Einsatz der NIR Spektroskopie in der pharmazeutischen Analytik: Charakterisierung von Johanniskraut-Trockenextrakten und Kopplungsmöglichkeiten mit der HPTLC

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Irene Ottilia Cora Rager

Tag der mündlichen Prüfung:	21. Dezember 2001
Dekan:	Prof. Dr. H. Probst
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Breitmaier

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar in der Zeit vom Januar 1999 bis Dezember 2001.

Meinem Doktorvater danke ich für die Anregungen und Diskussionen und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Den Firmen Finzelberg und Lichtwer danke ich für die großzügige Überlassung der Trockenextrakte, der Firma Foss NIRSystems für die Bereitstellung des NIR Spektrometers, der Firma Merck für die Sonderanfertigung der Dünnschichtplatten und schließlich der Firma Bruker Optics für die leihweise Überlassung des FT-NIR Spektrometers.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Arbeitskreis danke ich herzlich für das ausgezeichnete Arbeitsklima, welches durch viele Diskussionen, gute Freundschaft, ständige Hilfsbereitschaft und die nötige Geduld während der Entstehungsphase dieser Arbeit gekennzeichnet war. Mein besonderer Dank gilt weiterhin Frau Dr. Roos für die wertvollen Gespräche, intensive Zusammenarbeit und hilfreiche Ideen.

Weiterhin bedanke ich mich für das sorgfältige Korrekturlesen des Manuskripts bei Herrn Rösler, Frau Dr. Roos, Herrn Schneider und Frau Wellsow.

Ebenfalls danke ich der DFG für die Teilnahme am Graduiertenkolleg „Analytische Chemie“ an der Universität Tübingen und für das gewährte Stipendium.

Teile dieser Arbeit wurden und werden veröffentlicht bzw. vorgestellt:

- Rager I, Kovar KA. Densitometry on Thin-Layer Plates by Near-Infrared Spectroscopy. Posterpräsentation. DPhG-Jahrestagung, 05.-07. Oktober 2000, Münster;D
  Archiv der Pharmazie 2000; 333; Suppl 2, 45.

- Rager I, Roos G, Schmidt PC, Kovar KA. Quanitfication of Hyperfoirn and Biapigenin in St. John's Wort Extracts. Vortrag. Traits, Tracks and Traces. International Congress and 49th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, 02.-06. September 2001, Erlangen, D

- Rager I, Roos G, Schmidt PC, Kovar KA. Rapid Quantification of Constituents in St. John's Wort Extracts by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. J Pharm Biochem Anal. Im Druck.

- Rager I, Roos G, Kovar KA. Rapid Quanitfication of Constituents in St. John's Wort Extracts by NIR Spectroscopy. Posterpräsentation. Ulla Summer School, 21. August – 01. September 2001, London, GB

- Rager I, Hoffmann V, Kovar KA. Hyphenated Techniques: a New Method for the On-line Coupling of FT-Near-Infrared Reflectance Spectroscopy and HPTLC. J Planar Chromatgr (in Vorbereitung).

Für Großemama

Wer alle seine Ziele erreicht, hat sie
wahrscheinlich zu niedrig gewählt.
Herbert von Karajan

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 2

2.1 Geschichtliche Entwicklung der NIRS 2
2.2 Anwendungen in der Routineanalytik 4
2.3 Problemstellung 6

3 Theorie 9

3.1 Nahinfrarot Spektroskopie 9
3.1.1 Absorptionsspektren 9
3.1.2 Messmethodik 12
3.1.3 Messsysteme 15
3.1.4 Multivariate Datenanalyse 16
3.2 Kopplungsmethoden 17
3.2.1 Allgemeines 17
3.2.2 Die HPLC – MS Kopplung 18
3.2.3 Kopplung in der instrumenteller HPTLC 21

4 NIRS Analytik von Johanniskrautextrakten 23

4.1 Vorbemerkungen 23
4.1.1 Inhaltsstoffe 23
4.1.2 Wirkung 23
4.1.3 Standardisierung von pflanzlichen Zubereitungen 26
4.1.4 Extraktion 28
4.1.5 Analytik 30
4.2 HPLC als Referenzmethode der NIRS 31
4.2.1 Auswahlkriterien 31

4.2.2 Standardsubstanzen ... 32
4.2.3 Ergebnisse ... 33
4.3 Multivariate Analyse ... 35
4.3.1 Datenvorbehandlung ... 35
4.3.2 Derivativspektroskopie ... 36
4.3.3 Partial Least Squares Regression ... 39
4.3.3.1 Achsenabschnitt der Regressionsgerade (offset) ... 40
4.3.3.2 Bias ... 40
4.3.3.3 Korrelationskoeffizient (correlation coefficient) ... 40
4.3.3.4 Residual Variance ... 41
4.3.3.5 Root Mean Square Error of Calibration (RMSEC) ... 41
4.3.3.6 Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP) ... 42
4.3.3.7 Steigung der Regressionsgeraden (slope) ... 42
4.3.4 Ergebnisse ... 43
4.3.4.1 Rohspektren ... 43
4.3.4.2 PLS2 Kalibration nach Datenvorbehandlung ... 45
4.3.4.3 PLS1 Kalibration nach Datenvorbehandlung ... 47
4.3.4.4 Auswertung der Ergebnisse ... 51
4.4 Diskussion ... 52

5 Die direkte HPTLC-FT-NIRS on-line Kopplung ... 57

5.1 Grundlagen ... 57
5.1.1 Dünnschichtchromatographie ... 57
5.1.2 Dünnschichtchromatographie und IR ... 58
5.2 Geräteaufbau ... 59
5.2.1 Fourier-Transformations Nahinfrarot Spektroskopie ... 59
5.2.2 Vorteile der FT-NIR Technik ... 62
5.2.3 Messsystem ... 63
5.3 Identifizierung ... 65
5.3.1 Hauptkomponentenanalyse ... 65

5.3.2 Datenvorbehandlung 66
5.3.3 Diskriminantenanalyse 69
5.3.4 Ergebnisse 70
5.4 Quantifizierung 74
5.4.1 Gram-Schmidt Vektororthogonalisierung 74
5.4.2 Ergebnisse 75
5.5 Diskussion 76

6 Experimenteller Teil 80

6.1 Validierung der Gehaltbestimmungsverfahren 80
6.1.1 Kalibrierung 80
6.1.2 Arbeitsbereiche 80
6.1.3 Prüfung auf Normalverteilung 80
6.1.4 Linearität 81
6.1.5 Richtigkeit und Präzision 81
6.1.6 Verfahrensstandardabweichung 82
6.1.7 Messgröße und Vertrauensbereich 82
6.1.8 Theoretische Nachweis- und Bestimmungsgrenze 83
6.2 HPLC 84
6.2.1 Materialien 84
6.1.1.1 Chemikalien und Reagenzien 84
6.1.1.2 Säulen 84
6.1.1.3 Geräte 85
6.2.2 Spektroskopie 86
6.2.2.1 UV-VIS Diodenarray 86
6.2.2.2 Massenspektroskopie 87
6.2.3 Chromatographische Methode 89
6.2.3.1 Standard- und Probenvorbereitung 89
6.2.3.2 Chromatographisches Verfahren 90
6.2.3.3 Quantitative Auswertung und Verfahrenskenndaten 90

6.3 Instrumentelle HPTLC 94
6.3.1 Materialien und Geräte 94
6.3.2 Aufnahmetechnik 95
6.3.3 Quantitative Auswertung und Verfahrenskenndaten 96
6.4 Dispersive NIRS 97
6.4.1 Spektrometer 97
6.4.2 Geräteüberprüfung 98
6.4.3 Spektrenaufnahme 99
6.5 Fourier-Transformation NIRS 99
6.5.1 Spektrometer und DRIFT-Einheit 99
6.5.2 Geräteüberprüfung 100
6.5.3 Spektrenaufnahme 101
6.5 Software 101

7 Literaturverzeichnis 102

Abkürzungen

A	Absorption
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
AUC	Area under the Curve
CE	Kapillarelektrophorese
CV	Cross Validation; Kreuzvalidierung
DAD	Diodenarray-Detektion
DRIFT	Diffuse Reflectance Infrared Fourier-Transform
EI-MS	Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektroskopie
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie
FFT	Fast Fourier-Transformation
FID	Free Induction Decay
FIR	Fernes Infrarot
FT	Fourier-Transformation
GC	Gaschromatographie
GMP	Good Manufacturing Practices
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
log 1/R	Scheinbare Reflexion
MAO-A	Monoaminooxidase A
MCT	Mercury-Cadmium-Telluride
MIR	Mittelinfrarot
MS	Massenspektroskopie
NIPALS	Non-linear Iterative Partial Least Squares
NIR	Nahes Infrarot
NIRS	Nahinfrarot Reflexions-Spektroskopie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

OE	Optische Emission
PbS	Bleisulfid
PC	Principal Component; Hauptkomponente
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Principal Component Regression
PLS	Partial Least Squares
R	Reflexion
RMSEC	Root Mean Square Error of Calibration
RMSEP	Root Mean Square Error of Prediction
RP	Reversed Phase
SFC	Superkritische Flüssigkeitschromatographie
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis
SNV	Single Normal Variate
SPE	Solid Phase Extraction
T	Transmission
UV	Ultraviolett
VIS	Visible; Sichtbares Licht

1 Zusammenfassung

Die Qualitätskontrolle im Bereich der pharmazeutischen Industrie erfordert den Einsatz von Analysenmethoden, die dem modernen Anspruch auf hohen Probendurchsatz, reduzierte Probenkosten und minimale Analysenzeiten, sowie ökologischer Verträglichkeit entsprechen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Nahinfrarot Spektroskopie ein in der pharmazeutischen Industrie relativ neues Verfahren eingesetzt, welches seinen Ursprung in der Lebensmittelchemie und Analytik von Agrarprodukten hat. Die vorliegende Arbeit untersucht neue Grenzen dieser Routineanalytik, indem sie beweist, dass bisher nicht erreichte Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in komplexen Matrices – Pflanzenextrakten und HPTLC-Sorbentien – dieser spektroskopischen Methode durchaus zur Verfügung stehen. Damit eröffnet sie neue Anwendungsmöglichkeiten dieser Routineanalytik für die pharmazeutische Qualitätskontrolle und diskutiert ihre Einsatzgebiete.

Am Beispiel der quantitativen Nahinfrarot Bestimmung von Hyperforin und Biapigenin, zweier wichtiger Inhaltsstoffe von Johanniskrauttrockenextrakten, wurde die Eignung dieser Methode für die Qualitätskontrolle von Pflanzenextrakten gezeigt. Hyperforin war als Beispiel geeignet, da es mit einem Konzentrationsbereich von 1 bis 6 % in einer Menge in den Johanniskrautextrakten vorliegt, die für Nahinfrarot Bestimmungen üblich ist. Biapigenin hingegen bot sich an, da es ein Inhaltstoff ist, der in sehr niedrigen Konzentrationen vorliegt (0,1 bis 0,7 %), gleichzeitig aber über ein ausgedehntes chromophores System verfügt. Dadurch sind sehr genau Messungen im UV möglich, die exakte Referenzwerte für die Nahinfrarot Berechnungen liefern. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für valide Ergebnisse multivariater Modelle. Als Referenzmethode kam eine RP-HPLC zum Einsatz, validiert nach den Vorschriften der ICH Guideline Q2B. Der Gehalt beider Inhaltstoffe wurde in 35 industriell hergestellten Trockenextrakten verschiedener Herkunft ermittelt. Eine eigene Partial Least Squares (PLS1) Regression kalibrierte jeden der beiden Inhaltstoff multivariat. Das für Hyperforin aufgestellte Modell ergab mit einem Vorhersagefehler von 0,22 % (absolut) ein sehr gutes Ergebnis, welches die Bestimmung des Hyperforingehalts, der im Mittel bei 3 % liegen sollte, mit großer Präzision ermöglicht. Aufgrund der deutlich geringeren Konzentration des Biapigenins ist die Vorhersagequalität des dafür aufgestellten Modells etwas geringer. Nichtsdestotrotz ermöglicht die Teilung des Arbeitsbereichs der multivariaten Regression bei 0,35 % und die separate Berechnung des niederen Konzentrationsbereichs eine Vorhersage, die eine verlässliche Aussage über den Biapigeningehalt gewährleistet. Die Arbeit unterstreicht das Potential der Nahinfrarot Spektroskopie als Alternative zu herkömmlichen quantitativen Analysen von Pflanzenextrakten.

Weiterhin untersuchte man die Grenzen und Möglichkeiten einer Kopplung von Dünnschichtchromatographie und Fourier-Transformations Nahinfrarot Spektroskopie. Hierzu wurde die von Glauninger und Kovar entwickelte DRIFT (Diffuse Reflectance Infrared Fourier-Transformation)-Einheit eingesetzt. Die theoretischen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen einer Koffein-Quantifizierung wurden mittels Gram-Schmidt Verfahren untersucht. Sie lagen bei 0,51 bzw. 0,73 µg pro Spot bei einer Verfahrensstandardabweichung von 2.97 %. Für die Evaluierung der Identifizierungsgrenze wurden Spektren von vier strukturell verwandte Benzodiazepinen, die ähnliche Nahinfrarot Spektren besitzen, in-situ – also direkt auf der Platte - stationär aufgenommen. Durch die anschließend erfolgte Hauptkomponenten- und Diskriminantenanalyse konnte belegt werden, dass ab einer Konzentration von 30 µg pro Fleck eine Unterscheidung und Zuordnung der vier Benzodiazepine sicher möglich war.

2 Einleitung

2.1 Geschichtliche Entwicklung der NIRS

Seit der Entdeckung des Infrarot Lichts durch den Astronomen Herschel im Jahr 1800 [1] vergingen fast 100 Jahre, bis diese Region des elektromagnetischen Spektrums des Lichts von Spektroskopiekern näher untersucht wurde. Die größte Schwierigkeit am Anfang der Infrarot Spektroskopie war die Geräteausstattung. Coblentz war schon um 1900 in der Lage, Spektren mit Hilfe eines selbst gebauten Spektrometers mit Felssalzprisma und sensitivem Thermofühlers, der mit einem Spiegel-Galvanometer verbunden war, aufzunehmen. Diese Methode war jedoch sehr zeitintensiv, da es oft länger als ein Tag dauerte, bis ein Spektrum einer Substanz Punkt für Punkt erfasst war. Als am Ende des zweiten Weltkrieges die Entwicklung kommerzieller Geräte so weit war, dass Spektren routinemäßig in 15 Min. aufnehmbar wurden, konzentrierte sich das Interesse der Forscher auf die Region des Mittelinfrarot. Der Mangel an scharfen Banden, die Drift der Basislinie, die Häufigkeit von überlappenden Peaks und Schultern und der drastische Verlust an Signalstärke (im Vergleich zum Mittelinfrarot um den Faktor 2 bis 3) war neben der Schwierigkeit der Bandenzuordnung aufgrund der zahlreichen Obertöne und Kombinationsschwingungen Grund genug, sich nicht mit dem Nahen Infrarot zu beschäftigen.

Der erste Anstoß zum Gebrauch des Nahinfrarots war die vielzitierte Untersuchung von Kubelka und Munk [2], die sich mit der Technik der Diffusen Reflexion beschäftigte und das Tor zu einer ungewöhnlich einfachen Messmethode öffnete. Jedoch wurde diese Veröffentlichung von den meisten Analytikern dieser Zeit nicht beachtet, sie benutzen weiterhin Transmissionstechniken. Ellis und Bath [3] machten Gebrauch

von der starken Absorption von Wasser in der NIR Region und bestimmten den Feuchtigkeitsgehalt in Gelatine. Nach weitern 5 Jahren führte Freymann [4] Untersuchungen von Treibstoffen durch, Barchewitz folgte 1949 [5]. Bereits 1948 legte wiederum Kubelka die Grundlagen der Kubelka–Munk Funktion dar [6]. Mitte der 50er Jahre gab es zwei Übersichtsartikel über das Thema NIR im Allgemeinen, der zweite mit dem Schwerpunkt Gerätetechnik [7, 8]. Die Veröffentlichung von Goddu [9] fasste den Stand der Forschung zusammen und zeigte, dass die bisherigen Arbeiten sich an das Muster der Spektreninterpretation ihrer Vorgänger gehalten hatten, indem sie sich zur Quantifizierung auf eine einzelne Wellenlänge im Spektrum der einzelnen Proben beschränkten. Obwohl das Konzept des Gebrauchs mehrerer Wellenlängen und Multivariater Regressionsanalyse schon vor 1968 bekannt war, wurde es zum ersten mal von Ben-Gera und Norris in ihrer grundlegenden Veröffentlichung über die NIR Analyse von Agrarprodukten angewandt [10]. Ihre Arbeit befasste sich mit der Bestimmung von Fett und Feuchtigkeitsgehalt in Fleisch und Milch und Feuchtigkeitsgehalt von Sojabohnen. Außer der Veröffentlichung von Kubelka und Munk ist dies wohl die grundlegendste Arbeit im Bereich der Anwendung der Nahen Infrarot Spektroskopie und deshalb wohl auch mit die am häufigsten zitierte. Der anhaltende Erfolg auf dem Sektor der landwirtschaftlichen Produktions- und Qualitätskontrolle führte zu wissenschaftlicher Anerkennung und breiter Anwendung [11]. Dies spiegelte sich auch im sprunghaften Anstieg der Veröffentlichungen zu diesem Themengebiet wieder, die 1990 erstmals hauptsächlich im chemischen und pharmazeutischen Sektor angesiedelt waren [12]. Entscheidend für diesen Erfolg war die Entwicklung von extrem leistungsfähigen Spektrometern und vor allem die ungeheuren Fortschritte im Bereich der Auswertungssoftware, die inzwischen dem Anwender eine große Palette

an den unterschiedlichsten problemorientierten Lösungen bietet. Die Anwendung der NIRS als schnelle, zerstörungsfreie, nicht-invasive und probenvorbereitungsfreie moderne Analysenmethode konnte nun ausgiebig genutzt werden.

2.2 Anwendungen in der Routineanalytik

Nachdem sich die NIRS Analytik in der Landwirtschaft und Nahrungsmittelindustrie, vornehmlich in den USA und Kanada, etabliert hat, gibt es inzwischen auch unzählige Varianten der In-Prozess Kontrolle mittels NIRS, die umfassend beschrieben sind [13, 14]. Die American Association of Cereal Chemists (AACC) gab der NIRS 1982 den offiziellen Status einer „Federal Grain Inspection Service Method“, weiterhin existieren offiziell anerkannte Verfahren zur Untersuchung von allen Arten von Trockengemüse und Sojabohnen [15].

Im Vergleich dazu ist die Anwendung der NIRS im pharmazeutischen Bereich relativ jung. Ein Grund dafür mag im mangelnden Verständnis des angeblichen „Black Box“ Verfahrens gesehen werden, da die Analysenergebnisse nicht ohne weiteres nachvollziehbar sind. Deutlich wird diese Problematik auch in der bisher mangelnden Akzeptanz dieser neuen Technologie seitens der Behörden. Erst durch eine Validierungsstudie konnte 1992 eine Anerkennung der NIRS durch die FDA als gleichwertiges Verfahren gegenüber offiziellen Arzneibuchmethoden zur Bestimmung von Identität, Gehalt und Wassergehalt von Ampicillin-Trihydrat erreicht werden [16]. Die Zahl der behördlich zugelassenen Anwendungen ist trotz dieses Meilensteins nach wie vor gering, auch wenn es immer mehr Anstrengungen gibt, die Qualifizierung und Validierung von NIR Spektrometern und Verfahren zu erreichen [17, 18]. Hierbei ist selbstverständlich immer zu bedenken, dass für die Anerkennung durch ein Arzneibuch die festgelegten

Anforderungen an eine Methode hinsichtlich Richtigkeit, Präzision, Linearität, Spezifität, Empfindlichkeit und Robustheit einzuhalten sind. Der damit verbundene Zeit- und Kostenaufwand wurde bisher von der pharmazeutischen Industrie gescheut, sind hier die gesetzlichen Reglementierungen gegenüber anderen Branchen doch deutlich strenger. Jedoch macht die Aufnahme der NIRS in Form einer eigenen Monographie im Europäische Arzneibuch 1997 und in das Amerikanischen Arzneibuch (USP) die Trendwende sichtbar.

Tabelle 2-1: Wichtige Anwendungsgebiete der NIRS (nach [19]).

Bereich	Anwendung
Chemie	*Konventionell:* Zusammensetzung, Struktur, Wassergehalt von organischen Verbindungen; Charakterisierung von synthetischen Polymeren; Additive in Polymeren. *On-line monitoring:* Polymerisation, Petrochemische Prozesse, Bioprozesse, Polymer-Extrusion.
Landwirtschaft	Protein, Wasser, Fett, Öl, Asche in Weizen, Reis, Sojabohnen, Saatgut allgemein.
Nahrungsmittel-Industrie	Protein, Wasser, Fett in Backwaren, Molkereiprodukten, Fleisch, Snack Food, Kakao, Schokolade
Pharmazie	Identität, Gehalt und Feuchte in Pulvern, Granulaten, Tabletten; Restfeuchte in Lyophilisaten; Feuchte in Gelatine-Kapseln; Kristallinitätsgrad, Polymorphie, Dichte; Modifikationsumwandlungen, Härtegrad von Tabletten; Stabilität; Korngröße; Mischungsgüte. *On-line Monitoring:* Mischen, Granulieren, Trocknen, Filmcoating, Direktpelletierung.

Medizin	Nichtinvasive in-vivo Bestimmung von Körperfett, Cholesterol, Blutzucker, Sauerstoff; Wassergehalt der Haut; Hautkrebs; Fett, Kohlenhydrate und Stickstoff in Fäzes.
Umweltschutz	Kunststoff-Recycling; Schadgasmessungen, Sedimente (saurer Regen).

Im Rahmen des in der pharmazeutischen Industrie angestrebten Konzeptes des „Total Quality Management“ ist die neueste Entwicklung einer hundertprozentigen Identitätsprüfung pharmazeutischer Produkte auf der Fertigungsstrasse ein weiterer großer Schritt [20]. Tabelle 2-1 fasst die inzwischen weitverbreiteten routinemäßigen Anwendungen der NIRS zusammen und verdeutlicht das Potential dieser Methode.

2.3 Problemstellung

Obwohl die weitgefächerten Anwendungsmöglichkeiten der NIRS immer deutlicher werden, wird das Potential dieser Methode dennoch nach wie vor in der pharmazeutischen Industrie nicht voll ausgeschöpft. Weder wurde bisher versucht, die Ergebnisse der landwirtschaftlichen und lebensmitteltechnischen Analysen in die Qualitätskontrolle von Phytopharmaka zu transferieren, noch neue Anwendungsgebiete außerhalb der für die NIRS traditionellen Direktanalyse von Stoffen und Zubereitungen – wie die Kopplung mit chromatographischen Systemen - zu finden. So beschränkt sich der pharmazeutische Einsatz doch immer noch auf eher technologische Aspekte wie die Messung der Feuchtigkeit in Pulvern und Granuliergemischen oder auf die Eingangskontrolle von Reinsubstanzen, deren Spezifität überprüft werden. Die Qualitätskontrolle und Standardisierung von Pflanzenprodukten hingegen, die in der Agrartechnik schon seit langem verbreitet sind,

haben noch keine Anwendung bei den Herstellern von pharmazeutischen Pflanzenextrakten gefunden. Die Etablierung der NIRS in diesem Bereich hätte nicht nur die Vorteile, schnell, ökonomisch, reproduzierbar und genau zu sein, sondern auch eine direkte Kontrolle des Extraktionsvorgangs zu ermöglichen. Gleichzeitig könnte auf eine Standardisierung auf nur ein oder zwei Inhaltsstoffe verzichtet werden, da eine gleichzeitige Analyse von mehreren Inhaltstoffen parallel möglich wäre. Die Schwierigkeit hierbei ist sicher die zum Teil für die traditionelle NIRS sehr niedrigen Konzentrationen, in denen die für die pharmakologische Wirkung relevanten Stoffe vorliegen können. Auch handelt es sich bei Pflanzenextrakten um komplexe und in ihrer Zusammensetzung variierende Matrices, die andere Anforderungen an die Analytik stellen, als reine chemische Ausgangsprodukte in der pharmazeutischen Industrie. Am Beispiel des Hyperforins und Biapigenins in Johanniskrauttrockenextrakten verschiedener Herkunft, Extraktionsmethoden und Alter soll in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Einsatz der NIRS für die Phytopharmaka-Industrie eine geeignete Alternative zu herkömmlichen Methoden der Standardisierung und Qualitätskontrolle bietet (siehe auch Kap. 4.3.1).

Diese Einsatzmöglichkeit erschließt sich aus dem Bereich der Agrartechnologie und Lebensmittelindustrie der pharmazeutischen Industrie. Zusätzlich soll in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine neue Anwendung der Nahinfrarot Spektroskopie als Kopplungsmethode für dünnschichtchromatographische Systeme gezeigt werden. Die dabei zur Anwendung kommende DRIFT-Technik, die für das Mittelinfrarot entwickelt wurde [21], wird hierfür weiterentwickelt und mit der Nahinfrarot Spektroskopie gekoppelt. Dabei soll ein großer und einschneidender Nachteil der Kopplung mit dem MIR überwunden werden: Durch die Absorption des Kieselgels im Mittelinfrarot ist der

spektrale Bereich, der der Auswertung zur Verfügung steht, stark eingeschränkt. Größter Nachteil hier ist das Fehlen des klassischen Fingerprintbereichs, der für die endgültige Identifizierung vieler Substanzen im Mittelinfrarot von großer Bedeutung ist. Im Nahinfrarot hingegen kommt es durch die fehlende Eigenabsorption des Kieselgels zu keiner Einschränkung des spektralen Bereichs, sodass der gesamte Bereich zur Auswertung der Spektren direkt auf den Dünnschichtplatten zur Verfügung steht (siehe auch Kap. 5.1.2). Das Potential dieser Kopplung soll in dieser Arbeit durch die Quantifizierung von Koffein im Vergleich zum Mittelinfrarot gezeigt werden. Frühre Arbeiten von Frey zeigen in der Kopplung mit dem Mittelinfrarot für Koffein sehr geringe Werte für die Nachweis- und Bestimmungsgrenze [22]. Dadurch kann diese Arbeit als Referenz und quasi „Goldstandard“ herangezogen werden. Die Möglichkeiten und Grenzen der Identifizierung werden anhand der vier strukturell verwandten Benzodiazepine Bromazepam, Clobazam, Diazepam und Lorazepam, die im NIR sehr ähnliche Spektren aufweisen, belegt.

Ziel dieser Arbeit ist es, zwei neue Anwendungsmöglichkeiten dieser aus dem Agrarbereich kommenden Routinetechnik vorzustellen und ihr Einsatzpotential für die pharmazeutische Qualitätskontrolle zu evaluieren.

3 Theorie

3.1 Nahinfrarot Spektroskopie

3.1.1 Absorptionsspektren

Der infrarote Bereich des elektromagnetischen Spektrums lässt sich in drei Teilbereiche untergliedern: Nahinfrarot / NIR (800 - 2500 nm), Mittelinfrarot / MIR oder Infrarot/ IR (2500 - 25000 nm) und Ferninfrarot / FIR (25 µm – 1000 µm) [23]. Somit liegt das NIR zwischen dem sichtbaren Licht (VIS) und dem Mittelinfrarot. Laut Planckschem Gesetz ist die Energie eines Photons zur Frequenz der Strahlung proportional (3-1).

$$E = h \cdot \nu \quad (3\text{-}1)$$

E = Energie eines Photons (J)
h = Plancksche Wirkungskonstante ($6{,}626 \cdot 10^{-34}$ Js)
ν = Frequenz der Strahlung (s^{-1})

Die Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung und Materie resultiert in Absorption, die Änderung des Energiegehalts im Molekül. Nach quantenmechanischen Vorstellungen kann dies nur in diskreten Schritten erfolgen, wenn nämlich die eingestrahlte Energie der Energiedifferenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand genau entspricht. Die Energie des Photons wird vom Molekül absorbiert. Bei Absorption von Strahlung im IR – bzw. NIR – Bereich kommt es zur Anregung von Molekülschwingungen. Werden Bindungslängen verändert spricht man von Valenz- oder Streckschwingungen, werden nur die

Bindungswinkel verändert von Deformations- oder Biegeschwingungen. Zur Anregung von Valenzschwingungen sind in der Regel größere Anregungsenergien als zur Anregung von Deformationsschwingungen der gleichen Molekülgruppe nötig. Infrarot aktiv sind nur solche Substanzen, die ein permanentes Dipolmoment besitzen bzw. deren Dipolmoment sich während des Schwingungsvorgangs ändert. Die Anregung von Molekülschwingungen kann durch das Modell des anharmonischen Oszillators beschrieben werden: Neben Grundschwingungen, d. h. Übergängen des Moleküls vom Grundzustand (Schwingungsquantenzahl v = 0) in den nächsthöheren angeregten Zustand (v = 1), sind auch Übergänge über mehrere Energieniveaus hinweg möglich. Diese Schwingungen bezeichnet man als Oberschwingungen oder Obertöne. Sie besitzen eine wesentlich geringere Übergangswahrscheinlichkeit als die Grundschwingungen, dadurch sind die Absorptionskoeffizienten um den Faktor 10 – 1000 geringer als bei den Grundschwingungen [24]. Gleichzeitig liegen ihre Frequenzen unterhalb der ganzzahligen Vielfachen der Frequenzen ihrer Grundschwingungen [25]. Zusätzlich zu den Grund- und Obertönen treten auch Kombinationsschwingungen auf, deren Bandenintensität zu höheren Obertönen stark abnimmt. Sie entstehen, wenn die Energie eines Photons gleichzeitig verschiedene Schwingungen anregt, deren Energiesumme derjenigen des Photons entspricht. Im NIR werden in erster Linie Ober- und Kombinationsschwingungen detektiert, im MIR Grundschwingungen und im FIR Gerüstschwingungen.

NIR - Spektren sind durch breite, schlecht aufgelöste Banden und eine mit zunehmenden Wellenlängen ansteigenden Basislinie charakterisierbar. Im Vergleich zum MIR sind die Spektren bandenarm und eine Zuordnung einzelner Banden zu bestimmten Schwingungen ist kaum möglich, da diese durch Überlappung von Ober- und

Kombinationsschwingungen erzeugt werden [26]. Spektren können ohne vorherige Verdünnung der Probe aufgenommen werden, da die Intensität der Absorption im Vergleich zu den entsprechenden Grundschwingungen um den Faktor 10 – 1000 geringer ist. Oberschwingungen höherer Ordnung als drei sind aufgrund ihrer schwachen Intensitäten nicht mehr detektierbar. Hauptsächlich sind die zweite und dritte Oberschwingung der Valenzschwingungen von leichten Atomen mit starken chemischen Bindungen wie wasserstoffhaltigen Molekülen zu beobachten (C-H, O-H, N-H oder S-H). Für analytische Zwecke wird üblicherweise der Bereich von 1100 – 2500 nm genutzt, in dem sowohl Oberschwingungen (1100 – 1900 nm) als auch Kombinationsschwingungen (1900 – 2500 nm) detektierbar sind.

Spektren im Nahen Infrarot werden gewöhnlich in scheinbarer Absorption log 1/R aufgetragen, da zwischen den Konzentrationen und der scheinbaren Absorption im Nahen Infrarot ein nahezu linearer Zusammenhang besteht [14]. Diese gebräuchliche Transformation wird ebenfalls im Europäischen Arzneibuch empfohlen [27]. Durch diese Transformation wird die Beziehung zwischen Konzentration und Absorption des Analyten besser für eine lineare Funktion angenähert als bei Verwendung der im Mittelinfrarot gebräuchlichen Kubelka-Munk Funktion für Reflexionsmessungen. Grundsätzlich sind im Nahen Infrarot einige Bedingungen für die Gültigkeit dieser Funktion nicht erfüllt, so z. B. die Forderung nach einer nichtabsorbierenden Matrix und einer annähernd unendlich dünnen Schichtdicke der Probe. Dies wurde im Experiment durch Olinger und Griffiths belegt [28]. Physikalische Faktoren wie die Korngröße bleiben durch die Transformation in log 1/R Einheiten im Aussehen der Spektren erhalten [29].

Zusammenfassend sind für die Interpretation von NIR Spektren folgende Punkte von Bedeutung:

- Praktisch alle organischen Verbindungen absorbieren im Nahen Infrarot und ermöglichen den universellen Einsatz dieser Methode .
- Zur Messung der Proben ist eine Vorbereitung in Form von Verdünnung oder ähnlichen Schritten nicht nötig.
- Trotz der mangelnden Beziehung zwischen Strukturelementen und einzelner Banden ist das NIR Spektrum in seiner Gesamtheit für jede Verbindung charakteristisch.
- Wasserstoffbrücken haben einen Effekt auf die Lage der Banden des NIR Spektrums, weshalb bei der Messung auf Konstante klimatische Bedingungen geachtet werden muss [30].
- Das Spektrum einer festen Probe, die in diffuser Reflexion gemessen wird, wird stets durch Effekte von Streuung, gerichteter Reflexion, Brechungsindex, Oberflächenglanz und Polarisation überlagert sein [30].
- Neben den strukturcharakteristischen Merkmalen enthalten NIR Spektren immer auch Informationen über Bindungsstärke, Elektronegativität und Wasserstoffbrücken der Proben [30].

Die angeführten Unterschiede zwischen den Spektren im Mittelinfrarot und denen des Nahinfrarot machen deutlich, dass eine Interpretation und Auswertung der NIR Spektren, sowohl qualitativ als auch quantitativ, neue Ansätze benötigt. Die Auswertung der chemischen und physikalischen Eigenschaften einer Probe erfordern den Einsatz chemometrischer (multivariater) Methoden.

