



## Bio-farmacaceutische bepaling van geneesmiddelen

### Hoe doen we dit?

H. Lingeman, Vrije Universiteit, Amsterdam

Zoals in Deel I van deze serie is aangegeven begint de ontwikkeling van een vloeistofchromatografische (LC) methode met het verzamelen van de noodzakelijke informatie. Het gaat dan niet alleen om de fysisch-chemi-

sche eigenschappen van de te scheiden geneesmiddelen (analieten), interfererende verbindingen en van het monster, maar ook om vragen als het uiteindelijke doel van de bepaling, de gewenste gevoeligheid, of er een monsterverbewerking nodig is, etc. Een volgende vraag die beantwoord moet worden heeft

### Deel IIa

te maken met welke detector en welke detectie omstandigheden er gekozen moeten worden. Hierna moet het meest geschikte fasesysteem worden bepaald en kan een eerste optimalisatie procedure worden gestart. Als er zich hierbij geen problemen voordoen kan het systeem worden gevalideerd. Indien er wel problemen (b.v. asymmetrische en/of brede pieken, tailende pieken, een kolom afhankelijke scheiding, een slecht reproduceerbare scheiding, of een korte levensduur van de kolom) optreden is een tweede optimalisatie procedure noodzakelijk.

### Literatuur:

Bio-farmacaceutische Bepaling van Geneesmiddelen, Deel I: Extract 1998 9(2) 9- en Extract 1998 9(3) 15-

### K Vloeistofchromatografische scheiding van geneesmiddelen:

Aan het eind van Deel I is geconcludeerd dat fluoxetine, een matig polaire base met een pKa van 10,8, het beste kan worden bepaald met behulp van LC, waarmee het nog niet geheel duidelijk is geworden of hiervoor het beste normaal-fase (normal-phase) of omkeer-fase (reversed-phase) LC kan worden gebruikt. In Deel II zal een overzicht worden gegeven van de verschillende mogelijkheden van LC, met hierbij de noodzakelijke achtergrond gegevens, richtlijnen hoe een methode kan worden opgezet en gegevens hoe problemen kunnen worden gesignaleerd en opgelost.

### Inleiding:

Ondanks het feit dat de basisprincipes van de LC bekend worden verondersteld, wordt allereerst een kort overzicht gegeven van de belangrijkste parameters en vergelijkingen die in de LC worden gebruikt (Tabel 8). Belangrijke parameters bij iedere LC scheiding zijn de retentietijd ( $t_r$ ) en de dode tijd ( $t_0$ ) van de kolom. Deze twee parameters bepalen de capaciteitsfactor ( $k'$ ) van de verbinding die aangeeft welke fractie van de analiet er in de stationaire fase en welke fractie er in de mobiele fase zit.

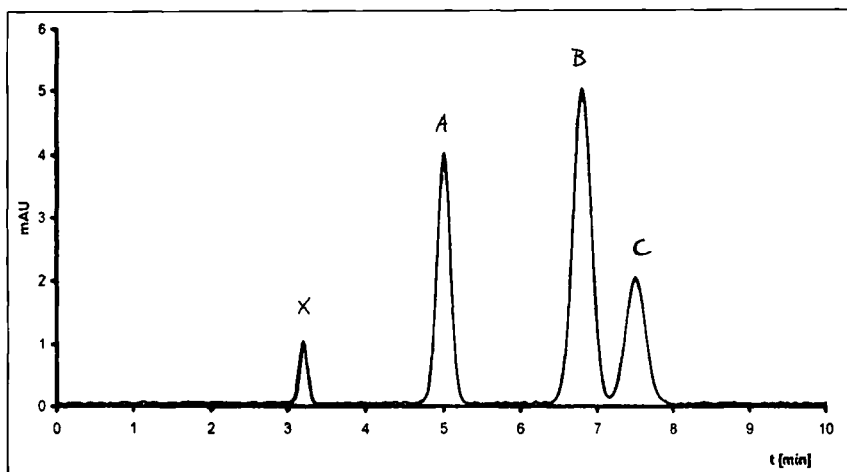
### Vraag:

Hoe kan  $t_0$  van een kolom worden bepaald?

### Belangrijke parameters en vergelijkingen in de LC

Capaciteitsfactor	$k'$	$k' = (t_r - t_0) / t_0$
Debiet	$F$	Snelheid van de mobiele fase (ml/min)
Dode tijd	$t_0$ (min)	$t_0 = V_m / F$
Dood volume	$V_m$ (ml)	$V_m = t_0 F$ $V_m = 0,7 (\pi/4) L d_c^2 = 0,5 L d_c^2$ $V_m = 0,1 L$ voor kolom met I.D. van 4,6 mm ( $L = \text{cm}$ , $d_c = \text{cm}$ )
Drukverval	$P$ (Pa)	$\sim 1000 L u \eta / d_p^2$ ( $u = \text{lineaire snelheid}$ , $\eta = \text{viscositeit}$ )
Gereduceerde schotelhoogte	$h$	$h = H / d_p$ ( $d_p = \text{deeltjesgrootte}$ )
Injectievolumen	$V_i$	$V_i = V_r / 2\sqrt{N}$ (maximaal injectievolumen)
Inwendige diameter van de kolom	$d_c$	
Kolomvolume	$V_c$ (ml)	$V_c = 1/4 \pi d_c^2 L$
Lengte van de kolom	$L$	
Lineaire snelheid	$u$ (m/s)	$u = L / t_0$
Minimaal te detecteren hoeveelheid	$W_m$	$W_m = 10^3 MW (k' + 1) (S/N) N' L d_c^2 / \epsilon \sqrt{N} L_c$ ( $MW = \text{moleculuurgewicht}$ , $S/N = \text{gewenste signaal-ruis-verhouding}$ , $N' = \text{basislijn ruis in absorptie eenheden}$ , $\epsilon = \text{molaire extinctie}$ , $L_c = \text{optische weglengte}$ )
Piekhoogte	$PH$	$PH = M_i / \sigma_i \sqrt{2\pi}$
Resolutie	$R_s$	$R_s = 2 (t_2 - t_1) / (W_1 + W_2)$ of $R_s = (t_2 - t_1) / \sigma_2$ $R_s = 1/4 [\alpha - 1] \sqrt{N} [k' / (1 + k')] /$
Retentietijd	$t_r$	$t_r = t_0 (1 + k')$
Retentievolumen	$V_r$	
Scheidingsfactor	$\alpha$	$\alpha = k'_2 / k'_1$
Schotelgetal	$N$	$N = (t_r / \sigma)^2$ of $N = 5,54 (t_r / W_0)^2$ ( $W_0 = \text{breedte van de piek op halve hoogte}$ )
Schotelhoogte	$H$	$H = L / N$
Verduunningsfactor	$DL$	$DL = C_{max} / C_0 = [4 V_i \sqrt{N}] / [\pi d_c^2 \epsilon L (1 + k')] (\sqrt{2\pi})$ ( $V_i = \text{injectievolumen}$ , $\epsilon = \text{porositeit van de stationaire fase}$ )

Tabel 8



Figuur 1: Chromatogram behorende bij Probleem 1.

