

Hochpräzise Reinheitsbestimmung analytischer Standards mittels quantitativer ^1H -NMR-Spektroskopie

Torsten Schönberger

Bundeskriminalamt, Kriminaltechnisches Institut, KT 12, D-65173 Wiesbaden

Abstract

In this article the use of NMR spectroscopy for high-precision determination of the purity of analytical standards is described. NMR spectroscopy fulfils the requirement of a relative primary method; therefore it can be applied for the quantification of almost any organic chemical substance. In this process the influence of phenomena, such as humidity adsorption, is also detected, which is not the case when chromatographic methods are used. Considering some parameters optimised for precision the method delivers an extremely low expanded uncertainty of measurement of 0.30 % (for $k=2$; confidence interval ≈ 95 %). An overview of the purity determinations carried out so far is given. Approximately one third of the analysed standards have critical purity deviations. This demonstrates the valuable contribution of the method described for the quality assurance.

Zusammenfassung

In diesem Artikel wird der Einsatz der NMR-Spektroskopie zur hochpräzisen Reinheitsbestimmung analytischer Standards beschrieben. Die NMR-Spektroskopie eignet sich aufgrund ihrer Eigenschaften als relative Primärmethode zur Quantifizierung von nahezu allen organisch chemischen Substanzen. Dabei wird auch der Einfluss von Phänomenen, wie z.B. Wasseranlagerungen, erfasst, die mit den üblicherweise verwendeten chromatographischen Verfahren nicht detektierbar sind. Unter Berücksichtigung einiger auf Präzision optimierter Parameter erzielt das vorgestellte Verfahren die äußerst geringe erweiterte Messunsicherheit von 0,30 % (für $k=2$; Vertrauensbereich ≈ 95 %). Es wird ein Überblick über die durchgeführten Reinheitsbestimmungen analytischer Standards gegeben. Bei etwa einem Drittel der Standards wurden kritische Abweichungen der Reinheitswerte festgestellt. Dies belegt den wertvollen Beitrag der beschriebenen Methode zur Qualitätssicherung.

1. Einleitung

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR) ist eine unverzichtbare Methode für die Strukturaufklärung organischer Moleküle. Dieser Einsatz ist im Bereich der pharmazeutischen Industrie weit verbreitet. Im Gegensatz dazu ist die quantitative Kernresonanzspektroskopie (qNMR) weniger bekannt, obwohl sie bereits 1963 durch Forbes und Hollis [1] erstmals beschrieben wurde. Malz lieferte 2003 [1] zum ersten Mal eine komplette Unsicherheitsbetrachtung und belegte, dass die qNMR die Anforderungen einer relativen Primärmethode erfüllt. Das heißt, es ist eine Methode höchster metrologischer Qualität, deren Messgrößen auf SI-Einheiten zurückzuführen sind.

Die qNMR wird zum ersten Mal 2009 im Europäischen Arzneibuch in der Ausgabe 6.3 beschrieben [2]. Im Gegensatz zur Quantifizierung mittels chromatographischer Methoden wird für die qNMR die Zielsubstanz nicht als Standard mit definierter Reinheit benötigt. Da unter Berücksichtigung spezieller Messbedingungen die Signalintensität im NMR-Spektrum proportional zur Stoffmenge ist, kann die Referenzierung auf Signale anderer Substanzen, die als interner Standard hinzu gegeben werden, erfolgen. Das bedeutet, dass grundsätzlich alle identifizierten Substanzen mittels qNMR auch direkt quantifiziert werden können.

Einige nach ISO Guide 34 zertifizierte Referenzmaterialien (ZRM) wurden speziell für die qNMR zum ersten Mal 2010 von Sigma-Aldrich angeboten [3]. Das umfassende Angebot der ZRM ermöglicht aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten und Signallagen im NMR Spektrum einen variablen Einsatz für nahezu alle Zielsubstanzen.

Im Kriminaltechnischen Institut des Bundeskriminalamtes wird die qNMR bereits seit 2004 auch für die Gemischanalytik eingesetzt. Da alle Inhaltsstoffe gleichzeitig in einem Spektrum detektiert werden, ist die Selektivität im Vergleich zur Chromatographie eher eingeschränkt. Trotzdem war es bei den bisher durchgeführten Analysen synthetischer Drogen möglich, bis zu 7 Komponenten nebeneinander zu quantifizieren. Das für die Gemischanalytik eingesetzte Verfahren wurde auf einfache Probenaufbereitung und hohen Durchsatz optimiert. Die kombinierte Messunsicherheit wurde im Rahmen der Validierung mit 1,0 % ermittelt.

