

# Modeller inden for væskekromatografi: Hvad kan vi bruge dem til?

At arbejde med teoretiske modeller inden for kromatografi kan give en dybere forståelse for, hvad der rent faktisk sker i eksperimentelle situationer. I omvendt fase væskekromatografi er der to veldokumenterede modeller.

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

Teoretiske modeller kan bruges til at forudsige udfald inden for et parameter-rum, og på den måde reducere større eksperimentelle indsatser til overkommelige opgaver. Eller de kan bruges til at verificere, at et eksperimentelt bestemt optimum er globalt og ikke lokalt. Inden for omvendt fase væskekromatografi er der to veldokumenterede modeller, som er anvendelige i eksperimentel kontekst og hvormed både mange kolonner og analytter er karakteriseret. Nedenfor gennemgås "The Hydrophobic Subtraction Model" (HS-modellen) [1] og "The Linear Solvent Strength Model" (LSS-modellen) [2] og eksempler på deres anvendelse gives.

## The Hydrophobic Subtraction Model

HS-modellen beskriver retentionen af en given analyt på et givent kolonnesystem relativt til retentionen af reference-komponenten ethylbenzen. Den relative retention beregnes som en funktion af fem kolonne-parametre og fem analyt-parametre, som hver især beskriver en kemisk interaktion mellem analyt og kolonne: hydrofobicitet ( $\eta'H$ ), sterisk hindring ( $\sigma'S^*$ ), analyt basicitet og kolonne-aciditet ( $\beta'A$ ), analyt aciditet og kolonne-basicitet ( $\alpha'B$ ) og endelig ion-binding ( $\kappa'C$ ). Modellen er indsat som ligning 1 nedenfor, hvor  $\alpha$  er den relative retention,  $k$  analyttens retentionsfaktor og  $k_{EB}$  ethylbensens retentionsfaktor. Små græske bogstaver er analyt-egenskaber, og store romerske bogstaver er kolonne-egenskaber. Hydrofobiske, syre-base og ioniske interaktioner øger den relative retention (+), hvorimod sterisk hindring mindsker den relative retention (-).

$$\log \alpha \equiv \log \left( \frac{k}{k_{EB}} \right) = \eta'H - \sigma'S^* + \beta'A + \alpha'B + \kappa'C \quad (1)$$

Mere end 650 kolonne-typer er blevet karakteriseret ved brug af HS-modellen. Deres kolonne-parametre kan findes på <http://hplccolumns.org>. Kolonne-karakteriseringen er uafhængig af f.eks. kolonne-dimensioner og flow, men fortæller noget om kolonnens egenskaber og selektivitet. Kolonne-

karakteriseringen er derimod meget afhængig af mobilfasens sammensætning. Den standardiserede karakteristik ved lav pH er udført ved kolonnetemperatur på 35°C og mobilfase 1:1 (v/v) acetonitril:buffer, hvor bufferen er 60 mM vandig kaliumdihydrogenphosphat (pH 2.8) evt. justeret med dråber af koncentreret hydrogenphosphat [3,4]. Modellen giver sig ud for at være mekanistisk ved at opkalde hvert enkelt led efter en kemisk interaktion, men det er den ikke i alle tilfælde – f.eks. har  $\pi$ - $\pi$ -interaktioner ikke et dedikeret led.

## At finde en kolonne med samme eller afvigende egenskaber

Vi vælger ofte kolonner ud fra *a priori*-eksperimentelle erfaringer. En mere objektiv måde er at bruge HS-modellens kolonne-parametre. F.eks. kan vi finde identiske eller lignende kolonner ved at sammenligne deres HS-parametre, ligesom det er muligt at finde kolonner med meget forskellig selektivitet. F-faktoren i ligning 2 giver et mål for, hvor ens to kolonner er. Lave F-værdier angiver høj similaritet. Typisk vil vi opfatte kolonner med  $F < 3$  som identiske og kolonner med  $F < 10$  som rimelig identiske. Meget forskellige kolonner har typisk  $F > 250$ .

$$F = \sqrt{(a(H_2-H_1))^2 + (b(S_2^*-S_1^*))^2 + (c(A_2-A_1))^2 + (d(B_2-B_1))^2 + (e(C_2-C_1))^2} \quad (2)$$

Vægtene a, b, c, d og e afhænger af vigtigheden af den specifikke interaktion for analytternes separation. Varierer analytterne f.eks. meget i hydrofobicitet er det en fin egenskab at udnytte i en kromatografisk separation, og b-vægten skal være relativt stor. Består ens prøve udelukkende af neutrale analytter, sættes e-vægten til nul, da der ikke er potentiale for ioniske interaktioner. I [5] har Gilroy *et al.* estimeret generelle vægte (a = 12,5, b = 100, c = 30, d = 143 og e = 83) baseret på 67 analytter med en bred vifte af egenskaber. Hvis man kender sin prøve godt, kan det give mening at bruge specifikke vægte målrettet prøvens analytter eller en bestemt klasse af analytter, i stedet for de mere generelle vægte. F-beregninger kan foretages online uden det store besvær på <http://hplccolumns.org>.

