

Validierung von quantitativen NMR-Bestimmungen

Malz, F. und Jancke, H.

Gliederung



- Motivation
- Grundlagen der qNMR
- Validierung
- Gehaltsbestimmung pharmazeutischer Substanzen
- Zusammenfassung

Definition Primäre Methode



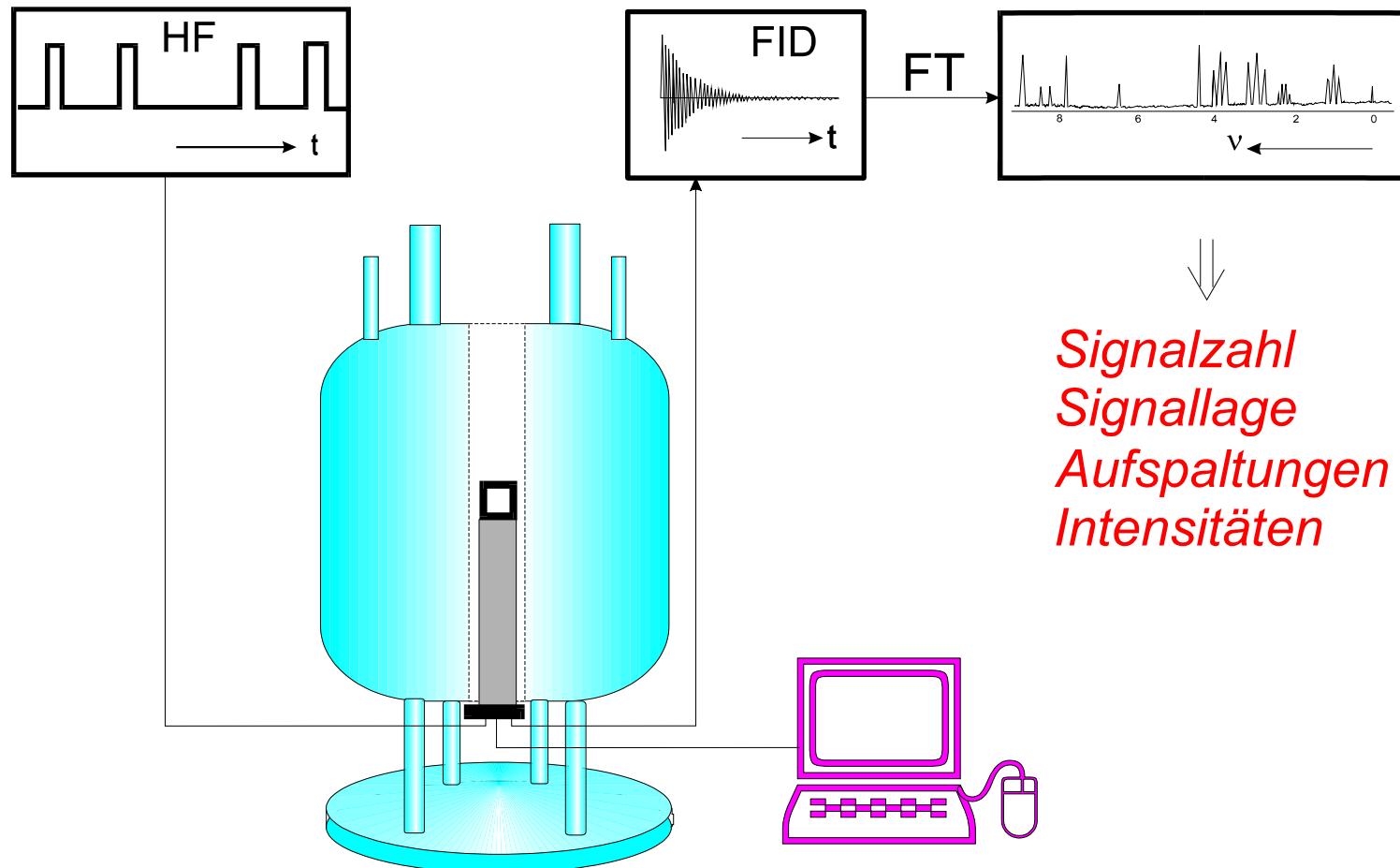
Comité consultatif pour la quantité de matière (CCQM)

Definition April 2000:

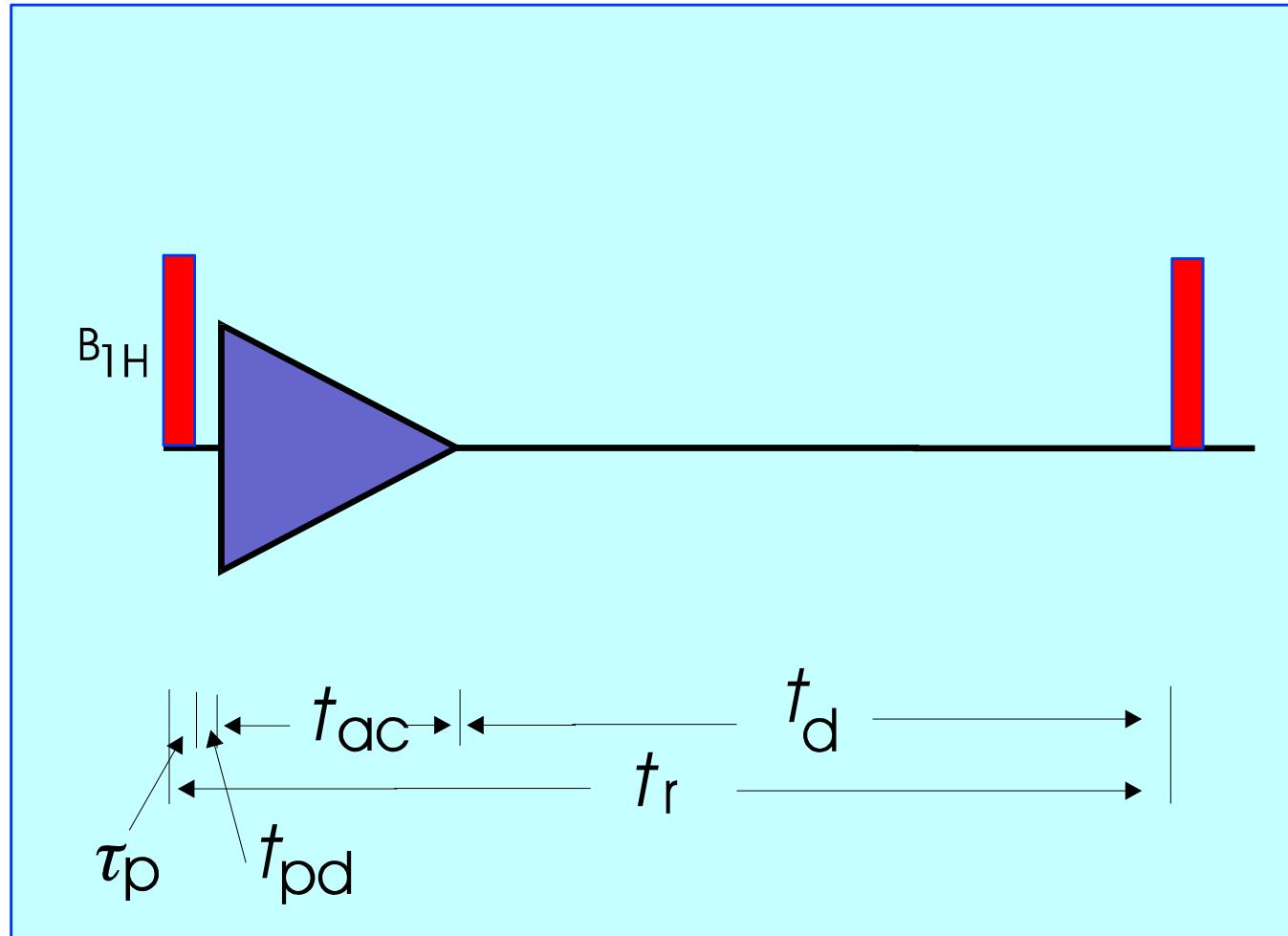
A **primary method** of measurement is a method having the **highest metrological properties**, whose operation can be **completely described** and understood, for which a complete **uncertainty statement** can be written down in terms of SI units.

- A **primary direct method**: measures the value of an unknown without reference to a standard of the same quantity.
- A **primary ratio method**: measures the value of a ratio of an unknown to a standard of the same quantity; its operation must be completely described by a measurement equation.

