



Tạp chí Khoa học và Kinh tế Phát triển
Trường Đại học Nam Cần Thơ

Website: jsde.nctu.edu.vn



PHƯƠNG PHÁP UHPLC VÀ MỘT SỐ VẤN ĐỀ LIÊN QUAN

Huỳnh Phương Thảo¹

¹Khoa Dược, Trường Đại học Nam Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Huỳnh Phương Thảo (email: hpthao@nctu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 18/10/2022

Ngày phản biện: 15/11/2022

Ngày duyệt đăng: 10/12/2022

Title: UHPLC method and
some related issues

Keywords: drug
development, life sciences,
liquid chromatography,
UHPLC

Từ khóa: khoa học đời
sống, phát triển thuốc, sắc
ký lỏng hiệu năng cao, sắc
ký lỏng siêu cao áp

ABSTRACT

High performance liquid chromatography (HPLC) is a popular analytical method in the pharmaceutical, cosmetic, food, and environmental fields. The need for life sciences and drug development is driving HPLC techniques towards higher resolution, sensitivity, and throughput. Ultra high-pressure liquid chromatography (UHPLC) is a major innovation in modern HPLC, setting a new standard of performance for faster analysis, higher resolution, and improved precision. The article provided some basic information related to the UHPLC system.

TÓM TẮT

Sắc ký lỏng hiệu năng cao (High performance liquid chromatography, HPLC) là phương pháp phân tích phổ biến trong lĩnh vực dược phẩm, mỹ phẩm, thực phẩm và môi trường. Nhu cầu phát triển khoa học đời sống và phát triển thuốc đang thúc đẩy kỹ thuật HPLC hướng tới độ phân giải, độ nhạy và thông lượng cao hơn. Kỹ thuật sắc ký lỏng siêu cao áp (Ultra high-pressure liquid chromatography, UHPLC) là bước cải tiến quan trọng của kỹ thuật HPLC hiện đại, thiết lập một tiêu chuẩn mới về hiệu năng để phân tích nhanh hơn, độ phân giải cao hơn với độ chính xác được cải thiện. Bài viết cung cấp một số thông tin cơ bản liên quan đến hệ thống UHPLC.

1. GIỚI THIỆU

Sắc ký lỏng là một trong những kỹ thuật phân tích được sử dụng rộng rãi hiện nay. Trong vài năm qua, một số cải tiến đáng kể đã được đưa ra để thực hiện các phân tích thông lượng cao và hiệu quả cao do nhu cầu xử lý số lượng phân tích ngày càng tăng và các mẫu ngày càng phức tạp hơn [1]. Lĩnh vực được phẩm, với nhu cầu nâng cao năng suất và giảm chi phí, là một trong các động lực chính thúc đẩy quá trình phân tích nhanh hơn. Sự phân tách hiệu quả cao cũng cần thiết cho nhiều ứng dụng, bao gồm proteomics, phân tích dịch chiết được liệu và chất chuyển hóa, tất cả đều xử lý các mẫu rất phức tạp. Với các mẫu khác nhau như vậy, hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography, HPLC) thông thường có một số hạn chế rõ ràng. Trong số các chiến lược khác nhau được sử dụng để đạt được sự phân tách nhanh và độ phân giải cao, sắc ký lỏng siêu cao áp (Ultra-high-pressure liquid chromatography, UHPLC) đã nhanh chóng được công nhận là một công cụ phân tích mạnh mẽ [2].

