

# 크로마토그래피의 원리와 분석법

## HPLC의 기기구성

Soonchunhyang University

Department of Chemical Engineering

Prof. Jungkyun Im

순천향대

나노화학공학과

임정균 교수



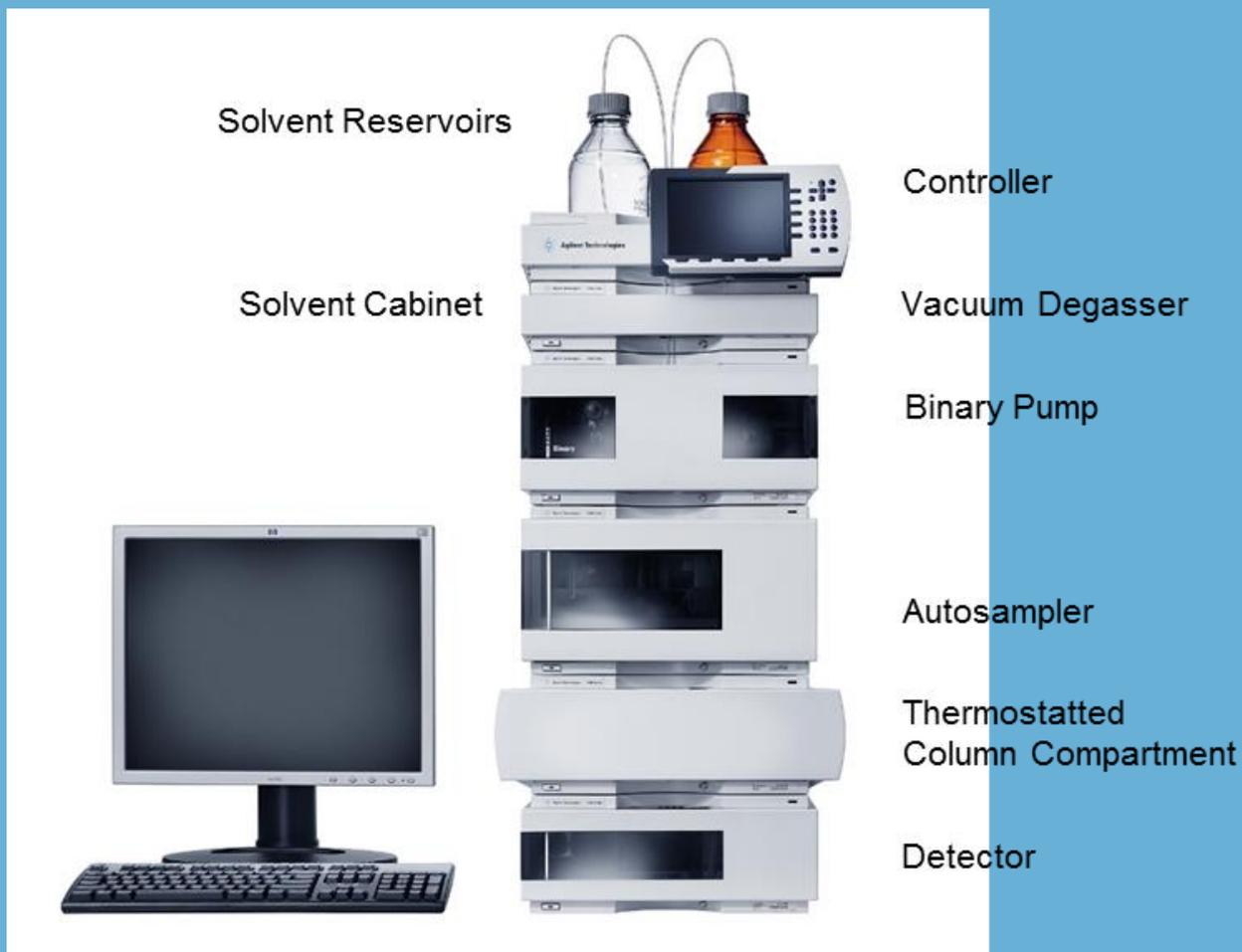


# HPLC 의 기본구성



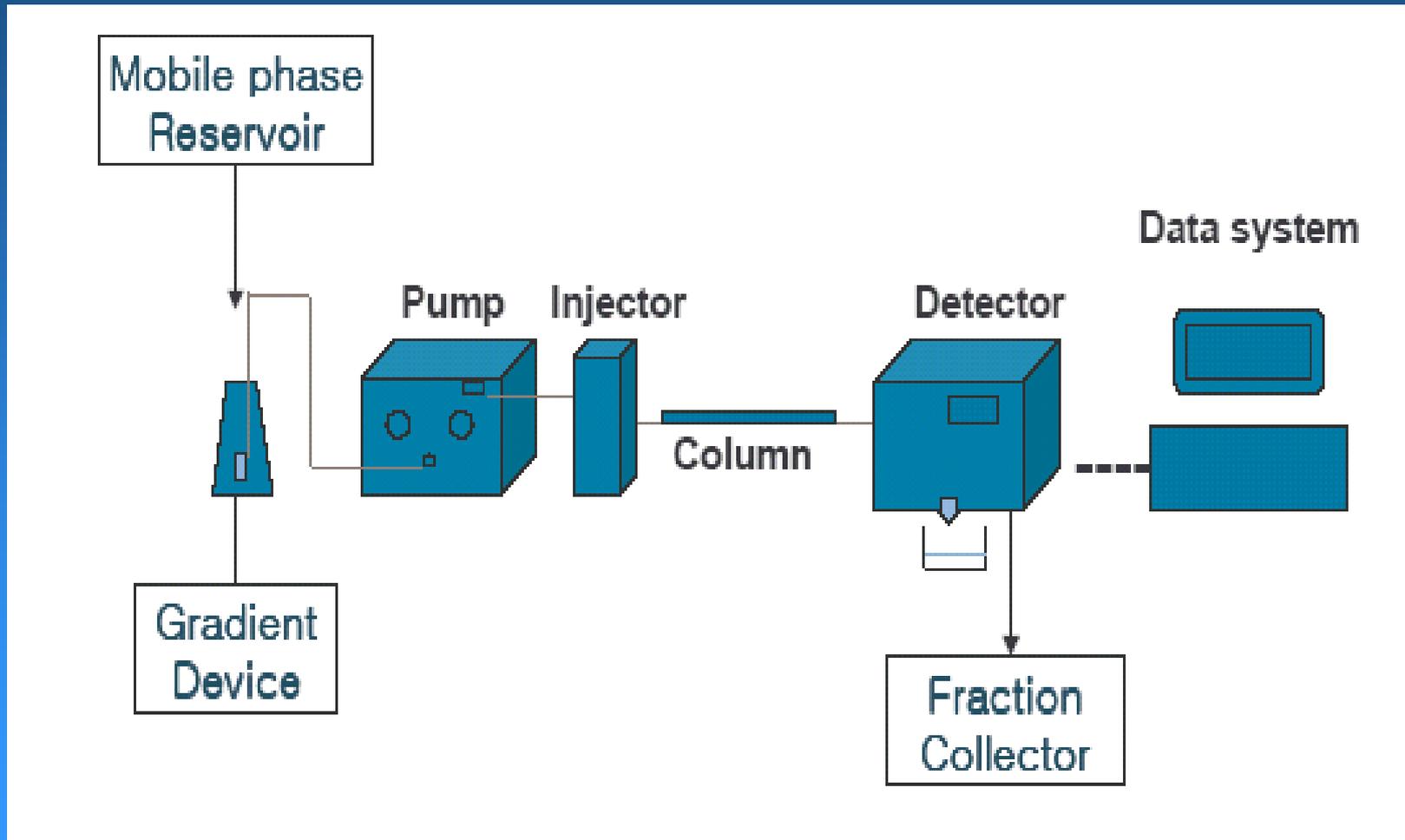


# Instrumentation of HPLC



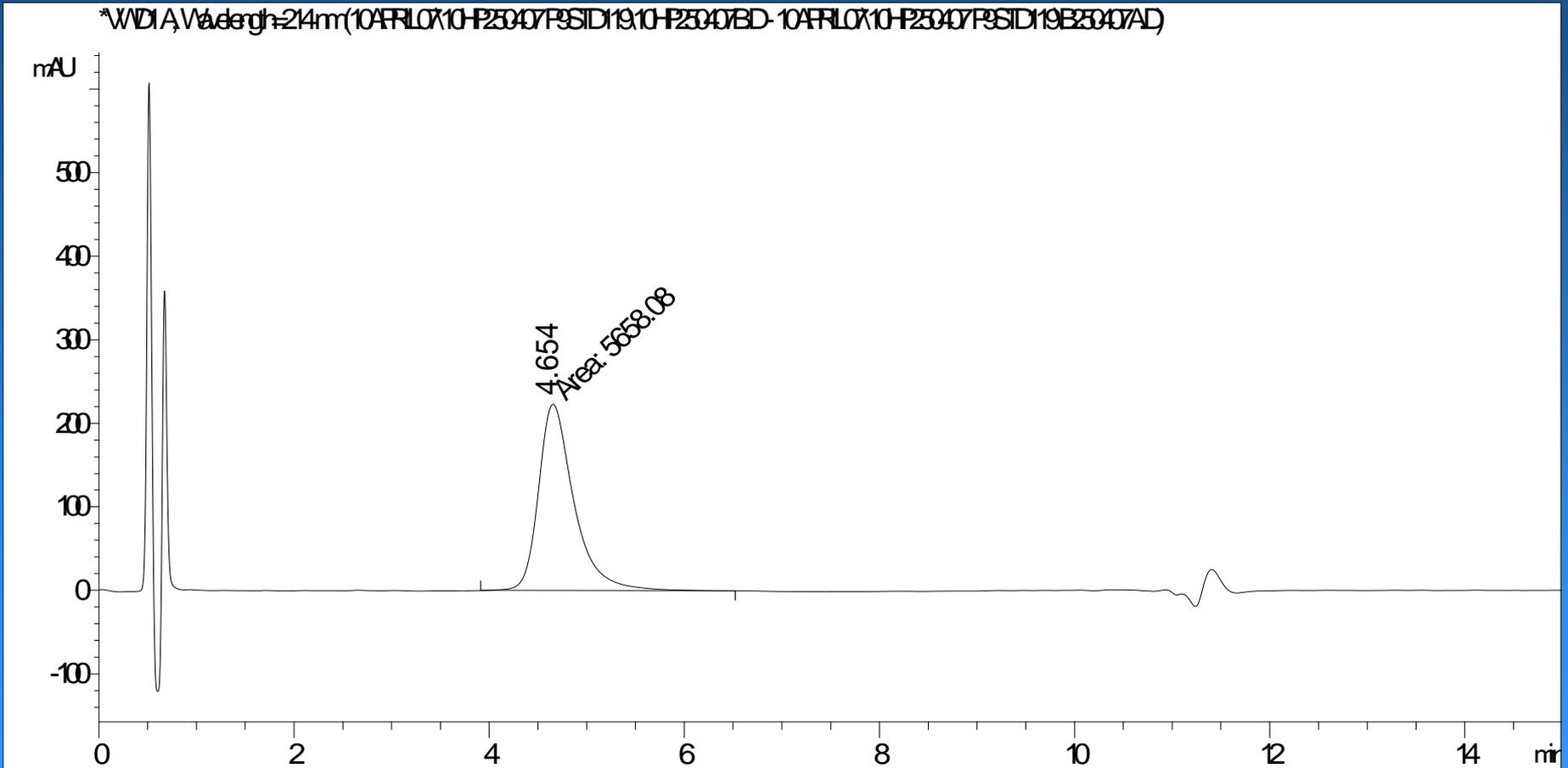


# HPLC의 모식도





# HPLC chart (spectrum)





# HPLC의 각 부분의 역할



1. 용매 이송 장치 ( Eluent Delivery Pump)
  - 시료 이송 및 분리를 위한 Solvent 를 이송 하는 역할
2. 시료 주입 장치 ( Injector)
  - 시료를 분리 관으로 보낼 수 있도록 하는 역할
3. 분리 관 ( Separation Column)
  - 혼합된 시료들을 단일 물질들로 분리 하는 역할
4. 검출기 ( Sample Detector)
  - 분리된 단일 시료들의 존재 여부를 확인하는 역할
5. 데이터 수집장치(Data system )
