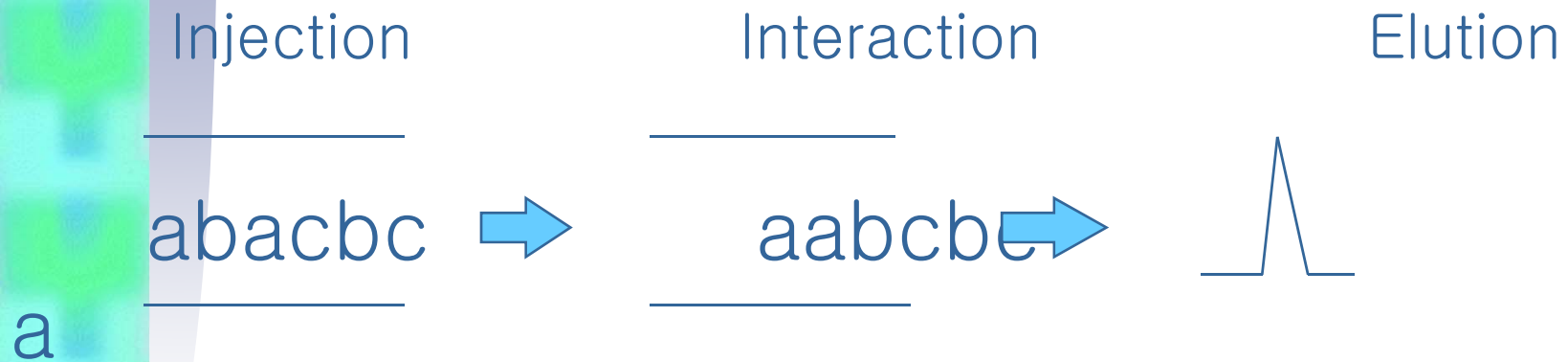




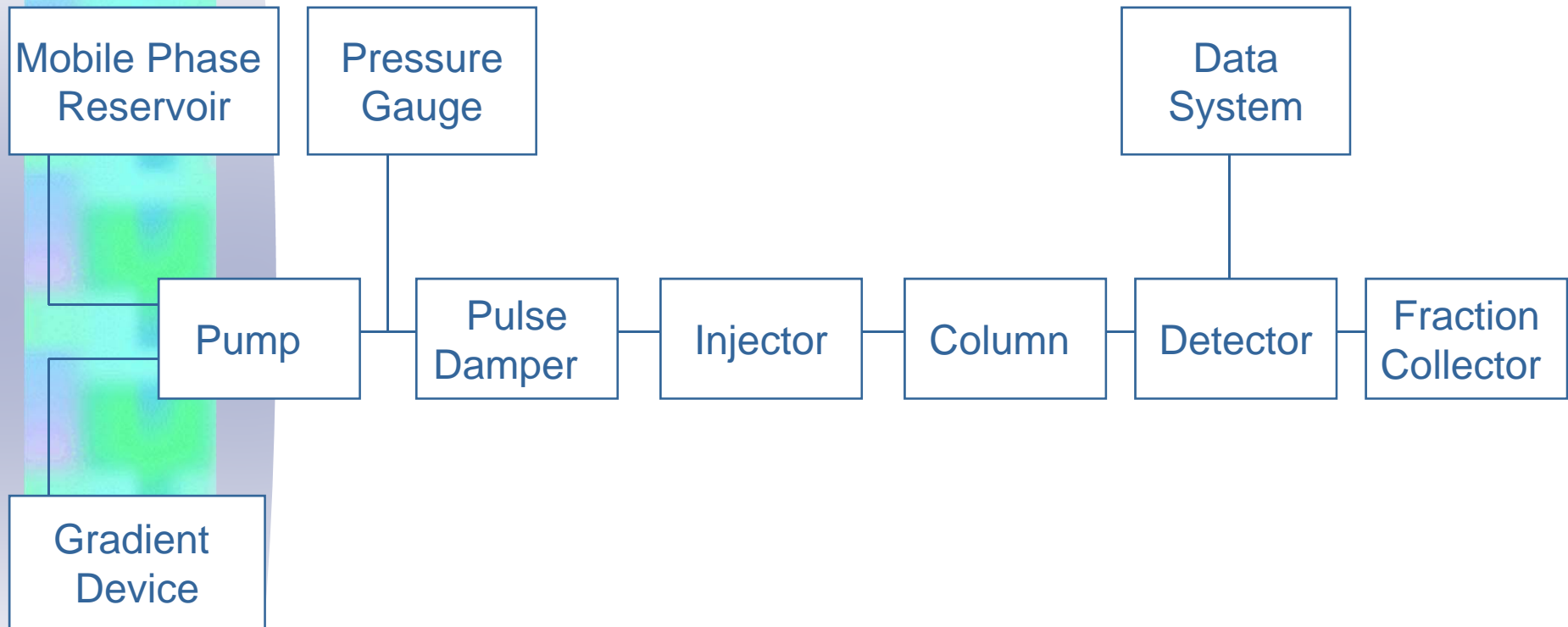
HPLC BASICS

Chromatography란 ?

혼합된 시료성분이 *이동상* 과 *고정상* 사이를 흐르면서 흡착, 분배, 이온교환 또는 분자크기 배재작용 등에 의해 각각의 단일 성분으로 분리되는 것을 말한다. 분리, 정성, 정량 등의 분석목적과 분리, 정제, 분취 목적에 이용된다.



HPLC System



Solvent Delivery System (Pump)

1. Pump

a.

b. 가 .

2. Waters Pump

a.

b. Pulse

(Gear

c. 가

d. Isocratic

e.

system

Cam

Pulse가 .)

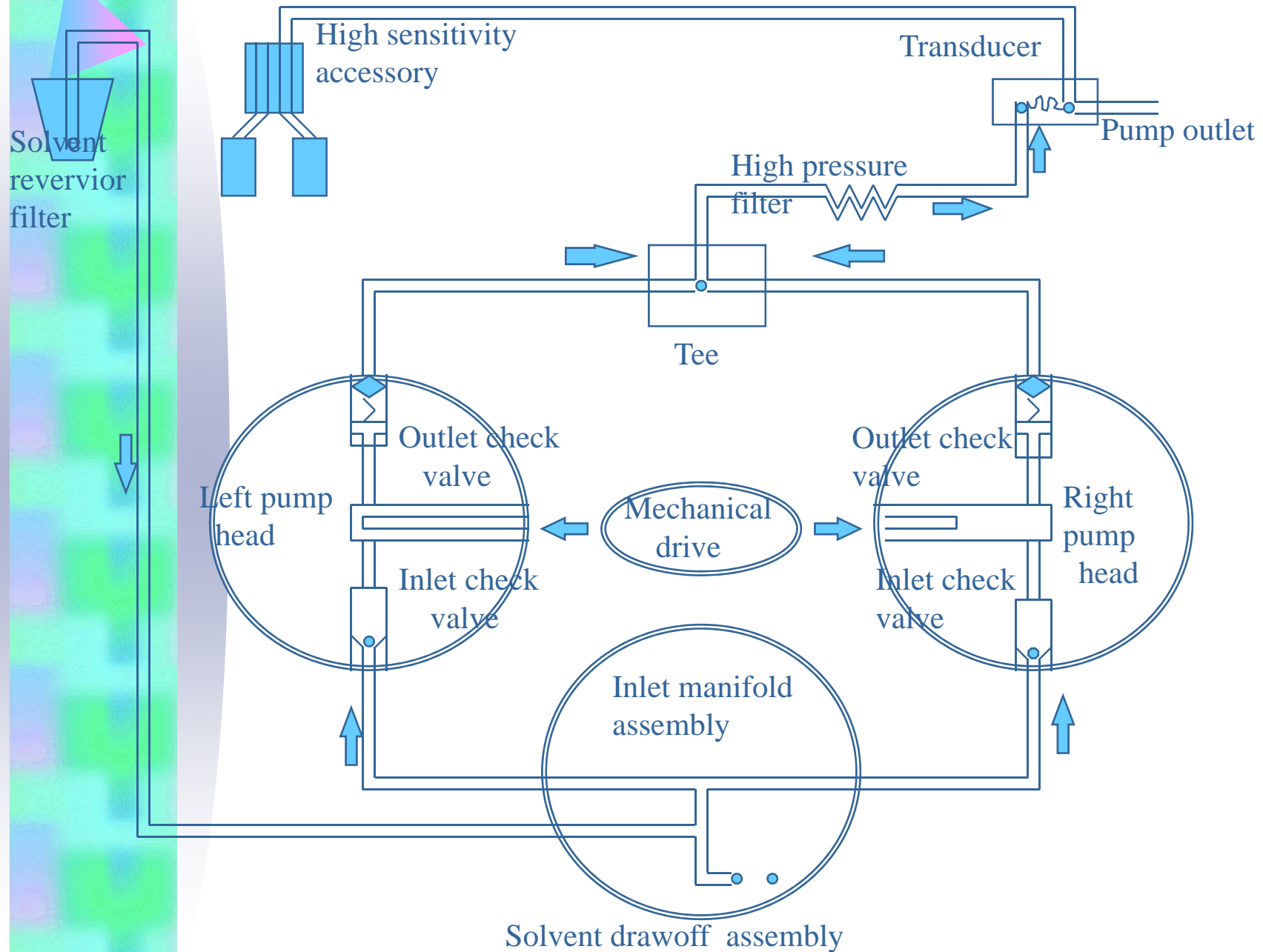
가 .

