

Methodenverifizierung der United States Pharmacopeia(USP)- Monographie mit dem Agilent Cary 60 UV-Vis

Quantifizierung von Eisenverunreinigungen in
Magnesiumsulfat gemäß der USP-Monographie



Autoren

Ciaran Worth, Wesam Alwan
und Fabian Zieschang
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Diese Studie zeigt, wie das Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer zur Verifizierung der United States Pharmacopeia(USP)-Monographie für die Quantifizierung von Eisenverunreinigungen in Magnesiumsulfat verwendet werden kann. Das Cary 60 wurde mit einem 18-Küvetten-Wechsler ausgestattet, was die automatisierte Analyse von Blindproben, Standards und Proben mit Steuerung durch die Agilent Cary WinUV Software ermöglicht. Die verifizierte Methode wurde verwendet, um die relative Masse von Eisen in zwei Magnesiumsulfatproben unterhalb des spezifizierten Grenzwerts von $0,5 \mu\text{g/g}$ zu bestimmen. Die Ergebnisse bestätigen die Eignung des Cary 60 für pharmazeutische Qualitätskontrollanwendungen.

Einführung

Behörden auf nationaler und internationaler Ebene regulieren Pharmazeutika, um die Sicherheit, Wirksamkeit, Qualität und angemessene Kennzeichnung von Arzneimitteln sicherzustellen. Diese Behörden veröffentlichen pharmazeutische Monographien für Wirkstoffentwickler und -hersteller, um sie dabei zu unterstützen, konsistente Qualitätsstandards über die Forschungs-, Entwicklungs- und Fertigungsprozesse hinweg sicherzustellen. Maßgebliche Pharmakopöen, wie die USP, das europäische Arzneibuch (Ph. Eur.), die British Pharmacopoeia (BP), die Japanese Pharmacopoeia (JP) und die Pharmacopoeia of the People's Republic of China (ChP) veröffentlichen pharmazeutische Monographien als Teil ihrer offiziellen Kompendien. Monographien stellen Methoden für die quantitative Bestimmung von pharmazeutischen Substanzen bereit, einschließlich der Messung von Verunreinigungen innerhalb akzeptabler Grenzen, und sind für die Konformität mit gesetzlichen Bestimmungen von grundlegender Bedeutung. Die UV-Vis-Spektroskopie ist eine in zahlreichen pharmazeutischen Monographien häufig aufgeführte Technik.

Gemäß der Guten Herstellungspraxis (GMP) müssen jegliche Techniken, die zur Analyse pharmazeutischer Substanzen verwendet werden, evaluiert werden, um ihre Eignung unter den tatsächlichen Einsatzbedingungen zu beurteilen. Die USP bietet allgemeine Informationen zur Verifizierung konformer Verfahren im USP General Chapter <1226> Verification of Compendial Procedures and specific guidance on UV-Vis spectroscopic techniques in USP General Chapter <857> Ultraviolet-Visible Spectroscopy.^{1,2}

Im Rahmen einer früheren Application Note wurden mit dem **Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer** und der **Cary WinUV Software** die Messungen durchgeführt, die von vielen der in USP <857> beschriebenen Verifizierungstests verlangt werden.³ Diese Studie bietet ein Beispiel dafür, wie ein mit einem **18-Küvetten-Wechsler** ausgestattetes Cary 60 UV-Vis zur Methodenverifizierung für die Quantifizierung von Eisen in Magnesiumsulfat gemäß der USP-Monographie über Magnesiumsulfat verwendet werden kann.⁴

Das Cary 60 UV-Vis

Das Cary 60 UV-Vis ist ein flexibles, leistungsstarkes und zuverlässiges UV-Vis-System, das sich ideal für Routineanalysen zahlreicher Substanzen in pharmazeutischen Laboren eignet (Abbildung 1). Das Cary 60 UV-Vis kombiniert eine qualitativ hochwertige Datenerfassung mit niedrigen Betriebskosten, insbesondere dank seiner leistungsstarken Xenonlampe als Lichtquelle. Die Robustheit und Zuverlässigkeit der Lampe, die sich in ihrer **10-Jahres-Garantie** widerspiegelt, reduziert potenzielle Kosten für den Austausch und die erneute Validierung und maximiert gleichzeitig die Betriebsbereitschaft des Geräts.

