

Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin, Berlin, Germany

Die Gehaltsbestimmung von Pyridoxinhydrochlorid (Vitamin B₆) nach Ph.Eur. 4. Ausgabe, Grundwerk 2002

N. KOS, J. P. SURMANN

Received August 1, 2005, accepted August 19, 2005

Prof. Dr. J. Peter Surmann, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, Königin-Luise-Str. 2–4, 14195 Berlin, Germany

Pharmazie 61: 414–416 (2006)

Die Gehaltsbestimmung von Pyridoxin-HCl erfolgt in der Ph.Eur. 4.0 durch alkalimetrische Titration in Ethanol unter Zusatz von Salzsäure. Theoretisch und praktisch wird die Undurchführbarkeit gezeigt. Die in Ph.Eur. 4.04 vorgeschriebene acidimetrische Titration in Ameisensäure/Acetanhydrid wird kritisch betrachtet und als Alternative eine einfache robuste Gehaltsbestimmungsmethode vorgeschlagen.

Determination of pyridoxine hydrochloride according to the European Pharmacopoeia 4.0

In the Ph.Eur. 4.0 assay pyridoxine hydrochloride is titrated by sodium hydroxide $0.1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in ethanolic solution. The impossibility of a correct evaluation of the titration curve is shown both in theory and practice. The new method in Ph.Eur. 4.04 is an acidimetric titration of the base chloride. In a mixture of formic acid/acetic anhydride the titration is made by perchloric acid. Because some critical points in this assay an alternative method is developed. This method is robust and should give results with high accuracy.

1. Einleitung

Während in den älteren Ausgaben des Europäischen Arzneibuches (Ph.Eur. 1997) die Ermittlung des Gehaltes von Pyridoxinhydrochlorid über die Bestimmung des Gegenions Chlorid erfolgte, das als Base in Eisessig nach der Quecksilberacetatmethode titriert wurde, wird in den neueren Ausgaben (Ph.Eur. NT 2001, Ph.Eur. 4 (Grundwerk)) das protonierte Pyridoxin als Kationensäure in Ethanol 96% mit wässriger Natriumhydroxidlösung $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ titriert. Ethanol als Lösungsmittel hat einerseits den Vorteil, dass hierin die meisten Arzneistoff-Hydrochloride und die bei der Deprotonierung entstehenden Arzneistoff-Basen ausreichend löslich sind, zum anderen ist wegen der verglichen mit Wasser erheblich kleineren Autoprotolysekonstante der Potentialsprung bei einer potentiometrisch indizierten Säure-Base-Titration in Ethanol größer als in Wasser, sodass auch Säuren mit pK_a -Werten > 8 (bis etwa $\text{pK}_a \leq 11$) noch präzise auswertbare Potentialsprünge ergeben. Da Ethanol häufig mit kleinen Mengen starker Säure (HCl) verunreinigt ist, muss dies zur Vermeidung systematischer Fehler berücksichtigt werden. Eine Bestimmung des Blindwertes durch Titration ist ungünstig, da dieser bei potentiometrischer Indikation nicht mit ausreichender Präzision zu ermitteln ist. Zur Eliminierung des Blindwertes wird der Titrationsvorlage ein genau definiertes Volumen einer eingestellten Salzsäure der Konzentration $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zugesetzt. Bei der nachfolgenden potentiometrisch indizierten Titration werden zwei Potentialsprünge festgestellt, die der Reaktion der Salzsäure (zugesetzte und im Ethanol vorhandene Menge) resp. der

Kationensäure entsprechen. Die Differenz zwischen den Volumina an den beiden Wendepunkten in den jeweiligen steilen Kurvenbereichen ist der Verbrauch für die Deprotonierung der Kationensäure. Neben der Eliminierung des systematischen Fehlers durch im Ethanol vorhandene starke Säure bietet dieses Vorgehen auch die Möglichkeit, bei vernachlässigbar kleinem Blindwert die Konzentration der eingesetzten Natriumhydroxid-Lösung zu überprüfen (Validierung). Dieses Verfahren der Titration schwacher Kationensäuren in Ethanol nach Zusatz von Salzsäure wird von der Ph.Eur. in zunehmendem Maße als robustes, präzises und umweltfreundliches Verfahren zur Gehaltsbestimmung von Arzneistoffhydrochloriden eingesetzt.

