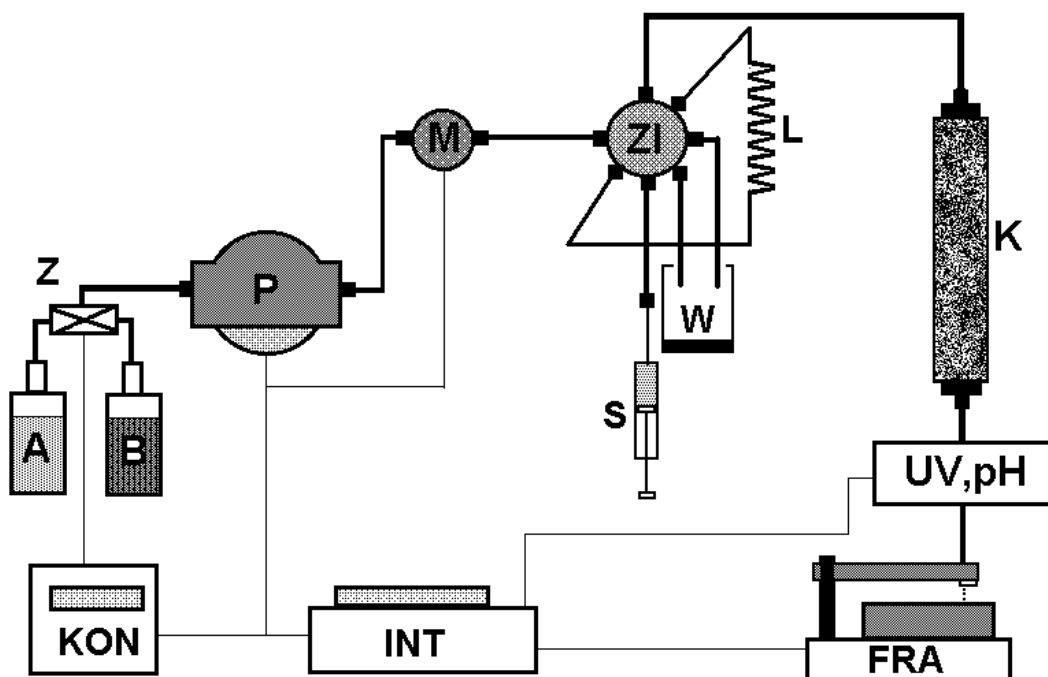


3. Urządzenia i aparatura stosowane w chromatografii ciekowej

Najważniejszym elementem chromatografii ciekowej, bez którego rozdział chromatograficzny nie może być wykonany, jest kolumna chromatograficzna. Jest to cylindryczny pojemnik z jednym wejściem i jednym wyjściem, wypełniony porowatą substancją (złożem, żelem). Wypełnienie kolumny dobrane jest w ten sposób by spełnić wymagania stawiane wybranej technice chromatograficznej. Poszczególne rodzaje złożeń oraz ich charakterystyki omówione są w następnych rozdziałach tego opracowania. Pozostałe urządzenia powszechnie stosowane w chromatografii ciekowej, jakkolwiek niezmiernie ważne, nie są niezbędne dla przeprowadzenia procesu separacji makromolekuł. Przepływ solwentu przez kolumnę możliwy jest tylko wtedy, gdy pomiędzy wejściem i wyjściem kolumny panuje różnica ciśnień. Tę różnicę ciśnień, w postaci ciśnienia hydrostatycznego, wywołuje wszechobecne pole grawitacyjne, jeżeli tylko górna powierzchnia solwentu położona jest powyżej wypływu z kolumny. Niestety, tak uzyskana różnica ciśnień nie zawsze jest wystarczająca do wymuszenia odpowiedniego przepływu. W związku z tym stosuje się specjalne pompy chromatograficzne, wymuszające znacznie większe przepływy, dzięki wyższym ciśnieniom do jakich mechanicznie sprężany jest solwent. Aby mógł zaistnieć przepływ solwentu z pompy do kolumny, niezbędne są odpowiednie wężyki zwane inaczej drenami lub kapilarami. Wężyki te dostarczają solwent (lub solwenty) ze zbiorników – poprzez pompę, mikser i zawór iniekcyjny – do kolumny, a stamtąd do detektora przepływowego i dalej do kolektora frakcji. Elektryczny sygnał z detektora przekazywany jest do rejestratora (integratora), gdzie podlega zapisowi i analizie. Schemat podstawowego systemu chromatografii ciekowej przedstawiony jest na rysunku 3.1.

Systemy chromatografii można podzielić na trzy grupy. Do pierwszej grupy zalicza się systemy niskociśnieniowe, w których maksymalne ciśnienie solwentu nie przekracza 0,5 MPa. W ramach tej grupy przepływ solwentów wymuszany jest dzięki stosowaniu pomp perystaltycznych lub dzięki grawitacyjnej różnicy ciśnień, wytworzonych różną wysokością słupa cieczy (solwentu). Do drugiej grupy zwyczajowo zalicza się systemy wysokociśnieniowe (*high performance liquid chromatography* – HPLC, *fast protein liquid chromatography* – FPLC), w których pompy mogą wytwarzać ciśnienia powyżej 0,5 MPa. Górna granica ciśnienia nie jest określana, ale większość systemów HPLC może wytwarzać ciśnienia powyżej 10 MPa. Trzecią grupę stanowią systemy chromatografii przemysłowej.



Rys. 3.1.

Schemat systemu chromatografii ciekowej. Przepływ cieczy (solwentów) z naczyń **A** i **B** wymuszany jest przez pompę **P**. Skład solwentu kontrolowany jest przez zawór **Z**, dzięki któremu możliwe jest tworzenie gradientu stężenia cieczy **B** w **A**. Z pompy ciecz podawana jest do miksera **M**, gdzie jest poddawana dokładnemu wymieszaniu. W następnej kolejności solwent podawany jest do zaworu iniekcyjnego **ZI**. Zawór ten ma zwykle kilka portów, co umożliwia wybór drogi przepływu solwentu. Solwent może być skierowany bezpośrednio na kolumnę, z pominięciem pętli **L**. Jeżeli próbka do rozdzielenia wcześniej naniesiona jest do pętli **L** (przy pomocy strzykawki **S**) to przeprowadzenie solwentu przez tę pętlę powoduje naniesienie próbki na kolumnę **K**. Naczynie **W** gromadzi solwent wypchnięty z pętli **L** w trakcie jej wypełniania próbką oraz solwent użyty do przemywania systemu. Rozdzielone składniki próbki wraz z solwentem wypływają z kolumny i dostają się do detektora **UV** i ewentualnie do detektora **pH**-metrycznego i/lub konduktometrycznego. Zmiany właściwości fizycznych wypływającego z kolumny materiału są rejestrowane przez detektor (detektory). Informacja o tym przekazywana jest do rejestratora-integratora **INT**, a rozdzielony na kolumnie materiał zbierany jest przez kolektor frakcji **FRA**. Całość systemu jest sterowana z poziomu kontrolera chromatografii **KON**. Do systemu takiego można podłączyć automatyczny podajnik próbek (autosampler), co pozwala zautomatyzować cykl rozdzieleń.

