

## Nachweis von Spurenstoffen und Transformationsprodukten mittels Massenspektrometrie: Welche Rolle spielt die Chromatografie?

*Dr. Thorsten Teutenberg, Dr. Jochen Türk*

*Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. (IUTA), Duisburg, [www.iuta.de](http://www.iuta.de)*

### Einleitung

Das Vorkommen von Spurenstoffen, Metaboliten und Transformationsprodukten im Wasserkreislauf stellt an die Massenspektrometrie immer höhere Anforderungen an Auflösung und Nachweisstärke. Die Rolle der Chromatografie wird von den MS-Anwendern dabei oft nur unzureichend oder einseitig betrachtet. Dabei spielt diese insbesondere bei der Analytik von polaren Arzneimittelwirkstoffen und Metaboliten, sowie bei der Ozonung entstehenden Transformationsprodukten eine entscheidende Rolle. Die Aufklärung dieser unbekannt Substanzen erfolgt mit Hilfe der hochauflösenden Massenspektrometrie. Häufig wird jedoch beobachtet, dass die Detektion insbesondere der polaren Stoffe problematisch ist, weil diese bei der chromatografischen Trennung auf einer Umkehrphase nur unzureichend zurückgehalten werden und somit mit oder nahe der Totzeit eluieren. Koeluierende Matrixbestandteile verursachen in vielen Fällen eine Ionensuppression. Die Aufgabe der Chromatografie besteht dann darin, die polaren Stoffe von den übrigen Matrixbestandteilen soweit abzutrennen, dass eine Detektion mit hoher Sensitivität möglich ist.

### Haupttext

Für die Chromatografie polarer Stoffe, die auf einer „konventionellen“ Silika-C-18 Phase nicht retardiert werden, bieten sich zum Beispiel stationäre Phasen auf Basis von Kohlenstoff an. Zu nennen sind hier Phasen aus grafitisiertem Kohlenstoff oder auf Basis von Zirkoniumdioxid, die mit Kohlenstoff beschichtet sind. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass gereinigtes Abwasser immer noch eine komplexe Matrix darstellt und neben den polaren Targetanalyten eine Vielzahl weiterer Verbindungen vorliegen, die weitaus unpolarer sind. Deshalb muss sichergestellt werden, dass die übrigen in der Probe enthaltenen Verbindungen eluiert werden können und keine Anreicherung unpolarer Komponenten auf der Säule erfolgt.

Ein wesentlicher Parameter, der die Retention entscheidend beeinflusst, ist der pH-Wert. Abbildung 1 zeigt die Abhängigkeit des Retentionsfaktors ausgewählter Modellsubstanzen vom pH-Wert der mobilen Phase für eine Silikagel- und eine Kohlenstoff basierte Umkehrphase. Die verwendeten stationären Phasen sind über einen weiten pH-Bereich stabil und können sogar im stark alkalischen Milieu eingesetzt werden. In diesem Fall wurde die pH-Wert Optimierung auf einer Hybridphase der Firma Waters sowie einer mit Kohlenstoff beschichteten Phase basierend

auf Zirkoniumdioxid durchgeführt. Die in Abbildung 2 gezeigten Chromatogramme verdeutlichen, dass eine Abtrennung des sehr polaren 5-Fluorouracil von der Totzeit auf der Silikagel basierten Hybridphase nicht möglich ist, da hier zu Beginn der Elution mit 100 % Wasser chromatografiert wird. Im Gegensatz dazu wird diese Komponente auf der mit Kohlenstoff beschichteten Zirkoniumdioxid Phase deutlich retardiert, obwohl zu Beginn der Elution bereits 25 % Methanol in der mobilen Phase enthalten sind.

