

Высокоэффективная жидкостная хроматография

План лекции

- Принципы метода
- Основные узлы жидкостных хроматографов
- Сорбенты для ВЭЖХ
- Наиболее распространенные виды современной ВЭЖХ
- Ультра-ВЭЖХ

Подвижная фаза – жидкость
Неподвижная фаза – твердое вещество

5 основных механизмов взаимодействия сорбат-сорбент

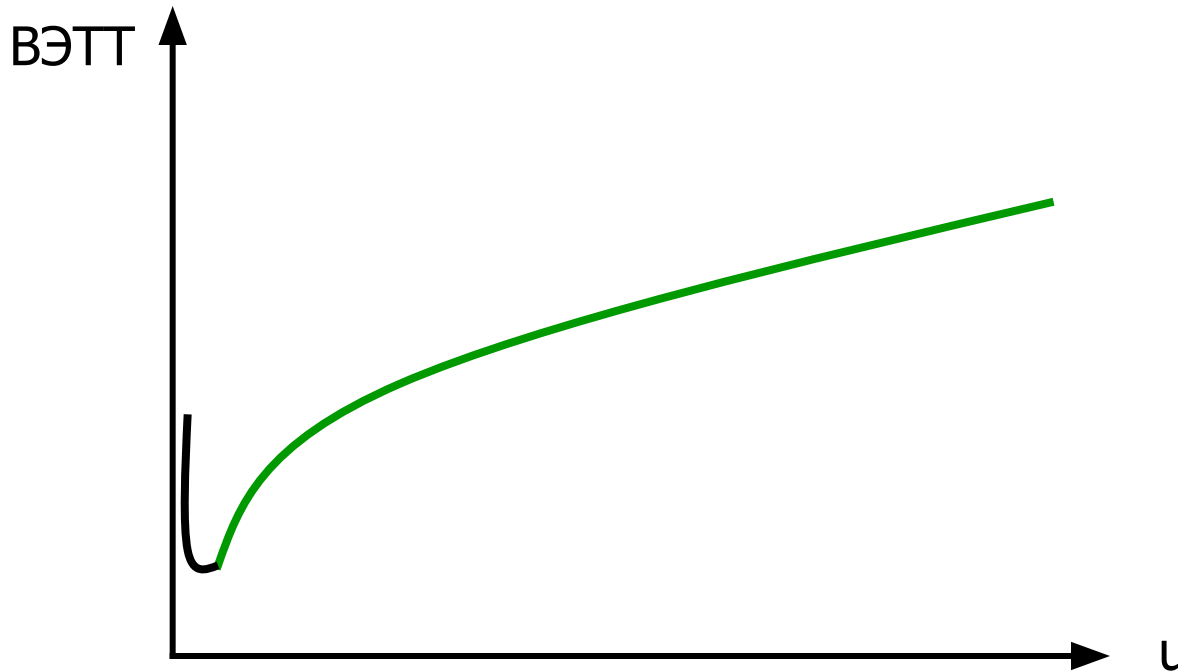
1. Распределение
2. Адсорбция
3. Ионный обмен
4. Эксклюзия (проникновение)
5. Специфические (геометрические и др.)

Часто присутствуют одновременно несколько механизмов.
При классификации выделяют основной.

Зависимость эффективности от скорости потока элюента в жидкостной хроматографии

$$\text{ВЭТТ} = A + B/u + Cu$$

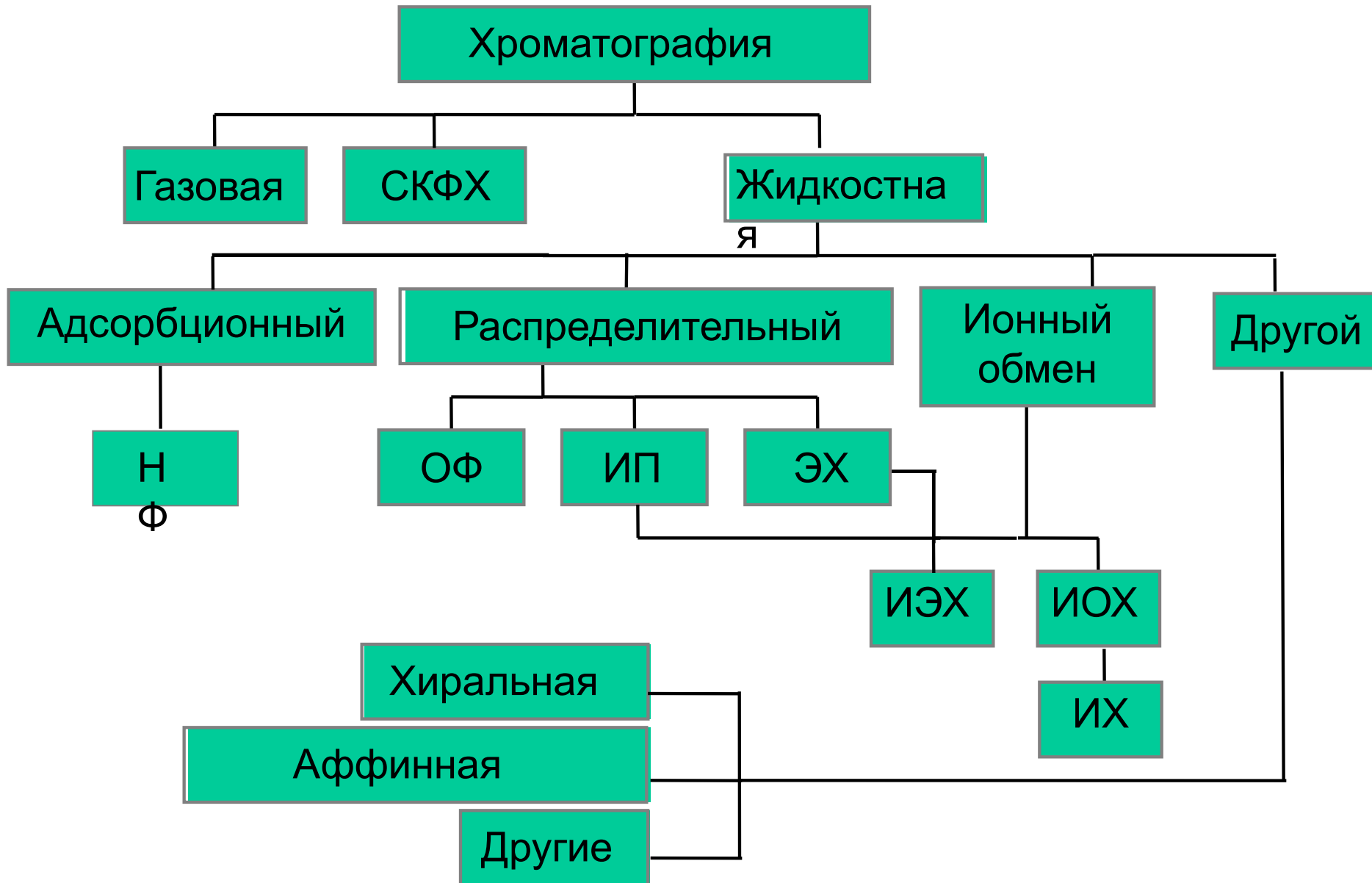
Скорости диффузии в жидкости на несколько порядков меньше, чем в газах



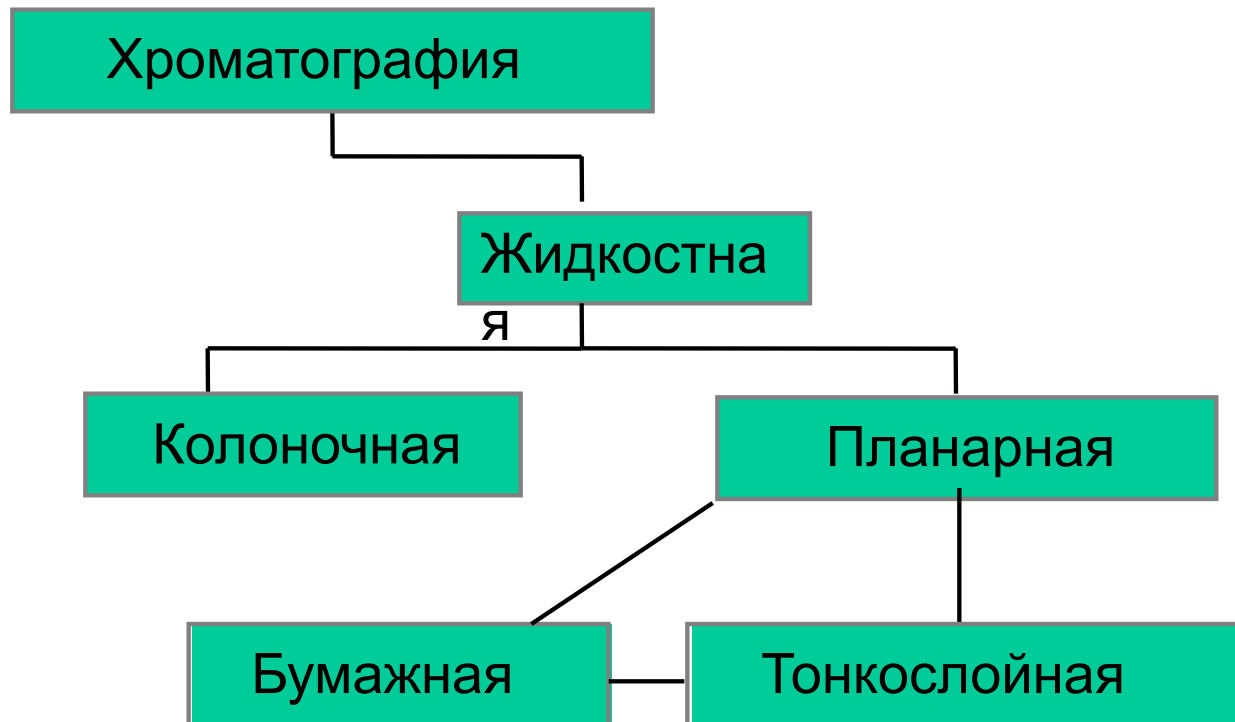
Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ или HPLC) –

современные (преимущественно колоночные)
варианты жидкостной хроматографии
с целью обеспечения
высокой эффективности разделения =>
мощный аналитический метод

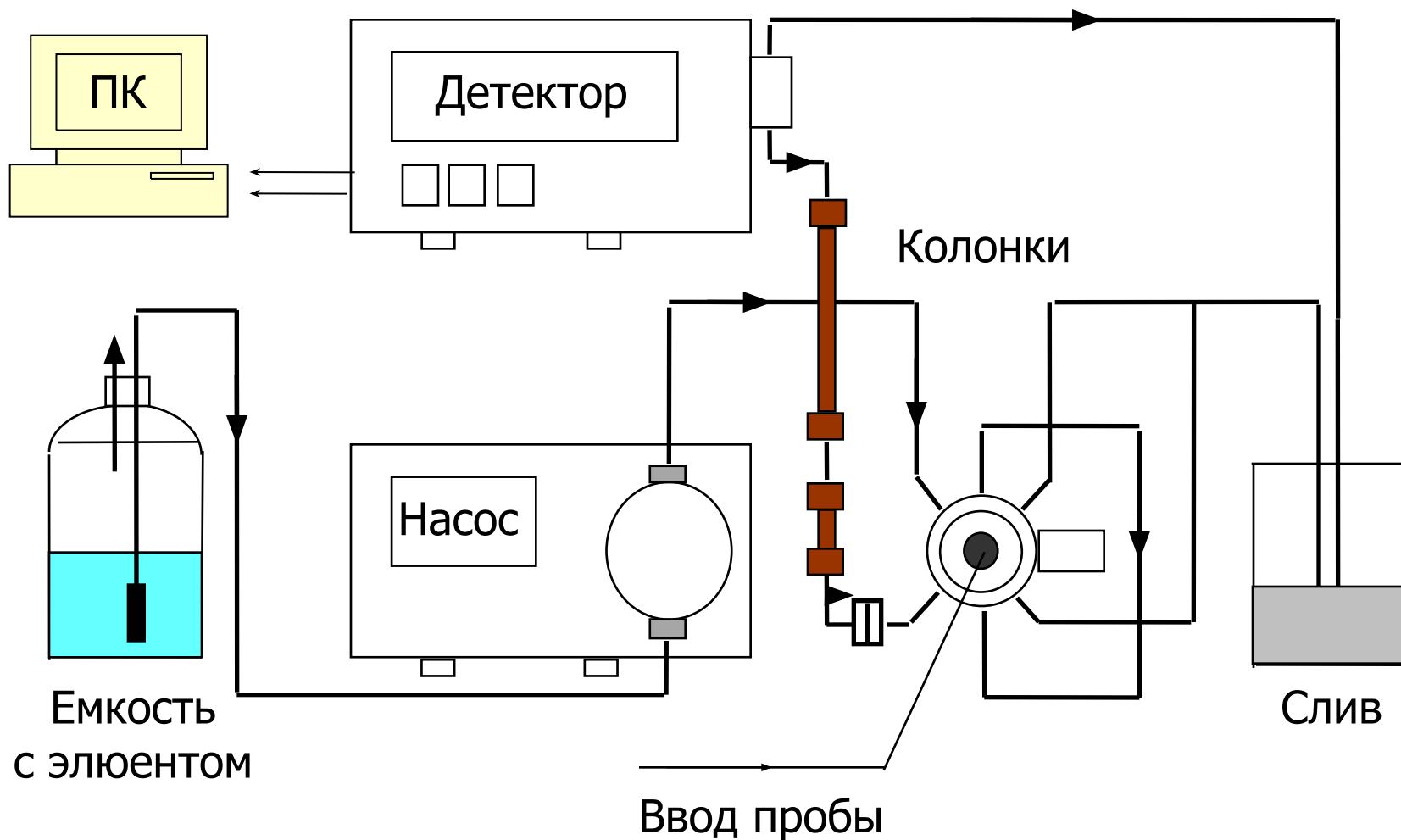
Виды ВЭЖХ по механизму взаимодействий



Виды ВЭЖХ по технике исполнения



Основные узлы жидкостных хроматографических систем



Требования к подвижной фазе

- Смачивать сорбент,
но не взаимодействовать с ним химически
- Растворять вещества пробы
- Не затруднять детектирование
- Быть дегазированной
- Обладать определенной «элюирующей силой»
- Быть легко и количественно удаляемой
(для препаративного разделения)

Элюирующая сила растворителей

Способность растворителей элюировать компоненты пробы характеризуется **элюирующей силой**.

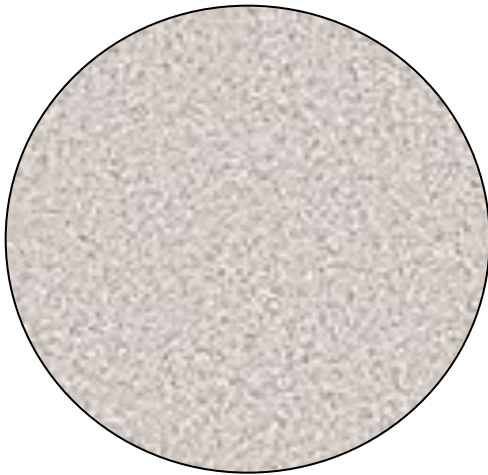
Расположение растворителей в порядке увеличения их элюирующей силы называют **элюотропным рядом**.

Элюенты: сильные и слабые

В общем случае сила элюента зависит от **полярности** растворителя.

Как правило используют **бинарные смеси** растворителей: удобство изменения элюирующей силы.

Сорбент. Матрица



Эффективность разделения

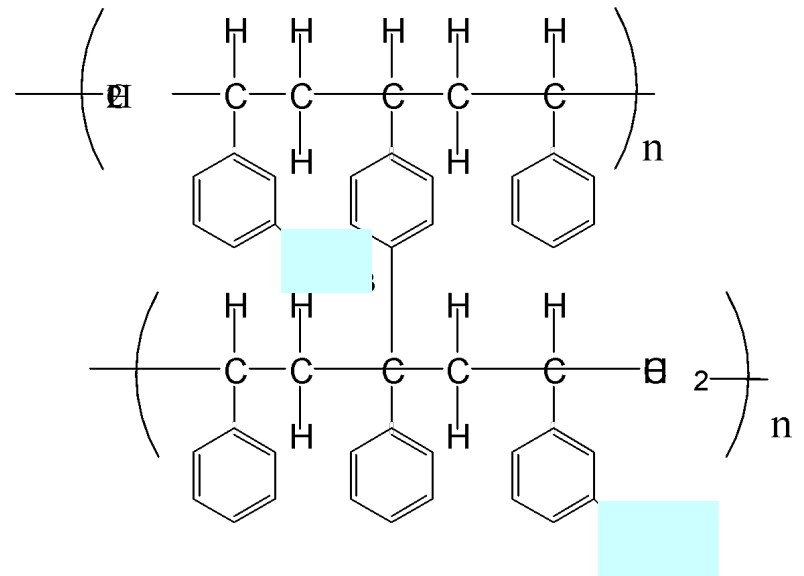
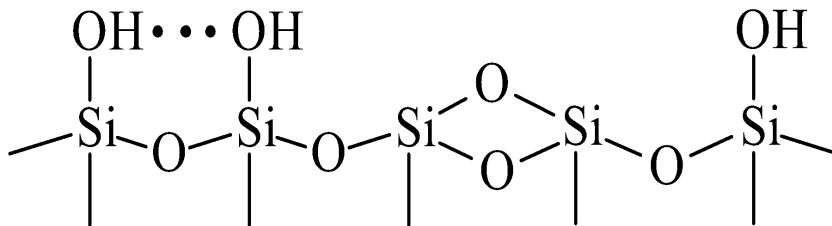
диаметр частицы 3-10 мкм

сферическая форма

монодispersность

одинаковый размер пор

Механическая и химическая устойчивость

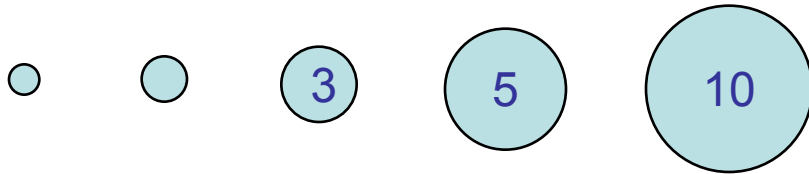


Основной тип матриц в ВЭЖХ – силикагель

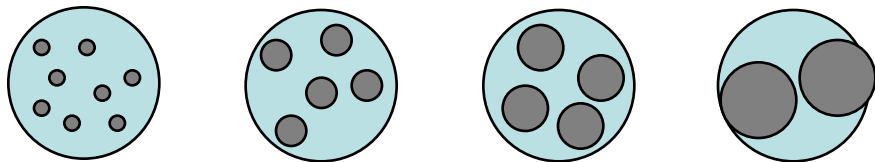
Сферичность



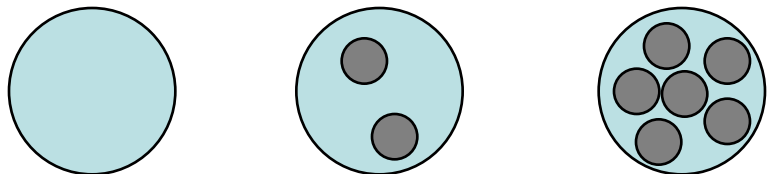
Размер частиц, мкм



Размер пор, А



Площадь поверхности, м²/г



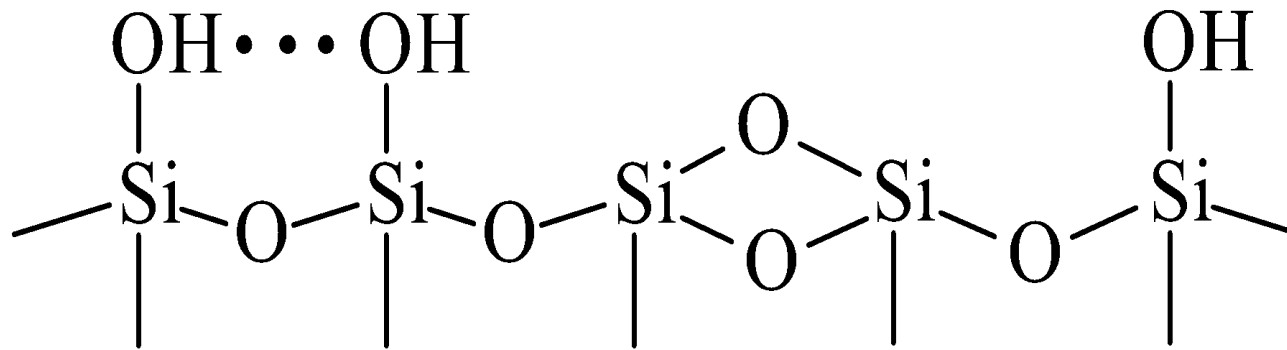
Достоинства

- Отработанная технология синтеза
- Доступность и относительно низкая цена
- Большой диапазон свойств
- Механическая прочность
- Химическая активность
ОН-групп на поверхности

