

Chemilumineszenz – eine universelle Detektionsmethode in der HPLC für stickstoffhaltige Substanzen

Dr. Christian Langfermann

AMI Arzneimitteluntersuchungsinstitut-Nord GmbH, Bremen, Germany

E-Mail: christian.langfermann@ami-nord.de

- Systemvoraussetzungen
- Einsatzzweck
- Prinzip der Chemilumineszenz
- Eigenschaften
- Response-Regeln (Literatur)
- Leistungsfähigkeit (Linearität, Präzision, Selektivität, Richtigkeit)
- Beispiele

AMI

Antek 8060 CLND Quant NQAD QT-500

NQAD



CLND

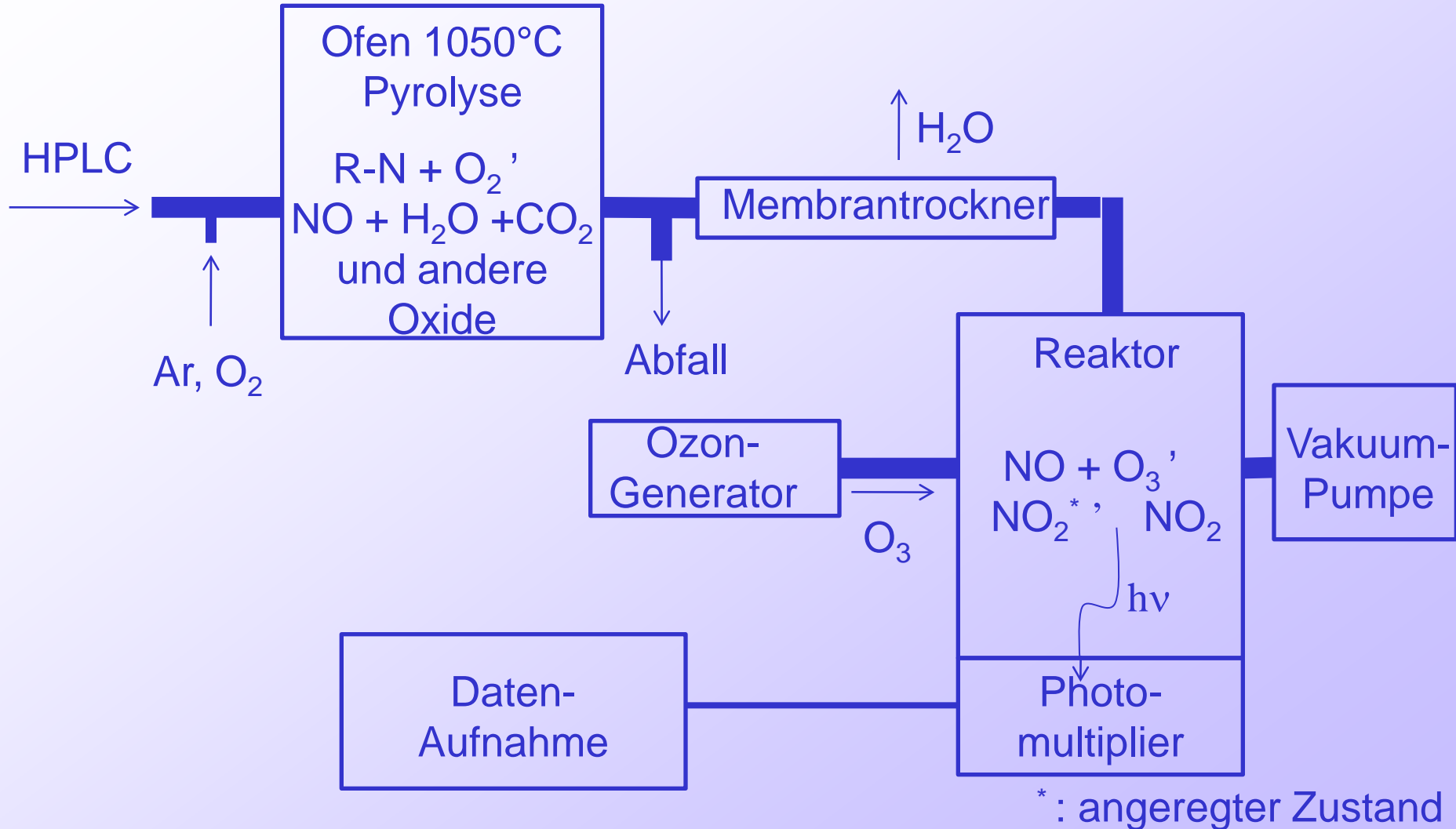
CLND: Chemiluminescence Nitrogen Detector
NQAD: Nano Quantity Analyte Detector

- Gasversorgung
 - Argon / Helium: 50 ml/min / 4-5 bar
 - Sauerstoff: 300 ml/min / 4-5 bar
- HPLC
 - Neues System
 - Gereinigtes System, wenn stickstoffhaltige Eluenten (Acetonitril) verwendet wurden
 - Ersatz des Degassers
 - Mobile Phasen: Kein Stickstoff (kein Acetonitril, Ammoniumsalze), flüchtig
- A/D Wandler

- Quantitative Bestimmung stickstoffhaltiger Substanzen (Wirkstoff/Verunreinigungen)
 - Keine spezifische Referenzsubstanz
 - Kein Chromophor erforderlich
- Identitätsnachweis parallel durch
 - HPLC/MS (Ionenfalle/TOF), GC/MS
 - Referenzstandards für qualitative Zwecke

- Definition: Emission von Licht im sichtbaren Bereich durch eine chemische Reaktion
- Versprühen des HPLC-Eluenten mit Sauerstoff
- Pyrolyse aller Probenbestandteile mit Sauerstoff bei 1050°C
- Quantitative Oxidation der stickstoffhaltigen Bestandteile zu NO
- Oxidation des NO in der Detektorzelle mit Ozon zu NO_2^* (angeregter Zustand)
- Emission von Licht bei Rückkehr in den Grundzustand

Prinzip der Chemilumineszenz



VORTEILE

- Sehr empfindlich für alle stickstoffhaltigen Substanzen
- Auch für flüchtige Substanzen geeignet
- Signalhöhe unabhängig von der Zusammensetzung der mobilen Phase
- Gradientenkompatibel
- Lineares Signal
- Kein Chromophor erforderlich
- Kalibration mit anderen stickstoffhaltigen Substanzen möglich, wenn Referenzsubstanzen nicht verfügbar sind

NACHTEILE

- Sehr empfindlich für alle stickstoffhaltigen Substanzen
- Keine stickstoffhaltigen HPLC-Eluenten (Acetonitril, Ammoniumsalze...)
- Sauberes Arbeiten (Stickstoff ist überall)
- Response bei benachbarten Stickstoffatomen im Molekül nicht equimolar