  - 검출기에서 확인된 시료를 전기적인 신호로 전환하여 크로마토그램을 표시하는 역할



# HPLC 각 구성에 대한 원리





# Solvent (용매:이동상)조건



- ❖ Solvent viscosity 가 낮아야 한다.
- ❖ 두 용매를 사용할 경우 혼합성이 서로 좋아야 한다.
- ❖ Solvent 에 의한 충전물이 녹아서는 안된다.
- ❖ 분석물질은 반드시 Solvent 에 녹아야 한다.
- ❖ Solvent 의 UV Cut-off, RI 값이 낮아야 한다.
- ❖ 낮은 b.p 를 갖아야 한다.



# Solvent Strength (용매 강도)



- ❖ 용매강도는 역상, 순상에 따라 서로 반대의 강도를 가지며, 유기용매와 물의 혼합시 물의 함량이 많을수록 성분의 머무름 시간(Retention Time)은 길어짐.

Solvent Strength	Reversed Phase	Normal Phase
	Water	Hexane
	DMSO	1-Chlorobutane
	Methanol	Methylene Chloride
	Acetonitrile	Acetonitrile
	Tetrahydrofuran	



## Mobile phase solvents

n-Hexane	(n-Hex)	↑ Low
iso-Octane	(iso-Oct)	
Chloroform	(CHCl <sub>3</sub> )	↑ Polarity
