

Sviluppo di metodi

HPLC (RPC) - UV/VIS :

aspetti chiave ed esempi

# Scelta delle caratteristiche della fase mobile

- 1 - **Spettro UV/VIS del composto** : ✓ *in fase mobile, se possibile*  
✓ *a pH noto e controllato*

Scegliere una lunghezza d'onda il più possibile prossima al massimo di assorbimento del composto.

## 2 - Solventi

**Componente organica:** tipicamente  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , THF (in RPC)

**THF :** *Cut Off* per l'assorbimento UV= 240 nm,  
elevata viscosità, rischio di degradazione a perossido  
tempo di condizionamento della colonna elevato

**$\text{CH}_3\text{CN}$**   
 **$\text{CH}_3\text{OH}$ :** solventi meno costosi/reattivi/viscosi del THF, danno meno problemi di assorbimento in UV anche se a lunghezze d'onda inferiori a 220 nm possono esserci derive della linea di base del cromatogramma, dovute all'assorbimento da parte loro.

## Componente acquosa:

se l'analita non è influenzato dal pH usare acqua tal quale

altrimenti : **tampone a  $\text{pH} > \text{pKa} + 1.5$  o**  
 **$\text{pH} < \text{pKa} - 1.5$**

**pH:** a  $\text{pH} < 2$  degradazione della colonna (distacco della silice dall'acciaio della colonna, rottura dei legami fra silice e fase legata)

a  $\text{pH} > 8$  la silice comincia a dissolversi

a  $\text{pH} > 8$  è meglio usare soluzioni tampone organiche, per ridurre l'idrolisi della silice

**Tamponi:** Acido trifluoroacetico (TFA) per  $\text{pH} < 5$   
Acetato di ammonio per  $\text{pH} = 5 - 6.5$  **tutti compatibili con MS**  
Carbonato di ammonio per  $\text{pH}$  basici

I sali di fosfato danno problemi di viscosità e solubilità e, soprattutto, **non sono compatibili con la principale interfaccia con la spettrometria di massa, ossia l'interfaccia a ionizzazione elettrospray (ESI)**

**USARE una concentrazione di tampone (50-100 mM, se possibile) sufficiente a garantire un buon potere di tamponamento**

## Ottimizzazione della risoluzione: selettività

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \left( \frac{k}{1 + k} \right)$$

Square root means extremely large increase in N required to significantly improve  $R_s$

Provides greatest potential for improvement

Can never exceed 1.0, even for large values of k.

Per raddoppiare  $R_s$  si dovrebbe aumentare N di 4 volte, il che è estremamente difficile

E' meglio lavorare, almeno inizialmente, su  $\alpha$

**Per CAMBIARE**  $\alpha$  : Prima cambiare il SOLVENTE ORGANICO da associare all'acqua, dopo tentare con una MISCELA di due o più solventi organici

Se questi approcci falliscono, tentare cambiando il pH (di 0.5 unità per volta). In caso di ulteriore insuccesso cambiare il TIPO DI COLONNA.

Se tutti gli approcci RPC falliscono cambiare METODO (Accoppiamento Ionico, Ripartizione in Fase Normale o per Interazione Idrofila) o TECNICA SEPARATIVA (Elettroforesi Capillare, Frazionamento in campo-flusso, ecc.).

## Ottimizzazione della risoluzione: fattore di capacità

$$k = (t_R - t_M) / t_M \quad \text{Fattore di Capacità}$$

Una buona separazione deve avere:  $2 < k < 10$

se  $k$  è basso, i primi picchi saranno troppo vicini al fronte del solvente e dunque, realisticamente, poco risolti l'uno dall'altro

se  $k$  è alto, gli ultimi picchi saranno troppo slargati (e quindi anche bassi)



Fare una stima di  $k$  per il primo e per l'ultimo picco: se è troppo vicino a 1 o a 20, rispettivamente, CAMBIARE la composizione della FASE MOBILE

$t_R$  è influenzato da variazioni di flusso e di dimensioni della colonna, mentre  $k$  no, pertanto, dopo aver ottimizzato  $k$ , si possono modificare o il flusso o le dimensioni della colonna senza modificare il suo valore.

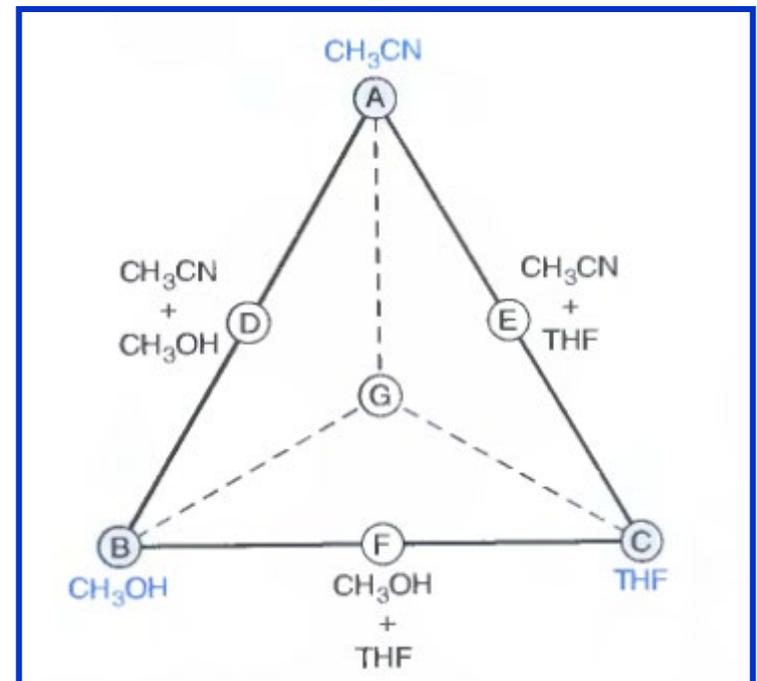
## Scelta della composizione ottimale della fase mobile in RPC

La prima opzione per una separazione RPC prevede un approccio isocratico con una miscela di acqua (eventualmente contenente un sistema tampone) e uno dei seguenti tre solventi, in ordine di scelta:  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , THF.

