

# HPLC-GC-Kopplung in der Praxis: Theorie, Applikationsbeispiele und Ausblick

Marco Nestola, Erik Becker, Institut Kirchhoff, Berlin

## 1. Einleitung

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Online-Verbindung der chromatographischen Trenntechniken HPLC und GC. In Zeiten von UHPLC, Mikro- und NanoLC und den damit verbundenen immer kürzeren Analysenlaufzeiten, wird eine effektive Probenvorbereitung immer wichtiger. Nicht selten ist sie der zeitlimitierende Faktor und entscheidend für Probendurchsatz, Genauigkeit und Empfindlichkeit des Prüfverfahrens. Festphasenextraktion (SPE), Dünnschicht- oder Säulenchromatographie sind oftmals Bestandteil der Probenaufarbeitung. Ihnen ist gemein, dass die Trennung der Analyten von der Probenmatrix zumeist an kieselgel- oder polymerbasierten Materialien stattfindet. Vergleichbare Sorbentien werden aber auch in HPLC-Säulen als stationäre Phase verwendet. Es liegt demnach nahe, diese Aufreinigungsschritte durch eine analytische HPLC zu automatisieren. Dies kann prinzipiell auf zwei verschiedene Arten stattfinden, der Offline- sowie der Online-Technik. Bei der Offline-Technik werden die entsprechenden Fraktionen nach der HPLC-Trennung entweder manuell oder automatisch gesammelt und dann weiter verwendet. Ein Beispiel dafür stellt die automatisierte Gelpermeationschromatographie (GPC) zur Aufreinigung fetthaltiger Proben im Bereich der Pestizid- und Kontaminantenanalytik dar. Nach Injektion des Probenextraktes auf die GPC-Säule wird zeitgesteuert über einen Fraktionssammler die gewünschte Fraktion aufgefangen. Nachteilig an diesen Offline-Ansätzen ist, dass die erhaltene Fraktion verdünnt vorliegt und daher meist aufkonzentriert oder umgelöst werden muss. Selbst nach der manuellen Aufkonzentrierung wird nur ein kleiner Teil der Probe ins analytische System, z. B. LC oder GC, injiziert. Bei diesen Prozessen ist die Gefahr einer Kontamination nie gänzlich auszuschließen. Online-Kopplungen transferieren hingegen die gesamte aufgereinigte Fraktion und können so bessere Empfindlichkeiten erreichen bei verringriger Gefahr von Kontaminationen.

Besonders die Kopplung zwischen analytischen HPLC-Systemen und nachgeschalteter gaschromatographischer Trenntechnik erlebt jüngst eine Renaissance. Die Idee der Online-HPLC-GC-Kopplung ist nicht neu: Bereits Anfang der 1980er Jahre wurden erste Versuche auf diesem Gebiet unternommen. Die Verbindung dieser zwei Trenntechniken ist keinesfalls zufällig gewählt. Die Vorteile lassen sich kurz zusammenfassen:

- hohe Kapazität/Beladbarkeit der HPLC
- hohe Trennleistung der GC, schnelle Chromatographie (Fast-GC)
- automatisierte Probenreinigung
- Minimierung von Analytverlusten
- Minimierung von Verschleppungen oder Carry-Over
- Empfindlichkeitssteigerung durch Transfer kompletter Fraktionen
- kein Eindampfen oder Umlösen erforderlich (Verringerung der Gefahr möglicher Abbauprodukte oder Verunreinigungen)
- Wiederfindungen i.d.R. höher
- höherer Probendurchsatz

Die HPLC ist in der Lage wesentlich größere Probenmengen zu verarbeiten als dies ein GC-basiertes Verfahren leisten könnte. Weiterhin sind in der HPLC weitaus effektivere Aufreinigungen möglich als in der GC. Hochmolekulare Probenbestandteile, die ein GC-System massiv stören, sind in der flüssigen Phase meist kein Problem. Die zahlreichen HPLC-Trenntechniken (Normalphase, Umkehrphase, Größenausschluss) liefern zum Teil orthogonale Ergebnisse im Vergleich zur Gaschromatographie auf den üblichen Trennsäulen. Im Gegensatz dazu ist in der GC im Vergleich zur konventionellen HPLC eine signifikant höhere Trennleistung erzielbar. Auch die wesentlich flexibleren und universelleren Detektoren sind sehr vorteilhaft. Die HPLC kann demnach als Probenvorbereitung für die GC verstanden werden.

Ein Applikationsbeispiel, auf Grundlage der HPLC-GC-Kopplung, stellt die Bestimmung von Mineralölkontaminationen in Lebensmitteln und Verpackungen dar (siehe Anwendungsbeispiele, Pkt. 17). Bei dieser Applikation werden die Vorteile einer direkten Kopplung beider Trenntechniken schnell deutlich: Auf Basis der Normalphasen-HPLC wird durch die Verwendung einer Kieselgelsäule die Möglichkeit eröffnet, aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe voneinander und zudem von Matrixbestandteilen, wie z. B. großen Mengen an Triglyceriden, abzutrennen. Für eine Quantifizierung wird jede Kohlenwasserstofffraktion separat über eine kurze unpolare GC-Trennsäule weiter aufgetrennt und über einen Flammenionisationsdetektor (FID) detektiert. Der FID hat den enormen Vorteil gegenüber vielen Detektoren, dass ihm ein Quasi-Einheitsresponse zugrunde liegt und daher ohne aufwendige Standardkalibration oder bei Fehlen eines geeigneten Standards eine Quantifizierung ermöglicht wird. Kein Detektor in der HPLC bietet diese Möglichkeit.

Bis dato wurde diese Technik stets als zu komplex und fehleranfällig dargestellt. Es ist unbestritten, dass die Kopplung zweier komplexer Analysetechniken eine intensive Einarbeitungsphase beim Anwender voraussetzt. Dennoch hat sich gezeigt, dass bei gebührender Sorgfalt ein HPLC-GC-System in einem Dienstleistungslabor im Hochdurchsatz robust eingesetzt werden kann. Die Vorteile der minimierten Probenvorbereitung, die in vielen Applikationen nur noch aus dem Einwiegen der Probe besteht, überwiegen deutlich. In Zeiten, in denen immer mehr Proben in immer weniger Zeit analysiert werden müssen, ist eine Technik, die manuelle Vorarbeiten an der Probe auf ein Minimum reduziert und maximale Automatisierung bietet, von großem Interesse in vielen Institutionen.

Von zentraler Bedeutung bei der Kopplung dieser beiden Systeme ist die Transfertechnik. Die aufgereinigten Probenextrakte, d.h. Fraktionen der injizierten Probe müssen quantitativ von der HPLC in den GC transferiert werden, um analysiert werden zu können. Nicht selten sind diese Volumina zwischen 100 µL und 1 mL in verschiedensten Lösungsmittelgemischen. Verglichen mit einer in der Gaschromatographie üblichen 1 µL-Injektion stellt dies ein hundert- bis tausendfach größeres Volumen dar. Effiziente Techniken zur Lösungsmittelverdampfung in Echtzeit sind daher erforderlich. Die bekannten Verfahren werden im Folgenden dargestellt und die jeweiligen Vor- und Nachteile kurz dargelegt.

Dieses Kapitel soll dem Anwender eine kompakte Einleitung in die Fachthematik der HPLC-GC-Kopplung liefern, ohne dabei alle Prozesse allzu tief zu erklären. Die Anforderungen an die Gerätetechnik sowie Fallstricke an wichtigen Bauteilen wie Autosampler, HPLC und GC werden offengelegt. Hauptaugenmerk wird auf praktischen Tipps und Hilfestellungen liegen, um effektiv mit Online-HPLC-GC-Systemen arbeiten zu können.

## 2. Allgemeiner Aufbau

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Kopplung aus HPLC und GC bereits Anfang der 1980er Jahre angegangen worden. Besonders Konrad Grob mit seinem Team im Kantonalen Labor Zürich in der Schweiz haben diese Kopplungstechnik vorangetrieben. Zahlreiche internationale Veröffentlichungen und dezidierte Fachliteratur sind aus diesen Arbeiten entstanden. 1989 hat das Unternehmen Carlo Erba (später Thermo Scientific) sich der HPLC-GC-Technik angenommen und ein eigenständiges Produkt, den Dualchrom 3000, entwickelt. Es stellte die erste Komplettlösung aus Hard- und Software auf diesem Gebiet dar und war die instrumentelle Grundlage für unzählige internationale Veröffentlichungen unterschiedlichster Autorenteams aus ganz Europa [1, 2, 3]. Im Wesentlichen bestand der Dualchrom aus einer HPLC-Spritzenpumpe, mehreren 6- oder 10-Port-Ventilen und einem GC-System mit On-Column-Injektor sowie wählbaren analogen Detektoren. In leicht veränderter Form wird dieses System heute unter dem Namen LC-GC 9000 von der Brechbühler AG aus der Schweiz vertrieben (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Allgemeiner Aufbau eines LC-GC-Systems (LC-GC 9000 der Brechbühler AG)

Anhand dieses Systems lässt sich der Weg der Probe sehr einfach erläutern: Der entsprechende Probenextrakt wird über einen Autosampler in ein übliches HPLC-Injektionsventil mit Probenschleife eingespritzt und gelangt von dort aus auf die HPLC-Säule. Hier findet eine mehr oder weniger grobe Trennung eines komplexen Stoffgemisches statt. Bestimmte Fraktionen, die die Zielanalyten enthalten, werden durch ein Transferventil online, d.h. direkt über ein geeignetes Interface, in einen Gaschromatographen geführt. Die Lösungsmittelverdampfung ist bei diesem System mittels On-Column-Injektor realisiert, kann aber auch durch andere Verfahren, wie einen PTV, erfolgen. Ein drittes Ventil am System ist notwendig, um die HPLC-Säule rückspülen zu können. Die aufkonzentrierte Fraktion wird im GC weiter aufgetrennt und mittels frei wählbarer Detektoren (z. B. FID) quantifiziert.

Der eigentliche Transfer einer Fraktion von der LC in den GC kann zeit- oder signalgesteuert erfolgen. Die einfachere Variante besteht darin, innerhalb eines fest eingestellten Zeitfensters die gewünschte Fraktion zu überführen (siehe Abb. 2).

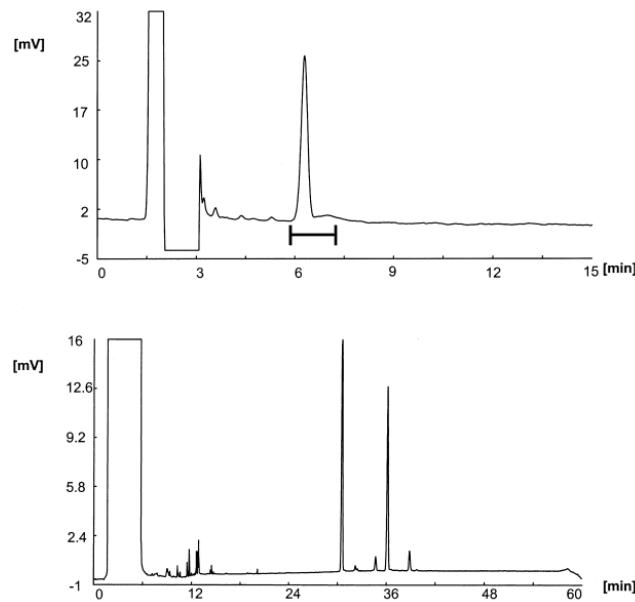


Abb. 2: Transfer eines fest eingestellten Zeitfensters von der LC in den GC  
(oben: LC-UV-Chromatogramm, unten: GC-FID-Chromatogramm der Fraktion – Ref. 2)

Eine dynamische, signalgesteuerte Variante bedient sich eines HPLC-Detektors. Der Transfer der Fraktion wird eingeleitet, sobald entweder ein bestimmter Schwellenwert im Signallniveau überschritten wird oder aber die Signalsteigung einen Schwellenwert überschreitet. Für kritische, zeitinstabile HPLC-Trennungen ist dieser Modus von Vorteil. Er stellt allerdings auch größere Anforderungen an die Hardware und vor allem die Software. Firmen, wie Axel Semrau, Agilent Technologies oder Shimadzu, bieten mittlerweile HPLC-GC-Systeme an, die als sog. „Komplettarbeitsplätze“ applikationsspezifisch als fertige Systemlösung angeboten werden.

### 3. LC-GC oder LCxGC - Heartcut vs. Comprehensive

Die grundlegende Idee bei einer Kopplung von HPLC und GC besteht darin, die Ziel-Analyten von interferierenden Matrixkomponenten auf der LC zu trennen. Im einfachsten Fall wird gezielt eine bestimmte Fraktion von wenigen hundert Mikrolitern Volumen geschnitten, die dann online in den GC übertragen wird (sog. Heartcut- oder (HP)LC-GC-Technik). Mittels einer so genannten Large-Volume-Injektion (LVI) wird diese Probenfraktion online aufgegeben, das Lösungsmittel entfernt und die Analyten möglichst diskriminierungsfrei in den GC überführt. Im Anschluss findet eine GC-Auftrennung und Detektion statt. Die Analyse gesamter LC-Läufe ist ebenfalls möglich, wenn gleich wesentlich aufwendiger (sog. Comprehensive- oder (HP)LCxGC-Technik). In diesen Fällen wird der gesamte HPLC-Lauf in zeitlich gleich große Volumeninkremente geteilt, die dann über die GC in die Bestandteile aufgetrennt und bestimmt werden. Aus den so erhaltenen Ergebnissen kann ein 2D-Chromatogramm erzeugt werden (Vergleich zu LCxLC- oder GCxGC-Techniken). Der Informationsgehalt solcher Chromatogramme ist enorm und erlaubt Aussagen über die Zusammensetzung hochkomplexer Proben. Für weitere theoretische Grundlagen wird auf dezidierte Literatur verwiesen [4]. Eine Veröffentlichung von Brinkman et. al. zeigt, wie eine umfassende LCxGC-

Technik zur Analyse von Ölen eingesetzt werden kann [5]. Die Umsetzung dieser Technik ist sehr anspruchsvoll, weil LC- und GC-Trennungen zeitlich aufeinander abgestimmt werden müssen. Wird beispielweise ein 1-Minuten-Volumenelement in den GC übertragen, dessen Trennung 20 Minuten dauert, müsste die LC während dieser 20 Minuten gestoppt werden, um die folgenden Volumenelemente nicht zu verwerfen. Diese Stopp-Flow-Technik ist zwar möglich, allerdings auch sehr zeitaufwendig. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die GC-Trennung massiv zu beschleunigen, um so eine echte Online-Kopplung zu ermöglichen. Es existieren Techniken, die komplette GC-Ofenprogramme in weniger als einer Minute möglich machen (sog. UltraFast-GC). Diese sind allerdings noch nicht flächendeckend etabliert und es existieren nur wenige marktreife Systeme. Weiterhin ist die Wahl möglicher Detektoren beschränkt.

#### 4. HPLC als Vortrennung für die GC

Bei der Wahl der geeigneten HPLC-Trenntechnik stehen folgende Fragestellungen im Mittelpunkt:

➤ **Selektivität**

Wie kann eine Abtrennung der Analyte von der Probenmatrix erfolgen?

