

CHROM. 10,676

ZWEI NEUE KONSTRUKTIONEN VON EINSPRITZVORRICHTUNGEN MIT ERWEITERTEN ANFORDERUNGEN ZUR ANWENDUNG IN DER HOCHDRUCK-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE

A. KINAWI

Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Freien Universität Berlin, Fachbereich 23, WE 03, 1000 Berlin 45 (B.R.D.)

(Eingegangen am 14. Juni 1977; geänderte Fassung eingegangen am 24. Oktober 1977)

SUMMARY

Two new constructions of injector valves being able to fulfil greater demands for use in high-pressure liquid chromatography

This paper deals with the description of two simple constructed injector valves which, without interruption of the mobile phase (on-stream-application) and being served manually, enable the performance of high-pressure liquid chromatographic analysis (up to 600 atm). Furthermore, as an extension of the requirements to injector valves until now, one of the described valves offers the possibility of the pre-purification of samples and the concentration of the substances to be determined.

EINLEITUNG

Die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) zählt heute dank ihrer raschen apparativen Entwicklung während der letzten fünf Jahre zu den modernen und leistungsfähigen analytischen Methoden¹⁻³.

Die zur Zeit käuflichen Einspritzvorrichtungen lassen sich in zwei Typen einteilen:

(1) Einspritzvorrichtungen, die die Analysenproben-Aufgaben ohne Unterbrechung des Flusses der mobilen Phase ermöglichen (On-Stream-Application).

(2) Einspritzvorrichtungen, die erst nach Unterbrechung des Flusses der mobilen Phase und Entspannung der Säule die Applikation erlauben (On-Column-Application, Stop-Flow-Methode).

Der wichtigste Mangel der bisher vorhandenen Einspritzvorrichtungen des 1. Typs, besteht hauptsächlich in der grossen Differenz zwischen der maximalem Pumpenleistung und dem maximalem Dichtigkeitsgrad dieser Einspritzvorrichtungen. So sind z.B. Pumpen erhältlich, die einen Maximaldruck von 600 atm erzeugen (z.B. Varian 8500), während die Einspritzvorrichtungen des 1. Typs einem maximalen Druck von 200-350 atm dicht halten^{4,5}.

Eine Ausnahme in diesem Zusammenhang soll eine Einspritzvorrichtung dar-

stellen, die nach Angaben des Herstellers (Ventil Nr. 7120; Fa. Latek Labortechnik-Geräte, Heidelberg, B.R.D.) einem Maximaldruck von 500 atm dicht hält. Dies wird jedoch nicht als Dauerbetrieb empfohlen. Die Einspritzvorrichtungen des 1. Typs ermöglichen jedoch die Durchführung der nächsten Applikation, während die vorhergehende Analyse noch nicht beendet ist, was eine Material- und Zeitersparnis bedeutet. Dies ist bei den Einspritzvorrichtungen nach der Stop-Flow-Methode nicht möglich. Ein weiterer Nachteil der Stop-Flow-Methode besteht in der andauernden Entspannung und Komprimierung der stationären Phase. Dies führt unweigerlich und besonders bei Anwendung von hohen Drucken, zu einer inhomogenen Änderung der Packungsdichte. Als Folge dieser Änderung steigt der Druck bei konstanter Fließgeschwindigkeit. Es können sogar aufgrund dessen unter Umständen rhythmische Peaks, ohne Eingabe von Proben, mehrere Minuten nach dem Start erscheinen.

Während der letzten drei Jahre und im Rahmen von Untersuchungen zur Inkompatibilität und Interaktion von Pharmaka (Antikoagulantien, Süsstoffe und Psychopharmaka), erwies sich die HPLC als eine brauchbare analytische Methode zur Bestimmung von Pharmaka und/bzw. ihren Metaboliten im biologischem Material (Serum, Urin und Leber)⁶⁻⁸. Hierbei ist jedoch eine Vorbereitung der Analysenproben unerlässlich. Dies geschieht durch Extraktion mit Methylenchlorid bzw. Fällen von Eiweiss mit Methanol oder Aceton, Eindampfen der Extrakte bzw. der methanolischen oder der acetonischen Phase und wiederholtes Extrahieren der Rückstände. Da die so vorbereiteten Analysenproben nicht nur die zu bestimmenden Stoffe, sondern auch native Bestandteile von biologischem Material enthalten, muss für die HPLC-Analyse dieser Extrakte ein geeignetes chromatographisches System erarbeitet werden.

