

# Vorteile der Miniaturisierung der HPLC

## Technische Grundlagen und Voraussetzungen für on-line Kapillar-LC / MS

- M. Breyer<sup>1/2</sup>, M. Twele<sup>1</sup>, K. Schmeer<sup>2</sup>, P. Földi<sup>1/3</sup> -

Mit Kapillar-LC und nano-HPLC (50 bis 800 µm Säuleninnendurchmesser) durchgeführte Analysen können ebenso sicher und zuverlässig sein wie mit herkömmlicher analytischer HPLC (4,0 oder 4,6 MM ID) durchgeführte. Unabdingbar hierfür sind jedoch geeignete Testverfahren, z.B. zur Kontrolle sowohl der Effizienz als auch der Selektivität der Säulen.

Abb. 1

### Säulentest - Effizienz

- Benzoate -

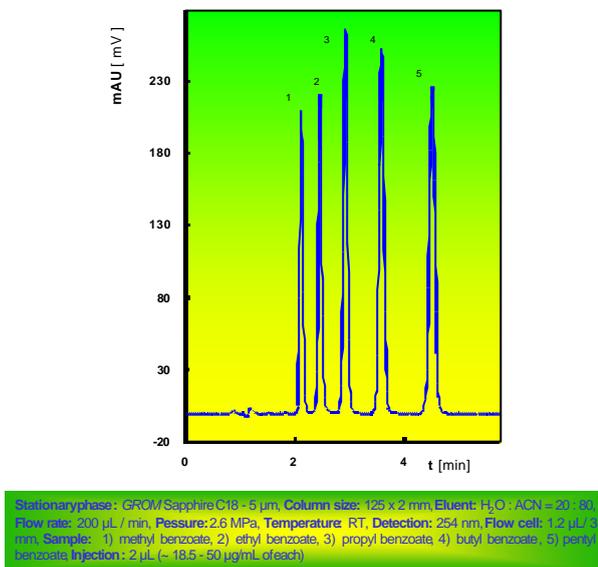


Abb. 2

### Säulentest - Selektivität \*

M. Arangio, H. Engelhardt \* (modifiziert)

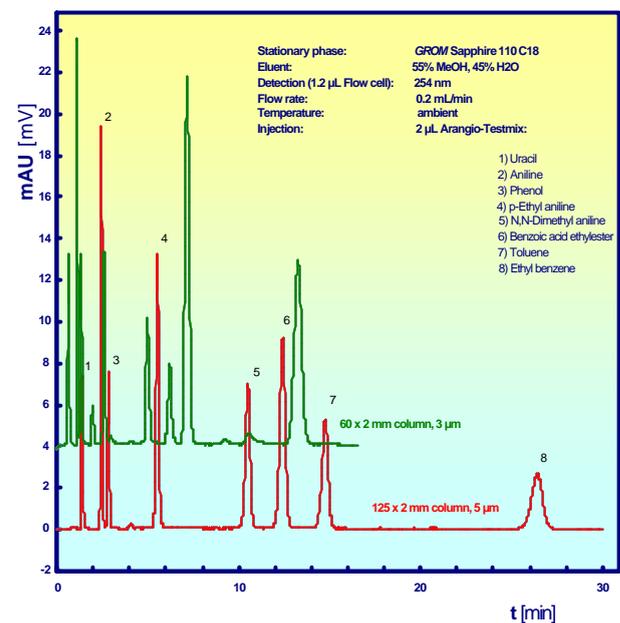
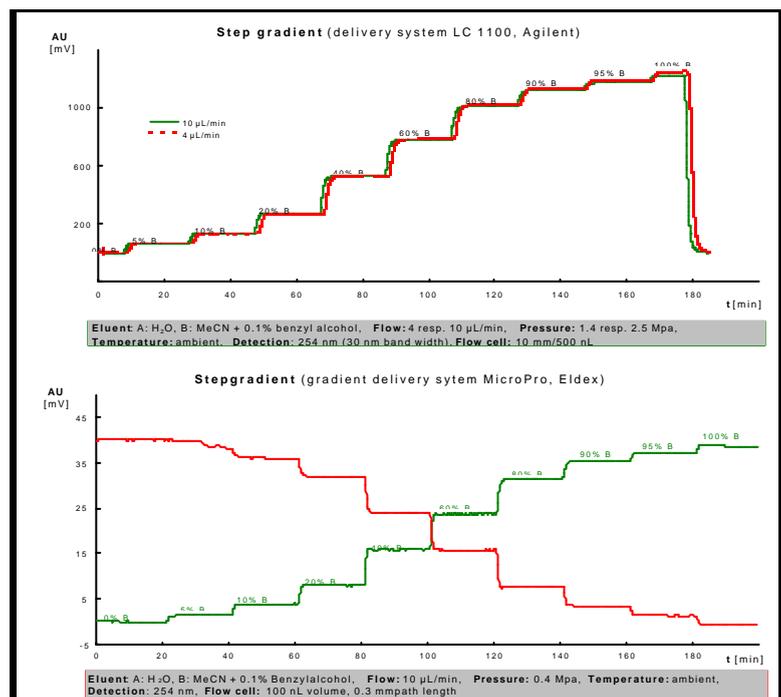