**Antwoord:**

Dit kan gebeuren door een onvertraagde component te injecteren zoals uracil of natrium nitraat.

Om te bepalen of een verbinding wel of niet voldoende retentie heeft op een kolom is het belangrijk om uit te rekenen of een verbinding wel of niet vertraagd wordt. Hiervoor moet het dood volume ( $V_m$ ) van de kolom bepaald worden. Aan de hand van Probleem 1 zal dit worden toegelicht. Aan de hand van hetzelfde probleem zal een voorbeeld worden gegeven van hoe een indruk van de kwaliteit van een kolom kan worden verkregen.

**Probleem 1:**

Kan piek X in Figuur 1 de onvertraagde component zijn? Wat is de  $k'$  waarde van de pieken A, B en C? Wat is de resolutie tussen de pieken B en C? Wat is het schotelgetal van de kolom? Hebben we te maken met een goede of een slechte kolom (b.v.  $h$  en  $\Delta P$ )?

**Gegevens:**

De dimensies van de kolom zijn:  $250 \times 4,6$  (=d) mm (C-18,  $10 \mu\text{m}$ ), het debiet is  $1,0 \text{ ml/min}$ , de druk is  $150 \text{ bar}$ , de mobiele fase bestaat uit

water:methanol (75:25), het injectievolume is  $20 \mu\text{l}$  en er wordt gedetecteerd bij  $254 \text{ nm}$ .

**Oplossing:**

$V_r$  van de eerste piek is  $3,2 \times 1,0 = 3,2 \text{ ml}$ . Het totaal kolomvolume is  $250 \times \pi \times r^2 = 4,155 \text{ ml}$ . ( $r = 0,5 \times d$ ) Dit betekent dat  $V_r$  ongeveer 77% van het totaal volume is en dat 23% wordt ingenomen door de stationaire fase. Dit is heel aannemelijk omdat voor de meeste op silicagel gebaseerde materialen geldt dat 40% van het volume tussen de deeltjes zit en ongeveer 20-40% in de deeltjes.

Aannemend dat piek X inderdaad de onvertraagde component is, zijn de  $k'$  waarden van de pieken A, B en C, respectievelijk: 0,562, 1,125 en 1,344.

De resolutie tussen de pieken B en C kan op een aantal manieren worden uitgerekend.

In Tabel 8 zijn een aantal vergelijkingen gegeven. In dit geval is het relatief eenvoudig om  $\sigma_2$  te bepalen. Uit de statistiek volgt dat 0,6 van de hoogte van de piek overeenkomt met  $2\sigma$  (dit is 0,23 min). Dit betekent dat  $\sigma_2$  0,115 min is. De resolutie is

dan ongeveer 6. Indien de andere formule wordt gebruikt komt dit neer op een resolutie van  $6/4 = 1,5$ . **Deze resolutie van 1,5 is de standaardwaarde die aangehouden wordt voor een goede scheiding.**

Het schotelgetal kan nu ook het beste worden berekend uitgaande van  $\sigma$ . Voor component B is dit 3496.

De schotelhoogte ( $H$ ) van de kolom is  $71 \mu\text{m}$ . Hieruit kan de gereduceerde schotelhoogte worden berekend en deze is dan 7,1. **Voor een goede kolom moet deze waarde 2-4 zijn.**

De druk die waargenomen wordt is  $150 \text{ bar}$ . Dit komt overeen met  $15 \times 10^6 \text{ Pascal}$ . Uitgaande van een lengte van de kolom van  $0,25 \text{ m}$ , een lineaire snelheid van  $0,0013 \text{ m/s}$ , een viscositeit van  $0,002 \text{ kg m/s}$  en een deeltjesgrootte van  $10^{-5} \text{ m}$  is het verwachte drukverval over de kolom  $6,5 \times 10^6 \text{ Pa}$  ( $65 \text{ bar}$ ). De conclusie is dus dat de permeabiliteit van de kolom niet echt goed is.

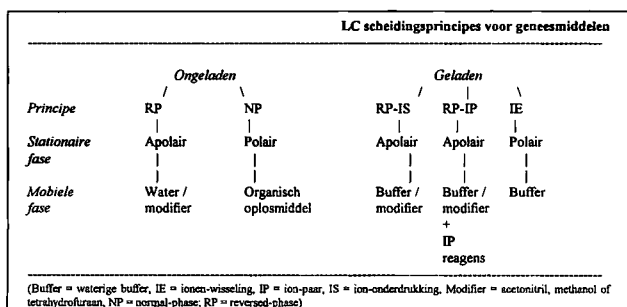
In een goed LC systeem moet het schotelgetal ( $N$ ) zo hoog mogelijk en de schotelhoogte ( $H$ ) zo klein mogelijk zijn. Indien nu de gereduceerde schotelhoogte ( $h$ ) wordt uitgezet tegen de lineaire snelheid ( $u$ ), ontstaat een curve met een minimum. Voor goede LC systemen ligt dit minimum bij een waarde van 2-4.

**Opmerking:**

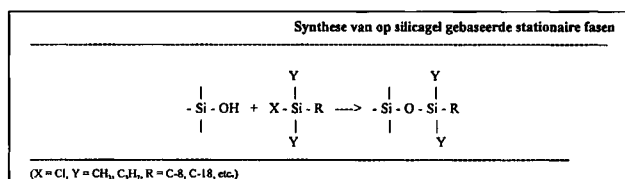
Informatie omtrent schotelgetallen en schotelhoogtes kan worden gevonden in L.R. Snyder en J.J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, 1979.

**Keuze LC systeem:**

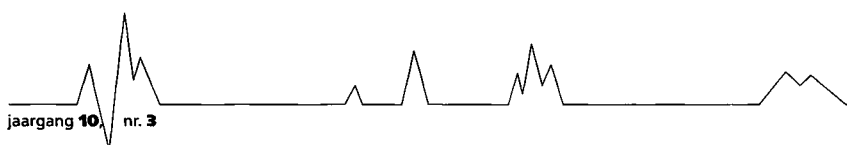
Aangezien laag-moleculaire organische verbindingen (geneesmiddelen) in het algemeen relatief hydrofoob zijn, ligt het voor de hand om een RP systeem te gebruiken voor de scheiding. Dit betekent dat een apolaire stationaire fase wordt gebruikt in combinatie met een polaire mobiele fase. Een overzicht



Schema 6



Schema 7



van de verschillende scheidingsprincipes is gegeven in Schema 6 op de vorige pagina.

De grote meerderheid van alle LC scheidingen, met name de RP schei-

dingen, wordt uitgevoerd op gemodificeerde silicagel kolommen. Dit betekent dat de silanol (-Si-OH) groepen die op het oppervlak van het sorbens zitten, gereageerd hebben met een geschikte silaanverbin-

ding waardoor er een stabiele siloxaan (-Si-O-Si-) binding is gevormd (Schema 7 - vorige pagina). Het probleem is echter dat na afloop van deze reactie nog steeds een groot aantal vrije silanol groepen aanwezig zijn, die voor storende secundaire interacties kunnen zorgen.

