

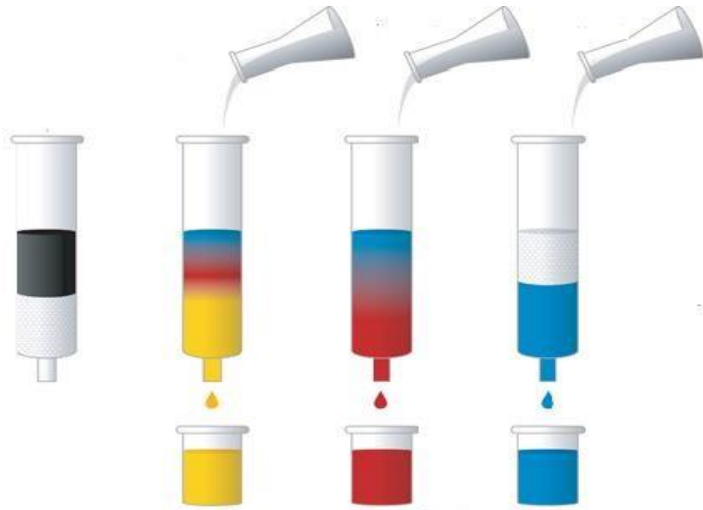


Современные аспекты хроматографии

Лекция на тему: **Виды жидкостной хроматографии**

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

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



Подвижная фаза проходит через неподвижную (стационарную) фазу. Молекулы разделяющихся 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 liquid 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)

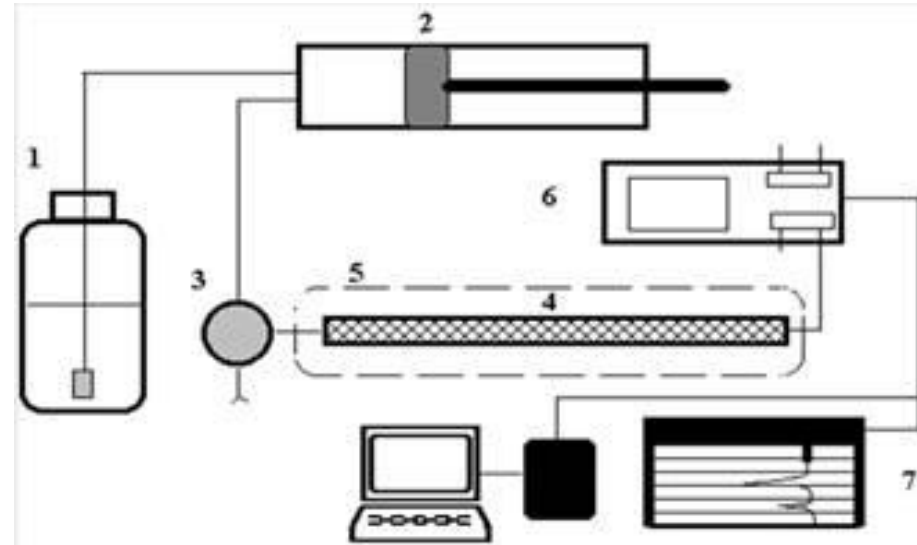
high performance liquid chromatography HPLC
(жидкостная хроматография высокого давления)

