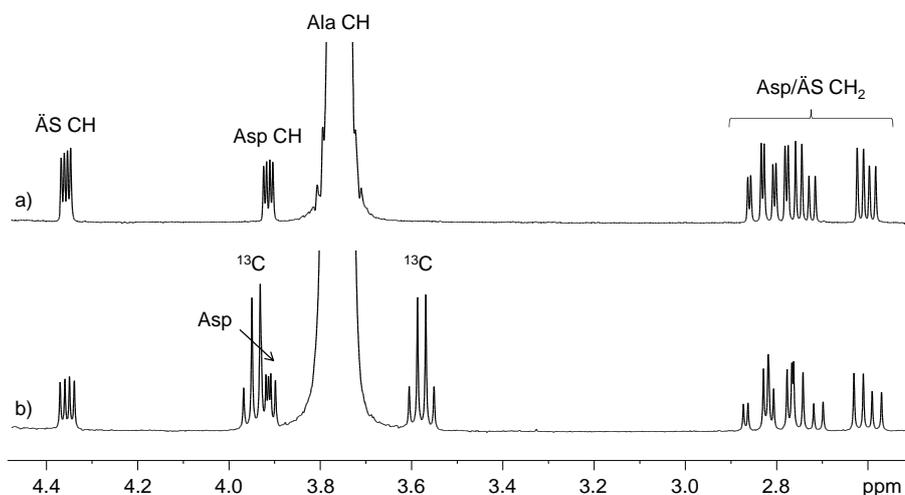


Abbildung 2.15: ^1H -NMR-Teilspektren der CH-Region der Alanin-Modellmischung bei 600 MHz mit ^{13}C -Entkopplung (a) bzw. 400 MHz ohne ^{13}C -Entkopplung (b). ^{13}C -Entkopplungsexperimente ermöglichen die Eliminierung der störenden ^{13}C -Satelliten (^{13}C) aus dem NMR-Spektrum und somit eine direkte Bestimmung von Asparaginsäure über die Integration der CH-Resonanz.

Die Ergebnisse der Reinheitsprüfung in NaOD- D_2O - bzw. DCl- D_2O -Lösungsmittelgemischen im Verhältnis 9:1 (V/V) liefern vergleichbare Ergebnisse zur quantitativen Analyse in D_2O und zeigen somit ebenfalls eine geringe relative Abweichung zum "wahren" Gehalt (Tabelle 2.5).

Alle drei Bestimmungsmethoden ermöglichen eine präzise Quantifizierung mit einer relativen Standardabweichung von deutlich unter 2%; der im Pharmabereich bei der Gehaltsbestimmung von Neben- und Abbauprodukten mit einem Gehalt von 1% bis 0.1% zulässige bzw. akzeptierte Richtwert der relativen Standardabweichung von maximal 10% [156] wird am vorliegenden Beispiel deutlich unterschritten. Vergleicht man die ermittelten Variationskoeffizienten mit der von Horwitz anhand zahlreicher Ringversuche entwickelten empirischen Gleichung für die maximal erwartete Streuung unter Wiederholbedingungen, wird die übliche relative Standardabweichung von 2.68% bzw. 3.79% bei einer Analytkonzentration von 1% bzw. 0.1% ebenfalls deutlich unterschritten [214].

NMR-Experimente in stark saurem Milieu erlauben eine zusätzliche experimentelle Überprüfung der Richtigkeit der Ergebnisse, da für die Verwandten Substanzen Glutamin-, Asparagin- und Äpfelsäure jeweils zwei vollständig separierte Resonanzen

Tabelle 2.5: Ergebnisse der quantitativen Analyse der Alanin-Modellmischung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel (D_2O) bzw. Lösungsmittelgemische (D_2O -NaOD und D_2O -DCl, jeweils 9:1 (V/V)). Angabe des tatsächlichen Gehalts der Verunreinigungen (Soll), des Mittelwertes (MW), der relativen Standardabweichung (RSD) und der Wiederfindungsrate (WF) von sechs unabhängigen NMR-Experimenten.

VS	Soll [%]	D_2O			D_2O -NaOD			D_2O -DCl		
		MW [%]	RSD [%]	WF [%]	MW [%]	RSD [%]	WF [%]	MW [%]	RSD [%]	WF [%]
Glu	0.98	0.98	0.66	100	0.98	0.78	100	0.97	0.33	99
Asp	0.39	0.38	1.33	97	0.39	1.89	100	0.37	0.38	95
ÄS	0.46	0.44	1.03	96	0.44	1.83	96	0.42	0.76	91
FS	0.41	0.41	0.14	100	0.41	0.20	100	0.41	0.33	100

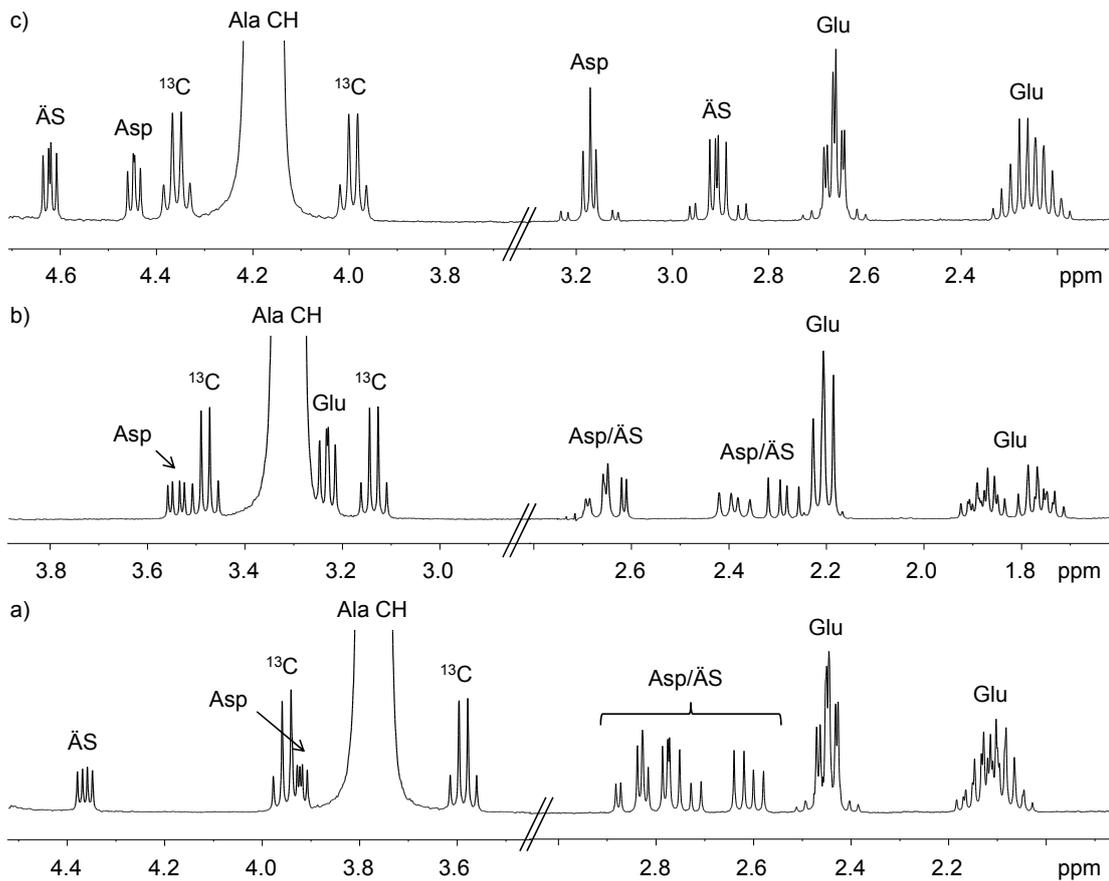


Abbildung 2.16: ^1H -NMR-Teilspektren der Alanin-Modellmischung in D_2O (a), D_2O -NaOD, 9:1 (V/V) (b) und D_2O -DCl, 9:1 (V/V) (c).

Tabelle 2.6: Überprüfung der Richtigkeit durch Integration und anschließenden Flächenvergleich zweier basisliniengetrennter Signale einer Verunreinigung. Angabe des Mittelwertes (MW) und der relativen Standardabweichung (RSD) von sechs unabhängigen NMR-Experimenten im D₂O-DCI-Gemisch, 9:1 (V/V).

Signal	CH ₂		CH	
	MW [%]	RSD [%]	MW [%]	RSD [%]
Glu (a)	0.98	0.33	nicht detektiert	
Glu (b)	0.98	0.20		
Asp	0.37	0.38	0.37	1.52
ÄS	0.42	0.76	0.42	1.38

im Spektrum integriert und somit quantitativ ausgewertet werden können (Abbildung 2.16 c). Die quantitative Bestimmung der drei Verunreinigungen liefert unter Berücksichtigung der CH₂- und CH-Signale gleiche Ergebnisse (siehe Tabelle 2.6).

2.4. Vergleich NMR-Spektroskopie versus HPLC

Um nun die Eignung der NMR-Spektroskopie im Rahmen der Reinheitsprüfung von Alanin auch für die routinemäßig durchgeführte Qualitätskontrolle aufzeigen zu können, soll im folgenden Abschnitt die qNMR-Methode mit einem zweiten, unabhängigen Verfahren, der HPLC,¹ verglichen und mögliche Vor- und Nachteile aufgezeigt werden.

2.4.1. HPLC-Methode

Zur Reinheitsprüfung von Alanin wird eine isokratische Trennmethode auf octadecylsilyliertem Säulenmaterial eingesetzt [213]. Die mobile Phase besteht aus einer Mischung von 1.5 mM Perfluoroheptansäure in Wasser und 1.5 mM Perfluoroheptansäure in Methanol im Verhältnis 96/4 (V/V). Die Verunreinigungen werden mit einer Intersil ODS-3-Säule (15 × 4.6 mm, 5 μm) bzw. Zorbax Eclipse XDB-C18-Säule (50 × 4.6 mm, 1.8 μm) bei einer Flussrate von 1.0 ml/min bzw. 0.5 ml/min und einer Temperatur von 30°C getrennt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe verschiedener

¹Die quantitative HPLC-Analytik wurde unter Leitung von Stefan Almeling in den Laboratorien des EDQM in Straßburg durchgeführt.

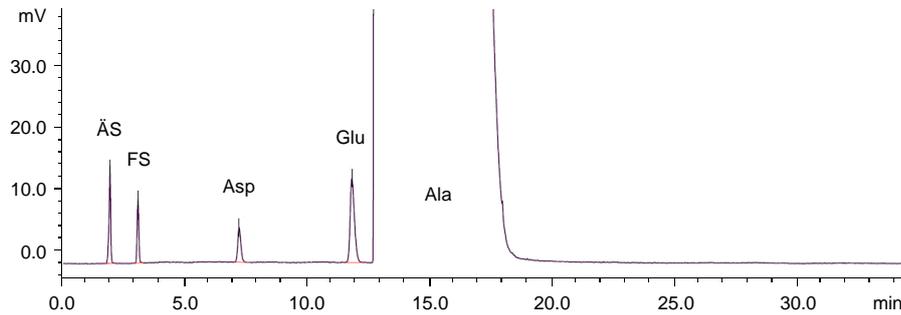


Abbildung 2.17: HPLC-Chromatogramm der Alanin-Modellmischung mit ELSD-Detektion.

Verdampfungsstreulichtdetektoren (“Corona Charged Aerosol Detector” (CAD), “Nano Quality Analyte Detector” (NQAD), “Evaporative Light Scattering Detector” (ELSD)) und einem massenselektiven Detektor (MS). Die Komponenten eluieren in folgender Reihenfolge: Äpfelsäure, Fumarsäure, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin (Abbildung 2.17). Die quantitative Bestimmung erfolgt mit Hilfe der Externen-Standard-Methode.

2.4.2. Vergleichskriterium Quantitative Analyse

In Tabelle 2.7 sind die mittels NMR-Spektroskopie und HPLC, gekoppelt mit verschiedenen Detektoren, ermittelten Ergebnisse zusammengefasst. Der Vergleich zeigt eine deutliche Übereinstimmung der Ergebnisse, die alle eine hohe Wiederfindungsrate zum tatsächlichen Gehalt aufweisen; einzig die quantitative Bestimmung der Fumarsäure zeigt beim Einsatz der HPLC-NQAD-Methode eine signifikante Abweichung, die zum Teil durch die starke Streuung der Ergebnisse der Einzelmessungen mit einer relativen Standardabweichung von 11.9% erklärt werden kann [213]. Beide Verfahren liefern richtige Ergebnisse und sind somit zur Reinheitsprüfung der Aminosäure geeignet.

Jedoch bietet die NMR-Spektroskopie gegenüber der HPLC im Rahmen der quantitativen Analyse einige Vorteile. Während für die quantitative Reinheitsprüfung von Alanin mittels ^1H -NMR-Spektroskopie der Zusatz eines Referenzmaterials nicht erforderlich ist (siehe Abschnitt 2.3.6), sind beim Einsatz der Flüssigkeitschromatographie geeignete Referenzsubstanzen nötig. Für die quantitative Analyse werden hier die

Tabelle 2.7: Vergleich der Reinheitsbestimmung der untersuchten Alanin-Modellmischung mittels quantitativer ^1H -NMR-Spektroskopie (qNMR) und HPLC gekoppelt mit unterschiedlichen Detektoren (NQAD, CAD, ELSD, MS) unter Angabe des Mittelwertes (MW) und der Wiederfindungsrate (WF).

VS	Soll [%]	qNMR		NQAD		CAD		ELSD		MS	
		MW [%]	WF [%]								
Glu	0.98	0.98	100	0.97	99	0.94	96	1.08	110	0.94	96
Asp	0.39	0.38	97	0.35	90	0.38	97	0.40	103	0.37	95
ÄS	0.46	0.44	96	0.45	98	0.46	100	0.43	93	0.40	87
FS	0.41	0.41	100	0.31	76	0.40	98	0.42	102	0.38	95

entsprechenden Externen Standards eingesetzt und mit Hilfe einer Einpunktkalibrierung bzw. durch das Erstellen einer Kalibriergeraden der Gehalt der jeweiligen Verunreinigung bestimmt [213]. Das Externe Standardisierungsverfahren bedingt somit den Einsatz teurer Standardsubstanzen mit bekannter Reinheit, eine aufwendige Probenvorbereitung mit einer Vielzahl an Verdünnungsschritten sowie eine Reihe zusätzlicher HPLC-Läufe, die beim Einsatz der NMR-Spektroskopie entfallen, da hier nur die zu untersuchende Probe am NMR-Spektrometer vermessen werden muss. Sind dagegen keine geeigneten Referenzsubstanzen erhältlich, müssen beim Einsatz der HPLC zusätzlich die entsprechenden Korrekturfaktoren bestimmt werden, um eine quantitative Auswertung über die Peakflächen zu ermöglichen. Die NMR-Spektroskopie bietet dagegen den Vorteil, dass aufgrund der direkten Proportionalität zwischen Intensität und Kernanzahl einer Resonanz auch andere Substanzen als der Analyt selbst potentielle Referenzsubstanzen darstellen; Korrekturfaktoren sind hier nicht erforderlich.

2.4.3. Vergleichskriterium Bestimmungsgrenze

Ein häufig in der Literatur diskutierter Nachteil der quantitativen NMR-Spektroskopie gegenüber konventionellen HPLC-Methoden ist ihre "Unempfindlichkeit" im Bereich der Reinheits- und Spurenanalytik. Der Vergleich der experimentell ermittelten Bestimmungsgrenzen von NMR-Spektroskopie und HPLC gekoppelt mit unterschiedlichen Detektoren zeigt jedoch, dass die Erfassung potentieller Verunreinigungen der

Tabelle 2.8: Bestimmungsgrenzen der potentiellen Verunreinigungen Glutamin-, Asparagin-, Äpfel- und Fumarsäure, experimentell ermittelt mittels NMR-Spektroskopie (qNMR) und HPLC gekoppelt mit unterschiedlichen Detektoren (NQAD, CAD, ELSD, MS).

VS	qNMR [%]	NQAD [%]	CAD [%]	ELSD [%]	MS [%]
Glu	0.02	0.04	0.008	0.30	0.0001
Asp	0.03	0.03	0.006	0.20	0.0001
ÄS	0.04	0.02	0.01	0.10	0.001
FS	0.004	0.02	0.01	0.20	0.005

Aminosäure L-Alanin auch mit Hilfe einer eher unempfindlichen spektroskopischen Methode wie der NMR-Spektroskopie in einem Konzentrationsbereich $\leq 1\%$ möglich ist (siehe Tabelle 2.8).

Die NMR-spektroskopisch ermittelte Bestimmungsgrenze der jeweiligen Verwandten Substanz liegt im vorliegenden Beispiel in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie für die HPLC-Methode mit NQAD-Detektion; die Anforderungen der ICH-Richtlinie werden hier für beide Verfahren erfüllt. Wie in Tabelle 2.8 dargestellt, ermöglicht die quantitative NMR-Spektroskopie im Vergleich zur HPLC-ELSD-Methode sogar eine um den Faktor 10 empfindlichere Bestimmung aller Verunreinigungen. Der Einsatz des CAD-Detektors weist im Vergleich zur NMR-Spektroskopie zwar eine bis um den Faktor 5 empfindlichere Erfassung der einzelnen Verunreinigungen auf, jedoch wird durch eine Erhöhung der Scan-Anzahl und/oder der Magnetfeldstärke (z. B. durch Einsatz eines 600 MHz-Spektrometers) auch mittels NMR-Spektroskopie die Quantifizierung im aufgeführten Konzentrationsbereich gewährleistet.

Die Bestimmungsgrenze wird beim Einsatz der ^1H -NMR-Spektroskopie neben den bereits erwähnten Einflussgrößen Einwaage, Scan-Anzahl und Magnetfeldstärke zudem von der Signalform und der Anzahl der Kerne, die die auszuwertende Resonanz hervorrufen, beeinflusst. Verunreinigungen, die im Spektrum ein scharfes Singulett zeigen, ermöglichen bei gleicher Kernanzahl in der Regel eine empfindlichere Detektion als Resonanzen mit Feinstruktur. Dieses Phänomen erklärt die empfindliche NMR-spektroskopische Bestimmung der Fumarsäure bis in Konzentrationsbereiche deutlich unter 0.01% , da diese Resonanz im Vergleich zu den anderen Verunreinigungen

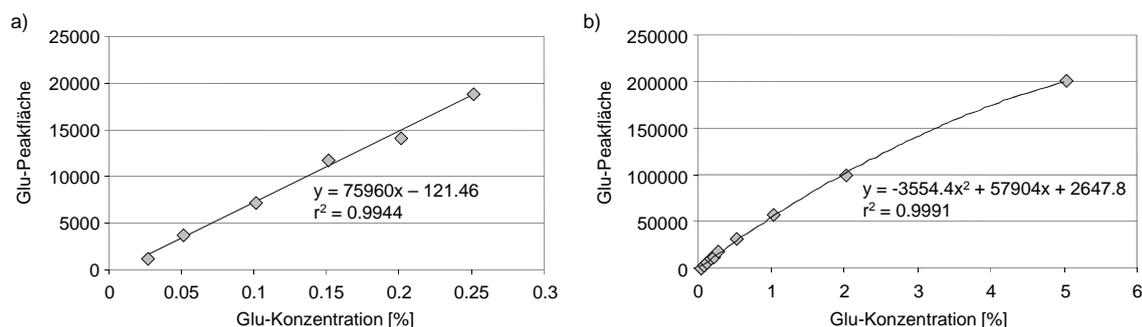


Abbildung 2.18: Überprüfung der Linearität der HPLC-NQAD-Methode am Beispiel der Glutaminsäure im Konzentrationsbereich von etwa 0,025–0,2% (a) und bei deutlich erhöhten Konzentrationen von bis zu 5% (b).

ein Singulett aufweist. Die entsprechende Bestimmungsgrenze liegt hier im Bereich des massenspezifischen Detektors (MS), der im allgemeinen eine sehr empfindliche Detektion erlaubt [213].

2.4.4. Vergleichskriterium Linearität

Während die lineare Abhängigkeit zwischen Signalfäche und Konzentration mittels NMR-Spektroskopie über einen weiten Konzentrationsbereich gewährleistet ist (siehe Abschnitt 2.3.5), muss für die HPLC-Methode der zulässige Arbeitsbereich beim Einsatz der verschiedenen Verdampfungsstreulichtdetektoren wie NQAD, CAD und ELSD im Rahmen der Methodvalidierung mit realen Proben sorgfältig bestimmt werden, da hier nur in einem definierten Konzentrationsbereich ein linearer Zusammenhang besteht [213].

Diese Problematik kann am Beispiel der Kalibrierkurve der Glutaminsäure mittels NQAD-Detektion deutlich aufgezeigt werden. Während für einen definierten Konzentrationsbereich von 2,5–20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine direkte Proportionalität zwischen der Peakfläche und der Glutaminsäure-Konzentration zu beobachten ist (Abbildung 2.18 a), ist bei deutlich erhöhten Glutaminsäure-Konzentrationen von bis zu 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der Übergang zu einer quadratischen Abhängigkeit zu erkennen (Abbildung 2.18 b); in diesem Konzentrationsbereich ist eine quantitative Bestimmung der Verunreinigungen mit hoher Richtigkeit nicht mehr gewährleistet. Dies gilt ebenfalls für die HPLC-Methode mit CAD-Detektion; für beide Detektoren besteht über einen Kon-

zentrationsbereich von etwa einer Zehnerpotenz eine lineare Abhängigkeit zwischen Konzentration und Peakfläche [213, 215]. Dieser begrenzte lineare Arbeitsbereich verhindert im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie die simultane quantitative Bestimmung von Hauptkomponente und potentiellen Verunreinigungen mit Hilfe eines Experimentes. Beim Einsatz des ELSD-Detektors wird zudem erst nach Logarithmierung der Peakfläche ein linearer Zusammenhang erhalten.

2.5. Zusammenfassung

Wie am vorliegenden Beispiel aufgezeigt werden konnte, eignet sich die quantitative NMR-Spektroskopie neben der Gehaltsbestimmung von Hauptkomponenten ebenfalls zur Prüfung auf Reinheit von Verwandten Substanzen geringer Konzentration. Im Vergleich zu den in der *L*-Alanin-Monographie beschriebenen Prüfmethode des Europäischen Arzneibuches [209] können mit der vorgeschlagenen ¹H-NMR-Methode alle zu erwartenden Verunreinigungen – Glutamin-, Asparagin-, Äpfel- und Fumarsäure – des heutzutage überwiegend eingesetzten Herstellungsverfahrens, der enzymatischen Synthese, im NMR-Spektrum identifiziert und quantitativ erfasst werden. Zudem konnte beim Einsatz der NMR-Spektroskopie ein deutlicher Empfindlichkeitsgewinn erzielt werden; die ermittelte Bestimmungsgrenze erfüllt mit einem LOQ $\leq 0.03\%$ die Vorgaben der ICH-Richtlinie Q3A(R2) für “Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung”. Die eher unspezifischen und unempfindlichen Arzneibuchmethoden erlauben hingegen keine vollständige Abdeckung des zu erwartenden Verunreinigungsprofils – Äpfelsäure und Fumarsäure können hier nicht detektiert werden – da diese Prüfverfahren vorwiegend auf die Detektion von Verunreinigungen synthetisch und aus Proteinhydrolysaten gewonnener Aminosäuren abzielen.

Der Vergleich der ¹H-NMR-Methode mit einer für den Routinebetrieb geeigneten Alanin-Reinheitsbestimmung mittels HPLC weist eine deutliche Übereinstimmung der Ergebnisse mit vergleichbaren Wiederholpräzisionen auf, die zudem eine hohe Wiederfindungsrate zum “wahren” Gehalt aufweisen, wodurch die Richtigkeit beider Methoden bestätigt werden konnte. Jedoch zeigt der Methodenvergleich auch einige Nachteile des chromatographischen Verfahrens im Vergleich zur NMR-spektroskopischen Bestimmung auf; zu nennen sind hier der Einsatz teurer, zertifizierter

Externer Standards, eine vergleichsweise aufwendige Probenvorbereitung, eine erhöhte Experimentanzahl für die quantitative Analyse sowie ein relativ schmaler linearer Arbeitsbereich, der die gleichzeitige quantitative Analyse von Hauptkomponente und potentieller Verunreinigungen in einem Experiment nicht erlaubt. Da beim Einsatz der NMR-Spektroskopie eine ähnlich empfindliche Erfassung der einzelnen Verunreinigungen wie mittels CAD- bzw. NQAD-Detektion und sogar im Vergleich zur HPLC-ELSD-Methode eine um den Faktor 10 kleinere Bestimmungsgrenze erreicht wird, macht dies den Einsatz der NMR-Spektroskopie auch für den Routinebetrieb attraktiv. Jedoch ist hier der Einsatz von Spektrometern hoher Magnetfeldstärke und/oder Kryomagneten zu empfehlen, da dann eine erhebliche Verkürzung der Messdauer pro Experiment gewährleistet wird.

3. Reinheitsprüfung von unfraktioniertem Heparin-Natrium

3.1. Aufgabenstellung

Heparine sind seit mehr als 70 Jahren das Mittel der Wahl in der Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Erkrankungen. Während anfangs ausschließlich unfraktionierte Heparine eingesetzt wurden, wird heutzutage – bedingt durch bessere pharmakokinetische Eigenschaften – den Niedermolekularen Heparinen (NMH) der Vorzug gegeben. Jedoch spielen die beiden unfraktionierten Heparine (UFH) – Heparin-Natrium und -Calcium – bis heute insbesondere als Antikoagulans in der Kardiologie und Herz-/Thoraxchirurgie sowie als Thromboseprophylaxe in der Intensivmedizin eine entscheidende Rolle [178, 216].

Ende 2007 stieg die Zahl der Meldungen über schwere allergieähnliche Reaktionen während der intravenösen Behandlung mit unfraktioniertem Heparin in den USA drastisch an; Anfang 2008 wurden zeitverzögert auch in Deutschland erste Verdachtsfälle gemeldet [217]. Betroffen waren in erster Linie herzkranken und Dialyse-Patienten, die im Rahmen der medizinischen Behandlung hohe Dosen Heparin erhalten hatten. Starker Blutdruckabfall und anaphylaktoide Symptome wie Hitzewallungen, Übelkeit, Bauchschmerzen, Juckreiz, Atembeschwerden und Ohnmacht waren die Folge [218]; in den USA wurden sogar Todesfälle gemeldet [219]. Die Gefahr wurde schnell erkannt, die Produktion von unfraktioniertem Heparin wurde bei betroffenen Firmen eingestellt und im Handel befindliche Heparin-Chargen wurden zurückgerufen; die Ursache blieb jedoch vorerst unbekannt, da alle Chargen den damals gültigen Anforderungen internationaler Arzneibücher (USP, Ph. Eur.) entsprachen. Auffällig war nur, dass die betroffenen Heparin-Muster alle aus China stammten, dem weltweit

größten Heparin-Produzenten. Verfahren wie Kapillarelektrophorese und Ionenpaar-Chromatographie lieferten erste Hinweise für einen Qualitätsmangel der Heparin-Chargen, da hier untypische und bis zu diesem Zeitpunkt teilweise unbekannte Peaks im Elektropherogramm detektiert wurden und verdächtige Proben nach Heparinase-Behandlung im Gegensatz zu reinem Heparin nicht vollständig abgebaut werden konnten [220]. ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren verdächtiger Heparin-Proben zeigten ebenfalls zusätzliche Signale, die nicht der Hauptkomponente Heparin zugeordnet werden konnten. Im März 2008 gelang es der Gruppe um Guerrini et al., die Identität der unbekanntes Verunreinigung mittels ein- und zweidimensionaler NMR- sowie LC-MS-Verfahren aufzuklären [35]. Übersulfatiertes Chondroitinsulfat, auch kurz als OSCS bezeichnet, wurde als Kontaminante identifiziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll nun unter Einsatz NMR-spektroskopischer Verfahren eine selektive und empfindliche Methode zur zuverlässigen Bestimmung kontaminierter Heparin-Proben entwickelt werden; der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Identifizierung und quantitativen Analyse von OSCS und weiteren natürlich vorkommenden Glykosaminoglykan-Verunreinigungen wie Dermatansulfat. Des Weiteren soll die Eignung der NMR-Spektroskopie im Vergleich zu gültigen Arzneibuchprüfungen des Ph. Eur. 6.0 und neuer, selektiver Nachweismethoden wie HPLC, Kapillarelektrophorese, IR- und Raman-Spektroskopie im Rahmen einer umfangreichen Untersuchung von 145 Chargen Heparin-Natrium, vorwiegend aus dem deutschen Markt, überprüft und bewertet werden.

3.2. Struktur, Eigenschaften und Wirkung von Heparin

Bei Glykosaminoglykanen (GAG) handelt es sich um natürlich vorkommende sulfatierte Polysaccharide, welche aus polydispersen, linear verknüpften Disaccharid-Einheiten aufgebaut sind. Diese Disaccharid-Einheiten enthalten jeweils einen Aminozucker – D-Glucosamin- oder D-Galactosamin-Derivate – und mindestens eine der beiden Zuckereinheiten ist aufgrund von anwesenden Sulfat- oder Carboxylgruppen negativ geladen. In Abhängigkeit der vorherrschenden Disaccharid-Einheit unterscheidet man zwischen sechs verschiedenen GAG-Typen: Heparin (Hep), Dermatansulfat (DS),

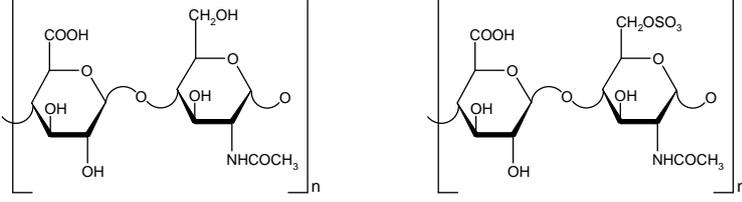
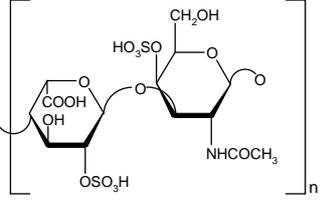
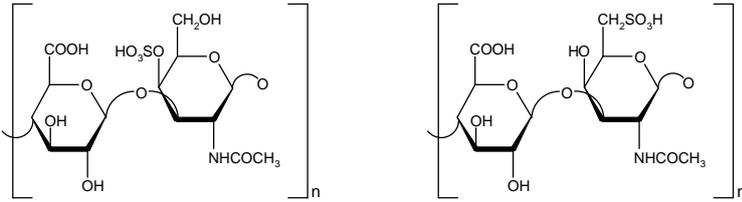
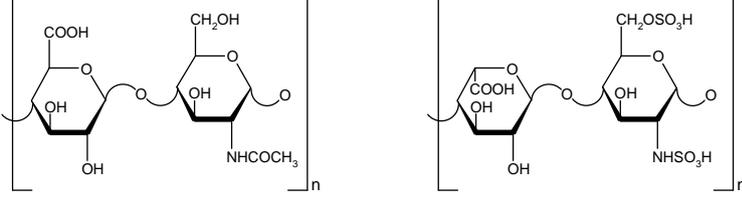
Chondroitinsulfat (CS), Hyaluronsäure (HA), Heparansulfat (HS) und Keratansulfat (KS) (siehe Tabelle 3.1). Aufgrund der strukturellen Diversität der Substanzklasse werden jedoch neben diesen “idealisierten” Grundeinheiten vielfältige Varianten, die sich im Sulfatgehalt und Sulfatierungsmuster, der Acetylierung des Aminozuckers und dem Uronsäuretyp unterscheiden, beobachtet.

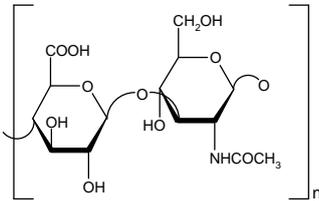
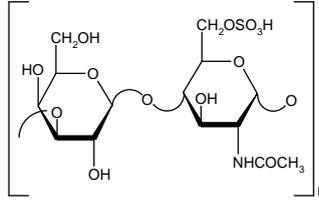
Heparin ist ein polydisperses Gemisch heterogener GAG-Moleküle, in welchem 10 verschiedene Monosaccharide vorkommen.¹ Die Disaccharid-Grundeinheit besteht jeweils aus einem Molekül Glucosamin und einem Molekül Uronsäure ([Uronsäure (α -1 \rightarrow 4)-D-Glucosamin]_n). Die Uronsäure liegt hier zu etwa 70 % als L-Iduronsäure und zu etwa 30 % als D-Glucuronsäure vor. Die wichtigste Disaccharid-Grundeinheit des Heparins setzt sich aus (1 \rightarrow 4)-verknüpfter α -L-Iduronsäure-2-O-sulfat und α -D-Glucosamin-N,2-disulfat zusammen. Daneben findet man eine Disaccharid-Einheit aus β -D-Glucuronsäure und N-Acetyl- α -D-Glucosamin (siehe Tabelle 3.1). Heparin weist von allen Glykosaminoglykanen den höchsten Sulfatierungsgrad auf; auf eine Tetrasaccharid-Einheit entfallen etwa 4 bis 5 Schwefelsäurereste. Als Bandbreite für das Molekulargewicht wird $M_r = 5\text{--}30$ kDa angegeben; die mittlere Molekularmasse liegt bei etwa $M_r = 13$ kDa [216, 221].

Heparin besitzt unter physiologischen Bedingungen die Fähigkeit, als hochgeladenes Polyanion an positiv geladene Strukturen zu binden und somit mit einer Vielzahl an Proteinen und Zellen zu interagieren; diese Wechselwirkungen bilden die Grundlage für die vielfältigen biologischen Aktivitäten dieses Glykosaminoglykans. Dass es sich hierbei nicht nur um unselektive Interaktionen handelt, zeigt beispielsweise die charakteristische Pentasaccharidsequenz, die für die Bindung an Antithrombin III und folglich für dessen Konformationsänderung und Aktivierung erforderlich ist und damit für die Faktor Xa- und thrombinhemmende Wirkung verantwortlich ist [178, 216]. Essentielles Strukturmerkmal für die Antithrombinvermittelte antikoagulatorische Aktivität ist u. a. das maximal sulfatierte Monomer α -D-Glucosamin-N,2,6-trisulfat [216]. Daneben spielen die Flexibilität der Iduronsäure sowie die Anzahl der Sulfatgruppen pro Disaccharid-Einheit eine zentrale Rolle für die antikoagulatorische Wirkung von Heparin, da hierdurch die Bindungsaffinität

¹Die strukturelle Variabilität von Heparin beruht auf 10 verschiedenen Monomeren: GlcNAc / GlcN / GlcNAc6S / GlcN2S / GlcN2S,6S / GlcN2S,3S,6S / GlcA / GlcA2S / IdoA / IdoA2S (IdoA: Iduronsäure, GlcA: Glucuronsäure, GlcN: Glucosamin).

Tabelle 3.1: Grundstrukturen der sechs verschiedenen Glykosaminoglykan-Typen mit den jeweiligen charakteristischen Disaccharid-Einheiten, die aus Iduronsäure (IdoA), Glucuronsäure (GlcA), Glucosamin (GlcN) bzw. Galactosamin (GalN) aufgebaut sind [216]. Für Heparin und Heparansulfat sind jeweils zwei charakteristische Disaccharid-Einheiten aufgeführt, da diese sich nur unzureichend mit einer einzelnen Disaccharid-Einheit beschreiben lassen.

Glykosaminoglykan	Struktur & Disaccharid-Grundeinheiten
Heparin	 <p data-bbox="683 862 1252 929">[4]-α-L-IdoA2S-(1\rightarrow4)-α-D-GlcN2S,6S-(1\rightarrow) [4]-β-D-GlcA2S-(1\rightarrow4)-α-D-GlcNAc6S-(1\rightarrow)</p>
Dermatansulfat	 <p data-bbox="683 1198 1252 1243">[4]-α-L-IdoA2S-(1\rightarrow3)-β-D-GalNAc4S-(1\rightarrow)</p>
Chondroitinsulfat	 <p data-bbox="651 1500 1268 1579">CS A: [4]-β-D-GlcA-(1\rightarrow3)-β-D-GalNAc4S-(1\rightarrow) CS C: [4]-β-D-GlcA-(1\rightarrow3)-β-D-GalNAc6S-(1\rightarrow)</p>
Heparansulfat	 <p data-bbox="699 1848 1236 1915">[4]-β-D-GlcA-(1\rightarrow4)-α-D-GlcNAc-(1\rightarrow) [4]-α-L-IdoA-(1\rightarrow4)-α-D-GlcN2S,6S-(1\rightarrow)</p>

Glykosaminoglykan	Struktur & Disaccharid-Grundeinheiten
Hyaluronsäure	 <p data-bbox="659 613 1161 647">[4]-β-D-GlcA-(1\rightarrow3)-β-D-GlcNAc-(1\rightarrow)</p>
Keratansulfat	 <p data-bbox="659 920 1161 954">[3]-β-D-Gal-(1\rightarrow4)-β-D-GlcNAc6S-(1\rightarrow)</p>

zu Gerinnungsproteinen beeinflusst wird [222].

Die antikoagulatorische Wirkung von Heparin beruht auf der Antithrombin-vermittelten Hemmung von Thrombin und Faktor Xa [223, 224]. Antithrombin III selbst besitzt eine hohe Affinität, mit Gerinnungsfaktoren Komplexe zu bilden, reagiert aber sehr langsam. Bindet nun Antithrombin III an die essentielle, spezifische Pentasaccharidstruktur von Heparin, wird die Hemmung von Thrombin und Faktor Xa um ein Vielfaches beschleunigt; Heparin übernimmt hier die Aufgabe eines Katalysators. Während für die Hemmung von Thrombin die Ausbildung eines ternären Komplexes aus Heparin, Antithrombin III und Thrombin erforderlich ist, ist für die Inaktivierung von Faktor Xa lediglich die Bindung von Heparin an Antithrombin III notwendig. Aus sterischen Gründen erfolgt die Bildung des ternären Komplexes nur, wenn das verabreichte Heparin-Molekül eine Kettenlänge von mehr als 18 Monosacchariden besitzt [178]; Heparin fungiert somit als Plattform für die Reaktion zwischen Thrombin und seinem Inhibitor Antithrombin III. Neben der Antithrombin-abhängigen Inhibition von Thrombin katalysiert Heparin die Heparin-Cofaktor-II-vermittelte Thrombinhemmung, die direkte Inaktivierung des Gerinnungsfaktors IXa sowie die Komplexbildung freier Calciumionen.

3.3. Gewinnung von Heparin-Natrium und mögliche Verunreinigungen

Heparin ist in einer Vielzahl von Organen enthalten; beachtliche Konzentrationen des Antikoagulans weisen v. a. Darmmukosa, Lunge, Leber, Thymus, Milz und Herz auf. Gebildet wird Heparin ausschließlich in den Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten; gespeichert wird es bis zu seiner Freisetzung in den Granula.

Laut Ph. Eur. kann pharmazeutisch eingesetztes Heparin aus den Lungen von Rindern oder aus den Intestinalschleimhäuten von Rindern, Schweinen oder Schafen gewonnen werden [225]. Seit Beginn der BSE-Krise (“**bovine spongiforme Enzephalopathie**”) wird Heparin, das als Arzneimittel verwendet werden soll, jedoch ausschließlich aus Schweineschlachtabfällen gewonnen, um so eine potentielle Kontaminierung mit TSE-Erregern (“**transmissible spongiforme encephalopathies**”) zu vermeiden [216].

Bis auf wenige Veröffentlichungen oder Patentanmeldungen, die v. a. allgemeine Arbeitsabläufe der Isolierung bzw. Reinigung umfassen, sind keine detaillierten Prozessabläufe für die Heparinengewinnung bekannt [226]. Die Gewinnung von Heparin pharmazeutischer Qualität erfolgt je nach Hersteller nach einem individuellen Protokoll; im Allgemeinen umfasst es vier wesentliche Schritte: (1) Extraktion der Darmmukosa, (2) Isolierung von Rohheparin mittels Alkoholfällung, (3) Reinigung des Rohheparins durch Proteinfällung, Bleichen und Entkeimen mit oxidierenden Reagenzien, (4) Isolierung von API-Heparin nach Kationenaustausch und Ultrafiltration [226, 227]. Das so gewonnene Heparin zeichnet sich durch eine beträchtliche Variabilität in seiner Struktur aus, da die Zusammensetzung der komplexen GAG-Mischung stark von Rasse, Herkunft, Haltungsbedingungen, Präparation des Ausgangsmaterials und den eingesetzten Methoden zur Isolierung und Reinigung beeinflusst wird [216].

Das Verunreinigungsprofil ist stark vom Prozess der Heparinengewinnung abhängig; neben Substanzen, die während der Extraktion, Isolierung und Reinigung eingesetzt werden, findet man in erster Linie weitere Nebenprodukte des Rohheparins; zu nennen sind hier andere GAG wie Dermatansulfat, Chondroitinsulfat A/C, Heparansulfat, Hyaluronsäure etc. sowie Proteine und Nukleinsäuren [227–229]. Als Hauptverunreinigung in API-Heparin wird Dermatansulfat beschrieben [230]; dessen

Verunreinigungsgrad ist abhängig von der Qualität des Reinigungsprozesses. Daneben findet man Lösungsmittel wie Ethanol, Aceton und Methanol, die vorwiegend zur Fällung und Isolierung der GAG eingesetzt werden [231, 232].

