

## Die Möglichkeiten und Grenzen der Hochtemperatur-Flüssigkeitschromatografie

*Dr. Thorsten Teutenberg*

*Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. (IUTA), Bliersheimer Str. 60, D-47229 Duisburg*

### Einleitung

In den letzten Jahren ist wieder Bewegung in den Markt der Flüssigkeits-Chromatografie gekommen. Jedes Jahr überbieten sich die Hersteller von Analysegeräten mit den Spezifikationen ihrer Systeme. Die Flüssigkeits-Chromatografie bei erhöhtem Druck – auch bekannt als UHPLC – hat mittlerweile Einzug in viele Routinelaboratorien gehalten. Eine andere Technik, die unter der Bezeichnung Hochtemperatur-Flüssigkeitschromatografie (HT-HPLC) bekannt ist, wird allmählich auch in verschiedenen Laboratorien eingesetzt. Die Möglichkeiten und Grenzen dieser innovativen Technologie werden anhand von Trennbeispielen diskutiert. Darüber hinaus wird erläutert, welche Soft- und Hardwarevoraussetzungen gegeben sein müssen, um die Hochtemperatur-HPLC erfolgreich anwenden zu können.

### Haupttext

Im Prinzip handelt es sich bei der Hochtemperatur-HPLC, ähnlich wie bei der UHPLC, nur um eine Variante der klassischen HPLC [1]. Der Hauptunterschied zur konventionellen HPLC besteht darin, dass die Temperatur als aktiver Parameter in die Methodenentwicklung integriert wird. Dabei erstreckt sich der praktisch nutzbare Temperaturbereich bis etwa 200 °C. Dadurch lässt sich die Flussrate und somit die Trennung bei höherer Temperatur aufgrund der niedrigen Viskosität der Lösemittelgemische signifikant steigern, bis wieder das Drucklimit der Säule beziehungsweise des HPLC-Systems erreicht wird. Abbildung 1 zeigt den temperaturabhängigen Verlauf der Viskosität für ein Binärsystem aus Wasser und Methanol [2]. Wie jeder Anwender weiß, generiert eine mobile Phase aus Wasser und Methanol bei Raumtemperatur ein deutlich höheres Druckmaximum als beispielsweise eine mobile Phase aus Wasser und Acetonitril unter ansonsten identischen Betriebsbedingungen. Dies hat dazu geführt, dass häufig Acetonitril anstelle von Methanol verwendet wird.

