

Todimensionel væskekromatografi: what's in it for you?

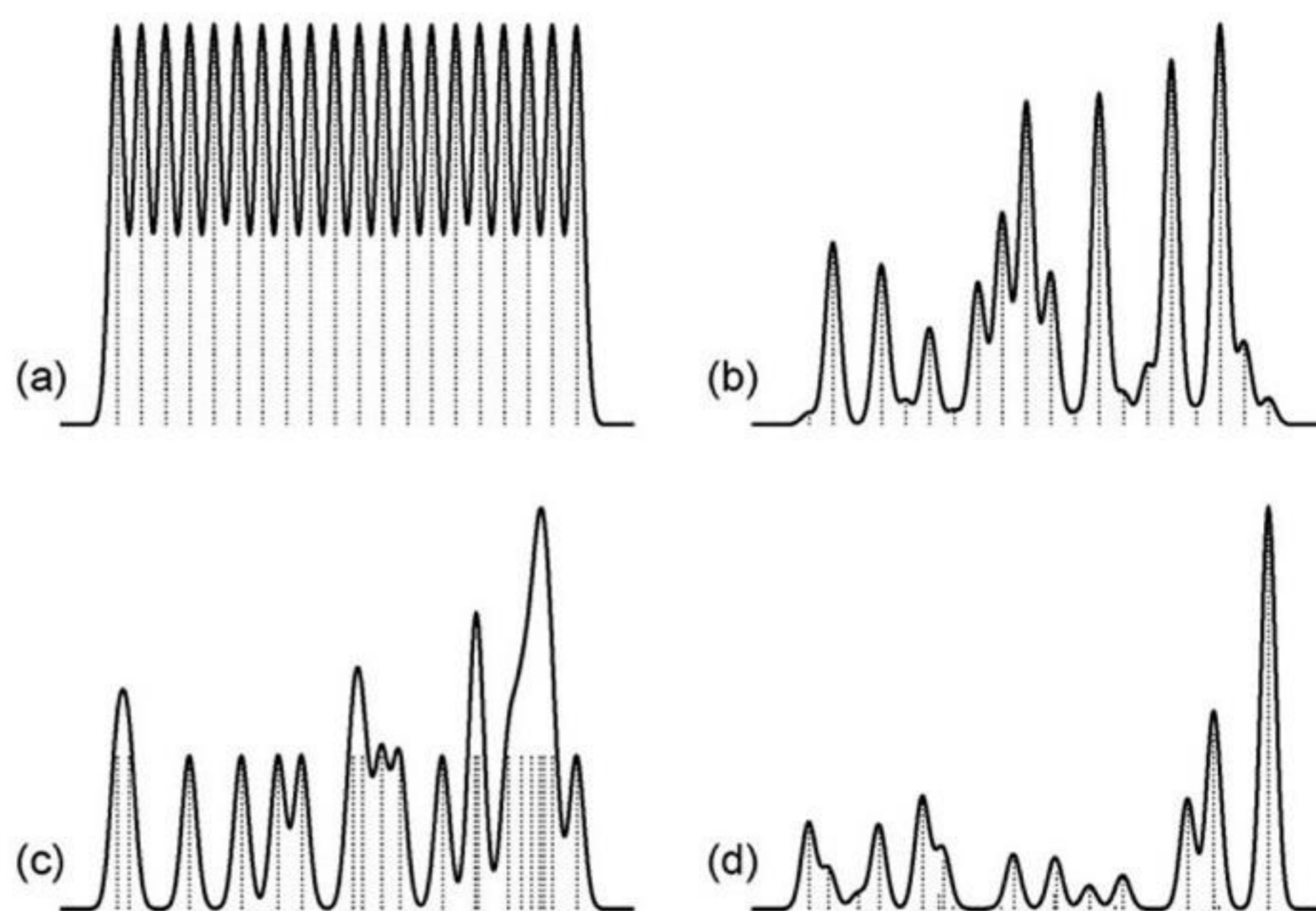
Netop i disse år er der en markant stigende interesse for 2D LC-teknikken. Den lover mange teoretiske fordele, men er stadig udfordrende at implementere i praksis.

Af Nikoline J. Nielsen, Rune Græsbøll, Jan H. Christensen, Analytisk Kemi Gruppen, Sektion for Miljøkemi og -Fysik, Institut for Plante- og Miljøvidenskab, Det Naturvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Todimensionel væskekromatografi (2D LC) er en teknik til separation af komponenter fra komplekse blandinger. Denne teknik er yngre og mindre udviklet i sammenligning med søster-teknikken todimensionel gaskromatografi (2D GC), hvor kommercielle instrumenter udbydes af flere forhandlere, og hvor teknikken anvendes på rutinebasis i mange laboratorier. Det første kommercielle 2D LC-system kom på markedet i 2013, men der er en markant stigende interesse for feltet: på HPLC-konferencen i 2011 var der ganske få bidrag på 2D LC, men i 2013 handlede mere end 20% af mere end 1000 bidrag om multidimensionel LC. Teknikken lover mange teoretiske fordele, men er stadig udfordrende at implementere i praksis, på en måde hvor ydeevnen matcher den, man opnår rutinemæssigt med 1D LC.