In un primo stadio di sviluppo del metodo per ciascun solvente organico, usato singolarmente, si determina la percentuale che garantisca la separazione complessivamente migliore.

In un successivo stadio di sviluppo si valuta la possibilità di usare una componente organica costituita da due o da tutti i tre solventi citati.

Graficamente si utilizza a tal fine il triangolo dello sviluppo di metodi HPLC (un esempio di disegno sperimentale per miscele):



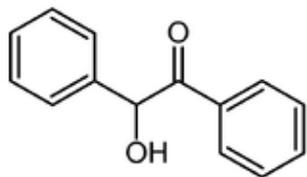
Sviluppo di un metodo HPLC isocratico su colonna C18 per una miscela di 7 composti aromatici

Tampone (pH 3.5):

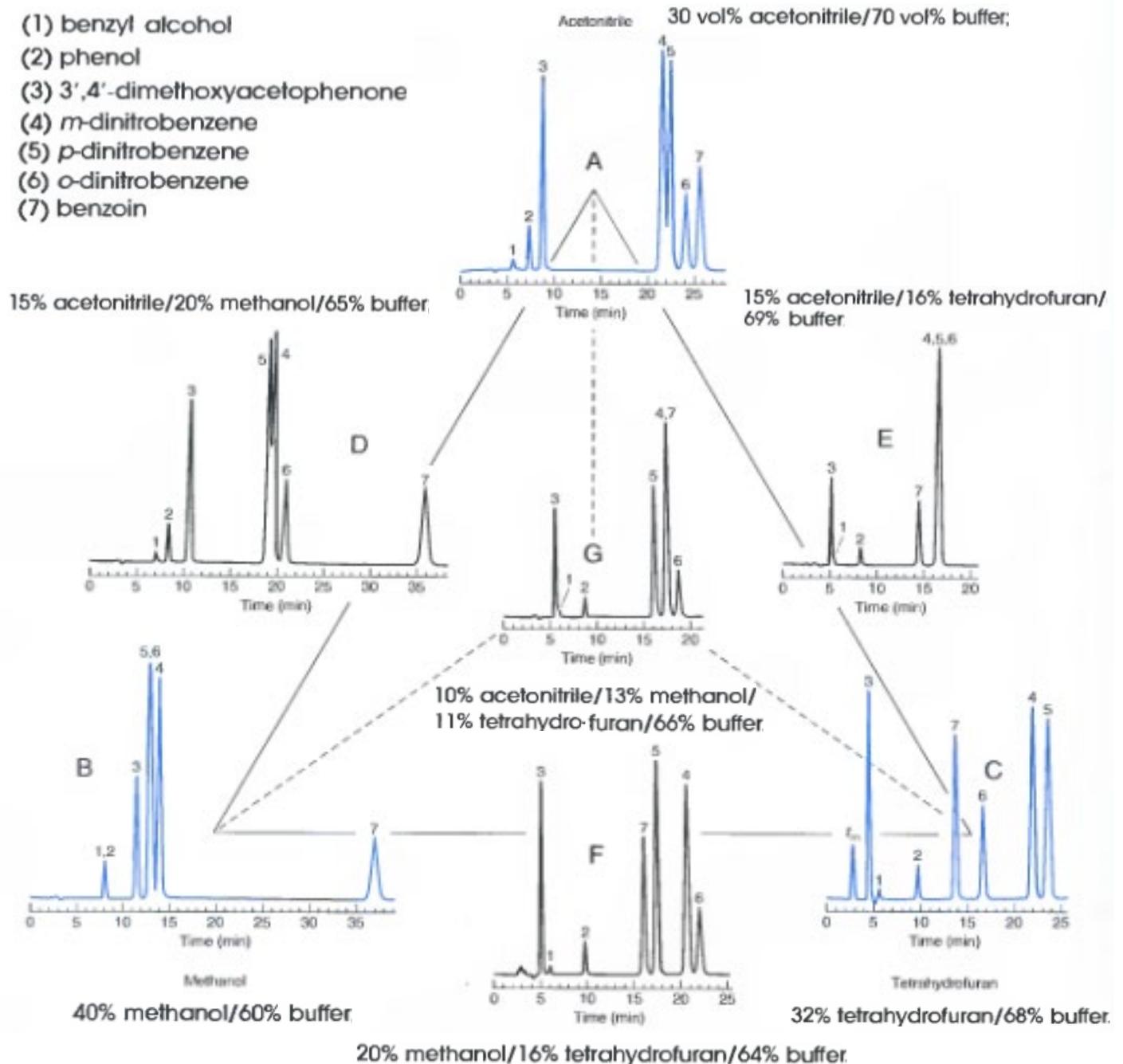
25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.1 g/L  $\text{NaN}_3$

