

Anwendungsbeispiele

Methodenentwicklung und Trenntechniken im Überblick

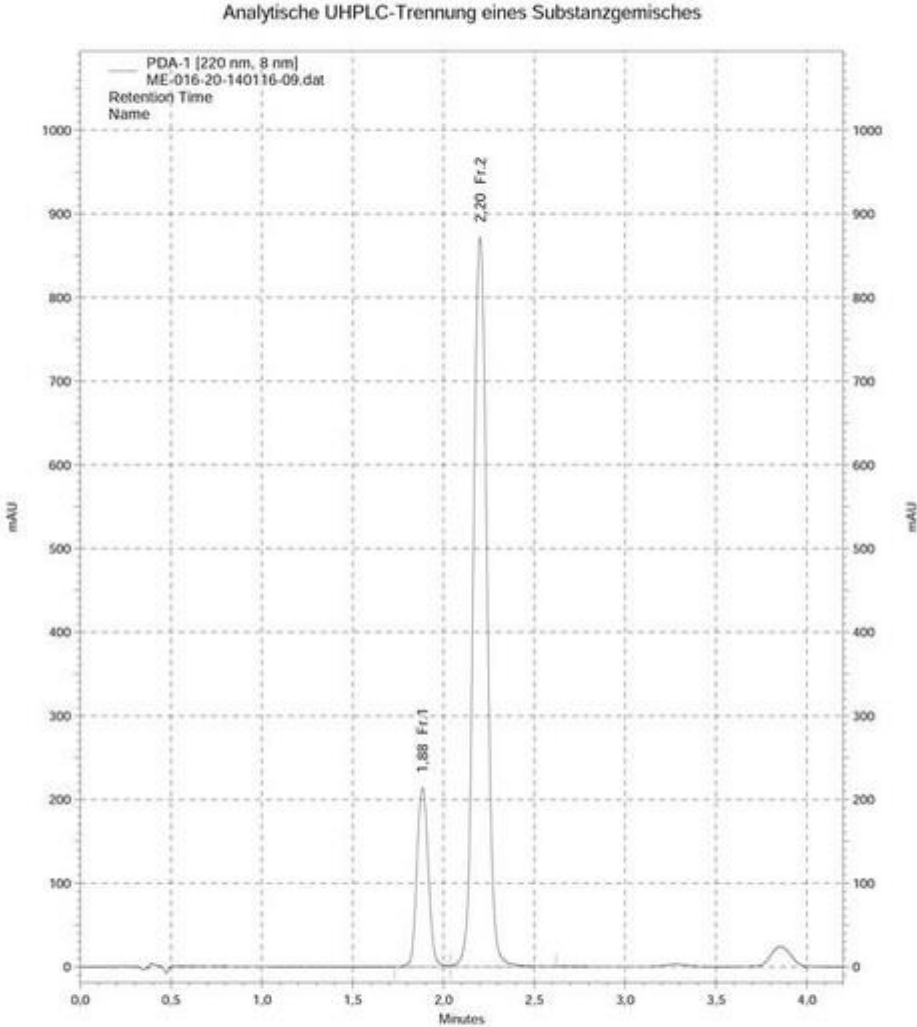
Auf dieser Seite werden einige Methoden, die im HPLC-Pool entwickelt wurden, vorgestellt. Im Fokus stehen dabei das Entwickeln einer analytischen Trennmethode und anschließendes Upscaling auf präparative Dimensionen (**Beispiel 1.**) und die Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen aus Katalyse-Reaktionen (**Beispiel 2.**).

Neu ist die Möglichkeit, schwer trennbare Gemische (i.d.R. Racemate und andere Strukturisomere) mit Hilfe von Peakrecycling präparativ aufzureinigen. (**Beispiel 3a.**) - die anschließende analytische Kontrollmessung gibt Aufschluß über die erzielte Reinheit (**Beispiel 3b.**) Ein weiteres Beispiel für die Leistungsfähigkeit von Peakrecycling zeigt **Abbildung 3c.**

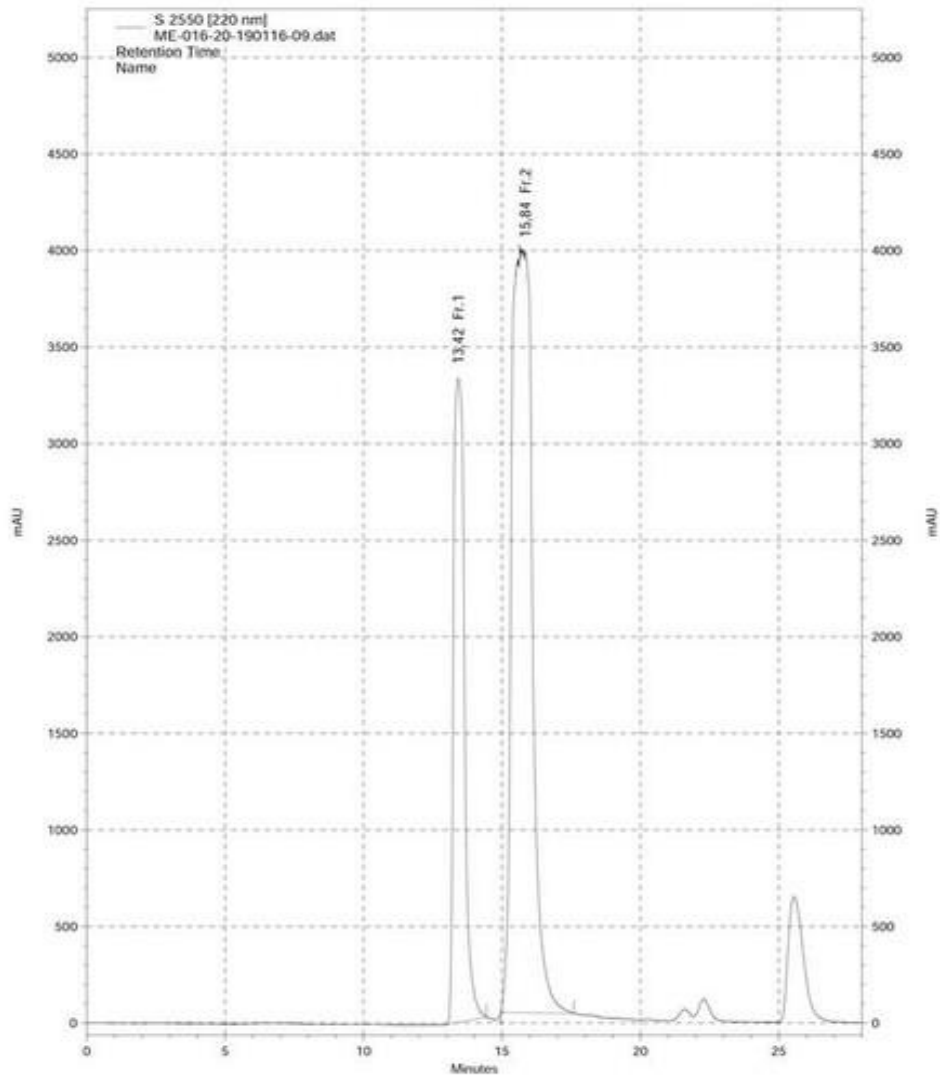
Auch sind quantitative Bestimmungen mit HPLC möglich. **Beispiel 4** zeigt die Quantifizierung von Koffein mit dem internen Standard Theophyllin. In **Beispiel 5** wird parallel die Konzentration von Theophyllin und Koffein mit einem externen Standard ermittelt.

