

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

HPLC – high **performance** liquid chromatography

or

HPLC – high **pressure** liquid chromatography

or

HPLC – high **price** liquid chromatography



Это хроматография, в которой подвижная фаза - **жидкость**. Неподвижной фазой является **неорганический адсорбент** или **органическое твердое вещество**, ковалентно связанное с частицами сорбента в колонке.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

По сути -это изначально созданная колоночная жидкостная хроматография, в которой применение современного оборудования позволило достичь **высоких скоростей и высокой эффективности** разделения.

70-е гг. XX в. - гигантский прогресс в инструментальной базе явился основой для современной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Область применения ВЭЖХ

1. Углеводороды с различными заместителями:

Алканы и алкены, бензолы, многоядерные ароматические, гетероциклы

2. Биоорганические соединения:

Углеводы, сложные липиды, гормоны, органические кислоты, пептиды, витамины, пигменты, ПАВ

3. Биоорганические соединения: Белки, ДНК, РНК

4. Полимеры, их моно- и олигомеры

5. Ионы: неорганические и органические

Модели аналитических хроматографов для ВЭЖХ

Agilent 1200, США



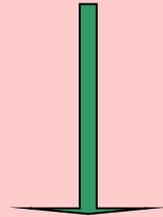
Alliance, Waters, США



МИЛИХРОМ А-02, Россия

Условия ВЭЖХ:

- «мягкий» температурный диапазон
- применение неразрушающих детекторов
- простота сбора вытекающей подвижной фазы



- развитие **препаративных** разделений в лабораториях для сбора очищенных веществ
- развитие **промышленных систем** для выделения и очистки веществ, используемых в практических целях

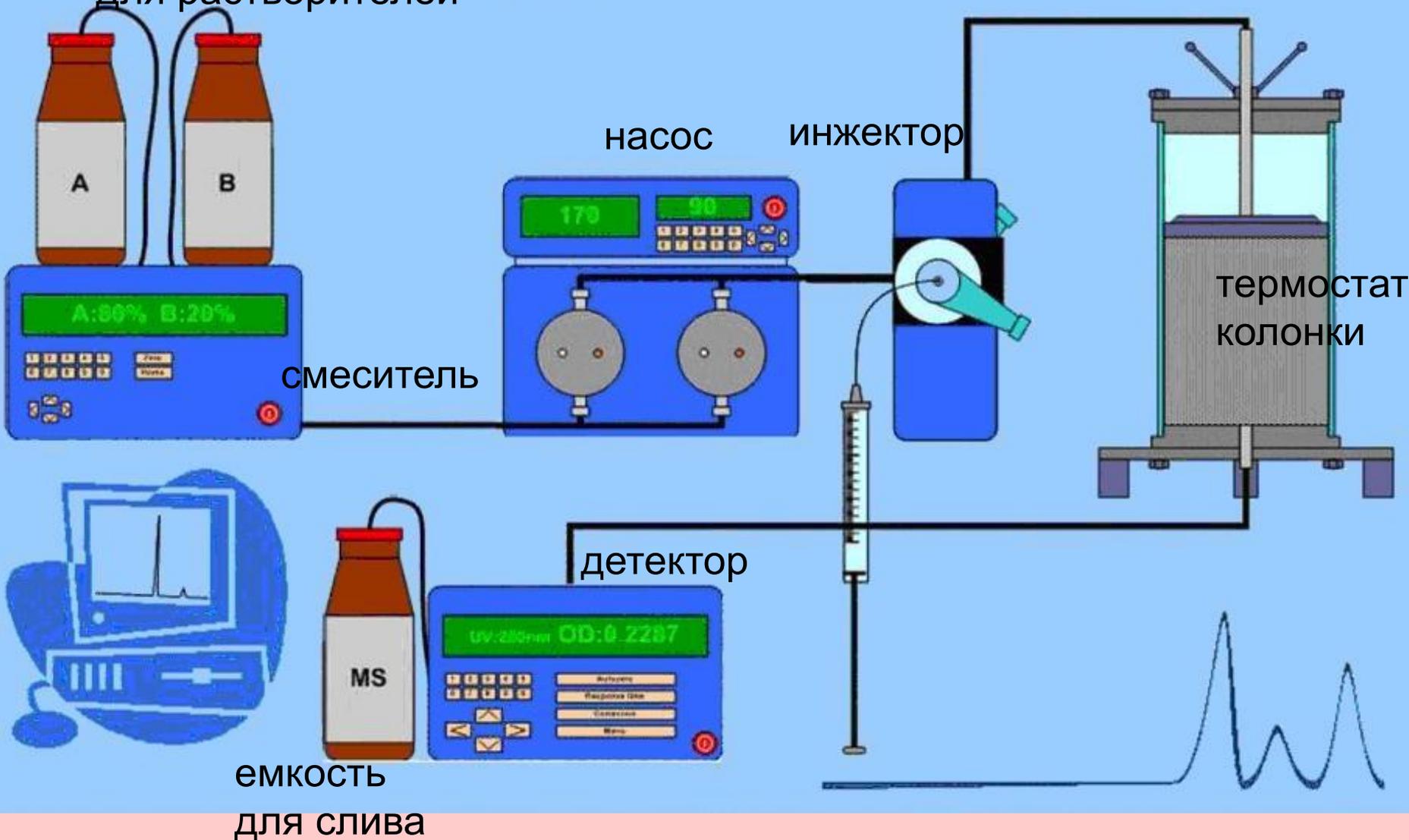
Препаративные хроматографы с коллекторами фракций



коллектор фракций

Схема хроматографов для ВЭЖХ

емкости
для растворителей



емкость
для слива

*Принцип «Подобное растворяется в подобном;
а разделяется противоположным» работает и в ВЭЖХ*

Адсорбция



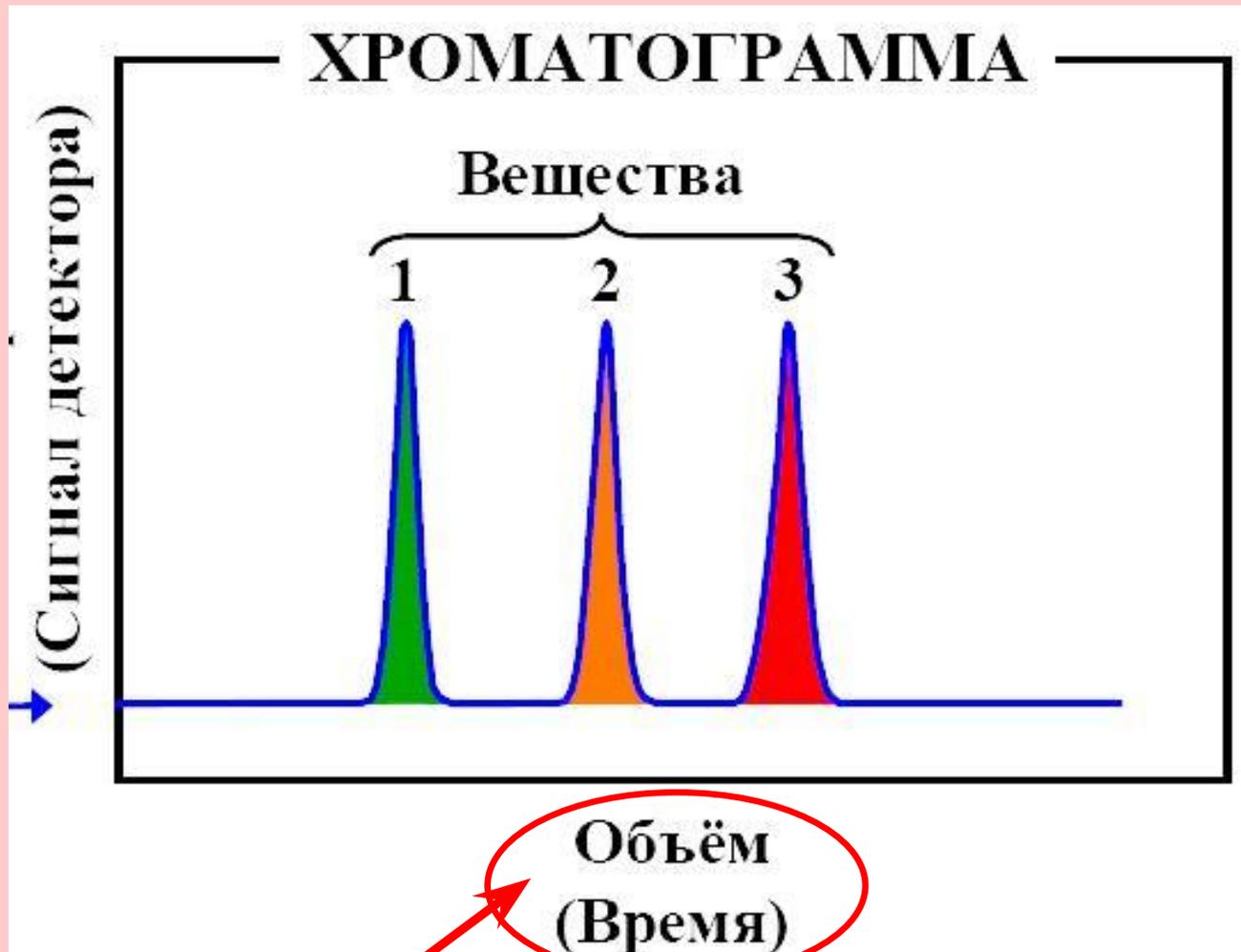
Элюция – процесс прохождения веществ через колонку с потоком подвижной фазы

Элюат – выходящий из колонки поток подвижной фазы с компонентами разделяемой смеси

Элюент – растворитель (или смесь), использующийся в качестве подвижной фазы

Элюирующая сила – способность подвижной фазы (смеси растворителей) десорбировать и вымывать компоненты пробы с сорбента данного типа

Элюотропный ряд – ряд, в котором растворители расположены в порядке возрастания элюирующей силы



Объем прошедшей подвижной фазы
при постоянной скорости потока

время удерживания ~ объем удерживания

Классификация жидкостной хроматографии

По характеристикам и взаимодействиям неподвижной фазы:

Нормально-фазовая

Обращенно-фазовая

Ионообменная

Эксклюзионная

Нормально-фазовая жидкостная хроматография:

неподвижная фаза – полярная,
подвижная фаза – неполярная.

