

Analytische Chemie 2016/2017

Miniaturisierung, Steigerung von Geschwindigkeit, Genauigkeit, Leistungsfähigkeit und Auflösung sowie die Verringerung von Nachweisgrenzen charakterisieren die Entwicklungen in der instrumentellen Analytik. Viele Methoden können inzwischen auf Probenvorbereitung verzichten und liefern gleichzeitig detaillierte und ganz neue Informationen über komplexe Proben. Umgekehrt ermöglichen neue Derivatisierungsschritte die Strukturaufklärung komplexer Moleküle. Mehrdimensionalität und Kopplung von Methoden, etwa der Ionenmobilität mit der Massenspektrometrie, bilden einen Trend. Die Einbeziehung von Bildinformation auf Mikroebene ist in der Massenspektrometrie heute ein Merkmal hochleistungsfähiger Bioanalytik.

Trennmethoden

◆ In der Flüssigchromatographie war das letzte Jahrzehnt von der Entwicklung von Säulenkonfigurationen geprägt, die Trennleistungen jenseits der 10 000 Böden pro Säule brachten. Im Wesentlichen sind dies Säulen mit Sub-2- μm -Partikeln, oberflächenporösen Partikeln oder Monolithen.

Bei den hocheffizienten stationären Phasen zeichnete sich in den letzten zwei Jahren ein Trend weg von der UHPLC (ultrahigh-performance liquid chromatography) mit stationären Sub-2- μm -Phasen ab. Stattdessen werden eher oberflächenporöse stationäre Phasen (superficially porous oder core-shell particles) eingesetzt. Sie bieten den Vorteil, Massen in einer dünnen, porösen, äußeren Schale von 3 bis 10 μm großen Partikeln diffusionskontrolliert zu transportieren.

Abbildung 1 (S. 390) gibt einen Überblick über die Trennleistungen und Analysengeschwindigkeiten, die verschiedene Säulenkonfigurationen erreichen. Mit 5 μm großen oberflächenporösen Partikeln ist die höchste Trennleistung von 120 000 Böden pro Säule realisierbar, erreicht bei einer Durchfluss-

zeit von 10 min.¹⁾ Solche hocheffizienten Säulenkonfigurationen dienen beispielsweise dazu, Fischöl eindimensional zu trennen. Dabei erreichen Trennsäulen von bis zu 3 m Länge bei einem Gegendruck von typischerweise weniger als 600 bar Bodenzahlen von bis zu 460 000 pro Säule.²⁾ Wie das Beispiel zeigt, sind solche Trennungen nicht nur von akademischem Interesse, sondern beantworten auch Fragen aus der Industrie.

Mehrdimensionale Flüssigchromatographie

◆ Den erhöhten Bedarf an Trennleistung und Peakkapazität decken vermehrt multidimensionale Trennungen, die mehrere chromatographische und massenspektrometrische Trenndimensionen kombinieren. Die gängigsten und inzwischen kommerzialisierten Ansätze zur Kombination verschiedener flüssigchromatographischer Trenndimensionen sind unter anderem die umfassende (comprehensive) 2-D-HPLC und die 2-D-HPLC mit multipler Fraktionensammlung (multiple heart-cutting 2-D HPLC).³⁾ Bei

der ersten Methode werden die Fraktionen aus der ersten Trenndimension in einer Schleife gesammelt und dann in eine sehr schnell trennende zweite Dimension transferiert. So wird die gesamte Trennung der ersten Dimension in die zweite überführt (daher umfassend).

Bei der Heart-Cutting-Methode werden interessierende Fraktionen aus der ersten Trenndimension in mehreren (typischerweise zwölf) über Ventile geschalteten Proben-schleifen gesammelt, um sie anschließend sequenziell in der zweiten Dimension zu analysieren (daher ausschneidend). Solche Systeme eignen sich zur Analyse komplexer Mischungen von Naturstoffen⁴⁾ oder therapeutischer Proteine.⁵⁾

Mehrdimensionale Gaschromatographie

◆ In der mehrdimensionalen Gaschromatographie wurden umfassende 2-D-GC und heart-cutting-2-D-GC zu drei- oder gar vierdimensionalen Systemen kombiniert.^{6,7)} Als weitere Trenndimen-

