Современные аспекты хроматографии

Лекция на тему: **Жидкостная хроматография**
(аппаратурное оформление систем)

Минажева Гүлшарат Салауатовна – доктор педагогических наук, кандидат химических наук, профессор кафедры АКХиТРЭ

High performance liquid chromatography (***HPLC*** - ВЭЖХ) - это один из эффективных методов разделения сложных смесей веществ, широко применяемый как в аналитической химии, так и в химической технологии. По механизму разделения анализируемых или разделяемых веществ ВЭЖХ делится на адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, лигандообменную и другие.

В практической работе разделение часто протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно. Так, эксклюзионное разделение бывает осложнено адсорбционными эффектами, адсорбционное — распределительными, и наоборот. При этом чем больше различие веществ в пробе по степени ионизации, основности или кислотности, по молекулярной массе, поляризуемости и другим параметрам, тем больше вероятность проявления другого механизма разделения для таких веществ.

Ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (*Ultra-high performance liquid chromatography - UHPLC*) является важным этапом в развитии жидкостной хроматографии.
Он использует хроматографическую колонку с частицами <2 мкм, которые используются в аналитических приборах, способных работать при высоких давлениях. Это обеспечивает крайне быстрое разделение с высокой эффективностью.

UHPLC является очень эффективным хроматографическим методом, который предлагает работу с широким диапазоном скоростей потока и значительно сокращает время проведения анализа.

UPLC **(**сверхпроизводительная жидкостная хроматография) - которая базируясь на принципах ВЭЖХ, увеличивает связанные между собой параметры скорости, чувствительности и разрешения.

HPLC (ВЭЖХ) vs UHPLC (УВЭЖХ)

HPLC

Inlet pressure 400ba – Давление на входе 400 бар

Lower comparative precision in sample introduction – Более низкая сравнительная точность при вводе образца

Detectors that use larger flow rates and larger detection cells – Детекторы, которые используют большие скорости потока и большие ячейки обнаружения

Some are equipped with automated sampling devices – Некоторые из них оснащены автоматическими устройствами для отбора проб

Slower with lower – Медленный с маленьким разрешением

UPLC/UHPLC

Inlet pressure more than 1000ba – Давление на входе больше, чем 1000ba

Higher precision in sample introduction – Более высокая точность ввода образца

Detectors that use small flow rates and low detection limits – Детекторы, использующие малые скорости потока и низкие пределы обнаружения

Most of equipments with automated sampling devices – Большая часть оборудования с автоматическими устройствами для отбора проб

Rapid with high resolution – Быстрый с высоким разрешением

HPLC (ВЭЖХ) vs UHPLC (УВЭЖХ)

ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) и **УВЭЖХ** (ультравысокоэффективная жидкостная хроматография) являются различными методами анализа, используемыми в химическом анализе для разделения, идентификации и количественного определения компонентов смесей.

Основные различия:

Эффективность разделения: УВЭЖХ предлагает более высокую эффективность разделения, чем ВЭЖХ. Это связано с использованием более мелких частиц носителя, более высокой скоростью потока и другими технологическими усовершенствованиями.

Скорость анализа: УВЭЖХ обычно обладает более высокой скоростью анализа по сравнению с ВЭЖХ. Это связано с использованием более высоких скоростей потока и улучшенной эффективностью разделения.

Размер частиц носителя: В УВЭЖХ обычно используются частицы носителя меньшего размера, что позволяет достигать более высокой эффективности разделения и более быстрых аналитических процессов.

Давление: УВЭЖХ работает при более высоких давлениях, чем ВЭЖХ, что позволяет использовать более мелкие частицы носителя и более высокие скорости потока для улучшения разделения и скорости анализа.

Чувствительность и разрешение: УВЭЖХ может обеспечить более высокую чувствительность и разрешение благодаря своей более высокой эффективности разделения и использованию передовых детекторов.

Каждый из этих методов имеет свои преимущества и области применения, и выбор между ними зависит от конкретных требований анализа и доступных ресурсов.

	Паскаль (Pa, Па)	Бар (bar, бар)	Техническая атмосфера (at, ат)	Физическая атмосфера (atm, атм)	Миллиметр ртутного столба (мм рт. ст., mm Hg, Torr, торр)	Метр водяного столба (м вод. ст., m H_2O)	Фунт-сила на квадратный дюйм (psi)
1 Па	1 Н/м²	10^{-5}	$10{,}197 \cdot 10^{-6}$	$9{,}8692 \cdot 10^{-6}$	$7{,}5006 \cdot 10^{-3}$	$1{,}0197 \cdot 10^{-4}$	$145{,}04 \cdot 10^{-6}$
1 бар	10^5	$1 \cdot 10^6$ дин/см²	1,0197	0,98692	750,06	10,197	14,504
1 ат	98066,5	0,980665	1 кгс/см²	0,96784	735,56	10	14,223
1 атм	101325	1,01325	1,033	1 атм	760	10,33	14,696
1 мм рт. ст.	133,322	$1{,}3332 \cdot 10^{-3}$	$1{,}3595 \cdot 10^{-3}$	$1{,}3158 \cdot 10^{-3}$	1 мм рт. ст.	$13{,}595 \cdot 10^{-3}$	$19{,}337 \cdot 10^{-3}$
1 м вод. ст.	9806,65	$9{,}80665 \cdot 10^{-2}$	0,1	0,096784	73,556	1 м вод. ст.	1,4223
1 psi	6894,76	$68{,}948 \cdot 10^{-3}$	$70{,}307 \cdot 10^{-3}$	$68{,}046 \cdot 10^{-3}$	51,715	0,70307	1 lbf/in²

Основные производители ЖХ :

- Waters
- Agilent
- Shimadzu
- Thermo Scientific

1.Waters Corporation - является одним из ведущих мировых поставщиков аналитического и препаративного оборудования для хроматографии, масс-спектрометрии и других областей аналитической химии.

-Они предлагают широкий ассортимент систем жидкостной хроматографии (HPLC) и масс-спектрометрии (MS), а также соответствующие программное обеспечение и расходные материалы.

-Широко известна благодаря своим инновационным разработкам и высоким стандартам качества.

2.Agilent Technologies - является крупным мировым поставщиком аналитического и научно-лабораторного оборудования.

-Их линейка продуктов включает в себя как жидкостные, так и газовые хроматографы, масс-спектрометры, спектрофотометры и другие аналитические инструменты.

-Известна своими технологическими инновациями и широким спектром решений для различных областей аналитической химии и биологии.

3.Shimadzu Corporation - японская компания, специализирующаяся на производстве научно-лабораторного и медицинского оборудования.

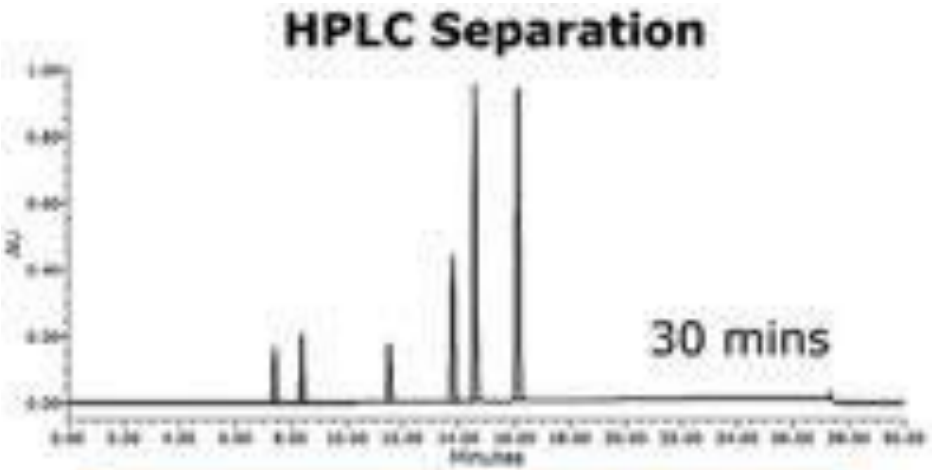
-Они предлагают широкий ассортимент хроматографических систем, включая как HPLC, так и газовую хроматографию (GC), а также связанные инструменты и программное обеспечение.

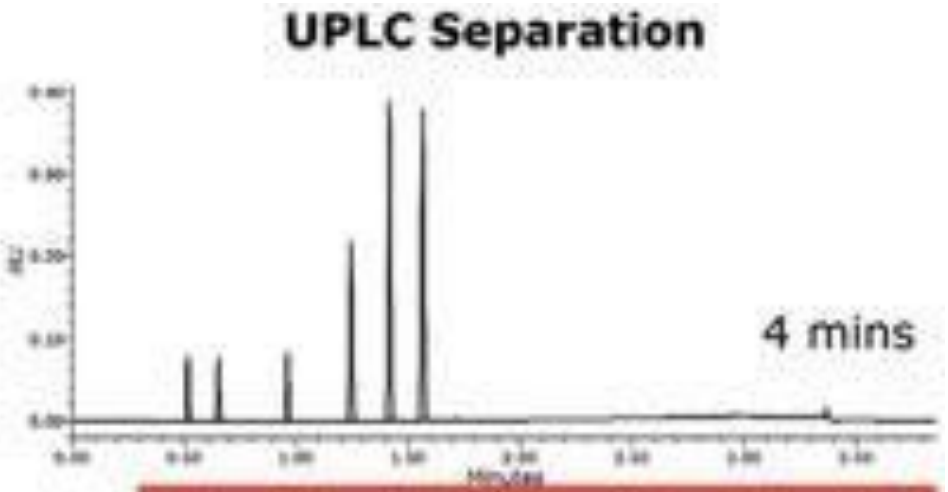
-Славится своими надежными и инновационными продуктами, а также широким мировым присутствием.

