

Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Germany

Simultane photometrische Bestimmung von kovalent gebundenem Fluor und Arzneistoffen anhaftender Fluoridkontamination im ppm-Bereich nach alkalischem Aufschluss

A. SEELING, Th. DAHSE, H. OELSCHLÄGER

Herrn Prof. Dr. med. W. Klinger, Jena, in Freundschaft zum 70. Geburtstag gewidmet

Eingegangen 26. Mai 2003, angenommen 18. Juli 2003

*Prof. Dr. Dres. h. c. Herbert Oelschläger, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Pharmazie, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany
b8oehe@rz.uni-jena.de*

Pharmazie 58: 866–869 (2003)

Durch die Kombination eines Aufschlusses mit Magnesiumoxid bei 800 °C und Übertreiben des gebildeten Fluorids durch Wasserdampfdestillation mit nachfolgender photometrischer Bestimmung als Aminomethylalizarindiessigsäure-Cer(III)-Komplex bei 620 nm gelingt in einem Arbeitsgang die Bestimmung von kovalent gebundenem Fluor in anhaftenden fluorhaltigen Solventien und primär daraus gebildeten Fluoridionen im Bereich von 0,1 bis 30 ppm. Die zwangsläufig eintretenden Verluste bei Aufschluss und Destillation werden durch Einführung eines zugelassenen Fehlerfaktors korrigiert. Das kombinierte Verfahren wurde gegen Dexamethason-kontaminierte Glucose validiert. Dexamethason enthält 4,84 % Fluor.

Simultaneous photometric determination of covalently bound fluorine and fluoride ion contamination adsorbed on drugs in the low ppm range after alkaline pulping

The simultaneous determination of fluorine resulting from inorganic fluoride as well as fluorine-containing solvents adsorbed to drugs was achieved in the 0.1–30 ppm range by a combination of decomposition with magnesium oxide at 800 °C and steam distillation of the resulting fluoride followed by photometric measurement of the aminomethylalizarindiacetic acid-cerium(III) complex at 620 nm. The inevitable loss of fluoride occurring during the decomposition and distillation processes was corrected using factors derived from authorized calibrations. The method was validated using glucose contaminated with dexamethasone which contains 4.84% fluorine per molecule.

1. Einleitung

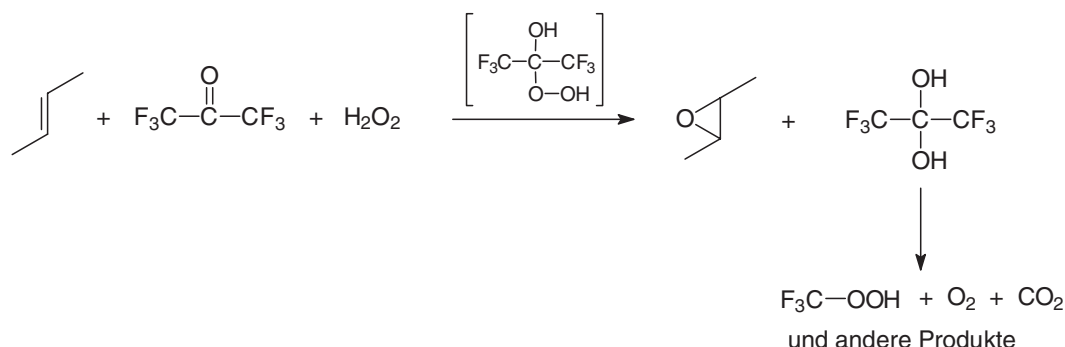
Die Synthese von Steroiden mit C11 β -Hydroxygruppe verläuft über das Epoxid C9-C11 mit nachfolgender regio-spezifischer Ringöffnung. Das Epoxid wird in der Regel hergestellt durch Oxidation der C9/C11-Doppelbindung mit Hexafluoraceton und H_2O_2 (Schema) [1].