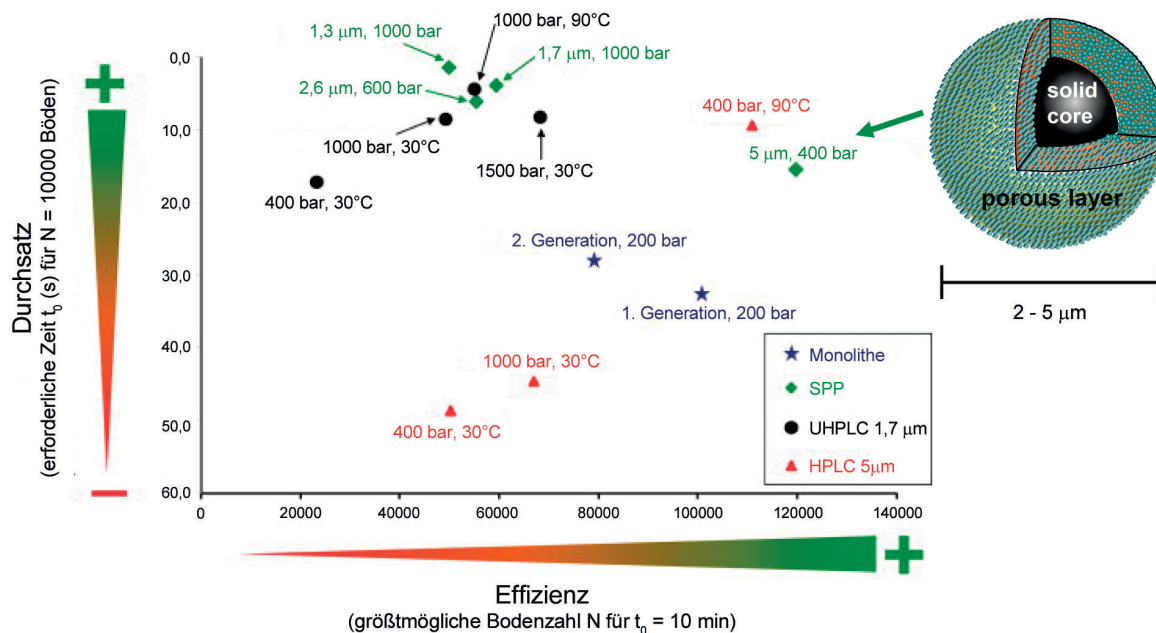


Abb. 1. Trennungen mit hocheffizienten Säulenkonfigurationen. Die höchste Trennleistung ist erzielbar bei 400 bar mit oberflächenporösen 5- μm -Partikeln (rechts oben). SPP: superficially porous particles¹⁾

sionen bieten sich im Anschluss an die zweidimensionale gaschromatographische Trennung physikalische Methoden wie Ionenmobilitäts- oder Massenspektrometrie an. Ein Aufbau mit beidem machte es möglich, mehr als 50 Komponenten eines Extrakts aus Ringelblumen (*Calendula officinalis*) zu trennen. So ließen sich auch den empirischen Formeln teilweise die Strukturen der pflanzlichen Inhaltsstoffe zuordnen (Abbildung 2).

Kapillarelektrophorese

◆ Für kapillarelektrophoretische Trennungen haben Cabot und Kollegen Mikrostrukturen mit 3-D-Druck hergestellt und dabei Nylon- oder Seidenfasern eingebunden.⁸⁾

Als besonders geeignet für die Charakterisierung von Proteinstrukturvarianten, den Proteoformen, hat sich die Kopplung der Kapillarelektrophorese mit der Massenspektrometrie erwiesen. So

trennte die Methode 155 Proteoformen des rekombinanten menschlichen Interferon- β 1, eines komplex glycosylierten biotherapeutischen Proteins.⁹⁾

Christian Huber, Salzburg

Literatur

- 1) S. Fekete, J. L. Veuthey, D. Guilleme, J. Chromatogr. A 2015, 1408, 1–14.
- 2) S. Lamotte, T. Gruending, U. Loebl, R. Stritskyet al., Chromatographia 2017, 80, 763–769.
- 3) K. Sandra, G. Vanhoenacker, I. Vandenheede, M. Steenbeke, M. Joseph, P. Sandra, J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2016, 1032, 119–130.
- 4) F. Cacciola, S. Farnetti, P. Dugo, P. J. Marriott, L. Mondello, J. Sep. Sci. 2017, 40, 7–24.
- 5) K. Sandra, M. Steenbeke, I. Vandenheede, G. Vanhoenacker, P. J. Sandra, J. Chromatogr. A 2017, 1523, 283–292.
- 6) Y. Nolvachai, C. Kulsing, P. J. Marriott, TrAC, Trends Anal. Chem. 2017, 96, 124–137.
- 7) C. Lipok, J. Hippler, O. J. Schmitz, J. Chromatogr. A 2018, 1536, 50–57
- 8) J. M. Cabot, N. P. Macdonald, S. C. Phung, M. C. Bredmore, B. Paull, Analyst 2016, 141, 6422–6431.
- 9) D. R. Bush, L. Zang, A. M. Belov, A. R. Ivanov, B. L. Karger, Anal. Chem. 2016, 88, 1138–1146.

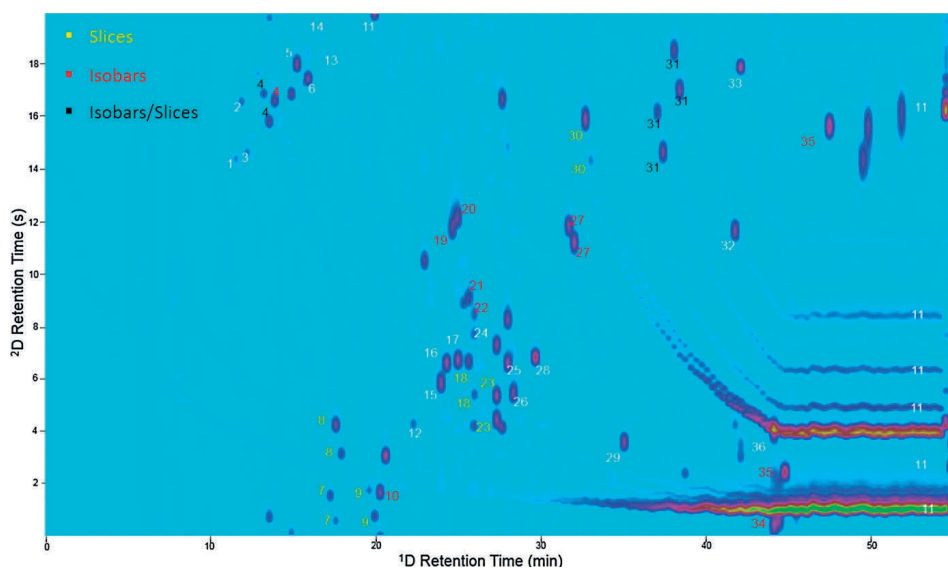


Abb. 2. Konturplot der ersten beiden Trenndimensionen einer vierdimensionalen GCxGCxAPCI-IM-qToF-Analyse eines Ringelblumenextrakts.⁷⁾

Mit freundlicher Genehmigung durch Elsevier, 2017.