3.1. Urządzenia i aparatura w chromatografii niskociśnieniowej

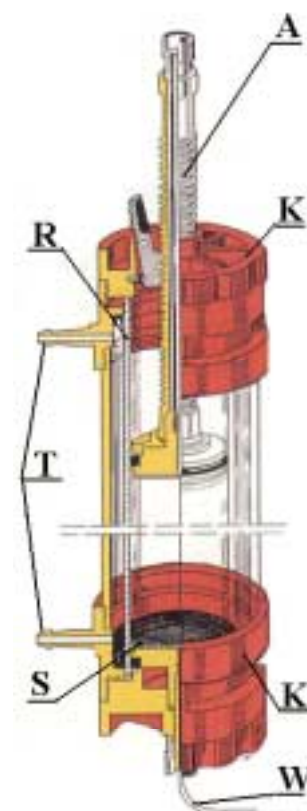
Poniżej zwięźle scharakteryzowane są różne akcesoria potrzebne do zestawienia niskociśnieniowego, manualnego systemu chromatografii ciekowej. W następnej kolejności omówiony zostanie system automatyczny, zawierający w przeważającej większości w swym składzie omówione wcześniej elementy.

3.1.1. Kolumny

W zależności od potrzeb i przeznaczenia stosowane są kolumny o różnych rozmiarach i różnym typie budowy. Kolumny te przeznaczone są do samodzielnego ich wypełniania wybranymi złożami. Aby uprościć proces upakowywania złożeń w kolumnie, stosuje się specjalne naczynia mocowane na górnej części kolumny (*ang. packing reservoirs*), które ułatwiają uzyskanie jednorodnej struktury złożeń. Wysokość złożeń w kolumnie może być regulowana przy pomocy adaptorów, które wypełniają sobą część kolumny wolną od złożeń i pozwalają do minimum ograniczyć objętość martwą kolumny. Kolumny mogą być osłonięte dodatkowym pojemnikiem (*ang. thermostatic jacket*) umożliwiającym termostatowanie złożeń przy pomocy opływającego kolumnę płaszcza wodnego.

Rys. 3.2.

Schemat kolumny chromatograficznej **XK**. Podstawowym elementem składowym kolumny jest szklana lub plastikowa rura **R**, na końcach której zamocowane są końcówki **K** wyposażone w specjalnej konstrukcji sita **S** utrzymujące wypełnienie w kolumnie. Do końcówek kolumny mocowane są wężyki **W** doprowadzające i odprowadzające solwent. Kolumna może być wyposażona w adaptor **A** oraz płaszcz termostatujący **T**.



W tabeli 3.1. zebrane są najważniejsze informacje dotyczące pustych kolumn. Przy wyborze kolumny należy kierować się głównie jej rozmiarami oraz wytrzymałością mechaniczną. Do filtracji żelowej potrzeba kolumn o możliwie największej długości. Wyboru średnicy kolumny należy wtedy dokonać na drodze kompromisu między ilością potrzebnego złożeń oraz objętością próbki, jaką planujemy nanieść na kolumnę. W technikach adsorpcyjnych długość kolumny nie wpływa znacząco na jej selektywność, ale im krótsza kolumna tym niższym ciśnieniem można wymusić określony przepływ. W tym przypadku należy rozpocząć wybór raczej od zdefiniowania objętości złożeń i do tej objętości dobrać kolumnę o maksymalnie dużej średnicy. Niewykorzystaną część objętości kolumny można wtedy zredukować stosując adaptor(y).

Tabela 3.1.

Zestawienie podstawowych informacji o pustych kolumnach chromatograficznych. Dane zaczerpnięte

z aktualnego (2000 r.) katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech.

Typ kolumny	Rodzaj materiału	Ekstremalne długości (cm)	Ekstremalne średnice (mm)	Maksymalne ciśnienie (MPa)	Adaptor i naczynie do pakowania	Termostatowanie
C	Szkło borokrzemowe	10 - 100	10 - 26	0,1	tak, tak	nie
XK	Szkło borokrzemowe	15 - 100	9 - 50	0,1 - 0,5	tak, tak	tak
SR	Szkło borokrzemowe	45 - 100	10 - 25	0,3 - 1,0	tak, tak	tak
HR	Szkło borokrzemowe	2,0 - 50	5 - 16	3,0 - 10,0	tak, tak	nie
PD-10	Polipropylen	11	15	przepływ grawitacyjny	nie, nie	nie

3.1.2. Pompy

Przepływ solwentów w zakresie niskich ciśnień można skutecznie wymusić stosując pompy perystaltyczne. Konstrukcja pomp pozwala regulować prędkość przepływu solwentów w dość dużym zakresie, przy zadowalającej stabilności tego przepływu. Zasadniczą wadą pomp perystaltycznych jest pulsacja ciśnienia, bardzo niekorzystnie wpływająca na złoża oraz na jakość rozdzielców. Bardziej zaawansowane technologicznie pompy tłokowe, na przykład pompa **P-50**, pozwalają wyeliminować tę wadę.



Rys. 3.3.

Pompy chromatograficzne stosowane w zakresie niskich ciśnień. **P-1** jest pompą perystaltyczną z wymiennymi wężykami o różnych przekrojach wewnętrznych i różnej odporności chemicznej. **P-50** jest prostą pompą tłokową pozwalającą znacznie ograniczyć pulsację tłoczonych solwentów.



Tabela 3.2.

Pompy stosowane do wymuszania przepływu w zakresie niskich ciśnień. Dane zaczerpnięte z aktualnego (2000 r.) katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech.

Typ pompy	Przepływ max/min (ml/min)	Ciśnienie max (MPa)	Kompensacja pulsacji
P-1	0,01 – 8,0	0,2	nie
P-50	0,1 – 49,9	0,5	tak

3.1.3. Detektory

W chromatografii biomolekuł najczęściej stosowane są detektory rejestrujące zmiany gęstości optycznej przepływającej substancji mierzone dla wybranej długości fali. Dla detekcji białek i peptydów powszechnie stosuje się światło o długości fali 280 nm. Światło o tej długości fali jest pochłaniane przez aminokwasy aromatyczne. Mniej chętnie stosuje się falę o długości 230 nm, pochłanianą przez wiązania peptydowe. Powodem tego jest fakt, że tak krótkie fale są silnie i nierezonansowo pochłaniane przez różne substancje, co znacznie komplikuje proces detekcji. Nukleotydy i kwasy nukleinowe pochłaniają światło o długości fali 254 nm, ale wiele detektorów pracuje skutecznie przy długości fali 260 nm.



Rys. 3.4.

Najczęściej stosowany w chromatografii niskociśnieniowej detektor UV-1. Detektor ten może być wyposażony w filtry: 254, 280 i 405 nm. Jako detektor w pełnym zakresie spektralnym (190-1100 nm) może być zastosowany spektrofotometr **Ultrospec 2000** z zamontowaną kuwetką przepływową. Instrument ten może dokonywać jednoczesnego pomiaru w kilku długościach fali.



Większość detektorów UV, przeznaczonych do prac w zakresie niskich ciśnień, wyposażona jest w monochromatyczne filtry, co umożliwia pomiar tylko dla wybranych długości fali. Detektory te mogą być wyposażone w celki różniące się długością drogi optycznej, co powoduje różną ich objętość. Uwagę zwraca tutaj możliwość zastosowania spektrofotometru **Ultrospec 2000** jako detektora UV. Zaletą tego wyboru jest możliwość płynnego wyboru długości fali jak i możliwość jednoczesnego pomiaru w wielu długościach

fali, oraz możliwość rejestrowania wyników w pamięci komputera i późniejszej ich obróbki. Z doświadczenia autora wynika, że jest to najwygodniejszy detektor UV-VIS, pozwalający na jednoczesną rejestrację w sześciu i więcej długościach fali (1).