Недостатки

- Химическая активность
ОН-групп на поверхности
- рН стабильность (2-9)
- Адсорбированная вода

Структура поверхности силикагеля

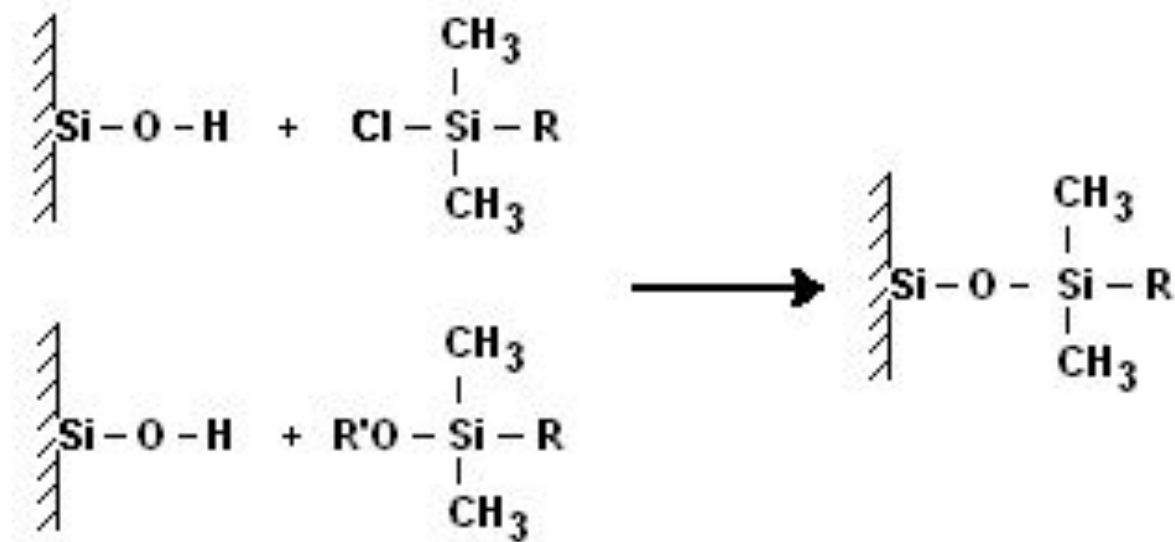


водород-связанные
группы

силоксановые
группы

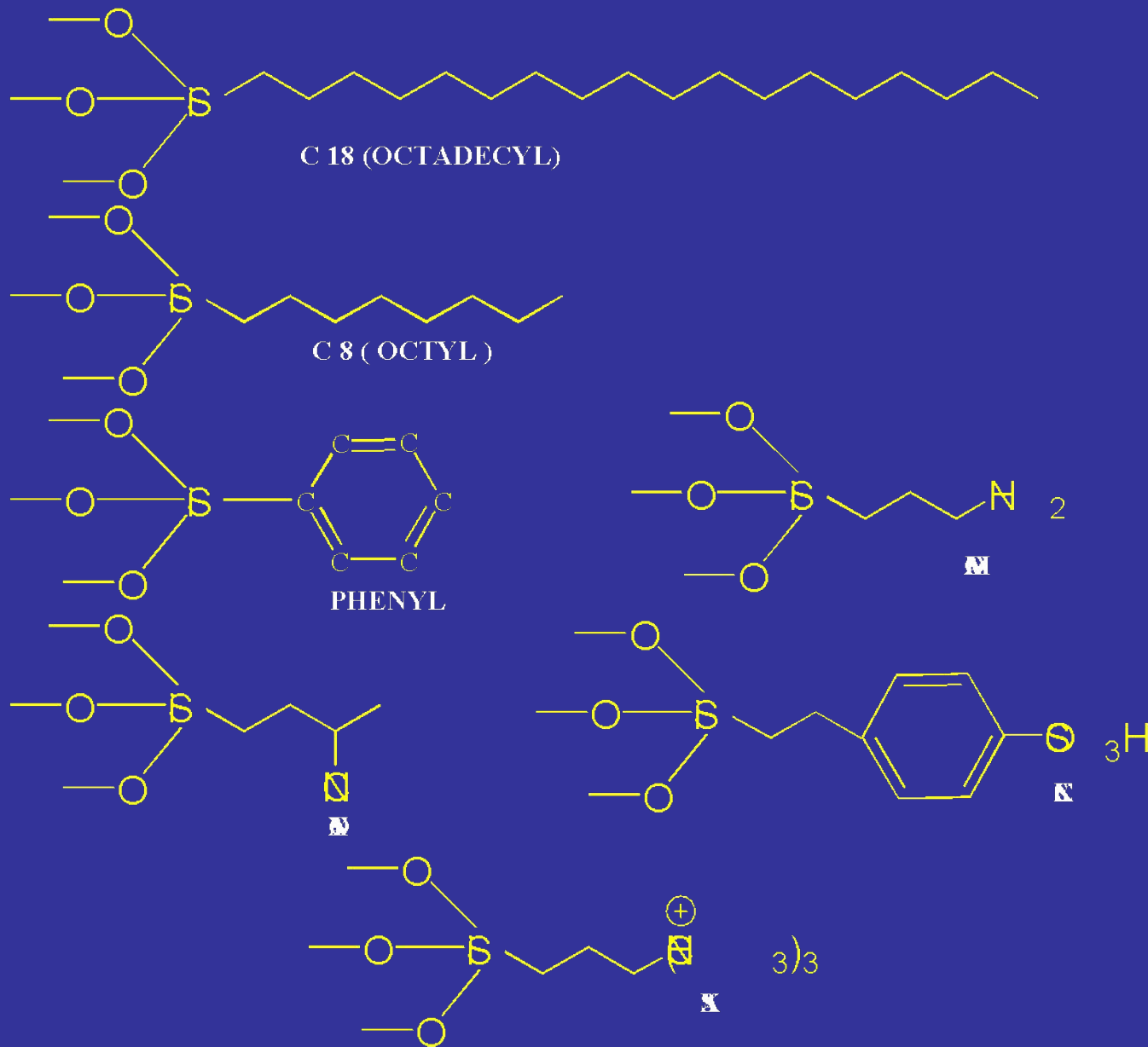
силанольные
группы

Получение химически модифицированных силикагелей



Модифицирование существенно расширяет спектр сорбентов и возможности ВЭЖХ!

Химически модифицированные силикагели



Рекомендации по применению химически модифицированных силикагелей

| | |
|---|---|
| C₁ | ОФ ВЭЖХ высокомолекулярных веществ полярной природы с большим количеством функциональных групп |
| C₂ | Наиболее полярная из привитых алкильных фаз, применяемых для разделения низкомолекулярных веществ в режиме ОФ ВЭЖХ. Отличается высоким влиянием силанольных групп на селективность разделения. Требует аккуратного выполнения требований по хранению колонок. |
| C₄ (5) C | Сорбент для ОФ ВЭЖХ с меньшим удерживанием чем фазы C8 и C18. Применяется для разделения больших молекул белков и гидрофобных пептидов при диаметре пор 300 |
| C₈ | Занимает среднее положение в ряду алкилсиликагелей. Применяется для ориентировочного разделения смесей неизвестного состава. |
| C₁₈ (16, 22) C C | Наиболее широко используемый сорбент в ОФ ВЭЖХ. Характеризуется высочайшей селективностью по отношению к гомологам. |
| Фенил | Материал для ОФ ВЭЖХ. Характеризуется повышенной селективностью к ароматическим соединениям и меньшей полярностью чем фазы C8 и C18 . |

Рекомендации по применению химически модифицированных силикагелей

| | |
|--------------|---|
| Нитро | Разделение ароматических соединений и соединений с двойными связями в режиме НФ ВЭЖХ. Как и все модифицированные силикагели не деактивируется следами воды в элюенте в режиме НФ ВЭЖХ. |
| Циано | Применяется как в НФ ВЭЖХ, так и в ОФ ВЭЖХ. Обладает селективностью, отличающейся от традиционных сорбентов: силикагеля - в НФ ВЭЖХ и алкилсиликагелей - в ОФ ВЭЖХ. |
| Диол | Применяется как в НФ ВЭЖХ, так и в ОФ ВЭЖХ. По хроматографическим свойствам близок к немодифицированному силикагелю при использовании варианта НФ ВЭЖХ. В качестве обращенной фазы работает в условиях гельфильтрационной хроматографии для разделения белков и пептидов.. |
| Амино | Применяется как в НФ ВЭЖХ, так и в ОФ ВЭЖХ. В условиях НФ ВЭЖХ по хроматографическим свойствам наиболее сходен с немодифицированным силикагелем. В условиях ОФ ВЭЖХ применяется для разделения сильнополярных соединений, например, сахаров. Обладает анионообменными свойствами в кислой среде, может быть использован для разделения анионов. |

Сорбенты для ВЭЖХ

Силикагель

Преимущества:

- Обеспечивает высокую эффективность
- Отработана методика синтеза сорбентов заданной геометрии
- Не набухает, устойчив к давлению
- Доступность

Недостатки:

- Структура поверхности зависит от условий синтеза (термообработка, промывка кислотными и щелочными растворами в процессе синтеза), присутствия ионов металлов и предыстории работы на сорбенте
- Устойчивость в ограниченном диапазоне рН: при рН 2-9

Основные виды ВЭЖХ

- Нормально-фазовая
- Обращенно-фазовая
- Гидрофильная
- Ион-парная
- Эксклюзионная
- Ультра-ВЭЖХ

Нормально-фазовая хроматография

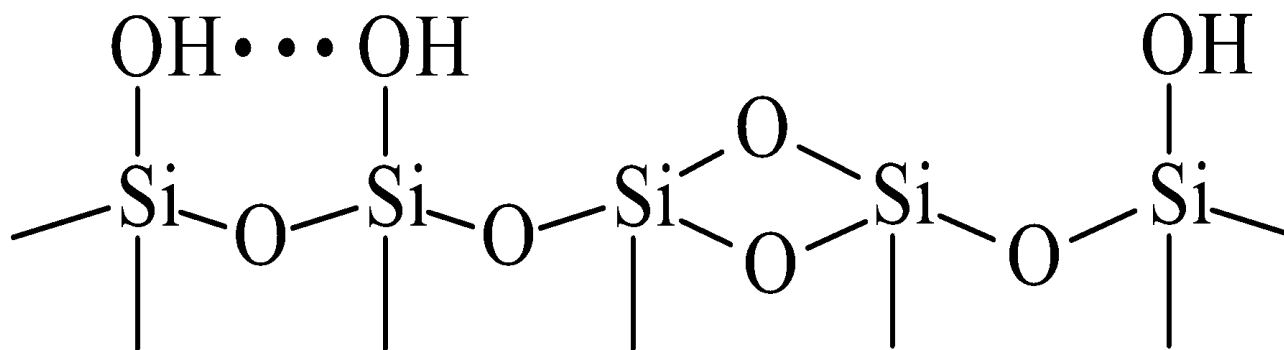
Нормально-фазовая хроматография



Нормально-фазовая хроматография

Подвижная фаза: гексан + этилацетат (хлороформ)

Неподвижная фаза: силикагель, оксид алюминия



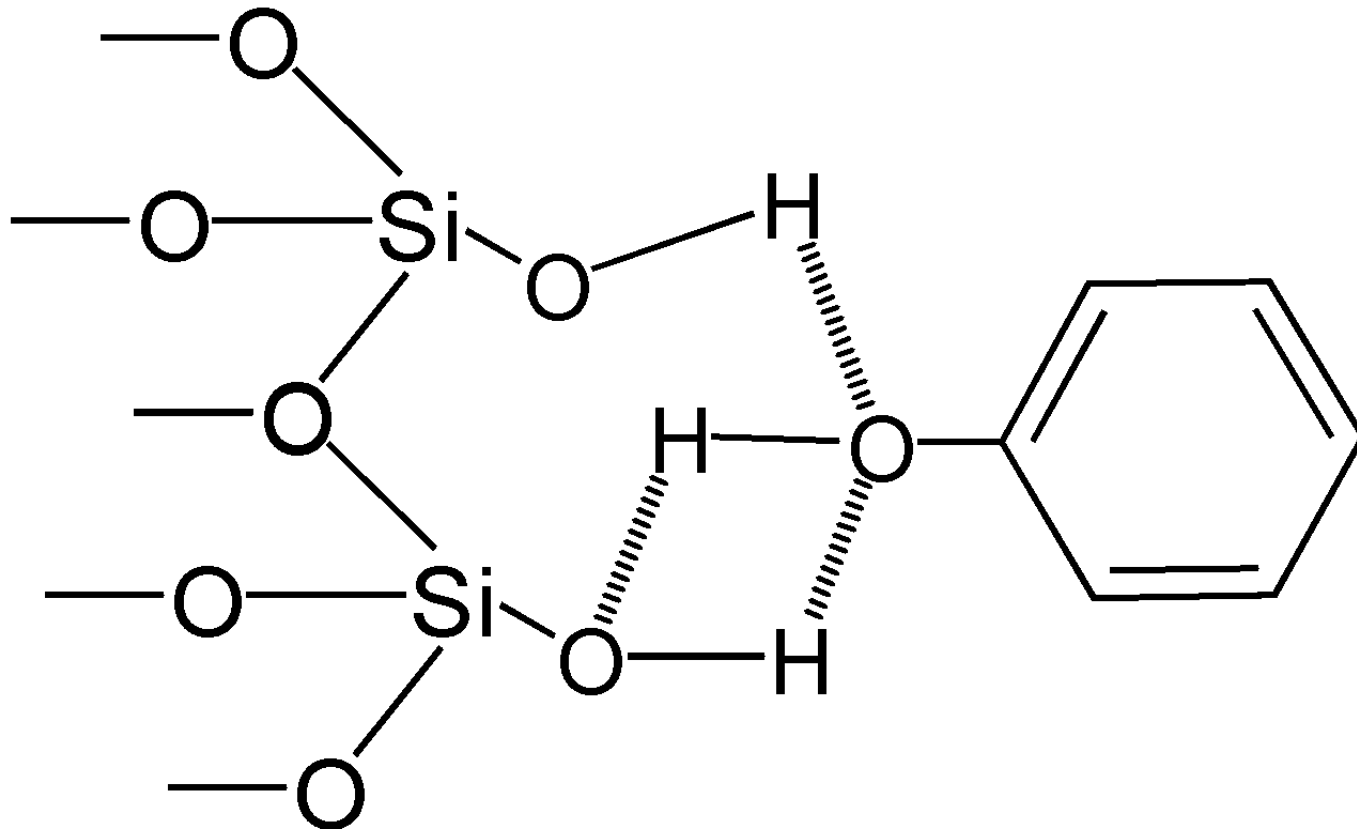
водород-связанные
группы

силоксановые
группы

силанольные
группы

Нормально-фазовая хроматография

Удерживание соединений за счёт
диполь-дипольных взаимодействий

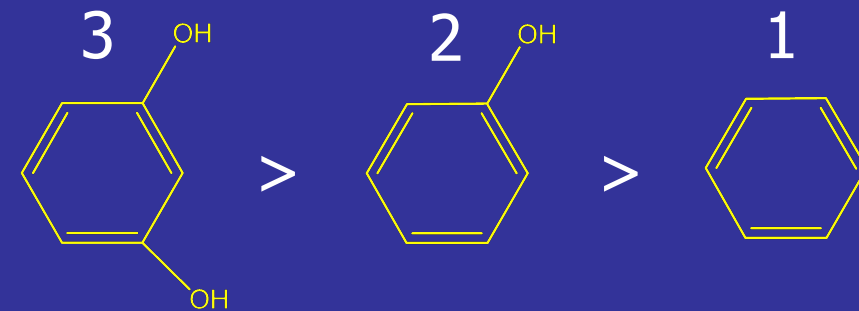
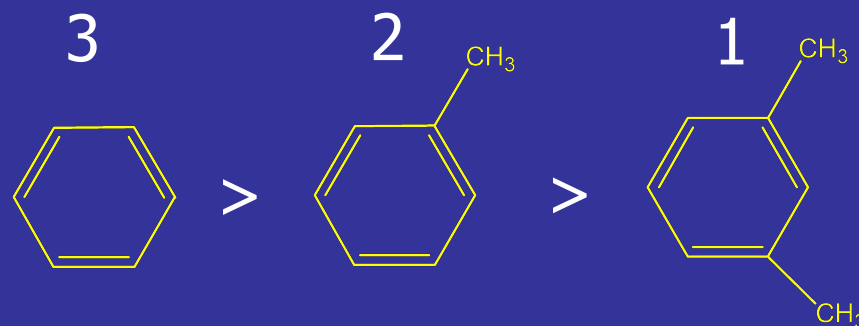
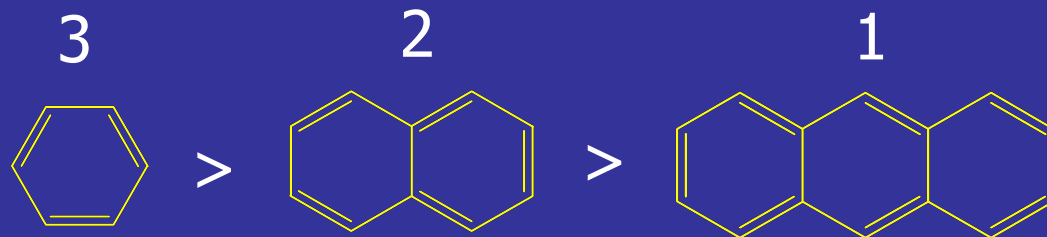
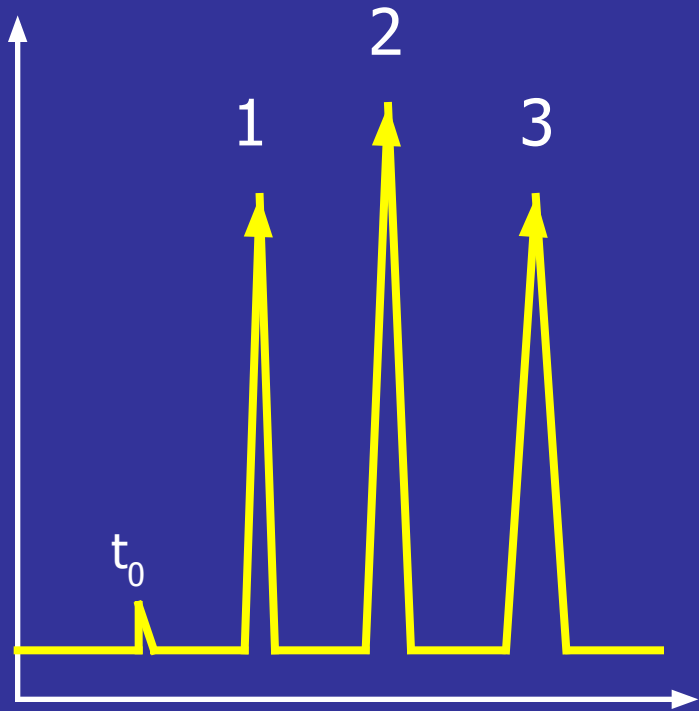