Abb. 3

**Mikro-Gradienten:** Gute chromatographische Trennungen komplexer Gemische z.B. von Pharmaka und Metaboliten, bzw. reproduzierbare analytische Ergebnisse sind in der Routine in hohem Maße von der Qualität der Gradienten abhängig. Dies gilt besonders in der Kapillar- und nano-HPLC für Flußraten von  $\leq 100 \mu\text{L} / \text{min}$ . Elutionsgradienten können schnell und einfach durch Ersetzen der HPLC-Säule durch einen Restriktor (Fused-Silica-Kapillare), sowie durch Zugabe von Benzylalkohol zum Eluenten B durch UV-Detektion bei 254 nm kontrolliert werden.

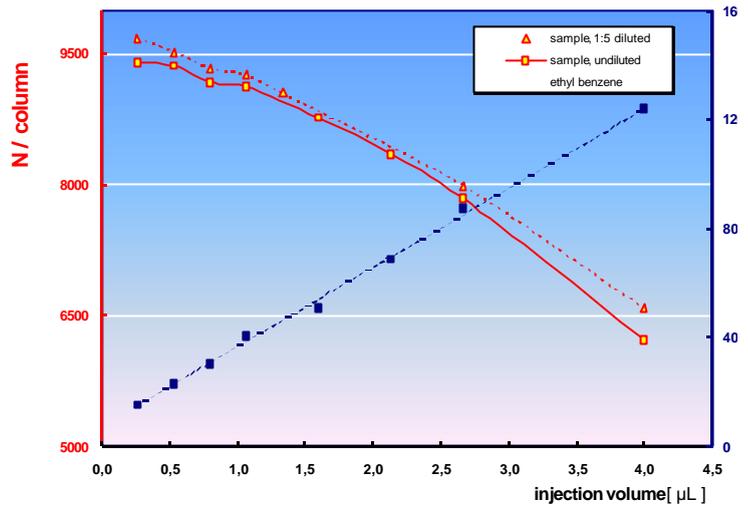


### **Einfluss des Injektionsvolumens:**

Ein weiterer kritischer, experimenteller Parameter für eine optimale Analyse durch Kapillar-HPLC ist die aufgetragene Substanzmenge bzw. das Einspritzvolumen. Abb. 4 zeigt, daß auf eine 800 µm ID-Kapillarsäule selbst von einer verdünnten Probe nicht mehr als 500 nL aufgetragen werden dürfen. Dies bedeutet, daß das Injektionsvolumen z.B. für eine 300 µm ID-Säule ≤ 100 nL sein sollte. Derartig kleine Probenvolumina können jedoch reproduzierbar nur durch „hair cutting“, d.h. durch „Zeit kontrollierte“ Injektion bzw. Steuerung des Injektionsventils aufgetragen werden. Hierbei bleibt die gefüllte Ladeschleife nur kurze Zeitintervalle im Eluentenstrom.

