

Vliv systémového objemu na gradientovou separaci

Petr Butzke

Vliv systémového objemu na gradientovou separaci

Proč se liší separace směsi látek za identických podmínek na různých chromatografických systémech?

Chromatografické systémy mají rozdílnou specifikaci:

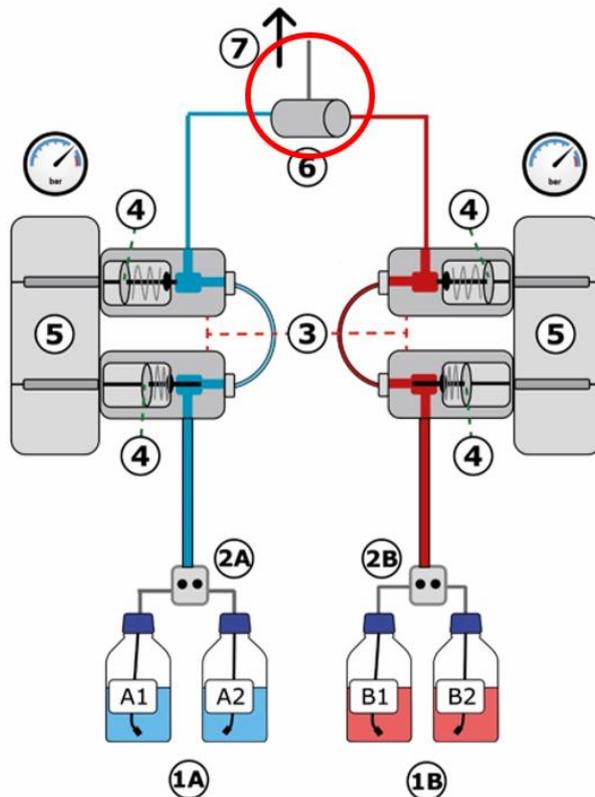
Gradient delay volume (systémový objem)

Pojmy „dwell volume“, „void volume“ a ekvivalenty v češtině

- **Dwell volume (systémový objem)**
- Vnitřní objem fluidických cest chromatografického systému od místa, kde dochází k smísení složek mobilní fáze při tvorbě gradientu mobilní fáze až k místu injektáže vzorku.
- **Void volume (dead volume, mrtvý objem)**
- Objem mobilní fáze pro nezadržovanou složku v chromatografickém systému. Složka se pohybuje rychlostí mobilní fáze. Jsou to fluidické cesty (a volný objem v koloně) mezi injektorem a detektorem.

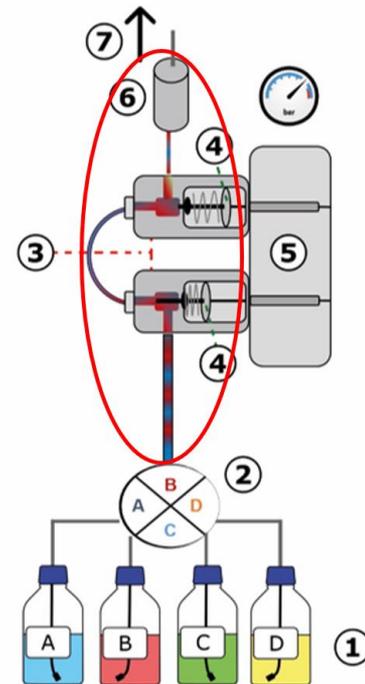
Vysokotlaký gradient

- Tvorba vysokotlakého gradientu s použitím dvou čerpadel.
- (1) zásobníky mobilní fáze,
- (2A,B) selekční ventily,
- (3) hlavy čerpadla,
- (4) písty čerpadla s pružinou,
- (5) pohonná jednotka čerpadla s motorem,
- (6) směšovač,
- (7) směr toku mobilní fáze k vysokotlaké části systému.

