Application Note

Agilent
Trusted Answers

Analyse von Handdesinfektionsmitteln mit dem Agilent 8860 GC in Konfiguration mit einem Flammenionisationsdetektor

Autoren

Jie Zhang
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

In dieser Application Note wird die Analyse von Handdesinfektionsmitteln auf Ethanol- und Isopropanolbasis beschrieben. Zur Optimierung der chromatographischen Auflösung und der Peakform wurde eine Agilent J&W DB-WAX-Säule verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Ein interner Kalibrierungsstandard (IS) diente zur Quantifizierung auf Basis der Methode <611> der US Pharmacopeia (USP). Untersucht wurde die Eignung des Geräts im Hinblick auf den Peaktailing-Faktor, die Auflösung zwischen Alkoholen und internem Standard und die Reproduzierbarkeit der Quantifizierung.

Einleitung

Ethanol und Isopropylalkohol (IPA) sind die wichtigsten aktiven Bestandteile von Handdesinfektionsmitteln. Zur Aufrechterhaltung der Wirksamkeit sollte die Ethanol- oder Isopropylalkohol(IPA)-Konzentration in einem geeigneten Bereich bleiben, in der Regel zwischen 65 und 75 %, wie auf dem Desinfektionsmittelbehälter angegeben. Da in Desinfektionsmitteln andere Alkohole als Verunreinigungen oder als unzulässige Zusätze zur Herstellung gefälschter Produkte vorliegen können, ist es wichtig, die richtigen Alkohole in der erforderlichen Konzentration nachweisen zu können. Eine von der USP empfohlene Technik zur Bestimmung der Alkoholkonzentration ist die Gaschromatographie (GC). Die GC kann darüber hinaus auch Informationen über die Retentionszeit liefern, mit der sich die Identität eines Alkohols verifizieren lässt, um nachzuweisen, dass das Handdesinfektionsmittel nicht verunreinigt ist. Mit ihren Möglichkeiten zur quantitativen und quantitativen Analyse wird die Gaschromatographie weiterhin eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle von Handdesinfektionsmitteln spielen.

Die Methoden zur Bestimmung von Alkoholen, wie beispielsweise USP <611>[1] und ASTM D3695[2] empfehlen eine mäßig polare oder polare Säule, um eine gute Trennung und Response der Alkoholkomponenten zu erhalten. Wie unsere früheren Arbeiten[3] gezeigt haben, können Agilent J&W DB-Wax- oder Agilent DB-624 Ultra Inert-Säulen bei Alkoholen schärfere und symmetrischere Peakformen liefern. Zum Nachweis von Alkoholen wird ein FID empfohlen, da er einfach zu bedienen ist und innerhalb des geprüften Konzentrationsbereichs nach Verdünnen der Alkohole während der Probenvorbereitung eine stabile und adäquate Response ergibt. Für diese Arbeit wurde eine DB-WAX Ultra Inert-Säule auf einem Agilent 8860 GC in Kombination mit einem FID für die Alkoholanalyse eingesetzt. Die Systemleistung wurde im Hinblick auf Reproduzierbarkeit der Retentionszeit, Peakauflösung, Peaktailing-Faktor und Präzision der Quantifizierung beurteilt. Ziel war es, die Eignung des 8860 GC/FID-Systems gekoppelt mit einer Agilent Ultra Inert-Säule für die Alkoholanalyse von Handdesinfektionsmitteln nachzuweisen.

Experimentelles

Das Agilent 8860 GC ist mit einem Split/Splitless-Einlass und einem FID ausgerüstet. Die Zuführung der flüssigen Proben erfolgte mithilfe des Agilent 7693A automatischen Flüssigprobengebers (ALS) mit einer 5-µl-Spritze. Die Analyseparameter sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Chemikalien und Standards

Die Alkohol-Lösemittel und ACN (IS) wurden von ANPEL Scientific Instrument (Shanghai, China) bezogen. Die Glycerin-Arbeitslösung wurde hergestellt, indem 58,4 mg Glycerin (circa 50 µl) eingewogen und mit destilliertem Wasser auf 1 ml verdünnt wurden. Die berechnete Konzentration der Glycerin-Arbeitslösung betrug 4,6 Vol.-%. Die Alkohol-Kalibrierungsstandards wurden durch Zugabe von Aliquoten der reinen Alkohole oder ihrer Arbeitslösung zu destilliertem Wasser bis zu einem Endvolumen von 1 ml hergestellt.

Ethanol, IPA und Glycerin gehören zu den Kalibrierungslösungen der Gruppe 1. Der Kalibrierungsbereich für Ethanol und IPA liegt zwischen 1 und 4 Vol.-%. Die Glycerinkonzentration betrug zwischen 0,01 und 0,18 Vol.-%. Methanol und *n*-Propanol (n-PA) wurde im Rahmen der Kalibrierungslösungen der Gruppe 2 vorbereitet. Der Kalibrierungsbereich von Methanol lag zwischen 1 und 4 Vol.-%, der von *n*-Propanol zwischen 0,1 und 1,5 Vol.-%. Der interne Standard (IS) Acetonitril (ACN) wurde den Kalibrierungslösungen in einer Konzentration von 5 Vol.-% zugesetzt. Die Kalibrierungslösungen wurden wie in Tabelle 2 dargestellt hergestellt. Die QK-Probe wurde durch Verdünnen von 25 µl Ethanol, 25 µl IPA und 50 µl Acetonitril mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1 ml hergestellt.