3.4. Übersulfatiertes Chondroitinsulfat als Kontaminante von Heparin

Übersulfatiertes Chondroitinsulfat (OSCS) besteht aus alternierenden β -D-Glucuronsäure- und N-Acetyl- β -D-Galactosamineinheiten und ist im Vergleich zu anderen, natürlich vorkommenden Glykosaminoglykanen stärker negativ geladen, da alle vier Hydroxylgruppen der Disaccharid-Einheit sulfatiert sind (siehe Abbildung 3.1). Während Chondroitinsulfat A als Synthesausgangsstoff kaum antikoagulatorische und antithrombotische Aktivität besitzt, kann eine beträchtliche Aktivitätssteigerung erzielt werden, wenn, wie am Beispiel des übersulfatierten Chondroitinsulfats, partielsynthetisch zusätzliche Sulfatgruppen in das CS-Molekül eingeführt werden [233], da dann die 2,3-disulfatierte Glucuronsäure von OSCS eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit der Iduronsäure-Einheit in Heparin besitzt und somit die Interaktion mit Gerinnungsproteinen erleichtert wird [222].

Übersulfatiertes Chondroitinsulfat hemmt, wie auch Heparin, die Blutgerinnung, jedoch werden auf mechanistischer Ebene Unterschiede beobachtet. Während Heparin als Katalysator des endogenen Faktor Xa- und Thrombin-Inhibitors Antithrombin III wirkt, hemmt OSCS Thrombin, indem es die Geschwindigkeit der Reaktion des endogenen Thrombin-Inhibitors Heparin-Cofaktor-II (HCII) mit Thrombin um ein Vielfaches erhöht [222]. Zudem wird bei Verabreichung von OSCS-kontaminiertem Heparin eine Beeinflussung des fibrinolytischen Systems beobachtet, da durch OSCS die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin erfolgt; dies erklärt die deutlich erhöhte Blutungsgefahr bei Patienten, die mit kontaminierten Heparin-Chargen behandelt wurden [234]. Die beobachteten akuten Nebenwirkungen, wie starker Blutdruckabfall und anaphylaktoide Reaktionen, werden durch die OSCS-vermittelte Aktivierung von Proteinen des Kallikrein-Kinin- und Komplementsystems hervorgerufen (siehe Abbildung 3.2). Während Heparin und OSCS beide den Faktor XII binden, interagiert einzig OSCS mit dem aktivierten Faktor XIIa, der die Hydrolyse von Präkallikrein

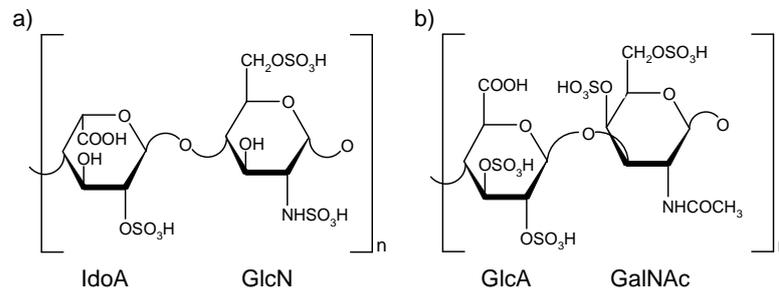


Abbildung 3.1: Chemische Struktur der charakteristischen Disaccharid-Einheiten von Heparin (a) und OSCS (b).

(PK) in Kallikrein (KK) stimuliert, welches dann die Hydrolyse von Kininogen (HMWK) und somit die Bildung des Vasodilatators Bradykinin (BK) anregt [218, 222, 235]. Aufgrund der fehlenden Ausbildung des FXIIa-PK-HMWK-Komplexes mit Heparin wird während der Heparin-Therapie keine erhöhte Bradykinin-Freisetzung beobachtet. Zudem induziert OSCS über die Aktivierung des Faktors XIIa die Synthese von Kallikrein und somit die Bildung der Anaphylatoxine C3a und C5a; hier handelt es sich um proinflammatorisch wirkende Fragmente der Komplementproteine C3 und C5, wodurch die auftretenden anaphylaktoiden Reaktionen erklärt werden können [218, 222].

3.5. ¹H-NMR-Spektroskopie

Bereits in der Vergangenheit konnte die Eignung der NMR-Spektroskopie zur strukturellen Charakterisierung von Glykosaminoglykanen mit Hilfe ein- und zweidimensionaler NMR-Techniken belegt werden [230, 232, 236–240]. Das ¹H-NMR-Spektrum dient hier nicht nur zur Überprüfung der Identität einzelner GAG wie beispielsweise Heparin, sondern ermöglicht zudem über den charakteristischen Fingerprint-Bereich eine Unterscheidung zwischen Natrium- und Calciumsalz sowie Schweine- und Rinder-Heparin [230, 232, 236, 238]. Da bereits kleine Variationen in Sulfatierungsgrad, Disaccharid-Grundkörper bzw. Substituenten-Muster die chemische Verschiebung charakteristischer ¹H-NMR-Signale stark beeinflussen, bietet die ¹H-NMR-Spektroskopie eine zuverlässige Unterscheidung komplexer GAG-Mischungen [241]. So kann beispielsweise die natürlich vorkommende Heparin-Verunreinigung Dermatansulfat über

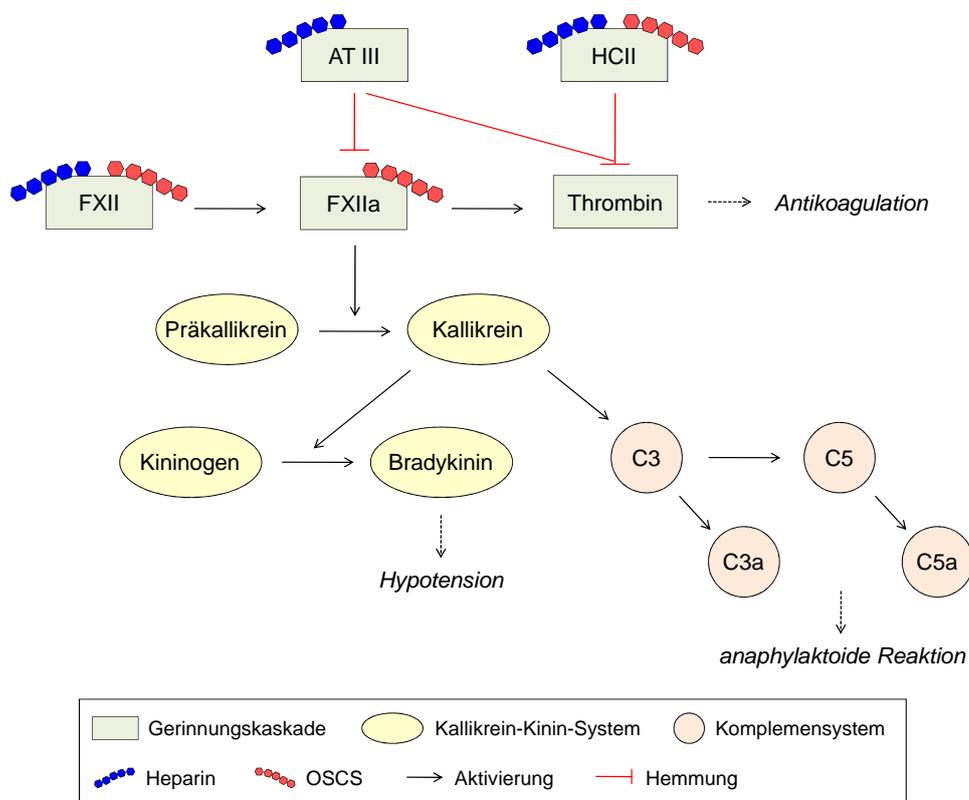


Abbildung 3.2: Einfluss von OCS auf die Gerinnungskaskade, das Kallikrein-Kinin-System und das Komplementsystem.

ihr N-Acetyl-Signal im ¹H-NMR-Spektrum in Anwesenheit von Heparin identifiziert werden [230, 232, 236].

3.5.1. Identifizierung von Glykosaminoglykan-Verunreinigungen

Die ¹H-NMR-Spektroskopie bietet als einfach durchzuführendes Screening-Verfahren die Möglichkeit, mit einem Experiment die Identität der zu analysierenden Heparin-Probe durch die Anwesenheit charakteristischer ¹H-NMR-Signale nachzuweisen, wobei gleichzeitig auch eine Aussage über die Qualität der Probe getroffen werden kann. Unter Aufnahme der jeweiligen Einzelspektren sowie durch “Spiking-Experimente” der drei Verunreinigungen Chondroitinsulfat A/C, Dermatansulfat und OCS zur Hauptkomponente Heparin wird eine eindeutige Signalzuordnung der Komponenten gewährleistet. Die charakteristische N-Acetyl-Region im Bereich von $\delta = 2.0\text{--}2.2$ ppm

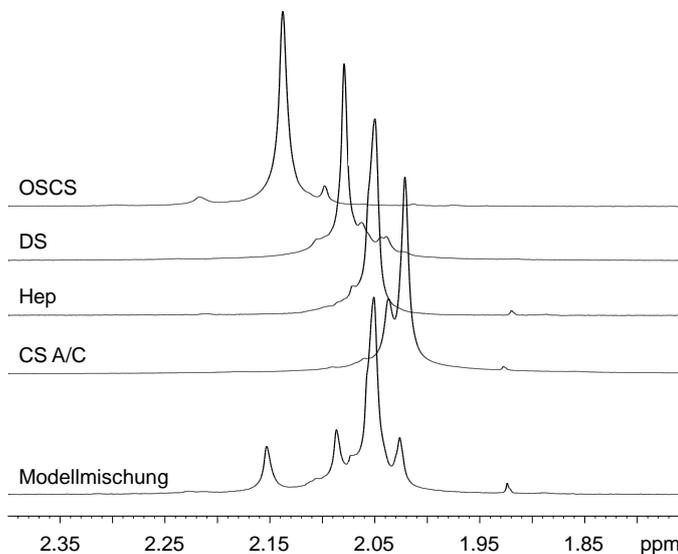


Abbildung 3.3: ^1H -NMR-Teilspektrum der N-Acetyl-Region einer Heparin-Modellmischung, gespiknt mit Chondroitinsulfat A/C (CS A/C), Dermatansulfat (DS) und übersulfatiertem Chondroitinsulfat (OSCS), sowie deren entsprechende Einzelteilspektren.

ermöglicht, wie in Abbildung 3.3 dargestellt, eine eindeutige Unterscheidung zwischen Heparin, Chondroitinsulfat A/C, Dermatansulfat und OSCS. Die entsprechenden N-Acetyl-Resonanzen liegen im ^1H -NMR-Spektrum bei $\delta = 2.05$ ppm für Heparin, $\delta = 2.04$ ppm für Chondroitinsulfat A/C, $\delta = 2.08$ ppm für Dermatansulfat sowie $\delta = 2.15$ ppm für OSCS. In realen Heparin-Mustern können, bedingt durch den Anisotropie-Effekt der Sulfatgruppen, geringfügige Abweichungen von etwa ± 0.01 ppm in den oben angegebenen chemischen Verschiebungen beobachtet werden.

Der Fingerprintbereich ($\delta = 3\text{--}6$ ppm) ist dagegen durch starke Signalüberlagerungen breiter Resonanzen gekennzeichnet (Abbildung 3.4) und scheint deshalb auf den ersten Blick für die Reinheitsprüfung ungeeignet zu sein; die in internationalen Arzneibüchern beschriebene Identitätsprüfung von Heparin vernachlässigt diesen Spektrenbereich vollständig und konzentriert sich bezüglich der Identifizierung potentieller Verunreinigungen einzig auf die N-Acetyl-Region [242, 243]. Eigene Experimente zeigen, dass die eindeutige Identifizierung potentieller Verunreinigungen jedoch auch über Resonanzen des Fingerprintbereichs erzielt werden kann. So ermöglicht beispielsweise die Erhöhung der Messtemperatur um mindestens 15 K, die eine Hochfeldverschiebung des Wassersignals relativ zu den anderen Resonanzen zur Folge

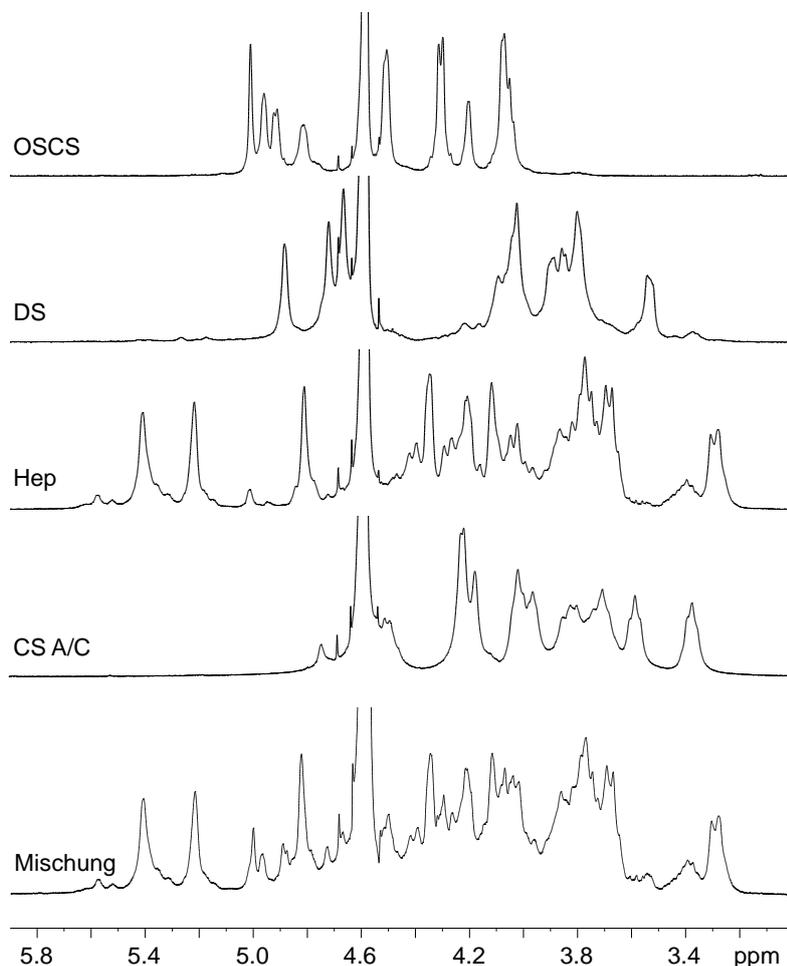


Abbildung 3.4: $^1\text{H-NMR}$ -Teilspektrum des Fingerprint-Bereichs einer Heparin-Modellmischung, gespikt mit Chondroitinsulfat A/C (CS A/C), Dermatansulfat (DS) und übersulfatiertem Chondroitinsulfat (OSCS), sowie deren entsprechende Einzelspektren.

hat (siehe Einleitung, Abschnitt 2.4.5), vor allem im Bereich von $\delta = 4.4\text{--}5.1$ ppm eine eindeutige Identifizierung von OSCS und Dermatansulfat [36].

Potentielle Verunreinigungen, wie beispielsweise übersulfatiertes Alginat oder N-sulfatierte Heparinoid-Derivate, die kein charakteristisches Signal im N-Acetyl-Bereich aufzeigen, und Verunreinigungen wie Heparansulfat oder Hyaluronsäure, deren charakteristische N-Acetyl-Resonanz ebenfalls eine chemische Verschiebung von $\delta = 2.05$ ppm aufweist, können mit dieser $^1\text{H-NMR}$ -Methode in Heparin-Proben jedoch nicht identifiziert werden [236, 244, 245].

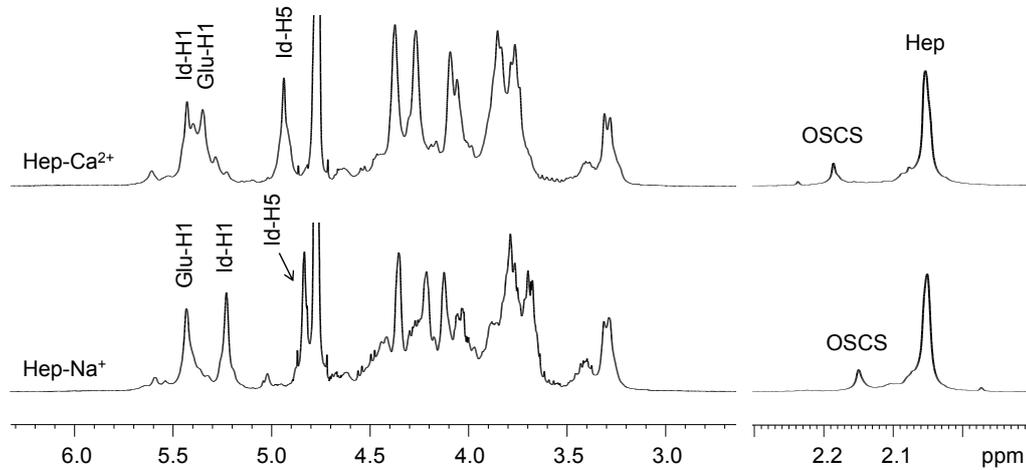


Abbildung 3.5: ¹H-NMR-Spektren von Heparin-Natrium (Hep-Na⁺) und Heparin-Calcium (Hep-Ca²⁺). Die beiden Salze lassen sich NMR-spektroskopisch v. a. aufgrund ihres unterschiedlichen Fingerprints im Bereich von $\delta = 4.8\text{--}5.6$ ppm deutlich voneinander unterscheiden. Zudem wird für OSCS-kontaminierte Proben eine Tieffeldverschiebung der charakteristischen N-Acetyl-Resonanz der Kontaminante beobachtet.

Das Europäische Arzneibuch beschreibt neben dem therapeutisch überwiegend eingesetzten Heparin-Natrium auch das entsprechende Calcium-Salz. Die ¹H-NMR-Spektroskopie ermöglicht eine eindeutige Differenzierung zwischen Heparin-Natrium und -Calcium, da im Fingerprintbereich zwischen $\delta = 4.8\text{--}5.6$ ppm deutliche Unterschiede erkennbar sind [238, 246]; wie eigene Experimente zeigen, werden die Signale der beiden Iduronsäureprotonen H1 und H5 in Anwesenheit von Calcium-Ionen tieffeldverschoben (siehe Abbildung 3.5). Da die chemische Verschiebung vom Gegenion beeinflusst wird, werden in Heparin-Calcium-Proben für potentielle Verunreinigungen zum Teil signifikante Signalverschiebungen beobachtet. Während die charakteristische N-Acetyl-Resonanz von OSCS in Heparin-Natrium-Proben eine chemische Verschiebung von $\delta = 2.15$ ppm aufweist, wird die entsprechende Resonanz in Anwesenheit von Calcium-Ionen tieffeldverschoben; die chemische Verschiebung beträgt hier $\delta = 2.18 \pm 0.01$ ppm (siehe Abbildung 3.5). Diese Signalverschiebung muss im Rahmen der Identitäts- und Reinheitsprüfung weiterer Ca²⁺-haltiger Heparin-Derivate wie dem Niedermolekularen Heparin Nadroparin ebenfalls beachtet werden [247]. Für Heparin, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat wird hingegen keine Tieffeldverschiebung der N-Acetyl-Resonanz beobachtet [247].

3.5.2. Nachweisgrenze

Die NMR-Spektroskopie hat sich als Methode der Wahl zur Aufdeckung kontaminierter Heparin-Proben erwiesen, da mit Hilfe der N-Acetyl-Resonanzen eine selektive Erfassung natürlich vorkommender und synthetisch hergestellter Verunreinigungen gewährleistet werden kann. Für die Arzneimittelsicherheit von Heparin ist die Nachweisgrenze der Methode von entscheidender Bedeutung, da nur empfindliche Verfahren die Detektion geringer Verunreinigungsmengen ermöglichen und somit eine angemessene Qualität der APIs sichergestellt wird.

Für die experimentelle Ermittlung der Nachweisgrenze von OSCS wurden verschiedene Modellmischungen mit definierter Konzentration an OSCS (0.05 bis 1 %) in Anwesenheit der Hauptkomponente Heparin (25 mg/700 μl) NMR-spektroskopisch vermessen (Messparameter siehe Tabelle 3.2), bis das entsprechende N-Acetyl-Signal bei $\delta = 2.15$ ppm nicht mehr im ^1H -NMR-Spektrum detektiert werden konnte. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, ist für eine OSCS-Konzentration von etwa 0.1 % ein N-Acetyl-Signal sichtbar, welches eine zum ^{13}C -Satelliten der Hauptkomponente ähnliche Signalintensität aufweist; das Signal-Rausch-Verhältnis dieser Resonanz liegt hier bei etwa $S/N \approx 5 : 1$. Die Fingerprint-Signale bestimmter Galactosamin- und Glucosaminprotonen (Gal-4, Gluc-1/3) ermöglichen ebenfalls eine Detektion von OSCS, jedoch werden hier aufgrund breiter, teilweise überlappender GAG-Resonanzen nur stärker kontaminierte Heparin-Proben erfasst.

Das charakteristische N-Acetyl-Signal bei $\delta = 2.15$ ppm erlaubt somit eine selektive und empfindliche Detektion von OSCS in Anwesenheit der Hauptkomponente Heparin. Die Behauptung der FDA, dass nur beim Einsatz von NMR-Spektrometern mit einer Magnetfeldstärke von mindestens 500 MHz eine empfindliche Identifizierung der synthetisch hergestellten Kontaminante gewährleistet wird [248], konnte durch eigene Experimente widerlegt werden. Unabhängig von der Feldstärke des eingesetzten NMR-Spektrometers kann bei einem Signal-Rausch-Verhältnis der N-Acetyl-Resonanz der Hauptkomponente von $S/N \geq 1200:1$ zwischen sauberen und mit 0.1 % OSCS-kontaminierten Heparin-Proben unterschieden werden; beim Einsatz von 400 MHz-Spektrometern ist das Akkumulieren von 128 Scans erforderlich [36]. Wird die Reinheitsprüfung an einem 600 MHz-Gerät durchgeführt, wird der Einsatz von ^{13}C -Entkopplungsexperimenten empfohlen, da hier das OSCS-Signal und der

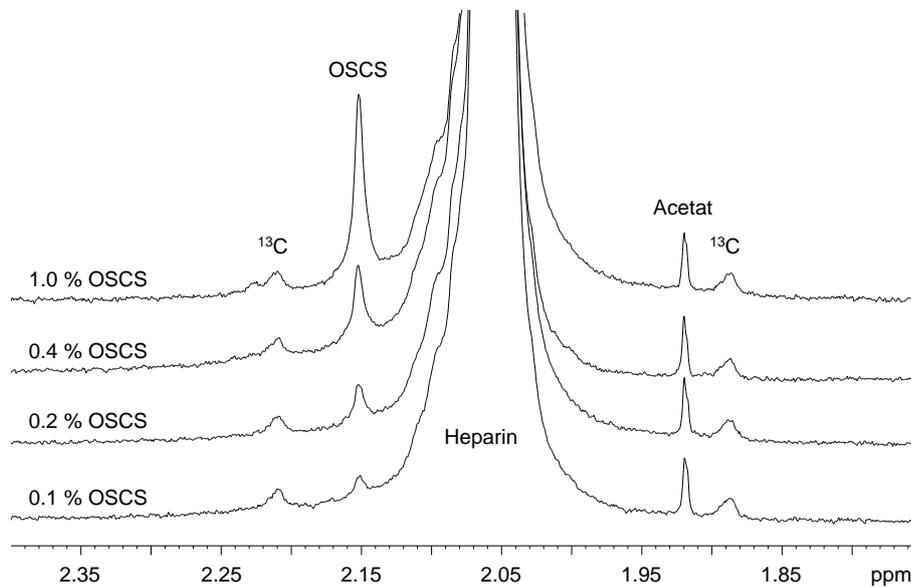


Abbildung 3.6: ^1H -NMR-Teilspektrum der N-Acetyl-Region von Heparin-Modellmischungen mit unterschiedlichem OSCS-Kontaminierungsgrad (0.1 bis 1 %) in D_2O ; (128 Scans, 400 MHz, 315 K).

Tabelle 3.2: Messparameter.

Spektrometer	Bruker Avance 400 MHz
NMR-Messkopf	BBO-Messkopf
Temperatur	315 K
Datenpunkte	64 K
Impuls	90°
Akquisitionszeit	6.84 s
Relaxation Delay	$7.84 \text{ s} \rightarrow \text{AQ} + \text{D1} \geq 5 \cdot T_1$
Spektrale Breite	12 ppm
Spektrale Auflösung	0.15 Hz/Punkt
Scan-Anzahl	128 $\rightarrow \text{S/N}(2.05 \text{ ppm}) \approx 1200 : 1$
<i>Lb</i> -Wert	0.3
Rotation	Rotation
Referenzierung	TSP- $\text{d}_4 = 0.00 \text{ ppm}$
Probenkonzentration	25 mg/700 μl
Lösungsmittel	D_2O

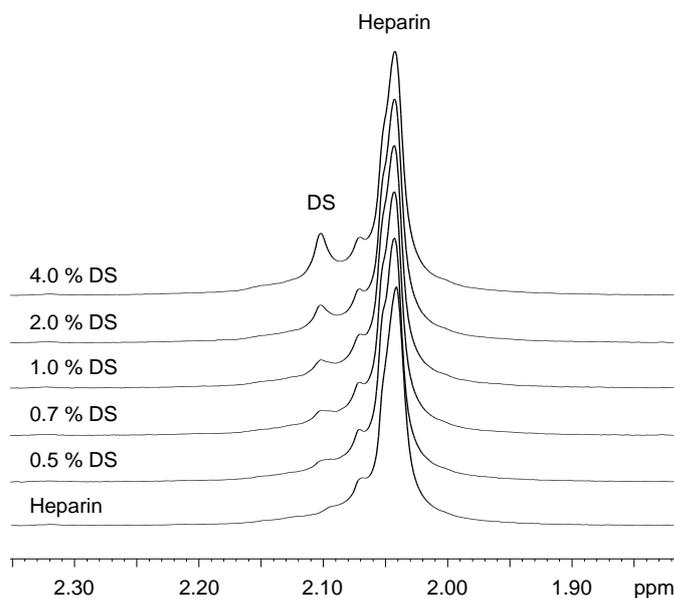


Abbildung 3.7: ^1H -NMR-Teilspektrum der N-Acetyl-Region von Heparin-Modellmischungen mit unterschiedlichem DS-Kontaminierungsgrad (0 bis 4%) in D_2O ; (NS = 128, 400 MHz, 315 K).

^{13}C -Satellit der Hauptkomponente beide ein Signal bei $\delta = 2.15$ ppm aufweisen und somit geringfügig kontaminierte Heparin-Proben nicht erkannt bzw. quantitativ erfasst werden können [114].

Die Ermittlung der Nachweisgrenze der natürlich vorkommenden Verunreinigung Dermatansulfat wurde analog zu den OSCS-Experimenten durchgeführt; einzig das zugespikte Konzentrationsintervall von Dermatansulfat wurde vergrößert (0.1 bis 4% DS). Da die beiden N-Acetyl-Resonanzen von Heparin und Dermatansulfat ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen, teilweise überlappen und somit keine vollständige Signalseparation vorliegt, können geringfügig verunreinigte Heparin-Proben nicht erkannt werden. Wie in Abbildung 3.7 dargestellt, ist ab einer Dermatansulfat-Konzentration von etwa 0.5% das charakteristische N-Acetyl-Signal bei $\delta = 2.08$ ppm im ^1H -NMR-Spektrum erkennbar [231]. Der Fingerprintbereich erlaubt hingegen keinen empfindlichen Nachweis von Dermatansulfat; hier werden mit Hilfe des Iduronsäureprotons in Position 1 ($\delta \approx 4.8$ ppm) nur stärker verunreinigte Heparin-Proben erkannt.

3.5.3. Quantitative Analyse

Die vorzugsweise in der NMR-Spektroskopie eingesetzte Absolutbestimmung mittels Interner-Standard-Methode ist für die quantitative Bestimmung der potentiellen GAG-Verunreinigungen ungeeignet, da Glykosaminoglykane als komplexe, strukturell uneinheitliche Polysaccharidgemische aus unterschiedlichen Disaccharid-Grundeinheiten aufgebaut sind, die sich zudem in ihrer Kettenlänge und dem Sulfatierungsmuster unterscheiden und somit kein definiertes Molekulargewicht aufweisen, welches für die Ermittlung des Gehalts erforderlich ist (siehe Einleitung, Abschnitt 2.5.2). Um dennoch eine quantitative NMR-spektroskopische Analyse der möglichen Verwandten Substanzen zu ermöglichen, werden in diesem Abschnitt verschiedene Quantifizierungsmöglichkeiten – Signalflächenvergleich, Höhenvergleich sowie Standard-Additionsverfahren – aufgezeigt und auf ihre Richtigkeit und Eignung für die routinemäßig durchgeführte Qualitätskontrolle überprüft. Die quantitativen NMR-Methoden mittels Signalflächen- bzw. Höhenvergleich wurden in Zusammenarbeit mit einer EDQM-Expertengruppe zur Identifizierung und Quantifizierung möglicher Heparin-Verunreinigungen entwickelt und ihre Eignung in einem Ringversuch überprüft.

Signalfläche

Die quantitative NMR-Analyse erfolgt üblicherweise über einen Signalflächenvergleich zweier basisliniengetrennter Resonanzen. Am vorliegenden Beispiel wird für die quantitative Bestimmung von OSCS bzw. Dermatansulfat ein Flächenvergleich über die N-Acetyl-Signale ermöglicht [114]; hierfür wird zuerst die Gesamtfläche im Bereich zwischen $\delta = 1.95$ und 2.19 ppm integriert, die Signalfläche auf den Wert 100 normalisiert und die OSCS- bzw. Dermatansulfat-Signalfläche ermittelt. Da in Heparin nur etwa jeder fünfte Stickstoff einen Acetyl-Substituenten trägt, in OSCS und Dermatansulfat jedoch jeder Stickstoff acetyliert ist, muss für die Bestimmung des Stoffmengenanteils X eine Flächenkorrektur durchgeführt werden; die ermittelte Signalfläche der Verunreinigung wird durch den Faktor 5 dividiert. Die Berechnung des Massenanteils der Verwandten Substanzen (P_{VS}) erfolgt unter Berücksichtigung der molaren Masse der jeweiligen Disaccharid-Grundeinheiten nach folgender Formel:

$$P_{VS} = \frac{X \cdot 809}{(X \cdot 809) + (100 - X) \cdot 637} \cdot 100 \% \quad (3.1)$$

Das Molekulargewicht der OSCS- bzw. Dermatansulfat-Disaccharid-Einheiten beträgt $M_r(\text{OSCS/DS}) = 809 \text{ g/mol}$ Disaccharid; für Heparin wird ein Molekulargewicht von $M_r(\text{Heparin}) = 637 \text{ g/mol}$ Disaccharid eingesetzt.²

Signalhöhe

Alternativ kann der Kontaminierungsgrad P_{VS} von Heparin-Mustern mit OSCS bzw. Dermatansulfat über einen Höhenvergleich der N-Acetyl-Signale von Verunreinigung (VS) und Heparin nach folgender Formel bestimmt werden:

$$P_{\text{VS}} = \frac{\text{Höhe(VS)}}{\text{Höhe(Heparin)}} \cdot \frac{1}{\text{KF}} \quad (3.2)$$

KF bezeichnet hierbei den Korrekturfaktor; dieser ist nötig, um dem unterschiedlichen Acetylierungsgrad der Glykosaminoglykane sowie der leicht variierenden Halbwertsbreite der N-Acetyl-Signale Rechnung zu tragen. Die experimentelle Bestimmung des Korrekturfaktors erfolgt mit Hilfe von "Spiking-Experimenten" mit definierten Mengen der jeweiligen Verunreinigung (0.1 bis 35 % Verunreinigung) zu einem als "sauber" deklarierten Heparin-Muster. Die Höhe der beiden Signale wird ausgehend von einer gemeinsamen Grundlinie bestimmt. Trägt man die Menge/Konzentration der hinzugefügten Verunreinigung gegen die Zunahme des Höhenverhältnisses der N-Acetyl-Resonanzen ($\text{Höhe(VS)}/\text{Höhe(Heparin)}$) auf, wird im Idealfall eine Gerade mit der Funktion $y = mx + n$ erhalten (siehe Abbildung 3.8). Der Korrekturfaktor ergibt sich aus der Steigung m der ermittelten Kalibriergeraden. Da der Korrekturfaktor u. a. vom eingesetzten Heparin-Muster, der Konzentration der Untersuchungslösung, der Magnetfeldstärke sowie der Messtemperatur beeinflusst wird, wird für die Ermittlung präziser und richtiger Ergebnisse eine individuelle Bestimmung des Korrekturfaktors anstelle der Verwendung des in Zusammenarbeit mit der EDQM-Expertengruppe ermittelten Korrekturfaktors empfohlen [114, 249]. Wie in Abbildung 3.8 dargestellt, ist beispielsweise für die quantitative Bestimmung von OSCS mittels 400 MHz-Spektrometer bei verschiedenen Messtemperaturen (300 und 315 K) der Einsatz unterschiedlicher Korrekturfaktoren ($\text{KF} = 0.047$ und 0.056)

²Die Summenformel der OSCS- bzw. DS-Disaccharid-Einheit beträgt $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NNa}_5\text{O}_{23}\text{S}_4$; für Heparin wird bei einem durchschnittlichen Sulfatierungsgrad von 2.3 die Summenformel $\text{C}_{14}\text{H}_{18.7}\text{NNa}_{3.3}\text{O}_{17.9}\text{S}_{2.3}$ eingesetzt.

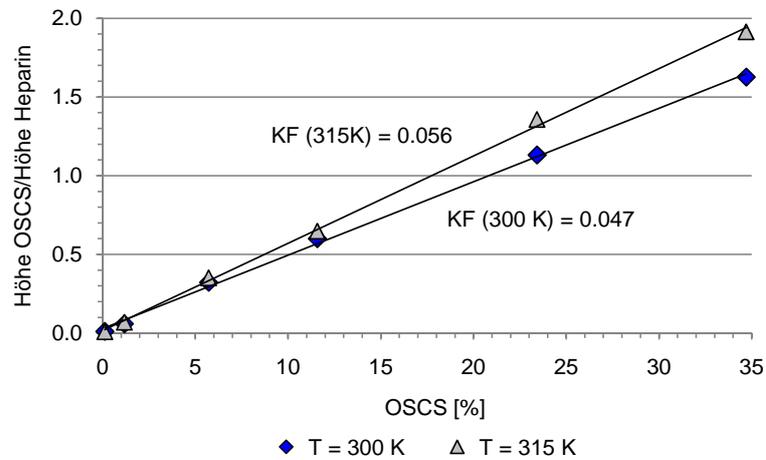


Abbildung 3.8: Bestimmung des Korrekturfaktors (KF) für die quantitative Analyse von OSCS bei $T = 300$ und 315 K. Für beide NMR-Experimente wird eine Kalibriergerade mit einem Bestimmtheitsmaß $r^2 = 0.999$ erhalten.

nötig.

Aufgrund einer deutlich geringeren Signalauflösung der beiden N-Acetyl-Signale von Heparin und Dermatansulfat – die N-Acetyl-Resonanz von Dermatansulfat sitzt auf der Flanke des entsprechenden Signals der Hauptkomponente – muss für die quantitative Bestimmung von Dermatansulfat zusätzlich eine Korrektur der gemeinsamen Basislinie erfolgen. Der Gehalt an Dermatansulfat kann mit Hilfe des Höhenvergleichs nach folgender Formel bestimmt werden:

$$P_{\text{DS}} = \frac{\text{Höhe}(\text{DS}) - Y}{\text{Höhe}(\text{Heparin})} \cdot \frac{1}{\text{KF}} \quad (3.3)$$

Die Konstante $Y = 1/10 \cdot \text{Höhe}(\text{Heparin})$ muss berücksichtigt werden, da die Basislinie einer sauberen Heparin-Probe bei $\delta = 2.08$ ppm eine Höhe von etwa 1/10 der N-Acetyl-Signalhöhe aufweist [114]. Bei einer Magnetfeldstärke von 400 MHz und einer Messtemperatur von 315 K wurde ein Korrekturfaktor $\text{KF} = 0.07$ ermittelt.

Überprüfung der Richtigkeit

Um eine Aussage über die Richtigkeit der beschriebenen Quantifizierungsmethoden treffen zu können, wurden Modellmischungen mit definiertem Gehalt an OSCS bzw.

Dermatansulfat (LOQ, 1, 6, 12, 24 und 35 % Verunreinigung) in Anwesenheit der Hauptkomponente NMR-spektroskopisch nach den in Tabelle 3.2 aufgeführten Messparametern vermessen und mit Hilfe beider Verfahren quantitativ ausgewertet [249].

Beide Methoden liefern im Rahmen der quantitative Analyse von OSCS bis zu einem Kontaminierungsgrad von etwa 10 % vergleichbare Ergebnisse, die zudem eine hohe Wiederfindungsrate zum tatsächlichen OSCS-Gehalt aufweisen (siehe Abbildung 3.9). Für Modellmischungen mit höherem OSCS-Anteil werden mit Hilfe des Flächenvergleichs jedoch signifikante Abweichungen zum tatsächlichen Wert beobachtet; wie in Abbildung 3.9 dargestellt, täuscht diese Methode v. a. bei stark kontaminierten Heparin-Proben eine zu geringe OSCS-Kontaminierung vor. Verursacht werden diese deutlichen Ergebnisabweichungen durch Überlagerungen der beiden N-Acetyl-Resonanzen. Während für Modellmischungen mit geringer OSCS-Konzentration eine fast vollständige Separierung der entsprechenden N-Acetyl-Signale beobachtet wird, nimmt die Signalüberlagerung mit steigendem OSCS-Anteil zu, wodurch falsche Integrale ermittelt werden. In diesem Fall ist für die Ermittlung "wahrer" Signalintensitäten anstelle gängiger Standard-Integrationsverfahren der Einsatz von "Line-Shape-Fitting"-Techniken, die eine Zerlegung überlappender Signale in ihre Einzelresonanzen ermöglichen, zu empfehlen [249].

Die Höhenbestimmung ermöglicht hingegen über einen großen Konzentrationsbereich (1 bis 35 % OSCS) eine richtige quantitative Bestimmung von OSCS; die Abweichung zum tatsächlichen Gehalt liegt hier deutlich unter 5 %. Zudem konnte durch die Teilnahme an einem EDQM-Ringversuch zur Identifizierung und Quantifizierung möglicher Heparin-Verunreinigungen durch die Analyse verschiedener Heparin-Muster in sechs unterschiedlichen NMR-Laboratorien die Reproduzierbarkeit beider Methoden ermittelt und somit deren Eignung überprüft werden [114]. Während die quantitative Bestimmung mittels Signalfächenvergleich stark von der Nachbearbeitung und Integration durch den jeweiligen Prüfer beeinflusst wird, bietet die Höhenbestimmungsmethode, die eine automatisch durchgeführte Bestimmung der Signalhöhen ermöglicht, deutlich weniger Fehlerquellen. Dies spiegelt sich in den relativen Standardabweichungen (RSD) beider Methoden wider; während im Rahmen des Ringversuchs die Höhenbestimmung mit einer relativen Standardabweichung von etwa 5 % eine präzise Quantifizierung von OSCS ermöglicht, streuen die Einzelergebnisse der verschiedenen Teilnehmer, selbst bei Einsatz eines Integrationsprotokolls,

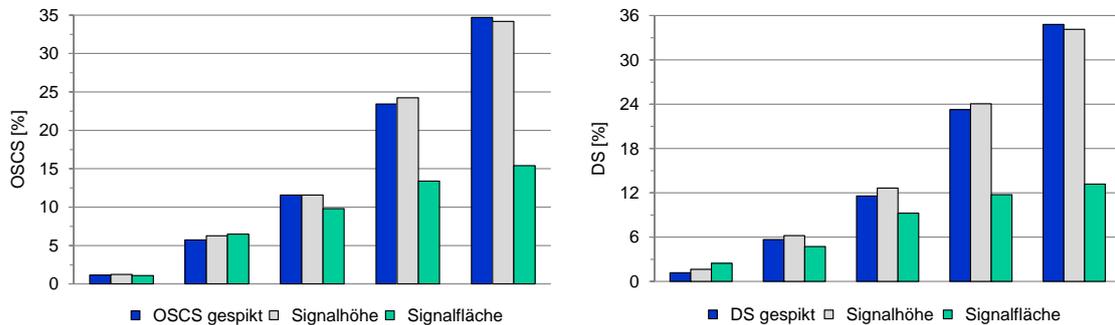


Abbildung 3.9: Vergleich der mittels Höhen- und Signalfächenbestimmung ermittelten Ergebnisse der untersuchten Modellmischungen mit dem tatsächlichen Gehalt an OSCS (OSCS gespikt) bzw. Dermatansulfat (DS gespikt) in Heparin.

mit relativen Standardabweichungen im Bereich von 20–30 % deutlich [114].

Die Ergebnisse der quantitative Analyse von Dermatansulfat mittels Höhenbestimmung zeigen, wie in Abbildung 3.9 dargestellt, eine deutliche Übereinstimmung mit dem tatsächlichen Wert (Abweichung vom Sollwert $\leq 10\%$); einzig für Modellmischungen mit geringem Verunreinigungsgrad von 0.5 und 1.0 % Dermatansulfat werden signifikante Unterschiede beobachtet. Die quantitative Analyse mittels Signalfächenvergleich beim Einsatz von Standard-Integrationsverfahren ist dagegen ungeeignet; starke Signalüberlagerungen verhindern bereits bei geringer Kontaminierung die Bestimmung richtiger Integrale.