Der NMR-Messvorgang



Single Pulse FT-NMR



Quantitative NMR

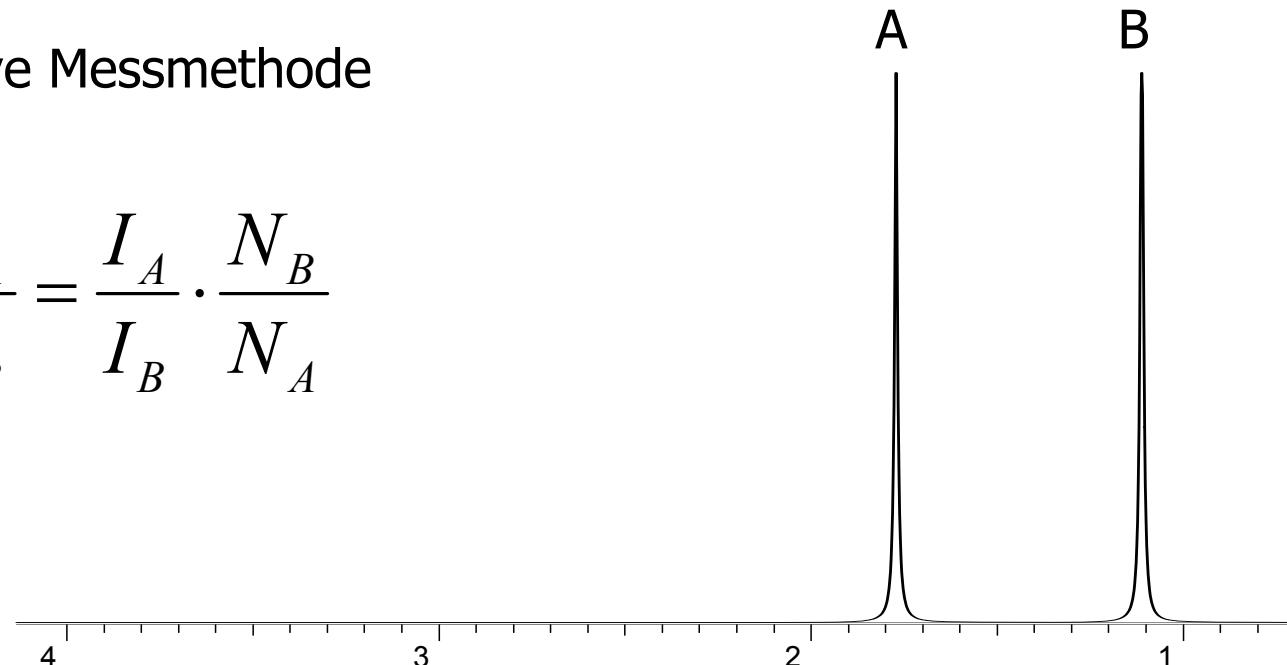
Grundlage:

Proportionalität zwischen Intensität (I_A) und Kernanzahl (N_A):

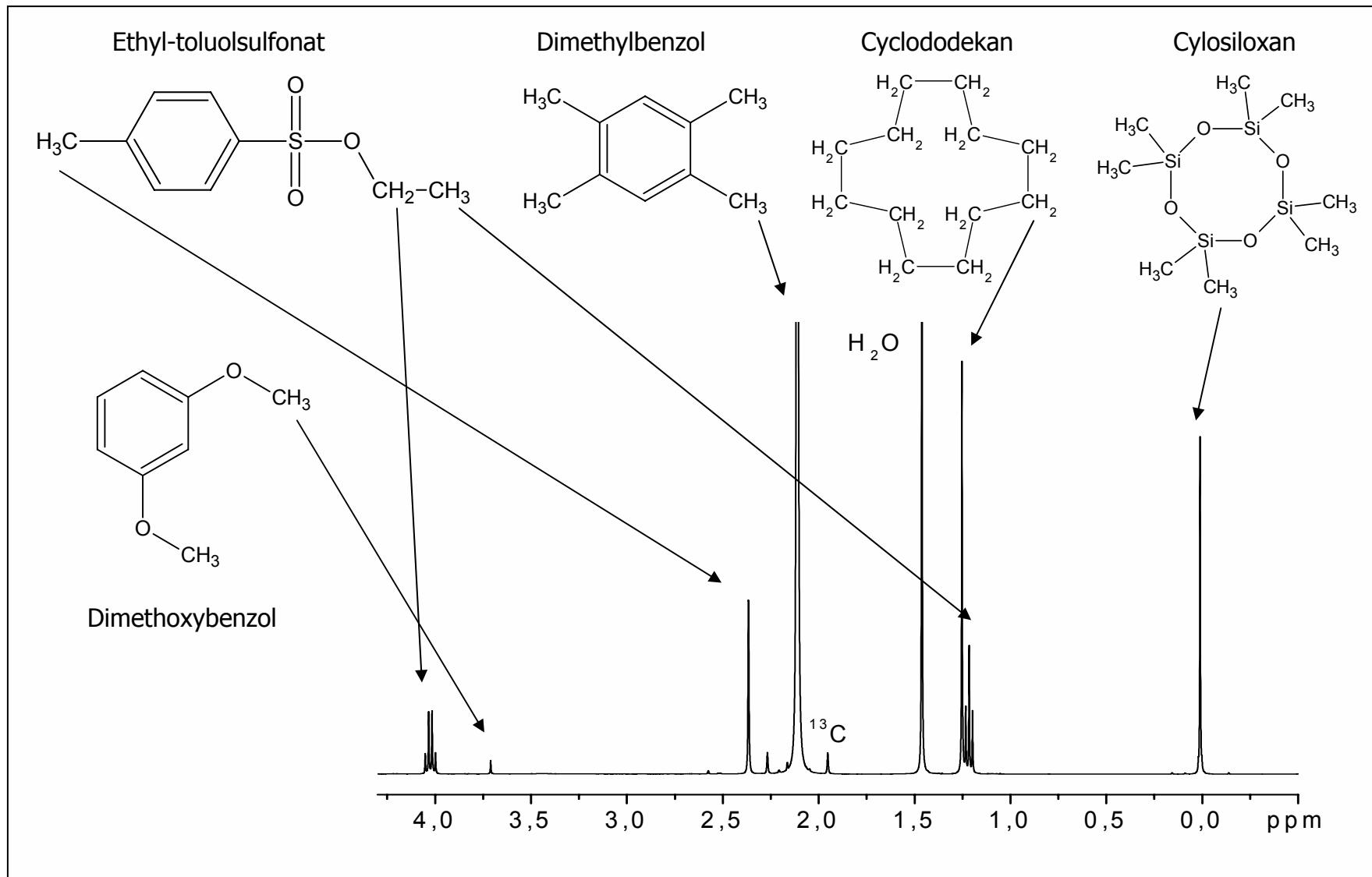
$$I_A = K_S \cdot N_A$$

Relative Messmethode

$$\frac{n_A}{n_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{N_B}{N_A}$$



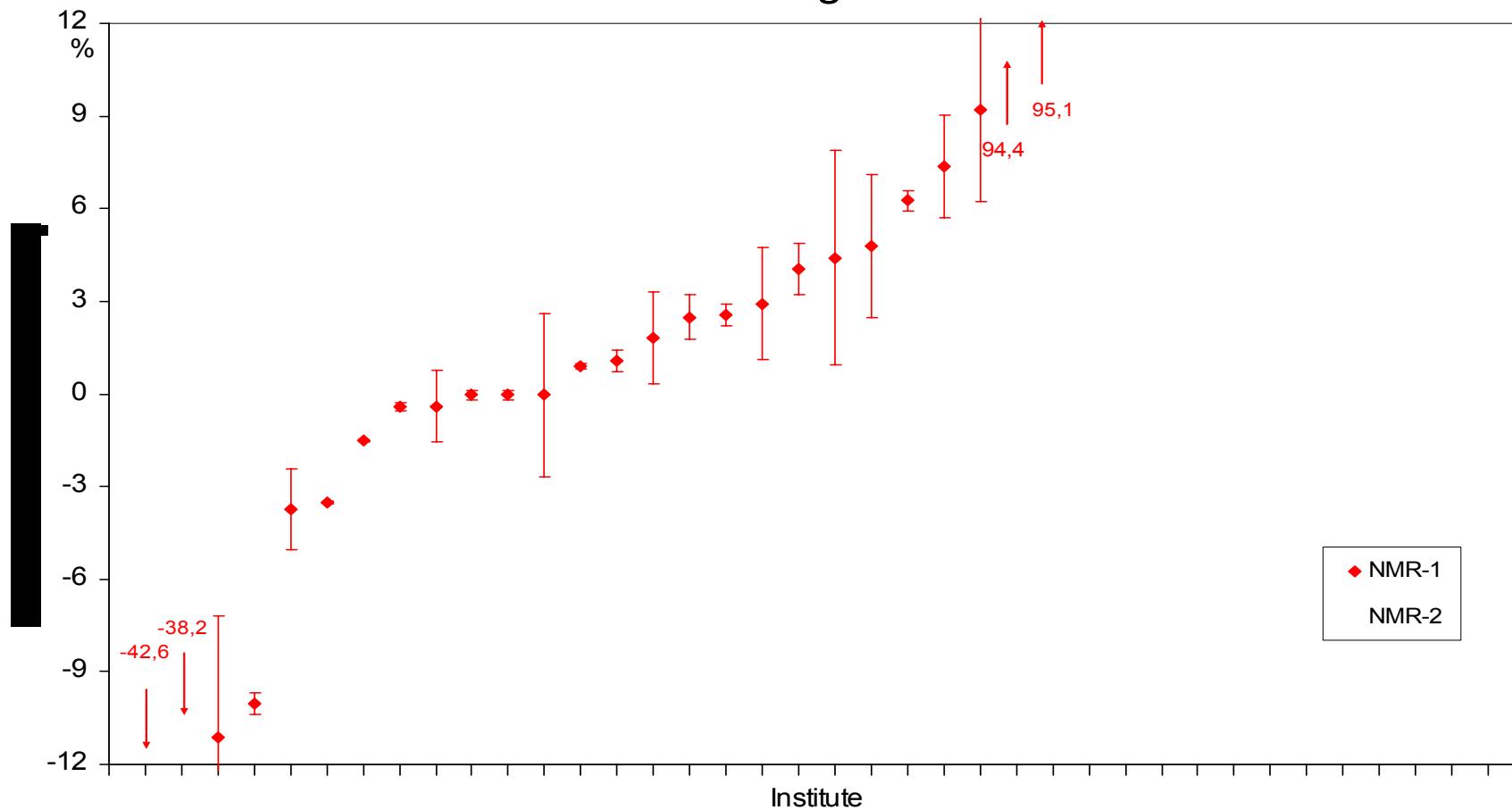
Modell-Lösung NMR-1



NMR-1

Komponente: Cy₁₂

Rel. Stoffmengenanteile



Validierungsplan

Forderung:

**Richtigkeit und Präzision
jeweils besser als 99%**

Untersuchungskriterien:

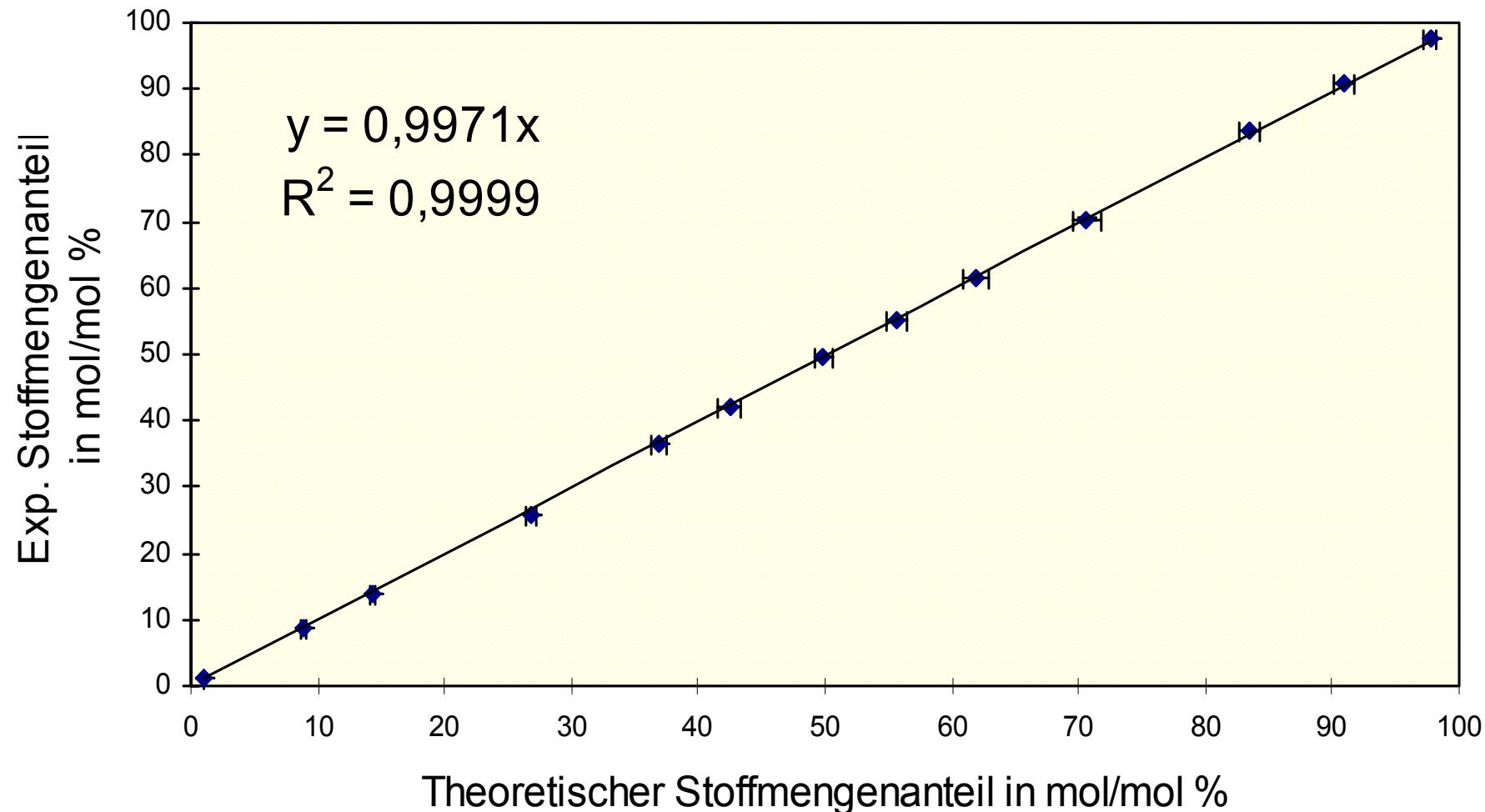
- Robustheit
- Linearität
- Wiederhol- und Vergleichbarkeit
- Spezifität und Selektivität

Durchführungsplan:

- Modell-Lösung 5-Komponenten-Lösung
- Parameter in weiten Bereichen systematisch variieren
- Jeweils 5 Spektren aufnehmen und auswerten
- Ringversuche organisieren
- Auf Gehaltsbestimmung erweitern

Linearität

13 Lösungen (Dur, D₄) mit Dur Stoffmengenanteilen von 1 bis 99 mol/mol %

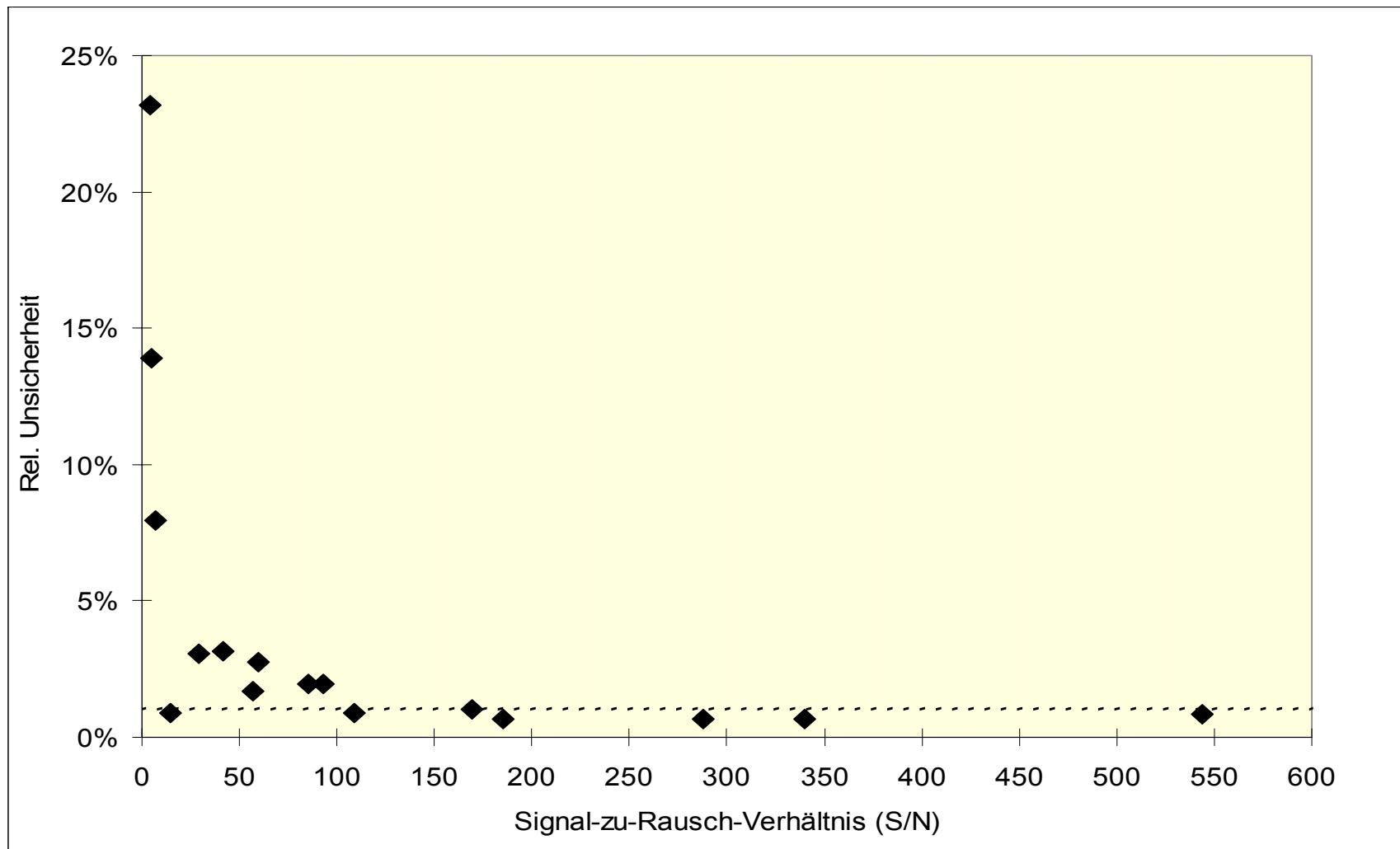


Robustheit



	Aufnahme-parameter	Prozessierungs-parameter	Auswerte-parameter
Robust innerhalb der untersuchten Grenzen	Pulse power für 90° pulses in dB: 2; 10 Preacquisition delay in μ s: 5; 10; 20; 50; 100 Receiver gain: 512 (Automatik); 256; 128; 64 Messtemperatur in K: 298; 323	Zero filling: SI= TD; 2xTD ; 4xTD	Frequenz-unabhängige Phasenkorrektur in °: 0; 0,05; 0,5; 1; 2,5
Effekt auf S/N	Pulse angle in °: 90; 63; 45; 30 ; 27; 18; 9 Anzahl der Scans: 2048; 512; 256; 128; 32 ; 16; 8	Exponentielle Multiplikation (em) in Hz: 0,3 ; 0,6; 1,0	
Effekt auf Signal-intensitäten	Acquisition time in s: 0,1; 0,2; 0,4 ; 0,9; 1,7; 3,4 ; 6,8 Relaxation delay in s: 30; 25; 20; 16; 12; 8; 5; 3 (Standardwert 10s für 30°pulse)		Frequenzabhängige Phasenkorrektur in °: 0; 0,2; 0,5; 2; 5; 10

