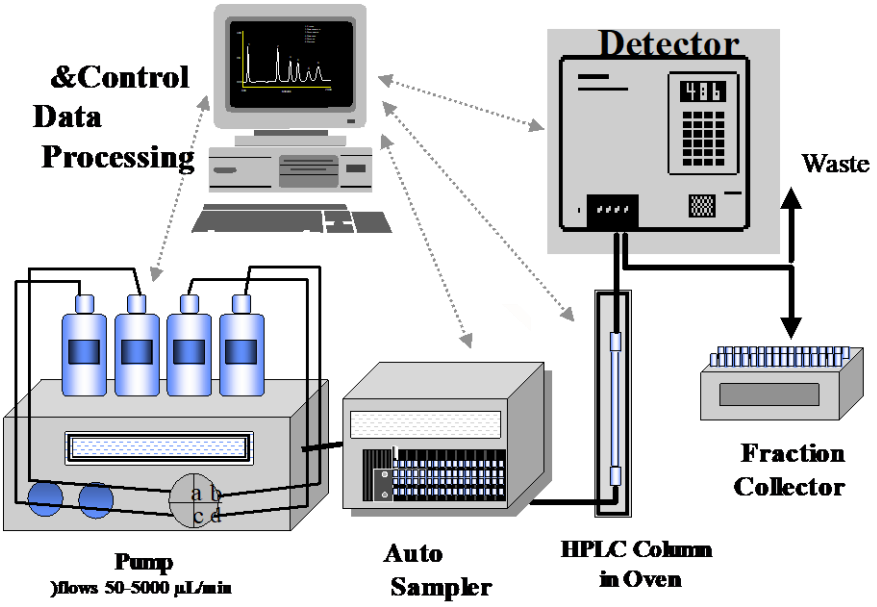
Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

מדריך ל- HPLC

אין כיום מעבדת מחקר פרמצבטית, ביולוגית או כימית המכבדת את עצמה ללא גישה חופשית למכשיר HPLC (High Performance Liquid chromatography) לשם אנליזה של חומרים שונים.

ציור 1



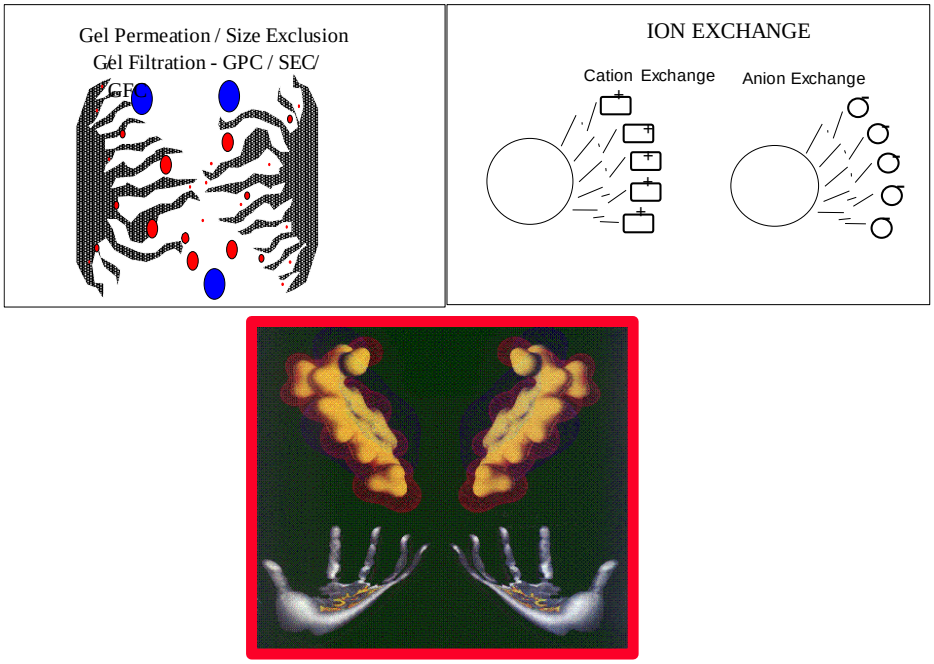
כיום בשלה עד מאוד הטכנולוגיה של HPLC, ולכן כמעט לכל חומר שנמצא בשימוש כלשהו קיימות שיטות אנליזה ספרותיות שניתן ליישמן, אם זה במאמרים בעיתונות המקצועית או בספרי פרוצדורות כמו הפרמקופאיות למיניהן, ולכן בדרך כלל ניתן בקלות להגיע למערכת הכימית הדרושה להפרדה. עם זאת, לעתים קרובות קשה לחזור בדיוק על התוצאות המתוארות בשיטות ספרותיות בשל מגבלות מיכשוריות. יש לזכור כי לא כל מכשיר HPLC מצויד בהכרח בצורה משביעת רצון לכל האפליקציות הקיימות, ולעתים מקור הבעיות הוא בפונקציות חשובות שהיו קיימות במכשיר בשיטה הספרותית ואינן קיימות במכשיר שנבחר ליישום הספציפי. המאמר הנוכחי מנסה לצייד את המשתמשים שאינם מומחים ב- HPLC במספר עקרונות בסיסיים שיעזרו להם בהתמודדות עם מכשיר ה- HPLC המתאים ליישומיהם, כדי להקל על ההתמודדות עם שיטות ספרותיות שקשה לחזור עליהן בהצלחה.

המפתח לעבודה נבונה של מכשיר ה- HPLC הוא הכרת העיקרון של התהליך הכרומטוגרפי שבבסיסו של היישום, והבנת הסיבות שעמדו מאחורי בחירת סוג הקולונה, הרכב הפאזה הנעה והגלאים המתאימים. כמובן שההיקף של המאמר הנוכחי אינו מאפשר דיון מעמיק בנושאים אלה, ולשם כך כדאי לעיין בספרים ובמאמרים [1-11]. האיור הבא מתאר בצורה סכמתית מאוד את הסוגים השונים של הכרומטוגרפיה, מתוכם נדון רק בנפוצים ביותר.

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

ציור 2



1. היפוך פאזות Reversed phase

הרוב המוחלט של הפרדות ואנליזות בעזרת HPLC כיום נעשה באופן הכרומטוגרפי (chromatographic mode) שנקרא Reversed Phase, על כן הדיון יתרכז בעיקר בעבודה נכונה של מכשיר HPLC עבור יישומים של אופן זה. לשם כך יש להרחיב את הדיבור מעט על עקרונות האופן הזה של הכרומטוגרפיה הנוזלית.

