

3 Einführung in die optischen und spektroskopischen Analysenmethoden

Optische und spektroskopische Analysenmethoden 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 Analysenmethoden** sind:

Was sind optische Analysenmethoden?

- 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 Analysenmethoden** 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 Analysenmethoden?

- 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 Polarisation (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

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.

Was sind Lichtquanten?

Planck'sche Gleichung

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 ($\tilde{\nu}$)	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 $\tilde{\nu}$ 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 Bereich (jenseits von Rot liegend = IR-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.

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**.

UV-Bereich
IR-Bereich

Vakuum-UV

Röntgenstrahlung

Poly- und monochromatisches 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

Farbsehen
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 Analysemethoden

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)	Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)
Molekül-spektroskopie	Fluorimetrie Raman-Spektroskopie	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)**, die **Fluorimetrie** und die **Ramanspektroskopie** (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).

Integrationsbereich. Die Signalintensität wird meist über Peakintegration des digitalen Spektrums ermittelt. Nach dem Arzneibuch sollten gleiche Integrationsbereiche ausgedrückt als Vielfaches der Peakbreite in halber Höhe für die Signale der Probe und der Referenzsubstanz angewendet werden.

Dynamischer Bereich. Der dynamische Bereich eines Analog-Digital-Wandlers beeinflusst die bestimmbare, minimale Peakintensität, wenn 2 Signale gleicher Peakbreite integriert werden sollen. Der Wandler sollte die Identifizierung von Signalen einer relativen Intensität von 0,003 % bezogen auf ein starkes, den Wandler sättigendes Signal ermöglichen.

14.4.2 Durchführung von ¹H-NMR-Messungen nach dem Arzneibuch

Das Arzneibuch beschreibt nur die heute übliche FT-NMR Technik. Die Substanzen werden in einem geeigneten, üblicherweise deuterierten Lösungsmittel gelöst, das einen Standard zur Kalibrierung der chemischen Verschiebung enthält. Meist werden in einer Konzentration von 0,5 bis 1,0 % zugesetzt:

Innere Standards für organische Lösungsmittel und wässrige Lösungen

- Tetramethylsilan für Lösungen in organischen Lösungsmitteln
- Natriumtrimethylsilyltetradeteropropionat für Lösungen in D₂O

Das Deuteriumsignal des Lösungsmittels dient auch als Lock der Feldfrequenz, um das Driften des Spektrums während der Messung zu verhindern. Die Spektrometereinstellungen sind so zu optimieren, dass das Magnetfeld über die gesamte Probe maximale Homogenität aufweist und keine Verzerrung des Spektrums nach Fourier-Transformation und Phasenkorrektur beobachtet wird. Anschließend werden Einzelmessungen aufaddiert, bis das geeignete Signal-Rausch-Verhältnis erreicht wird.

14.4.3 Strukturaufklärung

Mithilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie kann die Anordnung der Wasserstoffatome in organischen Molekülen untersucht werden. Zur Aufklärung des Kohlenstoffgerüsts besitzt die ¹³C-NMR-Spektroskopie (Kap. 15) große Bedeutung.

Die Interpretation von Protonenresonanzspektren muss sich auf die folgenden Punkte erstrecken:

Auswertung von ¹H-NMR-Spektren

- Integrationskurve (Kap. 14.3.2)
- Chemische Verschiebung (Kap. 14.3.1)
- Signalaufspaltungen (Analyse von Spin-Systemen, Kap. 14.3.3).

Bei der Auswertung von $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ist zu berücksichtigen, dass die zur Messung verwendeten deuterierten Lösungsmittel (Kap. 14.2.7) geringe Mengen der nicht deuterierten Verbindungen enthalten, die ebenfalls Kernresonanzsignale ergeben:

CDCl_3 : 7,27 ppm (s); C_6D_6 : 7,25 ppm (s); $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$: 2,50 ppm (quint) und ca. 3,3 ppm (s) (H_2O -Signal: Dimethylsulfoxid ist hygroskopisch und enthält oft Wasser); CD_3OD : 3,30 ppm (s) und ca. 4,75 ppm (s); D_2O : ca. 4,7 ppm (s); D_6 -Aceton: 2,04 ppm (s).

$^1\text{H-NMR}$ -Signale von Lösungsmitteln

Auswertung der Integrationskurve

Ziel der Auswertung der Integrationskurve ist es, für jedes Signal oder jede Gruppe von Signalen die Zahl der Wasserstoffatome zu ermitteln:

- Wenn die Summenformel der Substanz bekannt ist, erfolgt die Auswertung nach Kap. 14.3.2.
- Wenn die Summenformel der Substanz nicht bekannt ist, muss die für ein Wasserstoffatom charakteristische Höhe des Integrals aus einzeln stehenden, gut ausgebildeten Signalen bereits bekannter Strukturelemente des Moleküls abgeschätzt werden. Solche Signale sind meist im tieferen Feld (bei höheren δ -Werten) zu finden. So muss z. B. das AB-System der aromatischen Protonen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Benzocains (Abb. 14.16) entweder 2 oder 4 Protonen nicht aber 3 oder 5 Protonen entsprechen.

Auswertung der chemischen Verschiebung

Aus den chemischen Verschiebungen (δ -Werten) der Signale oder Signalgruppen eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums lassen sich mithilfe von Zuordnungstabellen (Tab. 14.2, Lit. 1 bis 10) Informationen über die Art der Bindung der Wasserstoffatome erhalten (Kap. 14.3.1). Hierbei ist die Zahl der Protonen der Signale in die Überlegungen mit einzubeziehen, weil sich die chemischen Verschiebungen analog gebundener Methyl-, Methylen- und Methingruppen unterscheiden (Tab. 14.2).

Einige Wasserstoffatome sind wegen ihrer extrem kleinen bzw. großen chemischen Verschiebungen leicht zu identifizieren: Protonen an Cyclopropanringen, olefinische Protonen, aromatische Protonen und Aldehydprotonen (Tab. 14.2). Es muss beachtet werden, dass die chemische Verschiebung einiger Protonen (OH, NH, COOH) besonders stark von der Art des Lösungsmittels, der Temperatur und der Konzentration abhängt.

Signale von OH-, NH- und COOH-Protonen

Signal-Aufspaltungen

Signal-Aufspaltungen erster Ordnung mit vicinalen Kopplungskonstanten lassen Schlüsse auf die Zahl der Nachbarprotonen eines be-

Auswertung von Kopplungskonstanten

stimmt Wasserstoffatom zu (Kap. 14.3.3, Tab. 14.5). Wenn zwei Signalgruppen gleiche Kopplungskonstanten zeigen, so kann eventuell angenommen werden, dass die betreffenden Wasserstoffatome miteinander koppeln, d.h. dass sie im Falle von vicinalen Kopplungskonstanten an benachbarte Kohlenstoffatome gebunden sind. Fernkopplungen über mehr als zwei C-Atome hinweg sind an den meist kleinen Kopplungskonstanten von 0 bis ca. 3 Hz zu erkennen (Kap. 14.3.3, Tab. 14.4). Liegt der Diederwinkel von vicinalen Wasserstoffatomen bei etwa 90°, so ist nach der Karplus-Kurve (Kap. 14.3.3, Abb. 14.15) ebenfalls nur eine geringe bzw. keine Aufspaltung zu erwarten.

Die gegenseitige Verknüpfung zweier Multipletts ist außer aus der Identität der Kopplungskonstanten gelegentlich auch aus dem **Dacheffekt** abzuleiten. Hier zeigen die Multipletts eine in Form der zwei Seiten eines Daches gegeneinander geneigte Asymmetrie. Die Analyse von Spin-Systemen höherer Ordnung (Kap. 14.3.3) kann zur Identifizierung größerer Strukturelemente eines Moleküls führen. Eine wesentliche Verbesserung der Analyse von Spin-Systemen bringen die zweidimensionale Protonen-Korrelation (H,H-COSY), die CH-Korrelation (Kap. 15) und die 3D-Spektren (Kap. 15).

Interpretationshilfen zur Auswertung von ¹H-NMR-Spektren

Doppelresonanz-Experimente

Spin-Entkopplung (Doppelresonanz). Die meisten NMR-Spektrometer sind mit Einrichtungen zur Spin-Entkopplung ausgestattet. Dabei wird der Einfluss der Nachbarprotonen, welche die Aufspaltung eines Signals verursachen, durch Einstrahlung einer zusätzlichen Störfrequenz ausgeschaltet. Das Signal der betrachteten Protonen geht dann in ein Singulett über. Strahlt man im Spektrum von Benzocain (Abb. 14.16) auf die CH₂-Gruppe ein, so geht das Triplett der Methylgruppe ($\delta = 1,32$ ppm; Abb. 14.12) in ein Singulett über. Wird die CH₃-Gruppe bestrahlt, so erhält man aus dem Quartett der CH₂-Gruppe ($\delta = 4,32$; Abb. 14.12) ebenfalls ein Singulett.

Deuterierungs-Experimente

D₂O-Austausch. Die Wasserstoffatome von OH-, NH- und COOH-Gruppen können durch Schütteln ihrer Lösung mit D₂O gegen Deuteriumatome ausgetauscht werden. Das Verschwinden der entsprechenden Signale im ¹H-NMR-Spektrum und das Auftreten eines HOD-Signals zeigen die Richtigkeit der Zuordnung solcher Gruppen. Auch die Deuterierung anderer Atomgruppen kann zu wichtigen Informationen führen (über Deuterierungsreaktionen vgl. Lit. 4).