Bitte beachten: die gezeigten Daten sind NICHT auf andere HPLC-Systeme / Säulen übertragbar!

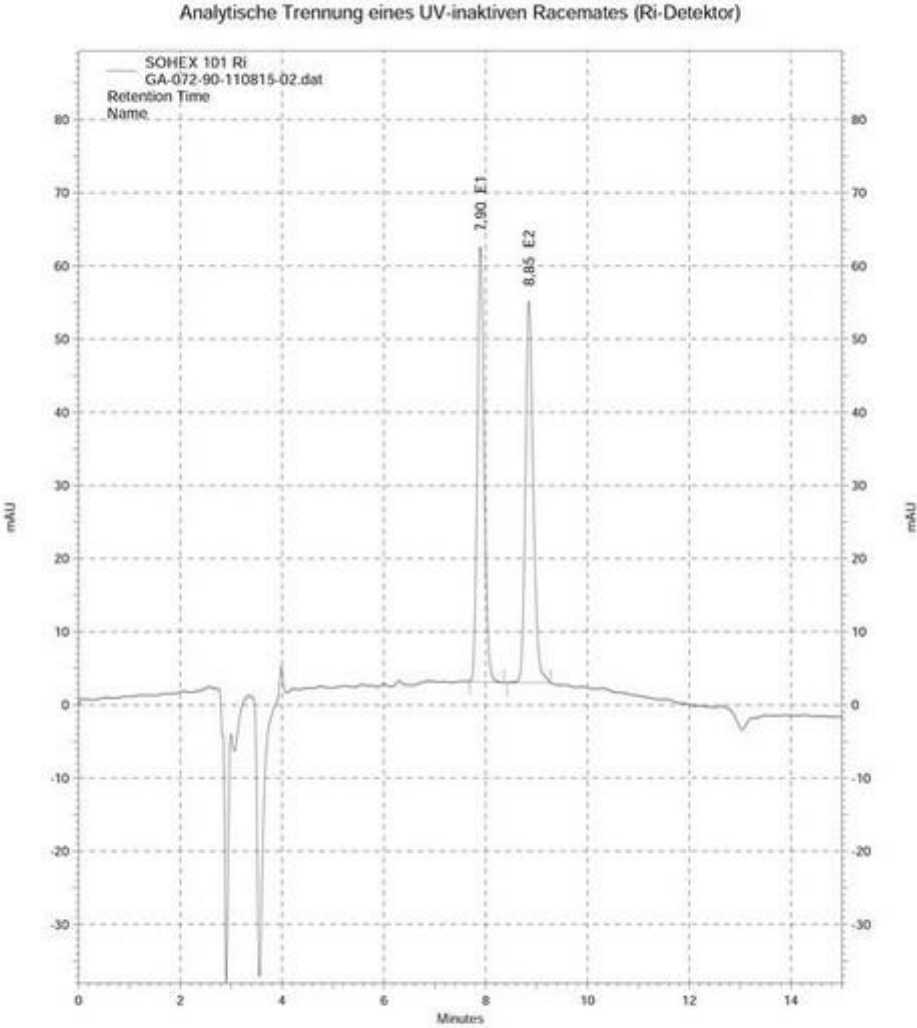
1. Upscaling einer analytischen UHPLC-Trennung auf präp. Dimensionen



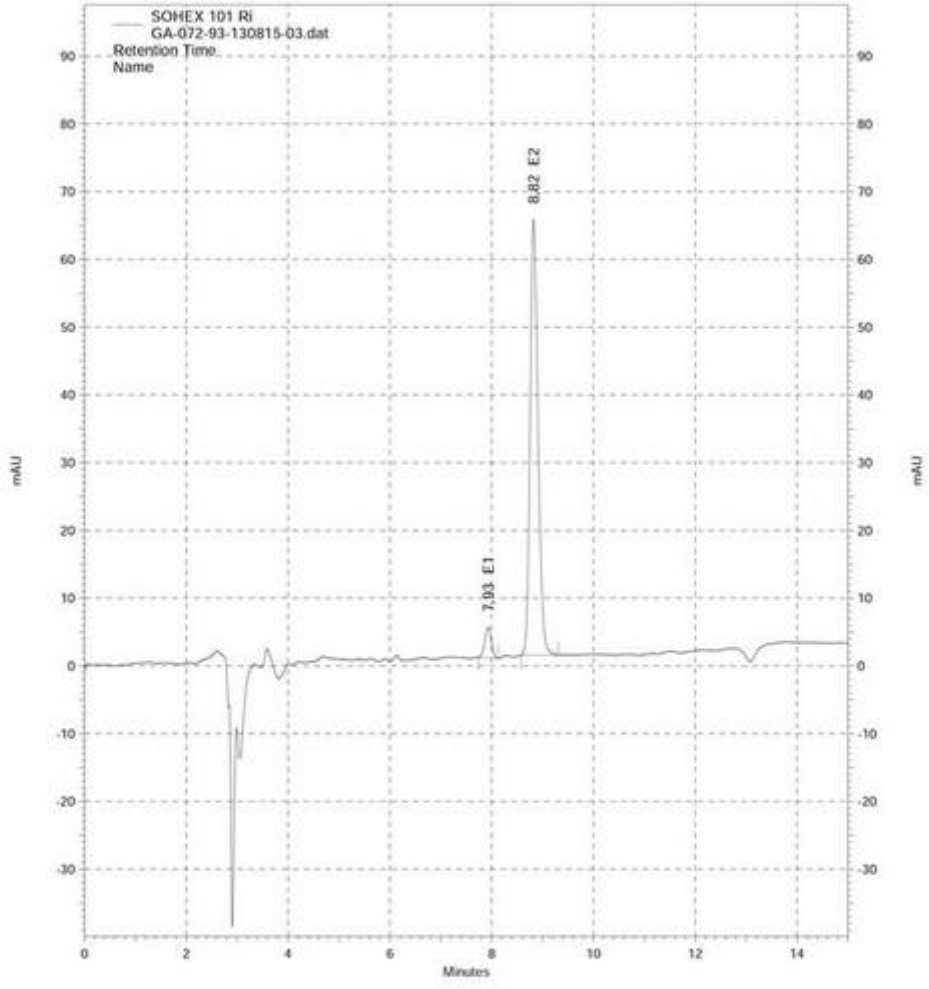
Präparative Substanztrennung nach Upscaling (ca. 25mg)