Um die Zeit bei der "Suche" nach so einem System im vertretbaren Rahmen zu halten, wurden relativ lange Säulen (ca. 2 m), gefüllt mit feinkörnigem Material (10 μm) verwendet. Aufgrund dieser Umstände ergab sich der Wunsch nach einer Einspritzvorrichtung, die die langwierige Prozedur der Vorbereitung der Analysenproben erspart, und die Vorteile der On-Column- und On-Stream-Application vereinigt. In dieser Arbeit werden die Konstruktionen zweier Einspritzvorrichtungen beschrieben und Anwendungsbeispiele angegeben.

BESCHREIBUNG DER EINSPRITZVORRICHTUNGEN

Spezifikation

	<i>1. Einspritzvorrichtung</i>	<i>2. Einspritzvorrichtung</i>
Material	Edelstahl	Edelstahl
Dichtung	Teflon	Teflon
Gewicht	260 g	ca. 800 g
Dichtigkeitsgrad	600 atm	600 atm
Probenvolumen	bis 40 μl	bis 80 μl
Betriebstemperatur	bei Zimmertemperatur getestet (25°)	bei Zimmertemperatur getestet (25°)

Beschreibung der 1. Einspritzvorrichtung

Diese Einspritzvorrichtung besteht aus einem Rotor (A), der von zwei Halbschalen (oben und unten) gefasst ist. Jeder der zwei Halbschalen besteht aus drei

Segmenten, C und D bzw. C' und D', die ihrerseits das Segment B bzw. B' umschliessen (Bohrungen durch B, C und B' C', Gewinde in D und D'). Die Segmente B und B' sind 1/100 mm stärker als der Teil des Rotors, welcher sich zwischen und in den Halbschalen freidreht (s. Fig. 1).

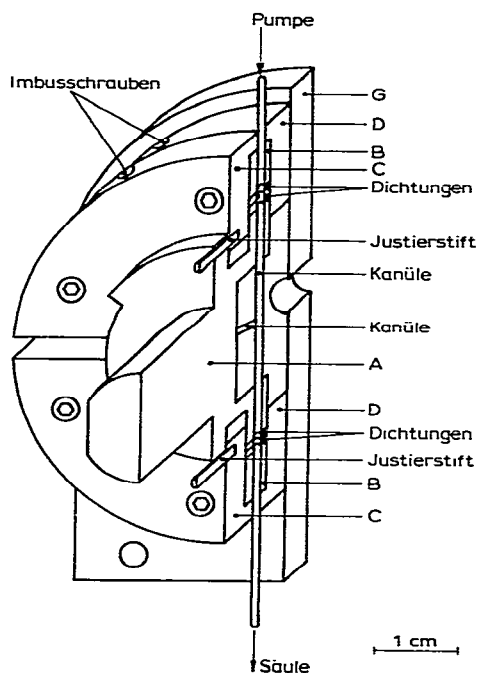


Fig. 1. Radialer Querschnitt der 1. Einspritzvorrichtung.

Die beiden Halbschalen sind durch vier Schrauben miteinander verbunden (je zwei Bohrungen durch C und D, Gewinde in C' und D'). Das Segment der oberen Halbschale B enthält drei radiale Bohrungen (Winkel, 60°) von denen die mittlere die Verbindung zwischen Pumpe und Rotor darstellt, während die beiden anderen abwechselnd zum Einspritzen der Analysenproben dienen. Das Segment B' (untere Halbschale) enthält eine in der Mitte angebrachte radiale Bohrung, die die Verbindung zwischen Säule und Rotor herstellt.

Sowohl der Rotor, als auch die beiden Segmente B und B' sind mit je einer Dichtung versehen. Um das Verrutschen der Dichtungen zu vermeiden, sind sowohl die beiden Segmente B und B' als auch der Rotor mit Zähnen versehen, weiterhin sind Nuten um die Bohrungen angebracht. Dies ist einfachheitshalber in Fig. 2 nicht gezeichnet. Um eine parallele Lage der beiden Halbschalen zu sichern, werden die beiden Halbschalen auf eine ebene Platte (G) befestigt (hierzu dienen drei der vier Schrauben, die die Segmente der einzelnen Halbschalen miteinander befestigen). Die Platte dient gleichzeitig zur Befestigung der Einspritzvorrichtung an einem stabilen Gegenstand. Der in und zwischen den beiden Halbschalen befindliche Teil des Rotors trägt drei sich kreuzende (Winkel, 60°) radiale Kanüle von denen zwei (benachbarte) durch den Rotor durchgehen, während die dritte, um die Kolbenpumpe zu entleeren,

