



Современные аспекты хроматографии

Лекция на тему: Жидкостная хроматография (ЖХ)

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

По механизму удерживания разделяемых веществ неподвижной фазой жидкостная хроматография делится на :

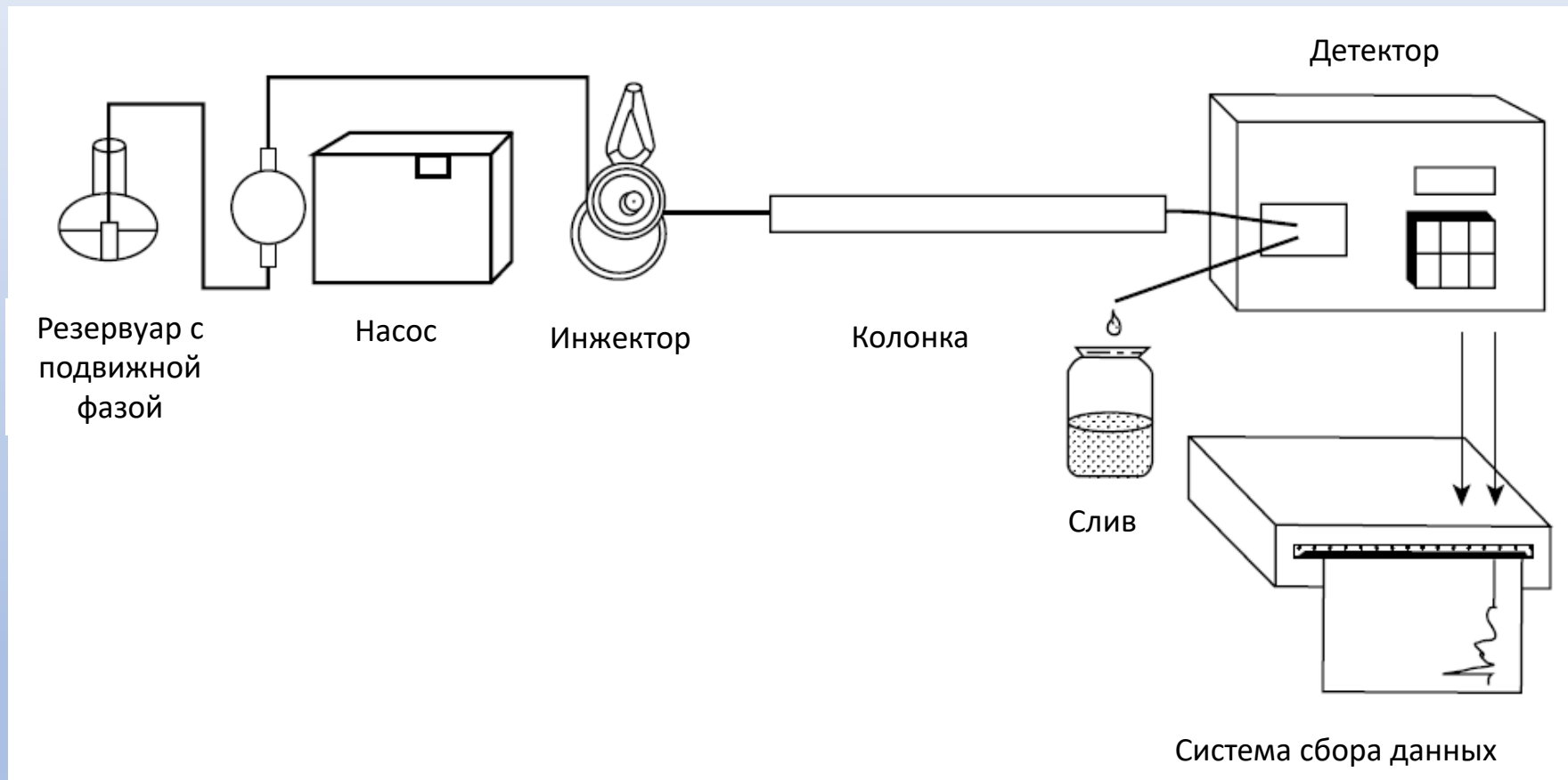
- осадочную хроматографию,
- адсорбционную,
- распределительную,
- ионообменную хроматографию (в т. ч. ионную хроматографию),
- ион-парную,
- лигандообменную хроматографию,
- эксклюзионную хроматографию (ситовую) и
- аффинную хроматографию (биоспецифическую).

Осадочная жидкостная хроматография основана на различной растворимости осадков, образующихся при взаимодействии компонентов анализируемой смеси с реагентом-осадителем.

Преимущества метода в том, что получающиеся вдоль сорбента зоны имеют резкие границы, содержат осадки только одного вещества и часто разделены зонами чистого сорбента.