- Signal proportional zur Menge an NO



- Azogruppen werden nicht detektiert

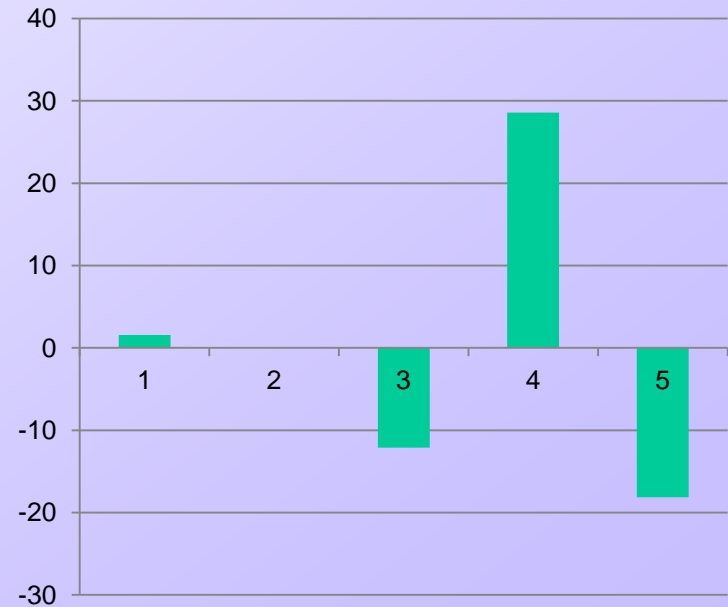
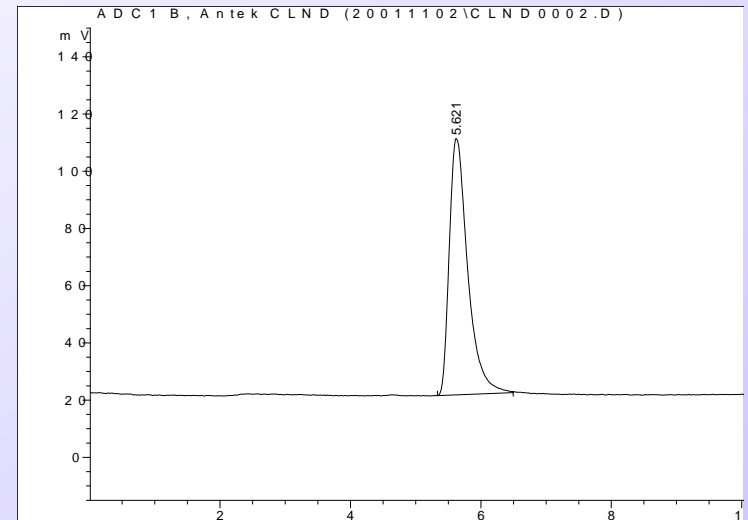
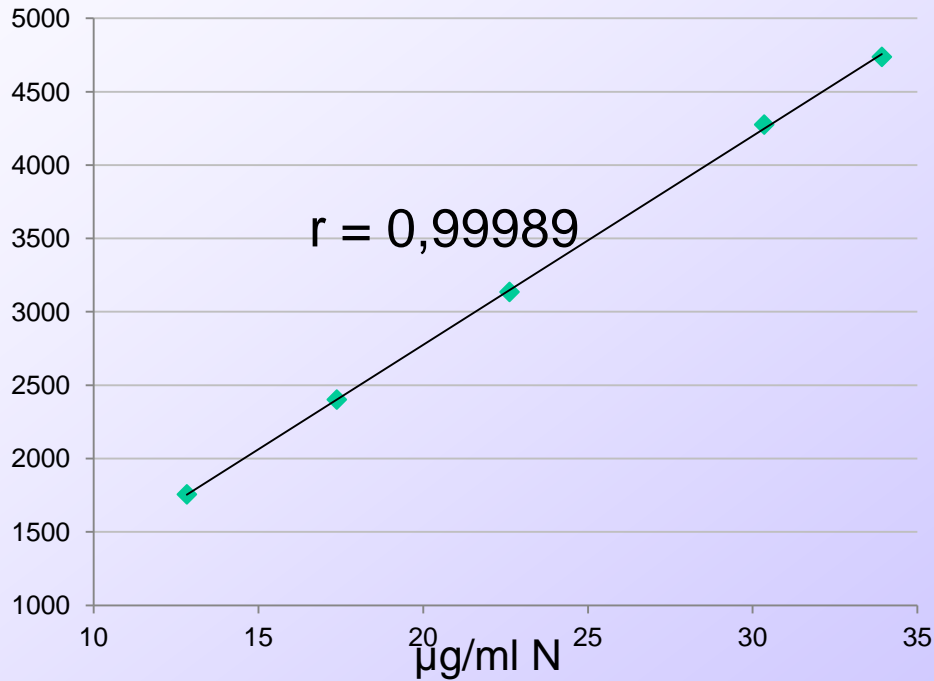
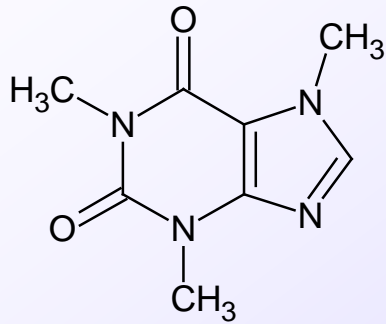


- N-N-Bindungen ergeben ca. ~ 50 % Signal

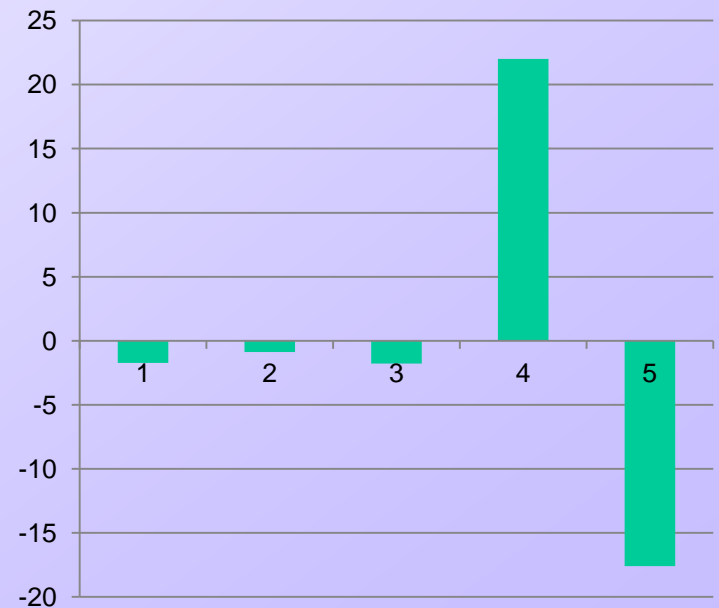
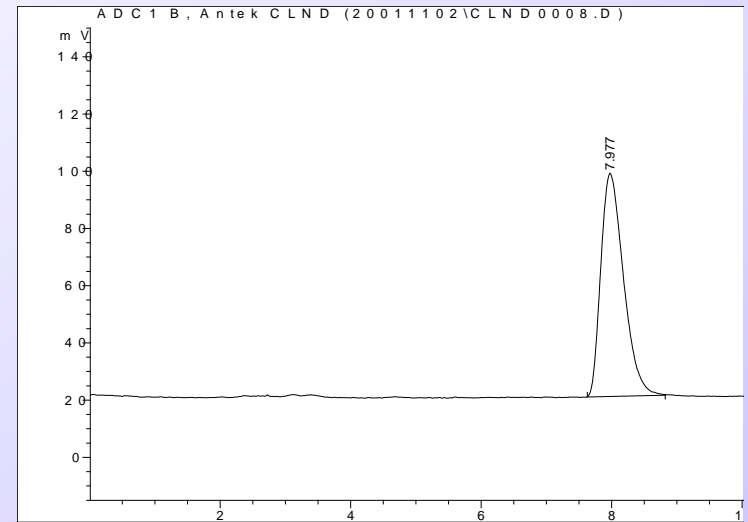
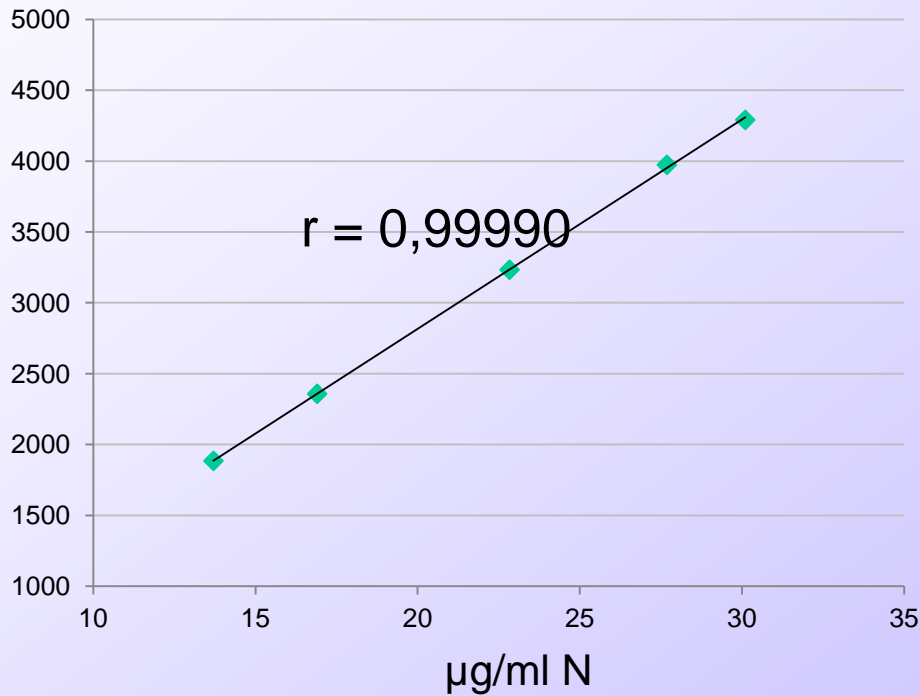
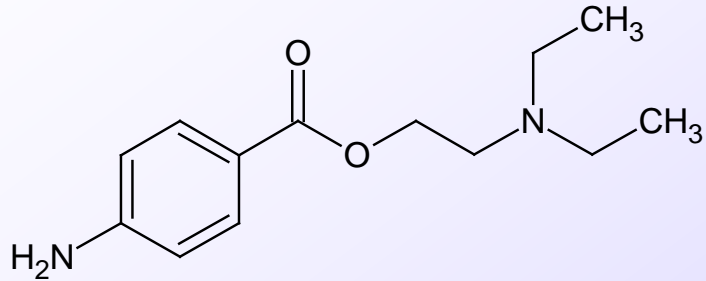


