Application Note

► Quantifizierung von Koffein mittels HPLC auf dem KNAUER Ausbildungssystem

Kategorie	Pharmazeutische Analytik
Matrix	Tabletten
Methode	HPLC
Schlüsselwörter	HPLC-Ausbildungssystem, HPLC-Einführung, Qualitätskontrolle, Kalibrierung, Quantifizierung, Interner Standard
Analyten	Koffein, Paracetamol, Theophyllin (IS)
ID	VSP0009N_A_D

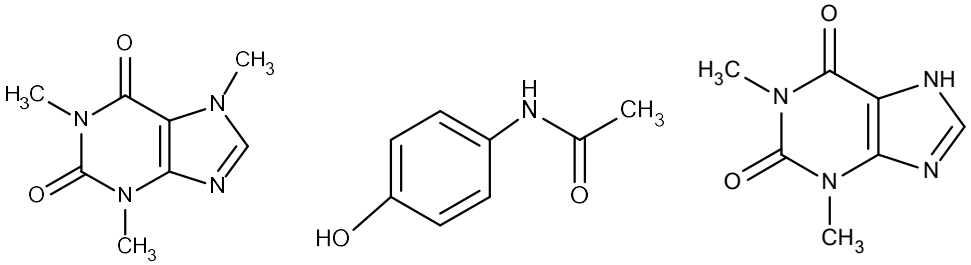
Zusammenfassung

Das KNAUER Ausbildungssystem ermöglicht eine leichte und schnelle Durchführung der Flüssigkeitschromatografie (HPLC, high pressure liquid chromatography) und fördert ein tieferes Verständnis dieser Trennmethode. Sie wird anhand eines einfachen Beispiels zur quantitativen Bestimmung der Zusammensetzung einer Probe aus Koffein und Paracetamol dargestellt. Dabei wird detailliert und anschaulich beschrieben, wie nach der qualitativen Bestimmung der Probenzusammensetzung und Zuordnung der auftretenden Peaks Koffein quantifiziert, eine Kalibrierung durchgeführt und darüber hinaus der interne Standard Theophyllin verwendet wird.

Einleitung

Koffein und Paracetamol sind häufig gemeinsame Bestandteile in pharmazeutischen Präparaten. Daher werden beide Substanzen oft gleichzeitig in einer Probe bestimmt. Kommt ein interner Standard wie z.B. Theophyllin zum Einsatz, muss dieser ebenfalls simultan bestimmt werden können.
Zur Analyse wird das KNAUER Ausbildungssystem verwendet, das isokratische HPLC-Läufe in Kombination mit UV-Detektion ermöglicht. Proben werden mittels Handinjektionsventil in das System injiziert. Damit stellt dieses System eine einfache, kompakte HPLC-Lösung auf Basis der KNAUER AZURA Compact Serie dar.
Neben der Koffein-Paracetamol-Analyse ist das KNAUER Ausbildungssystem für viele weitere Applikationen einsetzbar. Anleitungen zur Durchführung von Messungen, zur qualitativen und quantitativen Chromatogramm-Auswertung und die Bedienung der Software sind in kurzen Video-Tutorials verfügbar, die mit dem System ausgeliefert werden.

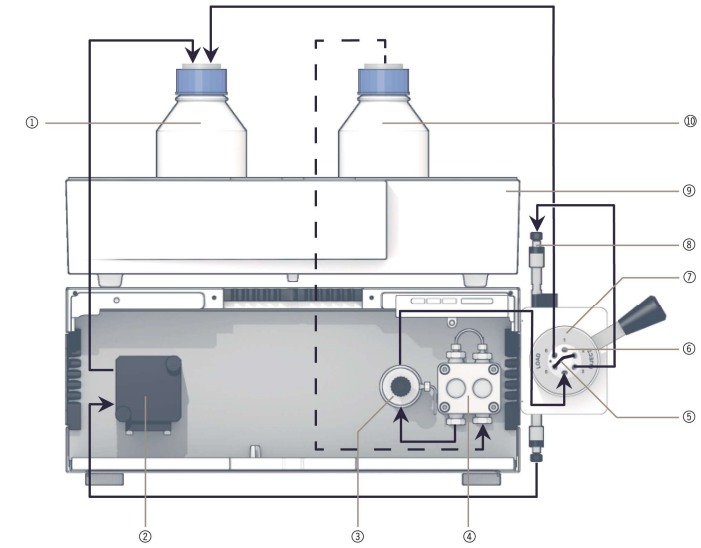
Abb. 1
Chemische Strukturen der untersuchten Substanzen



