

Валидиране на HPLC метод за определяне на кофеин в безалкохолни напитки

Мария Кънева, Искра Върбанова, Радостина Трендафилова,
Пламена Неделчева, Георги Костов, УХТ Пловдив

Резюме

В работата е представена методика за лабораторно валидиране на HPLC метод за определяне на кофеин в безалкохолни напитки. Разработена е калибрационна права с обхват 0 до 500 mg/dm³ с много добра линейност ($r^2 = 0,9996$). Точността и прецизността на аналитичния метод са определени посредством „метод на добавката“. Като количествена мярка за оценка на точността е използван аналитичният добив. Неговите стойности варират между 100% и 104%. Прецизността на метода е определена чрез повторемостта и възпроизводимостта в рамките на лабораторията, използвайки относителното стандартно отклонение (RSD). Стойностите на RSD са съответно 0,1 – 0,8% и 0,8 – 1,4%. В резултат на валидацията са доказани качеството и надеждността на получаваните аналитични резултати за съдържание на кофеин в безалкохолни напитки чрез използвания при конкретните условия HPLC метод.

Ключови думи: валидиране, HPLC, кофеин, безалкохолни напитки



Validation of HPLC method for analysis of caffeine in soft drinks

Maria Kaneva, Iskra Varbanova, Radostina Trendafilova,
Plamena Nedelcheva*, Georgi Kostov
University of food technologies - Department of Wine and Beer
Technology, *Department of Biochemistry and Molecular Biology
26, Maritza bul., Plovdiv 4002, Bulgaria,
Phone number: +359 32 603 796, e-mail: m_kaneva@abv.bg

Summary

The HPLC method for determination of caffeine in soft drinks was intralaboratory validated. The response was linear over a range of 0 – 500 mg/dm³ ($r^2 = 0,9996$). The accuracy and precision of analytical method were determined using spiked samples. The accuracy was reported as percent recovery. The range of recovery was 100 – 104 %. The relative standard deviation (RSD) was used to estimate repeatability and intermediate precision. The RSD values were 0,1 – 0,8 % and 0,8 – 1,4 % respectively. The validation data proved the quality and the reliability of analytical results obtained by HPLC method to quantify caffeine in soft drinks at given conditions.

Keywords: validation, HPLC, caffeine, soft drinks

1. Въведение

Кофеинът е естествен компонент на доста растения, по-известни от които са кафето, чаеното растение (*Camellia sinensis*), гуараната (*Paullinia cupana*) и др. Той се съдържа и в редица храни и напитки. Компонент е на енергийните напитки и напитките тип „кола“. В други видове безалкохолни напитки се среща сравнително рядко. Той е известен със своето стимулиращо и ободряващо действие. Интересът към него се обуславя от разнообразните физиологични ефекти, които оказва върху хората. Освен, че стимулира централната нервна система, той има и диуретично действие. При хора, които са чувствителни към кофеин или при по-високи дози може да доведе до безсъние, раздразнителност, нервност (Grembecka and Szeffer, 2012).

Консуматорите обръщат все по-голямо внимание на съдържанието на хранителните продукти, в това число и на количеството кофеин в напитките. Използването на надеждни аналитични методи е важно условие за

⇒ коректността на получаваните резултати. Съществуват различни методи за определяне на кофеин в храни и напитки: спектрофотометрични, потенциометрични, високоефективна течна хроматография (HPLC), йонна хроматография, високоефективна тънкослойна хроматография, капилярна електрофореза, газова хроматография (Ken-Hong, 2006).

За да се осигури надеждност на аналитичните данни, преди въвеждането на аналитичния метод за рутинно използване в дадена лаборатория е необходимо методът да бъде валидиран. Това е процес, чрез който се потвърждава, че прилаганата аналитична процедура е подходяща за извършване на съответния анализ (Huber, 2012). Счита се, че валидираният метод е напълно характеризирани, а получаваните резултати отговарят на целите за които се използва методът (Prichard, 2006).

