



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 206 427

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)
(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 13. 12. 79
(21) PV 8743-79

(11) (B 1)

(51) Int. Cl.³ B 01 D 15/08

(40) Zveřejněno 29. 08. 80
(45) Vydáno 15. 10. 83

(75)
Autor vynálezu JANDERA PAVEL ing. CSc. a
CHURÁČEK JAROSLAV prof. ing. DrSc., PARDUBICE

(54) Zařízení pro přesnou a reprodukovatelnou tvorbu gradientu mobilní fáze v kapalinové chromatografii

1

Vynález se týká provedení zařízení pro přesnou a reprodukovatelnou tvorbu gradientu mobilní fáze v kapalinové chromatografii.

Stále se rozšiřující aplikace účinné vysokotlaké kapalinové chromatografie pro analýzu složitých směsí organických látek v průmyslových i přírodních vzorcích i v biologických materiálech vyžadují zavádění techniky gradientové eluce pro analytické dělení těchto směsí. Při gradientové eluci se kontinuálně (méně často i diskontinuálně) mění složení mobilní fáze v průběhu vlastního dělení. K tomuto účelu je třeba mít k dispozici zařízení, které je schopno vytvářet koncentrační gradient mobilní fáze podle předem zvoleného programu. Aby toto zařízení tvořilo požadovaný gradient mobilní fáze přesně a reprodukovatelně, musí být jednak schopno směřovat složky mobilní fáze přesně v požadovaném, časově proměnném poměru, dávkovat takto připravenou mobilní fázi na chromatografickou kolonu za vysokého tlaku (až několika desítek MPa) a dále kompenzovat odchylky od požadovaného, časově proměnného složení a průtoku mobilní fáze, k nimž dochází v důsledku objemových změn (kontrakcí) při míchání různých kapalin či roztoků a v důsledku různé stlačitelnosti složek mobilní fáze při používaných vysokých tlacích.

Dosud známá a používaná zařízení pro tvorbu gradientu mobilní fáze při kapalinové chromatografii lze dělit do několika skupin. Zařízení, používající k tvorbě koncentračního gradientu kombinace několika vzájemně spojených uzavřených či otevřených nádob rozličného tvaru a objemu, obsahujících jednotlivé složky mobilní fáze, přičemž k mísení jednotlivých složek a k dopravě smíšené mobilní fáze do chromatografických kolon se používá jako hnací

síly gravitace, nelze použít při vysokých tlacích běžných v moderní kapalinové chromatografii. Použije-li se analogické kombinace několika nádob k mísení mobilní fáze před vstupem do vysokotlaké pumpy, která dodává smíšenou mobilní fázi s koncentračním gradientem na kolonu, je jednak značně omezená možnost výběru gradientů různé tvaru a strmosti a dále je utvořený gradient značně nepřesný, jednak vlivem různé hustoty směřovaných kapalin a jednak vlivem odchylek tvaru nádob (většinou skleněných) od přesně definovaného geometrického tvaru.

Další typ zařízení pro gradientovou eluci používá k tvorbě gradientu směšování dvou kapalin ve vysokotlaké části přístroje (US. patent č. 3,446,057; NSR patent č. 1953076; US. patent č. 4,032,445). K čerpání každé ze složek mobilní fáze je zapotřebí zvláštního vysokotlakého čerpadla. Poměr průtoků kapalin dávkovaných jednotlivými čerpadly se mění s časem podle požadovaného programu pomocí elektronického programátoru tak, aby suma průtoků všech kapalin čerpaných jednotlivými čerpadly byla konstantní v průběhu gradientové eluce. Zvláštní variantou této skupiny jsou zařízení pro tvorbu gradientu ve vysokotlaké části přístroje, která používají pouze jednoho vysokotlakého čerpadla dávajícího jednu složku mobilní fáze, přičemž druhá složka mobilní fáze je obsažena ve zvláštní smyčce spojené s tímto čerpadlem. Gradient složení mobilní fáze se v tomto případě vytváří pomocí elektronicky programovaných časových spínačů, ovládajících ventily propouštějící do směšovací komůrky střídavě jednu složku mobilní fáze přímo z čerpadla a druhou složku ze smyčky. Zařízení vytvářející gradient ve vysokotlaké části přístroje jsou schopna podle zvoleného programu přesně řídit rychlost elektromotorů pohánějících pumpy čerpající jednotlivé složky mobilní fáze. Při práci při vysokých tlacích obvyklých v kapalinové chromatografii však může docházet k významným odchylkám tvořeného koncentračního gradientu mobilní fáze od požadovaného profilu v důsledku různé stlačitelnosti jednotlivých čerpaných složek mobilní fáze.

