

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 163801 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1823/83

(51) Int.Cl.5

B 01 D 15/08

(22) Indleveringsdag: 25 apr 1983

(41) Alm. tilgængelig: 29 okt 1983

(44) Fremlagt: 06 apr 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 28 apr 1982 NL 8201757

(71) Ansøger: *DUPHAR INTERNATIONAL RESEARCH B.V.; C. J. van Houtenlaan 36; Weesp, NL

(72) Opfinder: Henri M. *Ruijten; NL, Hans de *Bree; NL, Peter H. van *Amsterdam; NL, Elbert *Wiegers; NL

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) For-kolonne til brug ved kromatografi og apparat til brug i et system til væske-kromatografering

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag

1823-83

Der beskrives en for-kolonne af trykresistent materiale til ved forhøjet tryk at for-koncentrere substanser, der skal kromatograferes. Kolonnen består af et beholderlegeme, der indvendig indsnævres mod de to ender, og som har udstyr til etablering af tætte forbindelser, dels opstrøms til en tilførselsledning for den væske, der skal for-koncentreres, dels nedstrøms til en separator-kolonne.

Endvidere beskrives et apparat til brug i et væske-kromatograferingssystem og omfattende en eller flere for-kolonner, valgfrit en eller flere separator-kolonner samt et forbindelseselement, og endelig beskrives et forbindelseselement til dette apparat.

DK 163801 B

Opfindelsen vedrører en for-kolonne af tryk-
resistent materiale til ved forhøjet tryk at forkon-
centrere substanser, der skal kromatograferes. Opfin-
delsen vedrører også et apparat til brug i et system
5 til væskekromatografering samt et forbindelseselement
til dette apparat.

Væskekromatografi er en meget anvendt separa-
tionsteknik, både til påvisning og efterfølgende
identifikation og bestemmelse af koncentrationerne
10 af i væsker opløste eller dispergerede substanser,
og til i en forud bestemt grad at udskille disse
substanser fra væsker. I det første tilfælde er der
tale om analytisk væskekromatografi og i det sidste
tilfælde forberedende væskekromatografi. Væskekromato-
15 grafi (LC), navnlig den såkaldte "høj-ydelses
væskekromatografi" (HPLC), kan opdeles i væske-
faststofkromatografi (LSC), fordelingskromatografi,
såsom væske-væske-kromatografi (LLC) og bundet-fase-
kromatografi (BPC), ionbytter-kromatografi, affini-
20 tets-kromatografi, og eksklusions-kromatografi, så-
som gelpermeation (GPC) og gelfiltrerings-kromatografi.

Ved de fleste af disse kromatograferings-
teknikker anvendes en eller flere kolonner, som er
fyldt med et sædvanligvis granuleret bæremateriale.
25 Valget af bærematerialet afhænger af det stof, der
skal kromatograferes, af den væske, hvori stoffet
findes, og af de opløsningsmidler, der anvendes til
kromatograferingsprocessen. Valget af de opløsnings-
midler og den bærer, der skal anvendes, bestemmes
30 således af det separationsproblem, der skal løses.

Når de substanser, der skal udskilles eller
detekteres, optræder som sporstoffer i væsken, dvs. i
meget små koncentrationer, er det normalt at anvende
en forkoncentrering. I dette tilfælde anvendes ofte

en for-koncentrationskolonne eller for-kolonne, som kan indskydes, før den egentlige kromatograferingskolonne eller separationskolonne.

En sådan for-kolonne (koncentrationskolonne) til brug ved væsekromatografering er beskrevet i U.S.A. patentskrift nr. 4 070 284. Den beskrevne, cylindriske kolonne har en maksimal størrelse på 0,4" i diameter og 0,6" i længden, og den tåler et tryk på højst 3 MPa. En sådan kolonne er dog ikke egnet til de fleste af de tidligere beskrevne formål, eksempelvis til ved brug af HPLC at koncentrere medikamenter og/eller metaboloider heraf i legemsvæsker, fordi både kapaciteten og opløsningen er for lille. Brugen af en kolonnepakning med relativ stor partikelstørrelse, som det anbefales i patentet, tilsyneladende for at undgå en utilladelig trykstigning under for-koncentrationsprocessen, har endog en ufordelagtig indvirkning på opløsningen. Brugen af en for-kolonne i HPLC-teknikken beskrives eksempelvis af Roth c.s. i J. Chrom. 222, (1981), side 13-22, Denne artikel vedrører påvisningen af medikamenter eller metaboloider heraf i legemsvæsker. Koncentrationen af disse sporstoffer i legemsvæsker er meget lille, eksempelvis af størrelsesordenen nanogram pr. ml, hvorfor en for-koncentrering er nødvendig. De af Roth c.s. anvendte for-kolonner er 25 mm lange, rette kolonner, der er tørfyldte med en til den påtænkte anvendelse egnet bærer. På denne bærer anbringes en prøve af den væske, der skal undersøges, således at sporstofferne, der skal detekteres, adsorberes på bærematerialet. Ved hjælp af et til dette formål valgt opløsningsmiddel elueres sporstofferne herefter fra for-kolonnen eller separationskolonnen. Kromatograferingskolonnen eller separationskolonnen er fyldt med et bæremateriale, der er egnet til at

skille sporstofferne i de forskellige bestanddele. Ved eluering af separationskolonnen kan stofferne opsamles og detekteres i mere eller mindre ren tilstand.

- 5 Det er faktisk konstateret, at hvis der anvendes en ret for-kolonne, som f.eks. beskrevet af Roth c.s. i den ovennævnte artikel, forstyrres den ved hjælp af en eller flere separationskolonner foregående opdeling i bestanddele af det i for-
- 10 kolonnen adsorberede materiale. I virkeligheden optræder der ved den følgende eluering forstyrrende faktorer i form af blokeringer og spøgelseeffekter, samtidig med at opløsningen normalt er dårlig. Tilsvarende fænomener, der navnlig optræder, når der kroma-
- 15 tograferes større volumener, er også blevet påvist af Schauwecker c.s.: J. Chrom. 136, (1977), 65.

- Det er på den anden side nu konstateret, at de ovennævnte problemer ikke optræder, når der anvendes en for-kolonne af trykresistent materiale til ved forhøjet
- 20 tryk at forkoncentrere substanser, der skal kromatograferes, hvilken forkolonne ved enderne har udstyr til etablering af tætte forbindelser, dels opstrøms til en tilførselsledning for den væske, der skal forkoncentreres, og dels nedstrøms til separatorkolonnen, og som
- 25 yderligere indvendigt har en opstrømsdel, som konvergerer mod tilførselsledningen for fordeling af den væske, der skal forkoncentreres, over legemets tværsnit, og en beholder indrettet til at indeholde et bæremateriale, der er egnet til forkoncentreringsformål, hvilken behol-
- 30 der er begrænset af to filtre, hvis periferi er tæt forbundet i forkolonnen, det ene placeret vedopstrømsenden af beholderen - under forkolonnens konvergerende del - og det andet placeret ved bunden af bærematerialet svaren-

de til nedstrømsenden af beholderen, hvilken forkolonne er særegen ved, at beholderen har en sammensat geometrisk form, som består af en første cylindrisk central del og en anden del, som er et, med den første del koaksialt, omdrejningslegeme, som, startende med samme basisradius som den centrale del 1, indsnævres indvendigt mod for-kolonnens nedstrømsende.

Det har ved anvendelse af en sådan for-kolonne vist sig muligt at for-koncentrere spor af metaboloider og lignende i væskesubstanser på en sådan måde, at der ved den efterfølgende udskillelse på kromatograferingskolonnen ikke optræder forstyrrende spøgelseseffekter og dårlig opløsning.

For-kolonnen ifølge opfindelsen gør det muligt at udføre en for-koncentrering af forskellige legemsvæsker, såsom urin, lumbalvæske, spytt og blodplasma, men også af organhomogenater og af afføring. Som resultat heraf er det muligt at detektere og bestemme spor af medikamenter og metaboloider i disse væsker og afsondringer og endda at isolere dem. For-kolonnen ifølge opfindelsen er dog ikke kun bestemt til farmaceutisk eller klinisk brug, idet den også kan anvendes på alle andre områder, hvor der skal udføres sporstofanalyser, eksempelvis til både kvantitativ og kvalitativ analyse af spildevand, drikkevand, regnvand, grundvand og overfladevand samt til detektering, bestemmelse og isolering af metaboloider, eksempelvis af pesticider i afgrøder, i jorden, i grundvandet og i overfladevandet.

På grundlag af teoretiske overvejelser er Said (J. High Res. Chrom. Commun. Feb. 1979, side 63-67) kommet til den erkendelse, at der til en kromatograferings-kolonne eller separator-kolonne

bør foretrakkes en konisk form frem for en trinvis opbygget (komposit) form. Denne teoretiske betragtning, som i øvrigt vedrører et separationsproblem og ikke et for-koncentrationsproblem, er dog ikke

5 underbygget af nogen praktiske eksempler. På den anden side kan dimensionerne af en kromatograferingskolonne ikke uden videre bruges til en for-koncentrationskolonne, fordi disse dimensioner er fastlagt bl.a. af det formål, til hvilket kolonnen er udført.

10 Dette fremgår også af den af Said foreslåede teoretisk foretrukne model af en separator-kolonne, som over en længde på 1 m har en konusdiametervariation fra 3 til 1 cm. Sådanne dimensioner er ikke egnet til en for-kolonne. Faktisk må indholdet af for-kolonnen

15 ikke være for stort, hvis der skal opnås en effektiv for-koncentrering. I øvrigt ville koncentrationen af sporstofferne i eluenten under separeringen blive for lav til at der kunne foretages en nøjagtig detektering og måling. For-kolonnens længde er derfor for-

20 trinsvis ikke mere end ca. 10 cm, medens til- og afgangsåbningerne skal være så store, at der undgås for store trykopbygninger i kolonnen. For-kolonnen ifølge opfindelsen kan yderligere bruges til for-koncentrering ved forhøjet tryk, eksempelvis kan

25 den anvendes ved tryk mellem 100 kPa og 10 MPa, hvilket er normalt ved denne anvendelse. Said tager i sine overvejelser ikke højde for sådanne tryk. I løbet af separationsprocessen, hvor for-kolonnen altså er forbundet til en separator-kolonne, kan

30 trykket i for-kolonnen stige helt op til ca. 40 MPa. Man må ved konstruktionen af en kolonne uden tvivl tage hensyn til disse høje tryk. Kolonnen skal derfor ikke alene være udformet, så den er egnet til

at for-koncentrere de substanser, der skal kromatograferes, uden at der i løbet af elueringen optræder de førnævnte fænomener, men den skal også være i stand til at modstå tryk på op til 40 MPa.