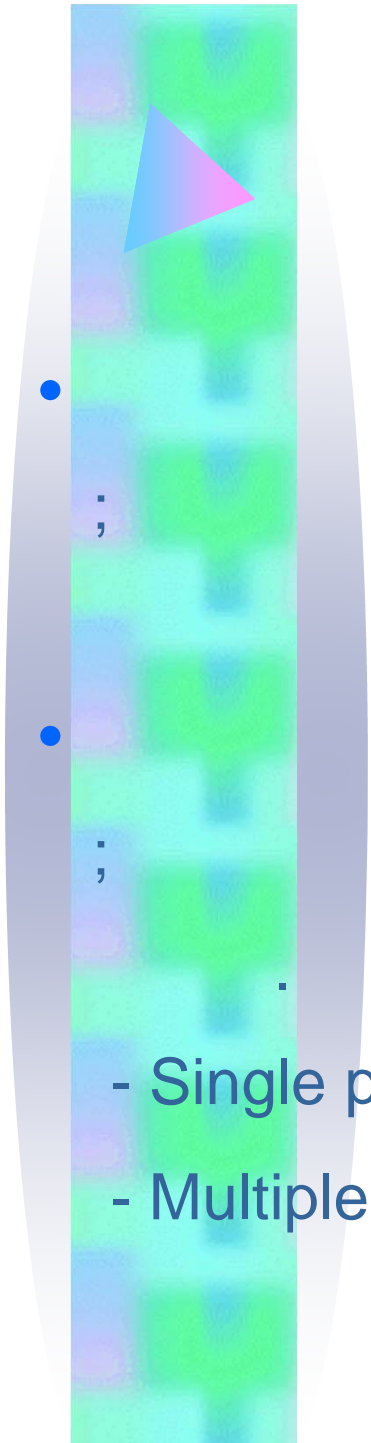
Gradient

.

.

FLOW PATH DIAGRAM





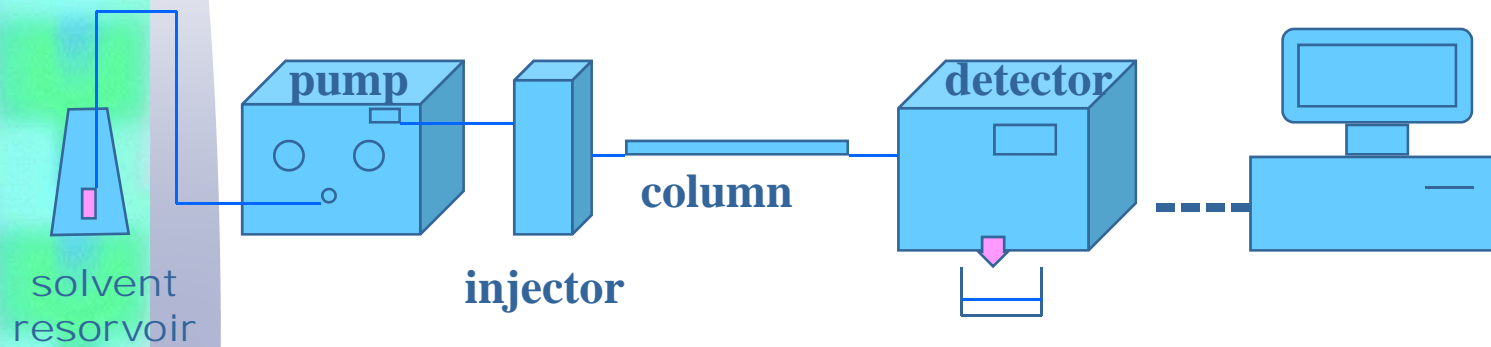
(Isocratic Mode)

(Gradient Mode)

가

- Single pump ; Low pressure
- Multiple pump ; High pressure

일정용매 조성법



- 가

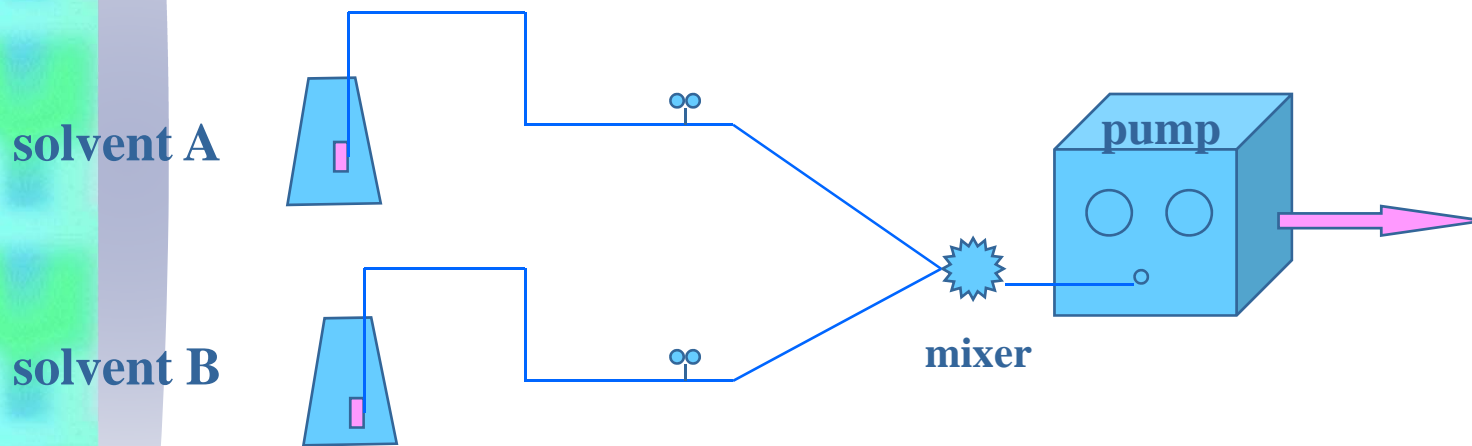
pump가

구배용매 조성법 (Gradient Mode)

Gradient Mode는 분석동안 용매의 조성을 바꾸어 줄 수 있을 뿐만 아니라, 시간에 따른 변화 및 그 형태 까지도 변화시킬 수 있다.

1) Single pump.