Die Probe des Handdesinfektionsgels war zu stark viskos für eine direkte Flüssigkeitsinjektion und musste vor der Injektion durch den 7693A automatischen Flüssigprobengeber verdünnt werden. Das ist der Grund dafür, dass die realen Proben und die Kalibrierungsstandards mit Lösemittelverdünnung hergestellt wurden. Die Handdesinfektionsmittelprobe mit einem Volumen von 50 µl wurde mithilfe einer gasdichten 1-ml-Spritze in ein Fläschchen gegeben. Dann wurden 50 µl Acetonitril als IS zugegeben, und die Probe wurde zur späteren Analyse mit destilliertem Wasser auf 1 ml verdünnt.

Tabelle 1. Analytische Parameter eines Agilent 8860 GC-FID für Alkoholstandards.

Agilent 8860 GC-Parameter	
S/SL-Einlass	250 °C, Splitverhältnis 20:1
Injektionsvolumen	0,2 µl
Trägergas	He
Säulenflussrate	7 ml/min, konstanter Fluss
Ofen	50 °C (5 min), 30 °C/min bis 230 °C (3 min)
FID	250 °C, Luft: 400 ml/min, Brenngas (H_2): 30 ml/min; Makeup-Gas (N_2) konstant: 18 ml/min
Säule	Agilent J&W DB-WAX UI, 30 m, 530 µm, 1 µm (Best.-Nr. 125- 7032UI)
Einlass-Liner	Agilent Ultra Inert, geringer Druckabfall, mit Glaswolle (Best.-Nr. 5190-2295)

Ergebnisse und Diskussion

Diese Application Note konzentriert sich auf die Analyse der wichtigsten Alkoholkomponenten in Handdesinfektionsmitteln sowie einer möglichen Verunreinigung durch Methanol. Der Kalibrierungsstandard umfasste fünf Arten von Alkoholen: Methanol, Ethanol, IPA, *n*-Propanol und Glycerin. Die Konzentrationen von Ethanol, IPA und *n*-Propanol wird in der Regel auf dem Etikett angegeben, weil sie eng mit der Wirksamkeit gegen Viren korrelieren. Glycerin und andere Arten von Alkoholen können in realen Proben ebenfalls nachgewiesen werden, jedoch wird von den Herstellern für diese Alkohole keine spezifische Konzentration auf das Etikett aufgedruckt. Die Einbeziehung von Glycerin in den Kalibrierungsstandard soll zeigen, dass das beschriebene System einen akzeptablen Peak ergibt und einen adäquaten Nachweis spät eluierender und viskoser Alkohole wie Glycerin erlaubt.

Die Trennung von fünf Alkoholen und einem internen Standard in wässriger Lösung mit Komponentenkonzentrationen, die von 1,0 bis 4 Vol.-% reichten, wurde auf einer Ultra Inert DB-WAX-Säule durchgeführt. Diese Probe war eine Mischung aus den Kalibrierungsstandards der Gruppe 1 und Gruppe 2 mit mittlerer Konzentration und dem Arbeitsstandard Glycerin. Wie im Chromatogramm (Abbildung 1) und Tabelle 3 gezeigt, waren die Tailing-Faktoren aller Peaks kleiner als 1,2. Methanol und IPA eluierten vor Ethanol. Die Auflösung zwischen *n*-Propanol und Acetonitril (IS) betrug 9, die Auflösung zwischen Ethanol und Acetonitril lag bei 12. Der USP-Standard <611> erfordert Tailing-Faktoren für Alkoholpeaks von weniger als 2,0 und Peakauflösungen gegenüber dem internen Standard von mehr als 4,0. Die auf dem 8860 GC erzielte Auflösung und Peakform bei einem Flussweg, der am S/SL-Einlass begann, die analytische Säule umfasste und beim FID endete, belegten, dass das System für eine gezielte Alkoholanalyse geeignet ist.

Die Auflösung zwischen Ethanol und IPA lag bei 1,31. Eine Basislinientrennung wurde zwar nicht erzielt, dies beeinträchtigt jedoch in der Regel die genaue Quantifizierung von Ethanol oder IPA nicht, da sie in den meisten Fällen ohnehin nicht zusammen im selben Handdesinfektionsmittel enthalten sind. Für den Fall, dass sie gleichzeitig vorliegen, ist die Auflösung von 1,31 ausreichend für eine genaue Quantifizierung des

Tabelle 2. Herstellung von Alkohol-Kalibrierungsstandards.