5 For-kolonnen kan anvendes til enhver af de ovenfor nævnte kromatografiske separationsprocesser, i hvilke en kolonne er nødvendig, eksempelvis væske-væske-kromatografi (LLC), væske-faststof-kromatografi (LSC), ionbytter-kromatografi, affinitets-
10 kromatografi og gelpermeations-kromatografi (GPC).

I en foretrukket udførelsesform har for-kolonnen ifølge opfindelsen en form, hvor beholderlegemets indervæg konvergerer konisk eller jævnt mod enderne. Det er en fordel, hvis forbindelsesud-
15 styret, opstrøms til en tilførselsledning for den væske, der skal for-koncentreres, og nedstrøms til en separator-kolonne, ligger diametralt modsat hinanden ved beholderlegemets to ender. Disse forbindelser kan være skrue- eller bøjleforbindelser, der
20 kan modstå et tryk på mindst 40 MPa. I yderligere en foretrukket udførelsesform indsnævres beholderlegemets indervæg kraftigere i opstrømsretningen end i nedstrømsretningen. Som et resultat heraf når den tilførte væske hurtigt en vis maksimal diameter,
25 medens aftrapningen fra den maksimale kolonnedia- meter til diameteren af nedstrømsåbningen er mere gradvis. Endnu en fordel ligger i, at diameteren af beholderlegemets nedstrømsåbning omtrent svarer til diameteren af en separator-kolonne, hvorved det
30 såkaldt laminare strømningsmønster forstyrres mindst muligt, når for-kolonnen under den kromatografiske separationsproces er forbundet til en separator-kolonne.

Kolonnen, som fortrinsvis er af rustfrit stål, kan være fremstillet ud i ét, men kan også være sammensat af to eller flere indbyrdes trykresistent forbundne dele. En passende forbindelse kan
5 opnås på flere måder. Man kan f.eks. forsyne de ydre segmenter med eksterne flanger og spænde disse flanger sammen ved hjælp af en spændering, et spædebånd eller ved hjælp af bolte igennem disse flanger. Hvis det ønskes, kan der ved hjælp af pakninger af
10 et passende materiale opnås en god trykresistent tætning. Set fra et produktionsteknisk synspunkt er en for-kolonne af flere dele mere fordelagtig end en kolonne, der er fremstillet ud i ét. Dette gælder navnlig, når der er tale om kolonner med større di-
15 mensioner. Som allerede nævnt må for-kolonnen være i stand til at modstå tryk på mindst 40 MPa. Denne styrke over for tryk opnås lettere ved at sammensætte kolonnen af flere dele.

Før brug af for-kolonnen fyldes denne med
20 et egnet bæremateriale eller adsorptionsmiddel. Til HPLC-undersøgelse af legemsvæsker kan f.eks. anvendes forbehandlet silica-gel, såsom silica-gel, der er gjort vandskyende (hydrofobt). Til andre formål kan anvendes andre, i forbindelse med væske-
25 kromatograferingsteknikken almindeligt kendte materialer, såsom aluminiumoxid eller en ionbytterharpiks. Kolonnen kan pakkes med det tørre bæremateriale, men bæreren kan alternativt optræde i form af en opslæmning i kolonnen. Oven på bærematerialet tilføres der i kolonnens tilspidsende op-
30 strømsdel fortrinsvis et inaktivt fyldmateriale. Hvis der som bæremateriale anvendes hydrofobt silica-gel, kan der som inaktivt fyldmateriale an-

vendes glasperler eller silica-gel. Ved brugen af et inaktivt fyldmateriale opnås, at det i for-kolonnen værende materiale, der skal kromatograferes, fordeles mere ensartet over hele kolonnens tværsnit.

- 5 En sådan fyldning anbefales også af Jong c.s. (J. Chrom. 148 (1978), side 127-141). Bærematerialet i kolonnen er fortrinsvis lukket inde mellem to filtre, der f.eks. kan være af sintret metal. Efter den sædvanlige konditionering af for-kolonnen til-
- 10 føres denne ved hjælp af en slange med tilhørende sprøjte eller, hvis der er tale om større volumener, ved hjælp af en pumpe, en prøve af den væske, der skal undersøges. De adsorberede komponenter tilbageholdes på bæreren, medens væsken dræner det ikke-
- 15 adsorberede materiale igennem kolonnen, og spildvæsken ledes bort fra kolonnen via en afgangsslange.

- For-kolonnen forbindes så nedstrøms til en separator-kolonne eller en kromatograferings-kolonne, der også konditioneres på normal måde. Derefter elueres det
- 20 adsorberede materiale i separator-kolonnen ved hjælp af et passende opløsningsmiddel eller en blanding af flere opløsningsmidler, hvorefter separator-kolonnen elueres, fortrinsvis med det samme opløsningsmiddel eller med den samme blanding af opløsningsmidler.
- 25 I stedet for en eluent med konstant sammensætning anvendes ofte en blanding af opløsningsmidler, hvis sammensætning gradvis ændres, en såkaldt gradient eluering. Ud over den kontinuerte gradient eluering kan også anvendes en trinvis gradient
- 30 eluering. Det til kromatograferings-processen nødvendige tryk opnås ved brug af en eller flere pumper. Væske-kromatograferingen omfatter herudover det sædvanlige styreapparat, en automatisk fraktions-

kollektor og detektorer, der er egnet til at påvise de bestanddele, der skal undersøges.

Brugen af et væskekromatograferingssystem, som ovenfor beskrevet medfører hyppige ændringer af tilslutningerne. Først skal for-kolonnen konditione-
5 res og præpareres med den væske, der skal kromatograferes. Både den opløsning, der er nødvendig for at konditionere kolonnen, og spildvæsken, fra hvilken sporstofferne ved adsorption er blevet flyttet over
10 på bæreren, skal ledes bort fra kolonnen. Det er derfor i nedstrømsenden nødvendigt med en tilslutningsmulighed til en afgangsslange. Til den egentlige separationsproces (eluering) må for-kolonnen dernæst i nedstrømsenden tilsluttes en separator-
15 kolonne. For at muliggøre konditionering har separator-kolonnen også mulighed for opstrøms at tilsluttes en væsketilførselsslange. Det er i flere tilfælde, f.eks. ved samtidig kromatografering af flere væskeprøver, ved gentagen for-koncentrering af kolonne-
20 eluater eller ved repetering af kromatograferingsprocessen med sigte på at opnå en højere grad af renhed, desuden i høj grad ønskeligt at man efter behag kan tilslutte forskellige for-kolonner til forskellige separator-kolonner.

25 Opfindelsen vedrører derfor også et forbindelsessystem, der på enkel måde gør det muligt efter ønske at tilslutte en eller flere for-kolonner til en afgangsslange for spildvæske eller til en eller flere separator-kolonner. Til det formål udvikledes
30 til et væskekromatograferingssystem et apparat, der omfatter en eller flere for-kolonner, et element til sammenkobling af kolonnen eller kolonnerne og en væsketilførselsledning til en eller flere sepa-

rator-kolonner og til en afgangsslange for spildvæske samt, hvis det ønskes, til en eller flere separator-kolonner. For-kolonnerne kan være af den ovenfor beskrevne type.

5 I det tidligere nævnte U.S.A. patentskrift nr. 4 070 284 beskrives også et apparat til et væskekromatograferingssystem, hvilket apparat har et antal flervejs-ventiler for tilslutning af for-kolonnen til separator-kolonnen. Disse flervejs-ventiler kan dog
10 ikke modstå tryk, der er højere end få Megapascal.

Som et særlig aspekt af opfindelsen udvikledes til det ovennævnte apparat et forbindelseselement, der kan modstå tryk på mindst 20 MPa. Forbindelses-
15 elementet ifølge opfindelsen omfatter to koncentriske skiver, der i indbyrdes tæt forbindelse kan drejes i forhold til hinanden, idet den ene af skiverne har åbninger for hermetisk tæt tilslutning af for-kolonnen eller -kolonnerne, og en væsketilførselsledning,
20 ning, og den anden af skiverne har åbninger for hermetisk tæt tilslutning af separator-kolonnen eller -kolonnerne og afgangsledningen for spildvæske, hvorhos åbningerne i de to skiver efter ønske kan bringes til at stå i forbindelse med hinanden ved
25 rotation af den ene skive i forhold til den anden.

Forbindelseselementets skiver, der fortrinsvis er af rustfrit stål, er indbyrdes tæt forbundne, eksempelvis ved hjælp af teflonpakninger. Ved at anvende pakninger, der har cirku-
30 lært tværsnit, og som er monteret i rundtgående spor i skiverne, opnås, at skiverne kan drejes i forhold til hinanden. Forbindelseselementet kan modstå tryk på op til ca. 40 MPa. Tilslutningerne

til åbningerne i skiverne er også fortrinsvis af rustfrit stål, og tætningerne kan, hvis det ønskes, være af teflon.

- For til åbningerne i skiverne at kunne til-
- 5 slutte for-kolonnen eller -kolonnerne, separator-kolonnen eller -kolonnerne samt tilførsels- og afgangsslangerne er der forbindelsesudstyr, eksempelvis i form af skrueforbindelser eller spændesamlinger. Et andet passende forbindelseselement
- 10 udgøres af en indsats med en central boring, hvilken indsats passer tæt sammen med en til en åbning i en af skiverne forbundet kolonne eller nippel til en tilførsels- eller afgangsslange, idet indsatsen udvendig har en flange, der ligger an mod en ansats,
- 15 der dannes af åbningen i skiven. Den centrale boring i indsatsen står udadtil i forbindelse med en kolonne eller en nippel, der eksempelvis kan være svejst på eller ved hjælp af en skrueforbindelse være forbundet med indsatsen og indefter i forbindelse med
- 20 en mindre boring i skiven. Diameteren af den centrale boring i indsatsen svarer fortrinsvis stort set til den indvendige diameter af kolonnen eller niplen. Ved at anvende kolonner, der har indsatser af samme ydre diameter og form, opnås, at en vilkårlig kolonne
- 25 efter ønske hurtigt kan forbindes med en tilhørende åbning i en af forbindelseselementets skiver. For på enkel måde at kunne dreje skiverne i forhold til hinanden enten manuelt eller automatisk kan den ene skive fastholdes, eksempelvis ved fastspænding af
- 30 et til skiven forbundet håndtag til en holder, medens den anden skive har hjælpeudstyr til at udføre den ønskede rotation. Hvis denne sidste skive skal betjenes manuelt, har den i yderkanten fortrinsvis

et håndtag eller en forbindelsesmulighed til et sådant. Skiverne kan også være udstyret med en låseanordning, eksempelvis en anslagsstift eller -plade, en anslagsstift i en udfræset rille eller en spærrepal eller
5 -bolt, der fikserer den position, i hvilken åbningerne i skiverne står i forbindelse med hinanden.