Das Cary 60 UV-Vis wurde hinsichtlich seiner Umweltauswirkungen unabhängig geprüft und hat von My Green Lab das **ACT-Siegel (Accountability, Consistency, Transparency – Verantwortlichkeit, Konsistenz, Transparenz)** erhalten. Das Siegel gibt Auskunft über die Umweltauswirkungen des Cary 60 UV-Vis im Lauf des gesamten Lebenszyklus des Geräts.



Abbildung 1. Das Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer bietet eine 10-Jahres-Austauschgarantie für die Xenonlampe.

Das Cary 60 UV-Vis ermöglicht eine Verbesserung der Umweltauswirkungen von Laboren ohne Kompromisse bei der Produktivität oder dem wissenschaftlichen Fortschritt.

Experimentelles

Reagenzien

- **Verdünnte Salzsäure (HCl):** 1 ml HCl in 1000 ml Wasser
- **Lösung A:** 500 mg/ml Ammoniumacetat in Wasser
- **Lösung B:** 13,4 mg/ml Ascorbinsäure in Wasser
- **Farbreagenz:** 3,8 mg/ml 3-(2-Pyridyl)-5,6-di-(2-furyl)-1,2,4-triazin-5',5"-disulfonsäure, Dinatriumsalz
- **Standard-Eisenstammlösung:** 1,0 µg/ml Eisen in verdünnter HCl

Herstellung von Blindproben-, Standard- und Probenlösungen

Die USP-Monographie über Magnesiumsulfat⁴ beschreibt die Quantifizierung der relativen Masse von Eisen in einer Magnesiumsulfatprobe, die basierend auf der Analyse von drei bekannten Standardlösungen mittels UV-Vis anhand einer Regressionskurve berechnet wird.

Alle Glasteile wurden mit verdünnter HCl gewaschen. Drei Standards wurden hergestellt, indem 2,0, 5,0 und 10,0 ml der Standard-Eisenstammlösung in separate volumetrische 50-ml-Kolben überführt und mit verdünnter HCl auf 35 ml verdünnt wurden. Eine Blindprobenlösung wurde durch Überführung von 35 ml verdünnter HCl in einen volumetrischen 50-ml-Kolben hergestellt. Alle Stammlösungen wurden am Tag der Messungen hergestellt.

Zwei Probenlösungen wurden durch Überführung von 10 g Magnesiumsulfat (CAS-Nummer 7487-88-9) in einen volumetrischen 50-ml-Kolben und Verdünnung auf 35 ml mit verdünnter HCl hergestellt. Die Eisenkonzentration in den Probenlösungen wurde mithilfe der etablierten, auf die Probenmatrix abgestimmten Kalibrierungskurve bestimmt.

Tabelle 1. Für die Berechnung der relativen Masse von Eisen in Magnesiumsulfat verwendete Standards.

Standard-	Eisenkonzentration (mg/l)	Eisenmasse in Standard (µg)
Standard 1	0,04	2
Standard 2	0,1	5
Standard 3	0,2	10

Geräte

Das Cary 60 UV-Vis wurde mit einem 18-Küvetten-Wechsler ausgestattet und über die Cary WinUV Software gesteuert. Der Multiküvettenwechsler kann automatisch bewegt werden, sodass die Küvetten nacheinander positioniert werden können, was die automatisierte Messung von bis zu 18 Küvetten ermöglicht. Der Multiküvettenwechsler ermöglichte somit die unbeaufsichtigte Analyse mehrerer Standards, Proben und Wiederholungen mit einer einzigen Methode, was die Produktivität erheblich steigert.⁵ Messungen wurden mittels Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Applikationssoftware Cary WinUV Concentration wurde verwendet, um eine Konzentrationsmethode zu erstellen, mit der Blindproben-, Standard- und Probenmessungen erfasst wurden. Die Methode führte automatisch die Blindwertsubtraktion durch, erstellte eine Konzentrationskurve und berechnete die Eisenkonzentration in den Proben. Die Methodenparameter sind in Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 2. Parameter für die Applikation Agilent Cary WinUV Concentration, die für die Agilent Cary 60 UV-Vis-Methode verwendet wurden.

