

Metody chromatograficzne w chemii i
biotechnologii, **wykład 5**

HPLC - aparatura

Chromatografia cieczowa adsorbcyjna

- ▶ Faza stacjonarna:

- ▶ Ciało stałe -> chromatografia adsorpcyjna

- ▶ Faza ruchoma:

- ▶ Ciecz -> chromatografia cieczowa

Układy chromatograficzne

- ▶ Chromatografia kolumnowa
- ▶ Chromatografia planarna



Chromatografia cieczowa

- ▶ Cieczowa chromatografia kolumnowa:
 - ▶ Klasyczna



Chromatografia cieczowa

- ▶ Cieczowa chromatografia kolumnowa:
 - ▶ Klasyczna
 - ▶ Flash/FPLC (chromatografia średniociśnieniowa)
 - ▶ Naciski: 0,6 -5 MPa,
 - ▶ Złóża sorpcyjne, sita molekularne,
 - ▶ Faza ruchoma: bufor
 - ▶ Rozdział białek i polimerów.

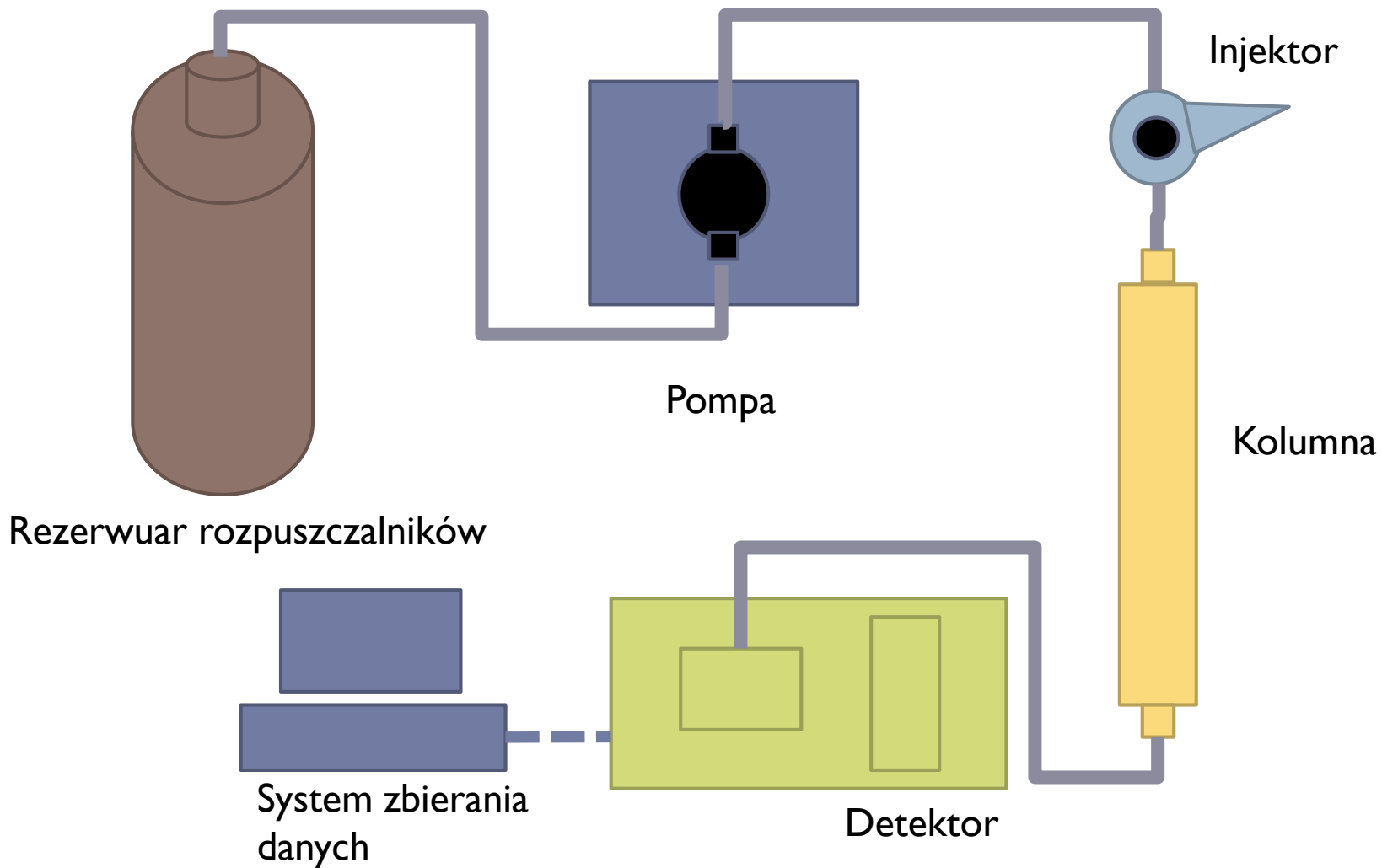


Chromatografia cieczowa

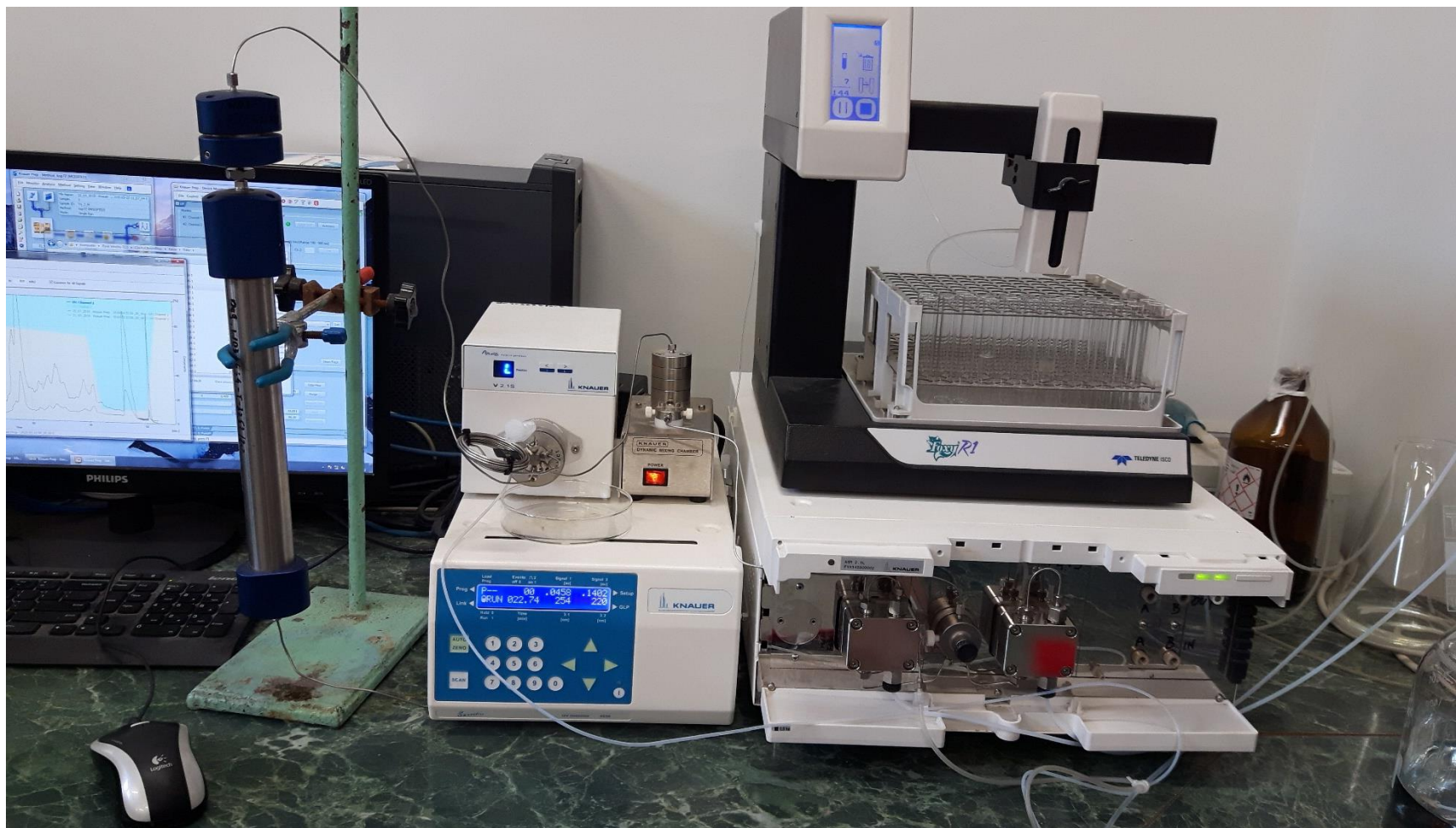
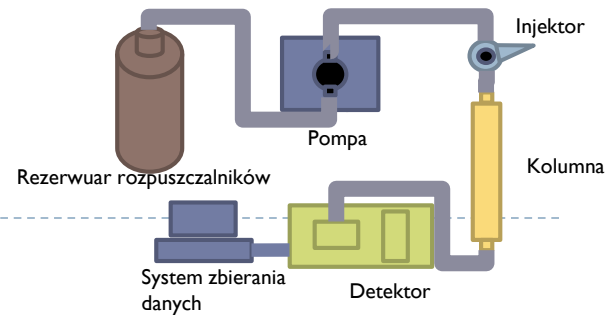
- ▶ Cieczowa chromatografia kolumnowa:
 - ▶ Klasyczna
 - ▶ Flash/FPLC
 - ▶ HPLC
 - ▶ Nadciśnienia powyżej 5 MPa,
 - ▶ Wysoka rozdzielczość,
 - ▶ Krótki czas analizy.