Konzentration Nr.	Kalibrierungsstandards der Gruppe 1			Kalibrierungsstandards der Gruppe 2	
	Ethanol (µl)	IPA (µl)	Glycerin-Arbeitslösung (µl)	Methanol (µl)	*n*-Propanol (µl)
1	40 (4,0 %)	10 (1,0 %)	2 (0,0092 %)	49 (4,9 %)	1 (0,1 %)
2	35 (3,5 %)	15 (1,5 %)	5 (0,023 %)	45 (4,5 %)	5 (0,5 %)
3	30 (3,0 %)	20 (2,0 %)	10 (0,046 %)	40 (4,0 %)	10 (1,0 %)
4	25 (2,5 %)	25 (2,5 %)	20 (0,092 %)	35 (3,5 %)	15 (1,5 %)
5	20 (2,0 %)	30 (3,0 %)	40 (0,184 %)	30 (3,0 %)	n. z.
6	15 (1,5 %)	35 (3,5 %)	n. z.	25 (2,5 %)	
7	10 (1,0 %)	40 (4,0 %)		20 (2,0 %)	
8	n. z.	n. z.		15 (1,5 %)	
9				10 (1,0 %)	

Das Endvolumen der Kalibrierungslösungen mit verschiedenen Konzentrationen beträgt 1 ml.
Die verschiedenen Alkoholkonzentrationen sind in Klammern angegeben.

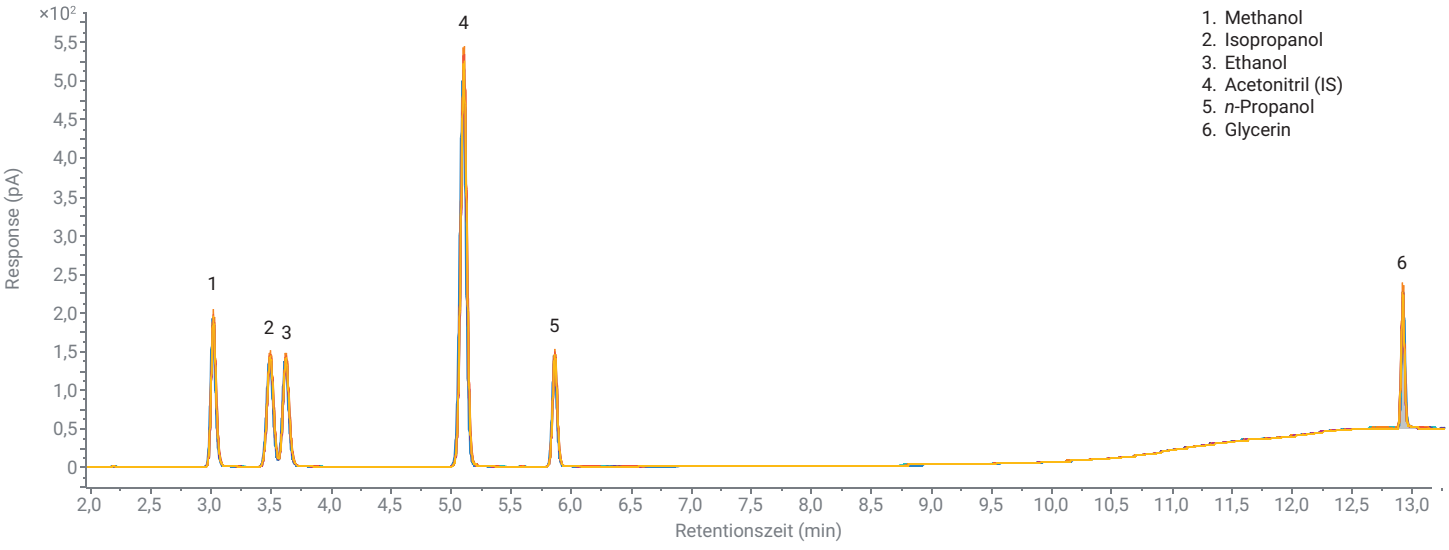


Abbildung 1. Überlagerung der Chromatogramme von Alkoholstandards, die auf einem Agilent 8860 GC/FID-System, installiert mit einer Agilent DB-WAX Ultra Inert-Säule, analysiert wurden.

Hauptalkohols, was sich am folgenden Analyseergebnis für eine Probe eines Handdesinfektionsgels zeigen lässt.

Die Kalibrierungskurven für die Alkohole wurden mithilfe einer Kalibriermethode mit internem Standard erstellt. Wie in Abbildung 2 und Tabelle 3 gezeigt, betragen die Korrelationskoeffizienten (R^2) für die Alkohole in deren gesamtem Kalibrierungsbereich 0,997 bis 0,999.

