

1 Überblick und Einstieg

Infrarotspektroskopie ist für die schnelle und zerstörungsfreie Identifizierung von Ausgangsstoffen im Apothekenlabor hervorragend geeignet. Dieses Handbuch gibt Ihnen einen schnellen Überblick über die Einsatzmöglichkeiten, Tipps für den Betrieb in der Praxis sowie Hintergrundinformationen über die für die Anwendung notwendige Installation und Dokumentation der Validierung marktüblicher Instrumente. Details zur Software und spezifische Informationen über die grundsätzlich sehr einfache Bedienung der Geräte sollten Sie vom Gerätehersteller erfragen!

Voraussetzung für schnelle und zerstörungsfreie Analytik in der Apotheke ist, dass die Probe direkt identifiziert werden kann, ohne die Substanz z. B. vorher mit Kaliumbromid zu verreiben. Diese Voraussetzung kann durch die Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) sowie mit Einschränkung auch durch Spektroskopie im mittleren Infrarot (MIR) erfüllt werden. Allerdings wird im MIR-Bereich dazu ein ATR-Probenkopf (Attenuated total reflection, abgeschwächte Totalreflexion) benötigt. In diesem Buch werden daher neben Geräten für die NIR-Spektroskopie nur ATR-FTIR-Geräte für den MIR-Bereich behandelt. Während der Umgang mit ATR-FTIR-Geräten seit Jahrzehnten fester Bestandteil der universitären Ausbildung ist, sind NIR-Spektrometer in Praktika der instrumentellen Analytik häufig noch nicht vorhanden und daher den potenziellen Anwendern nicht vertraut. Wie NIR-Geräte eingesetzt und bedient werden sollten, wird daher in diesem Buch erklärt.

NIRS: Optimal für kleine Zeitfenster

Da anders als in Auftragslabors in der Apotheke mit Analytik kein Geld verdient wird, kann nur selten pharmazeutisches Personal speziell für die Analytik beschäftigt werden. Zwangsläufig muss Analytik im Apothekenlabor zwischen Beratungsgespräche und andere nicht aufschiebbare Tätigkeiten in der Offizin eingetaktet werden. Bei chromatographischen Analysen ist das schwierig. Wenn eine DC-Kammer verwendet wird, muss man sich die Zeit nehmen, die DC-Platte genau rechtzeitig zu entnehmen oder man ist gezwungen die Analyse zu wiederholen. Bei NIRS ist das anders. NIRS-Analytik kann problemlos unterbrochen werden und lässt sich optimal in kleine Zeitfenster im Apothekenalltag einpassen.

Das Problem: Im Prinzip könnte man ein kommerziell verfügbares NIR-Spektrometer einfach aufstellen, den Stecker in die Steckdose stecken und Proben messen, auch wenn man noch nie mit einem NIR-Spektrometer gearbeitet hat. Es ist weder eine spezielle technische Expertise wie bei der Bedienung eines NMR-Geräts noch experimentelles Geschick wie bei der nass-chemischen Analytik erforderlich. Im einfachsten Fall könnte eine Rezeptursubstanz im Originalgefäß ohne Probenvorbereitung oder Umfüllen im Handumdrehen durch für den Anwender unbemerkt im Computer ablaufende statistische Methoden chemometrisch identifiziert werden. Dieses Vorgehen entspricht allerdings nicht der Guten NIR-Praxis und wird bei einer Inspektion in der Apotheke zu Recht nicht akzeptiert werden.

Chemometrie

Anders als bei der Infrarotspektroskopie im mittleren IR-Bereich (MIR) werden die bandenarmen aber informationsreichen NIR-Spektren nicht visuell sondern durch statistische Methoden computergestützt, also chemometrisch, bewertet. Die chemischen und physikalischen Informationen werden dazu vorbehandelt, gewichtet und aus den experimentellen Messdaten von Vergleichsspektren extrahiert und zu einem chemometrischen Modell bzw. Identifizierungsmodul verarbeitet. Idealerweise werden dabei Proben aller Lieferanten berücksichtigt, von denen Ausgangsstoffe bezogen werden sollen. Der hohe zeitliche und finanzielle Aufwand der Erstellung eines auf einer Spektrensammlung der gängigen Ausgangsstoffe und Drogen beruhenden Identifizierungsmoduls muss nicht von pharmazeutischem Personal bewältigt werden, sondern wird gerätespezifisch von den Herstellern der NIR-Geräte als Dienstleistung angeboten.

Die Lösung: Dieses Handbuch bietet den Einstieg in Gute NIR-Praxis in verständlicher Form. Es ist unverzichtbar, sich etwas näher mit der Methode zu beschäftigen, um Möglichkeiten und Grenzen zu erkennen und die wissenschaftlich und regulatorisch erforderlichen Maßnahmen zur Gerätequalifikation und Validierungsdokumentation treffen zu können. Insbesondere ist die NIR-Spektroskopie die erste Anwendung in der Pharmazeutischen Analytik, bei der routinemäßig eine Auswertung gemessener Spektren nicht durch visuellen Spektrenvergleich sondern durch chemometrische Methoden erfolgt. Dieses mathematische Vorgehen ist erklärungsbedürftig und wird in einem der folgenden Kapiteln praxisgerecht erläutert.