4.Thermo Fisher Scientific - один из крупнейших мировых поставщиков научно-лабораторного оборудования и реагентов.

-Их портфель включает в себя различные системы жидкостной хроматографии, включая HPLC, UHPLC, а также масс-спектрометры, спектрофотометры и другие инструменты.

-Предлагает широкий спектр решений для аналитической, биофармацевтической и других областей, их продукты известны своей высокой производительностью и надежностью.





Typical Column Volume = 2.49 mL

Typical Column Volume = 0.17 mL

HPLC		UPLC Reduction	UPLC	
Run Time	30 min.	**87%**	Run Time	3.86 min.
Solvent Consumed	30 mL	**83%**	Solvent Consumed	4.97 mL
Sample Consumed	20 µL	**93%**	Sample Consumed	1.0 µL

время выполнения

растворитель израсходован

образец потреблен

В ЖХ существует множество полезных модулей и компонентов, которые помогают улучшить производительность, точность и надежность анализа:

1.Помпы для подачи растворителя (Solvent Delivery Pumps): Они отвечают за точную подачу растворителей в систему. Это критически важный компонент, поскольку стабильность и точность подачи растворителей прямо влияют на разделение компонентов в пробе.
2.Модули смешивания (Mixing Modules): Они обеспечивают смешивание растворителей и проб перед введением в колонку, что помогает обеспечить однородность состава жидкости и улучшить точность анализа.
3.Модули детекции (Detection Modules): Включают различные типы детекторов, такие как UV-детекторы, флуоресцентные детекторы, масс-спектрометры и другие, которые используются для обнаружения и измерения аналитов после разделения на колонке.
4.Модули инжекции (Injection Modules): Эти модули отвечают за точное введение проб в систему. Они могут быть автоматическими или полуавтоматическими и обеспечивают точное и повторяемое введение пробного объема.
5.Колонки (Columns): Колонки являются ключевыми компонентами системы и предназначены для разделения аналитов в пробе. Они могут иметь различные типы наполнителей и химических свойств для разделения различных типов аналитов.
6.Контроллеры температуры (Temperature Controllers): Они используются для поддержания стабильной температуры в различных частях системы, включая колонку и детекторы. Контроль температуры помогает улучшить разделение и стабильность детекции.
7.Программное обеспечение (Software): Это необходимый компонент для управления и анализа данных, собранных в процессе хроматографического анализа. Программное обеспечение предоставляет возможности управления инструментом, а также анализа и обработки полученных данных.

Эти модули и компоненты обеспечивают основные функции и возможности системы ЖХ, обеспечивая точность, повторяемость и надежность аналитических результатов.

Полезные модули ЖХ, которые помогают улучшить производительность, точность и надежность анализа:

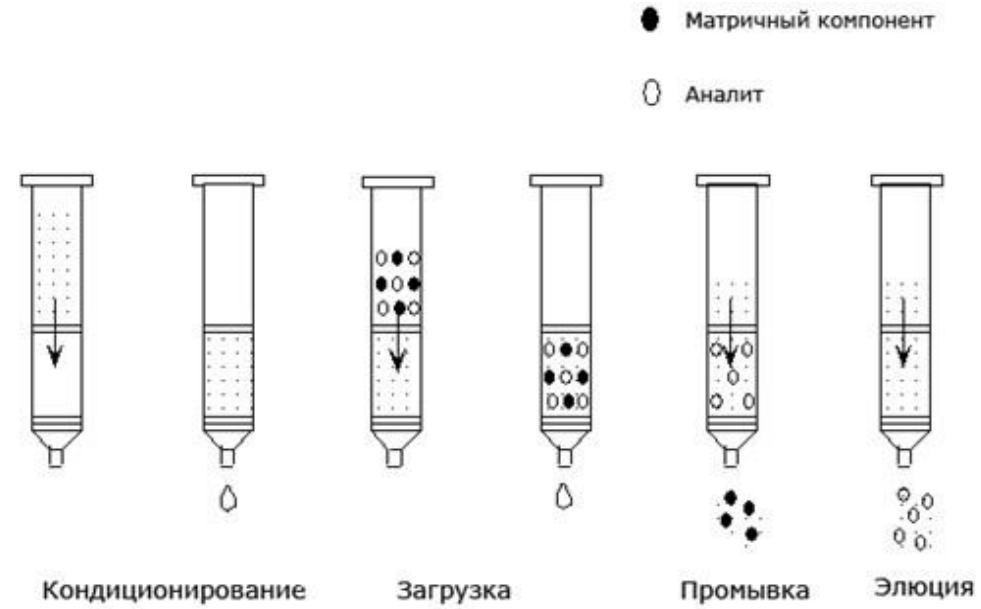
- Он-лайн твердофазная экстракция (ТФЭ)
- Постколоночная дериватизация
- Коллектор фракций
- Двумерная (2d) система

Твердо-фазная экстракция (ТФЭ)— эффективный и быстрый способ подготовки проб, прочно вошедший в практику современной лаборатории. **ТФЭ** - метод пробоподготовки, состоящий в концентрировании и отделении от матрицы целевого вещества (аналита) с использованием твердофазных сорбентов, с последующим элюированием (экстракцией) подходящими растворителями. ТФЭ позволяет сократить время пробоподготовки, уменьшить расход растворителей и поднять точность и правильность анализа.

Основными целями метода, являются:

1.очистка пробы от нежелательных примесей
2.концентрирование компонентов пробы для облегчения дальнейших исследований
3.перевод компонентов пробы на другую матрицу

Схема процесса ТФЭ



Пробы, подвергающиеся ТФЭ экстракции, как правило, сложного состава, включая сточную воду, мочу, кровь, напитки, органические и водные растворы. Требования ТФЭ изменяются в зависимости от объема образца. Автоматические ТФЭ системы используются при объемах более 10 мл жидкого образца и значительном потоке проб в лаборатории.

Предколоночная ТФЭ **(Online SPE)** - выполняется с помощью картриджей, которые устанавливаются перед хроматографической колонкой и обеспечивают очистку или концентрирование аналита в режиме «он-лайн»; предназначены только для ВЭЖХ.

Предколоночная ТФЭ **(Online SPE** - Solid phase extraction**)**

•Подходит для аналитов различной химической природы
•Плотная упаковка сорбента выдерживает обратный поток элюента
•Доступны в двух типоразмерах
•Максимальное допустимое давление — 250 psi
•Для установки предколоночных картриджей ТФЭ можно использовать набор запасных частей для защитных колонок ZORBAX (каталожный номер 820999-901)

Дериватизация — один из методов анализа, используемый в химии, который превращает анализируемое химическое соединение (аналит) в продукт с похожей химической структурой, называемый **дериватом** (производным). Как правило, специфическая функциональная группа соединения участвует в реакции дериватизации и превращает анализируемое соединение в дериват (производное) с отличающейся реакционной способностью, растворимостью, температурой кипения, температурой плавления, агрегатным состоянием или химическим составом. Возникающие в результате реакции новые химические свойства могут быть использованы для количественного определения или для разделения исходного вещества.

Методы дериватизации часто используются в химическом анализе смесей и в поверхностном анализе, например, в рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, где недавно внедрённые атомы маркируют характерные функциональные группы.

Некоторые характеристики желательны для реакций дериватизации:

-Реакция надёжна и протекает до конца. Небольшое количество начального материала облегчает анализ. Таким образом, это позволяет использовать небольшое количество анализируемого вещества.

-Реакция является общей для многих классов веществ, таким образом количество субстратов может быть велико. Однако же, реакция должна быть специфична для конкретной функциональной группы, уменьшая ненужное перекрёстное взаимодействие.

-Продукты реакции относительно стабильны и не распадаются в течение разумного периода времени, позволяя их анализировать.

-Некоторые примеры хороших реакций дериватизации: образование сложных эфиров и амидов с помощью ацилхлоридов.

Дериватизация — это получение производных анализируемого вещества, обладающих иными (лучшими с точки зрения используемого аналитического метода) аналитическими свойствами (например, иным УФ-спектром, флуоресценцией, термической стабильностью, летучестью и пр.)

Предколоночная и постколоночная дериватизация - это два различных метода, используемых в аналитической химии для улучшения обнаружения и анализа определенных соединений.
Их основные отличия:

1.Предколоночная дериватизация (Pre-column Derivatization):

- Предколоночная дериватизация происходит до того, как образец вводится в колонку хроматографа.
- В этом методе аналиты в образце реагируют с химическими реагентами перед анализом, чтобы образовать производные, которые лучше поддаются разделению и детекции на колонке.
- Преимущества предколоночной дериватизации включают возможность увеличения чувствительности анализа и улучшения разделения аналитов.
- Однако этот метод требует дополнительных шагов подготовки образца и времени на реакцию дериватизации.

2.Постколоночная дериватизация (Post-column Derivatization):

- Постколоночная дериватизация происходит после выхода образца из колонки, но до детекции.
- В этом методе образцы разделяются на колонке, а затем проходят через реакционный модуль, где они реагируют с химическими реагентами для образования дериватов.
- Постколоночная дериватизация позволяет избежать проблем, связанных с введением дериватизированных образцов в систему хроматографа.
- Однако этот метод также требует дополнительного оборудования и может потребовать дополнительного времени на выполнение анализа.

