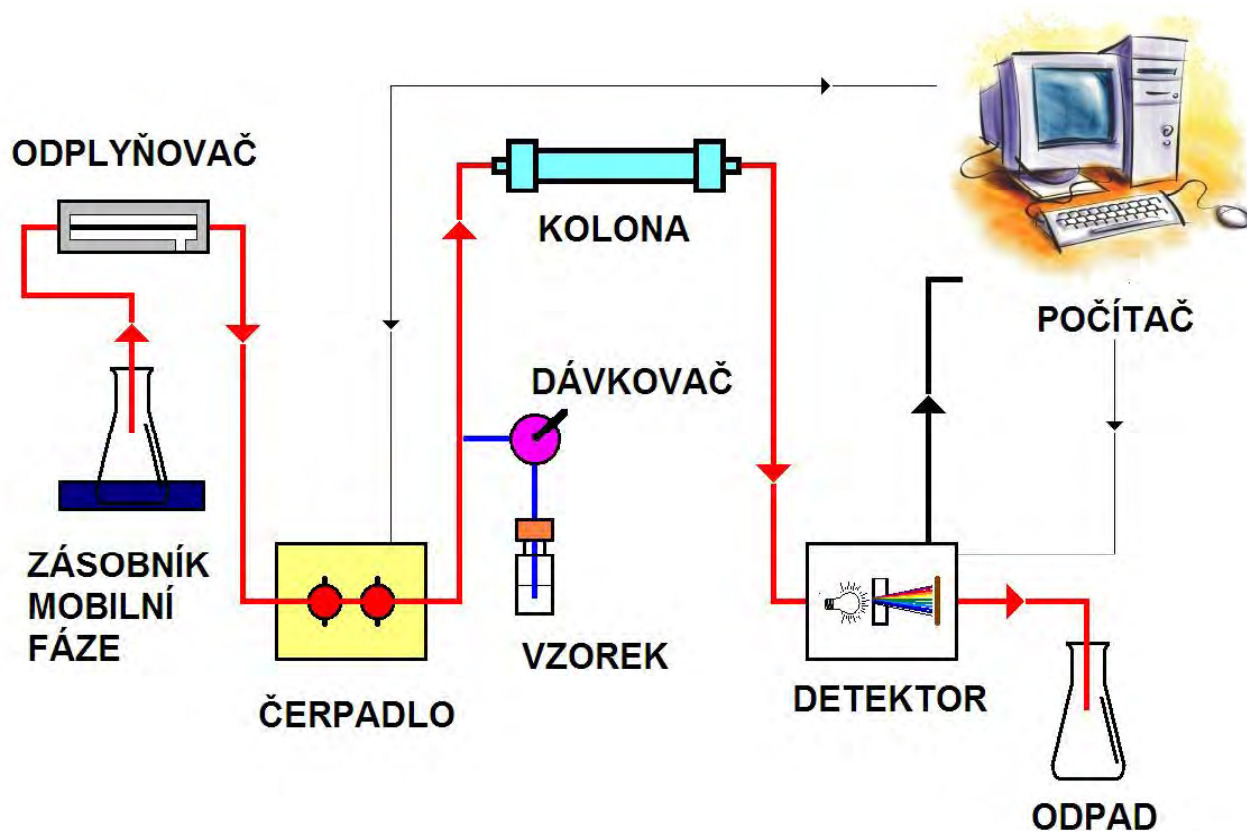


Instrumentace pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii

Josef Cvačka, 10.11.2010

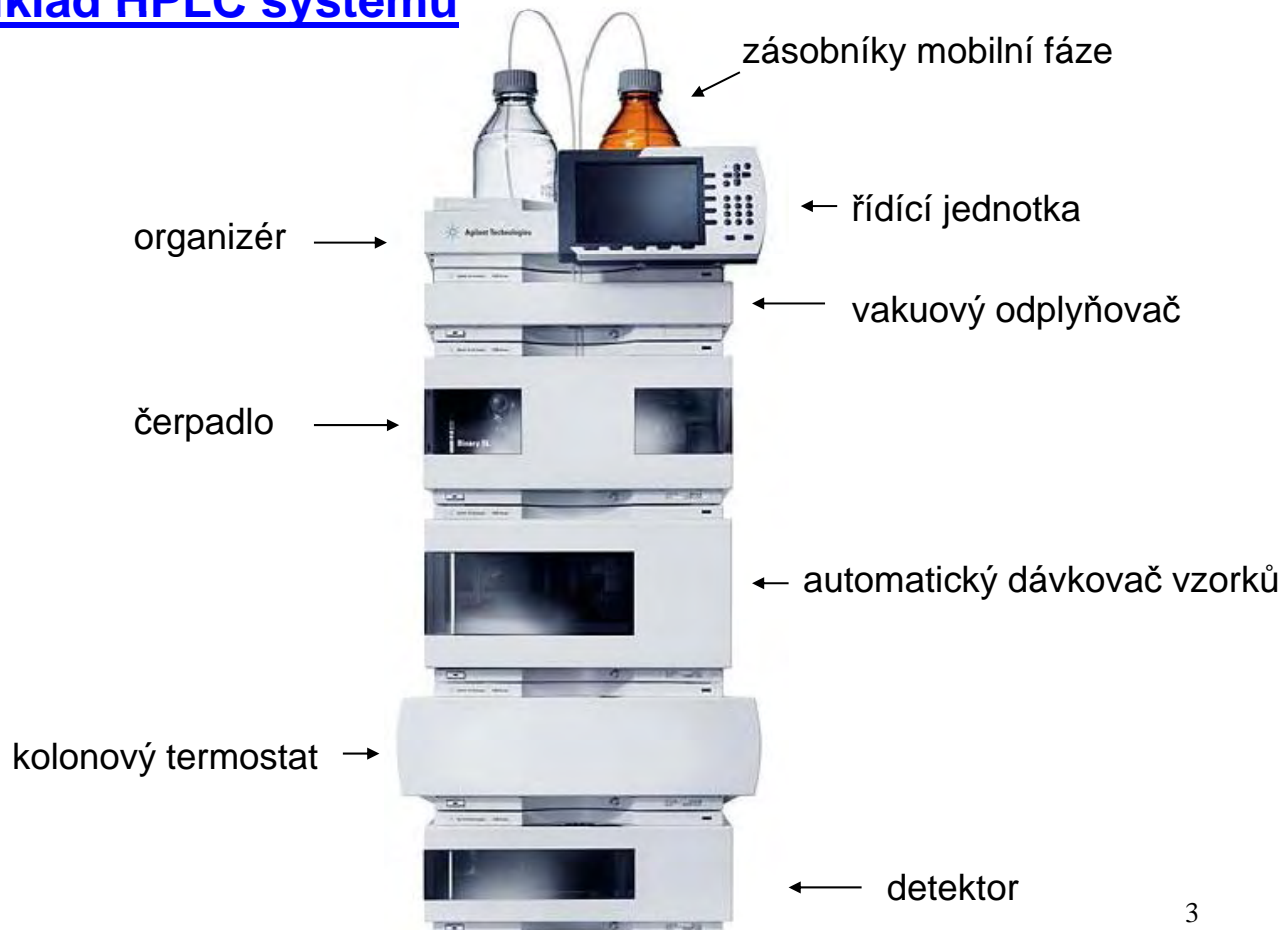
1

Schéma přístroje pro HPLC



2

Příklad HPLC systému



3

Zásobníky mobilní fáze

Nejčastěji skleněné nádoby objemu 0,1-2,5 l, opatřené ryskami a uzávěrem z inertního plastu s předvrtanými otvory pro teflonové hadičky 1/8".