Dichloromethane	(CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	
Ethylacetate	(AcOEt)	
Isopropylalcohol	(IPA)	
Tetrahydrofran	(THF)	
Dioxane		↓ High
Acetonitrile	(CH <sub>3</sub> CN)	
Ethanol	(EtOH)	
Methanol	(MeOH)	
Amines		
Acids		

# 용매 조건

- HPLC grade solvent가 물 인 경우 18 mega ohm이상.
- Low Viscosity
- 용매간 섞임 성. (miscibility No. 차가 15 미만 )
- 이동상은 고정상을 변화시키면 안 된다.
- 분리코자 하는 시료는 이동상에 녹아야 한다.
- UV cutoff, refractive index가 낮은 용매.

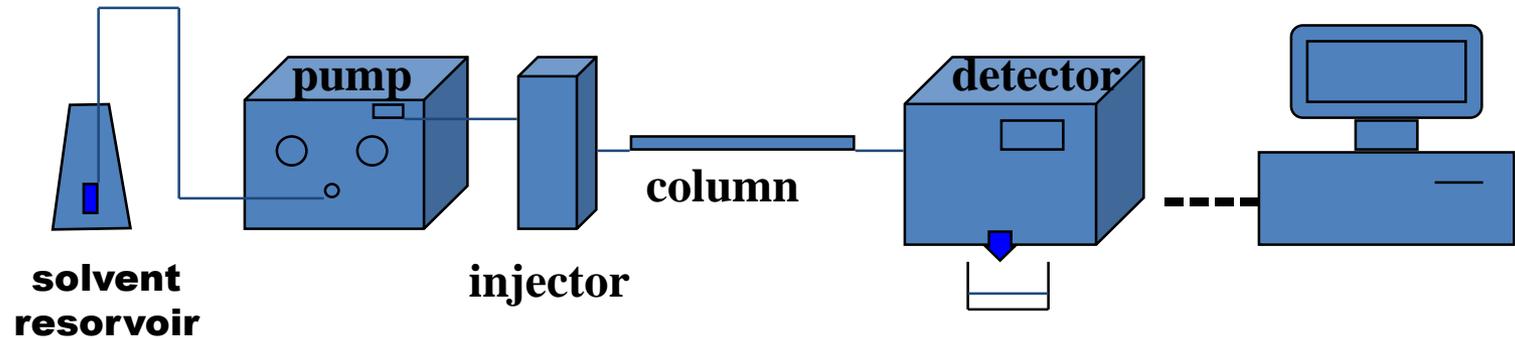


# Solvent Delivery Pump(펌프)



- 용매의 저장 용기에서 용매를 끌어서 시료 주입기로 밀어주는 역할
- Pump의 요건
  - 일정한 유속과 압력 유지
  - 가동이 쉽고 다양한 용매를 사용할 수 있어야 함
  - Pulse 방지를 위한 system
  - Isocratic에서 Gradient까지 사용
  - 내구성 우수

