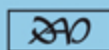


Rücker · Neugebauer · Willems

Instrumentelle pharmazeutische Analytik

Lehrbuch zu spektroskopischen,
chromatographischen, elektrochemischen
und thermischen Analysenmethoden

4. Auflage



Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten

**Lehrbuch zu spektroskopischen,
chromatographischen, elektrochemischen
und thermischen Analysenmethoden**

Gerhard Rücker, Bonn,
Michael Neugebauer, Bonn
Günter Georg Willems, Osthofen

4., durchgesehene und aktualisierte Auflage
mit 242 Abbildungen und 81 Tabellen



Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart

Charakterisierung von Analysenmethoden



Verzeichnis der Symbole

Teil I: Charakterisierung von Analysemethoden

a	Abschnitt auf der y -Achse der Kalibriergeraden	n	Anzahl der Messungen
b	Steigung der Kalibriergeraden (Regressionskoeffizient)	μ	richtiger Wert einer Analyse
b	Kalibrierempfindlichkeit von Messgeräten	r	linearer Korrelationskoeffizient
c	Konzentration	s	absolute Standardabweichung
C_m	Grenzkonzentration	s_{rel}	relative Standardabweichung
E	Empfindlichkeit	s^2	Varianz
F	Testgröße der F -Verteilung	s_R	Standardabweichung der Rauschsignale
F	absoluter Gesamtfehler	s_t	totale Standardabweichung
F_{rel}	relativer Gesamtfehler	S_m	Messsignal einer Substanz
f	um 1 verminderte Zahl der Bestimmungen ($n - 1$)	S_R	Mittelwert der Rauschsignale
f	absoluter Fehler der Teilschritte	$t_{\text{ber.}}$	Testgröße für den t -Test
f_{rel}	relativer Fehler der Teilschritte	Vk	Variationskoeffizient
γ	analytische Empfindlichkeit von Messgeräten	$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert der Messwerte
k	Faktor	x_i	Messwerte, Konzentrationswerte
ΔM	Änderung der Messwerte	Δx	Fehler einer Messung
		$\bar{y}$	arithmetischer Mittelwert von Messwerten
		y_i	Messwerte

Rechtliche Grundlagen zur Qualitätskontrolle von Arzneimitteln

Übersicht

Die Sicherung der Qualität von Arzneimitteln ist in einer Vielzahl von internationalen, europäischen und nationalen Vorschriften geregelt (Lit. 1,2). Diese beziehen sich zum einen auf den erforderlichen Prüfumfang und methodische Fragen und zum anderen auf die Einhaltung der Grundsätze der guten Herstellungspraxis (GMP).

Welche Prüfungen an Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen durchgeführt werden müssen, bestimmen im EU-Binnenmarkt der europäischen **Kodex für Humanarzneimittel** (Lit. 3) sowie die **europäische Prüfrichtlinie** (Lit. 4). Beide sind in Deutschland im **Arzneimittelgesetz** (Lit. 5) und in den **Arzneimittelprüfrichtlinien** gemäß § 26 AMG (Lit. 6) in nationales Recht umgesetzt. Weitere Detailvorschriften (Leitlinien und Empfehlungen) zu einzelnen Prüfungen sind im europäischen Regelwerk für Arzneimittel in Band 3 **Eudralex** (Humanarzneimittel) enthalten (Lit. 7,8).

Die **Grundsätze der guten Herstellungspraxis (GMP)**, die die Qualitätssicherung und Qualitätskontrolle einschließen, sind in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union verbindlich anzuwenden (Lit. 9). Nähere Einzelheiten sind EU-weit im **EG-GMP-Leitfaden** (Band 4 **Eudralex**) festgelegt (Lit. 10). Dieses umfangreiche Dokument, das erstmals im Jahr 1989 herausgegeben wurde und das in keinem Pharmaunternehmen, Herstellungsbetrieb und Kontrolllabor fehlen darf, hat zahlreiche Anhänge und wird ständig an den Stand von Wissenschaft und Technik angepasst. Seine wesentlichen Inhalte sind im deutschen Arzneimittelrecht in der **Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung** (AMWHV) von November 2006 implementiert (Lit. 11).

In dem vorliegenden Buch werden die instrumentell-analytischen Methoden für die Prüfung von Arzneistoffen, Hilfsstoffen und Fertigarzneimitteln behandelt. Dazu bilden die Arzneibücher (**DAB, Ph. Eur., HAB**) sowie der **Deutsche Arzneimittel-Codex (DAC)** eine wichtige Grundlage. Sofern nicht auf ein Arzneibuch zurückgegriffen werden kann, müssen für die Kontrolle der Qualität von Arzneistoffen, Wirkstoffen oder Fertigarzneimitteln eigene analytische Methoden ausgearbeitet und validiert werden. Die hieraus abgeleiteten **Spezifikationen** bilden die Grundlage der routinemäßigen Kontrolle für die Freigabe zur Verwendung innerhalb des Herstellungsverfahrens oder auch für das Inverkehrbringen (**Freigabespezifikation**) (Lit. 11). Die

Vorschriften für die Prüfung von Arzneimitteln

Grundsätze der guten Herstellungspraxis (GMP)

Analytische Vorschriften

Ausarbeitung eigener analytischer Vorschriften

Merkmale des Arzneimittels, die über seine gesamte Haltbarkeitsdauer eingehalten werden müssen, werden in der **Laufzeitspezifikation** beschrieben.

Qualifizierung und Validierung

Definition von Validierung und Qualifizierung

Ziel jeder analytischen Messung ist es, ein wahres Ergebnis bzw. den wahren Wert einer Größe zu ermitteln. Auch bewährte instrumentelle Methoden in der pharmazeutischen Analytik zeigen Analysenfehler bzw. Bestimmungsfehler. Um zu verlässlichen und reproduzierbaren Ergebnissen zu kommen, muss die Qualität und Eignung der Verfahren einer speziellen Kontrolle unterworfen werden. Diese Kontrolle wird als **Validierung** bezeichnet. Es gibt hierzu eine Reihe nationaler und internationaler gesetzlicher Regelungen. So fordern die europäische Prüfrichtlinie (Lit. 4) bzw. die deutschen Arzneimittelprüfrichtlinien (Lit. 6): „Alle Prüfverfahren müssen dem jeweiligen Stand der Wissenschaft entsprechen und müssen validierte Verfahren sein. Die Ergebnisse der Validierungsprüfung sind vorzulegen“. Der europäische Leitfaden zur guten Herstellungspraxis (EG-GMP, Lit. 10) enthält für die Begriffe der Qualifizierung sowie der Validierung die folgende Definition:

- **Validierung:** Beweisführung in Übereinstimmung mit den Prinzipien der Guten Herstellungspraxis (GMP), dass Verfahren, Prozesse, Ausrüstungsgegenstände, Materialien, Arbeitsgänge oder Systeme tatsächlich zu den erwarteten Ergebnissen führen.
- **Qualifizierung:** Beweis, dass eine Ausrüstung korrekt arbeitet und zu den erwarteten Ergebnissen führt. Teilweise wird der Begriff der „Validierung“ ausgeweitet und beinhaltet auch die Qualifizierung.

Der Anhang 15 zum EU-Leitfaden einer guten Herstellungspraxis von April 2001 (Lit. 10) ist der Thematik der **Qualifizierung und Validierung** gewidmet. Hiernach sollten alle Validierungsaktivitäten geplant werden.

Qualifizierung

Arten der Qualifizierung

Der erste Schritt einer Validierung neuer Einrichtungen, Anlagen oder Ausrüstungsgegenstände sollte die **Designqualifizierung** (DQ) sein (siehe Tab. 1). Bei neuen oder veränderten Einrichtungen, Anlagen oder Ausrüstungsgegenständen ist eine **Installationsqualifizierung** (IQ) vorzunehmen. Die IQ umfasst unter anderem die **Kalibrierung**. Im Anschluss an die Installationsqualifizierung sollte die **Funktionsqualifizierung** (OQ) stattfinden. Ihr erfolgreicher Abschluss ermöglicht die formale „Freigabe“ der Einrichtungen, Anlagen und Aus-

Tab. 1 Elemente der Qualifizierung (EG-GMP-Leitfaden, Lit. 10)

Qualifizierung bedeutet eine dokumentierte Verifizierung, dass Einrichtungen, Anlagen und Ausrüstung...	
Designqualifizierung (DQ)	... bezüglich des vorgesehenen Designs für den entsprechenden Verwendungszweck geeignet sind.
Installationsqualifizierung (IQ)	... so wie sie installiert wurden, mit dem genehmigten Design und den Empfehlungen des Herstellers übereinstimmen. Kalibrierung: Arbeitsgänge, durch die unter bestimmten Bedingungen die Beziehung zwischen den durch ein Messgerät oder ein Messsystem angezeigten oder den sich aus einer Materialmessung ergebenden Werten und den entsprechenden bekannten Werten eines Referenzstandards bestimmt wird. Kalibrieren: Vergleich einer gemessenen Größe mit einer Referenzgröße. zum Vergleich: Justierung: Ein Messsystem wird so abgeglichen, dass die gemessene Größe vom wahren Wert (Referenzwert) so wenig wie möglich abweicht und innerhalb des Toleranzbereichs liegt. Eichen: In einer Prüfung wird festgestellt, ob die eichrechtlichen Vorschriften, wie z. B. die Eichfehlgrenzen, nicht verletzt werden. Bestätigung durch Eichstempel.
Funktionsqualifizierung (OQ)	... so wie sie installiert oder modifiziert wurden, im Rahmen der vorgesehenen Betriebsbereiche den Erwartungen gemäß funktionieren.
Leistungsqualifizierung (PQ)	... so wie sie miteinander verbunden wurden, auf der Grundlage der genehmigten Prozessmethode und Produktspezifikation effektiv und reproduzierbar funktionieren.

rüstung zur Nutzung. Die anschließende **Leistungsqualifizierung (PQ)** dient dazu, Tests mit Produktionsmaterialien, geeigneten Ersatzmaterialien oder simulierten Produkten durchzuführen. Ausrüstungen und Prozesse sollen in bestimmten Zeitabständen bewertet werden, um zu gewährleisten, dass sie sich weiterhin in einem qualifizierten bzw. validierten Zustand befinden. Bei Änderungen ist eine Änderungskontrolle durchzuführen, evtl. mit einer **Requalifizierung** oder **Revalidierung**.

Validierung

Die Validierung im Rahmen der Guten Herstellungspraxis (Lit. 3,4,9) umfasst die Arten der Validierung

- Validierung analytischer Methoden
- Reinigungsvalidierung
- Prozessvalidierung.

Validierung analytischer Methoden

Vorschriften für die Validierung analytischer Methoden und Verfahren

Für analytische Methoden, die nicht explizit im Arzneibuch referenziert werden, ist der Nachweis zu führen, dass die Methode unter den gegebenen Anwendungsbedingungen unter Nutzung qualifizierter analytischer Geräte zuverlässig ist und zu korrekten analytischen Werten führt. Zur Validierung analytischer Methoden bei der Prüfung von Humanarzneimitteln wurden im Rahmen der internationalen Harmonisierung der Zulassungsanforderungen zwischen der Europäischen Gemeinschaft, den USA und Japan (International Conference on Harmonisation ICH) zwei wichtige Leitlinien (Guidelines) verabschiedet:

Harmonisierung der Validierungsmethoden

- Validation of analytical methods: Definitions and terminology (CPMP/ICH)381/95) von Juni 1995 (Lit. 12)
- Validation of analytical procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95) von Dezember 1996 (Lit. 13).

In diesen wird im Einzelnen dargelegt, bei welchen Prüfungen im Rahmen des Arzneimittel-Zulassungsverfahrens in welchem Umfang Validierungen durchgeführt werden müssen und welche Parameter in die jeweilige Validierung einzubeziehen sind.

Die vier gängigsten Methoden, die validiert werden müssen sind:

Wichtigste Bereiche der Validierung

- Identitätstests
- Gehalt an Verunreinigungen
- Grenzwertbestimmungen für Verunreinigungen
- Gehaltsbestimmung des Wirkstoffes selbst bzw. des Wirkstoffes im Fertigarzneimittel oder anderer ausgewählter Komponenten.

Typische Parameter der Validierung sind (siehe auch Tab.2 und Kap. 2.1 und 2.2):

Parameter der Validierung

- Präzision (precision), Wiederholpräzision (repeatability), Vergleichspräzision, (reproducibility), Laborpräzision, Wiederfindung (recovery)
- Richtigkeit (accuracy)
- Nachweisgrenze (limit of detection)
- Bestimmungsgrenze (limit of quantitation)
- Spezifität, Selektivität (specificity, selectivity)
- Linearität (linearity)
- Empfindlichkeit (sensitivity)
- Arbeitsbereich, Bestimmungsbereich (range)

Definition der Robustheit analytischer Verfahren

Wichtig ist darüber hinaus die **Robustheit** (*robustness, ruggedness*) einer Methode (Kap. 2.1.1). Sie ist definiert als die Störanfälligkeit der Ergebnisse durch variierende Bedingungen oder die Fähigkeit

eines Verfahrens, ein Ergebnis zu liefern, das durch variierende Bedingungen nicht oder nur unwesentlich verfälscht wird. Für jeden variierbaren Parameter lässt sich ein Bereich ermitteln, in dem die Genauigkeit der Methode nicht durch die Variation des Parameters beeinflusst wird. Die Größe dieses Bereichs ist das Maß für die Robustheit der Methode bezüglich des variierten Parameters. Ein weiterer integraler Bestandteil vieler analytischer Verfahren ist der Nachweis der Eignung für den spezifischen Test (system suitability testing). Die Parameter, die hierfür zu validieren sind, ergeben sich aus der Art des Verfahrens. Näheres hierzu siehe in Kap. 2 dieses Buches.

Tab. 2 Parameter der Validierung (EG-GMP-Leitfaden, Lit. 10, siehe auch Kap. 2.1 und 2.2)

Präzision (<i>precision</i>)	Sie beschreibt die Streuung von Analyseergebnissen. Als Maße dienen die Standardabweichung (s), die relative Standardabweichung (s_{rel}) (identisch mit dem Variationskoeffizient VK) und seltener die Varianz (s^2). Wiederholpräzision (repeatability): Aussage über die Präzision bei Wiederholbedingungen: gleiche Probe, gleicher Prüfer, gleiches Gerät, identische Reagenzien, kurzer Zeitabstand. Vergleichspräzision (reproducibility): Aussage über die Präzision unter Vergleichsbedingungen: anderes Labor (d. h. auch andere Geräte, Chemikalien, Prüfer). Laborpräzision: Aussage über die Präzision bei gleicher Probe, aber wechselnden Bedingungen: anderer Prüfer, anderes Gerät, anderer Tag, neue Chemikalien etc. Wiederfindungs(rate) (recovery): Verhältnis der unter Wiederholbedingungen gemessenen Ausbeute nach allen Analyseschritten (Mittelwert) zum richtigen Wert des Analyten in der Probe.
Richtigkeit (<i>accuracy</i>)	Sie erlaubt eine Aussage über den systematischen Fehler einer Methode. Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten und einem definitionsgemäß richtigen Wert (Referenzmaterial mit definiertem Gehalt).
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i>)	Kleinste nachweisbare Menge (DIN), minimal detektierbare Nettokonzentration oder Gehalt (ISO*).
Bestimmungsgrenze (<i>limit of detection</i>)	Kleinste quantifizierbare Menge (DIN), minimal detektierbare Nettokonzentration oder Gehalt (ISO*).
Spezifität (<i>specifity</i>)	Fähigkeit, eine bestimmte Substanz ohne Störungen durch andere Komponenten zu bestimmen. Selektivität (selectivity): Fähigkeit, verschiedene, nebeneinander zu bestimmende Komponenten ohne gegenseitige Störung zu erfassen.
Linearität (<i>linearity</i>)	Fähigkeit, innerhalb eines gegebenen Konzentrationsbereiches Ergebnisse zu liefern, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind (Kalibrierfunktion).
Empfindlichkeit (<i>sensitivity</i>)	Differenz in der Probenkonzentration, die der kleinsten detektierbaren Signaldifferenz entspricht; Steigung der Kalibriergeraden.
Arbeitsbereich (Messbereich) (<i>range</i>)	Konzentrationsbereich für akzeptable/bestätigte Angaben über die zu validierenden Parameter. Wird ermittelt aus der linearen Kalibrierfunktion, Bereich, für den diese Gültigkeit besitzt.

*) International Standardization Organisation

Prozess-Validierung

Gebiete der
Prozessvalidierung

In Ausnahmefällen kann es notwendig sein, Prozesse während der routinemäßigen Produktion zu validieren (**begleitende Validierung**). Eine **retrospektive Validierung** ist nur bei gut etablierten Prozessen zulässig. Übergreifende Vorschriften für die Arbeit in analytischen Laboratorien sowie für die Kalibrierung und Validierung von Analysenmethoden und Regelungen von Teilbereichen auf inoffizieller, wissenschaftlicher Grundlage werden unter den folgenden Begriffen zusammengefasst: Computersystem-Validierung (CSV), Good Analytical Practice (GAP), Good Automated Laboratory Practice (GALP).

Bedeutung des Standes der Technik

Anpassung der Methoden
an den Stand der Technik

Artikel 23 des Kodexes für Humanarzneimittel (Richtlinie 2001/83/EG, Lit. 3) fordert, dass auch nach Erteilung der Zulassung bezüglich der angewandten Kontrollmethoden zur qualitativen und quantitativen Analyse der Bestandteile des Fertigerzeugnisses stets der Stand der Technik und die Fortschritte der Wissenschaft berücksichtigt werden müssen. Gegebenenfalls sind die notwendigen Änderungen vorzunehmen, um die Kontrolle der Arzneimittel gemäß den allgemein anerkannten wissenschaftlichen Methoden sicherzustellen.

Literatur

- 1) Blasius H., Cranz H., Arzneimittel und Recht in Europa. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1998)
- 2) Blasius H., Müller-Römer D., Fischer, J., Arzneimittel und Recht in Deutschland. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1998)
- 3) Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel. Amtsblatt Nr. L 311 vom 28. 11. 2001, S. 67–128. Geändert durch die Richtlinien 2002/98/EG vom 27. Januar 2003, 2004/24/EG vom 31. März 2004 und 2004/27/EG vom 31. März 2004
- 4) Richtlinie 2003/63/EG der Kommission vom 25. Juni 2003 zur Änderung der Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel. Amtsblatt Nr. L 159 vom 27. 6. 2003, S. 46–94
- 5) Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz – AMG). In der Fassung der Bekanntmachung vom 12. Dezember 2005. BGBl. I S. 3394
- 6) Zweite Allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Änderung der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift zur Anwendung der Arzneimittelprüfrichtlinien vom 11. Oktober 2004. BAnz Nr. 197 vom 16. Oktober 2004
- 7) Eudralex. Volume 3 – Medicinal Products for Human Use: Guidelines. <http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev3.htm>. bzw. <http://www.emea.europa.eu/htms/human/humanguidelines/quality.htm>
- 8) Feiden K. (Hrsg.), Arzneimittelprüfrichtlinien. Sammlung nationaler und internationaler Richtlinien. Unter Mitarbeit von Helga Blasius. Fortsetzungswerk, einschl. 26. Aktualisierungslfg., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2007)

- 9) Richtlinie 2003/94/EG der Kommission vom 8. Oktober 2003 zur Festlegung der Grundsätze und Leitlinien der Guten Herstellungspraxis für Humanarzneimittel und für zur Anwendung beim Menschen bestimmte Prüfpräparate. Amtsblatt Nr. L 262 vom 14. 10. 2003, S. 22-2
- 10) Eudralex. Volume 4. EU Guidelines to Good Manufacturing Practice, Medicinal Products for Human and Veterinary Use, Stand Oktober 2005.
<http://EC.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/homev4.htm>
- 11) Verordnung zur Ablösung der Betriebsverordnung für pharmazeutische Unternehmer vom 3. November 2006. BGBl 2006 Teil I Nr. 51, 2523–2542 vom 9. November 2006, 2523 (Artikel 1: Verordnung über die Anwendung der Herstellungspraxis bei der Herstellung von Arzneimitteln und Wirkstoffen und über die Anwendung der Guten fachlichen Praxis bei der guten Herstellung von Produkten menschlicher Herkunft – (Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung – AMWHV)
- 12) Validation of analytical methods: Definitions and terminology (CPMP/ICH/381/95) as of June 1995
- 13) Validation of analytical procedures: Methodology (CPMP/ICH/281/95) as of Dezember 1996

1 Über den sinnvollen Umgang mit Messwerten und Messergebnissen

1.1 Ermittlung von Messwerten

Jede Messung ist naturgemäß mit experimentellen Fehlern oder Unsicherheiten behaftet. Häufig ist es nicht einfach, den Fehler einer Messung abzuschätzen oder gar zu berechnen; dennoch gibt es einige einfache Regeln, die es ermöglichen, ein Endergebnis mit der gebotenen Genauigkeit anzugeben. Darunter ist zu verstehen, dass das Resultat einer Messung oder Berechnung weder zu ungenau (d.h. mit zu wenig signifikanten Ziffern), noch übertrieben genau anzugeben ist (d.h. mit einer Anzahl an signifikanten Ziffern versehen ist, die in keiner Weise der Genauigkeit des Messvorganges entspricht – etwa sämtlichen Ziffern der Anzeige eines Taschenrechners).

Die Anzahl der angegebenen signifikanten Ziffern ist immer auch eine Aussage über die Genauigkeit bzw. über den Fehler des Messwertes.

Was ist bei der Angabe von Messwerten zu beachten?

Anzahl der Ziffern bei Messwerten

Signifikante Ziffern

Hierunter versteht man die Stellen, die mit Sicherheit bekannt sind plus der ersten unsicheren Stelle. Dabei wird üblicherweise unterstellt, dass die unsichere Stelle um ± 1 ihrer Einheit abweichen kann. Das Arzneibuch verwendet eine etwas andere Definition. Es werden nur die sicheren Stellen angegeben und eine Abweichung von ± 5 **hinter** der letzten angegebenen Stelle ist erlaubt.

Definition der signifikanten Ziffern

Unsicherheit

Unter **absoluter Unsicherheit** versteht man die mögliche Abweichung in der letzten Stelle eines Messwertes. Unter **relativer Unsicherheit** versteht man die absolute Unsicherheit in Promille oder Prozent bezogen auf den Messwert, siehe Gl. 1.1.