Lösungsmittel-Effekte. Änderungen im ¹H-NMR-Spektrum einer Substanz bei Wechsel des Lösungsmittels können die Interpretation erleichtern. Wichtig sind z. B. die folgenden Versuche:

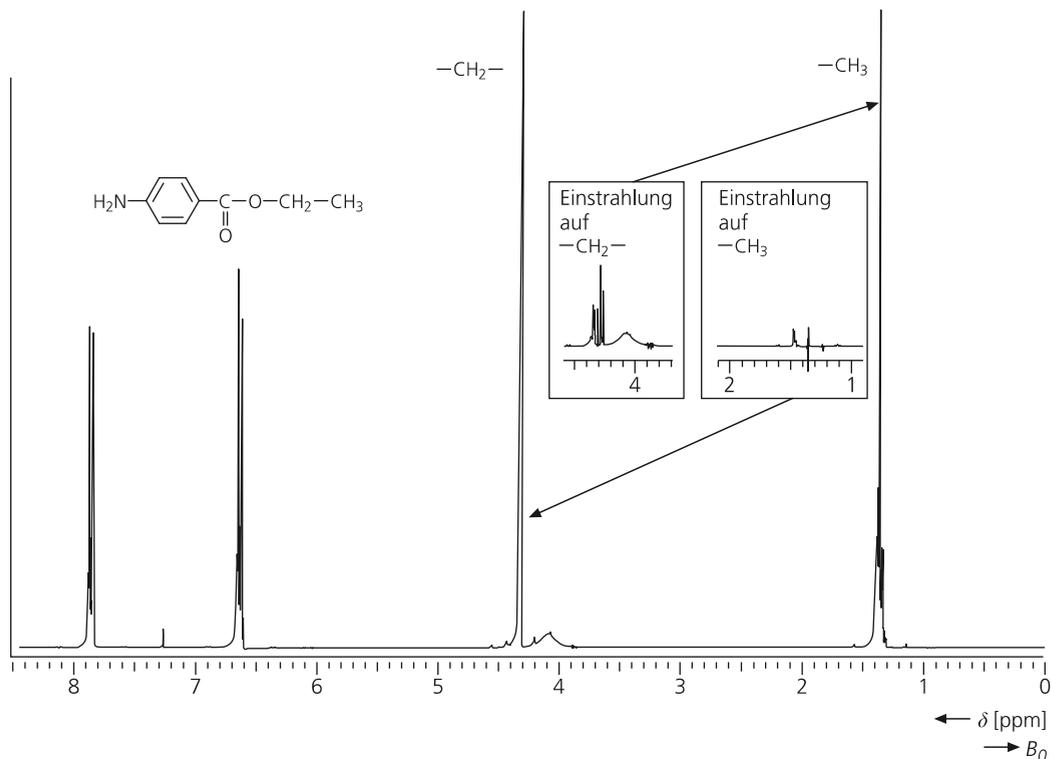


Abb. 14.16 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Benzocain nach Entkopplung (in CDCl_3 , $\omega_0 = 300 \text{ MHz}$)

Aufnahme des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums in absolut wasserfreiem Deuterodimethylsulfoxid ($\text{CD}_3)_2\text{SO}$ zur Charakterisierung von Aminen und Alkoholen. In diesem Lösungsmittel sind die Signale der OH-Protonen zu größeren δ -Werten von etwa 3 bis 7 ppm verschoben. Außerdem werden bei Abwesenheit von Feuchtigkeit (Kap. 14.3.3) die Austauschreaktionen mit den OH-Protonen anderer Moleküle so stark verlangsamt, dass oft Spin-Kopplungen mit Nachbarprotonen zu beobachten sind. Somit kann das OH-Proton primärer Alkohole ein Triplet und das sekundärer ein Dublett ergeben; in CDCl_3 wird eine solche Aufspaltung selten beobachtet.

Wie schon erwähnt wurde (Kap. 14.3.1), ändern sich im Lösungsmittel Benzol (C_6D_6) die chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale gegenüber den in CDCl_3 gemessenen δ -Werten nicht um den gleichen Betrag. Auf diese Weise können Signale, die sich in CDCl_3 überlagern, durch Messung in C_6D_6 eventuell getrennt werden.

Chirale Lösungsmittel (z. B. *R*- oder *S*-2,2,2-Trifluor-1-phenylethanol) können mit enantiomeren Verbindungen diastereomere Solvationskomplexe bilden, die zu unterschiedlichen $^1\text{H-NMR}$ -Spek-

Charakterisierung von Alkoholen und Aminen

Aromatische Lösungsmittel

Chirale Lösungsmittel

tren führen. Auf diese Weise kann z. B. die stereochemische Reinheit von Substanzen ermittelt werden (Lit. 1–5, 10).

Verschiebungs-Reagenzien. Misst man das ¹H-NMR-Spektrum einer Substanz in CDCl₃ in Gegenwart von Komplexen aus β-Diketonen mit Elementen der Lanthaniden-Gruppe (**Verschiebungs-Reagenzien**), so kann es zu Verschiebungen der Signale bis zu etwa 25 ppm kommen. Die Verschiebung hängt vom Mengenverhältnis Reagenz/Substanz und von der Entfernung der Wasserstoffatome von den im Molekül vorliegenden Heteroatomen (O, N) ab, an welchen die Komplexbildung stattfindet (vgl. Lit. 4). Ein gebräuchliches Verschiebungs-Reagenz ist Tris(dipivaloylmethanato)-europium (Eu(DPM)₃). Hier ist ein Europiumion durch drei Moleküle Dipivaloylmethan (DPM) (in der Enolform) komplex gebunden (weitere Reagenzien vgl. Lit. 4, 5). Chirale Verschiebungs-Reagenzien werden zur Unterscheidung von Enantiomeren eingesetzt (Lit. 4, 5).

Chirale
Verschiebungs-Reagenzien

Nuclear-Overhauser-Effekt

Befinden sich zwei Wasserstoffkerne in räumlicher Nähe, so kann die Relaxation (Kap. 14.2.6) des einen Kerns weitgehend durch Wechselwirkung mit dem benachbarten Kern stattfinden. Bei Einstrahlung der Resonanzfrequenz in den einen Kern wird dessen Energie auf den zweiten Kern übertragen, sodass die relative Intensität seines Signals, d. h. sein Integral, ansteigt. Bei einem Abstand der Kerne von weniger als etwa 3 Å kann die Zunahme der Integralhöhe bis zu 50 % betragen; in der Praxis gelten schon Werte ab etwa 10 % als signifikant. Man bezeichnet diese Erscheinung als **Nuclear-Overhauser-Effekt (NOE)** oder **Kern-Overhauser-Effekt**.

Abstand zweier Protonen
im Molekül

Das Verfahren kann zu Untersuchungen über den Abstand zweier Protonen im Molekül herangezogen werden, beispielsweise zur Entscheidung, ob in einem Strukturelement der eine oder der andere Wasserstoffkern einem dritten Kern näher benachbart ist. Bei der Messung müssen andere Relaxationsvorgänge möglichst ausgeschlossen werden. Daher befreit man die Messlösungen von molekularem Sauerstoff, der wegen seiner paramagnetischen Eigenschaften die Relaxation erleichtert. Meist wird der NOE durch Subtraktion des normalen Spektrums vom Doppelresonanzspektrum gemessen (**NOE-Differenzspektroskopie**) (Lit. 4).

NOE-Differenzspektros-
kopie

Zweidimensionale Protonenkorrelation

Die zweidimensionale Protonenkorrelation (**H,H-COSY-Methode**) wird routinemäßig zur Strukturzuordnung eingesetzt. Die Grundlagen der ein- (1D) und zweidimensionalen (2D)-NMR-Spektroskopie werden in Kap. 15 näher erläutert. Im vorliegenden Falle soll nur

auf die Anwendung in der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie eingegangen werden. Die zweidimensionale Protonenkorrelation (englisch: **correlation spectroscopy**; COSY) liefert Informationen über die H/H-Kopplungen eines Moleküls. Im H,H-COSY-Diagramm (Abb. 14.17, H, H-COSY-Spektrum von Ephedrin) ist sowohl auf der x-Achse, als auch auf der y-Achse das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Substanz aufgetragen. Die auf einer Diagonalen dieses Diagramms liegenden Markierungen (**Diagonalsignale**) verbinden jeweils gleiche Signale der beiden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren. Außerhalb der Diagonalen liegen die **Kreuzsignale**. Dort kreuzen sich zwei Hilfslinien (A, B, Abb. 14.17), die ausgehend von der chemischen Verschiebung zweier unterschiedlicher Kerne der beiden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren gezogen werden. Diese beiden Kerne koppeln miteinander, wenn ihre Diagonal- und Kreuzsignale ein Quadrat (**Korrelationsquadrat**) bilden (z. B. $\text{>}^2\text{CH-}$ und -CH_3 von Ephedrin, Abb. 14.17). Auf diese Weise können in Molekülen auch Kopp-

H,H-COSY-Diagramm

Diagonalsignale und Kreuzsignale

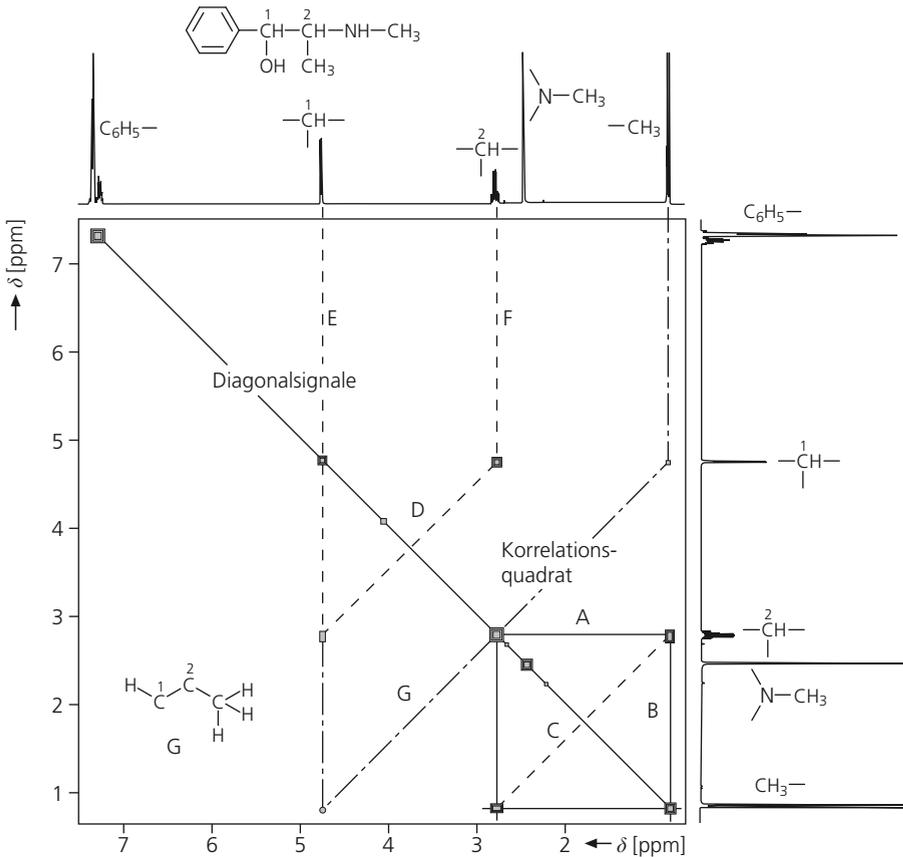


Abb. 14.17 Zweidimensionale Protonenkorrelation (H,H-COSY) von Ephedrin in CDCl_3 ($\omega_0 = 300 \text{ MHz}$)

Auswertung von
H,H-COSY-Diagrammen

lungen aufgefunden werden, die mit den eindimensionalen Methoden nicht erkannt wurden.

