

Exakte Konzentrationen bei geringen Kosten

Gravimetrische Probenvorbereitung verbessert die Effizienz und die Qualität von Arbeitsabläufen in der Analytik

Dr. Joanne Ratcliff und Dr. Jan Prochnow, Mettler-Toledo AG

Die Präparation von analytischen Proben- und Standardlösungen im Pharma-Qualitätskontroll-Labor ist ein typischer manueller Vorgang, bei dem Feststoffe eingewogen und im Messkolben bis zur Messmarke hin verdünnt werden. Gewöhnlich wird ein Minimum von 50 mL Lösung für analytische Messungen hergestellt, wobei nur ein geringer Bruchteil für die eigentliche Messung verwandt wird. Mehr als 99,9% einer hergestellten Lösung werden daher als Abfall verworfen.

Die Automatisierung dieses Arbeitsprozesses sorgt dafür, dass der Einfluss von der Arbeitsweise des Bedieners und Umgebungsfaktoren erheblich reduziert wird. Erfolgt die Zudosierung von Flüssigkeiten gravimetrisch, dann wird die Präzision verbessert und der Lösemittel- und Substanzverbrauch um mehr als 75% gesenkt.



Herkömmliche Probenvorbereitungstechnik

Das herkömmliche Protokoll zur Herstellung analytischer Proben oder Standards besteht aus der Einwaage der Substanz mittels Analysenwaage, dem Transfer in einen geeigneten Messkolben und anschließender Verdünnung durch Auffüllen bis zur Marke. Die Volumina der typischerweise verwendeten Messkolben betragen 50 oder 100 mL, während die Injektionsvolumina für moderne HPLC- oder UHPLC-Analytik typischerweise im Bereich von nur 10–20 µL liegen. Es gilt nämlich: Je größer der Messkolben, desto geringer ist der relative Fehler. Daher werden mehr als 99,9% der Probelösung letztendlich verworfen.

Im Wesentlichen sprechen zwei Gründe für die Präparation eines solchen Überschusses an Probenlösung: Einerseits können auf Analysenwaagen keine Mengen eingewogen werden, die kleiner sind als die Minimaleinwaage, andererseits sind beliebig kleine Messkolben nicht praktikabel, weil sonst der Fehler durch ungenaue Mensikus-Ablesung immer größer wird.

Das Einwiegen von Probensubstanz und Lösemittel anstelle der Verwendung von Messkolben verbessert Reproduzierbarkeit und Rückführbarkeit und minimiert die Schwierigkeiten hinsichtlich volumetrischer Kolben. Die verwendeten Vials sind klein und zudem Einweggefäße, wodurch die Risiken von Kreuz-Kontamination ausgeschlossen werden. „Versteckte“ Kosten für Reinigung der Kolben und die Entsorgung der Probenlösungen werden ebenfalls deutlich reduziert.

Messunsicherheit und Minimaleinwaage

Jede analytische Waage hat eine spezifische Minimaleinwaage entsprechend der USP-Bestimmungen. Das bedeutet, dass eine Einwaagegrenze für Festsubstanzen existiert, die sicherstellt, dass die erforderliche Genauigkeit eingehalten wird. Die relative Messgenauigkeit einer Waage hängt nach einer hyperbolischen Funktion vom Gewicht des Wägeguts ab (siehe Abb. 1). Die Obergrenze der relativen Messgenauigkeit bestimmt die Untergrenze der Einwaage – die sogenannte Minimaleinwaage.

Die Minimaleinwaage wird bestimmt durch die Wiederholpräzision, aber sie hängt auch von Umwelteinflüssen, wie Erschütterungen und Luftbewegungen sowie von der Geschicklichkeit des Bedieners ab. Daher wird empfohlen, die Minimaleinwaage der Analysenwaage mit einem Sicherheitsfaktor zu multiplizieren, üblicherweise Faktor zwei bis drei – je nachdem, wie stabil die Arbeitsbedingungen und wie kritisch die Einwaagen sind. Um dies in der Praxis zu verdeutlichen: Bei einer Minimaleinwaage von 10 mg ist der anzuwendende Sicherheitsfaktor 2, so dass 20 mg die minimale Einwaage sind, um den Präzisionsanforderungen zu genügen.

Grenzen der volumetrischen Probenvorbereitung

Werden Messkolben der Klasse A verwandt, dann muss mehr Probesubstanz als erforderlich verwendet werden, weil nur bestimmte Messkolbengrößen verfügbar sind. In der Praxis wird daher die Substanzeinwaage aufgerundet, um auf die verfügbare Messkolbengröße zu kommen. Wird allerdings das Lösemittel gravimetrisch zudosiert, dann kann mit einer minimalen Lösemittelmenge die gewünschte Konzentration eingestellt werden.

