

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

## Photometrische Bestimmung von Eisenkontaminationen in Arzneistoffen und biologischen Matrices

A. SEELING, P. WIECHA, H. OELSCHLÄGER

*Eingegangen am 28. Oktober 2002, angenommen am 11. November 2002*

*Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Herbert Oelschläger, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany*

*Pharmazie 58: 312–314 (2003)*

Die Ph. Eur. Grenzwertmethode der kolorimetrischen Eisenbestimmung mit Thioglycolsäure als Komplexbildner in ammoniakalischer Lösung wurde hinsichtlich der zugrundeliegenden Reaktion experimentell überprüft. Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur entsteht ein solvatisierter Komplex des zweiwertigen Eisens, weil Fe(III) durch die Thioglycolsäure reduziert wird. Die behauptete Oxidation des zweiwertigen Eisenkomplexes durch Luftsauerstoff tritt in diesem Milieu nicht ein. Für die Routineanalyse von Eisenspuren in Arzneistoffen und biologischen Matrices gelang die Optimierung der Grenzwertbestimmung durch Messung der Absorption des Komplexes bei 534 nm im Bereich von 10–100 ppm nach gestuftem oxidativen Aufschluss mit konz. Schwefelsäure/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Die Gehaltsbestimmung erfolgte durch Vermessung gegen eine Kalibrierlösung oder, bei höheren Ansprüchen an die Genauigkeit, durch Erstellung einer Eichgeraden mit mindestens fünf Messpunkten. Der Eisenanteil der käuflichen Reagenzien erfordert die Ermittlung eines Blindwertes.

### Photometric determination of iron-contaminations in medicinal substances and biological matrices

The Ph. Eur. detects colorimetrically the limiting value of iron by formation of a complex with thioglycolic acid in ammoniacal solution. This reaction was rechecked by experiments. Contrary to the literature a solvated Fe(II)-complex will be formed due to the reduction of Fe(III) by the present thioglycolic acid. A supposed oxidation of the Fe(II)-complex by atmospheric oxygen does not occur. For the routine determination of traces of iron in medicinal substances and biological matrixes a VIS-method was developed based on the measurement of the absorption of the complex at 534 nm in the range of 10–100 ppm after graded oxidative decomposition with conc. sulfuric acid/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. This assay needs a calibration mixture or in the case of a higher demand of accuracy a calibration curve with at least five measuring points. Because of the contamination of commercially available reagents a blank value must be determined.

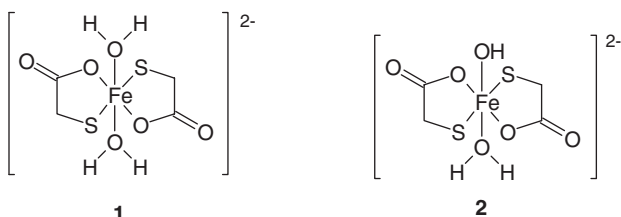
### 1. Einleitung

Die industrielle Produktion von Arzneistoffen führt fast immer zu Eisenkontaminationen der Intermediate und Finalprodukte, so dass im Drug Master File Grenzwerte festgelegt werden, die zumeist im unteren ppm-Bereich liegen. Die Bestimmung dieser Eisenkontamination kann je nach Anspruch an die Genauigkeit mit unterschiedlichen Methoden erfolgen. Vor allem Substanzen mit niedrigem Redoxpotential, die in Folge der katalytischen Wirkung von Eisenionen rasch von Luftsauerstoff oxidiert werden (z. B. Ascorbinsäure), bedingen Erfassungsgrenzen (EG) von < 2 µg/g, die in der Regel nur die Atomabsorptionsspektroskopie gewährleistet. In weniger reaktiven Substanzen, biologischen Proben und Wasser können höhere Gehalte, entweder durch elektroanalytische Verfahren, wie Voltammetrie (EG ca. 3 µg/g) oder Potentiometrie mit ionensensitiven Elektroden (EG 5 µg/g) oder durch komple-

xometrische Titration mit potentiometrischer bzw. kolorimetrischer Endpunktanzeige (EG 70 µg/g) bestimmt werden. Da Eisen mit einer Reihe von organischen und anorganischen Substanzen zum Teil intensiv gefärbte Komplexe bildet, bietet sich ferner die Möglichkeit der kolorimetrischen Bestimmung gegen Standardlösungen bekannten Gehalts mit visuellem Farbtiefevergleich (z. B. Dubosq-Eintauchkolorimeter, EG 20 µg/g) oder mit photometrischer Vermessung bei definierter Wellenlänge an. Deren Selektivität ist allerdings geringer als die der vorgenannten Methoden, da andere Elemente der VIII. Gruppe, vor allem Cobalt und Nickel, ähnliche Färbungen ergeben. Die Abwesenheit solcher störenden Elemente und Maskierungsmittel muss also gewährleistet sein.

