

# 1

## 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen

Dwight R. Stoll <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gustavus Adolphus College, St. Peter, USA

### 1.1 Motivationen für zweidimensionale Trennung

In der Vergangenheit war ein Großteil der Forschung, die sich mit mehrdimensionalen Trennungen und ihrer Anwendung auf reale analytische Probleme befasst hat, auf den Umgang mit komplexen Proben ausgerichtet. Diese werden traditionell als Proben mit Hunderten oder Tausenden von Substanzen beschrieben und stammen oft aus natürlichen Quellen wie Pflanzenextrakten oder Körperflüssigkeiten (z. B. Blut oder Urin). Es hat sich jedoch gezeigt, dass die mehrdimensionale Trennung auch für Proben, die schwer zu trennende, aber – nach der traditionellen Definition – nicht komplexe Analyten enthalten, äußerst effektiv sein kann. Da diese Unterscheidung einen großen Einfluss darauf haben kann, wie man an die Methodenentwicklung herangeht, beginnen wir hier mit einer Gegenüberstellung der beiden Fälle.

#### 1.1.1 Schwierig zu trennende Proben

Die Schwierigkeit, die mit der Trennung einer bestimmten Probe verbunden ist, kann von ihrer schiereren Komplexität (d. h. Tausende von darin enthaltenden Substanzen) herrühren. In diesem Fall reicht es nicht aus, sich auf die chromatographische Trennung allein zu verlassen, um das Gemisch vollständig zu trennen, sondern es ist ein zusätzliches Momentum für Selektivität erforderlich (z. B. Probenvorbereitung und/oder selektive Detektion mittels Massenspektrometrie). Es kommt jedoch häufig vor, dass Proben, die nur wenige Substanzen enthalten, aufgrund des hohen Ähnlichkeitsgrades der Substanzen in der Mischung schwer zu trennen sind. So kann ein Gemisch beispielsweise nur sechs Substanzen enthalten, aber wenn zwei dieser sechs Substanzen Enantiomere sind (1a und 1b), dann kann die vollständige Trennung des Gemisches mit einer einzigen Säule schwierig sein, selbst wenn die Trennung der Substanzen 2–5 von 1a/1b einfach ist. Solche Situationen treten heute häufiger auf als früher, zum Teil aufgrund der Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe mit mehreren chiralen Zentren [1] und der zunehmenden Bedeutung

#### 4 | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen

des Nachweises sowohl der D- als auch der L-Enantiomere von Aminosäuren ([2], siehe dazu auch Kap. 6 und 7).

##### 1.1.2 Komplexe Proben

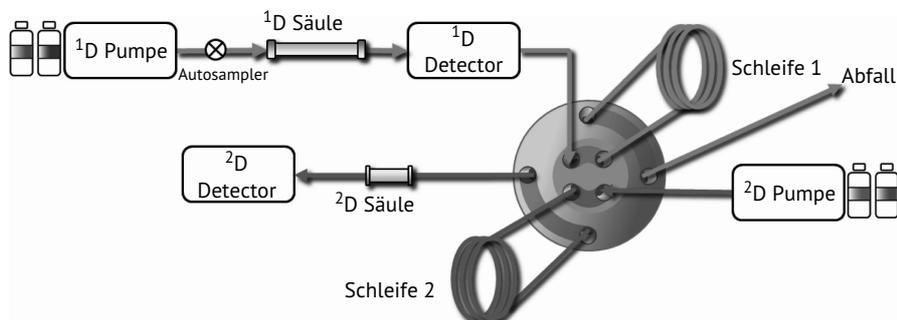
Wie oben erwähnt, wird traditionell davon ausgegangen, dass komplexe Proben Hunderte oder Tausende von unterschiedlichen Substanzen enthalten. Diese Proben stammen oft, aber nicht immer, aus der Natur. So können beispielsweise chemisch synthetisierte Tenside und Polymere zu sehr heterogenen Mischungen aus Tausenden von verschiedenen Substanzen führen. In der Vergangenheit konzentrierte sich die Analyse solcher Proben durch mehrdimensionale Chromatographie hauptsächlich auf sogenannte umfassende Trennmethode, die eine Art globales Profil oder „Fingerprint“ der Probe liefern. In solchen Fällen, in denen nur ein einziges oder wenige Moleküle in der Probe für die Analyse von Bedeutung sind, können einfachere mehrdimensionale Trennmethode wie z. B. das Schneiden eines Peaks ausreichend sein, ja sogar bevorzugt werden.

##### 1.1.3 Ziel der Trennung

Wie in der Literatur zur mehrdimensionalen Trennung und weiter unten oft diskutiert wird, ist der Prozess der Entwicklung einer mehrdimensionalen Trennmethode ein kompromissbehaftetes Verfahren. Beispielsweise beeinträchtigen Bedingungen, die kürzere Analysezeiten begünstigen, die Nachweisempfindlichkeit und umgekehrt. Daher ist es für den Analytiker wichtig, gleich zu Beginn der Methodenentwicklung zu erkennen und zu definieren, welche Leistungsmerkmale der Methode für ihn am wichtigsten sind. Wenn zum Beispiel das Erreichen einer vollständigen Auflösung von sechs kritischen Analytenpaaren für die Anwendung der Methode von entscheidender Bedeutung ist, dann sollten Entscheidungen zur Methodenentwicklung dieses Ziel unterstützen, auch wenn dies auf Kosten der Analysezeit und/oder der Nachweisempfindlichkeit geht.

## 1.2 Auswahl des zweidimensionalen Trennungsmodus

Alle zweidimensionalen Trennungen können entweder „offline“ oder „online“ durchgeführt werden. Im Offline-Modus werden eine oder mehrere Fraktionen des 1D-Eluats in einem Zwischenspeicher, wie z. B. einem Satz von Vials oder einer Mikrotiterplatte, gesammelt. Diese Fraktionen werden dann zu einem späteren Zeitpunkt (Minuten bis Jahre) in ein anderes LC-System (entweder dasselbe LC-System, das unter anderen Bedingungen als für die 1D-Trennung betrieben wird, oder ein ganz anderes LC-System) injiziert, entweder mit oder ohne Zwischenverarbeitung dieser Fraktionen. Bei Proteomik-Anwendungen der 2D-LC ist es beispielsweise üblich, die Fraktionen vor der Analyse durch die 2D-Trennung zu entsalzen oder durch Verdunstung zu trocknen, um organisches Lösungsmittel zu entfernen [3]. Im Online-Modus werden die von der 1D-Säule gesammelten Fraktionen entweder



**Abb. 1.1** Instrumentenkonfiguration, die typischerweise für 2D-LC verwendet wird (Quelle: Dr. Gabriel Leme).

sofort durch direkte Injektion in die 2D-Säule weiterverarbeitet oder für eine kurze Zeit (Sekunden bis Stunden) im Gerät selbst gespeichert (normalerweise in Kapillarschleifen oder an der Oberfläche von Sorbentien „Sorbensfallen“). Ein Beispiel für eine Instrumentenkonfiguration, die üblicherweise für diesen Zweck verwendet wird, ist in Abb. 1.1 dargestellt. In diesem Fall hat das Schnittstellenventil zwischen der 1D- und der 2D-Säule zwei Positionen. Durch Umschalten zwischen den beiden Stellungen ändert sich die Rolle der Schleifen 1 und 2 zwischen dem Sammeln des 1D-Eluats und dem Einleiten des 1D-Eluats in den 2D-Zustrom, wodurch dann das Eluat in die 2D-Säule injiziert wird.

Da kommerziell erhältliche Geräte für die 2D-LC-Trennung immer ausgefeilter und zuverlässiger geworden sind, geht der Trend in der Industrie weg von der Offline-Trennung, da die Durchführung von Offline-Trennungen für eine große Anzahl von Proben unpraktisch ist und das Risiko der Degradation und Kontamination der 1D-Fractionen besteht, wenn sie außerhalb des Geräts gehandhabt werden müssen [4]. Angesichts dieses Trends habe ich mich für den Rest dieses Kapitels ganz auf die Online-2D-LC konzentriert. Leser, die mehr über Offline-2D-LC erfahren möchten, werden auf Übersichtsartikel verwiesen, die sich diesem Thema widmen [5, 6].

