



Hochschule Anhalt (FH)

Fachbereich

Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik

Studiengang

Pharmatechnik

Thema der Bachelorarbeit

**Raman-Spektroskopie als erste Identitätsprüfung von Rohstoffen in der
Pharmaindustrie**

Verfasser

Carine Yolande Ngassa Noutche

Betreuer

Herr Prof. Dr. Georg Heun

Frau Heike Schynschetzki

Lüchow, den 31.07.2017

Erklärung

Ich versichere, diese Arbeit selbst und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.

Verwendete Literatur oder andere Unterlagen sind jeweils im Text vermerkt und im Anhang aufgelistet.

Lüchow, den 31.07.2017

(Carine Yolande Ngassa Noutche)

Vorwort

Das Studium im Studiengang Pharmatechnik an der Fachhochschule Köthen sieht ein Praxissemester und eine Bachelorarbeit vor.

Aus diesem Grund absolvierte ich mein Praktikum vom 01. Februar 2017 bis zum 22. Mai 2017 bei der Firma Artesan Pharma GmbH & Co.KG in Lüchow und anschließend schrieb ich weiterhin bei der Firma Artesan bis zum 31.07.2017 meine Bachelorarbeit.

Ein Ziel des Praktikums und der Bachelorarbeit besteht darin, das gewonnene Wissen aus den Vorlesungen in der Praxis anzuwenden. Außerdem sind die Sprachkenntnisse zu verbessern und weitere kulturelle und soziale Kompetenzen hinzu zu gewinnen. Das Ganze soll unter dem Aspekt der Globalisierung geschehen und dabei internationales betriebswirtschaftliches Fachwissen angeeignet werden.

Des Weiteren möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen beiden Betreuern Herr Prof. Dr. Georg Heun von der Fachhochschule Köthen und Frau Heike Schynschetzki von der Firma Artesan Pharma GmbH & Co.KG bedanken. Ohne Sie hätte ich nicht diese wertvollen Erfahrungen sammeln und diese sehr interessante Bachelorarbeit schreiben können. Frau Schynschetzki möchte ich für die tatkräftige Hilfe bei der Ausarbeitung dieser Arbeit und für die Verbesserungsvorschläge danken, besonders auch für die gewissenhafte und akribische Durcharbeitung meiner Dokumente, denen im Rohentwurf noch die eine oder andere Ungenauigkeit anhing. Des Weiteren möchte ich es nicht versäumen, mich für die gelungene Zusammenarbeit bei allen Kollegen der Artesan Pharma GmbH & Co.KG zu bedanken.

Auch meinen Familienangehörigen und meinen Freunden danke ich an dieser Stelle herzlich für all ihre Unterstützung, die sie mir jederzeit gaben.

Carine Yolande Ngassa Noutche

Lüchow, im Juli 2017

Inhalt

1.	Einleitung.....	6
2.	Theoretische Grundlagen.....	7
2.1	Einführung in die Spektroskopie	7
2.1.1	Die Elektromagnetische Strahlung	7
2.1.2	Energiezustände eines Moleküls	8
2.1.3	Schwingungsspektroskopie	9
2.2	Molekülspektroskopie.....	9
2.2.1	Schwingungsspektren.....	10
2.2.2	Rotationsspektren	15
2.3	Grundschnwingungen, Normalschnwingungen (Schnwingungen im Normalmodus, normal Modes).....	15
2.3.1	Grundschnwingungen.....	15
2.3.2	Normalschnwingungen eines Moleküls.....	16
2.4	Raman-Spektren.....	17
2.4.1	Raman-Effekt.....	17
2.4.2	Schnwingungs-Raman-Spektren.....	19
2.4.3	Rotation-Raman-Effekt.....	21
2.5	Die Aktivität der Schnwingungen	21
2.5.1	Polarisierbarkeit eines Moleküls	22
2.5.2	kovalente Bindung.....	25
2.6	Charakteristische Gruppenfrequenzen	26
2.6.1	Prinzipielle Effekte.....	27
2.6.2	Schnwingungskopplung.....	27
2.6.3	Kraftkonstanten.....	27
2.6.4	Elektronische Effekte.....	28
2.7	Einfluss der Messparameter auf Raman-Spektren.....	29
2.7.1	Das Problem der Fluoreszenz	29
2.7.2	Das Signal-Rausch-Verhältnis	30
3.	Methodische Grundlagen.....	30
3.1	Truscan RM- Analysator	30
3.1.1	Aufbau des Truscan RM-Analysator	30
3.1.2	Funktionsweise des TruScan RM-Analysators.....	31
3.2	RAMalyze.....	32

3.2.1	Menü Raman Interpretation	32
4.	Rohstoffe und Geräte	36
4.1	Rohstoffe	36
4.2	Geräte.....	37
5.	Praktische Durchführung.....	39
5.1	Methodenerstellung mit dem TruScan RM-Spektrometer	39
5.1.1	Aufnahme der Referenzspektren	39
5.1.2	Erstellung der Methoden	43
5.1.3	Validierung der Methoden	43
5.1.4	Selektivitätstest der Methoden.....	45
5.2	Darstellung des Ergebnisses mit dem TruScan RM-Spektrometer.....	46
5.3	Interpretation charakteristischer Bandenlagen mit RAMalyze.....	47
5.3.1	Raman Interpretation.....	47
6.	Ergebnisse und Diskussion	50
6.1	Bestimmungen der spektralen Aktivität.....	50
6.2	Ergebnisse der Methodenerstellung, Methodvalidierung und Selektivitätstest	51
6.3	Identitätsprüfung Raman-aktiver Rohstoffe mit Hilfe von Referenzspektren	54
6.4	Spektren Interpretation Raman-aktiver Rohstoffe mit RAMalyze	64
6.4.1	Benzocain	65
6.4.2	Carbamazepin.....	67
6.4.3	Lithiumcarbonat	69
6.4.4	Natriumascorbat.....	71
6.4.5	Paracetamol.....	72
6.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	73
7.	Zusammenfassung.....	74
8.	Literaturverzeichnis.....	75
9.	Abbildungsverzeichnis.....	76

1. Einleitung

Einer der ersten Schritte bei der Herstellung von pharmazeutischen Produkten ist die Identifizierung und Prüfung eingehender Rohstoffe die für die Herstellung benötigt werden. Die Identitätsprüfung von Rohstoffen ist ein Erfordernis der GMP-konformen Herstellung pharmazeutischer Produkte. Basierend auf gesetzlichen Regularien existiert bereits in der pharmazeutischen Industrie eine Überprüfung der Identität von Rohstoffen beim Wareneingang [1].

Nach diesen Regularien muss für jede Substanz in der Prüfeinrichtung eine ausführliche Charakterisierung vorhanden sein, aus der neben der geeigneten Bezeichnung, die Identität (einschließlich Chargennummer), Reinheit, Zusammensetzung, Konzentration, Homogenität, Stabilität oder sonstige relevante Eigenschaften eindeutig hervorgehen [2].

Die Identität eines Rohstoffes oder Produktes wird deshalb durch seine chemischen und physikalischen Eigenschaften definiert. Der Trend zur gebündelten 100%-Prüfung sowie die Erweiterung der Produktion können den dafür nötigen Prüfaufwand beträchtlich erhöhen. Pharmazeutische Hersteller suchen nach Möglichkeiten, ihre Produktqualität zu verbessern und gleichzeitig die Herstellungskosten zu reduzieren. Bei Wareneingang wird häufig in separaten Probenzugkabinen der Lieferung eine festgelegte Anzahl von Proben entnommen. Diese werden beschriftet und in das Prüflabor transportiert. Gelegentlich ist auch ein Laborspektrometer im Warenlager aufgestellt. Bis zur Messung der Proben und Freigabe bleibt die Ware gesperrt, was einige Tage dauern kann. Insbesondere die Änderung von der gebräuchlichen ($\sqrt{n+1}$) Probenahme zur 100%-Beprobung wird selbst bei Aufstockung der apparativen und personellen Kapazität die Durchlaufzeiten deutlich verlängern. Deshalb suchen viele Pharmafirmen nach Möglichkeiten, die Identitätsprüfung gleich im Wareneingang durchzuführen möglichst ohne den aufwändigen und sensiblen Schritt der Probenahme.

Eine effektive Methode zur qualitativen Prüfung pharmazeutischer Rohstoffe ist die Raman-Spektroskopie. Die Methode basiert auf den eindeutigen spektralen „Fingerabdrücken“ der verschiedenen Materialien. Individuell anpassbare Sicherheitseinstellungen und ausführliche Dokumentationen sichern die Einhaltung der GMP-Ansprüche sowie 21-CFR-Part-11-Konformität. Die Merkmale der Ramanspektroskopie insbesondere denn für die Schwingung bestimmter molekularer Bindungen charakteristischen scharfen Peaks gestatten also die Verifizierung einer großen Bandbreite an Rohstoffen. Daher sind Methoden zur Strukturbestimmung wichtige Werkzeuge zur Identifizierung von unbekanntem und zum Nachweis von bekannten Verbindungen.

Raman-Spektroskopie wird als schnelle und zerstörungsfreie Methoden bevorzugt, um die chemische Identität festzustellen und die Qualitätskontrolle zu gewährleisten. Der Einsatz von Handspektrometern kann die Abläufe im Wareneingang grundlegend verändern und beschleunigen. Diese Prozedere konnte mit relativ geringem Zeitaufwand durchgeführt

werden. Zur zügigen Erstellung der Bibliothek trug die Ramantechnologie selbst das Ihrige bei, denn das Einlesen von Standards ist schnell und einfach. Die spektralen Banden, die im Raman-Spektrum erfasst werden, sind spezifisch für jede Molekülbindung. Mit Hilfe der Raman-Spektroskopie können selbst komplexe Stoffgemische anhand ihres Bandenmusters identifiziert werden. Sie ist berührungsfrei, benötigt keine Probenvorbereitung und kann auch in wässrigen Lösungen eingesetzt werden.

Die Einsatzgebiete und Verwendungsmöglichkeiten der Raman-Spektroskopie sind vielfältig. Neben der hervorragenden Einsatzmöglichkeit zur Qualitätskontrolle von Ausgangsmaterialien, eignet Sie sich auch für die Sicherheitskontrollen bei Polizei und Zoll (z.B. Drogenidentifizierung), Militär (z.B. Sprengstoffdetektion) sowie zur Lebensmittelkontrolle. Für die Gefahrenabwehr konzipierte Raman-Spektrometer ermöglichen den Feuerwehren Einsätze mit unbekanntem Gefahrstoffen durch Vor-Ort-Analytik des freigesetzten Stoffes besser zu begegnen.

In der Produktion von Arzneimitteln bei der Firma Artesan Pharma GmbH & Co. KG werden mehr als 100 verschiedene Rohstoffe eingesetzt. Im Wareneingang wird die Identifizierung von Rohstoffen ständig qualitativ verbessert. Für die Artesan Pharma sollen nun im Rahmen dieser Bachelor-Arbeit die Methoden für das eingesetzte Ramanspektrometer „TruScan RM“ erstellt werden und im Zuge dessen anhand verschiedener Substanzklassen und deren Kontakt mit dem Ramanspektrometer die spektrale Ramanaktivität festgestellt werden. Parallel werden Rohstoffe bzw. deren Spektren mit den charakteristischen Bandenlagen mit dem Spektreninterpretationsprogramm „RAMalyse“ auf funktionelle Gruppen untersucht.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Einführung in die Spektroskopie

2.1.1 Die Elektromagnetische Strahlung

Die Untersuchung der Natur der Teilchen mithilfe der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie wird allgemein als Spektroskopie bezeichnet (Platzhalter1).

Das elektromagnetische Spektrum umfasst die Bereiche der Radiowellen, Mikrowellen, Infrarotstrahlung, des sichtbaren Lichtes, der Ultraviolettstrahlung, Röntgenstrahlung und Gammastrahlung. Die verschiedenen elektromagnetischen Strahlungen unterscheiden sich in ihren Frequenzen ν und damit in ihren Wellenlängen λ , die über Gl. 1 in Verbindung stehen (c Lichtgeschwindigkeit) [3].

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad [\text{Hz}] \quad \text{Gl. 1}$$

Die Quantentheorie stellt elektromagnetische Strahlung als einen Strom von Energiepaketen oder Quanten dar, die sich mit Lichtgeschwindigkeit fortbewegen. Die PLANCKSche

Beziehung zwischen der Energie eines Quants und der Frequenz der entsprechenden Strahlung fasst die Teilchen- und Wellennatur des Lichtes zusammen:

$$E = h \cdot \nu \quad [\text{J}] \quad \text{Gl. 2}$$

Die Wellenzahl bezeichnet die Zahl der Perioden (2π) eines Wellenzuges von 1 cm Länge.

Moderne Spektrophotometer stellen ein Infrarotspektrum linear in Wellenzahlen dar; für die Umrechnung von $\tilde{\nu}$ in λ gilt [3].

$$\tilde{\nu} = \frac{c}{\lambda} = \frac{10000}{\lambda} \quad [\text{cm}^{-1}] \quad (\lambda \text{ in } \mu\text{m}, 1\mu\text{m} = 10^{-6}\text{m}) \quad \text{Gl. 3}$$

2.1.2 Energiezustände eines Moleküls

Bei Zimmertemperatur befinden sich die Moleküle in einem isolierten System fast ausschließlich im elektronischen Grundzustand und überwiegend auch auf dem niedrigsten Schwingungsniveau. Hingegen können höhere Rotationsniveaus schon thermisch angeregt sein. Durch geeignete Energiezufuhr (Erwärmung, Einstrahlung von langwelligem Licht) können alle erlaubten Rotations- und Schwingungszustände angeregt werden. Jeder Elektronenzustand eines Moleküls ist durch Schwingungsniveaus unterteilt; die Energiedifferenz zwischen zwei benachbarten Schwingungsniveaus beträgt 1/10 bis 1/100 der Energiedifferenz zwischen zwei benachbarten Elektronenzuständen des Moleküls. Jedes Schwingungsniveau ist seinerseits durch Rotationsniveaus unterteilt; die Energiedifferenz zwischen zwei benachbarten Rotationsniveaus beträgt ungefähr 1/100 der Differenz zwischen zwei benachbarten Schwingungsniveaus.

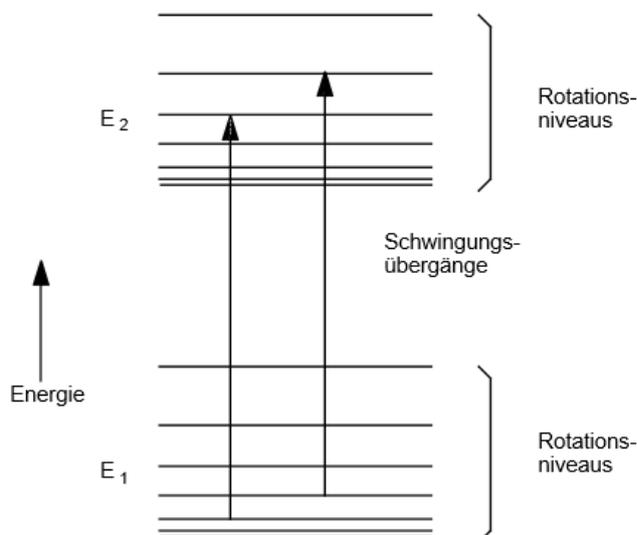


Abb. 1: Schematische Darstellung der Schwingungs- und Rotationsniveaus eines Moleküls

Die Feinstruktur von Rotationschwingungsspektren lässt sich meistens nur bei Schwingungen freier Moleküle, also im Spektrum von Gasen beobachten. Wegen der kleinen Energiedifferenzen zwischen den Rotationsniveaus (rund 0,005 eV je Molekül) ist der Abstand der Rotationslinien im Spektrum klein. Der zu einem bestimmten

Schwingungsübergang gehörende Satz von Rotationslinien wird "Bande" genannt; jeder einzelne Schwingungsübergang liefert dementsprechend eine eigene Bande. Die Gesamtheit aller Banden für einen gegebenen Übergang zwischen Elektronenniveaus wird als Bandengruppe oder Bandensystem bezeichnet.

Rotationschwingungsspektren sind im Bereich von 4000 bis 100 cm^{-1} (2,5...100 μm) zu beobachten. Die höheren Übergänge (vom Grundzustand in das übernächste oder noch höhere Schwingungsniveau) führen zu Absorptionen im nahen Infrarot (10000...4000 cm^{-1}). Absorptionsbanden im fernen Infrarot jenseits von 100 cm^{-1} in den Spektren freier Moleküle gehören zu reinen Rotationsübergängen. Bei Festkörpern gehören solche Absorptionen zu Kristallgitterschwingungen.

Eine bestimmte Schwingung lässt sich unter Absorption von Infrarotstrahlung anregen, wenn sich im Ablauf der Schwingung das Dipolmoment des Moleküls ändert. (Für das Auftreten einer Ramanstreuung ist Voraussetzung, dass sich die Polarisierbarkeit des Moleküls im Ablauf der Schwingung ändert.)

2.1.3 Schwingungsspektroskopie

Die Schwingungsspektroskopie beschäftigt sich mit der Absorption von Lichtquanten der Energie E , welche eine Zustandsänderung eines Moleküls hervorrufen. Anregungen im Wellenlängenbereich des nahen bis mittleren Infrarot, genutzt in der IR- und Raman Spektroskopie, erzeugen Änderungen von Schwingungs- und Rotationszuständen. Die Erfassung der IR-Spektren basiert auf der Absorption von IR-Strahlung. Im Gegensatz dazu wird bei der Raman-Spektroskopie die Streustrahlung detektiert. Zur Charakterisierung der elektromagnetischen Strahlung wird in der optischen Spektroskopie die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ verwendet [4]. Die Wellenzahl, der reziproke Wert der Wellenlänge λ mit der Einheit cm^{-1} , stellt die Proportionalität zur Frequenz ν (Gl. 4) und mit Gl. 2 auch die direkte Proportionalität zur Energie E her (Gl. 5).

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} [\text{cm}^{-1}] \quad \text{Gl. 4}$$

$$E = h \cdot c \cdot \tilde{\nu} [\text{J}] \quad \text{Gl. 5}$$

2.2 Molekülspektroskopie

Unter Molekülspektroskopie versteht man die präzise Messung von Frequenzen bei der Wechselwirkung zwischen Molekülen und elektromagnetischen Wellen. Die spektralen Bereiche lassen sich auf folgende Weise einteilen und kennzeichnen, wobei mit kleinen Energien begonnen wird und bei der Verknüpfung der Frequenzen mit physikalischen Ursachen die Frequenzbereiche oft nur unscharf voneinander abgegrenzt werden können: Mit Radiofrequenzen (kHz bis einige 100 MHz) können die Kernspinresonanz-Übergänge untersucht werden

- Mikrowellen (etwa 1 bis 100 GHz) charakterisieren den Bereich der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie und der Rotationsspektroskopie kleiner Molekülen in der Gasphase
- Infrarot-Spektroskopie (vom Mikrowellen- bis zum sichtbaren Bereich bei 700 nm) deckt den Bereich der Rotations- und, im Nahinfrarot ($\lambda = (10^{-3} - 10^{-1})nm$) die Schwingungs-Übergänge ab, die sogenannten Rotations-Schwingungs-Spektren
- Im sichtbaren-Bereich (700 bis 400 nm) und im UV-Bereich (400 bis 100 nm) liegen meist die elektronischen Übergänge der Valenzelektronen und erzeugen die sogenannten Bandenspektren, die sich aus Elektronen-Übergängen und überlagerten Rotations- und Schwingungsniveau-Änderungen zusammensetzen
- Im Vakuumultraviolette (VUV) (180 bis 100 nm) und mit Röntgen- und γ -Strahlung haben die Photonen derart hohe Quantenenergien, dass man Übergänge innerer Elektronen (innere Schalen) untersucht, wobei man häufig Photoelektronen-Spektroskopie betreibt.

2.2.1 Schwingungsspektren

In diesem Abschnitt werden reine Schwingungsspektren behandelt. Die Energie, die zur Anregung einer Schwingung benötigt wird, reicht auch immer zur Anregung von Rotationen der Moleküle aus.

Schon bei der Behandlung der Rotationsspektren von Molekülen wurde deutlich, dass die chemischen Bindungen ein bestimmtes Maß an Elastizität aufweisen, da sie durch die bei der Rotation auftretenden Zentrifugalkräfte gedehnt wurden. Diese Elastizität erlaubt auch die Bewegung (Schwingung) von Atomen eines Moleküls um ihre Gleichgewichtslage.

Der Punkt 2.2.1 befasst sich mit dem harmonischen und dem anharmonischen Oszillator, mit denen Schwingungen beschrieben werden können.

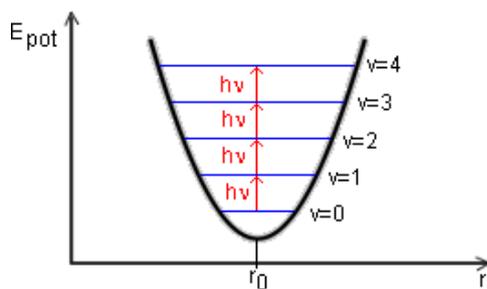


Abb. 2: harmonischer Oszillator

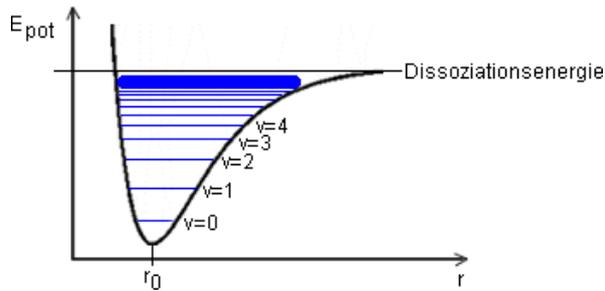


Abb. 3: anharmonischer Oszillator

2.2.1.1 Das Federkraftmodell

Schwingungen von Molekülen können in erster Näherung mit dem einfachen Modell des harmonischen Oszillators beschrieben werden. Grundlage hierfür ist zunächst die klassische Mechanik. Im ersten Schritt betrachtet man eine Masse, die an einer Feder befestigt ist. Die Feder befindet sich an einem unbeweglichen Gegenstand.

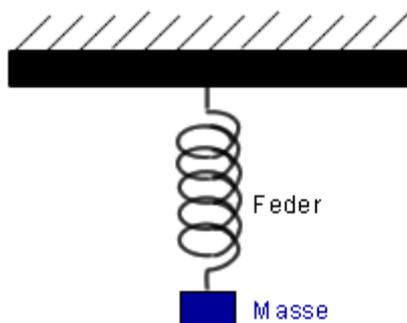


Abb. 4: ungedämpfter Federschwinger

Zieht man die Masse aus ihrer Gleichgewichtslage, dann wirkt eine rücktreibende Kraft entgegen:

$$F = k\Delta r$$

F - rücktreibende Kraft

k - Kraftkonstante der Feder

Δr - Auslenkung der Feder

Die dazugehörige Energiefunktion lautet:

$$E = \frac{1}{2}k \cdot \Delta r^2 \quad \text{Gl. 6}$$

Diese Funktion hat die Form einer Parabel. Die potenzielle Energie erreicht ihr Maximum, wenn die Feder maximal ausgedehnt bzw. maximal zusammengedrückt wird. Die potenzielle Energie ist dagegen null, wenn sich die Feder in ihrer Gleichgewichtslage befindet [4].

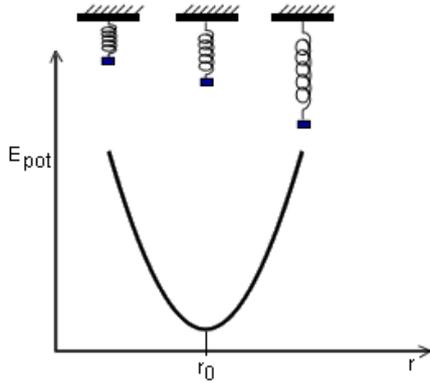


Abb. 5: Energiefunktion des ungedämpften Federschwingers

Zur Beschreibung der Schwingungsfrequenz dieser Bewegung mit Hilfe der klassischen Mechanik geht man vom Newton'schen Gesetz aus:

$$F = m \cdot a \quad \text{F- Kraft, m- Masse, a- Beschleunigung.} \quad \text{Gl. 7}$$

Die Beschleunigung ist die zweite Ableitung des Weges nach der Zeit:

$$a = \frac{d^2 \Delta r}{dt^2} \quad \text{Gl. 8}$$

Damit ergibt sich für die Kraft F:

$$F = m \frac{d^2 \Delta r}{dt^2} \quad \text{Gl.9}$$

Setzt man für F den Term $-k\Delta r$ ein, dann folgt:

$$-k \cdot \Delta r = m \frac{d^2 \Delta r}{dt^2} \quad \text{Gl. 10}$$

Die Lösung dieser Differenzialgleichung lautet:

$$\Delta r = A \cos(2\pi vt) \quad \text{Gl. 11}$$

Die zweite Ableitung ergibt:

$$\frac{d^2 \Delta r}{dt^2} = -4\pi^2 v^2 A \cos(2\pi vt) \quad \text{Gl.12}$$

Damit ergibt sich für die Schwingungsfrequenz der Masse v_m :

$$v_m = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad \text{Gl.13}$$

2.2.1.2 Der harmonische Oszillator

Nach der Behandlung des Federkraftmodells betrachtet man nun ein System, das aus den Massen m_1 und m_2 besteht. Diese Massen sind durch eine Feder verbunden. Die Gleichung

für die Schwingungsfrequenz der Masse aus dem Federkraftmodell muss nun so modifiziert werden, dass beide Massen m_1 und m_2 berücksichtigt werden. Dazu wird die reduzierte Masse μ eingesetzt:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \quad \text{Gl.14}$$

Das mechanische Modell beschreibt die Vorgänge auf molekularer Ebene nur unvollständig. Die Quantelung der Schwingungsenergien wurde bisher nicht berücksichtigt. Mit Hilfe der Quantenmechanik können die zulässigen Schwingungsenergien berechnet werden:

$$E = \left(v + \frac{1}{2}\right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad v: \text{Schwingsquantenzahl } v = 0; 1; 2; 3; \dots$$

$$E = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu_m \quad \nu_m: \text{Schwingungsfrequenz aus dem mechanischen Modell} \quad \text{Gl. 15}$$

Aus dieser Gleichung geht hervor, dass ein Molekül immer schwingt (auch am absoluten Nullpunkt). Ist $v=0$, dann schwingt das Molekül immer noch mit der Energie $\frac{1}{2}h\nu_m$. Diese Energie wird auch als Nullpunktenergie bezeichnet. Die Auswahlregel für Schwingungsübergänge beim harmonischen Oszillator lautet $\Delta v = \pm 1$. Der Abstand zwischen den benachbarten Energieniveaus ist immer identisch. Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Moleküle im Schwingungsgrundzustand ($v=0$).

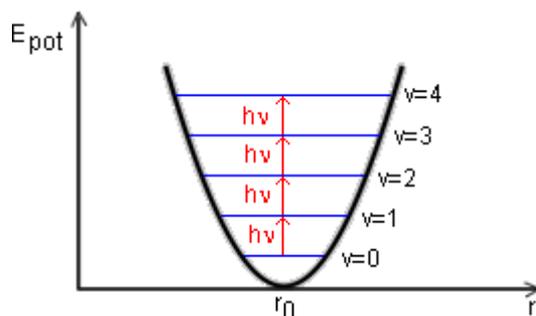


Abb. 6: harmonischer Oszillator

Die Energie beträgt dann:

$$E_0 = \frac{1}{2} h\nu_m \quad \text{Gl. 15.1}$$

Wird das Molekül durch Anregung in den ersten angeregten Schwingungszustand ($v=1$) angehoben, dann ist die Energie:

$$E_1 = \frac{3}{2} h\nu_m \quad \text{Gl. 15.2}$$

$$E_1 - E_0 = \frac{3}{2} h\nu_m - \frac{1}{2} h\nu_m = h\nu_m \quad \text{Gl. 15.3}$$

Genau die gleiche Energiedifferenz erhält man, wenn ein Molekül aus dem ersten angeregten Schwingungszustand ($v=1$) in den zweiten ($v=2$) gebracht wird.

$$E_2 - E_1 = \frac{5}{2}h\nu_m - \frac{3}{2}h\nu_m = h\nu_m \quad \text{Gl. 15.4}$$

Das bedeutet, dass alle Linien bei einer Wellenzahl auftreten, egal um welche Übergänge es sich handelt [4].

2.2.1.3 Der anharmonische Oszillator

Betrachtet man nun reale Moleküle, dann erkennt man, dass das Modell des harmonischen Oszillators Molekülschwingungen nicht vollständig beschreibt. Moleküle können nicht unbegrenzt zusammengestaucht oder gedehnt werden. Im ersten Fall wirken Abstoßungskräfte zwischen den Kernen entgegen. Im zweiten Fall kann das Molekül dissoziieren. Die beim harmonischen Oszillator angewendete Energiefunktion, die die Form einer Parabel hat, muss durch eine genauere Funktion ersetzt werden. Hierfür wird das Morse-Potenzial verwendet:

$$E = D_e [1 - e^{-a\Delta r}]^2 \quad D - \text{Dissoziationsenergie, } a - \text{Konstante; für jedes Molekül charakteristisch} \quad \text{Gl.16}$$

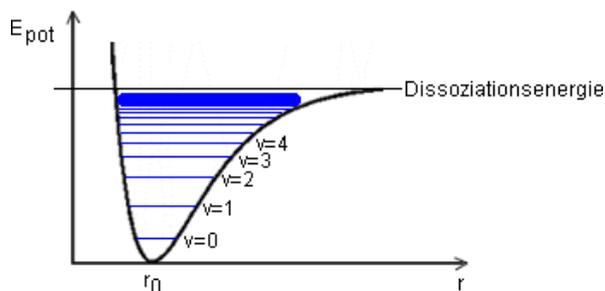


Abb. 7: anharmonischer Oszillator

Diese neue Energiefunktion hat die Form, wie sie im Bild dargestellt ist: Diese Kurven sind von Molekül zu Molekül unterschiedlich, da die Konstante a für jedes Molekül charakteristisch einen eigenen Wert annimmt.