2011 wurde ein weiteres Verfahren für die Reinheitsbestimmung von analytischen Standards entwickelt, welches in diesem Artikel beschrieben wird. Die Optimierung erfolgte dabei auf höchste Präzision. Dies ist besonders wichtig, da die Reinheit der meist für die chromatographische Quantifizierung verwendeten Standards proportional das Endergebnis aller darauf beruhenden Analysen beeinflusst.

Das Bundeskriminalamt verfügt bisher als einziges Kriminaltechnisches Institut in Deutschland über ein NMR Spektrometer. Im Rahmen der Zentralstellenfunktion werden deshalb auch Reinheitsüberprüfungen von Standards für Kriminaltechniken der Bundesländer durchgeführt. Dieses wertvolle Werkzeug zur Qualitätssicherung wird im BKA zur Eingangskontrolle und für regelmäßige Zwischenprüfungen von Standards eingesetzt. Dass diese Prüfung auch beim Einkauf von Standards mit Zertifikat sinnvoll ist, hat unter anderem die 2010 durchgeführte Eingangskontrolle der Reinheit von Vardenafil*HCl gezeigt. Das beigegefügte Zertifikat (nach Richtlinien der Firma) weist eine Reinheit von 99,5 % aus. Mittels qNMR wurde im BKA eine Reinheit von nur 90,4 % ermittelt. Die Differenz konnte auf eine falsche Stöchiometrie von Vardenafil zu HCl zurückgeführt werden.

In einigen anderen Fällen waren es Wasseranlagerungen, die die Reinheit der Standards deutlich reduzierten. Ähnliche Effekte wurden auch von Hays, Drug Enforcement Administration, USA 2005 beobachtet [4]. Im BKA werden aber nicht nur käufliche Standards überprüft. Der große Vorteil des variablen Einsatzes der qNMR wird auch zur Reinheitsbestimmung von Substanzen aus Sicherstellungen oder nach eigener Aufreinigung (z.B. mittels präparativer Flüssigchromatographie) genutzt. Dadurch können auch die über diese Wege erhaltenen Substanzen als Standards eingesetzt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Zertifizierte Referenzmaterialien

Calciumformiat, Fluka (Taufkirchen, Deutschland), 03836-5G, TraceCERT®, Standard für quantitative NMR, Lot#: BCBB7989, zertifizierte Reinheit 99.90 % g/g, erweiterte Unsicherheit 0.10 % (k=2); Maleinsäure, Fluka, 92816-5G, TraceCERT®, Standard für quantitative NMR, Lot#: BCBB7987, zertifizierte Reinheit 99.79 % g/g, erweiterte Unsicherheit 0.07 % (k=2); 3,5-Dinitrobenzoesäure, Fluka, 15639-5G, TraceCERT®, Standard für quantitative NMR, Lot#: BCBC1483, zertifizierte Reinheit 99.66 % g/g, erweiterte Unsicherheit 0.07 % (k=2); Benzoesäure, NIST (Gaithersburg, USA) Standard reference material Lot#: 39j, Calorimetric Standard; zertifizierte Reinheit 99.9958 % g/g, erweiterte Unsicherheit 0.0027 % (k=2); Dimethylsulfon, Fluka, 41867-5G, TraceCERT®, Standard für quantitative NMR, Lot#: BCBB9414V, zertifizierte Reinheit 99.65 % g/g, erweiterte Unsicherheit 0.08 % (k=2);

Durochinon, Fluka, 06856-5G, TraceCERT®, Standard für quantitative NMR, Lot#: BCBD0230V, zertifizierte Reinheit 99.30 % g/g, erweiterte Unsicherheit 0.13 % (k=2).

2.2. Probenvorbereitung

Es wird mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt. 2,5 – 22 mg der Probe und 20 mg (± 2 mg) des Referenzmaterials werden in separate Aluminium-Pfännchen auf einer Ultra-Mikro Waage exakt eingewogen und in ein 1,5 mL Glasgefäß gegeben. Nach Zugabe von 0,7 mL deuteriertem Lösemittel wird die Lösung im Ultraschallbad für 15 min behandelt und in 5 mm NMR-Röhrchen überführt.

