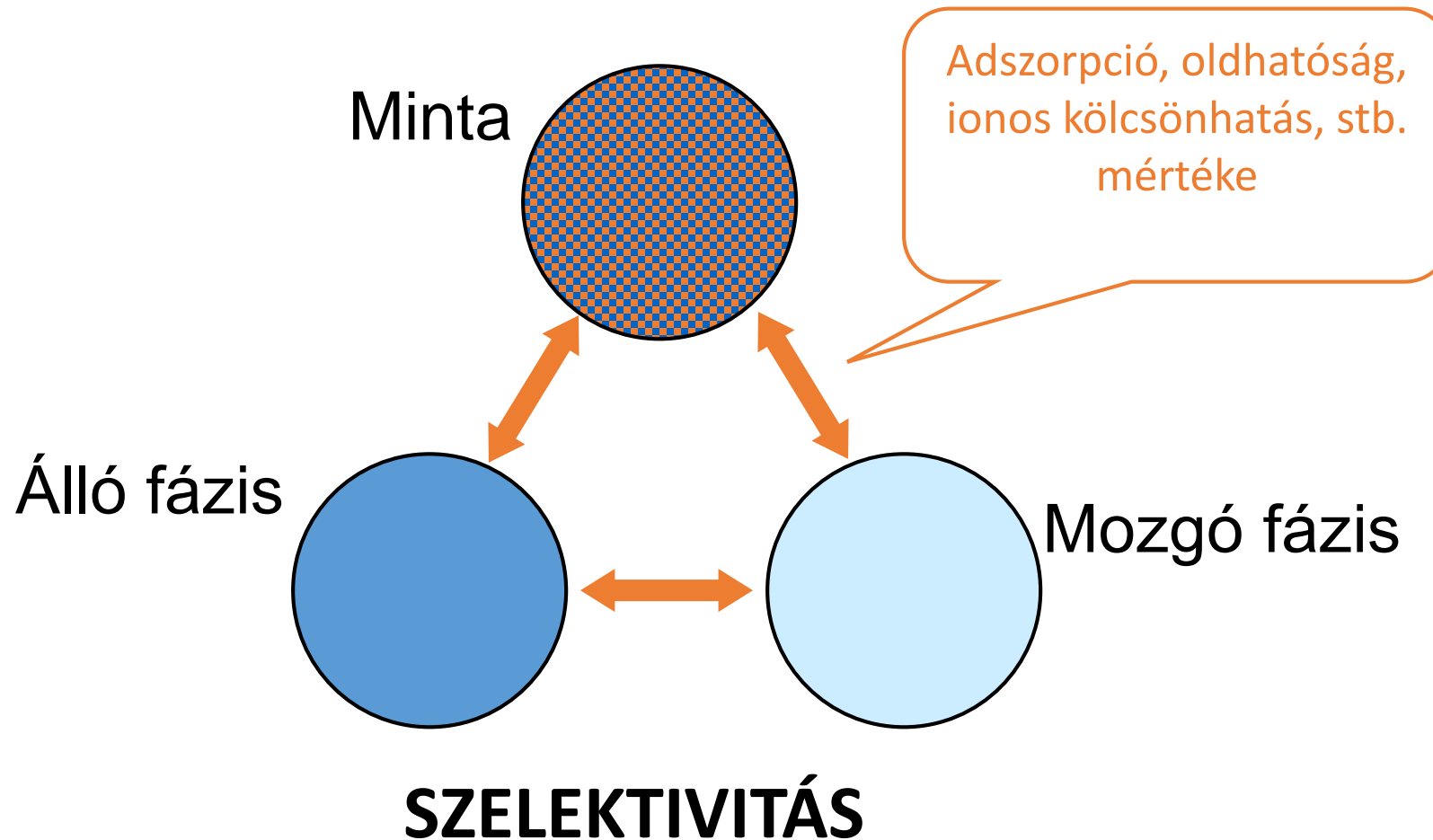


Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia/HPLC

A minta, az álló fázis és a mozgó fázis közötti kölcsönhatások a HPLC-ben

A különböző mintamolekulák és az álló, vagy mozgó fázis közötti kölcsönhatások különbözősége teszi lehetővé az elválasztást.



HPLC elválasztási módok

Vegyülettípusok	Mód	Állófázis	Mozgófázis
Semleges Gyenge sav Gyenge bázis	Fordított fázis (RP)	Apoláris Módosított szilikagél C18, C8, C4, fenil	Poláris Víz/szerves módosítók
Vízben kevésbé oldható, közepesen poláris vegyületek	Normál fázis (NP)	Poláris(abb) Szilikagél Alumínium oxid Módosított szilikagél	Apoláris(abb) Apoláris szerves oldószer / poláris módosítók
Erősen poláris vegyületek	Hidrofil kölcsönhatási kromatográfia (HILIC)	Szilikagél Módosított szilikagél ciano, amino, diol	Víz/szerves módosító (min. 60-70%)
Ionos vegyületek, savak, bázisok	Ionpár (IP)	C18, C8	Víz/szerves oldószer- ionpárképzők
Ionizálható szerves vegyületek, fehérjék, szervetlen ionok	Ioncsere (IEX)	Anion-, vagy kationcserélő gyanta	Vizes só oldat + puffer
Makromolekulák, polimerek	Méretkizárás	Polisztirol Szilikagél	Gélszűrés - vizes Gélpermeációs -szerves

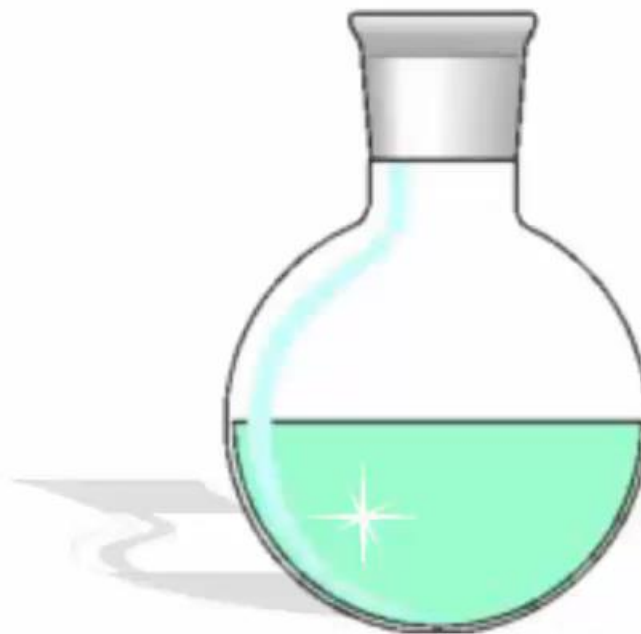
Polarit s

Reversed Phase HPLC 1 - Hydrophobicity

What is Hydrophobicity?

Before defining the normal and reversed phase HPLC, we will need to go through the concept of polarity as defined by hydrophobicity because this is fundamental to HPLC.

The stationary phase and mobile phase can be described as either hydrophobic or hydrophilic. These literally mean 'water hating' and 'water loving', respectively. For example, water and petrol don't mix and the petrol is considered hydrophobic.



play

The petrol won't mix with the water and settles as the top layer.

Ardent
scientific

Hidrofób / hidrofil kémiai szempontból

Reversed Phase HPLC 2 - Hydrophobicity

Hydrophobic & Hydrophilic

Another way to examine hydrophobicity (the amount of hydrophobic content) is from a chemical view.

A molecule such as methanol can be divided into two parts - the water-like hydrophilic part (OH - alcohol or hydroxyl group) and the hydrophobic part consisting of carbon and hydrogen.

As the number of carbons in the molecule increases, the molecule become more hydrophobic and after about 4 carbons (n-butanol), has very poor solubility in water and two layers are formed.

Ardent
scientific

Hydrophobic Hydrophilic



Number of Carbons	Compound Name
1	Methanol

Lower

Higher

Hydrophobicity

HPLC elválasztási módok

Vegyülettípusok	Mód	Állófázis	Mozgófázis
Semleges Gyenge sav Gyenge bázis	Fordított fázis (RP)	Apoláris Módosított szilikagél C18, C8, C4, fenil	Poláris Víz/szerves módosítók
Vízben kevésbé oldható, közepesen poláris vegyületek	Normál fázis (NP)	Poláris(abb) Szilikagél Alumínium oxid Módosított szilikagél	Apoláris(abb) Apoláris szerves oldószer / poláris módosítók
Erősen poláris vegyületek	Hidrofil kölcönhatási kromatográfia (HILIC)	Szilikagél Módosított szilikagél ciano, amino, diol	Víz/szerves módosító (min. 60-70%)
Ionos vegyületek, savak, bázisok	Ionpár (IP)	C18, C8	Víz/szerves oldószer- ionpárképzők
Ionizálható szerves vegyületek, fehérjék, szervetlen ionok	Ioncsere (IEX)	Anion-, vagy kationcserélő gyanta	Vizes só oldat + puffer
Makromolekulák, polimerek	Méretkizárás	Polisztirol Szilikagél	Gélszűrés - vizes Gélpermeációs -szerves

Normál fázisú HPLC

Reversed Phase HPLC 3 - Normal Phase

Normal Phase and Hydrophobicity

In Normal Phase Chromatography, the mobile phase is hydrophobic and the stationary phase is hydrophilic. An example of this is using silica as the stationary phase and hexane as the mobile phase. This was the most common form of liquid chromatography until the 1960's. The first experiment described in the video titled 'Fundamentals of HPLC 1' was normal phase liquid chromatography.

An example of a normal phase application is the analysis of phospholipids. The compounds are soluble in hexane but still hydrophilic enough for good retention on a silica column.

