

Kapillarflüssigchromatographie – Flugzeitmassenspektrometrie (Cap-LC-ToF MS)

Eine Option für die Routineanalytik von Pestiziden?



► Dr. Thorsten Teutenberg,
Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.
(IUTA)



► Dr. Jochen Türk,
Institut für Energie- und Umwelttechnik e. V.
(IUTA)

In der Bioanalytik spielt die Kapillar-HPLC (Cap-LC) bereits seit längerem eine wichtige Rolle. Der Grund hierfür ist, dass das zur Verfügung stehende Probenmaterial in vielen Fällen begrenzt ist, so dass nur geringe Mengen bzw. Volumina injiziert und analysiert werden können. Ein weiterer Vorteil ergibt sich bei Verwendung eines „tatsächlichen“ Cap-LC-Systems, mit dem Flussraten von wenigen Mikrolitern pro Minute generiert werden, weil der Lösemittelverbrauch drastisch reduziert werden kann.

Allerdings werden mit der Cap-LC immer noch Nachteile in Verbindung gebracht, die bisher einen Einsatz in anderen Bereichen als der qualitativen Bioanalytik verhindert haben. Vielfach ist nämlich festzustellen, dass solche Systeme mit einem Fluss-Splitter ausgestattet sind und es sich somit streng genommen nicht um Cap-LC-Systeme handelt. Außerdem wird die

Die Kapillar-HPLC ist eine hoch innovative Technologie. Dennoch ist die Akzeptanz dieser Technologie weiterhin gering. Dabei sind ihre Potenziale enorm. Einerseits können Kosten für teure und toxische Lösemittel drastisch reduziert werden, andererseits ergeben sich gerade in Verbindung mit der Massenspektrometrie deutliche Vorteile, weil der Lösemiteleintrag in das Massenspektrometer signifikant reduziert wird, so dass eine Low-Flow bzw. Nanospray-Quelle verwendet werden kann. Dadurch ist die Ionenausbeute höher und die Gefahr der Ionensuppression bei stark matrixbelasteten Proben weniger problematisch.

Das Ziel dieses Beitrags ist es, die Vor- und Nachteile der mit der Kapillar-HPLC gekoppelten Flugzeitmassenspektrometrie zu bewerten. Die Grundlage dafür bildet eine Applikation aus dem Bereich der Rückstandsanalytik von Pestiziden.

ungenügende Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten im Lösungsmittel-Gradientenmodus bemängelt. Besonders wichtig ist auch, eine totvolumenfreie Verbindung zwischen den einzelnen Bauteilen wie z. B. der Säule mit dem Injektor und der Säule mit dem Detektor herzustellen. Konventionelle HPLC-Systeme sind in der Anwendung deshalb wesentlich robuster bzw. einfacher zu bedienen, weil aufgrund des Säulendurchmessers von 3–4,6 mm die Kapillarleitungen nur eine untergeordnete Rolle in Bezug auf die chromatografische Auflösung bzw. die Peakbreite spielen. Inzwischen ist jedoch eine neue Generation von Cap-LC-Systemen auf dem Markt, die bereits Einzug in vielen Bereichen der Life-Sciences gehalten haben. Die Kopplung der Kapillar-HPLC mit der Massenspektrometrie sollte deshalb insbesondere wegen der geringen Flussraten ideal geeignet sein. Hierbei können die zu analysierenden Spezies mit einem „reinen“ bzw. „nicht unterstützten“ Elektrosprayionisations-Prozess ionisiert werden. Auf diese Weise lässt sich nicht nur die Sensitivität verbessern, sondern gleichzeitig erhöht sich auch die Anzahl der ionisierbaren Analyten. Des Weiteren kann auf zusätzliche Trocknungsgase bzw. höhere Temperaturen zur Unterstützung des Verdampfungsprozesses der mobilen Phase verzichtet werden.

In diesem Beitrag wird ein neues Setup bestehend aus einem Kapillar-HPLC-System, das

mit einem Flugzeitmassenspektrometer (ToF MS) gekoppelt ist, vorgestellt. Die Potenziale dieser Technologie werden am Beispiel der Messung von Pestiziden für die Routinerückstandsanalytik erläutert.