2.3. NMR Messung

Alle Messungen wurden an einem Bruker Avance 500 Spektrometer durchgeführt. Dabei wurde ein 5 mm Breitband-Invers Probenkopf mit z-Gradient verwendet. Die detaillierten NMR-spezifischen Angaben zur Methode sind in [5] beschrieben.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Methodenoptimierung

Zur Erreichung der hohen Präzision für die relativ geringen Probenmengen ist die Berücksichtigung zahlreicher Vorkehrungen nötig (detaillierte, NMR-spezifische Beschreibung hierzu siehe [5]).

Bei der Einwaage sind insbesondere elektrostatische Aufladungen und Feuchtigkeitsadsorptionen zu vermeiden. Eine Luftauftriebskorrektur könnte einen, wenn auch kleinen, systematischen Fehler verringern. Die für die Berechnung des Korrekturfaktors erforderliche Materialdichte ist jedoch oft nicht erhältlich.

Auch die NMR-Messung und –Auswertung gestaltet sich deutlich aufwendiger, als dies für das automatisierte, weniger präzise Verfahren für den Einsatz in der Gemischanalytik erforderlich ist. Zentraler Aspekt ist die Einhaltung einer Wartezeit zwischen den Pulsen, die mindestens dem siebenfachen der longitudinalen Relaxationszeit T_1 der Kernspin-Magnetisierung in der Lösung entsprechen muss. Es wurden T_1 -Zeiten zwischen einigen hundert Millisekunden und bis zu 40 Sekunden beobachtet. Das bedeutet, die T_1 -Zeiten müssen jeweils vor der eigentlichen Quantifizierungsmessung ermittelt werden. Außerdem ist ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) der ausgewerteten Signale von mindestens 20000 notwendig. Um diese elementaren Bedingungen zu erfüllen, muss in manchen Fällen die Messzeit auf mehrere Stunden erhöht werden.

Die Bearbeitung der Spektren (Phasen- und Basislinienkorrektur) muss manuell und mit höchster Sorgfalt erfolgen. Die Integrationsbereiche werden jeweils 50 Hz außerhalb der ^{13}C -Satelliten gesetzt. Dies stellt einen Kompromiss zwischen bestmöglicher Erfassung des Signals und Vermeidung von Überlappungen mit Nachbarsignalen dar.

Die Berechnung der Reinheit P einer Substanz X erfolgt nach der folgenden Formel durch Referenzierung auf den internen Standard Std :

$$P_X = \frac{I_X}{I_{Std}} \cdot \frac{N_{Std}}{N_X} \cdot \frac{M_X}{M_{Std}} \cdot \frac{m_{Std}}{m_{Probe}} \cdot P_{Std}$$

Dabei ist I das Integral, N die Anzahl der für das Signal verantwortlichen Spins (Protonen), M die Molekülmasse und m die Masse.