In einer übersichtlicheren Auswertung werden nicht Quadrate gezeichnet, sondern die jeweils zusammengehörenden nahezu gleich aussehenden Kreuzsignale durch Linien verbunden, welche die Diagonale senkrecht schneiden (C, D, G, Abb. 14.17). Diese Linien entsprechen der zweiten Diagonalen des jeweiligen Korrelationsquadrates. Um die Kopplungspartner zu finden, braucht man nur waagerechte oder senkrechte Hilfslinien (z. B. E, F, Abb. 14.17) zum gleichen Spektrum zu ziehen. Im Spektrum ist auch die Fernkopplung (W-Kopplung) zwischen ¹CH— und —CH₃ von Ephedrin durch eine solche Diagonale (G) dargestellt, die aus dem Spektrum (Abb. 14.20) nicht ohne weiteres zu ersehen ist, s. dazu Kap. 14.3.3.

Zur zweidimensionalen ¹H-NMR-Spektroskopie gehören auch:

- **NOESY-Aufnahmen** (Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy)
- **ROESY-Aufnahmen** (Rotating Frame Nuclear Overhauser Effekt Spectroscopy).

Man erhält analoge Diagramme wie beim H,H-COSY, jedoch zeigen die Kreuzsignale nicht die über Bindungen koppelnden, sondern die durch den NOE als räumlich nahe erkannten Kerne an (Lit. 1, 3–5, 10).

14.4.4 Konformationsanalyse von Arzneistoffen

Organische Moleküle können bekanntlich in verschiedenen Konformationen vorliegen, die durch Drehung um eine oder mehrere Einfachbindungen ineinander übergehen würden (vgl. Lehrbücher der organischen Chemie). Die ¹H-NMR-Spektroskopie ist eine der wichtigsten Methoden zur **Konformationsanalyse**. Eine solche Analyse könnte im einfachsten Falle wie folgt ablaufen:

Verlauf einer
Konformationsanalyse

1. Messung des ¹H-NMR-Spektrums und Ermittlung der Kopplungskonstanten der H-Atome (Kap. 14.3.3)
2. Abschätzung der Diederwinkel aus den Kopplungskonstanten nach der Karplus-Kurve (Kap. 14.3.3, Abb. 14.15)
3. Ableitung der wahrscheinlichen Konformation unter Verwendung eines maßstabgerechten Molekülmodells (z. B. der Molekülmodelle nach Dreiding).

Die Konformationsanalyse von Arzneistoffen kann von Bedeutung sein, wenn die Wirkung der Substanz von der richtigen Konformation abhängt.

Im Molekülmodell von Ephedrin z. B. ergeben sich für die Seitenkette drei bevorzugte, gestaffelte Konformationen A, B und C (Abb. 14.18), die durch Drehung des C^1 -Atoms um die $\text{C}^1\text{-C}^2$ -Achse bei feststehendem C^2 -Atom ineinander überführt werden können. Der Diederwinkel zwischen den Wasserstoffatomen an C^1 und C^2 beträgt für A 180° , für B 60° und für C ebenfalls 60° . Diese Winkel entsprechen nach der Karplus-Kurve (Abb. 14.15) Kopplungskonstanten von 9 bis 18 Hz für A bzw. von 2 bis 4 Hz für B und C. Gemessen wurde für Ephedrinhydrochlorid in wässriger bzw. D_2O -Lösung eine Konstante von 4 Hz (Abb. 14.20, gespreiztes Dublett vom Quartett für C^2H , dq). Daher sind die Konformeren B und C, die durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen OH-Gruppen und NHCH_3 -Gruppe stabilisiert werden, wahrscheinlicher als Konformation A. Man bevorzugt C, weil hier die beiden größten Gruppen des Moleküls (Benzolring und NHCH_3 -Gruppe) am weitesten voneinander entfernt sind.

Konformationsanalyse
von Ephedrin

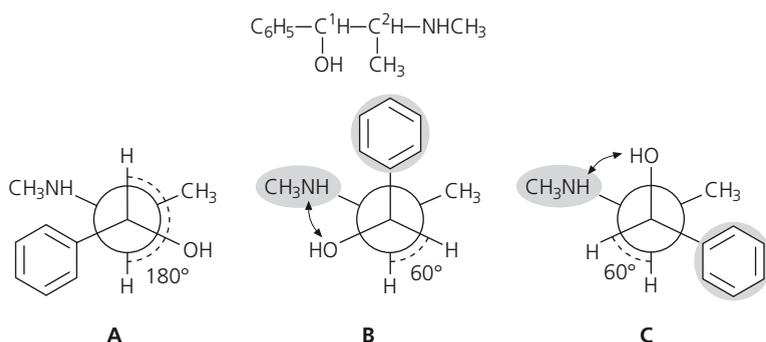


Abb. 14.18 Gestaffelte Konformationen des Ephedrins

14.4.5 Untersuchungen des Zustandes von Arzneistoffen in Lösung

Das Verhalten eines Arzneistoffes in wässriger Lösung ist von Bedeutung für seine biologische Wirkung. Mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie können z. B. folgende Strukturänderungen in Lösung untersucht werden (Lit. 20):

- Wasserstoffbrückenbindungen
- Tautomere Gleichgewichte
- Protonierung von Stickstoffatomen bzw. Deprotonierung von Carboxygruppen

- Assoziatbildung von Arzneistoffmolekülen untereinander oder mit anderen Stoffen
- Stabilität von Arzneistoffen (hydrolytische Spaltungen, Oxidationen, photochemische Reaktionen).

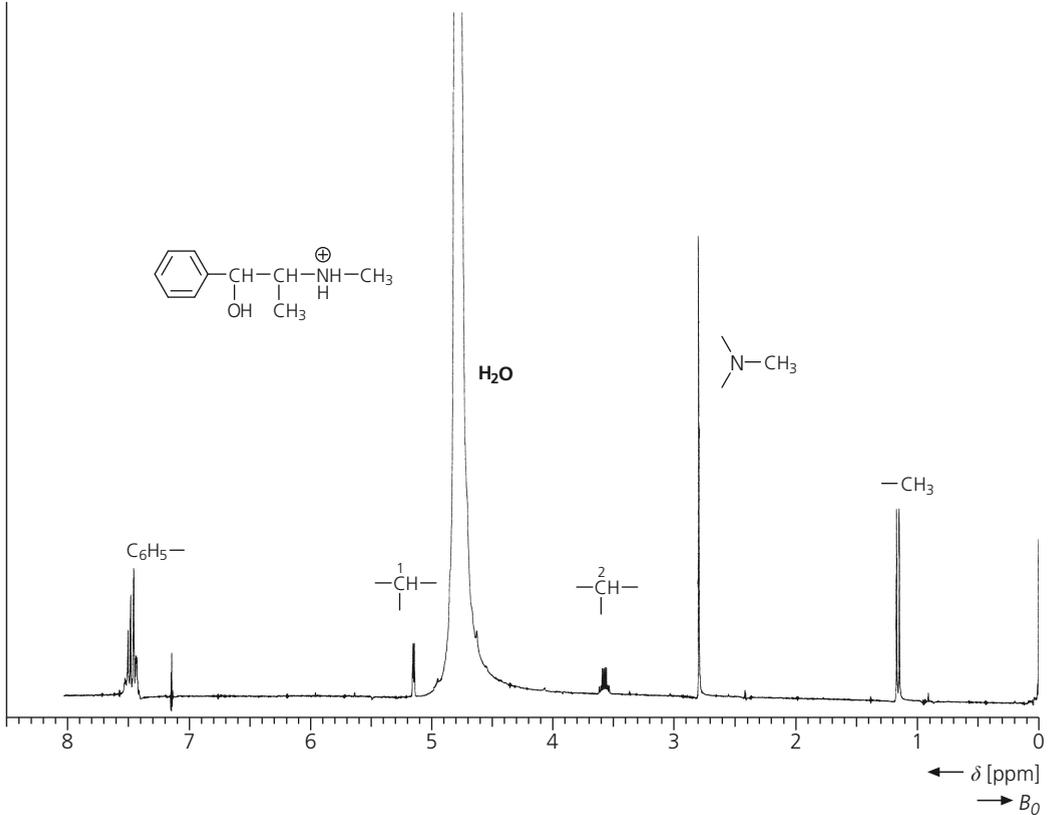


Abb. 14.19 ¹H-NMR-Spektrum von Ephedrinhydrochlorid in D₂O/H₂O ($\omega_0 = 300$ MHz)

Bei derartigen Untersuchungen wäre es zur Simulation der tatsächlichen Verhältnisse erforderlich, Kernresonanzspektren in wässriger Lösung zu messen. Dabei treten die folgenden Schwierigkeiten auf:

¹H-NMR-Spektren in wässriger Lösung

- Die Protonen des Wassers ergeben ein breites Kernresonanzsignal bei etwa $\delta = 4$ bis 6 ppm, das zusätzliche Rotationsseitenbanden aufweisen kann. Diese Wassersignale sind nicht lagekonstant und können wichtige ¹H-NMR-Signale des Arzneistoffes überdecken (Abb. 14.19).
- Bei stärkerer Verdünnung fallen die Signale austauschfähiger Hydroxy- und Aminprotonen mit dem Wassersignal zusammen.

■ Da Deuteriumatome bei den in der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie angewandten Bedingungen keine Kernresonanzsignale ergeben (Kap. 14.1.1), bringt die Verwendung von schwerem Wasser (D_2O) als Lösungsmittel eine Verbesserung der Verhältnisse. Aber auch hier treten Schwierigkeiten auf:

Verwendung von D_2O als Lösungsmittel

■ D_2O enthält einen kleinen Anteil H_2O , sodass auch hier ein Wassersignal (H_2O , HOD), wenn auch von wesentlich geringerer Intensität, in Erscheinung tritt (Abb. 14.20).