### 1.2.1 Das Analyseziel bestimmt den Modus

Ab Ende der 1970er-Jahre begannen verschiedene Gruppen, die Modi der 2D-LC-Trennung zu entwickeln, die allgemein als *Heartcut-Modus* und *umfassender Modus* bezeichnet werden [7, 8]. In den letzten zehn Jahren wurden zwei weitere Modi für 2D-Trennungen entwickelt, die als *mehrfacher Heartcut* und *selektiv umfassend* bezeichnet werden. Jeder dieser vier Modi wird in Abschn. 1.2.2 ausführlich besprochen. An dieser Stelle möchte ich jedoch betonen, dass die Wahl des Trennmodus immer vom Analyseziel bestimmt werden sollte. Wenn Sie zum Beispiel eine komplexe Probe haben und so viel wie möglich über diese Probe erfahren möchten (d. h. Hunderte von Substanzen identifizieren), dann wird der umfassende Modus der 2D-Trennung fast immer die beste Wahl sein. Wenn Sie jedoch nur an einigen wenigen Zielsubstanzen in der Probe interessiert sind – auch wenn die Probenmatrix hochkomplex ist –, dann ist ein gezielterer Modus der 2D-Trennung wie einfacher oder

6 | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen

mehrfacher Heartcut wahrscheinlich der beste Ansatz. In der Praxis ist die Zeit, die für jede 2D-Trennung benötigt wird, der entscheidende Parameter für eine effiziente Nutzung des 2D-LC-Instruments. Jede 2D-Trennung, die nicht notwendig für das Erreichen des Analyseziels ist, verursacht unnötige Kosten sowohl in Bezug auf Zeit als auch auf Material und macht die Methode unnötig komplex.

1.2.2 Gegenüberstellung der vier Modi für 2D-Trennungen

Die überwiegende Mehrheit der heute entwickelten 2D-LC-Anwendungen gehört zu einer der vier in Abb. 1.2 dargestellten 2D-Trennungsarten. Beim einzelnen Heartcut (A; LC-LC) wird eine einzelne Fraktion des 1D-Eluats, die die interessierenden Analyten enthält, am Ausgang der 1D-Säule aufgefangen und zur 2D-Säule transferiert, wo diese Fraktion der ursprünglichen Probe weiter getrennt wird, sofern die in der ersten und zweiten Dimension verwendeten Trennmechanismen komplementär sind. Der vielleicht größte Vorteil des LC-LC-Modus besteht darin, dass die Zeit, die für die Trennung des 1D-Eluats in der zweiten Dimension zur Verfügung steht, nicht begrenzt ist. Dies bietet eine enorme Flexibilität bei der Wahl der Parameter für die 2D-Trennung, einschließlich der Flussrate, der Säulenabmessungen und des Injektionsvolumens. Der größte Nachteil von LC-LC ist jedoch, dass diese Technik auf die Analyse von Substanzen begrenzt ist, die in einer einzigen Fraktion des 1D-Eluats erfasst werden können. Dennoch wurde der LC-LC-Ansatz mit großem Erfolg in diversen Anwendungsbereichen eingesetzt, die

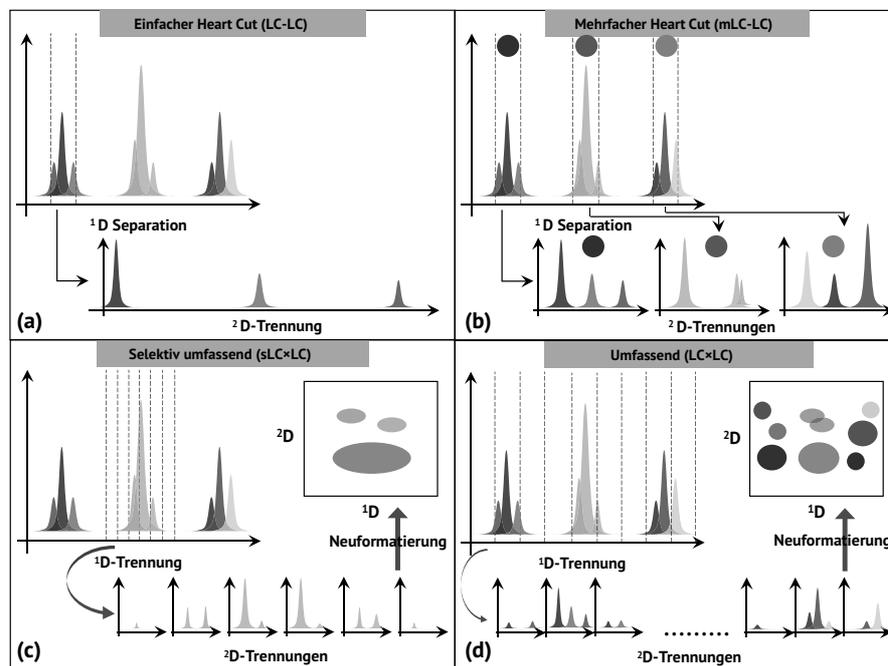


Abb. 1.2 Die vier verschiedenen Modi der 2D-LC-Trennung.

von der Identifizierung niedermolekularer pharmazeutischer Verunreinigungen [9] bis zum Nachweis von Arzneimittelmetaboliten im Plasma reichen [10].

Das genaue Gegenteil von LC-LC in Bezug auf die analytische Bandbreite ist der umfassende Modus der 2D-Trennung (D; LC  $\times$  LC). Wie die Abbildung zeigt, werden in diesem Fall Fraktionen des 1D-Eluats gesammelt und nacheinander einzeln in die 2D-Trennung überführt. Typischerweise ergibt dies eine lange Reihe von vielen (zehn bis hundert) 2D-Chromatogrammen, die in einem einzigen Datensatz gesammelt werden. Dieser lange Datensatz kann dann in Abschnitte zerlegt werden, die den einzelnen 2D-Trennungen entsprechen, und dann neu formatiert werden, sodass ein zweidimensionales Datenfeld entsteht, das dann entweder als Konturkarte oder als 3D-Oberflächendarstellung visualisiert werden kann. Die Vor- und Nachteile des LC  $\times$  LC-Ansatzes sind im Grunde genommen umgekehrt wie beim LC-LC-Ansatz. Der Hauptvorteil besteht darin, dass die Bandbreite der 2D-Trennung genauso groß ist wie die Bandbreite der 1D-Trennung. Der größte Nachteil besteht darin, dass die Zeit, die für jede einzelne der 2D-Trennungen zur Verfügung steht, stark eingeschränkt ist aufgrund der großen Zahl der Fraktionen des 1D-Eluats, die von der zweiten Dimension verarbeitet werden müssen.

Die beiden anderen in Abb. 1.2 dargestellten Modi sind Hybride der LC-LC- und LC  $\times$  LC-Modi. Im Falle des mehrfachen Heartcut (B; mLC-LC) wird eine Fraktion des 1D-Eluats je Abschnitt der 1D-Trennung gesammelt, die für eine weitere Trennung vorgesehen ist. Dies entspricht dem Vorgehen bei der LC-LC, wird im Verlauf der 2D-Trennung aber zwei- oder mehrmals wiederholt. Schließlich werden bei selektiven umfassenden Trennungen (C; sLC  $\times$  LC) mehrere Fraktionen des 1D-Eluats über eine bestimmte Zone der 1D-Trennung gesammelt, in Schleifen oder „Fallen“ gespeichert, und dann wie bei LC  $\times$  LC-Trennungen einzeln in die 2D-Säule injiziert. Diese Hybridmodi sind in vielen Fällen deshalb interessant, weil sie die Stärken von LC-LC und LC  $\times$  LC ausnutzen und gleichzeitig deren Schwächen mildern. Insbesondere bieten mLC-LC und sLC  $\times$  LC dem Analytiker eine große Flexibilität bei der Entwicklung und Implementierung einer 2D-LC-Methode, da sie die Entkopplung des Sammelns von 1D-Eluatfraktionen von deren weiteren Trennung in der zweiten Dimension ermöglichen [11].