Оба метода имеют свои преимущества и ограничения, и выбор конкретного метода зависит от целей анализа, типа образца и доступного оборудования.

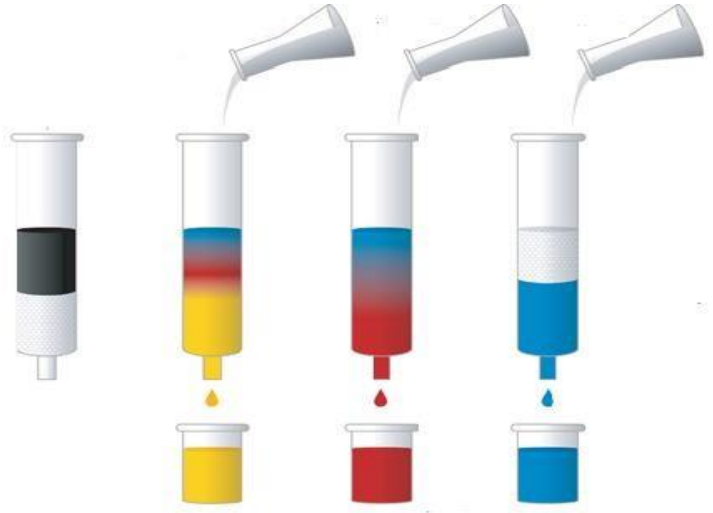
Двумерная хроматография - это тип хроматографической техники, при которой вводимая проба разделяется путем прохождения через две разные стадии разделения. Две разные хроматографические колонки подключаются последовательно, и стоки из первой системы переносятся на вторую колонку. Обычно вторая колонка имеет другой механизм разделения, так что полосы, которые плохо отделяются от первой колонки, могут быть полностью отделены во второй колонке. (*Например, за колонкой для обращенно-фазовой хроматографии C18 может следовать фенильная колонка*.)

Альтернативно, две колонки могут работать при разных температурах. Во время второй стадии разделения скорость, с которой происходит разделение, должна быть выше, чем на первой стадии, поскольку все еще есть только один детектор. Плоская поверхность поддается последовательному проявлению в двух направлениях с использованием двух разных растворителей. Двумерная хроматография - https://ru.qaz.wiki/wiki/Two-dimensional_chromatography

Двумерное разделение можно проводить с помощью газовой или жидкостной хроматографии. Были разработаны различные стратегии связывания для «повторной выборки» из первого столбца во второй. Некоторыми важными аппаратными средствами для двумерного разделения являются переключатель Динса и модулятор, которые выборочно переносят элюент первого измерения в колонку второго измерения.

Главное преимущество двумерных методов состоит в том, что они позволяют значительно увеличить пиковую мощность, не требуя чрезвычайно эффективного разделения в любой из колонок. (Например, если первая колонка предлагает пиковую емкость (k 1), равную 100 для 10-минутного разделения, а вторая колонка предлагает пиковую емкость 5 (k 2) при 5-секундном разделении, то объединенный пик емкость может приближаться к k 1 × k 2 = 500, при этом общее время разделения все еще составляет ~ 10 минут). Двухмерное разделение применялось для анализа бензина и других нефтяных смесей, а в последнее время и для белковых смесей.

Хроматография - это метод, основанный на разделении веществ между двумя несмешивающимися фазами.



Подвижная фаза проходит через неподвижную (стационарную) фазу.

Молекулы делящихся веществ могут находиться в обеих фазах.

Эффект расщепления - это разделение соединений при прохождении определенного расстояния с определенной задержкой, характерной для этого соединения.

Современные хроматографические методы:

- капиллярная газовая хроматография (**КГХ**),
- высокоэффективная жидкостная хроматография (**ВЭЖХ**),
- высокоэффективная тонкослойная хроматография (**ВЭТСХ**)
- высокоэффективная ионная хроматография (**ВЭИХ**),
- высококритическая флюидная хроматография (**ВЭИХ**),
- капиллярный электрофорез (**КЭ**)

Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз, типам процесса разделения и методам проведения

Название метода	Английская аббревиатура	Агрегатное состояние		Процесс разделения	Техника разделения
		подвижная фаза	стационарная фаза		
Жидкостно-жидкостная хроматография	LLC	жидкость	жидкость	распространение	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), TLC (ТСХ), PC (бумажная хромат.)
Газожидкостная хроматография	GLC	газообразный	жидкость	распространение	GC (ГХ)
Жидкостная хроматография	LC	жидкость	твердый	адсорбция	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), PC (бумажная хромат.)
Газовая хроматография	GC	газообразный	твердый	адсорбция	GC (ГХ)

Название метода	Английская аббревиатура	Агрегатное состояние		Процесс разделения	Техника разделения
		подвижная фаза	стационарная фаза		
Жидкостная хроматография	**LC**	**жидкость**	**твердый**	**адсорбция**	**LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), PC (бумажная хромат.)**
Газовая хроматография	**GC**	**газообразный**	**твердый**	**адсорбция**	**GC (ГХ)**

Адсорбция - концентрация вещества в твердой фазе;

Твердая фаза - адсорбент;

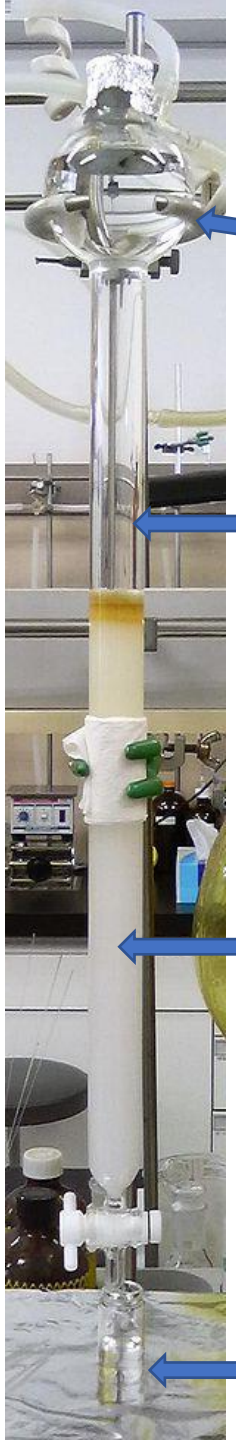
Хроматографическая колонка - кассета с адсорбентом, в этом случае адсорбент представляет собой неподвижную фазу;
Подвижная фаза - жидкость (жидкостная хроматография) или инертный газ (газовая хроматография);
Аналиты - это соединения, разделенные хроматографией.

Жидкостная хроматография низкого давления

(low pressure liguid chromatography, LPLC)

используется в основном для выделения чистых веществ

(препаративная хроматография)



Элюент

Хроматографическая колонка

Силикагель (μ 100 микрометров, т.е. 0.1 мм)

Элюат

Основные понятия:

Подвижная фаза (элюент) – растворитель (смесь растворителей), пропущенный через колонку;

Элюирование – пропускание элюента через хроматографическую колонку;

Элюат – фильтрат, вытекающий из хроматографической колонки;

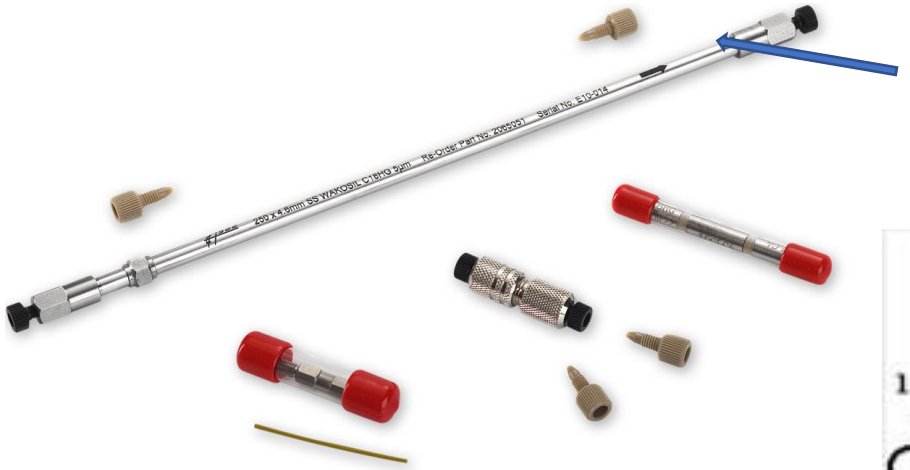
Недостаток LPLC – низкая разрешающая способность (хроматографические зоны компонентов широкие)

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

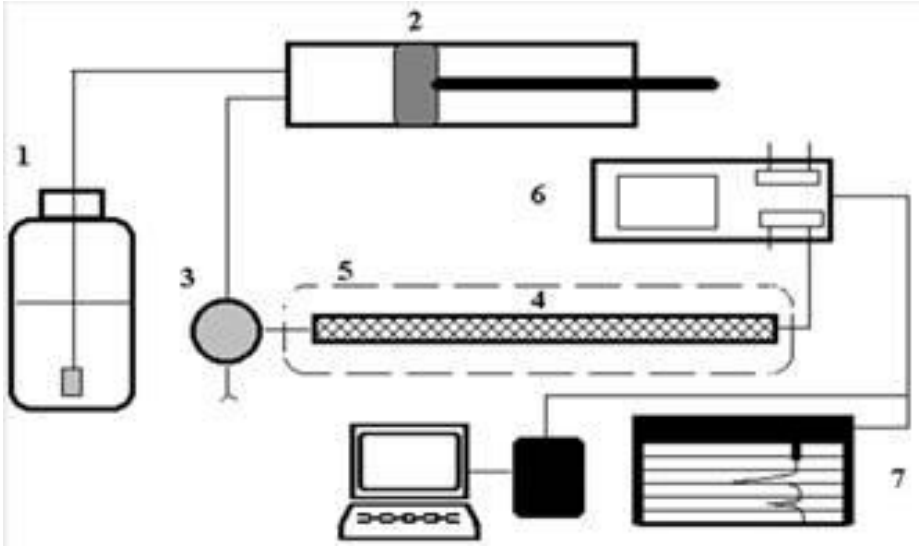
high performance liguid chromatography HPLC