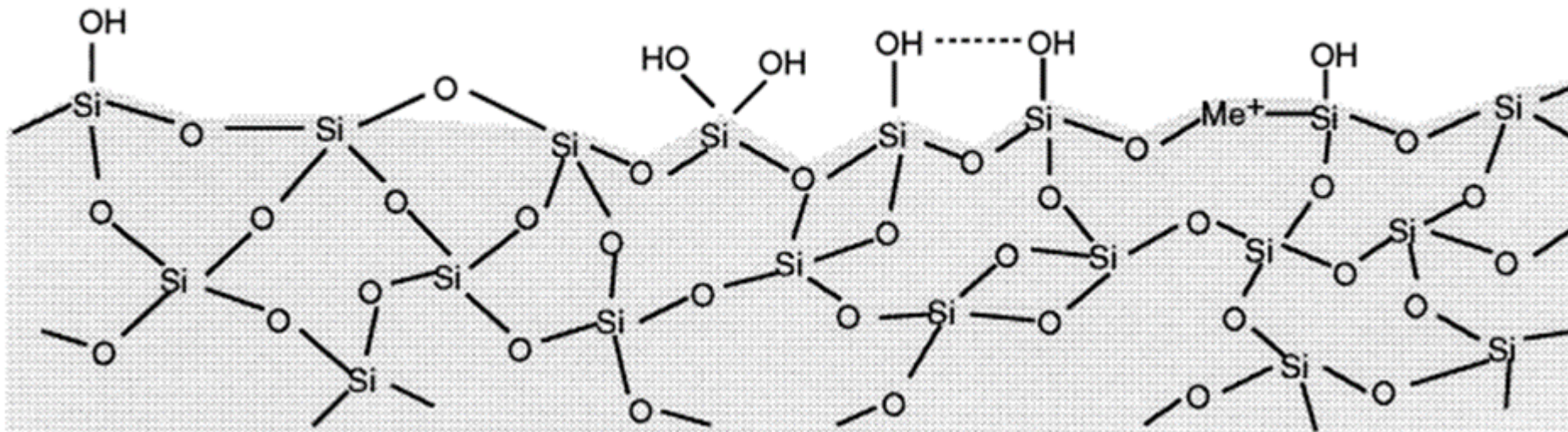
- Stationary Phase - Silica (hydrophilic)
- Mobile Phase - Hexane (hydrophobic)



play

Ardent
scientific

Szilikagél alapú állófázisok



Porózus - nagy fajlagos felület, 50-400 m²/g között
- fajlagos pórus térfogat, 0,5 – 1,0 cm³/g között

Nagy mechanikai stabilitás

Kompatibilisek mindenféle oldószerrel

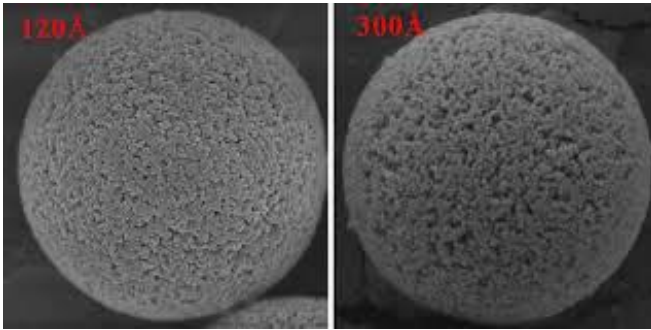
VIGYÁZAT!

pH > 8 oldódik

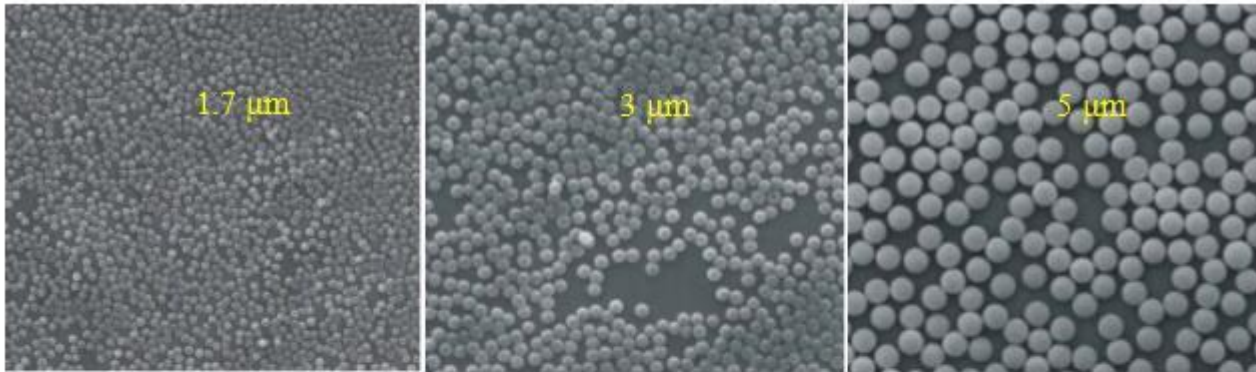
pH < 2 hidrolizál (módosított szilikagél)

vízérzékeny

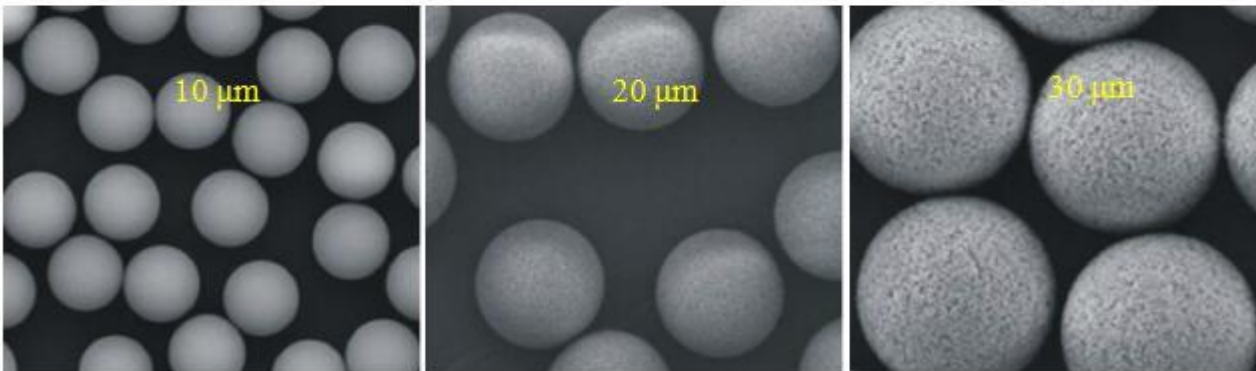
HPLC állófázisok morfológiája



porózus szemcsék / pórusméret 6-100 nm (60-1000 Å)



analitikai HPLC



preparatív HPLC

Az elválasztás mechanizmusa normál fázison

Reversed Phase HPLC 4 - Normal Phase

Separation Mechanism

Separation of components in a mixture in Normal Phase Chromatography occurs because the components will have different degrees of affinity for the stationary phase. Because the stationary phase is hydrophilic (polar), hydrophilic components in the mixture will tend to adsorb more to the stationary phase and thus take longer to elute. The more hydrophilic the component, the longer the retention time.

The separation mechanism can simply be described as **'like likes like'** i.e. hydrophilic components 'stick' more to the hydrophilic stationary phase and have greater retention.

- Stationary Phase - Silica
- Mobile Phase - Hexane



play

Ardent
scientific

HPLC elválasztási módok

Vegyülettípusok	Mód	Állófázis	Mozgófázis
Semleges Gyenge sav Gyenge bázis	Fordított fázis (RP)	Apoláris Módosított szilikagél C18, C8, C4, fenil	Poláris Víz/szerves módosítók
Vízben kevésbé oldható, közepesen poláris vegyületek	Normál fázis (NP)	Poláris(abb) Szilikagél Alumínium oxid Módosított szilikagél	Apoláris(abb) Apoláris szerves oldószer / poláris módosítók
Erősen poláris vegyületek	Hidrofil kölcönhatási kromatográfia (HILIC)	Szilikagél Módosított szilikagél ciano, amino, diol	Víz/szerves módosító (min. 60-70%)
Ionos vegyületek, savak, bázisok	Ionpár (IP)	C18, C8	Víz/szerves oldószer- ionpárképzők
Ionizálható szerves vegyületek, fehérjék, szervetlen ionok	Ioncsere (IEX)	Anion-, vagy kationcserélő gyanta	Vizes só oldat + puffer
Makromolekulák, polimerek	Méretkizárás	Polisztirol Szilikagél	Gélszűrés - vizes Gélpermeációs -szerves

Fordított fázisú HPLC - az állófázis

Reversed Phase HPLC 5 - Stationary Phase

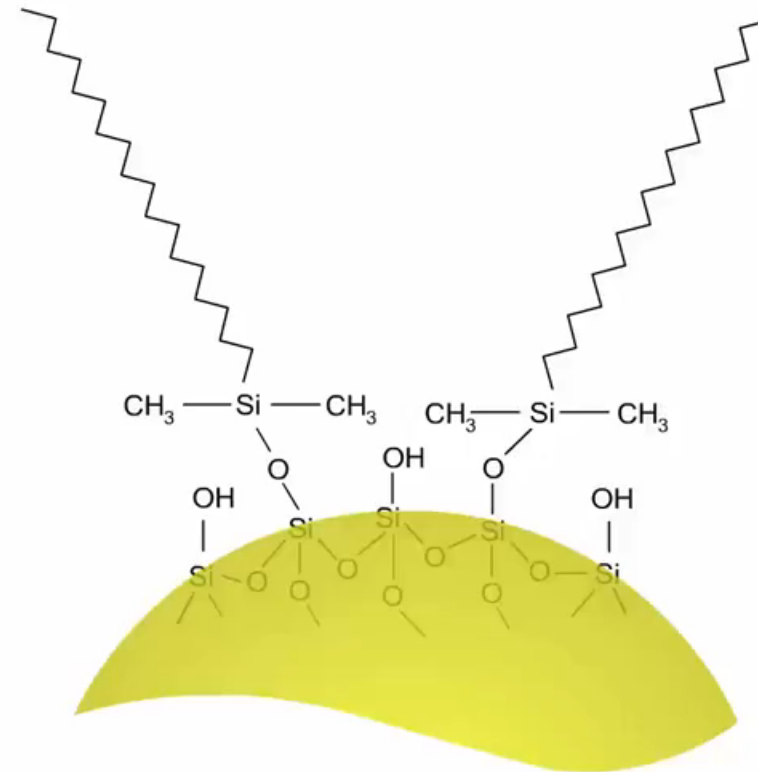
Creating a Reversed Phase Stationary Phase

Reversed phase is the opposite of Normal Phase HPLC i.e. the mobile phase is hydrophilic (water and water additives) while the stationary phase is hydrophobic. This is now the most popular form of chromatography.

The silica particles of the HPLC packing have to be modified to change the chemistry from hydrophilic to hydrophobic. This is done by modifying the surface of the HPLC particle by reacting with, for example, a **C18** group. This is 18 carbons joined back to back to create a long hydrophobe hanging off the silica particle. The silica particles are quite porous and the **C18** hydrophobic groups will cover most of the outside and inside of the particle. The **C18** hydrophobe is the stationary phase and the silica particle is called the support material.

