

Zertifikatskurs PTA im Krankenhaus (ADKA)

Analytik – 5. Instrumentelle Analytik

Dr. Božena Büttner, 06.11.2023



Deutscher
Apotheker Verlag

Gliederung Analytik

- 1) Rechtliche Rahmenbedingungen
- 2) Prüfung von Ausgangsstoffen
- 3) Inprozesskontrollen
- 4) Prüfung von Defekturarzneimitteln
- 5) Instrumentelle Analytik**
- 6) Qualitätsprüfung im Rahmen der Herstellung mit Herstellungserlaubnis nach §13 AMG

Methoden der pharmazeutischen Analytik

Nasschemische Verfahren

- Nachweis von Kationen, Anionen, nichtionischen Stoffen, funktionellen Gruppen
- Grenzprüfungen
- Säure-Base-, Redox-, komplexometrische und andere Titrationen

Physikalisch-chemische Verfahren/ Instrumentelle Analytik

- Optische und spektroskopische Verfahren
- Chromatographische Analysenverfahren
- Elektrochemische und weitere Analysenverfahren

Biochemische Verfahren

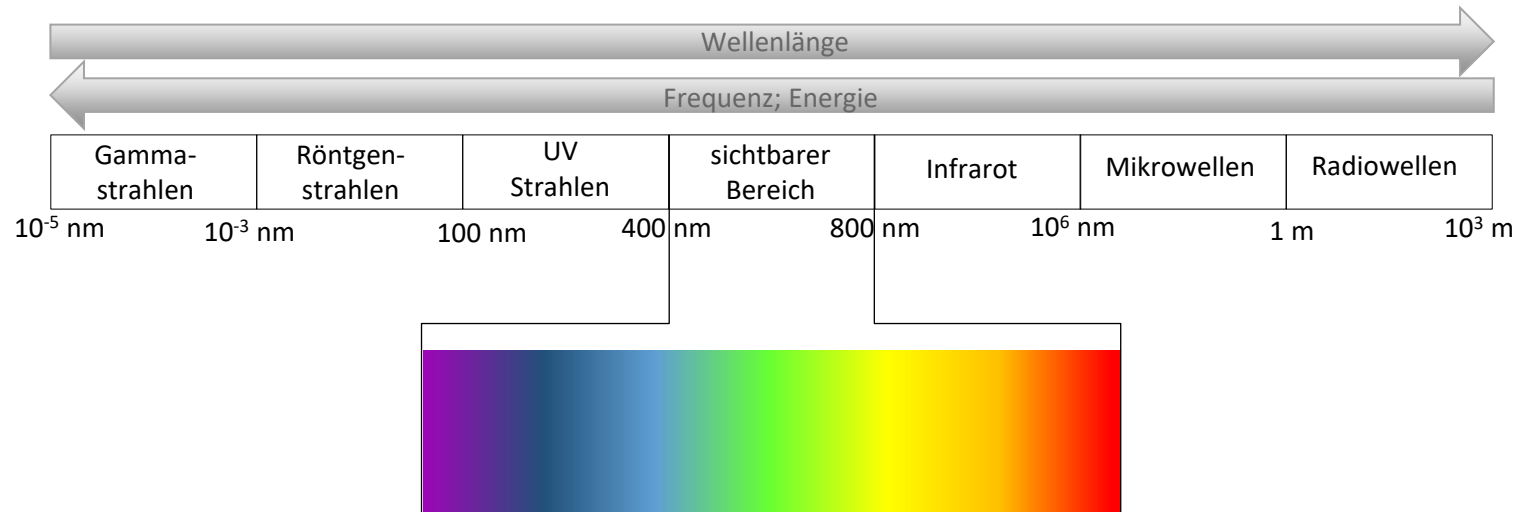
- Proteinanalytik mittels ELISA oder Radioimmunassay
- Biologische Wertbestimmung von Impfstoffen o. Blutgerinnungsfaktoren

Mikrobiologische Verfahren

- Prüfung auf Bakterienendotoxine
- Keimzahlbestimmung
- Prüfung auf Sterilität

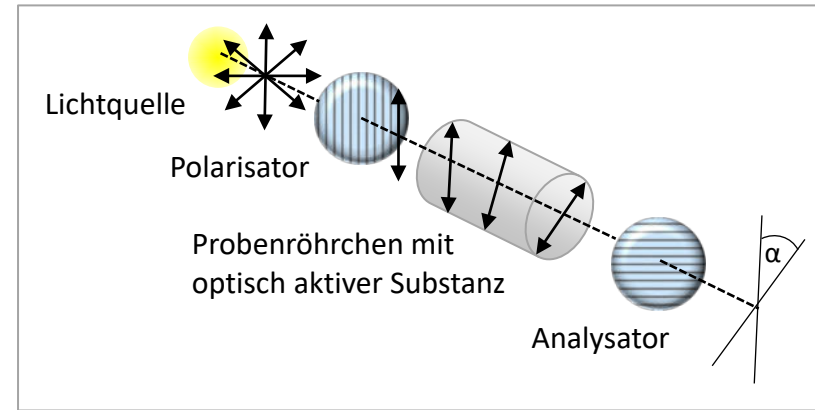
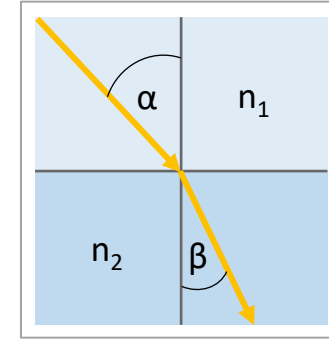
Optische und spektroskopische Verfahren - Grundlagen