3.1.2 Messmethodik

Bei der in der NIRS verwendeten äußeren Reflexionsmessung ist grundsätzlich zwischen gerichteter und diffuser Reflexion zu

unterscheiden. Sie zeichnet sich durch das Einstrahlen des Lichts von einem optisch dünneren in ein optisch dichteres Medium aus. Bei der gerichteten oder regulären Reflexion verhält sich die Oberfläche spiegelnd (polierte Oberfläche), es gelten geometrische Reflexionsgesetzte. Sie enthält keine spektrale Information.

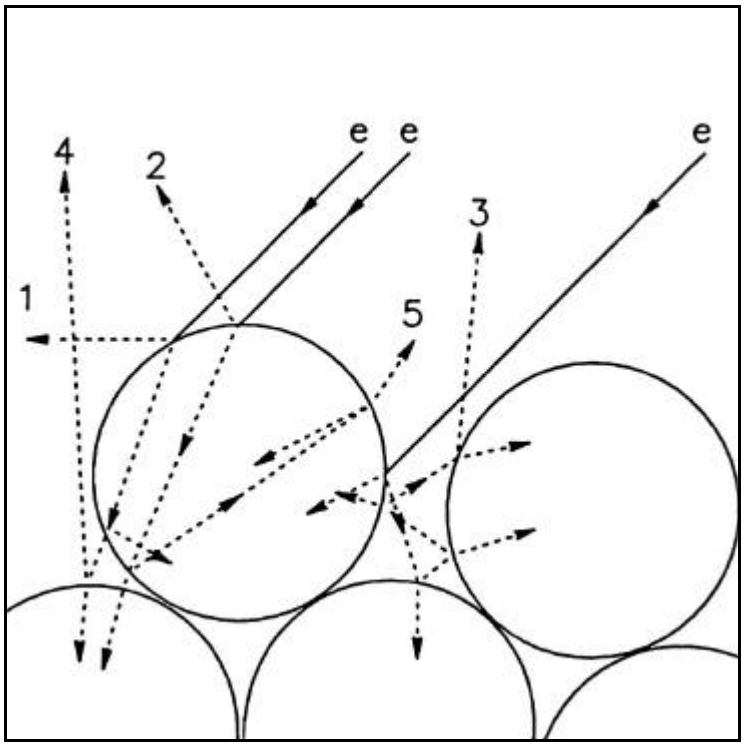


Abb. 3-1: Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Teilchen einer Probe; einfallende Strahlen (e); Strahlen 1-3 entsprechen gerichteter, die Strahlen 4 und 5 diffuser Reflexion.

Liegt jedoch eine streuende (matte) Oberfläche vor, wie bei pulverförmigen Proben, kommt es zu einer gleichmäßigen, in alle Richtungen des Halbraums ausgedehnten Reflexion (Abb. 3-1). Diese idealen Grenzfälle werden unter realen Bedingungen nicht erreicht. Problematisch für die quantitative Auswertung des reflektierten Lichtes sind die immer wechselnden Anteile beider Reflexionsarten. Erst durch die Einhaltung definierter Rahmenbedingungen, die diese Anteile konstant halten, wird die Reflexionsspektroskopie auswertbar. Ist das

Ausmaß der direkten oder auch Fresnel Reflexion minimal, gilt die von Kubelka und Munk [2, 6] aufgestellte Theorie. Sie zählt zu den sogenannten Zwei-Konstanten Theorien und ist deren allgemeinste (3-2).

$$f(R_\infty) = \frac{(1-R_\infty)^2}{2 \cdot R_\infty} = \frac{k}{s} \qquad (3\text{-}2)$$

R_∞ = diffuses Reflexionsvermögen einer Probe unendlicher Schichtdicke (absolutes Reflexionsvermögen)

k = Absorptionskonstante (cm^{-1})

s = Streuungskonstante (cm^{-1})

Somit ist das diffuse Reflexionsvermögen nur von dem Quotienten, nicht jedoch von den Absolutwerten der beiden Konstanten abhängig. Da beide Konstanten jedoch auf unterschiedliche Weise von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts abhängen, gilt diese Beziehung strenggenommen nur für monochromatisches Licht. Die Streuungskonstante wird jedoch unabhängig von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes, wenn die Partikel sehr groß gegenüber der Wellenlänge sind [31]. Im Nahen Infrarot ist dies etwa ab einer Partikelgröße von 100 bis 150 µm der Fall. Für Substanzen mit niedrigen k-Werten, also schwach absorbierende Substanzen, kann bei sehr hohen Schichtdicken und statistischer Verteilung der Partikel eine lineare Beziehung zwischen $f(R_\infty)$ und k erhalten werden. Dies ist im Nahen Infrarot ausreichend gewährleistet und somit verhält sich die Kubelka–Munk Funktion entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz (3-3).

$$f(R_\infty) = \frac{(1-R_\infty)^2}{2 \cdot R_\infty} = \frac{2{,}303 \cdot e}{s} \cdot c \qquad (3\text{-}3)$$

c = molare Konzentration (mol/L)

ε = molarer Absorptionskoeffizient (L/mol· cm)

Anstelle des absoluten Reflexionsvermögens wird in der Praxis das relative Reflexionsvermögen R'_∞ gegen einen Standard vermessen und als der Quotient von diffusem Reflexionsvermögen der Probe durch das des Standards angegeben. Neben Teflon-Scheiben mit eingebetteten anorganischen Pigmenten wie MgO oder $BaSO_4$ hat sich auch Keramik als geeignete Referenz erwiesen [32]. Kleine Verunreinigungen des Standards können zu negativen k-Werten bei der Anwendung der Kubelka-Munk Funktion führen, weshalb sich unter Verzicht der streng linearen Abhängigkeit zwischen Konzentration des Analyten und Absorption die scheinbare Absorption log $1/R'_\infty$ in der Praxis durchgesetzt hat. Liegen höhere Anforderungen an die Messgenauigkeit vor oder interessiert ein größerer Konzentrationsbereich des Analyten, müssen die Rohspektren mit Hilfe von empirischen Gleichungen an die jeweiligen speziellen Bedingungen angepasst werden. Inzwischen gibt es eine Vielzahl dieser chemometrischen Methoden zur optimalen Auswertung von Remissionsspektren [19].

3.1.3Messsysteme

Die ersten auf dem Markt erhältlichen Systeme für NIR Messungen bestanden aus modifizierten UV-VIS Spektrometern. Durch geringe Veränderungen am Monochromator sowie durch den Einsatz eines Bleisulfid (PbS)-Detektors war eine Erweiterung des spektralen Bereichs relativ einfach möglich [13]. Doch aufgrund ihres hohen Preises und der fehlenden Einsatzmöglichkeiten waren diese Geräte nicht weit verbreitet. Erst mit der Etablierung der Reflexionstechnik und dem damit verbundenem Anstieg des Interesses wurden eigens für die NIRS Instrumente hergestellt. Diese einfachen, aber robusten Geräte waren

zum Routineeinsatz in der Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie bestimmt. Aufgrund ihrer auf Interferenzfilter basierenden Monochromatoren waren sie sehr unflexibel und nur für ganz bestimmte Wellenlängenbereiche geeignet. Dies hat zur Entwicklung sogenannter scannender Systeme geführt. Hier kann man zwischen klassischen dispersiven Gitterspektrometern und Fourier-Transformation Instrumenten unterscheiden. Auf die für die Kopplung mit HPTLC entscheidenden Eigenschaften der Geräte mit Michelson-Interferometern wird in Kapitel 5.1 eingegangen. Neueste Entwicklungen sind AOTF (acousto-optic tunable filter) und DAD (diode-array detection) Geräte. Da beide Typen ohne mechanisch bewegte Teile arbeiten, erzielen sie hohe Messraten, wenn auch bei den DAD Geräten der Spektralbereich eingeschränkt ist [19].

3.1.4 Multivariate Datenanalyse

Der Begriff der Chemometrie (engl. chemometrics) wurde von Wold und Kowalski in den frühen 80er Jahren definiert. Der Begriff umschreibt allgemein computerunterstützte mathematische Verfahren, die zur Planung und Auswahl optimaler Messverfahren und Experimente sowie zur Gewinnung maximaler Information bei der Analyse von chemischen Daten verwendet werden [33]. Die Systematisierung von komplexen Merkmalsmustern, also von spektralen Daten, ist das Ziel chemometrischer Verfahren in der NIR Analytik. Hierbei kommen multivariate Verfahren zum Einsatz. Multivariat bedeutet hier, dass viele Absorptionswerte bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden und in die chemometrische Auswertung eingehen. Die verschiedenen zum Einsatz kommenden Algorithmen werden in den Kapiteln 4.3.3 und 5.3.1 bis 5.3.3 näher beschrieben.

3.2 Kopplungsmethoden

3.2.1 Allgemeines

Seit Hirschfeld 1980 den Begriff der Kopplungsmethoden als „Hyphenated Techniques“ [34] geprägt hatte, versteht man darunter generell die Kopplung einer chromatographischen Methode mit einer spektroskopischen. Motiviert ist die Entwicklung solcher Techniken durch die immer größer werdenden Ansprüche an analytische Verfahren, komplexe Proben schnell und sicher zu trennen, zu identifizieren und zu quantifizieren. Allein durch chromatographische Systeme kann dies bei unbekannten Proben ein unlösbares Problem darstellen, da ohne vorherige Informationen keine Zuordnung getrennter Substanzen erfolgen kann. Grundsätzlich sollten beide miteinander kombinierte Methoden orthogonal sein, das heißt unterschiedliche Informationen liefern, da ansonsten der Zugewinn an Information zu gering ist. Zusätzlich ist im Gegensatz zu einer Probenvorbereitung (z. B. Festphasenextraktion) das on-line Arbeiten für eine Kopplungsmethode ausschlaggebend.

Durch die Mehrdimensionalität der Daten gewinnt man bei gekoppelten Systemen mehr Information als durch die beiden einzelnen zusammen. Während die chromatographischen Systeme hervorragend geeignet sind, Substanzen zu trennen, zu isolieren und zu quantifizieren, liefert die Spektroskopie Aussagen zu Identität und Struktur der Komponenten. Dabei ist die Trennung der Substanzen und damit die Reinheit der einzelnen Peaks, die spektroskopisch vermessen werden, auch wieder entscheidend für eine schnelle Identifizierung und Strukturaufklärung, da störende Signale durch Verunreinigungen und Fremdsubstanzen wegfallen. Problematisch bei diesen Techniken ist jedoch immer das Interface, also die Art und Weise, wie das chromatographische und das spektroskopische System direkt verbunden werden können. Zwingende

Voraussetzungen des einen Systems wie das Fließmittel in der HPLC, stören entweder beim Probeneinlass oder führen zu Minderung der Spektrenqualität durch Geisterpeaks, erhöhtes Grundrauschen oder Verminderung der Empfindlichkeit. Mit zunehmender Entwicklung werden die Lösungen für diese Interface Module aber immer ausgereifter und führen so zu immer weniger Störungen. Tabelle 3-1 gibt eine Übersicht über die momentan gängigsten Kopplungsmethoden.

Tabelle 3-1: Gängige Kopplungsmethoden (nach [34]).

	GC	HPLC	SFC	HPTLC	CE
MS	♦♦♦	♦♦♦	♦	♦	♦♦
IR	♦♦♦	♦♦	♦	♦♦	♦
OE	♦♦	♦	♦		
AAS	♦	♦♦			
NMR		♦♦			♦
Fluoreszenz	♦♦	♦♦♦		♦♦♦	♦♦♦
UV-VIS	♦	♦♦♦		♦♦♦	♦♦♦

♦♦♦ kommerziell erhältlich und weitverbreitet

♦♦ kommerziell erhältlich, aber weniger weitverbreitet

♦ experimenteller Status, nicht kommerziell erhältlich

3.2.2 Die HPLC – MS Kopplung

Die meisten Detektoren für die Flüssigkeitschromatographie sind entweder spezifisch und unempfindlich wie der DAD-Detektor oder empfindlich aber unspezifisch wie der Brechungsindex-Detektor. Erst die erfolgreiche Kopplung der HPLC mit der MS hat diese Anforderungen an einen Detektor in zufriedenstellender Weise erfüllt. Der Durchbruch war hier die Etablierung der Sprühverfahren (ESI, APCI), die durch ihre

Probenvernebelungstechnik das Fließ- bzw. Lösungsmittel vom Problemfaktor zum Ionisierungsmedium und -träger gemacht haben. Trotzdem stellt die Verbindung der hohen Flussrate eines HPLC Systems und des Hochvakuums des Massenspektrometers die größte Schwierigkeit dar. Verschiedene Ansätze, diese Problematik zu umgehen, sind:

- Verstärkung der Pumpenleistung des Hochvakuums,
- Verdampfung des Fließmittels vor dem Übergang ins MS,
- Splitten des Flusses auf Kosten der Empfindlichkeit,
- Gebrauch von Micro-HPLC Säulen mit niederer Flussrate.

Kommerziell erhältliche LC-MS Systeme bestehen aus einer oder der Kombination dieser Strategien. Der Erfolg wird deutlich an der heutigen Verbreitung dieser Kopplungsmethode, die in fast jedem analytisch arbeitenden Labor routinemäßig zum Einsatz kommt.
Neben APCI Techniken ist die Elektrospray-Ionisation wohl die am häufigsten verwendete Methode zur Kopplung von HPLC und MS, da auch sehr große (Bio-)Moleküle bis zu 100 000 Da wie Proteine vermessen werden können. Zusätzlich lässt sich diese Methode leicht mit pneumatischer Vernebelungstechnik kombinieren und erlaubt somit den Einsatz herkömmlicher Trennungsverfahren. Durch Erweiterung des Quadrupol-Detektors zu mehren hintereinander geschalteter Systeme sind on-line Messungen von Tochterionenspektren leicht möglich und verfeinern so nicht nur die Identifizierung sondern auch die Trennung durch Selektion bestimmter Massen. Das Interface (Abb. 3-2) besteht aus einer Nadel, an deren Spitze durch Anlegen einer hohen Spannung ein feines Spray mit geladenen Tröpfchen austritt. Beschleunigt durch das elektrische Feld bewegen sich die Tröpfchen durch eine Schicht von

Vorhanggas. Dadurch wird zum einen die Flüssigkeit verdampft, zum anderen werden ungeladene Partikel daran gehindert, in den Detektor zu gelangen. Durch die ständig weitergehende Verdampfung des Fließmittels kommt es durch Coulombsche Abstoßungskräfte zu einer immer feineren Verteilung der Teilchen, bis nur noch geladene Moleküle übrig sind. Geleitet durch die Orifice-Spannung werden diese in das Hochvakuum des Detektors eingebracht und analysiert.

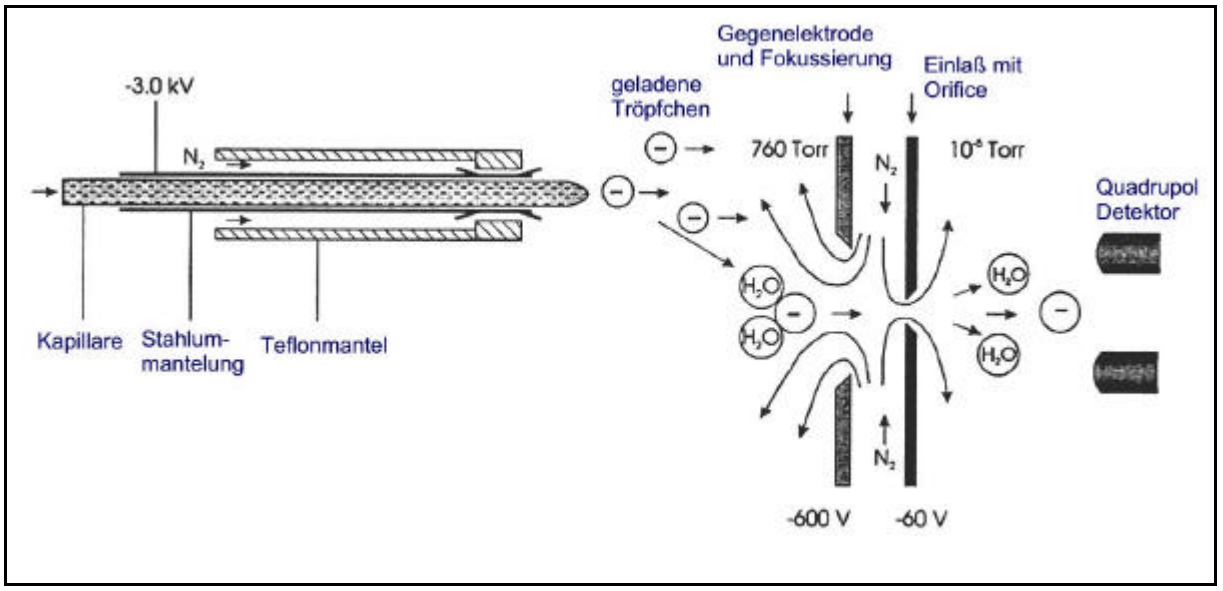


Abb. 3-2: Schema eines ESI-MS Interfaces.

3.2.3Kopplung in der instrumenteller HPTLC

Im Gegensatz zu den meisten chromatographischen Methoden erhält man in der HPTLC kein äußeres, sondern ein inneres Chromatogramm, was der Kopplung als on-line Methode im Prinzip widerspricht. Die entwickelte Platte muss bei allen Kopplungstechniken mit Spektroskopiearten erst von der mobilen Phase befreit werden, gegebenenfalls mit Nachweisreagenzien umgesetzt werden und kann erst dann detektiert werden. Während dies die echte on-line Kopplung im engeren Sinne der Definition unmöglich macht, erspart es auf der anderen Seite den Einsatz komplexer Interfaces. Während die mobile Phase also keine Rolle spielt, ist die stationäre Phase ausschlaggebend für jede Art der Detektion.

Die gängigste Kopplung ist im Grunde eine reine Weiterentwicklung der visuellen Auswertung. UV-VIS- und Fluoreszenz-Detektion in Form der sogenannten Densitometrie ermöglichen die schnelle Quantifizierung der getrennten Substanzen, in-situ Messungen ermöglichen die vorläufige Aussage über die Identität der Probe anhand ihres UV-Spektrums. Wie bei der HPLC liegt die Stärke dieser Methode in ihrer hervorragenden Empfindlichkeit und ihren universellen Einsatzmöglichkeiten, da die meisten zu detektierende Stoffe über chromophore Systeme verfügen. Ihre Schwäche zeigt sich hingegen in ihrer mangelnden Selektivität. Somit ist diese Methode als z. B. routinemäßige Qualitätskontrolle für die Industrie gut geeignet, da sie schnell, einfach und im Vergleich zur HPLC deutlich wirtschaftlicher ist. Als Weiterentwicklung hat sich in den letzten Jahren die Videodensitometrie etabliert, die eine sehr schnelle Aufnahmetechnik mit hervorragender, GMP gerechter Dokumentation verbindet und dementsprechend einen wichtigen Platz in der modernen Qualitätskontrolle gefunden hat [35].

Die Kopplung der HPTLC mit selektiveren spektroskopischen Techniken wie MS, NMR und IR sind hingegen deutlich schwieriger, da die Matrixeinflüsse der stationären Phase zum Teil unüberwindbare Probleme bereiten. Dazu kommt, dass der Versuch, ein kommerzielles Gerät zu entwickeln, das eine der ökonomischsten chromatographischen Methoden mit den gerätetechnisch teuersten spektroskopischen zu verbinden sucht, auch einen Markt finden muss. Während jedoch von erfolgreichen Kopplungen mit NMR wenig Berichte vorliegen [36], gibt es vielversprechende Ansätze, die HPTLC mit MS und IR zu verbinden [37-40]. Nimmt man die hier unvermeidlichen Störungen durch die Matrix in Kauf und reduziert sie weitgehend, kann man auf einfachem Wege zu einer sehr schnellen und dabei erstaunlich unkomplizierten Analytik gelangen.

4 NIRS Analytik von Johanniskrautextrakten

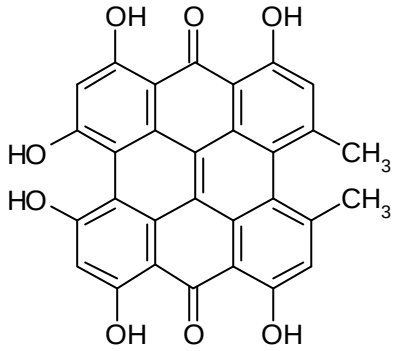
4.1 Vorbemerkungen

4.1.1Inhaltsstoffe

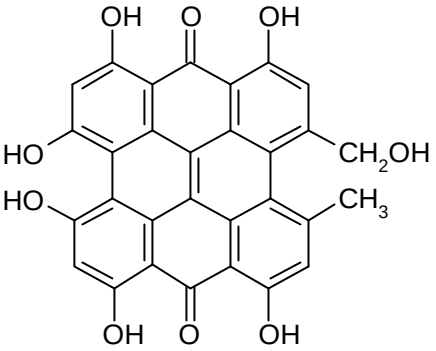
Hypericum perforatum, Johanniskraut, findet in therapeutischer Anwendung von depressiven Zuständen zunehmend Akzeptanz und ist eine der umsatzstärksten Arzneipflanzen auf dem deutschen Arzneimittelmarkt [41]. Weit über hundert zugelassene Präparate erzielen einen Gesamtumsatz in neunstelliger Höhe (DM). Damit liegt Johanniskraut in der Hitliste der umsatzstärksten Arzneipflanzen zur Zeit auf Platz zwei in der Bundesrepublik. Seine Inhaltsstoffe wurden daher in den vergangenen Jahren intensiv analysiert. Charakteristische Inhaltsstoffe sind Verbindungen mit Naphtodianthronstruktur, zu denen Hypericin und Pseudohypericin als Hauptvertreter gehören. Weiterhin wurden Flavonoide mit den Hauptkomponenten Hyperosid, Rutosid und Quercitrin, sowie eine Gruppe von Xanthonderivaten isoliert und strukturell bestimmt. Das Inhaltsstoffspektrum des Johanniskrauts umfasst außerdem die Phloroglucinverbindungen Hyperforin und Adhyperforin (s. Abb. 4-1).

4.1.2Wirkung

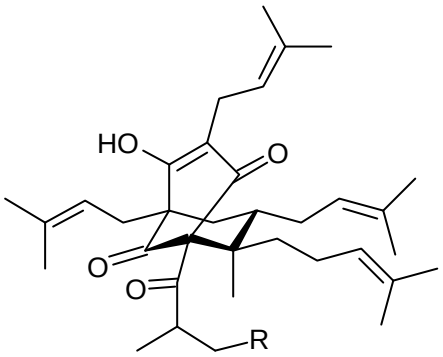
Das Johanniskraut nimmt heutzutage in der Therapie leichter bis mittelschwerer endogener Depressionen eine festen Platz ein. Weitere Anwendungsgebiete findet es bei reaktiven Depressionen, Angstzuständen, Erschöpfungsdepressionen, Depressionszuständen im Klimakterium, sowie zur Behandlung psychovegetativer Begleiterscheinungen der Depression [42].



Hypericin

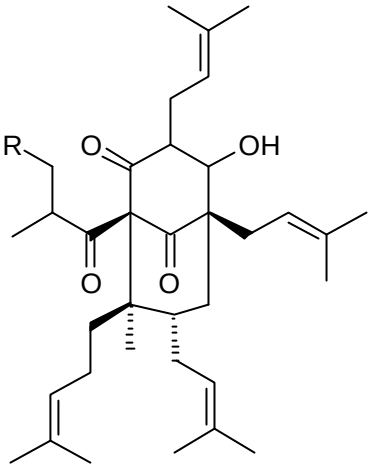


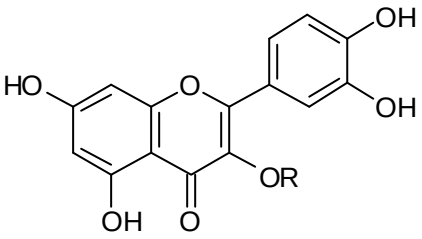
Pseudohypericin



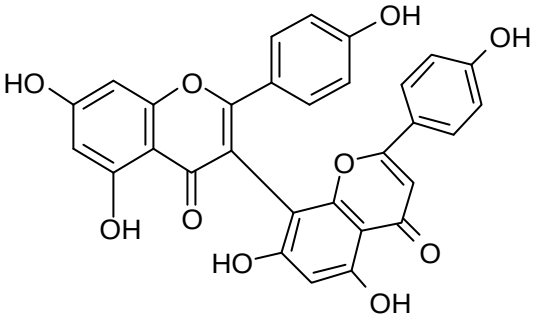
Hyperforin R = H
Adhyperforin R = CH_3

≡

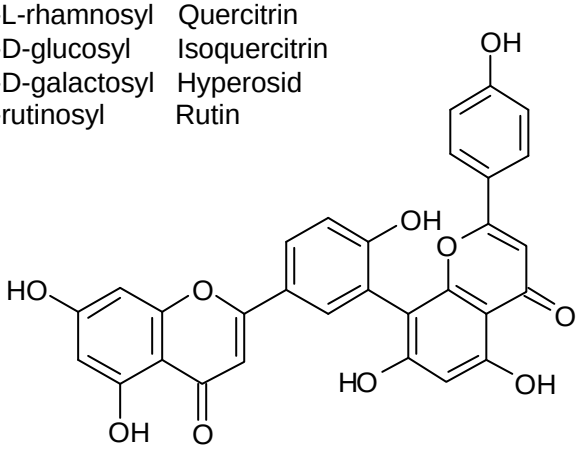




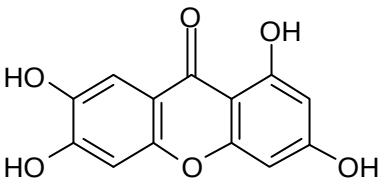
R = H	Quercetin
R = -α-L-rhamnosyl	Quercitrin
R = -β-D-glucosyl	Isoquercitrin
R = -β-D-galactosyl	Hyperosid
R = -β-rutinosyl	Rutin



I3,II8-Biapigenin



Amentoflavon = I3',II8 Biapigenin



1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon

Abb. 4-1: Wichtige Inhaltsstoffe von Johanniskraut (Hypericum perf.).

Weiterhin wird Johanniskrautöl (Oleum Hyperici) traditionell in der Therapie entzündlicher Hauterkrankungen eingesetzt. Obwohl sehr viele Arbeiten zur Isolierung und Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe vorliegen [43-45], konnte eine direkte Zuordnung des Wirkprinzips zu bestimmten Inhaltsstoffen bisher nicht erfolgen, da Johanniskrautextrakte wenigstens 10 Stoffe oder Stoffgruppen enthalten, die zu den arzneilichen Wirkungen beitragen. Studien zeigen, dass der Einsatz von Johanniskraut als Extrakt ein wirkungsvoller und konzentrationsabhängiger Serotonin (5-HT)-, Noradrenalin (NA)- und Dopamin (DA)- Wiederaufnahmehemmer ist, dessen Wirkung sich mit konventionellen Antidepressiva vergleichen lässt. Zudem ist Johanniskrautextrakt das bisher einzige bekannte pharmakologisch aktive Wirkprinzip, das an allen drei Transportern eine ähnlich starke Wirkung aufweist [46, 47]. Gleichzeitig wird belegt, dass nicht Hypericin sondern Hyperforin der aktive Inhaltsstoff ist, der für die synaptische Wiederaufnahmehemmung verantwortlich ist. Die ursprüngliche Annahme, dass das Wirkprinzip auf der Hemmung der Monoaminooxidase A (MAO-A) durch Hypericin beruht [48], gilt inzwischen als überholt. Hypericin wird inzwischen jedoch als potentieller Inhibitor von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB diskutiert [49], die wichtige Mediatoren der Immunantwort und des Entzündungsgeschehens sind. Weiterhin wird Hypericin eine anti-virale Wirkung zugeschrieben, die im Zusammenhang mit seiner Proteinkinasen hemmenden Wirkung diskutiert wird [43].

Die Wirksamkeit und gute Verträglichkeit von Johanniskraut wurde auch in mehreren klinischen Studien belegt [50], wobei diese von zum Teil unterschiedlichen Extrakten ausgingen. Trotz einiger Schwächen in den Studiendesigns wird das Potential von Johanniskraut als sehr wirksames

und dabei erstaunlich nebenwirkungsfreies Antidepressivum sehr deutlich.

4.1.3Standardisierung von pflanzlichen Zubereitungen

Pflanzen waren und sind der Ursprung einer Vielzahl von medizinischen Produkten. Schon seit Jahrhunderten werden von Pflanzen bzw. von Pflanzenteilen abstammende Materialen, typischerweise als Pulver oder als Extrakt, zur Heilung vieler Krankheiten eingesetzt. Diese Pulver und Extrakte sind in den meisten Fällen komplexe Mischungen von sowohl biologisch aktiven, als auch biologisch inaktiven Inhaltsstoffen.

Mit der Verwendung dieser Pulver und Extrakte als Arzneimittel sind allerdings Probleme verbunden. So ist der Einsatz von biologischem Material in kontrollierter und vorhersagbarer Weise aufgrund der chemischen Vielfalt der zahlreichen Inhaltsstoffe sehr schwierig. Mögliche Variationen der chemischen Zusammensetzung von mehreren Chargen aus verschiedenen Ernten bzw. Sammlungen machen den Einsatz für klinische Zwecke unmöglich. Andererseits stellt gerade diese komplexe Zusammensetzung von aktiven Stoffen, wie sie typischerweise in einem bestimmten Pflanzenextrakt enthalten ist, das Potential für synergistische oder additive Effekte im Wirkprofil dar. Diese Problematik bewirkte zahlreiche Bemühungen, möglichst viele der wirksamen Inhaltsstoffe zu isolieren und zu reinigen. Diese können, nach Bestätigung der Wirkung im klinischen Test, direkt als Phytopharmakon auf den Markt gebracht werden, oder aber zur Normierung des entsprechenden Extraktes herangezogen werden.

In Deutschland verstehen wir unter dem Begriff Normieren das Einstellen auf einen festgelegten Normwert, bezogen auf eine Substanz bzw. Substanzgruppe, die als wirksamkeitsbestimmend gilt [51]. Dieses Verfahren soll über alle Ernte- und Herstelljahre hinweg einen bestimmten Gehalt an wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen

garantieren. Als wirksamkeitsbestimmend gelten nur solche Inhaltsstoffe, die im isolierten Zustand den gleichen oder einen ähnlichen therapeutischen Erfolg ergeben wie der Gesamtextrakt. Dieses ist allerdings nur selten der Fall, in den meisten Fällen muss der Gesamtextrakt als Wirkstoff gelten. Obwohl das Isolieren von Reinstoffen aus Pflanzenmaterial von größter Bedeutung für die Arzneimittelforschung und -entwicklung ist, werden zusätzlich Methoden benötigt, die komplexes Pflanzenmaterial zuverlässig charakterisieren und standardisieren. Je weniger über die Wirkung der einzelnen Inhaltsstoffe bekannt ist, um so mehr müssen quantitative Bestimmungen durch qualitative Prüfungen wie Fingerprintchromatogramme ersetzt werden.

Die pharmazeutische Qualität von Hypericum Extrakten muss qualitativ und quantitativ eine konstante Zusammensetzung der wichtigen Inhaltsstoffe aufweisen. Zur Zeit werden fast alle Präparate am Gehalt an Hypericinen standardisiert, obwohl der Anteil dieser Substanzen an der therapeutischen Wirksamkeit fraglich sind. Dies hatte zur Folge, dass das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) im September 1995 mit dem – inzwischen teilweise widerrufenen – so genannten Bühler Papier für die Nachzulassung von Hypericum Präparaten verlangte, dass bei der Standardisierung des Extraktes dessen zusätzliche Normierung auf einen Inhaltstoff zu unterlassen sei.

Neuere Untersuchungen erhärten die Vermutung, dass Hyperforin und sein Begleitstoff Adhyperforin maßgeblich an der antidepressiven Wirkung beteiligt sind [52]. Diese sind jedoch stark oxidationsempfindlich und verlangen spezielle Aufwendungen für eine reproduzierbare Analytik [53]. Bereits während Trocknung, Lagerung und Extraktion des pflanzlichen Materials werden diese Verbindungen abgebaut. Da sie in Standardisierungen nicht berücksichtigt wurden, ist davon auszugehen,

dass in den bisher klinisch geprüften Extrakten jeweils sehr unterschiedliche Mengen an Hyperforin und Adhyperforin enthalten waren oder sind. Die Qualitätskontrolle von Johanniskrautzubereitungen muss daher eine robuste Methode für die Analyse des Gesamtextraktes beinhalten.

4.1.4Extraktion

Die Forderung nach Phytopharmaka mit zwingend reproduzierbaren Qualitätsprofilen der europäischen Arzneimittelprüfrichtlinien ist Voraussetzung für den gleichmäßigen therapeutischen Erfolg [51]. Dies kann nur durch das für das jeweilige Produkt geeignete Herstellungsverfahren erreicht werden. Mit dem vereinfachten Schema (Abb. 4-2) wird die Herstellung von Trocken- und Flüssigextrakten und Tinkturen und deren galenische Verarbeitung zu den entsprechenden Darreichungsformen (Tabletten, Dragees, Kapseln etc.) dargestellt. Das theoretische Qualitätsprofil einer jeden Darreichung ist in den Unterlagen für die Zulassung beim BfArM niedergelegt. Aus dieser dokumentierten pharmazeutischen Qualität ergibt sich quasi rückwirkend das Qualitätsprofil (Spezifikation) eines jeden Extraktes und seiner galenischen Weiterverarbeitung. Dieses Model bestimmt mittelbar auch die Art und Konzentration des Auszugsmittels, das Herstellungsverfahren und vor allem das Qualitätsprofil der Ausgangsstoffe, insbesondere natürlich der Droge.