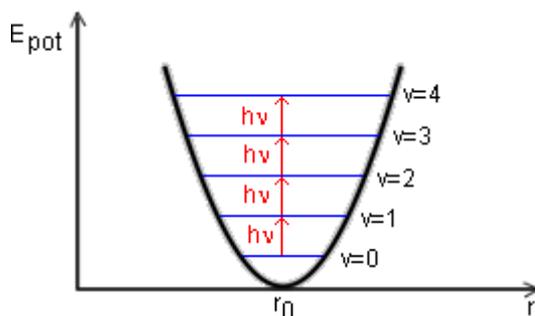


Abb. 8: harmonischer Oszillator

Vergleicht man aber den Kurvenverlauf des harmonischen Oszillators mit dem des anharmonischen Oszillators, dann erkennt man, dass sie bei niedrigen potenziellen Energien sehr ähnlich sind [4].

2.2.2 Rotationspektren

Rotationspektren sind Übergänge zwischen den Rotationsniveaus eines bestimmten Schwingungsniveaus in einem festgelegten Elektronenzustand des Moleküls. Bei solchen Übergängen ändert sich nur die Rotationsquantenzahl J , und die dazugehörigen Spektren bestehen meist aus einer Vielzahl eng benachbarter Linien mit fast äquidistanten Abständen. Für den einfachen Fall eines zweiatomigen Moleküls lassen sich die Abstände im Rotationspektrum durch die quantenmechanische Beschreibung eines starren Rotators (erste Näherung) berechnen und man erhält für die Rotationsenergien (in Joule)

$$E_{rot} = \frac{h^2}{2\theta} J(J+1) \quad (J = 1, 0, 2, \dots) \quad \text{Gl. 17}$$

mit dem Trägheitsmoment θ . Diese Beziehung wird auch geschrieben als

$$\nu(J) = (BJ(J+1)) \quad (J = 0, 1, 2, \dots) \quad \text{Gl. 18}$$

wobei B die sogenannte Rotationskonstante ist

$$B = \frac{h}{8\pi^2 c \theta} [cm^{-1}] \quad \text{Gl. 19}$$

Dabei ist $\tilde{\nu} = \frac{E}{hc}$ die Wellenzahl bezogen auf den Grundzustand des Moleküls und wird üblicherweise in der Einheit cm^{-1} angegeben.

2.3 Grundschwingungen, Normalschwingungen (Schwingungen im Normalmodus, normal Modes)

2.3.1 Grundschwingungen

Moleküle können Translationen, Rotationen und Schwingungen ausführen. Diese drei Bewegungsformen werden als zeitliche Änderung der Lagekoordinaten der Atome in dem betrachteten Molekül beschrieben. Hierzu legen wir zweckmäßigerweise in jeden Atomkern eines Moleküls den Ursprung eines kartesischen Koordinatensystems; dabei sollen die x -, y - und z -Koordinaten jeweils parallel zueinander liegen. Eine Bewegung liegt vor, wenn sich mindestens eine Lagekoordinate mit der Zeit verändert.

Bei einer Translation ändert nur der Massenschwerpunkt des Moleküls seine Lage; die Kernabstände und Winkel in dem Molekül bleiben erhalten. Bei einer Rotation ändert sich nur die Orientierung des Moleküls im Raum; Winkel, Abstände und Lage des Schwerpunkts des Moleküls bleiben erhalten. Bei einer Schwingung ändern sich die Kernabstände; die Lage des Schwerpunkts bleibt wiederum erhalten. Entsprechend den drei Raumkoordinaten hat jedes Atom drei Freiheitsgrade der Bewegung; zur Beschreibung aller Bewegungsmöglichkeiten eines N -atomigen Moleküls müssen wir also $3N$ Koordinaten angeben. Wenn wir uns nur für die Schwingungsmöglichkeiten eines Moleküls interessieren, dann müssen wir von der Gesamtzahl der Bewegungsmöglichkeiten die Zahl der Translationen 3 und die

Zahl der Rotationen (bei einem nichtlinearen Molekül 3, bei einem linearen 2) abziehen. Für die Beschreibung der Schwingungsmöglichkeiten eines nichtlinearen Moleküls brauchen wir demnach $3N - 6$, für lineare Moleküle $3N - 5$ -Koordinatenangaben.

Es muss zunächst festgestellt werden, dass sich bei einem schwingenden Molekül genauso wie bei einem mechanischen Modell aus Massen und Spiralfedern alle Schwingungsmöglichkeiten überlagern. Dies lässt sich leicht zeigen, wenn man ein mechanisches Modell mit mehreren Schwingungsmöglichkeiten mit periodischem Blitzlicht veränderlicher Frequenz (Stroboskop) bestrahlt. Jedes Mal, wenn die Frequenz des stroboskopischen Lichtes mit einer Eigenfrequenz des Modells übereinstimmt, scheint das Modell stillzustehen [5].

2.3.2 Normalschwingungen eines Moleküls

Die Normalschwingungen sind die beschriebenen "übrigen" Freiheitsgrade des Moleküls. Andere Schwingungen, z.B. Schwingungen von nur zwei Atomen in mehr als zweiatomigen Molekülen lassen sich durch Kombination aus entsprechenden Normalschwingungen gewinnen.

Eine Normalschwingung zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus:

- Alle Atome des Moleküls schwingen mit gleicher Frequenz und (meist) Phase, sie durchlaufen also gleichzeitig Maxima, Nulldurchgänge und Minima
- Die Amplitude der jeweiligen Schwingung hängt von der Masse der schwingenden Atome ab
- Die Schwingung erfolgt derart, dass der Schwerpunkt erhalten bleibt (z.B. dürfen nicht alle Atome in die gleiche Richtung schwingen, es darf sich also keine Translation ergeben) und so dass sich außerdem keine Rotation ergibt [5].

2.3.2.1 Charakterisierung von Schwingungen

Betrachten wir einmal das Kohlenstoffdioxid-Molekül CO_2 , Wie Abbildung 9 zeigt, ist nicht nur eine Schwingung der Atome untereinander möglich, sondern vier.

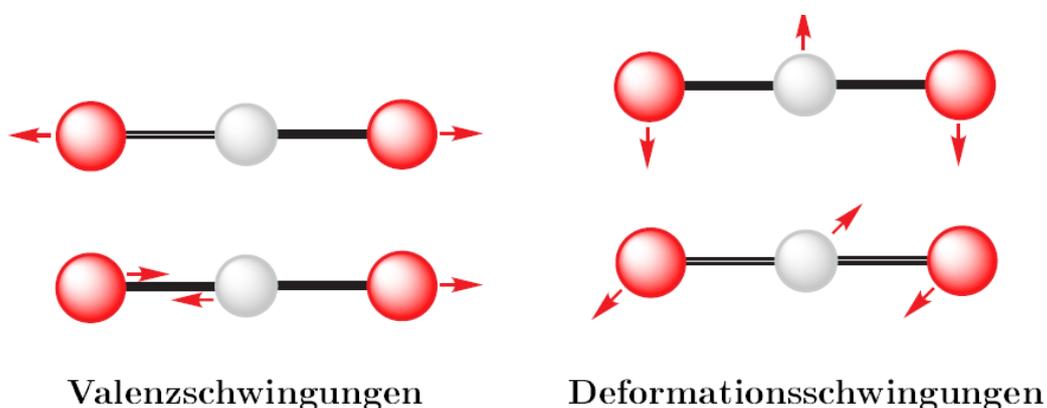


Abb. 9: Valenz- und Deformations-Schwingungen des Kohlendioxids

In Abbildung 9 wurden die vier Schwingungen des CO₂ bereits in die zwei Schwingungsarten eingeteilt: Valenz- und Deformationsschwingungen. Als Valenzschwingungen bezeichnet man Bewegungen entlang der Bindungsachse, also solche, bei denen sich die Bindungslänge verändert. Ändert sich jedoch der von den Bindungen eingeschlossene Winkel bei nahezu konstanter Bindungslänge, so handelt es sich um Deformationsschwingungen. Eine weitere Einteilung der Valenzschwingungen nach dem Symmetrieverhalten unterscheidet zwischen symmetrischen (Erhalt der Molekülsymmetrie) und antisymmetrischen (Verlust eines oder mehrerer Symmetrieelemente) Schwingungen sowie energiegleichen, entarteten Schwingungen. Unter den Deformationsschwingungen kann noch weiter in Spreiz- und Pendel-, sowie in Torsions- und Kippschwingungen unterschieden werden. Diese Namen

leiten sich sozusagen von der Art der Deformation ab. Eine Übersicht über die Unterteilung liefert Abbildung 10. Die obere Valenzschwingung in Abbildung 9 ist zum Beispiel symmetrisch, die untere antisymmetrisch. Die beiden Deformationsschwingungen (Spreizschwingungen) sind energetisch entartet, sie absorbieren bei der gleichen Frequenz und liefern deshalb nur eine Absorptionsbande.

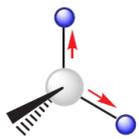
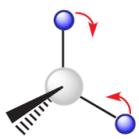
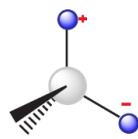
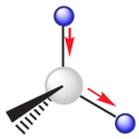
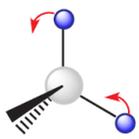
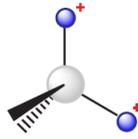
Valenzschwingungen ν	Deformationsschwingungen δ	
 symmetrisch, ν_s	 Spreiz- („bending“), δ	 Torsions- („twist“), τ
 antisymmetrisch, ν_{as}	 Pendel- („rocking“), δ	 Kipp- („wagging“), δ

Abb. 10: Verschiedene lokalisierte Schwingungen der Methyl-Gruppe (+ steht für Schwingungen vor, - für Schwingungen hinter der Papirebene)

2.4 Raman-Spektren

2.4.1 Raman-Effekt

Als Raman-Spektroskopie bezeichnet man eine spektroskopische Analysemethode zur Untersuchung von inelastischer Streuung von Licht an Molekülen. Dabei wird das Raman-Streulicht bei Wellenlängen beobachtet, das durch angeregte Molekülschwingungen gegenüber dem einfallenden Licht verschoben ist. Der Raman-Effekt ist ein Streuphänomen. Es ist allgemein bekannt, dass an trüben bzw. kolloidalen Proben eine Streuung von Licht an den makroskopischen Partikeln auftritt. Dieser Effekt wird als Tyndall-Streuung bezeichnet. Was passiert aber nun, wenn ein monochromatischer Lichtstrahl auf eine völlig staub- und

partikelfreie Probe trifft, die diesen Lichtstrahl kaum absorbiert? Das Licht wird an den Molekülen gestreut.

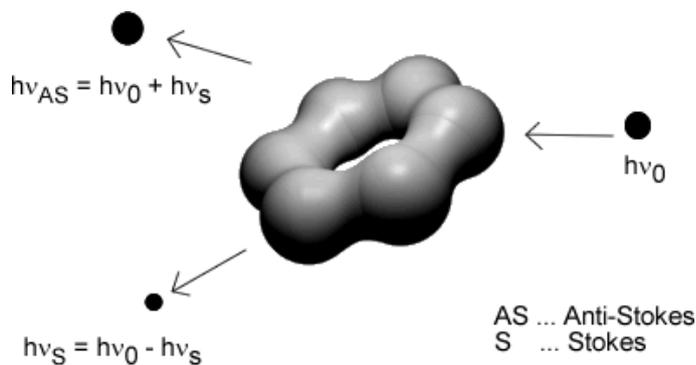


Abb. 11: Raman Spectroscopy edited by B. Schrader (1995); S. 19, Abb. 2.4.-1a

Der größte Teil dieser Streustrahlung (10^{-3} – 10^{-10} ; 99,9 %) hat dieselbe Energie bzw. Frequenz wie das eingestrahlte Licht und wird als Rayleigh-Streustrahlung bezeichnet. Neben dieser Strahlung findet man außerdem einen kleinen Teil von Streustrahlung (10^{-5} – 10^{-8} – 10^{-10}), deren Energie bzw. Frequenz sich von der Rayleigh-Streustrahlung unterscheiden. Diese Strahlung wird als Raman-Streustrahlung bezeichnet. Die Raman-Streustrahlung wird von Molekülschwingungen und Molekülrotationen verursacht. Die Raman-Spektroskopie ist damit eine spektroskopische Methode, die, wie die IR-Spektroskopie, häufig zur Strukturaufklärung organischer und anorganischer Verbindungen eingesetzt wird.

Wenn ein Molekül einer Probe mit einem Lichtquant der Energie $h\nu$ wechselwirkt, wird es zunächst auf einen virtuellen Zustand angehoben. Dieser virtuelle Zustand befindet sich zwischen dem Grundzustand und dem ersten elektronischen Zustand und kann jeden beliebigen Wert annehmen. Er ist nicht gequantelt.

Die Rayleigh-Linie weist im Spektrum dieselbe Frequenz wie das Erregerlicht auf. Es handelt sich hier um einen elastischen Stoß zwischen Molekül und einem Lichtquant der Erregerstrahlung. Bei der Rayleigh-Streuung wird also keine Energie an das Molekül abgegeben bzw. vom Molekül aufgenommen. Dies ist der wahrscheinlichste Prozess. Deshalb ist die Rayleigh-Linie im Raman-Spektrum sehr intensiv.

Die Stokes-Linien entstehen dadurch, dass Moleküle, die sich im Schwingungsgrundzustand befinden, durch Aufnahme von Energie des eingestrahlten Lichtes in einen angeregten Schwingungszustand übergehen. Die Streustrahlung befindet sich demnach bei größeren Wellenlängen (kleineren Frequenzen) als die Rayleigh-Linie.

Die Anti-Stokes-Linien entstehen, wenn sich ein Molekül schon in einem angeregten Schwingungszustand befindet. Dadurch können sie ihre Schwingungsenergie an die Anregungsstrahlung abgeben und selbst in den Schwingungsgrundzustand übergehen. Die Streustrahlung befindet sich demnach bei kleineren Wellenlängen (größeren Frequenzen) als die Rayleigh-Linie. Da sich bei Raumtemperatur aber nur wenige Moleküle im angeregten

Schwingungszustand befinden, sind diese Übergänge selten und die Intensitäten der Anti-Stokes-Linien nur gering.

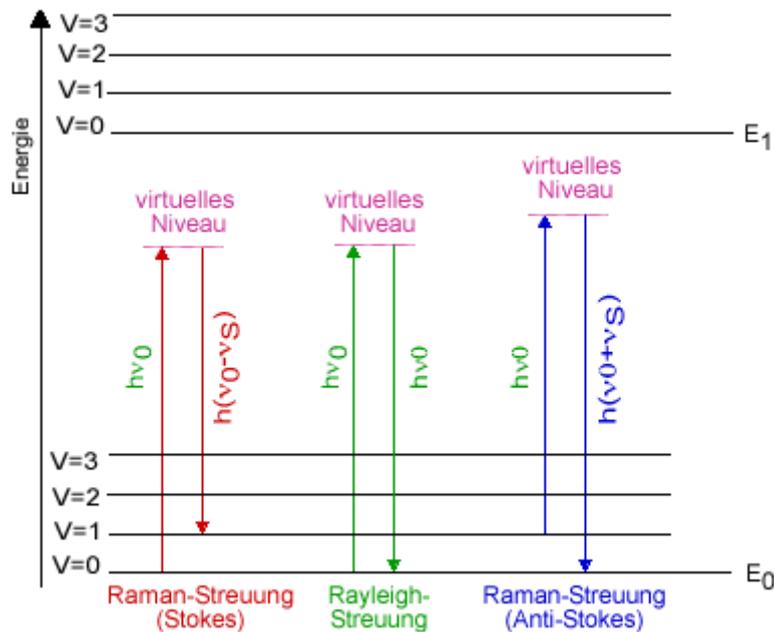


Abb. 12: Energieschema der Rayleigh- und Raman-Streuung; ΔE_M Energieänderung eines Moleküls [MCCREERY 2000, modifiziert].

2.4.2 Schwingungs-Raman-Spektren

Die Rayleigh- und die Ramanstreuung lassen sich anhand des Energieniveaudiagramms eines zweiatomigen Moleküls der Gl. 20 veranschaulichen. Aus dem Energieerhaltungssatz folgt, dass die Gesamtenergie des Systems vor und nach dem Streuprozess unverändert ist.

$$\varepsilon_{vor} + hc\tilde{\nu} = \varepsilon_{nach} + hc\tilde{\nu}_s \quad \text{Gl. 20}$$

ε_{vor} und ε_{nach} sind die Energien des Moleküls vor beziehungsweise nach dem Streuprozess.

Diese Energien setzen sich aus der elektronischen Energie, der Schwingungsenergie und der Rotationsenergie des Moleküls zusammen.

Im Beispiel der Abbildung 13 entsprechen die durchgezogenen Linien Schwingungsenergien mit den Schwingungsquantenzahlen $v = 0,1,2$. Die beiden energetisch höheren, gestrichelt gezeichneten "virtuellen Energien" sind keine Eigenenergien des Moleküls. Diese Energien sind einfach die Summe der Energie des Ausgangszustands des Moleküls und der Energie des einfallenden Photons. Daher kann von den Ausgangszuständen aus kein Absorptionsprozess in diese Zustände stattfinden. Die zugehörigen virtuellen Zustände oder Zwischenzustände können physikalisch nicht interpretiert werden, sie dienen der Veranschaulichung der auftretenden Energien:

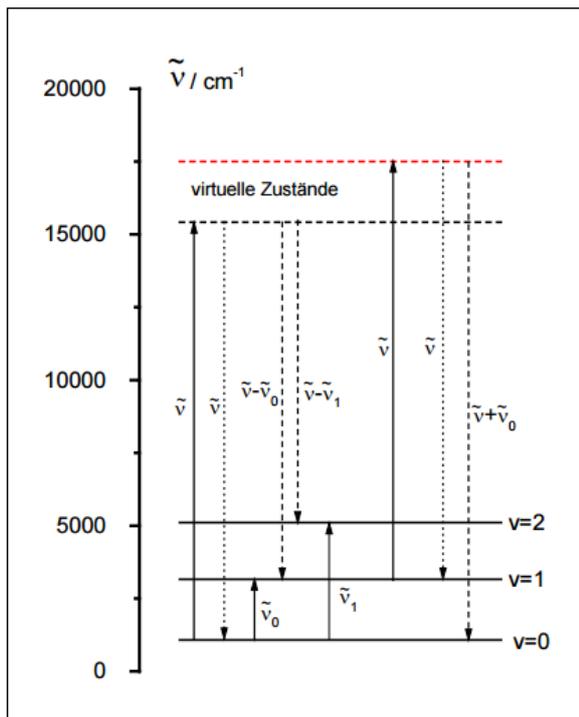


Abb. 13: Energieniveaudiagramm eines zweiatomigen Moleküls mit den Übergängen der Rayleighstreuung (gepunktete Pfeile) und der Ramanstreuung (gestrichelte Pfeile)

Aus Gl. 20 folgt

$$\frac{\epsilon_{vor} - \epsilon_{nach}}{hc} = \tilde{\nu}_s - \tilde{\nu} \quad \text{GL. 21}$$

so dass für die einzelnen Streutypen gilt:

$$\epsilon_{vor} = \epsilon_{nach} \text{ oder } \tilde{\nu}_s = \tilde{\nu} \text{ (Rayleighstreuung)} \quad \text{GL.22}$$

$$\epsilon_{vor} < \epsilon_{nach} \text{ oder } \tilde{\nu}_s > \tilde{\nu} \text{ (Stokes - Ramanstreuung)} \quad \text{GL.23}$$

$$\epsilon_{vor} > \epsilon_{nach} \text{ oder } \tilde{\nu}_s < \tilde{\nu} \text{ (Anti - Stokes - Ramanstreuung)} \quad \text{GL.24}$$

Das gestreute Photon kann also entweder Energie an das Molekül abgeben oder von dem Molekül Energie abführen oder es lässt die Energie des Moleküls unverändert. Die abgeführten beziehungsweise abgegebenen Energiedifferenzen entsprechen charakteristischen Energiedifferenzen zwischen Eigenzuständen des Moleküls, in den allgemeinen Energiedifferenzen zwischen Schwingungszuständen oder zwischen Rotationszuständen.

Die Anti-Stokes-Linien werden nur beobachtet, wenn die Energien des nullten und des ersten Schwingungszustandes so eng benachbart sind, dass eine ausreichende thermische Besetzung des ersten angeregten Schwingungszustandes, welcher der Ausgangszustand für den antistokeschen Streuprozess ist, ermöglicht wird. Die thermische Besetzungswahrscheinlichkeit kann mit der Boltzmannschen Beziehung berechnet werden. Grundsätzlich sind wegen der unterschiedlichen Besetzung der Ausgangszustände die Stokeslinien stärker als die Anti-Stokes-Linien. Entsprechend der Abschätzung in Gleichung

24 ist im Allgemeinen der erste Schwingungszustand verschwindend gering gegenüber dem nullten Schwingungszustand besetzt, so dass keine Anti-Stokes-Linien im Ramanspektrum beobachtet werden. Mittels des Ramaneffektes können demnach beispielsweise Schwingungsübergänge und in analoger Weise Rotationsübergänge von Molekülen experimentell untersucht werden. Vorteile der Benutzung des Ramaneffektes zur Untersuchung dieser Übergänge sind bei der Anregung die Verwendung von Lasern hoher Leuchtdichte und geringer spektraler Bandbreite gegenüber kontinuierlichen Lichtquellen im Infraroten sowie bei der Detektion der Strahlung die Verwendung von Monochromatoren und Photomultipliern im sichtbaren und ultravioletten anstatt im infraroten Spektralbereich [6].

2.4.3 Rotation-Raman-Effekt

Nicht nur Schwingungen, sondern auch Rotationen können zu einem Raman-Effekt führen, dem so genannten Rotations-Raman-Effekt. Man erkennt auch hier im Streuspektrum auf beiden Seiten der Rayleigh-Linie Streulinien, die aber in Abständen der Rotationsquanten auftreten. Hierbei spielt die Anisotropie der Polarisierbarkeit eine entscheidende Rolle. Bei nicht-kugelsymmetrischen Molekülen kann man die Polarisierbarkeit in zwei Hauptpolarisierbarkeiten $\alpha_{||}$ und α_{\perp} aufspalten, und so können Rotationen ebenfalls eine Modulation des eingestrahlt Lichts bewirken, indem die Photonen je nach Ausrichtung des Moleküls, bedingt durch die Polarisierbarkeit, unterschiedlich wechselwirken. Der Rotations-Raman-Effekt hängt demnach von der Differenz $\alpha_{||} - \alpha_{\perp}$ ab und ist umso stärker, je größer die Differenz wird. Diese Differenz ist bei allen linearen Molekülen ungleich Null. Beispiele für solche Moleküle sind H₂, N₂ oder CO₂.

Für Moleküle mit kugelsymmetrischer Elementverteilung gilt $\alpha_{||} = \alpha_{\perp}$ und damit wird die Differenz $\alpha_{||} - \alpha_{\perp} = 0$, so dass kein Rotations-Raman-Effekt auftritt. Beispiele für Moleküle mit kugelsymmetrischer Elementverteilung, die daher keine Rotations-Raman-Linien haben, sind CCl₄ oder C(CH₃)₄. Bei der quantenmechanischen Behandlung des Rotations-Raman-Effekts wird eine inelastische Photonenstreuung an einem linearen Rotator betrachtet, bei dem sich durch Aufnahme oder Abgabe von Rotationsquanten der Rotationszustand ändert. Dies führt zu einer Auswahlregel.

von $\Delta J = 0$ oder ± 2 , wobei für $\Delta v = 0$ nur $\Delta J = \pm 2$ relevant ist. Für einen starren Rotator '' mit den Energieniveaus.

$$E_{rot} = BhcJ(J + 1) \tag{Gl. 25}$$

$$B = \frac{h}{8\pi^2 c \theta} \tag{Gl. 26}$$

2.5 Die Aktivität der Schwingungen

Die Ramanspektroskopie beruht auf der Anregung von Schwingungen von Elektronenpaarbindungen (Atombindungen). Im Gegensatz zur Infrarotspektroskopie, die

eine Änderung des Dipolmomentes μ zur Aktivität einer Schwingung voraussetzt, muss sich entsprechend für die Ramanaktivität die Polarisierbarkeit α ändern.

2.5.1 Polarisierbarkeit eines Moleküls

Die klassische Theorie des Raman-Effektes beschreibt grundlegende Moleküleigenschaften, die für eine Raman-Aktivität Voraussetzung sind. Wird ein Molekül einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt, kommt es zu einer räumlichen Trennung der Ladungsschwerpunkte (Protonen – Elektronen). Ein elektrisches Dipolmoment wird erzeugt, das Molekül ist polarisiert.

$$\mu = \alpha E \quad \text{Gl. 27}$$

Die Abhängigkeit des induzierten Dipolmomentes μ von der Stärke des angelegten Feldes E und der molekularen Polarisierbarkeit α wird in Gl. 27 beschrieben. Es besteht ein vektorieller Zusammenhang, wobei das Dipolmoment μ und die Feldstärke E nicht dieselbe Richtung haben. Die Polarisierbarkeit α ist mathematisch ein Tensor. Eine Schwingung ist demzufolge Raman-aktiv, wenn sich die Polarisierbarkeit α eines Moleküls während der Schwingung ändert (Gl. 28), q Normalkoordinate der betreffenden Schwingung.

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial q}\right)_0 \neq 0 \quad \text{Gl. 28}$$

Da bei der IR-Spektroskopie eine Änderung des Dipolmomentes während der Schwingung die Voraussetzung für IR-Aktivität ist, stellt die Raman-Spektroskopie eine ideale Ergänzung zu dieser Methode dar. Mit der Raman-Spektroskopie werden vorrangig symmetrische Schwingungen und unpolare Bindungen dargestellt, während sich die Spektren der IR-Spektroskopie vorwiegend aus polaren Schwingungen und unsymmetrischen Bindungen ergeben. Sie können als komplementäre Methoden betrachtet werden. Wasser ist nur ein sehr geringer Ramanstreuer, weshalb es als Lösungsmittel in der Raman-Spektroskopie verwendet werden kann.

Die Wechselwirkung von elektromagnetischen Wellen mit Materie ruft eine Verschiebung der negativ geladenen Elektronenwolke gegenüber den positiv geladenen Molekülrümpfen hervor und induziert so ein Dipolmoment, das mit der Anregungsfrequenz der Lichtquelle schwingt. Da jede molekulare Substanz noch zusätzliche molekülspezifische Eigenschwingungen ausführt, lassen sich auch weitere Frequenzen beobachten, die von der Anregungsstrahlung unabhängig sind.

Das induzierte Dipolmoment μ_{ind} wird als Produkt aus Polarisierbarkeit α und elektrischer Feldstärke E beschrieben [7].

$$\mu_{ind} = \alpha E \quad \text{Gl. 29}$$

wobei α ein Tensor zweiter Stufe, μ_{ind} und E Vektoren sind. Die Polarisierbarkeit gilt dabei als Maß für die Verschiebbarkeit der Elektronenwolke gegenüber den Kernen.

Zur Vereinfachung wird hier nur der eindimensionale Fall entlang der Polarisation des anregenden Lichtfeldes betrachtet. Setzt man für das periodisch oszillierende elektrische Feld den Ausdruck $E = E_0 \cdot \cos(2\pi\nu_0 t)$ ein, so ergibt sich unter Berücksichtigung der Gleichung 13 für das induzierte Dipolmoment: E_0 ist dabei die Vibrationsamplitude und ν_0 die Anregungsfrequenz des Lasers.

Für kleine Auslenkungen q aus der Gleichgewichtslage q_0 ist die Polarisierbarkeit α linear zur Auslenkung. Aufgrund dessen lässt sich eine Taylorentwicklung durchführen:

$$\alpha(q) = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_0}\right) q + O\left(\left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_0}\right)^2\right) \quad \text{Gl. 30}$$

Die Auslenkung selbst kann als

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_R t) \quad \text{Gl. 31}$$

geschrieben werden, wobei q_0 die Gleichgewichtslage und ν_R die Schwingungsfrequenz des Moleküls sind.

Das Einsetzen von Gl. 29 und Gl. 30 in Gl. 31 liefert:

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_R t) = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_0}\right) q_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_R t) \quad \text{Gl. 32}$$

Der Ausdruck $\alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t)$ beschreibt in Gl.17 die Rayleigh-Streuung, bei der sich die Frequenz der rückgestreuten Photonen nicht ändert.

$$\mu_{ind} = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q_0}\right) q_0 E_0 \frac{\cos(2\pi(\nu_0 + \nu_R)t) + \cos(2\pi(\nu_0 - \nu_R)t)}{2} \quad \text{Gl. 33}$$

Der letzte Term lässt sich der Raman-Streuung zuordnen: Der Ausdruck $(\nu_0 + \nu_R)$ beschreibt die Anti-Stokes-Raman-Streuung und $(\nu_0 - \nu_R)$ die Stokes-Raman-Streuung. Laut Gleichung 32 sind die beiden Beiträge identisch und führen folglich zu den gleichen Intensitäten für die Stokes- und Anti-Stokes-Streuung. In der Realität ist dies aber nicht der Fall, denn die Besetzungswahrscheinlichkeit der Schwingungsniveaus folgt der Maxwell-Boltzmann-Verteilung und ist aufgrund dessen in hohem Maße temperaturabhängig.