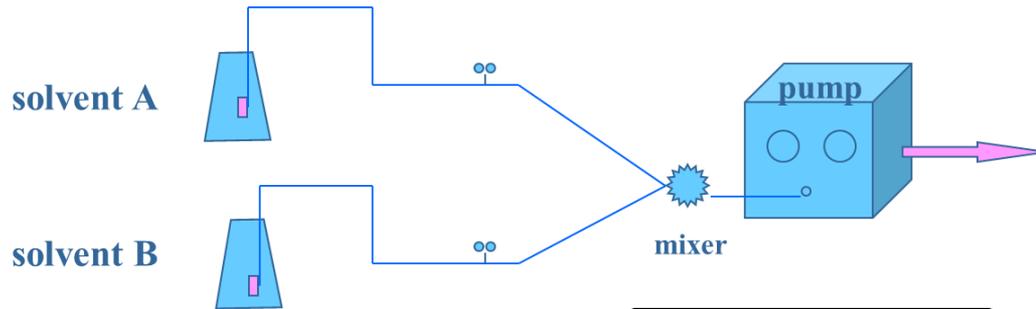
# 일정용매 조성법( Isocratic Mode )



- 가장 간단한 형태의 구성이며 한 pump가 일정조성의 용매를 밀어줌으로 실험 중 용매의 조성이 바뀌지 않는다.
- 즉 이동상이 60% ACN / 40% H<sub>2</sub>O 인 경우 분석시간동안 이 조성을 유지하면서 분석이 진행되는 것이다.
- 복잡한 화합물인 경우 여러가지 컬럼을 교체하여 분석하여도 분석이 안 될 경우에는 분석시간동안 용매의 조성을 바꿀 수 있는 다른 모드 즉 Gradient Mode를 사용해야 한다.

# 구배용매 조성법 (Gradient Mode)

## 1) single pump

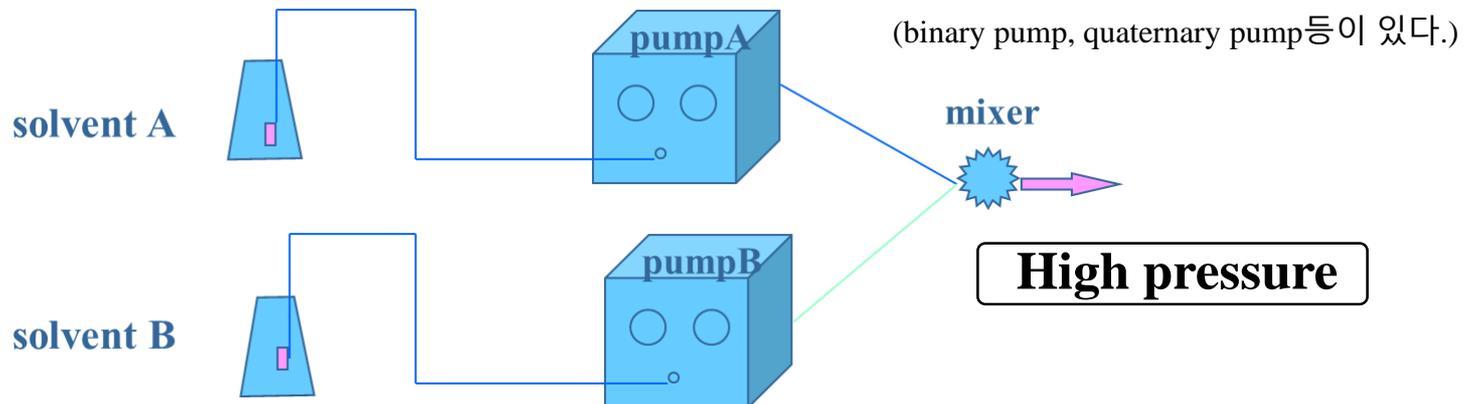


**Low pressure**

(low price, easy use)

## 2) multiple pump

장점으로는 각각 펌프의 outlet을 독립적으로 programming하여 컬럼으로 이동상이 들어가기전 mixer에서 용매들을 섞어주므로 모든 형태의 gradient mode가 가능하나 단점으로는 별도의 gradient controller가 필요하므로 가격이 비싸다.



(binary pump, quaternary pump등이 있다.)

**High pressure**

# Pump 압력 확인



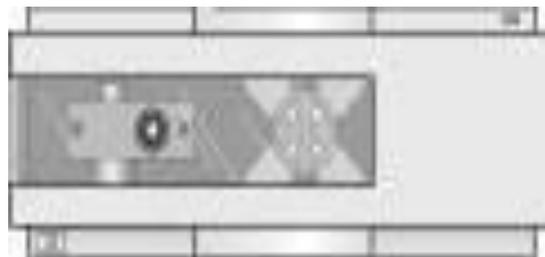
## Pump Module–types:

- Isocratic pump - Delivers constant mobile phase composition;
  - solvent must be pre-mixed;
  - lowest cost pump
- Gradient pump - Delivers variable mobile phase composition;
  - can be used to mix and deliver an isocratic mobile phase or a gradient mobile phase