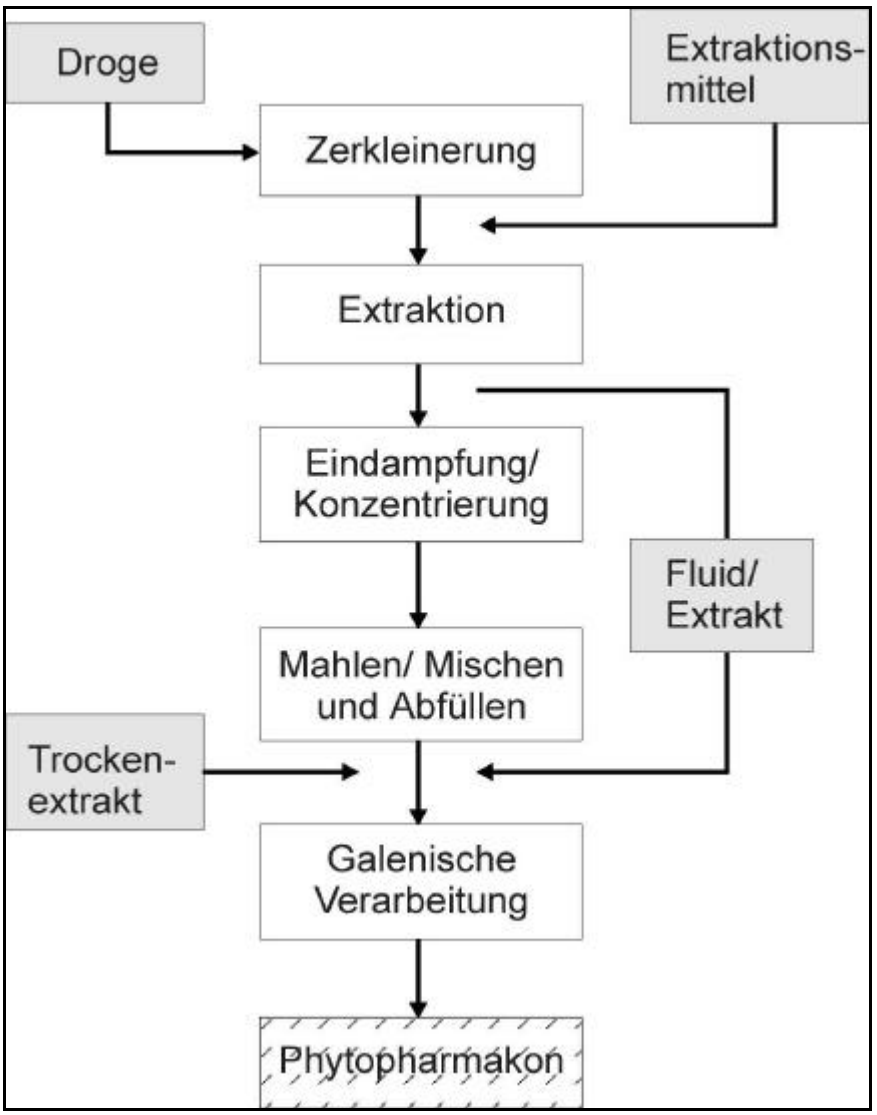


Abb. 4-2: Extraktionsverfahren bei pflanzlichen Arzneimitteln.

Die Vorgehensweise bei der Extraktion verdeutlicht die Vorteile einer möglichen In-Prozess Kontrolle des Extraktionsgeschehens, da die Qualität und Zusammensetzung des Produktes schon frühzeitig reguliert und korrigiert werden könnten. Als Alternative zu aufwendigen chemischen Methoden bietet sich hier die Nahinfrarot Spektroskopie an.

4.1.5Analytik

Nach DAC 1986 wird ein methanolischer Drogenauszug zur qualitativen Identitätsprüfung mittels Dünnschichtchromatographie untersucht [54]. Dort sind auch die weiteren nasschemischen Methoden für Reinheit und Gehalt beschrieben. Die dort beschriebene UV-spektroskopische Absorptionsmessung bei 590 nm zur Gehaltsbestimmung erfasst den Gehalt an Naphtodianthronen (Gesamthypericin), berechnet als Hypericin. Die Problematik dieser Bestimmung liegt an der lichtabhängigen Umwandlung von Protopseudohypericin und Protohypericin in Hypericin und Pseudohypericin. Wird nicht unter völligem Lichtausschluss gearbeitet, werden die gemessenen Werte für das Gesamthypericin immer deutlich höher liegen als die wahren Werte. Daher ist diese Methode nur eingeschränkt für eine sinnvolle Quantifizierung geeignet, denn sie erfasst unspezifisch alle hypericinartigen Verbindungen. Eine neuere Methode arbeitet mit einer HPLC-Methode, die den Gesamthypericingehalt nach Belichten erfasst, sodass alle Protoverbindungen in die Bestimmung mit eingehen [55]. Hier ist es für die Reproduzierbarkeit wiederum von großer Bedeutung, dass die Zeiten der Belichtung genau eingehalten werden.

Neben der Bestimmung des Gesamthypericins finden sich auch noch zahlreiche Veröffentlichungen, die eine Quantifizierung der restlichen Hauptbestandteile wie Rutin, Hyperosid, Quercitrin, Isoquercitrin, Quercetin, Biapigenin, Hyperforin und Adhyperforin beschreiben [44, 45, 56-58]. Insgesamt ist die umfassende Analytik von Hypericum Extrakten durch die mangelnde Stabilität einiger Inhaltsstoffe und durch ihr unterschiedliches Verhalten in chromatographischen Systemen grundsätzlich mit einigem Aufwand verbunden, will man eine korrekte und vollständige Analyse durchführen. Zudem erfüllen diese HPLC-Methoden zwar durchaus die nötigen Anforderungen an Richtigkeit,

Spezifität, Reproduzierbarkeit und Bestimmung der wichtigsten Komponenten, sind aber durch ihren hohen Zeitaufwand, anspruchsvolle technische Ausstattung, Bedarf an qualifiziertem Personal und den hohen Lösungsmittelverbrauch mit sehr hohen Kosten verbunden. Kurzum, sie sind für die heutigen Ansprüche an eine moderne Analytik wie hoher Probendurchsatz, reduzierte Probenkosten und minimale Analysenzeiten, sowie auch unter ökologischen Aspekten nicht zufriedenstellend und von geringer Perspektive.

4.2 HPLC als Referenzmethode der NIRS

4.2.1Auswahlkriterien

Obwohl die Nahinfrarot Reflektions-Spektroskopie (NIRS) schon erfolgreich zur Quantifizierung von Inhaltstoffen aus Pflanzenmaterial verschiedenster Herkunft eingesetzt worden ist [59-62], hat sie sich als Qualitätskontrollmethode für Pflanzenextrakte und Drogenauszüge in der pharmazeutischen Industrie noch nicht etabliert. Dies beruht vor allem auf der relativ hohen Nachweisgrenze (etwa 1% Gehalt) der NIRS, denn viele wichtige Komponenten in Pflanzenmaterial liegen in sehr geringen Mengen im Verhältnis zu den Begleitstoffen vor. Der erfolgreiche Einsatz von NIRS in der quantitativen Bestimmung von Inhaltsstoffen des Johanniskrautes würde eine einfach anzuwendende, proben-vorbereitungsfreie, nicht-destruktive, schnelle und in ihrer Richtigkeit mit traditionellen Methoden vergleichbare Analysentechnik bereitstellen. Da jedoch die Vorhersagegüte einer jeden NIRS und damit multivariaten Kalibration in hohem Maße von der Genauigkeit und Richtigkeit ihrer Referenzmethode abhängt, muss diese sorgfältig ausgewählt, überprüft und validiert werden.

Aufgrund ihrer sehr guten Leistungsdaten eignet sich die HPLC als Referenzmethode am besten, gleichzeitig konnte die Methodenentwicklung auch auf schon veröffentlichte Verfahren gestützt werden [44, 45, 56, 58]. Entsprechend dem Stand der Forschung wurde die Entwicklung und Validierung des Verfahrens auf die Empfehlungen der Guideline Q2B der Internationalen Konferenz zur Harmonisierung von technischen Voraussetzungen zur Zulassung von Arzneimitteln für den menschlichen Gebrauch (ICH) gestützt [63].

4.2.2Standardsubstanzen

Die Auswahl der Standardsubstanzen Hyperforin und Biapigenin erfolgte nach mehreren Gesichtspunkten: ihrer pharmakologischen Bedeutung, ihrer unterschiedlichen Stabilität und ihrer durchschnittlichen Konzentration in typischen Pflanzenextrakten. Da die Beteiligung des Hyperforins an der antidepressiven Wirkung inzwischen als belegt gelten kann, ist es als Qualitätsmarker für Johanniskrautextakte von größter Bedeutung und sollte bei der Standardisierung eine herausragende Rolle spielen [64]. Weiterhin liegt es in Konzentrationen um 3% in Trockenextrakten vor, sodass eine NIRS Bestimmung mit guten statistischen Eckdaten zu erwarten ist. Die Bedeutung von Biapigenin für die Wirkung von Hypericum Auszügen ist erst seit kurzer Zeit im Gespräch [65], jedoch bot sich die Substanz für das Projekt aufgrund seiner sehr niedrigen durchschnittlichen Konzentrationen (0,2-0,6%) an. Durch den Einsatz von Biapigenin konnte die Leistungsfähigkeit des NIRS Modells an seinen Nachweisgrenzen getestet werden. Gleichzeitig jedoch verfügt Biapigenin über eine im Vergleich zu Hypericin sehr hohe Stabilität und über ein sehr großes Chromophor, sodass trotz der geringen Menge die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der HPLC Bestimmung den hohen Anforderungen gerecht wurde.

4.2.3Ergebnisse

Der Einsatz eines steilen Gradienten, der schnell auf einen hohen Methanolanteil gebracht wurde, verkürzte den Lauf im Vergleich zu den Literaturmethoden um 45 Min. (s. Abb. 4-3). Zwar werden dadurch die anfänglichen Peaks einiger Flavonoide koeluiert, Biapigenin und Hyperforin sind aber als deutlich basisliniengetrennte Einzelpeaks nachzuweisen. Das Chromatogramm verdeutlicht auch den Einfluss des chromophoren Systems des Biapigenins auf die Detektion. Trotz circa zehnfach geringerer Konzentration erscheinen die Peakflächen beider Substanzen in ähnlichen Dimensionen. Vor allem im Vergleich zu dem bei etwa 30 Min. eluierendem Hypericin, das mit Biapigenin in gleicher Konzentration vorliegt, wird dieser Effekt sehr deutlich.

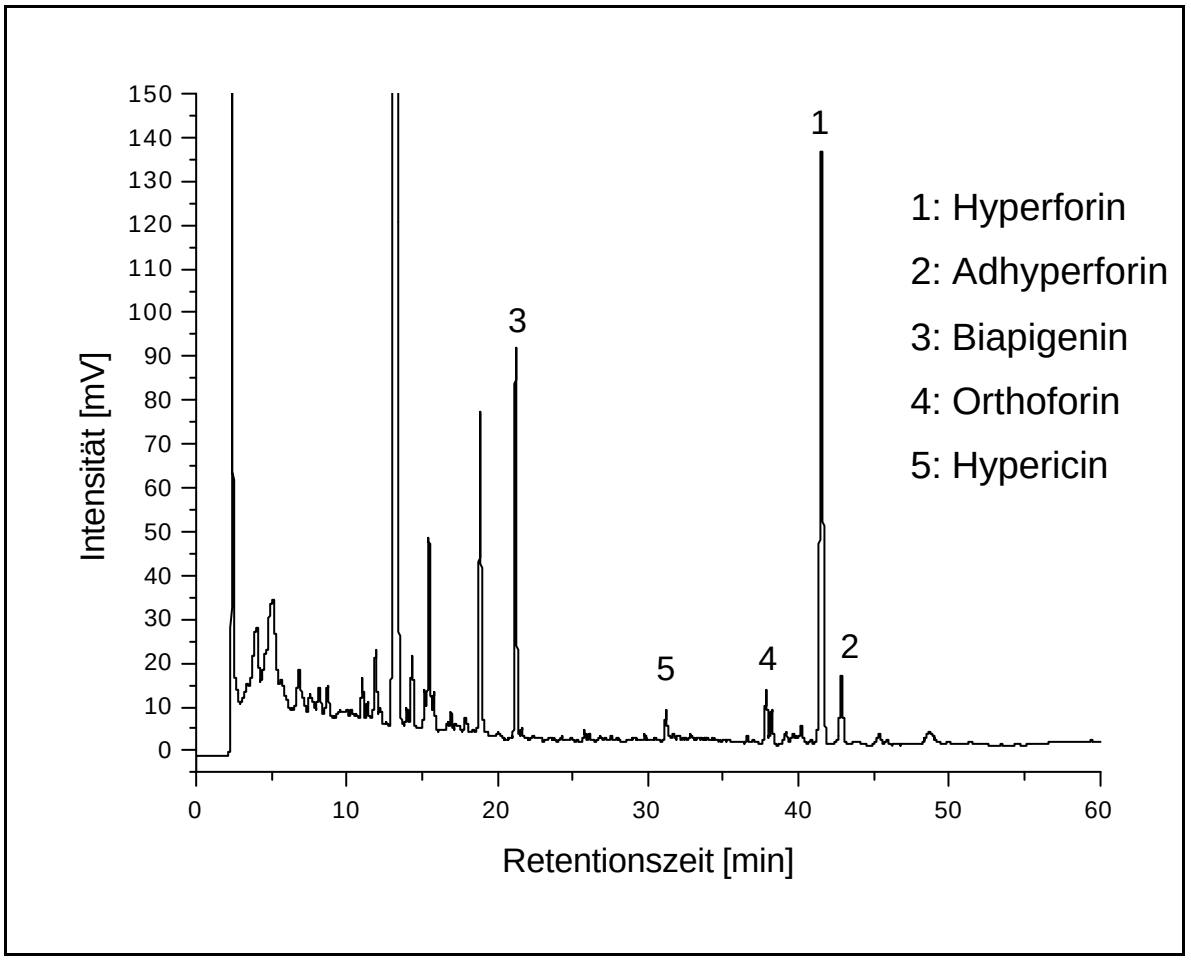


Abb. 4-3: HPLC Chromatogramm eines Johanniskrautextraktes.

Dies wird ebenfalls in den vergleichbar guten statistischen Werten beider Kalibrationen wiedergespiegelt. In Übereinstimmung mit den ICH Guidelines (s. 4.2.1) wurde die Spezifität der Methode durch Identitäts-Bestimmungen der Peaks mit Hilfe von LC-ESI-MS (Liquid Chromatography - Electro Spray Ionization - Mass Spectrometry) Messungen durchgeführt. Die Peakreinheit wurde durch wiederholte Aufnahmen von UV-DAD Spektren der Läufe gesichert. Die so erhaltenen Kopplungs-Spektren wurden anschließend mit den Orginalspektren der Standard-Substanzen verglichen. Die Richtigkeit der Gehaltsbestimmungsmethode wurde durch den Vergleich der erzielten Konzentrationswerte mit denen einer Referenzmethode des Herstellers Finzelberg belegt. Keine nennenswerten Unterschiede der Hyperforingehalte waren festzustellen. Präzision, Richtigkeit, Linearität und andere statistische Eckdaten wurden entsprechend gängiger Methoden geprüft und befanden sich alle im Normbereich der statistischen Tests (s. 6.2.3.3).

4.3 Multivariate Analyse

4.3.1Datenvorbehandlung

Bei der Aufnahme von Nahinfrarot Spektren erhält man zuerst Rohspektren (s. Abb. 4-4)von – vor allem im Vergleich zu Mittelinfrarot Daten – geringem Informationsgehalt. Um sinnvolle Ergebnisse zu erzielen, muss deshalb eine der Problemstellung angepasste Datenvorbehandlung stattfinden.

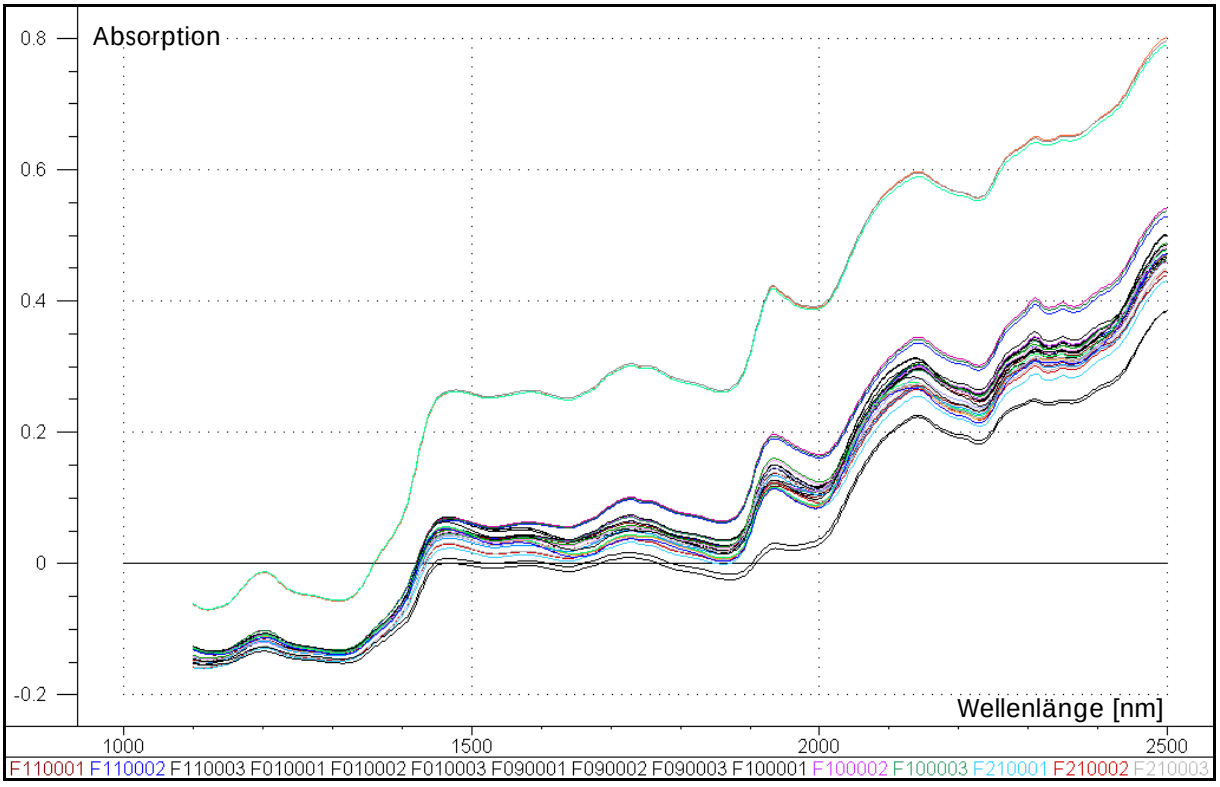


Abb. 4-4: Rohspektren einiger Trockenextrakte.

Physikalische Phänomene wie Kristallstruktur, Korngrößen-Verteilung, Wassergehalt und Packungsdichte in den Johannistrockenkrautextrakten führen zu Lichtstreuungseffekten, die die Reproduzierbarkeit der Messungen negativ beeinflussen. Mehrfachstreuungskorrektur (MSC: Multiplicative Scatter Correction) ist ein geeigneter Algorithmus zum Ausgleich dieses Effektes. Durch Mitteln und Justieren der Spektren auf

der Basis von Wellenlängen, die keine spezifischen spektralen Informationen über die Struktur beinhalten, ermöglicht dieser Rechenschritt den Ausgleich von Streueffekten, ohne die Möglichkeiten der Quantifizierung einzuschränken [66] (Abb. 4-5). Dabei wird bei dieser Methode ein Master-Spektrum generiert, gegen das alle anderen abgeglichen werden, auch die Spektren von zukünftigen zu bestimmenden Proben.

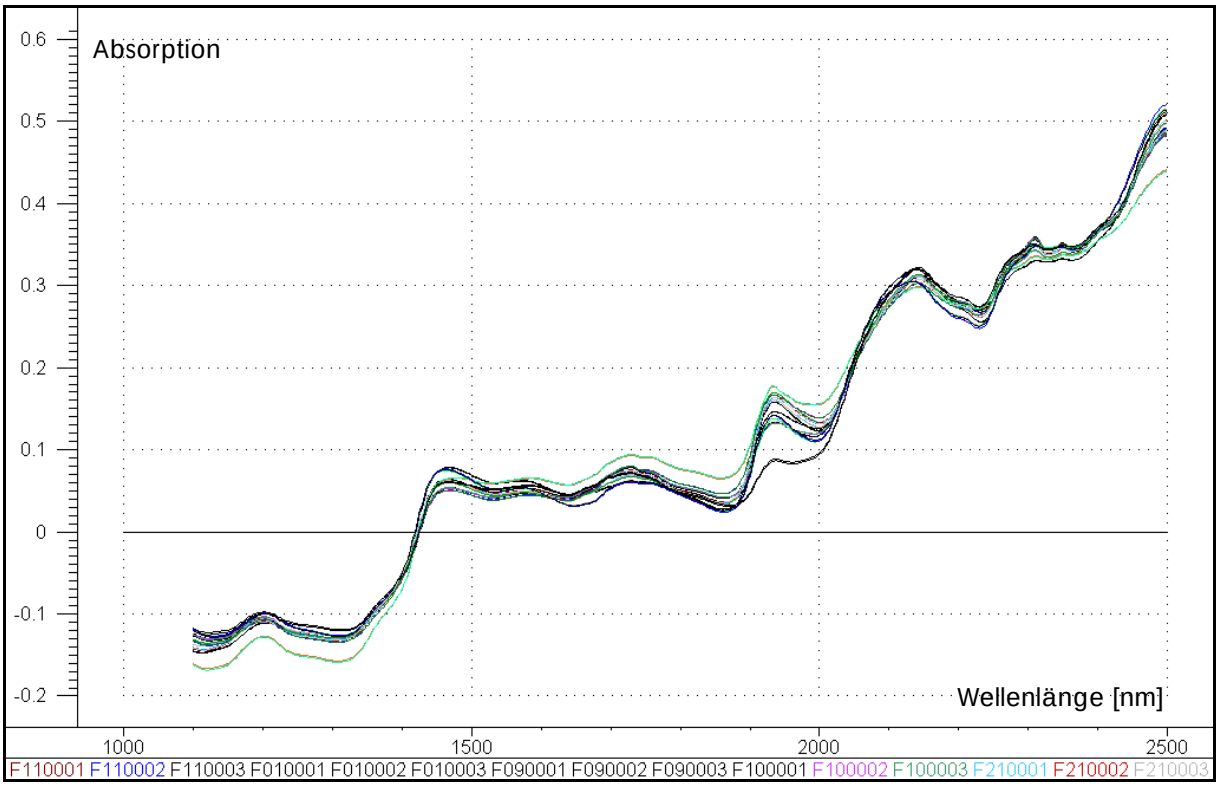


Abb. 4-5: Rohspektren aus Abb. 4-4 nach MSC.

4.3.2Derivativspektroskopie

Durch das Errechnen der zweiten Ableitung der Spektren wurde deren Krümmung beschrieben. Aufgrund des box-car Charakters der angewandten Savitzky - Golay Funktion [67] wird automatisch eine Glättung vorgenommen, die sich in diesem Falle auf jeweils 4 Punkte vor und nach dem Segment belief. Durch diese Normierung der Spektren auf

ihre Extremwerte und Vernachlässigung von Randeffekten an den einzelne Banden wurden die Einflüsse durch Streulichteffekte weiter minimiert und die spektrale Auflösung verbessert [68]. Jedoch muss man bei dieser Datennormierung eine Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses um den Faktor 4 in Kauf nehmen (Abb. 4-6).

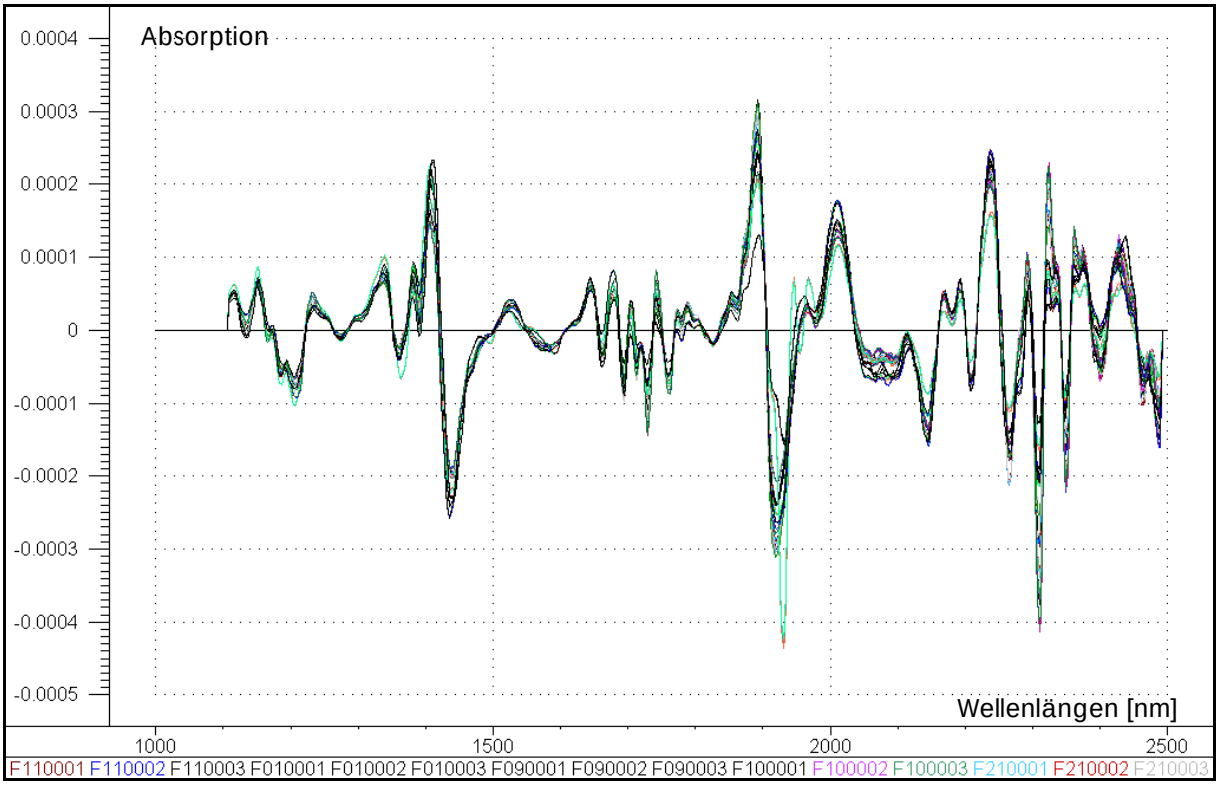


Abb. 4-6: Derivativspektren zweiter Ableitung der Daten aus 4-5.

Das Auftragen der Regressionskoeffizienten gegen die x-Variabeln durch das Programm „The Unscrambler™“ während der Entwicklung des multivariaten Modells visualisiert die Wellenlängen, die einen großen Einfluss auf die Modellrechnung haben. Durch die Auswahl dieser Wellenlängen und den Ausschluss von Wellenlängen mit geringem informativen Wert wird der Einfluss von Faktoren, die nur aufgrund des Rauschens in die Berechnungen eingehen, weitgehend minimiert. Dadurch kann der erwähnte Effekt der Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses ausgeglichen werden.

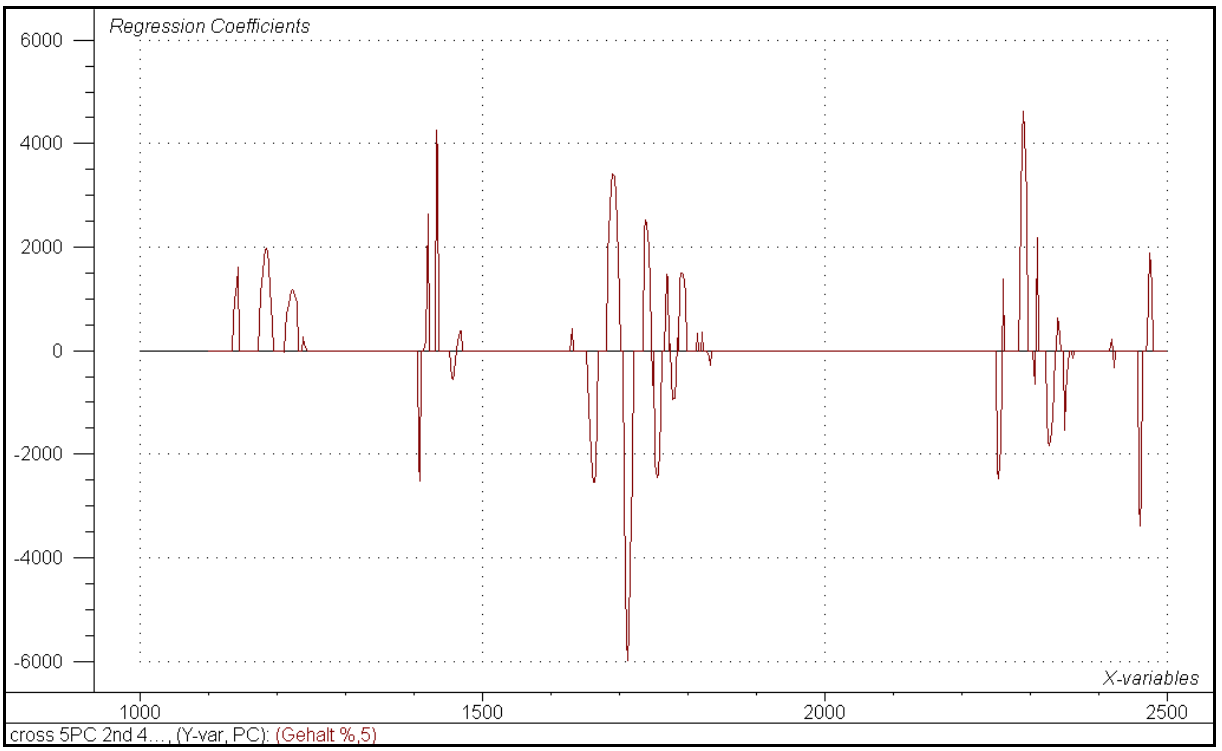


Abb. 4-7: Wellenlängenauswahl aufgrund der Variablen mit hohem Einfluss auf das Modell.

Die Abbildungen 4-4 bis 4-7 zeigen nochmals den Verlauf der beschriebenen Datenvorbehandlungen und verdeutlichen ihren Einfluss auf die Erstellung des statistischen Modells.

4.3.3Partial Least Squares Regression

Beim eingesetzten PLS Verfahren handelt es sich um eine bilineare Regressionsmethode, die eine kleine Anzahl von Faktoren (Hauptkomponenten oder auch principal components, PC) aus einem spektrale Datensatz extrahiert. Die genaueren mathematischen Grundlagen und der zugrunde liegende NIPALS Algorithmus sind umfassend in der Literatur beschrieben [69-73]. Dabei werden die Daten auf diejenigen komprimiert, die in direktem Zusammenhang mit den vorgegebenen Konzentrationswerten stehen (Projektion). Hierbei kann jede Probe als ein Punkt in einem multidimensionalen Raum angesehen werden. Das Modell wird als eine Serie von Komponenten aufgebaut, auf die die Proben - und die Variablen – projiziert werden können. Projektionen der Proben werden Scores genannt, die der Variablen Loadings. Die Näherung der Daten durch das Modell ist gleichbedeutend mit der orthogonalen Projektion der Proben auf das Modell. Die Restvarianz (residual variance) jeder Probe entspricht dem Quadrat des Abstandes zu ihrer Projektion. Durch die Verwendung der PLS Methode wird die Dimension des ursprünglichen Datenraumes auf ein Minimum reduziert, welches die Variationen noch hinreichend genau beschreibt.

Die Signifikanz jeder latenten Variablen wurde über Kreuzvalidierung (cross validation, CV) bestimmt, in dem bei der Berechnung jeder Hauptkomponente jeweils ein spektraler Datensatz entfernt wurde und seine Vorhersage anschließend durch das berechnete Modell stattfand. Dieser Schritt wurde für jede neu hinzukommende Hauptkomponente wiederholt, wobei als Fehlermaß die Summe der quadratischen Abweichungen dient. Ein lokales Minimum dieses Fehlers bestimmt die optimale Anzahl an Hauptkomponenten, weitere würden nur das Rauschen modellieren.

Grundsätzlich erfolgt die Berechnung der Modelle in zwei Schritten. Zuerst findet der Kalibrationsschritt mit der Entwicklung des Modells der Beziehung zwischen spektralen Daten und Konzentrationswerten statt. Anschließend wird der Vorhersageschritt, der Angaben über unbekannte Konzentrationen neuer Datensätze aufgrund ihrer Spektren ermöglicht, durchgeführt. Die Genauigkeit und Güte des Modells wird anhand einer Reihe von Parametern bestimmt [67].

4.3.3.1 Achsenabschnitt der Regressionsgerade (offset)

Er sollte bei einer optimalen linearen Beziehung möglichst Null sein und berechnet sich nach der Formel:

$$\text{Achsenabschnitt} = \frac{1}{N}(\sum y - \text{Steigung} \cdot \sum x) \qquad (4\text{-}1)$$

4.3.3.2 Bias

Unter Bias versteht man den Mittelwert aller Abweichungen (average value of the residuals). Er zeigt den systematischen Fehler zwischen Vorhersage- und Referenzwert (wahrer Wert).

$$\text{Bias} = \frac{1}{I}\sum_{i=1}^{I}(\hat{y}_i - y_{i)} \qquad (4\text{-}2)$$

4.3.3.3 Korrelationskoeffizient (correlation coefficient)

Der Korrelationskoeffizient r_{k1k2} ist ein Maß für die lineare Abhängigkeit zweier Variablen ohne Einheit. Errechnet wird er als die Quadratwurzel

der Kovarianz beider Variablen geteilt durch das Produkt ihrer Varianzen.

$$r_{k1k2} = \frac{\sum_{i \in Sk} (x_{ik1} - \bar{x}_{k1}) \cdot (x_{ik2} - \bar{X}_{k2})}{(I-1) \cdot S_x(k1) \cdot S_x(k2)} \qquad (4\text{-}3)$$

für k1,k2 = 1...K

4.3.3.4 Residual Variance

Residual Variance ist das gemittelte Quadrat aller Residuen der Proben und der Variablen. Es ist ein Maß des Fehlers, der durch die Bestimmung der vorgegebenen Werte durch die vom Modell errechneten gemacht wird.

$$ResVar(a,z) = \frac{1}{d} \sum_{n=1}^{N} Ra^2 \qquad (4\text{-}4)$$

Bei der Methodenvalidierung mittels Kreuzvalidierung gibt der Vergleich der Residual Variance von Kalibrierung und Validierung gegen die Zahl der Hauptkomponenten aufgetragen Hinweise auf die Robustheit des errechneten Modells. Verlaufen beide Kurven schnell auf ein Minimum und möglichst parallel, ist die Robustheit des Modells sehr hoch und die Güte für die Vorhersage unbekannter Proben sehr hoch [67].

