

Od kolony k robustní HPLC separaci a jiné tipy pro snadnější život analytika



Altium

Ondřej Lacina, Ph.D.

Aplikační specialista LC a LCMS

Tipy pro vývoj robustní metody

- Vývoj metody vždy začněte s novou kolonou.
- Vybírejte kolony s vhodnými vlastnostmi při pH metody (pH metody závisí na pKa analytů).
- Otestujte reprodukovatelnost mezi šaržemi kolon.
- Přesně a jednoznačně zdokumentujte přípravu mobilní fáze. Otestujte reprodukovatelnost přípravy MF.

Parametry vhodnosti (U)HPLC systému

- Rozlišení: >2
- Tvar píku: USP Tf ≈ 1 (<2)
- Opakovatelnost nástřiku: plocha, Tf atd.
 - RSD 0.1 - 0.25%
- Retenční faktor: $1 < k < 10$
- Relativní retence: α nebo k_2/k_1
- Poměr S/N: > 10

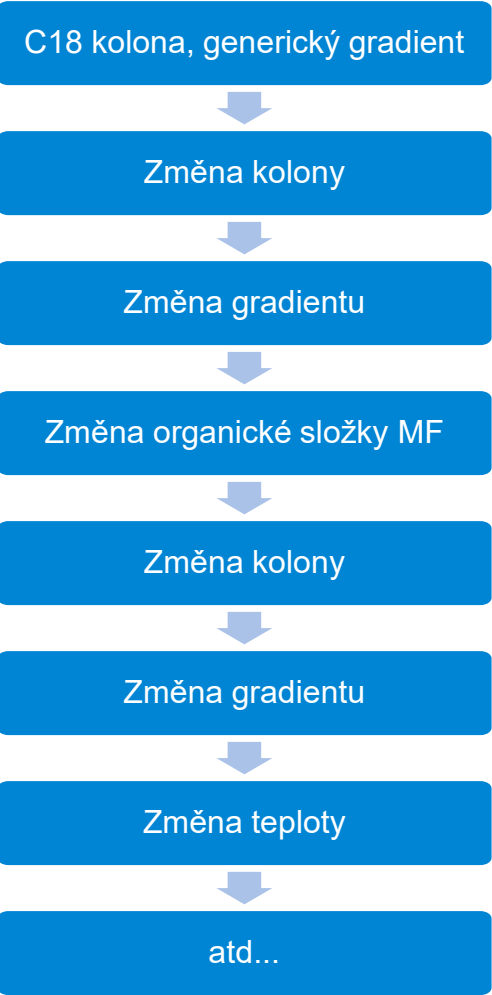
Kritéria metody

- Správnost, přesnost, robustnost
- Selektivita/Specifita
- Linearita
- Rozsah metody
- LOQ $\approx (10 \times S/N)$