Signal-zu-Rausch-Verhältnis



Einflussgrößen



Gerätekonfiguration

Magnetfeld (7,0T; 9,4T; 11,7T; 14,1T; 18,8T)

Probenköpfe (QNP, BBI, TXI, TXI-Kryo, **10mm HR, Si-spezial**)

Filtertyp (Digital, **Analogfilter**)

Operator (Messperson)

Spektrenkorrektur

Integration

Automatisierung

Korrekturalgorithmen (XWinNMR, MestRe-C)

Anfitten mit Lorentz-Gauß (WinFit)

Legende:

Rot: signifikante Abweichung,
systematischer Fehler

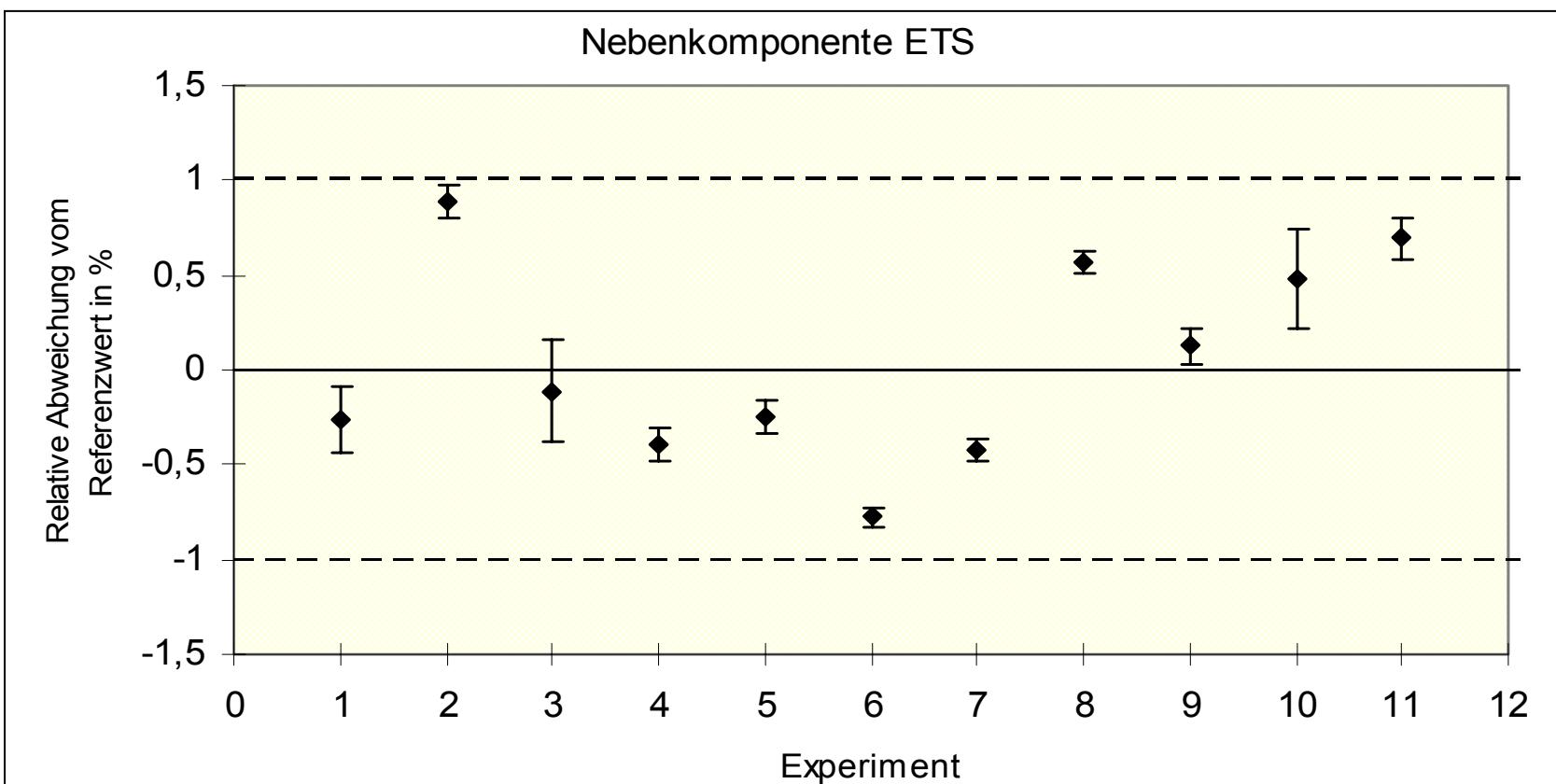
Schwarz: vernachlässigbare Abweichung
 $RSD(\text{Wied.}) < 0,6\%$
 $RSD(\text{Vergl.}) < 0,8\%$

Wiederhol/Vergleichbarkeit

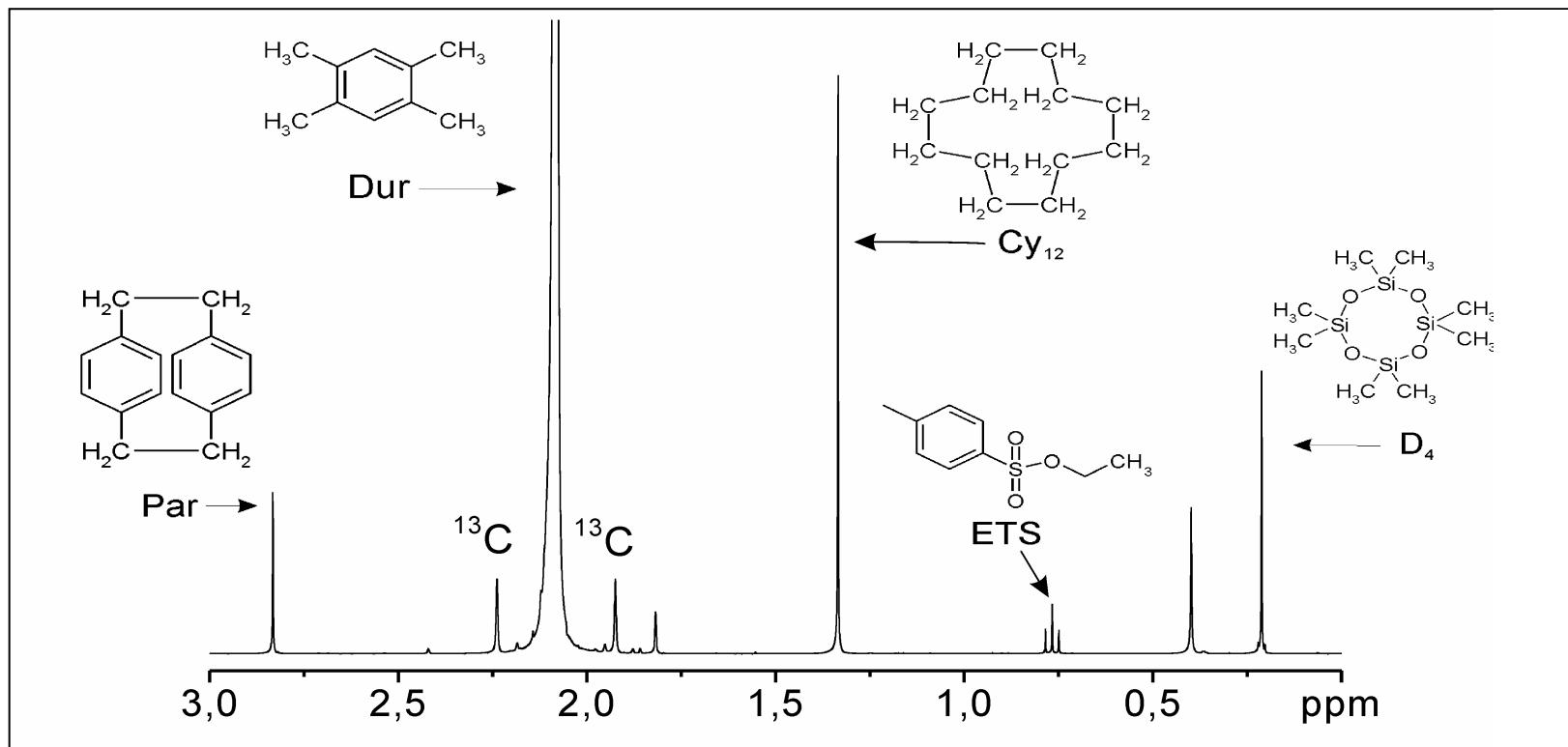
Wiederholbarkeit: - 5 Messungen nacheinander RSD < 0,5 %

