

Kopplungen in der HPLC

Stavros Kromidas, Blieskastel

Nachfolgend möchte ich Ihnen einen sehr kurzen Abriss zu Kopplungen in der HPLC geben; dieses Thema wird ausführlich in den Büchern behandelt, die am Ende dieses Textes aufgeführt sind.

Inhaltsangabe

Thema	Seite
Was ist eine Kopplung?	1
Bedeutung und Vorteile der Kopplungsverfahren	3
Kopplungen chromatographischer Verfahren	4
Wann werden welche Kopplungen gebraucht?	6

Was ist eine Kopplung?

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

Beispielsweise erfolgt zunächst in einer HPLC-Anlage eine mehr oder weniger grobe Trennung eines komplexen Stoffgemisches; das gesamte Eluat oder bestimmte Fraktionen werden anschließend Online, d. h. direkt über ein Interface, in einen Gaschromatographen geführt. Dort wird das vorgetrennte Gemisch weiter in seine Bestandteile aufgetrennt. Oft schließt sich eine Identifizierung mittels Spektroskopie an, also: LC-GC/MS-Kopplung. Vereinfacht formuliert: Die HPLC fungiert in diesem Fall quasi als „Online-Probenvorbereitung“ für die Kapillar-GC/MS, siehe Abb. 1 und 2.



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

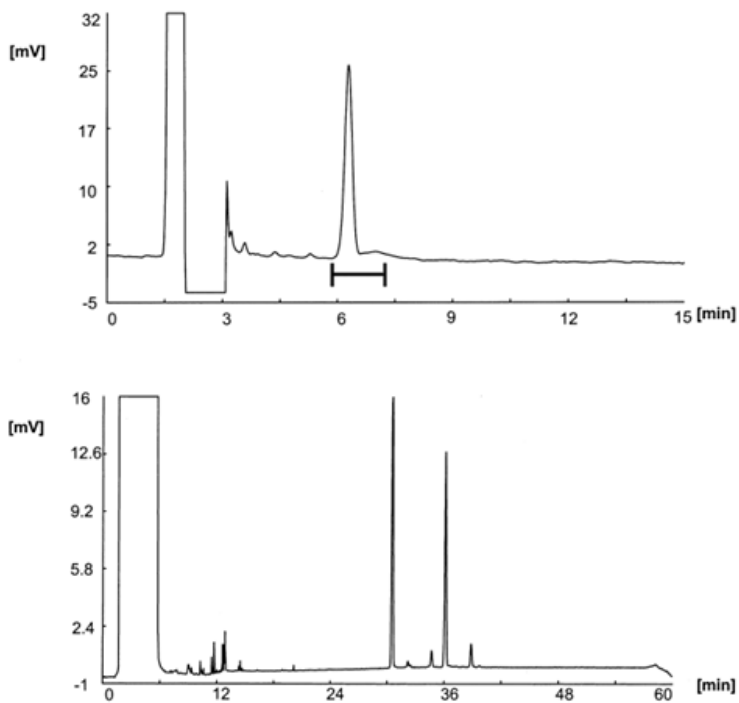


Abb. 2: Transfer eines fest eingestellten Zeitfensters von der LC in den GC (oben: LC-UV-Chromatogramm, unten: GC-FID-Chromatogramm der Fraktion – Ref. 2)
 Quelle: Nestola, Becker in Stavros Kromidas (Hrsg.) „Der HPLC-Experte“

Im täglichen Sprachgebrauch hat sich allerdings eingebürgert, als Kopplung im Wesentlichen die Kombination „Chromatographie-Trennung“ und „Detektion mit spektroskopischer Information“ zu bezeichnen, z. B. LC- oder HPTLC/MS-Kopplung. Die Kopplung zweier chromatographischer Verfahren dagegen wird meist als „Zweidimensionale Chromatographie“ („2D“) bezeichnet.

Bedeutung und Vorteile der Kopplungsverfahren

Bedeutung

Die Bedeutung der Kopplungsverfahren wächst seit Mitte der 1980er Jahre permanent, das Thema nimmt einen breiten Raum in internationalen Symposien über Chromatographie ein. In diesem Zusammenhang werden folgende Begriffe benutzt: Hyphenated Techniques, orthogonale Analysentechniken, (Comprehensive) 2D, mehrdimensionale Chromatographie, selten: Chromatoskopie, Spektrographie. Die Kopplungsverfahren werden auch in den nächsten Jahren ein dominantes Thema in der Analytik bleiben. So läuft beispielsweise z. Z. ein EU-finanziertes Projekt zur 3D, das Ziel des Vorhabens lautet: Anfang der 2020er Jahre soll eine Peakkapazität von 1.000.000 (tatsächliche Trennung von ca. 125.000 Peaks) in einer Nacht erreicht werden.