➤ **Lösungsmittel-Kompatibilität**

Ist die gewählte mobile Phase geeignet, um in „Echtzeit“ eingeengt zu werden und auch kompatibel mit der GC-Trennsäule und dem Detektionssystem?

➤ **Empfindlichkeit, Kapazität**

Welche Dimension der HPLC-Säule wird für die angestrebten Nachweisgrenzen benötigt?

Während im Bereich der klassischen HPLC hauptsächlich Reversed-Phase-Techniken eingesetzt werden, ist dies bei einer GC-Kopplung nicht unbedingt empfehlenswert. Die Verdampfung wasserhaltiger Eluenten ist komplizierter und stellt höhere Anforderungen an die Gerätetechnik als die Verdampfung organischer Lösungsmittel. Wasser hat eine wesentlich höhere Verdampfungsenthalpie als andere Lösungsmittel und ist aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften (z. B. Oberflächenspannung) nur dann zu verwenden, wenn es keine Alternativen gibt. Weiterhin ist zu beachten, dass Wasser bei unsachgemäßer Handhabung GC-Trennsäulen irreparabel beschädigen kann. Dies macht die Verwendung von Reversed-Phase-HPLC-Systemen schwierig, sofern sie wasserhaltige Eluenten einsetzen. Dennoch wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels kurz beschrieben, wie diese Trennsysteme mit einigen Kompromissen trotzdem mit der GC gekoppelt werden können.

Die Dimension der HPLC-Säule ist so zu wählen, dass genügend Probenmaterial injiziert werden kann, um eine ausreichende Menge der Analyte auf der Säule von der Probenmatrix zu trennen. Wenn dies auf den ersten Blick auf die generelle Verwendung von 4,6 mm ID Säulen hindeutet, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass mit größeren Säulen auch die Flussrate höher gewählt wird und demnach auch die erhaltenen Analytfaktionen ein deutlich größeres Volumen einnehmen, welches im weiteren Verlauf der Trennung verdampft werden muss. Das andere Extrem stellen LC-Kapillarsäulen dar (75-500 µm ID), wie sie in Mikro- oder NanoLC-Systemen Anwendung finden. Sie ermöglichen extrem kleine Transfervolumina, haben allerdings im Umkehrschluss kaum Kapazität für Matrixbestandteile. Aus diesem Grund hat sich in der Praxis die Verwendung von 2 mm ID Säulen für klassische HPLC-Anwendungen als effizient herausgestellt. Sie stellen genügend Kapazität für

Matrixbestandteile bereit und werden mit Flussraten betrieben (etwa 200 - 500 µL/min), die Fraktionsgrößen erlauben, die kompatibel mit Echtzeit-Verdampfersystemen sind.

Es hat sich gezeigt, dass sich für die HPLC-Aufreinigung der Probe die Normalphasen-HPLC, NARP (Non aqueous reversed phase)-HPLC oder die Gelpermeationschromatographie (GPC) besonders eignen. Allen Techniken ist gemein, dass sie mit rein organischen Eluentenmischungen arbeiten und so das Problem der Wassereliminierung umgehen. Wird die Literatur der letzten Jahre betrachtet, so ist festzustellen, dass für LC-GC-Applikationen zu über 90 % nicht modifiziertes Kieselgel für die HPLC-Säulen eingesetzt wird. Als Eluent wird oft ein Alkan (n-Pentan oder n-Hexan) mit einem polaren Modifier (Dichlormethan, MTBE, Isopropanol, etc.) verwendet. Die HPLC wird demnach i.d.R. im Normalphasen-Modus betrieben. Nicht modifiziertes Kieselgel hat die Eigenschaft, große Mengen an Triglyceriden aufzunehmen und von unpolareren Analyten abzutrennen. Dieser Effekt ist Grundlage zur Lösung vieler Trennprobleme (Alkyl- und Wachsester, Kohlenwasserstoffe, PAK aus fetthaltigen Matrices). Im Gegensatz zu GPC-Säulen können Kieselgelsäulen signifikant höhere Matrixmengen aufnehmen ohne überladen zu werden. Weiterhin sind sie wesentlich toleranter gegenüber komplexen Probenmatrices und können effizient mit einer Vielzahl von Lösungsmitteln rekonditioniert werden ohne Schaden davonzutragen. Grob et al. haben 1991 Studien zu diesem Thema veröffentlicht und gezeigt, dass nicht modifiziertes Kieselgel für die Retention von Triglyceriden geeignet ist und so eine Abtrennung von den Analyten möglich wird, sofern diese unpolarer sind [6].

In der Literatur wird aufgrund nicht reproduzierbarer Retentionszeiten und unkontrollierter Adsorption verschiedener Probenbestandteile von der Verwendung reinen Kieselgels als Trennsorbens abgeraten [7]. Ursächlich für diese Probleme ist die Oberfläche des Kieselgels. Auf ihr existieren verschiedene inhomogen verteilte aktive Zentren, im Wesentlichen freie Silanolgruppen, die für die Retention verantwortlich sind. Frühere Generationen kieselgelbasierter HPLC-Säulen enthielten hohe Mengen an Metallkationen, die wiederum ihrerseits für ein undefiniertes Retentionsverhalten und Peak tailing verantwortlich waren (s. auch Kap.5). Modernes sphärisches Kieselgel zeigt wesentlich weniger tailing für aktive Komponenten. Auch der Kontakt mit Wasser wird als kritisch betrachtet, da dies das Retentionsvermögen von Kieselgel schnell einbrechen lässt. Selbst getrocknete, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel enthalten immer noch Spuren von Wasser (aus der Luftfeuchtigkeit). Die Praxis zeigt jedoch, dass dies weit weniger ein Problem ist als befürchtet. Vermutlich stellt sich auf den HPLC-Säulen ein Gleichgewicht ein, welches relativ konstant zu sein scheint und daher nicht für die angedeuteten Retentionszeitschwankungen sorgt. Dennoch ist penibel darauf zu achten, dass injizierte Proben frei von Wasser sind. Ist dies nicht der Fall, so kann die Retention für polare Komponenten (z. B. Triglyceride) zusammenbrechen. Diese eluieren dann deutlich früher. Gelangen die Triglyceride in die zu transferierende LC-Faktion, so kann dies Probleme im GC-Teil des Systems erzeugen.

Ein anderer Grund, der normalerweise gegen die Verwendung von Kieselgel spricht, ist die relativ lange Equilibrierungszeit, die benötigt wird, wenn polare Lösungsmittel mit dem Sorbens in Kontakt kommen. Dies erschwert auch die Benutzung von Gradiententechniken, da sich die polaren Bestandteile des Eluenten auf den Säulen anreichern können und so eine Entmischung des Gradienten zu beobachten ist (Solvent Demixing). Dieser Effekt wird in der Reversed-Phase-HPLC nicht in dem Ausmaß beobachtet wie in der Normalphasen-HPLC [8]. Dennoch gibt es einige wenige Lösungsmittelkombinationen, die erfolgreich für eine Gradiententrennung Anwendung finden (z. B. Hexan/Dichlormethan). Eine Rekonditionierung einer HPLC-Säule mit purem Hexan ist in relativ

kurzer Zeit (etwa 10 Min. für eine 2 mm x 250 mm Kieselgelsäule mit 500 µL/min) möglich. Sofern ein Gradient nicht mit dem puren unpolaren Eluenten starten muss, sind auch polarere Modifier für eine Gradiententechnik geeignet, da das erwähnte Solvent Demixing minimiert werden kann. Bereits bei den Startbedingungen hat sich eine stabile Konzentration des polaren Lösungsmittels auf der Oberfläche des Kieselgels eingestellt [8].

Wird die HPLC-Säule mit einer großen Menge Matrixbestandteilen beladen, die erhöhte Retention auf dem verwendeten Material aufweisen, so ist es meist von Vorteil, die Säule nach erfolgtem LC-GC-Transfer automatisch bei jeder Analyse zurückzuspülen (sog. Backflush). Hoch retardierende Bestandteile können auf diese Weise effizient entfernt werden. Zum Startzeitpunkt der Rückspülung sollte auf einen HPLC-Eluenten höherer Elutionskraft gewechselt werden (z. B. Methyl-tert-butylether (MTBE) im Fall von Normalphasen-Chromatographie). Es ist zu beachten, dass nach der Rückspülung eine Rekonditionierung der Säule mit dem eigentlichen Eluenten notwendig ist. Es gelten hierfür die gleichen Regeln wie zuvor für die Gradiententechniken beschrieben.

## 5. Instrumentelle Anforderungen an die HPLC

Die Anforderungen an die eingesetzte HPLC-Hardware unterscheiden sich im Wesentlichen nicht von denen, die auch für jedes andere analytische HPLC-System heutzutage gestellt werden:

- reproduzierbare Flussraten
- minimale Totvolumina
- mögliche (binäre) Gradiententechnik
- alle Pumpen- und Detektorbauteile müssen mit organischen Lösungsmitteln kompatibel sein

Die Verwendung von Dichlormethan oder Tetrahydrofuran erfordert spezielle Pumpenteile, die nicht aus PEEK (Polyetheretherketon) oder anderen quellbaren Materialien bestehen dürfen. Weiterhin hat sich gezeigt, dass eine vollständige und reproduzierbare Durchmischung organischer Lösungsmittel in einem Niederdruckgradientensystem nicht sichergestellt werden kann. Viele Pumpensysteme enthalten außerdem vergleichsweise große Totvolumina, die die Verwendung von 2 mm ID Säulen bei Verwendung einer Gradiententechnik schwierig gestalten. Lange Gradientenansprechzeiten können Fraktionsvolumina vergrößern und LC-Trennungen stark erschweren.

In der Vergangenheit wurden hauptsächlich Spritzenpumpen für HPLC-GC-Techniken eingesetzt. Spritzenpumpen haben den inhärenten Vorteil, dass sie pulsationsfrei arbeiten und so reproduzierbare Förderraten auch bei kleinen Flüssen ermöglichen, ein Problem der ersten doppelkolbengetriebenen Pumpen. Weiterhin können sie in jeder Kolbenposition gestoppt und neu gestartet werden (effektiv für die Stopp-Flow-Technik in LCxGC-Anwendungen, siehe Pkt. 3). Trotzdem hat sich dieses Pumpkonzept im HPLC-Sektor nur vereinzelt durchgesetzt. Außer im Bereich der Mikro- sowie NanoLC werden flächendeckend Zweikolbenpumpen eingesetzt, die eine kontinuierliche Förderung des Eluenten ermöglichen. In den letzten Jahren hat sich durch elektronische Pulsdämpfung und weitere Designoptimierungen die Zuverlässigkeit dieser Kolbenpumpen aber deutlich verbessert, so dass auch kleine Flussraten von wenigen Mikrolitern pro Minute reproduzierbar gefördert werden können. Abbildung 3 zeigt die Genauigkeit eines aktuellen binären Hochdruckgradientensystems (Agilent 1260 Infinity).

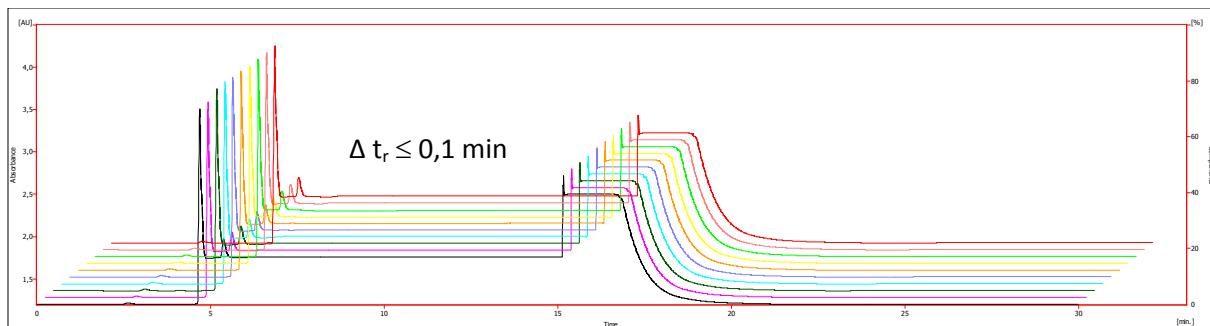


Abb. 3: LC-UV-Chromatogramme bei der Bestimmung von Mineralölkohlenwasserstoffen zur Verdeutlichung der Genauigkeit eines binären Hochdruckgradientensystems

Wie ersichtlich ist, wird trotz Verwendung einer Normalphasen-Gradiententechnik eine Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten ( $t_r$ ) von unter 0,1 Minuten erreicht. Diese Genauigkeit ist vollkommen ausreichend um präzise Retentionszeitfenster für den Transfer einer Fraktion in den GC zu definieren.

Die Einbindung eines HPLC-Detektors in das Gesamtsystem ist von Vorteil. Während in der Methodenentwicklung das HPLC-System so auch stand-alone genutzt werden kann, um die LC-Trennung zu optimieren, ist im LC-GC-Routinebetrieb eine Verfolgung der korrekten Fraktionstransfers möglich.

## 6. LC-GC-Transfer & Echtzeit-Verdampfung

Die über die HPLC gereinigte Fraktion muss im weiteren Verlauf eingeengt werden, um GC-kompatibel zu werden. Zu diesem Zweck existieren verschiedene Verfahren. Die Übertragung der LC-Fraktion in den GC ist vergleichbar mit der Injektion großer Volumina mit einer Spritze. Die Lösungsmittelverdampfungstechniken sind daher in großen Teilen vergleichbar. Es können an dieser Stelle nicht alle Techniken im Detail erläutert werden. Die gebräuchlichsten Techniken werden im Folgenden kurz vorgestellt. Für weitere Fragestellungen muss an dieser Stelle auf die Literatur verwiesen werden [9].

Zur Anbindung einer HPLC an einen GC ist die gebräuchlichste Variante die Verwendung eines 6-Port-Rotationsventils (siehe Abb. 4).

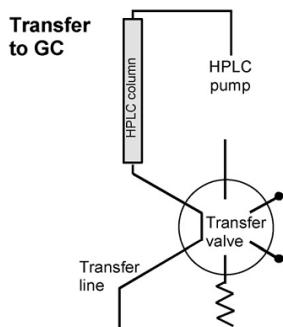


Abb. 4: Verbindung zwischen HPLC und GC durch ein 6-Port-Transferventil (Ref. 15)

Hier wird der Ausgang der HPLC über das Transferventil entweder direkt in den GC geleitet oder aber in Richtung des Lösungsmittelabfalls. Da nach Beendigung eines Transfers in den GC die Transferkapillare, üblicherweise eine dünne Fused-Silica-Kapillare, noch mit Eluent gefüllt ist, muss

diese mit Trägergas zurückgespült werden. Wird dies nicht durchgeführt, kann es zu einem starken Lösungsmittelpeak tailing am GC-Detektor kommen. Eine Rückspülung dieser Leitung gegen den Widerstand einer Restriktionskapillare durch das Trägergas des GC-Injektors ist sehr einfach zu realisieren. Eine Restriktionskapillare mit einem Durchmesser von etwa 50 - 75 µm ist ausreichend, um einerseits den Resteluenten zu entfernen, aber andererseits noch genug Trägergasfluss auf die eigentliche GC-Trennsäule zu ermöglichen. Da das Eluat in der Transferline etwa ein Volumen von 1-2 µL einnimmt (je nach Transferkapillare) und LC-Fraktionen üblicherweise mehrere hundert Mikroliter groß sind, ist mit keinem nennenswerten Analytverlust oder Carry-Over zu rechnen, sofern ein korrektes Fraktionsfenster gewählt wurde.