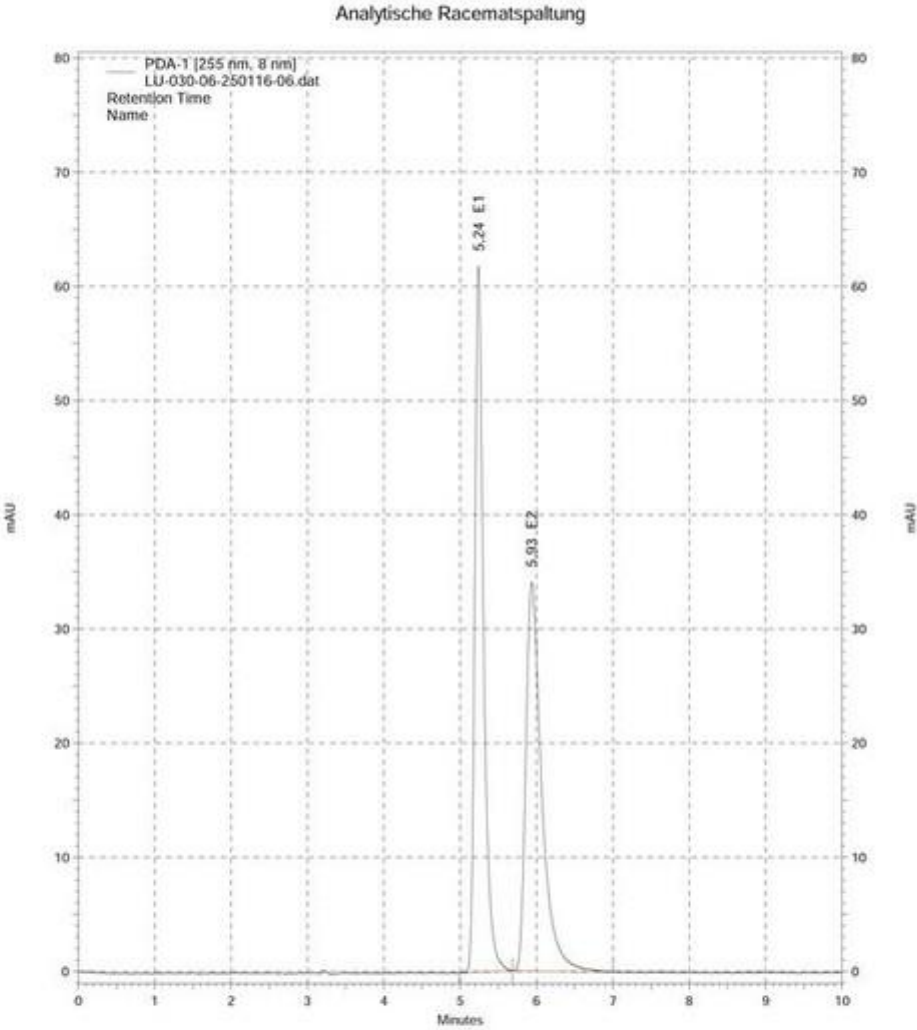
2. Analytische Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (*ee*) eines UV-inaktiven Racemates