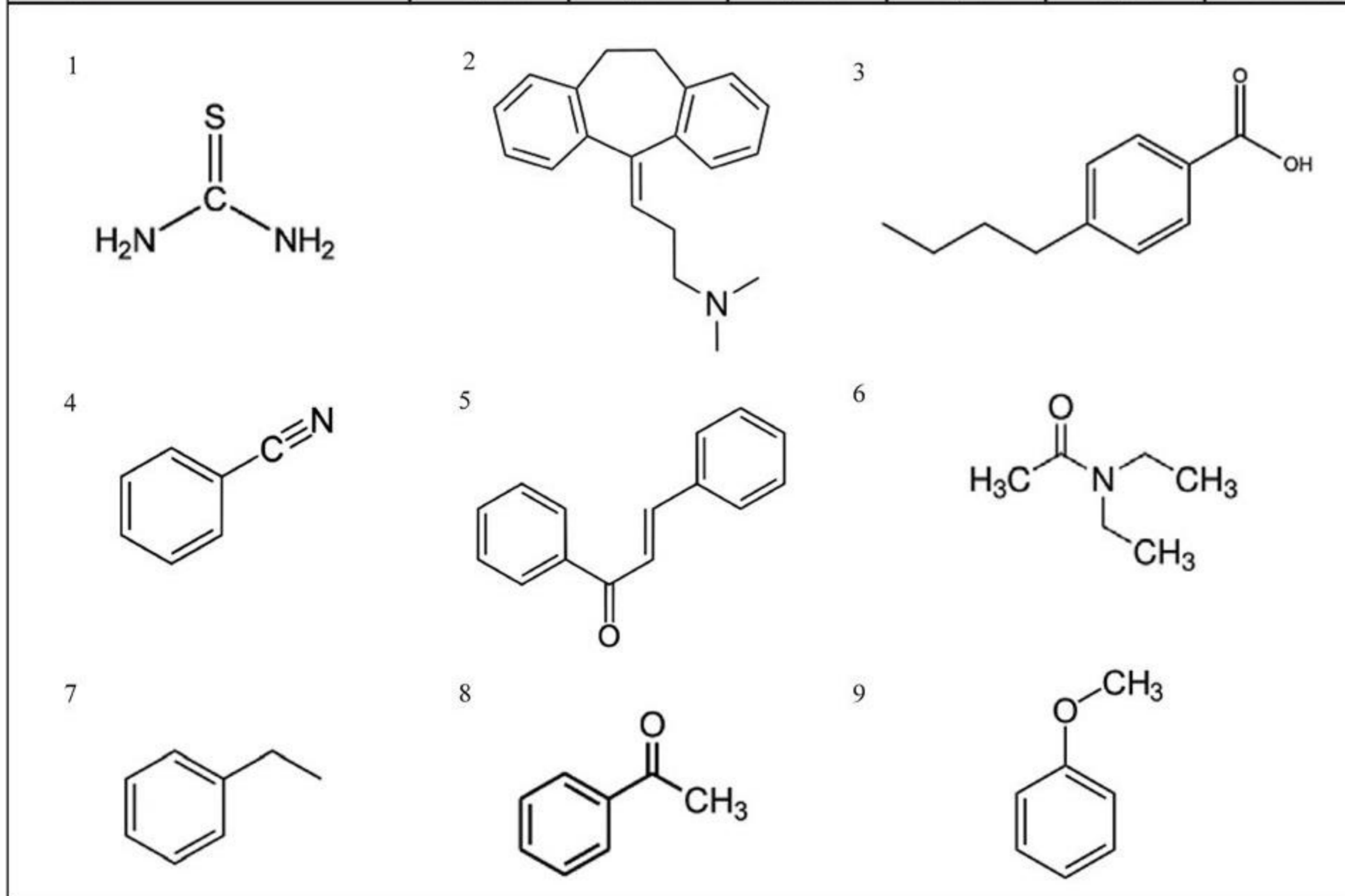
Inden for to-dimensionel kromatografi vil man typisk underkaste prøven to forskellige, orthogonale, separationer. Dvs. det er essentielt at identificere kolonner med orthogonale egenskaber. Vi har forsøgt os med at beregne prøve-specifikke vægte