Ardent
scientific

play



Az elválasztási mechanizmus fordított fázison

Reversed Phase HPLC 6 - Stationary Phase

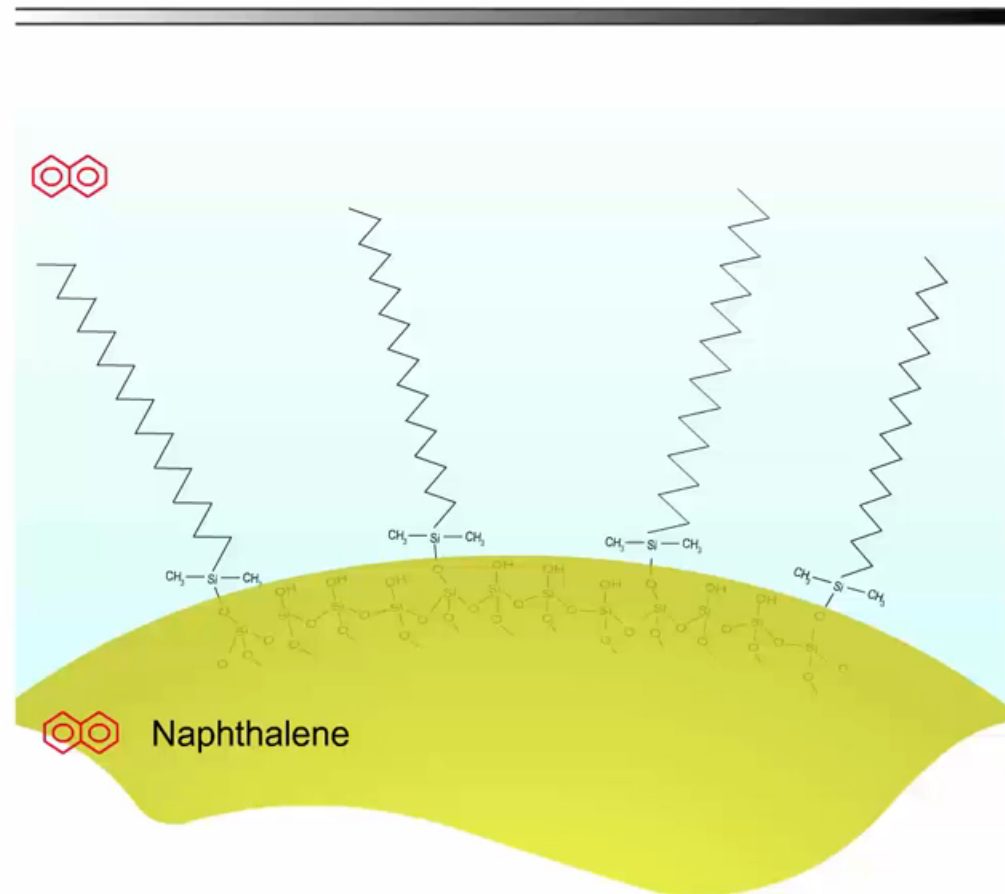
Reversed Phase Retention

Retention or hold-up depends on the degree of interaction with the stationary phase as the components travel through the column and migrate in and out of the particles and interact with the stationary phase. The molecule is said to partition between the stationary phase and the mobile phase. One partition is known as one theoretical plate. The more hydrophobic the analyte, the more retention and the higher the retention factor (k).

In this animation, a single naphthalene molecule is shown moving amongst the C18 stationary phase. There will be a degree of interaction between the C18 hydrophobe and the naphthalene molecule. This interaction will retard the exit of the molecule from the column and the compound will move slower than the flow of the mobile phase resulting in retention.

Ardent
scientific

play



Elválasztás fordított fázison

Reversed Phase HPLC 7 - Stationary Phase

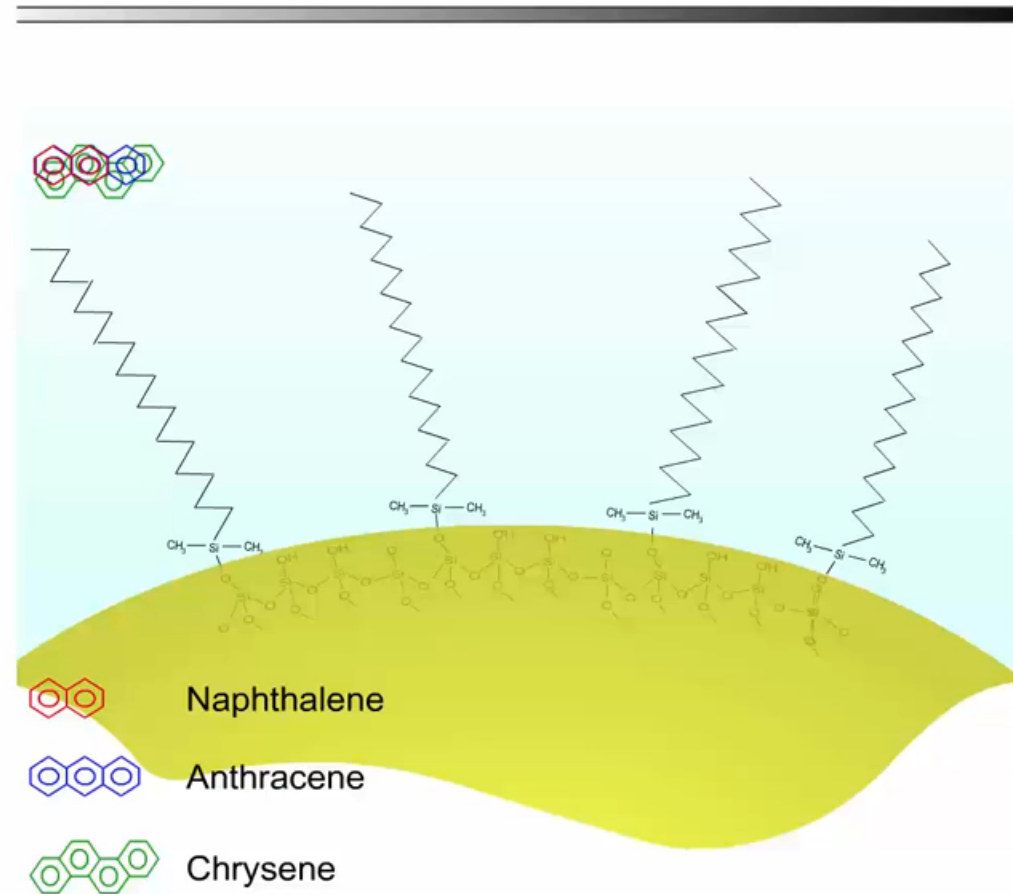
Reversed Phase Separation

In this separation, there are three different PAH (polycyclic aromatic hydrocarbons) components. The naphthalene molecule is the least hydrophobic while the chrysene molecule with more carbon atoms and more aromatic rings is the most hydrophobic.

Naphthalene elutes first and chrysene interacts more with the hydrophobic **C18** stationary phase and is more retained.

Ardent
scientific

play



Az elválasztás mechanizmusa fordított fázison

Reversed Phase HPLC 8 - Stationary Phase

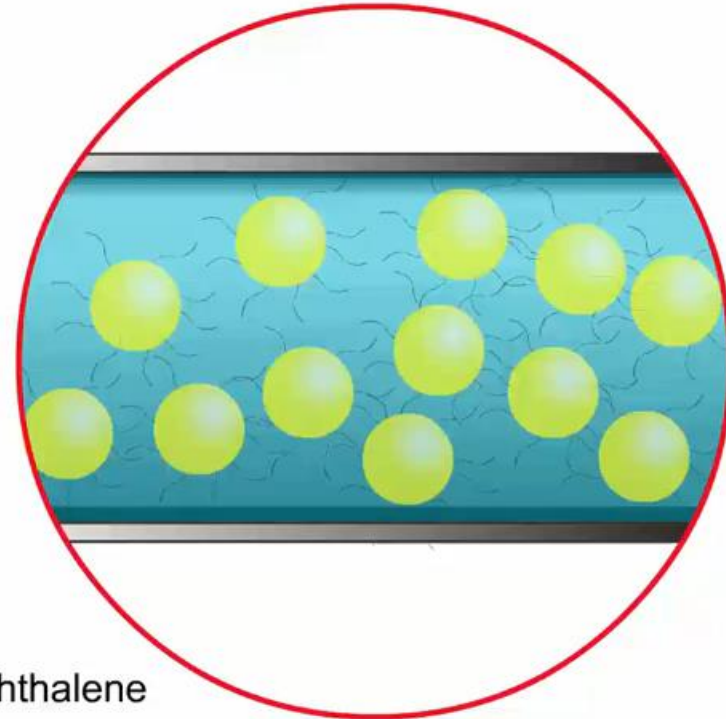
Reversed Phase Separation Mechanism

This animation shows a less magnified view of the three compounds separating on a **C18** phase. Notice that all three compounds move through the mobile phase at the same speed. This speed is dependent on the mobile phase flow rate.

The naphthalene molecules (red) elute first followed by the anthracene (blue) and then chrysene (green). The chrysene molecules interact more with the C18 stationary phase and therefore spend more time diffusing through the particle.

Ardent
scientific

play



- Naphthalene
- Anthracene
- Chrysene

Turista hasonlat

Reversed Phase HPLC 9 - Stationary Phase

Airport Analogy Revisited

A useful analogy can be to liken separating tourists at an airport because of the different times they spend in the shops (stationary phase).

liquor shops

play



in



out



Ardent
scientific



Visszatartás és felbontás fordított fázison

Reversed Phase HPLC 10 - Stationary Phase

Retention and Resolution

Increased hydrophobicity leads to increased retention in reversed phase HPLC. The effect of this is to also increase Resolution.

As the amount of hydrophobicity of a component is increased, Retention (**k**) is also increased together with Resolution (**R**). If there is no interaction of the components with the stationary phase (i.e. no retention), **k** = 0 and both components move through the column at the same speed as the mobile phase flow and elute together at **t₀**.

These two terms are fully explored in the playlists from 'Fundamentals of HPLC'.

