

## Potenziale und Anwendung der umfassenden zweidimensionalen Flüssigkeitschromatografie

*Dr. Thorsten Teutenberg, Jakob Haun, Juri Leonhardt, Christoph Portner*

*[Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V. \(IUTA\)](#), Bliersheimer Str. 58-60, D-47229 Duisburg*

### Einleitung

Die Etablierung der Massenspektrometrie (MS) hat vielen Anwendern in den letzten Jahren deutlich vor Augen geführt, dass die Chromatografie einen wesentlichen Beitrag zur Reduzierung der Ionensuppression leisten kann [1]. Vor diesem Hintergrund hat eine wahre „Renaissance“ der chromatografischen Trenntechniken, auch oder insbesondere in Verbindung mit der Massenspektrometrie, stattgefunden. Parallel zur Einführung der UPLC-Technologie im Jahre 2004 haben sich vornehmlich akademische Gruppen mit der Fragestellung beschäftigt, wie die Peakkapazität auf Basis der zweidimensionalen Flüssigkeitschromatografie deutlich erhöht werden kann, um immer komplexere Proben zu analysieren [2].

### Entwicklung des multidimensionalen Systems

Bei der umfassenden zweidimensionalen Flüssigkeitschromatografie (LC x LC) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem zwei Säulen so miteinander gekoppelt werden, dass das Eluat aus der ersten Trennsäule fraktioniert auf eine zweite Trennsäule übertragen wird. Das allgemeine Prinzip kann der in Abbildung 1 dargestellten Prinzipskizze entnommen werden.

In der „Continuous-flow Technik“, die in Abbildung 1 schematisch anhand einer möglichen Ventilkonfiguration dargestellt ist, bleibt der Fluss der ersten Trenndimension über die ganze Messung hinweg kontinuierlich bestehen. Das Modulationsventilsystem teilt lediglich das Eluat alternierend auf zwei Probenschleifen auf. Während die eine Probenschleife befüllt wird, wird das Eluat, welches zuvor in der anderen Probenschleife gesammelt wurde, auf die zweite Trennsäule übertragen. Durch Umschalten des Modulationsventils (5) wird genau die jeweils andere Probenschleife befüllt bzw. in die zweite Trenndimension entleert. Die experimentelle und technische Schwierigkeit der „Continuous-flow LC x LC“ besteht darin, das inhärente Zeitgesetz zwischen der Zykluszeit in der zweiten Trenndimension sowie der Sammelzeit des Eluates im Modulator zu lösen.