ved at bruge principal komponentanalyse på prøve-analytternes HS-parametre: jo større varians de enkelte analyt-parametre udsprender, des vigtigere er den tilsvarende kolonne-parameter for adskillelsen. Hvis f.eks. alle analytterne har samme  $\sigma'$ -værdi, så vil en ændring i kolonnen  $S^*$ -værdi ikke have nogen indflydelse på den relative retention af analytterne, og derfor bør  $b$ -vægten være nul. På den måde lykkedes det at øge orthogonaliteten i en to-dimensionel separation, i.e. andelen af udnyttet peak kapacitet, med en faktor 1.5 [6].

### At vurdere kolonne-fitness fra batch til batch

Man kan bestemme en kolonnes parametre ved at anvende syv udvalgte kemiske stoffer med forskellige egenskaber (hydrofobicitet, sterisk hindring, basicitet, aciditet og ion-binding), foruden thiourea (dødtids-indikator) og ethylbenzen (reference-komponent) fordelt på to injektioner. Deres struktur og analyt-parametre er givet i figur 1.

	$\eta'$	$\sigma'$	$\beta'$	$\alpha'$	$\kappa'$	$\lambda_{max}$ [nm]
Thiourea <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	241
Amitriptyline <sup>2</sup>	-1,094	0,163	-0,041	0,300	0,817	205 > 239
4-Butylbenzoic acid <sup>3</sup>	-0,266	-0,223	0,013	0,838	0,045	239
Benzenitrile <sup>4</sup>	-0,703	0,317	0,003	0,080	-0,030	223 > 270
trans-Chalcone <sup>5</sup>	0,029	0,918	-0,021	-0,292	-0,017	310 > 226
N,N-Diethylacetamide <sup>6</sup>	-1,390	0,214	0,369	-0,215	0,047	200
Ethylbenzene <sup>7</sup>	0	0	0	0	0	208
Acetophenone <sup>8</sup>	-0,744	0,133	0,059	-0,152	-0,009	243 > 280
Anisole <sup>9</sup>	-0,467	0,062	0,006	-0,156	-0,009	219 > 270



Figur 1. Struktur, analyt-parametre og absorptionsmaxima for de ni stoffer, som kan anvendes til at bestemme en kolonnes HS-parametre. Data fra [4], dog er absorptionsmaxima eksperimentelle data.

Således kan en kolonnes selektivitet monitoreres ret simpelt, efterhånden som den slides. Når retentionstiderne for de ni komponenter er kendt, kan de syv komponenters retentionsfaktorer og relative retentionsfaktorer beregnes. Den relative retention og analyt-parametre indsættes i HS-modellen, hvorved vi får syv ligninger med fem ukendte kolonne-parametre. Det kan løses med multipel lineær regression. Typisk vil man se, at  $C$ -termen øges som funktion af øget silanol-aktivitet, og/eller at  $H$ -termen mindskes, efterhånden som den apolare fase tabs. Ønskes målinger sammenlignet med kolonne-parametre

fra litteratur og databaser bør den standardiserede mobilfases sammensætning bruges [3,4], men man kan også generere egne kolonne-parametre med en, for laboratoriet, ofte anvendt mobilfase sammensætning.

### The Linear Solvent Strength Model

LSS-modellen bygger på en empirisk approksimation af en analyts retentionsfaktor i isokratisk omvendt fase væskekromatografi, som funktion af solvent-styrken [2]. Ligning 3 giver LSS-modellen, hvor  $k$  er analyttens retentionsfaktor,  $k_w$  er analyttens retentionsfaktor i rent vand,  $S$  er hældningen, og  $\varphi$  er volumenandelen af organisk solvent med værdier mellem 0 og 1.

$$\log(k) = \log(k_w) - S \times \varphi \quad (3)$$

Dvs. der forventes en lineær sammenhæng mellem logaritmen til retentionsfaktoren,  $\log(k)$ , og solventstyrken, idet  $\varphi$  angiver solventstyrken, som stiger med andelen af organisk solvent. For at give en idé om, hvor stor effekten af eluentstyrken er, kan det bemærkes, at  $S$ -værdien normalt vil ligge i området 2-6 for små molekyler. Man kan i modelberegninger anvende  $S = 4$ , hvis man ikke har bestemt  $S$  eksperimentelt. Det betyder, at man kan forvente en faktor 10 ændring i retentionstiden, for hver gang eluentstyrken ændres med 25%, f.eks. fra  $\varphi = 0,25$  til 0,50.