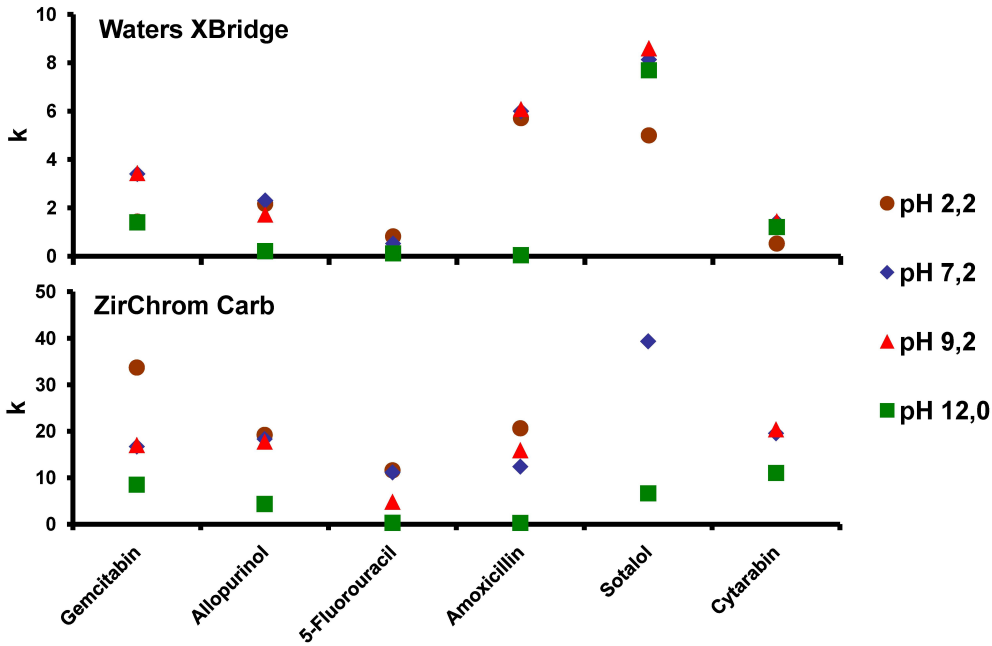


Abbildung 1: Abhängigkeit des Retentionsfaktors vom pH-Wert der mobilen Phase für ausgewählte Analyten auf einer Waters XBridge und ZirChrom-Carb Säule.

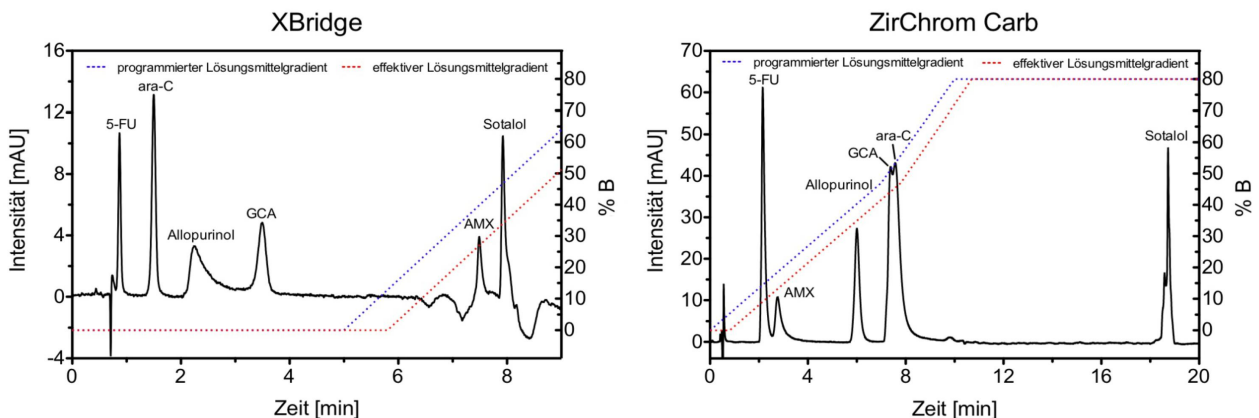


Abbildung 2: Trennung ausgewählter polarer Komponenten auf einer Waters XBridge und ZirChrom Carb Säule. Eingezeichnet ist der programmierte und tatsächliche Lösemittelgradient. Es bedeuten: 5-FU: 5-Fluorouracil; ara-C: Cytarabin; GCA: Gemcitabin; AMX: Amoxicillin.