- Anregung der Probe mit elektromagnetischer Strahlung
- Messung der daraus resultierende Wirkung



Optische Verfahren

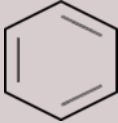
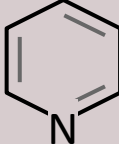
- Refraktometrie – Bestimmung des Brechungsindex (Ph.Eur. 2.2.6)
 - Wellenlänge λ des Lichts im Vakuum/ λ des Lichts im Material
 - Identitätsprüfung von ätherischen und fetten Ölen, physikalisch-chemische Eigenschaften von Flüssigkeiten
 - $$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1}$$
- Polarimetrie – Bestimmung der optischen Drehung (Ph.Eur. 2.2.7)
 - Drehung linear polarisierten Lichtes
 - Gehaltsbestimmung von Glucoselösungen, Reinheitsprüfung verschiedener Wirk- und Hilfsstoffe



UV/VIS-Spektroskopie – Grundlagen

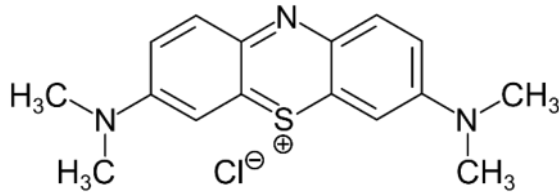
- Ultravioletter Spektralbereich (UV) = 200 – 400 nm
- Sichtbarer Spektralbereich (VIS) = 400 – 800 nm
- Strahlung wird absorbiert, Elektronen gehen vom Grundzustand in Angeregten Zustand
- Elektronen in Doppelbindungen und freie Elektronenpaare an O-, N-, S-Atomen werden leicht angeregt

Absorbierende Substanzen

Ungesättigte Kohlenwasserstoffe	$R_2C = CR_2$	$RC \equiv CR$
Mehrfachbindungen mit Heteroatomen	$R_2C = \bar{O}$	$R_2C = \bar{N}R$ $R\bar{N} = \bar{N}R$
Aromaten		

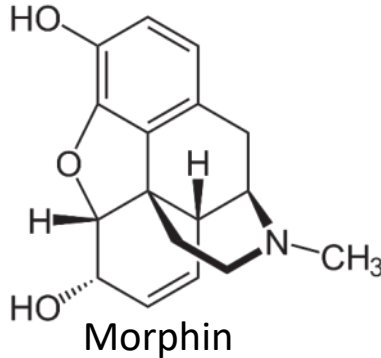
UV/VIS-Spektroskopie – Grundlagen

- Ph.Eur. 2.2.25
- Absorption im UV-Bereich: farblos; Absorption im VIS-Bereich: farbig
- Zu Anregung benötigte Energie sinkt mit steigender Anzahl konjugierter Doppelbindungen, Absorption im sichtbaren Bereich



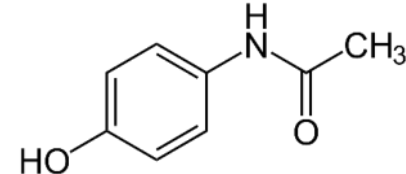
Methylenblau

$\lambda_{\max} = 660 - 665 \text{ nm}$
(Ethanol 50%)



Morphin

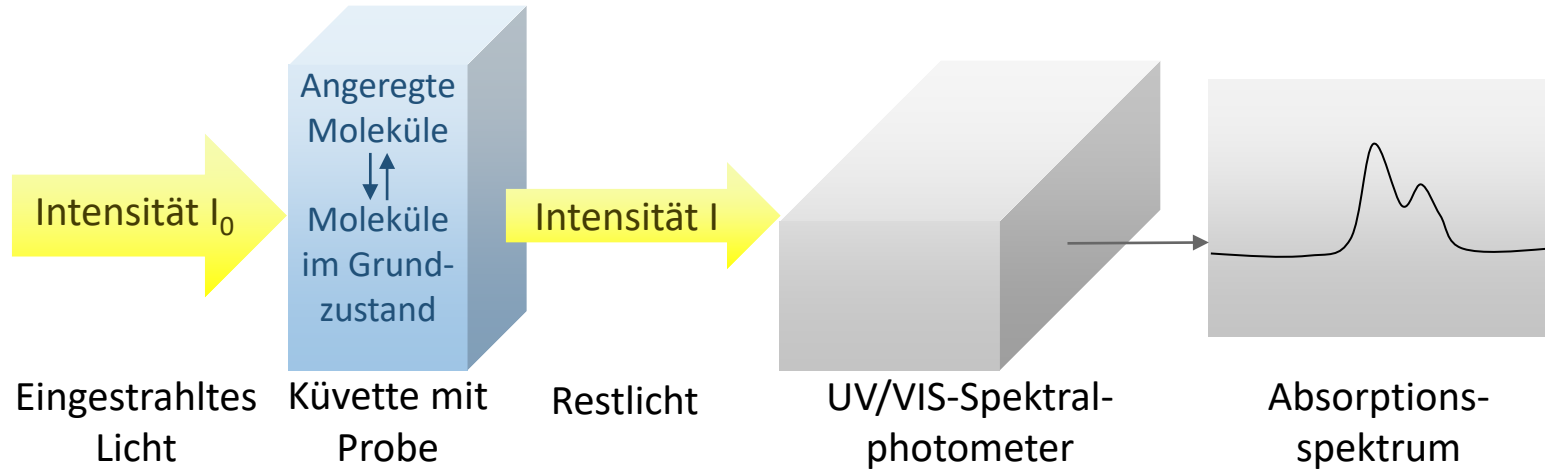
$\lambda_{\max} = 285 \text{ nm (H}_2\text{O)}$