Denne ligning kan anvendes til at forudsige retentionen i både isokratisk og gradient væskekromatografi. Det er muligt at beregne kromatogrammer for begge typer af separationer, blot man kender  $\log(k_w)$  og  $S$  for de involverede stoffer i det anvendte kromatografiske system. De to parametre i modellen,  $\log(k_w)$  og  $S$ , gælder kun på én kolonne og i ét solvent-system. Hvis man vil sammenligne f.eks. eluering med methanol:vand og acetonitril:vand, er det nødvendig at bestemme to sæt parametre: ét for analytterne med methanol:vand og ét for acetonitril:vand. Måling af LSS-parametrene er ganske ligetil: Man separerer analytterne isokratisk med forskellige eluentstyrker og laver så lineær regression af  $\log(k)$  som funktion af  $\varphi$ . Man behøver ikke bruge hele området ( $0 < \varphi < 1$ ), men man skal helst have retentionsfaktorer ( $k$ ) fra  $\sim 0,1 - 20$ . Ofte vil man observere en forbausende god linearitet inden for ( $0,05 < \varphi < 0,95$ ).

Der kan selvfølgelig forekomme afvigelser, som så vil gøre de efterfølgende forudsigelser mindre nøjagtige.

### LSS-modellen og gradient-eluering

Man kan også forudsige en komponents retentionstid, ligning 4, og dennes top-bredde, ligning 5, i gradient-eluering hvor  $t_R$  er retentionstiden,  $t_0$  er dødtiden,  $t_D$  er dwell-tiden,  $k_0$  er retentionsfaktoren ved starten af gradienten,  $b$  er gradientstejlheden,  $w_B$  er top-bredden ved basis, og  $N$  er antallet af teoretiske bunde i kolonnen.