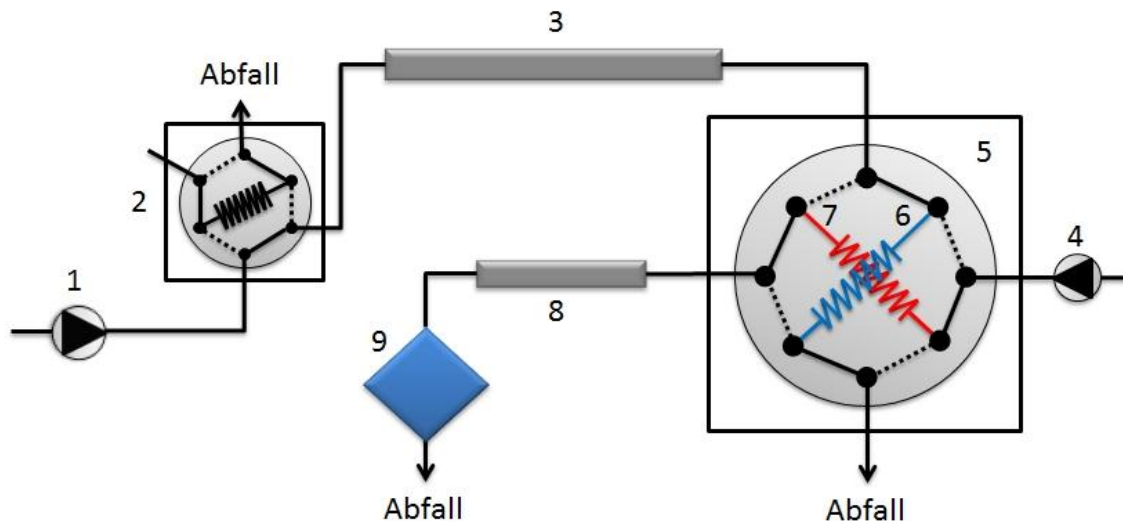


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Continuous-flow Technik.  
 1: Pumpe (erste Dimension), 2: Injektor, 3: Trennsäule (erste Dimension),  
 4: Pumpe (zweite Dimension), 5: Modulationsventil, 6 + 7: Probenschleifen,  
 8: Trennsäule (zweite Dimension), 9: Detektor.

Die Zeit für die Trennung in der zweiten Dimension inklusive der Zeit für die Re-Equilibrierung der stationären Phase nach einem Lösungsmittelgradienten darf nicht mehr Zeit in Anspruch nehmen als die Befüllung der Probenschleife im Modulationsventil, da ansonsten das Volumen der Probenschleife erschöpft und überschüssiges Eluat der ersten Dimension in den Abfall geleitet wird. Je größer diese Zykluszeit oder auch Modulationszeit ist, desto größer muss die Probenschleife sein und desto größer ist auch das Transfervolumen, was wiederum eine Reduzierung der Peakkapazität nach sich ziehen kann.

Der Vorteil der umfassenden zweidimensionalen LC x LC im Vergleich zu eindimensionalen Verfahren liegt darin, dass die Peakkapazitäten beider Trenndimensionen multipliziert werden können. Die Voraussetzung hierfür ist, dass sich beide Trenndimensionen orthogonal zueinander verhalten. Es muss kritisch angemerkt werden, dass diese Voraussetzung in der Praxis nie erfüllt wird.

Obwohl es eine Vielzahl von Beispielen aus dem akademischen Umfeld zum Thema LC x LC gibt, haben nahezu alle beschriebenen Verfahren den Nachteil, dass die Kompatibilität mit der Massenspektrometrie nicht gegeben ist. Der Grund ist in der extrem hohen Flussrate in der zweiten Trenndimension zu sehen, um kurze Zykluszeiten zu erzielen. Vor diesem Hintergrund bestand die Aufgabe eines kürzlich abgeschlossenen Forschungsprojektes unter anderem darin, die Trenneinheit zu miniaturisieren. Abbildung 2 fasst die Bausteine des multidimensionalen Systems, wie es innerhalb des Forschungsvorhabens umgesetzt wurde, plakativ zusammen.

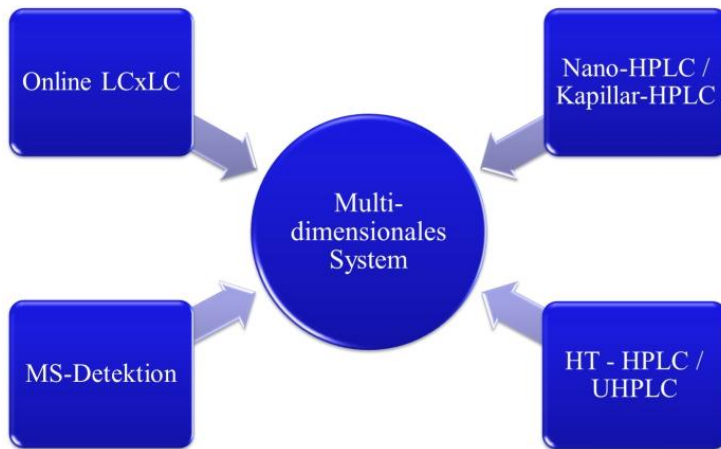


Abbildung 2: Schematische Darstellung des multi-dimensionalen Systems.