### 1.2.3 Hybride Modi bieten Flexibilität

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, wie die zusätzliche Flexibilität, die mLC-LC und sLC  $\times$  LC sich bieten, genutzt werden kann, und ich möchte im Folgenden zwei Beispiele zeigen. Erstens ist sLC  $\times$  LC hilfreich, um das sogenannte Untererfassungsproblem (Undersampling) bei 2D-Trennungen zu vermeiden. Undersampling bezieht sich auf den unerwünschten Effekt beim Sammeln von 1D-Eluatfraktionen, die breiter als etwa die Hälfte einer 1D-Peakbreite sind. In diesem Fall können Analyten, die nahe beieinander von der 1D-Säule eluieren, bei der Probenahme wieder vermischt werden, und die Trennleistung der ersten Dimension einer 2D-Trennung wird effektiv vermindert [12–14]. Dieses Problem tritt im LC  $\times$  LC-Modus besonders dann auf, wenn die 1D-Peaks schmal sind (z. B. < 5 s breit). Zur Bewältigung dieser Herausforderung können mehrere schmale (< 1 s) Fraktionen über eine be-

**8** | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen

stimmte Region gesammelt werden, die für die 1D-Trennung von Interesse ist. Zweitens kann der  $sLC \times LC$ -Modus auch dazu verwendet werden, das Volumen des 1D-Eluats zu steuern, welches für jede interessierende Region der 1D-Trennung in die 2D-Säule injiziert wird. Ein konkretes Beispiel soll diesen Vorteil deutlicher machen. Angenommen, wir haben eine bestehende 1D-LC-Trennung und möchten einen bestimmten Peak auf eine 2D-Säule zur weiteren Trennung und/oder Charakterisierung durch Massenspektrometrie übertragen. Wenn der 1D-Peak 15 s breit ist, dann beträgt das Volumen des zu übertragenden Peaks  $250 \mu\text{l}$ . Obwohl es sicherlich möglich ist, dieses Volumen in einer einzigen Fraktion zu übertragen, gibt es viele Fälle, in denen die Injektion eines solch großen Volumens in die 2D-Säule die Trennleistung der 2D-Trennung beeinträchtigt, insbesondere wenn ein Unterschied zwischen den mobilen Phasen der 1D- und der 2D-Trennung vorliegt [15]. Mit  $sLC \times LC$  kann man nun vier Fraktionen anstelle einer einzigen des interessierenden 1D-Peaks sammeln, wobei jede der Fraktionen etwa  $60 \mu\text{l}$  beträgt. Diese vier Fraktionen können dann einzeln in die 2D-Säule injiziert werden [16]. Dies wird zwar die Analysezeit erhöhen und erfordert eine komplexere Schnittstelle, aber diese Art von Flexibilität kann bei der Methodenentwicklung sehr wertvoll sein.

### 1.3 Wahl der Trennmodi

Nachdem man sich für den Modus der 2D-Trennung entschieden hat, besteht die nächste wichtige Entscheidung darin, welche zwei Trennmodi in der ersten und zweiten Dimension des 2D-Systems verwendet werden.

#### 1.3.1 Komplementarität als Leitmotiv

In der Literatur über 2D-Trennungen wird viel über das Prinzip der „Orthogonalität“ diskutiert, in Bezug auf die Auswahl der Trennmodi, die in einer 2D-Trennung verwendet werden sollten. Der Grund für die Forderung nach Orthogonalität ist, dass es von einem rein theoretischen Standpunkt aus gesehen am besten ist, wenn die aus den 1D- und 2D-Trennungen erhaltenen Retentionsmuster nicht korrelieren [17]. Ich denke jedoch, dass es von größerer praktischer Relevanz ist, über die Komplementarität der beiden in der 2D-Trennung verwendeten Trennmodi nachzudenken. Inwieweit ergänzt der in der zweiten Dimension verwendete Trennmodus die bereits in der ersten Dimension verwendete Trennung? Ein konkretes Beispiel soll helfen, diesen Punkt zu verdeutlichen. Nehmen wir an, wir trennen eine Mischung von Peptiden, die sowohl in der Gesamtzahl der Aminosäurereste als auch in der Anzahl der Lysinreste variieren, sodass deren positive Ladung in Lösung ebenfalls variiert (bei niedrigem pH-Wert). Wenn wir ein 2D-LC-System aus RP-C18-Säulen und mobilen Phasen mit niedrigem pH-Wert in beiden Dimensionen vorsehen würden, wird dies keine effektive 2D-Trennung ergeben, da die zweite Trennung keine neue Trennselektivität hinzufügt. Nehmen wir nun an, wir ändern die 1D-Trennung in Kationenaustausch (CEX), wo die Peptide hauptsächlich nach ihrem Grad der positiven Ladung eluieren werden

(niedrige Ladung eluiert zuerst, hohe Ladung eluiert zuletzt). Wenn wir nun eine 2D-Trennung mit einer RP C18-Säule hinzufügen, wird diese die 1D-Trennung gut ergänzen, da sie sich hauptsächlich nach der Wasserlöslichkeit der Peptide trennt (die am besten löslichen eluieren zuerst, die am wenigsten löslichen zuletzt). In diesem Fall können wir zwei Peptide haben, die die gleiche Ladung tragen – und somit in der CEX-Trennung koeluieren – aber aufgrund von Unterschieden in der Anzahl und/oder der Art der Aminosäuren sehr unterschiedliche Wasserlöslichkeiten (und somit unterschiedliche Hydrophobizität) haben, die sich durch die 2D-RP-Säule leicht trennen lassen.

In der Vergangenheit wurde viel Mühe darauf verwendet, herauszufinden, welche Trennmodi für verschiedene Probenotypen und Anwendungen am besten geeignet sind. Heutige Anwender können diese Ergebnisse als Grundlage für ihre eigene Arbeit verwenden. Für einige Anwendungsbereiche gibt es gute Veröffentlichungen, die die Komplementarität verschiedener Trennungen für bestimmte Molekültypen wie z. B. Peptide veranschaulichen [18]. Ich empfehle den Lesern, auch 2D-LC-Datenbanken zu konsultieren, um die jeweils besten Trennungen für ihre Anwendung herauszufinden.<sup>1)</sup>

### 1.3.2 Die Pirok-Kompatibilitätstabelle

Leider müssen wir mehr als nur die Komplementarität der Selektivitäten der unterschiedlichen Trennmodi berücksichtigen, die bei einer 2D-LC-Trennung verwendet werden. Andere Faktoren wie die Kompatibilität der mobilen Phasen mit den einzelnen Trennmodi sind ebenso wichtig und können die Kombination von Trennmodi, die unter dem Gesichtspunkt der Selektivität recht attraktiv aussieht, in der Praxis unbrauchbar machen. Zum Beispiel ist die Kombination einer Normalphasen-(NP)-Trennung (d. h. nicht modifiziertes Kieselgel als stationäre Phase, Hexan als mobile Phase) mit einer RP-Trennung für einige Anwendungen attraktiv, weil die NP-Trennung von adsorptiven Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase dominiert wird, während die RP-Trennung von der Verteilung der Analyten in eine gebundene stationäre Phase dominiert wird. Dieser Unterschied in den Retentionsmechanismen kann zu hochgradig komplementären Selektivitäten führen. Allerdings stoßen wir in diesem Fall auf eine größere praktische Schwierigkeit, da die unpolaren mobilen Phasen mit einem hohen Anteil organischer Lösungsmittel, die für NP-Trennungen verwendet werden, mit den wasserreichen mobilen Phasen, die für RP-Trennungen verwendet werden, nicht mischbar sind – zumindest nicht über einen breiten Mischungsbereich. Dieser Umstand schränkt die Verwendung einiger Kombinationen von Trennmodi wie NP-RP ein, obwohl selbst in diesem Fall das Mischbarkeitsproblem durch die Injektion sehr kleiner Mengen von 1D-Eluat in große 2D-Säulen beherrscht werden kann [19]. Pirok und Schoenmakers haben die Kenntnisse über die Kompatibilität diverser Trennungen in der 2D-LC gesammelt und in der in Abb. 1.3 dargestellten Tabelle zusammengefasst. Grau schattierte Kombinationen sollten gut funktionieren, während hellgrau schattierte Kombina-

1) <http://www.multidlc.org/literature/2DLC-Applications>.