Low pressure



2) Multiple pump

High pressure

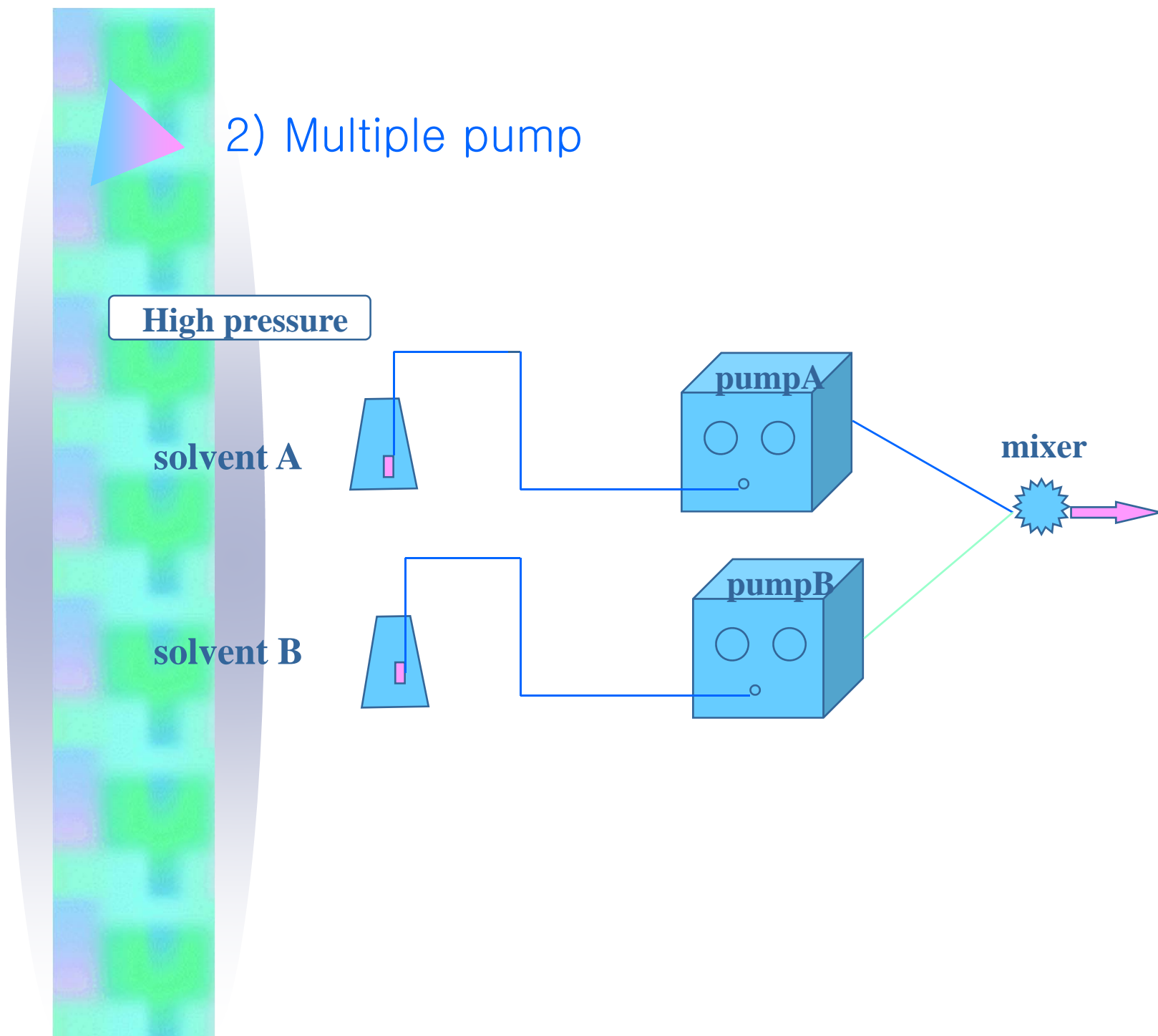
solvent A

solvent B

pumpA

pumpB

mixer





Injector

loading

Column

Injector

1. Rheodyne injector (Valve injector)
2. U6K injector (Syringe & Valve Mixed injector)
3. Automatic injector

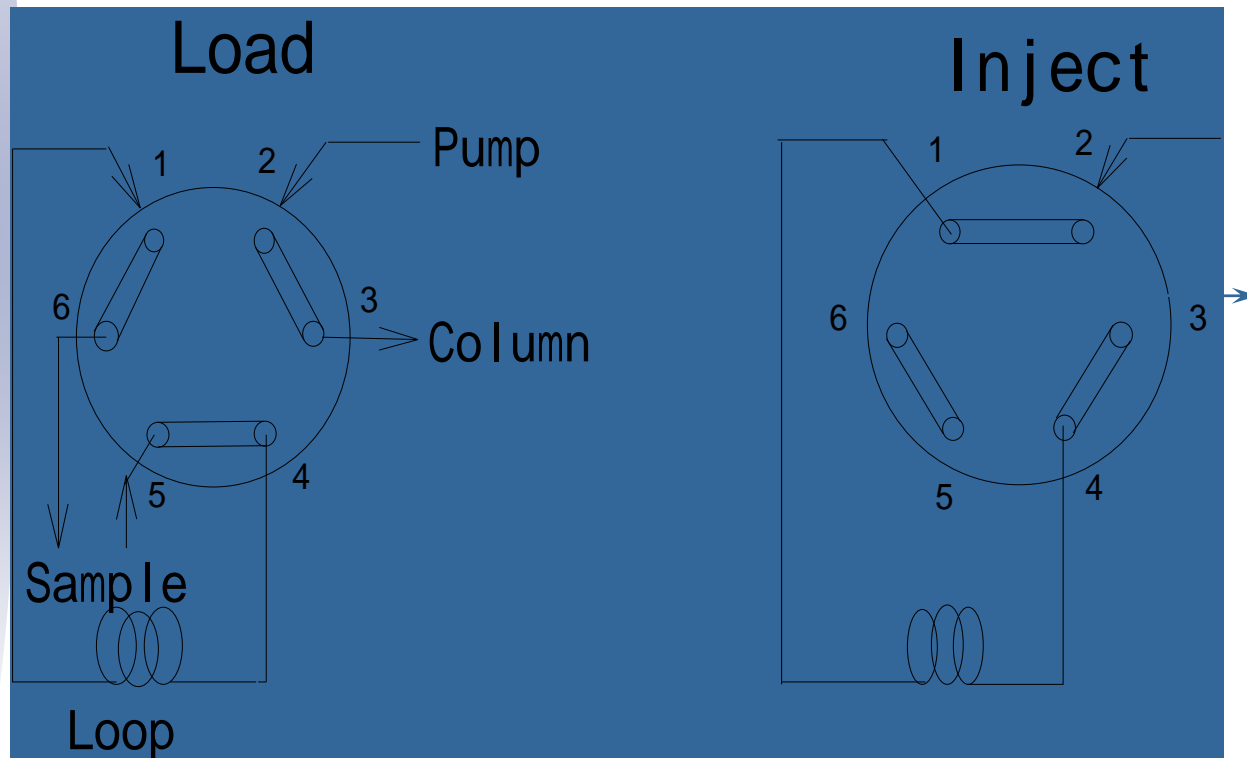
Rheodyne injector

1. loop

,

loop

2. Sample loop





Auto Injector

1. Free injection

2. 96 Step 가

3. 4 mL vial : 48 , 1 mL vial : 96
 가

4. 가 :

5. 가 :

6. Auto priming Auto needle washing 가



컬럼

◆ 3.5um, 4um, 5um, 6um, 7um, 10um, 37um, 55um, 75um

◆ Silica, Alumina, Silica-Bonded, Polymer(resin)-Bonded

➤ : Spherical, irregular

➤ Pore : 50 A ~ 300 A

충진제의 특성

- Pore size & Distribution :
 - Small Pore = higher efficiency = less band broadening
- Spherical or Irregular :
 - Irregular = higher Surface area = higher carbon load
 - Spherical = lower pressures = longer life
 - Spherical = better structural stability = longer life
- Particle size
 - Smaller particle = higher operating pressure = higher efficiency