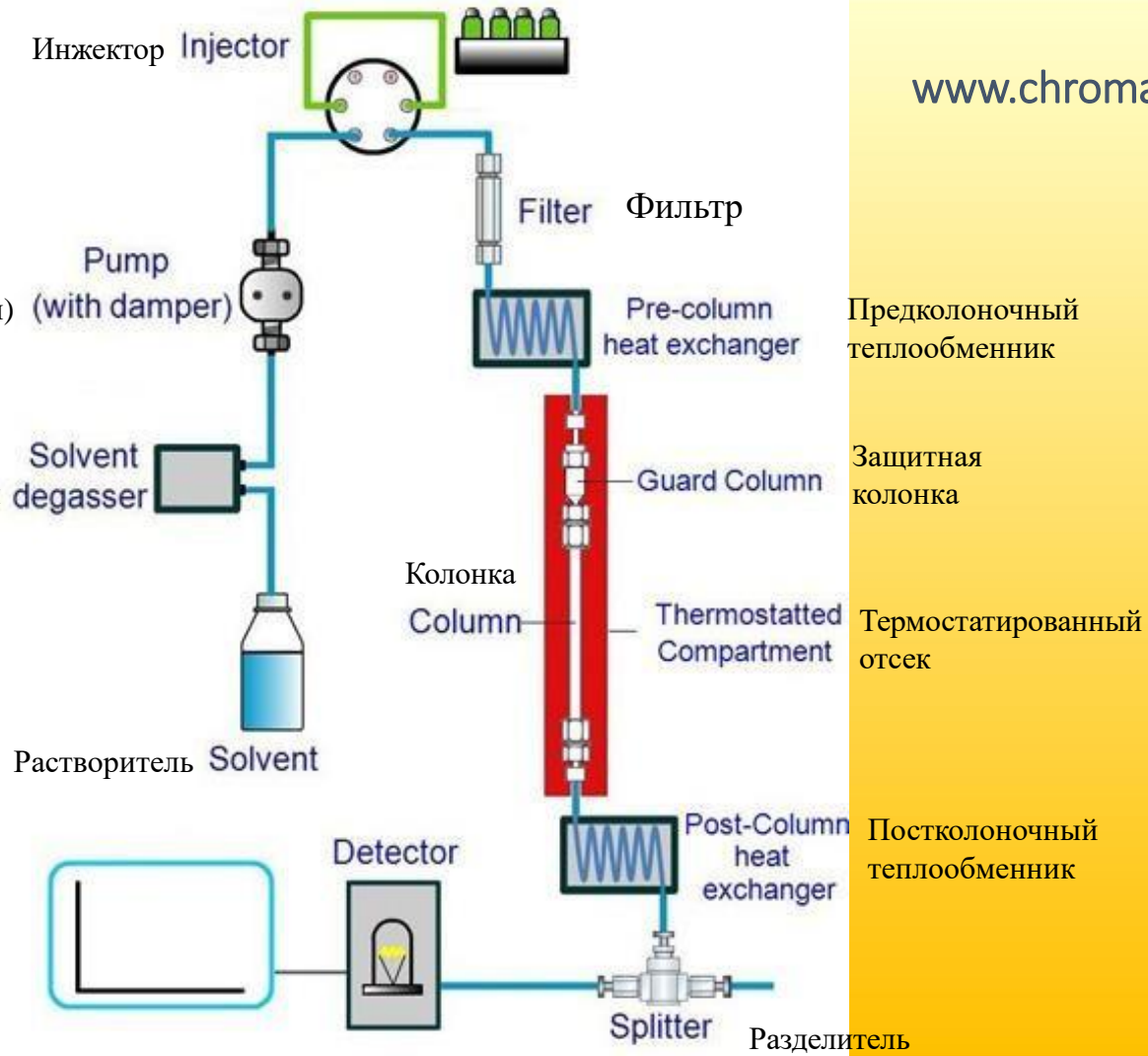
Метод пока не нашел широкого распространения.

Жидкостный хроматограф



Насос
(с демпфером)

Дегазатор
растворителя



Предколоночный
теплообменник

Защитная
колонка

Термостатированный
отсек

Постколоночный
теплообменник

Область аналитов

Хорошо растворимые соединения:

- Аминокислоты и белки
- Углеводы
- Полифенолы
- Полимеры и т.д.

Жидкостная хроматография (ЖХ) - это перспективный метод анализа (в сочетании с МС), который находит широкое применение в различных областях науки и промышленности:

1. Фармацевтическая промышленность:

- Определение содержания, идентификация активных фармацевтических ингредиентов (API) в лекарственных препаратах.
- Анализ примесей и различных форм выпуска лекарств (таблетки, капсулы, растворы и т. д.).
- Контроль качества производства лекарственных средств на всех этапах - от исследования и разработки до производства и контроля качества готовой продукции.

2. Аналитическая химия:

- Определение содержания химических соединений в различных материалах и образцах, например, в пищевых продуктах, косметике, воде, почве и т. д.
- Идентификация неизвестных соединений и примесей в образцах.
- Количественный анализ различных молекул, включая органические и неорганические соединения.
- Судебная экспертиза.

3. Биохимия и биология:

- Анализ биомолекул, таких как белки, нуклеиновые кислоты, липиды и углеводы.
- Определение структуры и конформации биомолекул.
- Исследования в области биомедицины, включая анализ биомаркеров, фармакокинетики и фармакодинамики.

4. Охрана окружающей среды:

- Мониторинг загрязнения воды, почвы и воздуха.
- Определение концентрации различных загрязнителей, таких как пестициды, тяжелые металлы, органические соединения и др.

5. Промышленность и производство:

- Контроль качества сырья и конечной продукции в различных отраслях промышленности, таких как пищевая, химическая, нефтеперерабатывающая, фармацевтическая и другие.
- Оптимизация производственных процессов и разработка новых методов синтеза и очистки продуктов.
- Жидкостная хроматография является универсальным инструментом анализа, который помогает исследователям и инженерам в различных областях повышать эффективность и точность своих исследований и производственных процессов.

Жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией — широко распространённый метод химического анализа сочетающий в себе физическое разделение жидкостной хроматографии (или высокоэффективной жидкостной хроматографии) с масс-спектрометрией.

Жидкостная хроматография разделяет смеси нескольких компонентов и масс-спектрометрия обеспечивает структурную идентичность отдельных компонентов с высокой чувствительностью.

Этот двойной метод может быть использован для анализа биохимических, органических и неорганических соединений.