Die Präzision der Quantifizierung wurde durch sieben Injektionen einer Alkoholmischung geprüft, Konzentration der Alkohole bei jeweils 1 bis 2 Vol.-% lag. Die resultierenden überlagerten Chromatogramme sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Quantifizierungspräzision wurde anhand der relativen Standardabweichung (RSD) des Response-Verhältnisses eines jeden Alkohols zu Acetonitril bei den sieben Injektionen beurteilt. In den meisten Fällen war die Quantifizierungspräzision besser als 1 %, ausgenommen Glycerin mit einer RSD von 1,7 %. Die Norm USP <611> verlangt, dass die RSD des Verhältnisses zwischen dem Alkohol-Peak und dem Peak des internen Standards nicht mehr als 4,0 % beträgt. Die Leistung der geprüften Plattform bezüglich der Präzision übertraf diese Anforderung von USP <611>.

Es wurde eine Alkoholanalyse von zwei Handdesinfektionsgelen und einem Handdesinfektionsspray durchgeführt. Die Chromatogramme der drei Produkte sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Prüfergebnisse für die Hauptalkohole in den einzelnen Proben sind in den eingefügten Tabellen aufgelistet. In der Probe des Desinfektionsgels Nr. 1 wurden Ethanol, *n*-Propanol und Glycerin identifiziert. Die ermittelten Konzentrationen von Ethanol, *n*-Propanol bzw. Glycerin betrugen 61,0 Vol.-%, 10,4 Vol.-% bzw. 0,3 Vol.-%. Die vom Hersteller angegebene Konzentration von Ethanol und *n*-Propanol lag bei 54 bis 66 Vol.-% bzw. 9 bis 11 Vol.-%. Die gemessenen und die angegebenen Konzentrationen stimmten für Gelprobe 1 gut überein.

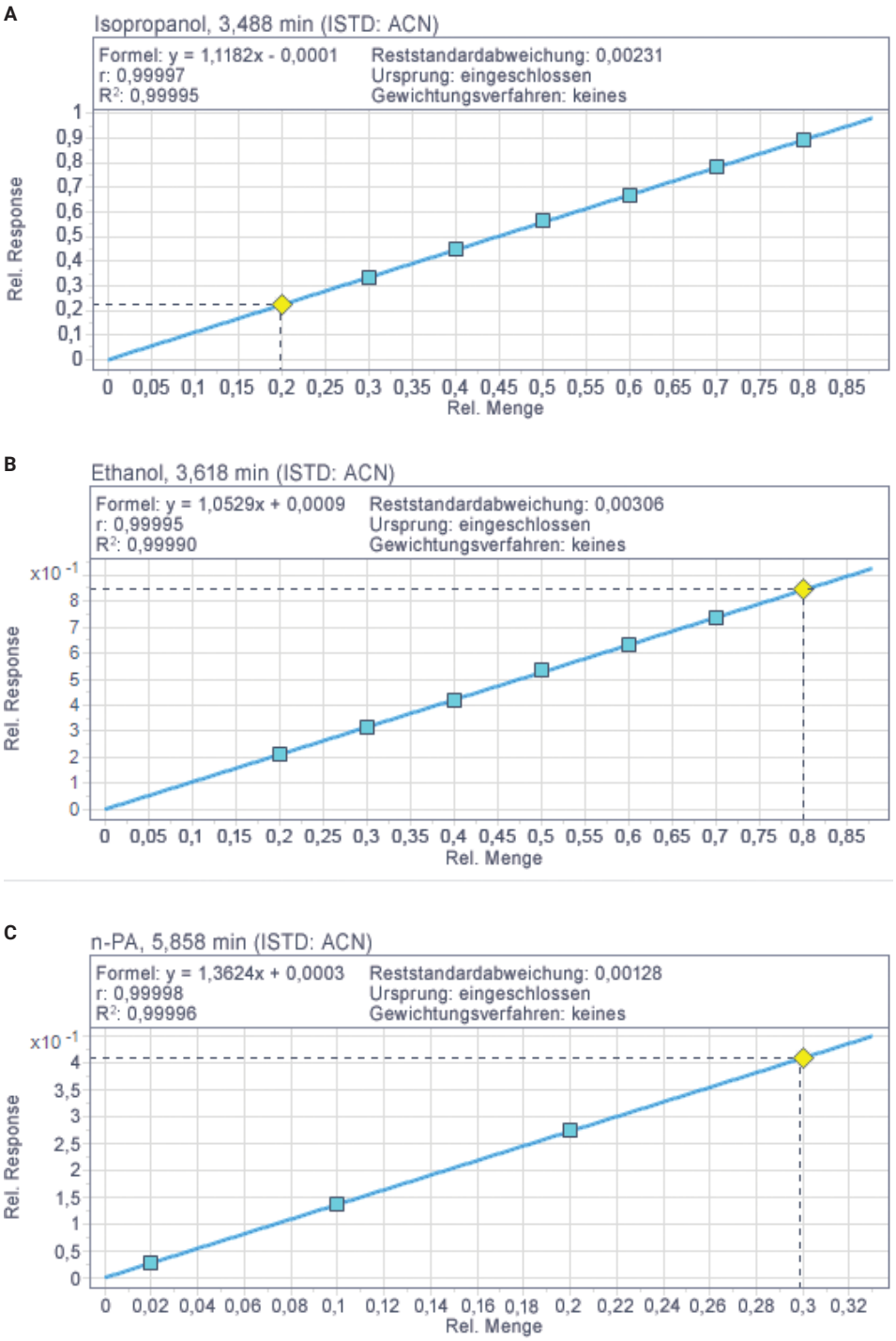
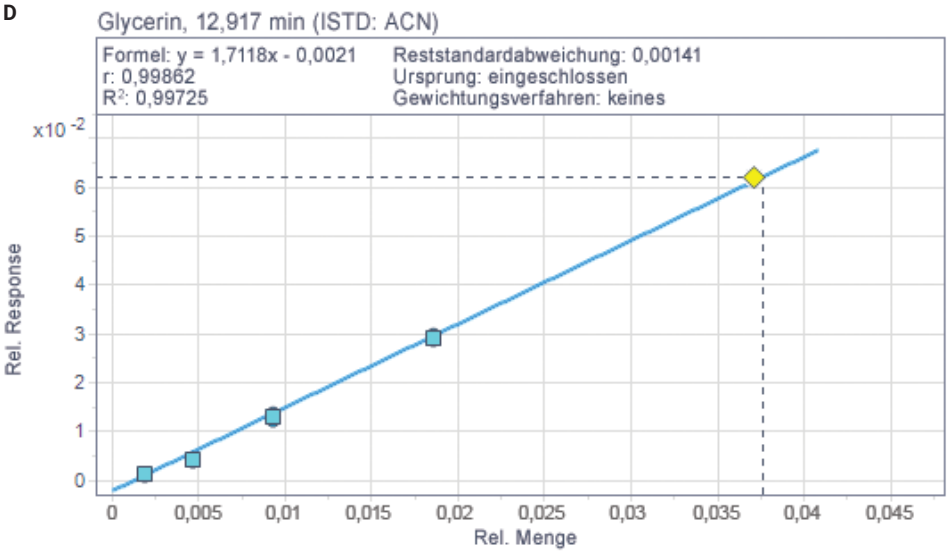