(жидкостная хроматография высокого давления)

Используется для аналитических целей



Колонка ВЭЖХ (l ~ 15-25 см;
Ø 2-4.6 мм;
μ 3-5 микрометров)

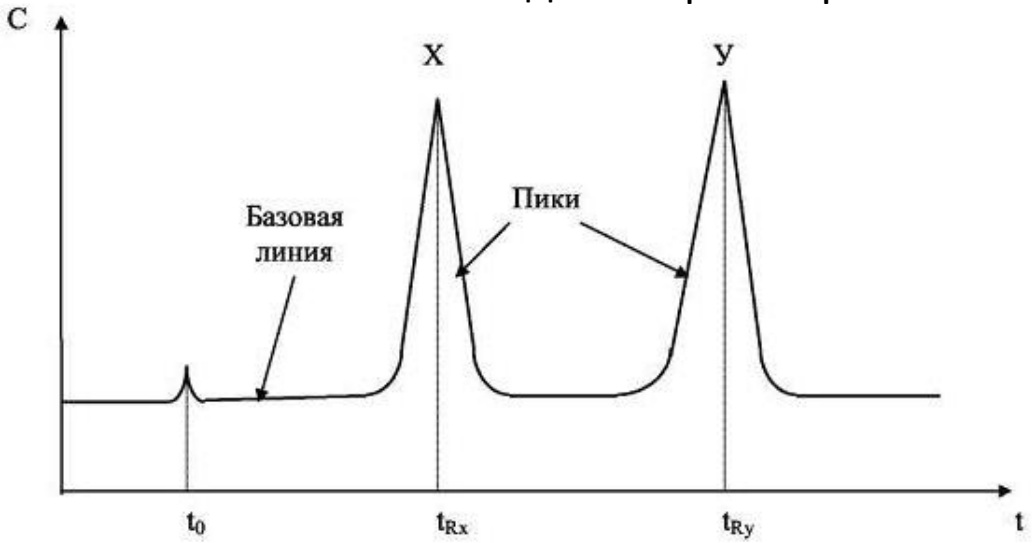


Блок-схема жидкостного хроматографа

1- емкость для забора элюента
2 – насос
3 - инжектор
4 - колонка для ВЭЖХ
5 – термостат
6 – детектор
7 - регистрирующая система

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Хроматограмма (графическое представление результата разделения) – зависимость сигнала детектора от времени элюирования



Пик – зависимость концентрации вещества в элюате от времени элюирования.
Площадь пика пропорциональна концентрации вещества в пробе.

Удерживание вещества в колонке – характеристика вещества в данной хроматографической системе

t_{Rx} – **Время удерживания** (время, за которое анализируемое вещество доходит от места ввода пробы до детектора;

V_R - **Объем удерживания** (произведение времени удерживания на объемную скорость подачи подвижной фазы)

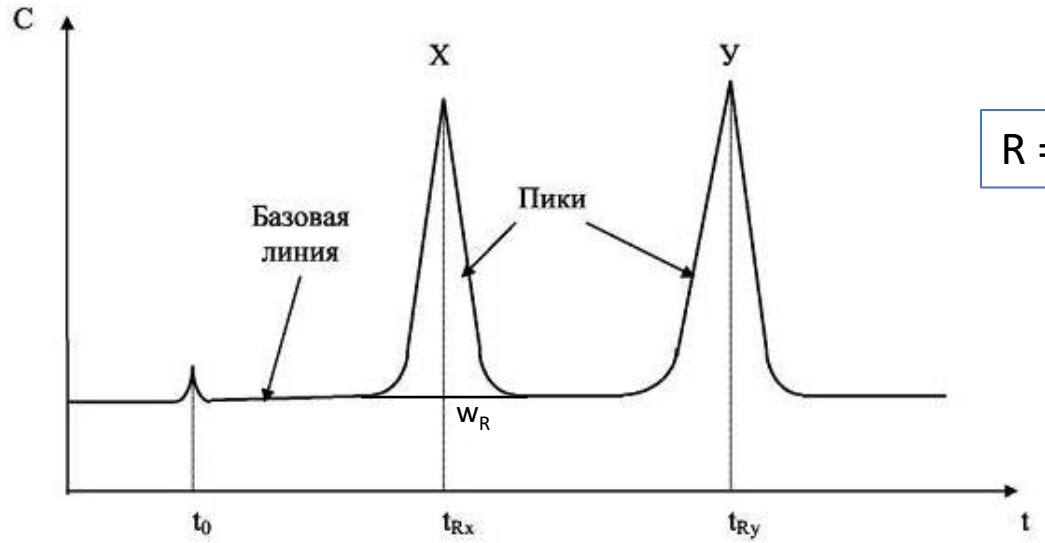
t'_{Rx} – **Приведенное время удерживания** $(t_{Rx} - t_0)$

k' – **Фактор удерживания** (t'_{Rx} / t_0)

t_0 – **Мертвое время колонки** (время, необходимое подвижной фазе чтобы пройти по колонке от места подачи пробы к детектору;

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Разрешение (R)– степень разделения двух веществ



$$R = 2 \times (t_{Rx} - t_{Ry}) / (w_X + w_Y)$$

w_R – ширина пика R у основания

R = 0 (вещества не разделяются)
R = 1 (перекрывание ~ 2% площадей двух пиков)
R ≥ 1 (пики разделяются до базовой линии)

Факторы, влияющие на разрешение:

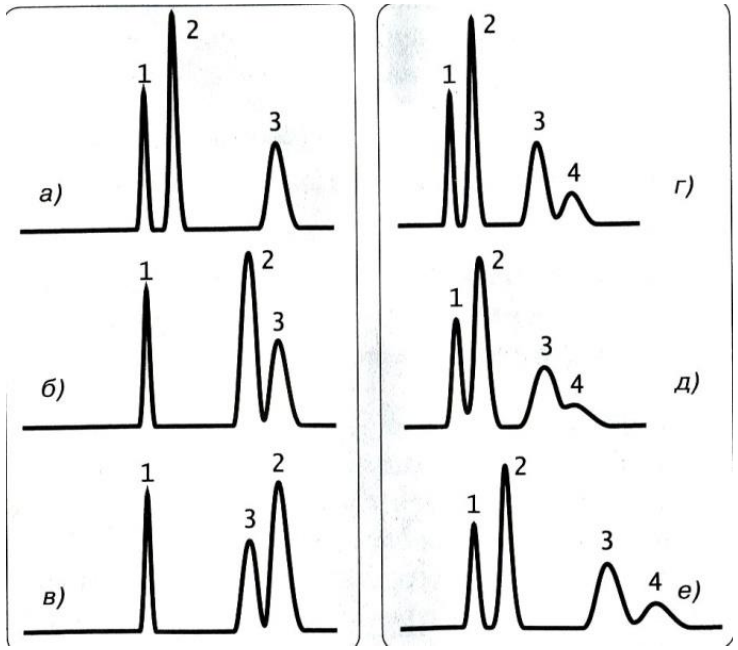
- удерживание,
- селективность,
- эффективность

Селективность – способность хроматографической системы к разделению веществ

$\alpha = k'_{Rx} / k'_{Ry}$

$\alpha = 1$ (**полное отсутствие селективности**, т.е. разделение не происходит)

Разделение на данном адсорбенте при применении данного элюента принципиально возможно при $\alpha > 1$!



Разделение с различной α

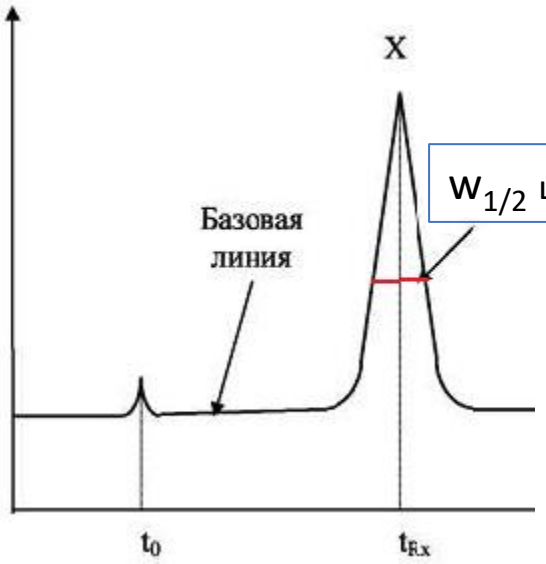
Разделение с одинаковой α

При постоянной селективности хроматограмма выглядит одинаково(последовательность элюирования, пропорции между факторами удерживания постоянны)

Для изменения селективности меняют либо адсорбент, либо состав эюента

Эффективность хроматографической колонки – величина размывания хроматографической зоны

$$N = 5.545 \times (t_{Rx} / w_{1/2})^2$$



$w_{1/2}$ ширина пика на половине высоте

Эффективность (N) – свойство хроматографической колонки, определяется:
- размером частиц адсорбента (μ)
- качеством изготовления адсорбента;
- качеством упаковки колонки адсорбента