Нормально-фазовая хроматография

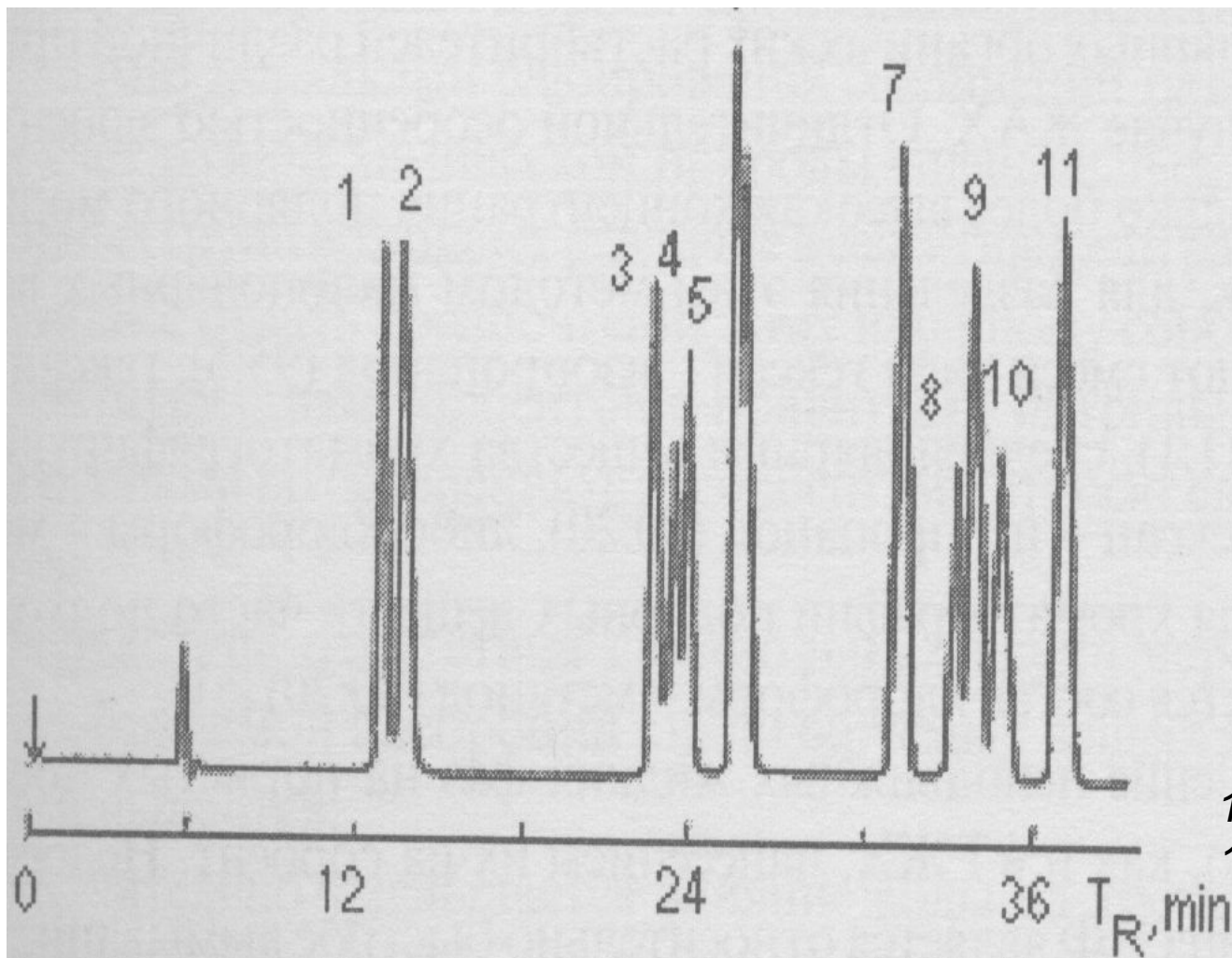
Закономерности удерживания

- Полярные соединения удерживаются сильнее, чем неполярные
- Гомологи, (вещества, различающиеся различным количеством метиленовых звеньев), разделяются хуже, чем в обращенно-фазовой ВЭЖХ
- Пространственные изомеры (*o*-, *m*-, *p*-) разделяются лучше, чем в обращенно-фазовой ВЭЖХ
- Вывод:
наиболее подходит для разделения позиционных изомеров неполярных или слабополярных веществ, растворимых в гексане, эфире, углеводородах.

Порядок элюирования в нормально-фазовой хроматографии



Хроматограмма фенолов, полученная методом нормально-фазовой хроматографии



Сорбент: Zorbax Silica
Элюент: Гексан – CH_2Cl_2

Пики:

1. 2,4,6-триметилфенол
2. 2,6-ксиленол
3. 2,5-ксиленол
4. 2,3-ксиленол
5. 2,4-ксиленол
6. о-крезол
7. 3,5-ксиленол
8. 3,4-ксиленол
9. м-крезол
10. п-крезол
11. фенол

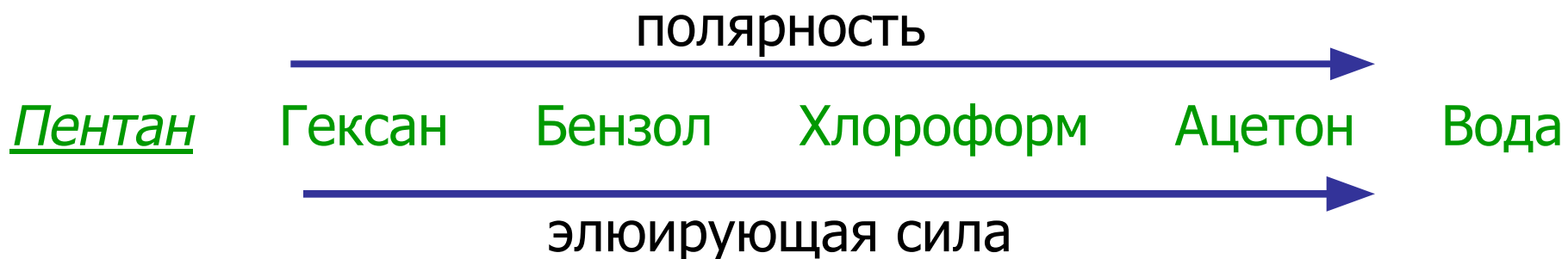
Элюирующая сила подвижной фазы

Показывает, во сколько раз энергия сорбции данного элюента больше, чем энергия сорбции «стандартного» элюента

В основном определяется полярностью добавляемого в подвижную фазу органического растворителя

В соответствии с элюирующей способностью растворители располагают в элюотропные ряды (ряды Снайдера)

В нормально-фазовой хроматографии



Обращенно-фазовая хроматография

Обращенно-фазовая хроматография

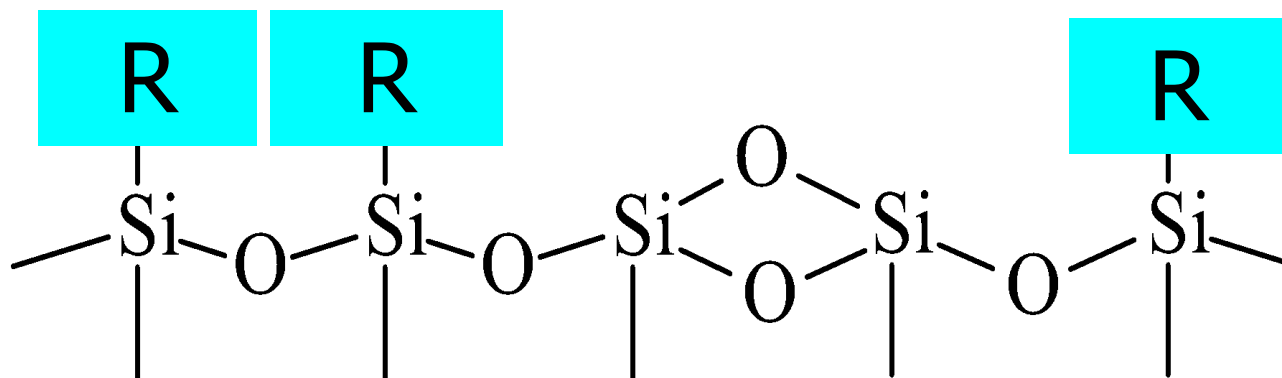


Обращенно-фазовая хроматография

Подвижная фаза более полярна, чем неподвижная

Ацетонитрил-вода

Метанол-вода



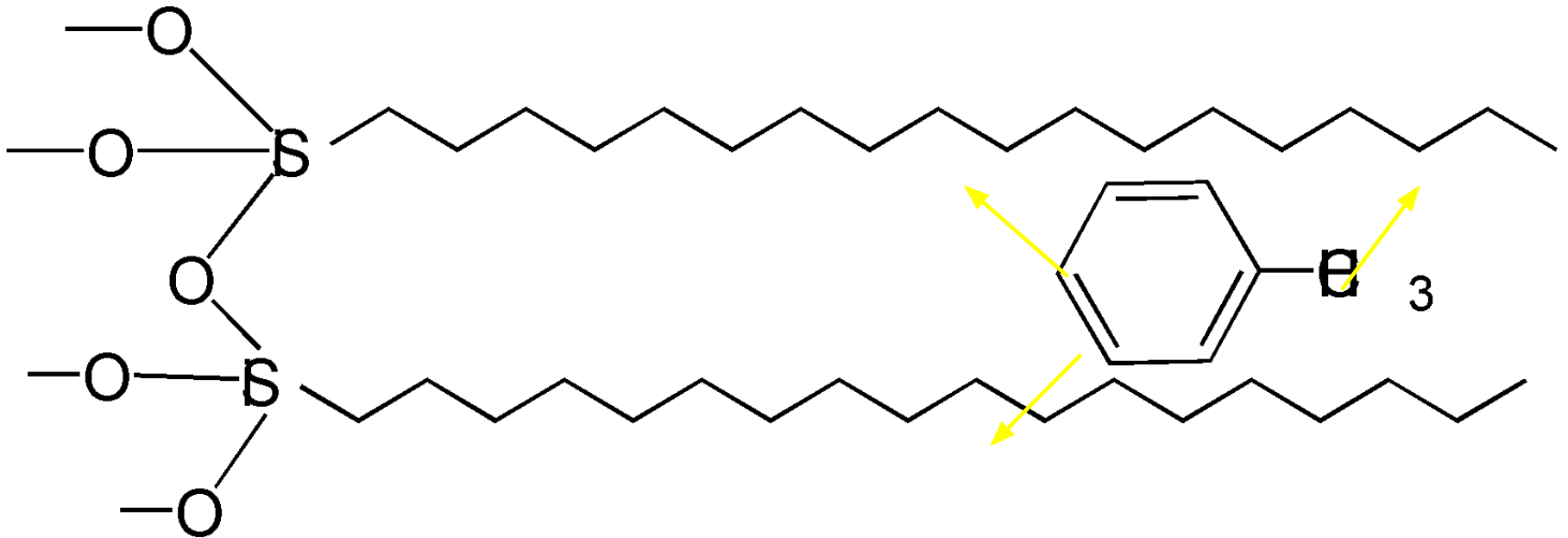
Неподвижные фазы

химически модифицированные силикагели

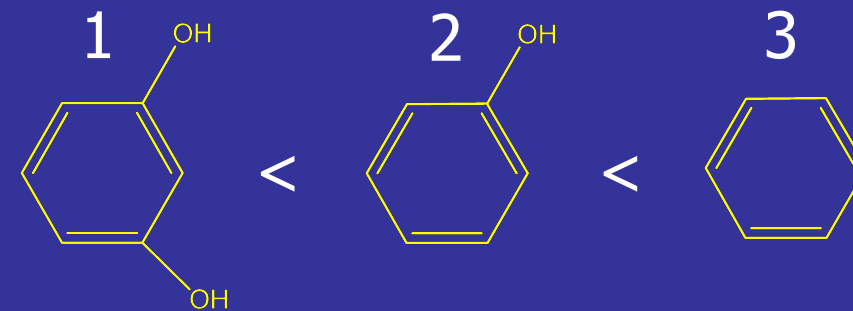
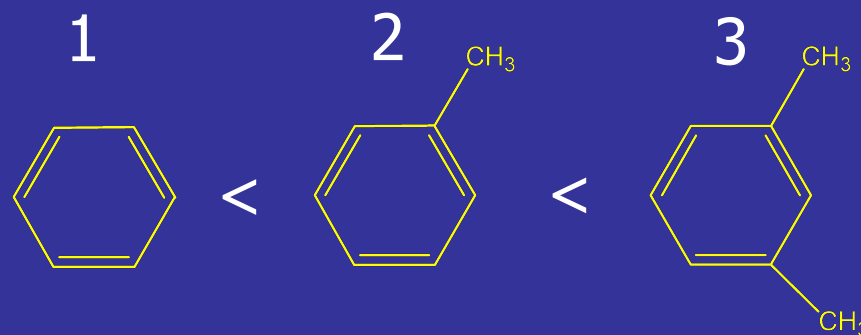
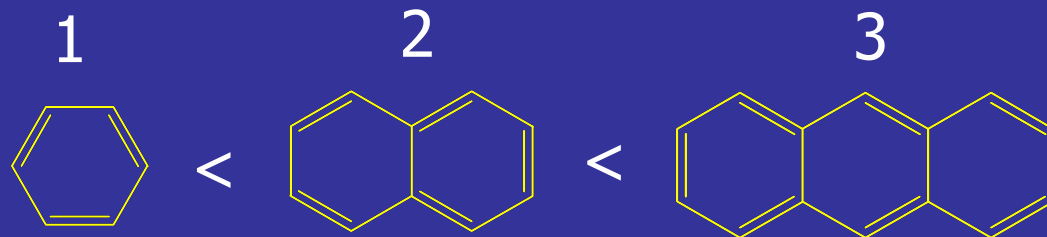
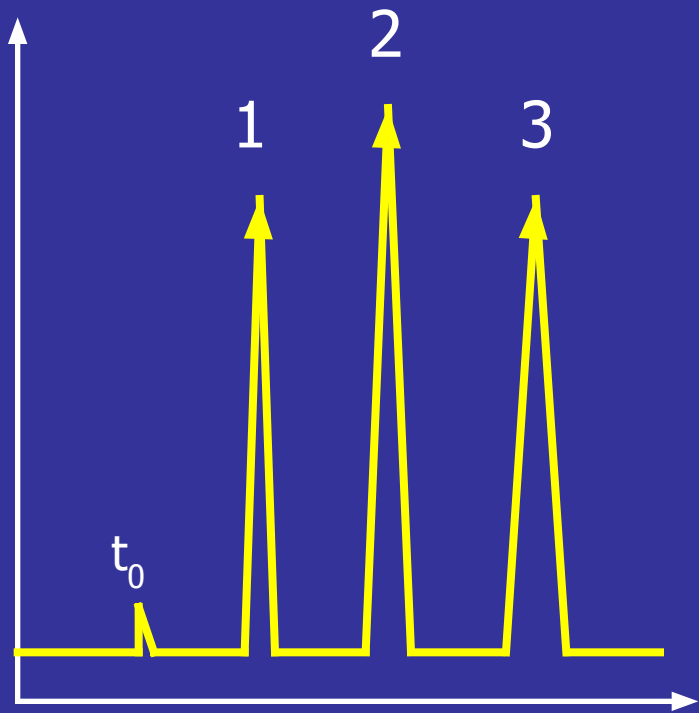
R = C₂, C₄, C₈, C₁₈, C₃₀

Обращенно-фазовая хроматография

Удерживание соединений за счёт гидрофобных взаимодействий

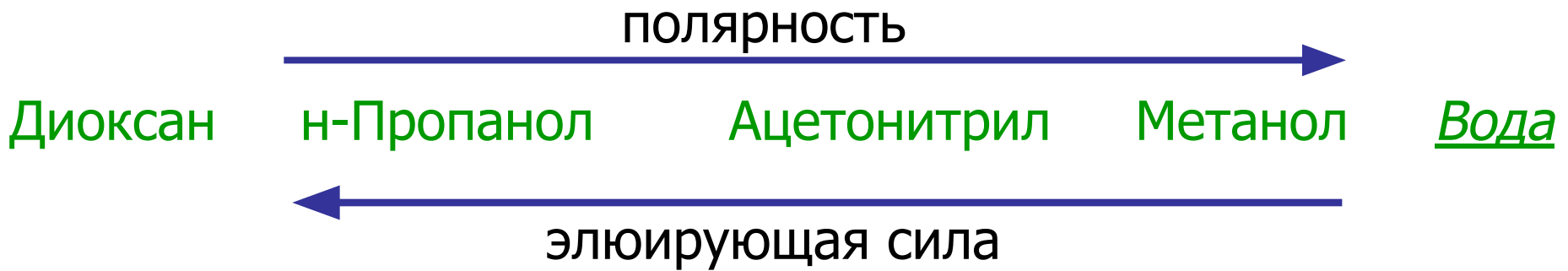


Порядок элюирования в обращенно-фазовой хроматографии

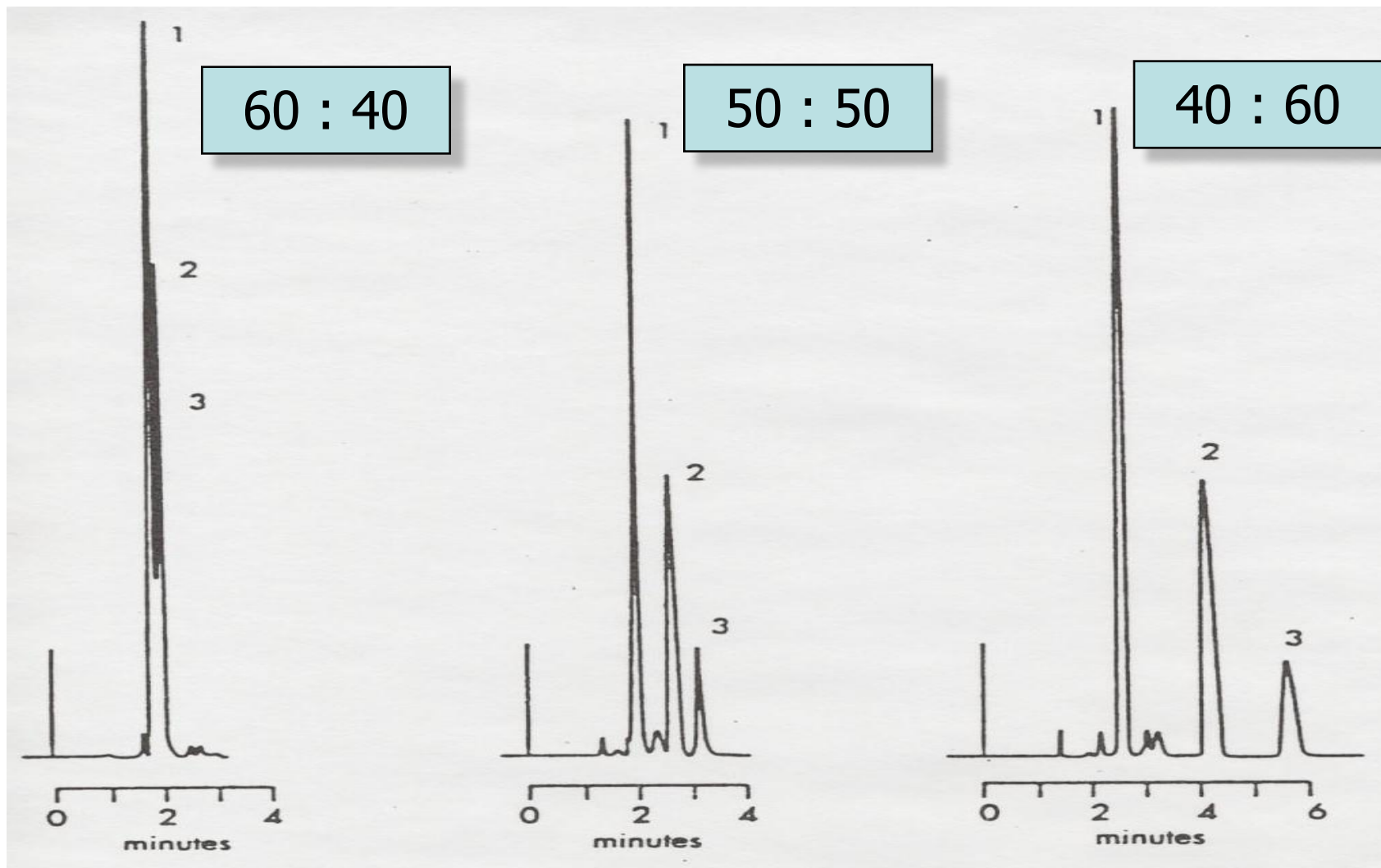


Элюирующая сила подвижной фазы

В обращенно-фазовой хроматографии

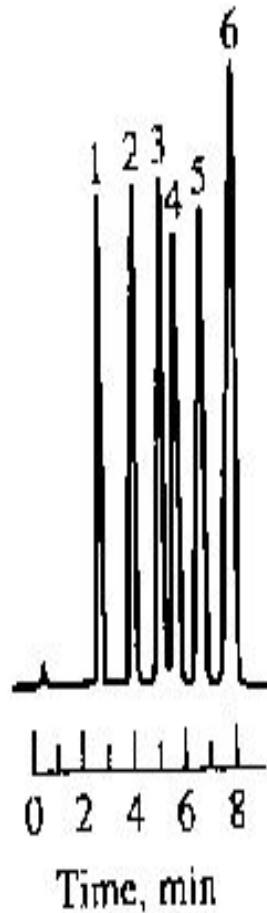


Удерживание веществ в ОФ-ВЭЖХ в зависимости от соотношения ацетонитрил-вода в элюенте