Abbildung 2A, B, C. Kalibrierungskurven für IPA (A), Ethanol (B) und *n*-Propanol (C) mit Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,999.

D



E

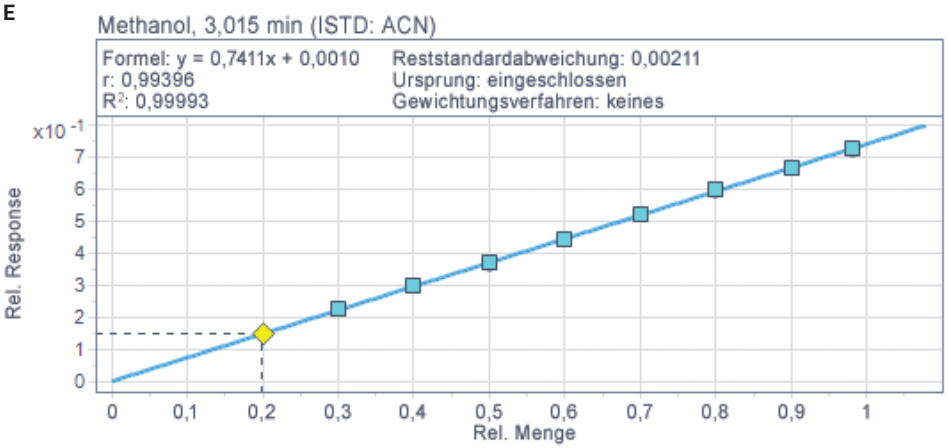


Abbildung 2D, E. Kalibrierungskurven für Glycerin (D) und Methanol (E) mit Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,995.

Tabelle 3. Nachweis der Systemeignung für die Alkoholanalyse.

Verbindung	Durchschnittliche RT (min)	RT RSD %	Quantifizierungspräzision (%)	Korrelationskoeffizient der Kalibrierung	Kalibrierungsbereich (Vol.-%)	Peaktailing-Faktor	Auflösung zw. Alkohol und IS
Methanol	3,015	0,025	0,3	0,9999	1 bis 4,9 %	1,2	> 15
IPA	3,488	0,028	0,41	0,9999	1 bis 4 %	1,1	> 15
Ethanol	3,618	0,026	0,16	0,9999	1 bis 4 %	1,0	15
n-Propanol	5,858	0,008	0,29	0,9999	0,1 bis 1,5 %	1,1	9
Glycerin	12,917	0,006	1,67	0,9970	0,0092 bis 0,184 %	1,0	> 9

