

di Antonella Siviero, Achille Cappiello, Giorgio Famiglini,
Filippo Mangani, Pierangela Palma
Istituto di Scienze Chimiche "F. Bruner"
Università di Urbino "Carlo Bo". asiviero@uniurb.it

UN NUOVO GENERATORE DI GRADIENTI PER MICRO- E NANO-HPLC



È descritto un nuovo sistema per generare gradienti di fase mobile a micro- e nano-flussi a partire da un Hplc convenzionale. Questo sistema si basa sull'impiego di una valvola multiposizione dotata di sei reservoir, ognuno dei quali viene riempito con una specifica composizione di fase mobile. Comandando elettronicamente la valvola, viene trasferita in colonna una sequenza di frazioni a diversa composizione di fase mobile e si ottengono gradienti accurati e riproducibili di varia forma (lineare, concava o convessa), per soddisfare le diverse esigenze di analisi.

Negli ultimi decenni, si è assistito ad una progressiva miniaturizzazione dei sistemi Hplc sia nelle dimensioni fisiche sia nei flussi di fase mobile utilizzati. L'abbandono della cromatografia liquida convenzionale, che comunque mantiene ancora un ruolo da protagonista, è motivato dai seguenti vantaggi: il minore consumo di solventi; la riduzione dei volumi d'iniezione e, quindi, la possibilità di lavorare con basse quantità di campione; il miglioramento dei limiti di rivelabilità in rivelatori sensibili alla concentrazione degli analiti, grazie alla minore diluizione del soluto in colonna e all'incremento del rapporto segnale-fondo dei picchi cromatografici (1, 2). Inoltre, nuove tecniche d'interfacciamento LC-MS impongono l'utilizzo di flussi sempre più bassi ($<1 \mu\text{L}/\text{min.}$) impiegati con colonne dal diametro interno $<150 \mu\text{m}$: una tale miniaturizzazione del sistema cromatografico viene comunemente indicata con il termine di "nano-Hplc". Uno dei problemi principali che si incontra lavorando a flussi molto ridotti consiste nella mancanza di una strumentazione affidabile in grado di generare gradienti di eluizione riproducibili, caratterizzati da un ritardo limitato nel trasporto dei solventi e da una miscelazione appropriata ed omogenea delle fasi mobili. Attualmente esistono in commercio (Agilent 1100; Ultimate LC Packings; CapLC Waters) dei sistemi Hplc in grado di soddisfare in parte queste aspettative. Il modo più economico e comune di ottenere flussi ridotti, condiviso dalla maggior parte di questi sistemi, consiste

nell'inserire un dispositivo di splittaggio tra la pompa e l'iniettore. I sistemi di splittaggio del flusso sono stati convenientemente utilizzati dal nostro gruppo di ricerca in molte applicazioni, anche in combinazione con la spettrometria di massa (3-6), tuttavia essi presentano delle limitazioni: innanzitutto, richiedono flussi superiori a quelli normalmente utilizzati in micro- e nano-Hplc; inoltre, si possono facilmente verificare delle distorsioni nel gradiente, causate da cambiamenti di pressione e conseguente alterazione del rapporto di splittaggio; infine, la variazione della composizione della fase mobile è trasferita alla colonna con un certo ritardo, penalizzando la separazione cromatografica. Negli ultimi anni, sono state proposte diverse soluzioni sperimentali (7-15) per superare tali difficoltà: nessun sistema tra quelli presentati si è, però, rivelato in grado di esercitare sul gradiente un controllo attento e preciso quanto quello fornito dai sistemi convenzionali ad alti flussi. In questo lavoro, viene descritto un nuovo sistema per la generazione di gradienti in micro- e nano-Hplc. Questo sistema è basato sull'uso di

una valvola multiposizione ed è realizzato in modo da poter essere facilmente adattato a qualsiasi Hplc convenzionale, convertendolo in un efficiente micro- o nano-Hplc.