Abb. 4

### **Einfluss des Injektionsvolumens auf die Trennleistung**



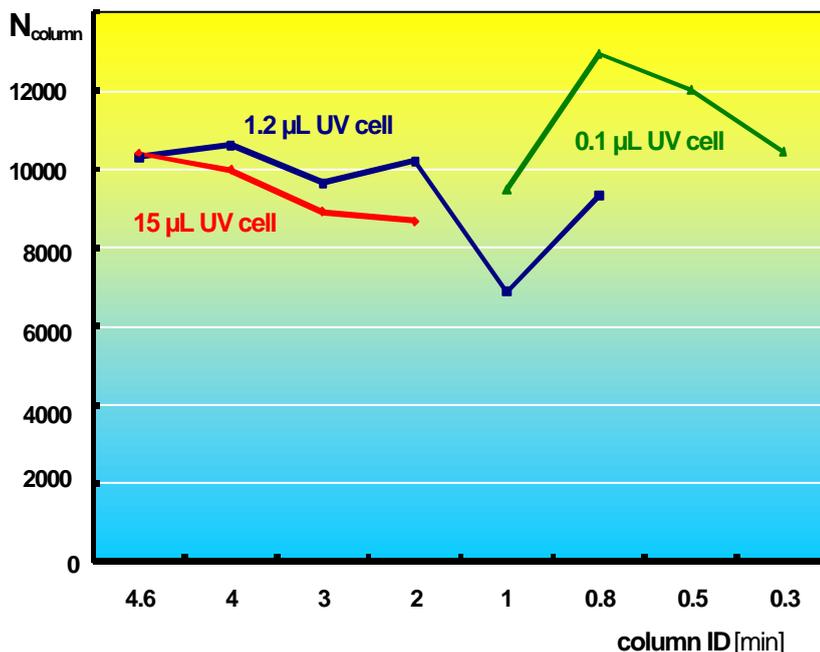
Stationary phase: GROM Sapphire C18 5 µm, Column size: 125 x 0.8 mm, Flow rate: 16 µL/min, Eluent: H<sub>2</sub>O : ACN = 20 : 80, Temperature: RT, Detection: 254 nm, Flow cell: 0.1 µL, Sample: 1) benzoic acid, 2) anisol, 3) benzene, 4) toluene, 5) ethyl benzene; undiluted ~ 1-3 mg/mL, resp. diluted 0.2-0.6 mg/mL

Mit **guten** Phasen **gut** gepackte Kapillarsäulen haben (nahezu) gleich gute Standzeiten wie analytische Säulen. Ihre Lebensdauer hängt im Wesentlichen von der Reinheit der Eluenten und von der Probenmatrix ab.

**Einfluss des Säulendurchmessers:** Die chromatographische Effizienz bzw. Auflösung sollten unabhängig vom Innendurchmesser der verwendeten HPLC-Säulen, wenn diese mit gleicher stationärer Phase ein und desselben Batches gefüllt sind. Im Gegenteil, in