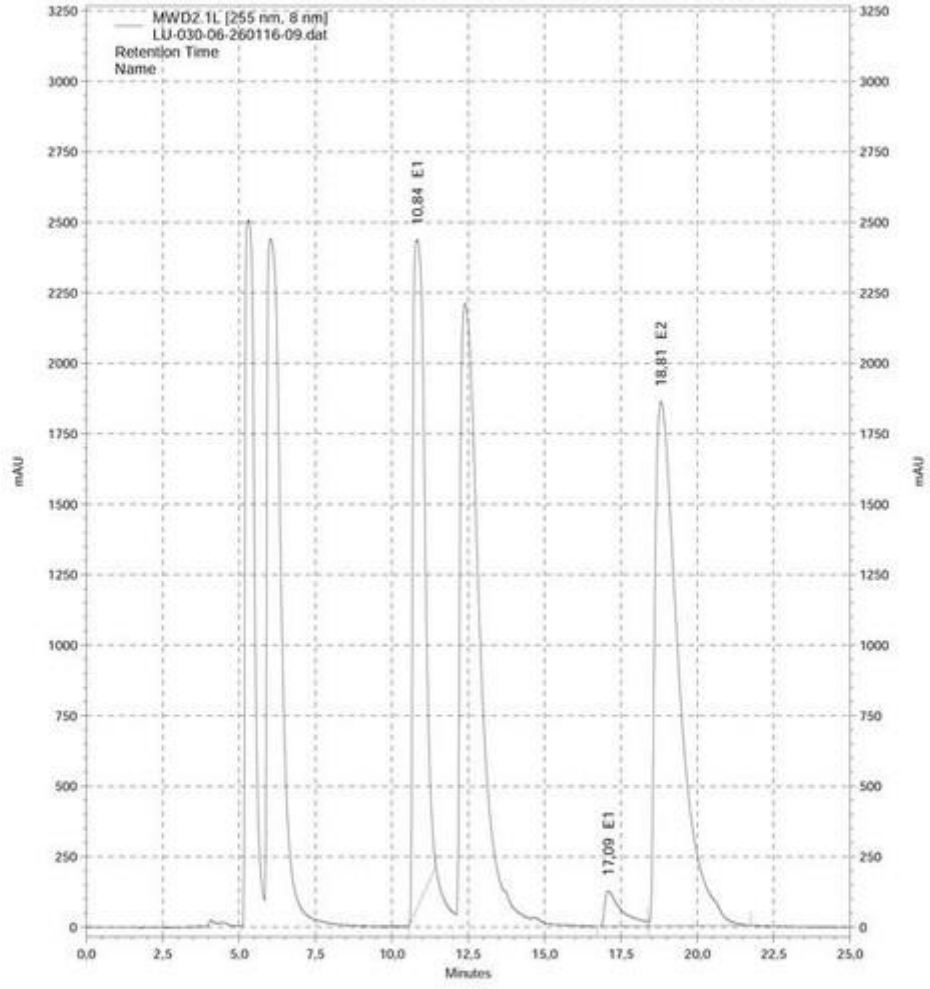
Bestimmung des Enantiomerenüberschusses (Ri-Detektor) = 90% ee



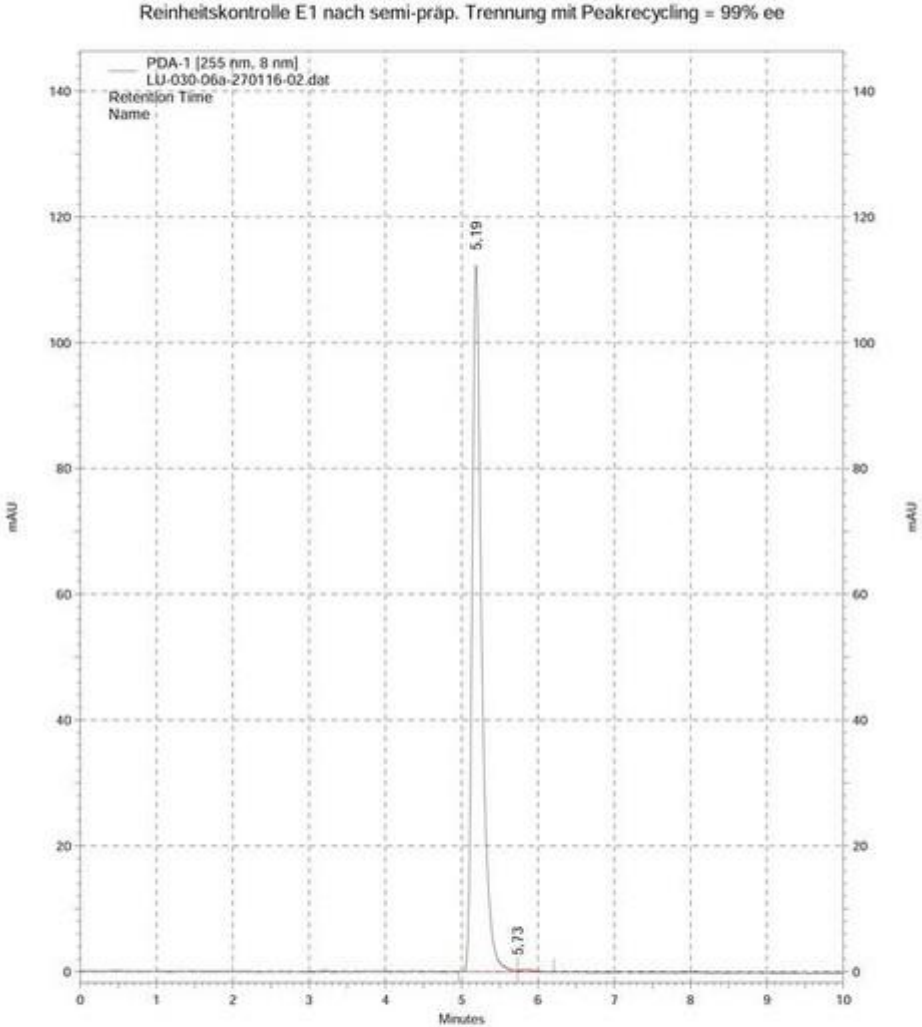
3a. Analytische Racematspaltung mit anschließender semi-pröp. Auftrennung durch Peakrecycling



