

10.3/2.02.24.00

2.2.24 IR-Spektroskopie

Abgesehen von ihrem Titel „IR-Spektroskopie“ wurde die Monographie zur Spektroskopie im mittleren Infrarot (IR) mit der Ph. Eur. 10.0 vollständig aktualisiert. Während in der USP für mittlere IR-Spektroskopie neben der traditionellen Bezeichnung IR auch *Mid-infrared* (mid-IR; 854 Mid-Infrared Spectroscopy) verwendet wird, verzichtet die Ph. Eur. in der vorliegenden Monographie weiter auf eine sprachlich übersichtlichere Nebeneinanderstellung von IR-Spektroskopie im nahen (**2.2.40 NIR-Spektroskopie**, Ph. Eur.) und mittleren IR-Bereich.

Im Vergleich zum englischen Titel der Monographie „Absorption Spectrophotometry, Infrared“, der auf eine Analogie zum Titel der Monographie **2.2.25 UV-Vis-Spektroskopie** (Ph. Eur.), die im Englischen „*Absorption Spectrophotometry, Ultra-violet and Visible*“ heißt, abzielt, ist der deutsche Name der Monographie jedoch wesentlich zutreffender und an den bisherigen Sprachgebrauch in der pharmazeutischen Analytik besser angepasst. Für Übersichten zu Theorie und Praxis der IR-Spektroskopie siehe Lit.^{1, 2)}.

Prinzip

Entsprechend den Ausführungen zu den physikalischen Grundlagen der Molekülspektroskopie in **2.2.21 Fluorimetrie** und **2.2.25 UV-Vis-Spektroskopie** (beide Ph. Eur.) geben die IR-Spektren von flüssigen oder festen Stoffen ein Bild der inneren Molekülschwingungen.

Wie im Kommentar zu **2.2.25** (Ph. Eur.) in Abb. 2 angedeutet wird, ist die Energiedifferenz zwischen den einzelnen Vibrationsniveaus jedoch bedeutend geringer als bei den Elektronenspektren, sodass bereits Quanten kurzwelliger Infrarotstrahlung (λ ca. 1 bis 50 μm) eine Änderung der Molekülschwingungen auslösen können (siehe im Kommentar zu **2.2.25**, Ph. Eur., die Abb. 3). Die zugehörigen Absorptionsbanden zeigen nur bei Gasen eine Feinstruktur, die durch gleichzeitig erfolgen-

de Rotationsübergänge verursacht wird, denn bei Festsubstanzen und Flüssigkeiten ist die Rotation der Moleküle im Kristallgitter oder Flüssigkeitsverband stark behindert.

Die Entstehung der Schwingungsspektren und ihre Beziehung zur Molekülstruktur lässt sich am einfachsten an einem zweiatomigen Molekül zeigen. Die hierin durch eine kovalente Bindung verknüpften und entlang dieser schwingenden Atome mit der Masse m_1 und m_2 stellen in erster Näherung einen harmonischen Oszillator dar. Diese grobe Analogie wird größer, wenn eines der Atome im Verhältnis zum anderen eine sehr große Masse hat und so quasi den Fixpunkt einer mechanisch befestigten Feder darstellt. Werden sie durch Anregung von außen um den Betrag x aus ihrer Ruhelage entfernt, so tritt eine rücktreibende Kraft von der Größe F auf (Hooke'sches Gesetz).

$$F = -k \cdot x \quad (1)$$

Hieraus ergibt sich unter Berücksichtigung des Newton'schen Gesetzes $F = m \cdot a$ (m = Masse, a = Beschleunigung) für die Schwingungsfrequenz ν dieses harmonischen Oszillators:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2)$$

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (3)$$

Dabei wird μ als reduzierte Masse der beiden Atome und der Proportionalitätsfaktor k als Kraftkonstante bezeichnet. Letztere gilt als wichtige physikalische Kenngröße der betreffenden Bindung.

Der molekulare anharmonische Oszillator kann im Gegensatz zum klassischen mechanischen Oszillator nicht jede beliebige Energie aufnehmen, sondern nur diskrete Energiebeträge (siehe im Kommentar zu **2.2.25**, Ph. Eur., die Abb. 2). Diese Tatsache führt zur Quantelung der Schwingungsbewegung, für die nur folgende Energiezustände E_S möglich sind:

$$E_S = h \cdot \nu \left(n + \frac{1}{2}\right) = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \left(n + \frac{1}{2}\right) \quad (4)$$

Die Schwingungsquantenzahl n kann dabei die Werte 0, 1, 2, 3 ... annehmen. Bei Raumtemperatur liegt das Molekül im Schwingungsgrundzu-

stand ($n = 0$) vor, während IR-Strahlungsquanten passender Energie einen Übergang in höhere Schwingungszustände anregen können, wenn sich dabei gleichzeitig das Dipolmoment ändert. Die in der Regel beobachteten Banden im IR-Spektrum von Flüssigkeiten und Festsubstanzen entsprechen der sog. Grundschiwingung, d.h. dem Übergang $n = 0 \rightarrow n = 1$. Höhere Schwingungen (z.B. 1. Oberschiwingung $n = 0 \rightarrow n = 2$) spielen hauptsächlich in der NIR-Spektroskopie im Wellenlängenbereich von 0,8 bis 2,5 μm (siehe 2.2.40, Ph. Eur.) eine Rolle.

Die im zweiten Absatz der Monographie gemachte Aussage zur Einteilung der IR-Strahlung in die drei Unterregionen nahes, mittleres und fernes Infrarot ist erklärungsbedürftig. Die Übersetzung des Originaltexts „*wavelength ranges that are generally accepted by convention*“ mit „*Unterregionen haben allgemein anerkannt festgelegte Wellenlängenbereiche*“ ist nicht inhaltsgleich. Der Originaltext zielt darauf ab, dass mangels scharfer physikalischer Abgrenzungen Konventionen zur Unterteilung herangezogen werden, die in verschiedenen Normen auch unterschiedlich sein können (z.B. DIN 5031 definiert mittleres IR abweichend von der Ph. Eur. als Strahlung der Wellenlängen von 3 bis 50 μm), während die amtliche Übersetzung suggeriert, dass solche Unterschiede eben nicht bestehen würden.

Anwendungen

Die IR-Spektroskopie im mittleren IR ist nach wie vor in den meisten Monographien organischer Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung als Prüfung auf Identität aufgeführt; immer häufiger stellt diese sogar die alleinige Identitätsprüfung dar. Für Ausgangsstoffprüfungen, bei denen eine Eingangsvermutung bestätigt werden soll, ist in der Regel der Spektrenvergleich mit Spektren von CRS (oder von diesen unter den in 5.12, Ph. Eur., beschriebenen Bedingungen abgeleiteten Sekundärstandards) vorgesehen. Bei hoher Übereinstimmung der unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Spektren kann die Identität auf diese Weise rasch und mit hoher Aussagekraft bewertet werden. Die Identifizierung unbekannter Proben, die in der Ph. Eur. nicht beschrieben ist, erfordert aus praktischen Gründen eine Spektrensammlung. Zwar können auch ohne Spektrenvergleich aus

dem IR-Spektrum umfangreiche Informationen zum Molekülbau abgeleitet werden, aber ohne Referenzsubstanz oder Referenzspektrum ist eine Feststellung der Identität normalerweise nicht möglich. Um Strukturinformationen aus Spektren zu erhalten, werden die Banden von Normalschwingungen, Gruppenfrequenzen und der sog. Fingerprint-Bereich herangezogen.

Normalschwingungen: Ein zweiatomiges Molekül zeichnet sich durch eine charakteristische IR-Bande der Grundschiwingung aus, deren Frequenz nach Gl. (2) von der Art der Bindung und der Masse der schwingenden Atome abhängig ist³). Bei mehratomigen Molekülen sind die verschiedenen Atome an mehreren Schwingungen gleichzeitig beteiligt. Die theoretische Betrachtung zeigt, dass einem N-atomigen, nichtlinearen Molekül, wie dies bei organischen Substanzen zur pharmazeutischen Verwendung die Regel ist, noch $3N - 6$ Freiheitsgrade für atomschwingungen zur Verfügung stehen. Dies resultiert aus den drei Koordinaten x , y , z für die Beschreibung der Position eines Atoms im Raum (Faktor 3), der Anzahl der Atome im Molekül N abzüglich von je drei Freiheitsgraden für die Rotation und die Translation, da diese das Molekül als Ganzes betreffen und auf die Anzahl der inneren Schwingungen der Atome gegeneinander keinen Einfluss haben. Anders ausgedrückt kann das N-atomige Molekül insgesamt $3N - 6$ „Normalschwingungen“ ausführen. Für eine einfache organische Substanz wie Benzen (C_6H_6) sind das schon $3 \cdot 12 - 6 = 30$ Normalschwingungen; allerdings sind davon einige IR-inaktiv, d.h. sie treten nicht im IR-Spektrum auf, weil die zugehörige Bewegung der Atome nicht zu einer Änderung des Dipolmomentes führt. Letzteres ist eine notwendige Voraussetzung für eine Absorption der IR-Strahlung. Da zu den Normalschwingungen noch einige Oberschwingungen hinzukommen und Absorptionsbanden ähnlicher Strukturelemente sich gegenseitig überlagern, ist die vollständige Analyse der IR-Spektren selbst mäßig komplizierter Moleküle schwierig oder gar unmöglich.

Gruppenfrequenzen, Fingerprint-Bereich: Bei jeder Normalschwingung bewegen sich sämtliche Atome in einem gewissen Ausmaß. Dennoch gibt es Vibrationen, bei denen diese Bewegung sich bevorzugt in bestimmten Bindungen manifestiert, während die restlichen Atome kaum eine Verschiebung aus ihrer Gleichgewichtslage erfahren.

Diese empirische Beobachtung führt zu einer ersten Unterteilung der Normalschwingungen in Gruppenfrequenzen, die bestimmten Bindungstypen oder funktionellen Gruppen zugeordnet werden können und Gerüst- oder Molekülschwingungen, an denen alle Atome der Moleküle beteiligt sind.

Entsprechend lässt sich auch eine grobe Unterteilung des am häufigsten gebrauchten „mittleren“ IR-Wellenzahlenbereiches von 4000 bis 667 cm^{-1} ($\lambda = 2,5$ bis 15 μm) vornehmen. Das Gebiet der Gerüstschwingungen umfasst vornehmlich den Wellenzahlenbereich von etwa 1500 bis 1000 cm^{-1} . Die hier auftretenden Absorptionsbanden sind so zahlreich, dass eine exakte empirische Zuordnung zu einer bestimmten Schwingungsbewegung des Moleküls sehr schwierig oder unmöglich ist. Dennoch ist dieser Bereich zur Charakterisierung und Identifizierung einer Substanz äußerst nützlich, da hier durch die Vielzahl der Banden ihr unverwech-

selbarer „Fingerabdruck“ niedergelegt ist. Aus diesem Grund nennt man den genannten Bereich auch Fingerprint-Bereich eines IR-Spektrums.

Die im Wellenzahlenbereich oberhalb von etwa 1500 cm^{-1} auftretenden Vibrationen kann man als weitgehend lokalisierte ungekoppelte Normalschwingungen betrachten. Sie lassen sich bestimmten Bindungen oder Atomgruppierungen zuordnen, unabhängig von der restlichen Molekülstruktur. Deshalb ist es mit Hilfe des IR-Spektrums möglich, Aussagen über das Vorkommen von Bindungstypen und von funktionellen Gruppen innerhalb einer fraglichen Substanz zu machen.

Die empirisch zugeordneten Gruppenfrequenzen findet man in ausführlichen Tabellenwerken der IR-Handbücher zusammengestellt^{4,5}. Eine orientierende Übersicht geben Tab. 1 und Abb. 1.

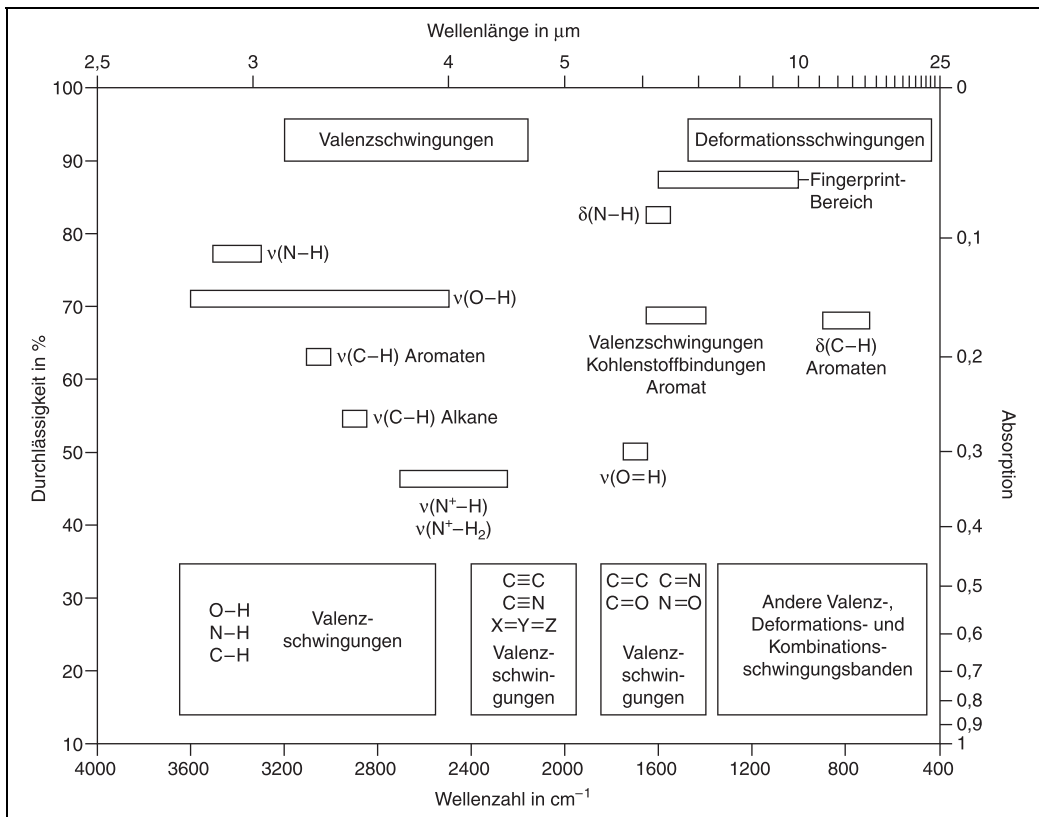


Abb. 1: Lage wichtiger Gruppenfrequenzen im IR-Spektrum

Tab. 1: Übersicht über charakteristische IR-Absorptionsbanden wichtiger Bindungstypen und funktioneller Gruppen

Bindungstyp/ funktionelle Gruppe	Verbindung	Wellenzahlen- bereich (cm ⁻¹)	Bemerkungen
C–H	Alkane	2850–2960	C–H-Valenzschwingung
		um 2500	CH ₃ -, C ₂ H ₅ -Substituenten an N ⁺
		1350–1470	C–H-Deformationsschwingung
		1430–1470	CH ₂ -Gruppe; C–H-Deformationsschwingung
		1375	CH ₃ -Gruppe; symmetrische C–H-Deformationsschwingung (Öffnen und Schließen des CH ₃ -„Schirmes“)
C–H	Alkene	3020–3080	C–H-Valenzschwingung
	– disubstituiert, <i>cis</i>	675–730	C–H-Deformationsschwingung
	– disubstituiert, <i>trans</i>	960–970	C–H-Deformationsschwingung
	– disubstituiert, <i>gem</i>	885–895	C–H-Deformationsschwingung
C–H	Aromatische Ringe	3000–3100	C–H-Valenzschwingung
C–H	Alkine	3300	C–H-Valenzschwingung
C–C	<i>gem</i> -Methylgruppen	1370–1385	Dublett der C–C-Deformationsschwingung
C=C	Alkene	1640–1680	Wenn symmetrisch substituiert, IR-inaktiv; Lage abhängig von der Konjugation
C=C	Alkine	2150–2260	
C=C ↔ C–C=	Aromatische Ringe	1450–1600	vier (einzelne von ihnen oft verdeckt, deshalb sehr häufig nur zwei) Banden; sehr charakteristisch
C–O	Alkohole, Ether, Carbonsäuren, Ester	1080–1300	genaue Lage von der Struktur der betreffenden Verbindung abhängig
C=O	Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren, Ester	1690–1760	genaue Lage der Carbonylbande von Substituenten abhängig; als Bestandteil mesomerer Systeme eher bei kleineren Wellenzahlen
O–H	Alkohole, Phenole (nicht assoziiert)	3590–3640	O–H-Valenzschwingungen
	Alkohole, Phenole mit H-Brücken	3200–3600	intermolekulare H-Brücken: Lage der O–H-Bande ist konzentrationsabhängig; intramolekulare H-Brücken: Lage der O–H-Bande ist nicht konzentrationsabhängig
O–H	Carbonsäuren (assoziiert)	2500–3000	Bande ebenso wie bei Alkoholen und Phenolen sehr breit
N–H	Amine	3300–3500	N–H-Valenzschwingung
		1550–1650	N–H-Deformationsschwingung
C–N	Amine	1180–1360	C–N-Valenzschwingung
C≡N	Nitrile	2210–2260	schmale, teils intensive Bande in einem ansonsten eher bandenarmen Bereich
NO ₂	Nitroverbindungen	1515–1560	asymmetrische und symmetrische
		1345–1385	NO-Valenzschwingung
C–Cl	Halogenide	600–800	C–Cl-Valenzschwingung

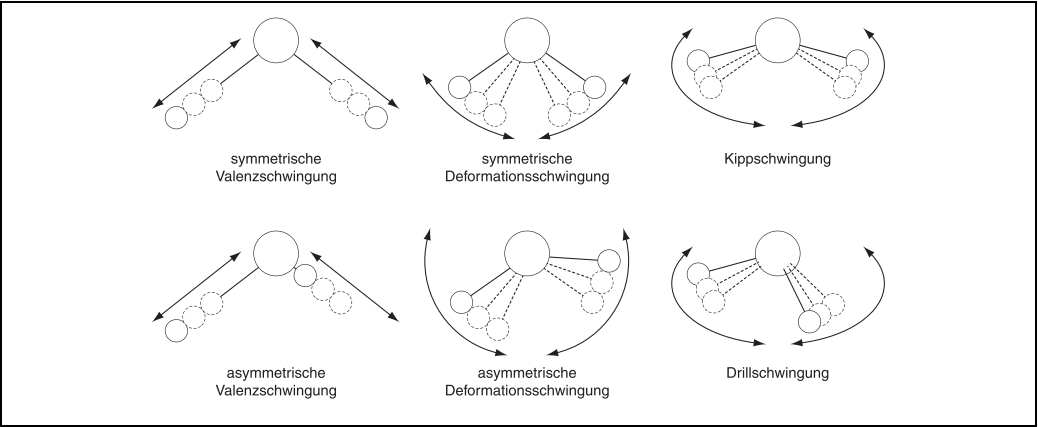


Abb. 2: Die wichtigsten Schwingungsarten der IR-Spektroskopie

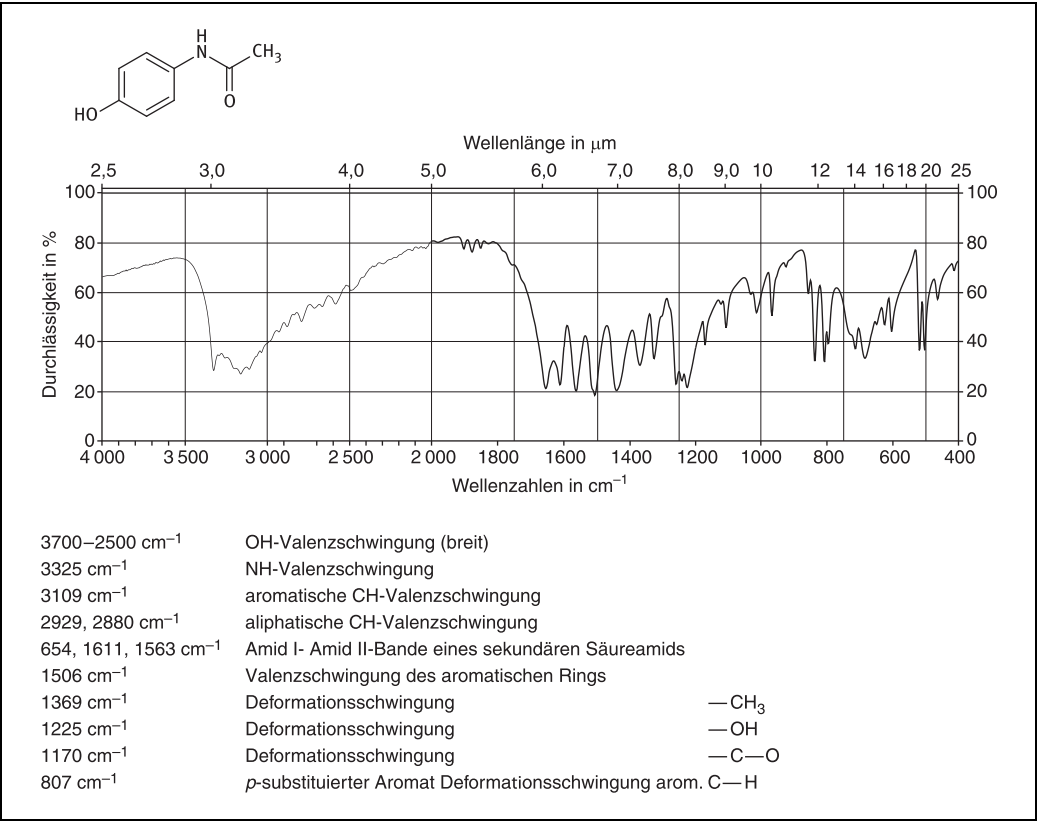


Abb. 3: IR-Spektrum von Paracetamol in KBr (1 mg in 300 mg)

Ausgehend vom Studium einfacher Moleküle wie Wasser lassen sich auch die Gruppenfrequenzen bestimmten Schwingungsbewegungen der daran beteiligten Atome zuordnen. Bei dem aus nur drei Atomen aufgebauten Molekül H_2O führen allerdings nicht alle Schwingungsbewegungen zu einer Änderung der beobachteten Absorption. Dabei unterscheidet man prinzipiell zwei Arten (Abb. 2):

1. Valenz- oder Streckschwingungen: Die Atome bewegen sich gleichzeitig (symmetrisch, ν_s) oder alternierend (asymmetrisch, ν_{as}) entlang der Bindung.
2. Deformationsschwingungen: Die Bindungswinkel werden durch die Bewegung deformiert.

Als Beispiel für den Informationswert eines IR-Spektrums gibt Abb. 3 das Spektrum des Paracetamols mit einer Interpretation seiner wichtigsten Banden wieder.

Neben der Bestätigung der vermuteten Identität und der Ableitung von Strukturinformationen unbekannter Moleküle kann die IR-Spektroskopie auch zur Untersuchung quantitativer Fragestellungen eingesetzt werden. Wegen der zur UV-Vis-Spektroskopie vergleichsweise kleineren molaren Absorptionskoeffizienten sind Empfindlichkeit und Genauigkeit quantitativer Bestimmungen deutlich geringer, sodass die Spektroskopie im mittleren IR-Bereich für Reinheitsprüfungen nur in besonderen Fällen Anwendung findet (s.u.). Dagegen lassen sich beispielsweise unterschiedlich konzentrierte Lösungen von Saccharose in Wasser nicht nur unterscheiden, sondern durch Erstellen einer Kalibriergeraden der Gehalt abschätzen oder überprüfen (siehe den Abschnitt „Methoden, Modus der abgeschwächten Total-Reflexion“). Wegen der Verfügbarkeit anderer leistungsfähiger Verfahren sind solche quantitativen oder halbquantitativen Verfahren aber keine Hauptanwendung der IR-Spektroskopie so wie es der Einsatz bei der Prüfung auf Identität zweifellos ist.

Im Kontext der *Process Analytical Technology* (PAT) spielen schwingungsspektroskopische Verfahren eine große Rolle. Während NIR-Spektrometer so klein und kostengünstig hergestellt werden können, dass sie in einem Mischer die sich ändernden Spektren bei jeder Rotation aufnehmen und übertragen, ist der apparative Aufwand für insbesondere FTIR-Geräte (siehe unter „Ausstattung“) höher, sodass z.B. ein Einbau in Rohrlei-

tungen nicht üblich ist. Trotzdem können durch Überwachung von Prozessparametern mittels IR-Spektroskopie chemische oder physikalische Vorgänge (wie Umwandlungen von Kristallformen) kontrolliert werden.

Chemische Analyse

Neben Arznei- und Hilfsstoffen, die typischerweise als Haufwerke von kristallinen Feststoffen auftreten, können auch daraus hergestellte Arzneiformen untersucht werden, auch wenn die Raman-Spektroskopie z.B. bei der Charakterisierung von Schmelzextrudaten oder Hartgelatine-Steckkapseln häufiger eingesetzt wird. Für die Analyse von Verpackungsmaterialien ist die IR-Spektroskopie sehr gut geeignet, insbesondere können transparente Kunststofffolien im Transmissionsmodus charakterisiert werden, wobei Interferenzerscheinungen auftreten, die sogar zur Ermittlung der Schichtdicke eingesetzt werden können. Nicht transparente Dichtungsmaterialien wie Deckeldichtungen können mittels ATR-Technik analysiert werden. Die Grenze der Messbarkeit ist bei schwarzen Kunststoffen erreicht, bei denen eine zu hohe Absorption der IR-Strahlung auftritt, wenn diese auch mit einem Germanium-ATR-Kristall nicht mehr untersucht werden können.

Ein weiteres Einsatzgebiet der IR-Spektroskopie ist die Qualitätsbeurteilung von zugekauften Wirk- und Hilfsstoffen, Packmitteln, Hilfsmaterialien etc. Spektrenvergleiche unterschiedlicher Chargen oder von Proben mehrerer Lieferanten können zur Prüfung von Ausgangsmaterialien auf Einhaltung festgelegter Toleranzen ihrer Eigenschaften beitragen. Der Begriff Qualifizierung von Ausgangsstoffen wurde hier nicht verwendet, da dies über die in den Monographien festgelegten Eigenschaften hinausgeht. In diesem Kontext können aber z.B. unterschiedliche Kristalleigenschaften überwacht oder Variation in den Eigenschaften von Verpackungsmaterial beurteilt und somit begrenzt werden.