1.1 IR-Spektroskopie im Europäischen Arzneibuch

Die Infrarotspektrometrie im nahen Infrarotbereich fand etwas später Eingang in die Arzneimittel-Qualitätskontrolle als die Spektrometrie im mittleren IR-Bereich. Umfangreiche Untersuchungen lagen aber schon früh im Bereich der Lebensmitteltechnologie vor, und 1993 wurde auch eine Validierungsstudie publiziert, die an dem pharmazeutischen Beispiel Ampicillin-Trihydrat [Plugge 1993] zeigen konnte, dass die NIR-Spektroskopie eine geeignete Alternative zu anderen offizinellen Methoden darstellt. Die FDA akzeptierte diese Ergebnisse und der Einsatz der NIR-Analytik für die beschriebenen Anwendungsbereiche, und die Technik wurde dann sehr schnell Bestandteil verschiede-

2 Probenvorbereitung und Probenpräsentation in der NIRS

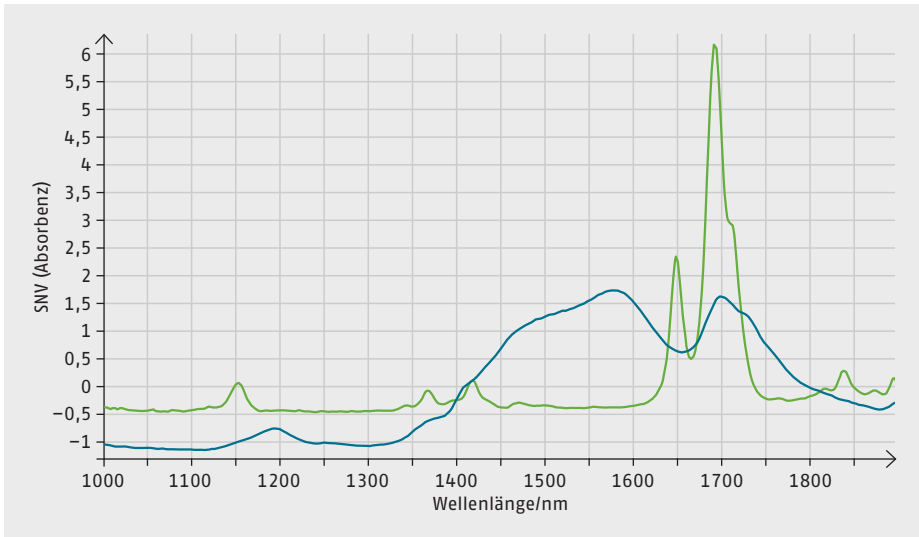
Die mit einem NIRS-Gerät durchführbaren Messmethoden haben Einfluss auf die Probenvorbereitung und -präsentation.

Die Probenvorbereitung in der NIRS ist häufig minimal. Bei Pulvern ist in der Regel ein Umfüllen in ein Glasgefäß, das auf das Messfenster gestellt werden kann, ausreichend. Unterschiedliche Schüttdichten können allerdings die Messung beeinflussen und auch hier ist es hilfreich, für eine technisch sehr einfach durchführbare Operation wie das Einfüllen in ein Glasgefäß den wissenschaftlichen Hintergrund kurz zu durchdenken. Bei Einstichgeräten muss lediglich sichergestellt werden, dass die Einstichsonde in ausreichenden Kontakt mit der Probe gebracht werden kann. Feste Arzneiformen wie Tabletten könnten bei unterschiedlicher Anordnung über dem Messfenster unterschiedliche Spektren ergeben und bei diesem in der Apotheke eher unüblichen Problem müsste eine optimale Probenpräsentation in Bezug auf ein reproduzierbares Einspannen der Tablette gefunden werden.

Der Großteil der Proben in der Apotheke sind Feststoffe, die im Reflexionsmodus gemessen werden, bei denen die Probenvorbereitung minimal und die Probenpräsentation unkritisch ist. Trotzdem ist es an dieser Stelle sinnvoll, mit einer allgemeinen und systematischen Betrachtung zum Thema Probenpräsentation zu beginnen, bevor in ►Kap. 2.2 auf diesen häufigsten Spezialfall näher eingegangen wird.

Das Arzneibuch gibt Hinweise für die Methodenoptimierung und die ordnungsgemäße Durchführung der Messung, die von den Geräteherstellern umgesetzt werden. So wird die geeignete Aufnahmedauer und Anzahl der Scans für Ausgangsstoffe in der Regel voreingestellt und muss nicht vom Anwender gewählt werden. Bei der Erstellung einer Ausgangsstoff-Spektrensammlung wird entschieden, ob eine Messung der Transmission, diffuser Reflexion oder Transflexion am ehesten zielführend ist. In der Apotheke muss dann für ein Pulver oder eine klare Probe der gleiche Messmodus wie bei der Erstellung der Spektrensammlung angewendet werden. In der Regel ist dieser Prozess Software-geführt.

