

Warten auf die Zukunft?

Nano-, Mikro- und zweidimensionale HPLC zeigen sich heute schon stark

Dr. Thorsten Teutenberg, Sandy-Dominic Freihoff, Terence Hetzel, Juri Leonhardt
Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V., Duisburg, Deutschland

Ein großes Thema auf der in Brügge abgehaltenen HTC-Konferenz, die sich thematisch mit Kopplungsverfahren von HPLC und innovativen Detektionstechniken befasst, war die Diskussion über Systemvolumina moderner UHPLC-Systeme. Wieder einmal ist festzustellen, dass die Säulen- und Partikeltechnologie die Gerätetechnologie überholt hat, so jedenfalls die Meinung vieler Experten. Es wurde mehrfach betont, dass die Verwendung von Trennsäulen mit einem Innendurchmesser kleiner als 2,1 mm nicht sinnvoll ist, da die Systemvolumina moderner UHPLC-Systeme trotz des großen Fortschritts der letzten Jahre immer noch zu groß sind [1]. Leider wurde in der Diskussion außer Acht gelassen, dass es schon seit vielen Jahren Mikro- und Nano-HPLC-Systeme gibt, bei denen das Gradientenverweilvolumen sowie die Totvolumina weniger als einen Mikroliter betragen. Diese Geräte sind allerdings in der Wahrnehmung sowohl der Anwender als auch Systemtheoretiker immer noch nicht in den unmittelbaren Fokus gerückt. Diese Lücke soll der vorliegende Beitrag schließen.

Nano-LC-MS-Kopplung

Es ist vollkommen unstrittig, dass die theoretisch verfügbare Trennleistung moderner stationärer Phasen nur dann zur Geltung kommt, wenn alle Volumina, die zu einer Bandenverbreiterung außerhalb der Trennsäule führen, deutlich reduziert werden. Mit dem im Folgenden beschriebenen Versuchsaufbau sollte deshalb der Frage nachgegangen werden, ob es möglich ist, Nano-Säulen in Verbindung mit einem Mikro-LC-System und einem konventionellen Massenspektrometer zu

nutzen. Als Trennsäule wurde eine monolithische Säule von Merck mit einem Innendurchmesser von 100 µm verwendet. Diese wurde über einen Filter mit dem Injektor des Mikro-LC-Systems sowie dem Emittertip des Massenspektrometers verbunden. Als Massenspektrometer wurde ein älteres Gerät von AB Sciex (QTrap 3200) verwendet. Um die Bandenverbreiterung nach der Trennsäule zu minimieren, wurde ein Emittertip mit einem Innendurchmesser von 25 µm eingesetzt. Der Wechsel des Tips ist ohne großen Aufwand innerhalb weniger Minuten möglich.