בשיטת ה- Reversed Phase הפאזות הנחות הארוזות בקולונות (columns) הן מצע הידרופובי, שמורכב בעיקר מגרגרים נקבוביים של סיליקה ג'ל בצורות שונות (spheric, irregular), בקטרים שונים (3, 5, 7, 10 µm) ובקוטר נקבוביות משתנה (60, 100, 150, 300, A), שעל שטח פניו קשורים כימית פחמימנים שונים (C3, C4, C8, C18). יש גם מצעים הידרופוביים פולימריים המשמשים כפאזות נחות כאשר יש מגבלות pH. ברוב השיטות הקיימות כיום להפרדת חומרי רפואה משתמשים בקולונות C-18 שנקראות לעתים בשמות מסחריים כמו ODS (octadecylsilane) או RP-18. ככל שיש למרכיבי הדוגמאות מאפיינים הידרופוביים רבים יותר הם מתעכבים יותר וכך מתקבלת ההפרדה ביניהם.

הפאזות הנעות הן תערובות של מים וממסים אורגניים פולאריים, ברובם המכריע מתנול ואצטוניטריל. התערובות הללו מכילות לרוב תוספים שונים כמו בופרים (אצטאט, פוספאט, ציטראט), ו/או חומרים פעילי שטח (אלקיל-אמינים או אלקיל-סולפונאטים) ו/או תוספים מיוחדים (EDTA). המטרה בשימוש בתוספים כאלו או אחרים היא הגברת היעילות ו/או הסלקטיביות, ובעיקר השליטה בהשהיית המומסים.

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

הגלאים בהם משתמשים ברוב המכריע של העבודה בהיפוך-פאזות הם גלאי UV-VIS, בשנים האחרונות נפוצים יותר ויותר גלאיי מערך דיודות (Diode Array), אך ניתן גם למצוא פה ושם גלאים פלואורסצנטיים, בייחוד באנליזות של דוגמאות ביולוגיות וסביבתיות. בתקופה האחרונה עולה בצורה דרמטית השימוש בגלאי ספקטרומטרית מסות כך שהמערכת נקראת: LC-MS (Liquid chromatography- Mass spectrometry).

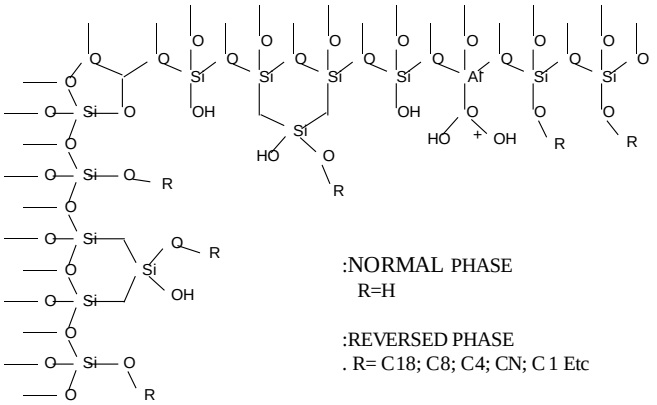
הגורמים המשפיעים על מידת ההשהיה של מומסים במערכות ה- Reversed Phase הם כדלקמן: א. האופי הכימי של שטח הפנים של הפאזה הנחה שארוזה בקולונה, ב. סוג הממסים הממסים המרכיבים את הפאזה הנעה ויחסי נפחיהם, ג. pH של הפאזה הנעה; ד. החוזק היוני של הפאזה הנעה. כאשר מבינים את אופי השפעתם של גורמים אלה על השהיית המומסים ניתן לשחק בהם כדי להתגבר על אי ההתאמה של הפרוצדורה הספרותית לאנליזה הדרושה.

א. האופי הכימי של שטח הפנים של הפאזה הנחה

פני השטח של האריזה מתוארים באיור הבא. האופי הכימי נקבע על ידי גודל הפחמימן הקשור על פני הסיליקה ג'ל, על ידי מידת הכיסוי שלו (Bonding Density) ביחידות של $\mu mole/m^2$, על ידי איכות וטוהר הסיליקה ג'ל ועל ידי מרכיבים שונים של הפאזה הנעה הספוחים באופן קבוע על פניו. ככלל, ככל שמספר הפחמנים בפחמימן הקשור אל הסיליקה גדול יותר, כן גדלה יכולתו להשהות מומסים אורגניים בתנאי שמדובר באחוז הכיסוי זהה. כלל נוסף הקשור באופי שטח הפנים של הפאזה הנחה הוא, שככל שגדול יותר מידת הכיסוי שלו על ידי הפחמימן, כך גדלה מידת ההשהיה של כל המומסים האורגניים. קולונות נחשבות להידרופוביות יחסית אם מידת הכיסוי עולה על $3\ \mu mole/m^2$.

ציור 3

Reversed Phase - Stationary Phase Surface



גורם חשוב באופי של שטח הפנים של העמודות הוא התוספים פעילי השטח, או במינוח המקצועי "יוצרי זוג-יונים" (Ion Pairing Reagents). אלה הם תוספים כמו אלקיל-אמינים (triethylamine, tetrabutylamine או אלקיל-סולפונאטים (dodecylsulfonate, heptyl, hexyl or octyl sulfonates),

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

הנספחים על פני הפאזה הנחה ההידרופובית ומצפים אותה במטען חיובי (האמינים) או שלילי (הסולפונאטים). בצורה כזאת הם יכולים להשפיע מאוד על מידת ההשהיה של מומסים טעונים חשמלית.

ב. *הרכב הממסים של הפאזה הנעה – חוזק ממס (Solvent Strength)*

ככלל, הממס החלש ביותר בשיטת ה- Reversed Phase הוא גם הממס הפולארי ביותר, המים. הממסים האורגניים הפולאריים האחרים בהם משתמשים נחשבים חזקים ביותר, כאשר סדר חוזק הממס פחות או יותר עוקב אחרי סדר המקדם הדיאלקטרי שלהם, כלומר על פי דרגת הפולאריות שלהם. ככל שהממס שמוסיפים לפאזה הנעה פולארי פחות, הוא נחשב חזק יותר אם משווים יחסים זהים בין נפחי הממסים, ולכן גם יזרז יותר את זמן היציאה של המומסים.

