

## **Entwicklung eines Raman-Detektors für flüssigchromatografische Anwendungen zur Charakterisierung komplexer pharmazeutischer Formulierungen**

<b>Laufzeit</b>	01.04.2012 - 30.06.2014
<b>Forschungsstelle 1</b>	Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V., IUTA Bliersheimerstraße 58-60 D-47229 Duisburg
<b>Projektleitung</b>	Dr. Thorsten Teutenberg
<b>Forschungsstelle 2</b>	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, HHU Institut für Physikalische Chemie Arbeitsgruppe für Flüssigphasen-Laserspektroskopie Universitätsstraße 1 D-40225 Düsseldorf
<b>Projektleitung</b>	Dipl.-Chem. Björn Fischer
<b>Förderung</b>	Das IGF-Vorhaben 17497 N der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), Bürgerstraße 12, 53173 Bonn und des Instituts für Energie und Umwelttechnik e.V. (IUTA), Bliersheimer Straße 60, 47229 Duisburg wird über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.



### **Problemstellung/Zielsetzung**

In vielen Bereichen der Lebenswissenschaften (Life Sciences), und hier insbesondere im Bereich der pharmazeutischen Analytik, ist die Charakterisierung, Identifizierung und Quantifizierung von Leitsubstanzen und deren Metabolite eine der Herausforderungen für die zukünftigen Forschungsaktivitäten sowie die Routineanalytik. Hierbei müssen immer komplexere Substanzgemische, die häufig Hunderte von Einzelkomponenten enthalten, analysiert werden. Dies stellt extreme Anforderungen an die chromatografischen Verfahren bzw. an die entsprechenden Detektionstechniken.

### **Raman-Spektroskopie**

Die pharmazeutische Analytik verfolgt daher das Ziel, so genannte Multidetektions-Systeme zu verwenden, wobei auf die Kompatibilität zwischen den einzelnen Detektionssystemen geachtet werden muss. Die Integration eines strukturaufklärenden Raman-Detektors in bestehende Multidetektions-Systeme für flüssigchromatografische Anwendungen kann deshalb als ideale Ergänzung zu den bereits etablierten Detektionstechniken betrachtet werden. Die Raman-Spektroskopie kann z.B. ein Massenspektrometer ersetzen, wenn wenige Zielanaly-

ten quantifiziert werden müssen und die zu erfassenden Komponenten nicht durch ihr UV-Spektrum identifiziert werden können. Die Raman-Spektroskopie kann jedoch auch in Kombination mit der Massenspektrometrie eingesetzt werden, wenn die Struktur unbekannter Metabolite aufgeklärt werden muss.

Derzeit steht nur die geringe Nachweisstärke der Raman-Spektroskopie einem möglichen kommerziellen Nutzen in Verbindung mit der klassischen HPLC-UV-Kopplung entgegen. Mit einer Verbesserung der Nachweisstärke eines aktuell entwickelten Raman-Detektors (IGF-Vorhaben-Nr.: 16120 N) um den Faktor  $10^4$  wären Konzentrationen von  $100 \text{ ng l}^{-1}$  messbar. Dies entspricht der Leistungsfähigkeit der UV-Detektion.

Die Verbesserung der Nachweisstärke wird in diesem Projekt durch Ausnutzung des SERS-Effektes (SERS: Surface Enhanced Raman Scattering) erfolgen. Für Moleküle, die an Metalloberflächen adsorbiert sind, kann eine deutliche Verstärkung der Raman-Signale beobachtet werden. Besonders gut lässt sich der SERS-Effekt z.B. durch den Zusatz von Metallkolloiden erzeugen, bei denen die Partikelgrößen zwischen 20 und 80 nm eingestellt sind. Dazu werden meist Kolloide aus Silber, Gold oder Kupfer verwendet. Im besten Falle lassen sich mit SERS-Verstärkungen von  $10^{10}$  bis  $10^{11}$  erreichen.

### **Hochtemperatur-HPLC**

Die Hochtemperatur-HPLC basiert auf dem für das hier beschriebene Projekt relevanten Effekt, dass Wasser mit zunehmender Temperatur immer unpolarer wird und im Grenzfall die Eigenschaften eines organischen Lösemittels annimmt. Vor diesem Hintergrund ist es möglich, anstelle der Lösemittelgradientenelution, die klassischerweise angewendet wird, die Temperaturgradientenelution zu verwenden. Obwohl die Anzahl temperaturstabiler stationärer Phasen immer noch recht begrenzt ist, wurde eine Reihe robuster Materialien auf Basis von Metalloxiden und Silikagel identifiziert, die eine ausreichende Langzeitstabilität bei hohen Temperaturen besitzen.