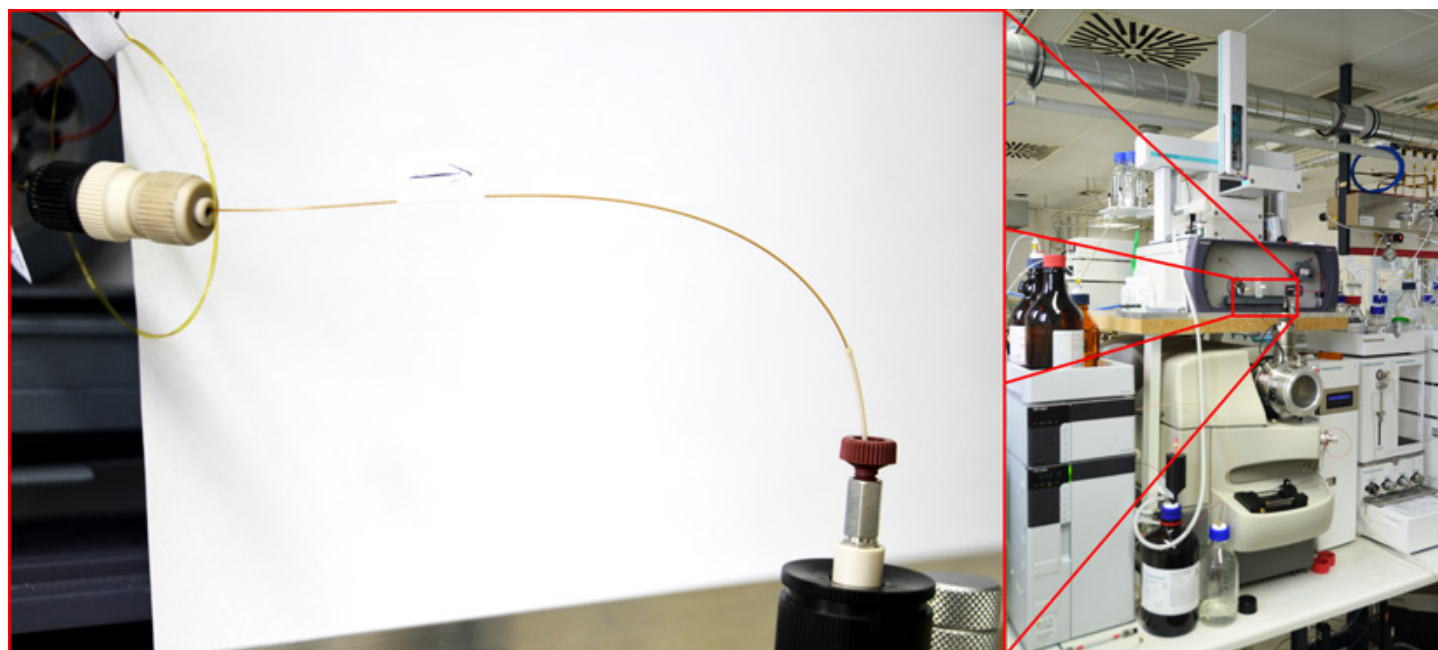


Abb. 1 Versuchsaufbau zur Kopplung von Eksigent Mikro-LC, Merck CapRod und AB Sciex QTrap 3200. Die Vergrößerung zeigt die Verbindung der Trennsäule mit dem Injektor und dem Emittertip des Massenspektrometers.

Wie anhand des Systemaufbaus in Abbildung 1 deutlich wird, kann die Säule wie eine Transferkapillare zwischen Injektor und Ionenquelle des Massenspektrometers eingespannt werden. Laut Empfehlungen des Säulenherstellers sollte ein Druck von 200 bar nicht überschritten werden, sodass die Flussrate unter den gegebenen Bedingungen auf 5 µL min⁻¹ eingestellt wurde. Abbildung 2 zeigt den Vergleich der Trennung von ca. 50 Arzneistoffen. Im ersten Fall wurde die Trennung mit einem konventionellen HPLC-System und einer monolithischen Phase mit einem Innendurchmesser von 2,0 mm erzielt. Im zweiten Fall wurde der in Abbildung 1 dargestellte Versuchsaufbau gewählt. Bei Betrachtung der Peakbreiten fällt auf, dass keine signifikante Bandenverbreiterung zu beobachten ist, wenn eine Nano-Trennsäule verwendet wird. Dieses Ergebnis mag zunächst überraschen, zumal keine Modifikationen an der Ionenquelle des Massenspektrometers vorgenommen werden müssen, um diese in einem niedrigen Flussbereich einsetzen zu können. Allerdings muss betont werden, dass eine Reduzierung des Innendurchmessers der Trennsäule bis 100 µm nur mit speziellen, für die Mikro- oder Nano-HPLC ausgelegten Systemen möglich ist. Diese sind allerdings seit mehreren Jahren von einer Vielzahl an Anbietern kommerziell verfügbar. Des Weiteren ist es zwingend erforderlich, die Dispersion nach der Trennsäule weitestgehend zu minimieren. Ohne die Anpassung des Innendurchmessers des Emittertips ist die Nutzung von Nano-Säulen mit dem gewählten Aufbau nicht möglich. Ein weiterer deutlicher Vorteil des miniaturisierten Ansatzes ist der Lösemittelverbrauch. Im Vergleich zur konventionellen Trennung beträgt dieser gerade einmal ein Prozent.