Mobilní fáze se čerpá přes filtry odstraňující mechanické nečistoty. Velikost pórů 2-20 μm .

Plastový filtr pro biochromatografické aplikace.

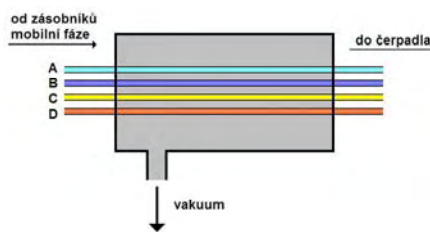


Nerezový (Hastalloy) filtr pro práci s halogenovanými rozpouštědly.

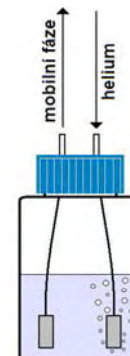


Odplyňovací zařízení

Membránové vakuové odplyňovače.
Mobilní fáze protéká semipermeabilní hadičkou umístěnou ve vakuu.



Héliové odplyňovače. Mobilní fáze se probublává heliem, které vytěsňuje rozpuštěné plyny. Rozpustnost He v rozpouštědlech je minimální.



Odplyňování filtrací za vakua nebo ultrazvukem.



Čerpadla mobilní fáze

HPLC (UHPLC) čerpadla pumpují mobilní fázi do systému. Umožňují programovat složení mobilní fáze v čase při gradientové eluci. Pracují při vysokých tlacích (HPLC do 400 bar, UHPLC do 1000 bar).

Pístová čerpadla: z principu pulsní tok, který je pomocí různých technických řešení převeden na bezpulzní. Využita ve většině HPLC systémů.

Stříkačková čerpadla: na bázi injekční stříkačky. Dokonale bezpulzní tok mobilní fáze. Pro speciální HPLC a UHPLC aplikace.

Jednotky tlaku v HPLC:

1 bar \approx 1 atm

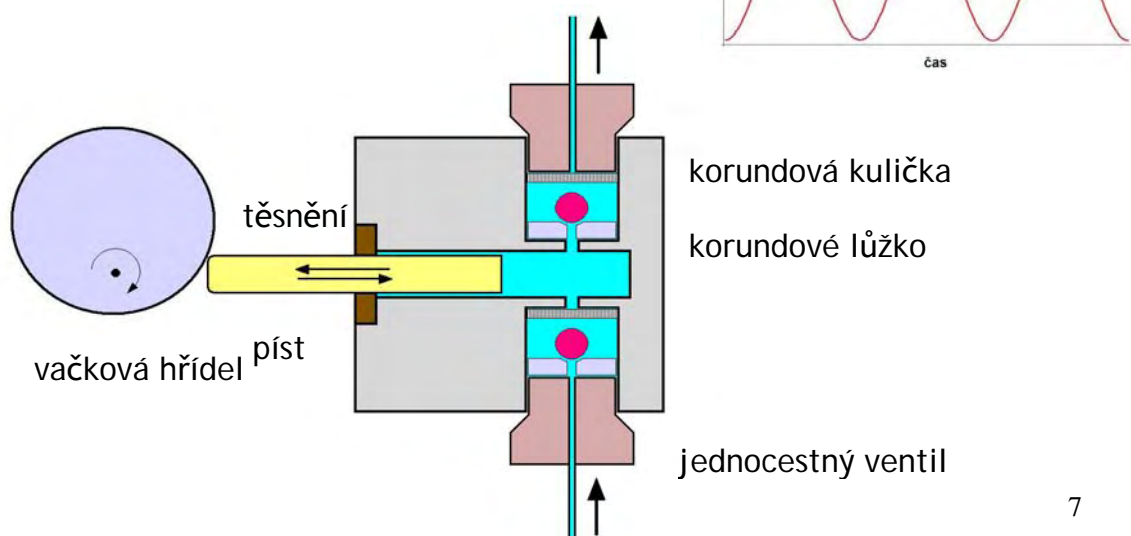
1 bar = 14,5 psi (pound per square inch)

Vysokotlaké pístové čerpadlo

Sání: píst nasává kapalinu spodním jednocestným ventilem, horní ventil je uzavřen.

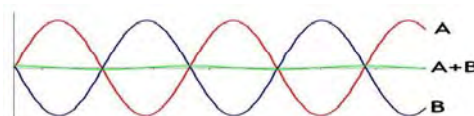
Výtlač: píst vytlačuje kapalinu, tím se spodní ventil uzavře a horní ventil otevře. Rychlost čerpání je dána rychlostí otáčení vačky.

⊖ Pulsování tlaku (průtoku).

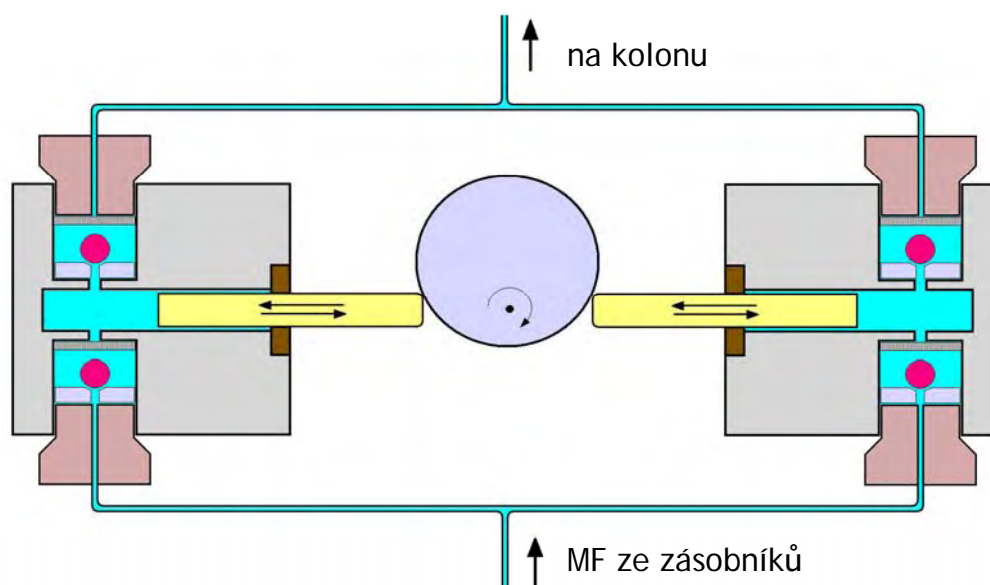


7

Duální vysokotlaké pístové čerpadlo



Duální čerpadlo pohání jeden motor. Zatímco se jedna část plní, druhá vytlačuje kapalinu do systému. Výsledkem je (téměř) bezpulsní čerpání. Ještě lepších výsledků je dosahováno elektronickou kontrolou pohybu pístů. Nejčastěji používané čerpadlo, pulsace tlaku je minimalizována.