4.3.3.5 Root Mean Square Error of Calibration (RMSEC)

Der RMSEC ist ein Maß für die mittlere Differenz zwischen vorhergesagten und vorgegebenen Werten im Stadium der Kalibration (Modellerrechnung). Er kann als der durchschnittliche Modellfehler,

ausgedrückt in den gleichen Einheiten wie die Originalwerte, interpretiert werden.

$$RMSEC = \frac{1}{yWeight}\sqrt{ResYCalVar} \qquad (4\text{-}5)$$

4.3.3.6 Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP)

Der RMSEP ist ein Maß für die mittlere Differenz zwischen vorhergesagten und gemessenen Werte im Stadium der Vorhersage oder Validierung. Er kann als durchschnittlicher Vorhersagefehler, ausgedrückt in den gleichen Einheiten wie die Originalwerte, interpretiert werden. Für die Kreuzvalidierung errechnet er sich wie folgt (4-6).

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{I_{tot}}\sum_{s=1}^{Nseg}\frac{1}{yWeights^2}\sum_{i=1}^{Is}Fiys(i,j)^2} \qquad (4\text{-}6)$$

4.3.3.7 Steigung der Regressionsgeraden (slope)

Die Regressionsstatistik gibt die Beziehung zwischen den vorgegebenen und errechneten (measured vs. predicted) Werten als 2-dimensionalern Plot in Form einer Regressionsgeraden mit der Steigung m wieder.

$$m = \frac{N\sum y \cdot x - \sum y \sum x}{N\sum x^2 - (\sum x)^2} \qquad (4\text{-}7)$$

Tabelle 4-1: Legende

Symbol	Beschreibung
yWeight	Gewichte von y

Fiy	Reste von y
A	Anzahl der verwendeten Hauptkomponenten
i, I	Anzahl der Proben
j, J	Nummer/ Anzahl der y-Variablen
k, K	Nummer/ Anzahl der x-Variablen
N	Anzahl der Elemente
r	Korrelation
R	Varianz pro x- oder y-Variablen
S	Standardabweichung
X	Mittelwert von x
x, X	x-Wert, X-Matrix
$\hat{y}_i$	Vorhergesagter Wert von y
y, Y	y-Wert, Y-Matrix

4.3.4Ergebnisse

4.3.4.1 Rohspektren

Alle Modelle weisen eine hohe Komplexität auf, erkennbar an der Zahl der Hauptkomponenten (PC). Zum einen erschwert dies die Auswertung, zum anderen kann aufgrund der hohen PC Zahl davon ausgegangen werden, dass in die Modelle sehr viel Rauschen und andere Störungen wie Matrixeffekte eingehen. Die Werte sind in Tab. 4-2 zusammengefasst.

Tabelle 4-2: Parameter der Rohspektren-Modelle (PLS1).

	Hyperforin Kalibrierung	Hyperforin Validierung	Biapigenin Kalibrierung	Biapigenin Validierung
PC Zahl	10	10	10	10

Steigung	0,926	0,757	0,310	0,218
y-Achsenabschnitt	0,224	0,772	0,236	0,268
Korrelationskoeffizient	0,962	0,865	0,556	0,404
RMSE (%)	0,434	0,826	0,080	0,089
Bias	$-3{,}09 \cdot 10^{-7}$	0,033	8,80 e-09	0,0009

Die Modelle beschreiben die Daten nicht besonders gut, erkennbar an den niedrigen Korrelationskoeffizienten und den Vorhersagefehlern, sowie den Bias. Die Steigung und der Achsenabschnitt sind in einem guten Bereich. Die Robustheit des Modells kann durch den visuellen Vergleich von den Residual Variance Plots verglichen werden (Abb. 4-8). Man sieht bei beiden Inhaltsstoffen kein schnelles Absinken auf ein Minimum und keinen parallelen Verlauf.

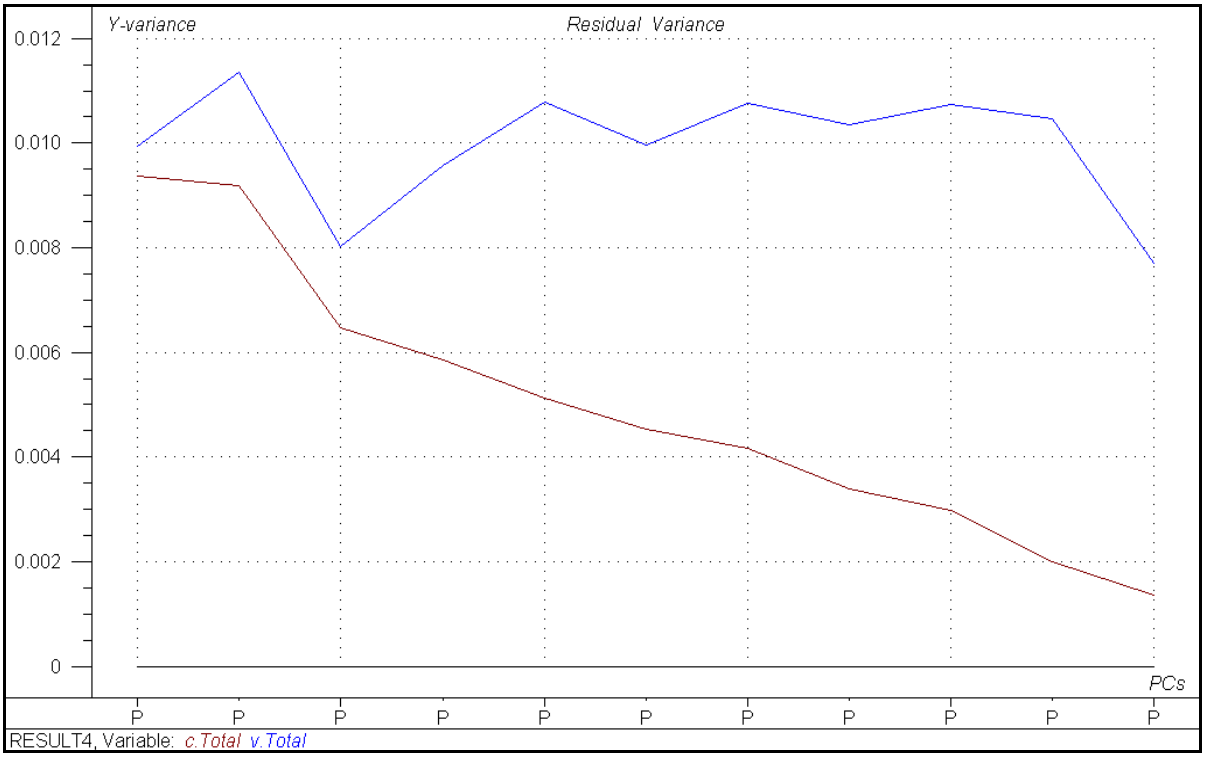


Abb. 4-8a: Residuenplot von der PLS1 Regression des Biapigenins.

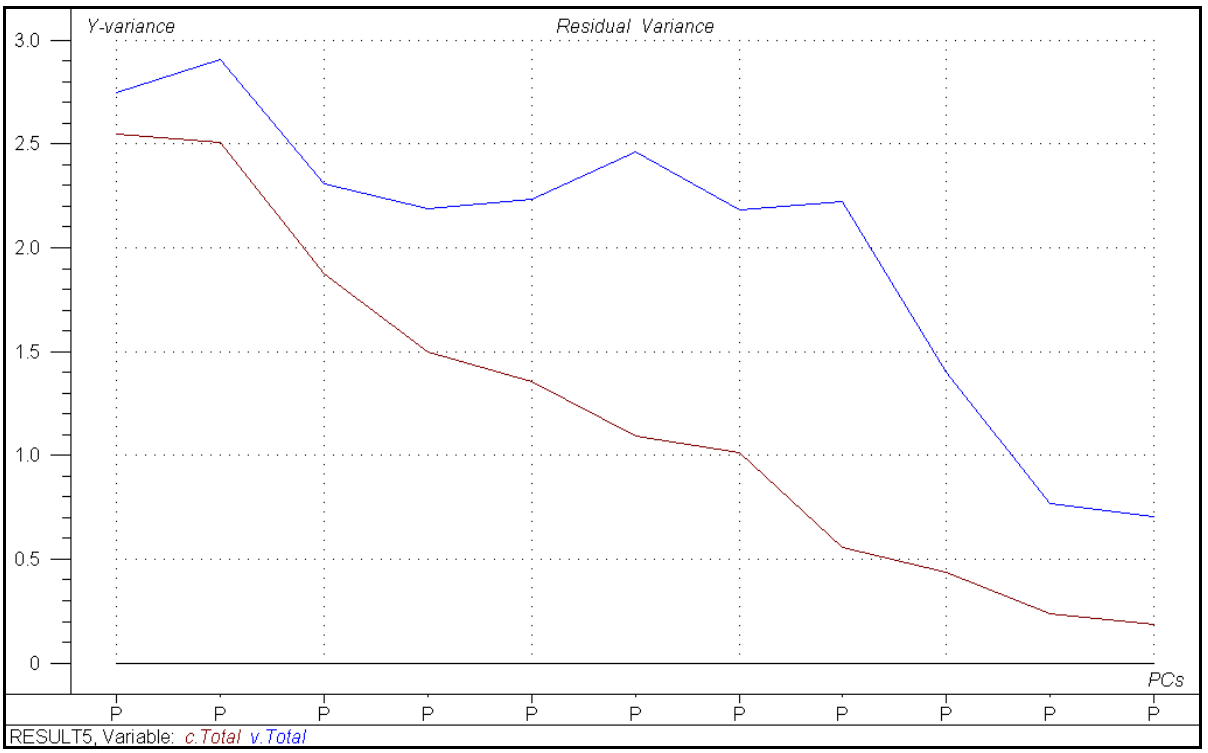


Abb. 4-8b: Residuen Plot der PLS1 Regression des Hyperforins.

4.3.4.2 PLS2 Kalibration nach Datenvorbehandlung

Im Gegensatz zu den aus den Rohspektren errechneten Modellen zeigt die PLS2 Rechnung für die nach Kap. 4.3.1 vorbehandelten spektralen Daten deutlich bessere Ergebnisse (Tab. 4-3). Zum einen sind 5 Hauptkomponenten ausreichend, um das Modell vollständig zu beschreiben, die Daten der Regression spiegeln das wieder, gleichzeitig ist die Vorhersagequalität ebenfalls gestiegen. Dies wird aus dem visuellen Vergleich der Residuenplots deutlich (Abb. 4-9).

Tabelle 4-3: Parameter der PLS2 Modelle nach Datenvorbehandlung.

	Hyperforin Kalibrierung	Hyperforin Validierung	Biapigenin Kalibrierung	Biapigenin Validierung
PC Zahl	5	5	5	5
Steigung	0,970	0,961	0,338	0,282

y-Achsenabschnitt	0,090	0,114	0,230	0,246
Korrelationskoeffizient	0,984	0,973	0,581	0,422
RMSE (%)	0,252	0,334	0,072	0,083
Bias	$-5{,}563 \cdot 10^{-8}$	-0,0039	$7{,}285 \cdot 10^{-9}$	-0,0035

Bei dem Vergleich der statistischen Eckdaten von Hyperforin und Biapigenin, die in der PLS2 miteinander in Beziehung gesetzt worden sind, sieht man eine deutliche Verschlechterung bei der Vorhersagegüte des Biapigenin Modells. Im Gegensatz zu Hyperforin, dessen Regressionskoeffizient mit 0,98 die Fähigkeit des Systems zur Vorhersage des Hyperforingehalts der Proben deutlich macht, kann man bei dem des Biapigenins von nur 0,5 nicht mehr von einer gültigen linearen Regression sprechen.

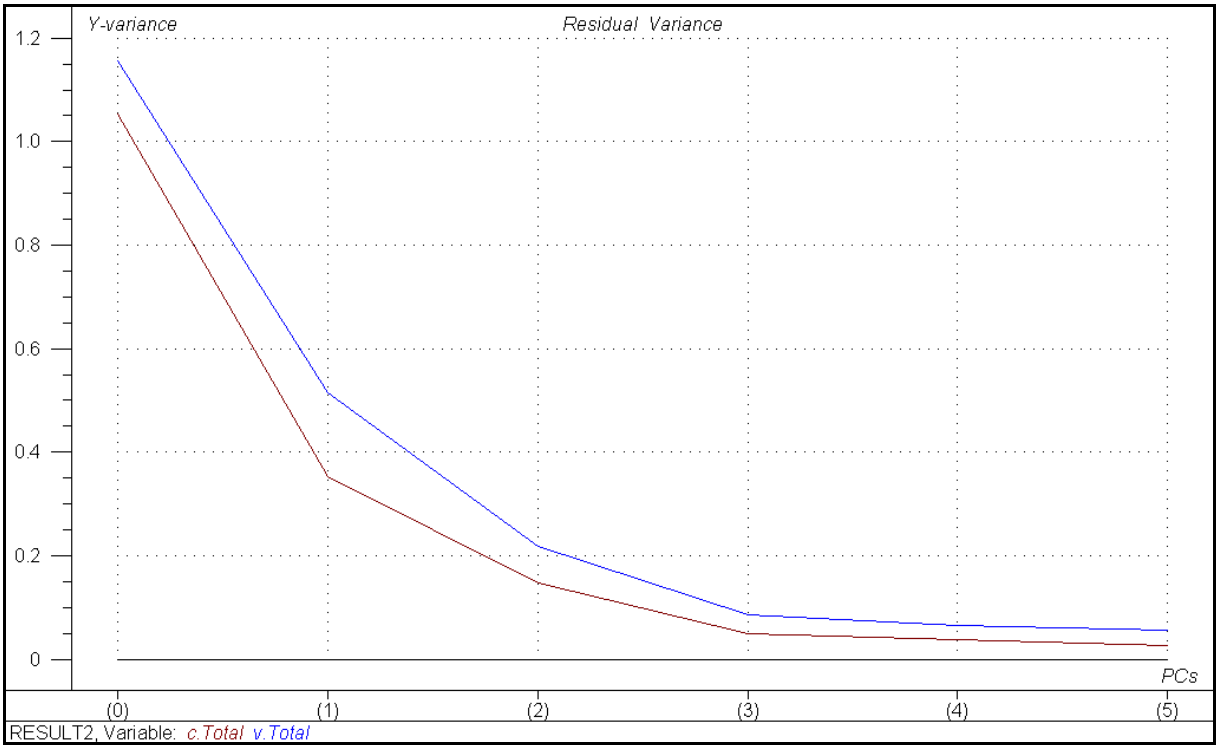


Abb. 4-9: Validierungs- und Kalibrierungsresiduenplot der PLS2 Regression für Hyperforin und Biapigenin.

4.3.4.3 PLS1 Kalibration nach Datenvorbehandlung

Für die Bestimmung der geringen Konzentrationen des Biapigenins mit guter Sicherheit liefert eine jeweils für Hyperforin und Biapigenin einzeln durchgeführte PLS1 Kalibration die besten Ergebnisse. Zusätzlich verfeinern lässt sich die Aussage noch durch eine Teilung des Arbeitsbereiches bei der Biapigenin Regression, sodass ein 2-Schritte Verfahren entsteht: erst eine Vorhersage des Biapigeningehaltes mit der PLS1 Regression über den gesamten Arbeitbereich, anschließend bei vorhergesagten Werten kleiner als 0,35 % eine nochmalige Analyse mit einem cut-off Modell, welches in der Lage ist, auch den Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 0,35 % hinreichend genau hervorzusagen und dabei gleichzeitig robust ist.

Tabelle 4-4: Parameter der PLS1 Regression des Hyperforins.

	Hyperforin Kalibrierung	Hyperforin Validierung
PC Zahl	5	5
Steigung	0.983	0.969
y-Achsenabschnitt	0.053	0.104
Korrelationskoeffizient	0.992	0.986
RMSE (%)	0.173	0.222
Bias	$-1.987 \cdot 10^{-8}$	0.0074

Tabelle 4-5: Parameter der PLS1 Regression des Biapigenins.

	Biapigenin Kalibrierung	Biapigenin Validierung	Biapigenin cut-off Kalibrierung	Biapigenin cut-off Validierung
PC Zahl	5	5	5	5
Steigung	0.963	0.912	0,985	0,996
y-Achsenabschnitt	0.012	0.030	0,004	0,010
Korrelationskoeffizient	0.982	0.961	0,993	0,984
RMSE (%)	0.018	0.026	0,005	0,007
Bias	$-1.407 \cdot 10^{-8}$	-0.000681	$5.795 \cdot 10^{-9}$	$-9.584 \cdot 10^{-6}$

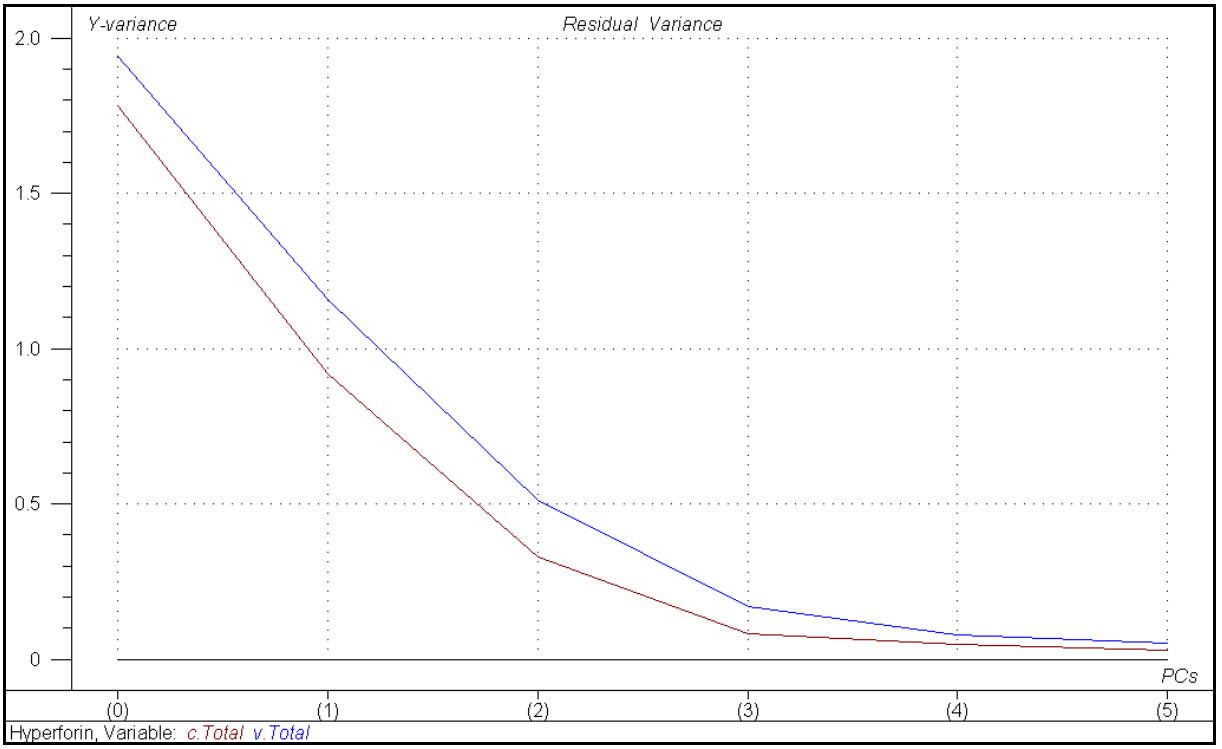


Abb. 4-10a: Residuenplot der PLS1 Regression des Hyperforins nach Datenvorbehandlung.

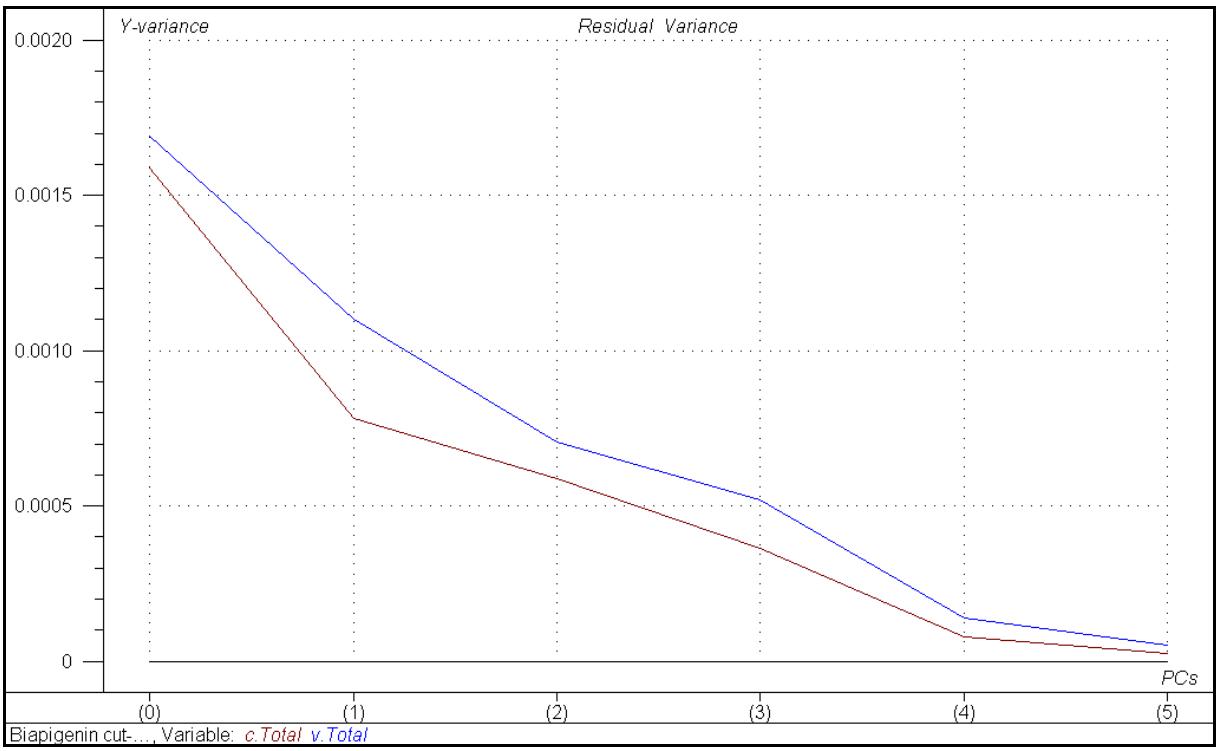


Abb. 4-10b: Residuenplot der PLS1 Regression des Biapigenins nach Datenvorbehandlung und Teilung des Arbeitsbereichs.

Auch hier zeigt die visuelle Auswertung der Residuenplots eine gute Robustheit durch einen parallelen Verlauf von Kalibrierung und Validierung, sowie durch die schnelle und deutliche Annäherung an das Minimum der nicht erklärten Restvarianz.

Einen schnellen Überblick und Einschätzung der Regression gibt der sogenannte Regressionsplot, in dem die gemessenen – also wahren Werte – gegen die vom Modell errechneten graphisch aufgetragen werden.

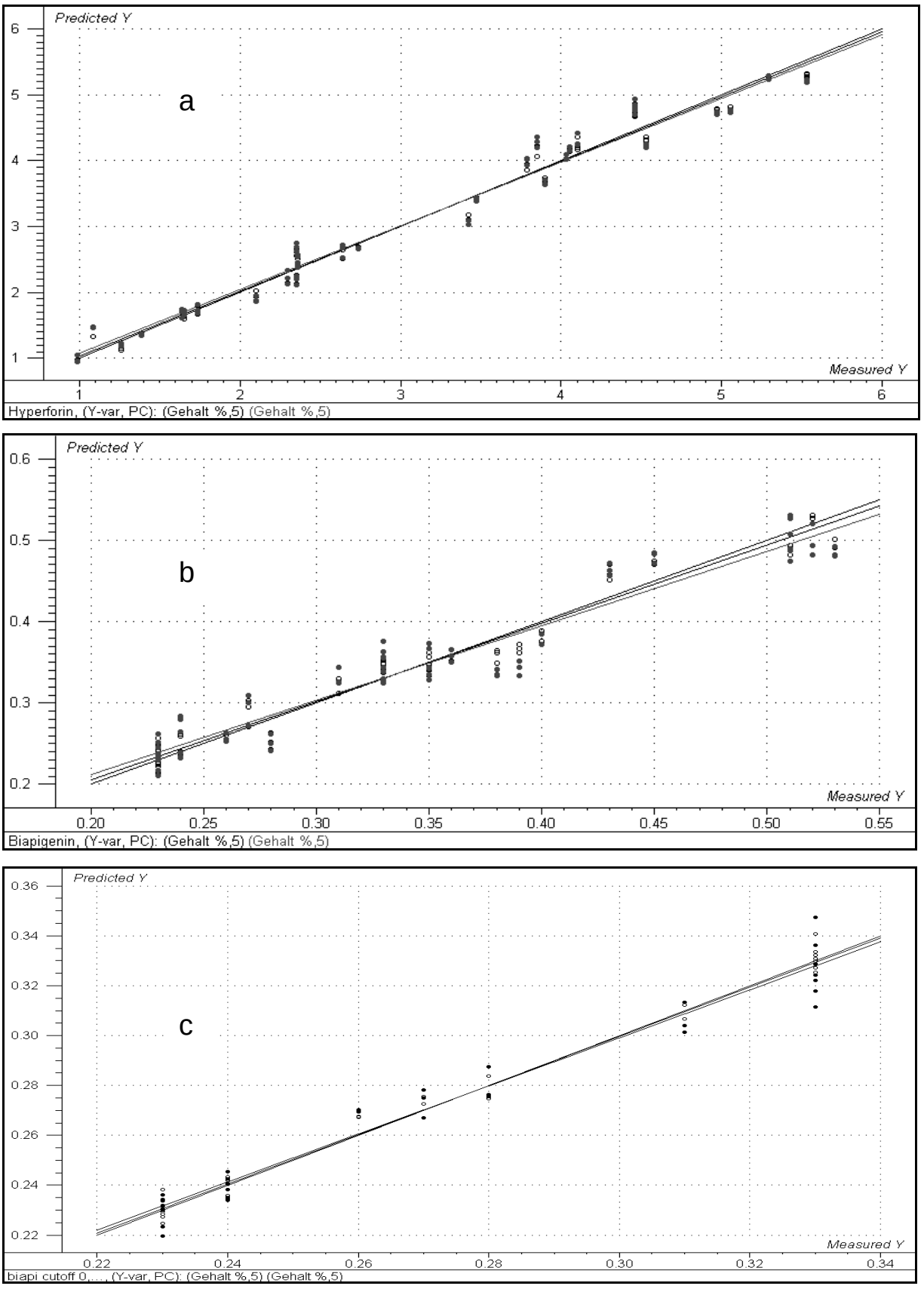


Abb. 4-11: Regressionsplots der PLS1 Modelle für Hyperforin (a), Biapigenin gesamter Arbeitsbereich (b) und Biapigenin cut-off (c).

4.3.4.4 Auswertung der Ergebnisse

Gute Kalibrationsergebnisse wurden für den Hyperforingehalt in Johanniskrautextrakten erzielt. Der Vorhersagefehler von nur 0,22 % (bezogen auf den absoluten Gehalt) im Arbeitsbereich von 1,0 bis 6,0 % insgesamt erlaubt eine verlässliche Gehaltsbestimmung, vor allem in Hinblick auf die Forderung der pharmazeutischen Industrie, Extraktionsmethoden einzusetzen, die einen Hyperforingehalt von mindestens 3 % Hyperforin in Trockenextrakt garantieren. Der Biapigeningehalt in den untersuchten Proben war mit 0,20 bis 0,55 % deutlich geringer und für die NIRS, die normalerweise in einem Bereich bis mindestens 1 bis 0,5 % arbeitet, sehr ungewöhnlich. Nichtsdestotrotz ist mit einem Vorhersagefehler von 0,024 % eine Vorhersage des Biapigeningehalts mit großer Präzision möglich. Beim der Betrachtung der Residuenplots für Biapigenin kann man jedoch eine im Vergleich zu Hyperforin größere Abweichung von Validierungs- und Kalibrierungsschritt sehen. Dies ist ein Hinweis auf eine eventuell mangelnde Robustheit des Systems. Dadurch würde die Fähigkeit der Kalibration verringert, unbekannte Proben vorherzusagen. Zur weiteren Verbesserung der Vorhersagegenauigkeit für neue und damit unbekannte Trockenextrakte, wurde eine aus der linearen Regressionsstatistik bekannte Methode angewandt. Der Arbeitsbereich des Modells wurde bei 0,35 % geteilt und der untere Bereich erneut multivariat kalibriert. Dadurch wurde der Vorhersagefehler des unteren Konzentrationsbereiches auf 0,007 % reduziert und der Residuenplot deutlich optimiert. Bei der Vorhersage von unbekannten Proben wird also ein 2-Stufen Verfahren eingeführt, bei dem zuerst der Biapigeningehalt mit dem ersten Modell über den gesamten Arbeitsbereich bestimmt wird. Bei einem gefundenen Wert kleiner oder

gleich 0,35 % wird dieser dann anschließend mit Hilfe des cut-off Modells verfeinert und präzisiert.

4.4 Diskussion

Die eingesetzte Methode der Kreuzvalidierung birgt einige Vorteile für die Erstellung des Modells, auch gegenüber der Validierung mit einem externen Testset. Grundsätzlich ist jedes multivariate Modell umso robuster und modelliert die tatsächlich gewünschten Variablen und nicht das Rauschen des Systems, wenn eine große Anzahl von Proben für die Berrechnung eingesetzt werden. Ebenfalls wichtig für die Erstellung des Modells ist eine sämtliche Möglichkeiten umfassende Variation sowohl bezüglich des Gehalts - also die modellierte Variable - als bezüglich anderer Faktoren wie Korngröße, Korngrößeverteilung, Feuchtigkeitsgehalt, Homogenität und Nebenprodukte wichtig. Je enger man diese Variationen hält und je weniger Proben man zur Kalibration einsetzt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, sein System überzutrainieren, d. h. Hauptkomponenten auszuwählen, die nur im Kontext des begrenzten Probenumfangs und nicht tatsächlich für den Gehalt bestimmter Inhaltsstoffe repräsentativ sind. In diesem Beispiel war der Probenumfang bedingt durch externe Faktoren auf 35 begrenzt. Eine weitere Verminderung durch Ausfall von circa zehn Proben für eine externe Validierung hätte sich ungünstig auf die Vorhersagegüte der multivariaten Kalibration ausgewirkt. Zusätzlich erhält man bei einer Kreuzvalidierung einen Vorhersagefehler, in den die Abweichungen aller Proben von jeweils dem errechneten Modell eingehen, da sie iterativ arbeitet und die Quadrate der Abweichungen anschließend aufsummiert. Visuell veranschaulicht im Residuenplot, kann man so sehr schnell einen sehr guten Überblick über die tatsächliche Qualität der Berechnung bekommen. Die Residuenplots sowohl für Biapigenin als auch für

Hyperforin zeigen jeweils den parallelen Verlauf für den Kalibrierungs- als auch Validierungsschritt und belegen damit den insgesamt kleinen Fehler in der Vorhersagequalität. Gleichzeitig sieht man in den Residuenplots das schnelle Absinken der restlichen nicht-erklärten Varianz, die bei der 5. Hauptkomponente schon weniger als 2 % ist. Dies zeigt, dass die modellierte Variable, also die jeweilige Konzentration, mit einer geringen Anzahl von spektralen Daten beschrieben werden kann. Damit wird im Falle der PLS1 Kalibration der Spektren nach Datenvorbehandlung tatsächlich nur die gewünschte Information modelliert und nicht auch noch spektrales Rauschen oder andere nur für diesen Datensatz spezifische Einflussfaktoren.

Vergleicht man die Ergebnisse der PLS2 zur PLS1 Kalibration mit erfolgter Datenvorbehandlung, erkennt man deutlich, dass der Biapigeningehalt, wenn er gleichzeitig mit dem des Hyperforins errechnet wird, eine sehr schlechte Vorhersagequalität bekommt. Das liegt zum einen an der grundsätzlich unschärferen, da weniger spezifischen, Berechnungsmethode eines PLS2 Algorithmus, zum anderen an dem großen Konzentrationsunterschied zwischen Biapigenin und Hyperforin. Dadurch ist der Einfluss des Hyperforingehalts gegenüber dem des Biapigenins so stark überbetont, dass ein Modell, das beide Variablen gleichzeitig modelliert, die Biapigeninkonzentration nicht mehr korrekt vorhersagen kann. Dies sieht man deutlich an dem Korrelationskoeffizienten für die Biapigenin-Regression, der mit 0,5 so schlecht ist, dass man im Prinzip nicht mehr von einer tatsächlichen linearen Beziehung sprechen kann. Somit ist die PLS2 Berechnung zur Bestimmung beide Komponenten nebeneinander nicht geeignet.

