



Zintegrowany system GPC/SEC

# OMNISEC



Wyłączny dystrybutor w Polsce:



## Chromatografia żelowa (GPC/SEC)

Chromatografia żelowa (GPC – Gel Permeation Chromatography / SEC – Size Exclusion Chromatography) jest techniką separacji szeroko wykorzystywaną w badaniach rozkładu masy cząsteczkowej polimerów, białek i innych makrocząsteczek. Próbka, po uprzednim rozpuszczeniu, nastrzykiwana jest na wypełnioną porowatym żelem kolumnę, w której następuje jej rozdział na frakcje. Kryterium separacji makrocząsteczek jest średnica hydrodynamiczna – cząsteczki o większym rozmiarze nie wnikają w mniejsze pory, a co za tym idzie, wypływają z kolumny szybciej niż cząsteczki mniejsze. Tak rozseparowana próbka trafia do kolejnych detektorów, dających dodatkowe informacje o: stężeniu poszczególnych frakcji (detektor RI i UV), bezwzględnej masie cząsteczkowej (rozpraszanie światła), strukturze/konformacji (detektor wiskozymetryczny), czy średnicy hydrodynamicznej (DLS).

## Zastosowania GPC/SEC

W branży polimerowej GPC jest jednym z podstawowych narzędzi. Dzięki GPC możliwe jest uzyskanie informacji o rozkładzie masy cząsteczkowej, której wielkość wpływa na właściwości polimeru. Ponadto system GPC z wielokrotną detekcją pozwala uzyskiwać dodatkową wiedzę na temat struktury, konformacji i rozgałęzień polimeru, przez co umożliwia lepsze zrozumienie zachowania wytworzonych materiałów.

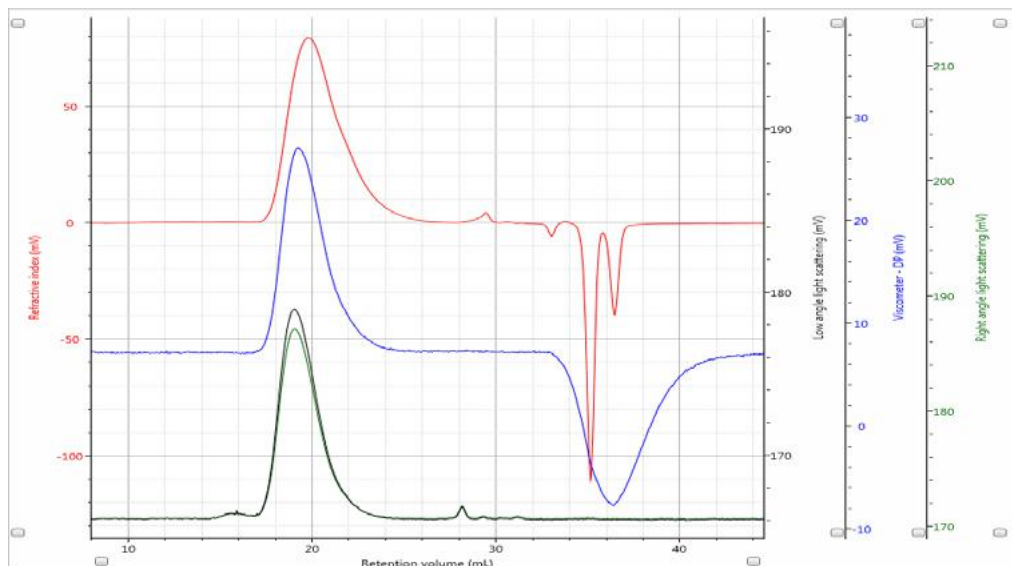
W badaniach białek technika SEC pozwala określić skład oligomeryczny próbki, a także pomaga zrozumieć mechanizm agregacji. SEC pozwala na rozdział poszczególnych form oligomerycznych i określenie ich masy cząsteczkowej oraz konformacji cząsteczki lub struktury powstałych agregatów.