В специализираната литература могат да бъдат открити редица публикации относно валидирането на различни аналитични методи, но общоприета процедура по валидиране липсва. Създаването на процедура за валидиране на аналитичния метод е отговорност на ползвателя на аналитичния метод. Той трябва да адаптира общоприетите принципи за валидиране към спецификата и изискванията за всеки метод (Merck, 2013). За да е ефективен процесът на валидиране е важно да се подберат подходящите параметри, които ще се оценяват и критериите по които се оценяват. Понякога се срещат разлики в дефинициите, използвани от различни организации. Повече параметри изискват повече време за валидиране. Не е необходимо винаги да се оценяват всички параметри, но е от значение да се определи, кои са важни за конкретно поставената цел (Huber, 2012).

Базирайки се на Международната конференция по хармонизация на техническите изисквания за регистрация на лекарствени продукти за човешка употреба (ICH – International Conference on Harmonization of Pharmaceuticals for Human Use) Ludwig Huber прави обобщение на параметрите, които се оценяват при валидиране на аналитични методи. В този обобщен списък са включени: *специфичност* (specificity), *селективност* (selectivity), *прецизност* (precision) – *повтаряемост* (repeatability), *възпроизводимост в границите на лабораторията* (intermediate precision), *възпроизводимост* (reproducibility), *точност* (accuracy), *аналитичен добив* (recovery), *изместване* (bias), *линейност* (linearity), *обхват* (range), *граница на откриване* (limit of detection), *граница на определяне* (limit of quantitation) и други (Huber, 2012).

Целта на настоящата работа е да се представи процедура за лабораторно валидиране и резултатите от валидирането на HPLC метод за определяне на кофеин в безалкохолни напитки.

2. Материали и методи

2.1. Материали (Реактиви, химикали и стандарти)

Използван е ацетонитрил (Sigma-Aldrich) за HPLC анализи, а кофеинът (Merck) е с чистота 99,6%. Всички останали реактиви са със степен чисти за анализ. За всички водни разтвори е използвана дейонизирана вода от система за обратна осмоза RO103TDS на фирма Pure Pro.

2.2. HPLC метод за определяне на кофеин

Методът за определяне на кофеин е приложен според процедурата описана в работата на Ken-Hong

(Ken-Hong, 2006), като вместо две хроматографски колони е използвана само една. Хроматографският анализ е осъществен на HPLC система - Agilent 1220 Infinity LC, оборудвана с колона Agilent HC-C18(2) 150 mm x 4.6 mm, 5 μm. Подвижната фаза е смес от ацетонитрил и дейонизирана вода 20:80 % (v/v), подкислена до рН 3.0 с фосфорна киселина и с добавка на натриев дихидрогенфосфат. Скоростта на потока е 1 ml/min, а детекцията е извършена при 254 nm. Инжектираните проби са с обем 20 μl. Подвижната фаза и пробите преди инжектиране са филтрирани през филтър 0,45 μm. Осъществено е и дегазиране на пробите и подвижната фаза с помощта на ултразвук.

2.3. Параметри, използвани за валидиране на HPLC метода

А. Линейност на стандартната крива (linearity)

За построяване на стандартната крива е приготвен основен разтвор на кофеин, от който чрез разреждане са получени 8 стандартни разтвора на кофеин с концентрации 25, 50, 100, 200, 250, 300, 400 и 500 mg/dm³. Концентрациите са съобразени със съдържанието на кофеин в безалкохолните напитки. Като празна проба се използва дейонизирана вода. Пробите са инжектирани трикратно. Линейността е оценена чрез уравнението на стандартната крива и коефициентът на детерминация r².

Б. Точност (accuracy)

Точността на метода е проверена като към безалкохолна напитка „студен чай“, която не съдържа кофеин, е добавен кофеин в концентрации покриващи диапазона на стандартната крива. С напитката е приготвен основен разтвор на кофеин с концентрация 1,0072 g/dm³ от който чрез разреждане са получени работните проби със следните концентрации – 81 mg/dm³, 242 mg/dm³ и 483 mg/dm³. За всяка от трите концентрации са приготвени по три проби (общо 9), като всяка от тях е инжектирана трикратно. За оценка на точността е използван аналитичният добив (recovery), който се изчислява по следната формула:

$$R = \frac{C_{изм}}{C_p} \cdot 100, \%$$

RR -аналитичен добив, %
C_{изм}, **C_{изм}** -измерената концентрация на анализа в пробата
C_p, **C_p** -концентрацията на анализа, реално добавен в пробата

В. Прецизност (precision)

Прецизността е оценена чрез повтаряемостта (repeatability) и възпроизводимост в рамките на лабораторията (intermediate precision) като е използвано относителното стандартно отклонение (или още коефициент на вариации):

$$RSD = \frac{S}{X_{cp}} \cdot 100, \%$$

RSD -относително стандартно отклонение, %
SS -стандартно отклонение, изразено в концентрационни единици
X_{cp}, **X_{cp}** -средната стойност от **n** измервания в концентрационни единици

Г. Повтаряемостта на метода

Този параметър е проверен като е разработена същата схема от 9 проби както за проверка на точността. Всяка от деветте проби е инжектирана трикратно в условията на повтаряемост – в един и същи ден, от един и същи оператор, на едно и също техническо средство.