I det følgende vil foretrukne udførelsesformer for opfindelsen blive nærmere beskrevet under henvisning til tegningen, hvor

10 fig. 1, 2 og 3 viser længdesnit i for-kolonner ifølge opfindelsen,

 fig. 4, 5 og 6 henholdsvis et planbillede og tværsnit af et forbindelseselement til et væske-kromatograferingssystem,

15 fig. 7 et delsnit i et apparat til et væske-kromatograferingssystem, hvilket apparat har et forbindelseselement og for-kolonner ifølge opfindelsen,

 fig. 8 det samme som fig. 7, denne gang dog
20 som planbillede, og

 fig. 9-14 forskellige kromatogrammer.

Den i fig. 1 i længdesnit viste for-kolonne består af et stykke og er af rustfrit stål. Den cylindriske, centrale del 1 konvergerer konisk mod de to
25 ender, idet delen 2 konvergerer stærkere i retningen mod opstrømsenden 3, end delen 4 gør i retning af nedstrømsenden 5. Opstrømsenden 3 har indvendigt gevind, i hvilket en nippel med udvendigt gevind kan skrues. Til denne nippel kan sluttes
30 en tilførselsslange til den væske, der skal kromatograferes. Nedstrømsenden har dels udvendigt gevind, ved hjælp af hvilket for-kolonnen kan skrues ind i et forbindelseselement, som f.eks. vist i fig. 6,

dels en fremstående, rundtgående kant eller kam 6, der danner et sæde for en pakning.

Fig. 2 og 3 viser tværsnit i for-kolonner ifølge opfindelsen, hvilke for-kolonner er sammensat af to dele, nemlig beholderformede dele 70 og 54, og dæksler 48 og 55. Dækslet til den i fig. 2 viste for-kolonne har en nippel 71, til hvilken der kan forbindes en slange, hvorigennem væske via en central boring 72 kan nå kolonnens indre. Dækslet har udvendigt gevind 73, ved hjælp af hvilket det kan skrues ind i den beholderformede dels indre gevind 74 op mod en pakning 75, der passer i et sæde 76 i den beholderformede del. Pakningen 75, i hvilken der er monteret et filter af sintret metal 50, er i figuren vist i større skala. Den beholderformede del 70 har ved nedstrømsenden en udvendig rundtgående kam 77, der danner et sæde til en pakning, samt gevind 78, hvormed kolonnen kan skrues ind i et forbindelseselement, eksempelvis som vist i fig. 7 og 8.

Ved hjælp af recesser 79 og 79a i dækslet og indvendigt gevindskårne bundhuller 80 og 80a i beholderdelen kan den i fig. 3 viste todelte kolonnes dele skrues sammen ved hjælp af bolte. Pakninger 81 og 82 passer ind i rundtgående riller 83 og 84, der er udsparet henholdsvis i dækslet og i beholderdelen, medens et eller flere filtre i en filterholder 85 holdes på plads mellem pakningerne. Dækslet har en rundtgående kam 86, der støder op til beholderdelens yderkant. Dækslet 55 har et indvendigt gevindskåret tilslutningshul 60 til en nippel for forbindelse til en tilførselsslange. Indvendigt spidser kolonnen konisk til mod de to ender, mod opstrømsenden under

en vinkel på 75° og mod nedstrømsenden under en vinkel på 27° . Endelig har beholderdelen ved nedstrømsenden også en udvendig rundtgående kam 87 og gevind 88.

- 5 Til et apparat til brug i et væskechromatograferingssystem vises i fig. 4 et planbillede af et forbindelseselement, til hvilket der ved 96 kan forbindes en for-kolonne. Fig. 5 og 6, der er tværsnitsbilleder af det i fig. 4 viste apparat hhv.
- 10 langs linien V-V og VI-VI, viser tydeligt, at forbindelseselementet omfatter to koncentriske skiver 7 og 8 af rustfrist stål, idet skiven 7 kan rotere om en lejetap 9. Skiverne holdessammen oven på hinden af den fælles tap 9, der er udformet som en
- 15 bolt og skruet igennem skiven 7. Cirkulære teflonpakninger (eksempelvis 10 og 11) med stort set cirkulært tværsnit ligger mellem de to skiver i spor i den ene af skiverne. De cirkulære pakninger ligger rundt om borerne (se det
- 20 følgende) i skiverne. Tilslutningsåbningen 96 til for-kolonnen har indvendigt gevind, så at kolonnen kan skrues ind i den, op mod en tætningspakning 12 af forstærket teflon. På den anden side af pakningen indsnævres åbningen 96 til en boring med mindre diameter, medens der mellem tilslutningsåbningen og boringen er et skiveformet filter af sintret metal 90.
- I yderkanten af den samme skive, som har tilslutningsåbningen til for-kolonnen, er der et håndtag 13. Den samme skive omfatter yderligere en nippel 14 for
- 30 tilslutning til en tilførselsslange til konditioneringsvæske. En konditioneringsvæske anvendes til at konditionere separator-kolonnen eller -kolonnerne forud for chromatograferingsprocessen. På den anden

af forbindelseselementets skiver er ved hjælp af to bolte fastgjort et håndtag 15, hvis væk fra skiven vendende ende 16 kan fikseres i en holder. I et sæde 17 i den samme skive er der en indsats 5 18 med en central boring for tilslutning til en separator-kolonne. Denne sidste skive omfatter også en nippel 19 for tilslutning til en afgangsslange til spildvæske, samt en hjælpeplade og tappe 20 og 21, der bevirker, at den vinkeldrejning af skiverne i 10 forhold til hinanden, som bringer åbningerne i skiverne i forbindelse med hinanden, lettere kan bestemmes.

Det i fig. 7 og 8 viste apparat til brug i et væskekromatograferingssystem omfatter et forbindelseselement 22, der består af to koncentriske 15 skiver af rustfrit stål, der kan dreje om en aksel 23 med lejer i begge ender, idet skiverne er udført med forsænkede åbninger. Der anvendes de samme teflonpakninger som tidligere beskrevet i forbindelse med den 20 i fig. 4-6 viste udførelsesform. Den øvre skive 24 er ved hjælp af bolte 25 forbundet til en flange 26 på den centrale aksel 23. Den øvre skive kan rotere i forhold til den nedre skive, idet akslen også roterer. Den øvre skive har seks med gevind forsynede 25 åbninger, i hvilke der enten kan skrues for-kolonner (ved 29, 30 og 31) eller, ved 32, indsatse 33 med centrale borer og omfattende nipler, eller til hvilke nipler kan forbindes. Alle åbninger fortsætter indefter i form af borer med mindre diameter. I den nederste skive er der åbninger 30 34, som danner sæder for indsatse 35, der har centrale borer, og hvortil indsatse nipler eller separator-kolonner er forbundet eller kan forbindes. Sæder-

ne i skiverne er af den samme form som dem, der blev beskrevet under henvisning til fig. 4-5. Den øvre skive kan roteres i forhold til den nedre skive ved hjælp af et håndtag 36. Den nedre skive 28 har yderligere låseudstyr til den øvre skive 24, 5 hvilket låseudstyr omfatter en fjederarm 37 med en pal 61, der går i indgreb med udsparede åbninger i den øvre skives yderkant. Dermed kan den øvre skive fikseres i en given position i forhold til 10 den nedre skive. Fikseringen kan fjernes ved med en knop 38 at føre palen mod fjedervirkningen og dermed ud af et hul i den øvre skives yderkant.

Den nedre skive er ved sin yderkant fastskruet i en holder 39, der omfatter to diametralt 15 modsat placerede stavformede elementer 40, der forløber parallelt med den centrale aksel 23.

I en vis afstand over forbindelseselementet 22 er to cirkulære, rustfri stålplader 41 og 42 forbundet til den centrale aksel 23, idet den øverste 20 ste plade 41 er forbundet til holderens stavformede elementer 40 ved hjælp af forbindelsesstænger eller eger 43. Pladerne er spændt tæt sammen oven på hinanden, idet der mellem pladerne er cirkulære teflonpakninger, ligesom det var tilfældet mellem 25 forbindelseselementets skiver. Den nedre plade 42 er stift fastgjort til lejeakslen 23 ved hjælp af bolte 44 og roterer således sammen med forbindelseselementet 23's øvre skive 24. Begge pladerne 41 og 42 har nipler 27 og 27a, som 30 er forbundet til borer i pladerne. Niplerne i den nedre plade 42 kan ved hjælp af slanger sluttes til niplerne eller for-kolonnerne i forbindelseselementet 22's øvre skive 24, og niplerne i den

øvre plade 41 kan sluttet til beholdere med forskellige væsker, eksempelvis konditioneringsvæske, væske, der skal kromatograferes og forskellige elueringsvæsker. Det i fig. 7 og 8 viste apparat er meget
5 velegnet til brug ved en automatisk kromatograferingsproces, fordi der mellem konditionering, fyldning af for-kolonnen eller -kolonnerne med sporstoffer, der skal adskilles, og forskellige elueringer, ikke skal aftages nogen tilførselsslanger. En hvilken
10 som helst ønsket væske kan ved på enkel måde at rotere den øvre forbindelsesskive tilføres en af for-kolonnerne eller separator-kolonnerne.

