

Als de eerste scheiding 100 minuten duurt en onderverdeeld wordt in honderd fracties, dan is er voor de tweede scheiding dus 1 minuut tijd.

Apparatuur en methoden voor 2D-LC zijn steeds beter beschikbaar. De techniek kan in dezelfde analysetijd een veel betere resolutie opleveren dan gewone vloeistofchromatografie. Toch lijkt 2D-LC nog geen grote vlucht te nemen.

Sneller scheiden in dubbele dimensie

ANTON DUISTERWINKEL

“Het is minder moeilijk dan het lijkt: apparatuur is goed te verkrijgen en eenvoudig te begrijpen.” Dat zegt hoogleraar polymeeranalyse van de Universiteit van Amsterdam Peter Schoenmakers over online tweedimensionale chromatografie. Bij die techniek wordt het chromatogram uit een eerste scheidingskolom in fracties opgevangen in twee lussen of *loops*. Steeds wordt één lus gevuld, terwijl de andere automatisch wordt geïnjecteerd en gescheiden in een tweede kolom. Als die scheiding is afgerond, schakelt het systeem en injecteert de inhoud uit de andere lus in de tweede kolom (zie infographic). Dat geheel levert vaak een veel betere scheiding op in dezelfde analysetijd dan eendimensionale chromatografie kan halen. Zeker om grote aantallen complexe stalen te analyseren kan dat heel waardevol zijn.

Ondanks dat de tweede dimensie duidelijkere resolutie- en snelheidsvoordelen oplevert, lijkt die buiten de academische wereld nog niet veel te worden toegepast. Dat heeft

allicht te maken met het feit dat de tweede dimensie het leven van de analist behoorlijk veel ingewikkelder maakt, hoe eenvoudig de apparatuur ook moge zijn. Schoenmakers: “Eendimensionale chromatografie is al een balanceeract tussen analysetijd, resolutie en drukval. Bij 2D-LC is dat nog veel complexer dan bij twee individuele scheidingen.”

DWARS

Een eerste uitdaging is de keuze van de beide kolommen en mobiele fasen. Om de tweede scheiding nut te laten hebben, moet die volgens een wezenlijk ander scheidingsmechanisme verlopen dan de eerste. De twee scheidingen moeten als

‘Eendimensionale chromatografie is al een balanceeract’

het ware dwars op elkaar staan, orthogonaal noemt men dat. Het ligt voor de hand om in de kolommen een sterk verschillende mobiele fase te gebruiken, maar de

beide processen moeten wel compatibel met elkaar zijn. Schoenmakers: “Als die fasen dan ontmengen in de tweede kolom, verstoort dat de basislijn daar zo sterk dat er geen zinvolle informatie uitkomt.”

Ontmenging is te voorkomen, bijvoorbeeld door oppervlakreactieve stoffen toe te voegen, of door kleine volumes in de tweede kolom te injecteren. Dat laatste gaat dan wel ten koste van de gevoeligheid. Volgens Pat Sandra, hoogleraar scheidingstechnieken aan de Universiteit van Gent, is het ook mogelijk de eerste mobiele fase te verdampen voordat het staal geïnjecteerd wordt in de tweede kolom. Dat kan bijvoorbeeld met een verdampingskamer tussen beide kolommen. “Maar het is ook interessant om de eerste scheiding te doen met superkritisch CO₂, wat verdampt zodra het de kolom uitkomt. Soms is het mogelijk om beide kolommen met dezelfde mobiele fase te doen, bijvoorbeeld tweemaal *reversed phase* bij verschillende pH's.”

Of orthogonale scheiding überhaupt zin heeft, hangt echter allereerst van het staal af. Sandra: “De componenten daarin moeten

wel twee eigenschappen hebben waarop ze te scheiden zijn." 2D-LC heeft geen enkele zin op een homologe reeks stoffen, maar kan wel nuttig zijn om bijvoorbeeld triglycerides van verschillende grootte en mate van verzadigdheid te scheiden. Daarvoor leent zich dan een combinatie van zilverionen-LC en reversed phase-LC.

Ook de veroudering van farmaceutische mengsels is goed te volgen in 2D-LC, omdat oxidatieve en/of thermische degradatie vrijwel altijd tot meer polaire afbraakproducten leidt. Dan kan één kolom op omvang of massa scheiden, en de andere op polariteit. Peptide- en eiwitmengsels zijn op vergelijkbare manier te scheiden. "Maar die blijken vaak zoveel componenten te bevatten dat combinatie met MS onontbeerlijk is", aldus Sandra.

PIEKDICHTHEID

Complexe stalen zijn minder geschikt voor 2D-LC omdat de tweede scheiding heel snel moet verlopen en dus maar een beperkt aantal pieken kan laten zien. Schoenmakers: "Je wilt het chromatogram dat uit de eerste kolom komt vaak in honderden fracties opdelen." Zou je het in minder fracties verdelen, dan verlies je

veel van de scheiding die de eerste kolom heeft aangebracht.

Als de eerste scheiding 100 minuten duurt en onderverdeeld wordt in honderd fracties, dan is er voor de tweede scheiding dus 1 minuut tijd – erg kort voor vloeistofchromatografie. Bedenk dat de tweede kolom vaak ook nog geregenereerd moet worden voor de volgende fractie erin kan. Ook dat kan 20 seconden duren. Zo blijven er dus maar enkele tientallen seconden over voor de scheiding, zeker als er ook ontmenging of andere injectie-effecten optreden.