2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hệ thống UHPLC thương mại đầu tiên, Acquity UPLC, được giới thiệu bởi Waters Corporation vào năm 2004. UPLC là từ viết tắt của “Ultra performance liquid chromatography”, sắc ký lỏng siêu hiệu năng, là tên thương mại được đăng ký độc quyền của hãng Waters và cũng là hệ thống UHPLC đầu tiên được giới thiệu ra thị trường. Nó được trang bị một máy bơm nhệ phân với giới hạn áp suất là 15.000 psi, một bộ lấy mẫu tự động và một đầu dò dây diode quang (PDA) với tế bào dòng PDA 0,5 μ L [3]. Hệ thống được giới thiệu cùng với cột C18 và C8 có đường kính trong 2,1 và 1,0 mm, được nhồi các hạt pha tĩnh lại

1,7 μ m. Ngày nay, quá trình chuyển đổi từ HPLC sang UHPLC đã hoàn tất với việc tất cả các nhà sản xuất lớn đều cung cấp hệ thống UHPLC có khả năng tạo áp suất hệ thống từ 15.000 đến 22.000 psi [3]. Áp suất hệ thống cao hơn cho phép sử dụng các cột chứa các hạt pha tĩnh rất nhỏ để phân tách nhanh hơn và tốt hơn các mẫu phức tạp.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kích thước hạt pha tĩnh

Trong sắc ký lỏng (LC), người ta thấy rõ rằng việc giảm kích thước hạt (d) có thể cải thiện hiệu quả sắc ký. Việc giảm d cho phép phân tách nhanh hơn cũng như tăng số lượng đĩa lý thuyết của cột. Đã có sự phát triển liên tục trong việc giảm kích thước hạt pha tĩnh mà đỉnh điểm là việc thương mại hóa các cột chứa các hạt nhỏ hơn 2 μ m. Những hạt nhỏ này đã cải thiện đáng kể hiệu quả phân tích vì số đĩa lý thuyết (N) và vận tốc tuyến tính pha động tối ưu (u) đều tỷ lệ nghịch với đường kính hạt d_p .

Năm 2004, hạt silica xốp đầu tiên có kích thước hạt dưới 2 μ m đã được thương mại hóa (1,7 μ m), cho phép độ phân giải tốt hơn so với hạt 5 μ m hoặc 3,5 μ m trước đây khi sử dụng hệ thống HPLC. Hiệu suất động học được cải thiện đáng kể khi giảm kích thước hạt từ các cột HPLC thông thường chứa các hạt 5 μ m xuống các hạt nhỏ hơn 2 μ m. Một cột dài 50 mm chứa các hạt nhỏ hơn 2 μ m có thể cung cấp 10.000 đĩa lý thuyết, tương đương với chiều dài cột 150 mm được nhồi các hạt 5 μ m [2]. Ngoài ra, vận tốc tuyến tính của pha động được tăng lên với các hạt nhỏ hơn và có thể phân tích nhanh hơn ba lần khi sử dụng các hạt nhỏ hơn 2 μ m so với 5 μ m [2]. Cuối cùng, lực cản chuyển khối được giảm đáng kể, cho phép các cột làm việc với vận tốc tuyến tính cao hơn vận tốc tối ưu mà không ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả phân tích. Do các

đặc điểm động học này, thời gian phân tích có thể được giảm đi 9 lần, với hiệu suất tương tự giữa HPLC (150 mm, 5 μ m) và UHPLC (50 mm, 1,7 μ m) ở vận tốc tuyến tính tối ưu [2]. Mặt khác, có thể tăng chiều dài cột để có hiệu quả tốt hơn mà không làm tăng thời gian phân tích so với quy trình HPLC. Tuy nhiên, những cột này chứa nhiều hạt pha tĩnh nhỏ tạo ra áp suất ngược cao (> 400 bar) thường không tương thích với thiết bị HPLC thông thường. Trong các điều kiện tốc độ tối ưu, các hạt 1,7 μ m tạo ra áp suất cao hơn 25 lần so với các hạt 5 μ m cho cùng chiều dài cột [2]. Giới hạn áp suất ngược của HPLC thông thường ở 400 bar có thể trở thành một vấn đề và cần phải sử dụng các hệ thống LC chuyên dụng chịu được áp suất cực cao. Ngày nay hệ thống UHPLC có thể chịu được áp suất lên đến 1.500 bar.