Det i fig. 7 og 8 viste apparat har tre rustfri stål for-kolonner ifølge opfindelsen, hvilke for-
15 kolonner er skruet i forbindelseselementet 22's øvre skive 24. Den i denne skives hul 29 skruede kolonne 45 er af den i fig. 2 viste art. De i skiven 24's huller 30 og 31 skruede kolonner 46 og 47 er af den i fig. 3 viste art. Kolonnen 45
20 omfatter et dæksel 48, der har en skrueforbindelse og tilslutningsnippel. Bærematerialet er i kolonnen lukket inde mellem to filtre 50 og 51 af sintret metal. I kolonnens mod opstrømsenden vendende koniske del er der oven på filtret et inaktivt fyldstof 52.
25 Kolonnen er ved hjælp af en teflonpakning 53 sluttet tæt til den i den øvre forbindelsesskive 24's åbning 29 udgående boring 62. Kolonnen 46 består af to dele 54 og 55, der er indbyrdes forbundet ved hjælp af bolte 56. Som i kolonnen 45
30 er der i kolonnen 46 filtre af sintret metal 57 og 58, medens tætningen mod den øvre forbindelsesskive 24 udgøres af en teflonpakning 59. Kolonnen står ved sin nedstrømsende i forbindelse med en åbning 63 i skiven 24.

Der kan selvfølgelig optræde forskellige modifikationer af de ovenfor beskrevne apparater. Eksempelvis kan både antallet af huller i forbindelseselementets skiver og i de cirkulære plader
5 varieres efter ønske og tilpasses forskellige tilslutninger, eksempelvis indsatse eller skrueforbindelser. Der vil inden for opfindelsens rammer kunne findes mange andre for fagmanden nærliggende udførelsesformer.

10 Ved brug af en for-kolonne ifølge opfindelsen fyldes mellemrummet mellem kolonnens to filtre af sintret metal først med bæremateriale, der f.eks. kan være en hydrofob silica-gel, eksempelvis CORASIL, NUCLEOSIL, ZORBAX eller LICHROPREP. I
15 kolonnens mod opstrømsenden vendende koniske del tilføres oven på filteret et inaktivt fyldstof, i dette tilfælde glasperler. For-kolonnen forbindes til det i fig. 5 og 6 eller i fig. 7 og 8 viste forbindelseselement. I det i fig. 7 og 8 viste apparat
20 anvendes flere for-kolonner ifølge opfindelsen. Apparatet omfatter yderligere en eller flere separator-kolonner, der fortrinsvis er fyldt med den samme type bæremateriale. Til konditionering af for-kolonnerne og separator-kolonnerne skylles konditioneringsvæske
25 gennem kolonnerne og opsamles i en spildbeholder. Dernæst fyldes for-kolonnen med det materiale, der skal kromatograferes, eksempelvis en urinprøve, idet dette materiale bringes til at strømme gennem den til en afgangsslange forbundne for-kolonne. Efter
30 denne fyldning forbindes for-kolonnen til en separator-kolonne, hvorefter kolonnen elueres. Denne eluering foretages fortrinsvis som en såkaldt gradient eluering, hvilket betyder, at elueringsmidlets sam-

mensætning varieres i løbet af elueringsprocessen. Elueringshastigheden, dvs. hastigheden hvormed elueringsmidlet pumpes gennem kolonnerne, afhænger dels af størrelsen af for-kolonnen eller -kolonnerne og separator-kolonnen eller -kolonnerne, dels af det materiale der skal kromatograferes, bærematerialet og elueringsvæsken. Elueringen udføres fortrinsvis ved stuetemperatur. I løbet af elueringen kan trykket i kolonnerne og forbindelseselementet stige til 20 eller 30 MPa, og endda helt op til 40 MPa. Detekteringen af sporstofferne kan foretages på forskellige måder, eksempelvis med spektroskopiske metoder, såsom UV-spektroskopi. I de fleste tilfælde vil eluatet dog indeholde for mange kromofore urenheder til, at der med held kan anvendes en UV-måling. Derfor anvendes fortrinsvis en radioaktivitetsmåling. I så tilfælde bliver ved undersøgelse af metaboloider den kemiske blanding, der skal undersøges, normalt et medikament, mærket radioaktivt, eksempelvis med radioaktivt carbon eller hydrogen: ^{14}C eller ^3H . Ved at måle den udsendte radioaktivitet kan både den kemiske forbindelse selv og mulige metaboloider heraf, der indeholder den mærkede del, detekteres. Denne detektion kan enten udføres on-line i eluatstrømmen eller off-line, dvs. i de opsamlede eluatportioner. Den første metode er hurtigere, medens off-line detekteringsmetoden normalt giver mere præcise resultater.

For i urin at kunne detektere isoxsuprin og metaboloider heraf blev 200 ml urin underkastet den ovenfor beskrevne kromatograferingsproces. Isoxsuprin eller p-hydroxy- α -[1-((1-methyl-2-phenoxyethyl)amino)ethyl]benzylalkohol er en substans med vaso-

dilaterende virkning. I den prøve, der skulle kromatograferes, optrådte spor af medikamentet og metaboloiderne heraf i en total mængde på få mikrogram.

5 Til for-koncentreringen anvendtes en rustfri stål-kolonne ifølge opfindelsen af den i fig. 3 viste type med en kapacitet på 27 ml. Som fyldstof i for-kolonnen anvendtes NUCLEOSIL 30 C 8, der er en hydrofob silica-gel. Separator-kolonnen havde
10 en indvendig diameter på 9 mm, en længde på 50 cm og var fyldt med ZORBAX 7 C 8, der også er en hydrofob silica-gel. Isoxsuprinen mærkedes med ^3H . Gradientelueringen udførtes med en blanding af vand og methanol, hvor methanol-indholdet steg fra 0 til 100%. Eluerings-
15 hastigheden var ca. 5 ml/min. Sporkomponenterne detekteredes off-line, hvorved det i fig. 9 viste kromatogram fremkom. I dette kromatogram er den målte radioaktivitet RA i tællinger pr. min. afsat mod tiden i minutter. I kromatogrammet er den med
20 J markerede top isoxsuprin, og de andre toppe repræsenterer metaboloider af isoxsuprin.

Til sammenligning blev det ovenfor beskrevne eksperiment gentaget med en ret for-kolonne af den til dette formål normale type, i stedet for med
25 en for-kolonne ifølge opfindelsen. Den rette for-kolonne havde den samme indvendige diameter på 9 mm og en længde på 15 cm. Det var i praksis ikke muligt at anvende en længere kolonne, fordi den trykopbygning, der fandt sted i kolonnen i løbet
30 af fyldningen, blev for stor. Eksperimentet udførtes endvidere med det samme apparat, den samme materialetype og under de samme reaktionsforhold som beskrevet ovenfor i forbindelse med for-kolonnen

ifølge opfindelsen. Det resulterende kromatogram er vist i fig. 10. I kromatogrammet ses tydeligt, at der ved de med GE mærkede steder forekommer såkaldte spøgelseseffekter.

- 5 For-kolonnen ifølge opfindelsen blev også anvendt til at løse forskellige andre separationsproblemer, som det fremgår af de i fig. 11, 12, 13 og 14 viste kromatogrammer. Der anvendtes enten et enkelt forbindelseselement, som vist i fig. 4-6,
10 eller det i fig. 7 og 8 viste apparat med seks tilslutninger.

Kromatogrammerne i fig. 11 og 12 er fremkommet ved søjlekromatografering af prøver, der indeholder [2-{4-(3-trifluormethylphenyl)-1-

- 15 piperazinyloethyl]-urinstof, der er en forbindelse med antiagressiv virkning, samt metaboloider heraf.

Til opnåelse af det i fig. 11 viste kromatogram er anvendt en rustfri stålfor-kolonne som vist i fig. 2; kapacitet 1,5 ml; fyldstof NUCLEOSIL 30 C 8.

- 20 Separator-kolonne: Rustfrit stål; længde 500 mm; indvendig diameter 9 mm; fyldstof NUCLEOSIL 7 C 8. Prøvemateriale: 22 ml blodplasma fra en hund. Eluering: Gradienteluering med en blanding af vand og methanol med et methanolindhold stigende fra 0 til
25 100%. Blandingen mærkedes med ^{14}C . Detektering: off-line; radioaktiviteten RA målt i tællinger pr. minut. Toppen ved T stammer fra den aktive forbindelse og de andre fra metaboloiderne.

- Til kromatogrammet i fig. 12 anvendtes en rust-
30 fri stål-forkolonne som vist i fig. 3; kapacitet 27 ml; fyldstof NUCLEOSIL 7 C 8. Separator-kolonne: Rustfrit stål; længde 500 mm; indvendig diameter 9 mm; fyldstof NUCLEOSIL 7 C 8. Prøvemateriale:

620 ml urin fra en hund. Eluering: Gradienteluering med en blanding af vand og methanol med et methanolindhold stigende fra 0 til 100%. Blandingen mærkedes med ^{14}C . Detektering: on-line. Toppen ved T stammer
5 fra den aktive forbindelse, og de andre stammer fra metaboloiderne. Elueringsmidlets gradientprofil i % methanol er betegnet med GP.

Trykket i systemet er betegnet med p. Dette tryk når en maksimal værdi på omkring 5.400 psi, dvs. ca.
10 35 MPa.

Fig. 13 viser et kromatogram, der er opnået ved kromatografering af en urinprøve, hvortil der er tilsat 0,5 ppb af stoffet DES. DES eller diethylstilbestrol er en substans med østrogenvirkning.
15 Der anvendtes en rustfri stål-for-kolonne ifølge opfindelsen og med en kapacitet på 13 ml; fyldstof LICHROPREP RP2, en hydrofob silica-gel. Separator-kolonne: Rustfrit stål; længde 250 mm; indvendig diameter 9 mm; fyldstof NUCLEOSIL 7 C 8. Urinprøvens
20 størrelse: 50 ml. Eluering: Gradienteluering med vand-methanol med et methanolindhold stigende fra 0 til 100%. DES mærkedes med ^3H . Detektering: Off-line. Toppen ved D stammer fra DES.

Kromatogrammet i fig. 14 er opnået ved søjle-
25 kromatografering af en urinprøve fra en rotte, hvilken prøve indeholder spor af
N-(2,6-difluorbenzoyl)-N'-(4-trifluormethylphenyl)-urinstof og metaboloider heraf. Denne urinstofforbindelse kan anvendes som insektmiddel til land-
30 brug, havebrug og forstvæsen. Der anvendtes en rustfri stål-for-kolonne som vist i fig. 3 med en kapacitet på 27 ml; fyldstof NUCLEOSIL 30 C 8. Separator-kolonne: Rustfrit stål; længde 500 mm; indvendig

diameter 9mm; fyldstof ZORBAX 7 C 8. Urinprøvens størrelse: 121 ml. Eluering: Gradienteluering med en blanding af vand og methanol med et methanolindhold stigende fra 0 til 100%. Blandingen mærkedes med ¹⁴C. Detektering: On-line. Toppen ved P stammer fra den aktive forbindelse, og de andre toppe stammer fra metaboloiderne. Elueringsmidlets gradientprofil i % methanol er betegnet med GP.