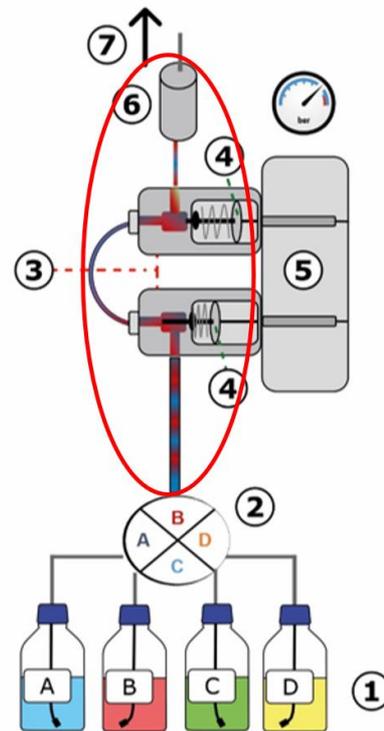
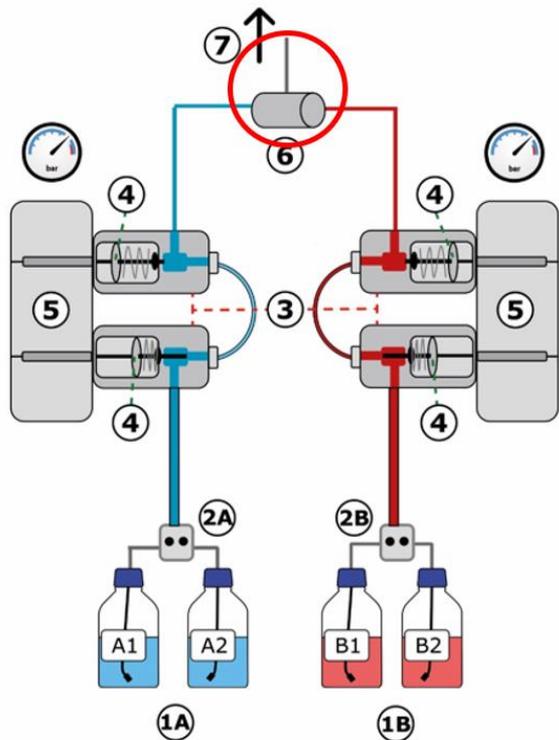


Nízkotlaký gradient

- Tvorba nízkotlakého gradientu pomocí rychlého proporcionálního ventilu.
 - (1) zásobníky mobilní fáze,
 - (2) gradientový proporcionální ventil,
 - (3) hlavy čerpadla,
 - (4) písty čerpadla s pružinou,
 - (5) pohonná jednotka čerpadla s motorem,
 - (6) směšovač,
 - (7) směr toku mobilní fáze.



Systemový objem porovnání vysokotlaký vs. nízkotlaký gradient



Příklad gradientové separace – Acquity H class

Efekt nastavení synchronizace startu gradientu s nástřikem vzorku.

Příklad gradientu:

	Time (min)	Flow Rate (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve
1	Initial	0.600	90.0	10.0	0.0	0.0	Initial
2	0.75	0.600	90.0	10.0	0.0	0.0	6
3	3.00	0.600	5.0	95.0	0.0	0.0	6
4	3.10	0.600	5.0	95.0	0.0	0.0	6
5	3.30	0.600	90.0	10.0	0.0	0.0	6
6	25.00	0.000	90.0	10.0	0.0	0.0	11