Der entscheidende Einfluss der richtigen und sorgfältigen Datenvorbehandlung wird sehr deutlich, wenn man die Ergebnisse der PLS1 Kalibrationen der Rohdaten und die der behandelten Daten

vergleichend betrachtet. Bei den Berechnungen mit den Rohspektren ist weder die Kalibration für Biapigenin noch die für Hyperforin erfolgreich, obwohl Hyperforin in einem für NIRS durchaus üblichen Konzentrationsbereich vorliegt. Zuerst sollten die Daten durch bestimmte Algorithmen so behandelt werden, dass Fehler und Störungen, die aufgrund der Messtechnik entstanden sind, ausgeglichen werden. Dazu gehört neben der Zentrierung der Daten die MSC (Multiplicative Scatter Correction), die Streueffekte weitgehend ausgleichen kann, sodass weniger Artefakte im Spektrum auftreten. Diese messtechnisch bedingten und eigentlich grundsätzlich zu empfehlenden Vorbehandlungen werden im endgültigen Berrechnungsmodell durch die Bildung der 2. Ableitung und die Wellenlängenselektion erweitert. Die 2. Ableitung erhält den linearen Zusammenhang des Lambert-Beerschen Gesetztes zwischen der Absorption und der Konzentration, gleichzeitig werden Streueffekte durch Bildung des Offsets vermindert und die spektrale Auflösung wird erhöht. Ausschlaggebend aber für die Erstellung des endgültigen Modells ist die Auswahl der Wellenlängenbereiche, die auch tatsächlich die gewünschte Information enthalten. In diesem Falle wurde zuerst gezielt der Bereich der Wasserbanden ausgeschnitten, da der Einfluss der Feuchtigkeit der Trockenextrakte auf die Modellerstellung möglichst gering gehalten werden sollte. Die weitere Selektion erfolgt empirisch, da - wie im theoretischen Teil schon diskutiert - die Spektren zwar durchaus typisch sind, jedoch einzelne Banden aufgrund der Komplexität der NIR Spektren und der des Gemisches nicht genau zugeordnet werden können. Hier liegt der entscheidende Schritt für die Erstellung des Modells, da eine gute Auswahl repräsentativer Wellenlängenbereiche zum einen zu einem System führt, welches die gewünschte y-Variable de facto wiederspiegelt, zum anderen alle Einfußfaktoren, die nur zufällig

auch kolinear wie das Detektor-Rauschen verlaufen, möglichst weitgehend ausschließt.

Die in dieser Arbeit entwickelte Quantifizierung von Hyperforin und Biapigenin in Johanniskrauttrockenextrakten mittels NIRS zeigt der HPLC durchaus vergleichbare Werte bezogen auf Präzision und Vorhersagefehler. Die Forderung nach einer umfassenden Gesamtanalyse von Pflanzenextrakten im Gegensatz zur Standardisierung auf eine oder mehrere Leitsubstanzen tritt immer mehr in den Vordergrund, da die Sicherheit und Wirksamkeit pflanzlicher Zubereitungen offensichtlich in direktem Zusammenhang mit genauer Dosierung des als Wirkprinzip anerkannten Gesamtextraktes steht. Hier hat die NIRS im Vergleich zur HPLC die ausgesprochenen Vorteile – wenn das Kalibrationsmodell steht - viel schneller zu sein, wenig bis gar keine Lösungsmittel zu verbrauchen und keine Probenvorbereitung zu benötigen. Somit werden nicht nur die Kosten für die Analysen gesenkt, sondern auch ökologische Gesichtspunkte beachtet. Trotz dieser großen Vorteile kann dieses Kalibrationsmodell nur auf die zwei untersuchten Substanzen angewandt werden. Es ist ungeeignet, unbekannte Substanzen zu quantifizieren oder gar diese zu identifizieren oder Aufschlüsse über ihre Struktur zu geben. Die Einschränkung auf zwei Inhaltstoffe kann jedoch durch die Quantifizierung von etwa zehn anderen Inhaltstoffen des Johanniskraut, z. B. Hypericin oder verschiedene Flavonoide, durch eine geeignete Methode und eine darauffolgende Erweiterung des multivariaten Systems aufgehoben werden. Damit wäre diese Methode dann universell zur Quantifizierung von Inhaltstoffen des Johanniskrauts einsetzbar und als Routinemethode leicht zu etablieren. Da die in einer Firma bzw. Produktionseinheit anfallenden Extrakte durch die Qualität ihrer Extraktion schon auf einen bestimmten, eng begrenzten Gehalt eingeschränkt werden, verkleinert

sich natürlich auch der Arbeitsbereich. Dies führt, wie an dem cut-off Modell des Biapigenins gut zu sehen ist, zu noch besseren Vorhersageergebnissen, sodass im Routineeinsatz in der Phytopharmaka Industrie mit noch schärferen und präziseren Vorhersageintervallen zu rechnen ist. Zusätzlich zu der in den Arzneibüchern schon dokumentierten Fähigkeit der NIRS, erfolgreich in der Qualitätskontrolle einsetzbar zu sein, ist für eine routinemäßige Quantifizierung eine regelmäßige Überprüfung der durch die NIRS Analytik gewonnen Daten sicherlich im Rahmen eines Qualitätssicherungsprogramms wichtig. Dabei kann das System überwacht und gegebenenfalls ausgeweitet werden. Somit ersetzt die NIRS auf Dauer die HPLC als Referenzmethode nicht völlig, verringert jedoch das Ausmaß ihres Einsatzes erheblich. Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt ist sicherlich die zukünftige Überprüfung des Extraktionsverlaufes schon während der Extraktion durch on-line NIRS Messungen, die die Effizienz der Extraktion und die benötigte Dauer und die eingesetzten Lösungsmittel auf ein Optimum einstellen könnte.

5 Die direkte HPTLC-FT-NIRS on-line Kopplung

5.1 Grundlagen

5.1.1Dünnschichtchromatographie

Das mit über 90 % der Fälle in der HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) eingesetzte Kieselgel 60 ist das häufigste Sorbens. Im Gegensatz zur HPLC kommen reversed phase Materialen sehr selten vor. Die Trennleistung des Schichtmaterials (Messgrößen Bodenhöhe und Trennzahl [74]) wird in erster Linie von der Geometrie der stationären Phase (Korngröße und –verteilung, Packungsdichte) und von der Homogenität des Porensystems (spezifische Oberfläche, Porendurchmesser, Porenvolumen) bestimmt, während die Selektivität auf der chemischen Eigenschaft des Sorptionsmaterials beruht [74]. Im Gegensatz zu konventionellen TLC-Schichten haben moderne HPTLC-Fertigschichten insgesamt eine kleinere Korngröße und eine engere Partikelgrößenverteilung und zeigen dadurch eine deutlich höhere Trennleistung [75]. Für die Kopplung mit Infrarotspektroskopie wurden in Zusammenarbeit mit der Firma Merck handgestrichene Spezialplatten entwickelt [76]. Diese optimierte HPTLC-Kieselgel-Sorbensschicht enthält einen 50 %igen Magnesium-Wolframat Anteil. Durch die Verwendung dieses Materials, das im infraroten Bereich schwach absorbiert und gleichzeitig die Reflexionseigenschaften verstärkt, werden sowohl das Signal-Rausch-Verhältnis als auch die DRIFT-Spektren Qualität signifikant verbessert. Es besteht zwar beim Einsatz dieses Materials ein Unterschied in den Retentionszeiten der Substanzen zu herkömmlichen Kieselgel-Phasen, jedoch ist das Trennvermögen bei Anpassung des Fließmittels durchaus vergleichbar [77].

5.1.2Dünnschichtchromatographie und IR

Im Bereich des Mittelinfrarot gab es schon früh Versuche, Dünnschichtchromatographie mit dieser spektroskopischen Methode zu verbinden. Dabei wurden off-line Verfahren eingesetzt, in dem die durch die Chromatographie entstandenen Zonen vom Träger der festen Phase entfernt, anschließend die getrennten Substanzen eluiert und dann vermessen wurden. Dazu standen dann verschiedene Techniken zur Verfügung, am häufigsten wurden die Proben entweder auf KBr aufgetragen und in Transmission, diffuser Reflexion oder aber direkt nach der Elution im Lösungsmittel in Transmission gemessen [78]. Die Technik der diffusen Reflexion erlaubt auch eine Messung direkt von der Platte, jedoch stört die im Vergleich zu KBr sehr große Eigenabsorption des Kieselgels die Messung und schränkt den für qualitative und quantitative Messungen zur Verfügung stehenden Wellenlängenbereich erheblich ein. Die in Zusammenarbeit mit der Firma Bruker von Glauninger, Kovar und Hoffmann [21] entwickelte DRIFT-Technik (Diffuse Reflectance Infrared Fourier-Transformation) ermöglichte zum ersten Mal, nicht nur in-situ Messungen durchzuführen, sondern auch mit Hilfe des in Kap. 5.4.1 beschriebenen Gram-Schmidt Verfahrens direkt von der TLC-Platte chromatogrammgleiche Spuren aufzunehmen.

Neben der Entwicklung eines für die DRIFT-Technik besser geeigneten Sorbens wird die NIRS als Alternative zur MIRS diskutiert. Im Gegensatz zu der starken Absorption des Kieselgels im Bereich der Mittelinfrarot Strahlung absorbiert es im Nahen Infrarot kaum. Dadurch kann bei einer Aufnahme der gesamte spektrale Bereich des NIR genutzt werden. Demgegenüber stehen die Nachteile des Nahen Infrarot, vor allem die Tatsache, dass die Signalintensität sehr viel schwächer ist und die direkte Zuordnung von Moleküleigenschaften zu bestimmten Banden durch die Komplexität der NIR Spektren nicht möglich ist. Die bisherigen

auf diesem Bereich veröffentlichten Arbeiten hatten entweder grundsätzlich nur dispersive Messtechniken eingesetzt oder in Transmission gearbeitet [69, 79, 80]. Dadurch ist die Scan-Technik nicht wirklich automatisiert, die Vorteile der Fourier-Transformation werden nicht wirklich genutzt und es handelt sich auch nicht um eine Kopplungsmethode im engern Sinne des Wortes.

Durch Verbinden der für das Mittlere Infrarot entwickelten DRIFT-Einheit von Glauninger et al. mit einem Hochleistungs-Fourier-Transformation NIR Gerät der Firma Bruker und den speziellen Reflexions-Platten sollen die Möglichkeiten und Grenzen dieser neuen Kopplungstechnik erforscht werden. Um sinnvolle Vergleiche mit Ergebnissen des Mittelinfrarots zu erhalten, wurde für die Quantifizierung Koffein gewählt, welches sehr niedere Nachweisgrenzen hat [81] und deshalb quasi als Goldstandard und Maß für die Güte der NIR-Quantifizierung eingesetzt werden kann. Zur Testung der tatsächlichen Fähigkeit des Systems, Substanzen zu identifizieren, wurden 4 strukturell sehr ähnliche Benzodiazepine gewählt. Hierbei wird gewährleistet, dass die Spektren dieser jeweils sehr ähnlichen Substanzen durch die multivariate Datenbehandlung auf die jeweils charakteristischen Eigenschaften jeder Substanz reduziert werden.

5.2 Geräteaufbau

5.2.1Fourier-Transformations Nahinfrarot Spektroskopie

Ein Interferometer bildet anstelle eines Monochromators in dispersiv arbeitenden Spektrometern die optische Hauptkomponente in der Fourier-Transformations Infrarot Spektroskopie [82]. Das Michelson-Interferometer besteht aus einem Strahlenteiler, einem feststehenden und einem beweglichen Spiegel (Abb. 5-1). Das Material des

Strahlenteilers ist dabei abhängig von dem gewünschten spektralen Bereich, im Nahen Infrarot handelt es sich um CaF (Kalziumfluorid). Die Strahlung wird vom Strahlenteiler auf den feststehenden und den beweglichen Spiegel verteilt und jeweils wieder auf den Strahlenteiler zurück reflektiert. Dabei überlagern sich auf dem optischen Weg in Richtung des Detektors beide Interferometerarme, es entsteht konstruktive und destruktive Interferenz. Das Interferogramm wird durch die geschwindigkeitskonstante Bewegung des Spiegels aufgenommen.

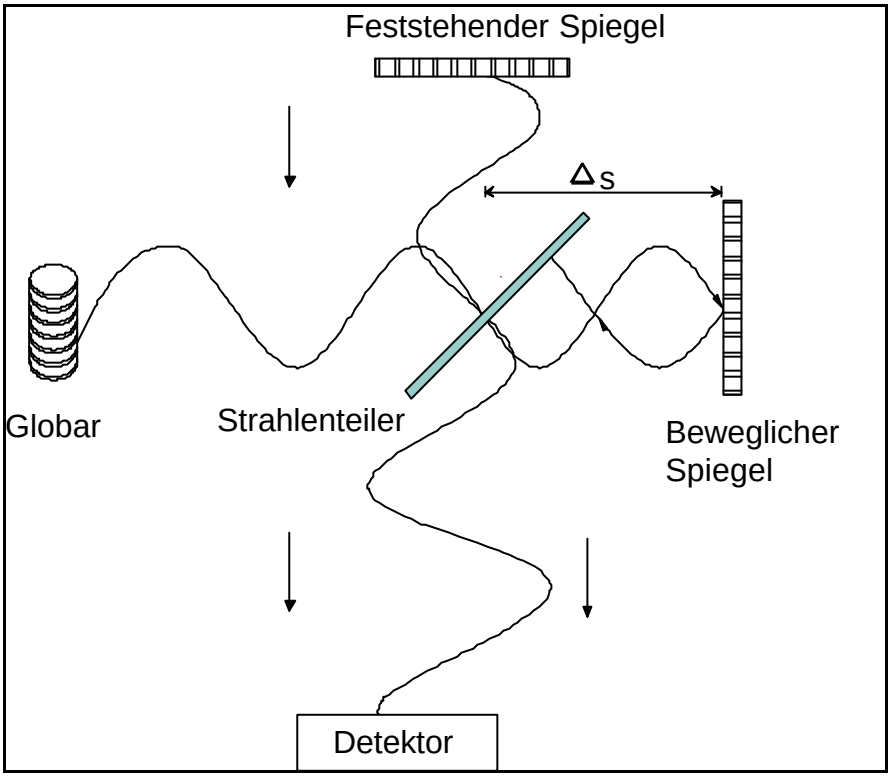


Abb. 5-1: Interferenzbildung im Michelson-Interferometer.

Durch diese Bewegungstechnik handelt es sich beim Interferogramm um eine Darstellung von Signalintensitäten als Funktion der Zeit. Das Spektrum hingegen besteht aus Signalintensitäten als Funktion der Frequenz, also Wellenlängen. Diese Überführung von Information in Spektrenform wird mittels der Fourier-Transformation, oder besser Fast Fourier-Transformation, da es sich um diskrete Datenpunkte handelt,

vorgenommen [82]. Grundlage dieser Umwandlung, die auch bei der NMR FID Technik angewandt wird, ist die Arbeit des französischen Mathematikers Jean Baptiste Fourier aus dem Jahre 1822. Er stellte fest, dass jede Kurve als Summe unendlich oder endlich vieler Sinus- und Kosinusfunktionen dargestellt werden kann, wenn sich deren Perioden wie ganzzahlige Vielfache verhalten.

$$f(t) = \sum_{i=0}^{\infty} a \cdot \cos(i \cdot w \cdot t) + b_0 + \sum_{i=0}^{\infty} b_i \cdot \sin(i \cdot w \cdot t) \qquad (5\text{-}1)$$

f(t) = Kurve als Funktion der Zeit (z. B. Interferogramm)
a, b = Fourier Koeffizienten
ω = Winkelgeschwindigkeit
t = Zeit

Diese Funktion gilt jedoch nicht für diskrete und äquidistante Datenpunkte, wie sie trotz hoher Auflösung in der Spektroskopie anfallen. Deshalb wurde diese Technik erst mit Einführung der FFT nach Cooley und Tukey und computergestützter Auswertung mit großem Erfolg eingesetzt. Weiterhin setzt die Theorie der FT unendliche Frequenzspektren voraus, was technisch nicht zu verwirklichen ist. Durch das aufgrund des Spiegelwegs abrupte Abrechen des Signals entstehen im errechneten Spektrum beidseitig zu den Banden Nebenmaxima. Durch Apodisation, eine mathematische Funktion der Faltung, können diese Nebenmaxima gedämpft werden, jedoch verbreitern sich hierbei die Banden, es verschlechtert sich also die Auflösung. Die optische Auflösung ist eine Funktion des Spiegelwegs und verhält sich näherungsweise umgekehrt proportional zur optischen Wegedifferenz. Da in kurzer Zeit sehr viele Scans möglich sind, die dann

zur Berechnung eines Spektrums gemittelt werden, kann über die Messzeit das Signal-Rausch-Verhältnis beeinflusst werden. Bei luftgespülten Systemen ergibt sich hierbei ein Optimum, ab dem das S/N sich durch Addition von Schwingungseffekten wieder verschlechtert.

5.2.2Vorteile der FT-NIR Technik

Trotz ihres höheren Rechenaufwands besitzt die FT-NIR Technik gegenüber dispersiven Spektrometern einige für die DRIFT-Anwendung relevanten Vorteile [23]:

- Das Interferometer zeichnet sich durch eine konstante Auflösung über den gesamten Spektralbereich aus.
- Alle Spektralelemente verlassen, mit sich selber moduliert, gleichzeitig den Interferenzspektralapparat (Multiplex- oder Fellget-Vorteil). Das Rauschen des Detektors wird daher proportional über den gesamten Spektralbereich verteilt.
- Der Interferenzspektralapparat benutzt anstelle eines schmalen Spaltsystems kreisrunde Blenden. Dies erhöht den Lichtdurchsatz und bewirkt einen um etwa zwei Zehnerpotenzen höheren optischen Leitwert (Jaquinot-Vorteil).
- FT-NIR Systeme besitzen eine sehr hohe Wellenlängen-genauigkeit, bedingt durch die präzise Abtastung der Spiegelposition. Das Interferenzmuster eines He/Ne-Lasers dient dabei als Referenz und gibt den Takt für die punktförmige Abtastung des Interferogramms vor.

5.2.3Messsystem

Bei der DRIFT-Technik handelt es sich um Messung der diffusen Reflexion, wie sie schon in Kap. 3.1.3 besprochen wurde. Dabei wird das polychromatische Licht von einer NIR-Lichtquelle ausgestrahlt. Mit Hilfe des Spektralapparats wird dann das Interferogramm erzeugt, welches normalerweise von einem internen PbS-Detektor aufgezeichnet wird. Durch die von Glauninger et al. [21] entwickelte spezielle Apparatur (Abb. 5-2) ist es möglich, den Nahinfrarot Strahl durch einen Umlenkspiegel extern in die DRIFT-Einheit auszuleiten.

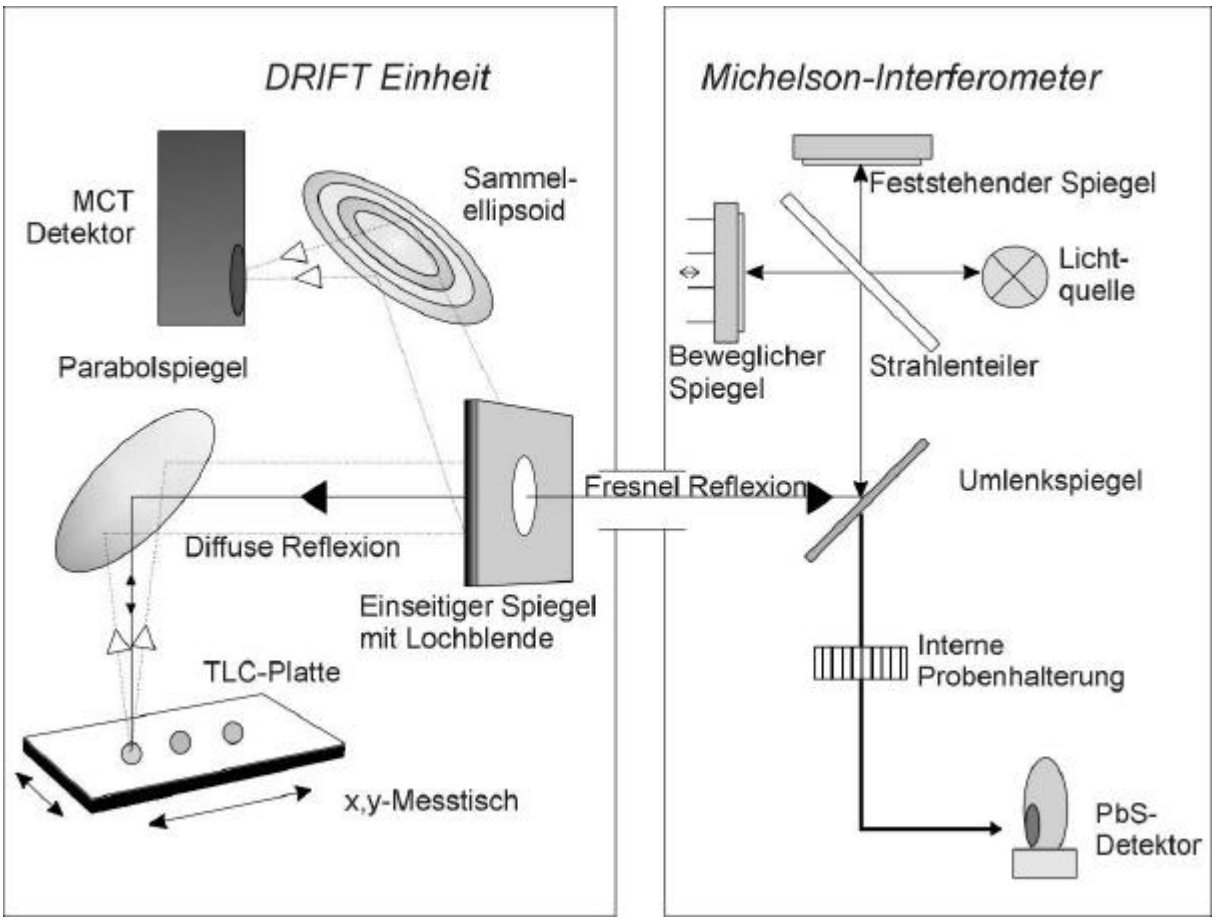


Abb. 5-2: Schema des Spektrometer und der DRIFT-Einheit.

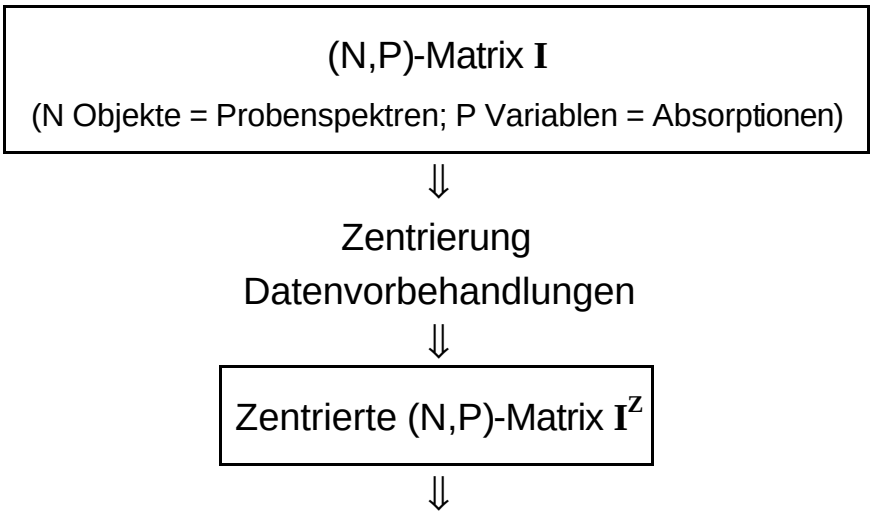
Durch den Parabolspiegel wird der Strahl senkrecht auf die HPTLC-Platte geleitet. Die gerichtete Reflexion oder Fresnel Reflexion, die keine spektrale Information enthält, wird durch eine Lochblende wieder in das

Spektrometer zurückgeführt und nicht detektiert. Die diffuse Reflexion hingegen wird von dem über den Parabolspiegel und den einseitigen Spiegel reflektiert, vom Sammelellipsoid gebündelt und zum MCT-Detektor gelenkt. Dieser Schmalbanddetektor hat die Vorteile, sowohl im Mittleren als auch im Nahen Infrarot detektieren zu können und gleichzeitig eine Frequenz von 40 Hz verarbeiten zu können. Dadurch kann das Interferometer schneller getaktet werden als bei interner PbS-Detektion und ein Scannen der HPTLC-Platten ist in kurzer Zeit möglich. Dazu wird die Platte mit Hilfe eines computergesteuerten x,y-Tisches unter dem Lichtstrahl in definierten und diskreten Zeitabständen kontinuierlich hindurchgeführt. Je schneller dabei die Spur abgefahren wird, desto weniger Scans können für ein Spektrum gemittelt werden und desto schlechter wird das S/N Verhältnis. Die endgültige Geschwindigkeit und Scanzahl ist also immer ein Kompromiss zwischen der – möglichst geringen – Analysenzeit und des Signal-Rausch-Verhältnisses.

5.3 Identifizierung

5.3.1Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (Principle Component Analysis, PCA) ist eine der wichtigsten multivariaten Verfahren. Synonyme sind unter anderem Singular Value Decomposition in der numerischen Analyse, Karhunen-Loewe Expansion in der Elektrotechnik und Eigenvektor Analyse in der Physik [33, 83]. Anwendung findet sie üblicherweise, wenn die Zahl der Analyten bzw. der Wechselwirkungen zwischen diesen geringer ist als die Zahl der Variablen, d. h. bei Variablenkolinearität. Dies ist z. B. bei der Spektroskopie der Fall. Hier werden pro Analyten etwa 500 bis 800 Absorptionspunkte bestimmt, wobei nicht jede Wellenlänge essentieller Informationsträger ist. Somit kann das ursprüngliche Spektrum durch eine wesentlich kompaktere Näherung bzw. Projektion ersetzt werden. Die relevanten Variablen des Datensatzes werden dabei extrahiert und in Form von Hauptkomponenten (PCs) dargestellt. Hauptkomponenten sind als optimale Linearkombinationen, d. h. gewichtete Summen der ursprünglich gemessenen Variablen aufzufassen. Zur Auffindung dieser Hauptkomponenten wird prinzipiell wie in Abb. 5-3 vorgegangen [19].



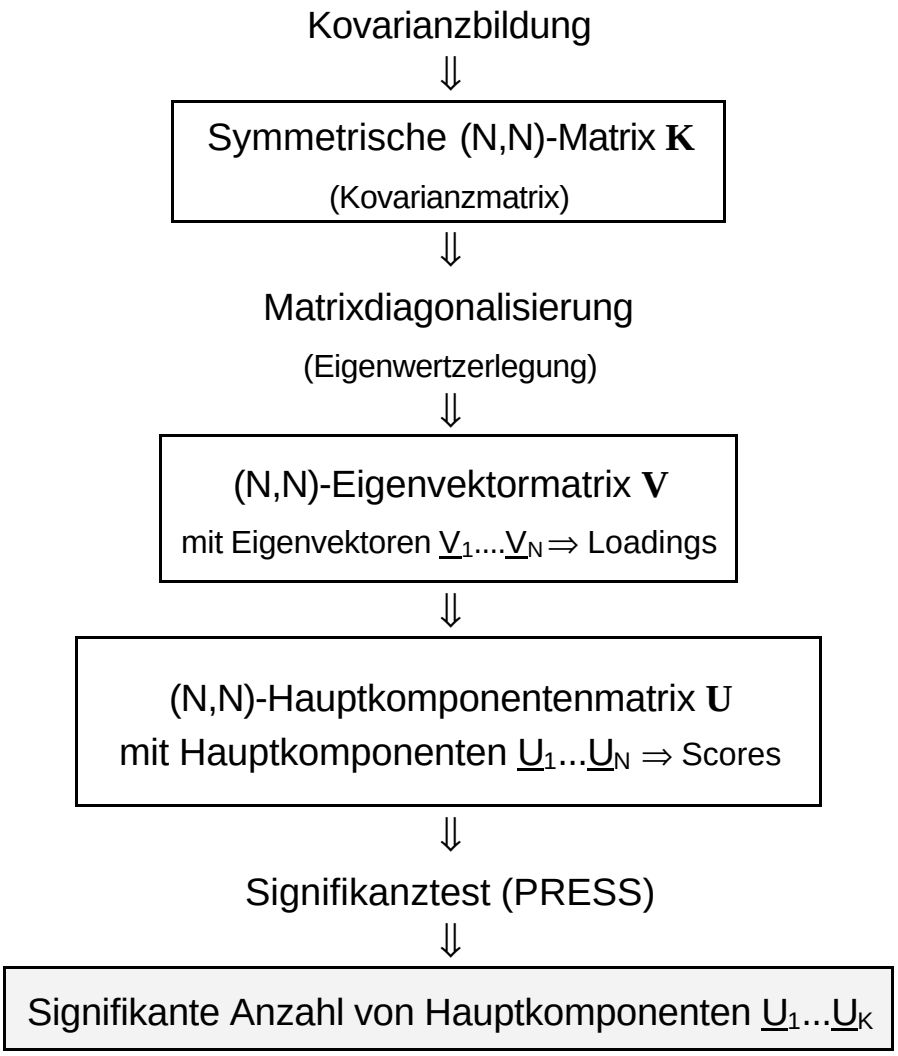


Abb. 5-3: Ablauf einer Hauptkomponentenanalyse

5.3.2Datenvorbehandlung

Wichtig bei der Erstellung eines PCA Modells ist die richtige Auswahl der Hauptkomponenten. Zum einen müssen alle in den zukünftigen Proben möglichen Variationen erfasst werden, zum anderen gilt es, die Anzahl der Hauptkomponenten so auszuwählen, dass die Aufsummierung der gewichteten Einzelspektren alle Variationen berücksichtigt, ohne aber Variationen zu modellieren, die nur aufgrund des Rauschens oder anderer Störfaktoren auftritt.

Im Falle der Kopplung wurde die Variation aufgrund der unterschiedlichen Platten, die handgestrichen und damit sehr ungleichmäßig waren, dadurch ausgeglichen, dass alle vier verschiedenen Benzodiazepine jeweils statistisch auf zehn unterschiedlichen Platten aufgesprüht wurden. Besonderes Augenmerk wurde auch auf die Datenvorbehandlung gelegt. Da bei den in-situ Messungen auf den Platten die Spektrenqualität unter der schwachen Intensität des Nahen Infrarot zu leiden hat und zusätzlich zwei negative Banden aufgrund des organischen neutralen Bindemittels, welches im NIR absorbiert, stören, wurden zum einen die spektralen Bereiche ausgewählt, dabei der Bereich bis ca. 8000 nm ausgespart, die negativen Bereiche herausgeschnitten und der Bereich des starken, detektorbedingten Signalabfalls bei 4000 nm ebenfalls weggeschnitten. Anschließend fand eine mittlere Zentrierung statt. Dies bedeutet, dass das Durchschnittsspektrum aller Spektren gebildet wird und dann von jedem einzelnen subtrahiert wird. Dadurch verstärken sich die kleinen Unterschiede zwischen den Spektren. Da die Hauptkomponenten nicht aus den absoluten Absorptionen, sondern aus den Unterschieden in den Absorptionen berechnet werden, wird dadurch das Modell verbessert.
Durch das Messen in diffuser Reflexion kommt es zu Streueffekten, die aufgrund der Inhomogenität der Proben nicht gleichmäßig über das ganze Spektrum verteilt sind. Dadurch kommt es typischerweise zu einer Basislinienveränderung, da dieser Einfluss im Bereich längerer Wellenlängen größer ist. Neben der in 4.3.2 besprochenen MSC gibt es auch noch die sogenannte Standard Normal Variate Transformation (SNV), die ebenfalls die Haupteffekte der Streuung aus den Spektren zu entfernen versucht. Im Gegensatz zur MSC werden die Spektren hier nicht in Relation zu einem externen Idealspektrum normiert, sondern durch die Normierung auf die Standardabweichung über den gesamten

spektralen Bereich jedes einzelnen Spektrums. Weiterhin wurde die Auflösung durch Bildung der ersten Ableitung mit Savitzki-Golay 5-Punkt Glättung durchgeführt, um die Effekte durch Untergrundrauschen zu minimieren und Unterschiede in den einzelnen Spektren gleichzeitig hervorzuheben (Abb. 5-4).