Vorteile

1a) Kopplung zweier chromatographischer Verfahren miteinander

Bei komplexen Stoffgemischen wie Naturstoffgemischen, Emulgatoren, Pestizid-Metaboliten, Polymergemischen mit Monomeren usw. ist oft die Selektivität (genauer: die Peakkapazität, Anzahl der Peaks pro Zeiteinheit) eines chromatographischen Verfahrens nicht ausreichend, um alle Probestandteile aufzutrennen. Durch die Online-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 im optimalen(!) Fall die Peakkapazitäten, z. B.

HPLC:	Peakkapazität : 10
Zweidimensionale DC:	Peakkapazität : 10
Kopplung HPLC-Zweidimensionale DC:	Peakkapazität : 100

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

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

Obwohl die Kopplung eines Trennverfahrens mit einem spezifischen Assay (z. B. HPLC gekoppelt mit einem enzymatischen Test) zu einer merklichen Verbesserung

der Spezifität führen kann, widmet man sich heute eher der Kopplung zweier chromatographischer Verfahren.

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

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

Kopplungen chromatographischer Verfahren

Was?	Kommentar
LC-LC	Im Moment mit Abstand die wichtigste Kopplungstechnik in diversen Varianten (z. B. RP-HILIC, RP-Mixed Mode, RP-RP usw.). Wird Hardware-und Softwaretechnisch von allen großen Hersteller unterstützt
SPE-LC	Neuer Name für eine alte Technik: Online-Kopplung eines Probenvorbereitungs- und eines Trennschrittes,
LC-GC	z. B. Festphasenextraktion - HPLC-Trennung Bereits seit Anfang der 1980er Jahre in der Diskussion und ansatzweise im Einsatz, noch kein Durchbruch (Gerstel, Axel Semrau)
LC-DC	Technisch und methodisch ausgereift, in der Umweltanalytik teilweise erfolgreich, noch nicht die Akzeptanz auf breiter Basis (Camag)
LC-CE/CEC	Technisch (mit Einschränkungen) 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 (PSS)
SFE-SFC, SFE-GC	Keine Kopplung im eigentlichen Sinne, eher Automatisierung eines Probenvorbereitungsschrittes, sehr spezifisch, (noch) geringe Akzeptanz
SEC-IEC	Trennung von Proteinen zunächst durch Gelfiltration und anschließend mittels Ionenaustausch. Großes Potenzial, geringe Verbreitung

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, noch seltener Einsatz, wird stets interessanter
LC-MS und LC-Multi MS	Die wichtigste Kopplung der LC nach der Kopplung mit dem DAD, s. u.; ausgereift, mehrere Interfaces möglich, mittlerweile auch robust und günstig, immer mehr auf breiter Basis im Einsatz
LC-MALDI (Q-TOF)	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 sind
GPC-FTIR	Seit über vierzig Jahren der Begleiter des forschenden Polymeranalytikers, sehr aussagekräftig
LC-FTIR	Erst seit Beginn der 1990er Jahre in der Diskussion; durch die Lösungsmittelbeschränkung relativ kleines Einsatzgebiet
LC-NMR	Enormer Informationsgewinn, Geräte sehr teuer und betreuungsintensiv, die Nachweisgrenze ist nach wie vor ein Problem, in Forschungsbereichen vereinzelt im Einsatz
LC-AAS, LC-ICP, ICP-MS	Durch lediglich eine Durchflusszelle ist ein jedes klassisches ICP- oder AAS-Gerät für die Online-Kopplung umrüstbar, hohe Nachweisgrenze, noch recht selten anzutreffen

Von der weiteren Entwicklung der Mikro- und Sensorentchnik wird auch die Kopplungstechnik profitieren. Im Falle einer wachsenden Akzeptanz wird erwartet, dass die miniaturisierten und subminiaturisierten Kopplungssysteme, **Mikro-Total-Analysen-Systeme**, μ TAS, Chip-HPLC-MS in der chemischen Prozesstechnik, der Qualitätskontrolle, der Medizin, der Vor-Ort-Umweltanalytik (als portable Systeme) und in der klinischen Diagnostik verstärkt eingesetzt werden – aber keines Falls auf breiter Basis in einem klassischen analytischen Labor.

Wann werden welche Kopplungen gebraucht?

1) Chromatographie 1 – Chromatographie 2 (2D)

Trennung komplexer Stoffgemische ähnlicher Komponenten, Erhöhung der Selektivität und der Peakkapazität (Hunderte bis Tausende von Peaks theoretisch trennbar) Außerdem: Die 2D-Chromatographie ist der beste „Detektor“, um die Peakhomogenität zu überprüfen. In Abbildung 3 wird gezeigt, dass unter Peak Nr. „D“ sich doch noch 18 Komponenten befinden – erst mit Hilfe der zweidimensionalen DC feststellbar. Und in Abbildung 4 befinden sich im vollkommen symmetrischen Peak Nr. 3 tatsächlich drei Komponenten – ebenfalls nur mit Hilfe der 2D erkennbar.

