

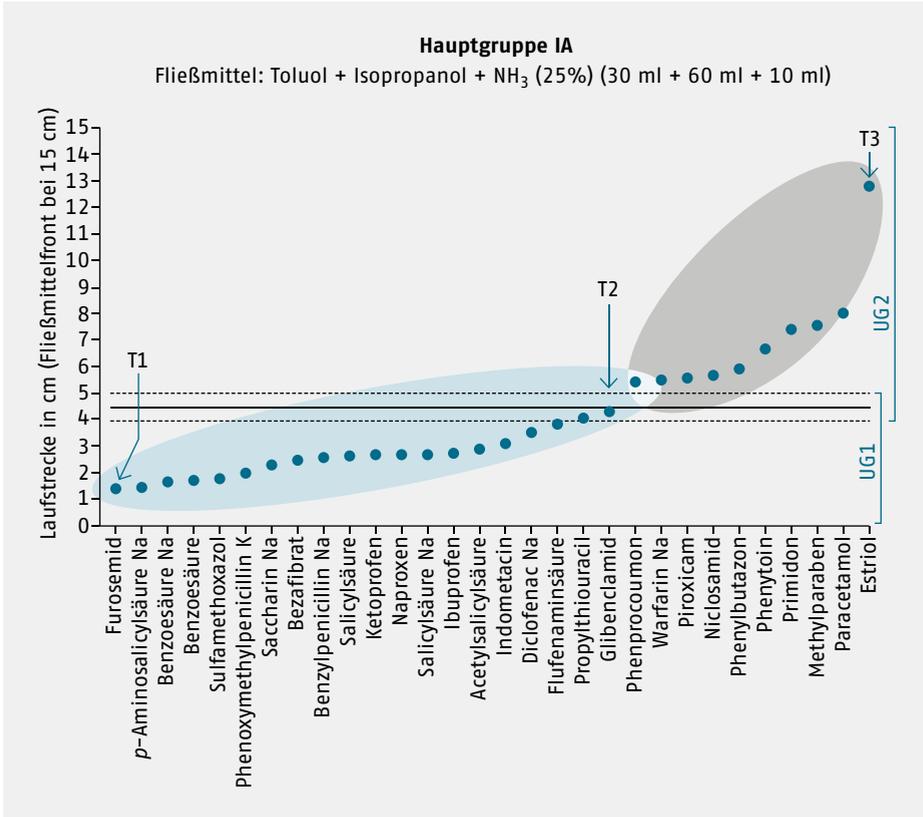
1 Systematische Identifizierung eines Arzneistoffgemisches

Die Analysenbearbeitung eines Arzneistoffgemisches gliedert sich in fünf Abschnitte:

1. Allgemeine Vorproben,
2. Trennung der Arzneistoffe vom Träger mit anschließender Identifizierung des Trägers,
3. Ausschütteln in sechs chemisch definierte Hauptgruppen,
4. Vortrennung durch systematische Dünnschichtchromatographie (DC) und
5. Identifizierung der isolierten Arzneistoffe.

Die Arzneistoffe werden zunächst auf Aussehen und Geruch geprüft (►Kap. 2.1, ►Kap. 2.2). Anschließend wird auf die Löslichkeit und auf das Verhalten gegenüber Säuren und Basen untersucht (►Kap. 2.3), ebenso auf Farbreaktionen (►Kap. 2.4) und hinsichtlich möglicher Fluoreszenz (►Kap. 2.5). Hier kann die elementaranalytische Untersuchung auf Anwesenheit von Stickstoff, Schwefel oder Halogenen sinnvoll sein (►Kap. 2.6). Durch zunächst allgemeine (►Kap. 5) und dann spezielle Reaktionen (►Kap. 6) lassen sich die Arzneistoffe in bestimmte Stoffklassen einteilen und Informationen über die Art des Trägers erhalten. Im nächsten Schritt soll der Träger von den Arzneistoffen getrennt und identifiziert werden. In einem modifizierten Stas-Otto-Trennungsgang erfolgt die Extraktion der Arzneistoffe in sechs chemisch definierte Hauptgruppen (IA, IB, II, III, IV und V). Die in den einzelnen Fraktionen des Analysengangs angefallenen Substanzen werden zunächst im Fließmittel der entsprechenden Hauptgruppe mit den angegebenen Testsubstanzen ein erstes Mal chromatographiert und damit die Untergruppe, in welche die gesuchte Substanz gehört, bestimmt. Liegt die gesuchte Substanz im Bereich zwischen T1 und T2, so befindet sich der Arzneistoff in Untergruppe 1. Befindet sich der gesuchte Arzneistoff im Bereich zwischen T2 und T3, so ist die Substanz der Untergruppe 2 zuzuordnen (◉Abb. 1.1). Überschneidungen lassen sich dabei nicht vermeiden, da sich durch die Aktivitätsänderungen des Sorbens, insbesondere durch die Umgebungsfeuchte, die relativen Wanderungstrecken zu den Testsubstanzen ändern können. Aus diesem Grund werden manche Substanzen in zwei Untergruppen eingeordnet.