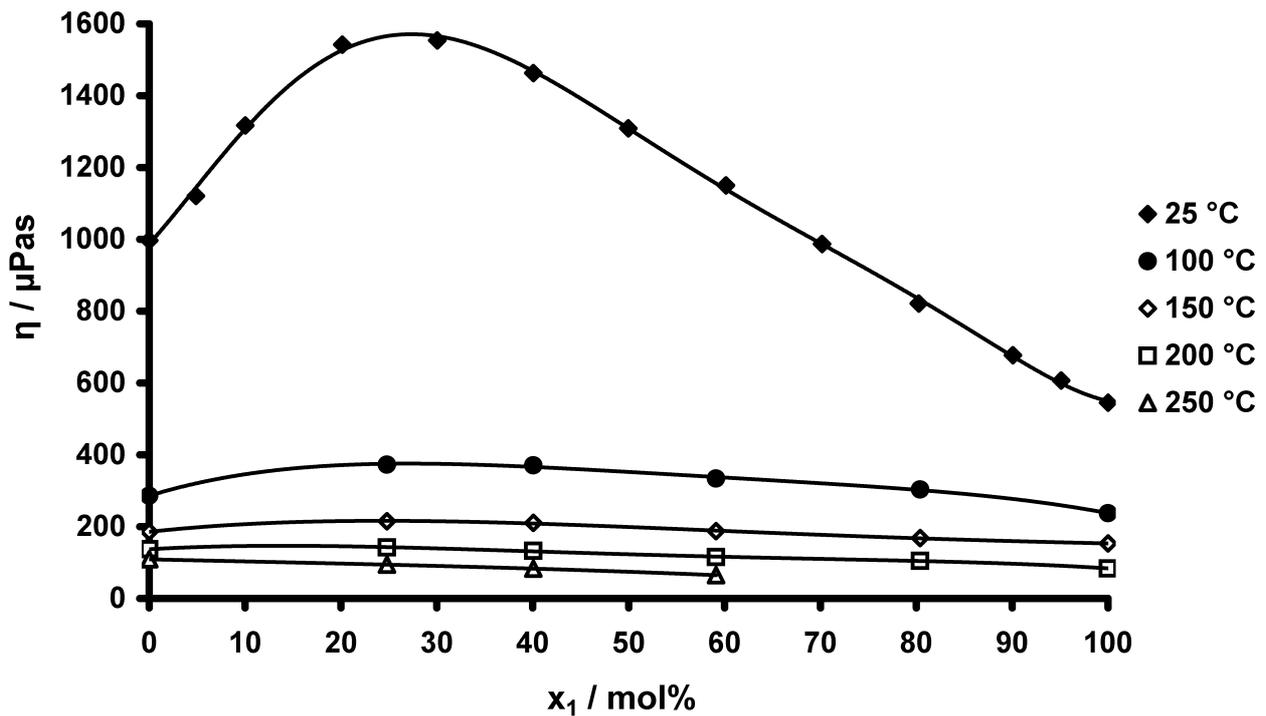


Abbildung 1: Temperaturabhängigkeit der Viskosität einer binären Mischung aus Methanol und Wasser. Weitere Daten können der Referenz [2] entnommen werden.

Aus Abbildung 1 ist jedoch ersichtlich, dass das Viskositätsmaximum bei einer Temperatur von ca. 100 °C für eine binäre mobile Phase aus Wasser und Methanol deutlich niedriger ausfällt. Im Vergleich zu Raumtemperatur kann somit bei einer etwa viermal höheren Flussrate gearbeitet werden.

Steht nun ein UHPLC-System mit erweitertem Druckbereich zur Verfügung, so lassen sich Trennungen, die unter normalen Bedingungen mehrere Minuten dauern, auf wenige Sekunden reduzieren, wie dies anhand der in Abbildung 2 dargestellten Chromatogramme ersichtlich ist.