■ In D_2O werden alle Wasserstoffatome von Hydroxygruppen, Aminogruppen und Carboxygruppen gegen Deuteriumatome ausgetauscht und sind nicht mehr zu beobachten (Kap. 14.4.3).

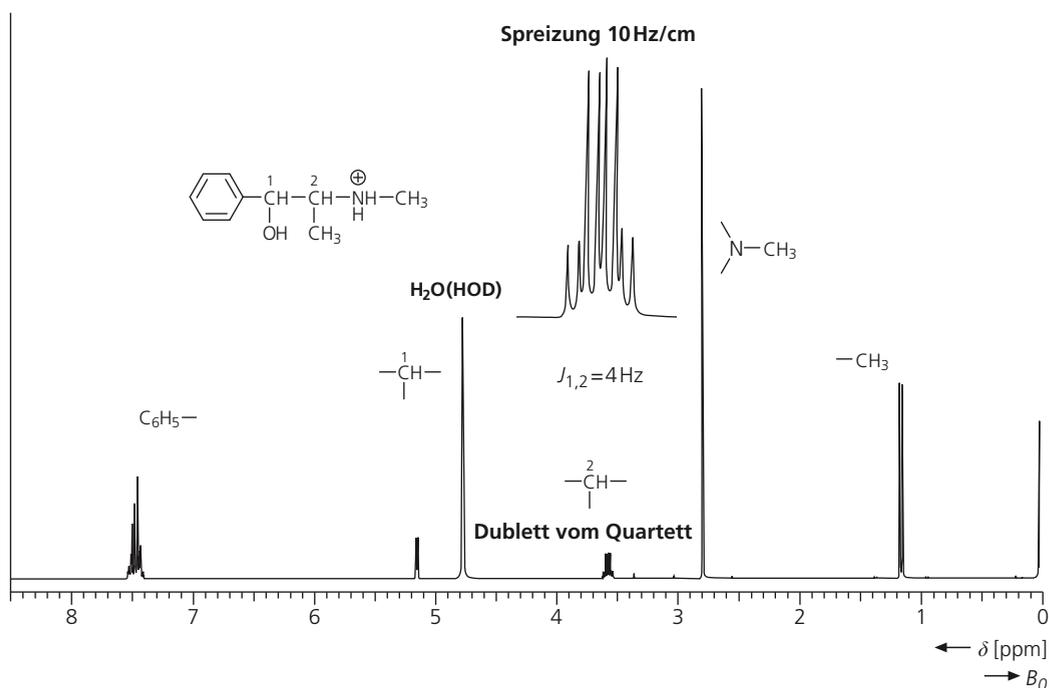


Abb. 14.20 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Ephedrinhydrochlorid in D_2O ($\omega_0 = 300 \text{ MHz}$)

Untersuchung von Wasserstoffbrückenbindungen

Das Kernresonanzsignal des Wasserstoffatoms einer OH-Gruppe wird wegen der Verringerung der Elektronendichte in das tiefere Feld (d. h. zu größeren δ -Werten) verschoben, wenn die Hydroxygruppe

Chemische Verschiebung bei Wasserstoffbrücken

an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. Da intermolekulare H-Brückenbindungen im Unterschied zu intramolekularen mit steigender Verdünnung zunehmend aufgebrochen werden, kommt es mit zunehmender Verdünnung zu einer Verschiebung der Kernresonanzsignale der Hydroxyprotonen zu kleineren δ -Werten (Lit. 4, 5). Größere Bedeutung zur Untersuchung von Wasserstoffbrückenbindungen besitzt die IR-Spektroskopie (vgl. Kap. 13).

Untersuchung tautomerer Gleichgewichte

Tautomerie und
¹H-NMR-Spektrum

Von vielen Arzneistoffen (z. B. Barbitursäurederivaten, Pyrazolinonen, Pyrazolidindionen) kann unter bestimmten Bedingungen die Ausbildung tautomerer Gleichgewichte erwartet werden. Die ¹H-NMR-Spektroskopie ist zur Untersuchung solcher Gleichgewichte geeignet (Lit. 4). Von Bedeutung ist die Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichte. Untersuchungen an Arzneistoffen wurden bisher meist in organischen Lösungsmitteln (z. B. CCl₄, CDCl₃) durchgeführt (Lit. 14), weil bei Messungen in wässriger Lösung und in D₂O die schon erwähnten Schwierigkeiten auftreten (s. o.). Wenn sich aber durch die Enolisierung auch die NMR-Daten (δ -Wert, Aufspaltung) nicht austauschbarer Wasserstoffatome ändern, so ist auch in wässriger Lösung eine Beobachtung von Tautomeriegleichgewichten möglich.

Protonierung basischer Arzneistoffe

Wo erfolgt Protonierung
eines Arzneistoffes?

Basische Arzneistoffe werden oft als Salze eingesetzt. Sind mehrere Stickstoffatome im Molekül vorhanden, so erhebt sich die Frage, an welchem die Protonierung bevorzugt stattfindet. Durch Protonierung alkylierter Aminogruppen ist wegen geringerer Elektronendichte (Fehlen des freien Elektronenpaares) eine Signalverschiebung der am Stickstoffatom gebundenen Alkylreste zu größeren δ -Werten zu erwarten (Tab. 14.2). Diese Verschiebungen können auch in D₂O-Lösung beobachtet werden. Die Einführung des zusätzlichen Protons kann auch zu einer verstärkten Aufspaltung der NMR-Signale der an benachbarte Kohlenstoffatome gebundenen H-Atome führen. In diesem Falle ist es möglich, den Ort der Protonierung aus den Aufspaltungsmustern der Nachbaratome festzulegen. Andererseits gibt auch das Aufspaltungsmuster des angelagerten Protons selbst Hinweise auf die Zahl der benachbarten Wasserstoffatome und damit auf den Ort seiner Bindung, wenn die Messungen in wasserfreiem Dimethylsulfoxid durchgeführt werden. Austauschvorgänge können durch Messung des ¹H-NMR-Spektrums bei tiefen Temperaturen verlangsamt werden.

Bindung von Arzneistoffen an Eiweißstoffe

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie kann zur Untersuchung der Bindung von Arzneistoffen an Eiweißmoleküle (Substrat-Protein-Wechselwirkungen) herangezogen werden. Die Ergebnisse ermöglichen Einblicke in die Art der **Eiweißbindung** und in die Struktur von Arzneistoff-Rezeptor-Komplexen (Lit. 20).

Bei derartigen Untersuchungen wird die Messung der Signalbreite (Linienbreite) von $^1\text{H-NMR}$ -Signalen herangezogen. Als Linienbreite bezeichnet man die in halber Höhe des Signals gemessene Breite. Die Linienbreite wird im Wesentlichen bestimmt durch:

- Fernkopplungen
- Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1
- Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 .

Die Spin-Spin-Relaxationszeit (T_2) (Kap. 14.2.6) hängt von der Flexibilität der Moleküle bzw. der Wasserstoffatome ab. Eine Einschränkung der Bewegungsmöglichkeiten z. B. durch Bindung eines Arzneistoffmoleküls an ein großes Eiweißmolekül, kann zu einer Verkleinerung von T_2 führen. Andererseits ist die Relaxationszeit T_2 umgekehrt proportional der Linienbreite der Kernresonanzsignale: eine kleinere Spin-Spin-Relaxationszeit T_2 führt damit zu einer größeren Linienbreite. Daher erlaubt die Linienbreite von Kernresonanzsignalen Schlüsse auf die Bewegungsmöglichkeiten des Moleküls und damit auf die Eiweißbindung.

Aus derartigen Untersuchungen ergab sich z. B., dass Penicilline bevorzugt über den Acylrest an Eiweiß gebunden werden.

Stabilitätsuntersuchungen an Arzneistoffen in Lösung

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bietet eine aussagekräftige Möglichkeit zur Untersuchung der Stabilität von Arzneistoffen in wässriger Lösung bzw. in D_2O . Voraussetzung ist, dass sich das NMR-Spektrum der Umwandlungsprodukte von dem der Ausgangssubstanz charakteristisch unterscheidet. Durch Messung des NMR-Spektrums der Arzneistofflösung in bestimmten zeitlichen Abständen kann eventuell aus der Abnahme des Integrals der Signale der Ausgangssubstanz und der Zunahme des Integrals der Signale der Spaltprodukte der Abbauvorgang des Arzneistoffes auch in seinem zeitlichen Ablauf verfolgt werden.

Relaxationszeit und Eiweißbindung von Molekülen

20 Hochleistungs-Flüssigchromatographie

20.1 Prinzip der Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Ziffer 2.2.29 im
Arzneibuch

Definition der HPLC

Die **Hochleistungs-Flüssigchromatographie (high performance liquid chromatography: HPLC)** ist eine Form der Säulenchromatographie, bei der das Elutionsmittel mithilfe von Pumpen durch die Trennsäule gedrückt wird. Sie dient wie alle chromatographischen Verfahren zur Trennung von Substanzgemischen sowie deren qualitativer und quantitativer Analyse. Sie wird hauptsächlich für analytische Trennungen eingesetzt, kann jedoch auch präparativen Zwecken dienen. Als Ergebnis der Trennung wird im Hochleistungs-Flüssigchromatogramm (HPLC, Abb. 20.1) wie bei allen äußeren Chromatogrammen die Intensität des Detektorsignals in Abhängigkeit von der Zeit registriert.