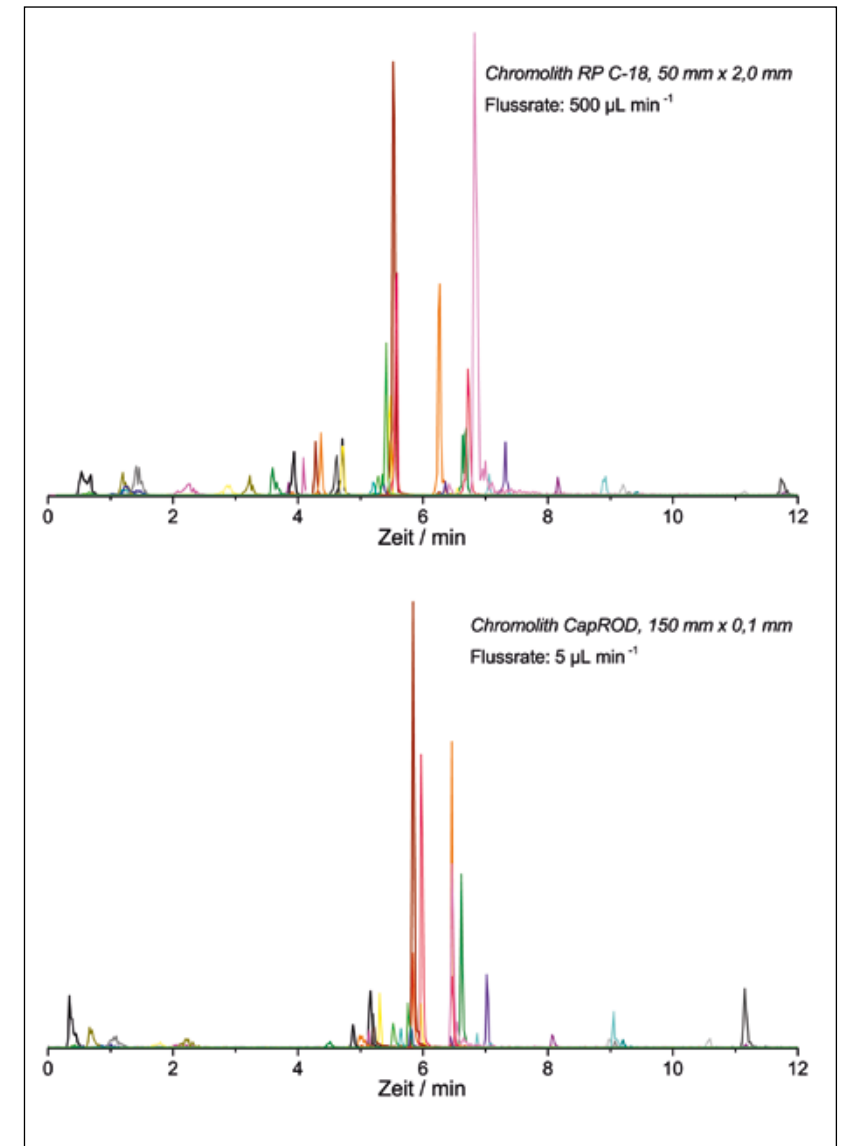


Abb. 2 Vergleich der Trennung von ca. 50 Arzneistoffen mit konventioneller HPLC-MS-Kopplung (oberes Chromatogramm) sowie mit dem in Abbildung 1 dargestellten Versuchsaufbau (unteres Chromatogramm).

Zweidimensionale Nano-LC x Mikro-LC-MS-Kopplung

Während eindimensionale Trennungen im Bereich der Target-Analytik etabliert sind, spielen zweidimensionale Trennungen im Bereich von Screening-Analysen und der Identifizierung von Biomarkern aus komplexen Proben eine immer wichtiger werdende Rolle [2]. Darüber hinaus können diese Verfahren ganz allgemein im Rahmen eines Suspected- oder Nontarget-Screening, z. B. in der Wasser- und Abwasseranalytik, Anwendung finden. Solche Analysestrategien wurden in den vergangenen Jahren immer häufiger diskutiert, insbesondere das Langenauer Wasserforum hat hier maßgebliche Impulse gesetzt.

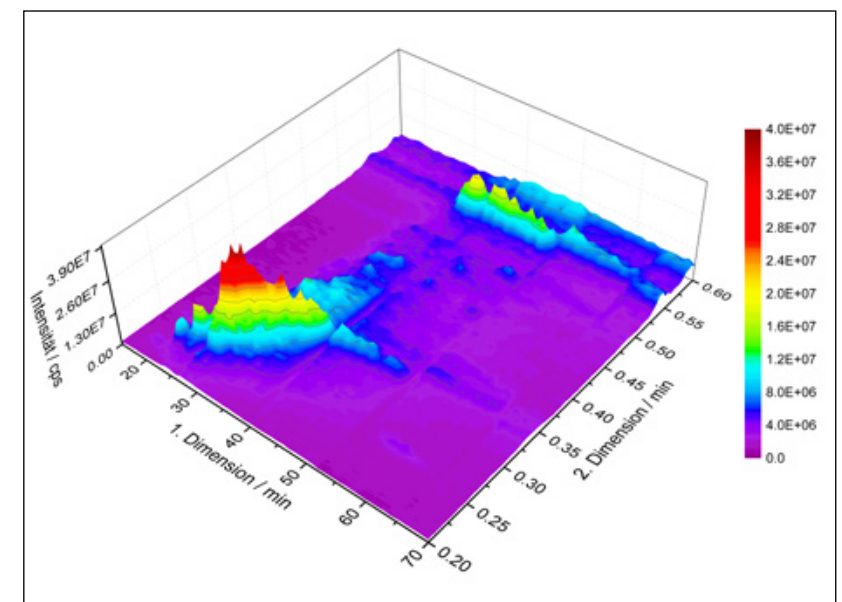


Abb. 3 3D-Plot der LC x LC-Trennung einer Abwasserprobe. Weiterführende Informationen können der Literaturstelle [3] entnommen werden.