- Zeitraum von 5 Monaten (Exp. 1 bis 7) RSD \leq 0,8 %

Vergleichbarkeit: - **Messkopf (Exp. 8 und 9)**
- **Messperson (Exp. 10 und 11)**



Modell-Lösung NMR-2



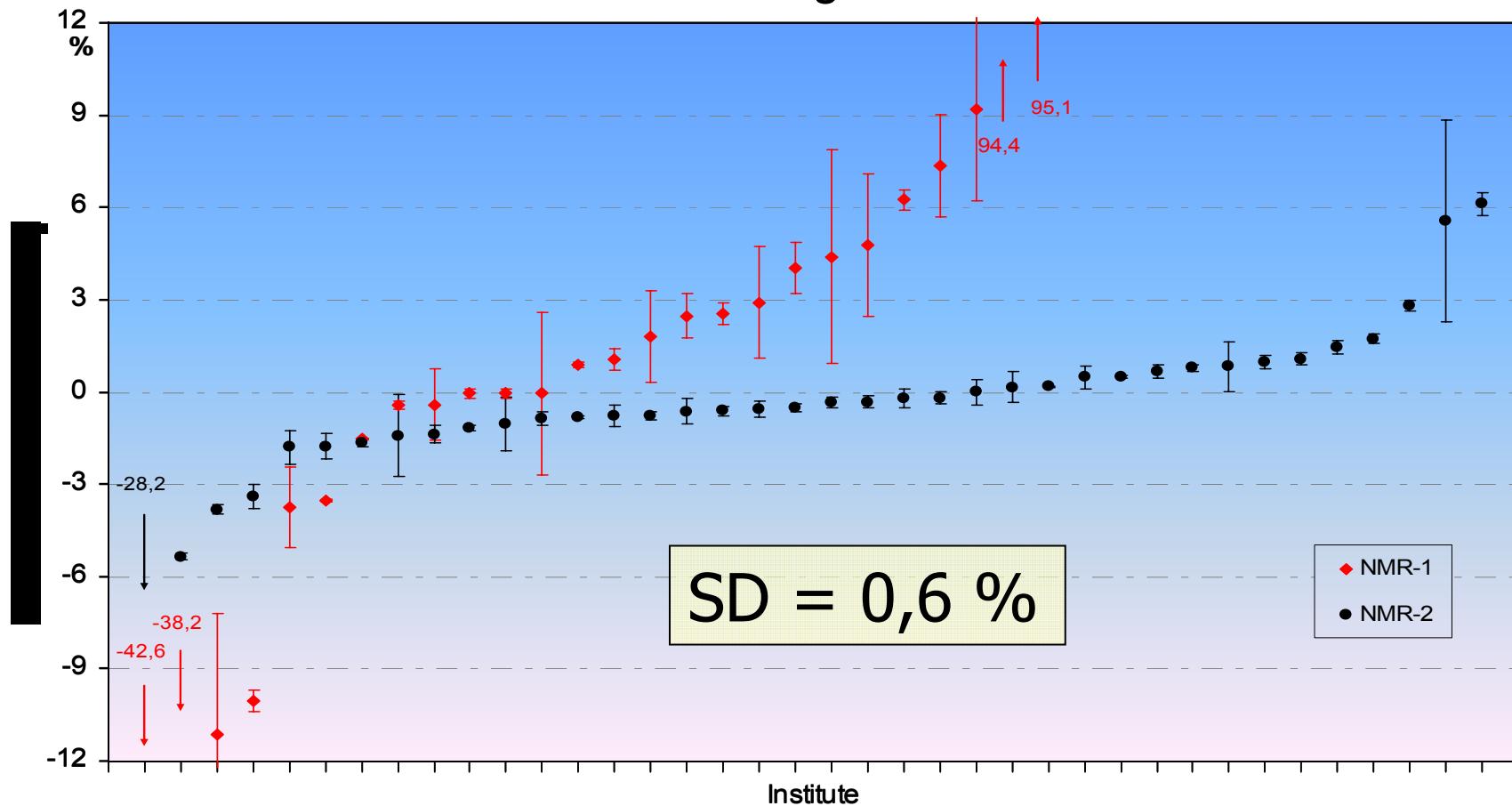
Arbeitsanweisung erarbeitet:

- 16 Aufnahme- und Prozessierungsparameter
- Auswertung: sorgfältige manuelle Phasen- und Grundlinienkorrektur, Integrationsbereich $64 \cdot n_{1/2}$ (Integrationsfaktor: 64)

NMR-1 vs. NMR-2

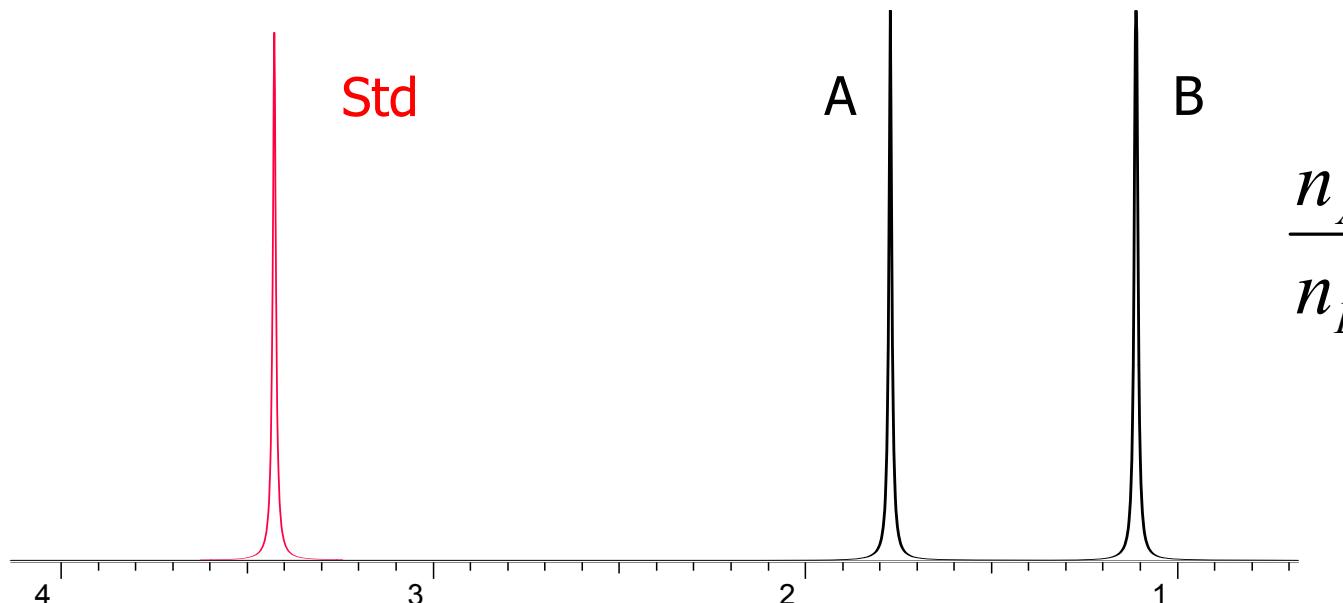
Komponente: Cy₁₂

Rel. Stoffmengenanteile



qNMR (Gehalt)

Relative Messmethode



$$\frac{n_A}{n_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{N_B}{N_A}$$

Zuwaage eines Standards

Absolute
Messgrößen

$$P_A = \frac{I_A}{I_{\text{Std}}} \cdot \frac{N_{\text{Std}}}{N_A} \cdot \frac{M_A}{M_{\text{Std}}} \cdot \frac{m_{\text{Std}}}{m} \cdot P_{\text{Std}}$$

