

Applikation

► Inhaltsstoffe von Hustensaft

Kategorie	Pharmazie
Matrix	Hustensaft
Methode	HPLC
Schlagworte	Hustensaft, Guaifenesin, Kodein, Pseudoephedrin
Analyten	Guaifenesin, Kodein, Pseudoephedrin
ID	VPH1, publiziert 12/07, erneuert 09/09



Zusammenfassung

Es wird eine schnelle und stabile HPLC-Methode für die gleichzeitige Bestimmung von Inhaltsstoffen in Hustensaft vorgestellt. Die Trennung von Kodein, Pseudoephedrin und Guaifenesin mit Hilfe der Umkehrphasen-HPLC erwies sich hierbei als optimal.

Einleitung

Ein Unternehmen der pharmazeutischen Industrie erteilte den Auftrag, eine qualifizierte Methode für die isokratische Bestimmung von Kodein, Pseudoephedrin und Guaifenesin in Hustensaft zu entwickeln. Es sollte eine definierte Trennung aller Inhaltsstoffe erzielt werden, um die Methode in der Qualitätskontrolle anwenden zu können. Die zusätzliche Trennung eines Additivs, dessen Identität nur dem Hersteller bekannt ist und nicht bestimmt werden sollte, beeinflusst die Wahl der stationären Phase maßgeblich. Die genannten Inhaltsstoffe spielen unterschiedliche Rollen in der therapeutischen Behandlung von Bronchialerkrankungen. Guaifenesin hat eine schleimlösende Funktion und unterdrückt gleichzeitig trockenen Husten. Kodein ist ein Monomethylether des Morphins und findet sich im Opium. Es ist als Betäubungsmittel klassifiziert und wirkt nicht nur unterdrückend auf Husten sondern wirkt auch grundsätzlich schmerzlindernd. Normalerweise wird Kodein in Kombination mit anderen Arzneimitteln eingesetzt. Pseudoephedrin hilft bei Allergien und hat eine abschwellende Wirkung auf die Schleimhäute. Wilcox and Stewart [1] beschreiben eine Methode zur Bestimmung von Guaifenesin. Für die Trennung von Guaifenesin und Kodein verwenden sie ein nicht derivatisiertes Kieselerde-Gel und setzen Phosphatpuffer und Acetonitril ein. Doch diese Methode hat das Problem, dass Pseudoephedrin nicht ausreichend von Kodein getrennt werden kann. An anderer Stelle in der Literatur [2] wird die Trennung von Guaifenesin und Pseudoephedrin mit Hilfe von Überkritischer Flüssigkeitschromatografie beschrieben. Für die isokratische Trennung von Acetaminophen, Pseudoephedrin, Guaifenesin und Dextromethorphan werden eine Phenylphase und eine ternären mobile Phase vorgeschlagen. Das erscheint im Vergleich mit der isokratischen HPLC-Methode komplexer und wir schauen daher in den Pharmaführer für Analyten. Dort wird eine Umkehrphasentrennung für Guaifenesin vorgeschlagen [3]. Basierend auf der Molekularstruktur (Abb. 1) sollten verschiedene Umkehrphasen C18-Kieselerde-Gele für die Trennung der benannten Verbindungen geeignet sein. Wegen der vierten Verbindung im Hustensaft, die nach Namen und Struktur unbekannt ist, wurden für die Methodenentwicklung C18-Umkehrphasenmaterialien mit unterschiedlichen Selektivitäten gewählt. Um symmetrische Peaks für alle Verbindungen zu erhalten, wurde der pH-Wert auf 1,85 eingestellt. Es wurden drei verschiedene, Basen deaktivierte C18-Phasen mit unterschiedlichen C18-Dichten und -Polaritäten ausgewählt, die die nötige pH-Stabilität erfüllen. Die folgenden stationären Phasen wurden verwendet: ProntoSIL 120-5 C18 ace-EPs, Eurospher 100-5 C18 und ProntoSIL 120-5 C18 SH.

Experiment Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung ist sehr einfach und besteht aus nur einem Verdünnungsschritt. Für die Analyse des Hustensaftes wurde die Originalprobe auf 1:25 mit dem HPLC-Eluenten verdünnt. Es ist zu empfehlen, die Probe mit einer 0,45 µm Spritzenfiltereinheit zu filtrieren.