ג. *pH של הפאזה הנעה*

כאשר מדובר בדוגמאות המכילות מומסים בעלי קבוצות פונקציונליות מיוננות, כמו אמינים, קרבוקסילים, פוספאטים, פוספונאטים, סולפאטים וסולפונאטים, ניתן לשלוט בדרגן היינון של הקבוצות הללו בעזרת שימוש בבופרים בפאזה הנעה. קבוצות קרבוקסיליות במומסים מקבלות מטען יותר ויותר שלילי ככל שה- pH של הפאזה הנעה עולה מעל ל- pKa שלהן, ואז הן הופכות את כל המולקולה לפולארית יותר. כלומר, העלאת ה- pH של הפאזה הנעה מעל 5-4 = pH (שהוא תחום ה- pKa המקובל לקבוצות קרבוקסיליות) מורידה את מידת ההשהיה של חומרים המכילים קבוצות קרבוקסיליות, והפוך, שימוש בפאזה ענה ב- pH נמוך מ- 4 יגביר את ההשהיה שלהם. לעומת זאת, חומרים המכילים קבוצות פונקציונליות בסיסיות כמו אמינים, שתחומי ה- pKa שלהם מעל 8, יתעכבו יותר ויותר ככל שיעלה ה- pH של הפאזה הנעה, ויתקרב ל- 8. מאחר ובדרך כלל אסור להשתמש בעמודות Reversed Phase בפאזות נעות בעלות pH גבוה מ- 8 והשליטה על מידת ההשהיה של אמינים בתחום זה היא מוגבלת.

ד. *חוזק יוני של הפאזה הנעה*

החוזק היוני של הפאזה הנעה נקבע על ידי ריכוזי התוספים (כמו בופרים ומלחים) וגם הוא יכול להשפיע על חוזקה של פאזה זו כממס לפי השפעתה על מסיסות המרכיבים של הדוגמא. כאשר מערבבים ממסים שונים עם מלחים המרכיבים את הבופרים, יש להיזהר משימוש בחוזק יוני גבוה מ- 0.1 M במלחים אורגניים (כמו אצטאט וציטראט) או 0.01 M במלחים אי-אורגניים (כמו פוספאט) בשל שקיעת מלחים במשאבה, בצנרת ובעמודה ולהרבות בתקלות במכשיר אם אינו מצוייד בשטיפת אטמים (Seal wash) מיוחדת למקרים כאלה.

יישומים

1.1 Reversed phase – Pharmaceutical Assay

המכשירים המתאימים לבדיקות של ריכוז החומר הפעיל בחומרי גלם רוקחיים או בתכשירים רוקחיים הם בדרך כלל פשוטים יחסית, מאחר ושיטות הבדיקה אינן דורשות עבודה בגרדיינטים של ממסים או סף גילוי נמוך במיוחד. לעומת זאת, המכשיר חייב בהחלט לעמוד בעומס עבודה רב ביותר

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

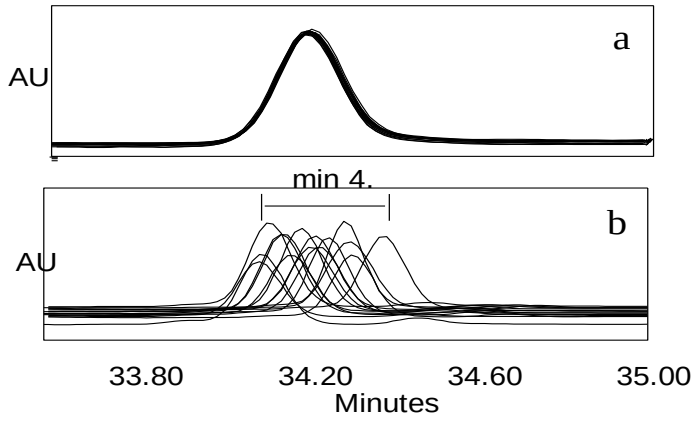
Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

ולהיות מדוייק מאוד מבחינת נפחי ההזרקה כדי לקבל תשובות מהימנות של ריכוזים, משום שהמבחנים של דיוק התשובה הכמותית הם מחמירים מאוד בתעשייה הרוקחית.

כאשר נדרשות בדיקות לעקבות של זיהומים (Impurity profile) או חומרי פירוק (Degradation products) בחומרי הגלם או בתכשירים הרוקחיים אזי הדרישות לרמת הביצוע של מערכת ה- HPLC עולות באופן משמעותי. קודם כל בבדיקות מעין אלו יש לעתים קרובות צורך בשימוש בגרדיינט ממסים, כדי להפריד את החומר הפעיל מהזיהומים ומחומרי הפירוק. השימוש בגרדיינט כרוך בערבוב באחוזים משתנים של ממסים בעלי צפיפות, צמיגות ודחיסות שונים, ולכן נדרשת משאבה ברמה גבוהה של דיוק, לשם השגת חזרה טובה של זמני השהייה (RSD < 1%), דבר שנועד לזהות בבטחה את החומרים בריכוזים הנמוכים. האיור הבא מראה שני מצבים, קבוצת הכרומטוגרמות בציור 3a מראה את החזרה הטובה כאשר הגרדיינט מתבצע בדיוק גבוה, ואילו ציור 3b מראה את חוסר החזרה על זמני ההשהיה כאשר יש אין דיוק רב בגרדיינו. בנוסף לכושר הביצוע של המכשיר בגרדיינטים, נדרש סף גילוי נמוך ככל האפשר, כדי שניתן יהיה לבצע אנליזה כמותית לחומרים בריכוזים נמוכים מאוד. לשם כך נדרשת פעולה חלקה מאוד של המשאבה וגלאים יציבים מאוד לקבלת מינימום רעש רקע. גלאי ה- UV-VIS חייב להיות רגיש מאוד ובעל יציבות גבוהה של הסיגנל שלו, משום שהעבודה דורשת רמת רגישות גבוהה מאוד של המערכת.

ציור 4

Overlay of Chromatograms



אנליזה של חומרי פירוק פרמצבטיים מחייבת עבודה עם גלאיי מערך דיודות, בשל הצורך לוודא שבמהלך התפרקות החומרים הפעילים לא מתקבל חומר זר שזמן ההשהיה שלו בכרומטוגרמה חופף לזה של החומר הפעיל לו עושים אנליזה. כאשר קורה מקרה כזה האנליזה של החומר הפעיל אינה מהימנה, ובתעשייה הרוקחית בעיות מהימנות של ריכוזי חומרים פעילים הן חמורות ביותר. כדי לוודא שאין חומר זר חופף לפיק הראשי של החומר הנבדק יש צורך באנליזה ספקטרלית של הפיקים בכרומטוגרמה, שכוללת התאמת ספקטראות לספרית סטנדרטים בעלי ניקיון גבוה, וביצוע מדידות של ניקיון הפיק (Peak Purity). כאשר נדרשת אנליזה ספקטרלית חשוב לוודא שהגלאי רגיש מספיק כדי

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

שיוכל לגלות ריכוזים נמוכים של אי-נקיונות שעלולים להיות נוכחים בתוך הפיק הראשי. כמו כן יש לוודא שעובדים ברזולוציה ספקטרלית הגבוהה ביותר (band-pass נמוך) שבה שהרעש לא יפריע מדי להשוואה בין חומרים בעלי ספקטרום UV-VIS דומה מאוד. דבר חשוב ביותר לשים לב הוא הצורה בה התוכנה מבצעת מדידת ניקיון הפיק כראוי. חשוב שהתוכנה תהיה מסוגלת לבדוק נקודות רבות ככל האפשר על פני הפיק כך שתצליח לגלות עד כמה שניתן נוכחות חומרים זרים בפיקים הנבדקים.