Definition der absoluten und relativen Unsicherheit

$$\text{Rel. Unsicherheit} = \frac{\text{abs. Unsicherheit}}{\text{Messwert}} \cdot 100 [\%] \quad (\text{Gl. 1.1})$$

Auf einer Analysenwaage kann üblicherweise mit einer Genauigkeit (absoluten Unsicherheit) von $\pm 0,5$ mg gewogen werden, obwohl eine Ablesung von zehntel Milligramm möglich ist. Bei einer Einwaage

Beispiel für die Berechnung
der relativen Unsicherheit

von z. B. 1341,7 mg sollte der richtige Wert somit zwischen 1341,2 und 1342,2 mg liegen. Als Messwert können 5 signifikante Ziffern angegeben werden, 4 sicher gemessene Ziffern (1341) sowie die 7 als unsichere Stelle. Die relative Unsicherheit beträgt nach Gl. 1.2 0,037 % und ist von der absoluten Einwaage abhängig.

$$\text{Rel. Unsicherheit} = \frac{\pm 0,5 \text{ mg}}{1341,7 \text{ mg}} \cdot 100 = 0,037 \% \quad (\text{Gl. 1.2})$$

Werden z. B. nur 25,7 mg mit der angenommenen absoluten Unsicherheit von $\pm 0,5$ mg eingewogen, so beträgt die relative Unsicherheit fast 2 % und dürfte für viele Analysen bereits zu groß sein. Aus diesem Grund lässt das Arzneibuch bei niedrigen Einwaagen häufig zunächst eine ca. 10fach höhere Menge einwiegen und nach dem Lösen in einem größeren Volumen, z. B. 100,0 ml, einen aliquoten Teil, z. B. 10,0 ml, für die Analyse abpipettieren. Dieses Verfahren führt zu einer geringeren Unsicherheit, da der Verdünnungsschritt mit Vollpipette und Messkolben zu einem kleineren Fehler führt als die direkte Einwaage der kleineren Menge.

Bedeutung des Dezimal-
kommata bzw. -punktes

Die Zahl der signifikanten Stellen vor oder hinter dem Dezimalkomma bzw. Dezimalpunkt ist bedeutungslos, da Dezimalkomma bzw. -punkt mit Hilfe der Exponentialschreibweise oder der Wahl einer anderen Einheit beliebig verschoben werden kann, siehe Gl. 1.3.

$$1341,7 \text{ mg} = 1,3417 \text{ g} = 1,3417 \cdot 10^3 \text{ mg} \quad (\text{Gl. 1.3})$$

Sind Nullen signifikante
Ziffern?

Erlaubt wäre jedoch die Schreibweise 0,0013417 kg, da führende Nullen, d. h. vor der ersten gemessenen Ziffer stehende Nullen im Gegensatz zu Nullen, die innerhalb des Messwertes oder im Anschluss an den Messwert stehen, nicht signifikant sind.

Die Umrechnung von z. B. 5,1 g = 5100 mg stellt somit einen groben Fehler dar, da bei der Angabe 5,1 g nur zwei signifikante Stellen definiert sind und die relative Unsicherheit bei einer angenommenen Abweichung von ± 1 in der letzten Stelle ca. 2 % beträgt. Die Angabe 5100 mg würde dagegen eine relative Unsicherheit von nur 0,02 % vortäuschen. Die richtige Schreibweise wäre 5,1 g = $5,1 \cdot 10^3$ mg, bei der die Zahl der signifikanten Stellen nach der Umrechnung unverändert beibehalten wird.

Angabe volumetrischer
Messwerte nach dem
Arzneibuch

Eine wiederum abweichende Definition benutzt das Arzneibuch bei der Angabe von volumetrischen Messwerten. Hier bedeutet eine Null hinter dem Dezimalkomma bzw. in der letzten Stelle hinter dem Dezimalkomma, dass das Volumen so genau wie möglich gemessen werden muss. In diesen Fällen ist bei quantitativen Bestimmungen eine Vollpipette oder ein Messkolben zu verwenden, für welche die zulässigen Toleranzen der Eichordnung gelten.

1.2 Berechnung von Messergebnissen

Fast immer ist es notwendig, aus verschiedenen Messwerten ein Analysenergebnis zu berechnen. Dabei ergibt sich häufig das Problem, dass die Angabe der einzelnen Messwerte mit unterschiedlicher Unsicherheit, d. h. auch mit unterschiedlicher Zahl von signifikanten Stellen erfolgt. Ein Beispiel dafür ist z. B. die quantitative Bestimmung von wasserfreiem Natriumsulfat durch Kationenaustauschchromatographie nach dem Arzneibuch. Als Einwaage sollen ca. 1,30 g, genau gewogen, verwendet werden. Nach den Definitionen des Arzneibuches bedeutet dies, dass die Einwaage zwischen 1,17 und 1,43 g liegen muss, da eine maximale Abweichung von 10 % gegenüber der Vorgabe erlaubt ist. Die Vorgabe von 1,30 g mit drei signifikanten Ziffern ist so zu interpretieren, dass auf einer Analysenwaage auf ± 5 mg genau gewogen werden muss, da das Arzneibuch in der nicht mehr angegebenen Stelle eine Abweichung von ± 5 zulässt. Die Einwaage könnte z. B. 1342 mg betragen, die relative Unsicherheit von ca. 0,4 % ist für eine derartige Bestimmung ausreichend. Die auf einer Analysenwaage üblicherweise erreichbare Genauigkeit von $\pm 0,5$ mg muss nicht ausgenutzt werden, wodurch sich der Zeitbedarf für die Wägung erniedrigt. Moderne digitale Analysenwaagen werden die Einwaage trotzdem mit 5 signifikanten Ziffern, d. h. auf zehntel Milligramm genau angeben, die auch verwendet werden kann.

Messwerte mit unterschiedlicher Unsicherheit

Beispiel: Anzahl der signifikanten Ziffern eines Messergebnisses, das durch Multiplikation und Division von Messwerten ermittelt wird

Wird nach dem Ionenaustausch die freigesetzte Schwefelsäure mit 1 M-Natronlauge titriert, so könnte sich bei Verwendung einer 50 ml Bürette ein Verbrauch von 18,8 ml ergeben. Eine genauere Angabe ist nicht möglich, da die Bürette nur auf 0,1 ml genau abgelesen werden kann. Die relative Unsicherheit dieser Messung beträgt ca. 0,5 % und ist für die Bestimmung ausreichend. Auch der maßanalytische Faktor wird deshalb vom Arzneibuch ebenfalls mit drei signifikanten Stellen (71,0 mg/ml) angegeben.

Bei dem Ergebnis dürfen somit nur drei signifikante Stellen angegeben werden, selbst wenn die Einwaage auf einer digitalen Analysenwaage mit 5 signifikanten Stellen durchgeführt wurde, siehe Gl. 1.4.

$$\text{Gehalt Na}_2\text{SO}_4 = \frac{18,8 \text{ ml} \cdot 71,0 \text{ mg/ml}}{1342,1 \text{ mg}} \cdot 100 = 99,5 \% \quad (\text{Gl. 1.4})$$

Der Grund dafür liegt darin, dass die Unsicherheit des Messergebnisses durch den Messwert mit der größten relativen Unsicherheit, in diesem Fall dem Volumen der Maßlösung, bestimmt wird. Das berechnete Ergebnis des Taschenrechners mit 8 oder mehr Ziffern muss in diesem Fall auf drei signifikante Ziffern verkürzt werden, wobei in die dritte Stelle die übliche Rundung einfließen kann. Die Angabe von mehr als drei signifikanten Ziffern würde eine geringere

Unsicherheit vortäuschen, die durch das Analysenverfahren nicht gegeben ist. Deutlich unterschieden werden muss bei derartigen Berechnungen zwischen Messwerten und sonstigen Zahlen. Die **Zahl** 100 im obigen Beispiel hätte somit keinen Einfluss auf die Anzahl der signifikanten Stellen.

Werden bei der Berechnung von Messergebnissen aus Messwerten außer Multiplikation und Division auch Additionen oder Subtraktionen durchgeführt, so gehen statt der relativen Unsicherheiten die absoluten Unsicherheiten der Messwerte in das Messergebnis ein. Bei Additionen oder Subtraktionen von Messwerten dürfen im Ergebnis nur so viele Dezimalstellen erscheinen, wie der Einzelwert mit der geringsten Stellenzahl rechts vom Dezimalkomma aufweist. Dies ist die Zahl mit der größten absoluten Unsicherheit. Exponentialzahlen sind zuvor auf den größten Exponenten abzugleichen:

Beispiel: Anzahl der signifikanten Ziffern eines Messergebnisses, das durch Addition und Subtraktion von Messwerten ermittelt wird

Beispiel 1

$4,16 \text{ min} + 17,032 \text{ min} + 28,9 \text{ min} = 50,1 \text{ min}$
und **nicht** (lt. Rechner) $50,092 \text{ min}$

Beispiel 2

$4,00 \cdot 10^{-2} \text{ min} + 5,55 \cdot 10^{-3} \text{ min} + 10^{-6} \text{ min} =$

$$\begin{array}{r} 4,00 \cdot 10^{-2} \text{ min} \\ + 0,555 \cdot 10^{-2} \text{ min} \\ + 0,0001 \cdot 10^{-2} \text{ min} \\ \hline \end{array}$$

$4,56 \cdot 10^{-2} \text{ min}$
und **nicht** (lt. Rechner) $4,5551 \cdot 10^{-2} \text{ min}$

2 Validierung und Kalibrierung

Für eine vertiefte Einführung in die mathematischen Grundlagen der Fehlerbetrachtung sei auf die Literatur 1–4 verwiesen. Siehe auch Kapitel „Rechtliche Grundlagen zur Qualitätskontrolle von Arzneimitteln“.

2.1 Validierung von Analysenverfahren

Fehler bei Analysenverfahren

Die bei Durchführung eines Analysenverfahrens erhaltenen Messwerte (x_i , $i = 1, 2, 3$ usw.) sind mit **Abweichungen vom wahren Wert** (Unsicherheiten) behaftet. Man unterscheidet:

Definitionen und Arten von Fehlern

- Zufällige (statistische) Abweichungen (zufällige Fehler)
- Systematische Abweichungen (systematische Fehler).

Zufällige (statistische) Abweichungen (zufällige Fehler). Unvermeidliche, zufällige, vom Einfluss des Analytikers unabhängige Schwankungen der Messwerte bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter genau den gleichen Bedingungen (**Wiederholbedingungen**). Ein Maß für diese zufälligen Abweichungen ist die **Präzision** (Kap. 2.1.1 und 2.1.2).

Zufällige Fehler

Systematische Abweichungen (systematische Fehler). Abweichungen, die auf eine vorhandene Störung des Analysenverfahrens zurückzuführen sind, z. B. mangelhafte Geräte, nicht genau eingestellte Normallösungen, Verunreinigung von Reagenzien, unvollständige Extraktionen, Zersetzungen, Einfluss von Begleitstoffen, eine sich wiederholende falsche persönliche Verfahrensweise u. a. Ein Maß für die systematischen Abweichungen ist die **Richtigkeit** bzw. die **Wiederfindung** (Kap. 2.1.1 und 2.1.2).

Systematische Fehler

Angabe der Mess- oder Analysenergebnisse

Die Angaben der Mess- oder Analysenergebnisse erfolgt im Allgemeinen als **arithmetischer Mittelwert** ($\bar{x}$) mehrerer Bestimmungen (x_1 , x_2 , x_3 usw.). Die **Fehler** (Unsicherheiten) ($\pm \Delta x$) einer Messung (Ab-

Arithmetischer Mittelwert

weichung um Δx nach oben oder nach unten) können angegeben werden als:

Absoluter und relativer Fehler

- **Absolute Fehler** (absolute Messunsicherheiten) in der gleichen Maßeinheit wie das Mess- bzw. Analyseergebnis ($\bar{x} \pm \Delta x$)
- **Relative Fehler** (relative Messunsicherheiten), in Prozent des Mess- bzw. Analyseergebnisses s. Gl. 2.1.

$$\bar{x} \pm \frac{\Delta x \cdot 100}{\bar{x}} [\%] \quad (\text{Gl. 2.1})$$

In jedem Fall bezeichnet der Fehler ausgehend vom Mittelwert $\bar{x}$ das Intervall $\pm \Delta x$ in dem mit einer definierten Wahrscheinlichkeit der wahre Wert der Messgröße liegt. Ein korrekt angegebenes Analyseergebnis besteht aus dem um bekannte systematische Abweichungen korrigierten Mittelwert ($\bar{x}$) und dem Fehler.

Anwendung des Medians

Median. Die Angabe des arithmetischen Mittels $\bar{x}$ setzt eine symmetrische Häufigkeitsverteilung der Einzelmesswerte in Form einer **Gauß'schen Glockenkurve** voraus (Kap. 2.1.1). Ist keine symmetrische Verteilung gegeben, wie z. B. bei biologischen oder medizinischen Untersuchungen, so kann der **Medianwert (Median)** herangezogen werden. Dies ist jedoch nur bei größeren Messreihen sinnvoll.

Ermittlung des Medians

Zur Ermittlung des Medians werden die Einzelmesswerte in steigender Reihenfolge geordnet. Bei ungerader Zahl von Messwerten wird der mittlere Wert als Median herangezogen. Bei gerader Anzahl von Messwerten ergibt sich der Median als Mittelwert der beiden mittleren Werte (z. B. bei 10 Messwerten aus dem 5. und 6. Wert). Vorteil des Medians ist, dass er durch stark abweichende Messwerte (**Ausreißer**, Kap. 2.1.2) nicht beeinflusst wird d. h. er ist gegenüber Ausreißern **robust** (Kap. 2.1.1).

Was ist das Ziel der Validierung?

Ziel der **Validierung einer Analysenmethode** ist die Überprüfung und Bewertung ihrer Qualität bzw. **die Ermittlung der Fehler**. Dabei soll durch Laboratoriumsversuche nachgewiesen werden, dass das Analysenverfahren aussagekräftige, richtige und präzise Informationen über das analytische Problem liefert bzw. welche Unsicherheiten zu erwarten sind.

2.1.1 Qualitätsmerkmale für Analysenverfahren

Zur Validierung von Analysenverfahren werden u. a. folgende Qualitätsmerkmale herangezogen:

Qualitätsmerkmale bei der Validierung von Analysenverfahren

- Präzision (precision)
- Richtigkeit (accuracy)
- Nachweisgrenze (limit of detection)
- Bestimmungsgrenze (limit of quantitation)
- Selektivität, Spezifität (selectivity, specificity)

- Linearität (linearity)
- Empfindlichkeit (sensitivity)
- Bereich (Bestimmungsbereich) (range)
- Robustheit (robustness, ruggedness).

Die Qualitätsmerkmale werden gelegentlich unterschiedlich definiert, so dass diesbezüglich eine gewisse Verwirrung herrscht. Im Folgenden wurden insbesondere die Definitionen der USP und der DIN-Normen 55350 herangezogen (Lit. 5).

Präzision

Die **Präzision** ist ein Maß für den Grad der Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter genau den gleichen Bedingungen (**Wiederholbedingungen**). Die Messergebnisse (x_i) sind im Allgemeinen statistisch um den Mittelwert $\bar{x}$ (das arithmetische Mittel der Messwerte) in Form einer **Gauß'schen Glockenkurve** verteilt (**Normalverteilung**, siehe Abb. 2.1). Man bezeichnet die statistischen Abweichungen auch als **zufällige Fehler**.

Zufällige Fehler, Präzision bzw. Reproduzierbarkeit von Analysenergebnissen

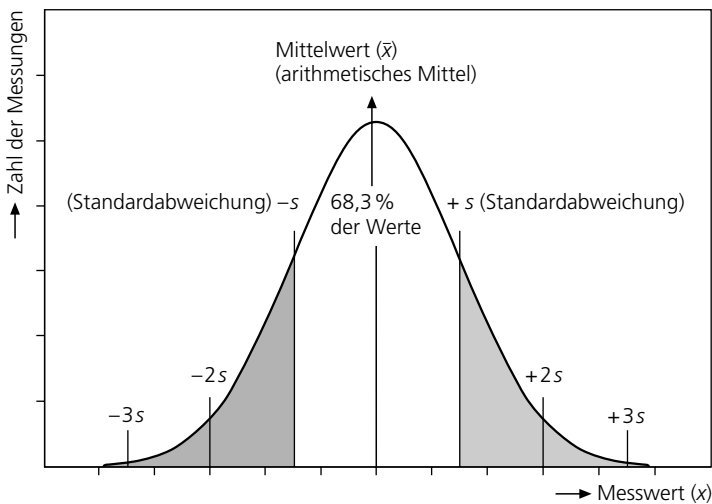


Abb. 2.1 Normalverteilung von Messwerten (Gauß'sche Glockenkurve)

Die für die Validierung wichtige Frage, ob eine Normalverteilung vorliegt, kann z. B. mithilfe von **Wahrscheinlichkeitspapier** beantwortet werden. Dafür sollten mindestens ca. 30 Messwerte vorliegen. Mit schon fünf Messwerten sind Abschätzungen möglich (Lit. 6).

Kennzeichnung der
Präzision

Die Präzision eines Verfahrens kann durch die **Standardabweichung** (s) bzw. **relative Standardabweichung** (**Variationskoeffizient**, Kap. 2.1.2) zahlenmäßig erfasst werden. Die Standardabweichung charakterisiert die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert. Man unterscheidet:

- **Wiederholpräzision** (repeatability), wenn das Analysenverfahren am gleichen Objekt unter genau den selben Bedingungen mit dem gleichen Gerät im gleichen Labor vom gleichen Analytiker mehrmals wiederholt wird. Dabei wird die **Wiederholstandardabweichung** bestimmt (Kap. 2.1.2).
- **Vergleichspräzision*** (reproducibility), bei wiederholter Durchführung des Analysenverfahrens am gleichen Objekt in verschiedenen Laboratorien durch verschiedene Analytiker mit verschiedenen Geräteausrüstungen. Dabei wird die **Vergleichstandardabweichung** bestimmt (Kap. 2.1.2).

Richtigkeit

Abweichung des Mittelwertes
vom wahren Wert

Die **Richtigkeit** gibt die Abweichung des Mittelwertes $\bar{x}$ der Bestimmungen vom **wahren Wert** an. Die Ursachen für diese Abweichungen können als **systematische Fehler** beschrieben werden. Wenn der wahre Wert einer Analyse nicht bekannt ist (was häufig der Fall ist), wird stattdessen ein durch Abschätzung ermittelter **Näherungswert** zur Berechnung der Richtigkeit herangezogen. Diesen Näherungswert bezeichnet man als **richtigen Wert**.

Abschätzung des richtigen
Wertes

Zur Ermittlung bzw. **Abschätzung des richtigen Wertes** gibt es u. a. folgende Möglichkeiten:

- Stöchiometrische Berechnung (man erhält den wahren Wert).
- Referenzmethode, mithilfe einer anerkannten bzw. hochgereinigten Standardsubstanz (richtiger Wert). Im Arzneibuch sind für manche Arzneistoffe Chemische Referenzsubstanzen (**CRS** bzw. **RN**) und Biologische Referenzsubstanzen (**BRS**) aufgeführt. Sie können vom Technischen Sekretariat der Europäischen Arzneibuchkommission, Straßburg bezogen werden. Für Referenzmaterialien gilt als analytisches Qualitätsmerkmal die **Rückführbarkeit** (traceability). Sie bedeutet, dass das verwendete Referenzmaterial auf ein „zertifiziertes Referenzmaterial“ einer unabhängigen Institution bezogen oder mit ihm verglichen (rückgeführt) wurde.

Chemische und biologische
Referenzsubstanzen des
Arzneibuchs

*) Oft wird für die Vergleichspräzision der deutsche Begriff **Reproduzierbarkeit** angewandt. Nach DIN 55350 soll dieser Begriff nicht verwendet werden, da er umgangssprachlich die Wiederholpräzision einschließt.

Nachweisgrenze

Sie gilt für **qualitative** Analysen und gibt die niedrigste Masse (g, mg, µg, ng) bzw. den niedrigsten Gehalt (**Grenzkonzentration**) einer Substanz (% , ppm, ppb, mol · l⁻¹) an, die mit dem Verfahren noch zuverlässig nachgewiesen werden kann.

Kleinste Masse oder Konzentration bei **qualitativen** Analysen

Bestimmungsgrenze

Sie gilt für **quantitative** Bestimmungen und ist die niedrigste Masse bzw. der niedrigste Gehalt, die unter den angegebenen Analysenbedingungen in dem vorliegenden Material noch mit akzeptabler Präzision (s. o.) und Richtigkeit (s. o.) bestimmt werden kann.

Kleinste Masse oder Konzentration bei **quantitativen** Analysen

Selektivität

Die **Selektivität** bzw. **Spezifität** gibt an, inwieweit ein Verfahren für eine bestimmte Substanz in Gegenwart anderer Substanzen (chemisch ähnliche Substanzen, Verunreinigungen, Abbauprodukte, Hilfsstoffe u. a.) präzise und richtige Ergebnisse liefert. Man bezeichnet die Summe der Begleitstoffe auch als **Matrix**.

Selektivität, Spezifität

Definition der Matrix

Linearität

Die **Linearität** einer quantitativen Analysenmethode beschreibt die **Proportionalität** zwischen den Messergebnissen und der Stoffmenge bzw. der Konzentration. Die Proportionalität kann entweder direkt sein, oder erst durch eine mathematische Transformation der Messwerte sichtbar gemacht werden. Linearität gilt praktisch nur für einen bestimmten Konzentrationsbereich (**Bestimmungsbereich**, s. u.).

Proportionalität zwischen Messwerten und Stoffmenge; Bestimmungsbereich

Empfindlichkeit

Die **Empfindlichkeit** beschreibt, wie stark ein Messergebnis auf Konzentrationsänderungen reagiert. Ein Analysenverfahren ist umso empfindlicher, je größer die Änderung des Messwertes bei einer bestimmten Konzentrationsänderung ist. Im umgangssprachlichen Gebrauch wird der Begriff Empfindlichkeit häufig fälschlicherweise mit der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze (s. o.) gleichgesetzt. Der Begriff Nachweisempfindlichkeit sollte nicht benutzt werden, da er nicht eindeutig definiert ist.

Was ist Empfindlichkeit? Sie hat in der Umgangssprache eine andere Bedeutung als in der Analytik!

Zahlenmäßig erfasst wird die Empfindlichkeit durch Angabe des Zuwachses der Messgröße je Zunahme um eine Konzentrationseinheit der zu bestimmenden Substanz. Bei direkter Proportionalität entspricht dies der **Steigung der Kalibriergeraden** (Kap. 2.1.2). Ein Verfahren ist umso empfindlicher, je größer die Steilheit ist.

Erfassung der Empfindlichkeit

Bestimmungsbereich

Definition des Bestimmungsbereiches

Der **Bestimmungsbereich** (Bereich) ist dasjenige Massen- bzw. Konzentrationsintervall, in welchem der zu bestimmende Stoff mit der angegebenen Präzision und Richtigkeit (s. o.) bestimmt werden kann. Die Angabe erfolgt in denselben Einheiten wie bei den Analysenergebnissen (z. B. g, mg, µg, %, ppm, mol · l⁻¹).

