

UV-VIS-Spektroskopische Bestimmung von Arzneistoffen

Vorausgesetzte Kenntnisse

- Aufbauprinzipien der Elektronenhüllen von Molekülen;
- bindende, nichtbindende und antibindende Molekülorbitale, σ - und π -Orbitale;
- Zusammenhang Struktur-Absorptionsspektrum, Chromophore,
- Grundprinzipien der optischen Spektroskopie, Strahlungsenergie und -intensität; Einstrahl- und Zweistrahlergeräte; Arten der elektromagnetischen Strahlung und zugeordnete Spektroskopiearten.

Literatur

- [1] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems: "Instrumentelle pharmazeutische Analytik", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1992
- [2] P. Surmann: "Quantitative Analyse von Arzneistoffen und Arzneizubereitungen", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1987
- [3] H. Naumer, W. Heller: "Untersuchungsmethoden in der Chemie", Georg Thieme Verlag Stuttgart 1986
- [4] D.H. Williams, I. Fleming: "Strukturaufklärung in der organischen Chemie", Georg Thieme Verlag Stuttgart 1986
- [5] DAB 9 Kommentar Vol.1 (1985)
- [6] K.-H. Näser, G. Peschel: "Physikalisch-Chemische Meßmethoden", Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1987

Diese Anleitung enthält:

Versuch UV-VIS 11 a:

Simultanbestimmung von Coffein und Crotylbarbital unter Ausnutzung der pH-Abhängigkeit der Barbitalbande (s. auch Versuch "UV-VIS-Spektroskopie-Gleichgewichtskonstanten")

Versuch UV-VIS 11 b:

Kolorimetrische Bestimmung von Arzneistoffen nach Umsetzung:

Phenazon mit p-Dimethyl-amino-benzaldehyd (p-DMAB);

(siehe auch Versuch 13 : Bestimmung aromatischer Amine)

Methodisches

Die UV-VIS-Spektroskopie ist die Messung der Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung im UV- und VIS-Bereich (200-400 nm und 400-800 nm) mit dem zu untersuchenden Stoff. In diesem Spektralbereich reicht die Strahlungsenergie

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

für die Übergänge zwischen Elektronenzuständen aus (Elektronenspektren). Obwohl die Elektronenhülle des gesamten Moleküls die Lage des elektronischen Energieniveaus bestimmt, kann das Absorptionsspektrum näherungsweise verstanden werden, wenn man nur den Teil des Moleküls betrachtet, dessen Elektronen sich im betrachteten Spektralbereich leicht anregen lassen (π - und n-Elektronen). Diese anregbaren Baugruppen des Moleküls heißen chromophore Gruppen, die beobachteten Übergänge sind $n-\pi^*$ - und $\pi-\pi^*$ - Übergänge. Zur Anregung von σ -Elektronen reicht die Strahlungsenergie im UV-VIS-Bereich nicht aus (σ -Zustände werden in der Regel nur mit der energiereicheren Vakuum-UV-Strahlung (<180 nm) angeregt), das gesättigte

Kohlenstoffgerüst trägt also wenig zur beobachteten Absorption bei.

Der Zusammenhang zwischen Struktur der Chromophoren und ihrem Absorptionsspektrum ist der Literatur zu entnehmen (z.B. [1], [3], [4]).

Erfolgt die Elektronenanregung im sichtbaren Bereich, so erscheint die absorbierende Verbindung in der betreffenden Komplementärfarbe, d.h., sie erscheint farbig (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Farben und verursachende Absorptionen

Lage des Absorptionsmaximums in nm	absorbierte Farbe	Komplementärfarbe (Farbe des absorbierenden Stoffes)
400	violett	gelbgrün
500	blaugrün	rot
600	gelb	blau
700	rot	blaugrün

Substanzen, die im sichtbaren Spektralgebiet (400...800 nm) nicht absorbieren, können oft chemisch in quantitativer Weise in Substanzen umgewandelt werden, die im Sichtbaren absorbieren. Auf diese Weise sind quantitative Bestimmungen im apparativ leichter zugänglichen Spektralbereich möglich (Kolorimetrie). Die Messung erfolgt im einfachsten Fall durch visuellen Farbvergleich mit Testlösungen (Kolorimeter) oder durch Messung der Absorbanz bei einer geeigneten Wellenlänge mit Spektralphotometern.