8

Duální vysokotlaké pístové čerpadlo



Součásti jednocestného ventilu.



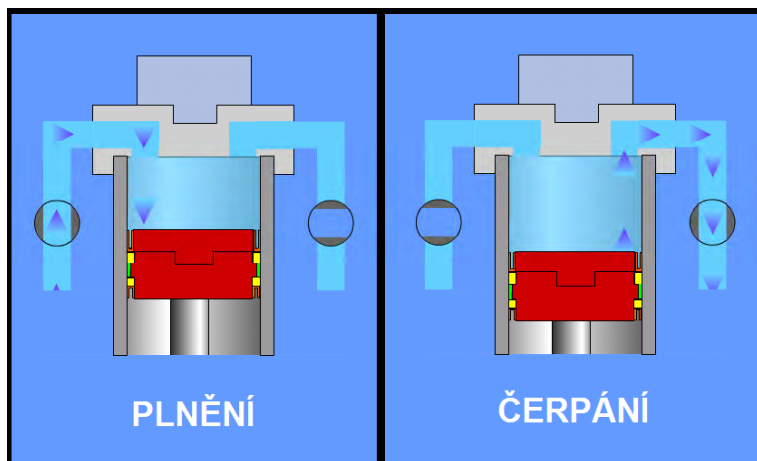
Příklad duálního čerpadla

9

Vysokotlaké stříkačkové čerpadlo

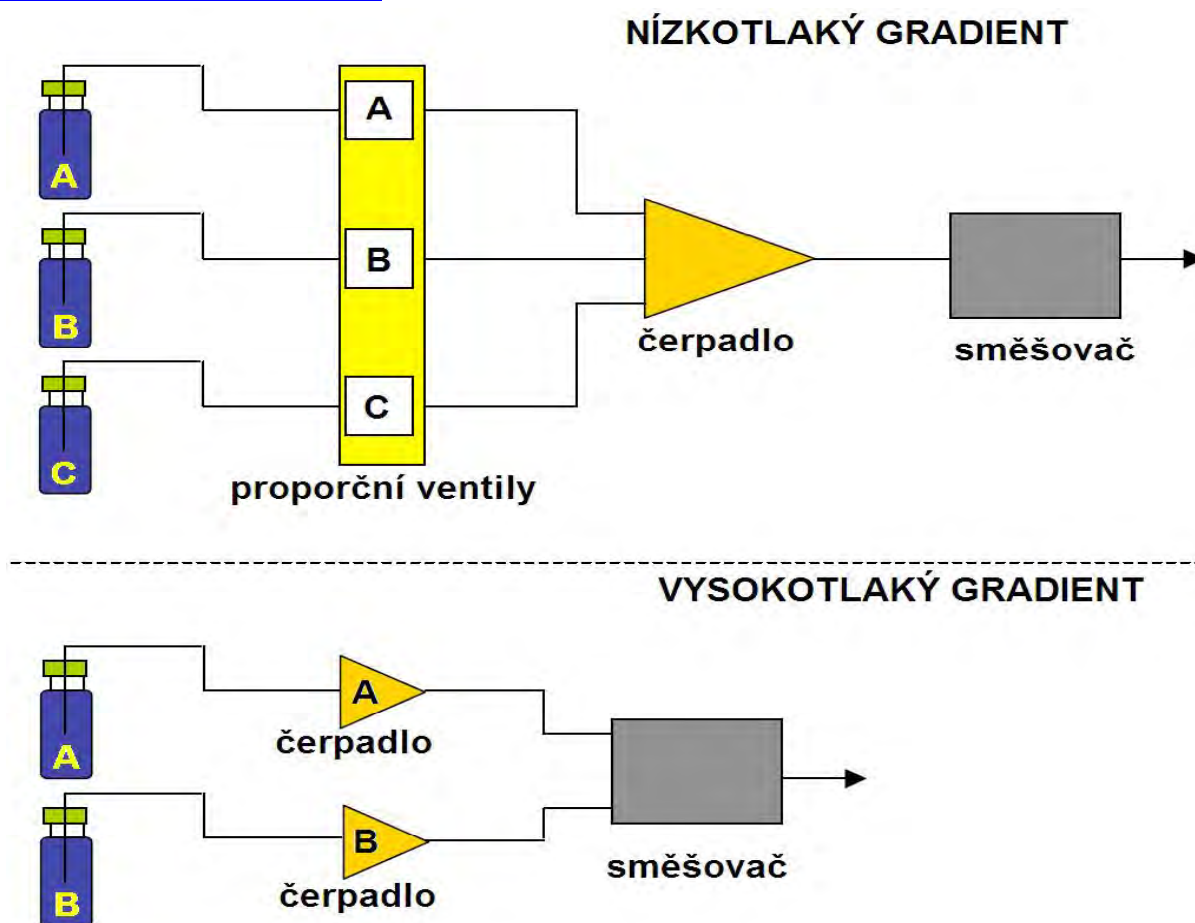
Čerpadlo na bázi stříkačky. Mobilní fáze se nasaje do válce, ze kterého je pak vytlačována konstantním pohybem pístu. Výhodou je absolutně bezpulzní tok, nevýhodou omezený objem mobilní fáze (nelze doplňovat během měření). Zapojením dvou stříkačkových čerpadel lze provádět gradientovou eluci, nebo kontinuálně dodávat mobilní fázi (zatímco jedno čerpá, druhé se plní a naopak).

Běžně se v HPLC a UHPLC nepoužívá.



10

Gradientová eluce



Gradientová eluce

Dva způsoby mísení rozpouštědel pro gradientovou eluci:

1. Nízkotlaký gradient: rozpouštědla jsou mísená před vstupem do HPLC čerpadla (za nízkého tlaku).

☺ Stačí jen 1 čerpadlo, vyšší reprodukovatelnost tvorby gradientu

☹ Vadné proporční ventily mohou způsobit nepřesnosti při mísení rozpouštědel. Větší mrtvý objem systému.

2. Vysokotlaký gradient: pro každé rozpouštědlo je potřeba samostatné HPLC čerpadlo, k mísení dochází až za čerpadly (za vysokého tlaku).

☺ Malý mrtvý objem, menší zpoždění gradientu.

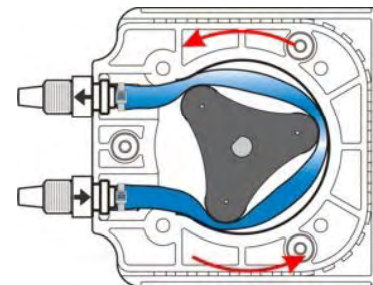
☹ Potřeba 2 (nebo více) čerpadel. Nižší reprodukovatelnost tvorby gradientu, zvláště při nízkých průtocích.