Robustheit

Was ist die Robustheit eines Analysenverfahrens?

Die **Robustheit** (Störanfälligkeit, Belastbarkeit gegenüber äußeren Einflüssen) einer Analysenmethode bedeutet ihre Widerstandsfähigkeit gegen stärkere Abänderungen der Analysenbedingungen und gegen Störeffekte. Damit beschreibt sie, inwieweit ein Verfahren trotz dieser Änderungen noch richtige, präzise und aussagekräftige Informationen liefert. Folgende Änderungen bzw. Einflüsse kommen z. B. in Frage:

Einflüsse auf die Robustheit

- Störanfälligkeit der Messgeräte
- Stabilität der Prüflösung
- Durchführungszeiten
- Temperatureinflüsse
- Lichteinflüsse
- Herkunft, Stabilität und Alter der Reagenzien
- Schwankungen in der Konzentration der Reagenzien
- Untersuchungslaboratorium (vgl. auch Kap. 2.2.2).

Man spricht von einem **robusten Verfahren**, wenn solche Effekte keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das Analysenergebnis ausüben. In der Literatur ist der Begriff der Robustheit nicht ganz einheitlich und noch nicht endgültig definiert. Die USP unterscheidet z. B. zwischen Robustheit (robustness) und Rauheit (ruggedness).

2.1.2 Erfassung und Bestimmung der Qualitätsmerkmale für Analysenverfahren

Erfassung der Präzision durch Bestimmung der Standardabweichung

Beschreibung der Präzision durch die Standardabweichung

Zur Beurteilung der **Präzision** eines Analysenverfahrens (bzw. des **zufälligen Fehlers**) wird die **Standardabweichung** herangezogen. Man unterscheidet:

Arten der Standardabweichung

- Absolute Standardabweichung (s)
- Relative Standardabweichung (s_{rel}) (auch: **Variationskoeffizient** V_k)
- Quadrat der Standardabweichung (s^2) als **Varianz**.

Die **absolute Standardabweichung** (s) bestimmt man aus den Ergebnissen der mehrmaligen Wiederholung der Analyse unter genau den gleichen Bedingungen.

Die Berechnung von s erfolgt mit Hilfe der Gl. 2.2.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

Berechnung der
absoluten
Standardabweichung

s = absolute Standardabweichung

x_i = Einzelmesswerte der Bestimmungen

$\bar{x}$ = Mittelwert der Einzelmesswerte

n = Anzahl der Bestimmungen (mindestens 5 Werte)

Die Standardabweichung (s) wird als **Betrag (ohne Vorzeichen)** angegeben. Sie ist zur Kennzeichnung entsprechender Intervalle in der Gauß'schen Glockenkurve nach rechts ($+s$) und nach links ($-s$) aufgetragen (Abb. 2.1), bzw. vom Mittelwert $\bar{x}$ subtrahiert oder addiert ($\bar{x} \pm s$). Die Angabe erfolgt in den gleichen Einheiten wie das Analyseergebnis (g, mg, µg, ng, mol · l⁻¹).

Angabe der Standardab-
weichung

Gauß'sche Glockenkurve

Würde man die Abweichung jedes einzelnen Messwertes (x_i) vom Mittelwert ($\bar{x}$) berechnen und die Werte einfach summieren, so ergäbe sich auf Grund der unterschiedlichen Vorzeichen (positive und negative Abweichungen vom Mittelwert) der Wert Null.

Zum Vergleich der Standardabweichungen verschiedener Verfahren eignet sich besser die **relative Standardabweichung** (s_{rel}) (meist in %) bezogen auf den Mittelwert der Bestimmungen ($\bar{x}$). Die relative Standardabweichung wird auch als **Variationskoeffizient** (Vk) bezeichnet.

Relative Standardabwei-
chung; Variationskoeffi-
zient; Varianz

$$s_{\text{rel}} \text{ (bzw. } Vk) = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} [\%] \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Die **Varianz** (s^2) kann zur Ermittlung der Gesamtstandardabweichung mehrerer unabhängiger Messwertreihen herangezogen werden (Lit. 3).

Folgen die Messergebnisse einer **Gauß'schen Verteilung (Normalverteilung, Gauß'sche Glockenkurve)** (Kap. 2.1.1, Abb. 2.1), so liegen 68,3 % der gemessenen Werte innerhalb des Intervalls $\bar{x} - s$ bis $\bar{x} + s$, 95,9 % der Werte zwischen $\bar{x} - 2s$ bis $\bar{x} + 2s$ und 99,7 % zwischen $\bar{x} - 3s$ bis $\bar{x} + 3s$.

Als **Ausreißer** bezeichnet man Messwerte, die stark von den übrigen abweichen. Die Ursachen für diese Abweichungen sollten so weit möglich aufgeklärt werden. Zur Abgrenzung von anderen Messwerten gibt es **Ausreißertests** (Lit. 6, 7). Durch Ausreißer nicht beeinflusst wird der **Median** (s. o.), der aber nur bei großen Messreihen eingesetzt wird. So genannte **Unfallwerte** sind Messwerte, die durch Fehler bei der Versuchsdurchführung verfälscht wurden und deren Ursache erkannt wurde (z. B. Übertitrieren usw.) (Lit. 7).

Behandlung von Ausreißern
bei Messreihen; Ausreißer-
tests; Unfallwerte

Zur Bestimmung der Standardabweichung werden mindestens $n = 5$ Proben getrennt aufgearbeitet und analysiert; keinesfalls sollte

Berechnung der Standard-
abweichung

diese Zahl unterschritten werden. Man führt die Berechnung am besten mithilfe einer Wertetabelle durch. Zuerst berechnet man den Mittelwert ($\bar{x}$) und dann die Abweichungen der Einzelbestimmungen (x_i) vom Mittelwert ($x_i - \bar{x}$), die man quadriert: $(x_i - \bar{x})^2$. Die Quadrate werden addiert, durch die Zahl der Messwerte vermindert um 1, dividiert und die Wurzel gezogen (Gl. 2.2). Der Betrag (ohne Vorzeichen) ergibt die Standardabweichung. Die meisten Taschenrechner für naturwissenschaftliche Zwecke ermöglichen die Berechnung der Standardabweichung aufgrund der einprogrammierten Funktion.

Mithilfe der Standardabweichung kann man auch die **Wiederholbarkeit** und **Vergleichbarkeit** von Analyseergebnissen sowie die **Genauigkeit von Messgeräten** (Kap. 2.2) beschreiben:

Wiederholstandard-
abweichung

■ Beschreibung der Wiederholbarkeit von Analyseergebnissen durch die **Wiederholstandardabweichung**: Mehrfache Wiederholung der Bestimmung von der Probenvorbereitung bis zur quantitativen Analyse unter genau den gleichen Bedingungen, im gleichen Laboratorium und vom gleichen Analytiker.

Vergleichstandardabwei-
chung; Ringversuche

■ Beschreibung der Vergleichbarkeit von Analyseergebnissen durch die **Vergleichstandardabweichung**: Durchführung des Analysenverfahrens an der gleichen Probe durch mehrere verschiedene Laboratorien oder verschiedene Analytiker an verschiedenen Geräten (**Ringversuche**) (Lit. 7). Die Vergleichstandardabweichung ist im Allgemeinen um den Faktor 1,5 bis 2-mal größer als die Wiederholstandardabweichung.

Systemstandardabwei-
chung; Gerätestandard-
abweichung

■ Beschreibung der Genauigkeit von Messgeräten durch die **Systemstandardabweichung**: Sie dient der Überprüfung und Beurteilung des Messsystems bzw. eines Messgerätes (**Gerätestandardabweichung**) insbesondere zur Berechnung der **analytischen Empfindlichkeit** (Kap. 2.2.1). Zur Bestimmung der Systemstandardabweichung wird eine Probe einmal aufgearbeitet, die Probelösung mindestens zehnmal gemessen und die Standardabweichung dieser Messungen bestimmt.

Vergleich von Standardabweichungen als Maß der Präzision durch den *F*-Test

Vergleich unterschiedlicher
Analysenverfahren

Wie schon erwähnt, wird die Standardabweichung auch zum Vergleich der Präzision **unterschiedlicher** Analysenverfahren herangezogen. Der Unterschied in der Standardabweichung kann entweder zufallsbedingt sein oder auf Verbesserungen oder Verschlechterungen der analytischen Methode beruhen. Aufschluss darüber, ob die Präzision zweier Verfahren als gleich anzusehen ist oder unterschiedliche Standardabweichungen auf andere Einflüsse zurückzuführen sind, gibt der **F-Test**. Zur Anwendung des *F*-Tests wird als erster Einstieg der unten stehende vereinfachte Weg empfohlen. Für ein genaueres Studium wird auf die weiterführende Literatur (Lit. 8, 9, 1–4) verwie-

Voraussetzung:
Normalverteilung!

sen (nicht erfasst wurden in diesem Zusammenhang Begriffe wie z. B. **Nullhypothese**, **einseitiger** und **zweiseitiger** Test, **α -** und **β -Fehler** usw.).

Man berechnet zunächst aus den Standardabweichungen der beiden zu vergleichenden Verfahren (1 und 2) eine Testgröße F nach Gl. 2.4:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

Berechnung der Testgröße der F -Verteilung

F = Testgröße der F -Verteilung

s_1 = Standardabweichung des Verfahrens 1

s_2 = Standardabweichung des Verfahrens 2 ($s_1 > s_2$)

Liegt ein signifikanter Unterschied in der Standardabweichung d.h. der Präzision der Verfahren 1 und 2 vor, so ist F größer als ein tabellierter Zahlenwert (Tab. 2.1, F -Verteilung). Dieser hängt vom Risiko der Aussage und von der Zahl der durchgeführten Analysen nach beiden Methoden (n_1 , n_2) ab. Ist F gleich oder kleiner als der tabellierte Zahlenwert, so ist ein Unterschied in der Präzision der Verfahren 1 und 2 nicht nachweisbar.

Die Werte der F -Verteilung sind oft für eine **Irrtumswahrscheinlichkeit** von 5 % tabelliert (Tab. 2.1). Vereinfacht dargestellt bedeutet dies, dass bei F -Werten, die größer als die tabellierten Werte sind, mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % die verglichenen Methoden ungleiche Präzision besitzen. In Tab. 2.1 entsprechen f_1 und f_2 der um 1 verminderten Zahl der jeweils durchgeführten Bestimmungen (Zahl der Freiheitsgrade) ($f_1 = n_1 - 1$, $f_2 = n_2 - 1$).

Interpretation der Werte der F -Verteilung

Erfassung der Richtigkeit, Wiederfindung

Die **Richtigkeit** eines Analysenverfahrens hängt von der Größe **systematischer Fehler** ab, die auf eine Störung des analytischen Verfahrens hinweisen. Sie kann überprüft werden (Kap. 2.1.1):

- Mithilfe eines Standards (**Referenzmethode**)
- Anhand einer Kalibriergeraden, wenn diese nicht durch den Nullpunkt verläuft (s. auch unter Erfassung von Linearität, Empfindlichkeit und Bestimmungsbereich).

Die relative Abweichung des Analysenwertes vom richtigen Wert (Kap. 2.1.1) wird mithilfe eines Standards bzw. einer Standardsubstanz bestimmt. Dazu werden mindestens drei Modellmischungen mit verschiedenen Gehalten der zu bestimmenden Substanz (**Standardsubstanz**) hergestellt, die auch alle anderen Komponenten enthalten müssen. Der Gehalt dieser Modellmischungen wird als richtiger Wert (μ) angesehen (Kap. 2.1.1). Aus dem Mittelwert ($\bar{x}$) mehrerer (jeweils mindestens 5) Bestimmungen an **einer** Modellmischung erhält man einen Ausdruck für den Gesamtfehler der Bestimmungsmethode in

Überprüfung der Richtigkeit durch eine Referenzmethode

Tab. 2.1 F -Verteilung (Irrtumswahrscheinlichkeit 5 %) nach Lit. 4 ($f_1 = n_1 - 1$; $f_2 = n_2 - 1$)

$\frac{f_1}{f_2}$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,9	245,9	248,0	249,1	250,1	251,1	252,2	253,3	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25	2,21
14	4,60	3,74	3,32	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,10	2,06	2,01	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	1,97	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	1,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	1,98	1,93	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,25	2,18	2,10	2,05	2,01	1,96	1,92	1,87	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,23	2,15	2,07	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,20	2,13	2,05	2,01	1,96	1,91	1,86	1,81	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79	1,73
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,16	2,09	2,01	1,96	1,92	1,87	1,82	1,77	1,71
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,15	2,07	1,99	1,95	1,90	1,85	1,80	1,75	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	2,13	2,06	1,97	1,93	1,88	1,84	1,79	1,73	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,12	2,04	1,96	1,91	1,87	1,82	1,77	1,71	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,10	2,03	1,94	1,90	1,85	1,81	1,75	1,70	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,59	1,53	1,47	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96	1,91	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35	1,25
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,67	1,57	1,52	1,46	1,39	1,32	1,22	1,00

Form der relativen Abweichung vom jeweils richtigen Wert in Prozent (Gl. 2.5).

$$\text{Relative Abweichung} = \frac{(\bar{x} - \mu) \cdot 100}{\mu} [\%] \quad (\text{Gl. 2.5})$$

$\bar{x}$ = Mittelwert der Bestimmungen an einer Modellmischung

μ = richtiger Wert (zugesetzte Substanzmenge zur Modellmischung)

Berechnet man umgekehrt die in der Analyse wiedergefundene Substanzmenge in Prozent, so ergibt sich die **Wiederfindung (Wiederfindungsrate; recovery)** (Gl. 2.6).

$$\text{Wiederfindung} = \frac{\bar{x} \cdot 100}{\mu} [\%] \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Berechnung der Wiederfindung; Wiederfindungsrate

Diese bildet ebenfalls ein Maß für die Richtigkeit des Analysenverfahrens.

Abschätzung, ob in einem Analysenverfahren ein systematischer Fehler vorliegt durch den **t-Test**

Die an Modellanalysen ermittelte relative Abweichung vom richtigen Wert (bzw. die **Wiederfindung**) gibt keine **exakte** Auskunft, ob **wirklich** ein systematischer Fehler vorliegt, sondern stellt einen Gesamtfehler dar, in welchem auch zufällige Fehler enthalten sind. Ob auch ein systematischer Fehler vorliegt, kann mit dem **t-Test (Student-t-Test)** abgeschätzt werden. Dabei wird das Auftreten eines systematischen Fehlers mit Hilfe eines **t-Wertes** ermittelt, welcher sich aus der Statistik ergibt (Tab. 2.2). Man berechnet zuerst den t -Wert (t_{ber}) für die Analyse und vergleicht ihn mit dem tabellierten t -Wert für $f = n - 1$ (Tab. 2.2):

Berechnung des t -Wertes zur Ermittlung systematischer Fehler

Student ist ein Pseudonym des englischen Chemikers W. S. Gosset (1876 bis 1937)

$$t_{\text{ber}} = \frac{\bar{x} - \mu}{s} \cdot \sqrt{n} [\%] \quad (\text{Gl. 2.7})$$

t_{ber} = berechneter Wert

$\bar{x}$ = Mittelwert der Bestimmungen

μ = richtiger Wert (z. B. zugesetzte Standardsubstanz)

s = Standardabweichung des Verfahrens

n = Zahl der durchgeführten Bestimmungen

$f = n - 1$ (vgl. Tab. 2.2)

Ein **systematischer Fehler** wird nicht angenommen, wenn der berechnete Wert (t_{ber}) zwischen dem positiven und negativen Betrag des Tab. 2.2 entnommenen t -Wertes liegt: $-t < t_{\text{ber}} < +t$.

Tab. 2.2 *t*-Test-Tabelle (nach Lit. 10) ($f = n - 1$)

<i>f</i>	Irrtumswahrscheinlichkeit	
	5 %	1 %
1	12,706	63,657
2	4,303	9,925
3	3,182	5,841
4	2,776	4,604
5	2,571	4,032
6	2,447	3,707
7	2,365	3,499
8	2,306	3,355
9	2,262	3,250
10	2,228	3,169
15	2,131	2,947
20	2,086	2,845
30	2,042	2,750
40	2,021	2,704
60	2,000	2,660
∞	1,960	2,576

Erfassung der Nachweisgrenze

Grenzkonzentration bei
nicht instrumentellen
Methoden

Für nicht instrumentelle Methoden (z. B. Fällungsanalysen, Farb-reaktionen u. a.) wird an Modellmischungen diejenige Masse bzw. Konzentration (**Grenzkonzentration**) ermittelt, bei der die Reaktion gerade noch als eindeutig positiv angesehen werden kann. Für **instrumentelle Methoden** wird die Ermittlung der Nachweisgrenze in Kap. 2.2.2 besprochen.

Erfassung der Bestimmungsgrenze

Bestimmungsgrenze bei
nicht instrumentellen
Methoden

Für nicht instrumentelle Methoden wird an Modellmischungen die niedrigste Masse bzw. Konzentration ermittelt, bei der die quantitative Bestimmung noch mit vertretbarer Präzision und Richtigkeit durchgeführt werden kann. Für **instrumentelle Methoden** vgl. Kap. 2.2.3.

Erfassung der Selektivität

Die Beurteilung der Selektivität (Spezifität) ist für die Arzneistoff-Analytik von besonderer Bedeutung. Zu ihrer Erfassung muss die zu bestimmende **Reinsubstanz (Standardsubstanz)** zur Verfügung stehen, bzw. isolierbar sein. Zunächst sollte sichergestellt werden, dass das Messsignal nur durch die Prüfsubstanz erzeugt wird. In manchen Fällen sind Simultanbestimmungen mehrerer Substanzen möglich, auch wenn die Messsignale dieser Substanzen teilweise überlappen (vgl. z. B. Kap. 11, UV-Vis-Spektroskopie). Dann führt man Analysen in Gegenwart der **Proben-Matrix**, d. h. aller Begleitstoffe (Verunreinigungen, Abbauprodukte, Begleitsubstanzen, Hilfsstoffe u. a.; **Vergleichsanalyse**) sowie **ohne** diese Begleitstoffe aus (**Referenzanalyse**) und vergleicht die Ergebnisse und die Standardabweichungen. Eventuell ist ein *t*-Test durchzuführen, um die Identität der Mittelwerte nachzuweisen, s. u. Weichen die Mittelwerte bzw. Standardabweichungen voneinander ab, so liegen Störungen durch die Matrix vor.

Stehen die Begleitstoffe nicht zur Verfügung oder sind sie unbekannt, so müssen die Bestimmungsergebnisse mit solchen verglichen werden, bei welchen das Analysenmaterial vorher einer mehr oder weniger vollständigen Reinigung unterzogen wurde (z. B. durch chromatographische Verfahren). Für die Validierung der Analytik von Phytopharmaka vgl. Lit. 11.

Standardsubstanzen zur Erfassung der Selektivität

Vergleich der Ergebnisse der Referenz- und Vergleichsanalyse; Störungen durch die Matrix

t-Test zum Vergleich zweier Mittelwerte

Der Vergleich der Mittelwerte zweier Messreihen z. B. zur Beurteilung der Selektivität ist mithilfe des *t*-Testes (s. o. unter Erfassung der Richtigkeit, Wiederfindung) nach **vorangegangenem *F*-Test** (s. o. unter Erfassung der Präzision durch Bestimmung der Standardabweichung) möglich. Voraussetzung ist, dass nach dem *F*-Test die Standardabweichungen als **nicht signifikant unterschiedlich** angesehen werden. Zunächst wird die totale Standardabweichung (s_t) der beiden Messreihen (Messreihe 1, Messreihe 2) berechnet:

Vergleich der Mittelwerte zweier Messreihen

Berechnung der totalen Standardabweichung

$$s_t = \sqrt{\frac{s_1^2 (n_1 - 1) + s_2^2 (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Dann wird die Testgröße t_{ber} bestimmt:

Berechnung der Testgröße t_{ber}

$$t_{\text{ber}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_t} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

- s_1, s_2 = Standardabweichungen der Messreihen 1 und 2
- n_1, n_2 = Anzahl der Messungen in den Messreihen 1 und 2
- $\bar{x}_1, \bar{x}_2$ = Mittelwert der Messreihen 1 und 2

Der Unterschied der beiden Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ wird als nur zufällig angesehen, wenn sich ergibt: $-t < t_{\text{ber}} < +t$. Der Wert t wird (mit $f = n_1 + n_2 - 2$) der Tab. 2.2 entnommen.

Erfassung von Linearität, Empfindlichkeit und Bestimmungsbereich

Die Ermittlung der **Linearität**, der **Empfindlichkeit** und des **Bestimmungsbereiches** kann im gleichen Versuch durchgeführt werden.

Erfassung der Linearität

Abhängigkeit der Messwerte von der Konzentration; Verdünnungsreihe

Anhand von Modellmischungen mit steigender Konzentration an Standardsubstanz oder zunehmender Verdünnung wird die Abhängigkeit der Messwerte von der Konzentration untersucht und eine graphische Auftragung der Messwerte gegen die Konzentration erstellt. Hierbei sind als mögliche Ergebnisse zu erwarten:

Berechnung einer Kalibriergeraden bei direkter Proportionalität, Ausgleichsgerade

■ Bei **direkter Proportionalität** (linearer Abhängigkeit) erhält man eine Gerade (**Kalibriergerade**). Ihr Verlauf sollte mit Hilfe der **Methode der kleinsten Fehlerquadrate** optimiert werden (**Ausgleichsgerade**, s. u.). Zur Erstellung einer Kalibriergeraden müssen mindestens 5 Messpunkte verwendet werden. Die Messpunkte sollen den Messbereich gleichmäßig abdecken, der Null- bzw. Blindwert, d. h. der Messwert einer substanzfreien Probe, muss ebenfalls gemessen werden. Als Beispiel für eine Kalibriergerade vgl. Abb. 8.2 und 11.13.

Transformation einer nicht linearen Kalibrierkurve in eine Gerade

■ Bei Kurven (**Kalibrierkurve**) sollte versucht werden, durch mathematische Transformationen eine Gerade zu erhalten (z. B. durch graphische Auftragung des Logarithmus der Messwerte gegen die Konzentration bzw. des Logarithmus der Konzentration gegen die Messwerte). Kalibrierkurven verlaufen häufig in begrenzten Bereichen **nahezu linear** und können in diesem Bereich annähernd wie eine Gerade behandelt werden. Beispiele bilden Abb. 11.13 und 21.7.

Berechnung des Verlaufs einer Kalibriergeraden (Regression 1. Art)

Optimierung der Kalibriergeraden durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate

Um aus den Messpunkten (der **Messwolke**) den Verlauf der Kalibriergeraden zu bestimmen, benutzt man die **Methode der kleinsten Fehlerquadrate**.