Parameter	Einstellung
Wellenlänge der Analyse	594 nm*
Signalmittlungszeit (SAT)	0,5 s
Spektrale Bandbreite (SBW)	1,5
Anzahl der Standards	3
Anzahl der Proben	2

* In der USP-Monographie über Magnesiumsulfat festgelegt⁴

Ergebnisse und Diskussion

Verifizierung der Methode

Der in USP <857>² beschriebene Prozess zur Verifizierung von UV-Vis-Methoden umfasst die folgenden Anforderungen:

Genauigkeit der Messungen: Die Messgenauigkeit kann durch Wiederfindungsstudien bekannter Konzentrationen des Analyten in der erforderlichen Matrix bestimmt werden.

Die Messgenauigkeit des Tests auf Eisen in Magnesiumsulfat wurde bestimmt, indem drei Magnesiumsulfat-Standardproben mit einer Nennkonzentration von 0,1 mg/l mit 2, 4 und 6 ml Eisen-Standardlösung mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml versetzt wurden. Die Konzentration des Eisens wurde dann durch Ausführung von sechs Wiederholungsmessungen (Replikaten) und Berechnung der mittleren Extinktion für jede versetzte Lösung berechnet. Die prozentuale Wiederfindung wurde mithilfe von Gleichung 1 berechnet.

Gleichung 1.

$$\% \text{ Wiederfindung} = \frac{C_1}{C_2} \times 100$$

Wobei gilt:

C_1 = gemessene Konzentration

C_2 = berechnete Konzentration

Die Wiederfindungsergebnisse von 100 ± 6 % der erwarteten Konzentration von Eisen in Magnesiumsulfat (Tabelle 3) lagen klar innerhalb der akzeptablen Grenzen von 80,0 bis 120,0 %, die von USP <857> für die mittlere Wiederfindung in Verunreinigungsanalysen vorgegeben werden.

Tabelle 3. Wiederfindungsanalyse von drei Magnesiumsulfatproben, die mit einem Eisenstandard (0,2 mg/l) in drei Konzentrationen versetzt wurden, mit einem Agilent Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer.

Magnesiumsulfatprobe zur Bestimmung der Genauigkeit	Nennkonz. (mg/l)	Volumen versetzten Standards (ml)	Berechnete Konz. (mg/l)	Gemessene Konz. (mg/l)	Wiederfindung (%)
1	0,100	2	0,1166	0,1104	94,6
2		4	0,1286	0,1218	94,8
3		6	0,1375	0,1403	102,0

Präzision der Messungen: Die Präzision oder Reproduzierbarkeit kann durch Messung der Konzentration von sechs ähnlich vorbereiteten Probenlösungen bei 100 % der Analyse-Testkonzentration und Bestimmung von deren relativer Standardabweichung (RSD) bestimmt werden.

Die Präzision des Tests auf Eisen in Magnesiumsulfat wurde bestimmt, indem eine Standardlösung mit einer Nennkonzentration von 10 µg Eisen in 50 ml der Analysematrix in sechs Teile aufgeteilt wurde. Die Extinktion der sechs in den 18-Küvetten-Wechsler geladenen Teile wurde dann mit dem Cary 60 UV-Vis bei 594 nm gemessen. Mithilfe der Funktion „Sample Averaging“ (Proben-Mittelwertbildung) in der Applikationssoftware WinUV Concentration wurden alle sechs Replikatproben innerhalb desselben Laufs gemessen. Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde durch die Berechnung der RSD der gemessenen Konzentration jeder Probe ermittelt. Es wurde eine RSD von 1,8 % bestimmt, was innerhalb der Grenze von nicht mehr als (No more than, NMT) 15,0 bis 20,0 % gemäß Vorgabe durch USP <857> liegt.

Tabelle 4. Messung der Präzision für Eisen in sechs Magnesiumsulfat-Replikatproben.

Probe	Extinktion	Probenkonzentration (mg/l)
Probe 1-1	0,1864	0,1894
Probe 1-2	0,1884	0,1924
Probe 1-3	0,1929	0,1993
Probe 1-4	0,1898	0,1946
Probe 1-5	0,1881	0,1920
Probe 1-6	0,1875	0,1911
Standardabweichung (SD)	0,002276	0,00348
% RSD	1,205	1,802113

Spezifität: Die Spezifität kann sichergestellt werden, indem das Nichtvorhandensein von Interferenzen im Spektralbereich des Standards und der Probenmatrix nachgewiesen wird.