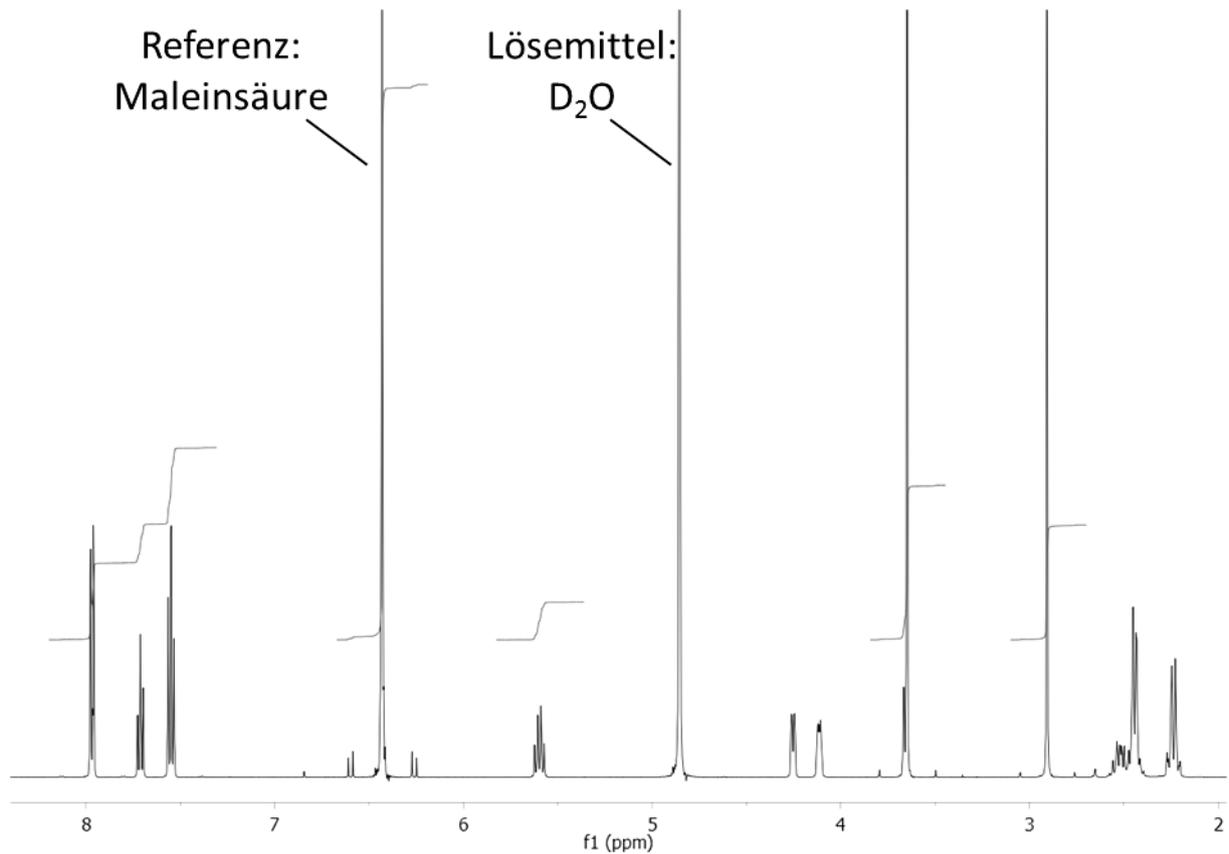


Abb. 1. ^1H -NMR Spektrum von Cocain*HCl in D_2O mit internem Standard Maleinsäure und ausgewerteten Integralen.

3.2. Messunsicherheit

Die Messunsicherheit des Verfahrens wurde im Rahmen der Validierung über zwei verschiedene Ansätze bestimmt. Für die Bestimmung nach dem “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement” (GUM) [6] wurden die Teilbeiträge der Messunsicherheit (Tab. 1) entsprechend des Ursache-Wirkungs-Diagramms (Abb. 2) ermittelt und in einer abschließenden Berechnung zusammengefasst.

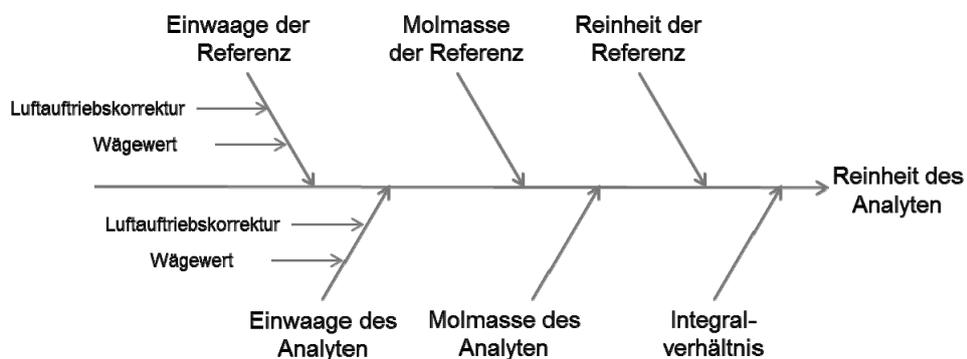


Abb. 2. Ursache-Wirkungs-Diagramm gemäß Eurachem/CITAC Guide [7].

Die größten Teilbeiträge liefern das Integralverhältnis (Maß für die Gerätepräzision) und die Unsicherheit für die Reinheit des Referenzmaterials.