Budowa aparatu

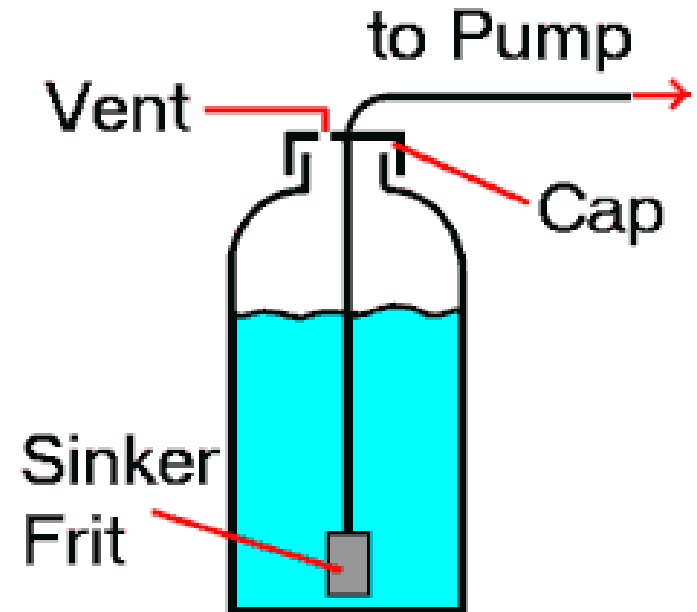
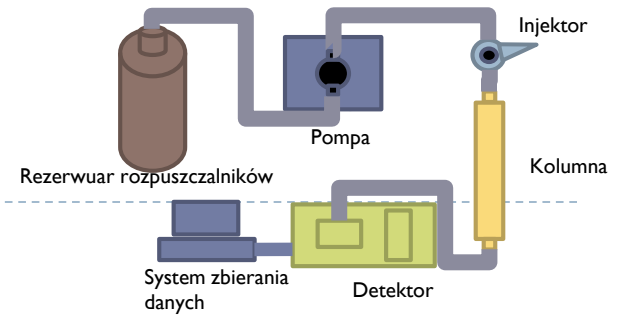


Chromatografia cieczowa



Budowa aparatu

► Zasobniki rozpuszczalników



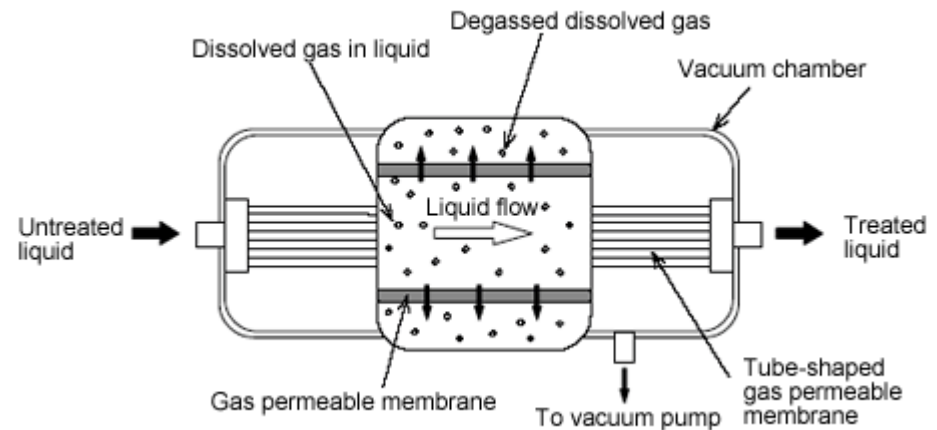
Rozpuszczalniki

- ▶ **Odgazowywanie rozpuszczalników**
 - ▶ Każdy rozpuszczalnik zawiera rozpuszczone powietrze.
 - ▶ Mieszanki rozpuszczalników przeważnie słabiej rozpuszczają powietrze.
 - ▶ Powstawanie bąbelków powietrza w aparacie HPLC jest bardzo niekorzystne:
 - ▶ Złe działanie pomp
 - ▶ Poszarpana linia bazowa



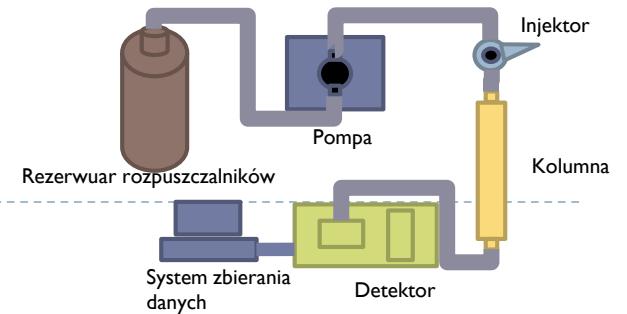
Rozpuszczalniki

- ▶ Odgazowywanie rozpuszczalników
 - ▶ Ultradźwięki
 - ▶ Próżnia
 - ▶ Przepłukiwanie helem – hel bardzo słabo rozpuszcza się w eluentach
 - ▶ Degazer membranowy – optymalny.



Budowa aparatu

► Pompa

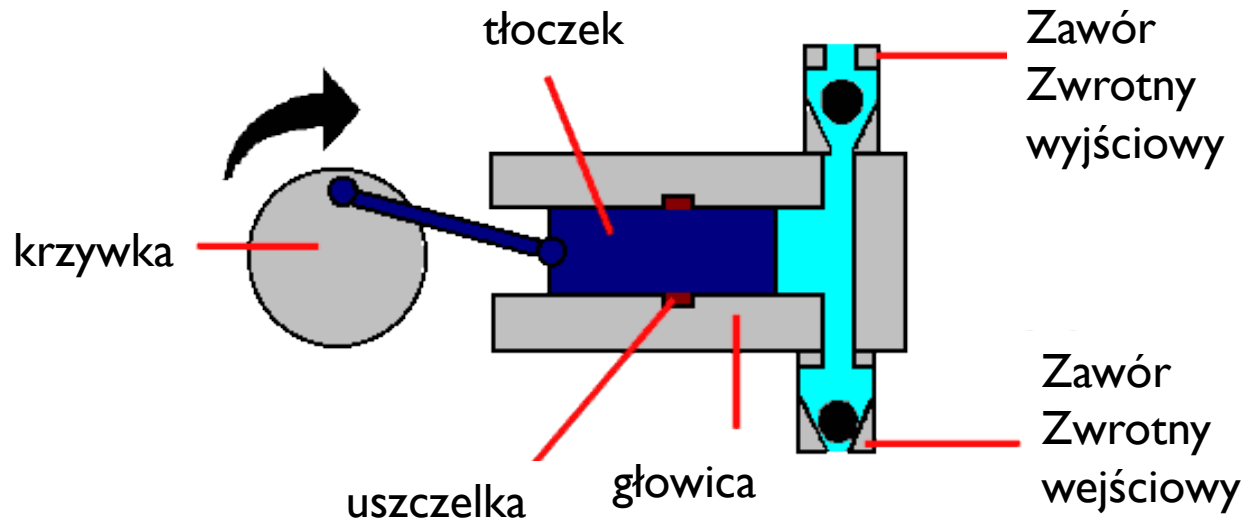


Pompa stałoprzepływowa, tłokowa- sposób ciągły, odtwarzalny i z optymalną prędkością wymusza przepływ fazy ruchomej przez kolumnę chromatograficzną



Budowa aparatu

► Pompa

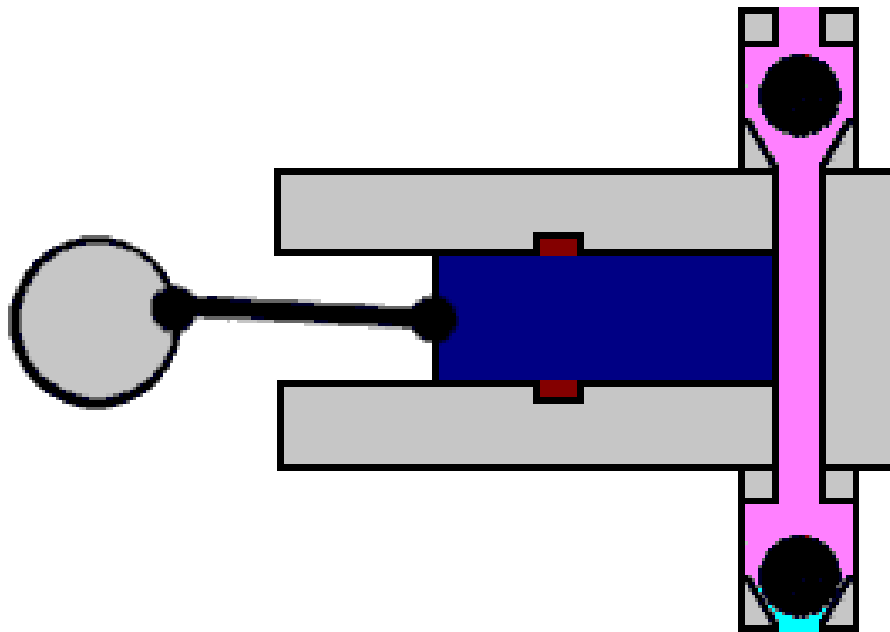


Objętość tłoczonej cieczy zależy od średnicy tłoków, ich amplitud oraz szybkości ruchów.