Ist die Messgröße y eine lineare Funktion der Konzentration x , so besitzt die Kalibriergerade (Abb. 8.2) eine Gleichung der Form:

$$y = a + bx$$

a = Achsenabschnitt auf der y-Achse

b = Steigung (**Regressionskoeffizient**)

Die charakteristischen Größen der Kalibriergeraden erhält man wie folgt (Lit. 3):

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Gl. 2.10})$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

x_i = Konzentrationswerte

$\bar{x}$ = Mittelwert der Konzentrationen

y_i = Messwerte

$\bar{y}$ = Mittelwert der Messwerte

Die Berechnung ist einfacher mit programmierbaren Taschenrechnern oder PC-Software möglich.

Berechnung des linearen Korrelationskoeffizienten für die Kalibriergerade

Ob und in welchem Ausmaß ein Zusammenhang zwischen zwei Messreihen (bzw. Zahlenreihen x, y) besteht, gibt der **lineare Korrelationskoeffizient** (r) an (Lit. 3):

Zusammenhang zwischen zwei Messreihen; linearer Korrelationskoeffizient

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Die Werte entsprechen denjenigen bei der Berechnung des Verlaufs der Kalibriergeraden. Der Grad des Zusammenhangs zwischen den Größen x und y in der Kalibriergeraden ist umso besser, je näher sich der lineare Korrelationskoeffizient r dem Wert -1 oder $+1$ nähert. Bei $r = 0$ besteht kein Zusammenhang zwischen x und y .

Erfassung der Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit ergibt sich aus der Änderung der Messwerte bei Änderung der Konzentration oder Masse der zu bestimmenden Substanz (Kap. 2.1.1):

Was ist die Empfindlichkeit eines Messverfahrens?

$$E = \frac{\Delta M}{\Delta c} \quad (\text{Gl. 2.12})$$

E = Empfindlichkeit

ΔM = Änderung der Messwerte

Δc = Änderung der Konzentration bzw. Masse

Bei linearer Abhängigkeit entspricht die Empfindlichkeit der Steigung der Kalibriergeraden, d.h. dem **Regressionskoeffizienten** (b).

Empfindlichkeit und Regressionskoeffizient

Empfindlichkeit bei spektroskopischen Gehaltsbestimmungen

Bei UV-spektroskopischen Gehaltsbestimmungen z. B. sollte möglichst am Maximum bzw. am höchsten Maximum gemessen werden, weil dort die Empfindlichkeit am größten ist.

Erfassung des Bestimmungsbereiches

Der Bestimmungsbereich darf nicht über den niedrigsten oder höchsten Messwert hinaus extrapoliert werden

Der Massen- bzw. Konzentrationsbereich, innerhalb dessen eine Analysenmethode eingesetzt werden kann, ergibt sich aus dem Verlauf der Kalibriergeraden bzw. des annähernd linearen Teils der Kalibrierkurve. Meist liegt die günstigste Möglichkeit in der Mitte des durch Messpunkte abgedeckten Linearbereiches. Die Kalibriergerade bzw. Kurve darf nicht über die äußeren Messpunkte hinaus extrapoliert werden.

Erfassung der Robustheit

Wie kann die Robustheit erfasst werden?

Die **Robustheit** kann nicht exakt zahlenmäßig erfasst werden. Zur Ermittlung interessierender Einflüsse sollten die entsprechenden Bedingungen geändert und an einem aliquoten Teil der Probe eine **erneute Validierung** der infrage kommenden Qualitätsmerkmale durchgeführt und mit der ursprünglichen Beurteilung verglichen werden (vgl. z. B. USP). Bei Änderungen des Laboratoriums bzw. des Analytikers (**Ringversuche**) kann z. B. die **Vergleichsstandardabweichung** (Kap. 2.1.1) zur Beurteilung der verschiedenen Messergebnisse herangezogen werden.

2.1.3 Durchführung von Validierungen in der pharmazeutischen Analytik

Allgemeine Grundsätze

In der pharmazeutischen Analytik muss sich die Validierung der Analysenverfahren auf alle drei Bereiche der Qualitätskontrolle von Arzneimitteln beziehen:

- Identitätsprüfung
- Reinheitsprüfung
- Gehaltsbestimmung.

Definitionen und Vorschriften zur Validierung pharmazeutischer Analysenverfahren

Das Arzneibuch gibt zur Zeit keine **allgemeinen Hinweise** zur Validierung von Analysenverfahren, jedoch findet man Angaben bei einzelnen Methoden. Allgemeine Definitionen und Vorschriften finden sich in der USP. Eine Zusammenfassung über Validierung pharmazeutischer Analysenverfahren befindet sich in Lit. 12. (Zur Validierung klinisch-analytischer Methoden vgl. Lit. 8).

In die Validierung sollten alle das Resultat beeinflussenden Parameter einbezogen werden, wie Luftfeuchte, Licht, Temperatur, Druck, Qualität und Alter der Reagenzien und Lösungsmittel, Messinstrumente usw. Die Messinstrumente sind zu kalibrieren (Kap. 2.2) und die Vergleichssubstanzen (Standardsubstanzen) zu charakterisieren bzw. zu standardisieren (Rückführbarkeit, s. Kap. 2.1.1). Die Probenmuster müssen repräsentativ sein.

Die bei der Validierung zu ermittelnden Parameter hängen neben dem analytischen Ziel (Identitätsprüfung, Reinheitsprüfung, Gehaltsbestimmung) im Wesentlichen von folgenden Vorgaben ab:

Parameter zur Validierung
pharmazeutischer
Analysenverfahren

- Untersuchungsmaterial (Arzneiformulierungen, Synthesedukte, Arzneimittellendprodukte, Reaktionszwischenprodukte, Rohmaterialien, wiedergewonnene Lösungsmittel, biologisches Material u. a.)
- Konzentrations- bzw. Gehaltsbereich der zu bestimmenden Stoffe (z.B. $> 10\%$, $10 - 0,01\%$, $< 100\text{ ppm}$).

Für das Arzneibuch vorgesehene oder andere breit anzuwendende Methoden sollten grundsätzlich sowohl im entwickelnden Labor als auch in **Ringversuchen** (s. u. unter Validierung von Identitätsprüfungen) validiert werden. Bei Anwendung bereits in der Literatur beschriebener Analysenverfahren ist häufig eine erneute Validierung (**Revalidierung**) notwendig, weil sich die publizierten Daten meist nur auf dasjenige Labor beziehen, welches die Methode entwickelt hat. Verlauf und Ergebnisse der Validierung sind schriftlich zu dokumentieren (Proben, Vergleichssubstanzen, Reagenzien, Geräte, Geräteeinstellungen, Temperatur, Zeit, Messergebnisse, Berechnungen, Bewertung der Ergebnisse). Die fortlaufende Kontrolle wird anhand von **Kontrollkarten** (vgl. Lit. 1) durchgeführt.

Validierung in Ringversuchen;
Revalidierung

Dokumentation und
Konsequenzen der Validierung

Genügen die bei der Validierung erhaltenen Ergebnisse nicht den Anforderungen, so sind die Analysenbedingungen zu verändern, z. B. durch Verringerung oder Beseitigung systematischer Fehler. Ist dies nicht möglich, so ist evtl. eine andere Methode heranzuziehen. Zur Bewertung der Standardabweichungen unterschiedlicher Methoden kann ein *F*-Test genutzt werden (Kap. 2.1.2).

Validierung von Identitätsprüfungen

Organoleptische Prüfungen können wegen starker interindividueller Einflüsse nicht exakt validiert werden. Bei anderen Identitätsprüfungen ist insbesondere die **Spezifität (Selektivität)** gegenüber Verbindungen mit ähnlicher Struktur zu überprüfen.

Validierung organoleptischer
Prüfungen

Validierung von Reinheitsprüfungen

Zur Validierung von Reinheitsprüfungen sind insbesondere zu überprüfen (s. auch Tab. 2.3):

- Spezifität (Selektivität)
- Nachweisgrenze
- Richtigkeit
- Robustheit.

Validierung von
Grenzprüfungen

Bei **Grenzprüfungen** ist besonderer Wert auf die Nachweisgrenze zu legen. Eventuell ist die Ermittlung der Richtigkeit und des Bereiches notwendig (vgl. USP).

Validierung von Gehaltsbestimmungen

Bei der Validierung einer Methode zur Gehaltsbestimmung müssen mindestens folgende Merkmale untersucht werden:

- Linearität, Empfindlichkeit
- Bestimmungsbereich, Bestimmungsgrenze
- Spezifität (Selektivität)
- Richtigkeit
- Präzision
- Robustheit.

Analyse von Placebos

Die Validierung sollte mit der Untersuchung der Abhängigkeit der Messwerte von der Konzentration (Linearität, Empfindlichkeit) beginnen. Dann sollte in dem als günstig ermittelten Konzentrationsbereich die Spezifität (Selektivität) überprüft werden. Anschließend wäre bei verschiedenen Konzentrationen die Wiederfindung zu bestimmen, um zu ermitteln, ob ein systematischer Fehler vorliegt. Die Analyse eines Placebos ist einzubeziehen. Dabei darf das Ergebnis nicht signifikant verschieden von null sein.

Ausarbeitung von
Konventionsmethoden

Liegt ein systematischer Fehler vor, so ist er zu beseitigen, eventuell durch eine Kalibrierung der Messgeräte (Kap. 2.2). Ist dies nicht möglich, so ist er zu minimieren und in die Berechnungsformel einzubeziehen (**Konventionsmethode**). Schließlich muss zur Beurteilung der Präzision die Wiederhol- und Vergleichsstandardabweichung ermittelt werden.

Vorschriften der USP zur Validierung

Die USP teilt die zu validierenden Analysenmethoden je nach den zu überprüfenden Merkmalen in die Kategorien I, II, III und IV ein (Tab. 2.3):

- Kategorie I:** Untersuchung von Hauptkomponenten (Arzneistoffe oder aktive Komponenten) in pharmazeutischen Endprodukten.
- Kategorie II:** Untersuchungen auf Verunreinigungen oder Abbauprodukte der Hauptkomponenten in pharmazeutischen Endprodukten (Grenzprüfung und quantitative Bestimmung der Nebenprodukte).
- Kategorie III:** Untersuchung von Leistungsparametern wie Auflösungsgeschwindigkeit, Wirkstofffreisetzung u. a.
- Kategorie IV:** Identitätsreaktionen.

Tab. 2.3 Validierungsvorschläge der USP (zur Nomenklatur siehe Kap. 2.1.1)

Merkmal	Kategorie I Gehalts- bestimmung	Kategorie II Grenzprüfung	Kategorie II quant. Be- stimmung	Kategorie III quant. Be- stimmung	Kategorie IV Identi- fizierung
Präzision	+	–	+	+	–
Richtigkeit	+	+))	+	+))	–
Nachweisgrenze	–	+	–	+))	–
Bestimmungsgrenze	–	–	+	+))	–
Selektivität, Spezifität	+	+	+	+))	+
Bereich	+	+))	+	+))	–
Linearität	+	–	+	+))	–

*) Die Überprüfung dieser Größen hängt vom analytischen Problem ab.

2.2 Kalibrierung von Messgeräten

Kalibrierung bedeutet in diesem Fall die Überprüfung der für ein Analysenverfahren benötigten Geräte auf Eignung für den vorgesehenen Zweck, auf einwandfreie Funktion und auf die Lage der Messergebnisse in den vorgegebenen **Toleranzen**. Die Toleranzen ergeben sich aus den Angaben der Hersteller. Die Kalibrierung muss in regelmäßigen zeitlichen Abständen erfolgen, da Abweichungen im Messverhalten der Geräte oft nur langsam eintreten und daher nicht sofort erkannt werden. Die Ergebnisse sollen laufend schriftlich dokumentiert werden (z. B. auf **Kontrollkarten**, Lit. 1). Die Kalibrierung von Messgeräten wird bei den einzelnen instrumentellen Methoden teilweise erwähnt. Sie sollte anhand von Eich- bzw. Kalibrier-Standards (z. B. **Standardspektren**, **Standardsubstanzen**) durchgeführt werden und die Spezifikationen der Hersteller berücksichtigen.

Messgeräte zur Bestimmung von Masse, Volumen und Temperatur unterliegen dem **Eichgesetz**. Danach sind Waagen alle 2 Jahre zu ei-

Toleranzen von
Messgeräten

Dokumentation der Kali-
brierung von Messgeräten

Vorschriften des
Eichgesetzes

chen. Für analytische Zwecke sollte aber mindestens alle 6 Monate eine Überprüfung erfolgen.

Von besonderer Bedeutung zur Beurteilung von Messgeräten und instrumentellen Analysenmethoden sind:

- Empfindlichkeit
- Nachweisgrenze
- Bestimmungsgrenze.

2.2.1 Empfindlichkeit von Messgeräten

Bezüglich der Empfindlichkeit kann man bei Messgeräten unterscheiden (Lit. 13):

- Kalibrierempfindlichkeit (b)
- Analytische Empfindlichkeit (γ).

Die **Kalibrierempfindlichkeit** (b) von Messgeräten entspricht der in Kap. 2.1.1 und 2.1.2 gegebenen Definition für die Empfindlichkeit von Analysenverfahren. Bei direkter Proportionalität von Messwerten und Konzentration bzw. Masse ist sie gleich der **Steigung der Kalibriergeraden**, d. h. gleich dem Regressionskoeffizienten (b).

Analytische Empfindlichkeit
von Messgeräten

Die **analytische Empfindlichkeit** (γ) von Messgeräten bezieht die Präzision, d. h. die **Systemstandardabweichung** (s) (Gerätestandardabweichung, Kap. 2.1.2) in die Betrachtung ein:

$$\gamma = \frac{b}{s} \quad (\text{Gl. 2.13})$$

b = Kalibrierempfindlichkeit

s = Systemstandardabweichung

Ein Messgerät spricht danach umso empfindlicher auf Konzentrationsänderungen an, je größer die Steigung der Kalibriergeraden (b) und je kleiner die Gerätestandardabweichung (s), also je größer γ ist (Lit. 13). Die analytische Empfindlichkeit kann wegen der Konzentrationsabhängigkeit von s ebenfalls konzentrationsabhängig sein.

2.2.2 Nachweisgrenze bzw. Bestimmungsgrenze bei Messgeräten

Signal-Rausch-Verhältnis

Die Anzeige von Messgeräten kann bei Messungen ohne die zu bestimmende Substanz (**Blindwerte**) mehr oder weniger stark schwanken (Abb. 18.8). Diese Schwankungen nennt man **Rauschen** (noise). Man bezeichnet das Verhältnis der Höhe des Messsignals (mit Substanz) zu den Rausch-Signalen (ohne Substanz) als Signal-Rausch-Verhältnis. Dieses Verhältnis ist von Bedeutung für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze des Messgerätes. Um eine Substanz noch eindeutig nachzuweisen (**Nachweisgrenze**) bzw. zu bestimmen (**Bestimmungsgrenze**), muss das Messsignal der Substanz (S_m) erkennbar größer als der **Mittelwert der Rausch-Signale** ($\bar{S}_R$) sein:

$$S_m > \bar{S}_R \quad (\text{vgl. Abb. 18.8})$$

Nachweisgrenze und Rauschsignale bei Messsystemen

Nachweisgrenze

Als Nachweisgrenze wird im Allgemeinen ein Signal-Rausch-Verhältnis $S_m : \bar{S}_R = 2 : 1$ bis $3 : 1$ angesehen (Lit. 13, USP), d.h. nur Signale, welche mindestens doppelt oder dreimal so intensiv sind wie der Mittelwert der Rausch-Signale gelten als eindeutig positiv (Abb. 18.8 A).

Andere Autoren beziehen zur Charakterisierung der **Nachweisgrenze** nicht die absolute Höhe der Rausch-Signale, sondern ihre **Standardabweichung** (s_R) in die Berechnung ein und fordern, dass das Messsignal um die k -fache Standardabweichung ($k \cdot s_R$) größer sein muss als der **Mittelwert der Rausch-Signale** ($\bar{S}_R$):

$$S_m = \bar{S}_R + k \cdot s_R \quad (\text{Gl. 2.14})$$

S_m = Nachweisgrenze (als Höhe des Messsignals)

$\bar{S}_R$ = Mittelwert der Rausch-Signale

s_R = Standardabweichung der Rausch-Signale

k = Faktor

Für die Nachweisgrenze wird meist ein Minimalwert von $k = 3$ vorgeschlagen (Lit. 13, USP). Dies bedeutet, dass das Messsignal mindestens um die dreifache Standardabweichung des **Rauschens** ($3 s_R$) größer sein muss als der Mittelwert der Rausch-Signale ($\bar{S}_R$), um mit einer Sicherheit von 95 % eine Substanz nachzuweisen. Für $k = 6$ erhöht sich die Sicherheit der Erfassung auf 99,7 % (Lit. 8).

Nach diesem Ansatz kann die experimentelle Ermittlung der Nachweisgrenze von Messgeräten wie folgt verlaufen:

1. Bestimmung von $\bar{S}_R$ und s_R aus 20–30 Messungen des Blindwertes ohne die zu bestimmende Substanz

Experimentelle Ermittlung der Nachweisgrenze von Messgeräten

2. Berechnung der Nachweisgrenze in Form von S_m (als Höhe des Messsignals) unter Verwendung des Faktors $k = 3$
3. Berechnung der Nachweisgrenze in Form der Nachweiskonzentration (**Grenzkonzentration**) (C_m):

$$C_m = \frac{S_m - \bar{S}_R}{b} \quad (\text{Gl. 2.15})$$

b = Steigung der Kalibriergeraden. (Größe des Messsignals pro Konzentrationseinheit) (Kap. 2.1.2)

Für die Kontrolle und Optimierung von **¹H-NMR-Spektrometern** nach dem Arzneibuch wird eine andere Definition des Signal-Rausch-Verhältnisses herangezogen (vgl. Kap. 14.4.1). Für die **Chromatographie** (Teil III) ist die Arzneibuchdefinition und Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses S/N in Kap. 18.2.3 beschrieben.

2.2.3 Bestimmungsgrenze bei Messgeräten

Bestimmungsgrenze von
Messgeräten und
Mittelwert des Rauschens

Zur Definition der Bestimmungsgrenze für quantitative Bestimmungen vgl. Kap. 2.1.1. Die Berechnung erfolgt wie bei der Nachweisgrenze von Messgeräten beschrieben, aber mit $k = 10$, d. h., das Messsignal sollte den Mittelwert der Blindwert-Signale (Rauschen) $\bar{S}_R$ um die zehnfache Standardabweichung der Blindwerte (s_R) übertreffen (siehe Lit. 10 unter „Einführung“):

$$S_m = \bar{S}_R + 10 s_R \quad (\text{Gl. 2.16})$$

S_m = Bestimmungsgrenze (als Höhe des Messsignals)

$\bar{S}_R$ = Mittelwert der Rausch-Signale (Blindwert)

s_R = Standardabweichung des Blindwertes

Damit ist die Bestimmungsgrenze in diesem Falle etwa um den Faktor 3 größer als die Nachweisgrenze.

2.3 Abschätzung von Gesamtfehlern, Fehlerfortpflanzung

Beitrag der Teilfehler
eines Verfahrens
zum Gesamtfehler

Analysenverfahren bestehen meist aus mehreren Teilschritten mit oft sehr unterschiedlich großen einzelnen Fehlern. Um das gesamte Verfahren zu optimieren, interessiert, wie die Teilfehler zum **Gesamtfehler** beitragen. Die Fehler der Teilschritte ergeben sich aus der:

- Fehlerabschätzung der Teilschritte
- Abschätzung der Ablesegenauigkeit der Messgeräte bzw. aus den Angaben der Hersteller.

Der **Gesamtfehler** des Verfahrens errechnet sich aus den Fehlern der Teilschritte nach dem **Fehlerfortpflanzungsgesetz** (eine Normalverteilung vorausgesetzt Kap. 2.1.2), je nachdem wie die Teilschritte in das Gesamtergebn eingehen.

Berechnung des Gesamtfehlers nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz

Bei **Multiplikation** oder **Division** der Messergebnisse bzw. Variablen der analytischen Teilschritte zum Gesamtergebn werden die **relativen** Fehler der Teilschritte (f_{rel}) quadratisch addiert und aus der Summe die Wurzel gezogen. Man erhält beispielsweise bei 3 Teilschritten (1, 2, 3) den relativen Gesamtfehler (F_{rel}) wie folgt:

$$F_{\text{rel}} = \sqrt{(f_{\text{rel}} 1)^2 + (f_{\text{rel}} 2)^2 + (f_{\text{rel}} 3)^2} \quad (\text{Gl. 2.17})$$

Die Gl. 2.17 zeigt, dass wegen der Quadrierung der größte Teilfehler verhältnismäßig stark zum Gesamtfehler beiträgt. An diesem Teilfehler (bzw. Teilschritt) sollte die Optimierung des Verfahrens einsetzen.

Gelegentlich wird durch einfache Addition der relativen Teilfehler ein **relativer Größtfehler** (größter möglicher Fehler, maximal möglicher Fehler) ermittelt:

Relativer Größtfehler

$$\text{Größtfehler} = (f_{\text{rel}} 1) + (f_{\text{rel}} 2) + (f_{\text{rel}} 3) \quad (\text{Gl. 2.18})$$

Bei **Addition** oder **Subtraktion** der Messergebnisse bzw. Variablen der analytischen Teilschritte zum Gesamtergebn werden die **absoluten** Fehler der Einzelschritte (f) quadratisch addiert und aus der Summe die Wurzel gezogen. Man erhält beispielsweise bei 3 Teilschritten (1, 2, 3) den absoluten Gesamtfehler (F) wie folgt:

$$F = \sqrt{(f1)^2 + (f2)^2 + (f3)^2} \quad (\text{Gl. 2.19})$$

Auch hier trägt der größte Fehler überproportional zum Gesamtfehler bei. Durch einfache Addition der Einzelfehler kann ein **absoluter Größtfehler** ermittelt werden.