Ein entscheidender Punkt bei der Kopplung von Chromatografie und Massenspektrometrie ist die Verwendung von Pumpen mit extrem niedrigem Gradienten-Verweilvolumen. Obwohl viele

Gerätehersteller hauptsächlich den erweiterten Druckbereich bis mittlerweile 1.300 bar in den Vordergrund stellen, ist die Beschleunigung der chromatografischen Methoden in Verbindung mit einem massenspektrometrischen Detektor erst durch die geringen „Ansprechzeiten“ des Lösemittelgradienten möglich geworden. Dieser Sachverhalt lässt sich am Besten anhand der in Abbildung 3 gezeigten Trennung von Komponenten, die ein breites Polaritätsspektrum umfassen, erläutern [1,2].

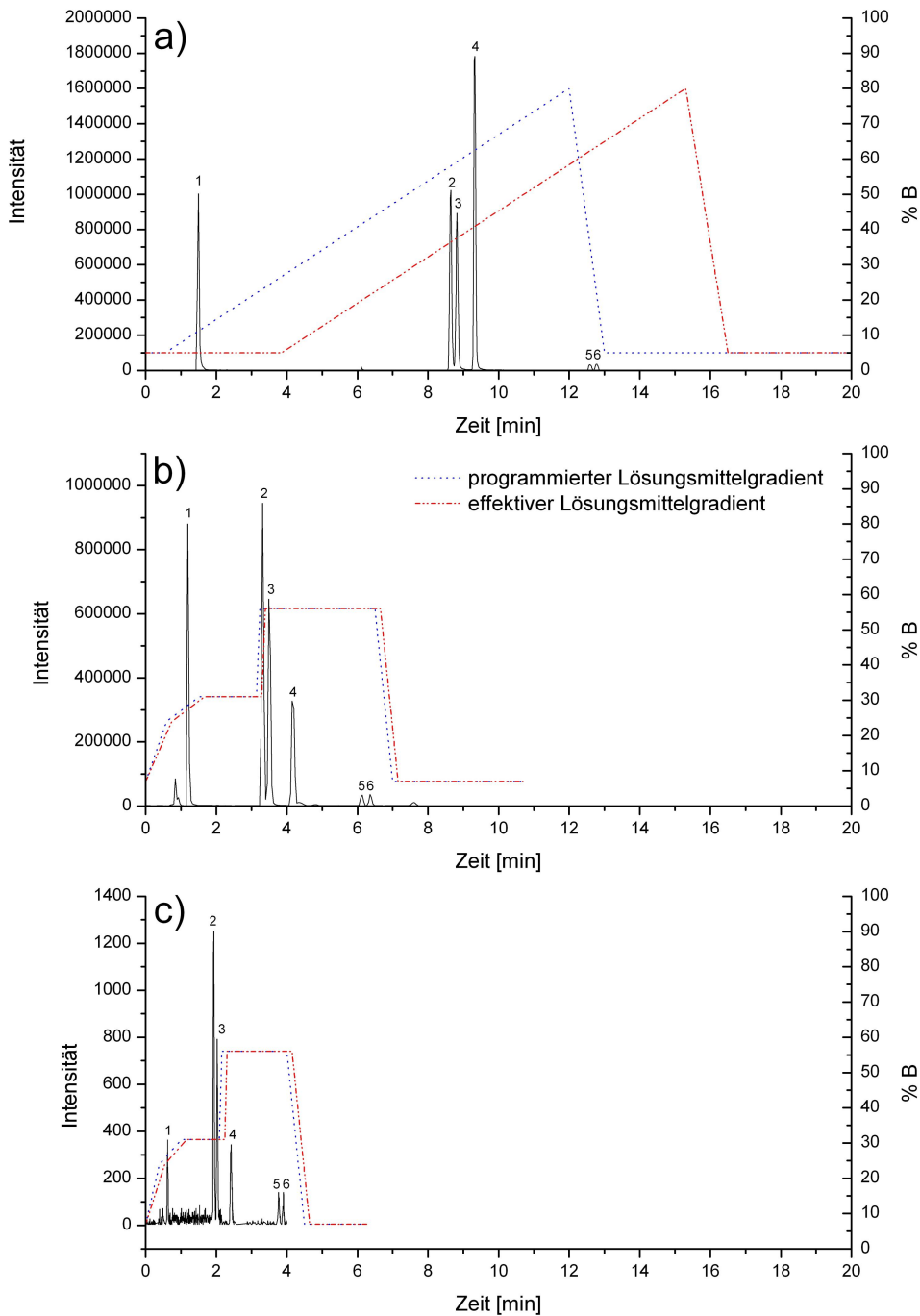
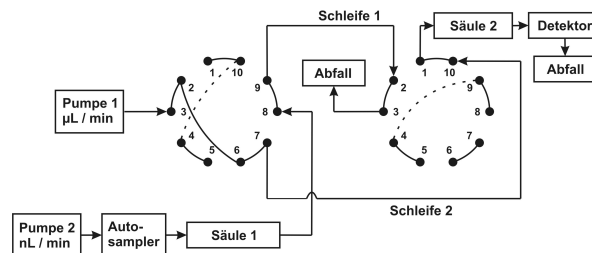