Systemaufbau

Alle Experimente wurden mit einem Kapillar-HPLC-System von Eksigent (Eksigent ExpressLC-100, Eksigent Technologies) durchgeführt, das mit Microfluidic-Kontrollern ausgestattet ist. Das System ermöglicht die direkte Generierung von Flussraten zwischen 0,2 und 30 µl/min, ohne dass ein Fluss-Splitter benötigt wird. Das System ist optimiert für Kapillarsäulen mit einem Innendurchmesser von 300 µm. Die chromatografischen Trennungen wurden auf einer Säule der Firma Phenomenex durchgeführt (100 mm x 0,3 mm ID, 2,5 µm, 100 Å), die mit dem Synergi Fusion-RP Material gepackt war. Die Säule wurde mit dem HPLC Mini Column Ofen von ApMass (A. Müller Industriesysteme) beheizt, der speziell für LC-MS Systeme entwickelt worden ist. Zur Verbindung des Injektors mit der Säule wurde eine PEEKSIL Kapillare (11 cm, 360 µm OD; 30 µm ID) eingesetzt. Die Säule wurde direkt mit dem Emitter verbunden. Als Emitter diente ein Taper Tip (20 cm, 360 µm OD, 20 µm ID, Standardbeschichtung) von New Objective. Das Leco Unique HT TOFMS ausgerüs-

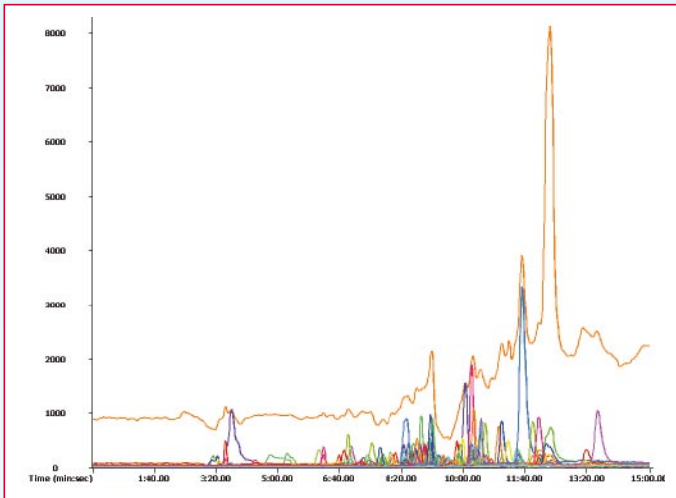


Abb. 1: Chromatogramm eines Pestizid-Mix. Stationäre Phase: Phenomenex Synergi Fusion-RP (100 mm x 0,3 mm ID, 100 Å; 2,5 µm); Mobile Phase: A: Wasser (+0,1 % Ameisensäure), B: Methanol (+0,1 % Ameisensäure); Gradient: von 30 auf 100 % B in 9 Minuten; Flussrate: 3 µl/min; Temperatur: 40 °C; Detektion: Leco Unique HT TOFMS; ESI+: 3,2 kV; Massenbereich: m/z 20–1000; Aufnahmezeit: 8 Spektren pro Sekunde.

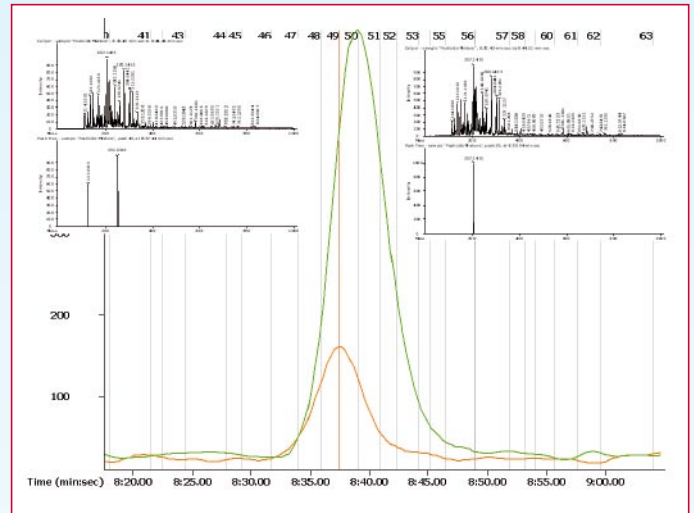


Abb. 3: Extrahierte Ionen-Chromatogramme der co-eluierenden Pestizide Heptenphos (orange) und Isoprotruron (grün). Die Einschübe zeigen die Caliper-Spektren (summiert) sowie die Peak True-Spektren (deconvoluted) dieser Substanzen. Links: Caliper-Spektrum von Heptenphos; Rechts, Caliper-Spektrum von Isoprotruron.