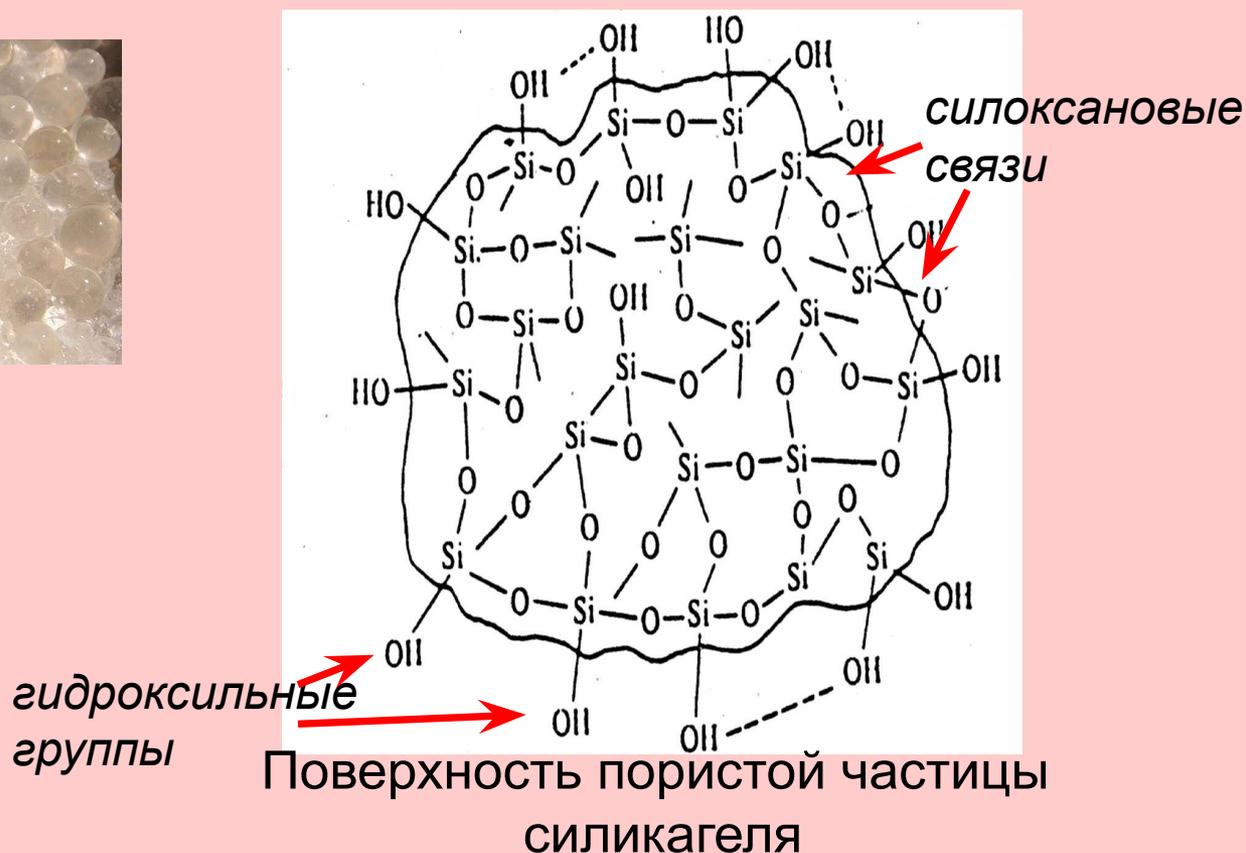
Неподвижные фазы:

силикагель и его модификации, оксид алюминия

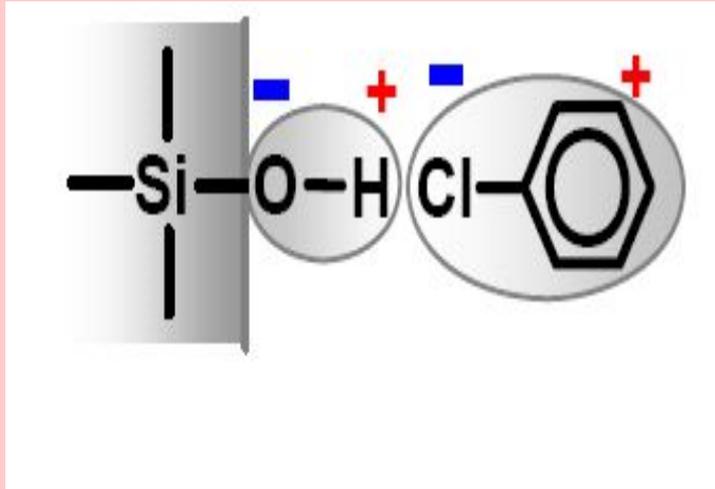


Элюенты:

углеводороды,
эфиры,
спирты и пр.



Нормально-фазовая жидкостная хроматография:



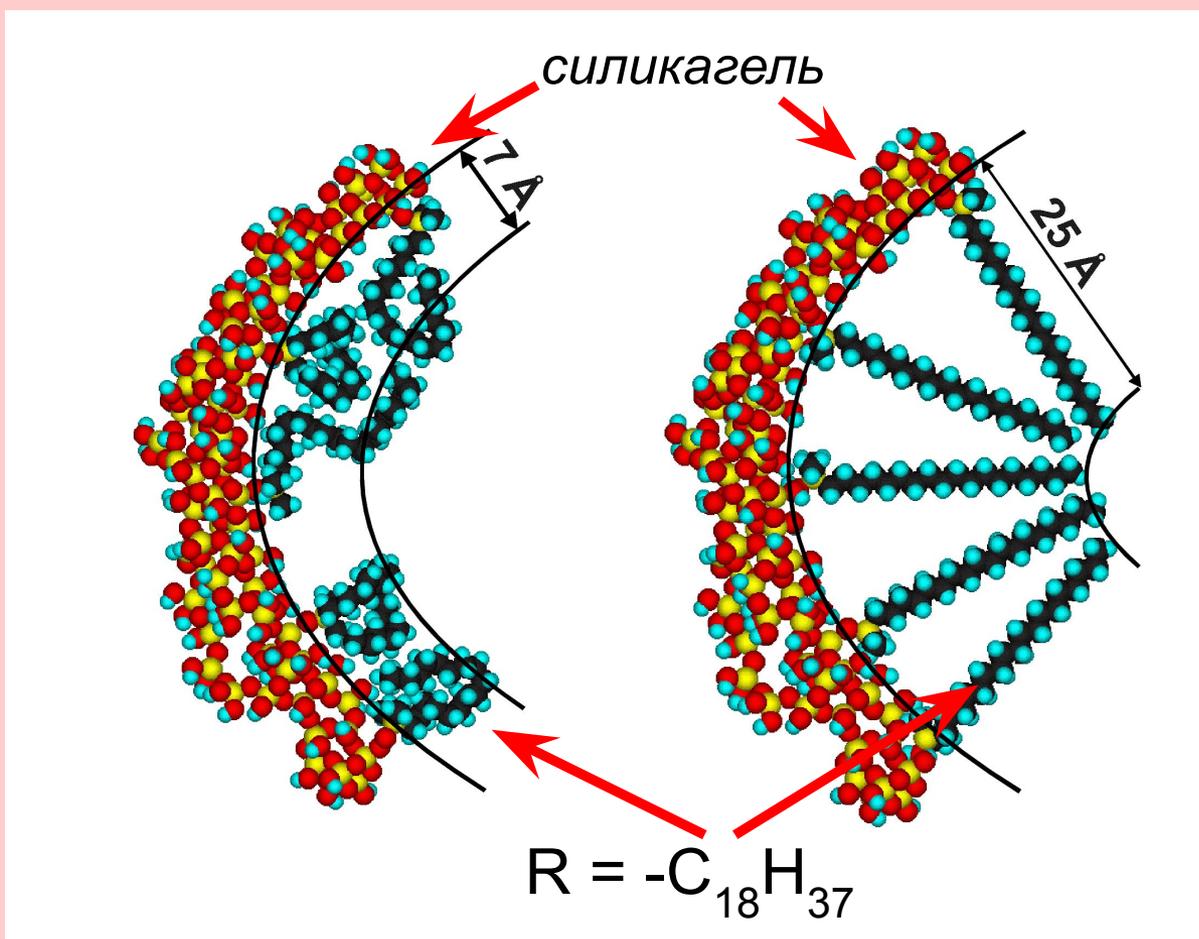
Взаимодействия
веществ и
неподвижной фазы

Разделение: мало- и нерастворимые в воде вещества,
позиционные изомеры углеводородов с заместителями

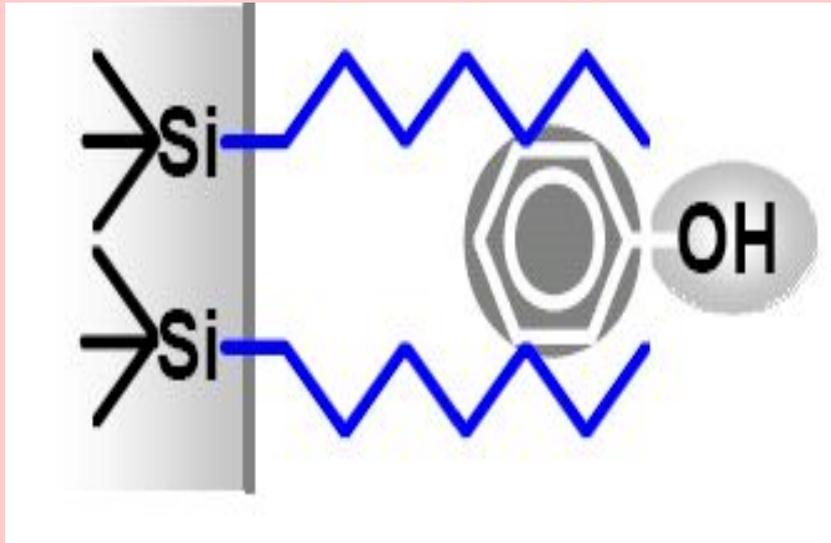
! *Практическое использование нормально-фазовой хроматографии затруднено из-за микроколичеств воды, содержащейся в растворителях, которая закрывает адсорбционные центры силикагеля, что ведет к значительному изменению хроматографических параметров.*

Обращенно-фазовая жидкостная хроматография

Неподвижные фазы: расположение привитых остатков на поверхности силикагеля



Обращенно-фазовая жидкостная хроматография



Взаимодействия
веществ и
неподвижной фазы

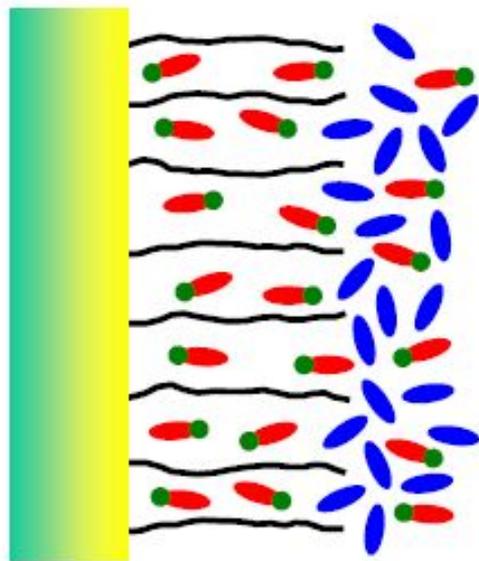
Разделение: нейтральные органические вещества, слабые кислоты, слабые основания и пр.