Tabela 3.3.

Detektory przepływowe przydatne do pracy w systemach chromatografii niskociśnieniowej. Dane zaczerpnięte z aktualnego (2000 r.) katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech.

Typ detektora	Rodzaj pomiaru	Zakres pomiarowy	Pojemność celki pomiarowej (μl)
UV-1	Detektor UV, filtrowy	254, 280, 405 (nm)	50, 80, 250,
Uvicord S II	Detektor UV, filtrowy	206, 226, 254, 280, 313, 365, 405 (nm)	70
Ultrospec 2000	Spektrofotometr UV-VIS	190 – 1100 (nm)	75
pH Monitor	Pomiar pH	0 – 14	40
PH/C-900	Pomiar pH i przewodności	0 – 14 1 μS – 1000 mS	24 88
Conductivity Monitor	Pomiar przewodności	1 μS – 1000 mS	14

Mniej powszechnie stosuje się detektory rejestrujące zmiany wartości pH przepływających solwentów. Detektory te są przydatne do obserwacji zmian pH w technice chromatografii jonowymiennej, gdy zaadsorbowane molekuly eluowane są w gradiencie pH. Podobne zadanie spełnia detektor przewodności (konduktometr), ale w sytuacji, gdy zaadsorbowane molekuly eluowane są w gradiencie stężenia soli. Sygnał elektryczny z detektora musi być zarejestrowany w postaci czytelnej dla obsługującego system. Najprostszym sprzętem do rejestracji są jedno lub dwukanałowe rejestratory typu x-t, zapisujące na przesuwałcej się taśmie papieru zmiany sygnału elektrycznego w czasie. Do wyboru mogą być: dwukanałowy rejestrator **REC-112** lub jednokanałowy **REC-111**. W przypadku zastąpienia detektora spektrofotometrem **Ultrospec 2000**, sygnał z detektora rejestrowany jest w pamięci komputera.

3.1.4. Kolektory frakcji

Zadaniem kolektora frakcji jest zbieranie materiału wypływającego z kolumny w porcjach o określonej objętości. Nieco bardziej skomplikowane kolektory frakcji mogą, w wyniku współpracy z detektorem (lub z kontrolerem chromatografii), zbierać tylko wybrane porcje materiału, charakteryzujące się określonymi właściwościami fizycznymi (OD, pH, σ). Kolektory różnią się również pojemnością koszyczków oraz sposobem prowadzenia koszyczka względem drenu.

Rys. 3.5.

Kolektor frakcji **RediFrac** jest najprostszym i najczęściej używanym kolektorem, natomiast **SuperFrac** jest najbardziej technologicznie zaawansowanym kolektorem, spełniającym wszystkie wymagania stawiane tego typu instrumentom.



Tabela 3.4.

Charakterystyka kolektorów frakcji. Dane zaczerpnięte z aktualnego (2000 r.) katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech.

Typ kolektora	Liczba probówek w koszyku	Metoda frakcjonowania	Możliwość wydzielania pików
RediFrac	40, 95 lub 175	krople, czas	nie
Frac-100	40, 95 lub 175	krople, czas	tak
Frac-200	40, 95 lub 175	krople, czas	tak
SuperFrac	84, 180 lub 312	krople, czas, piki	tak

3.1.5. Zawory, miksery i drobny sprzęt chromatograficzny

Wybór odpowiedniej drogi przepływu solwentu w systemie chromatograficznym realizowany jest dzięki różnorodnym zaworom. Podstawową grupę stanowią wielozadaniowe zawory manualne, o różnej liczbie portów (3 porty – LV-3 i SRV-3-; 4 porty – LV-4

i SRV-4, 9 portów – V-8), oraz manualne zawory do nastrzykiwania próbek (V-7 i IV-7). Zawory te skutecznie spełniają swe zadania w manualnych niskociśnieniowych systemach chromatograficznych. W systemach automatycznych, o których mowa poniżej, stosowane są odpowiedniki tych zaworów, ale zaopatrzone w elektromagnetyczne siłowniki przełączające je w odpowiednim momencie. Mogą to być następujące zawory: 3-portowe PSV-50, 9-portowe MV8, IMV8, oraz zawory iniekcyjne MV7, IMV7.



Rys. 3.6.

Zawory stosowane w niskociśnieniowej chromatografii cieczerw. Od lewej: PSV-50, LV-3, LV-4, SRV-3, SRV-4, V-8 i V-7.

Dzięki zaworom możliwe jest pobieranie solwentów z różnych naczyń i formowanie z nich różnych kompozycji. Należy jednak tę nowo powstałą kompozycję dokładnie wymieszać. Czynność tę wykonują miksery, w których wirowe pole magnetyczne wprawia w ruch obrotowy metalowy dipol magnetyczny. W zależności od ilości płynów, które muszą być wymieszane w jednostce czasu, eksperymentator dysponuje dwoma typami mikserów: 0,6 ml oraz 6 ml. Mniejszy z mikserów może pracować tylko w systemie automatycznym, podczas gdy większy może pracować niezależnie i być użytecznym w systemach manualnych. Specjalnie dla systemów manualnych skonstruowano naczynie do formowania gradientu stężenia (*gradient maker*) GM-1. Naczynie to pozwala na łatwe formowanie gradientów liniowych.

Rys. 3.7.

Miksery pozwalające na przygotowanie solwentu o odpowiednim składzie. Od lewej: naczynie do formowania gradientu GM-1, mikser 6 ml oraz mikser 0,6 ml.



Do nanoszenia próbek na kolumnę powszechnie stosuje się zawory iniekcyjne (wymienione powyżej). Zawory te muszą być wyposażone w pętle o dokładnie określonych objętościach. Dostępne są pętle: 50 μ l, 100 μ l, 500 μ l, 1000 μ l i 2000 μ l. Dla większych objętości można zastosować urządzenia zwane superpętlami (*ang. superloops*) o objętościach: 10 ml, 50 ml oraz 150 ml. Nieco odmienne są naczynia aplikacyjne **SA-5** i **SA-50**, przeznaczone tylko dla systemów manualnych. Naczynia te stanowią jednocześnie pułapkę dla pęcherzy powietrza i zabezpieczają kolumnę przed zapowietrzeniem.

Na koniec należy wspomnieć o wężykach (drenach lub kapilarach), dzięki którym może odbywać się przepływ solwentów w całym systemie chromatograficznym. Zainteresowani znajdą wężyki różniące się nie tylko średnicami wewnętrznymi i zewnętrznymi ale również materiałami z których są wykonane, co gwarantuje odpowiednią ich trwałość przy pracy z agresywnymi płynami. W katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech (2) znaleźć można również całą gamę złączek, pozwalających na szybkie, trwałe i skuteczne łączenie wężyków.