Д. Възпроизводимост в рамките на лабораторията.

Всяка от деветте проби е инжектирана трикратно в рамките на един ден, от един и същи оператор. Същата процедура е повторена в друг ден от друг оператор.

Е. Границата на откриване (LOD) и границата на количествено определяне (LOQ) на метода

Границите са изчислени въз основа на регресионен анализ на данните от калибрационната крива при малки концентрации на кофеин (от 0 до 100 mg/dm³), според процедура описана от Shrivastava и Gupta (Shrivastava and Gupta,2011). Изчислено е стандартното отклонение на получените от регресионния анализ данни за остатъците (y-residuals) на площта на пика. Използван е и наклонът на калибрационната крива, както и следните формули за изчисляване на LOD и LOQ:

$$LOD=3.STDEV/b \quad LOQ=10.STDEV/b$$

където: STDEV – стандартно отклонение на остатъците (y-residuals) на площта на пика; b – наклон на калибрационната крива (slope)

2.4. Статистическа обработка на резултатите

Използвани са вградени функции на Excel за изчисляване на стандартно отклонение и регресионен анализ ANOVA.

3. Резултати и обсъждане

На фиг.1 е представена типична хроматограма за определяне на концентрацията на кофеин при лабораторното валидиране на метода. Въз основа на набор от сходни анализи са определени и параметрите в процеса на валидиране.

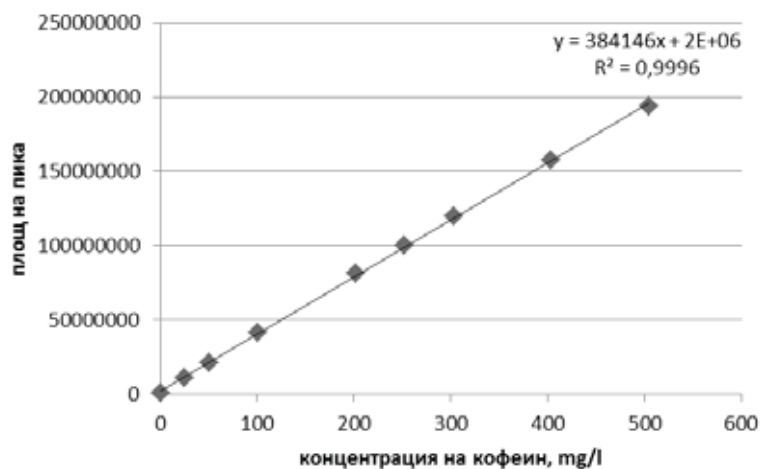
3.1. Линейност на стандартната крива (linearity)

Линейността е интервала от концентрации на определяния компонент, в който сигналът от детектора е в линейна зависимост от концентрацията му. Тя се определя чрез серия от 3 до 6 инжектирания на 5 или повече стандартни концентрации, които покриват 80 – 120 % от областта на очакваните концентрации в пробите (Huber,2012).