Он может быть применён в широком диапазоне отраслей промышленности, включая **биотехнологии**, мониторинг окружающей среды, пищевой и **фармацевтической**, агрохимической и косметической промышленности

Основные узлы

- Подвижная фаза (растворители)
- Насос с дегазатором
- Инжектор
- Колонка (в термостате)
- Детектор(ы)

Типы ЖХ

- Нормально-фазовая (normal-phase, NP LC)
- **Обращенно-фазовая (reversed-phase, RP LC)**
- Ионная (ion, IC)
- Эксклюзионная (size-exclusion, GPC, GFC)

Оптимизация анализа

- Скорость и состав подвижной фазы (**полярность**, рН)
- Природа и размер частиц стационарной фазы
- Температура хроматографирования
- Объем вводимой пробы
- Детектор и его параметры (длина волны и др.)

Скорость и состав подвижной фазы в хроматографии играют важную роль в разделении компонентов образца и определении эффективности аналитического процесса.

Скорость подвижной фазы:

Скорость течения (flow rate): Это скорость, с которой подвижная фаза проходит через колонку хроматографа. Она измеряется в миллилитрах в минуту (мл/мин) или в литрах в час (л/ч). Скорость течения влияет на разделение компонентов образца: слишком высокая скорость может привести к недостаточному разделению, а слишком низкая может вызвать избыточную ретенцию (задерживание) компонентов.

Линейная скорость (linear velocity): Это скорость, с которой подвижная фаза проходит через длину колонки за единицу времени. Она измеряется в сантиметрах в минуту (см/мин) или в метрах в час (м/ч). Линейная скорость обычно поддерживается в определенном диапазоне для оптимального разделения компонентов.

Состав подвижной фазы имеет полярность и pH:

Полярность: Полярность подвижной фазы определяется ее способностью взаимодействовать с анализируемыми соединениями. Полярные соединения лучше разделяются на более полярных стационарных фазах, а неполярные соединения - на менее полярных фазах. Полярность подвижной фазы можно регулировать выбором определенных растворителей (например, вода, метанол, ацетонитрил) и их концентраций.

pH: В случае использования жидкостных систем, pH подвижной фазы также может влиять на разделение компонентов, особенно для ионогенных соединений. Разные значения pH могут изменять заряд молекул и их взаимодействие с стационарной фазой, что влияет на скорость и эффективность разделения.

Правильный выбор скорости и состава подвижной фазы зависит от конкретных требований анализа, характеристик образца и стационарной фазы. Оптимизация этих параметров позволяет добиться наилучшего разделения компонентов и достичь желаемой чувствительности и точности анализа.

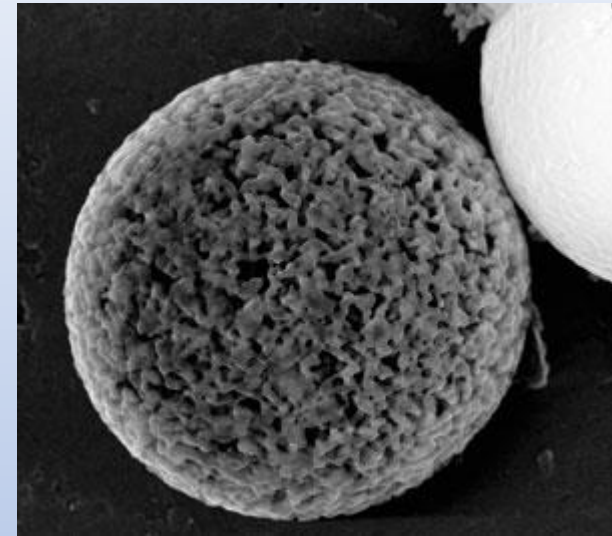
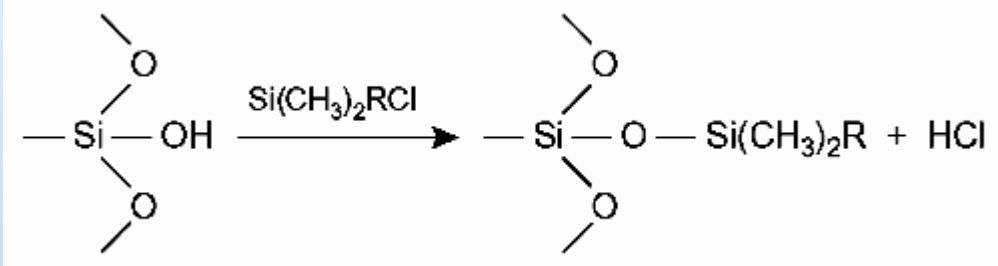
Цель оптимизации

- Максимально быстрое разделение
- Максимально эффективное разделение
- Максимальная чувствительность
- Максимальная точность
- Минимальные расходы растворителей

Колонки

- Аналитические ($d < 5$ мм)
- Препаративные ($d > 5$ мм)
- Защитные (для защиты колонок от загрязнения)

Стационарные фазы



- Октадецил (C₁₈)
- Октил (C₈)
- Циано (CN-)
- Фенил (-C₆H₅)
- Амино (-NH₂)