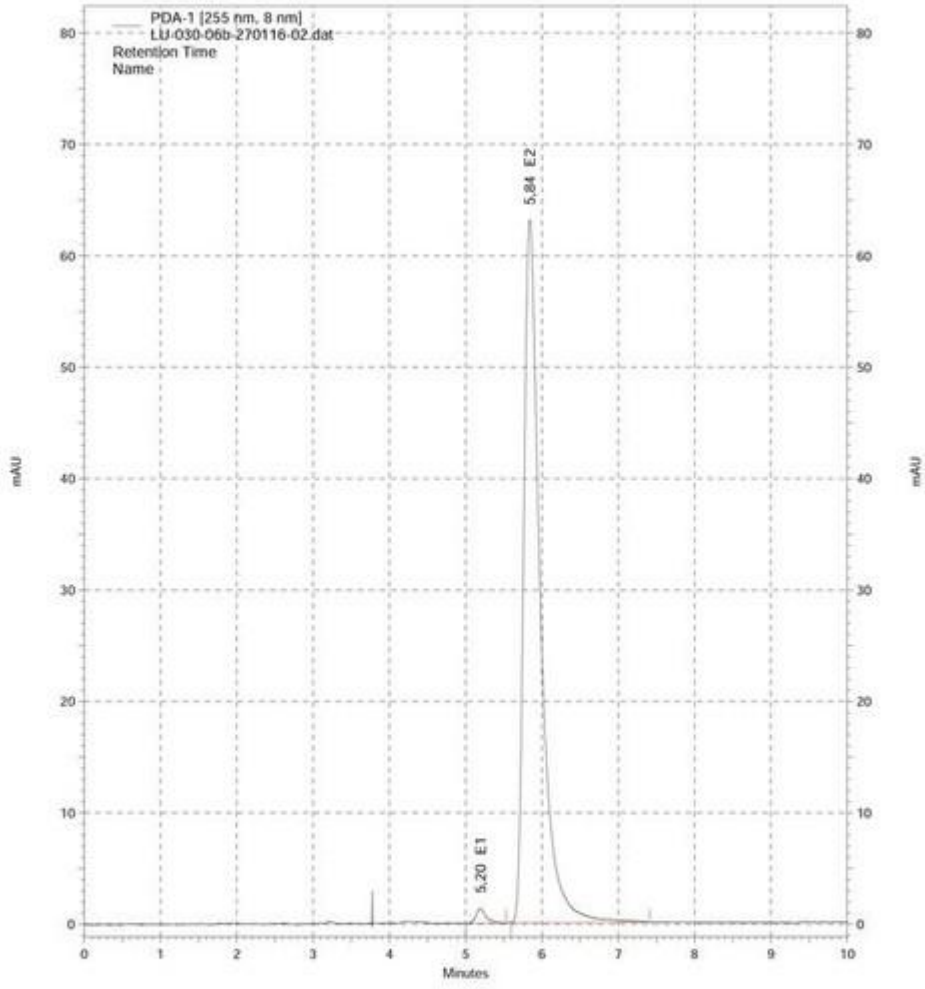
Semi-prap. Racematspaltung mit Peakrecycling (15mg)



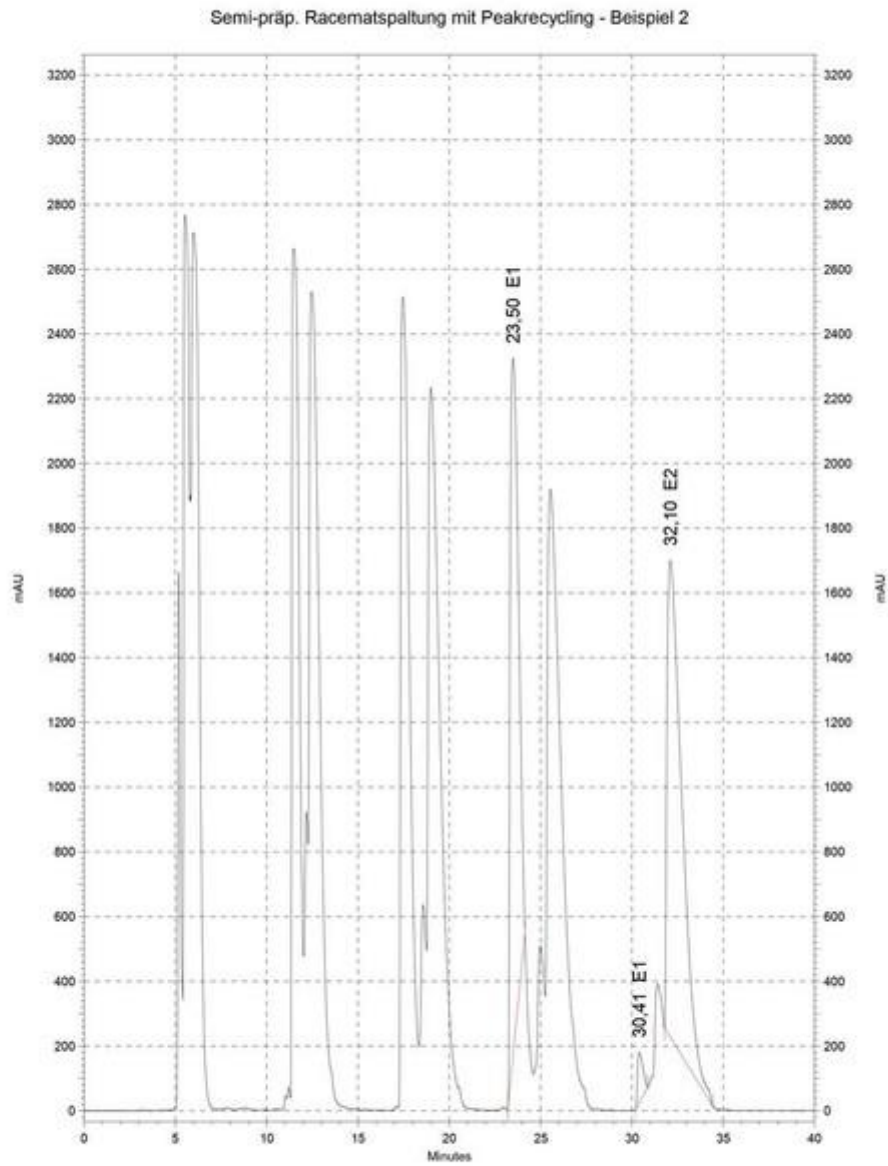
3b. Analytische Reinheitskontrolle des oben getrennten Racemates



