

ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΑ –ΜΕΤΡΟΛΟΓΙΑ ΜΕΘΟΔΩΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

ΜΙΧΑΗΛ Α. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, ΝΙΚΟΛΑΟΣ Χ. ΜΕΓΚΟΥΛΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ,
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
e-mail: koupparis@chem.uoa.gr

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνική της Υγροχρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) αποτελεί σήμερα την κατεξοχήν αναλυτική τεχνική για τον έλεγχο φαρμάκων, τροφίμων και περιβάλλοντος. Οι μέθοδοι HPLC χαρακτηρίζονται από εξαιρετική εκλεκτικότητα (selectivity), αναπαραγωγιμότητα, ανθεκτικότητα, και σε συνδυασμό με ειδικούς ανιχνευτές πολύ καλή ανιχνευσιμότητα. Αποτελούν σήμερα τις μεθόδους επιλογής ως πρότυπες, επίσημες, αποδεκτές ή εσωτερικές για την επίλυση μεγάλου αριθμού αναλυτικών προβλημάτων.

Η τεχνική της HPLC βασίζεται στο διαχωρισμό των ουσιών ενός δείγματος με το μερισμό τους μεταξύ δύο φάσεων, μιας υγρής στατικής και μιας υγρής κινητής φάσης, χρησιμοποιώντας μηχανισμούς: κατανομής (κανονικής και αντίστροφης φάσης, ιοντικών ζευγών), ιονταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και συγγένειας. Οι ουσίες μετά την έκλουσή τους από τη στήλη (στατική φάση) ανιχνεύονται από διάφορους ανιχνευτές (φασματοφωτομετρικό, φθορισμομετρικό, ηλεκτροχημικό, εξατμιστικό σκέδασης ακτινοβολίας, δείκτη διάθλασης, φασματόμετρο μαζών) παράγοντας ένα αναλυτικό σήμα (χρωματογραφική κορυφή) που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση (χρόνος έκλυσης, φάσμα) και ποσοτικοποίηση (ύψος ή εμβαδόν κορυφής).

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Για την ποσοτικοποίηση ενός αναλύτη σε ένα δείγμα χρησιμοποιούνται οι παρακάτω μέθοδοι:

1. Καμπύλης αναφοράς: Χρησιμοποιούνται εξωτερικά πρότυπα και κατασκευάζεται καμπύλη βαθμονόμησης (εμβαδόν ή ύψος κορυφής ως προς συγκέντρωση), η εξίσωση παλινδρόμησης της οποίας υπολογίζεται με τον αλγόριθμο των ελαχίστων τετραγώνων (least squares regression analysis).
2. Μέθοδος ενός προτύπου: Χρησιμοποιείται ένα μόνο πρότυπο, με συγκέντρωση κοντά στη συγκέντρωση του αγνώστου, με την προϋπόθεση ότι η καμπύλη αναφοράς είναι γραμμική και διέρχεται από την αρχή των αξόνων. Είναι η κατεξοχήν χρησιμοποιούμενη σε συνθήκες ρουτίνας.
3. Μέθοδος εσωτερικού προτύπου: Επιλέγεται μια δεύτερη ουσία (εσωτερικό πρότυπο) με παρεμφερή χρωματογραφικά και αναλυτικά χαρακτηριστικά με τον αναλύτη και προστίθεται σε ίδια συγκέντρωση σε πρότυπα και άγνωστα. Ως αναλυτικό σήμα λαμβάνεται ο λόγος υψών ή εμβαδών του αναλύτη προς του εσωτερικού προτύπου και χρησιμοποιείται για την εφαρμογή των μεθόδων (1) και (2). Κύριο πλεονέκτημα είναι οι διορθώσεις που επιτυγχάνονται στα σφάλματα που προκαλούνται από την ολίσθηση του συστήματος και τις ατελείς ανακτήσεις στα διάφορα στάδια (εκχύλιση, παραγωγοποίηση, κλπ).