Als Detektionsverfahren sollte die hochauflösende Massenspektrometrie eingesetzt werden, da die Analyse komplexer Gemische im Vordergrund steht und die Möglichkeit gegeben sein soll, auch unbekannte Verbindungen anhand ihrer exakten Masse zu identifizieren. Dem Problem der Kompatibilität zwischen der chromatografischen Einheit und dem massenspektrometrischen Detektor

soll durch die Verwendung von Nano- und Kapillarsäulen in der ersten und zweiten Trenndimension begegnet werden. Die Flussrate, die in das MS geleitet wird, kann somit auf  $50 \mu\text{L min}^{-1}$  begrenzt werden. Über die Parameter Druck und Temperatur lassen sich weitere Nachteile klassischer zweidimensionaler Verfahren beheben. Die Anwendung höherer Temperaturen insbesondere in der zweiten Trenndimension kann Lösemittelleffekte kompensieren, wenn unterschiedliche mobile Phasen in der ersten und zweiten Trenndimension verwendet werden. Die Anwendung hoher Drücke in Kombination mit höheren Temperaturen führt zu einer extremen Beschleunigung des chromatografischen Trennprozesses in der zweiten Dimension ohne Verlust an Effizienz. Durch Nutzung von teilporösen Partikeln (fused-core) kann die lineare Fließgeschwindigkeit zusätzlich erhöht werden.

Abbildung 3 zeigt nun die Kopplung zwischen dem verwendeten Eksigent Nano LC-Ultra 2D-System sowie dem AB Sciex TripleTOF 5600 Massenspektrometer.

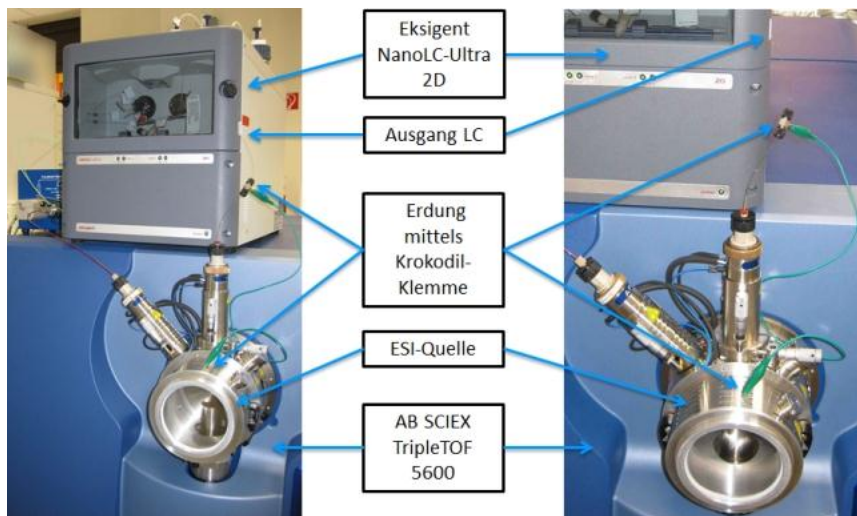


Abbildung 3: Versuchsaufbau der umfassenden LC x LC-TOF-MS Kopplung auf Basis der Eksigent NanoLC-Ultra 2D und des AB Sciex TripleTOF 5600.

Besonders wichtig bei der Verwendung von Säulen mit einem Innendurchmesser zwischen 75 µm und 300 µm ist es, die Totvolumina zwischen allen Bauteilen des Systems weitestgehend zu reduzieren. Der Vorteil des Eksigent Systems besteht in der kompakten Anordnung der beiden 10-Port Ventile und der Pumpenausgänge, so dass beide Trennsäulen auf kürzestem Wege miteinander verbunden werden können. Wie anhand des Versuchsaufbaus in Abbildung 3 zu erkennen ist, wurde die Erdung über einen Metallverbinder zur Elektrosprayquelle mittels Krokodilklemme realisiert. Dies war zur Vermeidung von Peakverbreiterungen durch zu lange Wege zwischen dem Ausgang der Säule und dem Einlass in die Quelle des Massenspektrometers bei Verwendung der vorgesehenen Quellenerdung notwendig.