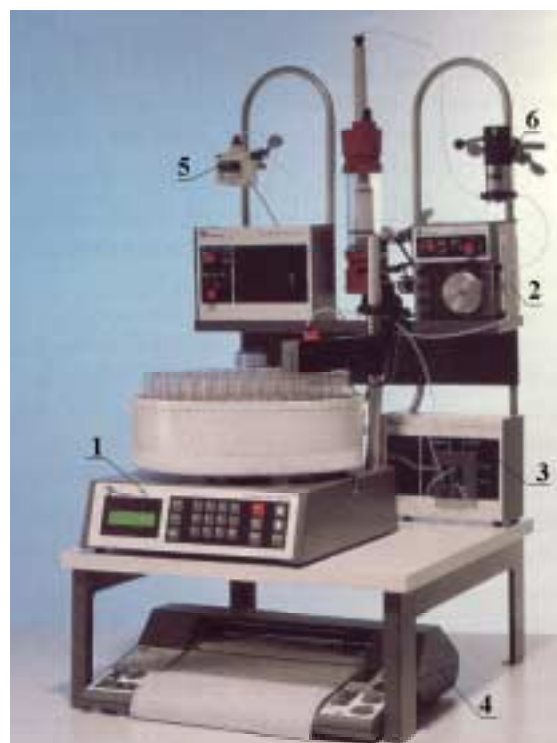
3.1.5. Automatyka w chromatografii niskociśnieniowej

GradiFrac jest systemem chromatografii niskociśnieniowej, spełniającym wymogi automatyzacji procesu separacji makromolekuł, wykorzystujący manualny sposób nanoszenia próbki na kolumnę. W skład zestawu wchodzi (rys. 3.8.): **GradiFrac** - kolektor frakcji będący jednocześnie kontrolerem chromatografii, pompa chromatograficzna **P-1** lub **P-50**, detektor **UV-1** z rejestratorem **REC-112** lub opcjonalnie spektrofotometr **Ultrospec 2000** z modulem programu komputerowego **Swift-TD**, dwa elektromagnetyczne zawory **PSV-50**, mikser 0,6 ml oraz zawór iniekcyjny **IV-7**.

Rys. 3.8.

GradiFrac - zautomatyzowany system chromatografii niskociśnieniowej. W skład zestawu wchodzi:

- 1 - **GradiFrac** - kolektor frakcji i kontroler zestawu
- 2 - **P-1** - pompa perystaltyczna
- 3 - **UV-1** - detektor optyczny
- 4 - **Rec 112** - dwukanałowy rejestrator x-t
- 5 - mikser 0,6 ml
- 6 - **IV-7** - zawór iniekcyjny (manualny)



Nowo wprowadzonym, w pełni zautomatyzowanym systemem chromatografii niskociśnieniowej jest **ÄKTAprime** (rys. 3.9). Jest to kompaktowy zestaw, należący do rodziny chromatografów **ÄKTA**, w skład którego wchodzi integralnie związane: pompa, monitor UV, monitor konduktywności, kolektor frakcji, oraz opcjonalnie monitor pH-metryczny. W odróżnieniu od zestawu **GradiFrac**, **ÄKTAprime** umożliwia nanoszenie próbki na kolumnę w sposób automatyczny z wykorzystaniem elektromagnetycznie sterowanego zaworu iniekcyjnego lub pompy systemowej. Przebieg procesu chromatografii rejestrowany jest w pamięci systemu i po zakończeniu pracy dane mogą być wyprowadzone do rejestratora **Rec-112** lub do pamięci komputera.

Rys. 3.9.

ÄKTAprime - zautomatyzowany system chromatografii niskociśnieniowej. W skład zestawu wchodzi:

- 1 - pompa
- 2 - kontroler chromatografii z wyświetlaczem
- 3 - kolektor frakcji
- 4 - detektor UV i konduktometryczny
- 5 - automatyczny zawór iniekcyjny
- 6 - zawór wyboru buforu
- 7 - mikser



W Tabeli 3.4. zebrane są najważniejsze parametry charakteryzujące oba systemy z uwzględnieniem opcjonalnych wyborów pomp oraz rodzajów detekcji. **GradiFrac** pozwala na przygotowanie i zapamiętanie 10-ciu programów chromatograficznych, składających się maksymalnie z 50-ciu kroków każdy. Natomiast **ÄKTAprime** umożliwia zapamiętanie 40 programów chromatograficznych, a ponadto posiada zachowane w pamięci typowe programy przeznaczone dla poszczególnych technik chromatografii.

Chociaż poszczególne odcinki programowanych zmian stężenia składników eluenta realizowane są w sposób liniowy, to zastosowanie wielu punktów łamiących (kroków) pozwala uzyskać praktycznie dowolny kształt gradientu. Możliwość zaprogramowania warunków, przy których zbierane mają być frakcje (szybkość narastania i spadku piku oraz

wartości progowe) pozwala na efektywne wykorzystanie kolektora frakcji do zbierania tylko interesującego nas materiału. Pompa perystaltyczna **P-1**, stanowiąca standardowe wyposażenie systemu **GradiFrac**, nie jest w stanie zabezpieczyć wystarczająco wysokich przepływów i ciśnień niezbędnych przy pracy z kolumnami o dużych objętościach. Niedogodność tę można wyeliminować wybierając pompę tłokową **P-50**. Pompa ta ma dodatkowo wbudowany system redukcji pulsacji ciśnienia, co wpływa bardzo pozytywnie na żywotność złożeń wypełniających kolumny. System **ÄKTAprime** wyposażony jest w pompę nowej konstrukcji - o znacznie lepszych osiągnięciach niż te, które charakteryzują pompę **P-50**, umożliwiającą pełną kontrolę limitu ciśnienia. Rozwiązanie to zapobiega przypadkowemu zniszczeniu kolumny. Zastosowanie spektrofotometru **Ultrospec 2000** jako detektora UV pozwala w obu systemach na śledzenie zmian gęstości optycznej w zakresie 190 - 1100 nm, przy możliwości zastosowania do detekcji jednocześnie wielu długości fali, tak w zakresie ultrafioletu, jak i w zakresie widzialnym i bliskiej podczerwieni.

Tabela 3.4.

Zestawienie najważniejszych parametrów systemów chromatografii niskociśnieniowej **GradiFrac** oraz **ÄKTAprime**. Dane zaczerpnięte z katalogów firmy Amersham Pharmacia Biotech na rok 1999 i 2000.

Parametr	GradiFrac	ÄKTAprime
Pompa	P-1, 0,01 – 8,3 ml/min, 0,2 MPa P-50, 0,1 – 49,9 ml/min, 0,5 MPa	0,1 – 50,0 ml/min, 1,0 MPa, + kontrola limitu ciśnienia
Formowanie gradientu	dwu lub trójskładnikowy gradient, mieszanie w mikserze 0,6 ml lub 6 ml	dwuskładnikowy gradient, mieszanie w mikserze M-925
Ładowanie próbki	manualny zawór IV-7 z pętlami lub z superpętlami, przy dużych objętościach ładowanie pompą systemową	Automatyczny zawór z pętlami lub z superpętlami, przy dużych objętościach ładowanie próbek pompą systemową
Detekcja + rejestracja	UV-1 + Rec -112 lub Ultrospec 2000 z komputerem	monitor UV (254 i 280 nm, opcjonalnie 214, 313, 365, 405, 436, 546 nm) + conductywny monitor, rejestracja w pamięci systemu z możliwością przesłania danych do pamięci komputera lub do rejestratora Rec-112
Detekcja dodatkowa + rejestracja	pH – monitor lub conductivity monitor, rejestracja w drugim kanale Rec-112	monitor pH, rejestracja j.w., Ultrospec 2000 z komputerem
Zbieranie frakcji	GradiFrac - objętość, czas lub krople, możliwość zbierania pików	ÄKTAprime – objętość, automatyczne zbieranie pików
Kontroler chromatografii	GradiFrac – 10 programów, 50 kroków w każdym programie	ÄKTAprime – 40 programów, system zawiera również gotowe programy dla poszczególnych technik chromatograficznych