10 | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen

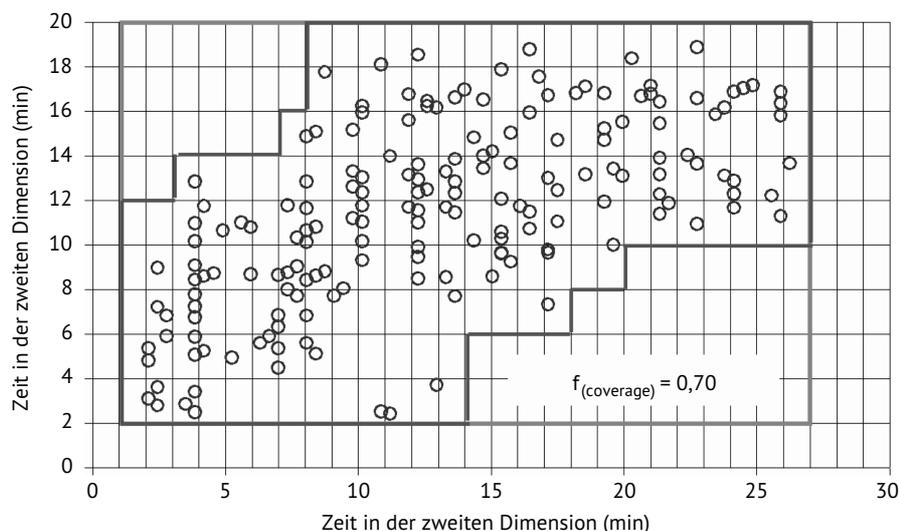
	<sup>2</sup> RP	<sup>2</sup> NP	<sup>2</sup> HILIC	<sup>2</sup> HIC	<sup>2</sup> IEX	<sup>2</sup> SEC-Aq	<sup>2</sup> SEC-Or	<sup>2</sup> Ag	<sup>2</sup> Chiral	<sup>2</sup> Affinity	<sup>2</sup> SFC
<sup>1</sup> RP H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> H <sup>+</sup> Q <sup>+</sup> M <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> Q <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> Q <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> H <sup>+</sup> M <sup>+</sup> Q <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> Q <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> H <sup>+</sup> I <sup>+</sup> O <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> H <sup>+</sup> I <sup>+</sup> O <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> Q <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> I <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	H <sup>+</sup> Q <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	F <sup>+</sup> H <sup>+</sup> M <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> NP H <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup> O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B E O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup> B O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	O <sup>+</sup> O <sup>2+</sup>	A E O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup> O <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>	A E O <sup>+</sup> O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> O <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>
<sup>1</sup> HILIC H <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup>	A O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup>	X <sup>+</sup>	X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> HIC H <sup>+</sup>	E O <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	B O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup>	B O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	A O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>
<sup>1</sup> IEX H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	E O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>	B O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	B X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	A O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>
<sup>1</sup> SEC-Aq H <sup>+</sup>	E O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup>	A O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	E O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> SEC-Or H <sup>+</sup>	B <sup>2+</sup> O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>	B O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> Ag H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>
<sup>1</sup> Chiral I <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup>
<sup>1</sup> Affinity H <sup>+</sup> S <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	B O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	A O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>	B O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> P <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> p <sup>2+</sup>	O <sup>+</sup> P <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>
<sup>1</sup> SFC H <sup>+</sup>	E O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	E O <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup> p <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>2+</sup>	O <sup>+</sup> X <sup>+</sup>	O <sup>2+</sup>	O <sup>2+</sup> X <sup>+</sup>	E O <sup>+</sup> X <sup>2+</sup>

Abb. 1.3 Matrix zur Kompatibilität der verschiedenen Trennungsmodi bei der Verwendung in der ersten oder zweiten Dimension von 2D-LC-Systemen. Abdruck mit Genehmigung aus [20].

tionen mindestens ein oder mehrere Probleme erzeugen, die gelöst werden müssen, bevor sie für eine 2D-Trennung ausgewählt werden. Leser, die an einer detaillierteren Erklärung aller Informationen in dieser Tabelle interessiert sind, werden auf die Originalarbeit von Pirok und Schoenmakers verwiesen [20]. Die Tabelle wird im Zuge der Weiterentwicklung der 2D-LC-Technologie ständig aktualisiert; eine aktuelle Version ist auf unserer Website<sup>2)</sup> zu finden.

### 1.3.3 Bestimmung der Komplementarität von Trennungen

Sobald wir eine erste Auswahl der beiden Trennmodi für unsere 2D-LC-Trennung getroffen haben, müssen wir die Qualität der resultierenden Trennung beurteilen. Für spezifischere Trennungen sind wir normalerweise am meisten daran interessiert, eine oder mehrere Zielsubstanzen untereinander oder von der Probenmatrix aufzulösen. In diesem Fall reicht es aus, zu beurteilen, inwieweit die 2D-Trennung die Substanzen getrennt hat, die von der 1D-Säule koeluieren; dies ist ein Maß für die Komplementarität der beiden Trennungen. Bei umfassenderen Trennungen interessiert uns in der Regel, inwieweit durch das Zusammenspiel von 1D- und 2D-Trennung die Bestandteile der Probe über den gesamten Trennbereich verteilt sind. Die Notwendigkeit, dies zu beurteilen, hat viele Gruppen dazu veranlasst, eigene Metriken zu entwickeln, die in neueren Artikeln kritisch diskutiert und verglichen wurden [21, 22]. In unserer eigenen Arbeit haben wir den in Abb. 1.4



**Abb. 1.4** Darstellung des häufig verwendeten Ansatzes zur Schätzung des Anteils des 2D-Trennraums, der bei der Analyse realer Proben von Peaks belegt wird. Die graue Umrandung erfasst die Bereiche, in denen Peaks normalerweise auftreten können. Außerhalb der Umrandung liegen die Totzeiten und Äquilibrierungszeiten der ersten und zweiten Dimension. Nach [24].

2) [www.multidlc.org/megatable](http://www.multidlc.org/megatable).

**12 | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen**

dargestellten Ansatz verwendet, der darauf hinausläuft, den Anteil des verfügbaren 2D-Trennbereichs, der die Peaks enthält, zu schätzen, indem die Anzahl der Segmente, die Peaks enthalten, ermittelt und durch die Gesamtzahl der Segmente des Trennbereichs geteilt wird. Während der Methodenentwicklung passen wir die Elutionsbedingungen in beiden Dimensionen an, um die Peaks so breit wie möglich über den Trennbereich zu verteilen und so eine möglichst 100-prozentige Abdeckung des Raumes zu erreichen. Dies ist in der Praxis nur selten möglich, aber einige Anwendungen können mehr als 90 % Abdeckung erreichen [23].

## 1.4 Auswahl der Trennungsbedingungen

Neulinge bei mehrdimensionalen Trennungen sprechen oft davon, dass sie von der Anzahl der Variablen, die bei der Entwicklung einer 2D-Methode zu berücksichtigen sind, und der scheinbaren Komplexität von 2D-Trennungen überfordert sind. Es stimmt zwar, dass bei einer 2D-Methode mehr Variablen zu berücksichtigen sind als bei einer 1D-Methode, aber bei einer methodischen Herangehensweise ist es möglich, die Methodenentwicklung so anzugehen, dass man nicht überfordert wird. Im Folgenden betrachten wir die Methodenentwicklung von zwei verschiedenen Ausgangspunkten aus:

1. es existiert bereits eine 1D-Methode, die wir in die 1D-Trennung einer 2D-Methode umwandeln wollen,
2. die 2D-Methode muss von Grund auf entwickelt werden, wobei wir nicht durch die Parameter einer bestehenden 1D-Methode eingeschränkt sind.