Abb. 5

### **Einfluss des Säulendurchmessers auf die Bodenzahl bei verschiedenen UV-Zellen**



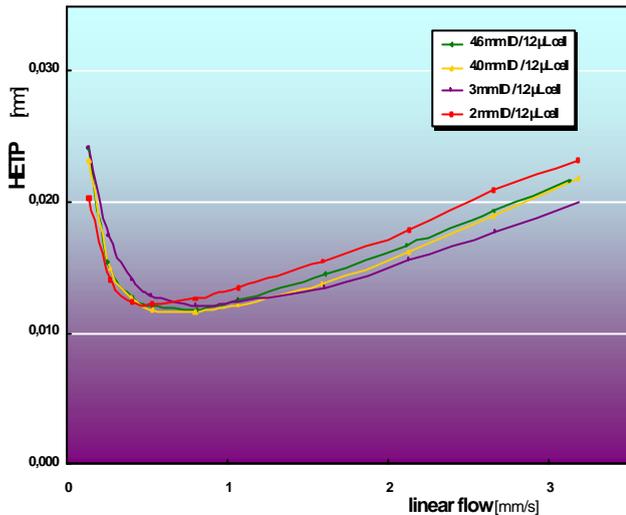
mit **GROM Saphir C18** Partikeln gepackten „fused silica“-Kapillarsäulen (500- und 800 µm ID) konnte 10 bis 20 % höhere Bodenzahlen **N** erzielt werden als in mit demgleichen Material gefüllten analytischen Säulen (Abb. 5-7). Die mit einer Microbore-Säule (1 mm ID) erzielte relativ niedrigere Bodenhöhe **H** ist auf schlechtere Dispersion innerhalb der Säulenköpfe zurückzuführen (Abb. 6, - - ◆ - ◆ -).

Stationary phase: GROM Sapphire C18 - 5 µm, Column size: 125 x 0.3 - 4.6 mm, Flow (lin. Vel): 0.5 mm/s, Eluent: H<sub>2</sub>O : ACN = 20 : 80, Temperature: RT, Detection: 254 nm, Flow cell: 15 µL, 1.2 µL, 0.1 µL, Sample: 1) methyl benzoate, 2) ethyl benzoate, 3) propyl benzoate, 4) butyl benzoate, 5) pentyl benzoate, Injection: 2 - 10.6 µL (~ 18.5 - 43.8 µg/mL of each),

## Optimale Flußrate – v. Deemter-Diagramme

Abb. 6

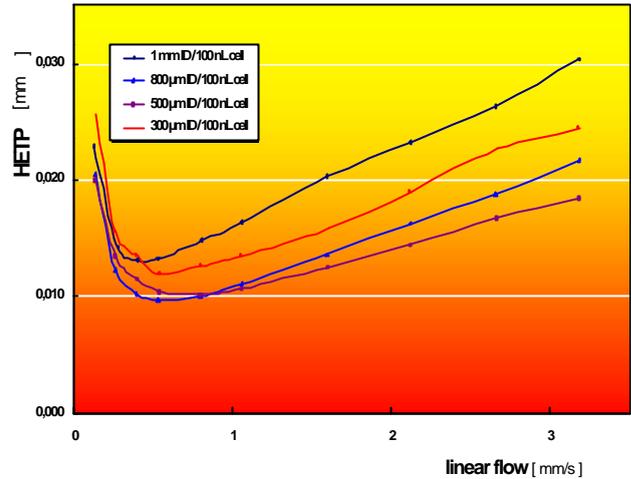
2 - 4,6 mm Säulen ID



Stationary phase: GROM Sapphire C18 - 5 µm, Column size: 125 x 2 - 4,6 mm, Flow rate: variabel, Eluent: H<sub>2</sub>O : ACN = 20 : 80, Temperature: RT, Detection: UV- (254 nm), Flow cell: 1.2 µL / 3 mm, Sample: 1) methyl benzoate, 2) ethyl benzoate, 3) propyl benzoate, 4) butyl benzoate, 5) pentyl benzoate Injection: 2 - 10.6 µL (~ 18.5 - 43.8 µg/mL of each)

Abb. 7

300 µm - 2 mm Säulen ID



Stationary phase: GROM Sapphire C18 - 5 µm, Column size: 125 x 0.3 - 1 mm, Flow: variabel, Eluent: H<sub>2</sub>O : ACN = 20 : 80, Temperature: RT, Detection: UV- (254 nm), Flow cell : 0.1 µL / 0.3 mm, Sample: 1) methyl benzoate, 2) ethyl benzoate, 3) propyl benzoate, 4) butyl benzoate, 5) pentyl benzoate Injection: 0.04 - 0.5 µL (~ 18.5 - 50 µg/mL of each),

**Einfluß des Volumens der Durchflußzellen:** Um für Analysen in der Routine möglichst hohe Auflösung zu gewährleisten, muß das Totvolumen eines HPLC-Systems (z.B. Kapillarverbindungen, Säulenein- u. Ausgang, Durchflußzelle etc.) bekanntlich möglichst klein sein. Dies ist unabhängig von der Detektionsart (s. Abb.3 und Abb.4). Zu beachten ist jedoch, daß bei der UV-Detektion oft kleine Flußzelle synonym mit kleiner Schichtdicke ist und somit nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Empfindlichkeit der Detektion abnimmt. Für die Radio-Detektion gilt ähnliches, da Counts pro Zeiteinheit (cps) gemessen und kleine Zellen zu schnell durchströmt werden.