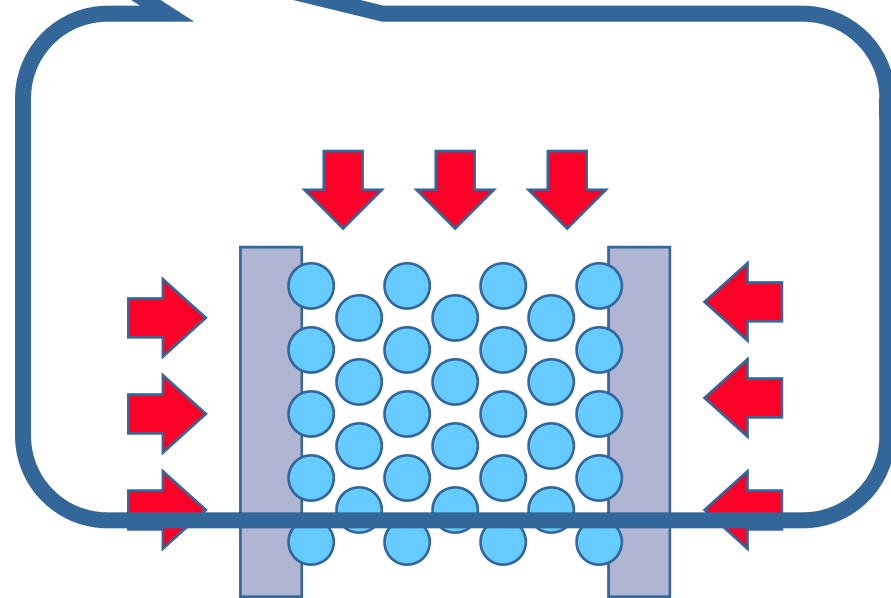


컬럼의 종류

- 재질에 따른 분류
 - Steel 컬럼
 - PEEK 컬럼
 - Radial-pak 컬럼
- 분리기작에 따른 분류
 - 손상컬럼
 - 역상컬럼
 - 이온컬럼
 - 크기배재컬럼

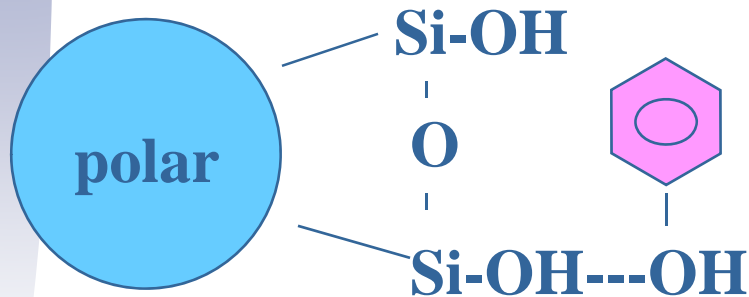
재질에 따른 분류

- Steel 컬럼
 - Steel 카트리지 컬럼 - End fitting 장치
- PEEK (polyetheretherketone) 컬럼
- 플라스틱 Radial-Pak 카트리지컬럼
 - 방사압축기술

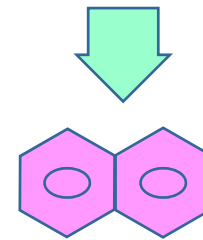


1. Normal Phase(흡착작용)

- Functional group의 polarity에 의한 분리이다.
- 일반적으로 non-aqueous, non-polar solvent를 사용한다 ; 극성이 큰 물질이 가장 나중에 용출된다.



Hexane

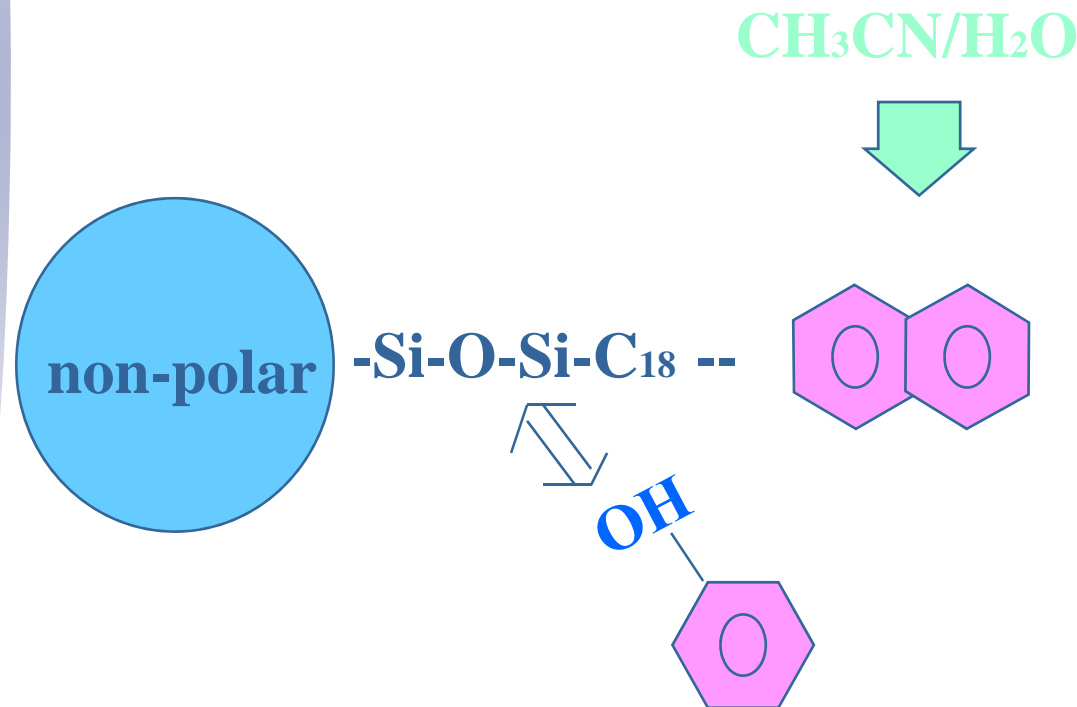


순상총전컬럼의 종류

- Silica Phase
 - Resolve Silica, uPorasil, Nova-pak Silica
- Bonded Phase
 - Nova-pak CN, NH₂
 - u-Bondapak CN, NH₂
 - Resolve CN, NH₂

2. Reverse Phase(분배 작용)

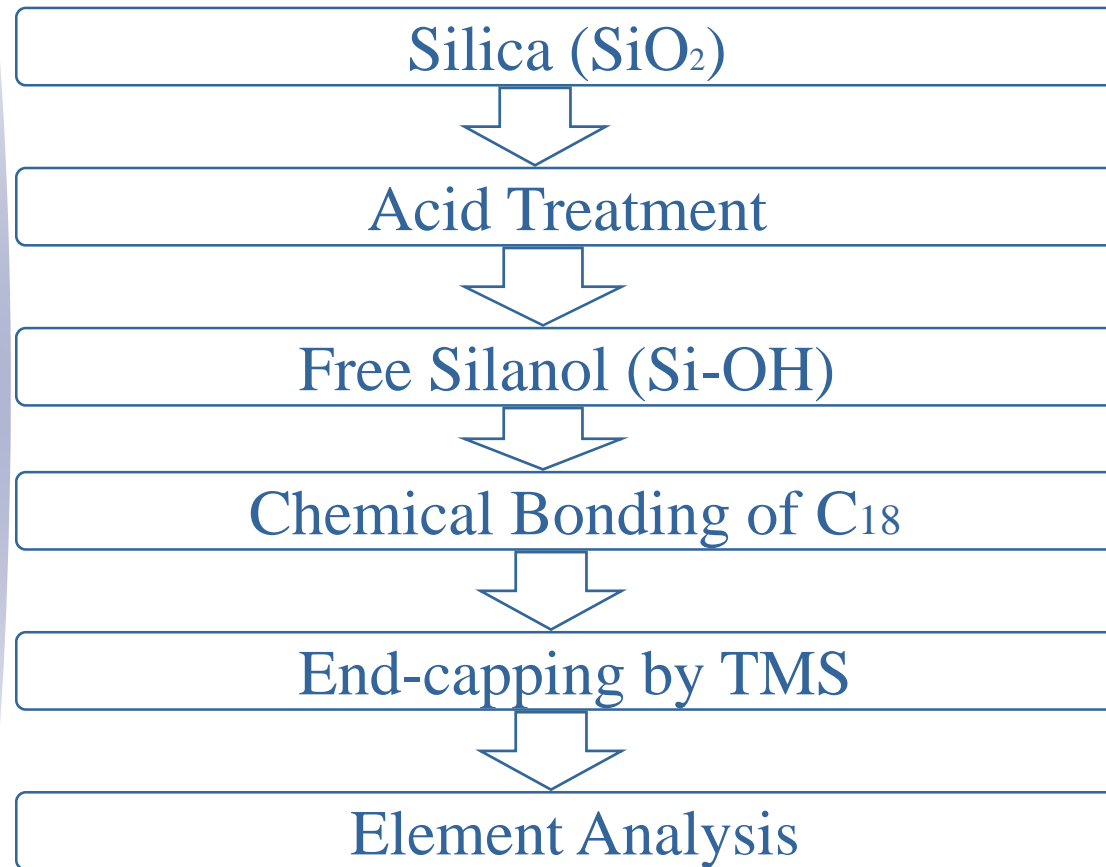
- Bonded compound(C18, C8, CN, ph)와 분석물질간의 상호작용에 의한 분리
- 비극성이 큰 물질이 가장 나중에 용출된다