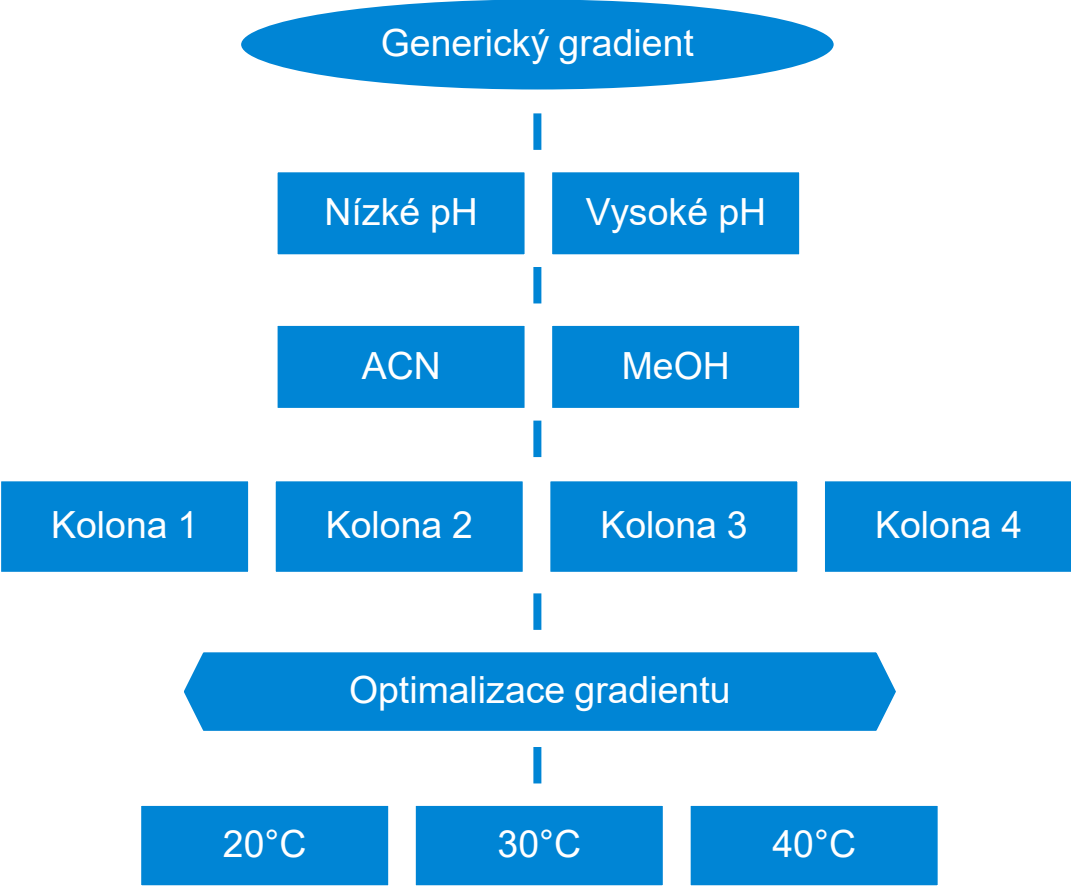


Jak na vývoj chromatografické metody

Jeden parametr za druhým



Systematický postup



Jak na vývoj chromatografické metody

Systematický postup

Generický gradient

Nízké pH

Vysoké pH

ACN

MeOH

Kolona 1

Kolona 2

Kolona 3

Kolona 4

Optimalizace gradientu

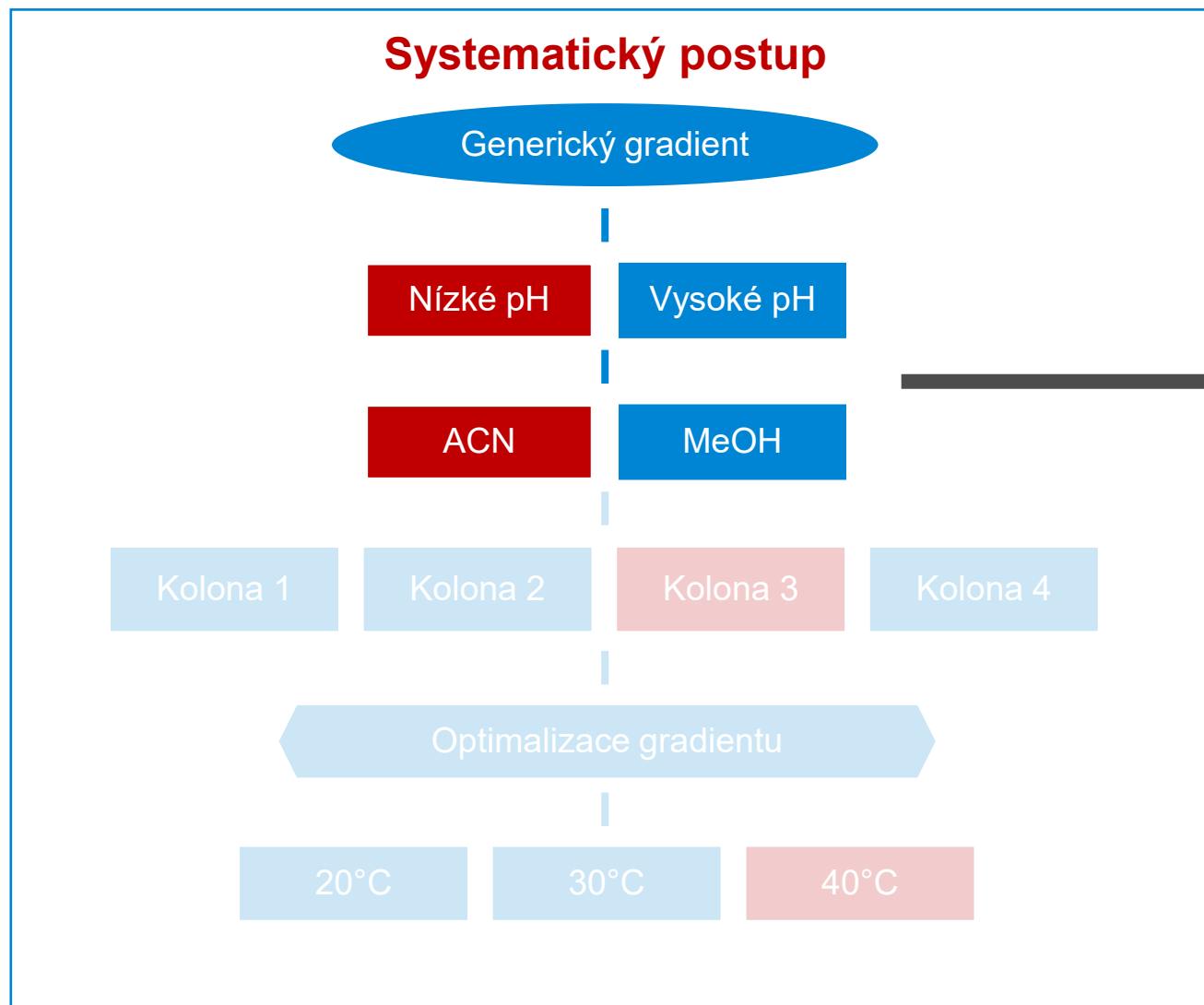
20°C

30°C

40°C

- 5 – 95% (100%) organické fáze
- Délka gradientu $\approx$ 10 objemů kolony

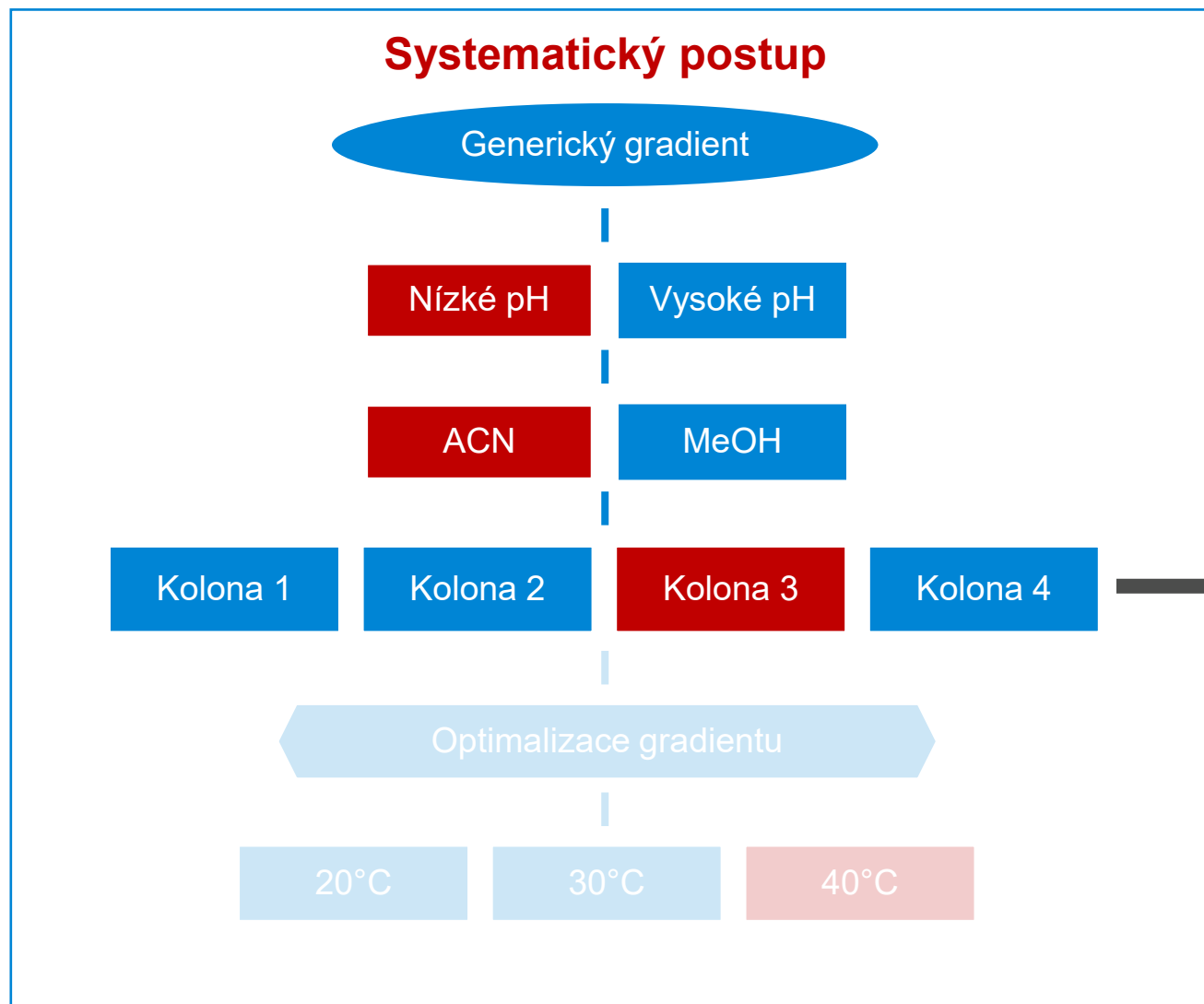
Jak na vývoj chromatografické metody



Výběr nejvhodnější mobilní fáze:

- pH pro retenci/separaci analytů
- Organický modifikátor pro změnu selektivity.

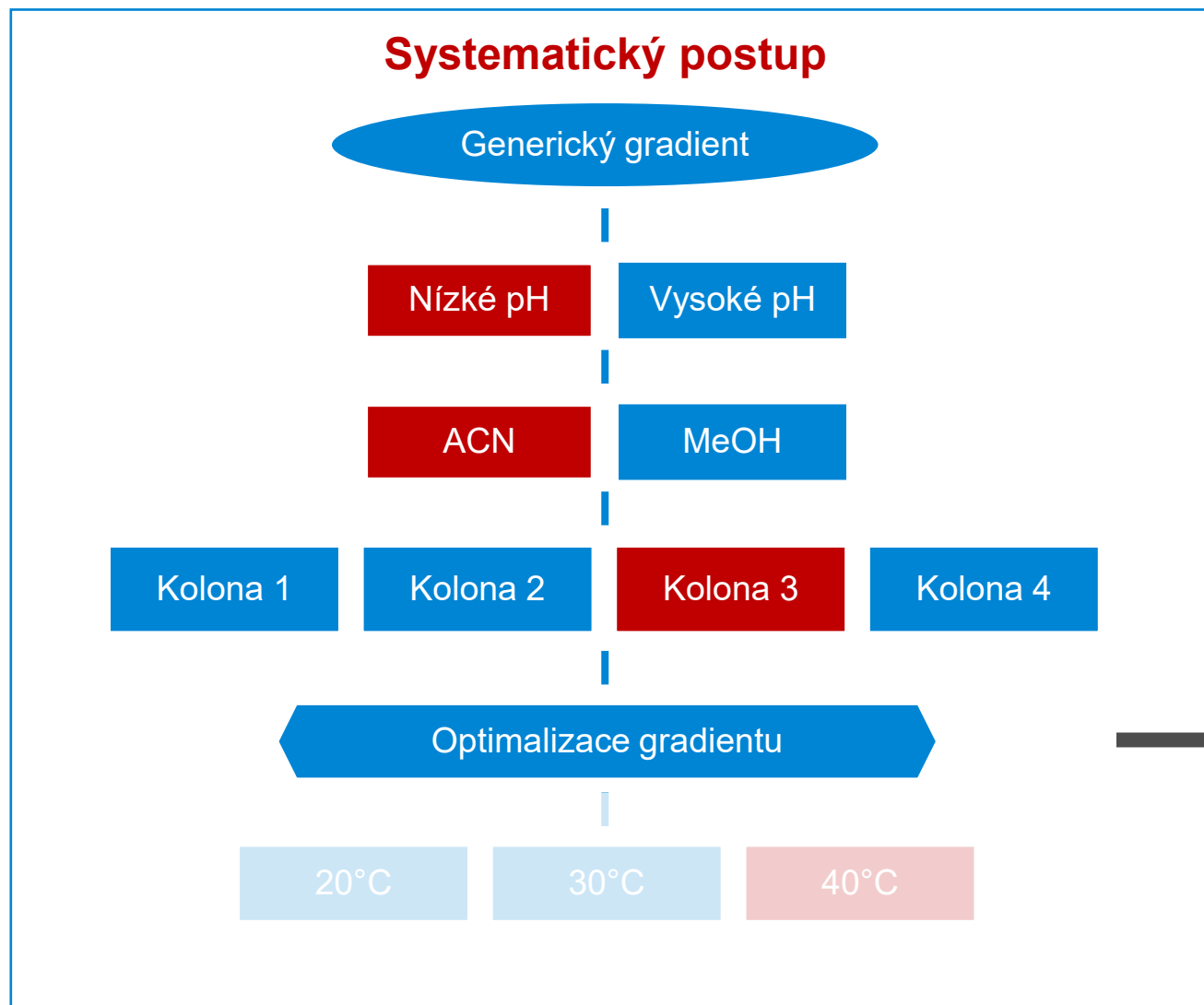
Jak na vývoj chromatografické metody



Výběr stacionární fáze:

- Odlišné interakce pro polární a nepolární analyty, π - π interakce apod.
- Lepší selektivita, rychlejší analýza.
- Spektrum fází na stejném nosiči zjednoduší výběr vhodné kolony.

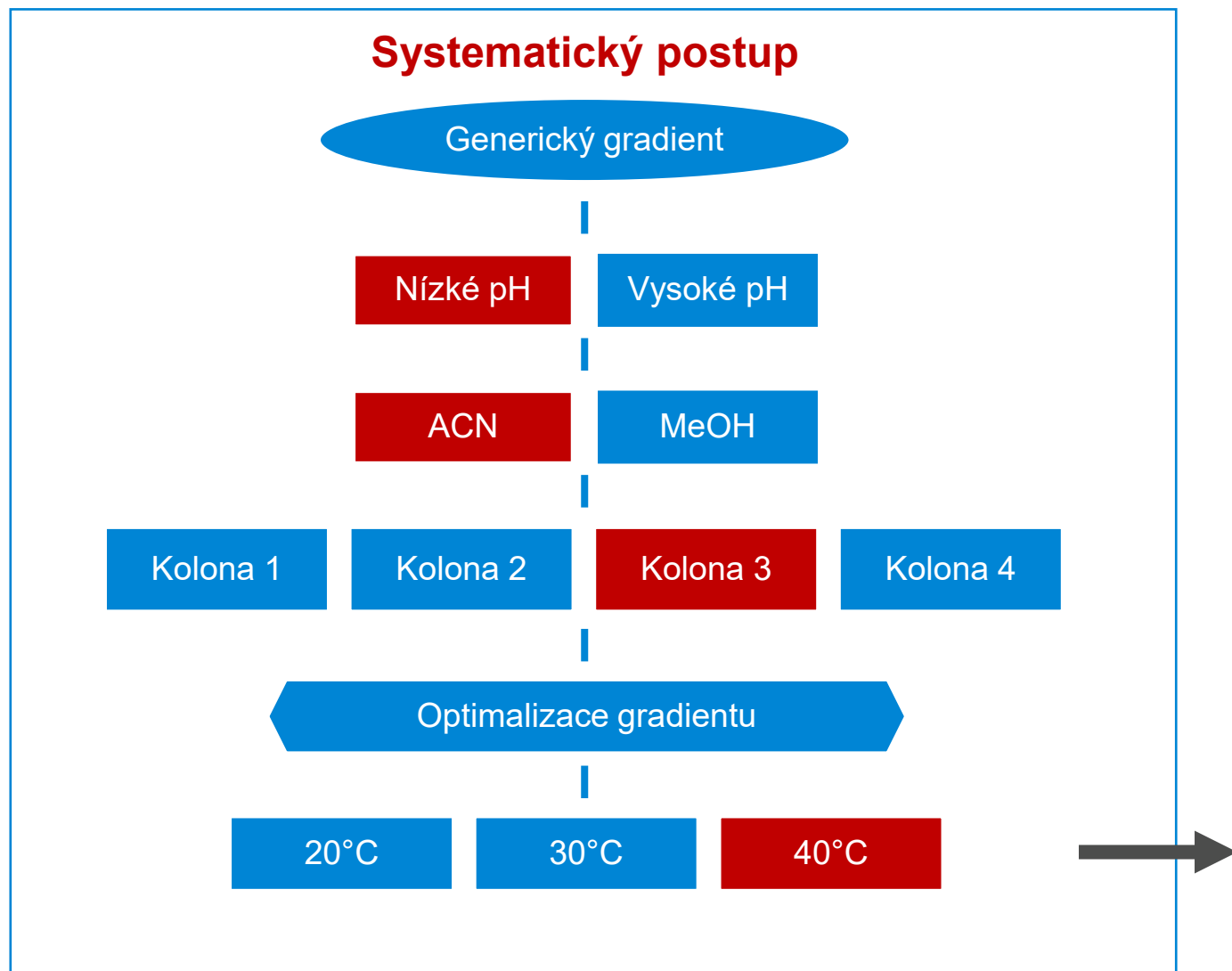
Jak na vývoj chromatografické metody



Finální úprava gradientu

- Začít gradient v silnější MF?
- Skončit ve slabší MF?
- Dostatečná re-kondicionace kolony, ale neztrácejte zbytečně čas:
 - Cca 5× objem kolony + objem systému.
 - Lze zrychlit průtok pro úsporu času.