Der letzte Ausdruck in der Gleichung 32 wird Null, wenn sich die Polarisierbarkeit mit dem Abstand der Kerne im Molekül nicht ändert: Es würde also eine nicht Raman-aktive Schwingung vorliegen. Demzufolge können die Raman-aktiven Schwingungen nur dann auftreten, wenn die Polarisierbarkeit des Moleküls während der Schwingung oszilliert, d. h. $(\delta\alpha/\delta q_0) \neq 0$. Des Weiteren ist die Intensität des Raman-Signals proportional zum Quadrat der Änderung der Polarisierbarkeit: $I_R \propto (\delta\alpha/\delta q_0)^2$. Zusätzlich gilt folgende Auswahlregel: Bei einem Molekül mit einem Symmetriezentrum sind alle Schwingungen, die antisymmetrisch zum Symmetriezentrum sind, im Raman-Spektrum verboten [7].

2.5.1.1 Polarisierbarkeit und Polarisierbarkeitsänderung bei dreiatomigen linearen Molekülen

2.5.1.1.1 Symmetrische Valenzschwingungen

Anhand der Grundschrwingungen eines dreiatomigen linearen Moleküls wie CO₂ werden die Polarisierbarkeitsänderungen veranschaulicht. Die symmetrische Valenzschwingung ist Raman-aktiv, da sich das Polarisierbarkeitsellipsoid im gestreckten (Abb. 14) und gestauchten Zustand (Abb. 15) unterscheidet. Im gestreckten Zustand sind die Elektronen am weitesten vom Kern entfernt. Hier werden eine Deformierung der Elektronenhülle (und damit die Polarisierbarkeit) am leichtesten möglich sein. Das Polarisierbarkeitsellipsoid ist am größten. Im gestauchten Zustand befinden sich die Elektronen nahe am Atomkern, das Molekül ist am wenigsten polarisierbar (das Polarisierbarkeitsellipsoid ist am kleinsten).

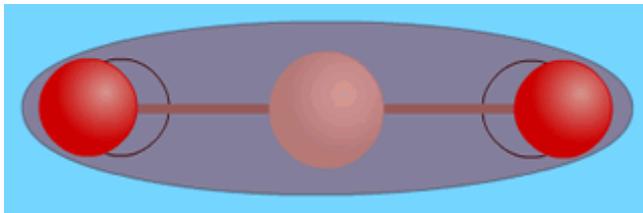


Abb. 14: gestrecktes dreiatomiges Molekül

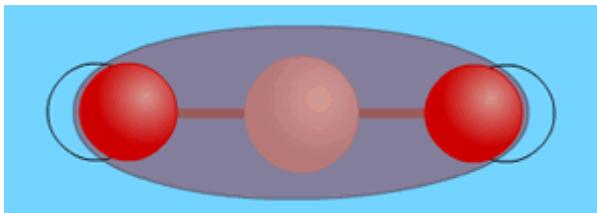


Abb. 15: gestauchtes dreiatomiges Molekül

Das Polarisierbarkeitsellipsoid ist für die gestreckte und gestauchte Bindung verschieden groß. Die Polarisierbarkeit ändert sich im Verlauf der Molekülschwingung.

2.5.1.1.2 Antisymmetrische Valenzschwingungen und Deformationsschwingung

Bei der antisymmetrischen Valenzschwingung (Abb. 16) und (Abb. 17) und der Deformationsschwingung sind die Polarisierbarkeitsellipsoide bei beiden Schwingungsendzuständen gleich groß. Diese Schwingungen führen also zu keiner Polarisierbarkeitsänderung und sind deshalb Raman-inaktiv.

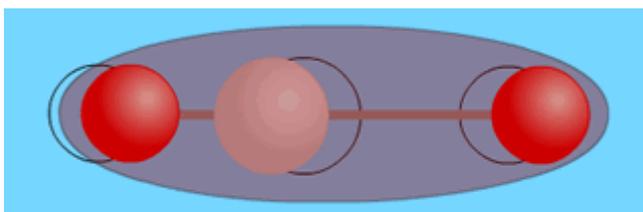


Abb. 16: antisymmetrische Valenzschwingung

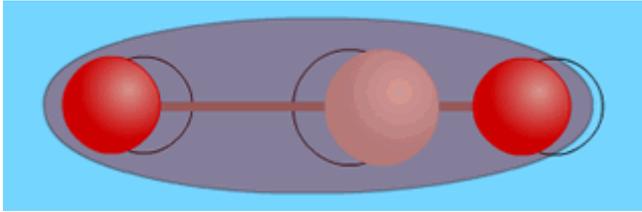
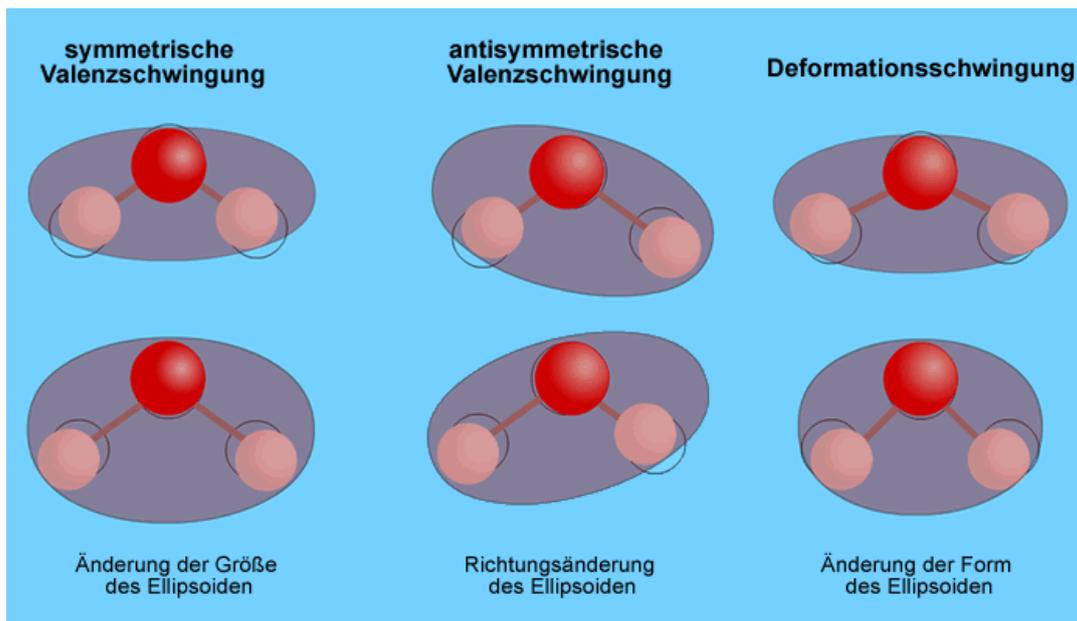


Abb. 17: antisymmetrische Valenzschwingung

Es erfolgt keine Änderung des Polarisierbarkeitsellipsoids während der Schwingung.

2.5.1.2 Polarisierbarkeit und Polarisierbarkeitsänderung bei dreiatomigen gewinkelten Molekülen

Bei dreiatomigen gewinkelten Molekülen führt die symmetrische Valenzschwingung, wie auch beim dreiatomigen linearen Molekül, zu einer Änderung der Größe des Polarisierbarkeitsellipsoids. Bei der antisymmetrischen Schwingung ändert sich nicht die Größe des Ellipsoids an den Endzuständen, sondern dessen Orientierung. Während der Deformationsschwingung des dreiatomigen gewinkelten Moleküls ändert sich wiederum die Form des Polarisierbarkeitsellipsoids an den Endzuständen. Alle drei Schwingungen sind Raman-aktiv.



2.5.2 kovalente Bindung

Als Atombindungen bzw. kovalente Bindungen bezeichnet man chemische Bindungen, bei denen die Bindungselektronen von den beteiligten Atomen gemeinsam genutzt werden. Sie sind typisch zwischen Atomen von Nichtmetallen. Ihr Gegenstück ist die Ionenbeziehung bzw. ionische Bindung, wie sie v.a. in Salzen vorliegt. Hier ist der Unterschied der Elektronegativitäten groß, so dass die Bindungselektronen überwiegend beim stärker

elektronegativen Atom lokalisiert, d.h. polarisiert sind. Beides sind Modell-Grenzfälle. In der Natur kommen alle Übergänge vor. Darüber hinaus können beide Bindungstypen in einem Molekül vorliegen. Beispiele hierfür sind Salze organischer Säuren, wie etwa Natriumacetat. Atombindungen liegen im Übrigen nicht nur in organischen Stoffen, wie Methan, Alkohol oder Benzin vor, sondern auch in aus Nichtmetallen bestehenden anorganischen Stoffen, wie Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid, Ammoniak u.Ä. und anorganischen Feststoffen, wie Diamant, Silicium Dioxid und Metalloxiden, die Atomgitter bilden.

Doch selbst komplexer gebaute anorganische Anionen und Kationen, also Moleküle die elektrische Ladungen tragen und Salze bilden, wie Sulfat-, Nitrat-, Phosphat- und Ammonium-Ionen, werden in ihrem Inneren durch Atombindungen zusammengehalten. In der Praxis sind gerade hier allerdings alle Übergänge möglich, die Intensitäten ihrer Schwingungsbanden je nach Atombindungsanteil mehr oder weniger hoch. Bei Vorliegen im Ionen- bzw. Kristallgitter werden die Schwingungen behindert, sind in der Folge die Banden verbreitert, Frequenzen verschoben, können Schwingungen koppeln und durch veränderte Bindungswinkel neu entstehen. Darüber hinaus sind auch über die Ionenbeziehung gebundene Kationen Aussagen möglich, wenn auch nur vage. Diese resultieren aus intramolekularen Wechselwirkungen, denn je nach Masse und Elektronegativität nimmt das Kation auf die Schwingungsfrequenzen im Rest des Moleküls Einfluss. Die Intensität der Schwingungen bei anorganischen Stoffen ist meist gering, erst recht mit steigendem Ionenbeziehungs-Anteil, so dass sie schwingungsspektroskopisch viel schlechter identifizierbar sind als organische Stoffe.

2.6 Charakteristische Gruppenfrequenzen

Ein Molekül besitzt viele Schwingungsmöglichkeiten, an denen streng genommen alle Atome teilnehmen. Es gibt jedoch auch Schwingungen, die auf einzelne Strukturelemente der Moleküle zurückzuführen sind. Diese Schwingungen nennt man charakteristische Gruppenfrequenzen. Solche Schwingungen sind in den Spektren dann zu beobachten, wenn nur eine geringe Kopplung zwischen der zu betrachtenden Atomgruppe und dem Rest des Moleküls auftritt. Eine geringe Kopplung ist dann gegeben, wenn sich die charakteristische Frequenz stark von der Frequenz der benachbarten Bindung unterscheidet. Gemäß unten stehender Gleichung ist dies der Fall, wenn sich die Kraftkonstanten oder die Massen der an den Bindungen beteiligten Atome stark unterscheiden.

$$v = \frac{1}{2n} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad v - \text{Frequenz}, k - \text{Kraftkonstante}, \mu - \text{reduzierte Masse} \quad \text{Gl. 33}$$

Bezüglich des Massenunterschieds sind nach den Erfahrungen charakteristische Frequenzen dann zu erwarten, wenn Atommassen vorhanden sind, die entweder um 100% nach oben oder 50% nach unten von der Masse des Zentralatoms abweichen. Die Wellenzahl der C-H-Valenzschwingung liegt z.B. immer in der Gegend von 3000 cm⁻¹.

Aufgrund empirischer Daten und theoretischer Ableitungen schließt man auf das Vorhandensein bestimmter Strukturgruppen. So kann die Anwesenheit oder Abwesenheit von z.B. Carbonyl-, Hydroxy- und Amino-Gruppen, Nitrilen, oder auch von aromatischen Systemen auf den ersten Blick erkannt werden [8].

2.6.1 Prinzipielle Effekte

Die charakteristischen Frequenzen einer Gruppe erscheinen aus noch zu behandelnden Gründen nicht bei einer bestimmten Wellenzahl, sondern in einem relativ engen Wellenzahlenbereich. Dieser Umstand scheint sich auf den ersten Blick für die Spektren Interpretation nachteilig auszuwirken. Doch in der Realität können diese Wellenzahlverschiebungen zur Aufklärung der Konstitution des Molekülrestes ausgenutzt werden [8].

2.6.2 Schwingungskopplung

Schwingungskopplungen treten dann auf, wenn zwei Schwingungen ähnlicher Frequenz in einem Molekül nahe beieinander liegen. Ein Beispiel für diesen Effekt ist die CH₂-Gruppe. Die Schwingungen der beiden CH-Bindungen koppeln miteinander. Daraus resultieren zwei Schwingungen, die symmetrische und die antisymmetrische Valenzschwingung, die bei unterschiedlichen Wellenzahlen zu beobachten sind. Die Schwingungskopplung ist auch der Grund, warum die Lage der Schwingungsbanden nicht eindeutig vorherzusagen ist. So ist z.B. die C-O-Valenzschwingung verschiedener Alkohole nicht an der gleichen Position zu finden, da die Schwingungen der angrenzenden Molekülreste (C-C und C-H) die Lage der C-O-Valenzschwingung beeinflussen [8]:

Alkohol	Lage der CO-Valenzschwingung [cm ⁻¹]
primärer Alkohol	1075 - 1000
sekundärer Alkohol	1150 - 1075
tertiärer Alkohol	1210 - 1100

Abb. 18: Beispiel zur Schwingungskopplung

2.6.3 Kraftkonstanten

Die Lage der Schwingungsbanden ist stark von den Bindungsverhältnissen im Molekül abhängig. Die Stärke einer chemischen Bindung wird durch die Kraftkonstante beschrieben.

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \text{Gl.34}$$

Laut der obigen Beziehung gilt, dass mit größer werdender Kraftkonstante k sich die Schwingungsfrequenz v zu größeren Werten verschiebt.

Gruppe	Kraftkonstante [N/m]	Wellenzahl [cm ⁻¹]
C-C	450	≈ 1100
C=C	960	≈ 1600
C≡C	1560	≈ 2100

Abb. 19: Abhängigkeit der Lage der Schwingungsbanden von der Kraftkonstante

2.6.4 Elektronische Effekte

Elektronische Effekte beeinflussen die Bindungsverhältnisse in einem Molekül bzw. in Atomgruppen, so dass es zu Änderungen der Größe der Kraftkonstanten und damit zu einer Verschiebung der Schwingungsfrequenz kommt. Allgemein gilt, dass eine Vergrößerung der Kraftkonstanten auch zu einer Vergrößerung der Schwingungsfrequenz führt ($k \propto \nu$).

Induktive Effekte werden beobachtet, wenn direkte Nachbarn die zu betrachtende Bindung stärken bzw. schwächen und demzufolge zu einer Schwingungsfrequenzerhöhung bzw. -erniedrigung führen. Ein Beispiel ist die symmetrische Deformationsschwingung der CH₃-Gruppe [8].

Gruppe	C-CH ₃	N-CH ₃	O-CH ₃
Wellenzahl [cm ⁻¹]	1380	1430	1450

Abb. 20: Beispiel für die Auswirkungen elektronischer Effekte auf Schwingungsspektren

Die CH-Bindungen werden durch elektronenziehende Substituenten (O-Atom) gestärkt, die Schwingungsfrequenz wird größer.

Der Einfluss des mesomeren Effektes auf die Lage der Schwingungsbanden wurde am Beispiel des para-substituierten Acetophenons gut untersucht. Durch elektronenschiebende Substituenten (para-Stellung) z.B. einer NH₂-Gruppe wird die Carbonyl-Bindung geschwächt und dementsprechend ihre Schwingungsfrequenz erniedrigt. Elektronenziehende Substituenten wie z.B. eine NO₂-Gruppe wirken umgekehrt, die Carbonyl-Bande wird zu größeren Wellenzahlen verschoben.

Keton	p-Amino-Acetophenon	Acetophenon	p-Nitro-Acetophenon
Wellenzahl [cm ⁻¹]	1677	1691	1700

Abb. 21: Beispiel für die Auswirkungen elektronischer Effekte auf Schwingungsspektren

2.7 Einfluss der Messparameter auf Raman-Spektren

Die gewählten Messparameter für die Aufnahme von Raman-Spektren bestimmen im Wesentlichen die Qualität der Spektren. Entsprechend der Analysenaufgabe werden verschiedene Parameter variiert. Für die Routineanalytik sind das im Allgemeinen die Auflösung und die Messdauer (Signal-Rausch-Verhältnis). In der Raman-Spektroskopie spielen natürlich auch die Laserfrequenz und die Laserleistung eine wichtige Rolle. [8]

2.7.1 Das Problem der Fluoreszenz

Ein großes Problem in der Raman-Spektroskopie ist die gleichzeitige Anregung der Fluoreszenz.

Bei farbigen, dunklen Verbindungen stellt das Auftreten von Fluoreszenz ein großes Problem zur Aufnahme von Ramanspektren dar.

Die Fluoreszenz kann durch die Probe selbst oder aber auch durch Verunreinigungen entstehen. Raman-Banden werden durch die Fluoreszenz oft vollständig überdeckt. Der Grund dafür ist, dass die Fluoreszenz eine viel größere Effizienz aufweist, als die Raman-Streuung.

Entstehung der Fluoreszenz

Anhebung eines Moleküls durch die Anregungsstrahlung in ein Schwingungsniveau des ersten angeregten Elektronenzustands E_1 ; Molekül fällt in Schwingungsgrundzustand von E_1 zurück, Relaxation erfolgt strahlungslos; Molekül fällt vom Schwingungsgrundzustand von E_1 in ein Schwingungszustand von E_0 zurück \Rightarrow Fluoreszenz

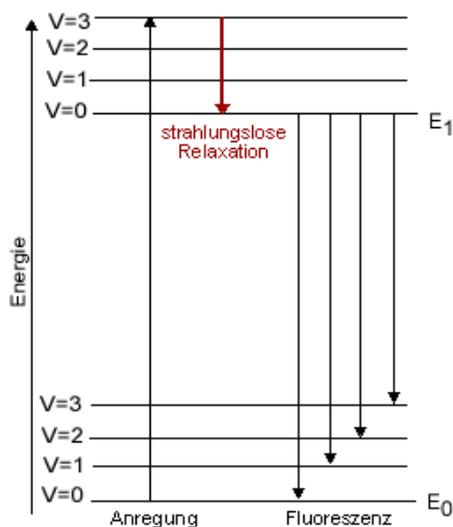


Abb. 22: Termschema der Fluoreszenz

Die Abbildung 22 zeigt, dass die Fluoreszenzstrahlung länger wellig als die anregende Strahlung ist. Die Fluoreszenzstrahlung beobachtet man im Raman-Spektrum dementsprechend auf der Stokes-Seite (Stokes-Regel).

2.7.2 Das Signal-Rausch-Verhältnis

Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Spektren Qualität ist das Signal-Rausch-Verhältnis. Es ist definiert als der Quotient aus der gemessenen Signalintensität und dem durch verschiedene Effekte verursachten Rauschen. Im Fall der Raman Spektroskopie sind u.a. Fluoreszenz (materialabhängiges Rauschen bzw. externes Rauschen), Detektorrauschen (Instrument abhängiges Rauschen), Signalverarbeitungsmethoden und externe Faktoren, wie z.B. Lichteinstrahlung oder kosmische Strahlung relevante Einflussgrößen. Abhängig von der Ursache der unerwünschten Messereignisse werden unterschiedliche Arten der Datenvorbehandlung eingesetzt, die den Einfluss der unerwünschten Messereignisse reduzieren. Jedoch lässt sich nicht jeder Fehler durch eine entsprechende Vorbehandlungsmethode entfernen. Systematische Fehler, wie z.B. unregelmäßige Wellenzahl-Verschiebungen aufgrund einer fehlerbehafteten Achsen- Kalibrierung des Spektrometers, bedürfen grundlegender Überprüfungen im experimentellen Design. Treten jedoch z.B. Intensitätsänderungen im Raman Signal aufgrund von Schwankungen der Leistung des Lasers, Basislinienverschiebungen oder Fluoreszenzen auf. [8].

3. Methodische Grundlagen

3.1 Truscan RM- Analysator

3.1.1 Aufbau des Truscan RM-Analysator



Abb. 23: Aufbau des TruScan RM-Spektrometers [9]

3.1.2 Funktionsweise des TruScan RM-Analysators

Als Lichtquelle dient ein Diodenlaser. Der Diodenlaser besteht aus einem Halbleiter-Laserkristall mit einer positiven und negativen-Schicht. Zwischen diesen Schichten befindet sich eine pn-Übergangsschicht. Bei Stromdurchgang zwischen den beiden Schichten werden Elektronen-Loch-Paare erzeugt, die durch Rekombination Lichtquanten aussenden. Die Elektronen-Loch-Paare entsprechen energetisch denen der angeregten Zustände von Atomen. Die Wellenlänge der ausgesandten Laserstrahlung wird durch die Energiedifferenz der beteiligten Halbleiterniveaus bestimmt [10].

Der große Nachteil einer Laserdiode ist die Erzeugung eines divergenten Laserstrahls [11] (aufgeweiteter Laserstrahl) [12]. Die erzeugte divergente Laserstrahlung wird auf ein frequenzstabilisierendes Gitter geleitet. Eine eingebaute Kollimatoroptik fokussiert das Licht der Laserdiode zu einem parallelen Strahlenbündel.

Die Laserstrahlung wird über eine Glasfaser als „Anregungslaser“ zur Ramansonde geleitet und wiederholt durch einen fokussierenden Kollimator gelenkt. Der gebündelte parallele Laserstrahl gelangt durch einen Bandbreitenfilter, der die Frequenz der Laserstrahlung auf einen bestimmten oberen und unteren Wert eingrenzt [13].

Danach durchläuft der Laserstrahl nach Reflexion mit einem Spiegel, einen Kerbfilter. Hier werden Frequenzen des Laserstrahls nochmals in einem sehr schmalen Frequenzbereich eingegrenzt [13], sodass der mit einer nun annähernd exakten Anregungswellenlänge von 785 nm auf die Probe trifft. Das gestreute Licht (blaue Licht) wird über eine fokussierende Optik als paralleler, gebündelter Lichtstrahl in das Kompaktspektrometer geleitet. Nach Reflexion des Laserstrahls mit einem Spiegel, gelangt der Laserstrahl auf ein optisches Gitter, in dem das gestreute Licht spektral zerlegt wird. Nach Reflexion des Lichtes durch einen Spiegel, gelangt das gestreute Licht in den Charge-coupled-Detektor.

Der CCD-Detektor besteht aus einer Reihe von Metalloxid-Halbleiter-Kondensatoren, die aus jeweils drei Schichten aufgebaut sind. Auf einem positiv-dotierten Siliziumsubstrat ist eine dünne Siliziumdioxidschicht aufgetragen, die als Isolator fungiert. Darüber befindet sich eine Elektrode mit einem positiven Potential. Die einfallende Streustrahlung verursacht in der positiv-dotierten Siliziumsubstratschicht Elektronen-Loch-Paare bzw. freie Ladungsträger. Die Elektronen wandern in Richtung der positiven Elektrode, wobei sie die Elektrode durch die Isolationsschicht nicht erreichen. Die Anzahl der Elektronen in einem Metalloxid-Halbleiter-Kondensator entspricht dem Maß der lokalen Belichtung. Das Auslesen der Ladungen erfolgt anhand eines ladungsgekoppelten Transportprinzips. Die Ladungen liegen zunächst nur auf einem unter Spannung liegenden Kondensator. Durch den dazu geschalteten zweiten Kondensator verteilen sich die Ladungen auf die beiden Kondensatoren. Im letzten Schritt wird der erste Kondensator abgeschaltet, sodass die gesamten Ladungen unter dem dazu geschalteten Kondensator liegen. Die Ladungen wurden

komplett in die benachbarte Kondensationszelle geschoben. Danach werden die Ladungen in ein Spannungssignal umgewandelt und detektiert [10].

Die Elektronen-Loch-Paare werden neben dem Einfluss von Licht, auch durch erhöhte Temperaturen verursacht [10]. Dem wirkt die eingebaute Peltier-Kühlung entgegen.

3.2 RAMalyze

Die Software „RAMalyze“ von der Firma „LabCogniton Analytical GmbH & Co.KG“ setzt die spektroskopische, mathematische und wissenschaftliche Grundlage um und ist basiert auf gedruckten renommierten Regelwerken (z.B. George Socrates „Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies“).

Das primäre Ziel der Raman-Auswertungsfunktion in der Software ist die Unterstützung des Experten und auch des unerfahrenen Benutzers durch leistungsfähige Werkzeuge und einer von Experten aufgestellten Wissensbasis in Form vordefinierter Auswerteregeln. Somit wird die automatische und interaktive Raman-Spektrenanalyse oder Bestätigung der Spektren und Moleküle in kürzester Zeit möglich. Das elektronische Nachschlagewerk für Raman-Shifts bietet über 1000 Regeln für charakteristische Gruppenfrequenzen. Das Regelwerk deckt den Bereich der organischen und anorganischen Chemie ab.

Ein umfassendes Regelwerk hilft bei der Kategorisierung von Raman-Banden und der Zuordnung zu den entsprechenden funktionellen Gruppen. Eine Regel enthält eine charakteristische "chemische" Beschreibung einer Bande. Die funktionellen Gruppen chemischer Verbindungen erzeugen eine oder mehrere Banden an definierten Positionen im Raman-Spektrum. In der Strukturbestimmung und -aufklärung werden die gemessenen Spektren und zugehörigen Moleküle durch den Analytiker manuell zusammengeführt [14].

- Die identifizierten IR/Raman-Banden müssen funktionellen Gruppen zugeordnet werden.
- Moleküle müssen auf funktionelle Gruppen untersucht werden.

Im Folgenden soll das Programm anhand des einfachen Beispiels von Ascorbinsäure näher erläutert werden.

3.2.1 Menü Raman Interpretation

Die Software RAMalyze beinhaltet viele Möglichkeiten einer Ramanspektrenanalyse.

3.2.1.1 Automatische Analyse des Spektrums

Die automatische Analyse „Spektrum interpretieren“ ermöglicht, anhand von vordefinierten Regeln, die automatische und interaktive Analyse gängiger Banden in einzelnen Raman-Spektren. Die automatische Analyse „Spektrum interpretieren“ eignet sich neben der Interpretation charakteristischer Bandelagen bekannter Substanzen auch zur partiellen

Strukturaufklärung unbekannter Substanzen. Eine Liste der identifizierten Peaks und der zugehörigen funktionellen Gruppen werden als Ergebnis der Analyse ausgegeben.

Nach erfolgreicher Analyse eines Spektrums werden die Ergebnisse in einem Ergebnisdialog „Interpretation“ dargestellt, d.h. alle identifizierten Banden im Spektrum beziehen sich auf eine von dem Programm vorgeschlagenen funktionellen Gruppe mit entsprechenden Interpretationsregeln.

Das interpretierte Spektrum wird in der Spektren-Ansicht in der oberen Hälfte des Dialogs angezeigt. Passende funktionelle Gruppen werden in der Tabelle in der unteren Hälfte des Dialogs angezeigt. Für die momentan ausgewählte funktionelle Gruppe wird die Liste der zutreffenden (identifizierten) Regeln in der oberen linken Tabelle angezeigt. Die nicht zutreffenden (nicht identifizierten) Regeln sind dagegen in der oberen rechten Tabelle aufgelistet. Jede funktionelle Gruppe verfügt außerdem über eine grafische Darstellung, die als Molekülfragment in der Datenansicht angezeigt wird.