ברוב המכריע של המכשירים עמם עובדים בתעשייה הרוקחית כדאי לוודא שקיימת בתוכנה אופציה מובנית של חישובי "תאימות המערכת" System Suitability, בהם נבדקים הקריטריונים המספריים לרמת הביצוע של מערכת ה- HPLC שכוללים פקטור הרזולוציה, פקטור האסימטריה, מספר פלטות תיאורטיות וכו' (ראה ספרות 1-11). ללא בדיקות מקדימות של קריטריונים אלה לא נערכת אנליזה פרמצבטית ראויה לשמה.

1.2 Reversed phase – Amino Acids

אנליזה של חומצות אמיניות נעשית ברוב המכריע של השיטות בעזרת גרדיינט ממסים בפאזה הנעה. החומצות האמיניות מזוהות על פי זמני ההשהיה שלהן בדרך כלל, לכן חשוב לוודא שרמת הביצוע של המכשיר בעבודה בגרדיינטים היא גבוהה במיוחד, ושוב, הציור הקודם מדגים את הבעיתיות בגרדיינט בביצוע נמוך. מאחר והחומצות האמיניות הן חסרות כרומופורים (קבוצות פונקציונליות בולעות קרינת UV-VIS), נהוג להרכיב עליהן נגזרות בולעות קרינת UV-VIS או פולטות קרינה פלואורסצנטית בייחוד בדוגמאות ממקורות ביולוגיים. מסיבה זו כדאי לוודא שמערכת שנועדה לאנליזה של חומצות אמיניות תכלול גם גלאי פלואורסצנטי וגם גלאי בליעת אור.

בדרך כלל העבודה על חומצות אמיניות הינה כמותית, לכן כדאי שהתוכנה תתמודד בקלות עם הגדרת המומסים אחד אחר השני לפי זמני ההשהיה שלהם, ותבצע בקלות ובמהירות כיול כמותי של החומצות האמיניות, ובעזרת גרפי הכיול תבצע חישובים כמותיים על כל אחת ואחת מהחומצות האמיניות תוך דיווח ברור על התוצאות. יש לזכור שיש בסביבות 20 גרפי כיול על כל הרצת סטנדרט, דבר שעלול להכביד מאוד על תחנת עיבוד נתונים שאינה בעלת כוח מיחשוב מספיק.

1.3. Reversed phase – Peptides and Proteins

אנליזה של פפטידים וחלבונים כרוכה בשימוש כמעט מוחלט בשיטות הכוללות גרדיינט ממסים בפאזה הנעה. בדרך כלל הממסים הם מים:אצטוניטריל המכילים 0.1% TFA כאשר % האצטוניטריל עולה בהדרגה. מסיבה זו גם ביישומים אלה של Reversed phase יש לשים לב לרמת ביצוע גבוהה של דיוק בערבוב הממסים שמתבטאת בדיוק בזמני השהייה, שוב, החשיבות נובעת מהזיהוי של המומסים על פי זמני ההשהיה שלהם (שוב, איור 3 מדגים את החשיבות הזאת). כמו כן יש לעתים חשיבות לשמירת הטמפרטורה של הקולונות בשל השינויים בקונפורמציות של הממומסים כתוצאה משינויי טמפרטורות, לכן חשוב שהמכשיר יכלול תנור לקולונות. כאשר מדובר בדוגמאות ביולוגיות, לעתים יש מגבלות על נפח הדוגמא או שהמומסים נמצאים בריכוזים נמוכים ביותר, לכן יש חשיבות לרגישות של המערכת לריכוזים נמוכים, כלומר חשוב לוודא שניתן להשיג סף גילוי נמוך מתאים לריכוזים הביולוגיים. כאשר יש מגבלות על נפח הדוגמא יש לוודא שהדוגם מסוגל להזריק נפחים קטנים מאוד

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

בדיוק גבוה ללא צורך בהיערכות מיוחדת (כמו למשל החלפת לולאות הזרקה באופן תדיר). לעומת זאת, לעתים קרובות יש צורך דווקא להזריק נפחי דוגמא גדולים מאוד בתנאי גרדיינט התחלתיים כדי להעשיר את הכמות של הפפטיד או החלבון הספציפי בדוגמא, ואז יש צורך דווקא בנפחי לולאה גדולים בעמדת ההזרקה, כך שייתכן מצב בו קיימות שתי דרישות סותרות במכשיר HPLC אחד, מצד אחד נפחי הזרקה של מיקרוליטרים בודדים, ומצד שני נפחי הזרקה של מעל ל – 1 מ״ל.

1.4. Reversed phase – Food

אנליזה של מזון כוללת בדיקות פחמימות, ויטאמינים, שומנים וכו׳. מערכת HPLC העומדת לרשות מעבדה העוסקת בבדיקות מזון זקוקה בדרך כלל לגמישות בהרכבה. לאנליזה של פחמימות נדרש גלאי מקדם שבירה (ראה להלן עבודה ב- GPC), לאנליזה של ויטאמינים מסיסי מים או מסיסי שומן וכן גם לאנליזה של שומנים (שדורשים נגזרות בולעות קרינת אור או פולטות קרינה פלואורסצנטית) דרושים גלאים UV-VIS או פלואורסצנטיים. לעתים קרובות נדרש לעבוד בגרדיינט ממסים בפאזה הנעה, על כן גם במקרה זה רצוי לוודא שהמערכת מתפקדת היטב בעבודה בגרדיינט.

1.5. Reversed phase - Environmental

יישומים סביבתיים של Reversed phase כוללים בדיקות של רעלים כמו פחמימנים ארומטיים רב-טבעתיים (Polycyclic aromatic hydrocarbons), חומרי הדברה (Pesticides and herbicides), ושאריות חומרי נפץ. בדרך כלל מדובר במערכות בהן יש צורך בסף גילוי נמוך מאוד, לכן רצוי שהמשאבות יתנו זרימה חלקה מאוד, והגלאים יהיו בעלי אופטיקה חסרת רעש. לעתים קרובות נדרש במערכות אלה גלאי פלואורסצנטי לפחמימנים הארומטיים הרב-טבעתיים ולחומרים עליהם מרכיבים נגזרות פלואורסצנטיות להגברת רגישות הגילוי. לעתים נדרשת פעולת העשרה של החומרים המועמדים לאנליזה בשל הריכוזים הנמוכים של הדוגמאות, לכן נדרשות לולאות הזרקה בנפח גדול במיוחד המזרימות דרך הקולונה נפחים גדולים בתנאי הפרדה התחלתיים כאלה שהדוגמא מועמסת על הקולונה ורק אחר כך משנים את הפאזה הנעה לשם ההפרדה, הגילוי והכימות.