Koffein Paracetamol Theophyllin

Prinzip der HPLC

Chromatografische Verfahren dienen grundsätzlich der Trennung von Stoffen, um diese anschließend identifizieren und quantifizieren zu können. Die HPLC stellt dabei eine sehr leistungsfähige Methode dar, die sich u.a. in der pharmazeutischen Analytik etabliert hat. Das Prinzip beruht auf dem Fluss der mobilen Phase (Eluent) durch eine gepackte Trennsäule (stationäre Phase, Sorbens). Die zu analysierende Probe wird im Eluenten mitgeführt und zwischen Sorbens und Analyt treten verschiedene zwischenmolekulare Wechselwirkungen auf. Innerhalb der Säule wechseln die Analyt-Moleküle auf Ihrem Weg durch die Säule mehrfach zwischen mobiler und stationärer Phase, so dass sich ständig ein neues Gleichgewicht einstellt. Die Verweilzeit der gelösten Moleküle ist dabei abhängig von strukturellen Unterschieden und anderen Eigenschaften wie der Hydrophobizität. Aus diesem Grund werden die einzelnen Bestandteile einer Probe zu unterschiedlichen Zeiten eluiert und können räumlich und zeitlich voneinander getrennt werden.
Abb. 2 zeigt den schematischen Aufbau des AZURA Compact HPLC Ausbildungssystems. Sie besteht im Wesentlichen aus einem Lösungsmittelreservoir, einer Pumpe, einem Injektionsventil, einer Trennsäule, die optional von einem Säulenthermostaten umgeben ist, einem Detektor (hier UV-Detektor) und einer Auswerteeinheit.



-- Silikonschlauch
— Edelstahl-Kapillare

① Abfallflasche
② UV-Detektor
③ Drucksensor
④ Pumpe
⑤ Probenschleife
⑥ Injektions-Port
⑦ Injektionsventil
⑧ Säule
⑨ Flaschenwanne
⑩ Flasche mit mobiler Phase

Abb. 2

Schematischer Aufbau des AZURA Compact HPLC Ausbildungssystems

Zu Beginn der Trennung wird ein Eluent mit hohem Pumpendruck und konstanter Geschwindigkeit durch die HPLC-Anlage gefördert und transportiert dabei gleichzeitig einen/mehrere Analyten über die Trennsäule hin zum Detektor. Um die Drift und das Rauschen des Detektorsignals so gering wie möglich zu halten, ist eine konstante und pulsationsfreie Strömung des Eluenten wichtig.
Bei dem Einsatz der mobilen Phase werden zwei Möglichkeiten unterschieden: isokratische Elution und Gradientenelution. Von einer isokratischen Elution wird gesprochen, wenn die Zusammensetzung des Eluenten über die gesamte Messung konstant bleibt. Das ist in der hier beschriebenen Anwendung der Fall.
Im Gegensatz dazu werden bei einer Gradientenelution die Unterschiede der Elutionskraft der Lösungsmittel ausgenutzt. Dazu wird die Zusammensetzung des Eluenten über den Analysenzeitraum geändert[2,3] und zwischen einem Hoch- und Niederdruck-Gradienten unterschieden. Erfolgt das Mischen der Lösungsmittel vor der Pumpe drucklos, handelt es sich um einen Niederdruck-Gradienten. Erfolgt das Mischen der Lösungsmittel nach der Pumpe unter Hochdruck, wird er als Hochdruck-Gradient bezeichnet.[2]

Die chromatografische Auftrennung erfolgt im eigentlichen Herzstück eines jeden HPLC-Systems, der Trennsäule. Dabei ist die Trennleistung abhängig vom Innendurchmesser und der Länge der Säule sowie von der Art und Teilchengröße des Säulenfüllmaterials. Je nach Anwendungsgebiet werden unzählige HPLC-Säulen kommerziell angeboten und je nach Trennmechanismus in Säulen für die Umkehrphasen-, Ausschluss-, Ionen-, Affinitäts-, Chirale-, Normalphasen- und Hydrophile Interaktionschromatografie unterteilt.

Chromatografische Kenngrößen

Die Aufgabe des Detektors besteht in der Registrierung des Zeitpunktes, zu dem ein Substanz-Peak von der Säule eluiert wird. Der Detektor nimmt die Änderung der Zusammensetzung des Eluats wahr und wandelt diese Information in ein elektrisches Signal um, das mittels Computer ausgewertet werden kann.[2] In der HPLC werden in Abhängigkeit der strukturellen Eigenschaften der Analyten, eine Vielzahl unterschiedlicher Detektoren eingesetzt. Gebräuchliche Detektoren sind Refraktometrische-, UV-, Elektroanalytische- und Fluoreszenz-Detektoren.