Tab. 1. Unsicherheitsbudget.

Teilbeitrag	Standardunsicherheit in %
Integralverhältnis	0.044
Molmasse Referenz	0.005 - 0.010
Molmasse Analyt	0.005 - 0.010
Einwaage Referenz	0.002 - 0.020
Einwaage Analyt	0.002 - 0.020
Reinheit Referenz	0.000 - 0.100
Kombinierte Unsicherheit	0.040 - 0.110
zusätzlicher systematischer Fehler durch Nichtberücksichtigung des Luftauftriebs	0.000 - 0.035

Die Messunsicherheit wurde auch nach dem "NORDTEST-Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories" [8] berechnet. Hierbei wird die Unsicherheit des gesamten analytischen Prozesses in einem Schritt betrachtet. Dafür wurden bei über 50 Messungen jeweils ein ZRM gegen ein anderes quantifiziert. Für Einwaagen ab 5mg lag die kombinierte Messunsicherheit bei 0,15 %. Beide Verfahren führen demnach zu vergleichbaren Ergebnissen. Die kombinierte Messunsicherheit der Methode u_c wurde auf 0,15 % festgelegt. Daraus ergibt sich eine erweiterte kombinierte Messunsicherheit U (für $k=2$, Vertrauensbereich $\approx 95\%$) von 0,30 %.

Sofern die eingewogene Probenmenge von 5 mg oder das S/N der ausgewerteten Signale von 20000 unterschritten werden, muss die Messunsicherheit angepasst werden. Diese Abhängigkeiten wurden im Rahmen der Validierung ermittelt. Die exakte Angabe der Messunsicherheit ist jedoch nicht in allen Fällen möglich. So können zum Beispiel Signale von Verunreinigungen in den Integrationsbereich fallen, wie beispielhaft in Abbildung 3 illustriert wird. Diese müssen dann, sofern möglich, heraus gerechnet werden. Der exakte Einfluss dieser Subtraktion auf die Messunsicherheit muss noch untersucht werden.

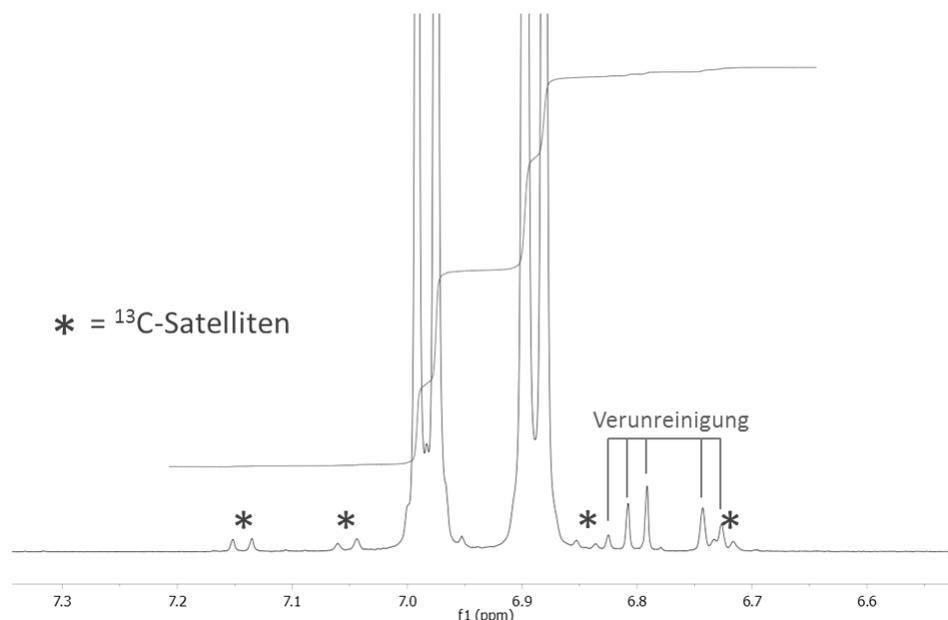


Abb. 3. Bereich der aromatischen Protonen eines ^1H -NMR Spektrums von Heroin*HCl in D_2O mit Darstellung der ^{13}C -Satelliten und der Signale von Verunreinigungen.