2. Untersuchungen und Ergebnisse

Die Arbeitsvorschrift zur Bestimmung von Pyridoxin-HCl nach Ph.Eur. NT 2001 und Ph.Eur. 4 (Grundwerk) lautet: *0,150 g Pyridoxin-HCl, in einer Mischung von 5,0 ml Salzsäure ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) und 50 ml Ethanol 96% R gelöst, werden mit Natriumhydroxid-Lösung ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) titriert. Das zwischen den beiden mit Hilfe der Potentiometrie (2.2.20) bestimmten Wendepunkten zugesetzte Volumen wird abgelesen. 1 ml Natriumhydroxid-Lösung ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) entspricht 20,56 mg Pyridoxin-HCl.*

Im Kommentar zur Ph.Eur. NT 2001 (Pohl 2002) wird zur Gehaltsbestimmung erläutert, dass bis zum ersten Wendepunkt die überschüssige Salzsäure titriert wird und zwischen dem ersten und zweiten Wendepunkt die Substanz erfasst wird. Hierbei wird, wie in der Monographie selbst,

vorausgesetzt, dass nur die Wendepunkte im steilen (Sprung-)Bereich der Titrationskurve gewertet werden. Im Pufferbereich (ca. Halbäquivalenzpunkt) ist jedoch ebenfalls ein Wendepunkt lokalisiert, der für die Ermittlung des verbrauchten Volumens nicht herangezogen werden darf. Hier sollte der Text des Arzneibuches präziser gefasst werden!

Voraussetzung für die Anwendbarkeit des beschriebenen Verfahrens der Simultantitration zweier Säuren ist eine genügend große Differenz in den Stärken der titrierten Säuren. HCl ist eine starke Säure, die in Wasser praktisch quantitativ zur Säure H_3O^+ (Hydronium-Ion, pK_a -Wert 0) reagiert, für Pyridoxin-HCl wird ein pK_a -Wert von 4,84 angegeben (Pohl 2002). Die Differenz scheint bei oberflächlicher Betrachtung groß genug zu sein. Berücksichtigt man jedoch die geringe Konzentration der Salzsäure ($0,909 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) gegenüber der von Pyridoxin-HCl ($13,265 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), so wird ein ausreichender Potentialsprung für die HCl fraglich. Die Simulation (Surmann, unveröffentlicht) der Titration unter der vereinfachenden Annahme einer mittleren Autoprotolysekonstante von 16 zeigt tatsächlich keinen auswertbaren Sprung bei einem Verbrauch von 0,5 ml Maßlösung (Abb. 1), der für die quantitative Umsetzung der Salzsäure erforderlich ist. Die praktische Titration bestätigt die Simulation (Abb. 2).

Damit ist festzustellen, dass die Titration nach Ph.Eur. 4 in der geplanten und vorgeschriebenen Weise nicht auswertbar ist.

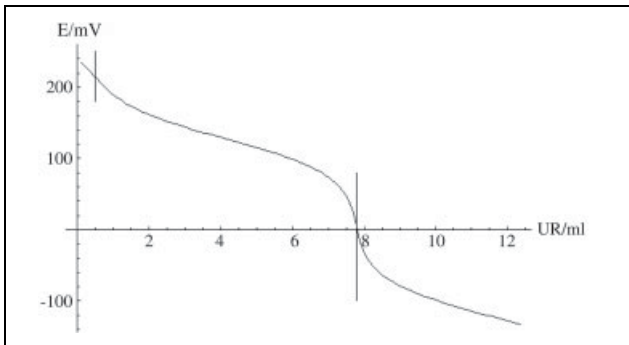


Abb. 1: Berechnete Titration von HCl (0,05 mmol) und Pyridoxin-HCl (0,73 mmol) mit $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH in einem Lösungsmittel mit der Autoprotolysekonstante $\text{pK}_{\text{Auto}} = 16$. Die Senkrechten zeigen die jeweiligen Äquivalenzpunkte