2. כרומטוגרפיה יונית - Ion Chromatography

בסוג הזה של כרומטוגרפיה נוזלית מפרידים חומרים יוניים בתמיסות מימיות ממקורות סביבתיים, תעשייתיים וביולוגיים, כיום היישום הוא בעיקר לאניונים אי-אורגניים. הקולונות בהן משתמשים ארוזות בצינורות בקוטר של 4-9 מ״מ ובאורך של 5-30 ס״מ. קוטר חלקיקי האריזה בדרך כלל נע בין 5-10 מיקרון. האריזה בנויה ממצע של סיליקה ג׳ל או פולימרים, לכן היא מסוגלת לעמוד בלחצים גבוהים יחסית. על פני שטח האריזה של הקולונה קשורות קבוצות פונקציונליות מיוננות חיובית (אמינים) או שלילית (סולפונאטים או קרבוקסילים) , כמתואר באיור 2, אליהן קשורים יונים נגדיים לאיזון חשמלי, למשל OH^- הוא יון נגדי לאמינים ו- H^+ הוא יון נגדי לקרבוקסילים והסולפונאטים. כאשר נכנסים מומסים טעונים שלילית אל הקולונה שעל פניה קשורות קבוצות אמיניות הם יוצרים

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

עמן קשר יוני תוך כדי החלפת היונים הנגדיים במהלך נדידתם בקולונה. ככל שצפיפות מטענם גדולה יותר הם מתעכבים יותר וכך מושגת ההפרדה ביניהם.

הקולונות הפולימריות מסוגלות לעמוד בתנאי pH קיצוניים, אך יש להן נטייה לתפוח או להצטמק לפי הרכב הפאזה הנעה, והן רגישות יותר ללחצים גבוהים. לעומתן קולונות מחליפי יונים המבוססות על סיליקה עמידות בלחצים גבוהים, אך הן רגישות לתנאי pH קיצוניים, בהם יש צורך לעתים קרובות. הגלאים הנפוצים ביותר הנם גלאיי מוליכות, אך גם יש שימוש לגלאים אלקטרוכימיים וספקטרוסקופיים בחלק מהשיטות. גלאי המוליכות מודד כל הזמן את מוליכות הפאזה הנעה, וכאשר מופיעים מומסים בעלי מוליכות שונה מהפאזה הנעה מתקבל סיגנל. הסיגנל הוא חיובי, אם מוליכותם גבוהה מזו של הפאזה הנעה, או שלילי אם היא נמוכה ממנה. מאחר והפאזות הנעות מורכבות בדרך כלל מבופרים, שיכולים להגיע לריכוזים גבוהים ולערכי pH קיצוניים, לעתים יש צורך להשתמש באביזרי Suppression ליונים, משום שאז מוליכות הפאזה הנעה גבוהה מאוד, וקשה לקבל סיגנלים ניתנים לכימות מהמומסים ללא ה- Suppressors.

מערכת ה- HPLC המתאימה לסוג זה של כרומטוגרפיה היא לעתים קרובות אל-מתכתית בכל חלקיה, או בנוייה ממתכת אל-חלד אינרטית או טיטניום באיכות טובה, כדי שתוכל לעמוד בתנאים קיצוניים של חומצה ובסיס בפאזה הנעה. המערכת חייבת להיות מסוגלת לבצע גרדיינטים, משום שמקובל להשתמש ביישומים רבים בשינוי הדרגתי של ה- pH או בהעלאה הדרגתית של החוזק היוני של הפאזה הנעה. כמו כן המערכת עשויה לכלול בדרך כלל אביזר מיוחד לכרומטוגרפיה יונית שנקרא Suppressor שנדרש לעיתים קרובות כאשר משתמשים בגלאי מוליכות בשילוב עם פאזות נעות מוליכות מאוד. ה- Suppressor ממוקם בין הקולונה לגלאי והוא משפיע על הסיגנלים המתקבלים מהמומסים לאחר ההפרדה. פעולתו נועדה לדכא את המוליכות של הפאזה הנעה (מכאן המונח suppression) כך שלא תרווה את תגובת הגלאי, ו/או לשנות את המומסים היוניים כך שמוליכותם תעלה לפני שהם מגיעים אל גלאי המוליכות.

גלאי המוליכות מכיל בתוכו מערכת תאי מדידה למוליכות, התלויה מאוד בחוזק היוני של התמיסות העוברות דרכה ובטמפרטורה, לכן חשוב לוודא שתכנונו של הגלאי הוא ברמה טובה שתמנע רגישות גבוהה מדי לטמפרטורת הסביבה, וכן חשוב שמערכת העברת הממסים של מכשיר ה- HPLC תהיה יציבה מאוד.

בדרך כלל נהוג לייחד מערכות HPLC לאנליזה של יונים, כלומר הן dedicated, בשל הכימיה המיוחדת שלהן, אך ניתן בהחלט לבנות מערכת עבור אנליזה של יונים מחיבור בין HPLC "רגיל" עם גלאי מוליכות ועם Suppressor. אולם במקרה זה יש לזכור שגלאי המוליכות רגיש ביותר לנוכחות עקבות של ממסים אורגניים וחייבים לקיים פרוצדורות שטיפה זהירות ביותר במעבר בין היישומים השונים של ה- HPLC.

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

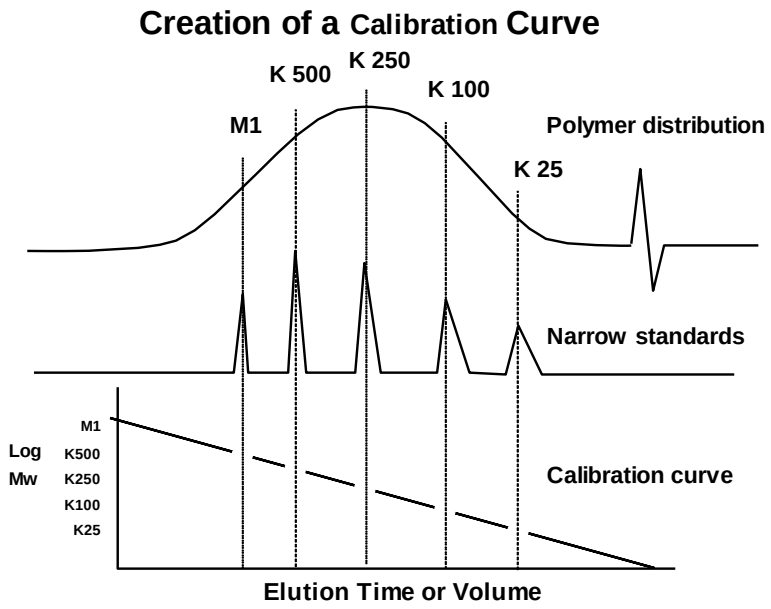
Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