Im Idealfall werden die Analyten, die durch den Eluenten über die Trennsäule zum Detektor transportiert werden, als Gauß-Glockenkurve registriert. Die Gesamtheit aller Peaks wird als Chromatogramm bezeichnet. Jeder einzelne Peak lässt qualitative und quantitative Aussagen bezüglich des Analyten zu, wobei die Fläche sowie die Höhe eines Peaks proportional zur Konzentration sind. Ausgewählte chromatografische Kenngrößen sind in Abb. 3 schematisch dargestellt und werden nachstehend erläutert.[4]

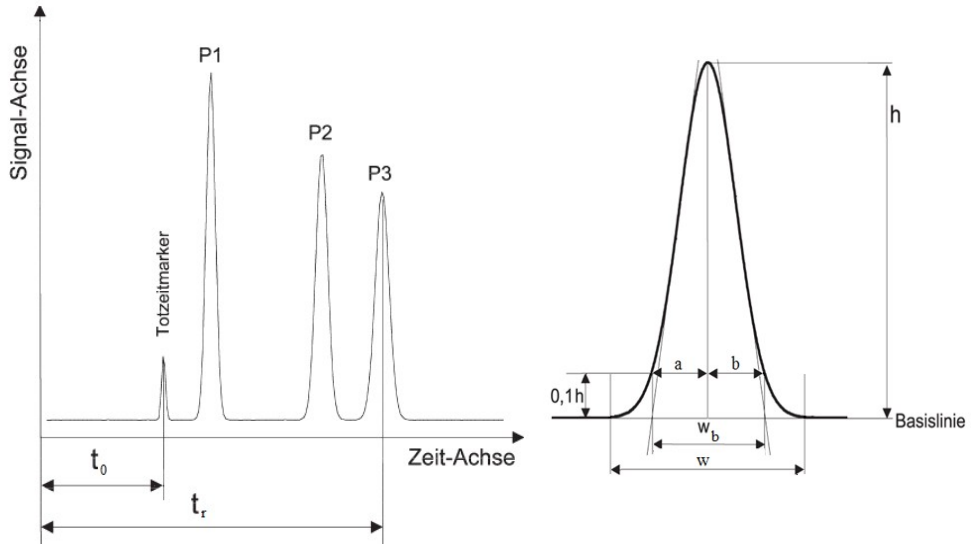


Abb. 3

Schematische Auswertung eines Chromatogramms[4]

Totzeit t_0

Die Zeit der Elution eines Analyten (Totzeitmarker), der keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingeht, wird als Totzeit t_0 bezeichnet. Während dieser Zeit halten sich alle Probenteilchen ausschließlich in der mobilen Phase auf.

Retentionszeit t_r

Die Retentionszeit t_r ist eine stoffspezifische Größe und sollte unter gleichen Bedingungen immer die gleichen Werte liefern. Sie setzt sich aus den Zeiten, in denen sich der Analyt in der mobilen und stationären Phase befindet, zusammen.

Peaksymmetrie bzw. *Tailing*-Faktor *T*

Der Symmetriefaktor eines Peaks besagt, wie gut die Form dem Idealverlauf (Gauß-Kurve) angenähert ist. Die Peaksymmetrie wird in 10% der Peakhöhe *h* gemessen, wobei *a* der Peakbreite der aufsteigenden und *b* der absteigenden Peakseite entspricht.
Somit ergibt sich ein *Tailing*-Faktor *T*:

$$T = \frac{b}{a}$$

Bei $T = 1$ liegt ein symmetrischer Peak vor. Bei Werten von $T > 1$ wird von einem *Tailing* und $T < 1$ von einem *Fronting* gesprochen.

Peakbreite *w*

Die Peakbreite *w* umfasst den Zeitraum von Beginn der Signalsteigung bis zum wiederholten Erreichen der Basislinie nach Abfall des Detektorsignals.

Mehrpunkt-Kalibrierung mittels internem Standard

Ein interner Standard ist ein Hilfsmittel, das bei quantitativen Analysen zur Erkennung von Abweichungen eingesetzt wird. Er dient als relative Bezugsgröße, die den Einfluss des Verfahrens auf das Ergebnis abbilden soll. Hierfür werden Stoffe verwendet, die dem Analyten möglichst ähnlich sind, in der Analysenprobe jedoch nicht vorkommen.[1] Da in dieser Applikation Koffein quantifiziert werden soll, eignet sich Theophyllin aufgrund seiner Struktur als interner Standard besonders gut (vgl. Abb. 1). Er wird jeder Probe sowie den Kalibrierlösungen in einem möglichst frühen Stadium des Analyseverfahrens in immer derselben definierten Menge zugesetzt.