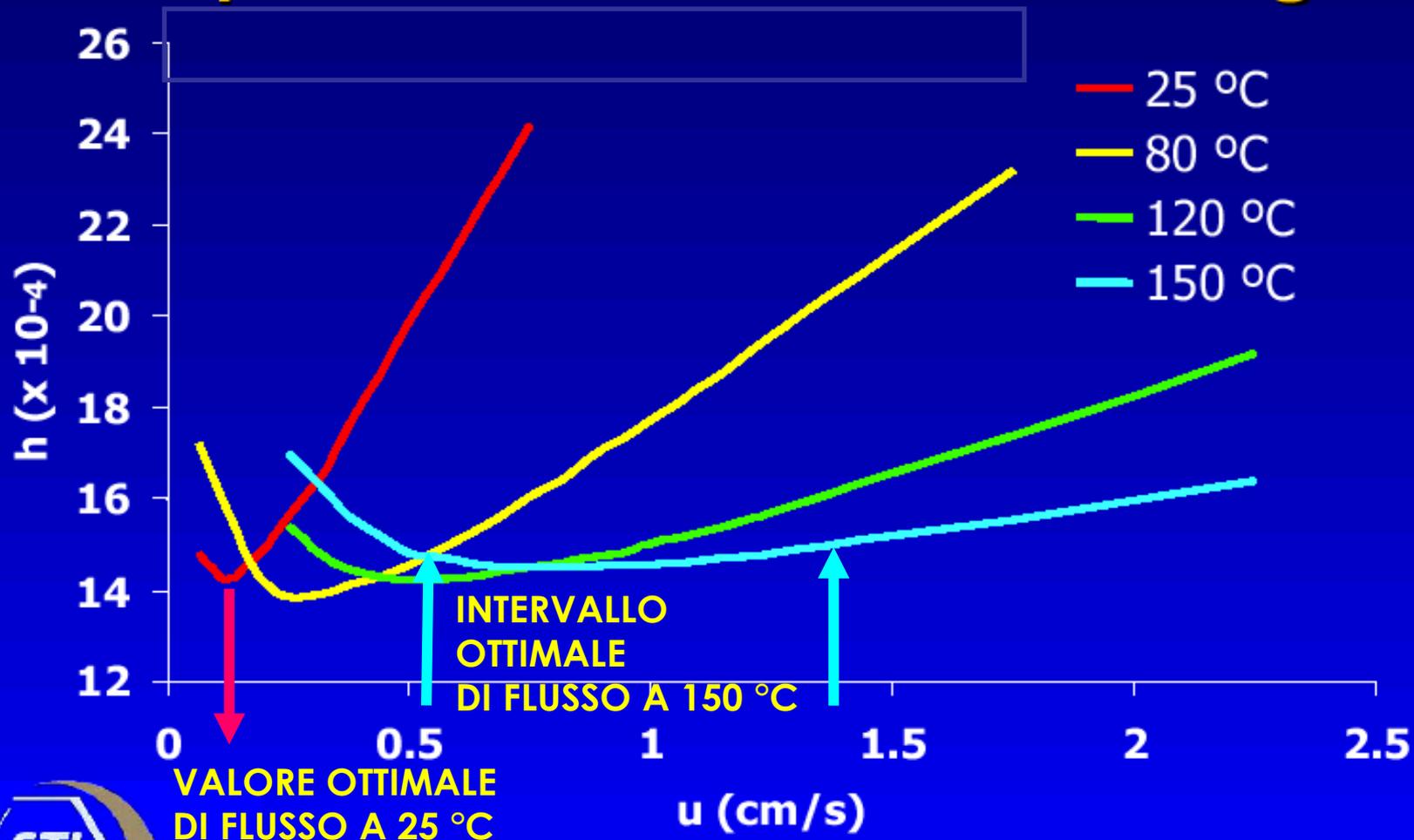
HCl



benzoino

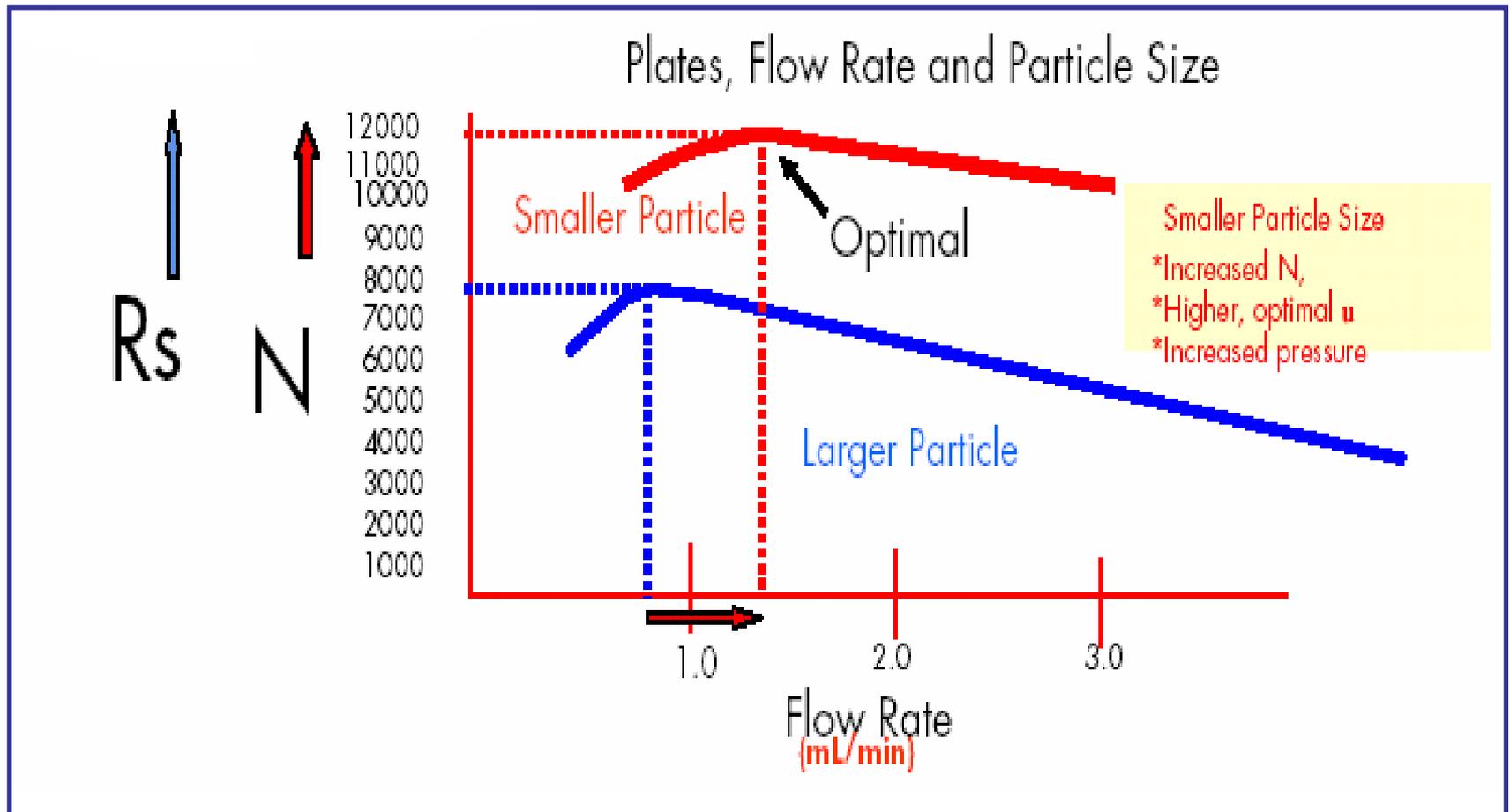


## Temperature Effects on Plate Height





# Miglioramento dell'efficienza: effetto della dimensione delle particelle di impaccamento sul numero di piatti teorici



Lo svantaggio legato all'impiego di particelle di diametro ridotto è rappresentato dalle **contropressioni più alte** e quindi dalla **necessità di impiegare pompe cromatografiche speciali (Ultrahigh Pressure LC, UPLC)**.

La diminuzione della dimensione delle particelle consente di ottenere una buona efficienza anche con colonne più corte, che consentono di ridurre i tempi di ritenzione (a parità di flusso).