–**Binary gradient pump** –delivers two solvents

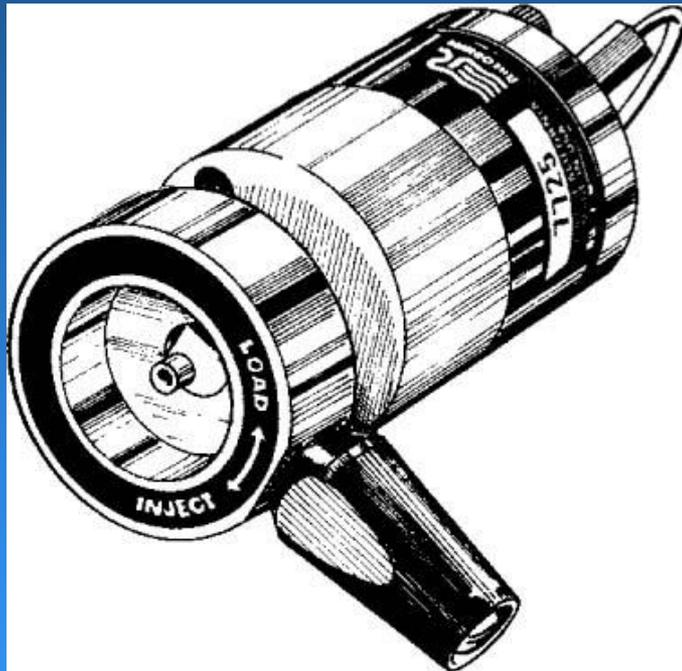


–**Quaternary gradient pump** –four solvents





# Injector(주입기)



Manual Injector



Autosampler



# Injector 의 원리



- 이동상에 시료를 loading하여 column으로 보내는 역할



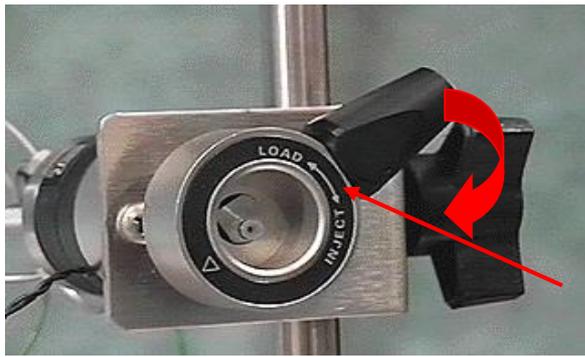
- Injector의 종류

- Rheodyne injector (Valve injector) (Manual injector)
- Automatic injector

Typical sample volumes are 5–to 20–microliters ( $\mu\text{L}$ ).

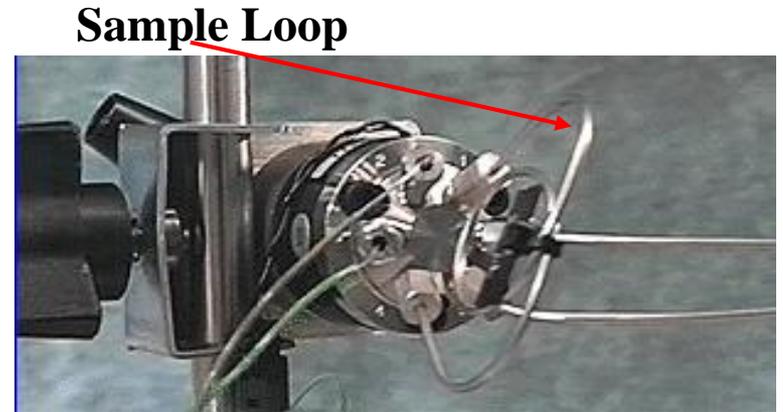
# Rheodyne injector (Manual injector)

1. 주입량이 loop에 의해 정해짐, 주입량 변화시 loop 교체 (단점)
2. Sample loop 세척이 요구
3. 신속하고 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음



