

**Agilent Technologies**

Premier Solution Partner

SFC-NCD-Kopplung zum Screening N-haltiger Substanzen

Produktinformation



Stickstoff als wichtiger Bestandteil in pharmazeutischen Wirkstoffen

Werden Wirkstoff-Bibliotheken hinsichtlich ihrer Verbindungen betrachtet, ist erkennbar, dass über 90% der Moleküle mindestens ein Stickstoffatom beinhalten. Für analytische Aufgaben im Pharmabereich eignet sich somit ein Detektor, der selektiv und sensitiv auf Stickstoffverbindungen anspricht. Der N-selektive Chemilumineszenzdetektor (NCD) ist hierfür prädestiniert, da sein Response linear und äquimolar zur Konzentration der Stickstoffhaltigen Analyte ist.

SFC-NCD-Kopplung zur selektiven und sensitiven Messung

Bei der SFC-NCD-Kopplung von der SIM GmbH handelt es sich um eine neue Technik, die den Anwendungsbereich der Chemilumineszenzdetektion erweitert. Die SFC (überkritische Flüssigkeitschromatographie) ist eine schnelle Trennmethode mit hohem Auflösungsvermögen; die stickstoffselektive Chemilumineszenzdetektion (NCD) weist die Vorteile der selektiven und sensitiven Detektion mit äquimolarem Response auf. Dadurch ist eine Quantifizierung ohne primären Referenzstandard möglich. Insgesamt steht mit dieser Kopplung eine schnelle und sensitive Methode zur Quantifizierung und Qualifizierung stickstoffhaltiger Analyten zur Verfügung.

Grundlage Chemilumineszenzdetektion

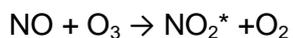
Der gesamte Detektionsprozess des NCDs kann in zwei Vorgänge gegliedert werden:

1. Stickstoffhaltige Komponenten, ausgenommen ist hier Distickstoff (N₂), werden unter thermo-oxidativen Bedingungen, d.h. hohen Temperaturen und einem hohen Anteil Sauerstoff, durch folgende allgemeine Reaktion zu Stickstoffmonoxid umgesetzt:



Die Umsetzung erfolgt unter hohen Temperaturen von 900 bis 1000 °C und einem Überschuss an Sauerstoff im Brenner.

2. Im folgenden Schritt wird NO in einer Reaktionszelle unter geringem Druck mit Ozon gemischt, wodurch es zur Bildung von angeregten NO₂* kommt:



Das gebildete NO₂* befindet sich im angeregten Zustand, fällt sehr schnell in seinen Grundzustand zurück und emittiert dabei Chemilumineszenzstrahlung im Bereich von 600 – 3200 nm, die mittels Photomultiplier (PMT) und vorgeschalteten optischen Filtern detektiert wird. Die emittierte Strahlung ist linear proportional zum gebildeten NO.

Äquimolarer Response – Quantifizierung ohne primären Referenzstandard

Die LC-Kopplung erweist sich aufgrund des Eintrags einer Flüssigkeit zunächst als schwerer umsetzbar als im Vergleich zur GC-Kopplung. Zusätzlich muss hierbei eine Vernebelungseinheit (Nebulizer) verwendet werden, um die Lösung möglichst fein zu verteilen. Der enorme Vorteil des NCD liegt im reaktionsbedingten stöchiometrischen Verhältnis des gebildeten Stickstoffmonoxid zum Analyten. Somit lässt sich der Response des Detektors in Relation zur gebildeten Menge NO setzen; d.h. die Kalibration mit einem externen Standard (z.B. Coffein) ermöglicht die Quantifizierung eines neu synthetisierten Produkts ohne eigenen Referenzstandard. Dieses Prinzip der Quantifizierung über den äquimolaren Response ist in Abb. 1 dargestellt.