## 7. PTV-Solvent-Split

PTVs (Programmed Temperature Vaporizer) sind heutzutage in vielen GCs standardmäßig verbaut und können somit schnell für erste HPLC-GC-Experimente eingesetzt werden (siehe Abb. 5). Im Vergleich zu herkömmlichen Split/Splitless-Injektoren können diese Injektoren unabhängig vom GC beheizt und gekühlt werden. Das Injektionsvolumen bei Split- oder Splitless-Verfahren ist beschränkt durch das Volumen des Gases, welches die injizierte Flüssigkeit nach der Verdampfung einnimmt. Während dieses Prozesses kommt es zu einer Expansion auf etwa das 500 - 1000-fache, d.h. eine 1 µL-Injektion erreicht nach Verdampfung ein Volumen von 500 µL und mehr [10]. Das genaue Expansionsverhältnis ist vom verwendeten Lösungsmittel abhängig. Ein extremes Beispiel stellt Wasser dar: 1 µL Wasser generiert mehr als 1 mL Wasserdampf.

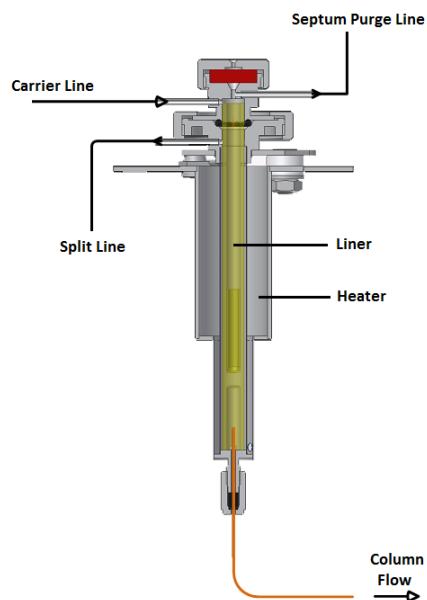


Abb. 5: Schematische Darstellung eines PTV-Injektors (ATAS GL OPTIC-4 Multiinjektor)

Wird der Injektor-Liner überladen, so ist eine reproduzierbare Überführung der Analyten in die GC-Säule nicht mehr sichergestellt, stattdessen expandieren die entstandenen Gase unkontrolliert in die Trägergas-, Split- und Septum-Purge-Leitungen und können so für Memory-Effekte oder Carry-Over sorgen.

Die PTV-Solvent-Split-Technik umgeht dieses Problem dadurch, dass die Temperatur des PTV während der Injektion unterhalb des Siedepunkts des Lösungsmittels gehalten wird und mit einem

hohen Trägergasstrom das Lösungsmittel abgeblasen bzw. verdampft wird. Vereinfacht kann dieser Sachverhalt durch die folgende Gleichung ausgedrückt werden [11]:

$$V_{inj,max} = V_{el} = \frac{M p_a}{\rho R T_o} \frac{p_o}{p_i} V_{t,o}$$

$V_{inj,max}$ : Maximale Injektionsgeschwindigkeit ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )

$V_{el}$ : Verdampfungsgeschwindigkeit ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )

M: Molmasse des Lösungsmittels (g/mol)

$p_a$ : Partialdruck des Lösungsmittels, abhängig von der Injektortemperatur (Pa)

$\rho$ : Dichte des Lösungsmittels ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )

$p_o$ : Druck außerhalb des Injektors (Pa)

$p_i$ : Druck im Injektor (Pa)

$V_{t,o}$ : Gesamtgasfluss durch den Injektor ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )

R: Universelle Gaskonstante ( $\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )

$T_o$ : Temperatur außerhalb des Injektors (K)

Die obige Gleichung ist unter der Annahme gültig, dass eine vollständige Sättigung des Trägergases mit Lösungsmittel gegeben ist und die Verdampfung isotherm erfolgt. Beide Annahmen entsprechen nicht der Realität, bieten jedoch einen guten Anhaltspunkt, um einen ersten Eindruck für die mögliche Injektionsgeschwindigkeit zu bekommen. In der Praxis hat sich eine Halbierung bis Drittteilung des theoretischen Werts als anwendbar erwiesen. Zusammengefasst gilt, dass eine Erhöhung der Injektionsgeschwindigkeit durch folgende Maßnahmen möglich ist:

- Erhöhung der Temperatur im Injektor  
(= Erhöhung des Partialdrucks des Lösungsmittels im Injektor)
- Erhöhung des Trägergasflusses durch den Injektor
- Reduktion des Drucks im Injektor

## 8. Geschwindigkeitskontrollierte Injektion

Im einfachsten Fall wird die Probe so schnell injiziert, wie die Dämpfe durch den Splitausgang mittels Trägergas abgeführt werden können. Im Fall einer LC-Kopplung, bei der der HPLC-Säulenausgang direkt in den PTV geführt werden kann, entspricht die Injektionsgeschwindigkeit der LC-Flussrate. Im Prinzip ist das Injektionsvolumen auf diese Weise unbeschränkt. Der große Nachteil dieser Technik besteht allerdings darin, dass während des Verdampfungsprozesses leicht- und mittelflüchtige Komponenten verloren gehen. Diese werden mit dem Lösungsmittel verdampft. Eine quantitative Retention der Analyte im Injektor ist am Beispiel eines n-Alkanstandards erst ab  $C_{18}H_{38}$  (Octadecan) zu erwarten [12]. Durch Senkung der Injektionstemperatur kann diesem Problem entgegen gewirkt werden. Sub-Ambient-Kühlungen durch cryogene Flüssigkeiten oder Peltier-Kühlung in PTV-Systemen sind jedoch sehr aufwendig und ineffizient. On-Column-Techniken sind in solchen Fällen vorzuziehen (siehe Pkt. 10). Eine Linerpackung mit Retentionskraft für organisches Material, wie z. B. Tenax TA, kann auch verwendet werden, um den Verlust leichtflüchtiger Komponenten zu verhindern oder die Einführung wässriger Eluenten zu ermöglichen, für die höhere Injektortemperaturen und Trägergasflüsse von Nöten sind. Jedoch ist dies mit der Gefahr verbunden, schwerflüchtige Komponenten nicht vom Packungsmaterial in den GC überführen zu können, weil die Retention zu hoch ist und auch durch erhöhte Injektortemperaturen nicht überwunden werden kann (z. B. Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe bei Verwendung von Tenax TA [13]).

## 9. At-Once-Injection/Rapid LV-Injection

Bei der At-Once-Injection wird die gesamte Probe mit relativ hoher Geschwindigkeit injiziert. Im Liner des Injektors ist ein inertes Packungsmaterial deponiert, welches das gesamte Lösungsmittelvolumen in flüssiger Form bei gegebenem Trägergasdruck aufnehmen kann. Durch die hohe Injektionsgeschwindigkeit und den permanent hohen Trägergasstrom ( $> 50 \text{ mL/min}$ ) kommt es zu einer rapiden Verdampfung des Lösungsmittels. Diese verbraucht eine große Energiemenge und führt so zu einer extrem schnellen Abkühlung des Liners. Diese Abkühlung fokussiert leichtflüchtige Komponenten, die bei einer geschwindigkeitskontrollierten Injektion verloren gehen würden. Übliche Injektorsysteme erlauben Injektionsvolumina bis etwa  $100 \mu\text{L}$ . Da die Injektionsgeschwindigkeit sehr hoch sein muss, ist eine Entkopplung vom LC-Fluss in den meisten Fällen erforderlich (siehe Abb. 6).

### LC-GC Sequence:

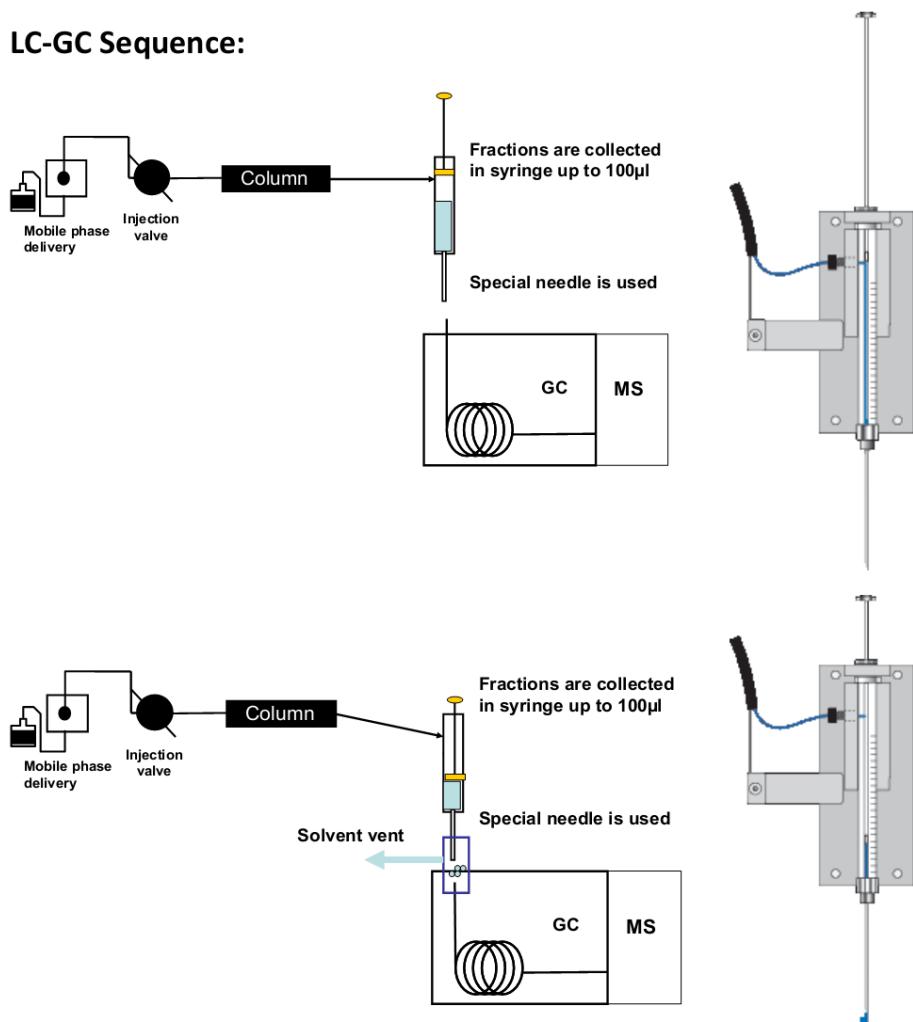


Abb. 6: Spritzenbasiertes LC-GC-Interface mit PTV im At-Once-Modus (Ref. ATAS GL)

## 10. On-Column-Techniken

Für Large-Volume-Injektionen und im Speziellen für HPLC-GC-Kopplungen haben sich in der Vergangenheit On-Column-Injektionstechniken bewährt, d.h. Verfahren, bei denen der LC-Eluent direkt in eine GC-Säule eingeleitet und dort verdampft wird. Ein separat beheiztes Verdampfungselement, wie einen PTV, gibt es in diesem Fall nicht. Die GC-Ofentemperatur wird hier für die Thermostatisierung genutzt. Der On-Column-Injektor ist im Wesentlichen nur eine Fixiereinheit für die GC-Säule, in die die Nadel der Injektionsspritze geführt ist (siehe Abb. 7). Damit

die Nadel der Spritze direkt in die Säule injizieren kann, ist die Verwendung von 0,32 mm oder 0,53 mm ID Säulen empfohlen. Spezielle Spritzen mit dünnerer Kanüle erleichtern das Injizieren weiterhin.

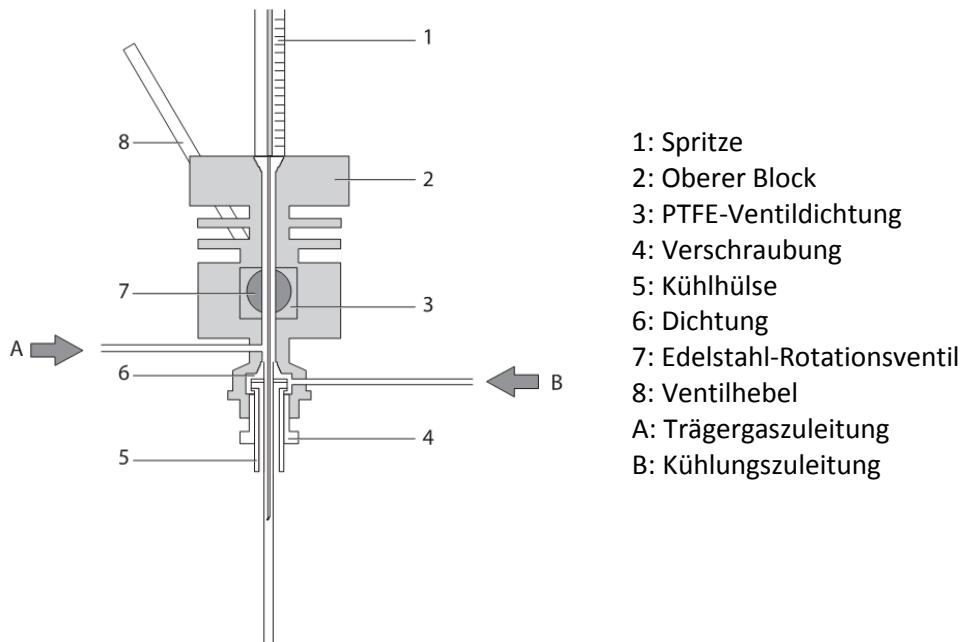


Abb. 7: Schematische Darstellung eines On-Column-Injektors (Ref. Thermo Scientific)

On-Column-Injektionstechniken sind bestens geeignet, um die gesamte LC-Fraktion diskriminierungsfrei in den GC zu überführen. Dies ist bei einem PTV nicht sichergestellt, da der Transfer der Analyte eine Verdampfung im Injektor voraussetzt. Schwerflüchtige Analyte können dabei diskriminiert werden [14]. Während allerdings ein Injektor im Gegenzug dazu dienen kann, nicht verdampfbares Material zurückzuhalten, werden diese Bestandteile bei einer On-Column-Injektion auf der GC-Säule deponiert und können so die Chromatographie nachhaltig beeinträchtigen. Für die HPLC-GC-Kopplung, bei der die LC dafür genutzt wird, um gerade diese Substanzen zu entfernen, ist diese Art der Injektion jedoch optimal geeignet.

Die einfachste Möglichkeit, eine HPLC mit einem GC zu verbinden, besteht darin, den Ausgang der HPLC-Säule (oder des HPLC-Detektors) über eine dünne Fused-Silica-Kapillare in den On-Column-Injektor zu führen (siehe Abb. 8). Vergleichbar mit einer Spritze wird die dünnere Kapillare in die GC-Säule eingeführt.