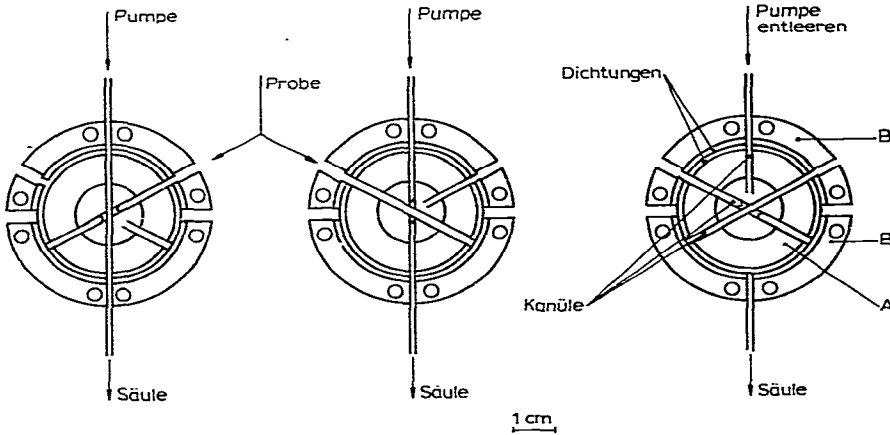


Fig. 2. Querschnitt durch die Segmente B, B', Dichtungen, Kanüle und Rotor.

von der Mitte aus durch die Platte (G) ins Freie führt. Die Justierung des Rotors erfolgt mit Hilfe zweier Justierstifte, die jeweils in der Mitte der oberen und unteren Halbschalen angebracht sind (s. Fig. 1).

Beschreibung der 2. Einspritzvorrichtung

Diese Einspritzvorrichtung besteht im wesentlichen aus drei Teilen: dem Oberteil (A), dem Unterteil (B) und dem Schieber (C). Der Schieber, der sich passend in den Nuten, die sich in dem Ober- und Unterteil befinden, hin und her bewegt, weist zwei senkrecht zu seiner Längsachse angebrachte Bohrungen auf, die abwechselnd die Verbindung Pumpe-Säule über (A) und (B) gewährleisten (s. Fig. 3 und 5).

Das Oberteil weist drei Bohrungen auf, von denen die mittlere mit der Pumpe

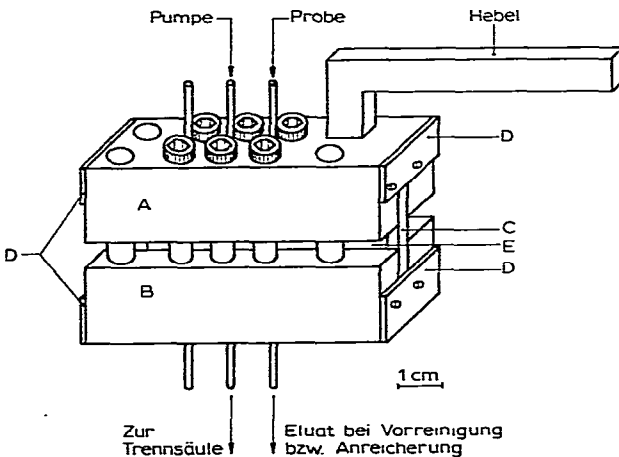


Fig. 3. Die Einspritzvorrichtung im montierten Zustand. Zur Erklärung der Bezeichnungen siehe Fig. 4 und 5.