Tyto chyby jsou potlačeny u další skupiny zařízení, kde se vytváří gradient mobilní fáze v nízkotlaké části před vstupem do vysokotlakého čerpadla pomocí programovaných časových spínačů ovládajících přívodní ventily pro jednotlivé složky mobilní fáze. K mísení těchto složek dochází v mísící komůrce před vstupem do vysokotlaké pumpy anebo přímo ve vlastní pístové komoře této pumpy. (US. patenty č. 3,985,019 a 3,985,021; US. patent č. 3,917,531 a US. patent č. 4,018,685)

Žádné z dosud známých a používaných zařízení pro tvorbu gradientu mobilní fáze však neumožňuje kompenzovat odchylky vytvářeného gradientu od požadovaného profilu v důsledku objemových kontrakcí při směšování různých kapalin. Tak např. při mísení methanolu s vodou v poměru 4 : 6 je objem vzniklého roztoku o cca 4 až 5% menší než součet objemů čistých složek před smísením. Směsi voda-methanol představují v současné době snad nejpoužívanější mobilní fáze v kapalinové chromatografii a objemové kontrakce v tomto systému při gradientové eluci mohou výrazně ovlivnit retenční časy, šířky i výšky pík, což se projeví chybami výsledků, zejména při korelaci dat získaných při různém průběhu gradientu a při eluci s konstantním složením mobilní fáze.

Výše uváděnou nevýhodu dosud užívaných zařízení pro tvorbu gradientu mobilní fáze odstraňuje a výhodou vyšší přesnosti a reprodukovatelnosti měření při gradientové eluci s sebou přináší předmětný vynález.

Podstata zařízení pro přesnou a reprodukovatelnou tvorbu gradientu mobilní fáze v kapalinové chromatografii spočívá v tom, že je tvořeno nízkotlakou programovatelnou tlačnou jednotkou, např. pístovým čerpadlem, kde každý jeho blok o objemu pístových komor max. 0,5 ml je připojen přes vstup k zásobníku příslušné složky mobilní fáze, přičemž jeho výstup je připojen ke směšovací komůrce o objemu 0,005 až 2 ml, která je pak s pomocí kapilárního potrubí o světlosti 0,05 až 2 mm připojena přes rozdělující člen jednak na vstup vysokotlakého pístového čerpadla s objemem komory pístu max. 0,5 ml a podruhé na přeřadové potrubí s vyústěním umístěným nad úroveň vstupu vysokotlakého čerpadla a současně nad úroveň rozdělujícího členu, přičemž vysokotlaké čerpadlo mobilní fáze je s pomocí výstupu spojeno se zařízením pro zavádění vzorků a dále s chromatografickou kolonou, a to případně přes průtokové čidlo a přes průtokový tlumič tlakových rázů.

Z výhod zařízení pro přesnou a reprodukovatelnou tvorbu gradientu mobilní fáze v kapalinové chromatografii lze uvést alespoň tyto:

- Zařízení umožňuje přesně a reprodukovatelně mísit dvě i více složek mobilní fáze podle požadovaného, časově proměnného poměru.
- Při nastavení celkového množství kapaliny čerpaného nízkotlakým programovatelným čerpadlem o cca 10 - 20% výše než množství kapaliny čerpané vysokotlakým čerpadlem nedochází k odchylkám skutečného průběhu gradientu mobilní fáze od požadovaného profilu, protože případné objemové kontrakce při mísení kapalin jsou kompenzovány tím, že vysokotlaké čerpadlo má možnost odebírat stále stejné množství mobilní fáze a mění se pouze množství kapaliny odcházející do přeřadu.
- Je-li vysokotlaké čerpadlo opatřeno zpětnovazebným kontrolním systémem nebo zařízením pro elektronickou kompenzaci stlačitelnosti kapalin při vyšších tlacích (což je u většiny čerpadel pro kapalinovou chromatografii splněno), nedojde k odchylkám skutečného gradientu mobilní fáze od požadovaného profilu v důsledku stlačitelnosti kapalin, protože k mísení obou kapalin dochází v nízkotlaké části přístroje.
- Nedochází k porušení požadovaného profilu gradientu při průtoku mobilní fáze od místa smísení až na chromatografickou kolonu. Mrtvý objem v této části zařízení je zcela srovnatelný s ostatními běžně používanými zařízeními pro tvorbu gradientu mobilní fáze v kapalinové chromatografii.
- Zařízení podle vynálezu umožňuje současné splnění výše uvedených výhod, což se projeví vysokou přesností při reprodukci požadovaného koncentračního gradientu mobilní fáze, jak ukazuje typický příklad znázorněný na obr. 1 (plná čára - skutečný gradient; přerušovaná čára - požadovaný gradient).

