

## Note

### Bestimmung der Totzeit in der "Reversed-phase" Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

O. FINI, F. BRUSA und L. CHIESA\*

*Abteilung Qualitätskontrolle, Wander Chimica S.A., Postfach, 6600 Locarno (Schweiz)*

(Eingegangen am 27. Oktober 1980; geänderte Fassung eingegangen am 3. Februar 1981)

Über die Totzeitbestimmung in der Gaschromatographie existieren viele Literaturangaben<sup>1-3</sup>. Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) sind die Literaturangaben bisher rar, obwohl die Kenntnis der Totzeit aus folgenden Gründen sehr wichtig ist:

(1) Aus der Totzeit und den Bruttoretentionszeiten können die Nettoretentionszeiten berechnet werden; daraus lassen sich die weiteren wichtigen Parameter errechnen ( $k$ -Werte, Bodenzahl usw.).

(2) Aus der Totzeit wird die Güte der Einrichtung geprüft, z.B. Dosiergüte (nach Kaiser<sup>4</sup>).

(3) Aus der Totzeit lassen sich ungünstige HPLC-Bedingungen erkennen, wie Fig. 1 zeigt.

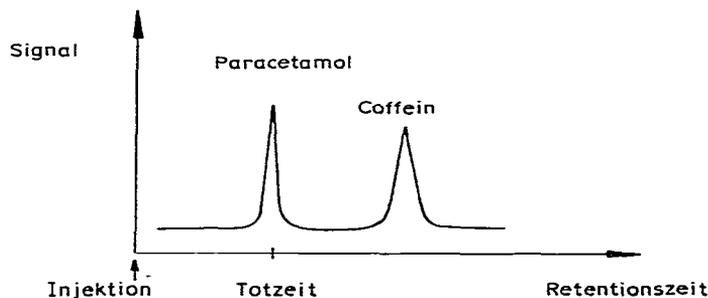


Fig. 1. Chromatogramm-Schema.

Im abgebildeten Chromatogramm-Schema ist das Paracetamol zwar von Coffein getrennt, aber die Spezifität der Paracetamol-Bestimmung ist sehr gering, und die Störungsmöglichkeiten sind hoch. Paracetamol wird in diesem Falle von der stationären Phase überhaupt nicht zurückgehalten. Von der Verwendung dieses chromatographischen Systems zur Paracetamol-Bestimmung ist deshalb (dank der Kenntnis der Totzeit) abzuraten.

Es gibt viele pharmazeutische Wirksubstanzen, die mit bestimmten Fließmitteln bei der Totzeit, oder sogar vorher (z.B. Acetylsalicylsäure), eluiert werden (vgl. Tabelle II).

DEFINITION DER TOTZEIT  $T_M$ 

Unter Totzeit  $T_M$  versteht man die Verweilzeit der zu bestimmenden Substanzen in der mobilen Phase. Die gemessene Retentionszeit einer Substanz ( $T_R$ ) ist die Summe aus der Totzeit ( $T_M$ ) und der Verweilzeit der Substanz in der stationären Phase ( $T_R$ ).

$$T_R = T_R + T_M$$

Theoretisch sollte die Totzeit  $T_M$ , bei gegebener Säule und Fluss, für alle Substanzen gleich sein<sup>5</sup> und unabhängig von der Fließmittelzusammensetzung.

## EXPERIMENTELLER TEIL

*Bestimmung des prozentualen Anteils von flüssiger und fester Phase in der Säule mittels Gravimetrie*

Um das exakte Volumen der in der Säule enthaltenen Flüssigkeit zu bestimmen (= theoretisches Totvolumen), wurde folgende Methode angewendet:

- (a) Wägen der Säule (einschliesslich stationärer und mobiler Phase) =  $G_{\text{tot}}$ ;
- (b) Quantitative Transferierung des Säuleninhaltes (fest + flüssig) in einen tarierten Rundkolben. Verdampfung der flüssigen Phase. Bestimmung des Gewichtes der festen Phase =  $G_{\text{fest}}$ ;
- (c) Wägen der leeren Säule =  $G_{\text{leer}}$ ;
- (d) Bestimmung des Totalvolumens der leeren Säule aus dem Gewicht der leeren Säule und dem Gewicht der mit Wasser gefüllten Säule =  $V_{\text{tot}}$ .