Ardent
scientific

Average Retention Factor (**k**) = 0

Resolution (**R**) = 0



Lower Higher
Retention

A mozgófázis és a turista hasonlat

Reversed Phase HPLC 11 - Mobile Phase

Tourist Analogy and The Mobile Phase

If we load the moving walkway now with duty free wine, the tourists stay on the walkway!

liquor shops



in



out



play

Ardent
scientific



A szerves módosító (szerves %)

Reversed Phase HPLC 12 - Mobile Phase

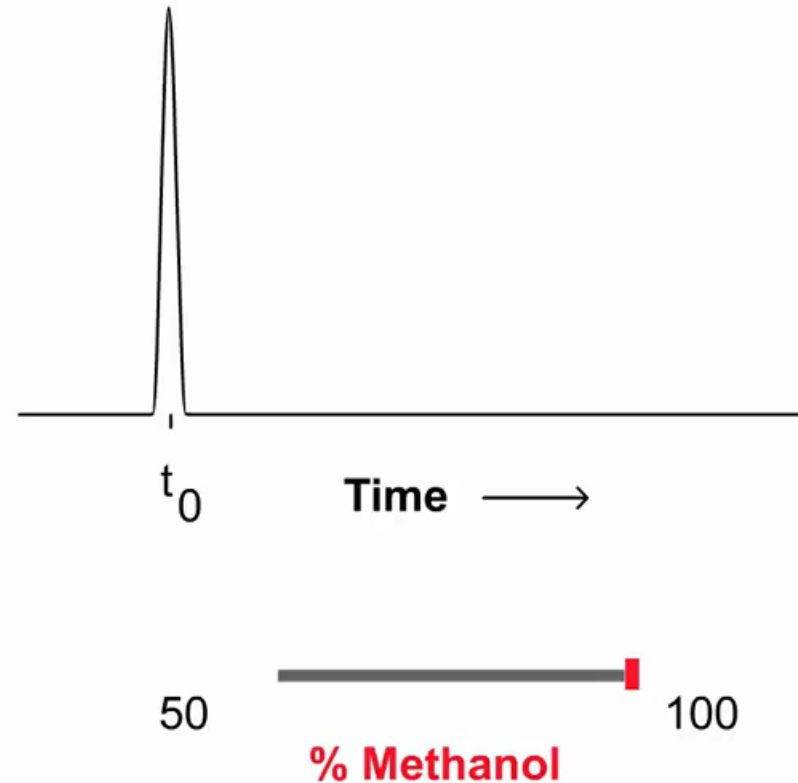
The Organic Modifier

From the tourist analogy to HPLC. In HPLC, a very powerful tool is the ability to change the degree of hydrophobicity of the mobile phase. Manipulating the mobile phase allows control of retention. The mobile phase hydrophobicity can be increased from pure water with the addition of hydrophobic water miscible additives such as methanol. These additives are known as organic modifiers.

As the percentage of the organic modifier is decreased in the mobile phase relative to water, the analyte will prefer the mobile phase less and spend more time interacting with the stationary phase. This leads to higher retention.

Always remember, **like likes like**.

Ardent
scientific

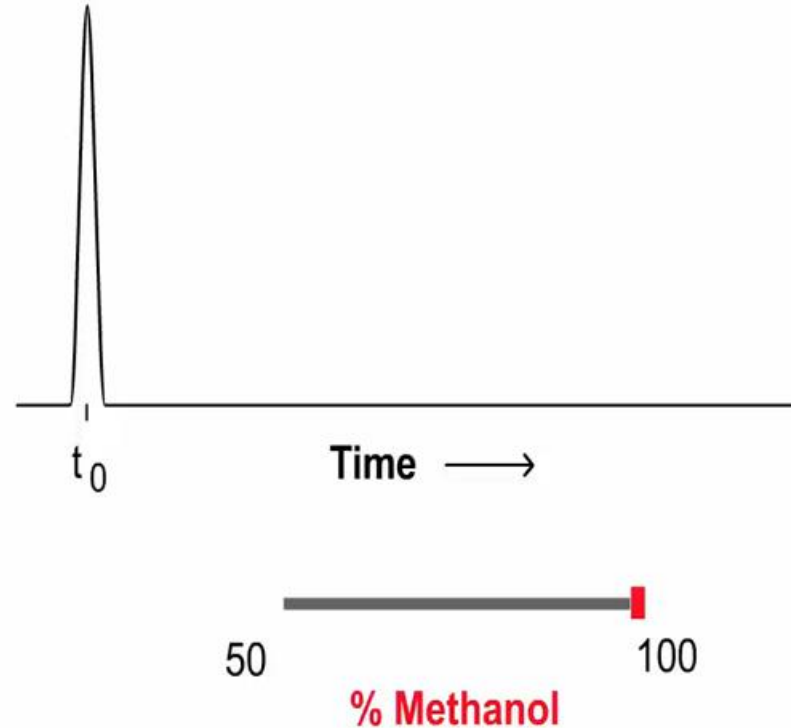


A szerves módosító % és a felbontás

Reversed Phase HPLC 13 - Mobile Phase

Mobile Phase and Resolution

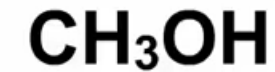
As we saw in the first module 'Fundamentals of HPLC', there is a strong correlation between resolution and retention. If there is no retention because the mobile phase is too strong *i.e.* too much organic modifier, there will also be no resolution as all the components will elute at the unretained time.



Ardent
scientific

Szerves módosítók fajtái

Reversed Phase HPLC 14 - Mobile Phase



Changing the Type of Organic Modifier

Not only can the percentage of organic modifier be changed but also the type of modifier. As the modifier is changed from methanol through to tetrahydrofuran (THF), the hydrophobicity increases as the number of carbon atoms increases.

Methanol and acetonitrile are the two most common modifiers used in reversed phase HPLC. Acetonitrile is preferred if low wavelength detection is required because it has low absorbance itself at low wavelengths.

Number of Carbons	Compound Name
1	Methanol



Ardent
scientific

Szerves módosító megválasztása

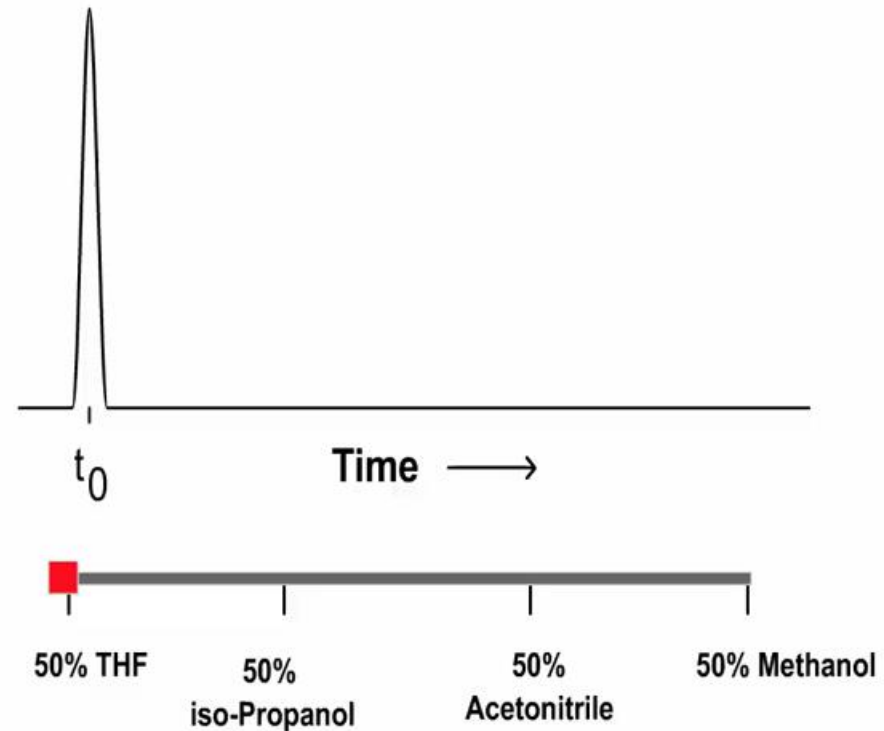
Reversed Phase HPLC 15 - Mobile Phase

Modifier Effect on the Chromatogram

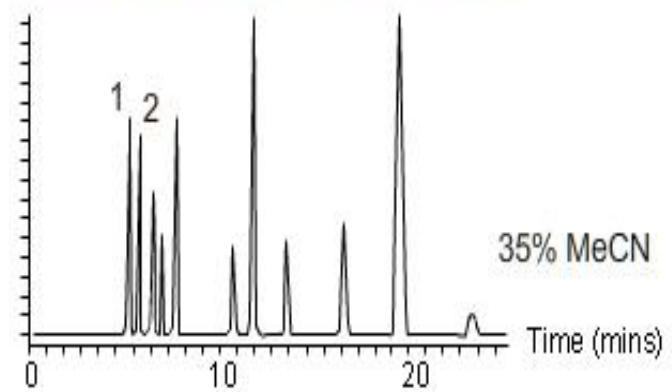
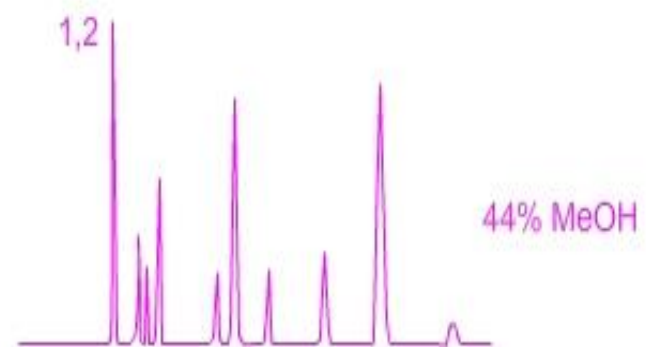
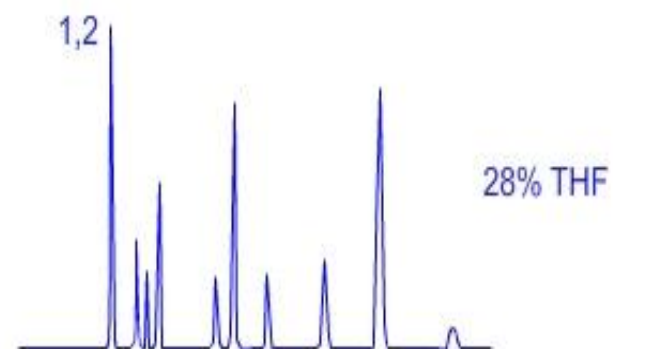
As the hydrophobicity of the mobile phase decreases, retention increases. Therefore when moving from methanol to acetonitrile, less acetonitrile is required to give the same retention.