In Abbildung 4 ist das Totalionenstrom-Chromatogramm einer Pool-Staubprobe gezeigt. Neben der Weiterentwicklung von analytischen Trenntechniken beschäftigt sich das IUTA sehr intensiv mit Fragestellungen aus der Innenraumhygiene. Hausstaub ist nicht nur eine komplexe Matrix, sondern dient auch als Passivsammler für mittel- bis schwerflüchtige Substanzen. Die Anreicherung dieser Stoffe aus Wohnräumen kann u. a. als Indikator herangezogen werden, ob eine mögliche Belastung der Bewohner durch toxische Substanzen vorliegt [6, 7].

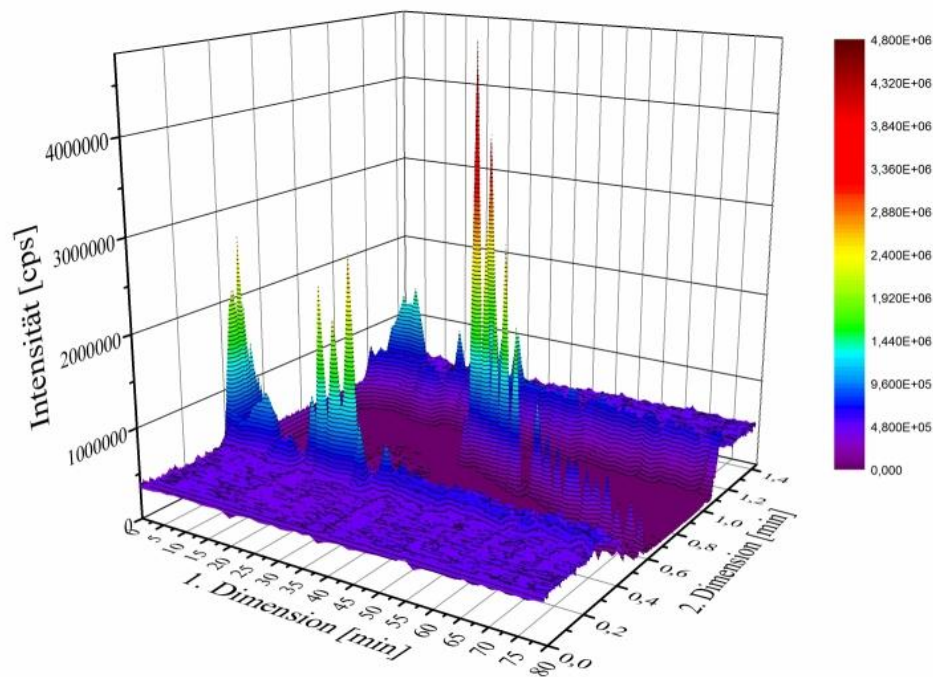


Abbildung 4: 3D-Plot – TIC-Chromatogramm einer Pool-Staubprobe.

Die Interpretation des in Abbildung 4 dargestellten TIC-Chromatogramms ist recht komplex, denn erst durch Dekonvolution in einzelne Massenspuren können alle Substanzpeaks dargestellt werden. Da es für die in diesem Beitrag beschriebene Kopplung keine herstellerseitige Softwarelösung gibt, die generierten zweidimensionalen MS-Daten automatisch auszuwerten, wurde auf selbst erstellte Makros zurückgegriffen [3]. Anhand des TIC-Chromatogramms lassen sich erste Aussagen bez. der Retentionsmechanismen treffen. In der ersten Trenndimension wurde eine Hypercarb-Säule verwendet, die aus reinem grafitisiertem Kohlenstoff besteht. Diese bietet den Vorteil, dass größere Volumina injiziert werden können und gleichzeitig auch polare Komponenten eine deutliche Retention erfahren [4]. In der zweiten Trenndimension wurde eine Umkehrphase mit teilporösen Partikeln und einem Innendurchmesser von 300 µm verwendet, um hohe lineare Fließgeschwindigkeiten zu erzielen. Auffällig ist, dass die inverse Diagonale im 3D-Plot auf einen deutlichen Unterschied in den Trennmechanismen der beiden stationären Phasen hinweist. Während die polaren Komponenten zu Beginn der Trennung in der zweiten Dimension zunächst keine Retention erfahren, kehrt sich dieser Mechanismus nach ca. 35 Minuten um. Komponenten, die auf der Hypercarb-Phase nur moderat retardiert werden, erfahren auf der RP-Säule plötzlich eine deutlich ausgeprägtere Retention. Im weiteren Verlauf der chromatografischen Trennung nimmt die Retention auf der RP-Phase dann wieder ab, während die Retention auf der Hypercarb-Phase zunimmt. Einen Erklärungsansatz hierfür bietet der sog. „Polar-Retention-Effect on Graphite“ [5].