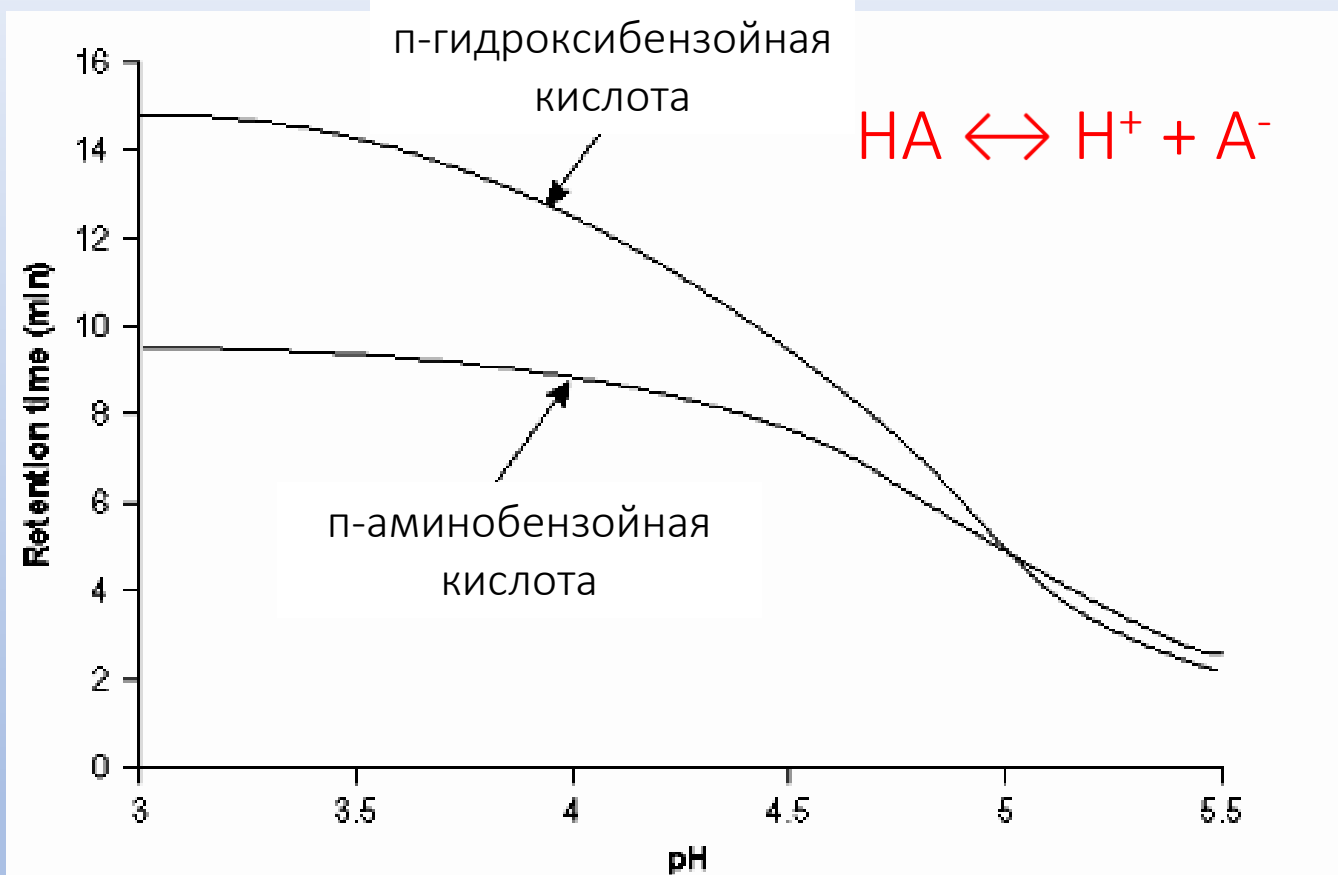
Стационарная (неподвижная) фаза

Таблица 1. Основные стационарные фазы, применяемые в обращённо-фазовой ВЭЖХ.

Обозначение	Описание	Структура
C1, TMS, SAS, триметил	Обладает высокой селективностью при разделении полярных соединений и соединений с большим количеством функциональных групп. Меньше всего удерживает соединения с алкильными группами в неполярных растворителях.	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_3 \\ \end{array}$
C2, RP-2, диметил	Обладает большим удерживанием, чем C1, и меньшим, чем C4, C8 и C18.	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_2\text{H}_5 \\ \end{array}$
C3, Пропил	Применяется в хроматографии гидрофобного взаимодействия (НІС) пептидов и белков.	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_3\text{H}_7 \\ \end{array}$
C4, Бутил	Применяется для НІС и ион-парной хроматографии. В неполярных растворителях обладает меньшим удерживанием, чем фазы C8 и C18. Данный материал с диаметром пор 300Å идеален для анализа больших белков и гидрофобных пептидов.	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_4\text{H}_9 \\ \end{array}$
C5, Пентил	С диаметром пор 300Å используется для обращённо-фазового разделения гидрофобных белков и пептидов. Более устойчив к гидролизу, чем C4.	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_5\text{H}_{11} \\ \end{array}$
C6, Гексил	Применяется для ион-парной хроматографии. Обладает меньшим удерживанием, чем C8 и C18.	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_{13} \\ \end{array}$
C8, MOS, RP-8, LC8, Октил	По селективности близок к C18, но обладает меньшим удерживанием. Широко используется в анализе лекарств, нуклеотидов, стероидов и т.д. С диаметром пор 300Å этот материал хорошо подходит для разделения пептидов и небольших гидрофильных белков.	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_8\text{H}_{17} \\ \end{array}$
C12, Додecil	Благодаря более короткой углеродной цепи, чем у C18, обеспечивает хорошее взаимодействие и более чёткую форму пиков для неполярных и умеренно полярных соединений.	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_{12}\text{H}_{25} \\ \end{array}$