- Systemvoraussetzungen
- Einsatzzweck
- Prinzip der Chemilumineszenz
- Eigenschaften
- Response-Regeln (Literatur)
- Leistungsfähigkeit (Linearität, Präzision, Selektivität, Richtigkeit)
- Beispiele

Coffein

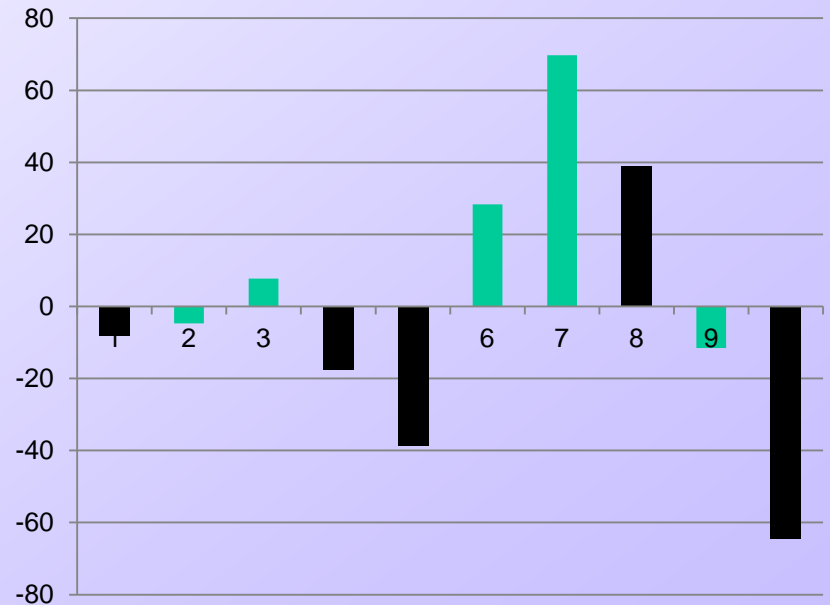
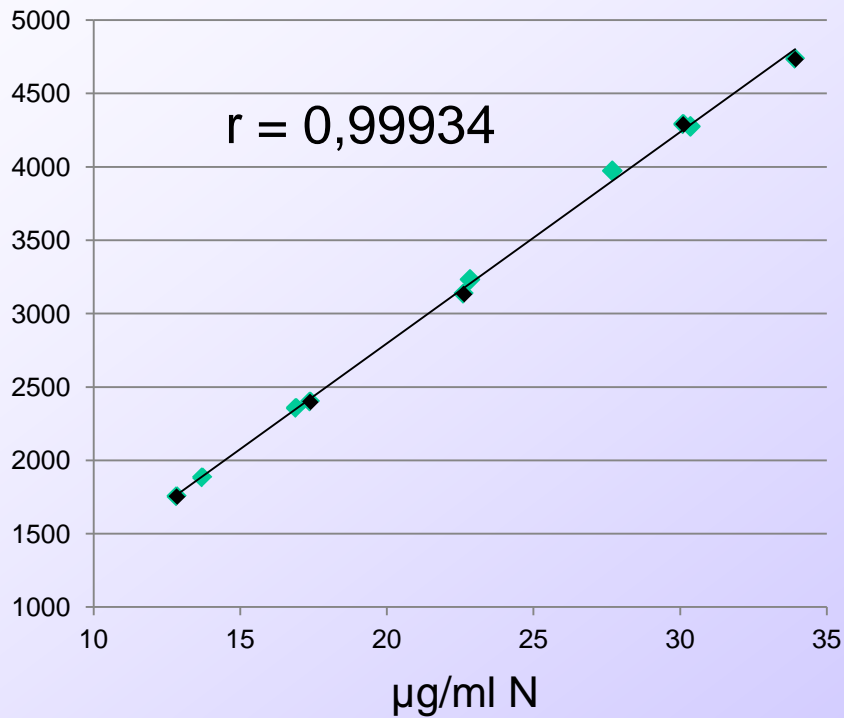
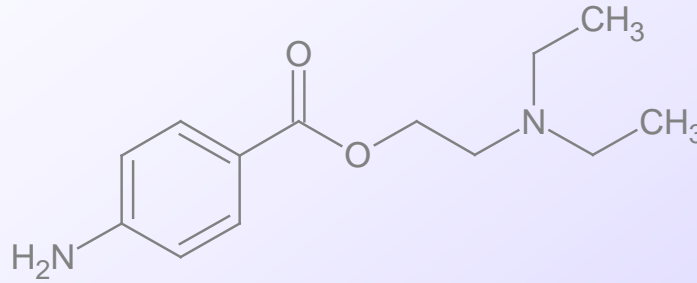
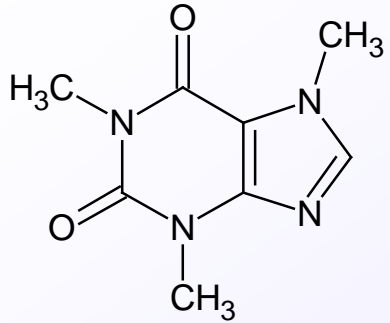