Zařízení pro přesnou a reprodukovatelnou tvorbu gradientu mobilní fáze v kapalinové chromatografii podle vynálezu je znázorněno na obr. 2 a je tvořeno nízkotlakým programovatelným čerpadlem 1, s výhodou pístovým s objemem komor pístů max. 0,5 ml, přičemž každý blok 2, 3 pístu (alespoň dva) je na svém vstupu 21, 31 připojen k samostatnému zásobníku

4, 5 jedné ze složek mobilní fáze.

Výstup 22, 32 nízkotlakého programovatelného čerpadla 1 je připojen ke směšovací komůrce 6 o objemu 0,005 až 2 ml, která je pak s pomocí kapilárního potrubí 7 o světlosti 0,05 až 2 mm připojena přes rozdělující člen 9 jednak na vstup 81 vysokotlakého pístového čerpadla 8 s objemem komory pístu max. 0,5 ml a podruhé na přepadové potrubí 10 s vyústěním 11 umístěným nad úrovní vstupu 81 vysokotlakého čerpadla 8 a současně nad úrovní rozdělujícího členu 9.

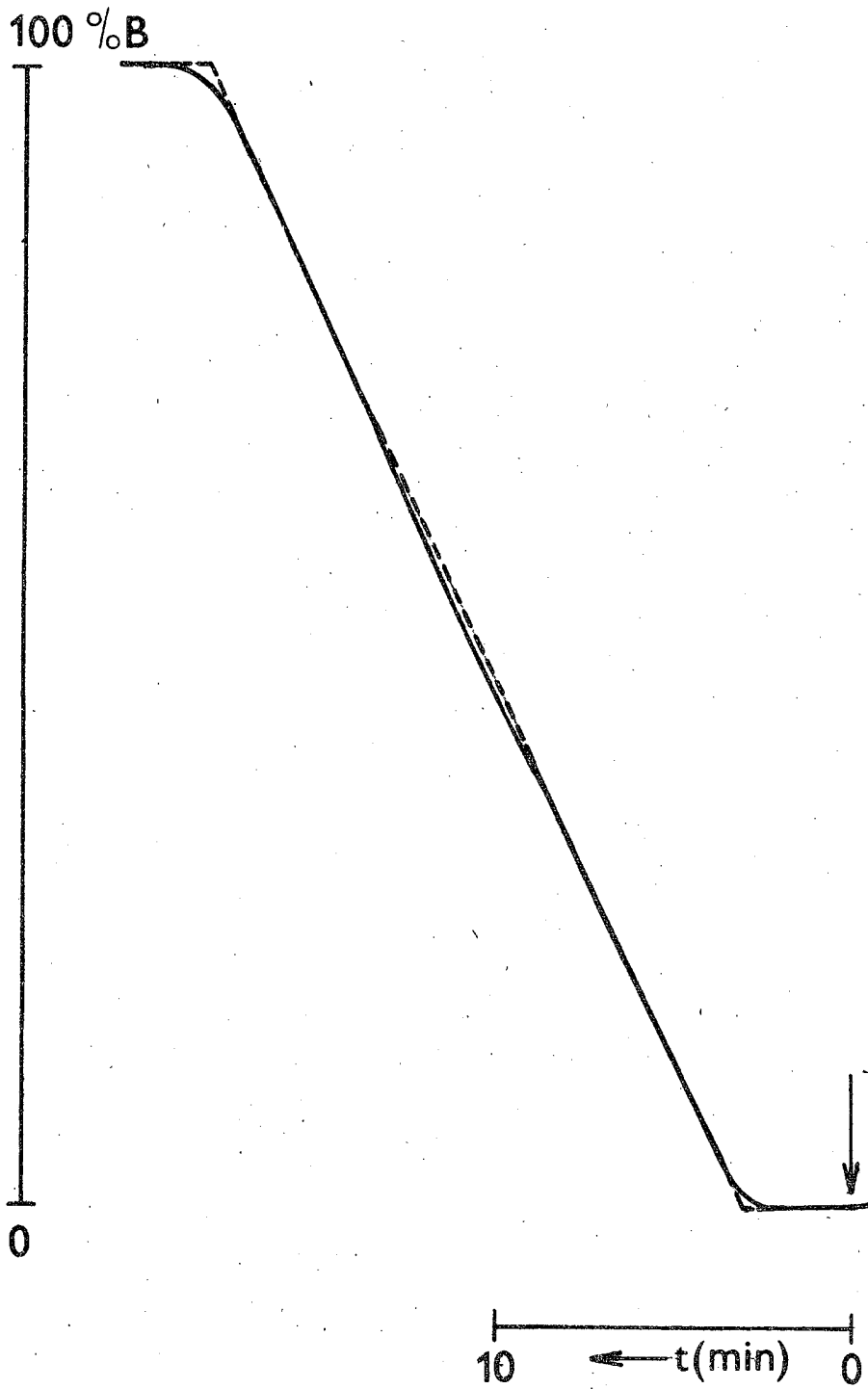
Za výstup vysokotlakého čerpadla 8 je připojena chromatografická kolona 12 se zařízením 13 pro nástřik vzorků, případně je mezi čerpadlem 8 a kolonou 12 dále umístěno čidlo pro měření tlaku a průtokový tlumič tlakových rázů (nejsou na obr. 2 naznačeny).