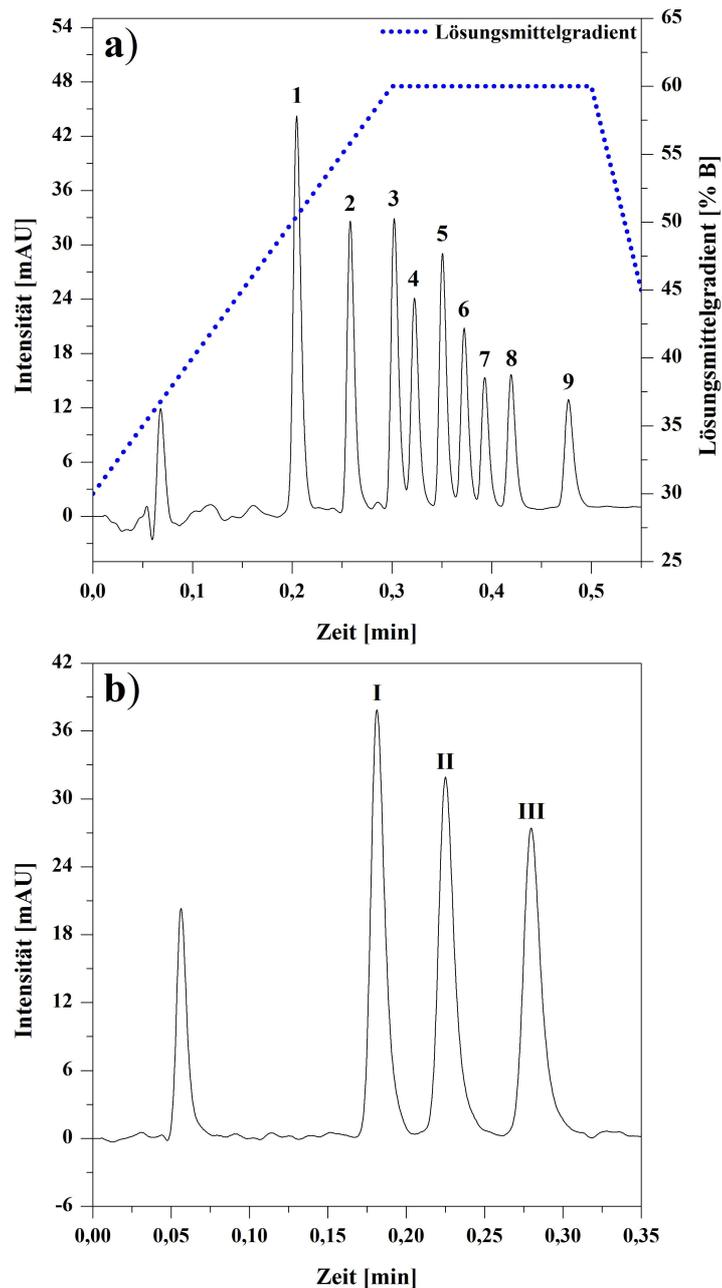


Abbildung 2: Trennung von a) neun Aldehyd- und Keton-DNPH Derivaten bzw. b) drei Steroiden auf einem LC-30A Nexera UHPLC-System der Firma Shimadzu. Stationäre Phase: Agilent Zorbax SB C-18 (50 x 1,0 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ). Mobile Phase: Wasser-Acetonitril, a) Lösungsmittelgradient, siehe Abbildung, b) isokratisch 60/40 (v/v).

Die hier gezeigten Trennungen wurden auf einem UHPLC-System der Firma Shimadzu mit erweitertem Druckbereich bis 1300 bar aufgenommen. Die Trennungen wurden bei einer Temperatur von 90 °C durchgeführt, wobei ein Druck von 1005 bar (Abbildung 2 a) bzw. 1140 bar (Abbildung 2 b) resultierte. Durch die Verwendung von Säulen mit einem Innendurchmesser von 1 mm lassen sich sehr hohe lineare Fließgeschwindigkeiten von 2 bis 4  $\text{cm s}^{-1}$  erzeugen. Dies

wiederum hat eine schnelle Reäquilibration der Trennsäule innerhalb weniger Sekunden nach einem Lösungsmittelgradienten zur Folge. Weitere Informationen lassen sich der Referenz [3] entnehmen.

Neben der Möglichkeit, durch Erhöhung der Temperatur die Trennung signifikant zu beschleunigen, ermöglicht die Anwendung höherer Temperaturen auch spezielle Kopplungstechniken, die auf der Verwendung einer rein wässrigen mobilen Phase basieren. Die Kopplung der HPLC mit der Isotopenverhältnismassenspektrometrie (IRMS) eröffnet hier zahlreiche Möglichkeiten im Bereich der Authentizitätskontrolle beziehungsweise der Herkunftsanalyse [4]. In einem aktuellen Forschungsvorhaben wird derzeit die HPLC mit der IRMS und einem in der Entwicklung befindlichen Raman-Detektor gekoppelt [5]. Auf diese Weise können neben der Ermittlung des substanzspezifischen Delta-Wertes gleichzeitig Strukturinformationen über die getrennten Komponenten erhalten werden.

Bei der Kopplung der HPLC mit der IRMS wird im Prinzip das Isotopenverhältnis der stabilen Isotope des Kohlenstoffs ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) gegen einen Standard bekannter Isotopie bestimmt. Eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Kopplung der HPLC mit der IRMS ist, dass nur kohlenstofffreie mobile Phasen verwendet werden können. Organische Modifier wie Methanol oder Acetonitril würden zu einem hohen Untergrundwert führen. Des Weiteren ist eine Basislinientrennung aller relevanten Komponenten in der Mischung zwingend erforderlich. Der Einsatz der Hochtemperatur-HPLC ist deshalb unumgänglich, da durch die Erhöhung der Temperatur eine Verminderung der Polarität von Wasser resultiert. Die statische Permittivität als Maß der Polarität nimmt mit steigender Temperatur ab, so dass sich Wasser bei hoher Temperatur zunehmend wie ein organisches Lösemittel verhält [6]. Dieser Effekt kann für HPLC-Anwendungen genutzt werden, da auf diese Weise Lösemittelgradienten durch Temperaturgradienten ersetzt werden können.