Thorsten Teutenberg, Jg. 1973, hat Chemie an der Ruhr-Universität Bochum studiert. Er hat dort zum Thema „Hochtemperatur-HPLC“ am Lehrstuhl für Analytische Chemie promoviert. 2004 wechselte er an das Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. in Duisburg als wissenschaftlicher Mitarbeiter. Seit 2012 leitet er den Bereich Forschungsanalytik und beschäftigt sich vorwiegend mit allen Aspekten der Hochtemperatur-HPLC, miniaturisierten Trenn- und Detektionstechniken sowie multidimensionalen chromatografischen Verfahren.

Vor diesem Hintergrund wurde ein zweidimensionales LC x LC-System, bestehend aus einer Nano- und Mikro-LC in der ersten und zweiten Trenndimension, auf Basis der Eksigent-Technologie entwickelt [3]. Das in der Publikation von Haun et al. beschriebene System wurde speziell

für die Erfordernisse eines Wasser- oder Abwasserscreenings modifiziert. In der ersten Trenndimension wurde deshalb eine Phase aus grafitisiertem Kohlenstoff von Thermo verwendet. Das Material zeichnet sich nicht nur durch eine deutlich stärkere Retention für polare Substanzen aus, sondern weist auch eine im Vergleich zu klassischen silikabasierten C-18 Phasen unterschiedliche Selektivität auf. In Abbildung 3 ist ein 3D-Plot einer Abwasserprobe dargestellt, wobei auf der x- und y-Achse die Retentionszeiten der einzelnen Trenndimensionen und auf der z-Achse die Intensität aufgetragen ist. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die zweidimensionale Auftrennung eine Verteilung der Peaks über die zur Verfügung stehende Fläche erfolgt. Durch die Kopplung mit einem Q-TOF-Massenspektrometer ist es möglich, anhand der Bestimmung der Summenformel und des Fragmentierungsmusters die Analyten sicher zu identifizieren. Weitergehende Auswertungen befassen sich nun mit der Frage, ob der hier vorgestellte technologische Ansatz einem konventionellen eindimensionalen Trennverfahren mit 2,1 mm ID Trennsäulen überlegen ist [4].

Fazit

Die hier aufgeführten Beispiele belegen das enorme Potenzial miniaturisierter Trenntechniken. Durch die Anwendung der Nano- und Mikro-LC lassen sich nicht nur beträchtliche Mengen an toxischen und teuren organischen Lösemitteln einsparen. Vielmehr wird durch den kompakten Aufbau dieser Systeme eine optimale Kopplung zwischen der Trennsäule und dem Massenspektrometer erhalten. Kritische Systemvolumina, die zu einer Bandenverbreiterung und somit geringen Trenneffizienz führen, können somit eliminiert werden. Laut Ansicht der Autoren ist ein „Warten auf die Zukunft“ nicht notwendig, wenn es um die Verfügbarkeit leistungsstarker miniaturisierter Trennsysteme geht. Entsprechende Geräte sind bereits seit mehreren Jahren kommerziell verfügbar.

■ teutenberg@iuta.de

Danksagung: Die Autoren möchten sich bei Dr. Karin Cabrera und Dr. Stephan Altmaier von Merck für die Überlassung monolithischer Säulen bedanken.

- Literatur
- [1] Heinisch, S. et al. (2008) J. Chromatogr. A 1203, 124–136
 - [2] Rodríguez, A. A. et al. (2012), J. Chromatogr. B 903, 30–39
 - [3] Haun, J. et al. (2013) Anal. Chem. 85, 10083–10090
 - [4] Leonhardt, J. et al. (2014) Anal. Bioanal. Chem. In preparation

Foto: © istockphoto.com, JovanaMilanko

Partikelmesstechnik –

Ich sehe was, was Du nicht siehst!



Neu:
Partikelmess-
sonde E25!

Mehr Wissen, mehr Kontrolle, mehr Produktionssicherheit!

Durch die in-situ Partikelanalyse von METTLER TOLEDO können Sie gezielt und mit geringem Zeitaufwand Ihre Prozesse optimieren. Die Information mitten aus dem Prozess ermöglicht ein ideales Verständnis für den Prozess. Dadurch kann man effizient und sicher optimieren und später auch den Prozess kontrollieren.

Die bewährte und in der Pharmaindustrie weit verbreitete Particle Track Technologie ist nun kostengünstig auch für folgende Anwendungsbereiche verfügbar:

- Kristallisation – optimierte Partikelgröße, kurze Filtrationszeiten
- Emulsion – schneller zu stabilen Emulsionen
- Flokkulation – effiziente Flokkulationsmittel, minimaler Materialeinsatz

► www.mt.com/particle-track



METTLER TOLEDO