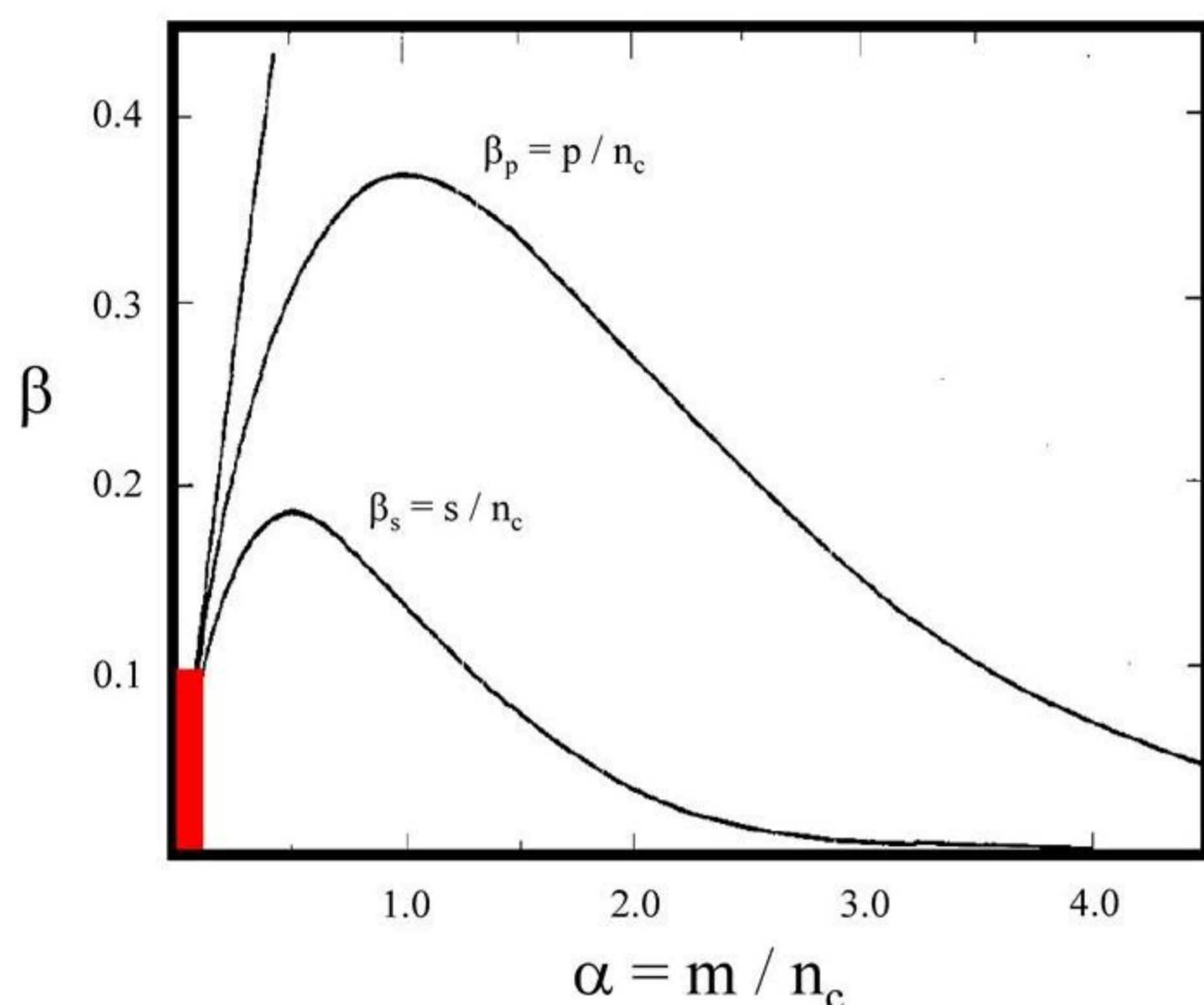
Analyse af komplekse prøver kræver høj peak-kapacitet

Som eksempel kan man forestille sig en prøve med 20 komponenter analyseret på et 1D kromatografisk system med en peak-kapacitet på 20. Der forudsættes, at komponenterne giver anledning til samme respons, og at de eluerer som perler på en snor. I dette tilfælde opnås en optimal separation (figur 1a). I en anden situation, hvor komponenterne stadig eluerer som perler på en snor, men hvor deres responsfordeling er mere tilfældig, er separationen mindre tilfredsstillende, fordi mange små toppe ligger skjult under større nært placerede toppe (figur 1b). Eller situationen hvor komponenterne igen har samme respons, men nu eluerer i et mere tilfældigt mønster; heller ikke her er kromatografien tilfredsstillende (figur 1c). Det sidste kromatogram (figur 1d) illustrerer den situation, vi oftest møder ved analyse af komplekse blandinger: komponenterne eluerer mere eller mindre tilfældigt, og de udspænder samtidig et stort responsområde – 20 komponenter kan altså ikke separeres tilfredsstillende med en peak-kapacitet på 20 [1].



Figur 1. Teoretisk gengivelse af kromatografi når 20 komponenter separeres på et system med en peak-kapacitet på 20. a) Komponenterne har samme respons og eluerer som perler på en snor, b) komponenterne har forskellige respons, men eluerer stadig som perler på en snor, c) komponenterne har samme respons men eluerer i et mere tilfældigt mønster, og d) komponenterne har forskellige respons og eluerer i et tilfældigt mønster. Fra [1].

Den statistiske teori for komponent-overlap finder en tydelig sammenhæng mellem systemets mætningsfaktor (α), altså antal komponenter (m) i prøven divideret med systemets peak-kapacitet (n_c), og med forholdet mellem singletter (s), dvs. enkelte toppe uden overlap med nabo-toppe, og peak-kapacitet ($\beta_s = s / n_c$) og endelig med forholdet mellem observerede toppe (p) og peak-kapacitet ($\beta_p = p / n_c$) (figur 2). Fra figur 2 kan konkluderes, at for at opnå en situation, hvor hovedparten af de observerede toppe er singletter ($\beta_p = \beta_s$ eller $p = s$), samtidig med at antallet af singletter repræsenterer en stor del af komponenterne i prøven ($\beta_s = \alpha$ eller $s = m$), så skal man befinde sig i det røde område. Dvs. det kromatografiske system skal have en peak-kapacitet, der er 10 gange højere end antallet af komponenter i prøven [2].