Определение эффективности колонки (тестирование колонки) проводят при: скорости подвижной фазы 1мл/мин (Ø 4.6 мм),
определенным адсорбатам (толуол, нафталин)

Пиковая плотность (n) – число пиков, которые могут быть расположены на хроматограмме друг за другом с разрешением, равным единице

$$n = 1 + 0.6 \times \sqrt{N} \times \lg (1 + k')$$

N – эффективность
K' – фактор удерживания последнего компонента

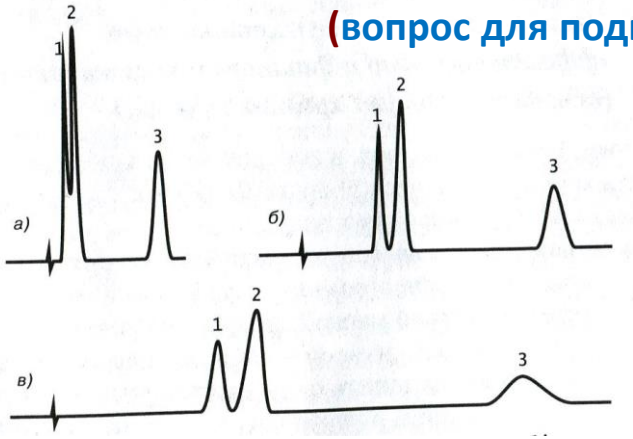
Основная формула хроматографии

$$R = 1/4 \times (\alpha - 1) / \alpha \times \sqrt{N} \times k'_{RY} / (k'_{RY} + 1)$$

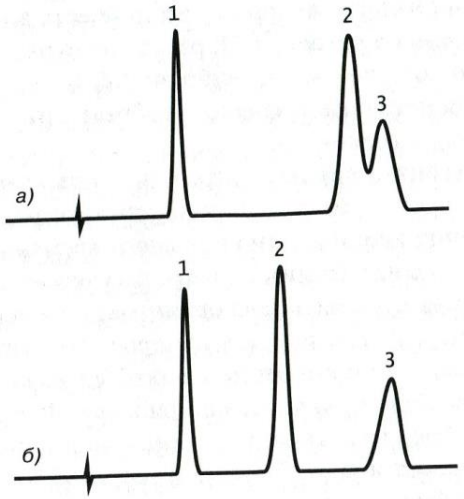
R - разрешение
α - селективность
N – эффективность
k'_{RY} – фактор удерживания второго пика

Как улучшить разрешение?

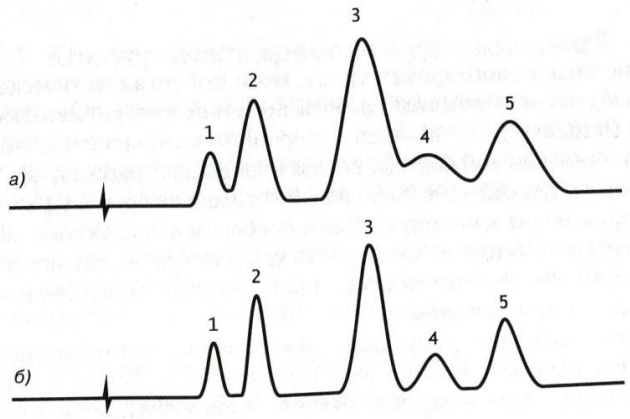
(вопрос для подготовки индивидуального ответа)



Разделение при увеличении k'
(время анализа сильно возрастает!)



Разделение при увеличении N



Разделение при улучшении α

Основными характеристиками подвижных фаз являются элюирующая способность и селективность.

Элюирующая способность подвижной фазы – это ее способность вступать в межмолекулярные взаимодействия как с разделяемыми соединениями и функциональными группами на поверхности сорбента. Эти взаимодействия по силе должны быть соизмеримы, что способствует десорбции разделяемых компонентов и формированию узких хроматографических зон.

Элюирующая сила определяется полярностью подвижной фазы.

В нормально-фазовой ВЭЖХ НФ – полярная (чаще всего силикагель), а ПФ – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.). Разделения компонентов достигают, меняя элюрующую силу подвижной фазы, которая зависит от энергии взаимодействия компонентов ПФ с поверхностью НФ. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность ПФ увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии НФ – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами С8, С18); ПФ – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Наименьшей элюирующей способностью обладает вода, а для повышения элюирующей способности в ПФ вводят ацетонитрил, метанол и другие растворители. Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы

Помимо элюирующей способности подвижная фаза должна обладать **селективностью** по отношению к компонентам разделяемой смеси.

Селективность подвижных фаз связана с их способностью к специфическим взаимодействиям с разделяемыми компонетами. Благодаря разному характеру взаимодействий, элюирующая способность по отношению к сорбатам различного строения будет отличаться, что и позволит их разделить.

Селективность, как и элюирующая способность, определяется в первую очередь составом подвижной фазы.

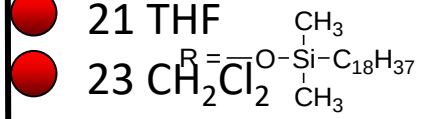
В состав подвижной фазы могут входить несколько различных по природе индивидуальных растворителей.

Элюотропные ряды являются простейшей формой ***оценки силы индивидуальных растворителей***. Они дают количественную оценку адсорбционной способности растворителей.

Элюотропный ряд – это перечень растворителей расположенных в порядке возрастания элюирующей способности.

Ряд полярности растворителей, применяемых в ЖХ

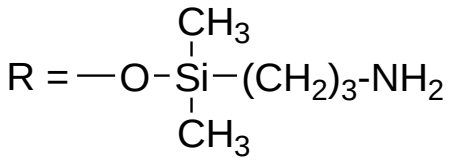
- 1 C_6H_{14}
- 21 THF
- 23 CH_2Cl_2
- 32 CH_3-CO-CH_3
- 37 ИПС
- 47 CH_3CN
- 54 CH_3OH
- 100 H_2O



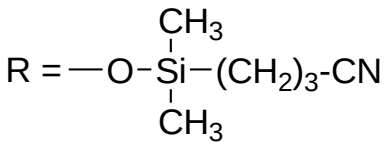
Адсорбенты, применяемые в ЖХ

- R = OH

Силикагель



Аминопропил-силикагель
(Аминофаза)

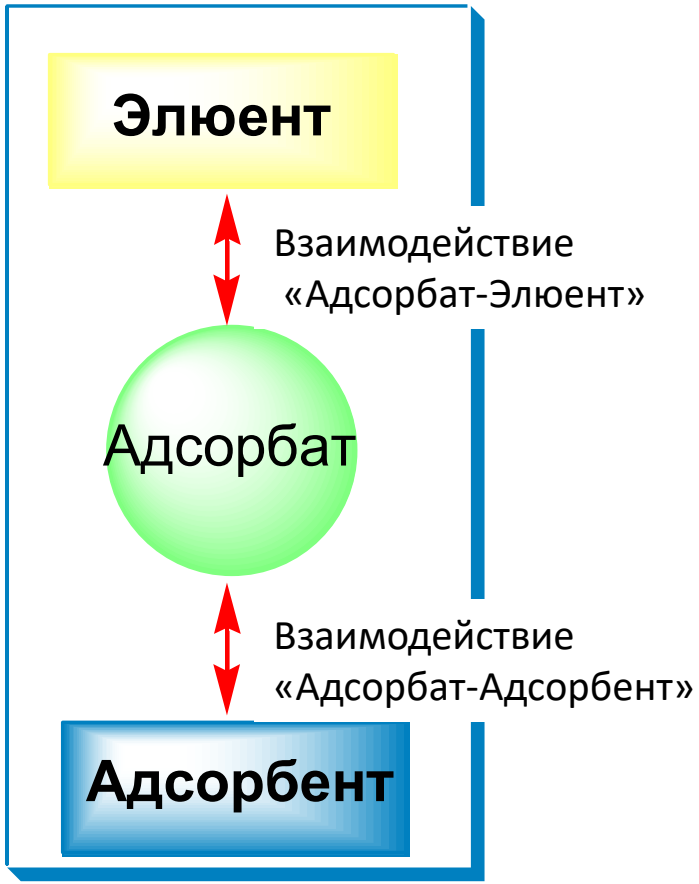


Цианопропил-силикагель
(Нитрильная фаза)

Октадецил-силикагель
(С18 фаза)

Как происходит удерживание

ЖХ:
Удерживание =
Взаимодействие «А-А» -
Взаимодействие «А-Э»

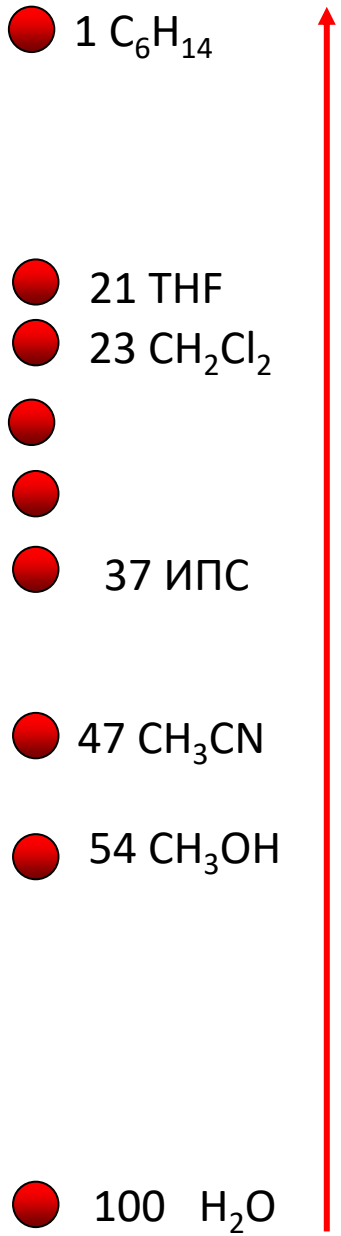


Нормально-фазовая (НФ, normal phase, NP) – хроматографическая система, основанная на полярном адсорбенте