A: Voda

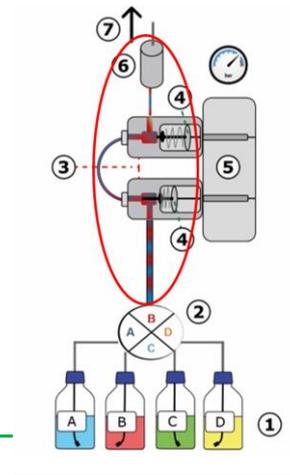
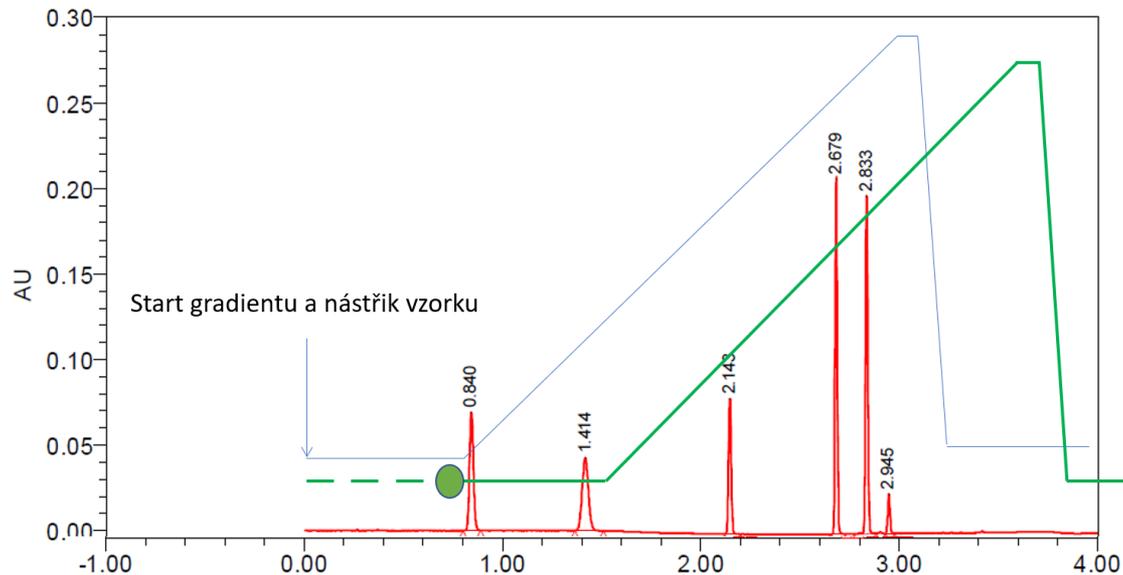
B: ACN

Průtok mobilní fáze 0,6 ml/min.

Gradient má reálně zpoždění dané systémovým objemem.

V tomto konkrétním příkladu cca 450 μ l.

Příklad gradientové separace – Acquity H class



Nástřik vzorku a start gradientu mobilní fáze proběhl v čase „0“.

Gradient podle zadání: 

Reálný gradient (efekt „dwell volume“): 

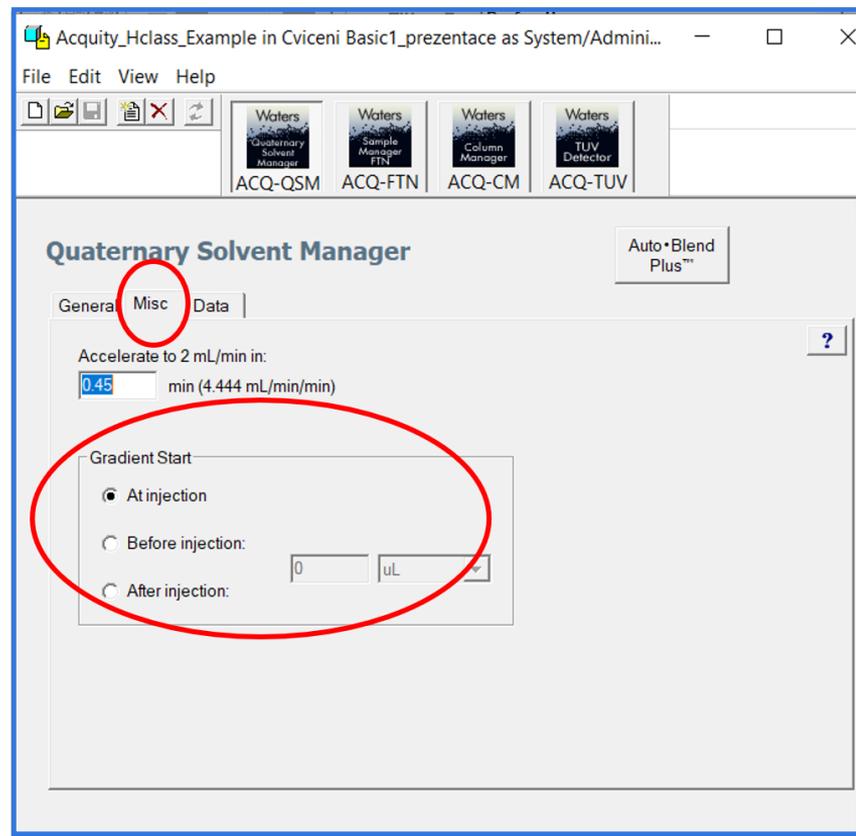
Možnosti eliminace rozdílů systémového objemu HPLC/UPLC/UHPLC chromatografů

Použití funkce „Gradient Start“ umožňuje eliminovat rozdíl v systémovém objemu při transferu metod bez zásahu do psaného gradientu.