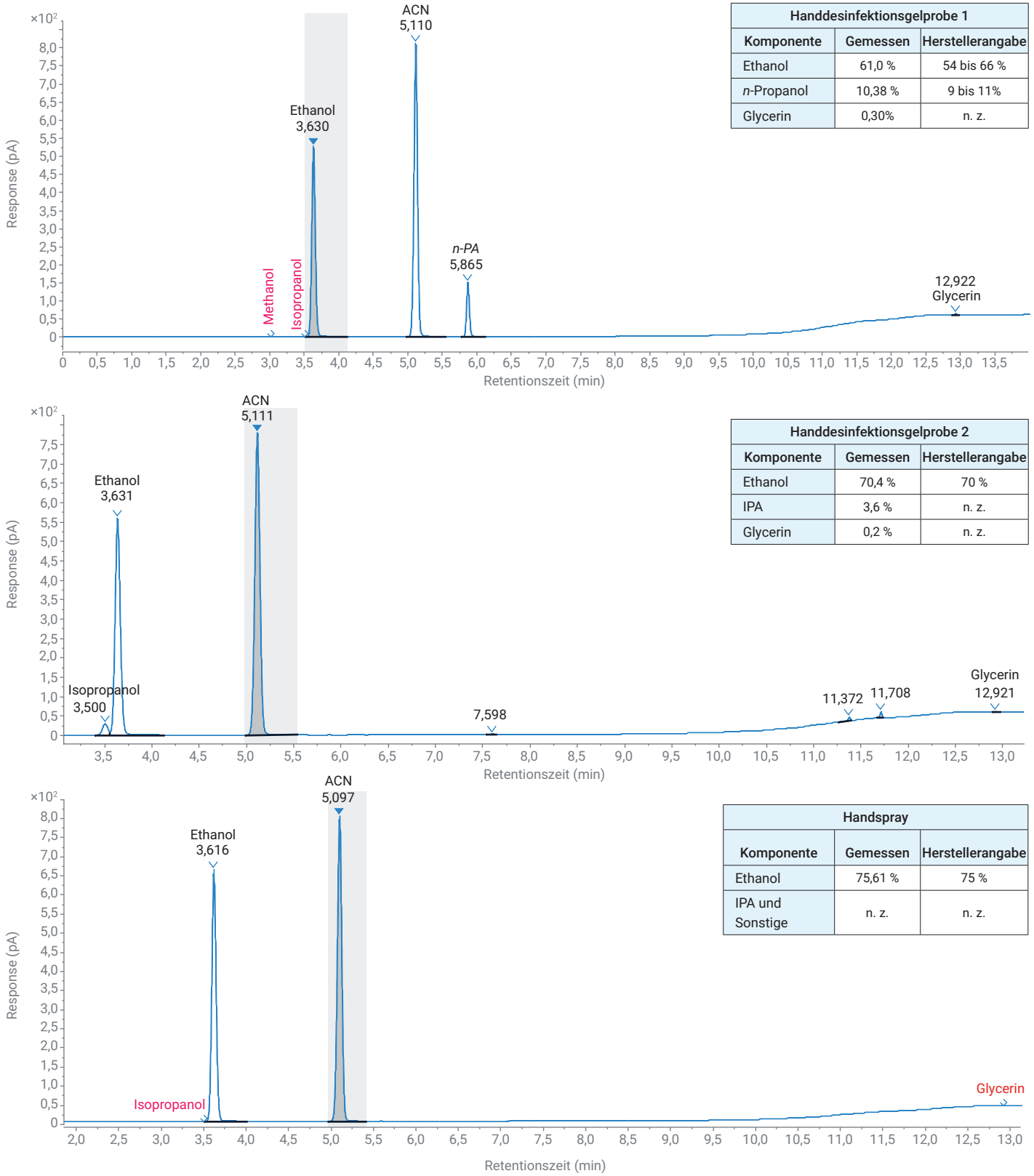


Abbildung 3. Chromatogramme zweier Handdesinfektionsgele und eines Handdesinfektionssprays und Identifizierungsergebnisse.

In Gelprobe 2 wurden 70,4 Vol.-% Ethanol, 3,6 Vol.-% IPA und 0,2 Vol.-% Glycerin gefunden. Angegeben waren 70 Vol.-% Ethanol, was ebenfalls gut mit dem Prüfergebnis übereinstimmte. Zwar wurde bei Gelprobe 2 keine Basislinientrennung von IPA und Ethanol erreicht, dennoch gelang eine genaue Quantifizierung von Ethanol. Die Ethanolkonzentration im Alkoholspray war mit 75 Vol.- % angegeben, gemessen wurden 75,6 Vol.- %. Glycerin wurde im Alkoholspray nicht nachgewiesen. In der Desinfektionsgelprobe 2 wurden weitere Peaks entdeckt, die bei 7,6, 11,4 und 11,7 Minuten eluierten. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Bestandteile, die der Hersteller als antimikrobiellen Wirkstoff oder Feuchthaltemittel usw. zusetzt. Ihre Konzentration wurde unter Verwendung des relativen Response-Faktors von Glycerin auf weniger als 1 Vol.-% geschätzt. In den drei Handdesinfektionsmittelproben wurde kein Methanol nachgewiesen.