Procain



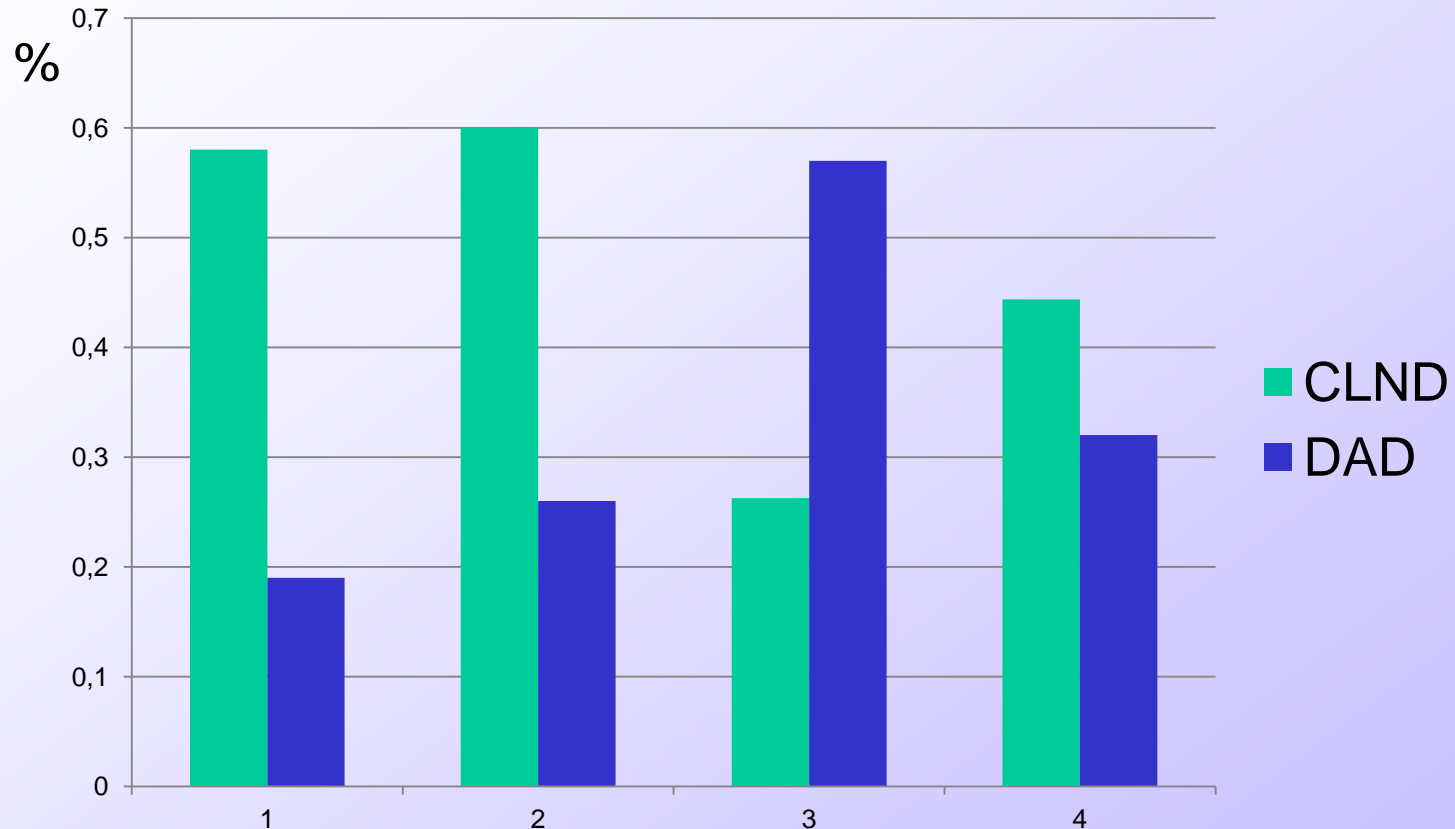
AMI

Linearität



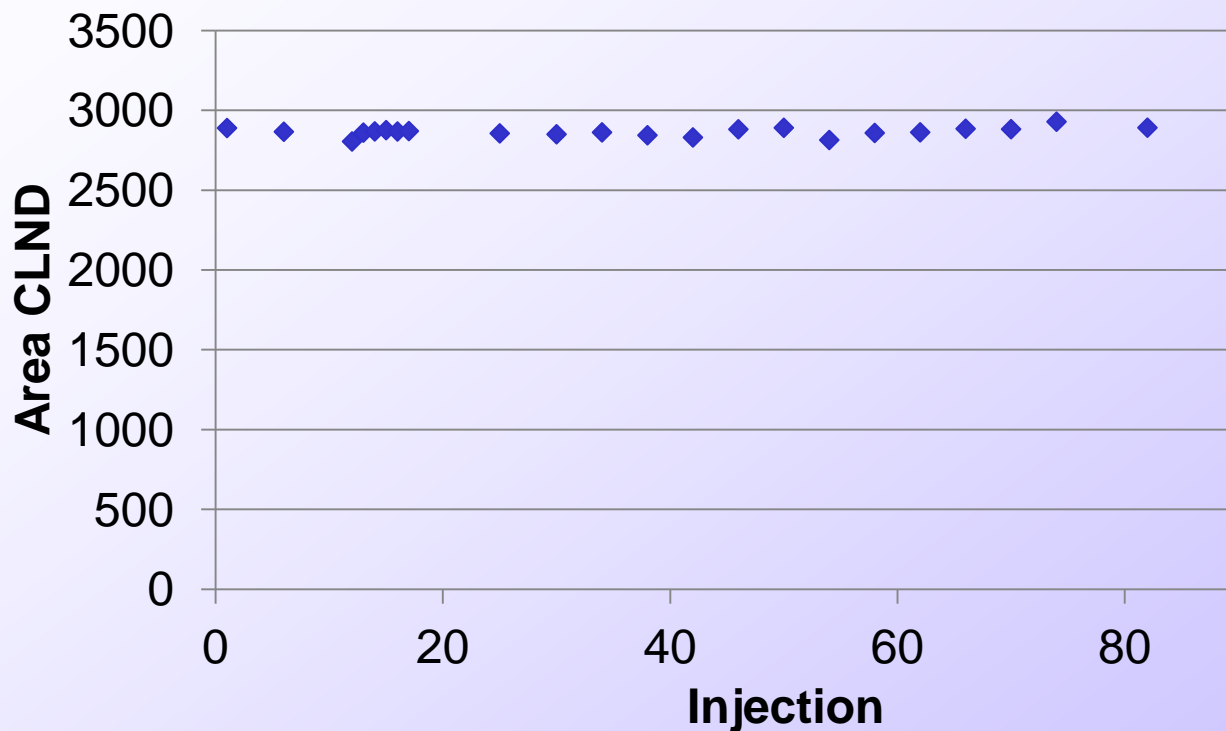
Prazision

(Sechsfach-Injektion Procain)

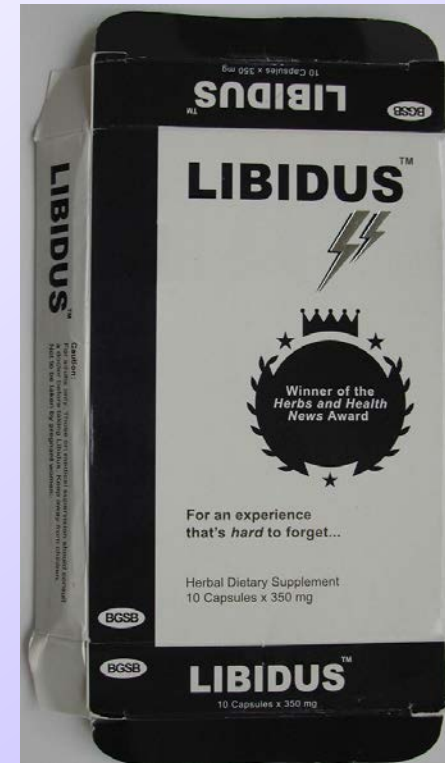
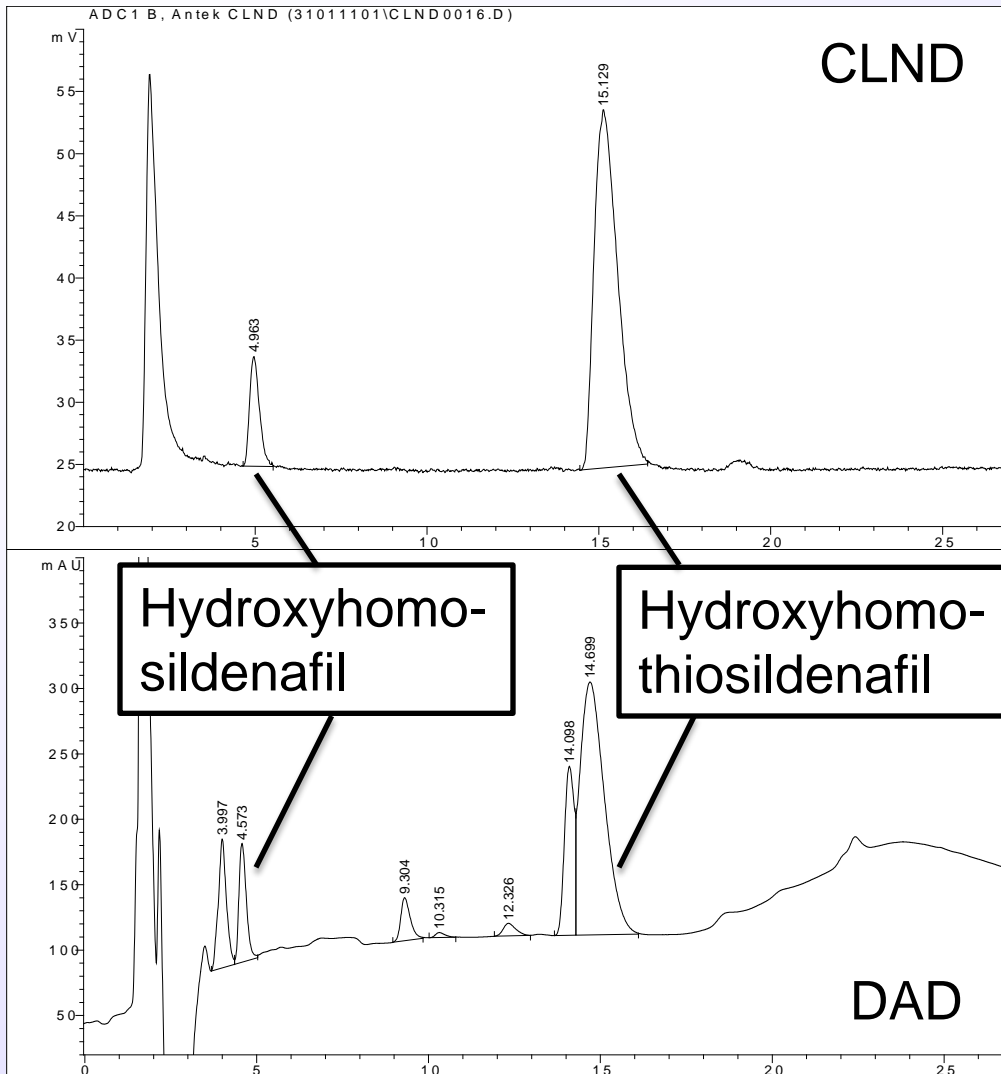