Standard-Additionsverfahren

Das Standard-Additionsverfahren stellt für die quantitative Analyse komplexer Gemische wie Heparin eine geeignete Alternativmethode dar [36], da hier durch die mehrmalige Zugabe bekannter Mengen einer Kalibriersubstanz – hier handelt es sich entweder um die zu quantifizierenden Verunreinigungen OSCS bzw. Dermatansulfat oder um die Hauptkomponente Heparin – die entsprechende Kalibrierfunktion individuell für jede Probe ermittelt werden kann, was den Einsatz von Korrekturfaktoren unnötig macht.

Am Beispiel zweier repräsentativer Heparin-Proben – Muster 15 und 63 – wurde der Gehalt von Dermatansulfat bzw. OSCS in Heparin mit Hilfe dieses Aufstockungsverfahrens bestimmt und die Richtigkeit durch einen Vergleich der Ergebnisse mit

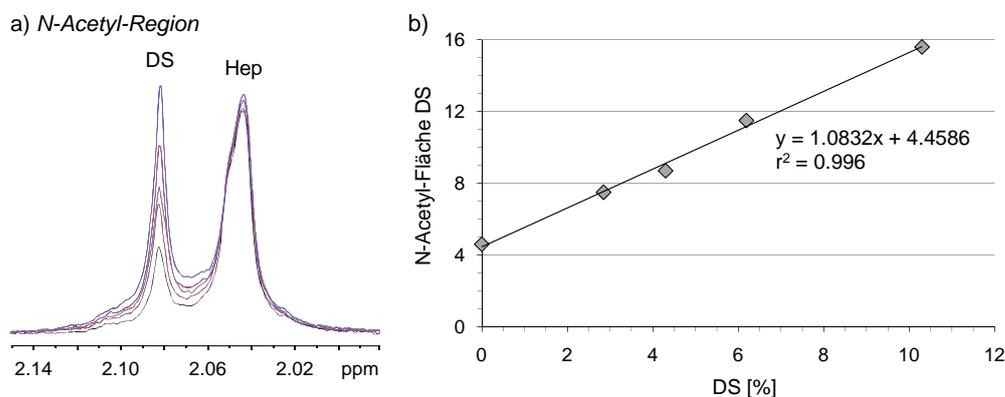


Abbildung 3.10: ^1H -NMR-Teilspektrum der N-Acetyl-Region von DS-verunreinigtem Heparin nach Zugabe von 3, 4, 6 und 10 % Dermatansulfat (a). Bestimmung des anfänglichen Dermatansulfat-Gehalts in Muster 15 mit Hilfe der linearen Regression (b).

der quantitativen Höhenbestimmung überprüft. Für die quantitative Bestimmung von Dermatansulfat wurde, wie in Abbildung 3.10 dargestellt, die Heparin-Probe (25 mg/700 μl) schrittweise mit etwa 3, 4, 6 und 10 % Dermatansulfat versetzt und der Zuwachs der N-Acetyl-Resonanz bei $\delta = 2.08$ ppm nach jeder Zugabe bestimmt (Messparameter siehe Tabelle 3.2). Trägt man die Konzentration der hinzugefügten Dermatansulfat-Referenzsubstanz gegen die Zunahme der Signalfäche auf, wird eine Gerade mit der Funktion $y = 1.0832x + 4.4586$ erhalten. Der anfängliche Dermatansulfat-Gehalt kann nach Verlängerung der Kalibriergeraden aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse direkt abgelesen werden. Für die quantitative Analyse von OSCS wurde der Verunreinigungsgrad der Probe indirekt über die quantitative Bestimmung der Hauptkomponente Heparin ermittelt. Hierfür wurde die zu analysierende Probe schrittweise mit etwa 25, 50, 75, 100, 150 und 200 % reinem Heparin versetzt und die Zunahme der Signalfäche bei $\delta = 2.05$ ppm bestimmt (Abbildung 3.11). Der ursprüngliche OSCS-Gehalt kann nach Subtraktion des experimentell ermittelten Heparin-Anteils von 100 % ermittelt werden.

Der Vergleich der mittels Standard-Additionsverfahren und Höhenbestimmung ermittelten Ergebnisse zeigt für die quantitative Analyse von Dermatansulfat bzw. OSCS in Heparin eine deutliche Übereinstimmung der Gehaltsergebnisse mit einer absoluten Abweichung von 0.1 bzw. 0.5 % für Probe 15 bzw. 63. Das Aufstockungsverfahren ermöglicht daher unabhängig von den jeweiligen Korrekturfaktoren der

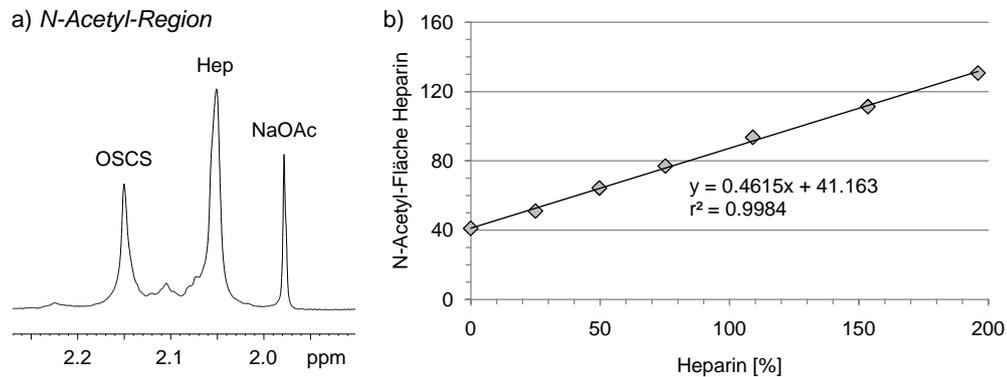


Abbildung 3.11: Indirekte Bestimmung des ursprünglichen OSCS-Gehalts über den Heparin-Gehalt nach Zugabe von 25, 50, 75, 100, 150 und 200 % Heparin zum zu prüfenden Heparin-Muster 63.

Höhen- bzw. Flächenbestimmung eine präzise und richtige Gehaltsbestimmung der beiden GAG-Verunreinigungen. Nachteil der Standard-Additionsmethode ist jedoch ihr beträchtlicher Zeitaufwand, da für jede zu prüfende Heparin-Probe eine eigene Kalibrierkurve erstellt werden muss; zudem ist der Einsatz von oftmals teuren Referenzsubstanzen definierter Reinheit notwendig.

3.5.4. Identifizierung weiterer Verunreinigungen

Die NMR-Spektroskopie bietet neben der Identifizierung potentieller Verwandter Substanzen die Möglichkeit, weitere Verunreinigungen, insbesondere Lösungsmittel, die während des Extraktions- und Reinigungsprozesses eingesetzt werden [250–252], mit Hilfe zusätzlicher, charakteristischer Resonanzen im ^1H -NMR-Spektrum zu erfassen [231]. Die gängigsten Restlösungsmittel wie Ethanol, Acetat, Aceton, Methanol und Formiat konnten mit Hilfe von “Spiking-Experimenten” zu realen, verunreinigten Heparin-API-Proben eindeutig identifiziert werden. Weiterhin wird in der Literatur über Lösungsmittelrückstände wie Butanol ($\delta_{\text{Butanol}} = 0.91; 1.35; 1.53; 3.61$ ppm) und den Komplexbildner Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ($\delta_{\text{EDTA}} \approx 3.5$ ppm) als mögliche Verunreinigungen in Heparin-Formulierungen berichtet [230, 232, 253]. Da die meisten Restlösungsmittel separierte Resonanzen in signalfreien Bereichen aufweisen (siehe Abbildung 3.12), wird mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie ein empfindlicher Nachweis dieser Verunreinigungen ermöglicht. Unter Berücksichtigung

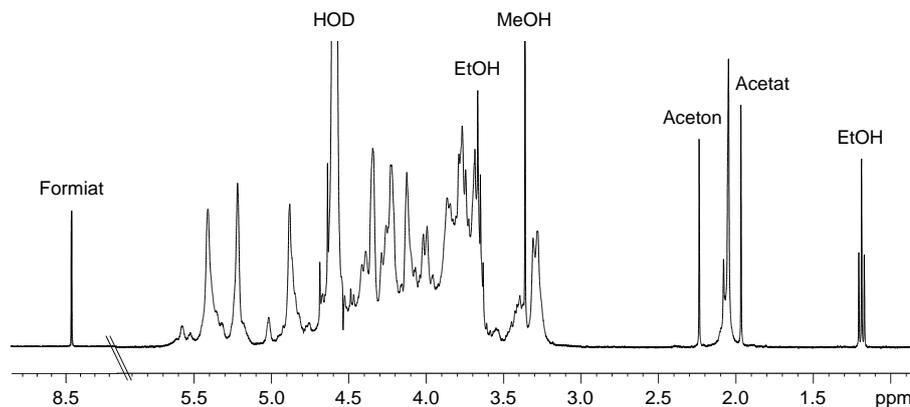


Abbildung 3.12: ^1H -NMR-Spektrum von Heparin, gespikt mit den potentiellen Restlösungsmitteln Ethanol (EtOH), Acetat, Aceton, Methanol (MeOH) und Formiat.

der entsprechenden T_1 -Relaxationszeiten kann nach Zusatz eines geeigneten Internen Standards der Gehalt der Restlösungsmittel quantitativ bestimmt werden.

Für die quantitative Analyse der Restlösungsmittel wurde im Rahmen der NMR-spektroskopischen Untersuchung realer Heparin-API-Chargen Maleinsäure, welche ein isoliertes Signal bei $\delta = 6.3$ ppm aufweist, als geeignete Interne Referenzsubstanz ausgewählt. Zur Herstellung der Untersuchungslösung wurden etwa 25 mg Heparin genau abgewogen, in 600 μl D_2O gelöst und mit 100 μl einer Maleinsäure-Stammlösung (10 mg/1 ml) versetzt. Abweichend von den in Tabelle 3.2 aufgelisteten Messparametern wurde die Scan-Anzahl auf 32 reduziert, der “Relaxation Delay” auf 60 s erhöht und das jeweilige ^1H -NMR-Spektrum unter Einsatz eines 30° -Impulses aufgenommen. Nach Integration der quantitativ auszuwertenden Resonanzen von Restlösungsmittel und Maleinsäure erfolgte die Gehaltsbestimmung, wie in der Einleitung in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, nach Gleichung (2.24).

Andere Verunreinigungen, wie beispielsweise das Mangan-Kation Mn^{2+} , welches u. a. beim Bleichen von Heparin in Form von Kaliumpermanganat eingesetzt wird, zeigen im ^1H -NMR-Spektrum zwar keine Signale, jedoch beeinflussen Schwermetallionen die Signalform und -lage der Hauptkomponente, so dass hier mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie ebenfalls ein Nachweis auf Mangan erfolgen kann [230]. Bereits geringe Mengen des Schwermetallions, selbst wenn diese unterhalb der erlaubten Maximalkonzentration des Ph. Eur. liegen [225], führen zu einer sichtbaren Verbreiterung der Linienform charakteristischer Heparin-Resonanzen, da das paramagnetische

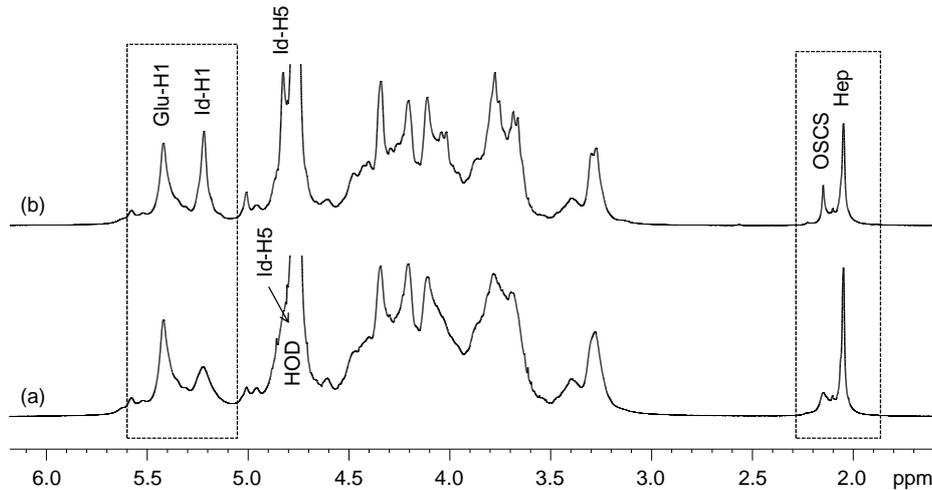


Abbildung 3.13: ^1H -NMR-Spektren einer Mn^{2+} -kontaminierten Heparin-Probe (a). Die Zugabe von EDTA zur Untersuchungslösung (b) führt zu einer deutlichen Verschmälerung bestimmter Resonanzen des Iduronsäurerestes (Id-H1, Id-H5) sowie des N-Acetyl-Signals von OPCS.

Metallion die Relaxationszeiten dieser Signale erheblich verkürzt. Das Mangan-Ion beeinflusst vorwiegend die Resonanzen der beiden Iduronsäure-Protonen (Id-H) in Position 1 und 5, deren Signale im Spektrum bei $\delta = 5.22$ ppm bzw. $\delta = 4.82$ ppm liegen. Wie eigene ^1H -NMR-Experimente in Abbildung 3.13 zeigen, werden diese Signale stark verbreitert; so nimmt die Höhe der Id-H1-Resonanz im Vergleich zum benachbarten Signal des Glucosaminprotons Glu-H1 mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 5.42$ ppm deutlich ab und die verbreiterte Id-H5-Resonanz wird vom Lösungsmittelsignal überlagert.

Da Mangan-Ionen ebenfalls die Breite der charakteristischen N-Acetyl-Resonanz von OPCS erhöhen (siehe Abbildung 3.13), muss eine mögliche Kontaminierung der Heparin-Probe mit Schwermetallionen sorgfältig überprüft werden, da geringe Mengen an OPCS ansonsten aufgrund der erheblichen Signalverbreiterung von der entsprechenden Resonanz der Hauptkomponente überlagert und somit nicht mehr erkannt werden können [254]. Zudem ist eine quantitative Analyse von OPCS mit Hilfe der Höhenbestimmung für Mn^{2+} -kontaminierte Heparin-Proben nicht direkt möglich.

In der NMR-Analytik von Glykosaminoglykanen ist aufgrund der störenden Eigen-

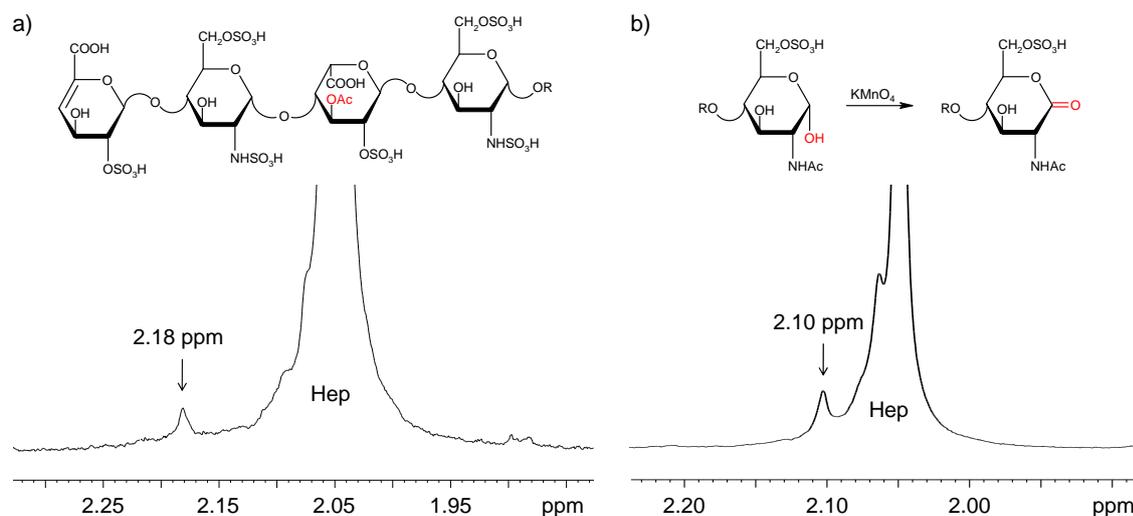


Abbildung 3.14: $^1\text{H-NMR}$ -Teilspektren der N-Acetyl-Region mit zusätzlichen Signalen bei $\delta = 2.18$ ppm (a) und $\delta = 2.10$ ppm (b) von potentiellen Heparin-Nebenprodukten, die während des Reinigungsprozesses von Rohheparin entstehen können.

schaften paramagnetischer Ionen der Zusatz eines Komplexbildners wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zur Untersuchungslösung eine gängige Methode, da so die Wechselwirkung zwischen negativ geladenen Sulfatgruppen der Polysaccharide und positiv geladenen Ionen verhindert werden kann [230, 254]. Das Ph. Eur. fordert im Rahmen der NMR-spektroskopischen Identitätsprüfung von Heparin-Natrium bzw. -Calcium ebenfalls die Zugabe geringer EDTA-Mengen ($12 \mu\text{g/ml}$) zur Untersuchungslösung, wenn die Höhe der Id-H1-Resonanz 80 % der Signalhöhe des Glu-H1-Protons unterschreitet [242]. Eigene NMR-Untersuchungen zeigen, dass durch die Zugabe von $300 \mu\text{g}$ EDTA pro Gramm Heparin die Mn^{2+} -bedingte Signalverbreiterung aufgehoben wird (siehe Abbildung 3.14).

Des Weiteren ermöglicht die N-Acetyl-Region im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum den Nachweis potentieller Heparin-Nebenprodukte, die während des Reinigungsprozesses von Heparin beim Bleichen mit Peroxyessigsäure bzw. Kaliumpermanganat entstehen können. Das charakteristische Singulett-Signal weist für das O-Acetyl-Heparin-Derivat eine chemische Verschiebung von $\delta = 2.18$ ppm und für das 2-N-Acetyl-2-deoxyglucono-1,5-lacton-Heparin-Derivat eine chemische Verschiebung von $\delta = 2.10$ ppm auf (Abbildung 3.14) [255–258].

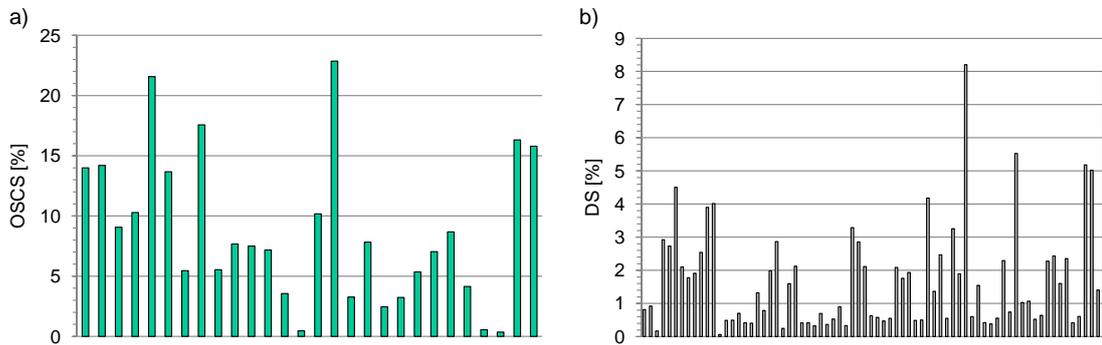


Abbildung 3.15: Graphische Darstellung des mit Hilfe der Höhenbestimmung ermittelten OSCS- (a) bzw. Dermatansulfat-Gehalts (b) der untersuchten Heparin-Proben. In 28 der 145 NMR-spektroskopisch analysierten Mustern wurde OSCS detektiert, 74 der 145 untersuchten Heparin-Proben enthielten Dermatansulfat.

3.5.5. Reinheitsanalyse von Heparin-Mustern

^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen von 145 repräsentativen Heparin-API-Mustern des deutschen Marktes (siehe Tabelle 3.6) ermöglichten unter Berücksichtigung der charakteristischen N-Acetyl-Region im Bereich von $\delta = 2.0\text{--}2.2$ ppm eine Unterteilung der zu analysierenden Chargen in vier Kategorien: “reines Heparin” (66 Muster), “Heparin mit Dermatansulfat” (51 Muster), “Heparin mit OSCS” (5 Muster) und “Heparin mit Dermatansulfat und OSCS” (23 Muster) [231]. Chondroitinsulfat A/C konnte dagegen in keinem Heparin-Muster nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Dermatansulfat wird Chondroitinsulfat A/C während des Reinigungsprozesses von Rohheparin selektiv abgetrennt, wodurch Chondroitinsulfat-freie bzw. -arme Heparin-Proben erhalten werden. Jedoch ist zu beachten, dass mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie eine eindeutige Unterscheidung zwischen Chondroitinsulfat-armen und reinen Heparin-Proben nicht gewährleistet wird, da hier das kleine N-Acetyl-Signal von Chondroitinsulfat A/C von der benachbarten Heparin-Resonanz überlagert wird.

28 der 145 untersuchten Heparin-Proben zeigen im ^1H -NMR-Spektrum das für OSCS charakteristische Signal bei $\delta = 2.15$ ppm; der mittels Höhenbestimmung ermittelte Kontaminierungsgrad der Proben schwankt zwischen 0.4 und 23 % OSCS. Die quantitative Analyse liefert für die Mehrzahl der OSCS-kontaminierten Heparin-Proben einen Verunreinigungsgrad von etwa 5 bis 15 %; einzig zwei Muster zeigen einen OSCS-Gehalt von über 20 % (Abbildung 3.15 a).

Tabelle 3.3: Einteilung der 145 untersuchten Heparin-Muster nach Häufigkeit und Gehalt der NMR-spektroskopisch identifizierten Lösungsmittelrückstände wie Ethanol, Acetat, Aceton, Methanol sowie Formiat.

	Ethanol	Acetat	Aceton	Methanol	Formiat
Häufigkeit	94	53	17	5	11
Gehalt	$\leq 9.4\%$	$\leq 0.5\%$	$\leq 0.04\%$	$\leq 0.5\%$	$\leq 0.05\%$

Durchschnittlich ist etwa jede zweite Heparin-Probe mit Dermatansulfat verunreinigt; dessen Anteil ist abhängig von der Gewinnung der Mukosa sowie der anschließenden Reinigungsmethode [259]. Der Gehalt dieser natürlich vorkommenden GAG-Verunreinigung schwankt zwischen 0.5 und 8%; wie in Abbildung 3.15 b dargestellt, liegt der durchschnittliche Dermatangehalt für eine Vielzahl der untersuchten Proben deutlich unter 2%.

In Abhängigkeit des Reinigungsprozesses werden in den 145 untersuchten Heparin-Proben Lösungsmittelrückstände von Ethanol, Acetat, Aceton, Methanol und Formiat identifiziert [231]. Die Häufigkeit sowie der Gehalt der jeweiligen Nebenprodukte, der mit Hilfe der Internen-Standard-Methode nach Zusatz von Maleinsäure NMR-spektroskopisch ermittelt wurde, sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Auffällig ist, dass der Gehalt der Restlösungsmittel – insbesondere Ethanol – für eine Vielzahl an Chargen deutlich über dem vom Ph. Eur. festgelegten Grenzwert von 0.3% für Methanol bzw. 0.5% für Ethanol, Acetat, Aceton sowie Formiat liegt und somit die Anforderungen des Arzneibuches nicht erfüllt werden.

3.6. Weitere ein- und zweidimensionale NMR-Experimente

Wie bereits in Abschnitt 3.5.1 aufgezeigt, können durch den Einsatz der ^1H -NMR-Spektroskopie eine Vielzahl sulfatierter Polysaccharid-Verunreinigungen über charakteristische N-Acetyl-Resonanzen qualitativ und quantitativ erfasst werden. GAG-Verunreinigungen mit fehlendem Acetat-Substituenten sowie N-acetylierte Polysaccharide mit einem charakteristischen N-Acetyl-Signal bei $\delta = 2.05\text{ ppm}$ können dagegen mittels ^1H -NMR-Spektroskopie, selbst in hohen Konzentrationen, nicht nach-

Tabelle 3.4: Messparameter.

Parameter	^{13}C -NMR	HSQC	
Spektrometer	400 MHz	600 MHz	
Temperatur	300 K	298 K	
Datenpunkte	64 K	<i>F2</i>	<i>F1</i>
Akquisitionszeit	1.37 s	4096	512
Relaxation Delay	3.37 s	0.14 s	0.01 s
Spektrale Breite	3.37 s	3.65 s	
Scan-Anzahl	238.35 ppm	12.5 ppm	134.7 ppm
Dummy Scans	16 K	64	
^1H -BB-Entkopplung	4	12	
prozessierte Datenpunkte	ja	–	–
Fensterfunktion	32 K	2048	2048
<i>Lb</i> -Wert	EM	QSINE	QSINE
	1.0	1.0	0.1

gewiesen werden. Die ^{13}C -NMR-Spektroskopie und/oder zweidimensionale HSQC-Experimente (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) erlauben hingegen neben der Identifizierung zu erwartender Verwandter Substanzen wie Dermatansulfat, Chondroitinsulfat A/C sowie OSCS auch eine Unterscheidung zwischen reinen und mit Heparansulfat-, Hyaluronsäure-, Alginat- sowie N-sulfatierter Heparinoid-Derivaten kontaminierten Heparin-Proben [35, 229, 232, 236, 239, 244].

Um das Potential dieser beiden NMR-Experimente für die Reinheitsprüfung von Heparin aufzeigen zu können, wurden reale Heparin-Proben und Referenzsubstanzen der Hauptkomponente sowie der zu erwartenden Verunreinigungen OSCS, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat A/C NMR-spektroskopisch vermessen. Für die Herstellung der jeweiligen Untersuchungslösung wurden etwa 100 mg Heparin-Probe bzw. Referenzsubstanz in 700 μl D_2O gelöst, in ein NMR-Röhrchen überführt und vermessen. Die wichtigsten Messparameter sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

^{13}C -NMR-Spektroskopie

Wie in Abbildung 3.16 dargestellt, ist im ^{13}C -NMR-Spektrum eine Unterscheidung zwischen reinem und verunreinigtem Heparin nicht nur über die charakteristische

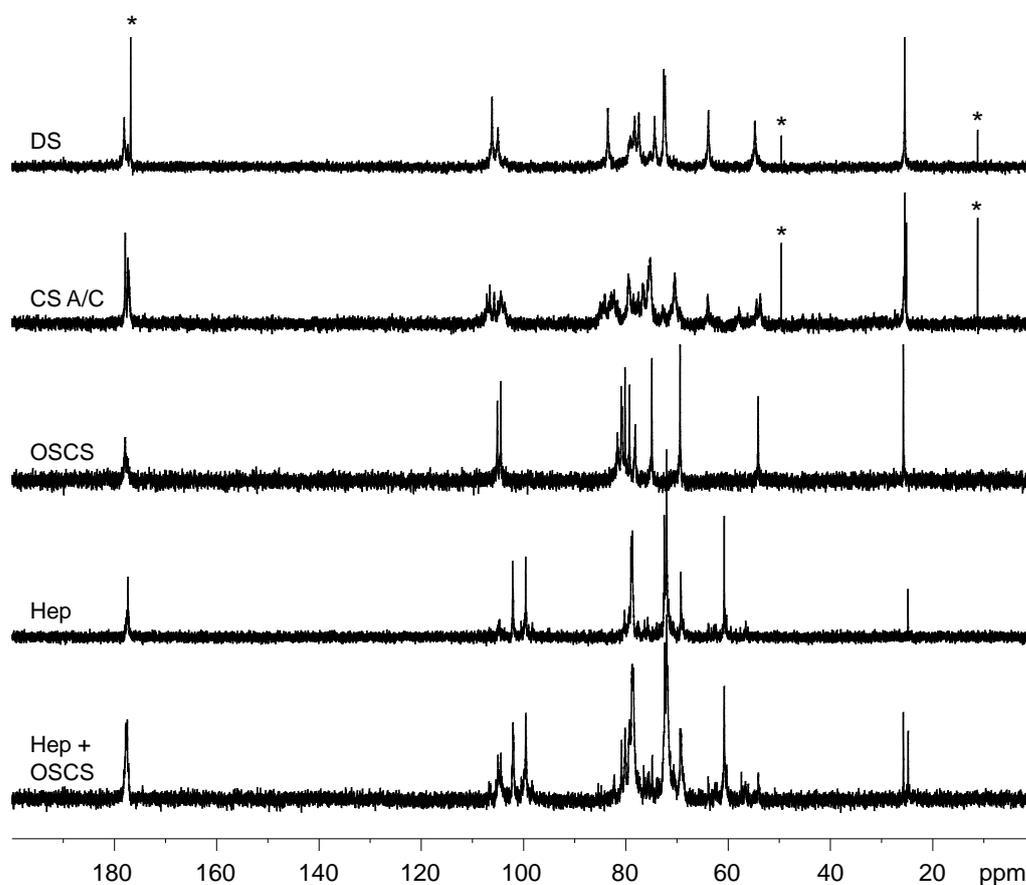


Abbildung 3.16: ¹³C-NMR-Spektrum einer realen, stark OSCS-kontaminierten Heparin-Probe (Hep + OSCS) sowie die entsprechenden Einzelspektren von Heparin (Hep), OSCS, Chondroitinsulfat A/C (CS A/C) und Dermatansulfat (DS). Lösungsmittelrückstände sind mit “*” gekennzeichnet.

N-Acetyl-Region im Bereich von etwa $\delta = 23\text{--}27$ ppm möglich, auch für eine Vielzahl anderer ¹³C-Atome wird eine vollständige Signalseparation erzielt.

Bereits in der Vergangenheit hat sich die ¹³C-NMR-Spektroskopie als geeignetes Verfahren zur strukturellen Charakterisierung und Analyse von Glykosaminoglykanen erwiesen [232, 236, 260, 261], da hier im Vergleich zur ¹H-NMR-Spektroskopie aufgrund separierter Resonanzen eine Aussage über Identität und Reinheit sulfatierter Polysaccharide getroffen werden kann. So wird beispielsweise die Identität Niedermolekularer Heparine im Ph. Eur. anhand eines ¹³C-NMR-Spektrums im Vergleich zur entsprechenden Referenzsubstanz überprüft [34]. Zusätzliche Signale im NMR-

Spektrum geben Hinweise auf anwesende Verunreinigungen; detektiert werden sowohl andere Glykosaminoglykane als auch Lösungsmittelrückstände. Zudem ist die Aufdeckung und Charakterisierung neuer, unbekannter Verunreinigungen beim Einsatz der ^{13}C -NMR-Spektroskopie im Vergleich zur ^1H -NMR-Spektroskopie wahrscheinlicher. Längere Messzeiten sowie höhere Nachweisgrenzen führen jedoch dazu, dass diese Technik als Screening-Verfahren für die Qualitätskontrolle von Heparin eher selten eingesetzt wird.

Zweidimensionales HSQC-Experiment

Eine geeignete Alternative stellt das zweidimensionale HSQC-Experiment dar. Während bei eindimensionalen NMR-Spektren die Abszisse der Frequenzachse entspricht und die Ordinate die Signalintensität wiedergibt, besitzt das zweidimensionale NMR-Experiment zwei Frequenzachsen; die Intensität bildet folglich eine dritte Dimension. Werden auf den beiden Frequenzachsen chemische Verschiebungen aufgetragen, spricht man von zweidimensionalen (verschiebungs)korrelierten NMR-Spektren; praxisrelevant sind Experimente, die auf beiden Achsen chemische Verschiebungen von Protonen abbilden, sowie Verfahren wie beispielsweise das HSQC-Experiment, das ^1H - und ^{13}C -chemische Verschiebungen miteinander verknüpft. Die 2D-NMR-Spektroskopie setzt eine Kopplung von Kerndipolen voraus; beobachtet werden skalare Kopplungen, d. h. Kopplungen über Bindungen hinweg, oder Wechselwirkungen durch den Raum. Treten zwei Kerne miteinander in Wechselwirkung, werden im zweidimensionalen NMR-Spektrum sogenannte Korrelationspeaks detektiert, die wichtige Informationen im Rahmen der Signalzuordnung liefern können. Beim HSQC-Experiment lässt sich anhand der Korrelationspeaks unmittelbar erkennen, welches Wasserstoffatom direkt an ein bestimmtes Kohlenstoffatom gebunden ist [86].

Dieses Verfahren bietet somit den Vorteil, dass Verunreinigungen, deren Resonanzen aufgrund von Signalüberlagerungen im ^1H -NMR-Spektrum nicht erkannt werden können, im 2D-NMR-Spektrum mittels Korrelationspeaks detektiert werden können. Während beispielsweise OSCS im ^1H -NMR-Spektrum nur über das N-Acetyl-Signal sowie teilweise über Fingerprintresonanzen im Bereich von $\delta = 4.4\text{--}5.1$ ppm erfasst werden kann, ermöglicht das zweidimensionale HSQC-Experiment die Identifizierung der Kontaminante über eine Vielzahl an Korrelationspeaks (siehe Abbildung 3.17).

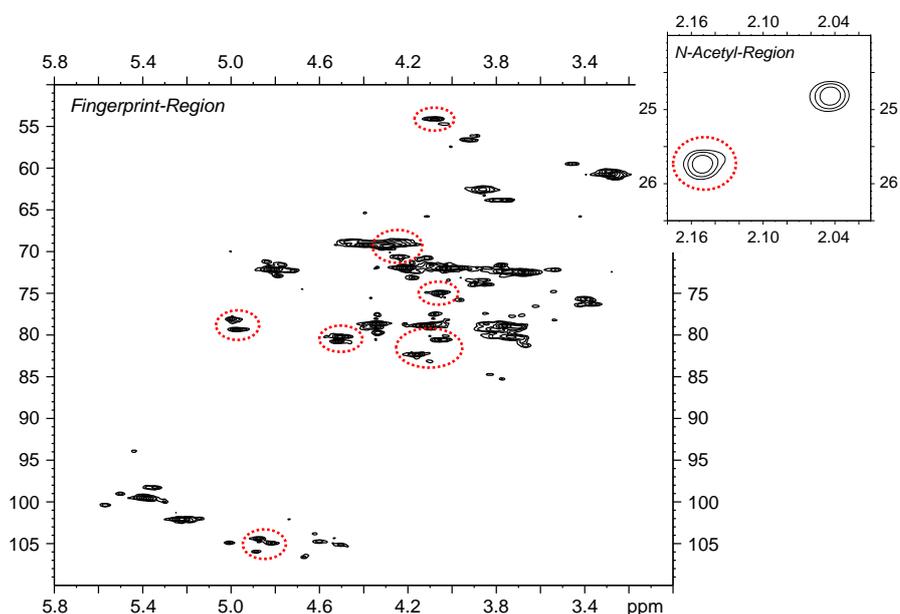


Abbildung 3.17: Zweidimensionales HSQC-Spektrum einer OSCS-kontaminierten Heparin-Probe. Die rot umrandeten OSCS-Korrelationspeaks erlauben die Identifizierung der Kontaminante.

Verunreinigungen, die im ^1H -NMR-Spektrum bedingt durch Signalüberlagerungen mit Heparinresonanzen nicht aufgedeckt werden können, zeigen im HSQC-Spektrum meist mehrere separierte Korrelationspeaks, da die Wahrscheinlichkeit, dass alle Peaks einer Verunreinigung mit den entsprechenden Korrelationspeaks überlagern, sehr gering ist. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, wie für alle Experimente, bei denen unempfindliche Kerne wie ^{13}C -Atome detektiert werden, die lange Messdauer. Jedoch kann mit Hilfe des HSQC-Experiments die Nachweisempfindlichkeit im Vergleich zur ^{13}C -NMR-Spektroskopie erheblich gesteigert bzw. die Messzeit drastisch reduziert werden. So wird beispielsweise beim Einsatz eines 500 MHz-Spektrometers für eine Vielzahl möglicher GAG-Verunreinigungen innerhalb weniger Stunden eine Nachweisgrenze von etwa 2–4 % erzielt [229, 244]. Der Einsatz von NMR-Spektrometern geringerer Feldstärke ist dagegen nicht empfehlenswert, da die Messzeit erheblich gesteigert werden muss, um vergleichbare Resultate zu erzielen.

Allgemein kann zusammengefasst werden, dass beide Verfahren – ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie zweidimensionale HSQC-Experimente – Alternativverfahren im Rahmen der Qualitätsbestimmung von Heparin zur ^1H -NMR-Spektroskopie darstellen.

Beide Methoden ermöglichen die Identifizierung potentieller Verunreinigungen wie Dermatansulfat, Chondroitinsulfat A/C und OSCS; zudem werden hier ebenfalls Restlösungsmittel mittels charakteristischer Signale erkannt. Beide Verfahren besitzen gegenüber der ^1H -NMR-Spektroskopie den Vorteil, dass neue, unbekannte Verunreinigungen leichter aufgedeckt werden können; dieser Vorteil ist jedoch mit einer deutlichen Verlängerung der Messzeit verbunden. Trotzdem ist das zweidimensionale HSQC-Experiment auch in der routinemäßig durchgeführten Qualitätskontrolle von Heparin zu empfehlen, wenn im ^1H -NMR-Experiment oder unter Einsatz weiterer orthogonaler Methoden die zu untersuchende Probe auffällig erscheint.

3.7. Alternative Reinheitsprüfungen

In diesem Abschnitt sollen durch Vergleich mit gültigen Arzneibuchmethoden des Ph. Eur. 6.0 und neuentwickelten, unabhängigen Verfahren wie HPLC, Kapillarelektrophorese, Infrarot- und Raman-Spektroskopie mögliche Vor- und Nachteile der NMR-Spektroskopie am Beispiel der 145 untersuchten Heparin-Muster (siehe Tabelle 3.6) aufgezeigt werden.

3.7.1. Arzneibuchanalytik von Heparin

Die strukturelle Diversität von Heparin stellt eine große Herausforderung für Heparinspezifische Nachweisprüfungen dar. Die beiden Monographien "Heparin-Natrium" und "Heparin-Calcium" des Ph. Eur. 6.0 sind durch Heparin-unspezifische Prüfmethode wie spezifische Drehung, Gelelektrophorese, pH-Wert, Stickstoffbestimmung, Wertbestimmung etc. gekennzeichnet, die die Identifizierung anderer Glykosaminoglykane als potentielle Verunreinigungen nicht abdecken; zudem wurden die Monographien seit etlichen Jahren nicht an den modernen Stand der Technik angepasst. Lebensbedrohliche Qualitätsmängel, die durch die Beimengung von Substanzen Heparin-ähnlicher Eigenschaften wie beispielsweise OSCS verursacht wurden, konnten mit den damals gültigen Nachweismethoden, wie im folgenden Abschnitt dargestellt, im Rahmen der Qualitätskontrolle nicht erkannt werden. Erst der Heparin-Skandal veranlasste internationale Behörden zu einer gründlichen Überarbeitung der Heparin-Monographien.

Die Notwendigkeit neuer, Heparin-spezifischer Prüfverfahren soll im folgenden Abschnitt anhand zweier unspezifischer Nachweismethoden des Ph. Eur. 6.0 – spezifische Drehung und Wertbestimmung – näher aufgezeigt werden. Dafür wurden 145 Heparin-Muster (siehe Tabelle 3.6) mit beiden Methoden analysiert und bewertet.

Optische Rotation

Die spezifische Drehung ist für eine Vielzahl chiraler Arzneistoffe ein Identitäts- und/oder Reinheitskriterium. Nach Ph. Eur. erfüllt eine Heparin-Probe die Identitätsanforderungen, wenn die spezifische Drehung mindestens $+35^\circ$ beträgt [225]. Glykosaminoglykane weisen deutlich voneinander abweichende spezifische Rotationen auf; während Heparin eine positive spezifische Drehung besitzt, nimmt die spezifische Drehung für Dermatansulfat, Chondroitinsulfat A/C und OSCS negative Werte an [233, 262, 263]. Folglich wird für verunreinigte Heparin-Proben eine im Vergleich zu reinem Heparin geringere spezifische Drehung erwartet.

Im Rahmen der Untersuchung von 145 Heparin-Mustern wurden alle Chargen polarimetrisch nach Ph. Eur. 6.0 vermessen. Hierfür wurden jeweils etwa 40 mg Probe genau abgewogen, zu 1 ml gelöst, ein Aliquot der Untersuchungslösung in eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 dm überführt, der experimentell ermittelte Drehungswinkel α bei der Wellenlänge der D-Linie des Natriumlichtes ($\lambda = 589.3 \text{ nm}$) und einer Temperatur von 20°C am Polarimeter abgelesen und die spezifische Drehung $[\alpha]_{20}^D$ nach folgender Formel berechnet:

$$[\alpha]_{20}^D = \frac{\alpha}{l \cdot c} \quad (3.4)$$

mit dem Drehungswinkel α in $[\circ]$, der Konzentration der Untersuchungslösung c in $[\text{g/ml}]$ und der Schichtdicke des Polarimeterrohres l in $[\text{dm}]$.