75 % от всех разделений ВЭЖХ – это
обращенно-фазовый тип

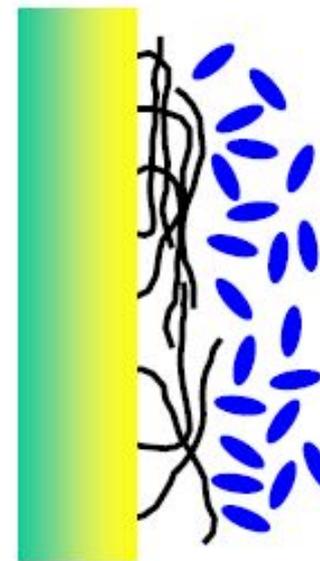
Обращенно-фазовая жидкостная хроматография

Коллапс обращенной фазы

Малое содержание
ВОДЫ



Высокое содержание
ВОДЫ

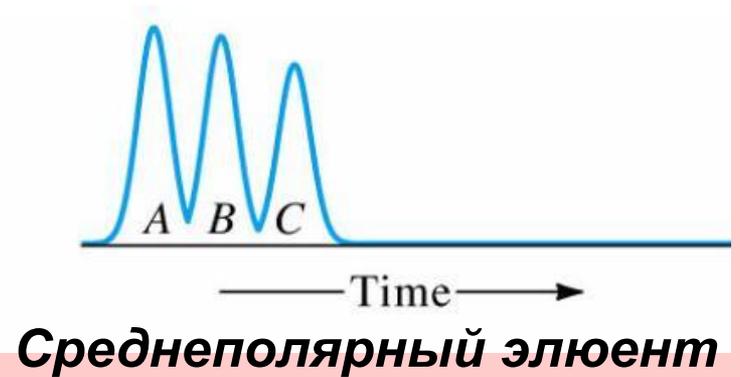
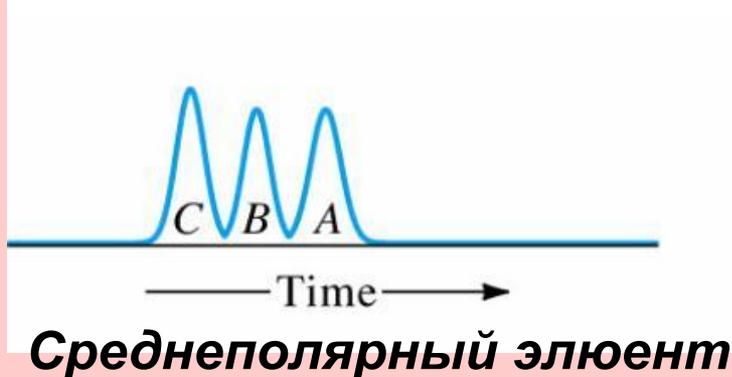
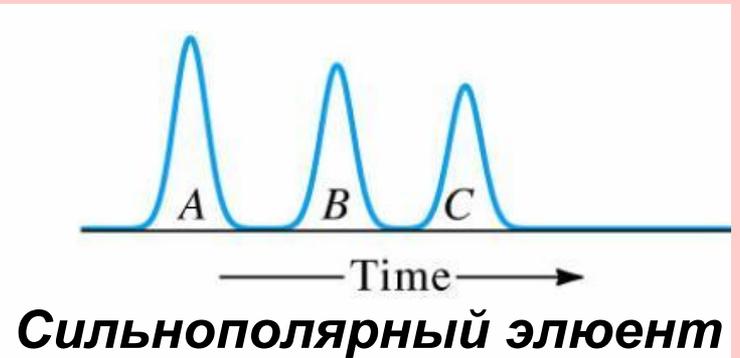
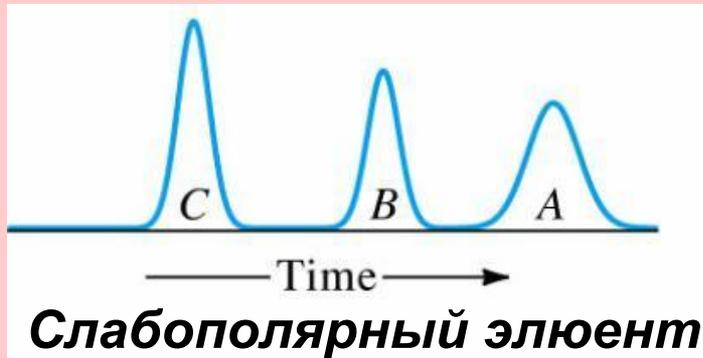


● - Вода ● - Метанол

Выход веществ с разной полярностью на разных неподвижных фазах

Нормальная фаза

Обращенная фаза

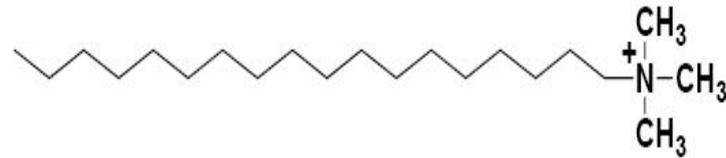
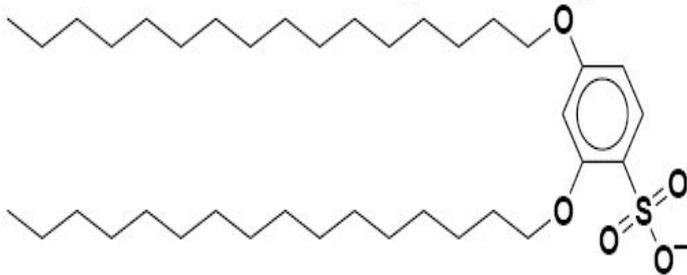


Полярность веществ: $A > B > C$

Ионообменная хроматография

Неподвижная фаза (ионообменные смолы) имеет заряженные функциональные группы, которые взаимодействуют с анализируемыми ионизированными молекулами противоположного заряда. Группы привиты на полимер или силикагель.

модификаторы обращенной фазы:

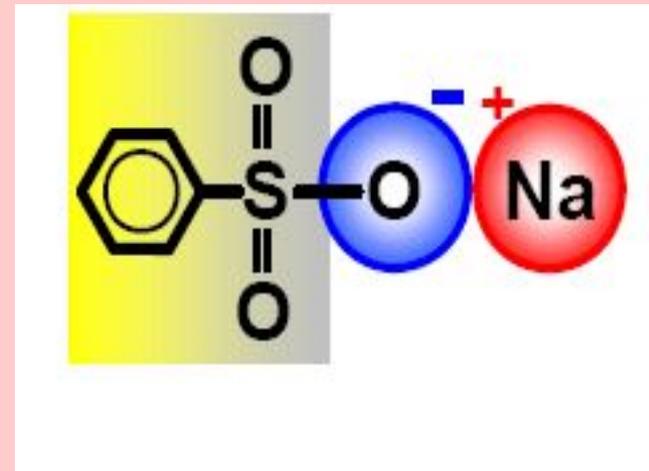


Катионит: делит катионы

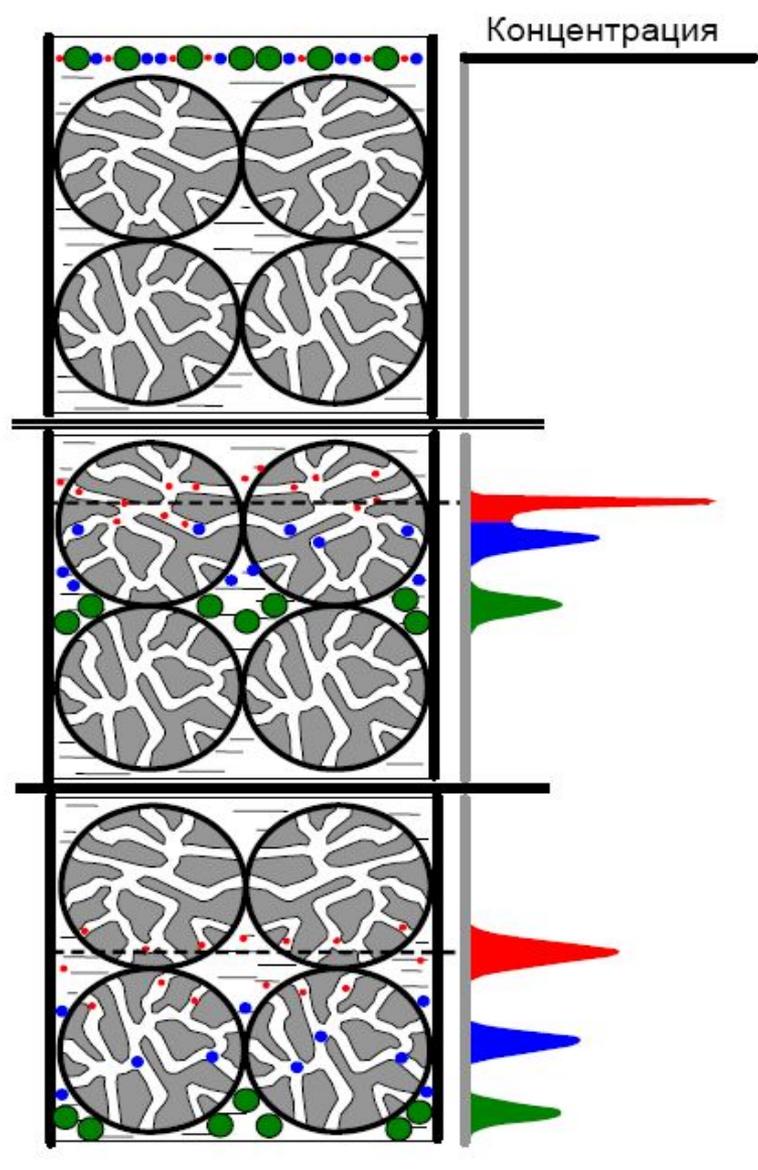
Анионит: делит анионы

Элюенты: водные растворы солей, кислот, щелочей

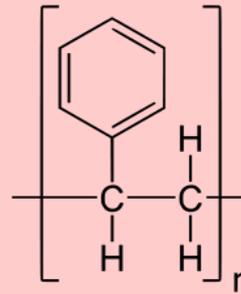
Пример разделения: аминокислоты



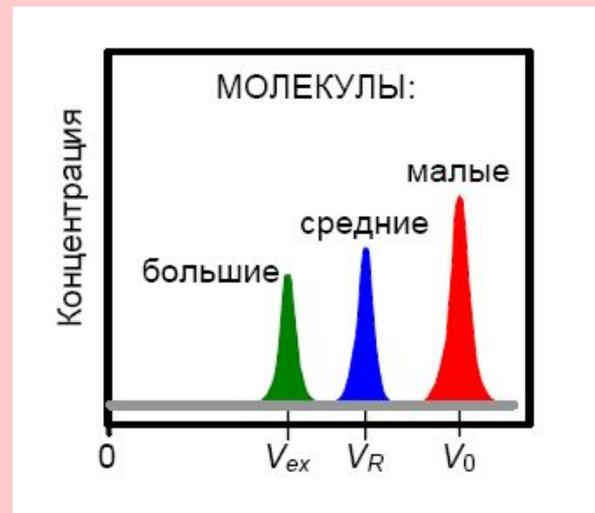
Эксклюзионная или гель-проникающая хроматография



Неподвижные фазы имеют выраженную поровую систему: макропористые стекла, полистирол



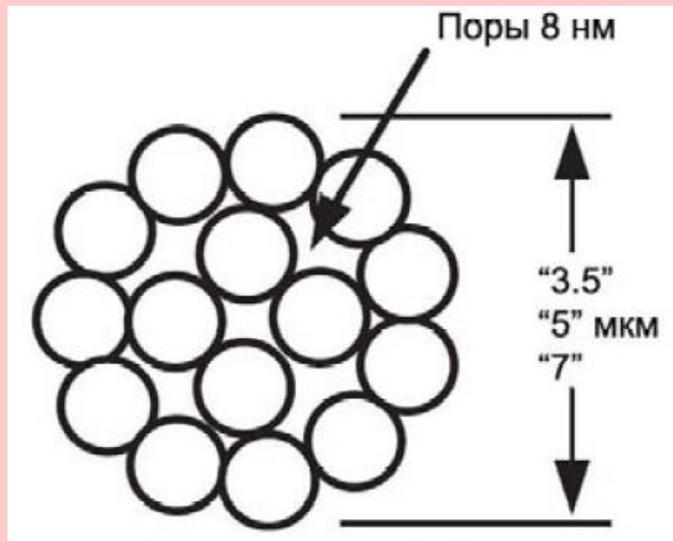
Звено полистирола
(поливинилбензола)



Применение: анализ полимеров
по молекулярному весу молекул

КОЛОНКА – «СЕРДЦЕ» ХРОМАТОГРАФА

Успех разделения в ВЭЖХ во многом зависит от типа частиц и качества их упаковки им колонки.