Nízkotlaká čerpadla

Nevhodná pro HPLC, mohou být využita pro pomocné čerpání za nízkého tlaku, např. kalibrace MS detektoru.

Peristaltické čerpadlo

Rotor periodicky stlačuje plastovou hadičku a tím vytlačuje kapalinu do systému.



Nízkotlaké stříkačkové čerpadlo

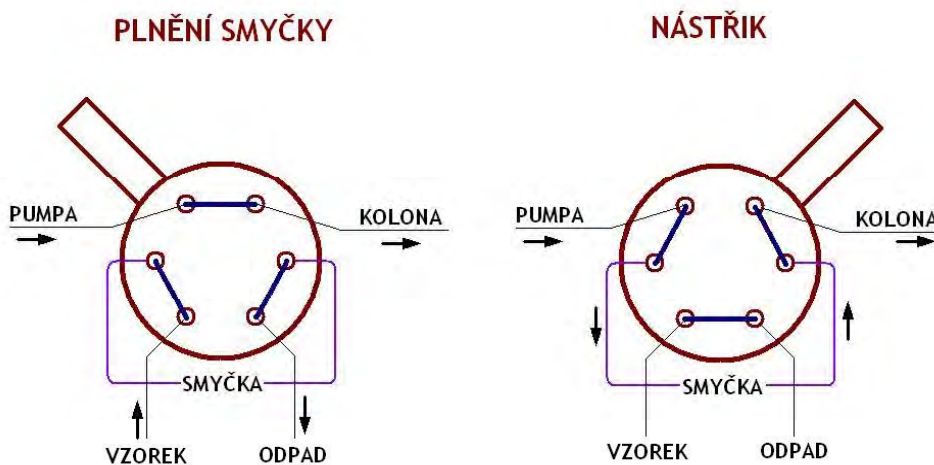
MF je ve stříkačce, odkud je konstantní rychlostí vytlačována do systému. Bezpulsní. Vhodné pro velmi nízké průtoky.



13

Dávkovací smyčkový ventil pro HPLC

Do chromatografického systému je možno dávkovat ručně (manuální dávkovací ventil) nebo pomocí automatického dávkovače (autosampleru).



Dvě polohy dávkovače: v poloze plnění smyčky je propojen vstup MF od pumpy s výstupem na kolonu přímo, v nástřikové poloze je propojen přes dávkovací smyčku (vzorek se vyplachuje do systému).

Dávkovaný objem je dán velikostí smyčky – jednotky až desítky μl

14

Automatické dávkovače pro HPLC

Přístroje pro automatické dávkování vzorků. Vzorky ve vialkách jsou umístěny v chlazeném prostoru. Robotický systém vybere požadovanou vialku a provede nástřik pomocí smyčkového ventilu.

Vialky – vzorkovnice (často 1,5 ml) na jedno použití se šroubovacím nebo namačkávacím víčkem (nutno použít speciální kleště). Ve víčku je septum, které se při nástřiku propíchne.



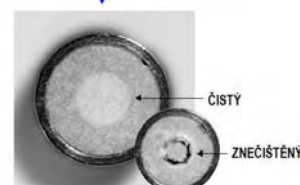
15

HPLC předkolony

Předkolony jsou krátké kolony zařazované těsně před analytickou kolonu.

Chrání kolonu tím, že zachytávají mechanické nečistoty a látky, které se ireverzibilně váží na kolonu.

Obsahují stejnou stacionární fázi jako analytická kolona.



16

HPLC kolony

Kolona je trubice (kovová, skleněná, křemenná, nebo plastová) obsahující stacionární fázi (náplňové nebo monolitické).

Specifikace kolony

C18; 4,6 × 250 mm; 5 μm; 100 Å

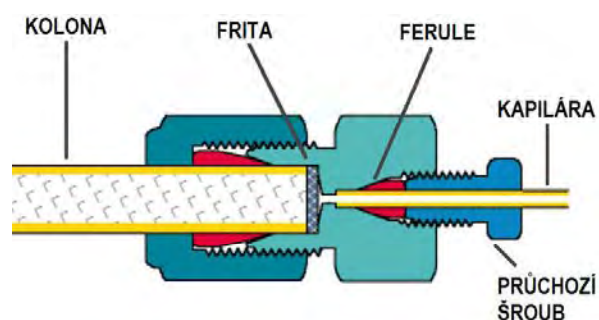
↑
typ fáze

↑
rozměry kolony

↑
velikost částic

↑
velikost porů

Chromatografie	Vnitřní průměr kolony	Průtok
Open Tubular LC	<25 μm	<25 nL/min
Nano HPLC	25-100 μm	24-4000 nL/min
Kapilární HPLC	100-100 μm	0.4-200 μL/min
Mikro HPLC	1.0-2.1 mm	50-1000 μL/min
Klasická HPLC	4.0-5.0 mm	1.0 -10.0 mL/min
Preparativní HPLC	>10 mm	> 20 mL/min



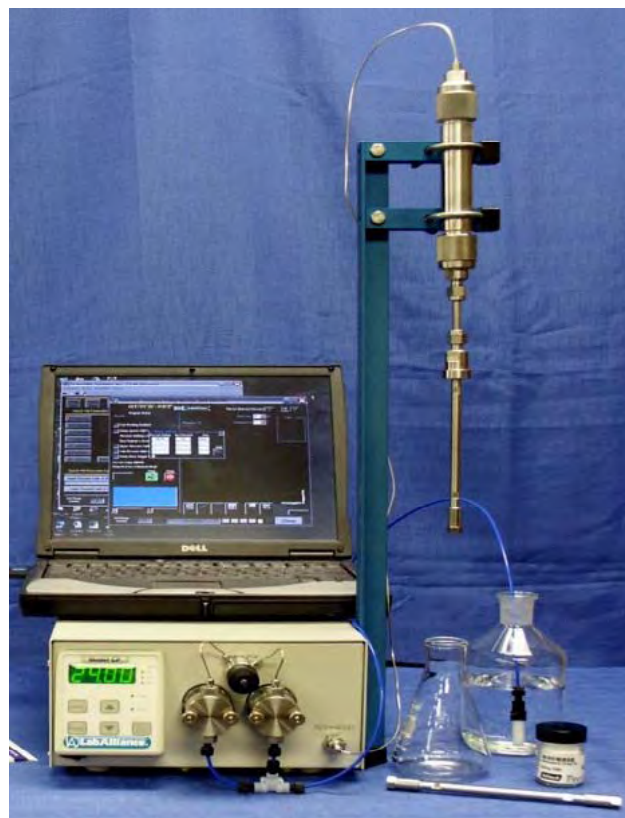
Kolony jsou uzpůsobeny pro připojení standardní 1/16" kapiláry.

Výroba kolon



Laboratorní plnička pro nanokolony.

Kolony lze plnit v laboratoři pomocí komerčně dodávaných plniček. Běžnou praxí je ale nákup naplněných kolon od výrobce.



Plnění standardních HPLC a UHPLC kolon.