„At injection“ (default nastavení)

„Before injection“

„After injection“



Efekt použití znalosti systémového objemu chromatografu sub 2 μm částice

Waters

THE SCIENCE OF FLUIDIC CONTROL™

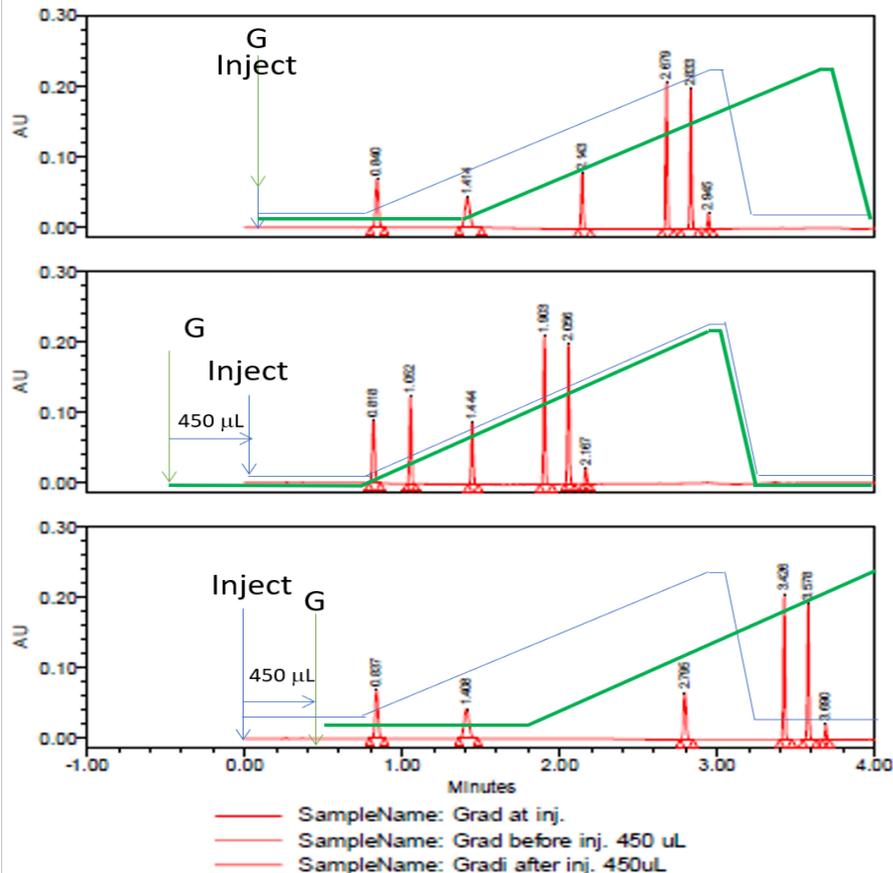
Příklad separace s použitím eliminace systémového objemu.

1. Start gradientu a nástřiku v jednom okamžiku.
2. Gradient odstartován, po odčerpání **450 μL** následuje nástřik vzorku.
3. Nástřik, gradient odstartován po odčerpání **450 μL** .