Bei Rezeptur- und Defekturarzneimitteln, für die keine Identifizierungsmodule bestehen, muss in der Apotheke ein geeigneter Messmodus ausgewählt werden. Während Messungen von in der Apotheke hergestellten Salben häufig unproblematisch sind, ist die Probenpräsentation fester Arzneiformen wie Kapseln oder Tabletten komplizierter. Besonders bei Messungen von Tabletten ist zusätzlicher Aufwand erforderlich, da hier die Orientierung der Probe und die Schichtdicke bei Transmission oder Transflexion beach-



● **Abb. 2.1** Die Spektren von Methanol (blau) und Dichlormethan (grün) unterscheiden sich sehr stark

tet werden müssen. Dieser Nachteil fällt in der Praxis deshalb kaum ins Gewicht, weil die Herstellung von Tabletten im Apothekenlabor eine Ausnahmesituation ist.

Neben Hinweisen zur Auswahl und Bedeutung eines geeigneten Hintergrundmaterials wird auf die Gefahr der unbemerkten Ablagerung von Material auf einem Messfenster, sogenanntes Fouling, hingewiesen.

■ **DEFINITION** Fouling ist wie die Probenpräsentation von Tabletten ein Problem bei Anwendungen im Industrielabor, z. B. beim Einsatz von NIR-Detektoren zur Überwachung von Leitungen durch ein Messfenster. Hier können sich von innen Partikel auf einer Scheibe ablagern, die ohne Unterbrechung des Prozesses von außen nicht zu entfernen sind und schließlich das Messergebnis beeinträchtigen.

Praxistipps

- Das Messfenster routinemäßig mit einem Tuch von Staub reinigen und Zerkratzen vermeiden.
- Das Probengefäß mit einem Abstandsring aus Kunststoff vom direkten Kontakt mit dem Glasfenster der Messzelle fernhalten.
- Auf sorgfältige Reinigung aller verwendeten Materialien, der Berührungsfläche des Messgeräts bzw. der Einstichsonde achten, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.

Neben organischen Arznei- und Hilfsstoffen in Form von Pulvern können auch Drogen, Flüssigkeiten und halbfeste Rezepturgrundlagen identifiziert werden. So lassen sich einerseits Methanol und Dichlormethan leicht differenzieren (● Abb. 2.1) als auch Ethanol-spezifikationen mit unterschiedlichem Wassergehalt sofort erkennen (● Abb. 2.2).

3 Überprüfung der Funktionsfähigkeit eines NIR-Geräts

Das Arzneibuch führt in Tabelle 2.2.40–1 die Anforderungen für die Überprüfung der Leistungsfähigkeit (früher: Funktionsfähigkeit) für NIR-Geräte auf. Dabei wird aus Gründen der Praktikabilität zwischen NIR-Prozess-Spektrometern für In-line-Inprozesskontrolle (z. B. in Rohrleitungen in der Industrie) und NIRS-Geräten für verschiedene Einsatzgebiete (Laborgeräte, mobile Geräte) unterschieden. Dies ist deshalb sinnvoll, weil Geräte in Rohrleitungen für Kalibrierungen schlecht zugänglich sind und einfachere Aufgaben erfüllen sollen. Deshalb ist ein geringerer Aufwand bei der Re-Kalibrierung gerechtfertigt.

Die in der Apotheke üblichen NIRS-Geräte fallen in die Kategorie Laborgeräte und mobile Geräte, für die eine Überprüfung der Wellenlängenskala mittels Vergleichsmessungen von Referenzsubstanzen leicht möglich ist und auch gefordert wird. Ausgenommen sind Geräte mit Filtern, die allerdings nicht verbreitet sind. Als geeignete Referenzsubstanzen verweist das Arzneibuch auf glasartig eingebettete definierte Gemische der Oxide Seltener Erden, die als Standards handelsüblich sind. Daneben werden aber auch immer noch Dichlormethan und Talkum aufgeführt. Eingebettete definierte Gemische der Oxide Seltener Erden können als Standard Reference Material (SRM) des National Institute of Standards and Technology (NIST) bezogen werden, z. B. NIST SRM 2036a, der an der Rückseite mit dem für diffuse Reflexion nahezu ideal geeigneten Polymer Polytetrafluorethylen (PTFE) beschichtet ist. Die NIST-Referenzmaterialien sind teuer. Handelsüblich sind auch etwas weniger kostspielige Standards, die auf NIST-Referenzmaterialien rückführbar sind und dies durch Zertifikate belegen. Die Überprüfung der Wellenlängenskala eines NIRS-Geräts kann auch insgesamt als Dienstleistung vergleichbar der Eichung einer Waage beauftragt werden. Bei der Erstinstallation gehört diese Überprüfung in der Regel zum Lieferumfang.