Kolonové termostaty

Teplota kolony ovlivňuje separaci analytů. Vyšší teplota většinou urychlí analýzu, dosahuje se vyšší účinnosti, ale může se snižovat rozlišení. Kontrolou teploty (použitím kolonového termostatu) se zlepšuje reprodukovatelnost retenčních časů.



- termostaty od laboratorní teploty výše

- termostaty pro vyšší i nižší teploty (s Peltierovým chlazením)



Termoelektrický chladič na bázi Peltierova efektu

Polovodiče typu p a n jsou vzájemně v kontaktu a zapojeny sériově do elektrického obvodu. Z jedné strany chladí, z druhé se odvádí teplo.



19

Spojovací prvky - kapiláry

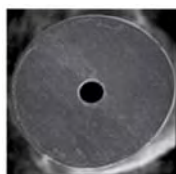
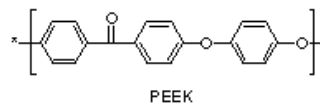
PEEK (polyetheretherketon) – vysoce odolný termoplast kompatibilní téměř se všemi rozpouštědly v HPLC. Narušují jej silné kyseliny, v CH₂Cl₂, DMSO a THF může bobtnat. Barevné kódování vnitřních průměrů.

Nerez – Vysoká mechanická odolnost, vhodná pro UHPLC.

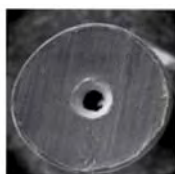
Teflon – pouze pro nízký tlak, použití jako odvod odpadu z dávkovačů.

Vnější průměr: 1/16" (1,59 mm)

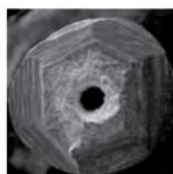
Vnitřní průměry: 0,005" až 0,007" (0,13-0,18 mm)



řez provedený výrobcem kapiláry



řez pomocí komerčně dodávané řezačky



řez pilníkem

Kvalitní seříznutí kapilár je velmi důležité aby se nesnižovala účinnost systému (mrtvé objemy).

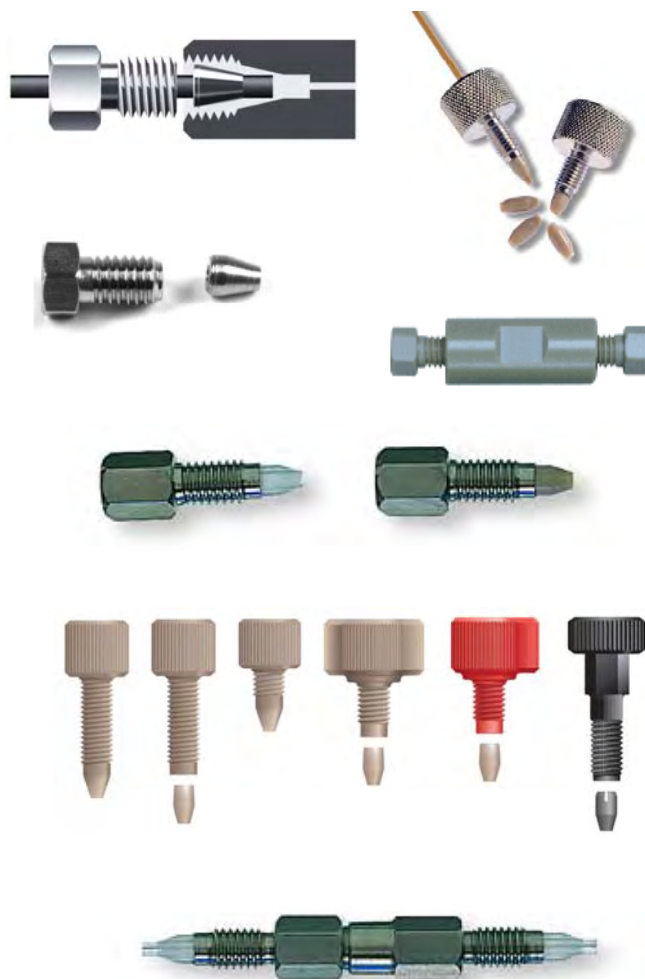
20

Spojovací prvky - šroubení

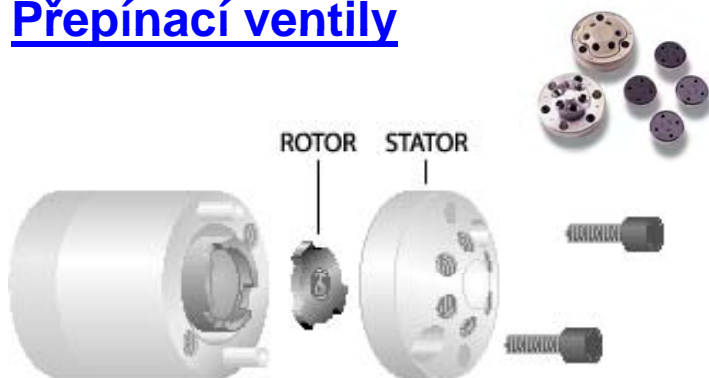
Standardizované spojovací prvky, nejčastěji z nerezu nebo PEEKu, většinou palcové závity. Tvar ferulí se liší podle výrobce (např. Waters, Valco, Rheodyne), pro minimalizaci mrtvých objemů nutno použít doporučené ferule a šrouby.

PEEKové šroubení se dotahuje rukou, nerezové s nerezovými ferulemi klíčem.

Specializované šroubení pro spojování kapilár (spojky), dělení toku (T-kusy), in-line filtry, pro kapilární HPLC nebo UHPLC...



Přepínací ventily



Ventily s univerzálním použitím v HPLC (dávkování, přepínání kolon, vícerozměrná HPLC apod.)

K nepohyblivému statoru těsně přiléhá otočný rotor. Poloha rotoru vůči statoru určuje, které pozice jsou vzájemně propojené.