Der entscheidende Vorteil der Hochtemperatur-HPLC im Gegensatz zu klassischen Flüssigkeitschromatografischen Verfahren liegt in der Möglichkeit, einen Großteil des organischen Lösemittels durch reines Wasser ersetzen zu können. Dies öffnet den Weg für eine Vielzahl von speziellen Kopplungstechniken, die auf der Verwendung rein wässriger Eluentensysteme basieren. Die Verwendung einer rein wässrigen mobilen Phase ist insbesondere für die Kopplung zwischen HPLC und Raman-Detektor ideal, da die Raman-Signale des Wassers im Vergleich zu den Signalen organischer Lösemittel relativ schwach sind. Somit können hohe Raman-Untergrund-Signale vermieden werden.

Allerdings muss dem Problem begegnet werden, dass mit reinem Wasser die Elution eines komplexen Vielkomponentengemisches in einem chromatografischen Lauf nicht ohne weiteres möglich ist. Vor diesem Hintergrund müssen Strategien entwickelt werden, die eine möglichst vollständige Elution des Gemisches erlauben. Zum einen kann auf die simultane Temperatur- und Lösemittelgradientenelution zurückgegriffen werden, wobei der organische Anteil in der mobilen Phase einen durch den Raman-Detektor vorgegebenen Grenzwert nicht überschreiten darf. Zum anderen ist es möglich, anhand einer Fraktionierung der Rohextrakte über die Probenvorbereitung die Komplexität des Gemisches herabzusetzen. Die einzelnen Fraktionen können dann auf Säulen unterschiedlicher Hydrophobizität analysiert werden, so dass der Anteil an organischem Lösemittel in der mobilen Phase auf ein Minimum reduziert werden kann.

### **Online-Probenvorbereitung**

Komplexe Substanzgemische wie z. B. Pflanzen- und Phytoextrakte erfordern eine gezielte Probenvorbereitung, um die Nachweisgrenze für eine bestimmte Zielkomponente zu verbessern oder aber um bei Fehlen eines spezifischen Detektionsverfahrens eine eindeutige Identifizierung der Zielkomponente zu ermöglichen. Um den Probendurchsatz zu erhöhen und gleichzeitig den personellen Aufwand zu minimieren, ersetzen vollautomatisierbare online-Verfahren die zeit- und kostenintensiven offline-Verfahren.

Der Probenvorbereitung kommt innerhalb des Projektes eine zentrale Rolle zu, da aufgrund der Limitierungen bezüglich der mobilen Phase eine Vorfraktionierung des Rohextraktes erzielt werden muss. Diese Vorfraktionierung dient gleichzeitig dem Zweck, die Probe aufzureinigen, um Matrixeffekte zu verringern, die insbesondere bei der massenspektrometrischen

Detektion zu geringen Wiederfindungsraten führen. Darüber hinaus ist die Möglichkeit gegeben, eine Aufkonzentrierung von Targetanalyten zu erreichen und den Rohextrakt in einzelne Fraktionen aufzuteilen, so dass die chromatografische Elution mit einem geringen Anteil an organischem Lösemittel erfolgen kann.