Load - Inject

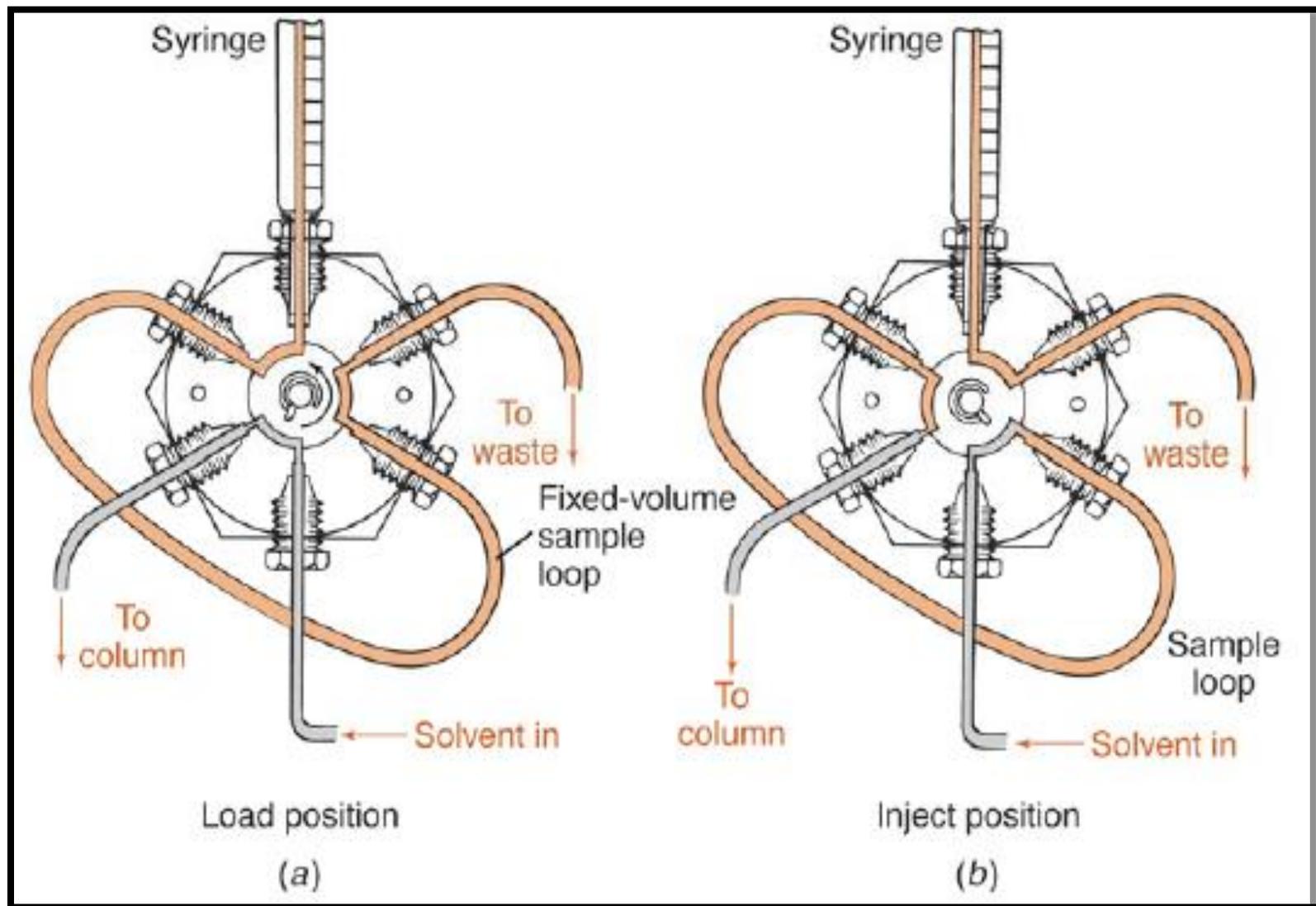
Front View



Rear View



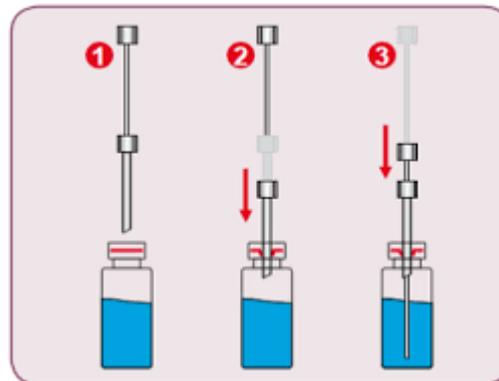
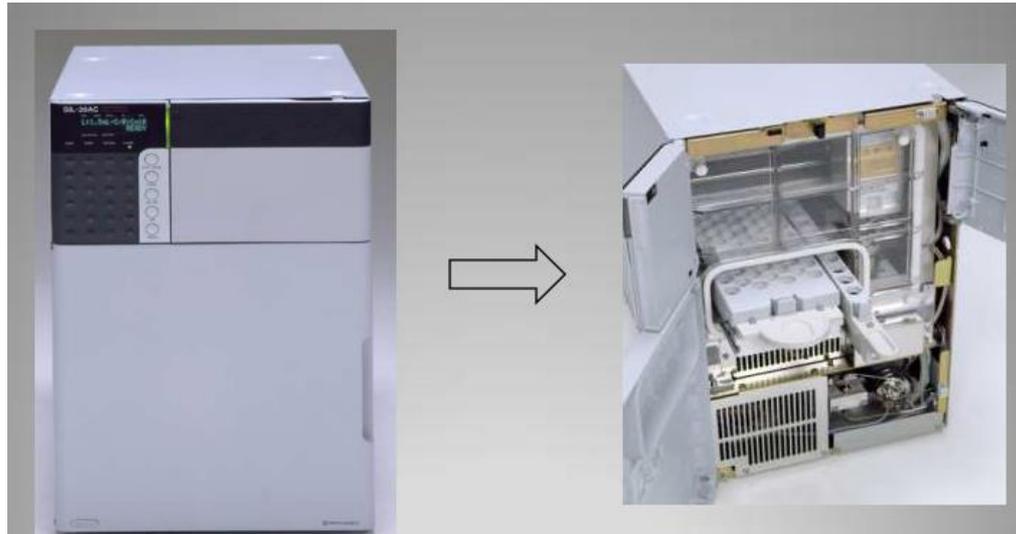
Inject



# Autosampler Injector

1. Auto addition 으로 실험실 생산성 향상
2. 96 Step의 조건 입력 가능
3. 4 mL vial : 48개, 1 mL vial : 96개 사용함에 따른  
무인 가동으로 분석시간 단축
4. 온도조절 가능 : 최대한 시료 변성 줄일 수 있음(heater 또는 cooler 장착)
5. 주입량에 따른 오차가 거의 없음 : 재현성 우수
6. needle wash pump의 auto-priming이 가능하며 또한 시료들의 연속적인 주입시 발생할 수 있는 주사기의 오염을 방지하기 위한 auto-needle washing이 가능함