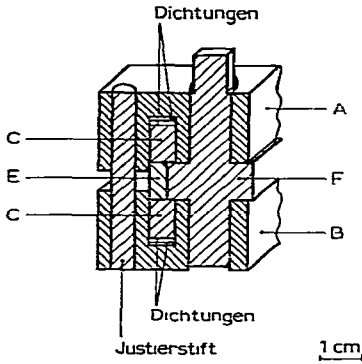


Fig. 4. Querschnitt durch die Einspritzvorrichtung, (A) Oberteil, (B) Unterteil, (C) Schieber, (E) Zahnstange, (F) Zahnrad.

verbunden ist, während die anderen abwechselnd zum Einspritzen der Analysenproben dienen (Position 1 bzw. 2, Fig. 5). Weiterhin ermöglichen die aus den beiden Bohrungen hervorstehenden kurzen Säulen (ca. 2–3 cm) die Verbindung dieser über ein Verbindungsstück (1/8 in.–1/8 in.) mit anderen Säulen (s. weiter unten).

Das Unterteil weist ebenfalls drei Bohrungen auf, von denen die mittlere die Verbindung zur Säule darstellt, während die beiden anderen über je eine kurze Säule (2–3 cm) das Anbringen einer "Fitting" mit einer Mikrosiebplatte erlauben. Beide Teile (A) und (B) lassen sich mit Hilfe von sechs Imbusschrauben (je drei links bzw. rechts von den Nuten) einander nähern. Bohrungen in (A), Gewinde in (B). Weiterhin gewährleisten drei Justierstifte, durchgehend durch (A) und (B), eine parallele Lage beider Nuten. Das seitliche Fressen der Schieber an den Wandungen der Nuten wird hierdurch verhindert (Fig. 3 und 4). Die vier Teile (D), die mit je zwei Schrauben an den Enden von (A) und (B) befestigt sind, verhindern das Fließen der Dichtungen und dienen weiterhin als Anschlag für den Schieber (s. Fig. 5). Um die Dichtigkeit zu er-

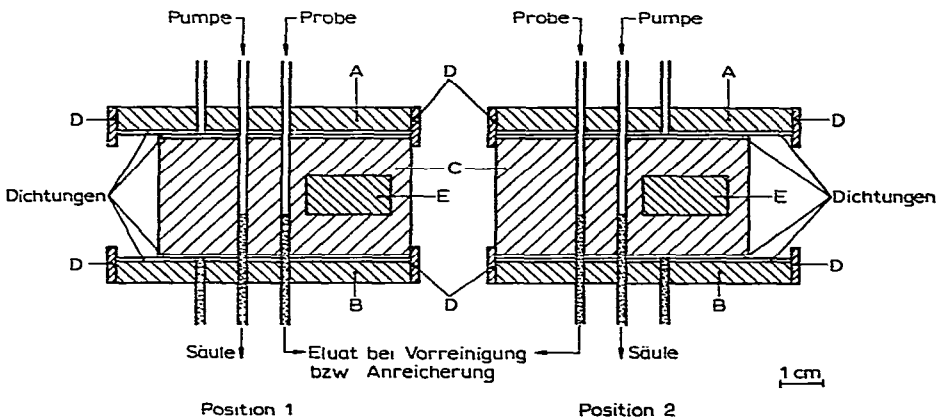


Fig. 5. Schnitt längs der Einspritzvorrichtung (A) (B) (C) und (E), siehe unter Fig. 4 (D). Endplatten zur Sperrung der Dichtungen und als Anschlag für (C).

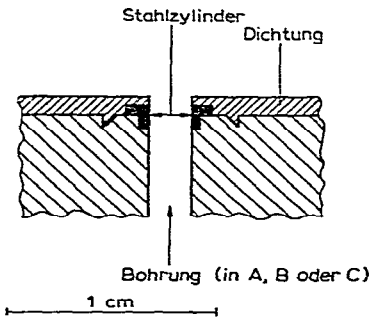


Fig. 6. Schnitt längs einer Bohrung in A, B bzw. C. ■

höhen, sind um alle Bohrungen in A, B und C Vertiefungen eingefräst und in jede Bohrung ein Stahlzylinder eingelassen (s. Fig. 6).

Die sechs Imbusschrauben geben die Möglichkeit, die Teile (A) und (B) an den Schieber so zu pressen, dass hohe Drücke dicht gehalten werden können, die drei Justierstifte garantieren eine parallele Lage von (A) und (B). Es galt also nur eine Methode zu finden, den Schieber ohne Übertragung von Querkräften, um seitliches Fressen des Schiebers an den Wandungen der Nuten zu vermeiden, zu betätigen. Von den erprobten Methoden zur Lösung dieser Aufgabe erwies sich die Anwendung einer Zahnstange (E), die in dem Schieber eingebettet ist, und eines Zahnrades (F), dessen Welle durch (A) und (B) durchgeht, als besonders geeignet (s. Fig. 4).