Die identifizierten funktionellen Gruppen werden zusammen mit Informationen aus dem Regelwerk angezeigt:

Informationen aus der Tabelle „Identifizierte Funktionelle Gruppen“:

- Qualitätswert der funktionellen Gruppe (Wahrscheinlichkeit eines Treffers zu einer funktionellen Gruppe). Werte bis zu 80% Trefferwahrscheinlichkeit gelten als akzeptabel.
- Name der funktionellen Gruppe
- Name der entsprechenden chemischen Untergruppe
- Name der entsprechenden chemischen Substanzklasse

Informationen aus der Tabelle „Interpretationsregeln“:

- Name und Art der Schwingung (Streck- oder Deformationsschwingung)
- Anfangswellenzahl [cm⁻¹] der Bande
- Endwellenzahl [cm⁻¹] der Bande
- Schwellwert (Beschreibung der zu erwartenden Intensität einer Bande. Die Angabe ist relativ zu allen Banden im analysierten Spektrum)
- Priorität (Beschreibung der relativen Bedeutung einer Bande in Bezug auf das analysierte Spektrum)

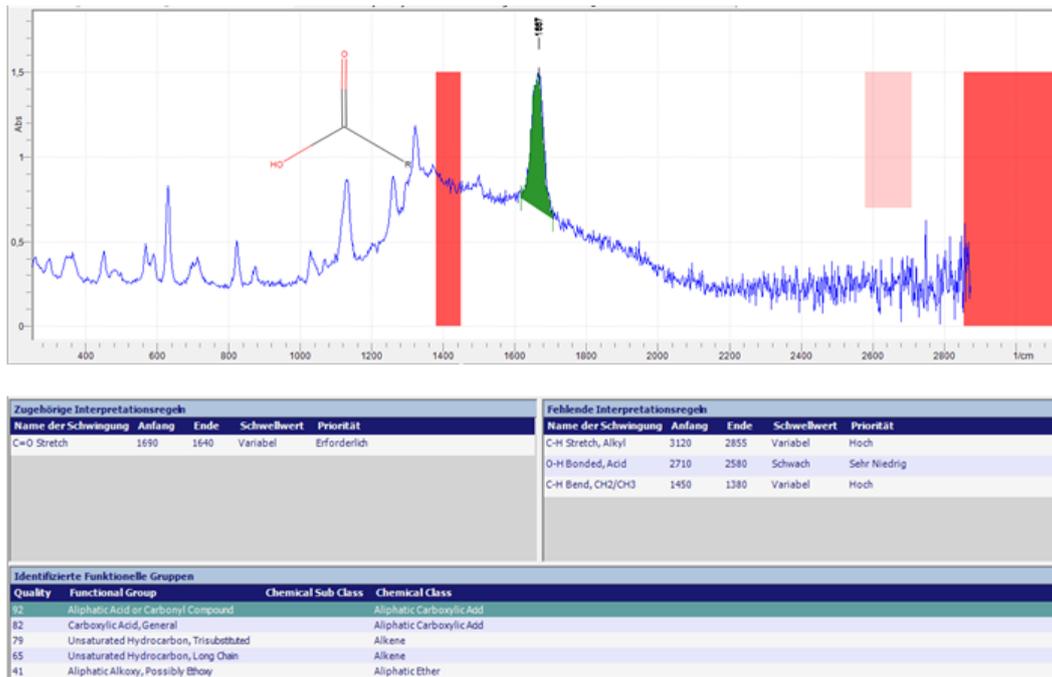


Abb. 24: Ergebnis „Spektrum interpretieren von Ascorbinsäure“

3.2.1.2 Manuelle Analyse des Spektrums

Die manuelle Interpretation von Ramanspektren mit Hilfe des „Regels-Designers“ setzt das Vorhandensein eines bekannten Moleküls voraus und beinhaltet die manuelle Zuordnung von funktionellen Gruppen zu einem Spektrum. Der Dialog sieht folgendermaßen aus:

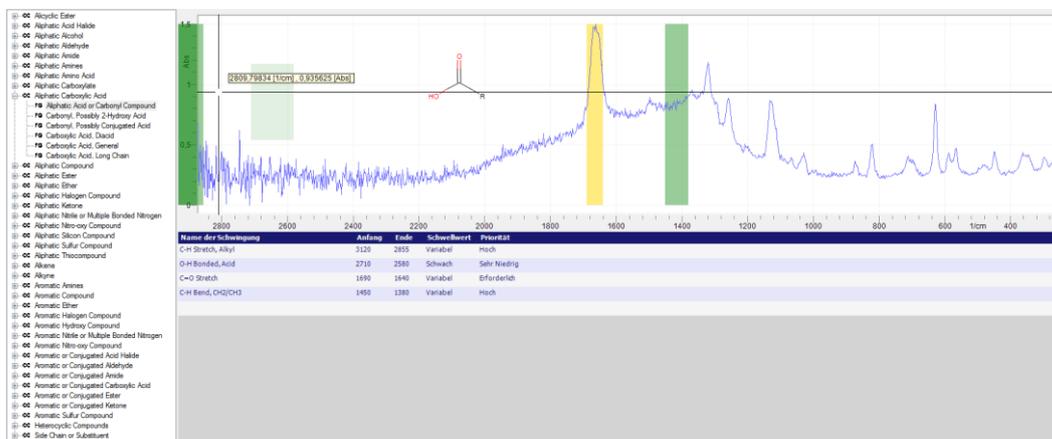


Abb. 25: Ergebnis von Ascorbinsäure mit Hilfe des „Regels-Designers“

Die Baumansicht der Interpretations-Regeln (in der linken Hälfte des Fensters) zeigt die Organisationsstruktur der Regeln innerhalb der Regel-Datenbank. Die Regeln können hierarchisch nach folgenden Klassen organisiert werden:

- Substanzklasse:

Die Substanzklasse ist eine organisatorische Instanz in der die speziellen Eigenschaften einer Gruppe von Substanzen (z.B. Alkohole oder aromatische Hydroxy-Verbindungen) zusammengefügt sind.

- Die Unterklasse:

Die Unterklasse ist eine organisatorische Instanz wie die Substanzklasse selbst. In manchen Fällen ist eine Substanzklasse zu allgemein und muss in diverse Unterklassen aufgespalten werden. Zum Beispiel ist die Substanzklasse der aromatischen Hydroxy-Verbindungen in die Unterklassen aromatische Alkohole und Phenol aufgeteilt.

- Funktionelle Gruppen:

Jede Substanzklasse oder Unterklasse enthält eine Zahl an funktionellen Gruppen, die den Fragmenten in den Molekülen entsprechen. Die funktionellen Gruppen sind für die in den Raman-Spektren auftretenden charakteristischen Banden verantwortlich.

- Interpretationsregeln:

Jede Bande wird durch eine Interpretations-Regel repräsentiert. Eine Regel ist die kleinste verfügbare Einheit in der Regeldatenbank. Die Eigenschaften der Banden wurden mit verschiedenen Parametern qualifiziert und diese Parameter beschreiben die Form und Charakteristiken der Bande.

3.2.1.3 Automatische und Manuelle Analyse des Spektrums

Der Browser für funktionelle Gruppen ermöglicht die sofortige Analyse einer bestimmten Frequenz im Raman-Spektrum. Eine Liste der funktionellen Gruppen mit der besten Übereinstimmung wird angezeigt. Im Gegensatz zur automatischen Analyse „Spektrum interpretieren“ werden die einzelnen Banden im Spektrum getrennt betrachtet.

Der Browser für funktionelle Gruppen dient zur

- Verbesserung der Auswertungsergebnisse der automatischen Raman-Spektren Interpretation. Zusätzliche funktionelle Gruppen können zur Verfeinerung / Korrektur des automatischen Ergebnisses hinzugefügt werden.
- Anzeige eines schnellen Überblicks aller für eine Frequenz im Spektrum in Frage kommenden funktionellen Gruppen.

Auswahl der Untersuchungsfrequenz

Eine schwarze vertikale Linie kennzeichnet die gewählte Untersuchungsfrequenz im Spektrum. Die Linie kann mittels Drag & Drop auf die gewünschte Frequenz verschoben werden. Die Liste der passenden funktionellen Gruppen wird automatisch aktualisiert und nach der Qualität der Übereinstimmung sortiert. Die funktionelle Gruppe mit der größten Übereinstimmung befindet sich an erster Stelle. Das Fenster sieht folgendermaßen aus:

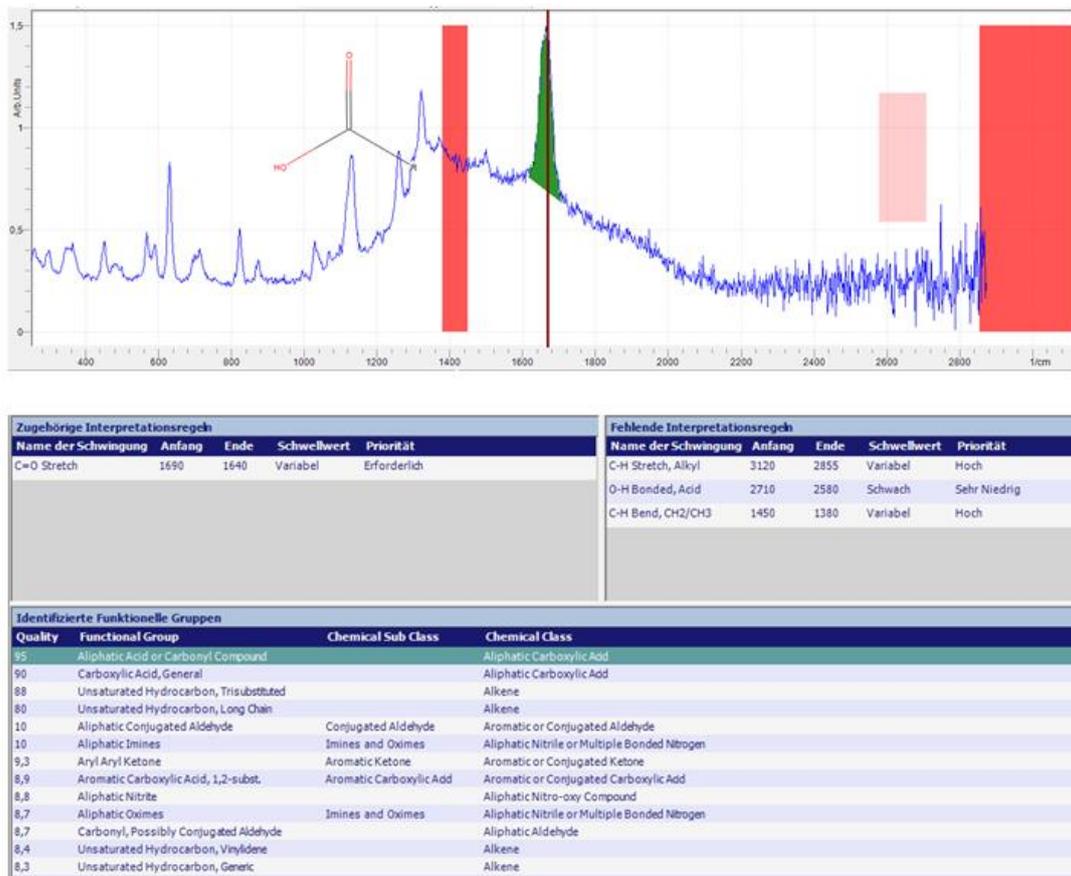


Abb. 26: Ergebnis „Browser für funktionelle Gruppen“ von Ascorbinsäure

4. Rohstoffe und Geräte

4.1 Rohstoffe

Im Rahmen der qualitativen Verbesserung der Identitätsprüfung von Rohstoffen im Wareneingang wurden insgesamt 150 Wirkstoffe, 90 Hilfsstoffe, 20 Aromastoffe und 30 Farbstoffe validiert.

Für diese Arbeit wurde folgende Auswahl an Rohstoffen gewählt.

Tabelle: Rohstoffe

Acetylsalicylsäure	Wirkstoff
Ascorbinsäure	Wirkstoff
Azithromycin	Wirkstoff
Benzocain	Wirkstoff
Biotin	Wirkstoff
Calcium-D-Panthenat	Wirkstoff

Captopril	Wirkstoff
Carbamazepin	Wirkstoff
Carvedilol	Wirkstoff
Celiprolol	Wirkstoff
Chininsulfat	Wirkstoff
Chlorprothixenhydrochlorid	Wirkstoff
Clotrimazol	Wirkstoff
Dapson	Wirkstoff
Diazepam	Wirkstoff
Doxycyclin Hydrat	Wirkstoff
Eisen-2-Sulfat	Wirkstoff
Ethacridinlactat 1H ₂ O	Wirkstoff
Lincomycin HCL	Wirkstoff
Lithiumcarbonat	Wirkstoff
Minocyclin HCL	Wirkstoff
Natriumascorbat	Wirkstoff
Oxytetracydin HCL	Wirkstoff
Paracetamol	Wirkstoff
Spectinomycin HCL	Wirkstoff
Vitamin B12	Wirkstoff

4.2 Geräte

Tabelle: Gerätedetails des TruScan-RM-Analysators

Messprinzip	Zerstörungsfreie Analyse mit Raman-Spektroskopie
Gewicht	0,9 kg

Größe	20,8 cm x 10,7 cm x 4,3 cm
Laser (Anregungswellenlänge)	785±0,5nm Laserlinienbreite:2cm-1 Stabilität: < 0,1 cm-1
Laserleistung	250 mW ± 25 mW
Spektralbereich	250 – 2875 cm-1
Spektrale Auflösung	8 –10,5 cm-1 (FWHM) über den Messbereich
Messoptik	NA = 0,33 18 mm Arbeitsabstand 0,2 bis 2,5 mm Punktgröße
Messzeit	Anwendungsabhängig, Belichtungszeit: Automatische Modi (12 ms Minimum)
Display	Farbiges, gut lesbares LCD-Display
Datenerfassung	Barcodeleser (2D-Code Standards)
Sicherheit	Login: Biometrie Fingerprint Reader
Transport	Stabiler, wasserfester Kunststoffkoffer
Betriebsbedingungen	Temperaturbereich: -20 °C bis +40 °C
Batterien	Interner, wiederaufladbarer Lithium-Ionen Akku ~ 4 h Betriebsdauer
Ext. Stromversorgung	100 – 240 V AC, 50/60 Hz
Gehäuse	Staub- und spritzwasserfestes, stabiles Kunststoffgehäuse
Standardzubehör	Stabiler wasserfester Tragekoffer

	Ersatzakku 2 DC Netzadapter 100 – 240 V AC,50/60Hz Ladeschale SD-Speicherkarte USB-Kartenleser Ethernet-Adapter Röhrenchenhalter Handbuch und Dokumentations-CD
--	--

5. Praktische Durchführung

5.1 Methodenerstellung mit dem TruScan RM-Spektrometer

Für die Methodenentwicklung ist die Erstellung einer Referenzspektren-Datenbank („Methoden“), die im Vorfeld für jeden Rohstoff erstellt wurde, erforderlich. Nach Validierung und abschließendem Selektivitätstest jeder Methode wurde über deren Eignung zur Identifizierung des jeweiligen Rohstoffs entschieden. Die Referenzmaterialien entstammen den Rückstellmustern aus dem Rückstelllager. Die praktische Durchführung der Methodenerstellung, Validierung und des Selektivitätstests aller Rohstoffe wird nachfolgend beschrieben.

5.1.1 Aufnahme der Referenzspektren

Die Messung erfolgt durch transparente Packmittel wie Klarglasbehälter, Polyethylen-Beutel, Folien, etc. Von jedem Rohstoff wurden demnach mehrere Referenzspektren zum Teil in verschiedenen Verpackungsmodifikationen aufgenommen. Der Polyethylen-Beutel wird mit dem Material (Feststoffe, Flüssigkeit) längs ein bis zwei Mal umgeknickt und in den Röhrenchenhalter gesteckt. Die Polyethylen-Pipette wird mit aufgezogener Flüssigkeit umgedreht in den Röhrenchenhalter gesetzt. Das Glas-Vial wird zur Messung in den Röhrenchenhalter gesteckt. Die Rein-Aufnahme von Feststoffen erfolgt mit möglichst geringem Abstand zum fokussierenden Material, direkt in den Polyethylen-Beutel hinein.

Mehrere Referenzspektren können einer Methode zugeordnet werden, ein Referenzspektrum kann nicht zu mehreren Methoden gehören. Es stand als Hilfsmittel zur Fokussierung des Lasers auf die Probe ein Röhrenchenhalter und ein Sondenkopf zur Verfügung, die an dem Ramanspektrometer angebracht werden können (Abbildungen 27 und 29).

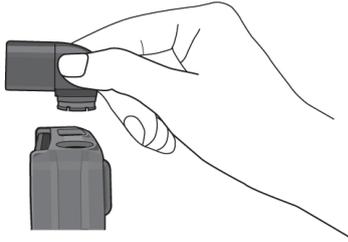


Abb. 27: Installation des Röhrenhalters

Der Röhrenhalter dient der Aufnahme von Spektren im Polyethylen-Beutel, Polyethylen-Pipette und Glas-Vial die zur genauen Fokussierung des Laserstrahls bis zu einer Höhe von 5 mm gefüllt wurden.



Abb. 28: Einsetzen des Standards

Der Sondenkopf ändert die Lage der Laserfokus nicht. Er hilft bei der korrekten Positionierung der Laseröffnung zur Probe. Der Sondenkopf dient der Aufnahme von Spektren in reiner Form.

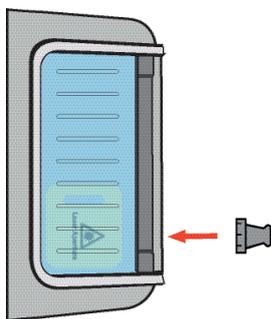


Abb. 29: Installation des Sondenkopfes

Raman-Systeme erlauben in der Außenmessung zumeist das Messen durch Verpackungsmaterialien. Diese müssen zumindest durchscheinend sein und dürfen nicht zu dick sein. Entscheidend ist darüber hinaus die Lage des Fokuspunktes des Lasers. Die Dicke des Verpackungsmaterials muss in jedem Fall so gering sein, dass der Fokuspunkt dahinter liegt, sonst misst man das Verpackungsmaterial.

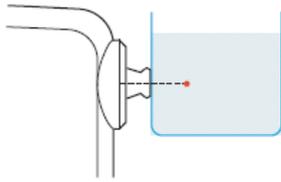


Abb. 30: Messung durch Einsatz des Sondenkopfes

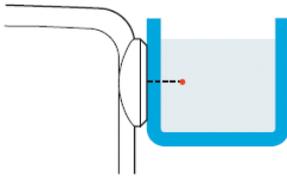
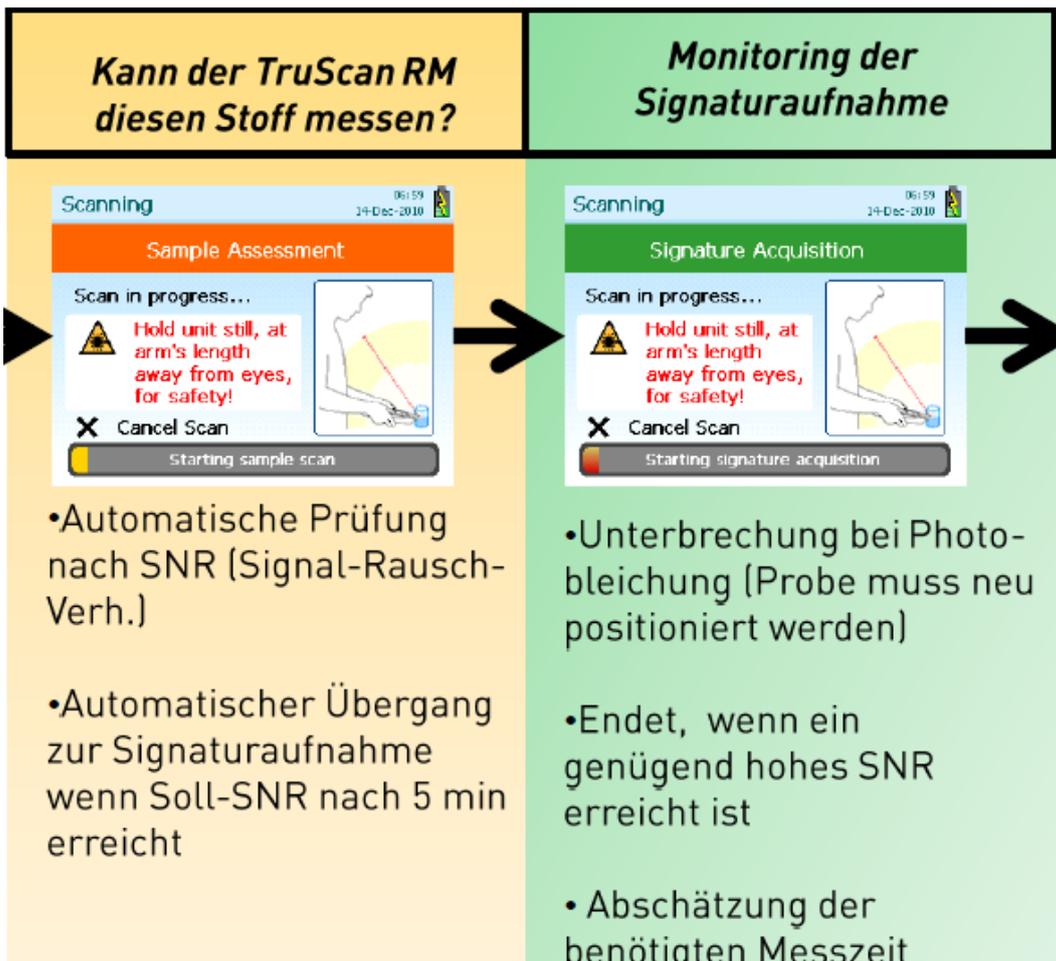


Abb. 31: Messung durch direkten Kontakt zwischen Gerätekopf und Behälter

Die Aufnahme von Spektren kann durch dünnwandige Behälter aus transparentem Klarglas oder Kunststoff (< 3mm Dicke) erfolgen. Bei dieser Aufnahme ist der Sondenkopf gegen die Behälteroberfläche zu halten (vgl. Abbildung 30). Diese Aufnahme kann auch durch dickwandige Behälter aus transparentem Klarglas oder Kunststoff (> 3 mm Dicke) erfolgen. Hier muss der Sondenkopf abgenommen und das Laseraustrittsfenster gegen die Behälteroberfläche gehalten werden (vgl. Abbildung 31). Die folgende Tabelle beschreibt die Möglichkeiten der Messung bei unterschiedlichen Situationen.

Situation	Möglichkeiten der Messung
Dünnwandige Behälter aus transparenten Klarglas oder Kunststoff (< 3 mm Dicke)	Sondenkopf gegen Behälteroberfläche halten (vgl. Abb. 30)
Dickwandige Behälter aus transparenten Klarglas oder Kunststoff (> 3 mm Dicke)	Sondenkopf abnehmen und Laseraustrittsfenster gegen die Behälteroberfläche halten (vgl. Abb. 31)
Flüssigkeiten, Feststoffe, halbfeste Arzneiformen	Gerät in einen Kunststoffbeutel einstecken und vorsichtig in die Substanz eintauchen
Flüssigkeiten	Kunststoff-Pipette mit aufgezogener Flüssigkeit umgedreht in den Röhren-Halter stecken

Die Aufnahme der Spektren wird mit Hilfe des Web-Admin-Programms verfolgt, eingelesen und angezeigt.



Das eingelesene Referenzspektrum wurde nach Abschluss der Aufnahme direkt angezeigt. Nach Aufnahme der Referenzspektren wurde das Gerät über eine Webschnittstelle mit dem Netzwerk verbunden. Mit Hilfe des Web-Admin-Programms wurden die eingelesenen Spektren zur weiteren Bearbeitung aktiviert. Spektren, die im weiteren Verlauf nicht weiter bearbeitet wurden, z.B. Spektren die durch Fluoreszenz vollständig überdeckt sind verblieben an dieser Stelle auf dem Status "Inactive".

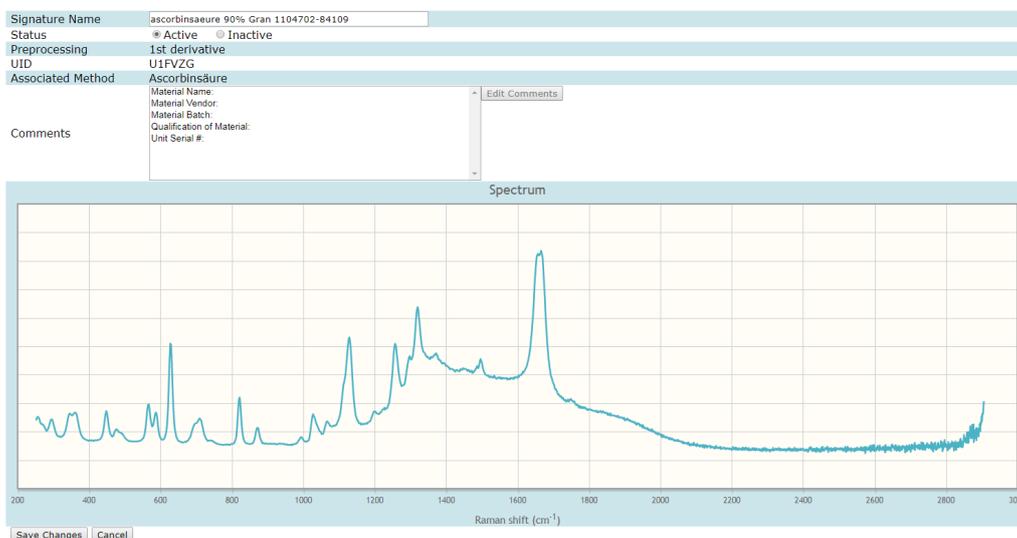


Abb. 32: Aktivierung der Signatur von Ascorbinsäure im WebAdmin

5.1.2 Erstellung der Methoden

Mit Hilfe des Web-Admin-Programms und Anschluss des Gerätes an das Netzwerk wurden die erstellten Referenzspektren zu einer Methode (Referenzspektrendatenbank eines Rohstoffes) zusammengefasst.

Method Information

Method Name	Ascorbinsäure
Barcodes	000001104702 000020001011 000001104701 000001003302 000020000774 000020000322 000020000695 000001003200
Sample ID Prefix	
Info Text (.html)	[No Info File] Browse Reset
Info Image (.jpg)	 Browse Reset
Enabled	<input checked="" type="checkbox"/>
Strong Pass and Fail Display	<input type="checkbox"/>
History:	View History
Signatures in Method	Unattached Signatures
ascorbinsaeure 90% Gran 1104702-84109 / 1st derivative Ascorbinsaeure 90% Gran 1104702-84258 / 1st derivative ascorbinsaeure 94%FC 110401-85600 / 1st derivative ascorbinsaeure EC 1003302-82792 / 1st derivative ascorbinsaeure fein 20000774-83213 / 1st derivative ascorbinsaeure fein gepulv 20000322-82677 / 1st derivative ascorbinsaeure krist 20000695-83610 / 1st derivative ascorbinsaeure pulv 1003200-84842 / 1st derivative	
Save Changes	Cancel

Abb. 33: Erstellung der Methode von Ascorbinsäure mit Hilfe des „WebAdmin“

5.1.3 Validierung der Methoden

5.1.3.1 Positivvalidierung

Die Positiv-Validierung erfolgt gegen eine andere Charge der gleichen Substanz (nicht mit der die Methode erstellt wurde). Bei diesem Test wurde untersucht, ob die erstellte Methode das Material, für das sie angelegt wurde, sicher identifizierte. Das zu erwartende Ergebnis ist ein „Pass“.

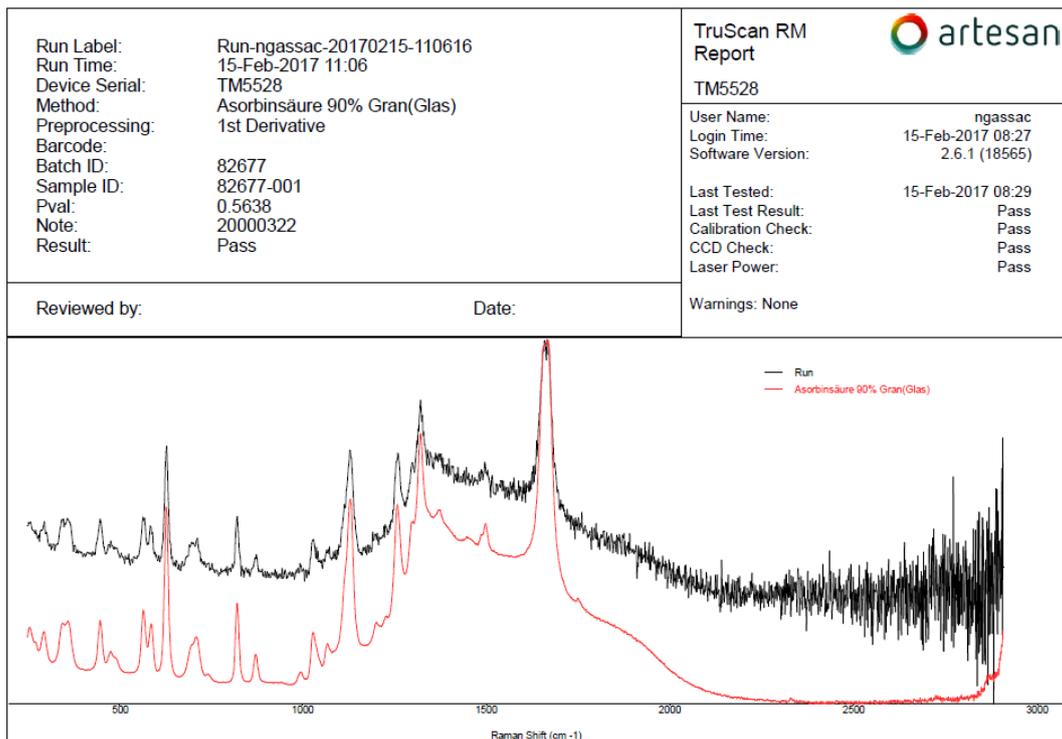


Abb. 34: Ergebnisse der Positivvalidierung von Ascorbinsäure mit einem „Pass“

5.1.3.2 Negativvalidierung

Die Negativ-Validierung untersucht, ob eine Methode zwischen dem Material, für das sie entwickelt wurde, und anderem ähnlichen Material (gleiche Substanzklasse, Struktur, usw.) unterscheiden kann. Die Auswahl dieser Referenzsubstanzen erfolgt durch den Verantwortlichen für Referenzsubstanzen. Das zu erwartende Ergebnis ist ein „Fail“.