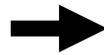
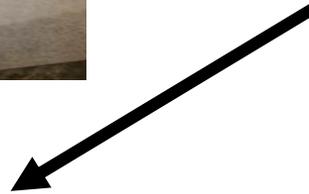
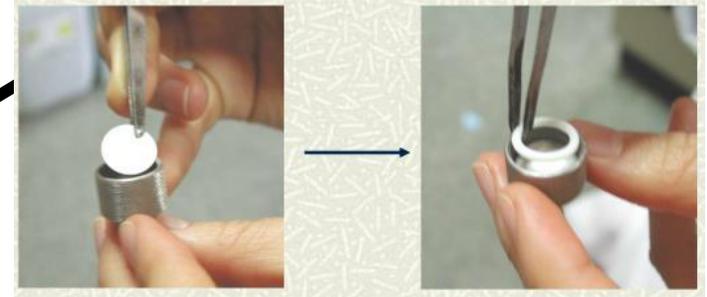
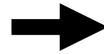
# Autosampler Injector

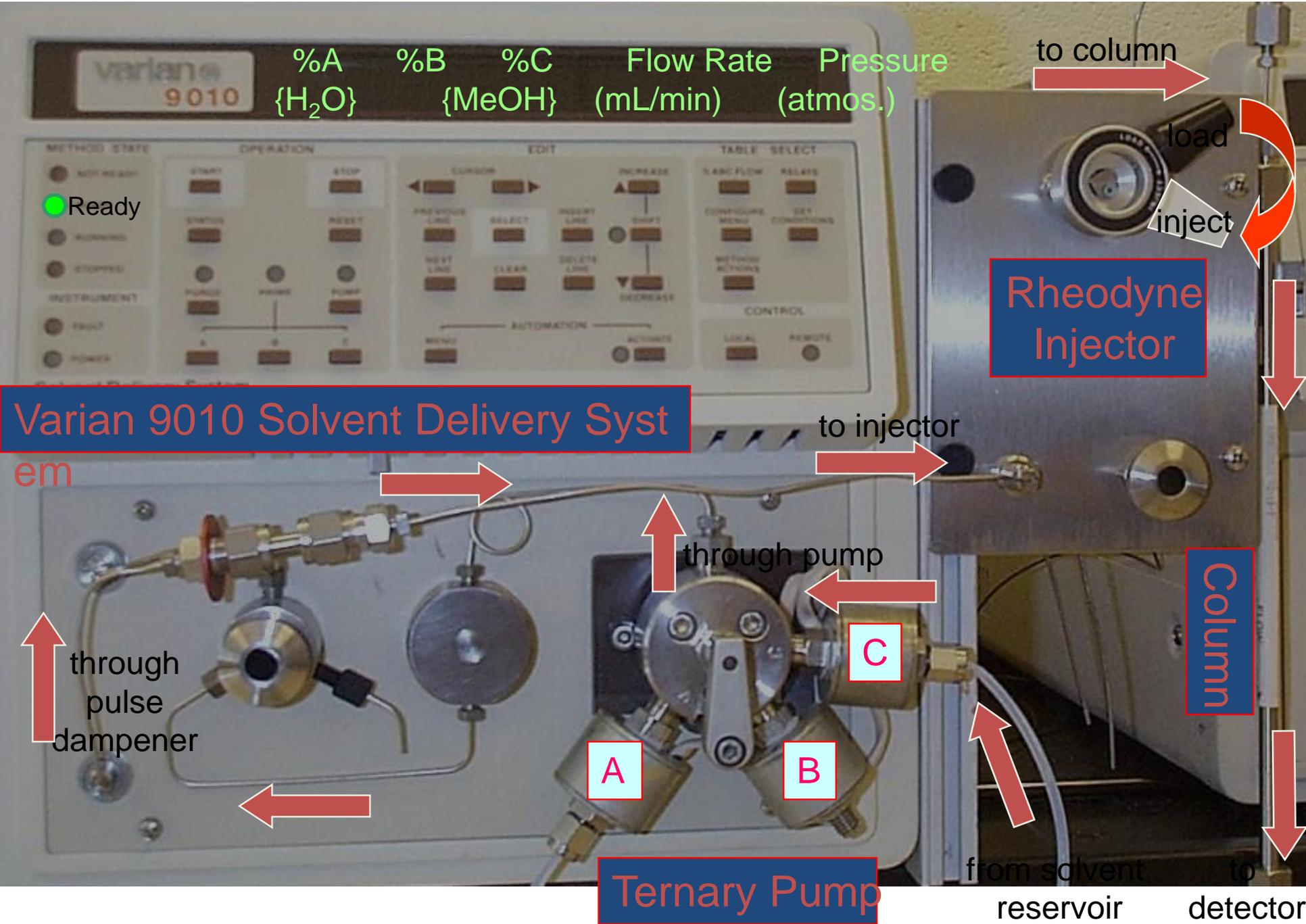


# Sample preparation



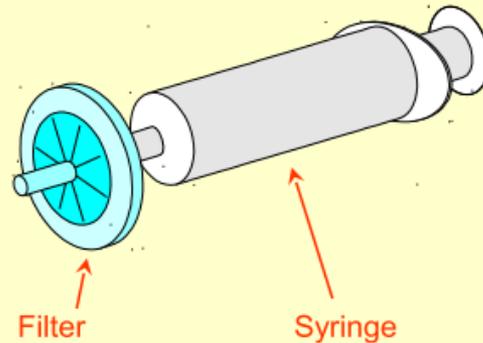
# Sample filtration





## Filtration and Centrifugal Separation

- In general, filter every sample before injection!
- It is convenient to use a disposable filter with a pore diameter of approx.  $0.45\ \mu\text{m}$ .
- Centrifugal separation is applicable for samples that are difficult to filter.