Experiment Vorbereitung der Standardlösungen

Für die drei Standards wurde eine Kalibrierkurve im Bereich 50 bis 1000 mg/l mit Hilfe einer Fünfpunktkalibrierung und folgender Regressionsgeraden erstellt:

Kodein $y=0,020 x+0,059 \quad R^2=0,997$

Pseudoephedrin $y=0,010 x+0,143 \quad R^2=0,999$

Guaifenesin $y=0,011 x +0,195 \quad R^2=0,999$

Chemische Strukturen

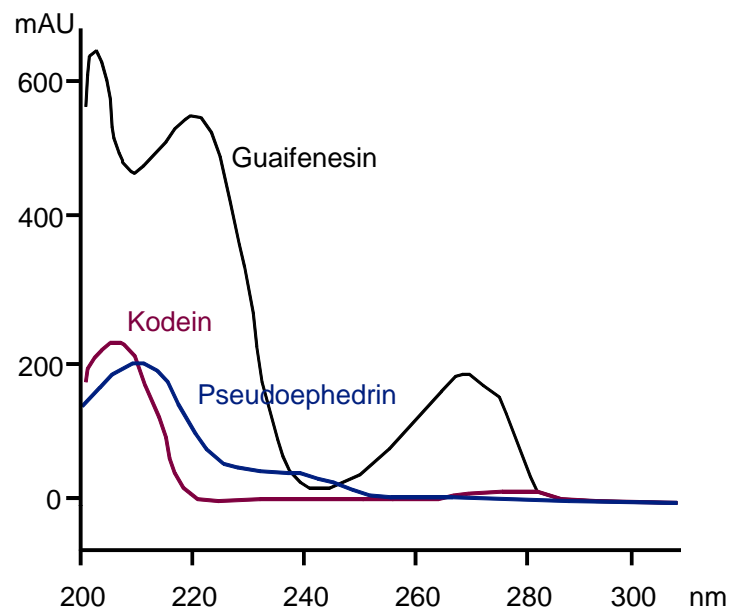
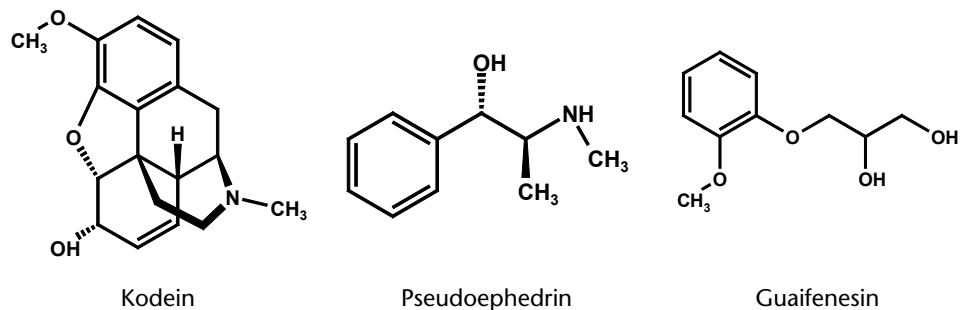


Fig. 1
Wellenlängenspektrum von
Kodein, Pseudoephedrin, und
Guaifenesin

Methodenparameter

Säule	ProntoSIL 120-5 C18 ace-EPS 250 x 4 mm EuroSpher 100-5 C18 250 x 4 mm ProntoSIL 120-5 C18 SH 250 x 4 mm
Eluent	H ₂ O:MeOH (70:30, v/v) mit 0,1 % TFA (pH 1,85)
Flussrate	0,8 ml/min
Injektionsvolumen	5 µl
Ofentemperatur	40 °C
Detektion	UV
	Kodein / Pseudoephedrin λ_{max} 210 nm Guaifenesin λ_{max} 220 nm

Ergebnisse

Mit allen verwendeten stationären Phasen konnte eine adäquate Trennung der Standardmischung erreicht werden. Die Reihenfolge der Trennung der untersuchten Verbindungen zeigt für die aufgeführten stationären Phasen keinen Unterschied. Lediglich die Selektivität der polar modifizierten Phase liefert einen niedrigeren α -Wert für die Trennung von Kodein und Pseudoephedrin. Die Analyse der Proben zeigt, dass nur mit der ProntoSIL C18 SH-Säule eine gute Trennung von Additiven und den anderen Inhaltsstoffen möglich ist (Abb. 2, blaue Kurve). So können die analysierten Verbindungen in Gegenwart von unbekanntem Inhaltsstoffen zuverlässig quantitativ erfasst werden.