La metodologia

Il cuore del nuovo generatore di gradienti è una valvola multiposizione, modello EMTCT6UW (Valco Instruments Co. Inc. Houston, TX), dotata di 14 porte, due delle quali costituiscono rispetti-

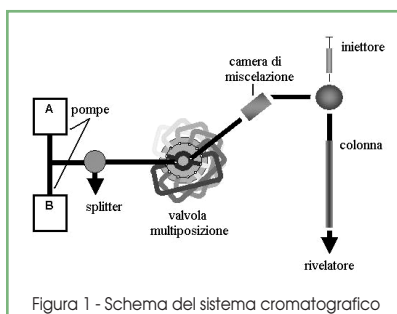


Figura 1 - Schema del sistema cromatografico

vamente l'entrata e l'uscita, mentre le altre 12 rappresentano i punti di connessione per 6 loop realizzate con dei tubicini di peek (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA) del diametro interno di 500 μm : le prime cinque loop hanno un volume di 50 μL , mentre la sesta ha un volume tre volte maggiore. Ogni loop viene riempita con una specifica composizione di fase mobile e all'ultima spetta solitamente la più alta concentrazione di solvente organico, ovvero la fase finale del gradiente in cromatografia a fase inversa: il suo maggiore volume, quindi, è necessario a garantire il completamento dell'analisi e la pulizia della colonna. In particolare, sono

state scelte per le sei loop le seguenti composizioni di fasi mobili: loop 1: 100% H_2O – 0% CH_3CN ; loop 2: 80% H_2O – 20% CH_3CN ; loop 3: 60% H_2O – 40% CH_3CN ; loop 4: 40% H_2O – 60% CH_3CN ; loop 5: 20% H_2O – 80% CH_3CN ; loop 6: 0% H_2O – 100% CH_3CN .

La valvola viene inserita, nell'ambito di un sistema cromatografico tradizionale, dopo il dispositivo di pompaggio e prima dell'iniettore, come illustrato in Figura 1. L'Hplc utilizzato è costituito da una doppia pompa Kontron Instruments 422 (Milano, Italia); i micro- e nano-flussi sono stati ricavati inserendo tra la pompa e la valvola un dispositivo di splittaggio realizzato con due capillari di silice fusa di diametro interno pari a 50 μm , collegati in serie e seguiti da una colonna di contropressione delle stesse caratteristiche di quelle utilizzate per le separazioni cromatografiche. In particolare, per le prove a microflussi, è stata utilizzata una colonna di lunghezza di 25 cm e diametro interno di 250 μm , impaccata nel nostro laboratorio con particelle

C18 da 5 μm ; per le prove a nanoflussi, invece, è stata utilizzata una colonna Zorbax 300 SB, di lunghezza di 15 cm e diametro interno di 100 μm , contenente particelle C18 da 3 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Durante la fase di riempimento delle loop, l'uscita della valvola viene collegata ad uno scarico, mentre la sua entrata viene collegata direttamente alla pompa, attraverso una valvola a due posizioni: in questo modo, è possibile utilizzare un flusso più alto (~1 mL/min.) e velocizzare così la procedura.

Terminato il riempimento delle loop, la valvola viene ricollegata allo splitter e all'iniettore e, da questo momento in poi, rimane in funzione unicamente la pompa dell'acqua. Il basso flusso di acqua in arrivo dallo splitter ricarica continuamente la loop 1 per il condizionamento della colonna, fino a quando ha inizio la corsa cromatografica: a questo

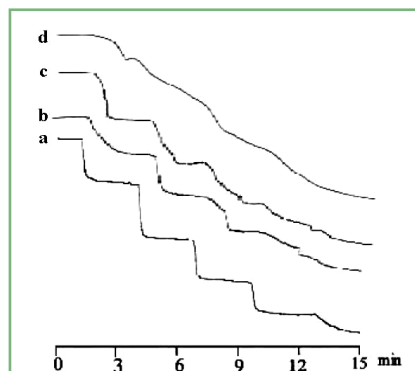


Figura 2 - Gradienti di 12 minuti dal 100% di H_2O al 100% di CH_3CN ottenuti con la valvola multiposizione al flusso di a) 2 $\mu\text{L}/\text{min.}$, b) 700, c) 500 e d) 300 nL/min.