C18, ODS, RP-18, LC-18, Октадецил	Классический обращённо-фазовый материал, обладающий наибольшим удерживанием в неполярных растворителях. Прекрасно работает в ион-парной хроматографии. Имеет широчайший спектр применений (разделение пептидов, нуклеозидов, нуклеотидов, стероидов, фармпрепаратов, витаминов, жирных кислот, пестицидов и пр.). С диаметром пор 300Å этот материал используют для разделения небольших гидрофобных пептидов.	$\begin{array}{c} \\ \text{—Si—C}_{18}\text{H}_{37} \\ \end{array}$
C₆H₅, Phenyl	Обладает уникальной селективностью, используется для разделения ароматических соединений. С диаметром пор 300Å этот материал используют для НИС.	$\begin{array}{c} \\ \text{—Si—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \text{ } \langle \text{C}_6\text{H}_5 \rangle \\ \end{array}$
C₆H₅ (линкер C₃H₆O), Фенил-эфир	Используется для разделения высокополярных ароматических веществ. Отличается по селективности от фенил- и фенил-гексил- фаз.	$\begin{array}{c} \\ \text{—Si—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} \text{ } \langle \text{C}_6\text{H}_5 \rangle \\ \end{array}$
C₆H₅ (линкер C₆H₁₂), Фенил-гексил	Обладает селективностью как у фенил-фазы, но со значительно большей стабильностью.	$\begin{array}{c} \\ \text{—Si—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \text{ } \langle \text{C}_6\text{H}_5 \rangle \\ \end{array}$
C₆F₅, PFP	Используется для анализа замещённых ароматических соединений. Отличается по селективности от фенил-гексил, классических фенил- и алкил-фаз.	$\begin{array}{c} \\ \text{—Si—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \text{ } \langle \text{C}_6\text{F}_5 \rangle \\ \end{array}$
CN, CPS, PCN, циано, цианопропил, нитрил	Может применяться как обращённо-фазовый или как нормально-фазовый материал. Будучи слегка полярной, эта фаза обладает отличной селективностью при разделении полярных соединений. Кроме того, она быстро уравнивается, что является ценным свойством при работе в режиме градиентного элюирования. Используется для анализа различных фармпрепаратов (например, антидепрессантов и пр.)	$\begin{array}{c} \\ \text{—Si—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN} \\ \end{array}$
NH₂, APS, амино, аминопропилсилил	Может использоваться для обращённо-фазовой, нормально-фазовой и ионообменной хроматографии (слабый анионообменник). В обращённо-фазовой хроматографии используется для разделения углеводов.	$\begin{array}{c} \\ \text{—Si—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \\ \end{array}$
ОН, Диол, глицерол	Может применяться как обращённо-фазовый или как нормально-фазовый материал. При работе в качестве обращённой фазы используется в гель-фильтрационной хроматографии (GFC) пептидов и белков.	$\begin{array}{c} \\ \text{—Si—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2 \\ \end{array}$

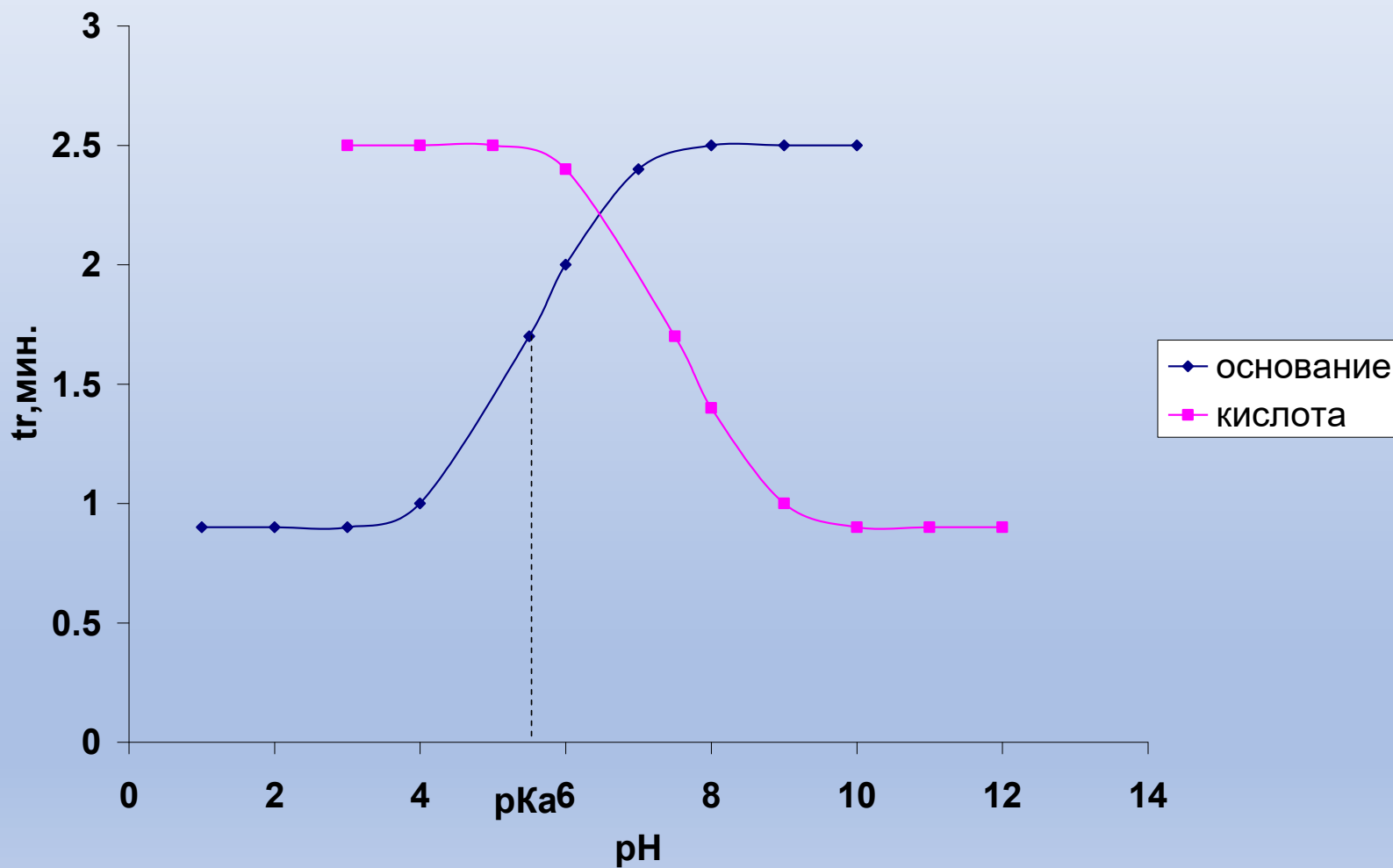
Влияние pH на удерживание кислот



Главное правило для ОФ ЖХ:

молекулярные формы аналитов удерживаются сильнее, чем ионные

Удерживание органических кислот и оснований от рН



В нормально-фазовой хроматографии обычно используют малополярные органические растворители (*гексан, циклогексан, гептан и др.*) с небольшими добавками полярных органических соединений, которые регулируют элюирующую силу подвижной фазы.