3.2. Urządzenia i aparatura w chromatografii wysokociśnieniowej

Cechą charakterystyczną chromatografii niskociśnieniowej jest relatywnie długi czas potrzebny dla przeprowadzenia poprawnej separacji makromolekuł. Aby przyspieszyć ten proces wprowadzone zostały systemy wysokociśnieniowe – typu HPLC. W systemach tych osiągnięto znaczące skrócenie czasu potrzebnego do separacji, przy jednoczesnej poprawie rozdzielczości metod. Niestety, odbyło się to kosztem znacznego zmniejszenia rozmiarów kolumn, co spowodowało redukcję ilości materiału rozdzielanego w trakcie jednego cyklu separacji. Wprowadzenie systemów średnociśnieniowych – typu FPLC, pozwoliło połączyć w jednym wszystkie zalety innych systemów. Systemy takie oferują możliwość szybkiej separacji makromolekuł z bardzo dobrą rozdzielczością, przy zachowaniu dużej pojemności kolumn chromatograficznych. Odbyło się to dzięki postępowi dokonanemu w technologii wytwarzania nowych złożeń. Okazało się, że można wytworzyć złoża odporne mechanicznie, a jednocześnie stawiające znacznie mniejsze opory przepływu niż złoża stosowane dotychczas w systemach HPLC. Kolejne lata dostarczyły nowych złożeń, mogących spełnić wszystkie wymagania stawiane im zarówno w systemach HPLC, jak i FPLC. W tabeli 3.5. zestawione są podstawowe parametry różnych systemów chromatograficznych.

Tabela 3.5.

Porównanie parametrów różnych wysokociśnieniowych systemów chromatograficznych. Dane zaczerpnięte z aktualnego (2000 r.) katalogu firmy Amersham Pharmacia Biotech.

System	Liczba pomp	Liczba zaworów	Ciśnienie max (MPa)	Zakres prędkości przepływu (ml/min)	Detekcja	Rechromatografia / kolektor frakcji	Auto-sampler
FPLC – Basic	2	1	4	0,17 – 8,33	UV – filtry 3 filtry, pH	nie / tak	nie
FPLC - Automated	2	8	4	0,17 – 8,33	UV – filtry 3 filtry, pH, konduktywność	nie / tak	nie
ÄKTA _{FPLC}	2	9	5	0,05 – 20,0	UV – filtry 7 filtrów, konduktywność, pH - opcjonalnie	tak / tak	nie
ÄKTA _{basic} 100	2	2	10	0,01 – 100,0	UV – ciągłe*, 3 długości fali mierzone jednocześnie	nie / tak	nie
ÄKTA _{explorer} 100	2	10	10	0,01 – 100,0	UV – ciągłe*, 3 długości fali mierzone jednocześnie, pH,	tak / tak	nie

c.d. tabeli 3.5.					konduktywność		
System	Liczba pomp	Liczba zaworów	Ciśnienie max (MPa)	Zakres prędkości przepływu (ml/min)	Detekcja	Rechromatografia / kolektor frakcji	Auto-sampler
ÄKTA _{basic} 10	2	2	25	0,001 – 10,0	UV – ciągłe*, 3 długości fali mierzone jednocześnie	nie / tak	tak
ÄKTA _{explorer} 10	2	10	25	0,001 – 10,0	UV – ciągłe*, 3 długości fali mierzone jednocześnie, pH, konduktywność	tak / tak	tak
ÄKTA _{purifier}	2	6	25	0,001 – 10,0	UV – ciągłe*, 3 długości fali mierzone jednocześnie, pH, konduktywność	nie / tak	tak
SmartSystem	2	4	18	0,01 – 2,0	UV – ciągłe*, 3 długości fali mierzone jednocześnie, konduktywność	nie / tak	tak

/* - zakres długości fali: 190-700 nm dla systemu ÄKTA i 190-600 nm dla SmartSystemu

W odróżnieniu od nazwy HPLC, powszechnie używanej przez wszystkich producentów chromatografów ciekowych, nazwa **FPLC** stanowi własność firmy Amersham Pharmacia Biotech i używana jest dla określenia grupy systemów średniociśnieniowych, specjalnie zaprojektowanych do prac z biomolekułami.

Jak łatwo zauważyć, systemy zgrupowane w tabeli 3.5. różnią się wieloma parametrami. Wspólną ich cechą jest to, że pompy zdolne są do wymuszania przepływów dzięki ciśnieniu znacznie przewyższającemu 0,5 MPa. Zainteresowani mogą dokonać wyboru między tańszymi systemami manualnymi (np. **FPLC- Basic**) i droższymi, zautomatyzowanymi systemami (np. **FPLC-Automated**) znacznie ułatwiającymi pracę. Im więcej zaworów może być sterowanych przez system tym bardziej rozbudowane mogą być programy chromatograficzne. Poniżej zaprezentowane i krótko omówione są poszczególne systemy.

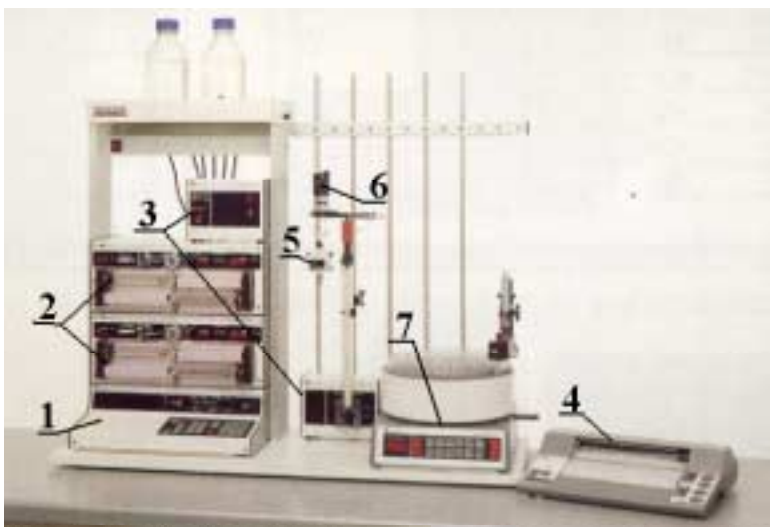
Oprócz prezentowanego na rysunku 3.9. podstawowego systemu **FPLC** dostępna jest bardziej zaawansowana technicznie jego forma w wersji zautomatyzowanej (**FPLC-Automated**). Wersja ta oparta jest na tych samych pompach **P-500**. Jest wyposażona jednak w inny kontroler chromatografii (**LCC-501 Plus**), umożliwiający komunikację z komputerem i sterowanie systemem tak z poziomu kontrolera chromatografii jak i z poziomu programu komputerowego **UNICORN**. Zestaw automatyczny posiada w wersji standardowej dwa automatyczne zawory **MV-8**, umożliwiające dowolne komponowanie składu solwentów w trakcie procesu separacji. System manualny może wykorzystywać w tym celu manualne

zawory **V-8**, które pozwalają na ręcznie sterowany wybór składu solwentów.

Rys. 3.10.