Die Quantifizierung von Wirkstoffen in Wasser oder wasserhaltigen Probenmatrices stellt bei Verwendung von Transmissionsgeräten hohe Anforderungen an die Probenvorbereitung und -präsentation, weil üblicherweise wasserempfindliche Alkalihalogenidfenster oder -Presslinge verwendet werden. Wasserunlösliche Zinkselenid-Fenster wä-

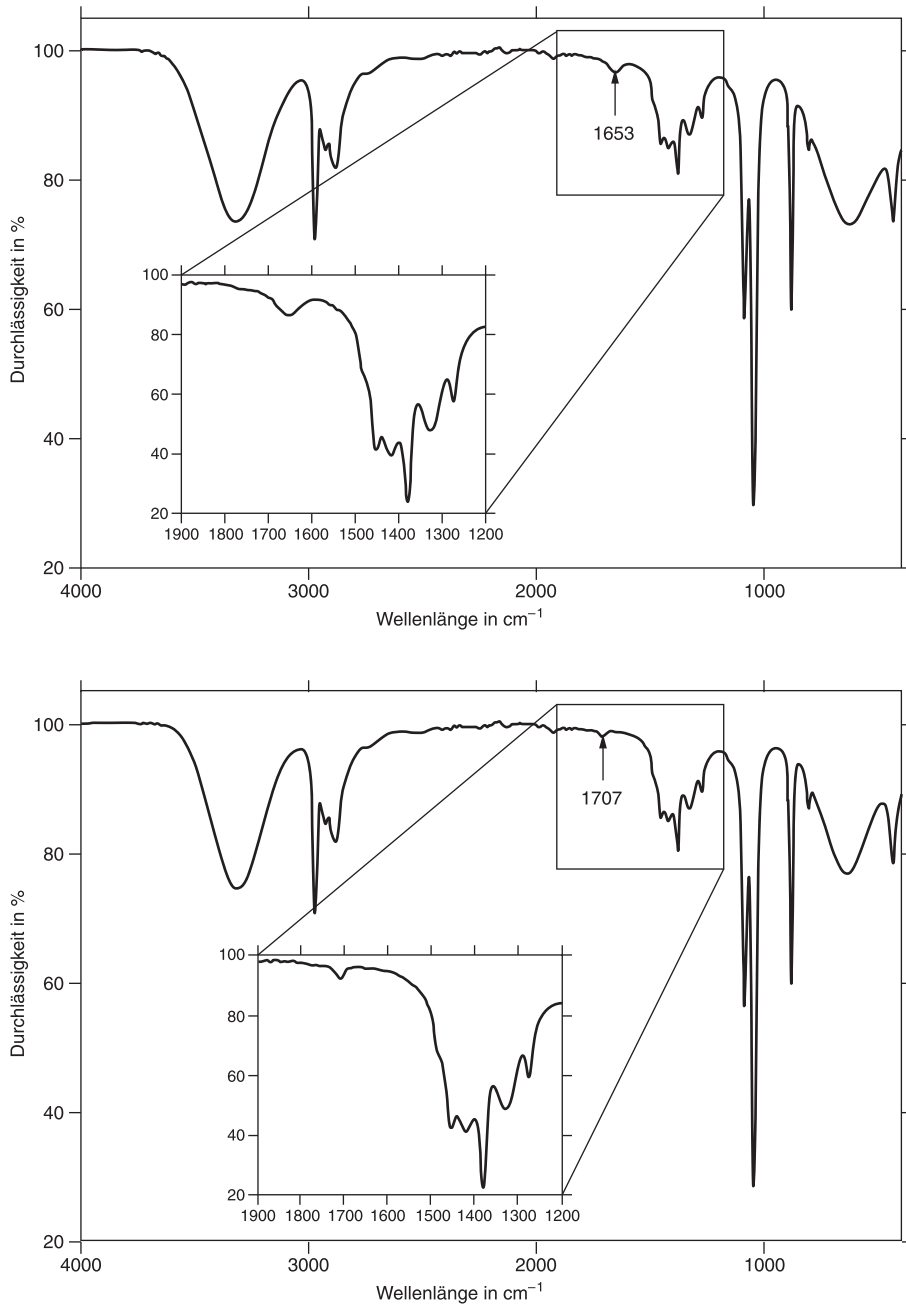


Abb. 4: Diamant-ATR-Spektren von nach Anbruch der Flasche durch Stehenlassen an der Luft mit Wasser verunreinigtem, absolutiertem, unvergältem (oben) oder mit 1 % Butanon vergältem Ethanol (unten); jeweils 128 Messungen gemittelt

ren eine praktische Abhilfe. Durch die weite Verbreitung von wasserkompatiblen ATR-Kristallen können wasserhaltige Proben im ATR-Modus aber ohne zusätzliche Maßnahmen untersucht werden. Zinkselenid-Kristalle sind in extremen pH-Bereichen nicht stabil (im Säuren wird sehr giftiges Selenwasserstoffgas freigesetzt) und dürfen nur zwischen pH 5 und 9 verwendet werden. Dagegen sind die verbreiteten Diamant-IRE (s. u.) selbst bei pH 1 oder 14 inert. Dadurch hat sich das Einsatzgebiet der IR-Spektroskopie hier in der Praxis deutlich erweitert. Tatsächlich kann der Wassergehalt in Ethanol (siehe Abb. 4, Wasserbande bei 1653 cm^{-1}), Vergällung mit Butanon (siehe Abb. 4, Carbonylabsorption von Butanon bei 1707 cm^{-1}) oder der Lösungsmittelgehalt von Proben untersucht werden, auch wenn die IR-Spektroskopie wie ausgeführt keine Spurenmethode ist (siehe im Abschnitt „Einschränkungen“) und für solche bisher nicht etablierten Anwendungen wie im NIR-Bereich chemometrische Verfahren für die quantitative Auswertung (s. u.) erforderlich sein können.

Für das Reaktionsmonitoring chemischer Synthesen werden Fasersonden angeboten, die eine kontinuierliche Spektrenaufnahme ohne wiederholte Probennahme in einem Temperaturbereich von -80 bis 180°C ermöglichen. Anders als in der NIR-Spektroskopie sind preisgünstige flexible Quarzglasfasersonden für die Prozessüberwachung kaum geeignet, weil sie im langwelligeren Bereich zu einer starken IR-Absorption führen. Marktübliche faseroptische Sonden für In-situ-IR-Messungen bestehen z. B. aus Silberhalogenid-Fasern die teuer und nicht bruchfest sind. Im Vergleich zum Einsatz von Quarzglas im NIR-Bereich ist die Dämpfung der mittleren IR-Strahlung durch AgCl selbst im nutzbaren Wellenzahlenbereich (600 bis 3000 cm^{-1}) hoch. Neben Faseroptiksonden sind deshalb auch starre Hohlleiter-Sonden mit relativ großem Durchmesser verfügbar. Sie leiten IR-Strahlung vom Spektrometer zum ATR-Kristall und wieder zurück und zeigen fast keine spektrale Abhängigkeit der Transmission⁶⁾. Alternativ sind Durchflusszellen erhältlich, die allerdings nur in einem engen Temperaturbereich verwendbar sind.

Zur Quantifizierung von Verunreinigungen in Gasen und anorganischen Materialien sei beispielhaft auf die Monographie **Sauerstoff 93 %** (Ph. Eur.) verwiesen. Dort ist aufgeführt, dass die Abwesenheit unzulässiger Anteile sowohl von CO_2 als auch

von CO mittels IR-Analysatoren untersucht werden können (siehe **2.5.24** und **2.5.25**, beide Ph. Eur.). Auch der Wassergehalt in Gasen könnte mittels IR-Spektroskopie kontrolliert werden, das wird in der Monographie aber nicht ausdrücklich vorgeschlagen (siehe unter „Verunreinigungen in Gasen“).

Physikalische Analyse

Wie die NIR-Spektroskopie ist die IR-Spektroskopie im mittleren IR dadurch gekennzeichnet, dass neben chemischen auch physikalische Einflussgrößen zu Veränderungen im gemessenen Spektrum führen. Häufig wird in Monographien deshalb darauf hingewiesen, dass Unterschiede zwischen den Spektren einer zu identifizierenden Probe und der entsprechenden CRS auf abweichenden Kristallformen beruhen könnten. Gekennzeichnet wird das durch den lapidaren Hinweis: „*It shows polymorphism*“. Ein historisch wichtiges Beispiel sind die nadel- oder plättchenförmigen Kristalle des Ranitidinhydrochlorids. Abweichend vom sehr ähnlichen Spektrum der Form 1 (Plättchen) weist das Spektrum der Form 2 (Nadeln) im Fingerprint-Bereich eine zusätzliche scharfe Bande bei 1045 cm^{-1} auf, die Spektren sind nicht identisch⁷⁾. Nach Auflösen beider Kristallformen in Methanol und Abdampfen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom werden amorphe Rückstände erhalten (siehe unter „Durchführung, Eindampfte Lösung“). Die amorphen Proben können wie im Fall von **Ranitidinhydrochlorid** (Ph. Eur.) empfohlen mit Paraffin verrieben und erneut untersucht werden; sie ergeben dann jeweils identische Spektren, weil die physikalischen Unterschiede nicht mehr bestehen. Nicht immer wird angegeben, wie die Spektren der amorphen Rückstände aufgenommen werden sollen (z. B. die Rückstände aus Dichlormethan in der Monographie **Fluconazol**, Ph. Eur.). Meist können die erhaltenen amorphen Proben einfacher und besser ohne Verreibung mit Paraffin mittels ATR-Technik untersucht werden. Andere Arzneibücher (JAP) lassen Proben parallel umkristallisieren, um einheitliche Kristallformen zu erhalten, das ist aber aufwändiger und führt nicht mit der gleichen Sicherheit zur Aufhebung physikalischer Unterschiede, es kann aber wegen der erhaltenen kristallinen Proben auf eine Verreibung mit Paraffin verzichtet werden. Die Notwendigkeit zur Überführung amorpher Proben (mit

oder ohne Paraffin) aus einem für die Messung ungünstigen Gefäß kann dadurch umgangen werden, das z.B. die Lösungen in Methanol oder Dichlormethan auf Alkalihalogenidplättchen oder -presslinge oder das Kristallfenster eines ATR-Messkopfes getropft werden und nach Verdunstung des Lösungsmittels der dort gebildete amorphe Film spektroskopiert wird.

Einschränkungen

In vielen Arzneistoff-Monographien ist vorgesehen, zusätzlich zur IR-Spektroskopie Prüfungen wie den Nachweis des Anions in Hydrochloriden mittels Silbernitratzugabe durchzuführen. Hintergrund ist die Tatsache, dass Chlorid-Ionen nicht IR-aktiv sind und nicht ohne Weiteres beurteilt werden kann, ob ein anderes Salz desselben Wirkstoffmoleküls ein nicht identisches Spektrum ergäbe. Das ist sehr wahrscheinlich, weil unterschiedliche Salze eines Wirkstoffs unterschiedliche Kristalle bilden und damit abweichende Anordnung der Moleküle ergeben; resultierende Schwingungsspektren unterschiedlicher Salze mit nicht direkt detektierbaren Anionen würden somit zu unterscheidbaren Spektren führen. Wenn dies aber nicht zweifelsfrei feststeht, ist eine zusätzliche nasschemische Prüfung für die eindeutige Identifizierung geboten. Eine Verwechslung von Hydrochlorid und freier Base wie im Falle von **Lidocainhydrochlorid-Monohydrat** und **Lidocain** (beide Ph. Eur.) kann aufgrund der Unterschiede der Spektren (wegen des protonierten oder nicht protonierten Stickstoffatoms) auch ohne Chloridnachweis ausgeschlossen werden (s. u.).

Reine Enantiomere einer Substanz können nicht unterschieden werden, da auch die Anordnung in den Kristallen spiegelbildlich und damit mittels IR-Spektroskopie ohne weitere Maßnahmen wie Salzbildung mit enantiomerenreinen Hilfsstoffen nicht unterscheidbar ist. Anders verhält es sich mit einem Racemat und enantiomerenreinem Arzneistoff. So unterscheiden sich die Kristalle von racemischem **Methadonhydrochlorid** (Ph. Eur.) (Smp. 233 bis 236 °C) und (*R*)-Methadonhydrochlorid (Smp. 239 bis 242 °C) auch schon im Schmelzbereich, weil eben zwei spiegelbildliche Molekülspezies in einem Racemat einen anderen Kristallverband bilden als stereochemisch identische Enantiomere. In Ermangelung eines CRS-Referenzspektrums von **Levomethadonhydro-**

chlorid (Ph. Eur.; (*R*)-Methadonhydrochlorid) wird in der Ph. Eur. allerdings trotzdem das Spektrum des Racemats zum Vergleich herangezogen. Aus den angeführten Gründen wäre es sinnvoll, sowohl Racemat als auch Enantiomer in Form ihrer eingedampften Lösungen (s. u.) zu messen, um Unterschiede durch abweichende Anordnung im Kristall auszuschließen.

Die Intensität der einzelnen Absorptionsbanden im IR-Spektrum ist wesentlich geringer als im UV-Spektrum. Während stärkere UV-Banden molare Absorptionskoeffizienten von $\varepsilon = 10000$ und mehr haben können (siehe den Kommentar zu **2.2.25**, Ph. Eur.), bewegen sich die zugehörigen Werte einer mittelstarken IR-Bande um $\varepsilon = 10$. Daher sind IR-Spektren für mikroanalytische quantitative Bestimmungen einer Reinsubstanz weit weniger geeignet als die Elektronenspektren.

Da Mahlvorgänge in automatischen Mühlen oder hohe Presskräfte, die zum kalten Fließen von Alkalihalogeniden wie KBr erforderlich sind, Energie in die Probe eintragen, kann die Kristallform einer Substanz, die in verschiedenen polymorphen Formen auftritt, durch die Probenvorbereitung verändert werden. Ist die Kristallform von Interesse, muss eine möglichst schonende Probenvorbereitung gewählt werden. Durch das Auflösen kristalliner Proben in einem Lösungsmittel würde das Problem umgangen, die Untersuchung polymorpher Formen aber gleichzeitig vereitelt werden. Die analytische Aufgabe ist entscheidend dafür, in welcher Weise die Probenvorbereitung zu erfolgen hat.

Bei heterogenen Proben können mehrere entnommene Stichproben unterschiedliche Spekten ergeben. Während in der Lebensmittelanalytik bei NIR-spektroskopischer Untersuchung von Hackfleisch Probenteller üblich sind, die die heterogene Probe aus Muskelfleisch und Fett über dem Messfenster drehen, um das Probenvolumen zu erhöhen und ein gemitteltes Spektrum zu registrieren, ist das in der IR-Spektroskopie im mittleren IR unüblich. Wenn die Probe nicht mechanisch homogenisiert oder eine ausreichende Stichprobe in einem Lösungsmittel zu einer homogenen Lösung aufgelöst und eingedampft werden kann, kann die Probenahme problematisch sein. Heterogene Gemische können aber auch mittels IR-Mikroskopie (siehe **5.24 Chemische Bildgebung**, Ph. Eur.) im Sinne eines *API mixtures distribution mapping* charakte-

riert werden. Die USP empfiehlt die IR-Mikroskopie zur Aufnahme von Spektren von Verunreinigungen.

Messmodi

Der Siegeszug der ATR-Geräte spiegelt sich in der gleichberechtigten Aufzählung des Modus der abgeschwächten Totalreflexion neben der Messung im Transmissionsmodus als Hauptmessmodi wider. Die Zahl der Wirkstoffmonographien, in denen die Herstellung von Presslingen und damit assoziiert die Aufnahme von Transmissionspektren explizit vorgesehen ist, ist rückläufig. In den meisten Monographien wird nicht aufgeführt, in welchem Messmodus die Identitätsprüfung auszuführen ist oder es werden beide Messmodi alternativ aufgeführt (s.u.). Bei der Identitätsprüfung unter Vergleich des mittleren IR-Spektrums des Analyten mit einem unter gleichen Messbedingungen aufgenommenen Spektrum der CRS liefern sowohl die Aufnahme im Transmissions- als auch im ATR-Modus sichere Aussagen. Grundsätzlich sind die Hauptmessmodi gleichwertig. Bei Arzneistoffen, von denen es enge Strukturverwandte mit sehr ähnlichen spektralen Eigenschaften gibt, wie z.B. **Fluphenazin** und **Fluphenazindecanoat** (beide Ph. Eur.), kann aber dennoch ein Messmodus explizit vorgesehen sein, weil dieser sich im konkreten Fall als besser geeignet erwiesen hat, um die schwierige Unterscheidung sicherzustellen. Dieser Modus sollte daher bevorzugt werden. Zu beachten ist aber, dass der Vergleich von Transmissions- und ATR-Spektren als „*not advisable*“ im übersetzten Text mit „nicht ratsam“ eingestuft wird.

Neben dem ATR-Modus, der der inneren Reflexion zuzuordnen ist, sind zwei seltener verwendete Modi der äußeren Reflexion genannt. Trifft polychromatische IR-Strahlung auf eine schwer durchlässige Probe, so dringt sie nur geringfügig in die Substanz ein. Die einzelnen Wellenlängen werden unterschiedlich absorbiert und regen Schwingungen innerhalb der Moleküle an. Die spekulare Reflexion beruht auf dem Phänomen der Spiegelung (reguläre Reflexion). Eintreffende IR-Strahlung wird an der Probenoberfläche gespiegelt (Einfallswinkel = Ausfallswinkel). Soll die spiegelnde Oberfläche selbst charakterisiert werden, ist ein Winkel von 90° geeignet.

Im anderen Fall, der *infrared reflection absorption spectroscopy* (IRRAS, auch IRAS), können Substanzen in dünnen Schichten auf Metalloberflächen wie organische (Sub-)Monolagen auf reflektierenden Oberflächen (Gold) unter streifendem Einfall (ca. 80°) der IR-Strahlung charakterisiert werden. Die erhaltenen Spektren unterscheiden sich stark von mit den Hauptmodi aufgenommenen Spektren.

Der Modus der diffusen Reflexion (*diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy* DRIFTS) verwendet eine Mischung aus Reflexion und Streuung. DRIFTS bietet Vorteile bezüglich der einfacheren Probenpräsentation, die in der pharmazeutischen Analytik aber auch durch ATR-Geräte gegeben sind. Einige Proben können direkt gemessen werden. Absorbiert die Probe IR-Strahlung allerdings sehr stark, so muss sie z.B. mit KBr vermischt werden. Der Abzug eines Spektrums, das mit reinem KBr erhalten wurde, wird dann erforderlich. Neben DRIFT-Modulen werden auch Ulbricht-Kugeln (Integrationskugeln) eingesetzt, die bei der Charakterisierung von Polymeren oder Detektion auf DC-Platten berührungslos und zerstörungsfreie Analysen durch diffuse Reflexion ermöglichen. Verbreiteter ist diffuse Reflexion in der pharmazeutischen Analytik in der NIR-Spektroskopie, zum Strahlengang siehe im Kommentar zu **2.2.40 NIR-Spektroskopie** (Ph. Eur.) die Abb. 1.

Modus der Transmission

Die Messung im Transmissionsmodus ist seit Jahrzehnten etabliert. Aus der gemessenen Transmission kann nach der im Arzneibuch angegebenen Beziehung in der amtlichen deutschen Übersetzung auch die Absorption (*A*) berechnet werden. Dadurch könnte das Spektrum auch als Funktion der Absorption auf der Ordinate dargestellt werden. Voraussetzung für die Richtigkeit dieser Umrechnung ist, dass Effekte wie Beugung, Streuung und Brechung keine nennenswerte Rolle spielen. Dies ist z.B. in der UV-Vis-Spektroskopie bei unendlich verdünnten Lösungen dann gegeben, wenn diese Effekte durch Vergleichsmessung mit einer Küvette identischer Beschaffenheit, gefüllt mit dem Lösungsmittel der Probenlösung ohne Probensubstanz, ermittelt und abgezogen werden können. In der NIR-Spektroskopie ist bei festen Proben ein ähnliches Vorgehen nicht möglich und deshalb die

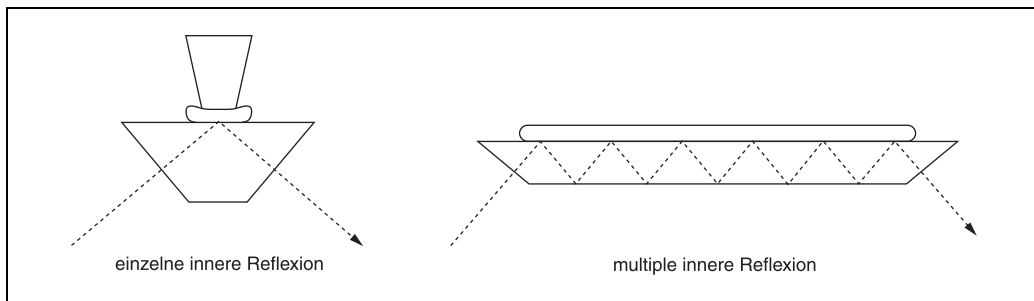


Abb. 5: Aufnahme von IR-Spektren durch einfache (links) und multiple (rechts) Mehrfachreflexion (Eccius); nach Lit.⁸⁾

Absorbanz und nicht die Absorption die auf der Ordinate aufgetragene Größe. Überträgt man diese Betrachtung auf die IR-Spektroskopie im mittleren IR-Bereich wird klar, dass es die einfachere Lösung ist, die Transmission oder Absorbanz auf der Ordinate aufzutragen und eine Berechnung der Absorption zu vermeiden. Im englischen Originaltext der Ph. Eur. wird (A) korrekt mit *Absorbance* bezeichnet, allerdings lautet der Monographietitel dagegen wie eingangs ausgeführt unverändert „*Absorption Spectrophotometry, Infrared*“ und nicht *Absorbance Spectrophotometry, Infrared*.

Modus der abgeschwächten Totalreflexion

Die ATR-Technik kann mit einfacher (*single attenuated total reflexion, single bounce ATR*) oder multipler abgeschwächter Totalreflexion am internen Reflexionselement (IRE) erfolgen (siehe Abb. 5).

Geräte mit sehr kleinen Diamant-IRE (Fläche ca. 1 bis 2 mm²) arbeiten z. B. nach dem Prinzip der einfachen abgeschwächten Totalreflexion, während mehrere cm große Zinkselenid-IRE eine multiple abgeschwächte Totalreflexion (Multireflex-ATR, *multi bounce horizontal ATR*) ermöglichen. Die Ph. Eur. schreibt „multiple reflection“ z. B. bei der Identitätsprüfung A in 3.1.9 (Ph. Eur.) vor. Die in der USP (1854, *Mid-Infrared Spectroscopy – Theory and Practice*) verwendete Bezeichnung MIR für *multiple internal reflection* ist insofern ungünstig, als eine Verwechslung mit mittlerer IR-Spektroskopie als solcher naheliegend ist. Der Strahlengang dieser beiden ATR-Varianten ist in Abb. 5 gegenübergestellt. Die Probe befindet sich bei den gebräuchlichsten Labortischgeräten mit

horizontal angeordneten IRE (H-ATR) oberhalb einer Schicht aus einem Material mit hoher optischer Dichte, z. B. hochreinem Diamant vom Typ IIa, Zinkselenid, Germanium, Thalliumbromidiodid.

Totale Reflexion tritt auf, wenn IR-Strahlung an der Grenze zwischen einem optisch dichten Kristall (IRE) und einem optisch dünnen Medium (Probe) unter einem Einfallswinkel auftrifft, der größer als der Grenzwinkel der Totalreflexion ist. Nach Goos und Hänchen läuft der total reflektierte Strahl aber nicht am Ort des Auftreffens, sondern in der Größenordnung von einer Wellenlänge in der Einfallsebene longitudinal versetzt zurück (Goos-Hänchen-Effekt)⁹⁾. Es kann daher angenommen werden, dass die IR-Strahlung dabei etwas in die Probe, die sich dafür im intensiven Kontakt zum ATR-Kristall befinden muss, eindringt. Bei Diamant-Kristallen kann der erforderliche enge Kontakt bei festen Proben durch eine Anpressmechanik sichergestellt werden. Bei sachgemäßem Gebrauch und Beachtung der Herstellervorgaben kann eine Beschädigung der IRE so trotz Kraftaufwands praktisch ausgeschlossen werden. Bei Fehlbedienung oder Anwendung roher Gewalt kann aber sogar eine Diamant-IRE beschädigt werden, z. B. indem diese aus ihrer Fassung gedrückt wird. Nachteil von Diamant-IRE ist die eingeschränkte IR-Transparenz zwischen 2400 und 2000 cm⁻¹, die allerdings in der pharmazeutischen Analytik keine wichtige Region darstellt. Schwerer wiegt die bei Banden geringer Transmission auftretende anomale Dispersion bei Diamant und ZnSe. Bei dem weniger harten ZnSe muss zudem darauf verzichtet werden, kristalline Proben auf die IRE zu pressen. Lediglich das vorsichtige Spreiten von halbfesten Zubereitungen wie Sal-

bensträngen mittels eines speziellen Spatels über die gesamte IRE ist sinnvoll. Beim Entfernen der Probe nach der Messung muss darauf geachtet werden, die IRE nicht zu zerkratzen, weil eine zerkratzte IRE den ATR-Messmodus stören würde.

Die Phänomene, die zur abgeschwächten Totalreflexion führen, werden mit der Theorie des evaneszenten Feldes beschrieben: Das elektromagnetische Feld der totalreflektierten Welle an der Grenzfläche bricht nicht abrupt ab. Es entsteht eine entlang der Grenzfläche propagierende Welle, die

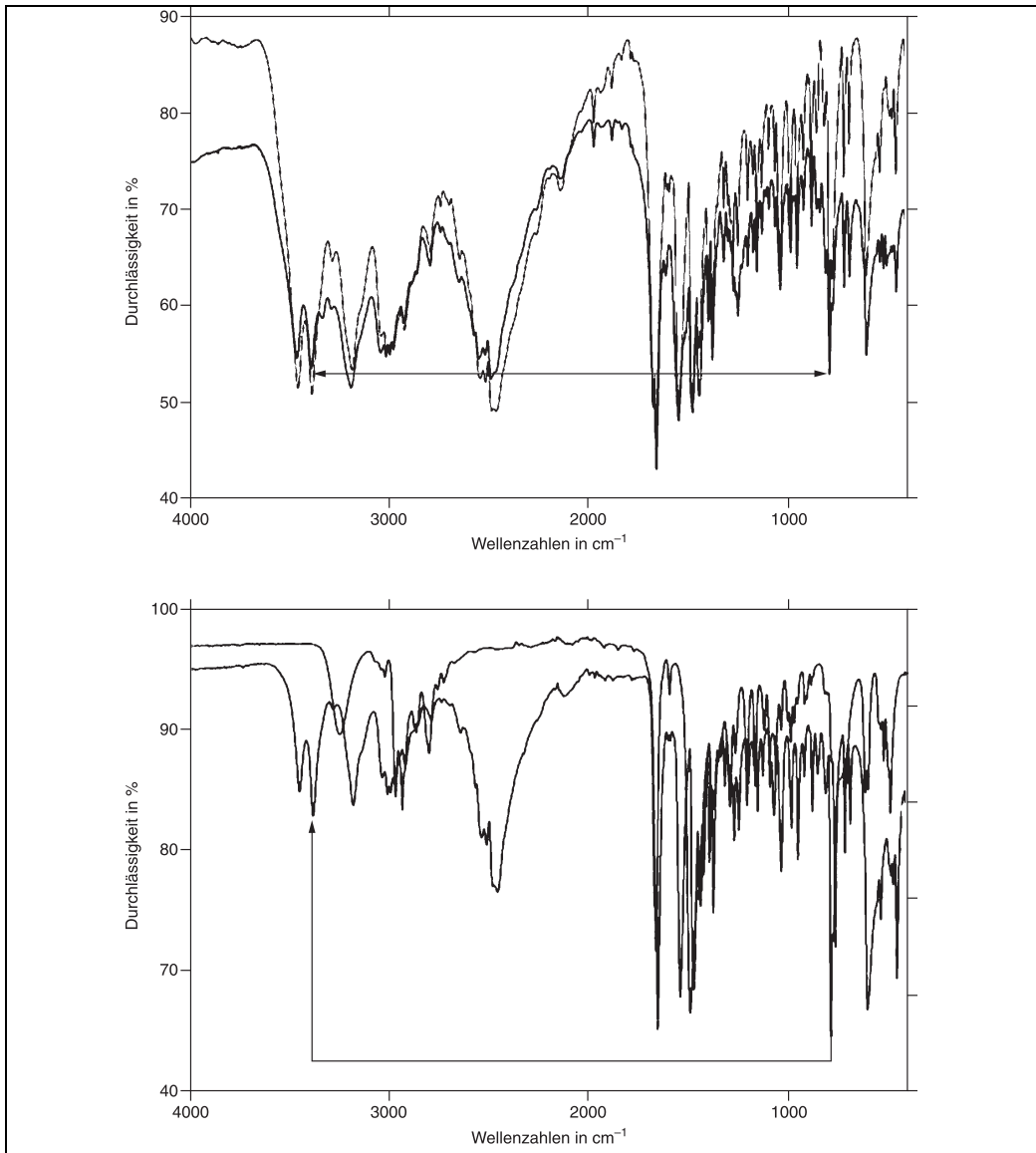


Abb. 6: Spektren in beiden Hauptmessmodi; die Pfeile weisen auf Intensitätsunterschiede in Spektren identischer Substanz hin; (oben Transmissionsmessung von Lidocainhydrochlorid-Monohydrat als KCl- und KBr-Pressling;) unten ATR-Messung (Diamant) von Lidocainhydrochlorid-Monohydrat sowie Lidocain

exponentiell mit der Eindringtiefe gedämpft wird. Diese Welle im optisch dünneren Medium wird als evaneszentes Feld bezeichnet. Da die aus der Probe zurückströmende Strahlungsenergie allerdings innerhalb der Eindringtiefe mit der Probe wechselwirken kann, tritt Absorption besonders der Wellenlängen auf, für die auch im Transmissionsspektrum eine verminderte Transmission beobachtet wird. Der wellenlängenabhängige Abklingfaktor beschreibt, wie weit das evaneszente Feld in die Probe eindringt. Unter anderem weil die Absorptionsintensität im ATR-Modus Wellenlängen-abhängig ist, sind die mit den beiden Hauptmodi gemessenen IR-Spektren nicht identisch (siehe Abb. 6). Die Feststellung, dass es nicht ratsam ist, ATR-Spektren mit Transmissionsspektren zu vergleichen, muss daher ernst genommen werden. Zwar kann die Wellenlängenabhängigkeit rechnerisch berücksichtigt und aus einem ATR- ein Transmissionsspektrum berechnet werden, es gibt aber weitere Effekte, die nicht so leicht zu berücksichtigen sind. Neben schichtdickenabhängiger Interferenz an Presslingen finden beim Mahlen und der Einbettung in KBr oder KCl Veränderungen der Probe statt, die in ihrem Ausmaß nicht bekannt sind und am besten durch Gleichbehandlung von Probe und CRS gehandhabt werden können (siehe unter „Durchführung“). In der Praxis werden zwar auch Spektrensammlungen von Transmissionsspektren nicht-CRS-rückführbarer Proben für die Identifizierung von Substanzen anhand ihres ATR-Spektrums mit Erfolg eingesetzt. Für eine sichere Identifizierung im Rahmen einer Arzneibuchprüfung ist am Ende aber ein Vergleich mit einem unter gleichen Bedingungen (gleicher Messmodus) erhaltenen Spektrum einer rückführbaren Referenzsubstanz unerlässlich.