Literatur zur Charakterisierung von Analysemethoden

- 1) L. Sachs: Angewandte Statistik. 9. Aufl., Springer-Verlag, Berlin (1999)
- 2) S. Bolton: Pharmaceutical Statistics. Marcel Dekker, New York (1990)
- 3) L. Kny, I. Beyrich, B. Göber: Lehrbuch der Arzneimittelkontrolle. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1983)
- 4) E. Glaser, P. Surmann: Praktische Mathematik in der Pharmazie. Thieme-Verlag, Stuttgart (1981)
- 5) Qualitätsmanagement und Statistik (DIN-Taschenbuch 223). 2. Aufl., Beuth Verlag, Berlin, Köln (1997)
- 6) G. W. Gottschalk in Analytiker-Taschenbuch Bd. 1, Seite 63. Springer-Verlag, Berlin (1980)
- 7) Reihe Lebensmittelanalytik, Heft 6/6, Fa. Boehringer, Mannheim (1983).
- 8) H. Vogel in Analytiker-Taschenbuch, Bd. 9, Seite 3. Springer-Verlag, Berlin (1990)

Mathematische Grundlagen

Praktische
Anwendung

- 9) E.L. Inman, J.K. Frischmann, P.J. Jiminez, G.D. Winkel, M.L. Persinger, B.S. Rutherford, J. Chromatogr. Science **25**, 252 (1987)
- 10) A.N. Martin, J. Swarbrick, A. Camarata: Physikalische Pharmazie. 3. Aufl., Wiss. Verlagsges., Stuttgart (1987); H. Leuenberger, (Hrsg.), Martin Physikalische Pharmazie. 4. Aufl., Wiss. Verlagsges., Stuttgart (2002)
- 11) K. Feiden (Hrsg.): Arzneimittelprüfrichtlinien. Sammlung nationaler und internationaler Richtlinien. Unter Mitarbeit von Helga Blasius. Grundwerk einschl. 26. Aktualisierungsfg., Wiss. Verlagsges., Stuttgart (2007)
- 12) G. Stenzhorn, Pharm. Ztg. **124**, 795, 1369 (1979)
- 13) D.A. Skoog, J.J. Leary: Instrumentelle Analytik. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1996)
- 14) H. Feltkamp, P. Fuchs, H. Sucker (Hrsg.): Pharmazeutische Qualitätskontrolle. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1983)
- 15) M. Otto: Chemometrie. VCH-Verlag, Weinheim (1997)

Optische und spektroskopische Analysenmethoden



Verzeichnis der Symbole

Teil II: Optische und spektroskopische Analysemethoden

A	Absorption	m	Masse, Massenzahl
A	Radioaktivität	m	mittelstarke Bande (IR)
$A_1^1\%$	spezifische Absorption	m	magnetische Quantenzahl
A_r	Relative Atommasse	m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
$[a]_D$	spezifische Drehung	M	Molekülmasse
a.m.u.	atomare Masseneinheit	M	reduzierte Masse
ΔA	Zirkulardichroismus	M_r	relative Molekülmasse
b	Schichtdicke	μ	magnetisches Moment
B, B_0	magnetische Flussdichte	μ	Permeabilität
Bq	Becquerel (Radioaktivität)	n	Hauptquantenzahl
c	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum	n	Zahl der konjugierten Doppelbindungen
c	Konzentration	n	Stoffmenge
Ci	Curie (Radioaktivität)	$n(\lambda)$	Brechzahl, Brechungsindex
γ	gyromagnetisches Verhältnis	N	Teilchenzahl (Atome, Moleküle)
d	relative Dichte	N_A	Avogadro-Konstante (Loschmidt'sche Zahl)
D	Durchlässigkeit	ν	Frequenz
Da	Dalton, Masseneinheit	$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
δ	chemische Verschiebung (NMR)	P	Drehimpuls
e	Ladung	π^*	angeregtes π^* -Niveau
e	Basis des natürl. Logarithmus	Q	Fluoreszenzquantenausbeute
eV	Elektronenvolt	r	Radius
E	Energie	rd	Rad (radioaktive Dosis)
ΔE	Energiedifferenz	rem	Rem (radioaktive Äquivalentdosis)
E	Extinktion (durch die Absorption A ersetzt)	R	Molekularrefraktion
E_{kin}	kinetische Energie	rad	rad (spezifische Drehung)
$\varepsilon(\lambda)$	molarer Absorptionskoeffizient	s	Spaltbreite
ε_{max}	Absorptionskoeffizient des Absorptionsmaximums	s	starke Bande (IR)
$\Delta\varepsilon$	molarer Zirkulardichroismus	s	Weg
g	statistischer Faktor in der Boltzmann-Gleichung	Sv	Sievert (radioaktive Äquivalentdosis)
g	Dissymmetrie-Faktor	σ^*	angeregtes σ^* -Niveau
Gray	Gray (radioaktive Dosis)	t	Zeit
h	Planck'sche Konstante	T	absolute Temperatur
H	magnetische Feldstärke	T	Transmission
Hz	Hertz	T_1	Spin-Gitter-Relaxationszeit
HOMO	höchstes besetztes Orbital	T_2	Spin-Spin-Relaxationszeit
I	Rotationsquantenzahl	$T_{1/2}$	Halbwertszeit
I	Lichtintensität	θ	Elliptizität
I	Kernspinquantenzahl	τ	chemische Verschiebung (NMR)
I_0	Intensität eines in eine Probe einfallenden Lichtstrahles	u	internationale atomare Masseneinheit
I_λ	Fluoreszenzintensität	U	Spannung
I.E.	Internationale Einheit	U	Geschwindigkeit
J	Kopplungskonstante	ν	Schwingungsquantenzahl
k	Boltzmann-Konstante	ν	Geschwindigkeit
k	Kraftkonstante	$\nu(\lambda)$	Lichtgeschwindigkeit in einem Medium
K	Kraft	V	Beschleunigungsspannung
K_L	Lorentz-Kraft	w	schwache Bande (IR)
K_z	Zentrifugalkraft	x	Dehnung (Auslenkung)
l	Küvettenlänge	z	Ladungszahl
LUMO	niedrigstes unbesetztes Orbital	Z	Schwingungsmöglichkeiten eines Moleküls
λ	Wellenlänge	ω	Kreisfrequenz
λ	radioaktive Zerfallskonstante		
λ_{max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums		

3 Einführung in die optischen und spektroskopischen Analysemethoden

Optische und spektroskopische Analysemethoden beruhen, abgesehen von einigen Ausnahmen, auf der Wechselwirkung von Licht mit den zu untersuchenden Substanzen, oder auf der Ausstrahlung von Licht durch die Substanzen.

Wichtige **optische Analysemethoden** sind:

Was sind optische Analysemethoden?

- Refraktometrie
- Chiroptische Methoden (Polarimetrie, Zirkulardichroismus, optische Rotationsdispersion).

Hier werden die optischen Erscheinungen der Lichtbrechung und der optischen Drehung zur Analyse von Stoffen herangezogen.

Die in der pharmazeutischen Analytik angewandten **spektroskopischen Analysemethoden** sind durch sehr unterschiedliche Grundvorgänge gekennzeichnet. Allen Methoden ist gemeinsam, daß man Energie (meist Lichtenergie) auf Atome oder Moleküle einwirken lässt und die Wirkungen beobachtet. Für den Pharmazeuten wichtige spektroskopische Methoden sind:

Was sind spektroskopische Analysemethoden?

- Spektralanalyse
- Atomemissionsspektroskopie (Flammenphotometrie)
- Atomabsorptionsspektroskopie
- UV-Vis-Spektroskopie
- Fluorimetrie
- IR-Spektroskopie
- NMR-Spektroskopie (Kernresonanzspektroskopie)
- Massenspektrometrie.

Da fast alle spektroskopischen Verfahren ebenfalls optische Vorgänge zur Analyse heranziehen, ist die Unterteilung in optische und spektroskopische Methoden nicht ganz schlüssig. Sie wird lediglich aus praktischen Gründen vorgenommen. Zunächst sollen die wichtigsten physikalischen Eigenschaften des Lichtes besprochen werden.

3.1 Licht als elektromagnetische Wellenbewegung

Was ist Licht?

Licht kann physikalisch als transversale elektromagnetische Wellenbewegung betrachtet werden, die durch periodische Änderung elektrischer und magnetischer Felder gekennzeichnet ist. Die Wellennatur des Lichtes zeigt sich in den Interferenz- und Beugungserscheinungen und der Polarisierung (Wellenoptik). Die Ausbreitung des Lichtes erfolgt geradlinig (elektromagnetische Strahlung; geometrische Optik). Das für den Menschen sichtbare Licht stellt nur den schmalen Ausschnitt aus dem Spektrum elektromagnetischer Wellen dar, der von unserem Auge wahrgenommen werden kann. In der Spektroskopie wird oft auch elektromagnetische Strahlung anderer Wellenlängen als Licht bezeichnet.

Lichtgeschwindigkeit,
Wellenlänge
und Frequenz

Alle Arten elektromagnetischer Wellen besitzen im Vakuum die gleiche Ausbreitungsgeschwindigkeit (**Lichtgeschwindigkeit**: $c = 2.997925 \cdot 10^{10} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$). In Materie verringert sie sich (vgl. Kap. 4, Refraktometrie). Die elektromagnetischen Wellen unterscheiden sich in der **Wellenlänge** λ bzw. in der **Frequenz** ν . Die Frequenz entspricht der Zahl der Schwingungen des elektrischen bzw. magnetischen Feldes pro Zeiteinheit (Schwingungen pro Sekunde); ihre Einheit ist s^{-1} (bzw. Hertz [Hz]; für hohe Frequenzen wird die Bezeichnung Megahertz, $1 \text{ MHz} = 10^6 \text{ Hz}$ verwendet). Ausbreitungsgeschwindigkeit c , Wellenlänge λ , und Frequenz ν sind durch Gleichung 3.1 verknüpft:

$$c = \lambda \cdot \nu \quad (\text{Gl. 3.1})$$

Definition
der Wellenzahl

Eine elektromagnetische Welle kann demnach entweder durch ihre Wellenlänge λ in Zentimeter [cm], Mikrometer [μm] oder Nanometer [nm] (siehe Tab. 3.2), oder ihre Frequenz ν [s^{-1}] charakterisiert werden. Eine dritte Größe zur Kennzeichnung einer elektromagnetischen Welle ist die Wellenzahl $\tilde{\nu}$. Sie stellt die reziproke Wellenlänge dar:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} [\text{cm}^{-1}] \quad (\text{Gl. 3.2})$$

$\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}]$ gibt die Anzahl der Wellenlängen an, die auf einen cm entfallen und darf nicht mit der Frequenz ν verwechselt werden. Wellenzahl und Frequenz sind durch die Lichtgeschwindigkeit c verknüpft:

$$\nu = c \cdot \tilde{\nu} \quad (\text{Gl. 3.3})$$

Nach dem SI-System wird auch die Wellenzahl wie die Frequenz mit ν bezeichnet und auf 1 m bezogen: $\nu = \frac{1}{\lambda} [\text{m}^{-1}]$. Dies kann zu Verwechslungen führen.

3.2 Energie der elektromagnetischen Wellen

Neben der Wellennatur deuten verschiedene Beobachtungen auch auf eine **Teilchennatur** des Lichtes hin. Man bezeichnet diese Strahlungsteilchen als **Lichtquanten** bzw. **Photonen**; sie besitzen eine bestimmte Energie. Elektromagnetische Strahlung besteht demnach nicht aus einem kontinuierlichen, beliebig teilbaren Energiestrom, sondern aus einem Strom nicht teilbarer Lichtquanten. Nach M. Planck, N. Bohr und A. Einstein ist die Energie E eines Lichtquants durch die **Planck'sche Gleichung** 3.4 gegeben:

$$E = h \cdot \nu \quad (\text{Gl. 3.4})$$

ν = Frequenz

h = Proportionalitätsfaktor (Planck'sche Konstante; allgemeine Naturkonstante), $6,6256 \cdot 10^{-34}$ Joule $\cdot$ s;

1 Joule = 0,238 cal, 1 cal = 4,1868 Joule

Was sind
Lichtquanten?

Planck'sche Gleichung

Wird für die Frequenz die Beziehung $\nu = c/\lambda$ eingesetzt, so lautet die Planck'sche Gleichung:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (\text{Gl. 3.5})$$

Damit ergeben sich bezüglich der Strahlungsenergie folgende Aussagen:

- Die Energie der Lichtquanten der elektromagnetischen Strahlung ist von der Frequenz abhängig. Je größer die Frequenz ist, umso größer ist die Energie der Strahlung.
- Die Energie der Lichtquanten der elektromagnetischen Strahlung ist umgekehrt proportional der Wellenlänge λ . Je größer die Wellenlänge, umso geringer ist die Energie.

Abhängigkeit
der Energie
der Lichtquanten

3.3 Spektrum der elektromagnetischen Wellen, Spektralbereiche

Elektromagnetische Wellen unterscheiden sich in ihren Wellenlängen λ bzw. Frequenzen ν und damit auch in der Energie ihrer Photonen. Das gesamte Spektrum der elektromagnetischen Wellen umfasst einen Bereich von sehr energiereicher Strahlung mit kleinen Wellenlängen bis zu sehr energiearmer Strahlung mit großen Wellenlängen. Für praktische Zwecke werden die elektromagnetischen Wellen in Spek-

Beschreibung
elektromagnetischer
Wellen und der
Spektralbereiche

Tab. 3.1 Das Spektrum der elektromagnetischen Wellen. Spektralbereiche (Wellenlängen bezogen auf Vakuum)

Spektralbereich	Wellenlänge (λ)	Wellenzahl (ν̃)	Strahlungsenergie*) kcal · mol ⁻¹ (kJ · mol ⁻¹)	Wirkung auf Moleküle
γ-Strahlen	kleiner als 0,1 Å (0,01 nm)		20 Mill. (80 Mill.)	Ionisation
Röntgenstrahlen (X-rays)	0,1–10 Å (0,01–1 nm)		20 Mill.–200 000 (80 Mill.–800 000)	Ionisation
Vakuum- Ultraviolett (Vakuum-UV)	100–200 nm		2000–150 (8000–600)	Elektronen- anregung
Nahes Ultraviolett (UV)	200–400 nm		150–80 (600–320)	Elektronen- anregung
Sichtbarer Bereich (Vis)	400–800 nm		80–40 (320–160)	Elektronen- anregung
Nahes Infrarot (NIR)**)	0,8–2,5 μm	12 550–4000 cm ⁻¹	40–12 (160–50)	Molekül- schwingungen
Infrarot, Mittleres Infrarot (IR, MIR)**)	2,5–50 μm	4000–200 cm ⁻¹	12–0,6 (160–2,5)	Molekül- schwingungen
Fernes Infrarot**)	50 μm–500 μm	200–20 cm ⁻¹	0,6–0,06 (2,5–0,25)	Molekül- rotationen
Mikrowellen (MW)	500 μm–30 cm		0,06–0,001 (0,25–0,004)	Molekülrotation Erwärmung
Radiowellen Funkwellen	größer als 0,1 m	(Frequenz ν kleiner als 3000 MHz)		Kernresonanz

*) 1 kcal = 4,1868 kJoule. Die Werte sind stärker gerundet.
**) Seltener verwendete Bezeichnungen sind IR-A (für NIR), IR-B (für MIR) und IR-C (für Fernes Infrarot).

tralbereiche eingeteilt (Tab. 3.1). Zur Abgrenzung der einzelnen Spektralbereiche wird fast immer die Wellenlänge λ benutzt. Nur im Bereich der Infrarotstrahlung (IR-Bereich) ist die Angabe der Wellenzahl ν̃ gebräuchlicher, bei Radiowellen wird meist die Frequenz ν angegeben. Zur Kennzeichnung der Wellenlänge haben sich bestimmte Längeneinheiten als praktisch erwiesen (Tab. 3.2).

Der für den Menschen sichtbare Teil des Spektrums der elektromagnetischen Wellen (Tab. 3.1) (auch Vis-Bereich, visible) umfasst den verhältnismäßig kleinen Wellenlängenbereich zwischen ca. 400 und 800 nm. Die Strahlungsenergie liegt etwa zwischen 80 und 40 kcal · mol⁻¹ (320–160 kJ · mol⁻¹). Bekanntlich vermittelt die kürzestwellige Strahlung des sichtbaren Bereiches den Farbeindruck violett, die längstwellige rot (Tab. 3.3). Daher wird in der Spektroskopie ein Übergang zu kürzeren Wellenlängen als **Blauverschiebung** und ein

Tab. 3.2 Längeneinheiten zur Angabe der Wellenlänge

Längeneinheit	Å	nm	µm	mm	cm	gebräuchlich im Spektralbereich
Å (Angström) auch AE (Angström-Einheit) (soll nicht mehr verwendet werden!)	1	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	γ-Strahlung, Röntgenstrahlung
nm (Nanometer) früher: mµ (Millimikron)	10	1	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	Vakuum-UV, nahes Ultraviolett, sichtbarer Bereich
µm (Mikrometer) früher: µ (Mikron)	10 ⁴	10 ³	1	10 ⁻³	10 ⁻⁴	Infrarot
mm (Millimeter)	10 ⁷	10 ⁶	10 ³	1	10 ⁻¹	Mikrowellen
cm (Zentimeter)	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁴	10	1	Mikrowellen

Übergang zu längeren Wellenlängen als **Rotverschiebung** bezeichnet. Andere Bezeichnungen sind **hypsochrom** für einen Übergang zu kürzeren Wellenlängen und **bathochrom** für einen Übergang zu längeren Wellenlängen. Die jeweils an den sichtbaren Bereich angrenzenden Bereiche werden als ultravioletter Bereich (jenseits von Violett liegend = UV-Bereich) und als infraroter bzw. ultraroter Bereich (jenseits von Rot liegend = IR-Bereich, UR-Bereich) bezeichnet. Die Energie der Strahlung des ultravioletten Bereiches ist wegen der kleineren Wellenlängen (200–400 nm) größer, die des infraroten Bereiches wegen der größeren Wellenlängen (0.8–50 µm, vgl. Kap. 13.2.1) kleiner als die des sichtbaren Bereiches. Der Bereich des Vakuum-Ultraviolett (100–200 nm) mit seiner recht energiereichen Strahlung von ca. 150–2000 kcal · mol⁻¹ (600–8000 kJ · mol⁻¹) hat seine Bezeichnung von der Erzeugung dieser Strahlung in einer Hochvakuum-Röhre. Röntgenstrahlen (im engl. Sprachgebrauch X-rays) und γ-Strahlen besitzen noch kürzere Wellenlängen und daher eine noch größere Energie. An den IR-Bereich (Nahes Infrarot, Infrarot) schließt sich die verhältnismäßig energiearme Strahlung des Fernen Infrarot, der Mikrowellen und Funkwellen (Radiowellen) an.

UV-Bereich
IR-Bereich

Vakuum-UV

Röntgenstrahlung

In der Praxis ist es möglich, Strahlung der in Tab. 3.1 aufgeführten Spektralbereiche zu erzeugen und bestimmte Wellenlängen daraus auszuwählen. Man bezeichnet Lichtstrahlung, die – ideal betrachtet – nur aus einer einzigen Wellenlänge bzw. praktisch aus einem schmalen Wellenlängenausschnitt besteht, als **monochromatisches Licht**. Licht, das ein Gemisch mehrerer Wellenlängen darstellt, ist **polychromatisches Licht**.

Poly- und mono-
chromatisches Licht

Aus Tab. 3.1 ist die große Spannweite der Energie der elektromagnetischen Wellen zu erkennen. Diese Energie kann auf Atome oder Moleküle einwirken und dort verschiedene Wirkungen hervorrufen, die später näher beschrieben werden.

3.4 Lichtabsorption und Farbe

Farbensehen
des Menschen

Das Gemisch aller Wellenlängen des Sonnenlichtes (Tageslicht) vermittelt dem Menschen den Farbeindruck weiß. Wird eine Substanz von Sonnenlicht getroffen, so absorbiert sie daraus bestimmte Wellenlängen. Das Restgemisch wird reflektiert bzw. durchgelassen. Dieser Rest an sichtbarer Lichtstrahlung ruft im menschlichen Auge nicht mehr den Farbeindruck weiß, sondern den Eindruck der Komplementärfarbe der absorbierten Wellenlänge hervor. Auf diese Weise entsteht der Eindruck der Farbigkeit von Stoffen (Tab. 3.3). Substanzen, die keine Strahlung des sichtbaren Bereiches absorbieren, ergeben den Farbeindruck weiß.

Tab. 3.3 Farbe von Wellenlängen des Sonnenlichtes und des nach Absorption dieser Wellenlängen ausgestrahlten Restlichtes (Komplementärfarbe)

Absorbierte Wellenlänge (nm)	Farbe der absorbierten Wellenlänge	Beobachtete Komplementärfarbe des Restlichtes
400	violett	grüngelb
425	dunkelblau	gelb
450	blau	orange
510	grün	purpurrot
550	gelb	dunkelblau
590	orange	blau
640	rot	blaugrün

3.5 Übersicht über die spektroskopischen Analysenmethoden

Anregung von Atomen
und Molekülen

In der Spektroskopie (mit Ausnahme der Massenspektrometrie) lässt man auf Atome oder Moleküle Strahlungsenergie oder seltener Wärmeenergie einwirken. Die Atome oder Moleküle gehen dabei in einen höheren Energiezustand über. Man bezeichnet diesen Vorgang als **Anregung**. Nach kurzer Zeit kehren sie wieder in den Grundzustand zurück und die Energie wird meist in Form von Wärmeenergie (strahlungslos), gelegentlich auch in Form von Strahlung, d. h. als Licht-

energie abgegeben. Das Ausmaß der Energie-Aufnahme (**Absorption**) oder Abgabe (**Emission**) kann gemessen und in Abhängigkeit von der Wellenlänge in einem **Spektrum** graphisch dargestellt werden. Das Spektrum wird zur Analyse der Substanz eingesetzt.

Absorption und Emission

3.5.1 Atomspektroskopie und Molekülspektroskopie

Untersucht man in der oben beschriebenen Weise Atome, so spricht man von **Atomspektroskopie**, bei der Untersuchung von Molekülen von **Molekülspektroskopie** (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 Spektroskopische Analysemethoden

	Emissionsspektroskopie	Absorptionsspektroskopie
Atom-spektroskopie	Spektralanalyse Atomemissionsspektroskopie (AES) (Flammenphotometrie)	Atomabsorptions-spektroskopie (AAS)
Molekül-spektroskopie	Fluorimetrie	UV-Vis-Spektroskopie IR-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie)

3.5.2 Emissionsspektroskopie und Absorptionsspektroskopie

Ein anderes Einteilungsprinzip für spektroskopische Methoden ergibt sich aus der Tatsache, dass die Verfahren entweder auf der Messung der **Lichtemission** oder der **Lichtabsorption** beruhen. Man bezeichnet sie als **Emissionsspektroskopie** bzw. **Absorptionsspektroskopie** (Tab. 3.4). Die Massenspektrometrie lässt sich in dieses Schema nicht einordnen.

Definition von Emissions- und Absorptionsspektroskopie

In der **Emissionsspektroskopie** erfolgt die Anregung der Atome bzw. Moleküle durch Zufuhr von Licht- oder Wärmeenergie. Man registriert das bei der anschließenden Rückkehr in den Grundzustand emittierte Licht, z. B. in Form des **Emissionsspektrums**. Zur Emissionsspektroskopie gehören z. B. die **Spektralanalyse**, die **Atomemissionsspektroskopie** (**Flammenphotometrie**) und die **Fluorimetrie** (Tab. 3.4).

