

De nieuwe LC is **groen**

Sinds vijf jaar is de **vloeistofchromatografie** een techniek rijker. Wat zijn de voordelen van micro-UHPLC en is het beter dan micro-LC?

SHURAILA STOPPEL

De afgelopen vijf jaar maakte de analysetechniek vloeistofchromatografie een evolutie door. Dit dankzij de komst van *micro Ultra High Performance Liquid Chromatography* (micro-UHPLC of als trademark van Waters micro-UPLC). Arjen Gerssen, onderzoeker bij onderzoeksinstituut Rikilt-Wageningen UR, ontwikkelt technieken om contaminanten en toxines in voedsel te kunnen detecteren.

Gerssen ziet de relatief nieuwe techniek wel zitten en voorspelt: "In de toekomst zullen steeds meer instellingen micro-UHPLC gaan gebruiken." De toepassingsgebieden voor micro-UHPLC lopen uiteen van kwaliteitscontroles in voedingsmiddelenindustrie en farmaceutische industrie tot medicijnontwikkeling, dopingcontroles, milieucontroles en toepassingen in onderzoeksvelden als proteomics en metabolomics.

COMBINATIE MET MS

Aanvankelijk ontwikkelden wetenschappers in de jaren negentig de vloeistofchromatografie (LC) door naar micro-LC. Die ontwikkeling vloeiende voort uit de behoefte aan schaalverkleining. Kleinere vloeistofstromen waren noodzakelijk omdat onderzoekers de massaspectrometer (MS) steeds vaker als detectiesysteem koppelden aan de LC en het totale eluens voor die concentratiegevoelige detectiemethode te belastend was.

"In de allereerste micro-systemen zat een *flow-split* om schaalverkleining tot stand te brengen", vertelt Gerssen. Daarbij vloeit het merendeel van de mobiele fase het afvalvat in, om de rest door het gevoelige micro-systeem te leiden. "Zelf een split maken, is echter instabiel en niet reproduceerbaar. Dat is voor het Rikilt onhandig, we moeten voldoen aan

strikte eisen en dan dienen retentietijden stabiel te zijn."

Wetenschappers werkten sinds eind jaren tachtig de oude LC-techniek ook op een andere manier uit, namelijk tot de HPLC. De superioriteit van de HPLC leidde ertoe dat dit systeem uitgroeide tot de standaard in vloeistofchromatografie. Het vormt door zijn goede scheidingscapaciteiten en lage detectielimieten ook een goede combinatie met de MS. De HPLC is intussen zo ingeburgerd dat analytici hiervoor nu meestal de algemene term LC gebruiken.

'Sommige labs doen het vanwege de groene chemie'

Daarna zorgde de doorontwikkeling van de HPLC naar de UHPLC, voor een nieuwe revolutie in de scheidingstechnieken. "Het grote verschil tussen HPLC en UHPLC is de resolutie", vertelt Bart Devreese, hoogleraar eiwitbiochemie van de Universiteit Gent. "De UHPLC-kolommen bevatten kleinere partikels die zorgen voor een hogere resolutie. Dat is van groot belang bij proteomics en metabolomics. Een celextract kan wel vijfduizend eiwitten bevatten en in totaal honderdduizend metabolieten. Dat geeft zo'n complexiteit dat de klassieke HPLC niet in staat is die van elkaar te scheiden." De kleine deeltjes in de UHPLC-kolommen daarentegen leiden tot zeer smalle pieken, die daardoor beter te detecteren zijn.

MICROSYSTEMEN

De doorontwikkeling ging verder. "Wij zochten naar manieren om de HPLC en UHPLC te miniaturiseren", vertelt Gerssen. Hij werkte de afgelopen jaren samen met de firma Waters aan toepas-