Ausstattung

Die unter „Messmodi“ aufgeführten zwei Hauptmessarten Transmission und abgeschwächte Totalreflexion (ATR) beziehen sich auf die Aufnahme vollständiger IR-Spektren von 600 bis 4000 cm^{-1} . Die ebenfalls relevante Messung einzelner Wellenlängen in Gasen (wie CO_2 oder CO in **Sauerstoff 93 %**, Ph. Eur.) mittels sog. nichtdispersiver IR-Geräte wird hier nicht berücksichtigt (siehe den Abschnitt „Verunreinigungen in Gasen“).

Für die Aufnahme von IR-Spektren waren lange zwei unterschiedlich arbeitende Spektrometer-

systeme nebeneinander in Gebrauch: „Dispersive“ Spektrometer und FTIR-Spektrometer.

1. „Dispersive“ IR-Spektrometer strahlen polychromatische IR in die Probe ein; nach dem Durchgang durch die Probe wird die Strahlung durch einen Monochromator (Prisma oder Gitter) in Strahlung einzelner Wellenlängen zerlegt (Dispersion) und diese nach Durchtreten des Spalts nacheinander im IR-Spektrum registriert. Im Gegensatz zu dispersiven UV-Vis-Spektrophotometern kann der Monochromator wegen der vergleichsweise geringen Energie der IR-Strahlung im mittleren Bereich hinter der Probe angeordnet sein und so störende Effekte durch Streustrahlung am Detektor vermieden werden. Die Produktion klassischer Gitterspektrometer/Zweistrahlergeräte dieser Bauart ist seit Jahrzehnten ausgelaufen und sie werden deswegen in der aktualisierten Monographie nicht mehr näher betrachtet. Ähnlich wie in der NIR-Spektroskopie könnte aber der einfache Aufbau dieses Gerätetyps zur Miniaturisierung für PAT-Zwecke an Bedeutung gewinnen.

2. FTIR-Spektrometer setzen die ebenfalls polychromatische IR-Strahlung ein, doch wird die Strahlung nach Durchgang durch die Probe ohne Zerlegung in einzelne Wellenlängen als Summe gemessen (Interferogramm). Dieses Interferogramm wird mit Hilfe einer Rechenoperation (Fourier-Transformation, FT) in ein IR-Spektrum überführt. Für die Aufnahme von IR-Spektren zur Identitätsprüfung werden wegen zahlreicher Vorteile (siehe den Abschnitt „Vorteile der FTIR-Spektroskopie“) praktisch nur noch diese FTIR-Geräte eingesetzt und der Text bezieht sich auf diesen Gerätetyp.

FTIR-Spektrometer: Die polychromatische thermische Lichtquelle in FTIR-Spektrometern ist ein weißglühender Siliciumcarbid-Globar (von *glow bar*, Glühstab) oder ein anderer schwarzer Strahler wie ein preisgünstiger elektrischer Heizwiderstand, z. B. Nickel-Chrom-Wendeln. Da Nernst-Stifte aus Zirkoniumdioxid-Yttriumoxid-Gemischen vorgeheizt werden müssen, ist der Globar heute weiter verbreitet. Das kennzeichnende Bauteil von FTIR-Spektrometern sind Interferometer, die die bei dispersiven Geräten notwendigen Monochromatoren überflüssig machen.

Interferometer⁽¹⁰⁾: Interferometer sind in der Herstellung sehr aufwändige optische Präzisionsinstrumen-

te, die den bei dispersiven Geräten notwendigen Monochromator und den für die Wellenlängenselektion erforderlichen Spalt überflüssig machen. Die optische Interferometrie ist ein Messverfahren, das die Wellennatur elektromagnetischer Strahlung ausnutzt. Im Zusammenhang mit Wellen auftretende Interferenzphänomene lassen sich bei Wasserwellen beobachten und machen Interferenz dort anschaulicher als in der IR-Spektroskopie. Die Charakterisierung einer Lichtstrahlung erfolgt mittels Interferometrie nicht durch eine Wellenlängenskala (oder Frequenzskala), sondern durch eine Zeitskala. Die von der Lichtquelle ausgehende IR-Strahlung wird zunächst durch einen Strahlenteiler in zwei gleich intensive Strahlen (A, B) geteilt (Abb. 7):

- Eine Hälfte des Strahls (A) wird durch den Strahlenteiler (Spiegel) rechtwinklig auf einen zweiten, festen Spiegel reflektiert.
- Die andere Hälfte (B) durchstrahlt den Strahlenteiler, fällt auf einen beweglichen Spiegel und wird dort ebenfalls reflektiert.

Beide Hälften A und B des Lichtstrahls vereinigen sich nach ihrer Reflexion wieder, überlagern sich und interferieren zum Strahl C. Wie sie interferieren, hängt von ihrer Phasendifferenz ab, d.h. von der Stellung des beweglichen Spiegels im Augenblick der Reflexion. Dafür gibt es für Strahlen jeder Wellenlänge zwei Grenzsituationen:

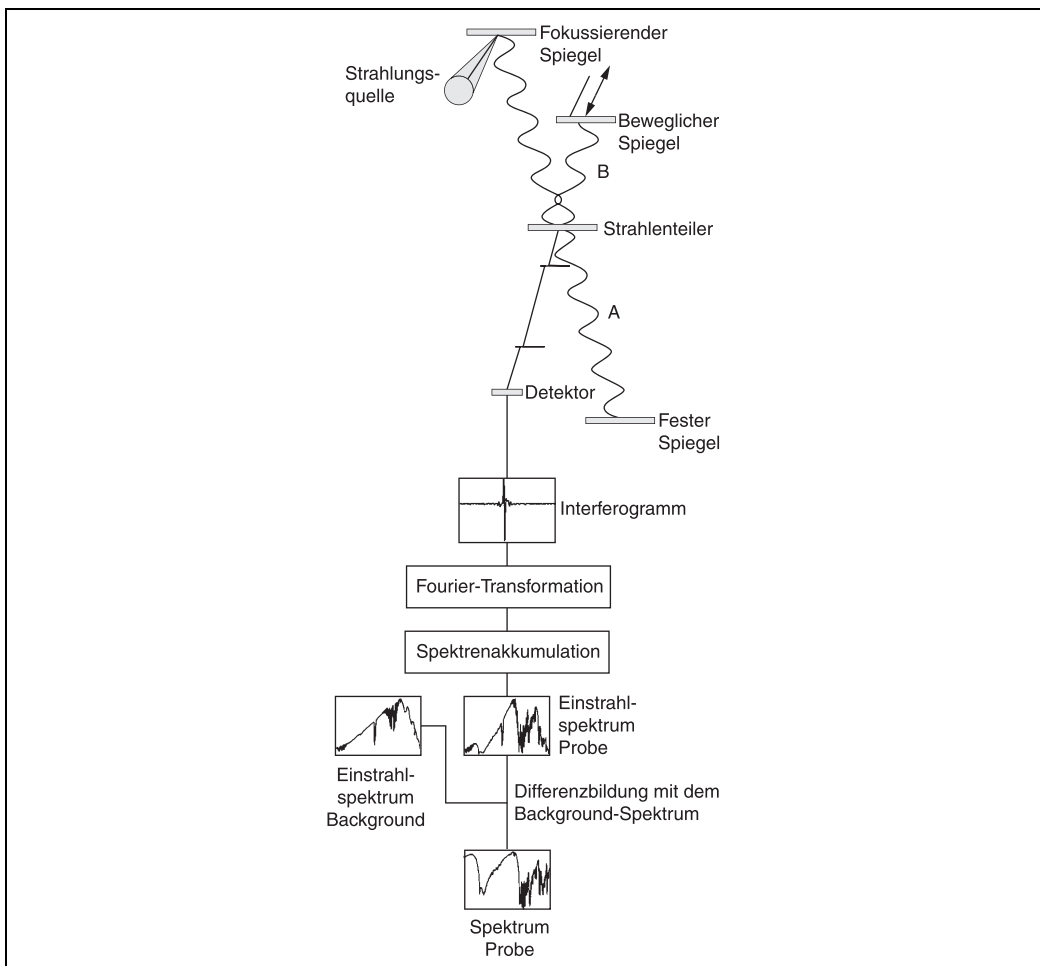


Abb. 7: Grundsätzlicher Aufbau eines FTIR-Spektrometers mit Interferometer (Lit.^{7, 10)})

- Ist der optische Weg vom Strahlungsteiler zu beiden Spiegeln gleich lang (Phasendifferenz Null) oder beträgt die Phasendifferenz 1λ , 2λ usw., so kommt es zur Addition der beiden Wellen A und B mit maximaler Lichtintensität.
- Beträgt die Phasendifferenz zwischen A und B $\pm\lambda/2$ oder ein ungerades Vielfaches davon, so löschen sich die beiden Wellen gegenseitig.
- Bei kontinuierlicher Hin- und Herbewegung des Spiegels wechselt die Lichtintensität in Abhängigkeit von der Stellung des Spiegels. Man erhält ein Interferogramm.

In Abb. 8, A ist das so erhaltene Interferogramm für Licht *einer* Wellenlänge dargestellt. In Abhängigkeit von der Bewegungszeit des Spiegels (also von der Phasendifferenz zwischen beiden Strahlen, d.h. von der Zeit) schwankt die Lichtintensität zwischen dem Maximum und Null. Eine bestimmte Wellenlänge λ entspricht einer bestimmten Zeit auf der Zeitskala der Spiegelbewegung. Die Wellenlänge kann daher durch diesen Zeitabschnitt charakterisiert werden (Zeitdomäne). Im FTIR-Spektrometer betreffen die Änderungen aber nicht nur *eine* Lichtwelle, sondern alle Wellen des IR-Strahlenspektrums und führen durch Überlagerung zu einem komplizierten Summen-Interferogramm für alle eingestrahnten Frequenzen mit einem großen Maximum (*center burst*) und relativ flachen Ausläufern (*wings*) (Abb. 8, B). Strahlenteiler aus KBr müssen vor Wasser geschützt werden; ist dies durch Kapselung, konvektive Trocknung und weitere Maßnahmen in sehr feuchter Umgebung nicht

sicherstellbar, sollte besser ein Strahlenteiler aus ZnSe eingesetzt werden.

Detektion, Fourier-Transformation: Beim Durchgang der gesamten, nicht in Strahlung einzelner Wellenzahlen aufgeteilten IR-Strahlung durch die Probe werden die für die Substanz charakteristischen Wellenzahlen teilweise oder ganz absorbiert. Das Interferogramm ändert daher in Abhängigkeit von der Zeit der Spiegelbewegung (Zeitdomäne) sein Aussehen und wird komplizierter, weil es die Summe mehr oder weniger unvollständiger Wellenbilder darstellt, die durch IR-Absorption entstanden sind (Abb. 8, B). Das Summen-Interferogramm für das Background- und das Proben-Spektrum wird nacheinander am Detektor registriert und im Rechner durch Fourier-Transformation in das dem Analytiker zugängliche IR-Spektrum überführt (zur Fourier-Transformation siehe Lit.¹¹⁾).

Neben der FT sind weitere mathematische Operationen erforderlich, um z.B. zu berücksichtigen, dass die optische Weglängendifferenz durch die maximale Spiegelverschiebung nicht unbegrenzt ist und damit vom theoretisch unendlichen Verlauf abweicht. Die messtechnisch bedingte beidseitige Begrenzung der digitalisierten Interferogramme muss durch ein Verfahren der optischen Filterung, die Apodisation, des abrupten Abbrechens an den Flanken in einen stetigen Abfall umgewandelt, korrigiert werden. Dazu wird das Interferogramm mit einer Dreiecks- oder Trapezfunktion multipliziert und so Störungen der Linienform des berechneten Spektrums unterdrückt. Eine weitere Verbes-

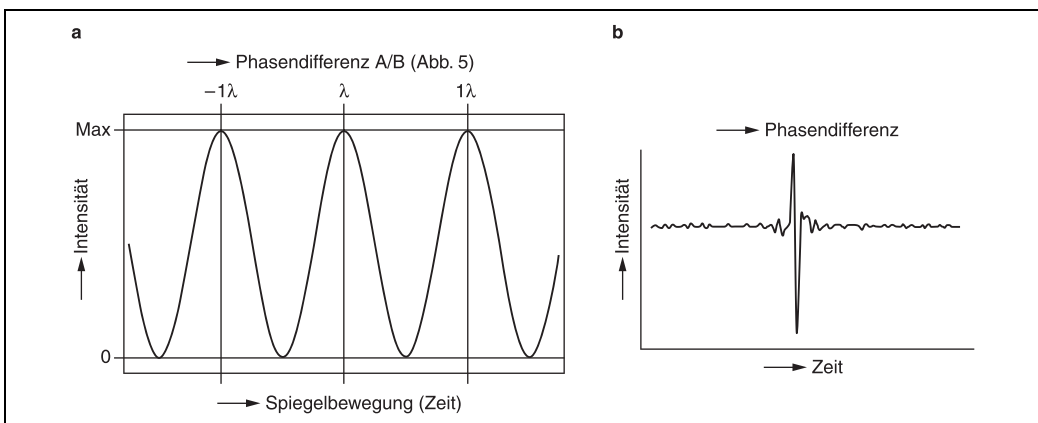


Abb. 8: Interferogramme; A Interferogramm für IR-Strahlung *einer* Wellenlänge ohne Absorption; B Beispiel eines Summen-Interferogramms für Wellenlängen nach IR-Absorption (nach Lit.¹⁰⁾)

serung der Linienform des Spektrums wird durch Erhöhung der Datenpunkte mittels Zerofilling erreicht. Durch das Hinzufügen von Nullen an beiden Enden des Interferogramms, was einer Interpolation entspricht, wird das Spektrum geglättet, ohne die Auflösung zu beeinflussen.

Vorteile der FTIR-Spektroskopie:

1. Einsatz eines Laser-Kalibrators (z. B. eines Helium-Neon-Lasers mit einer Wellenlänge von 632,8 nm) zur Festlegung der Wellenzahlen mit einer Genauigkeit bis $0,01\text{ cm}^{-1}$ bei kommerziellen Geräten („Connes-Vorteil“). Eine derartige Genauigkeit ist jedoch für die normale Anwendung, z. B. zur Prüfung auf Identität, nicht erforderlich.
2. Die Auflösung ist über den gesamten Spektralbereich konstant^{3, 7)}.
3. Für die FTIR-Einstrahlgeräte erfolgt eine automatische Korrektur der Untergrundabsorption (Kohlendioxid, Wasserdampf).
4. Bei Lösungsmittelspektren erfolgt die Lösungsmittelkorrektur nach Aufnahme des Lösungsmittelspektrums automatisch durch den Rechner.
5. Messung sehr geringer Probenmengen wegen verbesserter Empfindlichkeit; besseres Signal-Rausch-Verhältnis wegen Wegfall des bei dispersierenden Geräten erforderlichen Spalts und damit einer höheren Lichtausbeute (sog. „Jacquinot-Vorteil“) sowie gleichzeitiger Anregung bzw. Detektion IR-aktiver Schwingungen des Moleküls infolge Absorption bei der jeweiligen Frequenz aus einem definierten Wellenlängenbereich, was bei N Spektralelementen zu einer Verbesserung um den Faktor \sqrt{N} führt (sog. „Felgett-Vorteil“). Somit ist die zur Spektrenakkumulation erforderliche Messzeit eine wichtige Größe, da sie maßgeblich das Signal-Rausch-Verhältnis beeinflusst.
6. Kürzere Messzeiten (wenige Sekunden), wenn nicht stark verdünnte Proben (siehe Ethanol mit und ohne 1% Vergällungsmittel, Abb. 4) die Aufnahme einer sehr hohen Spektranzahl erfordern.
7. Möglichkeiten zur „Bearbeitung“ des Spektrums, z. B. Ausdrucken aller oder bestimmter Wellenzahlen, Änderung der Transmissionskala, Ausblenden des Fingerprint-Bereichs, Unterdrückung von künstlichen Nebenmaxima einer Bande (Apodisation) u. a.

8. Bessere Kopplungsmöglichkeiten mit chromatographischen Trennverfahren, z. B. GC-MS.

Die üblichen Probenaufnahmesysteme reichen von einem mechanisch simplen Probenhalter für Alkalihalogenid-Presslinge bis zu den oben erwähnten Durchflusszellen. Da die Probenpräsentation vom Messmodus abhängt, werden Unterschiede im Abschnitt „Durchführung“ besprochen.

Thermische Photodetektoren registrieren die Erwärmung eines Bauteils durch das einfallende Licht und messen die entstehende Temperaturerhöhung. Früher verwendete Thermoelemente sind einfach und robust, aber für schnelle FTIR-Geräte zu träge. Höhere Photoempfindlichkeit und bessere Zeitauflösung zeigen pyroelektrische Detektoren, sie sind die Standarddetektoren für die Routineanalytik.

Pyroelektrische Detektoren: Detektoren für IR-Strahlung im mittleren IR sind z. B. DTGS-Detektoren (DTGS = deuteriertes Triglycinsulfat). DTGS weist unterhalb seiner Curie-Temperatur eine spontane temperaturabhängige elektrische Polarisierung auf. Bei einer Temperaturänderung durch auftreffende IR-Strahlung ändert sich die spontane Polarisierung und die effektive Oberflächenladung. Die Kompensation der Oberflächenladung durch bewegliche Ladungsträger wird verändert und resultiert in einer Spannungsänderung in einem Messkreis.

Halbleiter-Photoelemente: In einem gleichmäßig dotierten Halbleitermaterial werden durch Einfall von Licht bewegliche Ladungsträger erzeugt. Durch diesen inneren Photoeffekt wird der Widerstand herabgesetzt, was in Photowiderständen zum Nachweis von IR-Strahlung ausgenutzt wird. Besonders leistungsfähige MCT-Detektoren (*mercury, cadmium, telluride*) haben allerdings den Nachteil, dass sie für den Einsatz im Fingerprint-Bereich mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden müssen.

Im NIR-Bereich verwendete Vakuumphotodetektoren, die auf dem äußeren Photoeffekt beruhen, sind im mittleren IR-Bereich nicht gebräuchlich.

Gerätesoftware: Die verwendete Software muss das Spektrometer (inklusive Interferometer) steuern. Der dafür erforderliche Aufwand ist zwar erheblich, kann aber als Routineanwendung gelten. Das gleiche gilt für die mathematisch anspruchsvolle FT-Transformation der Hintergrund- und

Roh-Probenspektren sowie die Datenverarbeitung zu letztendlich ausgegebenen Probenspektren. Da die Spektrenauswertung durch Spektrenvergleich in der Ph. Eur. im Vordergrund steht, berechnen marktübliche Systeme eine Übereinstimmung von Spektren und können eine ausreichend hohe Übereinstimmung automatisch anzeigen.

IR-Mikroskopie: Die Weiterentwicklung von FTIR-Mikroskopen macht diese Geräte zu wertvollen Instrumenten für zusätzliche Charakterisierungsoptionen. Nicht homogene Arzneistoffproben können mittels eines API (*active pharmaceutical ingredient*) Mischungs-Verteilungskartierung (*mixtures distribution mapping*) näher spezifiziert werden als das durch eine Probenhomogenisierung möglich ist. Sekundärpackmittelqualität, Kontaminationen auf Oberflächen, Polymerfilmeigenschaften und Fehlstellen in Packmitteln können mittels dieser Technik untersucht werden, allerdings sind auch Raman- und NIR-Geräte für diese Anwendungen verfügbar (siehe 5.24, Ph. Eur.).

Wie bei den Vorteilen der FTIR-Geräte erwähnt, sind Kopplungstechniken wie GC-FTIR möglich und sinnvoll, aber nicht weit verbreitet. Durch die Vorteile von MS-Kopplungstechniken sind FTIR-Detektoren, weil sie zerstörungsfrei arbeiten, aber eine Zusatzoption für GC-FTIR-MS-Kopplungen. Informationen z. B. über Substitutionsstellen an Aromaten, die aus dem MS-Spektren nicht entnehmbar sind, können aus dem zusätzlich registrierten IR-Spektrum abgeleitet werden.

Kontrolle der Leistungsfähigkeit der Ausstattung

FTIR-Geräte sind komplexe und rechnergesteuerte Analysengeräte und erfordern vor Inbetriebnahme eine Qualifizierung. Zur Qualifizierung mit Systemeignungsprüfung – *Design Qualification* (DQ), *Installation Qualification* (IQ), *Operational Qualification* (OQ) mit SOP für die Gerätekalibrierung, *Performance-Qualification* (PQ) – ist es sinnvoll, mit dem Gerätehersteller zusammen zu arbeiten. Die USP (854 Mid-Infrared Spectroscopy) sieht die IQ, OQ und PQ vor. Automatische Selbsttests, die von der Gerätesoftware überwacht werden, stellen

bei kommerziellen Geräten eine komfortable Möglichkeit dar, auftretende Störungen zu erkennen. Die turnusmäßige Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Geräts nebst Dokumentation in angemessenen Zeitabständen kann in Zusammenarbeit mit dem Hersteller oder vom Anwender alleine in Form einer wiederholten, z. B. jährlichen OQ durchgeführt werden. Minimalanforderung ist die Kontrolle der Wellenzahlskala und der spektralen Auflösung.

Wellenzahlskala und spektrale Auflösung

Die Überprüfung der Richtigkeit der Wellenzahlskala des Gerätes und des spektralen Auflösungsvermögens des Gerätes geschieht rein pragmatisch an Hand des IR-Spektrums eines Polystyren-Films. Polystyren-Filme können in das Gerät eingebaut, mitgeliefert oder separat bezogen werden. Wegen der Alterung von Kunststofffolien ist die begrenzte Verwendbarkeitsdauer zu beachten, z. B. könnten eine Verwendbarkeit von drei Jahren ab Herstellungsdatum und ein Austausch oder eine Rezertifizierung durch den Hersteller über einzusendende Spektren des Polystyren-Films vorgesehen sein. Deshalb ist ein Einbau in das Gerät praktikabel, aber nicht so vorteilhaft wie bei den über lange Zeiträume stabilen Seltenerd-Standards der NIR-Spektroskopie. Die Abb. 9 zeigt ein Polystyren-Spektrum, in dem die in Tab. 2.2.24-1 des Arzneibuchs genannten Banden zur Kontrolle der Wellenzahlskala bezeichnet sind. Sie wurden von früher 7 auf nunmehr nur noch 4 Banden reduziert. Geringe Abweichungen für ATR-Geräte sind aus der Tabelle ersichtlich. Aus dem aufgenommenen Spektrum des Polystyren-Films werden die Transmissionsminima entnommen und die Abweichung der Wellenzahl vom Soll protokolliert. Für Apotheken stellt das Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker (ZL) eine Vorlage für ein Protokoll über die Überprüfung des Auflösungsvermögens und Richtigkeit der Wellenzahlskala online zur Verfügung. Wegen des erheblichen apparativen Aufwands (integrierte Laserkontrolle) sind Abweichungen der Wellenlängenskala außerhalb der Sollwerte normalerweise nicht zu erwarten und ein Grund, das Gerät warten bzw. reparieren zu lassen.