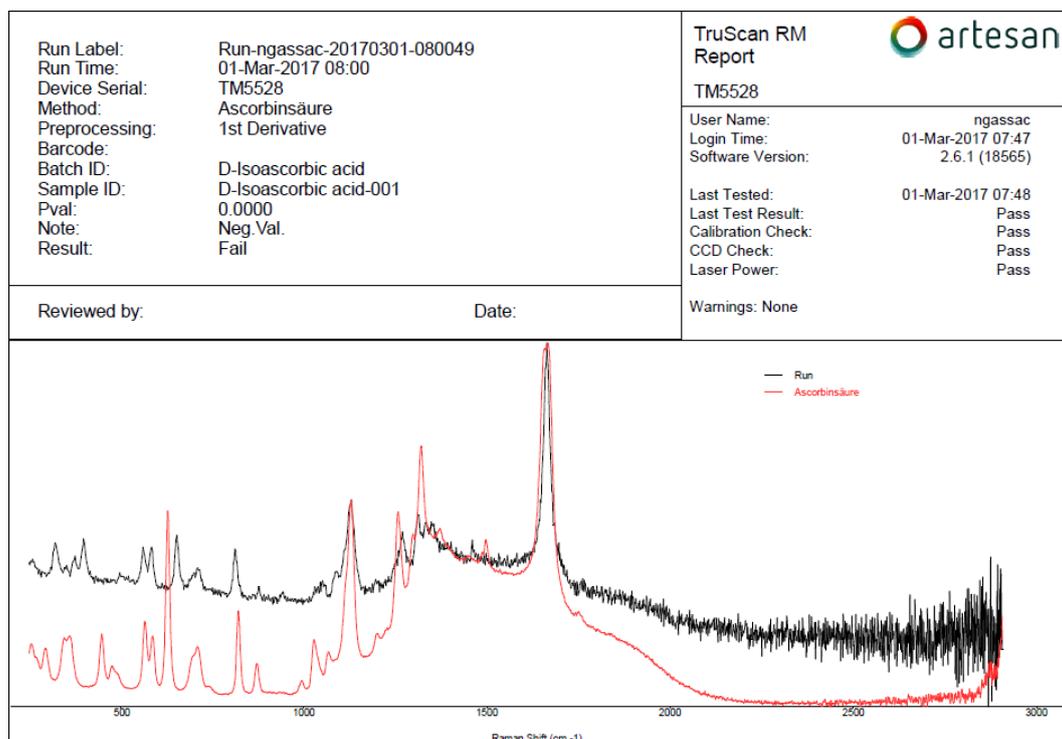


Abb. 35: Ergebnisse der Negativvalidierung von Ascorbinsäure mit einem „Fail“

5.1.4 Selektivitätstest der Methoden

Bei einer Identitätsprüfung ist die Spezifität (d.h. Selektivität) das wichtige Bewertungskriterium.

Nach Erstellung aller Methoden und deren Validierung sind die einzelnen Methoden gegeneinander auf ihre Selektivität getestet worden.

Die Bewertung des Selektivitätstestes erfolgt nach Farbmarkierungen:

Grün:

Die ausgewählte Methode ist hochgradig widerspruchsfrei. Die ausgewählte Methode kann von allen vorhandenen Methoden selektiv unterscheiden. Der p-Wert (Grad der Übereinstimmung zwischen Probe- und Referenzmaterial) liegt größer 0,1 und bestätigt die Identität.

Rot:

Treffer zu einer anderen nicht geprüften Methode, die von der ausgewählten Methode als „Fail“ gewertet wurde. Die Methode ist für Stoffe, die diese Methode unerwünscht passiert haben, nicht selektiv genug.

Gelb:

Treffer zu „Nächste Nachbarn“ die von der ausgewählten Methode als „Needs investigation“ gewertet wurden. Es geht ein moderates Risiko aus, dass Elemente mit gelber Farbmarkierung die ausgewählte Methode unerwünscht passieren. Der p-Wert liegt zwischen 0,001 und 0,1 und deutet auf eine schwache Ähnlichkeit hin.

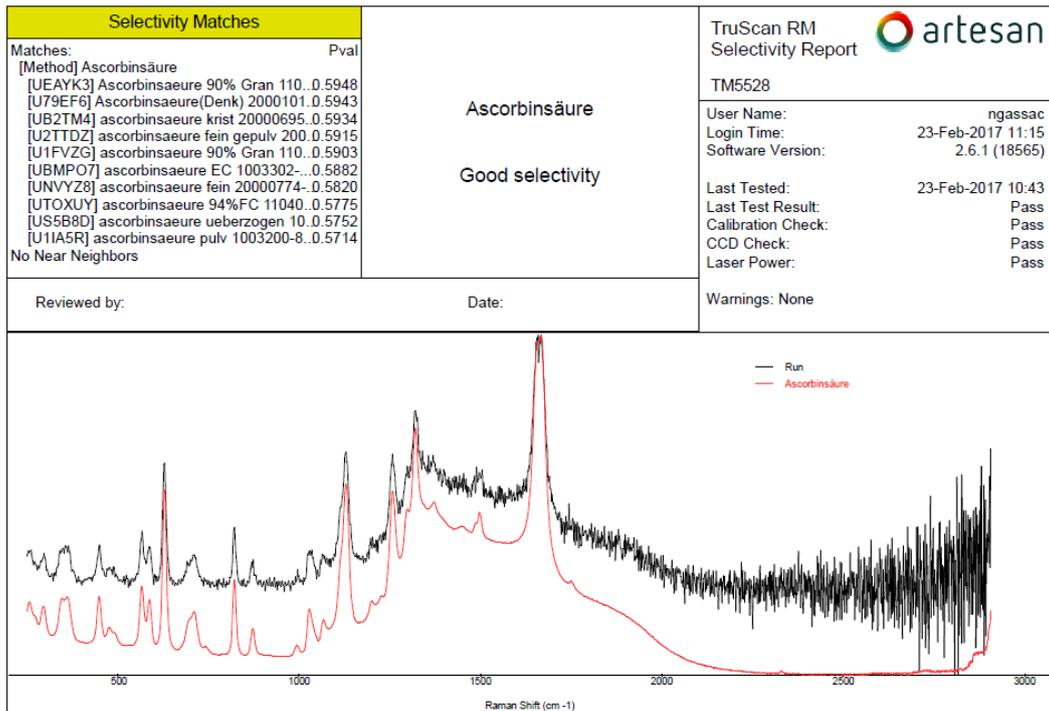


Abb. 36: Selektivitätstest von Ascorbinsäure

5.2 Darstellung des Ergebnisses mit dem TruScan RM-Spektrometer

Nach Abschluss der Analyse zeigt das Gerät an, ob die Identitätsprüfung für das ausgewählte Material erfolgreich („Pass“) oder fehlgeschlagen („Fail“) ist (vgl. Abb. 37 und 38).



Abb. 37: Bildschirm „erfolgreicher Durchlauf“



Abb. 38: Bildschirm „fehlgeschlagener Durchlauf“

Die Ergebnisse eines „Pass“ entsprechen einer eindeutigen Identifizierung. Das Ergebnis bzw. die Güte der Messung zwischen Referenz und Probe wird durch den „p-Wert“ ausgedrückt. Der p-Wert resultiert aus dem Vergleich von Referenzspektrum und Probespektrum, der in der oberen linken Ecke der Reportdatei „JPG oder PDF“ angegeben ist. Dieser Wert gibt den Grad und die Güte der Übereinstimmung zwischen Referenz und Probe an. Der TruScan RM verwendet einen Grenz-p-Wert von 0,05 für eine Entscheidung. P-Werte $\geq 0,05$ entsprechen einer Übereinstimmung („Pass“), p-Werte $< 0,05$ entsprechen keiner Übereinstimmung („Fail“). Pass-Ergebnisse mit p-Werten im Bereich 0,05–0,1 deuten auf evtl. Verpackungs- und Lichteinflüsse hin. Je größer der p-Wert, desto größer ist der Grad der Übereinstimmung.

5.3 Interpretation charakteristischer Bandenlagen mit RAMalyze

Die praktische Anwendung des Programms RAMalyze wird im Folgenden anhand des Beispiels von Ascorbinsäure erläutert.

5.3.1 Raman Interpretation

5.3.1.1 Automatische Analyse des Spektrums

Mit Hilfe der automatischen Analyse „Spektrum interpretieren“ wurden die funktionellen Hauptgruppen in den Molekülen ermittelt. Dazu wurde das Spektrum von dem Programm „RAMalyze“ betrachtet. Das Programm „RAMalyze“ reagierte nach Auswertung des Spektrums mit einer Auflistung mehrerer funktioneller Gruppen mit Qualitätstreffer-Werte die für das eingelesene Spektrum in Frage kamen. Die zutreffende funktionelle Hauptgruppe im Molekül mit einem Qualitätstrefferwert $> 80\%$ der als, akzeptabel galt, wurde in der angezeigten Liste manuell ausgesucht. Durch Anklicken der ausgesuchten funktionellen Gruppe konnten die charakteristischen Schwingungen mit deren grün hinterlegten Bandenlagen und angezeigten Wellenzahlbereichen ermittelt werden.

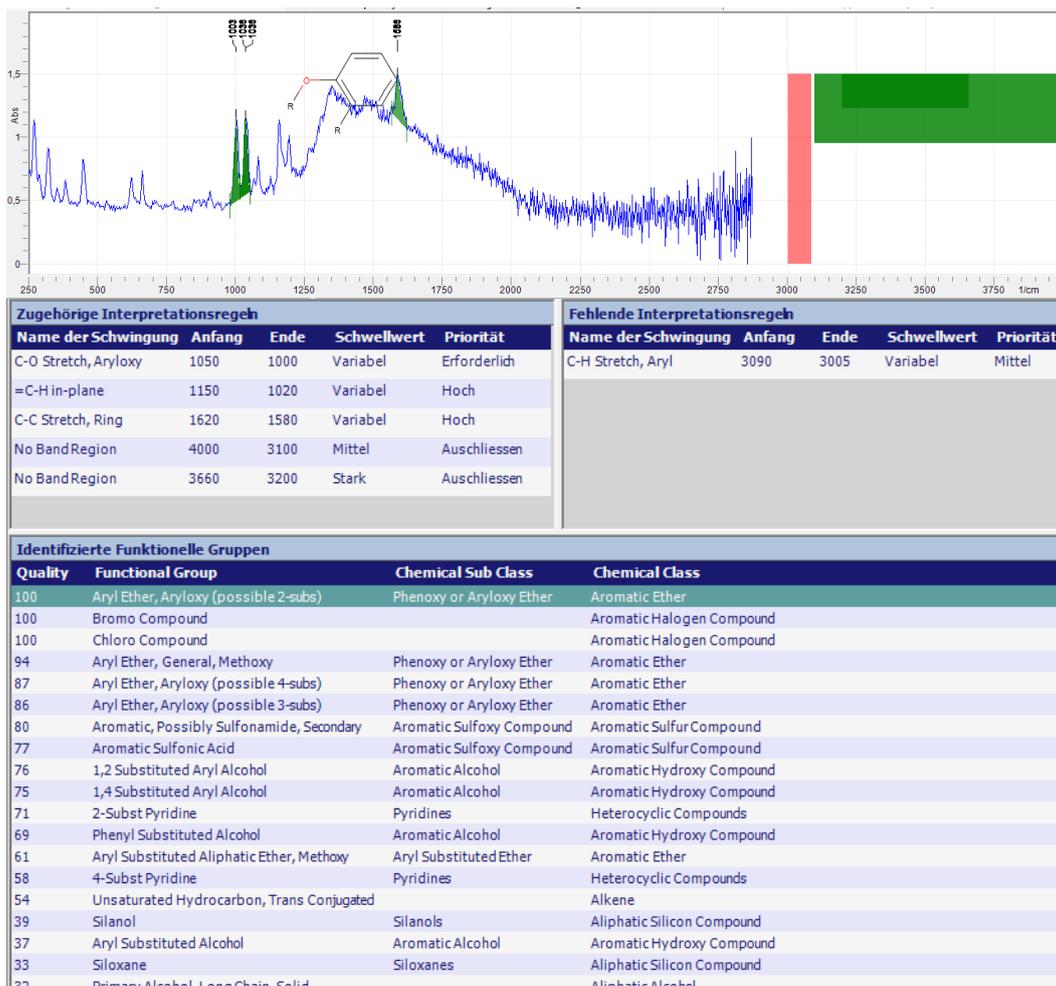


Abb. 39: Ergebnis „Spektrum interpretieren von Clotrimazol“

5.3.1.2 Manuelle Analyse des Spektrums

Die manuelle Analyse mit Hilfe des „Regel-Designers“ eines Spektrums kam vor allem dann zum Einsatz, wenn die automatische Untersuchung insbesondere bei größeren Molekülen, die mehrere funktionelle Gruppen enthielten, zu unzureichenden Ergebnissen führte. Demzufolge wurden dem Spektrum, manuell die im Molekül befindlichen funktionellen Gruppen zugeordnet. In der linken Baumansicht ist das Schema dargestellt, durch welches die manuelle Zuordnung der funktionellen Gruppe erfolgte. Die zu den funktionellen Gruppen zugehörigen Banden sind im Spektrum grün hinterlegt. Unter dem Spektrum wurde eine Tabelle als Analysenergebnis für die gefundenen Wellenzahlbereiche angezeigt.

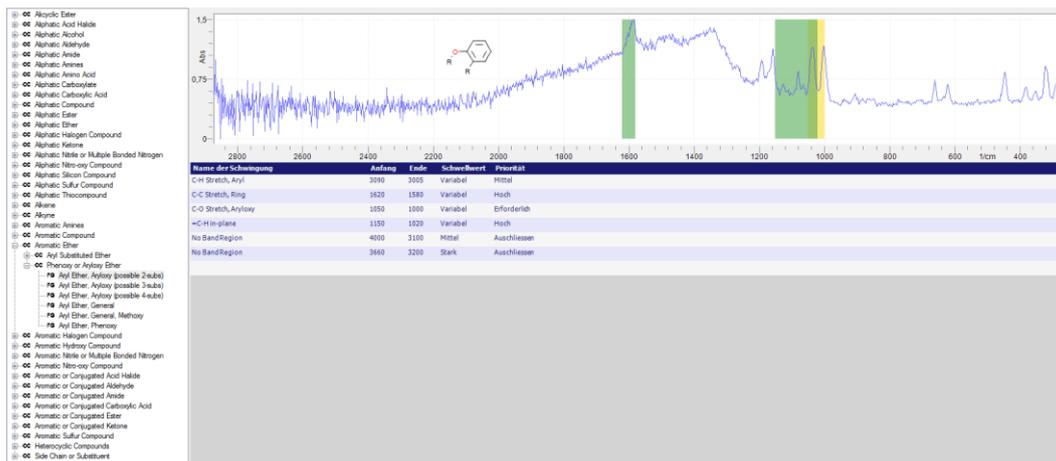


Abb. 40: Ergebnis von Clotrimazol mit Hilfe des „Regels-Designers“

5.3.1.3 Automatische und Manuelle Analyse des Spektrums

Die Funktion des „Browser für funktionelle Gruppen“ diente der gezielten Analyse einer einzelnen charakteristischen Bande in einem Spektrum. Mit Hilfe einer im Spektrum erschienenen dunkelroten vertikalen Linie, die über Drag & Drop auf die gewünschte Bande verschoben werden konnte, wurde eine Liste aller passende funktionellen Gruppen und deren Auslegungsregeln automatisch angezeigt.

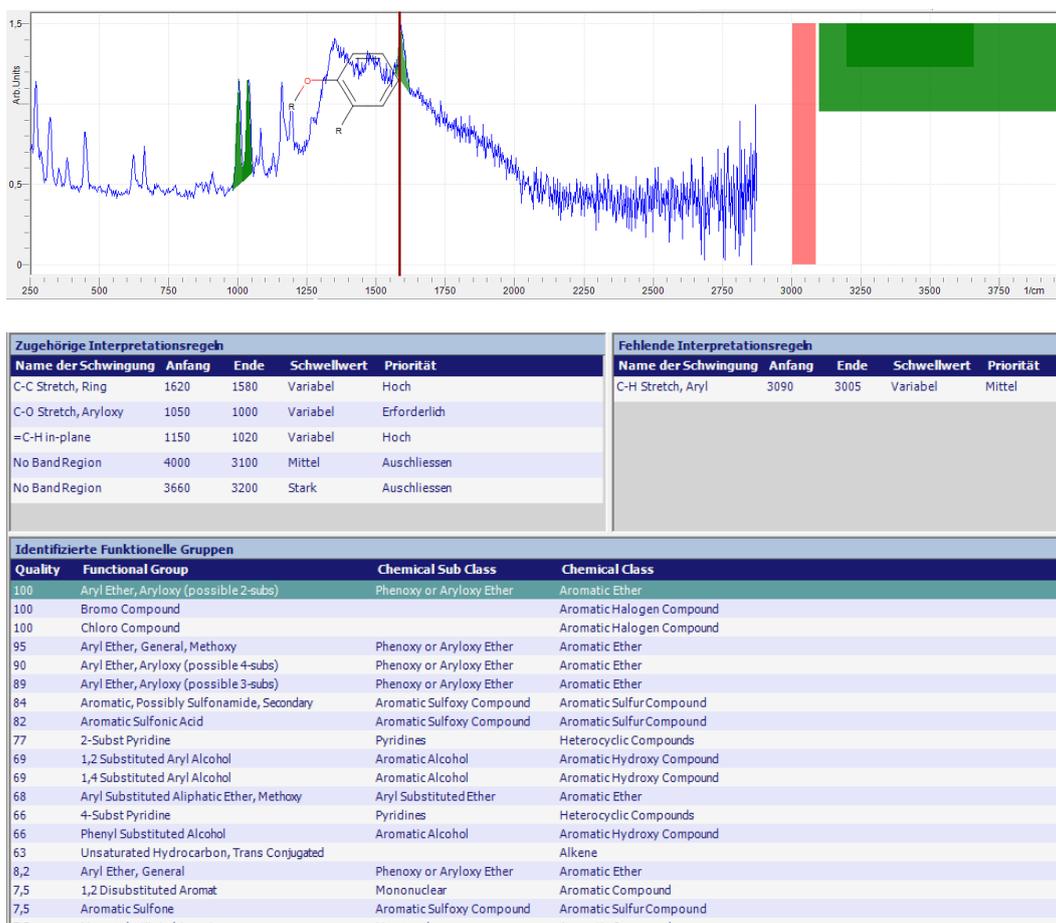


Abb. 41: Ergebnis „Browser für funktionelle Gruppen“ von Clotrimazol

6. Ergebnisse und Diskussion

Die Raman-Spektroskopie ist eine wichtige Methode zur Charakterisierung und Identifizierung von verschiedenen Substanzen. Dabei wird ausgenutzt, dass jede Substanz eine einzigartige Signatur im Raman-Spektrum aufweist.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Rohstoffe aus verschiedenen Substanzklassen untersucht. Die Untersuchung umfasst die spektrale Aktivität der Rohstoffe. Aus diesen Raman-Aktiven Rohstoffen wurden Referenzspektren Datenbanken erstellt und validiert, sowie anschließend die Überprüfung der Methoden-Selektivität (Unterscheidbarkeit jeder Methode auf dem Ramanspektrometer „TruScan RM“) durchgeführt. Die Referenzspektren Datenbanken wurden im Wareneingang zur Verfügung gestellt und werden dort für die Identitätsprüfung von Raman-Aktiven Stoffen benutzt.

Mit Hilfe des Spektreninterpretationsprogrammes „RAMalyse“ wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit ausgewählte Raman-aktive Rohstoffe zur genaueren Strukturaufklärung hinsichtlich ihrer Raman-aktiven Schwingungen durch Interpretation charakteristischer Bandenlagen untersucht.

6.1 Bestimmungen der spektralen Aktivität

Mit Hilfe der Probenbeurteilungsphase des TruScan RM-Spektrometers erfolgt die prinzipielle Bewertung der Raman-Aktivität. Hier wird das Schwingungsverhalten des Moleküls kurz vor dem Einlesen des Spektrums untersucht. Im Gegensatz zu den Raman-Aktiven Stoffen, bei denen die Probenbeurteilungsphase direkt in die Spektrenaufnahmephase überging, reagierte der TruScan RM-Analysators bei Raman-inaktiven Rohstoffen mit der Rückmeldung „Insufficient raman signal to develop signature“.

Wird das Molekül von einem alternierenden elektrischen Feld E der Frequenz ν_0 getroffen, wird ein Dipolmoment mit der Frequenz der elektromagnetischen Welle induziert. Anschaulich betrachtet verhält sich das Molekül dann wie eine Antenne und emittiert elektromagnetische Strahlung mit der gleichen Frequenz wie das anregende elektrische Feld. Demnach ist die molekulare Eigenschwingung nur dann Raman-aktiv, wenn sich die Polarisierbarkeit entlang der Normalkoordinate dieser Schwingung ändert. Die Modulation des induzierten Dipolmoments durch die Eigenschwingung des Moleküls äußert sich in zwei zusätzlichen Frequenzbeiträgen $\nu_0 - \nu_k$ (Stokes) und $\nu_0 + \nu_k$ (Anti-Stokes).

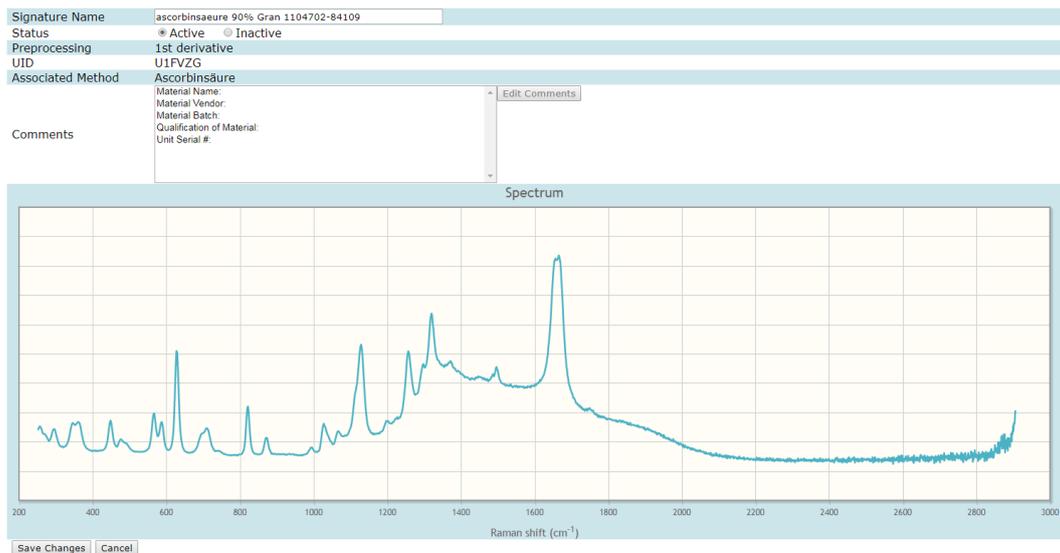


Abb. 42: Beispielspektrum von Ascorbinsäure als Ramanaktive Substanz

Nicht messbar sind Stoffe wie Natriumchlorid oder Salzsäure, Natrium und Kalzium als Kation die generell mit Schwingungsspektroskopie Methoden nicht darstellbar sind. Darüber hinaus war klar, dass das Kation aufgrund der zwischen Kation und Anion bestehenden weitgehend ionischen Bindung i.d.R. mit den untersuchten Verfahren praktisch nicht identifiziert werden kann.

Die Raman-inaktivität der Ionenbindung der Salzsäure ist auf die bestehende feste Ionengitteranordnung zurückzuführen. Die Elektronen sind im Gegensatz zu Atombindungen nicht frei beweglich, sodass sich während eines angelegten elektrischen Feldes die Polarisierbarkeit eines Moleküls nicht ändert. Der TruScan-RM-Analysator registrierte mit den oben genannten Substanzen mit „Insufficient raman signal to develop signatures“.

Andere Rohstoffe, darunter stark gefärbte (Farbstoff) oder auch pflanzliche Stoffe sind aufgrund der dunklen oder trüben Färbung bzw. starker Fluoreszenz für die Raman Spektroskopie nicht geeignet.

6.2 Ergebnisse der Methodenerstellung, Methodvalidierung und Selektivitätstest

Mehrere Referenzspektren eines Rohstoffes in unterschiedlichen Verpackungsmodifikationen wurden nach Beurteilung der spektralen Raman-aktivität aufgenommen. Es wurde zu jedem Rohstoff eine Methode erstellt.

Für eine angelegte Methode wurde die Prüfung der Positivvalidierung auf eine sichere Identifizierung einer Substanz durchgeführt. Bei der Positivvalidierung verglich das TruScan-RM-Spektrometer demnach zwei Spektren (Proben und Referenz der gleichen Substanz) miteinander, deren Übereinstimmung mit einem „Pass“-Ergebnis angezeigt wurde.

Für die Methode, die nicht angelegt wurde, prüfte man eine sichere Unterscheidung einer Substanz bei der Negativvalidierung. Hier wurde eine Methode mit einer ähnlichen Substanz in Kontakt gebracht, dessen Nicht-Übereinstimmung ein „Fail“-Ergebnis ergab.

Die Negativvalidierung bei Chlorprothixenhydrochlorid, Dapson, Diazepam, Ethacridinlactat 1H₂O, Spectinomycin HCL entfiel wegen unzureichender Auswahl an ähnlichen Testsubstanzen.

Der abschließende Selektivitätstest mit dem TruScan-RM-Spektrometer wurde nach Erstellung aller Methoden und deren Validierungen durchgeführt. Es wurden hier alle erstellen Methoden auf dem TruScan-RM-Spektrometer gegeneinander auf ihre exakte Unterscheidung überprüft.

Tabelle: Ergebnisse der Methodenerstellung, Methodvalidierung und Selektivitätstest

Rohstoff	Positivvalidierung	Negativvalidierung gegen	Selektivitätstest
	Mit „Pass“- Ergebnisse	„Fail“-Ergebnisse	
		Fail	
Ascorbinsäure	Pass	D-Isoascorbic acid	Grün
		Fail	
Azithromycin	Pass	Erythromycin	Grün
		Fail	
Biotin	Pass	Biotinsulfon	Grün
		Fail	
Calcium-D- Panthothenat	Pass	Dexpanthenol	Grün
		Fail	
Carvedilol	Pass	Carvedilol Verunreinigung C	Grün
		Fail	
Celiprolol	Pass	Celiprolol Verunreinigung C	Grün

		Fail	
Chininsulfat	Pass	Chinidinsulfat	Grün
		Fail	
Chlorprothixenhydrochlorid	Pass	Ohne Negativ	Grün
		-	
Clotrimazol	Pass	Clotrimazol Verunreinigung E	Grün
		Fail	
Dapson	Pass	Ohne Negativ	Grün
		-	
Diazepam	Pass	Ohne Negativ	Grün
		-	
Doxycyclin	Pass	Oxytetracyclin Hcl	Grün
		Fail	
Eisen-2-Sulfat	Pass	Kupfer-2-sulfat 5H ₂ O Pulver	Grün
		Fail	
Ethacridinlactat 1H ₂ O	Pass	Ohne Negativ	Grün
		-	
Lincomycin HCL	Pass	Fail	Grün
		Clindamycin	
Minocyclin HCL	Pass	Doxycyclin	Grün
		Fail	
Oxytetracydin HCL	Pass	Doxycyclin	Grün
		Fail	
Spectinomycin HCL	Pass	Ohne Negativ	Grün
		-	
Vitamin B12	Pass	Methylcobalamin	Grün
		Fail	

6.3 Identitätsprüfung Raman-aktiver Rohstoffe mit Hilfe von Referenzspektren

Mit Hilfe von Referenzspektren sind einige Methoden zur Identitätsprüfung im Wareneingang zum Einsatz gekommen. Dies geschieht nach Methodenerstellung, Validierung und erfolgreichem Selektivitätstest der Methoden. Die Abbildungen 43 bis 62 beschreiben den Spektralen Vergleich von Referenz- und Probespektrum. Diese Rohstoffe konnten mit Angabe des „Pass“- Ergebnisses von dem TruScan-RM-Analysator identifiziert werden.

Die Referenzspektren (rot markiertes Spektrum) unterscheiden sich bezüglich des Signal-Rausch-Verhältnis sehr stark vom in der Routine aufgenommenen Probespektrum „Run“ (schwarz markiertes Spektrum). Die Referenzspektren wurden mit einer sehr viel höheren Signalgenauigkeit bzw. mit einer sehr viel geringen Geschwindigkeit aufgenommen (hohes Signal-Rausch-Verhältnis) als die Probespektren, sodass die auftretenden Störschwankungen am Signal bei den Probespektren deutlich größer sind als bei den Referenzspektren.

Im Gegensatz zu den Probeaufnahmen, die i.d.R. nur wenige Sekunden dauerten, variierten die Aufnahmezeiten der Referenzspektren in Abhängigkeit von der Stärke des Ramansignals zwischen 5 und 60 Minuten.