Soll die Überprüfung der Wellenlängenskala im Messmodus „diffuse Reflexion“ erfolgen, sind in der Praxis vor allem Einbettungen von Oxiden der Seltenen Erden in Kunststoffen oder Gläsern gebräuchlich, auch wenn die meisten Banden nicht sehr scharf sind. Geeignet sind Standards, die auf die zertifizierten Standards NIST SRM 1920a oder 2036a rückführbar sind. Diese festen Suspensionen sind in der Regel ebenso wie ein Teflonstandard als interne Weißreferenz dauerhaft in NIRS-Geräte eingebaut und werden nach dem Start des Geräts automatisch in den Strahlengang gefahren. Bei einigen Geräten wie dem apo-ident-Gerät von Hiperscan ist hörbar, wie ein Elektromotor dies intern und ohne Eingriff des Benutzers durchführt. Wesentliche Vorteile dieser Einbettungen von Oxiden

der Seltenen Erden sind die sehr geringe Temperaturabhängigkeit der Bandenlage dieser Standards und deren Langzeitstabilität. Ältere Weißstandards aus Titandioxid zeigten keine gute Langzeitstabilität und wurden daher durch sehr stabile Marken-Teflonstandards, z. B. Zenith Polymer ersetzt. Alternativ lässt das Arzneibuch die Verwendung von Polystyrenfolien zu, die allerdings alle drei Jahre ausgetauscht oder rezertifiziert werden müssen. Diese Folien unterscheiden sich von den in der MIRS üblichen Standardfolien durch ihre Dicke (0,7–2,0 mm). Der Grund dafür ist, dass Polystyren im kurzwelligen IR-A-Bereich nur schwach ausgeprägte, asymmetrische Banden zeigt. Die in MIR-Geräte eingebauten, dünneren Polystyrenfolien müssen ebenfalls regelmäßig (alle drei Jahre) ausgetauscht oder rezertifiziert werden.

Referenzsubstanzen

Für die Überprüfung von NIR-Geräten eignen sich folgende Substanzen:

- Gemische von Oxiden Seltener Erden,
- Dichlormethan,
- Talkum.

Für den Messmodus diffuse Reflexion auch:

- Teflonstandards,
- Polystyrenfolien (alle 3 Jahre Rezertifizierung erforderlich).

Titandioxid ist aufgrund fehlender Langzeitstabilität ungeeignet.

Damit sind Präparationen von Oxiden Seltener Erden (Dy_2O_3 , Er_2O_3 , und Ho_2O_3) in einem definierten Massenverhältnis die beste Wahl. Die Zusammensetzung verwendeter Oxidgemische bezieht sich häufig noch auf den alten Standard NIST SRM 1920a und weist zwischen etwa 900 nm und 2200 nm mehrere geeignete Banden auf. Solche Standards ergeben im Bereich bis etwa 2000 nm insgesamt neun Messpunkte. Für NIRS-Geräte mit einem Messbereich bis 2500 nm sind zusätzlich auf NIST SRM 1920 a rückführbare Standards sinnvoll und handelsüblich, die zusätzliche Banden im IR-B-Bereich bis 2500 nm aufweisen.

Als Möglichkeiten ohne die teuren Standards auszukommen wird die Verwendung von Talkum vorgeschlagen und Banden bei 948, 1391 und 2312 nm angeführt. Ebenso aufgeführt ist für die Messung der Transflexion die Verwendung einer Suspension von trockenem Titandioxid in Dichlormethan. Titandioxidpartikel weisen praktisch keine NIR-Absorption auf und wirken nur reflektierend für Dichlormethan, dessen Absorptionsbanden als eigentlicher Standard dienen können. Dieses Vorgehen ist aber in der Praxis nicht die Methode der Wahl.

Dichlormethan wird ebenfalls als Referenzsubstanz für die Messung der Transmission mit NIRS-Tischgeräten und mobilen Geräte aufgeführt. Zwar kann dieses halogenierte Lösungsmittel in der Tat einfach vermessen werden, die Banden unterhalb von 1600 nm sind aber nur schwach und die Absorption bei 2245 nm für Transmissionsmessungen zu stark. Wird Dichlormethan preisgünstig im Chemikalienhandel bezogen, ist zudem die Rückführbarkeit auf zertifizierte Standards nicht automatisch gegeben. Stand der Technik ist eine dünne Borosilikatglasmatrix (1,5 mm), die Sm_2O_3 , Yb_2O_3 , Nd_2O_3 , sowie La_2O_3 und ZrO_2 enthält. NIRS-Tischgeräte und mobile Geräte für den Einsatz in der Apotheke werden aber in der Regel nicht für Transmissionsmessungen konstruiert.

