

Kopplungsverfahren in der HPLC

Autor: Dr. Stavros Kromidas

Was ist eine Kopplung?

Streng genommen, handelt es sich dabei um die - meist – On-line-Verbindung zweier Verfahren miteinander.

Beispielsweise erfolgt in einer HPLC-Anlage eine mehr oder weniger grobe Trennung eines komplexen Stoffgemisches; das gesamte Eluat oder bestimmte Fraktionen werden On-line, d. h. direkt über ein Interface, in einen Gaschromatographen geführt. Dort wird das Gemisch weiter in seine Bestandteile aufgetrennt. Oft schließt sich eine Identifizierung mittels Spektroskopie an.

Im täglichen Sprachgebrauch hat sich allerdings eingebürgert, im Wesentlichen die Detektion mit spektroskopischer Information nach einem üblichen Chromatographieverlauf als Kopplung zu bezeichnen, z. B. LC-MS-Kopplung, LC-NMR-Kopplung.

Bedeutung und Vorteile der Kopplungsverfahren

Die Bedeutung der Kopplungsverfahren nimmt seit Mitte der 1980er Jahre permanent zu, das Thema nimmt einen breiten Raum in internationalen Symposien über Chromatographie ein. In diesem Zusammenhang werden folgende Begriffe benutzt: Hyphenated Techniques, orthogonale Analysetechniken, 2D- oder mehrdimensionale Chromatographie, Chromatoskopie, Spektrographie. Die Kopplungsverfahren werden auch in den nächsten Jahren ein dominantes Thema in der Analytik bleiben.

Vorteile

1a) Kopplung zweier chromatographischer Verfahren miteinander.

Bei komplexen Stoffgemischen wie Naturstoffgemischen, Emulgatoren, Metaboliten, Polymergemischen mit Monomeren usw. ist oft die Selektivität (genauer: die Peakkapazität) eines chromatographischen Verfahrens nicht ausreichend, um alle Probenbestandteile aufzutrennen. Durch die On-line-Kopplung mit einem zweiten Verfahren, das nach einem möglichst unterschiedlichen Trennprinzip trennen soll, wird eine enorme Erhöhung der Trennkapazität erreicht. Z. B. mittels HPLC erfolgt eine (Vor-)Trennung nach Polaritäten und anschließend wird nach Molekülgröße mittels GPC getrennt. Durch die Kopplung multiplizieren sich die Peakkapazitäten, z. B.

HPLC:	Peakkapazität : 10
zweidimensionale DC:	Peakkapazität :10
Kopplung HPLC mit DC:	Peakkapazität :100

1b) Kopplung zweier unterschiedlicher Trenntechniken miteinander, z. B.

Gelelektrophorese	-	μ -HPLC/CLC
Mikrodialyse	-	μ -HPLC/Kapillarelektrophorese
HPLC	-	Immunoassay (Immunochematographie)

Obwohl unterschiedliche Trennprinzipien (z. B. Chromatographie gekoppelt mit einem enzymatischen Test) die Selektivität stark erhöhen, widmet man sich heute eher der Kopplung zweier chromatographischer Verfahren.

2) Kopplung Chromatographie-Spektroskopie, bzw. Chromatographie – spezifischer Detektion

Bei unbekanntem Proben hilft die On-line-Kopplung der Chromatographie mit der Spektroskopie oder der spezifischen Detektion (chemische- und Biosensoren) der Identifizierung. Dieser Weg wird heute eher gegangen als der oben beschriebene aufwendigere (Kopplung zweier Trennverfahren miteinander).

Es sind viele Kombinationen denkbar. Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über den heutigen Stand wieder.

Kopplungen chromatographischer Verfahren

Was?	Kommentar
LC-LC	Neuer Name für eine alte Technik: On-line-Kopplung eines Probenvorbereitungs- und eines Trennschrittes, z. B. Festphasenextraktion - HPLC-Trennung.
LC-GC	Bereits seit Anfang der 1980er Jahre in der Diskussion und ansatzweise im Einsatz, noch kein Durchbruch (Spezialist, Firma Gerstel).
LC-DC	Technisch und methodisch ausgereift, in der Umweltanalytik teilweise erfolgreich, noch nicht die Akzeptanz auf breiter Basis (Spezialist, Firma Camag).
LC-CE/CEC	Technisch - mit Einschränkungen – teilweise ausgereift, kann in der Zukunft evtl. in miniaturisierter Form interessant werden.
LC-GPC	Ausgereift, aussagekräftig, beschränkt sich auf ein relativ kleines Marktsegment in der Polymeranalytik (Spezialist, Firma PSS).
SFE-SFC, SFE-GC	Keine Kopplung im eigentlichen Sinne, sondern Automatisierung eines Probenvorbereitungsschrittes, sehr spezifisch, (noch) geringe Akzeptanz.