4. Μέθοδος κανονικοποίησης: Η εκατοστιαία περιεκτικότητα ενός αναλύτη σε ένα δείγμα υπολογίζεται από το κλάσμα του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη προς το άθροισμα των εμβαδών όλων των κορυφών εξαιρουμένων των θορύβων. Σε περίπτωση διαφορετικής απόκρισης των ουσιών του μείγματος στον ανιχνευτή του συστήματος χρησιμοποιούνται παράγοντες απόκρισης (response factors) που προσδιορίζονται πειραματικά χρησιμοποιώντας πρότυπες ουσίες.
5. Μέθοδος προσθήκης γνωστών ποσοτήτων: Μετρείται το αναλυτικό σήμα του αναλύτη σε ένα υποδείγμα και σε ένα άλλο ή άλλα παρόμοια υποδείγματα στα οποία έχει προστεθεί γνωστή ποσότητα του αναλύτη. Εφαρμόζεται όταν εμφανίζεται επίδραση μήτρας στη μέθοδο.

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΘΟΔΩΝ HPLC

Για τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση μιας μεθόδου HPLC μελετώνται πειραματικά τα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά της μεθόδου. Τα κυριότερα εξ αυτών είναι:

- 1) Αριθμός θεωρητικών πλακών (Number of theoretical plates), N:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2$$

t_R = χρόνος ανάσχεσης και $w_{0,5}$ = ημιεύρος κορυφής

Εκφράζει την επίδοση της στήλης για το συγκεκριμένο αναλύτη.

- 2) Διαχωριστικότητα (Resolution), R_s , μεταξύ δύο γειτονικών κορυφών:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{1,0,5} + w_{2,0,5}}$$

Εκφράζει την εκλεκτικότητα της μεθόδου και τιμή $R_s > 1,5$ αποδεικνύει ικανοποιητικό διαχωρισμό των κορυφών στη γραμμή βάσης.

- 3) Λόγος κορυφής προς κοιλάδα (peak-to-valley ratio), p/v. Χρησιμοποιείται στην περίπτωση που δεν υπάρχει διαχωρισμός στη γραμμή βάσης, ιδιαίτερα όταν υπάρχει μια μικρή κορυφή κοντά σε μια μεγάλη κορυφή.

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

H_p = ύψος μικρής κορυφής από την προέκταση της γραμμής βάσης

H_v = ύψος στο χαμηλότερο σημείο της κοιλάδας που χωρίζει τις δύο κορυφές από την προέκταση της γραμμής βάσης.

- 4) Σχετική συγκράτηση (Relative retention), r:

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

t_M = νεκρός χρόνος

Χρησιμοποιείται αντί του χρόνου ανάσχεσης και επιλέγεται μια ουσία αναφοράς με χρόνο ανάσχεσης t_{R1} .

5) Παράγοντας συμμετρίας ή ασυμμετρίας (Symmetry factor), A_s :

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ = εύρος στο 1/20 του ύψους κορυφής

d = απόσταση κατακορύφου από την κορυφή και του ανερχόμενου τμήματος της κορυφής στο 1/20 του ύψους κορυφής.

Τιμή $A_s = 1$ αποδεικνύει ιδανική συμμετρική κορυφή, ενώ είναι αποδεκτές τιμές 0,8 – 1,2, εκτός εάν τεμκηριώνεται διαφορετικά.

6) Λόγος σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise-ratio), S/N:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

H = ύψος κορυφής του αναλύτη από την προέκταση της γραμμής βάσεως παρατηρούμενη σε μια περιοχή 20-πλάσια του ημιεύρους της κορυφής

h = εύρος θορύβου

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ HPLC

Για την ανάπτυξη μιας μεθόδου HPLC με βέλτιστα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά, αρχικά επιλέγεται η κατάλληλη στήλη, ανάλογα με το μηχανισμό που κρίνεται ο πλέον κατάλληλος για το συγκεκριμένο μείγμα ουσιών και στη συνέχεια επιλέγεται η κινητή φάση (αναλογία διαλυτών, συγκέντρωση αλάτων ή αντιδραστηρίων, pH), η θερμοκρασία της στήλης, ο όγκος του ενιέμενου δείγματος και οι παράμετροι του ανιχνευτή. Κατά τη βελτιστοποίηση τίθενται οι στόχοι προς βελτίωση (διαχωριστικότητα, ανιχνευσιμότητα, επαναληψιμότητα, γραμμικότητα, χρόνος ανάλυσης). Η βελτιστοποίηση μπορεί να διεξαχθεί με δύο μεθόδους:

- Μονοπαραμετρική (univariate) βελτιστοποίηση: Μεταβολή κάθε φορά ενός παράγοντα και διατήρηση των άλλων στις βέλτιστες τιμές τους. Απαιτείται επανάληψη του κύκλου, ιδιαίτερα εάν υπάρχει αλληλεπίδραση των παραμέτρων.
- Πολυπαραμετρική βελτιστοποίηση – Μέθοδος Simplex: Μεταβάλλονται συγχρόνως όλοι οι παράγοντες και χρησιμοποιείται μια συνάρτηση απόκρισης (response function), στην οποία περιλαμβάνονται οι στόχοι προς βελτίωση με συντελεστές βαρύτητας. Απαιτεί ειδικό πρόγραμμα υπολογιστή εάν οι πειραματικές παράμετροι προς βελτιστοποίηση είναι περισσότερες των δύο.

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ – ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΔΙΑΚΡΙΒΩΣΗΣ / ΕΛΕΓΧΟΥ ΕΠΙΔΟΣΗΣ

Τα συστήματα HPLC είναι πολύ εξελιγμένα με φανταστικές δυνατότητες ελέγχου και επεξεργασίας δεδομένων. Τα κυριότερα τμήματα και απαιτήσεις για διακρίβωση / έλεγχο επίδοσης είναι τα παρακάτω:

- 1) Αντλία: Είναι ένα από τα σημαντικότερα τμήματα του συστήματος HPLC και πρέπει να εξασφαλίζει επαναλήψιμη και ακριβή ροή χωρίς παλμούς. Είναι πολύ σημαντικό το σύστημα να έχει δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution) 4 διαύλων. Ελέγχεται η επαναληψιμότητα, ακρίβεια και σταθερότητα της αντλίας και η ακρίβεια του συστήματος βαθμιδωτής έκλουσης.
- 2) Στήλη: Ελέγχεται μέσω του αριθμού θεωρητικών πλακών, της διαχωριστότητας των κορυφών και του παράγοντα συμμετρίας τους.
- 3) Θερμοστατούμενος θάλαμος: Ελέγχεται η ακρίβεια της επιτυγχανόμενης θερμοκρασίας και η σταθερότητά της.
- 4) Δειγματολήπτης: Ελέγχεται η ακρίβεια και επαναληψιμότητα του λαμβανόμενου όγκου και επίσης η μόλυνση μεταφοράς (carry over contamination).
- 5) Ανιχνευτής: Ελέγχεται η γραμμικότητα απόκρισης, ευαισθησία, σταθερότητα και σε ορισμένες περιπτώσεις η ακρίβεια των παραμέτρων λειτουργίας (π.χ. μήκος κύματος) και των μετρήσεων του (π.χ. απορρόφηση).

Επειδή είναι δύσκολο να διακριβώνεται / ελέγχεται κάθε τμήμα ξεχωριστά είναι δυνατός ο έλεγχος της λειτουργίας του συνολικού συστήματος μέσα από τον έλεγχο επίδοσης της μεθόδου που εφαρμόζεται.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΤΑΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ (SYSTEM SUITABILITY TEST)

Είναι έλεγχοι και εκτελούνται πριν την καθημερινή εφαρμογή μιας μεθόδου με σκοπό την τεκμηρίωση ότι το συνολικό σύστημα ανταποκρίνεται σε δεδομένες προδιαγραφές. Συνήθως γίνονται πολλαπλές ενέσεις προτύπου διαλύματος του αναλύτη και ελέγχεται η %RSD, ενίεται ένα μίγμα ουσιών και ελέγχεται η διαχωριστικότητα στο χειρίστο ζεύγος, και ελέγχεται επίσης ο αριθμός θεωρητικών πλακών, ο παράγοντας συμμετρίας και πιθανόν το εμβαδόν της κορυφής του πρότυπου αναλύτη. Τα στοιχεία αυτά αρχειοθετούνται.