Wenn Licht der Wellenlänge λ eine Probe mit der Schichtdicke d durchquert, sinkt die Intensität des eingestrahnten Lichtes infolge der Absorption von I_0 auf I nach

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d} \quad \text{(Lambert-Beersches-Gesetz)} \quad (1)$$

Dieses für Konzentrationsmessungen grundlegende Gesetz gilt streng bei Verwendung von monochromatischem Licht und nur dann, wenn Wechselwirkungen der Moleküle untereinander vernachlässigt werden können, also insbesondere in stark verdünnten Lösungen.

Aus Gleichung (1) folgt, dass der dekadische Logarithmus des Intensitätsverhältnisses I_0/I zur Konzentration proportional ist:

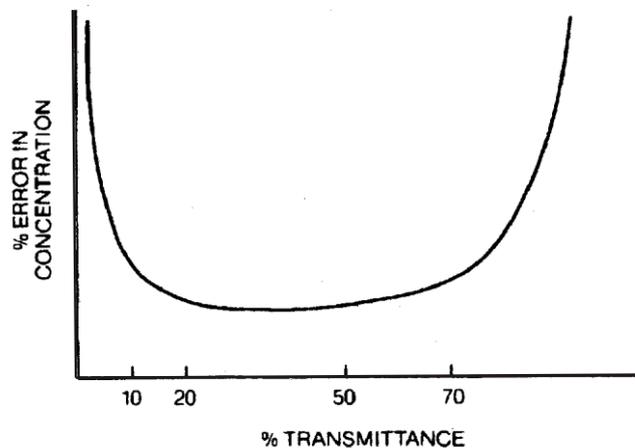
$$A = \lg(I_0 / I) = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (2)$$

Diese Größe ist die „Absorption“ oder Absorbanz (in Anlehnung an das englische "absorbance", in der älteren Literatur wurde diese Größe "Extinktion" genannt), sie wird entweder aus den Intensitäten berechnet oder direkt vom Spektrometer ausgegeben.

Wird die Konzentration in mol/l angegeben, ist $\varepsilon(\lambda)$ der molare Absorptionskoeffizient (Maßeinheit z.B. $l/(\text{mol cm}) = 10^3 \text{ cm}^2/\text{mol}$).

Wenn die Molmasse unbekannt ist (oder bei Messung von Mischungen) wird die spezifische Absorption $A_{1\% \text{ cm}}$ angegeben. Sie stellt die Absorption (Absorbanz) einer 1%igen Lösung der Schichtdicke 1 cm dar. Umfangreiche Tabellen der für die pharmazeutische Praxis wichtigen spezifischen Absorption sind z.B. in [1] und [2] zu finden.

Bei spektralphotometrischen Gehaltsbestimmungen ist im Interesse einer hohen Genauigkeit zu beobachten, dass die untersuchte Lösung eine Absorbanz im Bereich 0.2 ... 0.7 haben sollte, der relative Fehler der Konzentrationsmessung hat in diesem Bereich ein ausgeprägtes Minimum (Twyman-Lothian-Kurve).



Liegt die Absorbanz der Probe außerhalb des günstigen Bereiches, sind die Konzentration der Lösung (z.B. durch Verdünnen) oder die Dicke d der Küvette geeignet zu wählen.

Versuch UV-VIS 11 a:

Simultanbestimmung von Coffein und Crotylbarbital unter Ausnutzung der pH-Abhängigkeit des Crotylbarbitalspektrums

Allgemeines:

Das UV-Spektrum von Coffein ist in stark alkalischer Lösung ($\text{pH}=13,7$) dem von Crotylbarbital so überlagert, dass eine Konzentrationsbestimmung aus dem UV-Spektrum unter diesen Bedingungen unmöglich ist. Die Absorptionsbanden der Mischung bilden ein schwach strukturiertes Plateau. Coffein hat sein Absorptionsmaximum bei 273 nm, Barbiturat bei 255 nm. Verringert man den pH-Wert des Gemisches von 13,7 auf 10,5, verschiebt sich die Absorptionsbande des Crotylbarbitals von 255 nm auf 240 nm. Die Ursache dafür liegt in der Protolyse (im Zusammenhang mit der Keton-Enol-Tautomerie des Stoffes). Die UV-aktive paraständige CO-Gruppe des Crotylbarbitals tritt nicht mehr auf. Eine Bestimmung des Crotylbarbitalgehaltes wird aus der Differenz der Spektren der Gemische bei den pH-Werten 13,7 (0,5 m NaOH) und Boraxpuffer (eingestellt auf $\text{pH} = 10,5$) möglich. Die pH-unabhängige Coffeinbande mittelt sich heraus.