### 1.4.1 Mit Vorgabe feststehende Bedingungen in der ersten Dimension

Angenommen, wir wollen eine 2D-Methode entwickeln, indem wir eine 2D-Trennung zu einer bestehenden 1D-Methode hinzufügen. Dies ist in Fällen üblich, in denen eine 1D-Methode zur Trennung und Bestimmung der Konzentrationen mehrerer Verunreinigungen in einem Wirkstoff verwendet wird. Wenn diese Methode auf UV-Detektion beruht und plötzlich ein neuer Peak auftritt, lautet die erste Frage – was ist dieser neue Peak? Diese Frage lässt sich oft schnell mit einem einfachen Heartcut-Ansatz (LC-LC) und dem Hinzufügen einer 2D-Trennung lösen, die eine MS-Detektion erlaubt. Dies ermöglicht die Erfassung des neuen, unbekannt Peaks, dessen Übertragung auf die 2D-Säule, die Trennung der Bestandteile der Fraktion voneinander und von dem Puffer der 1D-mobilen Phase und schließlich die Elution und Detektion durch Massenspektrometrie. Die Entwicklung einer solchen Methode ist im Prinzip einfach, aber sobald man sich die Variablen ansieht, stößt man schnell auf ein Problem. Angenommen, die bestehende 1D-Methode läuft mit einer Flussrate von 1 ml/min und der zu bestimmende Peak ist 5 s breit auf halber Höhe. Wenn wir diesen Peak vollständig erfassen wollen, inklusive eines Sicherheitsabstands davor und danach, um leicht Retentionsverschiebungen von einer Analyse zur nächsten zu berücksichtigen, dann müssten wir einen etwa 20 s breiten

Anteil des 1D-Eluats sammeln ( $8\sigma$  Peakbreite, plus 10 % auf jeder Seite). Bei einer Flussrate von  $1000 \mu\text{l}/\text{min}$  entspricht dies einem Fraktionsvolumen von etwa  $333 \mu\text{l}$ . Als Injektionsvolumen für die 2D-Trennung ist diese Menge selbst für die größten heute gebräuchlichen analytischen Säulen (z. B.  $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$  Innendurchmesser) zu groß und wird die Qualität der 2D-Trennung erheblich beeinträchtigen. Dies ist der erste Punkt, an dem eine wichtige Entscheidung getroffen werden muss. Wir haben drei Hauptoptionen (Leser, die sich für nähere Einzelheiten interessieren, werden auf die neuere Literatur verwiesen; siehe [15]):

1. Injizieren Sie die gesamte Fraktion, wie sie ist, in eine große 2D-Säule und hoffen Sie auf das Beste. Dies funktioniert gut in Fällen, in denen der Zielanalyt aus der 1D-Säule in einem Eluat enthalten ist, welches ein schwaches Lösungsmittel für die 2D-Säule darstellt (z. B. 1D-Eluat mit 10/90 ACN/Wasser, der in eine mobile 2D-Phase mit 20/80 ACN/Wasser injiziert wird), aber dies ist nicht immer möglich oder praktikabel.
2. Injizieren Sie einen kleineren Anteil des 1D-Peaks, um das Fraktionsvolumen handhabbarer zu machen (z. B.  $40 \mu\text{l}$ ). Dieser Ansatz löst das Problem des Injektionsvolumens, führt aber möglicherweise zu neuen Problemen:
  - a) es besteht die Gefahr, dass Analyten fehlen, die im vorderen oder hinteren Teil des 1D-Zielpeaks eluieren, und
  - b) die Reproduzierbarkeit dieses Ansatzes ist nicht gut, da er empfindlich auf kleine Verschiebungen der 1D-Retentionszeit reagiert.
3. Die Option, die dem Analytiker die größte Kontrolle bietet, ist die Verwendung einer aktiven Modulationstechnik, um die Auswirkungen des großen Fraktionsvolumens auf die 2D-Trennung zu steuern. Die gängigsten Ansätze sind:
  - Verdünnung des 1D-Eluats mit schwachem Lösungsmittel unter Verwendung einer zusätzlichen Pumpe (z. B. Verdünnung mit Wasser im Falle einer RP-Trennung in der zweiten Dimension)
  - Aktive Lösungsmittelmodulation unter Verwendung eines Ventils zur Anpassung der 1D-Fraktion
  - Verwendung einer „Adsorptionsfalle“ zur Trennung der interessierenden Analyten von der 1D-Matrix vor der Injektion in die 2D-Säule.

Nachdem das geeignete Volumen der 1D-Fraktion und der Ansatz zur Übertragung dieser Fraktion in die zweite Dimension gewählt ist, können die Dimensionen und Bedingungen für die 2D-Säule festgelegt werden. Im Falle einer LC-LC-Trennung wie der in diesem Szenario beschriebenen, hat der Analytiker in der zweiten Dimension eine große Flexibilität, und die meisten Regeln, die wir für die Auswahl der Säulen und Bedingungen in 1D-LC verwenden, gelten auch hier. Die Säulenlänge, die Partikelgröße und die Flussrate werden stark von der Analysezeit für die 2D-Trennung bestimmt, und die theoretischen Überlegungen hinter dieser Auswahl sind einfach anzuwenden [27]. Trennungen in der zweiten Dimension, die lang dauern und eine hohe Auflösung erfordern, profitieren von langen Säulen ( $> 100 \text{ mm}$ ). Andererseits werden kurze Trennungen oder in Fällen, in denen nur eine grobe 2D-Trennung erforderlich ist (z. B. bei Entsalzungsanwendungen), kurze Säulen ( $< 100 \text{ mm}$ ) ausreichen. Bei Verwendung der UV-Detektion in der zweiten

**14** | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen

Dimension sind Säulen mit größerem Durchmesser ( $> 3,0$  mm i. d.) und höheren Durchflussraten ( $> 1$  ml/min) wünschenswert, da diese Bedingungen die Auswirkungen des großen Volumens des injizierten 1D-Eluats mildern. Andererseits sind bei der MS-Detektion in der zweiten Dimension Säulen mit kleinerem Durchmesser ( $< 2,1$  mm i. d.) und niedrigeren Flussraten ( $< 1$  ml/min) wünschenswert, um das „Fluten“ des MS-Einlasses mit Lösungsmittel zu vermeiden.

**1.4.2 Bei null anfangen – flexible Bedingungen in der ersten Dimension**

Wenn wir eine 2D-LC-Methode von Grund auf neu entwickeln, haben wir nicht so viele Einschränkungen zu beachten wie beim Hinzufügen einer 2D-Trennung zu einer bestehenden 1D-LC-Trennung. In den meisten Fällen nutzen die Anwender diese Freiheit, indem sie die Durchflussrate der 1D-Trennung reduzieren, sodass das Volumen des 1D-Eluats, welches in die 2D-Säule geleitet wird, nicht so groß ist wie im oben beschriebenen Szenario. Dies ist besonders hilfreich bei LC  $\times$  LC-Trennungen, bei denen 2D-Säulen tendenziell klein sind, um schnelle 2D-Trennungen zu ermöglichen. In diesem Fall beträgt eine typische 1D-Durchflussrate 50  $\mu$ l/min. Aber selbst bei LC-LC- und hybriden 2D-LC-Trennungen ist der Umgang mit einer 1D-Flussrate von 200  $\mu$ l/min wesentlich einfacher als der Umgang mit 1000  $\mu$ l/min.

**1.4.3 Besonderheiten bei umfassenden 2D-LC-Methoden**

Wie in Abb. 1.2 dargestellt, werden bei umfassenden 2D-LC-Trennungen viele Fraktionen des 1D-Eluats gesammelt und im Verlauf einer einzigen 2D-LC-Analyse in die 2D-Säule überführt. Dies bedeutet, dass alle mit einer einzigen 2D-Trennung verbundenen Schritte im Verlauf einer LC  $\times$  LC-Analyse zehn- oder hundertmal stattfinden, einschließlich eines oder zweier Ventilschaltungen je Fraktion, in der Regel einhergehend mit einer veränderten Zusammensetzung der mobilen Phase für die Elution der injizierten Komponenten. Die meisten LC  $\times$  LC-Trennungen dauern zwischen 30 min bis 3 h, wobei die Zeitskala jeder 2D-Trennung normalerweise 15–120 s beträgt. Dies wiederum erfordert, dass die zweite Dimension mit kurzen ( $< 50$  mm), schmalen (2,1 mm i. d.) Säulen und hohen ( $> 1$  ml/min) Flussraten betrieben wird. Natürlich gibt es Ausnahmen, aber diese Bedingungen sind typisch. In unserer Arbeit haben wir beobachtet, dass die Konstruktion des Ventils, das für den Transfer von 1D-Eluatfraktionen in die zweite Dimension verwendet wird, und der Druck, bei dem die 2D-Säule betrieben wird, einen signifikanten Einfluss auf die Lebensdauer von 2D-Säulen haben, weshalb diese Parameter bei der Entwicklung von LC  $\times$  LC-Methoden unbedingt in Betracht gezogen werden sollten [23, 28].