Abbildung 3: Vergleich der Trennung von Substanzen unterschiedlicher Polarität auf einem System mit großem (1000 µL, Abb. 3a) und kleinem (130 µL, Abb. 3b und c) Gradientenverweilvolumen. Eingezeichnet ist der programmierte und tatsächliche Lösemittelgradient. Weitere Informationen können der zitierten Application Note entnommen werden [1].

Da bei der Massenspektrometrie häufig Flussraten zwischen 300 und 500  $\mu\text{L}/\text{min}$  angewendet werden, können bei HPLC-Systemen mit großem Gradientenverweilvolumen deutliche Verzögerungen zwischen dem programmierten und dem tatsächlichen Gradienten entstehen. Moderne UHPLC-Systeme wie zum Beispiel das Infinity 1290 System der Firma Agilent mit einem Gradienten-Delay-Volumen von 130  $\mu\text{L}$  bewirken, dass keine Zeitverzögerung zwischen dem programmierten und tatsächlichen Gradienten stattfindet. Dies bedeutet gleichzeitig, dass die Analysenzeit und die Zykluszeit, die auch die Zeit der Reäquilibration nach einem Gradienten einschließt, deutlich reduziert werden können.

Eine weitere Möglichkeit, eine Abtrennung der polaren Komponenten von der Matrix zu erreichen, ist die so genannte umfassende zwei-dimensionale Chromatografie (comprehensive two-dimensional liquid chromatography, 2D-HPLC) [3]. Bei diesem Verfahren, das sich gegenwärtig noch im Forschungsstadium befindet, werden zwei möglichst orthogonale, das heißt sich in ihrer Selektivität stark unterscheidende stationäre Phasen, genutzt. Im Gegensatz zur POPLC, bei der die Trennsäulen direkt hintereinander gekoppelt werden [4], sind diese bei der umfassenden 2D-HPLC über eine Ventilschaltung miteinander verbunden. In definierten Zeitintervallen wird das Eluat aus der ersten Trennsäule in zwei Schleifen gesammelt, die alternierend befüllt werden und danach über die zweite Trennsäule chromatografiert. Dabei entspricht die Analysenzeit für die zweite Dimension exakt der Sammelzeit für das Eluat aus der ersten Trennsäule. Das am IUTA entwickelte und in Abbildung 4 schematisch dargestellte Verfahren basiert auf einem 2D-Nano- und Kapillar-HPLC-System der Firma Eksigent, das von der Firma Axel Semrau vertrieben wird.