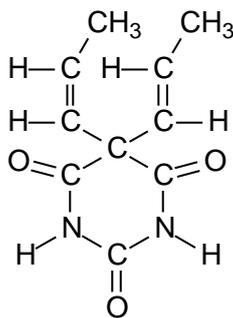
Differenzspektren erhält man

- über numerische Subtraktion der Einzelspektren an einem PC oder
- durch Verwendung eines Gemisches von Coffein und Crotylbarbital bei $\text{pH}=13,7$ als Meßprobe und des gleichen Gemisches bei $\text{pH}=10,5$ als Vergleichsprobe im Referenzstrahlengang des Spektrometers.

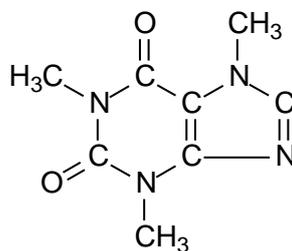
Die Bestimmung des Coffeins erfolgt durch Messung der Mischung bei $\text{pH} \leq 4$ (Ansäuern in HCl). Die Barbitalbande ist dann soweit zu kleineren Wellenlängen verschoben, dass die pH-unabhängige Coffeinbande ohne störende Überlagerung vorliegt.

Die Messungen werden am UV-VIS-Diodenarray-Spektrometer Specord S100 durchgeführt. Die Spektrenaufnahme erfolgt im Bereich von 220 - 320 nm. Die Küvettendicke beträgt 1cm, es müssen Kieselglasküvetten (auch als Quarzglasküvetten bekannt) verwendet werden. Warum? Alle Spektren und Versuchsschritte sind exakt zu protokollieren.

Vorsicht: Lösungen der Chemikalien sind nicht stabil und müssen daher vor der Spektrenaufnahme frisch vorbereitet werden.



Crotylbarbital



Coffein

Aufgaben und Versuchsdurchführung

I. Aufnahme der Spektren definierter Gemische von Crotylbarbital und Coffein

I.1 Herstellen von Stammlösungen für Crotylbarbital und Coffein

Der Arbeitsbereich für die Coffeinbestimmung und die Barbitalbestimmung liegt bei etwa 20 µg/ml.

Vorbereitet werden je 20 ml einer methanolischen Lösung von Crotylbarbital und Coffein (Konzentration 20 mg / 100 ml Methanol, d.h., $c = 200 \mu\text{g/ml}$).

Diese Stammlösungen müssen kühl und dunkel aufbewahrt werden!

I.2 Herstellen der Messlösungen und Messen der **reinen Spektren** und der **Spektren des Stoffgemisches** bei pH 13.7 (in 0.5 M NaOH) und bei pH 10.5 (in Boratpuffer)

Aus den Stammlösungen werden die Messlösungen hergestellt. Diese müssen zu Beginn des Versuches frisch vorbereitet werden. Sie sind nicht lange haltbar.

Folgende Lösungen werden hergestellt und deren Spektren jeweils im Bereich von 220 ... 320 nm aufgenommen:

- Aufnahme der 0.5 M NaOH-Lösung als Referenz
 - Lösung **A**: 1 ml der Crotylbarbital-Stammlösung auf 10 ml mit 0.5 M NaOH auffüllen und messen (Dateiname: A)
 - Lösung **B**: 1 ml der Coffein-Stammlösung auf 10 ml mit 0.5 M NaOH auffüllen und messen. (Dateiname: B)
 - Mischung **AB**: Jeweils 1 ml der Messlösungen **A** und **B** werden gut miteinander gemischt und spektroskopiert. Das Gemisch **AB** verbleibt in der Küvette. (Dateiname: AB)