Ciò deriva dal fatto che il numero di piatti teorici di una colonna può essere stimato usando la relazione:

$$N = 3000 L/d_p$$

con  $L$  = lunghezza della colonna (in cm) e  $d_p$  = diametro delle particelle di impaccamento (in  $\mu\text{m}$ )

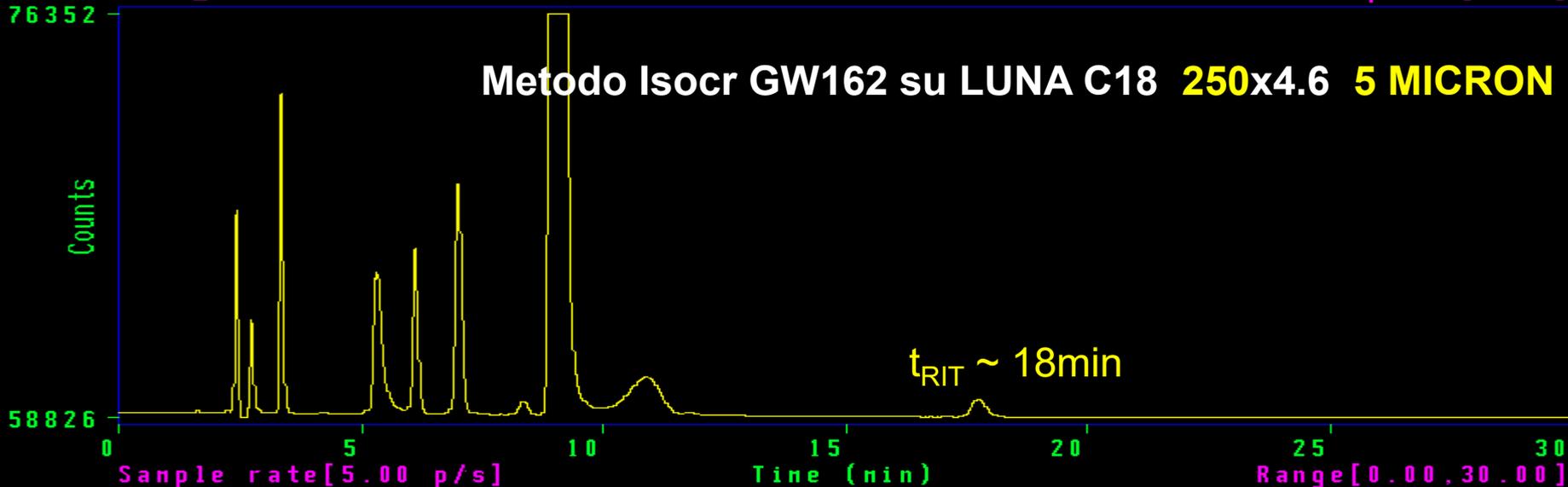
**Esempio:** passando da una colonna 25 cm x 4.6 mm con particelle impaccanti da 5  $\mu\text{m}$  a una colonna 15 cm x 4.6 mm con particelle da 3  $\mu\text{m}$  il rapporto  $L/d_p$  si mantiene costante:

$$L/d_p = 25/5 = 5 = 15/3$$

ma si ottiene una riduzione al 60% (15/25) del tempo della corsa cromatografica, a parità di RISOLUZIONE fra i picchi.