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem Verunreinigungsgrad und der spezifischen Drehung von Heparin aufzeigen zu können, wurde wie in Abbildung 3.18 dargestellt, der NMR-spektroskopisch ermittelte Gehalt von OSCS bzw. Dermatansulfat gegen die jeweilige spezifische Drehung aufgetragen. Die Anwesenheit potentieller Verunreinigungen wie OSCS und Dermatansulfat führt zu einer Abnahme der spezifischen Drehung; derselbe Effekt wird für Chondroitinsulfat A/C als mögliche Verunreinigung beobachtet. Grundsätzlich gilt, dass mit ansteigendem

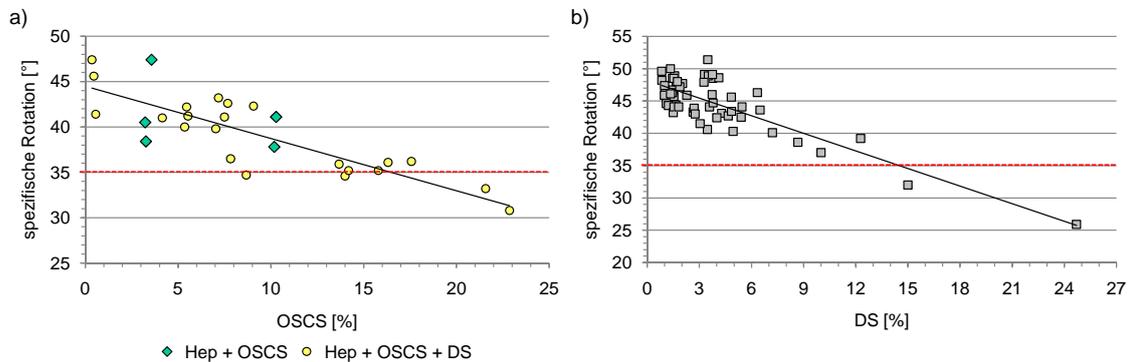


Abbildung 3.18: Abhängigkeit der spezifischen Rotation von Heparin vom Gehalt der potentiellen Verunreinigungen OSCS (a) und Dermatansulfat (b); abgebildet sind hier die experimentell ermittelten Ergebnisse der 145 untersuchten Heparin-Muster. Der nach Ph. Eur. 6.0 geforderte Grenzwert der spezifischen Drehung von $+35^\circ$ wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

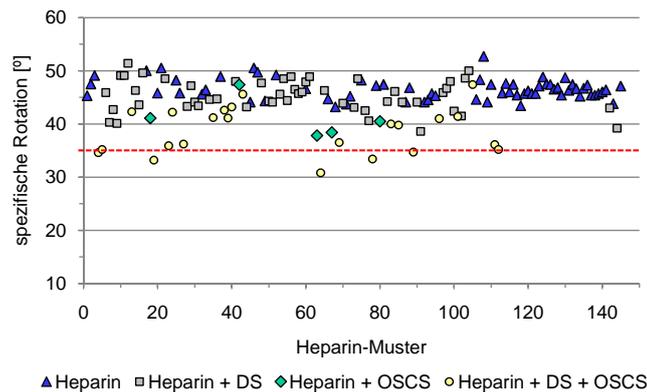


Abbildung 3.19: Spezifische Rotation der 145 Heparin-Muster, unterteilt in die vier NMR-Kategorien (siehe Abschnitt 3.5.5). Der nach Ph. Eur. 6.0 geforderte Grenzwert wird durch die gestrichelte Linie dargestellt.

Gehalt anderer GAG-Verunreinigungen in Heparin die ermittelte spezifische Drehung abnimmt [231].

Eine empfindliche Erkennung potentieller Verunreinigungen wird hingegen mit der beschriebenen polarimetrischen Identitätsprüfung nicht ermöglicht. Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, können Heparin-Proben mit geringem Verunreinigungsgrad nicht von reinen Heparin-Mustern unterschieden werden; einzig stark kontaminierte Heparin-Proben erfüllen nicht die Anforderungen des Arzneibuches. Da OSCS, Der-

matansulfat und Chondroitinsulfat A/C die spezifische Rotation in gleicher Weise beeinflussen, ist zudem keine selektive Unterscheidung zwischen partialsynthetisch hergestellter Kontaminante und natürlich vorkommenden Verwandten Substanzen möglich.

Qualitätsmängel der Hauptkomponente können mit diesem eher unselektiven und unempfindlichen Identitätsnachweis nicht aufgedeckt werden. Im Rahmen der polarimetrischen Untersuchung von 145 Heparin-Proben konnten von 79 kontaminierten API-Heparin-Proben nur fünf als “verunreinigt” eingestuft werden (siehe Abbildung 3.19 und Tabelle 3.6).

Biologische Aktivität

Ein entscheidendes Qualitätsmerkmal für Heparin ist seine antikoagulatorische Aktivität; die Substanz besitzt die charakteristische Eigenschaft, die Gerinnung von Frischblut zu verzögern. Nach Ph. Eur. 6.0 muss die Wirksamkeit für Heparin zur parenteralen Anwendung mindestens 150 I.E. je Milligramm, bezogen auf die getrocknete Substanz, betragen [225]. Die biologische Gehaltsbestimmung von Heparin, die sogenannte Wertbestimmung, erfolgt *in vitro* nach der Methode der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), indem unter gleichen Bedingungen die Gerinnungsverzögerung von rekalkifiziertem Citratschafplasma mit einer in Internationalen Einheiten eingestellten Standardzubereitung für Heparin (Heparin-Natrium *BRS*) verglichen wird [264].

Im Rahmen der Untersuchung von 145 Heparin-Mustern wurden 29 charakteristische Proben ausgewählt und deren antikoagulatorische Aktivität nach dem unter “Wertbestimmung von Heparin” [264] beschriebenen Gerinnungstest bestimmt;³ alle 29 untersuchten Heparin-Proben entsprachen mit einer biologischen Aktivität von mindestens 150 I.E./mg den Anforderungen des Ph. Eur. 6.0 (siehe Abbildung 3.20 a). Zusätzliche Messungen in Humanplasma wiesen jedoch im Vergleich zu Experimenten in Schafplasma für bestimmte Heparin-Muster signifikante Unterschiede in der antikoagulatorischen Aktivität auf (Abbildung 3.20); fünf der 29 untersuchten Heparin-Proben genügten zudem mit einer biologischen Aktivität von ≤ 150 I.E./mg nicht den

³Die Wertbestimmung der Heparin-Muster wurde in den Laboratorien der Merckle Gruppe in Ulm durchgeführt.

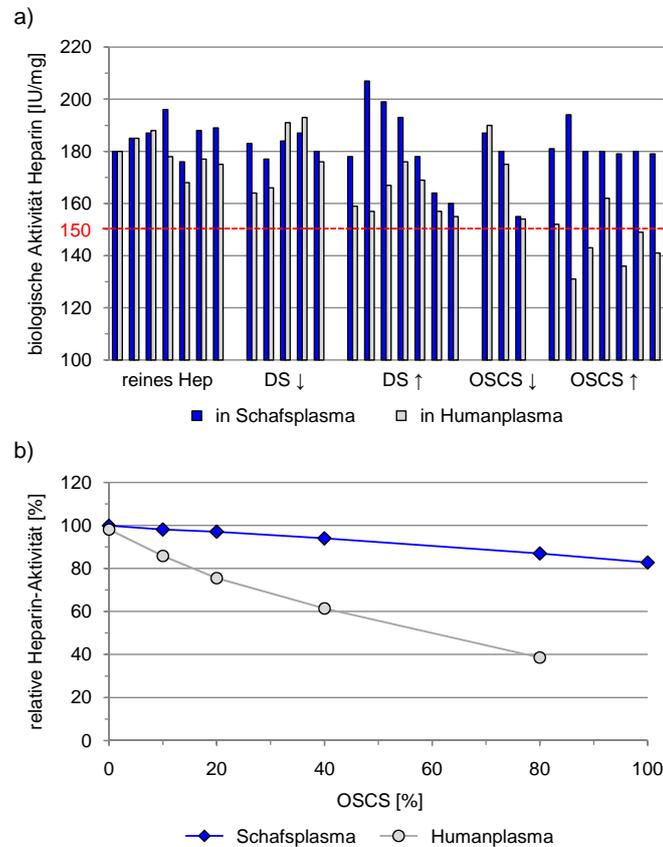


Abbildung 3.20: Biologische Aktivität 29 repräsentativer Heparin-Muster in Schafplasma und Humanplasma (a). Die nach Ph. Eur. 6.0 geforderte Mindestaktivität von 150 IU/mg wird durch die gestrichelte Linie dargestellt. Signifikante Aktivitätsunterschiede OSCS-kontaminierter Proben in Schaf- und Humanplasma sind auf den OSCS-vermittelten Aktivitätsverlust von Heparin in Humanplasma zurückzuführen (b).

Anforderungen des Arzneibuches. Während für reine Heparin-Proben vergleichbare Aktivitäten in Schaf- und Humanplasma ermittelt werden konnten, wurden für OSCS-kontaminierte Chargen deutliche Abweichungen festgestellt, die somit auf Qualitätsmängel hindeuten [249]. OSCS selbst besitzt, wie Heparin, eine gerinnungshemmende Wirkung und verlängert die aktivierte partielle Thromboplastinzeit; jedoch ist die antikoagulatorische Aktivität im Vergleich zu Heparin etwa um den Faktor 4 bis 5 kleiner [222, 249]. Dennoch können OSCS-kontaminierte Heparin-Muster mit Hilfe des Gerinnungstestes in Humanplasma identifiziert werden, da mit steigender OSCS-Kontamination ein deutlicher Aktivitätsverlust von Heparin beobachtet werden kann,

während analoge Experimente in Schafplasma nur eine geringe Aktivitätsabnahme zeigen (siehe Abbildung 3.20 b). Die Anwesenheit von Dermatansulfat zeigt hingegen in Humanplasma keine signifikante Aktivitätsabnahme von Heparin. Der optimierte Gerinnungstest in Humanplasma ermöglicht prinzipiell eine selektive Erfassung OSCS-kontaminierter Heparin-Muster, jedoch werden auch hier nur stark kontaminierte Proben erkannt.

Im Rahmen der Monographie-Überarbeitung wurde die biologische Aktivität von 150 auf 180 I.E./mg erhöht [265], um somit eine deutlichere Differenzierung von reinem und verunreinigtem Heparin-Material zu gewährleisten. Während nach dem alten Monographie-Entwurf beim Einsatz von Humanplasma nur 50 % OSCS-kontaminierter Heparin-Proben erfasst werden konnten, wurden durch die Erhöhung der Mindestaktivität auf 180 I.E./mg neun von zehn OSCS-verunreinigten Heparin-Proben aufgedeckt. Von Nachteil ist, das in diesem Fall auch reine Heparin-Muster teilweise die geforderte Aktivität nicht aufwiesen (siehe Abbildung 3.20).

3.7.2. Infrarot- und Raman-Spektroskopie

Die Infrarot-Spektroskopie (IR) zählt heutzutage im Rahmen der Identitätsprüfung von organischen Arzneistoffen zu den gängigsten Arzneibuch-Routinemethoden. Die Identität eines Arzneistoffes gilt als bestätigt, wenn das IR-Spektrum der zu prüfenden Substanz bezüglich der Bandenlage und -intensität mit dem Spektrum der entsprechenden Referenzsubstanz übereinstimmt. Zusätzliche Banden im IR-Spektrum ermöglichen prinzipiell die Identifizierung potentieller Verunreinigungen; jedoch findet diese spektroskopische Methode im Rahmen der Reinheitsprüfung nur selten Einsatz, da die visuelle Auswertung der Spektren eine Erfassung geringer Verunreinigungsmengen ($\geq 0.5\%$) aufgrund von Bandenüberlagerungen üblicherweise nur für separiert liegende und/oder intensive IR-Absorptionsbanden gewährleistet.

Das Prinzip der Raman-Spektroskopie ähnelt der IR-Spektroskopie, da bei beiden Verfahren Atomgruppen zur Molekülschwingung angeregt und charakteristische Banden im Spektrum registriert werden. Im Raman-Spektrum erhält man v. a. für unpolare oder wenig polare Atomgruppen charakteristische Banden, die im entsprechenden IR-Spektrum nur ungenügend bzw. nicht zugeordnet werden können; somit ergänzen sich IR- und Raman-Spektroskopie. In der pharmazeutischen Analytik

findet die Raman-Spektroskopie bislang kaum Anwendung.

Teilbereiche der IR- und Raman-Spektren – v. a. der Fingerprint-Bereich, der für jeden Arzneistoff ein charakteristisches Bandenmuster, den sogenannten Fingerabdruck eines Moleküls, besitzt – bieten sich in diesen einfach und schnell durchzuführenden Screening-Verfahren ohne vorherige Probenvorbereitung prinzipiell für die Aufdeckung von Arzneimittelfälschungen an. Wie in Abbildung 3.21 dargestellt,⁴ werden im Fingerprint-Bereich von OSCS-kontaminierten Proben im Vergleich zu reinen Heparin-Chargen Bandenverbreiterungen sowie die Detektion von zusätzlichen Schultern beobachtet, die den Absorptionsmaxima charakteristischer OSCS-Banden entsprechen. Eine vollständig isolierte Bande wird für OSCS jedoch nicht beobachtet, wodurch eine visuelle Unterscheidung zwischen kontaminierten und reinen Mustern erschwert bzw. unmöglich gemacht wird [266]; zudem ähnelt das Bandenmuster von Dermatansulfat stark dem der Kontaminante.

Spektren, die sich visuell nicht bzw. nur minimal unterscheiden, können mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse (MVA) in ihre Hauptkomponenten zerlegt werden. Aus einer Fülle an Messdaten werden die wesentlichen, unabhängigen Informationen herausgearbeitet und somit Gruppen gleicher Proben ermittelt. Grundlage dieses statistischen Analysenverfahrens bildet die Kalibrierung; hierfür müssen Kalibrierproben unterschiedlicher Eigenschaften mit einem unabhängigen Verfahren vermessen und eindeutig charakterisiert werden. Am Beispiel von Heparin wurden für die Kalibrierung 57 repräsentative Proben NMR-spektroskopisch vermessen und mit Hilfe der N-Acetyl-Region einer der vier möglichen Gruppen zugeordnet [266]. Mit Hilfe von Regressionsmodellen (“Partial Least Squares” (PLS)) kann dann eine Vorhersage über die Anwesenheit von OSCS getroffen werden (siehe Abbildung 3.22); mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (“Principle Component Analysis” (PCA)) können die Proben in Gruppen ähnlicher Eigenschaften zusammengefasst werden.

Im Rahmen der Untersuchung von 145 Heparin-Mustern ermöglichte die IR- und Raman-Spektroskopie nach Einsatz der multivariaten Datenanalyse eine zuverlässige Identifizierung OSCS-kontaminierter Proben. Einzig Proben mit einem Verunreinigungsgrad $\leq 1\%$ konnten mit beiden Verfahren nicht als kontaminierte Muster

⁴Die IR- und Raman-spektroskopischen Untersuchungen der 145 Heparin-Muster wurden unter Leitung von Dr. Jochen Norwig in den Laboratorien des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) in Bonn durchgeführt.

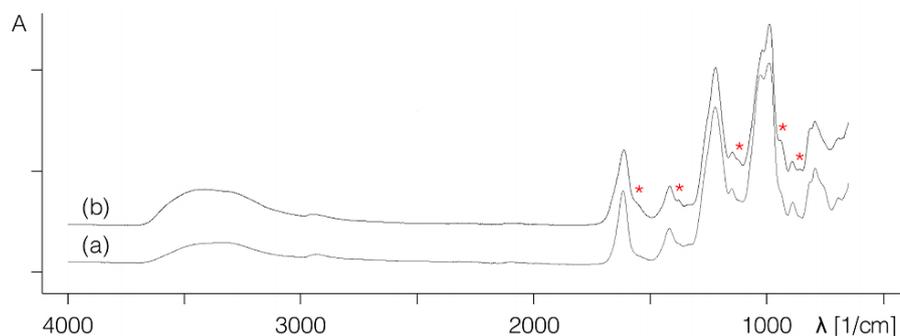


Abbildung 3.21: IR-Spektren einer reinen Heparin-Probe (a) und einer OSCS-kontaminierten Heparin-Charge (b). Die durch OSCS verursachten Bandenverbreiterungen und Schulterausbildungen sind in Spektrum (b) mit “*” gekennzeichnet.

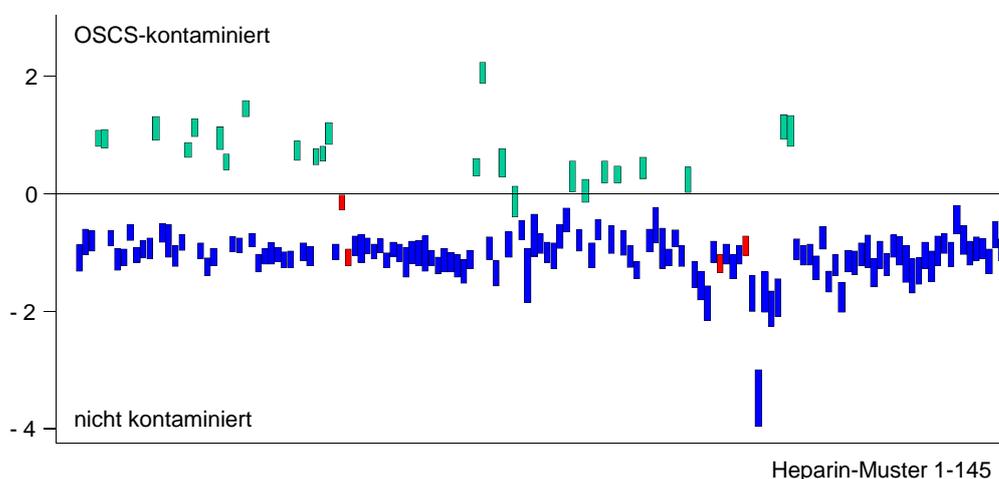


Abbildung 3.22: Einteilung der 145 IR-spektroskopisch untersuchten Heparin-Proben in die beiden Kategorien “nicht kontaminiert” und “OSCS-kontaminiert” mit Hilfe eines PLS-Regressionsmodells. Der Vergleich mit der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zeigt, dass die rot markierten Proben fälschlicherweise als rein eingestuft wurden.

eingestuft werden; als experimentell ermittelte Nachweisgrenze wurde für die IR-Methode deshalb ein Grenzwert von etwa 1 % OSCS bestimmt [266].

3.7.3. Kapillarelektrophorese

Um weitere Zwischenfälle zu vermeiden, ordnete die FDA im März 2008 für alle Heparin-Natrium- und -Calcium-Chargen, die in den Verkehr gebracht werden sollten, eine zusätzliche Untersuchung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und Kapillarelektro-

phorese (CE) an [248, 267]; nur als eindeutig OSCS-frei identifizierte Heparin-API-Chargen durften fortan für die Produktion verwendet werden. Das BfArM übernahm die beiden Prüfverfahren und weitete die Testung zusätzlich auf Niedermolekulare Heparine aus, nachdem in Enoxaparin-Fertigarzneimitteln ebenfalls OSCS detektiert wurde [217].

FDA-Methode. Die Trennung der polyanionischen Substanzen erfolgt mit Hilfe einer Quarzkapillare, die einen Innendurchmesser von 50 μm , eine Gesamtlänge von 64.5 cm und eine effektive Länge von 56 cm aufweist. Der Hintergrundelektrolyt besteht aus 36 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer, der mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3.5 eingestellt wird. Zur Herstellung der Probelösung werden etwa 10 mg Heparin in 1 ml Milli-Q-Wasser gelöst, mittels eines Celluloseacetat-Membranfilters (0.22 μm) filtriert und unter hydrodynamischer Injektion bei einem Druck von 50 mbar über eine Zeitspanne von 10 s injiziert. Die Trennung der Polysaccharide erfolgt bei einer Temperatur von 25 °C, die Detektion bei einer Wellenlänge von 200 nm. Die Migration der drei Komponenten erfolgt in folgender Reihenfolge: OSCS, Heparin, Dermatansulfat (Abbildung 3.23 a).

Die CE-Methode ermöglicht, wie in Abbildung 3.23 a dargestellt, eine Unterscheidung zwischen Heparin, OSCS und Dermatansulfat. Die entsprechenden Elektropherogramme zeichnen sich durch breite Peaks mit teilweise starken Überlappungen aus, die die Detektion geringer OSCS- bzw. Dermatansulfat-Mengen sowie eine quantitative Analyse über die Peakflächen unmöglich machen.

Die kapillarelektrophoretische Untersuchung der 145 Heparin-Muster ermöglicht,⁵ wie die ^1H -NMR-Spektroskopie, eine Unterteilung der zu prüfenden Chargen in die vier beschriebenen Kategorien; zusätzliche Peaks, die bekannten Verwandten Substanzen wie Chondroitinsulfat A/C oder noch unbekanntem Kontaminanten zuzuordnen sind, wurden in keinem Elektropherogramm detektiert. Im Vergleich zu den Ergebnissen der ^1H -NMR-Spektroskopie, die die Detektion von bis zu 0.1 % OSCS bzw. 0.5 % Dermatansulfat gewährleistet, konnten aufgrund starker Peaküberlagerungen mit dem Hauptpeak Heparin OSCS- bzw. Dermatansulfat-Konzentrationen von $\leq 1\%$ nicht erfasst werden; die entsprechenden Muster wurden somit fälschlicherweise als "rein"

⁵D. Brinz, U. Holzgabe (unveröffentlicht).

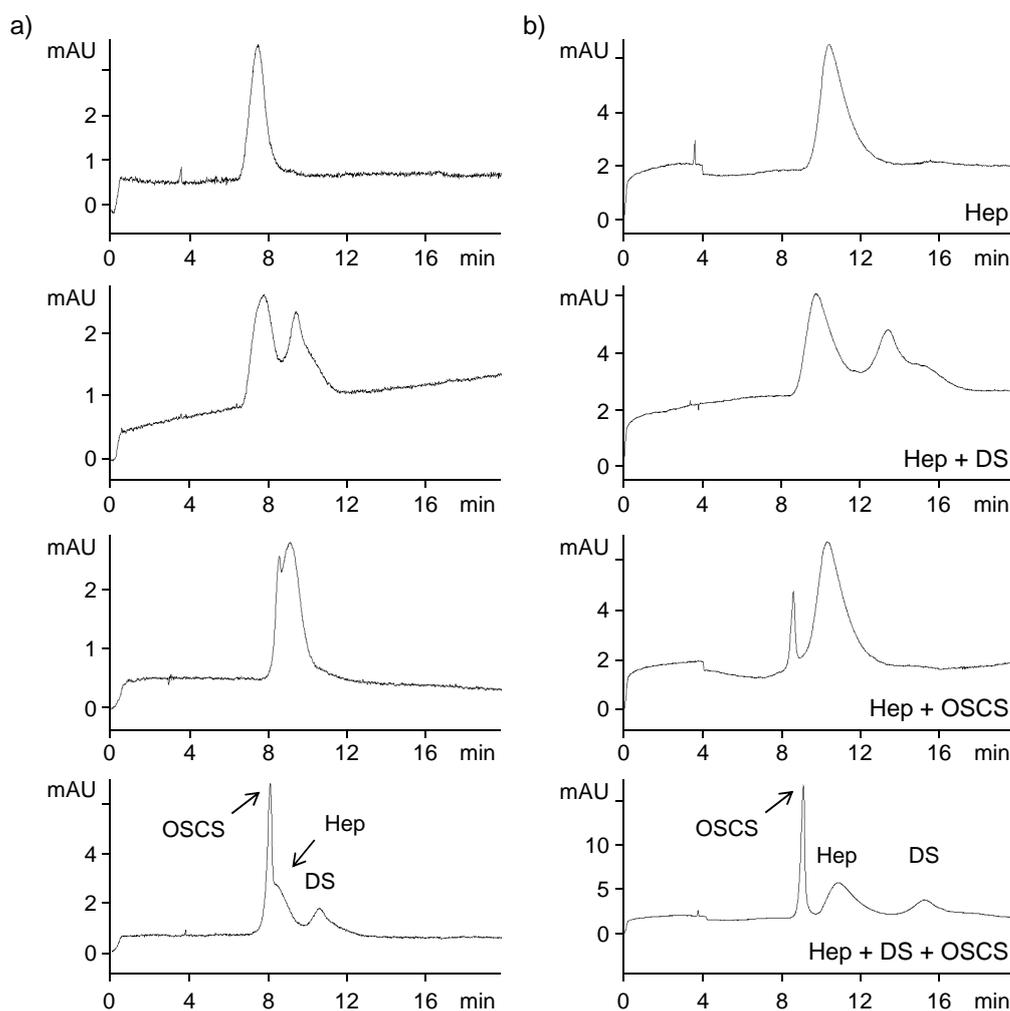


Abbildung 3.23: CE-Elektropherogramme repräsentativer Heparin-Proben der vier ermittelten Kategorien – “Hep”, “Hep + DS”, “Hep + OSCS” sowie “Hep + DS + OSCS” – nach FDA (a) und Somsen et al. (b).

eingestuft. Zudem wurden vereinzelt laut NMR-Analyse als “rein” deklarierte Proben aufgrund eines unregelmäßigen Verlaufs der Basislinie, v. a. im Dermatansulfat-Bereich, als geringfügig DS-haltig charakterisiert. Für den Großteil der untersuchten Proben wurden jedoch mit der ^1H -NMR-Spektroskopie übereinstimmende Ergebnisse erhalten (siehe Tabelle 3.6).

Da starke Peaküberlagerungen eine empfindliche Erfassung sowie eine quantitative Bestimmung potentieller Verunreinigungen in Heparin mit Hilfe der Kapillarelektro-

phorese nicht ermöglichten, war eine Optimierung der von der FDA veröffentlichten CE-Methode zwingend notwendig. Den beiden Gruppen um Somsen et al. [268] sowie Wieglos et al. [269] gelang durch den Einsatz hochmolarer Puffer eine deutliche Verbesserung der Peakseparation (siehe Abbildung 3.23 b), die zum einen eine deutliche Erniedrigung der Nachweisgrenze von OSCS (0.1 %) und Dermatansulfat (0.5–0.6 %) mit sich brachte, und zum anderen nun eine quantitative Reinheitsprüfung erlaubt. Die CE-Methode nach Somsen et al. wurde vom EDQM als geeigneter Ersatz für die FDA-Methode anerkannt.

Optimierte Methode nach Somsen. Die Trennung der GAG 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 mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3.0 eingestellt wird. 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 erzielt werden. Die Migration der drei Komponenten erfolgt in gleicher Reihenfolge.

Die kapillarelektrophoretische Untersuchung unter Einsatz der nach Somsen et al. modifizierten Methode ermöglichte eine empfindliche Aufdeckung OSCS-haltiger Heparin-Proben;⁶ alle nach ¹H-NMR-Spektroskopie als “OSCS-kontaminiert” eingestufte Muster wurden erkannt. Eine zuverlässige Identifizierung geringer Dermatansulfat-Mengen nahe der Nachweisgrenze von $\text{LOD} \approx 0.5\%$ war dagegen, bedingt durch eine geringere Auflösung sowie die sehr breite und flache Peakform, nicht für alle Muster möglich. Im Vergleich zur Vorgängermethode kann diese Methode jedoch als geeignete Alternative zur ¹H-NMR-Spektroskopie bezeichnet werden. Restlösungsmittel, die NMR-spektroskopisch empfindlich nachgewiesen und quantifiziert werden können, werden aufgrund eines fehlenden Chromophors, welches für die UV-Detektion essentiell ist, im Elektropherogramm nicht nachgewiesen.

⁶D. Brinz, U. Holzgrabe (unveröffentlicht).

3.7.4. SAX-HPLC

Polysulfatierte Glykosaminoglykane besitzen unter physiologischen Bedingungen als hochgeladene Polyanionen die Fähigkeit, an positiv geladene Strukturen zu binden. Diese Eigenschaft kann gezielt für die analytische Trennung von Glykosaminoglykanen eingesetzt werden; ein geeignetes Verfahren stellt die Anionenaustauschchromatographie dar. Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf einer unterschiedlich starken Wechselwirkung der Analytionen mit funktionellen Gruppen der stationären Phase. Anionen mit hoher Selektivität zur positiv geladenen Matrix werden daher stärker reteniert als Anionen mit geringerer Affinität. Bei der “Strong Anion Exchange”-Chromatographie trägt die unlösliche Matrix als funktionelle Gruppen quartäre Ammoniumgruppen, die mit den negativ geladenen Substituenten – Sulfat- und Carboxylgruppen – der Glykosaminoglykanen in Wechselwirkung treten können.

Die mobile Phase A besteht aus einem 2.5 mM Natriumdihydrogenphosphatpuffer, für die mobile Phase B wird zusätzlich Natriumperchlorat (1 M) zum Phosphatpuffer zugesetzt; beide Puffer werden mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3.0 eingestellt. Zur Herstellung der Probelösung werden 20 mg Heparin in 1 ml Milli-Q-Wasser gelöst, mittels Celluloseacetat-Membranfilter (0.22 μm) filtriert und jeweils 10 μl der Untersuchungslösung injiziert. Die Glykosaminoglykane werden bei einer Temperatur von 40 °C mit einer Dionex IonPac AS11-Säule (2 \times 250 mm, 9 μm) bei einer Flussrate von 0.22 ml/min unter Gradientenelution getrennt und bei einer Wellenlänge von 202 nm detektiert [270]. Die Komponenten eluieren in folgender Reihenfolge: Dermatansulfat, Heparin, OSCS (Abbildung 3.24).

Die SAX-Methode ermöglicht, wie in Abbildung 3.24 dargestellt, eine Trennung der drei Glykosaminoglykane Heparin, OSCS und Dermatansulfat. Da unter den gewählten Analysebedingungen Chondroitinsulfat A/C mit Dermatansulfat coeluiert, kann mit dieser Methode nicht zwischen den beiden natürlich vorkommenden Heparin-Verunreinigungen unterschieden werden. Chromatogramme mit einem zusätzlichen Peak bei etwa 25 min lassen jedoch Dermatansulfat als Hauptverunreinigung vermuten, da Chondroitinsulfat A/C während des Reinigungsprozesses (fast) vollständig abgetrennt werden kann. Eine stark variierende Kettenlänge und Anzahl der Sulfatgruppen in den GAG-Molekülen bedingt Chromatogramme mit sehr breiten Peaks, die über mehrere Minuten eluieren; so eluiert Heparin beispielsweise über knapp

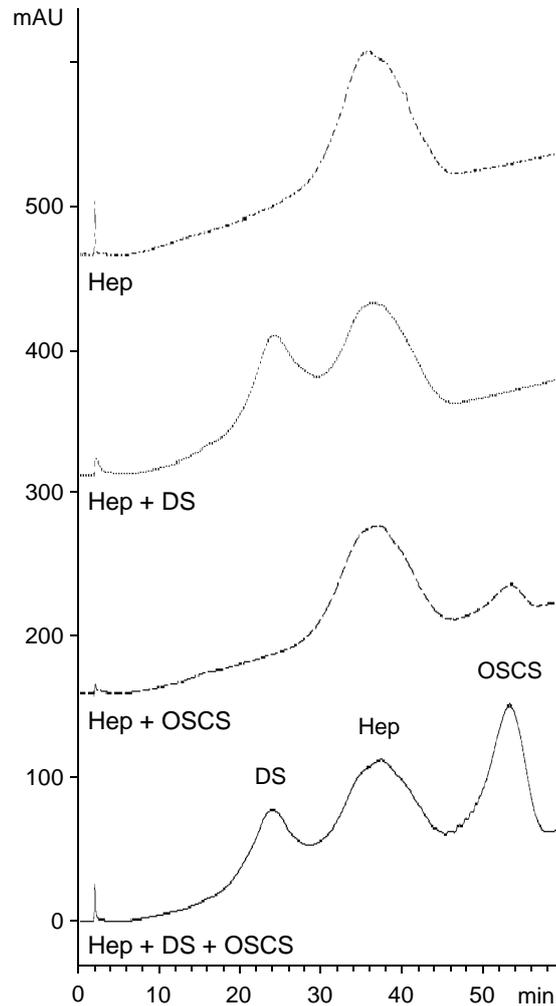


Abbildung 3.24: SAX-HPLC-Chromatogramme repräsentativer Heparin-Proben der vier ermittelten Kategorien “Hep”, “Hep + DS”, “Hep + OSCS” sowie “Hep + DS + OSCS”.

20 min (siehe Abbildung 3.24).

Die Analyse der 145 Heparin-Muster mittels SAX-HPLC ermöglicht,⁷ wie die ¹H-NMR-Spektroskopie, eine Unterteilung der zu prüfenden Chargen in die vier beschriebenen Kategorien; zusätzliche Peaks wurden in keinem Chromatogramm detektiert. In der Literatur wird für OSCS eine Nachweisgrenze von etwa 0.05 % beschrieben [270]; dennoch wurden drei geringfügig OSCS-kontaminierte Heparin-Proben (OSCS \approx 0.5 %) mittels HPLC nicht identifiziert. Ein ähnlicher Effekt ist

⁷D. Brinz, U. Holzgrabe (unveröffentlicht).

für Dermatansulfat beobachtbar. Laut Trehy et al. [271] liegt die Nachweisgrenze für Dermatansulfat bei etwa 0.1 %. Heparin-Proben mit einem durchschnittlichen Dermatansulfat-Gehalt von 0.5 %, die im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein eindeutig erkennbares Signal bei $\delta = 2.08$ ppm aufwiesen, konnten teilweise aufgrund der sehr breiten, überlappenden Peaks von Heparin und Dermatansulfat nicht eindeutig der Kategorie "Heparin mit Dermatansulfat" zugeordnet werden. Während eine geringe Peakauflösung die quantitative Analyse von stark Dermatansulfat-kontaminierten Proben negativ beeinflusst, kann der Gehalt von OSCS in Heparin nach Integration der entsprechenden Peaks mit Hilfe der Externen-Standard-Methode bestimmt werden. Von Nachteil ist dagegen, dass unbekannte Verunreinigungen, deren Peaks ähnliche Retentionszeiten wie Heparin aufweisen, nicht aufgedeckt werden können; zudem werden Restlösungsmittel ebenfalls nicht im Chromatogramm detektiert.

3.8. Revision der Heparin-Monographie

Neben den bereits beschriebenen Verfahren wurde im Zuge des Heparin-Skandals eine Vielzahl weiterer, innovativer Methoden entwickelt, die im Vergleich zu den "veralteten" Prüfmethode internationaler Arzneibücher die eindeutige Detektion, Charakterisierung bzw. Quantifizierung potentieller Glykosaminoglykan-Verunreinigungen und/oder Verunreinigungen aus dem Extraktions- und Reinigungsverfahren ermöglichen. Ein Großteil der entwickelten Methoden zielt auf eine empfindliche Identifizierung der Kontaminante OSCS bzw. der natürlich vorkommenden Heparin-Verunreinigung Dermatansulfat ab. Zu nennen sind hier weitere spektroskopische Methoden wie das zweidimensionale DOSY-NMR-Experiment [272], Nahinfrarotspektroskopie [273, 274] und Zirkulardichroismus [275, 276], elektrophoretische Verfahren wie eindimensionale Polyacrylamid- bzw. Celluloseacetat-Gelelektrophorese [241, 277] und neuentwickelte CE-Methoden [278, 279], Fluoreszenz-Mikroplatten-Assay [280, 281], Polymerase-Kettenreaktion [282], potentiometrisch arbeitende Polyanionen-Sensoren [283], chromatographische bzw. elektrophoretische Verfahren gekoppelt mit massenselektiven Detektoren oder NMR-Spektroskopie [284, 285], amidolytische Faktor Xa- und Faktor IIa-Bestimmung mit photometrischer bzw. fluorimetrischer Detektion [245, 286], selektive Gerinnungstests wie Prothrombinzeit-

Tabelle 3.5: Revidierte Heparin-Monographie des Ph. Eur. 6.8 und USP 35(5).

Ph. Eur. 6.8-Monographie	USP 35(5)-Monographie
Prüfung auf Identität	
Gerinnungstest in Schafplasma ¹ H-NMR-Spektroskopie SAX-HPLC	¹ H-NMR-Spektroskopie SAX-HPLC Aktivitätsverhältnis Anti-Faktor Xa zu Anti-Faktor IIa
Prüfung auf Reinheit	
SAX-HPLC	Verhältnis Galactosamin zu Gesamt- Hexosamin mittels HPLC
Wertbestimmung	
Aktivität in Schafplasma	Aktivität Anti-Faktor IIa

Bestimmung [287] sowie multivariate Datenauswertung, vorwiegend von ¹H-NMR-Messdaten [249, 288–291]. Zahlreiche, in der Literatur beschriebene Vergleiche von bereits etablierten NMR- und SAX-HPLC-Methoden mit den hier aufgeführten Alternativverfahren zeigen deutlich, dass die Bestimmung biologischer Parameter, wie die Hemmung von Faktor Xa und Faktor IIa und die Verkürzung der Prothrombin-Zeit, sowie die statistische Auswertung von spektroskopisch aufgenommenen Messdaten mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse eine selektive und empfindliche Identifizierung von OSCS und weiteren GAG-Verunreinigungen ermöglichen [245, 249, 274, 286, 288, 289]; zudem können hier ebenfalls quantitative Aussagen über den Gehalt der GAG-Verunreinigungen getroffen werden.

Aus dieser Vielzahl neuentwickelter Methoden konnten nun im Rahmen der zweiten Revision der Heparin-Monographie geeignete Methoden hoher Empfindlichkeit, Selektivität und Robustheit ausgewählt werden. Einsatz fanden hierbei unabhängige Methoden mit unterschiedlicher Funktionsweise wie NMR-Spektroskopie, SAX-HPLC und Anti-Faktor Xa- bzw. IIa-Aktivitätsbestimmung (siehe Tabelle 3.5) [243, 292], um so die Qualität des Arzneistoffes zu gewährleisten und gleichzeitig neue, bisher unbekannte Verunreinigungen in Zukunft schneller erfassen zu können. Die revidierte Version ermöglicht nun eine empfindliche Identifizierung und Begrenzung der Kontaminante OSCS ($\leq 0.1\%$) sowie natürlich vorkommender Galactosamin-haltiger

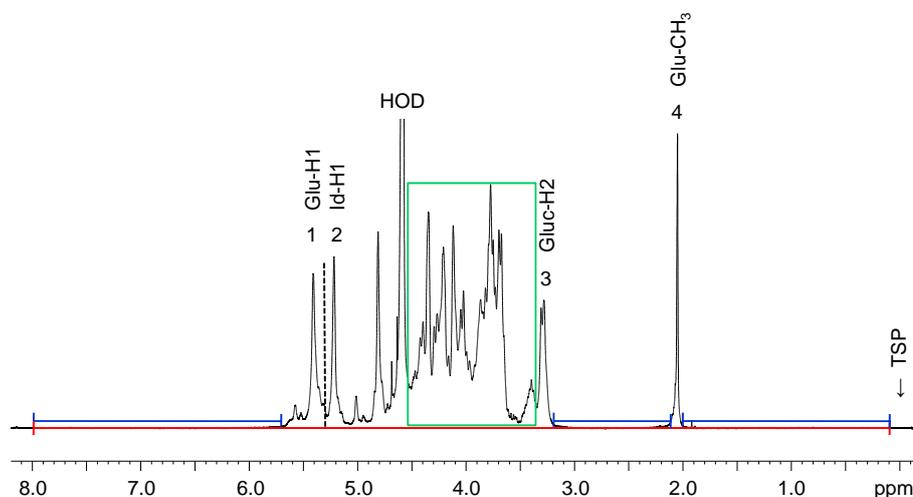


Abbildung 3.25: Einteilung des ^1H -NMR-Spektrums von Heparin-Natrium in die in der USP aufgeführten Teilbereiche $\delta = 0.1\text{--}2.0$, $2.1\text{--}3.2$ und $5.7\text{--}8.0$ ppm (blau) sowie $\delta = 3.35\text{--}4.55$ ppm (grün). Ausgehend von einer gemeinsamen Basislinie (rot) darf für zusätzliche Resonanzen in den blau- und grün-markierten Bereichen eine maximale Signalhöhe von 4 bzw. 200 % der mittleren Höhe der beiden Resonanzen 1 und 2 nicht überschritten werden.

Polysaccharide wie Dermatansulfat und Chondroitinsulfat A/C ($\leq 1.0\%$ (USP) bzw. $\leq 2.0\%$ (Ph. Eur.)) mittels NMR-Spektroskopie und HPLC. Zudem wird mit der in der USP unter “Prüfung auf Identität” aufgeführten ^1H -NMR-Methode der Gehalt weiterer Heparin-Derivate und Restlösungsmittel aus dem Extraktions- und Reinigungsprozess mit Hilfe einer Signalhöhenbestimmung begrenzt. Hierfür wird, wie in Abbildung 3.25 dargestellt, das NMR-Spektrum in unterschiedliche Teilbereiche aufgeteilt. Im blau markierten Bereich von $\delta = 0.1\text{--}2.0$, $2.1\text{--}3.2$ und $5.7\text{--}8.0$ ppm darf die Signalhöhe nicht identifizierbarer Resonanzen nicht größer als 4 % der mittleren Höhe der beiden Signale 1 und 2 sein. Zusätzlich darf im grün markierten Bereich von $\delta = 3.35\text{--}4.55$ ppm die maximale Signalhöhe 200 % der mittleren Höhe der beiden Signale bei $\delta = 5.42$ ppm und $\delta = 5.21$ ppm nicht überschreiten.