 - Aufnahme der Boratpufferlösung als Referenz
 - Lösung **C**: 1 ml der Crotylbarbital-Stammlösung auf 10 ml mit Boratpuffer auffüllen und messen. (Dateiname C)
 - Lösung **D**: 1 ml der Coffein-Stammlösung auf 10 ml mit Boratpuffer auffüllen und messen. (Dateiname: D)
- (Achtung!! Für die auszuführende Coffein-Gehaltsbestimmung muss hier nach Beendigung der Spektrenaufnahme der Absorptionswert am Maximum der Coffein-Bande bei 273 nm abgelesen werden. Ermitteln Sie den Wert und notieren Sie ihn!).
- Mischung **CD**: Jeweils 1 ml der Meßlösungen **C** und **D** werden gut miteinander gemischt spektroskopiert. Das Gemisch **CD** verbleibt in der Küvette. (Dateiname CD)

I.3 Bestimmung des Differenzspektrums

Das Differenzspektrum wird rechnerisch ermittelt (Dateiname: AB_CD_1). Im Anschluss an die Spektrenaufnahme ermittelt man die Absorptionswerte bei 255 und 240 nm aus der grafischen Darstellung.

Die Absorptionswertdifferenz zwischen den Wellenlängen 255 und 240 nm $A_{255-240 \text{ nm}}$ ist proportional der Crotylbarbitalkonzentration (Maximum und Minimum des Differenzspektrums können gegenüber diesen Wellenlängen geringfügig verschoben sein).

II. Konzentrationsbestimmung von Crotylbarbital in Anwesenheit von Coffein

II.1 Aufnahme einer Eichkurve

Für die Aufnahme der Eichkurve werden entsprechend der untenstehenden Tabelle nacheinander folgende Mischungsverhältnisse der Mischungen **AB** und **CD** in zwei Küvetten durch schrittweises Aufstocken der Mischung **AB** und **CD** mit je 0.5 ml der Coffein-Messlösungen **B** und **D** hergestellt und deren Differenzspektren ermittelt. Die entsprechende Mischung **CD** wird dazu jeweils zuerst als Referenzprobe, die Mischung **AB** dann jeweils als Messprobe aufgenommen). Die Absorptionswertdifferenzen werden aus den Spektren bestimmt. Beachten Sie, dass die Spektren der Mischungen aus der Reihe 1 bereits gemessen wurden.

Berechnen Sie die Konzentrationen von Crotylbarbital in den bereiteten Mischungen nach unten stehender Formel und tragen Sie diese sowie auch die aus den Spektren ermittelten Absorptionswertdifferenzen in unten stehende Tabelle ein. (Die Messlösungen A, B, C und D haben eine jeweilige Konzentration $c_{\text{Anfang}} = 20 \mu\text{g/ml}$, $v_{\text{Anfang}} = v_A = v_C = 1 \text{ ml}$,

$v_{\text{gesamt}} = v_A + v_B = v_C + v_D$).

$$c_{\text{end}} = \frac{c_{\text{anfang}} \cdot v_{\text{anfang}}}{v_{\text{gesamt}}}$$

Mischung AB (Messprobe)		Mischung CD (Referenzprobe)					
Nr.	Lösung A in ml	Lösung B in ml	Lösung C in ml	Lösung D in ml	c_{Barbital} in $\mu\text{g/ml}$ im Gemisch AB	$\Delta \text{Abs}_{(255-240)}$	Dateiname
1.	1	1	1	1			AB_CD_1
2.	1	1.5	1	1.5			AB_CD_2
3.	1	2	1	2			AB_CD_3
4.	1	2.5	1	2.5			AB_CD_4
X							AB_CD_x

Berechnen Sie eine Ausgleichsgerade (Programm ORIGIN, linearer Fit):

$$c_{\text{Crotylbarbital}} [\mu\text{g/ml}] = a + b \cdot A_{255-240 \text{ nm}}$$

II.2 Bestimmung einer unbekanntes Konzentration von Crotylbarbital in einem Gemisch aus Crotylbarbital und Coffein

Sie erhalten eine Lösung mit einem Gemisch aus Crotylbarbital und Coffein unbekannter Zusammensetzung.

Bestimmen Sie die Konzentration an Crotylbarbital unter Verwendung der zuvor bestimmten Ausgleichsgeraden.

- 1.) 1 ml der Testlösung auf 10 ml mit Boraxpuffer (pH=10,5) auffüllen. Diese Testlösung als Referenz messen.
- 2.) 1 ml der Testlösung auf 10 ml mit 0.5 M NaOH auffüllen. Diese Testlösung als Probe messen.
- 3.) Das so erhaltene Differenzspektrum erhält den Dateinamen: AB_CD_x
- 4.) Berechnen Sie unter Verwendung der von Ihnen unter II.1.1 ermittelten Ausgleichsgerade die unbekannte Konzentration von Crotylbarbital und deren mittleren Fehler.