Gel Permeation Chromatography (GPC) - ניפוי לפי גודל

סוג זה של כרומטוגרפיה נועד להפריד חומרים גבוהי משקל מולקולרי בעזרת קולונות עשויות מג'ל מיוחד שמסנן אותם לפי גודלם, כמתואר באיור 2. קולונה טיפוסית היא בעלת אורך של 25-30 ס"מ וקוטר של 4-10 מ"מ עם אריזות בקוטר של 5-10 מיקרון וארוזה בג'ל מיוחד בעל נקבוביות גדולות מאוד. אריזת הקולונות משמשת כמעין נפה להבחנה בין מולקולות על פי גודלן. קוטר נקבוביות האריזה קובע איזה תחום משקלים מולקולריים תפריד הקולונה. כדי להרחיב את תחום המשקלים המולקולריים הניתנים לאנליזה מנמוכים מאוד עד לגבוהים מאד נהוג לעתים קרובות להשתמש במערך של קולונות בעלות אריזה בנקבוביות בגדלים שונים. כאשר מדובר בפולימרים בעלי פעילות ביולוגית, בדרך כלל הפאזות הנעות הן מימיות, ואילו כאשר מדובר בפולימרים מסונתזים וחומרים פלסטיים הפאזות הנעות בדרך כלל הינן אל-מימיות. בדרך כלל מטרת ההפרדה היא לקבוע משקל מולקולרי, או יותר נכון פיזור המשקל המולקולרי של המומסים (Molecular size distribution).

הגלאים בהם משתמשים הם בעיקר גלאיי מקדם שבירה: Refractive Index (RI), בשל העובדה שפולימרים ביולוגיים כמו פוליסאכרידים, או פולימרים אורגניים תעשייתיים הם חסרי כרומופורים ב- UV, אך נותנים תגובה טובה ורגישה מספיק בגלאי מקדם שבירה.

כדי לקבוע פיזור משקל מולקולרי של מומסים חייבים קודם לכן לכייל את המערכת בעזרת חומרים סטנדרטיים שמשקלם המולקולרי ידוע, כמתואר באיור הבא. הכיול נעשה כך שבונים גרף כיול שמקשר את זמני ההשהיה של קבוצת הסטנדרטים למשקלם המולקולרי. לאחר שקשר זה ידוע, ניתן להזריק למערכת חומרים שאינם ידועים ולקבוע את משקלם המולקולרי לפי זמני ההשהיה שלהם.



Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

התשובה הסופית ניתנת בדרך כלל ב"פיזור המשקל המולקולרי" שהוא בעצם פונקציה המתארת את הכמות היחסית של כל משקל מולקולרי, והיא ניתנת כמערך של המומנטים של הפיק המתאר את הפיזור הזה:

1st Moment = Mn (Number Average)

2nd Moment = Mw (Weight Average)

3rd Moment = Mz (Z Average)

4th Moment = Mz+1 (Z+1 Average)

Mw/Mn = Polydispersity

מומנטים אלה הם בעצם מספרים המאפיינים את הפולימרים מבחינה פיזיקלית.

מאחר וזמני ההשהיה במכשיר כזה חייבים להימדד במדויק, ומחשבים מהם משקל מולקולרי, יש חשיבות רבה מאוד לרמת הביצועים של מכשיר ה- HPLC בשמירה על קצב זרימה קבוע ומדוייק. זמני ההשהיה מתייחסים ל- log MW, כלומר, בתנאים מסוימים שינוי ב- 1% של קצב הזרימה יעלה או יוריד עד כ- 10% מהמשקל המולקולרי של המומס. אחת הדרכים המקובלות להתמודד עם אי-דיוקים של משאבות ה- HPLC בעבודה עם GPC היא שימוש בחומרי ייחוס שנותנים פיק ייחוס (Reference Peak). בוחרים חומר שמופיע בסופה של הכרומטוגרמה ונותן אפשרות לנרמול של זמן ההשהיה. אולם יש לזכור שאין זה בהכרח פתרון מוצלח, משום שחוסר דיוק בקצב זרימה יכול לבוא לידי ביטוי לאורך זמן ההרצה של הכרומטוגרמה, והנרמול הזה רק משפר את המצב, לא בהכרח פותר את הבעיה לגמרי. בנוסף לכך, יכול לקרות מצב בו תהיה חפיפה בין פיק הייחוס לבין פיקים של חומרים בעלי עניין מהדוגמא שעברו Total penetration בשל העובדה שמשקלם המולקולרי נמוך.

העבודה עם גלאי מקדם השבירה (RI) אינה דומה כלל וכלל לעבודה עם גלאי UV-VIS הנפוצים יותר. גלאי זה מצויד בשני תאי זרימה, אחד לפאזה הנעה שמשמשת כייחוס ואחד לדוגמאות. איפוס הגלאי נעשה על מקדם השבירה של הפאזה הנעה כאשר היא ממלאת את שני התאים, של הייחוס ושל הדוגמא. כאשר מגיע מומס אל תא הזרימה של הדוגמא הוא משנה את מקדם השבירה וגורם להופעת סיגנל חיובי או שלילי, תלוי אם הוא מעלה או מוריד את מקדם השבירה. מאחר ומקדם השבירה רגיש ביותר לטמפרטורה חשוב מאוד להקפיד שהגלאי מצויד באמצעים שונים לשמירה טובה של טמפרטורת תאי הזרימה. בדרך כלל אחת הסיבות הנפוצות ביותר לחוסר היציבות של גלאים אלה (שמתבטא ב- Noise and drift של קו הבסיס - baseline) היא המבנה הלוקה בחסר של אמצעי השמירה על הטמפרטורה. כמו כן יש לוודא שהקולונות נמצאות בתנור השומר על הטמפרטורה, ומצויד באלמנט מחליף חום כדי שהתהליך כולו יתרחש בטמפרטורה אחידה.

שיקול חשוב מאוד בשימוש במערכת HPLC המיועדת לעבודה ב- GPC הוא היכולת של התוכנה להתמודד עם הצרכים המיוחדים של המדידות. קודם כל היכולת לנרמל את זמני ההשהיה לפי פיק הייחוס, דבר שני, היכולת להגדיר סטנדרטים כסטנדרד צר או רחב: Narrow standards או Broad standards, כאשר מסטנדרדים צרים נלקח רק ערך יחיד של משקל מולקולרי ומסטנדרד רחב ניתן לקחת פיזור שלם של משקלים מולקולריים ליצירת גרף הכיול. כמו כן התוכנה צריכה להיות מסוגלת לתת תשובות של משקל מולקולרי יחיד לנעלם בעל משקל מולקולרי יחיד (Narrow Unknown) או

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

לתת תשובות של פיזור משקל מולקולרי לנעלמים בעלי אוסף של משקלים מולקולריים (Broad unknown).