3.3. Bisherige Reinheitsbestimmungen

Nachfolgend sind jene Substanzen aufgelistet, die als Standards auf Reinheit überprüft wurden. Teilweise wurden mehrere Proben einer Substanz quantifiziert.

(2-CB) 4-Brom-2,5-dimethoxyphenylethylamin	(JWH-250) 2-(2-Methoxyphenyl)-1-(1-pentylindol-3-yl)ethanon	Methamphetamin
(6-MAM) 6-Monoacetylmorphin	Levomepromazin	Methylon
Acetylcodein	(m-CPP) meta-Chlorphenylpiperazin	Methylphenobarbital
Acetylthebaol	(MDA) 3,4-Methylenedioxyamphetamin	Morphin
Amphetamin	(MDEA) 3,4-Methylenedioxy-N-ethylamphetamin	Narcotin
Boldenon-undecanoat	(MDMA) 3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin	Papaverin
Cocain	Mephedron	Paracetamol
Codein	Mescalin	Promazin
Coffein	Methadon	Promethazin
Harmalin		Psilocin
Harmin		Psilocybin
Heroin		Strychnin
(JWH-081)		Thebain
4-Methoxy-naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanon		Vardenafil

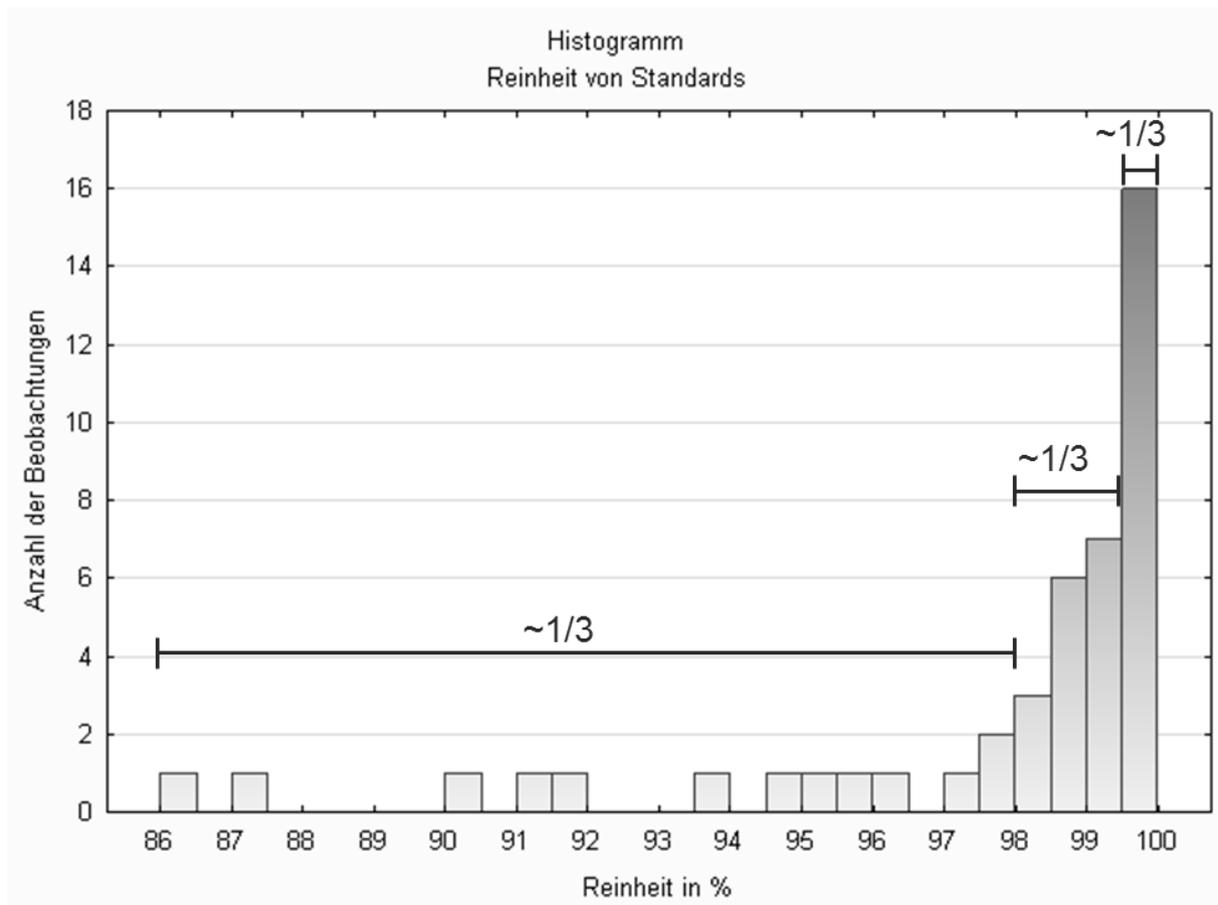


Abb. 4. Häufigkeitsverteilung der ermittelten Reinheiten von mittels qNMR überprüften analytischen Standards.

Die Verteilung der ermittelten Reinheiten zeigt Abb. 4. Erwartet wurde in allen Fällen ein „reiner“ Standard mit einem Gehalt von nahezu 100 %. Die bisherigen Ergebnisse können in drei in etwa gleich große Gruppen unterteilt werden: Bei einem Drittel der Standards lag die Reinheit über 99,5 %, bei einem weiteren Drittel noch über 98,0 %, was auch noch als unkritisch zu bewerten ist. Das restliche Drittel der Ergebnisse verteilt sich über einen weiten Bereich bis zu einer Reinheit von lediglich 86 %. Die Verwendung dieser Standards ohne Berücksichtigung der tatsächlichen Reinheit würde für die (z.B. chromatographische) Analyse systematische Fehler verursachen. Es ist zu erwarten, dass die Größenordnung dieses Fehlers meist nicht durch die festgelegte Messunsicherheit der Verfahren erfasst wird.

4. Schlussfolgerung