Die im Europäischen Arzneibuch 1997 aufgenommene Methode (2.4.9) zur Grenzwertbestimmung von Eisenkontaminationen stützt sich auf eine Komplexbildungsreaktion mit Thioglycolsäure in ammoniumcitratgepuffertem Mi-

lieu, wobei der Citratzusatz die Ausfällung von Metallhydroxiden verhindert. Die Intensität der entstehenden rosaroten Färbung darf nicht größer sein als die einer unter definierten Bedingungen hergestellten Referenzlösung mit dem in der jeweiligen Monographie genannten Fe-Gehalt. Als untere Referenzlösung wird eine 10 ppm-Ammoniumeisen(II)-sulfat-Lösung herangezogen. Mit Nickelionen bildet Thioglycolsäure unter gleichen Bedingungen einen deutlich schwächer gefärbten, mit Cobaltionen einen gelben bis roten Komplex. In Lösung entstehen nach Angaben der Literatur abhängig von der Oxidationsstufe des Eisens die komplexen rosaroten Anionen  $[\text{Fe}(\text{SCH}_2\text{COO})_2]^{2-}$  (1) oder  $[\text{Fe}(\text{SCH}_2\text{COO})_2(\text{OH})]^{2-}$  (2).



## 2. Untersuchungen, Ergebnisse und Diskussion

Nach unserer Auffassung führt der große Überschuss an Thioglycolsäure spontan zur Reduktion des dreiwertigen Eisens unter Bildung von 2,2'(Dithio)-diessigsäure, so dass bei der Komplexbildung von einer reinen Eisen(II)-Lösung ausgegangen werden muss. Diesem vereinfachten Umstand trägt auch das Europäische Arzneibuch 1997 im Abschnitt 4.1.2 (Referenzlösungen für Grenzprüfungen) mit der Herstellungsvorschrift für die Eisen-Lösungen 10 ppm/20 ppm Rechnung, für die Verbindungen mit Eisen unterschiedlicher Oxidationsstufen eingesetzt werden. Für die postulierte Reduktion von Fe(III) ist allerdings noch kein schlüssiger experimenteller Beweis erbracht worden. Daher wurden von uns einerseits unter  $\text{N}_2$ -Begasung Fe(III)-Ionen mit 0,1 M-Thioglycolsäure reduziert und andererseits Thioglycolsäure mit Fe(III)-Ionen oxidiert. Die Titrationskurve zeigt Abb. 1, der Endpunkt wurde mit Hilfe des Tangentenverfahrens ermittelt. Zu Beginn der Titration tritt der schon von Geffken und Surborg [1] beschriebene Tetraaquokomplex (1:1) auf, der sich im weiteren Verlauf der Titration über die Färbungen oliv-

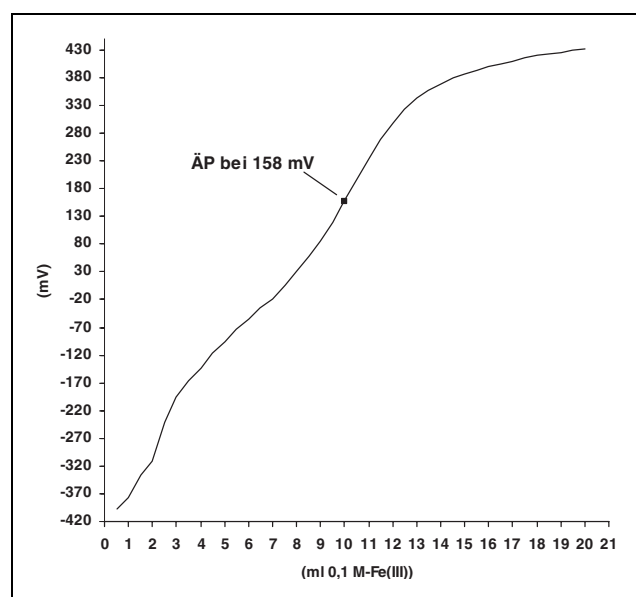


Abb. 1: Titrationskurve von 0,1 M-Thioglycolat mit 0,1 M- $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$