Bei der klassischen Säulenchromatographie fließt das Elutionsmittel aufgrund des hydrostatischen Druckes von oben nach unten durch die mit der stationären Phase gefüllte Trennsäule. Voraussetzung für die chromatographische Trennung ist eine ausreichende Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase, die durch die Schwerkraft zustandekommt. Die Trenneffizienz der Säule hängt stark von der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung der stationären Phase ab. Kleinere und gleichmäßig geformte Teilchen führen zu einer hohen Trenneffizienz (Kap. 18.2.2). Aus der kleineren Partikelgröße resultiert eine hohe Packungsdichte in der Trennsäule, die dem Elutionsmittel Widerstand entgegensetzt. Um trotz der hohen Packungsdichte

Sehr feine und gleichmäßig geformte Teilchen führen zu einer hohen Trenneffizienz

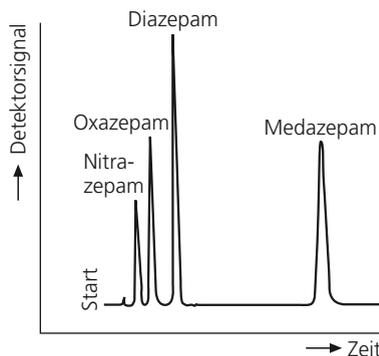


Abb. 20.1 Hochleistungs-Flüssigchromatogramm eines Gemisches aus Tranquilizern

eine ausreichende Strömungsgeschwindigkeit des Elutionsmittels zu gewährleisten, wird das Elutionsmittel in der HPLC mithilfe von Pumpen durch die Säule gedrückt. Der für den Fluss der mobilen Phase notwendige Druck hängt von Packungsdichte und Länge der Trennsäule sowie der Viskosität des Elutionsmittels ab. Aufgrund der wesentlich höheren Trenneffizienz gegenüber der konventionellen Säulenchromatographie wird die Säulenchromatographie unter Druck als **Hochleistungs-Flüssigchromatographie** (HPLC) bezeichnet. Die ältere Bezeichnung **Hochdruck-Flüssigchromatographie** (high pressure liquid chromatography) sollte nicht verwendet werden, da die chromatographische Trennung selbst nicht durch den Druck bedingt wird. Die Entwicklung von Geräten und Methoden zur Durchführung der HPLC begann in den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts.

Einer Trennung durch HPLC sind nahezu alle löslichen organischen und anorganischen Arzneistoffe zugänglich, da durch die fast beliebige Kombinationsmöglichkeit von mobiler und stationärer Pha-

Die Förderung des Elutionsmittels erfolgt mit Pumpen

Die HPLC ist eine universell einsetzbare Trennmethode

Tab. 20.1 Verfahren und Einteilungsmöglichkeiten der Hochleistungs-Flüssigchromatographie

A) nach dem angewandten Trennmechanismus

Adsorptionschromatographie
Verteilungschromatographie
Umkehrphasenchromatographie
Chirale Wechselwirkungen
Ionenpaarchromatographie
Ionenaustausch-(Ionen-)chromatographie
Größenausschlusschromatographie
Affinitätschromatographie

B) nach dem notwendigen Druck

Niederdruckchromatographie (LPLC) (low pressure liquid chromatography)	ca. 1–10 bar ^{a)}
Mitteldruckchromatographie (MPLC) (medium pressure liquid chromatography)	ca. 10–40 bar ^{a)}
Hochdruckchromatographie (HPLC)	40–400 bar ^{a)}
Ultrahochleistungs-Flüssigchromatographie (UHPLC)	> 400 bar

C) nach den durchgesetzten Substanzmengen

Analytische Trennungen	< 1 ng bis < 1 mg
Präparative Trennungen	> 1 mg

^{a)} In der HPLC ist noch die Benutzung der Druckeinheit bar üblich, obwohl sie nicht dem SI-Einheitensystem entspricht. 1 bar = 10⁵ Pa (Pascal) = 1,013 atm; im englischen Sprachraum wird häufig die Druckeinheit psi (pound per square inch) benutzt. 1 bar = 14,5 psi.

Vergleich zwischen GC
und HPLC

se nahezu jede gewünschte Selektivität eingestellt werden kann. Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten haben dazu geführt, dass sich die HPLC heute zur meistangewandten Trennmethode in der pharmazeutischen Analytik entwickelt hat. Ein Vorteil gegenüber der Gaschromatographie (Kap. 19) besteht darin, dass die Analysesubstanzen nicht verdampft werden müssen, sondern in gelöster Form untersucht werden können. Es werden die unterschiedlichsten Techniken und Mechanismen (Tab. 20.1) zur Stofftrennung benutzt. Eine Einteilung der Methoden kann nach dem angewandten Trennmechanismus, dem notwendigen Druck und nach der getrennten Substanzmenge erfolgen (Tab. 20.1). Im Folgenden wird hauptsächlich auf analytische Trennungen eingegangen.

Trennverfahren in der HPLC

20.2 Aufbau von Geräten zur Hochleistungs-Flüssigchromatographie

Geräte zur Durchführung der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (Abb. 20.2) benötigen die folgenden Komponenten:

Komponenten von
HPLC-Geräten

- Elutionsmittel
- Pumpsystem
- (Gradientenmischer)
- Probeneinlasssystem
- Trennsäule
- Detektor
- Schreiber, Integrator, Auswertesystem.

Funktionsweise
von HPLC-Geräten

Das Elutionsmittel wird aus einem Vorratsgefäß durch Probeneinlasssystem und Trennsäule zu einem Detektor gepumpt. Im einfachsten Fall besitzt das Gerät nur eine Pumpe und benötigt keinen Gradientenmischer. Ein solches Gerät ist für **isokratische** Arbeitsweise ausgelegt, d. h. man kann während einer Trennung die Zusammensetzung des Lösungsmittelgemisches nicht kontinuierlich verändern (**Lösungsmittelgradient**, Kap. 20.2.3). Zur Erzeugung eines Lösungsmittelgradienten benötigt man mindestens zwei Pumpen (Hochdruckgradient) oder ein System von Schaltventilen (Niederdruckgradient). Im Probeneinlasssystem wird die Untersuchungslösung in den Eluentenstrom eingebracht und von dort aus weiter zu der Trennsäule transportiert. Nach der chromatographischen Trennung gelangen die Substanzen in den Detektor. Das elektrische Signal, das vom Detektor erzeugt wird, kann in Auswerteeinheiten wie Schreiber, Integrator oder Labordatensystemen als äußeres Chromatogramm registriert werden.

Totvolumina verschlechtern
die chromatographische
Trennung

Die einzelnen Teile des HPLC-Gerätes müssen möglichst **totvolumenarm** verbunden werden. Unter Totvolumina versteht man nicht von Elutionsmittel durchflossene (**gespülte**) Geräteteile, Leitungen oder Anschlussstücke. Durch Totvolumina können chromatographische Trennungen verschlechtert werden.

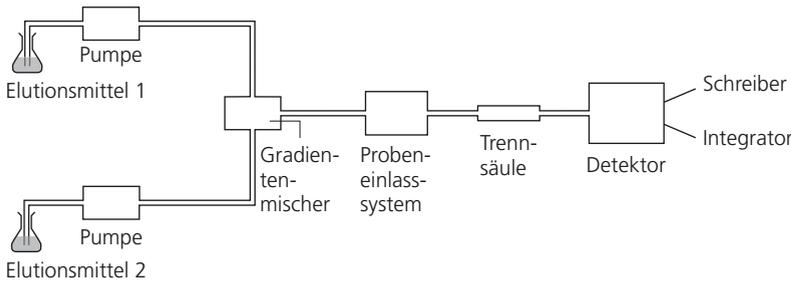


Abb. 20.2 Schematischer Aufbau eines HPLC-Gerätes

Tab. 20.2 Elutionsstärke von Lösungsmitteln (Elutrope Reihe nach Lit. 9, modifiziert)

Lösungsmittel	Siedetemperatur °C	n_D^{20}	UV-cut-off ^{a)}	Lösungsmittelstärke ϵ° ^{b)}	Viskosität (cP bei 20 °C) (1cP = 10 ⁻³ Pa · s)
Hexan	69	1,375	210	0,01	0,33
Cyclohexan	81	1,427	210	0,04	0,98
<i>tert.</i> -Butylmethylether	53	1,369	220	0,20	–
Isopropylchlorid	36	1,378	225	0,29	0,33
Toluol	111	1,496	285	0,29	0,59
Chloroform	62	1,446	245	0,40	0,58
Dichlormethan	40	1,424	245	0,42	0,44
Tetrahydrofuran	67	1,405	220	0,45	0,51 (25 °C)
Aceton	56	1,359	330	0,56	0,32
Dioxan	101	1,422	220	0,56	1,54
Essigsäureethylester	77	1,372	260	0,58	0,45
Acetonitril	82	1,344	200	0,65	0,37
Isopropanol	82	1,378	210	0,82	2,3
Ethanol	79	1,361	210	0,88	1,2
Methanol	65	1,329	220	0,95	0,60
Wasser	100	1,333	200	groß	1,0

^{a)} unter UV-cutoff versteht man diejenige Wellenlänge, unterhalb der das Lösungsmittel so stark absorbiert, dass die Detektion nicht mehr möglich ist (s. auch Durchlässigkeitsgrenzen von Lösungsmitteln, Tab. 11.7).

^{b)} ϵ° ist ein relatives Maß für die Elutionsstärke oder Polarität der Lösungsmittel. Die angegebenen Zahlenwerte wurden experimentell an Al₂O₃ bestimmt; für die Elutionsstärke an Kieselgel gilt die gleiche Reihenfolge, jedoch sind die Zahlenwerte unterschiedlich.

20.2.1 Elutionsmittel

Elutionsmittel müssen frei von Schwebstoffen und Gasen sein

In der HPLC werden an die Elutionsmittel hohe Anforderungen gestellt. Sie müssen sehr rein sein und dürfen in dem verwendeten Detektor (Kap. 20.2.7) kein Störsignal verursachen. Zur Entfernung von unlöslichen Verunreinigungen und Schwebstoffen sollte das Elutionsmittel vor der Verwendung durch eine engporige Fritte filtriert werden. Störungen können außer durch Verunreinigungen auch durch gelöste Gase wie Luft bzw. Sauerstoff im Elutionsmittel auftreten, die in der Pumpe oder bei der Druckentlastung des Elutionsmittels im Detektor Gasblasen bilden können. Abhilfe schafft eine Entgasung des Elutionsmittels, die mithilfe von Ultraschall unter Vakuum oder durch Inertgasspülung mit Helium erreicht werden kann.

Auswahl von Elutionsmitteln

Die Auswahl der Lösungsmittel hängt von der verwendeten Trennsäule und somit vom Trennmechanismus ab und erfordert viel Erfahrung. Häufig ist für die Elutionskraft bzw. -stärke eines Elutionsmittels die Polarität, d. h. die Stärke der Hydrophilie oder Lipophilie ausschlaggebend. In der **eluotropen Reihe** (Tab. 20.2) sind die Lösungsmittel nach steigender Polarität bzw. abnehmender Lipophilie geordnet. Bei der **Normalphasenchromatographie** (Kap. 20.2.6) steigt die Elutionsstärke im Allgemeinen mit zunehmender Polarität, bei der Chromatographie an **Umkehrphasen (Reversed-Phase-Chromatographie, Kap. 20.2.6)** nimmt die Elutionsstärke bei steigender Polarität ab (Tab. 20.3). Sind mehrere Lösungsmittel bezüglich Selektivität und Polarität als Elutionsmittel geeignet, so sollte das Lösungsmittel mit der geringeren Viskosität verwendet werden.