Jak na vývoj chromatografické metody

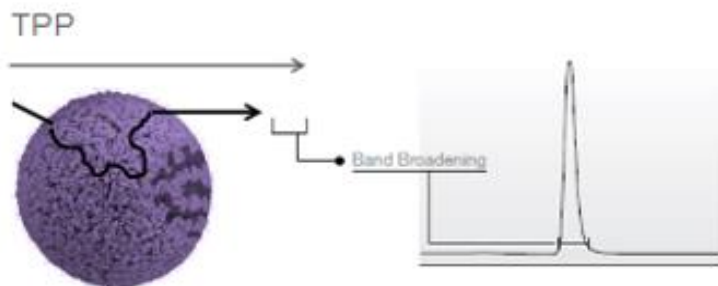


Teplota separace

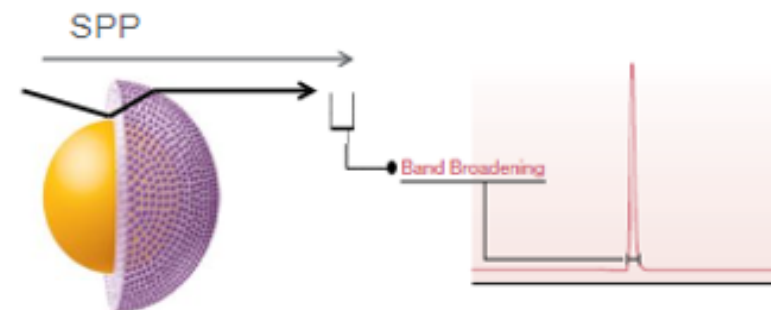
- Vyšší teplota
 - Stabilnější separace, menší vliv laboratorní teploty.
 - Změna retenčního faktoru (k) a separačního faktoru (α).
 - Nižší tlak, rychlejší rekondicionace.
- Nižší teplota:
 - Může zlepšit separaci kritických párů.
 - Vyšší tlak.
 - Vyšší nároky na kolonový termostát, potenciálně nestabilní RT.
 - Kondenzace vody v kolonovém prostoru – LEAK senzor!

Volba kolony

Typy sorbentů

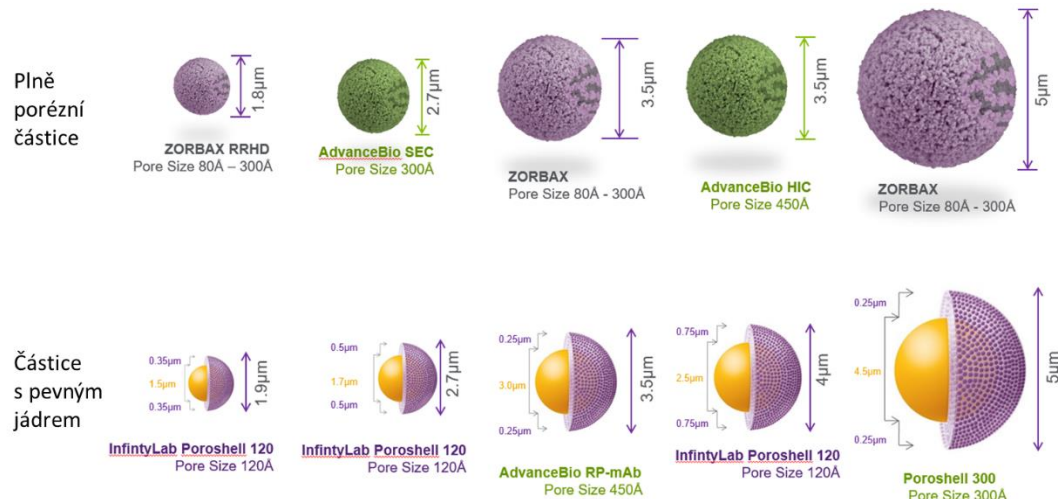


Vysoká kapacita sorbentu
Tradiční sorbent



Vysoká účinnost separace bez navýšení tlaku
Nižší kapacita kvůli pevnému jádru.

Dostupné velikosti částic sorbentů a zařazení dle tlakových limitů u kapalinového chromatografu:



Agilent Poroshell: široký výběr fází pro každou aplikaci

Chemie stacionárních fází

Univerzální pro většinu aplikací	Pro nízké pH mobilní fáze	Pro vysoké pH mobilní fáze	Alternativní selektivita	Retence polární analytů	HILIC	Chirální separace
Poroshell 120 EC-C18 1.9 µm, 2.7 µm, 4 µm	Poroshell 120 SB-C18 1.9 µm, 2.7 µm, 4 µm	Poroshell HPH-C18 1.9 µm, 2.7 µm, 4 µm	Poroshell 120 Bonus-RP* 2.7 µm	Poroshell 120 Aq-C18* 2.7 µm	Poroshell 120 HILIC 1.9 µm, 2.7 µm, 4 µm	Poroshell 120 Chiral-V 2.7 µm
Poroshell 120 EC-C8 1.9 µm, 2.7 µm, 4 µm	Poroshell 120 SB-C8 2.7 µm	Poroshell HPH-C8 2.7 µm, 4 µm	Poroshell 120 PFP* 1.9 µm, 2.7 µm, 4 µm	Poroshell 120 SB-Aq* 1.9 µm, 2.7 µm, 4 µm	Poroshell 120 HILIC-Z 2.7 µm	Poroshell 120 Chiral-T 2.7 µm
Poroshell 120 Phenyl-Hexyl* 1.9 µm, 2.7 µm, 4 µm		Poroshell 120 CS-C18 2.7 µm		Poroshell 120 EC-CN* 2.7 µm	Poroshell 120 HILIC-OH5 2.7 µm	Poroshell 120 Chiral-CD 2.7 µm
						Poroshell 120 Chiral-CF 2.7 µm

*kompatibilní s 100 % vodnou mobilní fází

Na co dát pozor při vývoji robustní metody?



Altium

Co dělat s novou kolonou?

Zkondicionovat!

1. Test rozpustnosti pufrů:

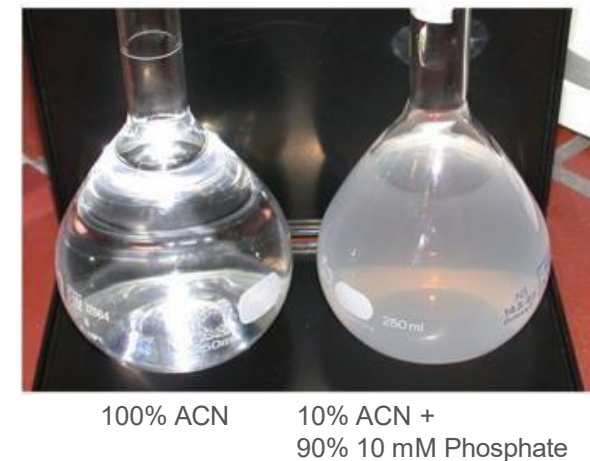
- Vyzkoušet nejvyšší % organické fáze (rozpouštědlo přidávat do pufru, ne naopak).
- MeOH má všeobecně lepší rozpustnost.

2. Kondicionace kolony:

- a) Začít ve 100% organiky (cca 10 objemů kolony), pomalu zvyšovat průtok od 0,05-0,1ml/min s krokem 0,05-0,1ml/ml (délka kroku cca 3-5 objemů kolony)
- b) Mobilní fáze bez pufrů (cca 10 objemů kolony)
- c) MF s puftrem a nejvyšším % organiky (konec gradientu, cca 10 objemů kolony)
- d) MF s puftrem a nejnižším % organiky (počátek gradientu, 10-20 objemů kolony)

3. Test kolony:

- Několik nástříků STD pro stabilizaci RT (případně i 1-2 nástříky blanku pro test kontaminace)



Vždy se podívejte do „user guide / care guide“ od výrobce kolony



Co dělat s novou kolonou?

Kromě kondicionace ji ještě otestujte!

SERIAL NUMBER: USDAZ01333

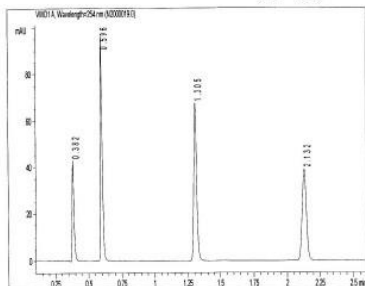
PART NUMBER: 959758-902
COLUMN TYPE: ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 2.1 x 100 mm, 1.8 µm
PACKING LOT #: B09089

TEST CONDITIONS

MOBILE PHASE = 60% Acetonitrile / 40% Water
COLUMN PRESSURE = 517.2 Bar
COLUMN FLOW = 0.50 ml / min
LINEAR VELOCITY = 0.436 cm / sec
TEMPERATURE = AMBIENT (Nominally 23 °C)
INJECTION VOLUME = 1 µl

QUALITY CONTROL PERFORMANCE RESULTS FOR NAPHTHALENE

TEST VALUES	SPECIFICATIONS
THEORETICAL PLATES = 22337	MIN = 21000
SELECTIVITY = 1.90	RANGE = 1.82 - 1.92
USP TAILING FACTOR = 1.08	RANGE = 0.98 - 1.20
(@ 5% Peak Height)	
k' = 4.58	



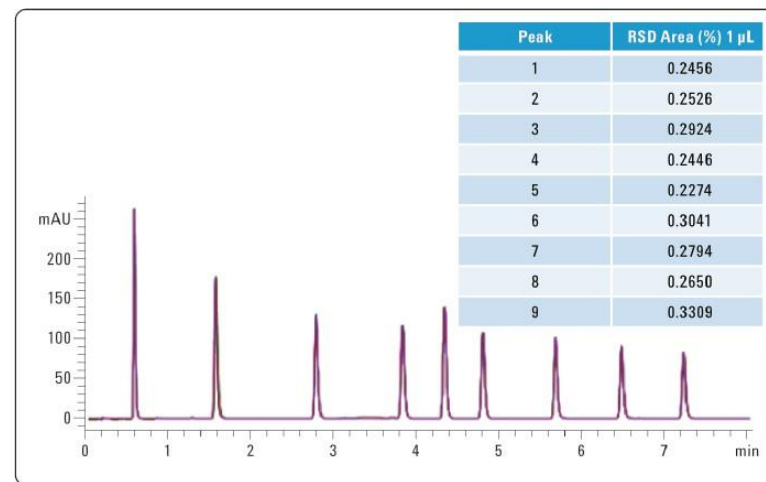
Sample components with concentrations diluted in mobile phase in the following elution order.