역상 충전 컬럼의 종류

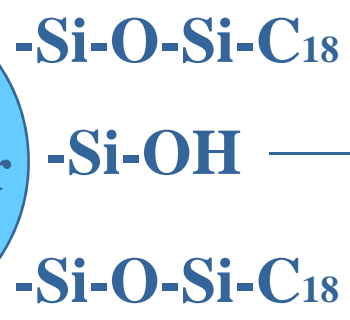
- ☞ u-Bondapak C18, CN, Phenyl
- ☞ Resolve C8, C18, CN, Phenyl
- ☞ Lichrosorb RP-18, RP-8
- ☞ Deltapak C18, C8
- ☞ Symmetry C18, C8
- ☞ Symmetryshield C8

C₁₈ Column 제조방법



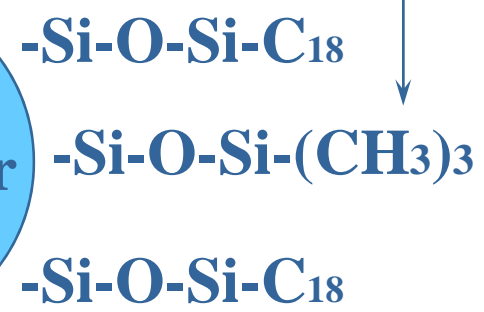
End-capping이란?

non-polar



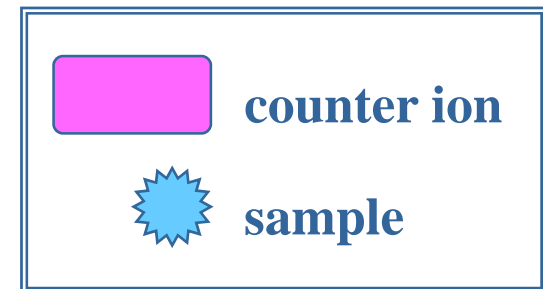
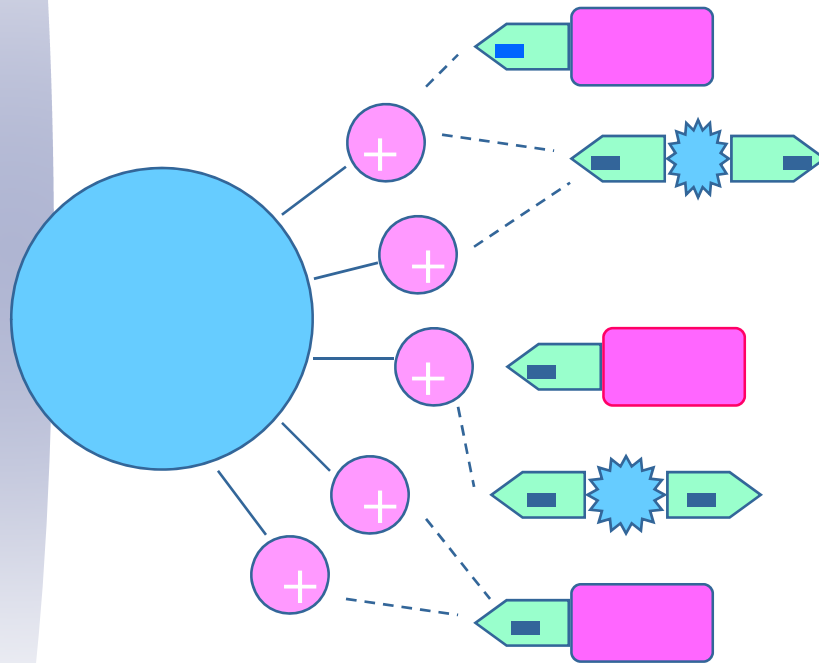
TMS-Cl

non-polar



3. Ion Exchange(이온 교환 작용)

; 이온화도의 차이에 의해 분리 된다.

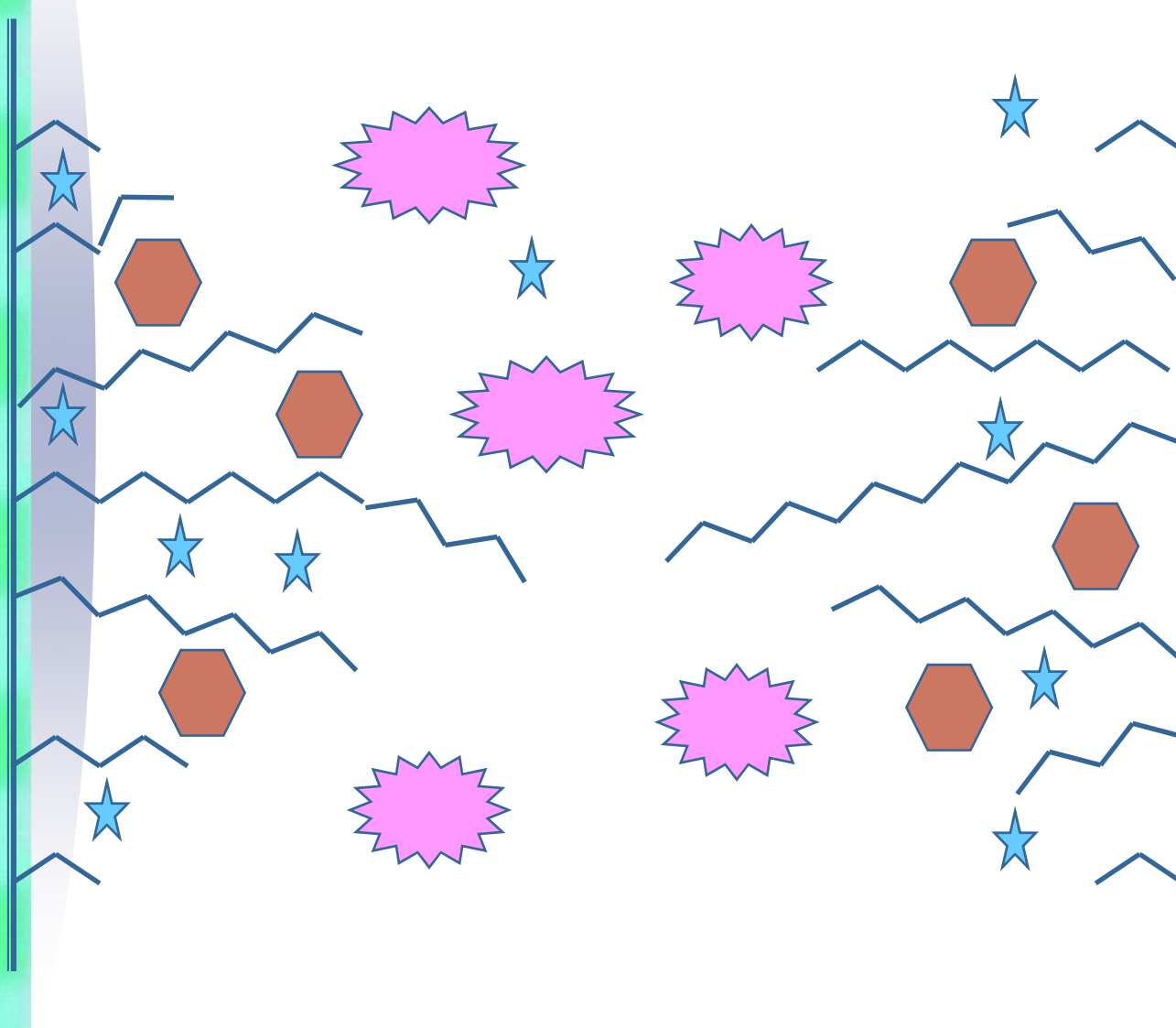




이온교환컬럼의 종류

- IC-pak Anion/Cation
- SAX(Strong Anion Exchanger)/SCX
- Protein-pak DEAE/SP HR

D. Size Exclusion(분자체작용)





분자체 column의 종류

- GPC : Styragel HR, HT, HMW Series
- Aqueous GPC : Ultrahydrogel Series
- Aqueous GFC : Protein-pak Series



[Empty box]

> 2000

< 2000

Hanxane

Y

Silica, Porasil

N

MeOH

Y

CN, Ph, C8, C18

N

THF

Y

Styragel HR, HT, HMW

N

IONIC

Y

NR₃, COO, SO₃

Organic Sol.