Budowa aparatu

- ▶ Pompa



Budowa aparatu

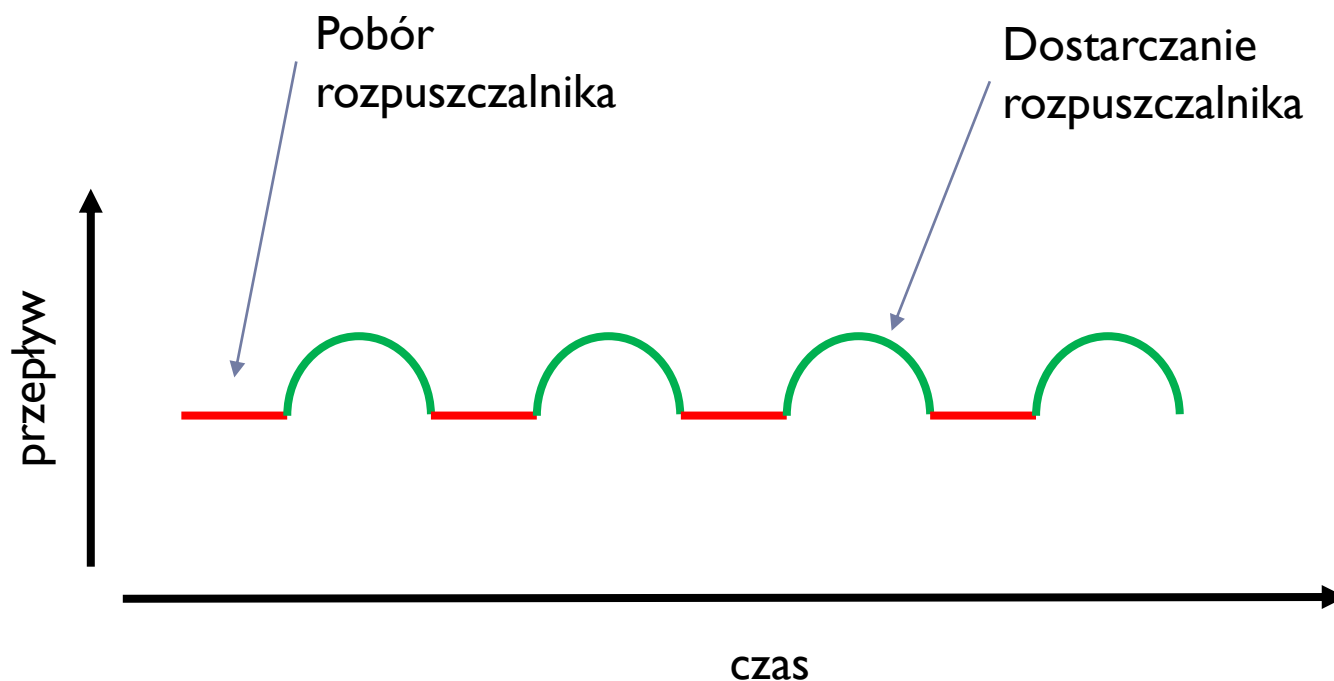
- ▶ **Pompa - cechy charakterystyczne:**
 - ▶ Zakres objętościowego wydatku ciecży (do 30 ml/min)
 - ▶ Maksymalne ciśnienie robocze (30 – 50 MPa)
 - ▶ Odtwarzalność wydatku objętościowego
 - ▶ Zakres pulsacji wydatku



Budowa aparatu

▶ Pompy

- ▶ pulsacja - zakłócenia linii podstawowej chromatogramu i spadek czułości detektorów

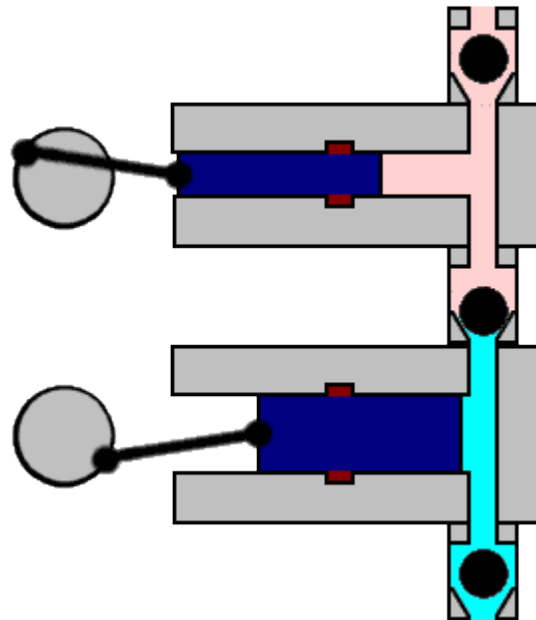


Kontrola pulsacji: zmniejszenie objętości pompowanej cieczy / zwiększenie prędkości ruchu tłoka / zastosowanie pomp dwutłokowych



Budowa aparatu

- ▶ Pompy
- ▶ Układ z dwoma tłoczkami – stabilniejszy przepływ

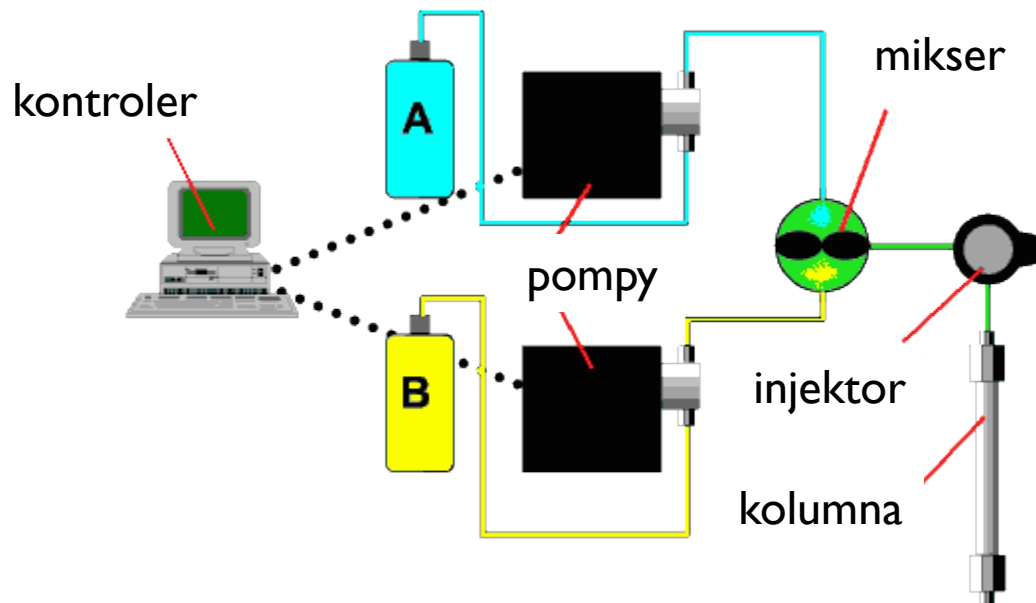


Działanie tłoków jest przesunięte o 180 stopni - odpowiednia zmiana prędkości ruchu tłoka w różnych jego położeniach eliminuje pulsację.



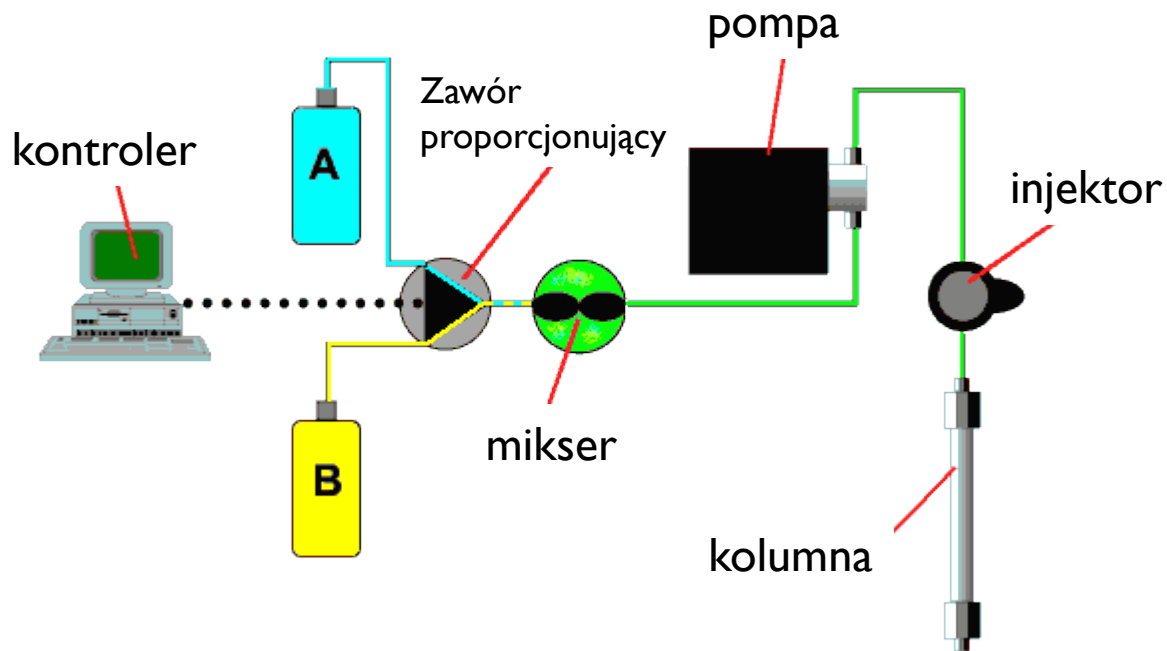
Budowa aparatu

- ▶ Układ gradientowy dla wysokiego ciśnienia



Budowa aparatu

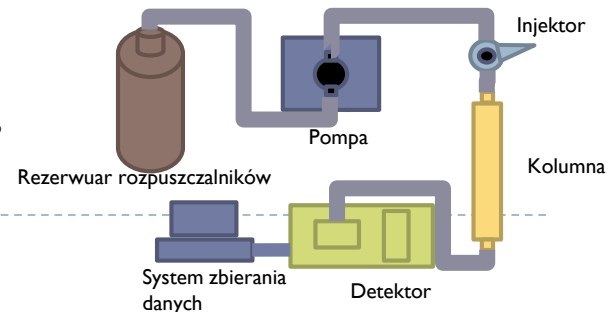
- ▶ Układ gradientowy dla średniego ciśnienia (z jedną pompą)