Der vierkantige Teil der Welle, welcher über (A) hervorsteht, dient zur Befestigung eines Hebels. Da die Zahnstange *nicht* mit dem Schieber starr verbunden ist, drückt sich, bei Betätigung des Hebels, nur die Zahnstange an die Wandungen der Nuten von (A) und (B), während der Schieber die Kraftübertragung parallel zu seiner Längsachse erfährt (s. Fig. 3 und 5).

Funktionsweise: Dies ist Fig. 2 und 5 zu entnehmen.

VORTEILE DIESER EINSPRITZVORRICHTUNGEN GEGENÜBER BISHERIGEN EINSPRITZSYSTEMEN

(1) Der wichtigste Vorteil der 2. Einspritzvorrichtung besteht in der gegebenen Möglichkeit die Analysenproben unmittelbar vor der Durchführung der Analyse in einer der beiden Bohrungen des Schiebers vorzubehandeln. Da beide Bohrungen in (C) den gleichen Durchmesser wie die Trennsäule aufweisen, (2.1 mm) und bis zu einer geeigneten Höhe mit einer geeigneten stationären Phase gefüllt sind, stellen sie somit einen beweglichen Teil der Trennsäule dar. So ist es gelungen, Pharmaka und/bzw. ihre Metabolite "direkt" aus Seren und Urin zu bestimmen. Hierzu wurde die für die Trennung in der Hauptsäule verwendete mobile Phase aus einer der beiden Bohrungen in (C) durch Wasser verdrängt, 5–20- μ l Serum bzw. Urin auf das "Säulchen" gegeben, und mit einer im Vorversuch ermittelten Menge Wasser eluiert, das Wasser mit Hilfe von Pressluft entfernt, die Bohrung erneut mit der mobilen Phase gefüllt und den Schieber betätigt.

Wie schon oben erwähnt, ermöglicht eine der kurzen Säulen die an (A) befestigt sind, diesen Vorgang, indem sie, über ein Verbindungsstück 1/8 in.–1/8 in. einer Säule angeschlossen wird, die das Wasser enthält und andererseits an einer Gas-

flasche angeschlossen ist. Diese bequeme Arbeitsweise erspart die langwierige aber sonst erforderliche Prozedur der Vorbereitung der Analysenproben für die HPLC-Bestimmungen von Pharmaka und Metabolite aus biologischem Material. Weiterhin ist hiermit und bei Anwendung einer geeigneten stationären Phase in den Bohrungen von (C), (z.B. reversed-phase LiChrosorb RP-8 bzw. RP-18 oder Aktivkohle) die Anreicherung von Spuren organischer Substanzen aus wässrigen Lösungen (z.B. Urin) möglich.

(2) Sollte weder eine Vorreinigung der Analysenproben, noch eine Anreicherung der zu bestimmenden Substanzen erforderlich sein, bieten dennoch beide Einspritzvorrichtungen den Vorteil der Vereinigung der On-Column- und On-Stream-Application. Dies wirkt der Bandenverbreiterung entgegen, schont die stationäre Phase und erspart Zeit und Material (Vergleiche Fig. 7-10).

(3) Durch Auswahl einer geeigneten stationären Phase in den Bohrungen von (C) (nicht identisch mit der Trennsäule), lässt sich eine bessere Auflösung erreichen. Beispiele hierfür sowie für die Bestimmung von Pharmaka und ihre Metabolite aus Seren sind Gegenstand abgeschlossener Arbeiten und werden demnächst publiziert.

(4) Durch Anwendung von doppelten Dichtungen wird die Verschleissercheinung der Dichtungen wesentlich herabgesetzt und die Dichtigkeit erhöht.

