

Dr inż. Piotr Guga
CBMiM PAN w Łodzi
Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
e-mail: pguga@bio.cbmm.lodz.pl

Najczęstsze błędy w technice HPLC.

Technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, ang. high performance liquid chromatography) jest w chwili obecnej jedną z najszerzej stosowanych technik analitycznych w chemii, biochemii, biologii molekularnej i innych naukach pokrewnych. Zakres jej stosowalności obejmuje ogromny obszar, zarówno jeżeli chodzi o skalę procesu jak i techniki rozdziału i typy wykorzystywanych oddziaływań analitu z fazą nieruchomą. Stosując chromatografy cieczowe w odpowiedniej konfiguracji można analizować lub wyodrębnić od mikrogramów czy pojedynczych pikomoli materii w analityce biochemicznej do kilku bądź kilkudziesięciu gramów, a więc ilości milimolowych i większych, w zastosowaniach preparatywnych w skali półprzemysłowej i przemysłowej. Najszerzej znana ogółowi chemików metoda chromatografii na żelu krzemionkowym jest również stosowana w wersji HPLC, gdzie w porównaniu do swojej klasycznej odmiany w otwartych kolumnach szklanych ogromnie zyskuje na szybkości i powtarzalności. Jednak metoda ta, zwana chromatografią na fazie normalnej, jest znacznie mniej popularna niż chromatografia na tzw. fazie „odwrotnej” lub „odwróconej”, gdzie grupy silanolowe krzemionki są zmodyfikowane resztami alkilowymi lub alkiloarylowymi. Właśnie ta technika, czyli RP-HPLC (ang. reverse phase high performance liquid chromatography) jest stosowana w od 85 do 90% wszystkich analiz. Inne podstawowe typy HPLC to chromatografia jonowymienna, chromatografia oddziaływań hydrofobowych i najbardziej specyficzna metoda – chromatografia powinowactwa biochemicznego. Ponieważ każda z tych metod rozdziału może być wykorzystana przy zastosowaniu różnego typu detektorów, jak np. najbardziej popularne detektory UV/VIS, lub detektory konduktometryczne, fluorescencyjne, polarymetryczne i inne, to jest zrozumiałym, że obszar zastosowań metody HPLC jest praktycznie nieograniczony, zwłaszcza biorąc pod uwagę zastosowanie zamiast klasycznych detektorów, sprzężonych z chromatografem spektrometrów masowych lub spektrometrów absorpcji atomowej, co oprócz wzrostu czułości detekcji do poziomu części femtomola daje dodatkowe informacje o składzie cząsteczek opuszczających kolumnę chromatograficzną. O ile 15 lat temu chromatografy cieczowe typu HPLC stanowiły rzadkość w polskich laboratoriach badawczych, to obecnie stanowią one podstawowe narzędzie badawcze, bez którego postęp w wielu dziedzinach nauk przyrodniczych byłby praktycznie niemożliwy. Wciąż też są kupowane nowe aparaty, coraz doskonalsze i bardziej wszechstronne, które mogą, ale niestety często nie dają spodziewanych rezultatów podczas codziennej pracy. W niniejszym opracowaniu chciałbym zwrócić uwagę na błędy popełniane nie podczas pojedynczej analizy, ale na etapie konfigurowania systemu podczas zakupu, a także na błędy w doborze kolumny chromatograficznej, jej typu, wielkości i rodzaju wypełnienia. Błędy te są o tyle istotne, że znajomość najistotniejszych parametrów na które należy zwracać uwagę jest wśród szerokiej rzeszy obecnych i przyszłych użytkowników tych aparatów dalece niewystarczająca, a błędy popełnione przy zakupie sprzętu są bardzo trudne do usunięcia ze względu na koszty zakupu dodatkowych modułów. Podejmując decyzję o żądanej konfiguracji musimy przede wszystkim odpowiedzieć sobie na pytanie, czy chromatograf będzie wykorzystywany tylko do prac analitycznych, czy też również do prac półpreparatywnych lub preparatywnych. Do prac analitycznych wystarczą kolumny o średnicy wewnętrznej 1-2mm, dla których nominalne natężenie przepływu eluenta wynosi 50-300µl/min. W porównaniu do typowych