In der Applikationssoftware Cary WinUV Scan wurden Wellenzahlscans einer Blindproben- und einer Standard-Eisenlösung mit einer Nennkonzentration von 0,2 mg/l durchgeführt. Abbildung 2 zeigt einen Vergleich der photometrischen Response des Farbreagens (3-(2-Pyridyl)-5,6-di-(2-furyl)-1,2,4-triazin-5',5"-disulfonsäure, Dinatriumsalz) in einer Eisenlösung im Vergleich zu derselben Lösung ohne Eisen (Blindprobenlösung) um den Ziel-Peak bei 594 nm herum. Die Blindprobenlösung zeigt keine photometrische Response im Spektralbereich der Analyse, woraus sich schließen lässt, dass in diesem Bereich keine Interferenzen vorliegen.

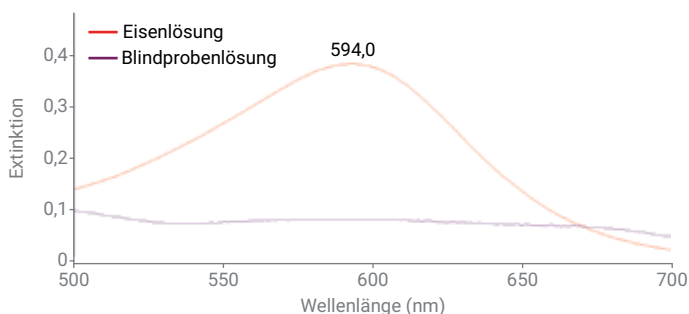


Abbildung 2. Vergleich von Wellenlängenscans zwischen einem Farbreagenz, das einer eisenhaltigen Lösung zugegeben wurde, und demselben Reagenz, das einer Blindprobenlösung (ohne Eisen) zugegeben wurde.

Quantifizierungsgrenze (QL): Die QL von Eisen wurde geschätzt, indem die SD von sechs Wiederholungsmessungen einer Blindprobenlösung berechnet und der Wert mit 10 multipliziert wurde. Für diesen Test wurde eine geschätzte QL von 0,00231 mg/l berechnet. Um diese geschätzte Quantifizierungsgrenze zu bestätigen, sollte das Signal/Rauschen-Verhältnis an der Grenze größer als 10 sein und müssen die Genauigkeit und Präzision der Messung bei dieser Konzentration sichergestellt werden. Die QL sollte $\leq 50\%$ des in der Monographie angegebenen Grenzwerts betragen, um als gültig angesehen zu werden.

Tabelle 5. Berechnete Konzentrationen von sechs Wiederholungsmessungen einer Blindprobenlösung und geschätzte QL von Eisen.

Replikat	Konzentration (mg/l)
1	0,00776
2	0,0075
3	0,00776
4	0,00802
5	0,00762
6	0,00736
SD	0,000231
QL	0,002319

Nach der erfolgreichen Verifizierung des Cary 60 UV-Vis-Verfahrens kann die Analyse von Eisen in Magnesiumsulfat gemäß der USP-Monographie bedenkenlos durchgeführt werden. Die Verifizierung bestätigt, dass das Gerät und die Versuchsparameter für die tatsächlichen Einsatzbedingungen geeignet sind.

Messung von Eisen in Magnesiumsulfat: Für die Bestimmung der relativen Masse von Eisen in Magnesiumsulfat legt die USP-Monographie fest, dass zur Erstellung einer Kalibrierungskurve die Extinktionswerte von drei Standardisenlösungen in der Analysematrix zu verwenden sind. Die relative Masse von Eisen in einer Magnesiumsulfatprobe kann dann mittels Gleichung 2 bestimmt werden.

Zur Herstellung der Analysematrix wurden jeder der Standard-, Proben- und Blindprobenlösungen je 5 ml Lösung B und Farbreagenz zugegeben (siehe Abschnitt „Experimentelles“). Jede Lösung wurde dann mit verdünnter HCl auf das gewünschte Volumen (50 ml) verdünnt.

Die Extinktion jeder Standardlösung wurde gegen die Blindprobenlösung gemessen und gegen ihren Eisengehalt aufgetragen (siehe Abbildung 3).