Paracetamol

$\lambda_{\max} = 241 \text{ nm (HCl 0,1 M)}$

UV/VIS-Spektroskopie – Messaufbau



- Einstrahlphotometer: Lichtstrahl passiert Probe und wird anschließend detektiert
- Zweistrahphotometer: geteilter Lichtstrahl passiert gleichzeitig Probe und Matrix und wird anschließend detektiert

UV/VIS-Spektroskopie – Absorptionsspektrum

- Lambert-Beersches Gesetz

- $A_\lambda = \varepsilon_\lambda * c * d$

A = Absorption bei definierter Wellenlänge λ

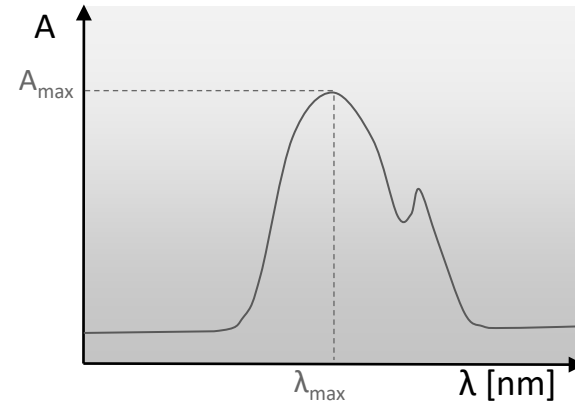
ε = molarer Absorptionskoeffizient [$\text{l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$]

c = molare Konzentration [$\text{mol} * \text{l}^{-1}$]

d = Schichtdicke

- Absorptionsspektrum

- Probe wird mit einem definierten Wellenlängenbereich bestrahlt
 - Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge = Absorptionsspektrum
 - λ_{max} : abhängig von Substanz, Lösungsmittel, Salzbildung
 - A_{max} : abhängig von Stoffkonzentration, Lösungsmittel
 - $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = Absorption einer 1%igen Lösung (m/V) bei einer Schichtdicke von 1 cm und gegebener Wellenlänge, unter Angabe des Lösungsmittels



UV/VIS-Spektroskopie – Anwendung in der Krankenhausapothek

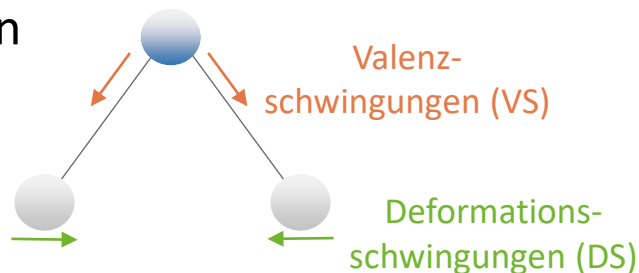
- Identitäts- und Reinheitsprüfungen gemäß Ph.Eur.:
 1. Absorption der Prüflösung muss bei einer definierten Wellenlänge innerhalb des spezifizierten Bereiches liegen
 2. Vergleich zweier Absorptionen bei unterschiedlichen Wellenlängen, Bildung der Differenz bzw. des Quotienten
- Gehaltsbestimmung von Defekturarzneimitteln:
 1. Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes bei bekanntem Absorptionskoeffizienten
 2. Einsatz einer Vergleichslösung bekannten Gehalts
 3. Anwendung einer Kalibriergeraden
 - Voraussetzung: Validierung der Methode

IR-Spektroskopie – Grundlagen

Teilbereiche der infraroten (IR) Strahlung

nahes IR (NIR)	$\bar{\nu} = 12500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$	$\lambda = 0,8 - 2,5 \text{ }\mu\text{m}$
mittleres IR	$\bar{\nu} = 4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ $\bar{\nu} = 4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$	$\lambda = 2,5 - 50 \text{ }\mu\text{m}$
fern IR	$\bar{\nu} = 200 - 20 \text{ cm}^{-1}$	$\lambda = 50 - 500 \text{ }\mu\text{m}$