Der typische Konzentrationsbereich in der Pharma-Analytik erfordert Lösemittelmengen im Milliliterbereich, was Einwaagen im Gramm-Bereich entspricht. Diese können auf Analysenwaagen mit sehr hoher Präzision eingewogen werden, weil sie mehrere Größenordnungen oberhalb der Minimaleinwaage liegen, und die Ungenauigkeit der Wägung hyperbolisch mit zunehmendem Netto-Gewicht der Einwaage abnimmt.

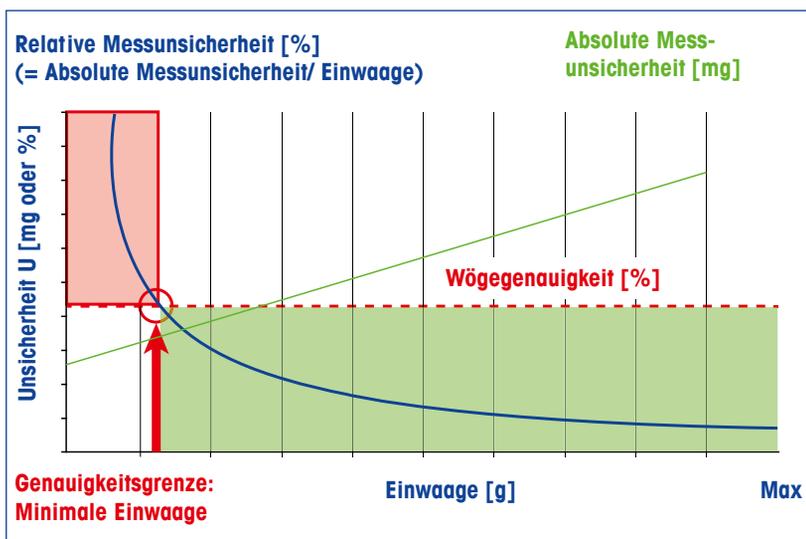


Abb. 1 Hyperbolische Abhängigkeit der Messunsicherheit von der Netto-Einwaage. Die Genauigkeitsgrenze ist die Minimaleinwaage

Einsparung von Analysesubstanz und Lösemittel

Minimaleinwaage und der anzuwendende Sicherheitsfaktor sind stark bedienerabhängig und werden durch die Umgebung beeinflusst. Die automatische Pulverdosiierung mit dem Quantos Pulver-Dosiersystem reduziert diese nachteiligen Einflüsse und kann somit sowohl die Minimaleinwaage als auch den Sicherheitsfaktor signifikant verkleinern. Dieser beträgt 1,5 – sofern die externen Bedingungen stabil sind. So weist zum Beispiel die Analysenwaage XP 205 nach USP eine Minimaleinwaage von typischerweise 21 mg und einen empfohlenen Sicherheitsfaktor von 2 auf. Die automatische Dosierwaage des Quantos Systems ermöglicht eine Minimaleinwaage von 8 mg und der empfohlene Sicherheitsfaktor beträgt 1,5.

Die manuelle Herstellung einer Probelösung mit der Konzentration von 1.0 mg/mL mit einer Dichte von 1 g/mL benötigt unter Verwendung von Messkolben 50 mg Proben-substanz und 50 mL Lösemittel. Wenn die Lösung automatisch und gravimetrisch angesetzt wird, werden lediglich 12 mg Proben-substanz und 12 mL Lösemittel benötigt. Dies ermöglicht eine deutliche Verringerung der Kosten, die erforderlich sind, um die USP-Anforderungen einzuhalten: Es werden 76 % an Proben-substanz und Lösemittel eingespart.

Abbildung 2 zeigt, wie Minimaleinwaage, Zielkonzentration und die zur Verfügung stehenden Messkolbengrößen die erforderlichen Mengen an Proben-substanz und Lösemittel bestimmen. Die roten und grünen Kurven stellen den Lösemittelbedarf für die volumetrische beziehungsweise die gravimetrische Methode in Abhängigkeit von der Zielkonzentration dar.

Die rote Kurve dieser Graphik demonstriert, dass mit der volumetrischen Methode lediglich vier einzelne Konzentrationen (horizontale Kurvenzüge) mit der Minimaleinwaage von 42 mg bereit werden können. Für alle übrigen Konzentrationen muss signifikant mehr Lösemittel eingesetzt werden, weil die Menge eingewogener Proben-substanz an das nächsthöhere Messkolbenvolumen angepasst werden muss.