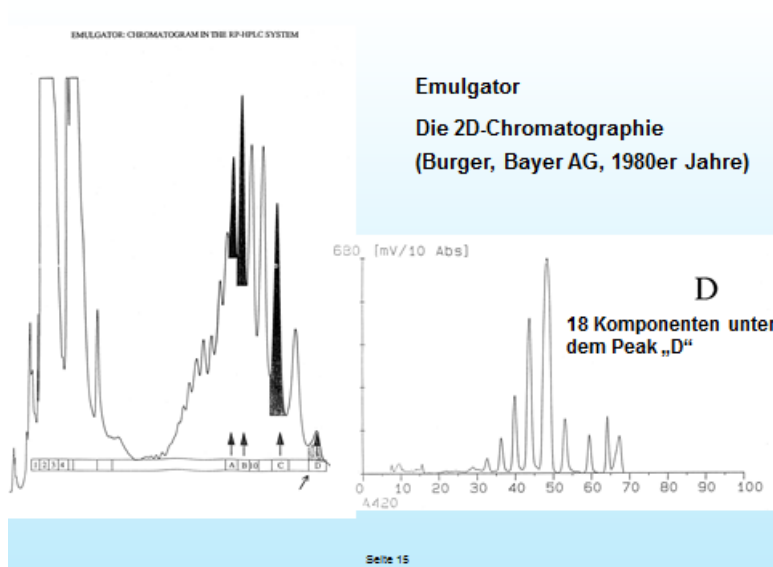


Abb. 3 HPLC-DC-Kopplung: Der HPLC-Peak „D“ enthält 18 Komponenten

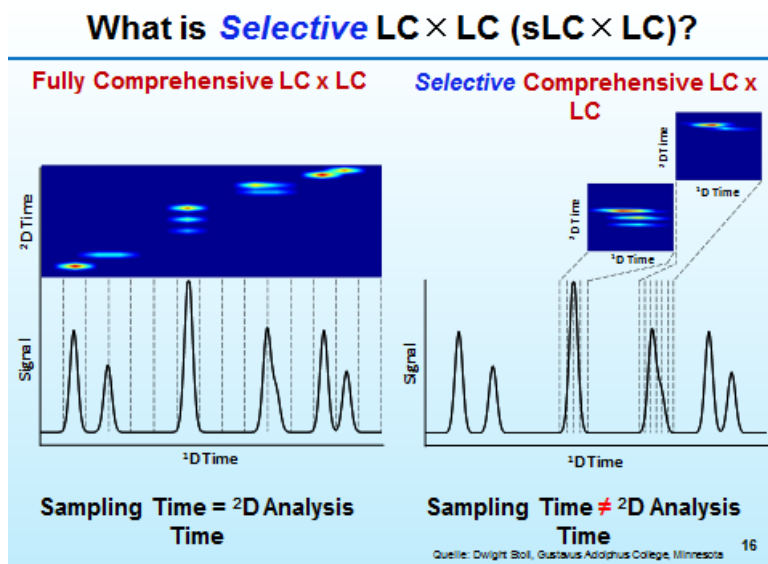


Abb. 4 LC-LC-Kopplung zu Überprüfung der Peakhomogenität: Unter dem symmetrischen Peak Nr. 3 befinden sich drei, unter dem eher „verdächtigen“ (wegen des „Buckels“) Peak Nr. 4 lediglich zwei Komponenten.

2) Chromatographie - Spektroskopie

Identifizierung unbekannter Probenkomponente, Erhöhung der Spezifität bei gleichbleibender Auflösung

3) Chromatographie 1 - Chromatographie 2 - Spektroskopie Komplexe Trennung inkl. Identifizierung, Erhöhung sowohl der chromatographischen Auflösung/Peakkapazität als auch der Spezifität

Applikationsbeispiele sind bei den Herstellern erhältlich, z. B. Camag für LC-DC, ThermoScientific, Agilent, Shimadzu, Waters für LC-LC, Bruker für LC-NMR, PSS für GPC- und LC-FTIR.

Es ist verständlich, dass die Bereitschaft für Publikationen aus dem Industrieumfeld 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 folgenden Publikationen:

„HPLC richtig optimiert“

„Der HPLC-Experte“ – Möglichkeiten und Grenzen der modernen HPLC“

„Der HPLC-Experte II – so nutze ich meine HPLC/UHPLC optimal!“ Wiley-VCH

„Das LC-MS-Buch für Anwender“