3.2 Các yêu cầu về hệ thống

Hiện nay, có rất nhiều lựa chọn về thiết bị chịu được áp suất trên 400 bar từ nhiều nhà sản xuất khác nhau. Về việc lựa chọn một hệ thống UHPLC, chi phí chắc chắn là một yếu tố quyết định cần được cân nhắc, nhưng cũng cần phải xem xét thông số kỹ thuật của tất cả các thiết bị hiện có trên thị trường vì chúng không tương đương nhau. Đặc điểm quan trọng nhất là giới hạn áp suất trên và tỷ lệ dòng tương ứng, điều này xác định giá của một hệ thống UHPLC. Đối với các hệ thống thương mại, áp suất tối đa thay đổi trong khoảng 600 đến 1.500 bar. Để phân tách nhanh hoặc cực nhanh các hỗn hợp đơn giản, việc sử dụng các hạt nhỏ là cần thiết, nhưng không nhất thiết phải làm việc với áp suất cực cao. Đối với các thí nghiệm thông lượng cao, các thiết bị UHPLC với giới hạn áp suất khoảng 600-800 bar có thể cung cấp một giải pháp phù hợp với mức giá hợp lý. Mặt khác, để phân tách có độ phân giải cao, một hệ thống có

áp suất trên cực cao là cần thiết khi làm việc ở một tốc độ dòng phù hợp [2].

Bên cạnh khả năng áp suất của thiết bị, điều quan trọng là thiết bị phải được điều chỉnh để hoạt động ở chế độ nhanh và cực nhanh với thể tích cột giảm. Các cột có đường kính nhỏ (đường kính trong 1 và 2,1 mm) thường được sử dụng trong UHPLC yêu cầu thể tích ngoài cột nhỏ, bao gồm thể tích đầu dò, thể tích ống dẫn và thể tích tiêm mẫu. Thể tích của các ống nối phải được giảm đáng kể. Vì lý do này, chiều dài ống phải càng ngắn càng tốt và đường kính của nó được chọn là sự thỏa hiệp giữa giảm áp suất có thể chấp nhận được và thể tích thấp. Thể tích tiêm mẫu phải được chọn phù hợp với cột. Một nguyên tắc chung là duy trì thể tích tiêm từ 1% đến 5% thể tích chết của cột ở chế độ đẳng dòng [2]. Vì hầu hết các phân tích với UHPLC được thực hiện với cột 50 $\times$ 2,1 mm ($V_0 = 120 \mu$ L), thể tích tiêm vào phải từ 1 đến 5 μ L, để hạn chế sự mở rộng dải. Ngoài ra, chu kỳ tiêm nhanh là cần thiết để thời gian phân tích thấp hơn 1 hoặc 2 phút.

Đối với đầu dò UV, thể tích đầu dò, hằng số thời gian và tốc độ ghi nhận tín hiệu phải được lựa chọn cẩn thận. Đầu dò lý tưởng được sử dụng trong UHPLC nên có thể tích tế bào đo thấp ($< 2 \mu$ L), trong khi độ nhạy không được thấp hơn so với thiết bị HPLC thông thường (độ dài đường dẫn 10 mm). Hằng số thời gian của đầu dò phải đủ nhanh (≤ 100 ms) vì độ rộng đỉnh trong UHPLC rất nhỏ (chỉ vài giây). Tốc độ ghi nhận mẫu của đầu dò UV phải cao đủ để thu được lượng điểm dữ liệu phù hợp cho mỗi đỉnh (> 20 Hz). Để giảm ảnh hưởng bất lợi của thể tích ngoài cột và tránh sự mất mát đáng kể về hiệu quả phân tích, các điều kiện sắc ký dẫn đến hệ số lưu giữ phù hợp (k ít nhất bằng 3) được khuyến nghị trong UHPLC [2].