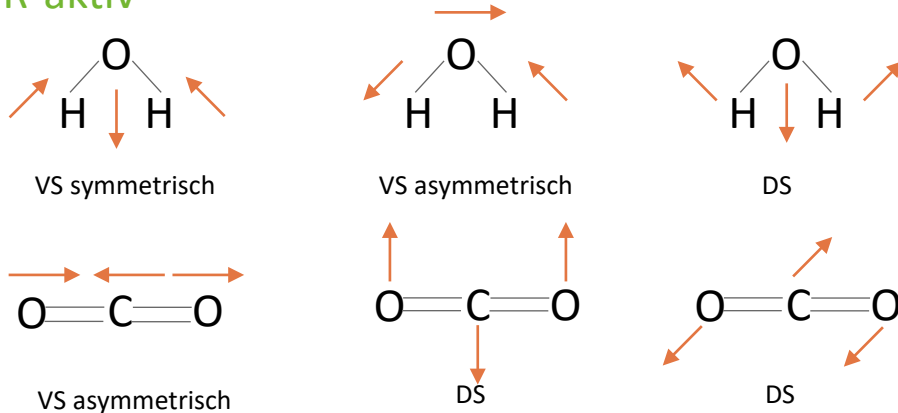
- Moleküle werden durch Absorption von IR-Strahlung zu mechanischen Schwingungen zwischen den Atomen angeregt
- Ph.Eur. 2.2.24



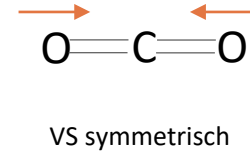
IR-Spektroskopie – Grundlagen

- Angeregt werden nur Schwingungen mit periodischer Änderung des Dipolmoments (Ladungsverteilung, Ladungsschwerpunkt)

IR-aktiv



IR-inaktiv



- Nicht erfasst werden anorganische Salze

IR-Spektroskopie – Messgeräte

Spektrometerarten

Dispersive IR-Spektrometer:

- Lichtquelle > Probenküvette > Monochromator > Detektor > Auswertungsgerät
- Wellenlängen werden nacheinander vermessen

Fourier-Transform(FT)-IR-Spektrometer:

- Kein Monochromator notwendig, Messung bei vielen Wellenlängen, Umwandlung des gemessenen Frequenzsignals in ein Zeitsignal (Interferogramm)
- Anschließende Umwandlung mittels Fourier-Analyse (komplexe Berechnungen) in ein IR-Spektrum

Aufnahmetechniken

Transmission o. Absorption

- Feste Substanzen werden als Paraffin-Paste oder KBr-Pressling gemessen
- Flüssigkeiten und Gase werden in Küvetten gemessen
- Energie durchstrahlt Probe und wird anschließend vermessen

Diffuse Reflexion

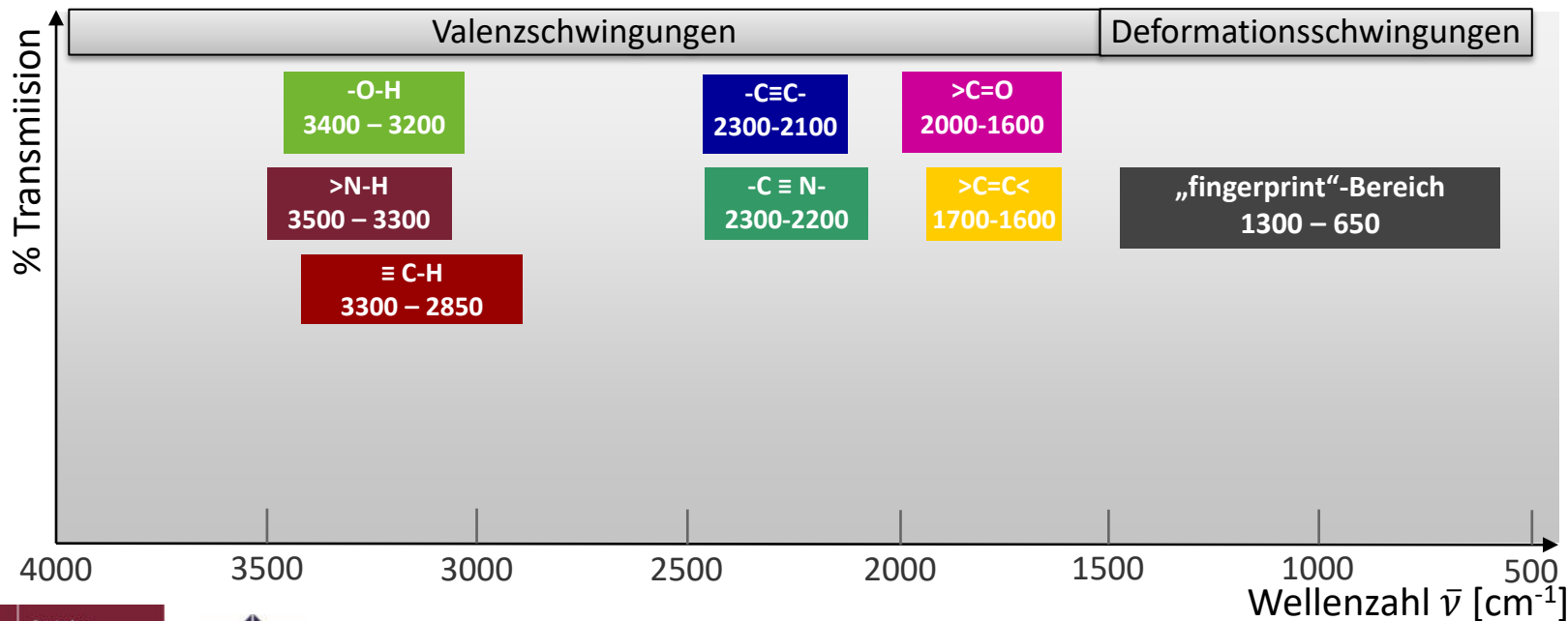
- s. NIR-Spektroskopie

Abgeschwächte Totalreflexion (ATR)