Im Rahmen des Projektes zur HPLC-Raman-IRMS-Kopplung wurden bereits zahlreiche HPLC-Methoden mit Wasser als mobiler Phase und Anwendung der Temperaturgradientenelution entwickelt. Eine Auswahl dieser Trennungen ist in Abbildung 3 dargestellt. Der Vorteil bei der Verwendung einer rein wässrigen mobilen Phase besteht außerdem darin, dass die Ramansignale der Analyten nicht durch die mobile Phase gestört werden.

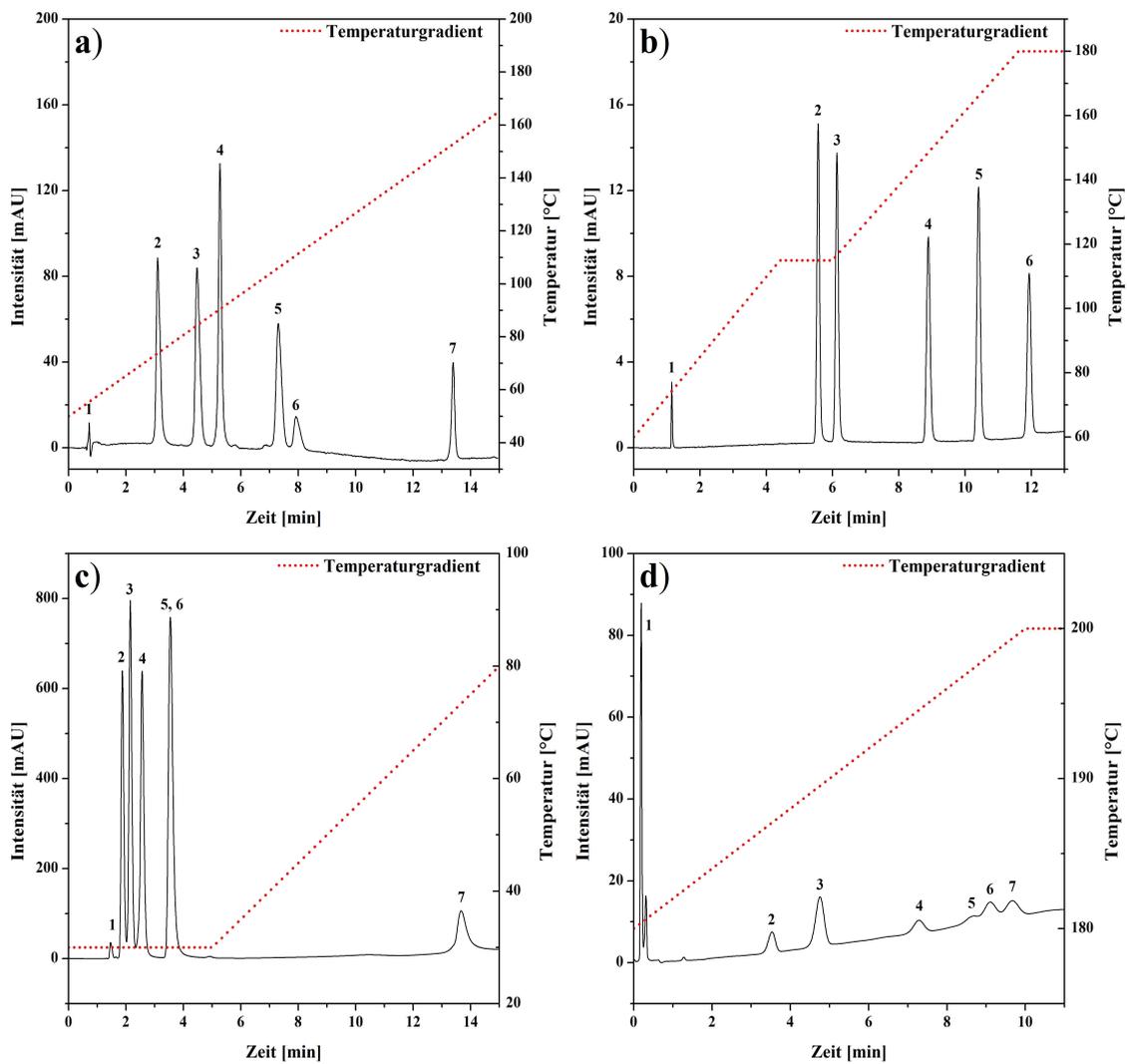


Abbildung 3: Übersicht der entwickelten Methoden für die HPLC-Raman-IRMS-Kopplung.

- a) Trennung von Lebensmittelzusatzstoffen. Stationäre Phase: Waters XBridge C-18.
- b) Trennung von Sulfonamiden. Stationäre Phase: Waters XBridge C-18.
- c) Trennung von Lebensmittelzusatzstoffen. Stationäre Phase: ZirChrom-PBD.
- d) Trennung von Steroiden. Stationäre Phase: Waters XBridge C-8.

Wie anhand eines Vergleichs der Chromatogramme aus Abbildung 3 a und c ersichtlich ist, weisen mit einem Polymer beschichtete Phasen aus Zirkoniumdioxid eine geringere Hydrophobizität auf als die auf Silikagel basierten Hybridphasen. Dies bedeutet, dass auch unpolare Analyten wie zum Beispiel Steroide bei niedrigeren Temperaturen eluiert werden können. In einigen Fällen ist jedoch keine ausreichende Basislinientrennung möglich, da wie im Beispiel 3 c gezeigt, eine Koelution bei niedrigen Temperaturen beobachtet wird. Eine isotherme Elution ist für die in Abbildung 3 gezeigten Beispiele in der Regel nicht möglich, da sehr lange Laufzeiten > 60 Minuten resultieren und die spät eluierenden Komponenten als breite Banden detektiert werden.