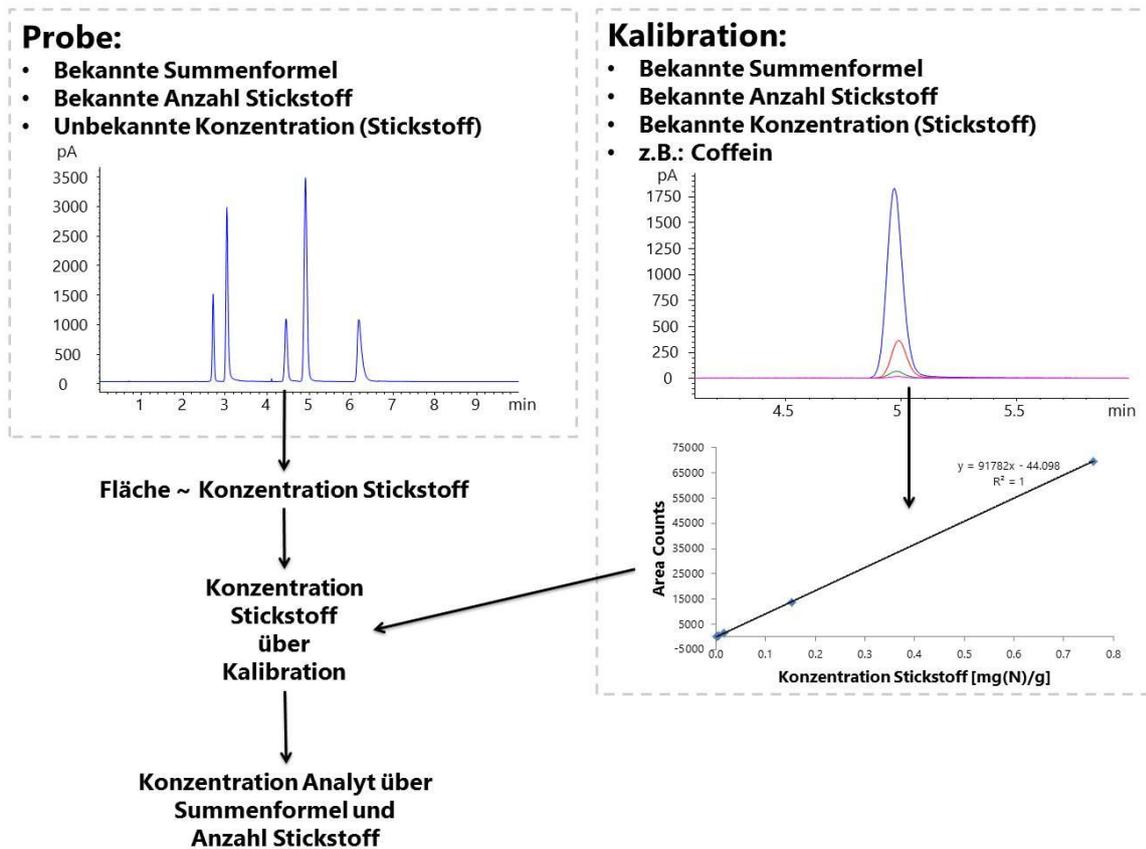


Abb. 1 Prinzip der Quantifizierung über den äquimolaren Response

Kalibration mit Coffein

Die Kalibrationsreihe wurde mittels ethanolischer Coffeinelösung im Bereich von 0,32 – 770 ppmw Stickstoff (N) (0,00032 – 0,77 mg(N)/g) angesetzt (n=11) und jeder Standard dreifach injiziert.

Abb. 2 zeigt die Kalibrationsgerade mit Konfidenzintervall (P=95%). Die Verfahrensstandardabweichung V_{x0} betrug 0,49%. LOD und LOQ liegen bei 1,7 $\mu\text{g(N)/g}$ (5,9 $\mu\text{g(Coffein)/g}$) und 5,68 $\mu\text{g(N)/g}$ (19,7 $\mu\text{g(Coffein)/g}$).