Используется для аналитических целей



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

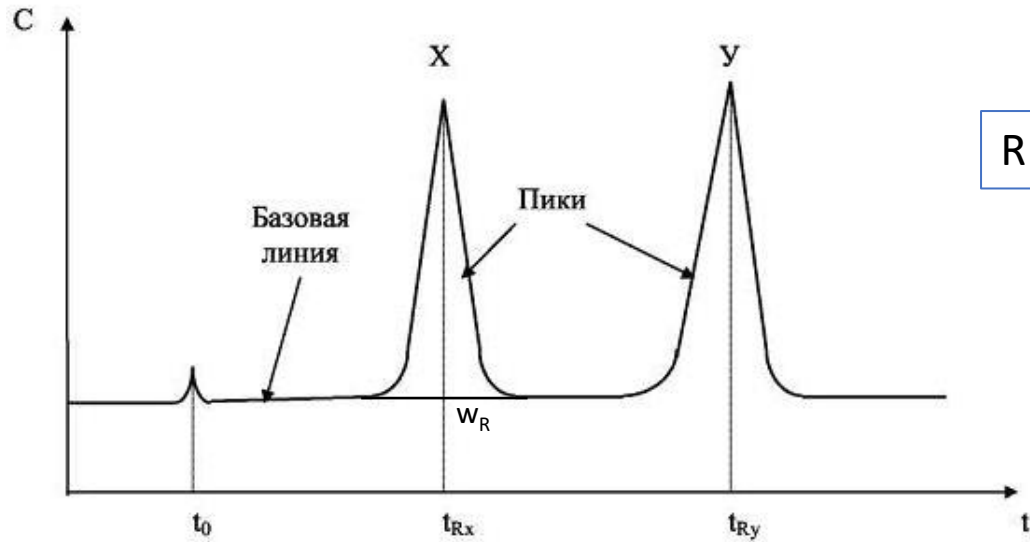
- 1- емкость для забора элюента
- 2 – насос
- 3 - инжектор
- 4 - колонка для ВЭЖХ
- 5 – термостат
- 6 – детектор
- 7 - регистрирующая система



Блок-схема жидкостного хроматографа

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Разрешение (R) – степень разделения двух веществ



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

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

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), называемая также жидкостной хроматографией высокого давления, – наиболее перспективный аналитический вариант классической колоночной хроматографии в современном приборном исполнении.

ВЭЖХ позволяет проводить одновременное:

- разделение** сложных проб на составляющие их компоненты,
- детектирование** большинства компонентов,
- измерение концентрации** одного или нескольких соединений (*в зависимости от конкретных аналитических задач и наличия стандартных образцов*).

Метод ВЭЖХ широко применяется для целей количественного химического анализа в экологии, санитарно-гигиенических и ветеринарных исследованиях, при контроле качества и сертификации пищевой и сельскохозяйственной продукции, в медицине, фармацевтике, нефтехимии, криминалистике и пр.

- **Высокоэффективная жидкостная хроматография** (ВЭЖХ, англ. *HPLC, High performance liquid chromatography*) — один из эффективных методов разделения сложных смесей веществ, широко применяемый как в аналитической химии, так и в химической технологии.
- Основой хроматографического разделения является участие компонентов разделяемой смеси в сложной системе Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий (*преимущественно межмолекулярных*) на границе раздела фаз.
- ВЭЖХ входит в состав группы методов, которая включает предварительное разделение исходной сложной смеси на относительно простые.
- Полученные простые смеси анализируются затем обычными физико-химическими методами или специальными методами, созданными для хроматографии.

- **В высокоэффективной жидкостной хроматографии** (ВЭЖХ) используют колонки диаметром до 5 мм, плотно упакованные сорбентом с частицами малого размера (3-10 мкм); давление для прокачивания элюента до $3 \cdot 10^7$ Па (*ее называют также хроматографией высокого давления*).
- Варианты ВЭЖХ - микроколоночная хроматография на наполненных колонках малого диаметра и капиллярная хроматография на полых и наполненных сорбентом капиллярных колонках.
- **К жидкостной хроматографии** обычно относят также гидродинамическую хроматографию, где неподвижная фаза отсутствует.
- В этом случае используют тот факт, что скорость потока элюента максимальна в центре полого капилляра и минимальна у его стенок, а разделяемые компоненты распределяются между движущимися с разной скоростью слоями элюента в соответствии со своими размерами или под влиянием наложенного в поперечном направлении внешнего силового поля (*центробежного, электрического, магнитного*).