Die Elutionsstärke von Elutionsmitteln unterscheidet sich bei der Chromatographie an Normalphasen und Umkehrphasen

Tab. 20.3 Beziehung zwischen Elutionsmittelstärke (Elutionskraft) und Retention in der Normalphasen- und RP-Chromatographie

Phase	Sorbens	Retention		Elutionsstärke	
		polare Substanzen	unpolare Substanzen	polare Lösungsmittel	unpolare Lösungsmittel
Normal	hydrophil	stark	schwach	hoch	gering
Umkehr reversed phase (RP)	lipophil	schwach	stark	gering (H ₂ O)	hoch (MeOH/CH ₃ CN) ^{a)}

^{a)} In der RP-Chromatographie werden meist mit Wasser mischbare, organische Elutionsmittel verwendet; sie stellen den **lipophilen** Anteil des Elutionsmittels dar, obwohl sie innerhalb der eluotropen Reihe noch recht polar sind.

20.2.2 Pumpen

Um konstante Fließgeschwindigkeiten von ca. 0,1 bis 10 ml/min zu ermöglichen, müssen Pumpen von HPLC-Geräten Drücke bis 300 oder sogar 400 bar liefern können (s. Tab. 20.1). Zum Betrieb von **Microbore-HPLC-Säulen** (Kap. 20.2.5) ist es notwendig, den Fluss auch noch in einem Bereich von 1 bis 100 µl/min exakt einstellen zu können. Der notwendige Druck kann über 400 bar ansteigen.

Im Allgemeinen werden Kolbenpumpen verwendet, bei denen sich ein oder mehrere Kolben zur Förderung des Elutionsmittels hin- und herbewegen. Der Ein- und Auslass des Elutionsmittels wird durch Kugelventile gesteuert. Als Baumaterialien werden hochresistente Werkstoffe verwendet. Die Pumpenköpfe bestehen meist aus korrosionsfestem Edelstahl, Titan oder Keramik, die Kolben werden üblicherweise aus Saphir gefertigt. Die Pumpen sollten möglichst pulsationsarm arbeiten, d. h. einen kontinuierlichen Fluss erzeugen. Ein pulsierendes Elutionsmittel kann in einigen Detektoren (Brechungsindex-, Leitfähigkeits-, elektrochemischer Detektor, Kap. 20.2.7) Signalschwankungen verursachen. Je nach Pumpentyp kann es notwendig sein, hinter die Pumpe ein Dämpfungselement zu schalten, um einen pulsationsarmen Fluss des Eluenten durch die Säule zu erreichen.

HPLC-Pumpen sind empfindliche Präzisionsgeräte. Vor ihrer Verwendung sollte man sich ausführlich über ihre Bedienung informieren. Gasblasen stören aufgrund ihrer Komprimierbarkeit eine gleichmäßige Förderung des Eluenten. Bei den meisten Pumpen kann man minimale und maximale Werte für den Druck vorgeben. Der Minimalwert schützt die Pumpe vor Trockenlaufen, der Maximalwert vor zu hohem Druckanstieg z. B. bei Verschluss oder Verstopfung von Injektionssystem oder Säule. Bei Verwendung salzhaltiger Puffer sollte unbedingt verhindert werden, dass Salze auskristallisieren und dadurch Kolben und Dichtungen beschädigt werden können. Viele Pumpen sind zu diesem Zweck mit einer Kolbenhinterspülung ausgestattet. Nach der Benutzung sollten die Pumpen sorgfältig mit reinem, inerten Lösungsmittel gespült werden. Wurden Puffer verwendet, so muss zunächst mit reinem Wasser und anschließend mit Methanol oder Acetonitril gespült werden.

20.2.3 Gradientenmischer

Eine optimale Trennung von Substanzen lässt sich nicht immer mit einem Elutionsmittelgemisch konstanter, **isokratischer** Zusammensetzung erreichen (Kap. 20.3.5), sondern es kann notwendig sein, während der Analyse das Mischungsverhältnis der Komponenten des Elutionsmittels zu verändern. Wird das Mischungsverhältnis von zwei Komponenten variiert, so spricht man von einem **binären Gradienten**, bei drei Komponenten von **ternären Gradienten**.

Eigenschaften von HPLC-Pumpen

Funktionsweise von HPLC-Pumpen

Umgang mit HPLC-Pumpen

Eine HPLC-Pumpe darf nie trocken laufen!

Auskristallisierende Salze können die Pumpe zerstören

Gradientenelution

Wie werden Gradienten erzeugt?

Die einfachste Form eines Gradienten ist ein **Stufengradient**, bei dem in bestimmten Zeitabständen das Volumenverhältnis der Elutionsmittelbestandteile verändert wird. Ein Stufengradient kann in einfacher Weise dadurch erzeugt werden, dass in bestimmten Zeitabständen unterschiedliche Elutionsmittelgemische in das Vorratsgefäß der Pumpe gegeben werden. Wesentlich aufwendiger ist die Erzeugung eines **stufenlosen Lösungsmittelgradienten**. Wird der Gradient als **Niederdruckgradient** vor der HPLC-Pumpe erzeugt, so werden die verschiedenen Lösungsmittel durch ein System von Schaltern in eine Mischkammer gefördert. Durch zeitabhängige Programmierung von deren Öffnungszeiten kann das Mischungsverhältnis des Eluenten eingestellt werden. Die Erzeugung eines **Hochdruckgradienten** ist aufwendiger, da für jede Komponente der Gradientenmischung eine eigene, teure HPLC-Pumpe benötigt wird. Die Steuerung der notwendigen Förderleistung der einzelnen Pumpe erfolgt wie bei der Erzeugung des Niederdruckgradienten durch einen Rechner.

Unterschied zwischen Niederdruck- und Hochdruckgradienten

20.2.4 Probeneinlasssystem

Funktionsweise der Dosierschleife (Loop)

Die Aufgabe der Probenlösung erfolgt bei der HPLC mithilfe von **Sechswegventilen** und **Dosierschleifen** (Abb. 20.3). In der **Ladestellung** des Sechswegventils fließt das Elutionsmittel direkt von der Pumpe zur Trennsäule. Die Probe wird mit einer HPLC-Spritze, die im Gegensatz zu einer GC-Spritze (Kap. 19.2.1) eine stumpfe Nadel besitzen muss, durch den Probeneinlass drucklos in die Dosierschleife eingespritzt. Diese steht beim Einfüllen der Probe nicht mit dem Elutionsstrom in Verbindung. Die Dosierschleife besteht z. B. aus einer Metallkapillare mit 1 bis 2000 µl Innenvolumen. Das Volumen der eingespritzten Probe muss nicht genau abgemessen werden, da die eigentliche Dosierung durch das Schleifenvolumen erfolgt. Vielmehr sollte so viel Probenlösung eingespritzt werden, bis überschüssige Probe aus dem Probenauslass austritt und dadurch die vollständige Füllung der Dosierschleife angezeigt wird.

Manuelle, motorbetriebene und pneumatische Umschaltung des Sechswegventils

Durch Umschalten des Sechswegventils in die **Injektionsstellung** wird der Eluentenstrom durch die Dosierschleife geleitet und die Substanz auf die Trennsäule transportiert. Das Umschalten des Ventils sollte möglichst rasch erfolgen, da das Ventil während des Umschaltens vollständig geschlossen ist und durch die fördernde Pumpe ein erhöhter Druck aufgebaut wird. Dies kann einerseits zu einer Abschaltung der Pumpe führen, andererseits entspannt sich der Druck nach dem Umschalten stoßförmig auf die Säule, was zu einer Schädigung der Säulenfüllung oder zu Störsignalen im Detektor führen kann. Motorbetriebene Injektoren, die diese Störungen verhindern und sehr reproduzierbare Retentionszeiten gewährleisten, besitzen Schaltzeiten von ca. 0,1 Sekunden.

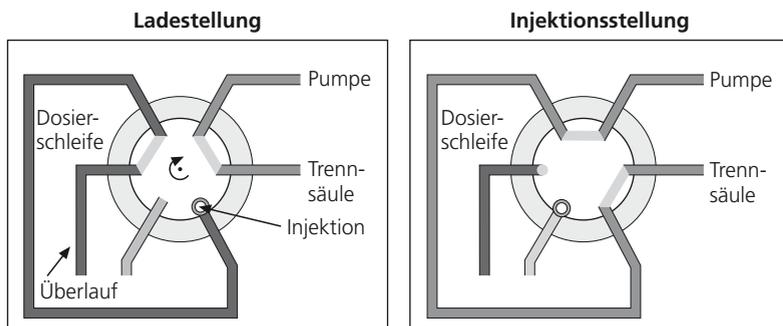


Abb. 20.3 Funktion eines Sechswegventils mit Dosierschleife

20.2.5 Trennsäulen

Die Trennsäulen der HPLC bestehen üblicherweise aus rostfreiem Stahl, seltener aus Glas oder stahummanteltem Glas. Sie sind ca. 5 bis 30 cm lang und besitzen einen inneren Durchmesser von 2 bis 8 mm. An den Enden befinden sich Metallfritten. Zu ihrer Schonung sollten bei der Analyse stärker verschmutzter Proben (Pflanzenextrakte, biologische Proben) kurze Vorsäulen vor die Trennsäule geschaltet werden. Häufig werden **Kartuschensysteme** verwendet, bei denen die Trennsäulen in eine Metallhülse eingespannt oder durch aufsteckbare Anschlussstücke befestigt werden.

Die Säulenabmessungen müssen den neu entwickelten, leistungsfähigeren und immer kleiner werdenden Trennpartikeln (Kap. 20.2.6) angepasst werden. Daraus resultierte die Entwicklung von **Narrowbore-** und **Microbore-Säulen** (Säulen mit engem Durchmesser), bei denen der Säulendurchmesser auf 1 mm oder sogar unter 1 mm reduziert wurde. Aufgrund ihrer Packung mit Partikeln von 3–2 µm Durchmesser besitzen sie sehr hohe Trenneffizienz (Kap. 18.2.2). Dies wiederum ermöglicht sehr kurze Trennsäulen, auf denen sich chromatographische Trennungen bei hoher Elutionsmittelgeschwindigkeit durchführen lassen. Die technischen Anforderungen an Pumpe, Verschraubungen und Detektoren sind jedoch sehr hoch, da z. B. Totvolumina im System oder ein pulsierender Elutionsmittelstrom stärkere Störwirkungen auf die Trennung ausüben als bei der HPLC mit konventionellen Säulen. Trennungen an sehr kurzen Säulen mit geringem Durchmesser und sehr kleinen Trennpartikeln werden heute unter dem Begriff **UHPLC (Ultra-High-Performance Liquid-Chromatographie)** zusammengefasst.