Een ander probleem is dat fabrikanten niet dezelfde silicagel materialen gebruiken als basis voor hun stationaire fase. Hierdoor kunnen C-18 kolommen van verschillende fabrikanten totaal andere eigenschappen bezitten en kunnen er zelfs verschillen (b.v. reproduceerbaarheid) optreden tussen C-18 kolommen van dezelfde fabrikant.

De 'zuurgraad' van de stationaire fase bepaald bijvoorbeeld of een kolom bij uitstek geschikt is voor de scheiding van basische of voor de scheiding van zure verbindingen. Andere verschillen zijn de afscherming van de nog aanwezige vrije silanolgroepen (end-capping), het percentage vrije silanolgroepen en de 'chemie' waarmee de alkylketen aan de silicagel wordt gekoppeld (Schema 7). C-18 fasen kunnen bijvoorbeeld gemaakt worden uitgaande van dimethyl of uitgaande van diisopropyl-/diisobutylsilanen. De dimethylfasen zijn duidelijk veel minder stabiel dan de diisopropyl-/diisobutylfasen. Dit verklaart tevens waardoor end-cappen van fasen met behulp van een methylsilaan verbinding niet altijd voor stabiele fasen zorgt. De stabiliteit van gemodificeerde silicagel kolommen is sterk afhankelijk van de ketenlengte. C-18 fasen zijn duidelijk veel stabielere dan C-2 fasen.

Een overzicht van veel gebruikte stationaire fasen, in de LC voor de scheiding van geneesmiddelen, is in Tabel 9 gegeven. Hierbij is onderscheid gemaakt tussen niet-polaire (apolaire), polaire en IE fasen. Wat betreft de niet polaire fasen geldt globaal de volgende interactie volgorde: koolstof > SDB > C-18 > fenyl > C-8 > cyanopropyl > butyl. Wel is het zo dat afhankelijk van de functionele groepen die in de analiet aanwezig zijn, de retentie en/of de selectiviteit sterk kan veranderen. Wat betreft de polaire stationaire fasen geldt de volgende interactie volgorde: silicagel > aminopropyl > diol > cyanopropyl. Het hier gegeven overzicht van stationaire fasen is slechts een bloemlezing uit het zeer grote aanbod dat tegenwoordig te verkrijgen is.

## Stationaire fasen gebruikt in de LC voor geneesmiddelen

### Niet-polaire fasen

Methyl	Weinig stabiel, weinig retentie, redelijk beschikbaar
Ethyl	Weinig stabiel, weinig retentie, redelijk beschikbaar
Butyl	Beperkte stabiliteit, redelijke retentie, goede beschikbaarheid Geschikt voor hydrofobe eiwitten / peptiden Bijzonder geschikt voor RP-IP scheidingen
Cyanopropyl	Redelijk stabiel, redelijk - goede retentie, goede beschikbaarheid Andere selectiviteit in vergelijking met C-18 Bruikbaar in NP en RP mode Snelle evenwichtinstellingen waardoor bijzonder geschikt voor gradient elutie
Hexyl	Beperkte stabiliteit, redelijke retentie, redelijke beschikbaarheid
Octyl (C-8)	Redelijke - goede stabiliteit, goede retentie, goede beschikbaarheid Ideale fase voor hydrofiele peptiden / eiwitten
Cyclohexyl	Redelijk stabiel, redelijk - goede retentie, goede beschikbaarheid
Fenyl	Stabiel, goede retentie, goede beschikbaarheid Andere selectiviteit in vergelijking met C-18 Bijzonder geschikt voor aromatische verbindingen
Octadecyl (C-18)	Stabiel, goede retentie, zeer goede beschikbaarheid In veel gevallen de meest geschikte fase
SDB	Copolymeer van styreen en divinylbenzeen, zeer sterke retentie Stabiel bij 0 < pH < 12, goede piekvorm, lange levensduur Laag schotelgetal
Koolstof	Zeer sterke retentie, stabiel bij 0 < pH < 14 Relatief duur, vervuld snel

### Polaire fasen en zwakke ionen-wisselaars

Silicagel	Deactivering door water, weinig stabiel (2 < pH < 8) Geschikt voor adsorptie en NP toepassingen
Aluminiumoxide	Deactivering door water, weinig stabiel (2 < pH < 12) Geschikt voor adsorptie en NP toepassingen
Cyanopropyl	Redelijk stabiel, redelijk - goede retentie, goede beschikbaarheid Andere selectiviteit in vergelijking met C-18 Bruikbaar in NP en RP mode Snelle evenwichtinstellingen waardoor bijzonder geschikt voor gradient elutie
Diol	Geschikt voor de scheiding van polyolen
Aminopropyl	Weinig stabiel, matige retentie, beperkte beschikbaarheid Bruikbaar in NP en RP mode en als zwakke ionen-wisselaar Geschikt voor scheiding van koolhydraten
Amine	Zwakke ionen-wisselaar geschikt voor de scheiding van sterke zuren
Carbonzuur	Zwakke ionen-wisselaar geschikt voor de scheiding van sterke basen

### Sterke ionen-wisselaars

Sulfonzuur	Geschikte voor de scheiding van zwakke basen Zowel gebaseerd op silicagel als op SDB
Quaternaire ammonium	Geschikt voor de scheiding van zwakke zuren Zowel gebaseerd op silicagel als op SDB

Tabel 9

Kolom parameters in RP-LC kolommen					
Kolom type	I.D. (mm)	Dood volume (ml)	Debiet (ml/min)	Injectie hoeveelheid (mg)	Injectie volume (ml)
Capillair	0,32	0,0075	0,001-0,02	0,001	1
Microbore	1,0	0,07	0,02-0,1	0,01	5
Analytisch	4,6	2,5	0,5-2,0	0,1	10
Semi-prep.	10	12	5,0-20	1,0	50
Preparatief	20	50	10-100	5,0	200

Tabel 10

De scheiding van basische verbindingen met behulp van RP-LC levert nog steeds problemen op. Er zijn een aantal mogelijkheden om dit op te lossen. Er kunnen bijvoorbeeld ion-onder-drukkings (IS) of tailing-onderdrukkings reagentia of ion-paar (IP) vormers worden toegevoegd. Een andere mogelijkheid is het gebruik van niet-gemodificeerd silicagel in de RP mode (water/methanol als mobiele fase) of het gebruik van SDB fasen.

Voor de scheiding van eenvoudige monsters waarbij gevoeligheid minder belangrijk is kunnen de laatste twee technieken goede diensten bewijzen. IS technieken zijn eigenlijk alleen maar geschikt voor zwakke basen omdat de maximum pH die op silicagel fasen gebruikt kan worden ongeveer 8 is. Tailing-onderdrukkers, eenvoudige alifatische aminen, hebben het nadeel dat ze de levensduur van de kolom aanzienlijk kunnen bekorten, terwijl bij gebruik van IP reagentia het meestal veel tijd kost voordat zich een evenwicht heeft ingesteld.

Samenvattend kan worden gezegd dat:

- C-18 nog steeds de meest populaire stationaire fase is,
- zowel de C-8 als de cyanopropyl fase voortdurend in populariteit toenemen,
- SDB kolommen steeds vaker gebruikt worden voor de scheiding van polaire en basische verbindingen, en in die gevallen waarbij extreme pH waarden noodzakelijk zijn,
- sferische deeltjes de voorkeur hebben boven onregelmatig gevormde deeltjes,
- speciaal gedeactiveerde kolommen de voorkeur hebben voor de scheiding van basische verbindingen,
- er een duidelijke trend is om kortere kolommen (5-15 cm) met een kleinere inwendige diameter en gepakt met kleinere deeltjes (3-5 µm) te gebruiken.

Kolom problemen					
Oorzaak	Drift	Tailing	N	α	k'
Verstoppingen	X	XX	XX		
Extra dood volume		XX	XX		
Geadsorbeerd monster	?		X	X	XX
Chemische reactie		X	X	XX	X

Tabel 11

De belangrijkste reden om kolommen met een kleinere inwendige diameter, en als gevolg hiervan ook kortere kolommen, te gebruiken is af te lezen uit de onderstaande vergelijking:

$$DL = C_{\max}/C_0 = [4 V_i \sqrt{N}] / [\pi d_c^2 \epsilon L (1 + k')] (\sqrt{2\pi})$$

Uit deze vergelijking valt af te lezen dat hoe kleiner de inwendige diameter van de kolom, des te hoger de concentratie in de detectorcel zal zijn. Omdat in het algemeen concentratie gevoelige detectoren worden gebruikt in de LC, betekent dit een verbeterde detecteerbaarheid.

Het gebruik van kleinere deeltjes brengt een hoger drukverval, over de kolom, met zich mee waardoor de lengte van de kolom aangepast moet worden. De toepassing van kolommen met een kleinere inwendige diameter brengt zoals gezegd met zich mee dat een aantal kolom parameters veranderen (Tabel 10). Het dood volume kan berekend worden met de volgende formule:

$$V_m \approx 0,7 (\pi/4) L d_c^2 \approx 0,5 L d_c^2$$

Het maximaal te injecteren volume kan als volgt worden berekend:

$$V_i = V_r/2\sqrt{N}$$

In deze vergelijking is  $V_r$  het retentievolume van de eerste piek (ml). Het vertalen van het debiet van de ene naar de andere kolom kan gebeuren met behulp van de volgende vergelijking:

$$X = (L_2/L_1) (r_2/r_1)^2$$

In deze vergelijking is L de lengte van de kolom (mm) en r de straal van de kolom (mm).

Om nu het debiet van kolom 2 te berekenen wordt het debiet van kolom 1 met X vermenigvuldigd. In dit geval blijft de lineaire snelheid hetzelfde. De belading van kolom

2 (mg) kan op dezelfde manier worden berekend.

Zowel het schotelgetal als de retentie kunnen veranderen tijdens het gebruik van RP kolommen. Verder kunnen er een aantal problemen gaan optreden. Het is daarom belangrijk om een aantal factoren (Tabel 11) goed in de gaten te houden.

Kolommen waarop schone monsters worden geïnjecteerd hebben een levensduur van 1000-2000 monsters/kolom. De levensduur van kolommen waarop 'smerige' monsters worden geïnjecteerd is 200-500 monsters, terwijl voor biomedische analyses de levensduur soms beperkt is tot 50-200 monsters/kolom.

#### Opzetten en optimaliseren van een LC methode:

De belangrijkste randvoorwaarden bij het opzetten van een geschikte LC methode zijn:

- een k' waarde van 5-10, een resolutie van minimaal 1,5,
- een drukverval over de kolom van maximaal 200 bar,
- symmetrische en scherpe pieken,
- een RSD van 2-5% voor kwantitatieve bepalingen.

Het opzetten van een start methode kan gebeuren aan de hand van de in Tabel 12 (op volgende pagina) genoemde parameters.

De laatste jaren is een duidelijke trend waarneembaar naar het gebruik van kortere kolommen (5-15 cm) met een kleine inwendige diameter (2-3 mm) en gepakt met 3-5 µm deeltjes. Het voordeel van deze kolommen is, zoals eerder aangegeven, dat er minder verdunning in de kolom plaats vindt. Hierdoor worden er scherpere en hogere pieken verkregen wat een groot voordeel is bij de detectie van lage concentraties.

Het optimaliseren van een LC scheiding betekent meestal het optimali-



Begin condities voor opzetten van LC methode	
Parameter	Begin condities
<b>Kolom</b>	
dimensie	25 x 0,46 cm
deeltjesgrootte	5 µm
stationaire fase	C-8 of C-18
<b>Mobiele fase</b>	
oplosmiddelen	water / acetonitril
percentage modifier	variabel (> 50%)
buffer	25 mM fosfaat, pH 3,5
additieven (tailing onderdrukker, ion-paar vormer, etc.)	indien nodig
debiet	1 - 2 ml/min
Temperatuur	30 - 40 °C
<b>Monster</b>	
volumen	< 50 µl
hoeveelheid	< 100 µg

Tabel 12

seren van de resolutie. Hiertoe kan het beste onderstaande vergelijking worden gebruikt:

$$R_s = 1/4 [\alpha - 1] \cdot [\sqrt{N}] \cdot [k' / (1 + k')]$$

Deze vergelijking kan opgedeeld worden in 3 factoren:

$$N = 5,54 (t_r / W_b)^2 = \text{schotelgetal} = \text{efficiëntie}$$

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = \text{scheidingsfactor} = \text{selectiviteit}$$

$$k' = (t_r - t_0) / t_0 = \text{capaciteitsfactor} = \text{retentie}$$

De eerste stap is meestal het optimaliseren van de  $k'$  door het aanpassen van het percentage organische modifier en/of de pH. Indien de  $k'$  echter een waarde heeft van  $2 < k' < 5$  heeft verder optimaliseren meestal weinig effect meer op de resolutie. Een hoger schotelgetal zal altijd resulteren in een betere selectiviteit. Het schotelgetal kan worden aangepast door het debiet, de kolomlengte, de deeltjesgrootte of de kwaliteit van de kolom te veranderen. Het nadeel is dat dit meestal een negatief effect heeft op de retentie en de druk in het systeem.

De beste manier, maar ook de minst voorspelbare, is aanpassing van de selectiviteit. Dit kan op een aantal manieren gebeuren:

- (i) aanpassen van de percentages aan organische modifier in de mobiele fase,
- (ii) het kiezen van een andere organische modifier,
- (iii) het optimaliseren van de pH van de mobiele fase,
- (iv) het kiezen van een stationaire fase met andere interactie eigenschappen,

- (v) het veranderen van de temperatuur en
- (vi) het gebruik van additieven (b.v. ion-paar reagentia).

### Probleem II:

Zoals in Figuur 2 is te zien is er geen basislijnscheiding tussen de pieken A, B en C. Bereken de  $k'$  waarde van de 3 pieken. Bereken de selectiviteit ( $\alpha$ ) tussen de pieken A en B en tussen de pieken B en C. Geef aan hoe de resolutie tussen de pieken verbeterd kan worden. Welke  $k'$  waarden zijn er nodig om basislijn scheiding te krijgen bij gelijkblijvende selectiviteit?

### Gegevens:

De dimensies van de kolom zijn: 100 x 4,6 mm (C-18, 5 µm), het debiet is 1,0 ml/min, de druk is 150 bar, de mobiele fase bestaat uit water:methanol (50:50), het injectievolumen is 10 µl en er wordt gedetecteerd bij 254 nm.

### Oplossing:

Er kan aangenomen worden dat de 'dip' bij 1,5 min de onvertraagde component is. De  $k'$  waarden voor de componenten A, B en C zijn dan respectievelijk: 0,333, 0,467 en 0,600.

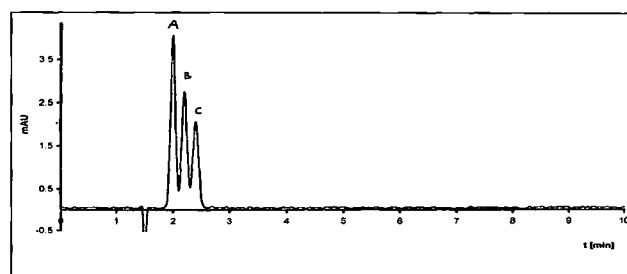
De selectiviteit tussen de pieken A en B is 1,402 en die tussen de pieken B en C is 1,285.

Om basislijn scheiding te verkrijgen moet, afhankelijk van de gebruikte formule, een resolutie van 1,5 of 6,0 worden verkregen. De vergelijking die gebruikt kan worden is:

$$R_s = [\alpha - 1] \cdot [\sqrt{N}] \cdot [k' / (1 + k')]$$

Invullen van deze vergelijking levert:

$$6 = [1,402 - 1] \cdot [\sqrt{(2,0/0,005)^2}] \cdot [k' / (1 + k')]$$



Figuur 2: Chromatogram behorende bij Probleem II

Dit betekent dat de retentie van de verbindingen ( $[k' / (1 + k')] = 0,373$ ) te laag is. Het percentage methanol zal dus verlaagd moeten worden totdat de  $k'$  van component A ongeveer 0,59 is.

Samenvattend kan gesteld worden dat de optimalisering van een LC procedure uit een aantal stappen kan bestaan die achtereenvolgens worden uitgevoerd:

- 1 Optimalisering van het LC systeem,
- 2 Optimalisering van de detectie condities,
- 3 Toepassing van een meer gevoelige detectie techniek,
- 4 Invoering van een derivatiseringsprocedure,
- 5 Optimalisering van de monstervoorbewerking procedure.

### RP-LC scheiding van neutrale verbindingen:

De meest voor de hand liggende methode om ongeladen organische verbindingen van elkaar te scheiden is het gebruik van RP-LC systemen. Alleen voor bijzonder hydrofiele of sterk hydrofobe verbindingen is het verstandiger om een ander fasesysteem te kiezen.

Het ontwikkelen van een RP-LC systeem bestaat uit de volgende stappen:

- 1 Het opzetten van een RP-LC systeem met een binaire mobiele fase (water-methanol/acetonitril) en C-8 of C-18 als de stationaire fase waarin de analieten een  $k'$  hebben van 2-10, maar in ieder geval tussen de 1 en 20.
- 2 Het controleren of een robuust systeem is verkregen door de selectiviteit, resolutie, piek symmetrie en het schotelgetal te bepalen.
- 3 Het aanpassen van het fase-

systeem indien een of meerdere van de hierboven genoemde parameters niet aan de gestelde eisen voldoet.

- 4 Het optimaliseren van de kolomparameters (lengte, deeltjesgrootte, debiet) totdat aan alle gestelde eisen wordt voldaan.

Het aanpassen van het fasesysteem kan op een aantal manieren gebeuren. De belangrijkste parameters zijn:

- het percentage organische modifier,
- de keuze van de organische modifier (methanol, acetonitril of tetrahydrofuraan),
- het type kolom (b.v. zure of basische C-18, C-18 of fenyl, silicagel of polymeer),
- de temperatuur.

De keuze van de meest geschikte organische modifier is al gedeeltelijk in Deel Ib besproken. Samenvattend kan gezegd worden dat voor de scheiding van neutrale verbindingen met behulp van RP-LC de volgende factoren belangrijk zijn: mengbaarheid met water, viscositeit, chemische reactiviteit en absorptie. Het gevolg hiervan is dat acetonitril meestal de voorkeur heeft. De uiteindelijke keuze hangt af van de volgende eigenschappen: dipool moment en proton donerende/accepterende eigenschappen. Dit betekent bijvoorbeeld dat voor de scheiding van zure verbindingen (proton donor) met behulp van acetonitril kleinere  $k'$  waarden verkregen zullen worden dan met methanol.

De algemene regel is dat voor het scheiden van eenvoudige monsters (een enkele analiet) acetonitril als modifier wordt gebruikt. Dat bij de scheiding van monsters met meerdere analieten met vergelijkbare zuur/base eigenschappen zowel acetonitril als methanol gebruikt kunnen worden en dat bij monsters die verschillende zure en/of basische verbindingen bevatten een mengsel van methanol en acetonitril wordt gebruikt. Tetrahydrofuraan kan in dit

laatste geval worden gebruikt om de resolutie te verbeteren.

#### Opmerking:

Een probleem bij het gebruik van tetrahydrofuraan is dat er regelmatig storende oxidatie producten in voorkomen. In plaats van tetrahydrofuraan kan methyl-*t*-butylether (MTBE) worden gebruikt. Doordat MTBE niet met water mengbaar is moet er altijd wat methanol aan de mobiele fase worden toegevoegd.

Het veranderen van de organische modifier betekent ook dat een ander percentage modifier gebruikt moet worden. Aan de hand van een nomogram (Figuur 3) kan afgelezen worden wat, bij benadering, het nieuwe percentage moet zijn. Het effect van het vervangen van acetonitril door methanol is te zien in Figuur 4. Dit laat duidelijk zien dat het vaak de moeite waard is om de invloed van de modifier op de retentie en de resolutie te onderzoeken. Het optimaliseren van de mobiele fase kan gebeuren met behulp van een 'Solvent-Selectivity-Triangle'.

Bij eenvoudige monsters kan dit handmatig gebeuren, maar bij meer ingewikkelde monsters is het sterk aan te bevelen de hiervoor speciaal ontwikkelde software programma's te gebruiken.

#### Literatuur:

L.R. Snyder en J.J. Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, 1979  
 J.W. Dolan en L.R. Snyder, Troubleshooting LC Systems, Humana, 1989  
 L.R. Snyder, J.L. Glajch en J.J. Kirkland, Practical HPLC Method Development, Wiley, 1980

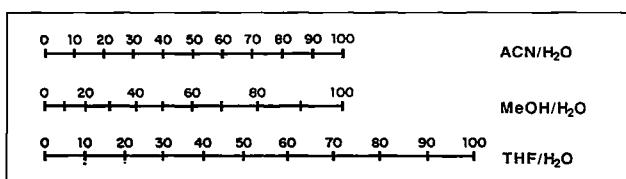
Indien het optimaliseren van de mobiele fase niet het gewenste resultaat heeft kan een andere stationaire fase worden gekozen. Hierbij dient opgemerkt te worden dat de

selectiviteit van een C-8 en een C-18 kolom ongeveer hetzelfde is en dat dus bijvoorbeeld fenyl of een cyanopropyl kolom gebruikt moet worden. Terwijl op een C-8/C-18 kolom de van der Waals interacties overheersen, spelen bij gebruik van een fenyl kolom  $\pi$ -interacties een belangrijke rol. Dit betekent weer dat voor de scheiding van aromatische verbindingen de resolutie vaak verbeterd kan worden door een fenyl kolom te gebruiken. Voor de scheiding van aldehyden en ketonen kan heel goed een cyanopropyl kolom worden toegepast omdat hier dipool interacties een belangrijke rol spelen. Wel is het zo dat de hydrofobiciteit van een cyanopropyl kolom beperkt is (vergelijkbaar met een C-4 kolom).

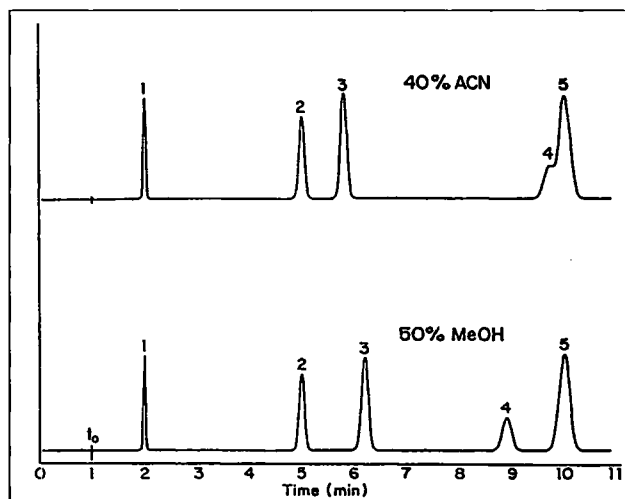
Bij de scheiding van neutrale verbindingen heeft de temperatuur meestal weinig invloed op de resolutie. Een verhoging van de temperatuur geeft meestal wel scherpere pieken als gevolg van een lagere viscositeit van het oplosmiddel.

Om reproduceerbare resultaten te verkrijgen is het belangrijk om: stabiele kolommen te gebruiken, geen extreme pH waarden te gebruiken, de kolommen goed te equilibreren, iedere analyse minimaal in duplo uit te voeren, regelmatig kalibratie monsters te meten en de kolom te thermosteren.

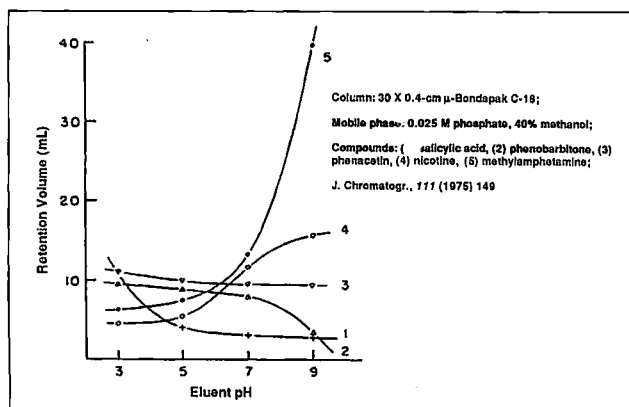
RP-LC is voor de meeste neutrale verbindingen de beste keuze, maar voor sterk hydrofiële verbindingen is het beter om NP-LC te gebruiken. In dit geval heeft een cyanopropyl kolom de voorkeur. Terwijl als



Figuur 3: Oplosmiddel nomogrammen



Figuur 4: Effect van methanol en acetonitril op de resolutie



Figuur 5: Effect van de pH op de selectiviteit

mobiele fase het beste een mengsel van propanol en hexaan kan worden gebruikt.

### RP-LC scheiding van geladen verbindingen:

Een verandering van de pH van de mobiele fase zal bij zure, basische en amfotere verbindingen een verandering in de lading tot gevolg hebben en dus in de retentie als RP-LC wordt gebruikt. De regel is dat geladen verbindingen relatief hydrofiel zijn (kleine  $k'$ ) en dat ongeladen verbindingen relatief hydrofoob zijn (grote  $k'$ ). Dit betekent dat bij een toename van de pH, de  $k'$  van zure verbindingen zal dalen en die van basische verbindingen zal stijgen.

Een aardig voorbeeld van dit pH effect is te zien in Figuur 5. De verbindingen 1 en 2 zijn in dit geval zure verbindingen, 3 is een neutrale verbinding en 4 en 5 zijn basische verbindingen. Dit betekent dat indien een mengsel van verbindingen gescheiden moet worden het verstandig is om eerst de relatie tussen de pH en de  $k'$  (zie Figuur 5) vast te leggen. Om een reproduceerbaar systeem te verkrijgen, voor verbindingen met zure en/of basische functies, is het belangrijk dat de pH van de mobiele fase 1,5-2 eenheden verwijderd is van de pKa van de verbinding (zie ook Deel Ib).

Als gevolg hiervan is de keuze van de buffer erg belangrijk en dit betekent weer dat een fosfaat of een acetaat buffer niet zo maar gebruikt kunnen worden (Tabel 13). Dit houdt in dat het mogelijk is om voor iedere pH een geschikte buffer te vinden. Citraat buffers hebben het nadeel dat ze corrosie van roestvast staal kunnen veroorzaken. Ammonia en formiaat buffers zijn relatief vluchtig en TRIS en diethylamine buffers zijn niet altijd zuiver. Verder is een

belangrijke parameter het kiezen van de eigen absorptie van de buffer-ionen (zie Deel Ib). Het opzetten van een methode gaat ongeveer op dezelfde manier als het ontwikkelen van een RP-LC methode voor neutrale verbindingen. Er zijn echter enkele belangrijke verschillen:

- De keuze van het type buffer ionen, de ionsterkte en de pH zijn nu veel kritischer parameters. Het type buffer-ionen is belangrijk voor de buffer capaciteit en eventuele secundaire effecten. Terwijl de pH misschien wel de belangrijkste retentie bepalende factor is.

### Opmerking:

- Sporen van metalen die in de stationaire fase aanwezig zijn kunnen complexen vormen met bepaalde anionen (b.v. citraat, fosfaat) die in de mobiele fase en/of het monster aanwezig zijn, waardoor piekvervormingen kunnen optreden.
- Omdat de meeste zouten (b.v. buffer ionen) beter oplosbaar zijn in methanol dan in acetonitril, heeft methanol vaak de voorkeur bij dit soort separaties. Ook in dit geval is het belangrijk om met een relatief hoog percentage (50-75%) aan organische modifier te beginnen en dit vervolgens te optimaliseren.
- Door additionele secundaire interacties is piek tailing eerder een probleem dan bij de scheiding van neutrale verbindingen. Dit komt ondermeer door de interactie van

de aanwezige vrije silanol groepen met basische verbindingen. Acetaat ionen kunnen worden gebruikt om de aanwezige basische groepen op de stationaire fase af te schermen, terwijl een eenvoudig symmetrisch primair amine (b.v. tributylamine) gebruikt kan worden om de zure groepen af te schermen (Schema 8).

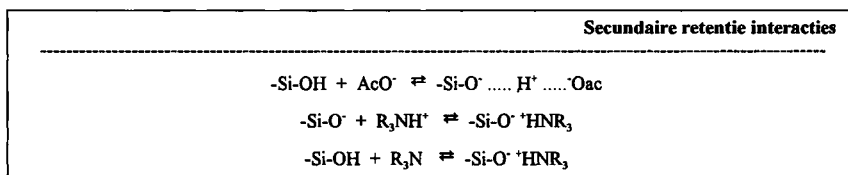
Het optimaliseren van een scheiding voor basische verbindingen begint bij het kiezen van de stationaire fase. In het algemeen zal een op silicagel-gebaseerde C-8 of C-18 kolom worden gebruikt. Om piekvervorming, met inbegrip van piek tailing, te voorkomen is het belangrijk dat een goed 'ge-endcapte' en 'weinig zure' kolom wordt gebruikt. Verder is het verstandig om een pH van 3,5 of lager te kiezen om de ionisatie van de vrije silanolgroepen te onderdrukken. De concentratie van de buffer moet tussen de 25 en 50 mM liggen om ongewenste ionogene interacties te voorkomen. Indien in uitzonderlijke gevallen toch nog piek tailing voorkomt kan tributylamine worden toegevoegd in een concentratie van ongeveer 50 mM.

In tegenstelling tot bij de scheiding van neutrale verbindingen, kan de temperatuur (b.v. 30-60 °C) een belangrijke parameter zijn om de scheiding van (gedeeltelijk) geladen verbindingen te verbeteren.

De scheiding van zwakke zuren en/of basen kan het beste gebeuren met

Buffers voor LC separaties		
Buffer	pKa	Buffer bereik
Fosfaat	2,1	1,1 - 3,1
Citraat	3,1	2,1 - 4,1
Formiaat	3,8	2,8 - 4,8
Citraat	4,7	3,7 - 5,7
Citraat	5,4	4,4 - 6,4
Fosfaat	7,2	6,2 - 8,2
TRIS	8,3	7,3 - 9,3
Ammonia	9,2	8,2 - 10,2
Boraat	9,2	8,2 - 10,2
Diethylamine	10,5	9,5 - 11,5
Fosfaat	12,3	11,3 - 13,3

Tabel 13



Schema 8

Ion-paar reagentia en hun toepassingen	
Tegen ion (IP reagens)	Toepassing
Quaternaire ammonium verbindingen (b.v. tetramethyl, tetrabutyl, tetrahexyl, cetrimide)	(Sterke) en zwakke zuren
Tertiaire aminen (b.v. trioctylamine)	Sterke zuren
Alkyl en arylsulfonaten (b.v. methaan-, heptaan-sulfonaat, kampfersulfonaat)	(Sterke) en zwakke basen
Perchlorzuur	Basische geneesmiddelen
Alkylsulfaten	Vergelijkbaar met alkylsulfonaten
Carbonzuren	Sterke basen

Tabel 14

behulp van RP-IS LC, waarbij de pH zo laag mogelijk gehouden moet worden. Indien zowel zure als basische functies aanwezig zijn, wordt eveneens een pH van 3-4 gekozen en wordt indien nodig een IP reagens toegevoegd om de retentie van de geladen componenten te verhogen.

RP-IP scheiding van geladen verbindingen: Ion-paar (IP) LC heeft enkele voordelen ten opzichte van de eerder besproken technieken voor de RP scheiding van geladen verbindingen:

- betere retentie voor polaire ionen,
- betere resolutie bij de scheiding van mengsels van zure, basische en neutrale verbindingen,
- meer mogelijkheden om de  $k'$  te variëren.

Er zijn echter ook een aantal nadelen aan IP-LC, en dan met name aan RP-IP LC, verbonden:

- evenwichtinstellingen op de kolom kunnen zeer lang duren.
- het is een tamelijk ingewikkeld systeem dat moeilijker is te optimaliseren, een procedure die daarom ook vaak tijdrovend is, thermostrening is in bijna alle gevallen een noodzaak.

RP-IP LC wordt uitgevoerd door aan een mobiele fase die uit methanol (of acetonitril) en een buffer bestaat een IP reagens toe te voegen. Veel gebruikte IP reagentia zijn alkylsulfonaten voor de scheiding van basische verbindingen en quaternaire ammonium verbindingen voor de scheiding van zure verbindingen.

Het retentiemechanisme in RP-IP LC, bij gebruik van een C-18 kolom bijvoorbeeld, is niet zo eenvoudig te beschrijven. In het algemeen kan gesteld worden dat bij gebruik van IP reagentia met een lange keten (b.v. hexylsulfonaat, cetrimide) het IP reagens aan de stationaire fase wordt geadsorbeerd waardoor een geladen fase ontstaat. Het mechanisme lijkt nu heel veel op dat van IE LC. Indien echter symmetrische IP

Analiët	pKa	pH keuze bij RP-IP scheidingen
		pH (RP-IP LC)
Sterke zuren	< 2	2 - 7,5
Zwakke zuren	> 2	6 - 7,5
Sterke basen	> 8	2 - 8
Zwakke basen	< 8	2 - 5

Tabel 15

reagentia (b.v. tetrabutylammonium) worden gebruikt vormen deze met de analiet een ion-paar in de mobiele fase. Het mechanisme lijkt dan het meest op standaard RP-LC. Helaas zullen in de praktijk meestal beide mechanismen een meer of minder belangrijke rol spelen.

De retentie van een analiet in een IP systeem hangt af van de volgende parameters:

- keuze van IP reagens (tegen ion)
- grootte en vorm van IP reagens
- concentratie van IP reagens
- keuze van organische modifier
- percentage organische modifier
- pH
- keuze buffer-ionen
- ionsterkte
- temperatuur
- stationaire fase

De algemene regel is: des te hydrofober het tegen-ion is, en des te hoger de concentratie hiervan, des te meer retentie het ion-paar zal hebben. Met betrekking tot de concentratie van het IP reagens geldt dat bij een bepaalde concentratie, die soms gerelateerd is aan de kritische micel concentratie, een maximum retentie wordt bereikt. Het toevoegen van een organische modifier heeft hier hetzelfde effect als bij gewone RP-LC. De pH is van invloed op de lading van de analiet en bepaalt hiermee in welke mate het ion-paar gevormd kan worden. Buffer ionen kunnen in sommige gevallen zelf ook als IP reagens dienen, terwijl te hoge buffer-ionen concentraties uitzouteffecten te weeg kunnen brengen. Voor de temperatuur geldt dat deze omgekeerd evenredig is met de retentie en de stationaire fase heeft precies dezelfde invloed als bij RP-LC.

Enkele veel gebruikte tegen-ionen en de hiermee uitgevoerde toepassingen zijn in Tabel 14 gegeven. Bij het opzetten van een RP-IP LC methode, wordt in eerste instantie het percentage modifier aangepast en vervolgens de pH. Indien nu niet voldoende retentie of te weinig

selectiviteit wordt verkregen kan een IP reagens worden toegevoegd. De concentratie van het IP reagens moet relatief laag worden gehouden. Indien een IP reagens wordt toegevoegd moet in een aantal gevallen de ionsterkte van de buffer worden verlaagd. Bij de meeste RP-IP LC scheidingen is de keuze van de pH belangrijker dan het type tegen-ion tijdens het optimaliseren van scheidingsprocedure (Tabel 15).

Samenvattend kan worden gezegd dat in RP-IP LC de retentie met name wordt beïnvloed door het percentage aan organische modifier, de buffer en de ionsterkte en dat de selectiviteit geregeld kan worden met behulp van de grootte van het tegen-ion en de concentratie hiervan en de pH. Verder is het belangrijk om in de gaten te houden dat bij het gebruik van IP technieken zich een aantal problemen kunnen voordoen:

- *Basislijn verstoringen.*

Deze kunnen voorkomen worden door het monster op te lossen in de mobiele fase, niet meer dan 50 µl te injecteren en door een goede kwaliteit buffers en ion-paar reagentia te gebruiken.

- *Piekvorm verstoringen.*

In sommige gevallen komen frontende of gespleten pieken voor. Dit kan vaak verholpen worden door de temperatuur te veranderen, alleen is moeilijk te voorspellen of de temperatuur verhoogd of verlaagd moet worden.

- *Trage evenwichtinstellingen.*

Doordat ion-paar reagentia vaak sterk aan de kolom worden geadsorbeerd duurt het vaak erg lang voordat zich een evenwicht heeft ingesteld. Het regenereren van een kolom, het verwijderen van het ion-paar reagens, heeft meestal nog meer tijd nodig dan het in evenwicht brengen van de kolom. Opvallend is dat de evenwichtinstellingen minder tijd vragen indien symmetrische, min of meer bolvormige, ion-paar reagentia worden toegepast.

Behalve RP-IP LC is het ook mogelijk



om IE-LC te gebruiken voor de scheiding van geladen verbindingen. Deze techniek wordt met name gebruikt indien UV detectie bij 200 nm gebruikt moet worden, indien men geen gebruik wil maken van een relatief ingewikkeld systeem als RP-IP LC. Het opzetten van een methode is in dit geval relatief eenvoudig. Allereerst wordt een geschikte stationaire fase gekozen. Hierbij is het belangrijkste dat voor zwakke zuren en basen een sterke ionen wisselaar wordt gekozen en omgekeerd. Als tweede wordt een geschikte pH gekozen. De keuze van de pH moet zodanig zijn dat er voldoende ionogene interactie is tussen de stationaire fase en de analiet. Vervolgens wordt een eerste analyse uitgevoerd met behulp van een waterige mobiele fase die 0-1 M natriumchloride bevat. Vervolgens kunnen de fase condities worden aangepast totdat een reproduceerbaar en stabiel systeem is verkregen.

### Probleem III:

De scheiding van de verbindingen A en B in een monster is acceptabel, maar de analyse tijd lijkt onnodig groot te zijn (Figuur 6)! Wat is de resolutie tussen de pieken A en B? De scheiding kan versneld worden door het percentage methanol in de mobiele fase te verhogen. Geef

aan welke methanol concentratie er gebruikt kan worden. Wat zal er met de piek hoogtes gebeuren bij gebruik van deze nieuwe methanol concentratie?

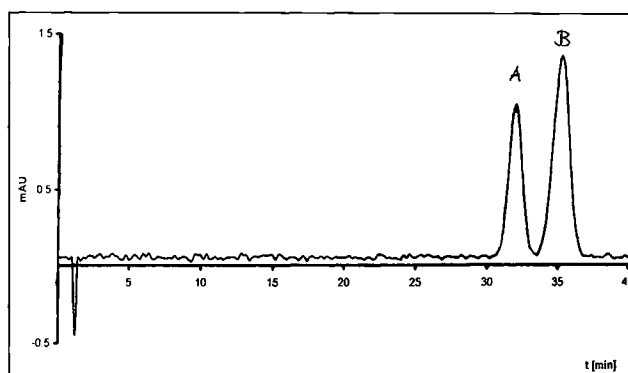
### Gegevens:

De dimensies van de kolom zijn: 250 x 4,6 mm (C-18, 5  $\mu$ m), het debiet is 1,0 ml/min, de druk is 50 bar, de mobiele fase bestaat uit water: methanol (80:20), het injectievolume is 20  $\mu$ l en er wordt gedetecteerd bij 254 nm.

### Oplossing:

$\sigma_a$  is 0,5 min. Dit betekent dat de resolutie tussen A en B 6,4 of 1,6 is (afhankelijk van de gebruikte formule).

Het effect van methanol kan bepaald worden uit de helling van de lijn die wordt verkregen als  $\log k'$  wordt uitgezet tegen het percentage methanol. Aangenomen mag worden dat in de meeste gevallen dit een factor 1,5 is voor iedere verandering in de methanol concentratie met 10%.



Figuur 6: Chromatogram behorende bij Probleem III

$k'$  moet ongeveer 2-5 zijn. In dit geval is  $k'$  echter ongeveer 25. Dit betekent dat de  $k'$  met een factor 5 moet worden vermindert. Dit betekent  $\log 5 / \log 1.5 = 4.10\%$  methanol. Of in andere woorden het percentage methanol moet van 20% naar 60% worden verhoogd.

De piekhoogte kan worden berekend met behulp van  $\sigma_v$ . De vergelijkingen die hiervoor gebruikt worden zijn:

$PH = M_r / \sigma_v \sqrt{2\pi}$  en  $\sigma_v = V_r / \sqrt{N} = V_0 (1 + k') / \sqrt{N}$ . In dit geval verandert alleen  $k'$  van 25 naar 5. Dit betekent dat  $\sigma_v$  met een factor  $(1 + 25) / (1 + 5) = 4,3$  kleiner wordt. Het gevolg is dat de piekhoogte ook met een factor 4,3 hoger wordt.