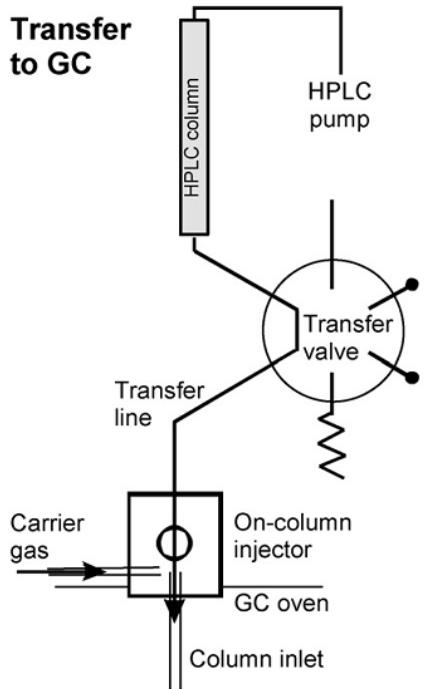


Abb. 8: Verbindung zwischen HPLC und On-Column-Injektor (Ref. 15)

Säulen mit einem Durchmesser von 0,53 mm sind für diesen Zweck sehr gut geeignet. Damit die Analytik auf dem GC nicht auf diese Megabore-Säulen beschränkt ist, empfiehlt sich aus mehreren Gründen die Verwendung einer unbelegten Vorsäule mit 0,53 mm Innendurchmesser. Diese wird mit einem Verbinder an die eigentliche GC-Trennsäule angekoppelt.

Auch wenn ein solches System praktisch anwendbar ist und auch bereits Grundlage des Carlo Erba Dualchrom 3000 war, entspricht es dennoch nicht dem optimalen Geräteaufbau. Wie Biedermann et. al. 2009 gezeigt haben, ist die permanente Installation einer Fused-Silica-Kapillare in einem On-Column-Injektor Grundlage für einen Memory Effekt in der Größenordnung von 0,5 - 3 % von Transfer zu Transfer [15]. Die Verwendung eines simpleren Aufbaus unter Auslassung des On-Column-Injektors ist zu bevorzugen. Das verwendete T-Stück übernimmt die wichtigste Aufgabe des Injektors, nämlich die Mischung von Trägergas und Injektionsvolumen (siehe Abb. 9).

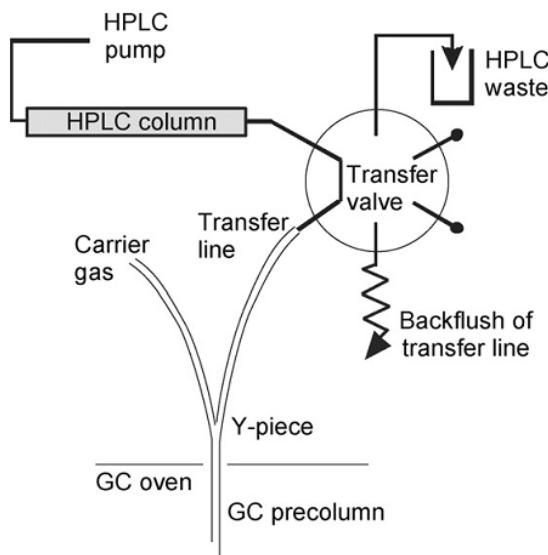


Abb. 9: Ersatz des On-Column-Injektors durch das Y-Interface (Ref. 15)

### 11. Alternative On-Column Transfertechniken

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass während der Entwicklung diffiziler LC-GC-Techniken auch andere On-Column-Transferverfahren (Loop-Type, etc.) entwickelt wurden. Der folgende Kapitelabschnitt beschäftigt sich nur mit der bekanntesten und universellsten Variante. Ein Verweis auf die weitergehende Literatur ist in den Referenzen gegeben [16].

### 12. Solvent Trapping und Bandenverbreiterung

Die Verdampfung einer Probe in der GC-Säule folgt definierten Regeln. Exemplarisch soll dies an einer Injektion eines leichtflüchtigen Lösungsmittels mit verschiedenen volatilen Analyten dargestellt werden. Die GC-Trennsäule ist hierbei direkt an einen On-Column-Injektor angeschlossen und endet in einem Flammenionisationsdetektor (irrelevant für diese Betrachtung). Die Temperatur des GC-Ofens liegt hierbei unterhalb des druckkorrigierten Siedepunkts des Lösungsmittels, damit das Lösungsmittel flüssig in die GC-Säule einfließen kann. Eine Ofentemperatur oberhalb des Siedepunkts führt zu einer Verdampfung des Lösungsmittels am Säulenkopf. Bedingt durch die Dimension der Trennsäule erzeugt dies einen Rückdruck, der ein weiteres Eindringen des Lösungsmittels in die Trennsäule verhindert.

Typische GC-Trennsäulen sind mit PDMS (Polydimethylsiloxan) beschichtet. Dieses wird zur Veränderung spezifischer Selektivitäten mit verschiedenen Seitenketten im Polymer modifiziert. Reine PDMS-Phasen sind unter dem Namen DB-1, Rtx-1, VF-1, etc. bekannt. Bei der Flutung des Säuleneingangs mit Lösungsmittel wird dieses durch das Trägergas in die Säule gedrückt. Es bildet sich auf der Innenwand der Trennsäule ein Lösungsmittelfilm aus (sog. geflutete Zone, siehe Abb. 10). Wie lang diese Zone wird und ob sie einen stabilen Film bildet, hängt maßgeblich von der Kompatibilität des Lösungsmittels und der stationären Phase der Säule ab. Typischerweise benetzen unpolare Lösungsmittel, wie Alkane, unpolare stationäre Phasen besonders gut. Das Lösungsmittel bildet dann eine vergleichsweise kurze geflutete Zone am Säuleneingang aus.

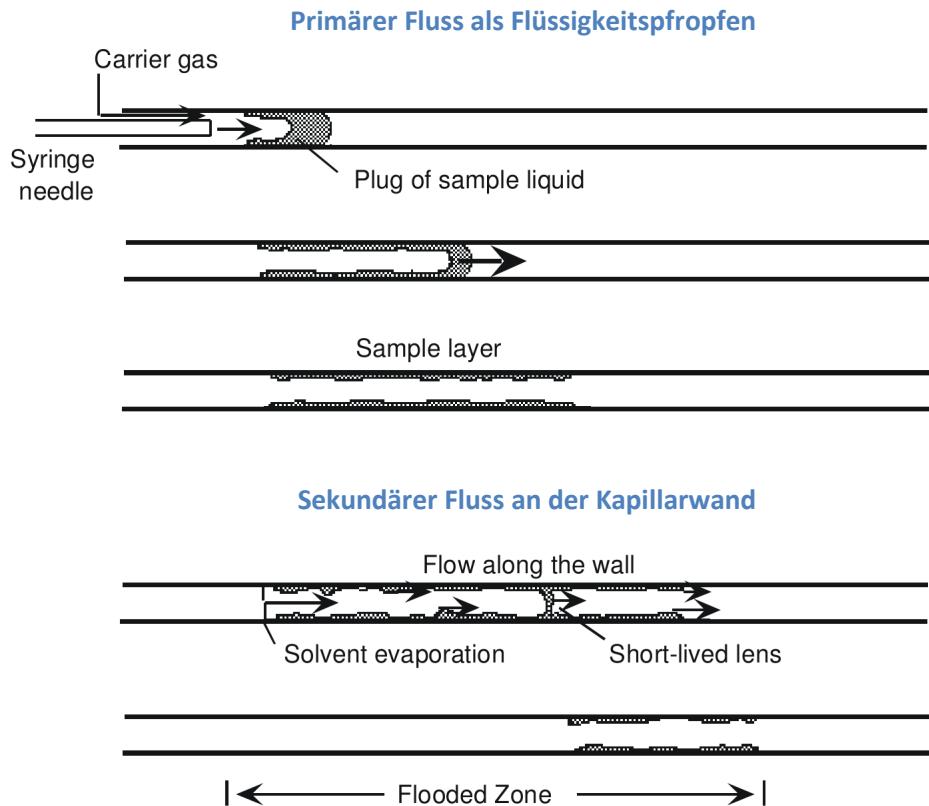


Abb. 10: Ausbreitung der gefluteten Zone am Säulenbeginn: Nach primärer Ausbildung eines instabilen Films an der Kapillarwand, bildet sich im weiteren Verlauf die geflutete Zone durch Sekundärprozesse (Ref. 25)

Wird im Gegensatz dazu versucht, ein polares Lösungsmittel wie Aceton oder Methanol auf eine unpolare stationäre Phase zu injizieren, können wenige Mikroliter Lösungsmittel fast ungehindert in Tropfenform mehrere Meter durch die Säule gelangen und die geflutete Zone stark verlängern. Innerhalb der gefluteten Zone sind die Analyte gleichmäßig verteilt. Die Verdampfung des Lösungsmittelfilms geschieht durch Sättigung des einströmenden Trägergases, kontrolliert von der Rückseite der gefluteten Zone. Sobald es gesättigt ist, strömt es quasi ungehindert durch die verbleibende geflutete Zone.

Bei diesem Verdampfungsprozess sind zwei Dinge zu beobachten.

- Leichtflüchtige Substanzen verdampfen mit dem Lösungsmittel
- Schwerflüchtige Substanzen verbleiben an den Stellen der Säule, an denen sie während der Ausbreitung der gefluteten Zone deponiert wurden

Die entstandenen Dämpfe werden bei diesem Beispiel durch die gesamte Trennsäule und das Detektorsystem (FID) geführt. Dadurch, dass die geflutete Zone von der Rückseite zu verdampfen beginnt, werden leichtflüchtige Substanzen durch den Trägergasstrom durch die noch restliche vorhandene geflutete Zone geleitet. Im Bereich der Lösungsmittelfront kondensieren diese wieder und es kommt zu einer Anreicherung der Leichtflüchtigen (sog. Solvent Trapping, siehe Abb. 11). Dieser Prozess wiederholt sich bis der letzte Rest des Lösungsmittels verdampft ist. Die leichtflüchtigen Substanzen liegen dann als schmale Bande maximal konzentriert vor. Existiert keine stabile geflutete

Zone in Form eines Lösungsmittelfilms an der Innenwand der GC-Säule, so ist dieser Prozess nicht möglich.

Das schwerflüchtige Material ist auf der gesamten Strecke der abgedampften gefluteten Zone verteilt (sog. Band Broadening in Space). Die Länge reicht je nach Injektionsvolumen von wenigen Zentimetern bis mehreren Metern. Um die Analyte als scharfe chromatographische Peaks detektieren zu können, ist eine anschließende Fokussierung notwendig. Bandenbreiten von etwa 15 bis 30 cm sind, je nach Trennsäulenlänge, tolerierbar. Diese Breiten sind allerdings nur für 1 µL-Injektionen realisierbar. Large-Volume-Injektionen erzeugen Bandenbreiten, die um ein Vielfaches größer sind. Eine Fokussierung im weiteren chromatographischen Verlauf ist auf normalen Wegen nicht mehr möglich. Eine Cryofokussierung nach der ehemals gefluteten Zone könnte dieses Problem lösen. Es existiert allerdings eine wesentlich elegantere Lösung dieses Problems: Um breite Anfangsbanden effektiv zu fokussieren, können unbelegte Vorsäulen, d.h. GC-Trennsäulen ohne stationäre Phasen verwendet werden. Durch eine chemische Desaktivierung der Fused-Silica-Oberfläche ist es möglich, die Benetzungseigenschaften gezielt zu verändern. Auf diesen Säulen ist dann Solvent Trapping genauso möglich wie in belegten Trennsäulen, auch wenn aufgrund der fehlenden stationären Phase die geflutete Zone länger ausfällt. Da diese Vorsäulen allerdings im Vergleich zu Trennsäulen eine verschwindend geringe Retentionskraft ausbilden (daher werden sie auch als Retention Gaps bezeichnet), migrieren die verteilten schwerflüchtigen Substanzen bereits bei sehr geringer Ofentemperatur. Am Säulenkopf der angekoppelten Trennsäule kommt es zu einer Aufkonzentrierung der Hochsieder, da die Retentionskraft der stationären Phase signifikant über der der unbelegten Vorsäule liegt (sog. Phase-Ratio Focusing). Die Substanzen werden erst bei weiterer Erhöhung der Ofentemperatur in den chromatographischen Prozess entlassen (sog. Cold Trapping) und können so ebenfalls als scharfe Bande detektiert werden. Auf diese Weise ist es möglich, Bandenbreiten von mehreren Metern Länge effektiv zu fokussieren (sog. Retention-Gap-Effekt, siehe Abb. 11).

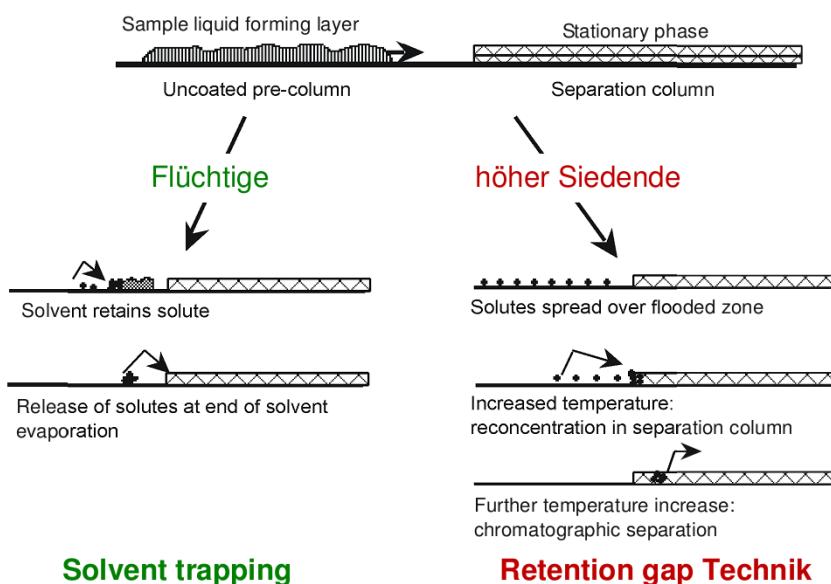


Abb. 11: Aufkonzentrierung der Anfangsbanden leicht- und schwerflüchtiger Verbindungen in einer Kapillarsäule (Ref. 25)

### 13. Der frühe Dampfausgang (SVE)

Die Abführung der Lösungsmitteldämpfe durch die gesamte Trennsäule ist bei großen LC-Fraktionen ineffektiv. Außerdem können nicht alle verwendeten Detektionssysteme (z. B. ECD, Electron Capture Detector, zur Bestimmung chlorierter Substanzen) mit derart großen Lösungsmittelmengen betrieben werden. Um die Verdampfung effizienter zu gestalten und den Detektor zu schützen, wurde der SVE (Solvent Vapour Exit oder früher Dampfausgang) entwickelt.