Abb. 8

**UV-Detektion (v. Deemter-Kurve)**

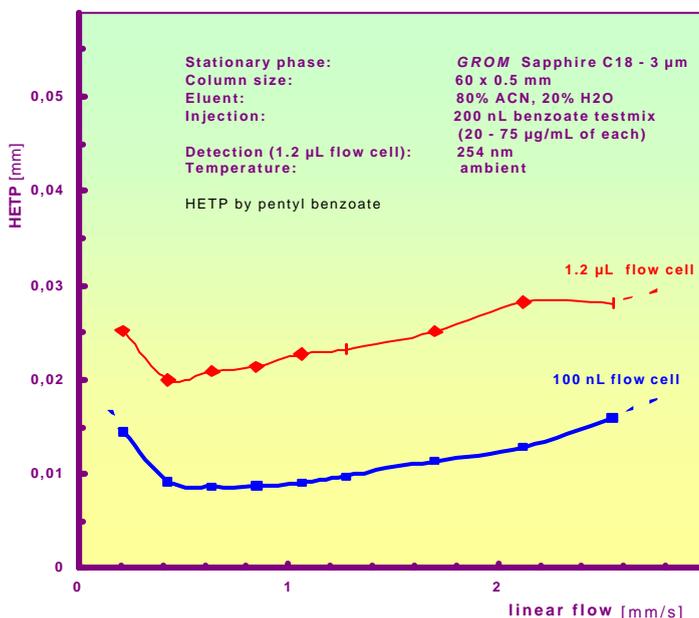
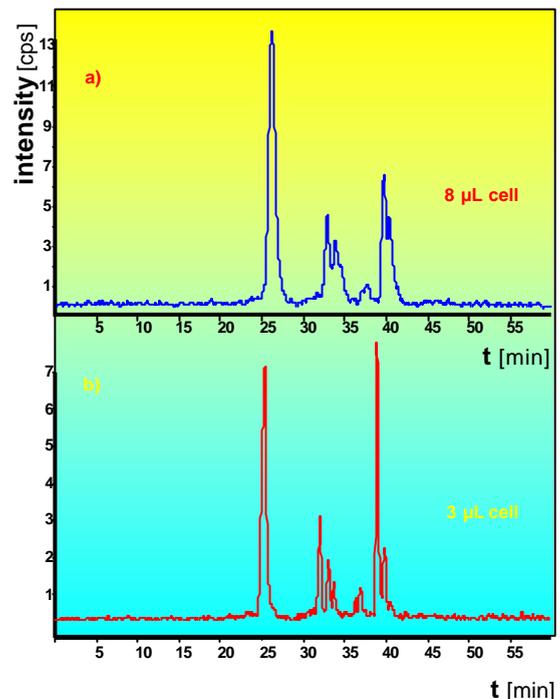


Abb. 9

**Radio-Detektion**



Stationary phase: Nucloesil100 C18 HD, Column size: 125 x 1 mm 3 µm, Flow rate: 37.5 µL / min, Eluent: A: 10 mM NH<sub>4</sub>Ac pH 3.0, B: ACN, Flow cell: a) 8 µL, b) 3 µL, Sample: Drug + Metabolites, Injection: 40 µL

Die „driving force“, nämlich das wichtigste Argument für den Einsatz von Kapillar-LC und nano-HPLC ist nicht wie vielfach behauptet die Lösungsmittlersparnis, somit Umweltschutz und Senkung der Kosten, oder kleine Probenmengen, sondern der drastische Gewinn an Empfindlichkeit (~ 200-fach, s. Abb. 10) sowie die einfache, sichere Handhabung für die on-line LC / MS-Kopplung, die das Splitten des Eluats überflüssig macht. Selbst bei UV- oder Radio-Detektion und simultaner on-line Kopplung mit MS ist der Verlust an Auflösung bei entsprechender Konstruktion des Splitters vernachlässigbar (Abb. 11).