Figur 2. Sammenhængen mellem et systems mætning (α) defineret ved ratioen mellem prøve-komponenter (m) og peak-kapacitet (n_c) og ratioen mellem toppe og peak-kapacitet (β). En top kan være en singlet (s), en doublet, en triplet etc. eller summen af alle observerede toppe (p). Her er kun givet ratioen for singletter over peak-kapacitet (β_s) og for total antal toppe over peak-kapacitet (β_p). Fra [2]. Den gode analyse af komplekse blandinger opnås i det røde felt, altså når peak-kapaciteten er 10 gange højere end antallet af prøvekomponenter, eluerer hovedparten af komponenterne som singletter.

Overordnet set kan der opnås peak-kapaciteter på 500 for 1D LC med en analysetid på 30 min. Det svarer til, at den gode analyse kan udføres på prøver indeholdende op til 50 komponenter. Der kan opnås andre typer separation ved at bruge multikanals-detektorer. Her anvendes typisk massespektrometri, hvor separationen baseres på masse-ladningsforhold, men der vil ofte være en signifikant matrixeffekt med upålidelig kvantificering til følge, så længe komponenterne overlapper efter den kromatografiske separation og dermed under ioniseringen. F.eks. når der måles kemiske metabolit-fingeraftryk, indeholder prøverne typisk langt flere komponenter, end der kan kvantificeres og identificeres pålideligt.

Hvad er 2D LC?

I 2D LC fraktioneres eluenten fra første dimensions (1d) kolonnen i på hinanden følgende fraktioner, hvorefter disse fraktioner påsættes anden dimensions (2d) kolonnen og separeres en efter en. Det kan gøres på forskellige måder: Offline, stop-flow, heart-cut og comprehensive 2D LC. I offline-opsætningen afkobles de to separationer i tid; således parkeres 1d fraktionerne i rør eller på faste faser. 2d analysen har ingen tidsbegrænsning,

og typisk opnås høje peak-kapaciteter i både 1d og 2d . Den fulde 2D-analyse tager fra timer til dage, og peak-kapaciteten pr. tidsenhed er relativt lav. I stop-flow opsætningen standses flowet på 1d kolonnen gentagne gange, mens hver eluerende fraktion analyseres på 2d kolonnen. Her er 2d analysetiden kortere, fordi separationen i 1d ikke må ødelægges af komponenternes diffusion under stilstand. Da store molekyler diffunderer kortere pr. tidsenhed ift. små molekyler, fungerer denne tilgang godt med f.eks. peptider og proteiner. Tidsforbruget er højt, men ikke ligeså højt som for offline 2D LC. Comprehensive 2D LC (LC \times LC), på dansk "fyldestgørende" eller "udtømmende" 2D LC, opererer i samme tidsregime som traditionel 1D LC. Her opsamles fraktioner fra 1d skiftevis i to loop; når der opsamles i loop 2, analyseres hvad der tidligere opsamledes i loop 1 og vice versa. Typisk er 2d analysetiden 20 sekunder, og 1d separationen køres kontinuerligt. Den fulde analysetid er 30-120 min, den absolutte peak-kapacitet moderat, men peak-kapaciteten pr. tidsenhed høj - op til 40 pr. minut. I heart-cut 2D LC, eller selektiv LC \times LC, analyseres kun udvalgte 1d fraktioner på 2d kolonnen; på den måde er den fulde analysetid typisk som i LC \times LC, men der er længere tid til de udvalgte 2d separationer, og peak-kapaciteten bliver brugt der, hvor den vurderes mest værdifuld.

Den multiplikative fordel

Vi kender alle et 1D LC-kromatogram med retentionstid ud af x-aksen og respons op af y-aksen. For 2D LC udspændes kromatogrammet af et plan med 1d retentionstiden ud af x-aksen, 2d retentionstiden ud af y-aksen og responset op af z-aksen. Betragtes kromatogrammet ovenfra kommer responset så at sige ud af planet. Når vi deler x-y-planet op i mindre firkanter, hvor firkanternes areal udspændes af en peak-kapacitets enhed for hhv. 1d og 2d , er det tydeligt, at den totale 2D peak-kapacitet ($^{tot}n_c$) er lig produktet af 1d peak-kapaciteten (1n_c) og 2d peak-kapaciteten (2n_c) (figur 3, side 24).

Det betyder, at vi kan øge peak-kapaciteten med en faktor 10, hvis vi kan opnå en beskedent 2d peak-kapacitet på 10, mens vi kører en normal 1d separation. Eller kan vi nu også det? Det er ikke så nemt at implementere LC \times LC i praksis, her kommer et eksempel med to koblede omvendt fase (RP)-systemer.