Hierbei entsteht ein reaktives Hydroperoxid als Intermediat. Für die Qualität des Endproduktes ist die Frage von ausschlaggebender Bedeutung, ob bei der Epoxidierung bzw. den nachfolgenden Syntheseschritten Hexafluoraceton mitgeführt wird und ob dessen C-F-Bindung gespalten wird und somit dem Endprodukt Fluoridionen anhaften. Damit stellte sich die Frage eines gemeinsamen Nachweises von Hexafluoraceton über seine F-Atome und bereits primär bei der Synthese gebildeten Fluoridionen. Eine Head-space-Analyse für Hexafluoraceton hätte einen weiteren analytischen Aufwand impliziert. Die analytische Aufgabe bestand also darin, eventuell mitgeführtes Hexafluoraceton im unteren ppm-Bereich zu mineralisieren, damit die gesamte Verunreinigung in einem Messverfahren als Fluorid erfasst werden konnte. Um eine

solche Analytik für das Apothekenlaboratorium akzeptabel zu gestalten, bot sich das Verfahren der Europäischen Pharmakopöe zur Grenzwertbestimmung von Fluorid an, das auf der UV-VIS-Bestimmung eines Aminomethylalizarindiessigsäure-Cer(III)-Komplexes beruht, in dem ein Wassermolekül durch Fluorid ausgetauscht worden ist (KZ 6). Dieser Komplex zeigt λ_{\max} bei 620 nm. Das Arzneibuchverfahren dient z. B. dem Nachweis von Fluorid in Flurazepam. Hier ist eine Verunreinigung von max. 500 ppm zugelassen. Die Pharmakopöe gibt aber keinen Hinweis zur Zerstörung von organischer Substanz, um deren F^- -Kontamination im Spurenbereich quantitativ zu bestimmen.

In der Literatur werden zur Mineralisierung fluorhaltiger Verbindungen zahlreiche Verfahren empfohlen. Ältere Verfahren basieren auf einem Aufschluss mit Magnesiumacetat oder Natriumhydroxid bei 600 °C. Einen nicht unerheblichen apparativen Aufwand erfordern die Verbrennungsaufschlüsse in einer Druckaufschlussbombe, wobei zur Zerstörung der organischen Materie elektrisch gezündeter Sauerstoff eingesetzt wird [2]¹. Auch im Bom-

Schema



benrohr erhitztes Kalium kann zur Zerstörung benutzt werden.

Zusammengefasst beinhaltet also das zu lösende Problem die Zerstörung der organischen Substanz, kontaminiert mit Spuren von Hexafluoracetone, wobei keine nennenswerten F^- -Verluste eintreten dürfen, ferner eine weitgehend verlustfreie Wasserdampfdestillation als Gemisch von H_2SiF_6 (13 %ig), SiF_4 und H_2F_2 und die photometrische Bestimmung des Gesamtfluorids als Komplex bei 620 nm. Die Ergebnisse basieren auf 68 Aufschlüssen mit Nachfolgeoperationen.

2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Zur Erprobung der in der Literatur beschriebenen Aufschlussverfahren wurde als Modellsubstanz das fluorhaltige Dexamethason in Form einer Stammverreibung (1000 ppm bezogen auf Fluorid) mit Glucose eingesetzt, die durch erneute Verreibung mit Glucose auf die Zielkonzentrationen 10 $\mu\text{g/g}$ bzw. 20 $\mu\text{g/g}$ eingestellt wurde.

Als Aufschlussmethode wurde die Veraschung im offenen System mit MgO bei 800 °C gewählt. Das entstandene

MgF_2 zeigt einen Dampfdruck von 1 Pa [1150 °C]. Ein Aufschluss mit H_2O_2 in schwefelsaurem Milieu würde zu F^- -Verlusten durch flüchtige H_2F_2 führen. NaOH und KOH kamen aufgrund des höheren Dampfdrucks der Alkalifluoride (Dampfdruck: KF 1,3 hPa [885 °C], NaF 1,0 hPa [1077 °C]) zur Veraschung nicht in Betracht. Das optimierte Aufschlussverfahren wie auch die im folgenden diskutierten Folgeoperationen sind im Experimentellen Teil wiedergegeben.