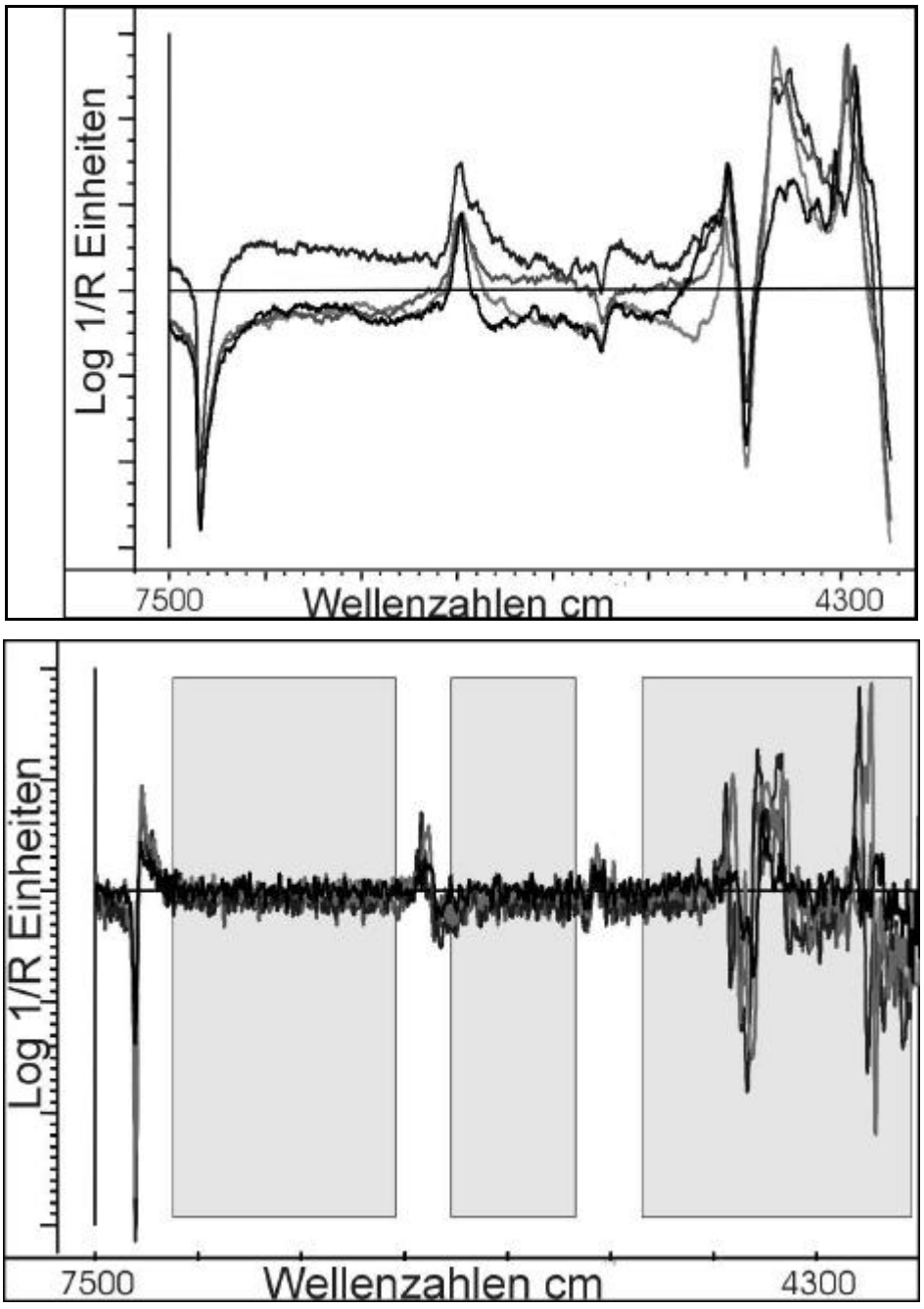
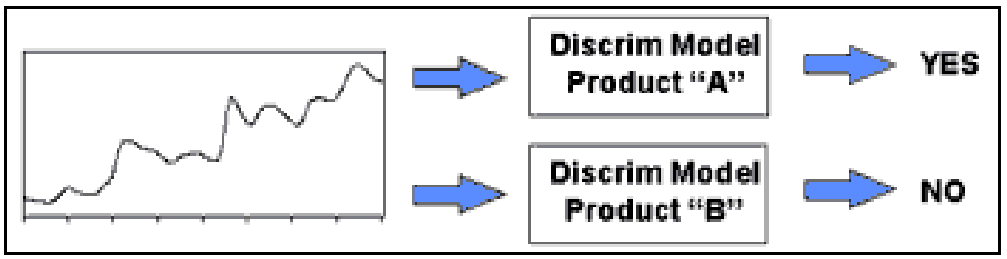


Abb. 5-4: Rohspektren und Spektren nach Datenvorbehandlung: grau unterlegt sind ausgewählte Wellenzahlenbereiche.

5.3.3Diskriminantenanalyse

Nach Erstellen eines PCA Modells benutzt man zur Vorhersage unbekannter Proben die Diskriminantenanalyse. Dabei wird zur Identifizierung einer Probe das Spektrum der unbekannten Probe gegen das aufgestellte und errechnete Modell verglichen.



(5-2)

Je nach gewähltem Algorithmus wird die Wahrscheinlichkeit angezeigt, dass ein Spektrum einem gewissen Modell entspricht (positive Identifizierung) oder das es nicht entspricht. Am besten geeignet ist dazu die Erstellung eines Diskriminanten-Modells für jede einzelne zu bestimmende Substanz mittels eines Testsets und die anschließende Kontrolle von der Qualität der Übereinstimmung und der Erkennung von Nicht-Übereinstimmung mit Hilfe von externen Validierungsproben. Der Grad der Übereinstimmung, also der „fit", kann durch mehrere statistische Kennzahlen bestimmt werden. Am häufigsten wird dabei die sogenannte Mahalanobis Distanz benutzt, aber auch F-Test und der Vergleich der Abweichungen des zu bestimmenden Spektrums mit dem aus den Hauptkomponenten errechneten kann herangezogen werden. PLSPlus/IQ der Firma Galactic hat im Gegensatz zum „Unscrambler™" die Möglichkeit, alle diese Diskriminanten gleichzeitig zu prüfen und anzuzeigen [84].

5.3.4Ergebnisse

Zur Feststellung der geeignetsten Modellparameter, Datenvorbehandlungen und einflussreichen Wellenlängen wurde als erstes eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit allen vier verschiedenen Benzodiazepinen gleichzeitig vorgenommen. Dazu wurden die Spektren der Benzodiazepine jeweils in fünf unterschiedlichen Konzentrationen aufgenommen. Es stellte sich heraus, dass ab einer Konzentration von weniger als 10 µg pro Spot keine Zuordnung mehr möglich war, das heißt, alle diese Spektren wurden in der PCA als Ausreißer identifiziert und von der weitern Modellrechnung ausgeschlossen.

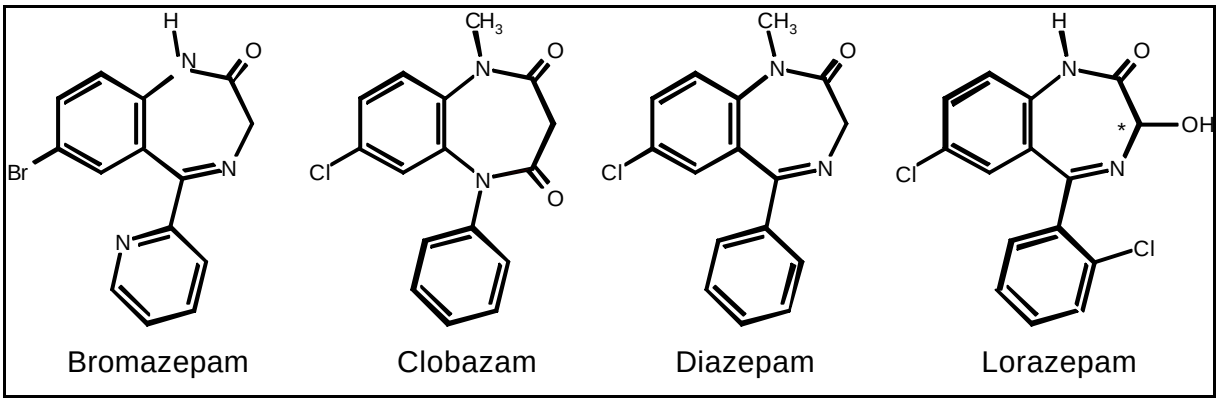


Abb. 5-5: Strukturformeln der 4 eingesetzten Benzodiazepine.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der NIR Spektren der Benzodiazepine generell und insbesondere gemessen auf den HPTLC-Platten, waren sehr viele Schritte der Datenvorbehandlungen nötig. Besonders wichtig dabei war die Benutzung der 1. Ableitung, da diese quantitative Unterschiede in den Spektren nivelliert. Bei Einsatz der 2. Ableitung waren die Unterschiede in den Spektren aufgrund der verschiedenen Konzentrationen von größerem Einfluss als die Unterschiede aufgrund der strukturellen Eigenschaften jedes Moleküls. Die Ergebnisse der PCA sind in Abb. 5-6 dargestellt. In diesem Scoreplot ist eine Clusterbildung der einzelnen Benzodiazepine gut zu erkennen.

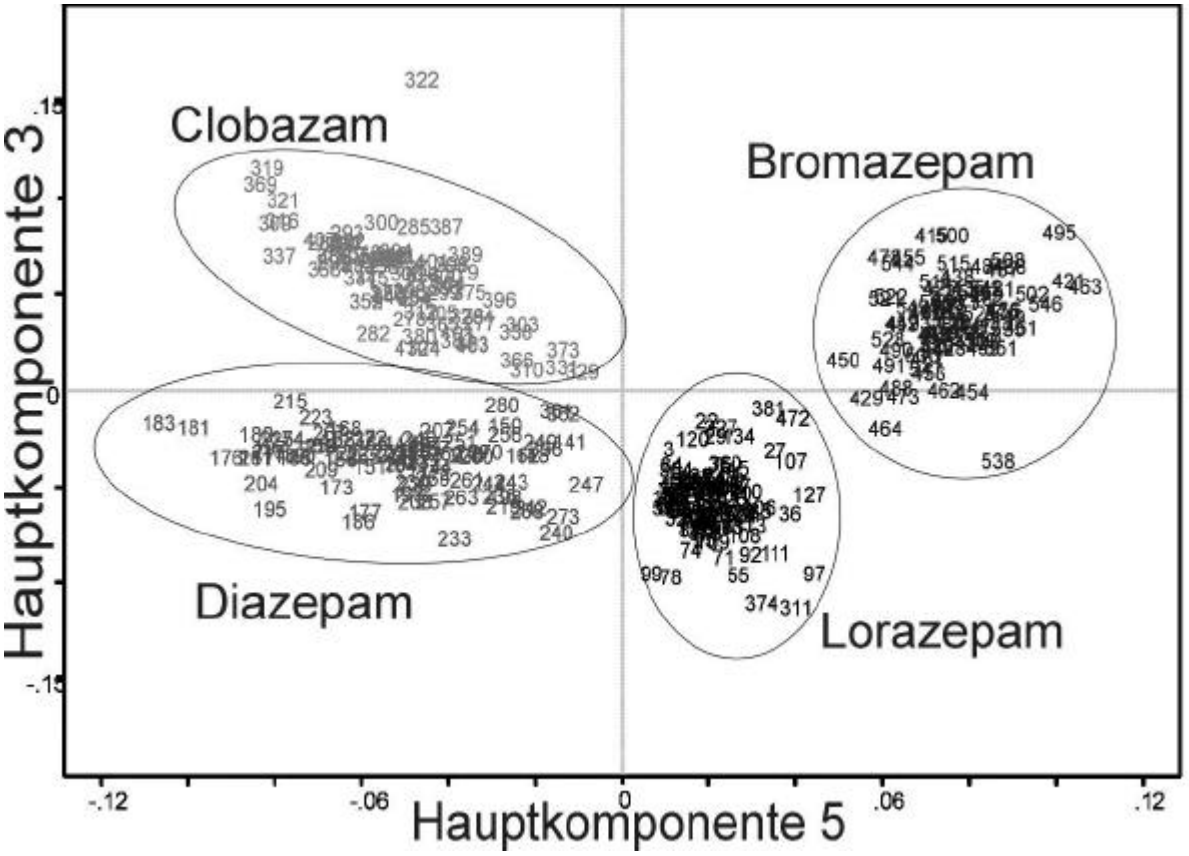


Abb. 5-6: Scoreplot der 3. und 5. Hauptkomponente aller Benzodiazepine.

Gleichzeitig jedoch sieht man, dass diese Auftrennung erst in der 3. und 5. Hauptkomponente deutlich wird. Deswegen wurden auch zur Diskriminantenanalyse jeweils Modelle erstellt, die über mehr als 5 Hauptkomponenten verfügen, um eine eindeutige und richtige Zuordnung der Validierungsspektren zu der Substanzklasse zu gewährleisten. Diese bestanden jeweils aus zwei Spektren des „richtigen“ also tatsächlichen Stoffes und aus abermals zwei Spektren der drei restlichen nicht-richtigen Benzodiazepine. Aufgrund der Ergebnisse der Hauptskomponenten-Analyse wurde die Diskriminantenanalyse nur mit den Spektren der Konzentrationen 30, 40 und 50 µg pro Spot durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-1 bis 5-4 aufgeführt. Entscheidend für die Auswertung der Mahalanobis

Distanz (M-Distanz) ist ein Wert unterhalb 3 (dreifache Distanz vom Mittelpunkt des Clusters), der F-Wert und darauf folgende F-Test werden anhand von Tabellenwerken (im Programm integriert) ausgewertet bei einem Signifikanzniveau von 0,25 [84]. Die Anzahl der Freiheitsgrade wird anhand der Hauptkomponenten jedes einzelnen Modells ausgerechnet. Spektrale Residuen sollen möglichst geringe Werte annehmen, um eine möglichst genaue Übereinstimmung mit dem aus den Hauptkomponenten rekonstruierten Spektrum zu erreichen.

Tabelle 5-1: Diskriminantenanalyse mittels Bromazepam-Modell.

B-Modell	stimmt	M-Distanz	Residuen	F-Wert	F-Test
Bromazepam	ja	0,545	0,0049	1,419	0,757
Bromazepam	ja	0,345	0,0047	1,369	0,748
Clobazam	nein	4,034	0,0144	4,128	0,950
Clobazam	nein	3,419	0,0126	3,646	0,935
Diazepam	nein	5,045	0,0172	4,955	0,967
Diazepam	nein	5,872	0,0194	5,597	0,975
Lorazepam	nein	8,170	0,0258	7,437	0,989
Lorazepam	nein	4,1734	0,0150	4,322	0,954

Tabelle 5-2: Diskriminantenanalyse mittels Clobazam-Modell.

C-Modell	stimmt	M-Distanz	Residuen	F-Wert	F-Test
Bromazepam	nein	9,519	0,1440	8,302	0,992
Bromazepam	nein	7,931	0,1245	7,179	0,988
Clobazam	ja	0,264	0,0154	0,980	0,643
Clobazam	ja	0,445	0,0170	0,981	0,667
Diazepam	nein	15,99	0,2242	12,92	0,998
Diazepam	nein	3,509	0,0557	3,210	0,919
Lorazepam	nein	3,221	0,0615	3,547	0,933

Lorazepam	nein	4,673	0,0811	4,675	0,962

Tabelle 5-3: Diskriminantenanalyse mittels Diazepam-Modell.

D-Modell	stimmt	M-Distanz	Residuen	F-Wert	F-Test
Bromazepam	nein	5.990	0,0770	6,873	0,986
Bromazepam	nein	3,729	0,0494	4,410	0,957
Clobazam	nein	5,786	0,0763	6,808	0,986
Clobazam	nein	6,149	0,0760	6,784	0,986
Diazepam	ja	0,289	0,0104	0,931	0,655
Diazepam	ja	0,273	0,0106	0,949	0,659
Lorazepam	nein	3,511	0,0492	4,390	0,957
Lorazepam	nein	4,189	0,0562	5,016	0,968

Tabelle 5-4: Diskriminantenanalyse mittels Lorazepam-Modell.

L-Modell	stimmt	M-Distanz	Residuen	F-Wert	F-Test
Bromazepam	nein	6,664	0,1123	8,937	0,991
Bromazepam	nein	6,977	0,1198	9,535	0,992
Clobazam	nein	4,814	0,0863	6,867	0,982
Clobazam	nein	4,916	0,0871	6,935	0,982
Diazepam	nein	4,797	0,0851	6,773	0,981
Diazepam	nein	3,736	0,0738	5,877	0,973
Lorazepam	ja	0,565	0,0227	1,810	0,805
Lorazepam	ja	0,594	0,0220	1,755	0,798

5.4 Quantifizierung

5.4.1Gram-Schmidt Vektororthogonalisierung

Für die universelle wellenlängenunabhängige Detektion wurde dieses Verfahren bereits 1977 in der GC-IR eingeführt [85] und von Glauninger [21] für die TLC-IR Kopplung übernommen. Das Gram-Schmidt Verfahren berechnet das Chromatogramm direkt aus dem Interferogramm der Probe durch Herauszeihen von N aufeinanderfolgende Punkten in der Nachbarschaft des Centerbursts jedes Interferogramms [86]. Diese N Punkte umfassenden Untermengen werden als Vektoren in einem N-dimensionalen Euklidischen Raum behandelt. Vor dem Abscannen einer HPTLC Platte wird ein orthonormaler Satz von M<N Basisvektoren aus M Hintergrundinterferogrammen mittels des aus der linearen Algebra bekannten Gram-Schmidt Orthonormalisierungsverfahrens aufgestellt. Der so bei einem Scan entstehende Chromatogrammdatenpunkt wird dann als Vektordifferenz zwischen dem N-Punkt Probenvektor und dessen Projektion auf die M-Vektor Basis berechnet. Spektrale Veränderungen über den gesamten Detektionsbereich werden somit gleichzeitig angezeigt und man erhält ein Chromatogramm ähnlich einer FID-Detektion. Bei der angewandten Methode werden die Interferogramme zur Berechnung der Basis vor der eigentlichen Messung auf einem leeren Teil der Platte möglichst in der Nähe der zu bestimmenden Substanzen aufgenommen. Die Berechnung einer Gram-Schmidt Spur erfolgt dann in Echtzeit parallel zur Aufnahme der Daten, sodass das Chromatogramm zu jedem Zeitpunkt der Messung zur Verfügung steht, also on-line. Da die Spektren und Chromatogramme jederzeit aus den Interferogrammen in Kubelka-Munk Einheiten oder in log 1/R Einheiten umgerechnet werden können und der lineare

Zusammenhang zwischen Konzentration und Reflexionseinheit in der DRIFT-Technik von der totalen Konzentration abhängig ist, werden im allgemeinen beide Möglichkeiten getestet und pragmatisch die geeignetere ausgewählt [22].

5.4.2Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte nach Auswahl in log 1/R Einheiten. Zur Bestimmung der Kalibrierfunktion wurden von fünf Platten Gram-Schmidt Spuren aufgenommen und diese dann basislinienkorrigiert und integriert.

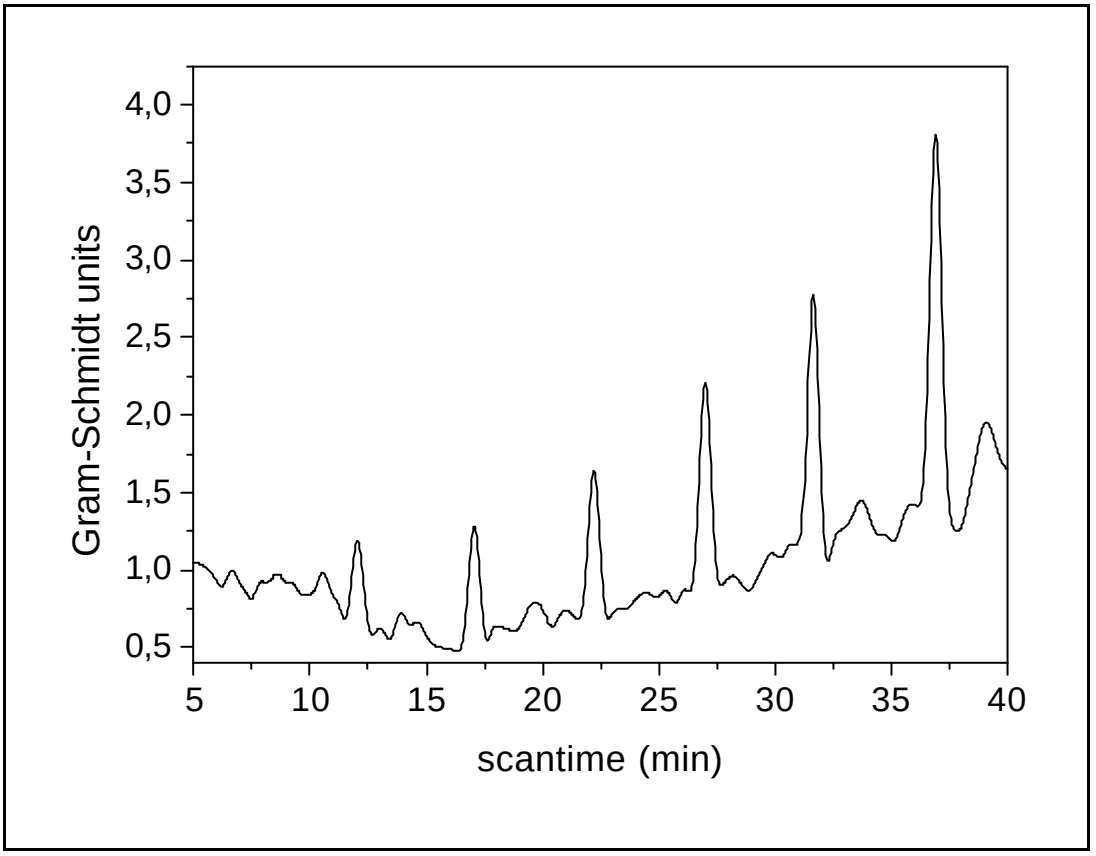


Abb. 5-7: Gram-Schmidt Spur von Koffein 1,2 bis 2,5 µg pro Spot.

Die Fläche unter den Kurven wurde gegen die Konzentrationen aufgetragen. Um eventuelle Lösungsmitteleffekte zu vermeiden und die Daten des Koffeins genau mit denen von O. Frey [22] vergleichen zu

können, wurde auf eine Entwicklung der Platten verzichtet, da kein Trennungsproblem eines Gemisches zur Diskussion stand. Um eventuelle Platteneffekte zu minimieren wurden die Konzentrationsreihen immer in verschiedenen Reihenfolgen aufgetragen, was angesichts der Inhomogenität der handgestrichenen Platten einen sinnvollen Schritt darstellte. Die damit erhaltenen Chromatogramme werden durch Abb. 5-7 repräsentiert. Dabei sieht man deutlich das große Rauschen der Basislinie, welches durch die Inhomogenitäten der Platten entstanden ist. Zur Berechnung der Verfahrenskenndaten wurden jeweils 10 Werte im oberen und unteren Bereich ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Kap. 6.3.3 zusammengefasst. Die Verfahrensstandardabweichung liegt mit 2.97 % gerade unterhalb der maximal tolerierbaren von 3 % [87], sodass die Kalibration akzeptabel ist.

5.5 Diskussion

Die gezeigte Arbeit macht deutlich, dass eine Unterscheidung und Identifizierung mittels HPTLC-FT-NIR Kopplung möglich ist. Jedoch bestehen zwei Probleme, welche die Anwendung einschränken. Im Gegensatz zu der Kopplung im MIR können die Substanzen nicht einfach über eine Spektrenbibliothek identifiziert werden. Diese Bibliothekssuche nimmt nur einen Zeitaufwand von wenigen Sekunden in Anspruch. Hier hingegen musste erst die sehr aufwendige und zeitraubende Hauptkomponentenanalyse durchgeführt werden, die anschließend durch eine Diskriminantenanalyse vervollständigt wurde. Dennoch ist damit zum ersten Mal die Identifizierung und Klassifizierung von strukturell verwandten Substanzen mittels multivariater Analyse gelungen, Vorarbeiten von Ciurczak et al. [80] postulieren zwar auch eine Identifikationsmöglichkeit, jedoch arbeiten sie mit Hilfe einer initial erstellten Spektrenbibliothek, deren Zuverlässigkeit aufgrund der

Komplexität der NIR Daten in Frage zu stellen ist. Weiterhin geben sie keine Konzentrationen für die von ihnen aufgenommen Spektren an, somit ist eine Einschätzung der Identifizierungsgrenze leider nicht möglich. Das hier vorgestellte Verfahren ist hingegen erfolgreich einsetzbar und in der Lage, zuverlässig richtige Ergebnisse zu liefern. Jedoch gilt dies nur für den für die normale Dünnschichtchromatographie hohen Konzentrationsbereich von 30 µg pro Spot aufwärts. Hier liegt das Problem, denn möchte man beide Methoden direkt koppeln, sollte es möglich sein, vor der spektroskopischen Analyse eine Trennung vorzunehmen. Bei einem Konzentrationsbereich von über 30 µg kommt man jedoch schon einem Überladen des dünnschicht-chromatographischen Systems nahe, gleichzeitig muss man durch die Entwicklung einer Platte mit Diffusionseffekten rechnen, welche die Konzentrationen im Peakmaximum gegenüber der direkten Aufsprühmethode deutlich verringern. Somit ist die Identifizierung mittels HPTLC-FT-NIR in jedem Falle sehr spezifischen und komplexen Problemen vorbehalten, wie die sehr schwierige Analyse von Polyglykolen. Diese sind im Mittelinfrarot nicht voneinander zu unterscheiden, da sie sich nur in Gerüstschwingungen des Fingerprintbereichs unterscheiden, welcher der HPTLC-FTIR Kopplung wegen des eingeschränkten spektralen Bereichs nicht zur Verfügung steht. Gleichzeitig ist die HPLC Analytik dieser Stoffe mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, da eine Auswertung im UV/VIS Bereich aufgrund des mangelnden Chromophors nicht möglich ist. Hier wäre also die ansonsten aufwendige Methode sehr sinnvoll zum Einsatz zu bringen.

Während die für die Identifizierung geltenden Einwände bei der Quantifizierung auch eine gewisse Rolle spielen, steht uns doch hier dank der Gram-Schmidt Technik eine schnelle, universelle, wenn auch

unspezifische Detektionsmethode mit Hilfe der direkten HPTLC-FT-NIR Kopplung zur Verfügung. Diese erlaubt es im Vergleich mit den bisher veröffentlichten Daten [79, 88] eine Reduzierung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Koffein-Kalibration, die im Bereich von ein bis zwei Zehnerpotenzen niedriger liegt. Gleichzeitig ist sie deutlich schneller und das resultierende Chromatogramm wesentlich besser hinsichtlich Grundrauschen und Peaksymmetrie. Jedoch muss auch hier die deutlich schwächere Absorption des Nahinfrarots in Betracht gezogen werden. Im Vergleich zu den Kalibrationswerten für Koffein, die Frey [22] im Mittelinfrarot ermittelt hat, wird dieser Effekt sehr deutlich. Er errechnete für die Bestimmung von Koffein im Mittelinfrarot bei Anwendung der Gram-Schmidt Technik eine theoretische Nachweisgrenze von 32 ng und eine theoretische Bestimmungsgrenze von 79 ng pro Spot. Die Natur dieser beiden Kenngrößen ist aber zu beachten. Zwar sind beide rechnerisch zu ermitteln und liegen in Falle der NIR-Kopplung bei 0,51 bzw. 0,73 µg pro Spot. Dabei handelt es sich jedoch um theoretische Kenngrößen der Statistik der aufgestellten Kalibrierfunktion, nicht um reale Beziehungen zwischen detektierbarem Signal und Grundrauschen. Eine visuelle Auswertung der Chromatogrammspur zeigt aber deutlich, dass 1,2 µg pro Spot eindeutig als Peak vom Grundrauschen zu trennen und zu integrieren sind. An dieser Stelle muss wiederum an die oben erwähnte Problematik der wirklichen Identifizierung erinnert werden. Wie sich gezeigt hat, liegt die tatsächliche Identifizierungsgrenze der Diskriminanten- und Hauptkomponentenanalyse bei ca. 30 µg pro Spot, ein deutlich höherer Wert als die theoretisch errechnete Bestimmungsgrenze der Koffein-Kalibration. Bei den ansonsten für NIR Kalibrationen eingesetzten Stoffmengen und Konzentrationsbereichen ist aber eine Identifizierungsgrenze von 30 µg pro Spot extrem niedrig und erlaubt

zum erstenmal den Einsatz der NIRS in einem Bereich, der deutlich unterhalb der mg Grenze liegt. Somit ist eine Quantifizierung von Substanzen ohne ausgeprägtes chromophores System eine sinnvolle Anwendungsmöglichkeit dieser Kopplungstechnik. Denn die hervorragenden Werte für Koffein im Mittelinfrarot beruhen selbstverständlich auch auf der starken Absorptionsintensität der Carbonylbanden bei 1703 und 1658 cm^{-1}, die uns im Nahinfrarot nicht zur Verfügung stehen.

Tatsächlich hat sich die Hoffnung, dass der Wegfall der Matrixeinflüsse durch den Einsatz der nahen Infrarotspektroskopie einen so großen Vorteil gegenüber der schwächern Intensität derselbigen bringen wird, in dieser Arbeit nicht bestätigen lassen. Nichtsdestotrotz ist der Einsatz dieser Kopplung bei speziellen Trennungs- und Detektionsproblemen eine Alternative, die zwar arbeitsaufwendig aber vielversprechend scheint. Dies ist jedoch in jedem Falle nur bei Verwendung von Fourier-Transformation Technik garantiert, da nur durch diesen Einsatz eine echte on-line Kopplung beider Methoden in einem vernünftigen Zeitrahmen möglich ist.

6 Experimenteller Teil

6.1 Validierung der Gehaltbestimmungsverfahren

6.1.1Kalibrierung

Die Kalibrierung des HPLC-Verfahrens wurde nach Funk, Kromidas und den ICH Guidelines zur Validierung von Analysenmethoden durchgeführt [63, 89, 90]. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte über die Peakflächen. Zur Herstellung der Kalibrierfunktionen wurden methanolische Lösungen durch Verdünnen hergestellt. Die Validierung eines Verfahrens ist der Prozess der Sicherstellung der Eignung einer analytischen Prozedur für ihren vorgesehnen Zweck.

6.1.2Arbeitsbereiche

Für beide zu quantifizierenden Substanzen wurde ein Arbeitsbereich definiert und jeweils eine Kalibrierfunktion mit 7 äquidistanten Messpunkten erstellt. Die Festlegung der Arbeitsbereiche wurde anhand der Methodenentwicklung festgelegt.

6.1.3Prüfung auf Normalverteilung

Normalverteilte Daten sind Voraussetzung für alle folgenden statistischen Tests und Prüfungen [91]. Die Normalverteilung ist eine Wahrscheinlichkeitsverteilung, die nur von zufälligen Fehlern, dem Mittelwert und der Standardabweichung abhängt. Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Test nach David durchgeführt. Die Werte sind mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% normalverteilt, wenn sich der Quotient aus der Spannweite der Daten und der Standardabweichung s

innerhalb der Grenzwerte befindet (untere Schranke g_u = 2.51, obere Schranke g_o = 4.24).

6.1.4Linearität

Zur Berechnung der Analysenwerte muss zunächst die Funktion berechnet werden, welche die beste Anpassung an die Werte der Kalibrierpunkte besitzt. Linearität der Funktion ist für die weiteren Berechnungen der statistischen Kenngrößen Vorraussetzung, da für Polynome höheren Grade andere Berechnungen herangezogen werden müssen. Die Linearität wurde mit Hilfe des Anpassungstests nach Mandel überprüft [89]. In diesem Test werden die Rest-Standardabweichungen der linearen und polynomischen Regression in Abhängigkeit der verwendeten Standardkonzentrationen verglichen und die Prüfgröße einem tabellierten F-Wert gegenübergestellt.

6.1.5Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit oder systemische Abweichung (Bias) ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem aus der Regressionsanalyse erhaltenen Mittelwert und dem wahren Wert. Die Richtigkeit wurde mit jeweils 10 Proben im unteren, mittleren und oberen Bereich der Kalibrierfunktion überprüft [90]. Angegeben wird die relative systematische Abweichung in Prozent (d_{rel}).

$$d_{rel} = \frac{\left| x_{soll} - \bar{x} \right|}{x_{soll}} \cdot 100 \qquad (7\text{-}1)$$

Die Präzision ist das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen, durch die zufällige Fehler erfasst werden. Als Maß dient die

Standardabweichung s oder der Variationskoeffizient VK. Zur Berechnung der Präzision an den oberen und unteren Arbeitsbereichgrenzen wurden die Einzelwerte der Zehnfachbestimmungen benutzt.

$$VK = \frac{\sqrt{s^2}}{\bar{x}} \cdot 100 \qquad (7\text{-}2)$$

6.1.6Verfahrensstandardabweichung

Dieser Parameter beschreibt den Quotienten der Reststandardabweichung und der Steigung der Regressionsgeraden. Die relative Verfahrensstandardabweichung ermöglicht den Vergleich verschiedener Analysenverfahren.

$$V_{xo} = \frac{(S_{xo} \cdot 100)}{\bar{x}} \qquad \text{wobei} \qquad S_{xo} = \frac{sdv(x)}{a_1} \qquad (7\text{-}3{,}4)$$

6.1.7Messgröße und Vertrauensbereich

Beim Errechnen der Analysenfunktion aus der Kalibrierfunktion ergibt sich ein Punktschätzwert für die wahrscheinlichste Konzentration, der ohne Angabe eines Intervallschätzers wertlos bleibt. Der Analysenfehler setzt sich aus dem Fehler bei der Bestimmung des Analysenwertes und dem Fehler der Kalibrierfunktion zusammen. Die Quadrate der Absolutfehler addieren sich. Aus dem Fehlerfortpflanzungsgesetzt folgt ein durch zwei Hyperbeläste begrenztes Prognoseintervall. Der Vertrauensbereich (VB) ist umso größer, je weiter man vom Datenschwerpunkt entfernt ist (Fehlertrompete).

$$VB_{(\hat{x})} = \frac{sdv(x)}{a_1} \cdot t \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{N}} + \frac{(\hat{y} - \bar{y})}{a_1^2 \cdot \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (7\text{-}5)$$

6.1.8Theoretische Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die kleinste Menge oder Konzentration eines Stoffes, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit bei einmaliger Analyse mit einem Fehlerrisiko von 5% qualitativ nachgewiesen werden kann, wird als Nachweisgrenze bezeichnet. Unter der Bestimmungsgrenze eines Analysenverfahrens versteht man analog diejenige kleinste Menge oder Konzentration eines Stoffes, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit bei einmaliger Analyse mit einem Fehlerrisiko kleiner/gleich 5% quantitativ nachgewiesen werden kann [92]. Die Nachweis- (XN) und Bestimmungsgrenzen (XB) wurden rechnerisch aus den Kalibrierkenndaten ermittelt [89].

$$XN = 2 \cdot \frac{sdv(x) \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (7\text{-}6)$$

$$XB = \frac{y_h - a_0}{a_1} + \frac{sdv(x) \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (7\text{-}8)$$

6.2 HPLC

6.2.1Materialien

6.1.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien entsprachen p.a. Qualität und wurden von den Firmen Merck, Rathburn und Sigma bezogen. Bidestilliertes Wasser für die HPLC wurde im Technologischen Institut der Universität Tübingen hergestellt. Biapigenin wurde als reine Standardsubstanz von Firma Roth bezogen. Hyperforin wurde von H. Orth am Technologischen Institut der Universität Tübingen isoliert [53] und im Pharmazeutischen Institut selbst zur Verwendung als Standardsubstanz durch semi-präparative HPLC aufbereitet. Dazu wurde die Hauptfraktion aufgefangen, unter Lichtschutz gelagert, unter Stickstoffschutzatmosphäre das Lösungsmittel entfernt und das entstandene Produkt über Nacht unter Lichtschutz lyophilisiert. Johanniskrauttrockenextrakte wurden freundlicherweise durch die Firmen Finzelberg und Lichtwer Pharma bereitgestellt.