(5) Durch die Anordnung der Anschlüsse (Pumpe-Kanüle- bzw. Bohrung in

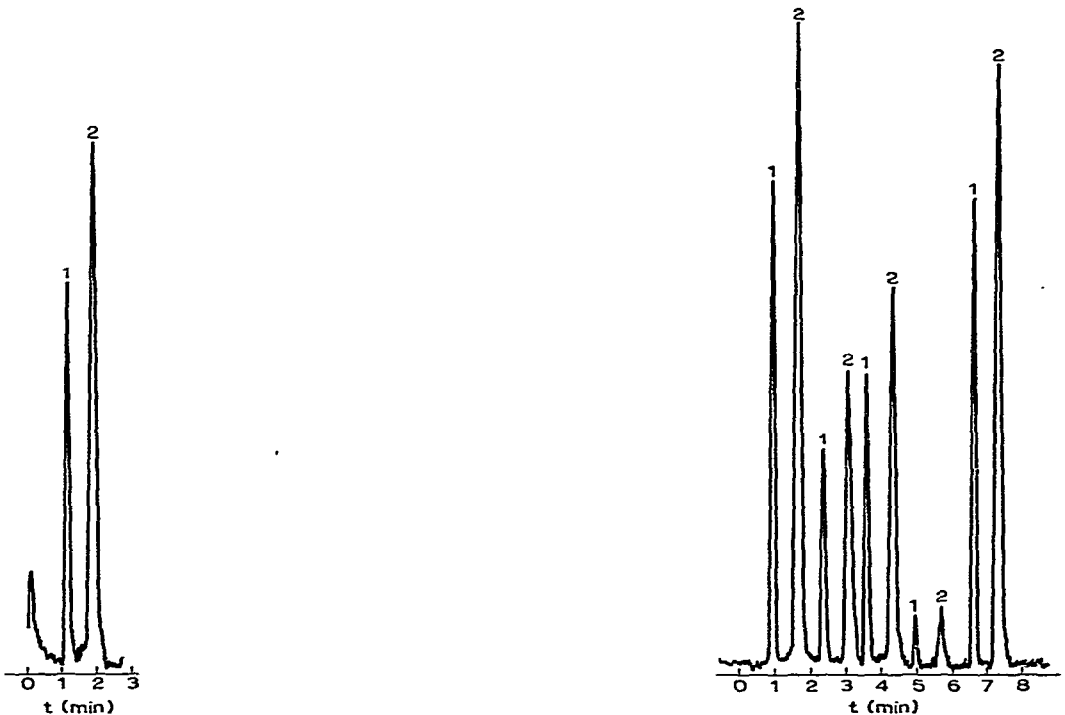


Fig. 7. HPLC-Analyse von Phenprocoumon (1) und Chlordiazepoxid (2) unter Anwendung der Stop-Flow-Methode mit der 1. Einspritzvorrichtung.

Fig. 8. Fünf HPLC-Analysen von Phenprocoumon (1) und Chlordiazepoxid (2) unter Anwendung der 1. Einspritzvorrichtung (On-Stream-Application).

(C)-Säule) erfordert jede Probenaufgabe nur eine einmalige Betätigung des Rotors bzw. des Schiebers, während bei anderen Systemen die Einspritzvorrichtungen für jede Probe zweimal betätigt werden müssen. Dies schont zusätzlich die Dichtungen. So zeigten die Dichtungen nach 200-maliger Betätigung keine Ermüdungserscheinungen.

BEMERKUNG ZUR HANDHABUNG

Die Dichtungen werden erst dann durchbohrt, nachdem der Schieber (bzw. der Rotor) unter wiederholtem gleichmässigen Anziehen der Imbusschrauben mehrmals hin- und her bewegt wurde (bzw. um 120° gedreht wurde).

DURCHFÜHRUNG VON HPLC-ANALYSEN UNTER VERWENDUNG BEIDER EINSPRITZVORRICHTUNGEN

Mit Hilfe der ersten Einspritzvorrichtung wurden die HPLC-Analysen von Phenprocoumon-Chlordiazepoxyd (Fig. 7 und 8), durchgeführt. Wie Fig. 8 zeigt, er-