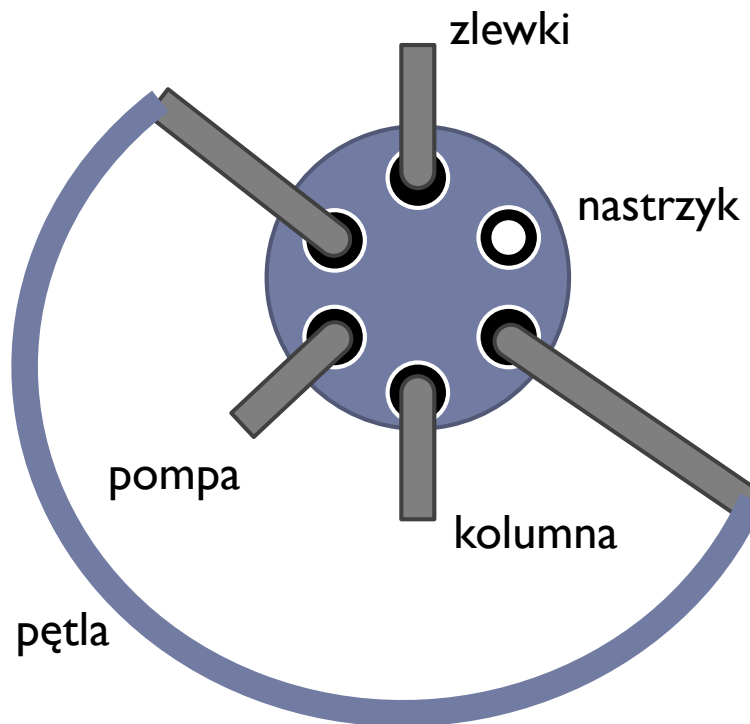
Zawór proporcjonujący - doprowadzanie na przemian poszczególnych składników eluentu do pompy i mieszalnika w czasie okresu proporcjonowania



Układ wprowadzania próbki

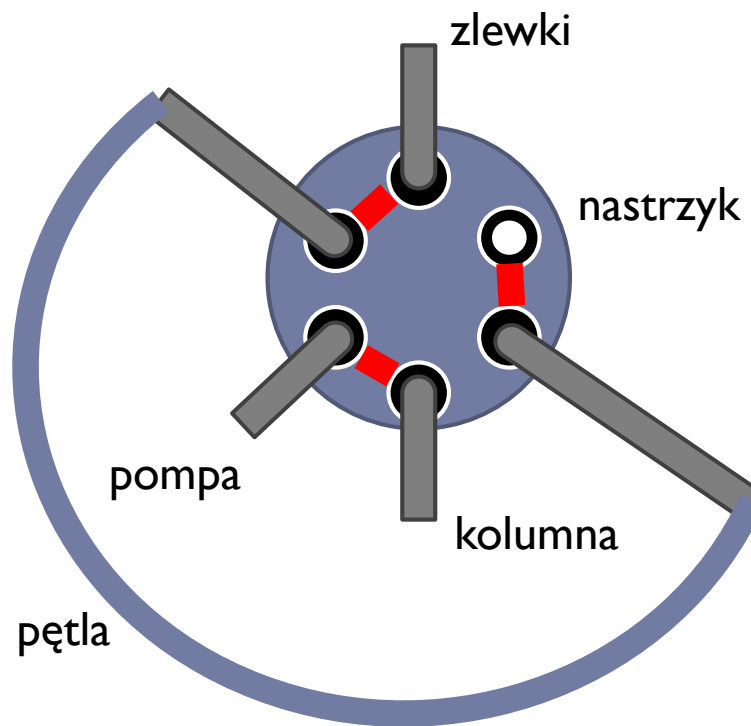


- ▶ **Injektor** - wprowadzenie próbki pod ciśnieniem atmosferycznym do układu, w którym panuje ciśnienie do kilkudziesięciu Mpa.



Układ wprowadzania próbki

► Injektor

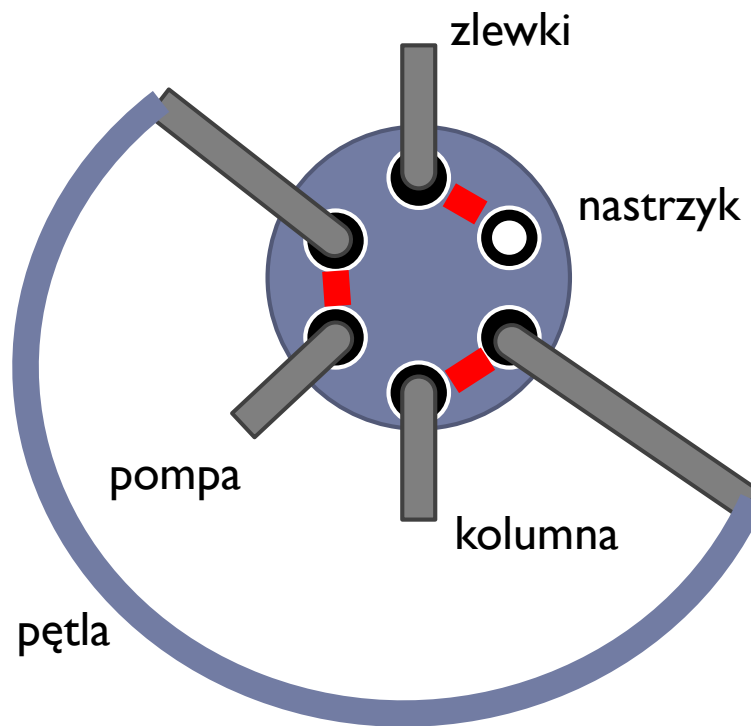


Pozycja LOAD



Układ wprowadzania próbki

► Injektor

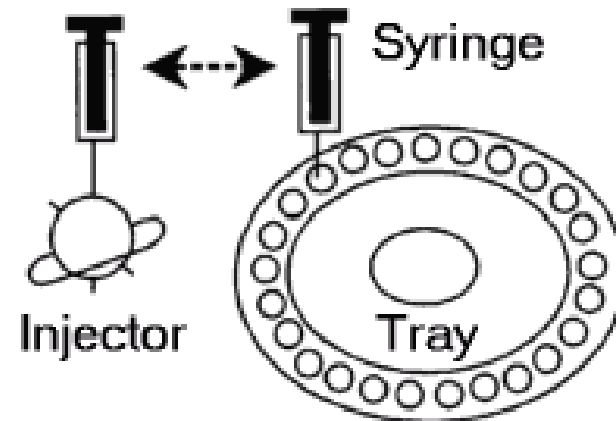
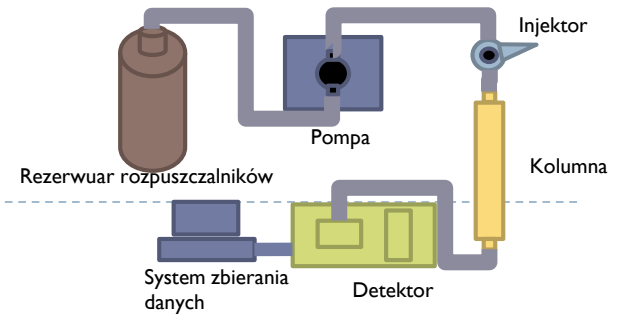