N

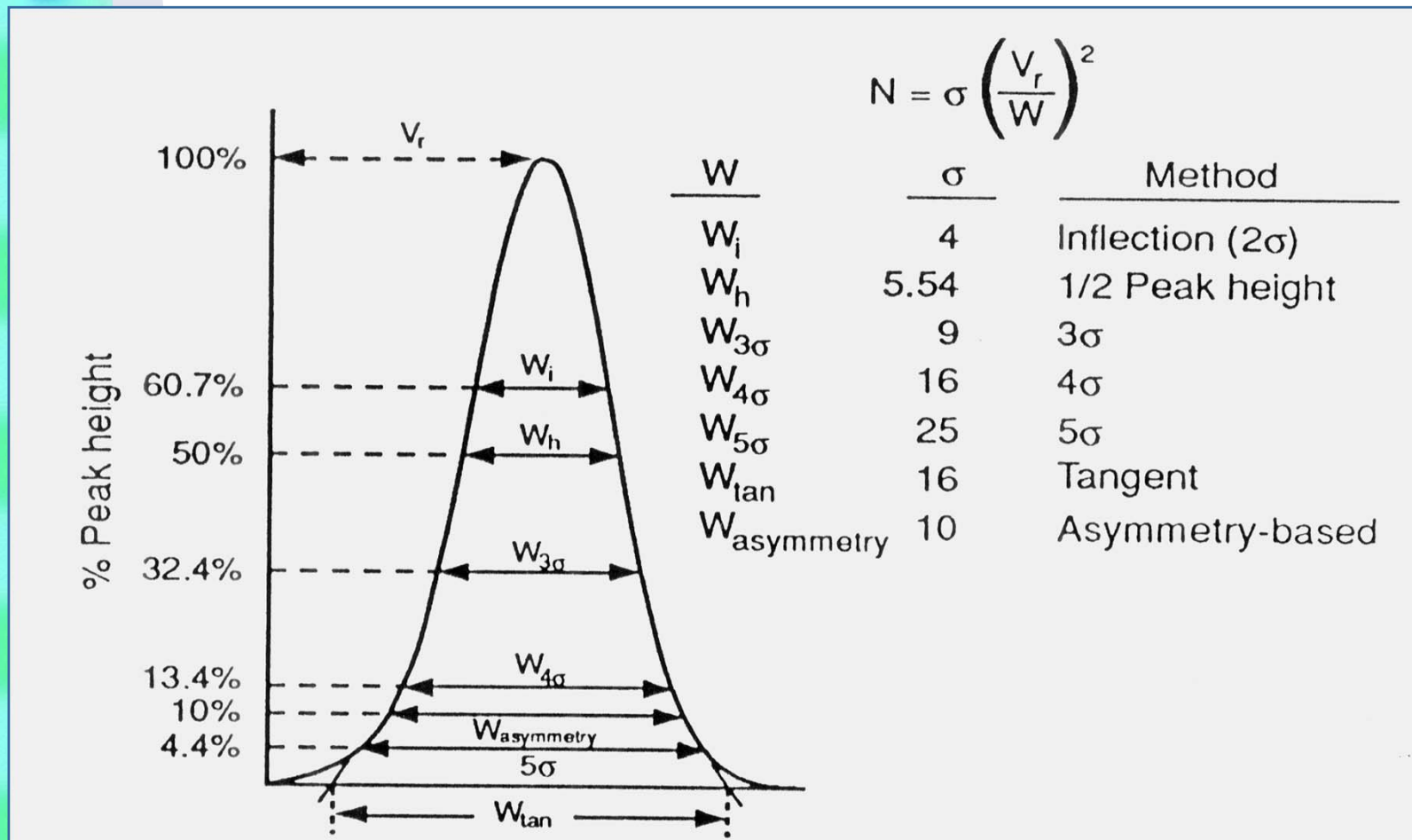
Water

Y

Ultrahydrogel Protein-pak

Y

컬럼 효율 계산(이론단수)



분리능 (Resolution)

$$R = \frac{1}{4} \left(1 - \frac{1}{a}\right) \sqrt{N} \left\{ \frac{k'}{1+k'} \right\}$$

a : 선택성 인자

N : 이론단수 (컬럼의 효율)

k' : 용량인자

Detector

컬럼에 의해 분리된 시료의 양에 비례한 전기적 신호를 만든다

1. Signal to noise ratio (S/N ratio) 가
2. Noise , Drift 가
3. Detection limit 가
4. Flow rate , temperature , pressure
5. Gradient 가 가

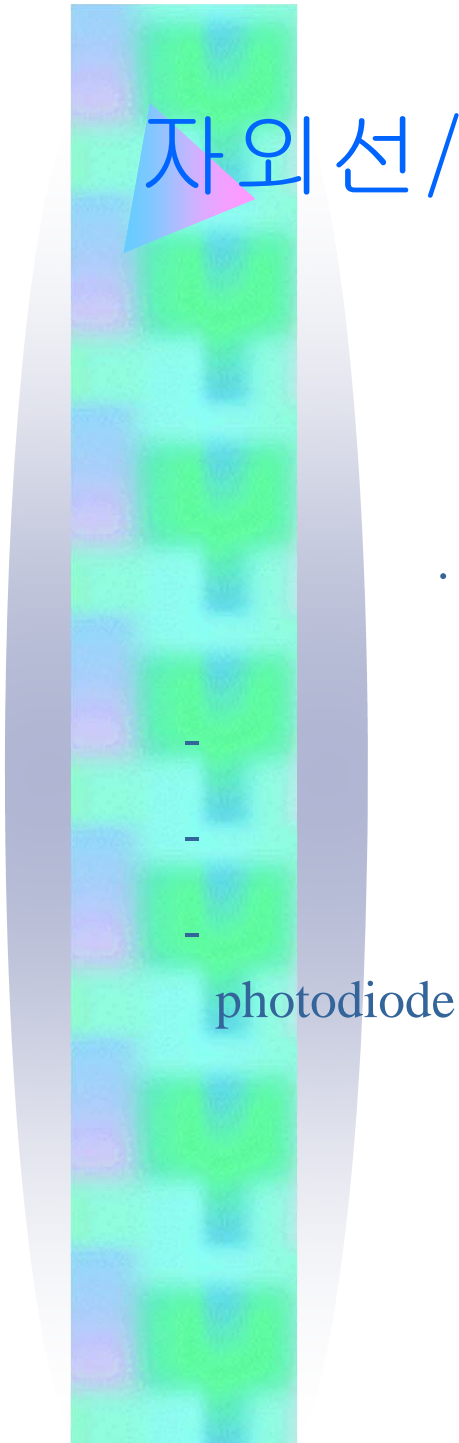
Detector의 종류

- Optical Detector
 1. UV/Visible Detector
 2. Fluorescence Detector
 3. Refractive Index Detector
- Electrochemical Detector
 1. Conductivity Detector
 2. Electrochemical Detector

가 Detector

	RI	UV/VIS	Fluorescence	Electro-chemical	Conductivity
Response	universal	selective	selective	selective	selective
Sensitivity (typical)	micro-gram	nanogram	picogram	picogram	nanogram
Flow sensitivity	YES	NO	NO	YES	YES
Temperature sensitivity	YES	NO	NO	YES	YES