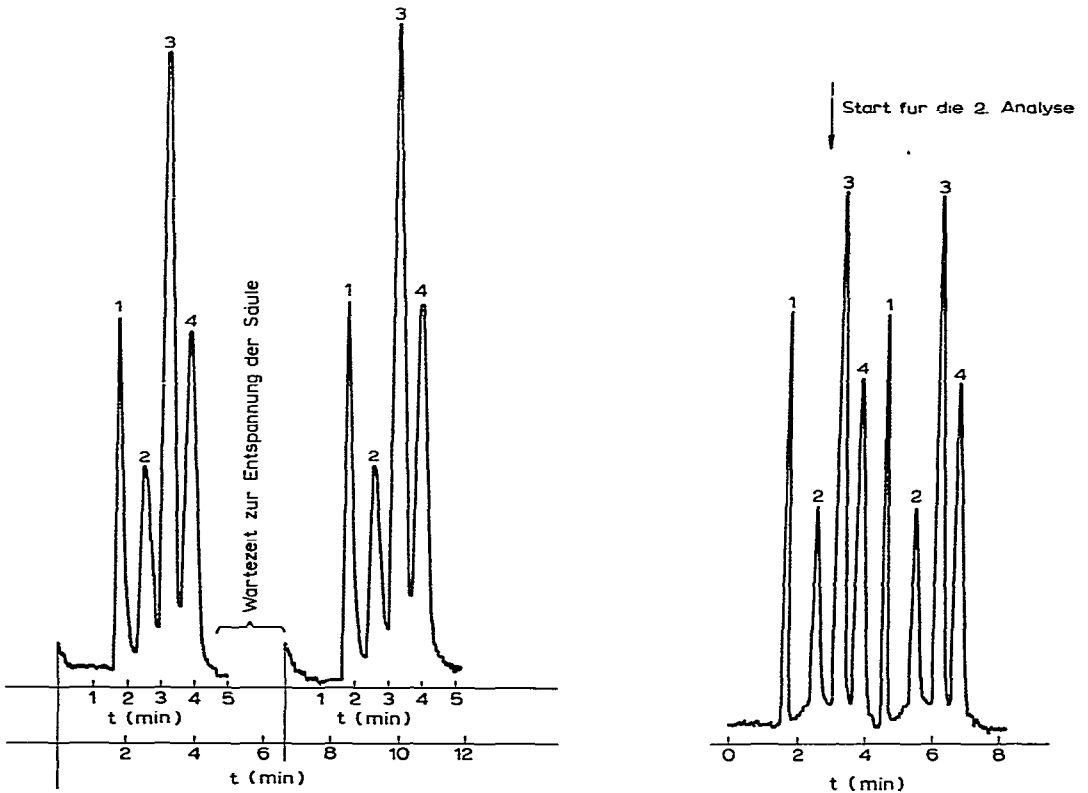


Fig. 9. Chromatogramme zweier HPLC-Analysen von Phenprocoumon (1), Phenobarbital (2) Tegretal (3) und Coffein (4) bei Anwendung der Stop-Flow-Methode und mit Hilfe des Injektorblocks der HPLC-Anlage Varian 8500.

Fig. 10. Chromatogramme zweier HPLC-Analysen aus der gleichen Analysenlösung und unter gleichen Bedingungen jedoch bei Anwendung der 2. Einspritzvorrichtung.

folgte hier die Applikation der nächstfolgenden Analysenproben nachdem der Phenprocoumon-Peak der zuvor applizierten Probe detektiert wurde. Für die Durchführung dieser Analysen eignete sich folgendes chromatographisches System: Gerät: Varian 8500; Säule: Rostfreier Stahl 100 cm \times 2.1 mm I.D.; stationäre Phase: Partisil 10, 10 μ m; Detektor: UV, bei 240 nm, S beam, Range 0.01, UV-VIS-Spektral-Photometer, Varian Modelle 635; Schreiber: Varian A-25, Spannung 50 mV, Papier-vorschub: 50 cm/h; mobile Phase: Methanol, 70 ml/h; angezeigter Druck: 315 atm; Temperatur: Raumtemperatur (25°).

Die zweite Einspritzvorrichtung wurde bei der Durchführung der HPLC-Analysen von Phenprocoumon-Phenobarbital-Tegretal-Coffein verwendet (Fig. 9 und 10). Hierfür wurde das oben erwähnte chromatographische System mit folgenden Änderungen verwendet: Säulenlänge: 1.9 m; stationäre Phase: Merckosorb® Si-60, 10 μ m; Wellenlänge: 234 nm; angezeigter Druck: 470 atm.

Da die hier gezeigten Chromatogramme 9 und 10 aus ein und derselben Lösung der oben erwähnten Stoffe in Methanol durchgeführt wurde, lässt sich der Einfluss der Einspritzvorrichtung auf die "apparative" Bandenverbreiterung deutlich erkennen.