«Идеальная» частица адсорбента с порами

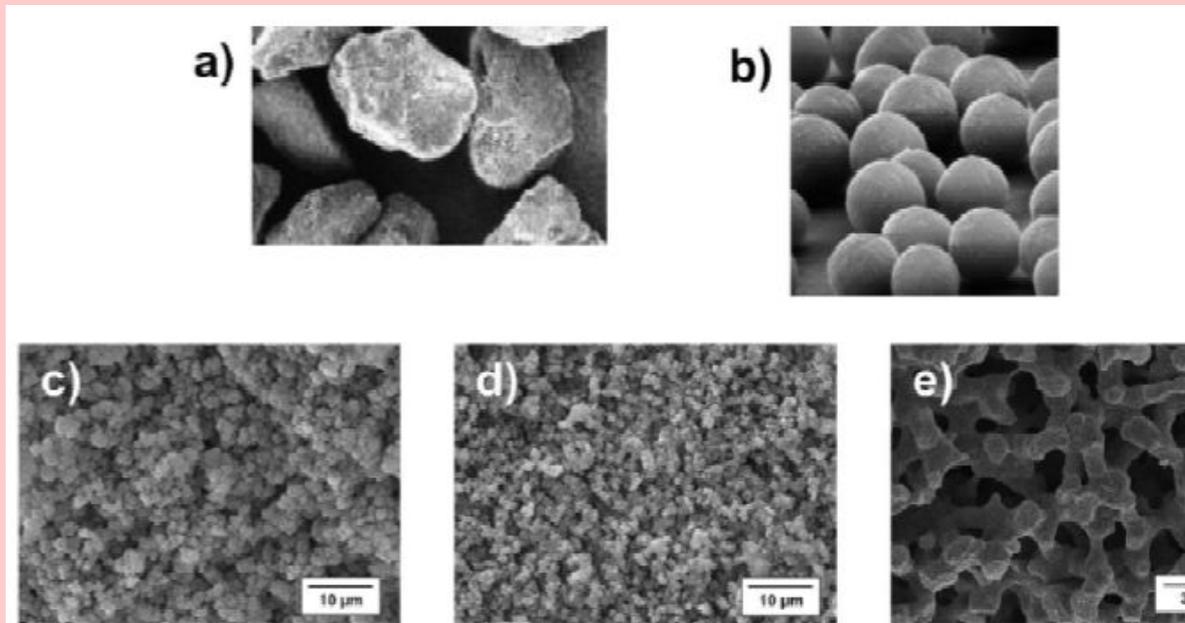
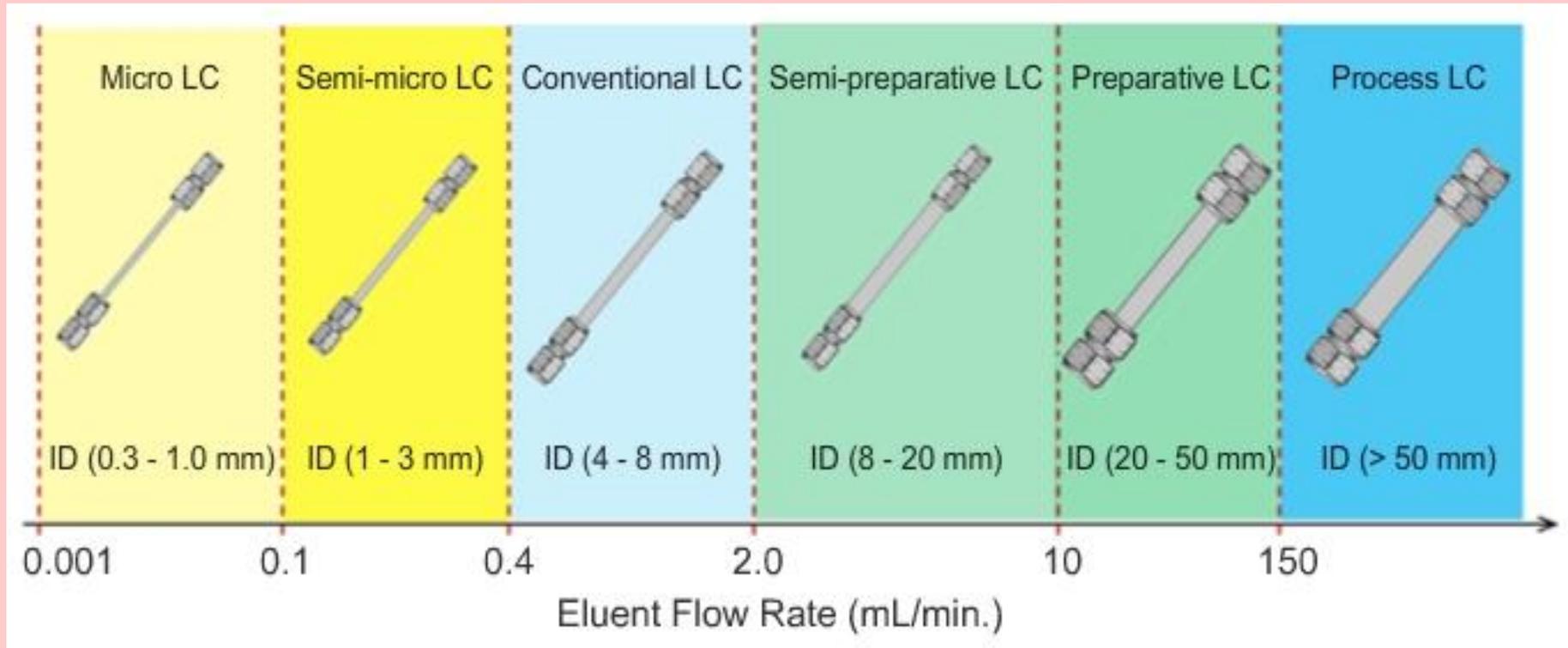


Fig. 1. Scanning electron microscopy pictures of different types of porous chromatographic materials. (a) Irregularly-shaped silica particles, (b) spherical silica particles, (c) organic polymer monolith A (UNO S), (d) organic polymer monolith B (CIM Disk), and (e) organic polymer monolith C (Chromolith).

Реальные частицы адсорбента,
заполняющие колонку

Колонки для ВЭЖХ



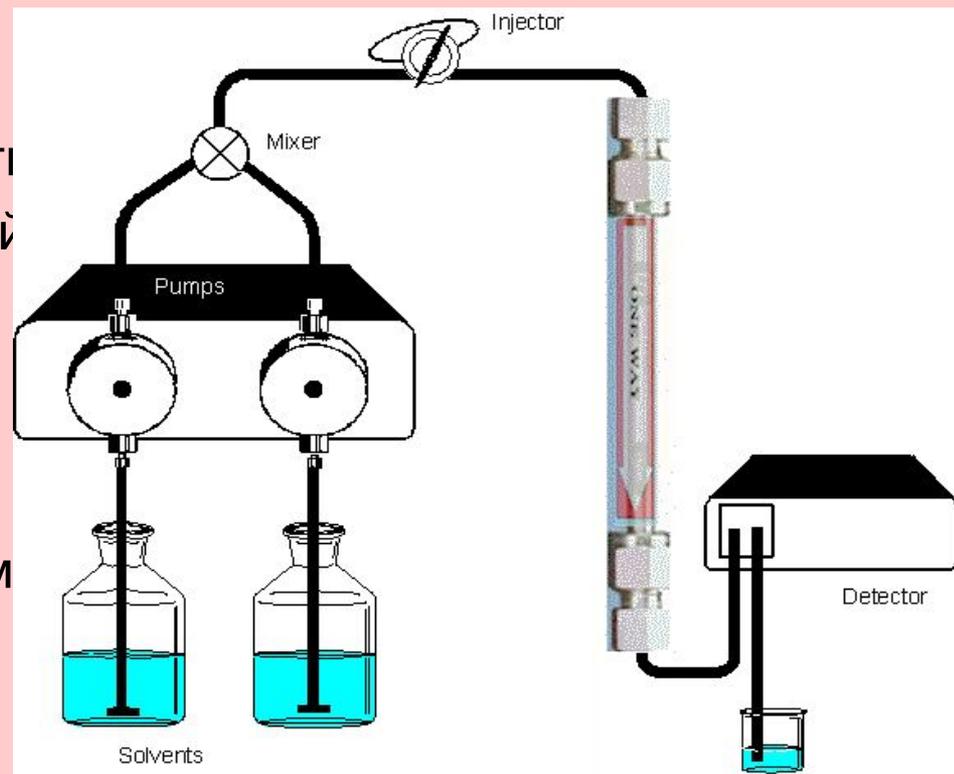
Колонки для аналитических разделений

Длина	5 – 30 см
Вн.диаметр	2- 8 мм
Размер частиц	3 – 10 ± 1 мкм
Число т.т.	5000 - 12000

Колонки для ВЭЖХ



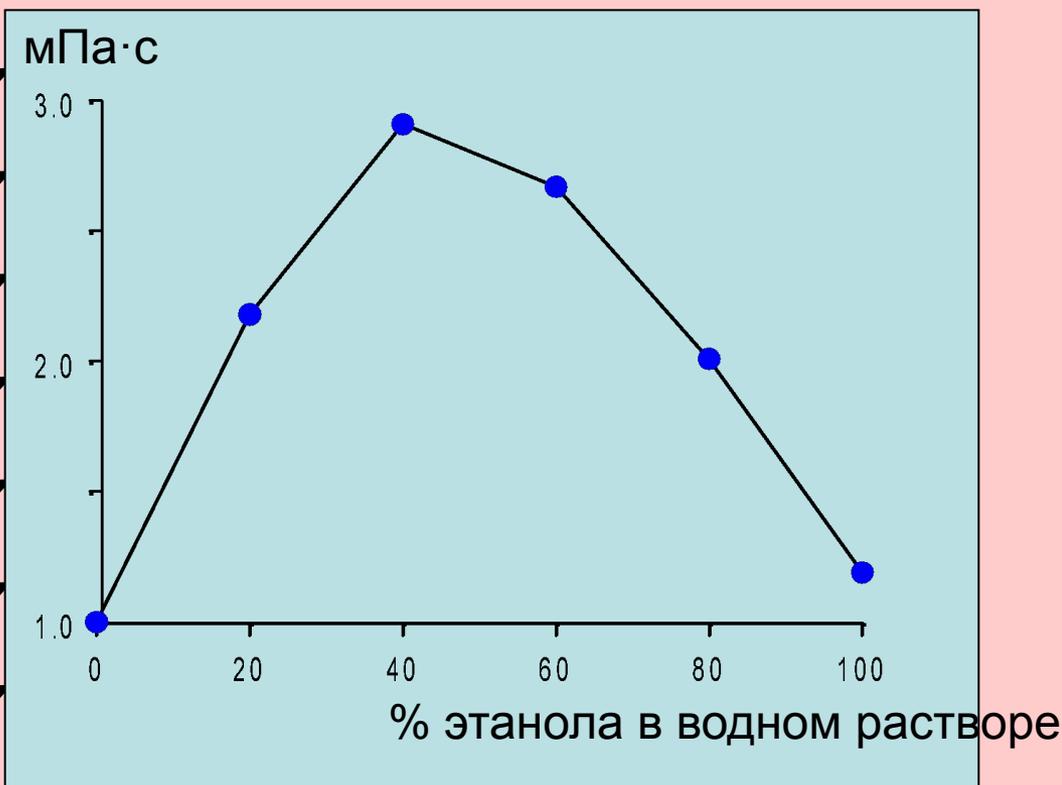
- Имеют указатель направления потока, который не следует менять
- Внутренняя поверхность – гладкий металл, давление до 300 атм.
- Плавный переход от большего внутреннего диаметра к малому внешнему диаметру (под штуцер)
- Фильтры с диаметром пор 2-5 мкм на входе и выходе
- Возможно использование предколонки меньшей длины