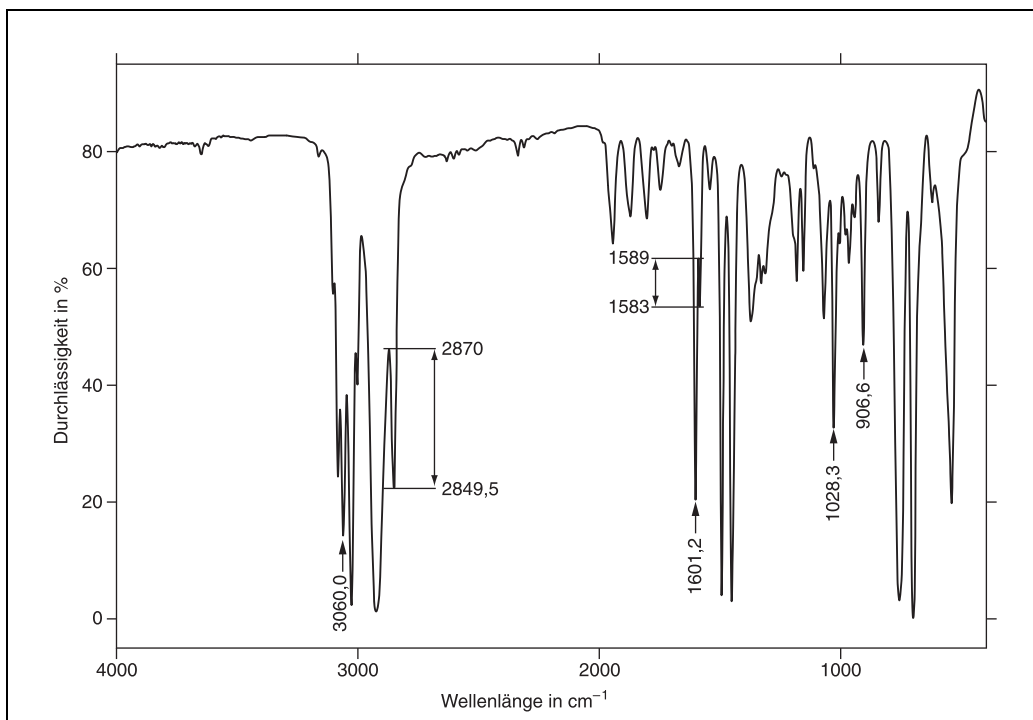


Abb. 9: IR-Spektrum eines Polystyren-Films; Angabe von Wellenzahlen für ausgewählte Banden (nach der Ph. Eur. 9.7)

Anders als im Transmissionsmodus, bei der eine konstante Schichtdicke durch die Stärke des Polystyren-Films festgelegt werden kann, ist das im ATR-Modus nicht der Fall. Zwar kann leicht eine praktisch unendliche Schichtdicke realisiert werden, die Eindringtiefe der Strahlung hängt aber von Geräteparametern wie Einfallswinkel oder Material des ATR-Kristalls ab. Deshalb sollen Bewertungskriterien für die Auflösung entsprechend den Spezifikationen des individuellen Geräts definiert werden. Eine marktübliche Lösung ist, einen eingebauten Polystyren-Film zu vermessen, ohne ihn auf den ATR-Diamant zu pressen, da ja Veränderungen der Wellenlängenskala durch Alterung der IRE nicht zu befürchten sind. Für andere Messmodi überlässt die Ph. Eur. es den Herstellern, geeignete Referenzmaterialien für ihre IR-Systeme bereitzustellen.

Eine geeignete Geräteauflösung bei vom Hersteller angegebener Apodisation (siehe unter „Vorteile der FTIR-Spektroskopie“, Nr. 7) kann gut an Spektren von Gasen definiert werden, da deren Qualität

nicht von der Probenzubereitung abhängt. Unabhängig davon lässt die Ph. Eur. das Auflösungsvermögen anhand von Banden des Polystyren-Films überprüfen. Es ist umso besser, je stärker zwei benachbarte Banden mit sehr unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten voneinander abgesetzt sind. Allerdings ist die Höhe der kleineren Bande von der Ordinatenendnung abhängig. Daher muss diese so eingestellt werden, dass die große Bande nicht ganz die Abszisse (Nulllinie) erreicht.

Die Differenz der Absorption zwischen dem Minimum bei 2870 cm^{-1} (A) und dem Maximum bei $2849,5\text{ cm}^{-1}$ (B) wird ermittelt und muss mehr als 0,33 betragen. Abgelesen werden auch die Absorptionswerte beim Absorptionsminimum bei 1589 cm^{-1} (C) und die beim Absorptionsmaximum bei 1583 cm^{-1} (D). Die Differenz muss größer als 0,08 sein, um die Akzeptanzkriterien zu erfüllen.

Eine Software- bzw. Computer Validation (CV) wird nicht separat gefordert. Sinnvollerweise wird diese in die Qualifizierungsphasen integriert sein. Typischerweise bescheinigt der Gerätehersteller

eine Softwareentwicklung und -validierung z.B. nach „GAMP – Good Practice Guide: Validation of Laboratory Computerized Systems“. Die Software soll korrekt geliefert und installiert sein (IQ), kritische Funktionen müssen während der OQ getestet werden und während der PQ wird verifiziert, dass das computergesteuerte System ordnungsgemäß arbeitet. Wird weder neue Software aufgespielt noch wird der PC ausgetauscht, kann sich die z.B. jährliche Funktionsüberprüfung auf eine Wiederholung der OQ beschränken. Für quantitative Analysen werden keine konkreten Angaben gemacht.

Durchführung

Vorbereitung und Einbringen der Probe

Da die beiden Hauptmessmodi sich in Bezug auf die Probenpräsentation unterscheiden, erfordern sie eine unterschiedlich aufwändige Probenvorbereitung. Ist der Messmodus frei zu wählen, kann die Probenvorbereitung dadurch minimiert werden.

Modus der Transmission

Die Absorptionskoeffizienten der meisten Arznei- und Hilfsstoffe sind im mittleren IR höher als im nahen IR, wo Feststoffe sowohl in diffuser Reflexion als auch im Transmissionsmodus unverdünnt gemessen werden. Für Transmissionsmessungen müssen Feststoffe daher in der Regel mit einem IR-transparenten Lösungs- oder Einbettungsmittel verdünnt werden. Eine ungenügende Verdünnung wird durch Transmission einzelner Bereiche von unter 5 % im Spektrum ersichtlich. Eine Transmission von kleiner 5 % ist allerdings kein grundsätzlicher Ausschlussgrund zur Verwendung von Transmissionsspektren, wenn spezielle Gründe diese niedrige Transmission rechtfertigen.

Flüssigkeiten: Sollen flüssige Proben im Transmissionsmodus gemessen werden, ist der Aufwand grundsätzlich höher als im ATR-Modus, weil die Auswahl an IR-transparenten Materialien für Messfenster im mittleren IR begrenzt ist. Geeignet sind Alkalihalogenid-Platten, die allerdings teuer, nicht bruchfest und mit einigen Ausnahmen (z.B. ZnS und ZnSe, eingeschränkt auch AgBr oder CaF₂, nicht mit Wasser kompatibel sind, da sie sich eintrüben oder lösen. Dünne Schichten was-

serfreier Flüssigkeiten (Wassergehalt < 1 %) können zwischen zwei NaCl-Platten in den Strahlengang gebracht werden. Dabei genügt für hoch siedende Flüssigkeiten ein Tropfen, der zwischen den Kochsalzplatten einer zerlegbaren Küvette zu einem Kapillarfilm breitgedrückt wird. Bei niedrig siedenden Flüssigkeiten können spezielle Flüssigkeitsküvetten eingesetzt werden.

Flüssigkeiten oder Festsubstanzen in Lösung: Verglichen mit der UV-Vis-Spektroskopie sind relativ konzentrierte Lösungen erforderlich. Die Mehrzahl der dort verwendeten Lösungsmittel scheidet wegen zu starker Eigenabsorption im gesamten mittleren IR-Bereich von vornherein aus. Geeignet sind aus diesem Grunde nur die vergleichsweise toxischen Lösungsmittel Schwefelkohlenstoff, Tetrachlorkohlenstoff und Chloroform, die allerdings je nach angewandter Schichtdicke (0,1 bis 1 mm) wegen nicht idealer IR-Transparenz auch noch Teilbereiche des Spektrums verdecken.

Festsubstanzen dispergiert in einer Festsubstanz (Pressling): Da praktisch keine vollständig IR-transparenten Lösungsmittel verfügbar sind und das Handling von Flüssigkeitsküvetten aufwändig ist, wird üblicherweise die notwendige Verdünnung durch Verreiben mit einem zwischen 4000 und 400 cm⁻¹ IR-transparenten Alkalihalogenid als Dispergiermedium erzielt. Alkalihalogenide haben die Eigenschaft, unter hohem Druck plastisch zu werden („kalter Fluss“); feine Kristallpulver fließen dann zu einem Pressling zusammen, der nach Aufhebung des Drucks als durchsichtige Scheibe zurückbleibt. Bewährt hat sich die schonende Verreibung zunächst der Probensubstanz per Hand in einem Achatmörser. Solche Mörser weisen eine sehr glatte, gut zu reinigende Oberfläche auf und verhindern Verschleppungen von Probensubstanzen. Dann wird zunächst ein kleiner Anteil des benötigten Dispergiermediums dazugegeben und erneut verrieben. Nach weiterer portionsweiser Zugabe des Einbettungsmittels (nach der USP 10, 20, 40, 80, dann 160 mg) wird im Idealfall eine weitgehend homogene Mischung mit geeigneter Partikelgröße erhalten. Ist die Korngröße der Substanz im Pressling größer als die kleinste gemessene Wellenlänge (also 2,5 µm bei Wellenzahlen bis zu 4000 cm⁻¹) und/oder sind die Brechungsunterschiede von Probe und Dispergiermittel groß, resultiert ein deutlicher Abfall der Basislinie von rechts nach links zu höheren Wellenzahlen (Chris-

tiansen-Effekt). Im Spektrum treten asymmetrische Banden auf, bei denen Flanken in Richtung größere Wellenzahlen steil ansteigen, während Flanken zur niedrigeren Wellenzahl hin einen flachen Verlauf zeigen. Durch längeres Mahlen kann der Christiansen-Effekt verringert werden, gleichzeitig findet ein vermehrter Eintrag von Wasser in das hygroskopische Einbettungsmittel statt. Mechanische Mühlen sind ebenfalls gut geeignet; es ist allerdings nicht trivial, die jeweils beste Verreibung zu realisieren, da sowohl ungenügende als auch zu starke Zerkleinerung der Partikel zu unbrauchbaren Presslingen führen kann. Das während der Herstellung der Verreibung Wasserdampf aus der Laborluft mit dem hygroskopischen Pulver in Kontakt kommt, lässt sich nicht vollständig vermeiden, kann aber die Qualität des Presslings negativ beeinflussen und führt zu breiten Banden bei 3400 und 1640 cm^{-1} . Beim anschließenden Verdichten des Haufwerks in einer hydraulischen Presse bei einem kurzzeitigen Druck (1 bis 3 min) von 6 bis 8 t/cm^2 in Spezialpressformen, wie sie von den verschiedenen Herstellerfirmen für IR-Zubehör angeboten werden, sollte aber dieser Tatsache Rechnung getragen und bei vermindertem Druck gearbeitet werden, wenn Aufnahme von Wasser ein Problem darstellt. Durch Anschluss der Matrize des Presswerkzeugs an die Vakuumpumpe wird Zutritt weiterer Laborluft verhindert, die weitere Adsorption von Wasser an die Partikeloberfläche ausgeschlossen und durch den verminderten Druck eventuell sogar rückgängig gemacht.

Die beim Verreiben, Mahlen und Kompaktieren auftretenden Kräfte sind geeignet, die Energie zu liefern, die für chemische und physikalische Umwandlungen metastabiler Zustände ausreichend sind. Liegen Kristalle in einer Kristallform vor, die nicht die thermodynamisch stabilste ist, kann die notwendige Aktivierungsenergie zur Umwandlung in die thermodynamisch stabilere Kristallform aus diesen Prozessen geliefert werden. Die dann erhaltenen Spektren können von den erwarteten Spektren abweichen, eine Identitätsprüfung stören und müssen deshalb beachtet werden. Soll zwischen mehreren handelsüblichen polymorphen Kristallformen eines Arzneistoffs unterschieden werden, sind mechanische Belastungen möglichst zu minimieren, um keine Artefakte zu erzeugen.

Verunreinigungen im Einbettungsmittel können ebenfalls eine Ursache für fehlerhafte Presslinge

sein. Deswegen sind Alkalihalogenuide in besonderer Reinheit handelsüblich („für die Spektroskopie“) und müssen in einem Exsikkator über einem Trockenmittel gelagert werden. In der Praxis hat sich vor allem Kaliumbromid bewährt, das bis 250 cm^{-1} (40 μm) für IR-Strahlen durchlässig und in der erforderlichen Reinheit und Korngröße leicht herzustellen ist. Das stark polare KBr führt allerdings zu stärkeren Wechselwirkungen mit Arzneistoffen als nicht IR-transparente Dispergiermittel wie Paraffin. Die Empfehlung der Ph. Eur., IR-Spektren von Hydrochloriden als KCl-Pressling aufzunehmen, beruht auf der theoretisch möglichen Umwandlung von Salzen unter oben erwähnter mechanischer Belastung, weicht aber z.B. von der Praxis der USP ab. In Abb. 6 (oben) sind Transmissionsspektren von Lidocainhydrochlorid-Monohydrat als KCl- und KBr-Pressling zu sehen, die sich unterscheiden. Diese Abweichungen können aber nicht als Beleg für eine Umsalzung dienen, da nicht sichergestellt werden kann, dass sich die Presslinge nicht auch in weiteren Eigenschaften der beiden Einbettungsmittel unterscheiden.

Da starke mechanische Zerkleinerung auf der einen Seite günstig sein, auf der anderen aber auch zu schneller Trübung der transparenten Presslinge führen kann, bedarf es einiger Übung, bis man klare, transparente Scheiben mit geringer Eigenabsorption für die mittlere IR-Strahlung erhält. Ungleichmäßig transparente oder trübe Presslinge werden an einer Basislinien-Transmission unter 60 % oder der „Absorption“ von 0,22 im ansonsten eher bandenfreien Bereich bei 2000 cm^{-1} erkannt. Dass besser die Transmission betrachtet und speziell bei nicht transparenten Presslingen nicht von Absorption, sondern von Absorbanz gesprochen werden sollte, ergibt sich aus den oben gemachten Erläuterungen. Ungenügende Presslinge zu zerkleinern und erneut zu einem Pressling zu verdichten, führt in der Regel nicht zum Erfolg. Gelingene Presslinge sind mechanisch ausreichend stabil, um in spezielle Probenhalter überführt zu werden, und sollten unverzüglich gemessen werden.

Festsubstanzen dispergiert in einer Flüssigkeit (Paste): Zur Herstellung einer Paste verreibt man zunächst eine Spatelspitze der Substanz in einem Achatmörser sehr sorgfältig zu einem äußerst feinen Pulver, die Qualität der anschließend erhaltenen Spektren nimmt mit dem Zerkleinerungsgrad

der Substanz zu. Einige Monographien sehen bei Substanzen, die in verschiedenen polymorphen Kristallformen auftreten, bei Abweichungen der Feststoffspektren den Vergleich der Spektren von Pasten amorpher Lösungsrückstände vor. So können Unterschiede, die ausschließlich auf unterschiedliche Kristallformen zurückgehen, ausgeschlossen werden. Häufig verwendet man dann den nach Auflösen z. B. in Methanol und Verdampfen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom erhaltenen amorphen Rückstand. Zu dem verriebenen oder amorphen Inhalt des Achatmörser gibt man anschließend einen Tropfen Dispergiermittel wie flüssiges Paraffin *R* („Nujol“, abgeleitet von *new oil*) und vermischt gründlich zu einer Zubereitung halbfester Konsistenz, die dann zwischen zwei Kochsalzplatten einer zerlegbaren Küvette in den IR-Strahlengang gebracht wird. Sehr nachteilig wirkt sich die starke Eigenabsorption des Paraffins im Bereich von 2800 bis 2900 cm^{-1} (3,5 μm), 1450 cm^{-1} (6,9 μm) und 1375 cm^{-1} (7,3 μm) aus, die mögliche Banden der Substanz in den genannten Regionen völlig überdeckt. Will man diese Gebiete untersuchen, muss man auf andere Einbettungsmittel (z. B. Hexachlorbutadien oder Perfluorokohlenwasserstoffe) ausweichen, die ihrerseits in gewissen Bereichen unterhalb 1250 cm^{-1} nicht transparent sind oder einen anderen Messmodus wählen.

Ungleichmäßige transparente Pasten werden verworfen. Eine geringe Transmission bei 4000 cm^{-1} , eine zwischen 4000 und etwa 2500 cm^{-1} stark ansteigende Basislinie und ein unerwartet kleines Verhältnis von relativen Intensitäten einiger Banden werden als Ausschlusskriterien aufgeführt. Oft kann die Herstellung einer Paste umgangen werden, indem die amorphe Substanzprobe als eingedampfte Lösung (s. u.) untersucht wird.

Geschmolzene Festsubstanzen: Geschmolzene Massen sind eine Option, aus Festsubstanzen metastabile, amorphe Feststoffe zu erhalten.

Eingedampfte Lösung: Lösungen der zu prüfenden Substanz in einem flüchtigen Lösungsmittel, das nicht notwendigerweise IR-transparent sein muss, können z. B. auf KBr-Plättchen verdampft und so ein Trockenfilm hergestellt und in Transmission vermessen werden. Dieses Vorgehen ist z. B. für **Disopyramid** (Ph. Eur.) vorgesehen, weil der Arzneistoff in zwei polymorphen Formen vorkommt.

Konkret sollen Lösungen von Disopyramid in Dichlormethan *R* auf KBr-Presslinge gegeben und bei 60 °C für eine Stunde getrocknet werden. Das gleiche Vorgehen wird auch zur Identitätsprüfung der strukturell sehr ähnlichen Arzneistoffe **Fluphenazin** und **Fluphenazindecanoat** (beide Ph. Eur.) empfohlen, wobei eine zusätzliche Prüfung mittels DC-Prüfung wegen der Ähnlichkeit der Spektren erforderlich ist. In der Monographie **Poly(vinylacetat)** (Ph. Eur.) wird sowohl die Transmissionsmessung eines Trockenfilms (eingedampfte Aceton-Lösung auf KBr-Pressling) als auch alternativ die direkte Vermessung der Substanz im ATR-Modus aufgeführt. Weiterhin besteht die bereits genannte Möglichkeit, als Träger für einen Trockenfilm direkt die IRE eines ATR-Geräts zu verwenden, was sowohl naheliegend als auch praktikabel erscheint. Anders als bei KBr-Presslingen oder NaCl-Einkristallplättchen, die häufig bei erhöhter Temperatur z. B. eine Stunde lang getrocknet werden müssen, können die Trockenzeiten (bei Raumtemperatur) jedoch nicht so gut standardisiert werden. Deshalb ist diese Variante auch nicht vorgesehen und verbietet sich, wenn der Probendurchsatz hoch ist. Eingedampfte Lösungen wären z. B. auch geeignet, ein Enantiomer wie (*R*)-Methadonhydrochlorid (**Levomethadonhydrochlorid**, Ph. Eur.) mit seinem Racemat Methadonhydrochlorid zu vergleichen, wenn keine enantiomerenreine Referenz zur Verfügung steht. Im Falle von Betäubungsmitteln unterliegt die Versendung von CRS-Proben Restriktionen und wird durch Referenzspektren ersetzt, weshalb zurzeit leider nur ein Referenzspektrum des kristallinen Feststoffs Methadonhydrochlorid als Racemat erhältlich ist, keine Spektren eingedampfter Lösungen aufgenommen werden können und somit geringfügig abweichende Spektren in Kauf genommen werden müssen.

Gase: Für die Aufnahme von IR-Spektren gasförmiger Substanzen sind Spezialküvetten erforderlich. Sie haben in der Regel eine Schichtdicke von 10 cm und sind mit zwei Anschlussstutzen und Absperrhähnen für die Gaszufuhr und die Gasabfuhr versehen. Zum Füllen muss die Zelle zunächst durch Evakuieren von Luft befreit werden. Anschließend wird sie mit dem zu untersuchenden Gas bis zu einem bestimmten Partialdruck gefüllt. Dann kann entweder direkt gemessen oder der Unterdruck in der Gasküvette zuvor durch Einleiten eines für die mittlere IR-Strahlung durchlässigen

Gases wie Stickstoff *R* oder Argon *R* ausgeglichen werden. Das Evakuieren und Füllen muss mit Hilfe einer geeigneten Vakuumapparatur vorgenommen werden, die eine genaue Kontrolle des Drucks und nach dem Evakuieren ein direktes Einleiten des zu untersuchenden Gases und eventuell des Füllgases ermöglicht. Um Wasser, Kohlendioxid oder andere atmosphärische Gase zu kompensieren, ist ein dafür geeignetes Messprotokoll zu befolgen. Die IR-Spektren von Gasen zeichnen sich dadurch aus, dass die registrierten Banden eine Rotationsfeinstruktur zeigen, die zusätzliche Aussagen über die Energiedifferenz der Rotationsniveaus gestattet. Die Ph. Eur. sieht die Aufnahme von Gas-IR-Spektren in Normalküvetten z.B. bei **Isofluran** vor. Anstelle einer CRS-Probe ist ein CRS-Probenspektrum beim EDQM (für die übliche CRS-Gebühr) erhältlich. Da Gasspektren wie ausgeführt sehr gut vergleichbar sind, ist der Verzicht auf die Versendung auch vor dem Hintergrund der für Gasküvettenfüllungen benötigten Menge einsichtig.

ATR-Modus

Der ATR-Modus ist für flüssige und feste Proben geeignet und besonders attraktiv. Wenn überhaupt eine Probenvorbereitung erforderlich sein sollte, beschränkt diese sich auf sehr einfache Operationen wie Zerreiben von großen Kristallen und grobem Material.

Flüssigkeiten: Man registriert Spektren von Flüssigkeiten am einfachsten auf ATR-Kristallen. Eine Probenvorbereitung kann dann entfallen, lediglich bei sehr leicht flüchtigen Lösungsmitteln muss die Probe gekühlt werden, damit sie nicht vor Abschluss der Messung verdampft ist. Sowohl vorliegende wässrige Lösungen als auch organische Lösungsmittel und darin gelöste Arznei- und Hilfsstoffe können ohne Probenvorbereitung auf einen ATR-Kristall getropft und das Spektrum des Lösungsmittelfilms oder des Trockenfilms registriert werden. Festsubstanzen oder Flüssigkeiten für die Aufnahme von Spektren in Lösungsmitteln zu lösen und so Stoffgemische zu erzeugen und zu untersuchen, wenn auch die Untersuchung des Rein- stoffs möglich wäre, ist für qualitative Aussagen nur in Ausnahmefällen üblich (z.B. bei **Chlorpromazinhydrochlorid**, Ph. Eur., in Dichlormethan). Bei solchen Spektren müssen zum einen Lösungsmittelspektren als Background registriert

und abgezogen werden, zum anderen treten das Spektrum beeinflussende Wechselwirkungen auf, die man nicht ohne Grund in Kauf nehmen würde.

Festsubstanzen: Ein unverzichtbarer enger und gleichmäßiger Kontakt zwischen Probe und Kristalloberfläche wird bei mechanisch hoch belastbaren Diamant-IRE in der Regel durch Betätigen eines vom Hersteller vorgesehenen Anpressmechanismus realisiert.

Alternativ kann nach der Ph. Eur. eine feste Substanz gelöst und auf den ATR-Kristall getropft werden, um nach möglichst vollständigem Verdunsten des Lösungsmittels einen Trockenfilm zu erhalten. Wegen der hohen Geschwindigkeit des Verdunstungsprozesses leichtflüchtiger organischer Lösungsmittel ist eine geordnete Kristallisation unwahrscheinlich und es würden überwiegend sehr dünne, eventuell nicht zusammenhängende amorphe Trockenfilme gebildet werden. Die Ph. Eur. lässt daher Kristalle der Substanz auf dem ATR-Kristall mit einer Lösung der gleichen Substanz bedecken und dann das Lösungsmittel zur Trockne eindampfen. So kann auch ohne mechanische Belastung eine größere Stoffmenge auf die IRE gebracht werden, gleichzeitig steigt die Reproduzierbarkeit der Filmbildung und die Wahrscheinlichkeit, im Spektrum Einflüsse der vorherrschenden Kristallform abzubilden. Sollen durch die durch unterschiedliche polymorphe Kristallformen eines Stoffes im Proben- und Referenzspektrum hervorgerufenen Abweichungen eliminiert werden, sind Informationen über das Kristallgitter im Spektrum unerwünscht. Dann ist dieses Vorgehen nicht zielführend und die Messung eingedampfter Lösungen als amorphe Trockenfilme vorteilhafter.

Methoden

Die IR-Spektroskopie im mittleren IR dient bei nahezu allen organischen Arzneistoffen zum Identitätsnachweis, kann aber zusätzlich für in diesem Kapitel nicht beschriebene quantitative Bestimmungen angewendet werden. Die quantitative Analyse ist im Vergleich zur UV-Vis-Spektroskopie dadurch erschwert, dass nicht mit stark verdünnten Lösungen in transparenten Lösungsmitteln gearbeitet werden kann und bei festen Proben die Absorbanz statt der Absorption betrachtet werden müsste. Trotzdem können die hier beschriebenen FTIR-Geräte dazu herangezogen werden, z.B. den Gehalt von Saccharose-Lösungen oder für individuelle Pa-

tienten hergestellten Methadonhydrochlorid-Säften in der Apotheke zu überprüfen.

Die Proben werden dem Messmodus entsprechend vorbereitet oder nur präsentiert und die Messung durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten der Proben- und Referenzspektren werden verarbeitet und evaluiert. Wie schon erwähnt, sollte die Spektrenqualität durch Apodisation, Zerofilling und weitere hier nicht beschriebene mathematische Operationen (Phasenkorrektur) verbessert werden. Die Aussage, in der Praxis sei die Bearbeitung der Rohdaten auf eine spektrale Normalisierung und auf eine Subtraktion von durch Kohlendioxid und Wasserdampf hervorgerufenen Banden begrenzt, ist insofern unklar.

Spuren von Wasser in der Probe oder als Dampf in der Luft können zu Banden in der Nähe von 3700 und 3600 cm^{-1} sowie zu einem zusätzlichen Signal bei ca. 1600 cm^{-1} führen. Die im Tagesverlauf typischerweise durch Atmung des Laborpersonals steigende Kohlendioxidkonzentration in der Laborluft würde zu Banden einer asymmetrischen Streckschwingung bei 2350 cm^{-1} und einer Knickschwingung bei 650 cm^{-1} führen und muss ebenfalls kompensiert werden. Dies kann durch wiederholte Aufnahme von Hintergrundspektren (Background) oder rechnerisch (siehe den Abschnitt „Vorteile der FTIR-Spektroskopie“, Nr. 3) realisiert werden.

Identifizierung

In der Regel muss zum Identitätsnachweis durch IR-Spektroskopie die entsprechende CRS in Straßburg angefordert werden, um einen Vergleich beider IR-Spektren (d.h. das der zu untersuchenden Substanz und das des Referenzstandards) vornehmen zu können. Bei einer bereits zur Verfügung stehenden CRS ist abzuklären, ob dieser der aktuellen zugelassenen Charge entstammt (*batch number*).

Trotz aller Fortschritte in der Gerätetechnik ist dieser umständliche auch der sicherste Weg zur Identitätsprüfung, weil das IR-Spektrum der fraglichen Substanz mit dem unter identischen apparativen Bedingungen aufgenommenen IR-Spektrum einer Referenzsubstanz besser verglichen werden kann als mit einem Referenzspektrum, das unter abweichenden Bedingungen aufgenommen wurde. Dieses Vorgehen stellt deshalb den Standard in der Pharmazeutischen Industrie dar. Wurde allerdings in einem Labor eines Unternehmens bereits ein CRS-Spektrum aufgenommen und gespeichert,

kann es so lange als Referenzspektrum verwendet werden, bis die verwendete Charge der CRS-Referenz nicht mehr verfügbar ist und damit die Rückführbarkeit erlischt (s.o.) oder sich Messparameter geändert haben. Seit der Ph. Eur. 9.7 ist dieses Vorgehen im Zuge der Adaption des Kapitels 2.2.23 an PAT auch generell zugelassen.