Udfordringer i implementeringen af RP \times RP

Helt grundlæggende er der fire aspekter i implementeringen, som kræver omhu og snilde: at undgå unødigt undersampling af 1d ; at etablere hurtig 2d kromatografi med acceptabel peak-kapacitet; at fokusere 1d fraktionen på 2d kolonnen, og at 2d separationen er komplementær til 1d separationen. ►



Pipetteservice

Akkrediteret kalibrering
Reparation • Vedligeholdelse

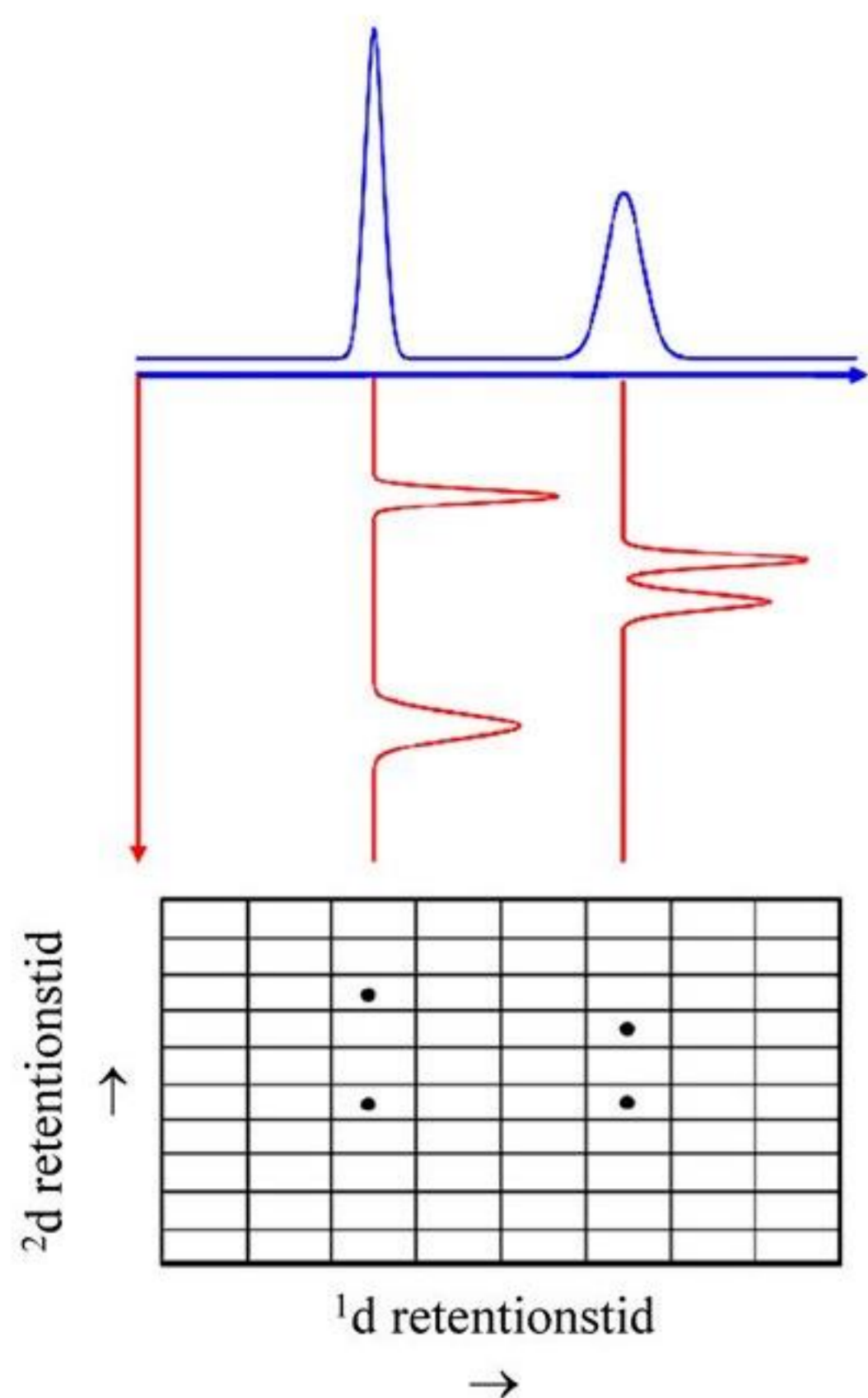
Gilson Center of Excellence • Certificerede teknikere • 20 års erfaring
• Alle førende fabrikater • Elektroniske certifikater • Serviceaftaler



Biolab A/S,
Sindalsvej 29, DK-8240 Risskov,
Tlf: 8621 2866 Fax: 8621 2301
E-mail: pipetteservice@biolab.dk
www.biolab.dk