In der **Absorptionsspektroskopie** erfolgt die Anregung der Atome oder Moleküle durch Einstrahlung von Licht mit definierten Wellenlängen. Registriert wird der **absorbierte Anteil** der Lichtintensität. Trägt man die Messwerte für die absorbierte Lichtintensität gegen die Wellenlänge auf, so erhält man das **Absorptionsspektrum** der Atome oder Moleküle. Zur Absorptionsspektroskopie gehören z. B. die **Atomabsorptionsspektroskopie** (AAS), die **UV-Vis-Spektroskopie**, die **IR-Spektroskopie** und mit Einschränkungen auch die **NMR-Spektroskopie** (Tab. 3.4).

4 Refraktometrie

4.1 Grundlagen der Refraktometrie

Definition der
Brechzahl
(Brechungsindex)

In der Refraktometrie misst man die **Brechzahl** (den **Brechungsindex***) und wertet sie analytisch aus (vgl. Lehrbücher der Physik). Wenn ein Lichtstrahl der Wellenlänge λ aus dem Vakuum in eine durchsichtige Substanz eintritt, kommt es zu einer Verlangsamung seiner Ausbreitung. Das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum (c) und der Lichtgeschwindigkeit in der Substanz ($v(\lambda)$) wird als Brechzahl $n(\lambda)$ (Brechungsindex n_λ *) bezeichnet:

$$n(\lambda) = \frac{c}{v(\lambda) \text{ Substanz}} \quad (\text{Gl. 4.1})$$

In der Praxis wird die Brechzahl jedoch nicht auf das Vakuum (**absolute Brechzahl**), sondern auf Luft bezogen (**relative Brechzahl**). Anstelle der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum wird die in Luft herangezogen:

$$n(\lambda) = \frac{v(\lambda) \text{ Luft}}{v(\lambda) \text{ Substanz}} \quad (\text{Gl. 4.2})$$

Die absolute Brechzahl von Luft, die gegen Vakuum gemessen 1,0003 beträgt, wird damit zur relativen Brechzahl 1,0000.

Was ist Refraktion?

Snellius'sches
Brechungsgesetz,
Totalreflexion

Beim Übergang eines Lichtstrahls aus einem optisch dünneren (Luft) in ein optisch dichteres Medium (Substanz) kommt es auch zu einer Änderung der Ausbreitungsrichtung (**Lichtbrechung, Refraktion**). Der Strahl wird zum Lot hin gebrochen (Abb. 4.1). Die Sinus-Werte von Einfallswinkel α und Brechungswinkel β verhalten sich wie die Brechzahl des Eintrittsmediums (n_2) zur Brechzahl des Austrittsmediums (n_1), im vorliegenden Falle des optisch dichteren (n_2) und optisch dünneren (n_1) Mediums (**Snellius'sches Brechungsgesetz**).

Ist das Austrittsmedium Luft ($n_1 = 1$), so erhält man die auf Luft bezogene Brechzahl n_2 des Eintrittsmediums:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n(\text{Eintrittsmedium})}{n(\text{Austrittsmedium})} = \frac{n_2}{n_1} = n_2 \quad (\text{Gl. 4.3})$$

*) In der Physik ist der Begriff **Brechzahl** üblich. Das Arzneibuch benutzt die ältere Bezeichnung **Brechungsindex**.

Die Brechzahl (der Brechungsindex) $n(\lambda)$ ändert sich wegen der Abhängigkeit der Lichtgeschwindigkeit in einer Substanz von λ mit der Wellenlänge des Lichtes (**Dispersion**). Man verwendet meist die D-Linie des Natriums mit der Wellenlänge $\lambda = 589,3 \text{ nm}$ (vgl. Kap. 6) und macht dies durch den Zusatz D deutlich. Auch von der Temperatur ist die Brechzahl abhängig. Meist gibt man den für 20°C bestimmten Wert an und verwendet das Symbol n_D^{20} . Die Abhängigkeit von der **Polarisierbarkeit** wurde früher zur Berechnung der Molekularrefraktion herangezogen. Die Brechzahlen von Flüssigkeiten liegen meist zwischen 1,3 und 1,8, die von Festkörpern zwischen 1,3 und 2,5.

Dispersion der
Brechzahl

4.2 Messung der Brechzahl

Die zur Bestimmung der Brechzahl (des Brechungsindex) verwendeten Messgeräte werden als **Refraktometer** bezeichnet. Sie nutzen meist den **Grenzwinkel der Totalreflexion** zur Messung aus (Abbé-Refraktometer, Pulfrich-Refraktometer, Zeiss-Eintauchrefraktometer). Gewöhnlich wird das **Abbe-Refraktometer** verwendet.

Prinzip der
Brechzahl-Messung;
Refraktometer

4.2.1 Grenzwinkel der Totalreflexion

Fällt ein monochromatischer Lichtstrahl aus einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium, so wird er vom Lot weggebrochen (Abb. 4.1, Strahl a). Vergrößert man den Einfallswinkel α , so wird auch der Brechungswinkel β größer. Man kann α so weit vergrößern, bis $\beta = 90^\circ$ oder größer als 90° wird (Abb. 4.1, Strahl c bzw. b). In diesem Falle geht der Lichtstrahl nicht mehr in das optisch dünnere Medium über, sondern wird in das dichtere Medium reflektiert, man sagt, er wird total reflektiert. Denjenigen Winkel α , bei dem β gerade 90° wird (Abb. 4.1, Strahl c), bezeichnet man als **Grenzwinkel der Totalreflexion**, weil bei einer weiteren Vergrößerung von α Totalreflexion erfolgt. Wie der Brechungswinkel, so ist auch der Grenzwinkel der Totalreflexion wellenlängenabhängig (vgl. Lehrbücher der Physik).

Totalreflexion

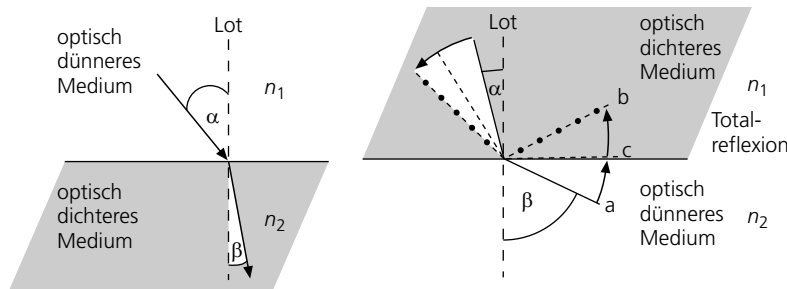


Abb. 4.1 Lichtbrechung am optisch dichteren und optisch dünneren Medium; Totalreflexion

4.2.2 Abbe-Refraktometer

Aufbau des
Abbe-Refraktometers

Das Abbe-Refraktometer (Abb. 4.2) benutzt den Strahlengang der Totalreflexion (Kap. 4.2.1) zur Messung der Brechzahl (Brechungsindex). Das Gerät enthält zwei Glas-Prismen, ein drehbares oberes **Beleuchtungsprisma** und ein unteres **Messprisma**. Das Beleuchtungsprisma ist auf seiner Unterfläche aufgeraut, um das ausfallende Licht diffus zu machen, so dass es die Unterfläche in allen Richtungen verlässt, als ob es mit verschiedenen Einfallswinkeln dort aufgetroffen wäre. Nach Hochklappen des beweglichen Beleuchtungsprismas wird die Probe auf das glatte Messprisma gebracht und durch Zuklappen in dünner Schicht zwischen den beiden Prismen verteilt. Durch das Beleuchtungsprisma fällt weißes Licht in die Anordnung, welches im Okular beobachtet wird. Dort sieht man eine Hell-Dunkel-Grenze, die mithilfe eines Drehknopfes mit einem Fadenkreuz zur Deckung gebracht wird. Die Hell-Dunkel-Grenze ist wie folgt zu deuten:

Hell-Dunkel-Grenze
im Abbe-Refraktometer

- Ausgehend von der Lichtquelle fällt Licht durch das Beleuchtungsprisma und dessen aufgeraute Oberfläche durch Streuung in vielen verschiedenen Winkeln in die optisch dünnere Probe (a, b, c). Strahlen, die mit dem Einfallswinkel der Totalreflexion α in die Probe gelangen, erreichen gerade noch das Messprisma (Strahlengang a). Strahlen mit einem größeren Einfallswinkel als α werden an der Grenze Beleuchtungsprisma/Probe total reflektiert, sie gelangen nicht in das Messprisma und damit nicht an das Okular, welches dort abgedunkelt bleibt (Strahlengang b).
- Strahlen, mit einem kleineren scheinbaren Einfallswinkel als dem Winkel der Totalreflexion α , gelangen aus dem Beleuchtungsprisma in die Probe und von dort in das Messprisma. Sie fallen auf das Okular (Strahlengang c) und bewirken dort Helligkeit.
- Auf diese Weise wird die Hell-Dunkel-Grenze im Okular durch den streifenden Strahlengang (a) mit dem Einfallswinkel α und dem Brechungswinkel $\beta = 90^\circ$ markiert. Dieser Grenzwinkel α der Totalreflexion (Kap. 4.2.1) kann am Okular gemessen werden. Für den Strahlengang (a) kann dann das Snellius'sche Brechungsgesetz mit dem Brechungswinkel $\beta = 90^\circ$ angewandt werden:

Messung der
Brechzahl

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{\sin \alpha}{\sin 90^\circ} = \frac{n(\lambda) \text{ Substanz}}{n(\lambda) \text{ Glas}} \quad (\text{Gl. 4.4})$$

Da $\sin 90^\circ = 1$ ist, erhält man folgende Beziehung, die bei bekannter Brechzahl des Glases die Bestimmung der Brechzahl der Substanz aus dem Winkel α ermöglicht:

$$n(\lambda) \text{ Substanz} = \sin \alpha \cdot n(\lambda) \text{ Glas}$$

Auf der Skala des Refraktometers ist nicht der Winkel α , sondern direkt die Brechzahl (der Brechungsindex) abzulesen.

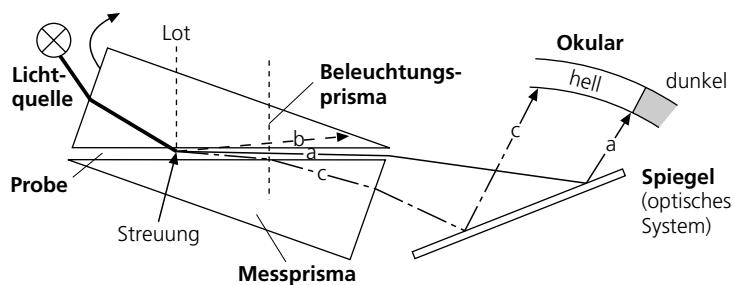


Abb. 4.2 Strahlengang im Abbe-Refraktometer

Die Prismenfassungen des Abbe-Refraktometers sind mit Anschlüssen für einen Thermostaten versehen. Für Messungen nach dem Arzneibuch muss auf $20 (\pm 0,5) ^\circ\text{C}$ temperiert werden. In Ausnahmefällen wird bei 40° oder 75°C gemessen (Fette, Cetylpalmitat).

In den meisten Fällen wird Tageslicht oder weisses Kunstlicht zur Messung verwendet, weil die Geräte mit einem Kompensator versehen sind, der die Messwerte auf Natrium-D-Licht bezieht. Das Arzneibuch (2.2.6) gibt den Brechungsindex bis auf drei Dezimalstellen an. An dem verwendeten Refraktometer muss daher diese Stelle noch exakt ablesbar und die vierte zu schätzen sein, wobei die Ziffern 1 bis 4 auf null und die Ziffern 5 bis 9 auf zehn zu runden sind.

Nach dem Arzneibuch werden zur Kontrolle des Refraktometers 2,2,4-Trimethylpentan (n_D^{20} 1,392), Toluol (n_D^{20} 1,497) und 1-Methylnaphthalin (n_D^{20} 1,616) verwendet. Für diese Substanzen gab die Ph.Eur.4.0 auch die Änderung des Brechungsindex pro Grad Temperaturänderung an (Temperaturkoeffizient $\Delta n/\Delta t$); Temperaturkoeffizienten für zahlreiche Stoffe s. Lit. 4.

Anforderungen an
das Refraktometer
nach dem Arzneibuch

4.3 Anwendungen der Refraktometrie in der Pharmazie

Die Brechzahl (Brechungsindex) ist eine charakteristische Stoffkonstante, die zur Identitäts-, Reinheits- und Gehaltsprüfung von Arzneistoffen herangezogen wird. Insbesondere lassen sich Stoffgemische wie ätherische und fette Öle durch die Brechzahl charakterisieren. Beimengungen, Verfälschungen und Verdorbenheit können zu einer Veränderung der Brechzahl führen.

Auch quantitative Bestimmungen sind möglich, wenn eine Kalibrierkurve erstellt wird. Die Brechzahl ermöglicht dann eine schnelle Gehaltsbestimmung und wird insbesondere in der industriellen Pharmazie angewandt.

Bedeutung besitzt die Refraktometrie auch als Detektionsmethode in der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (Brechungsindexdetektor, Brechzahl-detektor; vgl. Kap. 20.2.7).

Anwendungen
der Brechzahl-Messung

Anwendungen im Arzneibuch (2.2.6)

Im Arzneibuch (Ziffer 2.2.6) wird der Brechungsindex bei vielen Stoffen zur Identitäts- und Reinheitsprüfung herangezogen (Lit. 4): z. B. ätherische Öle, Benzylalkohol, Dichlormethan, Glycerol, Methylsalicylat, Propylenglycol u. a. Bei Nicethamid ist der n_D vom Wassergehalt abhängig (Lit. 1).

Bei Glycerol ist aufgrund des Brechungsindex eine schnelle quantitative Bestimmung des Wassergehaltes möglich, weil n_D mit zunehmendem Wassergehalt nahezu linear abnimmt (Lit. 1).

Das Arzneibuch verwendet den Brechungsindex auch in der Fettanalytik (Octyldodecanol, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat, Kakaobutter, Rizinusöl, Sesamöl, mittelkettige Triglyceride u. a.). Hier nimmt der n_D mit zunehmender Zahl von C-Atomen und Doppelbindungen im Molekül zu. Damit besteht eine Korrelation zwischen der Iodzahl von Fetten und Fettsäuren und ihrem Brechungsindex.

Literatur über Refraktometrie

- 1) G. Rücker, Brechungsindex. In F. Bracher, P. Heisig, P. Langguth, E. Mutschler, G. Rücker, O. Scriba, E. Stahl-Biskup, R. Troschütz, G. Seitz (Hrsg.): Arzneibuch-Kommentar mit 26. Erg. Lfg. Wiss. Verlagsges., Stuttgart, Govi-Verlag, Eschborn (2007)
- 2) H. Althoff in H. Feltkamp, P. Fuchs, H. Sucker: Pharmazeutische Qualitätskontrolle. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York (1983)
- 3) D. A. Skoog, J. J. Laery: Instrumentelle Analytik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1996)
- 4) H. Münstermann, Pharmaz. Ztg. **137**, 1990 (1992)
- 5) W. Baumann in Hager, Bd. 2, S. 149 (1991)

5 Chiroptische Analysenmethoden

Bei den chiroptischen Methoden lässt man **polarisiertes Licht** auf optisch aktive (chirale) Substanzen einwirken. Die Messergebnisse führen zur Charakterisierung der Verbindungen, insbesondere ihrer Stereochemie. Zu den chiroptischen Methoden (s. auch Abb. 5.4) gehören:

- Polarimetrie
- Zirkulardichroismus (CD)
- Optische Rotationsdispersion (ORD) und Cotton-Effekt (CE).

Was sind chiroptische Methoden?

Es wird auch links- und rechtspolarisierte IR- und Raman-Strahlung zur Untersuchung der Stereochemie eingesetzt (VOA: Vibrational Optical Activity, Lit. 6, 7, Polarimetrie).

5.1 Polarimetrie

5.1.1 Grundlagen der Polarimetrie

In der Polarimetrie wird die Drehung der Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes durch optisch aktive Substanzen gemessen (**optische Drehung**) und zur Analyse herangezogen.

Linear polarisiertes Licht

Wie bereits erwähnt (Kap. 3.1), sind Lichtstrahlen transversale elektromagnetische Wellen, deren elektromagnetisches Feld senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung schwingt. Natürliches Licht schwingt in allen Ebenen (Abb. 5.1). Man bezeichnet solches Licht als **nicht polarisiert**. Dagegen nennt man Licht, das nur in einer Ebene schwingt (Abb. 5.1) **linear polarisiert**; seine Erzeugung aus natürlichem Licht bezeichnet man als **Polarisation**.

Nicht polarisiertes und polarisiertes Licht

Polarisation

Erzeugung von linear polarisiertem Licht

Nicol'sches Prisma

In doppelbrechenden, optisch anisotropen Kristallen z.B. Kalkspat (CaCO_3) sind Ausbreitungsgeschwindigkeit und Ausbreitungsrich-

Nicol'sches Prisma.
Ordentlicher und
außerordentlicher Strahl

tung von einfallendem Licht für die verschiedenen Schwingungsebenen des Lichtes unterschiedlich (Abb. 5.1). Fällt ein unpolarisierter Lichtstrahl auf die Rhomboederfläche eines solchen Kalkspatkristalls, so wird er in zwei Strahlen aufgespalten, den:

- **Ordentlichen Strahl**, er wird beim Eintritt in das Prisma verhältnismäßig stark gebrochen
- **Außerordentlichen Strahl**, er wird schwächer gebrochen.

Wichtig ist, dass beide Strahlen senkrecht zueinander polarisiert sind. Der ordentliche Strahl schwingt senkrecht zur Papierebene, der außerordentliche in der Papierebene der Abb. 5.1. Die Intensität beider Strahlen ist gleich groß und gleich der Hälfte der einfallenden Intensität.

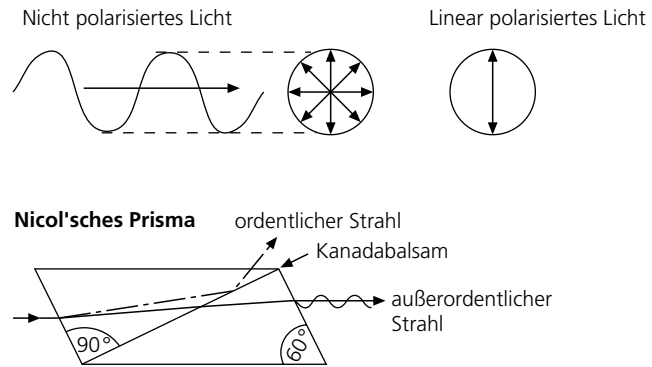


Abb. 5.1 Linear polarisiertes Licht. Nicol'sches Prisma

Im **Nicol'schen Prisma** (Nicol) (Abb. 5.1) wird der ordentliche Strahl durch Totalreflexion (Kap. 4.2.1) entfernt. Man erhält ausschließlich das in der Papierebene schwingende, polarisierte Licht des außerordentlichen Strahles.

Herstellung des
Nicol'schen Prismas

Zur Herstellung des Nicol'schen Prismas wird ein Kalkspatkristall bestimmter Abmessungen in zwei Teile geschnitten und mit Kanadabalsam*) wieder verklebt. Unpolarisiertes Licht wird in der Weise in das Prisma eingestrahlt (Abb. 5.1), dass der Einfallswinkel des ordentlichen Strahls beim Eintritt aus dem Kalkspat in das optisch dünnere Medium (Kanadabalsam) den Grenzwinkel der Totalreflexion überschreitet. Er wird auf diese Weise durch Totalreflexion entfernt,

*) Balsam (Balsamum canadense) aus der Balsamtanne (*Abies balsamea*) sowie aus *A. fraseri* oder *Tsuga canadensis* mit dem gleichen Brechungsindex wie „Kronglas“ (ein Kali-Kalk-Glas). Kanadabalsam enthält u. a. Pinen, β -Phellandren, Harzsäuren, Bernsteinsäure.

während der außerordentliche Strahl das Prisma polarisiert verlässt und zur Messung verwendet wird (Abb. 5.1).

Polarisationsfilter, Polarisationsfolien

Statt dem Nicol'schen Prisma werden auch Polarisationsfilter oder Polarisationsfolien verwendet. Dort sind in dünne Platten oder Folien stark doppelbrechende Kristalle oder anisotrope Flüssigkeiten (flüssige Kristalle) eingelagert.

Zirkular polarisiertes Licht

Zirkular polarisiertes Licht schwingt ebenfalls nur in einer Richtung wie linear polarisiertes Licht, aber die Schwingungsrichtung dreht sich bei der Ausbreitung (Abb. 5.2), und beschreibt eine Spirale. Dreht sich die Schwingungsebene des auf den Beobachter zukommenden Lichtstrahles nach links (entgegen der Uhrzeigerrichtung), so liegt **linkszirkular polarisiertes Licht** vor; dreht sie sich nach rechts (in Uhrzeigerrichtung), so liegt **rechtszirkular polarisiertes Licht** vor (Abb. 5.2). Besitzen je ein links- und ein rechtszirkular polarisierter Lichtstrahl gleiche Frequenz, gleiche Amplitude und gleiche Phase (d.h. sind sie kohärent), so addieren sie sich zu einem linear polarisierten Lichtstrahl (Abb. 5.2).

Links- und rechtszirkular-polarisiertes Licht

Umgekehrt kann man sich jeden linear polarisierten Lichtstrahl aus je einem kohärenten links- und rechtszirkular polarisierten Lichtstrahl zusammengesetzt denken.

Optische Aktivität

Optisch aktive Substanzen drehen die Schwingungsebene des linear polarisierten Lichtes entweder nach rechts (im Uhrzeigersinn, positiv, Symbol d oder $+$) oder nach links (entgegen dem Uhrzeigersinn, negativ, Symbol l oder $-$), beurteilt von einem Beobachter, auf den der Strahl zukommt.

Die optische Drehung lässt sich wie folgt deuten: Die Wechselwirkung der beiden Enantiomeren einer Substanz mit links- und rechts-

Deutung der optischen Drehung

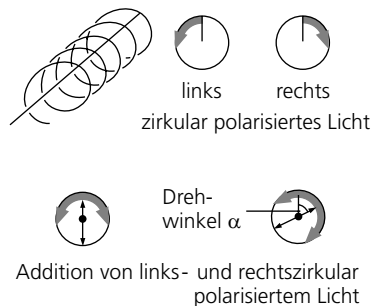


Abb. 5.2 Zirkular polarisiertes Licht

zirkular polarisiertem Licht ist wegen der sterischen Unterschiede verschieden. Als eine Folge pflanzt sich links- und rechtszirkular polarisiertes Licht in den beiden Enantiomeren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit fort. Diese unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeit in einer optisch aktiven Substanz führt zu einer Phasenverschiebung der beiden polarisierten Lichtwellen, die sich beim Verlassen der Substanz an einer anderen Stelle des Kreises als bei einer optisch inaktiven Substanz zu einer linear polarisierten Welle addieren. Die Schwingungsebene dieser Welle ist daher um einen Winkel α gedreht (Abb. 5.2), der als **Winkel der optischen Drehung** bzw. **Drehwinkel** (**Drehungswinkel**) bezeichnet wird.