- Keine Probenaufbereitung notwendig
- IR-Licht wird durch Probe mehrfach total reflektiert, bei jeder Reflexion wird geringe Menge an Absorption gemessen

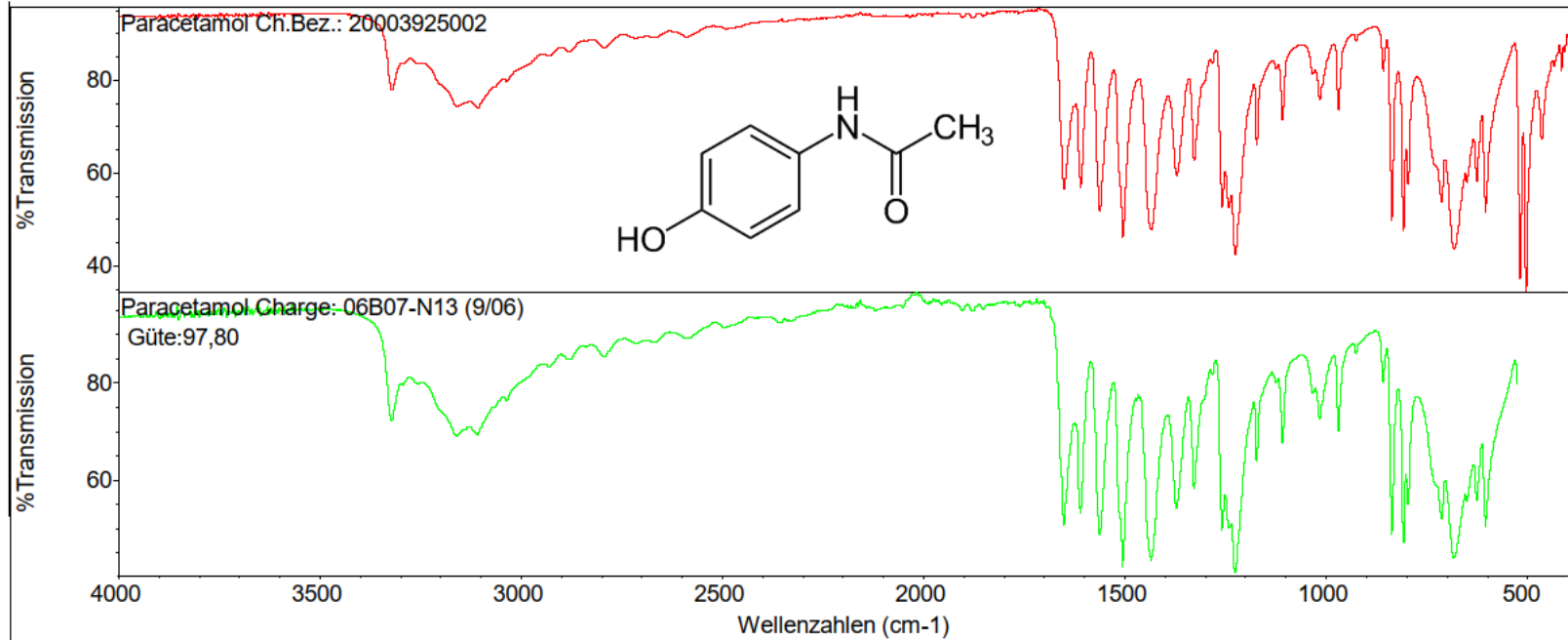
IR-Spektroskopie – Transmissionsspektren

- IR-Spektrum: Transmission (T) in Abhängigkeit von der Wellenzahl $\bar{\nu}$ [cm^{-1}]
- die Lage von IR-Banden im Spektrum ist charakteristisch für ein molekulares System



IR-Spektroskopie – Beispiel

- IR-Spektrum: Transmission (T) in Abhängigkeit von der Wellenzahl $\bar{\nu}$ [cm⁻¹]



IR-Spektroskopie – Anwendung in der Krankenhausapothek

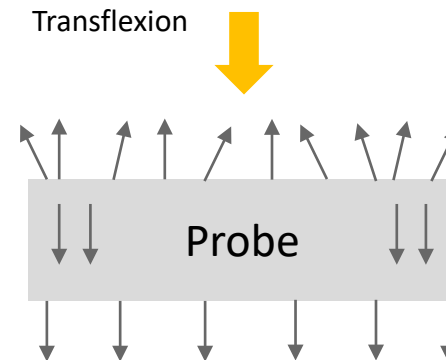
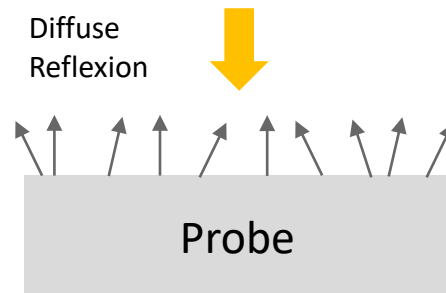
- Identitätsprüfung
 - Routinemethode zur Identitätsprüfung gemäß Ph.Eur. und anderer Arzneibücher
 - Vergleich des Messspektrums mit einer Referenzsubstanz mit bekannter Identität
 - Bei Abweichungen polymorpher Substanzen werden gelöst und wieder zur Trockne eingedampft und erneut vermessen
- Reinheits- und Gehaltsbestimmung
 - Aufgrund geringer Sensitivität und verfügbarer Alternativmethoden kaum praktisch relevant