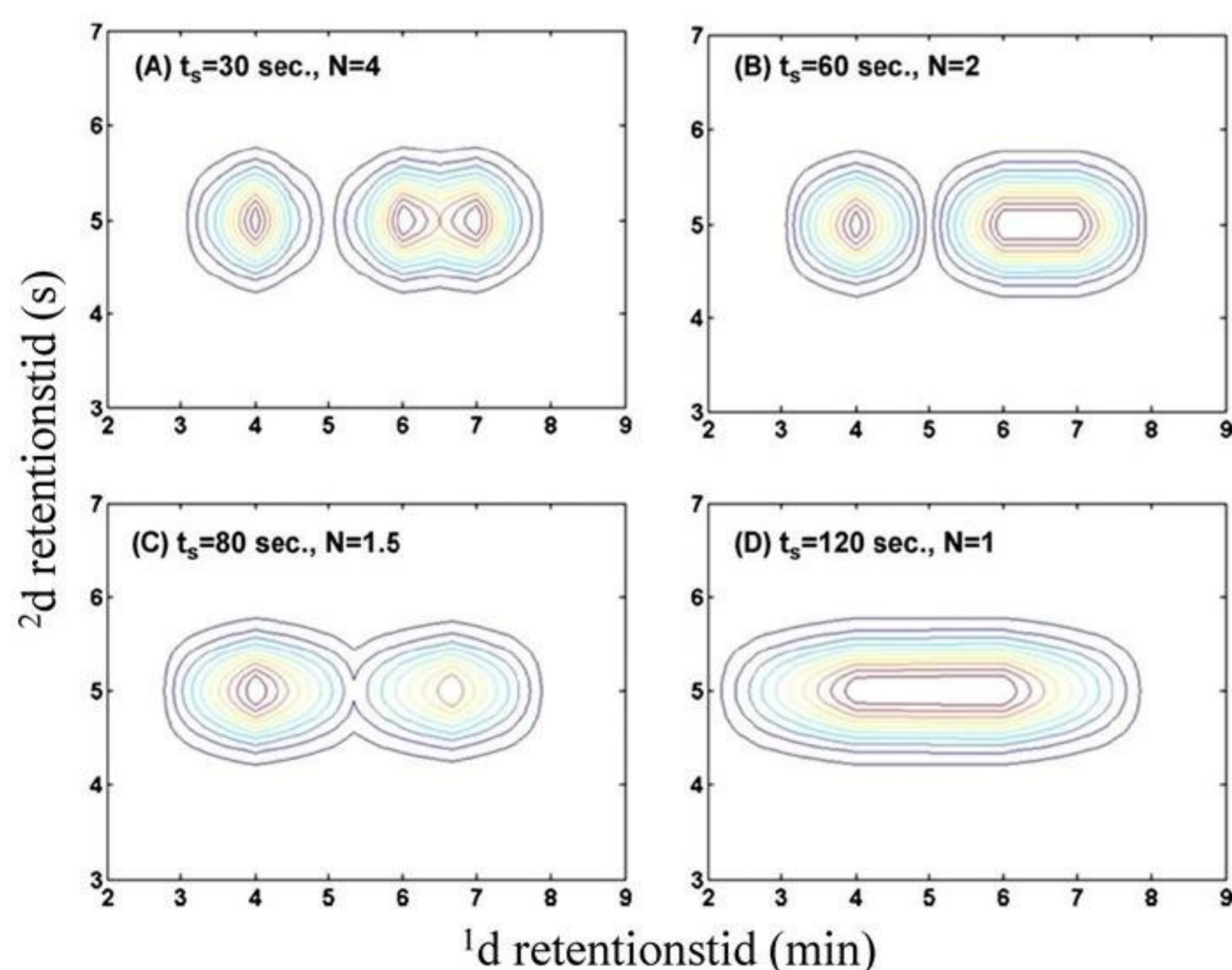
Cal. Reg. Nr. 482



Figur 3. Illustration af det multiplikative forhold mellem total peak-kapacitet og peak-kapaciteten opnået i uafhængige ¹d og ²d separationer. Separationsplanet opdeles i mindre firkanter, hvor vandrette og lodrette sider hver repræsenterer en peak-kapacitets enhed i hhv. ¹d og ²d. Fra [3].

Undersampling

For ikke at blande de komponenter, der allerede er helt eller delvist adskilt efter ¹d separationen, er det vigtigt at opsamle fraktioner ca. 3 gange henover en ¹d kromatografisk top. Hver fraktions-opsamling foregår i samme tidsrum som en ²d separation, dvs. jo hurtigere ²d kromatografi, jo oftere kan der opsamles fraktioner fra ¹d-kolonnen. Skal regnestykket gå op med en modulerings-tid på 20 sekunder, kræves en ¹d topbredde på 1 minut [4,5]. I figur 4 eksemplificeres hvorledes 3 komponenter



Figur 4. Eksempler på hvor dårlig 2D-adskillelse der opnås, når ¹d kromatografien fraktioneres for sjældent: a) er situationen hvor fraktioneringstiden (t_s) er 30 sekunder svarende til 4 fraktioner henover en ¹d topbredde ($N=4$), b) t_s på 60 sekunder svarende til $N=2$ giver dårlig adskillelse af top 2 og 3, c) t_s på 80 sekunder svarende til $N=1.5$ giver ingen adskillelse af top 2 og 3, og d) t_s på 120 sekunder svarende til $N=1$ giver ingen adskillelse mellem top 1,2 og 3 – og dette på trods af fin adskillelse mellem selv det kritiske par efter ¹d kromatografien. Fra [3].