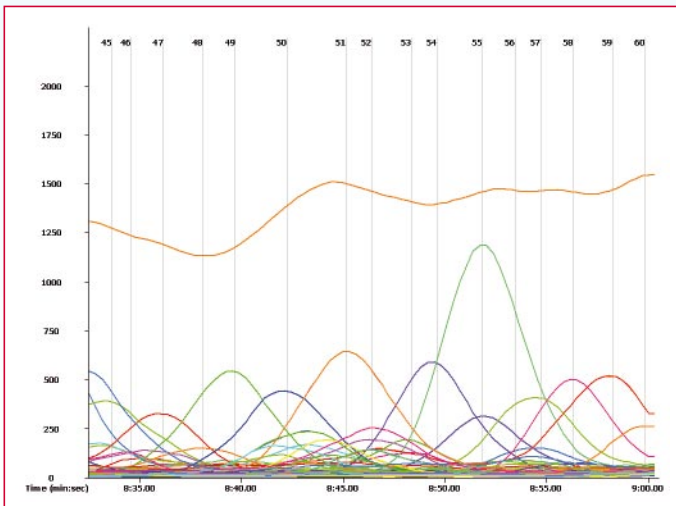


Abb. 2: Ausschnitt des Chromatogramms aus Abbildung 1. Jede Komponente, die automatisch von der Software erkannt wurde, ist mit einem grauen Peak-Marker versehen.

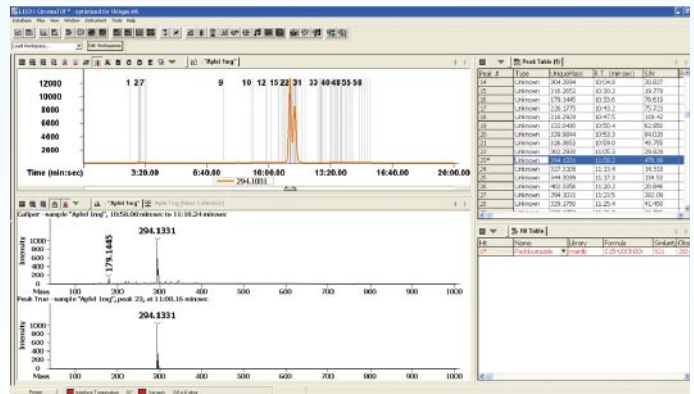


Abb. 4: Peak True-Spektrum zur Substanzidentifikation

tet mit dem Low Flow Nebulizer, wurde als massensensitiver Detektor eingesetzt.

Detektion

Die Leistungsfähigkeit des Cap-LC-ToF MS Systems wurde mit einer Mischung von ca. 400 Pestiziden getestet. Die Datenanalyse wurde mit der Leco ChromaTOF 4.0 Software für LC-ToF MS durchgeführt. Die Software Plattform bietet eine Vielzahl an automatisierten Datenprozessierungswerkzeugen, wie z.B. automatische „peak find“

Routinen, True Signal Deconvolution, Bibliothekssuche in NIST-Format-Bibliotheken und automatischer Probenvergleich. Somit ist es möglich, selbst bei co-eluierenden Analyten akkurate Masseninformationen zu generieren. Abbildung 1 zeigt ein typisches Chromatogramm, nachdem die automatischen „peak find“-Routinen und True Signal Deconvolution angewendet worden sind.