## Potrójna detekcja

Dla potrzeb analizy GPC minimalna konfiguracja systemu chromatografii cieczerwowej to kolumna GPC i jeden detektor stężeniowy. W takim wypadku możliwe jest wykonanie analizy w oparciu o kalibrację konwencjonalną. Masa cząsteczkowa określana jest przez porównanie czasu retencji badanej makrocząsteczki z uprzednio zmierzonym wzorcem o znanej masie. Jest to metoda dość czasochłonna i kosztowna (wymaga pomiaru szeregu drogich wzorców dla stworzenia krzywej kalibracyjnej). Ponadto wzorce muszą mieć taką samą strukturę jak badana próbka (jeżeli wzorzec ma strukturę liniową, a próbka rozgałęzioną, to wynik uzyskany przy kalibracji konwencjonalnej nie będzie prawidłowy).

Dodanie detektora wiskozymetrycznego, mierzącego lepkość graniczną polimeru, eliminuje ten problem. Wiskozymetr różnicowy pozwala na określenie lepkości granicznej, będącej odwrotnością gęstości. Parametr ten określa jak dużo przestrzeni zajmuje makrocząsteczka, a jego wartość zależy od jej struktury. Tworząc krzywe kalibracyjne dla materiałów o różnej strukturze eliminujemy błąd związany z budową makrocząsteczek występujący w kalibracji konwencjonalnej.

Dotychczas detektora rozpraszania światła pozwala na pomiar bezwzględnej masy cząsteczkowej, eliminując konieczność tworzenia krzywej kalibracyjnej. Połączenie detektora stężeniowego z rozpraszaniem światła i wiskozymetrem, czyli system potrójnej detekcji umożliwia oprócz pomiaru bezwzględnej masy cząsteczkowej, także uzyskanie informacji o strukturze makrocząsteczki, jej rozgałęzieniach i średnicy hydrodynamicznej. Poczwórna detekcja, czyli układ wyposażony dodatkowo w drugi detektor stężeniowy UV, pozwala na analizę kopolimerów, gdzie jeden ze składników absorbuje światło UV, a drugi nie.



Typowy chromatogram; sygnały z poszczególnych detektorów oznaczone kolorami:

czerwony - RI,

zielony - RALS,

czarny - LALS,

niebieski - wiskozymetryczny.

## OMNISEC

OMNISEC to najnowszy system GPC/SEC firmy Malvern zaprojektowany tak, aby zapewniać jak najlepsze wyniki przy jak największej prostocie obsługi. System zbudowany jest z dwóch modułów: części chromatograficznej – RESOLVE i modułu detekcji – REVEAL. Moduł OMNISEC REVEAL jest dostarczany z oprogramowaniem OMNISEC v.11, które z jednej strony umożliwia proste ustawienie metody i obróbkę danych dla początkujących, zaś z drugiej daje zaawansowanym użytkownikom dostęp do specjalistycznych funkcji dla pełniejszego wykorzystania posiadanego sprzętu.

## RESOLVE

Dobry system chromatograficzny to podstawa dobrej separacji makrocząsteczek, a co za tym idzie klucz do uzyskania danych najwyższej jakości.

OMNISEC RESOLVE to zintegrowany system chromatograficzny zoptymalizowany pod kątem GPC/SEC. Wszystkie jego podzespoły zostały zaprojektowane dla zapewnienia stabilnego przepływu rozpuszczalnika i najlepszej separacji makrocząsteczek.

Wbudowany odgazowywacz o małej objętości umożliwia szybką stabilizację układu pomiarowego i przyspiesza operację zmiany stosowanego rozpuszczalnika, zaś jego wysoka wydajność zapewnia stabilny przebieg linii bazowej detektorów.