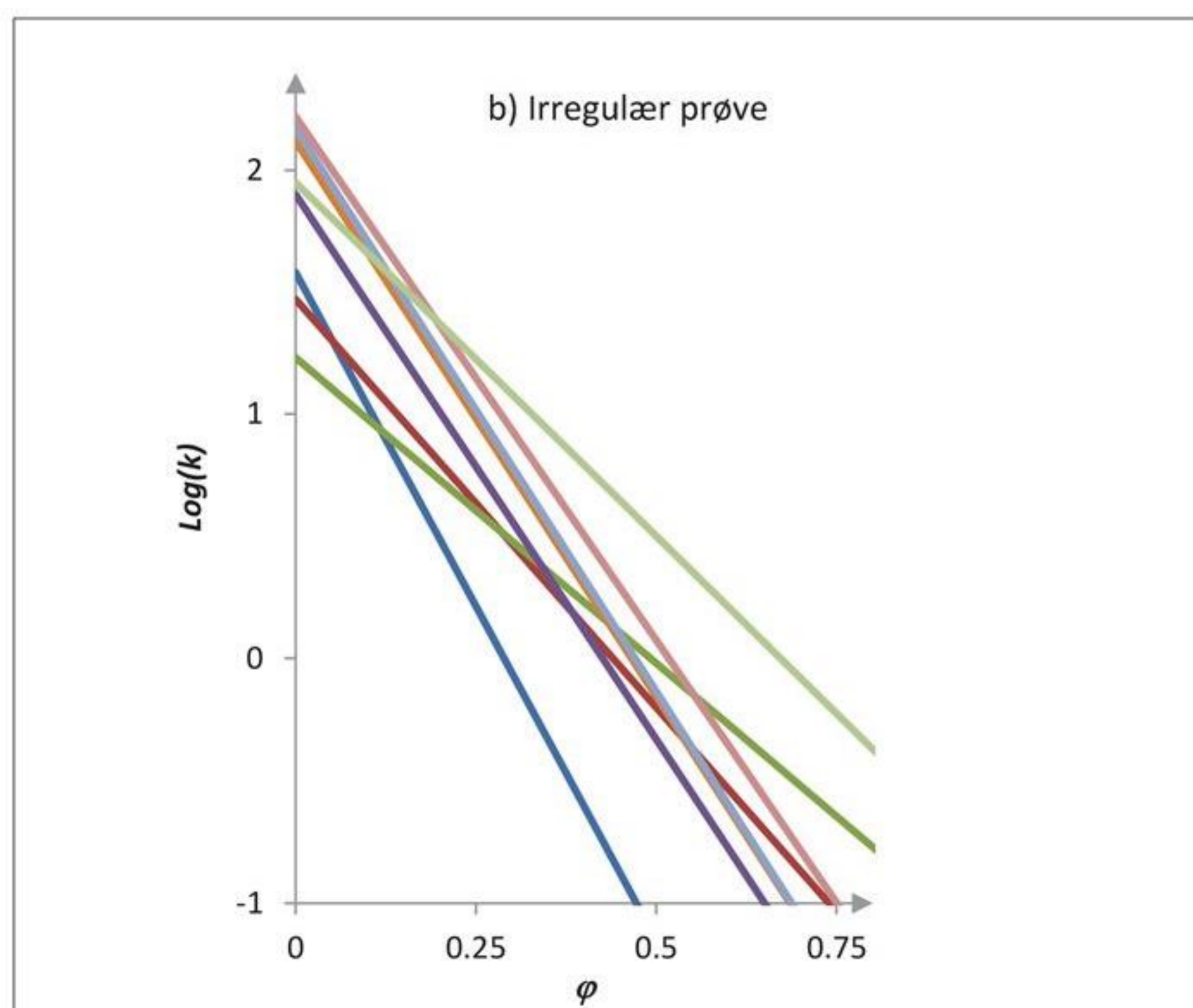
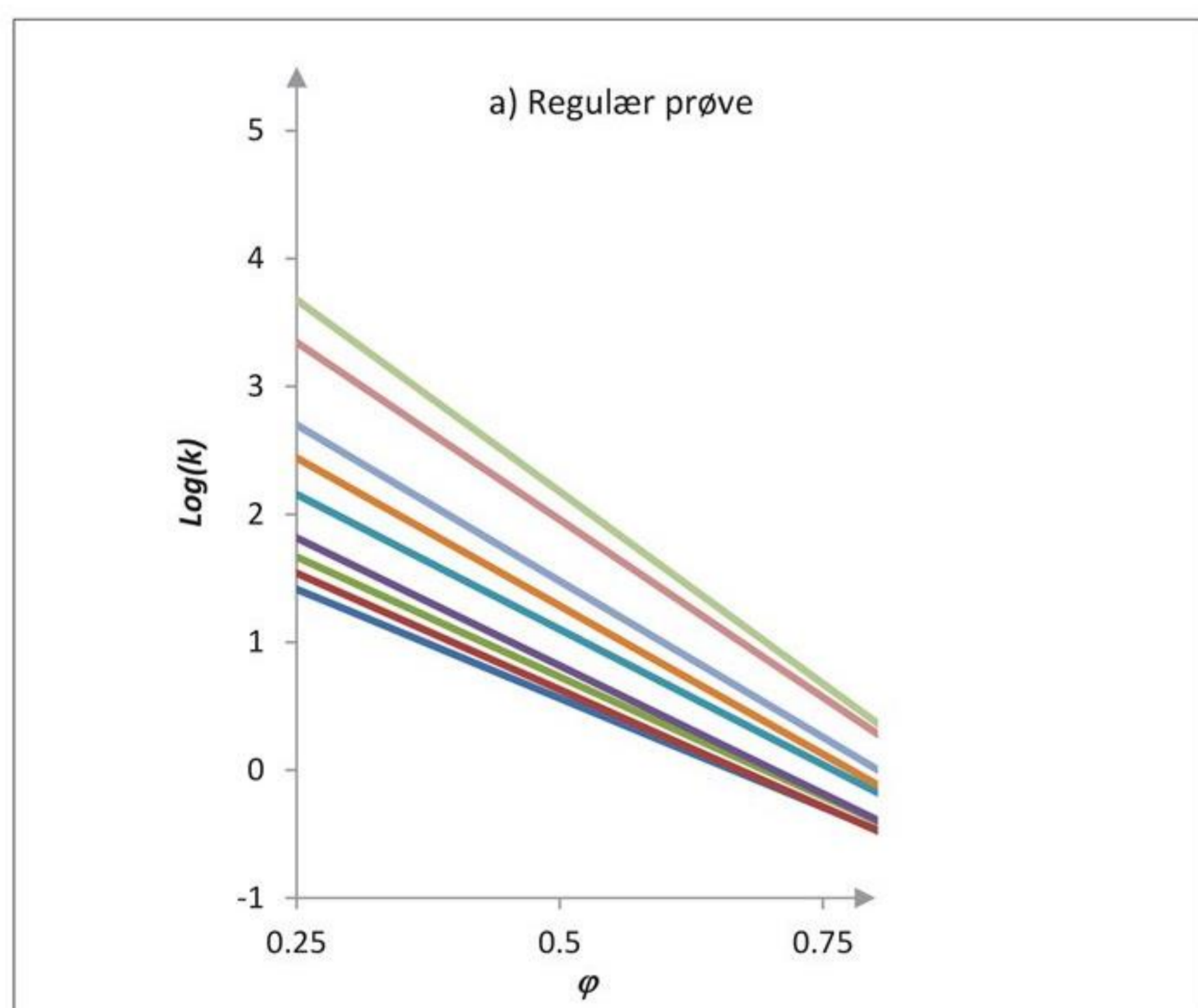
$$t_R \approx \frac{t_0}{b} \times \log(2,3 \times k_0 \times b) + t_0 + t_D \quad (4)$$

$$w_B \approx \frac{4}{\sqrt{N}} \times t_0 \times \left(1 + \frac{1}{2,3 \times k_0 \times b}\right) \quad (5)$$