Обращенно-фазовая (ОФ, reversed-phase, RP) – хроматографическая система, основанная на неполярном адсорбенте

« Адсорбция – процесс поглощения компонента (нескольких компонентов) из газовой смеси или жидкого раствора твердым материалом. Твердый поглощающий материал, используемый при адсорбции, называют **адсорбентом**, а поглощенный компонент – **адсорбатом** »

Обращенно-фазовая (неполярный адсорбент)

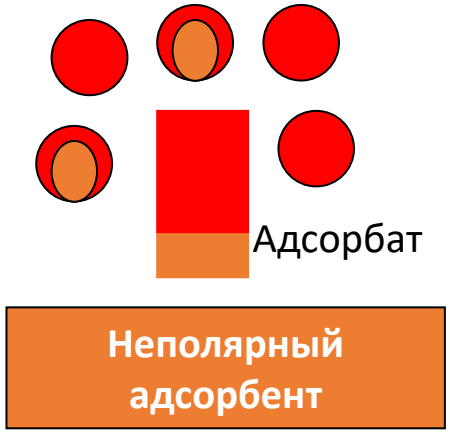


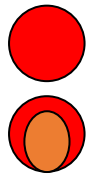
Основа – основной компонент элюента (растворитель)
Добавка – дополнительный компонент элюента

В ОФ хроматографии основа – всегда более полярный растворитель, чем добавка
(т.е., основа – полярная, добавка - неполярная)

Для ОФ ВЭЖХ:
Адсорбент - С18 силикагель;
Основа элюента – H_2O или водно-солевой буфер
Добавка – ацетонитрил, метанол, реже ТГФ (тетрагидрофуран) или ИПС (изопропиловый спирт)

Чем больше в элюенте доля неполярной добавки – тем меньше удерживание!





Нормально-фазовая система

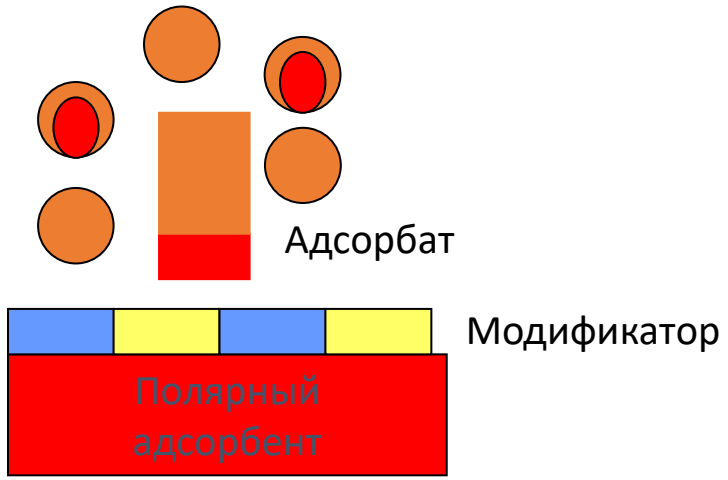
- 1 C_6H_{14}
- 21 THF
- 23 CH_2Cl_2
- 32 CH_3-CO-CH_3
- 37 ИПС
- 47 CH_3CN
- 54 CH_3OH
- 100 H_2O

Увеличение элюирующей силы растворителя в НФ

Модификатор – растворитель, способный модифицировать поверхность адсорбента.

Подавляет влияние остаточной влаги (стабилизирует удерживание)

Для НФ ВЭЖХ:
Основа – гексан
Полярная добавка – диоксан, ТГФ, EtOAc, $CHCl_3$, CH_2Cl_2, ацетон, ИПС
Модификаторы: H_2O, AcOH, ТЭА



Нормально-фазовая гидрофильная хроматографическая система (HILIC, hydrophilic interaction chromatography)

Гидрофильная хроматография – НФ ВЭЖХ, но с более полярным элюентом.
Применяется для разделения сильнополярных веществ.

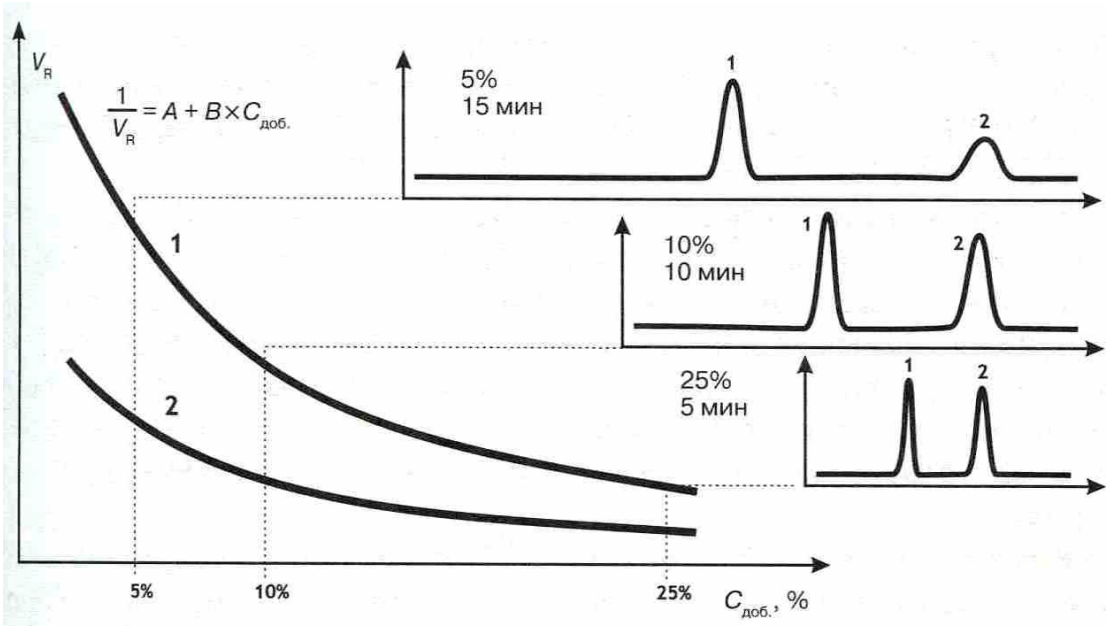
Для HILIC:
Основа – ацетонитрил
Полярная добавка и модификатор – вода или водно-солевой буфер

Чем больше в элюенте воды – тем меньше удерживание

Уравнение Скотта

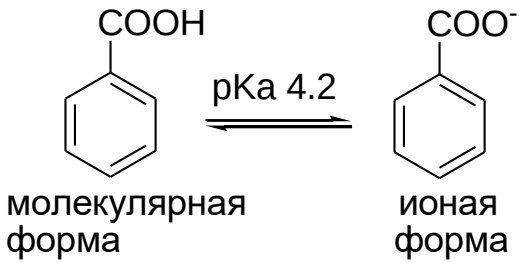
$$1/V_R = A + B \times C_{доб.}$$

V_R – удерживаемый объем
$C_{доб.}$ – доля добавки в элюенте
A, B - коэффициенты



Вид зависимости удерживания от концентрации добавки в элюенте

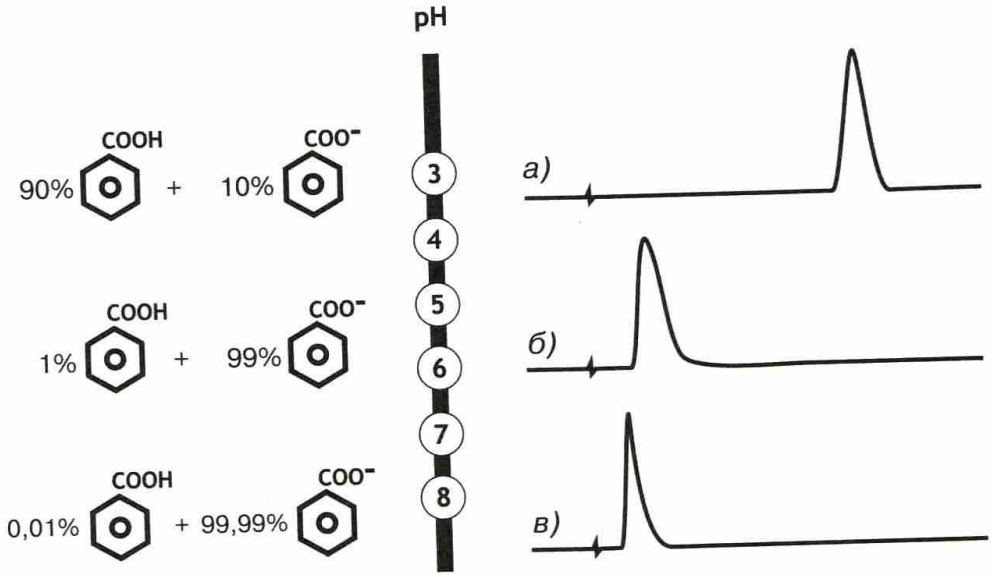
Удерживание ионных соединений на обращенно-фазовой системе/ Органические кислоты.