Aus diesen Messungen ergibt sich das Volumen der flüssigen Phase =  $V_{F1}$

$$V_{F1} = \frac{G_{\text{tot}} - (G_{\text{leer}} + G_{\text{fest}})}{S_{F1}}$$

wobei  $S_{F1}$  das spezifische Gewicht der mobilen Phase darstellt. Das Volumen der stationären Phase ( $V_{st}$ ) ist gegeben durch:

$$V_{st} = V_{\text{tot}} - V_{F1}$$

*Messungen.* Bei Knauer-Fertigsäulen (Knauer, Oberursel, B.R.D.), LiChrosorb RP-8, 7  $\mu\text{m}$ , 25  $\times$  0.46 cm, ergeben sich folgende Werte (25°C): Volumen der leeren Säule: 4.11 ml; Volumen der flüssigen Phase: 3.03 ml; Volumen der festen Phase: 1.08 ml. Die Erfahrung zeigt, dass sich das Volumen der festen Phase bei Änderung der mobilen Phase nicht ändert (keine "Schrumpfung" oder "Quellung"); daraus folgt, dass  $V_{st}$  eine konstante Grösse sein muss. Wenn man annimmt, dass bei der Chromatographie die gesamte, in der Säule weilende Flüssigkeit laufend erneuert wird, und wenn die Volumenkontraktion vernachlässigt wird, so stellt das oben gemessene Volumen der flüssigen Phase  $V_{F1}$  das theoretische Totvolumen der Säule dar.

Das Volumen der vor und nach der Säule angeschlossenen Kapillaren ist derart klein, dass es vernachlässigt werden kann; für den untersuchten Säulentyp ergeben sich somit:

bei einem Fluss von 1.00 ml/min eine theoretische Totzeit von 3.03 min, bei 2.00 ml/min eine theoretische Totzeit von 1.52 min, u.s.w.

#### Bestimmung der Totzeit mittels Inertsubstanzen

Eine Reihe möglicher Inertsubstanzen wurde unter gleichen HPLC-Bedingungen eingesetzt, und die Aufenthaltszeit bis zum Detektor wurde gemessen. Die Experimente wurden mit verschiedenen mobilen Pasen durchgeführt (vgl. Tabelle I).

*Diskussion.* Die theoretische Totzeit für die gewählten Bedingungen (vgl. Tabellen I und II) ist 3.03 min (s. oben).

Aus der Tabelle I sieht man, dass diese Zeit mit den gefundenen Zeiten von Formamid, Harnstoff und Thioharnstoff gut übereinstimmt. Aus praktischen Gründen (sehr gute UV-Absorption) empfehlen wir, Thioharnstoff zur Bestimmung der Totzeit in der "Reversed-phase" Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zu verwenden. Salze, Natriumnitrat usw. kommen mit bestimmten Fließmitteln zu früh und können nicht zur Bestimmung der Totzeit verwendet werden. Sauerstoff wird hingegen von der stationären Phase zurückgehalten und ist demzufolge zur Bestimmung der Totzeit nicht anwendbar. (Sauerstoff ist in organischen Lösungsmitteln besser löslich als in Wasser.)

Wie aus der Tabelle II ersichtlich ist, gibt es einige pharmazeutische Wirkstoffe, die bei der Anwendung bestimmter mobiler Phasen eine Retentionszeit aufweisen, die kleiner als die Totzeit ist. Dass gewisse Substanzen vor der Totzeit eluiert

TABELLE I

RETENTIONSZEITEN (min) EINIGER INERTSUBSTANZEN, DIE ZUR BESTIMMUNG DER TOTZEIT IN FRAGE KOMMEN KÖNNTEN

Konstant gehaltene Bedingungen: Fluss: 1,0 ml/min; Säule: Knauer-Fertigsäule RP-8, 7  $\mu$ m, 25  $\times$  0.46 cm, Volumen der leeren Säule = 4.11 ml; Einrichtung: Hewlett-Packard Flüssigchromatograph Modell 1084; Temperatur: 25 C; Bemerkung: Die Leitung vor und nach der Säule bestand aus kurzen Kapillar-Stahlröhren. Das Volumen dieser Röhren (= 0.05 ml) gegenüber dem Säule-Volumen war derart klein, dass es vernachlässigt wurde.