Die grüne Linie in der Graphik zeigt hingegen, dass bei gravimetrischer Zugabe des Lösemittels für alle Zielkonzentrationen lediglich die Minimaleinwaage an Probe eingesetzt werden muss (ersichtlich am stetigen Verlauf der Kurve). Ein Aufrunden aufgrund der verfügbaren Messkolbengrößen ist nicht erforderlich. Die Dosierung des Lösemittels mittels Wägung anstatt volumetrischer Abmessung ermöglicht stets die Zugabe der zur Zielkonzentration erforderlichen Menge.

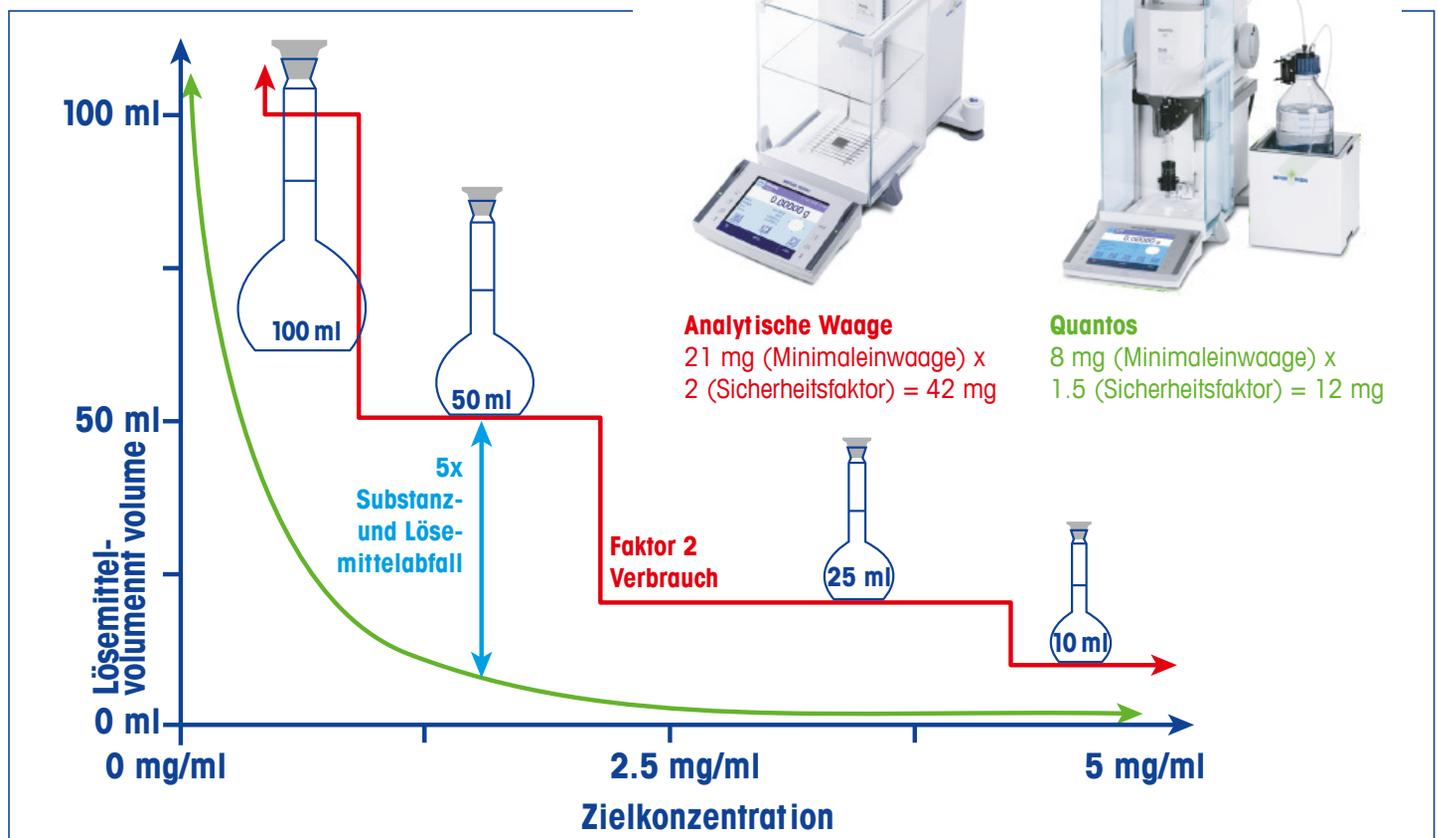


Abb. 2 Darstellung der benötigten Lösemittelmengen in Abhängigkeit von der gewünschten Konzentration
Rote Kurve: volumetrisch bei Verwendung von Messkolben **Grüne Kurve:** gravimetrisches Verfahren



Joanne Ratcliff ist im Produktmanagement bei Mettler-Toledo im Geschäftsfeld der „Quantos Automated Dosing Solutions“ seit 13 Jahren tätig. Ihre Spezialgebiete sind automatische Wägung, Pulverdosisierung und Probenvorbereitung aus. Als Chemikerin mit Schwerpunkt Analytik promovierte sie in physikalischer organischer Chemie an der Universität von Swansea in Wales, GB.