6.1.1.2 Säulen

Die semi-präparative HPLC des Hyperforins der Trockenextrakte erfolgte mit einer LiChroCART® 250-4 LiChrospher® RP 18 (5µm) HPLC Kartusche. Die quantitativen und ESI-MS Messungen wurden mit einer Grom-Sil® 120 ODX-4 HE (5 µm, 250 x 4 mm) Säule mit dazugehöriger Vorsäule (5 µm, 10 x 4 mm) der Firma Grom Analytik + HPLC Ltd, Herrenberg durchgeführt.

6.1.1.3 Geräte

Zur HPLC- Methodenentwicklung und Aufbereitung des Hyperforins wurde eine Anlage bestehend aus einer Gradienten-Pumpe der Firma Koltron, einem Probenaufgabeventil Modell 7125 der Firma Rheodyne, einem Waters 991 Photodiodenarray-Detektor und einem Waters 5200 Printer Plotter eingesetzt.

Die HPLC-Station zur Untersuchung der Trockenextrakte bestand aus einer Gradienten-Pumpe L 6200 A, einem LaChrom Autosampler L 7200 und einem L 4250 UV-VIS-Detektor der Firma Merck. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch ein D-7000 Interface Modul und der D-7000 Software der Firma Merck.

Ein API III TAGA 6000 E Tripel-Quadrupol Massenspektrometer der Firma Sciex, Kanada mit einer Elektrospray Ionenquelle und einem m/z Bereich von 2400 Da wurde für die ESI-MS Messungen eingesetzt.

Zur Überprüfung der Identität des gereinigten Hyperforins mittels Massenspektrometrie wurden EI-MS-Spektren mit einem Finnegan TSQ 70 Gerät (Ionisierungsenergie 70 eV, Quellentemperatur 200°C) erstellt.

6.2.2Spektroskopie

6.2.2.1 UV-VIS Diodenarray

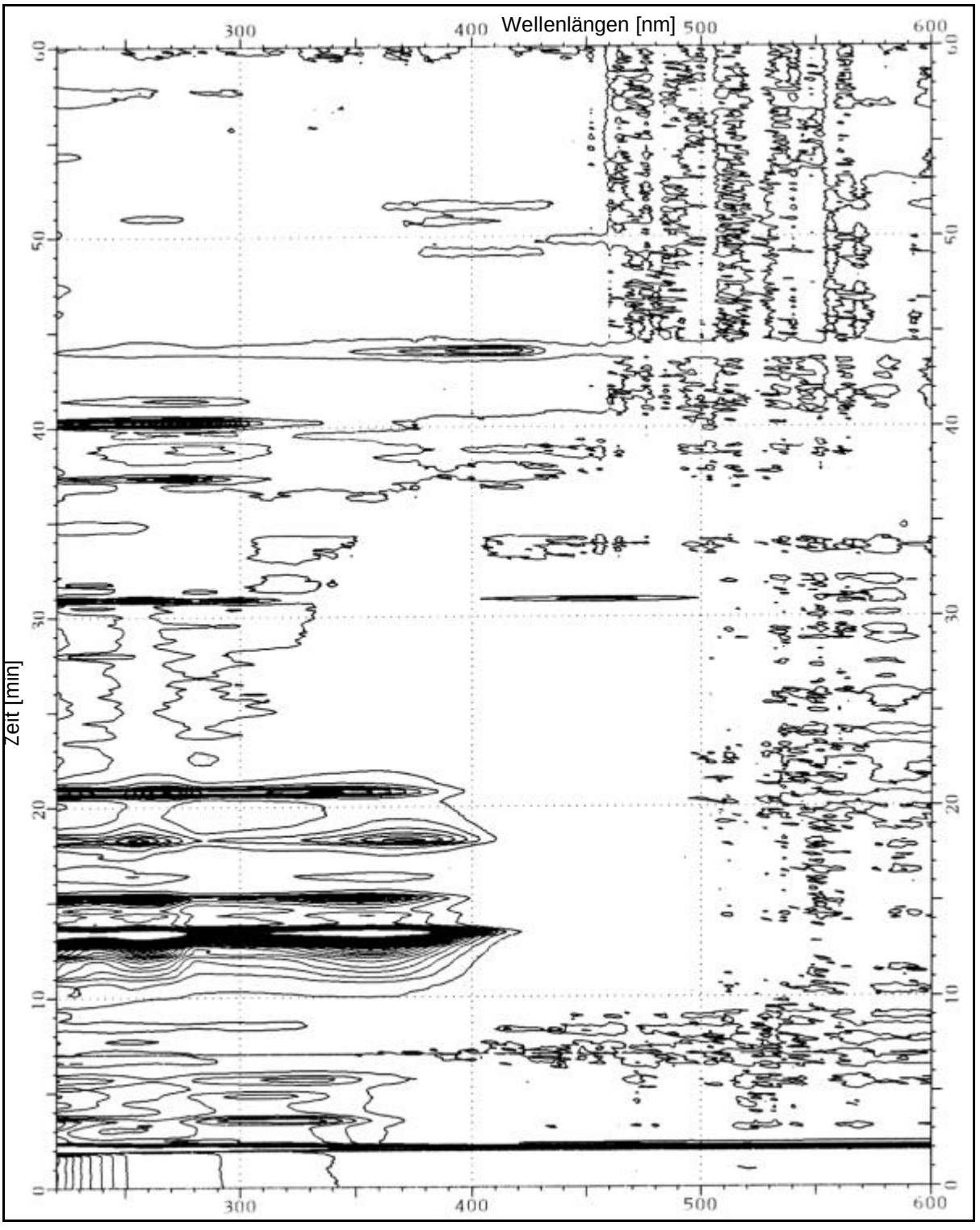


Abb. 6-1: Contour Plot des UV-DAD Chromatogramms einer Trockenextraktanalyse (Hyperforin: 40,5 Min; Biapigenin: 20,7 Min).

6.2.2.2 Massenspektroskopie

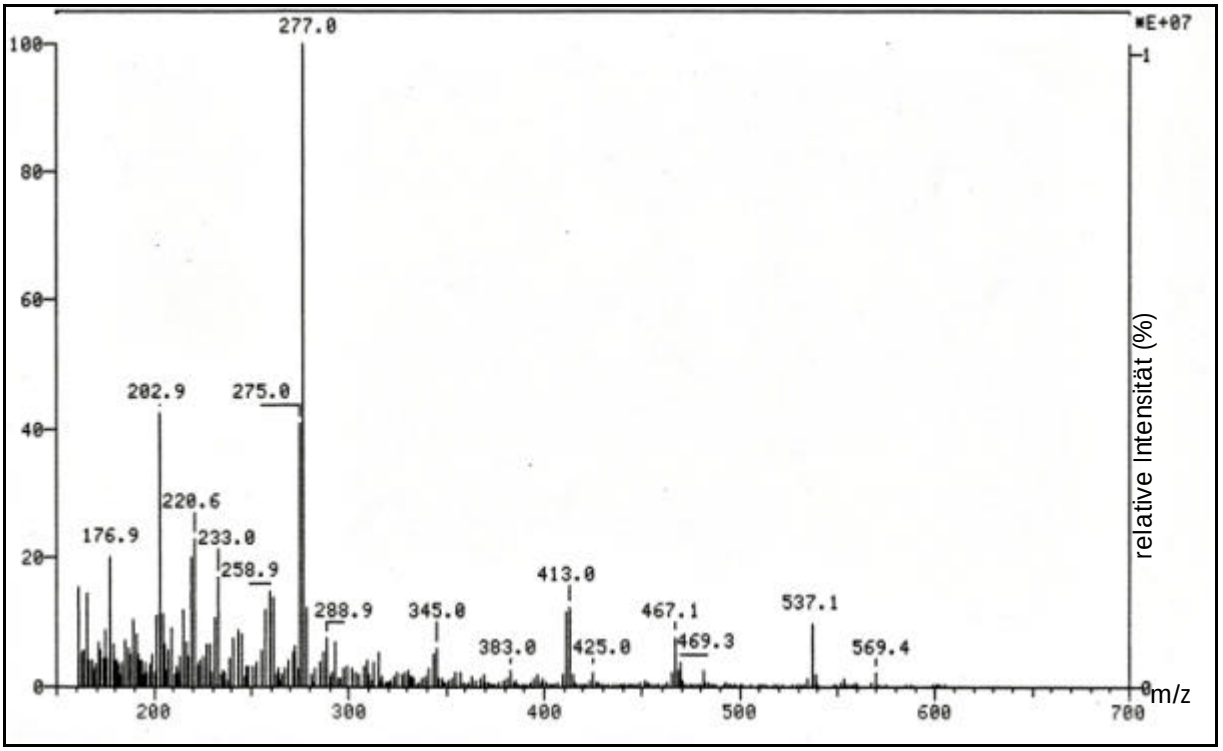


Abb. 6-2: EI-MS Hyperforin gereinigter Standard (MG 537 Da).

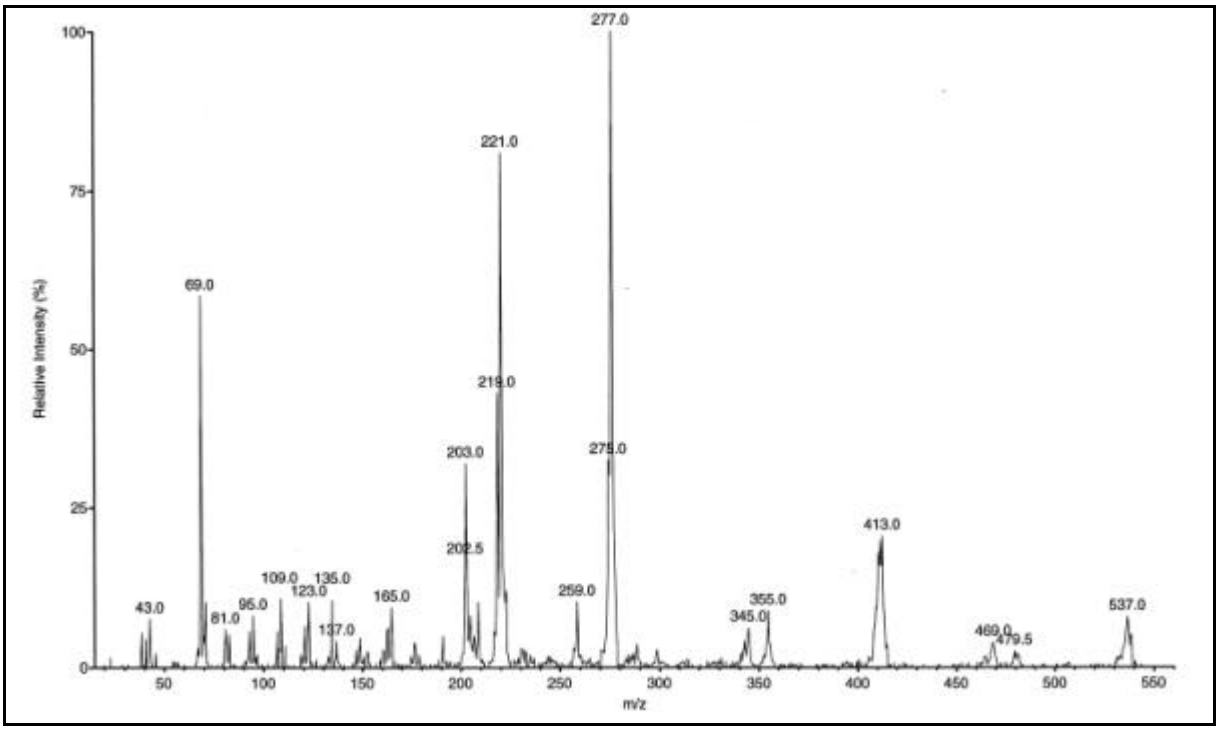


Abb. 6-3: ESI-MS Hyperforin (Tochterionenspektrum; MG 537 Da).

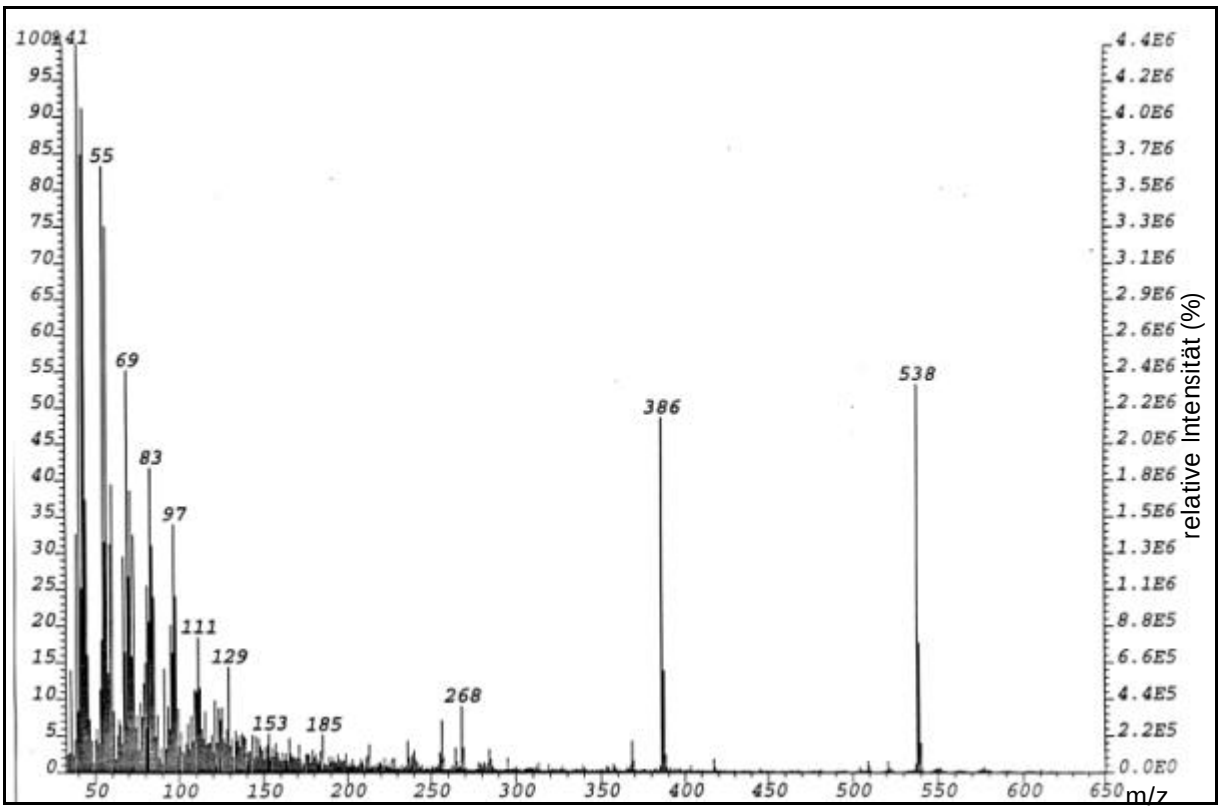


Abb. 6-4: EI-MS Biapigenin (Original der Fa. Roth; MG 538 Da).

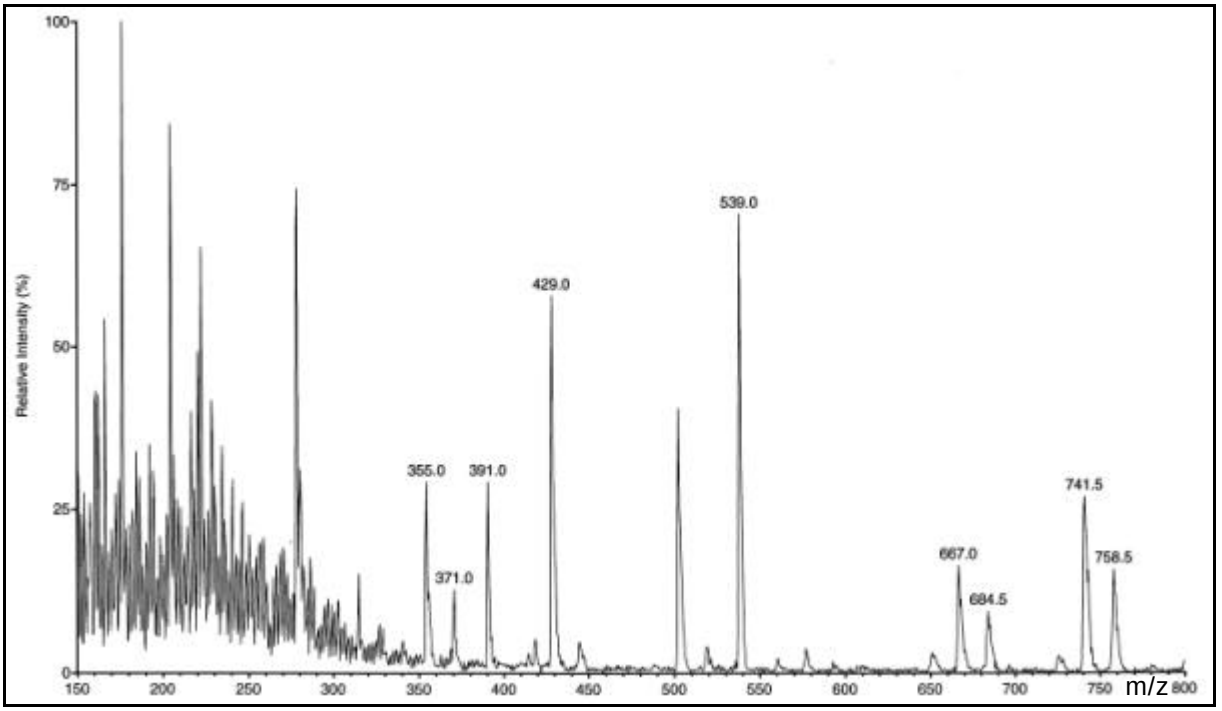


Abb. 6-5: ESI-MS Biapigenin (Mutterionenspektrum, positiv Mode: MG 538 + H^+).

Die EI- und ESI-MS Spektren entsprechen mit guter Übereinstimmung denen der gängigen Literaturstellen [45, 53, 56, 58]. Durch die Aufnahme des Tochterionenspektrums des Hyperforins sieht man ein im Prinzip dem EI-Spektrum entsprechendes Aufspaltungsmuster. Die Peaks in den höheren Massenbereichen des Mutterionenspektrum von Biapigenin, bei dem aus technischen Gründen eine Aufnahme des Tochterionenspektrums nicht möglich war, entstehen durch Adduktbildung und Dimerisierung im Elektrospray.

6.2.3Chromatographische Methode

6.2.3.1 Standard- und Probenvorbereitung

Die Identität und Reinheit von Hyperforin und Biapigenin wurden durch HPLC Photodiodenarray-Detektion (DAD, s. Abb. 6-1); Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit Elektrospray Ionisierung (LC-ESI-MS) und Elektronen-Stoß Ionisation direkt aus der Substanz sichergestellt. Beide Standardsubstanzen wurden in Methanol gelöst und zu sieben äquidistanten Konzentrationen in den passenden Arbeitsbereichen verdünnt.

Die Johanniskrauttrockenextrakte wurden in Methanol gelöst und auf Konzentrationen von circa 20 mg/ml verdünnt. Vor der Injektion in das HPLC System wurden die Lösungen durch Polytetrafluorethylen-Membranfilter (Rezist 30/0,2 PTFE, 0,2 µm, Schleicher & Schüll) von produktionsbedingten Schwebstoffen befeit. Vom entstandenen Filtrat wurde die Mittelfraktion zur Analyse eingesetzt. Die Konzentration der Extrakte betrug circa 20 mg/ml, das Injektionsvolumen lag bei 30 µl.

6.2.3.2 Chromatographisches Verfahren

Die Detektion beider Substanzen erfolgte bei 268 nm, gemessen in Absorption. Dadurch war eine Messung beider Substanzen in ihrer jeweiligen Flanke des Absorptionsmaximums möglich (s. Abb. 6-1). Als mobile Phase wurde ein linearer Gradient aus 0,1 % TFA in Wasser (mobile Phase A) und Methanol Gradient grade® (mobile Phase B) eingesetzt. Das System wurde nach Beendigung eines Laufes 5 Minuten äquilibriert. Der Gradient setzte sich wie folgt zusammen (Tab. 6-1). Die Flussrate wurde bei 1,0 ml/min konstant gehalten.

Tabelle 6-1: Zusammensetzung und Zeitabfolge des Gradienten.

Zeit [min]	Mobile Phase A [%]	Mobile Phase B [%]
0	70	30
0 –30	10	90
30 – 50	0	100
50 – 60	0	100
60 – 65	70	30
65 – 70	70	30

6.2.3.3 Quantitative Auswertung und Verfahrenskenndaten

Die Quantifizierung des Hyperforin- und Biapigeningehaltes erfolgte über die Peakflächen der Chromatogramme, wobei die Kalibrierfunktion auf Dreifachmessungen jeder Konzentration beruht, bis auf die niedrigsten, mittleren und höchsten Konzentrationen, die durch Zehnfachmessungen bestimmt wurden. Die so erhaltenen Mittelwerte der Peakflächen wurden gegen die Konzentration aufgetragen, um die jeweiligen Regressionsgeraden zu erhalten. Die Richtigkeit der erhaltenen Werte wurde durch Vergleichswerte einer Alternativmethode belegt. Aufgrund

der mangelnden Stabilität des Standards Hyperforin wurde auf Wiederholungsmessungen der Standardlösungen zum Belegen der Robustheit der Methode verzichtet. Da aber über den gesamten Messzeitraum konsistente Werte im Vergleich zur Alternativmethode gefunden werden, kann das System als hinreichend robust eingestuft werden.

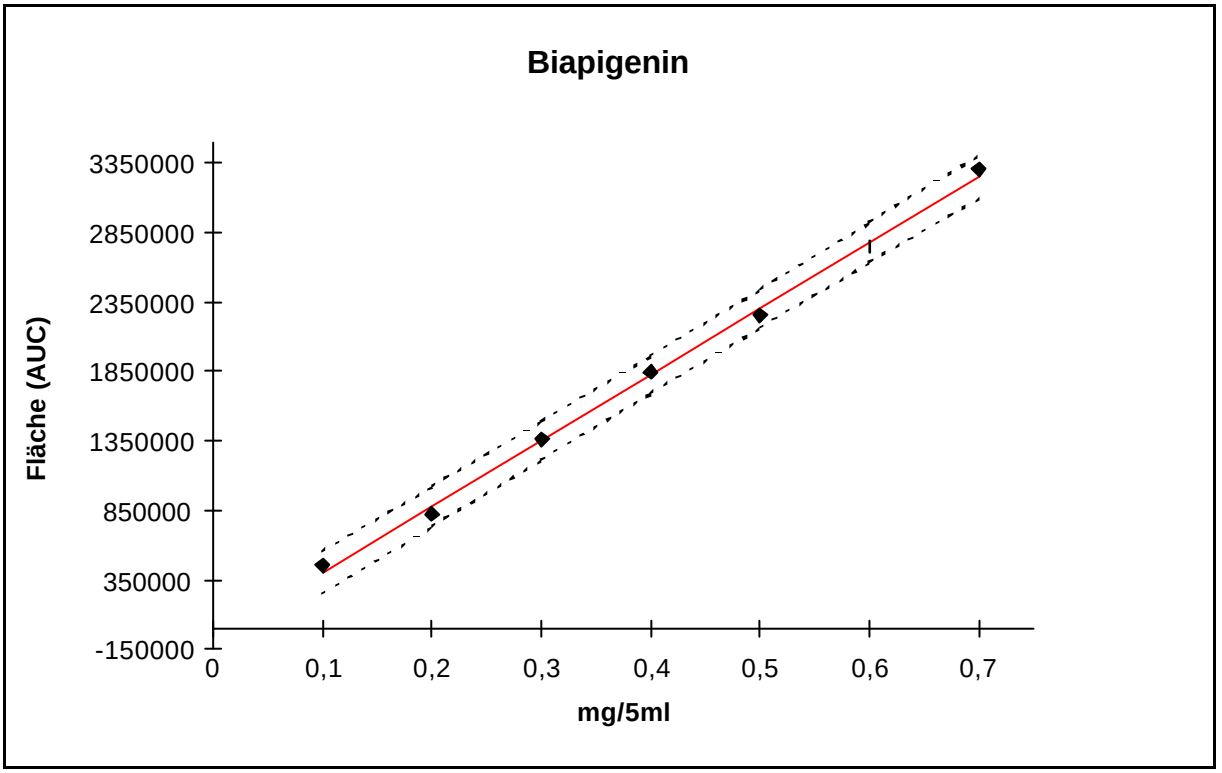


Abb. 6-6: Kalibrierkurve der Standardkonzentrationen des Biapigenins.

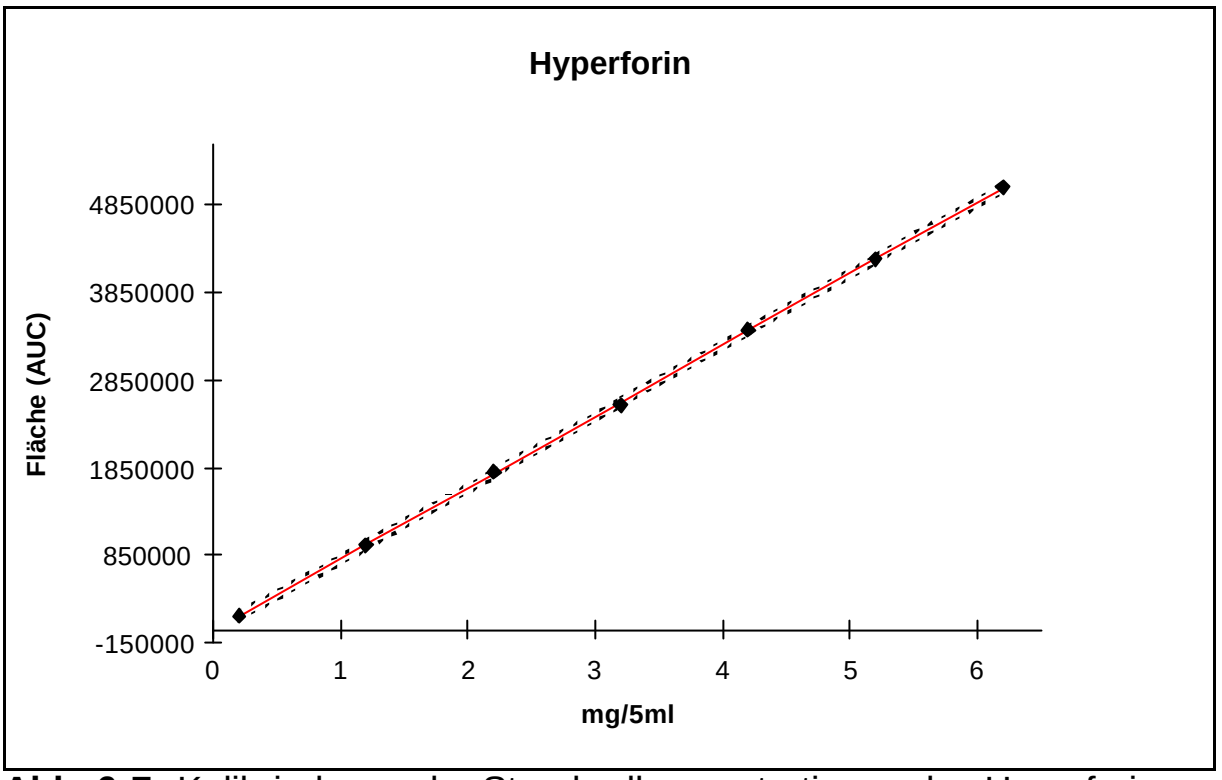


Abb. 6-7: Kalibrierkurve der Standardkonzentrationen des Hyperforins.

Die statistischen Daten der Kalibrierung sind in Tabelle 6-2 wiedergegeben. Der Linearitätstest nach Mandel (s. 6.1.4) ergab keine signifikant bessere Anpassung einer Regressionskurve 2. Ordnung. Bei allen Funktionen lag Normalverteilung vor.

Tabelle 6-2: Kalibrierkenndaten des HPLC-Verfahrens.*

Parameter	Hyperforin	Biapigenin
Arbeitsbereich (mg/ml)	0,2 – 6,2	0,1 – 0,7
Kalibrierpunkte	7	7
Steigung (*a*)	816019	4746694
Achsenabschnitt (*b*)	-11698	-71178
Korrelationskoeffizient (r^2)	0,9999	0,9990
Theoretische Nachweisgrenze XN (mg/ml)	0,13	0,07
Theoret. Bestimmungsgrenze XB (mg/ml)	0.20	0,10

Richtigkeit (d_{rel}), (%)	1,75	1,37
Präzision (VK), (%)	1,47	1,48
Relative Verfahrensstandardabweichung(%)	0,67	2,61

*für: y = ax + b mit y: Konzentration und x: Peakfläche

Die Ergebnisse für die analysierten 35 Extrakte sind in Tab. 6-3 zusammengefasst, wobei zur Kennzeichnung intern neue Namen vergeben wurden. Die zum Teil großen Konzentrationsunterschiede zwischen den Johanniskrauextrakten beruhen in erster Linie auf verschiedenen Lagerungen und ihren jeweiligen Alter.

Tabelle 6-3: Hyperforin- und Biapigeningehalt der Extrakte.

Bezeichnung	Gehalt Hyperforin [%]	Gehalt Biapigenin [%]
F 18	4,05	0,31
F 17	2,35	0,35
F 02	0,50	0,29
F 08	2,64	0,23
F 04	1,64	0,13
F 11	2,74	0,28
F 01	1,09	0,23
F 09	3,47	0,36
F 10	3,42	0,33
F 21	2,36	0,27
F 19	1,65	0,37
F 15	2,35	0,33
F 12	3,90	0,35
F 03	2,10	0,22
F 13	3,79	0,24

F 06	1,88	0,42
St-F-9722	1,74	0,31
St-I-9703	1,26	0,39
S 1	7,61	0,31
L 4	4,10	0,51
L 1	5,29	0,53
L 5	5,53	0,45
St-I-9806	4,03	0,33
St-F-0015	3,85	0,52
F 16	1,39	0,38
F 05	2,30	0,24
F 20	2,36	0,26
L 3	5,05	0,45
F 14	4,97	0,40
St-F-9803	0,78	0,43
St-M-9804	4,46	0,36
St-I-0044	4,53	0,24
L 2	4,46	0,51
St-F-9805	1,74	0,36
F 07	0,99	0,23

6.3 Instrumentelle HPTLC

6.3.1Materialien und Geräte

Ausgangsmaterialien waren Bromazepam, Clobazam, Diazepam, Lorazepam und Koffein aus Beständen der Pharmazeutischen Chemie. Die Substanzen wurden in Methanol p.a. Qualität (Merck) gelöst und mit Hilfe eines Linomat IV (Camag, Muttenz) automatisch in 4 mm breiten Banden aufgesprüht. Die Geschwindigkeit betrug 8 Sekunden pro µl.

Vom rechten Plattenrand wurde ein Abstand von 1,5 cm gewählt, zwischen den Bahnen 1,0 cm frei gelassen. Die Abstände der Bahnen in die Höhe betrug ebenfalls 1,0 cm.
Als stationäre Phase wurden spezielle, in Zusammenarbeit mit der Firma Merck (Darmstadt) im Rahmen einer früheren Arbeit entwickelte Dünnschichtplatten eingesetzt [76]. Sie bestehen aus handgestrichenem Kieselgel 60 und Magnesium-Wolframat (50%) mit einer Schichtdicke von 100 µm und neutralem Bindemittelzusatz.

6.3.2Aufnahmetechnik

Wie bereits in Kapitel 5.2 erläutert, wurde die GC-IR Software der Firma Bruker erfolgreich in der Kopplung von MIR Spektroskopie und Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Durch das Vektororthogonalisierungsverfahren nach Gram-Schmidt steht eine wellenlängenunabhängige Methode zur Erstellung von Chromatogramm - Spuren zur Verfügung, die auch zur Lokalisierung von Substanzflecken auf der Dünnschicht - Platte dienen kann. Vor der eigentlichen Messung wurden die Referenzinterferogramme auf einer leeren Bahn mit den Parametern der Messung aufgenommen. Der Messtisch wurde dafür diskontinuierlich mit einer Schrittweite von 100 µm und einer Verweilzeit von 5s pro Messpunkt unter der DRIFT-Einheit bewegt. Für jedes Probeninterferogramm wurden 3 Scans koaddiert. Das Abfahren der Chromatogrammspur wurde unterhalb des untersten Auftragspunktes begonnen und oberhalb des höchsten beendet. Der Zeitaufwand bei 5 cm Laufstrecke betrug somit circa 45 Min.
Die Spektren der Benzodiazepine wurden durch stationäre DRIFT-Spektren ermittelt. Durch diese in-situ Methode ist es möglich, Spektren mit besserer Auflösung (4 cm^{-1}) aufzunehmen. Gleichzeitig wurden zur Minderung des Rauschens und zur Verbesserung der Spektrenqualität

64 Scans koaddiert. Die Reflektionsspektren wurden basislinienkorrigiert und zur weiteren Berechnung in 1/R Spektren umgewandelt und als JCAMP oder ASCII Formate abgespeichert.