Для получения воспроизводимых результатов в нормально-фазовой хроматографии необходимо строго контролировать содержание воды в растворителях, используемых в подвижной фазе.

В обращенно-фазовой хроматографии используют водные подвижные фазы, содержащие или не содержащие органические растворители.

Органическими добавками обычно служат полярные органические растворители (*ацетонитрил и метанол*).

Для оптимизации разделения могут использоваться водные растворы с определенным значением pH, в частности буферные растворы, а также различные добавки в подвижную фазу: *фосфорная и уксусная кислоты при разделении соединений кислотного характера; аммиак и алифатические амины при разделении соединений основного характера, и другие модификаторы.*

Растворители

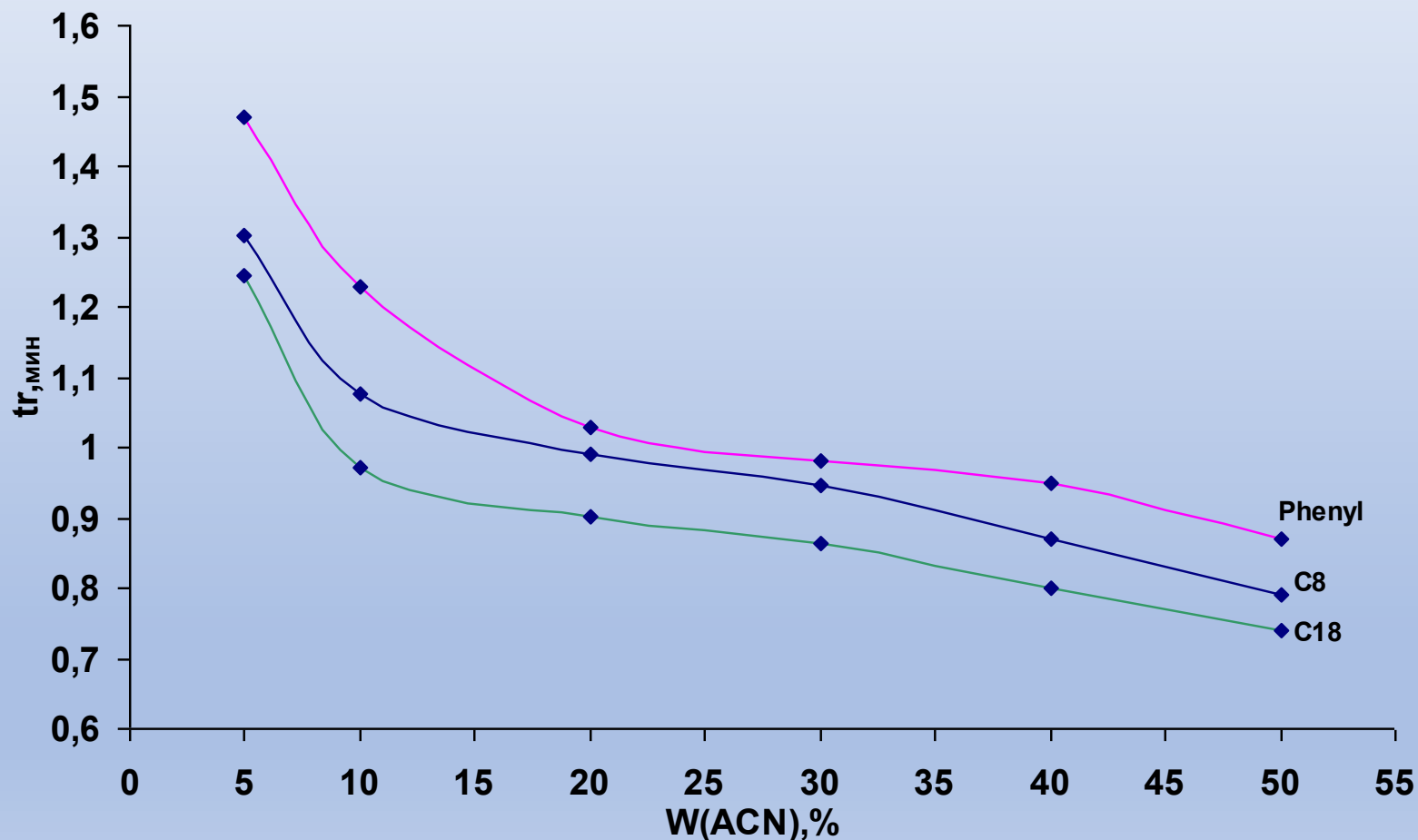
Растворитель	УФ отсечка, нм	Показатель преломления при 20°C	Вязкость, сР	Температура кипения, °С	Индекс полярности
п-пентан	190	1.3575	0.23	36.07	0.0
п-гексан	195	1.3749	0.31	68.7	0.1
циклогексан	200	1.4242	1.00	80.72	0.2
толуол	284	1.4969	0.59	110.62	2.4
МТБЭ	210	1.3689	0.27	55.2	2.5
метилен хлорид	233	1.4241	0.44	39.75	3.1
изопропанол	205	1.3772	2.40	82.26	3.9
тетрагидрофуран	212	1.4072	0.55	66.0	4.0
хлороформ	245	1.4458	0.57	61.15	4.1
этиацетат	256	1.3724	0.45	77.11	4.4
ацетон	330	1.3587	0.36	56.29	5.1
метанол	205	1.3284	0.55	64.7	5.1
ацетонитрил	190	1.3441	0.38	81.60	5.8
вода	190	1.3330	1.00	100.0	10.2

Обращённо-фазовая ВЭЖХ:

- а) неподвижная фаза очень неполярная;
- б) подвижная фаза относительно полярная (от воды до тетрагидрофурана);
- в) полярный растворитель, такой как вода, элюирует медленнее, чем менее полярный растворитель, такой как ацетонитрил.