Wo tritt optische Aktivität auf?

Optische Aktivität tritt auf bei:

- Kristallen, z. B. Quarz, verursacht durch den Aufbau des Kristalls. Sie geht beim Lösen oder Schmelzen verloren.
- Molekülen mit **Chiralitätszentrum** (bzw. Asymmetriezentrum). Moleküle, die sich wie Bild und Spiegelbild verhalten (**optische Antipoden, Enantiomere**), drehen die Ebene des polarisierten Lichtes um den gleichen Betrag nach links bzw. nach rechts. **Diastereomere** zeigen unterschiedliche Drehwerte und Drehrichtungen (vgl. Lehrbücher der organischen Chemie und Lit. 5).

5.1.2 Messung der optischen Drehung

Polarimeter

Die optische Drehung wird konventionell in Grad ($^{\circ}$) gemessen, nach dem Internationalen Einheitensystem (SI) in Radiant (Abkürzung rad)*). Messgeräte zu ihrer Messung bezeichnet man als **Polarimeter**. Die Drehung fester Substanzen wird in Lösung, die von Flüssigkeiten auch in reiner Form gemessen. Charakteristische Größe ist die **spezifische Drehung**.

*) Nach dem Internationalen Einheitensystem (SI) ist die spezifische Drehung (Symbol $[a_m]_D^t$) wie folgt definiert: Drehung einer Lösung oder Flüssigkeit von 1 kg optisch aktiver Substanz in 1 Kubikmeter Lösung bei einer Schichtdicke von 1 m, gemessen bei der Temperatur t und der Wellenlänge λ . Maßeinheit ist Radiant (rad). Möglich ist auch die Angabe in Milliradian-Quadratmeter je Kilogramm:

$$[a_m]_D^t = (\text{mrad} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1})$$

Diese unpraktischen Messgrößen werden in der Praxis kaum verwendet. Die spezifische Drehung in Milliradian kann wie folgt aus der spezifischen Drehung im CGS-System berechnet werden:

$$[a_m]_D^{20} = [\alpha]_D^{20} \cdot 0,1745$$

Spezifische Drehung

Die optische Drehung einer optisch aktiven Substanz ist von folgenden Faktoren abhängig:

Abhängigkeit der optischen Drehung

- Wellenlänge des polarisierten Lichtes. Man verwendet meist die D-Linie des Natriumlichtes bei 589,3 nm (vgl. Kap. 6).
- Temperatur. Meist werden die Messungen bei 20 °C durchgeführt.
- Lösungsmittel (z. B. dessen pH-Wert). Wenn keine andere Angabe gemacht wird, sollten wässrige Lösungen verwendet werden.
- Schichtdicke der durchstrahlten Lösung bzw. Flüssigkeit.
- Konzentration.

Diese Einflüsse werden bei der vom Arzneibuch benutzten konventionellen Definition der **spezifischen Drehung** $[\alpha]_D^{20}$ berücksichtigt:

Definition der spezifischen Drehung

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{c \cdot l} \quad (\text{Gl. 5.1})$$

α = gemessener Drehungswinkel [Grad]

c = Konzentration der Lösung [$\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]

l = Schichtdicke (Länge des Polarimeterrohres) [dm]

Danach ist die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ der Drehungswinkel in Grad (°) einer Lösung der optisch aktiven Substanz mit der Konzentration von $1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in einer Schichtdicke von 1 dm bei 20 °C, gemessen mit Natrium-D-Licht von 589,3 nm. Die Maßeinheit nach dem früheren CGS-System ist daher $\text{Grad} \cdot \text{ml} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Messung der spezifischen Drehung

In der Praxis lassen sich wegen schlechter Löslichkeit oder hohen Substanzbedarfs selten Lösungen mit Konzentrationen im Bereich von $1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ herstellen. Man arbeitet daher mit kleineren Konzentrationen. Verwendet man die Konzentration g/100 ml so muss man die rechte Seite der Gleichung mit 100 multiplizieren:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{100 \cdot \alpha}{c \cdot l} \quad (\text{Gl. 5.2})$$

c = Konzentration [g/100 ml]

l = Schichtdicke [dm]

Gibt man die Konzentration c nicht in g/100 ml sondern in $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ an, so muss zusätzlich der Nenner der Gleichung durch 10 dividiert werden:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{1000 \cdot \alpha}{c \cdot l} \quad (\text{Gl. 5.3})$$

c = Konzentration [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]

l = Schichtdicke [dm]

Wird eine optisch aktive Flüssigkeit in ungelöster Form vermessen, so entspricht die Masse der optisch aktiven Substanz pro ml der Dichte ρ_{20} , bzw. der relativen Dichte d_{20}^{20} , die sich nur geringfügig unterscheiden ($d_{20}^{20} = 1,00180 \cdot \rho_{20}$):

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{a}{\rho_{20} \cdot l} \quad \text{bzw.} \quad \frac{a}{d_{20}^{20} \cdot l} \quad (\text{Gl. 5.4})$$

ρ = Dichte bei 20°C in $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$

d_{20}^{20} = relative Dichte der Flüssigkeit bei 20°C, bezogen auf Wasser von 20°C

l = Schichtdicke [dm]

Interessant ist eine gelegentlich beobachtete Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen Drehung (z. B. bei Weinsäure). In bestimmten Fällen ist sogar die Drehrichtung von der Konzentration abhängig (z. B. Äpfelsäure).

Angabe der spezifischen
Drehung

Bei Angabe der spezifischen Drehung muss daher neben Wellenlänge, Temperatur und Lösungsmittel auch die Konzentration vermerkt werden, z. B.:

$$[\alpha]_D^{20} = +50,0^\circ \quad (c = 1,000 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}; \text{Chloroform})$$

Neben der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{20}$ wird gelegentlich die Molekularrotation $[M]_D^{20}$ (molarer Drehwert) herangezogen, die sich auf 1 Mol optisch aktive Verbindung bezieht (M_r = relative Molmasse):

$$[M]_D^{20} = \frac{[\alpha]_D^{20} \cdot M_r}{100} \quad (\text{Gl. 5.5})$$

Halbschattenpolarimeter

Aufbau des Polarimeters

Zur Messung der optischen Drehung wird das Halbschattenpolarimeter verwendet (Abb. 5.3). Lichtquelle ist die D-Linie einer Natriumdampflampe, deren Licht über ein optisches System an ein Nicol'sches Prisma (den **Polarisator**) gelangt. Ein zweites Nicol'sches Prisma befindet sich drehbar als **Analysator** vor dem Okular. Durch Drehung des Analysators um die Ausbreitungsachse des Lichtes sind bei fest stehendem Polarisator zwei extreme Positionen möglich:

1. Der Analysator steht in gleicher Stellung wie der Polarisator bzw. um 180° gedreht. Er ist für den in der Papierebene polarisierten außerordentlichen Lichtstrahl durchlässig, im Okular herrscht volle Helligkeit. Diese Stellung von Analysator und Polarisator bezeichnet man als parallel.
2. Wird der Analysator aus der parallelen Stellung um 90° oder 270° gedreht, so ist er für das in der Papierebene polarisierte Licht des Polarisators undurchlässig. Im Okular herrscht volle Dunkelheit.

Parallele und gekreuzte
Stellung von Polarisator
und Analysator

Man bezeichnet diese Stellung von Analysator und Polarisator als gekreuzt.

Bringt man zwischen den Polarisator und den gekreuzt stehenden, volle Dunkelheit erzeugenden Analysator in einem **Polarimeterrohr** (Abb. 5.3) die Lösung einer optisch aktiven Substanz, so dreht diese die Ebene des polarisierten Lichtes um den Winkel α . Das Okular hellt sich auf. Man muss den Analysator ebenfalls um den Winkel α drehen, damit er erneut gekreuzt zur Polarisationssebene des Lichtes steht, d.h. damit wieder volle Dunkelheit herrscht. Der am Analysator abzulesende Winkel entspricht der optischen Drehung der Lösung.

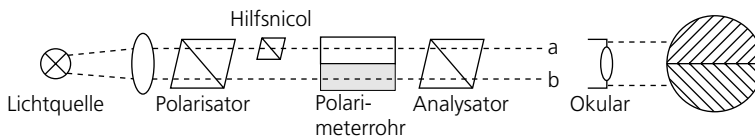


Abb. 5.3 Halbschattenpolarimeter

Da das menschliche Auge maximale Dunkelheit schlecht erkennt, arbeitet man nach der **Halbschattenmethode**. Hierbei wird der Strahlengang geteilt und in seiner oberen Hälfte ein zusätzliches Nicol'sches Prisma (**Hilfsnicol**) angebracht (Abb. 5.3, Strahlengang a). Stehen Polarisator, Hilfsnicol und Analysator parallel, so gelangt der Lichtstrahl ungeschwächt an das Okular. Verdreht man das Hilfsnicol um einen kleinen Winkel, so kommt es zu einer leichten Verdunklung der oberen Hälfte des Okulars. Man kann nun den Analysator so drehen, dass die untere Hälfte des Okulars (Abb. 5.3, Strahlengang b) so abgedunkelt ist, wie die obere Hälfte. Diese **Halbschatteneinstellung** wird als Nullpunkt der Messung gewählt. Bringt man nun das Polarimeterrohr mit der optisch aktiven Substanz in die untere Hälfte des Strahlenganges (b), so erscheinen die zwei Halbkreise ungleich dunkel, weil die Ebene des Strahles b durch die Substanz um den Winkel α gedreht wurde. Man stellt nun wiederum auf gleiche Dunkelheit ein (Halbschatten) und liest den Drehwinkel ab.

Halbschattenmethode.
Funktion des Hilfsnicols

Lichtelektrische Polarimeter

In einem lichtelektrischen Polarimeter erfolgt die Helligkeitsmessung über Photoelemente und einen Sekundärelektronenvervielfacher. Dieser steuert über einen Motor die Drehung des Analysators, bis erneut volle Dunkelheit herrscht. Meist wird der Messwert digital angezeigt.

5.1.3 Anwendungen der Polarimetrie in der Pharmazie

Die spezifische Drehung ist eine charakteristische Stoffkonstante, die in der Arzneistoffanalytik zur Identitäts-, Reinheits- und Gehaltsbestimmung eingesetzt wird. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass enantiomere und diastereomere Formen von Wirkstoffen unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften besitzen können (vgl. Lehrbücher der pharmazeutischen Chemie). Das Arzneibuch unterscheidet zwischen der **optischen Drehung** unter festgelegten Bedingungen und der **spezifischen Drehung** (Kap. 5.1.2).

Messung der optischen Drehung nach dem Arzneibuch

Vorschriften des Arzneibuchs für die Polarimetrie

Das Arzneibuch (Ziffer 2.2.7) schreibt ein Polarimeter vor, welches ein Ablesen des Drehwinkels bei $\lambda = 589,3 \text{ nm}$ auf $0,01^\circ$ gestattet. Die Drehung wird üblicherweise in einer Schichtdicke von $1,00 \text{ dm}$ bei $20(\pm 0,5)^\circ\text{C}$ gemessen. Messungen bei anderen Temperaturen dürfen nur dann durchgeführt werden, wenn in der Monographie eine Temperaturkorrektur vorgesehen ist. Um individuelle Einflüsse auszuschalten, wird der Nullpunkt als Mittelwert aus mindestens 5 Ablesungen bestimmt, und zwar bei:

- Lösungen an dem mit dem reinen Lösungsmittel gefüllten Polarimeterrohr
- Ungelösten flüssigen Substanzen an dem leeren Polarimeterrohr.

Die Messung erfolgt ebenfalls als Mittelwert von mindestens 5 Einstellungen. Es ist darauf zu achten, dass sich im Polarimeterrohr keine Luftbläschen befinden und die Lösung nicht getrübt ist. In manchen Fällen, z. B. bei Zuckern, ist die Einstellung eines Mutarotationsgleichgewichtes abzuwarten (z. B. Glucose, Mannose, Fructose). Dies kann gelegentlich durch Zugabe von Spuren Ammoniak-Lösung beschleunigt werden. Das vorgeschriebene Lösungsmittel darf nicht ausgetauscht werden, weil dadurch eine Änderung des Drehwinkels, in Ausnahmefällen auch des Drehsinns, hervorgerufen werden kann. Entsprechendes gilt für die Konzentration, die im Arzneibuch in $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ angegeben wird.

Die Skaleneinteilung des Polarimeters kann nach dem Arzneibuch mittels geeichter Quarzplättchen, die Linearität durch Messung des Drehwinkels von Saccharose-Lösungen bestimmter Konzentration kontrolliert werden.

Identitätsprüfungen

Nach dem Arzneibuch wird die optische Drehung in folgender Weise als Identitätskriterium herangezogen:

- Die Substanz muss eine bestimmte Drehungsrichtung zeigen, ohne dass ein Zahlenwert für die Drehung gefordert wird.

- Die Substanz muss die geforderte **optische** oder **spezifische Drehung** besitzen.
 - Die Substanz darf keine Drehung zeigen um den Überschuss eines Enantiomers auszuschließen, d. h. ein Racemat nachzuweisen.
- Nachweis von racemischen Arzneistoffen

Reinheitsprüfungen

Die Polarimetrie wird häufig zur Reinheitsprüfung eingesetzt, da Verunreinigungen zu einer Veränderung der optischen Drehung führen, falls die Beimengungen nicht zufällig den gleichen Drehwert wie die Substanz besitzen. Wichtig ist die Polarimetrie auch zur Überprüfung optisch aktiver Arzneistoffe auf Racemisierung. Im Arzneibuch ist in den meisten Fällen ein Mindest- oder Höchstwert oder ein Intervall für die spezifische Drehung vorgeschrieben.

Sonderfälle sind z. B.:

- **Ätherische Öle:** Es wird ein bestimmter Drehwinkel bzw. ein bestimmter Bereich gefordert, der in einer vorgeschriebenen Prüflösung zu messen ist.
- **Fructose, Glucose:** Es ist die Einstellung des Mutarotationsgleichgewichtes abzuwarten; die Einstellung wird in einigen Fällen durch Ammoniak-Lösung beschleunigt.
- **Mannitol, Sorbitol:** Zur Erhöhung des Drehwertes wird in Natriumtetraborat-Lösung gemessen.
- **Atropinsulfat:** Eine Verunreinigung durch das optisch aktive Hyoscyamin wird durch Begrenzung des Drehwinkels auf einen Wert nahe null limitiert.

Gehaltsbestimmungen

Die Polarimetrie kann zur Gehaltsbestimmung optisch aktiver Substanzen eingesetzt werden, wenn die spezifische Drehung von der Konzentration der Messlösung unabhängig ist (Kap. 5.1.2):

$$c = \frac{1000 \cdot a}{[\alpha]_D^{20} \cdot l} [\text{g} \cdot \text{l}^{-1}] \quad (\text{Gl. 5.6})$$

Bei konstanter Länge des Polarimeterrohrs ist die Konzentration dem abgelesenen Drehwinkel a direkt proportional. Soll die Konzentration c' in Prozent (m/m) bestimmt werden, so muss die relative Dichte d_{20}^{20} der Lösung (bzw. die Dichte ρ_{20}) berücksichtigt werden:

Konzentrationsbestimmung durch Polarimetrie

$$c' = \frac{100 \cdot a}{[\alpha]_D^{20} \cdot l \cdot \rho_{20}} [\% (\text{m/m})] \quad (\text{Gl. 5.7})$$

Substanzspezifische Polarimeter z. B. **Saccharimeter** zur Gehaltsbe-

stimmung von Zuckerlösungen, sind so kalibriert, dass anstelle des Drehwinkels direkt die Konzentration abgelesen werden kann.

5.2 Zirkulardichroismus

Bei der Messung des Zirkulardichroismus wird die **Lichtabsorption** von zirkular polarisiertem Licht durch optisch aktive Substanzen in Abhängigkeit von der Wellenlänge beobachtet und zur sterischen Analyse der Substanzen herangezogen.

5.2.1 Wirkung von zirkular polarisiertem Licht auf optisch aktive Substanzen

Wechselwirkung von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht mit einem optisch aktiven Medium. Chiroptische Erscheinungen

Wie in Kap. 5.1.1 beschrieben, kann man sich einen linear polarisierten Lichtstrahl durch Überlagerung von je einem links- und rechtszirkular polarisierten Lichtstrahl (von gleicher Frequenz und Amplitude) zusammengesetzt denken. Beim Durchgang von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht durch ein optisch aktives Medium (z.B. durch ein Enantiomer einer optisch aktiven Substanz) kommt es zu einer unterschiedlichen Wechselwirkung der beiden Strahlenarten mit der Substanz und folglich zu einer unterschiedlichen Ausbreitungsgeschwindigkeit und zu einer unterschiedlichen Lichtabsorption. Die unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeit führt zur **Optischen Drehung** (Kap. 5.1.1) und zu einer unterschiedlichen

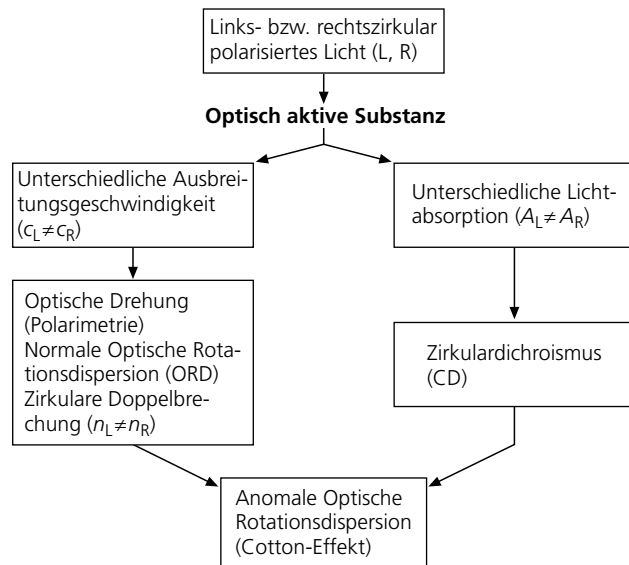


Abb. 5.4 Zusammenhang einiger chiroptischer Erscheinungen

Brechzahl (zirkulare Doppelbrechung) (s. Kap. 4) für die beiden Strahlen. Die unterschiedliche Lichtabsorption führt zum Zirkulardichroismus. In Abb. 5.4 ist der Zusammenhang von chiroptischen Erscheinungen dargestellt.

5.2.2 Definition des Zirkulardichroismus

Der Zirkulardichroismus (auch Circular dichroismus; CD) ist definiert als die Differenz ΔA der Absorption des links- und rechtszirkular polarisierten Lichtes (A_L , A_R) (Abb. 5.5). ΔA wird als **Zirkulardichroistische Absorption** bezeichnet:

$$\Delta A = A_L - A_R \text{ (ohne Einheit)} \quad (\text{Gl. 5.8})$$

Die Lichtabsorption A ist in Kap. 10.3 definiert. Ist $A_L > A_R$ so ist der Zirkulardichroismus positiv (+ CD), im umgekehrten Falle negativ (− CD). In Abb. 5.5 sind sowohl A_L und A_R als auch $\Delta A = A_L - A_R$ in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ aufgetragen. Für Racemate optisch aktiver Verbindungen ($A_L = A_R$) und für optisch nicht aktive Verbindungen ist $\Delta A = 0$.

Positiver und negativer
Zirkulardichroismus

Molarer Zirkulardichroismus

Bezogen auf einmolare Lösungen und eine Küvettenlänge von 1 cm, wird der molare Absorptionskoeffizient ε (Kap. 10.4.3) zur Definition des Zirkulardichroismus herangezogen: (**molarer Zirkulardichroismus, molarer differenzdichroistischer Absorptionskoeffizient**):

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \text{ (l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}\text{)} \quad (\text{Gl. 5.9})$$

Der molare Zirkulardichroismus $\Delta \varepsilon$ steht mit ΔA in folgendem Zusammenhang (Konzentration c in $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, Küvettenlänge l in cm):

$$\Delta \varepsilon = \frac{\Delta A}{c \cdot l} \quad (\text{Gl. 5.10})$$

Abhängigkeit des Zirkulardichroismus von der Wellenlänge

Wie die Absorption A bzw. der molare Absorptionskoeffizient ε (Kap. 10.4.3) ist auch die Differenz der Absorption bzw. des Absorptionskoeffizienten von links- bzw. rechtszirkular polarisiertem Licht ΔA bzw. $\Delta \varepsilon$ von der Wellenlänge (λ) abhängig (Abb. 5.5). Bei der Messung des CD wird meist $\Delta \varepsilon$ gegen λ aufgetragen (Abb. 5.6). Man bezeichnet das entsprechende Diagramm nicht ganz korrekt auch als **CD-Spektrum**. Zusätzlich hängt der CD ebenso wie die Lichtabsorption von der Temperatur und vom Lösungsmittel ab. Das Maximum bzw. Minimum des CD befindet sich am Maximum der UV/Vis-Ab-

CD-Spektrum

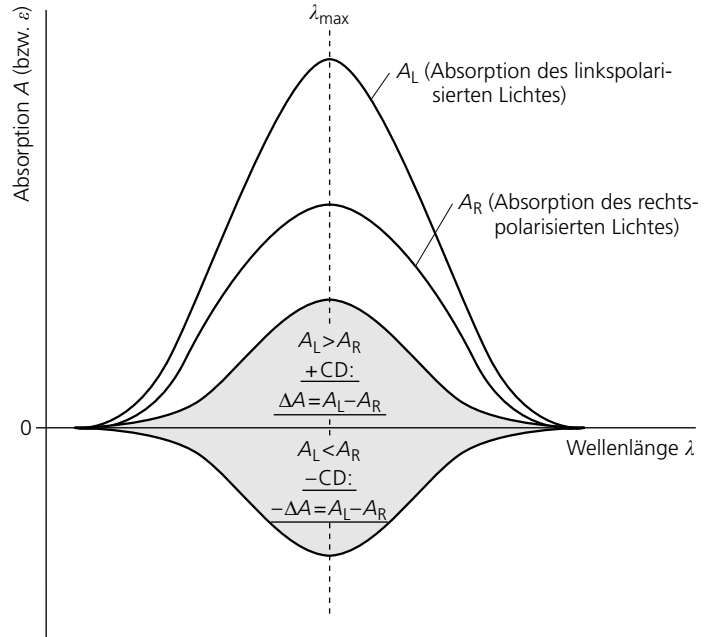


Abb. 5.5 Definition des Zirkulardichroismus

Positiver und negativer
Zirkulardichroismus

sorptionskurve der Substanz ($\lambda_{\max}$). Dort ist der Unterschied in der Absorption von links- bzw. rechtspolarisiertem Licht durch eine optisch aktive Substanz am größten, d. h. die beiden Lichtkomponenten werden dort am stärksten unterschiedlich absorbiert. Dies ist ursächlich verknüpft mit dem sterischen Bau der Substanzen. Bei enantiomeren Verbindungen wird z. B. entweder rechts- oder links zirkular polarisiertes Licht stärker absorbiert, was zu einem positiven oder negativen CD führt (Abb. 5.5). Außerdem liegt das Maximum oder Minimum des CD am Wendepunkt des Cotton-Effektes der Kurve der Optischen Rotationsdispersion (ORD-Kurve) (Kap. 5.3).