Fertig gepackte HPLC-Säulen können mit unterschiedlichen Trennmaterialien gefüllt in den gängigen Größen bezogen werden. Hinweise auf Hersteller geeigneter Trennsäulen, die in bestimmten Monographien des Arzneibuchs verwendet werden, sind in der Knowledge-Database auf der Internetseite des European Directorate

Aufbau und Abmessungen von HPLC-Säulen

Kartuschensysteme lassen sich einfach handhaben und sind auf längere Sicht preiswerter

Eigenschaften von Narrowbore- und Microbore-Säulen

UHPLC

HPLC-Fertigsäulen

for the Quality of Medicines & HealthCare (Lit. 3) zu finden. Im Internet werden Säulenkonfiguratoren angeboten, die bei der Suche nach der benötigten Säule helfen.

20.2.6 Säulenfüllung und Trennmaterialien

Die Säulenfüllung unterscheidet sich je nach Anwendungsgebiet und Trennmechanismus in ihrer **Korngröße**, **Korngrößenverteilung**, dem **Partikelmaterial**, der **Porengröße** und der **Beschaffenheit** der Oberfläche. Der Teilchendurchmesser schwankt im Allgemeinen zwischen 2 und 15 μm . Da die Trenneffizienz (Kap. 18.2.2) der Säule umso höher wird, je niedriger der Teilchendurchmesser ist, strebt man die Verwendung möglichst kleiner Teilchen an. Da jedoch der Druckabfall innerhalb der Säule umso größer wird, je kleiner die Partikel sind, ist der Partikelgröße aus praktischen Gründen eine untere Grenze gesetzt, die bei der UHPLC inzwischen bei ca. 1,5 μm liegt (Kap. 20.2.5). Der Durchmesser der Teilchen sollte möglichst gleichmäßig sein, weil aus großen Schwankungen in der Korngrößenverteilung ein zu hoher Druckabfall in der Säule und eine Verschlechterung der Trenneffizienz resultiert.

Die Trenneffizienz des Systems hängt von der Partikelgröße und der Füllqualität der Säule ab

Die Handelsbezeichnungen von sphärischem Material enden häufig mit -spher, die von gebrochenem Material mit -sorb

Als Trennmaterialien sind Stoffe mit großer spezifischer Oberfläche geeignet. Man verwendet üblicherweise stark **poröse Materialien** z. B. aus Kieselgel oder Al_2O_3 , die kugelförmig (**sphärisch**) oder unregelmäßig (**gebrochen**) geformt sein können oder poröses Kieselgel, das an keramische Mikropartikel gebunden ist. Der Porendurchmesser liegt im Allgemeinen zwischen 7 und 10 nm (70–100 Å). Teilchen mit größeren Porendurchmessern, die häufig aus organischen Polymeren aufgebaut sind, besitzen bei der **Ausschlusschromatographie** (Kap. 20.3.1) Bedeutung. Wichtig für alle Teilchen ist, dass sie dem hohen Druck innerhalb der Trennsäule standhalten und sich in ihrem Gerüst nicht verändern. Die Eigenschaften der Trennmaterialien werden je nach Verwendungszweck abgewandelt. Sie können auch mit Trennflüssigkeiten beschichtet oder chemisch modifiziert werden.

Modifizierte und unmodifizierte Materialien

Chemisch modifizierte Materialien werden u. a. in der **Umkehrphasenchromatographie (reversed phase; RP)** (Kap. 20.3.1) eingesetzt. Bei

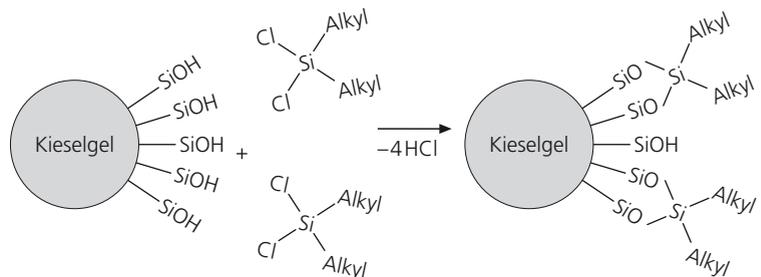


Abb. 20.4 Umsetzung von Kieselgel mit Alkylchlorosilanen

der Herstellung von RP-Teilchen wird die ursprünglich polare Oberfläche des Trägers, z. B. die Silanolgruppen des Kieselgels, durch Umsetzung mit Alkylchlorsilanen hydrophobiert (Abb. 20.4).

Die Oberfläche erhält auf diese Weise eine Bedeckung mit lipophilen Alkylgruppen, die als **Bürsten** bezeichnet werden. Folgende Alkylreste werden häufig bei der Herstellung von RP-Materialien eingeführt:

- Octylgruppen (RP-8)
- Octadecylgruppen (RP-18, ODS).

Für Trennungen an Umkehrphasen besitzt heute RP-18 Material (Octadecylsilan, ODS) die größte Bedeutung, auch im Arzneibuch wird RP-18 und RP-8 Material häufig verwendet. Darüber hinaus sind im Reagenzienteil des Arzneibuchs recht exotische RP-Materialien wie hexylsilyliertes, butylsilyliertes und phenylhexylsilyliertes Kieselgel aufgeführt, die nur selten – teilweise nur in wenigen Monographien – zur Chromatographie verwendet werden.

Ein Problem bei der Derivatisierung besteht darin, dass sich der weitaus größte Teil der umzusetzenden Silanolgruppen nicht auf der äußeren Oberfläche des Kieselgels, sondern in dessen Poren befindet und außerdem der Platzbedarf der Alkylsilylgruppen wesentlich größer ist als der von Silanolgruppen. Daraus resultiert, dass bei der beschriebenen Derivatisierung nur eine ca. 50%ige Umsetzung erfolgt. Da man jedoch in der RP-Chromatographie für die meisten Zwecke eine möglichst unpolare Oberfläche benötigt, schließt sich häufig ein weiterer Derivatisierungsschritt an, der als **Endcapping** bezeichnet wird. Bei diesem Schritt wird z. B. Trimethylchlorsilan zur Derivatisierung verwendet, das aufgrund der kleineren Molekülgröße weitere Silanolgruppen umsetzen kann. Im Arzneibuch wird derartig behandeltes Kieselgel als **nachsilyliert** bezeichnet. Der Namenszusatz **desaktiviert** bezeichnet oberflächenmodifizierte Kieselgele, die keine Wechselwirkungen mit basischen Analysesubstanzen eingehen. Derartig behandelte Sorbentien verhindern Peakasymmetrien, die bei nicht desaktivierten Materialien häufig zu beobachten sind. In jüngerer Zeit werden verstärkt monolithische HPLC-Phasen entwickelt und verwendet. Diese bestehen im Gegensatz zu partikulären Phasen aus einem monolithischen Stab, der in der HPLC-Säule durch Polymerisation erzeugt und dessen Oberfläche anschließend chemisch modifiziert wird. Monolithische Säulen zeichnen sich durch hohe Porosität aus und bieten dem Elutionsmittel nur einen geringen Druckwiderstand. Dies ermöglicht im Gegensatz zu gepackten Säulen höhere Fließmittelgeschwindigkeiten oder die Verwendung längerer Säulen bei gleichzeitig kürzeren Analysenzeiten bzw. höherer Trenneffizienz. Das Arzneibuch lässt monolithische RP-18 Säulen bisher nur in drei Monographien verwenden.

Umkehrphasen;
RP-Phasen

Phenylhexylsilyliertes Kieselgel wird im Arzneibuch nur bei der Reinheitsprüfung von Ketobemidon-HCl verwendet

Endcapping
(Nachsilylierung)

Z. B. RP-select B (Fa. Merck)

Monographien über Primidon und Noradrenalin-Salze im Arzneibuch

26 Voltammetrische Verfahren; Polarographie

26.1 Einführung in die Voltammetrie und Polarographie

Prinzip der Voltammetrie
Strom-Spannungs-Kurven

Verändert man an einer elektrolytischen Zelle die außen angelegte **Spannung** und trägt die jeweils fließende **Stromstärke gegen die Spannung** auf, so erhält man (unter bestimmten Bedingungen) **Strom-Spannungs-Kurven** wie in Abb. 22.7. Diese Strom-Spannungs-Kurven erlauben die **qualitative** und **quantitative Bestimmung** der umgesetzten Stoffe. Folgende Fälle sind zu unterscheiden:

Stationärelektrode:
voltammetrische Spitzen

■ **Voltammetrie an stationären Elektroden:**

Man erhält **spitzenförmige** Strom-Spannungs-Kurven (Abb. 22.7 unten). Die **Spitzenstromstärke** dient zur quantitativen, das **Spitzenpotential** (Abb. 26.3 links) zur qualitativen Bestimmung von Substanzen.

Quecksilbertropfelektrode:
polarographische Stufen

■ **Voltammetrie an der Quecksilbertropfelektrode (Polarographie):**

Man erhält **stufenförmige** Strom-Spannungs-Kurven (Abb. 22.7 oben). Der **Diffusionsgrenzstrom** dient zur quantitativen, das **Halbstufenpotential** (Abb. 26.7 oben) zur qualitativen Bestimmung von Substanzen.

Volt**am**metrie
Volt**am**metrie

Die Bezeichnung Volt**am**metrie (z. B. Kap. 22, Lit. 1) als Oberbegriff für diese Verfahren ist eine Kurzbeschreibung des Messprinzips: **Volt-Ampero-Metrie**. Es muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass der Begriff Volt**am**metrie für andere, noch zu behandelnde Methoden verwendet wird (vgl. Kap. 27).