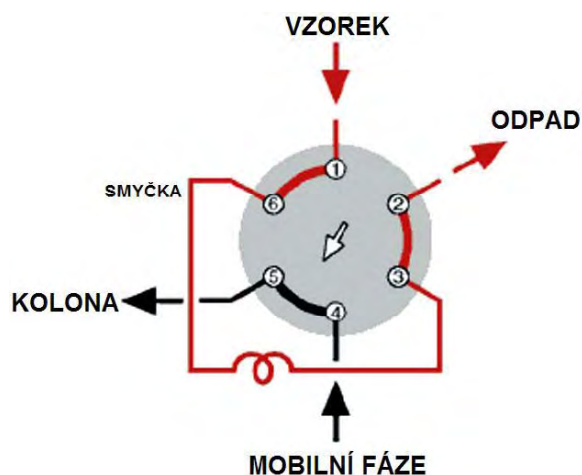
Mechanicky ovládané

Elektricky ovládané

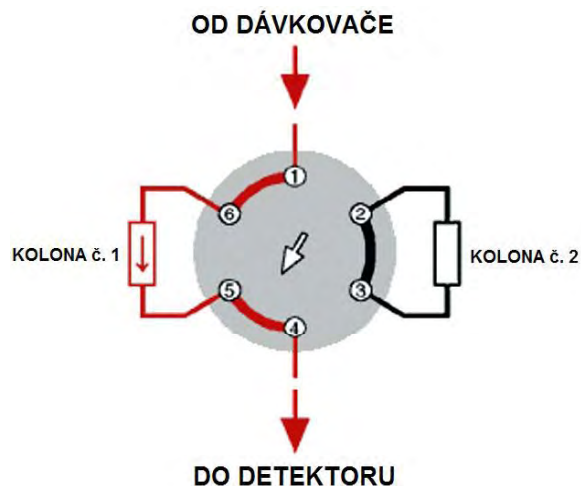


Přepínací dvoupozicové ventily - šesticestný

Dávkování vzorku z externí smyčky
nejčastější aplikace

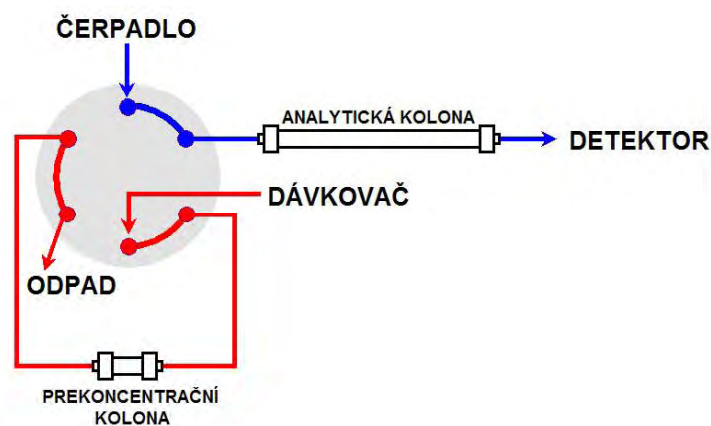


Přepínání mezi dvěma analytickými kolonami



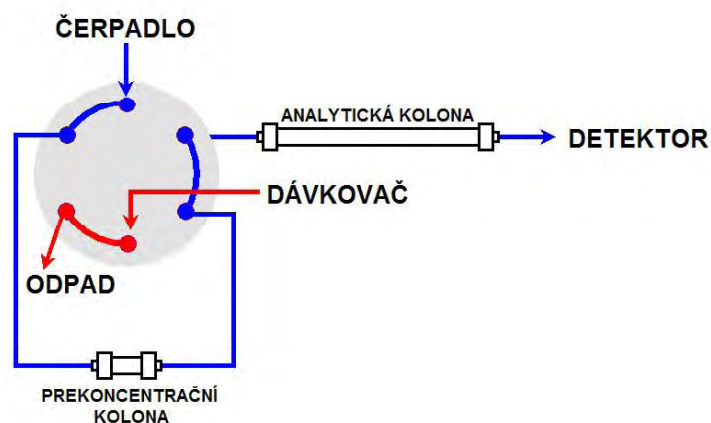
23

Přepínací dvoupozicové ventily - šesticestný



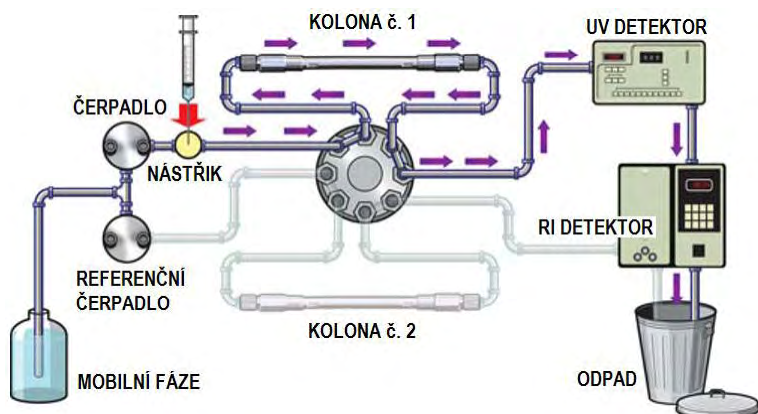
Dávkování s prekoncentrací vzorku na kolonce

Vzorek je dávkován na prekoncentrační kolonu (lze dávkovat velmi vysoké objemy). Po přepnutí ventilu jsou zachycené analyty vyplachovány mobilní fází na analytickou kolonu. Využití např. v kapilární HPLC při analýze bílkovinných hydrolyzátů.



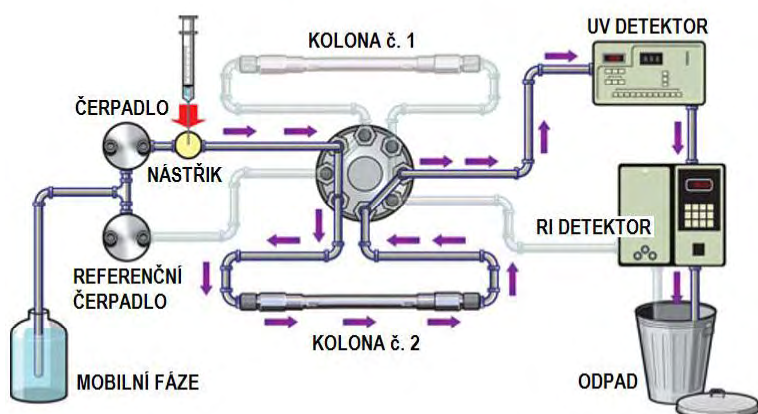
24

Přepínací dvoupozicové ventily - osmicestný



Přepínání kolon a současné zavádění referenční mobilní fáze do detektoru

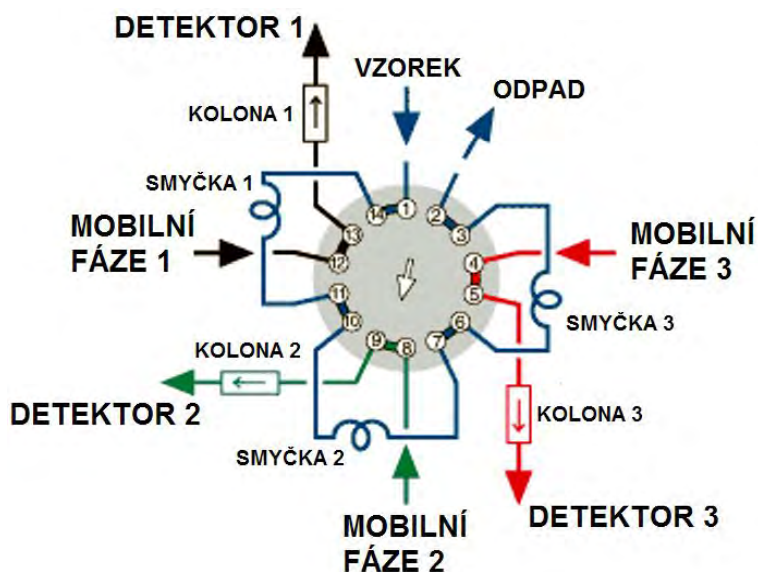
V systému jsou zařazeny dvě kolony, separace probíhá na jedné z nich. Současně se kontinuálně zavádí mobilní fáze do referenční cely refraktometrického detektoru.