Abb. 10

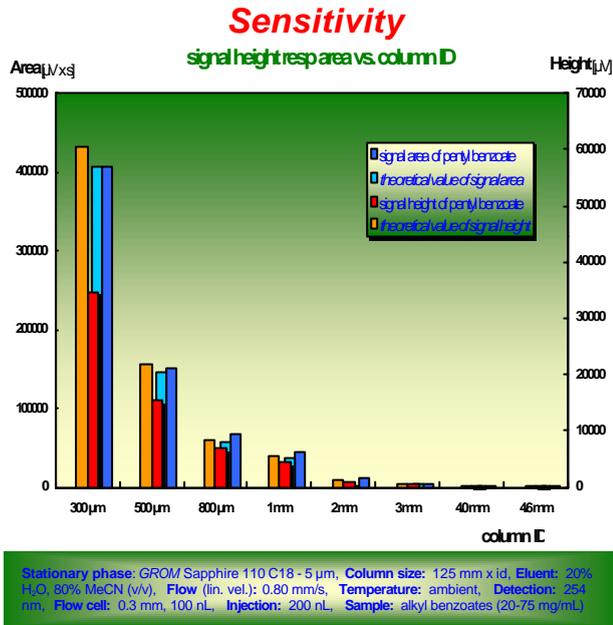
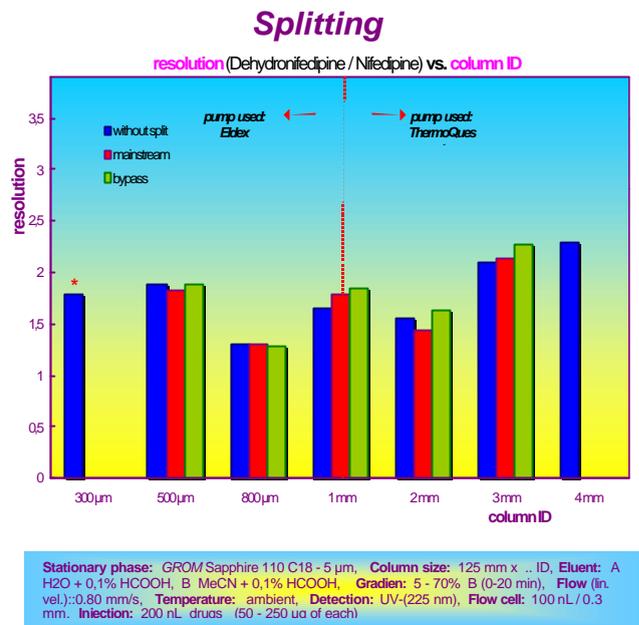


Abb. 11

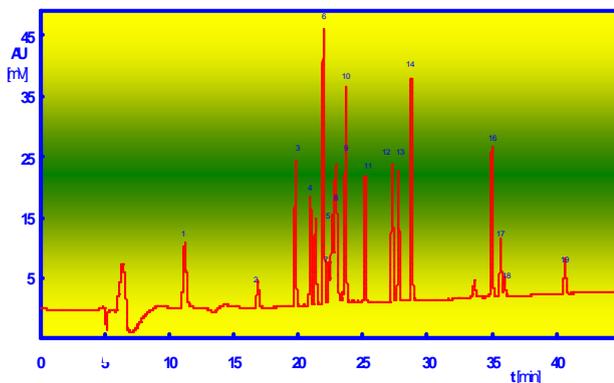


**Summary:** Durch Kapillar-LC und nano-HPLC erzielte Analyseergebnisse sind ebenso sicher und zuverlässig wie die mit konventioneller HPLC erzielten. Abb. 11 und 13 belegen vielmehr die weitaus höhere Empfindlichkeit und die hohe Auflösung moderner HPLC, besonders jedoch von on-line Kapillar-LC / MS.