Микроколоночная хроматография на наполненных колонках малого диаметра:

Этот вариант ВЭЖХ включает использование колонок с очень маленьким внутренним диаметром, обычно в пределах от 1 до 2 мм, хотя могут быть и еще меньшие диаметры.

Высокая разделительная способность и чувствительность.

Экономия времени и расхода растворителей, так как требуется меньшее количество образцового материала и растворителя для анализа.

Микроколоночная хроматография широко применяется в аналитической и биохимической химии для анализа сложных смесей веществ с высокой точностью и чувствительностью.

Капиллярная хроматография на полых и наполненных сорбентом капиллярных колонках:

Этот вариант ВЭЖХ включает использование капиллярных колонок, которые могут быть как полыми, так и наполненными сорбентом.

-Минимальное потребление реагентов и образцового материала благодаря малому внутреннему диаметру колонок.

-Высокая скорость анализа за счет быстрой диффузии в капиллярной системе.

-Возможность анализа малых объемов образца.

Капиллярная хроматография широко используется в фармацевтической, биохимической и клинической аналитике для анализа малых органических молекул, белков, нуклеиновых кислот и других биомолекул.

Оба варианта ВЭЖХ представляют собой мощные инструменты для анализа сложных смесей с высокой разрешающей способностью, чувствительностью и скоростью анализа.

Адсорбционная жидкостная хроматография в зависимости от относительной полярности сорбента и элюента подразделяется на нормально-фазовую и обращенно-фазовую.

В первом случае адсорбция веществ происходит на полярном сорбенте (*к примеру, на силикагеле, содержащем гидроксильные (силанольные) группы*) из неполярного элюента благодаря донорно-акцепторному взаимодействию или образованию водородных связей.

Во втором - на поверхности гидрофобизированного сорбента из полярного элюента благодаря дисперсионному (гидрофобному) взаимодействию разделяемых молекул с поверхностью (*образование водородной связи возможно в подвижной фазе с молекулами элюента, который, как правило, содержит воду*).

В распределительной жидкостной хроматографии разделение основано на распределении веществ между двумя жидкими фазами: неподвижной, нанесенной на поверхность носителя, и подвижной элюентом.

В зависимости от полярности жидких фаз возможны нормально-фазный и обращенно-фазный варианты. В первом случае на поверхность или в поры пористого носителя наносится полярная жидкость, не смешивающаяся с неполярным элюентом, во втором - используется неполярная неподвижная фаза и полярный элюент.

К распределительной жидкостной хроматографии относится и экстракционная жидкостная хроматография, в которой неподвижной фазой служит органический экстрагент, нанесенный на твердый носитель, а подвижной - водный раствор разделяемых соединений.

Обращенно-фазовая (неполярный адсорбент)

● 1 C₆H₁₄

● 21 THF

● 23 CH₂Cl₂

●

●

● 37 ИПС

● 47 CH₃CN

● 54 CH₃OH

● 100 H₂O

Увеличение элюирующей силы в ОФ ВЭЖХ

*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:

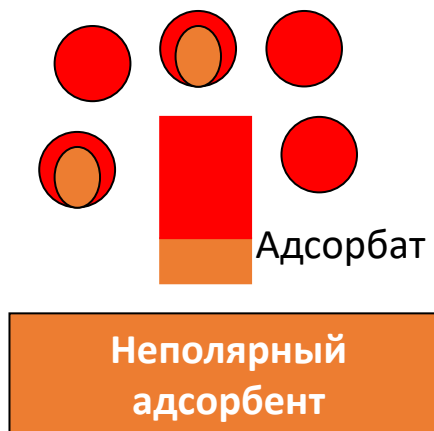
Адсорбент - C18 силикагель;

Основа элюента – H₂O или водно-солевой буфер

Добавка – ацетонитрил, метанол, реже ТГФ

(тетрагидрофуран) или ИПС (изопропиловый спирт)

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



Полярная основа



Неполярная добавка

Нормально-фазовая система

● 1 C₆H₁₄

● 21 THF

● 23 CH₂Cl₂

●

● 32 CH₃-CO-CH₃

● 37 ИПС

● 47 CH₃CN

● 54 CH₃OH

● 100 H₂O

Увеличение элюирующей силы растворителя в НФ

Модификатор – растворитель, способный модифицировать поверхность адсорбента.