Durch Einordnen der Arzneistoffe in die Untergruppen lässt sich die Anzahl der zu bestimmenden Arzneistoffe deutlich verringern. Somit ist nur noch zwischen den 10 bis 20 Arzneistoffen der Untergruppe zu suchen. Durch Fließmittel unterschiedlicher Polari-



● **Abb. 1.1** Schematisches DC zur Einordnung der Analysensubstanzen in Untergruppen

tät können die zu einer Untergruppe gehörenden Stoffe so aufgetrennt werden, dass nur noch zwischen wenigen Verbindungen zu entscheiden ist.

Die weitere Charakterisierung kann danach durch Sprühmittelkombinationen oder Gruppenreaktionen (►Kap. 5) und durch Einbeziehung der Elementaranalyse und des Schmelzpunktes erfolgen. Die eigentliche Identifizierung erfolgt durch spezielle Farbreaktionen (►Kap. 6) und physikalische Nachweismethoden wie z. B. die IR-Spektroskopie (►Kap. 10).

Um Misserfolge zu vermeiden, gilt Folgendes für die Untersuchungen:

- Die Reaktion soll möglichst mit abgetrennten, reinen Substanzen durchgeführt werden.
- Der positive Ausfall nur einer einzigen Reaktion darf für die Entscheidung nicht maßgebend sein. Aus diesem Grund sind möglichst viele chemische und physikalische Nachweise durchzuführen, um das vermutete Resultat zu bestätigen.
- Man sollte nur solche Farbreaktionen verwenden, die eine hohe Spezifität besitzen und deren Reaktionsmechanismus weitgehend geklärt ist.
- Eine Blindprobe wird stets empfohlen.

2 Vorproben

Für eine Vielzahl von Arzneistoffen können Vorproben erste Hinweise für ein sinnvolles Vorgehen zur weiteren Untersuchung des Arzneistoffgemisches geben. Es sei allerdings an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die nachfolgenden Reaktionen mit Reinsubstanzen durchgeführt wurden und die Durchführung einer Vorprobe aus einem Gemisch in vielen Fällen zu anderen Ergebnissen (Farbe, etc.) führen kann,

2

2.1 Aussehen/Eigenfarbe (Beispiele)

Benzylpenicillin (beige)	Mefloquin (weiß bis schwach gelb)	Rutosid (gelb bis grüngelb)
Doxycyclin (gelb)	Nicosamid (hellgelb)	Sulfadiazin (weiß bis gelb)
Ethacridinlactat (gelb)	Nifedipin (gelb)	Sulfasalazin (hellgelb bis braungelb)
Indometacin (weiß bis hellgelb)	Nimodipin (hellgelb bis gelb)	Tetracyclin HCl (ockergelb)
Menadion (hellgelb)	Riboflavin (gelb)	Trimethoprim (weiß bis schwach gelb)

2.2 Geruch (Beispiele)

Charakteristisch:	Captopril, L-Ephedrin, Lidocain, DL-Methionin, Penicillin, Phenprocoumon, Pyridoxin, Thiaminsalze
Beim Glühen:	
Karamellgeruch:	L-Weinsäure, Zucker, Stärke
Mercaptangeruch:	Thioharnstoffverbindungen (z. B. Propylthiouracil)
Ammoniakgeruch:	Säureamide (z. B. Nicotinamid), Streptomycin

2.3 Löslichkeit und Verhalten in Lauge und Säure

2.3.1 Löslichkeit in 3 N NaOH

Im Allgemeinen lösen sich Carbonsäuren, Phenole, Sulfonsäuren, Sulfonamide und viele Nitroverbindungen in 3 N NaOH. Aber auch andere Arzneistoffe, die andere funktionelle Gruppierungen aufweisen, können sich in 3 N NaOH lösen. Diese sind den jeweiligen Monographien zu entnehmen. Generell kann die Löslichkeit in verdünnter Natronlauge nicht alleine auf das Vorhandensein einer Nitrogruppe zurückzuführen sein, sondern wenn dann auf eine Kombination dieser mit Phenolen oder auch z. B. mit Amiden.