בדרך כלל אין צורך לייחד מערכת לעבודה ב- GPC, אך יש לזכור שהשימוש לסירוגין בשני יישומים שונים כמו למשל GPC ו- Reversed phase אינו כל כך פשוט וכדאי לבחור מערכת שעוברת בקלות מממסים מימיים לאל-מימיים, רצוי לוודא למשל שבוכנות המשאבה נשטפות מבחוץ על ידי Seal wash, כך שלא יישארו במשאבה שאריות של מלחים מעבודה בבופרים ב- Reversed phase במעבר לממסים האל-מימיים של GPC, אחרת הבוכנות ניזוקות בקלות יחסית.

יש לזכור שמערכת GPC דורשת סבלנות עוד גדולה יותר מאשר Reversed phase משום שזמני ההתייצבות של גלאי מקדם השבירה ושל הקולונות ארוכים יותר, וכן זמני האנליזה בשימוש בקולונות בטור עלולים להיות ארוכים הרבה יותר מהמקובל ב- Reversed phase. בעבודה עם GPC אין אפשרות לקצר בשום צורה שהיא את זמני האנליזה בשל עקרון ההפרדה של ניפוי על סמך גודל. החישוב הוא כ- 15 דקות לכל קולונה בקצב זרימה של 1 מ״ל לדקה, כלומר, אם משתמשים בשלוש קולונות זמן ההרצה הוא בערך 45 דקות ללא קשר עם הרכב הפאזה הנעה.

כרומטוגרפיה כיראלית Chiral Separations

בסוג זה של כרומטוגרפיה מפרידים איזומרים אופטיים זה מזה ישירות, ללא צורך בהרכבת נגזרות כיראליות עליהם כדי להפוך אותם לדיאסטראומרים שניתן להפרידם בכרומטוגרפית היפוך פאזות. הקולונות בהן משתמשים הן כיראליות בעצמן, כלומר על פני השטח שלהן נמצא חומר שהוא איזומר אופטי בעצמו, שנותן סביבה כיראלית לאיזומרים האופטיים. כאשר מגיע זוג איזומרים אופטיים לקולונה כזאת, אחד מהם נקשר טוב יותר (באופן זמני תוך כדי החלוקה) אל פני השטח בשל ״הכרה כיראלית״ מאשר השני, ולכן הם יוצאים מהקולונה בזמנים שונים. יש לזכור כי שני האיזומרים האופטיים הנם בעלי תכונות פיזיקליות זהות לגמרי כל עוד אינם נמצאים בסביבה כיראלית, ולכן ספקטרום UV או ספקטרום המאסות שלהם, בהגיעם אל הגלאי, הוא זהה לחלוטין.

יש מבחר גדול מאוד של סוגי קולונות כיראליות (ref), וקשה מאוד לחזות מראש איזו קולונה ואילו פאזות נעות יתאימו למומסים להם דרוש אנליזה. חלק גדול מההפרדות הכיראליות נעשה בממסים אל מימיים שאינם מתערבבים במים, ולכן בדרך כלל רצוי לייחד מכשיר להפרדה זו, בשל הסרבול של המעבר בין ממסים מימיים ובופרים לבין ממסים אל מימיים הלוך וחזור. אם בלתי ניתן לייחד באופן מוחלט מכשיר ליישום כיראלי, חשוב לבחור מכשיר HPLC בו המעבר הזה אינו מסורבל (ראה האמור לעיל במערכות GPC) ובנוסף על כך המכשיר צריך להתמודד בקלות עם עבודה בממסים אל מימיים מבחינת ערבובם במשאבה והזרקת נפחים באופן מדויק. יש לזכור שכשם שקשה למלא פיפטה רגילה בממסים אורגניים בצורה מדויקת מאוד, כך גם קשה לדוגמים האוטומטיים או הידניים לדייק בנפחים כאשר עובדים עם ממסים בעלי צמיגות נמוכה מאוד.

מאחר והספקטראות של שני האיזומרים האופטיים הם זהים לחלוטין, רצוי מאוד להשתמש בגלאי UV-VIS מסוג של מערך דיודות. בגלאי זה ניתן לזהות מייד מי הם האיזומרים האופטיים מתוך כל הפיקים המתקבלים בכרומטוגרמה. מאחר והאיזומרים האופטיים נותנים תגובה שונה

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

(הפוכה זה מזה) בפולרימטרים, קיימים גלאים כיראליים מסחריים שמנצלים תכונה זו, והם בעצם מעין פולארימטרים מקוונים. הגלאים הללו הוכיחו הצלחה מוגבלת ביותר והנם יקרים במיוחד, לכן לא זכו לשימוש נרחב.

Narrow Bore Columns

בשנים האחרונות גברה הנטייה לעבור לשימוש בקולונות בעלות קוטר חלקיקים קטן של האריזה וקוטר הצינור ממנו בנוייה הקולונה קטן יותר ויותר. מקוטר צינורות של 4.6 מ״מ ירדו הצינורות ל- 1 מ״מ קוטר. הורדת קוטר הקולונה גורם לעלייה של הלחץ, ולכן גם אורכן של הקולונות ירד מ- 25 ס״מ אורך טיפוסי ל- 10 ס״מ ופחות. השימוש בקולונות ממוזערות גורם לכך שניתן לעבוד בזמנים קצרים יותר ולחסוך בכמויות משמעותיות של ממסים כאשר כושר הביצוע של ההפרדה נשמר ואפילו משתפר. אלא שקיימות מספר בעיות במעבר לעבודה עם קולונות בקוטר צר. קודם כל הנפח הפנימי של קולונה כזאת יורד מאוד יחסית לנפחי הצנרת המחברת אותה אל המזרק ואל המשאבה, דבר שמעלה את הרחבת הפיקים שנובעת מ- Extra-column band broadening. מהסיבה הזאת יש לוודא שהנפח מחוץ לקולונה בצינורות הדוגם ובצנרת המחברת אל הגלאי לא יתרום להרחבה מיותרת של הפיקים ויוריד את רמת ביצועי הקולונה. דבר שני, יש להשתמש בנפחי הזרקה נמוכים מאוד כדי למנוע עומס היתר על הקולונה. מסיבה זו יש לוודא שהמכשיר מסוגל להתמודד עם הזרקת נפחים קטנים בדיוק גבוה. לבסוף, גם תא הגלאי האנליטי חייב להיות ״מיקרוסקופי״, נפחו חייב להיות קטן ככל האפשר ללא הרעה ברגישות הסיגנל, אחרת גם הוא ירחיב מאוד את השיאים וישחית את הישגיה של הקולונה בהפרדה.