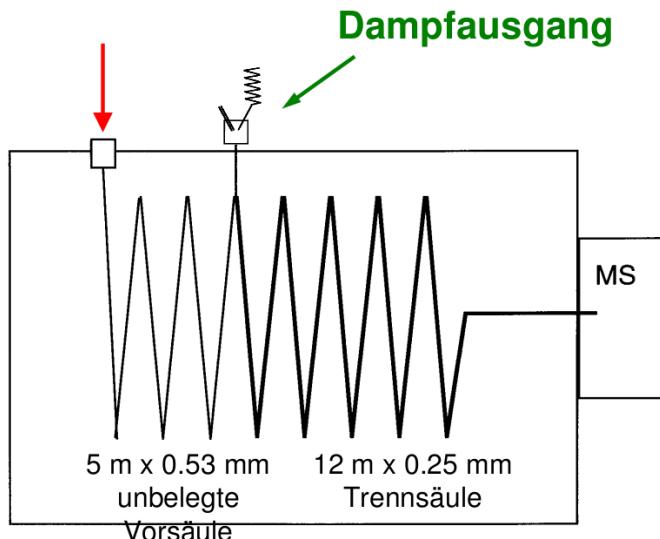


Abb. 12: Positionierung des SVE bei der Large-Volume-On-Column-Technik zwischen Vor- und Trennsäule (Ref. 25)

Der SVE besteht aus einem T-Stück zwischen Retention Gap und Trennsäule sowie einem Ventil am Dampfausgang. Abbildung 12 zeigt den schematischen Aufbau. Während der Lösungsmittelverdampfung wird bis auf einen kleinen Teil das gesamte Trägergas-Lösungsmitteldampfgemisch durch den geöffneten SVE geleitet. Der Detektor kann so effektiv geschützt werden. Um eine Kondensation der Dämpfe im Ventil zu vermeiden (dies könnte andernfalls zu kurzzeitigen Verstopfungen führen), ist es empfehlenswert, dieses permanent zu beheizen [17]. Nach dem Schließen des SVE-Ventils wird durch dieses nur noch ein kleiner Spülfluss geleitet (ebenfalls über eine Restriktionskapillare), um restliche Lösungsmittelrückstände in der Ableitung zu entfernen. Dies verhindert ein Rückströmen des Lösungsmittels nach dem Schließen des Ventils (unruhige Basislinie oder Lösungsmittelpeak). Der notwendige Minimalfluss durch diese Kapillare ist sehr gering, da lediglich die Diffusion zurück in den chromatographischen Prozess verhindert werden muss. Ein Fluss von 1 % des eingestellten Säulenflusses ist bereits ausreichend. Der Großteil des Trägergases fließt durch die Trennsäule. Durch einen SVE ist eine wesentlich schnellere Ableitung der Lösungsmitteldämpfe möglich (20 - 50-fach beschleunigt) [18]. Dies ermöglicht es, größere Fraktionen in geringerer Zeit einzufangen. Da eine im Vergleich zur Trennsäule kurze Vorsäule größerer Dimension verwendet werden kann, ist auch keine große Restriktion zu erwarten, die die Abführung der Dämpfe erschweren könnte.

#### 14. Simultane Lösungsmittelverdampfung (Concurrent solvent evaporation)

Bei Verwendung der On-Column-Technik kann zwischen zwei wichtigen Arten der Lösungsmittelverdampfung unterschieden werden, der simultanen und der partiell simultanen. Bei ersterer werden Lösungsmitteldämpfe genauso schnell abgeleitet wie Lösungsmittel zugeführt wird. Es ist nur eine kurze Retention Gap von etwa 40 - 50 cm erforderlich, da es keine geflutete Zone gibt (siehe Abb. 13).

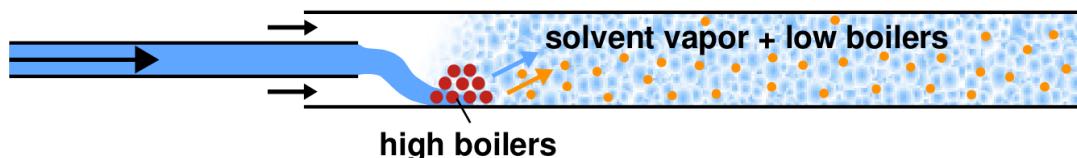


Abb. 13: Simultane Lösungsmittelverdampfung (Ref. 26)

Da bei dieser Technik kein Solvent Trapping nutzbar ist, kommt es zu einem Verlust leichtflüchtiger Analyten. Um diesen zu minimieren, kann ein alternativer Lösungsmitteleffekt namens Phase Soaking genutzt werden. Wird statt einer kurzen Retention Gap eine kurze belegte Säule verwendet (Retaining Precolumn), deren Länge sich an der maximal tolerierbaren Anfangsbandenbreite der Analyten orientiert, so kann die stationäre Phase durch die Lösungsmitteldämpfe aufquellen und zu einer zusätzlichen Retention für mittelflüchtige Komponenten eingesetzt werden.

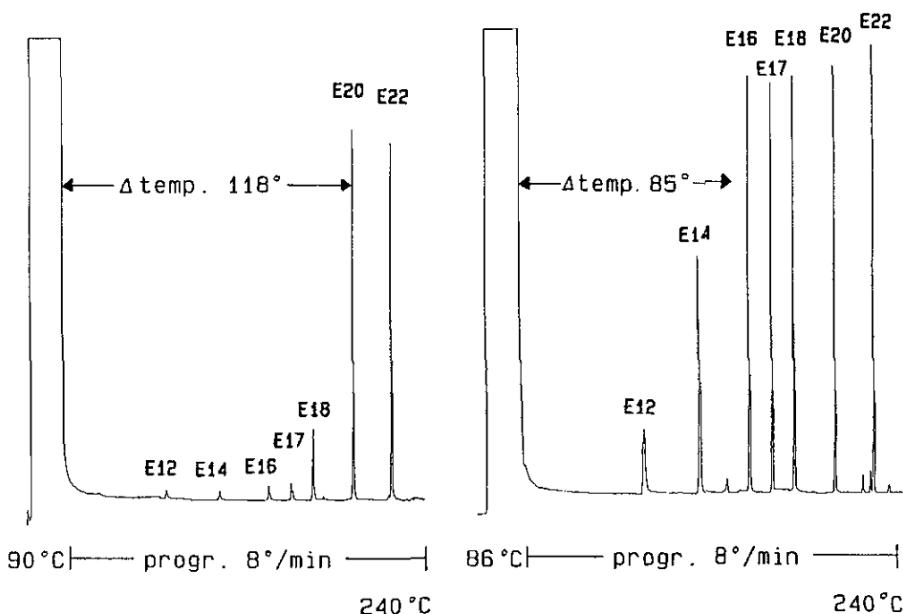


Abb. 14: On-Column-Injektion verschiedener Fettsäuremethylester mit simultaner Lösungsmittelverdampfung – links: mit einer kurzen Retention Gap, rechts: mit zusätzlicher Retaining Precolumn (Ref. 18)

Die Abbildung 14 zeigt den Unterschied zwischen der Verwendung einer Retention Gap und einer Retaining Precolumn. Durch letztere können Analyte mit geringerem Siedepunkt quantitativ mit einer simultanen Lösungsmittelverdampfung analysiert werden.

Zur Erreichung simultaner Verdampfungsbedingungen kann die GC-Ofentemperatur oder der Trägergasdruck erhöht werden. Letzteres bewirkt eine Verdünnung der Lösungsmitteldämpfe mit

dem Trägergas, was wiederum eine Verringerung des Taupunktes dieses Gemisches zur Folge hat, so dass eine simultane Verdampfung bei geringerer Ofentemperatur möglich wird (siehe PTV-Gleichung, Pkt. 7). Eine geringere Ofentemperatur hat den Vorteil, dass auch unter simultanen Verdampfungsbedingungen mittelflüchtige Komponenten quantitativ erhalten bleiben können.

Vor der Injektion wird der SVE geöffnet und der ausgewählte Trägergasdruck sowie Ofentemperatur zur Verdampfung eingestellt. Während der Injektion entweichen die Lösungsmitteldämpfe durch den SVE ( $> 100 \text{ mL/min}$ ). Ist die Injektion beendet, wird der SVE kurz danach (etwa 0,1 Minuten) geschlossen und das GC-Ofenprogramm mit dem zur Analytik nötigen Trägergasdruck bzw. -fluss eingestellt. Die Verschlusszeit des SVE ist vergleichsweise unkompliziert, da das gesamte Lösungsmittel bereits verdampft ist.

### **15. Partiell simultane Lösungsmittelverdampfung (Partially concurrent solvent evaporation)**

Ist es notwendig, auch leichtflüchtige Komponenten zu analysieren, z. B. Octan bei Verwendung von n-Hexan als Lösungsmittel, so ist die partiell simultane Lösungsmittelverdampfung die Technik der Wahl. Mit dieser Technik ist es möglich, Injektionsvolumina bis zu 1 mL diskriminierungsfrei in den GC zu überführen. Grundlage dafür ist die effektive Ausnutzung von Solvent Trapping während der Lösungsmittelverdampfung, die bei einer Ofentemperatur unterhalb des druckkorrigierten Siedepunkts des Lösungsmittels stattfindet. Im Gegensatz zur simultanen Lösungsmittelverdampfung ist eine lange Retention Gap notwendig, um genügend Kapazität zu bieten und eine ausreichend lange geflutete Zone ausbilden zu können. Üblicherweise werden 5 - 10 Meter einer 0,53 mm ID unbelegten Vorsäule verwendet. Der Fluss bei geöffnetem SVE beträgt etwa 50 - 70 mL/min. Während der Injektionsphase wird bereits ein Teil der Lösungsmitteldämpfe abgeführt, allerdings mit geringerer Geschwindigkeit im Vergleich zur Injektionsgeschwindigkeit. Das sich akkumulierende Lösungsmittel in der gefluteten Zone der Vorsäule bildet die Grundlage für das Solvent Trapping (siehe Abb. 15).

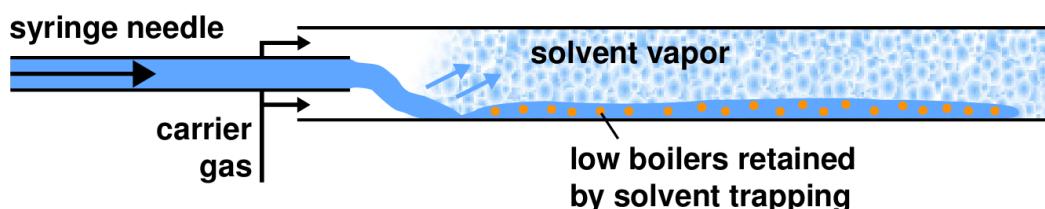


Abb. 15: Partiell simultane Lösungsmittelverdampfung zur Analyse leichtflüchtiger Verbindung (Ref. 26)

Anders als bei der simultanen Lösungsmittelverdampfung ist der Verschluss des SVE kritisch und muss an die gegebenen Bedingungen, d.h. Injektionsgeschwindigkeit, GC-Ofentemperatur und Trägergasdruck angepasst werden. Da nach Beendigung der Injektion noch eine geflutete Zone in der Vorsäule vorliegt, muss eine definierte Zeit gewartet werden, bevor der SVE geschlossen werden kann. Die dazu nötige Zeit kann experimentell auf folgende Art bestimmt werden:

Solange sich im Trägergas noch organische Materialien befinden, ist es mit gelber Flamme brennbar, auch bei Verwendung von Helium. Das ausströmende Gas am SVE kann angezündet werden und es kann somit kontrolliert werden, wie lange sich noch Lösungsmittel im Trägergasstrom befindet. In einem ersten Optimierungslauf für die Verdampfungsbedingungen sollten demnach die passenden

GC-Parameter von Hand eingestellt werden (Temperatur und Trägergasdruck). Der SVE muss geöffnet werden und die Injektion oder der LC-Transfer mit dem gewünschten Volumen gestartet werden. Der Ausgang vom SVE kann jetzt angezündet werden. Sobald die Injektionsphase abgeschlossen ist, sollte die Zeit gemessen werden, bis zu der die Flamme permanent erlischt. Der SVE kann danach geschlossen werden und das gesamte GC-System kurz ausgeheizt werden, um Restspuren vom Lösungsmittel aus der GC-Trennsäule zu entfernen.

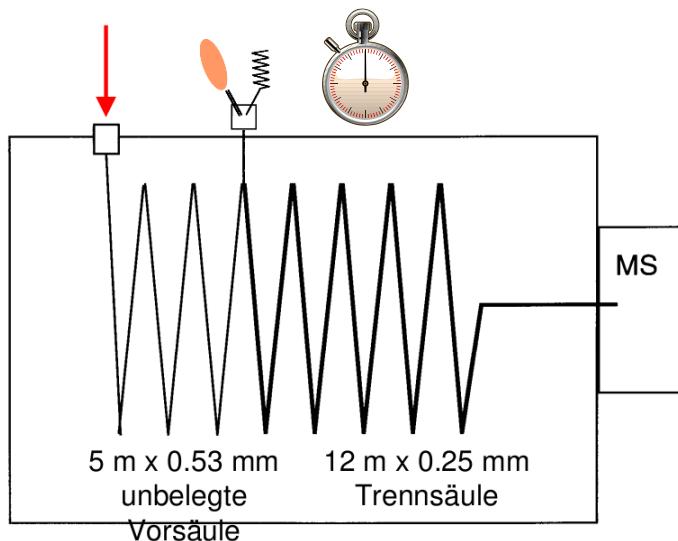


Abb. 16: Bestimmung der Lösungsmittelverdampfungszeit durch eine einfache Zeitmessung (Ref. 25)

Die gemessene Zeitspanne entspricht der Zeit, die benötigt wird, um das Lösungsmittel, das sich während der Injektionsphase auf der Vorsäule akkumuliert hat, abzudampfen. Da die leichtflüchtigen Komponenten mit dem letzten Rest des Lösungsmittels aus dem SVE entweichen, ist es notwendig, den SVE kurz vor diesem Zeitpunkt zu schließen, d.h. 3 - 5 Sek. vor Erlöschen der Flamme.

Auf diese Weise ist eine einfache erste Optimierung der Injektionsbedingungen möglich. Eine abschließende Optimierung ist im Rahmen eines GC-Testlaufs durchzuführen. Die Injektion eines Standardgemisches ist dafür am besten geeignet. Die Breite der Lösungsmittelpeaks (optimal etwa 2 - 4 Min.) sowie das diskriminierungsfreie Vorliegen der leichtflüchtigen Komponenten sind Indikatoren, die für eine Optimierung herangezogen werden können.

Nachfolgend ein zusammenfassender Überblick über die beschriebenen Transfertechniken:

| Fraktionsart           | Nur Schwerflüchter<br>(z.B. Octadecan aus Hexan) | inkl. Leichtflüchter<br>(z.B. Decan aus Hexan) |
|------------------------|--|--|
| < 100 - 150 µL Organik | PTV<br>Retention Gap (+SVE)                      | PTV (At-Once)<br>Retention Gap (+SVE)          |
| > 150 µL Organik       | PTV<br>Retaining Precolumn + SVE                 | Retention Gap + SVE (bis ca. 1 mL)             |
| Wässrig                | PTV<br>Retention Gap (+SVE)*                     | PTV + Adsorbens (z.B. Tenax TA)                |

Tabelle 1: Die verschiedenen Transfertechniken im Überblick (\*nicht für den Routinebetrieb geeignet, da Wasser Fused-Silica-Oberflächen angreift)

## 16. Erfahrungen aus der Praxis und Fehlersuche

Nachdem im bisherigen Verlauf dieses Kapitels alle wichtigen Grundlagen kurz zusammengefasst wurden, beschäftigt sich der kommende Abschnitt mit dem praxiserprobten Aufbau eines HPLC-GC-Systems und den Fallstricken im Routine-Betrieb. Die Abbildungen 17 und 18 zeigen ein aktuelles Gerätekonzept, respektive die schematische Darstellung des Systems.