2.3.2 Färbung mit 3 N NaOH

Gelbfärbungen	
Ampicillin Na (hellgelb)	Indometacin (gelb)
Biperiden HCl (gelb)	Prednisolon (gelb mit orangebraunen Tröpfchen)
Cefuroximaxetil (hellgelb)	Tetracyclin HCl (gelb, EF)
Chloramphenicol (nach Erhitzen gelb)	Thiamin HCl (gelb)
Doxycyclin (gelb, EF)	Thiamin NO ₃ (gelb)
Ethacridinlactat (gelb, EF)	
Orange-, Rot- und Braunfärbungen	
Acetylcystein (orange)	Physostigminsalicylat (helloranger Überstand, weißer NS)
Estriol (lachsfarben, unlöslich)	Propranolol HCl (rot)
Levodopa (orange bis orangebraun)	Riboflavin (orange, EF)
Menadion (hellorange → dunkelorange, unlöslich, EF)	Sulfasalazin (blutrot)
Niclosamid (brauner NS in gelber Lösung)	

2.3.3 Löslichkeit in 3 N H₂SO₄

In 3 N H₂SO₄ lösen sich gut die Basen der Fraktion III aus dem Stas-Otto-Trennungsgang (► Kap. 4).

2.3.4 Färbung mit 3 N H₂SO₄

Gelbfärbungen	
Biperiden HCl (hellgelb, milchigtrüb)	Cromoglicinsäure 2 Na (gelbe Ausflockung, unlöslich)
Chinin HCl (hellgelb)	Doxycyclin (gelb)

Gelbfärbungen (Fortsetzung)	
Ethacridinlactat (gelb, EF)	Riboflavin (gelb, EF)
Niclosamid (gelber NS)	Rutosid (gelb, EF)
Omeprazol Na (gelb)	

Orangefärbungen	
Physostigminsalicylat (weißer NS in helloranger Lösung)	Tetracyclin HCl (orange)

2.3.5 Löslichkeit in konz. H_2SO_4

Im Allgemeinen lösen sich in konzentrierter H_2SO_4 dieselben Substanzen, welche sich auch in verdünnter H_2SO_4 lösen – Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass für die Löslichkeit kein wässriges Medium notwendig ist.

Zu Bedenken ist, dass sich aufgrund des geringen Wasseranteils in konzentrierter H_2SO_4 auch eine Vielzahl anderer organischer Substanzen lösen können und sich eine generelle Vorhersagbarkeit der Löslichkeit damit schwierig gestaltet.

Zusätzlich besteht die Gefahr der Zersetzung bestimmter Substanzen, z. B. solcher mit funktionellen Gruppen wie sekundären Alkoholen oder Carbamaten.

Generell ist konzentrierte Schwefelsäure nicht als Lösungsmittel zu empfehlen, wenn anschließend mit der Probe weitere Analytik betrieben werden soll.

Nähere Infos siehe Individualmonographien der Ph. Eur.

2.3.6 Färbung mit konz. H_2SO_4

Es sind lediglich die eindeutigen Gelbfärbungen aufgeführt, da die Interpretation leichter Gelbfärbungen aufgrund der Eigenfarbe von konz. H_2SO_4 nicht eindeutig ist.

Gelbfärbungen	
Acetylsalicylsäure (hellgelb)	Metoclopramid HCl (zitronengelb)
Chinidin SO_4 (gelb bis gelbgrün)	Neostigminbromid (gelborange bis orange)
Chinin HCl (SO_4) (gelb bis gelbgrün)	Nimodipin (hellgelb, EF)
Ciprofloxacin HCl (hellgelb bis gelbgrün + Fluoreszenz)	Noscamin HCl (gelb → orangerot)
Clotrimazol (zitronengelb)	Omeprazol Na (gelb → gelbbraun)
L-Ephedrin HCl (gelb bis gelborange)	Orciprenalin SO_4 (hellgelb)
Furosemid (gelbgrün)	Physostigminsalicylat (gelb → braun nach Stehenlassen)
Indometacin (gelborange)	Prednisolon (gelb → orangerot → rot)

4 Analysengang (Stas-Otto-Trennungsgang)

4.1 Theorie

Der Stas-Otto Trennungsgang dient der Probenvorbereitung zur weiteren chromatographischen Auftrennung mit anschließender Identifizierung der Arzneistoffe.