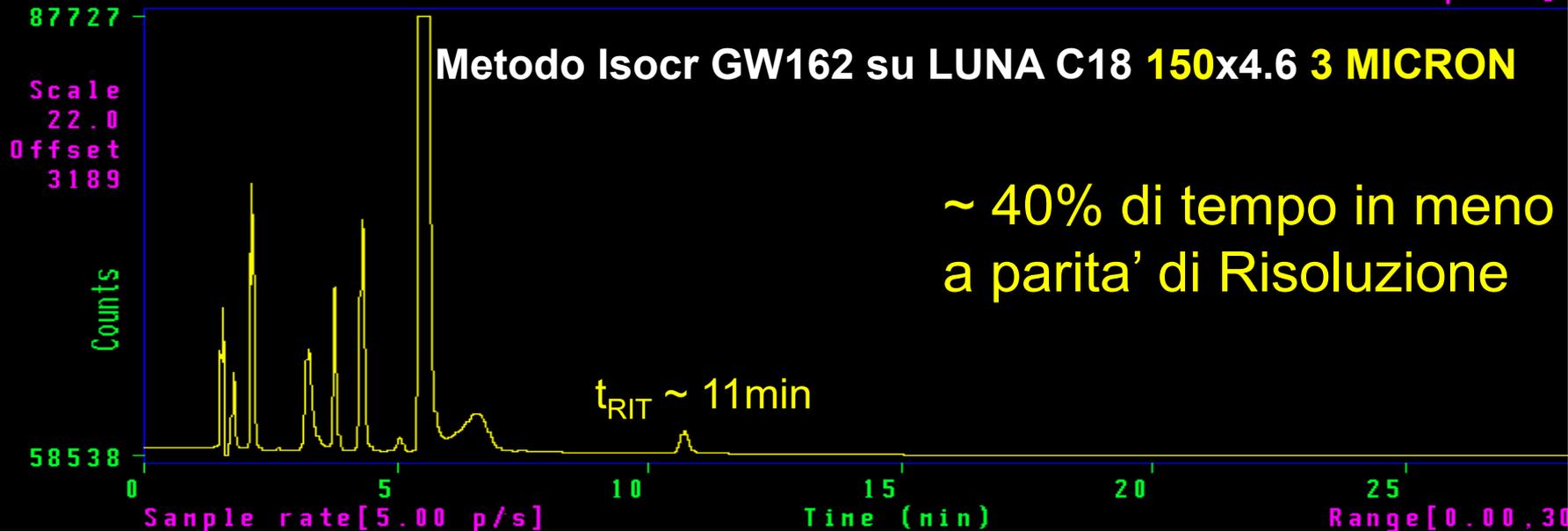
FORMAG002  
TEST\_MIX

10-NOV-2003 16:34:29  
Report [None]



FORMAG027

11-NOV-2003 11:4  
Report [M



# Scelta fra una separazione isocratica ed una a gradiente

## Vantaggi e svantaggi di una separazione isocratica

### VANTAGGI:

- LINEA DI BASE "ORIZZONTALE"
- NESSUNA RIEQUILIBRAZIONE DOPO UNA CORSA

### SVANTAGGI:

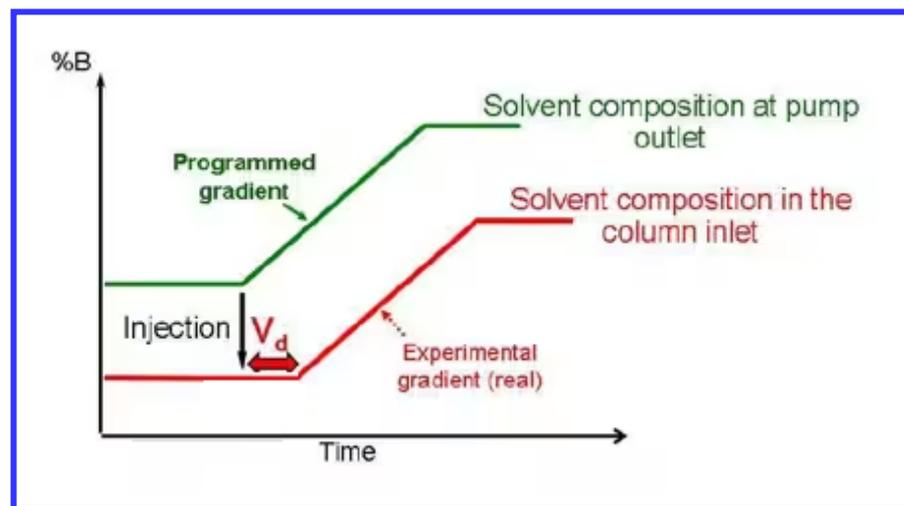
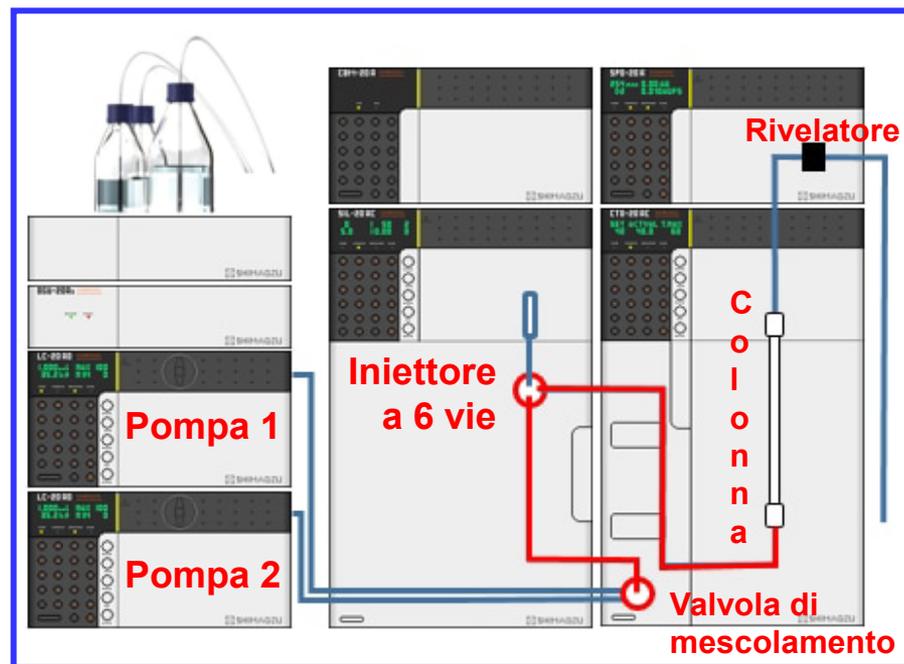
- PICCHI TARDO-ELUENTI SPESSO NON SIMMETRICI, QUINDI DIFFICILMENTE INTEGRABILI
- PICCHI PIU' LARGHI (BASSE EFFICIENZE)
- DIFFICOLTA' NEL TRASFERIMENTO DEL METODO FRA STRUMENTAZIONI DIVERSE A CAUSA DEL **DIVERSO RITARDO DI GRADIENTE**