NIR-Spektroskopie – Grundlagen

- Höhere Energie, Messung von Oberschwingungen > geringe Intensitäten > Messung unverdünnter Proben, keine Probenaufbereitung notwendig
 - Allgemeines Kapitel Ph.Eur. 2.2.40, keine Verankerung innerhalb von Monographien
 - Vergleich von Spektren ist häufig schwierig > Auswertung von Spektren nur mittels geeigneter validierter Datenverarbeitung (Chemometrie)
 - Einflüsse auf ein Spektrum:
 - Kristallformen eines Arzneistoffes
 - Kristallwasser, absorbiertes Wasser, Restlösungsmittel, Herstellungsverfahren
 - Temperatur und Luftfeuchte
- Einbeziehung chargenbezogener Unterschiede in Referenzdatenbank!

NIR-Spektroskopie – Aufnahmetechniken

- Transmission (s. IR)
- Diffuse Reflexion
 - Pulver streuen das Licht zurück
- Transflexion
 - klare Flüssigkeiten reflektieren nicht
 - Einsatz eines Stempels mit rauer Oberfläche, dieser wirft transmittiertes Licht zurück

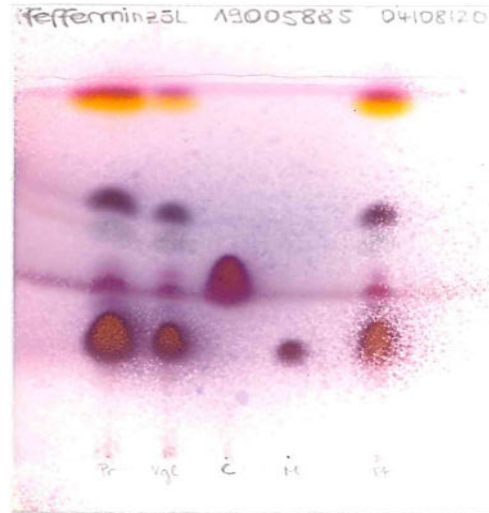


NIR-Spektroskopie – Anwendung in der Krankenhausapotheke

- Identitätsprüfung
 - Breit einsetzbare Alternative Identifizierungsmethode
 - ABER: für jede einzelne Substanz im Vorfeld Prüfung des validierten Modells notwendig (z.B. Anzahl Kalibrierproben, eingesetzter Chargen, Hersteller); Vorgaben Bundeslandspezifisch
 - Da diese kontinuierlich angepasst werden, stets Aktualisierung erforderlich
- Gehaltsbestimmung:
 - Nachweis in komplexer Matrix möglich
 - Problematisch: häufig geringe Sensitivität/ hohe Nachweisgrenze

Chromatographische Methoden

- Stationäre Phase und mobile Phase
- Wechselwirkungen von Stoffen mit den Phasen führen zur Auftrennung von Substanzgemischen, unterschiedliches Verhalten der Komponenten aufgrund:
 - Polarität
 - Lipophilie und Löslichkeit
 - Molekülgröße
 - Ladungen (Ionisierung) u.a.
- Trennmechanismen
 - Adsorption
 - Verteilung u.a.



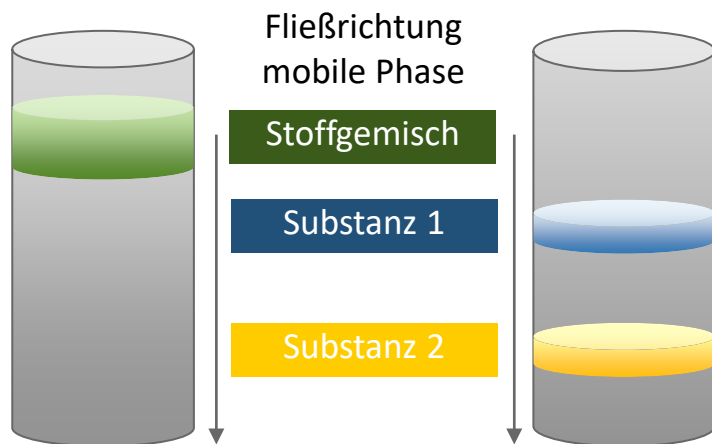
Chromatographische Methoden

Mobile Phase	Stationäre Phase	Trennverfahren
Flüssigkeit	Feststoff	Dünnschichtchromatographie (DC; Ph.Eur. 2.2.27) Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC; Ph.Eur. 2.2.29)
Flüssigkeit	Flüssigkeit	Flüssigkeits-Flüssigkeits-Chromatographie (LLC), Papierchromatographie (PC)
Gas	Feststoff	Gasadsorptionschromatographie (GSC)
Gas	Flüssigkeit	Gasverteilungschromatographie (GLC)

- GSC + GLC = Gaschromatographie (GC; Ph.Eur. 2.2.28)