Hierbei bezieht sich das orange-farbene Chromatogramm auf den Totalionenstrom (TIC). Die Komplexität der Trennung allein anhand

des TIC ist nicht auf den ersten Blick ersichtlich. Erst nach erfolgter Datenprozessierung ist die Software in der Lage, den überwiegenden Anteil der Analyten automatisch zu finden. Um diesen Sachverhalt zu veranschaulichen, ist in Abbildung 2 ein Ausschnitt des Chromatogramms von Abbildung 1 vergrößert dargestellt. Zwischen 8,30 und 9,00 Minuten wurden 15 Substanzen detektiert. Jeder Analyt, der von der Software automatisch gefunden wurde, ist mit einem grauen Peak Marker gekennzeichnet. Wie dem Chromatogramm aus Abbildung 2 entnommen werden kann, beträgt die Basis-Peakbreite etwa 8–10 Sekunden für jede Komponente. Dabei wurde die Datenaufnahme-

rate auf 8 Spektren pro Sekunde eingestellt. Dies bedeutet, dass ca. 80 Datenpunkte pro Peak erhalten werden. Diese Anzahl an Datenpunkten ist für eine Quantifizierung mehr als ausreichend. Im Gegensatz zur Detektion mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer erlaubt die Nutzung eines ToF MS das Screening einer hohen Anzahl von Analyten innerhalb eines Laufes. Somit lassen sich auch Substanzen identifizieren, die nicht in einer Quantifizierungsmethode integriert sind, wie dies z.B. bei der häufig eingesetzten Messung von Pestiziden im MRM-Modus eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers der Fall ist.

In dem dargestellten Beispiel eluieren 15 Komponenten inner-

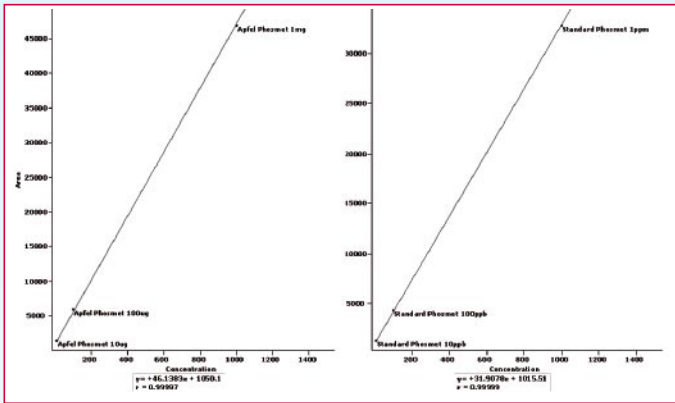


Abb. 5: Kalibrationskurven für Phosmet in Methanol (rechts) und in einer Apfelmatrix (links)

halb von 30 Sekunden. Somit können 400 Analyten ohne große Probleme in 15 Minuten detektiert werden. Da es möglich ist, mit dem Detektor bis zu 100 Vollspektren pro Sekunde aufzunehmen, stellen Co-Elutionen kein Problem dar. In Abbildung 3 ist ein Beispiel für eine Co-Elution der Pestizide Heptene-

phos und Isoproturon wiedergegeben. Der True Signal Deconvolution Algorithmus berechnet die Peak True Spektren für die beiden Substanzen. Das Caliper-Spektrum beinhaltet die addierten Spektren zwischen 8,30 und 8,45 Minuten.

Das Peak True-Spektrum kann zur Identifikation der Substanzen

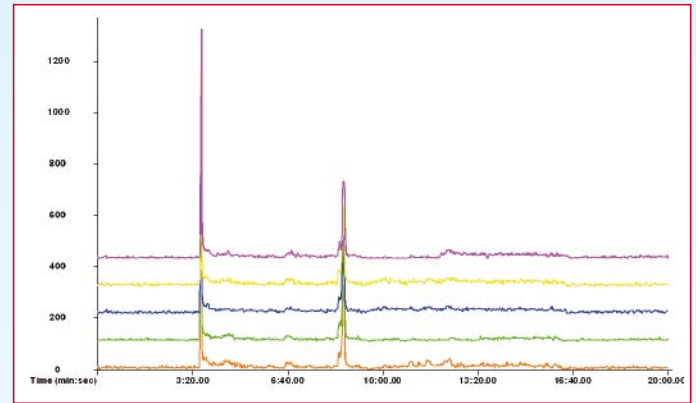


Abb. 6: Wiederholbarkeit des Lösungsmittelgradienten. Die relative Standardabweichung für die Retentionszeit beträgt weniger als 0,7%.

genutzt werden. Hierbei wird entweder die Massendifferenz bzw. das Isotopenmuster zur Formelkalkulation oder Bibliothekssuche genutzt. In Abbildung 4 ist ein Beispiel der Bibliothekssuche mit Hilfe des Isotopic Pattern Matching dargestellt. Als Bibliothek wurde hier die Mainlib der NIST genutzt. Für das darge-

stellte Peak True-Spektrum gibt es nur einen Hit mit einer Ähnlichkeit von über 92% für Paclobutrazol.