자외선/가시선 검출기



, 가 cell ,
(A)
(C) ,
, spectrum(Molar Absorptivity) ,
(path length , b) 가 .
,

$$A = Ebc \text{ (Lambert- Beer Law)}$$

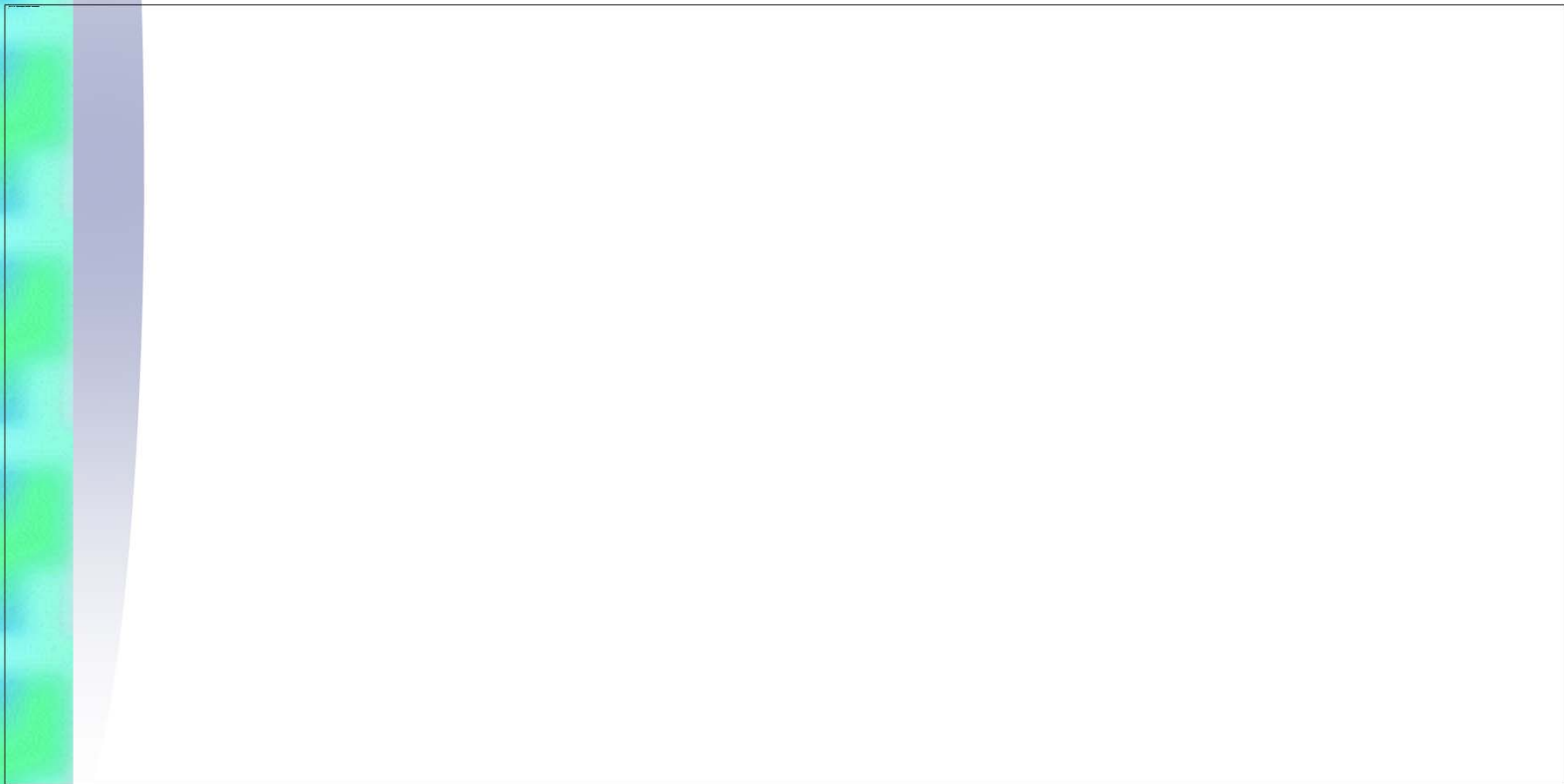
• 종류와 구조

1) Fixed type

- 광원 (Lamp)에 따라 정해진 몇 개의 파장만을 사용할 수 있다
- Wavelength : 214, 229, 254, 265, 280, 313, 340, 405, 436, 546 nm

2) Variable type

- 190-600 nm 사이의 모든 파장중에서 원하는 파장을 지정하여 사용한다

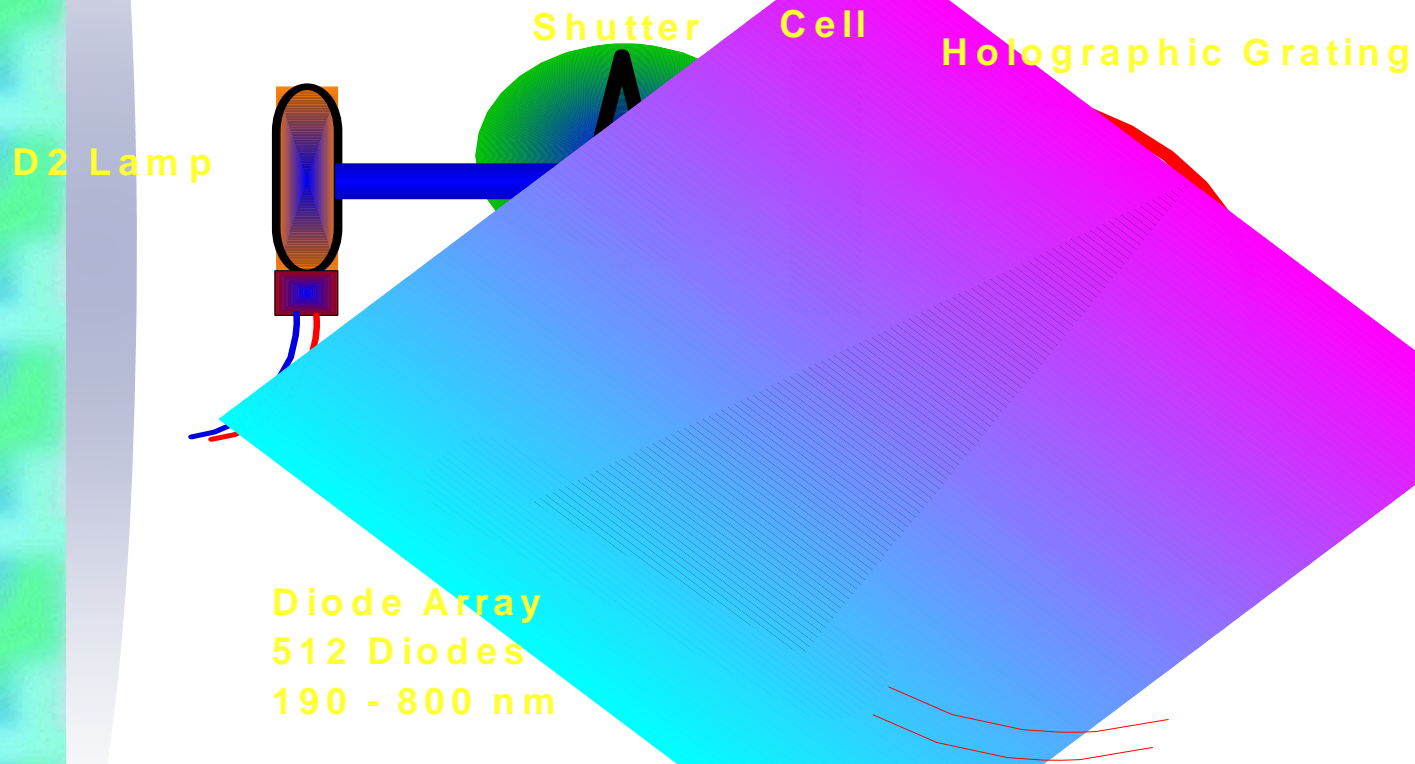


3) Photodiode Array Type

- 190 - 800 nm

scan .