There are other considerations when choosing the mobile phase such as:

- UV Absorbance
- Viscosity
- Toxicity
- Boiling Point



Ardent
scientific



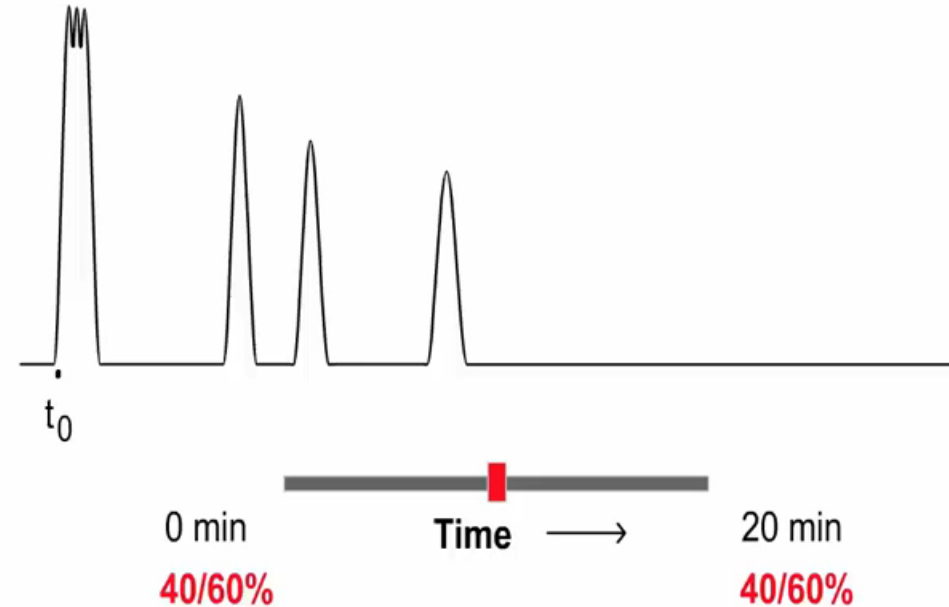
Izokratikus elválasztás

Reversed Phase HPLC 16 - Gradients

Isocratic Elution

Isocratic elution is defined as a static ratio of the mobile phase components for the entire analysis. In this example, the ratio of 40/60 (water / acetonitrile) is held constant.

In this analysis, the three early-eluting peaks have a very low k resulting in poor resolution. Also the k of the last-eluting peak is too high resulting in a long analysis time.



Ardent
scientific

Izokratikus és gradiens elválasztás

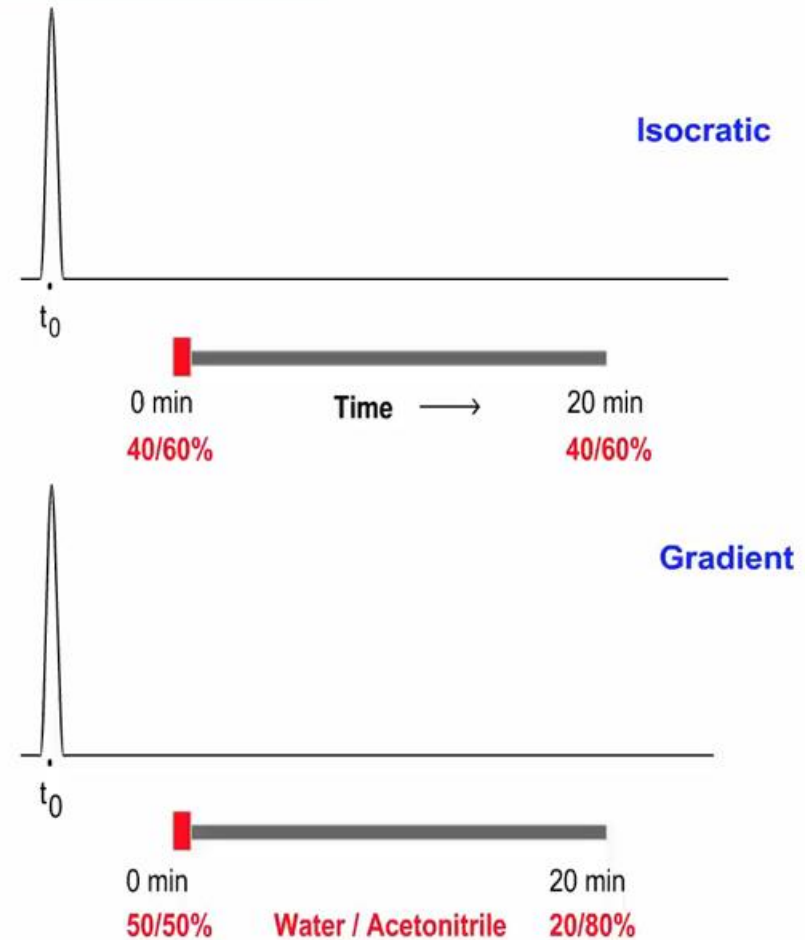
Reversed Phase HPLC 17 - Gradients

Isocratic Elution versus Gradient Elution

Quaternary and Binary pumps have the ability to vary the amount of the organic modifier throughout the analysis. This is called Gradient Elution. For example, as shown here in this gradient elution, the ratio begins at 50/50 but increases linearly to 80% acetonitrile over a 20 minute run. This control of the mobile phase strength allows precise control of the retention of the components.

By using a gradient profile, the three early-eluting peaks are now resolved because the initial mobile phase strength has been reduced to 50%. Also, the last-eluting peak **k** has been reduced as the acetonitrile percentage is increased to 80%.

Ardent
scientific



Gradiens elválasztás – egyforma keskeny csúcsok

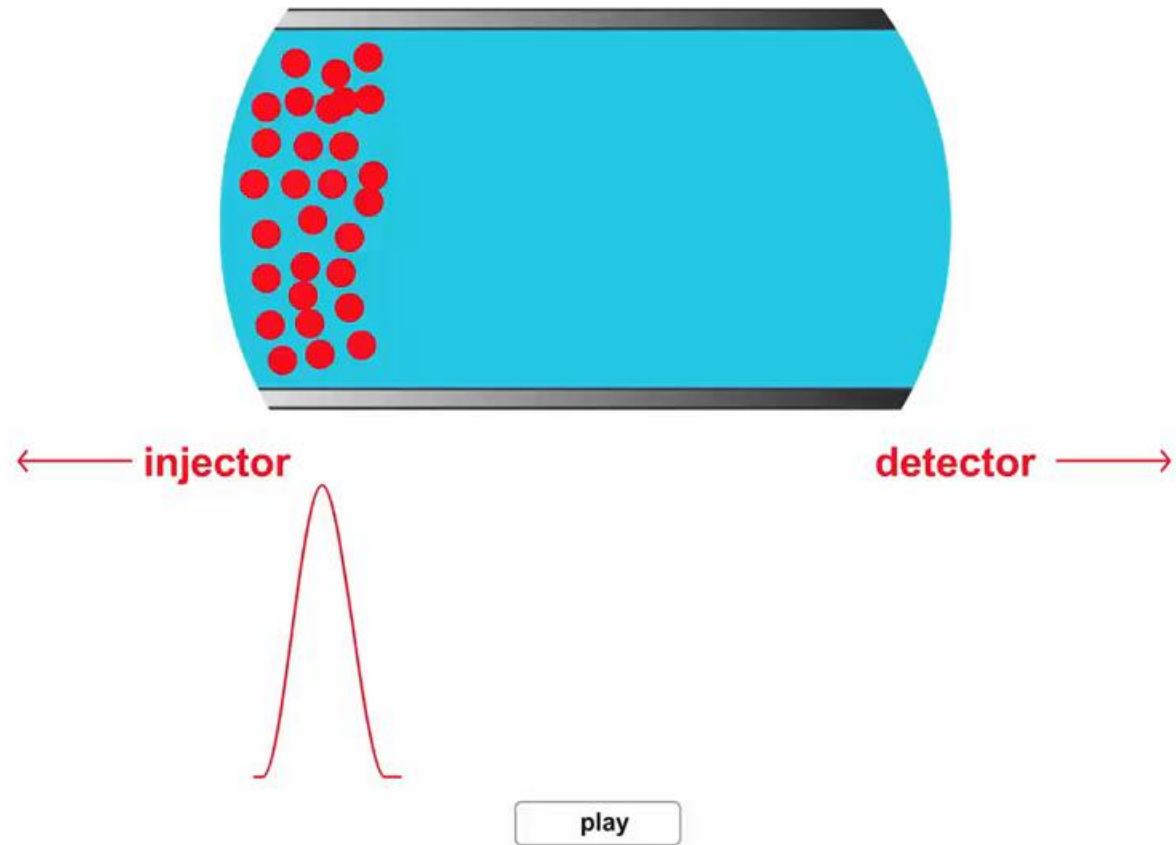
Reversed Phase HPLC 18 - Gradients

Gradient Elution - sharper peaks

Changing the organic modifier amount (%B) not only changes retention as shown but also changes the peak width. The molecules of the peak at the injector end of the column will 'see' the higher modifier amount first compared with the molecules at the detector end of the peak. This causes the injector-end molecules to move at a slightly higher velocity as the molecules partition more from the stationary phase into the mobile phase.

The peak becomes sharper and results in higher efficiency, better resolution and greater sensitivity. A measure of theoretical plates is only meaningful for an isocratic analysis.

Ardent
scientific



pH kontroll

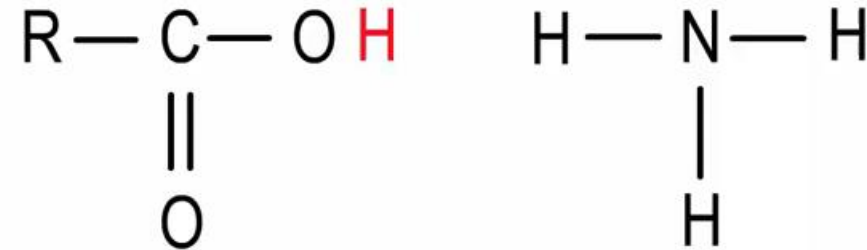
Reversed Phase HPLC 23 - pH and Buffers

Ionization

Up until now, we have discussed the separation of neutral components and focused on the effects of different degrees of hydrophobicity of the component and the mobile phase. We will now discuss the separation of ionic components by Reversed Phase HPLC.