Zusätzlich nennt das Arzneibuch als Wellenlängenstandard die Verwendung geeigneter Lampen oder anderer, nicht näher ausgeführter Referenzmaterialien. Die Messung

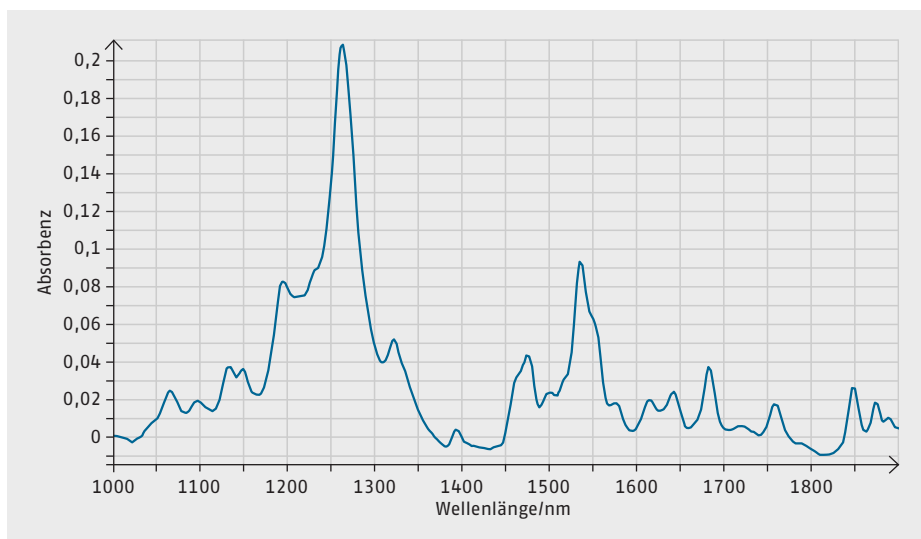
4 Installation und Praxistipps

4.1 Hiperscan apo-ident

Geräte wie das Hiperscan apo-ident verwenden einen schnell rotierenden Scanning-Grating-Spiegel um monochromatische NIR-Strahlung nacheinander auf die Probe zu strahlen. Da die Wellenlängen nicht gleichzeitig sondern sehr schnell nacheinander detektiert werden, können vergleichsweise preisgünstige Detektoren anstelle aufwendiger Photodiodenzellen verwendet werden. Eine zusätzliche Vereinfachung stellt die Verwendung von nichtthermostatierten Detektoren aus Gallium-Indium-Arsenid dar. Durch Einsatz solcher in der Optoelektronik gängigen Halbleiter-Detektoren können zwar nur Spektren im Bereich zwischen 1000–1900 nm aufgenommen werden, aufgrund des redundanten Charakters der Informationen aus mehrfachen Oberschwingungen ist für viele Anwendungen der Verzicht auf den Spektralbereich von 1900–2500 nm aber unkritisch. Zur Kalibrierung werden fest eingebaute Proben von Lanthanoxiden und ein Teflonstandard als interne Weißreferenz mittels Motor regelmäßig in den NIR-Strahl transportiert und gemessen. Die Absorptionsmaxima werden intern von der Gerätesoftware mit den im Arzneibuch geforderten Referenzwerten abgeglichen. Das Lanthanoxidspektrum kann mit der Software angezeigt und für Dokumentationszwecke archiviert werden (• Abb. 4.1).

In Tabelle 2.2.40.–1 führt das Arzneibuch akzeptierte Toleranzen für die Messung in dem in Frage kommenden Wellenlängenbereich an wenigstens drei Wellenlängen auf: $780 \pm 1 \text{ nm}$, $1200 \pm 1 \text{ nm}$, $1600 \pm 1 \text{ nm}$, $2000 \pm 1,5 \text{ nm}$, $2500 \pm 1,5 \text{ nm}$ bzw. bezogen auf Wellenzahlen $12800 \pm 16 \text{ cm}^{-1}$, $8300 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$, $6250 \pm 6 \text{ cm}^{-1}$, $5000 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ und $4000 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$. Dabei sollte jeweils die nächste geeignete Wellenlänge (Wellenzahl) verwendet werden.

Ursprünglich war in der Software des apo-ident-Geräts nur die Bestätigung oder Ablehnung einer vom Operator ausgewählten Eingangsvermutung vorgesehen. Die von MIR-Geräten vertraute Möglichkeit der Identifizierung einer unbekannt Substanz in Form einer Anzeige der Rangliste mit der identifizierten Referenz auf Platz 1 wurde aber von Anwendern und Vertretern von Überwachungsbehörden häufig gefordert und ist seit der apo-ident-Software-Version 0.97 implementiert. Alle Messprotokolle werden durch die apo-ident Software gespeichert und sind jederzeit wieder abrufbar.



• **Abb. 4.1** Scharfe Banden eines Lanthanoxidspektrums

Aus dem Europäischen Arzneibuch geht hervor, dass eine Überprüfung der Leistungsfähigkeit in regelmäßigen Intervallen erforderlich ist. Entsprechend den Vorgaben des Arzneibuches muss die Häufigkeit der Überprüfung einer Risikobeurteilung, die in den Händen der Apotheke liegt, unterzogen werden. Weil sich apo-ident jedoch mit den integrierten Standards ohnehin ständig selbst überprüft, ist eine jährliche Überprüfung aus technischer Sicht nicht unbedingt erforderlich. Der Hersteller empfiehlt deswegen, diese wichtige Überprüfung aller 3 Jahre durchzuführen.