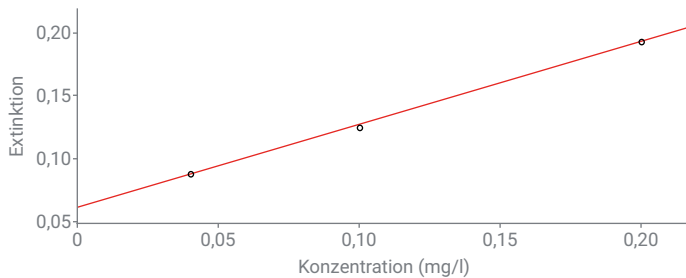


Abbildung 3. Kalibrierungskurve auf Basis der Messung von drei auf die Probenmatrix abgestimmten Eisenstandardlösungen mit einem Agilent Cary 60 UV-Vis.

Anschließend wurden die Extinktionswerte von zwei Probenlösungen gemessen und die Messwerte verwendet, um den Eisengehalt relativ zur Masse an Magnesiumsulfat gemäß Gleichung 2 zu berechnen.

Gleichung 2.

$$\text{Ergebnis} = \frac{C}{W}$$

Wobei gilt:

C = Eisengehalt in der Probenlösung (µg)

W = Gewicht des Magnesiumsulfats in der Probenlösung

Tabelle 6. Relativer Eisengehalt in zwei Magnesiumsulfatproben.

Magnesiumsulfatprobe	Eisengehalt (µg)	Ergebnis (µg/g)
Probe 1	3,1	0,31
Probe 2	2,5	0,25

Die Ergebnisse für Eisen liegen innerhalb der Abnahmekriterien von NMT 0,5 µg/g, was die in der USP-Monographie vorgegebene obere Grenze darstellt.

Fazit

Ein Agilent Cary 60 UV-Vis mit einem 18-Küvetten-Wechsler wurde verwendet, um zu demonstrieren, wie ein konformes UV-Vis-Verfahren aus einer USP-Monographie verifiziert werden kann. Die Agilent Cary WinUV Software und der 18-Küvetten-Wechsler automatisierten die gemäß den USP-Validierungstests erforderlichen mehrfachen Wiederholungsmessungen und reduzierten somit den Arbeitsaufwand für den Bediener. Die Validierungstests umfassten die Bestätigung der Genauigkeit, Präzision und Spezifität der Messungen sowie die Bestimmung der Quantifizierungsgrenze.

Nach der Verifizierung der Methode wurde das Cary 60 UV-Vis verwendet, um den Eisengehalt in zwei Magnesiumsulfatproben gemäß dem USP-konformen Verfahren für Magnesiumsulfat zu messen. Die Ergebnisse lagen innerhalb der Abnahmekriterien für dieses Material von < 0,5 µg/g.

Das Cary 60 UV-Vis eignet sich ideal für routinemäßige pharmazeutische Arbeitsabläufe für die Qualitätssicherung/Qualitätskontrolle (QS/QK) und R&D-Anwendungen. Die ebenfalls erhältliche optionale Agilent Cary WinUV Pharma Software unterstützt die Konformität mit 21 CFR Part 11 der US-amerikanischen FDA, EU-GMP Anhang 11 und entsprechende nationale Vorschriften zu elektronischen Aufzeichnungen.

Referenzen

1. United States Pharmacopeia. General Chapter, <1226> Verification of Compendial Procedures. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2024**. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M870_03_01
2. United States Pharmacopeia. General Chapter, <857> Ultraviolet-Visible Spectroscopy. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2022**. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M3209_03_01
3. Spectroscopy Solutions for Pharmaceuticals: Confidence in Compliance to USP <857> Using the Agilent Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer, *Agilent Technologies white paper*, Publikationsnummer 5991-7269EN, **2016**.
4. United States Pharmacopeia. USP Monographs, Magnesium Sulfate. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeia, **2024**. DOI: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M47040_06_01.html
5. Improved Lab Efficiency with the Agilent 18-Cell Changer Accessory, *Agilent Technologies technical overview*, Publikationsnummer 5994-7250EN, **2024**.

Weitere Informationen

- Cary 60 UV-Vis-Spektralphotometer
- Cary WinUV Software für UV-Vis-Anwendungen
- Häufige Fragen zur UV-Vis-Spektroskopie und zu Spektralphotometern

www.agilent.com

DE-001364

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
Gedruckt in den USA, 12. November 2024
5994-6929DEE