Photodiode Array Detector





1)

Excitation filter
excited state

sample cell
, ground state

가

가

가

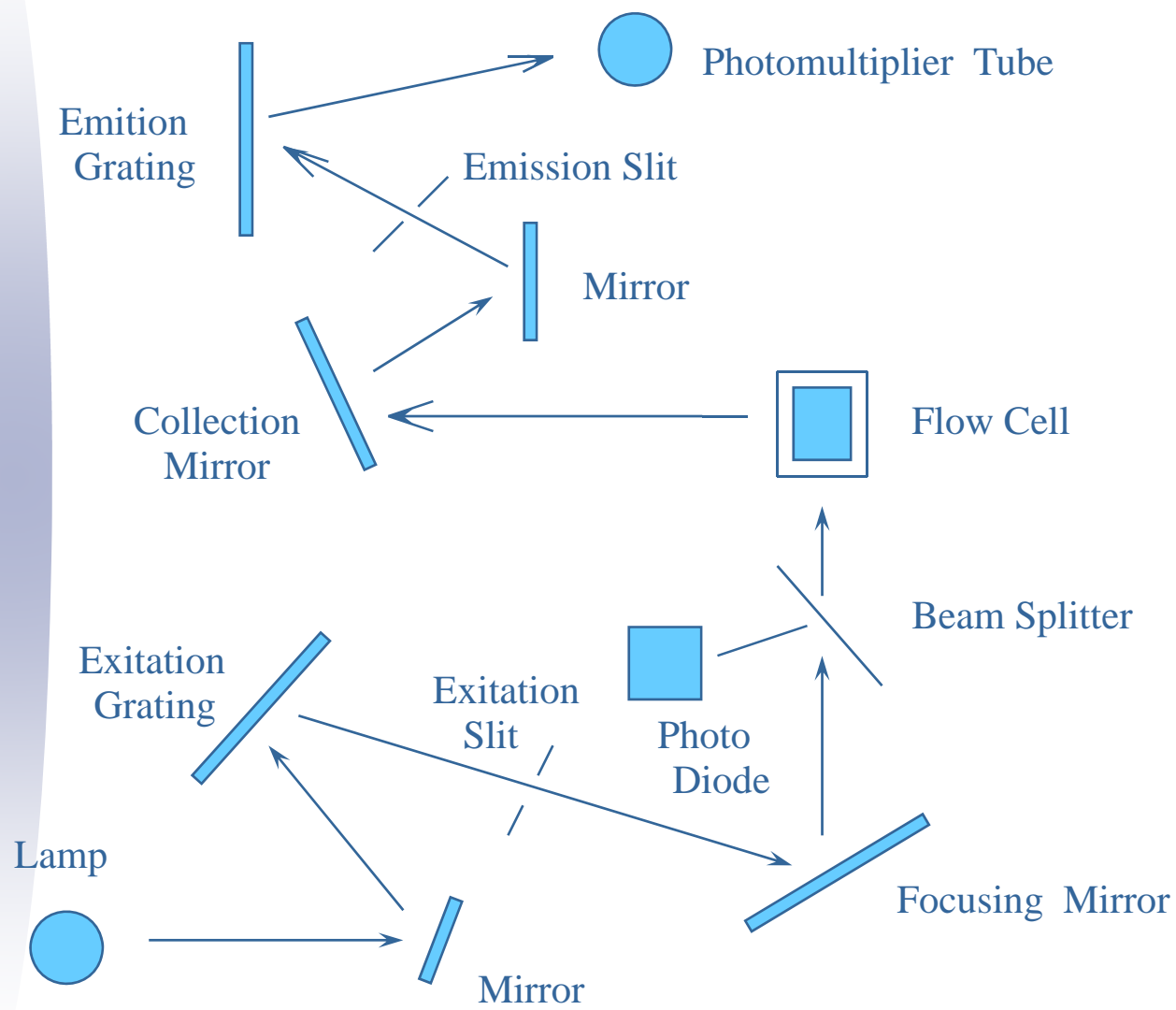
.

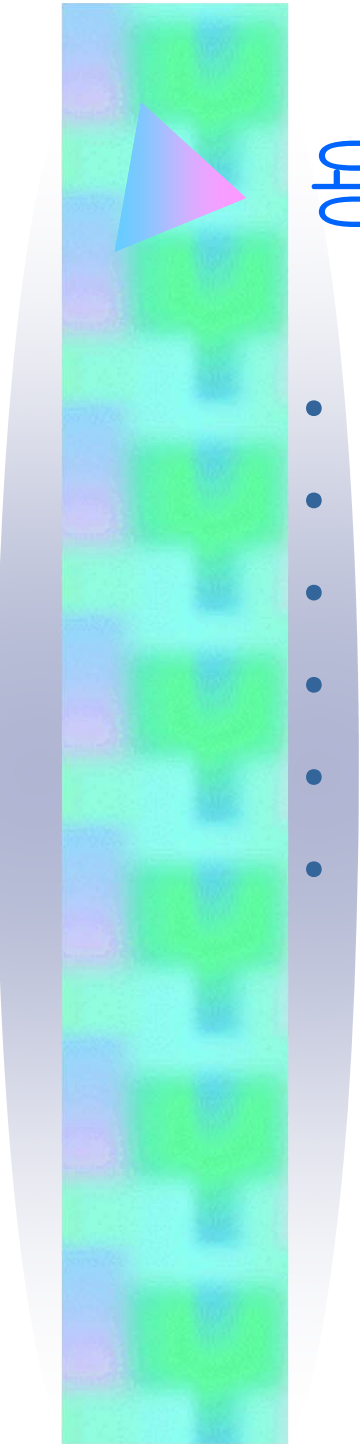
2)

Benzene
-N(CH₃)₂, -F, -CO

가 -OH, -OCH₃, -H₂, -NH(CH₃),

3)



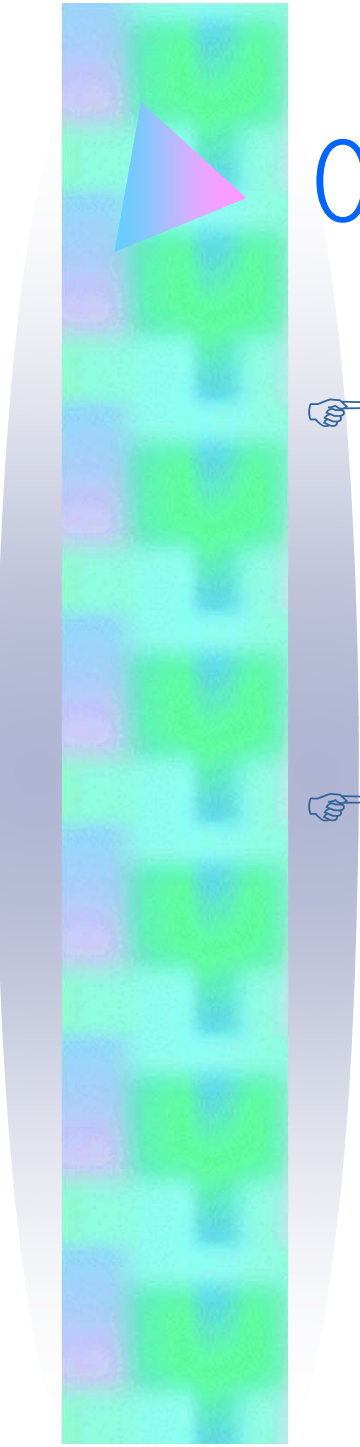


용매 조건

- HPLC grade solvent가 물인경우 18 mega ohm이상.
- Low Viscosity
- 용매간 섞임성. (miscibility No. 차가 15미만)
- 이동상은 고정상을 변화시키면 안된다.
- 분리코자 하는 시료는 이동상에 녹아야 한다.
- UV cutoff, refractive index가 낮은 용매.

Buffer 용액의 사용 목적

- 1) 이온성 시료일때 -이온억제 및 이온쌍형성
- 2) 생리 활성물질의 순수 분리,정제시 (pH조절)
- 3) 이온성 물질 분리시 이온강도 조절



이동상 변형제

☞ 목적 :

- 역상 방법에서 이온성 시료의 분리능을 높일 뿐만 아니라 시료를 비이온화시키기 위하여 사용한다

☞ 종류

- PIC A / Low UV
- PIC B Series



이동상 제조 (I)

- 용매 준비
 - HPLC 용 용매
 - 초순수(비저항값 ;18mega ohm)
 - 부피 대 부피 계량
 - 계량시 volume 비로 계량후 혼합
 - 용매 성질에 따라 흡열 ,발열 반응 가능
 - 부피비가 달라질 수 있다.



이동상 제조(II)

- Filter
 - 수용성 FILTER(PVDF)
 - WATER로 ACTIVATION
 - 지용성 FILTER(PTFE)
 - MeOH/적합한 용매로 ACTIVATION



이동상 제조(III)

- 탈기

이동상에 용존된 air, oxygen, bubble 제거

- Vacuum Degassing(진공탈기)

- 여과 + 탈기

- Helium Sparging

- 직접 이동상에 sparging

- Ultrasonication(초음파 파쇄)