Der ursprüngliche Analysengang ist von Jean Servais Stas, Professor für Chemie in Brüssel, um 1850 beschrieben worden. Bald danach wurde er von Friedrich Julius Otto, Professor für Pharmazeutische Chemie in Braunschweig, in eine praktikablere Form umgearbeitet.

4.1.1 Prinzip

Der Analysengang beruht auf der Verteilung von Substanzen zwischen einer wässrigen und einer organischen Phase, die nicht miteinander mischbar sind. Da die Verteilung alleine bei vielen Arzneimittelmischungen für eine Trennung nicht ausreicht, wird das Prinzip des Stas-Otto-Trennungsganges erst dann deutlich, wenn die Aspekte der Salzbildung- und Zerlegung mitbetrachtet werden. Dabei werden gegensätzliche Löslichkeitsverhältnisse geschaffen, die es ermöglichen aufgrund der unterschiedlichen Acidität und Basizität der Arzneistoffe weitere Trennungsvorgänge anzuwenden.

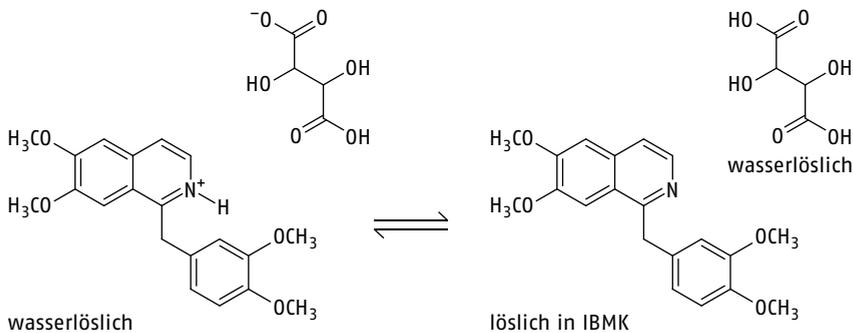
4.1.2 Salzbildungsvorgänge und Fraktionen des Stas-Otto-Trennungsganges

Fraktion I: Säuren und Neutralstoffe

Aus saurem, wässrigem Milieu werden mit Diethylether organische Säuren, Phenole und lipophile Neutralstoffe extrahiert. Man erhält einen Etherauszug, der als Fraktion I bezeichnet wird.

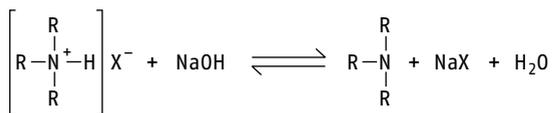
Die wässrige Phase wird mit Schwefelsäure angesäuert. Die starke anorganische Säure drängt die Dissoziation der sauren Arzneistoffe vollständig zurück:

und Neutralstoffen. Die Azidität der Weinsäure genügt nicht, um z. B. ein so schwach basisches Alkaloid wie Papaverin mit aromatisch gebundenem Stickstoff als Salz in der wässrigen Phase zu halten, wenn die Base gleichzeitig gut löslich in IBMK ist:



Fraktion III: Basen

Alkalisiert man die wässrige Phase mit Natronlauge, so werden die **Basen** freigesetzt, die in Ether ausgeschüttelt werden können. Eine Nachbehandlung mit IBMK vervollständigt die Extraktion. Die vereinigten organischen Phasen stellen die Fraktion III dar:



Auch hier können bestimmte Basen wie Physostigmin oder Pilocarpin durch Natronlauge zersetzt werden und dadurch der Fraktion IV verloren gehen. In solchen Fällen wird aus ammoniakalischem Milieu ausgeschüttelt.