25

Přepínací dvoupozicové ventily - čtrnácticestný

Současné dávkování vzorku na 3 různé kolony



26

Preparativní HPLC systémy

Slouží k izolaci větších (gramových) množství látek.

Kolony běžných délek (25 cm), ale větších průměrů (několik cm); velikost částic náplně 10 - 20 μm .

Často se volí normální HPLC systémy se silikagelem jako stacionární fází.

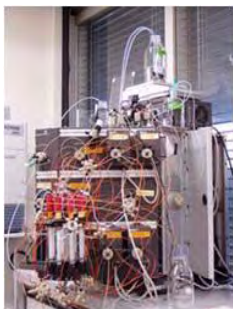
Používají se speciální čerpadla pro vyšší průtoky (do stovek ml/min).

Mobilní fáze se volí nejen podle chromatografických parametrů, ale i na základě ceny. Využívají se zařízení na recyklaci mobilních fází.



Preparativní HPLC systémy - SMBC

Kontinuální chromatografie se simulovaným pohybem stacionární fáze (**S**imulated **M**oving **B**ed **C**hromatography, SMBC) – uspořádání několika chromatografických kolon pro účinné preparativní separace



Laboratorní systémy
(10 - 100 ml/min)

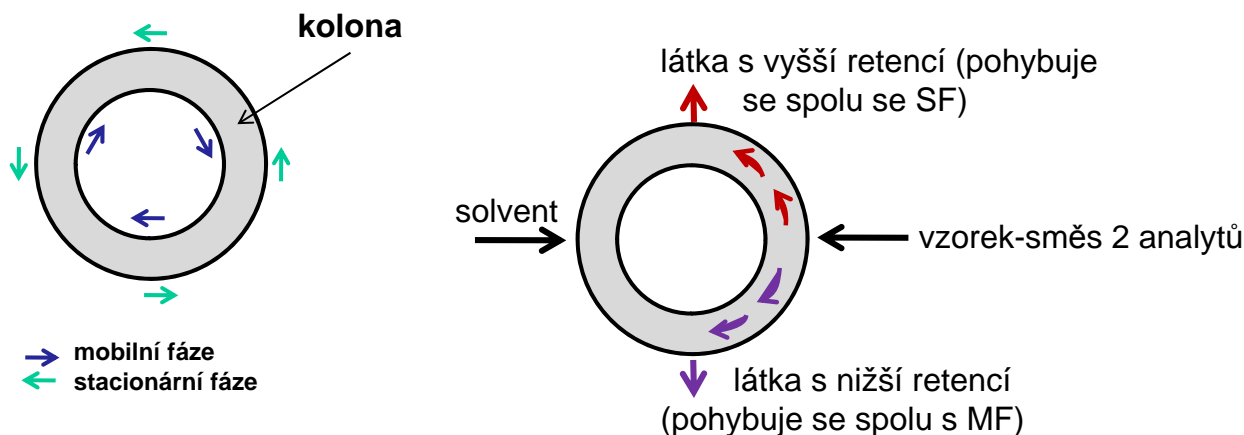


Průmyslové systémy

Využití: Produkce cukrů, farmaceutických a petrochemických produktů, chirálních látek, peptidů atd.

Kontinuální chromatografie s pohybem stacionární fáze

Imaginární kontinuální preparativní chromatografický systém s kolonou ve tvaru prstence, kde se stacionární fáze pohybuje v opačném směru než fáze mobilní:

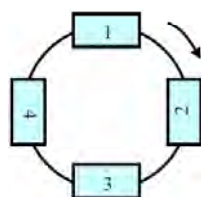


Výhody: kontinuální proces, vyšší produktivita, volbou průtoků lze zvýšit účinnost separace (zvýší se čas separace v koloně, vyšší počet pater)

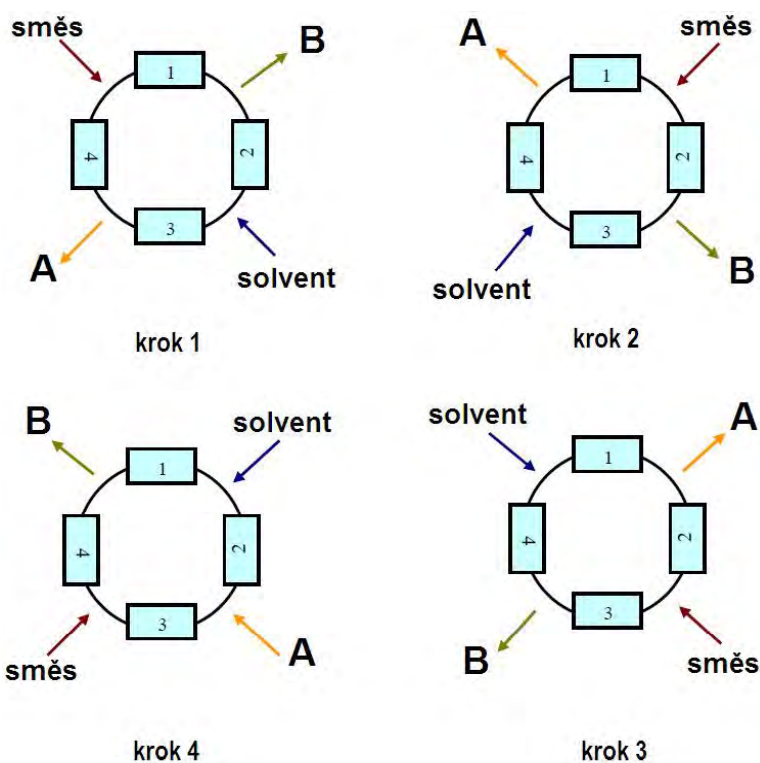
29

Kontinuální chromatografie se simulovaným pohybem stacionární fáze

V praxi se používá SMBC, kdy se pohyb stacionární fáze pouze simuluje přepínáním ventilů. V sérii je zapojeno několik kolon (4-12), čím více, tím se systém více blíží MB chromatografii.