10

P A T E N T K R A V

1. For-kolonne af trykresistent materiale til ved forhøjet tryk at forkoncentrere substanser, der skal kromatograferes, hvilken forkolonne ved enderne har udstyr til etablering af tætte forbindelser, dels opstrøms (3) til en tilførselsledning for den væske, der skal forkoncentreres, og dels nedstrøms (5) til separatorkolonnen, og som yderligere indvendigt har en opstrømsdel (2), som konvergerer mod tilførselsledningen for fordeling af den væske, der skal for-koncentreres, over legemets tværsnit, og en beholder (1, 4) indrettet til at indeholde et bæremateriale, der er egnet til for-koncentreringsformål, hvilken beholder er begrænset af to filtre, hvis periferi er tæt forbundet i forkolonnen, det ene (ved 50, 85) placeret ved opstrømsenden af beholderen - under for-kolonnens konvergerende del - og det andet (ved 77, 87) placeret ved bunden af bærematerialet svarende til nedstrømsenden af beholderen, **k e n d e t e g n e t** ved,

at beholderen (1, 4) har en sammensat geometrisk form, som består af en første cylindrisk central del (1) og en anden del (4), som er et, med den første del koaksialt, omdrejningslegeme, som, startende med samme basisradius som delen (1), indsnævres indvendigt mod forkolonnens nedstrømsende (5).

2. Kolonne ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den anden del af beholderen (4) konvergerer konisk eller krummer progressivt mod nedstrømsenden.

3. Kolonne ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at den består af to eller flere trykresistent forbundne dele (70-48, 54-55).

4. Kolonne ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at den er trykresistent til et tryk på ca. 40 MPa.

10 5. Apparat til et væskekromatografisystem omfattende (a) en eller flere forkolonner, (b) et element til at forbinde for-kolonnen eller -kolonnerne og en væsketilførselsledning med en eller flere separatorkolonner og med en afgangsledning for spildvæske, og (c) eventuelt en eller flere separatorkolonner, k e n d e t e g n e t ved, at apparatet omfatter en eller flere forkolonner ifølge et af de foregående krav.

6. Apparat ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at forbindelseselementet omfatter to koncentriske skiver (24, 28), der i indbyrdes tæt forbindelse kan drejes i forhold til hinanden, idet den ene af skiverne (24) har åbninger (29-32) for hermetisk tæt tilslutning af forkolonnen eller -kolonnerne til en væsketilførselsledning og den anden af skiverne (28) har åbninger (34) for tilslutning af separatorkolonnen eller -kolonnerne og afgangsledningen for spildvæske, hvoshos
25 åbningerne i de to skiver efter ønske kan bringes til at stå i forbindelse med hinanden ved rotation af den ene skive i forhold til den anden.