Gradientstejlheden ( $b$ ) er en nøgle-parameter for gradient-eluering i LSS-modellen. Dens beregning er givet i ligning 6, hvor  $t_G$  er gradient-tiden og andre parametre givet ovenfor. Gradientstejlheden fortæller os, hvor meget den eluotrope styrke stiger pr. kolonne-volumen. På den måde kan man sammenligne gradienter kørt ved forskellige flow eller på systemer med forskellig dødvolumen.

$$b = t_0 \times \Delta\varphi \times \frac{S}{t_G} \quad (6)$$

Normalt får man en bedre separation af to nabo-toppe, jo mindre stejl gradienten er. Men – som man kan se af ligning 6 – er stejlheden afhængig af  $S$  for hvert stof. Dvs., når to stoffer har forskellig  $S$ -værdi, vil de påvirkes lidt forskelligt af gradienten,



Figur 2. Logaritmen til retentionsfaktoren  $k$  som funktion af eluent styrken  $\varphi$  for en a) regulær prøve, og for en b) irregulær prøve. Modifieret efter [2].

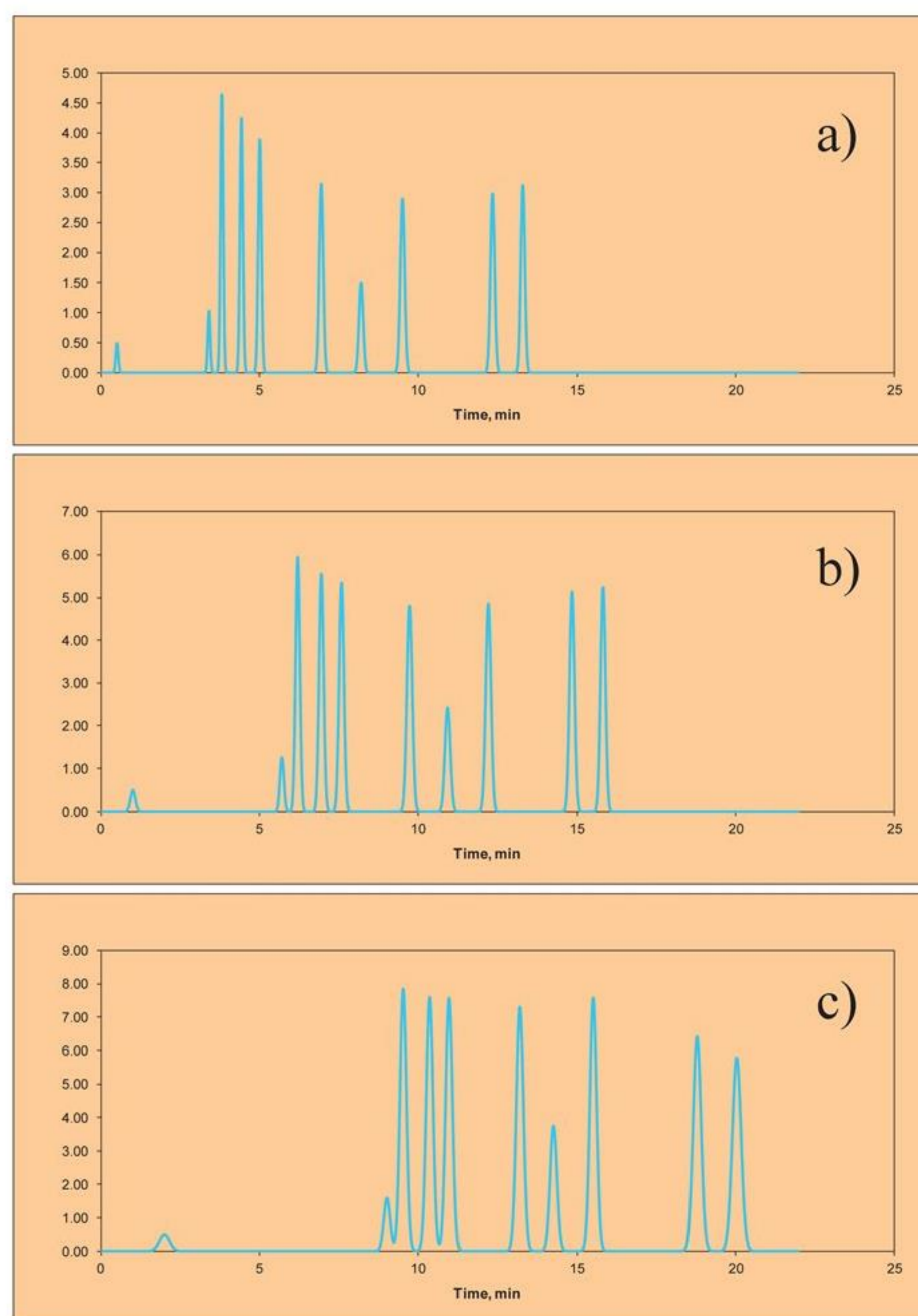
og derfor gælder denne generalisation kun i gennemsnit. I LSS-modellen skelner man mellem ”regulære prøver” og ”irregulære prøver”. I en regulær prøve vil ingen af de lineære relationer for *alle* analytterne i prøven,  $\log(k)$  vs  $\varphi$ , krydse hinanden. For regulære prøver gælder den generelle regel (at lav stejlhed giver bedst separation), da analytterne har tilnærmelsesvis samme  $S$ . I en irregulær prøve vil nogle af linjerne krydse hinanden: For de stoffer, hvor linjerne krydser hinanden, er der ingen generel regel for, om en stor eller en lille gradientstejlhed er bedst, figur 2.