Da die nach Lösen der mineralischen Aufschlussmasse in verdünnter Salzsäure resultierende hohe Ionenstärke das direkte Vermessen der Fluoridkonzentration verbot (Versuche mit Ionenchromatographie und ionensensitiver Elektrode waren erfolglos), wurde gemäß Vorschrift 2.4.5 der Ph. Eur. 4.00 (Grenzprüfung auf Fluorid) [3] Fluorid durch Wasserdampfdestillation abgetrennt. Die im Arzneibuch vorgeschriebene Destillatmenge musste hierbei von 50 auf 80 ml erhöht werden, da nach unseren Vorversuchen sonst eine quantitative Überführung nicht gewährleistet war. Als Absorbens wurde im 100,0 ml-Auffangkolben 5 mM-NaOH vorgelegt.

Die Komplexbildung des Fluorids erfolgt unter gleichzeitiger Pufferung der Lösung auf pH 4,2–4,4 durch Zugabe von Cer-haltigem Aminomethylalizarindiessigsäure-Reagenz R (Ph. Eur. 4.00). Der Ligandenaustausch von einem Molekül Wasser gegen ein Fluoridion im sechszähligen Cer-Komplex verschiebt das Absorptionsmaximum auf die Messwellenlänge 620 nm. Nach Einstellung des Gleichgewichts gilt das Lambert-Beersche-Gesetz im Konzentrationsbereich $>0 - 3,2 \cdot 10^{-11} \text{ mol/l}$, entsprechend $>0 - 0,6 \mu\text{g/ml}$ Fluorid. Abb. 1 zeigt die bathochrome Verschiebung im Cer-Komplex nach Ligandenaustausch.

Für die Validierung wurden in 3 Versuchsreihen je 4 Proben Dexamethason mit 10 $\mu\text{g/g}$ bzw. 20 $\mu\text{g/g}$ Fluorid und als Blindwerte MgO sowie $\text{MgO} + \text{Glucose}$ bei 800 °C aufgeschlossen, destilliert und kolorimetrisch vermessen. Unmittelbar vor einer Validierungsreihe wurde eine Kalibrierkurve aufgenommen, für die je 20,0 ml Lösungen von 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 ppm Fluorid mit je 5,0 ml des Aminomethylalizarindiessigsäure-Reagenzes R versetzt und bei 620 nm vermessen wurden. Die Eichgeraden (Abb. 2) waren im angegebenen Intervall linear (Quadrate der Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden $>0,998$).

Die statistische Bearbeitung der Analysenergebnisse (Tabelle 1) ergab, dass sich bei Überprüfung auf Reproduzierbarkeit der Mittelwert der 10 ppm-Reihe signifikant (95 % Vertrauensintervall) vom Mittelwert der 20 ppm-Reihe unterschied. Daher konnte bei stark abweichenden