Thông số quan trọng cuối cùng để thực hiện phân tách cực nhanh ở chế độ gradient là thể tích chờ của hệ thống, tương ứng với thời gian cần thiết để hỗn hợp dung môi đi đến đầu vào của cột. Để phân tích nhanh, cần phải có thể tích chờ gradient nhỏ. Với thể tích chờ lớn, sự phân tách nhanh bị ảnh hưởng vì một lượng dung môi đẳng dòng được tạo ra ở đầu giai đoạn gradient, có thể gây ra những thay đổi về độ chọn lọc và làm thời gian phân tích lâu hơn.

3.3 Loại pha tĩnh

Khi lựa chọn thiết lập cho hệ thống UHPLC, cần lựa chọn pha tĩnh có độ chọn lọc phù hợp cũng như hiệu suất và tuổi thọ có thể chấp nhận được. Năm 2004, hãng Waters ra mắt thể hệ cột lai mới được nhồi các hạt 1,7 μm có độ ổn định lên đến 1000 bar. Hạt liên kết ethylsiloxan/silica hybrid (BEH) có độ bền cơ học và hóa học cao trong khoảng pH rộng (1-12), chịu được áp suất và nhiệt độ cao lên đến 180 $^{\circ}\text{C}$ [2]. Nhiều nhà cung cấp khác cũng đã tạo ra các pha tĩnh có sẵn được nhồi các hạt nhỏ hơn 2 μm , tạo cơ hội chuyển hầu hết các phương pháp hiện có từ HPLC sang UHPLC. Sự đa dạng hóa học của pha tĩnh có thể giải quyết hầu hết các vấn đề phân tích: C8 và C18 phù hợp cho các hợp chất có độ phân cực trung bình; C4 và cyano cho hầu hết các chất phân tích không phân cực; diol, amino, silica, và sắc ký lỏng tương tác ưa nước (HILIC) cho các phân tử phân cực và biphenyl; perfluorophenyl hoặc zirconia cho phân tích thay thế chọn lọc [2]. Tất cả các pha tĩnh này không chỉ tương đương nhau về khả năng chịu áp suất (từ 600 đến 1.500 bar), kích thước hạt (từ 1,5 đến 2 μm) mà còn giống cả phạm vi pH và nhiệt độ. Ban đầu người ta cho rằng tuổi thọ của các cột được nhồi các hạt nhỏ hơn 2 μm thấp hơn so với các cột thông thường. Đúng là các cột UHPLC được sử dụng

thường xuyên ở áp suất rất cao, nhưng áp suất nhồi cột đã được tăng lên trong thời gian đó. Trong các phòng thí nghiệm, tuổi thọ của cột UHPLC và cột HPLC thông thường là tương đương nhau [2]. Tuổi thọ của cột có thể được biểu thị bằng số lần tiêm, số lượng thể tích cột hoặc khoảng thời gian được sử dụng. Với thể hệ cột mới nhất được nhồi các hạt nhỏ hơn 2 μm được thương mại hóa bởi các nhà cung cấp khác nhau, có thể thực hiện từ 500 đến 2000 lần tiêm hoặc thậm chí nhiều hơn trên một cột duy nhất [2]. Các giá trị này tương ứng với khoảng 5000-20.000 thể tích cột, hoàn toàn có thể so sánh với các giá trị thu được trên các cột HPLC tiêu chuẩn. Tuy nhiên, khi xét khoảng thời gian tương ứng, nó có thể thấp hơn đáng kể so với HPLC thông thường vì thông lượng của UHPLC cao hơn. Ví dụ, với một phân tích UHPLC trong vòng 1-5 phút, hàng trăm mũi tiêm có thể được thực hiện trong một ngày.

