

Der Workflow im Fokus

Praktische Umsetzung eines gravimetrischen Ansatzes bei der Probenvorbereitung

Dr. Joanne Ratcliff, Mettler Toledo AG

In den letzten 12 Monaten hat es rege Diskussionen bezüglich der Vorteile eines gravimetrischen Ansatzes bei der Vorbereitung von Proben gegeben <1–5>. Diese wurden von Branchenorganisationen anerkannt, beispielsweise von der United States Pharmacopeia (USP); die USP schlug im Pharmacopeial Forum (PF) September/Oktober 2012 vor, Unterkapitel <1251> „Weighing on an Analytical Balance“ zu aktualisieren.

Die Analytical Research and Development Group (AR&D) von Pfizer in Groton, USA hat sich dieses neuen Ansatzes zur Probenvorbereitung mithilfe eines neuartigen vollautomatischen gravimetrischen Probenvorbereitungssystems angenommen. In detaillierten Studien wurden die Unterschiede in der Probenvorbereitung und den Standards zwischen manuellen volumetrischen Verfahren und den neuen automatisierten gravimetrischen Methoden aufgezeigt.

In diesem Artikel werden die in zwei spezifischen, von der AR&D Group in Groton durchgeführten Versuchen erhaltenen Daten vorgestellt. In beiden Versuchen wurde die nicht patentgeschützte Substanz Koffein verwendet. Der erste Versuch konzentrierte sich auf die Wiederholbarkeit und Genauigkeit der Probenvorbereitung. Der zweite Versuch war eine Linearitätsstudie. In beiden Versuchen wurden die Proben manuell mithilfe volumetrischer Kolben vorbereitet und mit einer neuen, vollautomatischen Methode verglichen, bei der die Proben in einem gravimetrischen Dosiersystem, dem Quantos QX1 von Mettler Toledo, vorbereitet wurden. Das QX1-Dosier-

system beinhaltet eine 6-fache Mikrowaage zum Wägen von Substanzen und Lösungsmitteln mit automatisiertem Wechsel von bis zu zehn Substanzdosierköpfen und fünf Lösungsmitteldosierköpfen.

Wiederholbarkeit und Genauigkeit

Beim ersten Versuch sollte die Wiederholbarkeit und Genauigkeit der manuellen Probenvorbereitung mit der der neuen, automatisierten gravimetrischen Methode verglichen werden.

Es wurden sechs gleiche Lösungen zubereitet. Dazu wurden 20 mg Koffein abgewogen und in einem volumetrischen Kolben mit einer Methanol-Wasser-Mischung im Verhältnis 30:70 auf 50 ml aufgefüllt. Diese Prozedur dauerte insgesamt 50 Minuten. Das Lösen/Mischen der Proben auf einem Rüttler nahm 15 Minuten davon in Anspruch, sodass die manuelle Arbeitszeit 35 Minuten an Mitarbeiterkapazität (MAK) entsprach – 5 min pro Probe, Wäge- und Lösevorgang, zuzüglich 5 min für die



Foto: © iStockphoto.com / Danga Prater

	Probename	Ergebnis Id	Name	Bereich (µV*sec)	Potenz 1 (Menge/Einheit)
1	M1	18744	Koffein	5568747,28	0,413
2	M2	18745	Koffein	5694384,72	0,423
3	M3	18746	Koffein	5646098,85	0,419
4	M4	18747	Koffein	5450694,28	0,405
5	M5	18748	Koffein	5501403,13	0,408
6	M6	18749	Koffein	5632460,66	0,418
∅					0,41
% RSD					1,67

Tab. 1 Manuelle Vorbereitung von Proben – Wiederholbarkeit und Genauigkeit

	Probename	Ergebnis Id	Name	Bereich (µV*sec)	Potenz 1 (Menge/Einheit)
1	A1	17812	Koffein	5278355.59	0,377
2	A2	17813	Koffein	5264847.66	0,376
3	A3	17814	Koffein	5297039.30	0,378
4	A4	17815	Koffein	5265959.19	0,376
5	A5	17816	Koffein	5297020.61	0,378
6	A6	17817	Koffein	5224532.00	0,373
∅					0,38
% RSD					0,49

Tab. 2 Automatisierte gravimetrische Vorbereitung von Proben – Wiederholbarkeit und Genauigkeit

Unbekannte Proben	Lösung (g)	Fläche	Wg	Wa	des Zielwerts(%)
1	100	5468397	39,831	40,88	0,974339
2	100	6241589	45,6575	45,34	1,007002
3	100	4505394	32,5741	32,95	0,988592
4	100	4987986	36,2108	36,12	1,002513
5	100	6727337	49,3179	49,06	1,005257