Reinheitskontrolle E2 nach semi-prap. Trennung mit Peakrecycling = 98% ee



3c. Semi-präp. Auftrennung durch Peakrecycling (19,4 mg) - Beispiel 2



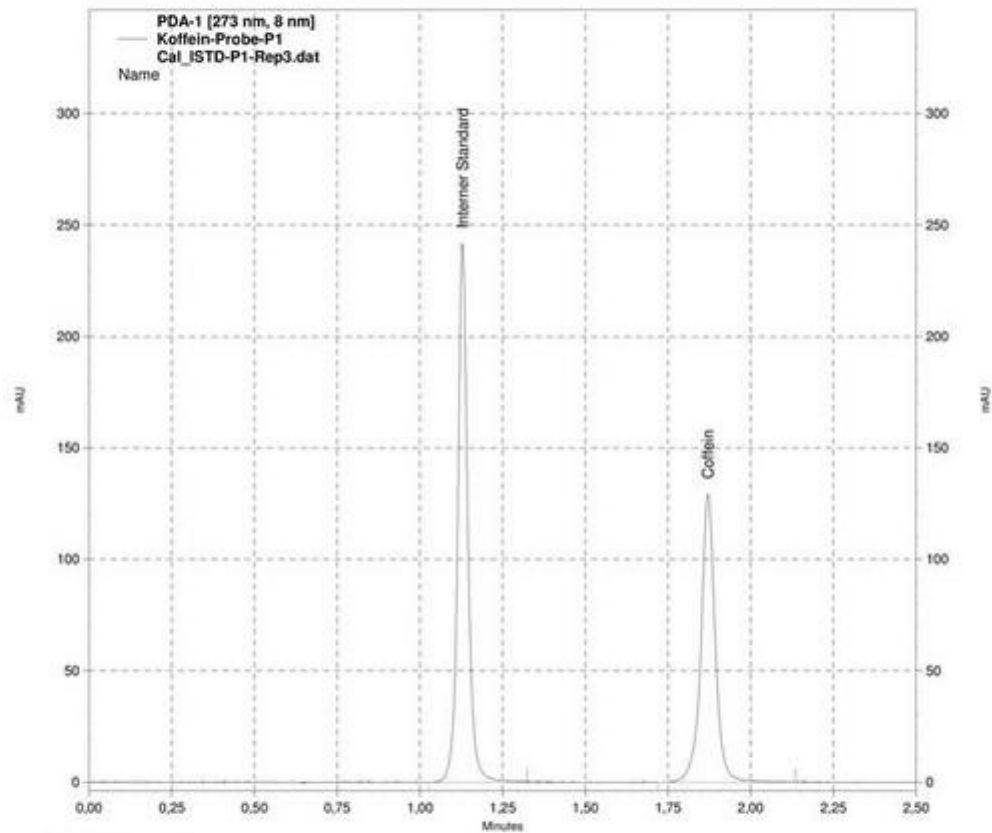
4. Quantitative Bestimmung von Koffein (Einwaage: 43,0 µg/ml) mit int. Standard (Theophyllin)

Internal Standard Report

Page 1 of 2

Method Name: D:\Enterprise\Europa\Method\U - 0.5ml - 10-90 - C1 - 190-400nm - 02,5min - 273nm - 40-23°C - 50 Hz - Cal Cof INST.met
 Data: D:\Enterprise\Europa\Result\2016\2016 - Tests und Kalibrierungen\Koffein 150416 Int. Standard\Cal_ISTD-P1-Rep3.dat
 User: SYSTEM (SYSTEM)
 Acquired: 15.04.2016 12:15:33 (GMT +02:00)
 Printed: 20.04.2016 10:33:45 (GMT +02:00)

ISTD Probe Koffein P1 - Einwaage: 43,0 mg - Knauer BlueOrchid C18 1,8µm 2 x 100mm - 273nm



PDA-1 [273 nm, 8 nm] Results

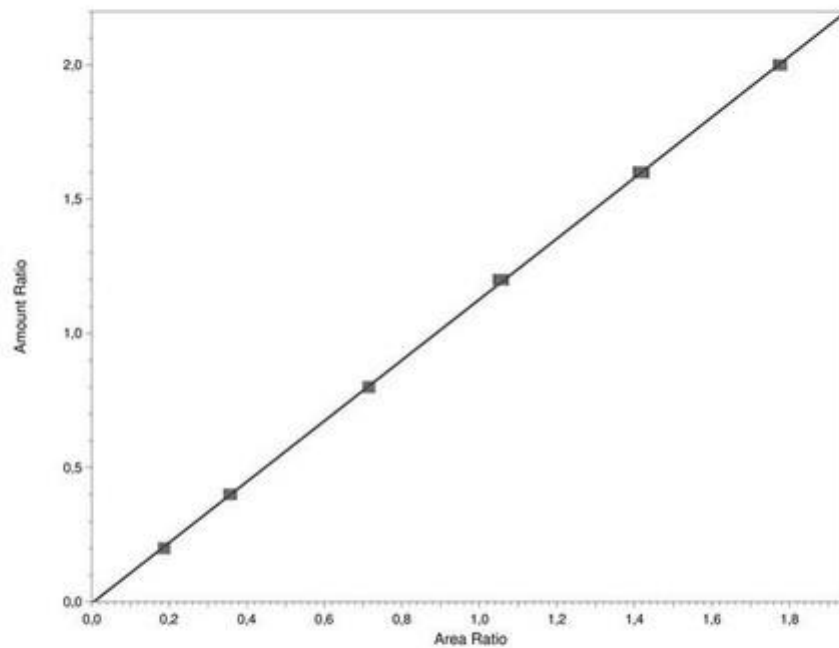
| PK # | Name | Retention Time | Area | Koffein µg/ml |
|--------|-------------------|----------------|--------|---------------|
| 1 | Internal Standard | 1,129 | 511442 | 0,00 |
| 2 | Coffein | 1,871 | 390412 | 42,91 |
| Totals | | | 901854 | 42,91 |

Internal Standard Report

Page 2 of 2

Method Name: D:\Enterprise\Europa\Method\U - 0.5ml - 10-90 - C1 - 190-400nm - 02,5min - 273nm - 40-23°C - 50 Hz - Cal Cof INST.met
 Data: D:\Enterprise\Europa\Result\2016\2016 - Tests und Kalibrierungen\Koffein 150416 Int.
 Standard\Cal_ISTD-P1-Rep3.dat
 User: SYSTEM (SYSTEM)
 Acquired: 15.04.2016 12:15:33 (GMT +02:00)
 Printed: 20.04.2016 10:33:45 (GMT +02:00)