III. Konzentrationsbestimmung von Coffein in Anwesenheit von Barbital

III.1 Aufnahme einer Eichkurve

Zur Aufnahme der Eichkurve werden Mischungen **CD** aus den boraxgepufferten Lösungen **C** und **D** entsprechend der Tabelle durch schrittweises Aufstocken der Lösung **C** mit je 0.5 ml der Lösung **D** hergestellt. Als Referenz dient der Boraxpuffer. Messprobe und Referenzprobe werden jeweils mit 3 Tropfen konz. HCl angesäuert (Soll-pH-Wert etwa 4.0, überprüfen mit Unitest-Papier!). Berechnen Sie die Konzentrationen an Coffein in den Lösungsgemischen nach unten stehender Gleichung ($c_{\text{Anfang}} = 20 \mu\text{g/ml}$, $v_{\text{Anfang}} = v_{\text{D}}$, $v_{\text{gesamt}} = v_{\text{C}} + v_{\text{D}}$)

$$c_{\text{end}} = \frac{c_{\text{anfang}} \cdot v_{\text{anfang}}}{v_{\text{gesamt}}}$$

Ermitteln Sie nach jeder Spektrenaufnahme die Absorbanzen an den Bandenmaxima zwischen 270 ... 271 nm und tragen Sie diese Werte in die Tabelle ein.

Nr.	Volumen Lsg. C [ml]	Volumen Lsg. D [ml]	c_{Coffein} in $\mu\text{g/ml}$ im Gemisch CD	max. Abs ₂₇₀	Dateiname
0.			20		D
1.	1	1			CD_1
2.	1	1.5			CD_2
3.	1	2			CD_3
4.	1	2.5			CD_4

Berechnen Sie eine Ausgleichsgerade:

$$c_{\text{Coffein}}[\mu\text{g/ml}] = a + b \cdot A_{271 \text{ nm}}$$

II.2 Bestimmung des Coffeingehaltes in einer Tablette

Sie erhalten eine Coffein-Tablette, deren Gehalt an Coffein Sie bestimmen sollen.

Eine geeignete Stoffeinwaage für eine Stammlösung beträgt etwa 3-4 mg, so liegt in der Messlösung (100-fache Verdünnung) eine solche Konzentration an Stoff vor, die etwa dem Arbeitsbereich Ihrer Eichkurve entspricht. Die Tablette wiegt 125 mg. Die Tablette ist zunächst zu wägen, danach zu mörsern.

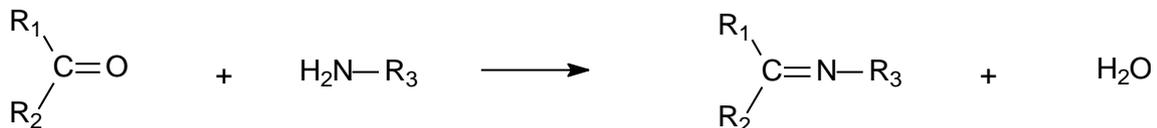
Stellen Sie 20 ml einer methanolischen Lösung des Stoffes als Stammlösung her (der Stoff wird zunächst in wenig Methanol unter Schütteln gelöst). Bereiten Sie daraus eine boratgepufferte Messlösung (1 ml Stammlösung mit Boratpufferlösung auf 10 ml auffüllen). Säuern Sie Mess- und Referenzprobe mit HCl an (pH=4, kontrollieren!) Zuerst wird der angesäuerte Boratpuffer als Referenz aufgenommen und dann die Testlösung als Probe spektroskopiert. Bestimmen Sie die Absorption bei 270-271 nm. Berechnen Sie mittels der Ausgleichsgerade die Konzentration an Coffein in der Lösung, deren mittleren Fehler und den Gehalt an Coffein in der Tablette (in Masse%).