Die für die Prüfung benötigten teuren, zertifizierten Referenzstandards müssen von den Anwendern nicht gekauft werden, sondern werden im Rahmen der durch Hiperscan angebotenen Dienstleistung zur Verfügung gestellt.

Die Überprüfung der Leistungsfähigkeit ist für die Apotheke der Nachweis, dass das Analysesystem den Anforderungen des Europäischen Arzneibuches genügt. Das entsprechende Kalibrierungsprotokoll nach Ph. Eur. 8/2.02.40.00 erhält die Apotheke bei Auslieferung des Geräts.

Praxisbeispiel

Coffeincitrat/Coffein

Wird aus der Auswahl identifizierbarer fester Arzneistoffe das Citronensäure-Salz des Coffeins (Coffeincitrat bzw. Koffeinzitrat) ausgewählt und dann aber eine Probe Coffein vermessen, erhält man nicht nur das Ergebnis „Übereinstimmung 0,0%“, sondern kann den Vergleich der gemessenen Spektraldaten mit den Daten allen in der Substanzklasse hinterlegten Substanzen näher in Augenschein nehmen. Bis zu 20 Ergebnisse, angeordnet nach der höchsten Übereinstimmung, können in einer Rangliste angezeigt werden. Um die im Hintergrund erstellte Rangliste einzusehen, muss lediglich auf ein Symbol (eine Hand) neben dem Messergebnis geklickt werden. Danach öffnet sich die Ansicht mit den Details zur in diesem Beispiel aus nachvollziehbaren Gründen gescheiterten Identifikation. An 1. Stelle (Rang 1) wird die Referenzsubstanz angezeigt, welche die höchste Übereinstimmung mit der Probe aufweist, dies ist in diesem Fall

5 NIRS und Chemometrie

5.1 Vergleich von Spektren

In der aktualisierten Monographie 2.2.40 gestattet das Arzneibuch den direkten Vergleich von Spektren einer Analysesubstanz mit dem einer Referenzsubstanz, was bisher ausdrücklich ausgeschlossen war. In der Regel werden die Rohdaten zusätzlich mit mathematischen Berechnungen so modifiziert, dass störende Faktoren zur Erleichterung der Identifizierung entfernt werden. Dadurch wird der anschließende Spektrenvergleich stabiler gegenüber Unregelmäßigkeiten. Typische Vorbehandlungen für Spektren bestehen in der Umwandlung der Reflexionswerte in Absorptionswerte, Bildung der 1. und 2. Ableitungen oder eine Streuungskorrektur in Form einer Multiplikativen Signalkorrektur (Multiplicative Scatter Correction, MSC). Falls diese häufig eingesetzten Operationen nicht zum gewünschten Erfolg führen, stehen dem Analytiker eine Vielzahl weiterer Verfahren zur Verfügung, für die allerdings im Pharmaziestudium kaum Platz ist und die deshalb sinnvollerweise von Spezialisten bei den Geräteherstellern ausgeführt werden.

Die Chemometrie umfasst eine Reihe statistischer Methoden, die es erlauben, chemische oder spektroskopische Daten zu interpretieren. Ziel ist es, komplexe Datensätze, auf verwertbare Informationen zu reduzieren, wie beispielsweise die Information zum Gehalt einer Substanz. Die NIR-Spektroskopie ist der erste Anwendungsbereich der Chemometrie, der explizit im Europäischen Arzneibuch aufgeführt wurde. Die ursprünglichen Vorbehalte gegenüber chemometrischen Verfahren basieren möglicherweise auf mangelnder Erfahrung mit dem scheinbaren „Black Box“-Ansatz, da die Spektren nicht wie sonst üblich interpretiert werden und Analyseergebnisse nicht ohne weiteres in allen Details nachvollziehbar sind. Häufig ist es sinnvoll, die Rohdatensätze vor der Erstellung eines Modells zu modifizieren, um unerwünschte Signale auszublenden und erwünschte Signale stärker zu gewichten. Es können so auch Wellenlängenbereiche identifiziert werden, die für die Vorhersage der relevanten Eigenschaft von hohem Aussagewert sind. Eine wichtige Aufgabe stellt auch das Entfernen bestimmter Teilbereiche des Spektrums dar, welche für die Bestimmung nicht relevant sind bzw. andere Informationen tragen. Ein Ausschluss der Wasserbanden reduziert häufig den Einfluss der Feuchte hygroskopischer Arzneistoffe bei Identitätsprüfungen. Dieses Vorgehen ist keine fragwürdige Datenmanipulation, sondern sachlich begründbar und daher sinnvoll, in vielen Fällen sogar notwendig. Dabei ist pharmazeutischer Sachverstand gefragt, denn die unkritische Unter-

drückung von Wassersignalen wäre bei der Identifizierung von definierten Hydraten eine Fehlerquelle.

■ **MERKE** Die Datenvorbehandlung für den Spektrenvergleich sollte in Händen von Spezialisten belassen werden, da unkritische Datenvorbehandlung eine unübersehbare Fehlerquelle darstellt.