Langzeitstabilität (Procain)

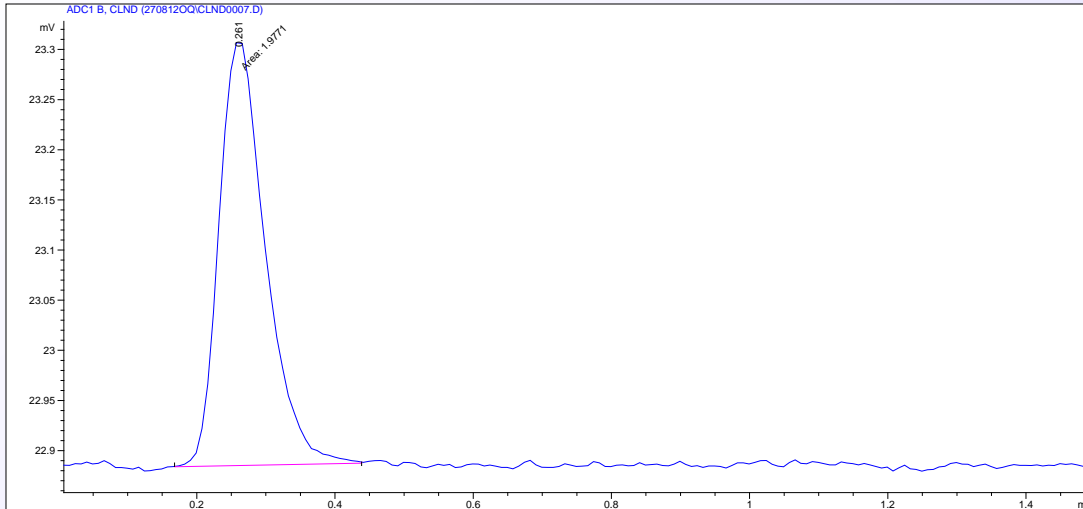
AMI



- ~90 Injektionen in 70 Stunden
- Kein Trend
- RSD 0,94 %



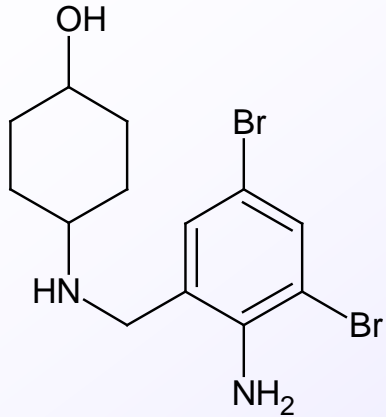
- PDE-5 Hemmer in pflanzlicher Matrix
- Selektiv für stickstoffhaltige Substanzen



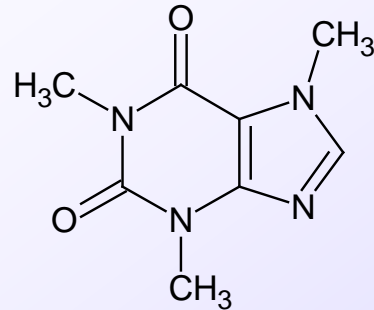
- 20 ng Coffein on column (entspricht 6 ng Stickstoff)
- S/N-Verhältnis 40

AMI

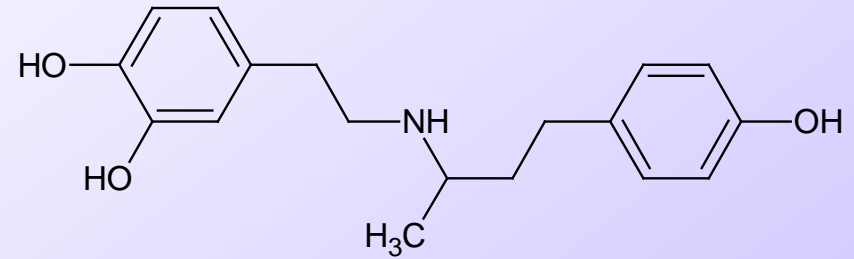
Richtigkeit– Kalibration mit Procain Substanzen mit isoliertem Stickstoff