Funkce zařízení podle vynálezu je zřejmá z obr. 2, kde je směr toku kapaliny znázorněn šipkami, a spočívá v tom, že jednotlivé kapalné složky mobilní fáze nasávané nízkotlakým programovatelným čerpadlem 1 ze zásobníků 4, 5, případně dalších, jsou podle požadovaného programu směšovány v komůrce 6 v časově proměnném poměru a takto smíšená mobilní fáze je tímto čerpadlem 1 dávkována kapilárním potrubím 7 do rozdělujícího členu 9, přičemž celkový průtok mobilní fáze mezi směšovací komůrkou 6 a rozdělujícím členem 9 je o cca 10 - 20% větší než průtok mobilní fáze dávkované vysokotlakým čerpadlem 8. Čerpadlo 8 nasává mobilní fázi z rozdělujícího členu 9, z něhož přebytečná mobilní fáze, jejíž množství se mění podle velikosti objemových kontrakcí při směšování složek mobilní fáze, je odvětvoována do přepadového potrubí 10, jehož výstup 11 je umístěn nad úrovní vstupu 81 vysokotlakého čerpadla 8 a současně nad úrovní rozdělujícího členu 9, aby na vstupu 81 čerpadla 8 nemohl vzniknout podtlak. Mobilní fáze s přesně reprodukováným koncentračním gradientem je dávkována čerpadlem 8 za vysokého tlaku na chromatografickou kolonu 12, opatřenou zařízením 13 pro nástřik vzorku.

P R Ě D M Ě T V Y N Á L E Z U

Zařízení pro přesnou a reprodukovatelnou tvorbu gradientu mobilní fáze v kapalinové chromatografii, v y z n a č e n é t í m , že je tvořeno nízkotlakým programovatelným pístovým čerpadlem (1), kde každý jeho blok (2, 3) o objemu pístových komor do 0,5 ml je připojen přes vstup (21, 31) k zásobníku (4, 5) příslušné složky mobilní fáze, přičemž jeho výstup (22, 32) je připojen ke směšovací komůrce (6) o objemu 0,005 až 2 ml, která je pak s pomocí kapilárního potrubí (7) o světlosti 0,05 až 2 mm připojena přes rozdělující člen (9) jednak na vstup (81) vysokotlakého pístového čerpadla (8) s objemem komory pístu do 0,5 ml a jednak na přepadové potrubí (10) s vyústěním (11) umístěným nad úrovní vstupu (81) vysokotlakého čerpadla (8) a současně nad úrovní rozdělujícího členu (9), přičemž vysokotlaké čerpadlo (8) mobilní fáze je s pomocí výstupu (82) spojeno se zařízením (13) pro nástřik vzorků a dále s chromatografickou kolonou (12), případně přes průtokové čidlo a přes průtokový tlumič tlakových rázů.

Obr. 1



Obr. 2

