

Ultraschnelle HPLC-Trennungen

Ausgewählte Applikationen

In den letzten Jahren hat auf dem Gebiet der Flüssigchromatographie ein wahrer Wettlauf zwischen den Geräteherstellern eingesetzt. Jedes Jahr wird ein neues System vorgestellt, das die Spezifikationen der übrigen Hersteller überbietet. Hiermit wird der Forderung nach schnellen und ultraschnellen Trennungen begegnet. Ein großer Vorteil von HPLC-Systemen mit erweitertem Druckbereich liegt eindeutig in der Verwendung kurzer Säulen, die mit kleinen Partikeln gefüllt sind. Hierdurch lassen sich konventionelle Methoden, die z. B. eine Laufzeit von 30 Minuten haben, signifikant beschleunigen. Neben dem erweiterten Druckbereich ist insbesondere das stark reduzierte Systemtotvolumen bzw. Gradientenverweilvolumen der ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) Systeme als eindeutiger Vorteil zu sehen. Nur auf diese Weise lassen sich auch tatsächlich schnelle Lösungsmittelgradienten realisieren. Konventionelle HPLC-Systeme haben häufig ein Gradienten-Verweilvolumen zwischen 0,5 und 1,0 ml, bei älteren Systemen kann dieses auch noch wesentlich größer sein. Ausgehend von einer Flussrate von $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ ergibt sich somit für den Lösemittelgradienten eine Verzögerungszeit von 0,5–1,0 Minuten. Wird die Flussrate deutlich reduziert, wie dies z. B. bei der Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie im Elektrospraymodus der Fall ist, kann die Verzögerungszeit auch zwei bis vier Minuten betragen, wenn die Flussrate z. B. auf $0,25 \text{ ml min}^{-1}$ eingestellt wird. Eine schnelle Trennung mittels Lösemittelgradientenelution ist damit per definitionem nicht möglich, egal ob kurze oder lange Säulen verwendet werden, da auch noch die Zeit für die Reequilibration der Trennsäule berücksichtigt werden muss.

Die Einführung der UHPLC-Technologie hat dazu geführt, dass in zunehmendem Maße Säulen mit einem Innendurchmesser von 2,1 mm eingesetzt werden [1]. Dies bietet den großen Vorteil, dass der Lösemittelverbrauch reduziert werden kann. Die Nutzung von Säulen mit einem Innendurchmesser von 1,0 mm wird in vielen Routinelaboratorien allerdings nicht in Erwägung gezogen, da diesen Säulen immer noch eine geringe Effizienz nachgesagt wird. Leider wird dabei häufig vergessen, dass die Konfiguration konventioneller HPLC-Systeme für die Nutzung dieser Säulen nicht geeignet ist.

In der vorliegenden Studie stand deshalb die Fragestellung im Vordergrund, inwieweit die Nutzung von Säulen mit einem Innendurchmesser von 1,0 mm auf einem modernen UHPLC-System der Firma Shimadzu (LC-30A Nexera) möglich ist. An zwei ausgewählten Applikationsbeispielen wird die Leistungsfähigkeit dieses Systems aufgezeigt, wobei die Trennungen am oberen Druck- und Temperaturlimit der Säulen und des HPLC-Systems durchgeführt wurden.

Abbildung 1 zeigt die Trennung von drei Steroiden unter isokratischen Bedingungen mit einer mobilen Phase aus Wasser und Acetonitril 60/40 (v/v) auf einer Agilent Zorbax SB C-18 Trennsäule ($50 \times 1,0 \text{ mm}$, $1,8 \mu\text{m}$). Die Flussrate betrug $1,1 \text{ ml min}^{-1}$, wobei ein Druck von 1140 bar resultierte. Die Temperatur wurde auf 90°C eingestellt, dies entspricht der durch den Säulenhersteller angegebenen Maximaltemperatur. In Tabelle 1 sind die Standardabweichungen der Peakflächen und Retentionszeiten angegeben. Das Injektionsvolumen betrug 100 Nanoliter und entspricht der kleinsten Injektionsmenge, die am Gerät eingestellt werden kann.

Wie anhand von Abbildung 1 deutlich wird, resultiert eine Gesamtlaufzeit von 0,35 min. Die

Zeit, die für die Vorbereitung der Injektion benötigt wird, kann durch den Fast-LC-Modus des Autosamplers auf ein Minimum reduziert werden. In diesem Fall wird die nächste Injektion bereits während des chromatografischen Laufs vorbereitet. Die Peakbreite an der Basis beträgt weniger als 2 sek, weshalb eine hohe Scangeschwindigkeit des Detektors erforderlich ist. Die Standardabweichung für die Retentionszeiten sowie für die Peakflächen beträgt weniger als 1,0% bzw. 2,3%. Obwohl die Abweichung für die Peakfläche relativ hoch erscheint muss berücksichtigt werden, dass gerade einmal 100 Nanoliter injiziert wurden.