3.4 Ưu điểm của UHPLC

Tách nhanh với độ phân giải tốt có lẽ là lý do chính để hầu hết các nhà sản xuất cân nhắc mua thiết bị UHPLC. UHPLC có thể tăng thông lượng mẫu lên 3-5 lần so với HPLC thông thường trong khi vẫn duy trì độ phân giải tương tự [3], ví dụ 5 phút so với 20 phút để phân tích độ tinh khiết của một chất. Phân tích có độ phân giải cao cho các mẫu phức tạp cũng là ưu điểm quan trọng của UHPLC. Đối với việc phân tích các thuốc có nhiều thành phần hoạt tính, các sản phẩm từ thảo dược hay phân tích các mẫu dịch sinh học, dịch chiết dược liệu, các nền mẫu môi trường hay thực phẩm, tất cả đều cần một phương pháp có độ phân giải cao và UHPLC chính là một trong các giải pháp hiệu quả hiện nay.

Việc phát triển các phương pháp HPLC thường liên quan đến việc lựa chọn các cột và pha động ban đầu, sau đó là tinh chỉnh các điều

kiện sắc ký để đảm bảo tách biệt đầy đủ tất cả các chất phân tích theo yêu cầu định lượng chính xác. UHPLC, với thời gian phân tích ngắn hơn và cân bằng cột nhanh hơn, rất thích hợp cho quá trình phát triển phương pháp nhanh hơn. Với giới hạn áp suất tăng lên, UHPLC có thể linh hoạt trong việc phát triển nhiều phương pháp - từ phân tích siêu nhanh đến các phương pháp cần độ phân giải rất cao để định hình chi tiết các mẫu phức tạp, do đó cung cấp mức độ linh hoạt cao hơn cho các ứng dụng khác nhau.

Các lợi ích khác của UHPLC bao gồm tiết kiệm dung môi và độ chính xác cao hơn. UHPLC tiết kiệm đáng kể dung môi cho cả chi phí mua vào và thải bỏ. Việc sử dụng dung môi giảm 5-15 lần so với HPLC do thời gian phân tích ngắn hơn và sử dụng cột có đường kính trong nhỏ (2,1-3 mm so với 4,6 mm) [3]. Độ chính xác cho cả thời gian lưu và diện tích đỉnh trong UHPLC được tăng lên gấp hai đến ba lần so với HPLC thông thường [3]. Với các máy bơm được thiết kế tốt hơn, độ chính xác của thời gian lưu được cải thiện cho các lần chạy lặp lại trong cùng một ngày và trong một khoảng thời gian dài. Độ chính xác của diện tích đỉnh cao hơn do các bộ lấy mẫu tự động chính xác hơn. Hầu hết các bộ lấy mẫu tự động HPLC có khả năng đạt được mức độ chính xác của diện tích đỉnh là 0,2-0,5 % độ lệch chuẩn tương đối (RSD) đối với thể tích tiêm > 5 μ L. Độ chính

xác này được cải thiện lên 0,1-0,2 % RSD trong UHPLC ngay cả khi thể tích tiêm giảm xuống còn 1 μ L [3].

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

UHPLC là một phương pháp phân tích mạnh mẽ và dễ thực hiện, có thể tăng đáng kể thông lượng mẫu trong khi vẫn duy trì hiệu suất tương đương và tăng độ phân giải trong thời gian phân tích hợp lý. Điều quan trọng cần lưu ý là hiệu năng của UHPLC không chỉ dựa trên cột mà còn dựa trên chất lượng của hệ thống sắc ký. Vì vậy các phân tích trên UHPLC nên được thực hiện trên một hệ thống tương thích với áp suất siêu cao, có thể tích hệ thống và thể tích chờ phù hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Rouessac, F., & Rouessac, A. (2022). *General aspects of chromatography*. In *Chemical Analysis - Modern Instrumentation Methods and Techniques (3rd edition)*. John Wiley & Sons Inc, 2022, 1-35.
- [2] Michal Holcapek, M., & Byrdwell, W.C. (2017). *Handbook of advanced chromatography / mass spectrometry techniques*. AOCS Press, Elsevier Inc.
- [3] Dong, M. (2019). *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists (Second Edition)*. John Wiley & Sons Inc, 2019.