Eine Prüfung auf Identität kann bei Verfügbarkeit auch durch Vergleich des Spektrums der zu prüfenden Substanz mit einem Ph.-Eur.-Referenzspektrum wie bereits angeführt vergleichsweise einfach bei Gasen wie **Isofluran**, aber auch z.B. bei **Calcitriol**, **Fosfomycin-Natrium**, **Mupirocin** (alle Ph. Eur.) und vielen weiteren Stoffen durchgeführt werden. Dies gilt in besonderem Maße für Substanzen wie **Methadonhydrochlorid** (Ph. Eur.), die als CRS-Proben nicht ohne weiteres gehandelt werden können, weil sie unter das Betäubungsmittelgesetz fallen. Diese pragmatische Lösung hat aber den Nachteil, dass wegen der zahlreichen unterschiedlichen kommerziell verfügbaren Geräte, herstellerspezifischer Rohdatenprozessierung und Messmodi (siehe die Ausführungen zur eingeschränkten Vergleichbarkeit von Transmissions- und ATR-Spektren) Abweichungen resultieren, die schwierig zu beurteilen sein können.

Eine Identitätsprüfung von in der Ph. Eur. beschriebenen Arznei- und Hilfsstoffen über kommerziell erhältliche Datenbanken entspricht nicht den Forderungen des Arzneibuchs, wenn weder die Rückführbarkeit der Referenzproben sichergestellt ist noch alle relevanten Details zur Probenmessung und Spektrenbearbeitung abgerufen werden können. Folglich dienen auch die im Kommentar abgebildeten IR-Spektren nur der Orientierung des Benutzers und können somit nicht die Aufnahme eines IR-Referenzspektrums ersetzen, wenn dies im Arzneibuch vorgeschrieben ist. Für nicht im Arzneibuch aufgeführte Ausgangsstoffe können dagegen geeignete Referenzspektren herangezogen werden.

Die JAP lässt das IR-Spektrum der fraglichen Substanz entweder mit dem eines unter gleichen Bedingungen aufgenommenen IR-Spektrums des Referenzstandards vergleichen oder mit dem im Anhang der Pharmakopoe (frei verfügbar) abgebildeten IR-Referenzspektrum oder lässt bei Reagenzien aufgeführte Wellenzahlen von Banden vergleichen. Für Offizinapotheken mit häufig wechselnden Ausgangsstoffen wäre das japanische System vorteilhafter. CRS-Referenzen zu beziehen

ist zeit- und kostenaufwändig und wenn die Ph. Eur. den Spektrenvergleich mit CRS-Referenzspektren akzeptiert, auch wenn im Detail unterschiedliche Aufnahmebedingungen vorliegen, wäre es wünschenswert, dass eine akzeptierte Spektrensammlung mit ATR-Spektren für die Ausgangsstoffprüfung ähnlich barrierefrei, idealerweise in elektronischem Format als Sammlung von Datenpunkttabellen, bereitgestellt würde. Die Ph. Eur. fordert lediglich gleiche Gerätebedingungen, gleiche Vorgehensweise und insbesondere Aufnahme der Spektren im gleichen Messmodus. Verschiedene IRE-Geometrien von ATR-Geräten könnten in diesem Zusammenhang wohl als gleich angesehen werden, ATR- und Transmissionsmodus aber nicht.

Verschiedene Vergleichsmethoden für Proben- und Referenzspektrum sind zulässig, solange die verwendete Methode und die spezifischen Akzeptanzkriterien, die einen Rückschluss auf die Identität zulassen, dokumentiert und begründet werden. Diese Anforderung ist bei einer Software-basierten Ähnlichkeitsbewertung leichter zu erfüllen als bei einem visuellen Spektrenvergleich, bei dem Unterschiede kaum quantifiziert werden. Früher galt, dass die Identität von Probe und Referenz nur dann gegeben ist, wenn Zahl, Lage und relative Intensität aller Banden in beiden Spektren übereinstimmen, weil das Übereinanderlegen gesamter Spektren auf Papier die Regel war. Zwar ist ein visueller Vergleich von Bandenpositionen und relativen Intensitäten nach wie vor aufgeführt und es gilt weiterhin, dass Transmissionsminima (oder Absorptionsmaxima) im Spektrum der zu prüfenden Substanz in Lage und relativer Größe denen des Referenzspektrums entsprechen müssen; es ist aber auch zulässig, nur wichtige, in der Monographie spezifizierte Regionen der Spektren in Form von Ausschnittsvergrößerungen übereinander zu legen oder Software-gestützt durch mathematische Berechnungen zu einem Ergebnis zu gelangen. Wird eine Berechnung des Korrelationskoeffizienten zwischen Proben- und Referenzspektrum durchgeführt, muss ein Grenzwert für die Identifizierung, z. B. Korrelationskoeffizient mal 100 % ≥ 95 %, für mindestens erforderliche Übereinstimmung festgelegt und begründet sein. Leicht realisierbar sind bei einem Software-gestützten Spektrenvergleich automatisch generierte Ranglisten, die alle dem System bekannten Spektren nach Ähnlichkeit reihen und die besten Treffer auf den

ersten Plätzen anzeigen. Die Überprüfung der Übereinstimmung durch fachlich speziell geschultes Personal bleibt trotz dieser komfortablen Möglichkeit notwendig. Sollten nämlich mehrere unterschiedliche Spektren eine sehr hohe Übereinstimmung von ≥ 95 % aufweisen, müssen Zusatzprüfungen durchgeführt werden, um eine Abgrenzung zu verbessern. Eine möglichst große Spektrensammlung führt damit nicht zu einer Arbeitserleichterung für die Bestätigung einer Eingangsvermutung, sondern nur für die Identifizierung unbekannter Proben. Eine große Spektrensammlung senkt aber das Risiko, eine Verwechslung mangels Vergleichsspektren nicht zu entdecken. Dafür wären auch Spektren nicht rückführbarer Substanzen oder ältere Spektren mit abweichenden Mess- oder Geräteparametern wertvoll. Für die Bestätigung der Identität im Arzneibuch beschriebener Arznei- und Hilfsstoffe dürfen solche Spektren aber nicht herangezogen werden. Das mögliche Auftreten sehr ähnlicher Spektren z. B. eng verwandter Substanzen ist in der Ph. Eur. bereits berücksichtigt und Zusatzprüfungen (siehe die Ausführungen zur Chloridfällung mit Silbernitrat-Lösung) noch regelhaft in den einzelnen Monographien zur Erhöhung der Sicherheit konkret vorgesehen, obwohl das erkennbare Ziel in neuen Monographietexten die Reduzierung des Umfangs von Zusatzprüfungen ist.

Beim Spektrenvergleich wird vorausgesetzt, dass Probe und Standard die gleiche Reinheit aufweisen und isomorph sind. Das letztgenannte Kriterium ist besonders bei den zur Polymorphie neigenden Substanzen nicht immer erfüllt. Sind Probe und Standard verschiedene kristalline Modifikationen der gleichen Substanz, so können ihre IR-Spektren vor allem im Fingerprint-Bereich Abweichungen aufweisen. Ist in der Monographie eine spezielle Modifikation vorgeschrieben, ist das Vorliegen einer anderen Kristallform ein wichtiger analytischer Befund und führt zur Ablehnung. Neben echten polymorphen Formen können auch pseudopolymorphe Formen (Solvate und Verdampfung von Lösungsmitteln bei Solvaten, Hydratbildungen), Verschiebungen zwischen Keto-Enol-Tautomerie- oder Assoziationsgleichgewichten oder unterschiedliche Korngrößen zu solchen Abweichungen Anlass geben.

Um die Unterschiede in den Spektren bewerten zu können, sieht die Ph. Eur. daher vor, die zu prüfende Substanz und die Referenzsubstanz in glei-

cher Weise so zu behandeln, dass sie umkristallisieren oder aber in der gleichen kristallinen Form auftreten oder ein spezielles Vorgehen wird in der Monographie beschrieben. Tatsächlich lässt die Ph. Eur. (z. B. bei **Ranitidinhydrochlorid**) Probe und Referenz getrennt in Methanol lösen, im Achatmörser zur Trockne eindampfen und aus den amorphen Rückständen Pasten mit Paraffin zubereiten. Von Umkristallisation oder dem Vorliegen gleicher Kristallformen kann bei den so hergestellten amorphen Substanzen also streng genommen nicht die Rede sein. Von den erhaltenen Pasten müssen erneut IR-Spektren aufgenommen werden, die die vorher auftretenden Unterschiede nicht mehr aufweisen, wenn diese z. B. auf unterschiedlichen Kristallformen beruht hatten. Sind die Spektren der amorphen Proben- und Referenzsubstanz identisch, kann die molekulare Identität von zu identifizierender Substanz und Referenz festgestellt werden. Ob die festgestellten Unterschiede dennoch relevant sind, muss im Rahmen der Ausgangsstoff-Qualifizierung bewertet werden. Sind allerdings auch in den Spektren der beiden Pasten Unterschiede zu erkennen, muss eine andere als die oben angeführten Ursachen vorliegen und die Identität von Probe und Referenz gilt als nicht festgestellt. In seltenen Fällen schreibt die Ph. Eur. auch die Aufnahme von Lösungsmittelspektren z. B. in Dichlormethan vor (z. B. bei **Cortisonacetat**). Die JAP sieht dagegen eine echte Umkristallisation der unterschiedlichen polymorphen Formen mit dem Ziel einheitlicher Kristallbildung vor. Dazu müssen zwei in der Hitze gesättigte, auf Raumtemperatur abgekühlte und dann übersättigte Lösungen stehen gelassen werden. Das dann eintretende geordnete Kristallwachstum nimmt allerdings mehrere Stunden Zeit in Anspruch und würde durch Spuren von Impfkristallen unbemerkt beeinflusst werden. Sollten noch Partikel der ursprünglichen Kristallform vorliegen, würde dies zu unterschiedlichem Kristallwachstum in beiden Lösungen führen können und das Ziel des Vorgehens würde verfehlt. Wenn in beiden Lösungen wie beabsichtigt gleiche Kristalle wachsen, müssen diese jeweils durch Filtration und Trocknung für eine erneute Herstellung von KBr-Presslingen vorbereitet werden. Anschließend werden erneut Spektren aufgenommen, verglichen und bewertet.

Spektrenauswertung mittels chemometrischer Methoden, die in der NIR-Spektroskopie der Normal-

fall ist (z. B. Euklidische Distanz, Mahalanobis-Distanz, Klassifizierungsmethoden) ist in der FTIR-Spektroskopie im mittleren IR-Bereich ebenfalls sinnvoll, aber eben nicht notwendig. Durch Anwendung chemometrischer Methoden können aber mehr Informationen aus Spektren entnommen und eine Automatisierung der Bewertung vorangetrieben werden. Zum Beispiel können Informationen über den Wassergehalt (siehe Abb. 4, oben), oder Partikeleigenschaften von Haufwerken oder Eigenschaften von Darreichungsformen aus experimentellen Messreihen ermittelt und für die Charakterisierung oder Qualifizierung herangezogen werden. Wie bei der NIR-Spektroskopie schließen diese Methoden das Set-up, die Beurteilung und die Validierung des chemometrischen Modells durch den Analytiker mit ein (siehe 5.21, Ph. Eur.) und erfordern die Erstellung eines validierten Identifizierungs-Moduls anstelle einer bloßen Spektrensammlung/-datenbank.

Verunreinigungen in Gasen

Außer den Normalzellen für die Registrierung von Gas-IR-Spektren gibt es für FTIR-Geräte Spezialküvetten oder Messköpfe mit einer optischen Schichtdicke bis zu mehreren Metern^{6,8}. Diese Strahlengänge können in kompakten Geräten realisiert werden, in dem der IR-Strahl mittels entsprechender spiegelnder Flächen innerhalb des z. B. kuppelförmigen, vergoldeten Messraums mehrfach reflektiert wird. Diese Zusatzmodule dienen zum Nachweis und zur Bestimmung von Spurenverunreinigungen in Gasen und sind z. B. für die Messung von Wasser in Sauerstoff geeignet. Beheizbare Module verhindern die Kondensation von Gasen in der Zelle.

Alternativ dazu können nichtdispersive IR-Geräte eingesetzt werden, bei denen keine ganzen Spektren registriert, sondern ausgewählte Wellenlängen in die Probe eingestrahlt oder nur ausgewählte Wellenlängen registriert werden. Da die Absorption von IR-Strahlung in Gasen zur Erwärmung führt, kann auch der Temperatur- oder Druckanstieg gegenüber einer Vergleichszelle registriert werden. Nach diesem Prinzip arbeiten auch handelsübliche IR-Analysatoren für die Erfassung des ausgeatmeten $^{13}\text{CO}_2$ -Anteils nach Gabe von ^{13}C -markiertem Harnstoff im Rahmen eines Tests auf Besiedlung des Magens mit *H. pylori*.

A. Link/Scr

Literatur

- 1) D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Instrumentelle Analytik*, Springer, Berlin 2013. 2) H. Günzler, H. M. Gremlich, *IR-Spektroskopie*, 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim 2003. 3) P. W. Atkins, J. de Paula, *Elements of physical chemistry*, 5. Aufl., Oxford UP, Oxford 2009. 4) M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 9. Aufl., Thieme Stuttgart 2016. 5) G. Rücker, M. Neugebauer, G. G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2013. 6) S. Lüttjohann, *Chem. Ing. Tech.* 85, 1012–1015 (2013). 7) T. J. Cholerton et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, 11, 1761–1766 (1984). 8) BRUKER OPTIK GmbH, *Alpha Benutzerhandbuch*, 4. Aufl., Ettlingen 2014; Thermo Scientific, Nicolet iS5 Kurzanleitung, K.-C. Schwan, Vers. 1, Dreieich 2011. 9) S. Roth, A. Stahl, *Optik: Experimentalphysik – anschaulich erklärt*, 1. Aufl., Springer Spektrum, Berlin 2019. 10) H. Parameswaran, *Basics of interferometry*, 2. Aufl., Elsevier, Amsterdam 2007. 11) J. Lange, T. Lange, *Fourier-Transformation zur Signal- und Systembeschreibung*, 1. Aufl., Springer Wiesbaden 2019.

Ringelblumenblüten

Calendulae flos

Allgemeine Angaben

In der Ph. Eur. 10.1 wurde die DC-Identitätsprüfung (C) neu verfasst und mit einer Abbildung versehen.

Definition

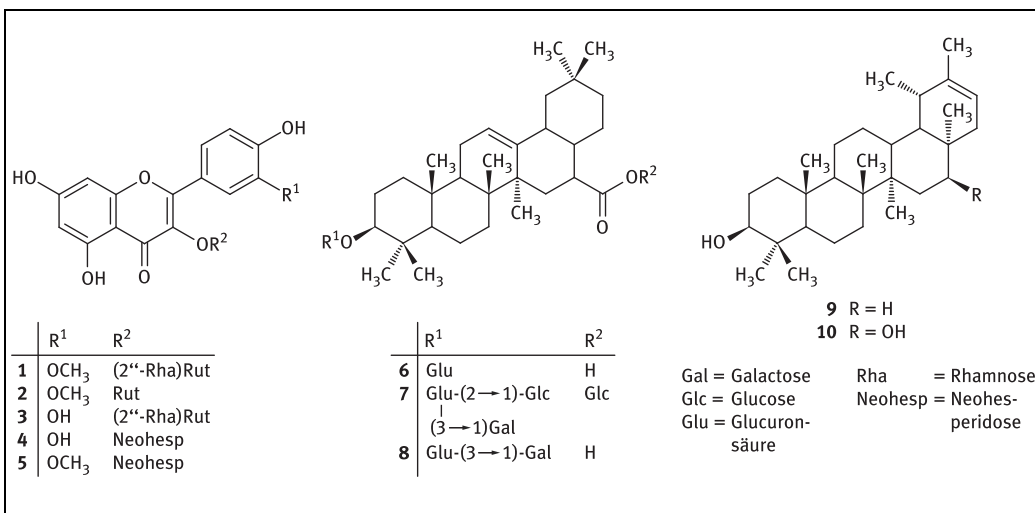
Stammpflanze^{1,2)}: Die (Garten-)Ringelblume, *Calendula officinalis* L. (Familie Asteraceae), wird seit dem Mittelalter als Garten- und Arzneipflanze kultiviert und ist heute nur noch als Kulturpflanze (mit mehreren Varietäten) bekannt. Man findet sie häufig als Zierpflanze in Gärten, zur Drogenengewinnung wird sie großflächig kultiviert. Die Ringelblume ist einjährig, 25 bis 50 cm hoch, ihre spateligen, kurz flaumig behaarten Blätter stehen gegenständig am Stängel. Jeder Stängel und jeder Seitenzweig trägt am Ende ein 3 bis 7 cm breites Blütenkörbchen mit schüsselförmigem Hüllkelch. Die Zungenblüten sind orangegelb, 15 bis 20 mm lang und in mehreren Reihen angeordnet; die Röhrenblüten sind trichterförmig und ebenfalls orangegelb. Als Kulturpflanze neigt die Ringelblume dazu, Röhren- in Zungenblüten umzuwandeln, sodass die Blüten manchmal auch „gefüllt“ aussehen. Die Früchte (Achänen) sind sichelförmig, gekrümmt bis geringelt.

Droge³⁾: Die Droge besteht fast ausschließlich aus Zungenblüten, die von verschiedenen Kulturvarietäten stammen können. Nach dem völligen Öffnen der Blütenköpfchen werden die Zungenblüten gesammelt und entweder im Schatten oder – häufiger – bei Temperaturen von 35 bis 80 °C getrocknet. Die Droge wird aus Ägypten, zum kleineren Teil aus Ungarn und Polen importiert.

Andere Drogennamen: Calendula, Marigold flower (engl.); Fleur de souci (des jardins) (franz.); Calendola (ital.); Flor de caléndula (span.)

Inhaltsstoffe¹⁻³⁾: Ringelblumenblüten enthalten 0,3 bis 0,8 % Flavonoide; die Ph. Eur. fordert einen Mindestgehalt an Flavonoiden von 0,4 %, berechnet als Hyperosid. Es handelt sich dabei vorwiegend um Derivate des Isorhamnetins und des Quercetins. Hauptflavonoide sind nach Lit.⁴⁾ das Isorhamnetin-3-*O*-(2''-rhamnosyl)-rutinosid (**1**; Typhaneosid), Isorhamnetin-3-*O*-rutinosid (**2**; Narcissin), Quercetin-3-*O*-(2''-rhamnosyl)-rutinosid (**3**; Manghaslin), Quercetin-3-*O*-neohesperidosid (**4**; Calendoflavobiosid) und das Isorhamnetin-3-*O*-neohesperidosid (**5**; Calendoflavosid). Außerdem sind dort noch drei weitere Isorhamnetinglykoside und vier weitere Quercetinglykoside (u.a. Rutosid und Isoquercitrin) aufgeführt, davon jeweils eines mit einer acetylierten Glucose. Als Calendoside I bis IV sind in Lit.⁵⁾ noch vier weitere Isorhamnetin- bzw. Quercetin-rhamnoglucoide identifiziert worden. An Phenylpropanoiden sind Kaffeesäure, Chlorogensäure, 3,5-, 1,5- und 3,5-Dicaffeoylchinasäure enthalten⁴⁾.

Die Droge enthält 2 bis 10 % Triterpensaponine und zwar die als Saponoside (A bis F) oder auch als Calenduloside (A bis F) bezeichneten Mono- bzw. Bisdesmoside der Oleanolsäure, wobei diese an C-3 immer mit Glucuronsäure glykosidiert ist (Saponosid F: **6**); an der Glucuronsäure hängt dann Galactose und/oder Glucose²⁾. Die Säuregruppe an C-28 ist teilweise mit Glucose verestert. Beispielfhaft seien die Strukturen von Saponosid A (**7**) und D (**8**) dargestellt. In Droge ägyptischer Provenienz wurden weitere Triterpenoligoglykoside identifiziert, die Calendasaponine A bis D⁶⁾. Die Droge enthält außerdem 4 bis 5 % Triterpenalkohole^{2,3)}, hauptsächlich vom ψ -Taraxen-, Taraxen-, Lupen-, Oleanen- und Ursen-Typ. Sie liegen in Form von Monoolen (α - und β -Amyrin, Lupeol, Taraxasterol), Diolen (Faradiol, Arnidiol) und Triolen (Heliantrirole A, B, C) vor, und zwar entweder frei oder mit Fettsäuren verestert. Dominierend ist dabei das Monool ψ -Taraxasterol (**9**) und das Diol



Faradiol (**10**), außerdem Monoester und Diester von Maniladiol, Arnitriol A und Lupan-3 β ,16 β ,20-triol⁷⁾; als Säurekomponenten sind Essigsäure, Laurinsäure, Myristicinsäure und Palmitinsäure beteiligt. Die Sterolfraction (1 bis 2%) besteht vorwiegend aus Stigmasterol, β -Sitosterol und Campesterol⁸⁾.

Bei den orangefarbenen Varietäten werden die Farbstoffe vorwiegend durch Carotinoide repräsentiert (1,5 bis über 4%)¹⁾; Hauptkomponenten sind dann Lutein, Zeaxanthin und Lycopin. Bei den gelb blühenden Varietäten handelt es sich um Xanthophylle. Zur Farbe der Blüten tragen auch die Flavonoide bei (s.o.). Das (wenig angenehm riechende) ätherische Öl der Droge (0,2 bis 0,3%; Röhrenblüten 0,64%, Zungenblüten 0,02%) besteht ganz überwiegend aus Sesquiterpenen, hauptsächlich α -Cadinol (29,1%), δ -Cadinen (5,2%), β -Calacoren 9,0%), γ -Cadinen (1,5%) und Cadina-3,9-dien (7,0%)⁹⁾; Lit.¹⁰⁾ nennt zusätzlich noch 1,10-Di-epicubenol, 1-Epicubenol und zahlreiche weitere Komponenten. Insgesamt wurden bis heute fast 70 Komponenten identifiziert²⁾, u.a. auch α - und β -Ionon; das Öl enthält auch freie Fettsäuren. In Droge ägyptischer Provenienz wurden auch zwei glykosidierte Terpene gefunden: zwei Iononglykoside (Officinosid A, B) und zwei Sesquiterpenglykoside (Officinosid C, D)⁶⁾ sowie zwei Glykosidester des Sesquiterpens Viridiflorol¹¹⁾.

Auffallend hoch ist der Gehalt an wasserlöslichen Polysacchariden (ca. 15%); es handelt sich um

säure, verzweigte Heteroglycane, Rhamnoarabinogalactane und Arabinogalactane¹²⁾. Die Blüten enthalten ferner 51,3 bis 68,0% ethanollösliche Kohlenhydrate und 4,2 bis 11,0% Pektine (Stängel: 21,2 bzw. 4,4%). Erwähnenswert sind noch die Cumarine Scopoletin, Umbelliferon und Aesculetin²⁾.

Prüfung auf Identität

C. Die Identitätsprüfung zielt auf die Flavonoide und Kaffeesäurederivate (Phenylpropanoide) der Droge. Sie wird mit Methanol extrahiert, der Extrakt auf einer Hochleistungs-DC-Platte (HPTLC, Korngröße 2 bis 10 μ m) getrennt. Als Referenzsubstanzen dienen Isorhamnetin-3-O-rutinosid (**2**; Narcissin) und Chlorogensäure. Nach Besprühen mit Diphenylboryloxyethylamin (früher: Naturstoffreagenz, Bildung von Bor-Chelatkomplexen) werden die Flavonoide im UV-Licht bei 366 nm als gelbbraune (Quercetinglykoside) oder gelbgrüne (Isorhamnetinglykoside) Zonen sichtbar, Kaffeesäure und deren Derivate als blau fluoreszierende Zonen. Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit und Stabilisierung der Fluoreszenz wird die DC mit Macrogol 400 (Polyethylenglycol-Lösung) nachbehandelt.

Die Trennung der Flavonoide erfolgt im Wesentlichen nach der Anzahl der Zucker; somit liegen die Aglykone nahe der Front, die Flavo-

noide mit einer Zuckerkomponente im mittleren DC-Bereich, darunter dann die Flavonoide mit 2 Zuckern und noch tiefer die Flavonoide mit 3 Zuckern. Im DC der Untersuchungslösung kann die Zone des Isorhamnetin-3-O-rutinosids (2; Narcissin) namentlich zugeordnet werden, die direkt darunter liegende braun oder gelb fluoreszierende Zone ist bei Auswertung der Abbildung in Lit.¹³⁾ das Rutosid, die deutlich tiefer liegende, gelbgrün fluoreszierende Zone das Isorhamnetin-rutinorhamnosid (1). Die hellblau fluoreszierenden Zonen stammen von den Kaffeesäurederivaten, wobei auf der Höhe der Chlorogensäure auch im DC eine hellblau fluoreszierende Zone zu erkennen ist; sie wird allerdings namentlich nicht zugeordnet. Die untere der hellblau fluoreszierenden Zonen nahe der Front ist die Kaffeesäure¹³⁾. Ansonsten wird der DC-Fingerprint im Vergleich zur tabellarischen Abbildung ausgewertet. Abbildungen in Lit.^{13–15)}, wobei dort Rutinosid anstelle von Isorhamnetin-rutinorhamnosid als Referenzsubstanz aufgetragen wird.

Gehaltsbestimmung

Für die Bestimmung des Flavonoidgehalts wird eine auch bei anderen Flavonoiddrogen der Ph. Eur. (siehe z. B. **Birkenblätter**, Ph. Eur.) verwendete photometrische Konventionsmethode eingesetzt. Das ist sinnvoll, da die Droge zahlreiche Flavonoide enthält und es somit um den Gesamtflavonoidgehalt geht. Das Prinzip der Bestimmung beruht auf einer Chelatkomplexbildung der Flavonoide mit Aluminiumchlorid, wobei ein Aluminium-Kation ($\text{Al}^{3\oplus}$) jeweils von drei Flavonoidmolekülen komplexiert wird. Die Flavonoid-

Chelatkomplexe sind gelb und stabil und lassen sich spektralphotometrisch im sichtbaren Bereich vermessen. Die strukturelle Voraussetzung für die Chelatbildung ist eine freie Hydroxygruppe in räumlicher Nachbarschaft zur Ketogruppe. Um sicherzustellen, dass die der Ketogruppe benachbarten Hydroxygruppen nicht durch Zucker besetzt sind, werden die Flavonoide mit Salzsäurezusatz und Hitze zunächst hydrolysiert. Der Zusatz von Methenamin bei der Hydrolyse soll eine Störung durch in der Droge enthaltene Leukoanthocyanidine verhindern. Diese würden ohne eine solche „Maskierung“ in Anthocyanidine überführt werden und mit $\text{Al}^{3\oplus}$ blaue Aluminiumchelate bilden. Damit würde die Prüflösung eine grüne Mischfärbung annehmen, die eine photometrische Erfassung der Flavonoide stören würde. Nach der Hydrolyse wird der Reaktionsansatz mit Wasser verdünnt, wonach die Aglykone mit Ethylacetat ausgeschüttelt werden können. Nach Waschen und Trocknen der Ethylacetat-Phase wird ein aliquoter Teil mit dem Aluminiumchlorid-Reagenz versetzt, wobei sich die intensiv gelben Aluminiumchelate der Flavonole und Flavone bilden; sie werden photometrisch bei 425 nm vermessen. Um der Formulierung der Gehaltsanforderung „berechnet als Hyperosid“ Rechnung zu tragen, enthält die Berechnungsformel die spezifische Absorption von Hyperosid ($A_{1\text{cm}}^{1\%} = 500$).