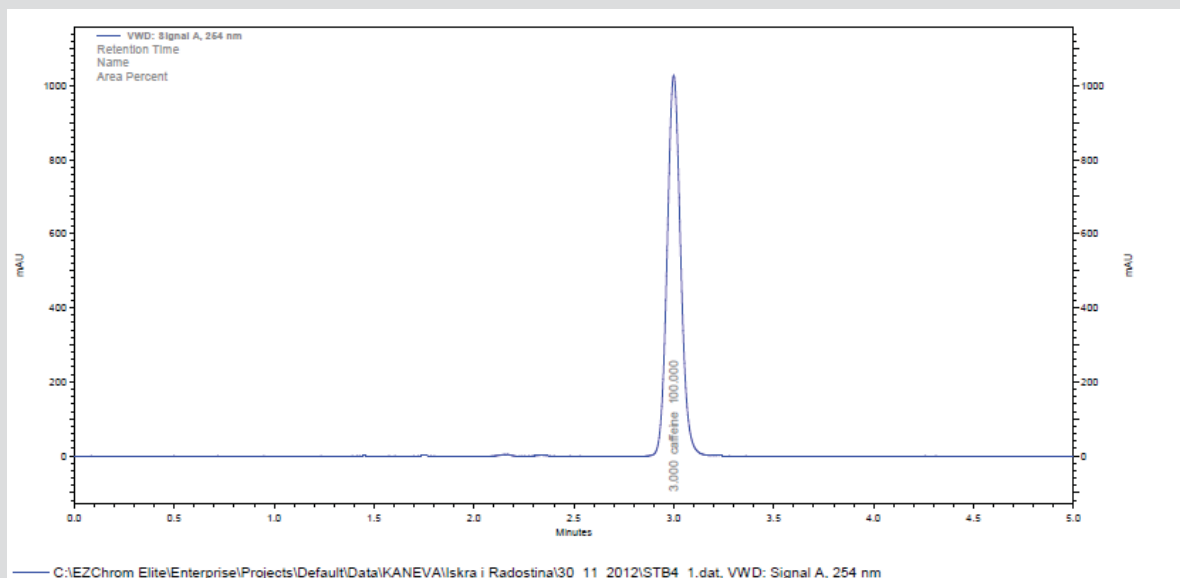
Средноаритметичните стойности от площта на пиковете, получени в резултат на трикратното инжектиране на осемте стандартни разтвора на кофеин и празната проба са използвани за намиране уравнението на кривата чрез вградени функции на Excel. Получено е уравнението $y = 384146.x + 2.10^6$, с коефициент на детерминация $r^2 = 0,9996$. Близката до единица стойност на коефициента r^2 е индикация за силно изразена линейна зависимост между сигналът от детектора (площта на пика) и концентрацията на кофеин в пробите (фиг.2).

3.2. Точност (асигураж)

Точността на аналитичния метод се определя като степен на съвпадение между резултата от измерването и истинската стойност на измерваната



Фиг.2 Стандартна крива на зависимостта между концентрацията на кофеин и площта на пика



Фиг. 1 Хроматограма на стандартен разтвор на кофеин

⇒ величина, т.е. показва до колко близко е измерването до истинската (коректната) стойност. Количествена мярка за точността е аналитичният добив (R), изразен в %. Той може да се определи чрез добавяне на познато количество от анализирания компонент (аналит) към проба, която не съдържа този компонент и сравняване на измерената стойност за концентрацията на анализа с реално добавеното количество анализ. Препоръчва се да се направят минимум 9 измервания, при минимум 3 концентрации на анализа, покриващи обхвата на метода (например три проби с добавка на анализ в различни концентрации, всяка от които се инжектира 3 пъти) (Huber,2012).

Аналитичният добив зависи от матрицата на пробата (вид и състав на пробата), процедурата за подготовка на пробата и концентрацията на анализа. В зависимост от концентрацията на анализа, средният аналитичен добив трябва да бъде в определени граници. За концентрация на анализа 100 mg/dm³ е възприето средният аналитичен добив да е между 90% и 107%, а при концентрация на анализа 1000 mg/dm³ между 95% и 105% (Huber,2012).

Резултатите от HPLC анализа на деветте проби безалкохолни напитки с добавка на кофеин в концентрации – 81 mg/dm³, 242 mg/dm³ и 483 mg/dm³, както и стойностите за аналитичният добив са представени в табл.1. Видно е, че аналитичният добив е 104% за пробите с концентрация на кофеин 81 mg/dm³; 102% за пробата с концентрация 242 mg/dm³; 100 - 101% за пробата с концентрация 483 mg/dm³. Изчислените аналитични добиви са в границите от 95 до 105%, каквото е изискването за аналитичен добив при концентрация на анализа 1000 mg/dm³. Това е потвърждение, че използваният метод за определяне на кофеин в безалкохолни напитки чрез HPLC е с необходимата точност.