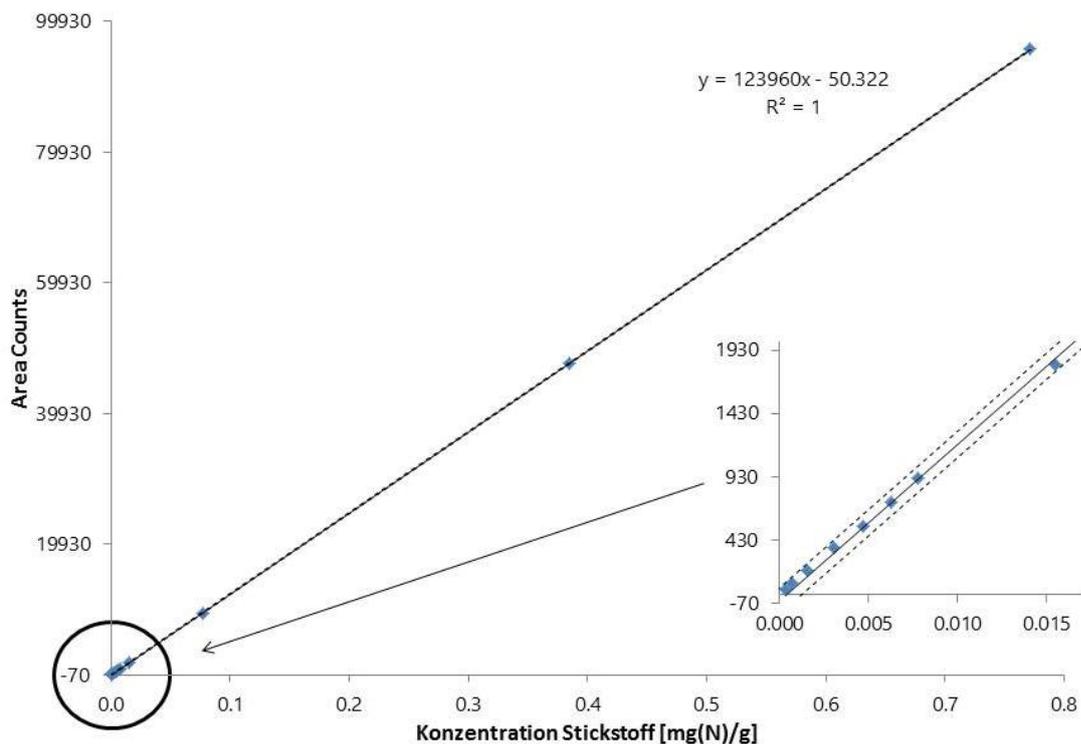


Abb. 2 Kalibrationsgerade für Coffein in Ethanol mit Konfidenzintervall (p_95%)