3.9. Zusammenfassung

Die im vorliegenden Kapitel dargestellte Heparin-Studie von 145 realen, teilweise mit OSCS und weiteren, natürlich vorkommenden GAG-Verunreinigungen kontaminierte API-Proben des deutschen Marktes belegt eindrucksvoll die Eignung der

^1H -NMR-Spektroskopie im Rahmen der Identitäts- und Reinheitsanalytik von komplexen Polysaccharid-Gemischen wie Heparin. Im Vergleich zu den unspezifischen und unempfindlichen Prüfmethode des Ph. Eur. 6.0, die für kontaminierte Chargen keine Qualitätsmängel aufzeigten, ermöglicht die ^1H -NMR-Spektroskopie eine zuverlässige Identifizierung und Quantifizierung potentieller Glykosaminoglykan-Verunreinigungen. Daneben erlaubt die hier beschriebene NMR-spektroskopische Methode die qualitative und quantitative Bestimmung von Lösungsmittelrückständen und Heparin-Derivaten, die aus dem Extraktions- und Reinigungsprozess stammen.

Um das Potential dieser spektroskopischen Technik zu untermauern, wurden die NMR-spektroskopisch untersuchten Heparin-Muster zusätzlich mit gängigen Prüfmethode des Ph. Eur. 6.0 wie spezifischer Drehung und Wertbestimmung sowie weiteren, neuentwickelten Methoden wie Kapillarelektrophorese, SAX-HPLC, IR- und Raman-Spektroskopie vermessen und die ermittelten Ergebnisse mit denen der ^1H -NMR-Spektroskopie verglichen und bewertet. Während unter Einsatz der beiden Arzneibuchverfahren keine Heparin-Fälschungen aufgedeckt werden konnten, erwiesen sich die neuentwickelten Reinheitsmethoden als geeignet.

Spektroskopische Verfahren wie IR- und Raman-Spektroskopie zeigen in ihren jeweiligen Spektren zwar keine isolierten Banden für OSCS und Dermatansulfat, jedoch ermöglicht eine statistische Auswertung der Messdaten mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse die zuverlässige Identifizierung OSCS-kontaminierter Heparin-Proben bis zu einer Nachweisgrenze von etwa 1%. Von Vorteil ist hier die einfache und schnelle Durchführung der Experimente ohne vorherige Probenvorbereitung, so dass Heparin-Chargen selbst direkt vor Ort mit einer mobilen Einheit untersucht und charakterisiert werden können. Zudem bietet die multivariate Datenanalyse den Vorteil, dass Heparin-Proben mit neuen, unbekanntem Verunreinigungen im Rahmen der statistischen Auswertung identifiziert oder als "auffällig" eingestuft werden können, da sie bereits bekannten Verunreinigungsprofilen nicht zugeordnet werden können.

Eine deutliche Übereinstimmung der Ergebnisse wurde im Rahmen dieser umfangreichen Heparin-Studie ebenfalls für chromatographische und elektrophoretische Verfahren beobachtet. Beide Methoden ermöglichen eine empfindliche Detektion von OSCS und Dermatansulfat; die entsprechenden Nachweisgrenzen liegen hier im Bereich der ^1H -NMR-Spektroskopie. Da beide Methoden jedoch auf die eindeutige Identifizierung von OSCS optimiert wurden, besteht hier die Gefahr, dass andere

Glykosaminoglykane oder neue, noch unbekannte Verunreinigungen in Zukunft im Rahmen der Qualitätskontrolle nicht entdeckt werden können, da die entsprechenden Peaks mit der Hauptkomponente Heparin oder möglichen Verunreinigungen wie OSCS und Dermatansulfat coeluierten.

Im Rahmen dieser umfangreichen Studie hat sich die NMR-Spektroskopie als Methode der Wahl für die Qualitätskontrolle von Heparin erwiesen. Die einfache und schnelle Durchführung der ^1H -NMR-Experimente ohne aufwendige Probenvorbereitung ermöglicht v. a. über die charakteristischen N-Acetyl-Resonanzen eine selektive und empfindliche Identifizierung sowie die quantitative Bestimmung der zu erwartenden GAG-Verunreinigungen. Ergänzend können weitere ein- und zweidimensionale NMR-Experimente die Ergebnisse der ^1H -NMR-Spektroskopie bestätigen, weitere Verunreinigungen aufdecken und gleichzeitig wertvolle strukturelle Informationen liefern. Dennoch sollte künftig der Schwerpunkt in der Qualitätskontrolle von Heparin, wie auch für weitere tierische Arzneistoffe mit komplexer chemischer Zusammensetzung, nicht nur auf einem einzelnen "optimalen" Verfahren liegen. Vielmehr ist eine Analyse mit mehreren orthogonalen Prüfmethoden zu empfehlen, die die ermittelten Einzelergebnisse bestätigen oder ergänzen, um so in Zukunft weitere Heparin-Skandale zu vermeiden.

Tabelle 3-6: Ergebnisse der Reinheitsanalytik von 145 Heparin-Mustern mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (NMR), Kapillarelektrophorese nach FDA (CE-FDA) und Somsen et al. (CE opt.), SAX-HPLC (HPLC), spezifischer Rotation ($[\alpha]_D^{20}$), Wertbestimmung in Schafplasma (SP) und Humanplasma (HP), Trocknungsverlust (H₂O) und quantitativer Analyse von OSCS und Dermatansulfat (DS), jeweils mittels Höhen- und Flächenbestimmung. Für die verschiedenen Methoden (NMR, CE und HPLC) ist jeweils die Zugehörigkeit zu einer der vier Kategorien “reines Heparin” (1), “Heparin mit Dermatansulfat” (2), “Heparin mit OSCS” (3) und “Heparin mit Dermatansulfat und OSCS” (4) aufgeführt.

Nr.	AM	WS	NMR	weitere Verunreinigungen	CE FDA	CE opt.	HPLC	$[\alpha]_D^{20}$	SP [IU/mg]	HP [IU/mg]	OSCS [%]		DS [%]		H ₂ O [%]
											Höhe	Fläche	Höhe	Fläche	
01	HS A	WS A	1	EtOH	2	2	2	45.3°	185	173					3.8
02	HS B	WS B	1	NaOAc, Aceton	2	2	2	47.5°	194	177					4.5
03	HS B	WS B	1	NaOAc, Aceton	1	2	1	49.1°	195	197					7.6
04	HS C	WS C	4	EtOH	4	4	4	34.6°	193	131	14.0	10.6	0.8	0.4	14.3
05	HS C	WS C	4		4	4	4	35.2°	206	159	14.2	11.0	0.9	1.1	14.9
06	HS C	WS C	2	EtOH	2	2	2	45.9°	182	163			0.2	0.2	10.7
07	HS C	WS D	2		2	2	2	40.3°	182	191			2.9	2.6	18.6
08	HS C	WS D	2	EtOH	2	2	2	42.7°	180	170			2.7	2.6	10.9
09	HS C	WS D	2	Aceton	2	2	2	40.1°	178	159			4.5	4.1	15.5
10	HS D	WS E	2	EtOH, Aceton	2	2	2	49.1°	184	181			2.1	2.1	6.0
11	HS D	WS E	2	EtOH, Aceton	2	2	2	49.1°	206	156			1.8	1.9	9.7
12	HS D	WS E	2	EtOH, Aceton	2	2	2	51.4°	179	173			1.9	2.0	6.2
13	HS D	WS E	4	EtOH, Aceton	4	4	4	42.3°	227	138	9.1	8.2	2.5	1.7	15.6
14	HS D	WS E	2	EtOH, Aceton	2	2	2	46.3°	197	166			3.9	3.5	13.9
15	HS D	WS E	2	EtOH, Aceton	2	2	2	43.6°	190	173			4.0	3.5	5.5
16	HS D	WS E	2	EtOH, Aceton	1	1	1	49.6°	169	165			0.1	0.2	19.8

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Table 3.6 – Fortgesetzt

Nr.	AM	WS	NMR	weitere Verunreinigungen	CE FDA	CE opt.	HPLC	$[\alpha]_D^{20}$	SP [IU/mg]	HP [IU/mg]	OSCS [%]		DS [%]		H ₂ O [%]
											Höhe	Fläche	Höhe	Fläche	
17	HS D	WS E	1	EtOH, Aceton	1	1	1	50.0°	183	182					16.1
18	HS D	WS F	3	NaOAc, EtOH, Aceton	4	4	4	41.1°	176	148	10.3	9.6			13.9
19	HS D	WS F	4	NaOAc, EtOH	4	4	4	33.2°	169	145	21.6	13.7	0.5	n.d.	18.4
20	HS D	WS F	1	NaOAc, EtOH, Aceton	2	1	1	45.8°	186	189					7.7
21	HS D	WS F	1	NaOAc, EtOH, Aceton	2	2	2	50.5°	182	182					6.6
22	HS D	WS F	2	NaOAc, EtOH, FA, Aceton	1	1	2	48.5°	186	214			0.5	0.2	13.7
23	HS E	WS C	4	NaOAc, EtOH	3	4	4	35.9°	179	143	13.7	10.8	0.7	0.4	10.9
24	HS F	WS F	4	NaOAc, EtOH	3	3	3	42.2°	172	155	5.5	7.0	0.4	0.2	17.3
25	HS F	WS F	1	NaOAc	2	2	2	48.2°	189	196					15.3
26	HS F	WS E	1	NaOAc	1	1	1	45.8°	178	178					18.3
27	HS F	WS F	4	NaOAc, EtOH, Aceton	4	4	4	36.2°	174	132	17.6	12.7	0.4	n.d.	12.0
28	HS F	WS F	2	NaOAc	2	2	2	43.3°	170	177			1.3	1.5	20.8
29	HS F	WS F	2	NaOAc, EtOH	2	2	2	47.2°	196	197			0.8	0.9	12.0
30	HS F	WS F	2	NaOAc, EtOH	2	2	2	44.1°	183	191			2.0	2.1	15.5
31	HS F	WS F	2	NaOAc, EtOH	2	2	2	43.4°	181	190			2.9	2.6	15.4
32	HS G	WS G	1	NaOAc	1	1	1	45.6°	199	205					14.9
33	HS G	WS E	1	NaOAc, EtOH	1	1	1	46.4°	206	215					12.8
34	HS G	WS G	2	NaOAc, EtOH	2	2	2	44.6°	194	195			0.2	0.3	22.7
35	HS G	WS G	4	NaOAc, EtOH	3	4	4	41.2°	192	173	5.5	6.5	1.6	1.3	15.2

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Tabelle 3.6 – Fortgesetzt

Nr.	AM	WS	NMR	weitere Verunreinigungen	CE FDA	CE opt.	HPLC	$[\alpha]_D^{20}$	SP [IU/mg]	HP [IU/mg]	OSCS [%]		DS [%]		H ₂ O [%]
											Höhe	Fläche	Höhe	Fläche	
36	HS G	WS G	2	NaOAc, EtOH	2	2	2	44.7°	193	190			2.1	1.9	15.2
37	HS G	WS E	1	NaOAc, EtOH	1	1	1	48.9°	210	204					14.5
38	HS G	WS G	4	NaOAc, EtOH	4	3	3	42.6°	207	180	7.7	8.0	0.4	0.4	9.6
39	HS G	WS G	4	NaOAc, EtOH	4	3	3	41.1°	202	180	7.5	7.8	0.4	0.3	17.5
40	HS G	WS G	4	NaOAc, EtOH	4	4	4	43.2°	204	186	7.2	7.3	0.3	0.1	7.5
41	HS G	WS G	2	NaOAc, EtOH	2		2	48.0°	203	209			0.7	0.8	9.1
42	HS G	WS E	3	NaOAc, EtOH	3		3	47.4°	209	208	3.6	3.3			18.3
43	HS H	WS H	4	FA	2		1	45.6°	180	183	0.5	0.3	0.4	0.5	17.5
44	HS H	WS H	2	FA	1		1	43.2°	182	187			0.5	0.6	14.5
45	HS H	WS H	1		1		1	44.1°	175	167					13.7
46	HS I	WS F	1	NaOAc, EtOH	1		1	50.5°	199	207					15.6
47	HS I	WS F	1	EtOH	1		1	49.7°	179	169					16.9
48	HS I	WS F	2	NaOAc, EtOH	2		2	47.7°	192	187			0.9	0.9	11.6
49	HS I	WS F	1	NaOAc	1		1	44.3°	210	212					15.7
50	HS I	WS F	2	NaOAc	1		1	44.3°	190	211			0.3	0.4	17.5
51	HS J	WS E	2	EtOH	2		2	44.1°	177	168			3.3	3.0	10.1
52	HS K	WS I	1	EtOH	1		1	49.2°	187	174					12.3
53	HS K	WS E	2	EtOH	2		2	45.6°	182	182			2.9	2.7	15.5
54	HS L	WS E	2	EtOH	2		2	48.5°	173	167			2.1	2.1	8.2

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Tabelle 3.6 – Fortgesetzt

Nr.	AM	WS	NMR	weitere Verunreinigungen	CE FDA	CE opt.	HPLC	$[\alpha]_D^{20}$	SP [IU/mg]	HP [IU/mg]	OSCS [%]		DS [%]		H ₂ O [%]
											Höhe	Fläche	Höhe	Fläche	
55	HS L	WS J	2		2		2	44.4°	182	201			0.6	0.8	17.6
56	HS A	WS K	2	NaOAc, EtOH, FA	2		1	48.9°	209	216			0.6	0.8	13.7
57	HS A	WS K	2	NaOAc, EtOH, FA	2		1	46.5°	209	190			0.5	0.5	8.5
58	HS A	WS K	2	EtOH, FA	1		1	45.7°	205	217			0.6	0.7	19.1
59	HS M	WS E	2	EtOH	2		2	46.0°	164	157			2.1	2.1	16.9
60	HS N	WS L	1	NaOAc, EtOH	1		1	46.6°	175	177					17.4
61	HS O	WS E	2	EtOH				47.9°					1.8	1.8	22.5
62	HS O	WS E	2	EtOH				48.9°					1.9	3.8	12.5
63	HS O	WS F	3	NaOAc				37.8°			10.2	9.8			19.0
64	HS O	WS F	4	NaOAc, EtOH				30.8°			22.9	13.7	0.5	0.1	18.0
65	HS O	WS F	2	NaOAc, EtOH				46.3°					0.5	0.5	18.5
66	HS O	WS F	1	NaOAc, EtOH				44.7°							16.2
67	HS O	WS F	3	NaOAc, EtOH				38.4°			3.3	3.3			19.3
68	HS O	WS M	1	NaOAc				43.2°							4.5
69	HS O	WS N	4	EtOH, FA				36.5°			7.8	6.8	4.2	2.7	25.0
70	HS O	WS N	2	NaOAc, EtOH, FA				43.9°					1.4	1.6	14.1
71	HS O	WS A	1	EtOH, 2.21 ppm				43.7°							18.2
72	HS O	WS A	1	EtOH				45.2°							19.6
73	HS O	WS D	2					43.1°					2.5	2.5	22.7

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Tabelle 3.6 – Fortgesetzt

Nr.	AM	WS	NMR	weitere Verunreinigungen	CE FDA	CE opt.	HPLC	$[\alpha]_D^{20}$	SP [IU/mg]	HP [IU/mg]	OSCS [%]		DS [%]		H ₂ O [%]
											Höhe	Fläche	Höhe	Fläche	
74	HS O	WS D	2	EtOH				48.5°					0.6	0.6	19.9
75	HS O	WS E	1	EtOH				48.2°							19.4
76	HS O	WS E	2	EtOH				42.5°					3.3	3.0	20.2
77	HS O	WS O	2	EtOH				40.6°					1.9	1.8	18.5
78	HS O	WS O	4	EtOH, FA, 2.10 ppm				33.4°				2.5	2.1	5.8	15.0
79	HS O	WS E	1	EtOH				47.2°							17.2
80	HS O	WS F	3	NaOAc, EtOH				40.5°				3.2	3.0		26.2
81	HS O	WS E	1	EtOH				47.4°							30.9
82	HS O	WS J	2	EtOH				44.2°					0.6	0.7	17.4
83	HS O	WS J	4	EtOH				40.0°				5.4	6.2	1.5	18.2
84	HS O	WS J	2	EtOH				46.1°					0.4	0.6	18.7
85	HS O	WS J	4	EtOH				39.8°				7.0	7.4	0.4	18.4
86	HS O	WS J	2	EtOH				44.1°					0.6	0.7	22.4
87	HS O	WS F	1	NaOAc				44.1°							19.7
88	HS O	WS E	1	EtOH				46.8°							18.9
89	HS O	WS E	4	EtOH				34.7°				8.7	8.0	2.3	18.3
90	HS O	WS J	2					44.1°					0.7	0.9	18.1
91	HS O	WS O	2	EtOH, FA, 2.10 ppm				38.6°					5.5	4.6	
92	HS O	WS I	1	EtOH				44.1°							17.3

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Tabelle 3.6 – Fortgesetzt

Nr.	AM	WS	NMR	weitere Verunreinigungen	CE FDA	CE opt.	HPLC	$[\alpha]_D^{20}$	SP [IU/mg]	HP [IU/mg]	OSCS [%]		DS [%]		H ₂ O [%]	
											Höhe	Fläche	Höhe	Fläche		
93	HS O	WS E	1					44.5°							17.7	
94	HS O	WS E	1					45.7°							26.8	
95	HS O	WS P	1	NaOAc				45.3°							16.1	
99	HS O	WS O	4	EtOH, FA				41.0°				4.2	4.7	1.0	0.9	14.7
100	HS P	k.A.	2	EtOH	2		2	45.9°						1.1	1.2	11.7
101	HS P	k.A.	2	EtOH	2		2	46.7°						0.5	0.6	12.1
102	HS P	k.A.	2	EtOH	2		2	48.0°						0.6	0.8	14.5
103	HS Q	WS Q	2	EtOH, NaOAc	2		2	42.4°	166	181				2.3	2.2	13.5
104	HS Q	WS Q	4	EtOH, NaOAc	2		2	41.4°	153	152		0.6	0.5	2.4	2.6	19.6
105	HS Q	WS Q	2	EtOH, NaOAc	2		2	41.5°	161	173				1.6	1.7	11.1
106	HS Q	WS E	2	EtOH	2		2	48.6°	160	155				2.4	2.6	16.3
107	HS Q	WS E	2	EtOH	2		2	50.0°	179	175				0.4	0.8	7.6
108	HS Q	WS E	4	EtOH	2		2	47.4°	180	175		0.4	0.3	0.6	0.9	5.5
109	HS R	WS R	1	EtOH, MeOH, NaOAc	1			44.6°								9.1
110	HS R	WS R	1	EtOH, MeOH, NaOAc	1			48.3°								8.7
111	HS R	WS R	1	EtOH, MeOH, NaOAc	1			52.7°								10.7
112	HS R	WS R	1	EtOH, MeOH, NaOAc	1			44.1°								14.5
113	HS R	WS R	1	EtOH, MeOH, NaOAc	1			47.4°								15.1
114	HS S	k.A.	4	EtOH	4		4	36.1°	173	136		16.3	10.4	5.2		7.8

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

Tabelle 3.6 – Fortgesetzt

Nr.	AM	WS	NMR	weitere Verunreinigungen	CE FDA	CE opt.	HPLC	$[\alpha]_D^{20}$	SP [IU/mg]	HP [IU/mg]	OSCS [%]		DS [%]		H ₂ O [%]
											Höhe	Fläche	Höhe	Fläche	
115	HS S	k. A.	4	EtOH	4		4	35.2°	195	136	15.8	10.4	5.0		6.3
116	HS T	k. A.	1		1			45.8°							19.1
117	HS T	k. A.	1		1			47.6°							19.0
118	HS T	k. A.	1		1			46.0°							19.8
119	HS T	k. A.	1		1			47.4°							19.1
120	HS T	k. A.	1		1			45.4°							21.7
121	HS T	k. A.	1		1			43.4°							18.8
122	HS T	k. A.	1		1			45.7°							18.5
123	HS T	k. A.	1		1			46.2°							19.0
124	HS T	k. A.	1		1			45.7°							19.1
125	HS T	k. A.	1		1			45.7°							18.6
126	HS T	k. A.	1		1			47.1°							20.0
127	HS T	k. A.	1		1			48.8°							18.6
128	HS T	k. A.	1		1			47.5°							19.6
129	HS T	k. A.	1		1			47.4°							19.2
130	HS T	k. A.	1		1			46.5°							19.3
131	HS T	k. A.	1		1			46.8°							19.6
132	HS T	k. A.	1		1			45.4°							18.8
133	HS T	k. A.	1		1			48.7°							16.7

Fortsetzung auf der nächsten Seite...

4. Reinheitsprüfung von Glycerin

4.1. Aufgabenstellung

Pharmazeutische Anwendung findet Glycerin, eine farblose, hochviskose Flüssigkeit, hauptsächlich als Lösungs- und Süßungsmittel in flüssigen Arzneiformen zur inneren Anwendung wie beispielsweise Lösungen oder Sirupe [293]. Aufgrund seiner dehydrierenden und irritierenden Wirkung auf die Rektalschleimhaut wird Glycerin in Form von Suppositorien oder Mikroklysmen zur Auslösung des Defäkationsreizes bei Verstopfung und schmerzhafter Stuhlentleerung, insbesondere bei Säuglingen und Kleinkindern, eingesetzt [178].

In der Vergangenheit wurde über zahlreiche Zwischenfälle mit unbeabsichtigter, aber auch mit vorsätzlicher Kontaminierung von Arzneimitteln berichtet (siehe Einleitung, Tabelle 1.1); Vorfälle mit Diethylenglycol-kontaminiertem Glycerin traten hierbei vermehrt auf (Tabelle 4.1). Bereits Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wurde Diethylenglycol (DEG) im Rahmen der “Sulfanilamid-Katastrophe” als gesundheitsgefährdende, toxisch wirkende Chemikalie identifiziert. Damals wurde Diethylenglycol aufgrund seiner sirupartigen, süßlich schmeckenden Eigenschaften als Glycerin-Austauschstoff in Sulfanilamid-haltigen Lösungen zur Behandlung akuter Infektionskrankheiten eingesetzt [294]; über 100 Menschen, darunter viele Kinder, starben nach Einnahme des Medikamentes infolge eines akuten Nierenversagens (bedingt durch eine massive Nekrose der proximalen Tubuli infolge einer Ablagerung von Calciumoxalatkristallen). Seine nephrotoxische Wirkung wird dabei durch den metabolischen Abbau von Diethylenglycol zu Oxalsäure verursacht [295, 296].

Trotz der Bekanntheit der gesundheitsgefährdenden Wirkung wurde auch in jüngerer Vergangenheit von zahlreichen Zwischenfällen mit DEG-kontaminierten Glycerinhaltigen Arzneimitteln berichtet [294, 297–316]. Nach dem Fund von Diethylengly-

Tabelle 4.1: Historische Fallbeispiele kontaminierter Glycerin-haltiger Arzneimittel, Medizinprodukte und Lebensmittel mit Diethylenglycol [294, 297–316].

Jahr	Land	DEG-kontaminierte Produkte	Todesfälle
1937	USA	Sulfanilamid-Saft	107
1969	Südafrika	Sedativum	7
1985	Österreich/Italien	Wein	0
1985	Spanien	Sulfadiazin-Salbe	5
1986	Indien	medizinisch eingesetztes Glycerin	14
1990	Nigeria	Paracetamol-Saft	40
1990/92	Bangladesch	Paracetamol-Saft	339
1992	Argentinien	Propolis-Hustensaft	26
1995/96	Haiti	Hustensaft	80
1998	Indien	Hustensaft	33
2006	Panama	Hustensaft	46
2007	Großbritannien	Zahnpasta	0
2008/09	Nigeria	“MyPikin teething mixture”	50
2009	Bangladesch	Paracetamol-Saft	24

col-kontaminierter Zahnpaste in den USA im Jahre 2007 forderte die “U. S. Food and Drug Administration” (FDA) die Entwicklung einer selektiven Identitätsprüfung auf potentielle Verunreinigungen wie Diethylenglycol und Ethylenglycol, sowie die anschließende Aufnahme in die Glycerin-Monographie der USP; die revidierte Identitätsprüfung beinhaltet nun neben der bereits eingesetzten IR-Prüfung, die keine Unterscheidung zwischen Glycerin und Diethylenglycol erlaubt, eine selektive, gaschromatographische Erfassung von Diethylenglycol und Ethylenglycol, die den Gehalt der beiden Kontaminanten auf jeweils höchstens 0.1 % limitiert [317, 318]. Zudem soll für weitere gefährdete Hilfsstoffe wie Propylenglycol, Sorbitol und Maltit eine Monographie-Überarbeitung hinsichtlich der Limitierung von Diethylenglycol und Ethylenglycol erfolgen.

Die NMR-Spektroskopie hat sich bereits in der Vergangenheit als Methode der Wahl zur Aufdeckung von Arzneimittel-, Nahrungsmittel- und Lifestyle-Produkt-Fälschungen erwiesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll nun am Beispiel von Glycerin das Potential der NMR-Spektroskopie auf dem Gebiet der Identifizierung von Arzneimittelfälschungen aufgezeigt werden. Ziel war die Entwicklung einer alternativen Reinheitsanalytik, welche eine selektive Begrenzung der drei zu erwartenden

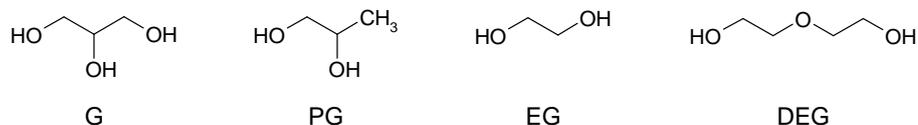


Abbildung 4.1: Chemische Struktur von Glycerin (G), Propylenglycol (PG), Ethylenglycol (EG) und Diethylenglycol (DEG).

Verunreinigungen Propylenglycol, Ethylenglycol und Diethylenglycol auf höchstens 0.1 % gewährleistet und somit den Anforderungen der USP entspricht.

4.2. Untersuchung von Glycerin mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die strukturelle Verwandtschaft der zwei- bzw. mehrwertigen Alkanole – ihr charakteristisches Unterscheidungsmerkmal ist die Anzahl der Hydroxylgruppen und Kohlenstoffatome (Abbildung 4.1) – lässt erwarten, dass der CH_2/CH -Bereich im ^1H -NMR-Spektrum durch starke Signalüberlagerungen gekennzeichnet ist und somit den Einsatz der ^1H -NMR-Spektroskopie im Rahmen der Reinheitsprüfung von Glycerin erschwert bzw. unmöglich macht. Die ^{13}C -NMR-Spektroskopie bietet hingegen aufgrund einer deutlich vergrößerten spektralen Breite im Vergleich zur ^1H -NMR-Spektroskopie den Vorteil, dass üblicherweise selbst strukturell ähnliche Moleküle ^{13}C -Resonanzen mit deutlich unterschiedlichen chemischen Verschiebungen aufweisen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde deshalb im Rahmen der Methodenentwicklung sowohl die ^1H - als auch ^{13}C -NMR-Spektroskopie eingesetzt.

4.2.1. Variation des Lösungsmittels

^1H -NMR-Spektroskopie

Erste Messungen in D_2O bestätigen die Annahme, dass die Resonanzen von Hauptkomponente und zu erwartenden Verunreinigungen aufgrund der strukturellen Verwandtschaft ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen und somit starke Signalüberlappungen im ^1H -NMR-Spektrum beobachtet werden (Abbildung 4.2 a). Ziel ist es nun, durch eine Änderung des Lösungsmittels eine Separation der CH_2 - und CH -

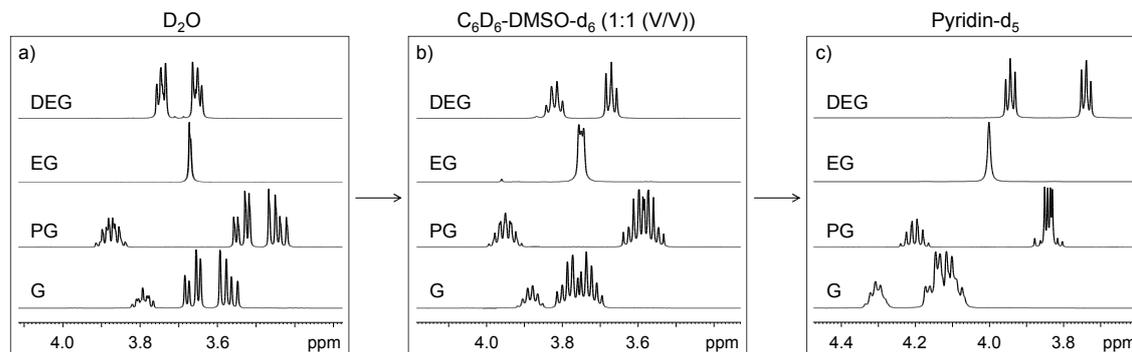


Abbildung 4.2: ^1H -NMR-Teilspektren der CH_2/CH -Region von Glycerin mit seinen potentiellen Verunreinigungen, geordnet nach verbesserter Signalseparation, für folgende Lösungsmittel: a) D_2O , b) C_6D_6 - DMSO-d_6 (1:1 (V/V)), c) Pyridin-d_5 . Eine optimale Signalseparation wird in Pyridin-d_5 erzielt.

Tabelle 4.2: Eingesetzte Lösungsmittel für die Signalseparation von Glycerin und seinen möglichen Verunreinigungen, sowie deren Löslichkeit im jeweiligen Lösungsmittel.

Löslichkeit	apolar		polar	
	aromatisch	nicht-aromatisch	aprotisch	protisch
gering	C_6D_6	CDCl_3	ACN-d_3	
hoch	Pyridin-d_5		DMSO-d_6	D_2O CD_3OD

Signale zu erzielen; hierfür wurden eine Vielzahl an Lösungsmitteln bzw. -gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung eingesetzt (Tabelle 4.2). Aufgrund der sehr geringen Löslichkeit der Substanz in apolaren Lösungsmitteln bzw. Acetonitril [319] musste für eine vollständige Lösung bzw. Mischbarkeit der Probe DMSO-d_6 als Lösungsvermittler zugesetzt werden.

Mit Ausnahme der beiden aromatischen Lösungsmittel C_6D_6 und Pyridin-d_5 kann in allen Lösungsmitteln bzw. -gemischen aufgrund starker Signalüberlagerungen keine vollständige Separation der CH_2 - und CH -Resonanzen erzielt werden; einzig die CH_3 -Resonanz von Propylenglycol ist aufgrund der Signallage im Hochfeld des ^1H -NMR-Spektrums vollständig isoliert. Beim Einsatz von C_6D_6 wird eine Hochfeldverschiebung für die CH_2 - und CH -Resonanzen der Verwandten Substanzen relativ zu den Glycerin-Signalen beobachtet (Abbildung 4.2 b); mit Ausnahme von Ethylen-

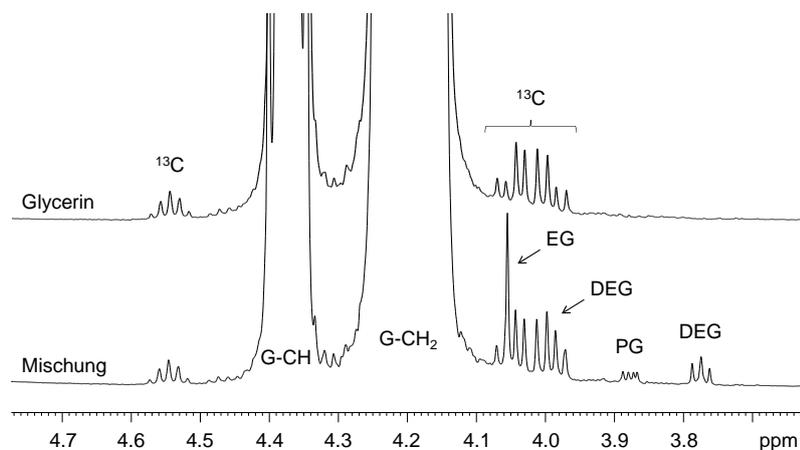


Abbildung 4.3: ^1H -NMR-Teilspektrum der CH_2/CH -Region einer Glycerin-Modellmischung gespikt mit jeweils 0.1% der möglichen Verunreinigungen Propylenglycol (PG), Ethylenglycol (EG) und Diethylenglycol (DEG) in Pyridin- d_5 . Signalüberlappungen des ^{13}C -Satelliten (^{13}C) mit der CH_2 -Resonanz von Ethylenglycol stören die Identifizierung und quantitative Analyse von Ethylenglycol und erfordern die Durchführung von ^{13}C -Entkopplungsexperimenten.

glycol kann für jede Verunreinigung mindestens ein vollständig separiertes Signal im ^1H -NMR-Spektrum gefunden werden. In Pyridin- d_5 wird eine noch stärker ausgeprägte Hochfeldverschiebung beobachtet, die eine vollständige Separation der vier Komponenten ermöglicht (Abbildung 4.2 c).

Die Identifizierung geringer Mengen an Ethylenglycol ($< 0.1\%$) sowie dessen quantitative Analyse wird durch eine Überlappung mit einem ^{13}C -Satelliten der CH_2 -Resonanz der Hauptkomponente gestört bzw. verhindert (Abbildung 4.3). Jedoch kann durch den Einsatz von ^{13}C -Entkopplungsexperimenten, die die Eliminierung des störenden ^{13}C -Satelliten aus dem Spektrum ermöglichen, eine direkte Bestimmung von Ethylenglycol über die Integration des entsprechenden CH_2 -Signals erfolgen.

^{13}C -NMR-Spektroskopie

Während im Protonenspektrum die CH_2/CH -Region durch starke Signalüberlagerungen gekennzeichnet ist, sind diese Resonanzen im ^{13}C -Spektrum meist vollständig separiert. Beim Einsatz von D_2O kann mit Ausnahme von Ethylenglycol für jede Verunreinigung mindestens ein vollständig isoliertes Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum

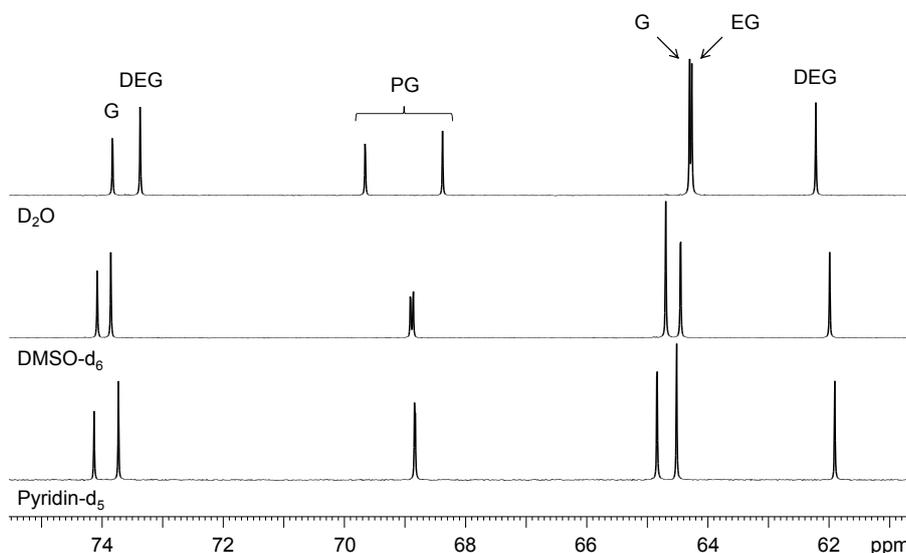


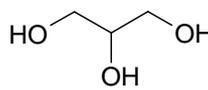
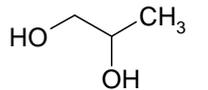
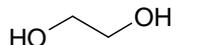
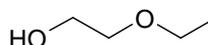
Abbildung 4.4: ¹³C-NMR-Teilspektren der CH₂/CH-Region von Glycerin mit seinen potentiellen Verunreinigungen, geordnet nach verbesserter Signalseparation, für folgende Lösungsmittel: a) D₂O, b) DMSO-d₆, c) Pyridin-d₅. Eine optimale Signalseparation wird in Pyridin-d₅ erzielt.

gefunden werden (Abbildung 4.4); ein ähnliches Trennverhalten wird in CD₃OD, ACN-d₃ und CDCl₃ beobachtet ($\Delta\delta(\text{G}-\text{EG}) \approx 4 \text{ Hz}$). Beim Einsatz von DMSO-d₆ kann die Auflösung zwischen den beiden CH₂-Signalen von Glycerin und Ethylenglycol deutlich verbessert werden ($\Delta\delta(\text{G}-\text{EG}) \approx 25 \text{ Hz}$). Während für Modellmischungen mit gleichem Anteil an Glycerin und Ethylenglycol eine vollständige Separation der beiden Signale erzielt werden kann (Abbildung 4.4), wird die Ethylenglycol-Resonanz für Modellmischungen mit geringer Ethylenglycol-Konzentration ($\leq 1\%$) von dem großen CH₂-Signal der Hauptkomponente teilweise überlagert. Der Wechsel zu aromatischen Lösungsmitteln wie Pyridin-d₅ ermöglicht jedoch die quantitative Erfassung geringer Mengen an Ethylenglycol, da hier die kritische Signalseparation deutlich verbessert werden kann ($\Delta\delta(\text{G}-\text{EG}) \approx 33 \text{ Hz}$).

4.2.2. Signalzuordnung

Unter Aufnahme der jeweiligen Einzelspektren sowie durch “Spiking-Experimente” von einer bzw. mehreren Verunreinigungen zur Hauptkomponente Glycerin wird eine eindeutige Signalzuordnung im Lösungsmittel Pyridin-d₅ gewährleistet. Zusätz-

Tabelle 4.3: Chemische Verschiebungen der Komponenten der Glycerin-Modellmischung (jeweils 30 mg/750 μl (^1H) bzw. 100 mg/750 μl (^{13}C)) in Pyridin- d_5 .

Komponente	Strukturformel	Atom	δ (^1H) [ppm]	δ (^{13}C) [ppm]
Glycerin		CH_2	4.04–4.20	64.84
		CH	4.30	74.13
Propylenglycol		CH_3	1.34	20.41
		CH_2	3.82	68.83
		CH	4.20	68.84
Ethylenglycol		CH	4.00	64.84
Diethylenglycol		CH_2	3.73	61.91
		CH_2	3.94	73.73

liche ein- und zweidimensionale NMR-Experimente wie DEPT, HMQC und HMBC ermöglichen eine Unterscheidung zwischen den CH_3 -, CH_2 - und CH-Atomen sowie deren eindeutige Zuordnung. In Tabelle 4.3 sind die chemischen Verschiebungen der entsprechenden ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale der Hauptkomponente Glycerin und der möglichen Verunreinigungen Propylenglycol, Ethylenglycol und Diethylenglycol zusammengefasst.

4.2.3. Bestimmung der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1

Die Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten der ^1H - und ^{13}C -Kerne erfolgte mit Hilfe des "Inversion-Recovery-Experiments". Für das ^1H -NMR-Experiment wurde eine Glycerin-Modellmischung gespikt mit jeweils 1 % der zu erwartenden Verunreinigungen eingesetzt; die Konzentration der Untersuchungslösung (50 mg/700 μl) sowie bestimmte NMR-Aufnahmeparameter wie Scan-Anzahl (NS = 128) und spektrale Breite (SW = 14 ppm) wurden analog zur quantitativen Analyse gewählt. Aufgrund der geringen NMR-Empfindlichkeit der ^{13}C -Kerne wurde für das ^{13}C -NMR-Experiment eine Glycerin-Modellmischung gespikt mit jeweils gleichen Anteilen an Propylenglycol, Ethylenglycol und Diethylenglycol (jeweils 60 mg/Komponente in 500 μl Pyridin- d_5) eingesetzt; dieser Kompromiss erlaubt die Ermittlung der T_1 -Zeiten mit einem akzep-

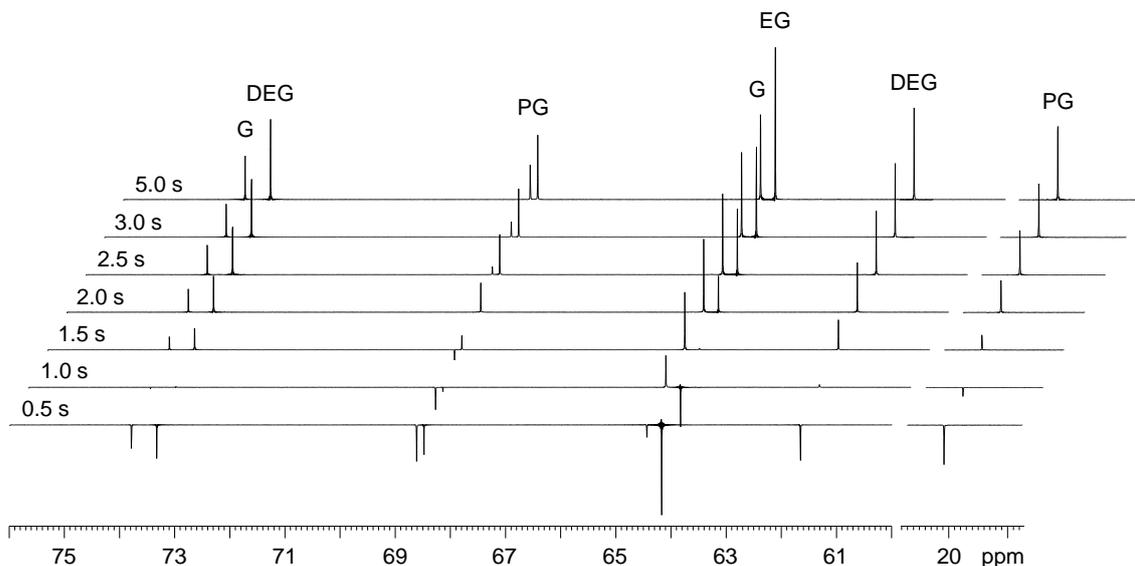


Abbildung 4.5: Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit von Glycerin und seinen potentiellen Verunreinigungen in Pyridin- d_5 . Zur besseren Übersicht ist nur eine Auswahl der durchgeführten 13 Experimente dargestellt.

tablem Messaufwand (128-Scan-Experiment). Vorversuche wie Ein-Scan-Experimente zur groben Abschätzung der T_1 -Relaxationszeiten sowie Literaturangaben ($T_1 \approx 0.1$ – 10 s für C-Atome mit direkt gebundenen Protonen [86]) ermöglichten die Festlegung der minimalen und maximalen Wartezeit; für die Bestimmung der entsprechenden Spin-Gitter-Relaxationszeiten von Haupt- und Nebenkomponente wurden jeweils 13 Experimente mit ansteigender Wartezeit von 0.5 s bis 10 s zwischen den beiden aufeinanderfolgenden 180° - und 90° -Impulsen durchgeführt (Abbildung 4.5). In Tabelle 4.4 sind die ermittelten T_1 -Relaxationszeiten für die ^1H - und ^{13}C -Kerne, gemessen in Pyridin- d_5 , zusammengefasst.