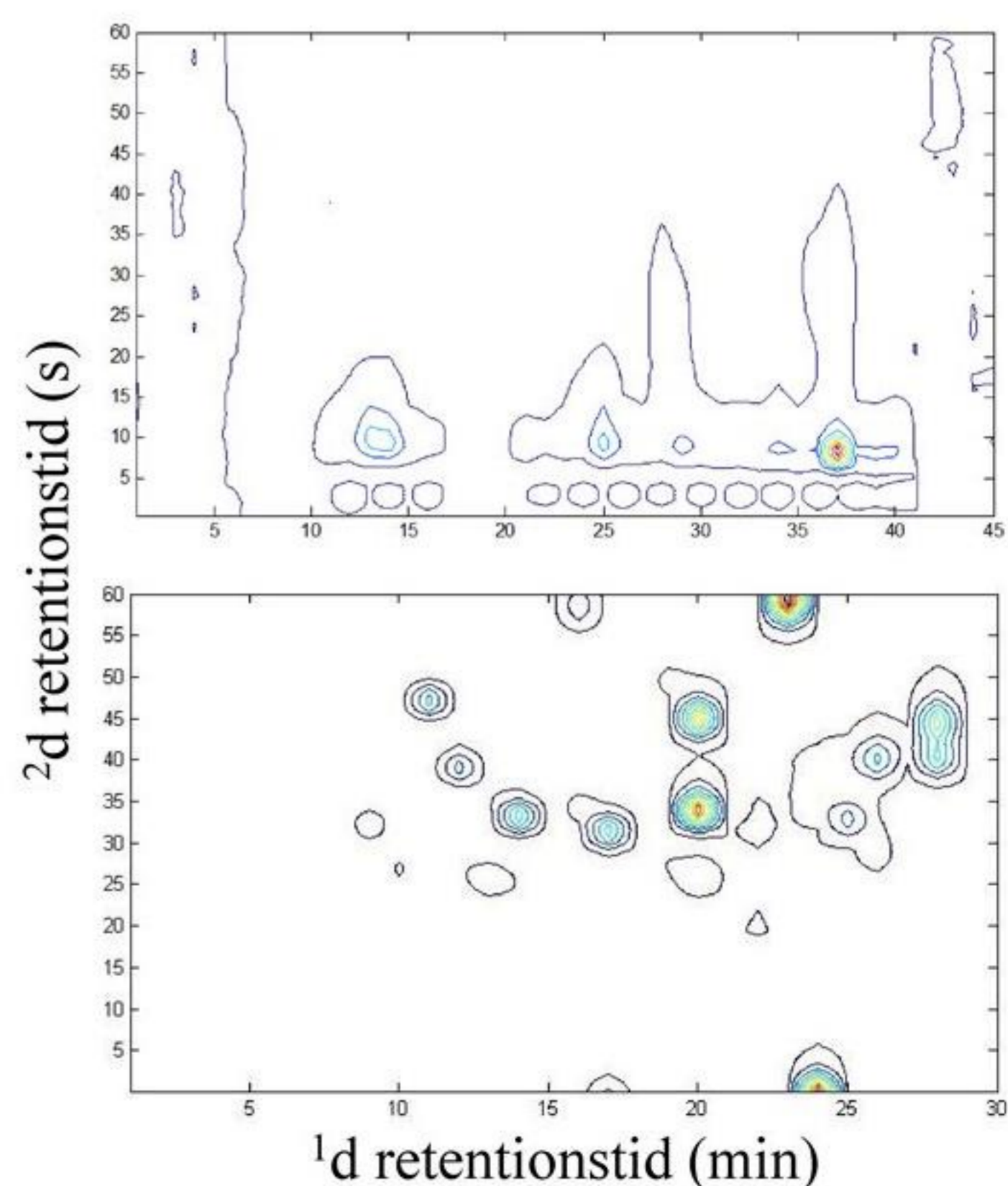
overlapper i 2D LC kromatogrammet, på trods af fin adskillelse efter ¹d kromatografien, når der fraktioneres mindre end 3 gange henover ¹d topbredden.

Hurtig ²d kromatografi

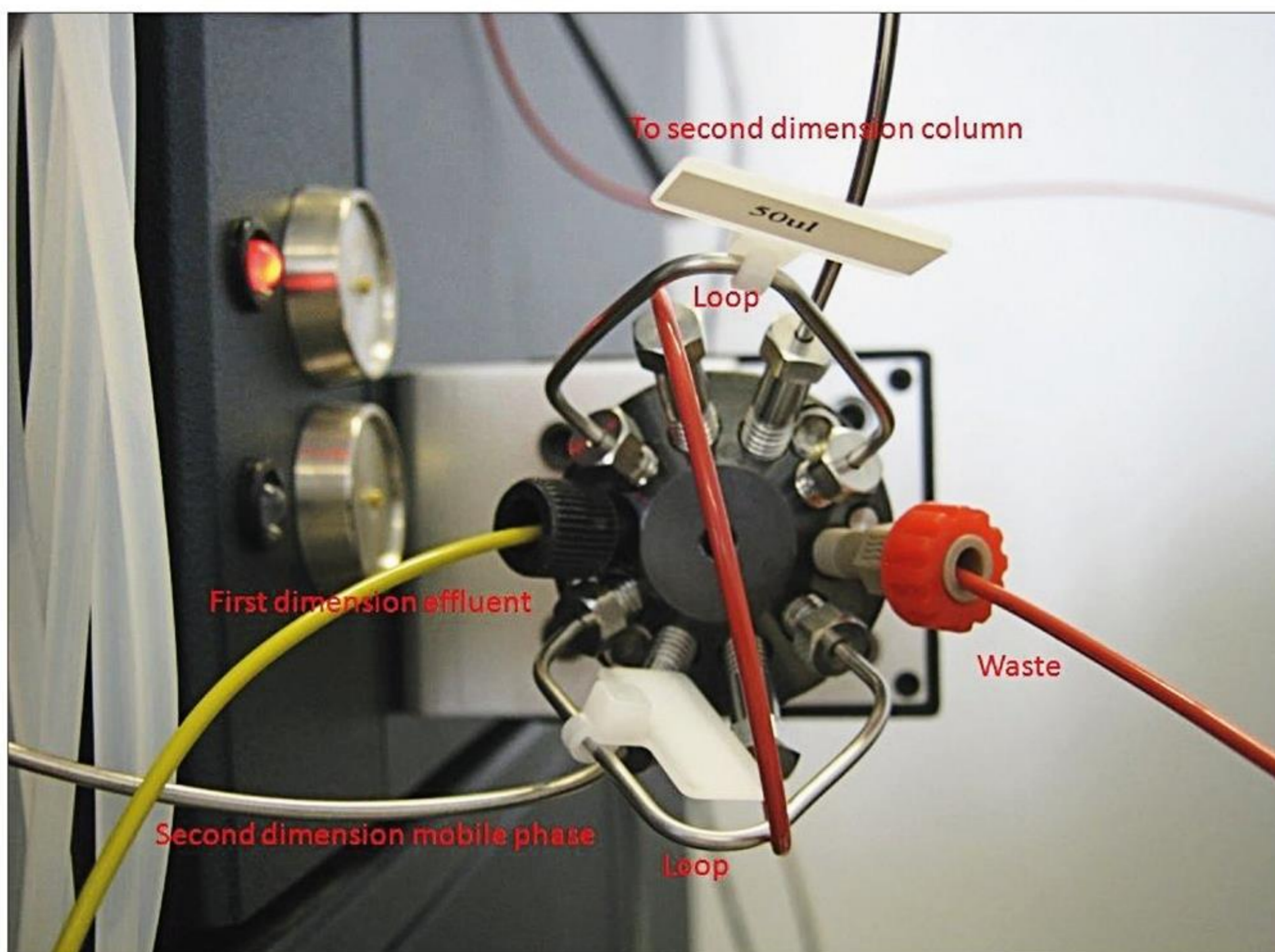
At kunne fraktionere ¹d kromatografien ofte forudsætter ekstrem hurtig ²d kromatografi. Det kan vi primært gøre ved at bruge teknikker, der giver høj peak-kapacitet pr. tidsenhed, her mest oplagt små partikler og/eller partikler med fast kerne og porøs overflade på ultrahøjtrykkssystemer. At køre med højt flow er også en anvendelig strategi. På den måde kan der køres flere kolonne-volumener igennem ²d systemet pr. tidsenhed, hvormed den kromatografiske hastighed øges. Med højt flow øges modtrykket på kolonnen desværre. Det afhjælpes ved at anvende ekstremt høje temperaturer (>90°C), som sænker mobil-fase-viskositeten og heldigvis også ofte komponenternes retentionsfaktor. Uheldigvis er der endnu ikke udviklet sub-1.7 µm diameter partikelfaser med eller uden fast kerne, som tåler så høje temperaturer. For smalle toppe, og dermed høj peak-kapacitet, kan det være en fordel at køre en stejl gradient i ²d separationen. Det kræver imidlertid, at der bruges tid på vask og re-ekvilibrering i ²d analysetiden. Desuden kan tiden fra mixer til kolonne (dwell-tiden) udgøre signifikant ventetid i systemer med alt andet end minimal dwell-volumen.