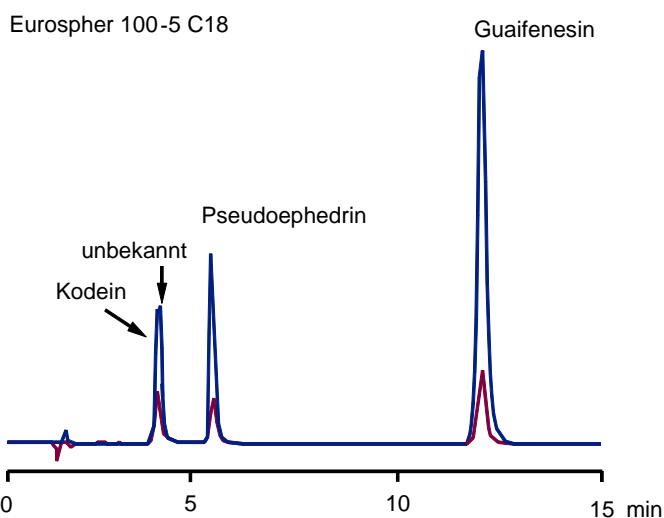


Abb. 1

Überlagerung der Standardprobe (rot) und der verdünnten Probe (blau) auf der EuroSpher 100-5 C18-Phase

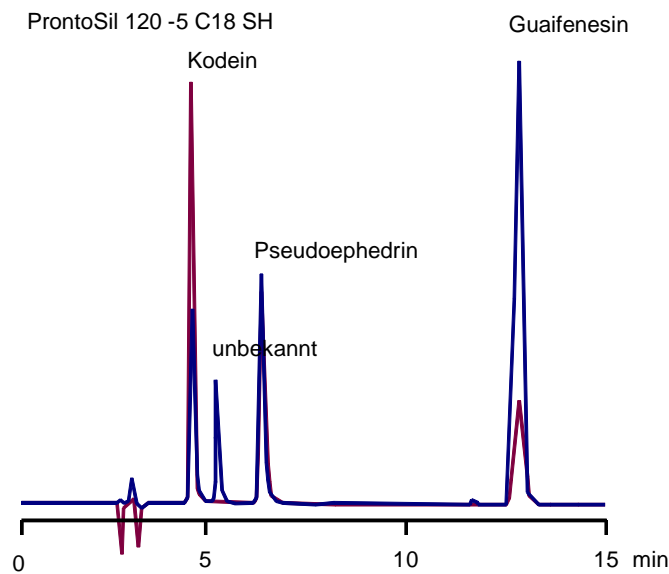


Abb. 2

Überlagerung der Standardprobe (rot) und der verdünnten Probe (blau) auf der ProntoSIL 120-5 C18 SH-Phase

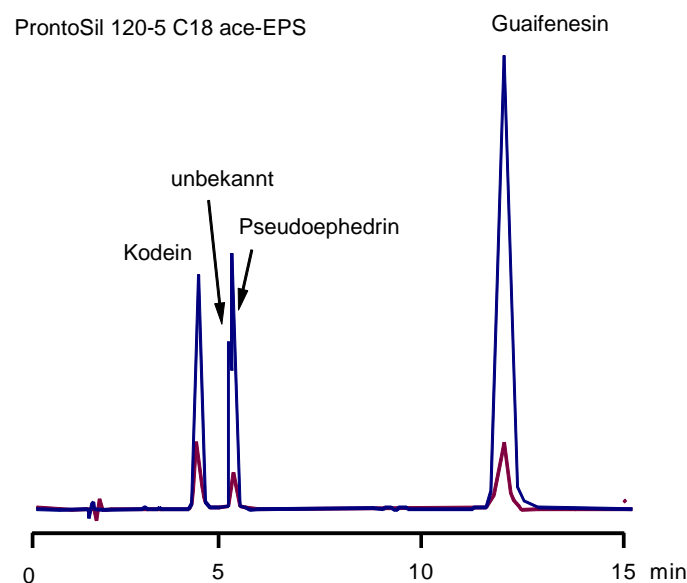


Abb. 3

Überlagerung der Standardprobe (rot) und der verdünnten Probe (blau) auf der ProntoSIL 120-5 C18 ace-EPS-Phase

Tabelle 1

Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Inhaltsstoffe von Hustensaft

Verbindung	Konzentration [g/l]	Konzentration in 5 ml [mg]	Herstellerangaben [mg/5 ml]
Kodein	2,048	10,24	10
Pseudoephedrin	6,095	30,48	30
Guaifenesin	20,65	103,28	100