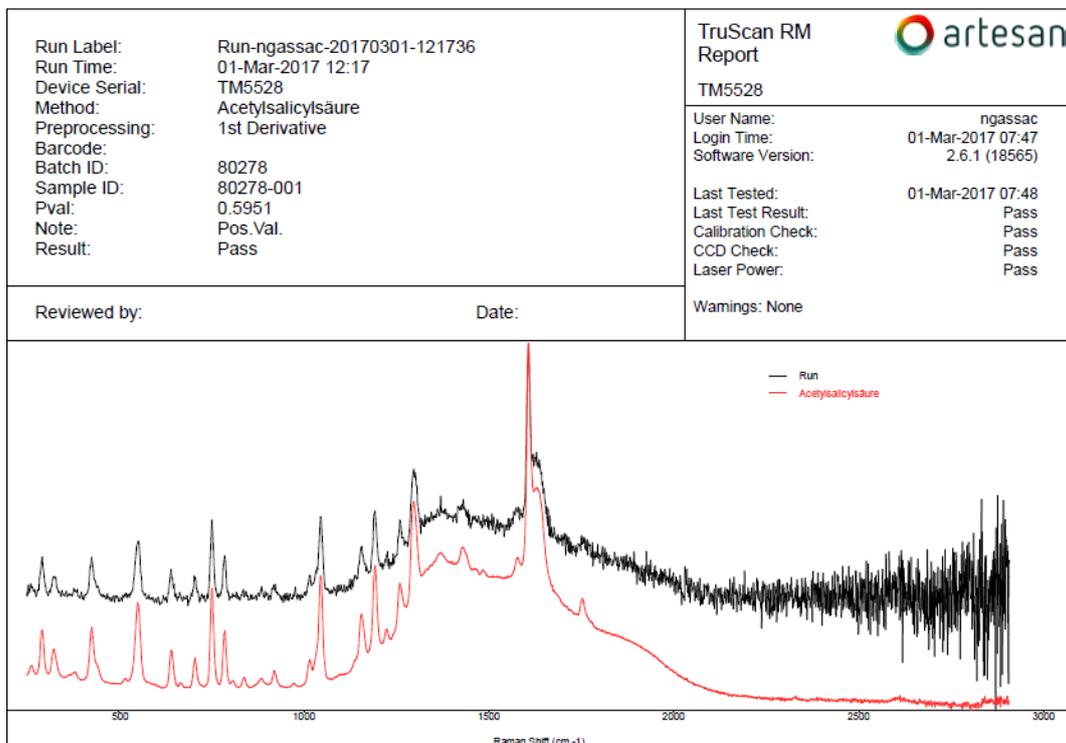


Abb. 43: Identitätsprüfung von Acetylsalicylsäure mit Hilfe von Referenzspektren

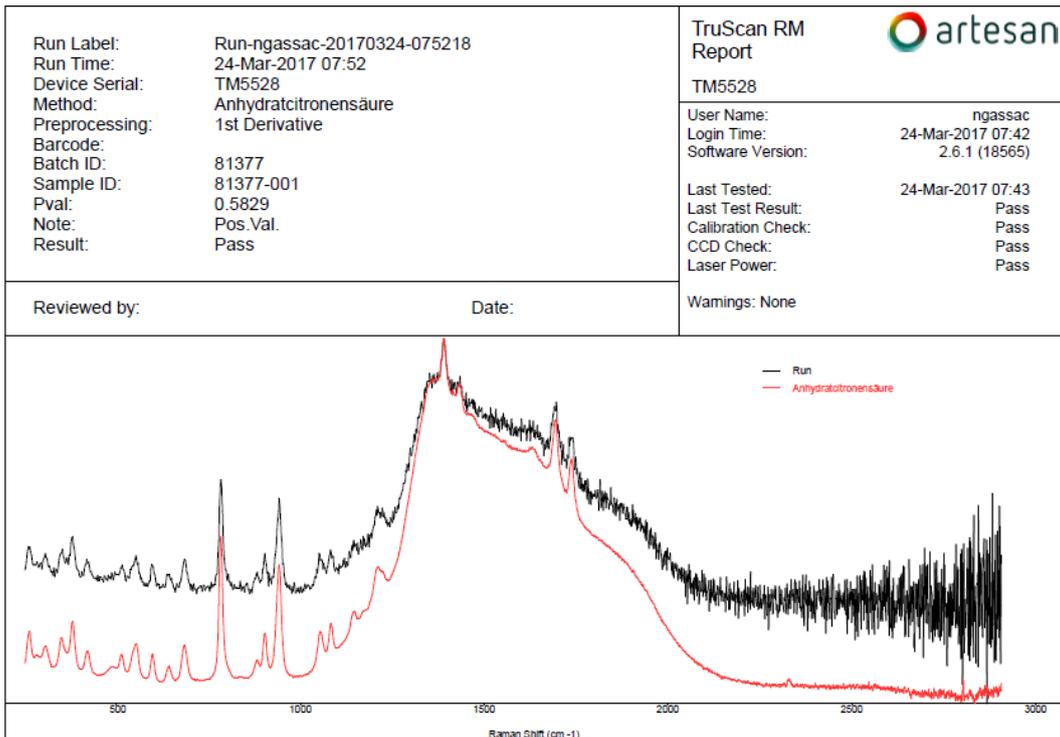


Abb. 44: Identitätsprüfung von Anhydritcitronensäure mit Hilfe von Referenzspektren

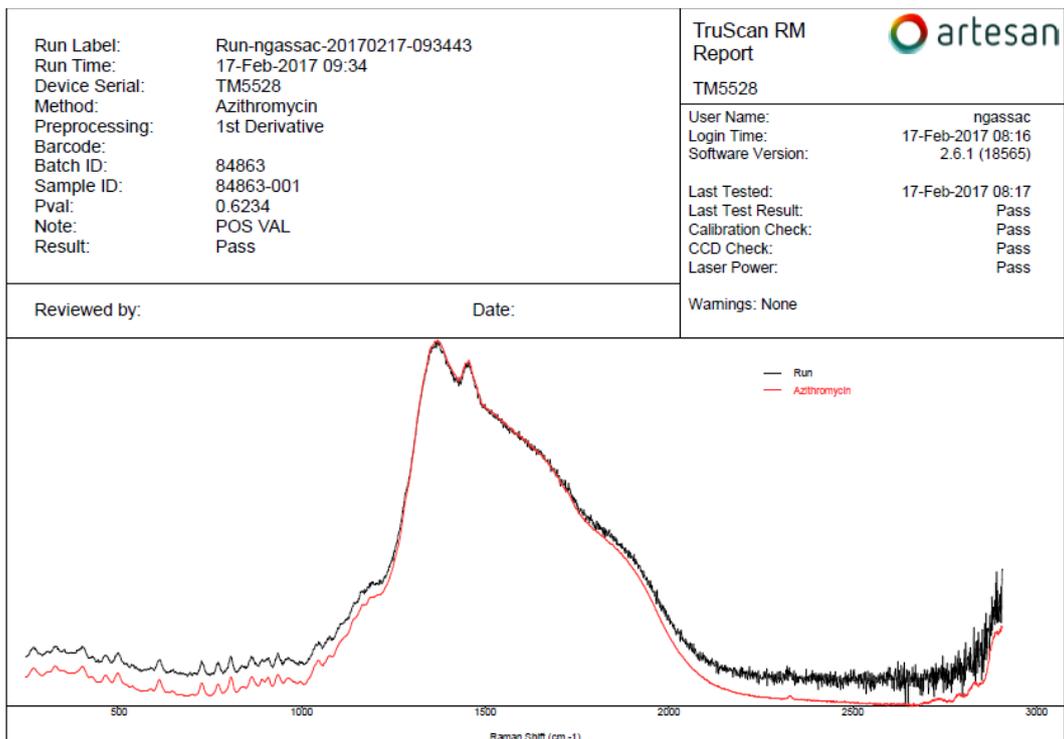


Abb. 45: Identitätsprüfung von Azithromycin mit Hilfe von Referenzspektren

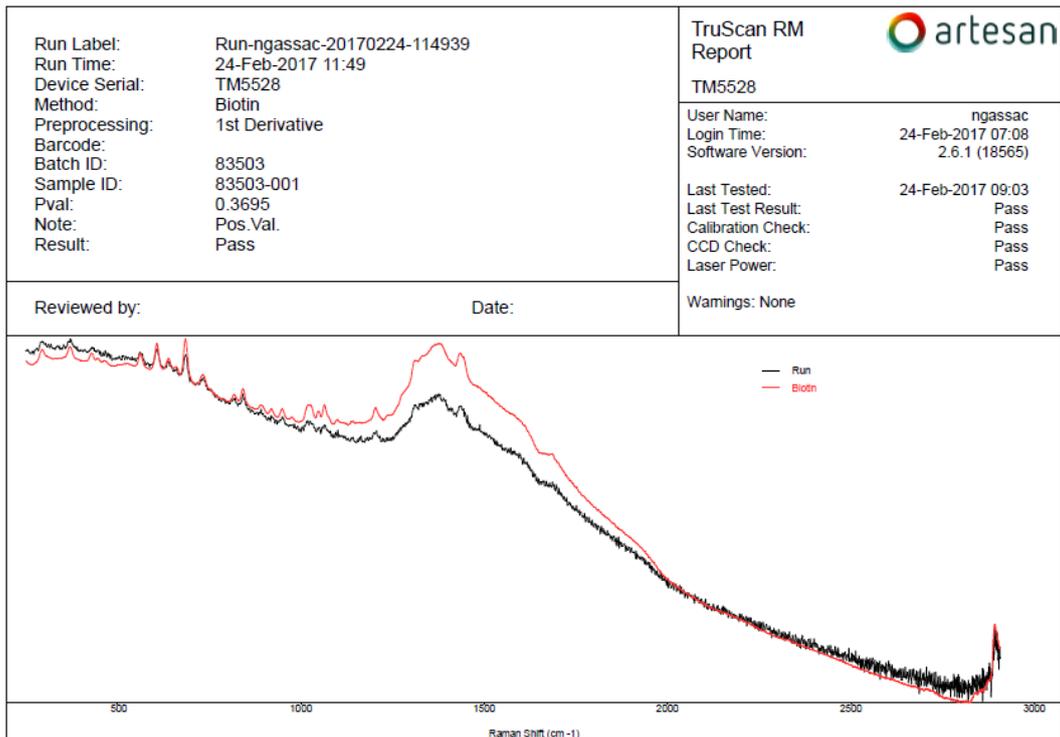


Abb. 46: Identitätsprüfung von Biotin mit Hilfe von Referenzspektren

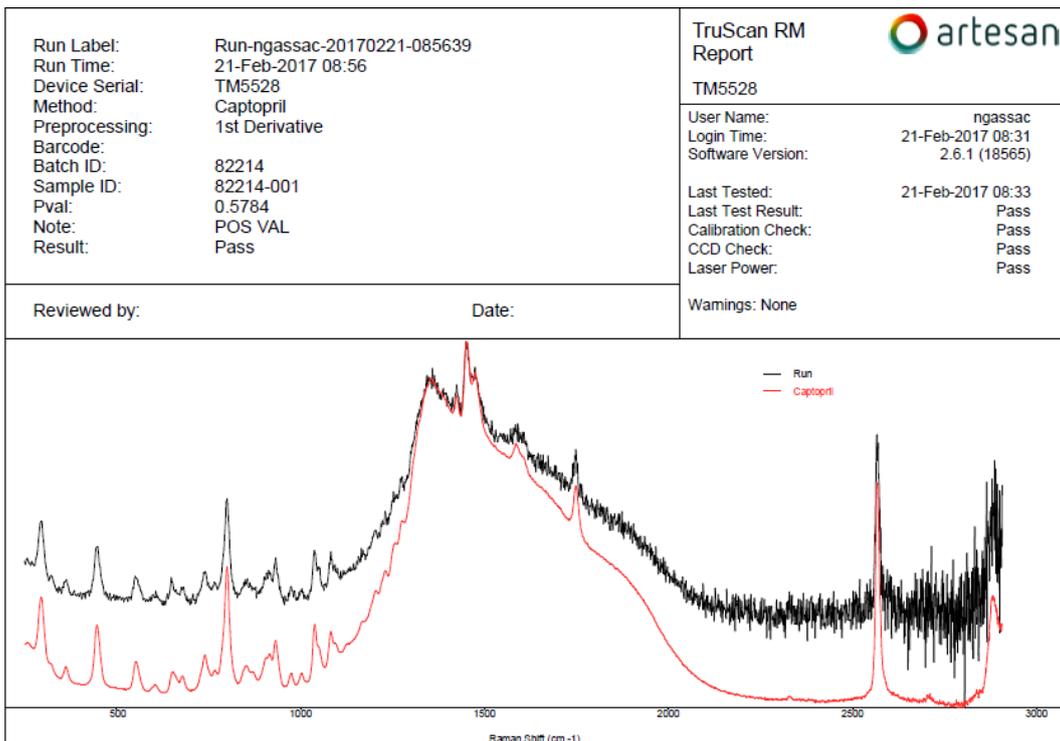


Abb. 47: Identitätsprüfung von Captopril mit Hilfe von Referenzspektren

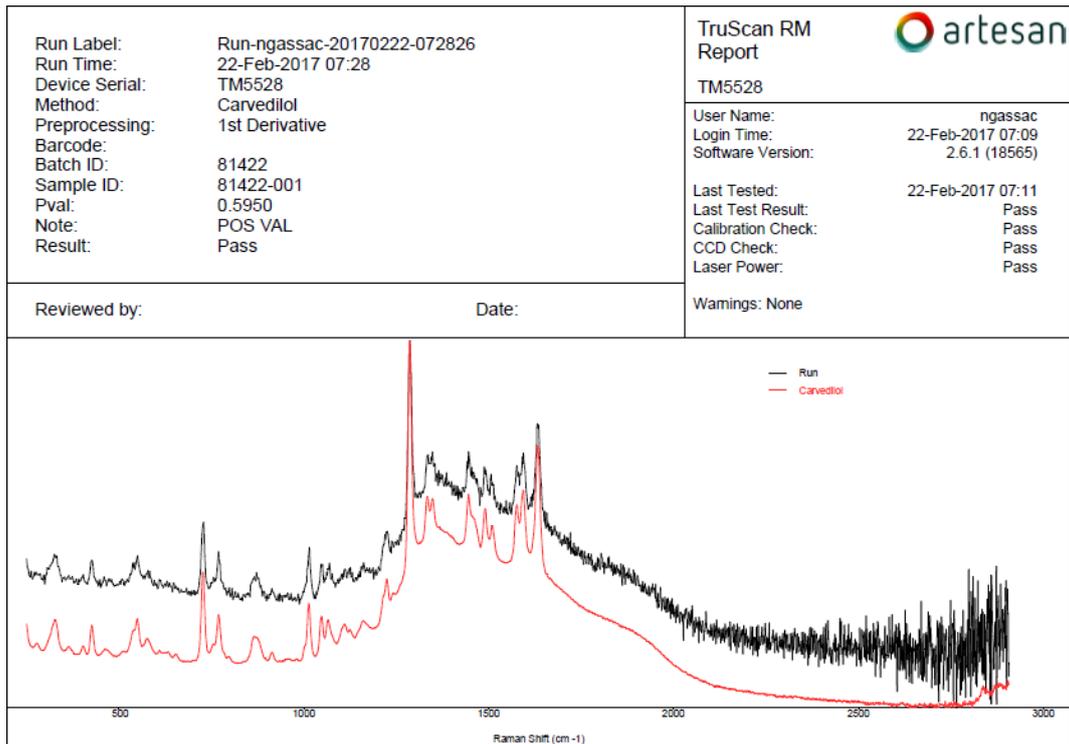


Abb. 48: Identitätsprüfung von Carvedilol mit Hilfe von Referenzspektren

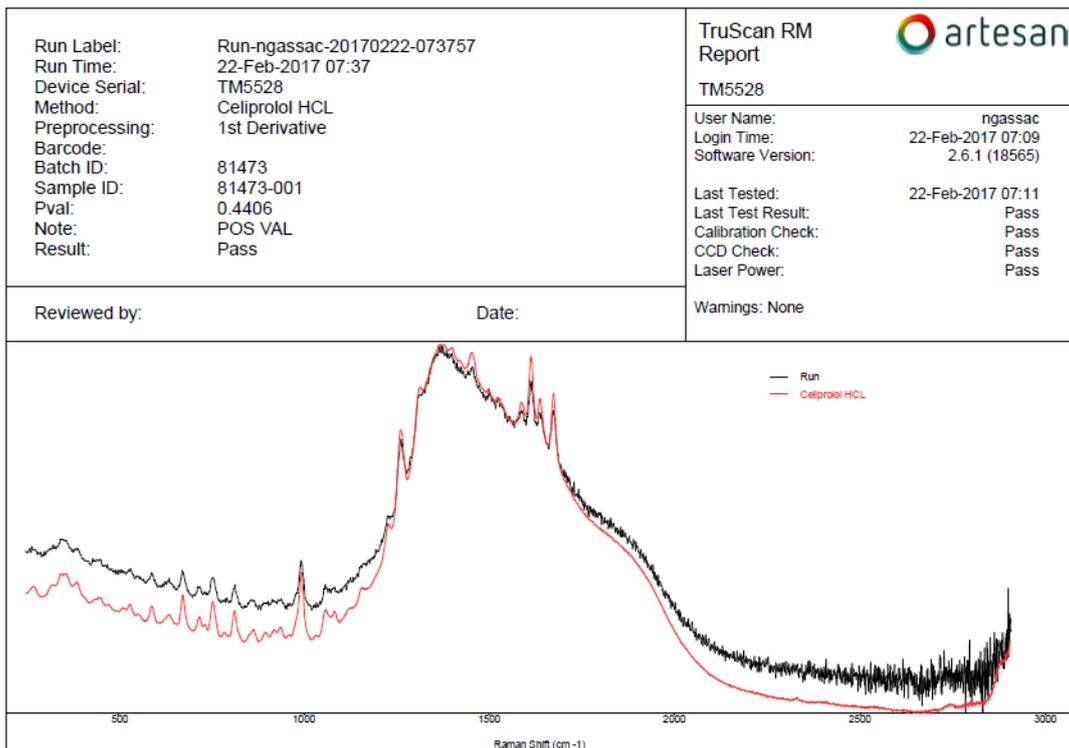


Abb. 49: Identitätsprüfung von Celiprolol mit Hilfe von Referenzspektren

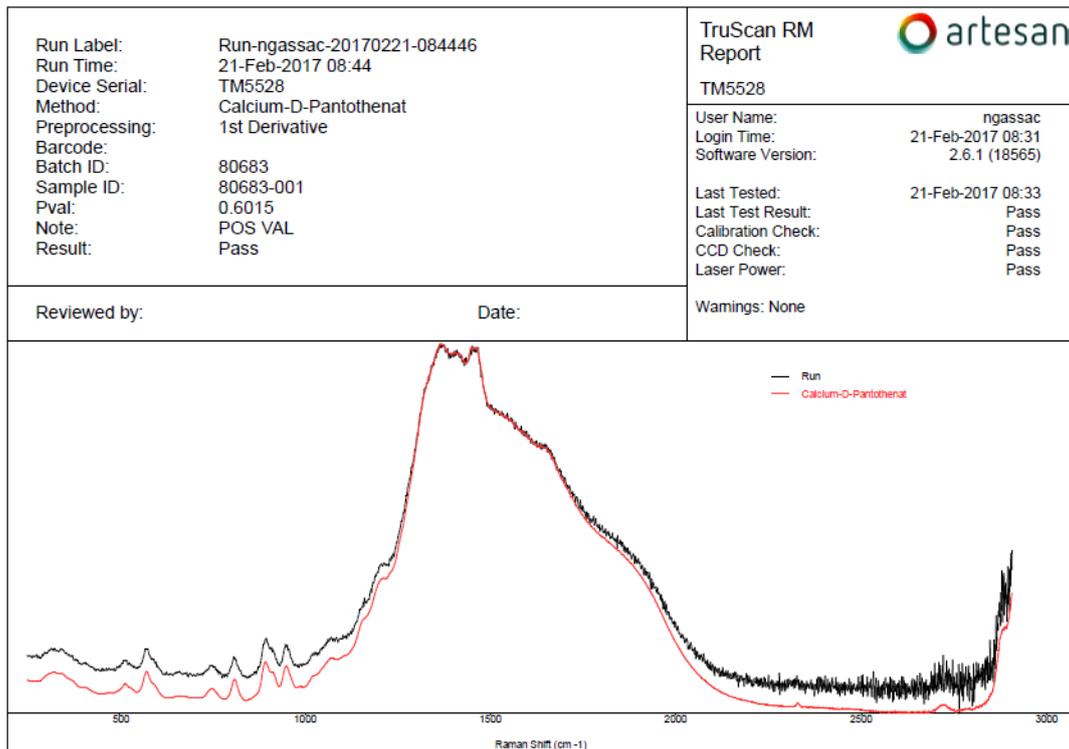


Abb. 50: Identitätsprüfung von Calcium-D-Pantothenat mit Hilfe von Referenzspektren

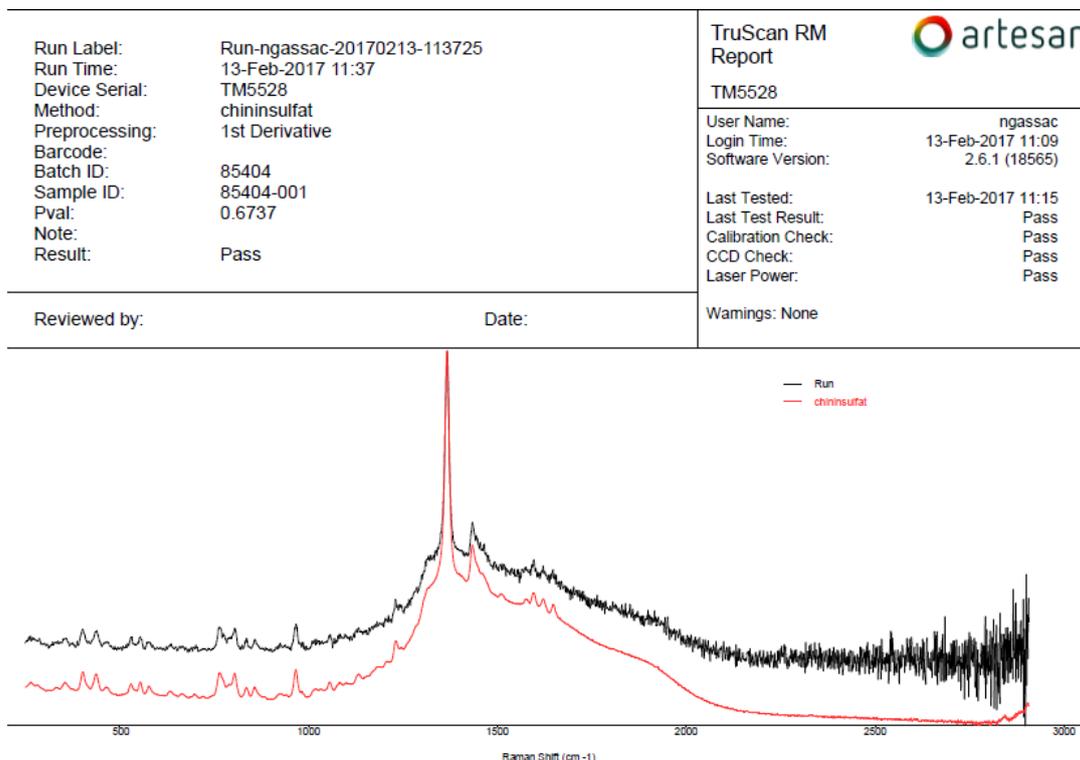


Abb. 51: Identitätsprüfung von Chininsulfat mit Hilfe von Referenzspektren

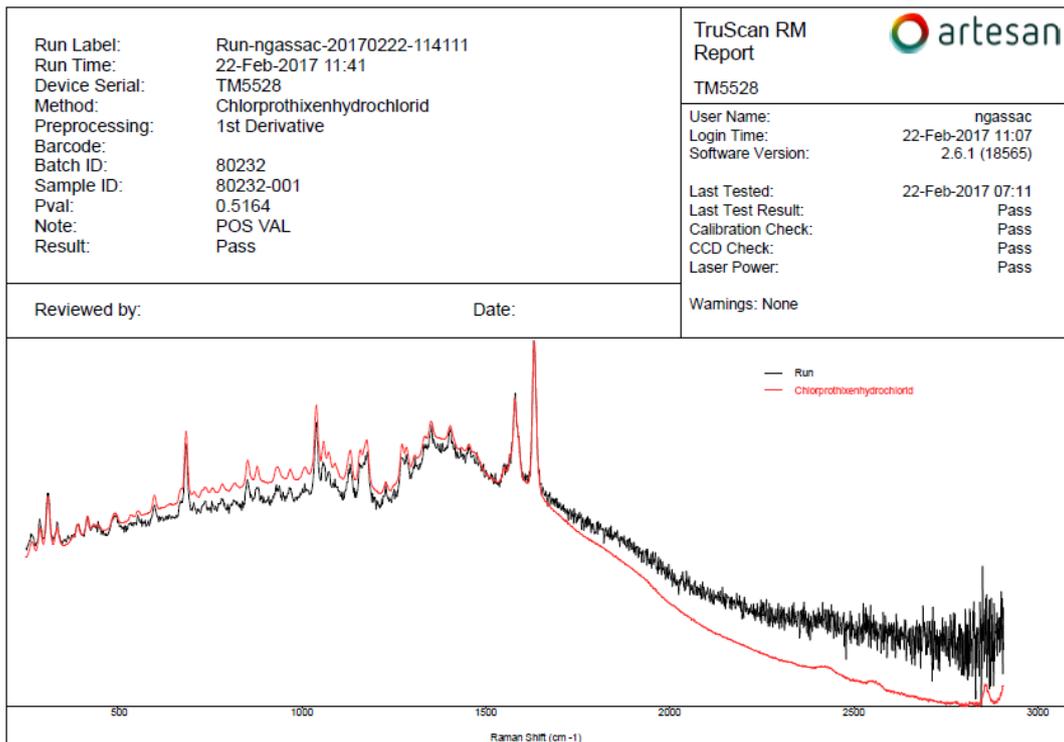


Abb. 52: Identitätsprüfung von Chlorprothixenhydrochlorid mit Hilfe von Referenzspektren