Выбор состава элюента:

свойства разделяемых веществ,
свойства неподвижной фазы

У элюентов важны свойства:



Вязкость жидкостей
при 25 °С, [мПа·с]

<u>ацетон</u>	0.31
<u>бензол</u>	0.60
<u>кровь</u> (при 37 °С)	3–4
<u>касторовое масло</u>	985
<u>этиловый спирт</u>	1.07
<u>этиленгликоль</u>	16.1
<u>глицерин</u> (при 20 °С)	1490
<u>мазут</u>	2022
<u>ртуть</u>	1.53
<u>метиловый спирт</u>	0.54
<u>жидкий азот</u> (при 77К)	0.16
<u>пропанол</u>	1.95
<u>оливковое масло</u>	81
<u>серная кислота</u>	24.2
<u>вода</u>	0.89

Свойства элюентов: смешиваемость

■ Не смешиваются
□ Смешиваются

Название	Уксусная	Ацетон	Ацетонитрил	Бензол	Бутанол	Тетрахлорид углерода	Хлороформ	Циклогексан	Циклопентан	Дихлорэтан	Дихлорметан	Диметилформаид	Диметил сульфоксид	Диоксан	Этил ацетат	Этанол	Диэтиловый эфир	Гептан	Гексан	Метанол	Метилэтил кетон	Изооктан	Пентан	Изопропанол	Дипропиловый эфир	Тетрахлорэтан	Тetraгидрофуран	Толуол	Трихлорэтан	Вода	Ксилол		
Уксусная																																	
Ацетон																																	
Ацетонитрил																																	
Бензол																																	
Бутанол																																	
Тетрахлорид углерода																																	
Хлороформ																																	
Циклогексан																																	
Циклопентан																																	
Дихлорэтан																																	
Дихлорметан																																	
Диметилформаид																																	
Диметил сульфоксид																																	
Диоксан																																	
Этил ацетат																																	
Этанол																																	
Диэтиловый эфир																																	
Гептан																																	
Гексан																																	
Метанол																																	
Метилэтил кетон																																	
Изооктан																																	
Пентан																																	
Изопропанол																																	
Дипропиловый эфир																																	
Тетрахлорэтан																																	
Tetraгидрофуран																																	
Толуол																																	
Трихлорэтан																																	
Вода																																	
Ксилол																																	

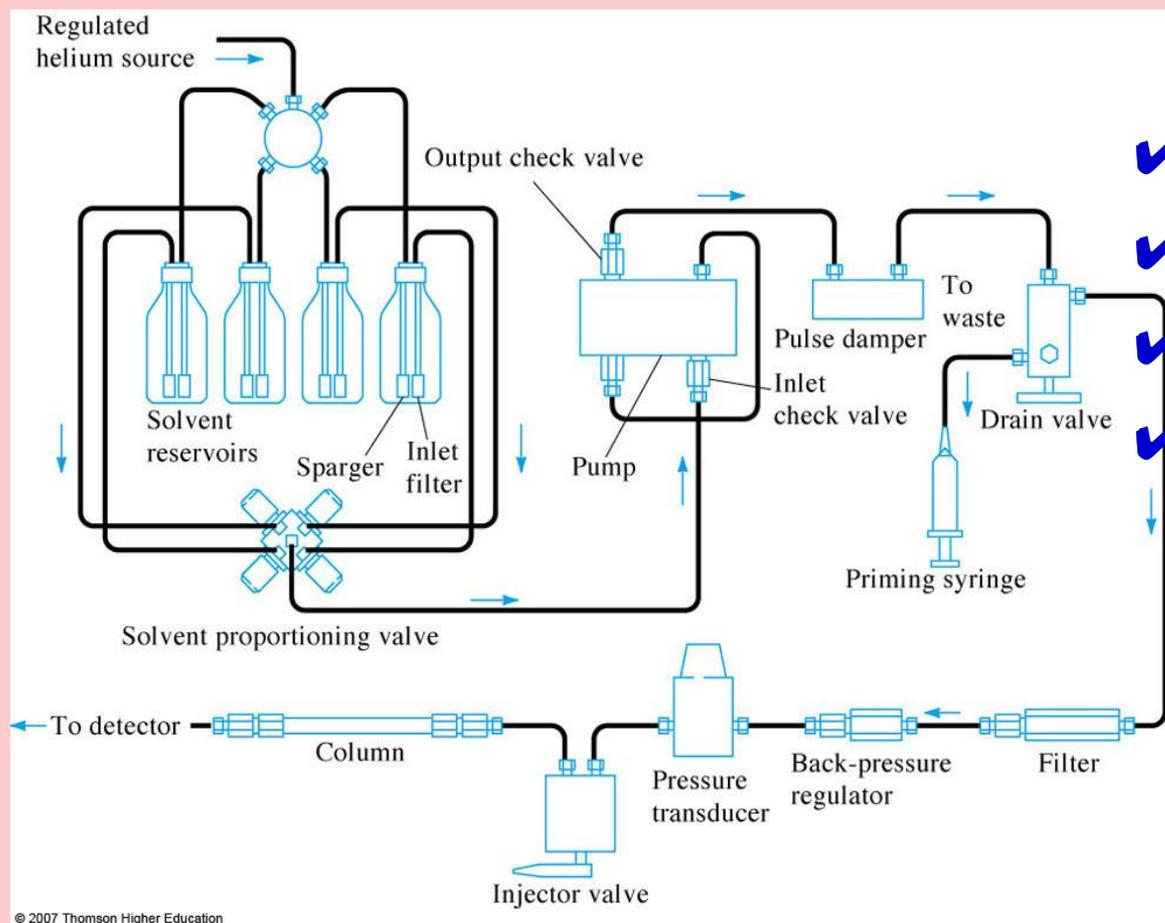
Изопропанол – хороший промежуточный растворитель

Свойства элюентов: элюирующая сила

Элюирующая сила – способность элюента вытеснять адсорбированные анализируемые вещества в поверхности адсорбента, ϵ

Растворитель	ϵ , для силикагеля
Гексан C_6H_{14}	0.01
Бензол C_6H_6	0.10
Бутилхлорид $CH_3-CH_2-CH_2-CH_2-Cl$	0.20
Хлороформ CH_3Cl	0.26
Дихлорметан CH_2Cl_2	0.32
Изопропиловый эфир $C_3H_7-O-C_3H_7$	0.34
Этилацетат $CH_3-COO-C_2H_5$	0.38
Тetraгидрофуран	0.44
Ацетонитрил CH_3-CN	0.50
Метанол CH_3-OH	0.70

Компоненты ВЭЖХ прибора: Система подачи элюентов

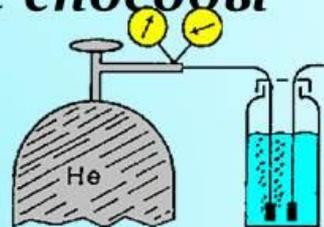


- ✓ Фильтрация
- ✓ Дегазация
- ✓ Смешивание
- ✓ Контроль давления (50-200 атм)

Система дегазации растворителя

Функция – удаление растворенного воздуха - пузырьков.

- **Растворенные газы в подвижной фазе могут:**
 - Привести к возникновению «воздушных затворов» в кранах и клапанах насоса.
 - Вызвать возникновение ложных пиков при прохождении через ячейку детектора.
- **Наиболее часто используемые способы дегазации:**
 - Пропускание гелия (удаляет 80% растворенного воздуха).
 - Вакуумная дегазация (удаляет около 60 % воздуха)
 - Часто эти два способа используют поочередно.



Насосы

Назначение: Подача подвижной фазы

Требования к насосам:



- Генерация давления до 15 МПа
- Слабые остаточные пульсации
- Химическая стойкость
- Обеспечение скорости потока от 0,1 до 10 мл/мин
- Точный контроль скорости потока

Типы насосов:

- Шприцевые
- Пневматические
- Плунжерные возвратно-поступательные

Шприцевые насосы

Преимущества:

- Простой
- Недорогой
- Отсутствие пульсаций потока

Недостатки:

- Ограниченный объем шприца
- Невозможность создания градиента растворителя
- Большой расход времени и растворителя на промывку при смене растворителя



Низкие скорости потока
1-10 мл/мин

Плунжерные возвратно-поступательные насосы

Это 90 % от всей массы насосов в ВЭЖХ

Наиболее часто используется насос с двойным ходом поршня.

Преимущества:

- Маленький внутренний объем (35-400 мл)
- Высокое давление на выходе (300-500 атм.)
- Пригодны для градиентного элюирования