Es stellt sich nun die Frage, welche spezielle Hardware verwendet werden muss, um Trennungen unter diesen Bedingungen durchzuführen. Eine Grundvoraussetzung ist natürlich eine entsprechend temperaturstabile stationäre Phase. Neben metalloxidischen Phasen auf Basis von Zirkoniumdioxid haben sich insbesondere Silikagelbasierte Hybridmaterialien der Firma Waters als extrem robust gegenüber hohen Temperaturen und extremen pH-Werten (2-12) erwiesen. Eine umfassende Liste geeigneter temperaturstabiler stationärer Phasen sowie die detaillierte Beschreibung der Testprozedur kann der Referenz [1] entnommen werden.

Neben der Verfügbarkeit entsprechend temperaturstabiler stationärer Phasen muss ein Heizsystem verwendet werden, mit dem Temperaturgradienten angewendet werden können. In einer direkten Kooperation zwischen IUTA und der in Oberhausen ansässigen Firma SIM GmbH wurde ein modulares System entwickelt, das die unabhängige Steuerung der Temperatur des Eluenten vor Eintritt in die Säule, der Temperatur der Trennsäule sowie der Temperatur des Eluenten nach der Säule erlaubt [7]. Dieses Heizsystem lässt sich flexibel in jedes kommerziell verfügbare HPLC-System integrieren. Sowohl die Trennsäule als auch die Kapillaren zur Vorheizung und Kühlung des Eluenten werden in maßgeschneiderte Aluminiumverschalungen eingelegt, so dass ein optimaler Wärmetransfer gewährleistet ist.



Abbildung 4: Spezielles Heizsystem für die Hochtemperatur-HPLC. Weitere Informationen zu den technischen Spezifikationen können der Referenz [7] entnommen werden.