Общее правило: неполярные соединения элюируются позже, чем полярные.

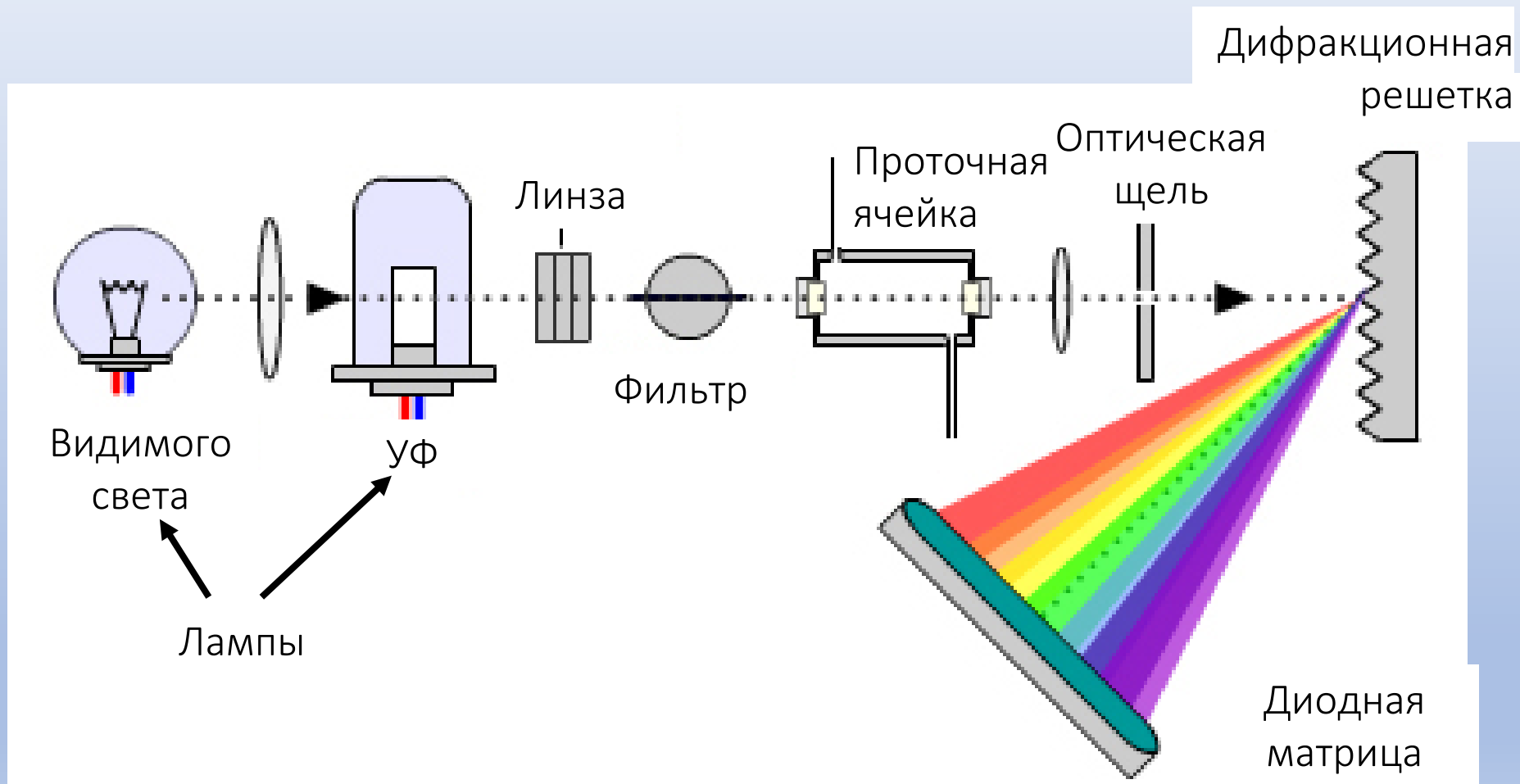
Удерживание полярного анализа обращенно-фазовыми стац. фазами