**1.4.4 Faustregeln**

1. Wenn Sie RP-Trennungen in beiden Dimensionen verwenden, versuchen Sie, die Säule mit der geringeren Retention für die erste Trennung zu verwenden. Dies trägt dazu bei, den Volumeneffekt bei der Übertragung des 1D-Eluats auf die 2D-Säule in Grenzen zu halten.

2. Schätzen Sie die Stärke des Lösungsmittels im 1D-Eluat im Vergleich zum Startpunkt bei der 2D-Trennung. Stellen Sie bei RP-Trennungen sicher, dass das 1D-Eluat etwa 10 % weniger organisches Lösungsmittel enthält; dies führt in der Regel zu guten Ergebnissen. Wenn dies nicht möglich ist, kann der Anteil an organischem Lösungsmittel mithilfe aktiver Modulation angepasst werden [25].
3. Ein guter Ausgangspunkt ist die Verwendung von Säulen mit gleichem Durchmesser für die 1D- und 2D-Trennung.

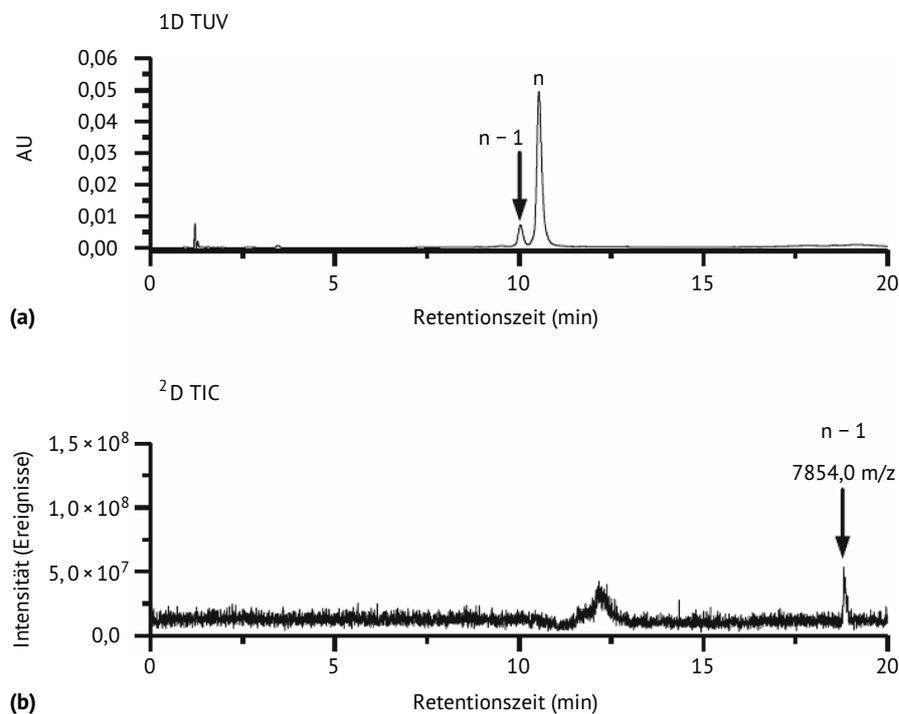
## 1.5 Beispiele für die Methodenentwicklung

Im Rahmen dieses Beitrags ist es nicht möglich, alle Aspekte der Methodenentwicklung im Detail zu behandeln. Ich denke, die nächstbeste Möglichkeit ist es, einige Beispiele von 2D-LC-Methoden vorzustellen und die wichtigsten Entscheidungen bei deren Methodenentwicklung zu erklären. Dies soll den Lesern ermöglichen, eine ähnliche Vorgehensweise bei der Entwicklung ihrer eigenen Methoden anzuwenden.

### 1.5.1 Beispiel Nr. 1 – Verwendung von LC-LC zur Identifizierung einer Verunreinigung in einem synthetischen Oligonukleotid

Dieses erste Anwendungsbeispiel, das aus der Arbeit von Koshel et al. stammt, verwendet eine einzelne 2D-LC-Heartcut-Methode zur Identifizierung einer Verunreinigung in einem synthetischen Oligonukleotid mittels Massenspektrometrie [29]. In der Vergangenheit war die Identifizierung solcher Verunreinigungen durch MS schwierig, da die hohen Konzentrationen langkettiger aminhaltiger Ionenpaar-Reagenzien, die für RP-Trennungen von Oligonukleotiden verwendet werden, mit der MS-Detektion nicht gut kompatibel sind. Die in Abb. 1.5a gezeigte 2D-LC-Methode ermöglicht jedoch die Trennung der Verunreinigung vom Zieloligonukleotid durch die 1D-Säule und die anschließende Trennung der Verunreinigung von langkettigen Ionenpaar-Reagenzien durch die 2D-Säule vor der Detektion. In diesem Fall wird in beiden Dimensionen die gleiche RP-Säulenchemie verwendet. Obwohl dies bei 2D-LC-Trennungen im Allgemeinen ungewöhnlich ist, ist es hier wirksam, weil die in der ersten und zweiten Dimension verwendeten Ionenpaar-Reagenzien chemisch recht unterschiedlich sind (Hexylamin vs. Triethylamin + Hexafluorisopropanol) und zu unterschiedlichen Selektivitäten führen. Die wichtigen Parameter für die Trennung sind in Tab. 1.1 dargestellt. Die 1D- und 2D-Fließgeschwindigkeiten sind ähnlich; dies ist möglich, da es sich um eine einfache Heartcut-Methode handelt und die Geschwindigkeit der 2D-Trennung nicht kritisch ist. Eine einzelne 50  $\mu$ l-Fraktion des 1D-Eluats (0,5 min  $\times$  0,10 ml/min) wird nach der Verdünnung mit wässrigem Elutionsmittel mittels der 2D-Pumpe auf die 2D-Säule übertragen. Dieser Verdünnungsschritt ist wichtig, da er den Gehalt an organischem Lösungsmittel der in die 2D-Säule injizierten Probe reduziert, was zu einer ausgezeichneten Peakform im 2D-Chromatogramm führt, wie in Abb. 1.5b dargestellt.

## 16 | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen



**Abb. 1.5** Identifizierung einer Verunreinigung in einem synthetischen farbstoffmarkierten Oligonukleotid unter Verwendung von LC-LC mit RP-Säulen in beiden Dimensionen. Die Verwendung unterschiedlicher Ionenpaarbedingungen in den beiden Dimensionen Hexylamin für die UV-Detektion, siehe (a), sowie Triethylamin + Hexafluorisopropanol für die MS-Kopplung, siehe (b), sorgt für eine komplementäre Selektivität, obwohl die Säulenchemie dieselbe ist, und macht die 2D-Trennung für den Nachweis durch Massenspektrometrie geeignet. Abdruck mit Genehmigung aus [29].

### 1.5.2 Beispiel Nr. 2 – umfassende 2D-LC-Trennung von Tensiden

In diesem zweiten Beispiel untersuchen wir die Verwendung von LC  $\times$  LC zur Abtrennung von Tween 20 (auch bekannt als Polysorbat 20 oder PS20), einer komplexen Mischung von Fettsäureestern von ethoxyliertem Sorbitan. Der umfassende Modus von 2D-LC ist eindeutig am besten geeignet, um eine komplexe Mischung wie diese zu charakterisieren. Die in Abb. 1.6 gezeigte Trennung, die aus der Arbeit von Vanhoenacker et al. stammt [30], ist eine schöne Demonstration, wie sich HILIC- und RP-Trennungen bei der Verwendung in einem 2D-Trennformat gut ergänzen können. Unter den Bedingungen dieser Trennung trennt die 1D-HILIC-Säule die Moleküle in erster Linie auf der Grundlage der Anzahl der vorhandenen Oxyethylengruppen, wobei höher ethoxylierte Moleküle später in der ersten Dimension eluiert werden. Die 2D-RP-Säule hingegen trennt die Moleküle in erster Linie auf der Grundlage der Länge und der Anzahl der vorhandenen Fettsäureestergruppen. Eine Zusammenfassung der für diese Trennung verwendeten Bedingungen ist in Tab. 1.2 dargestellt. Die 1D-Säule wird mit einer Flussrate betrieben, die für eine 2,1 mm-i. d.-Säule als niedrig angesehen wird (30  $\mu$ l/min), in erster Linie, damit das Volu-

**Tab. 1.1** Zusammenfassung der Bedingungen für die IPRP-IPRP-Trennung von farbstoffmarkierten Oligonukleotiden.

---

**Erste Dimension**

Säule: RP (C18); 50 mm × 2,1 mm i. d., 1,7 μm

Gradientenelution von 66 bis 76 % B

Lösungsmittel A: 100 mM Hexylamin-Acetat, pH 7

Lösungsmittel B: MeOH

Durchflussrate: 0,10 ml/min

Temperatur: 60 °C

Injektionsvolumen: 1 μl

Analysezeit: 30 min

---

**Zweite Dimension**

Spalte: RP (C18); 50 mm × 2,1 mm i. d., 1,7 μm

Gradientenelution von 20 bis 70 % B

Lösungsmittel A: 15 mM Triethylamin, 400 mM Hexafluorisopropanol in Wasser, pH 8

Lösungsmittel B: MeOH

Durchflussrate: 0,25 ml/min

Temperatur: 60 °C

Analysezeit (pro Fraktion): 20 min.