Zur Prüfung der Stabilität des Systems wurde eine lange Sequenz ausgeführt. Dabei wurden insgesamt 40 Injektionen von Handdesinfektionsgelproben und fünf QK-Proben durchgeführt. Die Sequenz begann mit einer QK-Probe, gefolgt von fünf Injektionen von Desinfektionsgelprobe 1 und fünf Injektionen von Desinfektionsgelprobe 2. Daran schlossen sich weitere drei Runden mit einer Injektion einer QK-Probe und 10 Injektionen von realen Proben sowie zum Abschluss eine fünfte Injektion einer QK-Probe an. Die nominale Konzentration von Ethanol und IPA in der QK-Probe betrug 50 Vol.-%. Die überlagerten Chromatogramme der fünf QK-Proben sind in Abbildung 4 dargestellt. Retentionszeit- und Quantifizierungsergebnisse für die fünf QK-Proben sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die gemessene Durchschnittskonzentration von Ethanol und IPA betrug 50,2 Vol.-% bzw. 51,2 Vol.-%. Die Quantifizierungsgenauigkeit betrug bei den QK-Proben 101 % und 102 %. Die Quantifizierungspräzision bei IPA und Ethanol betrug 0,715 % bzw. 1,11 %. Die Reproduzierbarkeit der RT betrug 0,03 % bzw. 0,04 %.

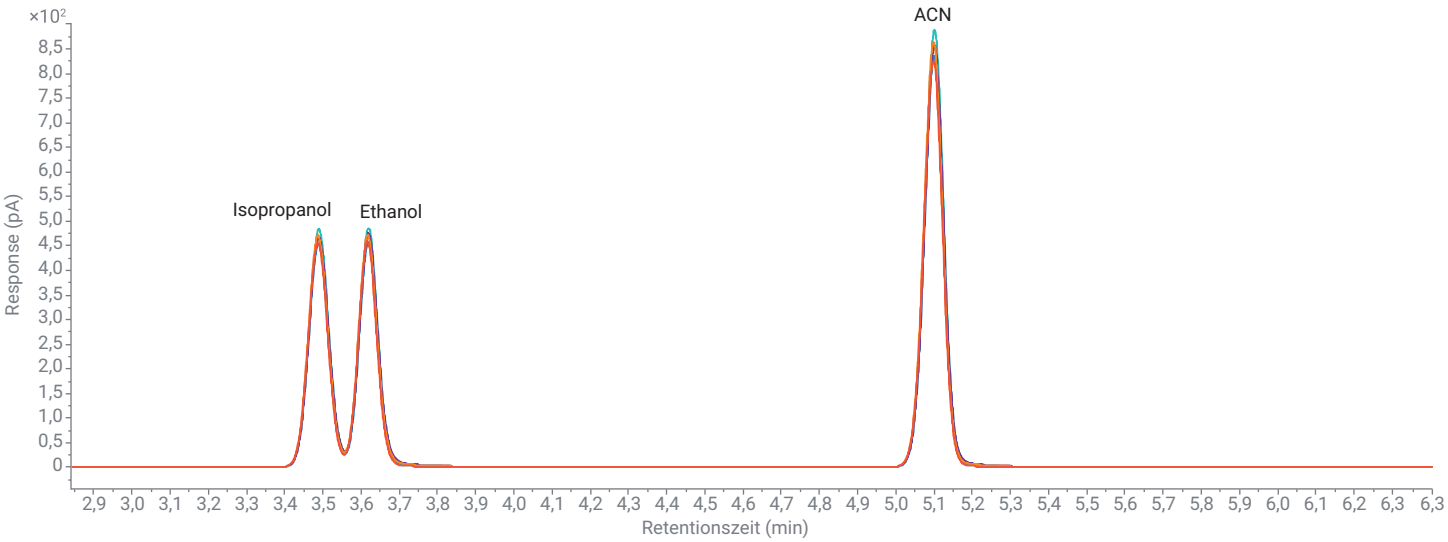


Abbildung 4. Überlagerte Chromatogramme von fünf QK-Proben.

Tabelle 4. Quantifizierung und RT-Präzision von fünf QK-Proben bei 40 Analyseläufen realer Proben.

Quantifizierung (Vol.-%)	QK1	QK2	QK3	QK4	QK5	Quan. RSD
IPA	50,363	50,038	49,958	50,045	50,821	0,71%
Ethanol	50,544	51,061	52,067	51,473	51,051	1,11%
Retentionszeit (min)	**QK1**	**QK2**	**QK3**	**QK4**	**QK5**	**RT RSD %**
IPA	3,487	3,488	3,488	3,486	3,486	0,03%
Ethanol	3,617	3,618	3,618	3,616	3,615	0,04%

Die Ergebnisse für die 20 Injektionen der Gelproben 1 und 2 sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Die für die 40 Injektionen von realen Handdesinfektionsmittelproben gemessenen Konzentrationen stimmten gut mit dem angegebenen Konzentrationsbereich überein. Die Quantifizierungspräzision für Ethanol und *n*-Propanol betrug 0,45 % bzw. 0,38 % bei Probe 1 und 0,55 % bzw. 0,31 % bei Probe 2. Die Reproduzierbarkeit der RT für Ethanol, IPA und *n*-Propanol bei 20 Injektionen reichte von 0,02 bis 0,04 %, was mit der RSD für die RT von 0,01 bis 0,03 % bei den in Tabelle 3 aufgeführten sieben aufeinander folgenden Injektionen gut übereinstimmt. Die Quantifizierungsgenauigkeit und -präzision der QK- und realen Proben belegt, dass auf dem 8860 GC-FID-System in Kombination mit einer Ultra Inert DB-WAX-Säule eine zuverlässige und genaue Alkoholanalyse möglich ist.