Position 1: Befüllung von Schleife 1 / Spülen von Schleife 2 in die 2. Dimension



Position 2: Befüllung von Schleife 2 / Spülen von Schleife 1 in die 2. Dimension

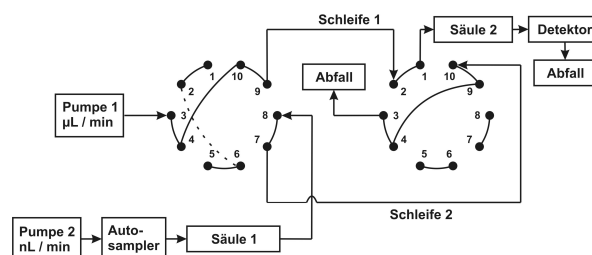


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ventilschaltung bei der umfassenden zweidimensionalen HPLC auf Basis der Nano- und Kapillar-HPLC.

Durch die Miniaturisierung der beiden Trennsäulen mit einem Innendurchmesser zwischen 75 und 300 µm kann die Flussrate der zweiten Trenndimension so eingestellt werden, dass eine Kopplung mit einer Low-Flow oder Nano-Quelle eines Massenspektrometers möglich wird. Das System wird zurzeit mit einem Flugzeitmassenspektrometer der Firma GSG gekoppelt, das sich durch eine sehr hohe Datenaufnahmerate von 100 Hz auszeichnet. Gegenwärtig werden Hausstaubextrakte und komplexe (Ab-)Wasserproben analysiert.

## Fazit

Bei allen Kopplungstechniken zwischen Chromatografie und Massenspektrometrie muss immer im Auge behalten werden, ob und wenn ja in welchem Maße eine chromatografische Trennung tatsächlich notwendig ist. Bei komplexen Proben, die häufig weit mehr als 100 Komponenten enthalten, ist eine Basislinientrennung aller in der Probe enthaltenen Stoffe in der Regel nicht möglich, aber auch nicht notwendig.

Im Gegensatz dazu bietet das Massenspektrometer die Möglichkeit, eine Auftrennung nach dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis vorzunehmen, so dass bei ausreichenden Datenpunkten je Peak auch koeluiierende Analyten mit unterschiedlicher Masse quantifiziert werden können. Eine vollständige Auftrennung aller Komponenten ist somit nur für isobare Stoffe wie zum Beispiel Strukturisomere notwendig. Es bleibt also festzustellen, dass die Chromatografie auch in Verbindung mit der Massenspektrometrie immer noch eine wichtige Rolle spielt.

**Jedoch gilt der Grundsatz: so viel Chromatografie wie notwendig, so wenig wie möglich.**

## Danksagung:

Die in diesem Beitrag vorgestellten Ergebnisse basieren auf zwei Projekten der industriellen Gemeinschaftsforschung. Die Forschungsvorhaben 15862 N und 15928 N werden über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (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.

## Literatur

- [1] S. Wiese, T. Teutenberg, J. Tuerk, E. Naegele, B.-W. Hoffmann, A. Gratzfeld-Huesgen, Agilent Application Note, 5990-1593EN (2010).
- [2] J. Tuerk, T.K. Kiffmeyer, H.-M. Kuss, M. Hahn, H. Stuetzer, C.Hadtstein, A. Heinemann, U. Eickmann, Intern. J. Environ. Anal. Chem., inpress, DOI: 10.1080/03067319.2010.494769.
- [3] I. Francois, K. Sandra, P. Sandra, Anal. Chim. Acta 641 (2009) 14.
- [4] M. Zedda, J. Tuerk, T. Teutenberg, S. Peil, T.C. Schmidt, J. Chromatogr., A 1216 (2009) 8910.