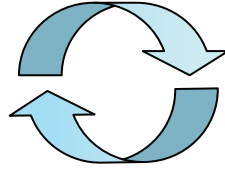


HPLC: Methodenentwicklung und Validierung einer quantitativen Bestimmung von Paracetamol neben Coffein

Betrieb

[Ausbildungsrahmenplan Nr. 13](#)



Berufsschule

[Rahmenlehrplan Lernfeld 8](#)

Geräte: HPLC-System mit 20- μ L-Injektor, RP 18 Säule, Autosampler oder HPLC-Spritze, Auswertesystem, Bürette, Pipetten, Kolben, Waage

Chemikalien: Paracetamol (R-Sätze: 22 / S-Sätze: 22 – 24 / 25, Xn), Coffein (R-Sätze: 20 - 25, S-Sätze: 22 – 24 - 44, T = Giftig), Methanol (R-Sätze: 11 - 23 / 25, S-Sätze: 2 – 7 – 16 -24, VbF: B, T = Giftig, F = leichtentzündlich, fruchtschädigend: D), Wasser (HPLC-Qualität)

1. Prinzip

Zunächst werden die Trennungsbedingungen am HPLC-System gesucht, um den Paracetamol- und Coffein-Peak bis zur Basis-Linie zu trennen. Bei der quantitativen Methode des äußeren Standards werden Kalibrierlösungen mit genau definierter Konzentration an Paracetamol und Coffein im HPLC-System chromatografiert. Die Peakfläche des Paracetamols in den Chromatogrammen wird dann in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen und es wird eine lineare Regression durchgeführt. Die Linearität wird beurteilt. Dann werden die Selektivität, die Präzision und die Richtigkeit abgeschätzt sowie die Robustheit des analytischen Verfahrens überprüft.

Anschließend wird eine Probenlösung, die Coffein und Paracetamol enthält, injiziert. Aus der erhaltenen Peakfläche des Paracetamols wird mit Hilfe der Geradengleichung die Konzentration an Paracetamol extrapoliert.

2. Orientierungsfragen

- (1) Warum muss bei dieser Untersuchung kein Puffer verwendet werden?
- (2) Was versteht man unter „Validieren“?
- (3) Welche Validierungsparameter kennen Sie?
- (4) Worin besteht der Unterschied zwischen „Präzision“ und „Richtigkeit“?
- (5) Warum wurden für diese Untersuchung die Parameter „Richtigkeit“, „Präzision“ und „Robustheit“ herausgesucht?
- (6) Was versteht man unter einer „linearen Regression“?
- (7) Welche Vor- und Nachteile hat die Methode „äußerer Standard“?
- (8) Von was ist die Maximumwellenlänge des Paracetamols abhängig?

3. HPLC-Bedingungen

HPLC-Säule:	RP 18 (z. B. Hypersil ODS), Korndurchmesser 5 μm , 12,5 cm, Innendurchmesser 4 oder 4,6 mm.
Injektor:	Autosampler oder Sixport-Ventil, Schleife 20 μL , isokratische Arbeitsweise oder Gradientensystem
Injektion:	100 μL Lösung in die 20- μL -Schleife
Wellenlänge:	Es ist die Maximumwellenlänge von Paracetamol einzustellen.

4. Durchführung anhand von Leitvorgaben

Führen Sie Ihre Arbeiten nach folgenden Leitvorgaben durch:

- (1) Stellen Sie eine wässrige Lösung her, die ca. 1 mg Paracetamol in 100 mL Lösung enthält.
- (2) Bestimmen Sie in einem externen Spektrofotometer die Maximums-Wellenlänge des Paracetamols zwischen 220 und 360 nm.
- (3) Stellen Sie eine Lösung her, die jeweils ca. 0,5 bis 1 mg Coffein und Paracetamol enthält.
- (4) Chromatografieren Sie die Lösung in einem HPLC mit einer RP-18-Säule, dabei wird die unter (2) gefundene Maximumswellenlänge eingestellt. Benutzen Sie Methanol/Wasser-Mischungen als Eluent, entweder unter isokratischer oder Gradienten-Arbeitsweise. Die Trennung des Coffein- und Paracetamolpeaks sollte bis zur Basislinie erfolgen. Der Fluss beträgt zunächst 1 mL / Min und ist ggf. zu optimieren. Das Injektionsvolumen beträgt 100 μL in eine 20- μL -Schleife. Es sind der Trennfaktor α und die Resolution R_s zu berechnen und zu dokumentieren (Selektivität)
- (5) Es sind mindestens 5 Kalibrierlösungen anzusetzen, deren Konzentration sich äquidistant im Messbereich 0,8 bis 1,2 mg Paracetamol pro 100 mL Lösung verteilen. Zu jeder Lösung werden noch 1 mg Coffein pro 100 mL Lösung zugefügt. Die Kalibrierlösungen sind aus Stammlösungen herzustellen.
- (6) Die Kalibrierlösungen werden mit einer Doppelbestimmung chromatografiert. Die Peakflächen des Paracetamols sollten sich um nicht mehr als 0,5 % (rel.) unterscheiden.
- (7) Von den Peakflächen in Abhängigkeit von der Konzentration an Paracetamol wird eine lineare Regression durchgeführt (z. B. mit EXCEL). Der Korrelationskoeffizient r sollte größer als 0,998 sein und der Ordinatenabschnitt sich nicht sehr von „0“ unterscheiden. Die Daten sind zu dokumentieren (Abschätzen der „Linearität“).
- (8) Anschließend wird eine „künstliche Probe“ hergestellt, indem 1000 mg Paracetamol und 200 mg Coffein intensiv im Mörser vermischt und homogenisiert werden.