Piec do kolumn pozwala na instalację do 6 analitycznych kolumn GPC/SEC i ich stabilizację w zakresie 20 - 65°C. Piec jest na tyle duży, że może pomieścić duże kolumny, jak np. GE TRICORN 10/300.

Autosampler na 96 pozycji zintegrowany w systemie OMNISEC RESOLVE z jednej strony umożliwia zachowanie stabilności nietrwałych związków (takich jak niektóre białka) przez obniżenie temperatury do 4°C, zaś z drugiej pozwala na ustawienie temperatury do 60°C dla zwiększenia rozpuszczalności i zmniejszenia lepkości rozpuszczalnika. Autosampler może pracować w trybie zapewniającym zero strat próbki – całość nasykiwana jest na kolumnę co pozwala zaoszczędzić szczególnie cenne próbki. Po nasykiwaniu autosampler jest automatycznie płukany dla usunięcia ewentualnych pozostałości po poprzedniej próbce.

Zoptymalizowana pod kątem GPC/SEC niskopulsacyjna pompa izokratyczna zapewnia niezwykle stabilny przepływ redukujący szумы na linii bazowej detektorów. Dla zminimalizowania korozyjnego wpływu soli na uszczelki pompa posiada wbudowany system przepływu wstecznego.

Wszystkie podzespoły systemu OMNISEC (zarówno w module RESOLVE, jak i REVEAL) są wyposażone w czujniki wychwytyjące wszelkie wycieki próbki i rozpuszczalnika.



## REVEAL

OMNISEC REVEAL to zintegrowany system detekcji łączący w sobie detektory stężeniowe (RI i UV-PDA), detektor rozpraszania światła RALS/LALS i detektor wiskozymetryczny. Wszystkie detektory umieszczone są we wspólnej obudowie termostатовanej w zakresie 20 - 65°C, dzięki czemu eliminowane są wahania temperatury między nimi, a także możliwe jest zastosowanie krótszych wężyków łączących poszczególne podzespoły, co znacząco zwiększa precyzję analizy. Wszystkie detektory są ustawione liniowo, dzięki czemu eliminowana jest konieczność rozdzielenia próbki na kilka strumieni.

## RI

Detektor RI jest detektorem stężeniowym. Wykorzystuje zależność współczynnika załamania światła od stężenia próbki. Dla próbki o znanym stężeniu możliwe jest wyznaczenie parametru  $dn/dc$  koniecznego do obliczenia bezwzględnej masy cząsteczkowej z natężenia rozpraszania światła. Dzięki udoskonalonej elektronice i precyzyjnej kontroli temperatury zapewnia doskonały przebieg linii bazowej, a co za tym idzie najwyższą czułość.



## UV-PDA

Zastosowanie w detektorze UV-PDA fotoczułej matrycy pozwala na uzyskanie sygnału absorpcji promieniowania UV w 1024 kanałach w zakresie 190 - 900 nm, co czyni go idealnym detektorem dla próbek zawierających chromofory, jak np. białka. W przypadku próbek, gdzie tylko część frakcji zawiera chromofor, umożliwia uzyskanie dodatkowych informacji o budowie kopolimerów czy o zanieczyszczeniach w próbce.

## RALS/LALS

Do pomiaru bezwzględnej masy cząsteczkowej OMNISEC wykorzystuje detektor rozpraszania światła RALS/LALS. W przypadku próbek o niskiej masie cząsteczkowej, dla których rozpraszanie światła jest izotropowe (takie samo we wszystkich kierunkach) stosowana jest technika RALS, czyli detekcja pod kątem 90° dla zapewnienia najlepszego stosunku sygnału do szumu. W przypadku większych makrocząsteczek automatycznie wybierana jest detekcja pod kątem 7° dla zapewnienia precyzyjnych wyników. Dzięki zastosowaniu lasera o mocy 50 mW i zwiększeniu stabilności linii bazowej możliwy jest pomiar próbek w ilościach tak niskich jak 100 ng!