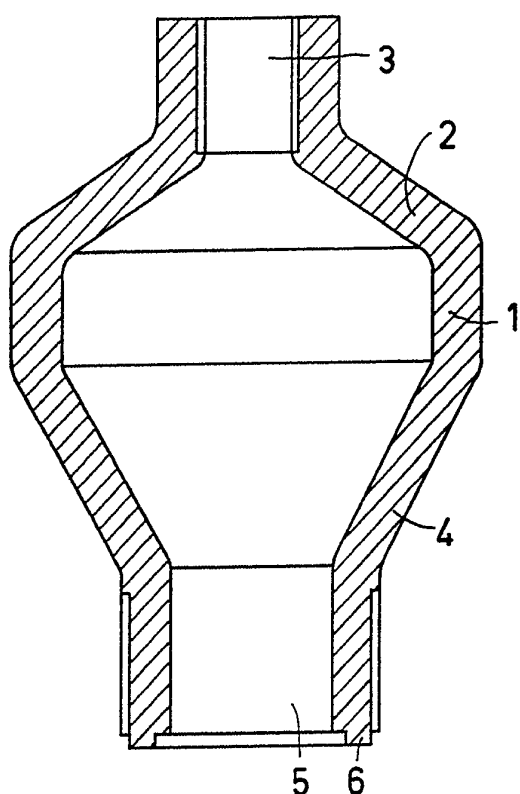


FIG. 1

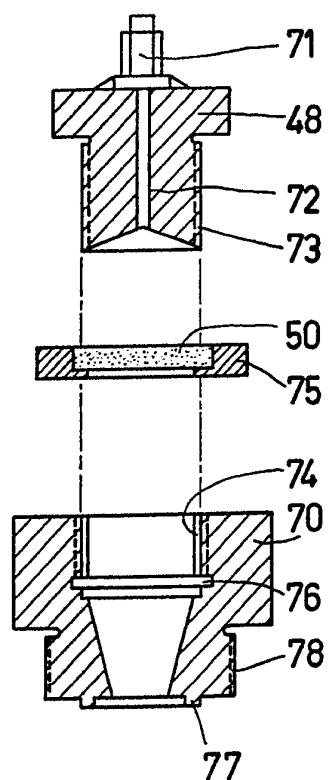


FIG. 2

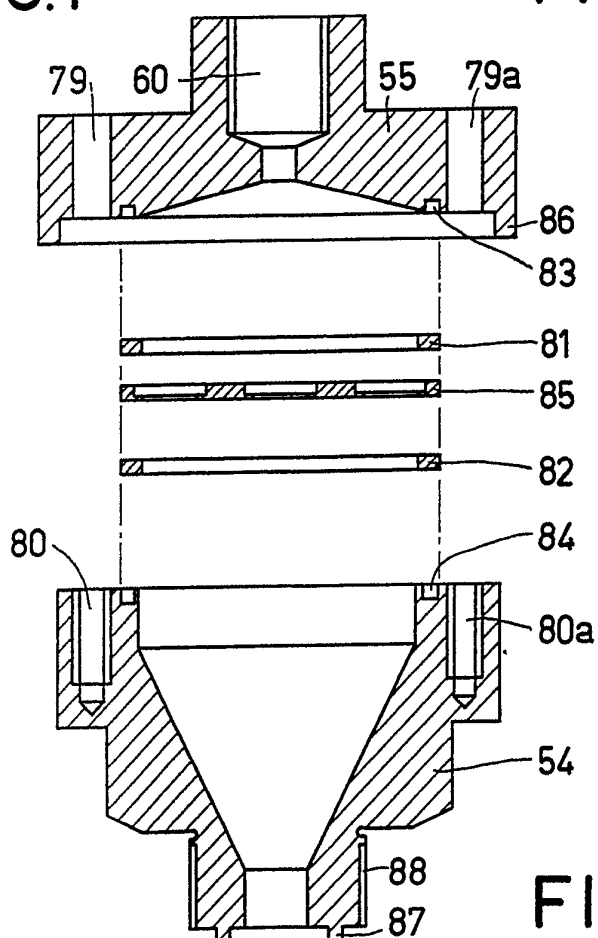


FIG. 3

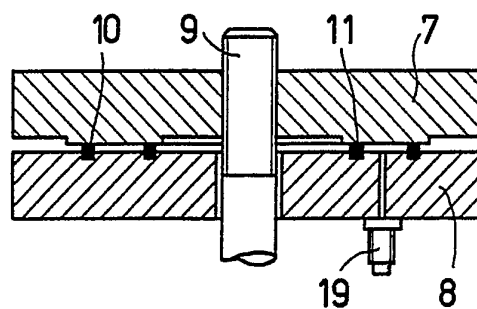


FIG. 5

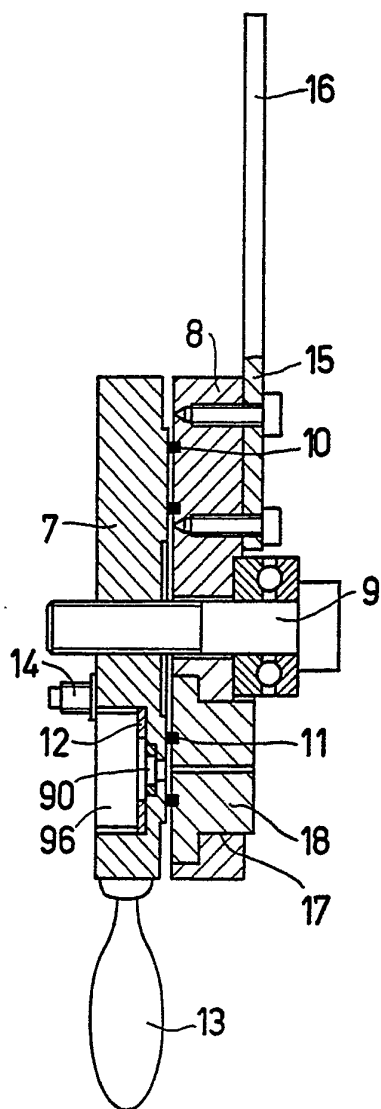


FIG. 6

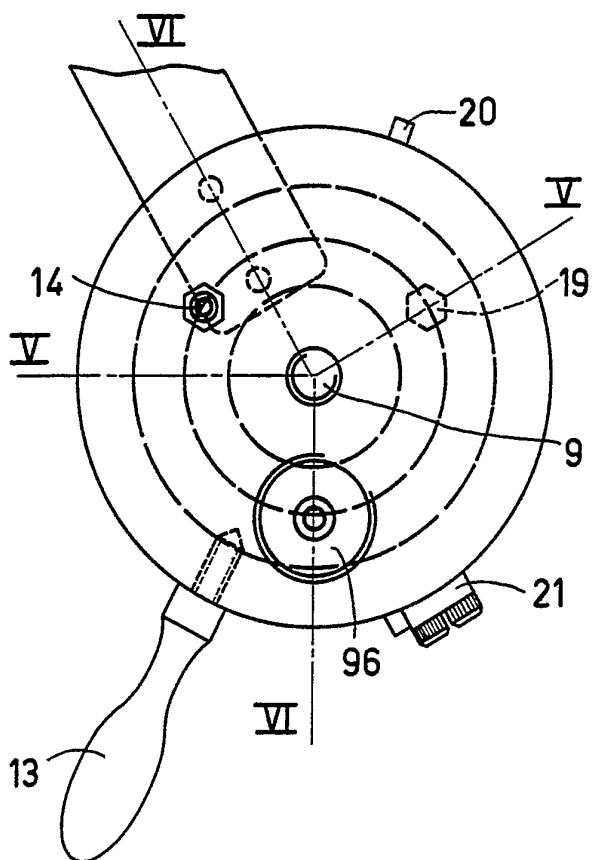
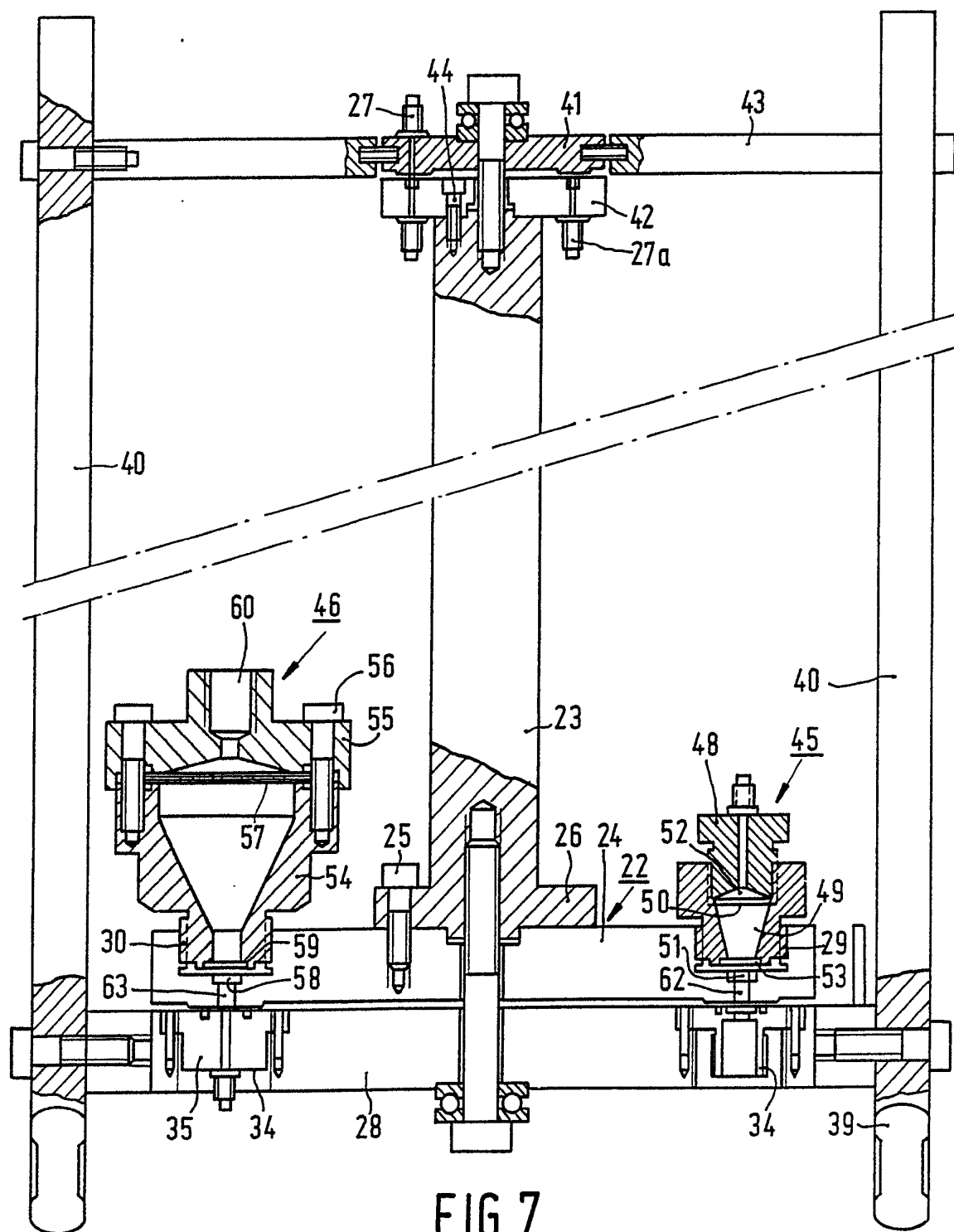
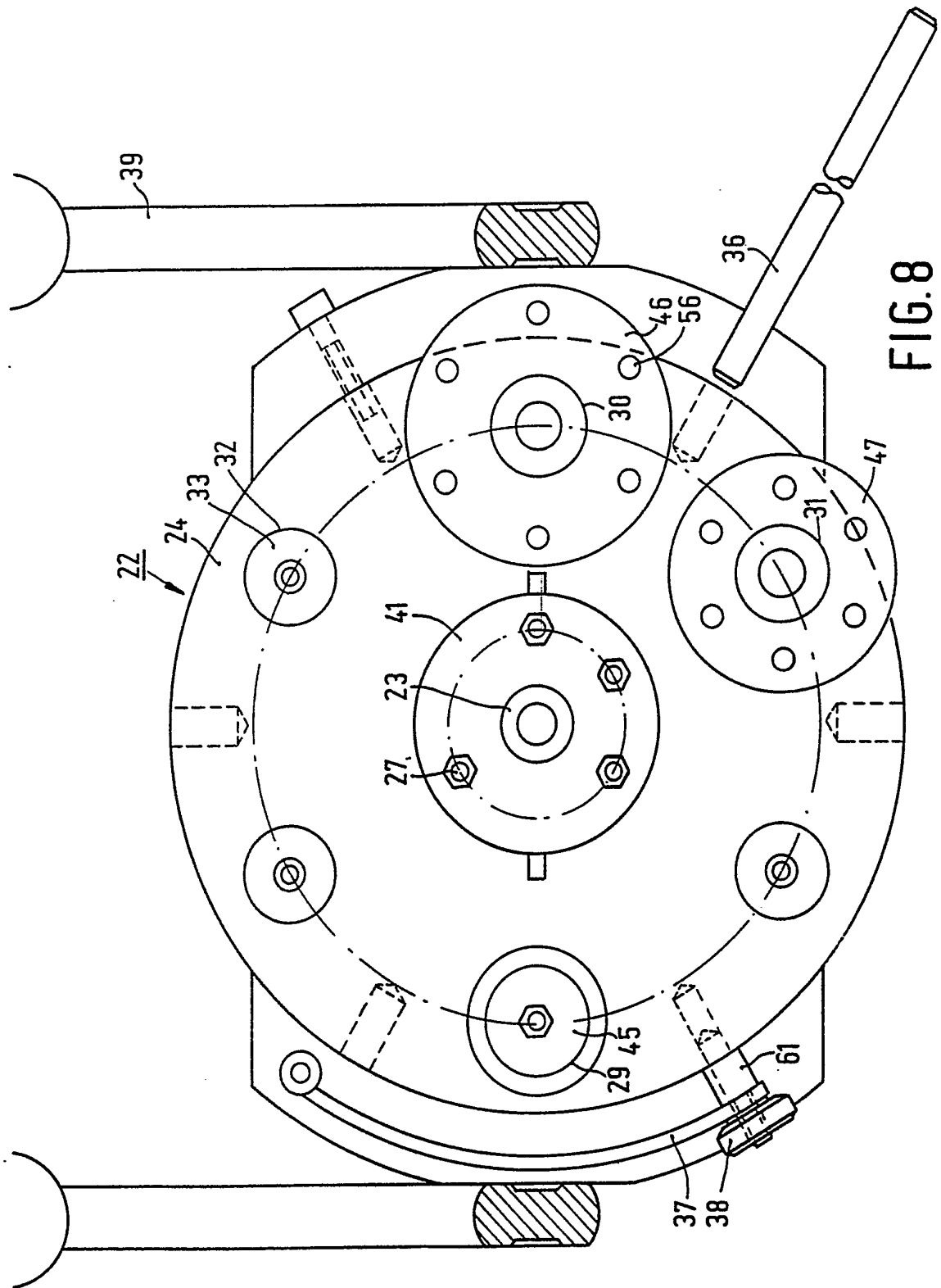