In Abbildung 2 ist eine Trennung ausgewählter Aldehyd- und Keton-DNPH-Derivate gezeigt. Diese Trennung wurde im Lösungsmittelgradientenmodus durchgeführt, wobei ebenfalls mit einer mobilen Phase aus Wasser und Acetonitril chromatographiert wurde. Auch in diesem Beispiel wurden Gerät und Trennsäule wieder am oberen

Druck- und Temperaturlimit betrieben (1.005 bar bei 90°C). Der Gradientenverlauf ist zusätzlich in Abbildung 2 eingezeichnet. Das Gradientenverweilvolumen, das alle Bauteile zwischen der Pumpe und der Säule einschließt, wurde über einen experimentellen Fit auf $109 \pm 11 \mu\text{l}$ berechnet. Damit ergibt sich ein höherer Wert als durch den Hersteller spezifiziert. Allerdings bezieht sich der hier berechnete Wert auf alle Bauteile zwischen Pumpe und Säule vom Punkt der Mischung der beiden Lösungsmittel bis zum Säulenkopf. Bei einer Flussrate von $1,0 \text{ ml/min}$ bedeutet dies, dass der programmierte Lösemittelgradient mit einer Verzögerung von etwa sieben Sekunden an der Säule ankommt. Tabelle 2 fasst wiederum die analytischen Kenndaten für 18 Wiederholmessungen zusammen. Aufgrund der extrem hohen Lineargeschwindigkeit von ca. 4 cm pro Sekunde wird eine schnelle Equilibration der Trennsäule erreicht. Die Systemdurchflusszeit beträgt für diese Methode

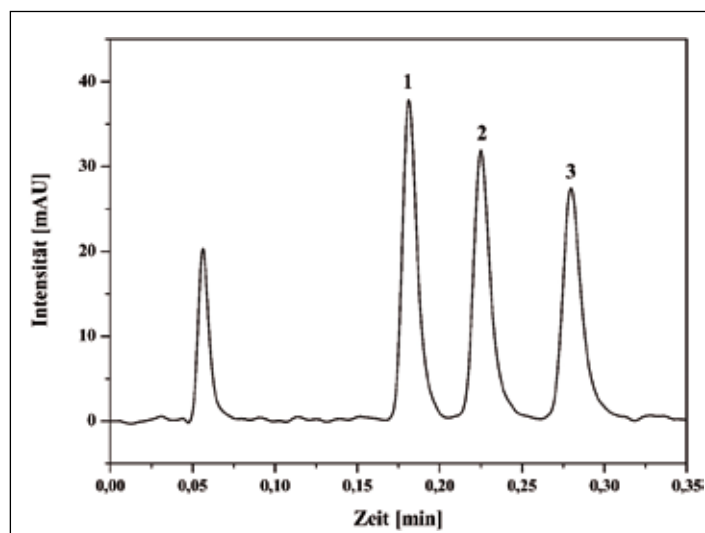


Abb. 1: Trennung von drei Steroiden. Detektion: 254 nm, Elutionsreihenfolge und Analyten: siehe Tabelle 1

Analyt	Elutionsreihenfolge	n ^a	RT [min]	SD RT [min]	Peakfläche [mAU*s]	SD Peakfläche [%]
19-Nortestosteron	1	20	0,181	0,0012	24144	1,9
Testosteron	2	20	0,224	0,0022	22442	2,0
Epitestosteron	3	20	0,279	0,0026	21825	2,3

^a Anzahl der Wiederholungsmessungen.

Tab. 1: Übersicht verschiedener chromatographischer und statistischer Kenngrößen der Steroid-Trennung. Dargestellt sind die Retentionszeit (RT) die Standardabweichung der Retentionszeit (SD RT) und die Standardabweichung der Peakfläche (SD Peakfläche).

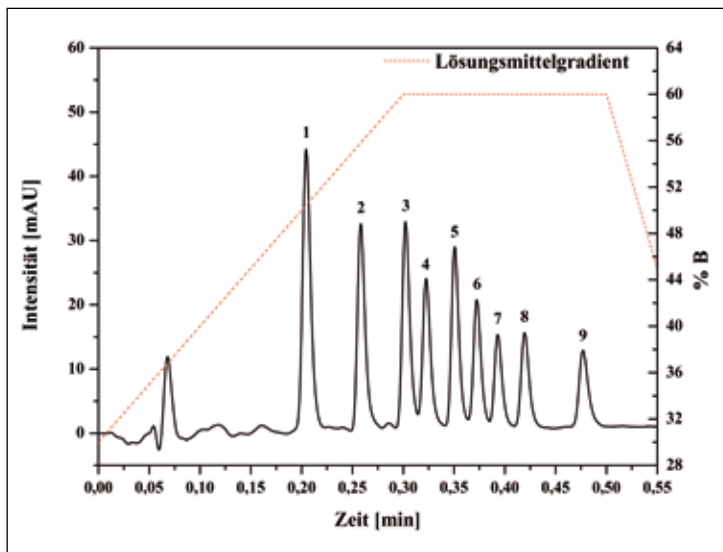


Abb. 2: Trennung von neun Aldehyd- und Keton-DNPH-Derivaten mittels Lösungsmittelgradient. Detektion: 254 nm (nach Lösungsmitteluntergrundsubtraktion), Elutionsreihenfolge und Analyten: siehe Tabelle 2