System **FPLC-Basic** był przez wiele lat podstawowym zestawem chromatografii cieczowej stosowanym do separacji biomolekuł. W skład zestawu wchodzi:

- 1 - **GP-250 Plus** - kontroler
- 2 - **P-500** - pompy
- 3 - **UV-1** - detektor
- 4 - **Rec-112** - rejestrator x-t
- 5 - mikser 0,6 ml
- 6 - **V-7** - zawór iniekcyjny
- 7 - **Frac 100** - kolektor frakcji



Naniesienie próbki na kolumnę odbywa się automatycznie (**MV-7**) lub ręcznie (**V-7**), w zależności od systemu. Oba zestawy umożliwiają zbieranie wybranych pików chromatograficznych przez kolektor frakcji sterowany sygnałem z detektora. Operacja ta wykonywana jest przy pomocy elektromagnetycznego zaworu **PSV-50**. Zastosowanie kolejnych dwóch zaworów **MV-8** lub **V-8** (w zależności od wersji systemu) umożliwia automatyczny lub manualny wybór kolumny, a zastosowanie kolejnego zaworu pozwala dokonywać zmiany kierunku przepływu solwentu przez kolumnę, bez konieczności rozłączania kapilar.

Rys. 3.11.

ÄKTA FPLC jest następcą systemu **FPLC**, stanowiąc jednocześnie naturalne połączenie z nowo wprowadzoną rodziną systemów **ÄKTA**.

W skład zestawu wchodzi:

- 1 - **P-920** - pompa
 - 2 - **UPC-900** - monitor UV, konduktometryczny i pH-metryczny
 - 3 - **Frac-901** - kolektor frakcji
- System sterowany i nadzorowany jest z poziomu programu komputerowego **UNICORN**



Kontynuatorem tradycji systemów **FPLC** jest nowy chromatograf **ÄKTA_{FPLC}**. Chromatograf ten posiada wszystkie zalety swych poprzedników, w tym minimalizujące pulsację pompy typu tłokowego, będąc jednocześnie w pełni automatycznym systemem. System **ÄKTA_{FPLC}** umożliwia szybki i efektywny dobór kolumn i buforów (*ang. scouting*) odpowiednich dla separowanych molekuł, a praca w środowisku programu **UNICORN** pozwala na wprowadzenie dodatkowych funkcji, nieobecnych w tradycyjnych systemach **FPLC**, w tym automatyczną rechromatografię wybranych pików. Ta ostatnia funkcja, w analogii do elektroforezy dwuwymiarowej (2D), nazywa się chromatografią dwuwymiarową. Warto również zwrócić uwagę na znacznie lepsze parametry pomp (patrz tabela 3.5.). Maksymalne ciśnienie pracy wzrosło do 5 MPa, a zakres prędkości przepływu wzrósł znacznie zarówno w zakresie najniższych (z 0,17 do 0,05 ml/min) jak i najwyższych przepływów (z 8,33 ml/min do 20 ml/min).

Kolejnym reprezentantem rodziny **ÄKTA** jest system **ÄKTA_{basic}**. Zestaw ten może być skompletowany w dwóch wersjach, różniących się wydajnością pomp i ich maksymalnym ciśnieniem. Wybór pompy **P-901** pozwala pracować przy przepływie do 100 ml/min i maksymalnym ciśnieniu 10 MPa. W drugiej wersji, pompa **P-903** pozwala pracować przy ciśnieniu do 25 MPa przy przepływie do 10 ml/min.

Rys. 3.12.

Zestaw chromatograficzny **ÄKTA_{basic}** jest najprostszym systemem umożliwiającym wykonanie podstawowych zadań chromatograficznych. W skład zestawu wchodzi:

1 - pompa serii **P-900**

2 - detektor **UV-900**

Opcjonalnie system można wyposażyć w kolektor frakcji **Frac-901** oraz autosampler **A-900**. Całość kontrolowana jest przez program komputerowy **UNICORN**.



System **ÄKTA_{basic}** może współpracować z kolektorem frakcji **Frac-901** oraz z autosamplerem **A-900**. Zastosowanie autosamplera pozwala zautomatyzować proces zadawania próbek.

Bardziej rozbudowanym systemem chromatograficznym jest zestaw **ÄKTApurifier**, standardowo wyposażony w dodatkowe detektory: konduktometryczny i pH-metryczny. System został przewidziany do prac związanych z oczyszczaniem i analizą peptydów oraz kwasów nukleinowych. Zarządzający i kontrolujący działanie zestawu program **UNICORN** dostarcza unikalnej możliwości sekwencyjnej analizy badanej próbki z zastosowaniem szeregu kolumn chromatograficznych pracujących w różnych, z góry zdefiniowanych warunkach (*ang. scouting*). Takie podejście bardzo ułatwia optymalizację metody separacji makromolekuł, co z kolei znacznie przyspiesza i upraszcza proces analizy wybranych materiałów i oczyszczania interesujących nas molekuł. System **ÄKTApurifier**, podobnie jak **ÄKTAbasic**, istnieje w dwóch wersjach, zależnie od rodzaju pompy. Może współpracować z kolektorem frakcji **Frac-901** oraz z autosamplerem **A-900**.

Rys. 3.13.

System **ÄKTApurifier** z autosamplerem.

W skład zestawu wchodzi:

1 - pompa serii **P-900**

2 - detektor **UV-900**

3 - detektor **pH/C-900**

4 - autosampler **A-900**

System można wyposażyć w kolektor frakcji **Frac-901**.

Całość kontrolowana jest przez program komputerowy **UNICORN**.



Ostatnim zestawem w serii **ÄKTA** jest **ÄKTAexplorer**. Zestaw ten może być również skonfigurowany jako **ÄKTAexplorer 10** lub **ÄKTAexplorer 100**, w zależności od rodzaju wybranej pompy. System może być z powodzeniem stosowany do prac tak laboratoryjnych, jak i półprzemysłowych w dziedzinie oczyszczania białek, peptydów, kwasów nukleinowych oraz innych molekuł aktywnych biologicznie.

Rys. 3.14.

Chromatograf cieczowy **ÄKTAexplorer**.

W skład zestawu wchodzi:

1 - pompa serii **P-900**

2 - detektor **UV-900**

3 - detektor **pH/C-900**

4 - uchylne drzwi, zamykające system pomp i detektorów, służące jako miejsce montażu zaworów oraz kolumn. Zestaw może współpracować z kolektorem frakcji **Frac-901**. Nie jest przewidziany do współpracy z auto-samplerem, ale posiada wbudowaną namiastkę tego urządzenia, pozwalającą na automatyczne pobieranie próbek z sześciu probówek. Nanoszenie próbek na kolumnę może być realizowane manualnie, przy pomocy strzykawki i zaworu iniekcyjnego, lub automatycznie przy pomocy pompy perystaltycznej lub pompy systemowej.



Możliwości zestawu **ÄKTAexplorer**, choć nie są prostą sumą możliwości poprzednio opisanych systemów, to jednak pozwalają wykonać dowolny rodzaj chromatografii cieczowej z uwzględnieniem wcześniej przedstawionych właściwości. Zestaw ten, oprócz możliwości optymalizacji procesu rozdziału, pozwala na automatyczne przygotowanie buforów (*ang. buffer prep*) i utrzymywanie stałej wartości pH solwentów. Możliwość automatycznego przeniesienia wybranego piku chromatograficznego z wyjścia jednej kolumny na wejście drugiej pozwala na realizację chromatografii wielowymiarowej. Zastosowanie dodatkowego zaworu, umożliwiającego zmianę kierunku przepływu solwentów, pozwala na łatwą instalację kolumn typu **STREAMLINE**, pracujących w warunkach ekspansji złoża. Metoda ta, opisana w rozdziale 5, znacznie przyspiesza proces oczyszczania rekombinowanych białek z zawiesiny hodowli komórkowej.