Hier wird mit der Methode des internen Standards eine Mehrpunkt-Kalibrierung durchgeführt. Die Kalibriergerade kann über die HPLC-Software erstellt werden und setzt für jeden Messwert die Konzentration und die Peakfläche des Analyten mit denen des internen Standards in Bezug. Dadurch werden z.B. Pipettier- oder Injektionsfehler ausgeglichen.

Es wird eine Kalibrierreihe mit Koffeinkonzentrationen im Bereich von 5-80 µg/ml angesetzt und diese nacheinander in das HPLC-System injiziert. Es ist ratsam, jeweils eine Mehrfachbestimmung jeder einzelnen Konzentrationsstufe durchzuführen, z.B. drei Injektionen pro Standard. Aus der Korrelation der Peakflächen und der zugehörigen Koffeinkonzentration wird eine Kalibriergerade erstellt. Mittels der Funktion dieser Geraden kann über die gemessene Peakfläche der Koffeingehalt auch einer unbekannten Probe bestimmt werden.

Vorbereitung der Standards

In einem ersten Schritt werden Koffein, Paracetamol und Theophyllin genau eingewogen und jeweils einzelne Stammlösungen hergestellt. Hierbei sollte die Einwaage der Einzelsubstanzen ca. 100 mg betragen. Gelöst werden die Substanzen in je 10 ml reinem Methanol, wodurch Stammlösungen der Konzentration von ca. 10 mg/ml entstehen. Nach Behandlung im Ultraschallbad sind die Substanzen komplett gelöst und können weiter verdünnt werden. Es ist wichtig, die genaue Einwaage zu notieren, um für die Analyse der Probe möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten.

Zur Identifizierung der Einzelsubstanzen mittels HPLC müssen die Einzelstandards verdünnt werden. Dabei werden den Stammlösungen Wasser zugesetzt (jeweils 1:100), die nun in das HPLC-System injiziert werden können.

Zur Herstellung der Kalibrierlösungen werden je 50 µl der Koffein- und Paracetamol-Stammlösungen gemischt und auf 5 ml mit Wasser verdünnt. Somit hat diese Lösung - bezogen auf jede Einzelsubstanz - eine Konzentration von jeweils ca. 100 µg/ml. Durch die vorherige Einwaage ist die reelle Konzentration genau zu notieren. Nachdem diese Lösung gut durchmischt wurde, kann sie weiter verdünnt werden. Es wird aus dieser Verdünnungsstufe eine Kalibrierreihe im Bereich von 5-80 µg/ml angesetzt, wobei mindestens vier verschiedene Verdünnungsstufen vermessen werden sollten.

Den fertig vorbereiteten Lösungen wird jeweils der interne Standard Theophyllin zugesetzt. Hierzu wird die Theophyllin-Stammlösung 1:10 in Wasser verdünnt, was eine Konzentration von etwa 1 mg/ml ergibt. Von dieser Lösung werden jedem Standard und jeder Probe exakt 20 µl zugesetzt, so dass eine Endkonzentration von ca. 20 µg/ml Theophyllin entsteht.

Tabelle 1

Einwaage und Verdünnung der Stammlösungen

Tabelle 1 und 2 zeigen die Berechnung der endgültigen Endkonzentrationen in den Verdünnungsstufen.

	Einwaage [mg]	Konzentration Stammlösung [mg/ml]	Konzentration Mix [µg/ml]
Koffein	99,3	9,9	99,3
Theophyllin	113,2	11,3	113,2
Paracetamol	107,7	10,8	107,7

Tabelle 2

Verdünnungsstufen der Kalibrierreihe

Koffein Verdünnungsstufe	Soll-Zustand der Koffein-Konzentration [µg/ml]	Ist-Zustand der Koffein-Konzentration (in 1,02 ml) [µg/ml]
1	5	4,9
2	20	19,5
3	40	38,9
4	60	58,4
5	80	77,8

Die Konzentration von Koffein in der endgültigen Verdünnungsstufe wird nach Zugabe des internen Standards berechnet. Es ist demnach darauf zu achten, das endgültige Volumen einzurechnen. In diesem Fall werden jeweils 1 ml Standard hergestellt und anschließend 20 µl Interner Standard hinzu pipettiert, was ein Gesamtvolumen von 1,02 ml ergibt. Alle Konzentrationen sind genau darauf bezogen.