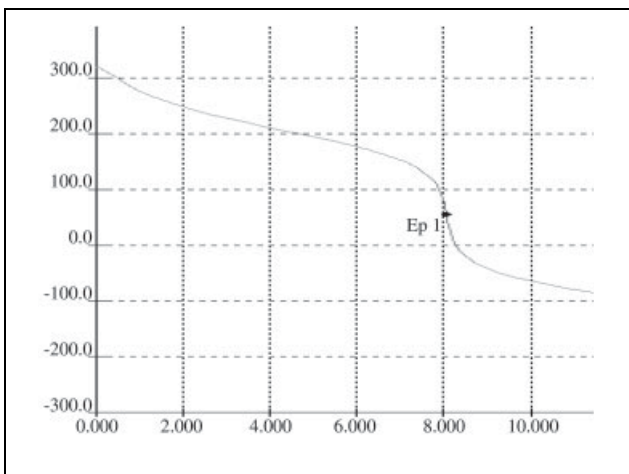


Abb. 2: Titration von Pyridoxin-HCl (0,758 mmol) und HCl (0,05 mmol) mit NaOH ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

3. Diskussion

In der Ph.Eur. 4.04 ist die alkalimetrische durch eine acidimetrische Titration der Base Chlorid ersetzt worden. Zur Vermeidung von Umweltbelastungen wird jedoch auf den Einsatz von Quecksilberacetat verzichtet. Die Base Chlorid wird im Lösungsmittel Acetanhydrid direkt mit Perchlorsäure in Eisessig titriert bei potentiometrischer Indikation. Zur Auflösung des Pyridoxin-HCl wird Ameisensäure eingesetzt. Die Basizität von Chlorid reicht im Lösungsmittel Acetanhydrid für die acidimetrische Titration aus (Surmann et al. 1983). Das Lösungsmittelgemisch erfordert jedoch die Bestimmung eines Blindwertes. Dieser wird in getrennter Titration des Lösungsmittels ermittelt, was Probleme macht, da der Potentialsprung wegen der geringen Menge vorhandener Basen nach Zugabe weniger Tropfen Maßlösung erfolgt und deshalb nur schwer und ungenau zu ermitteln ist. Folglich wird die Präzision einer solchen Titration nicht so gut sein wie eine erfolgreiche in Ethanol. Gegen den Einsatz von Ameisensäure/Acetanhydrid spricht zudem die mögliche Gefährdung durch Kohlenmonoxyd, das säurekatalysiert aus Ameisensäure in Gegenwart von Acetanhydrid entstehen kann (Surmann et al. 1996). Unter Umständen kann beim Aufbereiten für die Entsorgung (Neutralisieren) auch Chlorgas durch Komproportionierung von Chlorid und Perchlorsäure/Perchlorat entstehen. Eine Alternative zur Bestimmung von Pyridoxin-HCl liegt in einer potentiometrisch indizierten alkalimetrischen Titration, bei der die Tatsache genutzt wird, dass Pyridoxin-HCl zwei acide Gruppen enthält, das protonierte Amin (Pyridinium-Kation) und die phenolische OH-Gruppe. Da die Unterschiede in den thermodynamischen (makroskopischen) Aciditätskonstanten groß genug sind ($\text{pK}_{a1} = 4,84$, $\text{pK}_{a2} = 9,04$) (Pohl 2002), sollte eine Simultantitration möglich sein, wenn in einem Lösungsmittel mit einer Autoprotolysekonstante $< 10^{-14}$ titriert wird. Die Simulation der Titration unter Bedingungen, wie sie bei der ursprünglichen alkalimetrischen Titration der Ph.Eur. 4 genutzt wurden, zeigt die prinzipielle Richtigkeit der Überlegung (Abb. 3). Die praktische Titration bestätigt die Simulation und zeigt die praktische Anwendbarkeit der Titration (Abb. 4). Auf die Zugabe einer definierten Menge Salzsäure wird verzichtet, da die Auswertung auf dem Volumen basiert, das zwischen dem ersten und zweiten Wendepunkt (jeweils im steilen Bereich der Kurve) verbraucht wird. Das bis zum ersten Wendepunkt verbrauchte Volumen entspricht dem Verbrauch Base für Pyridoxin-HCl (1 Äquivalent) und die im Lösungsmittel enthaltene starke Säure (HCl) und kann zur Validierung herangezogen