grün, grün, gelb und orange in den 1:2-Komplex umwandelt. Unsere Befunde widerlegen die Erklärung im Kommentar zur Ph. Eur., dass bei der Grenzwertbestimmung als farbgebende Komponente der Komplex 2 entsteht, vielmehr wird durch die Präsenz der Thioglycolsäure (bei einer 10 ppm Fe-Konzentration beträgt der Überschuss an Thioglycolsäure das 400fache) Fe(III) spontan zu Fe(II) reduziert. Durch die Präsenz der Citronensäure würden ohnehin Fe(III)-Ionen komplexiert. Bei Annahme der Koordinationszahl (KZ) 6 (Fe(II) weist die KZ 4–6, Fe(III) die KZ 3–8 auf) besitzt das Fe(II) im Komplex 1:2 Kryptonedelgaskonfiguration. Somit ist die farbgebende Komponente bei dieser Grenzwertbestimmung eindeutig der rosarote Komplex 1 mit zweiwertigem Eisen, mit hoher Wahrscheinlichkeit solvatisiert (KZ 6).

Abweichend von der europäischen Fe-Bestimmung lässt die USP 25 (2002) Eisenionen nach Oxidation mit Peroxodisulfat als  $\text{Fe}(\text{SCN})_3$  durch Farbvergleich mit einem Standard bestimmen.

Abb. 2 zeigt das Spektrum des Eisenthio glycolat-Komplexes in wässriger Pufferlösung bei pH 9,0.

Ein den meisten photometrischen Bestimmungen anhaften der Nachteil ist die Eigenabsorption der Analysesubstanz, das heißt im VIS-Bereich die Untergrundfarbe der Lösung. Als weitere Beeinträchtigungen sind die Komplexbildungsfähigkeit, Ausfällungen und Schwerlöslichkeit des Analyten zu nennen. Um im Methodenvergleich mit mehreren verschiedenen Substanzen reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, ist es daher erforderlich, die Matrix zu zerstören, so dass rein wässrige Eisenlösungen definierter Zusammensetzung und Ionenstärke erhalten werden. Der oxidative Aufschluss im schwefelsauren Milieu mit gestufter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe gewährt einen minimalen Eintrag von anorganischen Substanzen. Primär kommt es zu einem wasserentziehenden (verkohlenden) Effekt der Schwefelsäure, so dass nachfolgend die primären Abbauprodukte mit geringeren Anteilen  $\text{H}_2\text{O}_2$  zersetzt werden können.

Die auf diese Weise erhaltene Ionenlösung kann nach Prüfung auf Peroxid-Freiheit ohne weitere Aufarbeitung mit den Reagenzien versetzt werden (s. experimenteller Teil). Wichtig ist die Einhaltung der Reihenfolge der Reagenzienzugabe, damit die Citronensäure als Hilfskomplexbildner das Ausfallen von Eisenhydroxid in ammoniakalischer Lösung verhindert. Die nach der Ph. Eur.-Methode erhaltene, charakteristisch rosarote Farbe des Eisen-Thioglycolat-Komplexes tritt bei Erreichen des optimalen pH-Bereiches spontan auf und bleibt zwischen pH 6 und 11 konstant. Zur besseren Reproduzierbarkeit wurde in allen Versuchen der pH-Wert  $9,0 \pm 0,2$  eingehalten. Die photometrische Vermessung der Eichlösungen und der Analyse sowie einer unter gleichen Bedingungen bereiteten Blindlösung er-

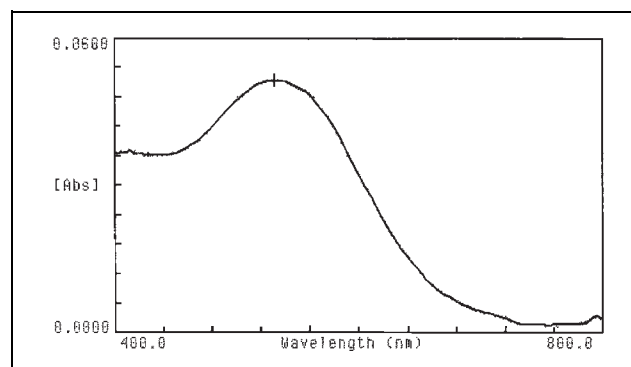


Abb. 2: VIS-Spektrum des Eisenthio glycolat-Komplexes (10 ppm Fe) in wässriger Pufferlösung bei pH 9,0 ( $\lambda_{\text{max}}$  534 nm).

folgt einheitlich nach 10 min bei 534 nm gegen Wasser als Kompensationsflüssigkeit.