Vorbereitung der Probe

Die reale Probe liegt in fester Form vor (Tablette) und enthält ebenfalls Koffein und Paracetamol. Sie wird genau eingewogen, komplett in 10 ml Methanol gelöst und anschließend ebenfalls 1:100 mit Wasser verdünnt. Der interne Standard Theophyllin wird in gleicher Menge zugesetzt wie in der Kalibrierlösung. Somit werden erneut 20 µg/ml der zuvor hergestellten Theophyllinlösung zu 1 ml Probelösung gegeben. Nachdem die Probelösung gut durchmischt worden ist, kann sie ebenfalls mittels HPLC analysiert werden.

Methoden Parameter

Säule	Eurospher II 100-5 C18, 125 x 4 mm
Eluent	Wasser/Methanol 60:40 (v/v)
Flussrate	0,8 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Systemdruck	ca. 110 bar
Detektion	UV bei 273 nm
Laufzeit	4 min

Ergebnisse

Die Messung der Einzelstandards ergibt eine Basislinientrennung der drei Peaks. Die Substanzen können problemlos getrennt und identifiziert werden. Abb. 4 zeigt die Überlagerung der Chromatogramme von den Messungen der Einzelstandards.

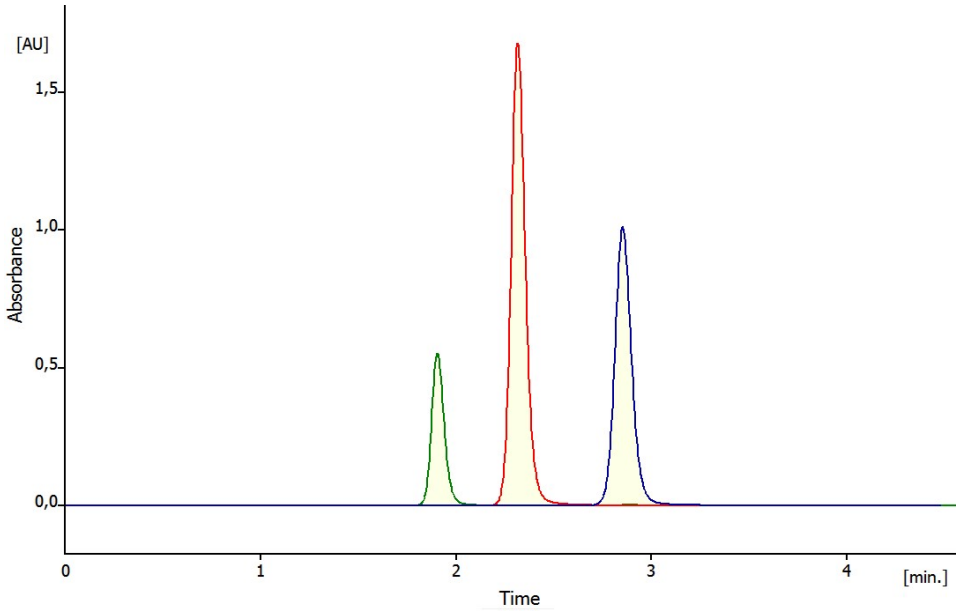


Abb. 4

Chromatogramme der Einzelstandards, grün: Paracetamol, rot: Theophyllin, blau: Koffein

Vor dem Hintergrund der Retentionszeiten der untersuchten Substanzen unter den gegebenen Bedingungen wird anschließend der Mix-Standard analysiert und die Peakzuordnung vorgenommen. Abb. 5 zeigt das Chromatogramm.