### <샘플과 주입 용매>

샘플과 주입 용매는 지연 시간에 부정적 영향을 줄 수 있다. 만일 샘플이 많은 양의 강력한 용매와 같이 주입된다면, 먼저 용출되는 피크들의 모양이 좋지 않고 재현성이 없는 지연 시간을 유발할 것이다. 이를 피하기 위해서는, 샘플을 가능하다면 시작하는 이동상을 이용하여 주입하여야 한다.

# 이동상 제조

- 탈기 (Degassing)

이동상에 용존된 air, oxygen, bubble 제거 용매를 완전히 degassing시킨 뒤 사용해야 한다. 만약 bubble이 pump로 들어갈 경우 유량의 정밀도에 영향을 줄수 있고 펌프도 치명적인 손상을 받을 수 있다.

- Vacuum Degassing(진공탈기)
  - 여과 + 탈기
- Helium(or Nitrogen gas) Sparging
  - 직접 이동상에 sparging
- Ultrasonication(초음파 파쇄)



## ❖ DEGASSING OF SOLVENTS:

- Several gases are soluble in organic solvents, when high pressure is pumped, the formation of gas bubbles increases which interferes with the separation process, steady baseline & shape of the peak.
- Hence de-gassing is very important and it can be done by various ways.

## (I) VACUUM FILTRATION:

- ✓ De-gassing is accomplished by applying a partial vacuum to the solvent container.
- ✓ But it is not always reliable & complete.

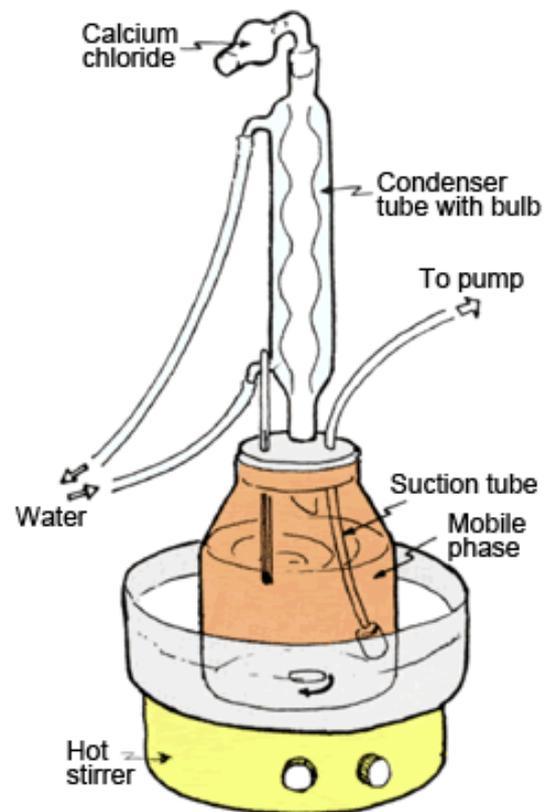
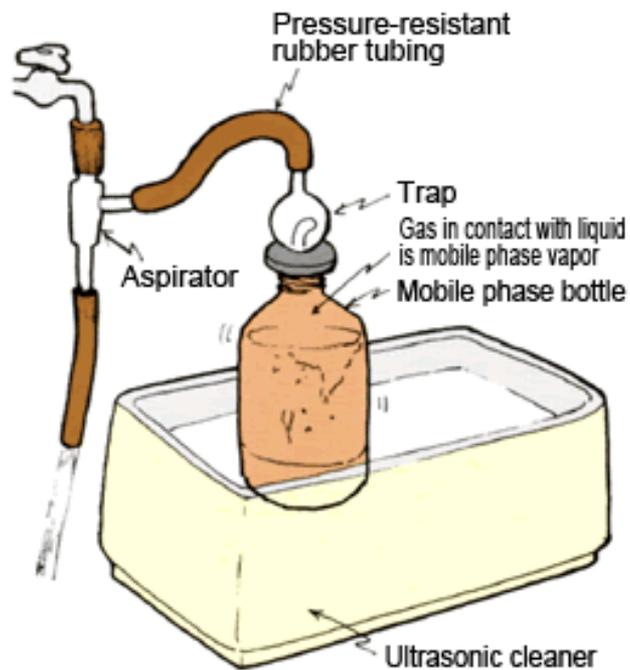
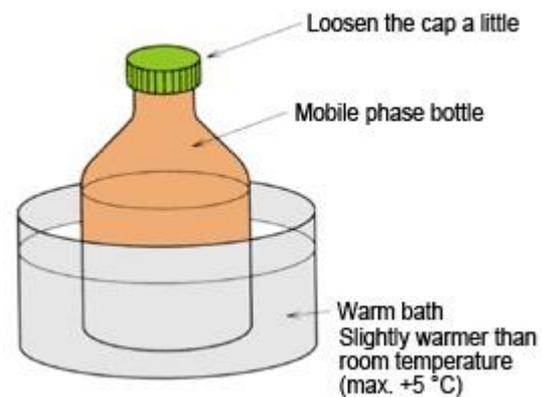
## (II) HELIUM PURGING: (or nitrogen gas is used)

- ✓ Done by passing Helium through the solvent.
- ✓ This is very effective but Helium is expensive.

## (III) ULTRASONICATION:

- ✓ Done by using ultrasonicator which converts ultra high frequency to mechanical vibrations.

# Degassing Methods



# Solvent delivery systems

- Continuously provide eluent (solvent).
- Provide accurate mobile phase compositions.
- Includes *solvent reservoirs*, *inlet filter*, and *degassing facilities* which works in conjugation

## Inlet Filters

- Stainless Steel or glass with 10 micron porosity.
- Removes particulates from solvent.



**The End.**