גימלון - כרומטוגרפיה פרפרטיבית : Scaling up – preparative chromatography

הצורך להשתמש ב- HPLC לשם ניקוי חומרים, או בידוד חומרים מתוך תערובות מורכבות, מצריך שימוש במערכות פרפרטיביות או סמי-פרפרטיביות. במערכות אלה משתמשים בקולונות בקוטר של החל מ- 10 מ״מ ועד מעל ל- 54 מ״מ באורך של 25 עד 50 או יותר ס״מ, הארוזות עם חלקיקים בקוטר שנע בין 10-50 מיקרון. השיקולים לעבודה של מערכת HPLC מתאימה לעבודה פרפרטיבית או סמי-פרפרטיבית הם שונים לגמרי מאלה של מערכת אנליטית. המטרה החשובה ביותר במערכת פרפרטיבית היא קבלת חומר נקי ככל האפשר בזמן קצר ככל האפשר תוך הוצאות מעטות ככל האפשר. נושאים כמו צורת פיקים נכונה למען כימות, דיוק גבוה מאוד בזמני השהייה לשם זיהוי נכון, רגישות גבוהה למען גילוי עקבות כמעט ואינם קיימים. ממילא החומר הנאסף נבדק בהמשך בעזרת מערכת אנליטית.

המשאבות במערכת פרפרטיבית חייבות לעבוד בקצבי זרימה גבוהים מאוד (עד ליטרים לדקה) וכדאי לוודא מראש שהמערכת תעמוד בלחצים שיתקבלו בעבודה בקצבי זרימה גדולים בקולונות שנבחרו לעבודה הפרפרטיבית. במקרים רבים החשיבות של החזרה על זמני ההשהיה אינה כה גורלית כמו במערכת אנליטית, ובוודאי לא הרגישות של הגילוי. לעומת זאת חשוב שהגלאי יהיה בעל תחום דינאמי רחב מאוד שניתן יהיה לגלות בכרומטוגרמה אחת ריכוזים גבוהים עם נמוכים בעת ובעונה אחת. חשובה גם הגמישות והקלות של הזרקת נפחים גדולים של דוגמאות, ובהפרדות קשות במיוחד

Written by Shula Levin: http://shula-lc.co.il

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

חשוב שתהיה האפשרות לבצע מיחזור (recycling) בתנאים איזוקרטיים, כדי להעביר את הדוגמא המופרדת שוב ושוב דרך הקולונה ולהאריך את מסלול ההפרדה, במטרה לשפר את ההפרדה.

התייחסות נכונה לספציפיקציות - Specifications

ספציפיקציות (Specifications) של מערכת HPLC הן מערך של תוצאות מדידות של היצרן שלה, שנותן את רמת הדיוק והמהימנות של מרכיבים שונים שלה. מספרים אלה מחייבים את היצרן ומשמשים בדרך כלל להבדלה של מכשירים זה מזה בכושר הביצוע שלהם. כאשר נגשים לבחור מערכת HPLC מתאימה ליישום ספציפי, ויודעים כבר אילו פונקציות הן חשובות מאוד לביצוע העבודה, כדאי לבדוק את רשימת הספציפיקציות של מרכיבי המכשיר הרלוונטיים, כדי לוודא שהפונקציות המסוימות הללו ניתנות אכן לביצוע בצורה משביעת רצון. לדוגמא, לפני עבודה על עקבות של חומרים להם דרושה רגישות גבוהה מאוד של גילוי, כדאי לוודא את הספציפיקציה לרעש בגלאי שנותן היצרן של המכשיר. היצרן חייב כמובן לספק את תנאי הבדיקה שנעשתה, משום שכדאי לדעת אם הבחינה שנעשתה על ידי היצרן היא מחמירה או מקילה יחסית לשיטת העבודה הצפויה למשתמש. דוגמא נוספת, אם הכוונה לעבוד בגרדיינטים מורכבים, יש לוודא שקיימת ספציפיקציה לדיוק ולמהימנות הרכב הממסים, ושהיא נמוכה ככל האפשר.

כאשר נגשים לבחון ספציפיקציות של מכשיר יש לזכור שהצגת הספציפיקציות על ידי יצרנים היא לעתים אמנות בפני עצמה, וכדאי לבדוק את התנאים בהם נלקחו תוצאות המדידות ככל שניתן. יש יצרנים שמרנים יחסית שמציגים תוצאות "בטוחות" יותר, כך שבפועל בשטח ניתן יהיה לקבל תוצאות טובות גם לאחר זמן שימוש ארוך. לעומת זאת יש יצרנים שמציגים את התוצאות הטובות ביותר שהשיגו במכשירים חדשים, ואם המכשיר שנבחר לאנליזה כבר אינו חדש לגמרי, ייתכן שלא ייתן תוצאות טובות כמו אלה שמוצגות בספציפיקציות. לעתים קרובות שימוש במכשיר בעל ספציפיקציות ירודות יותר, או כזה שאינו חדש ואינו בעל כושר ביצוע טוב כמו זה שהשתמשו בו בשיטה הספרותית, גורם לכך שקשה לחזור על התוצאות הספרותיות ולקבל תוצאות משביעות רצון.

References

1. **U.D. Neue,** *HPLC Columns, Theory, Technology, and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
2. **V. R. Meyer**, *Practical High-performance Liquid Chromatography*, (2nd Edition) Wiley, New York, 1994.
3. **M.C. McMaster**, *HPLC: A Practical User's Guide*, VCH Publishers, Inc., 1994.
4. **D. Parriott**, *A Practical Guide to HPLC Detection*, Academic Press, New York, 1993.
5. **S. Lindsay**, *High Performance Liquid Chromatography* (Series: Analytical Chemistry by Open Learning), Wiley, Chichester, 1993.
6. **B.A. Bidlingmeyer**, *Practical HPLC Methodology and Applications*, Wiley, 1992.

Downloaded from Shula Levin's WebSite of HPLC and LC-MS

7. **R. P. W. Scott**, *Liquid Chromatography Column Theory*, Wiley, New York, 1992.
8. **J.W. Dolan, L.R. Snyder**, *Troubleshooting LC Systems*, Humana Press, 1989.
9. **L.R. Snyder, J.L. Glajch, J.J. Kirkland**, *Practical HPLC Method Development*, Wiley, 1988.
10. **M. T. Gilbert**, *High Performance Liquid Chromatography*, Wright, Bristol, 1987.
11. **E. Katz**, *Quantitatie Analysis Using Chromatographic Techniques*, Wiley, Chichester, 1987.