Die bisher durchgeführten Quantifizierungen belegen, dass die Reinheiten der analytischen Standards in ca. jedem 3. Fall deutlich vom Erwartungswert abweichen. Die Verwendung dieser Standards für die Quantifizierung führt unweigerlich zu systematischen Abweichungen. Mit der qNMR steht ein äußerst präzises Qualitätssicherungswerkzeug für einen variablen Einsatz zur Verfügung. Die exakte Reinheitsbestimmung mittels qNMR ermöglicht die Verwendung von Korrekturfaktoren für analytische Standards geringerer Reinheit und damit die Vermeidung der systematischen Fehler. Die Anwendung des beschriebenen Verfahrens zur regelmäßigen Reinheitsüberprüfung von Standards erhöht deutlich die Verlässlichkeit der quantitativen Analyseergebnisse.

5. Danksagung

Ich danke Thomas Schäfer, Vincent Guillou, Thomas Andermann, Udo Zerell und Frank Malz für die hilfreichen Kommentare. Außerdem danke ich Christine Hellriegel, Alex Rueck, Fabian Wahl und Michael Weber von der Firma Sigma-Aldrich für die wertvollen Anregungen und ihre Bereitschaft, unsere Kundenwünsche zu berücksichtigen.

6. Literatur

- [1] Malz F. Quantitative NMR-Spektroskopie als Referenzverfahren in der analytischen Chemie. Dissertation; Humboldt-Universität; Berlin; 2010.
- [2] Bundesministerium für Gesundheit. Europäisches Arzneibuch, Amtliche deutsche Ausgabe (6.3). Deutscher Apotheker Verlag; Stuttgart; 2009.
- [3] Hellriegel C. New Generation of Certified Reference Materials by Quantitative ^1H -NMR (qNMR). Sigma-Aldrich; Buchs; 2010.
- [4] Hays PA. Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) Methods for Determining the Purity of Reference Drug Standards and Illicit Forensic Drug Seizures. *J Forensic Sci* 2005; 50: 1-19.
- [5] Schönberger T. Determination of Standard Sample Purity using the High Precision ^1H -NMR Process. *Anal Bioanal Chem* 2012; 403; 247-254.
- [6] Joint Committee for Guides in Metrology. Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. 2008.
- [7] EURACHEM. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, EURACHEM/CITAC Guide CG 4, Second Edition. 2000.
- [8] Magnusson B, Näykki T, Hovind H, Krysell M. Nordtest Report, Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Edition 2. Nordtest; Espoo; <http://www.nordicinnovation.net/nordtestfiler/tec537.pdf>; 2004.