Um einen eventuellen Einfluss der Betätigung des Schiebers während der Durchführung der Analyse auf die quantitative Bestimmung zu ermitteln, wurden aus der selben Lösung zehn Proben verschiedener Volumina gespritzt, der Schieber zu verschiedenen Zeitpunkten betätigt, die ermittelten Quotienten Q_1 , Q_2 und Q_3 gegen die Analysenzahl eingetragen (s. Fig. 11). Daraus lässt sich erkennen, dass der Umschaltvorgang ohne Einfluss auf die Bestimmung bleibt.

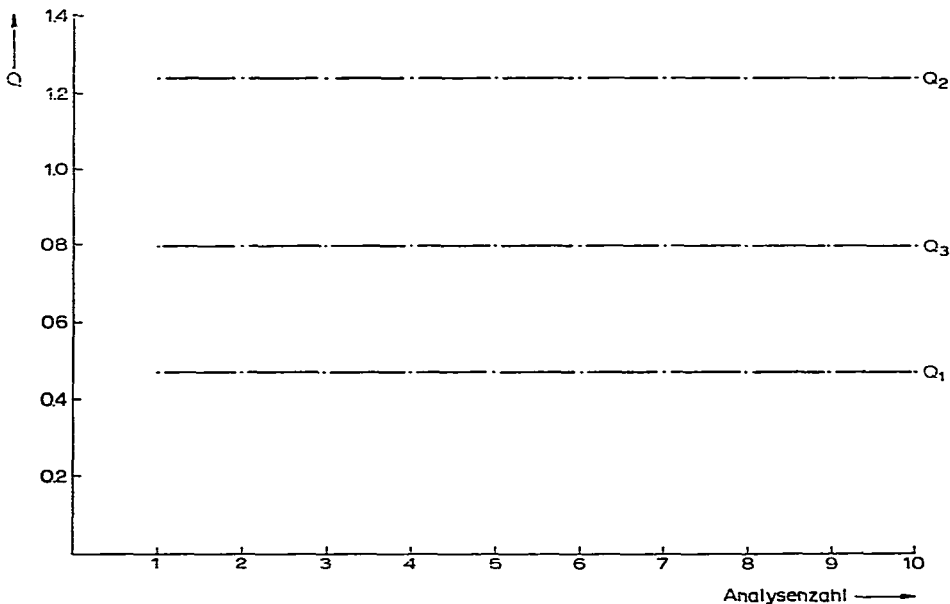


Fig. 11. Graphische Darstellung der Quotienten Q_1 , Q_2 und Q_3 in Abhängigkeit der Analysenzahl. Q_1 = Phenobarbital-Peakhöhe/Phenprocoumon-Peakhöhe; Q_2 = Tegretal-Peakhöhe/Phenprocoumon-Peakhöhe; Q_3 = Coffein-Peakhöhe/Phenprocoumon-Peakhöhe.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Beschreibung zweier einfach konstruierter Einspritzvorrichtungen, die ohne Unterbrechung des Flusses der mobilen Phase (On-Stream-Application) und in manueller Bedienungsweise die Durchführung von HPLC-Analysen (bis 600 atm), ermöglichen. Weiterhin bietet eine der hier beschriebenen Einspritzvorrichtungen, und zwar in Erweiterung der bisherigen Anforderungen an Einspritzsysteme, die Möglichkeit der Vorreinigung der Analysenproben von unerwünschten Störstoffen sowie der Anreicherung der zu bestimmenden Substanzen.

DANK

Mein Dank gilt den Herren Feinmechanikermeister Manfred Raer, Helmut Jäckel und Klaus Röding für ihre freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der hier beschriebenen Einspritzvorrichtungen.

LITERATUR

- 1 H. Engelhardt, *Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1975.
- 2 J. N. Done, J. H. Knox und J. Loheac, *Applications of High Speed Liquid Chromatography*, Wiley, Chichester, 1975.
- 3 P. R. Brown, *High Pressure Liquid Chromatography — Biochemical and Biomedical Applications*, Academic Press, New York, 1972.
- 4 B. Pearce und W. Li. Thomas, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 1107.
- 5 C. D. Scott, W. F. Johnson und V. E. Walker, *Anal. Biochem.*, 32 (1969) 182.
- 6 A. Kinawi, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 360.
- 7 A. Kinawi und I. Baumgartl, *Arzneim.-Forsch.*, 26 (1976) 2019.
- 8 A. Kinawi, A. Onken, B. Rozyczka und W. König, *Arzneim.-Forsch.*, 27 (1977) 363.