Gibt es also einen Unterschied zwischen konventioneller HPLC und Kapillar-HPLC in Bezug auf die nachgeschaltete Detektion?

Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen haben ge-

zeigt, dass der Gebrauch von „normal bore“-Säulen zu einem großen Verlust an Sensitivität führt und dass eine geringere Anzahl an Substanzen von der Software automatisch erkannt wurde. Die Ursachen hierfür sind in der Art des Ionisierungsprozesses zu suchen. Dieser ist bei Nutzung der Cap-LC aufgrund der dort verwendeten niedrigen Flussraten nicht unterstützt, d.h. er ist vom Innendurchmesser des Emitters, dem Abstand des Emitters vom Einlass in die Quelle und der Ionisierungs-Spannung abhängig. Insgesamt ähnelt das Spray einem Nano-Spray. Für ein solches ist bekannt, dass damit auch chemisch sehr unterschiedliche Analyten ionisiert werden können. Weiterhin nimmt die Ionensuppression ab, wie anhand der Darstellung in Abbildung 5 nachzuvollziehen ist. Hier sind die Kalibrationskurven für Phosmet in Methanol und einer Apfelmatrix dargestellt. Auffällig ist, dass kaum Unterschiede in Response zu erkennen sind.

Chromatographie

Die Reproduzierbarkeit von Gradientenläufen wird bei Cap-LC-Anwendungen häufig angezweifelt. Es wird allerdings eine relative Standardabweichung in Bezug auf die Wiederholbarkeit der Retentionszeit von 0,7% für Komponenten zu Beginn und in der Mitte des Chromatogramms erzielt (siehe Abbildung 6).

Zusammenfassung

Entgegen der allgemeinen Auffassung, dass der Einsatz von Cap-LC-Systemen in der Rückstandsanalytik nicht geeignet ist, belegen die hier vorgestellten Ergebnisse am Beispiel der Analyse einer Pestizidmischung, dass eine exzellente Reproduzierbarkeit und Sensitivität sowohl in Bezug auf die Chromatographie als auch Detektion gegeben ist. Gerade die Kopplung der Cap-LC mit der ToF MS eröffnet vielfältige Potenziale, da aufgrund

der hohen Datenaufnahmerate dieser Geräte eine Vielzahl an Substanzen in einem einzigen chromatographischen Lauf in kurzer Zeit detektiert und identifiziert werden kann. Die Anwendung geringer Flussraten in Verbindung mit der Nanosprayionisation führt zu Spektren mit niedrigem Untergrundrauschen, die sich deshalb für eine automatische Datenprozessierung hervorragend eignen. Selbst in Matrixproben konnte keine signifikante Ionensuppression festgestellt werden. Besonders hervorzuheben ist, dass aus dem geringen Lösungsmittelverbrauch erhebliche Kosteneinsparungen resultieren.

Danksagung

Die Autoren möchten sich bei Dr. Karl Schmeer von Bayer Crop Science recht herzlich für die wertvollen Diskussionen zum Thema Cap-LC und Massenspektrometrie bedanken. Ebenso gilt der Dank Andreas Müller von ApMass für die Bereitstellung des Säulenofens und die Unterstützung bei der Installation.

Norbert Wenkel und Eike Logé von Axel Semrau sei herzlich gedankt für die Bereitstellung des Eksigent Express Cap-LC-Systems sowie die fortwährende Unterstützung während der Durchführung dieser Studie.

► KONTAKT

Dr. Thorsten Teutenberg
Dr. Jochen Türk
Institut für Energie- und
Umwelttechnik e.V. (IUTA)
Duisburg
Tel.: 02065/418-179
Fax: 02065/418-211
teutenberg@iuta.de
tuerk@iuta.de

Dr. Mike Duiken
LECO Instrumente GmbH
Tel.: 02166/687-313
Fax: 02166/687-148
mike.duiken@leco.de
www.leco.de