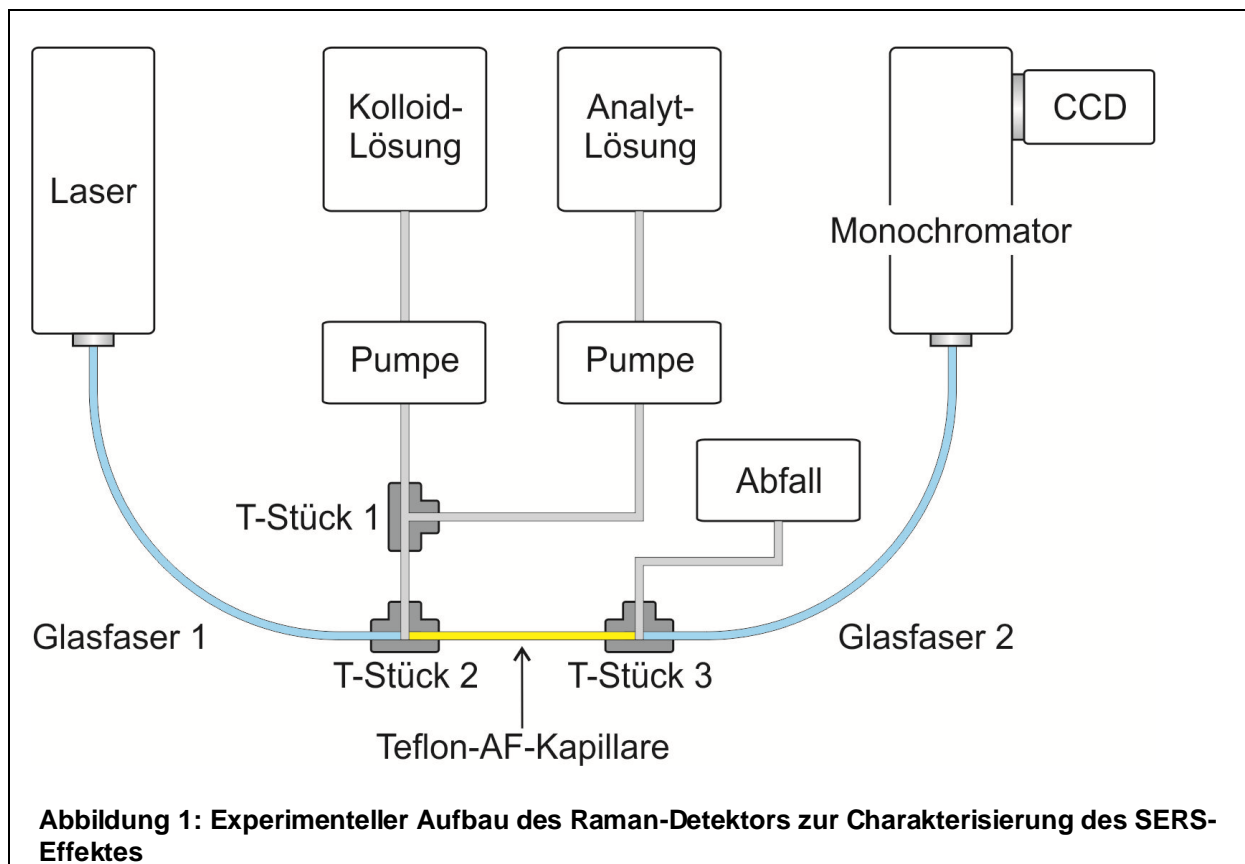
Innerhalb des Projektes soll ein SPE Exchange Modul (SPE: Solid Phase Extraction) eingesetzt werden. Dieses bietet neben einer Integration in bestehende Hardware-Komponenten den Vorteil, dass Rückstellproben genommen und dass alle verfügbaren SPE-Materialien eingesetzt werden können. Die Verfügbarkeit von Rückstellproben wird als wichtiges Kriterium angesehen, da Routinelaboratorien über mehrere Wochen bzw. Monate verpflichtet sind, Rückstellproben zu sammeln.

## Sachstand

### Aufbau des Raman-Detektors zur Charakterisierung des SERS-Effektes

Für die Charakterisierung des SERS-Experimentes wurde ein erster experimenteller Aufbau realisiert, mit dem die möglichen Nachweisgrenzen in der flüssigen Phase bestimmt werden können. Dazu werden sowohl Analyt- als auch Metallkolloid-Lösungen mit definierten Konzentrationen in das Raman-System eingespritzt und über das T-Stück 1 zusammengeführt. In der Teflon-AF-Kapillare, welche die Funktion eines Flüssigkernlichtwellenleiters besitzt, erfolgt dann die Raman-spektroskopische Analyse. Dazu wird das Laseranregungslicht über das T-Stück 2 in die Teflon-AF-Kapillare eingekoppelt. Das hier entstehende Raman-Streulicht wird am T-Stück 3 mittels Glasfaser abgenommen und in der Monochromator- / Detektor-Einheit spektral analysiert. Das System wurde so konzipiert, dass es für die spätere Kopplung mit der HPLC kompatibel ist.

In Kürze werden erste Messergebnisse erwartet.



## **Projektbezogene Veröffentlichungen**

Projektbezogene Veröffentlichungen sind in Planung.