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ / ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ HPLC

Κατά την επικύρωση / επαλήθευση μιας μεθόδου HPLC εξετάζονται τα παρακάτω χαρακτηριστικά ποιότητας:

- 1) Εκλεκτικότητα: Εξετάζεται η επίδραση του μητρικού υλικού στον προσδιορισμό του αναλύτη. Στοιχεία που το αποδεικνύουν είναι η διαχωριστότητα (R_s) και η καθαρότητα κορυφής (peak purity) στην περίπτωση φασματοφωτομετρικών ανιχνευτών.
- 2) Ανιχνευσιμότητα: Προσδιορίζεται το όριο ανίχνευσης (Detection Limit, LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit, LOQ). Κυρίως χρησιμοποιείται ο λόγος σήματος προς θόρυβο (LOD συγκέντρωση αναλύτη που έχει $S/N = 3,3$, LOQ συγκέντρωση αναλύτη που έχει $S/N =$

- 10). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί η τυπική απόκλιση των αναλύσεων SD ενός αραιού δείγματος, το τυπικό σφάλμα (S_a) της τομής της καμπύλης αναφοράς και η τυπική αποκλιση των υπολοίπων ($S_{y/x}$) της καμπύλης αναφοράς. Σε όλες τις περιπτώσεις LOD είναι ησυγκέντρωση που έχει αναλυτικό σήμα ίσο με 3,3 φορές το SD ή S_a ή $S_{y/x}$.
- 3) Γραμμικότητα: Ελέγχεται ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient, r) της καμπύλης βαθμονόμησης και η καλή προσαρμογή των σημείων της καμπύλης στο γραμμικό μοντέλο. Τίθενται προδιαγραφές για την τιμή r.
 - 4) Πιστότητα (Precision): Ελέγχεται η %RSD σε διάφορα επίπεδα από την ανάλυση του ίδιου δείγματος σε συνθήκες επαναληψιμότητας (repeatability) και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (intra-laboratory reproducibility) ή ενδιάμεσης πιστότητας (intermediate precision). Οι συνθήκες επαναληψιμότητας απαιτούν ίδιο όργανο, ίδιος αναλυτής και βραχύ χρονικό διάστημα. Οι συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας απαιτούν μακρύ χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 3 διαφορετικές ημέρες) και εάν είναι δυνατόν διαφορετικά όργανα και αναλυτές.
 - 5) Ευαισθησία: Εκφράζεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς και σχετίζεται με την ανιχνευσιμότητα. Υψηλή ευαισθησία συνεπάγεται συνήθως μικρό όριο ανίχνευσης.
 - 6) Ανθεκτικότητα (ευστάθεια) (robustness ή ruggedness) (Υπάρχει μια σύγχυση όσον αφορά το χρησιμοποιούμενο όρο): Ελέγχεται η επίδραση μικρών σκοπούμενων μεταβολών των πειραματικών παραμέτρων (σύσταση κινητής φάσης, ταχύτητα ροής, θερμοκρασία στήλης, παράμετροι ανιχνευτή (π.χ. μήκος κύματος)). Ο έλεγχος αυτός απαιτεί ένα πειραματικό σχεδιασμό και χρησιμοποιούνται χημειομετρικές προσεγγίσεις για το βαθμό επίδρασης κάθε παραμέτρου. Από τη μελέτη αυτή θα φανεί σε ποιές πειραματικές παραμέτρους είναι ευαίσθητη (δεν έχει ανθεκτικότητα) η μέθοδος και θα τεθούν όρια ανοχής των παραμέτρων αυτών.
 - 7) Ακρίβεια (Accuracy): Υπολογίζεται το σφάλμα ή η ανάκτηση (recovery) από την εφαρμογή της μεθόδου σε πιστοποιημένα υλικά αναφοράς, ή ενισχυμένα λευκά δείγματα. Η ακρίβεια της μεθόδου ελέγχεται επίσης με συμμετοχή σε διεργαστηριακά ή σύγκριση με άλλη πρότυπη μέθοδο (εάν υπάρχει).

Τα χαρακτηριστικά που προσδιορίζονται από την επικύρωση / επαλήθευση συγκρίνονται με προδιαγραφές (απαιτήσεις προτύπων, απαιτήσεις κανονισμών, απαιτήσεις σκοπούμενης χρήσης) και εάν ικανοποιούν τις προδιαγραφές το Εργαστήριο προβαίνει σε δήλωση καταλληλότητας της μεθόδου (fitting to purpose).