punto la valvola viene attivata e, attraverso un dispositivo elettronico gestito manualmente o tramite computer, si seleziona la loop 2, il cui contenuto, a maggiore forza eluente, viene introdotto in colonna. Questa loop viene mantenuta on-line con la colonna per un determinato intervallo di tempo, in funzione del tipo di gradiente desiderato. Lo stesso processo viene ripetuto successivamente, fino a quando si seleziona l'ultima loop: in questo modo, attraverso il trasferimento in colonna di una sequenza di precise frazioni di fase mobile, si genera il gradiente. Una volta riempite, le loop sono in grado di soddisfare diverse prove consecutive, a seconda del flusso utilizzato e del tipo di gradiente scelto: infatti, l'acqua in arrivo

dallo splitter spinge sul liquido contenuto al loro interno senza creare mescolamento, a causa del basso flusso utilizzato e del ridotto diametro delle loop. In Figura 2 vengono riportati i gradienti di 12 minuti dal 100% di H_2O al 100% di CH_3CN ottenuti con la valvola multiposizione a diversi flussi. La variazione della composizione della fase mobile è stata monitorata ad una lunghezza d'onda di 260 nm, utilizzando un rivelatore UV Spectra 100 (Spectra-Physics, San Josè, CA): per evidenziare la differenza di assorbanza tra i due solventi, è stato aggiunto all'acqua dell'acetone in quantità dello 0,5%. La curva (a) è relativa ad un flusso di 2 $\mu\text{L}/\text{min.}$ ed è evidente un caratteristico andamento a scalini: questo rivela delle improvvise variazioni nella composizione della fase mobile e, quindi, nella polarità dei solventi, che possono influenzare la separazione cromatografica, sia in termini di risoluzione che di riproducibilità. Le curve (b) e (c) si riferiscono a flussi rispettivamente di 700 e 500 nL/min. dove, sebbene molto atten-

nuato, è ancora presente un andamento a scalini. La curva (d) mostra il profilo ottenuto ad un flusso di 300 nL/min.: a flussi così ridotti, il mescolamento dei solventi all'interno delle connessioni del sistema è sufficiente a garantire una variazione meno brusca della fase mobile.

Per favorire ad ogni flusso una miscelazione completa dei solventi in arrivo dalle loop, è stata introdotta una camera di miscelazione tra la valvola e l'iniettore. Il volume di questa camera deve essere scelto in funzione del flusso operativo e deve essere tale da contenere al suo interno simultaneamente tre diverse composizioni di solventi: studi di fluidodinamica hanno, infatti, rivelato che solo in questo modo è possibile arrivare ad una completa eliminazione degli scalini. Per mettere a punto una camera di miscelazione opportuna, sono stati effettuati diversi tentativi (16); i risultati migliori si sono ottenuti utilizzando una connessione

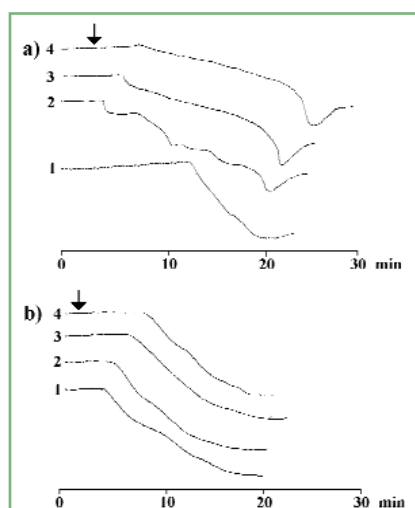


Figura 3 - Gradienti di 18 minuti dal 100% H_2O al 100% CH_3CN ottenuti con a) il sistema convenzionale e con b) la valvola multiposizione, al flusso di 1) 2 $\mu\text{L}/\text{min.}$, 2) 700, 3) 500 e 4) 300 nL/min. Le frecce indicano l'inizio del gradiente

VALORI DI DEVIAZIONE STANDARD RELATIVA DEI TEMPI DI RITENZIONE

Composto	Tempo di ritenzione (min.)											RSD (%)
	inj 1	inj 2	inj 3	inj 4	inj 5	inj 6	inj 7	inj 8	inj 9	inj 10	$\bar{x}$	
19-Nortestosterone	25,15	24,94	25,02	25,03	25,02	25,02	25,18	25,40	25,08	24,99	25,08	0,50
Testosterone	26,23	26,12	26,40	26,63	26,20	26,10	26,57	27,64	26,20	26,42	26,45	1,63
17-Metilttestosterone	27,07	27,85	27,41	27,88	27,38	27,32	27,87	28,04	27,42	27,74	27,60	1,09
Dietilstilbestrolo	28,40	28,58	28,48	28,57	28,53	28,68	28,65	28,77	28,57	28,63	28,59	0,35
Medrossiprogesterone acetato	30,34	31,27	31,31	31,15	31,04	31,28	31,45	31,60	31,36	31,25	31,20	1,03

(Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA), la cui apertura interna è stata aumentata e modificata, ricavando tre volumi, rispettivamente di 1, 3 e 5 μL , da utilizzare in funzione del flusso selezionato. Questo sistema, provato a micro- e a nanoflussi, si è rivelato particolarmente efficace e, dal confronto con i gradienti ricavati con un sistema convenzionale nelle stesse condizioni sperimentali, emerge che i gradienti che si ottengono con il nuovo dispositivo sono caratterizzati da una maggiore accuratezza, da un ritardo iniziale limitato e da un andamento che rispecchia più fedelmente quello previsto dalla teoria. In Figura 3, vengono raffrontati i gradienti di 18 minuti dal 100% di H_2O al 100% di CH_3CN ottenuti con i due sistemi a flussi di 2 $\mu\text{L}/\text{min.}$, 700, 500 e 300 $\text{nL}/\text{min.}$ Di conseguenza, le analisi di miscele complesse effettuate utilizzando la nuova valvola mostrano sempre, indipendentemente dalla durata del gradiente e dal flusso impostati, una maggiore risoluzione ed una migliore distribuzione e separazione dei picchi rispetto a quelle ricavate con il sistema tradizionale. In Figura 4, viene riportato il confronto della separazione di una miscela di ormoni effettuata ad un flusso di 500 $\text{nL}/\text{min.}$ con un gradiente di 18 minuti dal 100% di H_2O al 100% di CH_3CN , utilizzando sia il sistema convenzionale che il nuovo dispositivo.

lare con interfaccia Direct-El (17-19): è stata calcolata, per i vari composti, la deviazione standard relativa dei tempi di ritenzione e i valori trovati, riportati nella Tabella, si mantengono sempre inferiori al 2%, indicando un'ottima riproducibilità.

Forma del gradiente

Il funzionamento del nuovo dispositivo consente di ottenere gradienti di diversa forma, da adattare alle varie esigenze di separazione. Infatti, assegnando alle singole loop intervalli di tempo differenti e considerando che intervalli di tempo brevi corrispondono a rapide variazioni nella composizione della fase mobile mentre intervalli di tempo lunghi corrispondono a variazioni più lente, è possibile ricavare gradienti concavi e convessi (16). In Figura 5 viene riportata la separazione di una miscela di nitro-IPA, effettuata ad un flusso di 250 $\text{nL}/\text{min.}$ utilizzando un gradiente di 30 minuti dal 100% di H_2O al 100% di CH_3CN rispettivamente lineare, concavo e convesso: il gradiente lineare comporta la sovrapposizione quasi completa del secondo e del terzo picco con una durata di analisi di circa 30 minuti; i gradienti concavo e convesso, invece, consentono di ottenere una separazione soddisfacente, anche se non completa, dei due picchi in questione con un tempo di analisi rispettivamente più breve e più lungo. Quindi, con la valvola è possibile esercitare un

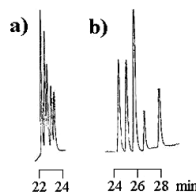


Figura 4 - Separazione di una miscela di ormoni ad un flusso di 500 $\text{nL}/\text{min.}$, utilizzando un gradiente di 18 minuti dal 100% di H_2O al 100% di CH_3CN con a) il sistema convenzionale e con b) la valvola multiposizione. In ordine di eluizione: 19-nortestosterone, testosterone, metilttestosterone, dietilstilbestrolo, medrossiprogesterone acetato. Volume di iniezione 60 nL . Rivelatore UV, $\lambda=254\text{ nm}$