Andere Bestimmungsmethoden: Der Gehalt an Saponosiden lässt sich am besten mittels HPLC bestimmen¹⁶⁾. Die Carotinoide lassen sich sowohl kolorimetrisch als auch photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmen; siehe dazu die in Lit.²⁾ zitierten Publikationen.

E. Stahl-Biskup

Pharmakologische Eigenschaften^{3, 17, 18)}

Pharmakodynamik: Ringelblumenblüten werden in ähnlicher Weise wie **Arnika**blüten (Ph. Eur.) verwendet, siehe den zugehörigen Kommentar. Zubereitungen aus der Droge wirken entzündungshemmend, antimikrobiell, spasmolytisch und fördern die Wundheilung sowie die Bildung von Granulationsgewebe. Die angiogenen und spasmo-

lytischen Wirkungen wurden an Organpräparaten nachgewiesen. Als Hauptwirkprinzipien für die wundheilende Wirkung gelten Flavonoide wie Quercetinglykoside, Kämpferol und Isorhamnetin sowie verschiedene bidesmosidische und monodesmosidische Saponine. Das ätherische Öl und die Flavonoide wirken antibakteriell und mäßig fungizid. Die antiinflammatorische Wirkung wird auf freie und veresterte Triterpenalkohole zurückgeführt. Kleinere kontrollierte und nicht-kon-

trillierte klinische Studien ergaben positive Wirkungen bei äußerlicher Behandlung von Patienten mit Verbrennungen ersten bis dritten Grades sowie mit venösen Bein-Ulzera.

Indikationen: Äußerliche Behandlung von entzündlichen Veränderungen der Mund- und Rachenschleimhaut, Soor, trockener Haut, Ekzemen, Verbrennungen, Hämorrhoiden sowie von Wunden mit schlechter Heilungstendenz wie z.B. Ulcus cruris. In der Volksmedizin wird die Droge auch innerlich zur Verdauungsförderung, bei Störungen der Gallenproduktion, Magengeschwüren, als Diuretikum, Anthelmintikum und bei Menstruationsbeschwerden verwendet.

Das HMPC (Ausschuss der EMA) hat Ringelblumenblüten für das Anwendungsgebiet „leichte Hautentzündungen (z.B. Sonnenbrand), kleine Wunden, leichte Entzündungen im Mund- und Rachenraum“ als traditionelles pflanzliches Arzneimittel eingestuft¹⁹⁾.

Dosierung: Etwa 1 bis 4 g zerkleinerte Droge werden mit heißem Wasser (ca. 150 ml) übergossen und nach 10 min durch ein Teesieb gegeben.

Bei Entzündungen im Mund wird mit dem noch warmen Aufguss mehrmals täglich gespült und gegurgelt. Zur Behandlung von Wunden wird Leinen oder ein ähnliches Material mit dem Aufguss durchtränkt und auf die Wunden aufgelegt. Die Umschläge werden mehrmals täglich gewechselt. Cremes, Lotionen und Salben zur äußerlichen Anwendung enthalten 2 bis 5 g Rohdroge pro 100 g.

Nebenwirkungen: Gelegentlich sind Überempfindlichkeitsreaktionen, Brennen und Juckreiz möglich. Bei länger dauernder Anwendung können Kontaktekzeme auftreten.

Kontraindikationen: Überempfindlichkeit gegen Ringelblumen oder andere Korbblütler

Schwangerschaft und Stillzeit: Wegen fehlender Daten sollten Ringelblumenblüten während der Schwangerschaft und der Stillzeit gemieden werden. Die Droge wirkt in vitro Uterus-tonisierend.

M. Neubeck/Mu

Literatur

1) O. Isaac, *Die Ringelblume – Botanik, Chemie, Pharmakologie, Pharmazie und therapeutische Verwendung*, Wiss. Verlagsges., Stuttgart 1992. 2) O. Isaac, J. Reichling, *Calendula*, in: Hager. 3) Wichtl, 6. Aufl., S. 136–139 (2016). 4) D. N. Olennikov et al., *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1685–1702 (2017). 5) D. N. Olennikov, N. I. Kashchenko, *Chem. Nat. Comp.* 50, 633–637 (2014). 6) M. Yoshikawa et al., *Chem. Pharm. Bull.* 49, 863–870 (2001). 7) C. Nicolaus et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118, 195–205 (2016). 8) M. Heldmaier, Dissertation, Univ. Hamburg 2007. 9) L. Petrovic et al., *J. Essent.*

Oil Res. 22, 243–246 (2010). 10) V. Kaskoniene et al., *Chromatographia* 73 (Suppl. 1), 163–166 (2011). 11) A. A. Zaki, A. A. Ashour, L. Qiu, *Nat. Prod. Res.* DOI 10.1080/14786419.2020.1747457. 12) J. Varljen, A. Lipták, H. Wagner, *Phytochemistry* 28, 2379–2383 (1989). 13) Rohdewald/Rücker/Glombitza, Bd. 2. 14) Pachaly, *Ringelblumen*, Bd. 2. 15) DAC, Bd. 4 und 5. 16) E. Vidall-Ollivier et al., *Pharm. Acta Helv.* 64, 156–158 (1989). 17) MedicinesComplete®, *Herbal Medicines*. 18) B. Van Wyk, C. Wink, M. Wink, *Handbuch der Arzneipflanzen*, S. 85, Wiss. Verlagsges., Stuttgart 2015. 19) Herbal Medicinal Product Committee: www.ema.europa.eu/en/medicines (eingesehen 07/2020).

Definition

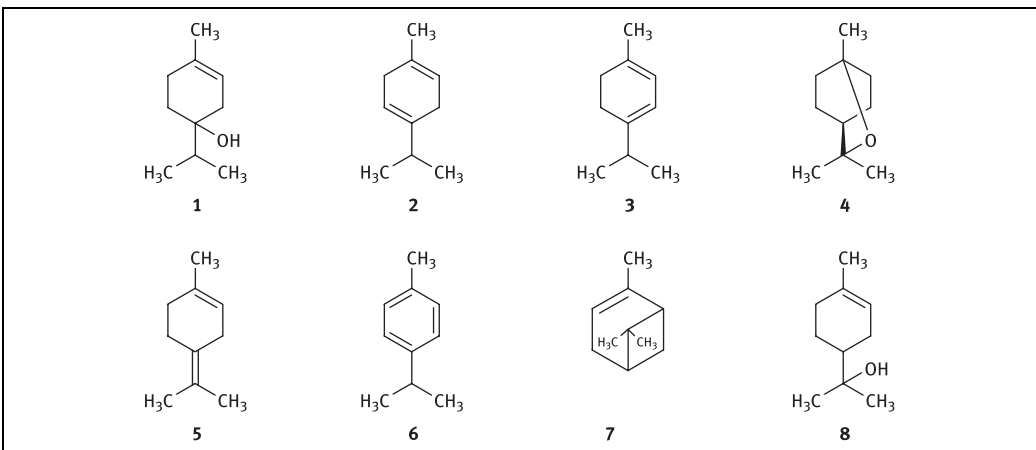
Stammpflanze^{1,2)}: Der Name „Teebaum“ wurde im Jahre 1770 von dem Naturkundler Joseph Banks geprägt, der James Cook auf der „HMS Endeavour“ bei seiner ersten Südsee-Expedition (1768-1771) begleitete. In Ermangelung an echtem Tee (*Camellia sinensis*) braute sich die Schiffsbesatzung ein Ersatzgetränk aus den Blättern der vorhandenen Sträucher und Bäume, die sie daraufhin „Teebäume“ nannten. Dazu zählten Arten der Gattungen *Baeckea*, *Kunzea*, *Leptospermum* und *Melaleuca* (alle in der Familie Myrtaceae).

Der Begriff „Teebaumöl“ im weiteren Sinne wird für die ätherischen Öle verschiedener Arten dieser vier Gattungen verwendet. Demgegenüber ist Teebaumöl nach der Definition des Arzneibuchs das ätherische Öl von *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel und anderer *Melaleuca*-Arten, namentlich *M. linariifolia* Sm. und *M. dissitiflora* F. Muell. Zur Unterscheidung von den anderen Teebaumölen sollte es besser als „Australisches Teebaumöl“ bezeichnet werden (siehe auch die Reinheitsprüfung „Chromatographisches Profil“).

Der Gattungsname *Melaleuca* nimmt Bezug auf den schwarzen Stamm, möglicherweise auch verkohlt durch Feuer, und die weiße Rinde der jüngeren Zweige (gr. melas = schwarz, gr. leucos = weiß). Das Epitheton *alternifolia* beschreibt die wechselständige Stellung der Blätter. Ansonsten handelt es sich um bis 7 m hohe Bäume mit buschiger Krone und spitz-lanzettlichen Blättern. Die Blüten stehen an den Bäumen in hellen flauschigen Massen.

Gewinnung: Die Bäume werden in Plantagen kultiviert und das ätherische Öl in Großdestillationsanlagen aus den Blättern und Zweigen durch Wasserdampfdestillation gewonnen. Australien ist ausschließliches Lieferland. Die frostharte *M. linariifolia* wächst wie *M. alternifolia* an der australischen Ostküste, das Verbreitungsgebiet von *M. dissitiflora* liegt im Landesinneren.

Andere Drogennamen: Tea tree oil, Melaleuca oil (engl.); Huile essentielle de Melaleuca (franz.)



Inhaltsstoffe¹⁻⁴: Von *M. alternifolia* sind sechs Chemotypen bekannt^{5, 6}), wovon nur der Terpinen-4-ol-reiche Typ mit einem niedrigen Gehalt an 1,8-Cineol als Arzneibuchöl Verwendung finden kann. Da die kommerzielle Ölgewinnung ausschließlich aus Pflanzenmaterial von Plantagenanbau erfolgt, sind die auf dem Markt befindlichen Öle recht einheitlich zusammengesetzt. Hauptkomponenten sind Terpinen-4-ol (**1**; 30 bis 40% Ph. Eur.: mindestens 30,0%), γ -Terpinen (**2**; 19 bis 23%; Ph. Eur.: 10,0 bis 28,0%) und α -Terpinen (**3**; 8 bis 11%; Ph. Eur.: 5,0 bis 13,0%). Daneben sind 1,8-Cineol (**4**; 2,5 bis 5%; Ph. Eur.: höchstens 15,0%), Terpinolen (**5**; 3 bis 5%; Ph. Eur.: 1,5 bis 15,0%), *p*-Cymen (**6**; 1 bis 5%; Ph. Eur.: 0,5 bis 12,0%), α -Pinen (**7**; 1,5 bis 3%; Ph. Eur.: 1,0 bis 6,0%), α -Terpineol (**8**; 2 bis 3%; Ph. Eur.: 1,5 bis 8,0%) und Limonen (1 bis 2%; Ph. Eur.: 0,5 bis 4,0%) enthalten. In Konzentrationen von meist jeweils unter 1% sind weitere 10 Monoterpene, 13 Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe (u.a. Aromadendren – Ph. Eur.: höchstens 7,0%, δ -Cadinen) und 6 sauerstoffhaltige Sesquiterpene (u.a. Viridiflorol, Globulol, T-Cadinol) vorhanden.

Die Enantiomerenverhältnisse einzelner Ölkomponten, die möglicherweise für eine Authentizitätsprüfung Bedeutung haben können, sind in Lit.^{7, 8}) untersucht; bei Terpinen-4-ol überwiegt das (+)-Enantiomer.

Prüfung auf Identität

A. Das ätherische Öl wird zu 2% in Heptan gelöst und adsorptionschromatographisch an Kieselgel getrennt. Als Referenzsubstanzen dienen 1,8-Cineol (**4**), Terpinen-4-ol (**1**) und α -Terpineol (**8**). Detektiert wird mit Anisaldehyd-Reagenz, einem Universalreagenz, das nach dem Erhitzen der Platte farblich differenzierte Zonen ergibt (Bildung u.a. von Triphenylmethanfarbstoffen). Im Chromatogramm der Untersuchungslösung können 1,8-Cineol, Terpinen-4-ol und α -Terpineol namentlich zugeordnet werden. Die Farben können von den Farbangaben abweichen. Naturgemäß sind weitere Zonen erkennbar, auf die nicht näher eingegangen wird. Die im Öl enthaltenen Monoterpene-Kohlenwasserstoffe (Terpinolen, *p*-Cymen, α -Pinen, Limonen) werden kaum erfasst, da sie beim Erhitzen von der Platte ab-

dampfen, bevor die Reaktion eintritt. Dementsprechend sind die violett gefärbten Zonen nahe der Front den Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffen zuzuordnen (u.a. Aromadendren). Eine Abb. ist in Lit.⁹) zu finden, eine farbige Abb. im DAC¹⁰), wobei dort Borneol und Bornylacetat als Referenzsubstanzen aufgetragen werden.

B. Für die Identitätsprüfung besser geeignet ist die GC, da damit alle Ölkomponten erfasst werden können. Dabei wird durch Retentionszeitenvergleich das Komponentenmuster der Untersuchungslösung mit dem der Referenzlösung verglichen. Mit den für die Reinheitsprüfung „Chromatographisches Profil“ ausgewählten 11 Referenzsubstanzen ist das Öl gut charakterisiert. Quantitative Aspekte bleiben dieser Reinheitsprüfung vorbehalten.

Prüfung auf Reinheit

Chromatographisches Profil: Der große Vorteil der GC ist, dass sie eine simultane quantitative Bestimmung aller Ölkomponten erlaubt, sodass für die Qualitätsprüfung keine weiteren Gehaltsbestimmungen notwendig sind. Die angegebenen Säulen- und Analysenparameter garantieren eine für die Prüfung geforderte Basislinientrennung des Substanzpaares Terpinen-4-ol und Aromadendren, was sich möglicherweise auch mit den im Routinelabor eher üblichen Säulen von 30 m erreichen lässt. Der Temperaturgradient errechnet sich aus den Angaben zu 5°C/min.

Als Referenzsubstanzen dienen α -Pinen, Sabinen, α -Terpinen, Limonen, 1,8-Cineol, γ -Terpinen, *p*-Cymen, Terpinolen, Terpinen-4-ol, Aromadendren, α -Terpineol, über deren Retentionszeiten die Peak-Identifizierung vorgenommen wird. Die quantitative Bestimmung erfolgt, wie in der Ätherisch-Öl-Analytik üblich, durch Peakflächenermittlung und Normalisierung der Peakflächen (100%-Methode), also ohne Bestimmung substanzspezifischer Korrekturfaktoren, wie es eigentlich für einen Flammenionisationsdetektor wegen seiner substanzspezifischen Ansprechempfindlichkeit zu fordern ist.

Die geforderten Grenzwerte gewährleisten, dass Verwechslungen mit oder Zumischungen von anderen Teebaumölen ausgeschlossen werden können. Als solche kommen das Neuseeländische Teebaumöl (Manukaöl, aus *Leptospermum scopae*-

rium J. R. Forst & G. Forst.), Kanukaöl [aus *Kunzea ericoides* (A. Rich.) Joy Thoms.] ,Cajuputöl (aus *Melaleuca cajuputi* Powell) und Niaouliöl [aus *M. quinquenervia* (Cav.) S. T. Blake] in Frage²⁾. „Neuseeländisches Teebaumöl“ (Manukaöl) hat mit „Australischem Teebaumöl“ der Ph. Eur. keinerlei Ähnlichkeit und ist v.a. durch das Vorkommen von β -Triketonen charakterisiert⁹⁾. Kanukaöl besteht hauptsächlich aus α -Pinen (50 bis 80 %). Die anderen beiden Teebaumöle zeichnen sich durch einen hohen 1,8-Cineolgehalt aus (40 bis 65 %).

Um Zusätzen von Terpinen-4-ol vorzubeugen, sollte eine obere Grenze gesetzt werden (Vorschlag nach Lit.²⁾: 45 %). Der Grenzwert für Terpinolen gewährleistet, dass keine Öle verwendet werden, die unter dem Namen „high cineole“ gehandelt werden, jedoch in Wirklichkeit Terpinolen-Chemotypen repräsentieren.

Teebaumöl ist vor einigen Jahren wegen allergischer Hauterscheinungen in den Fokus der Toxiko-

logen gekommen¹²⁾. Man fand schließlich heraus, dass diese unerwünschte Wirkung v.a. durch (schlecht) gelagerte Öle hervorgerufen wurde¹³⁾. Unter Einfluss von Sauerstoff oxidiert Terpinen-4-ol über ein Peroxid zu 1,2,4-Trioxymenanthan unter gleichzeitiger Dehydrierung der beiden Terpinene und Terpinolen zu *p*-Cymen¹³⁾, dessen Gehalt dabei merklich ansteigt (nach 1 Jahr 4facher Wert!), wobei 1,2,4-Trioxymenanthan als gelbe Plättchen ausfällt¹⁴⁾; die Terpinene fallen gleichzeitig deutlich ab (nach 1 Jahr um die Hälfte)²⁾. Insofern ist die obere Begrenzung von *p*-Cymen (12,0 %) wichtig.

Die Ergebnisse einer detaillierten Untersuchung der quantitativen Zusammensetzung eines frischen Teebaumöls im Vergleich zu einem lange gelagerten Teebaumöl mittels zweidimensionaler GC (GC x GC-qMS) wird in Lit.¹³⁾ vorgestellt.

E. Stahl-Biskup

Pharmakologische Eigenschaften

Pharmakodynamik^{3, 16-18)}: In vitro wirkt Teebaumöl antiviral gegen *Herpes-simplex*-Virus 1 und 2; antibakteriell gegen grampositive (z.B. Enterokokken, *Bacillus subtilis*, Staphylokokken, Listerien, *Propionibacterium acnes*), gramnegative Erreger (z.B. Pseudomonaden, *E. coli*, *Klebsiella* spec., *Salmonella* spec.), Methicillin-resistente *Staphylococcus-aureus*-Stämme, multiresistente *St.-aureus*-Arten sowie *Mycoplasma pneumoniae* und antimykotisch gegen *Candida*- und *Malassezia*-Arten sowie Dermatophyten, z.B. *Trichophyton*-Arten.

Pharmakokinetik: Teebaumöl ist wie alle ätherischen Öle aufgrund seiner Lipophilie ein Zellreizmittel und wird gut über Haut und Schleimhaut resorbiert. Es liegen keine weiteren Angaben zur Pharmakokinetik vor.

Indikationen¹⁹⁾: Aufgrund fehlender Teebaumölhaltiger Fertigarzneimittel zur Anwendung am Menschen gibt es derzeit keine gesicherte Indikation für Teebaumöl.

Therapeutische Wirkungen von Teebaumöl bei Verbrennungen, Mund- und Zahnfleischentzündungen, Schnittwunden, Hautabschürfungen, Soor-Infektionen sowie verschiedene Vaginalinfektionen wurden in klinischen Beobachtungsstudien untersucht, die allerdings teilweise Mängel aufweisen. Bei den Ergebnissen handelt es sich meist um Anwendungsbeobachtungen, Patientenangaben oder Einzelfallberichte. Die meisten Aussagen zu den oben erwähnten Indikationen haben daher lediglich orientierenden Charakter.

In klinischen Studien zu Erkrankungen mit *Tinea pedis* schnitt Teebaumöl nicht besser als Placebo ab, jedoch bei Onychomykose der Zehennägel zeigte sich reines Teebaumöl in randomisierten Doppelblindstudien als wirksam.

Bei *Acne vulgaris* stellt eine 5%ige Teebaumölbereitung eine Alternative zu klassischen Therapeutika dar.

In einer Studie wurde Teebaumöl (keine Konzentrationsangabe) bei AIDS-Patienten mit oropharyngealer Candidiasis getestet. Nach dem Ergebnis scheint Teebaumöl auch eine mögliche Alternative bei Fluconazol-resistenten Keimen zu sein.

Verdünntes Teebaumöl (1 Esslöffel Mandelöl mit 5 Tropfen Teebaumöl) wird in der Krankenpflege

bei Herpes labialis und H. genitalis mit Erfolg eingesetzt und auch bei *Candida*-Infektionen im weiblichen Vaginalbereich scheint Teebaumöl wirksam zu sein (20 Tropfen Teebaumöl in 100 ml dest. Wasser. Vor Gebrauch schütteln und Tampon damit tränken, vaginal einführen, alle 12 h wechseln).

Das HMPC (Ausschuss der EMA) hat Teebaumöl für das Anwendungsgebiet „kleine, oberflächliche Wunden und Insektenstiche sowie kleine Geschwüre (Furunkel, Akne); gegen Juckreiz und Hautreizungen bei Fußpilz sowie zur Behandlung einer leichten Entzündung der Mundschleimhaut“ als traditionelles pflanzliches Arzneimittel eingestuft²⁰⁾.

Dosierung³⁾: Da derzeit Dosisfindungsstudien fehlen, erscheinen Angaben zur Dosis recht willkürlich. Für die meisten Anwendungen scheinen verdünnte Zubereitungen hinreichend zu sein, zum Beispiel 5- bis 10%iges Teebaumöl, möglicherweise noch niedrigere Konzentrationen. Rezepturen mit 5%igem Teebaumöl haben den „Australian Therapeutic Goods Act“ für Desinfizienzien und Antiseptika sowie den „British Pharmacopoeia Preservative Efficacy Test“ bestanden.

Intoxikation¹⁹⁾: Konkretes humantoxikologisches Datenmaterial liegt nicht vor, die Toxizität ist mit der des **Eucalyptusöl** (Ph. Eur.) vergleichbar (siehe den zugehörigen Kommentar).

Bei einem zweijährigen Kind klangen Verwirrheitszustände nach Einnahme von weniger als

10 ml Teebaumöl innerhalb von 5 h vollständig ab. Bei einem 23 Monate alten Kind traten nach Einnahme von weniger als 10 ml Verwirrheitszustände und Koordinationsstörungen auf. Die Symptome verschwanden innerhalb von 5 h wieder.

Klinisch relevante Vergiftungen sind in Anbetracht der üblichen Anwendung und bisherigen Erfahrungen bei traditionellen Anwendungen nicht zu erwarten.

Nebenwirkungen: Bei kutaner und vaginaler Applikation sind Kontaktdermatiden und Hautirritationen, wahrscheinlich hervorgerufen durch Oxidationsprodukte von Terpenen, beschrieben worden. Dies gilt im Besonderen für die Anwendung von reinem Teebaumöl.

Kontraindikationen: Überempfindlichkeit gegen Teebaumöl und seine Inhaltsstoffe.

Bei Allergikern ist die Anwendung mit besonderer Vorsicht vorzunehmen.

Interaktionen: keine bekannt

Schwangerschaft und Stillzeit: Es liegen keine Hinweise vor.

Besondere Hinweise: Teebaumöl sollte nicht unverdünnt auf Haut und Schleimhaut aufgetragen werden.

D. Haspel/Mu

Literatur

- 1) G. Harnischfeger, J. Reichling, *Melaleuca*, in: Hager.
- 2) F. Christoph, Dissertation, Univ. Hamburg 2001.
- 3) J. Reichling et al., *PZ Prisma* 8, 228–238 (2001).
- 4) B. M. Lawrence, *Perfum. Flavor* 31, 52–56 (2006).
- 5) I. A. Southwell, I. A. Stiff, J. J. Brophy, *J. Essent. Oil Res.* 4, 363–367 (1992).
- 6) L. Homer et al., *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 367–382 (2000).
- 7) M. Kreck et al., *Flav. Fragr. J.* 17, 32–40 (2002).
- 8) Shellie et al., *Flav. Fragr. J.* 19, 582–585 (2004).
- 9) Rohdewald/Rücker/Glombitza, Bd. 2.
- 10) DAC, Bd. 4 und 5.
- 11) F. Christoph, P.-M. Kaulfers, E. Stahl-Biskup,

- J. Essent. Oil Res.* 11, 705–710 (1999).
- 12) K. H. Hammer et al., *Food Chem. Toxicol.* 44, 616–625 (2006).
- 13) J. J. Brophy et al., *J. Agric. Food Chem.* 37, 1330–1335 (1989).
- 14) M. Harkenthal, B. M. Hausen, J. Reichling, *Pharmazie* 55, 153–154 (2000).
- 15) P. Q. Tranchida et al., *J. Chromatogr. Sci.* 48, 262–266 (2010).
- 16) P. Schnitzler, K. Schön, J. Reichling, *Pharmazie* 56, 343–347 (2001).
- 17) M. Harkenthal et al., *Pharmazie* 54, 460–463 (1999).
- 18) M. Harkenthal, G. Layh-Schmitt, J. Reichling, *Pharmazie* 55, 380–384 (2000).
- 19) M. R. Jacobs, *Clin. Toxicol.* 32, 361–364 (1994).
- 20) Herbal Medicinal Product Committee: www.ema.europa.eu/en/medicines (eingesehen 08/2020).

Achtung: Lit. 11 nicht im Text verankert!!!!

Chlorhexidindigluconat-Lösung

Chlorhexidini digluconatis solutio

Allgemeine Angaben

Chlorhexidin ist ein kationisches Bisbiguanid mit antibakterieller Aktivität.

An weiteren Chlorhexidinderivaten beschreibt die Ph. Eur. **Chlorhexidindiacetat** und **Chlorhexidindihydrochlorid**.

Chlorhexidindigluconat-Lösung ist eine mindestens 19,0- und höchstens 21,0%ige Lösung dieser Substanz in Wasser.

Schon im Nachtrag 7.8 wurde bei der Reinheitsprüfung „Chloranilin“ die Prüfung durch Farbvergleich, die auf der Umsetzung zu einem Azofarbstoff beruht, durch eine UV-Vis-spektrometrische Methode ersetzt. Der Grenzwert für Chloranilin wurde von 0,25 % auf 500 ppm gesenkt.

CAS-Nr.: 18472–91–0

PubChem-Nr.: 44134624

DrugBank-Nr.: DB00878 (Chlorhexidin)

Stabilität/Lagerung: Chlorhexidindigluconat-Lösung soll bei einer Temperatur unter 25 °C gelagert werden¹⁾. 5%ige Verdünnungen sind oft mit einem nichtionischen Lösungsvermittler versetzt, um ein Ausfallen des Chlorhexidins nach Mischung mit hartem Leitungswasser zu verhindern. Daher sollten für die Anwendung auf der Schleimhaut Lösungen aus der 20%igen Lösung durch Verdünnen hergestellt werden.

Eigenschaften

Farblose bis blassgelbe Flüssigkeit, klar bis schwach opaleszierend, geruchlos oder nahezu geruchlos, bitterer bis brennender Geschmack; mischbar mit bis zu 5 Teilen Ethanol¹⁾ und mit bis

zu 3 Teilen Aceton¹⁾. Die Wasserlöslichkeit des Chlorhexidindigluconats ist im Vergleich zur Chlorhexidin-Base deutlich erhöht (> 50 % gegenüber 0,08 % bei 20 °C)²⁾.

Prüfung auf Identität

Das Arzneibuch sieht zwei Reihen von Identitätsprüfungen vor, siehe hierzu den Kommentar zu **1.4** (Ph. Eur.).