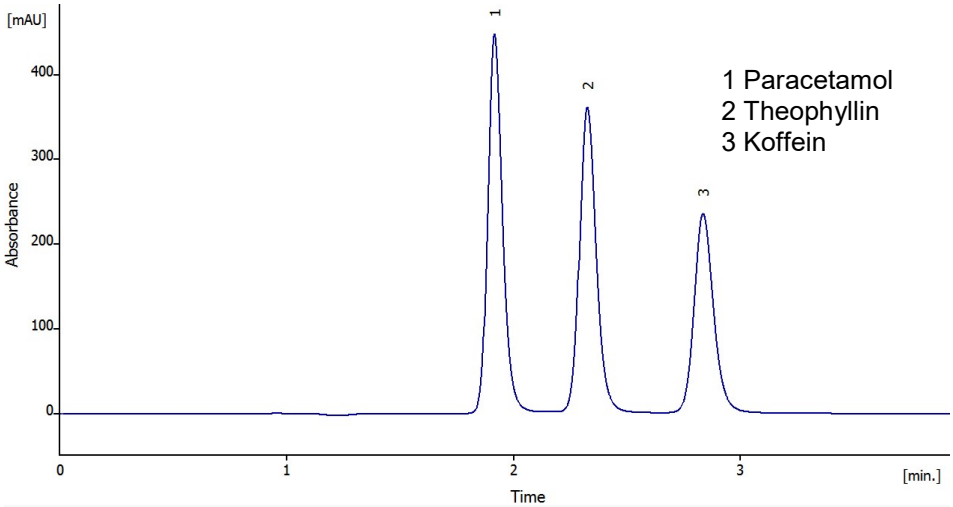


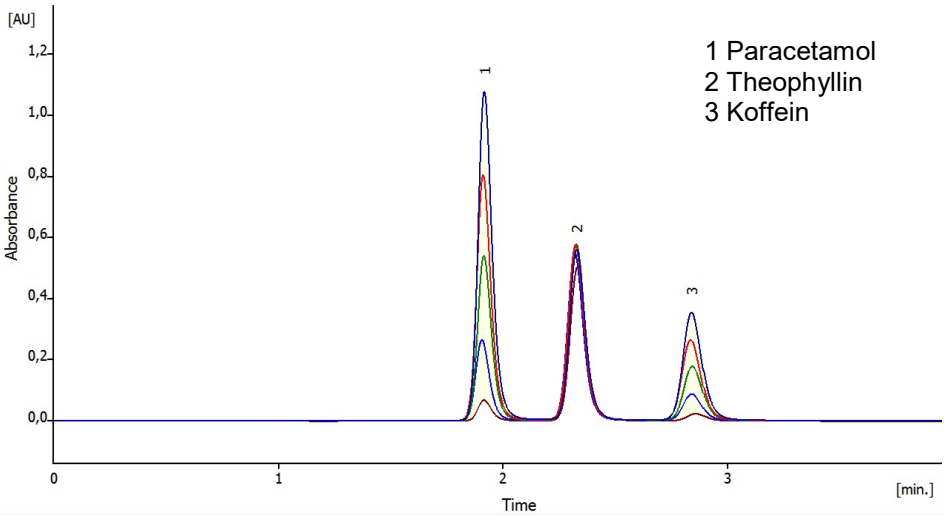
Abb. 5

Chromatogramm des Mix-Standards

Daraufhin wird das System kalibriert. Hierzu werden alle hergestellten Verdünnungsstufen mehrfach in das System injiziert und die Peakflächen der erhaltenen Chromatogramme analysiert. Abb. 6 veranschaulicht die Überlagerung von je einem Chromatogramm pro Verdünnungsstufe. Es wird deutlich, dass der interne Standard immer in vergleichbarer Intensität und unabhängig von der Koffeinkonzentration des Standards auftritt. Im Vergleich dazu steigen die Peakflächen von Koffein und Paracetamol mit zunehmender Konzentration an.