Met meer kolommen werken in die tweede dimensie – zodat meer fracties gelijktijdig bekeken kunnen worden – is ook erg lastig omdat het vrijwel onmogelijk is om die kolommen identiek te maken. 2D-LC is daarom ongeschikt voor uiterst complexe stalen. "Voor echt ingewikkelde stalen die wel volledig geanalyseerd moeten worden is *off-line* 2D-LC daarom een betere optie", denkt Sandra. Bij die techniek worden de stalen vanuit de eerste kolom tijdelijk opgeslagen en later in alle rust in een tweede kolom geïnjecteerd. Daarvoor zijn ook volledig geautomatiseerde robots voorhanden. Maar je hebt niet meer het voordeel van de snelle ana-

SCHEIDING VAN TERMEN

De term 2D-LC wordt algemeen gebruikt voor een systeem waarin twee kolommen voor vloeistofchromatografie zijn gekoppeld. Daarbij onderscheiden we LC-LC, waarbij bepaalde delen uit het eerste chromatogram verder worden gescheiden, en LCxLC, volledige 2D-LC, waarbij het volledige eerste chromatogram in monsters wordt verdeeld en door de tweede kolom gehaald. In dat laatste geval worden de resultaten vaak in een tweedimensionale plot weergegeven, waarin kleur de intensiteit van een piek aangeeft. |

lyse. "Dat is echter niet kritisch als je met deze techniek bijvoorbeeld een biomarker kunt vinden", weet Sandra.

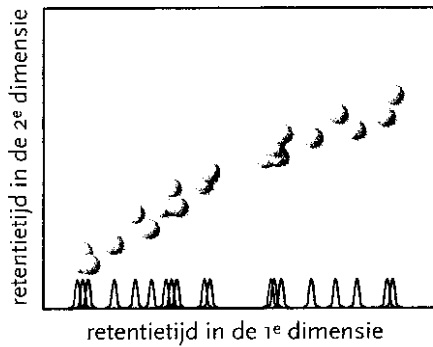
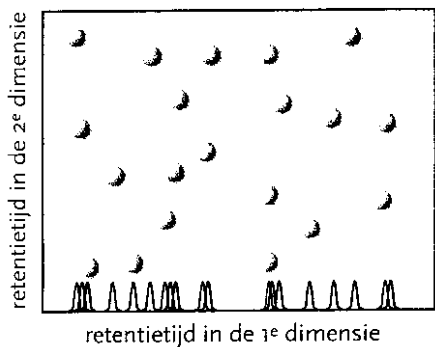
Al met al vindt hij de aandacht voor 2D-LC een hype. "Het nut voor bijvoorbeeld de complexe polymeerstanden van Schoenmakers is duidelijk, maar voor andere toepassingen moet de techniek zich nog bewijzen." Een goed alternatief is volgens Sandra LC gekoppeld met hogeresolutiemassaspectrometrie.

ONTWIKKELING

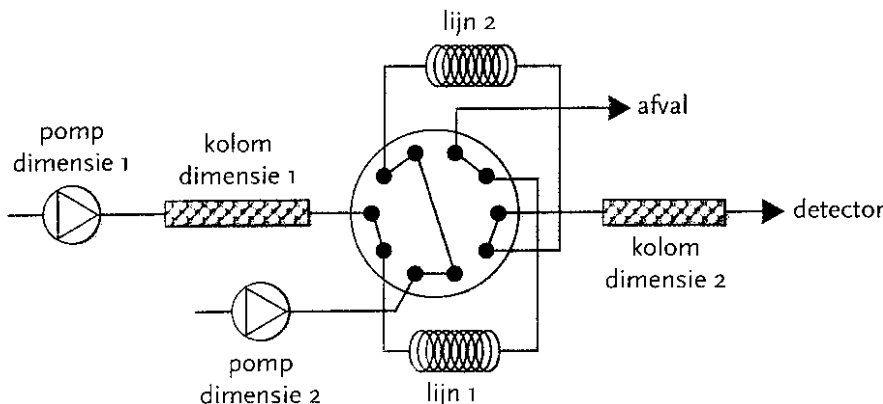
Toch is 2D-LC volgens Schoenmakers zeer geschikt om productie te draaien bij tamelijk complexe stalen. "Er worden dan ook steeds meer toepassingen gepubliceerd en *application notes* geschreven door de leveranciers." Een probleem is nog wel dat de software nog niet zover is ontwikkeld als de hardware, al zit ook daar vooruitgang in. Schoenmakers: "Kwantificering luistert heel nauw."

Ook op andere vlakken staat de techniek niet stil. Zo wordt LCxLC gekoppeld aan MS en krijgt de koppeling van LC-IMD-MS veel aandacht. IMD staat voor *Ion Mobility Detection*. Ook keert de dunne-laagtechnologie terug voor de tweedimensionale scheiding. Een nadeel is dat de koppeling met MS dan moeilijker wordt.

Schoenmakers is verder bezig met 3D-LC. "Daarin proberen we stalen driedimensionaal te scheiden in medium dat zo groot is als een suikerklontje." De grootste uitdaging daarbij is de detectie van de componenten. Er is nog geen systeem dat eenvoudig kan vinden waar de pieken zijn uitgekomen en die vervolgens kan identificeren. Schoenmakers: "Het kan nog wel 5 jaar duren voordat 3D-LC uit de research-fase komt en kan worden toegepast." Dat stadium is 2D-LC allang voorbij. |



2D-LC heeft alleen zin als de beide scheidingen een wezenlijk ander scheidingsmechanisme gebruiken en de retentietijden in de twee kolommen niet of nauwelijks correleren (a). Is de correlatie sterk (b), dan is het onderscheid met een 1D-chromatogram minimaal.



Er zijn veel uitvoeringsvormen 2D-LC met een tien- of twaalfwegkraan en twee of meer lussen om stalen op te slaan. Hier een voorbeeld waarbij lus 1 gevuld wordt en lus 2 gescheiden in de tweede kolom.