Peak: Coffein -- ISTD -- PDA-1 [Channel 1]



| | Level 1 | Level 2 | Level 3 | Level 4 | Level 5 | Level 6 |
|------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Amount Ratio | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 1,6 | 2 |
| Area Ratio | 0,18605 | 0,357051 | 0,714887 | 1,05528 | 1,41759 | 1,77771 |
| RF | 1,074980418 | 1,120287136 | 1,119058462 | 1,137135171 | 1,128679935 | 1,125044585 |
| | 01708 | 34644 | 53152 | 78588 | 82245 | 76985 |
| Last Area Ratio | 0,185433 | 0,356662 | 0,715081 | 1,05649 | 1,416 | 1,78002 |
| Residual | -0,00475348 | 0,00169489 | -0,00332877 | 0,0113858 | 0,00130677 | -0,00630517 |
| Rep StDev | 0,000895951 | 0,00188618 | 0,000763868 | 0,00554948 | 0,00645247 | 0,00269497 |
| Rep %RSD | 0,479973 | 0,527689 | 0,106881 | 0,526479 | 0,454665 | 0,151795 |
| Rep 1 Area Ratio | 0,185752 | 0,355271 | 0,715552 | 1,06048 | 1,41173 | 1,77822 |
| Rep 2 Area Ratio | 0,186706 | 0,35837 | 0,714092 | 1,05109 | 1,42324 | 1,77512 |
| Rep 3 Area Ratio | 0,187543 | 0,358683 | 0,714433 | 1,05066 | 1,42254 | 1,77285 |

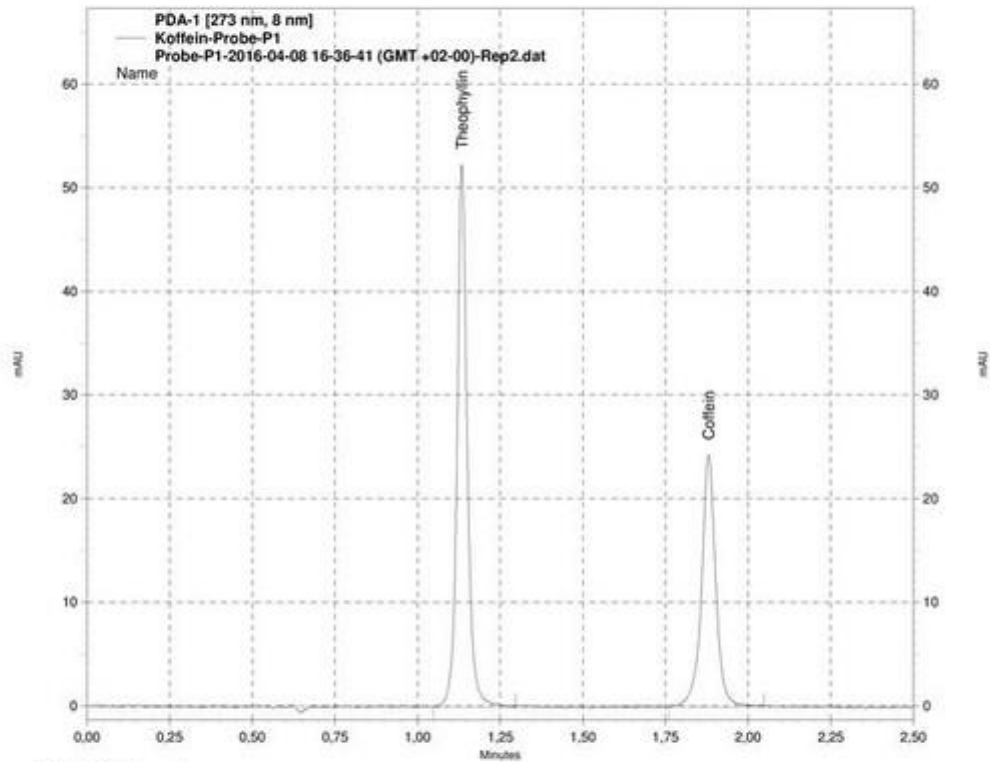
5. Quantitative Bestimmung von Theophyllin (Einwaage: 9,35 µg/ml) und Koffein (Einwaage: 6,8 µg/ml) mit ext. Standard

External Standard Report

Page 1 of 3

Method Name: D:\Enterprise\Europa\Method\U - 0.5ml - 10-90 - C1 - 190-400nm - 02,5min - 273nm - 40-23°C - 50 Hz - Cal The-Cof.met
 Data: D:\Enterprise\Europa\Result\2016\2016 - Tests und Kalibrierungen\Koffein-Theophyllin 080416
 Ext. Standard\Probe-P1-2016-04-08 16-36-41 (GMT +02-00)-Rep2.dat
 User: SYSTEM (SYSTEM)
 Acquired: 08.04.2016 16:37:23 (GMT +02:00)
 Printed: 20.04.2016 10:32:15 (GMT +02:00)

Probe P1 = Einwaage 9,35 µl/ml Theophyllin + 6,8 µg/ml Coffein - KNAUER BlueOrchid C18 1,8µm 2 x 100mm - 273nm



PDA-1 [273 nm, 8 nm] Results

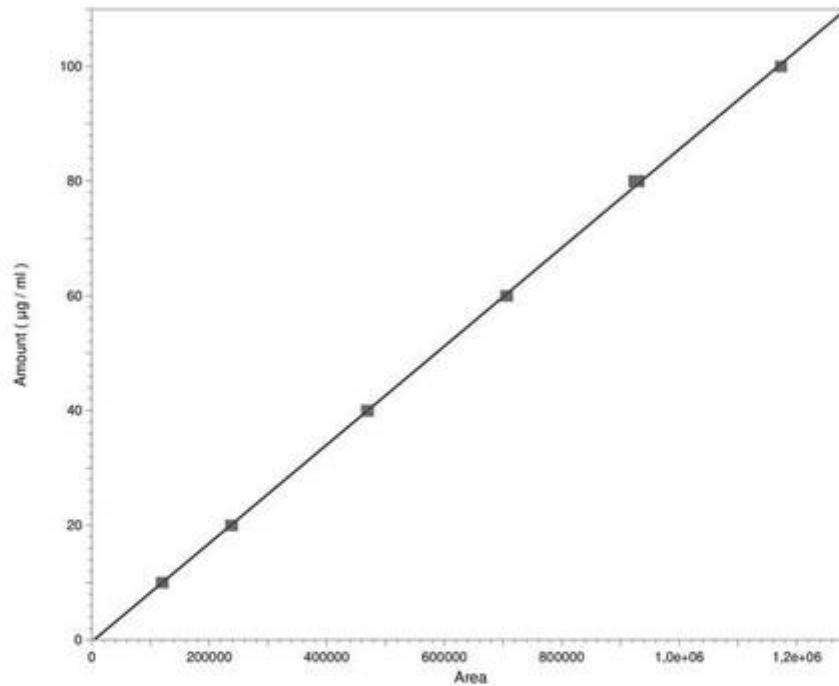
| PK # | Name | Retention Time | Area | Concentration µg/ml |
|--------|-------------|----------------|--------|---------------------|
| 1 | Theophyllin | 1,134 | 112193 | 9,30 |
| 2 | Coffein | 1,881 | 73183 | 6,84 |
| Totals | | | 185376 | 16,14 |