Quantifizierung diverser Testsubstanzen

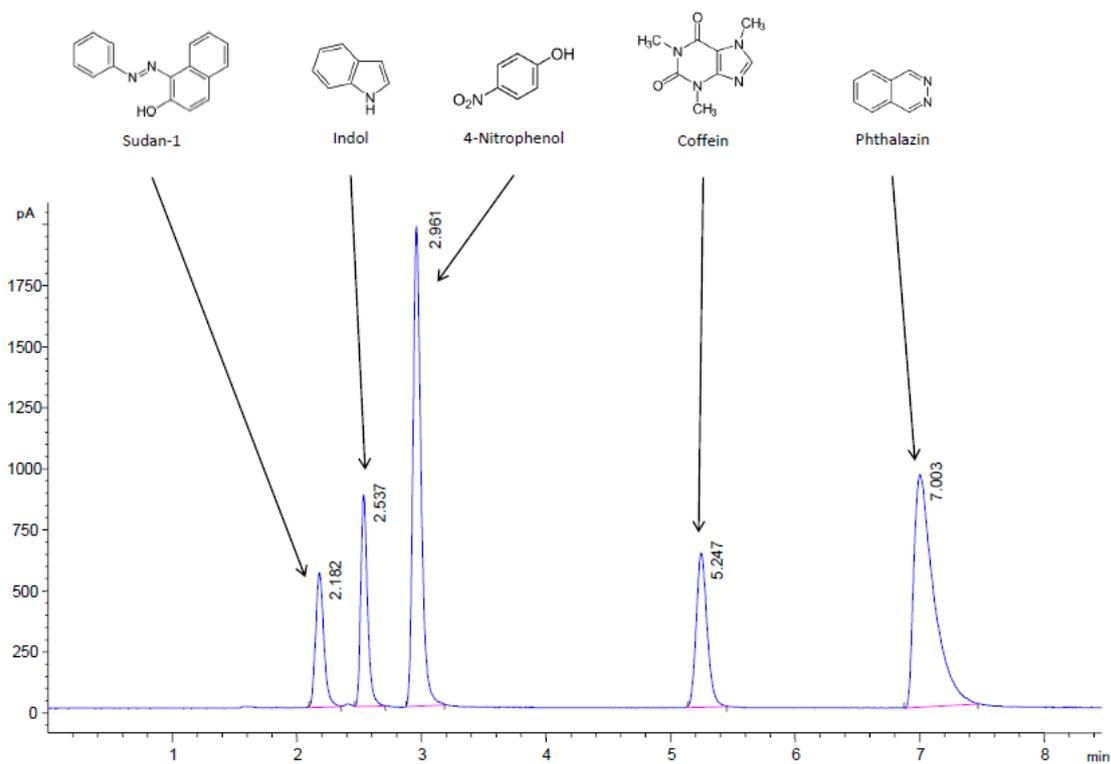


Abb. 3 Chromatogramm eines 5-Komponenten-Mix mit SFC-NCD-Kopplung (Zorbax RX-Sil 4.6 x 250mm; 5µm 1.5 ml/min CO₂ mit 14% Methanol als Modifier; 5µl Injektionsvolumen; TCC: 40 °C; BPR: 140 bar)

In Abb. 3 ist ein Beispielchromatogramm von 4 Komponenten zusammen mit dem Kalibrationsstandard Coffein zu sehen. Als Testsubstanzen zur Quantifizierung wurden hier Sudan-1, Indol, 4-Nitrophenol und Phthalazin sowie der Standard Coffein jeweils in Ethanol eingesetzt. Die Wiederfindungsraten lagen – mit Ausnahme des Sudan-1 - zwischen 88 und 106% (s. Tab. 1). Die Komponente Sudan-1 ist aufgrund ihrer N=N-Bindung nicht für die Quantifizierung über den äquimolaren Response mit dem Coffein-Standard geeignet, was sich auch bei dem Ergebnis für die Wiederfindungsrate zeigt (WFR(Sudan-1) 70,46 %). Die relativen Standardabweichungen bezogen auf die Peakfläche lagen bei diesen Beispielsubstanzen im Bereich von 0,6 – 6,3 %.

Tab. 1 Quantifizierung der Testsubstanzen Sudan-1, Indol, 4-Nitrophenol und Phthalazin mit Coffein über den äquimolaren Response (n=3)

Parameter	Sudan-1	Indol	4-Nitrophenol	Phthalazin	Phthalazin 1:10
C _{SOLL} [mg/g]	1,21	3,787	5,57	1,987	0,196
C _{IST} [mg/g]	0,85	3,842	5,878	1,765	0,173
N _{SOLL} [mg/g]	0,14	0,453	0,561	0,428	0,042
N _{IST} [mg/g]	0,10	0,460	0,592	0,380	0,037
WFR [%]	70,46	101,46	105,52	88,81	88,47
RSD (Area) [%]	0,55	1,05	1,21	1,21	6,26
RSD (RT) [%]	0,15	0,08	0,13	0,08	0,13

Zusammenfassung

Die durchgeführten Testmessungen belegen die Vorteile des NCD als leistungsfähigen und selektiven Detektor für die SFC. Messbare Analyten müssen lediglich eine C-N Bindung enthalten, um nachweisbar zu sein. Zur Quantifizierung mittels äquimolarem Response gilt dieselbe Annahme; einzige Ausnahme bilden hier N=N-Bindungen, da diese einen zusätzlichen Zerfallsprozess zu N₂ unterliegen. Der lineare Kalibrationsbereich beginnt für Coffein im unteren ppm-Bereich und umfasst bis zu 4 Zehnerpotenzen. Bei der Quantifizierung mit dem externen Standard Coffein wurden für die Testsubstanzen Wiederfindungsraten zwischen 88 und 105 % bei relativen Standardabweichungen von 0,6 bis 6,3 % erreicht.