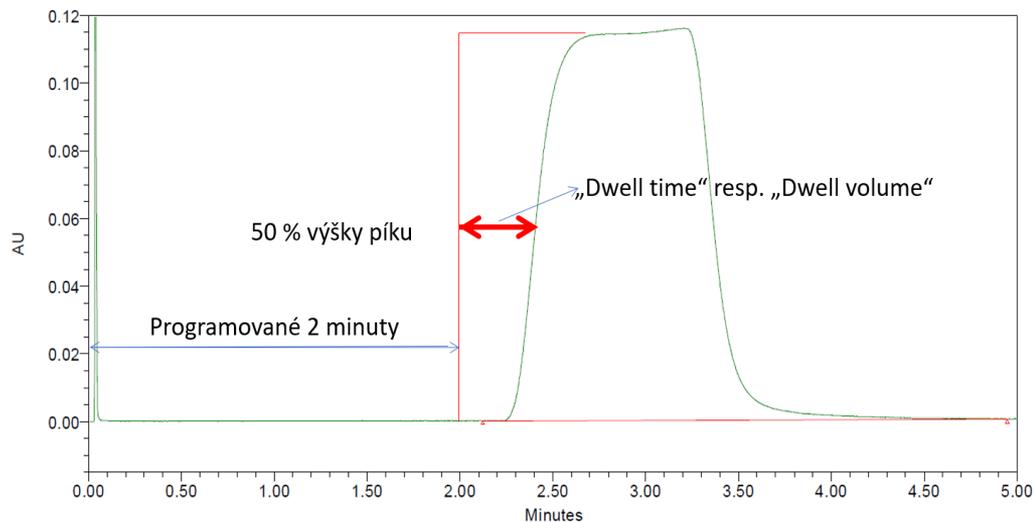
Průběh gradientu dle instrumentové metody:



„Reálný“ průběh gradient:



Jak zjistit hodnotu systémového objemu



Line A: voda, Line B : 10 % THF voda, průtok: 1 ml/min

Gradient: 0 min 100 % A, ve 2. minutě skoková změna na 100 % B, 3. min 100 % A.

Fluidické spojení: přes spojku

Detekce 220 nm.

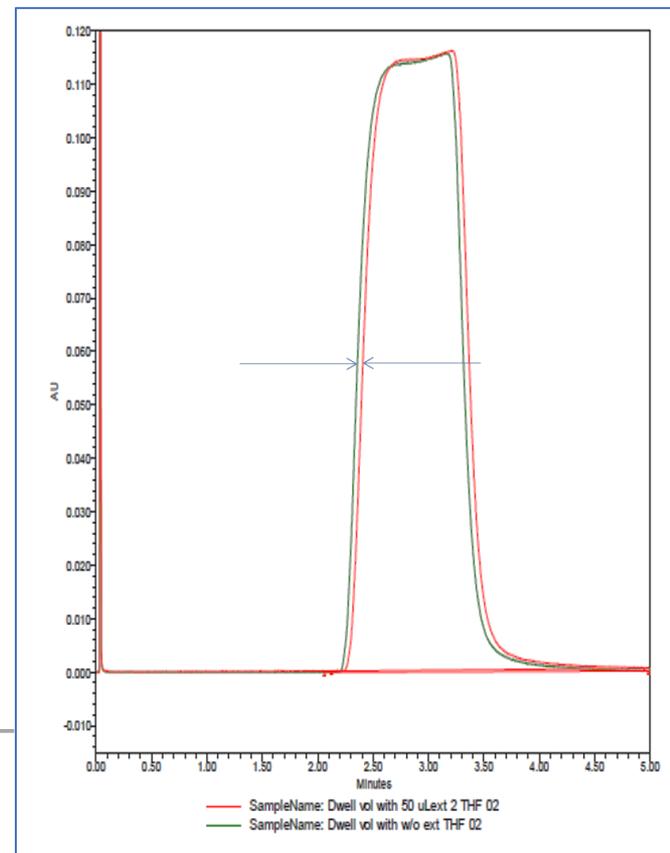
Jak zjistit hodnotu systémového objemu.