Strom-Spannungs-Kurven

Diffusionsgrenzstrom und
Spitzenstrom:
konzentrationsproportional

Wie in der allgemeinen Einführung in die Elektrochemie (vgl. Kap. 22.4.3) erörtert wurde, führt die Steigerung der Zellspannung nicht mehr zu einer Steigerung der **Stromstärke**, sobald die Geschwindigkeit der zur Elektrode diffundierenden Teilchen ihr Maximum erreicht, so dass die Zahl der pro Zeiteinheit ankommenden und elektrochemisch umgesetzten Teilchen begrenzt wird. An Quecksilbertropfelektroden bildet sich ein **Diffusionsgrenzstrom** aus (Abb. 22.7 oben). Dieser ist der **Lösungskonzentration** der umgesetzten Teilchen **proportional**. Auch der bei ruhender Lösung erhaltene **Spitzenstrom** (vgl. Abb. 26.3 unten) der **Stromspitze** erweist sich als proportional zur Konzentration der Lösung.

Die in Abb. 22.7 oben definierte **Zersetzungsspannung** ist aufgrund ihrer Konzentrationsabhängigkeit zur Identifizierung von Stoffen ungeeignet. Jene Zellspannung, bei der die Zellstromstärke die **Halbte des Diffusionsgrenzstromes** beträgt, ist jedoch unabhängig von der Konzentration. Dieses **Halbstufenpotential** (vgl. Abb. 26.2, links) kann zur Identifizierung der umgesetzten Teilchen dienen. Ähnlich ist auch das **Spitzenpotential** der Strom-Spannungs-Kurve in ruhender Lösung (vgl. Abb. 26.3) nicht von der Konzentration, sondern von der Art der umgesetzten Teilchen abhängig. Kommerzielle Geräte zur Aufnahme von Strom-Spannungs-Kurven erzeugen im Allgemeinen einen **Spannungsvorschub** (linear scan) zum Abfahren des interessierenden Spannungsbereiches und registrieren den dabei fließenden Strom in Form der Strom-Spannungs-Kurve.

Halbstufenpotential und Spitzenpotential: konzentrationsunabhängig

Quecksilbertropfelektrode, Polarographie

Erst die von J. Heyrovsky 1922/23 entwickelte **Quecksilbertropfelektrode** ergab reproduzierbare stufenförmige Strom-Spannungs-Kurven. Heyrovsky nannte das Verfahren **Polarographie**. **Die Polarographie stellt damit einen Spezialfall der Voltammetrie mit Tropfelektrode dar.**

Abbildung 26.1 zeigt die prinzipielle Anordnung zur Polarographie und die Funktion der Tropfelektrode. Sie besteht aus einer **Glas-kapillare** von 12 bis 15 cm Länge und ca. 0,05 mm Innendurchmesser, die über einen Schlauch mit einem **Hg-Vorratsgefäß** verbunden ist.

Bedeutung der Quecksilbertropfelektrode
Polarographie:
Spezialfall der Voltammetrie

Prinzip der Geräte zur Aufnahme von Strom-Spannungs-Kurven

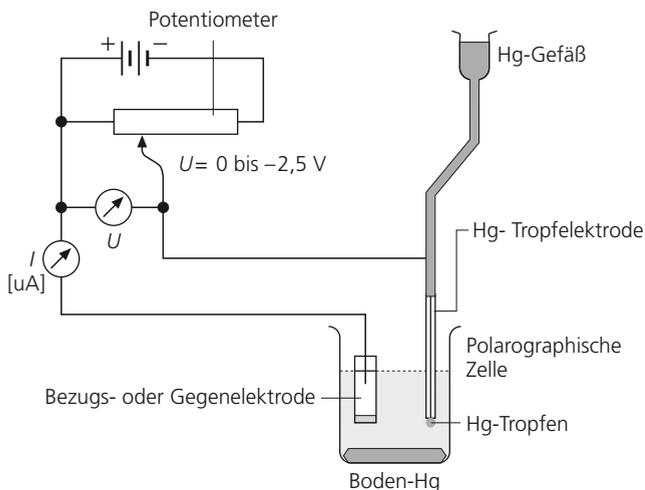


Abb. 26.1 Prinzipielle polarographische Anordnung mit Tropfelektrode. U Spannung der Tropfelektrode gegen Bezugs- oder Gegenelektrode, I Zellstromstärke

Aufbau der Quecksilbertropfelektrode Infolge des Quecksilberdruckes wachsen am Kapillarende Quecksilbertropfen heran, die etwa alle 3 Sekunden abtropfen. Der Vorteil der Tropfelektrode ist die ständige, reproduzierbare Erneuerung der Quecksilbertropfen und damit der Elektrodenoberfläche. Der besondere Mechanismus von Oberflächenwachstum und Wanderung der Teilchen zu dieser Oberfläche sowie die Homogenisierung der Lösung beim Abfallen des Tropfens führen zu den stufenförmigen Strom-Spannungs-Kurven (**polarographische Stufen**, vgl. z.B. Abb. 26.2 links).

Vorteil der Quecksilbertropfelektrode

Entstehung der Stufen

Bedeutung der Mikroarbeitselektroden

Polarographie und Voltammetrie arbeiten mit **Mikroarbeitselektroden**, d.h. mit Elektroden kleiner Oberfläche. Diese bieten den Vorteil, dass der Stoffumsatz während der Bestimmung, gemessen am Gesamtgehalt der Lösung, gering bleibt und die Aufnahme von **Polarogrammen** einer Probelösung nahezu beliebig oft wiederholt werden kann. 1959 erhielt J. Heyrovsky für seine Arbeiten den Nobelpreis.

Kapazitiver Ladestrom

Störend: kapazitive Ladeströme Die Quecksilbertropfelektrode bringt einen Nachteil mit sich: Der Oberflächenzuwachs des Tropfens muss wie ein wachsender Kondensator (vgl. Abb. 22.11, Ersatzschaltbild der elektrolytischen Zelle) auf die anliegende Zellspannung aufgeladen werden. Es fließt ein **kapazitiver Ladestrom**. Ein solcher Ladestrom tritt auch dann auf, wenn die Spannung geändert wird. Der kapazitive Ladestrom („**Grundstrom**“) überlagert sich dem Messsignal („**Faraday'scher Strom**“) und schränkt damit die Bestimmungsgrenze der Voltammetrie ein. Es hat deshalb nicht an Versuchen gefehlt, das Verhältnis von Ladestrom zu Faraday'schem Strom zugunsten des Faraday'schen Stromes zu verbessern.

Folgende Verfahren können genannt werden:

- Methoden zur Verbesserung der Bestimmungsgrenzen: Tastpolarographie, Derivatpolarographie
- Ladestromkompensation
- Pulspolarographie
- **Tastpolarographie:** Die Strommessung erfolgt nur in einem Zeitintervall am Tropfenende weil dort das relative Oberflächenwachstum und damit der Ladestrom am kleinsten sind.
 - **Derivatverfahren:** Durch Ableitungsbildung werden lineare Anstiege des Grundstromes mathematisch beseitigt.
 - **Ladestromkompensation:** Ein dem linearen Ladestromanteil entgegengesetzter Anstieg wird elektronisch erzeugt und addiert. Die nichtlinearen Ladestromanteile bleiben dabei jedoch unkompensiert.
 - **Pulsverfahren:** Bei Anlegen eines Spannungsimpulses klingt der resultierende Ladestrom schneller ab als der Faraday'sche Strom. Die Pulsverfahren messen deshalb den Strom gegen Ende des angelegten Impulses. Im Falle der **Pulspolarographie** werden die Pulse erst gegen Ende des Tropfenlebens angelegt.
 - **Inverse Voltammetrie:** Eine Verbesserung des Verhältnisses von Grundstrom und Faraday'schem Strom kann auch durch eine An-

reicherung erzielt werden. Durch Wahl einer bestimmten Spannung lässt man dem eigentlichen Bestimmungsvorgang eine **Elektrolyse**, z. B. die Abscheidung eines Metalles an einer stationären Arbeitselektrode vorausgehen. Nach Beendigung der Elektrolyse wird dann durch umgekehrten (inversen) Spannungsvorschub der **Auflösungsstrom** der vorher angereicherten Substanz gemessen.

Inverse Voltammetrie

Anwendungsbereich der Voltammetrie bzw. Polarographie

Der Anwendungsbereich der Voltammetrie ist sehr umfangreich, da viele **Elemente in Oxidationsstufen** vorkommen, die einer elektrochemischen Umsetzung zugänglich sind. Gleiches gilt für **organische Verbindungen**, deren **funktionelle Gruppen** elektrochemisch aktiv sind. Es ist hervorzuheben, dass auch **neutrale Moleküle** an Elektroden umgesetzt werden können. Da die Voltammetrie **qualitative und quantitative Daten** liefert, sind sowohl **Identitäts-, Reinheits- als auch Gehaltsbestimmungen** möglich.

Viele **Arzneistoffe** wurden polarographisch bzw. voltammetrisch untersucht (vgl. Kap. 26.4). Das Arzneibuch lässt im Gegensatz zu anderen Pharmakopöen (z. B. USP) polarographische Methoden nicht verwenden. Die voltammetrischen Verfahren bilden jedoch die Grundlage anderer im Arzneibuch vorgeschriebener elektrometrischer Indizierungsverfahren.

Die **Bestimmungsgrenze** der voltammetrischen Verfahren reicht von etwa $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bei der einfachen **Gleichspannungspolarographie** über ca. $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bei den pulspolarographischen und komplexen Wechselspannungsverfahren (vgl. Kap. 26.5) bis etwa $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ bei der **inversen Voltammetrie**. Zur Durchführung der Bestimmungen genügen wenige Milliliter Lösung. **Puls- und komplexe Wechselspannungsverfahren** (s. Kap. 26.5.3) übertreffen in vielen Fällen die Nachweisgrenzen der Atomabsorptionsspektroskopie (vgl. Kap. 9), beträchtlich. Die Methoden ergänzen sich im Anwendungsbereich gegenseitig. Die **Unsicherheit der Bestimmungen** kann mit 1 bis 3% angegeben werden, soweit sie, wie bei anderen Verfahren, nicht von Konzentrationsverhältnissen und vom Untergrund eingeschränkt wird. Der Einsatz voltammetrischer Detektoren in der HPLC verbindet die hohe Trennleistung dieser Methoden und die niedrigen Nachweisgrenzen der Voltammetrie.

Welche Stoffe sind grundsätzlich durch Voltammetrie bestimmbar?

Voltammetrie in der Pharmazie, Arzneibücher

Bestimmungsgrenzen voltammetrischer Verfahren

Voltammetrische Detektoren in der HPLC