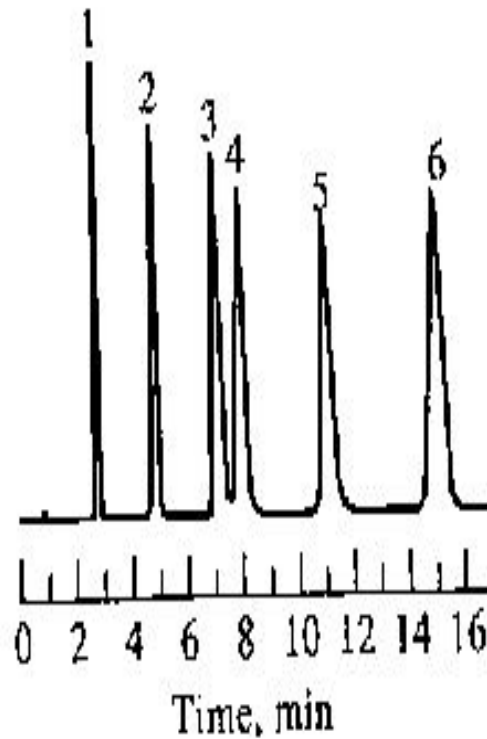


Зависимость удерживания веществ в ОФ-ВЭЖХ от длины привитого радикала на поверхности силикагеля

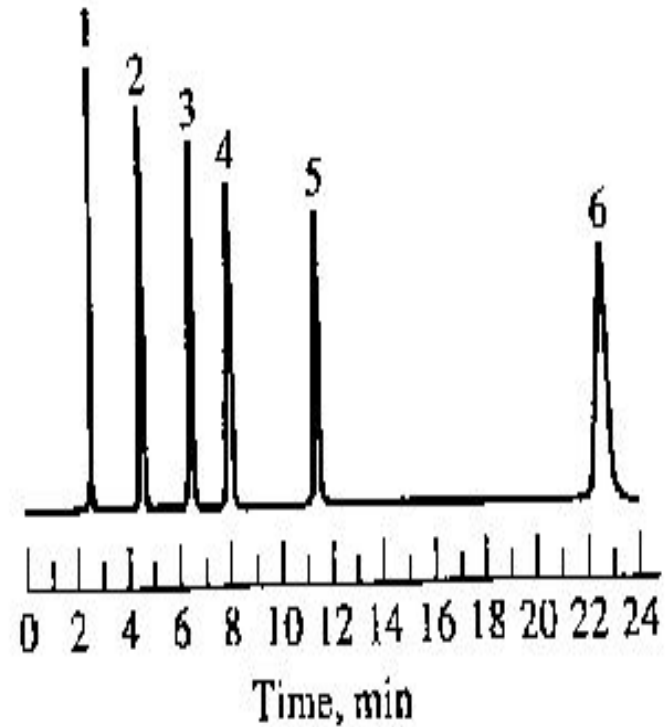
C-2



C-8



C-18

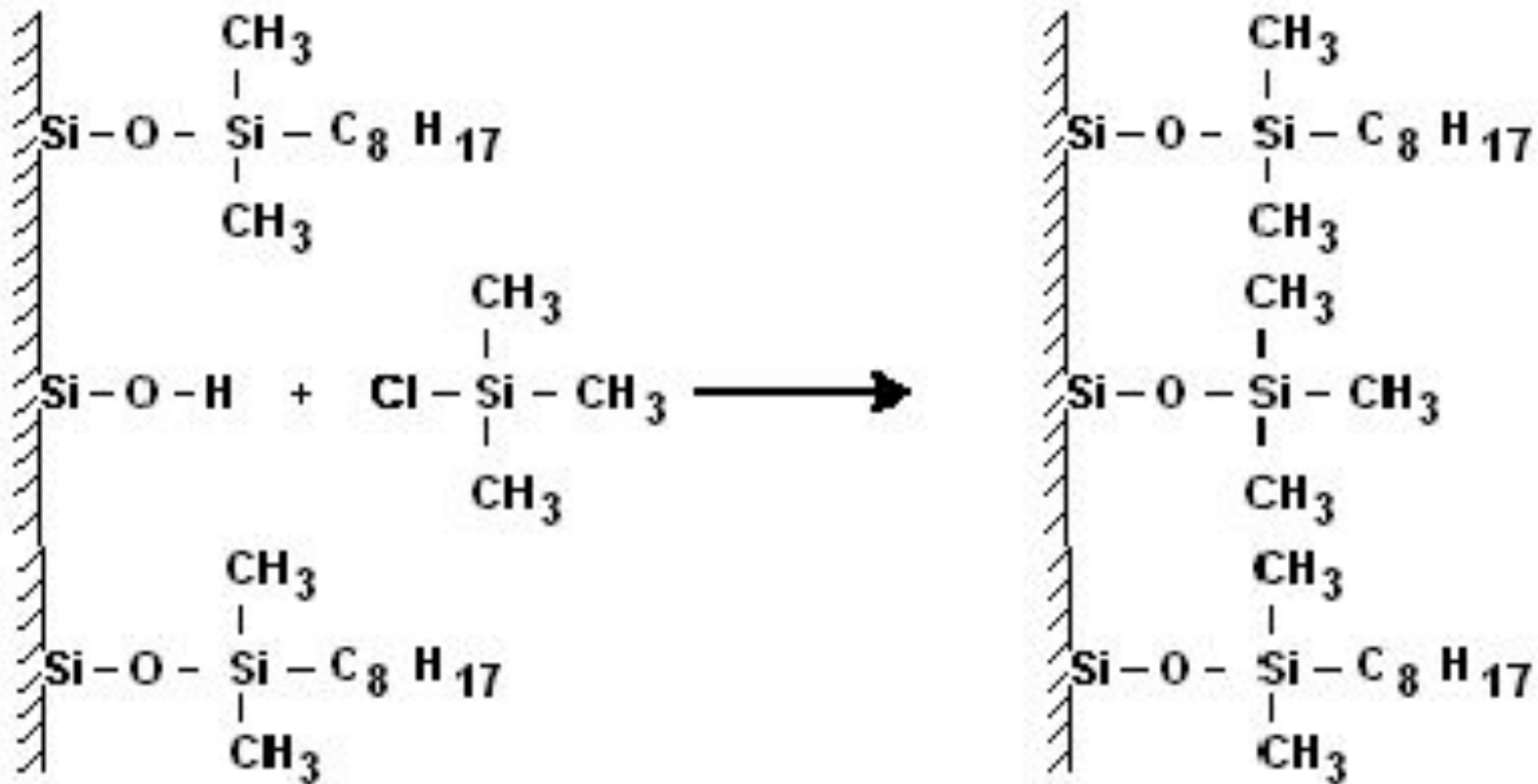


Зависимость удерживания от pH элюента



Методы маскирования остаточных силанольных групп

- Эндкепинг



Основные проблемы ОФ ВЭЖХ

| | |
|--|--|
| Взаимодействие веществ основной природы с остаточными силанольными группами | Эндкеппинг; работа с элюентами с рН, где отсутствует диссоциация Si-OH; добавка триэтаноламина в элюент |
| Слабое удерживание полярных веществ, невозможность работы с 100%-ным водным элюентом | Новые фазы с полярным эндкеппингом и полярной вставкой |
| Плохая стабильность силикагелевых колонок в кислой и щелочной среде | Новые силикагели с равномерной прививкой групп, малым содержанием переходных металлов, специальные фазы |

Закономерности удерживания веществ в ОФ ВЭЖХ

- Удерживание возрастает с появлением неполярных заместителей (CH_3 , CH_2 , Cl , Br , I)
- Удерживание уменьшается с появлением полярных заместителей (CN , NO_2)
- Еще более удерживание снижается с появлением функциональных групп, способных к образованию водородных связей (COOH , OH)
- Значительное снижение удерживания происходит с появлением заряженных групп (SO_3^- , NH_3^+)
- Разветвленные изомеры удерживаются слабее, чем изомеры нормального строения

Сравнение нормально-фазовой и обращенно-фазовой хроматографии

НФ

ОФ

| | | |
|-------------------------------------|---|--|
| Неподвиж. фаза | Полярная (SiO_2) | Неполярная ($\text{SiO}_2\text{-C}_8$, $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$) |
| Подвиж. фаза | Неполярная (гексан, хлороформ) | Полярная (вода, ацетонитрил) |
| Скорость движения в-в по колонке | Неполярные быстрее | Полярные быстрее |
| Причины разделения веществ | Различие в дипольн. моментах (полярности) | Гидрофобные вз-я, различие в #С. |

Хроматография гидрофильных взаимодействий HILIC

Идея: использовать механизм нормально-фазовой хроматографии с менее токсичными растворителями

Неподвижные фазы –
силикагель, модифицированный
аминогруппами, диолами, PVA
– очень гидрофильный

Подвижные фазы –
метанол, ацетонитрил

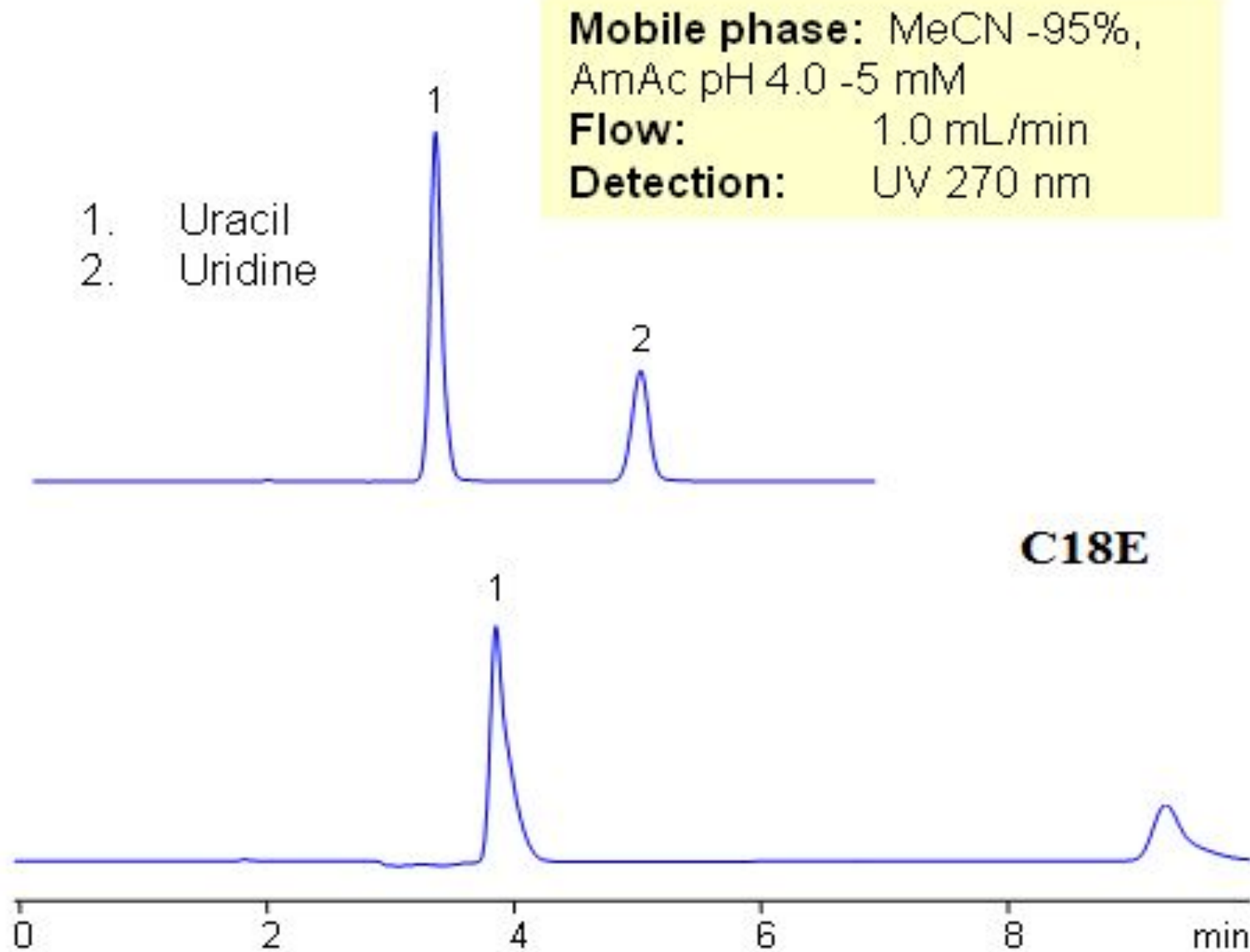
Достоинства

- Многие вещества лучше растворяются в такой подвижной фазе
- Работа с менее токсичными растворителями
- Сохраняется селективность НФ-варианта к разделению позиционных изомеров
- Низкие ПО с МС-детектированием

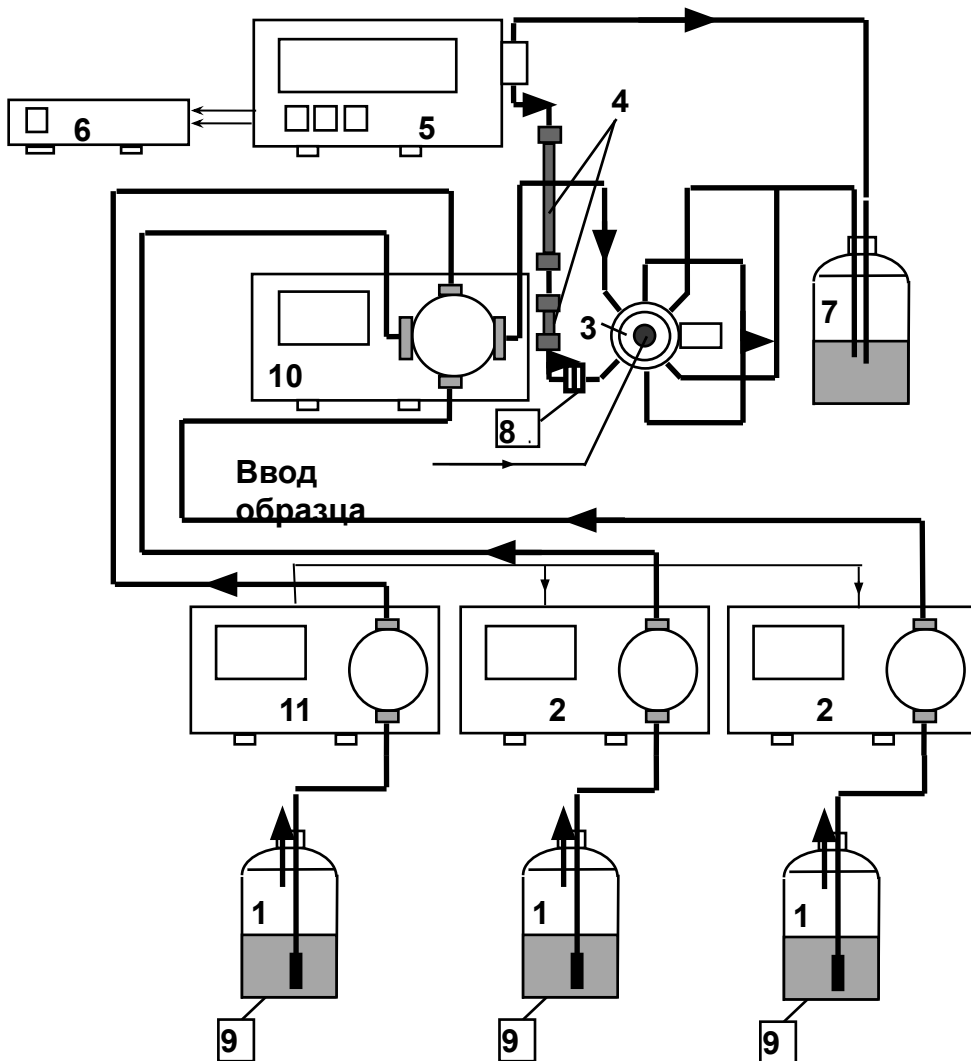
Определяемые вещества

- Полипептиды
- Олигосахариды
- Фенолы
- Аминокислоты

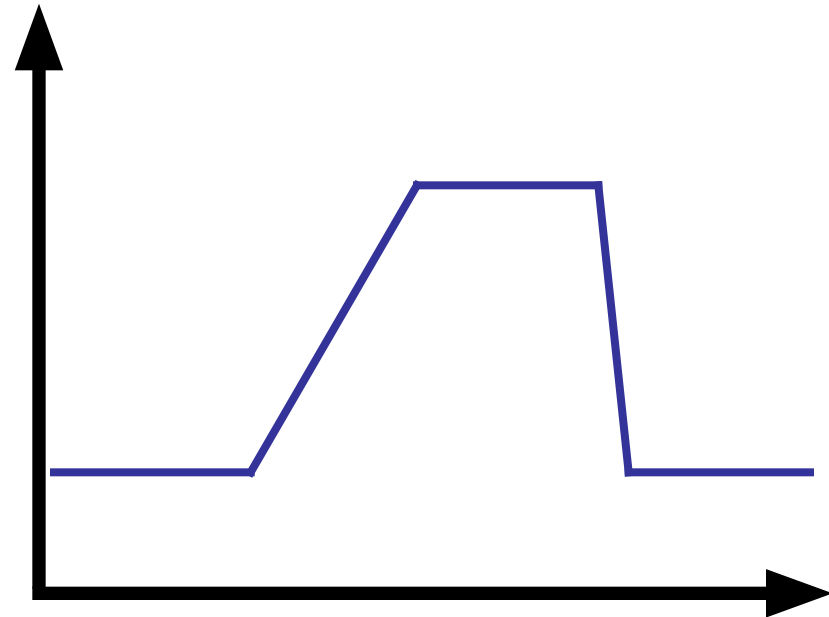
Сравнение традиционной ВЭЖХ и HILIC



Возможности градиентного элюирования в ОФ-ВЭЖХ



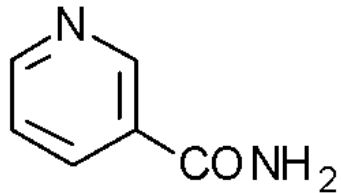
Элюирующая сила



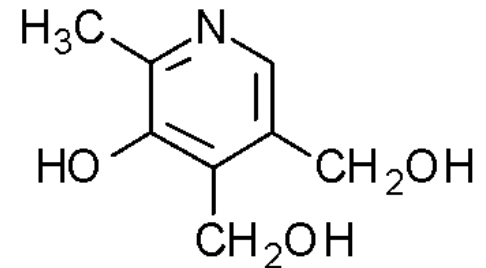
Время

Водорастворимые витамины

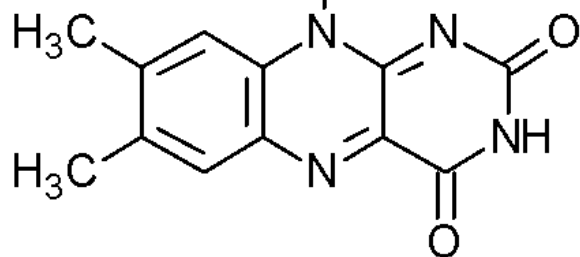
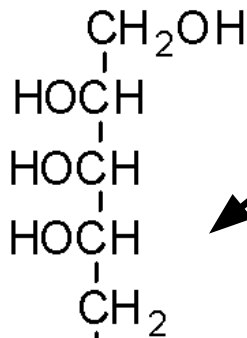
Никотинамид (В₃)