Abb. 6

Überlagerung der Chromatogramme zur Kalibrierung

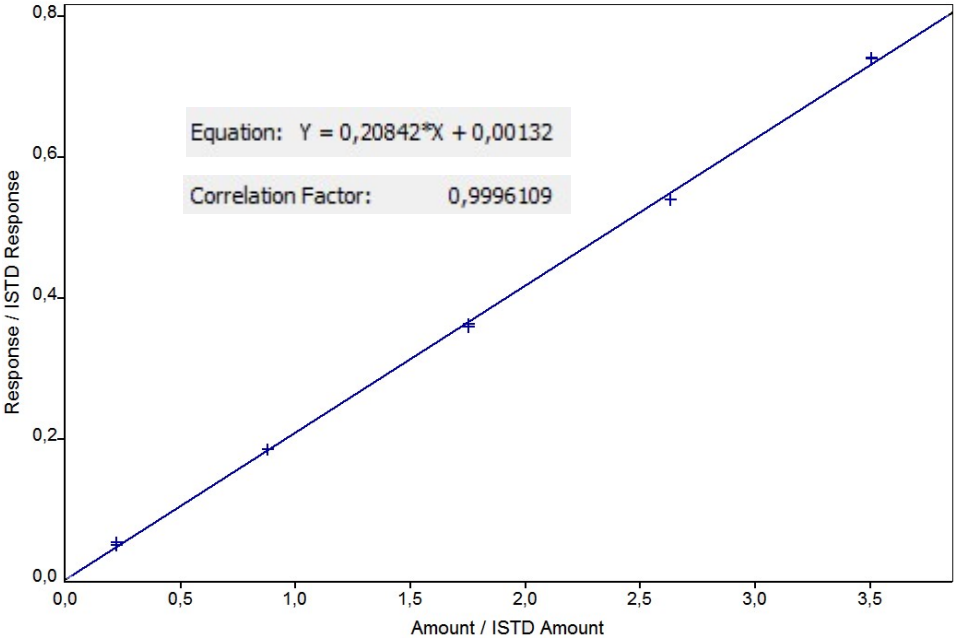


Wie oben beschrieben, werden die Peakflächen des jeweiligen Standards mit denen des internen Standards korreliert und eine ISTD Kalibriergerade erstellt. Dies kann unkompliziert mit der Kalibrierfunktion der HPLC-Software durchgeführt werden. Die erhaltene Kalibriergerade für Koffein ist in Abb. 7 wiedergegeben.

Der berechnete Korrelationsfaktor sollte möglichst nahe 1,0 liegen. In diesem Fall liegt er mit > 0,999 in einem sehr guten Bereich und zeigt, dass die gewählte Methode sehr gut und reproduzierbar funktioniert sowie für die Quantifizierung von Koffein geeignet ist.

Abb. 7

ISTD Kalibriergerade von Koffein erstellt mittels HPLC-Software



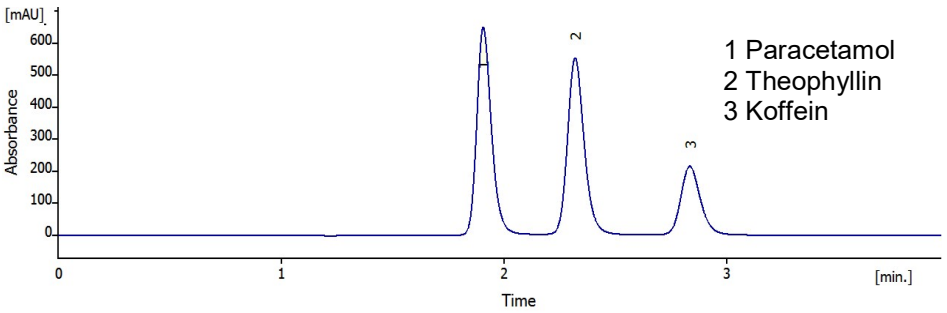
Mit Hilfe dieser Kalibriergeraden kann eine Probe unbekannter Konzentration analysiert werden. Wenn diese, wie beschrieben, vorbereitet und durch eine HPLC analysiert wird, kann sie bei Hinterlegung einer Kalibrierung mit Hilfe der Software ausgewertet werden. Abb. 8 zeigt das zugehörige Chromatogramm und die Ergebnistabelle der analysierten realen Probe.

Laut Kalibrierung ist in der Probe ein Koffeingehalt von 46,7 µg/ml enthalten. Wird mittels der Einwaage der Probe und der Verdünnungsstufen dieser Gehalt hochgerechnet, erhält

man den totalen Gehalt an Koffein in der Trockensubstanz.

Abb. 8

Quantitative Auswertung der Koffeinhaltigen Probe



Result Table (ISTD - 130508_Coffein_Probe - ASM2.1LUV)

	Reten. Time [min]	Response	Amount [µg/ml]	Amount [%]	Peak Type	Compound Name
1	1,903	3032,161	N/A	N/A	Error	Paracetamol
2	2,317	2923,127	ISTD	ISTD	ISTD	Theophyllin
3	2,833	1327,957	46,665	100,0	Ordnr	Coffein
	Total		46,665	100,0		

Mit der Einwaage von 105,0 mg Probe, den Verdünnungen von 1:10 mit MeOH und 1:100 mit Wasser und der Zugabe des internen Standards ergibt sich ein Koffeingehalt in der Feststoffprobe von ca. 47,6 mg. Das entspricht einer Koffeinkonzentration von 45 Massenprozent bezogen auf die Einwaage t.

Fazit

Mit dem KNAUER Ausbildungssystem ist die Identifizierung und Quantifizierung von Koffein in Proben auf einfache Art und Weise möglich. Das System ist übersichtlich und kann idealerweise in der Ausbildung verwendet werden.
Mit der Software ClarityChrom kann das System konfiguriert und gesteuert sowie die Daten aufgenommen und ausgewertet werden. Detaillierte Informationen zur Verwendung der Software sind in den mitgelieferten Videos und Manuals zu finden.