## Detektor wiskozymetryczny

Wiskozymetr różnicowy służy do wyznaczania granicznej lepkości polimeru, która jest proporcjonalna do odwrotności gęstości. Parametr ten określa jak dużą przestrzeń zajmuje makrocząsteczka i jest niższy w przypadku cząstek bardziej upakowanych (jak np. rozgałęziony polimer) i wyższy w przypadku mniej upakowanych (jak np. polimer liniowy). Detektor wiskozymetryczny działa na zasadzie mostka Wheatstone'a. Jest on zbudowany z czterech kapilar pozostających w stanie równowagi do momentu wplynięcia do nich próbki. Kapilary są tak skonstruowane, że wptywająca do nich próbka zakłóca stan równowagi mostka i pojawia się różnica ciśnień na obu jego ramionach. Różnica ciśnień jest zależna od lepkości próbki. Wiskozymetr przed wprowadzeniem próbki musi pozostawać w stanie równowagi. W systemie OMNISEC balansowanie mostka wiskozymetrycznego jest realizowane automatycznie, dzięki specjalnej konstrukcji kapilar. Sam mostek, w razie potrzeby, może być wymieniony samodzielnie przez użytkownika w ciągu kilku minut bez konieczności wzywania serwisu. Ponadto OMNISEC posiada wbudowany system zabezpieczający przetworniki ciśnienia przed uszkodzeniem wynikającym z nagłej zmiany lepkości układu.

## Viscotek SEC-MALS 20

Detektor wielokątowego rozpraszania światła - Viscotek SEC-MALS 20 służy do wyznaczania bezwzględnej masy cząsteczkowej i promienia żyracji. Detektor wykorzystuje 20 fotoczułych elementów rozmieszczonych w zakresie od 12 do 164° i jest wyposażony w pionowo ustawioną celę pomiarową minimalizującą możliwość zanieczyszczenia. Duża ilość kątów, a przy tym największa ilość niskich kątów zapewnia najwyższą precyzję uzyskanych wyników. Istnieje też 9-kątowa wersja Viscotek SEC-MALS 9. Detektory SEC-MALS 20 i SEC-MALS 9 mogą być zastosowane jako element systemów GPC/SEC firmy Malvern lub połączone z systemem innego producenta.



## GPC/SEC a struktura cząsteczek

Chromatografia żelowa z zaawansowaną detekcją pozwala poza rozkładem masy cząsteczkowej, uzyskać także informacje o strukturze przestrzennej cząsteczek. Tego typu informacje pochodzą głównie z detektora wiskozymetrycznego. Dość użyteczną funkcjonalnością, szczególnie w przypadku rozgałęzionych polimerów, jest wykres Marka-Houwinka. Pokazuje on zależność lepkości granicznej

## Kompletny system, czy pojedyncze detektory?

Oferowane przez firmę Malvern zintegrowane systemy detekcji posiadają dedykowane moduły chromatograficzne. Zakup kompletnego systemu to pewność, że część chromatograficzna i detektorowa są optymalnie dobrane dla zapewnienia najwyższej jakości danych. Ponadto zakup kompletnego systemu od jednego dostawcy to jeden punkt kontaktowy do wsparcia technicznego, co z jednej strony stanowi ułatwienie, zaś z drugiej oznacza niższe koszty obsługi serwisowej.

Wszystkie oferowane przez firmę Malvern moduły detekcji mogą także współpracować z systemami GPC/SEC innych producentów.

od masy cząsteczkowej. Można dzięki niemu porównywać próbkę ze wzorcem odniesienia, który powinien mieć strukturę liniową. Jeżeli dla tych samych mas lepkość graniczna badanej próbki będzie niższa niż dla liniowego wzorca będzie to oznaczało, że próbka prawdopodobnie ma strukturę rozgałęzioną.