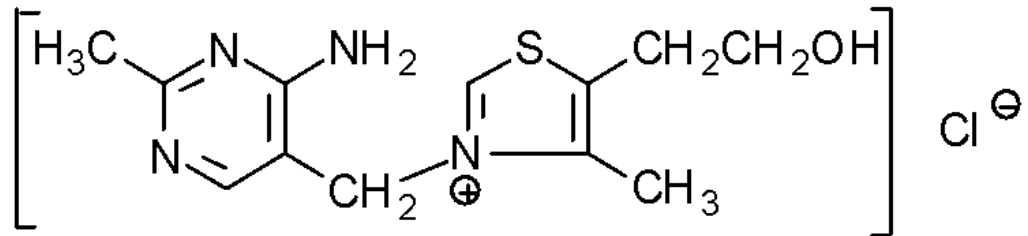
Пиридоксин (В₆)



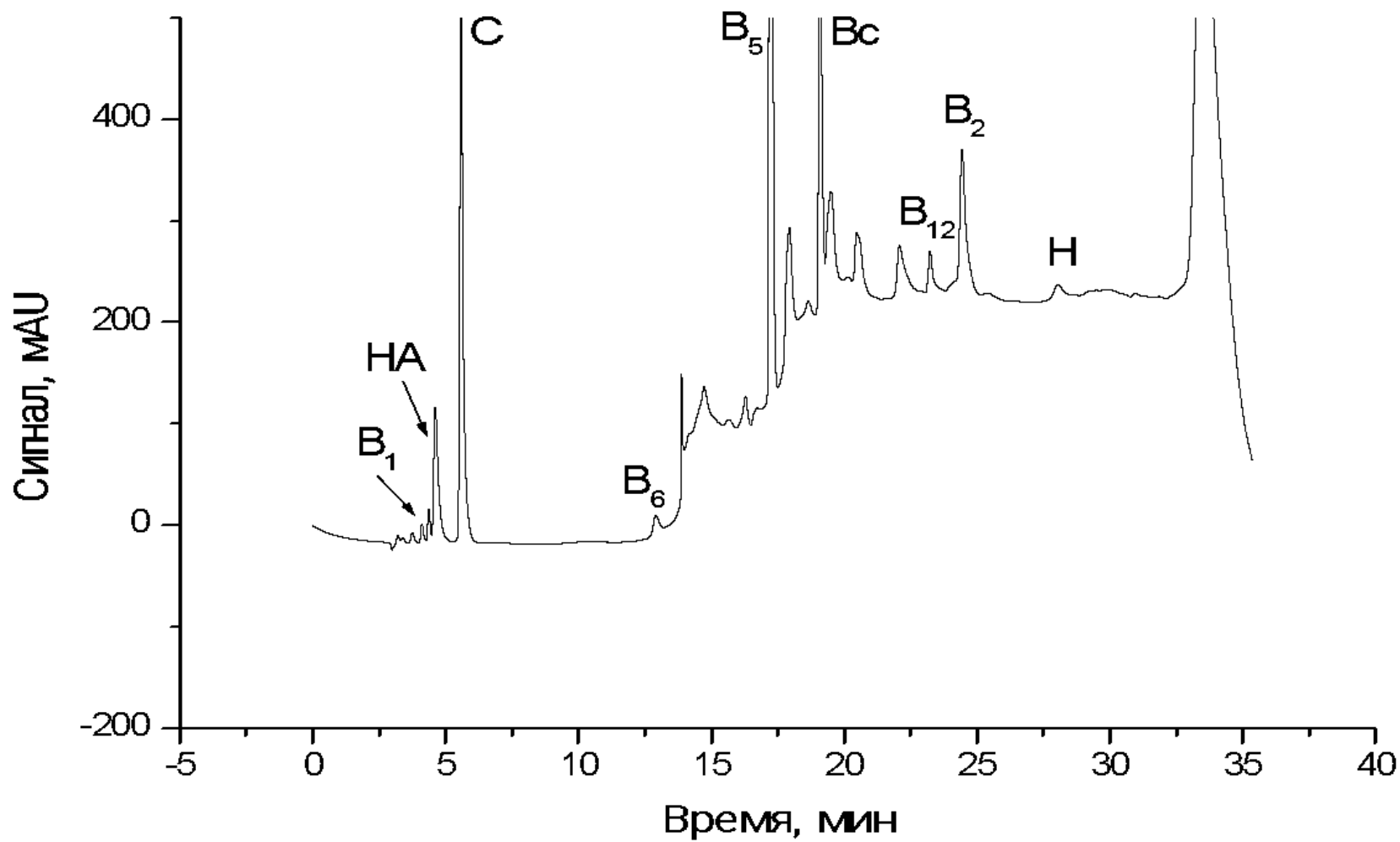
Рибофлавин (В₂)



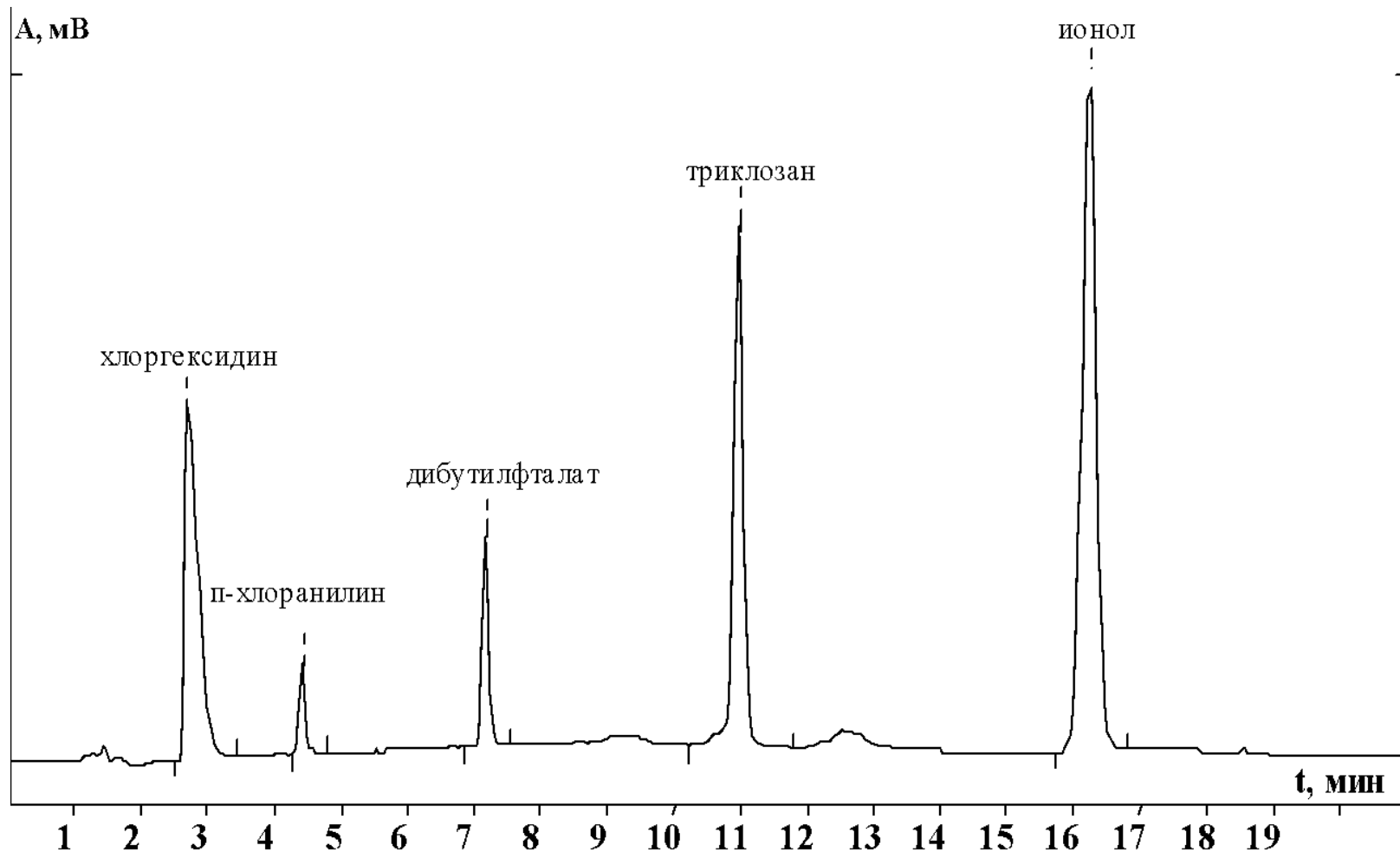
Тиамин (В₁)



Определение водорастворимых витаминов в таблетках



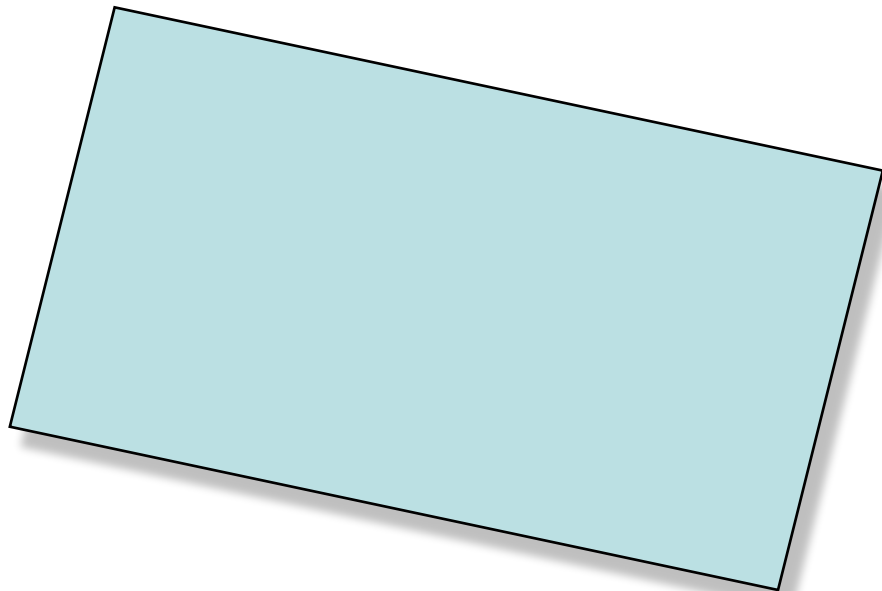
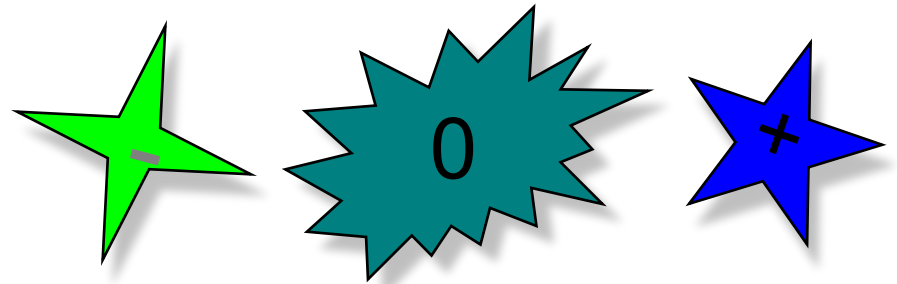
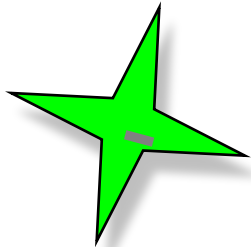
Хроматограмма раствора для дезинфекции хирургического поля



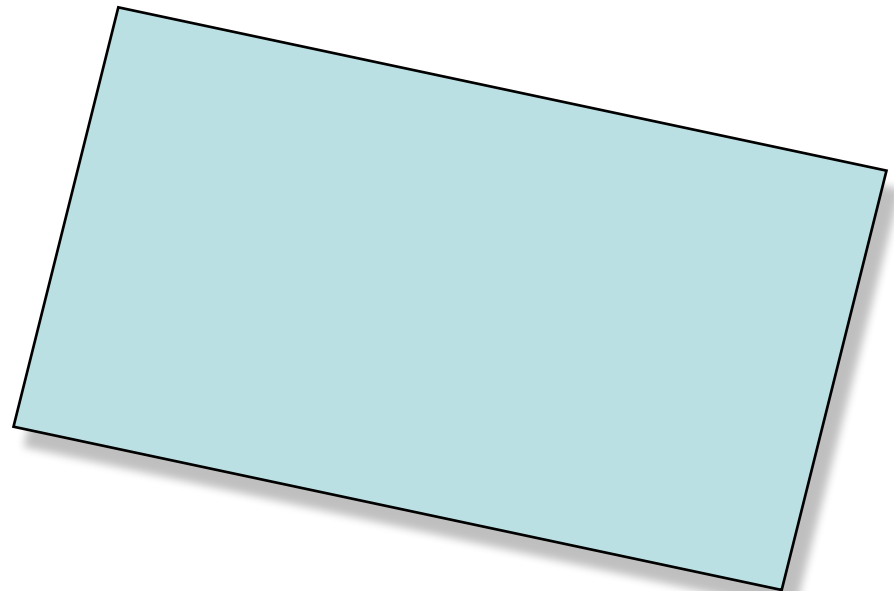
Градиентное элюирование. $\lambda=265$ нм.