Anschließend an die Datenvorbehandlung können die Daten in einer Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) oder einer Partial Least Square Regression (PLSR) verarbeitet werden. Auch hier gilt, dass die Vielzahl an mathematischen Methoden nur von Spezialisten beherrscht werden kann.

5.2 Datenvorbehandlung

In Abhängigkeit von der verwendeten Messmethode und der folgenden Datenverarbeitung ist in vielen Fällen eine Datenvorbehandlung erforderlich. Dadurch soll ein möglichst günstiges Signal-Rausch-Verhältnis erreicht und eine Verzerrung der Originaldaten möglichst vermieden oder korrigiert werden.

5.2.1 Rauschen

● Abb. 5.1 zeigt eine idealisierte spektrale Bande ohne Rauschen, in ● Abb. 5.2 ist die gleiche Bande verrauscht dargestellt, das Signal-Rausch-Verhältnis (vgl. Ph. Eur. 2.2.46) beträgt etwa 5. Das Signal in ● Abb. 5.3 erscheint deutlich weniger verrauscht als in ● Abb. 5.2, aber dafür stark verzerrt im Vergleich mit ● Abb. 5.1.

Das Rauschen kann durch einfache Mittelwertbildung vermindert werden. Werden jeweils 11 Messwerte gemeinsam betrachtet und die Summe aller Werte der *i*. Position jeweils ± 5 Werte addiert (**Moving Average**), durch 11 geteilt und statt des Originalwertes aufgetragen, verringert sich das Rauschen (● Abb. 5.3). In dieser Abbildung wird aber auch ein Nachteil dieser Art der Rauschunterdrückung deutlich: Das Signal wird deutlich verzerrt. Moving Average ist eine der am einfachsten zu verstehenden Möglichkeiten der Rauschunterdrückung, aber auch eine der am wenigsten geeigneten, da die Signalverzerrung zu hoch ist.

Andere Formen der Rauschunterdrückung arbeiten daher mit einer gewichteten Mittelung, das heißt unterschiedliche Werte in der Nachbarschaft werden unterschiedlich stark gewichtet. Dadurch kann die Signalstruktur berücksichtigt werden. Es wird ebenfalls ein gemittelt, rauschreduziertes Signal erhalten, aber mit viel geringerer Verzerrung. Der Algorithmus nach **Savitzky-Golay** ist einer der bekanntesten Möglichkeiten zur gewichteten Rauschunterdrückung, es gibt aber eine Reihe von weiteren Optionen, die ähnlich arbeiten und die je nach Signalform und Struktur des Rauschens besondere Vorteile haben. Mit diesen speziellen Eigenschaften der Signalfilterung muss sich der Anwender allerdings nicht auseinandersetzen. Die Möglichkeiten zur Rauschunterdrückung in den NIR-Standard-Softwarepaketen sind gut für ihre Zwecke geeignet. Eine schöne graphisch animierte Darstellung der Mittelwert-Glättung nach Savitzky-Golay findet sich auf der Seite de.wikipedia.org/wiki/Savitzky-Golay-Filter.

6 Validierung und Kalibrierung

6.1 Prüfmittelüberwachung gemäß Arzneibuch

NIR-Spektrometer sind GMP-gerecht qualifizierbar und können einer Prüfmittelüberwachung gemäß Arzneibuch (Ph.Eur. oder auch USP) unterzogen werden. Die Validierung der Auswertemethoden hinsichtlich der Anforderungen des Arzneibuchs dient der Überprüfung der Eignung des erstellten Modells für die Identifizierung der Proben.

Quantitative NIRS-Methoden sind indirekte Analysenmethoden. Die erhaltenen Spektren müssen mit Referenzwerten, die in etablierten Methoden ermittelt werden, in Bezug gesetzt werden. Zudem weisen NIR-Spektren eine Variabilität der optischen Daten auf, die zum Teil im Rauschpegel (noise level) der NIRS-Geräte begründet ist. Einen weit aus größeren Effekt können jedoch Partikelgrößeneffekte, Packungscharakteristik, Verunreinigungen oder unterschiedliche Kristallinität haben. Bei qualitativen Methoden sind diese Herausforderungen sehr viel leichter zu beherrschen indem bei der Zusammenstellung der Referenzdatenbank genügend verschiedene Proben berücksichtigt und ausgewertet werden. Neue Handelsprodukte mit abweichenden Eigenschaften würden bei einer Identifizierung möglicherweise fälschlich ausgeschlossen, so dass Anbieter von Arzneistoffen ein Interesse daran entwickeln müssten, physikalische Parameter wie Korngrößenverteilung etc. in einem marktüblichen Rahmen zu halten, ein Risiko für Patienten entstände dadurch nicht.