Таблица 1

Данни от проверка на точността на HPLC метода за определяне на кофеин в безалкохолни напитки

проба номер	Съдържание на кофеин (средноаритметично от три инжектирания), mg/dm ³	Реално добавено количество кофеин в напитката, mg/dm ³	Аналитичен добив (recovery), %
1	84.0	81	104
2	84.1	81	104
3	84.3	81	104
4	246.3	242	102
5	247.1	242	102
6	247.9	242	102
7	483.6	483	100
8	485.9	483	101
9	485.8	483	101

3.3. Прецизност (precision)

Прецизността е „степен на съвпадение на резултатите от изпитването, получени при определени условия” (Merck, 2013, БДС ISO5725-1). Чрез прецизността се оценява колко близки са отделните резултати. Количествена мярка за оценка на прецизността е стандартното отклонение (S), изчислено на база стойностите от n измервания, получени с дадения метод, при определени условия. Много често, за удобство на

сравненията, стандартното отклонение се представя чрез относителното стандартно отклонение (RSD), или наричано още коефициент на вариации (CV).

Стандартното отклонение, съответно относителното стандартно отклонение може да се използва за определяне на: повторяемост (repeatability), възпроизводимост в рамките на лабораторията (intermediate precision) и възпроизводимост (reproducibility). И трите са елементи от оценка на прецизността на аналитичният метод.

Повторяемостта (repeatability) е степента на съвпадение на резултатите от изпитването, получени при условия на повторяемост, а именно – резултатите са от последователни измервания на една и съща величина, при изпитване на една и съща проба, извършени в кратък интервал от време, при едни и същи условия на околната среда, от един оператор на едно и също техническо средство, което не е калибрирано отново в същия интервал от време.

Един от подходите за определяне на повторяемостта (repeatability) изисква поне 9 повторения на измерването, които покриват напълно областта на приложение на метода (Huber,2012). Това може да се постигне чрез 3 проби с различна концентрация и трикратно измерване на величината за всяка от трите проби.

За оценка на прецизността в зависимост от концентрацията на анализа са възприети следните стойности за относителното стандартно отклонение: 5,3% при концентрация на анализа 100 mg/dm³ и 3,7% за концентрация 1000 mg/dm³ (Huber,2012).

Резултатите от HPLC анализа на пробите с добавка на кофеин, получени в условия на повторяемост, изчислените средни стойности на концентрация на кофеин и относителните стандартни отклонения са представени в табл.2. Относителното стандартно отклонение за пробите с концентрация на кофеин 81 mg/dm³ е от 0,1% до 0,8 %, за пробите с концентрация 242 mg/dm³ е от 0,1% до 0,5 %; за пробите с концентрация 483 mg/dm³ е от 0,1% до 0,5 %.

Получените стойности за относително стандартно отклонение са далеч по-малки от изискваните 5,3% при концентрация на анализа 100 mg/dm³ и 3,7% при концентрация на анализа 1000 mg/dm³. Това безспорно демонстрира, че използваният метод за определяне на кофеин в безалкохолни напитки чрез HPLC е с много добра повторяемост (repeatability).

Възпроизводимостта в рамките на лабораторията (intermediate precision)

се определя като степен на съвпадение на резултати, получени чрез един и същи метод, при изпитване на идентични проби от различни оператори, по различно време с едно и също техническо средство. Чрез нея се преценява до колко в една и съща лаборатория, използваният метод дава еднакви резултати. За оценка на възпроизводимостта в рамките на лабораторията се използва относителното стандартно отклонение, като стойностите му в зависимост от концентрацията на анализа са същите както когато RSD се използва за оценка на

Таблица 2

Данни от проверка на повторяемостта на HPLC метода за определяне на кофеин в безалкохолни напитки

проба номер	концентрация на кофеин, mg/dm ³		RSD, %
	данни от трите инжектирания	средно аритметично	
1	84.0 ; 84.1 ; 83.8	84.0	0.2
2	84.7 ; 83.4 ; 84.2	84.1	0.8
3	84.4 ; 84.3 ; 84.2	84.3	0.1
4	246.9 ; 246.0 ; 246.1	246.3	0.2
5	247.0 ; 247.1 ; 247.3	247.1	0.1
6	249.3 ; 247.5 ; 247.0	247.9	0.5
7	485.1 ; 483.4 ; 482.2	483.6	0.3
8	486.1 ; 485.4 ; 486.1	485.9	0.1
9	488.0 ; 486.0 ; 483.3	485.8	0.5

Таблица 3

Данни от проверка на възпроизводимостта в границите на лабораторията

проба номер	концентрация на кофеин средно, mg/dm ³		RSD, %
	Ден 1	Ден 2	
1	84.0	82.4	1.4
2	84.1	83.2	0.8
3	84.3	83.4	0.8
4	246.3	241.6	1.4
5	247.1	242.3	1.4
6	247.9	243.8	1.2
7	483.6	477.2	0.9
8	485.9	476.5	1.4
9	485.8	479.2	1.0

повторяемостта.