FIG. 4





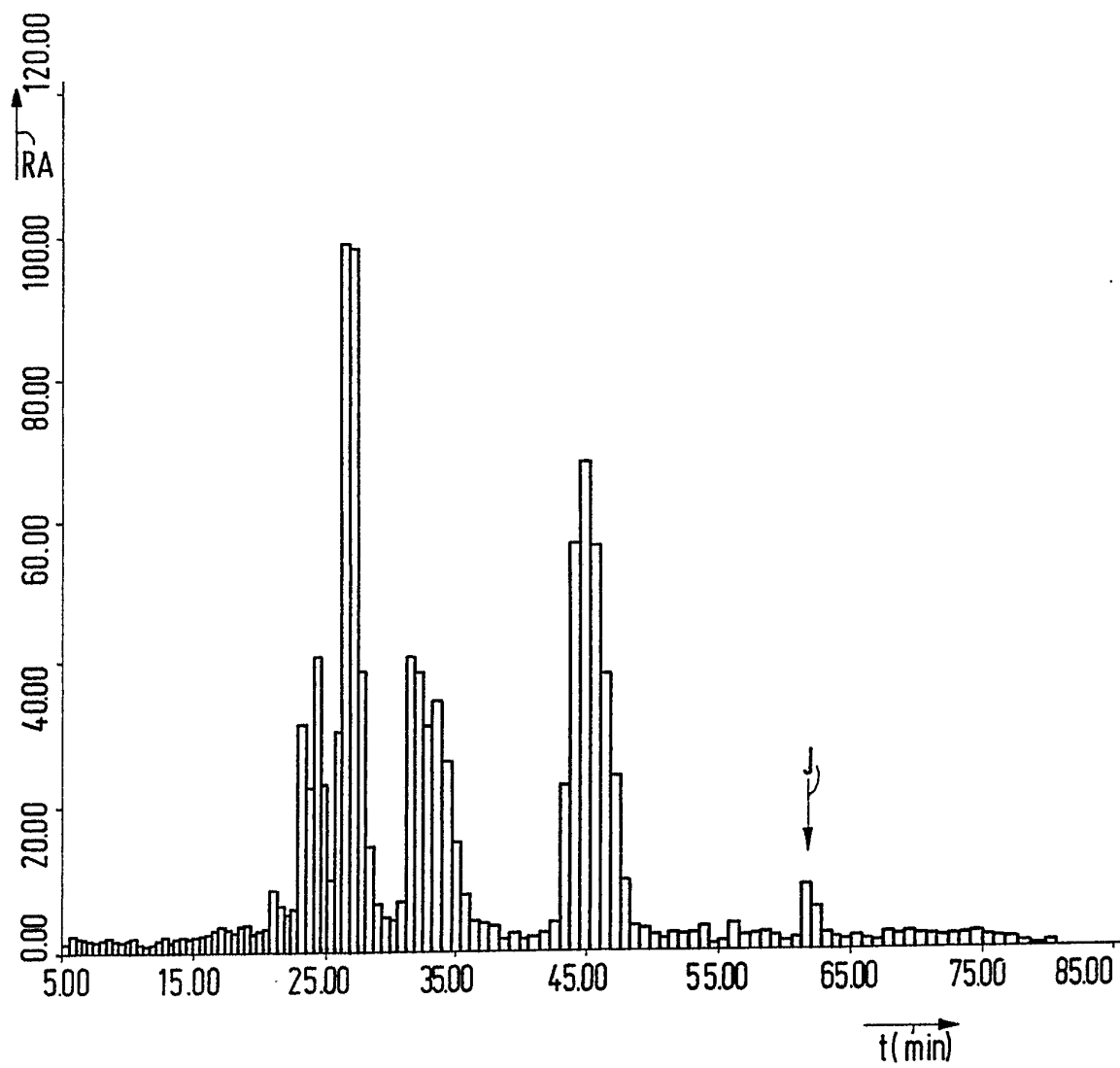


FIG.9

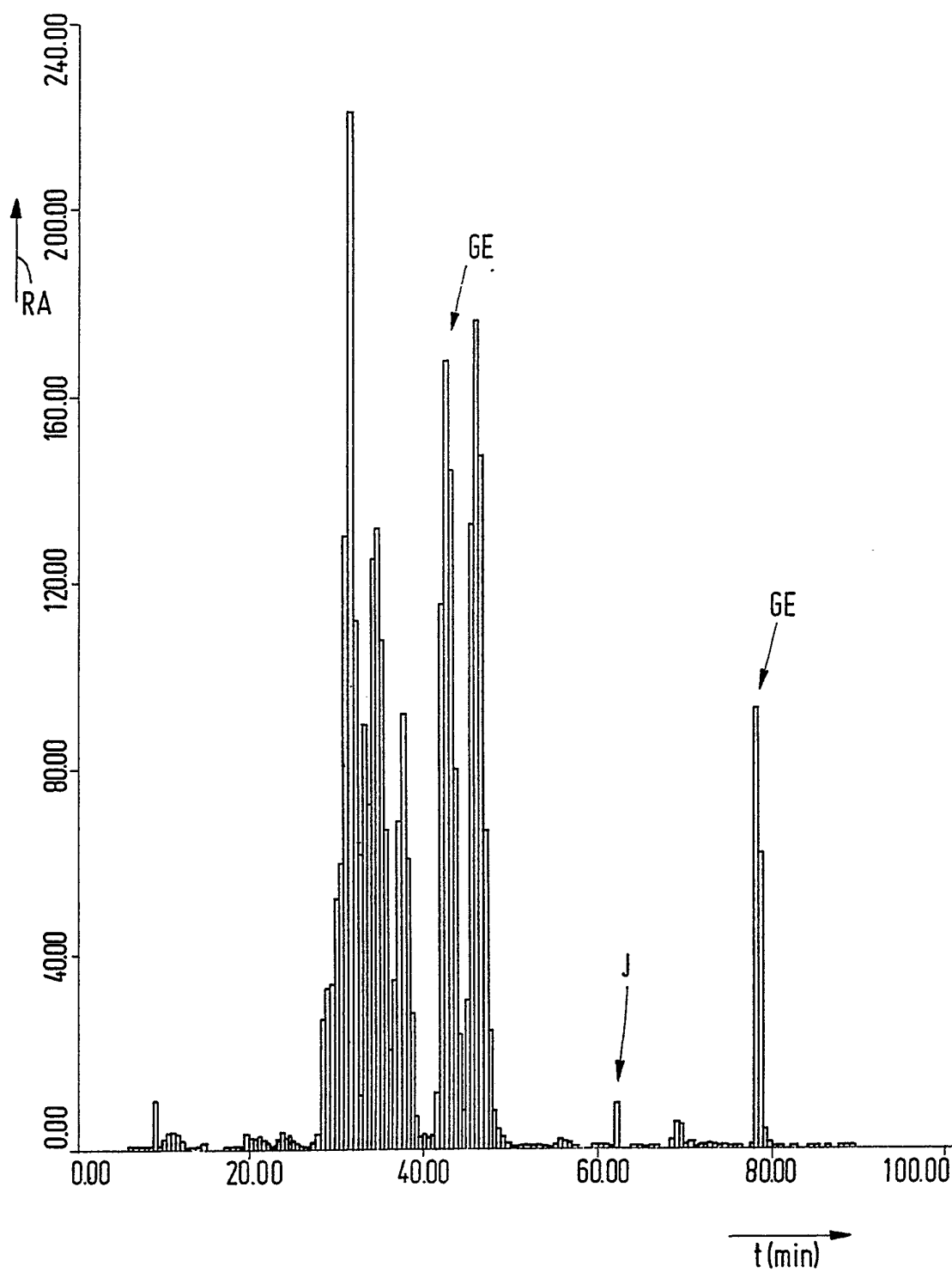


FIG.10

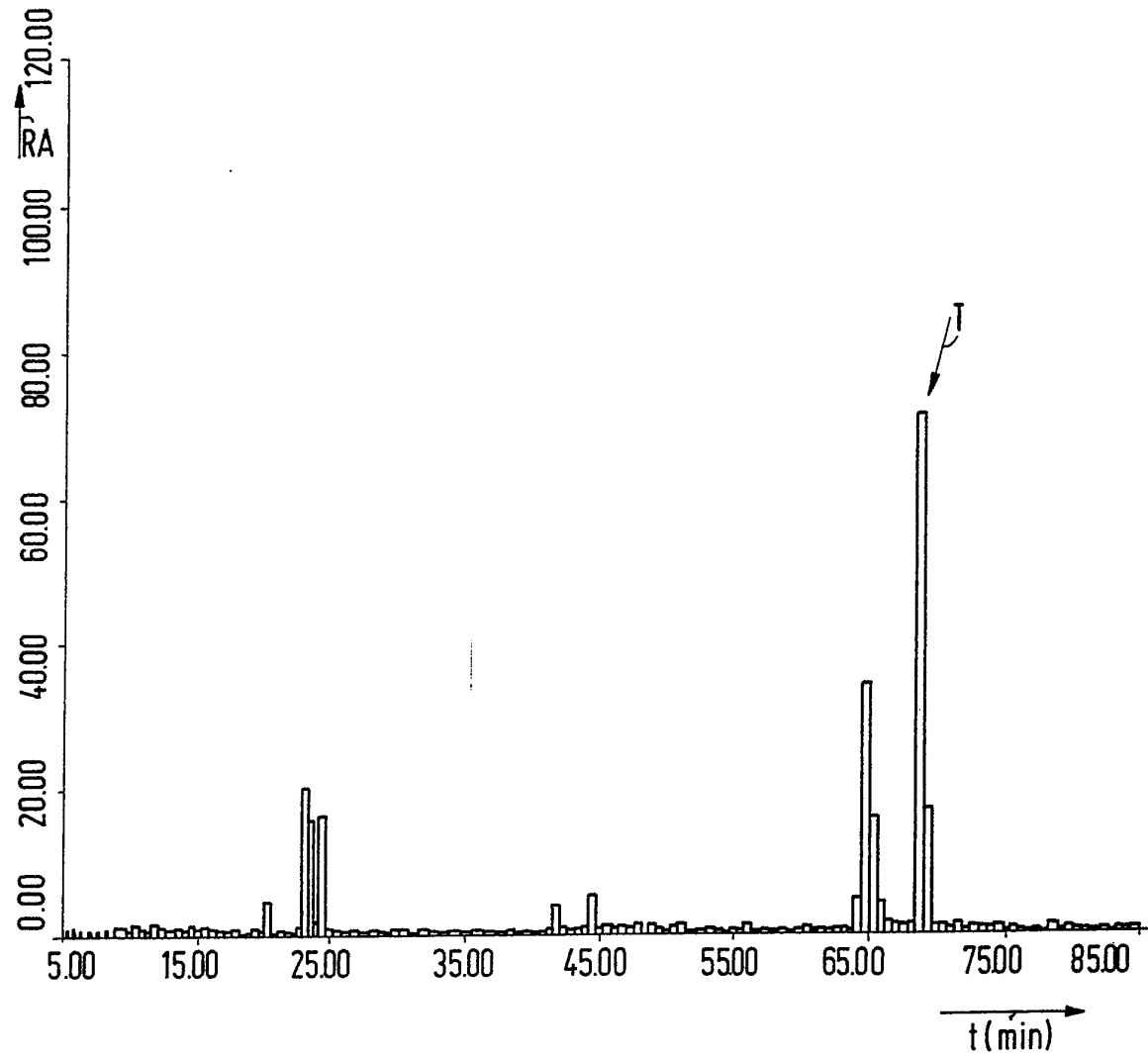