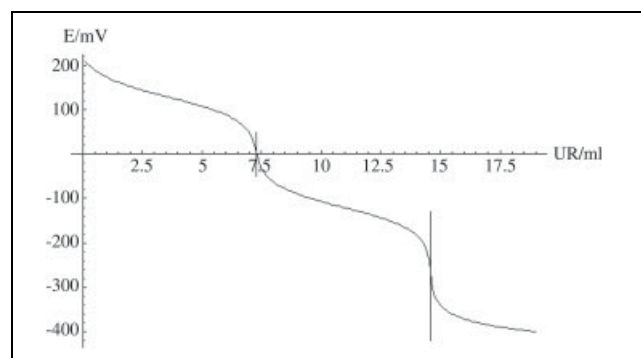


Abb. 3: Berechnete Titration von Pyridoxin-HCl (0,73 mmol) mit $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH in einem Lösungsmittel mit der Autoprotolysekonstante $\text{pK}_{\text{Auto}} = 16$. Die Senkrechten zeigen die jeweiligen Äquivalenzpunkte

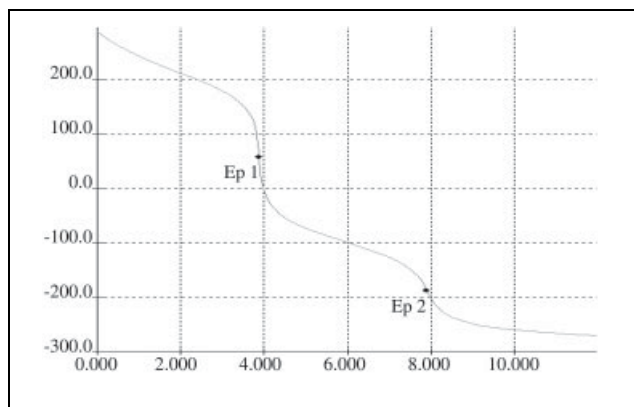


Abb. 4: Titration von Pyridoxin-HCl (0,393 mmol) mit NaOH ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

gen werden: es muss bei aufeinander folgenden Titrationen (in gleicher Art und Menge Lösungsmittel) um jeweils den gleichen konstanten Betrag größer sein als das zwischen erstem und zweiten Wendepunkt verbrauchte Volumen (Abb. 4).

Folgende Vorschrift zur alkalimetrische Titration von Pyridoxin-HCl wird vorgeschlagen:

75,0 mg Substanz in einer Mischung von 5 ml Wasser und 50 ml Ethanol 96% gelöst werden mit Natriumhydroxid-Lösung ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bei potentiometrischer Indikation titriert. Das zwischen den in den jeweiligen steilen Bereichen der Kurve liegenden beiden Wendepunkten verbrauchte Volumen wird abgelesen. 1 ml Natriumhydroxid-Lösung ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) entspricht 20,56 mg Pyridoxin-HCl.

Die Einwaage ist so gewählt, dass mit einer 10 ml Bürette gearbeitet werden kann. Auch wenn, wie vom Arzneibuch noch toleriert, eine um 10% erhöhte Einwaage gemacht wird und der Faktor der Maßlösung nur 0,9 beträgt, ist das bis zum 2. Äquivalenzpunkt benötigte Volumen Natriumhydroxid-Lösung ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) kleiner als 9 ml (8,92 ml), so dass bei Titration bis 10 ml der zweite Sprung für die Ermittlung des Wendepunktes noch ausreichend dargestellt ist.

4. Experimenteller Teil

4.1. Geräte

Titrimo GP 736 mit Software EasyCap 2.10.11 (Metrohm, Herisau, Schweiz). Messelektrode: Solvotrode[®] (6.0229.100, Metrohm, Herisau, Schweiz), das ist eine kombinierte Glaselektrode mit LiCl in EtOH als Innenlösung für die Ag/AgCl-Referenzelektrode.

4.2. Durchführung

Konditionieren der Solvotrode für 10 min in Ethanol 96 %. Dynamische-Äquivalenzpunkt-Titration (DET) als Titrationsmodus. Messwertübernahme driftkontrolliert ($\Delta E \leq 20 \text{ mV/min}$) nach maximal 30 s. Kleinste dosierbare Volumeneinheit 10 μl .

Literatur

- Pohl B (2002) Pyridoxin-HCl. In: Bracher F, Heisig P, Langguth P, Mutschler E, Rücker G, Scriba G, Stahl-Biskup E (ed.) Kommentar zum Europäischen Arzneibuch. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Surmann P, Dietz C, Wilke H, Nassauer T (1983) Zur Titration von Arzneistoffchloriden und -bromiden in wasserfreien Lösungsmitteln. Dtsch Apoth Ztg 123: 1110–1112.
- Surmann P, Boeing M, Berndt G (1996) Gefahr im Labor. Pharm Ztg 141: 2848.