Ein häufig diskutierter Nachteil der quantitativen ^{13}C -NMR-Spektroskopie – überwiegend lange T_1 -Relaxationszeiten vieler Kerne ($T_1 \approx 0.1$ – 300 s) – macht den Einsatz dieser Messtechnik aufgrund von sehr langen Wartezeiten zwischen zwei aufeinanderfolgenden Impulsen in der Praxis oftmals unrealistisch. Die kurzen T_1 -Relaxationszeiten im vorliegenden Beispiel, die mit etwa $T_1 \approx 1.5$ – 3 s im Bereich der entsprechenden Spin-Gitter-Relaxationszeiten der Protonen liegen, ermöglichen hingegen prinzipiell die Durchführung quantitativer ^{13}C -NMR-Experimente im Rahmen der Reinheitsprüfung von Glycerin. Die Messzeit pro Probe wird in beiden Fällen

Tabelle 4.4: T_1 -Relaxationszeiten der ^1H - und ^{13}C -Kerne von Glycerin und den zu erwartenden Verunreinigungen Propylenglycol, Ethylenglycol und Diethylenglycol in Pyridin- d_5 .

Komponente	Atom	T_1 (^1H) [s]	T_1 (^{13}C) [s]
Glycerin	CH_2	1.5	1.5
	CH	1.9	2.2
Propylenglycol	CH_3	1.9	2.2
	CH_2	2.2	2.2
	CH	2.2	3.6
Ethylenglycol	CH_2	2.6	2.9
Diethylenglycol	CH_2	1.9	1.5
	CH_2	1.9	2.2

durch den am langsamsten relaxierenden Kern, die CH_2 -Resonanz von Ethylenglycol, bestimmt; eine Wartezeit von $t(^1\text{H}) = 13\text{ s}$ bzw. $t(^{13}\text{C}) = 14.5\text{ s}$ ist beim Einsatz eines 90° -Impulses im Rahmen der quantitativen Analyse ausreichend.

Wegen der geringen natürlichen Häufigkeit der ^{13}C -Kerne und der niedrigeren Nachweisempfindlichkeit im Vergleich zu Protonen muss für das Erreichen derselben Nachweisgrenze die Scan-Anzahl deutlich erhöht werden. Für die Reinheitsprüfung von Glycerin mit einer geforderten Nachweisgrenze von $\text{LOD} \leq 0.1\%$ beträgt die Messzeit pro Probe beim Einsatz eines 400 MHz-Spektrometers etwa 20 h.

Eigene ^{13}C -Experimente zeigen, dass bereits nach Zugabe von 20, 40 bzw. 80 mM $\text{Cr}(\text{acac})_3$ zur Glycerin-Modellmischung eine deutliche Verkürzung der T_1 -Relaxationszeiten beobachtet wird; die Messdauer pro Experiment kann auf wenige Stunden (etwa 2–3 h) verkürzt werden. Jedoch ist bereits ab einer Konzentration von 20 mM $\text{Cr}(\text{acac})_3$ eine deutliche Verbreiterung der Resonanzen sichtbar, so dass die Ethylenglycol-Resonanz vom deutlich größeren CH_2 -Signal der Hauptkomponente überlagert wird (Abbildung 4.6).

4.2.4. Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Ausgehend von einem Verunreinigungsgrad von jeweils 1 % Propylen-, Ethylen- und Diethylenglycol in Anwesenheit der Hauptkomponente Glycerin (50 mg/700 μl Pyridin- d_5) (Abbildung 4.7) wurde für die experimentelle Ermittlung der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze die Konzentration der Verwandten Substanzen stetig erniedrigt,

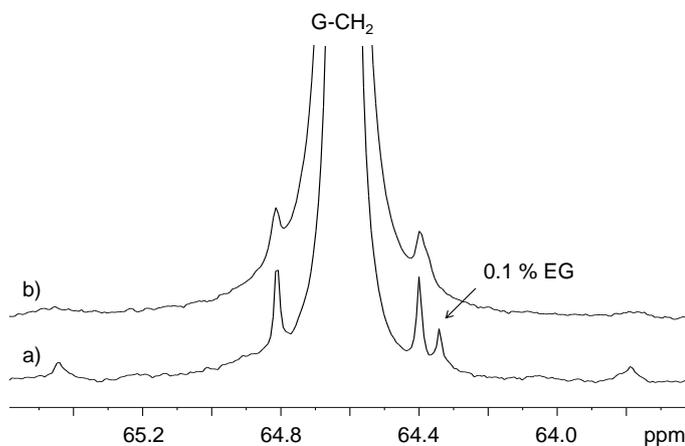


Abbildung 4.6: ^{13}C -NMR-Teilspektrum der CH_2 -Region von Glycerin (G) und Ethylenglycol (EG) vor (a) und nach (b) Zugabe von $\text{Cr}(\text{acac})_3$. Nach Zugabe von 20 mM $\text{Cr}(\text{acac})_3$ wird eine deutliche Linienverbreiterung beobachtet, die die Detektion von 0.1 % Ethylenglycol verhindert.

bis kein Signal mehr im ^1H -NMR-Spektrum erkennbar war. In Tabelle 4.5 sind die experimentell ermittelten Bestimmungsgrenzen der zu erwartenden Verunreinigungen, bestimmt über ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1, zusammengefasst. Da die Modellmischung mit einer Ethylenglycol-Konzentration von etwa 0.005 % für die entsprechende CH_2 -Resonanz ein deutlich größeres Signal-Rausch-Verhältnis aufweist, kann nach Extrapolation eine Bestimmungsgrenze von $\text{LOQ} < 0.001\%$ angenommen werden. Für die entsprechenden Nachweisgrenzen kann jeweils eine um den Faktor 2 bis 3 kleinere Konzentration der jeweiligen Bestimmungsgrenze angenommen werden.

Da die Durchführung quantitativer Glycerin-Experimente mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie beim Einsatz von Spektrometern mit einem Arbeitsbereich ≤ 400 MHz aufgrund sehr langer Messzeiten für die Routineanalytik kein akzeptables Kosten-Nutzen-Verhältnis aufweist, soll im Folgenden die Eignung dieser Technik als schnell und einfach durchzuführendes qualitatives Screening-Verfahren zur Detektion potentieller Verunreinigungen in Glycerin aufgezeigt werden. Hierfür wurden Modellmischungen mit jeweils 0.1 bzw. 1 % der zu erwartenden Verunreinigungen in Anwesenheit der Hauptkomponente Glycerin (200 mg/500 μl Pyridin- d_5) mittels routinemäßig aufgenommener ^{13}C -NMR-Experimente – d. h. Protonen-Breitband-Entkopplung ohne NOE-Unterdrückung und kurze Wartezeiten zwischen zwei aufeinanderfolgenden

Tabelle 4.5: Bestimmungsgrenze der Verunreinigungen Propylenglycol, Ethylenglycol und Diethylenglycol mittels ^1H -NMR-Spektroskopie bei einer Magnetfeldstärke von 400 MHz unter Einsatz gespikter Glycerin-Modellmischungen mit einer Konzentration von 50 mg/700 μl Pyridin- d_5 .

Verunreinigung	H-Atom	LOQ [%]	LOQ [mg/700 μl]
Propylenglycol	CH_3	0.005	0.0025
	CH_2	0.05	0.025
Ethylenglycol	CH_2	< 0.005	< 0.0025
Diethylenglycol	CH_2	0.025	0.0125
	CH_2	0.025	0.0125

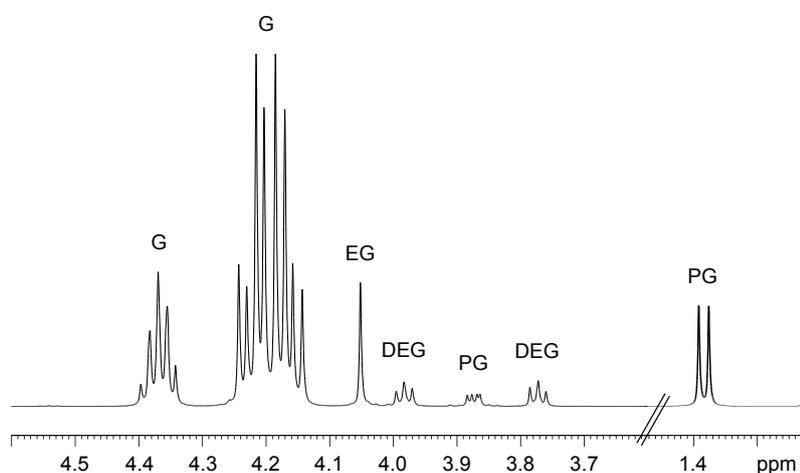


Abbildung 4.7: ^1H -NMR-Spektrum von Glycerin (G) in Pyridin- d_5 , gespickt mit jeweils 1 % der möglichen Verunreinigungen Propylenglycol (PG), Ethylenglycol (EG) und Diethylenglycol (DEG).

Impulsen, die eine vollständige Relaxation des Spinsystems in den Gleichgewichtszustand verhindern – untersucht. Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, können unter Aufnahme von 4096 Scans Glycerin-Chargen, die mit etwa 1 % Ethylenglycol bzw. Diethylenglycol kontaminiert sind, deutlich identifiziert werden. Die Nachweisgrenze der hier beschriebenen Methode liegt bei etwa 0.1 %; das Signal-Rausch-Verhältnis der ^{13}C -Resonanzen liegt im Bereich von etwa 7:1.

Der Vergleich der experimentell ermittelten Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen der zwei beschriebenen NMR-Methoden mit der von der USP geforderten Begrenzung von Diethylenglycol und Ethylenglycol auf jeweils höchstens 0.1 % zeigt, dass

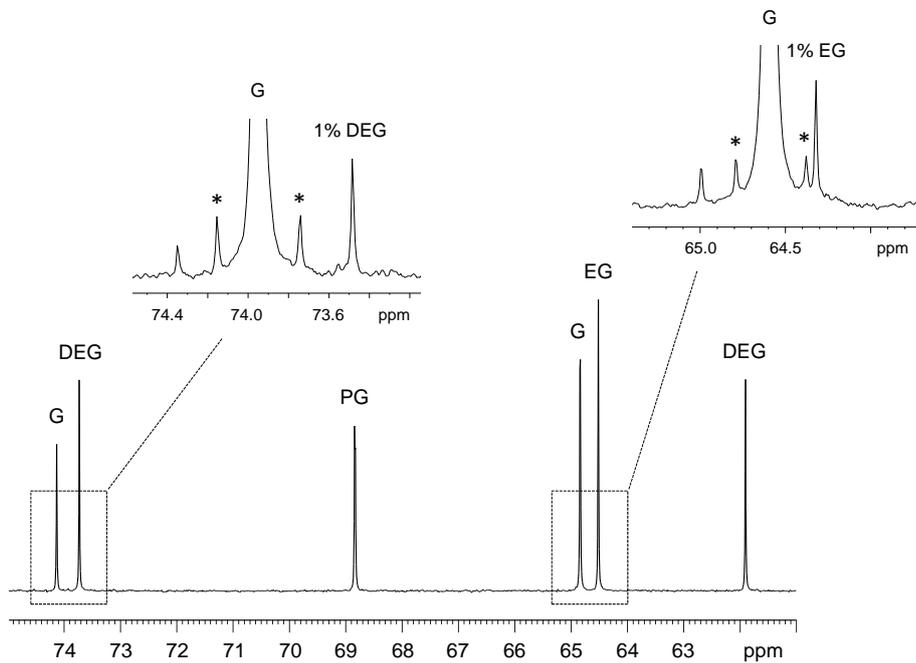


Abbildung 4.8: ^{13}C -NMR-Spektrum von Glycerin (G) in Pyridin- d_5 , gespikt mit den möglichen Verunreinigungen Propylenglycol (PG), Ethylenglycol (EG) und Diethylenglycol (DEG). Die zugehörigen ^{13}C , ^{13}C -Kopplungskonstanten ($^1J(\text{C},\text{C})$) sind mit “*” gekennzeichnet.

Tabelle 4.6: Messparameter.

Spektrometer	Bruker Avance 400 MHz
NMR-Messkopf	BBI-Messkopf
Temperatur	300 K
Datenpunkte	64 K
Impuls	90°
Akquisitionszeit	5.86 s
Relaxation Delay	$14.5\text{ s} \rightarrow \text{AQ} + \text{D1} \geq 5 \cdot T_1$
Spektrale Breite	14 ppm
Spektrale Auflösung	0.17 Hz/Punkt
Scan-Anzahl	128 $\rightarrow \text{S/N} \geq 10 : 1$
<i>Lb</i> -Wert	0.3
Referenzierung	Pyridin- $\text{d}_5 = 7.22\text{ ppm}$

unter Einsatz der NMR-Spektroskopie geringe Mengen der potentiellen Kontaminanten in Glycerin-Chargen identifiziert bzw. quantitativ erfasst werden können; die Anforderungen des Arzneibuches werden gewährleistet.

4.2.5. Quantitative Analyse

Die quantitative Reinheitsprüfung von Glycerin mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie erfolgt ohne Einsatz einer zertifizierten Referenzsubstanz. Der Signalflächenvergleich einer vollständig separierten Resonanz der jeweiligen Verunreinigung I_{VS} mit einem isolierten Signal der Hauptkomponente Glycerin I_{G} ermöglicht unter Berücksichtigung der Anzahl der Kerne N , die die Resonanz hervorrufen, und des jeweiligen Molekulargewichtes M den quantitativen Reinheitsnachweis durch Berechnung des Gehalts P_{VS} einer Verunreinigung:

$$P_{\text{VS}} = \frac{I_{\text{VS}}}{I_{\text{G}}} \cdot \frac{N_{\text{G}}}{N_{\text{VS}}} \cdot \frac{M_{\text{VS}}}{M_{\text{G}}} \cdot 100\% \quad (4.1)$$

Während die quantitative Analyse der beiden potentiellen Verunreinigungen Propylenglycol und Diethylenglycol mit den in Tabelle 4.6 angegebenen Messparametern durchgeführt werden kann, macht die störende Signalüberlagerung mit dem ^{13}C -Satelliten der Hauptkomponente für die quantitative Bestimmung von Ethylenglycol den Einsatz von ^{13}C -Entkopplungsexperimenten notwendig.

Die Eignung der quantitativen ^1H -NMR-Spektroskopie zur Reinheitsprüfung von Glycerin wurde anhand von Glycerin-Modellmischungen mit unterschiedlichem Verunreinigungsgrad (0.1–5 % pro Verunreinigung) an Propylen-, Ethylen- und Diethylenglycol untersucht. Zur Herstellung der Modellmischungen wurden jeweils 50 mg Glycerin genau eingewogen, in einer entsprechenden Menge Pyridin- d_5 gelöst, mit unterschiedlichen Volumina der drei Stammlösungen mit einem Kontaminierungsgrad von jeweils 25 mg/ml Pyridin- d_5 versetzt und unter quantitativen Bedingungen mittels Einfachbestimmung am 400 MHz-Spektrometer vermessen. Die quantitative Analyse der potentiellen Verunreinigungen in den untersuchten Glycerin-Modellmischungen zeigt mit einer Wiederfindungsrate von mindestens 96 % und maximal 104 % eine geringe relative Abweichung zum tatsächlichen Gehalt der jeweiligen Verunreinigung (siehe Tabelle 4.7). Die ^1H -NMR-Methode liefert richtige Ergebnisse und ist somit

Tabelle 4.7: Quantitative ^1H -NMR-Analyse von Glycerin-Modellmischungen mit unterschiedlichem Kontaminierungsgrad an Propylen-, Ethylen- und Diethylenglycol unter Angabe des Sollwertes (Soll), des experimentell ermittelten Ist-Wertes (Ist) und der Wiederfindungsrate (WF).

Propylenglycol			Ethylynglycol			Diethylenglycol		
Soll	Ist	WF	Soll	Ist	WF	Soll	Ist	WF
[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
4.68	4.78	102	4.88	4.72	97	4.59	4.55	99
3.94	4.03	102	4.11	3.96	97	3.86	3.95	102
2.99	3.06	102	3.12	3.02	97	2.94	2.99	102
1.93	1.97	102	2.01	1.94	96	1.89	1.93	102
0.99	1.01	102	1.04	1.01	97	0.97	1.00	102
0.73	0.75	102	0.77	0.74	97	0.72	0.73	101
0.48	0.49	101	0.50	0.49	98	0.47	0.49	103
0.24	0.25	104	0.25	0.24	96	0.24	0.23	98
0.10	0.10	104	0.10	0.11	104	0.10	0.10	98

zur quantitativen Reinheitsprüfung von Glycerin geeignet.

4.3. Zusammenfassung

Das im vorliegenden Kapitel besprochene Fallbeispiel "Glycerin" belegt als ein weiteres Beispiel die Eignung der NMR-Spektroskopie auf dem Gebiet der Erkennung von Arzneimittelfälschungen. Sowohl ^1H - als auch ^{13}C -NMR-Spektroskopie ermöglichen die Identifizierung und selektive Begrenzung der potentiellen Kontaminanten Ethylen- und Diethylenglycol sowie der natürlich vorkommenden Verunreinigung Propylenglycol auf höchstens 0.1 % und genügen somit den in der USP beschriebenen Anforderungen für pharmazeutisch eingesetztes Glycerin. Während das ^1H -NMR-Spektrum aufgrund der strukturellen Verwandtschaft der zwei- bzw. mehrwertigen Alkanole Resonanzen mit ähnlichen chemischen Verschiebungen bzw. Signalüberlagerungen aufweist und einzig beim Einsatz von Pyridin- d_5 für jede Komponente mindestens ein vollständig separiertes Signal aufweist, welches sich für die quantitative Analyse eignet, ist beim Einsatz der ^{13}C -NMR-Spektroskopie die Wahrscheinlichkeit von Signalüberlagerungen, bedingt durch eine vergrößerte spektrale Breite, deutlich

geringer; neue bis dahin unbekannte Verunreinigungen können somit leichter erfasst werden. Eine geringe natürliche Häufigkeit sowie niedrige Nachweisempfindlichkeit und die NOE-Problematik erfordern für eine empfindliche, quantitative Erfassung der Verwandten Substanzen jedoch NMR-Spektrometer hoher Magnetfeldstärke, da ansonsten sehr lange Messzeiten den Einsatz dieses Verfahrens in der Praxis unrealistisch machen.

5. Abschließende Bewertung

Das Prinzip der NMR-Spektroskopie unterscheidet sich grundlegend von dem routinemäßig eingesetzter, chromatographischer Verfahren. Während letztgenannte Methoden auf dem unterschiedlichen Verhalten von Stoffen beim Phasenübergang zwischen einer mobilen und einer stationären Phase basieren, werden bei der NMR-Spektroskopie Spin-Übergänge zwischen verschiedenen Energieniveaus beobachtet, die durch resonante Einstrahlung von Magnetfeld-Impulsen induziert werden. Ladungsdichte und Nachbargruppeneffekte verschieben die entsprechende Resonanzfrequenz des zu betrachtenden Kerns in unterschiedlichem Ausmaß, so dass chemisch nicht-äquivalente Kerne im Frequenzspektrum getrennte Signale hervorrufen. Die direkte Proportionalität zwischen Signalintensität und Anzahl der Kerne, die die Resonanz hervorrufen, bildet hier die Grundlage für den Einsatz der NMR-Spektroskopie im Rahmen der quantitativen Analyse.

Die unterschiedliche Funktionsweise legt eine ausführliche Untersuchung von Vor- und Nachteilen dieser neuartigen Technik im Vergleich zu routinemäßig eingesetzten Verfahren nahe, insbesondere in Fällen, in denen konventionelle Methoden versagen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einsatz der quantitativen NMR-Spektroskopie im Rahmen der Gehaltsbestimmung von Hauptkomponenten, der Reinheitsprüfung auf Verwandte Substanzen und des Nachweises von Arzneimittel-fälschungen im Vergleich zu etablierten Arzneibuchmethoden näher untersucht.

Gehaltsbestimmung

Die chromatographische Analyse komplexer Mehrkomponentengemische stellt oftmals eine analytische Herausforderung dar, da aufgrund sehr ähnlicher Molekülstrukturen in vielen Fällen eine geringe Auflösung zwischen benachbarten Peaks bzw. Peaküberlagerungen im Chromatogramm beobachtet werden, die eine präzise und richtige

Gehaltsbestimmung der Einzelkomponenten erschweren bzw. unmöglich machen. Um dennoch eine Aussage über die Qualität dieser Stoffgemische treffen zu können, werden als "Notlösung" häufig komplizierte, wenig robuste Trennmethode eingesetzt. Dies trifft weitgehendst auch auf die HPLC-Arzneibuchmethoden zur Gehaltsbestimmung der drei ausgewählten Arzneistoffgemische Codergocrinmesilat, Clomifencitrat und Flupentixoldihydrochlorid zu. Da jedoch bereits kleine Strukturunterschiede im Molekül einen Einfluss auf die chemische Verschiebung NMR-aktiver Kerne besitzen, stellt die NMR-Spektroskopie für die Qualitätskontrolle von Mehrkomponentengemischen prinzipiell eine geeignete, analytische Messmethode dar. NMR-Spektren komplexer Moleküle sind zwar häufig durch eine Vielzahl an Signalen mit teilweise starken Überlagerungen gekennzeichnet, jedoch wird für die Gehaltsbestimmung pro Komponente eine einzige separierte Resonanz benötigt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines Methodenvergleichs anhand der drei ausgewählten Beispielsubstanzen die Eignung der NMR-Spektroskopie als quantitative Messmethode im Vergleich zu etablierten und konventionell richtig geltenden Verfahren wie HPLC bezüglich verschiedener Aspekte – Methodenentwicklung, Validierung und Gehaltsbestimmung – näher untersucht. Die hohe Übereinstimmung der Analysenergebnisse im Rahmen der Gehaltsbestimmung bestätigt eindrucksvoll die Eignung der quantitativen NMR-Spektroskopie als gleichwertige, orthogonale Methode. Eine Vielzahl an Vorteilen wie schnell und einfach durchzuführende Probenvorbereitung, geringer Lösungsmittelverbrauch, kurze Messdauer pro Experiment, geringer Mess- und Zeitaufwand für die Methodenentwicklung und -validierung, Verzicht auf teure, zertifizierte Referenzmaterialien sowie die simultane Prüfung auf Identität, Reinheit und Gehalt machen den Einsatz dieser "neuen" Technik unter Zusatz eines geeigneten Internen Standards auch für den Routinebetrieb attraktiv; Externe-Standard-Verfahren sind dagegen aufgrund ihrer erhöhten Fehleranfälligkeit im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Qualitätskontrolle nur bedingt einsetzbar.

Reinheitsprüfung

Das Verunreinigungsprofil eines Arzneistoffs wird in erster Linie von seinem Herstellungsprozess beeinflusst. Bereits leicht abgeänderte bzw. alternative Herstellungs-

verfahren haben oftmals stark unterschiedliche Verunreinigungsprofile zur Folge, die im Rahmen der Reinheitskontrolle mit den gültigen Arzneibuchmethoden nicht zwangsläufig abgedeckt werden können. Diese Problematik wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Aminosäure L-Alanin näher untersucht.

Während die „veralteten“, unspezifischen und unempfindlichen Nachweismethoden der L-Alanin-Monographie die zu erwartenden Verunreinigungen des heutzutage überwiegend eingesetzten Herstellungsverfahrens, der enzymatischen Synthese, nur unzureichend abdecken, können mit der vorgeschlagenen ^1H -NMR-Methode alle zu erwartenden Verwandten Substanzen im NMR-Spektrum eindeutig identifiziert und quantitativ erfasst werden. Die häufig in der Literatur diskutierten Nachteile der quantitativen NMR-Spektroskopie, wie etwa eine zu hohe Unempfindlichkeit im Vergleich zu anderen spektroskopischen Methoden bzw. stark streuende und vom wahren Gehalt abweichende Ergebnisse konnten nicht bestätigt werden. Die hier beschriebene NMR-Methode ermöglicht eine sensitive Erfassung aller zu erwartenden Verwandten Substanzen und entspricht den Anforderungen der ICH-Richtlinie Q3A(R2) mit einer Bestimmungsgrenze von $\leq 0.03\%$. Sie liefert Ergebnisse mit einer hohen Wiederfindungsrate zum „wahren“ Gehalt der untersuchten Alanin-Modellmischung und einer Genauigkeit, die der konventioneller Methoden wie HPLC und GC entspricht.

Bis heute werden trotz des großen Potentials der NMR-Spektroskopie auf dem Gebiet der Reinheitsprüfung von Arzneistoffen aufgrund der hohen Anschaffungskosten nicht in jedem analytischen Labor NMR-Spektrometer eingesetzt. Stattdessen kommen für die routinemäßig durchgeführte Reinheitskontrolle von Arzneistoffen üblicherweise chromatographische Verfahren wie HPLC, meist gekoppelt mit UV-Dektoren, zum Einsatz. Am Beispiel der Reinheitsanalytik von L-Alanin konnten mit Hilfe eines Vergleichs zweier unabhängiger, orthogonaler Methoden die Eignung der quantitativen NMR-Spektroskopie im Rahmen der routinemäßigen Qualitätskontrolle sowie Vor- und Nachteile dieser „neuen“ Technik im Vergleich zur entsprechenden HPLC-Methode aufgezeigt werden; zu nennen sind hier Vergleichskriterien wie Probenvorbereitung, linearer Arbeitsbereich, Bestimmungsgrenze, Einsatz von Referenzmaterial sowie benötigte Mindestanzahl der Experimente für die quantitative Analyse. Für den Routinebetrieb ist dabei der Einsatz von hohen Magnetfeldstärken und/oder Kryomagneten zu empfehlen, da dann eine empfindliche und schnell durchführbare Prüfung auf Verwandte Substanzen gewährleistet wird.

Aufdeckung von Arzneimittelfälschungen

In den letzten Jahren stieg die Zahl der Meldungen über unwissentlich bzw. absichtlich herbeigeführte Qualitätsmängel bei Arzneimitteln drastisch an. Unterschiedliche Herstellungsverfahren sowie die bewusste Beimengung billiger, Hauptkomponenten-ähnlicher Substanzen bedingen dabei in der Regel abweichende Verunreinigungsprofile, die oftmals mit den gültigen Prüfverfahren der Arzneibücher nicht abgedeckt werden können. Das Auftreten neuer, bislang unbekannter Verunreinigungen ist stets mit der Gefahr von möglicherweise schwerwiegenden, unerwünschten Arzneimittelwirkungen und folglich mit einer erhöhten Gefährdung der Patientensicherheit verbunden, wie etliche Fallbeispiele kontaminierter Arzneimittel in der Vergangenheit bewiesen. Die NMR-Spektroskopie bietet hier als ein schnell und einfach durchzuführendes Screening-Verfahren die Möglichkeit, neue, eventuell noch unbekannte Verunreinigungen über zusätzliche Signale im NMR-Spektrum zu erfassen, gleichzeitig strukturell zu identifizieren und somit Fälschungen von Originalpräparaten zu unterscheiden. Da hier die Methode nicht wie bei chromatographischen Verfahren auf ein bestimmtes Verunreinigungsprofil hin optimiert wurde, liegt die Wahrscheinlichkeit neue Verunreinigungen zu detektieren bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen deutlich höher. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde anhand von zwei aktuellen Beispielen die Eignung der NMR-Spektroskopie zur Aufdeckung von Arzneimittelfälschungen näher untersucht.

Anfang 2008 erschütterte der Heparin-Skandal die weltweite Öffentlichkeit. Nach der intravenösen Gabe von unfraktioniertem Heparin starben in den USA über 240 Patienten, in großen Teilen Europas wurde bei einer Vielzahl an Patienten ebenfalls das Auftreten schwerer allergieähnlicher Reaktionen beobachtet. Als Kontaminante wurde das Heparin-ähnliche Glykosaminoglykan "Übersulfatiertes Chondroitinsulfat" (OSCS) identifiziert. Im Vergleich zu den unspezifischen und unempfindlichen Prüfmethode des Ph. Eur. 6.0, die für kontaminierte Heparin-Chargen keine Qualitätsmängel aufzeigen konnten, ermöglicht die ^1H -NMR-Spektroskopie eine zuverlässige Identifizierung und Quantifizierung von OSCS sowie weiterer natürlich vorkommender Glykosaminoglykan-Verunreinigungen wie Dermatansulfat und Chondroitinsulfat A/C über die charakteristische N-Acetyl-Region. Daneben erlaubt die hier beschriebene ^1H -NMR-Methode die qualitative und quantitative Bestimmung von Lösungsmittelrückständen

und weiteren Heparin-Derivaten, die aus dem Extraktions- und Reinigungsprozess stammen. ^{13}C - und zweidimensionale NMR-Experimente wie HSQC liefern zusätzlich wertvolle strukturelle Informationen und eignen sich insbesondere zur Analyse verdächtiger Heparin-Muster. Um die Eignung der vorgeschlagenen NMR-Methode im Vergleich zu routinemäßig eingesetzten Verfahren aufzeigen zu können, wurden im Rahmen einer umfangreichen Studie 145 Heparin-Muster zusätzlich mit neuentwickelten, OSCS-selektiven Nachweismethoden wie SAX-HPLC, Kapillarelektrophorese, IR- und Raman-Spektroskopie vermessen und die ermittelten Ergebnisse mit denen der ^1H -NMR-Spektroskopie verglichen. Als Methode der Wahl für die Qualitätskontrolle von Heparin erwies sich das NMR-spektroskopische Verfahren.

Eine ähnliche Ausgangslage findet man für den Hilfsstoff Glycerin vor. Die Kontaminanten Diethylenglycol und Ethylenglycol weisen ebenfalls eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zur Hauptkomponente auf, sind im Vergleich zu Glycerin deutlich preiswerter, jedoch besitzen ihre Metabolite toxische Wirkung. Da in den letzten Jahren vermehrt über meist tödlich verlaufende Zwischenfälle mit Diethylenglycol-kontaminiertem Glycerin berichtet wurde, der Nachweis dieser Verwandten Substanz jedoch nicht in der Monographie vorgeschrieben war, forderte die "U. S. Food and Drug Administration" die Aufnahme einer selektiven Identitätsprüfung auf die potentiellen Verunreinigungen Diethylenglycol und Ethylenglycol; zum Einsatz kam eine gaschromatographische Methode. Eigene NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigen, dass sowohl mittels ^1H - als auch ^{13}C -NMR-Spektroskopie die beide Kontaminanten sowie eine weitere, natürlich vorkommende Verunreinigung, das Propylenglycol, selektiv identifiziert und quantitativ erfasst werden können; beide Methoden erfüllen die in der USP beschriebenen Anforderungen an pharmazeutisch eingesetzte Glycerin. Der in der vorliegenden Arbeit dargestellte Vergleich von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie zeigt deutlich, dass ^{13}C -NMR-spektroskopische Experimente im Rahmen der Reinheitsprüfung von Glycerin aufgrund einer stark vergrößerten spektralen Breite prinzipiell von Vorteil sind, da hier trotz struktureller Verwandtschaft die Wahrscheinlichkeit von Signalüberlagerungen deutlich geringer ist; neue Verunreinigungen können somit leichter erfasst werden. Die geringe Nachweisempfindlichkeit und die NOE-Problematik der ^{13}C -NMR-Spektroskopie limitiert jedoch bis heute den Einsatz der quantitativen ^{13}C -NMR-Spektroskopie im Routinebetrieb, da beim Einsatz von NMR-Spektrometern geringer Magnetfeldstärke meist sehr lange Messzeiten erfor-

derlich sind.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die NMR-Spektroskopie als analytische Messmethode im Rahmen der Gehaltsbestimmung von Hauptkomponenten sowie der Reinheitsprüfung auf Verwandte Substanzen ein gleichwertiges, orthogonales Verfahren zu konventionell eingesetzten HPLC-Methoden darstellt, welches zusätzlich eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber etablierten, chromatographischen Verfahren aufweist; zu nennen ist hier v. a. die im Vergleich zu chromatographischen Methoden, die bereits Equilibrierungszeiten von bis zu einer Stunde vor dem ersten HPLC-Experiment aufweisen, schnelle Probenvorbereitung und kurze Messdauer. Zudem eignet sich diese Technik insbesondere auch zur Identifizierung von Arzneimittelfälschungen. Trotz ihres großen Potentials findet die NMR-Spektroskopie in der Qualitätskontrolle von Arzneistoffen kaum Einsatz, was zum einen auf die geringe Akzeptanz neuartiger Methoden, zum anderen jedoch auch auf die vergleichsweise hohen Anschaffungs- und Wartungskosten zurückzuführen ist.

6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung der Fragestellung, ob sich die quantitative NMR-Spektroskopie zur Bestimmung von Identität, Reinheit und Gehalt von Arzneistoffen eignet, und wie sich Präzision und Empfindlichkeit dieser Methode im Vergleich zu etablierten chromatographischen Verfahren verhalten.

Die quantitative Untersuchung der drei strukturell jeweils verwandten Mehrkomponentengemische Codergocrinmesilat, Clomifencitrat und Flupentixoldihydrochlorid bewies eindrucksvoll die Eignung der ^1H -NMR-Spektroskopie als orthogonale, analytische Messmethode im Vergleich zu validierten HPLC-Arzneibuchmethoden. Unter Zusatz von 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester als geeignete Interne Referenzsubstanz wurde für Codergocrinmesilat C_6D_6 als optimales Lösungsmittel unter Zugabe geringer Mengen des Lösungsvermittlers DMSO-d_6 ermittelt; die $\text{H}_{5'}$ -Region lieferte hier für jede Komponente ein vollständig separiertes Signal, welches sich für die quantitative Auswertung eignete. Die im Rahmen einer Validierung der ^1H -NMR-Methode ermittelten Ergebnisse erfüllten bezüglich Präzision und Richtigkeit die an eine im pharmazeutischen Bereich eingesetzte analytische Methode gestellten Anforderungen; zudem wurden weitere Prüfparameter wie Selektivität, Linearität, Robustheit und Stabilität verifiziert. Externe-Standard-Experimente wie "Zwei-Röhrchen-Methode" und ERETIC-Verfahren bestätigten die quantitativen Ergebnisse der Internen Standardisierung; jedoch wurde hier – insbesondere für die ERETIC-Technik – eine höhere Fehleranfälligkeit und somit eine größere Streuung der Einzelergebnisse beobachtet. Vergleichbare Ergebnisse wurden für Clomifencitrat unter Zusatz von Nicotinamid als Internen Standard in DMSO-d_6 sowie für Flupentixoldihydrochlorid in einem Lösungsmittelgemisch von Toluol-d_8 und CD_3OD mit 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester als geeigneter Referenzsubstanz ermittelt. Am Beispiel von Codergocrinmesilat und Flupentixoldihydrochlorid konnte zudem die Eignung anderer NMR-aktiver Kerne wie ^{13}C und ^{19}F für die quantitative Analyse

von komplexen Substanzgemischen aufgezeigt werden.

Das Potential der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie für die Reinheitsprüfung von Arzneistoffen wurde am Beispiel der Aminosäure L-Alanin aufgezeigt. Die zu erwartenden Verunreinigungen Glutamin-, Asparagin-, Äpfel- und Fumarsäure konnten im Gegensatz zu den "veralteten" Prüfmethode des Europäischen Arzneibuches eindeutig identifiziert und quantifiziert werden; mit einer Bestimmungsgrenze von $\leq 0.03\%$ wurden die Vorgaben der ICH-Richtlinie Q3A(R2) für "Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung" erfüllt. Die deutliche Übereinstimmung der NMR-spektroskopisch ermittelten Ergebnisse einer quantitativ untersuchten Alanin-Modellmischung mit einer für den Routinebetrieb geeigneten HPLC-Methode unter Einsatz verschiedener Detektoren wie CAD, NQAD, ELSD und MS, sowie der Vergleich wichtiger Prüfparameter wie Linearität und Nachweisgrenze bestätigten die Eignung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Qualitätskontrolle.

Die Aufdeckung von Arzneimittelfälschungen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit anhand der zwei aktuellen Fallbeispiele Heparin und Glycerin näher untersucht. Die in Zusammenhang mit dem Heparin-Skandal verantwortliche Kontaminante OSCS konnte neben Dermatansulfat und weiteren natürlich vorkommenden Glykosaminoglykan-Verunreinigungen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eindeutig identifiziert und auf 0.1% OSCS bzw. 0.5% Dermatansulfat begrenzt werden. Eine präzise und richtige quantitative Bestimmung der beiden Glykosaminoglykane wurde über die N-Acetyl-Resonanzen im Bereich von $\delta = 2.0\text{--}2.2\text{ ppm}$ mit Hilfe der Signalhöhenbestimmung und dem Standard-Additionsverfahren ermöglicht; deutliche Abweichungen vom "wahren" Gehalt wurden hingegen, bedingt durch starke Signalüberlagerungen, nach Flächenvergleich beobachtet. Weitere Verunreinigungen, insbesondere Lösungsmittelrückstände, die während des Extraktions- und Reinigungsprozesses des Heparins eingesetzt werden, konnten ebenfalls über charakteristische Resonanzen identifiziert und nach Zusatz von Maleinsäure mit Hilfe der Internen-Standard-Methode quantitativ erfasst werden. Eine umfangreiche Untersuchung von 145 Heparin-API-Mustern mittels NMR-Spektroskopie und weiteren, neuentwickelten Verfahren wie HPLC, Kapillarelektrophorese, IR- und Raman-Spektroskopie konnte die Eignung der entwickelten $^1\text{H-NMR}$ -Methode bestätigen.

Potentielle Glycerin-Kontaminanten wie Diethylenglycol und Ethylenglycol konnten ebenso wie eine weitere, natürlich vorkommende Verunreinigung, Propylenglycol,

mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie identifiziert und quantifiziert werden; als optimales Lösungsmittel erwies sich in diesem Fall Pyridin- d_5 . Beide Methoden erfüllten die in der USP beschriebenen Anforderungen, die für pharmazeutisch eingesetztes Glycerin jeweils höchstens 0.1 % Diethylenglycol bzw. Ethylenglycol erlaubt. Während die quantitative Reinheitsprüfung beim Einsatz der ^1H -NMR-Spektroskopie mit einer Messdauer im Bereich von etwa 30 min für den Routineeinsatz geeignet ist, ist die entwickelte quantitative ^{13}C -NMR-Methode beim Einsatz von Spektrometern geringer Magnetfeldstärke aufgrund einer geringen Nachweisempfindlichkeit und der NOE-Problematik für den Routinebetrieb nur bedingt anwendbar.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die untersuchten Beispiele die NMR-Spektroskopie als in hohem Maße geeignet für die quantitative Analyse von Arzneimitteln ausweisen.

7. Summary

The main objective of the present thesis was the investigation of the suitability of quantitative NMR spectroscopy for identification, purity assay, and quantification of a given drug, as well as a comparison of precision and sensitivity of this method with well-established chromatographic routines.

The quantitative analysis of the three multi-component drug mixtures codergocrine mesylate, clomiphen citrate, and flupentixol dihydrochloride strikingly demonstrates the suitability of the ^1H NMR spectroscopy as an independent analytical measurement technique in comparison to validated HPLC methods of international pharmacopoeias. Using ethyl-4-(dimethylamino)benzoate as qualified internal standard, C_6D_6 was determined to be the optimal solvent in the case of codergocrine mesylate, under addition of low amounts of the solubilizer DMSO-d_6 . In this case, the H5' region provides a completely separated signal for each component, which is suited for quantification. Concerning precision and accuracy, the results obtained from validation of the ^1H NMR method met the requirements that are made on an analytical routine for pharmaceutical purposes; additionally, further validation parameters such as selectivity, linearity, robustness, and stability have been verified. Experiments like the "twin tube" and ERETIC techniques utilizing external standards confirm these results; however, in this context an increased error rate and therefore larger variance was observed, especially in the case of ERETIC. Comparable results were obtained for clomiphen citrate in DMSO-d_6 using nicotinamide as internal standard, as well as for flupentixol dihydrochloride in a mixture of toluene- d_8 and CD_3OD , using ethyl-4-(dimethylamino)benzoate as qualified internal standard. By means of codergocrine mesylate and flupentixol dihydrochloride, additionally the suitability of other NMR active nuclei as ^{13}C or ^{19}F for quantification of complex mixtures was shown.