Refokusering

Nogle ¹d fraktioner vil indeholde solvent af relativ høj eluotrop styrke, f.eks. hvis de er opsamlet sidst i en gradient-kørsel. Det relativt store fraktionsvolumen, f.eks. 50 µL, sammenlignet med en normal LC-injektion på 1-10 µL, og den høje eluotrope styrke gør det svært at lave en injektion på ²d kolonnen, således at injektionsbåndet fokuseres og komponenterne opkoncentreres i et mindre volumen. Figur 5 viser to af vores allerførste kørsler på et hjemmebygget system. Øverst uden refokusering, hvor alle komponenter elueres i ²d injektionsvolumen med høj eluotrop, nederst med passende refokusering. Ringe fokusering kan udbedres ved at indsætte en mere retentiv ²d kolonne, ved at påsætte en mindre del af den opsamlede ¹d fraktion, ved at fortynde ¹d fraktionen med lav eluotrop styrke solvent, eller ved at øge ²d flowhastighed og kolonnedimensioner.



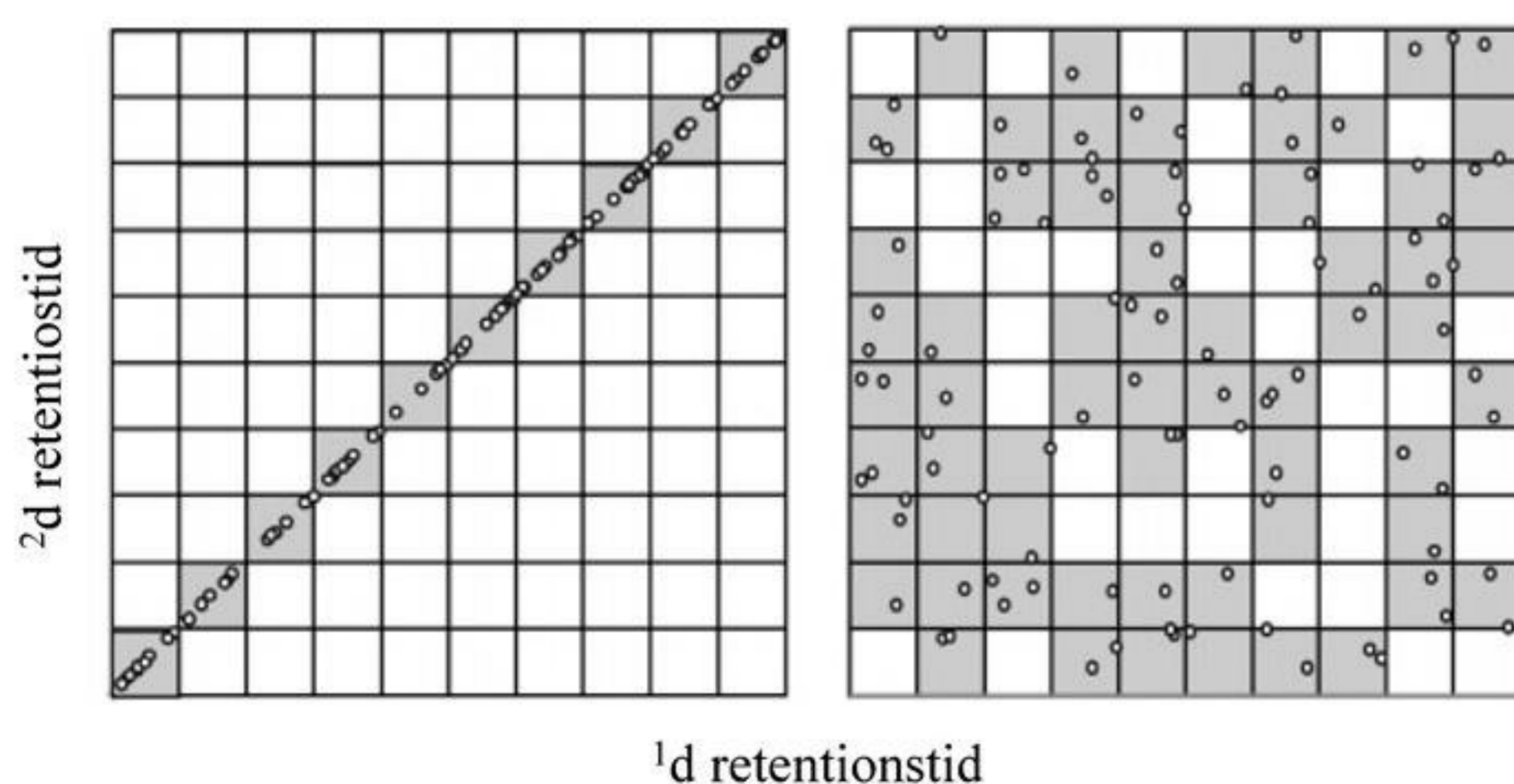
Figur 5. Eksempel på dårlig refokusering (øverst) og hvorledes refokuseringen etableres ved at udskifte en mindre retentiv ²d kolonne med en mere retentiv ²d kolonne (nederst). Egne data.