Peak #	Conc (ug/ml)	Sample Component
1	10	Uracil
2	400	Phenol
3	50	4-Chloro Nitrobenzene
4	80	Naphthalene

QC Report kolony je měřen na optimalizaovaném LC systému:

- Neočekávejte, že získáte přesně stejný výsledek jako v protokolu.
- Otestujte kolonu na Vašem systému, abyste měli SVOJ referenci.

- Použijte standardní test mix (např. 01080-68704), vlastní QC, referenční materiál apod.
- Sledujte parametry jako retenční čas, plocha, tailing, rozlišení a tlak systému.
- Monitorujte kolonu pravidelně. Vhodné výchozí informace pro troubleshooting.

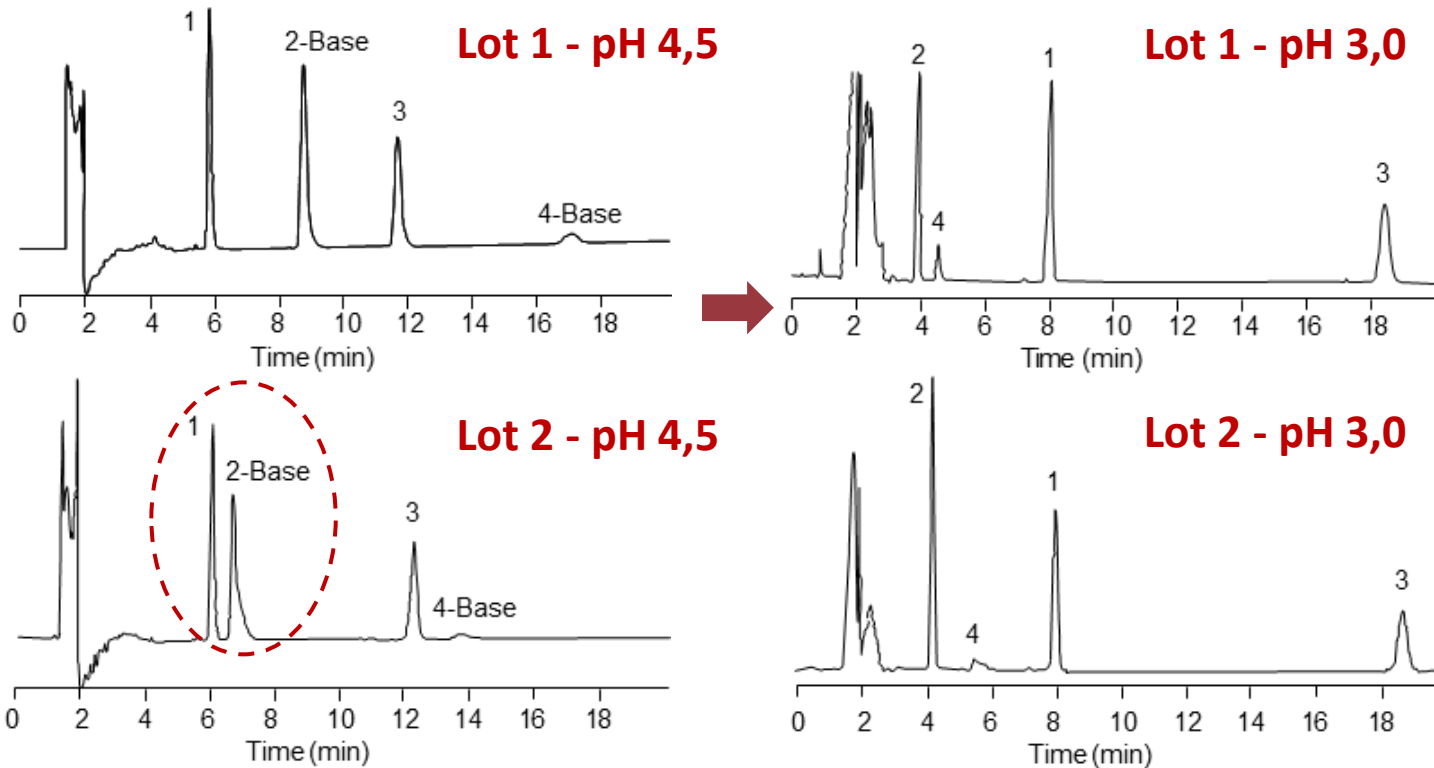


Chromatographic conditions

Sample: RRLC Checkout sample (p/n 5188-6529)
Column: Agilent Poroshell 120 EC C18, 3 mm x 50 mm, 2.7 µm
Mobile phase: A = Water, B = Acetonitrile
Gradient: 0 min 20% B, 8 min 80% B
Flow rate: 1.2 mL/min
Stop time: 8 min
Post time: 4 min
Injection volume: 1 µL
Column temperature: 30 °C
DAD: 245/10 nm, Ref 400/100 nm
Flow cell: 10 mm
Peak width: <0.025 min (10 Hz)

Nevalidujte pouze na jedné šarži kolon

Změna selektivity mezi jednotlivými šaržemi v závislosti na volbě pH



pH 4,5 - změna selektivity mezi jednotlivými šaržemi pro bazické analyty

pH 3,0 – žádná změna selektivity mezi šaržemi

Pro zajištění robustnosti

- Otestujte alespoň tři různé šarže zvolené kolony.
- Porovnejte rozlišení píků. Pokud se rozlišení významě mění, změňte metodu.

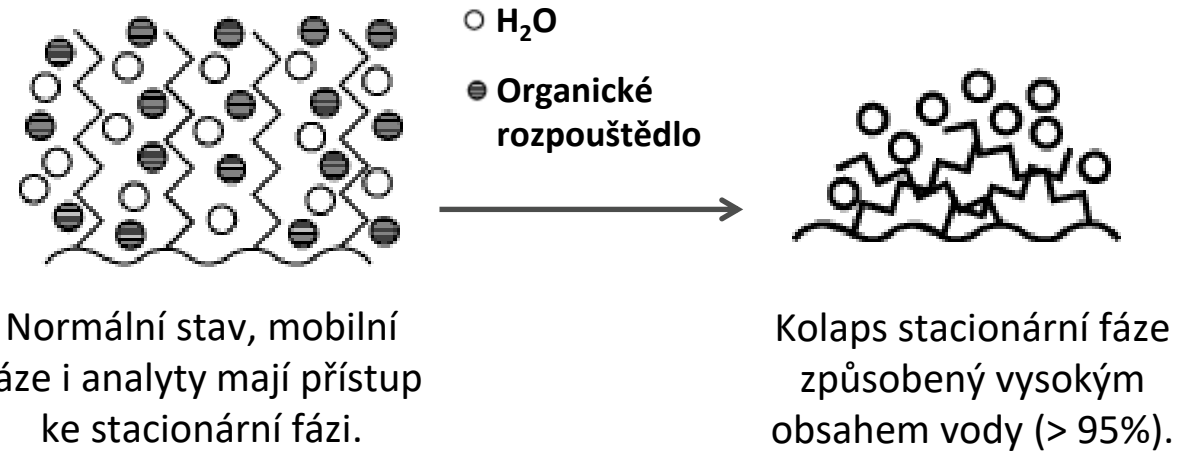
Agilent Method Validation kits

- Obsahuje 3 stejné kolony z různých šarží.
- Za objednáací číslo kolony se přidá „K“.
- Více v dokumentu **5991-9123EN**: InfinityLab Poroshell 120 ordering.

Hlídejte doporučené podmínky pro kolonu

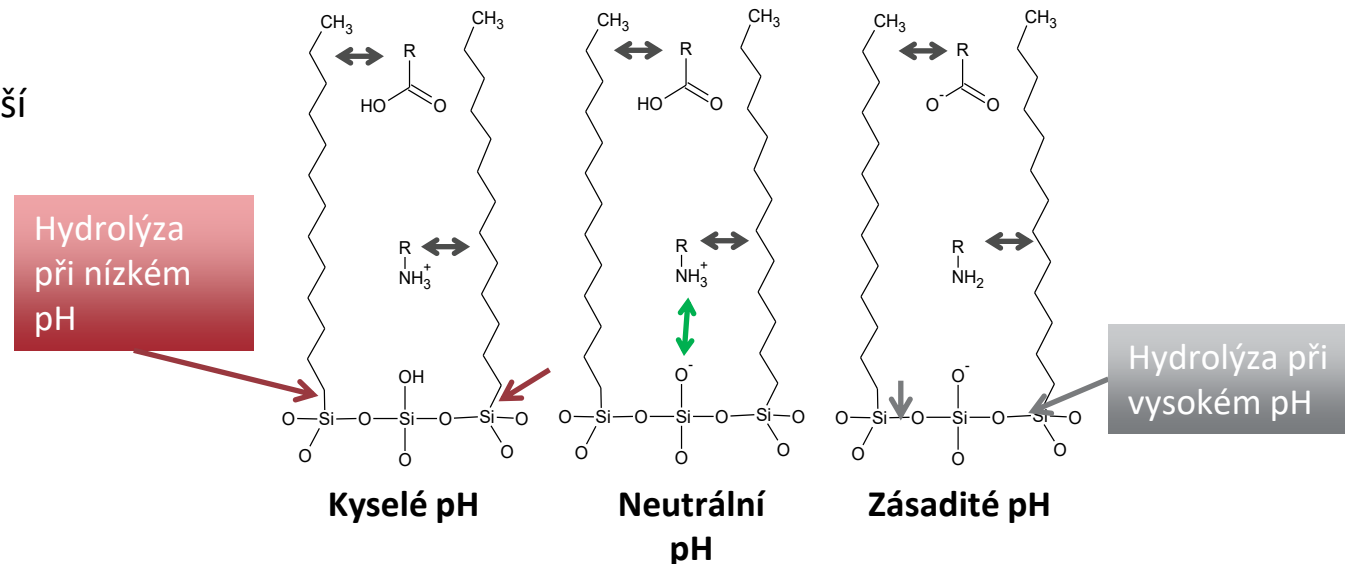
Kolaps stacionární fáze:

- Standardní C18 kolony vyžadují min 5% org. fáze.
- V případě potřeby je nezbytné použít kolony kompatibilní se 100% vodnou fází (obsahují polární endcapping nebo embedovanou polární skupinu).