Weak acids and bases can exist either in the ionized or non-ionized form. The non-ionized form is more hydrophobic and will be retained more in reversed phase HPLC.

The pH of the mobile phase determines the degree of ionization and we will now cover how the ionization can be controlled through pH control.



Ardent
scientific

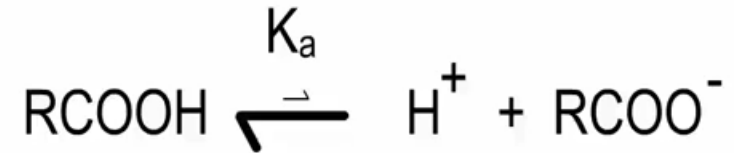
Gyenge savak disszociációja

Reversed Phase HPLC 24 - pH and Buffers

Ionization of Acids

The measure of ionization is the Equilibrium Constant (K_a). The acid RCOOH can dissociate to H^+ and RCOO^- as shown on the right. K_a is the ratio of the molar concentration of the products of the reaction over the molar concentration of the starting protonated acid $[\text{RCOOH}]$. A high K_a indicates strong ionization i.e. the reaction is driven to the right.

You will notice that the K_a equation has the $[\text{H}^+]$ (concentration of H^+) on the top line. The $-\log$ of $[\text{H}^+]$ is the pH of the solution. Therefore by controlling the pH we can control the degree of ionization and the amount of hydrophobicity of the component. For example, a low pH (high $[\text{H}^+]$) will drive the reaction to the left resulting in little ionization of the acid.



$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{RCOO}^-]}{[\text{RCOOH}]}$$



Ardent
scientific

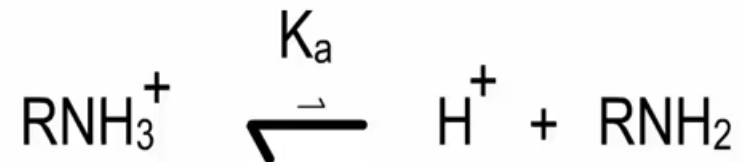
Gyenge bázisok disszociációja

Reversed Phase HPLC 25 - pH and Buffers

Ionization of Bases

A base can also exist as the protonated (ionized) form) or as the unprotonated base (neutral form). A high K_a indicates little ionization i.e. the reaction is well to the right. Lowering the pH for bases drives the reaction to the left resulting in more ionization.

The challenge often in reversed phase HPLC is the analysis of basic compounds. Bases in an ionized form are much more susceptible to erratic chromatography than ionized acids.

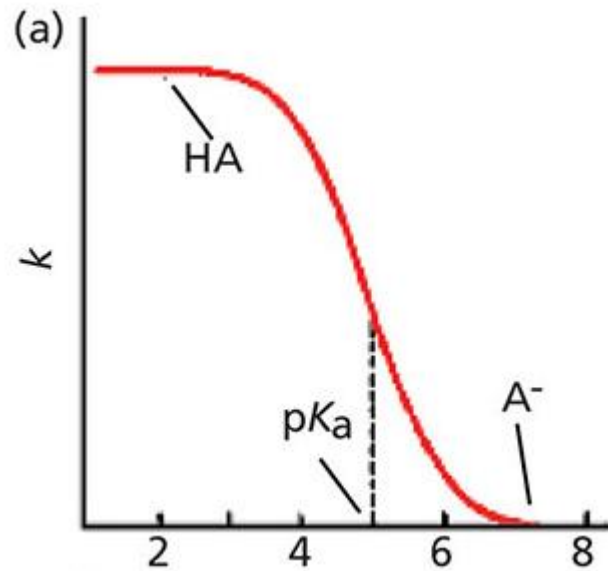


$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{RNH}_2]}{[\text{RNH}_3^+]}$$

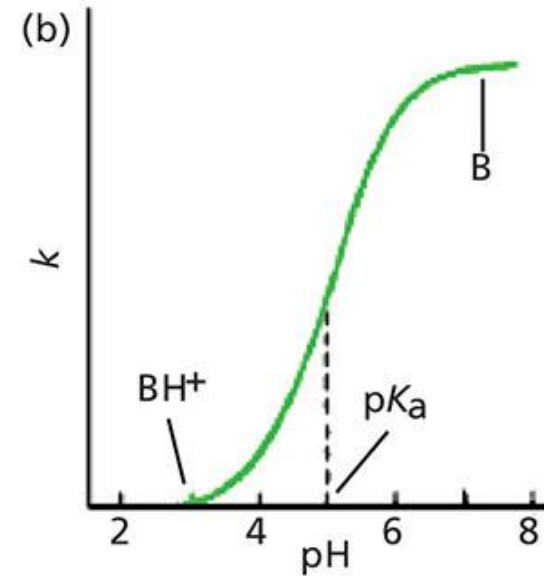


Ardent
scientific

Ionizálható vegyületek visszatartása a pH függvényében



gyenge sav



gyenge bázis

HPLC elválasztási módok

Vegyülettípusok	Mód	Állófázis	Mozgófázis
Semleges Gyenge sav Gyenge bázis	Fordított fázis (RP)	Apoláris Módosított szilikagél C18, C8, C4, fenil	Poláris Víz/szerves módosítók
Vízben kevésbé oldható, közepesen poláris vegyületek	Normál fázis (NP)	Poláris(abb) Szilikagél Alumínium oxid Módosított szilikagél	Apoláris(abb) Apoláris szerves oldószer / poláris módosítók
Erősen poláris vegyületek	Hidrofil kölcönhatási kromatográfia (HILIC)	Szilikagél Módosított szilikagél ciano, amino, diol	Víz/szerves módosító (min. 60-70%)
Ionos vegyületek, savak, bázisok	Ionpár (IP)	C18, C8	Víz/szerves oldószer- ionpárképzők
Ionizálható szerves vegyületek, fehérjék, szervetlen ionok	Ioncsere (IEX)	Anion-, vagy kationcserélő gyanta	Vizes só oldat + puffer
Makromolekulák, polimerek	Méretkizárás	Polisztirol Szilikagél	Gélszűrés - vizes Gélpermeációs -szerves

Fordított fázisú ionpár kromatográfia

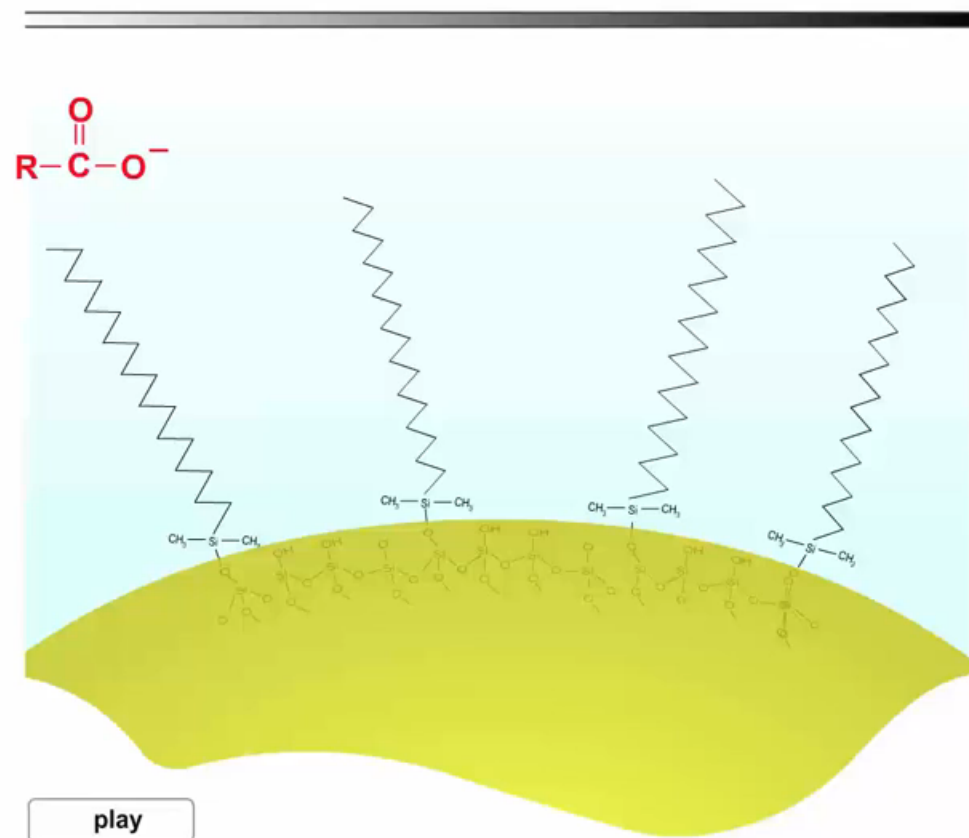
Reversed Phase HPLC 30 - pH and Buffers

Ion Pairing

It is possible to separate acids and bases as well in reversed phase HPLC. This can be achieved by ion pairing. While the acid itself will be too hydrophilic in the dissociated state, retention will be increased when complexed with a hydrophobic counter ion.

In this animation, the component is an acid and at high pHs will be in an ionic form. The component will therefore elute at t_0 . Through addition of an ion pairing reagent (such as an alkyl quaternary ammonium salt) to the mobile phase, a complex is formed between the ionic component and the ion pairing reagent.