Tab. 3 „Unbekannte“ Proben für die manuelle Linearitätsstudie

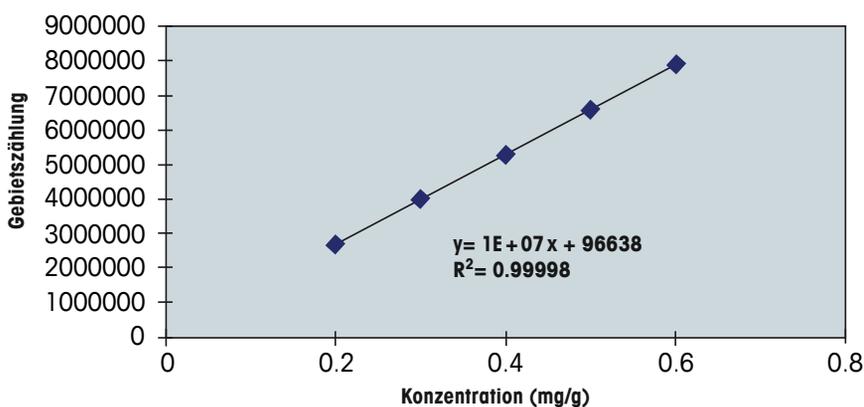


Abb. 1 Linearitätsdiagramm der Daten der automatisierten gravimetrischen Probenvorbereitung

Unbekannte Proben	Lösung (g)	Fläche	Wg	Wa	des Zielwerts(%)
1	9,6499	3981080	2,90039	2,895	1,003751
2	9,7724	4636669	3,43293	3,42	1,005572
3	9,6779	5297030	3,89423	3,871	1,007719
4	9,6714	5926070	4,36235	4,352	1,004034
5	9,5548	6557919	4,77689	4,777	1,001583

Tab. 4 „Unbekannte“ Proben für die automatisierte gravimetrische Linearitätsstudie

Vorbereitung des Verdünnungsmittels. Tabelle 1 zeigt die manuellen volumetrischen Daten. Die zentrale Kennzahl ist die relative Standardabweichung (RSD) dieser Proben von 1,67 % (Tab.1).

Tabelle 2 zeigt die äquivalenten, mit der automatisierten gravimetrischen Methode erzielten Daten. Es wurden sechs gleiche Lösungen zubereitet. Dazu wurden 5 mg Koffein abgewogen und mit 12,5 g des gleichen Verdünnungsmittels (Methanol/Wasser im Verhältnis 30:70) direkt in eine Ampulle gegeben. Diese Prozedur dauerte insgesamt 30 min; 10 min davon waren Vorbereitungszeit (z. B. Füllen und Montieren von Pulver- und Flüssigdosierköpfen und Einstellen der Sequenz), weitere 20 min waren Laufzeit. Die RSD bei diesen Proben betrug 0,49%. (Tab. 2)

	Manuelle Vorbereitung	Automatisierte Vorbereitung
Substanzmenge	20 mg Substanz + 50 mL Verdünnungsmittel	5 mg Substanz + 12,5 g Verdünnungsmittel
Zeit	50 min (ges.) 35 min (MAK)	30 min (ges.) 10 min (MAK)
Genauigkeit	% RSD = 1,67	% RSD = 0,49

Dieser Versuch hebt drei Vorteile der automatischen gravimetrischen Vorbereitung von Proben hervor: Es werden 75 % weniger an Substanz und Lösungsmittel gebraucht, um die Probenlösungen herzustellen; mehr als 70 % der Arbeitszeit wird bei der Probenvorbereitung eingespart, und vor allem erhöht sich die Genauigkeit um mehr als das Dreifache.

Linearitätsstudie

Der zweite Versuch war eine Linearitätsstudie. Um die manuellen Daten zu erhalten, wurden fünf verschiedene Konzentrationen von 0,2 bis 0,6 mg/ml in 100-ml-Kolben zubereitet. Dies dauerte 60 min. Die lineare Regressionsanalyse zeigte einen Korrelationskoeffizienten von 0,99473 (Abb. 1).

Fünf unbekannte Proben wurden mit Konzentrationen zwischen 0,3 und 0,5 mg/mL vorbereitet. Tabelle 3 zeigt die tatsächlich in die Lösung eingewogene Koffeinmenge (Wv) im Gegensatz zu der aus dem Vergleich mit dem Linearitätsdiagramm ermittelten Menge (Wa). Die Übereinstimmung dieser beiden Werte variiert zwischen 97 und 100 % (letzte Spalte).