Jan Prochnow, leitet das Product Management und Business Development der Quantos Business Unit, Mettler-Toledo, in Greifensee, Schweiz. Nach dem Studium der Physik an der RWTH Aachen promovierte er am Forschungszentrum CERN in Genf.

Reproduzierbarkeit der Proben-Konzentrationen

Das Verfahren der automatischen gravimetrischen Dosierung von Feststoffen und Flüssigkeiten weist eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der hergestellten Probenkonzentrationen auf. Um dies zu demonstrieren, wurden neun Lösungen einer pharmazeutischen Wirksubstanz (API) einzeln hergestellt, jeweils manuell und automatisiert. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Konzentrationen wurden die Lösungen mittels HPLC analysiert.

Es wurden neun Lösungen mit der Zielkonzentration 0,603 mg/g hergestellt. Dazu wurden 10 mg der Wirksubstanz automatisch in braune 20 mL Glas-Vials eingewogen – der Variationskoeffizient betrug 0,89%. Anschließend wurde das Lösemittel – eine Mischung aus Acetonitril / Wasser im Verhältnis 80 / 20 – gravimetrisch auf Basis der genauen Einwaage der Wirksubstanz in die neun Vials zudosiert. Der Variationskoeffizient der so eingestellten Konzentration betrug 0,001%. Bei der anschließenden HPLC-Analyse wurden 2 µL Probenvolumina injiziert. Die Peakflächenauswertung der automatisiert hergestellten Lösungen ergab eine relative Standardabweichung von 0,19%, die der einzeln manuell bereiteten Lösungen jedoch 0,60%. Um zwischen den Reproduzierbarkeiten der Probenpräparation und der HPLC-Analyse unterscheiden zu können, wurden eine Probelösung zehnfach analysiert. Dabei wurde für die Peakflächenauswertung der zehn Wiederholungsläufe der HPLC-Analysen ein Variationskoeffizient von 0,21% erhalten.

Bei Herstellung einer Standard-Lösung mittels automatisierter Wägung von Probensubstanz und Lösemittel liegt die Varianz der Zielkonzentration der Lösungen unterhalb derjenigen der-HPLC-Analyse und ist damit nicht mehr signifikant.

Die automatische gravimetrische Präparation von Standard- und Probelösungen verbessert aufgrund der höheren Reproduzierbarkeit die Analysenergebnisse und reduziert die Kosten jeder Versuchsreihe.

Zusammenfassung

Die Verwendung von Messkolben und der manuelle Wägeprozess erhöhen den Verbrauch von Probensubstanz und Lösemittel beträchtlich. So werden 99,9% der hergestellten Lösungen verworfen und entsorgt. Automatische gravimetrische Herstellung von Standard- und Probelösungen reduziert die Minimaleinwaage der analytischen Waage und ist unabhängig von volumetrischen Messgefäßen. So werden Aufwand und Kosten für regelkonformes Arbeiten signifikant verringert. Da das gravimetrische Verfahren eine sehr hohe Genauigkeit bei der Herstellung von Konzentrationen ermöglicht, wird die Reproduzierbarkeit erhöht und die Analysenergebnisse verbessert.

- joanne.ratcliff@mt.com
- jan.prochnow@mt.com

Weitere Informationen unter:
www.mt.com/q-sampleprep





Zielsicher die richtige Konzentration

50 % der Out-of-Specification Results in QA/QC-Laboren entstehen bei der manuellen Probenverarbeitung.

Automatisierung macht die Probenvorbereitung weniger fehleranfällig und vereinfacht diesen zeitintensiven Arbeitsschritt. Lernen Sie von den Experten auf diesem Gebiet in einem Webinar:

► www.pharmtech.com/preventing

Quantos wiegt das Lösungsmittel ebenso wie die Substanz und erreicht so exaktere Konzentrationen.

Mehr als 50 % aller weltweit führenden Pharmaunternehmen haben sich bereits für Quantos entschieden. Wann ist es bei Ihnen soweit?



► www.mt.com/quantos

METTLER TOLEDO