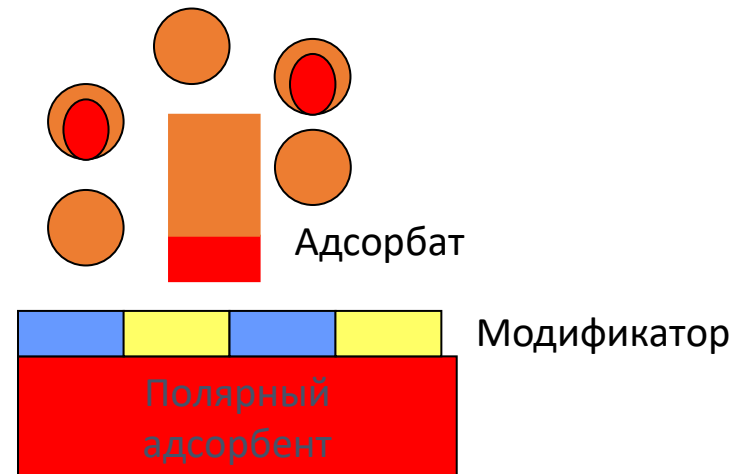
Подавляет влияние остаточной влаги (стабилизирует удерживание)

Для НФ ВЭЖХ:

Основа – гексан

Полярная добавка – диоксан, ТГФ, EtOAc, CHCl₃, CH₂Cl₂, ацетон, ИПС

Модификаторы: H₂O, AcOH, ТЭА



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 инъекции (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

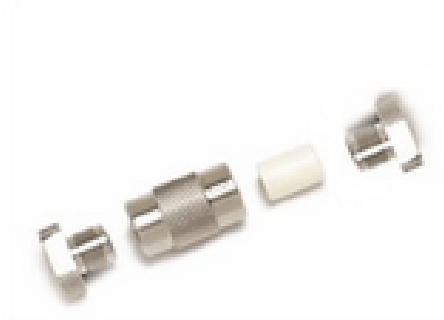
Схема процесса ТФЭ



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).

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 $k_1 \times k_2 = 500$, 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.

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, [полярности](#) 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

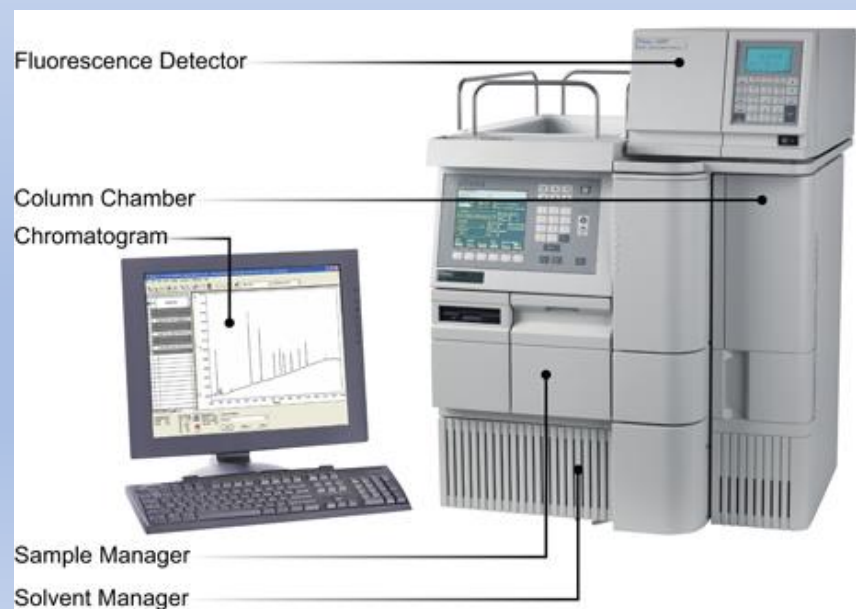
Higher precision in sample introduction – Более высокая точность ввода образца

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

ВЭЖХ системы



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.