Възпроизводимостта в рамките на лабораторията на метода за определяне на кофеин в безалкохолни напитки е оценена като са използвани данните за концентрация на кофеин в пробите, анализирани при оценка на повторяемостта и резултатите от инжектиране на същите проби от друг оператор, в ден различен от първите анализи. Въз основа на средните стойности за концентрацията на кофеин, получени в двата дена е изчислено RSD за всяка проба. Данните са отразени в табл.3. Относителното стандартно отклонение варира от 0,8% до 1,4%. Това е значително по-малко от изискваните 5,3% при концентрация на анализа 100 mg/dm³ и 3,7% при концентрация на анализа 1000 mg/dm³ и потвърждава, че използваният метод за определяне на кофеин в безалкохолни напитки чрез HPLC е с много добра възпроизводимост в рамките на лабораторията (intermediate precision).

Граница на откриване (LOD) и граница на количествено определяне (LOQ)

Направен е регресионен анализ на данните от ка-

либрационата крива при малки концентрации на кофеин в резултат на което е получено следното линейно уравнение, $y = 640074 + 403736 \cdot x$, където y е площта на пика, а x е концентрацията на кофеин в mg/dm³. Изчислено е стандартното отклонение на остатъците (y-residuals) от регресионния анализ. Въз основа на стандартното отклонение на остатъците на площта на пика и наклона на калибрационната кривата ($b=403736$) е намерено, че за настоящия метод за определяне на кофеин в безалкохолни напитки чрез HPLC границата на откриване е 0,7 mg/dm³, а границата на количествено определяне е 2,4 mg/dm³.

Изводи

Осъществена е процедура по валидиране на HPLC метод за определяне на кофеин в безалкохолни напитки въз основа на данните за линейност, точност, повторяемост и възпроизводимост в рамките на лабораторията, при конкретните условия на метода. Изчислено са границата на откриване и границата на количествено определяне. Потвърдена е приложимостта на HPLC метод за определяне на кофеин в безалкохолни напитки при конкретните условия на провеждане.

Литература

1. БДС ISO5725-1 Точност (истинност и прецизност) на методи и резултати от измерване. Част 1: Общи принципи и определения.
2. Grembecka, M., P. Szeffer (2012) Simultaneous Determination of Caffeine and Aspartame in Diet Supplements and Non-Alcoholic Beverages Using Liquid-Chromatography Coupled to Corona CAD and UV-DAD Detectors. Food Anal. Methods, 5, p1010-1017.
3. Huber, L. (2012) Validation of Analytical Methods and Procedures. Available from <http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx>, access 11.2012.
4. Ken-Hong Chou (2006) Caffeine content of national and store brand carbonated beverages. A Thesis, Master of Science, Auburn, Alabama.
5. Merck (2013) Методи за изпитване на специфични проби, „Мерк България“ ЕАД, София 2013.
6. Prichard, E. (2006) Quality assurance for chemical analysis (превод на български Соня Ганева). Available from: <http://ncphp.government.bg/files/QUACHA-BG%20translation.pdf>, access 09.2013.
7. Shrivastava, A., V.B. Gupta (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chron Young Sci [serial online] 2011 [cited 2013 Apr 8];2:21-5. Available from: <http://www.cyonline.org/text.asp?2011/2/1/21/79345>, access 04.2013.

За контакт с авторите:

гл.ас.д-р Мария Кънева, Искра Върбанова, Радостина Трендафилова, доц.д-р Георги Костов, гл.ас.д-р Пламена Неделчева*, катедра „Технология на виното и пивото“, катедра „Биохимия и молекулярна биология“, Университет по хранителни технологии, Пловдив 4002, бул. „Марица“ № 26, тел. 032 603 796, e-mail: m_kaneva@abv.bg