Ardent
scientific



HPLC elválasztási módok

Vegyülettípusok	Mód	Állófázis	Mozgófázis
Semleges Gyenge sav Gyenge bázis	Fordított fázis (RP)	Apoláris Módosított szilikagél C18, C8,C4, fenil	Poláris Víz/szerves módosítók
Vízben kevésbé oldható, közepesen poláris vegyületek	Normál fázis (NP)	Poláris(abb) Szilikagél Alumínium oxid Módosított szilikagél	Apoláris(abb) Apoláris szerves oldószer / poláris módosítók
Erősen poláris vegyületek	Hidrofil kölcönhatási kromatográfia (HILIC)	Szilikagél Módosított szilikagél ciano, amino, diol	Víz/szerves módosító (min. 60-70%)
Ionos vegyületek, savak, bázisok	Ionpár (IP)	C18, C8	Víz/szerves oldószer- ionpárképzők
Ionizálható szerves vegyületek, fehérjék, szervetlen ionok	Ioncsere (IEX)	Anion-, vagy kationcserélő gyanta	Vizes só oldat + puffer
Makromolekulák, polimerek	Méretkizárás	Polisztirol Szilikagél	Gélszűrés - vizes Gélpermeációs -szerves

Ioncserés kromatográfia

- minta – töltéssel rendelkező (pl. szervetlen ionok, erősen savas, vagy bázikus szerves vegyületek)
- mozgófázis – ionos vegyület (só, vagy erős sav/bázis)
- állófázis – ionos vagy ionizálható csoportokat tartalmaz – ioncserélő gyanták
pl. kationcserélő oszlop $-\text{SO}_3^-$, vagy COO^- csoportok BH^+ elválasztására
vagy anioncserélő oszlop $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ csoportok A^- elválasztására

Ioncserés kromatográfia

- a minta ionjai és az állófázis ellentétes töltésű ionjai között elektrosztatikus vonzás (Coulomb erők) jön létre
- a minta ionok és a mozgófázis ellenionjai versengenek az állófázishoz kötött ellentétes töltésű ionokért. Ez határozza meg a retenciót.



- a különböző minta ionok eltérő mértékben kötődnek az állófázis ellentétes töltésű ionjaihoz.

Ioncserés kromatográfia

GE Healthcare
Life Sciences



<https://www.youtube.com/watch?v=q3fMqgT1do8>

HPLC elválasztási módok

Vegyülettípusok	Mód	Állófázis	Mozgófázis
Semleges Gyenge sav Gyenge bázis	Fordított fázis (RP)	Apoláris Módosított szilikagél C18, C8, C4, fenil	Poláris Víz/szerves módosítók
Vízben kevésbé oldható, közepesen poláris vegyületek	Normál fázis (NP)	Poláris(abb) Szilikagél Alumínium oxid Módosított szilikagél	Apoláris(abb) Apoláris szerves oldószer / poláris módosítók
Erősen poláris vegyületek	Hidrofil kölcönhatási kromatográfia (HILIC)	Szilikagél Módosított szilikagél ciano, amino, diol	Víz/szerves módosító (min. 60-70%)
Ionos vegyületek, savak, bázisok	Ionpár (IP)	C18, C8	Víz/szerves oldószer- ionpárképzők
Ionizálható szerves vegyületek, fehérjék, szervetlen ionok	Ioncsere (IEX)	Anion-, vagy kationcserélő gyanta	Vizes só oldat + puffer
Makromolekulák, polimerek	Méretkizárás	Polisztirol Szilikagél	Gélszűrés - vizes Gélpermeációs -szerves

Méretkizárásos kromatográfia

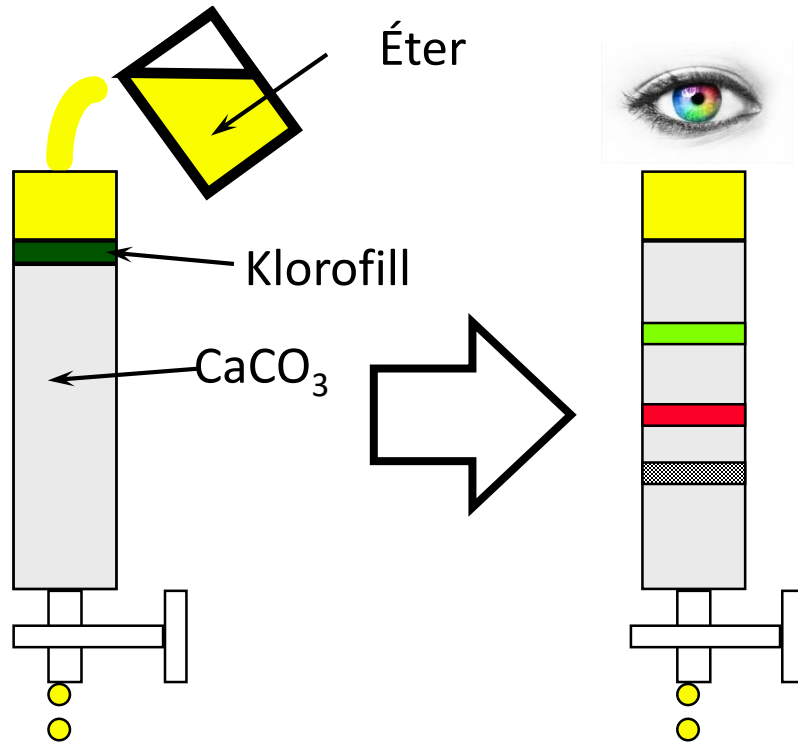
GE Healthcare
Life Sciences



<https://www.youtube.com/watch?v=oV5VB5kO3tQ>

A HPLC műszerezettsége

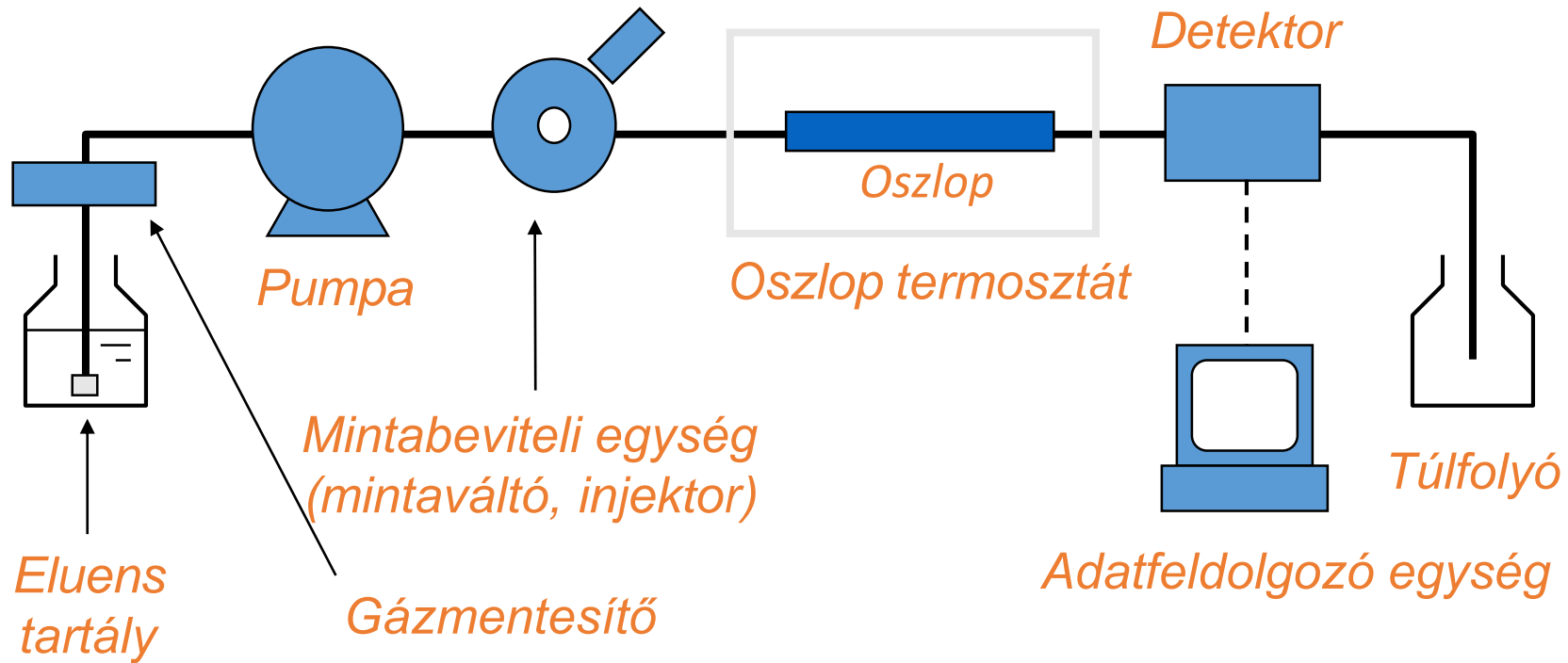
Cvett



ultranagynyomású HPLC rendszerek



A HPLC műszerezettsége



Modern HPLC rendszer

ELUENS vagy MOZGÓFÁZIS

GÁZ MENTESÍTŐ

NAGYNYOMÁSÚ SZIVATTYÚ vagy PUMPA

$\Delta p \sim 400$ bar, F: 0.1-10 ml/min, pulzálás < 1-2%

MINTABEVITEL

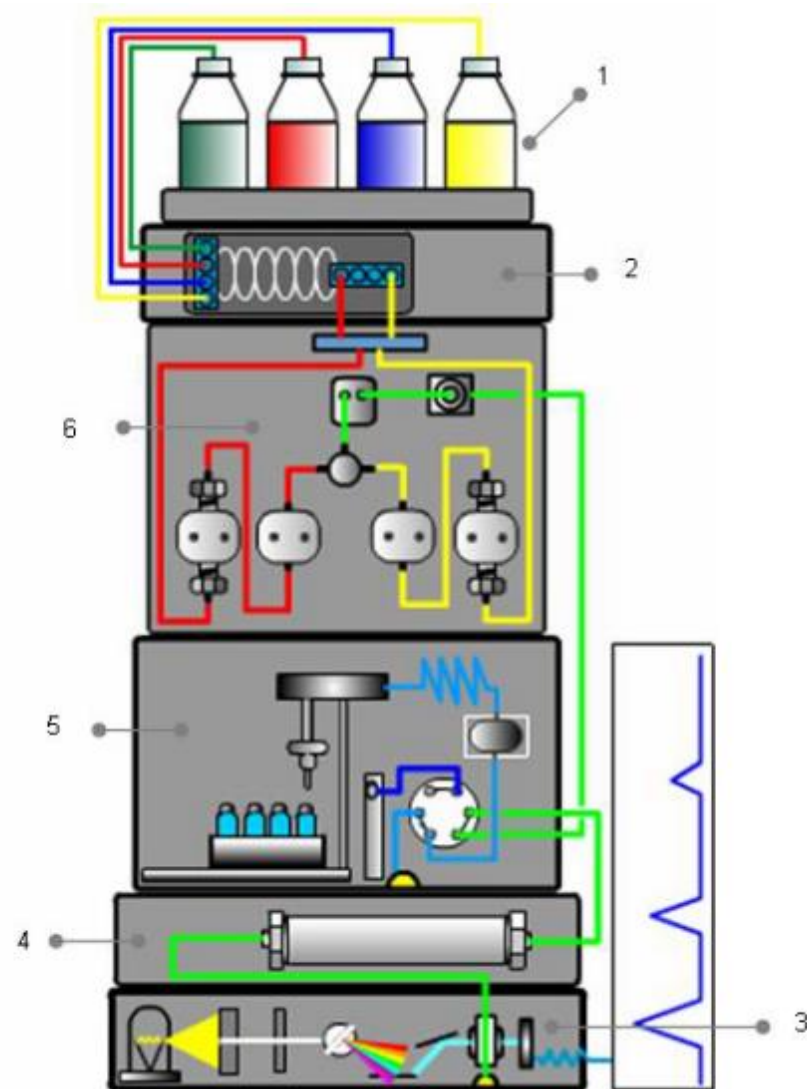
V_{inj} : 1-100 μ l, reprodukálhatóság < 0,2%