Abb. 17: HPLC-GC-System bestehend aus Autosampler, HPLC-UV und GC (Ref. Fa. Axel Semrau GmbH)

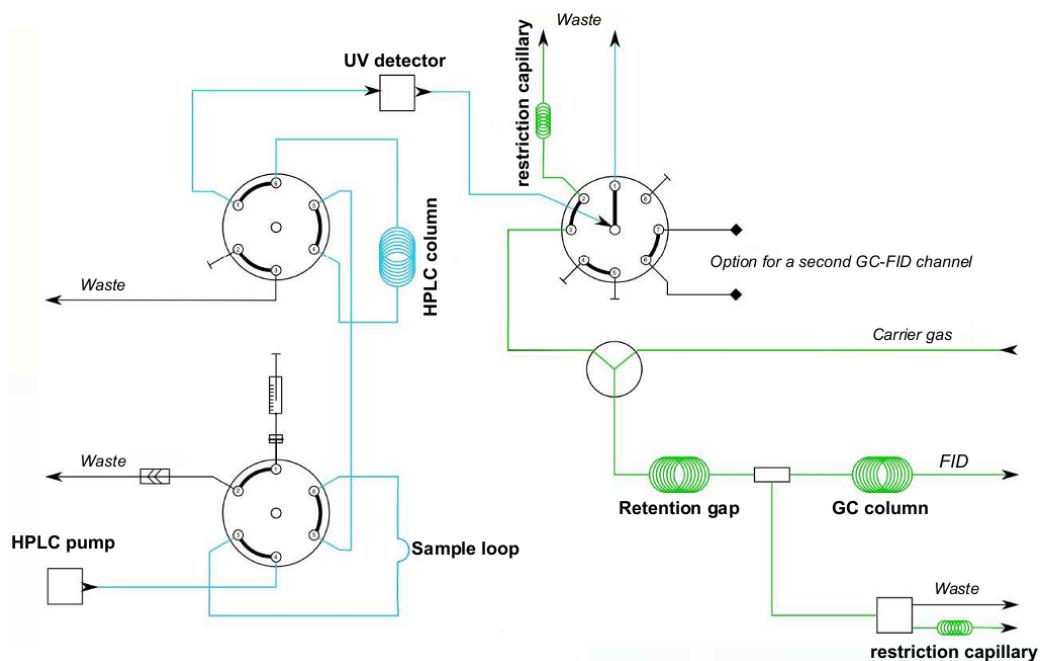


Abb. 18: Schematische Darstellung eines HPLC-GC-Systems aus Abb. 17 (Ref. Fa. Axel Semrau GmbH)

Das gezeigte System verwendet 1/16-Zoll-Ventile, z. B. eignen sich Ventile aus der Cheminert®-Serie der Firma VICI AG International. Sie sind lösungsmittelbeständig und können auch permanent mit Lösungsmitteln wie THF oder Dichlormethan betrieben werden. Im HPLC-Teil des Systems werden standardmäßig nur Edelstahlleitungen verwendet, da diese im Gegensatz zu PEEK gegenüber allen gängigen organischen Lösungsmitteln beständig sind. Zur Benutzung von Fused-Silica-Kapillaren an diesen Ventilen bietet VICI sog. „One-Piece“-Adapter an (siehe Abb. 19). Dabei handelt es sich um passende Reduzieradapter aus Materialien wie Polyimid, PEEK oder Vespel-Graphit, mit denen die Kapillaren direkt ans Ventil angeschlossen werden können. Dies vereinfacht die Montage aller Kapillaren am gesamten System erheblich.



Abb. 19: „One Piece“-Adapter zur Verbindung von Fused-Silica-Kapillaren an 1/16-Zoll- oder 1/32-Zoll- Ventile (VICI AG International, Schweiz)

Statt eines On-Column-Injektors wird ein einfaches T-Stück verwendet, welches totvolumenarm Trägergas und LC-Eluent zusammenführt. Im Gegensatz zu einem klassischen Injektor ist es wesentlich günstiger und zeigt „keine“ Memory-Effekte zwischen zwei Transfers. Ursprünglich in Form eines Glas-Pressfits realisiert, wird nun ein Metall-T-Stück verwendet. Dieses verwendet 1/32-Zoll-Ferrules, ebenfalls in Form von VICI „One-Piece“-Adaptoren, und kann beliebig oft wiederverwendet werden. Dies ist ein großer Vorteil im Vergleich zu den meist nur einmalig zu verwendenden Glas-Pressfits. So kann sehr einfach zwischen verschiedenen Vorsäulen (Retention Gap oder Retaining Precolumn unterschiedlichster Längen) gewechselt werden. Der SVE im GC-Ofen wird durch ein modifiziertes SGE-Miniverbinder-System realisiert. Es verwendet ausschließlich SilTite®-Ferrules, d.h. Metallferrules, die nach einmaligem Anziehen dicht sind. Graphit- bzw. Vespel-Graphit-Ferrules, die klassischerweise im GC-Bereich eingesetzt werden, neigen nach mehreren GC-Läufen zu Undichtigkeiten. Reines Graphit ist auch dafür bekannt, Lösungsmitteldämpfe verzögert freizugeben, was zu einer unruhigen Basislinie führen kann (siehe Abb. 20).

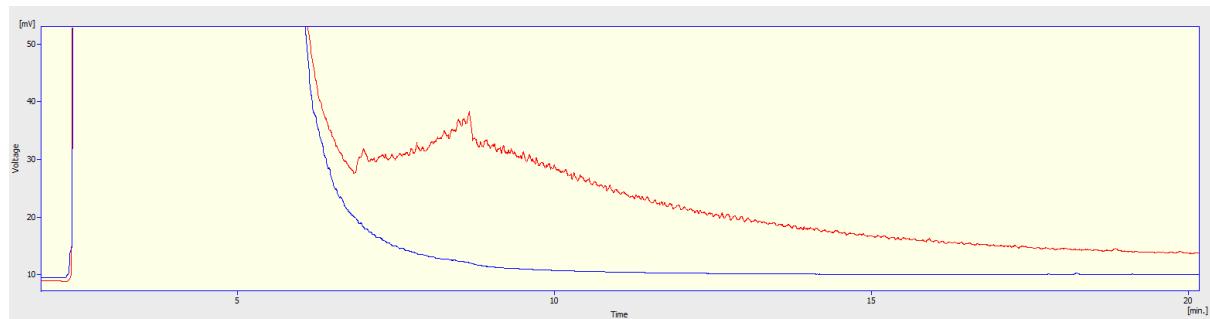


Abb. 20: Einfluss des Ferrule-Materials am SVE-T-Stück auf die Basislinie bei einer Injektion von 750 µL Hexan/MTBE (90:10) (GC-FID-Chromatogramm – simultane Lösungsmittelverdampfung – blau: SilTite®-Ferrules, rot: Graphit-Ferrules)

Um dies auszuschließen, ist es empfehlenswert das System mit dieser Art von Dichtung aufzubauen. Weiterhin bieten SilTite®-Dichtungen eine optimale Grundlage bei der Verwendung massenspektrometrischer Detektoren, die sensibel auf Sauerstoff reagieren können. Bei der Wahl

des SVE-Ventils wurde darauf geachtet, dass dieses beheizbar ist und ebenfalls die notwendige Lösungsmittelbeständigkeit aufweist.

Im Routine-Betrieb zeigt sich dieses System als sehr stabil. Tritt dennoch ein Fehler auf, gibt es mehrere Möglichkeiten, diesen einzugrenzen. Durch Integration eines UV-Detektors kann z. B. überprüft werden, ob der HPLC-Part korrekt funktioniert. Abbildung 21 zeigt den Verlauf eines typischen LC-UV-Chromatogramms aus einer Applikation zur Bestimmung von Kohlenwasserstoffen aus Mineralölrückständen in Lebensmitteln (siehe Anwendungsbeispiele, Pkt. 17). Das verwendete Dichlormethan in der mobilen Phase hat einen UV-Cut-Off von 232 nm, so dass mit dem UV-Detektor die Dichlormethankonzentration im Eluentenstrom während des Gradienten verfolgt werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, am Ende des Laufs auf eine vollständige Rekonditionierung der HPLC-Säule zu prüfen. Auch das Mischverhalten der HPLC-Pumpe ist so kontrollierbar. Zeigt sich bei einer Förderung von Hexan/Dichlormethan eine wellenförmige Grundlinie, spricht dies für ein zeitlich inhomogenes Zumischen von Dichlormethan. Die Ursache ist in vielen Fällen Luft in einem der Pumpenköpfe. Typische Marker wie der Anstieg der Grundlinie, die Retentionszeiten, Flächen und Asymmetriefaktoren definierter Analytpeaks (z. B. Perylen) können als kritische Parameter im Rahmen von Systemeignungstests genutzt werden.

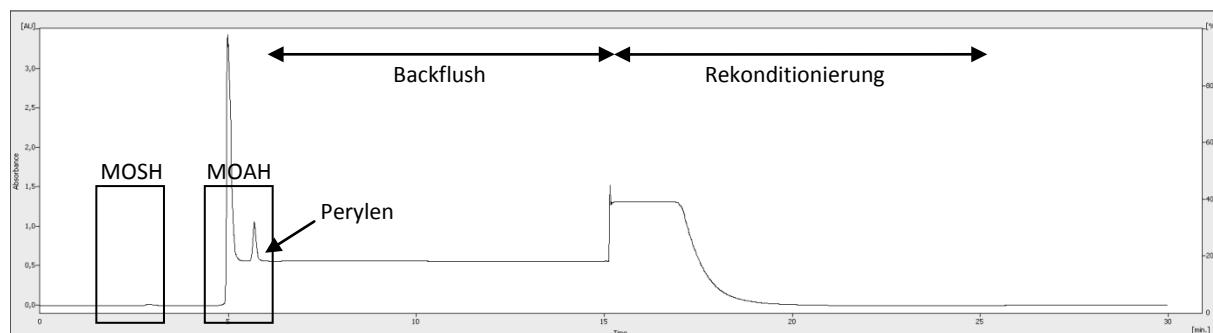


Abb. 21: LC-UV-Chromatogramm bei der Bestimmung von Mineralölkohlenwasserstoffen

Ist hier bereits ein Problem, wie zu kleine Peaks bzw. schlechte Peakformen zu beobachten, so ist das Problem injektions- oder HPLC-seitig zu lokalisieren. Ist hingegen kein Unterschied zu früheren Chromatogrammen zu erkennen, so ist das Problem im weiteren Verlauf des Systems zu suchen.

GC-seitig kann die Peakbreite und Form des Lösungsmittelpeaks (sofern ein passender Detektor, wie z. B. ein FID, verwendet wird) als Indikator für einen fehlerfreien Betrieb herangezogen werden. Weicht die Breite und/oder Form des Lösungsmittelpeaks signifikant von früheren Chromatogrammen ab, so kann dies auf ein Problem beim Abdampfen des Lösungsmittels hindeuten. Folgende Beobachtungen sind die gängigsten im Routinebetrieb:

- Lösungsmittelpeak zu schmal oder unterbrochen
  - Undichtigkeit im GC
  - zu hoher Abdampfdruck, zu hohe Ofentemperatur
  - zu geringe oder instabile HPLC-Flussrate
- Lösungsmittelpeak zu breit
  - Verstopfung im Vorsäulen-SVE-Teil des Systems
  - zu geringer Abdampfdruck, zu geringe Ofentemperatur
  - zu hohe HPLC-Flussrate

- Extremes Tailing des Lösungsmittelpeaks
  - Verstopfung des SVE-Ventils
  - Verstopfung der Fused-Silica-Restriktionen am Fraktionierungs- bzw. SVE-Ventil
  
- ➔ Die Funktionsweise dieser Restriktionen lässt sich am einfachsten prüfen, indem sie in ein organisches Lösungsmittel gehalten werden. Es sollten sich deutlich sichtbare Trägergasblasen zeigen. Ist dies nicht gegeben, sollte die Kapillare geringfügig gekürzt oder getauscht werden. Tritt dieser Umstand häufiger auf, so sollte auf eine Kapillare größeren Innendurchmessers gewechselt werden. Kapillaren mit einem Durchmesser von 25 µm neigen zu einer schnelleren Verstopfung als 50 µm-Kapillaren. Ein Ausgleich des größeren Querschnitts ist durch eine Verlängerung der Kapillare gegeben.
  
- ➔ Können falsche GC-Parameter ausgeschlossen werden, so ist zur Problemsuche die Verwendung eines Lecksuchgerätes sowie eines Flussmessers empfehlenswert. Mit dem Lecksuchgerät sollte das System an allen kritischen Stellen auf Dichtigkeit überprüft werden. Dies sind alle Verbindungs- und Verschraubungspunkte (Fraktionierungsventil, On-Column-T-Stück, SVE-T-Stück, SVE-Ventil, etc.). Mit einem Flussmesser kann bei geöffnetem SVE-Ventil der Trägergasfluss bestimmt werden. Es ist angebracht, regelmäßig den Soll-Fluss für eine angewendete Applikation zu notieren. Hat sich dieser Fluss signifikant verändert, so ist keine zuverlässige Verdampfung des Lösungsmittels mehr gegeben und dies höchstwahrscheinlich der Grund für den beobachteten Fehler.

Anhand der Peakformen der Analyten im GC können weitere Probleme lokalisiert werden:

- Tailing früh eluierender Komponenten, welches mit höherer Ofentemperatur zunimmt
  - Kontamination der Retention Gap
  - Spülung\* bzw. Wechsel der Retention Gap
- Peak-Splitting hochsiedender Komponenten
  - Kontamination der Retention Gap
  - Spülung\* bzw. Wechsel der Retention Gap
- Peakverbreiterung hochsiedender Komponenten
  - Die Vorsäule könnte Boden- oder Wandkontakt haben. Dies führt zu heißen bzw. kalten Stellen in der Vorsäule, die den Retention Gap Effekt beeinflussen können.

\*Nimmt die Retentionskraft in einer Retention Gap zu, hat dies Einfluss auf den chromatographischen Prozess. In diesen Fällen ist keine effektive Konzentrierung der Anfangsbanden schwerflüchtiger Substanzen am Säuleneingang der Trennsäule möglich. Es kann zu Peakdeformationen wie Peaksplitting oder Tailing kommen. Diese Erhöhung der Retentionskraft kann durch Ablagerung schwerflüchtigen Materials in der Retention Gap erklärt werden. Um den ursprünglichen Zustand wiederherzustellen, kann versucht werden, die Retention Gap mit Lösungsmitteln verschiedener Polaritäten zu spülen:

- Bei einem HPLC-GC-Instrument ist es am effektivsten, die Vorsäule direkt an die HPLC-Pumpe anzuschließen und mit dem HPLC-Eluenten zu spülen. Die oben erwähnten „One Piece“-

Adapter von VICI in der passenden Dimension eignen sich, um 0,53 mm Säulen direkt an 1/16-Zoll Anschlüsse der Ventile oder HPLC-Pumpen anzuschließen. Lösungsmittel wie Dichlormethan, MTBE im ersten Schritt und danach Hexan haben sich für eine Spülung als effizient erwiesen. Da die Retention Gap keinen nennenswerten Gegendruck aufbaut, kann mit hohem Fluss (mehrere mL/min) gespült werden. 10-20 mL Lösungsmittel reichen in jedem Fall aus. Nachdem die Säule gespült wurde, kann sie zurück in den GC eingebaut werden. Jedoch sollte die Verbindung zum SVE-T-Stück noch nicht erfolgen, da die Säule noch mit Lösungsmittel gefüllt ist. Die Vorsäule sollte jetzt eine Zeit lang mit Trägergas gespült werden, bevor sie wieder vollständig ins System integriert wird. Sind bei der Injektion eines Standardgemischs nun wieder symmetrische Peakformen kritischer Analyte erreicht, war die Spülung erfolgreich und die Retention Gap kann weiterhin verwendet werden. Das gleiche Vorgehen ist im Übrigen auch bei Retaining Precolumns und GC-Trennsäulen möglich, sofern die stationäre Phase am Fused-Silica-Gerüst chemisch gebunden ist.