Eine detailliertere Auswertung auf der Grundlage von Non-Target- bzw. General-Unknown Screenings ist grundsätzlich besonders anspruchsvoll. Die sehr großen Datenmengen bei der hochauflösenden MS liefern viele Informationen wie z. B. die Summenformel und zusätzlich bei MS/MS-Experimenten das Fragmentierungsmuster eines Analyten. Eine manuelle Auswertung kommt hierfür nicht in Frage. Hier muss eine intelligente Software eingesetzt werden, die in der Lage ist, Signale einzelner Substanzen erkennen und analysieren zu können.

## **Fazit**

Obwohl die zweidimensionale Flüssigkeitschromatografie auf Basis der Nano- und Kapillar-HPLC ohne Probleme mit hochauflösenden Massenspektrometern gekoppelt werden kann, sind weitere Modifikationen notwendig, um die umfassende LC x LC in Forschungslaboratorien als Werkzeug zur Charakterisierung komplexer Proben zu etablieren. Wesentliche Schwachpunkte sind zur Zeit noch die fehlende integrative Softwaresteuerung und die intelligente



Datenauswertung der komplexen zweidimensionalen Chromatogramme. Es ist aber davon auszugehen, dass innerhalb der nächsten Jahre von Seiten der Hersteller auf diese Anforderungen reagiert werden wird, so dass einer breiten Nutzung dieser viel versprechenden Technologie nichts mehr im Wege steht.

## Danksagung

Die Autoren möchten sich bei folgenden Personen bzw. Institutionen bedanken. Das Forschungsvorhaben 15928 N der Forschungsvereinigung IUTA wurde 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.



Gefördert durch das



Darüber hinaus danken wir AB Sciex und Herrn Sven Stuke von Bayer CropScience für die Möglichkeit, Messungen am TripleTOF 5600 im Rahmen einer Demostellung durchzuführen. Julia Jasak danken wir für die freundliche Unterstützung und Hilfestellung bei der Kopplung des Eksigent Systems mit dem Massenspektrometer. Herrn Dr. Maier-Rosenkranz von der Firma Grace danken wir für die Unterstützung bei der Anfertigung maßgeschneiderter Kapillarsäulen.

## Literatur:

- [1] T.M. Annesley, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041.
- [2] I. Francois, K. Sandra, P. Sandra, *Anal. Chim. Acta* 641 (2009) 14.
- [3] J. Leonhardt, *Entwicklung einer umfassenden zweidimensionalen HPLC auf Basis von Nano- und Kapillarsäulen mit UV- und massenspektrometrischer Detektion*, Fachbereich Chemie, Niederrhein University of Applied Sciences, Krefeld, Germany, Master thesis, 2011.
- [4] A. Reeh, *Entwicklung einer Onlineanreicherung für die Multikomponentenanalyse von Arzneimitteln mittels HPLC-MS unter Verwendung einer Chromatographiesimulationssoftware*, Fachbereich Chemie, Niederrhein University of Applied Sciences, Krefeld, Germany, Master thesis, 2011.
- [5] C. West, C. Elfakir, M. Lafosse, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3201.
- [6] C. Portner: *Entwicklung flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischer Methoden zum Nachweis von Mykotoxinen im Hausstaub*. Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften, Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg, Dissertation, 2012.
- [7] W. Butte, B. Heinzow, *Rev Environ Contam Toxicol* 175 (2002) 1.