## Ritardo di gradiente nelle strumentazioni HPLC

Inevitabilmente una strumentazione HPLC implica la presenza di un volume compreso fra la valvola in cui avviene il mescolamento dei solventi che costituiscono la fase mobile e l'inizio della colonna.

In figura è mostrato il caso di un sistema HPLC con gradiente ad alta pressione a doppio solvente.

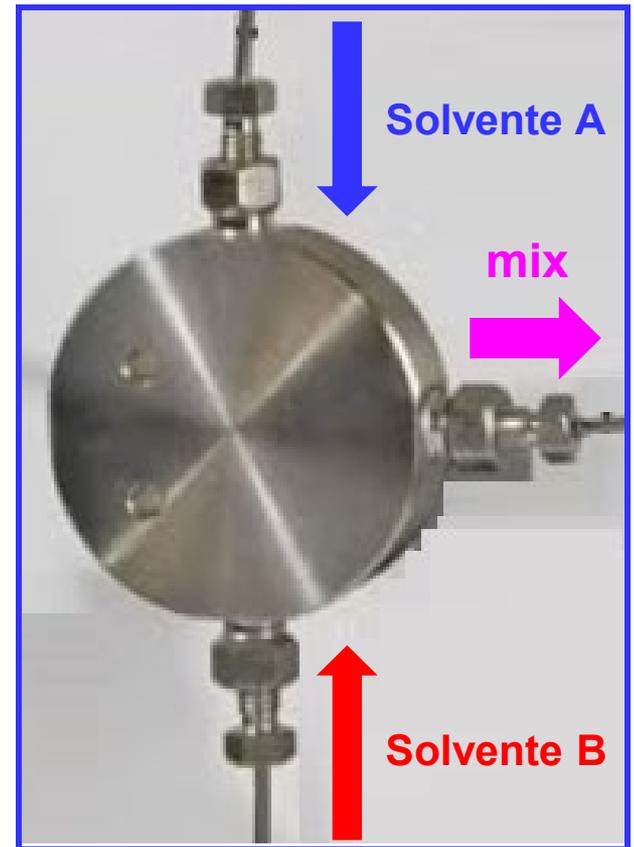
Quando la valvola di iniezione passa in posizione INJECT la composizione di fase mobile all'inizio della colonna non è quella impostata in quel momento dal gradiente e ci vorrà del tempo affinché quest'ultima arrivi alla colonna. Tale tempo è noto come ritardo di gradiente e determina una variazione artificiosa dei tempi di ritenzione, realisticamente diversa in strumentazioni diverse.



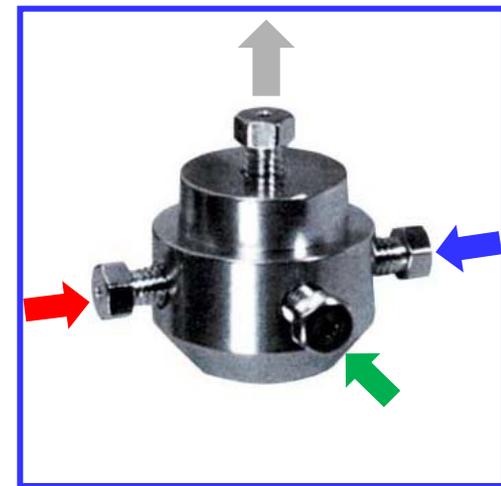
Dettaglio di un tipo di valvola di mescolamento impiegata per realizzare un gradiente ad alta pressione basato su due solventi.

I due solventi provengono rispettivamente da una delle due pompe in dotazione alla strumentazione.

Il flusso determinato da ciascuna pompa stabilisce le percentuali di A e B che costituiscono il mix in uscita.



Valvola di mescolamento impiegata per realizzare un gradiente ad alta pressione basato su quattro solventi (uno dei quattro ingressi non si vede nella foto).