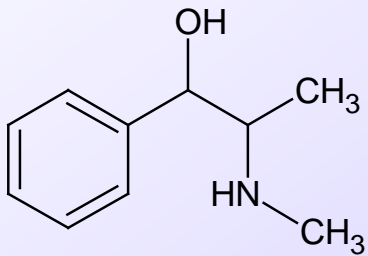
Ambroxol: 101,4 %



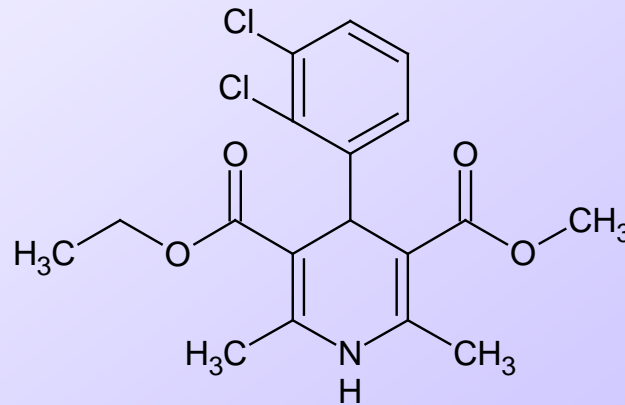
Coffein: 98,5 %



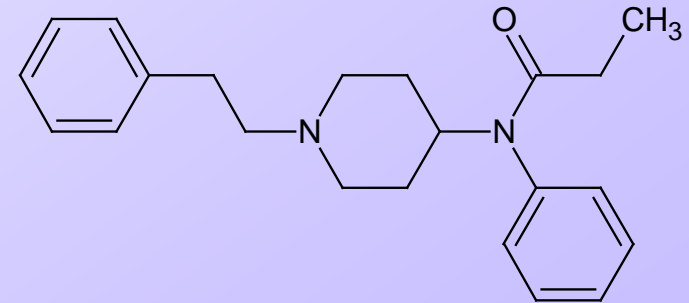
Dobutamin: 94,4 %



Ephedrin: 103,3 %

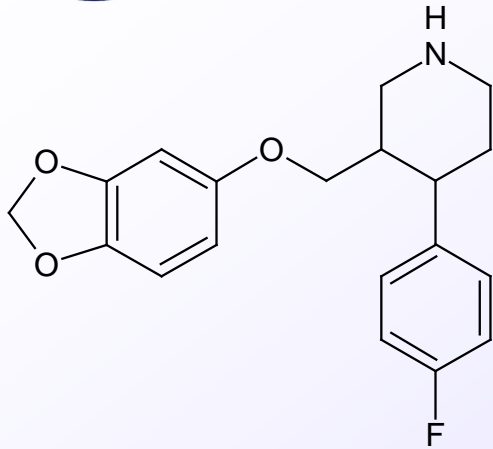


Felodipin: 94,0 %

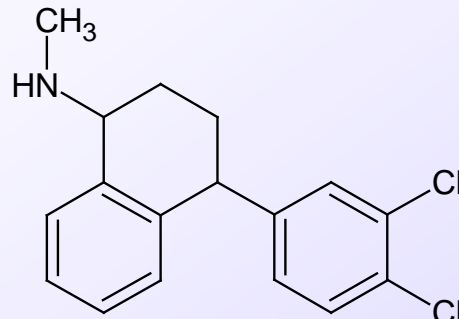


Fentanyl: 94,0 %

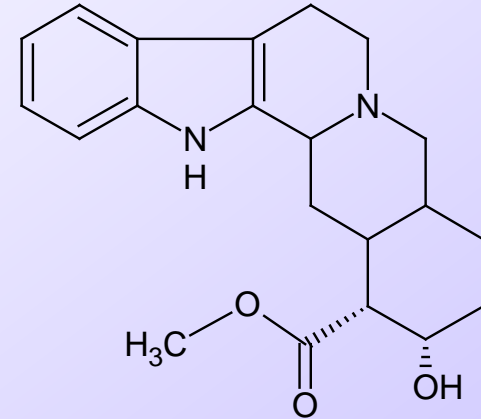
Richtigkeit– Kalibration mit Procain Substanzen mit isoliertem Stickstoff



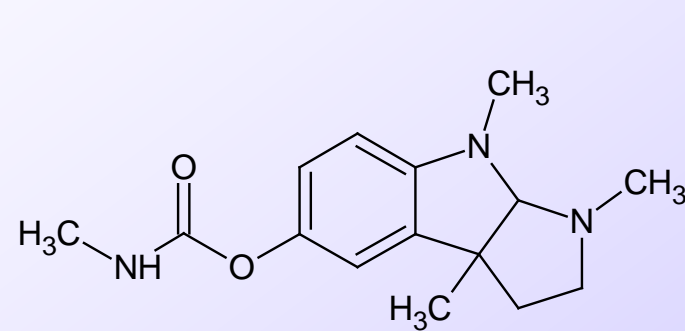
Paroxetin: 98,8 %



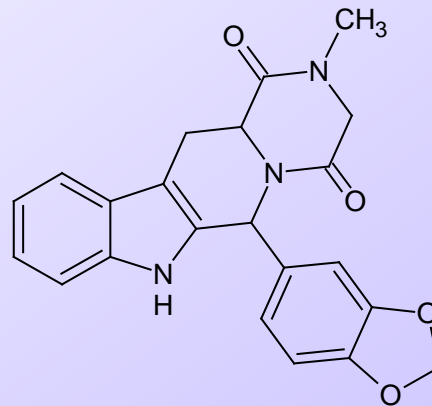
Sertralin: 100,3 %



Yohimbin: 98,5 %



Physostigmin: 103,3 %

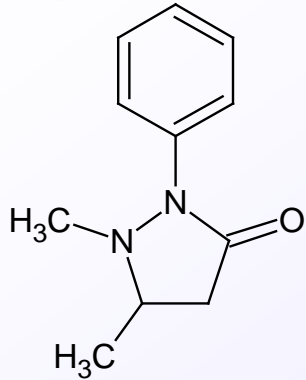


Tadalafil: 94,2 %

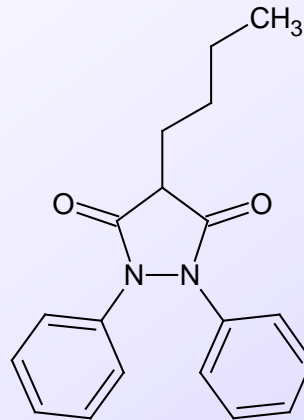
Richtigkeit– Kalibration mit Procain

AMI

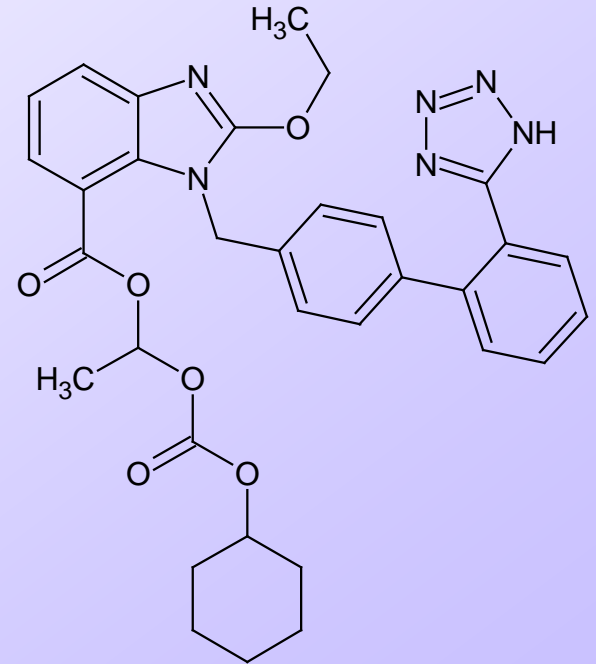
Substanzen mit benachbartem Stickstoff



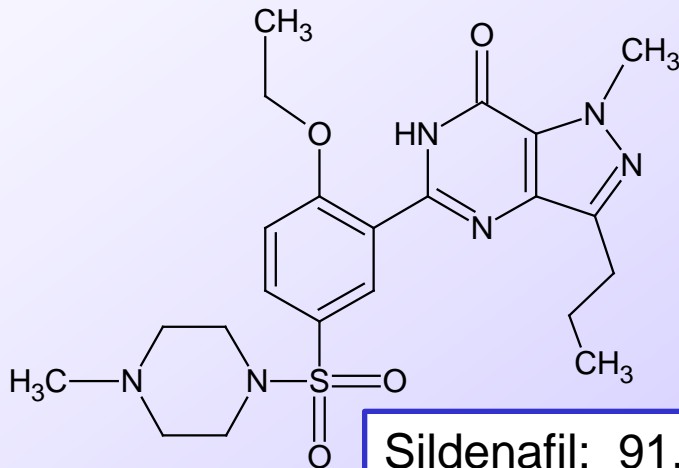
Phenazon: 87,9 %
Theoretisch : 50 %



Phenylbutazon: 93,7 %
Theoretisch: 50 %



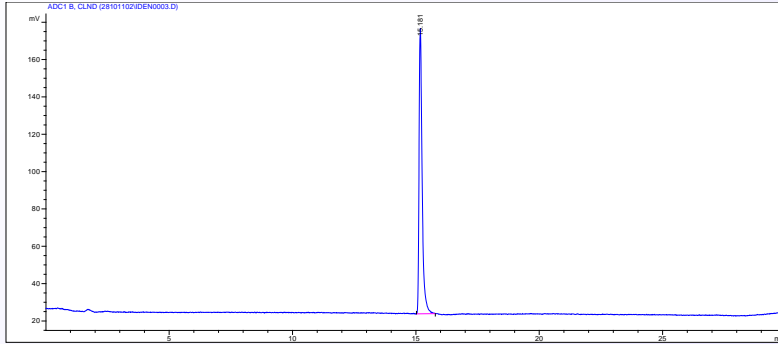
Candesartancilexetil: 48,8 %
Theoretisch : 66,6 %