Referenzen

1 *Eintrag: internal standard*. In: *IUPAC Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book")*. doi:10.1351/goldbook.I03108.

2 Meyer, V. R.: *Practical High Performance Liquid Chromatography*. 5. Aufl. Chichester: WILEY, 2010.

3 Böcker, J.: *Chromatographie*. Würzburg: Vogel, 1997.

4 Kromidas, S.; Kuss, H.-J.: *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*. Weinheim: WILEY, 2008.

Autoren

Dr. Silvia Marten, Head of Columns and Applications Department, KNAUER

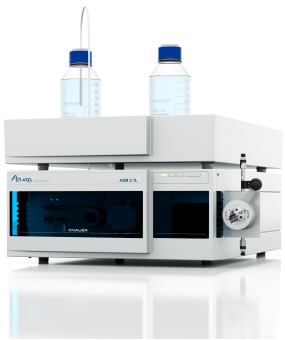
Mareike Margraf, Columns and Applications Department, KNAUER

Eigenschaften der verwendeten Säule

Eurospher II zeichnet sich durch außerordentliche mechanische und chemische Stabilität aus und bietet exzellente Peaksymmetrie für saure, basische und neutrale Verbindungen.

Stationäre Phase	Eurospher II 100-5 C18
USP Code	L1
Porengröße	100 Å
Porenvolumen	0,8 ml/g
Spezifische Oberfläche	320 ± 20 m^2/g
Partikelgröße	5 µm
Form	spherical
Kohlenstoffgehalt	16% C
Endcapping	ja
Dimension	125 x 4 mm
Bestellnummer	12WE181E2J

System



Das HPLC-Ausbildungssystem AZURA Compact wird in einem Schulungspaket angeboten. Dieses Paket enthält das isokratische HPLC-Gerät AZURA Compact mit Injektionsventil, Pumpe, Säule und Detektor sowie Flaschenwanne und Lösungsmittelflaschen. Damit können die einzelnen Schritte einer HPLC (Injizieren, Pumpen, Auftrennen, Detektieren, Auswerten) mühelos und anschaulich erlernt werden.

Für die Steuerung des Gerätes und die Darstellung der ausgewerteten Chromatogramme werden ein Laptop und die HPLC-Software ClarityChrom geliefert.

Beschreibung	**Art.-Nr.**
Gesamtsystem: bestehend aus	671101100
Flaschenwanne E 2.1L	AZC00
2 Flaschen à 1000 ml	A5324-1
AZURA Assistent mit UVD 2.1S UV/VIS Einkanal-Detektor mit variabler Wellenlänge und Pumpeneinheit 4.1 S mit Druckaufnehmer und 10 ml Pumpenkopf	AYCALXBA
Durchflusszelle, UV, 10 mm, 10 µl, 1/16", Edelstahl, mit Wärmetauscher Ein- und Ausgang einseitig	A4061XB
Azura Start-up kit 1/16", Edelstahl, Kapillarkit für Ausbildungssystem	A9849-2
Manuelles Injektionsventil, 6-Port/3-Kanal, Edelstahl, 1/16", 400 bar, 0,3 mm Bohrungsgröße,	AVI26BC
Haltewinkel AZURA L für Knauer man. Injektionsventile	A9853
Probenschleife 10 µl Edelstahl 1/16", 0,25 mm	A05645
Injektionsspritze 100 µl, TP5100-71	A0726
Vertex Plus Säule 125 x 4 mm Eurospher II 100-5 C18 mit integrierter Vorsäule	12WE181E2J
Magnetclip für Säulen 3, 4 und 4,6 mm ID für alle AZURA Geräte	A9847
ClarityChrom 6.1.0 Educational License ein System + 2x Offline Für Kunden:	A1672-9
Notebook Englisch für ClarityChrom, PurityChrom	A1304-1E
Router Netgear ProSafeWireless FVS318N-100EUS 8-Port 8x RJ-45, Gigabit, WLAN, VPN, Firewall	A64809INT
Werkzeug-Kit Azura für Systeme mit PEEK oder Pre-cut Kapillarkits	A1033

Kontakt

KNAUER
Wissenschaftliche Geräte GmbH
Hegauer Weg 38
14163 Berlin, Germany

Tel: +49 30 809727-0
Fax: +49 30 8015010
E-Mail: info@knauer.net
Internet: www.knauer.net