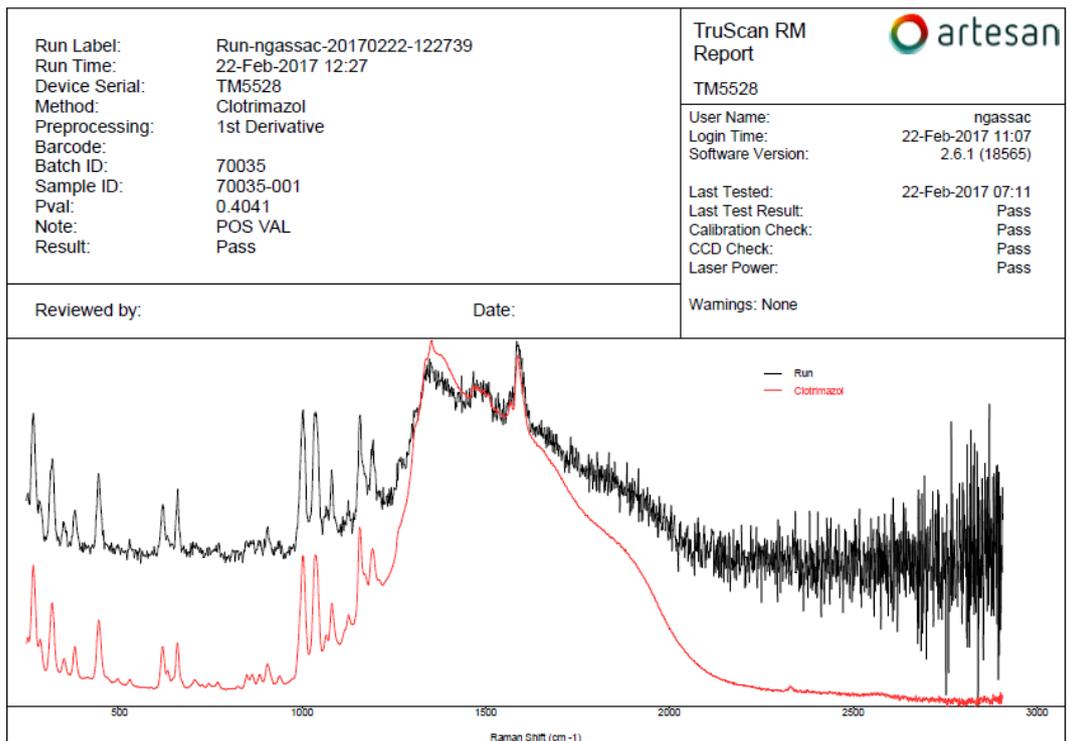


Abb. 53: Identitätsprüfung von Clotrimazol mit Hilfe von Referenzspektren

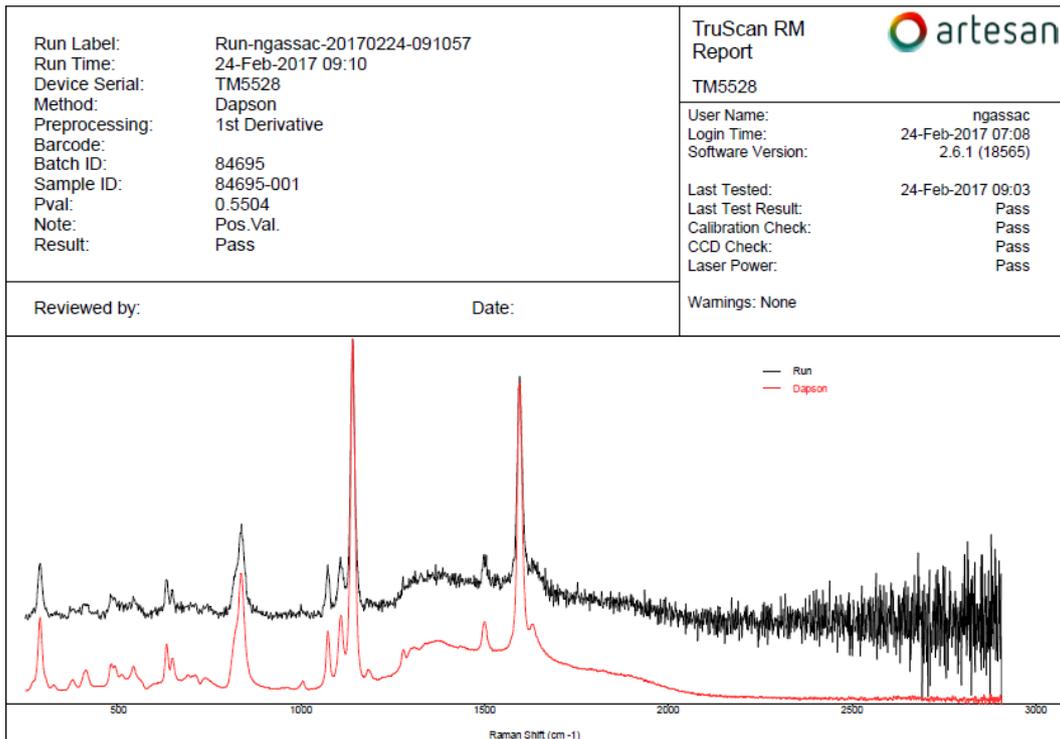


Abb. 54: Identitätsprüfung von Dapson mit Hilfe von Referenzspektren

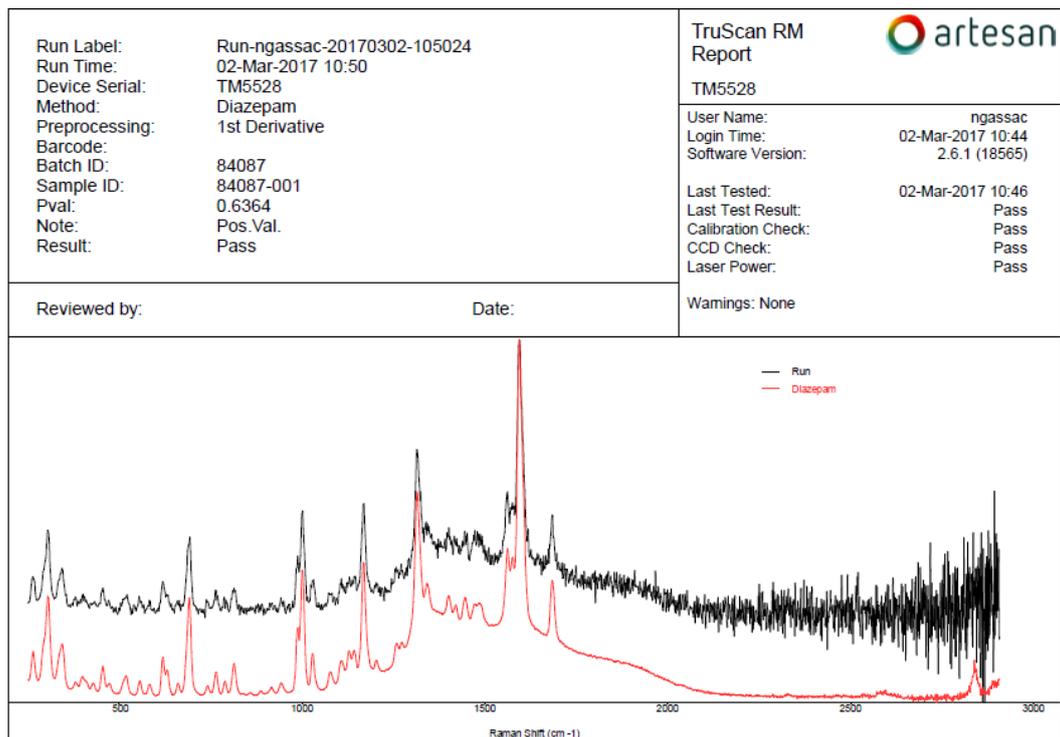


Abb. 55: Identitätsprüfung von Diazepam mit Hilfe von Referenzspektren

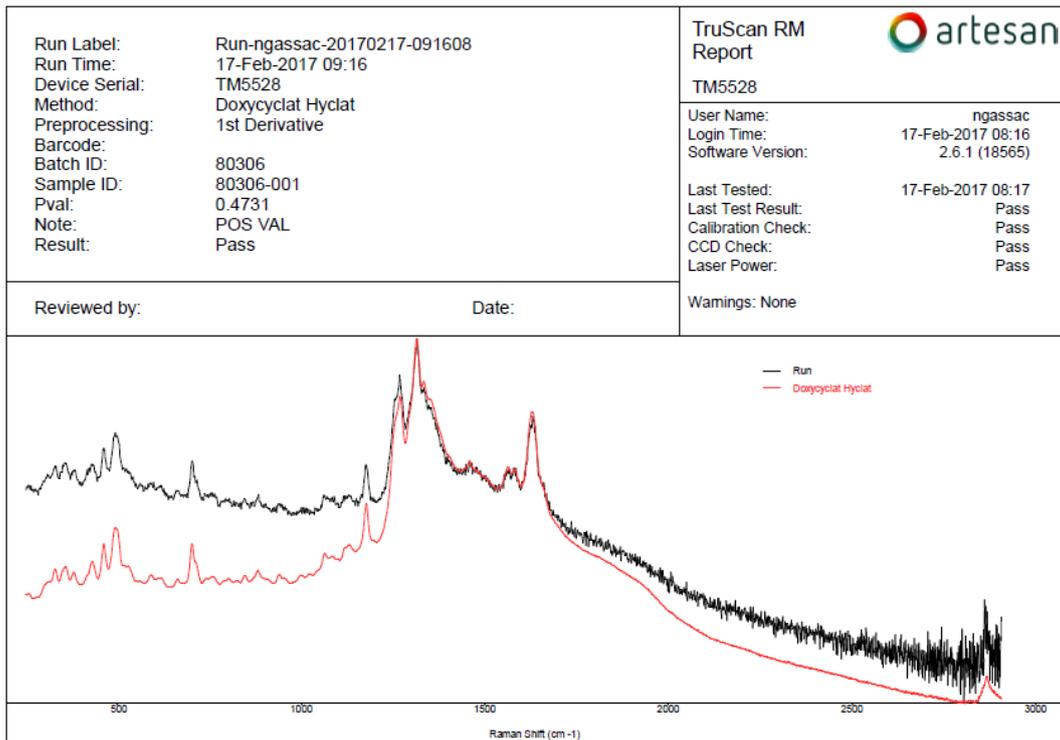


Abb. 56: Identitätsprüfung von Doxycyclin Hyclat mit Hilfe von Referenzspektren

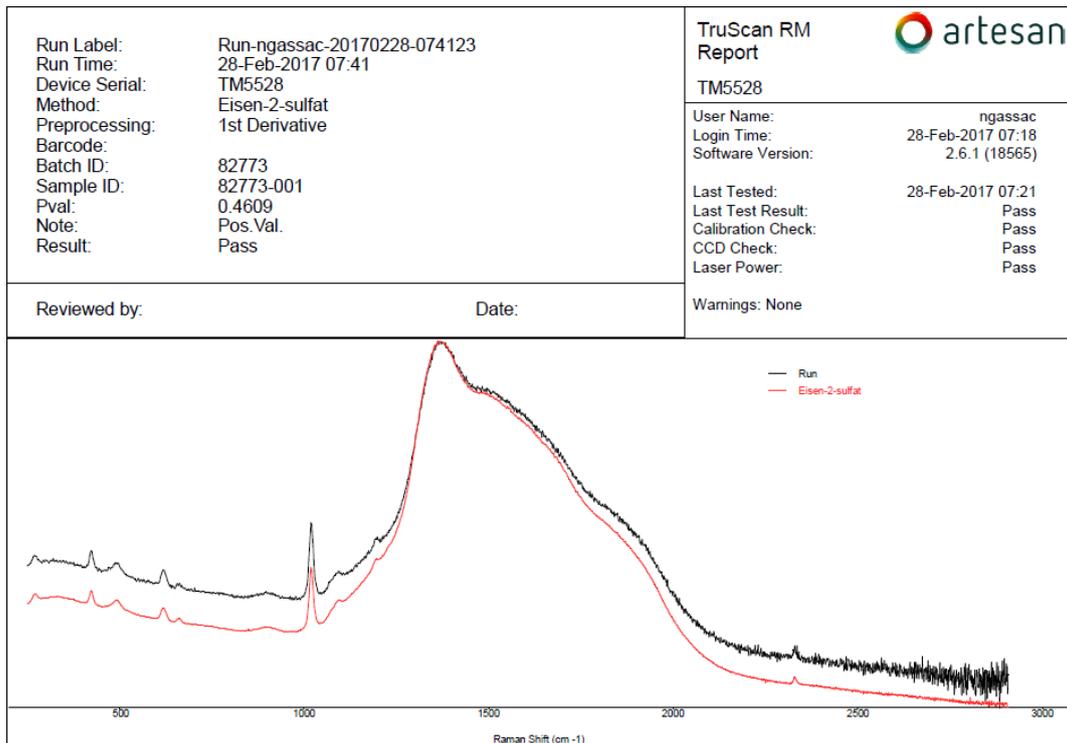


Abb. 57: Identitätsprüfung von Eisen-2-Sulfat mit Hilfe von Referenzspektren

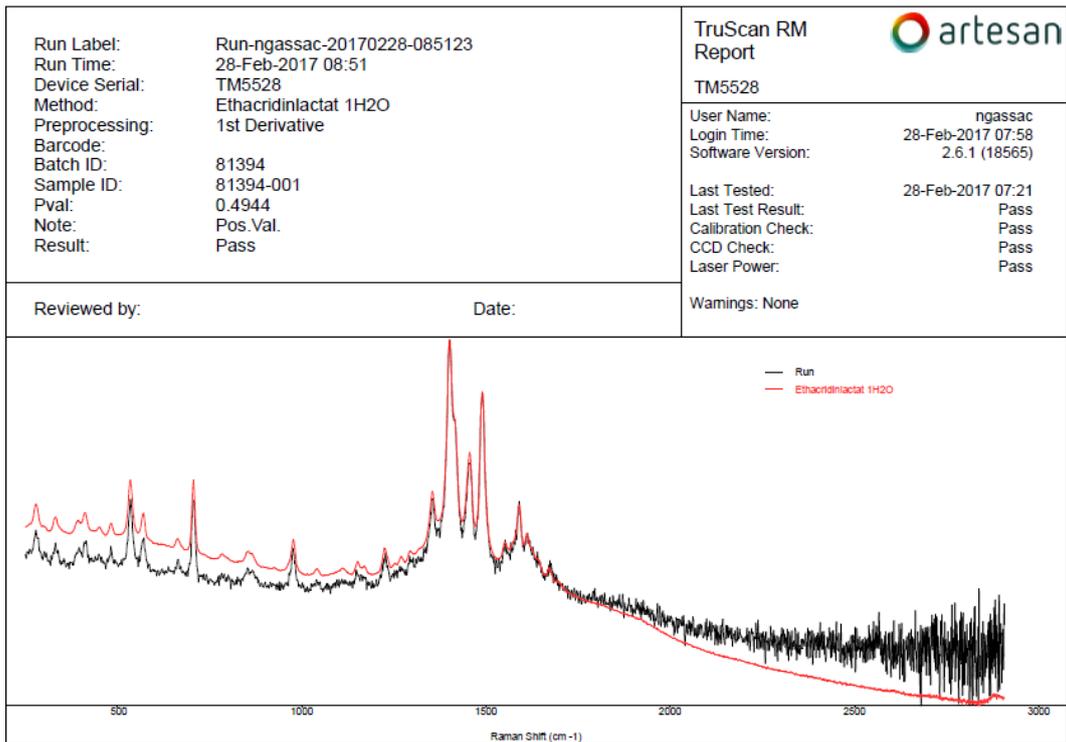


Abb. 58: Identitätsprüfung von Ethacridinlactat 1 H2O mit Hilfe von Referenzspektren

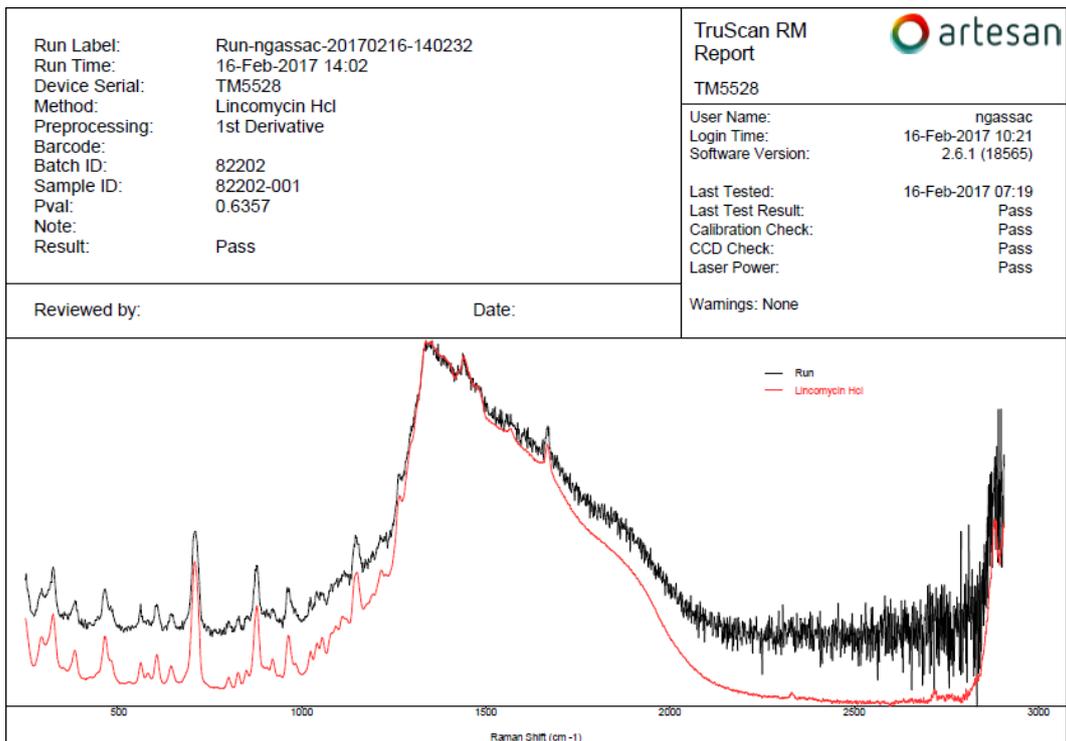


Abb. 59: Identitätsprüfung von Lincomycin HCL mit Hilfe von Referenzspektren

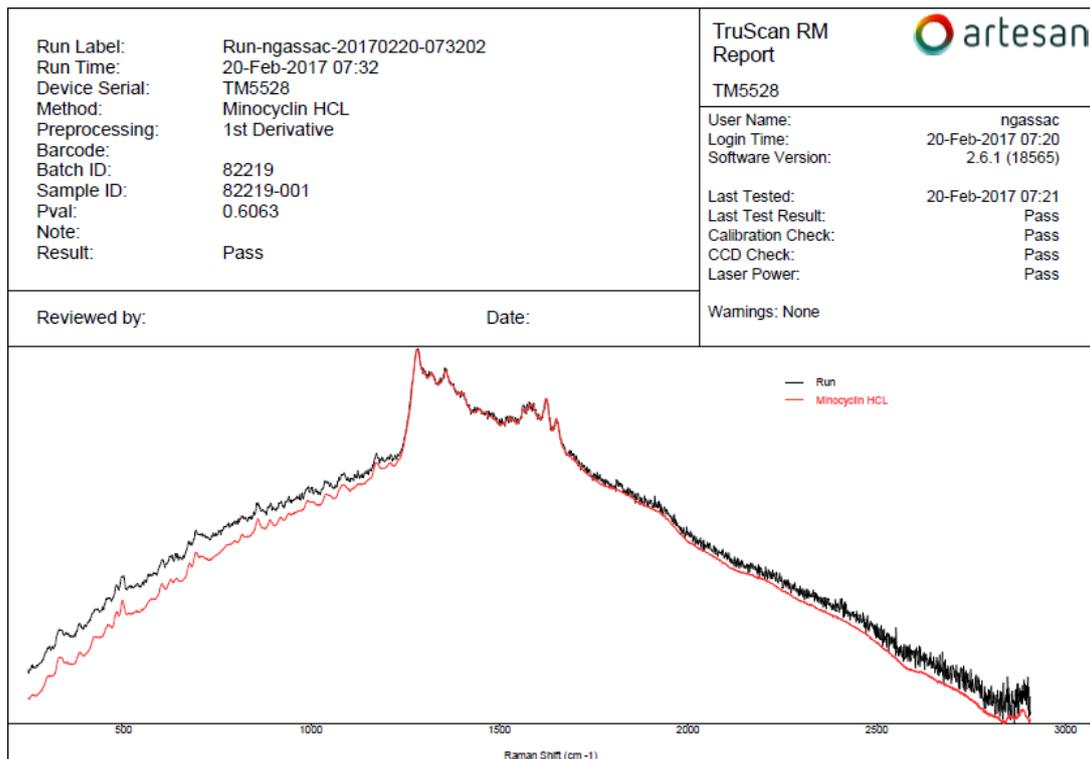


Abb. 60: Identitätsprüfung von Minocyclin HCL mit Hilfe von Referenzspektren

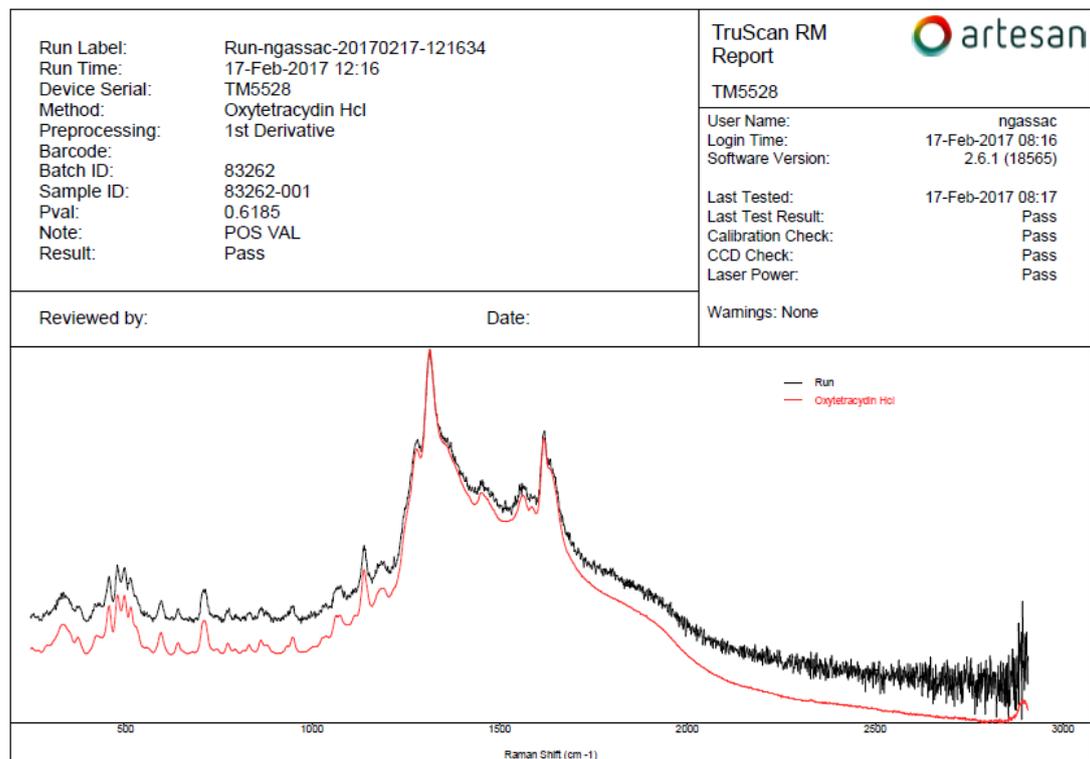


Abb. 61: Identitätsprüfung von Oxytetracyclin HCL mit Hilfe von Referenzspektren

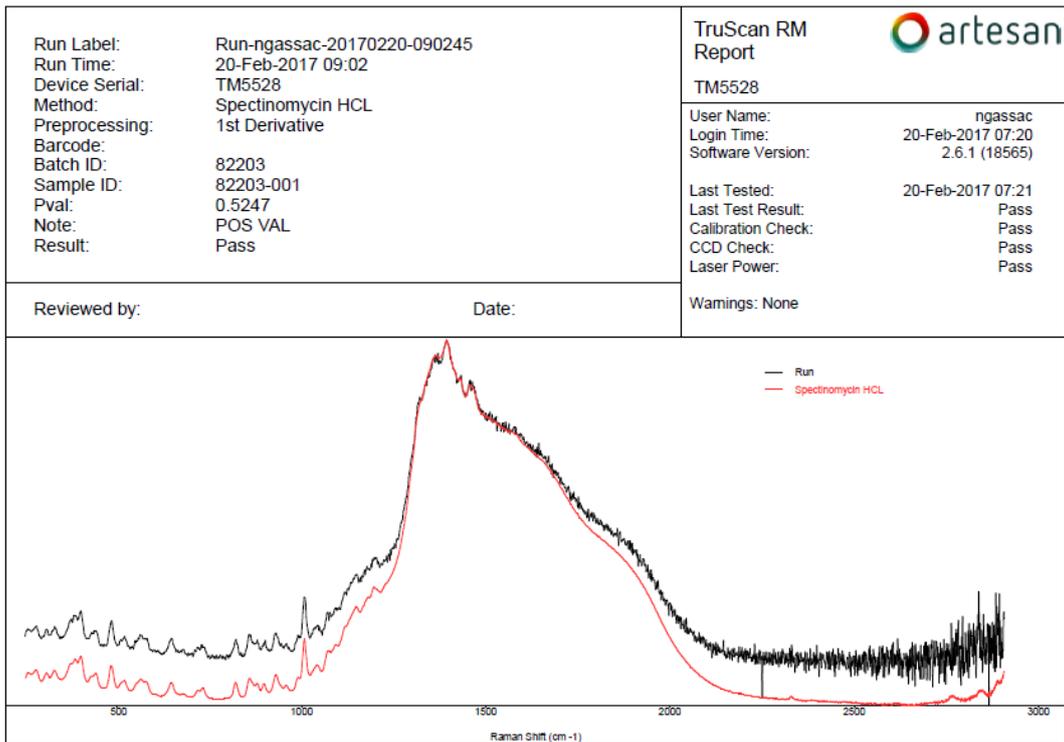


Abb. 62: Identitätsprüfung von SpectinomycinHCL mit Hilfe von Referenzspektren

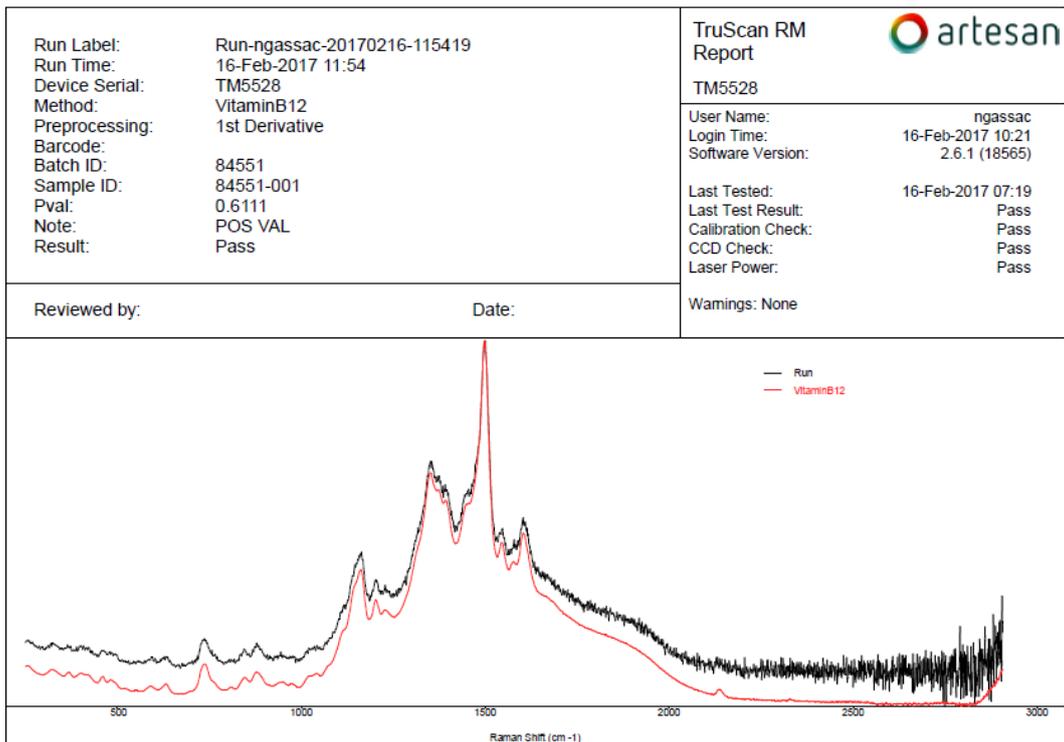


Abb. 63: Identitätsprüfung von Vitamin B12 mit Hilfe von Referenzspektren

6.4 Spektren Interpretation Raman-aktiver Rohstoffe mit RAMalyze

Neben dem Spektrenvergleich zwischen Probe und Referenz wurden ausgewählte Raman-aktive Rohstoffe zur genaueren Strukturaufklärung bezüglich ihrer Raman-aktiven Schwingungen durch

Interpretation charakteristischer Bandenlagen mit Hilfe der automatischen und/oder manuellen Analyse des Spektren Interpretationsprogrammes „RAMalyze“ untersucht.

Die von dem Programm RAMalyze vorhergesagten Wellenzahlbereiche wurden zusätzlich mit den Angaben einer Literatur verglichen.

Als Raman-Spektrum bezeichnet man die Auftragung der Signalintensität des gestreuten Lichts gegen die Raman-Verschiebung, die in der Regel als Raman-Shift bezeichnet wird. Diese Verschiebung entspricht der Energiedifferenz des eingestrahnten und des Raman-gestreuten Lichts und wird historisch bedingt in Wellenzahlen ν angegeben, die auf der Abszisse aufgetragen werden. Als Wellenzahl definiert man die Anzahl der Wellen pro Einheit und somit den Kehrwert der Wellenlänge. Obwohl die SI-Einheit von Wellenzahlen m^{-1} ist, ist die in der Spektroskopie gebräuchlichere Einheit inverse Zentimeter cm^{-1} . Die Wellenzahlen sind proportional zur Frequenz und infolgedessen energieproportionale Einheiten. Jede Raman-aktive Vibration resultiert in einem Peak mit einem Maximum, dessen Position auf der Wellenzahlachse charakteristisch für eine bestimmte Molekülschwingung ist. Die auf der Ordinate aufgetragene Streustrahlungsintensität ist proportional zur Anzahl der von einem Detektor registrierten Photonen und kann in beliebigen Einheiten angegeben werden.

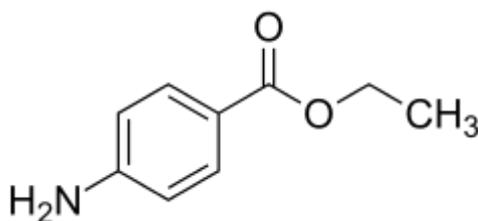
Die Schwingungsfrequenzen, die für die korrekte Identifizierung sehr wichtig sind liegen typischer Weise unter 1500 cm^{-1} . Der Bereich wird in der Raman-Spektroskopie wegen seiner Bedeutung auch als Fingerprint-Bereich bezeichnet, da er Rückschlüsse auf die Feinstruktur erlaubt. Mit Ausnahme der N-H-Deformationsschwingung, deren Banden im Wellenzahlbereich von ca. $1600\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$ auftreten, sind im Fingerprint-Bereich aufgrund der „schwereren“ Beugeschwingungen vor allem Deformationsschwingungen δ zu beobachten. Gleichzeitig charakterisiert er das Molekül als Ganzes. Die Schwingungsfrequenzen funktioneller Gruppen und Mehrfachbindungen liegen hingegen i.d.R. oberhalb 1500 cm^{-1} .

In den folgenden Abschnitten werden die Rohstoffe anhand ihrer IUPAC-Bezeichnungen, Strukturformeln sowie deren Ausschnitte aus dem Proberamanspektrum charakterisiert. Zur Veranschaulichung sind die verschiedenen funktionelle Gruppen in den Molekülen farblich markiert. Die Ergebnisse aus der Spektren-Interpretation des Programmes „RAMalyze“ werden dargelegt und dessen Resultate mit denen aus der Literatur verglichen.

6.4.1 Benzocain

Substanzklasse: Aromatische Ester

IUPAC-Bezeichnung: p-Aminobenzoessäureethylester



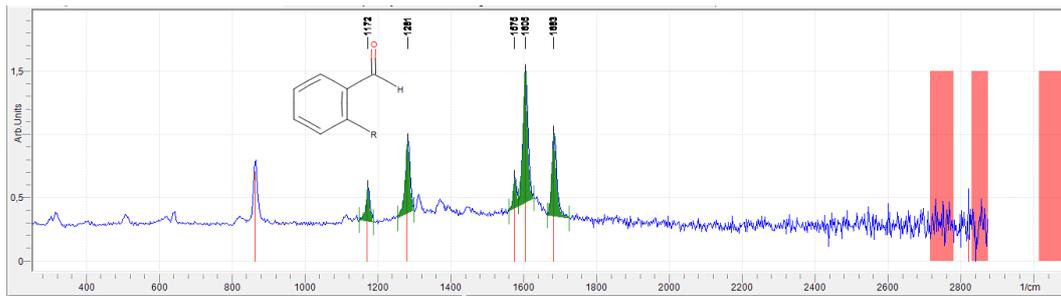


Abb. 64: Ausschnitt des Probespektrums von Benzocain

Das Probespektrum von Benzocain wurde von dem Programm RAMalyse mit der automatischen Analyse „Spektrum interpretieren“ mit einem Qualitätswert von 100% als Aromatisches konjugiertes Aldehyd identifiziert. Da es sich bei Benzocain nicht um ein Aromatisches konjugiertes Aldehyd sondern um einen Aromatischen Ester handelt. Wie alle Carbonyl-Verbindungen zeigen Ester im Raman-Spektrum eine starke Bande der C=O-Valenzschwingung. Um Ester eindeutig zu identifizieren, muss neben der C=O-Valenzschwingung die C-O-C-Valenzschwingung der Ester-Gruppe als Kontrollbande vorhanden sein. Unter Vernachlässigung dieses Sachverhaltes diagnostizierte das Programm RAMalyse für die Valenzschwingung ν C=O eines Aromatischen Aldehyds eine intensive Bande im Wellenzahlbereich von 1705-1680 cm^{-1} . Im Hinblick auf die Literaturangabe der Aromatischen konjugierten Aldehyde (1710-1690 cm^{-1}) wurde eine geringe Verschiebung zur kleinen und größeren Wellenzahl \checkmark festgestellt. Insgesamt konnte die intensive Bande im Bereich von 1705-1680 als Aromatisches Aldehyd in dem Benzocain-Molekül von dem Programm RAMalyse identifiziert werden. Mit den zur Verfügung stehenden Vergleichstabellen konnte der exakte Wellenzahlbereich eines Aromatischen Esters (1745-1730 cm^{-1}) nicht ermittelt werden.