6.3.3Quantitative Auswertung und Verfahrenskenndaten

Gram–Schmidt Spuren von Koffeinlösungen in äquidistanten Konzentration im Arbeitsbereich von 1,2 bis 2,4 µg pro Auftragungsfleck wurden von vier Dünnschichtplatten, auf die jeweils sieben Spuren aufgetragen waren, aufgenommen. Die so entstandenen Chromatogramme wurden basislinienkorrigiert und integriert. Die so erhaltenen Mittelwerte der Peakflächen wurden gegen die Konzentrationen aufgetragen, um die Regressionsfunktion zu erhalten (Abb. 6-8).

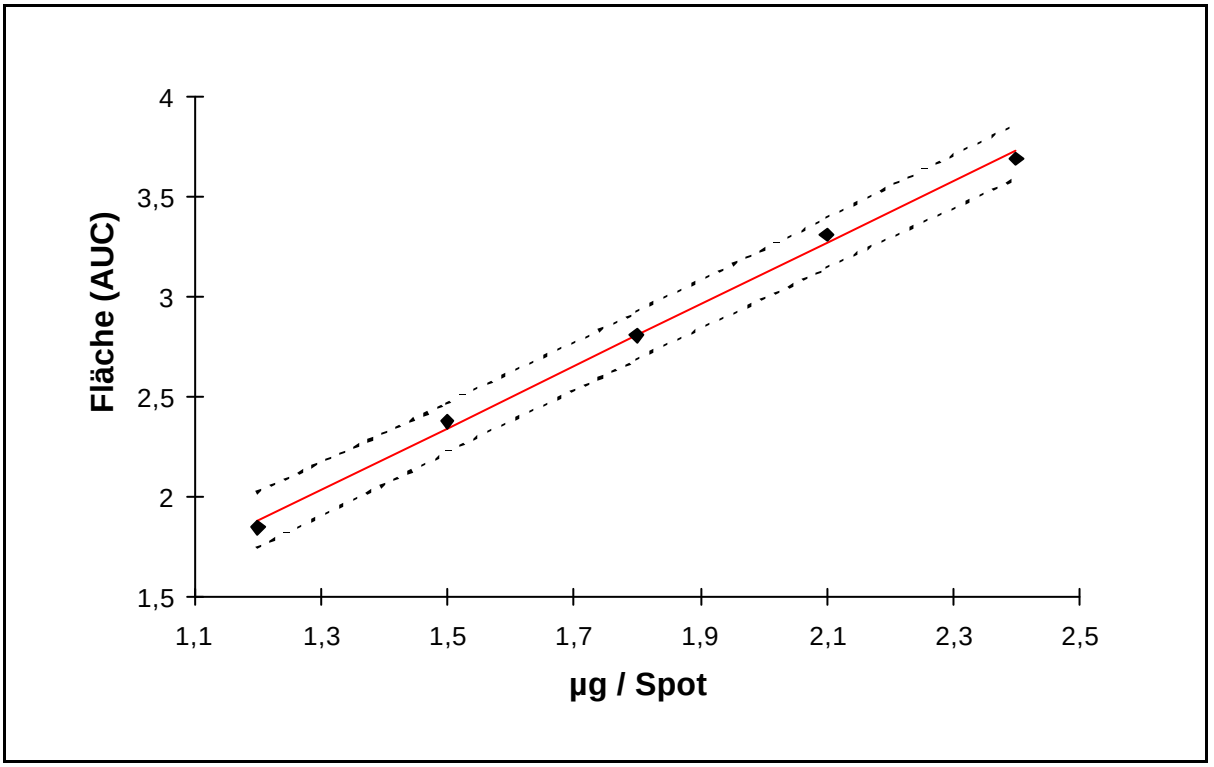


Abb. 6-8: Kalibrierkurve der Koffein Bestimmung.

Die statistischen Daten der Kalibrierung sind in Tabelle 6-4 wiedergegeben. Normalverteilung und Linearität wurden überprüft (s. 6.1.4).

Tabelle 6-4: Kalibrierkenndaten der Koffein Bestimmung.*

Parameter	Koffein
Arbeitsbereich (µg/Spot)	1,2 – 2,4
Kalibrierpunkte	5
Steigung (a)	1,5212
Achsenabschnitt (b)	0,0363
Korrelationskoeffizient (r^2)	0,9952
Theoret. Nachweisgrenze XN (µg/Spot)	0,51
Theoret. Bestimmungsgrenze XB (µg/Spot)	0,73
Relative Verfahrensstandardabweichung (%)	2,97

*für: y = ax + b mit y: Konzentration und x: Peakfläche

6.4 Dispersive NIRS

6.4.1Spektrometer

Die Messungen wurden mit einem Foss NIRSystems Modell 6500 Spektrometer (Foss NIRSystems, Inc., Silver Spring, MD, USA) mit DCA Modul (Direct Contact Analyzer) durchgeführt (Abb. 6-9), das einen Messbereich von 400 bis 2500 nm besitzt. Das polychromatische Licht der Halogenlampe wird durch ein holographisches Gitter in monochromatisches verwandelt. Das Gerät ist mit zwei Silizium-Detektoren und sechs Bleisulfid (PbS)-Detektoren ausgestattet. Das Licht trifft durch einen Spalt von unten auf die Probe, wobei die diffus reflektierte Strahlung durch sechs im 45° Winkel angebrachte Detektoren

erfasst wird. Die Aufnahmegeschwindigkeit liegt bei 1,8 Scans pro Sekunde.

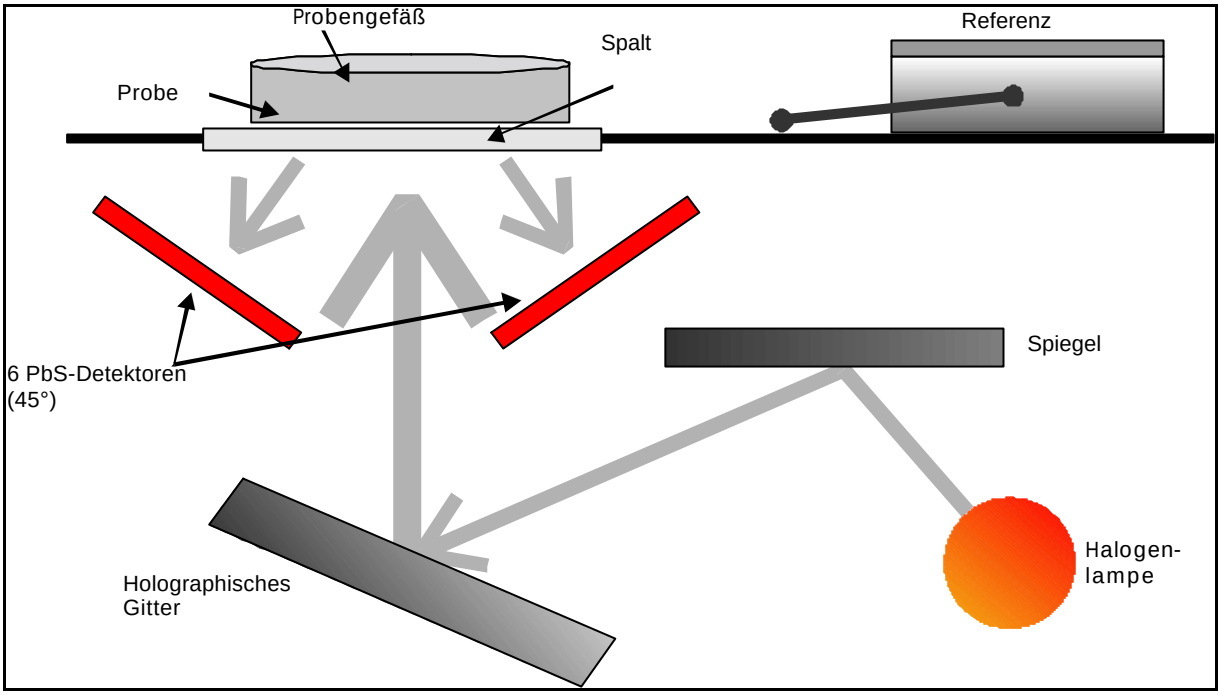


Abb. 6-9: NIRSystems Direct Contact Analyzer Spektrometer

6.4.2Geräteüberprüfung

Die Gerätespezifikationen sind in Tab. 6-5 beschrieben, wobei sich die Werte auf den Bereich von 1100-2500 nm beziehen. Die zu den Messungen nötigen Standards und Prüfroutinen sind in das Gerät und die NSAS - Software (6.5) integriert. Zur Überprüfung des Rauschens wurden je 32 Scans von 20 Messungen des Keramikstandards gemittelt. Die Genauigkeit der Wellenlängenskala wird anhand eines Polystyrol - Standards und dessen charakteristischer Peaks überprüft. Wellenlängenreproduzierbarkeit und spektrale Bandbreite werden aus je zehn aufeinanderfolgenden Messungen des Polystyrol - Standards ermittelt. Entsprechend der Herstellerempfehlung wird die Lampe jährlich ausgetauscht und das Gerät vom Hersteller gewartet.

Tab. 6-5: Gerätespezifikationen des NIRSystems 6500.

Kenngröße	Spezifikation
Rauschen (peak to peak)	< 0,20 mA
Rauschen (RMS)	< 0,02 mA
Wellenlängengenauigkeit	+/- 0,3 mm
Wellenlängenreproduzierbarkeit	+/- 0,010 nm
spektrale Bandbreite	10 nm +/- 2 nm

6.4.3Spektrenaufnahme

Die NIR Spektren wurden von 1100 – 2500 nm im Abstand von 2 nm aufgenommen, wobei zur Reduzierung des Rauschens die Signale von 32 Scans pro Aufnahme gemittelt wurden. Die totale Anzahl der Datenpunkte belief sich auf 700. Die Umrechnung in Einheiten der scheinbaren Reflexion (log 1/R) erfolgte automatisch. Als Referenz diente der geräteinterne Keramikstandard. Um Einflüsse durch Inhomogenitäten in der physikalischen Struktur der Extrakte zu minimieren, wurde jede Extrakt-Probe dreimal gemessen, nachdem durch Umschütteln eine neue Packung im Probengefäß erzeugt worden war. Die weiteren chemometrischen Berechnungen der spektralen Datensätze fanden auf einem PC Pentium III (750 MHz, 128 MB RAM, 12 GB Festplatte) statt.

6.5 Fourier-Transformation NIRS

6.5.1Spektrometer und DRIFT-Einheit

Die HPTLC-FT-NIRS Untersuchungen wurden mit einem Vector 22/N NIR Spektrometer der Firma Bruker Optik GmbH, Ettlingen, durchgeführt. Die externe DRIFT-Einheit (s. 5.2) war ebenfalls in

Zusammenarbeit mit Bruker entwickelt worden. Das Spektrometer verfügt über ein kompaktes und hermetisch abgedichtetes Optikgehäuse mit interner Trocknung, einer luftgekühlten NIR Quelle (Halogenlampe). Der Strahlenteiler des Interferometers besteht aus KBr-Substrat, das Interferometer selbst ist reibungsfrei gelagert, sodass keine Druckluftversorgung nötig ist. Die Scanrate lag bei 8/Sek., was einer Auflösung von 8 cm^{-1} entspricht. Über einen Umlenkspiegel wurde der Messstrahl senkrecht auf die DC-Platte gelenkt. Die DRIFT-Einheit ist mit einem MCT (Mercury-Cadmium-Telluride) Schmalbanddetektor der Firma Infrared Associated Inc (New Brunswick, Modell D313) ausgestattet, wobei der Lichtstrahl durch vergoldete Optik gesammelt und auf den Detektor gelenkt wird. Die DRIFT-Einheit wurde kontinuierlich mit wasser- und kohlendioxidfreier Luft gespült, um Störbanden auszuschließen. Der eingesetzte Drucklufttrockner der Firma Zander Aufbereitungstechnik GmbH (Essen) arbeitet mit einer Spülrate von 1000 L/h, Die Steuerung des x,y - Messtisches erfolgte unabhängig mit Hilfe eines PC AT 268, Software MCL - Step (Bruker).

6.5.2Geräteüberprüfung

Das Alignment des Interferometers beim Vector 22/N ist durch die permanente Rocksolid™ Justierung gewährleistet, sodass manuelles Nachjustieren entfällt. Weiterhin verfügt das Gerät über eingebaute Kontroll- und Funktionstests, sodass auf manuelles Überprüfen der Leistung verzichtet werden konnte. Die Wellenzahlgenauigkeit lag bei 0,01 cm^{-1}, die photometrische Exaktheit bei 0,1 % Transmission.

6.5.3Spektrenaufnahme

Nach Aufnahme der Interferogramme durch den unabhängigen AQP1/5 Akquisitionsprozessor fand die weitere Datenverarbeitung auf einem PC Pentium III (500 MHz, 128 MB RAM, 12 GB Festplatte) statt. Die weiteren chemometrischen Berechnungen der spektralen Datensätze fanden auf einem PC Pentium III (750 MHz, 128 MB RAM, 12 GB Festplatte) statt.

6.5 Software

Die Aufnahme der dispersiven NIR Spektren wurde mit der Software NSAS Version 3.5 (Near-Infrared Spectral Analysis Software, NIRSystems) durchgeführt. Anschließend wurden die Spektren im JCAMP Format für weitere Berechnungen ausgelesen. Die Aufnahme der DRIFT-Spektren fand mit Hilfe der Software OPUS/IR, Version 3.1 (Bruker Optik) unter dem Betriebssystem OS/2 Warp Version 3 statt. Die Spektren wurden ebenfalls als JCAMP Formate ausgelesen.

Die multivariate Datenverarbeitung fand mit Hilfe der Software „The Unscrambler™“ Version 7.01 (CAMO AS, Trondheim, Norwegen) und der Software PLSplus/IQ (Galactic Industries, Salem, USA) statt. Beide Programme wurden unter Windows 98se betrieben.

7 Literaturverzeichnis

[1] Herschel W. Investigation of the Powers of the Prismatic Colors to Heat and Illuminate Objects; with Remarks that Prove the Different Refrangibility of Radiant Heat. Phil Trans. 1800; 90: 225-284.

[2] Kubelka P, Munk F. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. Zeits Tech Physik. 1931; 12(112): 593-601.

[3] Ellis JW, Bath J. Modifications in the Near-Infrared Absorption Spectra of Protein and of Light and Heavy Water Molecules when Water is Bound to Gelatin. J Chem Phys. 1938; 6(11): 723-729.

[4] Freymann M, Freymann R. Identification of Fuels by Near-Infrared Spectrometry. Application to the Analysis of Ketones. Groupement franc develop recherches aeronaut Note tech. 1943; No. 11: 53 pp.

[5] Barchewitz P. Near-Infrared Absorption Spectra of Pure Compounds (with Application to Hydrocarbons). Congr groupement avance methodes anal spectrograph produits met. 1949; 11: 153-5.

[6] Kubelka P. New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials, Part I. J Opt Soc Am. 1948; 38: 448.

[7] Kaye W. Near-Infrared Spectroscopy. I. Spectral Identification and Analytical Applications. Spectrochim Acta. 1954; 6: 257-87.

[8] Kaye W. Near-Infrared Spectroscopy. II. Instrumentation and Technique. Spectrochim Acta. 1955; 7: 181-204.

[9] Goddu RF. Near-Infrared Spectrophotometry. Advances Anal Chem Instr. 1960; 1: 347-424.

[10] Ben-Gera I, Norris KH. Influence of Fat Concentration on the Absorption Spectrum of Milk in the Near-Infrared Region. Israel J Agr Res. 1968; 18(3): 117-24.

[11] Davies AMC. Near Infrared Spectroscopy: Time for the Giant to Wake up. Eur Spectrosc News. 1987; 73: 10-16.

[12] McClure WF. Near-Infrared Spectroscopy: The Giant is Running Strong. Anal Chem. 1994; 1: 43A-53A.

[13] Hirschfeld T. Near-Infrared Reflectance Analysis of Foodstuffs in: Analysis of Foods and Beverages: Modern Techniques. Charalambous G (Hrsg.) Orlando: Academic Press Inc.:1984.

[14] Williams PC, Norris K. Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. 1. Auflage. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists Inc.: 1987.

[15] Osborne BG, Fearn T. Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis. Essex: Longman Scientific & Technical: 1988.

[16] Plugge W, van der Vlies C. Near-Infrared Spectroscopy as an Alternative to assess Compliance of Ampicillin Trihydrate with Compendial Specifications. J Pharm Biomed Anal. 1993; 11(6): 435-439.

[17] Ciurczak EW. Validation of Spectroscopic Methods in Pharmaceutical Analysis. Pharm Technol. 1998; 22(3): 92-97.

[18] Moffat AC, Trafford AD, Jee RD, Graham P. Meeting the International Conference on Harmonisation's Guidelines on Validation of Analytical Procedures: Quantification as Exemplified by a Near-Infrared Reflectance Assay of Paracetamol in Intact Tablets. Analyst. 2000; 125(7): 1341-1351.

[19] Radtke G, Knop K, Lippold BC. Near Infrared (NIR) Spectroscopy. Fundamentals and Application from a Pharmaceutical Point of View. Pharm Ind. 1999; 61(9): 848-857.

[20] Herkert T, Prinz H, Kovar KA. One Hundred Percent Online Identity Check of Pharmaceutical Products by Near-Infrared Spectroscopy on the Packaging Line. Eur J Pharm Biopharm. 2001; 51(1): 9-16.

[21] Glauninger G, Kovar KA, Hoffmann V. Possibilities and Limits of an On-line Coupling of Thin-Layer Chromatography and FTIR Spectroscopy. Fresenius J Anal Chem. 1990; 338: 710-716.

[22] Frey OR. Die Direkte DC-FTIR-On-line-Kopplung: Möglichkeiten und Grenzen der Quantitativen Bestimmung. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen; 1992.

[23] Gottwald W, Wachter G. IR-Spektroskopie für Anwender. 1. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH: 1997.

[24] Burns DA, Ciurczak EW. Handbook of Near-Infrared Analysis. 1. Auflage. New York: Marcel Dekker, Inc.: 1992.

[25] Weidlein J, Müller U, Dehnike K. Schwingungsspektroskopie. Eine Einführung. 2. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag: 1988.

[26] Martin KA. Recent Advances in Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. Appl Spectrosc Rev. 1992; 27: 325-383.

[27] Europäisches Arzneibuch 1997 A, Amtliche Deutsche Ausgabe. Nachtrag 2001. Stuttgart, Eschborn: Deutscher Apotheker Verlag, Govi-Verlag: 2001.

[28] Olinger JM, Griffiths PR. Quantitative Effects of an Absorbing Matrix on Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. Anal Chem. 1988; 60: 2427-2435.

[29] Dhanoa MS, Lister SJ, Sanderson R, Barnes RJ. The Link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) Transformations of NIR Spectra. J Near Infrared Spectrosc. 1994; 2: 43-47.

[30] Workman JJ Jr. Interpretative Spectroscopy for Near Infrared. Appl Spectrosc. 1996; 31: 251-320.

[31] Kortüm G. Reflexionsspektroskopie. Berlin: Springer Verlag: 1969.

[32] Birth GS, Hecht HG. The Physics of Near-Infrared Reflectance in: Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. Williams PC, Norris K (Hrsg.) St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc.:1987.

[33] Otto M. Chemometrie, Statistik und Computereinsatz in der Analytik. Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft mbH: 1997.

[34] Hirschfeld T. The Hy-phen-ated Methods. Anal Chem. 1980; 52(2): 297A, 299A-300A, 302A, 304A, 308A, 312A.

[35] Essig S, Kovar KA. Impurity Test of Theophylline: Comparison of Classical Slit Scanner with Videodensitometry. J Planar Chromatogr. 1999; 12(1): 63-65.

[36] Bonnett R, Czechowski F, Latos-Grazynski L. Metalloporphyrins in Coal. 4. TLC-NMR of Iron Porphyrins from Coal: the Direct Characterization of Coal Hemes using Paramagnetically Shifted Proton NMR Spectroscopy. Energy Fuels. 1990; 4(6): 710-16.

[37] Wilson ID. The State of the Art in Thin-Layer Chromatography-Mass Spectrometry: a Critical Appraisal. J Chromatogr A. 1999; 856(1 + 2): 429-442.

[38] Wilson ID, Morden W. Advances and Applications in the Use of HPTLC-MS-MS. J Planar Chromatogr. 1996; 9(2): 84-91.

[39] Stahlmann S, Kovar KA. Analysis of Impurities by High-Performance Thin-Layer Chromatography with Fourier Transform Infrared Spectroscopy and UV Absorbance Detection in situ Measurement: Chlordiazepoxide in Bulk Powder and in Tablets. J Chromatogr A. 1998; 813(1): 145-152.

[40] Kovar KA, Ensslin HK, Frey OR, Rienas S, Wolff SC. Identification and Estimation of Complex Mixtures by Direct-TLC-IR On-line Coupling. GIT Spez Chromatogr. 1991; 11(2): 95-8, 100-1.

[41] Schulz V, Hänsel R. Rationale Phytotherapie. 4. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer: 1999.

[42] Kraul R. Johanniskraut: Botanik, Inhaltsstoffe, Qualitätskontrolle, Pharmakologie, Toxikologie und Klinik. 1. Auflage. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.: 2000.

[43] Nahrstedt A, Butterweck V. Biologically Active and Other Chemical Constituents of the Herb Hypericum perforatum L. Pharmacopsychiat. 1997; 30: 129-134.

[44] Piperopoulos G, Lotz R, Wixforth A, Schmierer T, Zeller KP. Determination of Naphthodianthrones in Plant Extracts from Hypericum perforatum L by Liquid Chromatography Electrospray Mass Spectrometry. J Chromatogr B. 1997; 695(2): 309-316.

[45] Hansen SH, Jensen AG, Cornett C, Bjornsdottir I, Taylor S, Wright B, Wilson ID. High-Performance Liquid Chromatography On-line Coupled to High-Field NMR and Mass Spectrometry for Structure Elucidation of Constituents of Hypericum perforatum L. Anal Chem. 1999; 71(22): 5235-5341.

[46] Muller WE, Rolli M, Shäfer C. Effects of Hypericum Extract LI 160 in Biochemical Models of Antidepressant Activity. Pharmacopsychiat. 1997; 30: 102-107.

[47] Muller WE, Singer A, Wonnemann M Hyperforin Represents the Neurotransmitter Reuptake Inhibiting Constituent of Hypericum Extract. Pharmacopsychiat. 1998; 31: 16-21.

[48] Suzuki O, Katsumata Y, Oya M Inhibition of Monoamino Oxidase by Hypericin. Planta Med. 1984; 50: 194-196.

[49] Bork PM, Bacher S, Lienhard Schmitz M, Kaspers U, Heinrich M Hypericin as a Non-Antioxidant Inhibitor of NF-κB. Planta Med. 1999; 65: 297-300.

[50] Nathan PJ. The Experimental and Clinical Pharmacology of St. John's Wort (Hypericum perforatum L.). Mol Psych. 1999; 4: 333-338.

[51] Gaedcke F, Steinhoff A und B. Phytopharmaka. 1. Auflage. Stuttgart: Wiss. Verlg.-Ges.: 2000.

[52] Schellenberg R, Sauer S, W; D. Pharmacodynamic Effects of two Different Hypericum Extracts in Healthy Volunteers Measured by Quantitative EEG. Pharmacopsychiat. 1998; 31: 44-53.

[53] Orth HJC, Rentel C, Schmidt PC. Isolation, Purity Analysis and Stability of Hyperforin as a Standard Material from Hypericum perforatum L. J Pharm Pharmacol. 1999; 51: 193-200.

[54] Deutscher Arzneimittelcodex 1986, 3. Ergänzung 1991. Frankfurt, Stuttgart: Govi-Verlag, Pharmazeutischer Verlag GmbH, Deutscher Apotheker-Verlag: 1991.

[55] Gaedcke F. Johanniskraut und dessen Zubereitung: Qualitätsbeurteilung über HPLC. Dtsch Apoth Ztg. 1997; 137(42): 117-121.

[56] Maisenbacher P, Kovar KA. Adhyperforin: a Homologe of Hyperforin from Hypericum perforatum. Planta Med. 1992; 58(3): 291-293.

[57] Liu FF, Ang CYW, Heinze TM, Rankin JD, Berger RD, Freeman JP, Lay JO. Evaluation of Major Active Components in St. John's Wort Dietary Supplement by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection and Electrospray Mass Spectrometric Confirmation. J Chromatogr A. 2000; 888: 85-92.

[58] Brolis M, Gabretta B, Fuzzati N, Pace R, Panzeri F, Peterlongo F. Identification by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-Mass Spectrometry and Quantification by High-

Performance Liquid Chromatography-UV Absorbance Detection of Active Constituents of Hypericum perforatum. J Chromatogr A. 1998; 825: 9-16.

[59] Molt K, Zeyen F, Podpetschnig-Fopp E. Quantitative NIR-Spektrometrie am Beispiel der Bestimmung des Sennosidgehalts in pflanzlicher Matrix. Pharmazie. 1997; 52(12): 931-937.

[60] Schulz H, Drews HH, Krüger H. Rapid NIRS Determination of Qualtity Parameters in Leaves and Isolated Essential Oils of Mentha Species. J Essent Oil Res. 1999; 11: 185-190.

[61] Schulz H, Engelhardt UH, Wegent A, Drews HH, Lapczynski S. Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy to the Simultaneous Prediction of Alkaloids and Phenolic Substances in Green Tea Leaves. J Argric Food Chem. 1999; 47(12): 5064-5067.

[62] Wilson ND, Watt RA, Moffat AC. A Near-Infrared Method for the Assay of Cineole in Eucalyptus Oil as an Alternative to the Official BP Method. J Pharm Pharmacol. 2000; 53(1): 95-102.

[63] International Conference of Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Step 3: Guideline on Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996.

[64] Nöldner M. Johanniskrautextrakte soll man nach Hyperforin-Gehalt standardisieren. Fachpressekonferenz: Johanniskrautforschung aktuell. 22.11.2000. Frankfurt, Biozentrum: Medizinisch Wissenschaftliche Informationsdienste MWI.

[65] Sloley BD, Urichuk LJ, Ling L, Gu LD, Coutts RT, Pang PKT, Shan JJ. Chemical and Pharmacological Evaluation of Hypericum perforatum Extracts. Acta Pharm Sinic. 2000; 21(12): 1145-1152.

[66] Candolfi A, Maesschalck R, D. Jouan-Rimbaud D, Hailey PA, Massart DL. The Influence of Data Pre-processing in the Pattern

Recognition of Exipients Near-Infrared Spectra. J Pharm Biomed Anal. 1999; 21: 115-132.

[67] Camo AS. The Unscrambler 6.0. User's guide. Trondheim, Norwegen: 1996.

[68] Blanco M, Coello J, Iturriaga H, Maspoch S, de la Pezuela C. Effect of Data Preprocessing Methods in Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectroscopy for the Determination of the Active Compound in a Pharmaceutical Preparation. Appl Spectrosc. 1997; 51: 240-246.

[69] Ciurczak EW, Cline-Love LJ, Mustillo DM. The use of Near-Infrared Spectroscopy in Thin-Layer Chromatography, Part1. Quantitative Measurements. Spectroscopy. 1990; 5(8): 38-42.

[70] Geladi P, Kowalski BR. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. Anal Chim Acta. 1986; 185: 1-17.

[71] Haaland DM, Thomas EV. Partial Least-Squares Methods for Spectral Analysis. 1. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information. Anal Chem. 1988; 60(11): 1193-1202.

[72] Martens H, Naes T. Partial Least Squares Regression. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley and Sons Ltd: 1989.

[73] Lorber A, Wangen L, Kowalski B. A Theoretical Foundation for the PLS Algorithm. J Chemom. 1987;: 19-31.

[74] Geiss F. Fundamentals of Thin Layer Chromatography. Heidelberg, Base, New York: Dr. A. Hüthig: 1987.

[75] Frey HP, Zieloff K. Qualitative und Quantitative Dünnschichtchromatographie. 1. Auflage. Weinheim: VCH: 1993.

[76] Bauer GK, Pfeifer AM, Hauck HE, Kovar KA. Development of an Optimized Sorbent for Direct HPTLC-FTIR On-line Coupling. J Planar Chromatogr. 1998; 11: 84-89.

[77] Bauer GK. Entwicklung einer optimierten Sorbensschicht für die direkte HPTLC-FTIR on-line Kopplung. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität, Tübingen; 1998.

[78] Otto A, Bode U, Heise HM. Experiences with Infrared Microsampling for Thin-Layer and High-Performance Liquid Chromatography. Fresenius Z Anal Chem. 1988; 331: 376-382.

[79] Yamamoto H, Yoshikawa O, Nakatani M, Tsuji F, Maeda T. Densitometry on Thin-Layer Plates by Fourier-Transform Near-Infrared Spectrometry. Appl Spectrosc. 1991; 45(7): 1166-1170.

[80] Ciurczak EW, Murphy WR, Mustillo DM. The use of Near-Infrared Spectroscopy in Thin -Layer Chromatography, Part II: Qualitative Applications. Spectroscopy. 1991; 6(3): 36-40.

[81] Frey OR, Kovar KA, Hoffmann V. Possibilities and Limitations of Assays by On-line Coupling of Thin-Layer Chromatography and FTIR Spectroscopy. J Planar Chromatogr. 1993; 6(2): 93-9.

[82] Griffiths PR, De Haseth JA. Fourier Transform Spectrometry. Vol 83 of Chemical Analysis. New York: Wiley: 1986.

[83] Wold S, Geladi P, Esbensen K, Oehman J. Multi-Way Principal Components-and PLS-Analysis. J Chemom. 1987; 1(1): 41-56.

[84] PLSplus/ IQ User's Guide. Salem, USA: Galactic Industries Corporation: 1999.

[85] De Haseth JA, Isenhour TL. Reconstruction of Gas Chromatograms from Interferometric Gas Chromatography/ Infrared Spectrometry Data. Anal Chem. 1977; 49(13): 1977-81.

[86] Herres W, Gronholz J. Understanding FT-IR Data Processing. Part 1: Data Acquisition and Fourier Transformation. Comput Appl Lab. 1984; 2(4): 216-20.

[87] Ferenczi-Fodor K, Vegh Z, Pap-Sziklay Z. Validation of the Quantitative Planar Chromatography Analysis of Drug Substances: 1.Definitions and Practice in TLC. J Planar Chromatogr. 1993; 6(4): 198-203.

[88] Fong A, Hieftje GM. Near-IR Spectroscopic Examination of Thin-Layer Chromatography Plates in the Diffuse Transmittance Mode. Appl Spectrosc. 1994; 48(3): 394-399.

[89] Funk W, Dammann V, Vonderheid C, Oehlman G. Statistische Methoden in der Wasseranalytik. 1. Auflage. Weinheim, Germany: VCH Publishers: 1985.

[90] Kromidas S. Validierung in der Analytik. 1. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH: 1999.

[91] Sachs L. Angewandte Statistik. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer: 1992.

[92] Koch OG, Koch-Gedic GA. Handbuch der Spurenanalyse, Teil 1. 2. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer: 1974.

Meine akademischen Lehrer neben Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

A. W. Frahm	Pharmazeutische Chemie
H.-H. Otto	Pharmazeutische Chemie
K. H. Bauer	Pharmazeutische Technologie
R. Schubert	Pharmazeutische Technologie
L. Heide	Pharmazeutische Biologie
H. Rimpler	Pharmazeutische Biologie
K. Starke	Pharmakologie
K. Aktories	Pharmakologie
M. Kist	Mikrobiologie
H.-J. Meyer	Klinische Pharmazie

Meine akademischen Lehrer im Rahmen des Graduiertenkollegs “Analytische Chemie” waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

G. Gauglitz	Physikalische Chemie
V. Hoffmann	Physikalische Chemie
C. Ziegler	Physikalische Chemie
E. Bayer	Organische Chemie
G. Jung	Organische Chemie
B. Koppenhöfer	Organische Chemie
H. B. Stegmann	Organische Chemie
V. Schurig	Organische Chemie
H. M. Liebich	Klinische Chemie
P. Grathwohl	Angewandte Geologie

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Rager
Vornamen:	Irene, Ottilia, Cora
Geburtstag:	07.11.1971
Geburtsort:	Schwäbisch Gmünd
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch

Ausbildung

1978-1982	Carl-Joseph-Leiprecht Grundschule, Rottenburg
1982-1998	Deutschorden-Gymnasium, Bad Mergentheim
1998-1991	Schiller-Gymnasium, Ludwigsburg
1991	Abitur
1991-1992	Studium der VWL mit Schwerpunkt Regionalstudien an der Universität Tübingen
1992-1996	Studium der Pharmazie an der Universität Freiburg
02 / 1994	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
10 / 1996	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
1996-1997	Pharmaziepraktikum in der Apotheke im Kastanienhof, Gundelfingen
12 / 1997	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
01 / 1998	Approbation als Apothekerin

1999-2001	Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit dem Titel *„Der Einsatz der NIR Spektroskopie in der Pharmazeutischen Analytik: Charakterisierung von Johanniskraut-Trockenextrakten und Kopplungsmöglichkeiten mit der HPTLC“* am Pharmazeutischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. K.-A. Kovar
seit 1999	Weiterbildung zur Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik

Berufliche Tätigkeiten

1993	Wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Universität Freiburg
1998-1999	Tätigkeit als Apothekerin in der Apotheke im Kastanienhof, Gundelfingen
1999-2001	Stipendiatin und Kollegiatin im Graduiertenkolleg der DFG „Quantitative Analyse und Charakterisierung pharmazeutisch und biochemisch relevanter Substanzen“ an der Universität Tübingen
2000	Wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen
1999-2001	Teilzeitbeschäftigung als Apothekerin in der Apotheke am Elbenplatz, Böblingen
2000	Vertretung als Apothekerin in der Moriz-Apotheke, Rottenburg a. N.