При pH = pKa
[молекулярная форма] = [ионная форма]

В ОФ ВЭЖХ аналиты предпочтительно переводить в молекулярную форму.

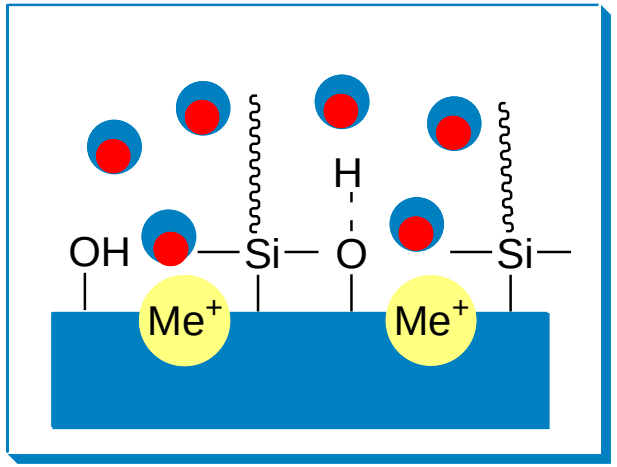
pH = 2.5 достаточно для ОФ хроматографирования большинства органических кислот (используют H_3PO_4)



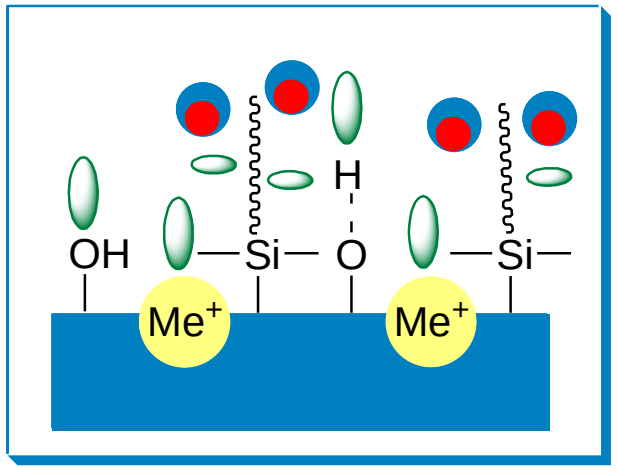
Равновесие форм бензойной кислоты в водном растворе при различных pH.
Вид хроматограммы бензойной кислоты в зависимости от pH водной основы элюента

Удерживание ионных соединений на обращенно-фазовой системе. Органические основания

Схема действия модификатора:



А) без модификатора



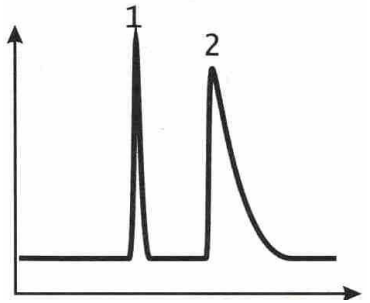
Б) с модификатором

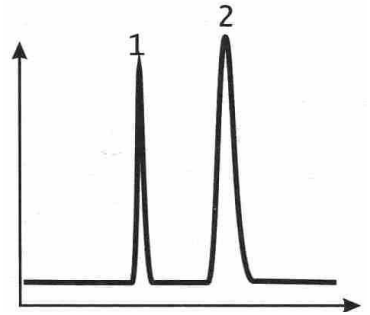
основное ионное соединение

модификатор (ТЭА)

Содержание модификатора (ТЭА) в элюенте (1-2%)

Органические основания в ОФ ВЭЖХ разделяются в виде ионных форм



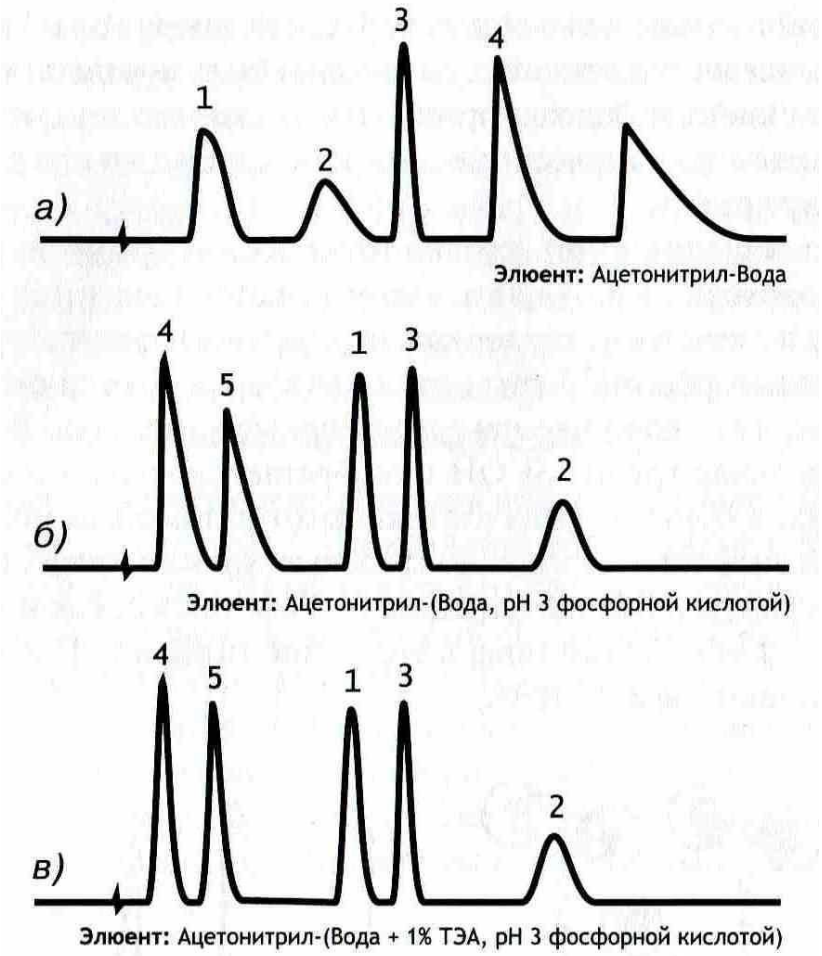


1 – неионное соединение
2 – основное ионное соединение

Поддержание ионных соединений во вращающейся фазе. Нейтральные соединения, смесь органических кислот и оснований

Нейтральные и ионные соединения в зависимости от состава водной основы

изменение хроматограммы АФ в



1,2 – органические кислоты
4,5 – органические основания
3 – неионные соединения

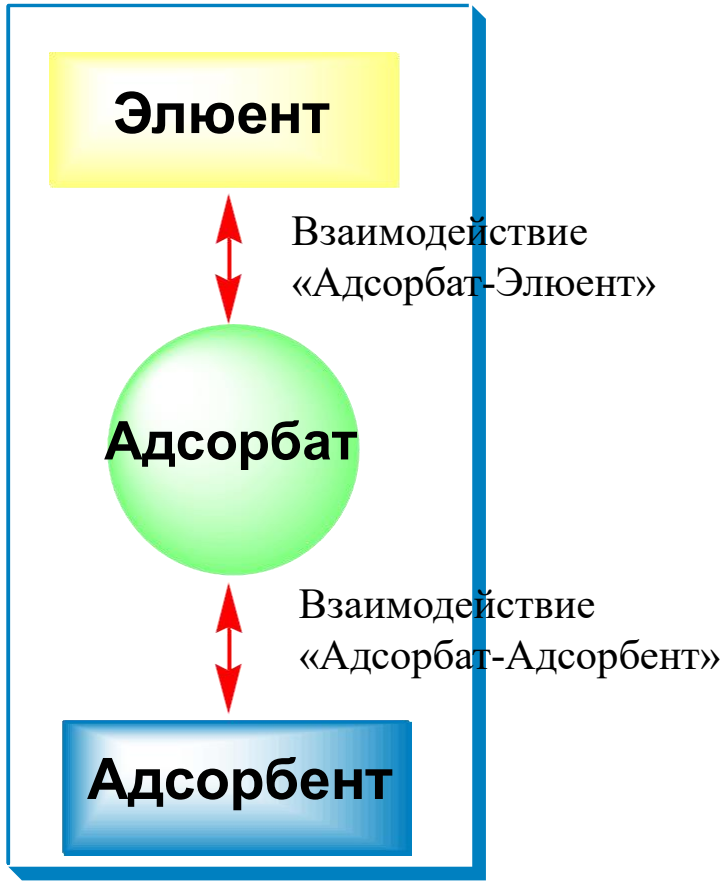
Уникальная система AF: элюент органический растворитель (1% водный раствор ТЕА, фосфорная кислота pH 2,5)