Analyt	Elutionsreihenfolge	n ^a	RT [min]	SD RT [min]	Peakfläche [mAU*s]	SD Peakfläche [%]
Formaldehyd-2,4-DNPH	1	18	0,204	0,0022	23895	2,7
Acetaldehyd-2,4-DNPH	2	18	0,257	0,0032	16497	2,5
Acrolein-2,4-DNPH	3	18	0,302	0,0030	16414	3,7
Propionaldehyd-2,4-DNPH	4	18	0,321	0,0028	11753	5,0
Crotonaldehyd-2,4-DNPH	5	18	0,350	0,0034	13974	2,9
Butyraldehyd-2,4-DNPH	6	18	0,372	0,0029	10439	4,5
Benzaldehyd-2,4-DNPH	7	18	0,393	0,0032	8008	3,5
Valeraldehyd-2,4-DNPH	8	18	0,420	0,0029	8502	3,6
Hexaldehyd-2,4-DNPH	9	18	0,477	0,0038	7711	2,6

^a Anzahl der Wiederholungsmessungen.

Tab. 2: Übersicht verschiedener chromatographischer und statistischer Kenngrößen der Aldehyd und Keton-DNPH-Trennung. Dargestellt sind die Retentionszeit (RT), die Standardabweichung der Retentionszeit (SD RT) und die Standardabweichung der Peakfläche (SD Peakfläche).

etwa 1,2 sek, so dass die Säule nach 12 sek mit 10 Säulenvolumina gespült wird.

Es stellt sich nun die Frage, inwieweit solche schnellen Trennungen tatsächlich in der Routineanalytik Anwendung finden. Anhand der vorgestellten Applikationsbeispiele wird ersichtlich, dass sich diese Art der Anwendung hervorragend für ausgewählte Fragestellungen in der Prozessanalytik eignen würde, wenn z. B. der Reaktionsverlauf online überwacht werden soll [2]. Darüber hinaus öffnet sich auch für die sog. umfassende zweidimensionale HPLC (LC × LC) ein neues Anwendungsgebiet [3,4]. Analog zur GC × GC, die bereits in der Routineanalytik Anwendung findet, muss bei der LC × LC das Problem gelöst werden, dass eine ultraschnelle Trennung im Gradientenmodus durchgeführt und gleichzeitig eine auch für die Massenspektrometrie geeignete Flussrate gewählt wird. Obwohl verschiedene Hersteller bereits Systeme anbieten, die für die umfassende 2D-HPLC geeignet sind, ist der teilweise recht hohe Lösemittelverbrauch als besonders negativ anzusehen, da oftmals Flussraten bis zu 5 ml min⁻¹ angewendet werden. Die Reduzierung des Innendurchmessers der Trennsäule und die Anpassung der Flussrate stellen laut Meinung der Autoren ein wichtiges Kriterium dar, diese viel versprechende Technologie in breiterem Umfang einzusetzen. Ein von IUTA zurzeit in einem Forschungsvorhaben der industriellen Gemeinschaftsforschung bearbeitetes Projekt befasst sich insbesondere mit der Kopplung einer zweidimensionalen HPLC-Trennung mit massenspektrometrischen Detektoren, wobei allerdings eine weitere Miniaturisierung des Gesamtverfahrens angestrebt wird (IGF FV-Nr. 15928 N/1). Auf Grundlage der hier gezeigten Applikationsbeispiele wird ersichtlich, dass das Konzept der Ultrahochdruck- und Hochtemperatur-HPLC in Verbindung mit einer Reduzierung des Innendurchmessers der verwendeten Trennsäulen für die umfassende 2D-HPLC geeignet erscheint, ultraschnelle Gradiententrennungen unter Berücksichtigung der Kompatibilität mit der massenspektrometrischen Detektion durchzuführen.

Die Autoren bedanken sich bei der IGAM sowie der Shimadzu Europa GmbH für die Bereitstellung des Nexera UHPLC-Systems. Darüber hinaus gilt der Dank Agilent Technologies für die Bereitstellung der Trennsäulen.

Literatur

- [1] Nguyen D.T.T. et al.: J. Chromatogr. A 1167, 76 (2007)
- [2] Potter W. et al.: J. Chromatogr. A 786, 47 (1997)
- [3] Dugo P. et al.: J. Chromatogr. A 1184, 353 (2008)
- [4] Stoll D.R. et al.: J. Chromatogr. A 1122, 123 (2006)

KONTAKT

Dr. Thorsten Teutenberg
Steffen Wiese

Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.
Duisburg
Tel.: 02065/418-179
Fax: 02065/418-211
www.iuta.de