## 17. Anwendungsbeispiele

### Mineralölrückstände in Lebensmitteln

Mineralische Paraffine erweisen sich als eine der quantitativ bedeutsamsten Kontaminationen im menschlichen Körper [19]. Kürzerkettige gesättigte Kohlenwasserstoffe werden vom Körper leicht aufgenommen und können in einigen Organen auch gespeichert werden. Aus tierexperimentellen Studien ist bekannt, dass derartige Mineralölgemische zu Ablagerungen und Schäden in der Leber, den Herzklappen und den Lymphknoten führen können. Die aromatischen Kohlenwasserstoffe stehen in dringendem Verdacht, krebsfördernd zu wirken [20].

Die in den letzten Jahren durchgeführten Untersuchungen zeigen zum Teil eine sehr hohe Kontamination überwiegend trockener Lebensmittel aus bedruckten Umverpackungen aus Recyclingmaterial (z. B. Reis, Nudeln, Cerealien, Getreidemehle, Backmischungen, Kakaopulver, Schokolade) [21]. Kartonverpackungen für Lebensmittel werden i.d.R. aus recyceltem Papier hergestellt, das Mineralölrückstände aus Druckfarben enthält, wie sie üblicherweise im Zeitungsdruck verwendet werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass bestimmte Mineralölfraktionen bereits bei Zimmertemperatur verdampfen und in größeren Mengen auf das verpackte Lebensmittel übergehen können. Es handelt sich dabei um kürzerkettige Kohlenwasserstoffe mit Kohlenstoffzahlen < C<sub>25</sub> und einem hohen Anteil an Aromaten (ca. 10 - 25 %). Die Migration in das Lebensmittel erfolgt über Verdampfung, Transport in der Gasphase und Rekondensation im Lebensmittel. Sie ist deswegen beschränkt auf Komponenten mit einem gewissen Dampfdruck. Innenverpackungen aus Papier, Polyethylen oder Polypropylen verzögern die Migration, halten sie aber nicht auf [22]. Aber auch in anderen Produkten wie Schokolade und pflanzlichen Ölen konnten Mineralölrückstände nachgewiesen werden (siehe Abb. 22 und Abb. 23).

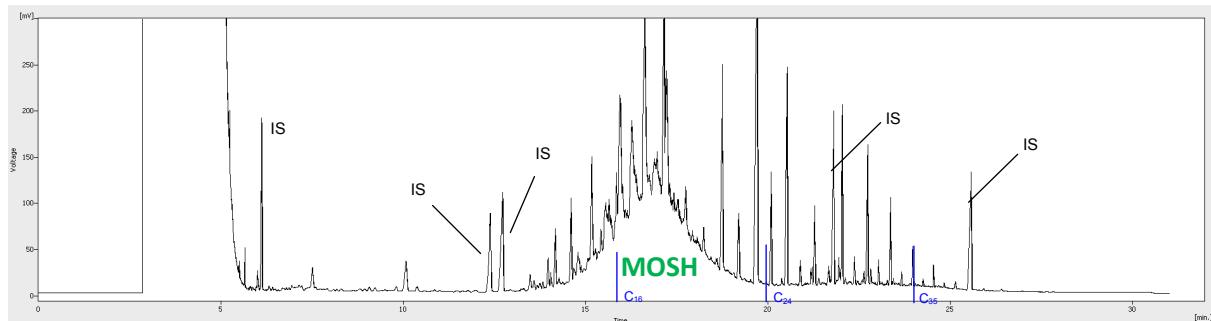


Abb. 22: Chromatogramm der MOSH-Fraktion einer Probe Schokolade mit einem Gehalt an Mineralölkohlenwasserstoffen von 23 mg/kg (Quelle dieser Kontamination: Recyclingkarton)

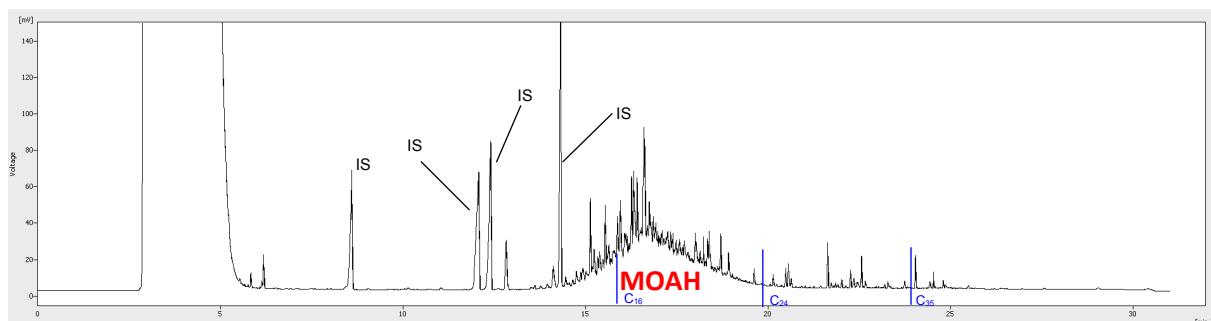


Abb. 23: Chromatogramm der MOAH-Fraktion einer Probe Schokolade mit einem Gehalt an Mineralölkohlenwasserstoffen von 6 mg/kg (Quelle dieser Kontamination: Recyclingkarton)

Oftmals weisen Lebensmittel schon vor dem Verpacken Rückstände von Mineralölen auf, die z. B. auf ölende Maschinenbauteile in der Produktion oder auf Schmierfette, die während Wartungs- bzw. Reinigungsarbeiten verwendet werden, zurückzuführen sind. Häufig ist eine umweltbedingte „Grundbelastung“ mit Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW-Bereich C<sub>20</sub> - C<sub>50</sub>) in den untersuchten Lebensmitteln nachweisbar, ohne aber eine eindeutige Kontaminationsquelle identifizieren zu können [23]. Möglicherweise ist für diese häufig vorkommende Kontamination im Wesentlichen die globale Umweltverschmutzung verantwortlich (unvollständige Verbrennung fossiler Brennstoffe). Nachfolgend sind mögliche Kontaminationswege zusammengefasst:

- Rohstoffe (z. B. Schmieröle von Erntemaschinen, Trocknungsprozesse, Abgase von Benzimotoren, Emissionen von Industrieanlagen)
- Transport (z. B. mineralölhaltige papierbasierte Verpackungen, mit „Batching oil“ behandelte Jutesäcke)
- Herstellungsprozess (z. B. ölende Maschinenbauteile)
- Lebensmittelverpackungen, Umverpackungen aus Recyclingpapier
- mineralölhaltige Druckfarben

Man unterscheidet zwischen zwei Substanzklassen: gesättigte (MOSH – mineral oil saturated hydrocarbons) und aromatische Kohlenwasserstoffe (MOAH – mineral oil aromatic hydrocarbons). Diese zwei Mineralölfraktionen werden aufgrund der unterschiedlichen toxikologischen Einstufung getrennt voneinander bestimmt.

Die Messung der Mineralölgehalte in Lebensmitteln ist anspruchsvoll, weil es sich um ein komplexes Gemisch handelt, das als Summe aller Komponenten quantifiziert werden muss. Eine Einzelkomponentenanalyse ist wegen der enormen Anzahl der Isomeren nicht möglich. Bei der

gaschromatographischen Untersuchung komplexer Mineralölgemische<sup>1</sup> werden keine scharf aufgelösten, sondern sehr breite Signale erhalten. Rowland und Mitarbeiter prägten 1990 für den resultierenden chromatographischen „Hügel“ den Begriff „unresolved complex mixture“ (UCM) [24].

Die LC-GC-Kopplungstechnik ermöglicht eine sehr effiziente Analytik von Mineralölkohlenwasserstoffen in Lebensmitteln. Die Untersuchung wird nach einer Methode, basierend auf Arbeiten von Konrad Grob vom Kantonalen Labor Zürich, durchgeführt [21, 25]. Zur Bestimmung der MOSH/MOAH-Fraktionen aus Verpackungen oder Lebensmitteln findet im ersten Schritt eine Normalphasen-HPLC statt. Die HPLC fungiert hierbei als automatisierte Online-Probenvorbereitung (Abtrennung von Lipiden, Wachsestern, Olefinen u.a.) und zur Trennung der gesättigten Kohlenwasserstoffe (MOSH) von den Aromaten (MOAH). Nach der Vortrennung werden die jeweiligen Fraktionen large-volume-on-column auf den GC transferiert und getrennt voneinander mittels FID detektiert. Man kombiniert dabei die hohe Kapazität der LC mit der hohen Trennleistung und schnellen Chromatographie der GC. Entscheidend für die applikativ erfolgreiche Kopplung dieser beiden Gerätesysteme ist eine geeignete Transfertechnik. Für den LC-GC-Transfer wird in diesem Fall die sogenannte Retention-Gap-Technik mit einer unvollständigen simultanen Lösungsmittelverdampfung verwendet. Dies ist entscheidend für die diskriminierungsfreie Erfassung auch der leichtflüchtigen Kohlenwasserstoffe. Die beiden Fraktionen (MOSH und MOAH) werden in zwei unabhängigen Läufen direkt auf den GC aufgegeben und analysiert.

Verglichen mit einer manuellen, mehrstufigen Aufarbeitung werden durch die automatisierte Probenaufarbeitung Analytverluste und mögliche Verschleppungen minimiert. Auch sind die Wiederfindungen i.d.R. höher und reproduzierbarer als mit den entsprechenden Offline-Varianten.

Nicht für alle Lebensmittel ist die Online-Probenaufreinigung ausreichend. Die beiden Mineralölfraktionen MOSH und MOAH müssen oftmals von lebensmitteleigenen Kohlenwasserstoffen unterschieden und abgetrennt werden. Als analytische Hilfstechniken bei komplexen Matrices (wie z. B. Tee, Schokolade oder pflanzlichen Ölen) werden die Vortrennung an aktiviertem Aluminiumoxid zur Abtrennung biogener Kohlenwasserstoffe (ungeradzahlige Paraffine vor allem von C<sub>23</sub> - C<sub>35</sub>) und die Epoxidierung zur Eliminierung störender lebensmitteleigener Olefine eingesetzt (z. B. Terpene, Squalene) [21, 25].

Die Genauigkeit und Empfindlichkeit dieser Analytik wird nicht nur vom verwendeten Verfahren sondern auch von der Art des nachgewiesenen Mineralöls (erkennbar anhand des Siedebereiches und des typischen Peakmusters) und den in der Probe enthaltenen Störsubstanzen beeinflusst. Mineralöle sind Vielstoffgemische, deren Zusammensetzung je nach Einsatz sehr unterschiedlich ist. Ein Dieselöl mit einem höheren Anteil an leichtflüchtigen Komponenten und vielen aufsitzenden n-Alkanen (ca. C<sub>9</sub> bis C<sub>24</sub>, Siedebereich 160 bis 390 °C) stellt andere Anforderungen an das Verfahren als ein Schmieröl (>C<sub>17</sub>, Siedebereich >300 °C), welches vor allem aus iso-Alkanen und Cycloalkanen besteht und bei dem die n-Alkane i.d.R. nicht mehr erkennbar sind.

Mit dem Summenparameter MKW werden u.U. auch Stoffe erfasst, die nicht zu den Mineralölen zählen. Eine bessere Selektivität wird man unter den gegebenen Bedingungen nur durch einen deutlich höheren Geräteaufwand (z. B. GCxGC) und eine andere Detektionstechnik erreichen (z. B. Massenspektrometrie). Zu LCxLC-Trennungen, s. Kap. 3.

<sup>1</sup> Als Mineralöle bezeichnet man in der petrochemischen Industrie die flüssigen Produkte, die bei der Destillation von Erdöl entstehen. Wichtige Mineralölprodukte sind Benzin, Kerosin, Heizöl, Diesel und Schmieröl.

Limitierender Faktor für die Bestimmungsgrenze ist die Kapazität der Trennsäule für Lipide und die in Lebensmitteln natürlich vorkommenden Substanzen wie Wachse oder Terpene, die bei der Quantifizierung nicht miterfasst werden dürfen.

Für die Bestimmung der Mineralölrückstände hat sich dabei die LC-GC-Kopplungstechnik als routinetauglich unter Beweis gestellt und bietet durch einen hohen Automatisierungsgrad entscheidende Vorteile gegenüber alternativen Verfahren.

### Sterine aus pflanzlichen Fetten und Ölen

Sterine stellen eine wichtige Substanzklasse dar, die zur Identifizierung und Authentifizierung von pflanzlichen Fetten und Ölen beitragen kann. Die Sterinverteilung, d.h. die prozentuale Verteilung der i.d.R. 15 untersuchten 4-Desmethylsterine, stellt einen spezifischen Fingerprint pflanzlicher Öle oder Fette dar und wird deshalb für den Nachweis möglicher Verfälschungen genutzt. So sind bereits geringe Beimischungen minderwertiger Öle und Fette erkennbar. Gerade Raps- oder Sonnenblumenöl sind sehr gut über ihre spezifische Sterinverteilung zu identifizieren und so in anderen pflanzlichen Ölen, wie z. B. Olivenöl, nachweisbar. Abbildung 24 zeigt einen typischen Vergleich zwischen einem extra nativen Olivenöl und demselben Öl, welches mit Rapsöl versetzt wurde.