### 3. Experimenteller Teil

#### 3.1 Oxidativer Aufschluss der Proben

1000 mg der Probe werden im 250 ml-Kjeldahlkolben mit 5,0 ml Schwefelsäure (96%, p.a.) versetzt und auf einem Drahtnetz mit der Bunsenbrennerflamme erhitzt. Die Messung der Vorheizzeit beginnt, sobald die Schwefelsäure siedet. Dabei ist zur Vermeidung von Schwefelsäureverlusten die Wärmezufuhr so zu regulieren, dass der Kondensationsring nicht über das untere Drittel des Kolbens hinaussteigt. Der Ansatz verfärbt sich innerhalb weniger Sekunden von orangerot nach schwarz. Nach ca. 5 min (Ende der Vorheizzeit) wird durch die Kolbenöffnung mit Hilfe eines geeigneten Trichters vorsichtig 30%ige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (p.a.) zugegeben. Die Menge soll bei etwa 3 ml pro Minute liegen und so geteilt sein, dass heftige Reaktion und Siedeverzüge, die zum Verspritzen evtl. auch durch die obere Kühleröffnung führen, vermieden werden. Die Entfärbung bis zum schwach beigen Farbton tritt nach Zugabe von etwa 15–20 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein. Weiterer Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erfolgt in 1 ml-Schritten bis zur vollständigen Entfärbung. Das entstandene Wasser wird zwischen den einzelnen Zugaben vollständig abgedampft. Dadurch reduziert sich die notwendige Menge  $\text{H}_2\text{O}_2$  um mehr als 50%, ein Vorteil im Hinblick auf die durch die Reagenzien eingebrachte Eisenverunreinigung.

Unmittelbar nach Verköchen des überschüssigen  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird der austretende Dampf mit einem Merckoquant<sup>®</sup> Peroxid-Teststäbchen auf Peroxidfreiheit geprüft. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Lösung wird anschließend mit NaOH (40% m/v; aus NaOH-Rotuli, p.a.) auf pH 3–4 eingestellt, unter dreimaligem Nachspülen mit ultrareinem Wasser in einen 50 ml-Messkolben übergeführt und bis zur Marke mit ultrareinem Wasser aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 10 ml für die polarographische Bestimmung zurückgestellt.

Zur Vorbereitung der photometrischen Eisenbestimmung werden 25 ml der verbleibenden Lösung in einen 50 ml-Messkolben übergeführt und mit 10%iger Ammoniaklösung (p.a.) unter Eiskühlung annähernd neutralisiert.

Die beschriebene Methode wurde auch teilautomatisiert mit einer Digesdahl-Aufschlussapparatur (Hach) durchgeführt. Die prinzipiell gleiche Arbeitsweise, deren Modifizierung lediglich in der exakteren Temperaturführung und der Ableitung der entstehenden Dämpfe mittels Wasserstrahlvakuum bestand, brachte keine signifikante Verbesserung der Ergebnisse, vor allem weil i. Vak. Eisenverluste eintraten.

#### 3.2 Photometrische Bestimmung

Gemäß der Vorschrift des EuAB 1997 (2.4.9) zur Eisenbestimmung werden zu der nach 3.1 erhaltenen Lösung 2,0 ml Citronensäurelösung (20% m/v; aus Citronensäure, wasserfrei, p.a.), 0,1 ml Thioglycolsäure (p.a.) und Ammoniaklösung (25%, p.a.) bis zur schwach alkalischen Reaktion (pH  $9,0 \pm 0,2$ ; pH-Meter) zugegeben und mit ultrareinem Wasser auf 50,0 ml ergänzt. Die Absorption der Lösung und des reinen Reagenziengemisches wird nach 10,0 min bei 534 nm gegen Wasser gemessen und der Fe-Gehalt anhand einer Eichlösung bestimmt, deren Gehalt nicht weiter als 20% vom erwarteten Gehalt abweichen darf. Dafür sind unmittelbar vor Beginn der Analyse frische Vergleichslösungen mit den unten genannten Fe-Gehalten (s. 3.6. Referenzlösungen) herzustellen.

#### 3.3 Polarographische Eisenbestimmung

Zur Validierung der photometrischen Bestimmung wird das aus dem Aufschluss nach 3.1 zurückgestellte Aliquot direkt über die Methode der Standardzumischung polarographisch vermessen.

#### 3.4 Quantitative Auswertung

Zur Untersuchung der Reproduzierbarkeit und zur Findung eines analytischen Fensters, in dem die Absorptions-/Konzentrations-Kurve dem Lambert-Beerschen Gesetz gehorcht, wurden zunächst Eichgeraden mit Fe-Stammlösungen vom Fe-Gehalt 10 µg/ml bis 120 µg/ml aufgenommen. Der Korrelationskoeffizient lag im Bereich von 20 bis 120 µg/ml bei etwa 0,999 ( $y = 0,0029x + 0,0065$ ) und konnte von allen Experimentatoren problemlos reproduziert werden.