---

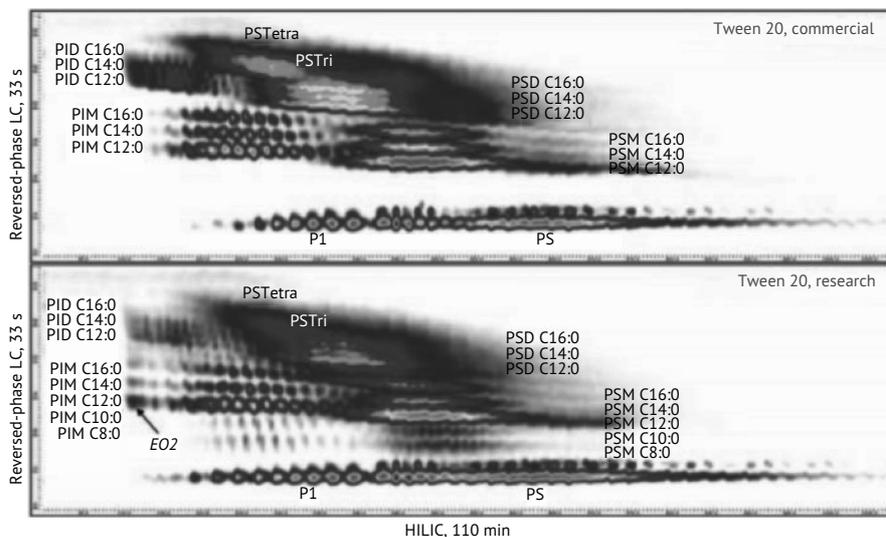
**Schnittstelle**Doppelte Ventile mit sechs Anschlüssen, mit direkter Überführung der Fraktion in die 2D-Säule

---

men des in die 2D-Säule injizierten 1D-Eluats nicht zu groß ist (20 μl). Dies ist hier besonders wichtig, weil jede dieser Fraktionen mehr als 75 % organisches Lösungsmittel enthält, während jede 2D-Trennung mit 60 % organischem Lösungsmittel beginnt, und das meiste dieser organischen Stoffe ist MeOH, das für RP-Trennungen ein schwächeres Lösungsmittel als ACN ist. Eine Erhöhung der 1D-Flussrate und damit des Volumens des 1D-Eluats, der mit jeder Fraktion in die 2D-Säule injiziert wird, würde zu einer starken Verbreiterung der 2D-Peaks führen.

Die 2D-Säule ist relativ kurz (50 mm), schmal (2,1 mm i. d.) und mit kleinen Partikeln (1,8 μm) gepackt, was die in der zweiten Dimension erforderlichen schnellen Trennungen begünstigt. Die Säulentemperatur beträgt 80 °C, was die Verwendung einer für diese Säule als hoch angesehenen Flussrate (2 ml/min) erleichtert [31]. Es werden steile Gradienten verwendet, sodass die Dauer jedes 2D-Zyklus nur 33 s beträgt, was dazu beiträgt, das Undersampling zu minimieren und die Trennung der 1D-Peaks, die von der 1D-Säule vor der Probenahme bereitgestellt werden, aufrechtzuerhalten.

18 | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen



**Abb. 1.6** Trennung der Bestandteile von kommerziellem PS20 mittels LC × LC mit HILIC- und RP-Säulen in der ersten bzw. zweiten Dimension. Angepasst mit Genehmigung nach [30].

### 1.6 Ausblick

Zurzeit beobachten wir eine rasche Verbreitung von 2D-LC-Methoden in Anwendungsbereichen, die von der pharmazeutischen Analyse bis zur Lebensmittel- und Getränkeanalyse reichen. Die Zahl der 2D-LC-Anwender wächst schnell, parallel zu den kontinuierlichen Fortschritten der kommerziell verfügbaren Technologie für 2D-LC und dem verbesserten grundlegenden Verständnis der Technik. Ich erwarte, dass wir in naher Zukunft sorgfältige und kritische Bewertungen der Robustheit dieser Technologie sehen werden. Dies wird für die breitere Nutzung der Technik wichtig sein, da verschiedene Branchen die Möglichkeit der Implementierung von 2D-LC-Methoden in regulierten und Qualitätskontrolllabors in Betracht ziehen. Die Entwicklung schlankerere Ansätze zur Methodenentwicklung (im Gegensatz zu den oben diskutierten erfahrungsbasierten Ansätzen), die wahrscheinlich von der Entwicklung von Software-Werkzeugen für diesen Zweck erheblich profitieren werden (In-Silico-Ansätze), ist dringend erforderlich und wird eine große Wirkung haben, wenn sie in der Praxis eingesetzt werden können. Gegenwärtig werden fast alle mehrdimensionalen LC-Trennungen auf Zeitbasis durchgeführt, d. h. die 1D-Trennung und die anschließende 2D-Trennung von 1D-Eluatfraktionen werden nacheinander durchgeführt. Parallel durchgeführte 2D-Trennungen wären vor diesem Hintergrund attraktiv. Solche Trennungen wurden bereits vor Jahrzehnten untersucht [32], standen damals aber vor ernsthaften technischen Herausforderungen. Diese Ideen werden jetzt vor allem von der Schoenmakers-Gruppe [33] wieder aufgegriffen, und derartige 3D-Trennungen könnten dank der explosionsartigen Zunahme der 3D-Druckmöglichkeiten in der Praxis eingesetzt werden, besonders für

**Tab. 1.2** Zusammenfassung der Bedingungen für die HILICxRP-Trennung von PS20.**Erste Dimension**

Spalte: HILIC (nackte Kieselsäure); 100 mm × 2,1 mm i. d., 1,8 μm

Gradientenelution von 98 bis 0 % B

Lösungsmittel A: 10 mM Ammoniumformiat, pH 3 in 50/50 ACN/Wasser

Lösungsmittel B: ACN

Durchflussrate: 30 μl/min

Temperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 1 μl

Analysezeit: 120 min

**Zweite Dimension**

Spalte: RP (C18); 50 mm × 2,1 mm i. d., 1,8 μm

Gradientenelution von 20 bis 100 % B

Lösungsmittel A: 5 mM Ammoniumformiat, pH 3 in 50/50 MeOH/Wasser

Lösungsmittel B: 5 mM Ammoniumformiat, pH 3 in 50/50 Ethylacetat/MeOH

Durchflussmenge: 2 ml/min

Temperatur: 80 °C

Analysezeit (pro Fraktion): 33 s

**Schnittstelle**

Doppelschleifen-Design mit 20 μl-Schleifen, im Gleichstrommodus betrieben

sehr komplexe Proben. Schließlich wird sich die Forschung in Bezug auf 2D-LC auf Strategien zur Datenanalyse konzentrieren, damit die Anwender leichter die Informationen aus datenreichen Chromatogrammen, wie in Abb. 1.6 dargestellt, extrahieren können.

**Danksagung**

Ich möchte Dr. Gabriel Leme für die Erstellung von Abb. 1.1 danken.