Hvis man kender de to parametre for alle analytterne i prøven, kan man beregne kromatogrammerne for alle mulige gradienter og prøve sig frem til en optimal gradient. De fleste virkelige prøver vil ofte indeholde en del analytter, der ikke opfører sig regulært.

Vha. disse formler har vi lavet et regneark, der tillader beregning af teoretiske kromatogrammer for både isokratisk og gradient-eluering. Regnearket er anvendt i eksemplet nedenfor.

## Undersøgelse af sammenhængen mellem gradient-tid og flow

Her følger et eksempel, hvor LSS-modellen kan forklare det paradoks, at man kan få en bedre adskillelse, når den samme



Figur 3. Beregnede kromatogrammer for de ni stoffer i den regulære prøve, på samme kolonne, samme gradient, men med forskellige flow.

a) Højt flow,  $F = 2$  ml/min; dødtid,  $t_0 = 0,5$  min.

b) Medium flow,  $F = 1$  ml/min; dødtid,  $t_0 = 1,0$  min.

c) Lavt flow,  $F = 0,5$  ml/min; dødtid,  $t_0 = 2,0$  min.

Gradienten er den samme for alle tre systemer:  $\varphi = 0,4-0,8$  over 15 min.

gradient anvendes med et højt flow sammenlignet med et lavt flow, figur 3.

Separationen er bedre jo hurtigere kørsel, og forklaringen i LSS-termer er simpel, men ikke åbenlys: At gradientstejlheden er mindre med det høje flow. Derfor vil man i gennemsnit opnå en bedre adskillelse på den korteste tid. Resolutionen ( $R_s$ ) mellem nabo-toppe er givet i tabel 1.

Flow, ml/min.	4,0	2,0	1,0	0,5	4,0	2,0	1,0	0,5
Top	$t_R$ [min]				$R_s$			
1	1,9	3,4	5,7	9,0	3,2	2,6	1,9	1,3
2	2,2	3,8	6,2	9,5	4,1	3,4	2,7	2,0
3	2,6	4,4	6,9	10,4	3,8	3	2,2	1,5
4	3,1	5,0	7,6	11,0	10,3	8,6	6,8	5,2
5	4,7	6,9	9,7	13,2	6,2	4,9	3,6	2,5
6	5,9	8,2	10,9	14,3	5,9	4,9	3,9	3,0
7	7,2	9,5	12,2	15,5	12,6	10,5	8,3	7,1
8	10,1	12,3	14,9	18,0	4,6	3,7	3,2	2,4
9	11,2	13,3	15,8	18,4				

Tabel 1. Retentionstider og resolution ( $R_s$ ) for forskellige flow på den samme kolonne med samme gradient og uændret antal teoretiske bunde.