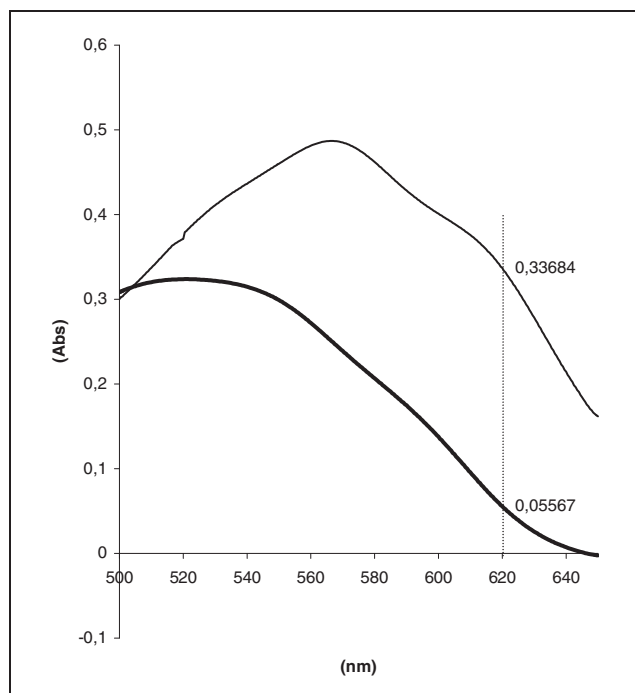


Abb. 1: VIS-Spektren des Aminomethylalizarindiessigsäure-Cer(III)-Komplexes in fluoridfreier Lösung (—) und nach Fluoridaustausch (---)

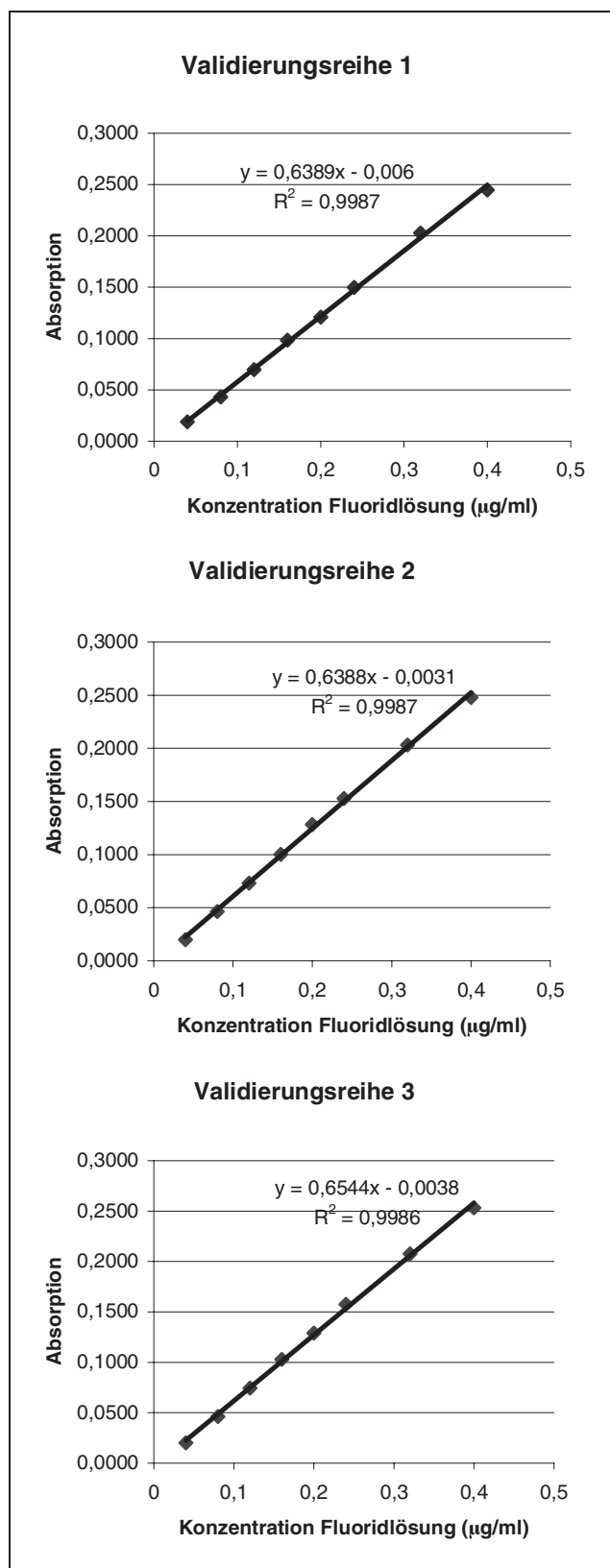


Abb. 2: Eichgeraden der Validierungsreihen 1–3

Gehalten der Testsubstanzen nicht das arithmetische Mittel gebildet werden, um den Fehlerfaktor zu erhalten, sondern es mussten je nach Konzentration des wiedergefundenen Fluorids in der Probe verschiedene Fehlerfaktoren angewendet werden. Die aus unseren Untersuchungen ermittelten Abgrenzungen der Fehlerintervalle definierten sich wie folgt:

Fehlerfaktor 1,15 für Werte von 0 bis < 12,5 µg gemessenem Fluorid

Fehlerfaktor 1,22 für Werte von 12,5 µg bis 17,5 µg gemessenem Fluorid

Fehlerfaktor 1,28 für Werte von 17,5 bis 30 µg gemessenem Fluorid

Für Proben mit über 30 µg Fluorid kann nur eine Abschätzung erfolgen.

Die genannten rechnerischen Korrekturen der gemessenen Werte von Proben mit unbekanntem Fluoridgehalt waren erforderlich, da vor allem während des Aufschlusses im offenen Tiegel, aber auch bei der Probenüberführung in die Destillationsapparatur und bei der Destillation Fluoridionen verloren gehen. Diese Vorgehensweise war für die Quantifizierung von Verunreinigungen auch gemäß den von der FDA 1996 herausgegebenen ICH-Guidelines legitim [4].

Nach dem ausgearbeiteten Verfahren wurden relevante Steroidproben der Fa. Jenapharm GmbH & Co. KG untersucht². Aufgrund der überlassenen Substanzmenge, es handelte sich um Rückstellmuster, war jeweils eine Doppelbestimmung möglich. Die erhaltenen Fluoridwerte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Die Fluoridgehalte aller Proben lagen unter 30 ppm und damit unterhalb des gemäß Ph. Eur. 4.00 für auf Fluorid zu prüfende Arzneistoffe vorgeschriebenen Grenzwerts, der substanzspezifisch festgelegt wird, z.B. für Flurazepam mit 500 ppm.

3. Experimenteller Teil

3.1. Aufschluss

In einen mit Aqua bidest. gereinigten und ausgeglühten Nickeltiegel werden 1000 mg Probe und 200 mg MgO eingewogen und mit einem Glasstab sorgfältig durchmischt. Danach erfolgt vorsichtig die Veraschung über dem Bunsenbrenner, bis die Rauchentwicklung zum Erliegen kommt. Der Tiegel wird dann in den kalten Muffelofen eingestellt, mit maximaler Heizrate auf 800 °C erhitzt und über 2 h bei 800 °C belassen. Nach dem Abkühlen verbleibt ein weißer Kuchen ohne schwarze Rückstände, der zur Weiterverarbeitung mit insgesamt 13 ml 70 proz. Perchlorsäure [5] verlustfrei in den mit 0,100 g säuregewaschenem Seesand versetzten Destillierkolben gespült wird. Zum Spülen der Öffnung der Destillationsglocke dienen 7 ml Aqua bidest.

3.2. Destillation

Der Aufbau der Apparatur entspricht weitgehend den Vorschriften der Ph.Eur. 4.00. Abweichend ist das Mantelgefäß nicht mit Tetrachlorethan, sondern mit Silikonöl als Temperierflüssigkeit gefüllt. Die Erwärmung erfolgt mittels Ölbad in der Weise, dass eine gleichbleibende Manteltemperatur von 149 ± 3 °C gewährleistet wird. Diese Temperatur ermöglicht einen gleichmäßigen Dampfstrom durch das Destilliergut, ohne dass nennenswertes Kondensat anfällt.

Als Auffanggefäß für das Destillat dient ein mit 0,5 ml 0,1 M–NaOH, 0,1 ml Phenolphthalein-Lösung R und 10 ml Aqua bidest. beschickter 100,0 ml-Maßkolben, der so positioniert wird, dass der verlängerte Auslauf des absteigenden Kühlers in die Vorlage eintaucht.