Ион-парная хроматография

Механизм (I) ион-парной хроматографии

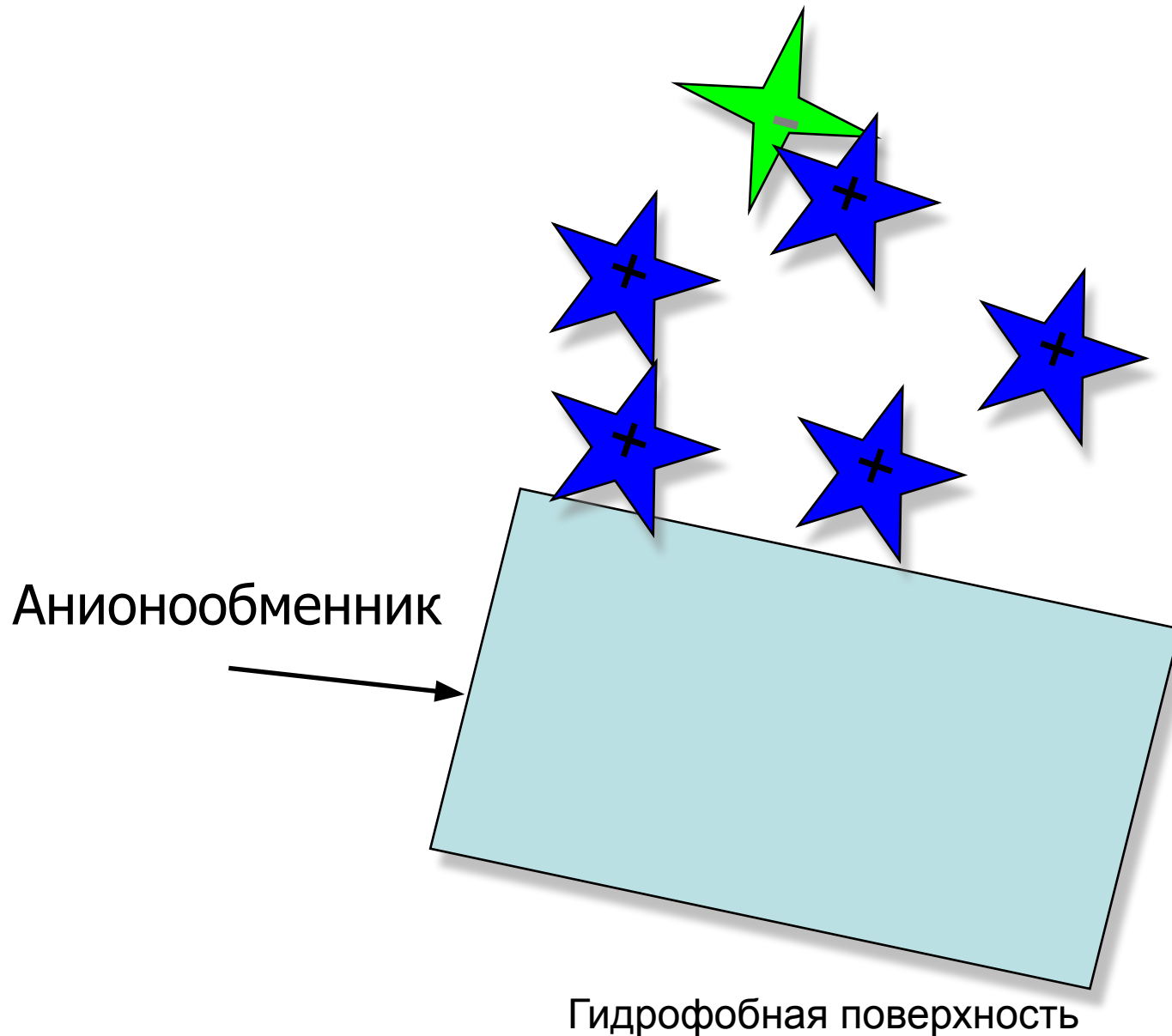


Гидрофобная поверхность



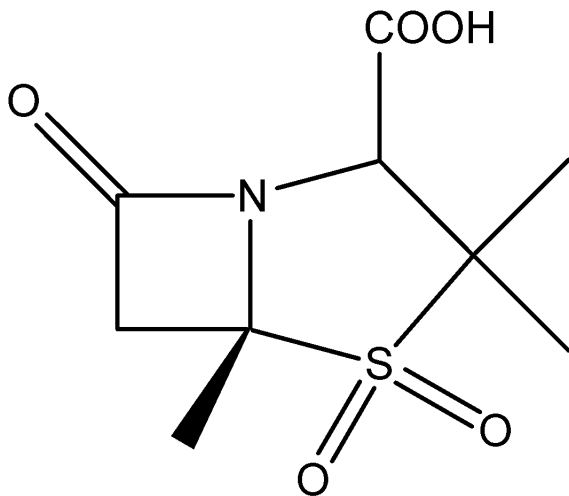
Гидрофобная поверхность

Механизм (II) ион-парной хроматографии

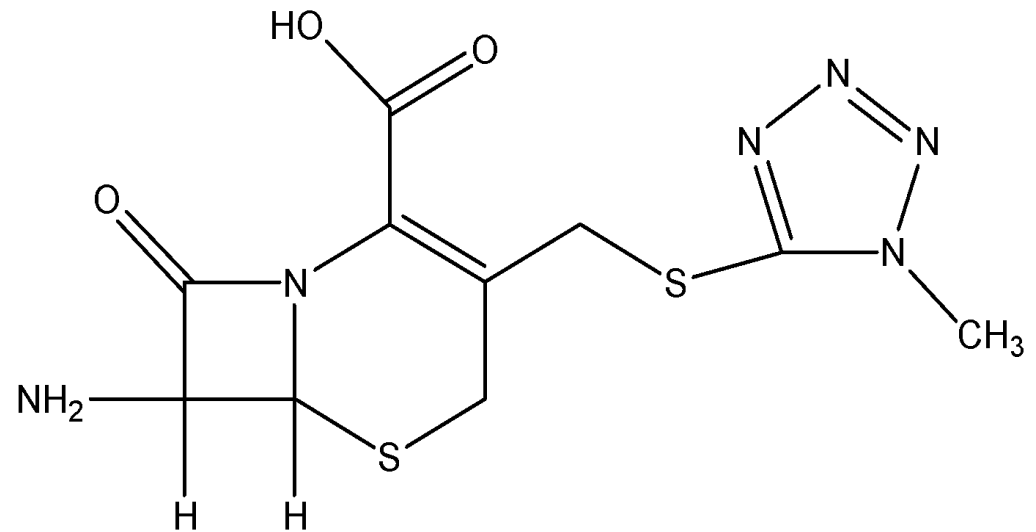


Ион-парная хроматография

Сульбактам

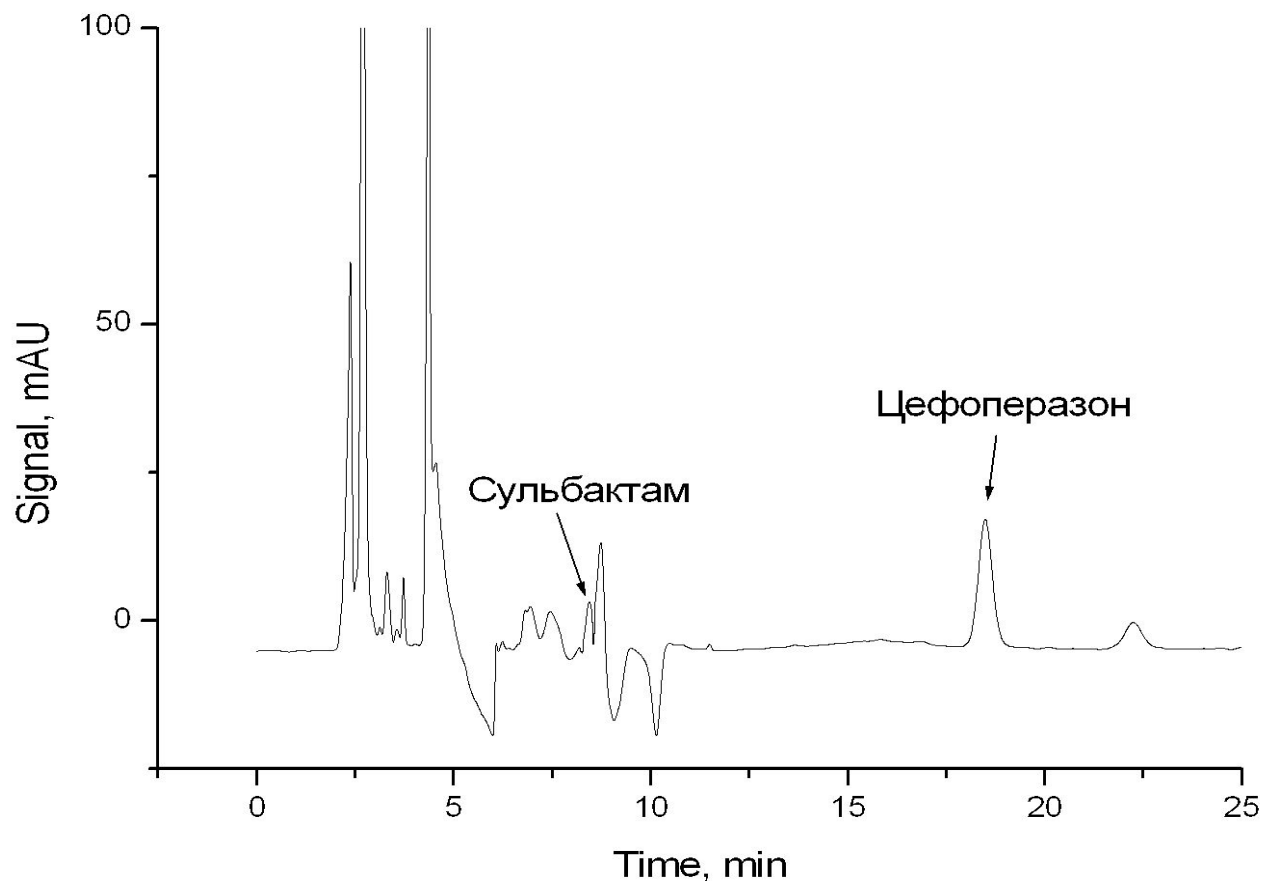


Цефоперазон



Хроматограмма образца плазмы крови содержащей сульбактам и цефоперазон

Предел обнаружения 4 мг/л



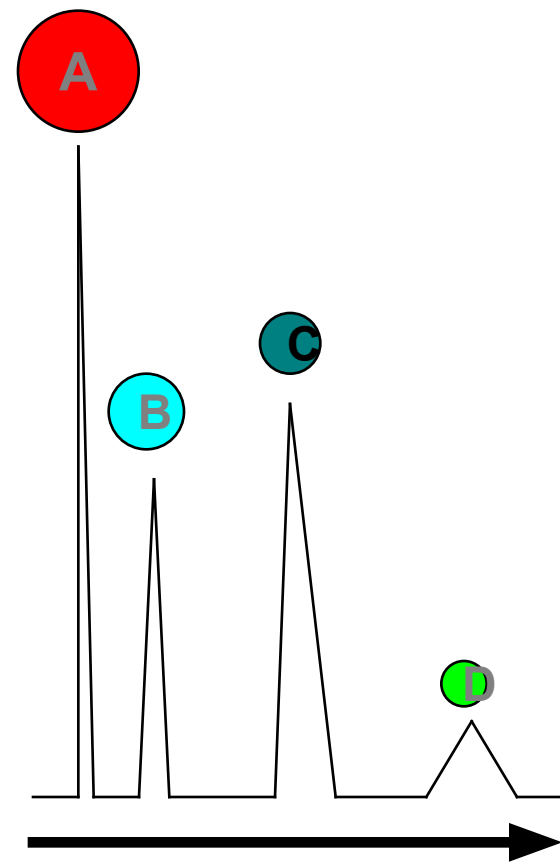
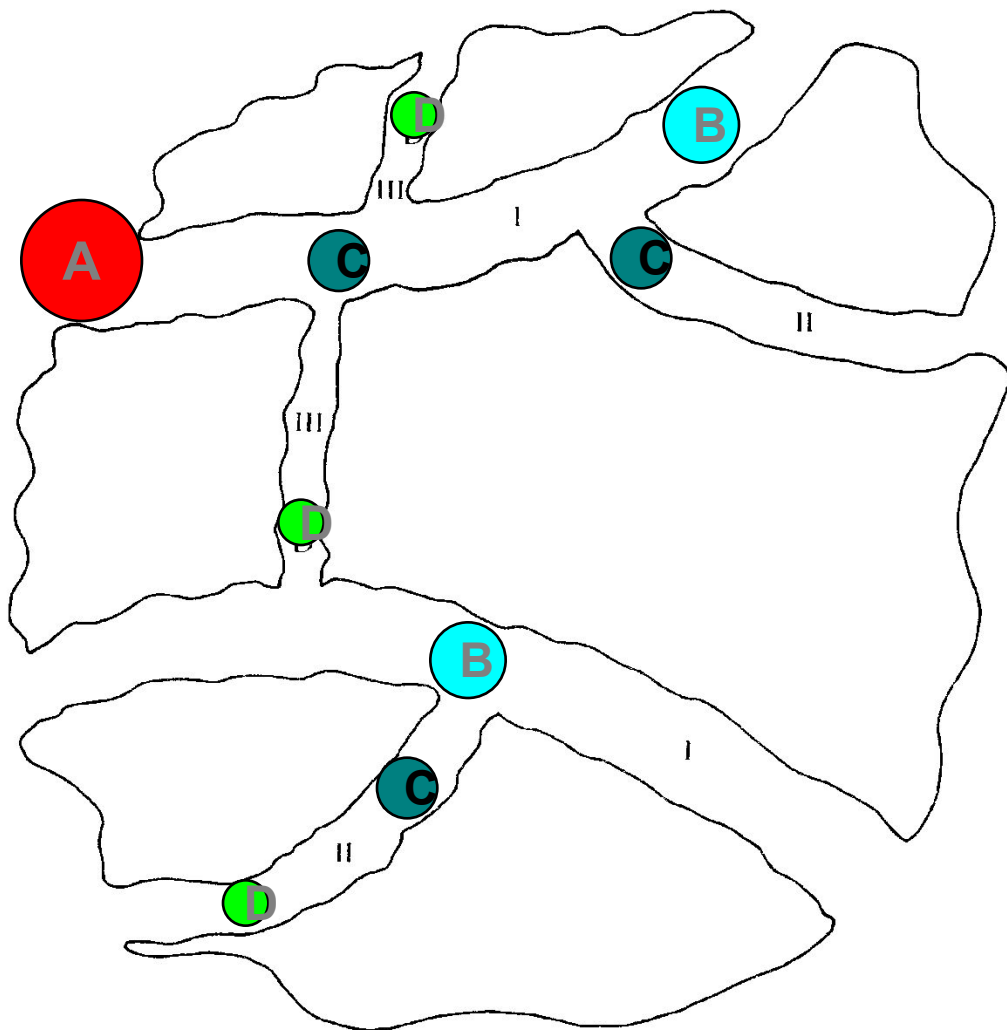
В элюенте – добавка бромида тетрабутиламмония

Эксклюзионная хроматография

Эксклюзионная хроматография

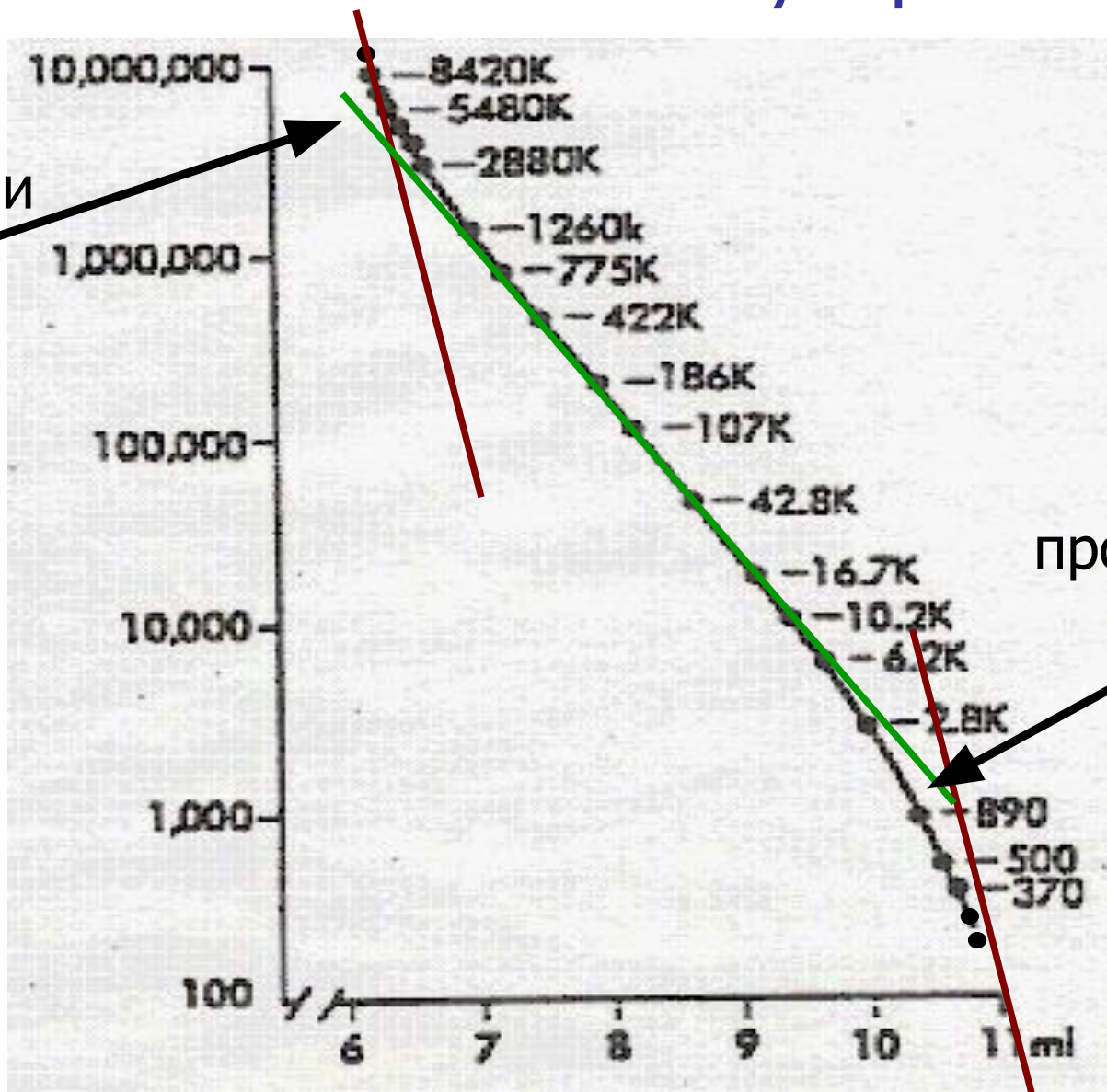
- Основана на **проникновении** (диффузии) молекул в гелевую матрицу (полиакриламиды, агароза и др.), содержащую поры определенного размера
- Размер пор сорбента определяет **предел эксклюзии** (обычно 10^6) и **предел проникновения** (обычно 10^3).
- Удерживание определяется **размером и формой** молекул
- Большие молекулы элюируются **перед** маленькими.
- Молекулы, размер которых превышает предел эксклюзии, элюируются с мертвым объемом V_0 .
- $0 \leq D \leq 1$ (**только** для эксклюзионной хр-фии)

Механизм эксклюзионной хроматографии



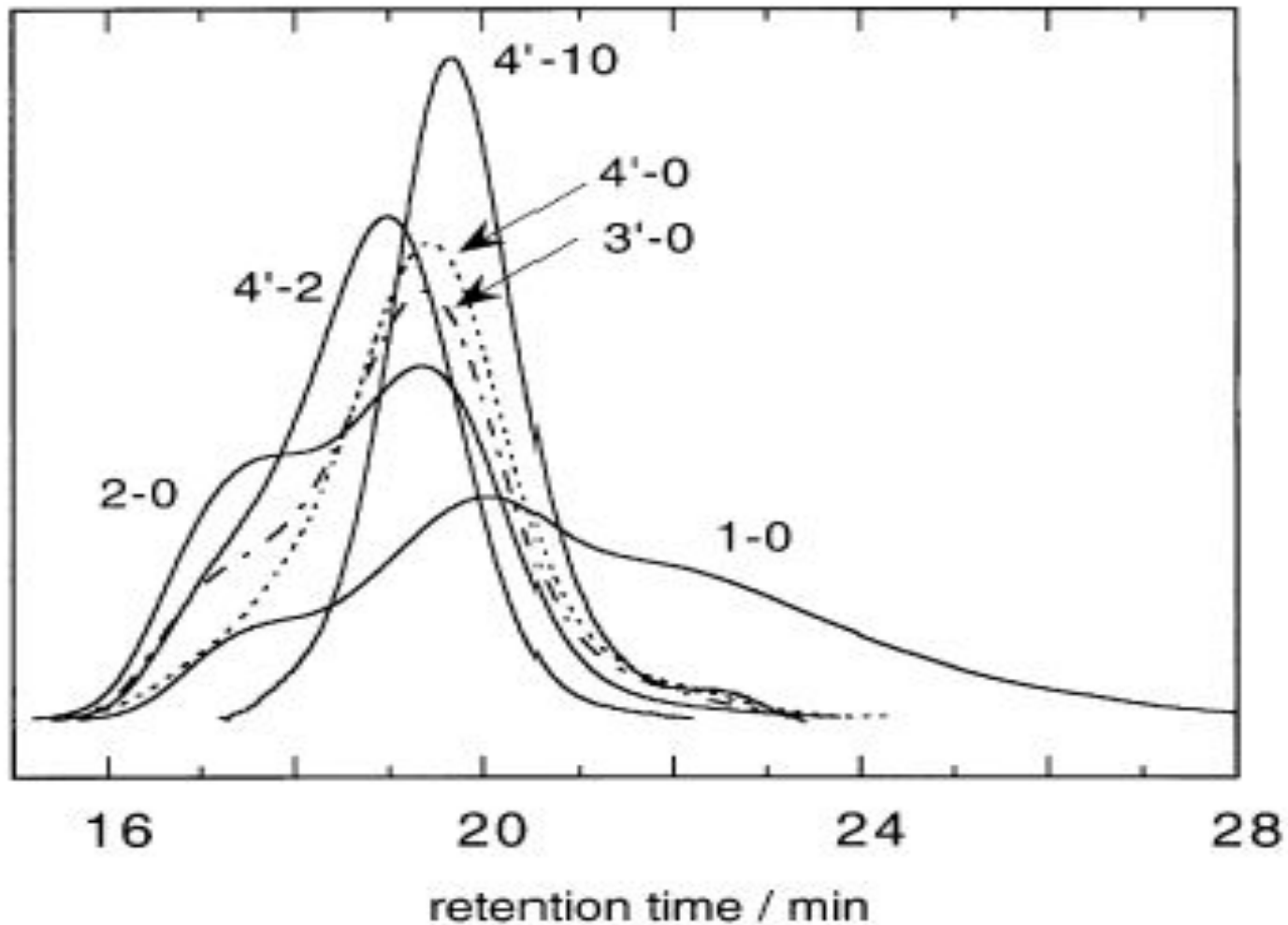
Удерживание молекул полимера в зависимости от молекулярной массы

Предел
экслюзии



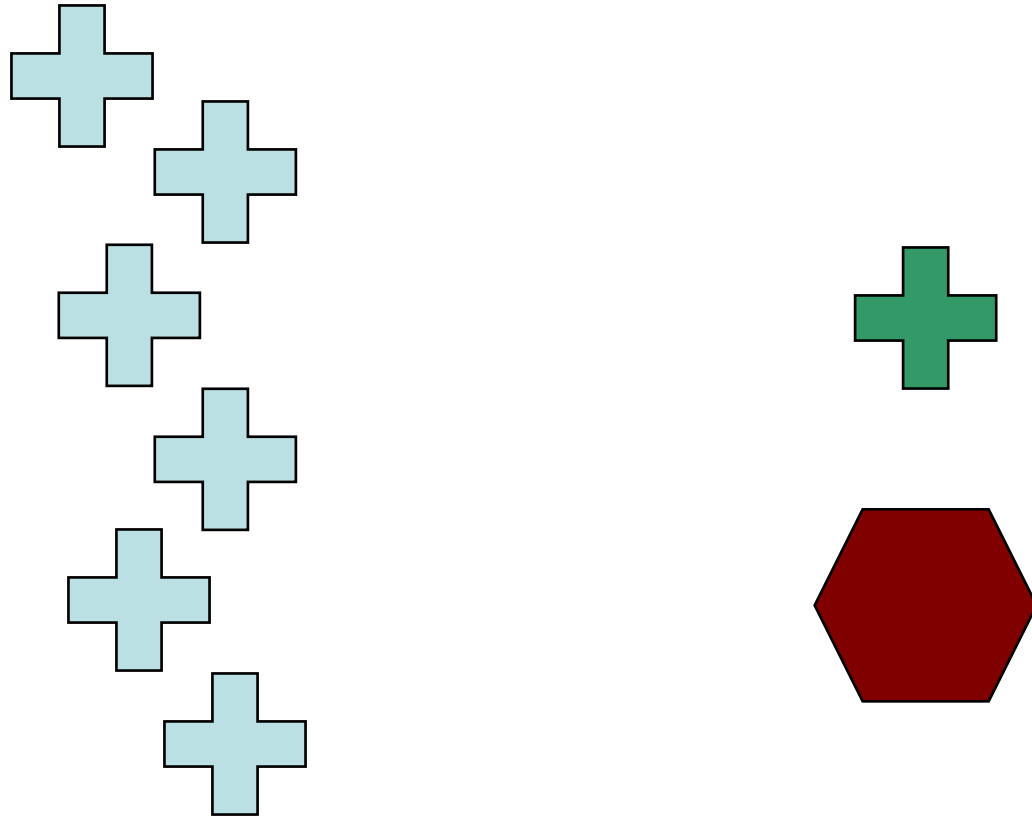
Предел
проникновения

Определение молекулярно-массового распределения образцов поливинилпирролидона



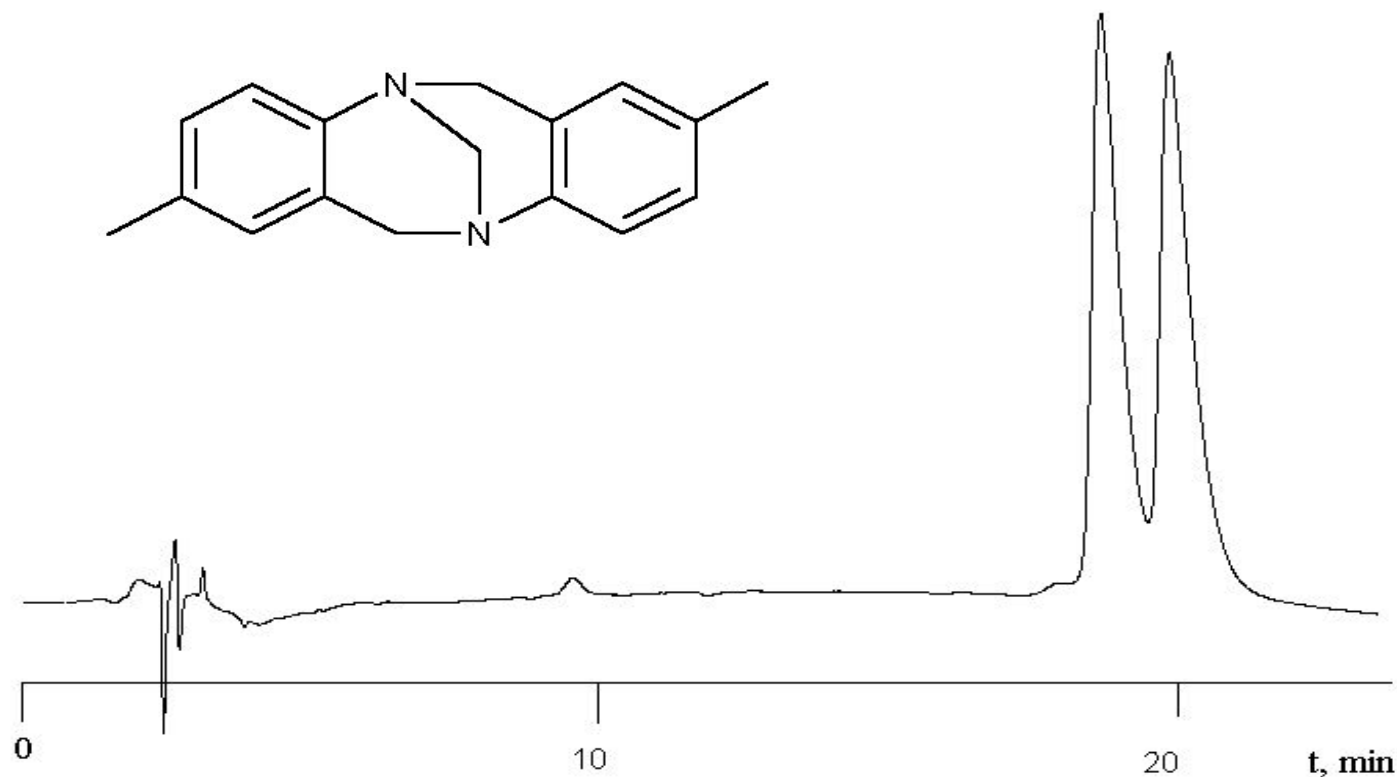
Жидкостная хроматография специфических взаимодействий