Versuch UV-VIS 11 b:

Kolorimetrische Bestimmung von Phenazon mit p-Dimethyl-amino-benzaldehyd (p-DMAB) ("Ehrlichs Reagenz")

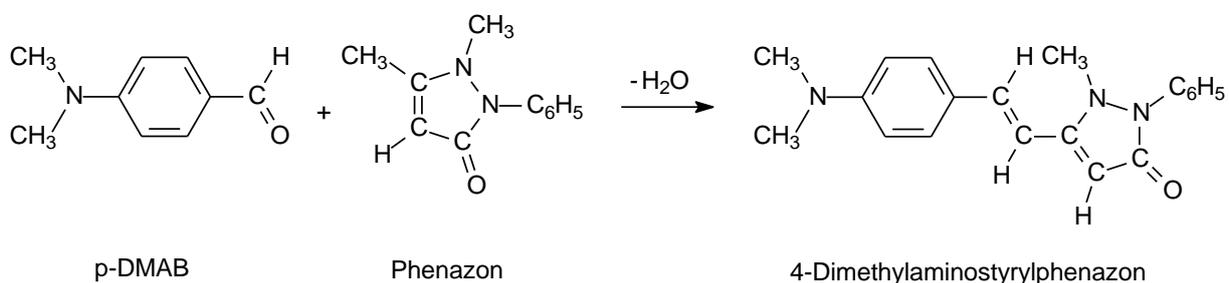
Allgemeines:

Primäre Amine kondensieren mit Aldehyden oder Ketonen zu Azomethinen nach dem Schema:



Die Azomethine sind insbesondere bei Verwendung aromatischer Aldehyde gefärbt, da die C=N-Doppelbindung dann Teil eines ausgedehnten Systems von π -Bindungen ist, die sich im sichtbaren Spektralbereich anregen lassen. Arzneistoffe, die nur im UV absorbieren, lassen sich nach der Umsetzung mit einem aromatischen Aldehyd (wie p-Dimethyl-amino-benzaldehyd, Zimtaldehyd oder Vanillin) im sichtbaren Spektralbereich photometrieren (Kolorimetrie). Das Verfahren ist z.B. zur Bestimmung primärer aromatischer Amine (z.B. Sulfonamide u.a.) geeignet.

Eine weitere Möglichkeit der Synthese photometrierbarer Derivate wird im folgenden Versuch genutzt. Dabei wird Phenazon mit p-Dimethyl-amino-benzaldehyd in saurer Lösung durch Kondensation zu einer Verbindung mit einem ausgedehnten System von π -Elektronen umgesetzt:



Da der Verlauf der Umsetzung wie bei den meisten Farbreaktionen nicht nur von der Konzentration des zu bestimmenden Arzneistoffes sondern auch von der Reagenzkonzentration, der Temperatur, der Reaktionszeit, dem Lösungsmittel und anderen Faktoren abhängt, ist die Abhängigkeit der Absorption von der Arzneistoffkonzentration häufig nicht linear. Es ist erforderlich, die Reaktionsbedingungen möglichst genau konstant zu halten. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über eine Kalibrierungskurve.

Aufgaben und Versuchsdurchführung

- 1.) Herstellen einer Stammlösung: 90 mg Phenazon im 100 ml-Maßkolben in Wasser lösen, mit Wasser auf 100 ml auffüllen.
- 2.) Herstellen der Meßlösungen: 1, 2, 5 und 10 ml Stammlösung in 50 ml - Maßkolben pipettieren und diese jeweils mit dest. Wasser auffüllen.
- 3.) Herstellen des Reagenz: Etwa 1.10 g p-DMAB im Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen einwiegen, 20 ml Wasser und 10 ml konzentrierte Schwefelsäure unter Beachtung aller Vorsichtsmaßnahmen (Pipettierhilfe, Schutzbrille etc.) zupipettieren.
- 4.) Herstellen der Untersuchungslösungen: Je 2 ml Meßlösung und 2 ml Reagenz in einem Becherglas schwenken (Vorsicht! Ätzend!), 60 min in den bereitgestellten Gefäßen stehen lassen; mit Kolbenpipette in 1 cm - Rundküvette füllen.
- 5.) Punktweise Messung des Absorptionsspektrums einer der Untersuchungslösungen sowie einer Blindprobe (2ml Wasser und 2ml Reagenz) im Bereich von 400 bis 600 nm im Abstand von 10 nm.
- 6.) Messung der Absorbanz aller Untersuchungslösungen bei der Wellenlänge der Maximalabsorption (510 nm); Berechnung der ausgeglichenen Kalibrierkurve.
- 7.) Bestimmung der Konzentration einer vorgegebenen Phenazonlösung mittels der ausgeglichenen Kalibrierkurve; Angabe des 95%-Vertrauensintervalls.