Zwar bieten nun auch immer mehr Hersteller von HPLC-Systemen Heizsysteme an, die eine Vorheizung des Eluenten bei Eintritt in die Säule erlauben, allerdings können diese Systeme in der Regel nicht für die speziellen Anwendungen der Hochtemperatur-HPLC verwendet werden, da unter anderem Temperaturgradienten nicht angewendet werden können und das obere Temperaturlimit zwischen 80 und 100 °C liegt.

Eine häufig gestellte Frage vieler Anwender bezieht sich insbesondere auf die Methodenentwicklung in der Hochtemperatur-HPLC. Auch hier wurden geeignete Strategien entwickelt, anhand weniger Basisläufe eine präzise Vorhersage von Retentionszeiten im Temperaturgradientenmodus zu erreichen [8]. Im Prinzip wurde ein aus der Gaschromatografie entlehntes Retentionszeitmodell für die Fragestellung der Hochtemperatur-HPLC adaptiert. Alle chromatografischen Methoden der in Abbildung 3 aufgeführten Chromatogramme wurden mit Hilfe dieses Vorhersagemodells erstellt, das auch in die Software DryLab 2000 plus des Mólnar-Instituts integriert wurde.

### **Fazit:**

Obwohl die Hochtemperatur-HPLC teilweise immer noch als „exotisches“ Trennverfahren betrachtet wird, sind alle notwendigen Hard- und Softwarekomponenten für eine erfolgreiche Nutzung dieser Technologie mittlerweile kommerziell verfügbar. Das große Potenzial dieser Technologie liegt zum einen in der Möglichkeit zur signifikanten Beschleunigung herkömmlicher HPLC-Methoden, zum anderen in der Nutzung der Temperaturgradientenelution für flüssigkeitschromatografische Anwendungen. Dies wiederum eröffnet den Weg für spezielle Kopplungsverfahren, die auf der Verwendung einer rein wässrigen mobilen Phase basieren. Die Verfügbarkeit temperaturstabiler stationärer Phasen kann zum jetzigen Zeitpunkt als ausreichend angesehen werden, allerdings besteht hier noch enormer Entwicklungsbedarf, um eine Vielzahl unterschiedlicher Materialien und somit Selektivitäten der Hochtemperatur-HPLC zugänglich zu machen.

### **Danksagung**

Die in diesem Beitrag vorgestellten Ergebnisse basieren auf mehreren Projekten der Industriellen Gemeinschaftsforschung. Die Forschungsvorhaben 14514 N und 16120 N wurden bzw. 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. Der Dank gilt darüber hinaus den Firmen IGAM mbH sowie Shimadzu Europa GmbH für die Bereitstellung des Nexera UHPLC-Systems sowie Waters und Agilent Technologies für die Bereitstellung der Trennsäulen.

## Literatur

- [1] T. Teutenberg, High-Temperature Liquid Chromatography - A User's Guide for Method Development, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010.
- [2] T. Teutenberg, S. Wiese, P. Wagner, J. Gmehling, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8470.
- [3] T. Teutenberg, S. Wiese, GIT 55 (2011) 168.
- [4] T.C. Schmidt, M.A. Jochmann, Compound Specific Isotopic Analysis, RSC Publishing, Cambridge, 2011, in preparation.
- [5] M.A. Jochmann, D.M. Kujawinski, L. Zhang, T.C. Schmidt, T. Teutenberg, S. Wiese, B. Fischer, H. Bettermann, GIT 54 (2010) 182.
- [6] T. Teutenberg, S. Wiese, P. Wagner, J. Gmehling, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8480.
- [7] SIM - Scientific Instruments Manufacturer GmbH, SIM HT Säulenofen, [http://www.sim-gmbh.de/index.php?option=com\\_content&task=view&id=64&Itemid=502&lang=de](http://www.sim-gmbh.de/index.php?option=com_content&task=view&id=64&Itemid=502&lang=de), letzter Zugriff: April 2011.
- [8] S. Wiese, T. Teutenberg, T.C. Schmidt, Anal. Chem. 83 (2011) 2227.