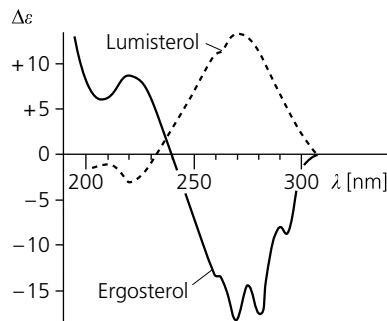


Abb. 5.6 Molarer Zirkulardichroismus von Lumisterol und Ergosterol (nach Lit. 4)

5.2.3 Messgrößen für den Zirkulardichroismus

Zur Beschreibung des Zirkulardichroismus sind im Arzneibuch (Ziffer 2.2.41) drei Messgrößen vorgesehen: die **Zirkulardichroistische Absorption** ΔA , der **Dissymmetrie-Faktor** g und die **Molare Elliptizität** (Θ).

Beschreibung des Zirkulardichroismus durch den Dissymmetrie-Faktor oder die Elliptizität

Zirkulardichroistische Absorption

Vgl. unter Kap. 5.2.2. Die Bestimmung von ΔA wird in der Ph.Eur. z. B. bei der Charakterisierung der Reagenzien (1S)-(+)-Campfersulfonsäure und Isoandrosteron eingesetzt, die auch zur Überprüfung des Dichrographen herangezogen werden.

Dissymmetrie-Faktor

Je größer der Unterschied $\Delta \varepsilon$ des links- und rechtszirkular polarisierten Lichtes am Maximum oder Minimum des CD ist (molarer Zirkulardichroismus s. Gl. 5.9), umso größer ist der Dissymmetrie-Faktor g (ε = molarer Absorptionskoeffizient):

$$g = \frac{\Delta \varepsilon}{\varepsilon} \text{ (ohne Einheit)} \quad (\text{Gl. 5.11})$$

Molare Elliptizität

Eine wichtige Größe zur Beschreibung des Zirkulardichroismus ist die **Elliptizität** (Θ , Theta). Würde z. B. der rechtszirkular polarisierte

Ableitung der Elliptizität

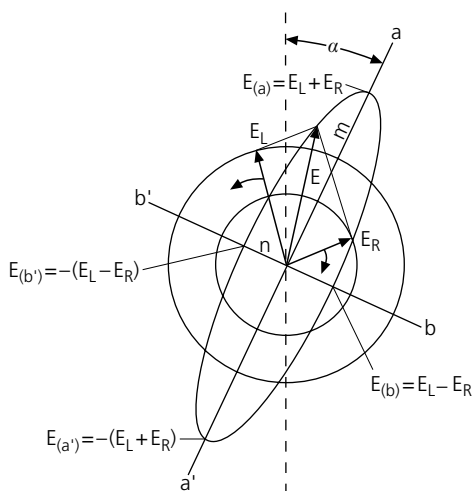


Abb. 5.7 Addition von links (L) und rechts (R) zirkular polarisiertem Licht unter Bildung von elliptisch polarisiertem Licht

Lichtstrahl (R) stärker absorbiert als der linkszirkular polarisierte Strahl (L) (Abb. 5.7), so ist der elektrische Schwingungsvektor $\vec{E}_R$ des rechtszirkular polarisierten Lichtes kleiner als der phasengleiche aber linksgängige Vektor $\vec{E}_L$ des linkszirkular polarisierten Lichtes. Die beiden sich entgegengesetzt drehenden Vektoren ($\vec{E}_R, \vec{E}_L$) addieren sich in jedem Augenblick ihrer Bewegung zum Gesamtvektor $\vec{E}$.

Entstehung von elliptisch
polarisiertem Licht

Elliptisch und linear
polarisiertes Licht

Beschreibung der Gestalt
der Ellipse des Lichtvektors

In Abb. 5.7 sind in a (entlang der y-Achse) die elektrischen Schwingungsvektoren $\vec{E}_R$ und $\vec{E}_L$ gleichgerichtet und es kommt zur Addition ihrer positiven Werte: $\vec{E} = \vec{E}_L + \vec{E}_R$. Dies entspricht einer Addition der Absolutwerte: $E_{(a)} = E_L + E_R$. Bei a' addieren sich die gleichgerichteten negativen Werte: $E_{(a')} = -(E_L + E_R)$. Bei b und b' entspricht der resultierende Summenvektor der Differenz der Absolutwerte, weil $\vec{E}_L$ und $\vec{E}_R$ entgegengerichtet sind: $\vec{E}_{(b)} = E_L - E_R$; $E_{(b')} = -(E_L - E_R)$. Somit beschreiben beim Übergang $a \rightarrow b \rightarrow a' \rightarrow b'$ die Werte für die Spitze des resultierenden Vektors $\vec{E}$ eine elliptische Bahn (**elliptisch polarisiertes Licht**). Wegen der unterschiedlichen Geschwindigkeit des links- und rechtszirkular polarisierten Lichtstrahls im Medium (**zirkulare Doppelbrechung, Optische Drehung**), steht die Ellipse nicht senkrecht, sondern sie ist um den Winkel α der optischen Drehung (Kap. 5.1) gedreht. Die Spitze des Vektors $\vec{E}$ bewegt sich als ellipsenförmige Helix in die Ausbreitungsrichtung des Lichtstrahls. Die Gestalt der Ellipse hängt vom Unterschied in der Größe der beiden Vektoren des elektrischen Feldes $\vec{E}_L$ und $\vec{E}_R$ ab. Sie geht für den Fall gleicher Geschwindigkeit beider Lichtarten ($\vec{E}_L = \vec{E}_R$) in eine Gerade (a–a') über (**linear polarisiertes Licht**). Der Betrag von E_L und E_R wird durch die unterschiedliche Lichtabsorption für das links- und rechtszirkular polarisierte Licht, d. h. durch den Zirkulardichroismus bestimmt. Folglich korreliert die Gestalt der Ellipse mit dem Zirkulardichroismus ΔA und kann zu dessen Beschreibung herangezogen werden. Allgemein ist die Form einer Ellipse durch das Verhältnis der kleinen Nebenachse (n) zur großen Hauptachse (m) gekennzeichnet und wird mit Hilfe der Elliptizität Θ beschrieben:

$$\Theta = \arctan \frac{\text{kleine Achse}}{\text{große Achse}} = \arctan \frac{n}{m} \quad (\text{Gl. 5.12})$$

Die Elliptizität Θ entspricht damit dem Bogen, den der Tangens des Verhältnisses $\frac{n}{m}$ beschreibt. Setzt man für n und m die Größe des entsprechenden resultierenden Lichtvektors $\vec{E}$ ein, so gilt:

$$\Theta = \arctan \frac{E_L - E_R}{E_L + E_R} \quad (\text{Gl. 5.13})$$

Die so definierte Elliptizität Θ der Spitze des Lichtvektors E kann zur Charakterisierung des Zirkulardichroismus herangezogen wer-

den. Gemessen wird die Elliptizität in Grad. Bezieht man sie auf Lösungen von $1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ so ergibt sich die **spezifische Elliptizität**. Die **molare Elliptizität** $[\Theta]$ (in eckigen Klammern) bezieht das Arzneibuch bei einer Küvettenlänge von $l = 1 \text{ cm}$ auf die Konzentration decimol pro cm^3 ($1/10 \text{ mol pro ml}$) (M_r = molare Masse):

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot M_r}{c \cdot l \cdot 10} [\text{Grad} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}] \quad (\text{Gl. 5.14})$$

Spezifische und molare Elliptizität

Die molare Elliptizität steht mit dem molaren Zirkulardichroismus in direkter Beziehung: Unter Einbezug des die Lichtabsorption der beiden Strahlen (E_L und E_R) beschreibenden Lambert-Beer'schen Gesetzes (Kap. 10.4), der Phasendifferenz der beiden Lichtwellen sowie einiger Vereinfachungen (z. B. Ersatz von $\ln$ durch $\lg$) kommt man von Gl. 5.14 zunächst zu folgender Beziehung:

Beziehung zwischen der molaren Elliptizität und dem molaren Zirkulardichroismus

$$[\Theta] = \frac{2,303}{4} \cdot \frac{180}{\pi} (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot l \quad (\text{Gl. 5.15})$$

c = Konzentration in $[\text{decimol} \cdot \text{ml}^{-1}]$; $l = 1 \text{ cm}$. Durch Umrechnung auf die für $\Delta\varepsilon$ definierte Konzentration $[\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}]$ (Faktor 100) erhält man:

$$[\Theta] = 2,303 \frac{4500}{\pi} \cdot \Delta\varepsilon \approx 3300 \cdot \Delta\varepsilon. \quad (\text{Gl. 5.16})$$

Diese Gleichung wird im Arzneibuch (Ziffer 2.2.41) zur Beschreibung des Zirkulardichroismus herangezogen.

5.2.4 Geräte zur Messung des Zirkulardichroismus

Geräte zur Messung des Zirkulardichroismus werden als **Dichrographen** bezeichnet, Geräte, welche direkt die Elliptizität anzeigen, als **Ellipsometer**. Das Arzneibuch beschreibt einen Dichrographen (Lit. 9).

Aufbau eines Dichrographen

Funktion des Dichrographen

In einem Monochromator erzeugtes **monochromatisches Licht** wird zunächst **linear polarisiert** (Abb. 5.8). Anschließend erfolgt abwech-

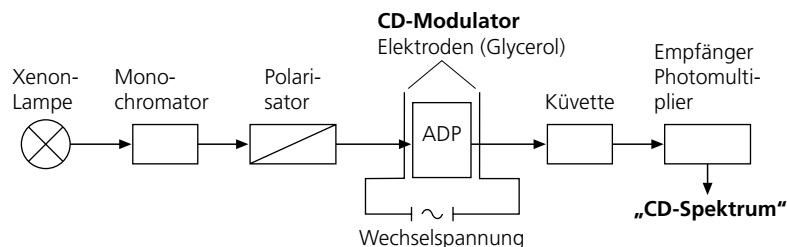


Abb. 5.8 Aufbau eines Dichrographen (ADP Ammoniumdihydrogenphosphat)

selnd Umwandlung dieses Lichtstrahls in rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht in einem **CD-Modulator** (Circulardichroismus-Modulator). Die wellenlängenabhängige Absorption beider Lichtarten durch die in der Küvette befindliche Substanz wird gemessen und ihre Differenz im CD-Spektrum (z. B. Abb. 5.6) als Funktion der Wellenlänge registriert.

Aufbau des CD-Modulators

CD-Modulator

Elektrooptischer Effekt

Zur Überführung von linear polarisiertem Licht in abwechselnd rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht wird der **elektrooptische Effekt** (Kerr-Effekt) herangezogen. Legt man an einen Kristall aus Ammoniumdihydrogenphosphat (ADP) mithilfe einer lichtdurchlässigen Elektroden-Flüssigkeit (z. B. Glycerol) eine Spannung (Abb. 5.8), so wird der Kristall in Abhängigkeit von der Größe der Spannung doppelbrechend. Es bildet sich bei Einstrahlung von Licht ein ordentlicher und ein außerordentlicher Strahl (Kap. 5.1). Legt man eine Wechselspannung an, so erfolgt eine von der Spannungsänderung abhängige Modifikation des Kristallaufbaus. Diese bewirkt einen spezifischen Gangunterschied zwischen dem ordentlichen und dem außerordentlichen Strahl ($\lambda/4$), der beim Wechsel der Spannungsrichtung zu abwechselnd links- und rechtszirkular polarisiertem Licht führt (**Pockels-Zelle**). Der Gangunterschied kann auch durch den **piezoelektrischen Effekt** eines Quarzkristalls herbeigeführt werden, der zur Erzeugung des elektrischen Wechselfeldes einem periodischen mechanischen Stress (Druck) unterworfen wird (**piezoelastische Modifikation**).

Piezoelektrischer Effekt

5.2.5 Anwendung des Zirkulardichroismus zur Untersuchung der Stereochemie von Arzneistoffen

Niedermolekulare Verbindungen

Oktanten- und Quadrantenregeln

Bei niedermolekularen Verbindungen z. B. bei Terpenen, Steroiden u. a. werden zur Interpretation des CD hinsichtlich der Stereochemie empirische und semiempirische Ansätze herangezogen wie die **Oktantenregel** und die **Quadrantenregeln**, s. dazu Lit. 1, 4, 6. Man unterscheidet Verbindungen mit einem chiralen Chromophor (**inhärent chirale Chromophore**, $\Delta\epsilon > 10$) oder mit einem nicht chiralen Chromophor, welcher aber durch eine dissymmetrische Umgebung gestört ist ($\Delta\epsilon < 10$). Letztere Chromophore werden weiter in chirale Sphären oder Klassen unterteilt, die einen unterschiedlichen chiroptischen Einfluss ausüben. Eine Aufstellung verschiedener Chromophore und der dazu gehörenden CD-Regeln gibt Lit. 6.

Biopolymere

Neben der Anwendung bei niedermolekularen Verbindungen ist auch die Bestimmung der Sekundärstruktur bzw. Konformation von Biopolymeren wie Polypeptiden, Proteinen und Nucleinsäuren mit Hilfe des CD pharmazeutisch interessant (Lit. 10). Beispielsweise lassen sich bei Proteinen Sekundärstrukturen wie z. B. Anteile der α -Helix, der β -Struktur (Faltblattstruktur) und anderer Strukturen näherungsweise bestimmen (Abb. 5.9). Im Spektrum der α -Helix von Peptiden (Abb. 5.9) liegt bei ca. 222 nm die Bande des $n \rightarrow \pi^*$ -Überganges des Peptides (Kap. 10.1.2), während die negative Bande bei 208 nm und die positive bei 192 nm dem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang entsprechen. Auch eine quantitative Bestimmung von α -Helix-Strukturen in Peptiden und Proteinen ist möglich.

Anwendung des Zirkulardichroismus bei Biopolymeren

5.2.6 Qualitätskontrolle von Arzneistoffen

Zur Qualitätskontrolle von Arzneistoffen wird der Zirkulardichroismus insbesondere bei Antibiotika, Alkaloiden, Enzymen, Steroiden, Vitaminen u. a. herangezogen (zu älteren Anwendungen siehe z. B. Lit. 10). Der CD kann z. B. mit der IR-Spektroskopie (Lit. 12, VCD-Spektroskopie, „Vibrations-CD-Spektroskopie“) und der HPLC (Lit. 11) gekoppelt werden.

5.2.7 Anwendungen im Arzneibuch

Das Arzneibuch (Ziffer 2.2.41) beschreibt zwar den Zirkulardichroismus als allgemeine Analysenmethode, gibt aber zur Zeit (2007) nur Anwendungen bei den Reagenzien (1*S*)-(+)-Campfersulfonsäure und Isoandrosteron an. Zu erwarten ist der Einsatz zur Charakterisierung von Biopolymeren (Kap. 5.2.5). Dort wird nicht die Konzentration des Polymers selbst, sondern die Konzentration eines Monomerenrestes herangezogen. Dieser entspricht der durchschnittlichen molaren Masse eines Monomeren, wenn man die Molekülmasse des Polymeren durch die Anzahl der Monomeren dividiert. Für Proteine nennt das Arzneibuch einen Durchschnittswert von 100–120 (meist 115, entsprechend einer Aminosäure), für Nukleinsäuren als Natriumsalze von etwa 330.

Monomerenrest nach Arzneibuch

5.3 Optische Rotationsdispersion, Cotton-Effekt

Wie bereits erwähnt (Kap. 5.1.2), hängen der Betrag und eventuell sogar die Richtung der optischen Drehung von der Wellenlänge des linear polarisierten Lichtes ab. Diese Erscheinung bezeichnet man

Abhängigkeit der optischen Drehung von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes

als **Optische Rotationsdispersion (ORD)**. Trägt man in einem Diagramm die Drehung $[\alpha]$ in Abhängigkeit von der Wellenlänge auf, so erhält man ORD-Kurven (Abb. 5.10).

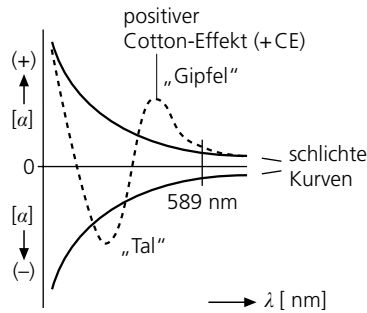


Abb. 5.10 Optische Rotationsdispersion (ORD-Kurven)

5.3.1 Normale optische Rotationsdispersion

Schlichte ORD-Kurven

Bei vielen Substanzen nimmt der Betrag der Drehung mit abnehmender Wellenlänge stetig zu. Die erhaltenen Kurven bezeichnet man als **schlichte Kurven**. Bei Enantiomeren sind sie symmetrisch zur Null-Linie angeordnet. Durch Messung bei kürzeren Wellenlängen kann die Messgenauigkeit der optischen Drehung erhöht werden, andererseits kann bei Messung an der Natrium-D-Linie bei sehr kleinen Messwerten Inaktivität vorgetäuscht werden (Abb. 5.10). Das Arzneibuch lässt z. B. zur Verbesserung der Messgenauigkeit die optische Drehung von Iopamidol bei 436 nm bestimmen.

5.3.2 Anomale Rotationsdispersion, Cotton-Effekt

ORD-Kurven mit Gipfel und Tal.
Positiver und negativer Cotton-Effekt

Zeigt eine Substanz Zirkulardichroismus (Kap. 5.2), so ist im Wellenlängenbereich der Absorptionsbande, d. h. des angeregten Chromophors, der schlichten Kurve der ORD (Abb. 5.10) eine S-förmige Kurve überlagert. Als Summe beider Kurven misst man eine ORD-Kurve mit Gipfel und Tal (Abb. 5.10). Man bezeichnet diese Erscheinung als **Cotton-Effekt (CE)** (nach A. A. Cotton, 1896). Die Gestalt der Kurve ist von der Stereochemie am Chromophor abhängig. Einen CE, bei dem das Maximum längerwellig ist, bezeichnet man als positiv und umgekehrt. Der Nulldurchgang liegt bei der Wellenlänge des Maximums des Zirkulardichroismus (Kap. 5.2), d. h. am Absorptionsmaximum der Substanz (Kap. 10.2). Der Cotton-Effekt wird zur Ableitung des sterischen Baus von Substanzen herangezogen. In der Analytik des Arzneibuches wird der Cotton-Effekt bisher nicht eingesetzt (Lit. 6).

Literatur über Polarimetrie

- 1) F. Bracher, P. Heisig, P. Langguth, M. Mutschler, G. Rücker, G. Scriba, E. Stahl-Biskup, R. Troschütz, G. Seitz (Hrsg.): Arzneibuch-Kommentar mit 26. Erg. Lfg. Wiss. Verlagsges., Stuttgart, Govi-Verlag, Eschborn (2007)
- 2) H. Althoff in H. Feltkamp, P. Fuchs und H. Sucker: Pharmazeutische Qualitätskontrolle. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart, New York (1983)
- 3) D.A. Skoog, J.J. Leary: Instrumentelle Analytik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1996)
- 4) G. Snatzke in B. Schröder, J. Rudolph: Physikalische Methoden in der Chemie. Verlag Chemie, Weinheim (1985)
- 5) H.J. Roth, Christa E. Müller, G. Folkers: Stereochemie und Arzneistoffe. Wiss. Verlagsges., Stuttgart (1998)
- 6) L.A. Nafie. Applied Spectroscopy **50**, 14A (1996)
- 7) H. Günzler, M. Heise, IR-Spektroskopie, VCH Weinheim, 1996

Literatur über Zirkulardichroismus

- 1) G. Snatzke. Angew. Chem. **80**, 15 (1968); **91**, 380 (1979); Methodicum Chemicum Bd. 1, S. 426 (1973)
- 2) K. Mislow: Einführung in die Stereochemie. Verlag Chemie, Weinheim (1967)
- 3) H. Rau in H. Naumer, W. Heller (Hrsg.): Untersuchungsmethoden in der Chemie. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1986)
- 4) M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (2005)
- 5) E.L. Eliel, S.H. Wilen: Organische Stereochemie. Wiley-VCH, Weinheim (1998)
- 6) G. Snatzke, F. Snatzke in Analytiker Taschenbuch. Bd. 1, S. 217, Springer Verlag, Berlin (1980)
- 7) V. Buß, Pharmaz. Ztg. **140**, 287 (1995)
- 8) H.J. Roth, Christa E. Müller, G. Folkers: Stereochemie und Arzneistoffe. Wiss. Verlagsges., Stuttgart (1998)
- 9) F. Bracher, P. Heisig, P. Langguth, M. Mutschler, G. Rücker, G. Scriba, E. Stahl-Biskup, R. Troschütz, G. Seitz (Hrsg.): Arzneibuch-Kommentar mit 26. Erg. Lfg. Wiss. Verlagsges., Stuttgart, Govi-Verlag, Eschborn (2007)
- 10) H. Althoff in H. Feltkamp, P. Fuchs, H. Sucker, Pharmazeutische Qualitätskontrolle, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1983)
- 11) J. Junghänel, T. Jira, Pharm. uns. Zeit **26**, 278–280 (1997)
- 12) H.H. Drese, Nachrichten aus der Chemie **51** (2003)

Literatur über Optische Rotationsdispersion

- 1) K. Mislow: Einführung in die Stereochemie. Verlag Chemie, Weinheim (1967)
- 2) M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Thieme-Verlag, Stuttgart (1995)
- 3) G. Snatzke, F. Snatzke in Analytiker Taschenbuch. Bd. 1, S. 217, Springer-Verlag, Berlin (1980)
- 4) V. Buß, Pharmaz. Ztg. **140**, 287 (2005)
- 5) H.J. Roth, Christa E. Müller, G. Folkers: Stereochemie und Arzneistoffe. Wiss. Verlagsges., Stuttgart (1998)
- 6) J. Junghänel, T. Jira, Pharm. uns. Zeit **26**, 278–280 (1997)