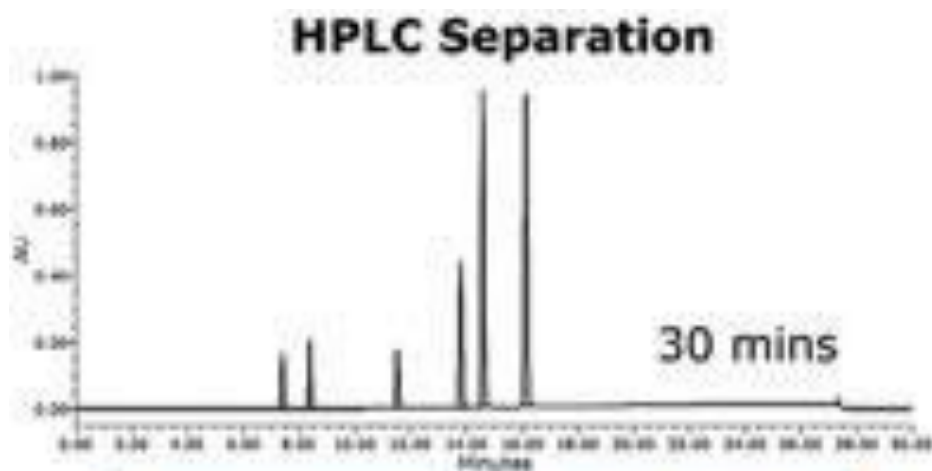
Скорость анализа: УВЭЖХ обычно обладает более высокой скоростью анализа по сравнению с ВЭЖХ. Это связано с использованием более высоких скоростей потока и улучшенной эффективностью разделения.

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

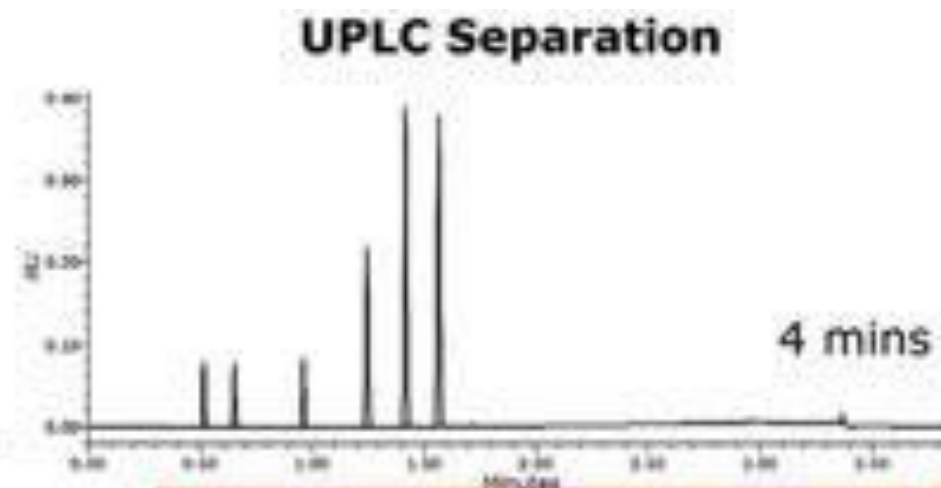
Давление: УВЭЖХ работает при более высоких давлениях, чем ВЭЖХ, что позволяет использовать более мелкие частицы носителя и более высокие скорости потока для улучшения разделения и скорости анализа.

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.



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 μ L		93%		Sample Consumed	1.0 μ L

время выполнения

растворитель
израсходован

образец потреблен

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.

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 ???