Fraktion IV: Phenolbasen, in IBMK/Isopropanol lösliche Basen

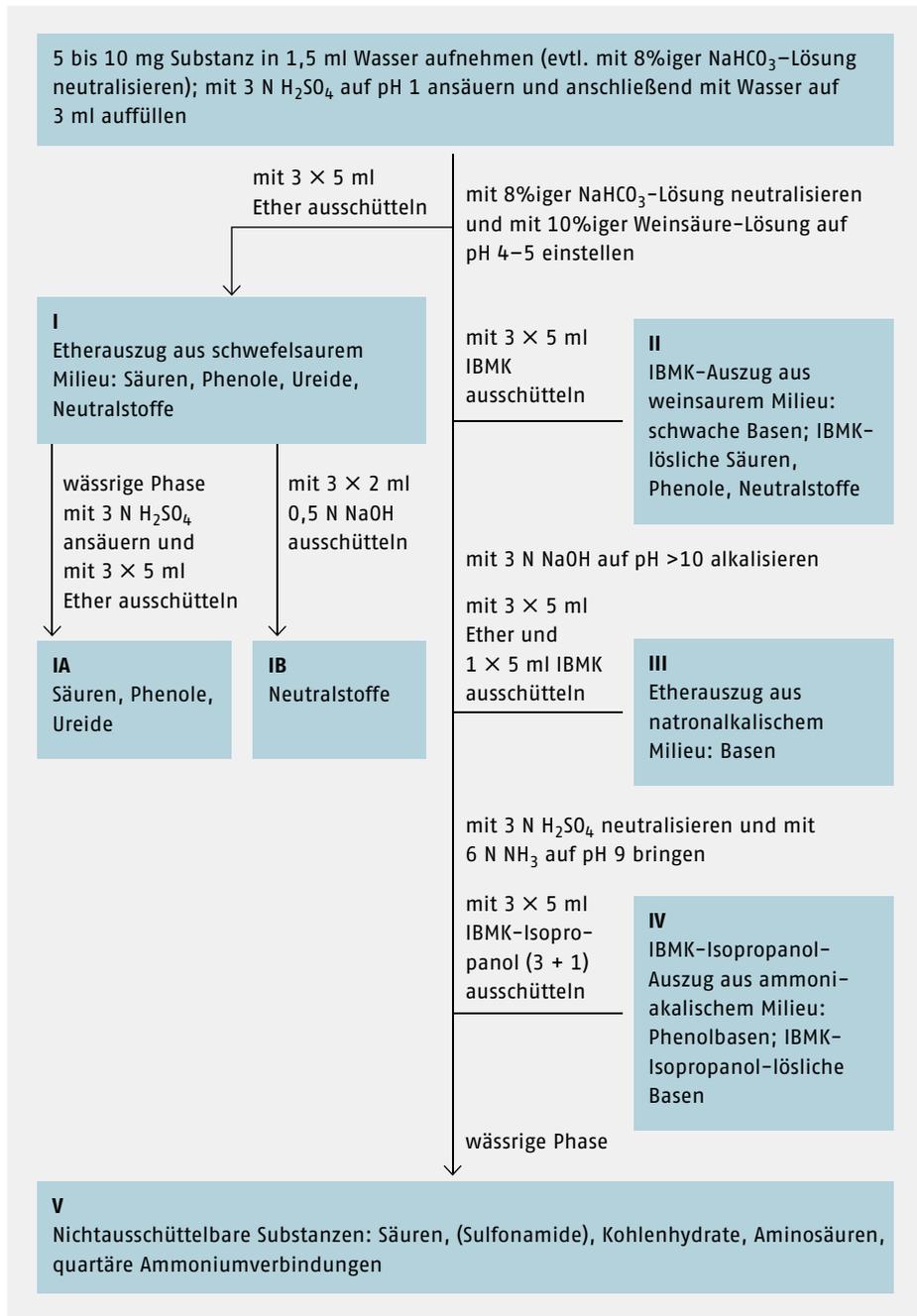
Aus der natronalkalischen Phase sind diejenigen Basen nicht ausschüttelbar, die phenolische Eigenschaften aufweisen (z. B. Morphin), da diese in Form ihrer Natriumphenolate in Wasser löslich sind. Um solche Basen abzutrennen, wird die wässrige alkalische Phase neutralisiert und sodann mit Ammoniak alkalisiert, denn die Basizität von Ammoniak ist zu gering, um wasserlösliche Phenolate zu erzeugen. Bei pH 9–10 liegt normalerweise der isoelektrische Punkt der phenolischen Basen, und in diesem pH-Bereich sind sie in organischen Lösungsmitteln am besten löslich. Wegen der Schwerlöslichkeit des Morphins verwendet man ein Lösungsmittelgemisch aus IBMK und Isopropanol (3 + 1); man erhält die Fraktion IV.