Pozycja INJECT



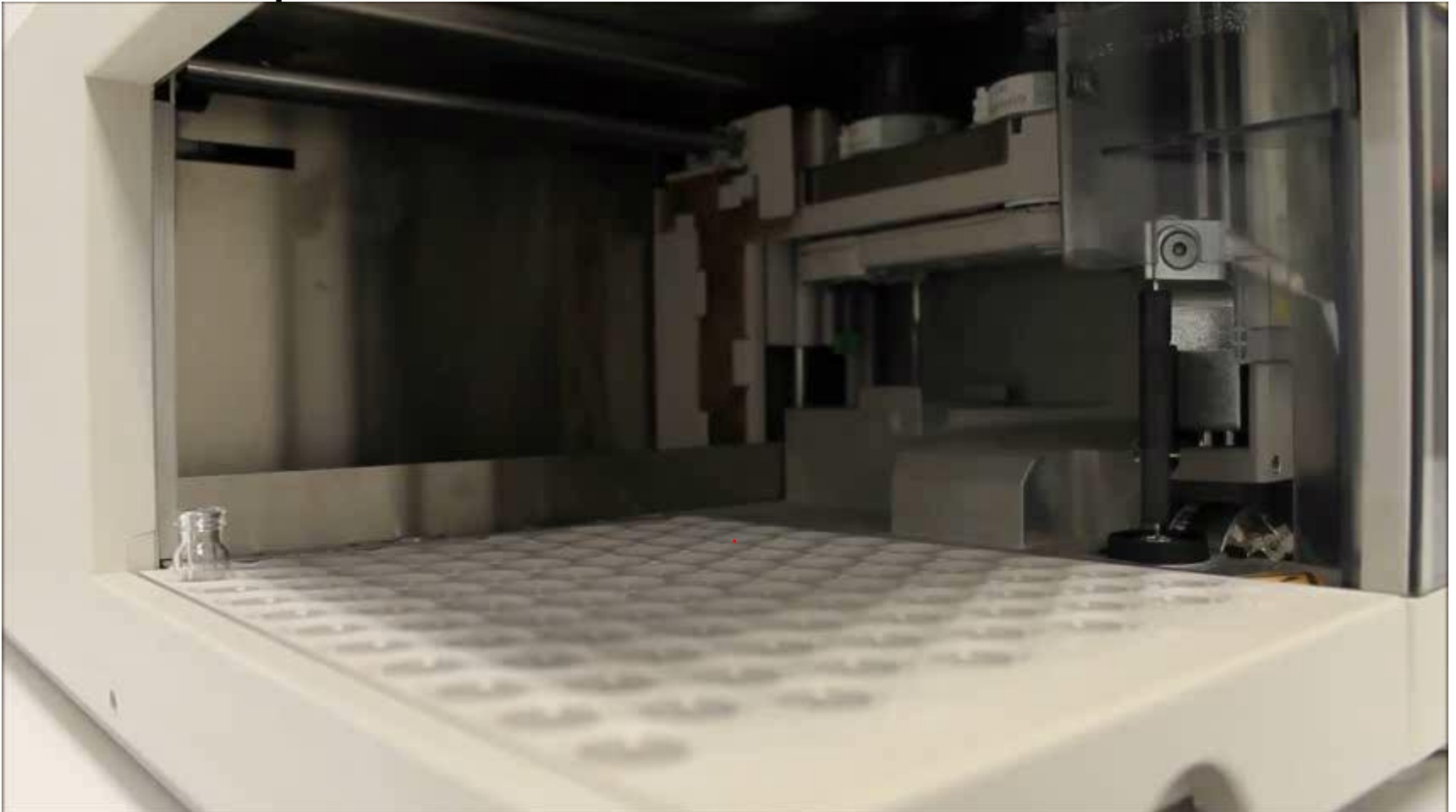
Autosampler

▶ Autosampler

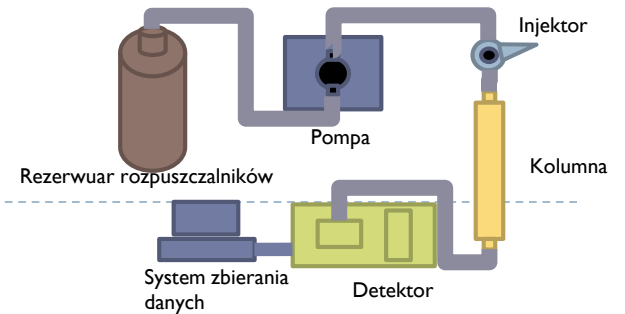


Autosampler

▶ Autosampler



Połączenia

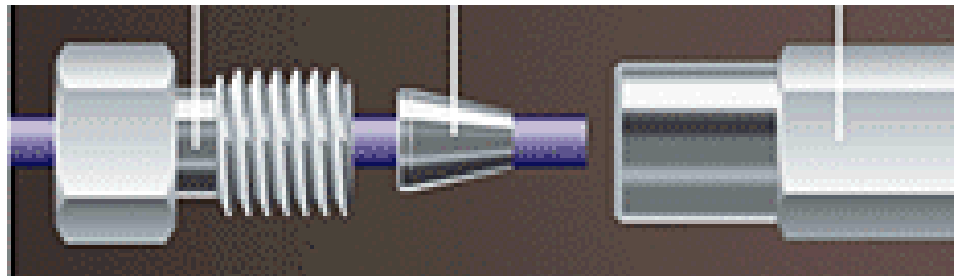


- ▶ Wszystkie rurki i połączenia po stronie wysokiego ciśnienia są wykonane ze stali nierdzewnej.

Nakrętka

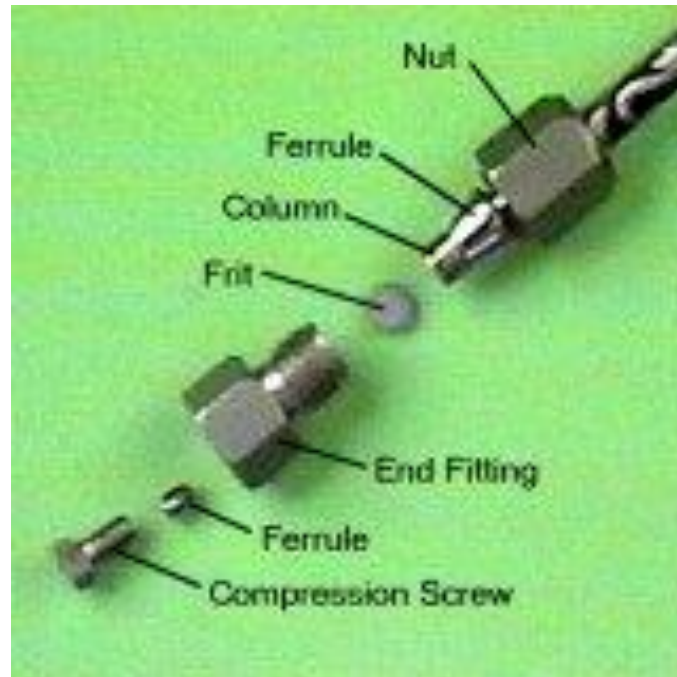
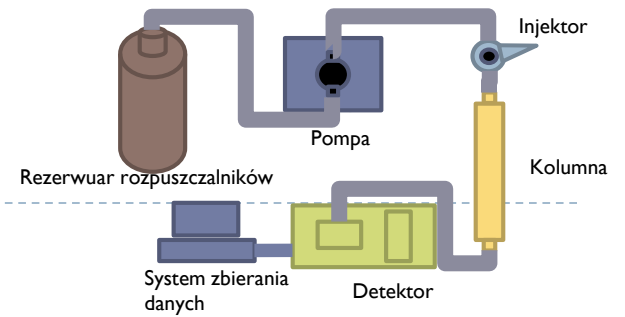
Ferulka