Wszystkie wyżej opisane systemy chromatografii cieczowej są zarządzane z poziomu komputera, z wykorzystaniem programu **UNICORN**. Program ten sprawuje pełną kontrolę nad systemem w czasie jego pracy (*ang. real-time control*) oraz gromadzi dane z detektorów i pozwala na ich dalszą obróbkę (*ang. data collection and evaluation*). Na ekranie monitora ukazują się wszystkie dane, wybrane przez operatora, odzwierciedlające przebieg procesu separacji oraz aktualne drogi przepływu solwentu w systemie. Takie rozwiązanie upraszcza kontrolę nad systemem. Przygotowanie nowego programu chromatograficznego jest bardzo łatwe i może być w całości tworzone przez użytkownika. Może być również oparte na

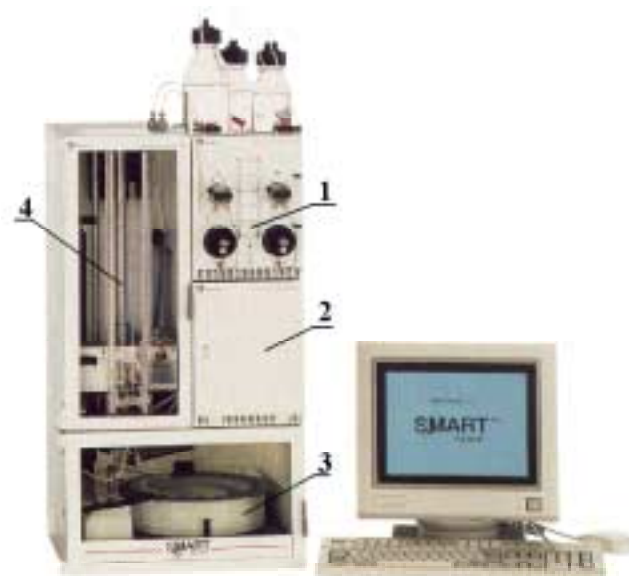
gotowych modułach programowych. W programie dostępna jest biblioteka gotowych kolumn chromatograficznych, co bardzo upraszcza przygotowanie programu chromatografii. Biblioteka ta zawiera wszystkie dane dotyczące parametrów kolumn i w miarę potrzeb może być uzupełniana o nowe kolumny. Funkcja WATCH, realizowana przez **UNICORN**, pozwala na wykonanie przez system określonego zadania, gdy tylko informacja docierająca z detektorów jest zgodna z wcześniej zaprogramowanym wzorcem. Funkcja ta pozwala na wykonywanie wcześniej wspomnianej chromatografii wielokierunkowej. Stosowanie tego samego programu dla różnych systemów znacznie upraszcza problem skalowania procesu chromatografii, to jest przejścia od skali analitycznej do mikropreparatywnej i dalej, poprzez skalę preparatywną do skali przemysłowej (*ang. process scale*). Program **UNICORN** może jednocześnie zarządzać aż czterema różnymi systemami chromatograficznymi, a dostęp do systemów i zgromadzonych danych jest limitowany zgodnie z przyjętą w danym laboratorium hierarchią, co zabezpiecza przed niepożądanym dostępem osób postronnych i umożliwia osobie nadzorującej pełną kontrolę nad systemami i operatorami. Program generuje raport o stanie systemu chromatograficznego zgodnie z wymaganiami GLP (*ang. good laboratory practice*) oraz raport z aktywności systemu i operatora (*ang. log book*).

SmartSystem jest odrębnym systemem chromatograficznym, który został zaprojektowany specjalnie do prac związanych z izolowaniem i analizą makromolekuł w skali mikro. Jako przykładowe zastosowanie wymienia się izolowanie receptorów błonowych z neuronów pochodzących z pojedynczego embrionu kurczaka. Niemniej spektakularna jest analiza składu łyzy ludzkiej czy płynu mózgowo-rdzeniowego (3). Do analizy wystarczyło 0,75 μ l łyzy (filtracja żelowa) lub 20 μ l płynu mózgowo-rdzeniowego (chromatografia odwróconej fazy).

Rys. 3. 15.

Zestaw **SmartSystem** przewidziany do prac w skali mikro. W skład systemu wchodzi:

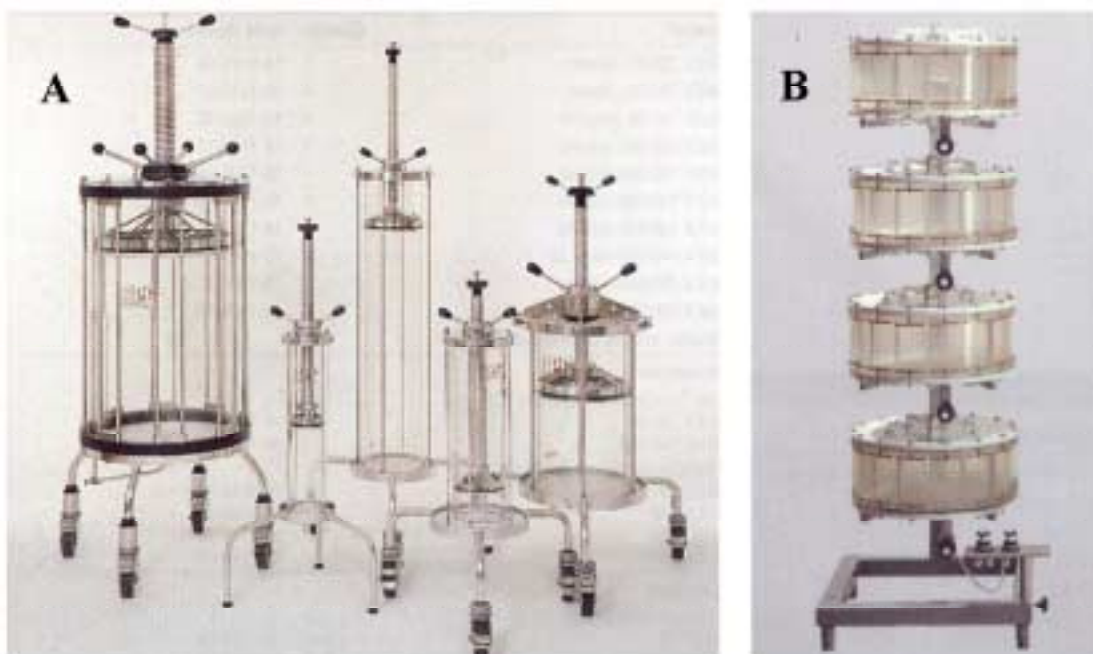
- 1 - μ Precision Pump
- 2 - μ Peak Monitor
- 3 - μ Fraction Collector
- 4 - Przedział dla kolumn PC



Należy w tym miejscu zwrócić uwagę na rzecz stosunkowo rzadko zauważaną. Firmy produkujące zarówno systemy, jak i kolumny z wypełnieniami, dopracowały do perfekcji wzajemne uwarunkowania systemów i kolumn. Efekt osiągnięty we współpracy systemu z przeznaczonymi dla niego kolumnami jest trudny do osiągnięcia w przypadku mieszanego pochodzenia systemów i kolumn. Przykładem tego może być **SmartSystem** oraz przeznaczone dla niego kolumny serii **PC** (*precision columns*). Wyeliminowanie objętości martwej w tym systemie do poziomu 100 μ l pozwala osiągnąć niespotykaną w innych zestawach rozdzielczość metod chromatograficznych. **SmartSystem** posiada jeszcze jedną unikalną cechę. Można zbierać frakcje w objętościach od 5 μ l do 2 ml. Połączenie niezwykle małej wartości objętości martwej z możliwością zbierania bardzo małych frakcji ma decydujące znaczenie w zastosowaniach preparatywnych w skali mikro.