Methoden Leistungsdaten

Linearität (r^2)	0,997-0,999
Linearitätsbereich	50 to 1000 mg
Genauigkeit der Retentionszeit	< 1 % RSD
Genauigkeit der Peakflächen	< 3 % RSD

Schlussfolgerung

Die stationäre Phase mit der höchsten Kohlenstoffbeladung und einer höheren sterischen Selektivität liefert die besten Trennergebnisse einschließlich einer definierten Abtrennung der Additive von den benannten Inhaltsstoffen. Sowohl die polar modifizierte C18-Phase

mit integrierten polaren Gruppen als auch die Standard-C18-Phase konnte keine vollständige Trennung von Additiven, Kodein und Pseudoephedrin bewirken. Dies ist ein ausgezeichnetes Beispiel für die Bedeutung, bei der HPLC-Methodenentwicklung reale Proben mit Nebenprodukten zu betrachten.

Literatur

- [1] M.L. Wilcox, J.T. Stewart, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000 Vol. 23, Nr. 5, S. 909-916
- [2] K.M. Patil, I. Choir, B. Raman, M. Sundaresan, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001 Vol. 63, Nr. 6, S. 468-472
- [3] G. Lunn, N.R. Schmuff, HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis, John Wiley & Sons 1997

Autor

Physikalische Eigenschaften der empfohlenen Säulen



Silvia Marten, Leiterin der Abteilung Säulen, Phasen und Applikationen, KNAUER

ProntoSIL C18 ace-EPS gehört zu der neuen Gruppe der stationären Umkehrphasenmaterialien mit polaren, eingebetteten Gruppen. Die Packung ist über einen weiten pH-Bereich (pH 1 – 10) sehr stabil. Im Vergleich zum Verhalten auf einer klassischen, gebundenen C18-Säule, zeigen saure Verbindungen größere Retentionszeiten, während basische Verbindungen geringfügig kürzere Retentionszeiten auf der Säule mit polaren, eingebetteten Gruppen zeigen.

Stationäre Phase	ProntoSIL 120-5 C18 ace-EPS
USP-Kode	L1
Porengröße	120 Å
Partikelgröße	5 µm
Form	sphärisch
Spezifische Oberfläche	300 m ² /g
% C	18.5
Endcapping	ja
Abmessungen	250 x 4 mm
Bestellnummer	25DF18APSJ

Eurospher C18 ist ein von KNAUER entwickeltes Premium-Kieselerde basiertes HPLC-Packungsmaterial. Es kann universell in verschiedenen Applikationen sowohl im analytischen als auch im präparativen Bereich eingesetzt werden.

Stationäre Phase	Eurospher 100-5 C18
USP-Kode	L1
Porengröße	100 Å
Partikelgröße	5 µm
Form	Sphärisch
Spezifische Oberfläche	350 m ² /g
% C	15
Endcapping	Ja
Abmessungen	250 x 4 mm
Bestellnummer	25DE181ESJ

ProntoSIL C18 SH ist die stationäre Phase der ProntoSIL-Produktlinie mit der höchsten Kohlenstoffbeladung. Es ist vollständig endcapped. Aufgrund der Kohlenstoffbeladung zeigt es eine ausgezeichnete Form, Selektivität und Stabilität sogar bei pH 1.

Stationäre Phase	ProntoSIL 120-5 C18 SH
USP-Kode	L1
Porengröße	120 Å
Partikelgröße	5 µm
Form	Sphärisch
Spezifische Oberfläche	300 m ² /g
% C	17
Endcapping	Ja
Abmessungen	250 x 4 mm
Bestellnummer	25DF180PSJ

Systemempfehlungen



Für diese Applikation wird das isokratische Smartline HPLC-System bestehend aus Degasser, Autosampler, Säulenofen, Mehrwellenlängen-UV-Detektor benötigt.

Beschreibung	Bestellnummer
Smartline Pumpe 1000, inkl. 10 ml Pumpenkopf	A50303
Smartline Manager 5000 mit Degasser	A5316
Autosampler 3950	A5005-1
Smartline Säulenofen 4050	A5300
Smartline UV Detektor 2600 PDA	A5200
10 mm Messzelle	A4061
ChromGate Software	A1493
ChromGate PDA Lizenz für Detektor 2600	A1459

Kontakt

Wissenschaftliche Gerätebau
Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH
Hegauer Weg 38
14163 Berlin, Germany

Tel: +49 (0)30 / 809727-0
Fax: +49 (0)30 / 8015010
Email: info@knauer.net
Internet: www.knauer.net