Die Manuelle Zuordnung der funktionellen Gruppe Aromatisches Alken substituiertes Keton und Aromatische Carbonsäure durch den Regel-Designer ergaben seitens der Valenzschwingung ν C=O ein überschneidendes Ergebnis mit dem der Aromatischen Aldehyde. Die Wellenzahl der Valenzschwingungen ν C=O der Aromatischen Aldehyde (1705-1680), der Aromatischen Alkene, substituierte Ketone (1700-1680) und Aromatische Carbonsäure (1700-1675) sind hinsichtlich der Ergebnisse aus der Spektreninterpretation mit RAMalyse annähernd identisch, sodass eine eindeutige Zuordnung der Bande im Bereich 1745-1730 cm^{-1} nicht möglich war. Ursächlich ist der eingetretene Kopplungseffekt zwischen den einzelnen Schwingungen ν C=O der Aromatischen Aldehyde, der Aromatischen Alkene, substituierten Ketone und der Aromatischen Carbonsäuren. Durch Kombination der drei Gruppen bzw. der Valenzschwingungen ν C=O im Benzocain-Molekül, die ähnliche charakteristische Gruppenfrequenzen aufweisen, kam es zu einer Wellenzahlverschiebung.

Durch Anwendung des „Browsers für funktionelle Gruppen“ wurde die sehr intensive Bande der Valenzschwingung ν C=C im Wellenzahlbereich 1625-1590 cm^{-1} aufgrund von

Kopplungseffekten der zwei Doppelbindungen im Molekül zu Verschiebungen größerer Wellenzahlen gegenüber der Literaturangabe 1610-1590 cm⁻¹ ermittelt.

Gruppen im Molekül	Raman-aktive Schwingungen	Bandenlage RAMALyse [cm ⁻¹]	Bandenlage Literatur [cm ⁻¹]	Verschiebung zu $\bar{\nu}$	Verschiebung zu >math>\bar{\nu}</math>
Aromatische Aldehyde	$\bar{\nu}$ C=O	1705-1680	1710-1690	10	5
Aromatische Alkene substituierte Ketone	$\bar{\nu}$ C=O	1700-1680	1700-1670	10	-
Aromatische Carbonsäure	$\bar{\nu}$ C=O	1700-1675	1710-1675	-	10
	$\bar{\nu}$ C=C, Ring	1625-1590	1610-1590	-	15
	δ C-H	850-680	900-670	10	50

6.4.2 Carbamazepin

Substanzklasse: Aromatische Carbonsäure Amid

IUPAC-Bezeichnung: 5H-Dibenz[b,f]azepin-5-carbamid

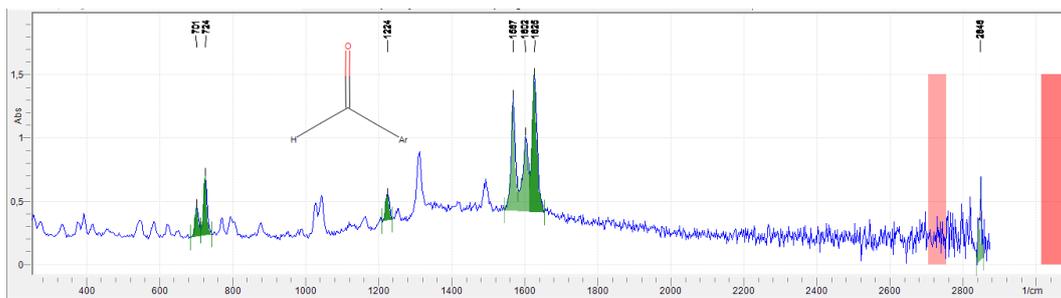
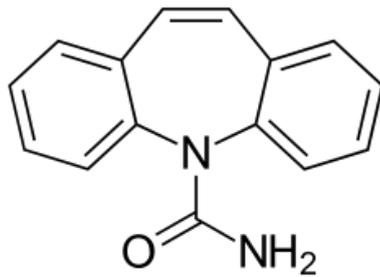


Abb. 65: Ausschnitt des Probespektrums von Carbamazepin

Das Probespektrum von Carbamazepin wurde anhand der automatischen Analyse „Spektrum interpretieren „ mit einem Qualitätswert von 85% als Aromatische Carbonsäure Amid identifiziert. Die sehr intensive Bande der Valenzschwingung ν C=O, im Wellenzahlbereich von 1670-1610 cm^{-1} konnte gegenüber dem Literaturwert (1680-1620) geringe Verschiebungen zu kleineren und größeren Wellenzahl ermittelt werden.

Die Wellenzahlverschiebung der Deformationsschwingung δ N-H der Aromatischen Amide ist analog zur δ N-H-Schwingung von Carbamazepin auf die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zurückzuführen, die durch Schwächung der Bindung zu einer Wellenzahlverschiebung führte.

Die Valenzschwingungen ν C-O des Aryl Alkyl-Ethers im Bereich 1300-1200 cm^{-1} mit einer intensiven Schwingung wurde durch automatische Analyse „Spektrum interpretieren“ von dem Programm RAMalyse mit einem Qualitätswert von 83% mit vernachlässigbar geringer Abweichung gegenüber der Literaturangabe (1310-1210 cm^{-1}) identifiziert.

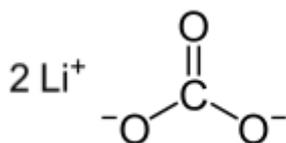
Durch Zuordnung der funktionellen Gruppen des tertiäre Alkohols mit dem „Regel-Designer“ konnte die charakteristische Valenzschwingung ν C-O der Carbamazepin mit einer mittel-intensiven Bande in den Bereich 1200-1120 mit geringen Abweichungen zu den Literaturwert dargelegt werden. Die Wellenzahlbereiche der Valenzschwingung ν C-O des Ary-Alkl-Ethers und des tertiäre Alkohols liegen sehr nah beieinander, sodass infolge einer Schwingungskopplung eine Verschiebung zu kleineren und größeren Wellenzahl \ddot{u} resultiert.

Gruppen im Molekül	Raman-aktive Schwingungen	Bandenlage RAMALyse [cm-1]	Bandenlage Literatur [cm-1]	Verschiebung zu < \ddot{u}	Verschiebung zu > \ddot{u}
Aromatische Amide	ν C=O	1670-1610	1680-1620	10	10
	δ N-H	1620-1505	1570-1515	10	-
Aryl-Alkyl-Ether	ν C-O	1300-1200	1310-1210	10	10
tertiärer Alkohol	ν C-O	1210-1120	1210-1100	20	-

6.4.3 Lithiumcarbonat

Substanzklasse: Carbonat

IUPAC-Bezeichnung: Dilithiumcarbonat (Lithiumsalz der Kohlensäure)



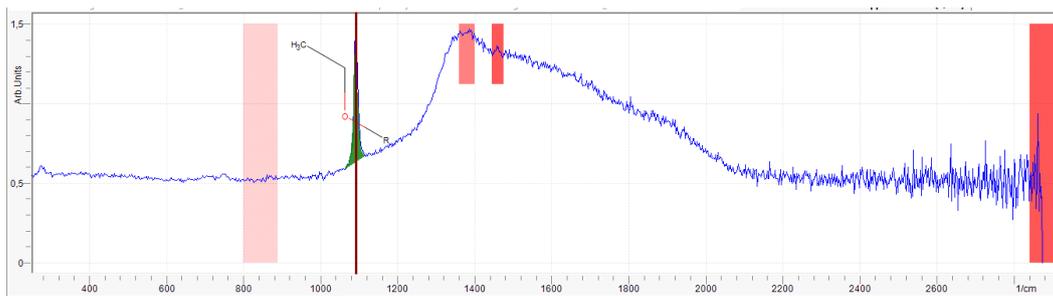


Abb. 66: Ausschnitt des Probespektrums von Lithiumcarbonat

Das Probespektrum von Lithiumcarbonat wurde von dem Programm RAMalyse mit der automatischen Analyse „Spektrum interpretieren“ als Aliphatischer Ester mit einem Qualitätswert von 98% identifiziert. Die sehr intensive Bande der Valenzschwingung ν C=O (Wellenzahl: 1140-1085) konnte mit einer größeren Abweichung zum Literaturwert (1200-1160) ermittelt werden.

Die manuelle Zuordnung der funktionellen Gruppe des Sekundären Alkohols durch den „Regels-Designer“ konnte mit relativ intensitätsschwachen Banden der Schwingungen ν C-O (1100-1060 cm^{-1}) gegenüber dem Literaturwert mit großer Abweichung (1075-1000) ermittelt werden.

Die Wellenzahlbereiche der Deformationsschwingungen δ C-O des Primären und Sekundären Alkohols sind laut Angaben des Programms RAMalyse identisch. Ursächlich ist auch hier der eingetretene Kopplungseffekt zwischen den einzelnen Schwingungen δ C-O des Primären und Sekundären Alkohols. Durch Kombination der beiden bzw. der Deformationsschwingungen δ , die ähnliche charakteristische Gruppenfrequenzen aufweisen, wurden größere Wellenzahlverschiebungen festgestellt.

Gruppen im Molekül	Raman-aktive Schwingungen	Bandenlage RAMalyse [cm-1]	Bandenlage Literatur [cm-1]	Verschiebung zu $< \checkmark$	Verschiebung zu $> \checkmark$
Aliphatische Ester	ν C=O	1140-1085	1200-1160	75	60
Sekundärer Alkohol	ν C-O	1100-1060	1075-1000	60	100
	δ C-O	950-880	970-880	-	20
Primärer Alkohol	ν C=O	1150-1070	1150-1075	5	-
	δ C-O	950-880	Ca 820	-	-

6.4.4 Natriumascorbat

Substanzklasse: Aromatische Carbonat, (Salz von Carbonsäure)

IUPAC-Bezeichnung: sodium 5-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3-hydroxy-4-oxo-furan-2-olate

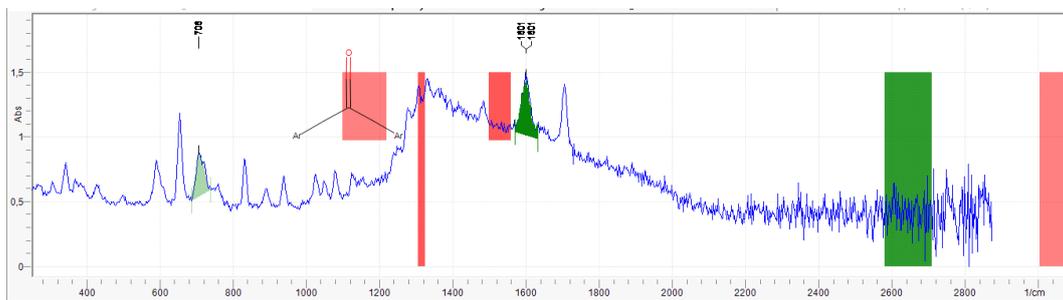
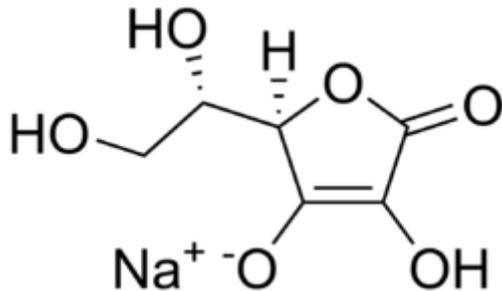


Abb. 67: Ausschnitt des Probespektrums von Natriumascorbat

Gruppen im Molekül	Raman-aktive Schwingungen	Bandenlage RAMAnalyse [cm-1]	Bandenlage Literatur [cm-1]	Verschiebung zu \checkmark	Verschiebung zu >math>\checkmark</math>
Aryl-Aryl-Keton	ν C=O	1675-1600	1670-1650	50	5
	ν C=C, Ring	1615-1580	1610-1590	10	5
Aromatische Ester	ν C=O	1740-1700	1740-1715	15	-
	ν C=C, Ring	1620-1580	1610-1590	10	10
Aromatische Carbonsäure	ν C=O	1710-1660	1710-1675	15	-
	ν C=C, Ring	1625-1585	1610-1590	5	15

Das Probespektrum von Natriumascorbat wurde vom Programm RAMAnalyse mit der automatische Analyse „Spektrum interpretieren“ als Aryl-Aryl-Keton mit einem Qualitätswert von 96% identifiziert. Die intensive Bande der Valenzschwingungen ν C=O

(Wellenzahlbereiche: (1675-1600 cm^{-1}) mit einer vernachlässigbaren größeren Abweichung zur Literaturangabe (1670-1650 cm^{-1}) .

Die Wellenzahlbereiche der Valenzschwingungen ν C=C der Aromatischen Carbonsäure (Wellenzahlbereich 1625-1585 cm^{-1}) und des Aromatischen Esters (Wellenzahlbereich 1620-1580 cm^{-1}) sind mit der Interpretation mit RAMalyse annähernd identisch.

Ursächlich ist der eingetretene Kopplungseffekt der zwei Doppelbindungen zwischen der Aromatischen Carbonsäure und dem Aromatischen Ester. Durch Kombination der beiden Gruppen bzw. der Valenzschwingungen ν C=C im Natriumascorbat, die ähnliche charakteristische Gruppenfrequenzen aufweisen, kam es zu einer Wellenzahlverschiebung.

6.4.5 Paracetamol

Substanzklasse: Aromatische Hydroxygruppe

IUPAC-Bezeichnung: N-(4-Hydroxyphenyl) acetamid

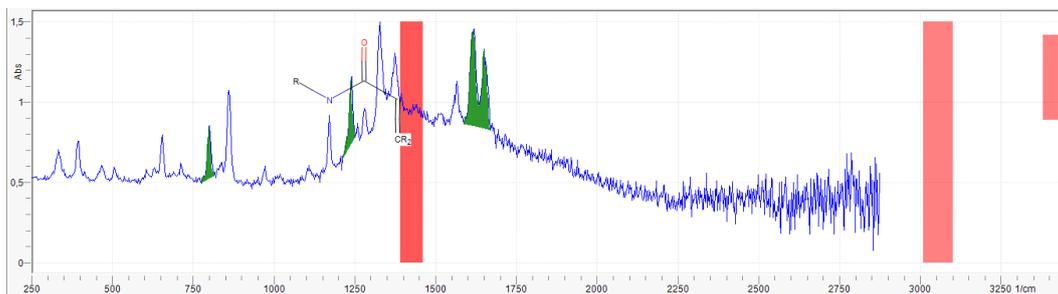
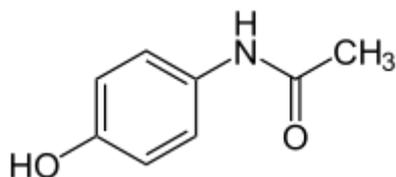


Abb. 68: Ausschnitt des Probespektrums von Paracetamol

Gruppen im Molekül	Raman-aktive Schwingungen	Bandenlage RAMalyse [cm^{-1}]	Bandenlage Literatur [cm^{-1}]	Verschiebung zu $< \ddot{\nu}$	Verschiebung zu $> \ddot{\nu}$
Aliphatische Amide	ν C=O	1700-1645	1680-1630	15	20
	ν C=C	1630-1610	1650-1635	25	20
Aryl-Aryl-Ketone	ν C=O	1675-1600	1670-1650	50	5

Aromatische Amide	ν C=O	1670-1610	1680-1620	10	10
	δ N-H	1650-1510	1570-1515	5	50

Das Probespektrum von Paracetamol wurde im Programm RAMalyse mit der automatischen Analyse „Spektrum interpretieren“ als Aliphatisches Amid mit einem Qualitätswert von 95% identifiziert. Da es sich bei Paracetamol nicht um ein Aliphatisches Amid sondern um ein Aromatisches Amid handelt.

Die intensive Bande der Valenzschwingungen ν C=O (Wellenzahlbereiche: (1700-1645 cm^{-1}) wurde mit einer vernachlässigbar größeren Abweichung gegen die Literaturangabe (1680-1630 cm^{-1}) identifiziert. Die sehr intensive Bande der Valenzschwingung ν C=C im Wellenzahlbereich 1630-1610 cm^{-1} führte aufgrund des Kopplungseffektes der zwei Doppelbindungen im Molekül zu Verschiebungen größerer und kleinerer Wellenzahl gegenüber der Literatur (1650-1635).

Die Deformationsschwingung δ N-H des Aromatischen Amids konnte durch die manuelle Zuordnungen mit dem „Regels-Designer“ gegenüber dem Literaturwert mit großen Abweichungen ermittelt werden. Die starke Verschiebung zu kleinerer Wellenzahlen ist neben der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung, die die Bindung schwächt.

Durch Anwendung des „Browsers für funktionelle Gruppen“ wurde Paracetamol als Aromatisches Amid mit einem Qualitätswert von 83%. Die intensitätsschwache Bande der Valenzschwingungen ν C=O des Aromatisches Amid mit einem Wellenzahlbereich von 1670-1610 ermittelt. Die Abweichungen zu dem Literaturwert (1680-1620) sind vernachlässigbar klein.

6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit Hilfe des Programmes „RAMalyse“ wurde die Spektren-Interpretation anhand drei verschiedener Analysenmethoden durchgeführt. Hier wurde die Untersuchung des Moleküls ausschließlich auf die Betrachtung charakteristischer Banden funktioneller Gruppen im Molekül durchgeführt. Mit der automatischen Analyse „Spektrum interpretieren“ konnten die gesuchten funktionellen Hauptgruppen mit Treffer-Qualitätswerten von > 85% mit überwiegend zufriedenstellenden Ergebnissen ermittelt werden. Es konnten neben der automatischen Analyse zusätzliche funktionelle Gruppen im Molekül mit Hilfe der manuellen Untersuchung des Spektrums durch Anwendung des „Regels-Designers“ oder „Browser für funktionelle Gruppen“ ebenfalls mit guten Ergebnissen repräsentiert werden.

Die abweichenden Ergebnisse des Programmes RAMalyse gegenüber den Literaturangaben belaufen sich auf Verschiebungen zu größeren und kleineren Wellenzahlen. Die Wellenzahlverschiebungen resultieren aus Schwingungskopplungseffekten zwischen verschiedenen oder gleichartigen Schwingungen mit ähnlichen oder gleichen Wellenzahlbereichen, die aufgrund deren Überlagerung zu Verschiebungen der Gruppenfrequenzen führten. Des Weiteren wurde gezeigt, dass zwischenmolekulare Effekte

wie die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung der N-H-Schwingung die Bindung schwächt und diesen Bereich zu kleineren Wellenzahlen verschieben.

7. Zusammenfassung

Einer der ersten Schritte bei der Herstellung von pharmazeutischen Produkten ist die Identifizierung und Prüfung von verschiedenen eingehenden Rohstoffen. Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde Raman-Spektroskopie als Identitätsprüfung von Rohstoffen in der Pharmaindustrie untersucht. Den Ausgangspunkt der Untersuchung bildete die Analyse der spektralen Raman-Aktivität verschiedener Rohstoffe mit dem Raman-Spektrometer „TruScan RM-Analysator“. Dabei erweitern Raman-Spektrometer, die Einsatzmöglichkeiten infolge ihrer Fähigkeit durch Verpackungsmaterialien, wie Glas und durchscheinende Kunststoffe messen zu können und basieren auf dem spektralen Vergleich von Probe- und Referenzspektrum. Dabei werden Referenzspektrendatenbanken für die einzelnen ramanaktiven Rohstoffe erstellt. Nach Validierung und abschließendem Selektivitätstest der Datenbanken wird über deren Eignung zur Identifizierung von Rohstoffen entschieden. Zur Methodenentwicklung war lediglich eine Probe jedes Stoffes erforderlich. Die hohe Spezifität dieser Technologie für viele verschiedene Stoffgruppen, die einfache Methodenentwicklung und Methodvalidierung ermöglichen eine Verbesserung der Rohstoffqualifizierung bei gleichzeitiger Kostenreduzierung. Die Untersuchungen zeigen, dass sich mit den Rohstoffen geeignete Ramanspektren als Referenz bei Identitätsprüfungen erzeugen lassen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden ausgewählte ramanaktive Rohstoffe zur genaueren Strukturaufklärung herangezogen. Dabei werden mit Hilfe des Spektreninterpretationsprogrammes „RAMALyse“ charakteristische Bandenlagen der ramanaktiven Schwingungen interpretiert. Die Unterschiede zu Literaturangaben, deren Ursache auf Wellenzahlverschiebungen durch Schwingungskopplung und zwischenmolekularer Effekte basiert, werden charakterisiert.

Die Raman-Spektroskopie beruht auf der Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie, die sich in Rayleigh-, Stokes- und anti-Stokes-Streuungen zeigt.

Ihr Ziel ist die Bestimmung der Schwingungsfrequenzen von Molekülen, wobei sich in vielen Fällen Raman- und IR- Spektroskopie ergänzen und ein Gesamtbild zur Strukturaufklärung erzeugen. Die grundsätzliche Aufgabe von Raman-Spektroskopie besteht in der Interpretation der ermittelten Frequenzen, die Rückschlüsse auf die Molekülstruktur bieten.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Christ G A, H. S. (1998). *GLP : Gute Laborpraxis ; Handbuch fuer Praktiker*. Darmstadt: GIT-Verl.. 2. Aufl.
- [2] Rehbinder E, K. D. (1985). *Chemikaliengesetz : Kommentar und Rechtsvorschriften zum Chemikalienrecht*. Heidelberg: Mueller
- [3] BANWELL und MCCASH 1999, COLTHUP et al. 1990, GÜNZLER und GREMLICH 2003, KERESZTURY 2002, LONG 2002, SCHRADER 1995, EUAB 2002
- [4] Manfred Hesse, Herbert Meier, Bernd Zeeh, *Spektroskopie Methode in der organische Chemie*. 7.überarbeitete Auflage
- [5] Douglas A. Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch *Instrumentell Analytik* 6. Auflage
- [6] Claus Czeslik, Heiko Seemann, Roland Winter. *Basiswissen Physikalische Chemie* 4.Auflage
- [7] J. R. Ferraro und K. Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press, 2012
- [8] Peter W. Aktins, Julio de Paula. *Physikalische Chemie* fünfte Auflage
- [9] ANALYTICON INSTRUMENTS GMBH. *Benutzerhandbuch Truscan RM Analysator*. Rosbach 2016
- [10] Donges, A. N. (1993). *Lasermesstechnik*. Band4. Heidelberg : Hüthig Buch Verlag GmbH, 1993
- [11] TRADOWSKY, K.:*Laser*.4. Auflage. Würzburg:Vogel Verlag, 1968
- [12] <http://www.lps-laser.de/lexikon/divergenz7.htm>
- [13] <http://www.delamar.de/faq/faq-filter-typen-filter-typ-und-was-er-macht-9486/>
- [14] Lab Cognition. *Benutzerhandbuch RAMalyse*, Köln 2016

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Schwingungs- und Rotationsniveaus eines Moleküls	8
Abb. 2: harmonischer Oszillator	10
Abb. 3: anharmonischer Oszillator	11
Abb. 4: ungedämpfter Federschwinger	11
Abb. 5: Energiefunktion des ungedämpften Federschwingers	12
Abb. 6: harmonischer Oszillator	13
Abb. 7: anharmonischer Oszillator	14
Abb. 8: harmonischer Oszillator	14
Abb. 9: Valenz- und Deformations-Schwingungen des Kohlendioxids	16
Abb. 10: Verschiedene lokalisierte Schwingungen der Methyl-Gruppe (+ steht für Schwingungen vor, - für Schwingungen hinter der Papierebene)	17
Abb. 11: Raman Spectroscopy edited by B. Schrader (1995); S. 19, Abb. 2.4.-1a	18
Abb. 12: Energieschema der Rayleigh- und Raman-Streuung; ΔEM Energieänderung eines Moleküls [MCCREERY 2000, modifiziert].	19
Abb. 13: Energieniveaudiagramms eines zweiatomigen Moleküls mit den Übergängen der Rayleighstreuung (gepunktete Pfeile) und der Ramanstreuung (gestrichelte Pfeile)	20
Abb. 14: gestrecktes dreiatomiges Molekül	24
Abb. 15: gestauchtes dreiatomiges Molekül	24
Abb. 16: antisymmetrische Valenzschwingung	24
Abb. 17: antisymmetrische Valenzschwingung	25
Abb. 18: Beispiel zur Schwingungskopplung	27
Abb. 19: Abhängigkeit der Lage der Schwingungsbanden von der Kraftkonstante	28
Abb. 20: Beispiel für die Auswirkungen elektronischer Effekte auf Schwingungsspektren	28
Abb. 21: Beispiel für die Auswirkungen elektronischer Effekte auf Schwingungsspektren	28
Abb. 22: Termschema der Fluoreszenz	29
Abb. 23: Aufbau des TruScan RM-Spektrometers [9]	30
Abb. 24: Ergebnis „Spektrum interpretieren von Ascorbinsäure“	34
Abb. 25: Ergebnis von Ascorbinsäure mit Hilfe des „Regels-Designers“	34
Abb. 26: Ergebnis „Browser für funktionelle Gruppen“ von Ascorbinsäure	36
Abb. 27: Installation des Röhrchenhalters	40
Abb. 28: Einsetzen des Standards	40
Abb. 29: Installation des Sondenkopfes	40
Abb. 30: Messung durch Einsatz des Sondenkopfes	41
Abb. 31: Messung durch direkten Kontakt zwischen Gerätekopf und Behälter	41
Abb. 32: Aktivierung der Signature von Ascorbinsäure im WebAdmin	42
Abb. 33: Erstellung der Methode von Ascorbinsäure mit Hilfe des „WebAdmin“	43
Abb. 34: Ergebnisse der Positivvalidierung von Ascorbinsäure mit einem „Pass“	44
Abb. 35: Ergebnisse der Negativvalidierung von Ascorbinsäure mit einem „Fail“	44
Abb. 36: Selektivitätstest von Ascorbinsäure	46
Abb. 37: Bildschirm „erfolgreicher Durchlauf“	46
Abb. 38: Bildschirm „fehlgeschlagener Durchlauf“	46
Abb. 39: Ergebnis „Spektrum interpretieren von Clotrimazol“	48
Abb. 40: Ergebnis von Clotrimazol mit Hilfe des „Regels-Designers“	49

Abb. 41: Ergebnis „Browser für funktionelle Gruppen“ von Clotrimazol.....	49
Abb. 42: Beispielspektrum von Ascorbinsäure als Ramanaktive Substanz	51
Abb. 43: Identitätsprüfung von Acetylsalicylsäure mit Hilfe von Referenzspektren.....	54
Abb. 44: Identitätsprüfung von Anhydratcitronensäure mit Hilfe von Referenzspektren.....	55
Abb. 45: Identitätsprüfung von Azithromycin mit Hilfe von Referenzspektren	55
Abb. 46: Identitätsprüfung von Biotin mit Hilfe von Referenzspektren.....	56
Abb. 47: Identitätsprüfung von Captopril mit Hilfe von Referenzspektren	56
Abb. 48: Identitätsprüfung von Carvedilol mit Hilfe von Referenzspektren	57
Abb. 49: Identitätsprüfung von Celiprolol mit Hilfe von Referenzspektren.....	57
Abb. 50: Identitätsprüfung von Calcium-D-Pantothenat mit Hilfe von Referenzspektren	58
Abb. 51: Identitätsprüfung von Chininsulfat mit Hilfe von Referenzspektren	58
Abb. 52: Identitätsprüfung von Chlorprothixenhydrochlorid mit Hilfe von Referenzspektren	59
Abb. 53: Identitätsprüfung von Clotrimazol mit Hilfe von Referenzspektren.....	59
Abb. 54: Identitätsprüfung von Dapson mit Hilfe von Referenzspektren	60
Abb. 55: Identitätsprüfung von Diazepam mit Hilfe von Referenzspektren	60
Abb. 56: Identitätsprüfung von Doxycyclin Hyclat mit Hilfe von Referenzspektren	61
Abb. 57: Identitätsprüfung von Eisen-2-Sulfat mit Hilfe von Referenzspektren	61
Abb. 58: Identitätsprüfung von Ethacrindinlactat 1 H ₂ O mit Hilfe von Referenzspektren.....	62
Abb. 59: Identitätsprüfung von Lincomycin HCL mit Hilfe von Referenzspektren	62
Abb. 60: Identitätsprüfung von Minocyclin HCL mit Hilfe von Referenzspektren	63
Abb. 61: Identitätsprüfung von Oxytetracyclin HCL mit Hilfe von Referenzspektren.....	63
Abb. 62: Identitätsprüfung von SpectinomycinHCL mit Hilfe von Referenzspektren	64
Abb. 63: Identitätsprüfung von Vitamin B12 mit Hilfe von Referenzspektren	64
Abb. 64: Ausschnitt des Probespektrums von Benzocain	66
Abb. 65: Ausschnitt des Probespektrums von Carbamazepin.....	68
Abb. 66: Ausschnitt des Probespektrums von Lithiumcarbonat	70
Abb. 67: Ausschnitt des Probespektrums von Natriumascorbat	71
Abb. 68: Ausschnitt des Probespektrums von Paracetamol	72