3.3. Urządzenia i aparatura stosowane w chromatografii przemysłowej

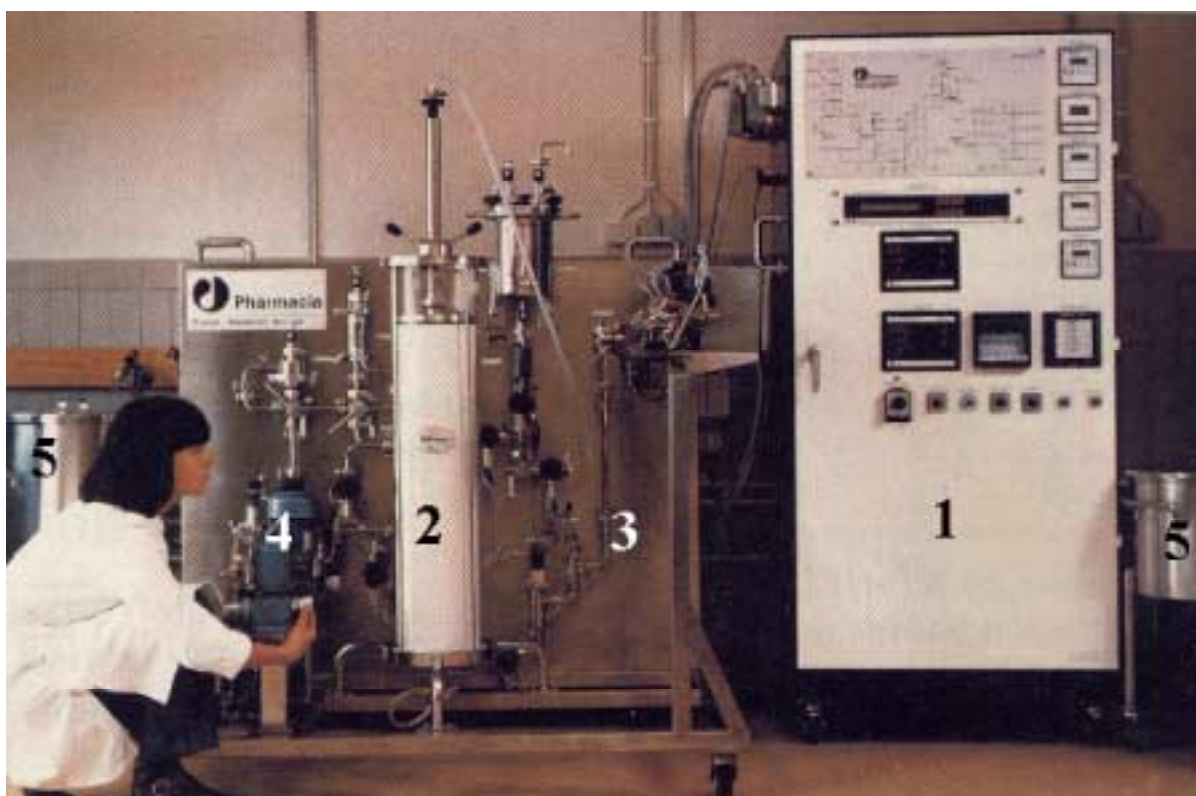
Zastosowanie chromatografii cieczowej w przemyśle wymaga osobnego osprzętu i specjalnie projektowanych systemów. Cechą charakterystyczną chromatografii przemysłowej jest bardzo duża objętość kolumn (litry) oraz duże przepływy objętościowe (litry/min).



Rys. 3.16.

Przykładowe kolumny stosowane do adsorpcyjnej chromatografii cieczowej i filtracji żelowej na skalę przemysłową. A - rodzina szklanych kolumn o zmiennej objętości (objętość maksymalna 2-90 l), B - stalowe kolumny segmentowe o ustalonej objętości (objętość segmentu 16 l).

Istnieje jednak duże podobieństwo rozwiązań technicznych i koncepcyjnych chromatografii w skali przemysłowej i w skali laboratoryjnej. Co więcej, podobieństwo to jest wykorzystywane do skalowania procesów. W początkowej fazie prac nad technologią oczyszczania wybranej makromolekuły stosuje się techniki chromatograficzne w skali laboratoryjnej. Na kolumnę nanosi się wyjściową substancję w ilości pojedynczych mikrogramów. Po zoptymalizowaniu procesu przechodzi się do skali preparatywnej, gdzie na kolumnę nanoszony jest materiał w ilości miligramów lub gramów. W skali przemysłowej na kolumnę nanosi się materiał w ilości wielu kilogramów. Sukces skalowania procesu chromatografii zależy w pierwszym rzędzie od możliwości zastosowania tych samych, bądź korespondujących wypełnień kolumn. Bardzo ważne jest jednak, aby systemy analityczne, preparatywne i przemysłowe zachowywały proporcjonalność przepływów i ciśnień. Oba powyższe warunki spełnione są całkowicie tylko wtedy, gdy cały proces technologiczny przygotowany jest z zastosowaniem systemów i wypełnień kolumn pochodzących od jednego producenta.



Rys. 3.17.

Kompletny zestaw chromatografii przemysłowej przygotowany zgodnie z zapotrzebowaniem konkretnego odbiorcy. W skład zestawu wchodzi:

- 1 - kontroler chromatografii z wbudowanym układem detektorów oraz integratorem
- 2 - szklana kolumna chromatograficzna wypełniona złożem o odpowiednich właściwościach
- 3 - system zaworów i drenów doprowadzających solwenty do odpowiednich elementów układu
- 4 - wysokowydajna pompa chromatograficzna
- 5 - naczynia zawierające solwenty i rozdzielany materiał.

Zarówno systemy, jak i kolumny służące chromatografii przemysłowej muszą spełniać szczególne wymagania w zakresie sterylności i czystości pracy. Konstrukcja zestawu oraz zastosowane materiały muszą umożliwiać sanityzację w miejscu pracy (*ang. clean in place - CIP*) bez zbędnych czynności ich demontażu. Współczesne kolumny chromatograficzne, przewidziane dla zastosowań przemysłowych, mogą być również wypełniane odpowiednimi złożami (i opróżniane) w miejscu pracy bez demontażu. Rozwiązanie takie znacznie upraszcza proces technologiczny oczyszczania biomolekuł.

3.4. LITERATURA

1. Walkowiak B. Use of the ULTROSPEC 2000 as a full range Multi-Wavelength detector for liquid chromatography. - Pharmacia Biotech (Biochrom), Application Note 53 (11/98).
2. BioDirectory - katalog Amersham Pharmacia Biotech 1999 r i 2000 r.
3. Method Manual Smart System. - Pharmacia LKB Biotechnology 1990.