- A. Chlorhexidin wird als Base gefällt und diese durch das IR-Spektrum identifiziert. Das Arzneibuch macht keine Vorgaben zur Aufnahmetechnik, geeignet sind KBr-Presslinge, vgl. Abb. 1.
- B. Der Nachweis des Gluconats erfolgt durch DC, siehe den Kommentar zu **Calciumgluconat** (Ph. Eur.). Das Sprühreagenz zur Detektion wurde schon in der Ph. Eur. 7.8 verändert, es besteht nunmehr aus einer Ammoniummolybdat-/Cersulfat-Lösung in verdünnter Schwefelsäure. Dieses Sprühreagenz ist auch in der USP vorgesehen.
- C. Die freie Base wird durch Zugabe von Natronlauge gefällt, abgesaugt, neutral gewaschen (Universalindikatorpapier) und in 25 ml Ethanol 70 % im Wasserbad bei 95 °C gelöst; nach dem Abkühlen entstandene Kristalle mit Ethanol 50 % waschen, bei 100 °C 1 h im Trockenschrank trocknen; sehr scharfe Schmelztemperatur der Base Chlorhexidin bei 132 °C
- D. Der Nachweis kann einfacher geführt werden: durch Mischen von 1 Tropfen Chlorhexidindigluconat-Lösung mit 1 ml methanolischer Kaliumhydroxid-Lösung *R* und Hinzufügen von 1 Tropfen Bromwasser *R*.

C

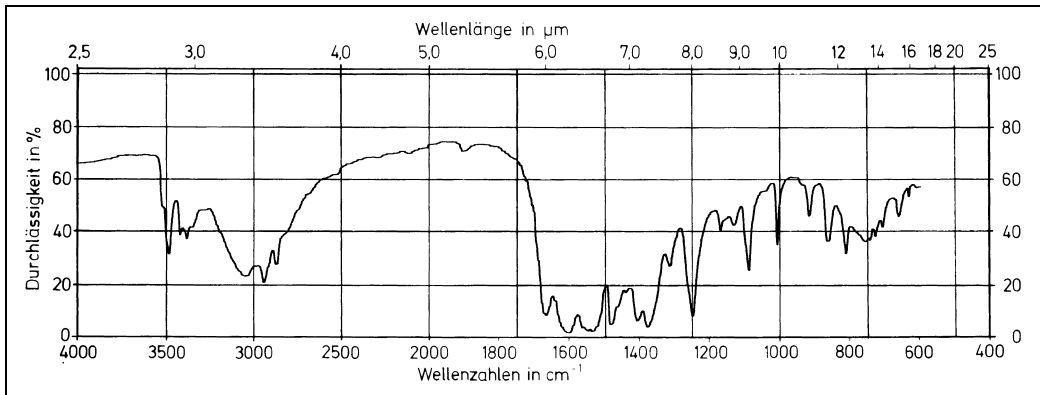


Abb. 1: IR-Spektrum von Chlorhexidin-Base in KBr (2,0 mg in 200 mg)

Prüfung auf Reinheit

Verwandte Substanzen: Siehe den Kommentar zu **Chlorhexidindiacetat** (Ph. Eur.). Das Spektrum möglicher Verunreinigungen ist schon in der Ph. Eur. 7.8 von zuvor 4 auf 15 Substanzen erhöht worden. Einige dieser aufgeführten Substanzen sind bekannte Hydrolyseprodukte des Chlorhexidins, z.B. die Verunreinigungen B, F, K und P (Lit.²⁾). In der Transparenzliste nicht mehr aufgeführt sind die Verunreinigungen durch das Harnstoffderivat 1,1'-[Hexan-1,6-diylbis(imino-carbonimidoyl)]bis[3-(4-chlorphenyl)harnstoff (Verunreinigung C), das durch Hydrolyse von Verunreinigung K entsteht, und das Trisbiguanid 1,1'-[(((4-Chlorphenyl)carbaminimidoyl)]imino]methyl]bis[imino(hexan-1,6-diyl)]bis[5-(4-chlorphenyl)biguanid (Verunreinigung D). Diese beiden Substanzen werden auch in den Monographien **Chlorhexidindiacetat** und **Chlorhexidindihydrochlorid** (beide Ph. Eur.) seit den Nachträgen 9.3 bzw. 9.4 nicht mehr aufgeführt. Die Trennung der Verunreinigungen wird an einer stationären nachsilanisierten C-18-Phase mit kleiner Korngröße (5 µm) unter Gradientenelution durchgeführt.

Chloranilin: Besonderes Augenmerk wird bei der Reinheitsprüfung auf die Verunreinigung P, 4-Chloranilin (*p*-Chloranilin, PCA), gelegt. PCA ist das primäre Degradationsprodukt des Chlorhexidins, es wird im Gegensatz zur Muttersubstanz gut resorbiert und metabolisiert. Seine reaktiven Metaboliten binden kovalent an Hämoglobin und Le-

ber- und Nierenproteine. PCA ist nephro- und hepatotoxisch sowie karzinogen. PCA entsteht unter sauren Bedingungen direkt aus Chlorhexidin oder indirekt über das Intermediärprodukt Verunreinigung K. Unter alkalischen Bedingungen entsteht PCA über verschiedene Reaktionswege indirekt aus Chlorhexidin²⁾. Sowohl die Ph. Eur. als auch die USP begrenzen den Gehalt an PCA nun auf 500 ppm (entsprechend 0,05 %). Die Prüfung beruht auf der Reaktion der primären aromatischen Aminogruppe von PCA mit Bratton-Marshall-Reagenz zu einem Azofarbstoff.

Gehaltsbestimmung

Siehe den Kommentar zu **Chlorhexidindiacetat** (Ph. Eur.). Im vorliegenden Falle werden die Gluconat-Ionen erfasst.

Andere Bestimmungsmethoden: Die USP lässt den Gehalt mittels HPLC und UV-Detektion bei 239 nm quantifizieren. Alternativ kann auch eine LC/MS-Bestimmung durchgeführt werden³⁾. Bestimmungen aus biologischen Matrices mittels LC-MS/MS sind ebenfalls publiziert⁴⁾.

Metabolisierung

Chlorhexidin wird äußerlich angewandt, nur wenig resorbiert und auch nur geringfügig metabolisiert.

O. Scherf-Clavel/Schi

Pharmakologische Eigenschaften⁵⁻⁸⁾

Pharmakodynamik: Chlorhexidin wirkt auf grampositive und einige gramnegative Bakterien bakteriostatisch. Das Optimum liegt zwischen neutralen oder schwach alkalischen pH-Werten. Die Effektivität gegen *Pseudomonas*- und *Proteus*-Arten, Hefen, Dermatophyten und Mykobakterien ist gering. Bakteriensporen werden nur nach 5-minütiger Einwirkung einer auf 100 °C erwärmten 0,5 %igen Lösung abgetötet, nicht aber bei Raumtemperatur. Gegen Pilze und Viren ist Chlorhexidin nur eingeschränkt wirksam.

Nach einer Händedesinfektion mit 0,5 %igem Chlorhexidindigluconat in 95 %igem Alkohol wurde eine Bakterienreduktion um 97,7 % erreicht, die wässrige Lösung mit 65,1 % war weniger effektiv als eine 4 %ige Detergenzienlösung (86,7 %). Mundspülungen mit 10 ml einer 0,2 %igen Chlorhexidin-Lösung führen zu einer starken Reduktion der Speichelbakterien (z.B. *Streptomyces mutans*), die bis zu 12 h nachweisbar ist. Durch die eingeschränkte Vermehrung von Bakterien werden somit die Plaque- und Kariesbildung verringert.

Bei Gebrauch über mehrere Monate nimmt die Wirkung aufgrund der reversiblen Verschiebung im Bakterienspektrum von Mundflora und Zahnplaque ab.

Wirkungsmechanismus: Die Wirkung von Chlorhexidin beruht auf dessen Affinität zur Zellwand von Mikroorganismen. Durch Adsorption von Chlorhexidin nimmt deren Permeabilität für niedermolekulare Substanzen zu, es kommt zu einem Austritt von Kalium- und Phosphat-Ionen (bei einer Chlorhexidinkonzentration von ca. 200 µg/ml) und infolge dessen zu einer bakteriostatischen Wirkung.

In hohen, nicht mehr klinisch relevanten Konzentrationen wirkt Chlorhexidin durch Koagulation von zytoplasmatischen Proteinen bakterizid.

Durch Verminderung der Permeabilität des Zervikalsschleims kann Chlorhexidin ferner die Mobilität der Spermien hemmen, die spermizide Wirkstärke entspricht der von Nonoxinol-9.

Pharmakokinetik: Chlorhexidin wird nur in geringem Umfang durch intakte Haut, aus dem Magen-Darm-Trakt oder vaginal resorbiert. Nach Mundspülungen bindet die kationische Substanz an

Hydroxylapatit des Zahnschmelzes sowie an Dentin, Zahnzement, Schleimhäute und Füllungen bzw. Zahnersatz. Durch langsame Desorption ist Chlorhexidin bis zu 8 h im Speichel nachweisbar. Resorbierte Substanz wird nur geringfügig metabolisiert. Nach versehentlichem Verschlucken während einer Mundspülung werden 90 % über die Fäzes ausgeschieden, der verbleibende Anteil wird im Urin wiedergefunden. Die Eliminationshalbwertszeit liegt bei 4 h.

Indikationen: Chlorhexidin ist zur Desinfektion von Haut und Schleimhaut sowie von chirurgischen Instrumenten indiziert. Ferner wird es in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde bei Entzündungen wie Stomatitis, Gingivitis, Parodontitis, Glossitis, Tonsillitis und Pharyngitis eingesetzt. Chlorhexidin kann hier auch zur Infektionsprophylaxe vor und nach operativen Eingriffen in Mund- und Rachenraum (Zahnentfernung, chirurgischer Zahnbettbehandlung, Mandeloperation) und zur Beseitigung von Mundgeruch angewendet werden. Außerdem dient es zur Konservierung anderer Arzneizubereitungen wie z. B. Augen- oder Nasentropfen.

Dosierung:

- Zur Prophylaxe von Zahnplaque, Prophylaxe und Behandlung von Gingivitis, Stomatitis und anderen Infektionen in Mund- und Rachenraum, Desinfektion nach chirurgischen Eingriffen in der Mundhöhle oder bei eingeschränkter Mundhygiene können verwendet werden: 1 %iges Gel, 0,2 %iges Spray oder 0,1- bis 0,2 %ige Mundspülungen; biodegradierbare Zubereitung mit Depoteffekt zum Einlegen in die Zahntaschen: 2,5 mg. Es steht in Deutschland auch ein 2 %iges Konzentrat zur Anwendung nach Verdünnung zur Verfügung.
- Zur Mundspülung soll 2- bis 3-mal täglich nach den Mahlzeiten und dem Zähneputzen mit mindestens 10 ml einer 0,1- bis 0,2 %igen Chlorhexidin-Lösung für 1 min gespült werden. Chlorhexidin-Gel (1 %) soll 2- bis 3-mal täglich z.B. mit Wattestäbchen oder der Zahnbürste auf die entzündeten Gebiete aufgetragen werden.

Weitere Anwendungen:

- Chirurgische Händedesinfektion, Desinfektion des OP-Areals: 0,5 %ige Lösung in 70 %igem Alkohol oder 2- bis 4 %ige Detergenzlösung
- Desinfektion von Harnröhre und Blasenkatetern: 0,05 %ige Lösung in Glycerin oder als

C

Gel in Kombination mit einem Lokalanästhetikum.

- Spülung der Blase: 0,02 %ige wässrige Lösung
- Wunddesinfektion: Mullkompressen mit 0,5 % Chlorhexidin getränkt oder als 0,05 %ige wässrige Lösung, weiterhin 1 %ige Creme oder 1 %iger Puder
- Geburtshilfe: 0,05 %ige wässrige Lösung oder 1 %ige Creme
- Desinfektion und Aufbewahrung gereinigter chirurgischer Instrumente: 0,05 %ige wässrige Lösung, 30 min (Katastrophenmedizin: 0,5 % in 70 %igem Alkohol, Einwirkdauer 2 min)
- Konservierung von Augentropfen, Reinigungslösungen für Kontaktlinsen u. a.: 0,01 %ige wässrige Lösungen

Intoxikation: Aus dem Magen-Darm-Trakt und über die Schleimhäute werden nur geringe Mengen resorbiert, sodass die akute Toxizität gering ist. Zur Behandlung wird eine Magenspülung empfohlen, bei anderen topischen Applikationen das Abspülen der betroffenen Region mit Wasser.

Die perorale Aufnahme (in suizidaler Absicht) von 30 g Chlorhexidindigluconat (150 ml einer Lösung) führte zu Ödemen des Pharynx, nekrotischen Läsionen der Speiseröhre und Lebernekrosen. Die erhöhten Leberenzyme normalisierten sich innerhalb von sechs Monaten nach dem Suizidversuch.

Nebenwirkungen: Es kann zu Überempfindlichkeitsreaktionen sowie zu kribbelndem oder brennendem Gefühl auf der Zunge kommen. In hoher Konzentration reizt Chlorhexidin Haut und Schleimhäute. Bei Kontaktlinsenträgern kann eine Konjunktivitis hervorgerufen werden.

Bei häufiger Anwendung auf der Haut kann es zu Kontaktdermatitiden und Photosensibilisierungen kommen. Nach Anwendung in der Mundhöhle wurden reversible Beeinträchtigungen des Geschmacksempfindens, ein reversibles Taubheitsgefühl der Zunge, Schuppung der Mundschleimhaut und Ohrspeicheldrüsenschwellungen beobachtet.

Weitere unerwünschte Begleiterscheinungen bei längerfristiger Anwendung sind reversible Verfärbungen von Zahnhartgewebe, Füllungen, Zahnersatz und Zungenpapillen (bis zu 50 %). Als Ursache wird eine verstärkte Bindung von Nahrungsbestandteilen (Eisen-Ionen oder anionischen Farbstoffen) angesehen. Die Braunfärbung wird

durch gründliche Mundpflege oder durch zusätzliche Anwendung von Zinnfluorid oder Peroxymonosulfat vermindert, verschwindet jedoch auch spontan nach Absetzen des Präparates.

Kontraindikationen: Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff; erosiv-desquamative Veränderungen der Mundschleimhaut, Wunden, Ulzerationen, direkte Applikation auf schlecht durchblutetes Gewebe, Anwendung am Auge und Ohr nur bei eindeutiger Deklaration (Cave: Hornhautschäden).

Infolge der irritierenden Wirkung darf Chlorhexidin nicht am Mittelohr und an anderen sensiblen Organen angewendet werden. Die Anwendung bei Kindern unter 2 Monaten sollte wegen der möglicherweise verstärkten systemischen Verfügbarkeit vermieden werden.

Interaktionen: Die antibakterielle Wirkung schwach konzentrierter Chlorhexidin-Lösungen (0,002 %) wird durch Alkohol (z. B. Benzylalkohol) verstärkt.

Chlorhexidinsalze sind inkompatibel mit Seifen oder anionischen Stoffen, in Zubereitungen über 0,05 % außerdem mit Boraten, Bicarbonaten, Carbonaten, Chloriden, Citraten, Nitraten, Phosphaten und Sulfaten sowie mit Kaliumiodid. Alginate, Traganth, Kaolin oder Calcium-, Magnesium- und Zinkverbindungen reduzieren die Aktivität von Chlorhexidin. Inaktiviert wird die Substanz durch Kork, Saccharose oder Polysorbat 80.

Da in vielen Zahnpasten anionische Tenside enthalten sind, ist zwischen dem Zähneputzen und der Anwendung von Chlorhexidin ein Abstand von ca. 30 min einzuhalten.

Schwangerschaft und Stillzeit: Zur Anwendung von Chlorhexidin während der Schwangerschaft liegen keine ausreichenden Daten vor. In Tierexperimenten wurde Embryotoxizität berichtet. Schädigende Effekte beim Menschen sind bislang allerdings nicht aufgetreten. Chlorhexidin sollte in dieser Zeit nur unter Vorsicht und nicht großflächig angewendet werden.

Die Anwendung während der Stillzeit erscheint vertretbar.

Besondere Hinweise: Verfärbungen an den Zähnen sind vorübergehend. Man kann ihnen zum Großteil vorbeugen, indem man seinen Tee-, Kaf-

fee- oder Rotweinkonsum reduziert. Falls Wundgefühl, Schwellungen oder Reizungen des Mundraumes auftreten, muss die Anwendung von Chlorhexidin sofort beendet werden.

Bewertung: Chlorhexidin ist ein vor allem in der Zahnmedizin benutztes Antiseptikum.

Die Substanz bewirkt eine eingeschränkte Vermehrung von Bakterien. In der Mundhöhle werden somit die Plaque- und Kariesbildung signifikant verringert. Unter den gebräuchlichsten Antiseptika wie z.B. Benzalkoniumchlorid oder Hexachlorophen gilt Chlorhexidin als das sicherste und effektivste. Anders als Benzalkoniumchlorid neigt

eine Chlorhexidin-Lösung nicht zur Kontamination und zersetzt sich nicht auf der Haut. Chlorhexidin weist ein breiteres Wirkungsspektrum auf als Hexachlorophen und zeigt im Gegensatz zu diesem auch keine signifikante Toxizität nach systemischer Resorption. Povidon-Iod ist ebenso gut antiseptisch wirksam wie Chlorhexidin, verbleibt jedoch deutlich kürzer am Applikationsort und kann lokale Hautreaktionen verursachen⁹⁾. Die spermizide Wirkstärke von Chlorhexidin entspricht etwa der von Nonoxinol-9¹⁰⁾.

M. Neubeck/Mu

C

Literatur

1) Martindale. 2) Merck Index. 3) Z. Zong, L. E. Kirsch, J. Pharm. Sci. 101, 2417–2427 (2012). 4) L. Wu et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 62, 224–227 (2012). 5) Drugdex®. 6) Fachinformation Chlorhexamed 1% Gel, GlaxoSmithKline Consumer Healthcare,

04/2017. 7) Fachinformation Chlorhexidindigluconat-Lösung 2%, Engelhard Arzneimittel, 01/2014. 8) Fachinformation Instillagel 6 ml/11 ml, FarcoPharma, 07/2014. 9) H. Vorherr et al., Am. J. Infect. Control. 16, 178–181 (1988). 10) D. Sharman et al., Fertil. Steril. 45, 259–264 (1986).

Chlortetracyclinhydrochlorid

Chlortetracyclini hydrochloridum

Allgemeine Angaben

Chlortetracyclin (**1b**) ist ein Antibiotikum aus der Stoffklasse der Tetracycline. Die Substanz wird hauptsächlich in der Veterinärmedizin eingesetzt.

Chlortetracyclinhydrochlorid ist definiert als ein Substanzgemisch, das mindestens 89,5 % Chlortetracyclinhydrochlorid und maximal 6,0 % Tetracyclinhydrochlorid enthält bei einem Gehalt von 94,5 bis 102,0 % für die Summe beider Verbindungen.

Die historisch erste Substanz in der Reihe dieser heute noch bedeutenden Antibiotika war das Chlortetracyclin (**1b**), das bereits 1945 von Duggar^{1, 2)} aus der Kulturlösung von *Streptomyces aureofaciens* isoliert und 1948 in die Therapie eingeführt wurde. Ihm folgte 1949 das Oxytetracyclin (**1c**) und einige Jahre später der eigentliche Grundkörper dieser Reihe, das Tetracyclin (**1a**).

Für ein Sammelreferat zu Chemie, Biochemie und Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Tetracycline siehe Lit.³⁾, für eine Übersicht zu Chlortetracyclin siehe Lit.⁴⁾.

In der Ph. Eur. 10.1 wurden die Beschreibung der stationären Phase der Reinheitsprüfung auf verwandte Substanzen sowie einige weitere Angaben präzisiert.

CAS-Nr.: 64–72–2
57–62–5 (Base)
64–75–5 (Tetracyclinhydrochlorid)
60–54–8 (Tetracyclin-Base)

PubChem-Nr.: CID 54684459
CID 54675777 (Base)

DrugBank-Nr.: DB09093 (Base)

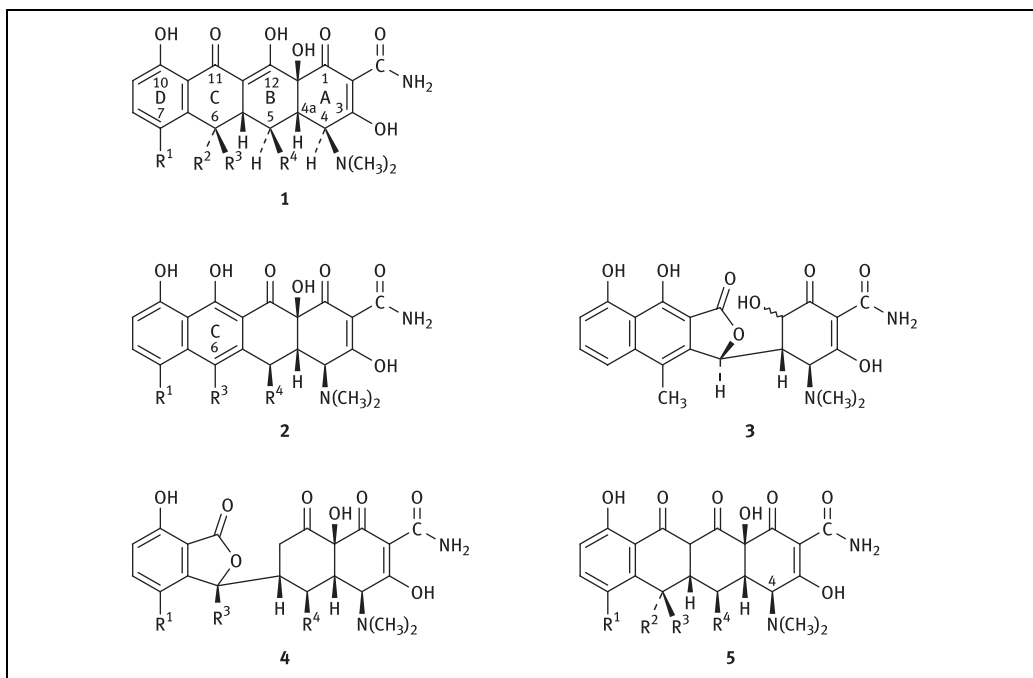
Gewinnung: Die Darstellung von Tetracyclin (**1a**) erfolgte zunächst partialsynthetisch⁵⁾ durch Hydrogenolyse von Chlortetracyclin (**1b**) und dann in einer gesteuerten Biosynthese unter Verwendung von chlorfreien Nährmedien. Die weiteren heute gebräuchlichen Tetracyclinderivate (siehe Tab. 1) werden mit Hilfe abgeänderter Biosynthesen unter Verwendung von Mutanten oder partialsynthetisch gewonnen.

Struktur/Stereochemie: Alle natürlichen Tetracycline weisen als chemische Grundstruktur ein isocyclisches Grundgerüst aus 4 linear anellierten Ringen auf, das Octahydronaphthacen-Ringsystem **1**; sie unterscheiden sich lediglich durch die Substituenten R¹ bis R⁴ in den Stellungen 5, 6 und 7. Das Gesamtmolekül ist nicht planar gebaut; die Ringe A und B stehen stark, die Ringe B und C schwach gewinkelt zueinander.

Neben der engen chemischen Verwandtschaft zeichnen sich die Tetracycline durch ein gleichartiges Wirkungsspektrum aus. Sie sind untereinander kreuzresistent (Parallelresistenz). Unterschiede bestehen lediglich in der Stabilität, besonders in Lösung, sowie geringfügig hinsichtlich Toxizität und Pharmakokinetik.

Tab. 1: Zusammenstellung der heute arzneilich verwendeten Tetracycline

Antibiotikum	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1a Tetracyclin	H	OH	CH ₃	H
1b Chlortetracyclin	Cl	OH	CH ₃	H
1c Oxytetracyclin	H	OH	CH ₃	OH
1d (B) Demeclocyclin	Cl	OH	H	H
1e Metacyclin	H	= CH ₂	OH	H
1f Doxycyclin	H	H	CH ₃	OH
1g Minocyclin	N(CH ₃) ₂	H	H	H



Stabilität/Lagerung: Als Festsubstanz vor Licht und Feuchtigkeit geschützt, lassen sich die Tetracycline praktisch ohne Zersetzung aufbewahren. In Lösung hingegen sind sie labil gegen Säuren und Basen, dabei unterliegen sie verschiedenen Abbau- und Umwandlungsreaktionen mit spezifischen Unterschieden zwischen den einzelnen Vertretern³⁾. So spalten Tetracycline mit einer OH-Gruppe an C-6 bei pH 2 leicht Wasser ab und bilden unter Aromatisierung von Ring C die Anhydrotetracycline **2**. Oxytetracyclin (**1c**) liefert in saurem Milieu anstelle der Anhydroverbindung die in einer raschen Folgereaktion unter Lactonbildung und Öffnung von Ring B entstehenden epimeren α - und β -Apoxytetracycline **3**. In Gegenwart von Basen lagern sich die Tetracycline zu den Isotetracyclinen **4** um. Dabei wird die OH-Gruppe von C-6 deprotoniert, es bildet sich ein Lacton unter Öffnung von Ring C. Chlortetracyclin (**1b**) ist besonders labil und zeigt diese Reaktion bereits bei pH 7,5 in der Wärme. Besonders schnell verläuft die Epimerisierung an C-4 bei pH-Werten von 2 bis 6 unter Bildung der 4-*epi*-Tetracycline **5** mit α -ständiger Dimethylaminogruppe⁶⁾. Das sich im Zeitraum von einem Tag bis zu mehreren Wochen einstellende Gleichgewicht besteht aus etwa zwei

Dritteln Tetracyclin und einem Drittel *epi*-Tetracyclin.

Diesen verschiedenen Umlagerungsreaktionen – besonders der bei schwach saurem pH erfolgenden Bildung von *epi*-Tetracyclin – ist bei der Herstellung von Dauerinfusionslösungen und deren Lagerung Rechnung zu tragen. Auch aus Gründen der Sterilhaltung sollte ein rascher Verbrauch angestrebt werden, da solche Lösungen sonst gegen Verunreinigung mit Hefen und Pilzen konserviert werden müssen.

Die antibiotische Wirksamkeit des *epi*-Tetracyclin beträgt nur etwa 1,5% derjenigen des Tetracyclin. Dieser Aktivitätsabfall lässt sich mikrobiologisch nur im turbidimetrischen Test erfassen; bei diesem 16 bis 18 h laufenden Agardiffusionstest wird *epi*-Tetracyclin wieder zu Tetracyclin zurückverwandelt.

Die in der Literatur zu findenden Angaben über die Stabilität von wässrigen Lösungen der verschiedenen Tetracycline berücksichtigen oft nur das Aussehen der Lösung (Verfärbung, Trübung, Sedimentbildung), geben aber häufig nicht den Epimerisierungsgrad an. Die Epimerisierungsprodukte sowie weitere Abbauprodukte lassen sich jedoch

durch DC und HPLC leicht nachweisen und bestimmen⁷⁻⁹). In einer wässrigen Lösung von Tetracyclinhydrochlorid bilden sich bei pH 3,5 in 48 h etwa 7 % *epi*-Tetracyclin.

Zwei- und dreiwertige Metall-Kationen wie Eisen, Aluminium, Kupfer, Nickel, Magnesium, Mangan und Calcium bilden mit Tetracyclinen bei pH-Werten über 3 größtenteils antibiotisch inaktive, aus dem Magen-Darm-Trakt nicht resorbierbare Komplexverbindungen (Chelate); u. a. Citronensäure, Glucosaminhydrochlorid und Phosphatkomplexe verhindern solche Komplexbildung. Im pH-Bereich von 3 bis 7,5 erfolgt die Komplexbildung über das Phenol-Diketon-System von C-10 bis C-12. Wenn bei steigendem pH die Dimethylamino-gruppe deprotoniert wird, kann auch hier gemeinsam mit der dazu *cis*-ständigen 12a-Hydroxygruppe ein weiteres Kation gebunden werden.