Hat man die Fraktion III nur mit Ether ausgeschüttelt, so können in Fraktion IV auch IBMK-lösliche, in Ether schwer lösliche, nichtphenolische Basen auftreten.

Fraktion V: Nichtausschüttelbare Substanzen

In der wässrigen ammoniakalischen Lösung bleiben nach Abtrennung der Fraktion IV die nichtausschüttelbaren Substanzen. In der Fraktion V treten hydrophile Säuren (z. B. Hydroxysäuren, Sulfonsäuren), Sulfonamide, Kohlenhydrate, Aminosäuren und quartäre Ammoniumverbindungen auf.

4.2 Stas-Otto-Trennungsgang, modifiziert nach H. Auterhoff und K. A. Kovar



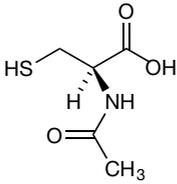
• Abb. 4.1 Stas-Otto-Trennungsgang

4.3 Hinweise zur praktischen Durchführung

Organische Lösungsmittel nehmen bei der Extraktion mit wässrigen Lösungen mehr oder weniger Wasser auf, so gehen in Diethylether oder IBMK einige Prozent Wasser über. Die organischen Phasen sind daher vor dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum zu trocknen. Dies geschieht z. B. durch Versetzen der Lösungen mit wasserfreiem, frisch geglühtem Natriumsulfat für ca. 10 Minuten. Bezüglich der Veränderung von Arzneistoffen durch Behandlung mit Natronlauge beachte man die angegebenen Modifizierungen in ►Kap. 4.1.2. Bei den „Nichtausschüttelbaren Substanzen“ (Hauptgruppe V) ist es zweckmäßig, die wässrige Lösung vorsichtig auf dem Wasserbad zur Trockene zu bringen und den Rückstand mit Ethanol oder Aceton auszuziehen. Dieser Auszug wird mit Gruppenreaktionen ►Kap. 5 und Dünnschichtchromatographie untersucht. Bei Verdacht auf „Nichtausschüttelbare Substanzen“ kann die Analysesubstanz direkt mit Ethanol oder Aceton extrahiert und dieser Auszug untersucht werden. Man umgeht so die Einwirkung von Säuren und Alkalien, die manche Substanzen wie die Sulfonamide zersetzen können, hat aber den Nachteil, dass Substanzen jeglicher Fraktionen anwesend sein können.

Zur Bestimmung von Mischschmelzpunkten im Metallblock (Linströmblock) oder in einer Gallenkamp-Schmelzpunktapparatur nach Tottoli (Büchi 512) beschickt man zweckmäßigerweise drei Schmelzpunktröhrchen: A mit der Analysesubstanz, V mit der Vergleichssubstanz und M mit einem Gemisch aus etwa gleichen Teilen beider. Schmelzen die Substanzen in allen Röhrchen gleichzeitig, so ist die Analysesubstanz mit der Vergleichssubstanz identisch, also ähnlich wie das TAV-Schema.

Acetylcystein



(2*R*)-2-(Acetylamino)-3-sulfanylpropansäure

$C_5H_9NO_3S$ (163,2)

Smp. 104–110 °C

Pharmakologie

Mukolytikum.

Analysenanfall

V.

Aussehen

Weißes Pulver.

Löslichkeit

Löslich in	Wasser	Ethanol	Methanol	Ether	Aceton
	löslich	löslich	löslich	löslich	schwer löslich

Vorproben

- Löslichkeit in 3 N NaOH (►Kap. 2.3.1): löslich.
- Färbung mit 3 N NaOH (►Kap. 2.3.2): orange
- Löslichkeit in 3 N H_2SO_4 (►Kap. 2.3.3): löslich.
- Löslichkeit in konz. H_2SO_4 (►Kap. 2.3.5): unlöslich.
- Löslichkeit in konz. HNO_3 (►Kap. 2.3.7): löslich.
- Färbung mit konz. HNO_3 (►Kap. 2.3.8): orange.
- Froehde-Reaktion (►Kap. 2.4.1): farblos → grün (nach 10 Minuten).
- Mandelin-Reaktion (►Kap. 2.4.2): blaugrün.