Dodržení pH:

- Obvyklý rozsah pH u RP kolon je 2-7, avšak jsou kolony s vyšší stabilitou pro nízká pH (1-7) nebo vysoká pH (2-12)
- Stacionární fáze se hydrolyzuje při nízkém pH!
- Silikagel se rozpouští za vysokého pH!



Příprava mobilní fáze

Malé odchylky v přípravě mobilní fáze mohou mít velký efekt.

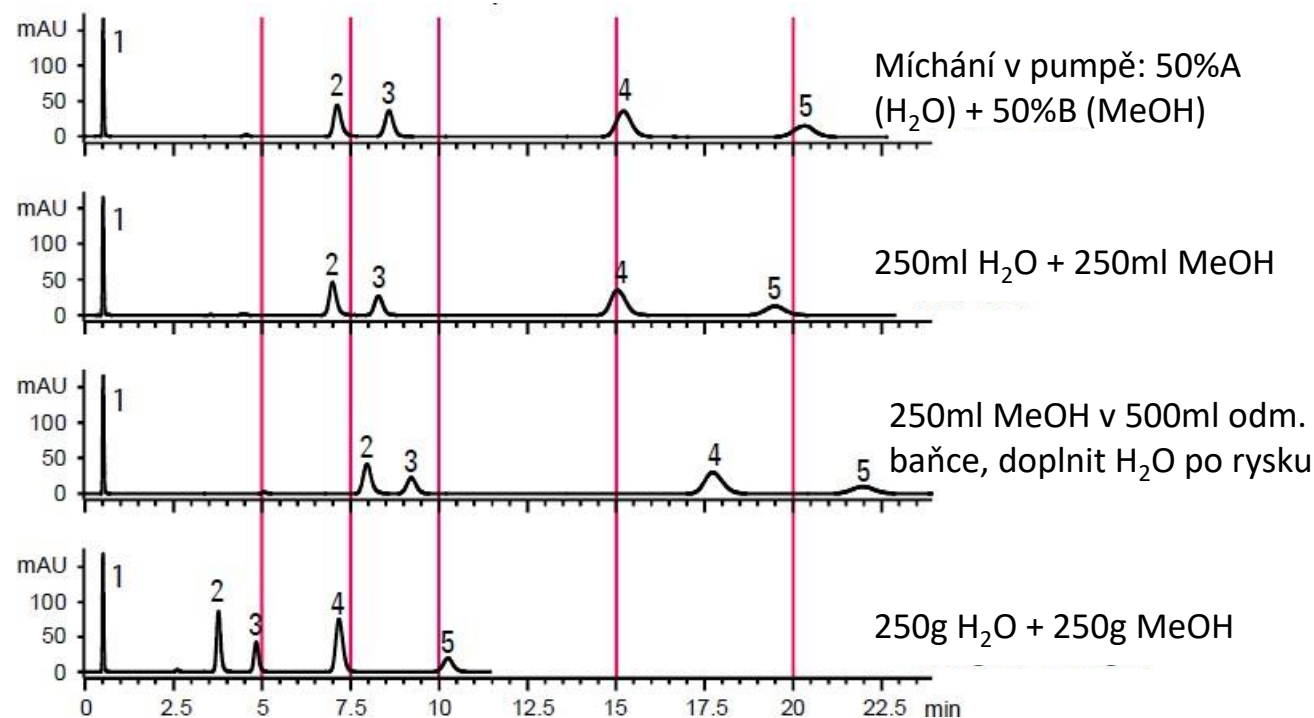
500 ml MeOH do 1l baňky a doplněný H₂O po rysku

≠

500 ml H₂O do 1l baňky a doplněný MeOH po rysku

≠

500 ml H₂O + 500 ml MeOH



1. Uracil; 2. Butylparaben; 3. Napthalene; 4. Dipropylphthalate; 5. Acenaphthene

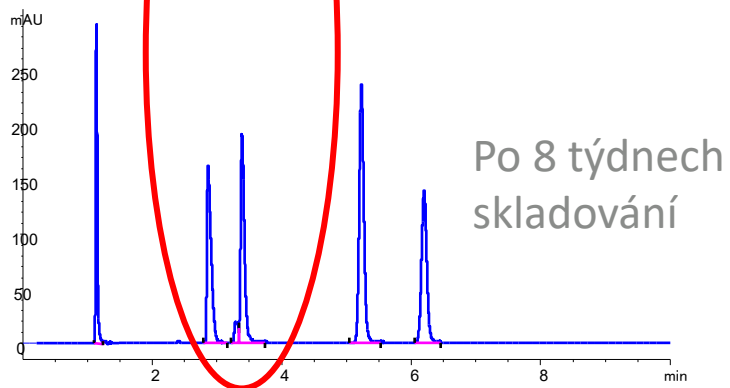
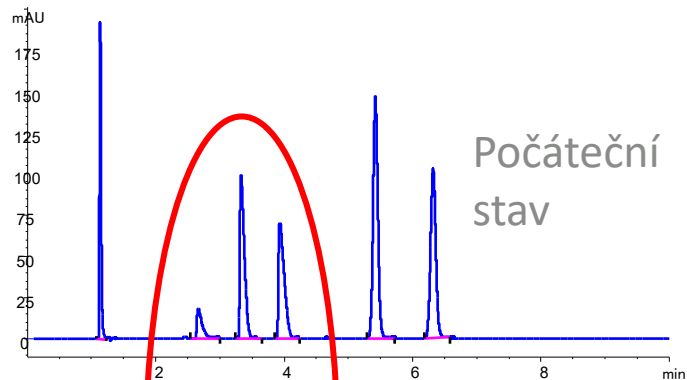
Postup přípravy MF může významně ovlivnit eluci:

- Bud'te konzistentní, přesně popište postup přípravy MF v SOP
- w/w je přesnější než v/v

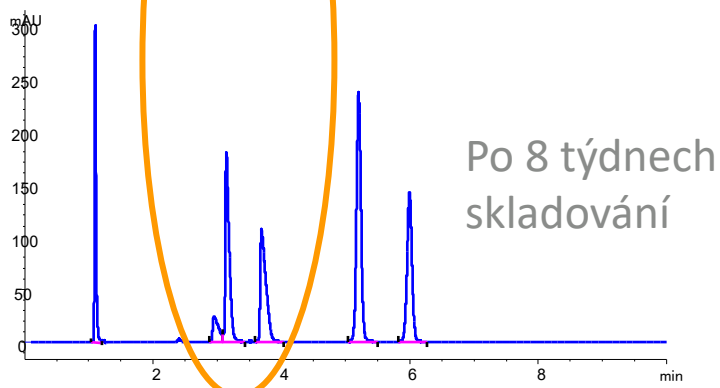
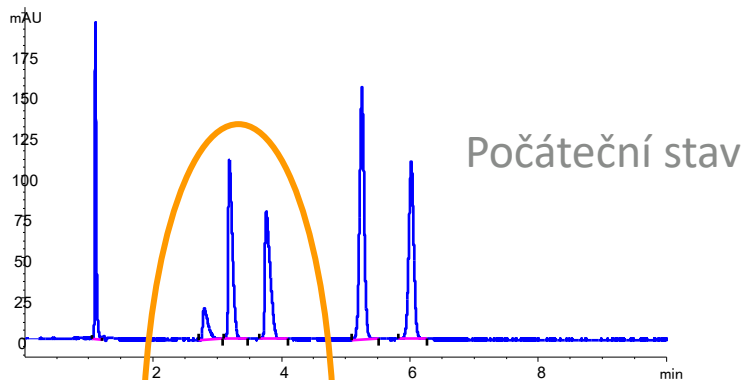
Skladování kolon

Vliv rozpouštědla při skladování ekvilibrované kolony (RP-HPLC)

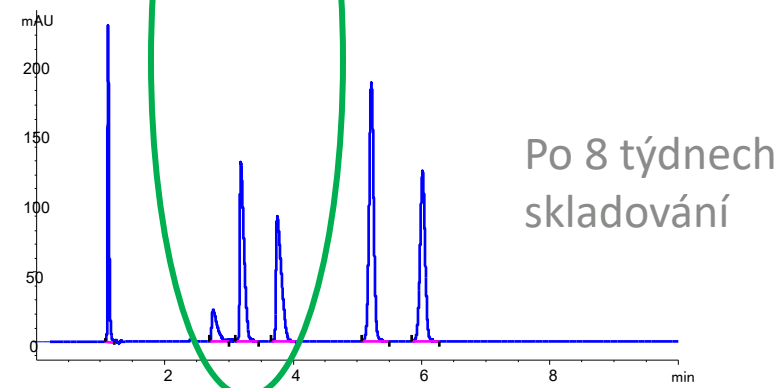
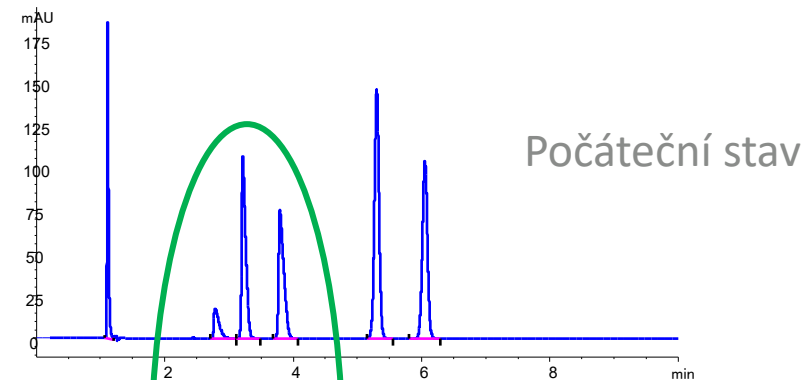
95/5 H₂O/ACN + 0,1% HCOOH



