

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 1 von 12

Verfasser	Monika Rapl	Wissenschaftlich, technischer Mitarbeiter, Bereich I	27.03.2012 M. Rapl
Überprüfung	Dr. Klaus Denzel	Leiter Bereich I	27.03.2012 Dr. Klaus Denzel
Freigabe	Dr. Edeltraud Ruff	QS-Phytos	i. V. 27.03.2012 Edeltraud Ruff
Inkraftsetzung	Dr. Klaus Denzel	Leiter Bereich I	27.03.2012 Dr. Klaus Denzel

	Name	Funktion	Datum	Unterschrift
Validierung	Validierungsplan Nr.:	-	Datum: -	
	Validierungsbericht Nr.:	-	Datum: -	
Geltungsbereich	Phytos GmbH & Co. KG; Bereich I			
Verteiler	- Original:	Phytos Archiv		
	- pdf-Kopie:	verfügbar via IT-Netzstruktur		
	- kontrollierte Papierkopie:	keine		
Archiv	Archiv Phytos GmbH & Co. KG			

Informationskopie - kein Änderungsdienst
 For Information only - No Change Control

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 2 von 12

Inhaltsverzeichnis

1	Zweck und Arbeitsbereich.....	3
2	Referenzsubstanzen, Chemikalien, Geräte und Ausrüstung.....	3
2.1	Referenzsubstanzen und Chemikalien	3
2.2	Geräte und Ausrüstung.....	4
3	Herstellung der Eluenten und Lösungen	5
4	Probenvorbereitung	5
5	Chromatographische Bedingungen	7
6	Quantitative Analyse – Integrationen - Berechnungen	9
6.1	Integration	9
6.2	Berechnung.....	10
6.2.1	Prozentuale Gehalte der Oligomeren berechnet über (-)-Catechin	10
7	Endergebnis.....	10
8	Abbildungen	11
9	Änderungsindex.....	12

Informationsskopie - kein Änderungsdienst
For Information only - No Change Control

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 3 von 12

1 Zweck und Arbeitsbereich

Bestimmung von Oligomeren Proanthocyanidinen (OPC) in Traubenkernextrakthaltigen Proben mit hohem OPC-Gehalt. Der Anteil an Oligomeren wird mittels RP-HPLC ermittelt.

2 Referenzsubstanzen, Chemikalien, Geräte und Ausrüstung

2.1 Referenzsubstanzen und Chemikalien

- Referenzsubstanz (en)

Substanz	Qualität
(-)-Catechin	Angegebener Gehalt siehe Zertifikat
(-)-Epicatechin	Angegebener Gehalt siehe Zertifikat

- Chemikalien

Substanz	Qualität	Hersteller	Art. Nr.
Reinst Wasser	$\geq 18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$	hergestellt mit Millipore Apparatur	-
Acetonitril	ultra gradient HPLC grade	J.T. Baker	9017
Essigsäure	Reag. Ph. Eur.	Merck	1.00063.1011
Aceton	baker analyzed	J.T. Baker	8002

Falls die oben erwähnten Referenzsubstanzen oder Chemikalien nicht verfügbar sind, können andere vergleichbare Referenzsubstanzen und Chemikalien benutzt werden.

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 4 von 12

2.2 Geräte und Ausrüstung

- Glasgeräte (Klasse A)

Name	Volumen
Messkolben (Braunglas)	20,0 mL; 50,0 mL
Messkolben	2000,0 mL
Messzylinder [MZ]	50 mL, 500 mL, 1000 mL
Enzympipette [EP]	1,0 mL

- Einmalartikel

Instrumente	Kurzbeschreibung	Hersteller	Art. Nr.
Einmalfilter	REZIST 30 / 1.0 PTFE	Whatman	10 463 505
Einmalspritze	Norm-Ject 2 mL	Henke Sass Wolf	4200.000VO

- Ausrüstung

Instrumente	Kurzbeschreibung/Typ/Model	Hersteller
Analysenwaage, Genauigkeit 0,01 mg	LE 225D-OCE semi-micro balance	Sartorius AG
Analysenwaage, Genauigkeit 0,001 mg	LE 225D-OCE micro balance	Sartorius AG

HPLC-system (bestehend aus)

Geräte	Model	Hersteller
Autosampler	AS-2055-Plus	Jasco GmbH
Intelligent HPLC Pumpe	PU-2080 Plus	Jasco GmbH
Ternary	LG-2080-02	Jasco GmbH
Gradienteneinheit		
3-Line Degaser	DG-2080-53	Jasco GmbH
Intelligent Sampler	3059AS	Jasco GmbH
UV – Detektor	UV-2070-Plus	Jasco GmbH

HPLC-Säule	Kurzbeschreibung/Typ/Model	Hersteller	Art. Nr.
Nova Pack	C18-AQ, 4 µm, 150x3,9 mm	Waters	WAT086344

Falls die oben erwähnten Geräte oder Ausrüstung nicht verfügbar sind, können andere vergleichbare Geräte oder Ausrüstung benutzt werden.