Poza lepkością graniczną zaawansowane GPC/SEC pozwala także uzyskać informacje na temat wielkości cząsteczek. Detektor wiskozymetryczny umożliwia wyznaczenie promienia hydrodynamicznego, zaś rozpraszanie światła – promienia żyracji. Sama wielkość cząsteczki jest oczywiście pewną informacją strukturalną, ale dzięki porównaniu promienia hydrodynamicznego z promieniem żyracji można w pewnych przypadkach uzyskać także informacje o kształcie cząsteczki.

## RALS/LALS i MALS

Równanie łączące masę cząsteczkową z sygnałem rozpraszanego światła (równanie Rayleigha) zawiera w sobie niezwykle trudny do wyznaczenia parametr określający zależność kątową sygnału. Ten czynnik staje się nieistotny w przypadku pomiaru pod kątem 0°, co z kolei jest technicznie niewykonalne. RALS, LALS i MALS to techniki pozwalające na pomiar bezwzględnej masy cząsteczkowej z wykorzystaniem rozpraszania światła, różniące się sposobem radzenia sobie z problemem zależności kątowej.

**RALS** (Right Angle Light Scattering) zakłada, że rozpraszanie światła jest jednakowe we wszystkich kierunkach, co jest słuszne wyłącznie dla małych makrocząsteczek (poniżej ok. 15 nm).

**LALS** (Low Angle Light Scattering) mierzy przy możliwie najniższym kącie (w systemach Malverna jest to 7°) i zakłada, że sygnał przy tym kącie pomiaru jest tożsamy z sygnałem przy kącie 0°.

**MALS** (Multi Angle Light Scattering) mierzy pod wieloma kątami, a sygnał ekstrapolowany jest do kąta 0°. Dodatkowo MALS umożliwia uzyskanie informacji o promieniu żyracji badanych makrocząsteczek.

# OMNISEC

## OMNISEC

## SEC-MALS 20

<b>Podstawowe mierzone parametry</b>	stężenie, dn/dc,	
	bezwzględna masa cząsteczkowa (Mn, Mw, Mz),	bezwzględna masa cząsteczkowa (Mn, Mw, Mz),
	polidispersyjność,	promień żyracji
	lepkość graniczna,	
	promień żyracji,	
	promień hydrodynamiczny	
<b>System chromatograficzny</b>	OMNISEC RESOLVE	może być połączony z systemem OMNISEC lub innym
<b>Przepływ</b>	0,01 – 10 ml/min	-
<b>Pojemność autosamplera</b>	96 fiolek lub 2 płytki 96-dołkowe	-
<b>Objętość nastrzyku</b>	1 – 300 $\mu$ L	-
<b>Kontrola temperatury autosamplera</b>	4 – 60 °C	-
<b>Piec do kolumn</b>	20 – 65° C, maksymalnie 6 kolumn	-
<b>System detekcji</b>	<b>OMNISEC REVEAL</b>	<b>SEC-MALS-20</b>
<b>Detektory stężeniowe</b>	RI, UV-PDA 1024 kanałów od 190 do 900 nm	konieczny zewnętrzny detektor
<b>Technika rozpraszania światła</b>	RALS/LALS	MALS
<b>Kąty pomiarowe</b>	90° i 7°	12°, 20°, 28°, 36°, 44°, 52°, 60°, 68°, 76°, 84°, 90°, 100°, 108°, 116°, 124°, 132°, 140°, 148°, 156°, 164°
<b>Zakres masy cząsteczkowej</b>	200 – 10 <sup>7</sup> Da	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>7</sup> Da
<b>Minimalna masa próbki (PS) dla LS</b>	100 ng	1 $\mu$ g
<b>Minimalna masa próbki (BSA) dla LS</b>	100 ng	2 $\mu$ g
<b>Detektor wiskozymetryczny</b>	4-kapilarny detektor wiskozymetryczny z systemem automatycznego balansowania i ochrony przetworników ciśnienia	-