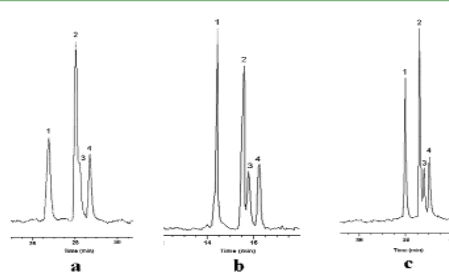


Figura 5 - Separazione di una miscela di 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ di nitro-IPA effettuata ad un flusso di 250 $\text{nL}/\text{min.}$ utilizzando un gradiente di 30 minuti dal 100% di H_2O al 100% di CH_3CN a) lineare, b) concavo e c) convesso. 1=1,8 dinitronaftalene, 2=2,2' dinitrobenzile, 3=1,5 dinitronaftalene, 4=1,3 dinitronaftalene. Volume di iniezione 60 nL . Rivelatore: spettrometro di massa quadrupolare con interfaccia Direct-El

A New Gradient Generator for Micro- and Nano-Hplc

We describe a new, simple device, based on the use of a 14-port switching valve, for the generation of accurate micro- and nanoflow gradients from any conventional Hplc system. The valve hosts six loops, each one filled with a selected mixture of eluents. A specific solvent gradient is generated through a sequence of controlled segments of a precise mobile-phase compositions, producing different gradient shapes for different separation needs. The new device has proven to be reliable and reproducible even at the lowest flow rate tested (200 $\text{nL}\cdot\text{min.}^{-1}$).

ABSTRACT

attento controllo sulla forma del gradiente ed ottimizzare quest'ultima in funzione della qualità della separazione e dei tempi di ritenzione.

Conclusioni

Le moderne interfacce cromatografia liquida-spettrometria di massa (Hplc/MS) richiedono gradienti di eluizione a flussi di fase mobile particolarmente ridotti ($<1 \mu\text{L}/\text{min.}$), per ottenere una sempre maggiore sensibilità e ridurre i rischi di contaminazione. A questo proposito, i risultati esposti in questo lavoro evidenziano che la nuova valvola multiposizione rappresenta un dispositivo efficace e conveniente per la generazione di micro- e nano-gradienti, offrendo, inoltre, il vantaggio di poter essere facilmente adattata ad Hplc convenzionali. Con questo nuovo sistema è possibile ottenere gradienti di diverso tipo caratterizzati da un'alta riproducibilità e rapidità anche a flussi di poche centinaia di nanolitri/minuto, grazie al fine controllo che esercita sulla distribuzione della fase mobile durante l'intera analisi cromatografica. Esso si pone, quindi, come valida ed economica alternativa ai sistemi attualmente presenti in commercio, creando le condizioni ottimali per l'accoppiamento con la spettrometria di massa e lo sviluppo di metodi per la determinazione di composti di interesse ambientale e biologico in varie matrici.

Bibliografia

- (1) K. Jinno, C. Fujimoto, *LC-GC*, 1989, **7**, 328.
- (2) K. Jinno, *Chromatographia*, 1988, **25**, 1004.
- (3) A. Berloni *et al.*, *Chromatographia*, 1994, **39**, 279.
- (4) A. Cappiello *et al.*, *Chromatographia*, 1990, **30**, 477.
- (5) A. Cappiello, F. Bruner, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1281.
- (6) A. Cappiello *et al.*, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 3841.
- (7) D. Ishii *et al.*, *J. Chromatogr.*, 1977, **144**, 157.
- (8) T. Takeuchi, D. Ishii, *J. Chromatogr.*, 1981, **218**, 199.
- (9) T. Takeuchi, D. Ishii, *J. Chromatogr.*, 1982, **253**, 41.
- (10) T. Takeuchi, D. Ishii, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1983, **6**, 310.
- (11) V. Berry *et al.*, *J. Liq. Chromatogr.*, 1986, **9**, 1529.
- (12) H. Bauer, *Chromatographia*, 1989, **28**, 289.
- (13) Z. Zhang, A. Marshall, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1998, **21**, 291.
- (14) C.E. Doneanu *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2001, **12**, 1205.
- (15) T. Le Bihan *et al.*, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1307.
- (16) A. Cappiello *et al.*, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 1173.
- (17) A. Cappiello *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2002, **13**, 265.
- (18) A. Cappiello *et al.*, *Mass Spectrom. Rev.*, 2001, **20**, 88.
- (19) A. Cappiello *et al.*, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 497A.