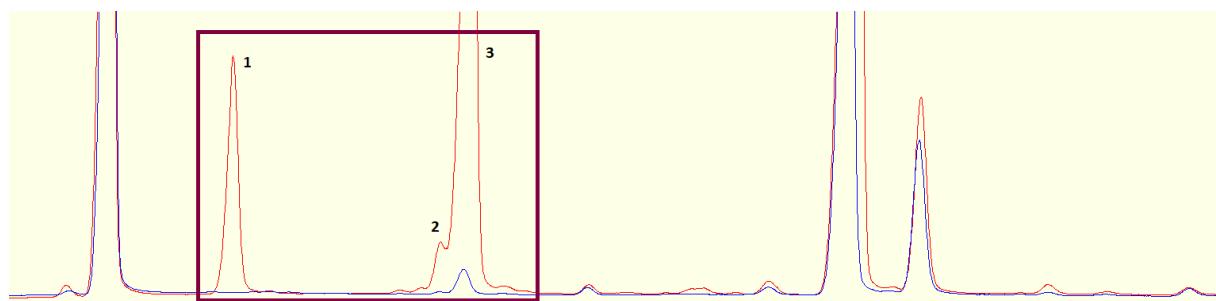


Abb. 24: GC-FID-Chromatogramme der Sterinverteilung pflanzlicher Öle im Vergleich – Olivenöl (blau) und ein mit Rapsöl versetztes Olivenöl (rot) (1=Brassicasterin, 2=24-Methylencholesterol, 3=Campesterin)

Die gängigen Verfahren zur Bestimmung des Gesamtsteringehalts und der prozentualen Verteilung der Sterine sind aufwendig und bedürfen zahlreicher manueller Probenaufarbeitungsschritte. Die ISO 12228 beschreibt die anerkannte Methodik: Nach Verseifung der Probe wird der unverseifbare Rückstand im ersten Schritt mittels einer Festphasenextraktion über Aluminiumoxid von den freien Fettsäuren befreit [27]. Das Eluat wird neutralisiert und eingeengt. Durch préparative Dünnschichtchromatographie werden die zu quantifizierenden 4-Desmethylsterine von störenden Matrixbestandteilen wie Tocopherolen, Triterpenen sowie 4-Methyl- und 4,4-Dimethylsterinen abgetrennt. Die entsprechende Fraktion wird von der DC-Platte abgenommen, gelöst, nochmalig eingeengt und derivatisiert. Die Sterine werden abschließend als Trimethylsilylether mittels GC-FID detektiert und mit Hilfe von Cholestanol als internem Standard quantifiziert. Der gesamte Ablauf benötigt ca. einen Arbeitstag, wobei der Durchsatz bei max. 4 - 6 Proben pro Mitarbeiter liegt.

Statt einer aufwendigen préparativen Dünnschichtchromatographie kann diese Analytik mit einem LC-GC-Ansatz umgesetzt werden. Die aufwendige Probenvorbereitung kann mit einem flexiblen Autosamplersystem vollständig automatisiert werden. Durch Verwendung eines CTC DualPAL-Autosamplers ist es möglich, die gesamte Probenvorbereitung zu automatisieren: Die Verseifung mit

ethanolischer KOH, Neutralisierung, Extraktion und Zugabe des internen Standards wird vollständig und ohne manuelle Eingriffe durchgeführt. Die Notwendigkeit der zeitaufwendigen und fehlerbehafteten Dünnschichtchromatographie wird durch einen leistungsfähigen Normalphasen-HPLC-Schritt über Kieselgel ersetzt. Die Trennung der Sterine von der Probenmatrix erfolgt isokratisch mit einer Mischung aus Hexan/iso-Propanol (98:2) als Eluent auf einer 2,1 mm x 250 mm Kieselgelsäule bei einer Flussrate von 300 µL/min.

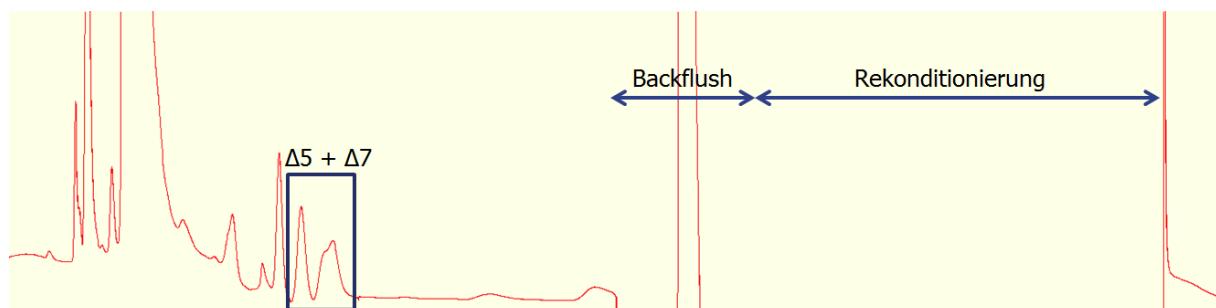


Abb. 25: LC-UV-Chromatogramm einer Sonnenblumenölprobe (Markierung der  $\Delta 5$ - und  $\Delta 7$ -Sterinfraktion)

Die  $\Delta 5$ - und  $\Delta 7$ -4-Desmethylsterinfraktion wird durch simultane Lösungsmittelverdampfung in den GC überführt, dort aufgetrennt (siehe Abb. 26) und mittels FID quantifiziert. Die HPLC-Säule wird in der Zwischenzeit mit MTBE bei erhöhtem Fluss zurückgespült und anschließend mit dem eigentlichen Eluenten rekonditioniert (siehe Abb. 25). Die einzige manuelle Aktion besteht darin, die Probe einzuhängen und in den Autosampler zu überführen. Nach etwa zwei Stunden liegt das abschließende Ergebnis vor.

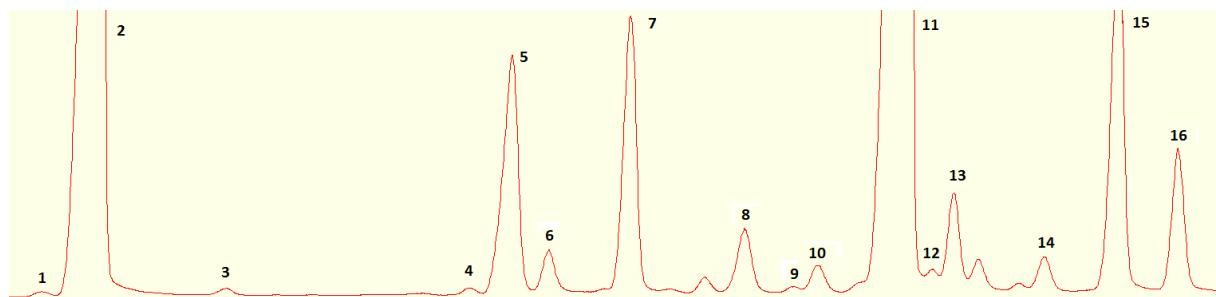


Abb. 26: GC-FID-Chromatogramm einer Sonnenblumenölprobe (1=Cholesterin, 2=Cholestanol (ISTD), 3=Brassicasterin, 4=24-Methylencholesterin, 5=Campesterin, 6=Campestanol, 7=Stigmasterin, 8= $\Delta 7$ -Campesterin, 9= $\Delta 5,23$ -Stigmastadienol, 10=Chleroosterin, 11=Sitosterin, 12=Sitostanol, 13= $\Delta 5$ -Avenasterin, 14= $\Delta 5,24$ -Stigmastadienol, 15= $\Delta 7$ -Stigmastenol, 16= $\Delta 7$ -Avenasterin)

Die Klasse der Sterine stellt nur einen interessanten Parameter für die Charakterisierung von Fetten und Ölen dar. Die Alkyl- und Wachsester- sowie Stigmastadien-Analytik [28, 29] kann ebenso mit einem LC-GC-System umgesetzt werden. Diese Technik ist somit ein wertvolles Werkzeug, um aufwendige Probenvorbereitungen komplett zu automatisieren und in vielen Fällen auf ein Minimum zu reduzieren.

## **18. Fazit und Ausblick**

Die Kopplung von Flüssig- und Gaschromatographie bringt viele Vorteile mit sich, die nachfolgend nochmals zusammengefasst sind:

- hohes Automatisierungspotential
- Minimierung von Analytverlusten bei der in komplexer Matrix üblichen mehrstufigen Aufarbeitung
- automatisierte Probenaufreinigung, die den Zeitaufwand sowie mögliche individuelle Handhabungsfehler minimiert und die Reproduzierbarkeit des Verfahrens erhöht
- Minimierung möglicher Verschleppungen oder Blindwerte
- Kontaminationsarm durch geschlossenes Gerätekonzept
- geeignet für die Rückstandsanalytik im Spurenbereich aus komplexer Matrix
- erhöhte Empfindlichkeit durch größere Injektionsvolumina in die HPLC
- Empfindlichkeitsgewinn durch Transfer kompletter LC-Fraktionen
- kein Eindampfen oder Umlösen von Lösungsmitteln erforderlich (mögliche Analytverluste, Abbauprodukte, Verunreinigungen)
- Wiederfindungen i.d.R. höher und reproduzierbarer als mit Offline-Varianten

Zusammenfassend ist die HPLC-GC-Kopplung ein stabiles, routinefähiges System mit hohem Probendurchsatz, einfacher Handhabung und geringen laufenden Kosten und trägt somit erheblich zur Effizienzsteigerung bei. Die Technik selbst ist komplex, allerdings beherrschbar, wenn das nötige Fachwissen vorhanden ist. Dieses Kapitel konnte nur eine sehr kurze Einführung in diese spannende Thematik liefern. Zusätzliche Informationen sind in zahlreichen internationalen Veröffentlichungen zu finden. Weitere Applikationen, wie die Bestimmung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen aus Lebensmitteln, zeigen, dass sich die HPLC-GC-Kopplung für die Kontaminatenanalytik als wertvolles Werkzeug darstellt. Die Bestimmung anderer Substanzklassen wie PCB (polychlorierte Biphenyle) und Pflanzenschutzmitteln aus fettreicher Matrix sind weitere denkbare Anwendungsmöglichkeiten.

## Literatur

- [1] Pietrogrande M.C., Michi M., Nunez Plasencia M., Dondi F.; Analysis of PCB by On-Line Coupled HPLC-HRGC; *Chromatographia*, **2002**; 55: 189-196
- [2] Kamm W., Dionisi F., Hischenhuber C., Schmarr H.G., Engel K.H.; Rapid detection of vegetable oils in milk fat by on-line LC-GC analysis of  $\beta$ -sitosterol as marker; *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*; **2002**; 104: 756-761
- [3] Grob K., Biedermann M., Caramaschi A., Pacciarelli B.; LC-GC Analysis of the Aromatics in a Mineral Oil Fraction: Batching Oil for Jute Bags; *J. High Resol. Chromatogr.*; **1991**; Vol. 14: 33-39
- [4] Ong R.C.Y., Marriott P.J.; A Review of Basic Concepts in Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography; *Journal of Chromatographic Science*; **2002**; Vol. 40: 276-291
- [5] Janssen H.G., De Koning S., Brinkman U.A.Th.; On-line LC-GC and comprehensive two-dimensional LCxGC-ToF MS for the analysis of complex samples; *Anal Bioanal Chem*; **2004**; 378: 1944-1947
- [6] Grob K., Kaelin I., Artho A.; Coupled LC-GC: The Capacity of Silica Gel (HP)LC Columns for Retaining Fat; *J. High Resol. Chromatogr.*; **1991**; Vol. 14: 373-376
- [7] Jandera P.; Gradient elution in normal-phase high-performance liquid chromatographic systems; *J. Chromatogr. A*; **2002**; 965: 239-261
- [8] Meyer V.R.; Example of gradient elution in normal-phase liquid chromatography; *J. Chromatogr. A*; **1997**; 768: 315-319
- [9] Hoh E., Mastovska K.; Large volume injection techniques in capillary chromatography; *J. Chromatogr. A*; **2008**; 1186: 2-15
- [10] Grob K., Fröhlich D.; Splitless Injection of Large Volumes of Aqueous Samples: Further Experience – Experiments on Analyzing Triazines by Direct Injection of Drinking Water; *J. High Resol. Chromatogr.*; **1994**; Vol. 17: 792-794
- [11] Staniewski J., Rijks J.A.; Solvent elimination rate in temperature-programmed injections of large sample volumes in capillary gas chromatography; *J. Chromatogr.*; **1992**; 623: 105-113
- [12] Bosboom J.C., Janssen H.G., Mol H.G.J., Cramers C.A.; Large-volume injection in capillary gas chromatography using a programmed-temperature vaporizing injector in the on-column or solvent-vent injection mode; *J. Chromatogr. A*; **1995**; 724: 384-391
- [13] Mol H.G.J., Hendriks P.J.M., Janssen H.G., Cramers C. A., Brinkman U. A. Th.; Large Volume Injection in Capillary GC Using PTV Injectors: Comparison of Inertness of Packing Materials; *J. High Resol. Chromatogr.*; **1995**; Vol. 18: 124-128
- [14] Purcaro G., Moret S., Conte L.S.; Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods; *Talanta*; **2012**; In-Press, Corrected Proof

- [15] Biedermann M., Grob K.; Memory effects with the on-column interface for on-line coupled high performance liquid chromatography-gas chromatography: The Y-interface; *J. Chromatogr. A*; **2009**; 1216, 8652-8658
- [16] Purcaro G., Moret S., Conte L.; Hyphenated liquid chromatography-gas chromatography technique: Recent evolution and applications; *J. Chromatogr. A*; **2012**; 1255: 100-111
- [17] Beens J., Tijssen R.; An On-Line Coupled HPLC-HRGC System for the Quantitative Characterization of Oil Fractions in the Middle Distillate Range; *J. Microcolumn Separations*; **1995**; 7(4) 345-354
- [18] Grob K., Schmarr H.G., Mosandl A.; Early Solvent Vapor Exit in GC for Coupled LC-GC Involving Concurrent Eluent Evaporation; *J. High Resol. Chromatogr.*; **1989**; Vol. 12: 375-382
- [19] Concin N., Hofstetter G., Plattner B., Tomovski C., Fiselier K., Gerritzen K., Fessler S., Windbichler G., Zeimet A., Ulmer H., Siegl H., Rieger K., Concin H., Grob K.; Mineral oil paraffins in human body fat and milk; *Food Chem Toxicol.*; **2008**, 46:544-552
- [20] Fragen und Antworten zu Mineralöl-Übergängen aus Verpackungsmaterialien auf Lebensmittel; FAQ des BfR vom 10.03.**2010**
- [21] Biedermann, M., Fiselier, K., Grob, K.; Aromatic hydrocarbons of mineral oil in foods: method for determining the total concentration and first results; *J. Agric. Food Chem.*; **2009**, 57. 8711-8721
- [22] Übergänge von Mineralöl aus Verpackungsmaterialien auf Lebensmittel; Stellungnahme Nr. 008/2010 des BfR vom 09.12.**2009**
- [23] Neukom H.P., Grob K., Biedermann M., Noti A.; Food contamination by C<sub>20</sub>-C<sub>50</sub> mineral paraffins from the atmosphere; *Atmos. Environ.* **2002**, 36, 4839-4847
- [24] Gough M.A., Rowland S.J.; Characterisation of unresolved complex mixtures of hydrocarbons in petroleum; *Nature*; **1990**; Vol. 344; 648-650
- [25] Mineralölanalytik im Lebensmittelbereich. Workshop des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) Berlin und des Kantonalen Labors Zürich, Juni **2010**
- [26] Mineralöle in Lebensmittelverpackungen - Entwicklungen und Lösungsansätze. Fachtagung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) Berlin, September **2011**
- [27] ISO 12228:**1999** Animal and vegetable fats and oils -- Determination of individual and total sterols contents -- Gas chromatographic method.
- [28] Biedermann M., Bongratz A., Mariani C., Grob K.; Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils; *Eur Food Res Technol.*; **2008**; 228:65-74
- [29] Grob K., Biedermann M., Artho A., Schmid J.P.; LC, GC and MS of sterol dehydration products; *La rivista italiana delle sostanze grasse*; **1994**; Vol. 71: 533-538