Kopplungen Chromatographie-Spektroskopie

GC-MS und GC-MS-MS	Die GC-MS-Kopplung war die erste Kopplung überhaupt, heute als Standardmethode anzusehen.
SFC-MS	Technisch ähnelt sie stark der GC-MS-Kopplung, seltener Einsatz.
LC-MS und LC-Multi MS	Die wichtigste Kopplung der LC nach dem DAD, s. u., ausgereift, mehrere Interfaces möglich, mittlerweile auch robust

und auf breiter Basis im Einsatz.

LC-MALDI	Ausgereift, in der Analytik von (Bio-)Polymeren und im F + E-Bereich oft unverzichtbar.
LC-UV(DAD)	Die erste Kopplung der LC mit der Spektroskopie, vielerorts die Standarddetektion, zwar angesehen aber nicht sehr aussagekräftig da UV-Spektren nicht sonderlich spezifisch.
SEC-IEC	Trennung von Proteinen zunächst durch Gelfiltration und anschließend mittels Ionenaustausch.
GPC-FTIR	Seit über zwanzig Jahren <u>der</u> Begleiter des forschenden Polymeranalytikers, sehr aussagekräftig.
LC-FTIR	Erst seit Beginn der 1990er Jahre in der Diskussion; Durch die Lösungsmittelbeschränkung relativ kleine Einsatzgebiete.
LC-NMR	Enormer Informationsgewinn, Geräte (noch) sehr teuer und betreuungsintensiv, die Nachweisgrenze geht ständig nach unten, in Forschungsbereichen wird sie immer wichtiger.
LC-AAS und LC-ICP	Durch lediglich eine Durchflußzelle ist ein jedes klassisches ICP- oder AAS-Gerät für die On-line-Kopplung umrüstbar, hohe Nachweisgrenze, noch recht selten anzutreffen.

Durch die Entwicklung der Mikrotechnik wird auch die Kopplungstechnik profitieren. Bei einer breiten Akzeptanz wird erwartet, dass die miniaturisierten und subminiaturisierten Kopplungssysteme, Mikro-Totalanalysen-Systeme, μ TAS, Chip-HPLC-MS in der chemischen Prozeßtechnik, Qualitätskontrolle, Medizin, Umweltanalytik und klinische Diagnostik verstärkt eingesetzt werden. Das wird allerdings noch einige Jahre dauern.

Wann werden welche Kopplungen gebraucht?

- 1) Chromatographie - Chromatographie
 - Trennung komplexer Stoffgemische ähnlicher Komponente, Erhöhung der Selektivität und somit der Auflösung.
- 2) Chromatographie - Spektroskopie
 - Identifizierung unbekannter Probenkomponente, Erhöhung der Spezifität bei gleichbleibender Auflösung.
- 3) Chromatographie-Chromatographie-Spektroskopie
 - Komplexe Trennung inkl. Identifizierung, Erhöhung sowohl der chromatographischen Auflösung als auch der Spezifität.

Applikationsbeispiele sind bei den Herstellern erhältlich, z. B. Camag für LC-DC, Thermo Electron, Agilent, Shimaolzu, Waters für LC-MS, Bruker für LC-NMR, PSS für GPC- und LC-FTIR.

Es ist außerdem verständlich, dass die Bereitschaft für Publikationen in der Industrie eher verhalten ist. Die gewonnenen Informationen sind meist für den eigenen Bedarf bestimmt, mancher Befund hat sich als äußerst brisant erwiesen. Ausführliche Beispiele über verschiedene Kopplungstechniken finden sich in: S. Kromidas (Hrsg.), HPLC richtig optimiert, Wiley-VCH, 2006, ISBN 3-527-31470-9.

Abkürzungen (Ausfühlicher Name in Klammer nur, wenn die Abkürzung für den englischen Begriff von der des deutschen differiert)

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
LC	Flüssigkeitschromatographie (Liquid Chromatography)
GC	Gaschromatographie
MS	Massenspektrometrie
FTIR	Fourier Transformations - Infrarot Spektroskopie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
DC	Dünnschichtchromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
SFE	Überkritische Extraktion (Super Fluid Extraction)
SFC	Überkritische Chromatographie (Super Fluid Chromatography)
MALDI	Matrix Assistent Laser Desorption Ionisation
AAS	Atom Absorptions Spektroskopie
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma (Induced Coupled Plasma) (Plasmaemissions-Spektrometrie)
SEC	Größen-Ausschluss-Chromatographie (Size Exclusion Chromatography)
GF	Gelfiltration
IEC	Ionenaustausch-Chromatoraphie (Ion Exchange Chromatography)