Основные детекторы

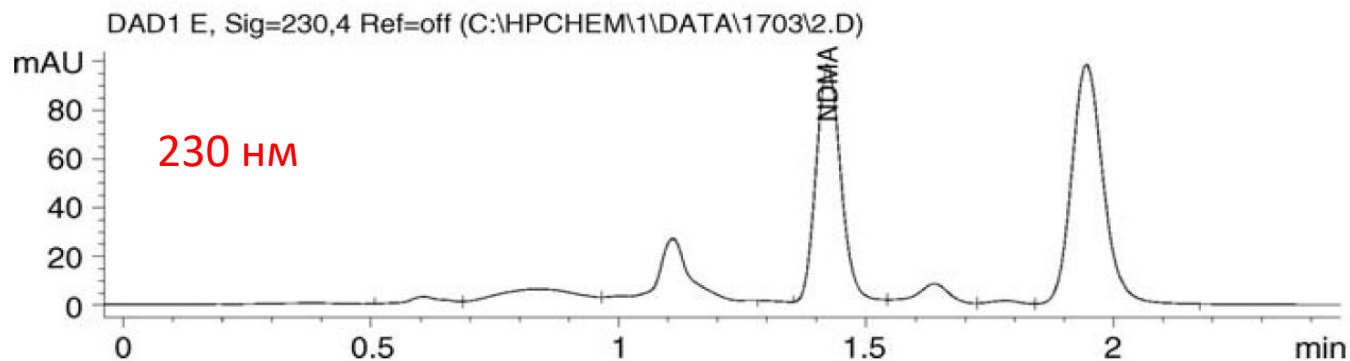
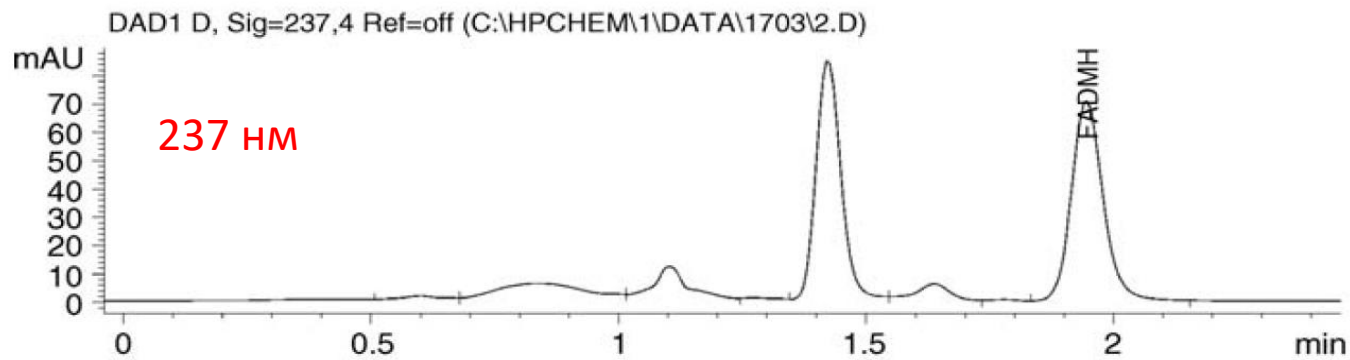
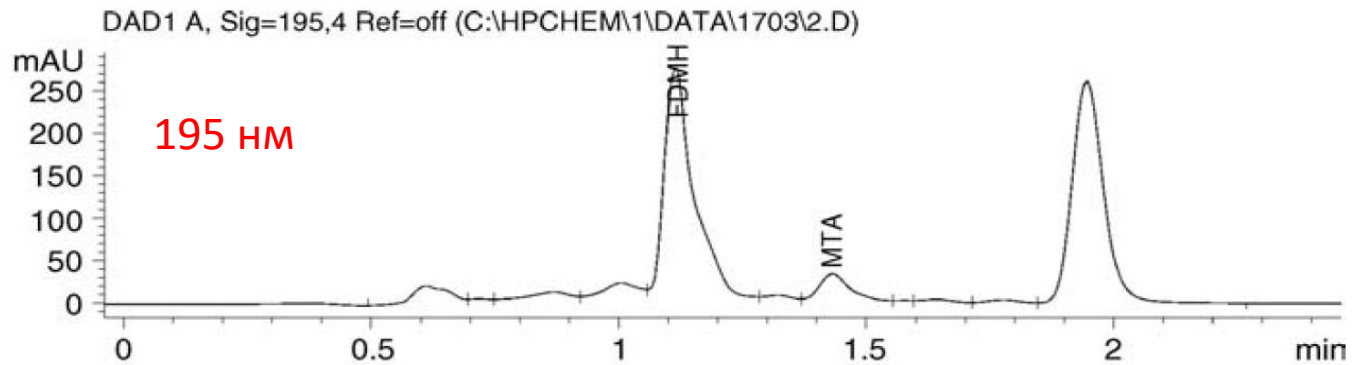
- **Спектрофотометрический и диодно-матричный**
- Флуоресцентный (*интенсивность флуоресценции*)
- Рефрактометрический (*показатель преломления*)
- Кондуктометрический (*электропроводность*)
- Амперометрический (*ток окисления или восстан.*)

Диодно-матричный детектор



Детектор регистрирует спектр поглощения в каждой точке хроматограммы и хроматограмму по множеству длин волн

Хроматограммы, полученные на диодно-матричном детекторе



Тест 1/5

Какой из типов ЖХ лучше всего подходит для определения сульфат-ионов в воде

- 1 – нормально-фазовая
- 2 – обращенно-фазовая
- 3 – ионная
- 4 – гель-фильтрационная

Тест 2/5

При каких рН лучше проводить разделение органических оснований?

1 – сильнокислых (<1)

2 – слабокислых (1-4)

3 – нейтральных (4-10)

4 – щелочных (>10)

Тест 3/5

Какой параметр обращенно-фазовой ЖХ более всего влияет на время удерживания средне и сильногидрофобных аналитов?

1 – полярность подвижной фазы

2 – рН подвижной фазы

3 – температура колонки

4 – состав стационарной фазы

Тест 4/5

Каким образом возможно уменьшить ширину пика аналита при сохранении эффективности удерживания методом ОФ ЖХ?

1 – увеличить скорость потока

2 – увеличить концентрацию ацетонитрила

3 – увеличить температуру

4 – уменьшить размер частиц стационарной фазы

Тест 5/5

Какой из методов способен обеспечить наибольшую эффективность разделения аналитов

1 – газовая хроматография

2 – жидкостная хроматография

3 – суперкритическая хроматография

4 – бумажная хроматография

Выводы (для СРМ)

- ❖ Какие виды жидкостной хроматографии вы знаете?
- ❖ Каковы преимущества методов жидкостной хроматографии?
- ❖ Каким образом проводят качественный и количественный анализ в ЖХ?



ВОПРОСЫ ???