Blok



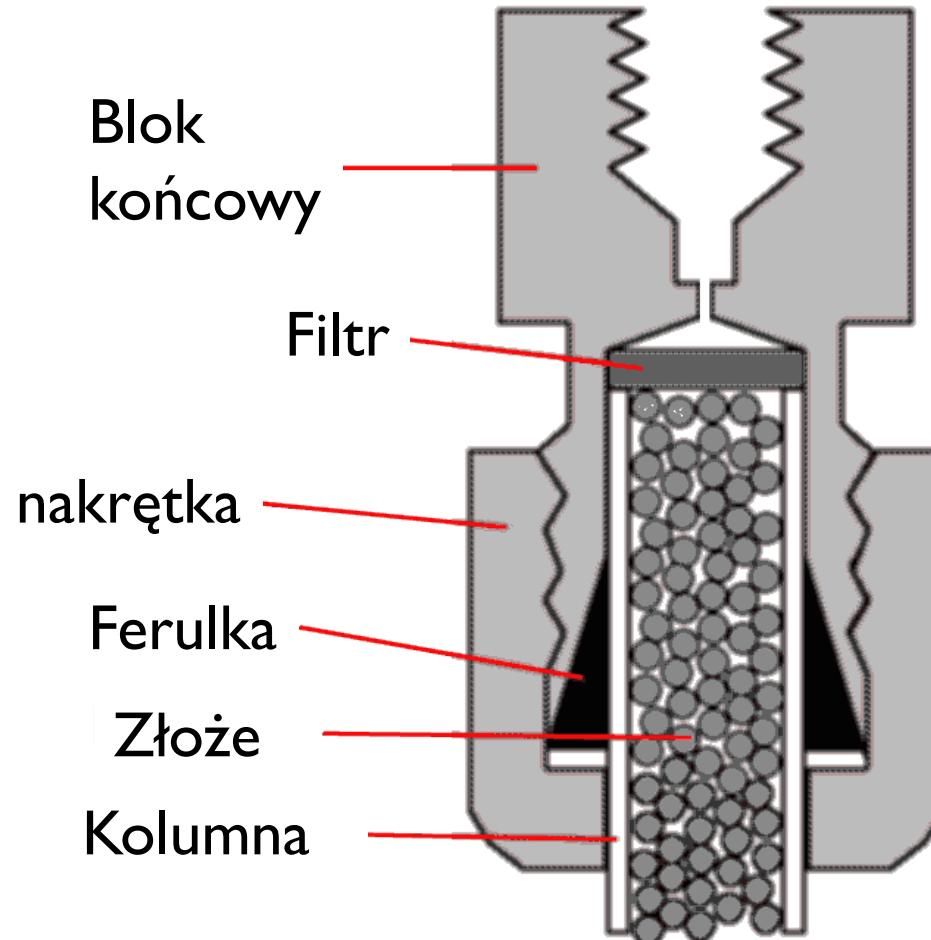
Połączenia

▶ Przyłączenie kolumny



Połączenia

▶ Przyłączenie kolumny



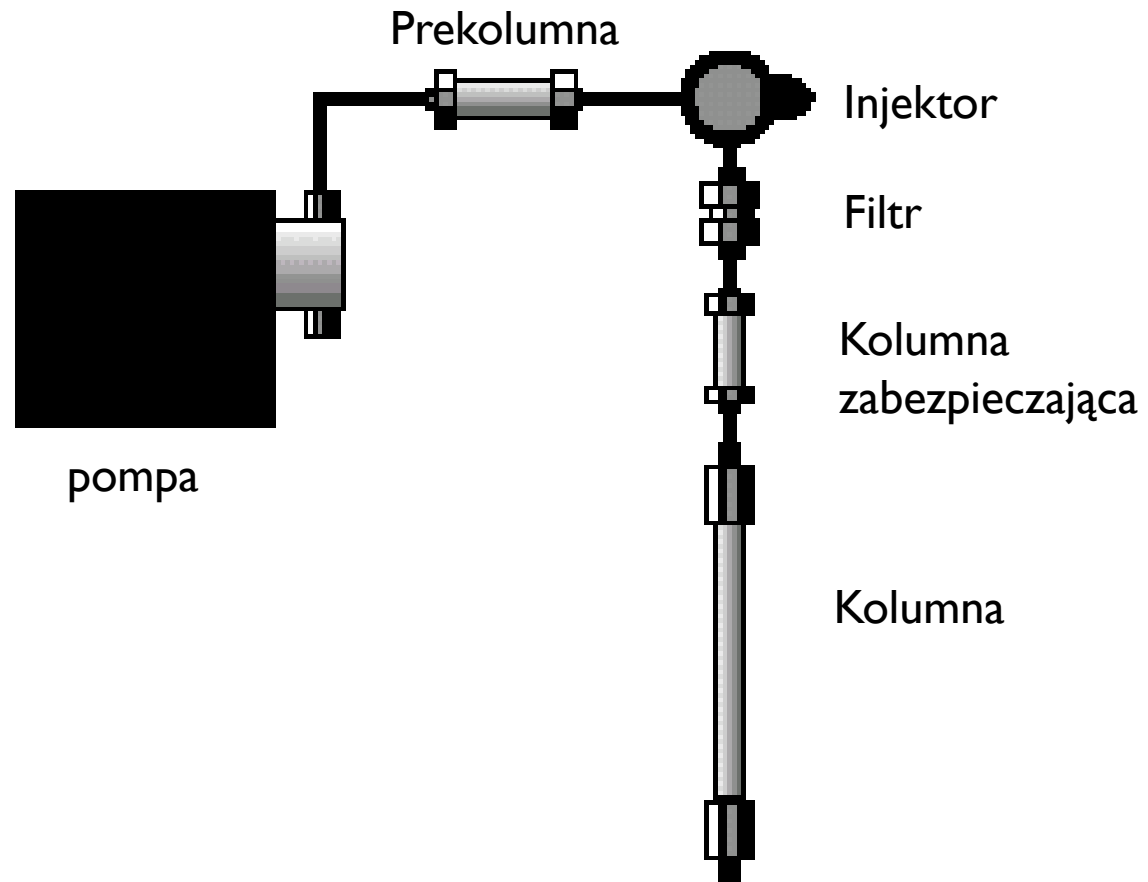
Kolumna

- ▶ Powody zniszczenia kolumny
 - ▶ Chemiczne
 - ▶ Zatkanie cząstkami stałymi
 - ▶ Szok mechaniczny
 - ▶ Adsorbpcja nieczystości



Kolumna

► Bezpieczne podłączenie kolumny

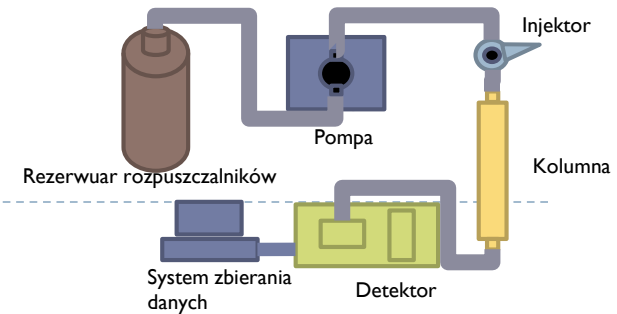


Kolumna

- ▶ Układ do termostatowania kolumn:
 - ▶ Powtarzalność wyników (stabilna temperatura)
 - ▶ Rozpuszczalność związków (podwyższona temperatura)
 - ▶ Stabilność analitów (obniżona temperatura)



Detektory



- ▶ Przepływowy instrument analityczny pozwalające zarejestrować (i zidentyfikować) substancje rozdzielane na kolumnie chromatograficznej
 - ▶ Nie istnieje dotychczas uniwersalny detektor – stosuje się wiele różnych
-
- ▶

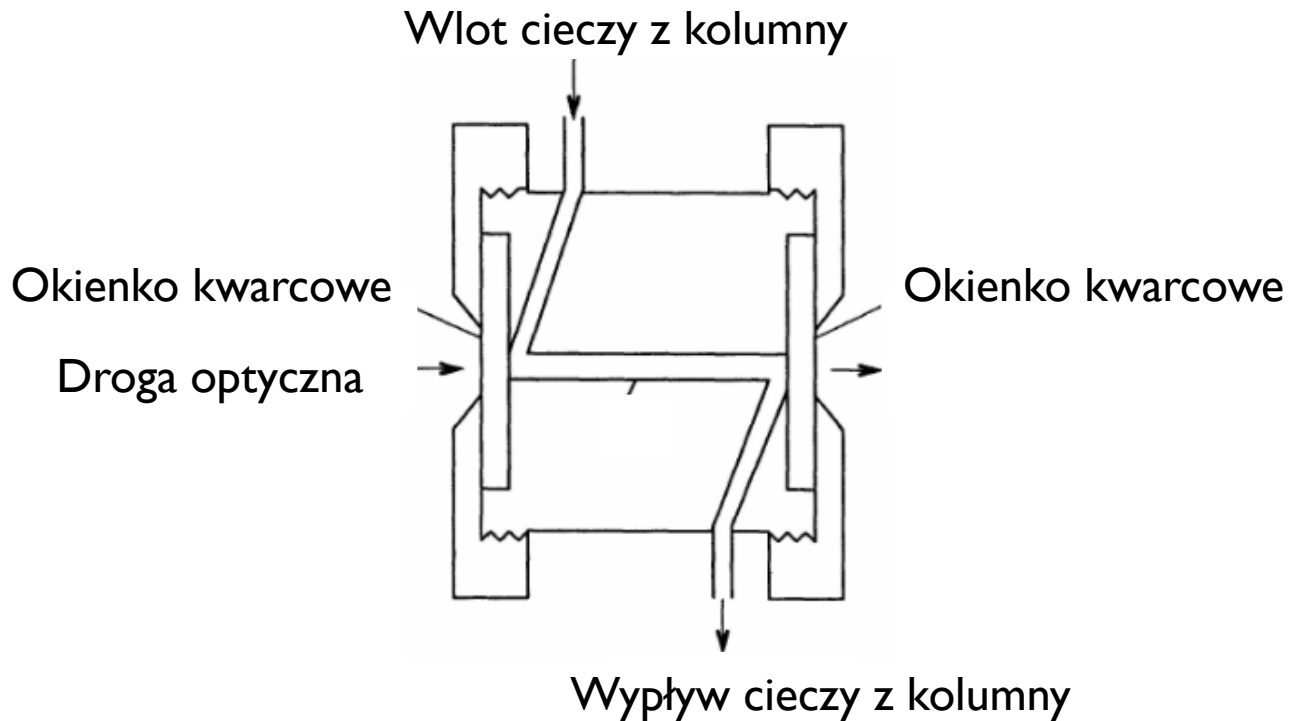
Detektory

- ▶ Ogólne – rejestrujące zmianę we właściwościach fizycznych fazy ruchomej dokonujące pomiaru różnicowego właściwości wspólnej dla próbki i fazy ruchomej np. współczynnik załamania światła, konduktywność.
- ▶ Specyficzne - rejestrujące charakterystyczne właściwości analizowanej substancji np. fluorescencja, aktywność elektrochemiczna.



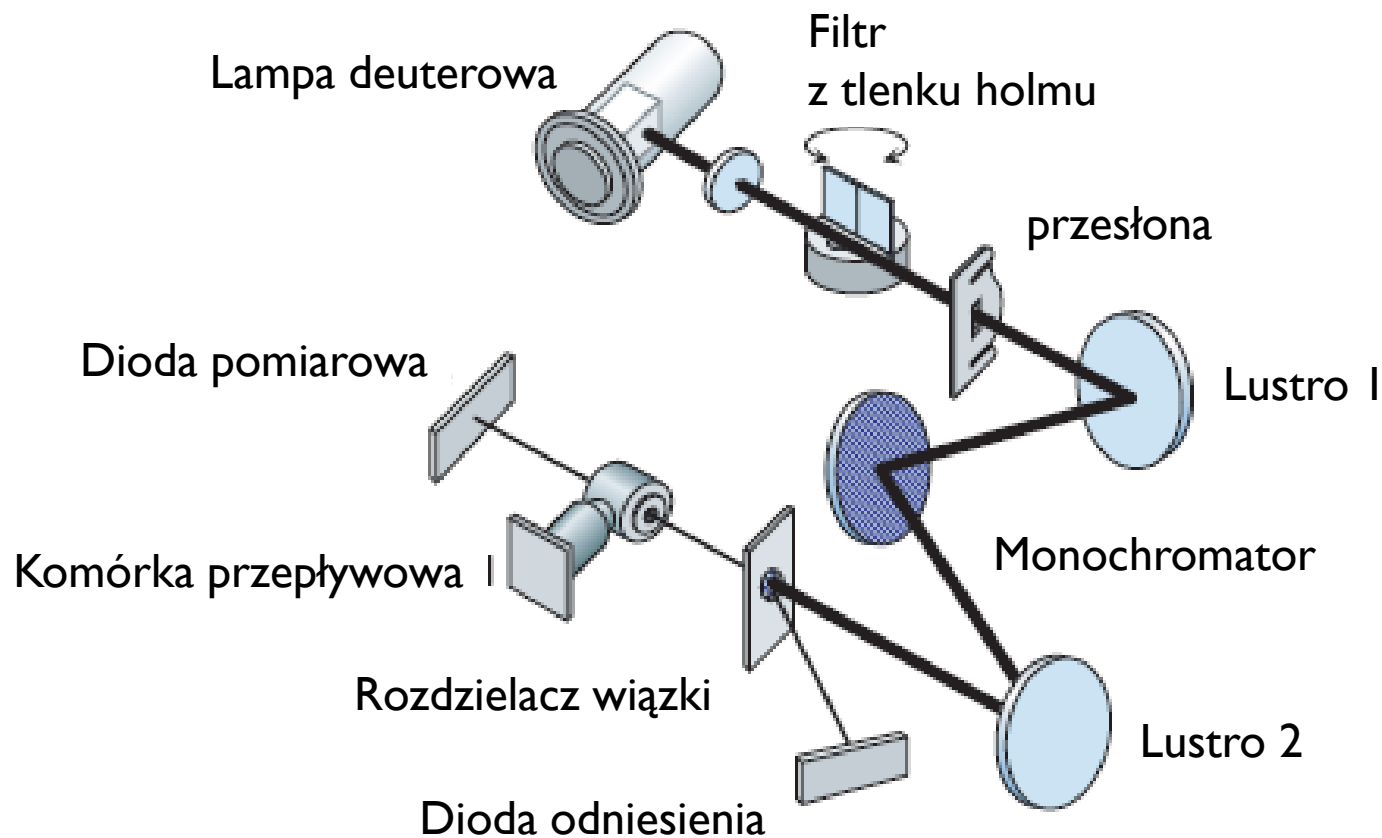
Detektory

- ▶ Komórka przepływowa detektora
 - ▶ Długość optyczna 10 mm, objętość 0,01 ml



Detektory

- ▶ **UV-Vis** (selektywny dla związków absorbujących światło w zakresie 200-800 nm)