I figur 3 er følsomheden væsentligt større ved lavt flow end ved højt flow. Det skyldes, at elueringen i højere grad styres af gradienten end af det volumen, der pumpes gennem kolonnen. Med det lave flow elueres hver analyt i et væsentligt mindre

$L$ [mm]	50	100	200	50	100	200
Top	$t_R$ [min]			$R_s$		
1	3,4	5,7	9,0	2,6	2,7	2,5
2	3,8	6,2	9,5	3,4	3,8	4,0
3	4,4	6,9	10,4	3,0	3,1	2,9
4	5,0	7,6	11,0	8,6	9,7	10,4
5	6,9	9,7	13,2	4,9	5,1	4,9
6	8,2	10,9	14,3	4,9	5,5	6,0
7	9,5	12,2	15,5	10,5	11,7	14,3
8	12,3	14,9	18,8	3,7	4,5	4,8
9	13,3	15,8	20,0			

Tabel 2. Retentionstider og kromatografisk resolution for forskellige kolonnælængder med samme gradient og flow. Antal teoretiske bunde er proportionale med kolonnælængden.

volumen end ved højt flow, og derfor er følsomheden større ved lavt end ved højt flow (forudsat en koncentrations-sensitiv detektor).

Et lignende eksempel kan vises med beregning af kromatogrammer for de ni stoffer på den samme kolonne-type, men af forskellig længde. Hvis man anvender den samme gradient, vil en længere kolonne nok give en marginalt bedre adskillelse end den korte, tabel 2. Men fordi gradient-stejlheden er større for den lange kolonne modvirkes effekten af de flere teoretiske bunde næsten helt. Det vigtigste man opnår, er en længere analysetid.

Men – nu skal man ikke konkludere, at det altid er bedre at anvende en kort kolonne og/eller højt flow. Paradokset opstår kun, fordi man anvender *den samme gradient*, men ikke *den samme gradientstejlhed*. Hvis gradienten skaleres til en længere kolonne eller et lavere flow, vil man altid få en bedre adskillelse, men oftest på bekostning af en længere analysetid.

Man kan lære meget mere om LSS-modellen ved at læse Snyder og Dolans bog om emnet [2] eller forsøge sig med beregning

af teoretiske kromatogrammer, ligesom de grundlæggende artikler om HS-modellen giver et godt fundament for at finde praktisk anvendelse for denne [1,3,5,7-9]. God fornøjelse.

E-mail:

Nikoline J. Nielsen: njn@plen.ku.dk

Referencer

1. L.R. Snyder, J.W. Dolan, P.W. Carr (2004): *J. Chrom. A*, 1060, s. 77-116.
2. L.R. Snyder, J.W. Dolan (2007): *High-performance Gradient Elution. The Practical Application of the Linear-Solvent strength Model*, Wiley.
3. N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.G. Wolcott, P.W. Carr (2002): *J. Chrom. A*, 961, s. 171-193.
4. L.R. Snyder, A. Maule, A. Heebsh, R. Cuellar, S. Paulson, J. Carrano, L. Wrisley, C.C. Chan, N. Pearson, J.W. Dolan, J.J. Gilroy (2004): *J. Chrom. A*, 1057, s. 49-57.
5. J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder (2003): *J. Chrom. A*, 1000, s. 757-778.
6. R. Græsbøll, N.J. Nielsen, J.H. Christensen (2014): *J. Chrom. A*, 1326, s. 39-46.
7. N.S. Wilson, M.D. Nelson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, P.W. Carr (2002): *J. Chrom. A*, 961, s. 195-215.
8. N.S. Wilson, J.W. Dolan, L.R. Snyder, P.W. Carr, L.C. Sander (2002): *J. Chrom. A*, 961, p. 217-236.
9. J.W. Dolan, L.R. Snyder (2009): *J. Chrom. A*, 1216, s. 3467-3472.

Nyt om ...

## ... Biobeskyttelse mod giftige guldioner

De fleste metalioner som  $Au^{3+}$  er giftige over for bakterier. Ikke desto mindre lever der bakterier i biofilm på guldklumper. Det er nu vist, at bakterien *Delftia acidovorans*, som lever i sådanne biofilm, producerer et usædvanligt peptid, delftibactin, der

binder det giftige  $Au^{3+}$  som en kompleks forbindelse og dermed beskytter bakterien. Delftibactin er usædvanlig ved at indeholde to *N*-hydroxygrupper. Man håber, man kan benytte peptidet til at syntetisere guld-nanopartikler af veldefineret størrelse. Hvis delftibactin er tilstrækkelig selektivt, kan det måske også anvendes til guldudvinding.



Foto: Aram Dulyan. Licensed under Creative Commons Attribution 2.0 via Wikimedia Commons.

Carl Th.

Gold biomineralization by a metallophore from a gold-associated microbe, *Nature Chemical Biology*, 9, April 2013, side 241.