The potential of the ^1H NMR spectroscopy for purity assays was demonstrated for the example of the amino acid L-alanin. Identification and quantification of the expec-

ted impurities glutamic acid, aspartic acid, malic acid, and fumaric acid was possible, in contrast to “out-dated” test methods of the European Pharmacopoeia; achieving a limit of quantification $\leq 0.03\%$, the demands of the ICH guideline Q3A(R2) for “substances for pharmaceutical use” have been met. Concerning the quantification of a alanine model mixture, the clear agreement between the results obtained by means of NMR spectroscopy and a HPLC method using various detectors like CAD, NQAD, ELSD, and MS, suited for routine analysis, as well as the comparison of various relevant parameters such as linearity and limit of quantification confirmed the qualification of ^1H NMR spectroscopy in the field of routine quality assurance.

Within the scope of this work, the disclosure of counterfeit drugs by means of NMR spectroscopy was investigated in detail utilizing two current case studies, namely heparin and glycerin. Besides dermatan sulfate and other natural occurrences of glycosaminoglycan impurities, the contaminant OSCS revealed in connection with the recent heparin affair was clearly identified in the ^1H NMR spectrum and these contaminants could be limited to 0.1% OSCS and 0.5% dermatan sulfate, respectively. A precise and accurate quantification of these two glycosaminoglycanes was achieved using signal height and standard addition methods applied to the N-acetyl resonances in the region of $\delta = 2.0\text{--}2.2\text{ ppm}$; comparison of signal areas however yielded considerable deviations from the “true” content, which are due to strong signal overlap. Further contaminants, especially solvent residues originating from the extraction and purification processes of heparin, have been able to be identified with the help of characteristic resonances; their quantification was possible using maleic acid as internal standard. An extensive study of 145 heparin API samples by means of NMR spectroscopy and other novel techniques such as HPLC, capillary electrophoresis, IR and Raman spectroscopy confirmed the qualification of the developed ^1H NMR method.

Potential contaminants in glycerin such as diethylene glycol and ethylene glycol have been able to be identified as well as quantified by means of ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, as was the case for propylene glycol, which is naturally present; the ideal solvent in this context turned out to be pyridine- d_5 . Both methods met the requirements of the USP, limiting the amount of diethylene glycol and ethylene glycol for pharmaceutical purposes to 0.1% , respectively. While ^1H NMR spectroscopy with a measurement time of about 30 min is well suited for routine application, the

applicability of the ^{13}C NMR method is limited due to the NOE effect and the low sensitivity at low field strengths.

In conclusion, each of the attended topics showed, that NMR spectroscopy is a powerful tool within the framework of quantitative drug analysis.

Experimenteller Teil

1. Material

1.1. Technische Geräte

Technische Geräte	Bezeichnung/Hersteller
NMR-Spektrometer	Bruker Avance 400 MHz, Bruker DMX 600 MHz, Bruker Biospin (Rheinstetten, D)
HPLC-Gerät	System 1100 LC, Agilent (Waldbronn, D)
Polarimeter	PerkinElmer 241, PerkinElmer (Waltham, MA, USA)
Waage	EW Präzisionswaage, Kern (Balingen, D)
Pipetten	Reference, Eppendorf (Hamburg, D)
Vortex	Vortex-Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Ultraschallbad	Sonorex, Bandelin (Berlin, D)
pH-Meter	PHM220 Lap pH-Meter, Radiometer (Willich, D)

1.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
NMR-Röhrchen Economic (5 µm)	Schott (Mainz, D)
NMR-Röhrchen Scientific (5 µm)	Schott (Mainz, D)
NMR-Röhrchen Typ 527-pp (5 µm)	Wilmad-LabGlass (Vineland, NY, USA)
Rollrandgläser (3 ml)	Hartenstein (Würzburg, D)
Pipettenspitzen	Hartenstein (Würzburg, D)
CME-Filter (0.22 µm)	Roth (Karlsruhe, D)
PVDF-Filter (0.22 µm)	Roth (Karlsruhe, D)
HPLC-Vials	YMC Europe GmbH (Dinslaken, D)

1.3. HPLC-Säulen

Säule	Maße	Hersteller
BetaBasic-4	250 × 4.6 mm, 5 µm	Thermo Hypersil Keystone (Bellefonte, PA, USA)
Betasil Silica-100	250 × 4.0 mm, 5 µm	
Hypersil Gold	150 × 4.6 mm, 5 µm	

1.4. Chemikalien

Deuterierte Lösungsmittel

- Deuteriumoxid (99.9 %), Methanol-d₄ (99.8 %), Chloroform-d (99.8 %) [Euristop (Saarbrücken, D)]
 - Acetonitril-d₃ (99.9 %), Benzol-d₆ (99.6 %), Dichlormethan-d₂ (99.6 %), Dimethylsulfoxid-d₆ (99.9 %), Toluol-d₈ (99.6 %), Pyridin-d₅ (99.5 %), deuterierte Natronlauge 30 wt % (99 %), deuterierte Salzsäure 35 wt % (99 %), 3-(Trimethylsilyl)propion-2,2,3,3-d₄-säure (98 %) [Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)]
-

Proben und Referenzsubstanzen

- Codergocrinmesilat (API) [Shire Deutschland GmbH (Köln, D), Novartis Pharma GmbH (Basel, CH)]; Dihydroergocristinmesilat [Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)]
 - Clomifencitrat [Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)]
 - Flupentixoldihydrochlorid (API), Z-Flupentixoldihydrochlorid, E-Flupentixoldihydrochlorid [Bayer HealthCare AG (Leverkusen, D)]; Z-Flupentixoldihydrochlorid ($\geq 98\%$) [Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)]
 - L-Alanin ($\geq 99.5\%$), L-Asparaginsäure ($\geq 99.5\%$), Äpfelsäure ($\geq 99.5\%$), Fumarsäure ($\geq 99\%$), L-Glutaminsäure ($\geq 99.5\%$) [Fluka (Buchs, CH)]
 - Heparin-Natrium (API), Übersulfatiertes Chondroitinsulfat [BfArM (Bonn, D)]; Heparin-Calcium (API), Heparin-Natrium (API) [Merckle Gruppe (Ulm, D)]; Chondroitinsulfat A/C (“from bovine trachea”), Dermatansulfat (“from porcine intestinal mucosa”, $\geq 90\%$), Heparin-Natrium (“from bovine intestinal mucosa”), Heparin-Natrium (“from porcine intestinal mucosa”) [Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)]; Übersulfatiertes Chondroitinsulfat ($\geq 95\%$) [SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)]
 - Diethylenglycol ($\geq 99\%$), Ethylenglycol ($\geq 99.5\%$), Glycerin ($\geq 99\%$), Propylenglycol ($\geq 99.5\%$) [Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)]
-

Zertifizierte Referenzsubstanzen

- USP Clomiphene Citrate RS (99.2 %), USP Ergoloid Mesylates RS (96.55 %), Flupentixoldihydrochlorid CRS (Z-Isomer 43.6 %) [LGC Standards (Wesel, D)]
- 4-Dimethylaminobenzoessäureethylester (99.6 %), Nicotinamid (99.5 %), Thymol (99.9 %), Kaliumhydrogenphthalat (99.9 %) [Spectral-Service (Köln, D)]

-
- Fluvoxaminmaleat (99.5 %) [Solvay (Weesp, NL)]

HPLC-Lösungsmittel

- Acetonitril (für UV, 99.99 %), n-Heptan (für HPLC, 99 %), Methanol (HPLC-Gradient Grade), 2-Propanol (HPLC-Gradient Grade, 99.5 %) [Fisher Scientific (Schwerte, D)]

Weitere Chemikalien

- Triethylamin (HPLC-Grade, ≥ 99.5 %) [Fisher Scientific (Schwerte, D)]
- Ammoniak 35 % (p.a.), Phosphorsäure 85 % (p.a.) [Grüssing (Filsum, D)]
- Chrom(III)acetylacetonat (≥ 99.99 %), 2,5-Dimethylfuran (≥ 99 %), EDTA-Natrium (≥ 99 %), Flecainidacetat (99.5 %), Flupenazindihydrochlorid, Maleinsäure (≥ 99.5 %), Benzol-1,3,5-tricarbonsäure (98 %) [Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)]

Das verwendete Wasser stammt aus der hauseigenen Demineralisierungsanlage (Umkehrosiose) und wurde mit einer Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q reagent grade water system) der Firma Millipore (Schwalbach, D) nochmals aufgereinigt.

2. Methoden

2.1. Standard-NMR-Experimente

Im Rahmen der Signalzuordnung bzw. Methodenentwicklung wurden für die Herstellung der jeweiligen Untersuchungslösung in Abhängigkeit des Molekulargewichts der zu analysierenden Substanz Probenmengen zwischen 30 und 100 mg (Signalzuordnung) bzw. 10 und 20 mg (Methodenentwicklung) in 750 μl Lösungsmittel gelöst. Für die Aufnahme ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente wurden üblicherweise folgende Messparameter eingesetzt (siehe Tabelle 2.1 und 2.2).

2.2. “Inversion-Recovery-Experimente”

Die Spin-Gitter-Relaxationszeit wurde unter Einsatz der “Inversion-Recovery-Pulssequenz” für alle quantitativ auszuwertenden Signale von Analyt und Internem Standard über die Abschätzung bzw. Bestimmung der T_0 -Zeit ermittelt. Die Konzentration der Untersuchungslösung wurde hier analog zur quantitativen Bestimmung gewählt. Die Experiment-Anzahl sowie die ansteigende Wartezeit von 0.1 s bis 10 s zwischen den beiden aufeinanderfolgenden 180° - und 90° -Impulsen wurde für jeden Arzneistoff individuell mit Hilfe von Vorversuchen festgelegt. Vor jeder Wiederholung der Impulsfolge wurde eine Wartezeit von mindestens 60 s eingehalten, um eine vollständige Relaxation des Spinsystems zu ermöglichen.

Tabelle 2.1: Standardisierte Messparameter für ^1H -, ^{13}C - und DEPT-Experimente.

Parameter	^1H	^{13}C	DEPT
Spektrometer	400 MHz	400 MHz	400 MHz
Temperatur	300 K	300 K	300 K
Datenpunkte	64 K	64 K	64 K
Impuls	30°	30°	DEPT-135
Akquisitionszeit	3.96 s	1.37 s	1.37 s
Relaxation Delay	4.96 s	3.37 s	3.37 s
Spektrale Breite	20.69 ppm	238.35 ppm	238.35 ppm
Scan-Anzahl	128	4096	2048
Dummy Scans	2	4	4
prozessierte Datenpunkte	32 K	32 K	32 K
Fensterfunktion	EM	EM	EM
<i>Lb</i> -Wert	0.3	1.0	1.0

Tabelle 2.2: Standardisierte Messparameter für COSY-, HMQC- und HMBC-Experimente. Spektrale Breite und dementsprechend Akquisitionszeit sowie “Relaxation Delay” wurden jeweils automatisch an die jeweilige Probe angepasst.

Parameter	COSY	HMQC	HMBC
Spektrometer	400 MHz	400 MHz	400 MHz
Temperatur	300 K	300 K	300 K
<i>F2-Dimension</i>			
Datenpunkte	2048	1024	4096
Scan-Anzahl	32	32	44
Dummy Scans	8	16	16
<i>F1-Dimension</i>			
Datenpunkte	128	128	256
<i>F2-Dimension</i>			
prozessierte Datenpunkte	1024 K	1024 K	2048 K
Fensterfunktion	SINE	QSINE	SINE
<i>F1-Dimension</i>			
prozessierte Datenpunkte	1024 K	1024 K	1024 K
Fensterfunktion	SINE	QSINE	SINE

2.3. Quantitative NMR-Experimente

Im Rahmen der quantitativen Analyse der zu untersuchenden Substanzen Codergocrinmesilat, Clomifencitrat, Flupentixoldihydrochlorid, L-Alanin, Heparin-Natrium und Glycerin wurde für die Herstellung der jeweiligen Untersuchungslösung eine definierte Probenmenge von Analyt und Internem Standard genau abgewogen und in 750 μl Lösungsmittel gelöst. Anschließend wurde ein Aliquot von 700 μl in ein NMR-Röhrchen überführt und NMR-spektroskopisch vermessen. Die wichtigsten Messparameter sind in Tabelle 2.3 und 2.4 zusammengefasst.

2.4. HPLC-Experimente

Die quantitative Gehaltsbestimmung der drei Mehrkomponentengemische Codergocrinmesilat, Clomifencitrat und Flupentixoldihydrochlorid mittels HPLC wurde nach USP [165, 166] bzw. Ph. Eur. [167] durchgeführt. Hierfür wurden jeweils sechs unabhängige Einwaagen von Analyt und zertifizierter Referenzsubstanz genau eingewogen, im entsprechenden Lösungsmittel gelöst, vor der Injektion mit einem 0.22 μm PVDF-Filter filtriert und mittels Dreifachbestimmung analysiert. Die wichtigsten Messparameter sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst. Nach Überprüfung der geforderten Systemeignungskriterien wurde der Gehalt des Mehrkomponentengemisches mittels Einpunktkalibrierung gegen einen Externen Standard bekannter Reinheit ermittelt.

2.5. Spezifische Drehung

Die polarimetrische Bestimmung der spezifischen Drehung der 145 Heparin-Proben wurde nach Ph. Eur. 6.0 durchgeführt [225]. Hierfür wurden 40 mg Substanz genau

eingewogen und in Wasser R zu 1.0 ml gelöst. Ein Aliquot der Untersuchungslösung wurde in eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 dm überführt und der Drehungswinkel α bei der Wellenlänge der D-Linie des Natriumlichtes ($\lambda = 589.3$ nm) und einer Temperatur von 20 °C am Polarimeter abgelesen. Die Berechnung der spezifischen Drehung erfolgte, wie im Allgemeinen Teil in Abschnitt 3.7.1 beschrieben, nach Gleichung (3.4).

Tabelle 2.3: Messparameter für die Gehaltsbestimmung der drei Mehrkomponentengemische Codergocrimmesilat, Clomifen-citrat und Flupentixoldihydrochlorid mittels ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektroskopie.

Parameter	Codergocrimmesilat		Clomifencitrat		Flupentixol-2HCl	
	^1H -NMR	^{13}C -NMR	^1H -NMR	^1H -NMR	^1H -NMR	^{19}F -NMR
Spektrometer	400 MHz	400 MHz	400 MHz	400 MHz	400 MHz	400 MHz
Temperatur	300 K	300 K	300 K	300 K	300 K	300 K
Datenpunkte	64 K	64 K	64 K	64 K	64 K	64 K
Impuls	90°	30°	90°	90°	90°	90°
Akquisitionszeit	5.11 s	1.37 s	5.11 s	6.86 s	5.82 s	5.82 s
Relaxation Delay	13.61 s	3.37 s	20.11 s	12.86 s	9.82 s	9.82 s
Spektrale Breite	16 ppm	238.35 ppm	16 ppm	12 ppm	30 ppm	30 ppm
Scan-Anzahl	64	4096	32	64	32	32
prozessierte Datenpunkte	32 K	32 K	32 K	32 K	32 K	32 K
Fensterfunktion	EM	EM	EM	EM	EM	EM
<i>Lb</i> -Faktor	0.3	1.0	0.3	0.3	0.3	0.3
^1H -BB-Entkopplung	–	ja	–	–	–	–
Einwaage Analyt	15 mg	80 mg	14 mg	7.5 mg	3 mg	3 mg
Lösungsmittel	C_6D_6 -DMSO- d_6	DMSO- d_6	DMSO- d_6	Toluol- d_8 - CD_3OD	CD_3OD	CD_3OD
Mischungsverhältnis	10:1 (V/V)	–	–	5:1 (V/V)	–	–
Interner Standard	DMABE	–	Nicotinamid	DMABE	Flecainidacetat	Flecainidacetat
Verhältnis Analyt/IS	15:1	–	3.5:1	5:1	2:1	2:1

Tabelle 2.4: Messparameter für die Prüfung auf Reinheit von L-Alanin, Heparin-Natrium und Glycerin mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie.

Parameter	L-Alanin		Heparin-Natrium		Glycerin	
	^1H -NMR	^{13}C -NMR	^1H -NMR	^{13}C -NMR	^1H -NMR	^{13}C -NMR
Spektrometer	400 MHz	400 MHz				
Temperatur	300 K	315 K	300 K	300 K	300 K	300 K
Datenpunkte	64 K	64 K				
Impuls	90°	90°	90°	30°	90°	30°
Akquisitionszeit	5.86 s	6.84 s	7.84 s	1.37 s	5.86 s	1.37 s
Relaxation Delay	44.86 s	7.84 s	7.84 s	3.37 s	14.50 s	3.37 s
Spektrale Breite	14 ppm	12 ppm	12 ppm	238.35 ppm	14 ppm	238.35 ppm
Scan-Anzahl	128	128	128	16 K	128	128
prozessierte Datenpunkte	32 K	32 K				
Fensterfunktion	EM	EM	EM	EM	EM	EM
<i>Lb</i> -Faktor	0.3	0.3	0.3	1.0	0.3	1.0
^1H -BB-Entkopplung	–	–	–	ja	–	ja
Einwaage Analyt	50 mg	25 mg	25 mg	100 mg	50 mg	200 mg
Lösungsmittel	D_2O	D_2O	D_2O	D_2O	Pyridin- d_5	Pyridin- d_5

Tabelle 2.5: Messparameter für die Gehaltsbestimmung der drei Mehrkomponentengemische Codergocrimmesilat, Clomifencitrat und Flupentixoldihydrochlorid mittels HPLC nach USP 32 [165, 166] bzw. Ph.Eur. 6.0. [167]

Parameter	Codergocrimmesilat	Clomifencitrat	Flupentixol-2HCl
Säule	Hypersil Gold 150 × 4.6 mm, 5 µm	BetaBasic-4 250 × 4.6 mm, 5 µm	Betasil Silica-100 250 × 4.0 mm, 5 µm
mobile Phase	Wasser 80 VT Acetonitril 20 VT Triethylamin 2.5 VT	Methanol 55 VT Wasser 45 VT Triethylamin 0.3 VT	Wasser 2 VT Ammoniak 4 VT 2-Propanol 150 VT Heptan 850 VT
Elution	isokratisch	isokratisch	isokratisch
Flußrate	1 ml/min	1 ml/min	1.5 ml/min
Injektionsvolumen	20 µl	50 µl	20 µl
Detektor	DAD-Detektor	DAD-Detektor	DAD-Detektor
Wellenlänge	280 nm	233 nm	254 nm
Temperatur	25 °C	25 °C	25 °C
Probenkonzentration	10 mg/10 ml	5 mg/100 ml	10 mg/25 ml
Lösungsmittel	Wasser/Acetonitril (1:1 (V/V))	mobile Phase	mobile Phase

Literaturverzeichnis

- [1] *Arzneimittelgesetz: Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln* (vom 24.08.1976, in der Fassung vom 12.12.2005, letzte Änderung vom 28.09.2009 (BGBl. I S. 3172)).
- [2] *Allgemeiner Text 6.10, Kontrolle von Verunreinigungen in Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [3] *Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances*. In: *Guideline Q6A*. International Conference on Harmonisation (2006).
- [4] Kramer PJ, Caldwell J, Hofman A, Tempel P, Weisse G. *Neurotoxicity risk assessment of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) as a synthetic impurity of drugs*. *Hum. Exp. Toxicol.* 17:283–293 (1998).
- [5] Belongia EA, Hedberg CW, Gleich GJ, White KE, Mayeno AN, Loegering DA, Dunnette SL, Pirie PL, MacDonald KL, Osterholm MT. *An investigation of the cause of the eosinophilia-myalgia syndrome associated with tryptophan use*. *N. Engl. J. Med.* 323:357–365 (1990).
- [6] Hill RH, Caudill SP, Philen RM, Bailey SL, Flanders WD, Driskell WJ, Kamb ML, Needham LL, Sampson EJ. *Contaminants in L-tryptophan associated with eosinophilia myalgia syndrome*. *Environ. Contam. Toxicol.* 25:134–142 (1993).
- [7] Mayeno AN, Lin F, Foote CS, Loegering DA, Ames MM, Hedberg CW, Gleich GJ. *Characterization of “peak E”, a novel amino acid associated with eosinophilia-myalgia syndrome*. *Science* 250:1707–1708 (1990).
- [8] Toyooka T, Yamazaki T, Tanimoto T, Sato K, Sato M, Toyoda M, Ishibashi M, Yoshihira K, Uchiyama M. *Characterization of contaminants in EMS-associated L-tryptophan samples by high-performance liquid chromatography*. *Chem. Pharm. Bull.* 39:820–822 (1991).

- [9] Trucksess MW. *Separation and isolation of trace impurities in L-tryptophan by high-performance liquid chromatography*. J. Chromatogr. 630:147–150 (1993).
- [10] Goda Y, Suzuki J, Maitani T, Yoshihira K, Takeda M, Uchiyama M. *3-Anilino-L-alanine, structural determination of UV-5, a contaminant in EMS-associated L-tryptophan samples*. Chem. Pharm. Bull. 40:2236–2238 (1992).
- [11] Williamson BL, Benson LM, Tomlinson AJ, Mayeno AN, Gleich GJ, Naylor S. *On-line HPLC-tandem mass spectroscopy analysis of contaminants of L-tryptophan associated with the onset of the eosinophilia-myalgia syndrome*. Toxicol. Lett. 92:139–148 (1997).
- [12] Boschetti C, Fronza G, Fuganti C, Grasselli P, Magnone AG, Mele A, Pellegratta C. *A nuclear magnetic resonance methode for the determination of the purity of commercial dequalinium chloride*. Arzneim.-Forsch. 45:1217–1221 (1995).
- [13] Wirth DD, Olsen BA, Hallenbeck DK, Lake ME, Gregg SM, Perry FM. *Screening methods for impurities in multi-sourced fluoxetine hydrochloride drug substances and formulations*. Chromatographia 46:511–523 (1997).
- [14] Wirth DD, Miller MS, Boini SK, Koenig TM. *Identification and comparison of impurities in fluoxetine hydrochloride synthesized by seven different routes*. Org. Process Res. Dev. 4:513–519 (2000).
- [15] Ali SL. *Lösungsmittelreste in Erythromycin*. Pharm. Ztg. 143:3343 (1998).
- [16] Lehr GJ, Barry TL, Petzinger G, Hanna GM, Zito SW. *Isolation and identification of process impurities in trimethoprim drug substances by high-performance liquid chromatography, atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography/mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J. Pharm. Biomed. Anal. 19:373–389 (1999).
- [17] Holzgrabe U, Deubner R, Novatchev N, Wienen F. *Verunreinigung von Arzneistoffen*. Dtsch. Apoth. Ztg. 143:3221–3228 (2003).
- [18] Hildebrand RJ. *Arzneimittelfälschungen in den USA*. Pharm. Ind. 64:147–150 (2002).
- [19] Kaale E, Leonard S, Van Schepdael A, Roets E, Hoogmartens J. *Capillary electrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1,2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid*. J. Chromatogr. A 895:67–79 (2000).

- [20] Wiene F, Holzgrabe U. *A new micellar electrokinetic capillary chromatography method for separation of the components of the aminoglycoside antibiotics*. Electrophoresis 24:2948–2957 (2003).
- [21] Deubner R, Schollmayer C, Wiene F, Holzgrabe U. *Assignment of the major and minor components of gentamicin for evaluation of batches*. Magn. Reson. Chem. 41:589–598 (2003).
- [22] Deubner R, Holzgrabe U. *Micellar electrokinetic capillary chromatography, high performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance - three orthogonal methods for characterization of critical drugs*. J. Pharm. Biomed. Anal. 35:459–467 (2004).
- [23] Hess S, Teubert U, Ortwein J, Eger K. *Profiling indomethacin impurities using high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance*. Eur. J. Pharm. Sci. 14:301–311 (2001).
- [24] *Monographie 1271, L-Tryptophan*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [25] Novatchev N, Holzgrabe U. *Evaluation of amino sugar, low molecular peptide and amino acid impurities of biotechnologically produced amino acids by means of CE*. J. Pharm. Biomed. Anal. 28:475–486 (2002).
- [26] Görög S, Babjak M, Balogh G, Csehi A, Dravec F, Gazdag M, Horvath P, Lauko A, Varga K. *Drug impurity profiling strategies*. Talanta 44:1517–1526 (1997).
- [27] Argentine MD, Owens PK, Olsen BA. *Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances*. Adv. Drug Deliv. Rev. 59:12–28 (2007).
- [28] Saavedra L, Huidobro AL, Gracia A, Cabanelas JC, Gonzalez MG, Barbas C. *CE as orthogonal technique to HPLC for alprazolam degradation product identification*. Electrophoresis 27:2360–2366 (2006).
- [29] Wells RJ, Hook JM, Al-Deen TS, Hibbert DB. *Quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy for assessing the purity of technical grade agrochemicals: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) and sodium 2,2-dichloropropionate (dalapon sodium)*. J. Agric. Food Chem. 50:3366–3374 (2002).

- [30] Wells RJ, Cheung J, Hook JM. *The use of qNMR for the analysis of agrochemicals*. In: Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B (Hrsg.), *NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis*, S. 291–315. Elsevier, Amsterdam (2008).
- [31] Beyer T, Schollmayer C, Holzgrabe U. *The role of solvents in the signal separation for quantitative ^1H NMR spectroscopy*. J. Pharm. Biomed. Anal. 52:51–58 (2010).
- [32] Lacroix PM, Dawson BA, Sears RW, Black DB, Cyr TD, Ethier JC. *Fenofibrate raw materials: HPLC methods for assay and purity and an NMR method for purity*. J. Pharm. Biomed. Anal. 18:383–402 (1998).
- [33] Forshed J, Erlandsson B, Jacobsson SP. *Quantification of aldehyde impurities in poloxamer by ^1H NMR spectroscopy*. Anal. Chim. Acta 552:125–135 (2005).
- [34] *Monographie 0828, Niedermolekulare Heparine*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [35] Guerrini M, Beccati D, Shriver Z, Naggi A, Viswanathan K, Bisio A, Capila I, Lansing JC, Gulieri S, Fraser B, Al-Hakim A, Gunay NS, Zhang Z, Robinson L, Buhse L, Nasr M, Woodchock J, Langer R, Venkataraman G, Linhardt RJ, Casu B, Torri G, Sasisekharan R. *Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events*. Nat. Biotechnol. 26:669–675 (2008).
- [36] 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*. J. Pharm. Biomed. Anal. 48:13–19 (2008).
- [37] Pauli W. *Zur Frage der theoretischen Deutung der Satelliten einiger Spektrallinien und ihrer Beeinflussung durch magnetische Felder*. Naturwiss. 12:741–743 (1924).
- [38] Rabi II, Millman S, Kusch P, Zacharias JR. *The molecular beam resonance method for measuring nuclear magnetic moments. The magnetic moments of ^6Li , ^7Li and ^{19}F* . Phys. Rev. 55:526–535 (1939).
- [39] Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. *Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid*. Phys. Rev. 69:37–38 (1946).
- [40] Bloch F, Hansen W, Packard ME. *Nuclear induction*. Phys. Rev. 69:127 (1946).
- [41] Rizzo V, Pinciroli V. *Quantitative NMR in synthetic and combinatorial chemistry*. J. Pharm. Biomed. Anal. 38:851–857 (2005).

- [42] Pauli GF. *qNMR - A versatile concept for the validation of natural product reference compounds*. *Phytochem. Anal.* 12:28–42 (2001).
- [43] Maniara G, Rajamoorthi K, Rajan S, Stockton GW. *Method performance and validation for quantitative analysis by ^1H and ^{31}P NMR spectroscopy. Applications to analytical standards and agricultural chemicals*. *Anal. Chem.* 70:4921–4928 (1998).
- [44] Malz F, Jancke H. *Validation of quantitative NMR*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38:813–823 (2005).
- [45] Beyer T, Diehl B, Holzgrabe U. *Quantitative NMR spectroscopy of biologically active substances and excipients*. *Bioanal. Rev.* 2:1–22 (2010).
- [46] Dixon WT. *Spinning-sideband-free and spinning-sideband-only NMR spectra in spinning samples*. *J. Chem. Phys.* 77:1800–1809 (1982).
- [47] Borer MA, Maple SR. *Control of spinning sidebands in high resolution NMR spectroscopy*. *J. Magn. Reson.* 131:177–183 (1998).
- [48] Pauli GF, Jaki BU, Lankin D. *A routine experimental protocol for qHNMR illustrated with taxol*. *J. Nat. Prod.* 70:589–595 (2007).
- [49] Bauer M, Bertario A, Boccardi G, Fontaine X, Rao R, Verrier D. *Reproducibility of ^1H -NMR integrals: a collaborative study*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17:419–425 (1998).
- [50] Shaka AJ, Barker PB, Freeman R. *Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation*. *J. Magn. Reson.* 64:547–552 (1985).
- [51] Simeral LS. *Improved analysis of minor species in mixtures using carbon-13 decoupling in one-dimensional proton NMR*. *Appl. Spectrosc.* 49:400–402 (1995).
- [52] Kupec E, Freeman R. *Adiabatic pulses for wideband inversion and broadband decoupling*. *J. Magn. Reson. Ser. A* 115:273–276 (1995).
- [53] Bendall MR, Skinner TE. *Calibration of STUD + parameters to achieve optimally efficient broadband adiabatic decoupling in a single transient*. *J. Magn. Reson.* 134:331–349 (1998).
- [54] Pauli GF, Jaki BU, Lankin DC. *Quantitative ^1H NMR: Development and potential of a method for natural products analysis*. *J. Nat. Prod.* 68:133–149 (2005).

- [55] Holzgrabe U. *Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications*. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 57:229–240 (2010).
- [56] Al Deen TS, Hibbert DB, Hook JM, Wells RJ. *Quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. Purity of phosphorus-based agrochemicals glyphosate (N-(phosphonomethyl)-glycine) and profenofos (O-(4-bromo-2-chlorophenyl) O-ethyl S-propyl phosphorothioate) measured by ^1H and ^{31}P QNMR spectroscopy*. Anal. Chim. Acta 125–135 (2002).
- [57] Szantay C. *High-field NMR spectroscopy as an analytical tool for quantitative determinations: pitfalls, limitations and possible solutions*. TrAC 11:332–344 (1992).
- [58] 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. 38:871–891 (2005).
- [59] Diehl B, Malz F, Holzgrabe U. *Quantitative NMR spectroscopy in the quality evaluation of active pharmaceutical ingredients and excipients*. Spectroscopy Europe 19:15–19 (2007).
- [60] Derome AE. *Modern NMR techniques for chemistry research*. Pergamon Books Inc., Elmsford, NY (1987).
- [61] Saito T, Nakaie S, Kinoshita M, Ihara T, Kinugasa S, Nomura A, Maeda T. *Practical guide for accurate quantitative solution state NMR analysis*. Metrologia 41:213–218 (2004).
- [62] Rabenstein DL. *Modern NMR techniques and their application in chemistry*, Kap. Quantitative chemical analysis by NMR, S. 323–369. Marcel Dekker, New York (1991).
- [63] Wells RJ, Cheung J, Hook JM. *Dimethylsulfone as a universal standard for analysis of organics by QNMR*. Accred. Qual. Assur. 9:450–456 (2004).
- [64] Pople JA, Schneider WG, Bernstein HJ. *High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance*. McGraw-Hill Book Co., New York (1959).
- [65] Lazlo P. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Kap. Solvent effects and nuclear magnetic resonance, S. 231–402. Pergamon Press, Oxford (1967).

- [66] Pauli GF, Kuczkowiak U, Nahrstedt A. *Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids*. Magn. Reson. Chem. 37:827–836 (1999).
- [67] Diehl B. *Principles in NMR spectroscopy*. In: Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B (Hrsg.), *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, S. 3–41. Elsevier, Amsterdam (2008).
- [68] Soinenen P, Haarala J, Vepsäläinen J, Niemitz M, Laatikainen R. *Strategies for organic impurity quantification by ^1H NMR spectroscopy: Constrained total-line-shape fitting*. Anal. Chim. Acta 542:178–185 (2005).
- [69] Buckingham AD, Schaefer T, Schneider WG. *Solvent effects in nuclear magnetic resonance spectra*. J. Chem. Phys. 32:1227–1234 (1960).
- [70] Abraham RJ, Byrne JJ, Griffiths L, Perez M. *^1H chemical shifts in NMR: Part 23, the effect of dimethyl sulphoxide versus chloroform solvent on ^1H chemical shifts*. Magn. Reson. Chem. 44:491–509 (2006).
- [71] Jones IC, Sharman GJ, Pidgeon J. *Spectral assignments and reference data*. Magn. Reson. Chem. 43:497–509 (2005).
- [72] Gottlieb HE, Kotlyae V, Nudelman A. *NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities*. J. Org. Chem. 62:7512–7515 (1997).
- [73] Schneider WG. *Directed solute-solvent interactions in benzene solutions*. J. Phys. Chem. 66:2653–2657 (1962).
- [74] Pauli GF. *Higher order and substituent chemical shift effects in the proton NMR of glycosides*. J. Nat. Prod. 63:834–838 (2000).
- [75] Farcasiu D, Ghenciu A. *Determination of acidity functions and acid strengths by ^{13}C NMR*. Progr. NMR Spectrosc. 29:129–168 (1996).
- [76] Tynkkynen T, Tiainen M, Soinenen P, Laatikainen R. *From proton nuclear magnetic resonance spectra to pH. Assessment of ^1H NMR pH indicator compound set for deuterium oxide solutions*. Anal. Chim. Acta 648:105–112 (2009).
- [77] Hägele C, Holzgrabe U. *pH-dependent NMR measurements*. In: Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B (Hrsg.), *NMR spectroscopy in drug development and analysis*, S. 61–70. Wiley-VCH, Weinheim (1999).
- [78] Szakacs Z, Hägele G. *Accurate determination of low pK values by ^1H NMR titration*. Talanta 62:819–825 (2004).

- [79] Szakacs Z, Kraszni M, Noszal B. *Determination of microscopic acid-base parameters from NMR-pH titrations*. Anal. Bioanal. Chem. 378:1428–1448 (2004).
- [80] Buckingham DA, Clark CR, Nangia A. *The acidity of norfloxacin*. Aust. J. Chem. 43:301–309 (1990).
- [81] Holzgrabe U, Branch SK. *^1H , ^{19}F and ^{13}C NMR spectral data of fifteen gyrase inhibitors and some metabolites*. Magn. Reson. Chem. 32:192–197 (1994).
- [82] Mitra A, Seaton PJ, Assarpour RA, Williamson T. *Unprecedented concentration dependent chemical shift variation in ^1H -NMR studies: A caveat in the investigations of molecular recognition and structure elucidation*. Tetrahedron 54:15489–15498 (1998).
- [83] Michaleas S, Antoniadou-Vyza E. *A new approach to quantitative NMR: Fluoroquinolones analysis by evaluating the chemical shift displacements*. J. Pharm. Biomed. Anal. 42:405–410 (2006).
- [84] Thakkar AL, Tensmeyer LG, Hermann RB, Wilham WL. *Self-association of caffeine in aqueous solution: ^1H nuclear magnetic resonance study*. Chem. Commun. S. 524–525 (1970).
- [85] Reuben J. *Paramagnetic lanthanide shift reagents in NMR spectroscopy: Principles, methodology and applications*. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 9:1–70 (1973).
- [86] Friebolin H. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. Wiley-VCH, Weinheim (2006).
- [87] Cockerill AF, Davies GLO, Harrison RG, Rackham DM. *NMR determination of the enantiomer composition of penicillamine using an optically active europium shift reagent*. Org. Magn. Reson. 6:669–670 (1974).
- [88] Martin R, Rothchild R. *^1H -NMR spectral simplification with achiral and chiral lanthanide shift reagents. Clenbuterol. Method for direct optical purity determination*. Spectrosc. Lett. 22:511–532 (1989).
- [89] Casy AF. *Chiral discrimination by NMR spectroscopy*. TrAC 12:185–189 (1993).
- [90] Jaki B, Franzblau S, Pauli GF. *An NMR method towards the routine chiral determination of natural products*. Phytochem. Anal. 15:213–219 (2004).

- [91] Kagawa M, Machida Y, Nishi H, Haginaka J. *Enantiomeric purity determination of acetyl-L-carnitine by NMR with chiral lanthanide shift reagents*. J. Pharm. Biomed. Anal. 38:918–923 (2005).
- [92] Arnaud GF, Florini N, Caglioti L, Zucchi C, Palyi G. *Fast enantioselective amino acid quantitative ^{13}C NMR determination by a praseodymium chiral shift reagent*. Tetrahedron: Asymmetry 20:1633–1636 (2009).
- [93] Casy AF, Mercer AD. *Application of cyclodextrins to chiral analysis by ^1H NMR spectroscopy*. Magn. Reson. Chem. 26:765–774 (1988).
- [94] Casy AF. *Use of cyclodextrins in chiral discrimination by NMR spectroscopy: an example of atropisomerism*. Magn. Reson. Chem. 31:416–417 (1993).
- [95] Branch S, Holzgrabe U, Jefferies TM, Mallwitz H, Matchett MW. *Chiral discrimination of phenethylamines with β -cyclodextrin and heptakis(2,3-di-O-acetyl) β -cyclodextrin by capillary electrophoresis and NMR spectroscopy*. J. Pharm. Biomed. Anal. 12:1507–1517 (1994).
- [96] Thunhorst M, Holzgrabe U. *Utilizing NMR spectroscopy for assessing drug enantiomeric composition*. Magn. Reson. Chem. 36:211–216 (1998).
- [97] Shamsipur M, Dastjerdi LS, Haghgoo S, Armspach D, Matt D, Aboul-Enein HY. *Chiral selectors for enantioresolution and quantitation of the antidepressant drug fluoxetine in pharmaceutical formulations by ^{19}F NMR spectroscopic method*. Anal. Chim. Acta 601:130–138 (2007).
- [98] Parker D. *NMR determination of enantiomeric purity*. Chem. Rev. 91:1441–1457 (1991).
- [99] Claridge TDW. *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*. Pergamon, Amsterdam (1999).
- [100] Günther H. *NMR-Spektroskopie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1992).
- [101] Staab HA, Lauer D. *Stabile rotationsisomere Carbonsäureamide*. Chem. Ber. 101:864–878 (1968).
- [102] Meersmann T, Schwager M, Varma V, Bodenhausen G. *Little-known advantages of very high fields in NMR*. J. Magn. Reson. A 119:275–279 (1996).
- [103] Kupce E. *NMR at 900 MHz*. Chem. Heterocycl. Comp. 37:1429–1438 (2001).

- [104] Jungnickel JL, Forbes JW. *Quantitative measurement of hydrogen types by integrated nuclear magnetic resonance intensities*. Anal. Chem. 35:938–942 (1963).
- [105] Hollis DP. *Quantitative analysis of aspirin, phenacetin, and caffeine mixtures by nuclear magnetic resonance spectrometry*. Anal. Chem. 35:1682–1684 (1963).
- [106] Jancke H. *NMR als primäre analytische Messmethode*. Nachr. Chem. Tech. Lab. 46:720–722 (1998).
- [107] King B. *The practical realization of the traceability of chemical measurements standards*. Accred. Qual. Assur. 5:429–436 (2000).
- [108] King B. *Metrology in chemistry: Part II. Future requirements in Europe*. Accred. Qual. Assur. 5:266–271 (2000).
- [109] Malz F. *Quantitative NMR in the solution state NMR*. In: Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B (Hrsg.), *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, S. 43–62. Elsevier, Amsterdam (2008).
- [110] Al-Deen TS, Hibbert DB, Hook JM, Wells RJ. *An uncertainty budget for the determination of the purity of glyphosate by quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) spectroscopy*. Accred. Qual. Assur. 9:55–63 (2004).
- [111] Pinciroli V, Biancardi R, Visentin G, Rizzo V. *The well-characterized synthetic molecule: a role for quantitative ^1H NMR*. Org. Process Res. Dev. 8:381–384 (2004).
- [112] Beyer T, Malz F. *Methodische Weiterentwicklung und Anwendung der quantitativen NMR-Spektroskopie für die pharmazeutische Analytik von Arzneistoffen (AiF-Abschlussbericht 14842 N)* (2009).
- [113] Weber M. *Zertifizierte Standards für die qNMR. Quantitative ^1H -NMR-Spektrometrie auf die Spitze getrieben*. GIT Labor Fachzeitschrift 7:527–529 (2010).
- [114] McEwen I, Mulloy B, Hellwig E, Kozerski L, Beyer T, Holzgrabe U, Rodomonte A, Wanko R, Spieser JM. *Determination of oversulphated chondroitin sulphate and dermatan sulphate in unfractionated heparin by ^1H -NMR. Collaborative study for quantification and analytical determination of LoD*. Pharmeuropa Bio 1:31–39 (2008).
- [115] Rundlöf T, Mathiasson M, Bekiroglu S, Hakkarainen B, Bowden T, Arvidsson T. *Survey and quantification of internal standards for quantification by ^1H NMR spectroscopy*. J. Pharm. Biomed. Anal. 645–651 (2010).