Anionen wie Phosphat, Citrat und Salicylat sowie Naturstoffe vom Typ des Coffein, *N*-Methylpyrrolidon oder Harnstoff erhöhen die Löslichkeit der Tetracycline durch Bildung schwacher Komplexe. Dies gilt auch für gewisse Polymere wie Polyvinylpyrrolidon.

Unverträglichkeiten: Die Substanz ist unbeständig in Gegenwart von Calciumchlorid, Ammoniumchlorid, Ringerlösung, Dextranen, Fructose und verschiedenen Cephalosporinen.

Synonyme: SF 66; für die Base: Clortetraciclina, A 377, NRRL 2209, SF 66

Arzneibuchnamen: Chlortetracycline Hydrochloride (USP)

Eigenschaften

Tetracycline allgemein sind gelbe, kristalline, geruchlose, bitter schmeckende, lichtempfindliche Verbindungen. Aufgrund ihrer sauren Gruppen und des basischen Dimethylaminorestes zeigen sie amphoterer Verhalten. Die Wasserlöslichkeit der Tetracycline ist im Allgemeinen gering und hängt vom pH ab: Sie ist am geringsten am isoelektrischen Punkt (im Bereich pH 6), wenn ein Zwitter-Ion vorliegt; leichter löslich sind die Hydrochloride.

7-Chlortetracyclinhydrochlorid (**1b**-HCl) ist eine dreibasische Säure mit pK_a -Werten von 3,30; 7,44

und 9,27 (Lit.¹⁰). Von diesen wird die erste Dissoziationsstufe durch die enolische OH-Gruppe an C-3, die zweite durch die enolische OH-Gruppe an C-12, die dem Phenol-Diketon-System über die Ringe B und C angehört, und die dritte durch die Dimethylammoniumgruppe an C-4 bedingt⁴). Wässrige Lösungen reagieren daher stark sauer und neigen durch Hydrolyse zur Abscheidung von Chlortetracyclin-Base. Bei pH 2,5 sind wässrige Lösungen relativ stabil, bei pH-Werten über 7 tritt eine schnelle Inaktivierung ein. Eine 50%ige Aktivitätsabnahme erfolgt im Carbonatpuffer pH 10 bei 22°C bereits nach etwa 18 min und in 0,01 M-Schwefelsäure bei 100°C nach etwa 8 min.

In Wasser von 25°C lösen sich ca. 14 mg Chlortetracyclinhydrochlorid pro ml, in verdünntem Alkali wesentlich mehr. In Methanol lösen sich 17 mg/ml, in Formamid 5 mg/ml; in vielen wenig polaren Solvenzien wie Chloroform, Diethylether, Benzol und aliphatischen Kohlenwasserstoffen ist die Substanz praktisch unlöslich⁴).

Prüfung auf Identität

- A. Die dünnschichtchromatographische Identifizierung der Tetracycline wurde für die meisten in der Ph. Eur. aufgeführten Derivate vereinfacht. Lediglich die zur Überprüfung des Trennsystems eingesetzten Substanzen variieren. Die Trennung erfolgt mittels RP-HPLC unter Verwendung eines sauren Fließmittels. Bei Chlortetracyclin (**1b**) dienen Doxycyclin (**1f**) und Demeclocyclin (**1d**, B) zur Prüfung der Systemeignung. Für weitere dünnschichtchromatographische Systeme siehe Lit.¹¹).
- B. Nach Lösen der Tetracycline in 96%iger Schwefelsäure und anschließendem Wasserzusatz beobachtet man unterschiedliche Farben, die eine gewisse Differenzierung erlauben (siehe Tab. 2).
- C. Siehe den Kommentar zu 2.3.1 (Ph. Eur.).
- D. Das Arzneibuch lässt die Substanz in der ersten Identifikationsreihe jetzt anhand der HPLC-Retentionszeit identifizieren. Siehe die Reihenprüfung „Verwandte Substanzen“.

Andere Identitätsprüfungen: Zur Anwendung der ¹³C-NMR-Spektroskopie zur Analytik der Tetracycline siehe Lit.¹²).

Tab. 2: Farbe der Tetracycline in 96 %iger H₂SO₄, 0,1 M HCl und 0,1 M NaOH

Antibiotikum	Farbe in 96 % H ₂ SO ₄		Farbe in 0,1 M HCl		Farbe in 0,1 M NaOH	
	direkt	H ₂ O-Zusatz	Tageslicht	UV-Licht	Tageslicht	UV-Licht
Tetracyclin	rotviolett	gelb			gelb	blau
Chlortetracyclin	tiefblaugrün	bräunlich				
Demeclocyclin	violett	gelb				
Doxycyclin	gelb					
Oxytetracyclin	tiefrot	gelb	gelb	grüngelb		

Tab. 3: Anforderungen der Ph. Eur. an pH-Werte und spezifische Drehung der Tetracycline

Antibiotikum	pH	[α] _D ²⁰	Lösungsmittel
Tetracyclin · HCl	1,8–2,8	– 240 bis – 255	0,1 M HCl
Tetracyclin-Base	3,5–6,0	– 260 bis – 280	0,1 M HCl
Chlortetracyclin · HCl	2,3–3,3	– 235 bis – 250	H ₂ O
Demeclocyclin · HCl	2,0–3,0	– 248 bis – 263	0,1 M HCl
Doxycyclin-Hyclat	2,0–3,0	– 105 bis – 120	0,1 M HCl
Oxytetracyclin · HCl	2,3–2,9	– 188 bis – 200	0,1 M HCl
Oxytetracyclin-Base	4,5–7,5	– 203 bis – 216	0,1 M HCl

Tab. 4: Absorptionsmaxima der Tetracycline¹³⁾

Antibiotikum	λ _{max} (A _{1 cm} ^{1 %})	
	0,1 M HCl	0,1 M NaOH
Tetracyclin · HCl	356 (301)	380 (366)
	269 (382)	268 (299)
Tetracyclin-Base	356 (326)	380 (398)
	269 (410)	268 (319)
Chlortetracyclin · HCl	367,5 ¹⁴⁾	345 ¹⁴⁾
	266 (360)	284 (280)
	228 (338)	254 (287)
Demeclocyclin · HCl	367 (252)	388 (347)
	267 (364)	276 (282)
	227 (356)	241 (338)
Doxycyclin-Hyclat ^{*)}	346 (246)	376 (329)
	269 (381)	255 (326)
Oxytetracyclin · HCl	353 (276)	376 (331)
	267 (380)	269 (320)
Oxytetracyclin-Base	352 (275)	
	266 (378)	269 (327)

^{*)} Lit.-Werte für das Hydrochlorid¹⁴⁾

Prüfung auf Reinheit

pH-Wert: Der pH-Wert der Tetracyclinhydrochloride schwankt lediglich in einem sehr engen Bereich. Die obere Grenze von 3,0 wird nur gelegentlich beim Chlortetracyclinhydrochlorid überschritten. Die reine Substanz zeigt in gesättigter Lösung einen pH-Wert von 2,8 bis 2,9; die Ph. Eur. gestattet 2,3 bis 3,3 für die 1 %ige Lösung (siehe Tab.3). Die Grenze stimmt mit den Anforderungen der USP für Chlortetracyclinhydrochlorid überein.

Spezifische Drehung: Siehe Tab. 3. Für die Reinsubstanz, gelöst in Wasser, wird eine spezifische Drehung [α]_D²³ von – 240 angegeben. Die spezifische Drehung ist sowohl zur Charakterisierung als auch zur Reinheitsprüfung geeignet, da sich die Werte der *epi*-Verbindungen deutlich von denen der normalen Formen unterscheiden. Die Grenze von – 235 bis – 250 für Chlortetracyclinhydrochlorid stimmt mit den Anforderungen der USP überein.

Verwandte Substanzen: Das Arzneibuch prüft unter Verwendung einer nachsilanisierten RP-8-Phase mit eingefügten polaren Gruppen besonders auf die Analoga Demecyclin (**1d**, B) und das 2-Acetylderivat **6** (H), die *epi*-Derivate 4-*epi*-Chlortetracyclin (**7**, A), 4-*epi*-Tetracyclin (**8**, D), 4-*epi*-Demethyltetracyclin (**9**, C) und 4-*epi*-Demethylchlortetracyclin (**10**, E), die Anhydroderivate Anhydrotetracyclin (**11**, J) und Anhydrochlortetracyclin (**12**, L) sowie deren *epi*-Verbindungen 4-*epi*-Anhydrotetracyclin (**13**, I) und 4-*epi*-Anhydrochlortetracyclin (**14**, K), außerdem auf die Isoverbindungen 4-Ischlortetracyclin (**15**, G) und 4-*epi*-Ischlortetracyclin (**16**, F).

Im Gegensatz zu älteren HPLC-Verfahren erlaubt die schon in der Ph. Eur. 7.5 eingeführten Methode die Auftrennung aller potentieller Verunreinigungen. Die Systemeignung wird anhand der Auflösung zwischen Tetracyclin (**1a**) und 4-*epi*-Demethylchlortetracyclin (**10**, E), zwischen 4-*epi*-Chlortetracyclin (**7**, A) und 4-Ischlortetracyclin (**15**, G) sowie zwischen 4-*epi*-Anhydrochlortetracyclin (**14**, K) und Anhydrochlortetracyclin (**12**, L) überprüft.

Unter Verwendung von Korrekturfaktoren wird **7** (A) auf 4,0 % begrenzt, **1d** (B) und **10** (E) auf jeweils 1,0 %, **11** (J) auf 0,3 % und die Verunreinigungen D (**8**), G (**15**), H (**6**) und L (**12**) auf jeweils 0,2 % sowie **14** (K) auf 0,15 %. Alle weiteren, nicht spezifizierten Verunreinigungen – darunter C (**9**), F (**16**) und I (**13**) – dürfen jeweils 0,10 % nicht überschreiten. Die Summe aller Verunreinigungen ohne Verunreinigung A (**7**) darf maximal 2,0 % betragen.

Ein weiteres HPLC-Verfahren findet sich in Lit.¹⁵⁾. Die Prüfung auf verwandte Substanzen kann auch mit der CE erfolgen¹⁶⁾. Die USP prüft nicht auf verwandte Substanzen.

Wasser: Die Grenze von 2,0 %, bestimmt nach Karl Fischer, stimmt mit den Anforderungen der USP für den Trocknungsverlust überein.

Andere Reinheitsprüfungen: Die früher in der Ph. Eur. durchgeführte Prüfung der spezifischen Absorption in den Maxima bei 267 und 367 nm bietet keinen wesentlichen Beitrag zur Reinheitsprüfung über die HPLC-Analysen hinaus (siehe

Tab. 4). Mit einer Prüfung auf Licht absorbierende Substanzen bei 460 nm erfolgt dagegen eine zusätzliche Limitierung der toxischen Anhydroverbindungen in ihrer Gesamtsumme. Chlortetracyclin enthält stets wechselnde Mengen Tetracyclin (bis zu 6 %), daher ist auch mit der Anwesenheit von Anhydro- und *epi*-Anhydroverbindungen beider Substanzen zu rechnen. Darüber hinaus können bei dieser Wellenlänge auch farbige Oxidationsprodukte begrenzt werden, die sich mit Hilfe der HPLC nicht erfassen lassen.

Gehaltsbestimmung

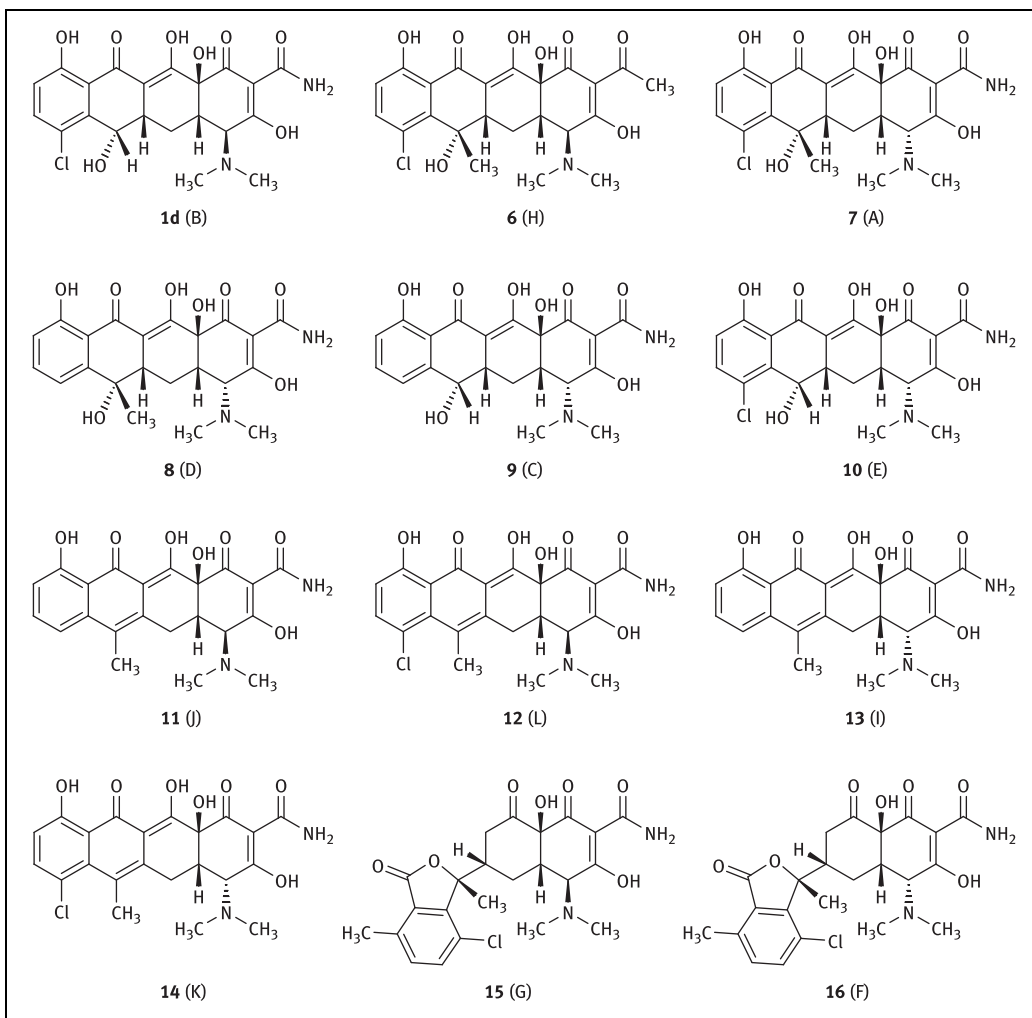
Die beiden aktiven Komponenten Chlortetracyclin (**1b**) und Tetracyclin (**1a**) werden mit der HPLC quantifiziert.

Andere Bestimmungsmethoden: Die USP lässt den Gehalt mikrobiologisch bestimmen. Die Untergrenze beträgt 900 µg/mg und für oral zu verabreichende Tierarzneimittel 820 µg/mg.

Für die Tetracycline werden neben fluorimetrischen Bestimmungen^{17, 18)} zahlreiche kolorimetrische¹⁹⁾, spektrophotometrische²⁰⁾ und polarographische²¹⁾ Methoden beschrieben. Kolorimetrische und spektrophotometrische Bestimmungen erfassen oft auch die inaktiven Abbauprodukte, weshalb sie immer weniger Anwendung finden. Es werden auch biologische Mikrobestimmungen²²⁾ und Radioimmunoassays²³⁾ eingesetzt. Im Laufe der Zeit hat sich vor allem die HPLC^{24–26)} zur selektiven Gehaltsbestimmung der Tetracycline bewährt. Für eine Zusammenfassung der Komplexität der chromatographischen Tetracyclin-Analytik siehe Lit.²⁷⁾.

Aufgrund der verbreiteten Verwendung von Tetracyclinen als Tierarzneimittel gelten in der EU Grenzwerte für Rückstände in Lebensmitteln. Für neuere HPLC-MS-Verfahren zur Bestimmung der Substanzen in Lebensmitteln siehe z.B. Lit.^{28–30)}, für eine Übersichtsarbeit siehe Lit.³¹⁾. Die Substanz kann auch in Abwässern und in mit Gülle gedüngtem Boden nachgewiesen werden³²⁾. Eine Übersicht über chromatographische und kapillarelektrophoretische Verfahren zur Bestimmung von Tetracyclinderivaten in Lebensmitteln gibt Lit.¹¹⁾.

C



Metabolisierung

Metaboliten der Substanz im menschlichen Stoffwechsel sind nicht beschrieben³³⁾. Bei dem in Tieren häufig angegebenen Metaboliten 4-*epi*-Chlortetracyclin (7, A) handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um ein Artefakt der Aufarbei-

tung. Die Ursache der Akkumulation von 4-*Iso*chlortetracyclin (15, G) und 4-*epi*-Isochlortetracyclin (16, F) in Eiern von mit Chlortetracyclin behandelten Hühnern^{34, 35)} ist auch ungeklärt.

G. Scriba

Pharmakologische Eigenschaften

Pharmakodynamik: Das zur Tetracyclin-Gruppe gehörende Breitspektrum-Antibiotikum Chlortetracyclin wird hauptsächlich zur Behandlung von okulären Chlamydieninfektionen eingesetzt. Wie alle Tetracycline wirkt es bakteriostatisch auf eine Vielzahl grampositiver und gramnegativer, proliferierender Keime. Nach aktiver Aufnahme in die Bakterienzelle bindet Chlortetracyclin an die 30S-Untereinheit der Ribosomen und blockiert damit die Proteinsynthese (verhindert den Transfer der Aminosäure von der t-RNA zur Peptidkette). Hohe Konzentrationen stören auch die Proteinsynthese bei Mensch und Tier. Die Resistenzentwicklung erfolgt langsam (Penicillin-Typ). Der Resistenzfaktor ist auf einem transferierbaren Plasmid lokalisiert. Bei seiner Expression, stimuliert durch die Anwesenheit von Chlortetracyclin, werden Proteine synthetisiert, die mit der Aufnahme des Antibiotikums in die Zelle interferieren und die Substanz aktiv aus der Zelle transportieren.

Pharmakokinetik³⁶⁾: Bei oraler Applikation ist die Bioverfügbarkeit von Chlortetracyclin gering (bis 30%). Maximale Plasmaspiegel treten innerhalb von 2 bis 4 h auf. Die Plasmaproteinbindung beträgt 47%, das Verteilungsvolumen 1 bis 2 l/kg. Die Verteilung erfolgt in verschiedene Körperflüssigkeiten und -gewebe, u.a. auch in die Zerebrospinalflüssigkeit, Knochen und Zähne. Die mittlere Plasmahalbwertszeit beträgt 5,5 h. Mehr als 70% einer Dosis werden biliär ausgeschieden, nur 15 bis 20% renal.

Zur Pharmakokinetik nach topischer Applikation liegen keine Untersuchungen vor.

Indikationen: Perorale Gabe bei schweren bakteriellen Infektionen wie subakuter bakterieller Endokarditis.

Topische Applikation bei bakteriell infizierten Wunden, Akne vulgaris, Verbrennungen, Pyodermien, Furunkulose, Ulcus cruris u.a. sowie zur Vermeidung von Infektionen nach Abschürfungen.

Topische Applikation am Auge bei okularer Rosazea oder okularen Infektionen durch *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidemicus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *H. ducreyi*, *Klebsiella pneu-*

moniae, *Francisella tularensis* (*Pasteurella tularensis*), *Yersinia pestis* (*Pasteurella pestis*), *Escherichia coli*, *Bacillus anthracis* und *Lymphogranuloma venereum*

Dosierung^{36, 37)}:

Perorale Anwendung: Erwachsene erhalten 250 bis 500 mg 4-mal täglich für 7 Tage oder länger.

Von der Anwendung bei Kindern wird aufgrund des hohen Nebenwirkungspotentials (besonders hinsichtlich der Zähne, siehe den Kommentar zu **Tetracyclinhydrochlorid**, Ph. Eur.) abgeraten. In absolut notwendigen Fällen 10 bis 50 mg/kg Körpergewicht täglich für 6 Tage.

Bei Leber- oder Niereninsuffizienz ist eine Dosisanpassung erforderlich.

Topische Anwendung: 1%ige Augensalbe 4- bis 12-mal täglich in den Bindehautsack einbringen; 1- bis 3%ige Salbe 2- bis 4-mal täglich auf die betroffenen Hautareale auftragen.

Intoxikation: Nach systemischer Überdosierung können insbesondere bei Schwangeren oder Patienten mit Niereninsuffizienz schwere Leberschäden durch Einlagerungen von Lipiden auftreten. Akute Symptome einer Vergiftung sind Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Fieber, zentralnervöse Erregungszustände und Kollaps.

Therapie: Die Behandlung erfolgt symptomatisch und unterstützend.

Nebenwirkungen³⁶⁾: Überempfindlichkeitsreaktionen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, gastrointestinale Krämpfe, Zahnverfärbung (besonders bei Kindern), Hautreaktionen, Photosensibilität, Nieren- und Lebertoxizität, Blutbildveränderungen, hämolytische Anämie.

Kontraindikationen: Überempfindlichkeit gegen Tetracycline.

Bei Leber- oder Niereninsuffizienz sowie bei bestehenden Pilzinfektionen ist Vorsicht geboten.

Wegen möglicher Zahnverfärbungen darf Chlortetracyclin nicht während der Schwangerschaft und auch nicht während der Stillzeit sowie ebenfalls nicht bei Kindern unter 8 Jahren angewendet werden. Dies gilt auch für die topische Anwendung.

C

Interaktionen: Aluminium-, Calcium- oder Magnesiumsalze können die Resorption von Chlortetracyclin reduzieren. Die bakterielle Wirksamkeit von Chlortetracyclin kann auch durch Penicilline verringert werden. Die Wirksamkeit oraler Kontrazeptiva kann eingeschränkt sein.

Schwangerschaft und Stillzeit: Chlortetracyclin überwindet die Plazentaschranke. Beim Fetus werden 25 bis 100 % der mütterlichen Blutspiegel gemessen. Im Tierexperiment wurde Reproduktionstoxizität gezeigt. Wegen möglicher Zahnverfärbungen darf, wie erwähnt, systemisches und topisches Chlortetracyclin daher nicht in der Schwangerschaft appliziert werden. Weiterhin besteht insbesondere während der Schwangerschaft durch systemisches Chlortetracyclin die Gefahr einer mütterlichen Leberschädigung, ähnlich dem klinischen und histopathologischen Bild der akuten Schwangerschaftshepatopathie.

Die Konzentrationen in der Muttermilch liegen bei 50 % der entsprechenden mütterlichen Plasmakonzentrationen. Zur Vermeidung von späteren Zahnverfärbungen beim Säugling sollte die systemische Applikation auch während der Stillzeit unterbleiben. Bei zwingender Indikation ist Abstillen zu erwägen.

Aus Sicherheitsgründen darf die topische Anwendung während der Schwangerschaft und der Still-

zeit nur unter ärztlicher Aufsicht und nach strenger Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen.

Bewertung^{36, 38):} Das Antibiotikum Chlortetracyclin wird überwiegend topisch zur Behandlung bakterieller Infektionen des Auges und der Haut eingesetzt. Als Standardantibiotika in der Ophthalmologie gelten Aminoglykoside (z. B. Gentamicin und Kanamycin), Chloramphenicol und Gyrasehemmer (z. B. Levofloxacin), während Chlortetracyclin lediglich bei okulären Chlamydieninfektionen gebräuchlich ist. Die systemische Anwendung zur Behandlung schwerer bakterieller Infektionen wie subakuter bakterieller Endokarditis erfolgt eher selten. In Abhängigkeit vom verursachenden Erreger werden bei bakterieller Endokarditis bevorzugt Substanzen wie Gentamicin, Vancomycin und Daptomycin eingesetzt, die zumindest teilweise auch gegen MRSA wirksam sind. Wie bei allen Tetracyclinen sollte wegen möglicher Zahnverfärbungen die systemische Anwendung bei Kindern unter 8 Jahren sowie bei Schwangeren während des 3. Trimenons der Schwangerschaft und der Stillzeit überwacht werden. Chlortetracyclin kann zur Verschlechterung einer bestehenden Niereninsuffizienz beitragen.

M. Neubeck/Mu

Literatur

1) B. M. Duggar, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 177 (1948).
 2) B. M. Duggar, *US Pat.* 2482055; C. A. 44, 8604f (1950). 3) W. Dürkheimer, *Angew. Chem.* 87, 751–784 (1975). 4) G. Schwartzman et al., in: *Florey*, Bd. 8, S. 101. 5) J. H. Boothe et al., *J. Am. Chem. Soc.* 75, 4621 (1953). 6) J. R. D. McCormick et al., *J. Am. Chem. Soc.* 79, 2849 (1957). 7) D. Steinbach, T. Strittmatter, *Pharm. Ztg.* 123, 1083 (1978). 8) N. Muhammad, J. A. Bodnar, *J. Pharm. Sci.* 69, 928 (1980). 9) K. Gstrein, F. Nachtmann, *Acta Pharm. Technol.* 26, 247 (1980); C. A. 95, 30460d (1981). 10) C. R. Stephens et al., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 4155 (1956). 11) H. Oka, Y. Ito, H. Masumoto, *J. Chromatogr. A* 882, 109–133 (2000). 12) A. F. Casey, A. Yasin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2, 19–36 (1984). 13) *Pharmeuropa* 5, 149 (1992). 14) *Dibbern*, Nr. 406. 15) R. Capote et al., *J. Sep. Sci.* 25, 399–404 (2002). 16) Y. M. Li et al., *Chromatographia* 48, 576–580 (1998). 17) A. Regosz, G. Zuk, J. Dembek-Lukasiak, *Sci. Pharm.* 46, 249 (1978). 18) C. Van den Borgert, A. M. Kroon, *J. Pharm. Sci.* 70, 186 (1981). 19) R. R. Krishna, P. Siraj, C. S. Sastry, *Indian J. Pharm. Sci.* 42, 82 (1980);

C. A. 93, 245561 g (1980). 20) A. Regosz, G. Zuk, *Pharmazie* 35, 24 (1980). 21) A. J. Cutie, J. Mills, T. Jochsberger, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 6, 77 (1980). 22) A. Georgopoulos, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 1, Reihe A*, 242, 387 (1978); C. A. 90, 132483c (1979). 23) B. A. Faraj, F. M. Ali, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217, 10 (1981). 24) T. Strittmatter, M. Siewert, *Pharm. Ztg.* 126, 1951 (1981). 25) J. H. Knox, J. Jurand, *J. Chromatogr.* 186, 763 (1979). 26) U. Jürgens, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 173, 356 (1981). 27) C. R. Anderson, H. S. Rupp, W.-H. Wu, *J. Chromatogr. A* 1075, 23–32 (2005). 28) A. Kaufmann et al., *Anal. Chim. Acta* 700, 86–94 (2011). 29) S. B. Turnipseed et al., *J. Agric. Food Chem.* 59, 7569–7581 (2011). 30) D. A. Bohm, C. S. Stachel, P. Gowik, *J. Chromatogr. A* 1216, 8217–8223 (2009). 31) A. Oenal, *Food Chem.* 127, 197–203 (2011). 32) L.-J. Zhou et al., *J. Chromatogr. A* 1244, 123–138 (2012). 33) K. N. Agwuh, A. MacGowan, *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 256–265 (2006). 34) D. G. Kennedy et al., *Analyst* 123, 2443–2447 (1998). 35) G. Zurhelle et al., *J. Agric. Food Chem.* 48, 6392–6396 (2000). 36) *Drugdex*®. 37) *Martindale*. 38) *Mutschler*.