Nach Gewährleistung der Sicherheit in der Aufstellung der Eichgeraden wurden mit der Modellsubstanz 3-Methoxy-8,14-seco-13-methyl-1,3,5(10),9(11)-gonatetraen-14,17-dion (Vorstufe einer Steroid-Synthese) Fe-Bestimmungen durchgeführt, deren Präzision gegen die voltam-

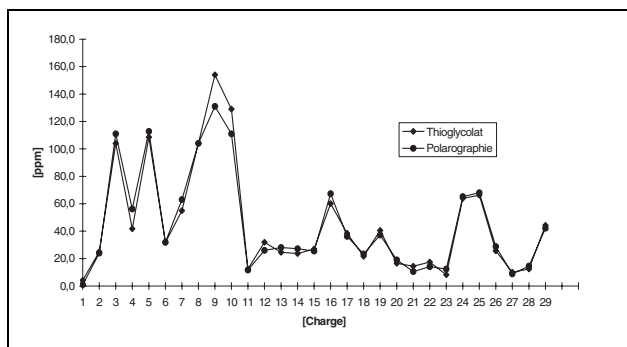


Abb. 3: Thioglycolat-Methode und polarographische Bestimmung im Vergleich

metrische Bestimmung validiert wurde. Die Abweichungen stellten sich auf  $\pm 5\%$  des polarographisch ermittelten Gehalts.

Anschließend wurde die Methode mit 29 im Verlauf von 2 Jahren gelieferten Secodion-Chargen erprobt. Bei den in Abb. 3 zusammengefassten Ergebnissen zeigen sich zwangsläufig größere Abweichungen (1–7 (–14) ppm) als in den Vorversuchen, da die Fe-Gehalte beträchtlich streuten (1–131 ppm, polarographisch ermittelt) und insgesamt 8 verschiedene Untersucher an diesen Screeningversuchen beteiligt wurden.

#### 3.5. Reagenzien

Die folgenden Reagenzien wurden von der Firma Merck/Darmstadt bezogen: Ammoniumeisen(II)-sulfat-hexahydrat p.a., Merckoquant<sup>®</sup>-Peroxid-Test, Natriumhydroxid Rotuli p.a., Schwefelsäure 96% p.a., Thioglycolsäure p.a., Wasser p.a., Wasserstoffperoxid Perhydrol<sup>®</sup> 30% Suprapur<sup>®</sup> und von der Fa. Fluka Ammoniaklösung 25% puriss. p.a., Citronensäure, wasserfrei puriss. p.a.

Wasser zur Herstellung von Reagenzlösungen wurde mittels Ionenaustauscher, Milli-Q demineralisiert und ultrafiltriert.

#### 3.6. Referenzlösungen

Die Stammlösung wurde nach der Vorschrift „Eisen-Lösung R (20 ppm Fe)“ des EuAB 1997 unter Verwendung von Ammoniumeisen(III)-sulfat-dodecahydrat der Qualitätsnorm p.a. hergestellt. Sie kann dicht verschlossen unter Lichtausschluss maximal 1 Woche verwendet werden.

Aus der 1:1 verdünnten Stammlösung wurden nach folgender Tabelle Referenzlösungen hergestellt.

Tabelle: Herstellung der Referenzlösungen

10 ppm-Stammlösung	Menge Fe(III) absolut	$\equiv \mu\text{g/g}$ in Secodion
1,0 ml	10 µg	10
2,0 ml	20 µg	20
3,0 ml	30 µg	30
4,0 ml	40 µg	40
⋮	⋮	⋮
12,0 ml	120 µg	120

Die vorgelegten Volumina sind jeweils ad 50,0 ml aufzufüllen. Lösungen und Verdünnungen werden mit Wasser der Qualität p.a. hergestellt.

#### 3.7. Geräte

pH-Meter: Digital-pH-Meter pH 525; WTW 82362 Weilheim i. Ob., Aufschlussapparatur: Digesdahl; Hach (Loveland, Col., USA), Photometer: Beckman DU<sup>®</sup> 640; Beckman-Coulter Inc. (Fullerton, CA, USA), Polarograph: VA-Prozessor 693 mit VA-Stand 694; Metrohm AG CH-9101 Herisau.

Danksagung: Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie, Frankfurt a. M. für stete finanzielle Förderung.

#### Literatur

1 Geffken, D.; Surborg, K.-H.: Dt. Apoth. Ztg. **128**, 1235 (1988)