Ukázka změření rozdílu hodnoty „dwell volume“ na systému Acquity H class:

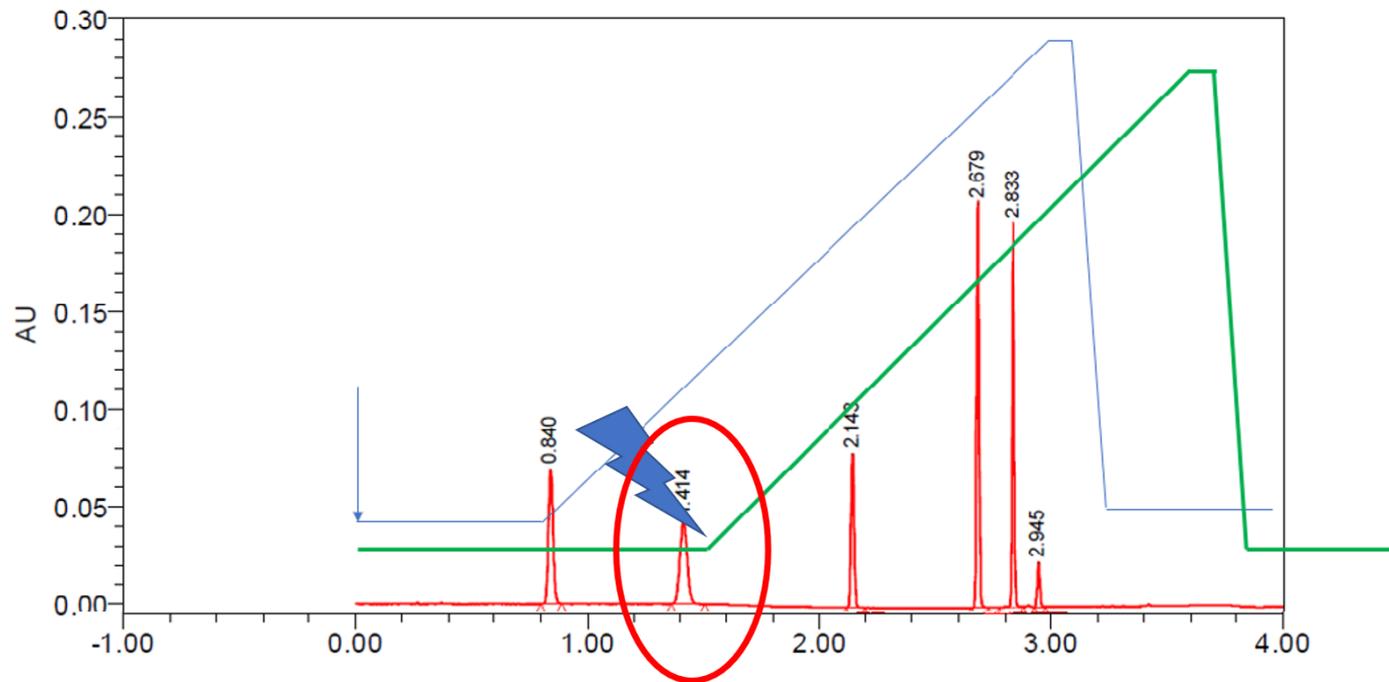
Zelený záznam: injektor bez 50 μl extended loop.
Červený záznam: nainstalována 50 μl ext. loop.

Primitivním změřením pravítkem a přepočtem vzdálenosti mezi křivkami na objem (dle velikosti průtoku mobilní fáze)*: 45 μl .

)* Běžná tolerance na přesnost smyček je 15 % a nepřesnost měření malé vzdálenosti pravítkem.



Tip pro vývoj separačních podmínek



Efekt použití znalosti systémového objemu chromatografu 3,5 µm částice



- Instrumentová metoda – gradientová tabulka W2695

General | Degas | Events | Flow | Temperature | Solvents | Channel

General System Parameters

Stroke Volume (µL) 100µL (flow rates <= 3.030 mL/m) Bubble Detect

Syringe Draw Rate (µL/sec) Normal **Pre Column Volume (µL) 1000.0**

Depth Of Needle (mm) 0.0 Chart Out %A

Column Position No Change Needle Wash Time Normal

Equilibration Time (mins) 0.00

General | Degas | Events | Flow | Temperature | Solvents | Channel

Pressure Limits

High Limit (psi) 4000.0 Low Limit (psi) 0.0

Programmed Flow

Accelerate to 10.0 mL/min in:

Pump Mode Gradient 2.00 min (5.00 mL/min/min)

Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve
1	1.40	90.0	10.0	0.0	0.0	
2	2.00	90.0	10.0	0.0	0.0	6
3	7.00	1.40	5.0	95.0	0.0	6
4	7.10	1.40	90.0	10.0	0.0	6
5	25.00	1.40	90.0	10.0	0.0	11

Efekt použití znalosti systémového objemu chromatografu

3,5 µm částice

- Separační modul W2695

- Start I + G společně

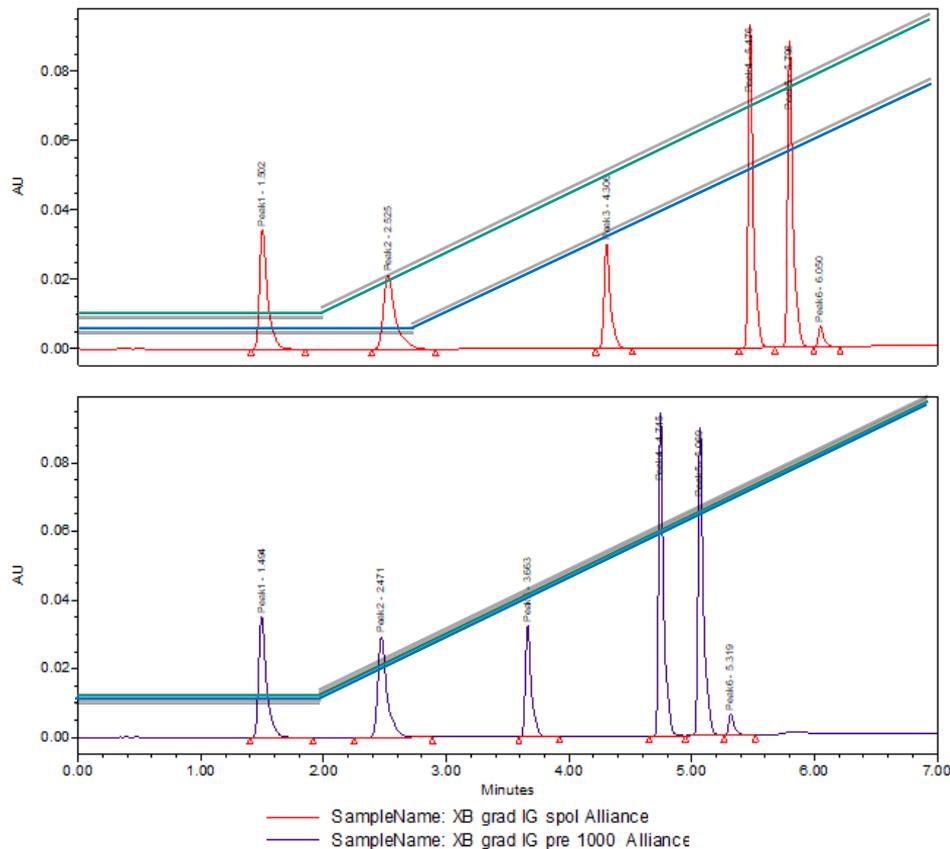
Průběh gradientu dle
instrumentové metody:



„Reálný“ průběh gradient:

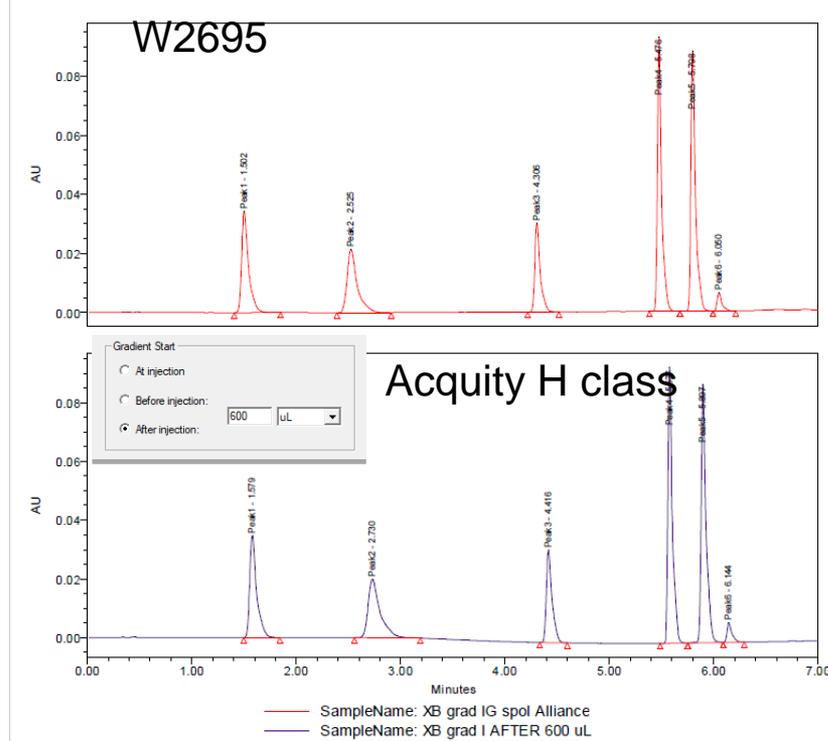
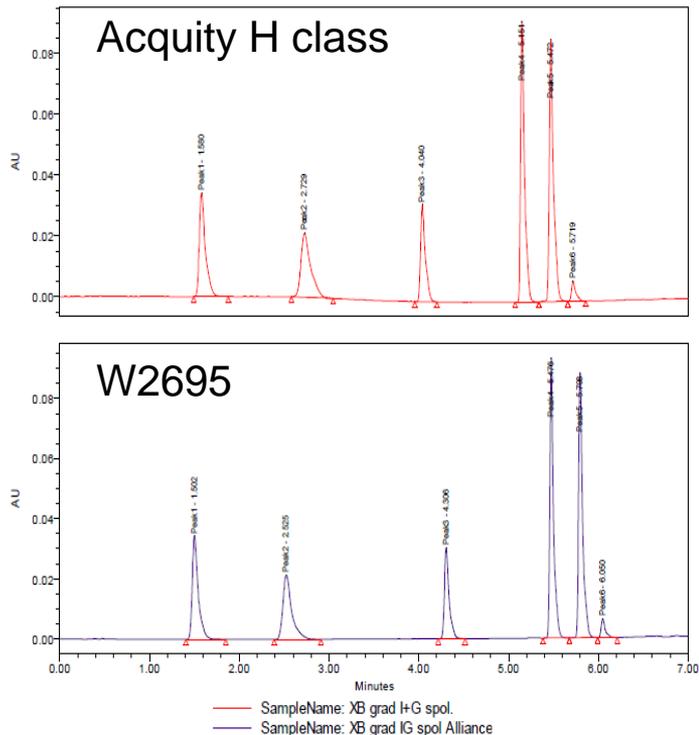


- Start G, po odčerpání 1000 µl
proveden nástřik



Efekt použití znalosti systémového objemu chromatografu 3,5 μm částice

Porovnání:



Efekt použití znalosti systémového objemu chromatografu 3,5 µm částice

■ Porovnání: W2695

General | Degas | Events | Flow | Temperature | Solvents | Channel |

Pressure Limits
High Limit (psi) Low Limit (psi)

Programmed Flow
Accelerate to 10.0 mL/min in:
Pump Mode min (5.00 mL/min/min)

Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve	
1	1.40	90.0	10.0	0.0	0.0		
2	2.00	90.0	10.0	0.0	0.0	6	
3	7.00	1.40	5.0	95.0	0.0	0.0	6

Acquity H class

Auto • Blend Plus™

Quaternary Solvent Manager

General | Misc | Data |

Solvents
A
B
C
D

Pressure Limits
Low: psi
High: psi

Seal Wash Period: min

Gradient:

Time	Flow (mL/min)	%A	%B	%C	%D	Curve	
1	Initial	1.400	90.0	10.0	0.0	0.0	Initial
2	2.00	1.400	90.0	10.0	0.0	0.0	6
3	7.00	1.400	5.0	95.0	0.0	0.0	6

Comment:

Gradient Start
 At injection
 Before injection:
 After injection:



Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™