

Drie keer zo snel met dubbele detectie

Een Flash chromatograaf die UV-detectie en Evaporation Light Scattering-detectie combineert, detecteert méér en bespaart veel tijd. Dat is de ervaring van onderzoeker Danny Geerdink van de vakgroep Bio-organische Chemie van de Rijksuniversiteit Groningen, waar deze nieuwe technologie de Nederlandse primeur had.

sis, de verwekker van tuberculose. Deze moleculen hebben zowel een zeer hydrofiel deel, een disaccharide, als een hydrofoob deel met twee lange vetzuren. Geerdink: “De hydrofobe kant zit aan buitenkant van de celwand en vormt zo een stevige barrière tegen antibiotica. Dat verklaart

Vóór de komst van de combinatie-techniek kostten afzonderlijke bepalingen al gauw anderhalf uur. Dat gaat nu drie keer zo snel. Geerdink: “We werkten met standaard glazen kolommen met silica. Daarna moesten we alle fracties nog met dunne-laagchromatografie (TLC) analyseren om na te gaan waar het product zat. Nu kunnen we in *real time* zien of er een product af komt. Omdat we de TLC-stap achterwege kunnen laten, zijn we doorgaans in een half uur klaar. Bovendien is de scheiding helemaal geautomatiseerd. In de tussentijd kun je dus rustig even wat anders gaan doen.”

Zuiver

De vakgroep waar Geerdink zijn promotieonderzoek doet, houdt zich bezig met de synthese van complexe organische moleculen. Vaak natuurlijke stoffen die voor onderzoek en ontwikkeling van geneesmiddelen zo zuiver mogelijk moeten zijn. Zo werkt Geerdink aan de synthese van glycolipiden die voorkomen in de celwand van *Mycobacterium tuberculo-*

Onderzoeker Danny Geerdink:

“Omdat we de TLC-stap achterwege kunnen laten, zijn we doorgaans in een half uur klaar.”



voor een deel waarom deze medicijnen bij deze bacterie maar matig werken en tuberculosepatiënten relatief lang met antibiotica behandeld moeten worden. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat de glycolipiden ook een antigene werking hebben en dus een immuunrespons opwekken. Ook voor verder onderzoek is het essentieel dat je ze zuiver in handen krijgt. Je kunt wel uitgaan van bacteriekweken, maar de extractie en zuivering zijn moeilijk, de opbrengsten gering.”

Synthesestappen

De synthese van deze stoffen biedt door zijn complexiteit fundamentele uitdagingen binnen de organische chemie. “Aan de disacchariden zijn veel verschillende residuen veresterd en de vetzuren hebben heel lange gefunctionaliseerde alkylketens.”

De synthese omvat daarom een groot aantal stappen. “Je moet eerst diverse bouwstenen afzonderlijk synthetiseren, voor je ze tot eindproduct kunt samenvoegen. De combinatie van zowel hydrofobe als hydrofiele componenten maakt dit alleen maar ingewikkelder. Daarnaast hebben we nog het probleem dat we niet zeker weten waar de vetzuren aan het disaccharide veresterd zijn.”

Optimaliseren

Van de komst van de Reveleris Flash chromatograaf van Grace Davison

Flash chromatografie

‘Flash’ is een vorm van kolomchromatografie, waarbij de loopvloeistof onder matige druk door de kolom geperst wordt. Die druk is aanzienlijk lager dan de 200 bar die soms bij HPLC wordt gebruikt. De Reveleris heeft een maximum druk van 200 psi (13,8 bar). De Groningse chemici werken daar nog ver onder. Afhankelijk van de gewenste loopsnelheid en de viscositeit van de loopvloeistof ligt de druk in hun kolommen tussen 20 en 60 psi.

Discovery Sciences vorig jaar hebben de Groningse onderzoekers geen dag spijt gehad. Ze gebruiken het apparaat eigenlijk bij elke stap van de synthese, vertelt Geerdink. “In de eerste plaats natuurlijk om de tussenproducten zo goed mogelijk te zuiveren. Maar we willen ook weten welke stoffen er daarnaast in het reactiemengsel zitten. Alleen zo kunnen we het verloop van de reacties precies volgen en kunnen we elke afzonderlijke synthesestap optimaliseren.” Hij benadrukt dat de afdeling aan UV-detectie alleen niet genoeg heeft. “Zowel de suikers als de lipiden zijn nauwelijks UV-actief, maar sommige tussen- en bijproducten zijn dat wel. Daarom hebben we zowel de UV- als de *Evaporation Light Scattering* (ELS)-detectie nodig.”

Automatisch

Een overzichtelijk aanraakscherm maakt de gebruikers snel wegwijs. Relevante variabelen, zoals kolomtype, eluens, looptijd en druk zijn eenvoudig in te stellen. Het display toont de pieken voor elk van de detectoren afzonderlijk. “Daarnaast is het voor verdere analyses handig dat je hem zo kunt in stellen dat alleen de pieken in buisjes worden opgevangen. Hij houdt ook precies bij welke piek in welk buisje terecht is gekomen.”

Verwisselen van kolommen en het laden van andere loopmiddelen is een fluitje van een cent. Er zijn verschillende voorgepakte kolommen leverbaar. Die worden automatisch door het apparaat herkend en parameters worden softwarematig aangepast. Standaardtaken als het equilibreren van de kolommen vinden automatisch plaats. Ook is het mogelijk om tijdens een bepaling de samenstelling van de loopvloeistof langzaam te veranderen. Daardoor kunnen componenten van het monster die bij het ene loopmiddel aan de kolom hechten, er met het tweede alsnog uitgehaald worden. “Het apparaat is behoorlijk flexibel in gebruik”, vindt Geerdink. Eigenlijk is het geschikt voor alle toepassingen van kolomchromatografie waarbij méér dan één



Links de Flash-cartridge van Grace (silica 40 micrometer) die een maximale druk van 200 psi aankan.

detectiemethode gewenst is, besluit hij. “Met name wanneer het te scheiden mengsel zowel UV-actieve als -inactieve stoffen bevat.”

Huup Dassen

Fotografie: Jaap Spieker

Het geïntegreerde systeem. Waterbehandeling en tank in één:

TKA LabTower EDI - het complete systeem!

TKA LabTower EDI - Zuiverwaterkwaliteit 15–10 MΩ×cm. Volgens de normen ASTM II, CAP, CLSI type 1, ISO 3696 en Aqua Purificata. Voor alle biotechnologische toepassingen en als voeding voor autoclaven, klinische analysers en ultrazuiverwatersystemen.

TKA Benelux BV
Edisonstraat 24 · 4004 JL TIEL
tel. 0344 632625
fax 0344 618667
www.tka.eu · info@tka.de

TKA