External Standard Report

Page 2 of 3

Method Name: D:\Enterprise\Europa\Method\U - 0.5ml - 10-90 - C1 - 190-400nm - 02,5min - 273nm - 40-23°C - 50 Hz - Cal The-Cof.met
 Data: D:\Enterprise\Europa\Result\2016\2016 - Tests und Kalibrierungen\Koffein-Theophyllin 080416
 Ext. Standard\Probe-P1-2016-04-08 16-36-41 (GMT +02-00)-Rep2.dat
 User: SYSTEM (SYSTEM)
 Acquired: 08.04.2016 16:37:23 (GMT +02:00)
 Printed: 20.04.2016 10:32:15 (GMT +02:00)

Peak: Theophyllin -- ESTD -- PDA-1 [Channel 1]



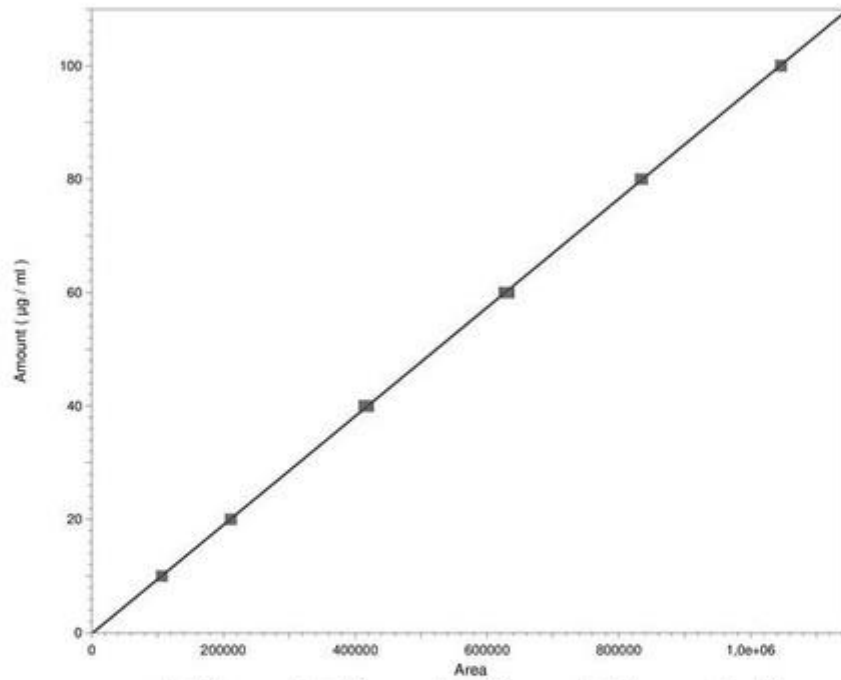
| | Level 1 | Level 2 | Level 3 | Level 4 | Level 5 | Level 6 |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Amount | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Area | 120049 | 237945 | 469341 | 706211 | 927028 | 1173030 |
| RF | 8,329966638 | 8,405321408 | 8,522597133 | 8,496044383 | 8,629733206 | 8,524931161 |
| | 48361e-005 | 98403e-005 | 63752e-005 | 33586e-005 | 40434e-005 | 18087e-005 |
| Last Area | 120391 | 238430 | 468742 | 705236 | 924171 | |
| Residual | 0,0273843 | -0,096276 | 0,0338853 | -0,306046 | 0,732571 | -0,391519 |
| Rep StDev | 484,368 | 686,601 | 846,407 | 1378,86 | 4039,7 | |
| Rep %RSD | 0,403477 | 0,288555 | 0,18034 | 0,195247 | 0,435769 | |
| Rep 1 Area | 120391 | 238430 | 468742 | 705236 | 924171 | 1173030 |
| Rep 2 Area | 119706 | 237459 | 469939 | 707186 | 929884 | |

External Standard Report

Page 3 of 3

Method Name: D:\Enterprise\Europa\Method\U - 0.5ml - 10-90 - C1 - 190-400nm - 02,5min - 273nm - 40-23°C - 50 Hz - Cal The-Cof.met
 Data: D:\Enterprise\Europa\Result\2016\2016 - Tests und Kalibrierungen\Koffein-Theophyllin 080416
 Ext. Standard\Probe-P1-2016-04-08 16-36-41 (GMT +02-00)-Rep2.dat
 User: SYSTEM (SYSTEM)
 Acquired: 08.04.2016 16:37:23 (GMT +02:00)
 Printed: 20.04.2016 10:32:15 (GMT +02:00)

Peak: Coffein -- ESTD -- PDA-1 [Channel 1]



| | Level 1 | Level 2 | Level 3 | Level 4 | Level 5 | Level 6 |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Amount | 10 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Area | 106519 | 211146 | 416762 | 629870 | 834121 | 1046044 |
| RF | 9,387996507 | 9,472141248 | 9,597815537 | 9,525775159 | 9,590934648 | 9,559827311 |
| | 6653e-005 | 5703e-005 | 18374e-005 | 95364e-005 | 57017e-005 | 27945e-005 |
| Last Area | 106609 | 211430 | 414519 | 627197 | 833321 | |
| Residual | -0,0388608 | -0,0690908 | 0,219117 | -0,210958 | 0,208109 | -0,108316 |
| Rep StDev | 127,279 | 402,344 | 3171,37 | 3780,19 | 1131,37 | |
| Rep %RSD | 0,11949 | 0,190553 | 0,760957 | 0,600154 | 0,135636 | |
| Rep 1 Area | 106609 | 211430 | 414519 | 627197 | 833321 | 1046044 |
| Rep 2 Area | 106429 | 210861 | 419004 | 632543 | 834921 | |