Хиральная хроматография (Разделение стереоизомеров)



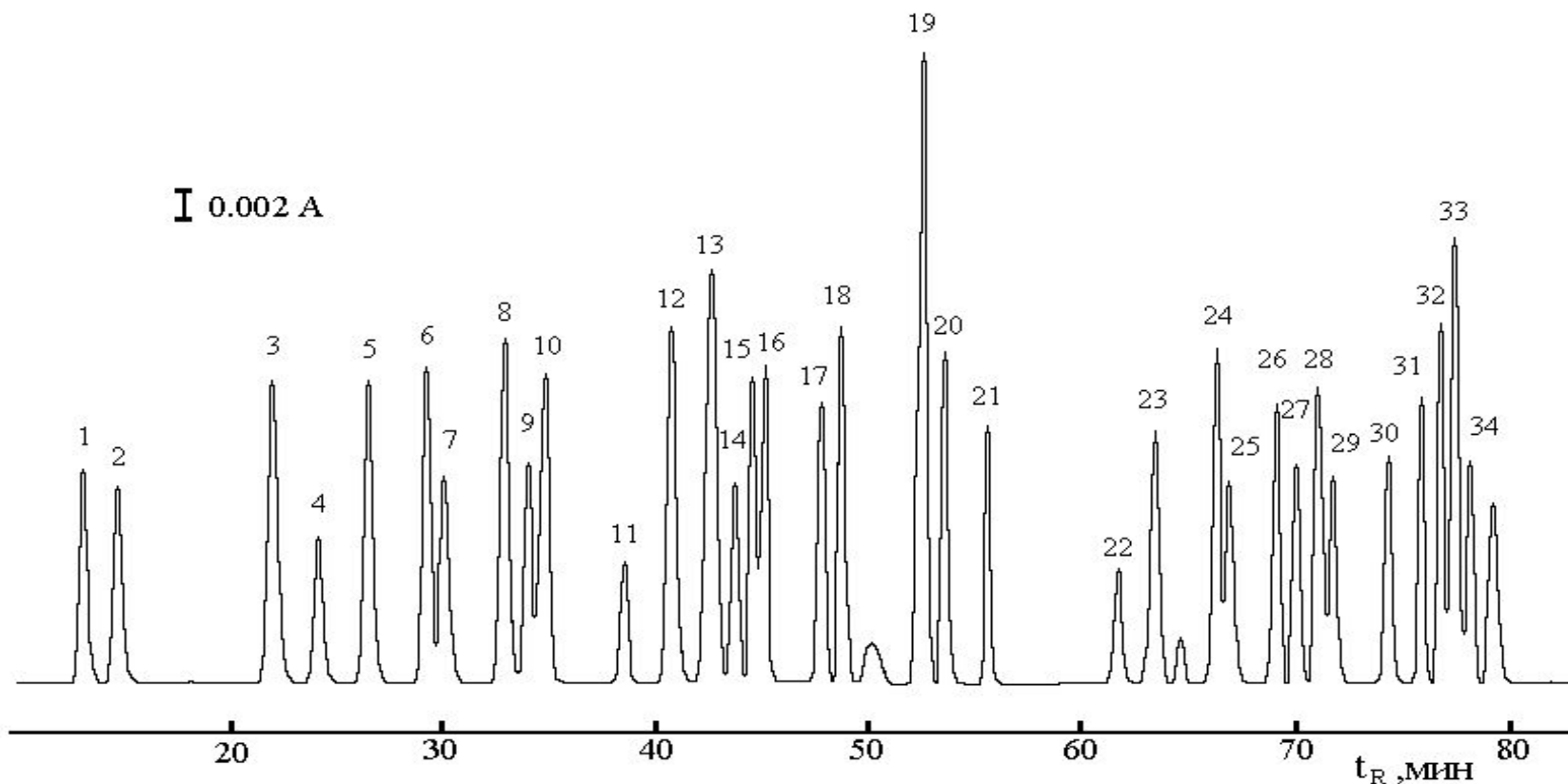
Неподвижная фаза для
разделения стереоизомеров

Разделение энантимеров «основания Троггера»



Подвижная фаза: 10% этилацетата в н-гексане.
Температура 22 °С. Скорость подв. фазы: 0,25 мл/мин.
Длина волны детектирования 254 нм.

Разделение оптических изомеров аминокислот



Column, Mightysil RP-18 (150x4.6 I.D.); mobile phase: methanol-0.01 M Na₂HPO₄, pH 6.0, gradient elution flow-rate, 0,5 ml/min. Detection: DAD, $\lambda=340$ nm.

Peaks: 1=L-Asp, 2=D-Asp, 3=L-Glu, 4=D-Glu, 5=L-Asn, 6=D-Asn, 7=L-Ser, 8=L-Gln, 9=D-Ser, 10=D-Gln, 11=D-His, 12=L-Thr, 13=Gly+L-His, 14=D-Thr, 15=D-Arg, 16=L-Arg, 17= β -Ala, 18=L-Ala, 19=L-Tyr+GABA, 20=D-Ala, 21=D-Tyr, 22=L-Met+L-Trp, 23=L-Val, 24=L-Phe, 25=D-Met, 26=D-Trp, 27=D-Val, 28=D-Phe, 29=L-Ile, 30=L-Leu, 31=L-Lys, 32=D-Ile, 33=D-Lys, 34=D-Leu.

Аффинная хроматография (избирательное связывание)

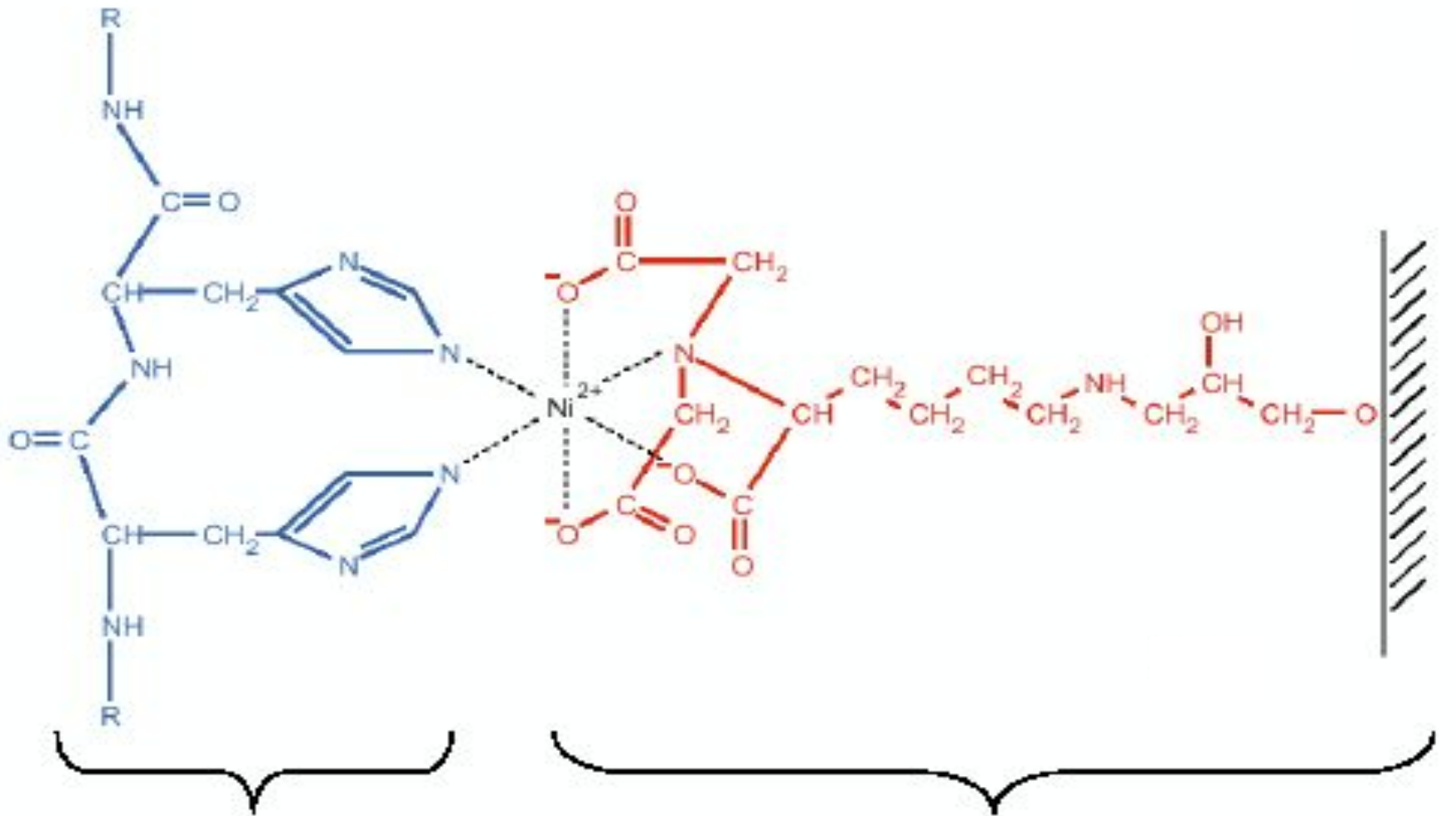
Основана на способности некоторых веществ
(в основном – белков)

нековалентно связываться со специфическим
молекулами или ионами (лигандами)

Лиганд **закреплен** на пористом сорбенте

Из множества веществ в анализируемой смеси
с лигандом реагируют **один или несколько**

Селективное взаимодействие лиганда с белками, содержащими парный гистидин



Белок

Агароза с никелевым комплексом НТА

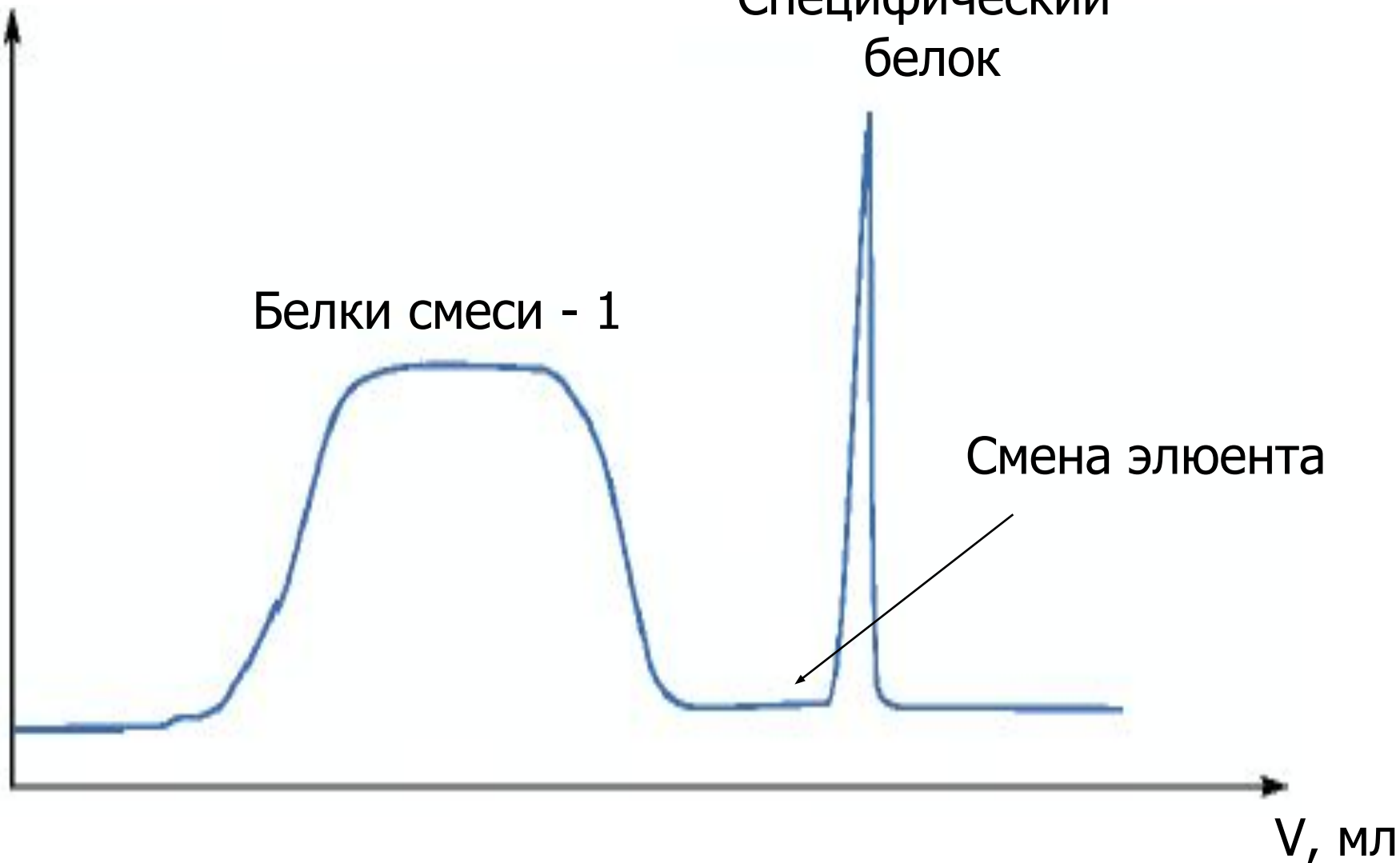
Типичный вид хр-мы в аффинной хр-фии

Сигнал
детектора

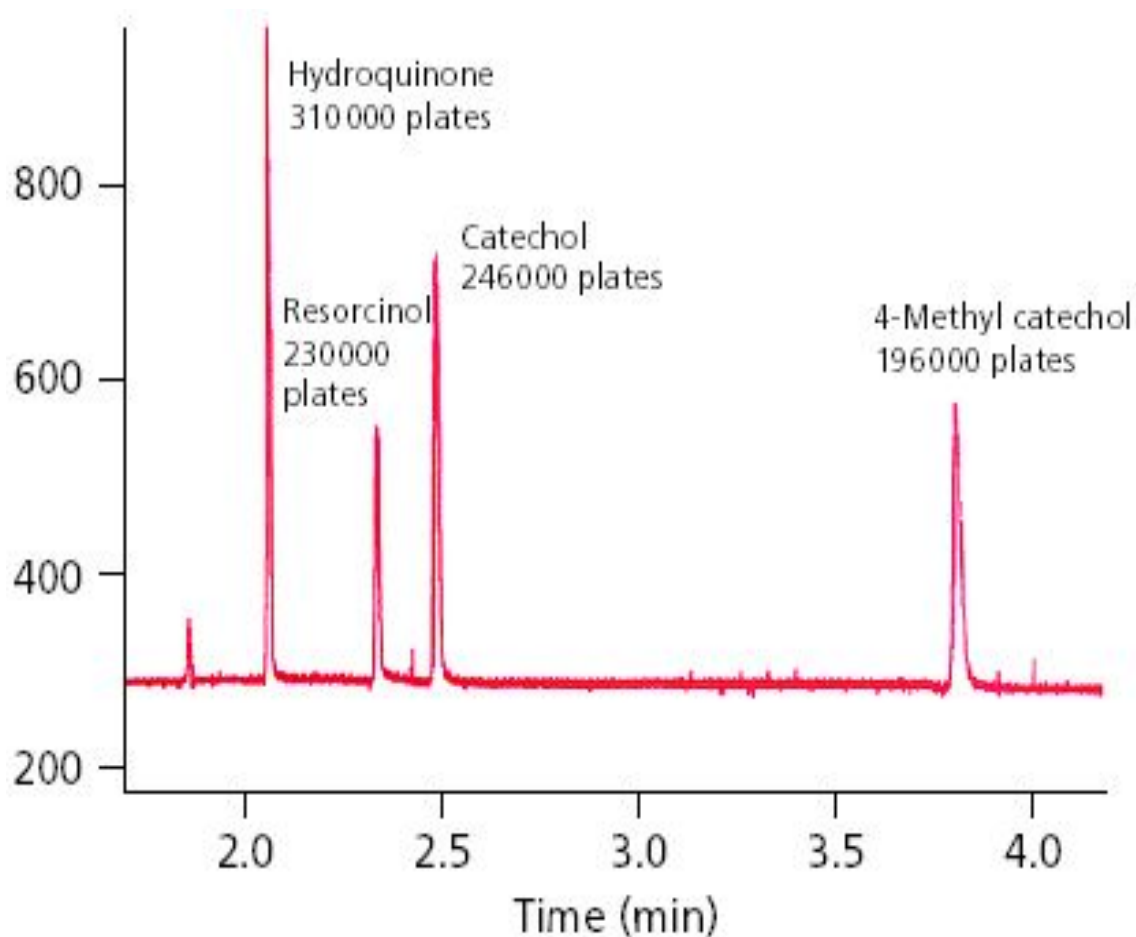
Специфический
белок

Белки смеси - 1

Смена элюента



Хроматография при ультравысоких давлениях



Колонка: 43 см x 30 мкм

Сорбент: 1 мкм

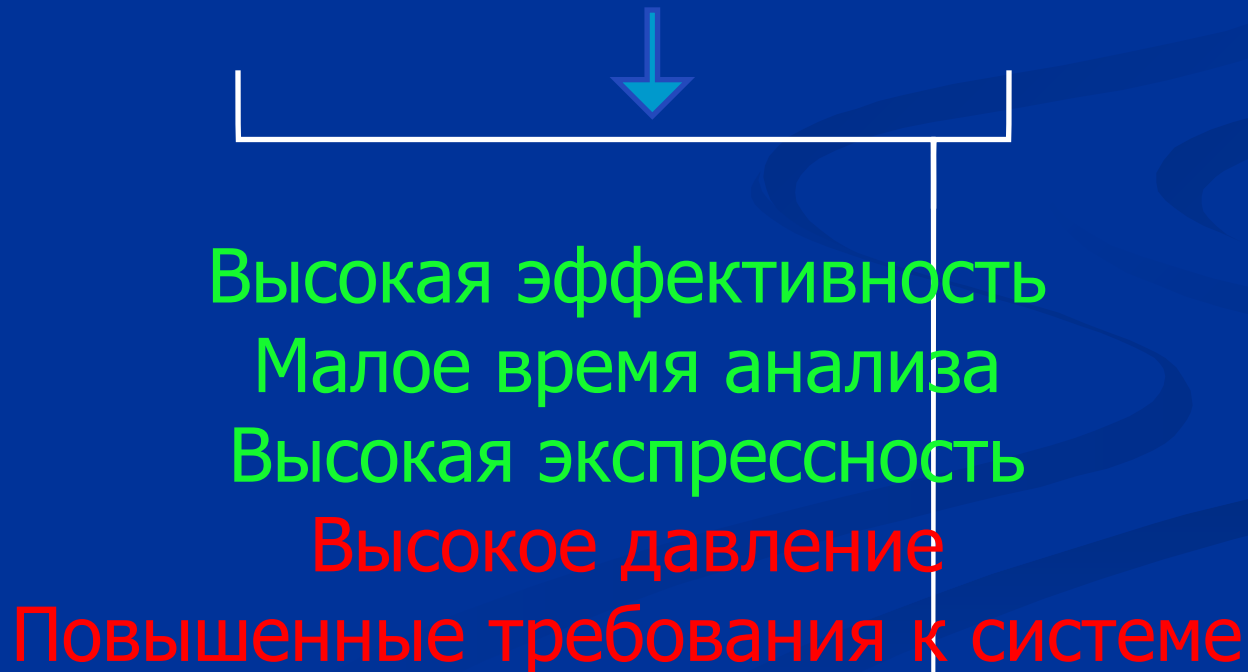
Давление: 7100 атм

Максимальная
эффективность: 625000
теор.т./м

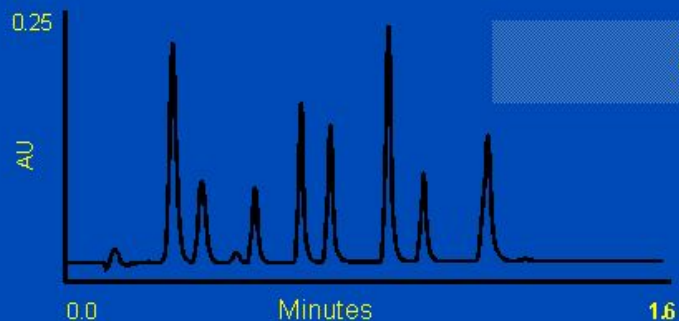
Вес установки ~ 7 тонн

Быстрая жидкостная хроматография (2004 г.) (UHPLC, RRLC, UPLC, RSLC)