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 5 von 12

3 Herstellung der Eluenten und Lösungen

Eluent A:	Essigsäure 2 %: 40 mL (MZ) Essigsäure werden in einen 2000,0 mL Messkolben gegeben und mit reinst Wasser zur Marke aufgefüllt
Eluent B:	Acetonitril / Essigsäure 2 %; 80 / 20; (v / v): 800 mL (MZ) Acetonitril und 200 mL (MZ) Eluent A werden vermischt
Lösungsmittel:	Aceton / gereinigtes Wasser / Essigsäure 70 / 29,5 / 0,5; (v / v / v)

Vorsicht: Pipettieren von Lösungen die organische Lösungsmittel enthalten

Lösungen, die organische Lösungsmittel enthalten, müssen mit graduierten Pipetten von Strich zu Strich pipettiert werden. Pipetten die auf vollständigem Auslauf geeicht sind, dürfen nicht verwendet werden.

4 Probenvorbereitung

Testlösung

Die Einwaagen müssen entsprechend der Zusammensetzungen der Produkte berechnet werden.

Eine Menge, entsprechend 25 mg [auf 0,01 mg genau angeben] Traubenkernextrakt, wird in einen 20,0 mL Braunglas-Messkolben eingewogen. Nach Zugabe von ca. 8 mL Lösungsmittel wird für 15 min mit Ultraschall behandelt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit Lösungsmittel zur Marke aufgefüllt und gut vermischt. Ein Aliquot wird über einen 1,0 µm Filter in ein HPLC-Vial filtriert. Der erste Milliliter der Filtration wird verworfen.

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 6 von 12

Referenzlösung(en)

Referenzlösung (-)-Catechin (RS-C)

Ca. 3 mg (-)-Catechin [auf 0,001 mg genau angeben] werden in einen 20,0 mL Braunglas-Messkolben eingewogen. Nach Zugabe von ca. 15 mL Lösungsmittel wird für 15 min mit Ultraschall behandelt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur, wird mit Lösungsmittel zur Marke aufgefüllt und gut vermischt. Ein Aliquot wird über einen 1,0 µm Filter in ein HPLC-Vial filtriert. Der erste Milliliter der Filtration wird verworfen.

Referenzlösung (-)-Epicatechin (RS-E)

Ca. 3 mg (-)-Epicatechin [auf 0,001 mg genau angeben] werden in einen 20,0 mL Braunglas-Messkolben eingewogen. Nach Zugabe von ca. 15 mL Lösungsmittel wird für 15 min mit Ultraschall behandelt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur, wird mit Lösungsmittel zur Marke aufgefüllt und gut vermischt. Ein Aliquot wird über einen 1,0 µm Filter in ein HPLC-Vial filtriert. Der erste Milliliter der Filtration wird verworfen.

Die Proben müssen direkt nach der Herstellung vermessen werden.

Informationsskopie - kein Änderungsdiplom
For Information only - No Change Control

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 7 von 12

5 Chromatographische Bedingungen

Eluenten: siehe Kapitel 3 "Herstellungen der Eluenten und Lösungen"

**Autosampler
Spüllösung :** Lösungsmittel
Anzahl der Spülschritte: mind. 3

Gradient:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
3	100	0
6	96	4
15	90	10
30	85	15
50	77	23
60	75	25
66	70	30
80	50	50
83	20	80
85	100	0
105	100	0

Flussrate: 1,0 mL/min

Detektion: Wellenlänge 280 nm
Aufnahmemodus Integrator

Laufzeit: 105 min

Aufzeichnungszeit: 105 min

Säulentemperatur: 22°C

Autosamplertemperatur: Raumtemperatur (nach Pharm. Eur.)

Injektionsvolumen: 10 µL

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 8 von 12

Typische Injektionsreihenfolge

Injektion Lösung	Anzahl der Injektionen	Zweck
Lösungsmittel	2	Reinheitsprüfung
Referenzlösung (RS-C)	1	Kalibrierung
Referenzlösung (RS-E)	1	Kalibrierung
Lösungsmittel	1	Reinheitsprüfung
Testlösung 1	1	Gehalt
...		
Testlösung 10	1	Gehalt
Lösungsmittel	1	Reinheitsprüfung

Informationskopie - kein Änderungsdienst
For Information only - No Change Control

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 9 von 12

6 Quantitative Analyse – Integrationen - Berechnungen

6.1 Integration

Das Fingerprint des Chromatogramms ist optisch durch zwei wellenförmige Bereiche untergliedert. Der erste Bereich mit größerer Amplitude macht in seiner Ausdehnung auf der x-Achse ca. 3/4 aus.

Die Integration erfolgt analog zum Beispielchromatogramm (Abb. 1).

1.) Gesamtfläche (GF)

Start: ca. 8 min

Ende: ca. 75 – 80 min

2.) Fläche (-)-Catechin (C)

3.) Fläche (-)-Epicatechin (E)

Informationskopie - kein Änderungsdienst
For Information only - No Change Control

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 10 von 12

6.2 Berechnung

6.2.1 Prozentuale Gehalte der Oligomeren berechnet über (-)-Catechin

1. Der Gehalt der Referenz muss vor der Konzentrationsberechnung der Referenzlösung berücksichtigt werden. Wenn der Gehalt vom Standard z.B. 98,9% beträgt, wird die Einwaage mit dem Faktor von 0,989 multipliziert bevor die Konzentration berechnet wird.