- [116] Talebpour Z, Haghgoo S, Shamsipur M. ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa, carbidopa, and methyl dopa in human serum and pharmaceutical formulations. *Anal. Chim. Acta* 506:97–104 (2004).
- [117] Özden T, Senyuva H, Aksahin I. Quantitative analysis of methocarbamol in solid dosage forms with ^1H -NMR spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21:467–472 (1999).
- [118] Bilia AR, Bergonzi MC, Lazari D, Vincieri FF. Characterization of commercial kava-kava herbal drug and herbal drug preparations by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 50:5016–5025 (2002).
- [119] Henderson TJ. Quantitative NMR spectroscopy using coaxial inserts containing a reference standard: purity determinations for military nerve agents. *Anal. Chem.* 74:191–198 (2002).
- [120] Fulton DB, Sayer BG, Bain AD, Malle HV. Detection and determination of dilute, low molecular weight organic compounds in water by 500 MHz proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chem.* 64:349–353 (1992).
- [121] Laycock MV, Thibault P, Ayer SW, Walter JA. Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards. *Nat. Toxins* 2:175–183 (1994).
- [122] Ramsey UP, Douglas DJ, Walter JA, Wright JLC. Biosynthesis of domoic acid by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Nat. Toxins* 6:137–146 (1996).
- [123] Barantin L, Le Pape A, Akoka S. A new method for absolute quantitation MRS metabolites. *Magn. Reson. Med.* 38:179–182 (1997).
- [124] Akoka S, Barantin L, Trierweiler M. Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Anal. Chem.* 71:2554–2557 (1999).
- [125] Remaund GS, Silvestre V, Akoka S. Traceability in quantitative NMR using an electronic signal as working standard. *Accred. Qual. Assur.* 10:415–420 (2005).
- [126] Silvestri V, Goupy S, Trierweiler M, Robins R, Akoka S. Determination of substrate and product concentration in lactic acid bacterial fermentation by proton NMR using the ERETIC method. *Anal. Chem.* 73:1862–1868 (2001).
- [127] Lane S, Boughtflower B, Mutton I, Paterson C, Farrant D, Taylor N, Blaxill Z, Carmody C, Borman P. Toward single-calibrant quantification in HPLC. A comparison of three detection strategies: evaporative light scattering, chemiluminescent nitrogen, and proton NMR. *Anal. Chem.* 77:4354–4365 (2005).

- [128] Caytan EGR, Remaud GS, Tenailleau E, Akoka S. *Precise and accurate quantitative ^{13}C NMR with reduced experimental time*. *Talanta* 71:1016–1021 (2007).
- [129] Michel N, Akoka S. *The application of the ERETIC method to 2D-NMR*. *J. Magn. Reson.* 168:118–123 (2004).
- [130] Molinier V, Fenet B, Fitremann J, Bouchu A, Queneau Y. *PFGE-NMR study of the self-diffusion of sucrose fatty acid monoesters in water*. *J. Colloid Interface Sci.* 286:360–368 (2005).
- [131] Van Lokeren L, Kerssebaum R, Willem R, Denkova P. *ERETIC implemented in diffusion-ordered NMR as a diffusion reference*. *Magn. Reson. Chem.* 46:S63–S71 (2008).
- [132] Ziarelli F, Caldarelli S. *Solid-state NMR as an analytical tool: Quantitative aspects*. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 29:214–218 (2006).
- [133] Ziarelli F, Viel S, Sanchez S, Cross D, Caldarelli S. *Precision and sensitivity optimization of quantitative measurements in solid state NMR*. *J. Magn. Reson.* 188:260–266 (2007).
- [134] Franconi FCC, Chapon C, Lemaire L, Lehmann V, Barantin L, Akoka S. *Quantitative MR renography using a calibrated internal signal (ERETIC)*. *Magn. Reson. Imaging* 20:587–592 (2002).
- [135] Tessem MB, Swanson MG, Keshari KR, Albers MJ, Joun D, Tabatabai ZL, Simko JP, Shinohara K, Nelson SJ, Vigneron DB, Bribbestad IS, Kurhanewicz J. *Evaluation of lactate and alanine as metabolic biomarkers of prostate cancer using ^1H HR-MAS spectroscopy of biopsy tissues*. *Magn. Reson. Med.* 60:510–516 (2008).
- [136] Risa Ø, Melø TM, Sonnewald U. *Quantification of amounts and ^{13}C content of metabolites in brain tissue using high-resolution magic angle spinning ^{13}C NMR spectroscopy*. *NMR Biomed.* 22:266–271 (2009).
- [137] Albers MJ, Butler TN, Rahwa I, Bao N, Keshari KR, Swanson MG, Kurhanewicz J. *Evaluation of the ERETIC method as an improved quantitative reference for ^1H HR-MAS spectroscopy of prostate tissue*. *Magn. Reson. Med.* 61:525–532 (2009).
- [138] Sitter B, Bathen TF, Singstad TE, Fjøsne HE, Lundgren S, Halgunset J, Gribbestad IS. *Quantification of metabolites in breast cancer patients with*

- different clinical prognosis using HR MAS MR spectroscopy.* NMR Biomed. 23:424–431 (2010).
- [139] Vlahov G, Schiavone C, Simone N. *Quantitative ^{13}C NMR method using the DEPT pulse sequence for the determination of the geographic origin (DOP) of olive oils.* Magn. Reson. Chem. 39:689–695 (2001).
- [140] Schmedake TA, Welch LE. *The quantitative analysis of an analgesic tablet.* J. Chem. Educ. 73:1045–1048 (1996).
- [141] Xia Z, Akim LG, Argyropoulos DS. *Quantitative ^{13}C NMR analysis of lignins with internal standards.* J. Agric. Food Chem. 49:3573–3578 (2001).
- [142] Adriaensens PJ, Karssenbergh FG, Gelan JM, Mathot VBF. *Improved quantitative solution state ^{13}C NMR analysis of ethylene-1-octene copolymers.* Polymer 44:3483–3489 (2003).
- [143] Vlahov G. *Quantitative ^{13}C NMR method using the DEPT pulse sequence for the detection of olive oil adulteration with soybean oil.* Magn. Reson. Chem. 35:S8–S12 (1997).
- [144] Capanema EA, Balakshin MY, Kadla JF. *A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy.* J. Agric. Food Chem. 52:1850–1860 (2004).
- [145] Giraudeau P, Baguet E. *Improvement of the inverse-gated-decoupling sequence for a faster quantitative analysis of various samples by ^{13}C NMR spectroscopy.* J. Magn. Reson. 180:110–117 (2006).
- [146] De Pooter M, Smith PB, Dohrer KK, Bennett KF, Meadows MD, Smith CG, Schouwenaars HP, Geerards RA. *Determination of the composition of common linear low density polyethylene copolymers by ^{13}C NMR spectroscopy.* J. Appl. Polym. Sci. 42:399–408 (1991).
- [147] Vlahov G. *Regiospecific analysis of natural mixtures of triglycerides using quantitative ^{13}C nuclear magnetic resonance of acyl chain carbonyl carbons.* Magn. Reson. Chem. 36:359–362 (1998).
- [148] Carr RH, Hernalsteen J, Devos J. *Determination of functionality and functionality distribution of polyether polyols by quantitative ^{13}C -NMR spectroscopy.* J. Appl. Polym. Sci. 52:1015–1022 (1994).

- [149] Ferrari B, Castilho P, Tomi F, Rodrigues AI, do Ceu Costa M, Casanova J. *Direct identification and quantitative determination of costunolide and dehydrocostuslactone in the fixed oil of Laurus novocanariensis by ^{13}C -NMR spectroscopy*. *Phytochem. Anal.* 16:104–107 (2005).
- [150] Wang D, Hadipour NL, Jerlin EA, Stark RE. *Quantitation of model digestive mixtures by ^{13}C -NMR*. *J. Lipid Res.* 33:431–439 (1992).
- [151] Vlahov G. *Determination of the 1,3- and 2-positional distribution of fatty acids in olive oil triacylglycerols by ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy*. *J. AOAC Int.* 89:1071–1076 (2006).
- [152] Henderson TJ. *Sensitivity-enhanced quantitative ^{13}C NMR spectroscopy via cancellation of $^1J_{\text{CH}}$ dependence in DEPT polarization transfer*. *J. Am. Chem. Soc.* 126:3682–3683 (2004).
- [153] Diehl B. *NMR spectroscopy of natural substances*. In: Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B (Hrsg.), *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, S. 181–200. Elsevier, Amsterdam (2008).
- [154] Diehl B. *NMR application for polymer characterisation*. In: Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B (Hrsg.), *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*, S. 157–180. Elsevier, Amsterdam (2008).
- [155] *Validation of analytical procedures: text and methodology*. In: *Guideline Q2(R1)*. International Conference on Harmonisation (2006).
- [156] Kromidas S. *Validierung in der Analytik*. Wiley-VCH, Weinheim (2005).
- [157] Rackham DM. *Applications of quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy in pharmaceutical research*. *Talanta* 23:269–274 (1976).
- [158] Holzgrabe U, Diehl B, Wawer I. *NMR spectroscopy in pharmacy*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17:557–616 (1998).
- [159] Brasch NE, Finke RGA. *Simple convenient and direct method for assessing the purity of cobalamins*. *J. Inorg. Biochem.* 73:215–219 (1999).
- [160] Larive CK, Jayawickrama D, Orfi L. *Quantitative analysis of peptides with NMR spectroscopy*. *Appl. Spectrosc.* 51:1531–1536 (1997).
- [161] Spyros A, Dais P. *Application of P-31 NMR spectroscopy in food analysis. 1. Quantitative determination of the mono- and diglyceride composition of olive oils*. *J. Agric. Food Chem.* 48:802–805 (2000).

- [162] Meusinger R. *Qualitative and quantitative determination of oxygenates in gasolines using ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Anal. Chim. Acta 391:277–288 (1999).
- [163] Clarke DW. *Acetone and ethyl acetate in commercial nail polish removers: a quantitative NMR experiment using an internal standard*. J. Chem. Educ. 74:1464 (1997).
- [164] LeFevre JW, Silveira A. *Quantitative determination of methylcyclohexanone mixtures using ^{13}C NMR spectroscopy*. J. Chem. Educ. 77:83–85 (2000).
- [165] *Ergoloid Mesylate Monograph*. In: *United States Pharmacopoeia 31*. United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, USA (2007).
- [166] *Clomiphene Citrate Monograph*. In: *United States Pharmacopoeia 31*. United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, USA (2007).
- [167] *Monographie 1693, Flupentixol-Dihydrochlorid*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [168] Stoll A, Hofmann E. *Die Dihydroderivate der natürlichen linksdrehenden Mutterkornalkaloide (9. Mitteilung über Mutterkornalkaloide)*. Helv. Chim. Acta 26:2070–2081 (1943).
- [169] Rote Liste Service GmbH. *Fachinformation Codergocrin (Dihydroergotoxin)*. <http://www.fachinfo.de>
- [170] Schoenleber WD, Jacobs AL, Brewer GA. *Analytical Profiles of Drug Substances*, Bd. 7, Kap. Dihydroergotoxine methanesulfonate, S. 81–148. Academic Press, NY (1978).
- [171] Casy AF. *Rapid identification of ergot derivatives by ^1H -NMR spectroscopy*. J. Pharm. Biomed. Anal. 12:27–40 (1994).
- [172] Komarova EL, Tolkachev ON. *The chemistry of peptide ergot alkaloids. Part 2. Analytical methods for determining ergot alkaloids*. Pharm. Chem. J.1 35:542–549 (2001).
- [173] Flieger M, Sedmera P, Vokoun J, Rehacek Z. *New alkaloids from a saprophytic culture of calviceps purpurea*. J. Nat. Prod. 47:970–976 (1984).
- [174] Spassov SL, Simeonov MF, Mikhova BP, Denkova P. *Application of modern NMR techniques for conformation analysis and assignment of NMR parameters of biologically active compounds*. J. Mol. Struct. 217:169–179 (1990).

- [175] Bracher F, Heisig P, Langguth P, Mutschler E, Rücker G, Scriba G, Stahl-Biskup E, Troschütz R. *Kommentar zur Monographie 2060, Codergocrinmesilat*. In: *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 5.0*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2005).
- [176] *Monographie 2060, Codergocrinmesilat*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [177] Bracher F, Heisig P, Langguth P, Mutschler E, Rücker G, Scriba G, Stahl-Biskup E, Troschütz R. *Kommentar zur Monographie 0997, Clomifencitrat*. In: *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 5.0*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2005).
- [178] Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. *Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2008).
- [179] Fields SM, Huber EW, Vaz RJ, Brake NW. *Unusual maxima in HPLC retention of an homologous series consisting of longer alkyl chain substitutions*. *Anal. Chem.* 68:2379–2385 (1996).
- [180] Bedford GR, Richardson DN. *Preparation and identification of cis and trans isomers of a substituted triarylethylene*. *Nature* 212:733–734 (1966).
- [181] Foster Ab, Jarman M, Leung OT, McCague R, Leclercq G, Develeschouwer N. *Hydroxy derivatives of tamoxifen*. *J. Med. Chem.* 26:1491–1497 (1985).
- [182] Shani J, Gazit A, Livshitz T, Biran S. *Synthesis and receptor-binding affinity of fluorotamoxifen, a possible estrogen-rezeptor imaging agent*. *J. Med. Chem.* 28:1504–1511 (1985).
- [183] Yang DJ, Cherif A, Tansey W, Kuang LR, Li C, Wright KC, Kim EE, Wallace S. *N,N-Diethylfluoromethyltamoxifen: synthesis, assignment of ^1H and ^{13}C spectra and receptor assay*. *Eur. J. Med. Chem.* 27:919–924 (1992).
- [184] *Monographie 0997, Clomifencitrat*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [185] von Bruchhausen F, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackenthal E, Hänsel R, Holzgrabe U, Keller K, Nürnberg E, Rimpler H, Schneider G, Surmann P, Wolf HU, Wurm G. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Stoffe A-D. Clomifencitrat*. Springer Verlag, Heidelberg, Heidelberg (1993).

- [186] Rote Liste Service GmbH. *Fachinformation Flupentixoldihydrochlorid*.
<http://www.fachinfo.de>
- [187] von Bruchhausen F, Dannhardt G, Ebel S, Frahm AW, Hackenthal E, Hänsel R, Holzgrabe U, Keller K, Nürnberg E, Rimpler H, Schneider G, Surmann P, Wolf HU, Wurm G. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Stoffe E-O. Flupentixoldihydrochlorid*. Springer Verlag, Heidelberg (1993).
- [188] Berger S, Braun S, Kalinowski HO. *NMR-Spektroskopie von Nichtmetallen, Band 4, ^{19}F -NMR-Spektroskopie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1994).
- [189] Talebpour Z, Haghgoo S, Shamsipur M. *A selective ^{19}F nuclear magnetic resonance spectroscopic method for the assay of the neuroleptic drug cis(Z)-flupentixol in human serum*. *Anal. Biochem.* 323:205–210 (2003).
- [190] Bernadou J, Armand JP, Lopez A, Malet-Martino MC, Martino R. *Complete urinary excretion profile of 5-fluorouracil during a six-day chemotherapeutic schedule, as resolved by ^{19}F nuclear magnetic resonance*. *Clin. Chem.* 31:846–848 (1985).
- [191] Malet-Martino MC, Armand JP, Lopez A, Bernadou J, Beteille JP, Bon M, Martino R. *Evidence for the importance of 5'-Deoxy-5-fluorouridine catabolism in humans from ^{19}F nuclear magnetic resonance spectrometry*. *Cancer Res.* 46:2105–2112 (1986).
- [192] Lenz EM, Wilson ID, Wright B, Partridge EA, Rodgers CT, Haycock PR, Lindon JC, Nicholson JK. *A comparison of quantitative NMR and radiolabelling studies of the metabolism and excretion of StatilTM (3-(4-bromo-2-fluorobenzyl)-4-oxo-3H-phthalazin-1-ylacetic acid) in the rat*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28:31–43 (2002).
- [193] Orhan H, Commandeur JNM, Sahin G, Aipar U, Sahin A, Vermeulen NPE. *Use of ^{19}F -nuclear magnetic resonance and gas chromatography-electron capture detection in the quantitative analysis of fluorine-containing metabolites in urine of sevoflurane-anaesthetized patients*. *Xenobiotica* 34:301–316 (2004).
- [194] Reigner B, Clive S, Cassidy J, Jodrell D, Schulz R, Goggin T, Banken L, Roos B, Utoh M, Mulligan T, Weidekamm E. *Influence of the antacid Maalox on the pharmacokinetics of capecitabine in cancer patients*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43:309–315 (1999).
- [195] Kleemann A, Leuchtenberger W, Hoppe B, Tanner H. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry A2*, Kap. Amino Acids, S. 57–97. VCH Verlagsgesellschaft mbh, Weinheim (1985).

- [196] Hermann T. *Industrial production of amino acids by coryneform bacteria*. J. Biotechnol. 104:155–172 (2003).
- [197] Hoppe B, Martens J. *Aminosäuren – Bausteine des Lebens*. Chem. Unserer Zeit 17:41–53 (1983).
- [198] Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Keßeler M, Stürmer R, Zelinski T. *Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten*. Angew. Chem. 116:806–843 (2004).
- [199] *Impurities in new drug substances*. In: *Guideline Q3A(R2)*. International Conference on Harmonisation (2006).
- [200] *Allgemeine Monographie 2034, Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [201] Petritis K, Elfakir C, Dreux M. *A comparative study of commercial liquid chromatographic detectors for the analysis of underivatized amino acids*. J. Chromatogr. A 961:9–21 (2002).
- [202] Hoppe B, Martens J. *Aminosäuren - Herstellung und Gewinnung*. Chem. Unserer Zeit 18:73–86 (1984).
- [203] Leuchtenberger W. *Biotechnology*, Kap. Amino acids – technical production and use. Band 6. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (1996).
- [204] Rehm HJ. *Industrielle Mikrobiologie*. Springer Verlag, Heidelberg (1980).
- [205] Bracher F, Heisig P, Langguth P, Mutschler E, Rücker G, Scriba G, Stahl-Biskup E, Troschütz R. *Kommentar zur Monographie 0752, Alanin*. In: *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 5.0*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2005).
- [206] Leuchtenberger W, Plöcker U. *Herstellung von Aminosäuren mit Hilfe biotechnologischer Methoden*. Chem. Ing. Tech. 60:16–23 (1988).
- [207] Kopec S, Holzgrabe U. *Impurity profile of amino acids?* Pharm. Sci. Notes 1:39–45 (2005).
- [208] *Allgemeine Monographie 1468, Fermentationsprodukte*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [209] *Monographie 0752, Alanin*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).

- [210] Seiyaku T. *Process for preparing L-alanine* (1975).
- [211] Yamamoto K, Tosa T, Chibata I. *Continuous production of L-alanine using Pseudomonas dacunhae immobilized with Carrageenan*. Biotechnol. Bioeng. 22:2045–2054 (1980).
- [212] Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K. *Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69:1–8 (2005).
- [213] Holzgrabe U, Nap CJ, Beyer T, Almeling S. *Alternatives to Amino-Acid-Analysis for the purity control of pharmaceutical grade L-alanine*. J. Sep. Sci. 33:2402–2410 (2010).
- [214] Horwitz W. *Evaluation of analytical methods for regulation of foods and drugs*. Anal. Chem. 54:67A–76A (1982).
- [215] Holzgrabe U, Nap CJ, Almeling S. *Control of impurities in L-aspartic acid and L-alanine by high-performance liquid chromatography coupled with a corona charged aerosol detector*. J. Chromatogr. A 1217:294–301 (2010).
- [216] Alban S. *Kohlehydrate III: Aminoglykane und Glykosaminoglykane*. In: Hänssel R, Sticher O (Hrsg.), *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, Kap. 20, S. 591–638. Springer Medizin Verlag (2009).
- [217] Alban S. *Lehren aus dem Heparin-Skandal*. Pharm. Ztg. 155:14–22 (2010).
- [218] Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, Elankumaran S, Smith S, Pelzer K, Lansing JC, Sriranganathan N, Zhao G, Galcheva-Gargova Z, Al-Hakim A, Bailey GS, Fraser B, Roy S, Rogers-Cotrone T, Buhse L, Whary M, Fox J, Nasr M, Dal Pan GJ, Shriver Z, Langer RS, Vebkataraman G, Austen F, Woodcock J, Sasisekharan R. *Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system*. N. Engl. J. Med. 358:2457–2467 (2008).
- [219] U. S. Food and Drug Administration. *Information on adverse event reports and heparin* (2009).
<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm112669.htm>
- [220] Shanley A, Thomas P, Vaccarello M. *Lessons from heparin* (2008).
<http://www.pharmamanufacturing.com/articles/2008/123.html>

- [221] Bracher F, Heisig P, Langguth P, Mutschler E, Rücker G, Scriba G, Stahl-Biskup E, Troschütz R. *Kommentar zur Monographie 0332, Heparin-Calcium*. In: *Kommentar zum Europäischen Arzneibuch 5.0*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (2005).
- [222] Li B, Suwan J, Martin JG, Zhang F, Zhang Z, Hoppensteadt D, Clark M, Farceed J, Linhardt RJ. *Oversulfated chondroitin sulfate interaction with heparin-binding proteins: New insights into adverse reactions from contaminated heparins*. *Biochem. Pharmacol.* 78:292–300 (2009).
- [223] Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. *Guide to anticoagulant therapy: Heparin: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association*. *Am. Heart. Assoc.* 103:2994–3018 (2001).
- [224] Linhardt RJ. *Heparin: structure and activity*. *J. Med. Chem.* 46:2551–2554 (2003).
- [225] *Monographie 0333, Heparin-Natrium*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [226] Linhardt RJ, Gunay NS. *Production and chemical processing of low molecular weight heparins*. *Semin. Thromb. Hemostas.* 25:5–16 (1999).
- [227] Liu H, Zhang Z, Linhardt RJ. *Lessons learned from the contamination of heparin*. *Nat. Prod. Rep.* 26:313–321 (2009).
- [228] Keire DA, Trehy ML, Reepmeyer JC, Kolinski RE, Ye W, Dunn J, Westenberger BJ, Buhse LF. *Analysis of crude heparin by ^1H NMR, capillary electrophoresis, and strong-anion-exchange-HPLC for contamination by over sulfated chondroitin sulfate*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51:921–926 (2010).
- [229] Guerrini M, Zhang Z, Shriver Z, Naggi A, Masuko S, Langer R, Casu B, Linhardt RJ, Torri G, Sasisekharan R. *Orthogonal analytical approaches to detect potential contaminants in heparin*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:16956–16961 (2009).
- [230] Neville GA, Mori F, Holme KR, Perlin AS. *Monitoring the purity of pharmaceutical heparin preparations by high-field ^1H -NMR magnetic resonance spectroscopy*. *J. Pharm. Sci.* 78:101–104 (1989).
- [231] Beyer T, Matz M, Brinz D, Rädler O, Wolf B, Norwig J, Baumann K, Alban S, Holzgrabe U. *Composition of OSCS-contaminated heparin occurring in 2008 in batches on the German market*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 40:297–304 (2010).

- [232] Guerrini M, Bisio A, Torri G. *Combined quantitative ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy for characterization of heparin preparations.* Semin. Thromb. Hemostas. 27:473–482 (2001).
- [233] Maruyama T, Toida T, Imanari T, Yu G, Linhardt RJ. *Conformational changes and anticoagulation activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation.* Carbohydr. Res. 306:35–43 (1998).
- [234] Carranza YE, Durand-Rougley C, Doctor V. *Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of chondroitin-4-sulfate.* Blood Coag. Fibrin 19:483–487 (2008).
- [235] Adam A, Montpas N, Keire D, Desormeaux A, Brown NJ, Marceau F, Westenberger B. *Bradykinin forming capacity of oversulfated chondroitin sulfate contaminated heparin in vitro.* Biomaterials 31:5741–5748 (2010).
- [236] Holme KR, Perlin A. *Nuclear magnetic resonance spectra of heparin in admixture with dermatan sulfate and other glycosaminoglycans. 2-D spectra of the chondroitin sulfates.* Carbohydr. Res. 186:301–312 (1989).
- [237] Toida T, Toyoda H, Imanari T. *High-resolution proton nuclear magnetic resonance studies on chondroitin sulfates.* Analytical Sciences 9:53–58 (1993).
- [238] Tachibana S, Nishiura S, Ishida S, Kakehi K, Honda S. *Quality check of heparin injections by ^1H -nuclear magnetic resonance spectroscopy.* Chem. Pharm. Bull. 38:2503–2506 (1990).
- [239] Guerrini M, Naggi A, Guglieri S, Santarsiero R, Torri G. *Complex glycosaminoglycans: profiling substitution patterns by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy.* Anal. Biochem. 337:35–47 (2005).
- [240] Guerrini M, Guglieri S, Naggi A, Sasisekharan R, Torri G. *Low molecular weight heparins: structural differentiation by bidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy.* Semin. Thromb. Hemostas. 33:478–487 (2007).
- [241] Zhang Z, Li B, Suwan J, Zhang F, Zhenyu W, Liu H, Mulloy B, Linhardt RJ. *Analysis of pharmaceutical heparins and potential contaminants using ^1H -NMR and PAGE.* J. Pharm. Sci. 98:4017–4026 (2009).
- [242] Europäisches Arzneibuch. *Monographie 0333, Heparin-Natrium.* PA/PH/Exp. 6/T (09) 42 PUB (2008).
<http://www.edqm.eu/en/What-new-525.html>

- [243] U. S. Pharmacopoeia. *Monograph Stage 2, Heparin Sodium*.
<http://www.usp.org/USPF/notices/heparinRB20090828.html>
- [244] Guerrini M, Shriver Z, Bisio A, Naggi A, Casu B, Sasisekharan R. *The tainted heparin story: an update*. *Thromb. Haemost.* 102:907–911 (2009).
- [245] Keire DA, Mans DJ, Ye H, Kolinski RE, Buhse LF. *Assay of possible economically motivated additives or native impurities levels in heparin by ^1H NMR, SAX HPLC, and anticoagulation time approaches*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52:656–664 (2010).
- [246] Liang JN, Chakrabarti B, Ayotte L, Perlin AS. *An essential role for the 2-sulfamino group in the interaction of calcium ion with heparin*. *Carbohydr. Res.* 106:101–109 (1982).
- [247] McEwen I, Rundlöf T, Ek M, Hakkarainen B, Carlin G, Arvidsson T. *Effect of Ca^{2+} on the ^1H NMR chemical shift of the methyl signal of oversulphated chondroitin sulphate, a contaminant in heparin*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49:816–819 (2009).
- [248] U. S. Food and Drug Administration. *Impurity evaluation of heparin sodium by ^1H -NMR spectroscopy* (2008).
http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin_NMR_method.pdf
- [249] Alban S, Lühn S, Schiemann S, Beyer T, Norwig J, Schilling C, Rädler O, Wolf B, Matz M, Baumann K, Holzgrabe U. *Comparison of established and novel purity tests for the quality control of heparin by means of a set of 177 heparin samples*. *Anal. Bioanal. Chem.* 399:605–620 (2010).
- [250] Straus AH, Nader HB, Bianchini P, Osima B. *Isolation and pharmacological activities of heparin and other sulfated mucopolysaccharides from thymus*. *Biochem. Pharmacol.* 30:1077–1083 (1981).
- [251] Volpi N. *Purification of heparin, dermatan sulfate and chondroitin sulfate from mixtures by sequential precipitation with various organic solvents*. *J. Chromatogr. B* 685:27–34 (1996).
- [252] Volpi N. *Fractionation of heparin, dermatan sulfate, and chondroitin sulfate by sequential precipitation: a method to purify a single glycosaminoglycan species from a mixture*. *Anal. Biochem.* 218:382–391 (1994).

- [253] McEwen I, Amini A, Olofsson IM. *Identification and purity test of heparin by NMR. A summary of two years' experience at the medical products agency.* Pharmaeuropa Bio Sci. Notes 1:65–72 (2010).
- [254] McEwen I. *Broadening of ^1H -NMR signals in the spectra of heparin and OSCS by paramagnetic transition metal ions. The use of EDTA to sharpen the signals.* J. Pharm. Biomed. Anal. 51:733–735 (2010).
- [255] Sanofi-Aventis. *Consequences of OSCS crisis on heparin compliance to USP proposed monograph.* (2009).
<http://www.usp.org/pdf/EN/meetings/workshops/heparin2009Viskov2.pdf>
- [256] Lee SE, Chess EK, Rabinow B, Ray GJ, Szabo CM, Melnick B, Miller RL, Nair LM, Moore EG. *NMR of heparin API: investigation of unidentified signals in the USP-specified range of 2.12 – 3.00 ppm.* Anal. Bioanal. Chem. 399:651–662 (2011).
- [257] Kellenbach E, Sanders K, Michiels PJA, Girard FC. *^1H NMR signal at 2.10 ppm in the spectrum of KMnO_4 -bleaches heparin sodium: identification of the chemical origin using an NMR-only approach.* Anal. Bioanal. Chem. 399:621–628 (2011).
- [258] Beccati D, Roy S, Yu F, Gunay NS, Capila I, Lech M, Linhardt RJ, Vebkataraman G. *Identification of a novel structure in heparin generated by potassium permanganate oxidation.* Carbohydr. Polym. 82:699–705 (2010).
- [259] Perlin AS, Sauriol F, Cooper B, Folkman J. *Dermatan sulfate in pharmaceutical heparins.* Thromb. Haemost. 58:792 (1987).
- [260] Watt DK, Yorke SC, Slim GC. *Comparison of ovine, bovine and porcine mucosal heparins and low molecular weight heparins by disaccharide analyses and ^{13}C NMR.* Carbohydr. Polym. 33:5–11 (1997).
- [261] Hamer GK, Perlin AS. *A ^{13}C -N.M.R. spectral study of chondroitin sulfates A, B, and C: evidence of heterogeneity.* Carbohydr. Res. 49:37–48 (1976).
- [262] Toida T, Maruyama T, Ogita Y, Suzuki A, Toyoda H, Imanari T, Linhardt RJ. *Preparation and anticoagulant activity of fully O-sulphonated glycosaminoglycans.* Int. J. Biol. Macromol. 26:233–241 (1999).
- [263] Hirano S. *Conformational analysis: optical rotation of polysaccharides in urea solution.* Life Sciences 10:151–155 (1971).

- [264] *Allgemeine Methoden, 2.7.5. Wertbestimmung von Heparin*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).
- [265] *Monographie 0333, Heparin-Natrium*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.4*. EDQM, Straßburg (2009).
- [266] Norwig J, Beyer T, Brinz D, Holzgrabe U, Diller M, Manns D. *Prediction of the oversulphated chondroitin sulphate contamination of unfractionated heparin by ATR IR spectroscopy*. Pharmeur. Sci. Notes 1:17–24 (2009).
- [267] U.S. Food and Drug Administration. *Impurity evaluation of heparin sodium by capillary electrophoresis* (2008).
http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/heparin/heparin_CE_method.pdf
- [268] Somsen GW, Tak YH, Toraño JS, Jongen PMJM, de Jong GJ. *Determination of oversulfated chondroitin sulfate and dermatan sulfate impurities in heparin by capillary electrophoresis*. J. Chromatogr. A 1216:4107–4112 (2009).
- [269] Wieglos T, Havel K, Ivanova N, Weinberger R. *Determination of impurities in heparin by capillary electrophoresis using high molarity phosphate buffers*. J. Pharm. Biomed. Anal. 49:319–326 (2009).
- [270] Houiste C, Martin C, Anger P. *HPLC assay of heparin like contaminants. Quantification of highly sulfated chondroitin sulfate*. PA/PH/Exp. 6/T (08) 31 (2008).
- [271] Trehy ML, Reepmeyer JC, Kolinski RE, Westenberger BJ, Buhse LF. *Analysis of heparin sodium by SAX/HPLC for contaminants and impurities*. J. Pharm. Biomed. Anal. 49:670–673 (2009).
- [272] Sitkowski J, Bednarek E, Bocian W, Kozerski L. *Assessment of oversulfated chondroitin sulfate in low molecular weight and unfractionated heparins diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy method*. J. Med. Chem. 51:7663–76665 (2008).
- [273] Spencer JA, Kauffman F, Reepmeyer JC, Gryniwicz CM, Ye W, Toler DY, Buhse LF, Westenberger BJ. *Screening of heparin API by near infrared reflectance and Raman spectroscopy*. J. Pharm. Science 98:3540–3547 (2009).
- [274] Sun C, Zang H, Lui X, Dong Q, Li L, Wang F, Sui L. *Determination of potency of heparin active pharmaceutical ingredient by near infrared reflectance spectroscopy*. J. Pharm. Biomed. Anal. 51:1060–1063 (2010).

- [275] Stanley FE, Stalcup AM. *The use of circular dichroism as a simple heparin-screening strategy*. Anal. Bioanal. Chem. 399:701–706 (2011).
- [276] Stanley FE, Warner AM, Stalcup AM. *The development of an FIA-CD strategy for screening sulfated polysaccharides using antimalarial drugs and related species as probes*. Anal. Bioanal. Chem. 399:707–716 (2011).
- [277] Domanig R, Jöbstl W, Gruber S, Freudemann T. *One-dimensional cellulose acetate plate electrophoresis – A feasible method for analysis of dermatan sulfate and other glycosaminoglycan impurities in pharmaceutical heparin*. J. Pharm. Biomed. Anal. 49:151–155 (2009).
- [278] Bendazzoli C, Liverani L, Spelta F, Prandi M, Fiori J, Gotti R. *Determination of dermatan sulfate and chondroitin sulfate as related substances in heparin by capillary electrophoresis*. J. Pharm. Biomed. Anal. 53:1193–1200 (2010).
- [279] Tripodi V, Flor S, Dobrecky C, Contin M, Lucangioli S. *Novel and highly sensitive mixed-polymeric electrokinetic chromatography system for determination of contaminants and impurities of heparin samples*. Electrophoresis 31:3606–3612 (2010).
- [280] Lühn S, Schiemann S, Alban S. *Simple fluorescence assay for quantification of OSCS in heparin*. Anal. Bioanal. Chem. 399:673–680 (2011).
- [281] Lühn S, Schrader T, Sun W, Alban S. *Development and evaluation of a fluorescence microplate assay for quantification of heparins and other sulfated carbohydrates*. J. Pharm. Biomed. Anal. 52:1–8 (2010).
- [282] Auguste C, Dereux S, Martinez C. *New development in quantitative polymerase chain reaction applied to control the quality of heparins*. Anal. Bioanal. Chem. 399:747–755 (2011).
- [283] Wang L, Buchanan S, Meyerhoff ME. *Detection of high-charge density polyanion contaminants in biomedical heparin preparations using potentiometric polyanion sensors*. Anal. Chem. 80:9845–9847 (2008).
- [284] Yang B, Solakyildirim K, Chang Y, Linhardt RJ. *Hyphenated techniques for the analysis of heparin and heparan sulfate*. Anal. Bioanal. Chem. 399:541–557 (2011).
- [285] Beni S, Limtiaco JFK, Larive CK. *Analysis and characterization of heparin impurities*. Anal. Bioanal. Chem. 399:527–539 (2011).

- [286] Alban S, Lühn S, Schiemann S. *Combination of a two-step fluorescence assay and a two-step anti-Factor Xa assay for the detection of heparin falsifications and protein in heparins*. Anal. Bioanal. Chem. 399:681–690 (2011).
- [287] Alban S, Lühn S. *Prothrombin time for detection of contaminated heparins*. N. Engl. J. Med. 359:2732–2734 (2008).
- [288] Zang Q, Keire DA, Wood RD, Buhse LF, Moore CWV, Nasr M, Al-Hakim A, Trehy ML, Welsh WJ. *Determination of galactosamine impurities in heparin samples by multivariate regression analysis of their ¹H-NMR spectra*. Anal. Bioanal. Chem. 399:635–649 (2011).
- [289] Zang Q, Keire DA, Richard DW, Buhse LF, Moore CMV, Nasr M, Al-Hakim A, Trehy ML, Welsh WJ. *Combining ¹H NMR spectroscopy and chemometrics to identify heparin samples that may possess dermatan sulfate (DS) impurities or oversulfated chondroitin sulfate (OSCS) contaminants*. J. Pharm. Biomed. Anal. 54:1020–1029 (2011).
- [290] Üstün B, Sanders KB, Dani P, Kellenbach ER. *Quantification of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in danaparoid sodium by ¹H-NMR spectroscopy and PLS regression*. Anal. Bioanal. Chem. 399:629–634 (2011).
- [291] Lima MA, Rudd TR, de Farias EHC, Ebner LF, Gesteira TF, de Souza LM, Mendes A, Cordula CR, Martins JRM, Hoppensteadt D, Fareed J, Sassaki GL, Yates EA, Tersariol ILS, Nader HB. *A new approach for heparin standardization: Combination of scanning UV spectroscopy, nuclear magnetic resonance and principal component analysis*. PLoS ONE 6:1–9 (2011).
- [292] *Monographie 0333, Heparin-Natrium*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.8*. EDQM, Straßburg (2010).
- [293] Bauer KH, Frömming KH, Führer C. *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1999).
- [294] Calvery HO, Klumpp TG. *The toxicity for human beings of diethylene glycol with sulfanilamide*. South Med. J. 32:1105–1109 (1939).
- [295] Friedman EA, Greenberg JB, Merrill JP, Dammin GJ. *Consequences of ethylene glycol poisoning*. Am. J. Med. 32:891–902 (1962).
- [296] Hesser L. *Diethylene glycol toxicity*. Fd. Chem. Toxic. 24:261–265 (1986).

- [297] Barr DB, Barr JR, Weerasekera G, Wamsley J, Kalb SR, Sjödin A, Schier JG, Rentz ED, Lewis L, Rubin C, Needham LL, Jones RL, Sampson EJ. *Identification and quantification of diethylene glycol in pharmaceuticals implicated in poisoning epidemics: an historical laboratory perspective*. J. Anal. Toxicol. 31:295–303 (2007).
- [298] Perez E, Limeres J, Tomas I, Diz P. *Letters to the Editor: toothpastes with diethylene glycol*. Med. Oral Pator. Oral Cir. Bucal. 13:E222–223 (2008).
- [299] Wax PM. *Elixiers, diluents, and the passage of the 1938 Federal Food, Drug and Cosmetic Act*. Ann. Intern. Med. 122:456–461 (1995).
- [300] Osterberg RE, See NA. *Toxicity of excipients - a Food and Drug Administration perspective*. Int. J. Toxicol. 22:377–380 (2003).
- [301] Wax PM. *It's happening again - another diethylene glycol mass poisoning*. J. Toxicol. Clin. Toxicol. 34:517–520 (1996).
- [302] Caccamo F, Di Corcia A, Samperi R. *Determination of diethylene glycol in wine. Rapid purification with a carboxack B cartridge and quantitation by gas chromatography*. J. Chromatogr. 354:478–481 (1986).
- [303] Cantarell MC, Fort J, Camps J, Sans M, Piera L. *Acute intoxication due to topical application of diethylene glycol*. Ann. Intern. Med. 106:478–479 (1987).
- [304] Pandya SK. *Letter from Bombay. An unmitigated tragedy*. BMJ 297:117–119 (1988).
- [305] Kumar A. *Diethylene glycol poisoning in Gurgaon, Haryana, India, 1998*. Bull. World Health Organ. 79:686 (2001).
- [306] Okuonghae HO, Ighogboja IS, Lawson JO, Nwana EJ. *Diethylene glycol poisoning in Nigerian children*. Ann. Trop. Paediatr. 12:235–238 (1992).
- [307] Hanif M, Mobarak MR, Ronan A, Rahman D, Donovan JJ, Bennish ML. *Fatal renal failure caused by diethylene glycol in paracetamol elixir: the Bangladesh epidemic*. Br. Med. J. 311:88–91 (1995).
- [308] Ferrari LA, Giannuzzi L. *Clinical parameters, postmortem analysis and estimation of lethal dose in victims of a massive intoxication with diethylene glycol*. Forensic Sci. Intern. 153:45–51 (2005).
- [309] Drut R, Quijano G, Jones MC, Scanferla P. *Pathologic findings in diethylene glycol poisoning*. Medicina (B Aires) 54:1–5 (1994).

- [310] O'Brien KL, Selanikio JD, Hecdivert C, Placide MF, Louis M, Barr DB, Barr JR, Hospedales CJ, Lewis MJ, Schwartz B, Philen RM, Victor S, Espindola J, Needham LL, Denerville K. *Epidemic of pediatric deaths from acute renal failure caused by diethylene glycol poisoning*. JAMA 279:1175–1180 (1998).
- [311] Junod SW. *Diethylene glycol deaths in Haiti*. Public health reports 115:78–86 (2000).
- [312] Singh J, Dutta AK, Khare S, Dubey NK, Jain NK, Wadhwa TC, Gupta SR, Dhariwal AC, Jain DC, Bhatia R, Sokhey J. *Diethylene glycol poisoning in Gurgaon, India, 1998*. Bull. World. Health. Organ. 79:88–95 (2001).
- [313] Rentz ED, Lewis L, Mujica O, Barr DB, Schier JG, Weerasekera G, Kuklenyik P, McGeehin M, Osterloh J, Wamsley J, Lum W, Alleyne C, Sosa N, Motta J, Rubin C. *Outbreak of acute renal failure in Panama in 2006: a case-control study*. Bull. World Health Organ. 86:749–756 (2008).
- [314] Hernandez F, Ibanez M, Sancho JV. *Fast determination of toxic diethylene glycol in toothpaste by ultra-performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry*. Anal. Bioanal. Chem. 391:1021–1027 (2008).
- [315] Gryniewicz CM, Spencer JA, Hankins M, Kauffman JF. *Spectroscopic methods for rapid determination of diethylene glycol in glycerin*. Am. Pharm. Rev. 10:1–4 (2007).
- [316] U.S. Pharmacopoeia. *Hot Topics: USP Glycerin Information*.
<http://www.usp.org/hottopics/glycerin.html>
- [317] *Glycerin Monograph*. In: *United States Pharmacopoeia 32*. United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, USA (2009).
- [318] Holloway G, Maheswaran R, Leeks A, Bradby S, Wahab S. *Screening method for ethylene glycol and diethylene glycol in glycerin-containing products*. J. Pharm. Biomed. Anal. 51:507–511 (2010).
- [319] *Monographie 0496, Glycerin*. In: *Europäisches Arzneibuch 6.0*. EDQM, Straßburg (2008).