45/55 H₂O/ACN, bez HCOOH



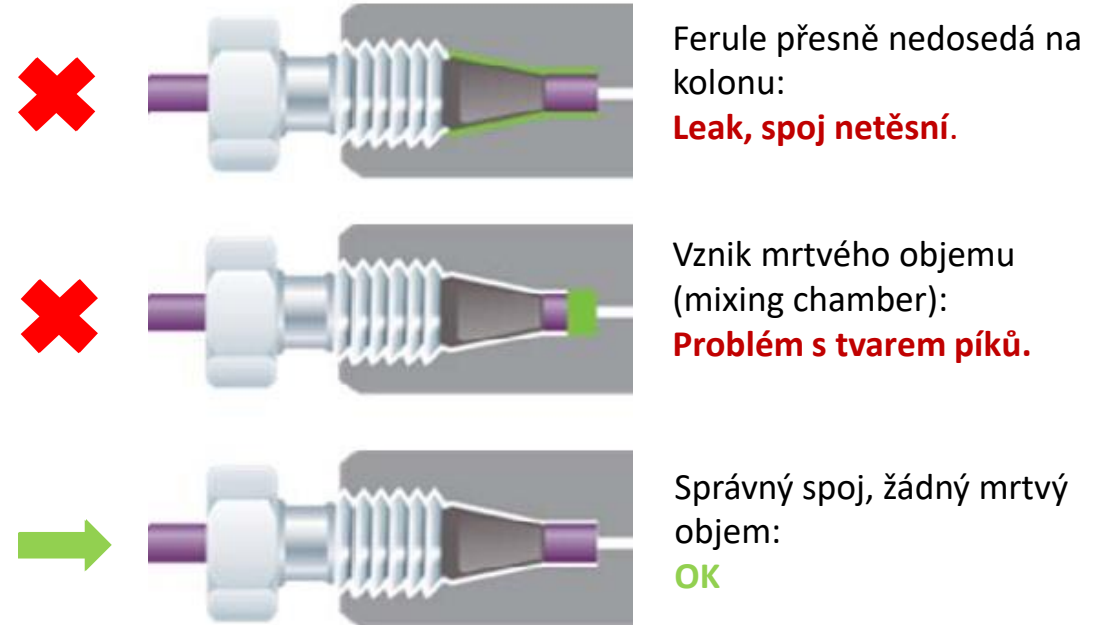
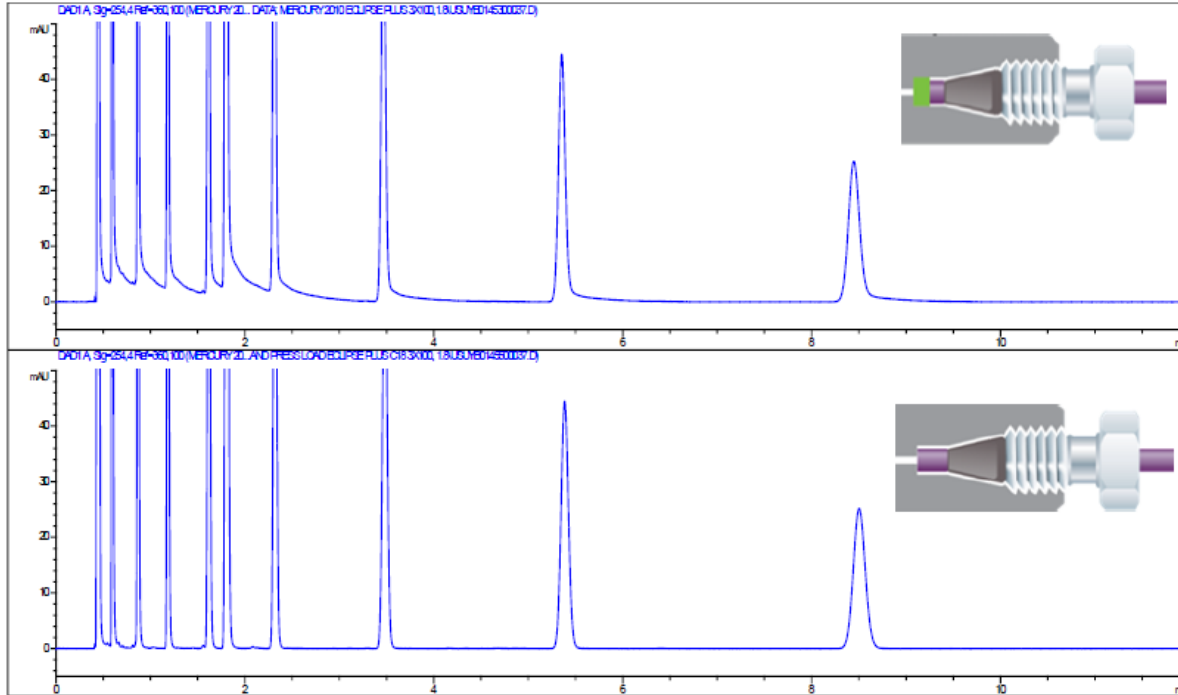
100% ACN



Rozpouštědlo, ve kterém jsou kolony dodávány od výrobce NENÍ optimální pro dlouhodobé skladování ekvilibrovaných kolon.

Připojení kolony (a další spoje v HPLC)

Chvostování píků? Zkontrolujte spoje v přístroji.



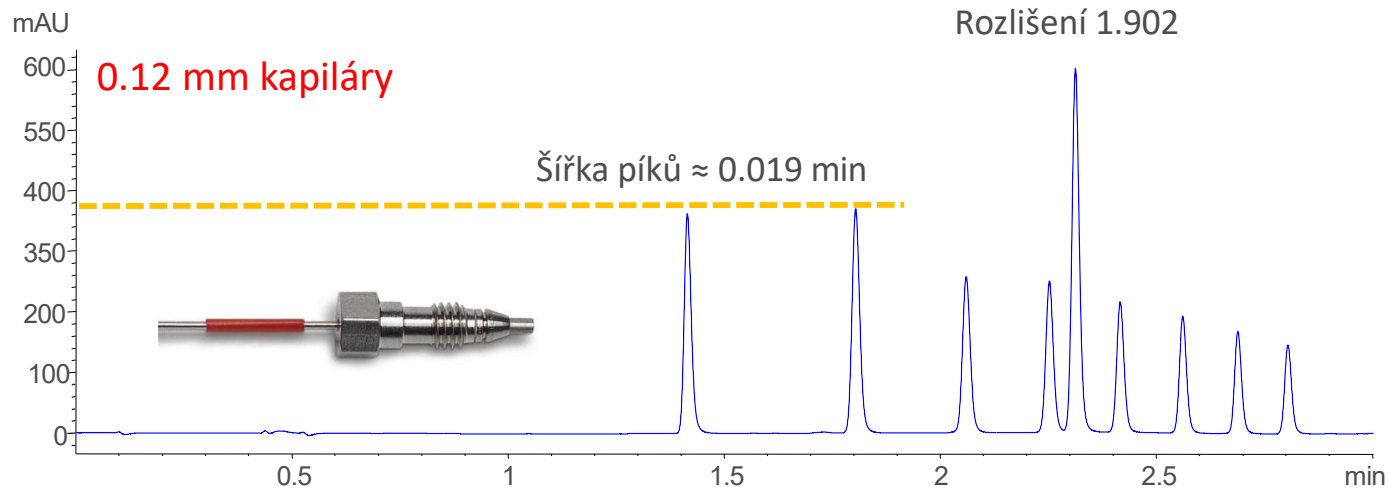
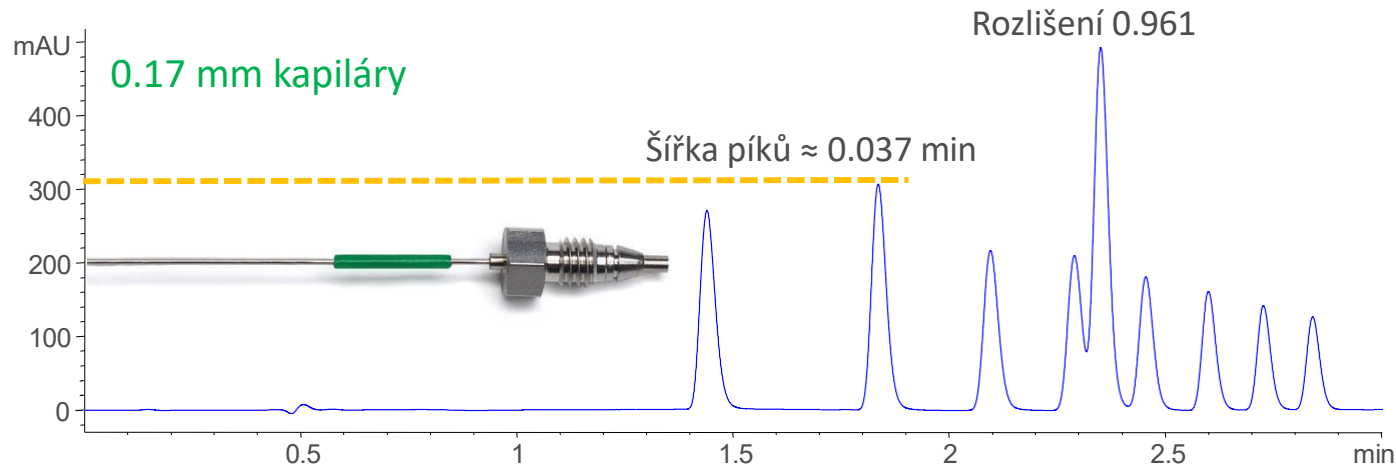
Agilent Quick Connect a Quick Turn fitting:

- Tlak až 1300bar
- Pružina zajišťuje nulový mrtvý objem
- Vyměnitelná ferule i kapiláry.



Nepoužívejte každou kapiláru, kterou najdete...

Disperze snižuje účinnost i vašeho HPLC



Délka	10mm	50mm	100mm	150mm
Průměr kapilár	Objem	Objem	Objem	Objem
0.17 mm (zelená)	0.227 uL	1.1uL	2.27 uL	3.3 uL
0.12mm (červená)	0.113 uL	0.55uL	1.13 uL	1.65 uL

Co zvyšuje disperzi?

- Příliš dlouhé kapiláry.
- Velký průměr kapilár.
- Špatné spoje, které mají mezery a vytvářejí směšovací komory.

Optimalizace délky a průměru kapilár je důležitá hlavně pro kolony s malým objemem.

Jak minimalizovat budoucí problémy?