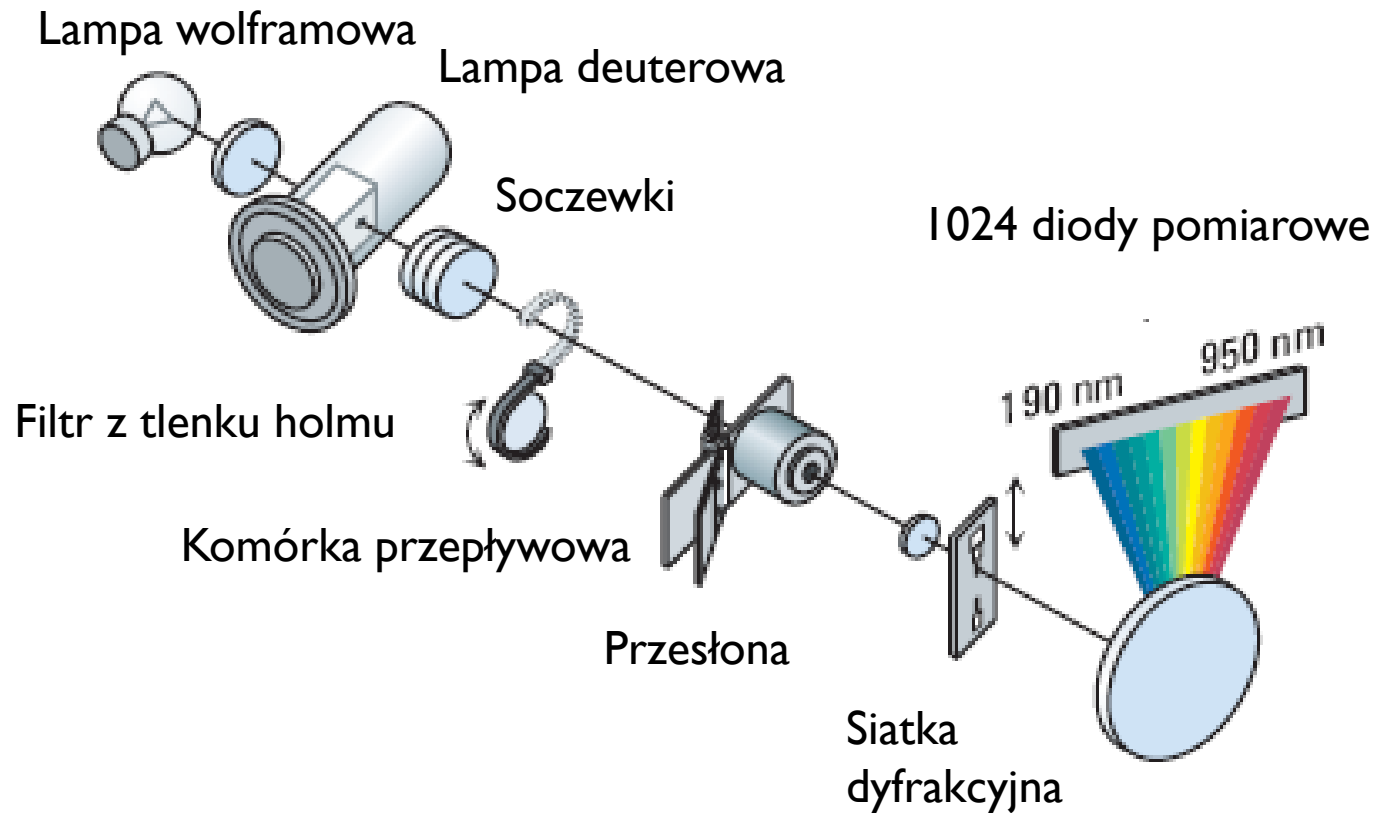


Monochromator - szczelina wejściowa wydziela wiązkę kierowaną na element dyspersyjny (siatka dyfrakcyjna)

Szczelina wyjściowa wycina właściwe pasmo z rozczepionego widma

Detektory

▶ Matryca fotodiodowa



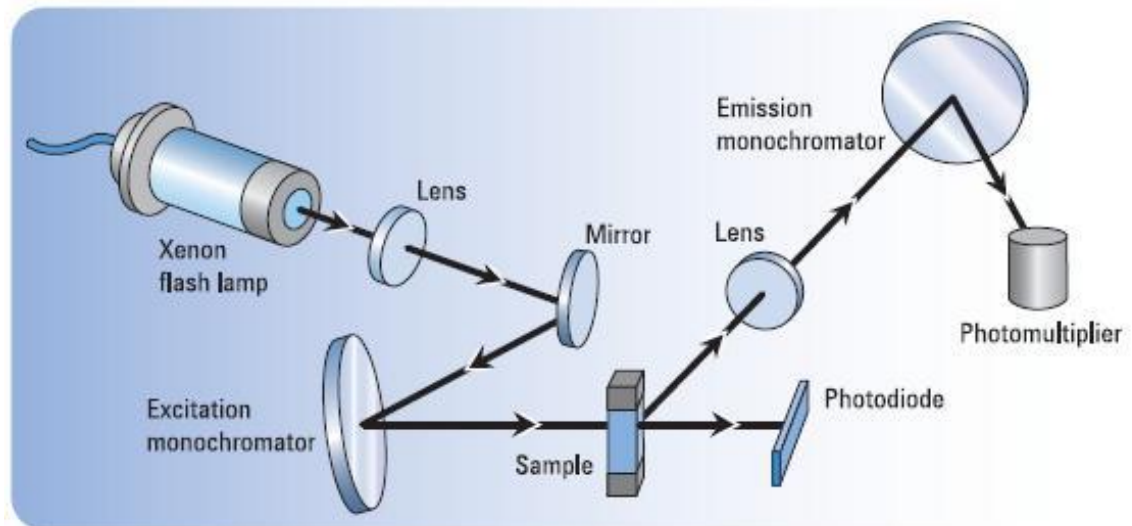
Detektory

▶ Rodzaje detektorów:

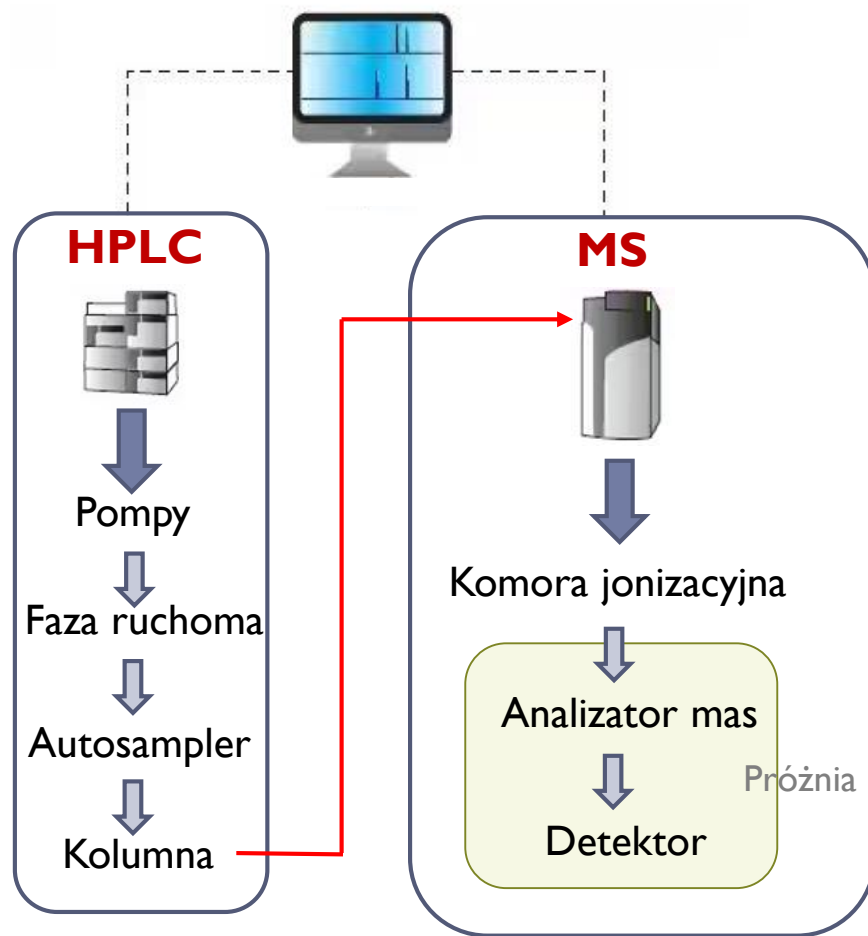
- ▶ Refraktometryczny (tylko dla elucji izokratycznej)
- ▶ Fluorescencyjny (czuły, specyficzny i selektywny)
- ▶ Elektrochemiczny (reakcje redox, faza ruchoma musi przewodzić prąd)
- ▶ Przewodnictwa (w chromatografii jonowej)