systém se 4 kolonami



30

Automatické sběrače frakcí

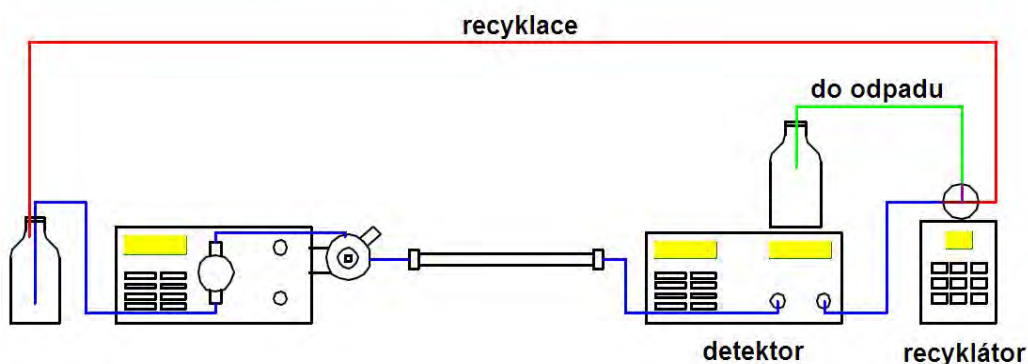
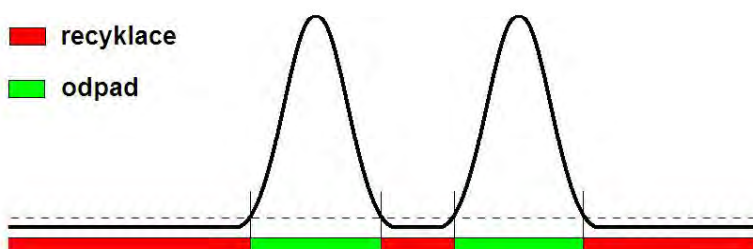
Robotické programovatelné systémy, které sbírají eluát do určených nádob (zkumavek, vialek apod.). Programují se na pevné retenční časy nebo podle signálu detektoru.



31

Zařízení pro recyklaci mobilní fáze

■ recyklace
■ odpad



Opětovné využití mobilní fáze při izokratické eluci.

32

Kapilární a nano- HPLC systémy

Speciální čerpadla umožňují spolehlivě pracovat s průtoky do $1 \mu\text{l}/\text{min}$. Pro nižší průtoky je nutné používat děliče toku.

Používají se velmi úzké křemenné nebo PEEKové kapiláry a spojovací prvky s velmi malými vnitřními objemy. Nutno dbát, aby v systému nebyly žádné mrtvé objemy, které mají obrovský vliv na rozmývání píků.

Detektory mají miniaturizované detekční cely, příp. se detekuje přímo na kapiláře za kolonou.



33

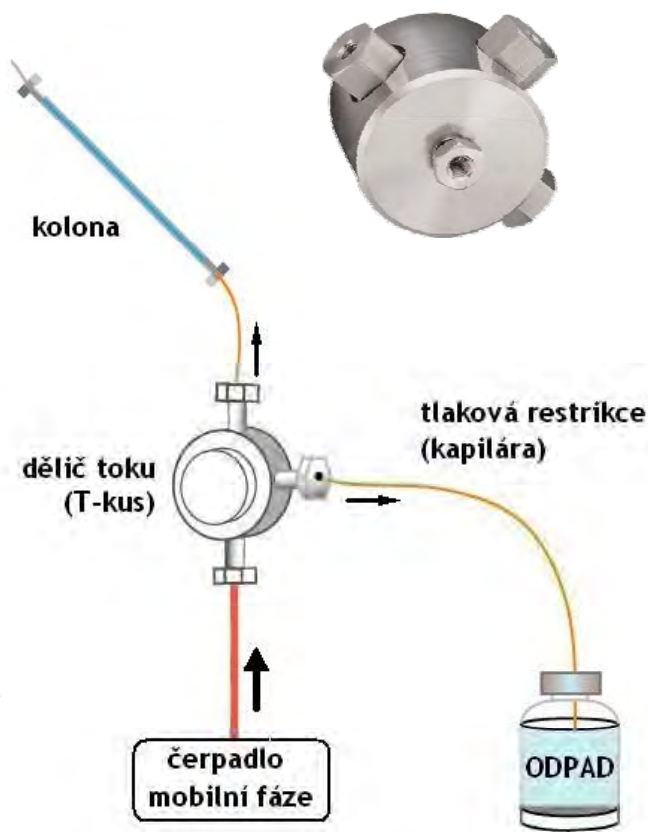
Děliče toku pro HPLC

Pokud je potřeba pracovat při nižších průtocích než umožňuje čerpadlo, je nutné použít děliče toku.

Dělicí poměr je dán rozdílem tlaků v obou větvích, tj. délkou a průměrem restriční kapiláry a tlakovým odporem kolony.



Komerčně jsou dodávány kalibrované děliče toku se sensory pro měření nízkých průtoků



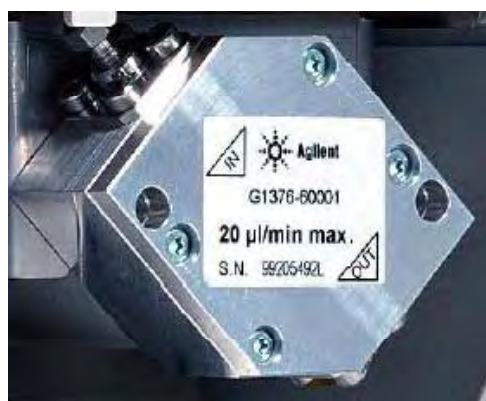
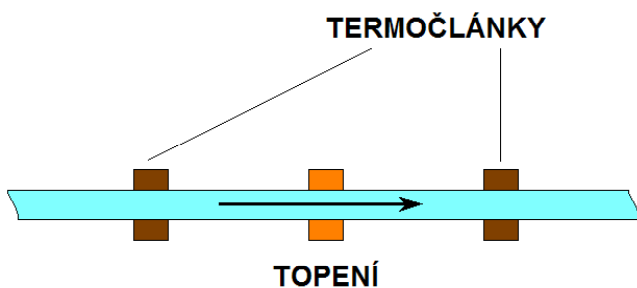
34

Měření nízkých průtoků

Bezkontaktní měření průtoku na základě tepelné vodivosti.

Pro nL a μ L průtoky.

TEPLOTNÍ PRŮTOKOVÝ SENZOR

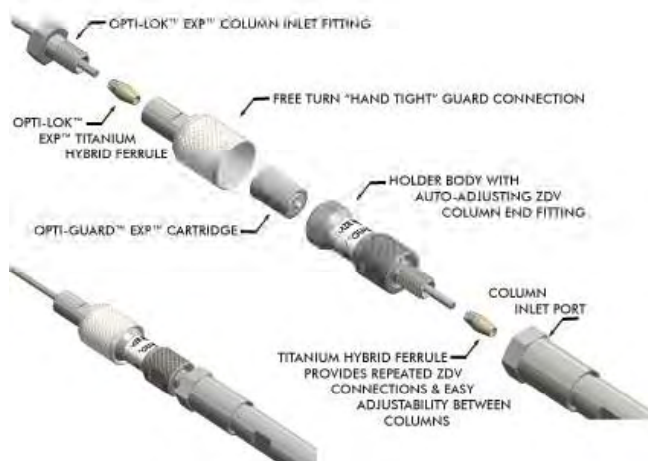


Materiály pro UHPLC



Moderní UHPLC systémy vyžadují vysoce odolné šroubení, které vydrží vysoké tlaky a teploty (do 1500-2000 bar, 150°C) .

Materiály: ocel, pozlacená ocel, kombinace ocel-PEEK, vysoce odolný PEEK
Speciálně navržený spojovací materiál, předkolony a jejich držáky,
kapiláry – ocel, standardní PEEK do 500 bar, zapouzdrěný v niklu 2500 bar



1/32" OD x .004" ID