## Criterio di scelta fra separazione isocratica e a gradiente

Si definisce un **intervallo di tempo del cromatogramma a gradiente** in cui siano **inclusi tutti i picchi**, quindi si valuta la differenza fra le percentuali di solvente organico nella fase mobile corrispondenti alle estremità dell'intervallo:

$$D\% = \%t_{Rn} - \%t_{Ri}$$

Si determina il rapporto (in percentuale) fra tale valore e la differenza ( $D_G$ ) fra le percentuali di solvente organico nella fase mobile all'inizio e al termine del gradiente:  $D\%/D_G \times 100$

La scelta della modalità di analisi si può effettuare in base al seguente **criterio**:

	< 25%	ISOCRATICA
$D\%/D_G$ :	> 40%	GRADIENTE
	TRA 25% e 40%	DA VERIFICARE

MAP090904050

10-SEP-2004 20:0

BLANK

Report [M

154750

Counts

$(63 - 42) / (95 - 10) \sim 25\%$

tg

*tempo sprecato*

zona libera da picchi

zona libera da picchi

10% B

~ 42% B

~ 63% B

95% B

58258

0

5

10

$t_{R1}$

15

$t_{Rn}$

20

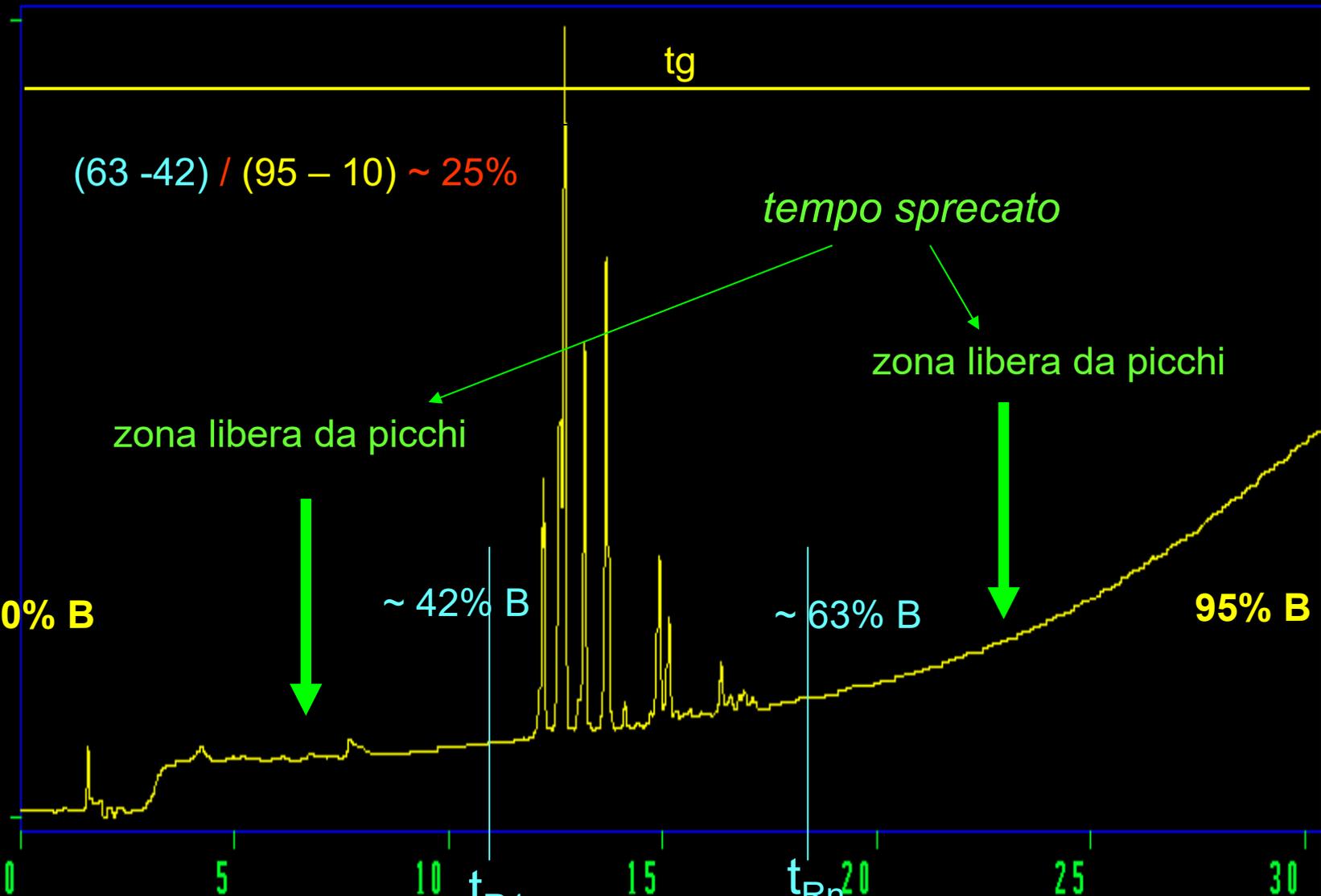
25

30

Sample rate [5.00 p/s]

Time (min)

Range [0.00, 32



## Volume di iniezione

Potendo scegliere, è più opportuno iniettare in colonna un volume piccolo di campione perché in tali condizioni:

- la scodatura dei picchi è minore
- i valori di N migliorano
- se il pH della fase di dissoluzione del campione è diverso da quello della fase mobile si ha minor rischio che il picco si sdoppi nel caso di analiti acidi/basici