Gehaltsbestimmung



Untersuchungsumfang pharmazeutischer Standards

Identität

- ^1H - und ^{13}C -NMR
- MS
- IR
- UV
- Schmelzpunkt
- etc

Gehalt

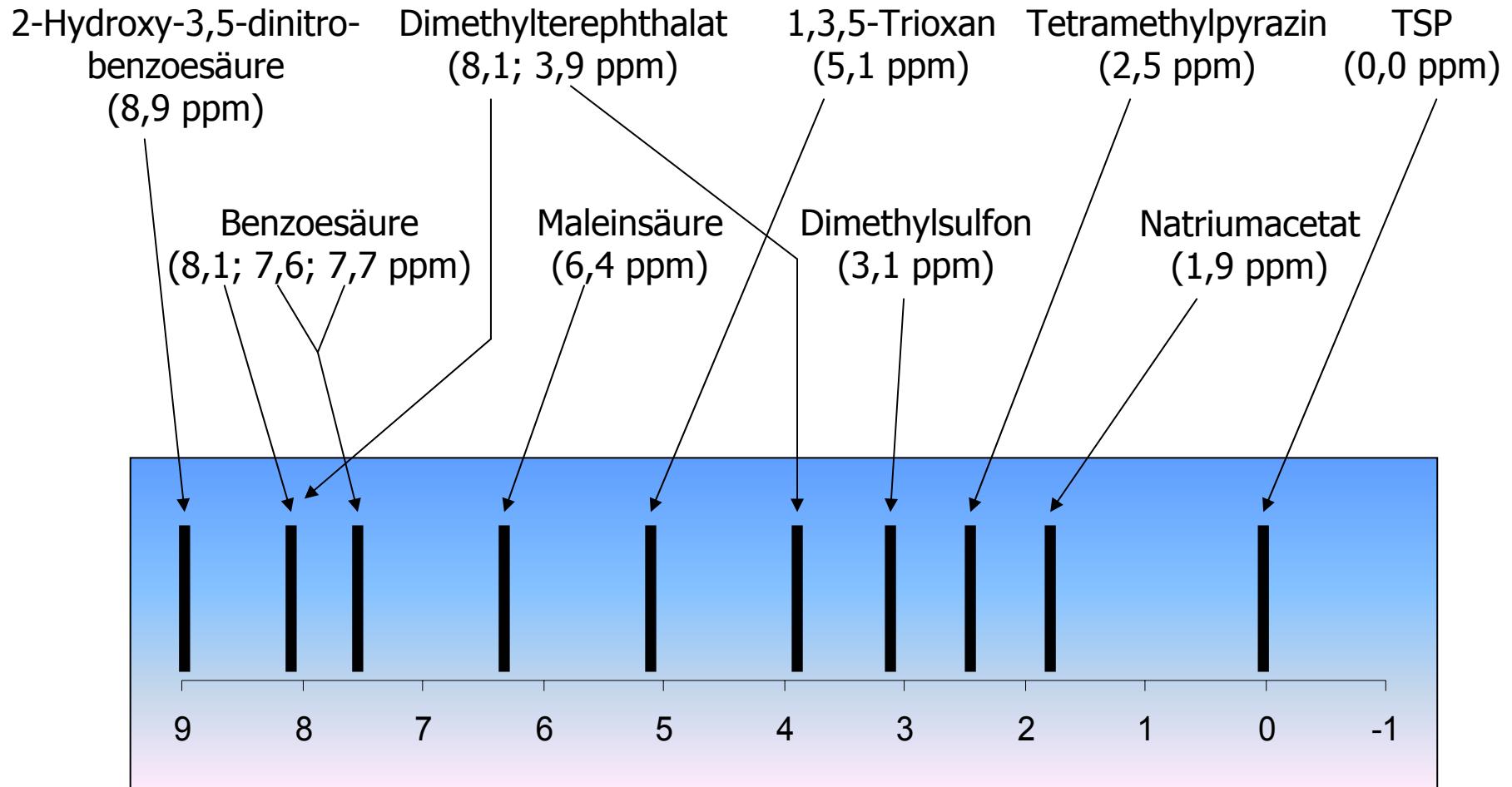
- Methode 1 (z.B. HPLC, 100%-Methode) (g1)
- Methode 2 (z.B. GC, 100%-Methode) (g2)
- Wasseranteil (z.B. Karl-Fischer-Titration) (w)
- Restlösemittel (r) und weitere Verunreinigungen (x)
(z.B. GC)

$$P = \bar{g} \cdot \left(\frac{100 - r - w - x}{100} \right)$$

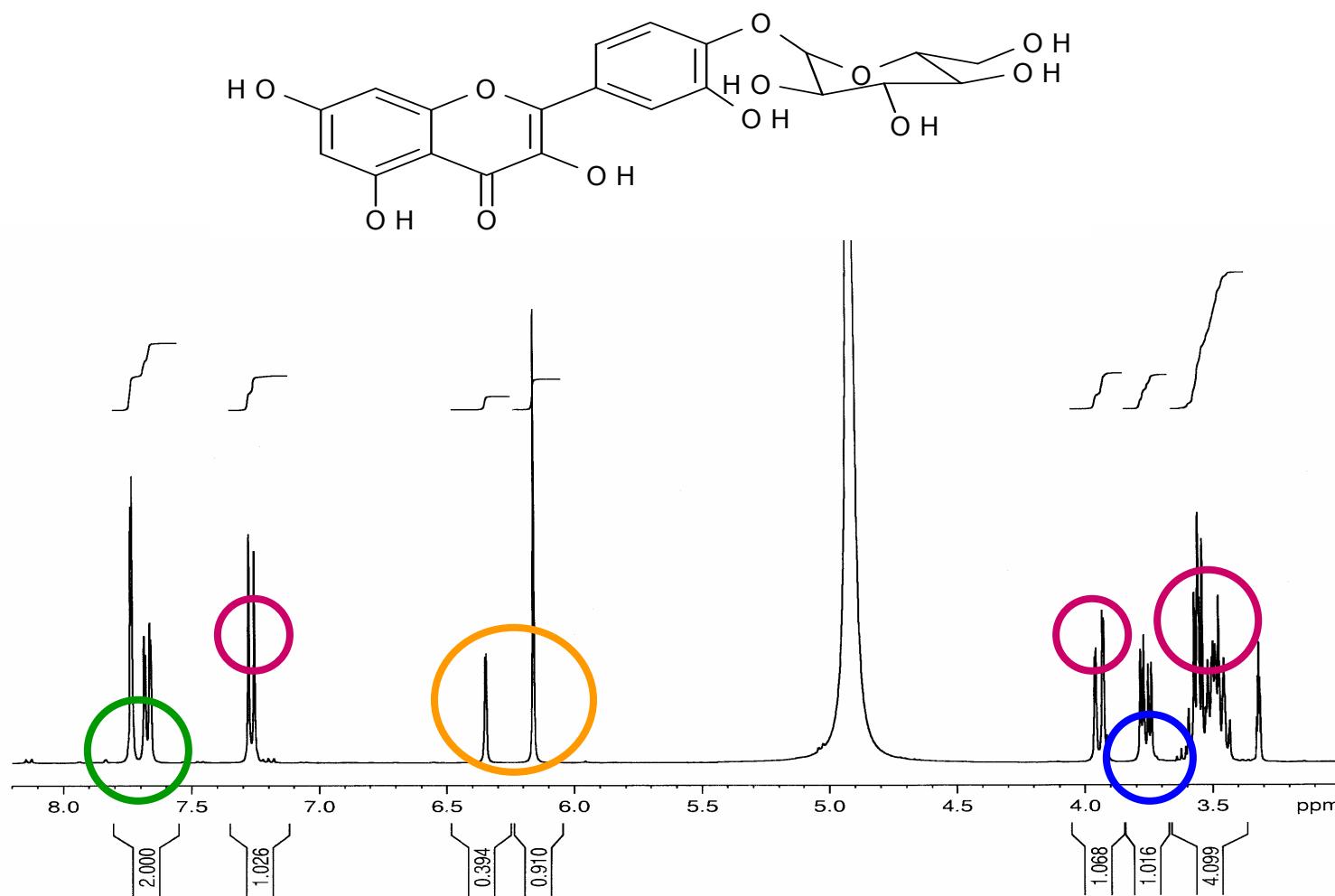
Vorteile:

- Ausgezeichnete Selektivität
- Gehaltsbestimmung über Hauptkomponente (direkte Methode)
- Einfache Probenpräparation
- Keine Aufarbeitung und Isolierung
- Zerstörungsfrei
- Gleichzeitige Analyse mehrerer Analyten in einem Gemisch
- Potenzielle primäre Relativ-Methode