Наиболее распространенные элюенты АФ, используемые с силикагелем С18

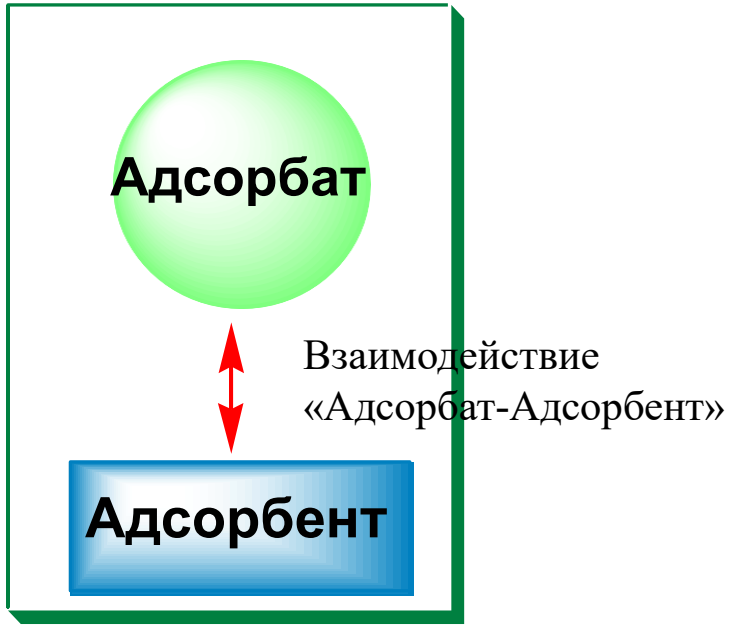
Объект анализа	Элюент
Фруктовые органические кислоты (щавель, вино, аскорбинка, молоко, уксус, лимон)	25 мМ (миллимоль/литр) водный раствор KH_2PO_4, pH 2 фосфорная кислота
Водорастворимые витамины (никотиновая кислота, никотинамид, пиридоксин, кофеин, тиамин, биотин, рибофлавин)	Ацетонитрил-(водный раствор гептилсульфоната Na с 10 мМ 1% ТЭА, фосфорная кислота pH 2.5) 10:90
Природные алкалоиды (скополамин, атропин, бруцин)	Ацетонитрил-(вода, фосфорная кислота pH 2.5) 20:80
Фармпрепараты (парацетамол, кофеин, салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота), консерванты и подсластители (сахарин, аспартам, бензойная кислота, сорбиновая кислота)	Ацетонитрил-(1% ТЭА водный раствор, фосфорная кислота pH 2.5) 20:80
Пиридины и аналины	Ацетонитрил-(1% ТЭА водный раствор, фосфорная кислота pH 3.5) 50:50
Фармпрепараты (трициклические антидепрессанты)	Ацетонитрил-(1% ТЭА сулы ерітндісі, фосфорная кислота pH 3.5) 60:40

Принцип «задержания и освобождения»

ЖХ:
Задержание =
Взаимодействие «А-А»
Взаимодействие «А-Э»

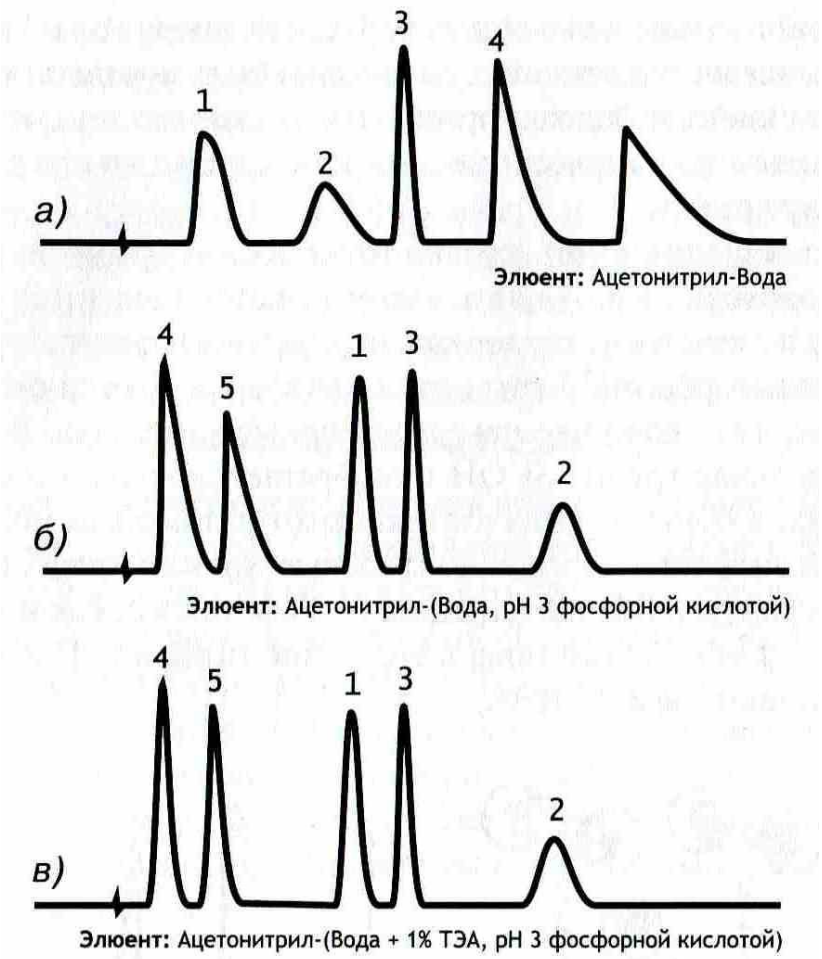


ГХ:
Задержание =
Взаимодействие «А-А»



Удерживание ионных соединений на обращенно-фазовой системе.
Смесь нейтральных соединений, органических кислот и оснований

Изменение ОФ хроматограммы смеси нейтральных и ионных соединений в зависимости от состава водной основы

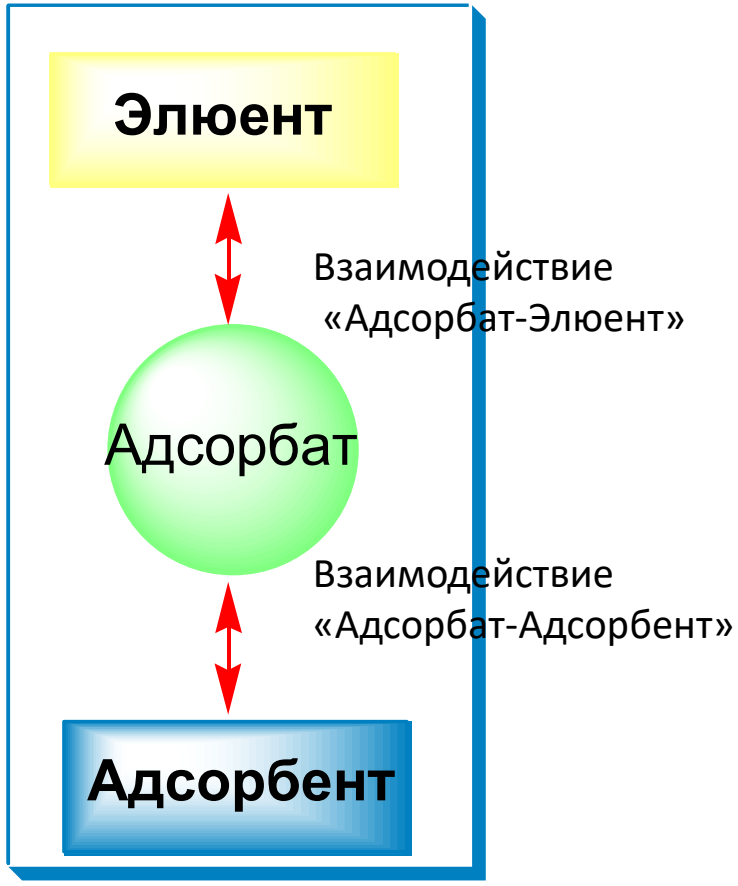


1,2 – органические кислоты
4,5 - органические основания
3 - неионное соединение

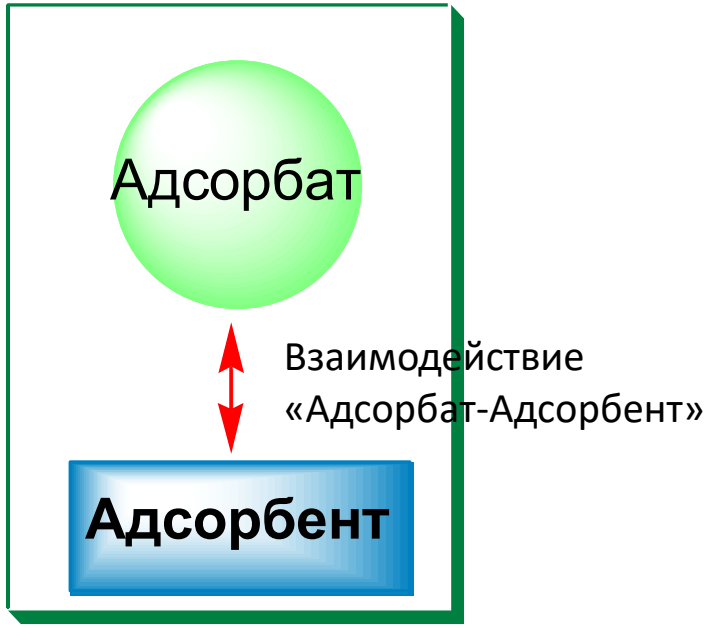
Уникальная ОФ система: элюент органический растворитель (1% водный р-р ТЭА (триэтиламин), pH 2,5 фосфорной кислотой)

Принцип «Подержать и отпустить»

ЖХ:
Удерживание =
Взаимодействие «А-А» -
Взаимодействие «А-Э»



ГХ:
Удерживание =
Взаимодействие «А-А»



Видео о ЖХ

https://www.youtube.com/watch?v=Qf6060arkqM

https://www.youtube.com/watch?v=xyi0bAurMxQ

https://www.youtube.com/watch?v=bCzFuxoT6aw

https://www.youtube.com/watch?v=kz_egMtdnL4

ВОПРОСЫ ???