FIG.11

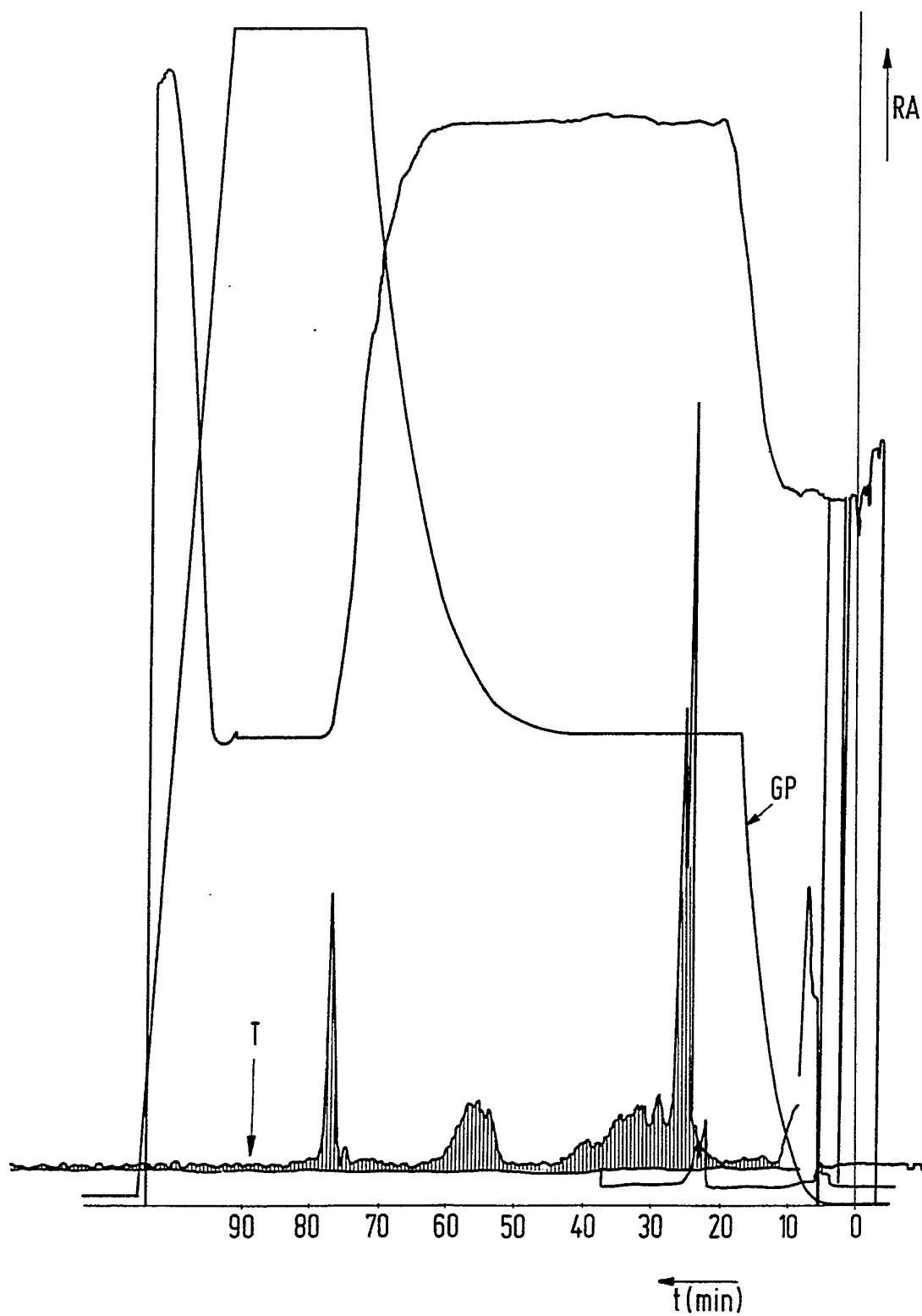


FIG.12

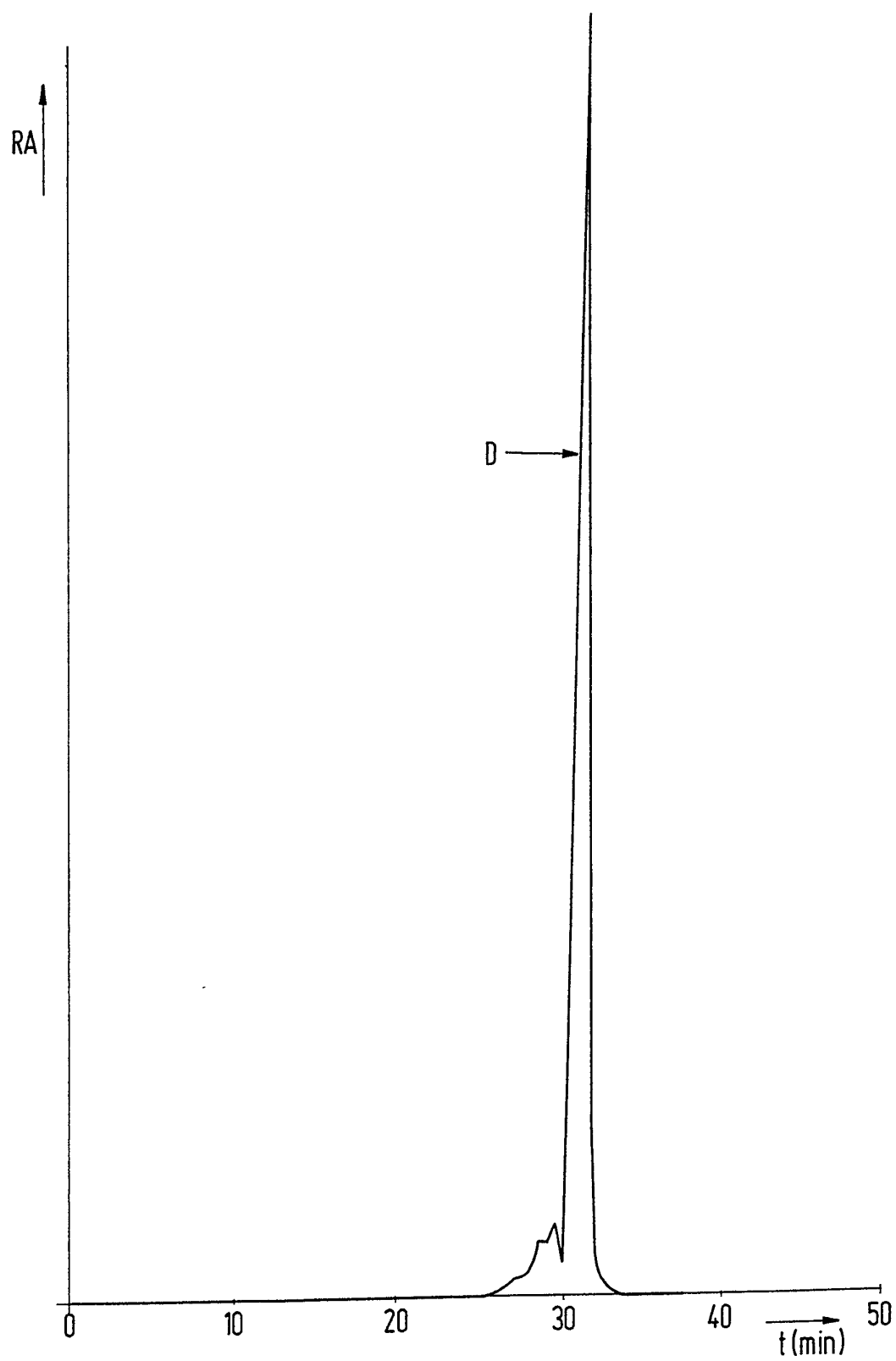


FIG.13

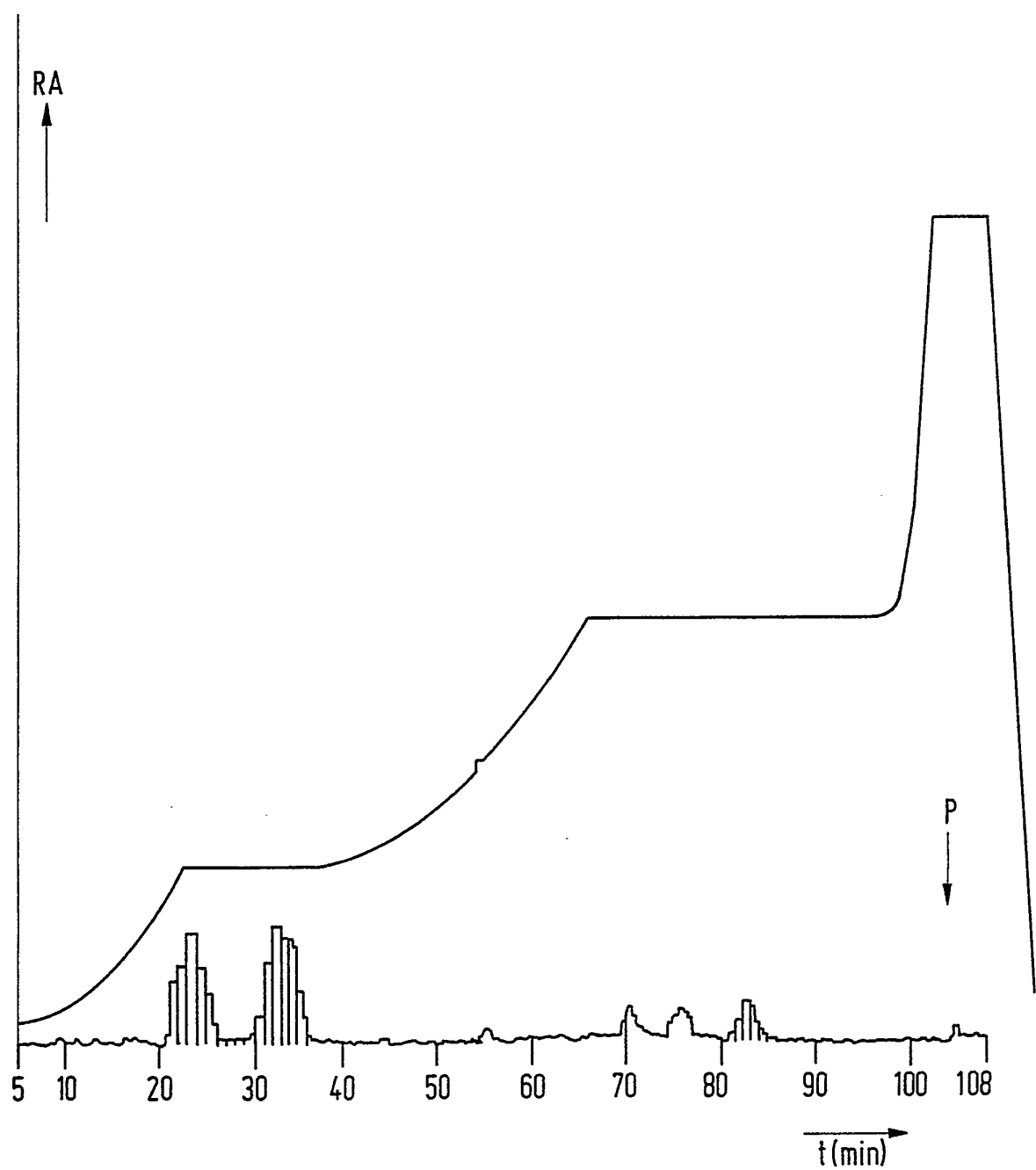


FIG.14