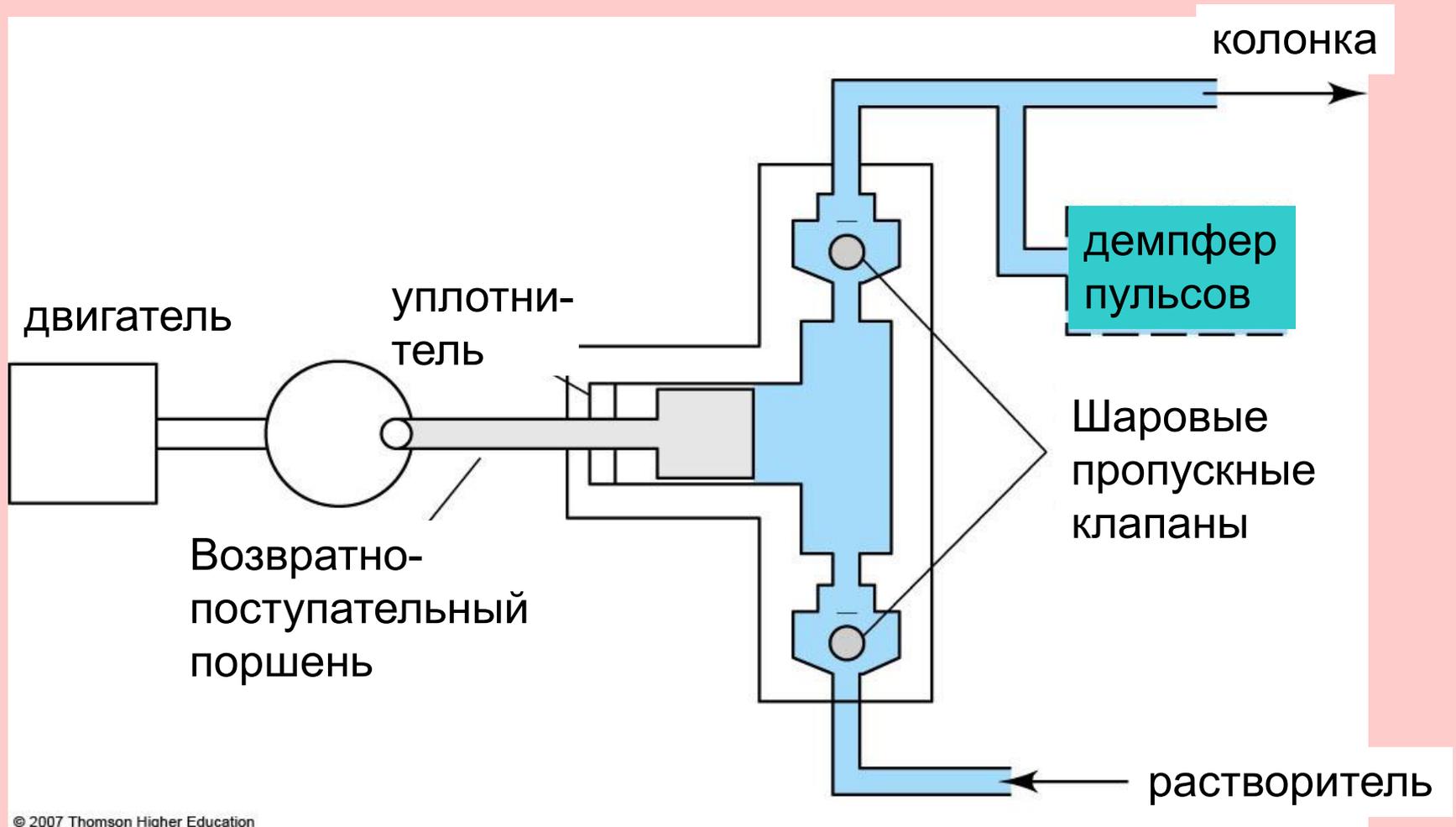
Недостатки:

- Создают пульсацию потока
- Дорогие

Способы борьбы с пульсацией

- Введение специальных узлов – гасителей пульсаций
- Совершенствование конструкций насосов.

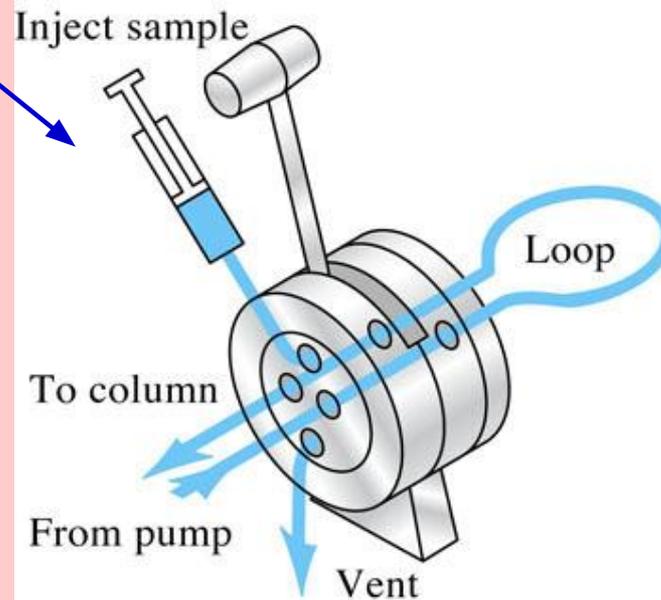
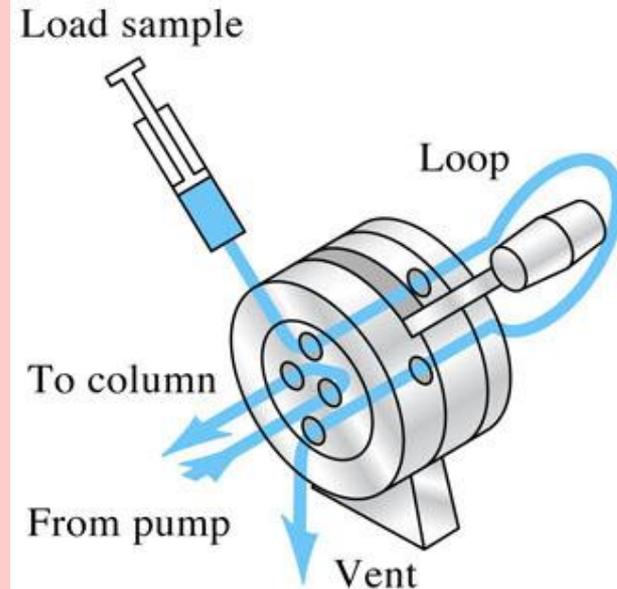
Схема плунжерного насоса возвратно-поступательного типа



- Содержат 1-3 головки, чем больше, тем лучше

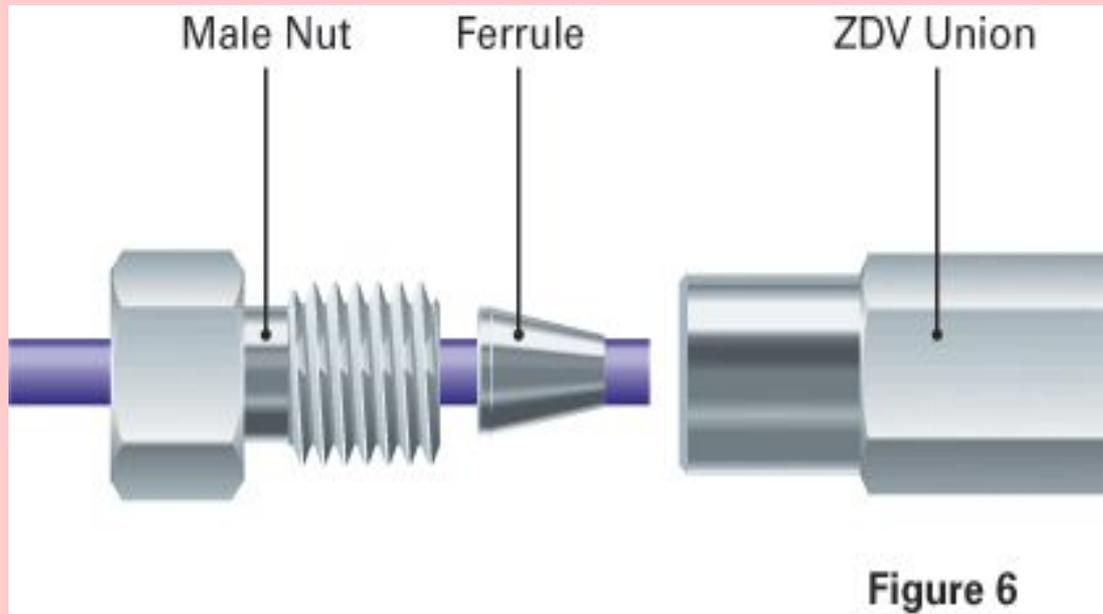
Система дозирования проб

- ✓ Петля объемом 5-100 мкл, 6-ходовый кран
- ✓ Шприцевого типа



Соединения в ВЭЖХ

Важно! Отсутствие течи дает постоянное давление и скорость потока, как следствие эффективное разделение



Перетягивание также нежелательно, так как ведет к выходу из строя уплотнителей

ДЕТЕКТОР – «ГЛАЗА» ХРОМАТОГРАФА

В ВЭЖХ - это преобразователь концентрации анализируемого вещества, растворенного в подвижной фазе, в электрический сигнал, по изменению физических свойств жидкости

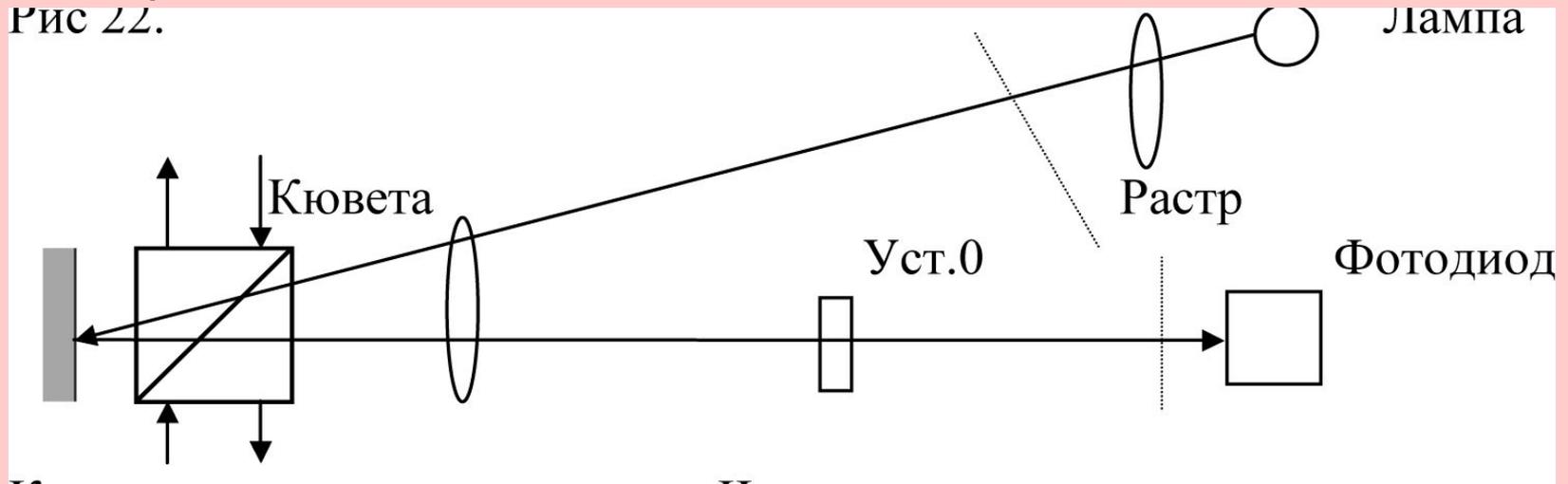
Детектор	Измеряемое физическое свойство	Чувствительность, г	Селективность
Спектрофотометрический	Оптическая плотность на определенной длине волны (фильтр или монохроматор)	10^{-9}	Высокая
Рефрактометрический	Разность показателя преломления	10^{-6}	Низкая
Флуориметрический	Излучение света на определенной длине волны	10^{-11}	Очень высокая
Амперометрический	Ток окисления или восстановления	$10^{-9} - 10^{-11}$	Очень высокая
Кондуктометрический	Электропроводность элюента	10^{-10}	Низкая
Масс-спектрометрический	Ионный поток, возникающий при различных энергетических воздействиях	10^{-9}	Средняя

Рефрактометрический детектор

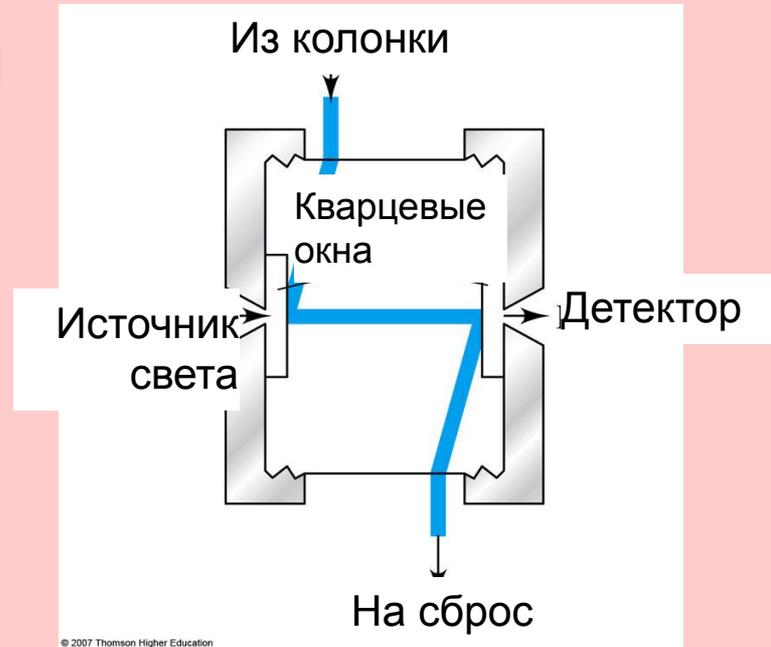
Достоинства:

- ✓ Универсальность
- ✓ Простота
- ✓ Дешевизна
- ✓ Применимость для неокрашенных веществ

Рис 22.