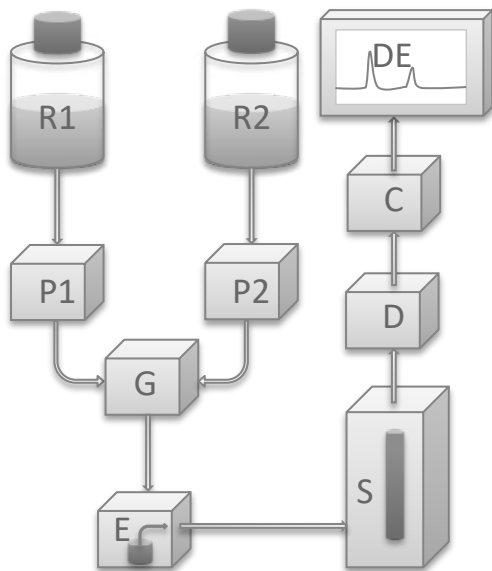
HPLC – Grundlagen

- High Performance Liquid Chromatography
- Mobile Phase wird unter hohem Druck (ca. 40 – 400 bar) durch eine mit stationärer Phase gefüllte Säule gepumpt



- Stationäre Phasen:
 - Alkylierte Kieselgele (reversed phase RP), C4-C18
 - RP modifiziert mit funktionellen Gruppen (Diol, Amin, Nitril)
 - Chirale Phasen (Cyclodextrine, modifizierte Cellulosen) zur Enantiomerentrennung
 - Teilchengröße 3-10µm
- Mobile Phasen (Fließmittel):
 - RP-Chromatographie: Wasser + mischbares organisches Lösungsmittel, z.B. Acetonitril, Methanol, Tetrahydrofuran
 - Zusatz von Puffern o. Ionenpaarbildnern möglich
 - Partikelfrei: Filtration durch 0,45µm-Filter
 - Luftblasenfrei: Ultraschallbad, „Degasser“

HPLC – Messaufbau



R: Reservoir für Fließmittel

P: Pumpe

G: Gradientenmischer

- Isokratische Elution
- Gradientenelution

E: Einlasssystem für Probe

S: Säule im Säulenofen

D: Detektor

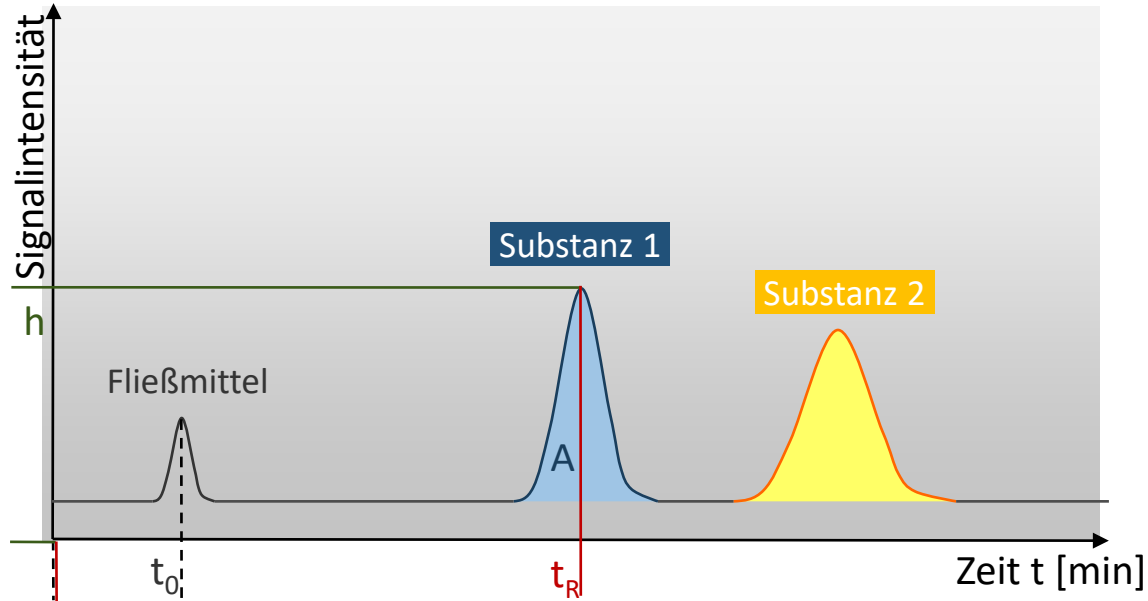
- UV/VIS-Detektor; PDA-Detektor
- Fluorimetrischer Detektor
- Refraktometrischer Detektor
- Elektrochemischer Detektor