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ

Η αβεβαιότητα μιας μεθόδου HPLC υπολογίζεται λαμβάνοντας υπόψη την αβεβαιότητα τύπου A (από δεδομένα πολλαπλών αναλύσεων ενός δείγματος σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας) και συνιστώσες τύπου B (πιστοποιητικό διακρίβωσης ζυγού, πιστοποιητικά σιφωνίων και ογκομετρικών σκευών, πιστοποιητικά προτύπων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς και το σφάλμα υπολογισμού αγνώστου από την καμπύλη αναφοράς).

ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Εάν η φύση του αναλυόμενου δείγματος επιτρέπει τη φύλαξή του σε μακρύ χρονικό διάστημα χρησιμοποιείται πιστοποιημένο υλικό αναφοράς ή ενισχυμένο λευκό δείγμα ή ένα άγνωστο δείγμα στο οποίο προσδιορίζεται η τιμή αναφοράς με πολλαπλές αναλύσεις και υπολογισμό της τυπικής απόκλισης. Το δείγμα ελέγχου αναλύεται σε τακτά χρονικά διαστήματα και οι μετρήσεις χρησιμοποιούνται για την κατασκευή του διαγράμματος ελέγχου (control chart). Σε περίπτωση ασταθών δειγμάτων χρησιμοποιείται η ενίσχυση ενός αγνώστου δείγματος κατά την ημέρα της ανάλυσης ή η διπλή ανάλυση (έτσι ανιχνεύεται μόνο το τυχαίο σφάλμα).

ΡΥΘΜΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Κατά την εφαρμογή μιας πρότυπης ή επίσημης μεθόδου HPLC σε ένα Εργαστήριο είναι δυνατόν να μην ανταποκρίνεται στις προδιαγραφές των απαιτήσεων, οπότε απαιτείται ρύθμιση των χρωματογραφικών συνθηκών. Στην περίπτωση του ελέγχου φαρμάκων, τέθηκαν από τη Φαρμακοποιία οι παρακάτω δυνατότητες ρυθμίσεων, που μπορούν να βρουν εφαρμογή και σε άλλους τομείς ελέγχου.

- 1) Σύσταση κινητής φάσης: Το ποσοστό του μικρότερου συστατικού μπορεί να ρυθμιστεί $\pm 30\%$ (σχετικά) ή $\pm 2\%$ (απόλυτα), όποιο είναι μεγαλύτερο. Κανένα άλλο συστατικό δεν μεταβάλλεται πέραν του 10% (απόλυτα).
- 2) pH υδατικού συστατικού κινητής φάσης: $\pm 0,2$ μονάδες pH και $\pm 1,0$ μονάδα pH στην περίπτωση ουδέτερων ουσιών.
- 3) Συγκέντρωση αλάτων ρυθμιστικού συστατικού κινητής φάσης: $\pm 10\%$.
- 4) Μήκος κύματος ανιχνευτή: Δεν επιτρέπεται μεταβολή.
- 5) Στατική φάση:
 - a. Μήκος στήλης: $\pm 70\%$
 - b. Εσωτερική διάμετρος στήλης: $\pm 25\%$
 - c. Μέγεθος σωματιδίων: μέγιστη μείωση 50% , δεν επιτρέπεται αύξηση.
- 6) Ταχύτητα ροής: $\pm 50\%$. Εάν έχει τεθεί ο αριθμός θεωρητικών πλακών ως έλεγχος καταλληλότητας συστήματος δεν επιτρέπεται μεταβολή της ταχύτητας ροής.
- 7) Θερμοκρασία: $\pm 10\%$ μέχρι μέγιστο $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 8) Όγκος ενιέμενου δείγματος: Μπορεί να μειωθεί εάν η ανίχνευση και η επαναληψιμότητα των κορυφών είναι ικανοποιητικές.
- 9) Βαθμιδωτή έκλυση: Η συνδεσμολογία του συστήματος μπορεί να μεταβάλει τη διαχωριστικότητα και τις σχετικές συγκρατήσεις λόγω αυξημένο νεκρού όγκου.