Es wurde ein äquivalenter Versuch durchgeführt, um die automatisierten gravimetrischen Daten zu erhalten. Diesmal wurden die Lösungen in 10 g Lösungsmittel statt 100 ml Lösungsmittel zubereitet. Es dauerte 40 min, die Lösungen vorzubereiten (zuzüglich 5 min zur Einstellung der Sequenz). Bei diesem Versuch ergab die lineare Regressionsanalyse einen beinahe perfekten Korrelationskoeffizienten von 0,99998 (siehe Abb. 1).

Wie beim manuellen Versuch wurden fünf unbekannte Proben mit Konzentrationen zwischen 0,3 und 0,5 mg/g vorbereitet und die Masse der einzelnen Lösungen aufgezeichnet. Die letzte Spalte in der „Unbekannten“-Tabelle 4 zeigt, dass die tatsächlichen Koffeingewichte im Vergleich zu den ermittelten Koffeingewichten für die einzelnen unbekannt Proben jeweils zu 100 % übereinstimmten.

	Manuelle Vorbereitung	Automatisierte Vorbereitung
Probengröße	100 mL Verdünnungsmittel	10 g Verdünnungsmittel
Zeit	60 min (ges.)	45 min (ges.)
Korrelationskoeffizient	0,99473	0,99998
Unbekannte Proben (% intent)	97 – 100 %	100 %

Die in der Linearitätsstudie ermittelten Daten zeigen die überragende Qualität der automatisierten gravimetrischen Methode: Es werden 90 % weniger Substanz und Lösungsmittel gebraucht; 25 % der Zeit werden eingespart, der Korrelationskoeffizient wird verbessert und die unbekannt Proben werden präzise identifiziert.

Praktische Vorteile der automatisierten gravimetrischen Probenvorbereitung

Die Genauigkeit der vorbereiteten Proben verbessert sich erheblich; dies wirkt sich automatisch positiv auf die Qualität der mit den Proben erzielten Analyseergebnisse aus. Die kürzere Arbeitszeit sowie die eingesparten Substanz- und Lösungsmittelmengen können sich erheblich auf die Laboreffizienz und die laufenden Kosten auswirken.

„Die Probenvorbereitung ist von zentraler Bedeutung für den analytischen Arbeitsablauf. Wir sind stolz auf unsere Zusammenarbeit mit Mettler-Toledo an der Entwicklung und vorläufigen Bewertung von Quantos QX1. Bei einem gezielten automatisierten (gravimetrischen) Probenvorbereitungsansatz mit dem QX1 konnte eine verbesserte Genauigkeit, ein geringerer Substanz- und Lösungsmittelverbrauch und eine kürzere Arbeitszeit für Analytisten im Vergleich zur manuellen Vorbereitung nachgewiesen werden. In unserer weiteren Arbeit mit dem System wollen wir herausfinden, wie und wo es routinemäßig am besten eingesetzt werden kann.“



Joanne Ratcliff ist Communications Project Manager für Laborwägesysteme bei Mettler Toledo. Dank ihres PhD in analytischer Chemie und ihrer 14 Jahre bei Mettler Toledo verfügt sie über umfassende Erfahrung im Umgang mit automatisierten Wäge-, Pulverdosisierungs- und Probenvorbereitungslösungen in Laboranwendungen in der pharmazeutischen Industrie. Zu den Anwendungen zählen unter anderem Kapselbefüllung, Abfüllen von Chemikalien in Flaschen, Vorbereitung von Analyseproben für QA/QC und Compound Management.

■ joanne.ratcliff@mt.com

Danksagungen

Dank an Mengyu Wu, Wellesley College, Wellesley, MA für die Durchführung der Versuche im Rahmen eines Sommerpraktikums bei Pfizer
Gang Xue, Jian Wang, Beverly Nickerson, George Reid, Pfizer Global R&D, Groton, USA

Literatur

- [1] „One-click sample preparation“, Joanne Ratcliff, World Pharmaceutical Frontiers, März/April 2012, S. 77.
- [2] „Innovations in Gravimetric Preparation of Analytical Solutions: Regulatory and Compensational Perspectives“, Gregory Martin, American Laboratory, Juni/Juli 2012
- [3] „The benefits of automated gravimetric sample preparation“, Joanne Ratcliff & Jan Prochnow, q&more, März 2012.
- [4] „Reducing Variability and Out-of-Specification Results by Implementing High Quality Gravimetric Sample Preparation (GSP)“, Charles Ray, Klaus Fritsch, Joanne Ratcliff, ISPE, Februar/März 2012.
- [5] On-demand-Webinare auf www.mt.com/Q-webinars: „Recent USP changes: Regulatory and quality aspects of sample preparation“; „What’s the matter with Sample Prep? Novel approaches and solutions“; „Preventing costly out-of-specification investigations“.



Gang Xue, Associate Research Fellow, Pfizer ARD