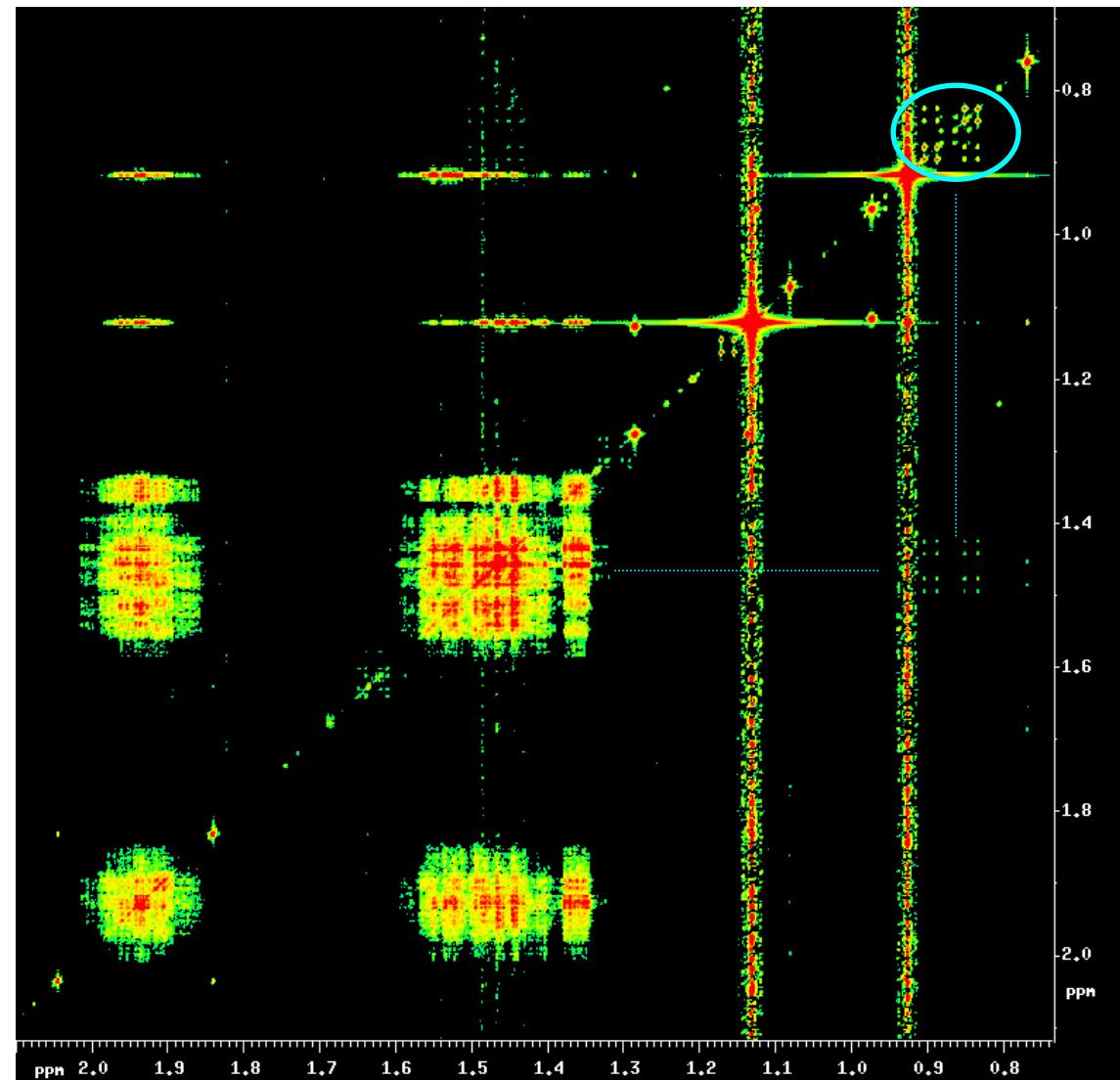
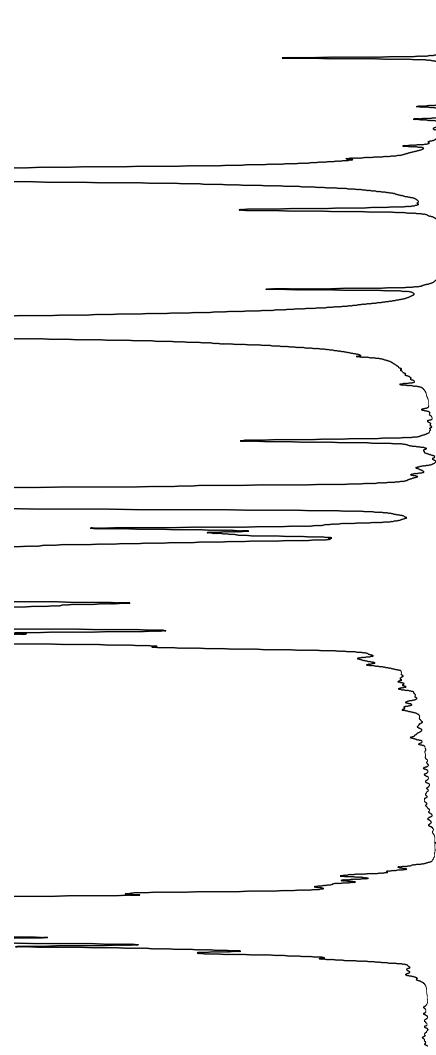
Interne Standards



Spiraeosid (Selektivität)

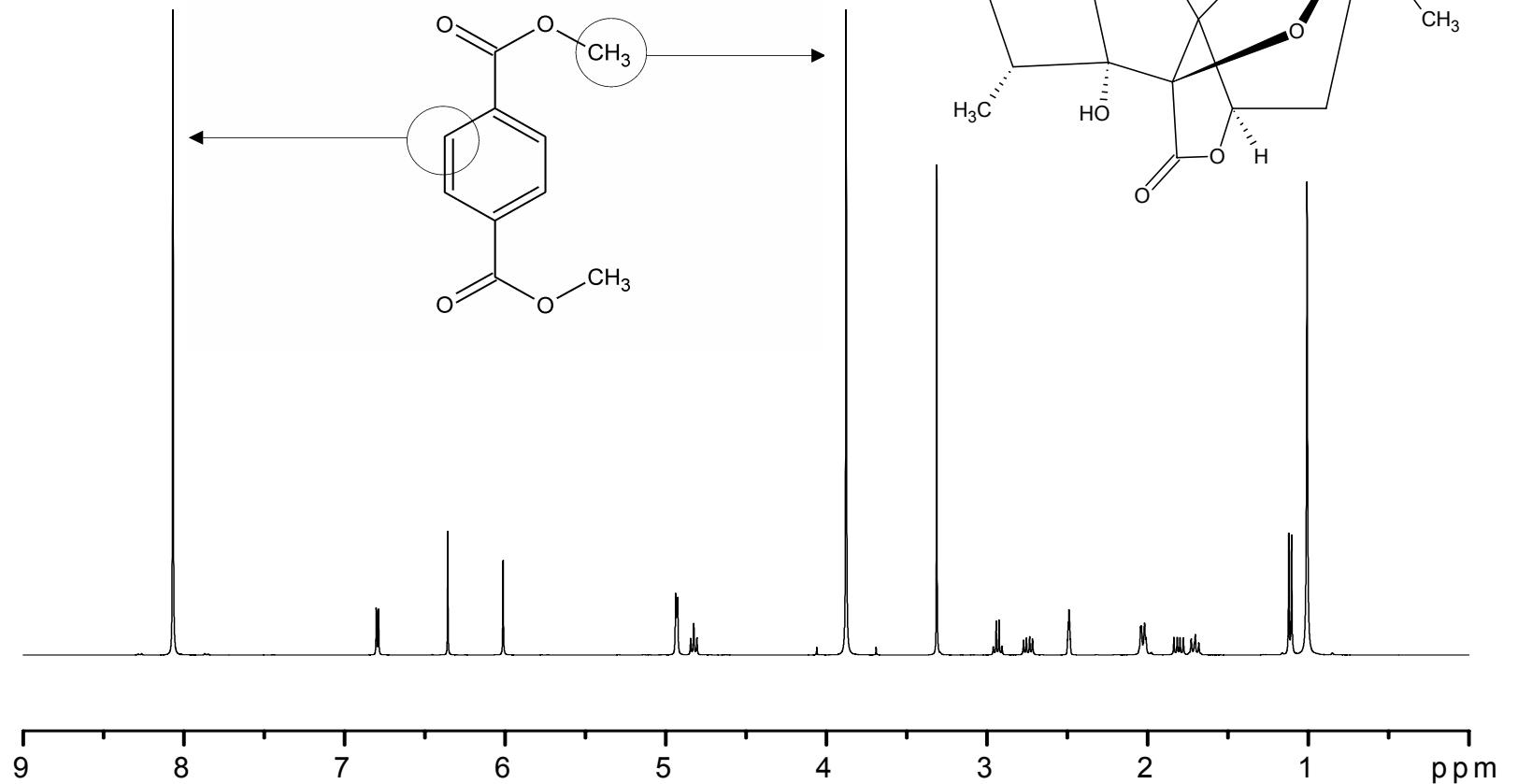


1,8-Cineol (Cosy)



Ginkgolid A

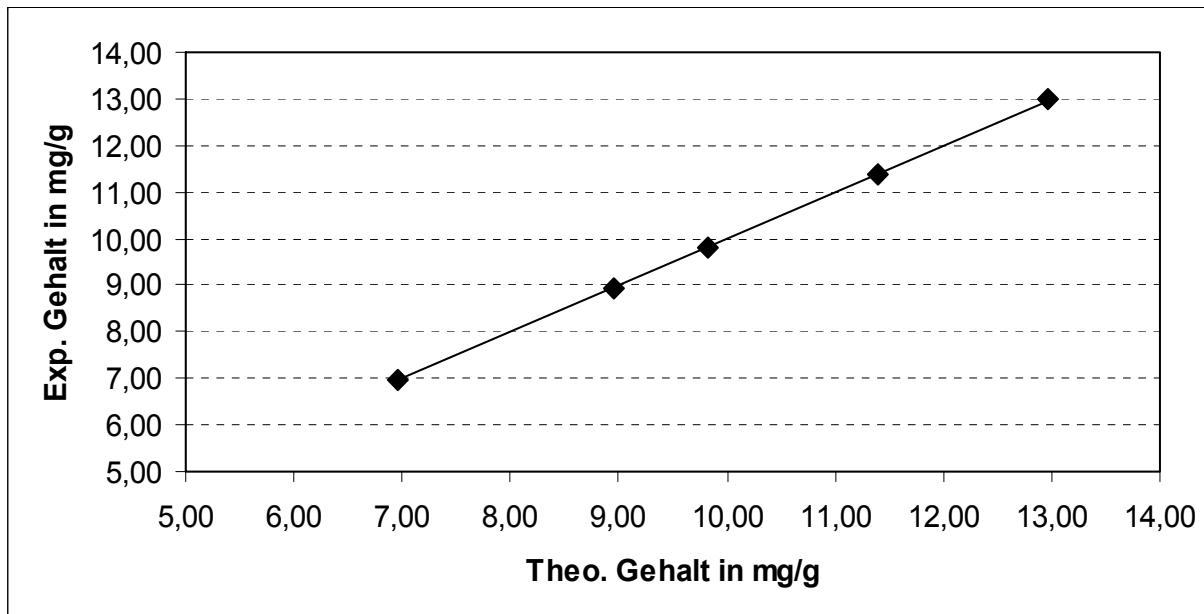
Auswertung: Ginkgolid A 6,01 ppm
Standard 8,07 ppm



Linearität

Die Bestimmung der Linearität erfolgte durch Einwägen von 5 unterschiedlichen Konzentrationen mit Referenzmaterial im Arbeitsbereich von 70 % bis 130 % des spezifizierten Grenzwertes.