Спектрофотометрический детектор – регистрирует изменение интенсивности падающего на кювету света при прохождении через нее элюата.



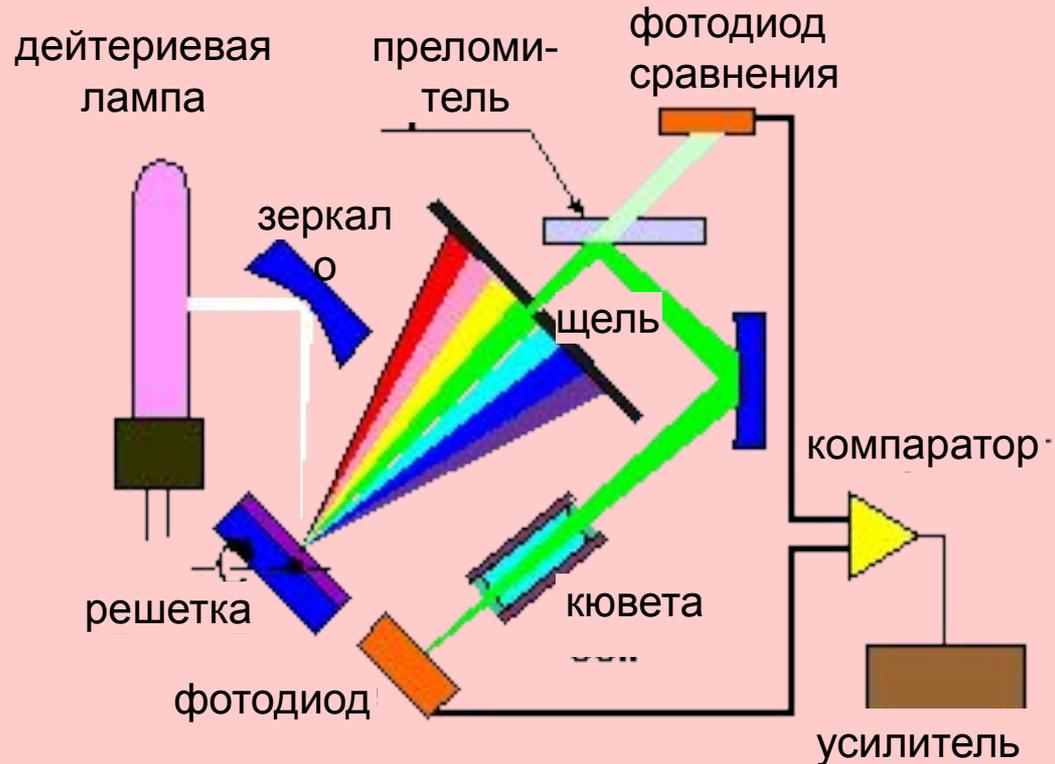
Достоинства

- ✓ Универсальный (возможен анализ практически всех групп веществ)
- ✓ Неразрушающий вид детектирования
- ✓ Прост в аппаратном оформлении
- ✓ Доступен для большинства лабораторий
- ✓ Обладает достаточно высокой чувствительностью (до 10^{-12} г в пробе)

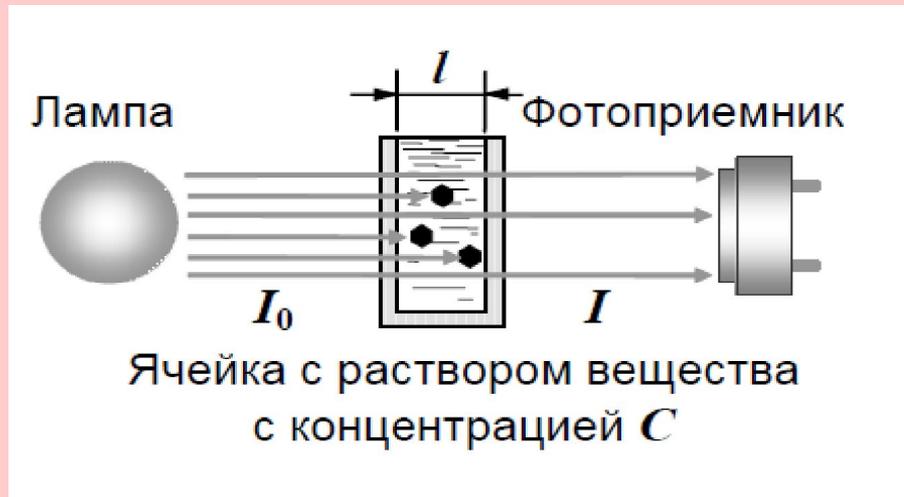
Объем кюветы 1-10 мкл

Типы фотометрических детекторов:

- ✓ Фотометры с набором светофильтров на несколько длин волн;
- ✓ Спектрофотометры с фиксируемой для всего анализа длиной волны – любой из полного диапазона;
- ✓ Спектрофотометры с возможностью переключения длины волны на разных участках хроматограммы;
- ✓ Сканирующие спектрофотометры с циклическим переключением нескольких длин волн в процессе и с возможностью записи спектра при остановке потока.



СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВЭЖХ



Закон Бугера-Ламберта-Бера

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot C \cdot l}$$

Монохроматический свет (световые колебания одной частоты) от источника (лампа) интенсивностью I_0 падает на кювету длиной l (оптический путь). Кювета заполнена раствором вещества с концентрацией C . Вещество способно поглощать излучение. Из кюветы выходит ослабленный световой пучок интенсивностью I .

ε_λ - коэффициент экстинкции (мера способности поглощения данного монохроматического излучения).

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВЭЖХ

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot C \cdot l}$$

Пропускание света
(100 \Rightarrow 0%)

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$$

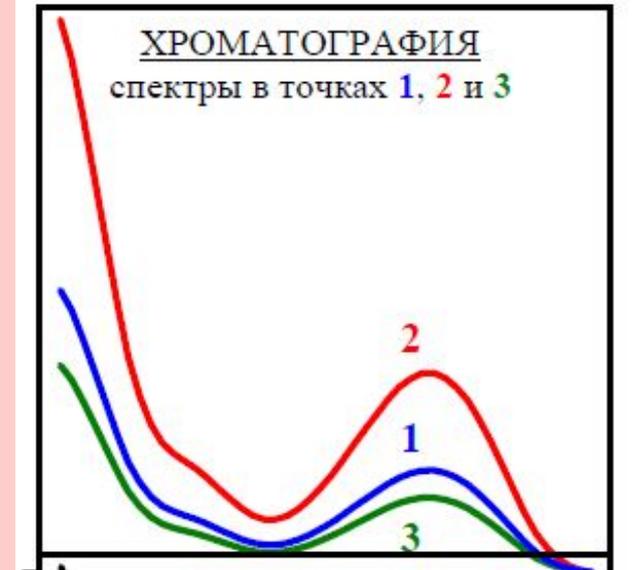
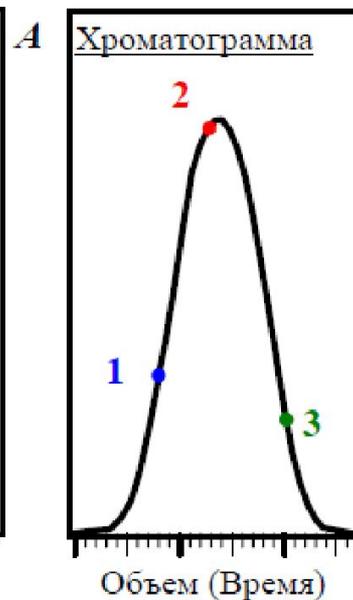
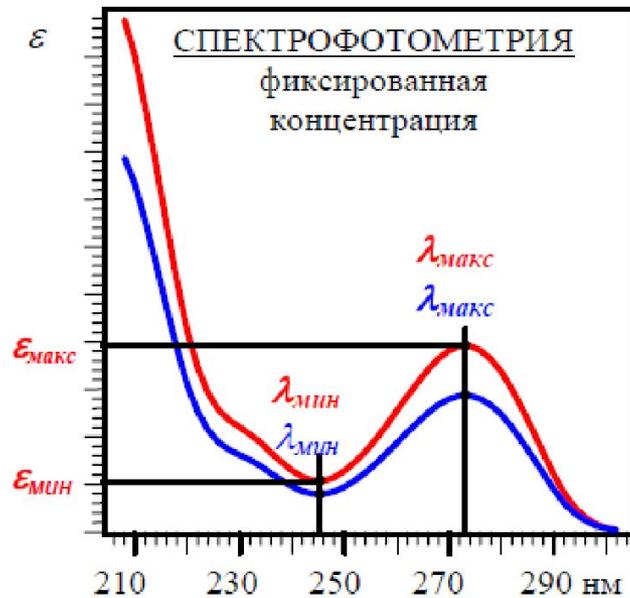
Поглощение света
(0 \Rightarrow ∞)

$$A_\lambda = -\log T = \varepsilon_\lambda \cdot C \cdot l$$

Поглощение раствора вещества при длине волны λ
прямо пропорционально концентрации вещества