Treten Arzneistoffe in verschiedenen Kristallformen auf, sind die NIR-Spektren genau wie auch MIR-Spektren nicht identisch. Deshalb ist es dringend ratsam, in der NIRS für polymorphe Kristallformen unterschiedliche Untergruppen einzuführen. Der Versuch verschiedene Kristallformen in einem Datensatz zusammenzufassen ist aufwendig und nicht zielführend. Vielmehr sollte der Analytiker auswählen können, welche Polymorphe der Ausgangsstoffe vorliegen. Sollte ein Hersteller eine nicht marktübliche Kristallform liefern wollen, müsste er damit rechnen, dass die Identitätsbestimmung bei den Kunden fehlschlägt.

Die rückführbaren Standards des EDQM werden typischerweise in Mengen von 15 mg gehandelt. Diese Substanzmenge reicht für viele instrumentelle Analysemethoden aus, nicht aber, um ein NIRS-Messgefäß zu befüllen. Daher müssen handelsübliche Ausgangsstoffe anderweitig, z. B. durch das ZL identifiziert werden, typischerweise durch die in den Arzneibuchmonographien vorgesehenen Verfahren wie Vergleich von MIR-Spektren, um

sie für eine Referenzdatenbank verwenden zu können. Dieses Vorgehen ist sinnvoll, da Eigenschaften von handelsüblichen Ausgangsstoffen bezüglich Partikelgröße und Korngrößenverteilung etc. auf diese Weise bei der Referenzdatenerstellung berücksichtigt werden, und steht einer Validierung der Referenzdatenbank nicht grundsätzlich im Weg.

Da Kristalle verwittern und organische Arzneistoffe bei der Lagerung chemischen Umsetzungen unterworfen sind, verändern sich die NIR-Spektren von Arzneistoffen über die Lagerungsdauer. Zur Erstellung eines Kalibriermodells für ein Identifizierungsmodul sollten idealerweise Proben verwendet werden, die im Hinblick auf ihre Beschaffenheit und Variabilität den später in der Apotheke zu identifizierenden Proben entsprechen. Arzneistoffe, die im Laufe der Zeit beispielsweise Wasser adsorbieren oder die Kristallform ändern – also in eine andere polymorphe Form übergehen – werden irgendwann nicht mehr mit dem Kalibriermodell übereinstimmen, wenn dieses nur mit frisch synthetisierten Proben erstellt wurde. Dies ist eine Herausforderung für die Wareneingangsanalytik, weil zu identifizierende Substanzen abgelehnt werden können, obwohl keine Verwechslung vorliegt, nur weil sie beim Hersteller oder Zwischenhändler gelagert worden sind. Die Erkennung langsam ablaufender Veränderungen von Ausgangsstoffen ist aber auch ein Vorteil, da diese geänderten Eigenschaften für den Herstellungsprozess kritisch sein können.

Für die Identifizierung von Rezeptursubstanzen, Teedrogen und Defekturarzneimitteln mit einem niedrigen Gesamtrisikoscore von unter 30 sind sequenzielle NIR-Geräte geeignet. Ein Zugriff auf eine beim Gerätehersteller mit gleicher Messtechnik erstellte Datenbank ist praktisch unverzichtbar.

■ **MERKE** Die Qualität der Datenbank ist dabei von entscheidender Bedeutung. Wichtig sind zudem der Zugriff auf die Rohdaten sowie der Einblick in die Datenvorbehandlung, um die Anforderungen des Arzneibuchs zu erfüllen.

Die Kosten für die Erstellung der Datenbank, also die Beschaffung von rückführbaren Standards und von Vergleichssubstanzen, die Datenvorbehandlung und chemometrische Analysen sowie die Validierung der Datenbank werden so auf viele Anwender verteilt. Ein solches Konzept steht und fällt mit einer umfangreichen Datenbank und deren Transferabilität nicht nur von Instrument zu Instrument einer Bauart, sondern auch zu weiterentwickelten Instrumenten. Wenn sich Spektren von Instrument zu Instrument nur wenig unterscheiden, können Algorithmen ähnlich der in ►Kap.5.2 Datenvorbehandlung beschriebenen Multiplikativen Signal-Korrektur (MSC) verwendet werden, um Datenbanken von einer Instrumenten-Baureihe auf eine andere zu übertragen.

Mit den deutlich leistungsfähigeren FT-NIR-Geräten können neben qualitativen auch quantitative Analysen einfach und schnell ausgeführt werden. Spezielle Methoden zur Untersuchung individueller Rezepturen im Defekturmaßstab können entwickelt werden. FT-NIR-Spektrometer und validierte Prüfmethode würden dann einen Einsatz auch bei Defekturszenarien mit einem hohen Risiko (Gesamtrisikoscore > 100) ermöglichen. Für den mittleren Risikobereich werden aktuell thermostatisierte Scanning-Grating-Geräte entwickelt, nichtthermostatisierte Geräte können oberhalb eines niedrigen Risikoscores nur für Messungen von Surrogatparametern aber nicht pauschal für halbquantitative Analysen empfohlen werden.

FTIR-Geräte von Bruker können mit einem zusätzlichen Multiple-Internal-Reflectance-Probenkopf so umgerüstet werden, dass anstelle des für unverdünnte Proben opti-