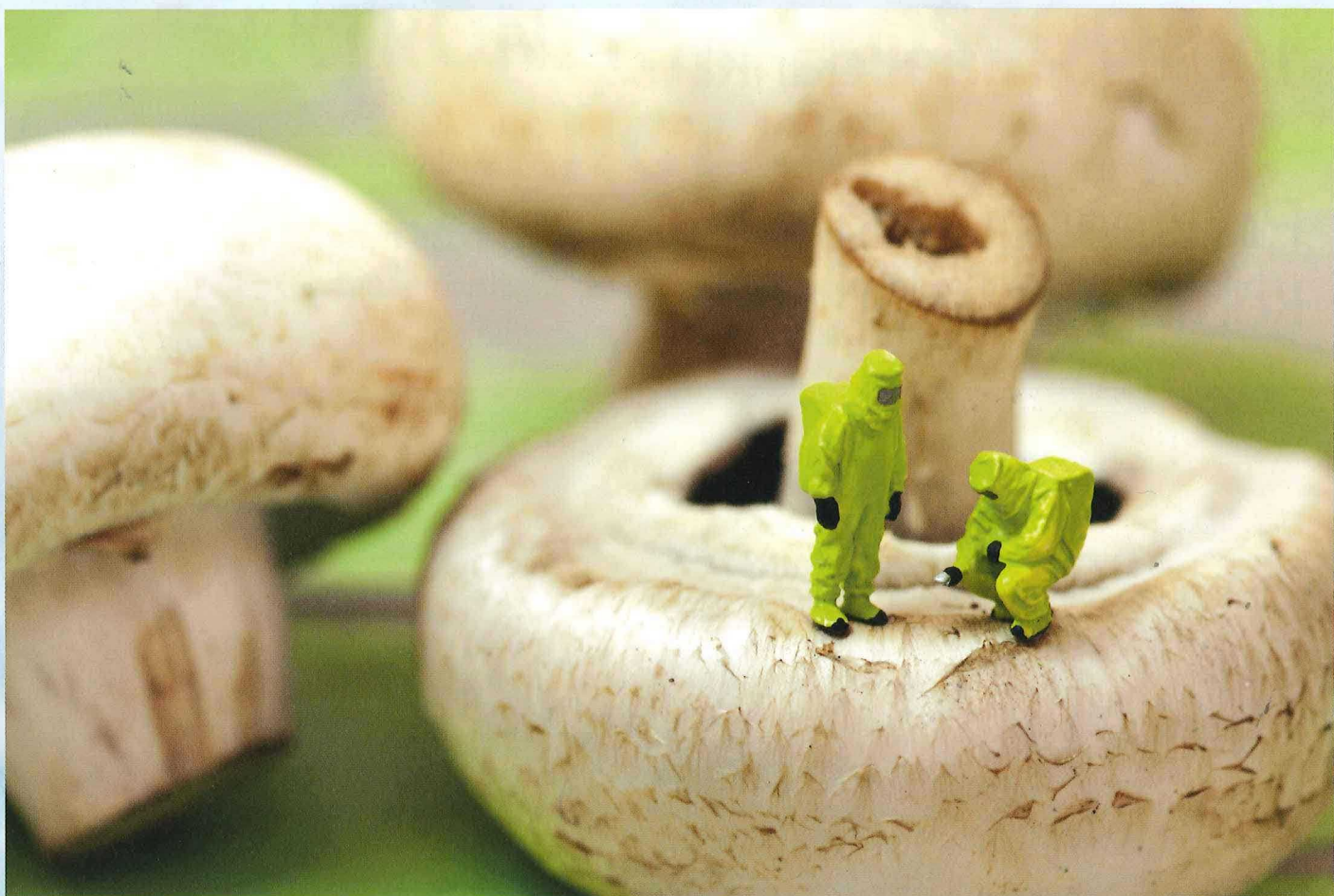
singen waarbij hij stabiele reproduceerbare micro- en nano-systemen gebruikt voor HPLC en UPLC, zonder flow-split. Sinds een jaar of vijf zijn die stabiele systemen op de markt. Gerssen: "Daarmee werd alles reproduceerbaarder." Bovendien verspil je geen oplosmiddelen meer, want bij de split-techniek belandde een groot deel van de organische oplosmiddelen in het afvalvat. Dat is duur en niet milieubewust.

De beweegredenen om HPLC en UHPLC systemen te willen verkleinen, verschillen per lab. Gerssen: "Sommige labs doen het om kosten te besparen of vanwege het milieu, de zogeheten groene chemie. Micro- of nano-UHPLC kan wel 99,5 procent aan oplosmiddel besparen ten opzichte van standaard UHPLC of HPLC." Daarnaast is er tien keer minder monster nodig voor de analyse. En vaak is de gevoeligheid in de MS eveneens beter. Net als dertig jaar geleden voor de overgang van LC naar micro-LC gold zijn het ook hier de inmiddels nog sensitievere MS-systemen die om miniaturisering vragen. "Kleinere vloeistofstromen geven minder vervuiling van de MS en dat komt de stabiliteit en het onderhoud ten goede", licht Gerssen toe.