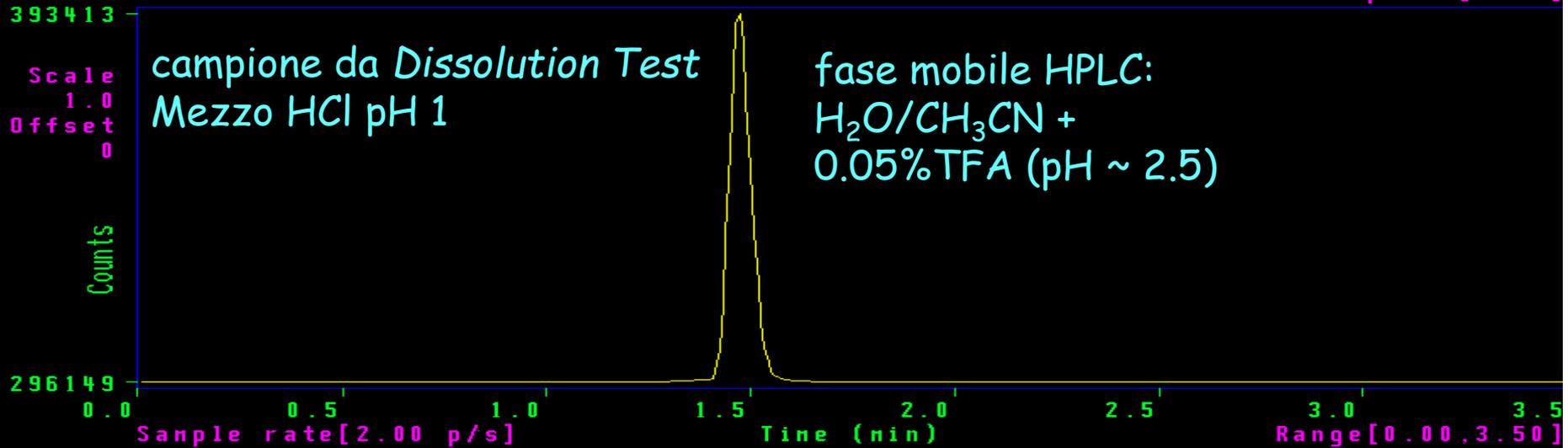
La ripetibilità (RSD) tra le iniezioni è ormai ottima con gli autocampionatori anche iniettando piccoli volumi (1  $\mu$ L).

Poiché l'iniezione di piccoli volumi implica concentrazioni elevate di campione e spesso gli analiti non sono solubili facilmente in acqua è possibile usare come co-solvente lo stesso solvente organico contenuto nella FASE MOBILE, ad una percentuale NON SUPERIORE a quella raggiunta in quest'ultima (specialmente nei metodi isocratici).

# Alterazione della forma dei picchi dovuta al pH

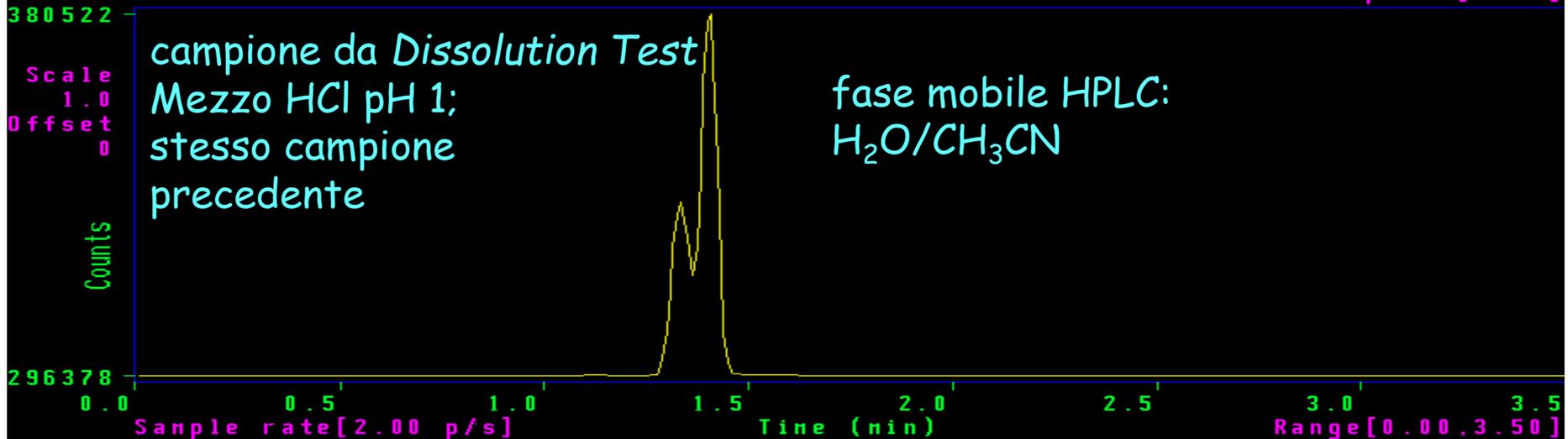
MAP151104004

15-NOV-2004 12:22:27  
Report [None]



MAP151104009

15-NOV-2004 13:47:46  
Report [None]



Lo **sdoppiamento del picco nel secondo cromatogramma** è dovuto alla forte differenza di pH esistente fra la soluzione del campione (molto acida) e la fase mobile (non acidificata).

Ne deriva una distribuzione dell'analita fra **due forme diverse (una protonata, l'altra neutra)**, che hanno tempi di ritenzione lievemente diversi, il che comporta lo sdoppiamento del picco.

Se invece la fase mobile ha un pH simile a quello della soluzione del campione (grazie all'aggiunta di acido trifluoroacetico, TFA), nel caso specifico quantomeno tale da essere molto inferiore al  $pK_a$ , **il picco diventa unico, perché predomina una sola delle due forme acido-base dell'analita.**

E' quindi opportuno, quando possibile, **USARE LO STESSO pH** (o per lo meno due pH vicini tra loro) per la **Fase di Dissoluzione del campione** e per la **Fase Mobile HPLC.**

Va sottolineato che nel caso di un analita che può distribuirsi fra due forme diverse, una neutra e l'altra protonata (o deprotonata), anche **la variazione imprevista, sul lungo periodo, del pH della fase mobile può portare ad uno sdoppiamento dei picchi, se il pH raggiunto non è sufficientemente lontano, verso l'alto o verso il basso, dal  $pK_a$  dell'analita.**