### Analyse von Pharmaka und Metaboliten

Abb. 12

#### UV-Detektion

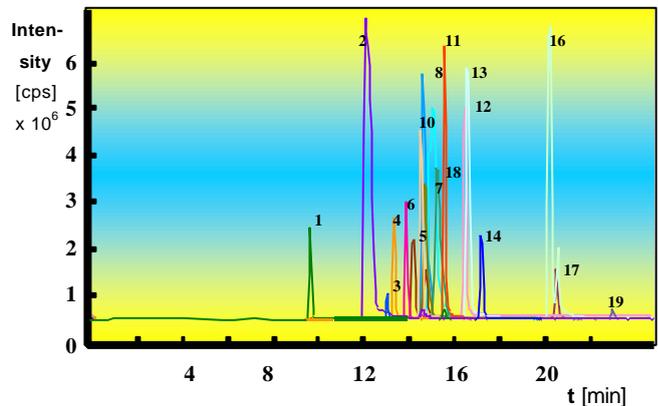


- |                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 1) Paracetamol (70 µg/mL)        | 6) 7-OH-Coumarin (175 µg/mL)    |
| 2) Dextrophan (140 µg/mL)        | 7) 1-OH-Midazolam (36 µg/mL)    |
| 3) 6-OH-Chlorzoxazon (140 µg/mL) | 8) Methoxymorphan (100 µg/mL)   |
| 4) 4-OH-Mephenytoin (70 µg/mL)   | 9) Dextromethorphan (100 µg/mL) |
| 5) 4-OH-Midazolam (100 µg/mL)    | 10) Nirvanol (350 µg/mL)        |

Stationary phase: GROM Sil 120 ODS-4 RE, 3 µm, Column size: 250 x 0.5 mm, Eluent: A: H<sub>2</sub>O + 0.1% HCOOH, B: MeCN + 0.1% HCOOH, Gradient: 8-83% B, 0-20 min, Flow rate: 10 µL/min, Pressure: 28.2 MPa, Temperature: ambient, Detection: 225 nm, Flow cell: 100 nL / 0.3 mm, Injection: 200 nL

Abb. 13

#### on-line MS



- |                              |                                 |
|------------------------------|---------------------------------|
| 11) Phenacetin (90 µg/mL)    | 16) Dehydronifedipin (90 µg/mL) |
| 12) Coumarin (120 µg/mL)     | 17) Nifedipin (70 µg/mL)        |
| 13) Mephenytoin (210 µg/mL)  | 18) Midazolam (100 µg/mL)       |
| 14) Chlorzoxazon (140 µg/mL) | 19) Diclofenac (90 µg/mL)       |
| 15) 4-OH-Diclofenac          |                                 |

Stationary phase: GROM Sapphire 110 C18, 5 µm, Column size: 125 x 0.5 mm, Eluent: A: H<sub>2</sub>O + 0.1% HCOOH, B: MeCN + 0.1% HCOOH, Gradient: 5-70% B (0-20 min), 70% B (20-25 min), Detection: MS/MS (atmospheric pressure ionisation), Flow rate: 10 µL/min (main stream 5 µL/min), Temperature: ambient, Injection: 0.2 µL

- <sup>1</sup> FH-Niederrhein, Abt. f. Bioverfahrenstechnik u. Biotechnologie,  
Adlerstr. 32, 47798 Krefeld
- <sup>2</sup> Bayer AG, Pharma-Entwicklung, Metabolismus u. Isotopenchemie,  
Aprather Weg 18a, 42096 Wuppertal
- <sup>3</sup> GROM Analytik + HPLC GmbH,  
Herrenberger Str. 54, 71083 Herrenberg-Kayh

Die oben beschriebenen Experimente wurden in einer Kooperation folgender Firmen durchgeführt:

