

Planta medica

Journal of
Medicinal
Plant Research

Editor - in - Chief
E. Reinhard, Univ. Tübingen
Pharmazeutisches Institut
Auf der Morgenstelle
7400 Tübingen

Editorial Board
H. P. T. Ammon, Tübingen
W. Barz, Münster
E. Reinhard, Tübingen
O. Sticher, Zürich
H. Wagner, München
M. H. Zenk, Bochum

Hippokrates Verlag
Stuttgart

Vol. 38
January 1980

No. 1

Review Article

Einsatzmöglichkeiten der HPLC zur Analytik von Naturstoffen

Applications of HPLC for the Analysis of Natural Products

R. W. Frei

Analytische Laboratorien der Freien Universität Amsterdam.

Key Word Index: HPLC; Absorption Chromatography; Reversed-Phase Chromatography; Ion Pair Chromatography; Cardiac Glycosides; Derivatization; Trace Analysis; Gradient Elution; Dansyl-chloride; Fluram; Senna Glycosides.

Abstract

In a comparison of adsorption to reversed phase chromatography examples for optimal separation of *digitalis*

glycosides will be given. Possibilities for both gradient elution and construction of low - cost gradients and their application to extracts of *senna* glycosides will be discussed. Various aspects

of sample application and procedures for compound concentration will be shown in connection with trace analysis.

To increase the selectivity and detection of the analysis the range of chemical derivatisation of natural products will be documented with respect to various alkaloids, sugars, cardiac glycosides and peptides. Advantages and disadvantages of derivatisation prior or after column separation will be discussed. A combination of these techniques can be used for efficient separation.

Einleitung

Die moderne Säulenflüssigkeitschromatographie, kurz auch HPLC (High Performance Liquid Chromatography) genannt, hat ihre Wurzeln deutlich in der klassischen Flüssigkeitschromatographie (Säulen und DC). Die Neuerungen sind vorwiegend auf dem technologischen Sektor zu finden, wie z. B. bessere Pumpen, Ventile, Säulenmaterialien und Detektoren, und man kann mit Recht sagen, daß HPLC schon jetzt in puncto Wichtigkeit einen Platz einnimmt, der der Gaschromatographie gleichkommt. Für den Einsatz bei Naturstoffen ist HPLC besonders geeignet, da wir es dort oft mit temperaturempfindlichen und / oder wenig flüchtigen Substanzen zu tun haben.

Es ist nun nicht die Absicht, hier einen Überblick über die instrumentellen Entwicklungen auf dem Gebiet der HPLC zu geben; ebensowenig möchte ich Rezepte geben, wie man gewisse Substanzgruppen trennen kann. Solche Informationen sind in der Literatur zur Genüge vorhanden [1, 2] oder werden

von den Instrumentenherstellern geliefert.

In dieser Darstellung möchte ich den Leser mit einigen Neuerungen auf den Gebieten der Trennoptimierung, Probenaufgabe und Einsatz chemischer Reaktionen zur Verbesserung der Chromatographie und Detektion bekanntmachen. Diese Aspekte haben allgemeine Gültigkeit, sind aber in unseren Laboren vor allem bei Naturstoffen eingesetzt worden. Es soll auch ausdrücklich erwähnt werden, daß eine Diskussion der präparativen HPLC ausgelassen wurde, obwohl diese für die Isolierung und Strukturaufklärung unbekannter Komponenten in Naturstoffgemischen von großer Wichtigkeit ist.

Aspekte der Trennung

Wahl des chromatographischen Systems

Bei der Suche nach einem optimalen isokratischen Trennsystem wird oft ein kontinuierlicher Gradient eingesetzt. Der größte Teil aller Probleme wird in einem Routinelabor mit im Handel erhältlichem Silikagel oder Umkehrphasen (C_{18} , C_8 , chemisch gebundene stationäre Phasen auf Silikagel) gelöst. Nur in besonderen Fällen werden andere Materialien, wie z. B. chemisch gebundene Phasen mit verschiedenen funktionellen Gruppen, Ionenaustauscher, Molekularsiebmaterialien oder affinitätschromatographische Materialien (metallbeladene oder enzymbehandelte Phasen) eingesetzt. Eine gute Übersicht über solche speziellen Phasen existiert in [3].

Zu diesem Gebiet soll ein Beispiel einer vergleichenden Untersuchung von

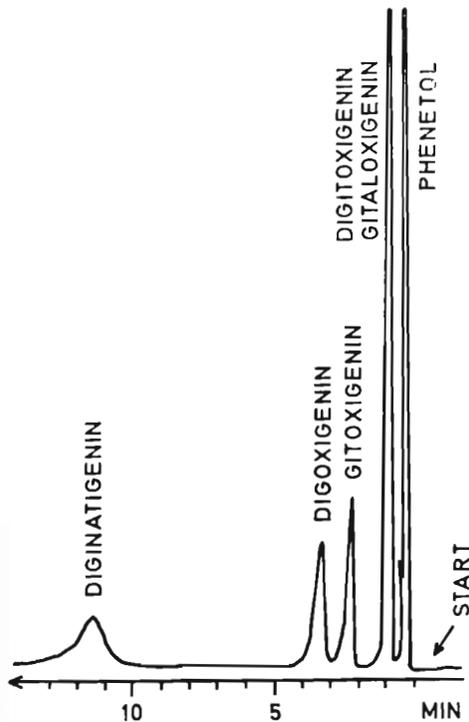


Abb. 1. Trennung einiger Aglykone mittels Adsorptionschromatographie. Säule: LiChrosorb SI 100, Korngröße 10 μm ; Länge 25 cm, 3 mm I.D. Mobile Phase: 3,7% MeOH in mit H_2O gesättigtem Methylchlorid. Fluß 2,4 ml/Min. (Δp 70 bar); Injektion mit Spritze 5 μl ; Detektion 230 nm.

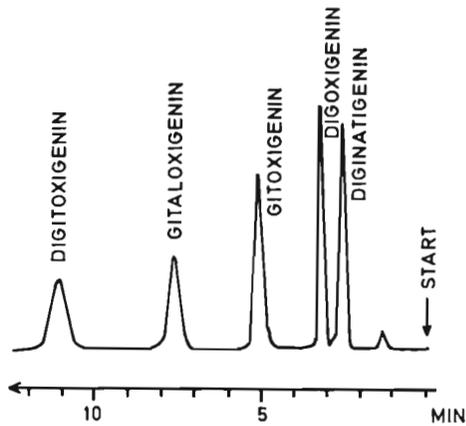


Abb. 2. Trennung einiger Aglykone auf Umkehrphasen. Säule: C_{18} , 10 μm ; Länge 30 cm, 3,5 mm I.D. Mobile Phase: 37% Acetonitril (Uvasol) in Wasser; Fluß 1,4 ml/Min. (Δp 100 bar); Injektion mit Schlaufe 25 μl ; Detektion 220 nm.

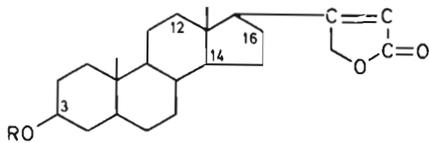


Tabelle I

Chemische Strukturen einiger *Digitalis*-Glykoside und Aglykone

Verbindung	Serie*	Substituent			R*
Digitoxigenin	A	H	OH	H	H
Gitoxigenin	B	H	OH	OH	H
Digoxigenin	C	OH	OH	H	H
Digoxin		OH	OH	H	D-D-D-
Lanatosid C		OH	OH	H	G-AcD-D-D-
Desacetyllanatosid C		OH	OH	H	G-D-D-D-
Diginatigenin	D	OH	OH	OH	H
Gitaloxigenin	E	H	OH	$\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{-O-C-H} \end{matrix}$	H

* D = Digitoxose; AcD = Acetyldigitoxose; G = Glukose

Digitalisglykosiden auf Adsorptions- und Umkehrphasenchromatographie gezeigt werden [4]. Die Strukturen der untersuchten Verbindungen sind in Tab. I zu sehen. In Abb. 1 wird die Trennung von vier Aglykonen auf Silikagel gezeigt. Die Trennordnung entspricht der Polarität der Komponenten (Tab. I); das Paar Digitoxigenin-Gitaloxigenin ist nicht getrennt. In einem solchen Fall ist eine Trennung oft leichter mit dem Einsatz einer Umkehrphase zu erzielen, wie aus Abb. 2 ersichtlich ist. Es wird auch eine perfekte Reversibilität der Trennordnung festgestellt.

Da in unseren Laboratorien die HPLC oft zur Trennung von Glykosiden aus Extrakten oder pharmazeutischen Formulierungen eingesetzt wird, ist das Trennverhalten innerhalb einer oder mehrerer Serien von Interesse. Die

Trennung von vier Komponenten aus der C-Serie auf einer C_{18} -Phase ist in Abb. 3 zu sehen. Mit Ausnahme des Ginsins ist auch hier eine Reversibilität der Trennordnung gegenüber der Absorptionschromatographie festzustellen. Der Einsatz von Umkehrphasen bietet für die Probenvorbereitung der Glykoside erhebliche Vorteile, indem wässrige Lösungen direkt auf die Säule gespritzt werden und auf umständliche Extraktionsverfahren verzichtet werden kann. Die Anwendung dieses Prinzips auf eine Direktaufgabe von 25 μ l Injektionslösung ist in Abb. 4 dargestellt. Der Wirkstoff Desacetyllanatosid C ist von Nebenprodukten und Hilfsstoffen abgetrennt.

Verbesserung der Trennung

Neben der Wahl optimaler Phasen

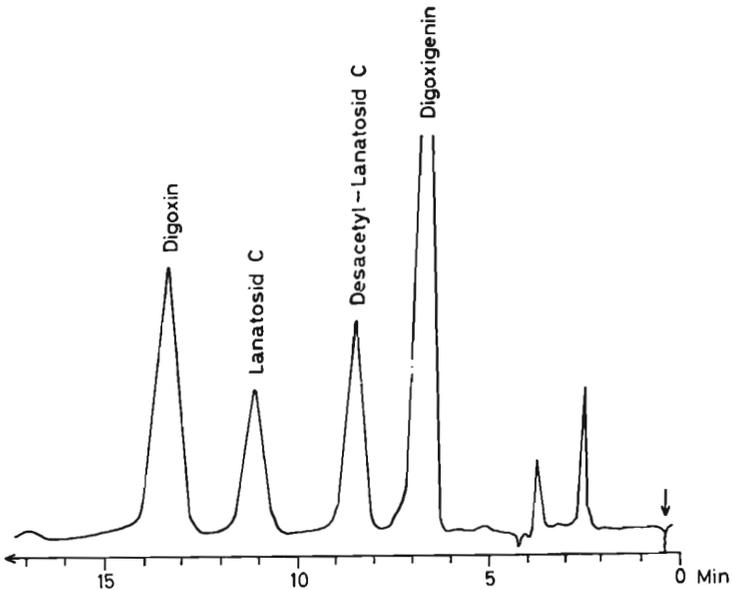


Abb. 3. Trennung von Digitalisglykosiden der C-Reihe. Mobile Phase: 35% (Tetrahydrofuran:Dioxan = 2:1) in Wasser. Fluß 1,4 ml/Min. (Δp 100 bar); Injektion mit Schlaufe 25 μ l; Detektion 220 nm.

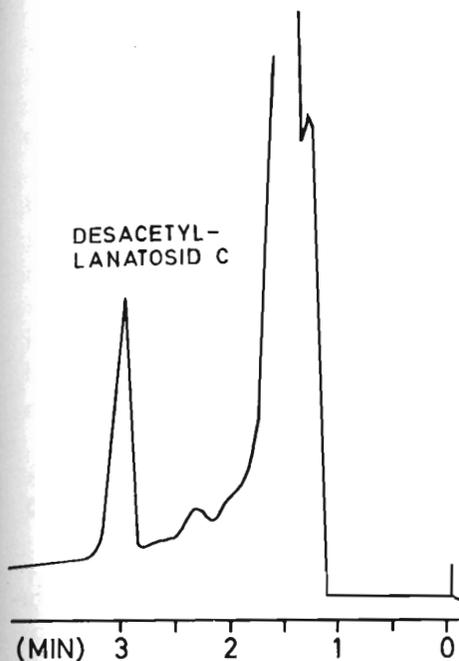


Abb. 4. Gehaltsbestimmung von Desacetyl lanatosid C in Injektionslösung (25 μ l Direktinjektion). Mobile Phase: 37% Acetonitril in Wasser; Fluß 1,4 ml/Min. (Δp 100 bar); Injektion mit Schlaufe 25 μ l; Detektion 220 nm.

können auch andere Möglichkeiten zur Trennverbesserung ausgeschöpft werden. Eine davon ist der Einsatz guter Säulen, die mit leistungsfähigen Packverfahren hergestellt werden. Über Vor- und Nachteile verschiedener Säulenpacktechniken wurde andernorts orientiert [5]. Die üblichen Materialien sind zudem jetzt in gepackter Form als leistungsfähige Normsäulen im Handel erhältlich. Die Herstellung von Topsäulen mit sehr hoher Bodenzahl ist allerdings immer noch eine Kunst und für ein Standardchromatographielabor kaum zugänglich.

Eine weitere und allgemein zugängliche Methode der Trennverbesserung ist

die Gradientenelution. Diese braucht auch nicht teuer zu sein, wenn niederdruckseitig Stufengradienten eingesetzt werden [6], und ist entgegen der Ansicht von immer noch vielen Experten echt quantitativ, vor allem mit Umkehrphasen. Das Schema eines „lowcost“-Stufengradienten, wie er in unseren Laboratorien entwickelt wurde [6] ist in Abb. 5 gezeigt. Die Hauptkomponente ist ein elektronisch gesteuertes Motorenventil, das das gewünschte Eluens abrufte. Die Pumpe sollte möglichst ein kleines Verdrängungsvolumen (< 1 ml) haben.

Die Trennleistungen, die mit einem solchen Gradientensystem erreicht werden können, sind am Beispiel eines Sen-naglykosidextraktes im nächsten Chromatogramm (Abb. 6) gezeigt. Die Retentionszeiten der verschiedenen Peaks sind zwischen 0,3 und 5,7% rel. Standardabweichung reproduzierbar; die Peakflächenreproduzierbarkeit schwankt zwischen 1,8 und 5,4% rel. Standardabweichung.

Aspekte der Probenaufgabe

Bei der Untersuchung von Naturstoffen sind oft die interessanten Komponenten oder ihre Nebenprodukte und Metaboliten in sehr kleinen Konzentrationen vorhanden. Wir haben es also mit echten spurenanalytischen Problemen zu tun. Bei kleinen Probemengen und niedriger Konzentration empfiehlt es sich, mit möglichst kurzen und engen Säulen zu arbeiten, um Bandenverbreiterung zu vermeiden. Oft ist zwar genug Probenflüssigkeit, jedoch in großer Verdünnung, vorhanden, so daß eine Spurenanreicherung, z. B. über Einen-

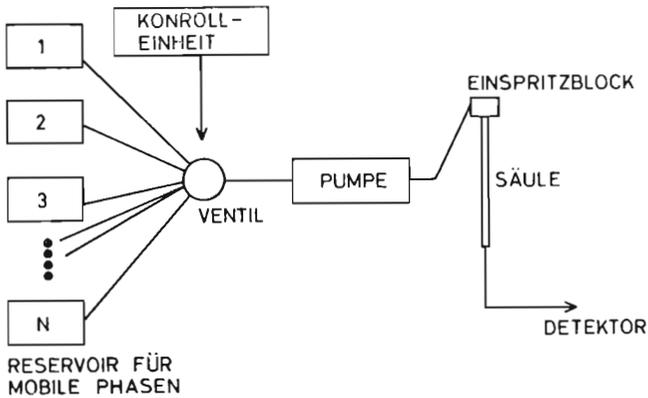


Abb. 5. Schematische Zeichnung eines Stufengradienten.

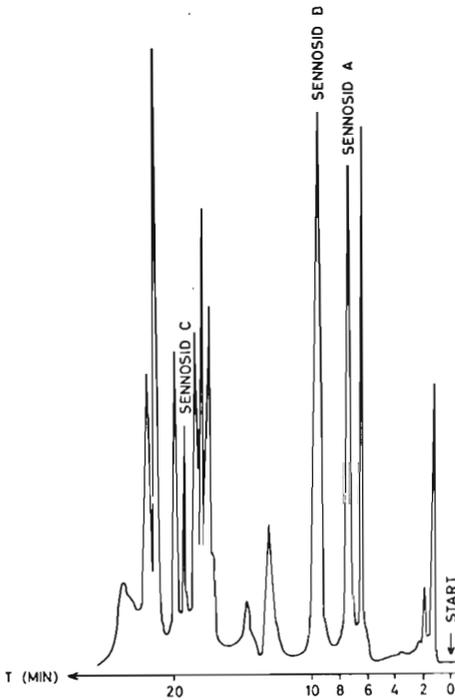


Abb. 6. Trennung eines Sennaglykosidextraktes mit dem Stufengradienten. Für Details siehe Referenz [6].

gung, Extraktion oder Adsorption notwendig ist. Letzteres Phänomen kann auch direkt auf der Säule über große Einspritzvolumina ausgenützt werden.

Spurenanreicherung über große Injektionsvolumina

Die Wichtigkeit großer Probenvolumina zur Verbesserung der Detektionsempfindlichkeit wurde schon früher diskutiert [7], jedoch ohne einen Aufkonzentrierungseffekt auf der Säule zu berücksichtigen. In unseren Arbeiten mit Peptiden [8] haben wir nun kürzlich festgestellt, daß bei der Aufgabe von großen Probemengen in wässriger Lösung ein Aufkonzentrierungseffekt am Anfang der Säule stattfindet. Bei der darauffolgenden Auftrennung mit dem Eluens können diese angereicherten Komponente ohne nennenswerte Bandenverbreiterung getrennt werden. Dieses Phänomen ist in Abb. 7 dargestellt. Nonapeptide mit verschiedenen Retentionszeiten wurden hier in einem $340 \mu\text{l}$ -Volumen auf die Säule gegeben, wobei bei wässrigen Proben keine, bei Proben im Eluens jedoch eine erhebliche Peakverringering (Bandenverbreiterung), vor allem bei wenig retardierten Komponenten, stattfand. Im letzteren Fall wandern die Peptide schon während der Probeneinspritzphase, was dann bei der Trennung zu breiten Banden führt.

Der Einfluß dieses Phänomens auf praktische Chromatogramme ist im nächsten Bild (Abb. 8) zu sehen, wo Oxytocin von Nebenprodukten abgetrennt wird. Nebenkomponenten, die bei 34 μl -Proben kaum noch erkenntlich sind, können bei 340 μl gut quantitativ erfaßt werden. Eine Bandenverbreiterung ist nicht festzustellen. Dieser Aufkonzentrierungseffekt wurde von uns bis zu 300 ml Probenvolumina ausgenutzt und untersucht [9].

Kombination

Gradient – Spurenanreicherung

Die Vorteile der Spurenanreicherung auf der Säule sind aus den vorhergehenden Resultaten ersichtlich. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist es, daß Störkomponenten oft in gleichem Maße aufkonzentriert werden, was an die Trennung große Anforderungen stellen kann. In solchen Fällen empfiehlt es sich, den Anreicherungsschritt mit Gradientenelution zu koppeln.

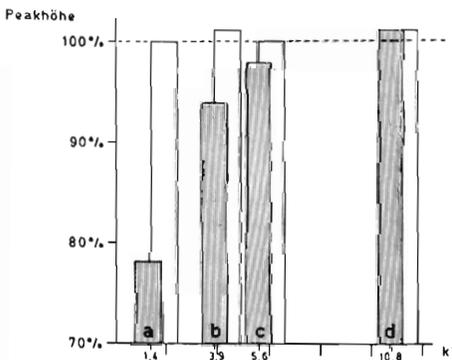


Abb. 7. Einfluß des Injektionsvolumens auf die Peakhöhe (Peakverbreiterung). – Peakhöhe bei 34 μl Injektion.

- 340 μl Injektion; Probe in mobiler Phase.
- 340 μl Injektion; Probe in Wasser.
- a) Lypressin-Ornipressin, b) Oxytocin, c) Felypressin, d) Demoxytocin.

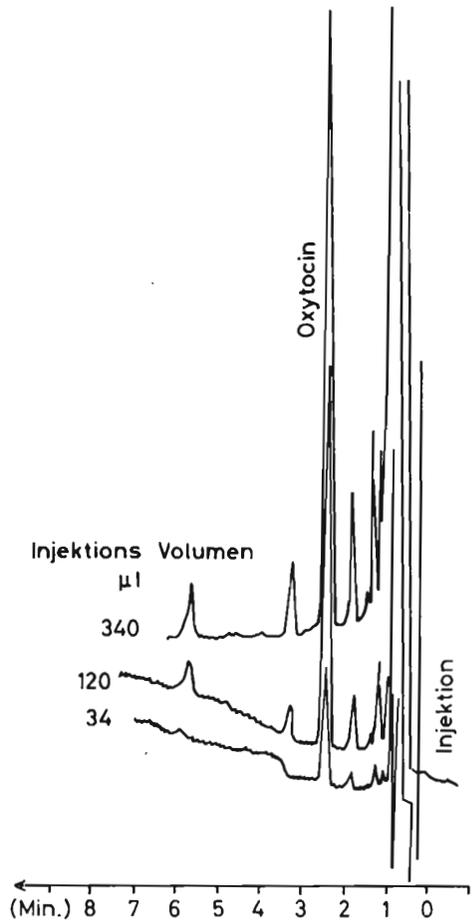


Abb. 8. Einfluß des Injektionsvolumens auf Peakhöhen und Peakbreiten am Beispiel einer Oxytocin-Injektionslösung.

Säule: Nucleosil C_8 , 5 μ ; 15 cm; 4 mm I.D.
Mobile Phase: 20% Acetonitril in Wasser mit Phosphatpuffer pH 7.

Ein Beispiel dieser Art ist in Abb. 9 gegeben, wo 2 ml einer Urinprobe direkt auf die Säule aufgespritzt wurden, um dann mit dem schon beschriebenen Stufengradienten (Abb. 5) aufgetrennt zu werden. Im ersten Elutionsschritt wurden wasserlösliche Komponenten wie Aminosäuren, Zucker etc. herausgewaschen, um dann für die Trennung

der weniger polaren Urinbestandteile die Elutionskraft durch stufenweisen Zusatz von Acetonitril zu erhöhen. Auf diese Art könnten z. B. Drogen und ihre Metaboliten in sehr geringen Mengen im Urin isoliert werden.

Aspekte der Detektion

Es besteht Einverständnis darin, daß die Detektion immer noch das schwächste Glied in der Kette der HPLC-Komponenten ist. Die besten Detektoren sind Spektrophotometer- und Fluoreszenzdetektoren, und es ist nicht erstaunlich, daß in letzter Zeit oft chemische

Reaktionen und Modifikationen beigezogen wurden, um die Detektionseigenschaften vieler Substanzen im Hinblick auf UV- oder Fluoreszenzdetektion zu verbessern. Dies kann vor oder nach der Chromatographie geschehen. Eine Diskussion der Derivatisierungsmöglichkeiten in der Flüssigkeitschromatographie wurde kürzlich veröffentlicht [10]. Hier sollen wiederum einige Anwendungsbeispiele aus unseren Labors aufgeführt werden.

Derivatisierung vor der Säule

Es gibt verschiedene Argumente, die für eine Derivatisierung vor der Säule sprechen. Die Reaktionen werden in

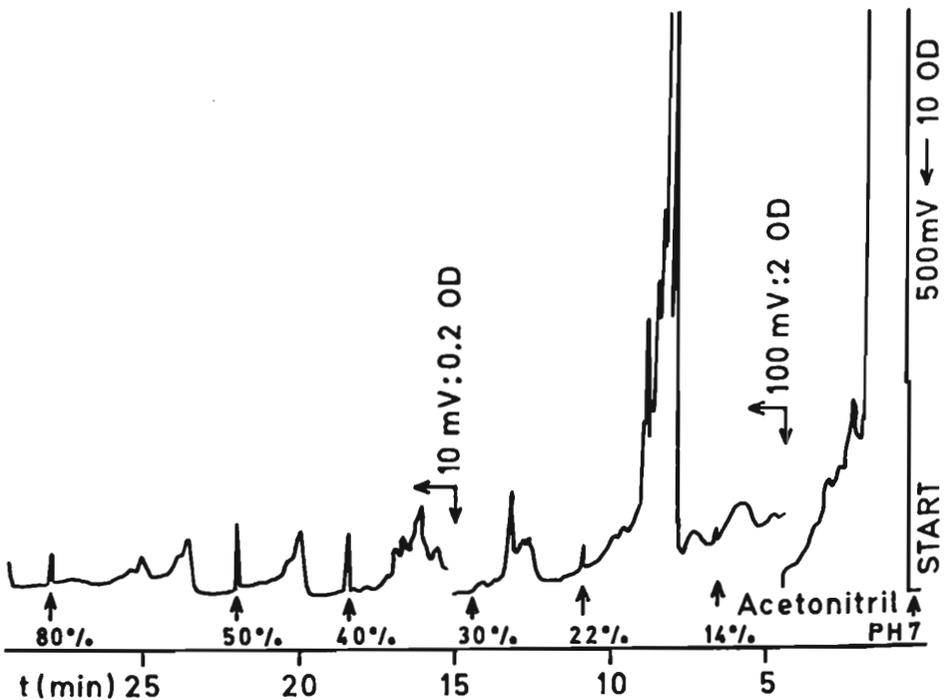


Abb. 9. Chromatogramm einer Urinprobe (~ 2 ml Injektion).

Säule: Nucleosil C_{18} , $5 \mu\text{m}$; 15 cm; 4 mm I.D. Stufengradient (siehe Zeichnung, Abb. 5).
Fluß: 3 ml/Min. Detektion 237 nm.

vitro ausgeführt, d. h. die Kinetik der Reaktion ist nicht kritisch, so lange sie quantitativ und relativ einfach ist. Die Spezifität des verwendeten Reagenzes kann über den Derivatisierungsschritt der Probenvorreinigung dienen; die Eliminierung eines Reagenzüberschusses ist kein Problem. Die chromatographischen Eigenschaften werden durch die Derivatisierung oft verbessert. Die Wahl einer mobilen Phase ist ebenfalls kein Problem.

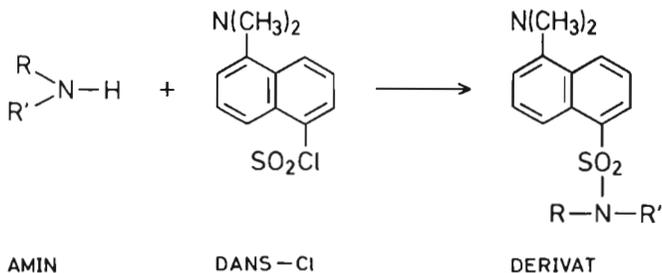
Eine Gefahr ist bei diesem Verfahren allerdings die Bildung von Artefakten. Der Reaktionsverlauf sollte deshalb gut bekannt sein. Das wohl bekannteste Fluoreszenzderivatisierungsreagenz ist Dansychlorid, das mit sekundären und primären Aminen und phenolischen Hydroxygruppen entsprechend untenstehender Gleichung reagiert: (Ref. [10] kann zur Diskussion der Anwendungsmöglichkeiten herangezogen werden).

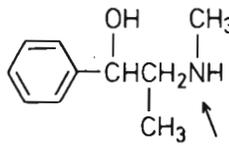
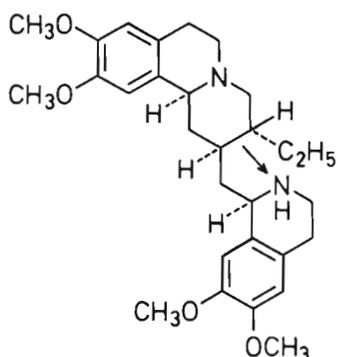
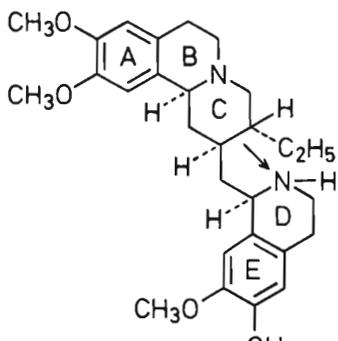
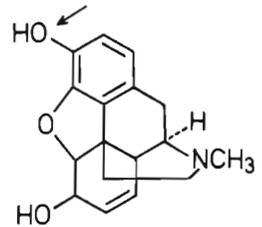
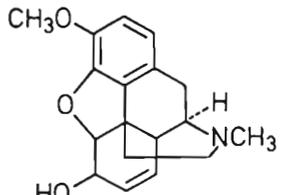
In unseren Laboratorien wurden u. a. Alkaloide untersucht [11] wie sie in Abb. 10 gezeigt werden. Die Pfeile deuten die Möglichkeiten der Derivatisierung an. Codein reagiert nicht. Eine solche Reaktion kann nun direkt in einer komplexen Probe, z. B. einem Extrakt oder einer biologischen Probe, durchgeführt werden. Die leicht extrahierbaren Derivate können getrennt werden. Die

Anwendung dieses Prinzips auf einen Hustensirup ist aus Abb. 11 ersichtlich. Hier ging es vor allem um die Bestimmung kleiner Mengen von Cephaelin (Peak 2), das über UV-Detektion nicht quantifiziert werden kann. Andere fluoreszenzerzeugende Reagenzien wie 4-chloro-7-nitrobenzo-2, 1, 3-oxadiazol (NBD-CI) [12]- O-phthalaldehyd [13] oder Fluram® (Hoffmann-La Roche) wurden spezifisch für primäre Aminogruppen eingesetzt. Dans- oder NBD-hydrazine sind für Keto- und Aldehydgruppen brauchbar [14]. Die Entwicklung neuer Reagenzien für möglichst alle funktionellen Gruppen wird in verschiedenen Laboratorien verfolgt.

In vielen Fällen ist eine im UV nachweisbare Derivatisierung angezeigt. Eine der ersten Anwendungen in der HPLC war die Derivatisierung von Ketosteroiden mit Phenylhydrazin [15]. Andere Anwendungen z. B. auf Fettsäuren, biogene Amine, Oestrogene etc., wurden diskutiert [10]. Die p-Nitrobenzoylierung von Digitalisglykosiden [16, 17] und Zuckern [18] wurde kürzlich bei uns mit Erfolg durchgeführt. Die Strukturen der untersuchten Verbindungen sind in Tab. I aufgeführt.

Eine vollständige Benzoylierung kann mit diesen Verbindungen in weniger als 10 Minuten bei Raumtemperatur durch-



EPHEDRIN	
EMETIN	
CEPHAELIN	
MORPHIN	
CODEIN	

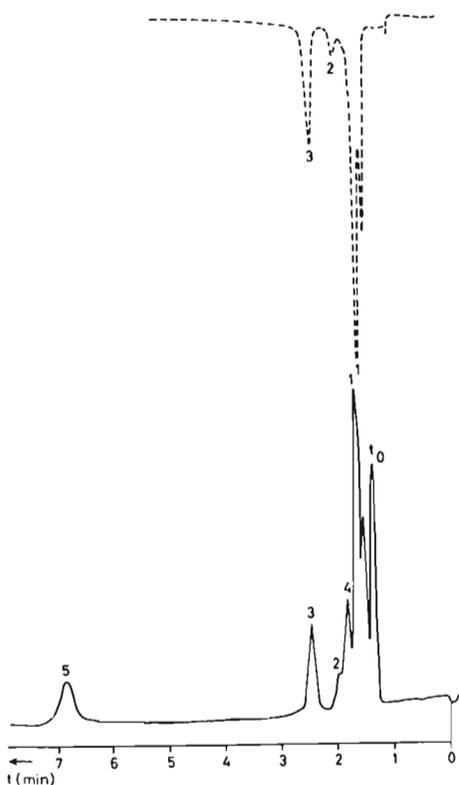


Abb. 11. Trennung von Ephedrin (Peak 1), Narcotin (Peak 4), Cephaelin (Peak 2), Emetin (Peak 3) und Codein (Peak 5) in Hustensirup. — UV-Detektion; --- Fluoreszenzdetektion.

geführt werden; allerdings bei 100fachen oder höheren Reagenzüberschüssen. Das ist bei diesem Mikromaßstab ohne weiteres möglich und eröffnet interessante Aspekte für andere Reaktionen. Die damit erreichbare Detektionsverbesserung ist aus dem nächsten Bild ersichtlich (Abb. 12), wo die UV-Spektren von derivatisiertem und reinem Digoxin gezeigt sind. Mit dieser Methode wurden

bei 260 nm je nach Substitutionsgrad Extinktionswerte von über 100 000 (also eine enorme Empfindlichkeitssteigerung) erzielt. Andere Vorteile dieser Technik sind eine Verringerung der Polarität und damit sowohl günstigere Extrahierbarkeit als auch chromatographische Eigenschaften. Dies ist aus Abb. 13 zu ersehen, wo im Vergleich zu Abb. 1 eine enorme Verbesserung der Trennung und der Trennzeit erreicht wurde. Die Anwendung der Nitrobenzoylierungsmethode auf einen Digitalisrohextrakt wird in Abb. 14 dargestellt.

Für Substanzen, die nicht leicht derivatisierbar sind, jedoch eine gute Lewis-Säuren- oder Basenaktivität besitzen, kann auch die sogenannte „Ionenpaar“-Chromatographie benutzt werden. Theoretische und praktische Aspekte dieser Technik wurden schon früher erwähnt [19].

Eine vereinfachte Gleichung für die Trennung solcher Ionenpaare ist gegeben mit

$$k' = V_s / V_m E_{QX} [X^-],$$

wobei k' der Retentionswert (= Kapazitätsfaktor) der zu trennenden Komponente ist, V_s und V_m den Volumina der stationären respektive mobilen Phase entsprechen, E_{QX} den Verteilungskoeffizienten und $[X^-]$ die Konzentration des zur Analyse benötigten Gegenions darstellen. Nehmen wir nun an, daß Adsorptionseffekte vernachlässigbar sind, so können anhand der Gleichung die Bedingungen errechnet werden, die zum

Abb. 10. Strukturen einiger untersuchter Alkaloide. Pfeile zeigen derivatisierbare Stellen für Dansyl-chlorid.

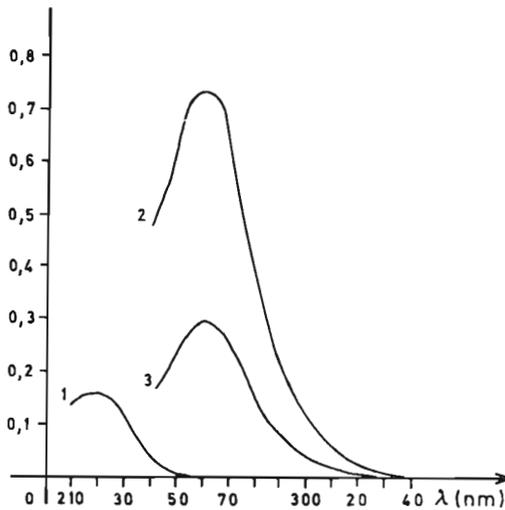


Abb. 12. UV-Spektren von Digoxin (in Aethanol) und dem 4-Nitrobenzoyl-Derivat in Chloroform. Die Derivatisierung bewirkt eine Maximaverschiebung nach 260 nm, was für die Detektion günstig ist.

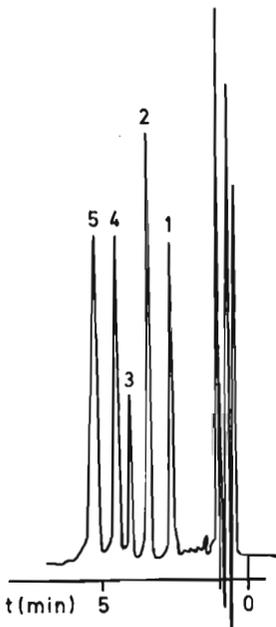


Abb. 13. Chromatogramm von 4-Nitrobenzoyl-Derivaten einiger Aglykone.

Säule: SI 60, 5 μ m; 15 cm; 3 mm I.D.
 Mobile Phase: n-Hexan:Methylenchlorid:Acetonitril:Methanol = 35:6:2,5:1 (V/V).
 Fluß: 1,75 ml/Min. (Δp 120 bar); Injektion:
 Schlaufe 20 μ l; Detektion bei 254 nm.

gewünschten k' -Wert führen sollen. In unseren Laboratorien wurden solche Trennungen mit Ergot- und Tropaalkaloiden und Pikrat als Gegenion durchgeführt. Besonders bei den Tropaalkaloiden führte dies zu sehr guten Detektions- und Selektivitätsverbesserungen [20]. Eine Anwendung auf ein natürliches Gemisch von Tropaalkaloiden ist in Abb. 15 gezeigt.

Derivatisierung nach der Säule

Die Vorteile der Derivatisierung nach der Säule liegen in der verringerten Artefaktbildung und der Möglichkeit, kombinierte Detektionsverfahren zu benutzen; z. B. UV-Detektion \rightarrow Derivatisierung \rightarrow Fluoreszenzdetektion. Als wesentlichster Nachteil kann die Beschränkung in bezug auf die Wahl des Eluens genannt werden, da dieses schließlich die Reaktion beeinflusst. Die Kinetik der Reaktion sollte zudem recht schnell sein, um Bandenverbreiterung zu verhindern. Die Reagenzien sollten

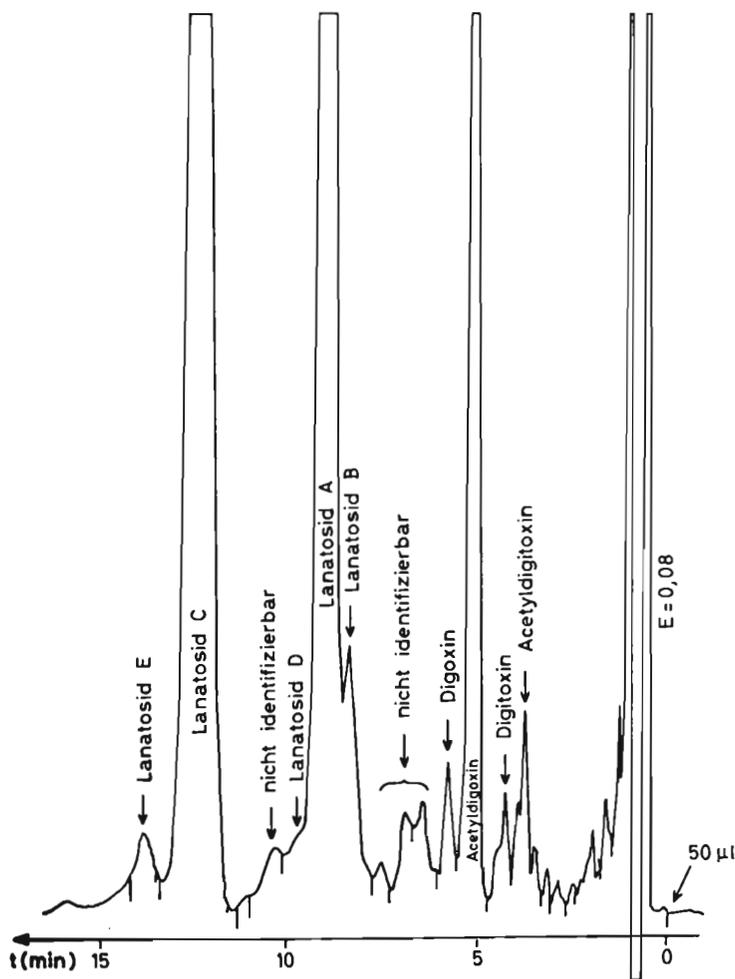


Abb. 14. Chromatogramm von 4-Nitrobenzoyl-Derivaten aus einem Digitalisrohextrakt. Mobile Phase: n-Hexan:Acetonitril:Methylenchlorid = 10:3:3 (V/V). Fluß: 1,75 ml/Min. (Δp 120 bar). Injektion: Schlaufe 20 μ l; Detektion bei 254 nm.

nicht unter den gleichen Bedingungen wie die Derivate detektierbar sein. Viele dieser Nachteile können jedoch technisch beseitigt werden, vor allem unter Zuhilfenahme des großen Wissens, das auf dem Gebiet der Autoanalytoren vorhanden ist.

Bei Sandoz wurden in letzter Zeit solche Arbeiten mit Nonapeptiden durchgeführt [21]. Als ideales $-NH_2$ -

spezifisches Reagenz für solche „post-column“-Reaktionen wurde Fluram® [22] eingesetzt. (Grundreaktion siehe S. 15)

Die dazu benötigte Apparatur wurde ebenfalls im Detail beschrieben [21, 23]. Besondere Sorgfalt muß auf die Konstruktion der Misch- und Reaktionskammern verwendet werden. Wegen des relativ hohen Fluoreszenzuntergrundes

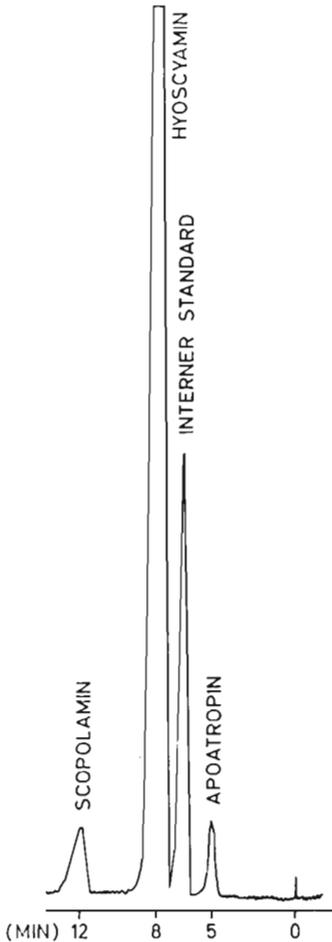


Abb. 15. Chromatogramm von Bellafolin[®]. Die Tropaalkaloide sind als Pikrat-Ionenpaare getrennt. Konzentrationen: Hyoscyamin 7,5 µg; Scopolamin 0,37 µg und Apotropin 0,02 µg/5 µl-Dosiermenge. Säule: SI 100, 5 µ; 15 cm; 3 mm I.D.

Mobile Phase: CHCl₃ mit stationärer Phase gesättigt.

Stationäre Phase: 0,06 M Pikrinsäure bei pH 6. Fluß: 0,2 ml/Min. (Δp 35 bar). Detektion bei 249 nm.

sollen auch nur absolut pulsationsfreie Pumpen verwendet werden.

Eine Anwendung dieses Verfahrens auf Oxytocin und Nebenprodukte ist in

Abb. 16 gezeigt. Die Detektionsverbesserung gegenüber UV-Detektion bei 220 nm [8] beträgt das 10fache. In Abb. 16 liefert die UV-Detektion für die Nebenprodukte absolut unbrauchbare Resultate. Da die Reaktion auch auf alle beobachteten Nebenprodukte anspricht, kann das Verfahren routinemäßig für die Reinheitsprüfung in Produktionsverfahren eingesetzt werden.

Kombinationsmöglichkeiten

Oft wäre eine Kombination mit Gradientenelution zur weiteren Verbesserung der Selektivität wünschenswert. Mit kontinuierlichen Gradienten dürfte dies jedoch schwierig sein, da eine sich ständig verändernde mobile Phase auch das Reaktionsmedium verändert und somit Basislinienprobleme zu erwarten sind. Am Fluram-Peptidmodell konnten wir nun zeigen, daß eine solche Kombination unter Verwendung eines Stufengradienten doch möglich ist [23], da sich auf jeder Stufe die Basislinie recht schnell stabilisiert. Eine solche Basislinie für einen üblichen Gradienten ist in Abb. 17 dargestellt. Die Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und der Peakflächen ist auch hier unter 2%, vorausgesetzt daß ein Peak nicht in die Zone der Basislinienverschiebung gerät.

Interessante Aspekte ergeben sich auch aus der Koppelung mit dem Aufkonzentrierungseffekt. Wie wir gesehen haben, werden bei der Spurenanreicherung oft auch Störkomponenten angereichert, die schwer zu eliminieren sind. Eine selektive Derivatisierung nach der Säule kann uns hier die notwendige Selektivität und oft noch eine zusätzliche Detektionsverbesserung liefern. Die Möglichkeit dieses Prinzips wurde schon an-

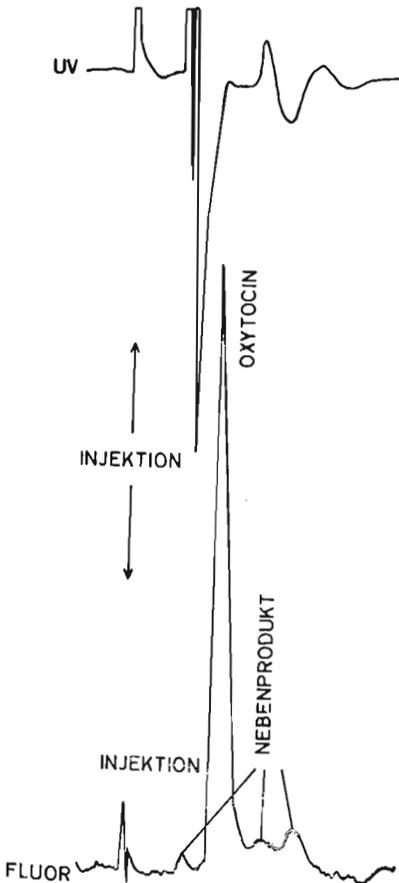
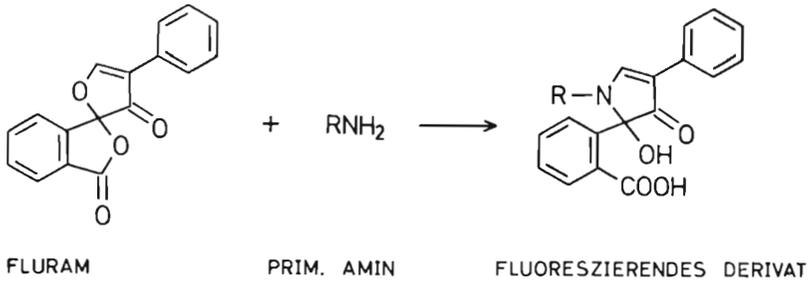


Abb. 16. Chromatogramm für Oxytocin und Nebenprodukte. Derivatisierung nach der Säure mit Furam. Mobile Phase: THF/CH₃COOH 0,05 M 100:50. Säule: SI 100, 5 μ ; 25 cm; 3 mm I.D. Fluß 1,0 ml/Min. (Δp 92 bar). Fluramlösung 0,7 ml/Min., Puffer 1,3 ml/Min.

dernorts erwähnt [9, 23]. Eine Anwendung ist in Abb. 18 gezeigt. Die 1,77-ml-Probe von Oxytocin wurde so verdünnt, daß sie mit der Gesamtkonzentration der 20- μ l-Probe identisch war; wir hatten es hier jedoch mit einem 90-fachen Aufkonzentrierungsfaktor zu tun. In diesem Chromatogramm ist der Vorteil der Methode deutlich zu sehen. Die Fluoreszenzdetektion nach der Derivatisierung liefert praktisch identische Chromatogramme ohne Störkomponenten, während die UV-Signale bei der 1,77-ml-Injektion durch Interferenzen erheblich gestört sind. Eine Erhöhung dieser Injektionsmenge auf 300 μ l (15 000fache Aufkonzentrierung) brachte keine erhebliche Verschlechterung der Fluoreszenzdetektion.

Schlußfolgerungen

Am Beispiel der Digitalisglykoside kann man die Komplementärfunktionen der Adsorptions- und Umkehrphasenchromatographie erkennen. In den meisten Fällen wird eine Reversibilität der Trennordnung festgestellt. Idealerweise wird jenes System für den Routineeinsatz gewählt, das eine gute isokratische Trennung bei Raumtemperatur und in der kürzesten Zeit gewährleistet. Um-

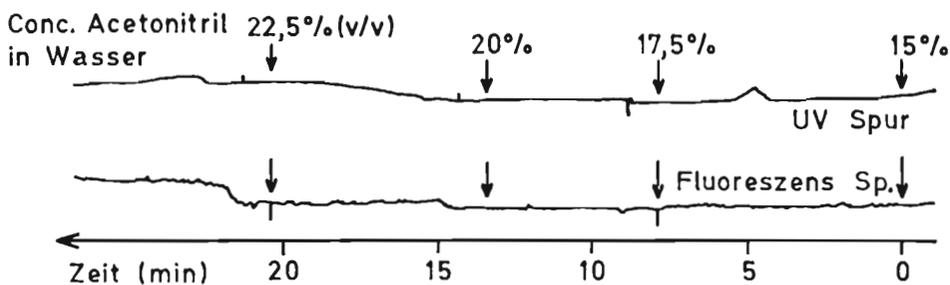


Abb. 17. Basislinie bei Fluramzusatz zu einem Stufengradienten.

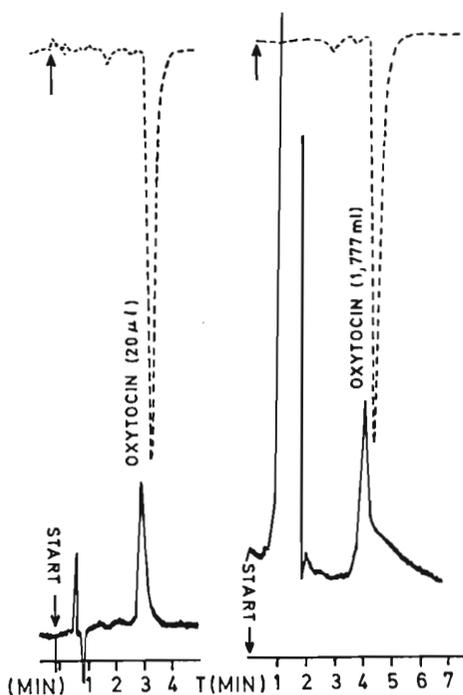


Abb. 18. Chromatogramme für Oxytocin bei verschiedenen Injektionsvolumina und Derivatisierung nach der Säule.

— UV-Detektion, --- Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung.

Säule: Merck RP 8, 5 μ ; 5 cm; 4 mm I.D.
 Mobile Phase: Acetonitril: H₂O (pH 7) 20:80.
 Fluß: 0,2 ml/Min., 24° C thermostatisiert.
 Fluramfluß: 0,02 ml/Min. (30 g Fluram in 100 ml ACN). Detektion UV 220 nm; Fluor. $\lambda_{\text{ex}} \sim 360$ nm, $\lambda_{\text{em}} \sim 470$ nm.

kehrphasensysteme haben oft den zusätzlichen Vorteil, daß sie eine einfachere Probenvorbereitung und bessere Detektionsmöglichkeiten im unteren UV-Bereich bieten. Diese Phasen sind zudem auch für Gradientenelution im Routineeinsatz gut geeignet, wobei sich oft ein einfacher Stufengradient bewährt.

Interessante Aspekte für die Spurenanalytik bietet die Spurenanreicherungstechnik auf der Säule, wobei sie durch Koppelung mit Gradientenelution und Derivatisierung noch erheblich gewinnt. Auf Umkehrphasen sollte dieses Aufkonzentrierungsphänomen generell für Komponenten von mittlerer bis geringerer Polarität anwendbar sein und analog auch für relativ polare Substanzen auf Adsorptionssystemen. Von der Reproduzierbarkeit her sind diese Verfahren auch für quantitative Arbeiten geeignet.

Derivatisierungsverfahren ganz allgemein können für die Lösung komplexer Probleme bezüglich Selektivitäts- und Detektionsverbesserung von großem Nutzen sein. Viel kann noch getan werden, um das Potential dieses Arbeitsgebietes besser auszuschöpfen. Ne-

ben neuen, besseren, selektiveren Reagenzien sind auch verbesserte Pumpen-, Misch- und Reaktionssysteme notwendig. Zur Kinetikbeschleunigung können z. B. thermische, katalytische und photochemische Prozesse benützt werden. Es ist auch klar, daß die Derivatisierungstechniken nicht auf photo- oder fluorometrische Detektion beschränkt bleiben müssen; andere Detektionsverfahren, wie z. B. Chemilumineszenz-, elektroanalytische, radiochemische- Emissions- und massenspektrometrische Verfahren können in Zukunft dadurch verbessert werden.

Literatur

1. Snyder, L. R. und J. J. Kirkland: *Introduktion zu Modern Liquid Chromatography*, New York, 1974, John Wiley & Sons Inc.
2. Engelhardt, H.: *Hochdruckflüssigkeitschromatographie*, Heidelberg, Berlin, New York 1976, Springer Verlag.
3. Grushka, Eli: *Bonded Stationary Phases in Chromatography*, Ann Arbor, 1974, Ann Arbor Science Publ. Inc.
4. Erni, F. und R. W. Frei: *J. Chromatogr.* **130**, 169 (1977).
5. Linder, H. R., H. P. Keller und R. W. Frei: *J. Chromatogr. Sci.* **14**, 234 (1976).
6. Erni, F. und R. W. Frei: *J. Chromatogr.* **125**, 265 (1976).
7. Karger, B. L., M. Martin und G. Guiochon: *Anal. Chem.* **46**, 389 (1974).
8. Krummen, K. und R. W. Frei: *J. Chromatogr.* **132**, 27 und 429 (1977).
9. Schauwecker, P., R. W. Frei und F. Erni: *J. Chromatogr.* **136**, 63 (1977).
10. Lawrence, J. F. und R. W. Frei: *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*, Amsterdam 1976, Elsevier.
11. Frei, R. W., W. Santi und M. Thomas: *J. Chromatogr.* **116**, 365 (1975).
12. Lawrence, J. F. und R. W. Frei: *Anal. Chem.* **44**, 2046 (1972).
13. Roth, M. und A. Hampai: *J. Chromatogr.* **83**, 353 (1973).
14. Frei, R. W. und J. F. Lawrence: *J. Chromatogr.* **83**, 321 (1973).
15. Siggia, S. und R. A. Dishman: *Anal. Chem.* **42**, 253 (1974).
16. Nachtmann, F., H. Spitzzy und R. W. Frei: *J. Chromatogr.* **122**, 293 (1976).
17. Nachtmann, F., H. Spitzzy und R. W. Frei: *Anal. Chem.* **48**, 1576 (1976).
18. Nachtmann, F.: *Z. Anal. Chem.* **282**, 209 (1976).
19. Schill, G.: In *Advances in Ion-Exchange and Solvent Extraction*, Vol. 6, Morinsky, J. A. und Y. Morends (ds.), New York - London, 1974, Marcel Dekker Inc.
20. Santi, W., J. M. Huen und R. W. Frei: *J. Chromatogr.* **115**, 423 (1975).
21. Frei, R. W., L. Michel und W. Santi: *J. Chromatogr.* **126**, 665 (1976).
22. Udenfriend, S. et al.: *Science* **178**, 871 (1972).
23. Frei, R. W., L. Michel und W. Santi: *J. Chromatogr.* **126**, 665 (1976); **142**, 261 (1977).

*Adresse: Prof. Dr. R. W. Frei,
Freie Universität Amsterdam,
Abteilung Analytische Chemie,
De Boelelaan 1083,
NL-Amsterdam 1081 hr*