Inmiddels hebben alle grote merken micro-UHPLC-systemen op de markt die geen gebruik hoeven te maken van een flow-split. Devreese: "Tegenwoordig kan de pomp een stabiele vloeistofstroom leveren van minder dan één microliter per minuut." Het zijn de lage vloeistof-snelheden die de hoeveelheid benodigd oplosmiddel verlagen. Schaalverkleining gaat ook gepaard met verlaging van de interne diameter van de kolom (zie tabel).

WEERSTAND

De UHPLC-systemen werken met zeer hoge druk, afhankelijk van het systeem



tot wel 1.000 bar, want de smalle UHPLC-kolommen met de zeer kleine deeltjes geven veel weerstand. "Persoonlijk gebruik ik liever niet van die hoge drukken", vertelt Devreese. "Het vraagt erg veel van je apparatuur en maakt de kosten van micro-UHPLC ten opzichte van micro-HPLC hoog."

Devreese heeft meer bedenkingen. "Ik denk dat de robuustheid van de micro- en nano-systemen minder goed is dan die van de HPLC en UHPLC." Met robuustheid doelt hij op de mate waarin het systeem goed blijft scheiden. Ofwel, blijven de gevoeligheid en de resolutie goed na bijvoorbeeld duizend injecties? En blijft de retentietijd stabiel? De fabrikanten beweren uiteraard van wel.

Twijfel over robuustheid en reproduceerbaarheid is waarschijnlijk ook de reden dat bedrijven, die veel kwaliteitscontroles uitvoeren, blijven vasthouden aan 4,6 mm-kolommen. Volgens

Devreese is vooral de farmaceutische industrie erg conservatief. "Ondanks dat het technisch toepasbaar is, is micro-UHPLC volgens mij typisch iets voor onderzoeksgebieden zoals de life sciences. De lage injectievolumes vragen om

'Ik denk dat de robuustheid minder goed is'

extra voorbewerking en dat brengt verschillen in de samplesamenstelling met zich mee die andere toepassingsgebieden, zoals QA-QC, proberen te vermijden." Gerssen: "Daarnaast zijn al die kanaaltjes heel klein, dus heb je sneller last van een verstopping. Ook daarvoor is de voorbewerking heel belangrijk."

Verder kan het een nadeel zijn als er op een lab al apparatuur aanwezig is waarmee de nieuwe micro-UHPLC hardware

moet samenwerken. Gerssen: "Als je een micro-UHPLC van Waters hebt staan, dan moet je ook het MS-systeem van die firma gebruiken. Dat was bij conventionele HPLC niet zo, die kon je aan elke MS koppelen. Als je alle apparatuur moet vervangen gaat dat niet in een keer. Het Rikilt kan sowieso niet van het ene op het andere moment op andere apparatuur overstappen, want het heeft allerlei methodes onder accreditatie draaien. Dat kun je niet zomaar veranderen."

Toch zien zowel Gerssen als Devreese in de toekomst veel voordelen voor de industrie om over te stappen naar micro-UHPLC. Het veld is nu nog in ontwikkeling, maar de initiële problemen met reproduceerbaarheid zijn er al niet meer. Een nieuwe methode implementeren kost tijd en daarom zal het volgens de onderzoekers nog enige tijd duren voordat de grote groep overstag is. Maar de micro-UHPLC biedt zo veel voordelen op het gebied van gevoeligheid, selectiviteit en kostenbesparing dat het uiteindelijk - ook voor routine- en kwaliteitscontrolelaboratoria - onvermijdelijk is om de overstap te maken.

	Kolom diameter	Deeltjes	Druk
HPLC	4,6 mm	3-5 micrometer	200-250 bar
UHPLC	1-2,1 mm	1-2 micrometer	600-1.200 bar
Micro-UHPLC	100-300 micrometer	1-2 micrometer	600-1.200 bar