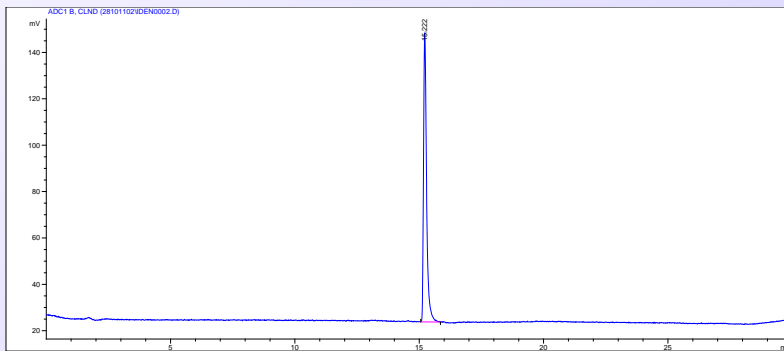
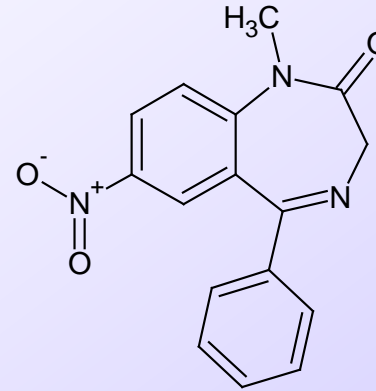
Sildenafil: 91,6 %
Theoretisch : 83,3 %

AMI

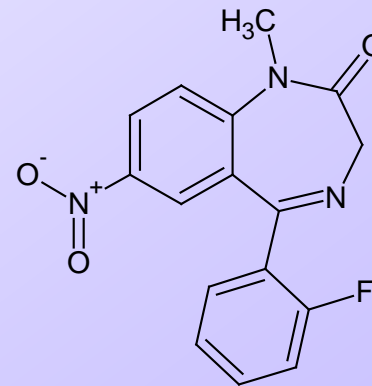
Flunitrazepam



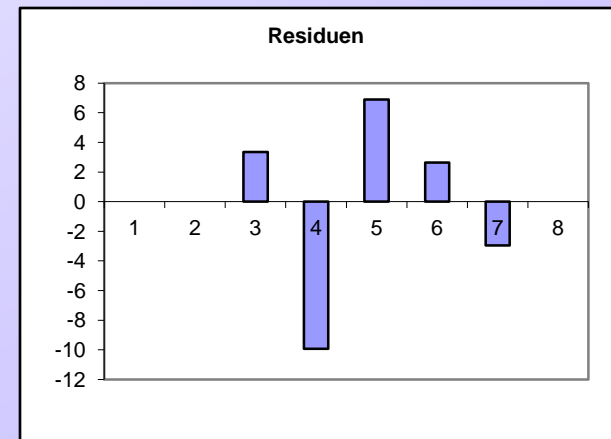
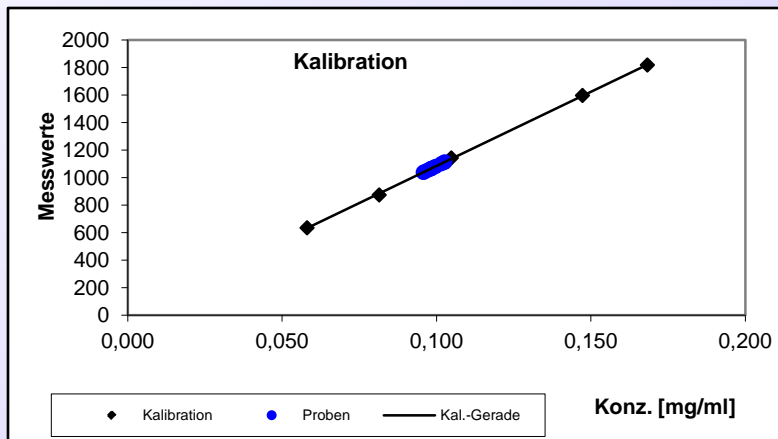
Kalibrierung mit Nitrazepam



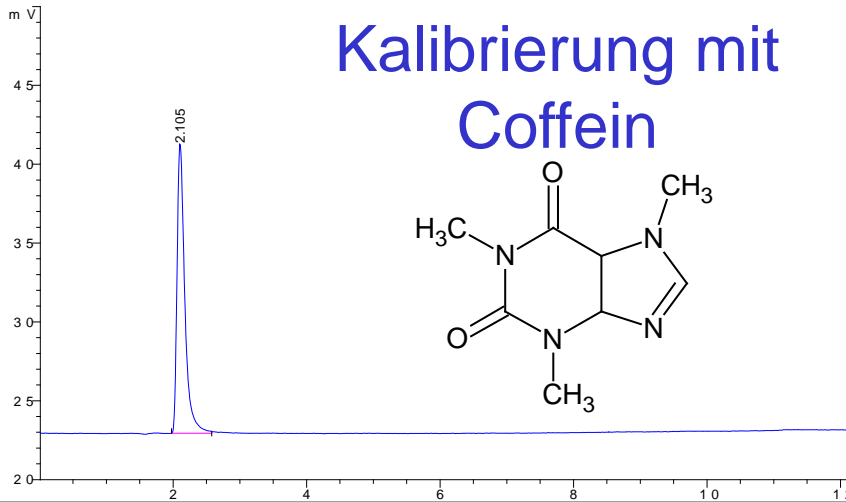
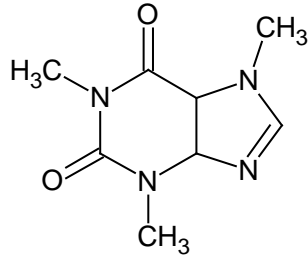
Flunitrazepam



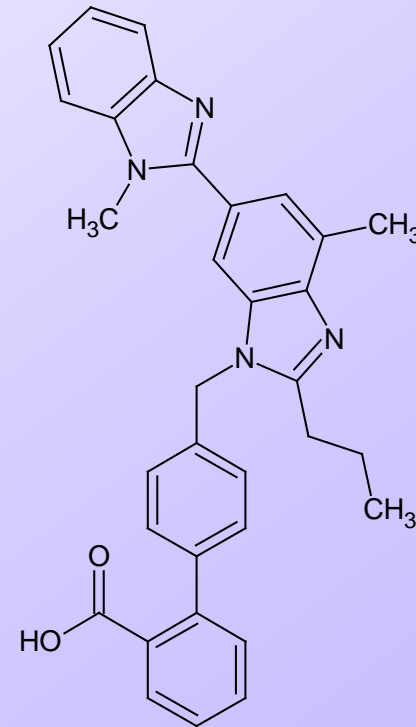
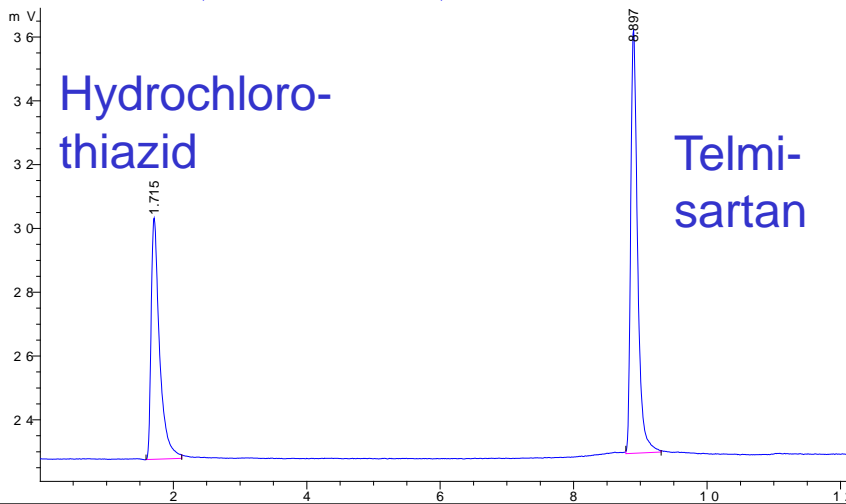
- Abgleich Flunitrazepam/Nitrazepam: 100,1 %
- Flunitrazepam Tabletten: 0,990 mg/Tabl. (99,0 % der Dekl.)