Parameter	Akzeptanzkriterium	Ergebnis
Regression r	$r > 0,995$	$r = 0,99995$



Wiederholpräzision



Die Bestimmung der Präzision erfolgt über Wiederholungsanalysen ($n = 6$)

Parameter

Akzeptanzkriterien

Wiederholpräzision ($n = 6$):

Variationskoeffizient VK < 2 %

Lsg.

I II III IV V VI

Einwaage in mg

Ginkgold A

10,47 10,27 10,19 10,70 10,28 10,42

Terephthalat

9,99 10,76 10,00 9,98 9,95 10,25

Gehalt in g/g %

99,13 99,12 99,51 99,05 99,55 98,92

Mittelwert 99,21 g/g %

SD 0,26 g/g %

VK 0,3 %

Vergleichspräzision

Die Vergleichspräzision wurde von einem anderen Mitarbeiter an einem anderen Tag durchgeführt (je n = 6 Aufarbeitungen).

Lösung	Mitarbeiter 1	Mitarbeiter 2
I	99,13%	99,63%
II	99,12%	98,92%
III	99,51%	99,37%
IV	99,05%	99,00%
V	99,55%	99,74%
VI	98,92%	98,94%
Mittelwert	99,21%	99,27%
SD	0,26%	0,36%
VK	0,3%	0,4%
$F=SD_2/SD_1^2$	2,02	
Tabellenwert (95%,5,5)	5,05	

Unsicherheitsbudget



Messgleichung:

$$P_A = \frac{I_A}{I_{Std}} \cdot \frac{N_{Std}}{N_A} \cdot \frac{M_A}{M_{Std}} \cdot \frac{m_{Std}}{m} \cdot P_{Std}$$

Kombinierte Unsicherheit:

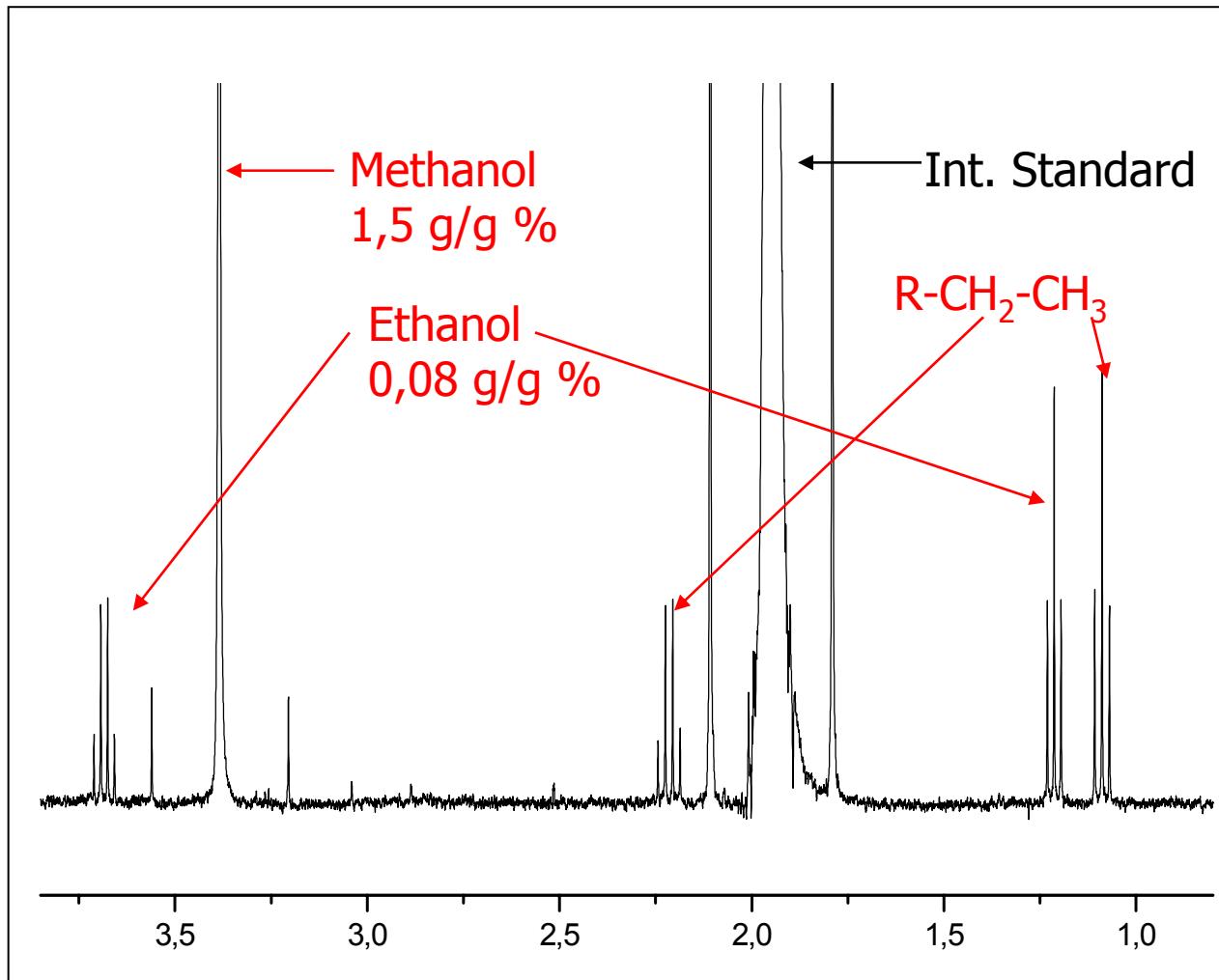
$$u(P_A) = P_A \cdot \sqrt{\left(\frac{u\left(\frac{I_A}{I_{Std}}\right)}{\frac{I_A}{I_{Std}}} \right)^2 + \left(\frac{u(M_A)}{M_A} \right)^2 + \left(\frac{u(M_{Std})}{M_{Std}} \right)^2 + \left(\frac{u(m_{Std})}{m_{Std}} \right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m} \right)^2 + \left(\frac{u(P_{Std})}{P_{Std}} \right)^2}$$

qNMR Analysenergebnisse



Substanz	Gehalt (NMR) in g/g %	Unsicherheit (k=2) in g/g %	Linearität r	Referenzwert (GC/HPLC mit KF)
Kavain	92,3	0,9	0,9998	94,8 %
Rutin (1)	90,9	0,7	0,9998	90,8 %
Rutin (2)	87,7	0,9	0,99990	88,3 %
1,8-Cineol	98,8	0,9	0,99990	98,5 %
Ginkgolid A (1)	99,2	0,9	0,99995	99,6 %
Ginkgolid A (2)	95,1	0,9	0,99990	94,8 %
Ginsenosid RC	89,8	1,0	0,9994	90,7 %

Verunreinigungen



Standardverfahren:

- 1) 100%-HPLC => Analyten
- 2) Karl-Fischer-Titr. => Wasser
- 3) Multi-GC => Verunreinigungen

R-CH₂-CH₃ nicht im Analysen-protokoll als Verunreinigung aufgeführt.

Zusammenfassung



- ^1H -qNMR ist linear, spezifisch und selektiv, robust in weiten Bereichen gegenüber den meisten Parametern.
- qNMR ist robust gegenüber Spektrometer-Konfiguration.
- Es ist eine allgemeingültige Arbeitsanweisung (im Sinne einer SOP) für Aufnahme und Auswertung notwendig. Diese ist strikt einzuhalten.
- Operator übt den größten Einfluss auf Richtigkeit und Präzision aus. qNMR benötigt gut ausgebildete Anwender.
- qNMR kann in der Pharmazie als orthogonale Methode zur Gehaltsbestimmung eingesetzt werden.

Danksagung



- Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit (BMWA)
Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH)
Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen
"Otto von Guericke" e.V. (AiF), (AiF-Nr.: 13843 N/1)
- Prof. Holzgrabe (Universität Stuttgart)
Dr. Christoffel (Bionorica AG)
Dr. Hauer (Schwabe GmbH & Co. KG)
Dr. Wissel (HWI Analytik GmbH)
Dr. Veit (LAT GmbH)
- BrukerBioSpin (Dr. Kerssebaum)
Dr. Mügge (Humboldt-Universität Berlin)
- Allen Teilnehmern der Ringversuche