| Substanzen*                       | Mobile Phase    |       |       |       |  |   |   |  |      |
|-----------------------------------|-----------------|-------|-------|-------|--|---|---|--|------|
|                                   | Methanol-Wasser |       |       |       | Methanol-<br>0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$<br>in Wasser<br>(pH 5.4).<br>50:50 | Methanol-<br>0.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$<br>in Wasser<br>(pH 8.3),<br>50:50 | Methanol-<br>NaCl-Lösung<br>0.1 M in Wasser<br>(pH 6.2),<br>50:50 |  |      |
|                                   | 100:0           | 75:25 | 50:50 | 25:75 |  |   |   |  |      |
| Natriumnitrat                     | 1.94            | 2.00  | 1.93  | 1.95  | 2.94   |   | 2.96  |  | 2.96 |
| Pikrinsäure                       | 1.78            | 1.65  | 1.77  | 2.92  | 6.70   |   | 6.40  |  | 6.05 |
| Chromotropsäure-<br>dinatriumsalz | 1.61            | 1.59  | 1.59  | 1.63  | 2.58   |   | 2.49  |  | 2.39 |
| Formamid                          | 3.00            | 2.94  | 2.93  | 3.02  | 2.91   |   | 2.91  |  | 2.94 |
| Wasser                            | —               | —     | 2.98  | 3.17  | —  |   | —   |  | 2.98 |
| Harnstoff                         | —               | 2.93  | 2.93  | 3.09  | 2.92   |   | 2.91  |  | 2.93 |
| Thioharnstoff                     | 2.90            | 2.88  | 2.94  | 3.15  | 2.94   |   | 2.93  |  | 2.93 |
| Uracil                            | 3.23            | 3.23  | 3.25  | 3.48  | 3.24   |   | 3.21  |  | 3.27 |
| Sauerstoff                        | 3.68            | 4.50  | 5.81  | 7.24  | 5.95   |   | 6.01  |  | 6.10 |

\* In möglichst kleiner Menge eingespritzt (50 bis 200 ng). Einspritzvolumen: 10  $\mu$ l.

TABELLE II

## RETENTIONSZEITEN (min) EINIGER PHARMAZEUTISCHER WIRKSTOFFE MIT BEKANNT KLEINEM KAPAZITÄTSFAKTOR

Konstant gehaltene Bedingungen: Fluss: 1.0 ml/min; Säule: Knauer-Fertigsäule RP-8, 7  $\mu$ m, 25  $\times$  0.46 cm, Volumen der leeren Säule = 4.11 ml.; Einrichtung: Hewlett-Packard Flüssigchromatograph Modell 1084; Temperatur: 25°C; Bemerkung: Die Leitung vor und nach der Säule bestand aus kurzen Kapillar-Stahlröhren. Das Volumen dieser Röhren (= 0.05 ml) gegenüber dem Säule-Volumen war derart klein, dass es vernachlässigt wurde.

| Substanz*          | Mobile Phase    |       |       |   |       |   |
|--------------------|-----------------|-------|-------|---|-------|---|
|                    | Methanol-Wasser |       |       | Methanol-0.1%<br>Ammoniumcarbonatlösung |       | Methanol-0.1%<br>Na-dihydrogenphosphat, |
|                    | 75:25           | 90:10 | 100:0 | 75:25                                   | 90:10 | 90:10                                   |
| Clopidamid         | 3.60            | 3.15  | 3.03  | 3.55                                    | 3.18  | 3.20                                    |
| Coffein            | 3.51            | 3.35  | 3.30  | 3.53                                    | 3.34  | 3.50                                    |
| Phenobarbital      | 3.57            | 3.12  | 3.02  | 3.24                                    | 3.02  | 3.20                                    |
| Acetylsalicylsäure | 3.12            | 3.02  | 3.07  | 2.82                                    | 2.57  | 2.64                                    |
| Paracetamol        | 3.12            | 3.04  | 2.99  | 3.09                                    | 3.07  | 3.18                                    |
| Aesculin           | 2.90            | 2.80  | 2.80  | 2.70                                    | 2.58  | 2.83                                    |

\* In möglichst kleiner Menge eingespritzt (50 bis 200 ng). Einspritzvolumen: 10  $\mu$ l.

werden, kann durch die Donnan's Gleichgewichtsverteilungen erklärt werden oder/ und dadurch, dass die erwähnten Substanzen unter bestimmten Bedingungen nicht in die Poren der stationären Phase eindringen können (Solvathülle).