KROMATOGRÁFIÁS OSZLOP

D_{part} : 2-10 μ m, d_c : 3-8 mm, L=2-25 cm

DETEKTOR

UV-VIS, FLD, ED, CD, RI, MS, ELSD, FTIR, NMR



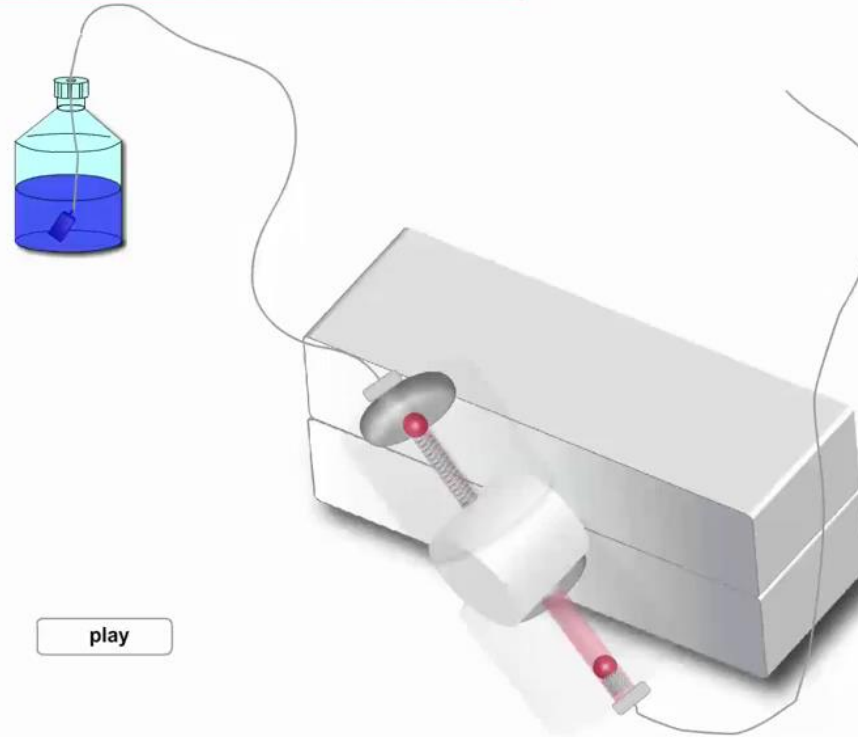
A HPLC pump

HPLC Instrumentation 9 - The Pump

Single Piston Pump and Check Valves

Of course the pump we have so far is quite useless because it only has one line in and out so the solvent is recycled in the solvent bottle. What we really want is to pull the mobile phase in and then pump it out towards the autosampler and column.

To do this we need to add two check valves and another line to our pump.



Ardent
scientific

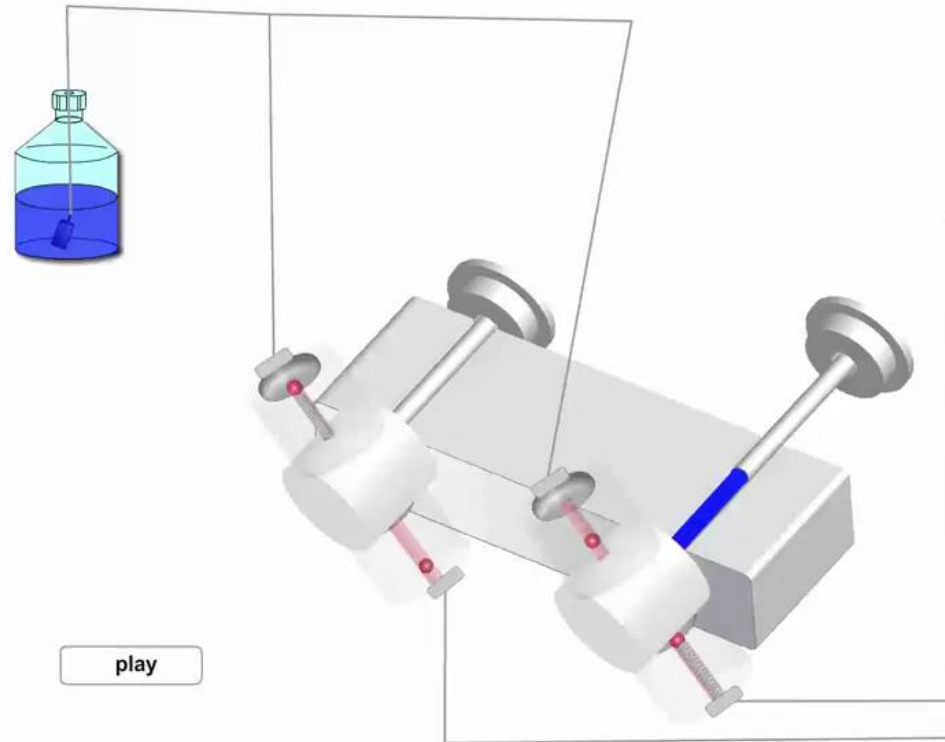
A HPLC pump

HPLC Instrumentation 10 - The Pump

Dual Piston

You might have noticed in the previous animation that the solvent flow was erratic. This is because the single piston is either withdrawing the solvent from the bottle OR dispensing the solvent out of the pump. It is critical in HPLC to have constant flow and the easiest way to achieve this is to introduce a second piston.

With a second piston, one piston is pulling the solvent into the pump and the other piston is pushing the solvent out of the pump. The pistons are 180° out of phase.



Ardent
scientific

HPLC mintabevitel – injektor

HPLC Instrumentation 19 - The Autosampler

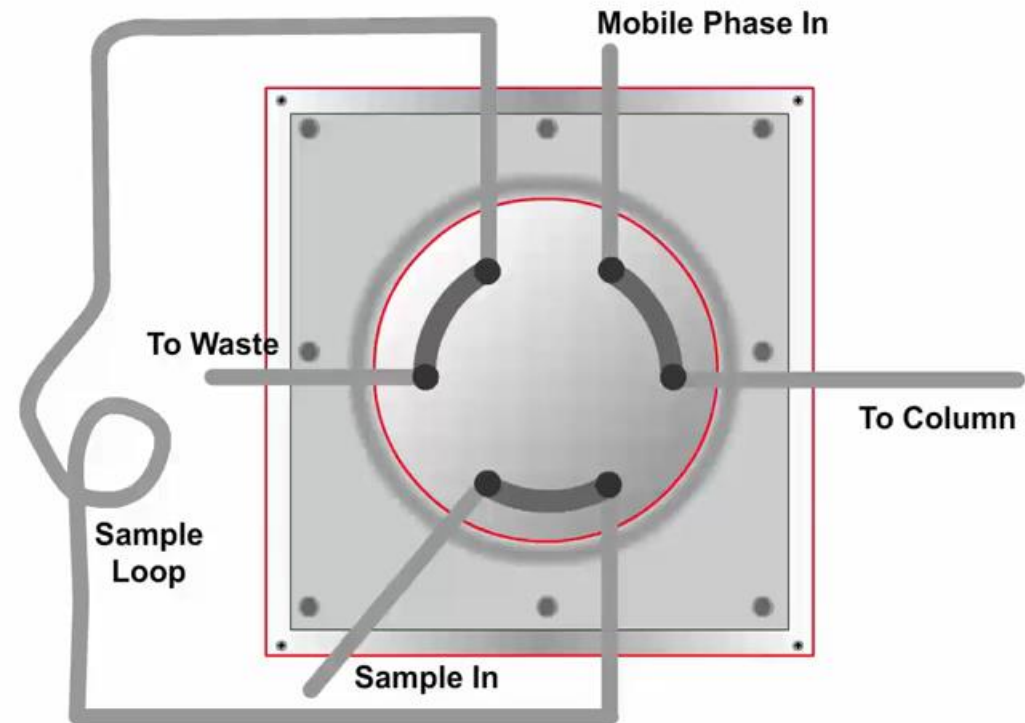
Sampling Valve

The autosampler is located between the pump and the column. The aim of the autosampler is to introduce the sample into the high pressure mobile phase flow without an interruption to the flow.

The principle of a sampling valve is to 'park' the sample in a sample loop while flow is maintained through the column. Introducing the sample into the loop can then occur at atmospheric pressure. Once the loop has been filled, the switching valve then rotates and the sample is introduced into the high pressure system.

This animation shows a typical six-port valve in action.

Ardent
scientific

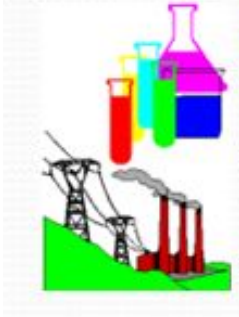


play

HPLC detektorok

Típus	Szelektivitás	Érzékenység (detektált mennyiség)
Törésmutató (RI)	kicsi	10-100 ng
Vezetőképesség	kicsi	1-10 ng
UV/VIS	közepes	0,1 ng
Elektrokémiai	nagy	1-10 pg
Fluoreszcens	nagy	1-10 pg
Tömegspektrométer	nagy	10-100 fg

HPLC alkalmazási területek



Vegyipar

polisztirol
ftalátok
festékek



Élettudományok

peptidek
fehérjék
nukleotidok



Gyógyszeripar

tetraciklinek
barbiturátok
antidepresszánsok
kortikoszteroidok



Fogyasztási cikkek

antioxidánsok
lipidek
cukrok



Környezetvédelem

poliaromás szénhidrogének
növényvédőszer
Szervetlen ionok



Klinikai kémia

aminosavak
vitaminok
homocisztein