**Literatur**

- 1 Venkatramani, C.J., Al-Sayah, M., Li, G., Goel, M., Girotti, J., Zang, L., Wigman, L., Yehl, P. und Chetwyn, N. (2016). Simultaneous achiral-chiral analysis of pharmaceutical compounds using two-dimensional reversed phase liquid chromatography-supercritical fluid chromatography. *Talanta* 148: 548–555, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.054>.
- 2 Hamase, K., Morikawa, A., Ohgusu, T., Lindner, W. und Zaitso, K. (2007). Comprehensive analysis of branched aliphatic D-amino acids in mammals using an integrated multi-loop two-dimensional column-switching high-performance liquid chromatographic system combining reversed-phase and enantioselective columns. *Journal of Chromatography A* 1143 (1–2): 105–11, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.078>.

## 20 | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen

- 3 Wang, H., Sun, S., Zhang, Y., Chen, S., Liu, P. und Liu, B. (2015). An off-line high pH reversed-phase fractionation and nano-liquid chromatography – Mass spectrometry method for global proteomic profiling of cell lines. *Journal of Chromatography B* 974: 90–95, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.10.031>.
- 4 Erni, F. und Frei, R. (1978a). Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures. *Journal of Chromatography A* 149: 561–569, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81011-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81011-0).
- 5 Horváth, K., Fairchild, J.N. und Guiochon, G. (2009). Optimization strategies for off-line two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1216 (12): 2511–2518, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.064>.
- 6 Fairchild, J.N., Horváth, K. und Guiochon, G. (2009). Approaches to comprehensive multidimensional liquid chromatography systems. *Journal of Chromatography A* 1216 (9): 1363–1371, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.073>.
- 7 Erni, F. und Frei, R.W. (1978b). Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures. *Journal of Chromatography A* 149: 561–569, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81011-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81011-0).
- 8 Johnson, E.L., Gloor, R. und Majors, R.E. (1978). Coupled column chromatography employing exclusion and a reversed phase. A potential general approach to sequential analysis. *Journal of Chromatography* 149: 571–585, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81012-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81012-2).
- 9 Luo, H., Zhong, W., Yang, J., Zhuang, P., Meng, F., Caldwell, J., Mao, B. und Welch, C.J. (2017). 2D-LC as an online desalting tool allowing peptide identification directly from MS unfriendly HPLC methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 137: 139–145, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.012>.
- 10 Jayamanne, M., Granelli, I., Tjernberg, A. und Edlund, P.-O. (2010). Development of a two-dimensional liquid chromatography system for isolation of drug metabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (3): 649–657, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.007>.
- 11 Groskreutz, S.R., Swenson, M.M., Secor, L.B. und Stoll, D.R. (2012). Selective comprehensive multi-dimensional separation for resolution enhancement in high performance liquid chromatography, Part I – Principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A* 1228: 31–40, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.035>.
- 12 Murphy, R.E., Schure, M.R. und Foley, J.P. (1998). Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 70: 1585–1594, <https://doi.org/10.1021/ac971184b>.
- 13 Horie, K., Kimura, H., Ikegami, T., Iwatsuka, A., Saad, N., Fiehn, O. und Tanaka, N. (2007). Calculating optimal modulation periods to maximize the peak capacity in two-dimensional HPLC. *Analytical Chemistry* 79 (10): 3764–3770, <https://doi.org/10.1021/ac062002t>.
- 14 Davis, J.M., Stoll, D.R. und Carr, P.W. (2008). Effect of first-dimension undersampling on effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations. *Analytical Chemistry* 80 (2): 461–473, <https://doi.org/10.1021/ac071504j>.
- 15 Stoll, D.R., Sajulga, R.W., Voigt, B.N., Larson, E.J., Jeong, L.N. und Rutan, S.C. (2017). Simulation of elution profiles

- in liquid chromatography – II: Investigation of injection volume overload under gradient elution conditions applied to second dimension separations in two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1523: 162–172, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.041>.
- 16** Pursch, M. und Buckenmaier, S. (2015). Loop-based multiple heart-cutting two-dimensional liquid chromatography for target analysis in complex matrices. *Analytical Chemistry* 87 (10): 5310–5317, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b00492>.
- 17** Giddings, J.C. (1984). Two-dimensional separations: Concept and promise. *Analytical Chemistry* 56 (12): 1258A–1270A, <https://doi.org/10.1021/ac00276a003>.
- 18** Gilar, M., Olivova, P., Daly, A.E. und Gebler, J.C. (2005). Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 77 (19): 6426–6434, <https://doi.org/10.1021/ac050923i>.
- 19** Dugo, P., Favoino, O., Luppino, R., Dugo, G. und Mondello, L. (2004). Comprehensive two-dimensional normal-phase (adsorption) – Reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 76 (9): 2525–2530, <https://doi.org/10.1021/ac0352981>.
- 20** Pirok, B.W.J., Gargano, A.F.G. und Schoenmakers, P.J. (2017). Optimizing separations in on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 41 (1): 68–98, <https://doi.org/10.1002/jssc.201700863>.
- 21** Schure, M.R. und Davis, J.M. (2015). Orthogonal separations: Comparison of orthogonality metrics by statistical analysis. *Journal of Chromatography A* 1414: 60–76, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.08.029>.
- 22** Gilar, M., Fridrich, J., Schure, M.R. und Jaworski, A. (2012). Comparison of orthogonality estimation methods for the two-dimensional separations of peptides. *Analytical Chemistry* 84 (20): 8722–8732, <https://doi.org/10.1021/ac3020214>.
- 23** Stoll, D.R., Lhotka, H.R., Harmes, D.C., Madigan, B., Hsiao, J.J. und Staples, G.O. (2019). High resolution two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry for robust and sensitive characterization of therapeutic antibodies at the peptide level. *Journal of Chromatography B*, November, 121832, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121832>.
- 24** Davis, J.M., Stoll, D.R. und Carr, P.W. (2008). Dependence of effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations on the distribution of peak capacity between the two dimensions. *Analytical Chemistry* 80 (21): 8122–8134, <https://doi.org/10.1021/ac800933z>.
- 25** Pirok, B.W.J., Stoll, D.R. und Schoenmakers, P.J. (2019). Recent developments in two-dimensional liquid chromatography – Fundamental improvements for practical applications. *Analytical Chemistry* 91 (1): 240–263, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b04841>.
- 26** Stoll, D.R., Shoykhet, K., Petersson, P. und Buckenmaier, S. (2017). Active solvent modulation – A valve-based approach to improve separation compatibility in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 89 (17): 9260–9267, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02046>.
- 27** Carr, P.W., Wang, X. und Stoll, D.R. (2009). Effect of pressure, particle size, and time on optimizing performance in liquid chromatography. *Ana-*

## 22 | 1 2D-HPLC – Methodenentwicklung für erfolgreiche Trennungen

- lytical Chemistry* 81 (13): 5342–5353, <https://doi.org/10.1021/ac9001244>.
- 28** Talus, E.S., Witt, K.E. und Stoll, D.R. (2015). Effect of pressure pulses at the interface valve on the stability of second dimension columns in online comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1378: 50–57, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.019>.
- 29** Koshel, B., Birdsall, R. und Chen, W. (2020). Two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry for impurity analysis of dye-conjugated oligonucleotides. *Journal of Chromatography B* 1137: 121906, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121906>.
- 30** Vanhoenacker, G., Steenbeke, M., Sandra, K. und Sandra, P. (2018). Profiling nonionic surfactants applied in pharmaceutical formulations by using comprehensive two-dimensional LC with ELSD and MS detection. *LCGC North America* 36 (6): 385–393.
- 31** Stoll, D.R., Cohen, J. und Carr, P. (2006). Fast, comprehensive online two-dimensional high performance liquid chromatography through the use of high temperature ultra-fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1122 (1–2): 123–137, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.058>.
- 32** Guiochon, G., Gonnord, M.F., Zakaria, M., Beaver, L.A. und Siouffi, A.M. (1983). Chromatography with a two-dimensional column. *Chromatographia* 17 (3): 121–124, <https://doi.org/10.1007/BF02271033>.
- 33** Davydova, E., Schoenmakers, P.J. und Vivó-Truyols, G. (2013). Study on the performance of different types of three-dimensional chromatographic systems. *Journal of Chromatography A* 1271 (1): 137–143, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.043>.