Als Richtlinie zur Erstellung von Analysemethoden schlagen wir vor, die HPLC-Bedingungen so zu wählen, dass der Peak der zu bestimmenden Substanz nach dem Thioharnstoff-Peak kommt und von diesem vollständig getrennt ist.

*Homologe Reihe*

Analog zur Gaschromatographie besteht auch bei der "Reversed-phase" HPLC die Möglichkeit, die Totzeit durch das Chromatographieren einer homologen Reihe zu berechnen<sup>4,6</sup>. Grundlage dazu ist das lineare Verhältnis zwischen Logarithmus der Netto-Retentionszeit ( $T_R = T_R - T_M$ ) und der homologen Zahl ( $n$ ) der entsprechenden Substanz<sup>6</sup>.

$$\log(T_R - T_M) = an + b$$

Wir haben Versuche mit nur einer homologen Reihe (*p*-Hydroxy-benzoesäureester) durchgeführt (Tabelle III). Die so errechneten Totzeiten weichen ein wenig von den direkt gemessenen ab. Es scheint, dass es einen weiteren Einflussparameter, wenigstens für die eingesetzte homologe Reihe, gibt, weil die berechnete Totzeit mit abnehmendem Methanol-Anteil in der mobilen Phase, d.h. mit zunehmendem Kapazitätsfaktor, zunimmt (Tabelle IV).

TABELLE III

## RETENTIONSZEITEN (min) EINER HOMOLOGEN REIHE

Konstant gehaltene experimentelle Bedingungen: Fluss: 2.0 ml/min. Säule: Knauer-Fertigsäule RP-8, 7  $\mu\text{m}$ , 25  $\times$  0.46 cm; Einrichtung: Hewlett-Packard Flüssigchromatograph Modell 1084; Temperatur: 25°C.

| Homologe Substanz             | Homologe Zahl | Mobile Phase Methanol-Wasser |       |       |
|-------------------------------|---------------|------------------------------|-------|-------|
|                               |               | 65:35                        | 60:40 | 55:45 |
| <i>p</i> -Hydroxybenzoesäure- |               |                              |       |       |
| -methylester                  | 1             | 2.36                         | 2.73  | 3.29  |
| -aethylester                  | 2             | 2.76                         | 3.40  | 4.44  |
| -propylester                  | 3             | 3.46                         | 4.61  | 6.64  |
| -butylester                   | 4             | 4.58                         | 6.71  | 10.67 |

TABELLE IV

## VERGLEICH ERRECHNETER UND GEMESSENER TOTZEITEN

Konstant gehaltene experimentelle Bedingungen: Fluss: 2.0 ml/min; Säule: Knauer-Fertigsäule RP-8, 7  $\mu\text{m}$ , 25  $\times$  0.46 cm; Einrichtung: Hewlett-Packard Flüssigchromatograph Modell 1084; Temperatur: 25°C.

| Mobile phase<br>Methanol-Wasser | Totzeit, errechnet aus den<br>Retentionszeiten einer<br>homologen Reihe (Tabelle III)<br>(Iterationsmethode) (min) | Totzeit durch<br>Thioharnstoff<br>gemessen (min) |
|---------------------------------|--|--|
| 65:35                           | 1.75   | 1.62   |
| 60:40                           | 1.85   | 1.63   |
| 55:45                           | 1.96   | 1.65   |

## LITERATUR

- 1 R. E. Kaiser, *Chromcard Gas-Chromatographie, Totzeit in der Gaschromatographie*, Institut für Chromatographie, Bad Dürkheim, 1978.
- 2 A. Grobler und G. Bálsiz, *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 57.
- 3 R. J. Smith, J. K. Haken und M. S. Wainwright, *J. Chromatogr.*, 147 (1978) 65.
- 4 R. E. Kaiser, *Chromatographia*, 9 (1976) 463.
- 5 H. Engelhardt, *Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1976, p. 7.
- 6 W. K. Al-Thamir, J. H. Purnell, C. A. Wellington und R. J. Laub, *J. Chromatogr.*, 173 (1979) 388.