ADC1 A, CLND (060312021GEHALT08.D)

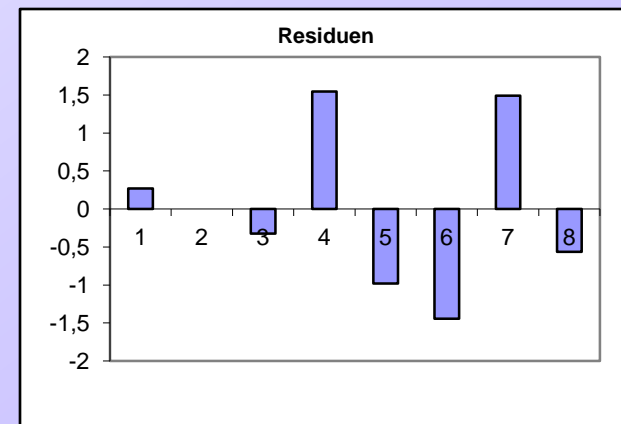
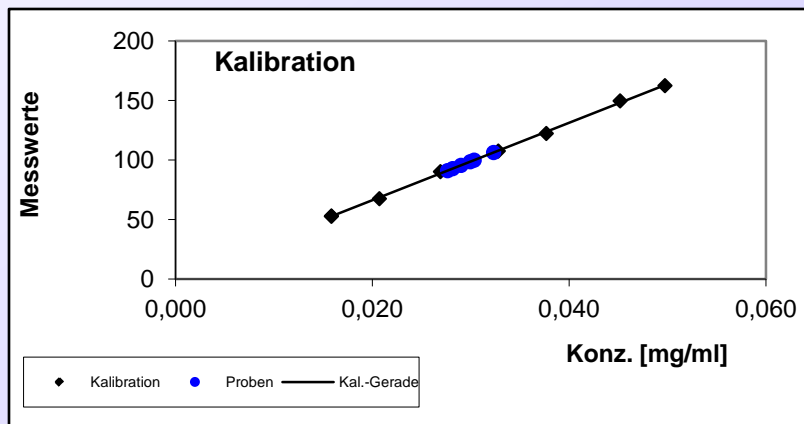
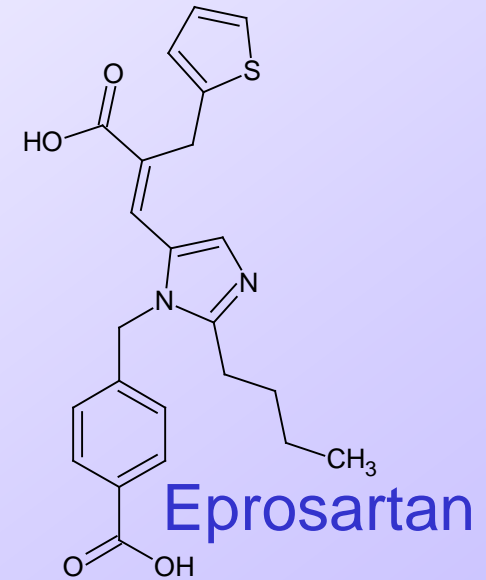
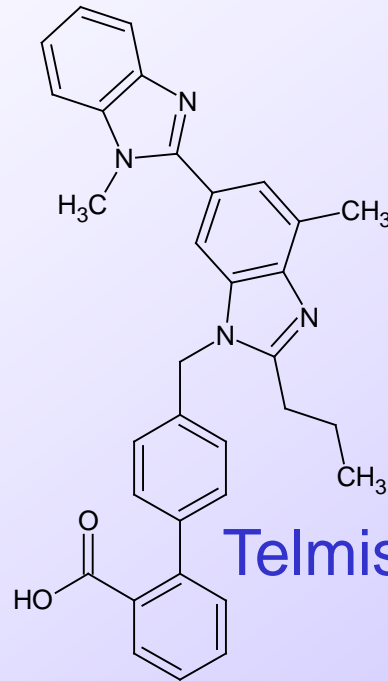
Kalibrierung mit
Coffein

ADC1 A, CLND (070312011GEHALT19.D)

Hydrochloro-
thiazidTelmi-
sartan

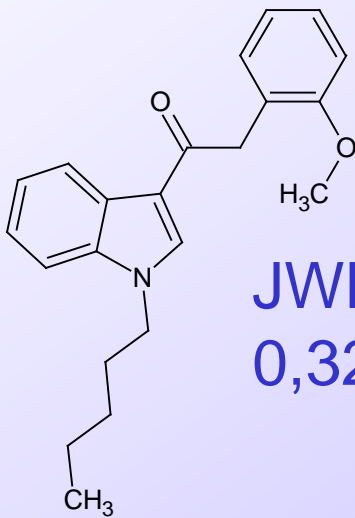
Telmisartan Tabletten:
91,6 % der Deklaration

Wiederfindung Eprosartan:
99,6 %

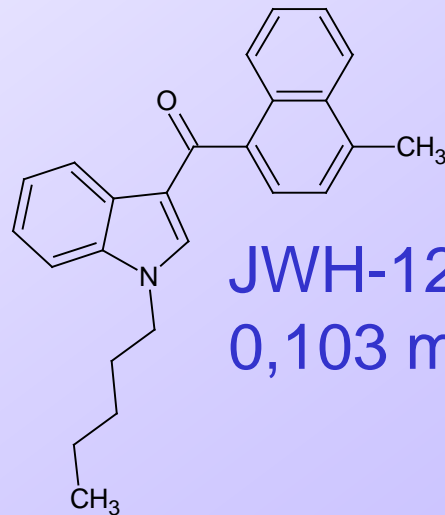


AMI

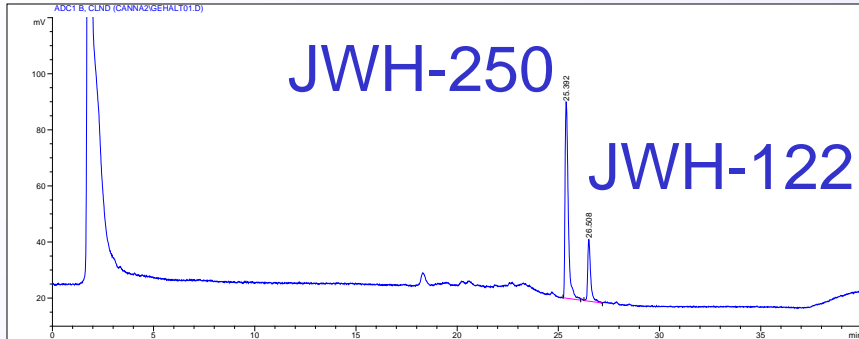
JWH 250 / JWH 122



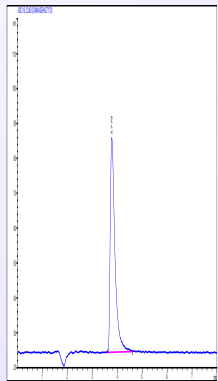
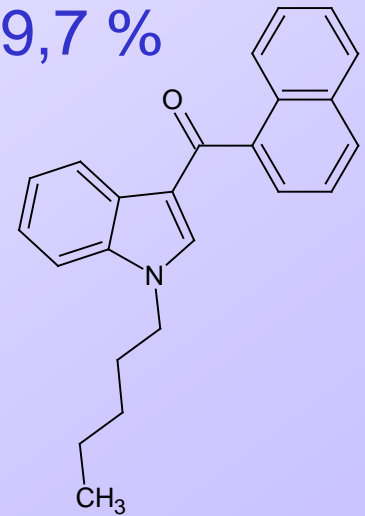
JWH-250
0,326 mg/g



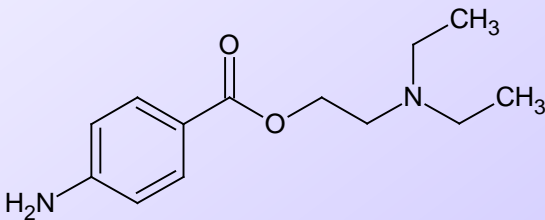
JWH-122
0,103 mg/g



Wiederfindung
JWH-018
99,7 %



Kalibrierung mit
Procain



- Lineares Signal
- Sehr gute Präzision
- Robust und stabil
- Selektiv für stickstoffhaltige Substanzen
- Equimolar für Analyten ohne benachbarte Stickstoff-Atome
- Nicht equimolar für N-N-haltige Verbindungen, kein einheitlicher Umrechnungsfaktor - Einsatz von ähnlichen Referenzsubstanzen