Schlussfolgerungen

Bei dieser Arbeit wurde das 8860 GC-System in Kombination mit einem FID und einer Ultra Inert DB-WAX-Säule für die Alkoholanalyse von Handdesinfektionsmitteln eingesetzt. Der inerte Gasflussweg, der mit dem Ultra Inert Liner und der Ultra Inert-Säule sichergestellt wurde, trug zur Erzeugung eines scharfer und symmetrischer Peaks mit Peaktailing-Faktoren von weniger als 1,2 für die Zielalkohole bei. Die Auflösung zwischen jeweiligem Alkohol und internem Standard übertraf die Anforderungen der USP-Methode <611>. Die durchschnittliche Quantifizierungspräzision war bei den flüchtigen Alkoholen kleiner als 1 %.

Tabelle 5. Zusammenfassung der Ergebnisse für Desinfektionsgelproben beim Stabilitätstest.

Gel 1					Gel 2				
	RT (min)	Quan. (Vol.-%)	RT (min)	Quan. (Vol.-%)		RT (min)	Quan. (Vol.-%)	RT (min)	Quan. (Vol.-%)
Injektion Nr.	Ethanol		*n*-Propanol		Injektion Nr.	IPA		Ethanol	
2	3,618	61,59	5,858	10,48	7	3,49	3,63	3,62	69,93
3	3,62	61,55	5,856	10,48	8	3,491	3,63	3,621	70,39
4	3,618	61,54	5,858	10,49	9	3,49	3,65	3,619	70,38
5	3,618	61,02	5,857	10,41	10	3,491	3,65	3,623	70,45
6	3,619	61,56	5,856	10,48	11	3,493	3,63	3,623	70,40
13	3,62	61,59	5,856	10,48	18	3,49	3,65	3,621	70,02
14	3,618	61,57	5,856	10,48	19	3,492	3,61	3,622	70,29
15	3,62	61,85	5,858	10,53	20	3,492	3,62	3,623	70,39
16	3,619	61,73	5,857	10,51	21	3,492	3,65	3,622	70,56
17	3,618	61,75	5,856	10,52	22	3,492	3,63	3,622	70,30
24	3,619	61,42	5,856	10,47	29	3,491	3,65	3,622	70,40
25	3,617	61,76	5,855	10,51	30	3,49	3,61	3,621	70,34
26	3,619	61,74	5,857	10,51	31	3,49	3,62	3,62	70,41
27	3,619	61,89	5,856	10,53	32	3,49	3,63	3,62	70,36
28	3,619	61,80	5,856	10,53	33	3,491	3,66	3,622	70,60
35	3,618	61,93	5,856	10,55	40	3,489	3,64	3,619	70,97
36	3,617	62,02	5,855	10,55	41	3,49	3,64	3,62	70,49
37	3,618	62,28	5,857	10,60	42	3,49	3,64	3,62	70,58
38	3,619	62,09	5,857	10,55	43	3,487	3,70	3,617	70,52
39	3,617	62,07	5,856	10,55	44	3,488	3,61	3,619	70,71
Mittelwert	3,62	61,74	5,86	10,51		3,49	3,64	3,62	70,42
RSD	0,03%	0,45%	0,02%	0,38%		0,04%	0,55%	0,04%	0,31%

Die Kalibrierungsergebnisse waren mit linearen Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,995 für alle fünf Alkohole hervorragend. Die Analyse der realen Handdesinfektionsgele und des Desinfektionssprays lieferte genaue Quantifizierungsergebnisse. Die Systemleistung der Kombination des 8860 GC/FID mit der Ultra Inert-Säule ist daher für die Analyse von Alkoholen in Handdesinfektionsmitteln geeignet.

Literatur

1. USP <611> Alcohol Determination, Monograph US Pharmacopeia, **2020**.
2. ASTM D3695-95(2013), Standard Test Method for Volatile Alcohols in Water by Direct Aqueous-Injection Gas Chromatography, ASTM International, West Conshohocken, PA, USA, **2013**.
3. Abercrombie, V. *et al.* Analysis of Ethanol and Isopropyl Alcohol in Alcohol-Based Hand Sanitizers by Direct Injection GC/FID, *Agilent Technologies application note*, Publikationsnummer 5994-1923EN.

www.agilent.com/chem

DE.5224768519

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2020

Gedruckt in den USA, 29. Juni 2020
5994-2089DEE

Agilent
Trusted Answers