kolumn o średnicy 4,6mm i natężeniach przepływu 1-1,5ml/min, oznacza to nawet 30-krotne zmniejszenie zużycia specjalnie czystych (i przez to drogich) rozpuszczalników i solnych składników buforów, przy jednoczesnym osiągnięciu najwyższej czułości analizy. Trzeba jednak pamiętać, że kolumny o tak małych średnicach (ang. narrow bore columns) dla zapewnienia powtarzalności analiz i należytej dokładności mieszania składników buforu wymagają niezwykle precyzyjnych pomp, najlepiej bezpulsowych pomp strzykawkowych. W systemie takim musi się znaleźć mieszalnik dynamiczny i detektor o możliwie najmniejszych objętościach martwych. Również przewody łączące poszczególne elementy systemu muszą mieć małą średnicę wewnętrzną i możliwie najmniejszą długość. Jeżeli jednak nasz system HPLC ma również współpracować z kolumnami 4,6mm, to oczywiście wielkość celi pomiarowej detektora i średnica przewodów łączących muszą uwzględniać potrzebę uzyskania odpowiednio większych przepływów, ale na tym kompromisie ucierpi czułość i rozdzielczość kolumny typu „narrow bore”. Łatwo sobie wyobrazić, że zbyt duża cela pomiarowa, bardziej właściwa dla zestawów pół-preparatywnych, będzie miejscem mieszania się związków o zbliżonych czasach retencji, dopiero co rozdzielonych na kolumnie chromatograficznej. Poniższe zestawienie pokazuje wpływ wielkości celi pomiarowej detektora na sprawność (N) kolumny analitycznej 250x4mm wypełnionej złożem C18, o przepływie nominalnym 1 mL/min, dla analizy butylobenzenu.

objętość celi	N
8mm ³	6400
30 mm ³	5200
150 mm ³	2300

Podobne znaczenie ma dobór średnicy przewodów łączących zawór do wprowadzania próbki z kolumną i kolumnę z detektorem. Poniższe dane opisują analizę fenolu na identycznej kolumnie ze złożem C18 z zastosowaniem przewodów o średnicach 0,25—0,75 mm.

zawór – kolumna, 30cm	0,25 mm	0,50 mm	0,75mm
N =	7300	4760	2800
kolumna – detektor, 30 cm			
N=	7200	5640	4065

Nie bez znaczenia jest również objętość próbki wprowadzanej na kolumnę. Przy objętościach 20 ul, 40 ul i 100 uL sprawność kolumny wynosi odpowiednio N=7300, 6200 i 3900 (analiza j.w.). Wynika to z faktu, że proces osadzania się próbki na złożu u wlotu kolumny powinien przebiegać z jak najmniejszą dyfuzją, czyli że „plasterek” kolumny w którym nastąpiła pełna absorpcja próbki powinien być możliwie najkrótszy.

Ważnym elementem dla zapewnienia powtarzalności analiz, zwłaszcza w technikach chromatografii jonowymiennej, jest zapewnienie stałej temperatury buforów i pracy kolumny w czasie sesji pomiarowej. Stosowanie termostatu dla kolumny jest oczywiste, ale powtarzalność czasów retencji zmniejsza się również, jeżeli pomieszczenie nie jest klimatyzowane. Zmiana temperatury pomieszczenia w ciągu dnia pracy o 4-5°C (w upalne dni to niewiele) powoduje zwykle zmiany czasów retencji i rozdzielczości kolumny uniemożliwiające korzystanie z przygotowanych wcześniej danych kalibracyjnych.

Oczywiście prawidłowe skonfigurowanie systemu jest konieczne dla efektywnej pracy, ale nie jest warunkiem wystarczającym. Wiele uwagi należy poświęcić doborowi kolumny chromatograficznej, co jest tym ważniejsze, że dobrej klasy kolumna kosztuje 400-

700 euro. Szukając odpowiedniej kolumny w katalogach natrafiamy na wiele parametrów, których dobre zrozumienie jest konieczne dla uniknięcia błędu.

Najważniejsze parametry wypełnienia to:

1) grupa funkcyjna związana ze złożem decydująca o rodzaju oddziaływań próbka-złoże

a) –OH, normalna faza, krzemionka

b) –Me, –Bu, C8 (octyl), C18 (octadecyl, ODS), –CN (cyano), –Ph (phenyl), czyli wypełnienia typu RP-HPLC,