Altium

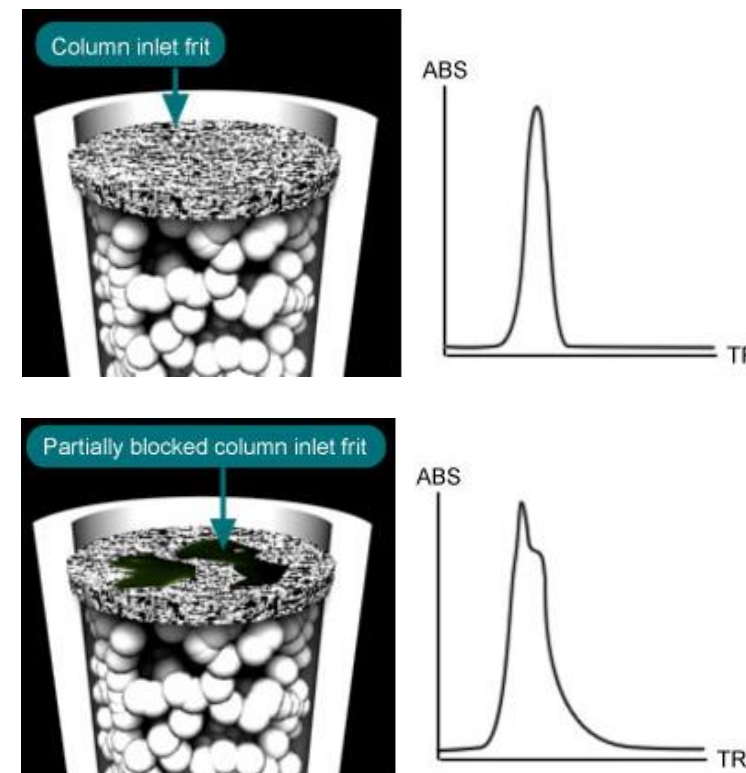
Chraňte kolonu!

Nejčastější problém s kolonou je vysoký tlak/ucpání kolony.

- Pozor na mobilní fáze s pufry
 - Pufry obvykle obsahují nerozpustné příměsi: **Filtrujte mobilní fáze!**
Částice 3-5 μ m filtry s porozitou 0,45 μ m; částice < 3 μ m filtry 0,2 μ m.
 - Otestujte rozpustnost pufru při nejvyšším % organické fáze.
- Správná příprava vzorku a přečištění (SPE, filtrace).
- Kolona je nejefektivnější (a nejdražší) filtr v HPLC systému:
 - **Používejte inline filtry a předkolonky.**

Agilent QuickChange Inline Filter:

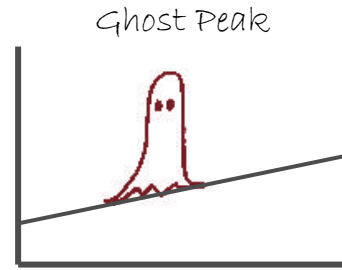
- Výměna filtru bez nářadí.
- Filtr nelze otočit do protisměru!
- Tlaková odolnost 1300 bar.



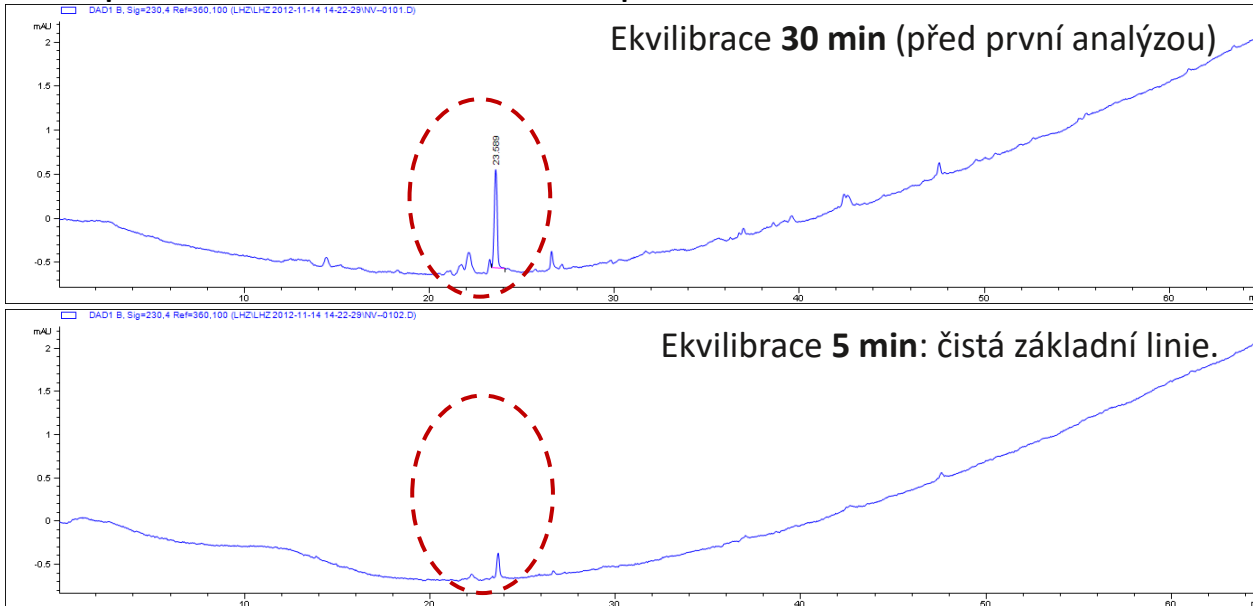
Rozpouštědla a kontaminace

Ghost píky a kontaminace obecně mohou být odkudkoli:

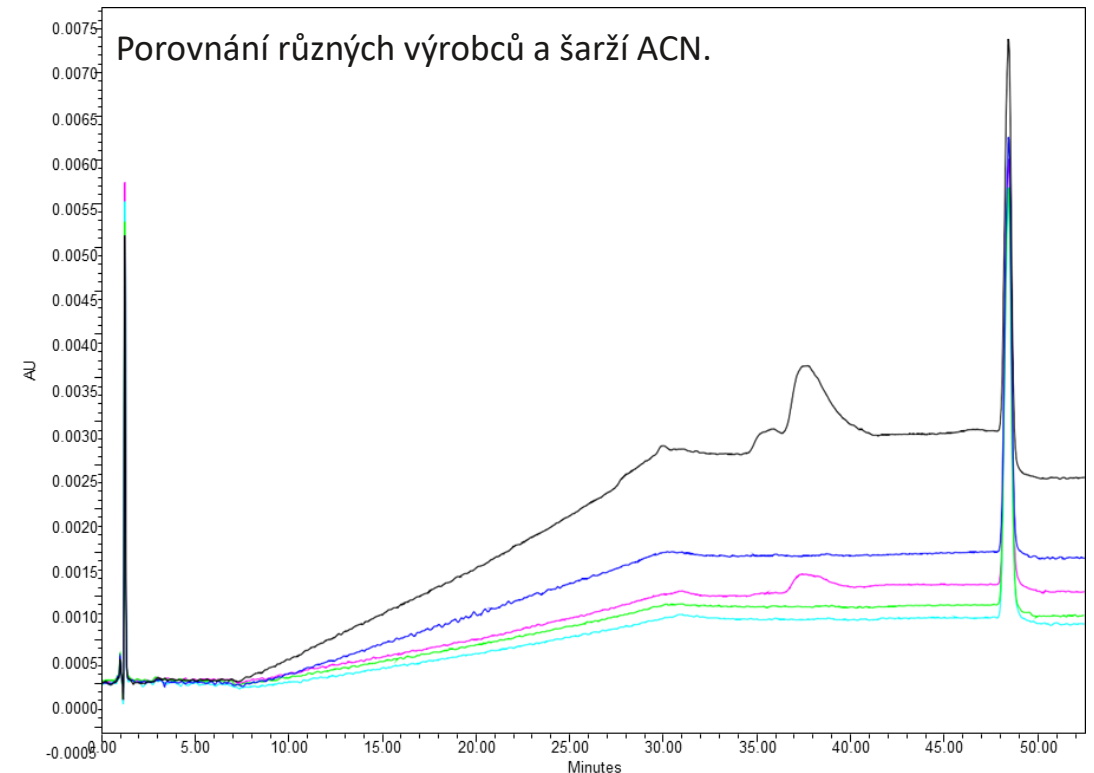
- Org. rozpouštědla a voda
- Aditiva (TFA, pufry)
- Vzorek
- Syringe filtry...



Jak poznat kontaminace z MF/pufrů?



- Otestujte novou šarži rozpouštědel hned!
- Lze jen obtížně reklamovat/vyměnit.

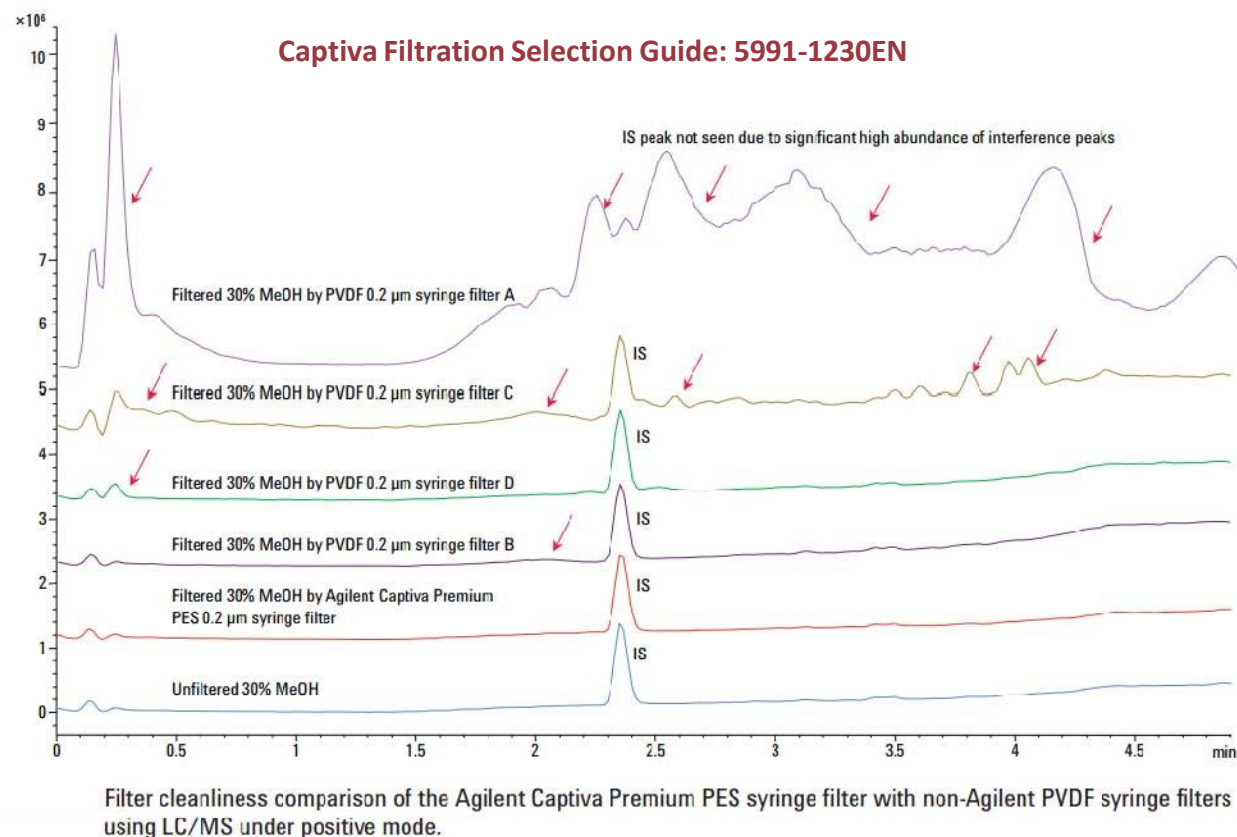


Rozpouštědla a kontaminace

- Vyberte si stříkačkové filtry kompatibilní s vaším vzorkem a rozpouštědlem (voda vs organika).
- Ujistěte se, že filtry NEJSOU zdrojem kontaminace!