1. Die Fläche der Oligomeren werden wie folgt berechnet (Abb.1):

Fläche der Monomeren:

$$PF_{\text{Monomere}} = (\text{Fläche (-)-Catechin} + \text{Fläche (-)-Epicatechin})$$

Fläche der Oligomeren:

$$PF_{\text{Oligomere}} = (\text{Gesamtfläche} - \text{Fläche Monomeren})$$

2. Die Gehalte von Oligomeren, berechnet als (-)-Catechin in Prozent [%] werden mit folgender Formel berechnet:

$$G_o = \frac{PF_{\text{Oligomere}} \times K_{RL}}{PF_{RL} \times EW} \times V \times 100$$

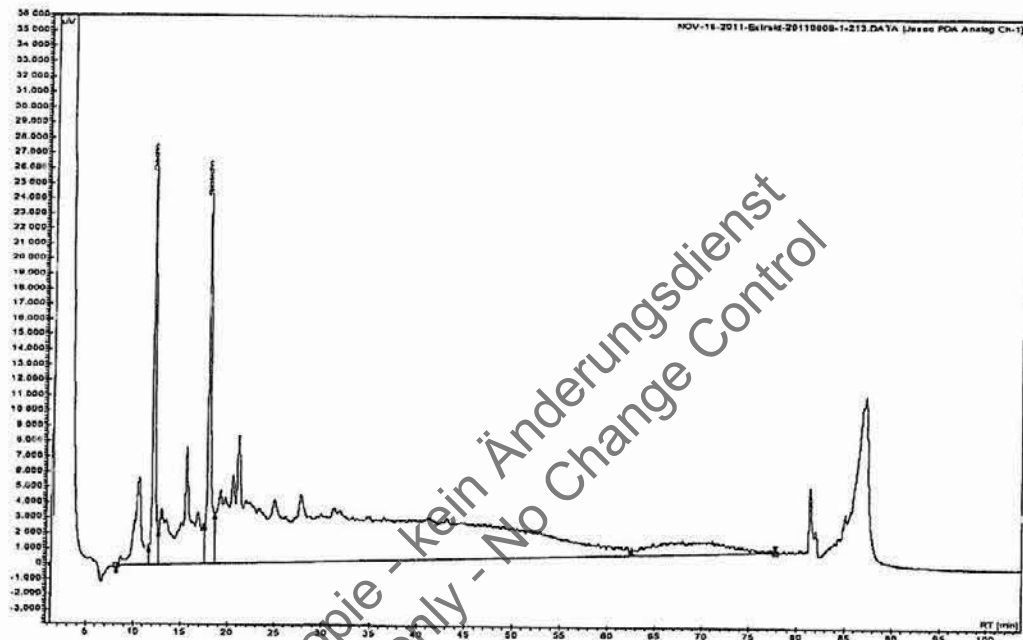
G_o	=	Gehalt von Oligomeren berechnet als (-)-Catechin in [%]
$PF_{\text{Oligomere}}$	=	(Gesamtfläche - Fläche Monomeren)
K_{RL}	=	Konzentrationen von (-)-Catechin in der Referenzlösung in [mg / mL]
PF_{RL}	=	Peakflächen von (-)-Catechin in der Referenzlösung
EW	=	Einwaage der Probe in [mg]
V	=	Volumen des Messkolbens (hier 20,0 mL)
100	=	Umrechnungsfaktor in Prozent

7 Endergebnis

Die Werte von G_o werden mit jeweils zwei Nachkommastellen angegeben.

8 Abbildung

Abb. 1: Beispielchromatogramm – vom 18. November 2011 - Traubenkernextrakt



Peak results :

Vial: 4 , Inj. Volume: 10,000 µl

NOV-16-2011-Extrakt-20110808-1-213.DATA [Jasco PDA Analog Ch-1]

Index	Name	Time (min)	Height (µV)	Area (µV Sec)	Area % (%)
1	UNKNOWN	10.57	6725	323679	3.604
2	Catechin	12.09	25486	533578	5.941
3	UNKNOWN	15.63	7627	835887	9.306
4	Epicatechin	17.94	23686	527386	5.872
6	UNKNOWN	21.09	8321	6295527	70.091
5	UNKNOWN	87.92	882	465937	5.187
Total			71728	8981995	100.000

Phytos GmbH & Co. KG	Prüfvorschrift / SOP
Traubenkernextrakthaltige Proben: OPC-Gehalte mit RP-HPLC	PV.03.P194_02
	Seite: 12 von 12

9 Änderungsindex

Ausgabe	Änderungen
02	Kapitel 1: „Zweck und Arbeitsbereich“ wurde besser beschrieben
01	Neues Dokument

Informationenskopie - kein Änderungsdienst
For Information only - No Change Control