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВЭЖХ

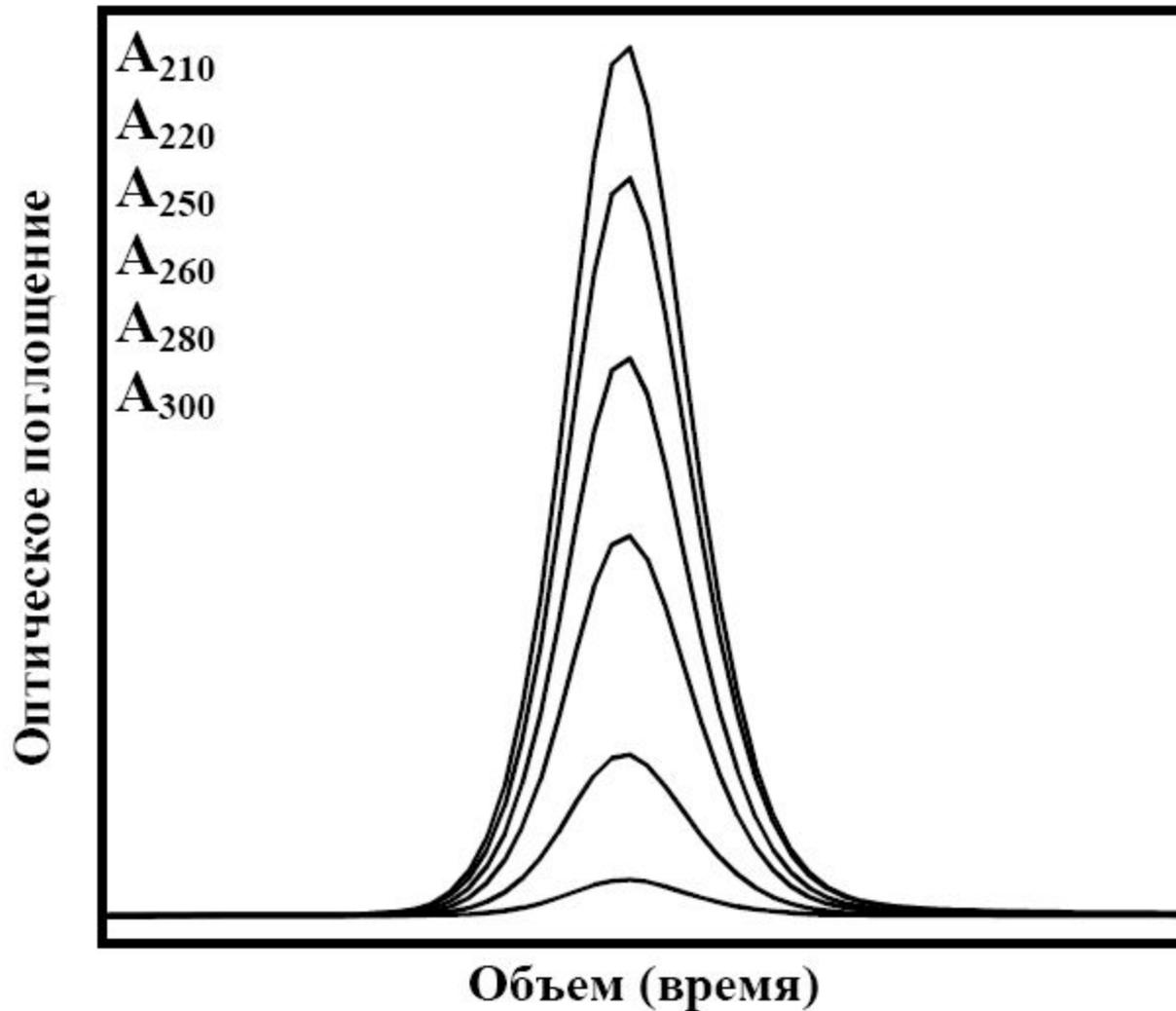
СРАВНЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ



$$R = \frac{A_{\lambda}}{A_0} = \frac{\epsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l}{\epsilon_0 \cdot C \cdot l} = \frac{\epsilon_{\lambda}}{\epsilon_0} = \text{const}$$

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВЭЖХ

МНГОВОЛНОВОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

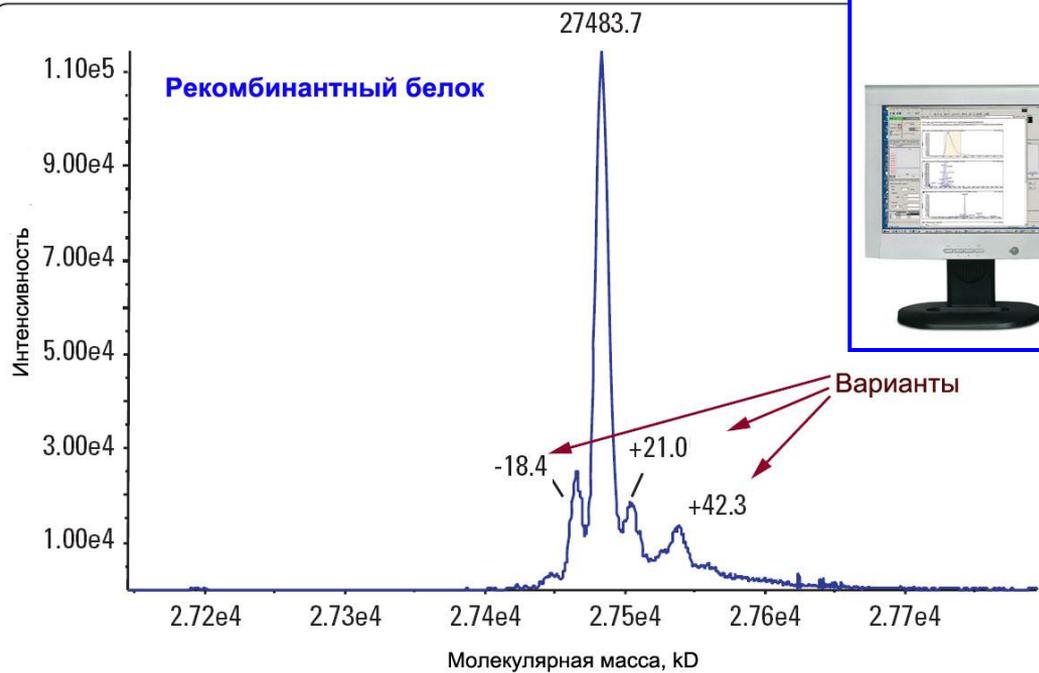


$$R = \frac{S_{\lambda}}{S_0} = \text{const}$$

Масс-спектрометрический детектор в ВЭЖХ



**Времяпролетный
масс-спектрометр**



Подготовка биологических образцов для хроматографических анализов

Биологические пробы часто не подходят для прямого анализа приборной хроматографией !



- Низкие концентрации определяемых веществ;
- Многокомпонентная матрица, мешающая разделению;
- Матрица вредна или несовместима с хроматографической колонкой;
- Интересующие вещества нелетучи либо разрушаются при высоких температурах.

Методические приемы подготовки биологических образцов



Гомогенизация (измельчение)

Добавление реагентов

Установка pH

Смешивание (встряхивание)

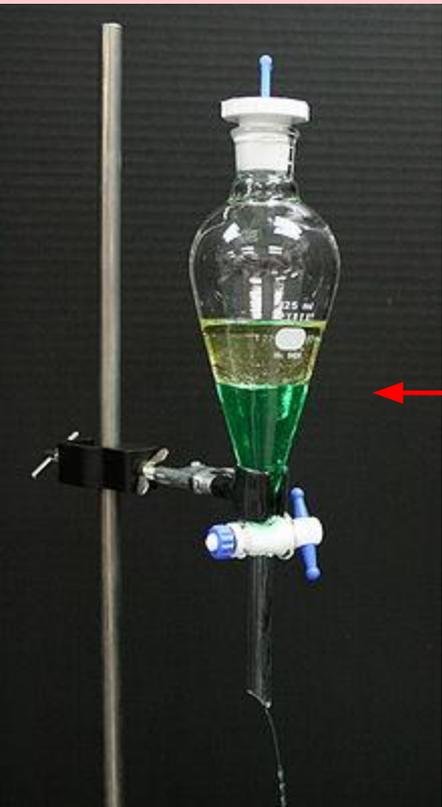
Нагревание (охлаждение)

Осаждение

Фильтрование

Центрифугирование

Выпаривание

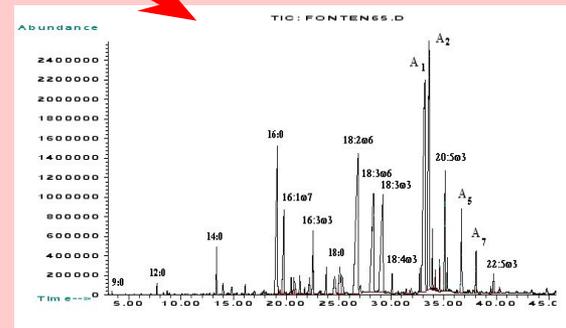
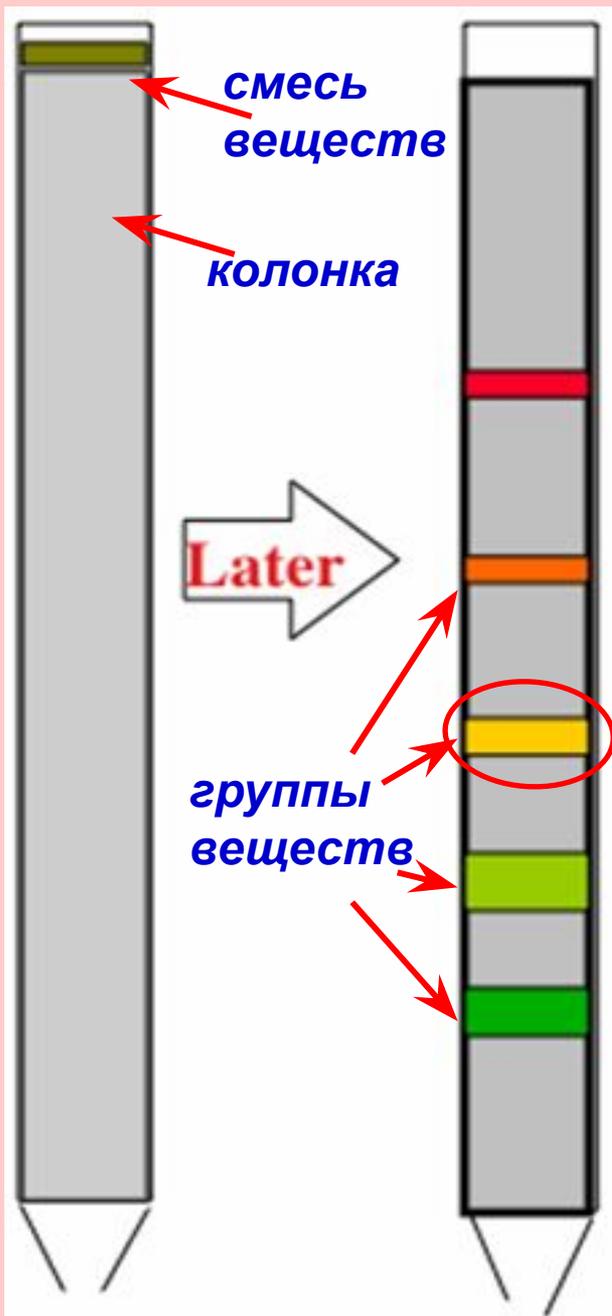


Жидкофазная и твердофазная экстракция

Очистка на колонках или в тонком слое

Очистка на колонках или в тонком слое

Для разделения и выделения групп веществ из сложных матриц: нужная группа элюируется, т.е. смывается с силикагеля, и далее подробно анализируется приборной хроматографией.



Хроматограмма

Реакционная газовая хроматография

Это направленные химические превращения нелетучих соединений в летучие, а также неустойчивых в устойчивые для дальнейшего ГХ анализа.

Один из способов: получение сложных эфиров

На практике используют:

диазометановый метод, $\text{RCOON} + \text{CH}_2\text{N}_2 \rightarrow \text{RCOONCH}_3 + \text{N}_2$

метанольный метод, $\text{RCOON} + \text{CH}_3\text{OH} \rightarrow \text{RCOONCH}_3$