C: Systemcontroller

DE: Datenerfassungssystem

- PC mit Auswertungssoftware

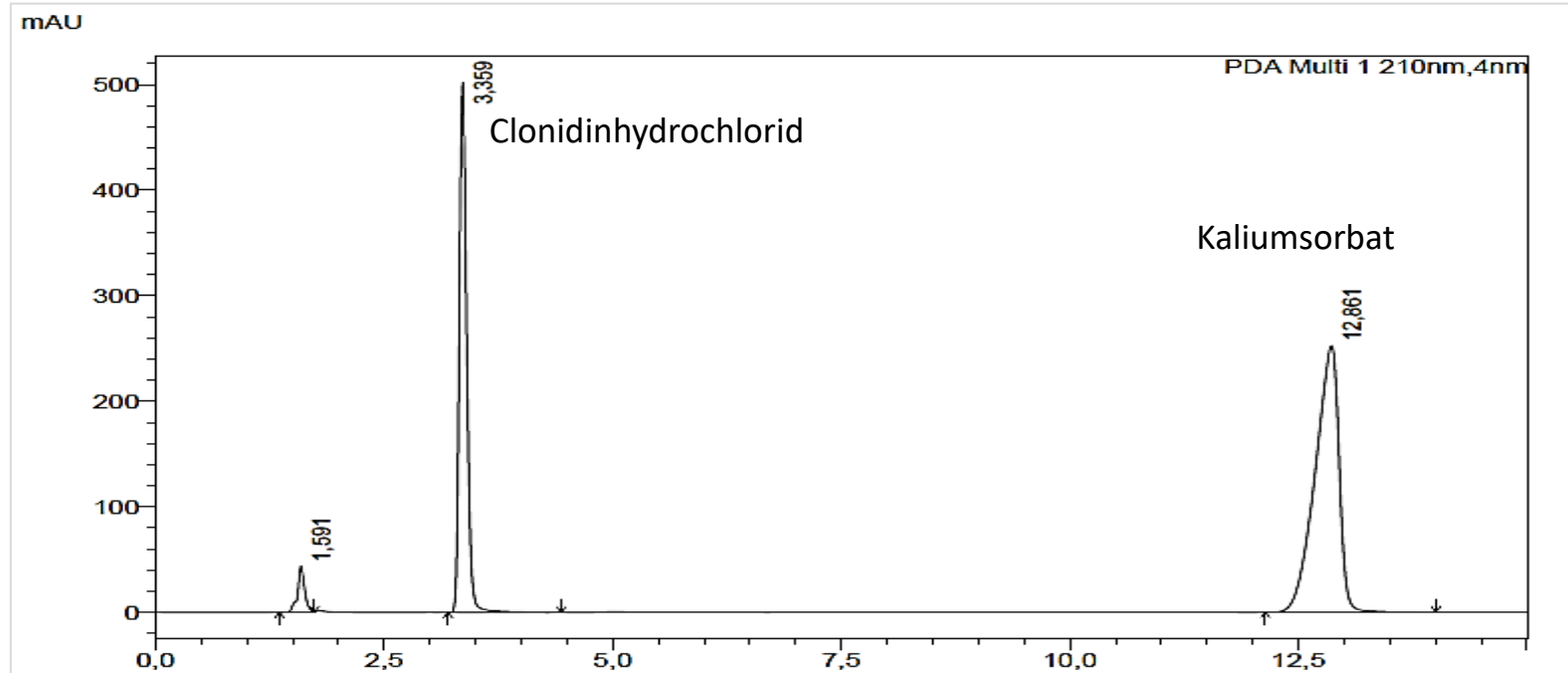
HPLC – Chromatogramm



- t_0 : Totzeit (Fließmittelpeak)
- t_R : Retentionszeit Substanz 1
- h : Peakhöhe Substanz 1
- A : Peakfläche Substanz 1

HPLC – Chromatogramm

Beispielchromatogramm Clonidin-HCl-Stammlösung 200 µg/ml



HPLC – Anwendung in der Krankenhausapothek

- Identitätsprüfung
 - Retentionszeit erlaubt Rückschluss auf Identität der Substanz im Vergleich mit Referenz
 - Meist in Kombination mit anderen Methoden bzw. als eine von mehreren Alternativprüfungen
- Reinheitsprüfung
 - Prüfung von Ausgangsstoffen; im Ph.Eur. meist als Abschnitt „Verwandte Substanzen“
- Gehaltsbestimmung
 - Gehaltsbestimmung von Ausgangsstoffen in einigen Ph.Eur. Monographien
 - Gehaltsbestimmung von Defekturarzneimitteln mit vorheriger Methodenvvalidierung
 - Vorteil: Nachweis von Stoffgemischen, vergleichsweise hohe Sensitivität und Genauigkeit
 - Nachteil: hoher apparativer und zeitlicher Aufwand

Elektrochemische und weitere Analysenverfahren

- Potentiometrie (Ph.Eur. 2.2.20)
 - z.B. als Bestandteil von pH-Elektroden, quantitative Analytik mittels potentiometrischer Titration
- Osmolalität (Ph.Eur. 2.2.35)
 - Bestimmung des osmotischen Drucks
- Viskosität (Ph.Eur. 2.2.10)
 - Viskosität von Flüssigkeiten
- Leitfähigkeit (Ph.Eur. 2.2.38)
- Schmelztemperatur (Ph.Eur. 2.2.14)
- Massenspektrometrie (Ph.Eur. 2.2.58)
 - Ermittlung der molaren Masse eines Moleküls bzw. seiner Schlüsselbruchstücke
 - In Kombination mit chromatographischer Trennung hochsensitive Analysenmethode



Literatur

- Ehlers, E. (2016). *Analytik II – Kurzlehrbuch Quantitative und Instrumentelle Analytik* (12. Auflage) DAV
- Imming, P. (2013). *Arzneibuchanalytik – Grundlagen für Studium und Praxis* (2. Auflage) WVG
- Europäisches Arzneibuch in aktuell geltender Fassung
- Deutscher Arzneimittel-Codex/ Neues Rezeptur Formularium (DAC/NRF)

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!



Kontakt:

Dr. Božena Büttner

Telefon: 0351 458-12957

E-Mail: bozena.buettner@ukdd.de