Sobald die Manteltemperatur ca. 145 °C erreicht hat, erfolgt die Dampfzuführung aus dem Dampfgenerator, der im einfachsten Fall aus einem 1000 ml-Rundkolben mit Brennerbeheizung, Steigrohr und Dampfüberleitung besteht. Während der Destillation muss auf Temperaturkonstanz im Mantelgefäß, gleichmäßige Destillationsgeschwindigkeit und möglichst geringe Dampfdruckschwankungen geachtet werden. Im Destillationskolben muss während der Destillation in erster Näherung ein Volumen von 20 ml aufrechterhalten werden. Außerdem wird ggf. durch Zugabe von einigen Tropfen 0,1 M–NaOH sichergestellt, dass das Destillat während der Destillation alkalisch bleibt.

Die Destillation ist nach einem Übertritt von 80 ml Destillat, entsprechend einem Maßkolbenfüllstand von 90 ml, beendet. Der Liebigkühler wird mit ca. 5 ml Wasser nachgespült.

3.3. Kolorimetrische Fluoridbestimmung

3.3.1. Herstellung der Kalibrierlösungen

Natriumfluorid p.a. wird 12 h bei 300 °C getrocknet. 442,0 mg der getrockneten Substanz werden mit Aqua bidest. zu 1000,0 ml gelöst (Stammlösung 200 ppm). Aus dieser Stammlösung erhält man durch Verdünnung mit Aqua

Tabelle 1: Ergebnis der Validierung mit Dexamethason nach statistischer Bereinigung

	10 ppm -Wert Wiederfindung in %	20 ppm-Werte Wiederfindung in %	Blindwerte in µg Fluorid
Validierungsreihe 1	90,8	74,2	5,8
Validierungsreihe 1	87,1	77,1	5,3
Validierungsreihe 1	—	84,8	5,7
Validierungsreihe 1	90,1	92,9	6,0
Mittelwert	89,3	82,2	5,7
Varianz	3,8	70,7	0,1
Standardabw (N-1)	1,9	8,4	0,3
Validierungsreihe 2	86,8	80,5	5,9
Validierungsreihe 2	—	82,1	5,1
Validierungsreihe 2	—	67,3	6,0
Validierungsreihe 2	83,9	—	5,4
Mittelwert	85,4	76,6	5,6
Varianz	4,1	66,3	0,2
Standardabw (N-1)	2,0	8,1	0,4
Validierungsreihe 3	81,1	83,3	4,4
Validierungsreihe 3	89,7	66,2	4,2
Validierungsreihe 3	85,9	70,1	4,8
Validierungsreihe 3	87,7	82,5	4,1
Mittelwert	86,1	75,5	4,4
Varianz	10,2	56,5	0,1
Standardabw (N-1)	3,2	7,5	0,3
Gesamtmittelwert	86,9	78,1	5,2
Gesamtvarianz	9,7	67,2	0,5
GesamtSt.abw. (N)	3,1	8,2	0,7

(Die Auswertung umfasst die Prüfung auf Ausreißer (Konfidenzintervall: 2 σ) sowie die Prüfung auf Vergleichbarkeit der Präzision (F-Test): $F = 67,2/9,7 = 6,93 > 3,35$ [tabellierter Wert für die Freiheitsgrade 8 und 10])

Tabelle 2: Fluoridgehalte in Steroidproben (µg/g)

Code	µg Fluorid gemessen	Fehlerfaktor	µg Fluorid korrigiert
30/00	8,5	1,15	9,8
15/01	12,1	1,15	13,9
28/01	17,8	1,28	22,7
26/01	14,4	1,22	17,6
25/01	21,0	1,28	26,9
49/01	17,6	1,28	22,5
10/02	22,6	1,28	28,9
21/02	18,5	1,28	23,7
24/02	16,8	1,22	20,5
32/02	12,5	1,22	15,2