Gruppenreaktionen

- Diazokupplungs-Reaktion (►Kap. 5.1.3): rot.
- Analoge Simon-Awe-Reaktion (►Kap. 5.1.4): pink (im Basischen).
- Fehling-Reaktion (►Kap. 5.2.1): dunkelgrün bis grünschwarz.
- Nachweis organischer Säuren (►Kap. 5.3): rot bis rotbraun. Nach Zugabe von Hydroxylamin fällt ein oranger NS aus.
- Hydroxamsäure-Reaktion (►Kap. 5.4): rotbraun.
- $FeCl_3$ -Reaktion (►Kap. 5.9): orange.

Spezielle Reaktionen

- Zwikker-Reaktionen (►Kap. 6.2): dunkelgrün → braun.
- Cu-Komplexe (►Kap. 6.5): grüner NS (nach 10 Minuten).

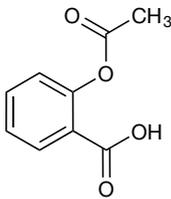
Quantitative Bestimmung

- 0,14 g Substanz werden in 60 ml Wasser R gelöst und mit 10 ml verdünnter Salzsäure- versetzt. Nach dem Abkühlen in einer Eis-Wasser-Mischung werden 10 ml Kaliumiodid-Lösung R zugesetzt. Unter Zusatz von 1 ml Stärke-Lösung R wird mit Iodlösung (0,05 mol/l) titriert (Ph. Eur.).

Besonderheiten

- Werden 0,5 ml Prüflösung mit 0,05 ml einer 5%igen Lösung (m/V) von Natriumpentacyanonitrosylferrat R und 0,05 ml Ammoniak-Lösung 26 % R versetzt, entwickelt sich eine violette Färbung (DAB).

Acetylsalicylsäure



2-Acetoxybenzoesäure

$C_9H_8O_4$ (180,2)

Smp. 143 °C (Sofortschmelzpunkt)

Pharmakologie

Analgetikum, Antipyretikum, Antiphlogistikum, Thrombozytenaggregationshemmer.

Analysenanfall

IA.

Aussehen

Weißes, kristallines Pulver.

Löslichkeit

Löslich in	Wasser	Ethanol	Methanol	Ether	Aceton
	schwer löslich	löslich	löslich	löslich	löslich

Vorproben

- Löslichkeit in 3 N NaOH (▶Kap. 2.3.1): löslich.
- Löslichkeit in 3 N H₂SO₄ (▶Kap. 2.3.3): unlöslich.
- Löslichkeit in konz. H₂SO₄ (▶Kap. 2.3.5): löslich.
- Färbung mit konz. H₂SO₄ (▶Kap. 2.3.6): hellgelb.
- Löslichkeit in konz. HNO₃ (▶Kap. 2.3.7): löslich.
- Froehde-Reaktion (▶Kap. 2.4.1): blau → violett.
- Mandelin-Reaktion (▶Kap. 2.4.2): dunkelgrün.
- Marquis-Reaktion (▶Kap. 2.4.3): hellrot.

Gruppenreaktionen

- Nachweis organischer Säuren (▶Kap. 5.3): rotbraun im FeCl₃-Überschuss, violett im Unterschuss.
- Hydroxamsäure-Reaktion (▶Kap. 5.4): dunkelrot bis rotbraun.
- FeCl₃-Reaktion (▶Kap. 5.9). Wenn die wässrige Lösung der Substanz nach kurzem Aufkochen und Wiedererkalten mit dem Reagenz versetzt wird, tritt eine Violett-färbung auf.

Spezielle Reaktionen

- Vitali-Morin-Reaktion (▶Kap. 6.3): brauner NS.
- Cu-Kompexe (▶Kap. 6.5): hellblau (klare Lösung).

Quantitative Bestimmung

- 1,00 g Substanz wird in 10 ml Ethanol 96 % R gelöst. Nach Zusatz von 50 ml 0,5 N NaOH-Lösung wird der Kolben 1 h lang stehen gelassen. Nach Zusatz von 0,2 ml Phenolphthalein-Lösung R wird mit 0,5 N Salzsäure titriert (Ph. Eur.).
- Titration in Aceton (unter Erwärmen lösen) gegen Phenolrot mit 0,1 N NaOH-Lösung. Bei Bestimmung neben Coffein wird die Titration in Ethanol 60 % durchgeführt.
- $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ in 0,1 N HCl: 485 bei 228 nm und 65 bei 275 nm.

Besonderheiten

- Beim Erwärmen mit 2 ml Ethanol und 2 ml konz. Schwefelsäure tritt der Geruch nach Ethylacetat auf.