▶ Spektrometria mas

▶ FT-IR



HPLC - MS

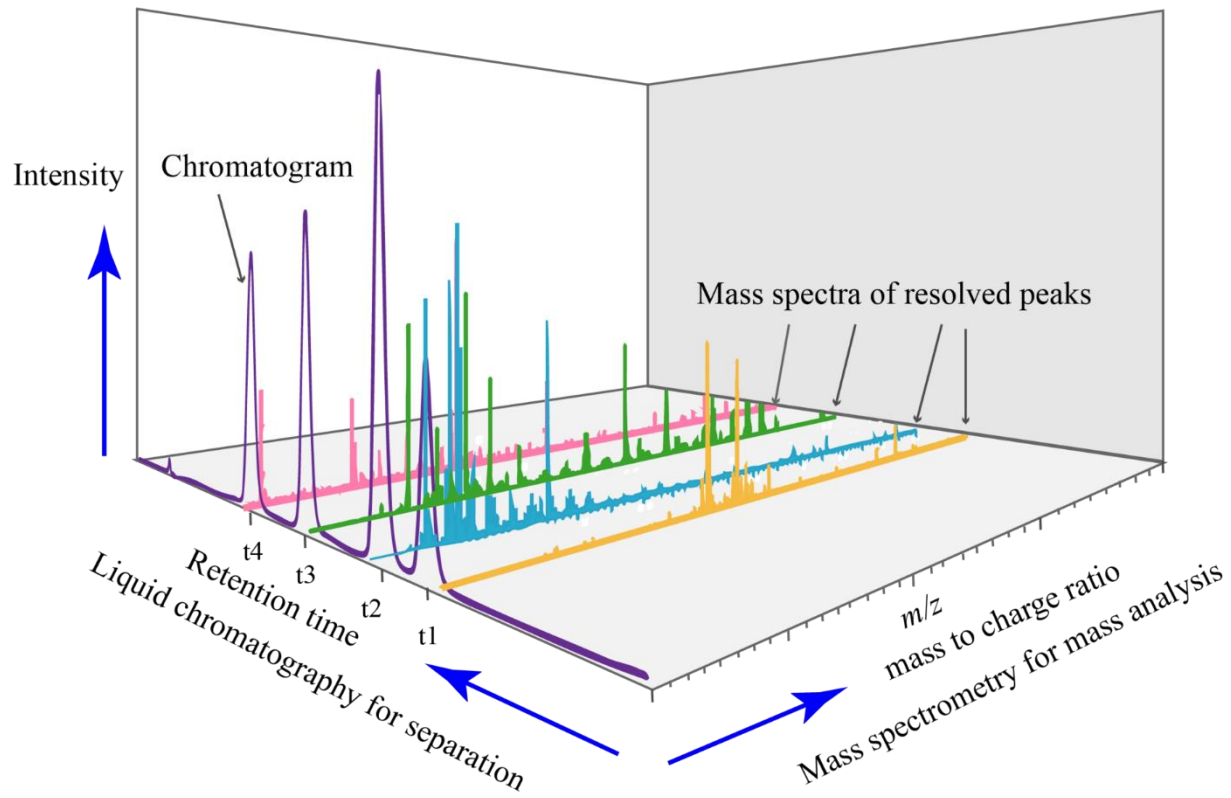


Przepływ: 1 ml/min
Ciśnienie: 100 – 250 bar



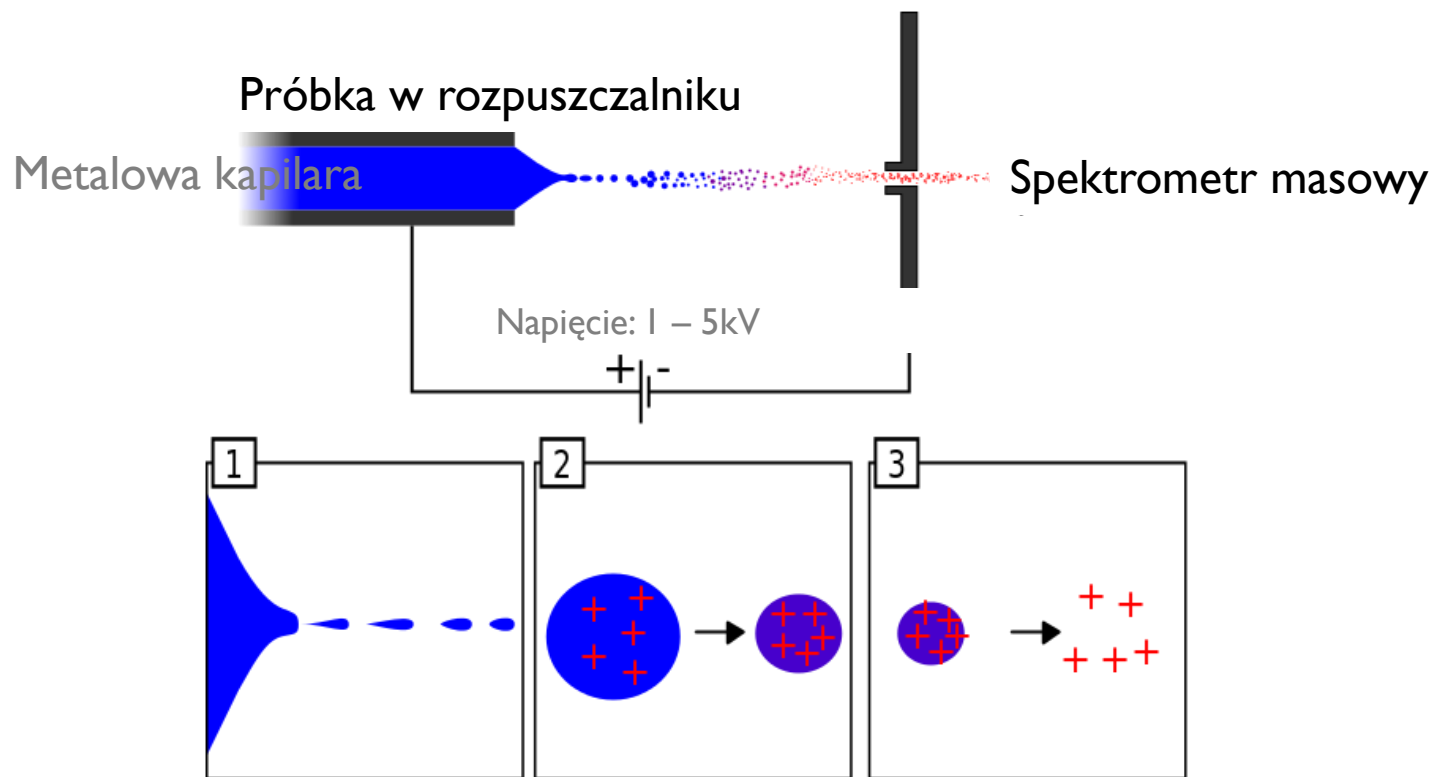
HPLC - MS

- ▶ Otrzymujemy widma masowe dla każdego piku



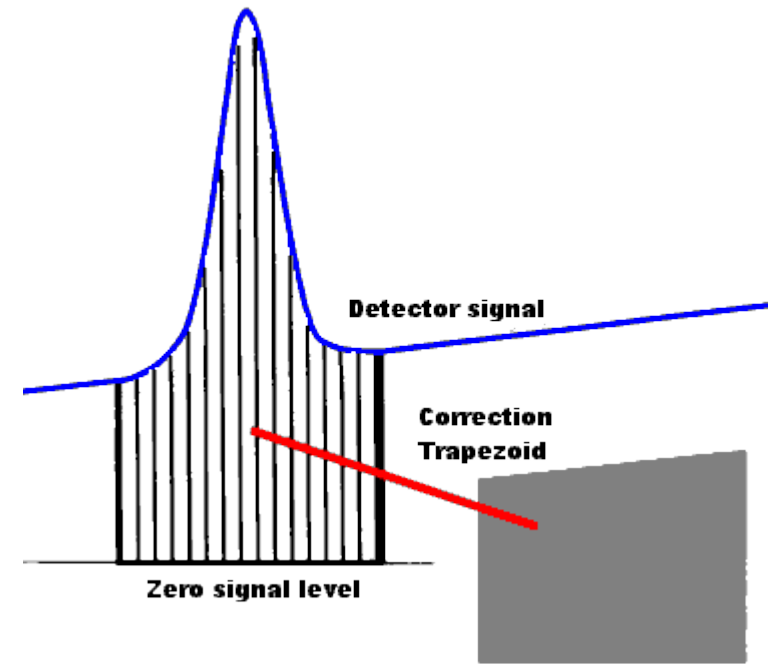
HPLC - MS

- ▶ Najczęściej do HPLC przyłączane są spektrometry z źródłem elektrospray:



Systemy obróbki danych

- ▶ Każdy program komputerowy do chromatografii powinien umożliwiać:
 - ▶ Zbieranie danych
 - ▶ Obróbkę danych



Konfiguracja HPLC

▶ HPLC preparatywne

- ▶ Dwie pompy o przepływie do 50 ml/min
- ▶ Ciśnienie do 150 bar
- ▶ Kolumny o średnicy 20 – 50 mm
- ▶ Kolektor frakcji

▶ HPLC analityczne

- ▶ Dwie pompy o przepływie do 10 ml/min (ew. 5 ml/min)
- ▶ Ciśnienie do 300 bar
- ▶ Kolumny o średnicy 4.6 mm
- ▶ Autosampler



Konfiguracja HPLC



Prosty układ HPLC:

- Pompa izokratyczna
- Ręczny układ do nastrzykiwania próbki
- Detektor UV-Vis
- Prosty kontroler



Konfiguracja HPLC



Zaawansowany układ HPLC:

- 4 pompy
- Autosampler
- Kolumna termostatowana
- Detektor diodowy
- Komputer



Podsumowanie

- ▶ Chromatografy do HPLC są układami o wielu możliwościach rozbudowy.
- ▶ Konfiguracja HPLC zależy od zastosowań.