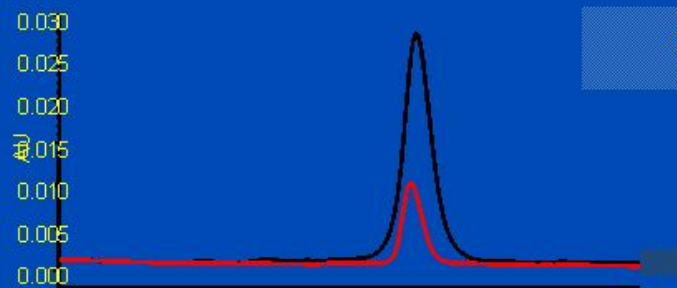
- Диаметр зерна сорбента менее 2 мкм
- Меньшие размеры колонок
- Относительно большие потоки растворителя



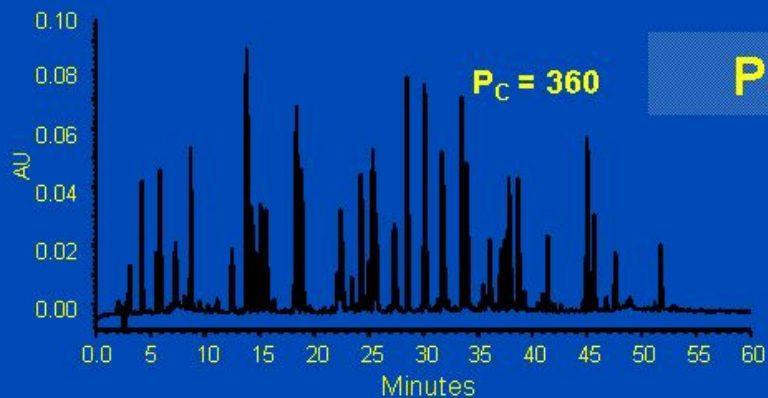
Преимущества UPLC



Скорость: 9X быстрее



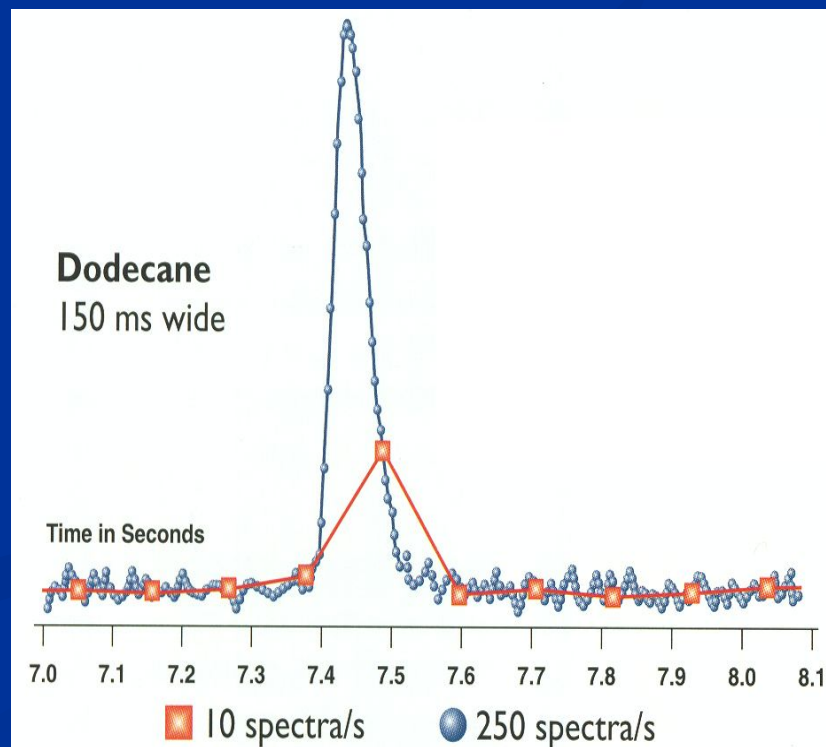
Чувствительность: 3X выше



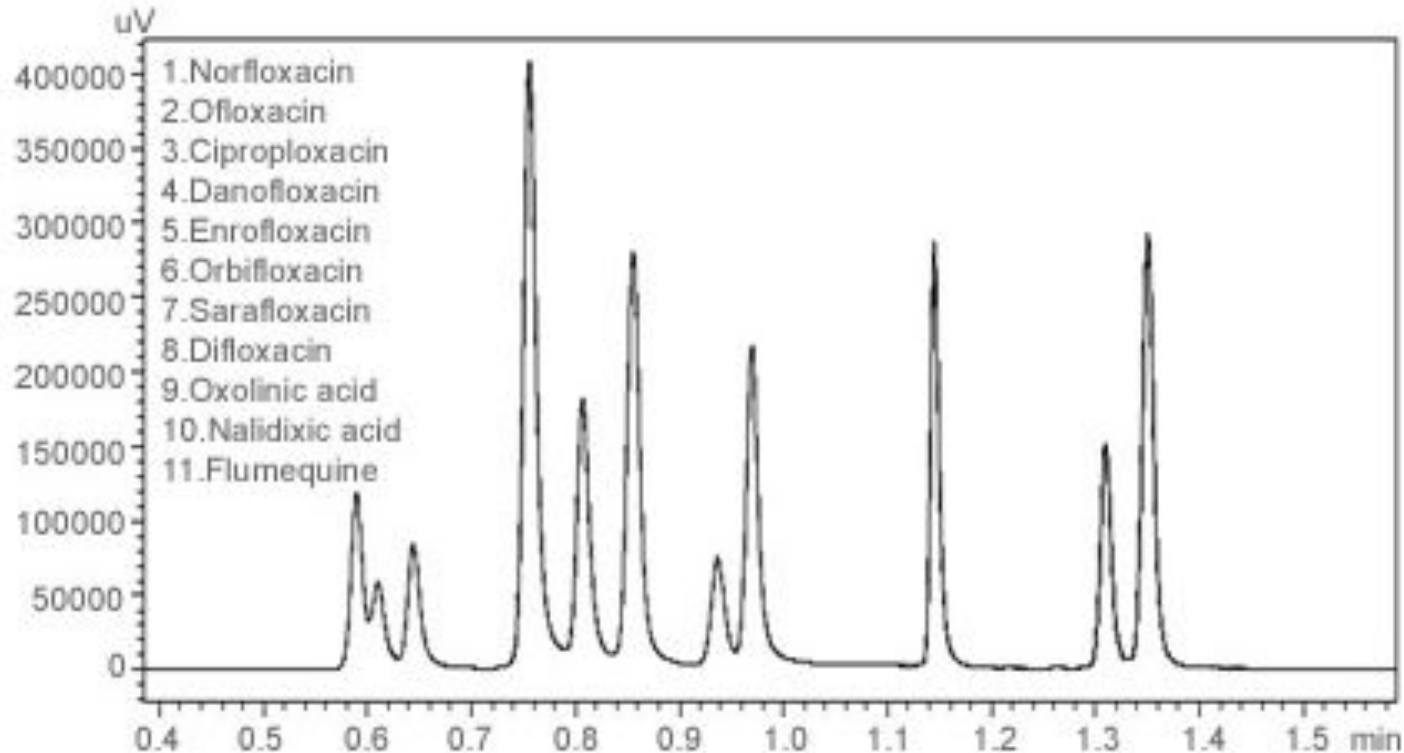
Разрешение: 1.7X больше

Технические особенности быстрых ВЭЖХ систем

- Короткие (30 – 50 мм) колонки с зерном менее 2 мкм малого внутреннего диаметра (1 – 3 мм), большие потоки растворителя (до 2 мл/мин)
- Необходимость использования высоких давлений (до 3000 Бар)
- Необходимость использования быстрых автосемплеров (цикл ввод-промывка менее 30 секунд)
- Необходимость использования быстрых детекторов (частота сбора данных 50 – 100 Гц)
- Минимизированный мертвый объем системы (до 10 – 20 мкл!!!!)



Пример определения флоксацинов методом УНПЛС



Column: ODS (3 mm i.d.×50 mm, 1.8 μm)

Mobile phase : A: 0.05% formic acid B: 0.1% formic acid in acetonitrile

Gradient : B 8% → 16%(0.75 min) → 36%(1-1.5 min) → 95%(2 min)

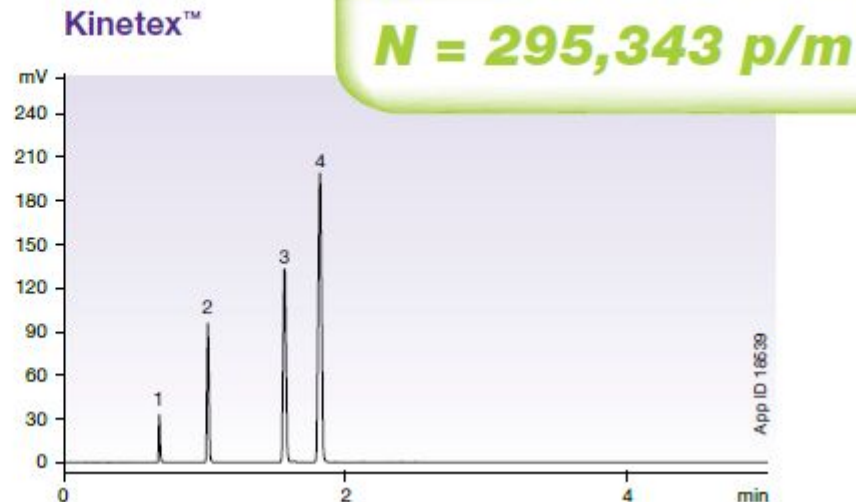
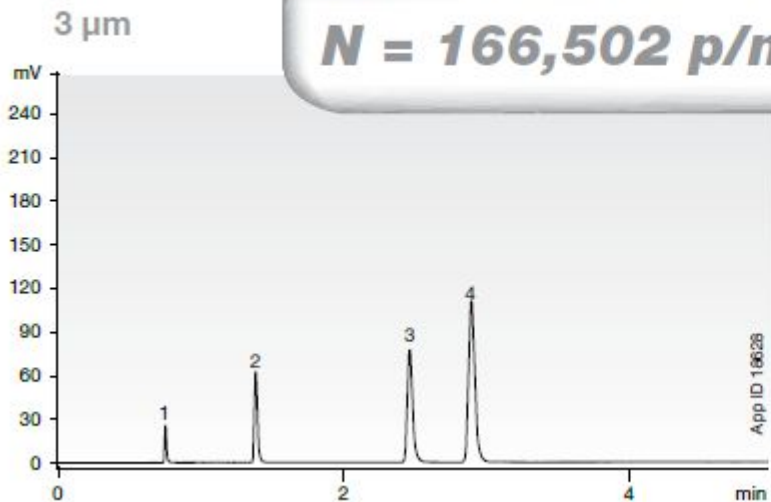
Flow rate: 2.0 mL/min

Column temp.: 55°C

Detection: Ex. 295 nm, Em. 455 nm (0-1.05 min)

Ex. 325 nm, Em. 365 nm (1.05-3 min)

Повышение характеристик хроматографического разделения Core – Shell технология

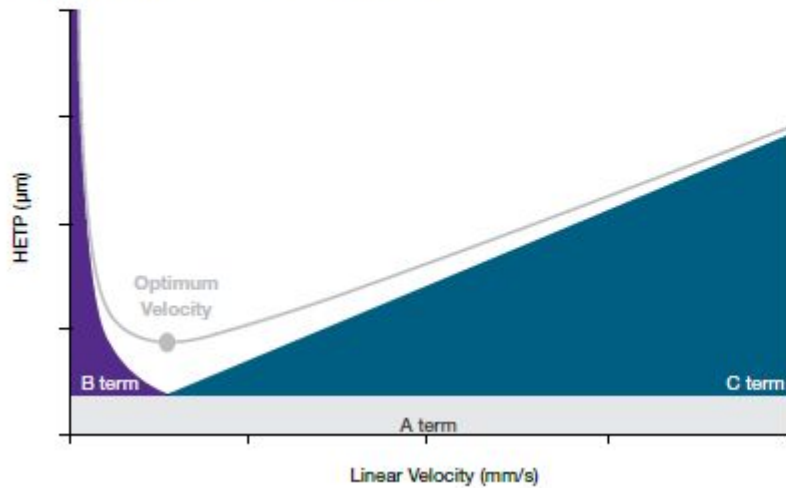


van Deemter Equation

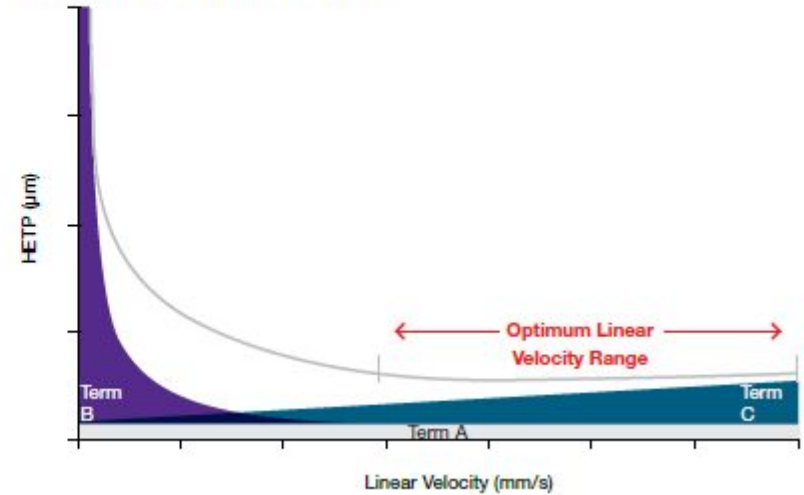
$$H = 2\lambda d_p + 2GD_m/\mu + w(d_p)^2\mu/D_m + Rd_s^2\mu/D_s$$

- A: Eddy Diffusion
- B: Longitudinal Diffusion
- C: Mass Transfer

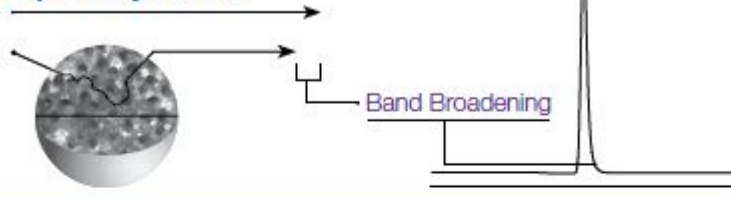
Traditional Chromatography



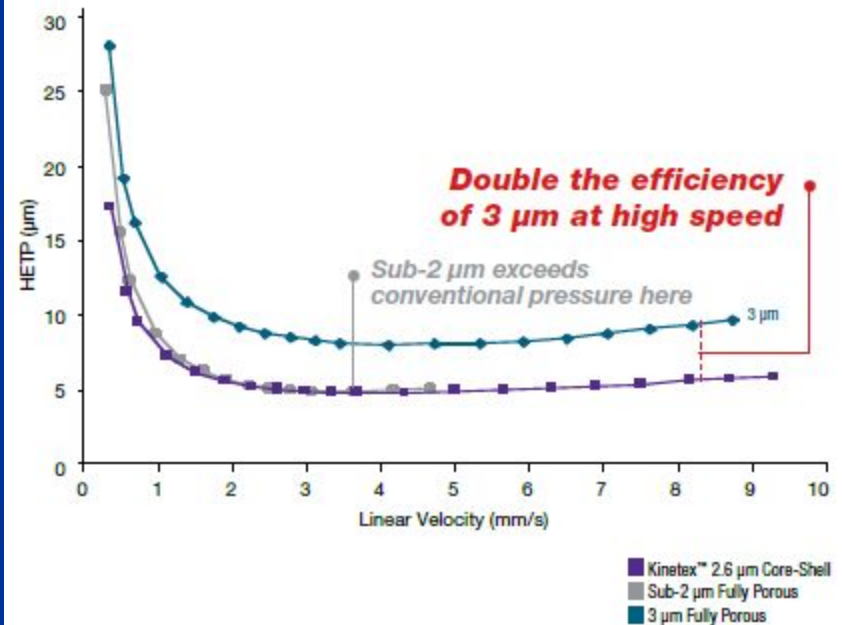
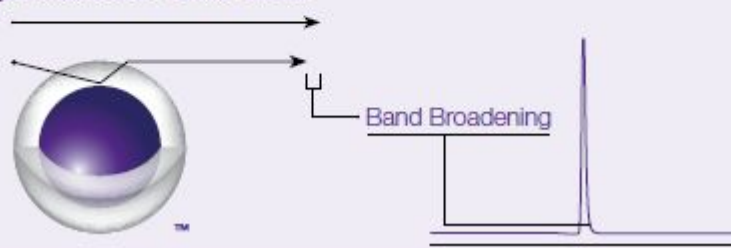
Ultra-High Performance



Sub-2 μm Fully Porous



2.6 μm Kinetex™ Core-Shell



Преимущества жидкостной хроматографии

- Более гибкие методы (многообразие вариаций подвижной и неподвижной фаз, механизмов разделения)
- Лучше воспроизводимость (жидкости легче поддаются стандартизации)
- Подходит для разделения полярных и неполярных веществ, а также высококипящих и термонеустойчивых соединений
- Высокая чувствительность и более высокая точность
- Мощный метод изучения механизма метаболизма веществ и т.п.