Systemets hjerte - switching-valven.

Orthogonalitet

Sidst, men ikke mindst, er det vigtigt, at separationsmekanismerne i hhv. 1^d og 2^d er nogenlunde forskellige – også kaldet ortogonale. Hvis ikke vil komponenterne eluere langs diagonalen på x-y-retentionsplanet eller i et beslægtet mønster. Det betyder at på trods af to anvendte kromatografiske systemer, så er den samlede separation stadig endimensionel, og et lignende resultat ville kunne være opnået med 1D LC og langt færre komplikationer. For at opnå en analyse, hvor den totale 2D teoretiske peak-kapacitet faktisk også udspændes af prøvens komponenter, kræves, at man har en prøve af en vis dimensionalitet. Dvs. en prøve som indeholder komponenter med flere typer forskelligheder, f.eks. kædelængde, størrelse eller ladning, der kan udnyttes i en separations-kontekst. Figur 6 illustrerer en situation, hvor systemets orthogonalitet er lav. Komponenternes retentionsmønster er diagonalt (venstre), og nederst ses en situation, hvor hele separationsplanet udspændes af prøvens komponenter; altså et system med maksimal orthogonalitet (højre).



Figur 6. Til venstre et eksempel på lav orthogonalitet, hvor den teoretiske peak-kapacitet udspændt af de to kromatografiske systemer ikke er tilgængelig for prøvens komponenter. Det kan skyldes, at de to kromatografiske systemer er for ens, eller at prøvens dimensionalitet er lav. Til højre den ideelle situation, hvor de to systemer er fuldt ortogonale, og hvor komponenternes retentionsmønster udspænder hele det kromatografiske plan. Fra [6].

Perspektiv

I Analytisk Kemi Gruppen har vi bygget vores eget budgetvenlige 2D LC-system af to gamle "skralde HPLC'er". Det fungerede fint i mange konstellationer [7], men at køre gradient i 2^d kræver en højtryks-skifteventil og et langt mindre dwell-volumen på 2^d systemet. Derfor er den ene "skralde HPLC" nu udskiftet med en UHPLC, og der er indkøbt en højtryks-skifteventil. Vi har også manglet software til at styre instrumentet med gennem processen, men efter et opstartet forskningssamarbejde med Waters, Milford, US er softwaredelen ikke længere en begrænsende faktor. I den nærmeste fremtid skal vi lege med deres prototype på et 2-4 dimensionelt system, hvor dimensionerne er en kombination af lav- og høj-effektivitets kromatografi, dvs. fast-fase-kolonner og HPLC/UHPLC-kolonner. Og der er nok at gå i gang med....

E-mail

Nikoline Juul Nielsen: njn@plen.ku.dk

Referencer

1. Guiochon, G.; Marchetti, N.; Mriziq, K.; Shalliker, R.A. (2008): Implementations of two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 1189, s. 109-168.
2. Davis, J.M.; Giddings, J.C. (1983): Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms. *Analytical Chemistry*, vol. 55, s. 418-424.
3. Stoll, D.R.; Li, X.; Wang, X.; Carr, P.W.; Porter, S.E.G.; Rutan, S.C. (2007): Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 1168, s. 3-43.
4. Murphy, R.E.; Schure, M.R.; Foley, J.P. (1998): Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, vol. 70, s. 1585-1594.
5. Davis, J.M.; Stoll, D.R.; Carr, P.W. (2008): Effect of first-dimension undersampling on effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations. *Analytical Chemistry*, vol. 80, s. 461-473.
6. Gilar, M.; Olivova, P.; Daly, A.E.; Gebler, J.C. (2005): Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, vol. 77, s. 6426-6434.
7. Græsbøll, R.; Nielsen, N.J.; Christensen, J.H. (2014): Using the hydrophobic subtraction model to choose orthogonal columns for on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, vol. 1326, s. 39-46.

Pipettecenteret

Kalibrering og service af alle fabrikater pipetter.

Vi kalibrerer både ved indsendelse eller på kundens adresse.

Salg af pipetter og laboratorie varer.



Pipettecenteret

Skovkanten 41 · 4700 Næstved
Tlf. 55 73 62 05 · Mobil 30 33 32 49
Email. nielslindgaard@stofanet.dk
www.pipettecenteret.dk