c) –CH₂–CH₂–C₆H₄–SO₃H, kationity

d) –(CH₂)₃NMe₃, anionity

2) wielkość ziarna złoża (particle size, 3–30 μm); im mniejsze ziarna, tym lepsza sprawność kolumny liczona w ilości półek teoretycznych na metr bieżący kolumny, ale i większe opory hydrauliczne przepływu. W poniższym zestawieniu przyjęto za punkt odniesienia ciśnienie zwrotne dla typowej kolumny o wymiarach 150x4.6mm, wypełnionej złożem C18 o wielkości ziarna 5 μm. Ma ono zwykle wartość ok 150 atmosfer. Widać zatem, że stosowanie złoża 3 μm w kolumnie o tych samych wymiarach oznacza ciśnienie podawane przez pompy rzędu 400 atmosfer, a to jest już wartość bliska wytrzymałości mechanicznej złożów krzemionkowych

wielkość ziarna (μm)	sprawność (N/m)	względne ciśnienie (kolumna 150x4.6mm)	zastosowanie
3	100000-120000	2,78	analizy wymagające najwyższej rozdzielczości
5	70000-90000	1,00	typowe analizy
8	45000-60000	0,39	rozdziały preparatywne
12	30000-40000	0,18	wielkoskalowe rozdziały preparatywne
30	1500-3000	0,03	ekstrakcja do fazy stałej

3) wielkość porów (pore size, 100–300 Å); aby duże cząsteczki np. białka mogły oddziaływać z grupami funkcyjnymi obecnymi wewnątrz porów złoża i aby uniknąć niespecyficznego uwięźnięcia składników próbki w złożu należy stosować złoża o odpowiednio dużych średnicach porów

4) rozwinięcie powierzchni (surface area, 50–300 m²/g); parametr określający powierzchnię złoża dostępną do oddziaływań z cząsteczkami naniesionej próbki. Większe rozwinięcie powierzchni daje większą sprawność kolumny, ale złoża takie są zwykle znacznie droższe.

5) zawartość węgla (%C, 2–16 %); parametr charakteryzujący wypełnienia typu RP, określający ich hydrofobowość. Dla typowych wypełnień, najwyższy %C jest w przypadku złożów C18, gdzie grupy silanolowe są zalkilowane łańcuchami węglowymi o 18 atomach węgla. Dla próbek silnie hydrofobowych należy stosować złoża o mniejszej zawartości węgla, np. złoża typu C8 a nie C18. Zastosowanie złoża zbyt hydrofobowego powoduje, że próbka jest eluowana przy bardzo wysokim stężeniu składnika organicznego eluenta, a wtedy rozdzielczość kolumny bardzo spada – analiza bardziej wtedy przypomina mycie kolumny niż pracę analityczną.

Co zrobić i czego unikać w czasie analizy techniką RP-HPLC?

1) stosować prefiltr zatrzymujący koloidalne zanieczyszczenia obecne w buforze i w próbce, oraz prekolumnę ze złożem tego samego typu co obecne w kolumnie analitycznej, ale o większej średnicy cząstek niż złożo kolumny.

2) wybór i przygotowanie rozpuszczalnika:

- a) tylko specjalnie czyste klasy HPLC!!!
- b) tylko specjalnie czyste szkło laboratoryjne!!! (nie używać do jego mycia detergentów)
- c) filtrowanie buforów przez filtry 0,2 μm
- d) odgazowanie buforów strumieniem helu lub przez zastosowanie próżni 10-20mm Hg i łaźni ultradźwiękowej

3) przygotowanie próbki

- a) minimalizacja objętości próbki
- b) filtrowanie próbki przez filtry 0,2 μm
- c) wirowanie próbki (min 5000 obr/min)

4) termostatowanie kolumny

5) równowagowanie kolumny pomiędzy analizami

- a) normalna faza (krzemionka/heptan) – 100 objętości kolumny (160 ml dla kolumny 250x4mm)
- b) odwrotna faza – 10-20 obj. kolumny czyli co najmniej 10-15 minut

Jak przedłużyć życie kolumny (jak oszczędzić 500 euro?)

- a) unikać skokowej zmiany buforu
- b) unikać gwałtownej zmiany ciśnienia w układzie – grozi uszkodzeniem ciągłości wypełnienia
- c) unikać analizy "asfaltu"!!! – tzw. niezidentyfikowane produkty smoliste nawet rozpuszczone w próbce mogą nieodwracalnie absorbować się na złożu zmniejszając sprawność kolumny
- d) wymieniać prefiltr i prekolumnę zanim ciśnienie w układzie przekroczy 1,5 x ciśnienie nominalne
- e) kontrolować pH buforu i próbki
- f) nie uszczelniać wycieków na siłę!!! – wymienić elementy łączące.
- g) starannie myć kolumnę po zakończeniu serii analiz – kontrolować profil elucji w trakcie mycia.

A teraz powodzenia!