Udržujte pořádek a hygienu v mobilních fázích. Menší riziko nejen mikrobiální kontaminace.

- InfinityLab Stay Safe Cap a promývací lahev se 4 hrdly.



InfinityLab Stay Safe
bezpečnostní víčko
P/N 5043-1218



InfinityLab Stay Safe
promývací lahev
P/N 5043-1339

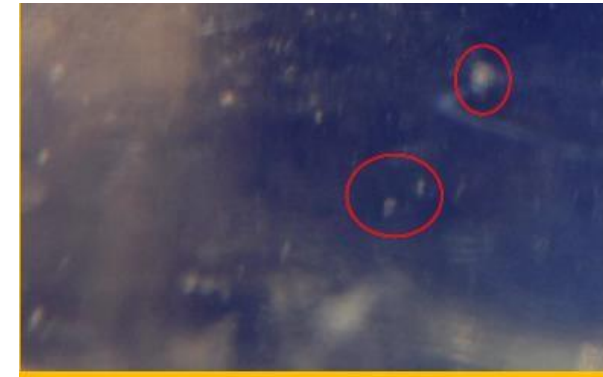
Mikrobiální kontaminace

Potenciální problémy

- Zvýšený tlak nebo kolísání tlaku, nízká životnost kolony.
- Může napodobovat problémy s aplikací (nepřesnosti v gradientu, ghost píky, vysoký šum)
- Obtížně odstranitelné, pokud se kontaminace dostane do degasseru a zbytku systému.

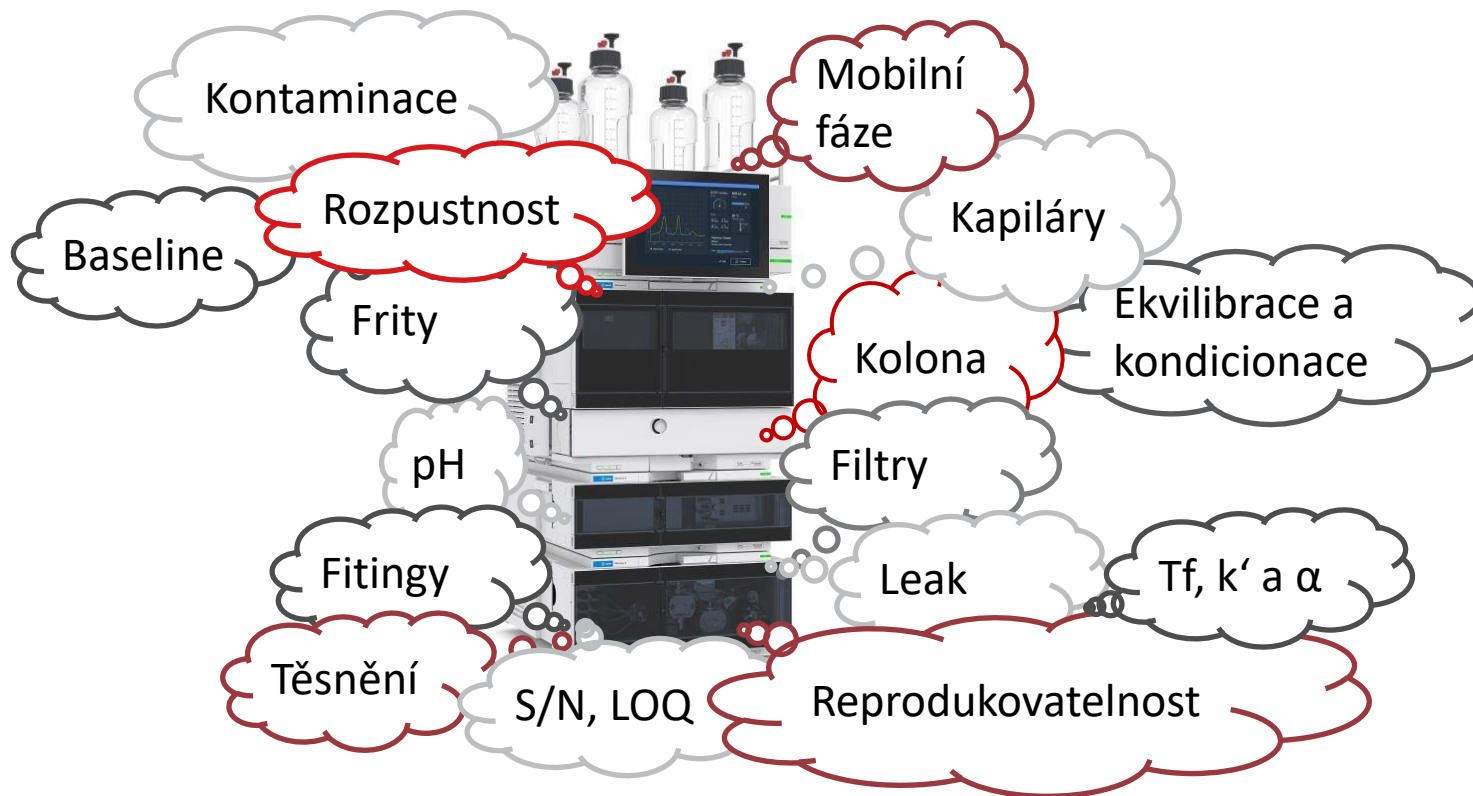
Prevence mikrobiální kontaminace

- Používejte čerstvou mobilní fázi, nedolévat, vyměnit láhev!
- Nenechávejte MF dlouho na stroji bez průtoku.
- Používejte tmavé lahve na vodnou MF.
- Pokud lze, přidejte k vodné MF 5% organiky nebo azid sodný (cca 0,02%).



Co si odnést do laboratoře?

Toto jsou jen některé z možných nástrah, se kterými se v laboratoři setkáváme poměrně pravidelně.



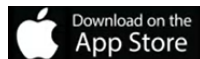
Pokud se chcete dozvědět víc a nezkoušet všechny nástrahy na vlastní kůži:

LC Handbook, 5990-7595EN

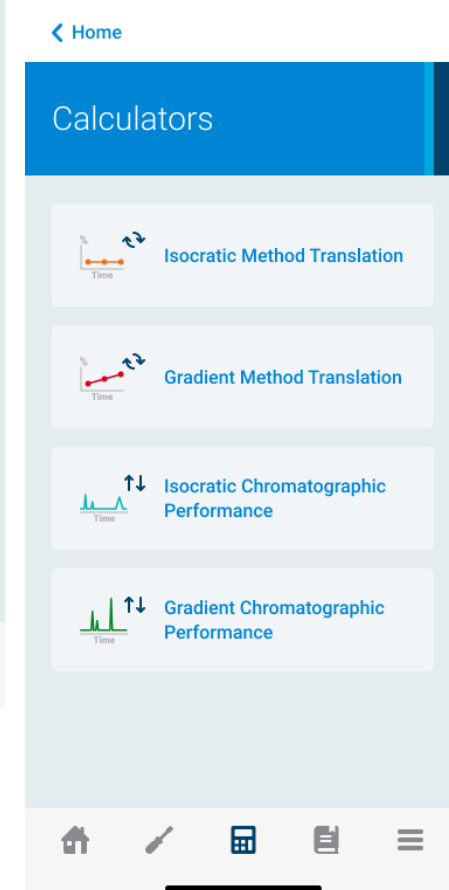
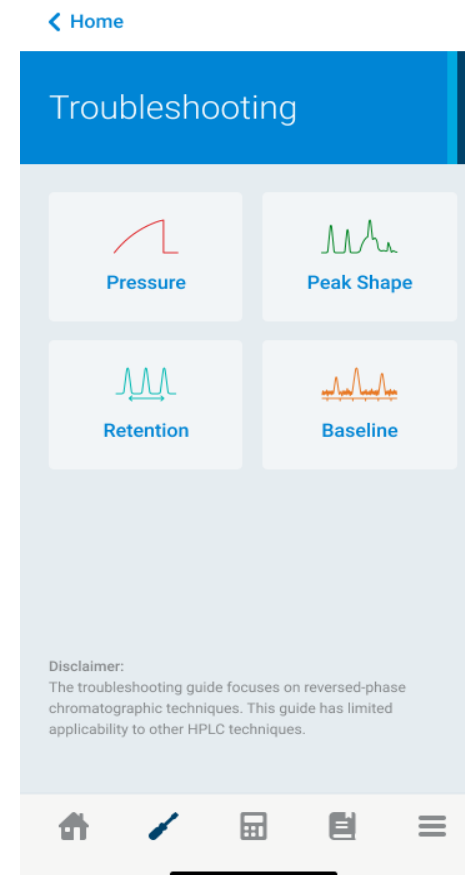
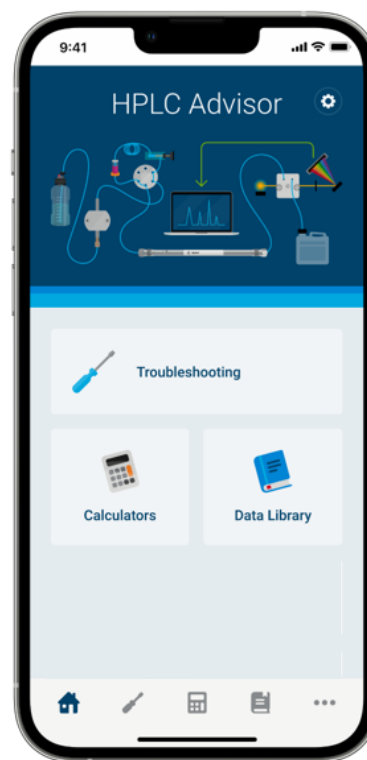
Co si odnést do laboratoře?

Aplikace Agilent InfinityLab HPLC Advisor

- Snadná identifikace a rychlejší řešení problémů s HPLC.
- Pomoc při vývoji i transferu metod.
- Převody jednotek, výpočty koncentrací.
- Přímé linky na „Agilent Knowledge Portal“, a literaturu.
- Vstup na „Agilent Community“ – diskuzní platforma, odpovídají běžní uživatelé i lidé z Agilentu.



Jak funguje HPLC Advisor





Děkuji za
pozornost