- (9) Aus 100 mg der homogenierten Mischung, auf 0,5 mg genau gewogen, wird eine Stammlösung hergestellt, die so weiterverdünnt wird, dass sich die Konzentration an Paracetamol etwa in der Mitte des Konzentrationsbereichs der Kalibrierlösungen befindet. Diese Lösungen werden bei den gegebenen Bedingungen chromatografiert und die Peakfläche notiert (Doppelbestimmung). Aus der Peakfläche, der Geradengleichung der linearen Regression und den Verdünnungsfaktoren ist der Gehalt an Paracetamol zu berechnen.
- (10) Der unter (9) gemachte Arbeitsschritt wird vom selben Auszubildenden, mit denselben Geräten und mit denselben Chemikalien noch 5mal wiederholt. Aus den dann 6 Ergebnissen sind durch einen Vergleich folgende Daten zu ermitteln:
- Liegen ausreißerfreie Daten vor?
 - Ist ein zeitlicher Trend in der Datenreihe zu beobachten?
 - Berechnung des Mittelwertes der 6 Konzentrationen
 - Berechnung der Standardabweichung der 6 Konzentrationen
 - Berechnung des Variationskoeffizienten V(%)

Der Variationskoeffizient V(%) sollte unter 1,5 % sein und ist zu notieren. Er ist das Maß für die Präzision des Verfahrens unter „Wiederholbedingungen“.

- (11) Es werden 3 künstliche Proben durch Einwiegen auf der Analysenwaage sehr sorgfältig hergestellt und intensiv homogenisiert:
- a) 800 mg Paracetamol und 200 mg Coffein
 - b) 1000 mg Paracetamol und 200 mg Coffein
 - c) 1200 mg Paracetamol und 200 mg Coffein

Alle drei Mischungen werden nach Punkt 9 bearbeitet und die entstehenden Lösungen chromatografiert (Doppelbestimmung). Mit Hilfe der Geradengleichung soll der Gehalt an Paracetamol in der Mischung bestimmt werden. Die Richtigkeit des Verfahrens wird abgeschätzt durch folgende Gleichung:

$$WFR = \frac{\text{gefundene Konzentration Paracetamol}}{\text{eingewogene Konzentration Paracetamol}} \cdot 100\%$$

Es soll geprüft werden, ob die durchschnittliche Wiederfindungsrate aller drei Werte (WFR) nicht mehr als 2 % von 100 % abweicht und ob die WFR der drei Konzentrationen (880, 1000 und 1200 mg) nicht mehr als 1 % von einander abweichen.

- (12) Schreiben Sie alle kritischen Parameter auf, die Ihnen während der Analyse oder während der Validierung Schwierigkeiten gemacht haben. Verändern Sie einige Parameter und überprüfen Sie für eine der künstlichen Proben die WFR:
- Veränderung der Wellenlänge um 2nm
 - Veränderung der Methanol/Wasserzusammensetzung des Eluenten um 5 %
 - Injektion von weniger als 100 µL in eine 70-µL-Schleife
 - Temperatur um + 10° C
 - usw.

Benennen Sie die kritischen Parameter des analytischen Verfahrens.

- (13) Es wird ein Validierungsbericht aufgesetzt, in dem alle Validierungsparameter benannt und bei Eignung das Verfahren freigegeben wird:
- Selektivität
 - Linearität
 - Wiederholpräzision
 - Richtigkeit
 - Robustheit
- (14) Eine handelsübliche Tablette mit 500 mg Paracetamol und 100 mg Coffein wird im Mörser zerrieben und homogenisiert. Nach dem Lösen in Wasser (ergibt evtl. eine Suspension wegen dem Placeboanteil), dem Auffüllen und dem Homogenisieren wird die Lösung ggf. abfiltriert. Die Stammlösung wird gemäß der Arbeitsweise verdünnt und chromatografiert.

Ist die Methode valide?

5. Umsetzungsvorschlag für den Ausbildungsbetrieb**5.1. Herstellung der Probe**

Die Proben zur Ermittlung der WFR werden vom Auszubildenden selbst gemischt.

5.2. Zeitbedarf

Der durchschnittliche Zeitbedarf zur Durchführung der Aufgabe beträgt ca. 8 Stunden.

5.3. Bewertung

Eine Bewertung ist nach den vorgelegten Validierungsdaten vorzunehmen.