Tabelle 3: Herstellung der Eichlösungen

[ppm] Fluorid	Verdünnung jeweils ad 100,0 ml
0,05	5,0 ml Fluoridlösung (1 ppm)
0,1	10,0 ml Fluoridlösung (1 ppm)
0,15	15,0 ml Fluoridlösung (1 ppm)
0,2	2,0 ml Fluoridlösung (10 ppm)
0,25	2,5 ml Fluoridlösung (10 ppm)
0,3	3,0 ml Fluoridlösung (10 ppm)
0,4	40,0 ml Fluoridlösung (1 ppm)
0,5	5,0 ml Fluoridlösung (10 ppm)
0,6	6,0 ml Fluoridlösung (10 ppm)

bidest. die Fluoridlösungen 10 ppm und 1 ppm, die zur Bereitung der im Folgenden aufgeführten Eichlösungen dienen (Tabelle 3). Das Aminomethylalarindessigsäure-Reagenz R wird gemäß Ph.Eur. 4.00 hergestellt.

3.3.2. Photometrische Messung

20,0 ml der Kalibrierlösung bzw. 20,0 ml des Destillats werden mit 5,0 ml Aminomethylalarindessigsäure-Reagenz R versetzt, verschlossen, geschüttelt und stehen gelassen. Innerhalb von 80–120 min erfolgt die Vermessung bei 620 nm. Als Kompensationsflüssigkeit dient eine gleich

behandelte Lösung von 20,0 ml Aqua bidest. mit 5,0 ml Aminomethylalarindessigsäure-Reagenz R. Für die Destillate werden jeweils 3 Lösungen vermessen und je 3 Absorptionswerte aufgenommen. Aus den erhaltenen 9 Werten wird der Mittelwert gebildet. Die pH-Werte der Lösungen werden direkt nach der Messung überprüft. In der Regel reicht die Pufferkapazität des Aminomethylalarindessigsäure-Reagenz R aus, um einen pH-Wert von 4,2–4,4 zu erreichen. Bei Abweichungen ist die Messlösung zu verworfen.

3.4. Chemikalien

Magnesiumoxid puriss. p.a. (Fluka); Natriumacetat-Trihydrat p.a. (Merck); $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ reinst (Merck); Phenolphthalein (Merck); Seesand, säuregewaschen (Merck); D-(+)-Glucose, anhydrous, 99 + % (Acros); HClO_4 70% p.A. (Acros); N-(3,4-Dihydroxy-2-anthrachinonylmethyl)-iminodiessigsäure Dihydrat p.a. (Aldrich); Dexamethason mikrofein DAB 10 (Caelo); NaOH >99% (Roth); Aqua bidest. (bidestilliert aus entionisiertem Wasser)

3.5. Geräte

Muffelofen L9/R, Nabertherm (D-28865 Lilienthal), Fluoriddestillationsapparat gem. Ph.Eur. 4.00 (2002), Wepa (D-56204 Hilscheid); Digital-pH-Meter pH 525, WTW (D-82362 Weilheim); UV/VIS/NIR-Photometer V-570, Jasco (D-64823 Groß-Umstadt)

Wir danken dem Fonds der Chemie, Frankfurt a. M., für finanzielle Förderung.

¹ Herrn Prof. Dr. Veit und Frau Dipl.-Ing. K. Maurer von der Westsächsischen Hochschule Zwickau danken wir für gute Kooperation bei Vorversuchen, unsere Proben in der Kalorimeterbombe aufzuschließen. Eine statistische Absicherung der Ergebnisse liegt noch nicht vor.

² Wir danken Herrn Dr. Hösel und Frau Dipl.-Chem. Kloss für angenehme Zusammenarbeit.

Literatur

- Ehrenberger, F.; Gorbach, S.: Quantitative organische Elementar- und Spurenanalyse, Verlag Chemie, Weinheim 1973
- Albrich, H.; Müller, M.: Laborpraxis **19**, 62 (1995)
- Ph.Eur. 4. Ausgabe, Grundwerk, (2002), Govi-Verlag, Pharmazeutischer Verlag GmbH, Eschborn
- Guideline for Industry; Impurities in New Drug Substances, ICH Q3A, 01/1996
- Kommentar zur Ph.Eur. 1997, 10. Lieferung (1999), Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart