

Жидкостная хроматография

- **Особенность жидкостной хроматографии – жидкая подвижная фаза**
- **Применяется для определения и разделения большего числа веществ, чем ГХ, поскольку многие вещества не обладают летучестью, неустойчивы при высокой температурах**
- **Жидкая фаза является активным элюентом и может сорбироваться на поверхности неподвижной фазы**
- **Молекулы элюента вытесняются с поверхностного слоя молекулами анализируемого соединения, поэтому V_R меньше в ЖХ по сравнению с ГХ, а диапазон линейности больше**

Жидкостная хроматография

- Применяя различные элюенты можно изменить параметры удерживания и селективности
- В классической жидкостной хроматографии элюент продвигается по колонке под действием силы тяжести, поэтому скорость процесса разделения мала

Жидкостная хроматография

Классификация методов жидкостной хроматографии:

1. *по агрегатному состоянию хроматографической системы:*

- – жидкостно-адсорбционная
- – жидкостно-жидкостная

2. *по способу перемещения элюента:*

- – *изократическая: состав ПФ сохраняется постоянным.*
- – *градиентная: состав ПФ в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону.*

Жидкостная хроматография

3. по конфигурации разделяющей системы:

- – планарная (бумажная, тонкослойная);
- – колоночная;
- – микроколоночная $d_{\text{колонок}} \leq 2 \text{ мм}$;
- – многоколоночная;
- – циркуляционная: разделяемая смесь веществ циркулирует с потоком ПФ через одну и ту же хроматографическую колонку или систему колонок;
- – многомерная: способ, при котором смесь веществ разделяется вначале в одних условиях, а затем отдельные фракции элюата подвергаются дальнейшему разделению в других условиях или иных системах;
-

Жидкостная хроматография

- – **перколяционная** (перфузионная): хроматография, при которой поток ПФ движется через поры твердого сорбента, а не между частицами сорбента;
- – **мультихроматография**: *неоднократно повторяемая хроматография в системе из двух колонок с НФ одинаковой или различной химической природы, при которой селективность системы варьируют путем изменения по заданному закону физических условий разделения (градиента давления или расхода ПФ, градиента температуры).*

Жидкостная хроматография

4. по относительной полярности подвижной и неподвижной фазы:

- – нормально-фазовая
- – обращено-фазовая

5. по механизму разделения:

- – адсорбционная
- – распределительная
- – эксклюзионная
- – аффинная
- – лигандообменная:
- – ионнообменная

В отдельную группу выделяют **электрофорез** и **электрохроматографические** методы.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

В настоящее время широкое распространение получил новый метод – *высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)*

Разделение основано на четырех принципах

- **Адсорбции** (жидко-твердофазная или адсорбционная хроматография);
- **Распределении** (жидкостно-жидкостная хроматография);
- **Ионном обмене** (ионообменная и ионная хроматография);
- **Эксклюзии** (гель-хроматография или эксклюзионная хроматография).

В хроматографии редко осуществляется какой-то один механизм разделения, чаще в разделии участвуют несколько механизмов одновременно

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Адсорбционная хроматография

- **Неподвижной фазой служит** силикагель или оксид алюминия, реже применяют синтетический силикат магния (флорисил), оксид магния, пористые стекла, пористые полимеры
- *ЖАХ основана на конкурентном взаимодействии полярных групп вещества и молекул растворителя с активными центрами адсорбента на его внутренней поверхности.*
- **Изотерма адсорбции линейна лишь в достаточно ограниченном диапазоне концентраций**
- **Процессы адсорбции локализованы на активных центрах поверхности сорбента.**

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Сильно полярные молекулы (например, вода) необратимо адсорбируются на этих центрах и дезактивируют поверхность адсорбента.
- Поэтому в адсорбционной хроматографии следует тщательно **контролировать содержание воды** в используемых растворителях.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Поверхность силикагеля, находящегося в равновесии с ПФ, всегда покрыта более или менее прочно связанным адсорбционным слоем.
- Если ПФ содержит два или более компонентов, то состав адсорбционного слоя отличается от состава в объеме ПФ.
- Главную роль в процессах взаимодействия молекул сорбата с адсорбционными слоями и поверхностью твердого адсорбента играют *ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия.*

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Разработаны модели удерживания *Снайдера, Сочевинского, Скотта и Кучеры.*
- В целом наблюдаются следующие закономерности:
удерживание возрастает:
 - а). с увеличением полярности сорбата;
 - б). с уменьшением числа атомов углерода в молекуле сорбата;
 - в). при увеличении числа π – электронов (для полиядерных соединений).

Высокоэффективная жидкостная хроматография

удерживание уменьшается:

- а). с увеличением степени экранирования полярных групп сорбата орто-заместителями;
- б). при увеличении полярности ПФ;
- в). по мере дегидроксилирования поверхности адсорбента.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- *Ряды функциональных групп органических веществ*
- *в порядке адсорбируемости на силикагеле:*
- $-\text{CH}_2- < -\text{CH}_3 < -\text{CH}=\text{CH}- < -\text{S}-\text{R} < -\text{O}-\text{R} < \text{NO}_2 < -\text{NH}-$
- $< -\text{C}(\text{O})\text{OR} < -\text{C}(\text{O})\text{H} < -\text{C}(\text{O})\text{R} < -\text{OH} < -\text{NH}_2 < -\text{C}(\text{O})\text{OH}.$
- $\text{F} - < \text{Cl}- < \text{Br}- < \text{I}- < -\text{OR} < -\text{NR}_2 < -\text{NO}_2 < -\text{C}(\text{O})\text{OR} < -\text{C}(\text{O})\text{R} < -\text{C}(\text{O})\text{H} < -\text{NH}_2 < -\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{R} < -\text{OH} < -\text{C}(\text{O})\text{OH} < -\text{SO}_3\text{H}.$

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Распределительная хроматография

- Разделение смеси осуществляется за счет различия коэффициентов распределения компонентов между двумя несмешивающимися фазами: растворителем и фазой на сорбенте.
- В зависимости от полярности неподвижной и подвижной фаз различают:
 - ▣ *Нормально-фазовую (НФХ)*
 - ▣ *Обращенно-фазовую хроматографию (ОФХ)*

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- В НФХ используют полярный адсорбент и неполярные подвижные фазы
- В ОФХ применяют неполярный адсорбент и полярные подвижные фазы
- Выбор подвижной фазы часто важнее, чем неподвижной
- Неподвижная фаза должна удерживать разделяемые соединения
- Подвижная фаза – обеспечивает емкость колонки и эффективность разделения

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- *Основные параметры, определяющие качество колонки:*

объемная скорость, диаметр частиц сорбента, характер заполнения колонки, геометрия заполнения, коэффициент диффузии.

- Удовлетворительными считают колонки с $N=3-3,5d$;
- очень хорошими – колонки с $N=2d$, где d –средний (эффективный) диаметр частиц сорбента, мкм.
- При длине колонки 150 мм с размером частиц сорбента 5 мкм возможно получение колонки с $N =10\ 000$ т.т.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Неподвижная фаза

- В качестве адсорбентов применяются тонкодисперсные пористые материалы
- **Полярные сорбенты** – оксиды кремния, алюминия, флорисил
- Применяются для разделения неполярных или среднеполярных соединений
- Характеризуются высокой чувствительностью к воде и растворителям

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- **Неполярные адсорбенты** – сажа, диатомит, кизельгур - неселективны к полярным молекулам
- Часто применяют сорбенты с привитыми неполярными фазами (силикагель с алкилсилильными группами – C_2 – C_{22} , наиболее часто C_{18}).
- Такие сорбенты называют *щеточными*

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Подвижные фазы должны:

- Хорошо растворять анализируемую пробу
- Иметь малую вязкость
- Быть инертными, безопасными, дешевыми
- Подходить применяемому детектору
- **Элюирующая сила (способность) ПФ** – свойство вступать в такие межмолекулярные взаимодействия с компонентами хроматографической системы, которые способствуют десорбции хроматографируемых соединений, более быстрому перемещению концентрационных зон индивидуальных компонентов исходных смесей.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- **Элюотропный ряд** – серия чистых или смешанных растворителей, приведенных в порядке возрастания их элюирующей способности в выбранной хроматографической системе.
- **Разделение достигается меняя элюирующую силу подвижной фазы**
- **Элюирующая сила растворителя показывает, во сколько раз энергия сорбции данного элюента больше, чем энергия сорбции элюента, выбранного в качестве стандартного (н-гептана)**

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Элюирующая способность характеризуется параметрами:
- 1. **адсорбционная сила** ϵ^0 растворителя - представляет относительную энергию взаимодействия молекул ПФ с поверхностью адсорбента;
- 2. **параметр Снайдера R'**
В НФХ с увеличением полярности растворителя элюирующая сила растет, а в ОФХ – снижается;
- 3. **параметр S** - отражает чувствительность величин удерживания к изменению состава ПФ (предложен для ОФХ).

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Основой всех способов классификации селективности является способность растворителей вступать в межмолекулярные взаимодействия различных типов.
- Элюирующую силу представляют в виде суммы парциальных величин, характеризующих *протонодонорные*, *протоноакцепторные*, *диполь-дипольные* и другие свойства растворителей.
- Снайдер разбил 81 растворитель на 8 классов, расположенные определенным образом на треугольнике селективности.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

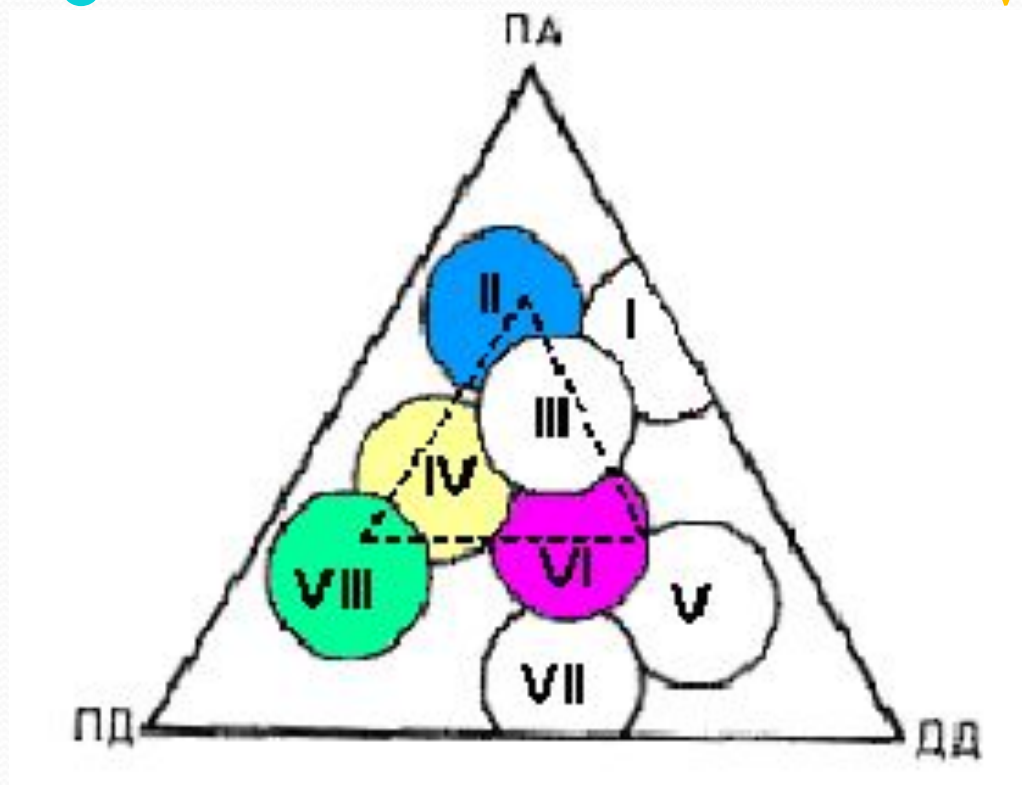
- Его вершинам отвечают гипотетические растворители, способные к взаимодействию только одного типа: к протонодонорным (ПД), протоноакцепторным (ПА) и диполь-дипольным (ДД) взаимодействиям.
- Окружности в его пределах изображают области соответствующие растворителям, поделенным на 8 групп селективности:
 - I – алифатические простые эфиры, амины;
 - II – алифатические спирты;
 - III – пиридины, тетрагидрофуран, амиды (кроме формамида);
 - IV- гликоли, уксусная кислота, формамид;

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- V – метиленхлорид, этиленхлорид;
- VI – алифатические кетоны и сложные эфиры, диоксан, сульфоны, нитрилы,



VII – ароматические углеводороды, нитросоединения,
III – фторированные спирты, вода, перфторформ.



Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Растворители одной группы сходны по селективности.
- Максимального изменения селективности можно ожидать при замене одного растворителя на другой из группы, наиболее удаленной на треугольнике.
- Для улучшения разделения высокополярных и ионогенных компонентов и формы пика в ПФ вводят специфические добавки:
- при разделении соединений *кислотного характера - фосфорную или уксусную кислоты,*
- при разделении *соединений основного характера аммиак и алифатические амины,*
- при разделении соединений *катионного характера - алкилсульфаты натрия.*

Высокоэффективная жидкостная хроматография

● Свойства растворителей для ВЭЖХ

Растворитель	Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила ϵ^0 на силикагеле	Параметр P'	Параметр S	Группа селективности
Ацетонитрил	190	0,50	5,8	3,1	VI
Вода	-	1,50	10,2	0,0	VIII
Гексан	190	0,01	0,1	-	-
Диоксан	215	0,45	4,8	3,5	VI
Метанол	205	0,7	5,1	3,0	II
Метиленхлорид	233	0,32	3,1	-	V
Пропанол-2	205	0,55	3,9	4,2	II
Тetraгидрофуран	212	0,44	4,0	4,4	III
Толуол	285	0,1	2,4	-	VII
Триэтиламин	-	-	1,9	-	I
Уксусная кислота	-	-	6,0	-	VI

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Элюенты делятся на слабые и сильные

- Слабые – мало адсорбируются неподвижной фазой, поэтому D сорбируемых веществ высоки
- Сильные – адсорбируются сильно, D сорбата низкие
- Растворитель тем сильнее, чем больше растворимость в нем пробы и чем сильнее взаимодействие растворитель – аналит

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Ряд Снайдера (в жидкостной адсорбционной хроматографии):
- пентан (0) < н-гексан < н-гептан (0,01) < циклогексан (0,04) < CCl_4 (0,18) < бензол (0,32) < CHCl_3 (0,38) < ацетон (0,51) < этанол (0,88) < вода, CH_3COOH

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- В ОФХ на C_{18} элюентный ряд имеет следующий вид:
метанол (1,0) < ацетонитрил, этанол (3,1) < изопропанол (8,3) < н-пропанол (10,1) < диоксан (11,7)
- Часто применяют смеси растворителей
- Оценка полярности многокомпонентных растворителей проводится через аддитивную комбинацию индексов полярности индивидуальных растворителей:

$$P_{\text{смеси}} = \sum_{i=1}^n f \cdot P_i'$$

- где f – доля вещества по объему.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Если один элюент долго и неполностью разделяет компоненты, то применяют метод градиентного элюирования – последовательно применяя более сильные растворители

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- **Обращенно-фазовая хроматография**

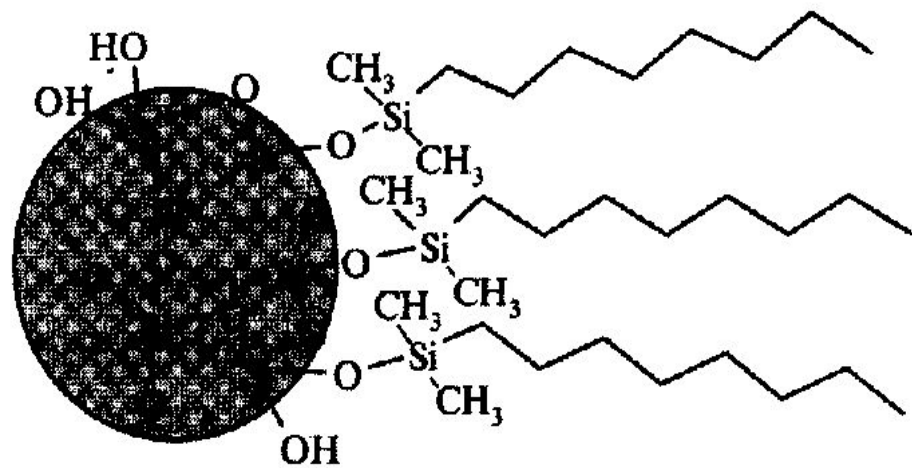
- *Неподвижные фазы*

- **Неподвижные фазы, полученные закреплением жидкостей путем физической адсорбции имеют ограниченный срок службы, т.к. возникает опасность вымывания растворителя в ходе хроматографического процесса**

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Наиболее часто применяются химически закрепленные фазы
- Для создания обращенной фазы поверхность силикагеля гидрофобизируют (обрабатывают алкилхлорсиланами). При этом образуется химически закрепленная фаза силоксана, содержащая Si-O-Si - связи
- Чаще всего алкильным остатком реагента является н-октадецил (C₁₈) или н-октил (C₈)

Высокоэффективная жидкостная хроматография



Участок поверхности обращенной фазы C₈. На поверхности имеются остаточные силанольные группы, частично связанные водородными связями между собой и с атомами кислорода да силоксановых групп.

- Поверхностный слой обращенной фазы рассматривают как псевдожидкость
- Чем длиннее алкильный радикал, тем больше времена удерживания органических веществ
- От длины радикала также зависит емкость колонки и максимальное количество пробы

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- **Плотность прививки** составляет 1,1-2,3 нм⁻². В зависимости от способа обработки свойства гидрофобизированных силикагелей могут изменяться, поэтому свойства колонок различных фирм несколько отличаются.
- **Содержание углерода** составляет 5-20 %.
- **Степень покрытия** поверхности силикагеля органическим модификатором 10-60%, в лучших случаях 90%.
- Наличие остаточных силанольных групп приводит к тому, что адсорбционный и ионообменный механизмы удерживания всегда сопутствуют обращенно-фазовому.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Для уменьшения числа силанольных групп сорбенты обрабатывают триметилхлорсиланом – процедуру называют *эндкеппинг*.
- Наиболее популярны силикагели торговых марок:
- *бондопак, лихросорб, порасил, сепарон, нуклеосил*.
- Недостатки ОФ сорбентов:
- ограниченный диапазон рН и сорбционная активность силанольных групп.
- Этого недостатка лишены в значительной степени колонки нового поколения фирмы “Феноминекс”, например, колонка Луна C_{18} стабильна в диапазоне значений рН 1,5-10.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

● *Механизм разделения*

- Механизм разделения до конца неясен.
- Распространенные теории Гильдебранта и Хорвата-Миландера.
- *Теория Гильдебранта:* основана на параметрах растворимости Гильдебранта, удерживание определяется межмолекулярными взаимодействиями разделяемых веществ с ПФ и НФ.
- Зависимость фактора емкости вещества от состава ПФ описывается ур.:

$$\ln k = A\phi^2 + B\phi + C$$

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- где ϕ - объемная доля органического компонента (модификатора) в ПФ, А, В, С – константы.
- Однако поведение соединений сложного состава с несколькими функциональными группами часто не удастся описать данной зависимостью.
- Более адекватно закономерности удерживания сорбатов в ОП ВЭЖХ описываются сольвофобной теорией Хорвата-Миландера.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

● Теория Хорвата-Миландера:

Показано, что водные элюенты, не содержащие органических растворителей, могут быть использованы для разделения полярных биологических молекул на C_{18} .

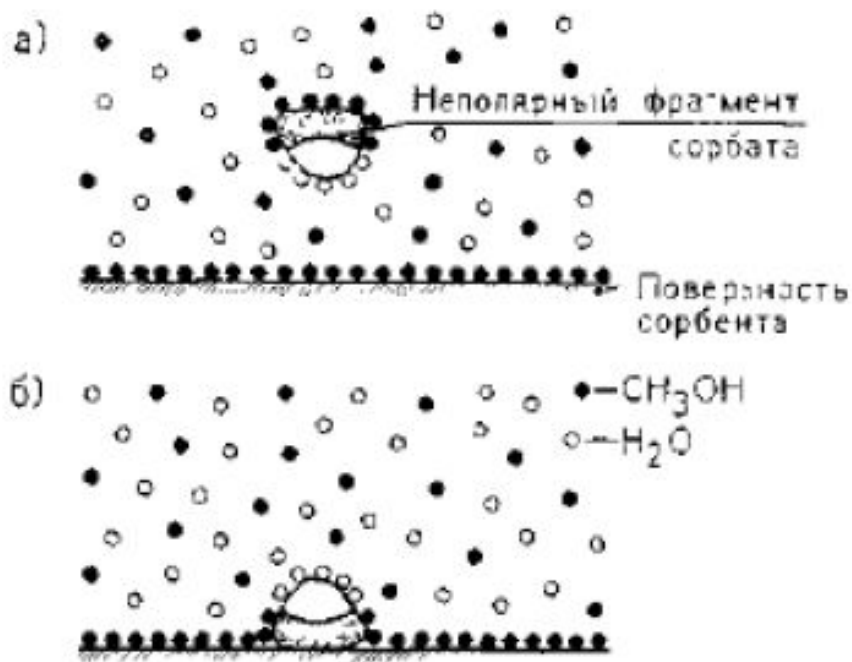
Что позволило сделать вывод: удерживание в ОФ варианте в основном определяется гидрофобными взаимодействиями между растворенным веществом и привитыми углеводородными радикалами НФ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- **Теория Хорвата.** В нормально-фазовом варианте между молекулами сорбатов и НФ образуются ассоциаты за счет кулоновских взаимодействий или водородных связей.
- В ОФ варианте причиной ассоциации являются сольвофобные взаимодействия в ПФ. Для полярных ПФ характерно сильное кулоновское взаимодействие и образование водородных связей между молекулами растворителей. Все молекулы растворителей связаны довольно прочно межмолекулярными силами. Чтобы поместить в эту среду молекулу сорбата, необходимо образование “полости” между молекулами растворителями.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

С энергетической точки зрения более выгодно такое положение, когда поверхность раздела между полярной средой и неполярными фрагментами НФ и молекулами сорбата минимальна. Уменьшение этой поверхности и достигается при сорбции.



Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Для обращено-фазового варианта ВЭЖХ характерно уширение хроматографических пиков.
- Основной причиной уширения пиков является существование на поверхности адсорбента сложных равновесных систем типа *молекулярный ион – молекула – молекулярный ассоциат – молекулярный полиассоциат*.
- Каждая из этих форм ионогенного соединения имеет свое время удерживания – в результате хроматографический пик соединения уширяется и создается впечатление потери эффективности хроматографической колонки.
- Симметричная форма пиков и высокая эффективность разделения достигается подкислением или подщелачиванием элюента.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- При выборе условий хроматографического разделения смеси веществ необходимо исходить, в первую очередь из физико-химических свойств разделяемых соединений.
- **Удерживание сорбатов определяется факторами:**
 - - гидрофобностью;
 - - дипольным моментом;
 - - объемом молекул;
 - - поляризуемостью;
 - - уменьшением площади поверхности при сорбции.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- **Гидрофобность.** Для упрощенной характеристики структурных параметров analyта и оценки баланса его гидрофильных и гидрофобных свойств использовали критерий гидрофобности Шатца:

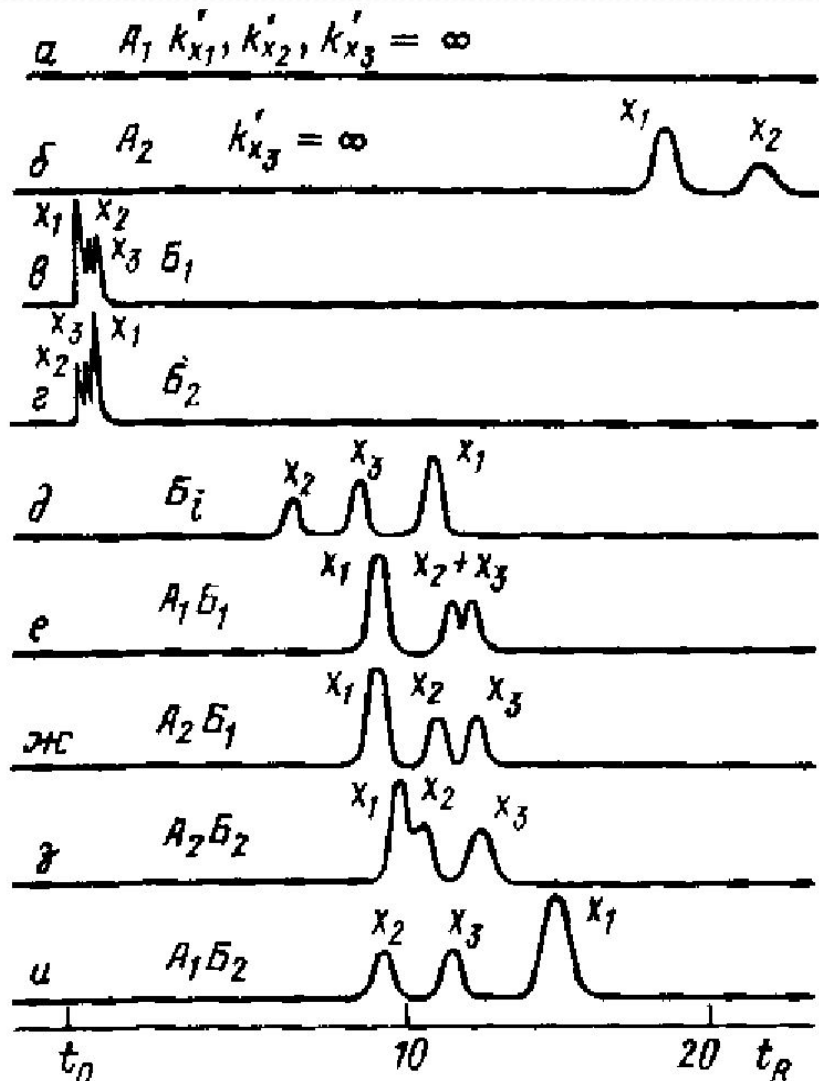
$$H = n_h - 4\sqrt{n_f}$$

- где n_h - число элементарных гидрофобных фрагментов в молекуле, т.е. сумма атомов углерода и галогенов,
- n_f - число полярных групп.
- Критерий H тесно коррелирует с критериями гидрофобности $\log P$ (логарифм коэффициента распределения вещества в системе октан-1-ол-вода) и $C\log P$.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

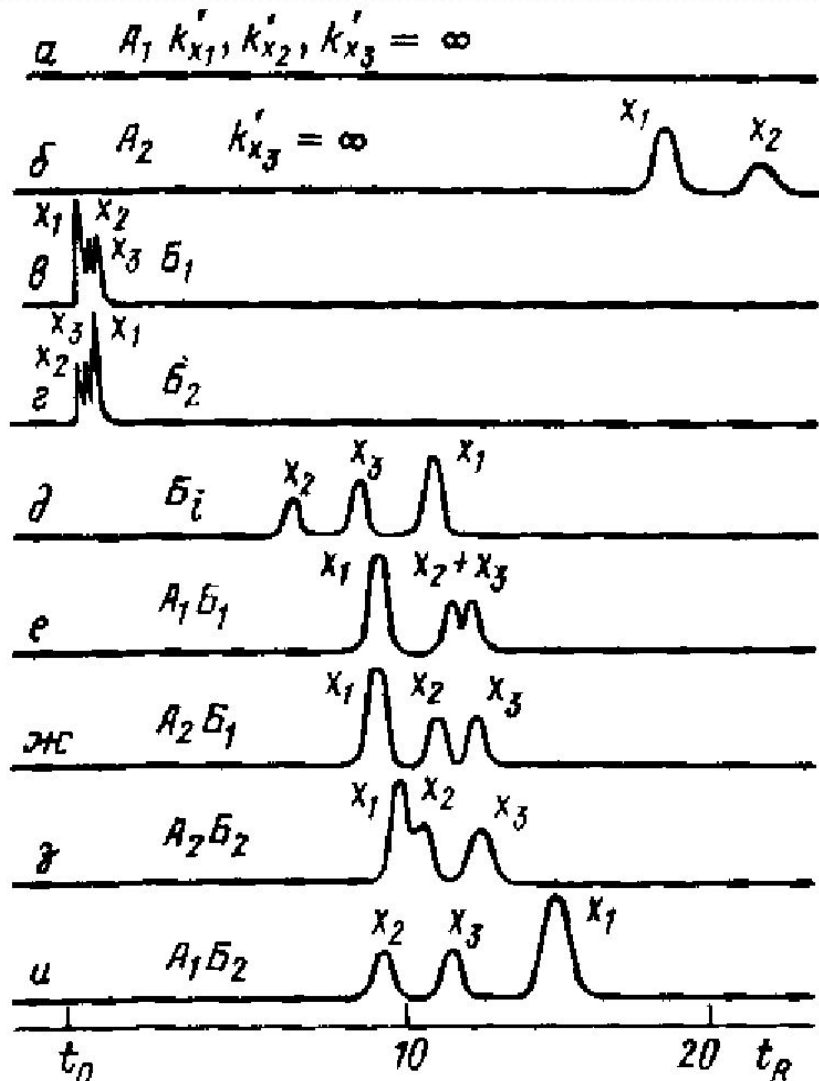
- При $N=0-4$ соединения гидрофильные, неограниченно растворяются в воде;
- При $N=0-4$ низкогидрофобные, хорошо растворяются в полярных растворителях;
- При $N=4-20$ полярность зависит от характера полярных групп и их взаимного расположения, априори предсказать их растворимость затруднительно;
- При $N=20-60$ соединения высокогидрофобные, характерна повышенная растворимость в малополярных растворителях, например, тетрагидрофуране и хлороформе.

Высокоэффективная жидкостная хроматография



- **Выбор растворителя.**
- а – р-ль A_1 : сорбируются все три компонента необратимо;
- б – р-ль A_2 : медленное элюирование X_1, X_2 ,
- X_3 сорбируется необратимо;
- Оба растворителя имеют явно недостаточную элюирующую силу.
- в, г- компоненты не удерживаются. Р-ли имеют большую элюирующую силу.
- Причина разного действия растворителей в сложном комплексе межмолекулярных взаимодействий в системах.

Высокоэффективная жидкостная хроматография



- Для оптимизации значения коэффициента емкости подбирали растворитель с подходящей силой. Для этого берут два индивидуальных растворителя, один из которых имеет заведомо недостаточную элюирующую силу, другой - заведомо избыточную. Из растворителей A_1, A_2, B_1, B_2 можно приготовить 4 бинарные смеси, обладающие подходящей элюирующей силой: $A_1B_1, A_2B_1, A_2B_2, A_1B_2$.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Система для проведения разделения методом ВЭЖХ включает: насос, дозатор, колонка, детектор и регистрирующее устройство.

Основные типы насосов: *шприцевые, пневмоусилительные, плунжерные возвратно-поступательные.*

К насосам в ВЭЖХ предъявляют следующие требования:

Создание давления не менее 15 МПа;

Минимальная пульсация потока;

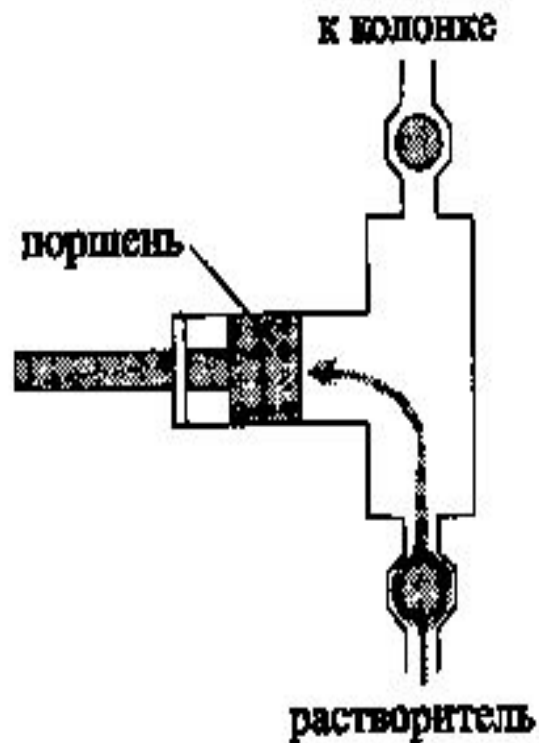
Химическая устойчивость ;

Производительность в пределах 0,1 – 10 мл/мин;

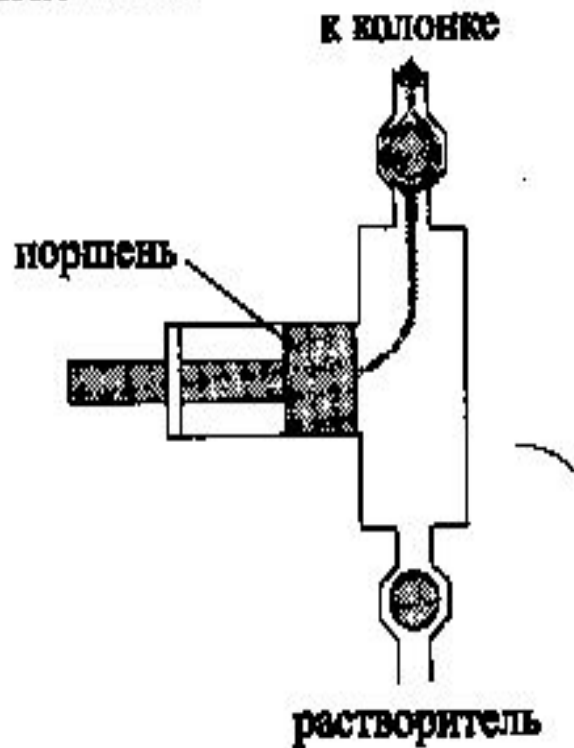
Высокая воспроизводимость скорости потока.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

всасывание:



нагнетание:

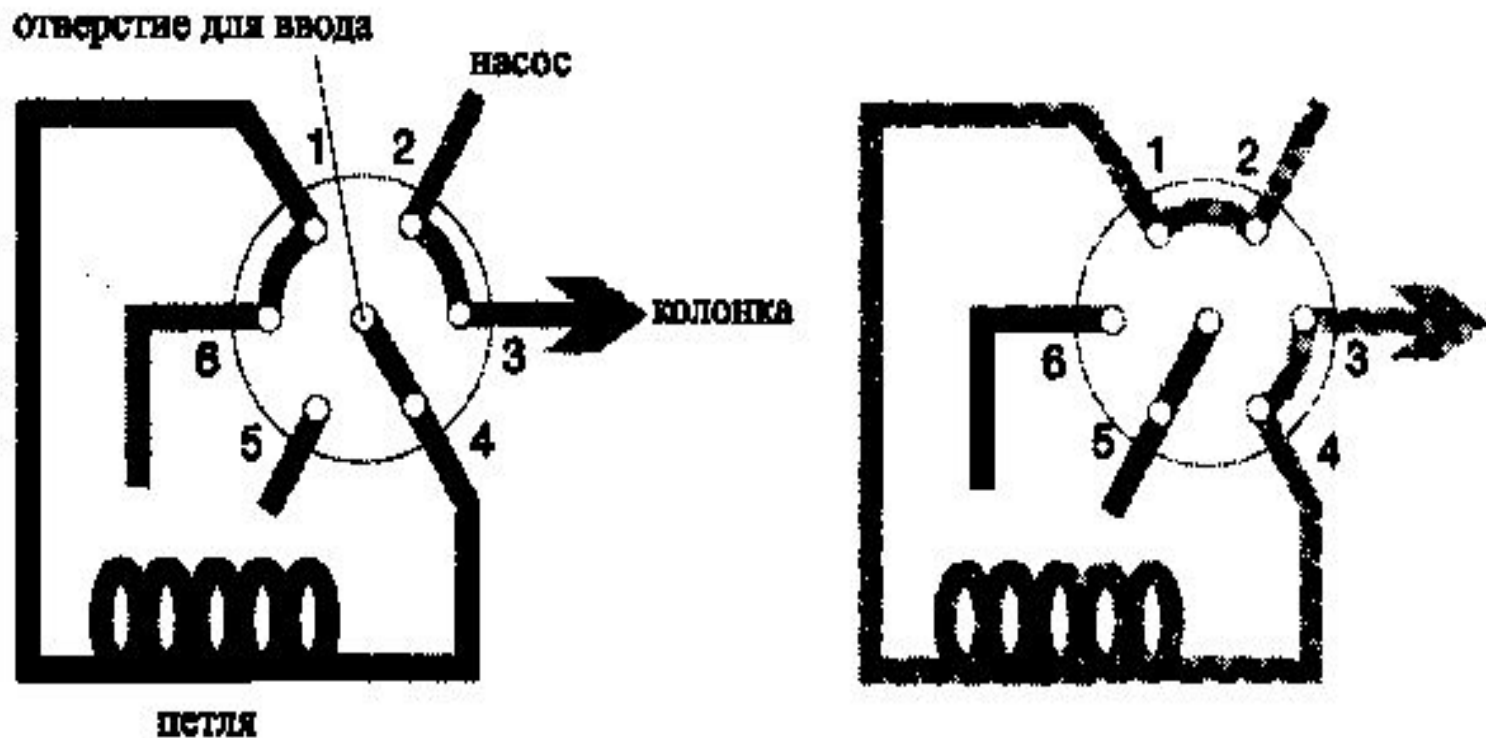


Двухплунжерный насос с шаровыми сапфировыми вентилями.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Для ввода пробы используют типы дозаторов:
 - дозирующая петля;
 - дозаторы с мембраной (без остановки потока и с остановкой потока).
- Система ввода пробы должна точно дозировать объемы от 5 до 500 мкл (давление в системе должно оставаться постоянным).
- Основным типом устройства для дозирования пробы служит петля инжектора.
- Она соединена с двумя выходами шестиходового крана. Раствор вводят в петлю с помощью микрошприца или автоматической системы ввода.

Высокоэффективная жидкостная хроматография



Ввод пробы в колонку при помощи шестиходового крана. Заполнение петли инжектора, (б) — ввод.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Разделяющие колонки обычно изготавливают из нержавеющей стали, специальных сортов стекла ($L = 10, 15, 25$ см; $d = 5,5$ мм)
- Поскольку в ВЭЖХ применяются только очень чистые растворители, для уменьшения их расхода используют микроколонки с внутренним диаметром 1 мм и длиной 30 – 75 мм.
- Перед разделяющей колонкой может устанавливаться предколонка для предварительного разделения или концентрирования

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Детекторы:

- Сректрофотометрический
- Рефрактометрический
- Флуориметрический
- Кондуктометрический
- Амперометрический
- Масс-спектрометрический

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Спектрофотометрическое детектирование
- В основе работы детектора лежат общие принципы спектрофотометрического анализа
- Детектирование в УФ- (реже видимой) области осуществляется при одной или нескольких длинах волн
- Предел обнаружения – 10^{-9} г

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Рефрактометрические детекторы
- Универсальные детекторы, измеряющие показатель преломления системы
- Аналитический сигнал дают все компоненты показатель преломления которых отличается от показателя преломления элюента
- Чувствительность – 10^{-6} г

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Флуориметрические детекторы
- В 1000 раз более чувствителен по сравнению с фотометрическим
- Нельзя использовать для определения кислородсодержащих растворителей, которые гасят интенсивность люминесценции
- Важная область применения детектирование ароматических полициклических углеводородов.
- Минимальное определяемое количество 10^{-11} г.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- Кондуктометрический детектор
- Применяется в ионной хроматографии для измерения электропроводности растворов
- Сигнал линеен в диапазоне 10^{-8} - 10^{-1} г/мл, предел обнаружения – 10^{-9} мкг/мл.
- Использование концентрационной колонки снижает предел обнаружения на 2 – 3 порядка
- Применение подавляющей колонки снижает вклад в сигнал детектора электропроводности ионов элюента

Высокоэффективная жидкостная хроматография

- **Амперометрический детектор**
- Применяют для определения органических соединений, которые могут быть окислены на поверхности твердого электрода. Аналитическим сигналом является величина тока окисления.
- Проводят измерения при постоянном потенциале, либо импульсном режиме, когда задается трехступенчатая развертка потенциала, которая обеспечивает на разных стадиях – окисление вещества, очистку электрода и его регенерацию.
- Особенно важен при определении фенолов, фенольных соединений, гидразинов, биогенных аминов и некоторых аминокислот. Минимальное определяемое количество 10^{-11} - 10^{-9} г.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

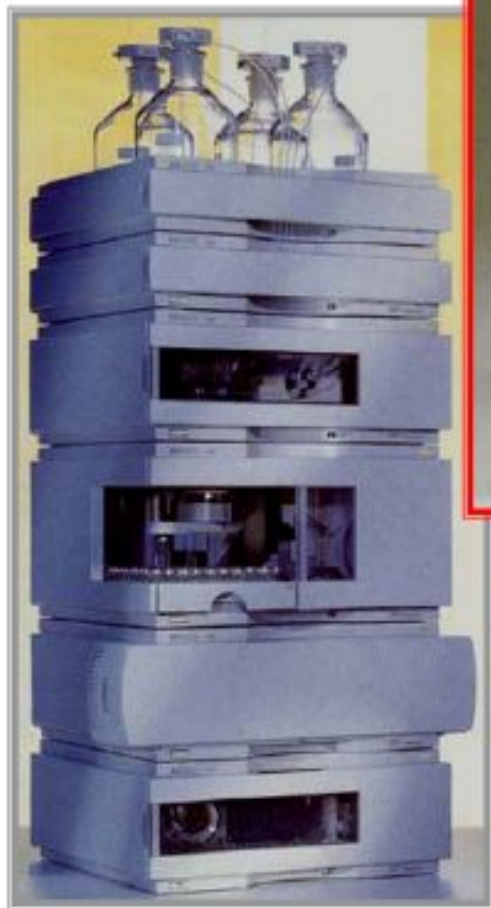
● Масс-спектрометрический детектор

- Используют масс-спектрометры высокого разрешения и достаточного быстродействия с химической ионизацией с применением электрораспыления. Применяется в ионной хроматографии для измерения электропроводности растворов. Основная проблема – проблема ввода элюента. Развитие микроколоночной хроматографии позволяет разработать системы прямого ввода элюента в ионный источник масс-спектрометра. Минимальное определяемое количество 10^{-12} - 10^{-10} г.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХРОМАТОГРАФЫ



Высокоэффективная жидкостная хроматография

КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

ПРЕПАРАТИВНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ



Высокоэффективная жидкостная хроматография

КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

ПРОМЫШЛЕННЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ



Высокоэффективная жидкостная хроматография

КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

ПОЛЕВЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ



Высокоэффективная жидкостная хроматография

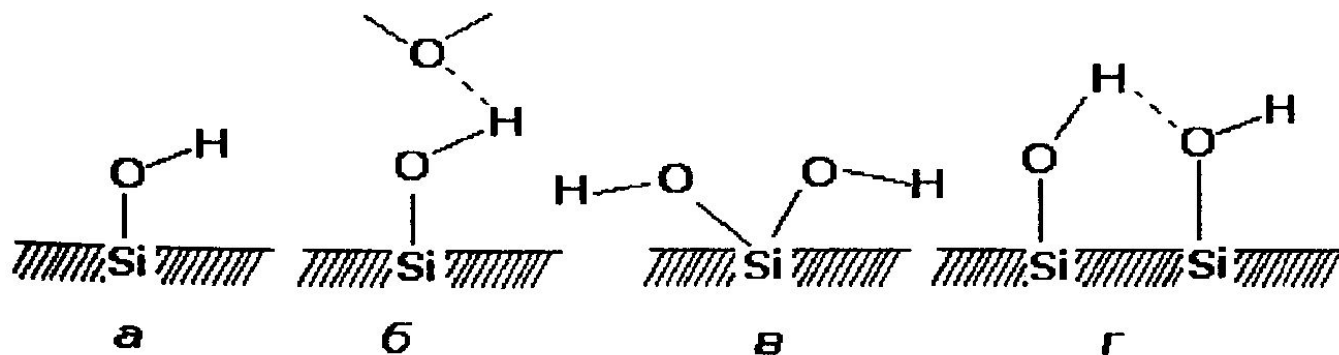


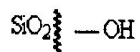
Рис. 1.5. Различные типы гидроксильных групп на поверхности силикагеля: а) свободная OH-группа; б) связанная OH-группа; в) геминальная OH-группа; г) реакционноспособная OH-группа

Силикагель $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ имеет аморфную структуру, его внутренняя поверхность энергетически неоднородна из-за наличия нескольких типов беспорядочно распределенных силанольных OH-групп.

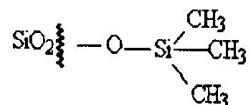
В адсорбционных процессах кроме OH-групп, участвуют и поверхностные силоксановые группы ≡Si-O-Si≡ .

Присутствующая в силикагеле вода удерживается в нем в результате взаимодействия с поверхностными силанольными группами и за счет капиллярной конденсации.

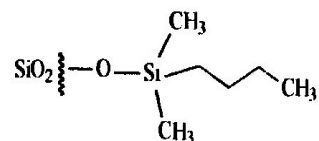
Привитые сорбенты



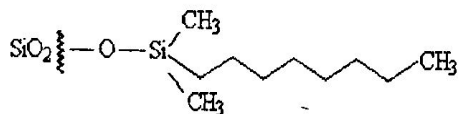
немодифицированный
силикагель



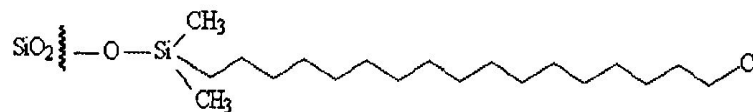
силикагель C₁



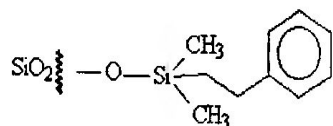
силикагель C₄



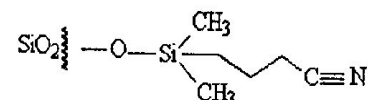
силикагель C₈



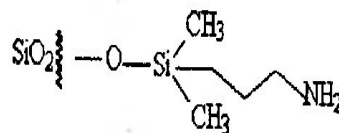
силикагель C₁₈ (ОДС)



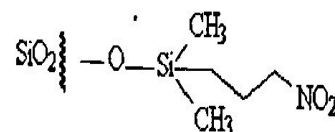
Фенилсиликагель (Ph)



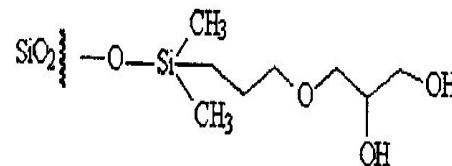
Нитрилсиликагель (CN)



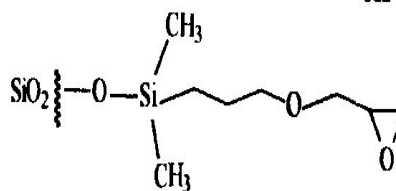
Аминосиликагель (NH₂)



Нитросиликагель (NO₂)



Диолсиликагель



Эпоксисиликагель

Функциональные группы прививают по связи ---Si---C--- .

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Адсорбосил CN
Адсорбосфер CN

*модифицирующая функциональная
группа нитрильная*

суффикс –сил
приставка сила-

сорбент из силикагеля

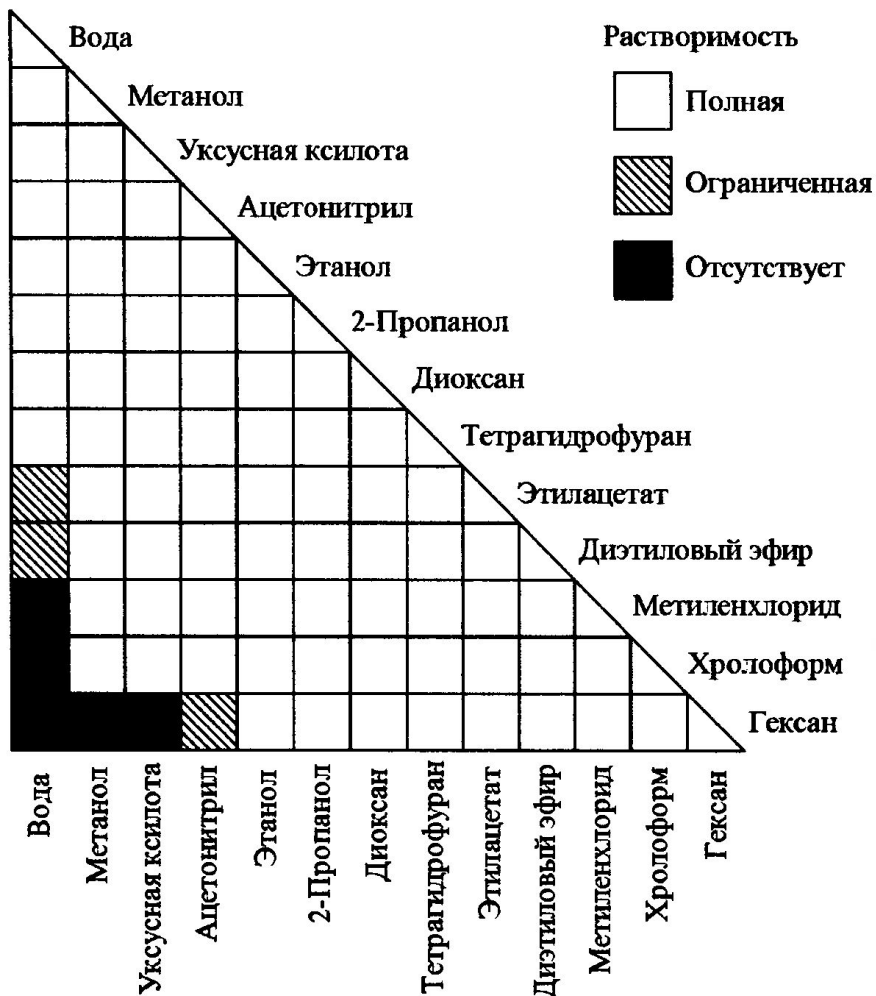
суффикс -сфер
приставка сфера-

форма частиц в сорбенте сферическая

Сферисорб ОДС - частицы сферические, силикагель модифицирован C18

Лихросфер РП-18 - частицы сферические, силикагель модифицирован C18
РП(RP) - обращенная фаза (reversed phase)

Смешиваемость. Миксотропный ряд.



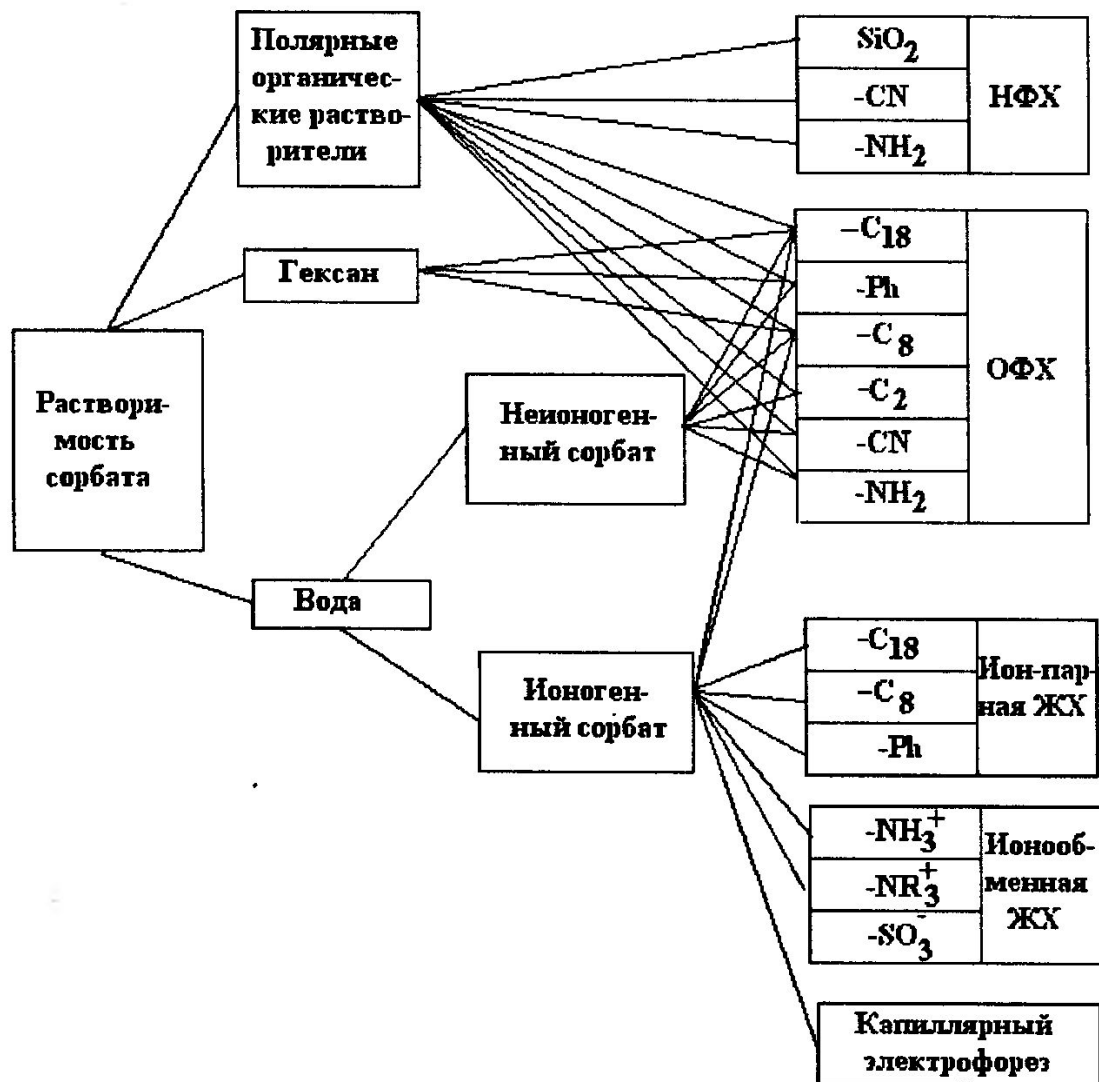
Углеводороды и их галогенпроизводные, простые и сложные эфиры, высшие спирты хорошо смешиваются между собой.

Сравнительно малополярные ТГФ и диоксан смешиваются с водой в любых соотношениях.

А нитрометан в 2 раза более полярный, чем они, смешивается с водой ограниченно.

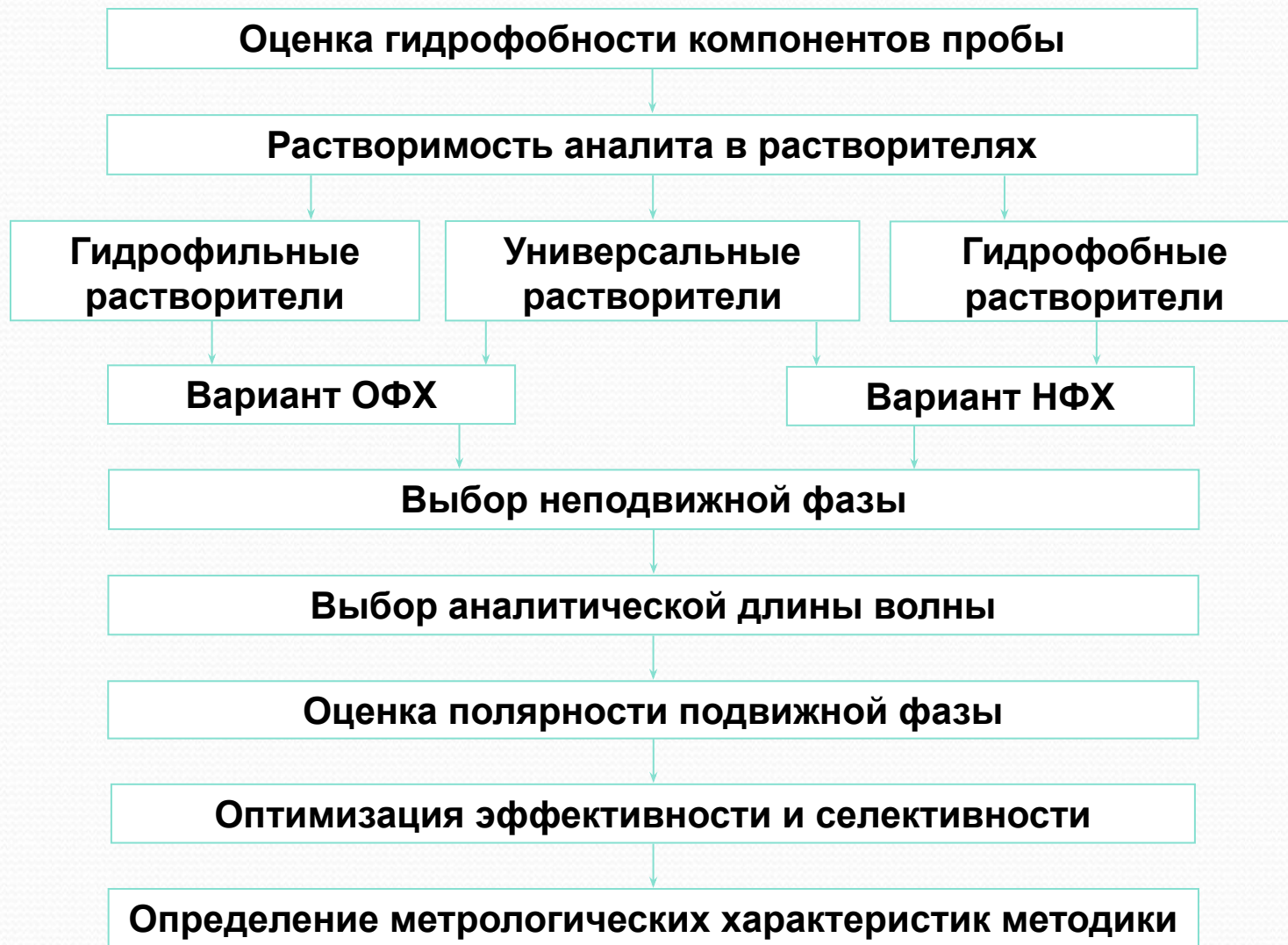
Взаимная совместимость часто применяемых в жидкостной хроматографии растворителей.

Схема выбора НФ для разделения низкомолекулярных органических соединений, исходя из их растворимости в неполярных и полярных растворителях и воде



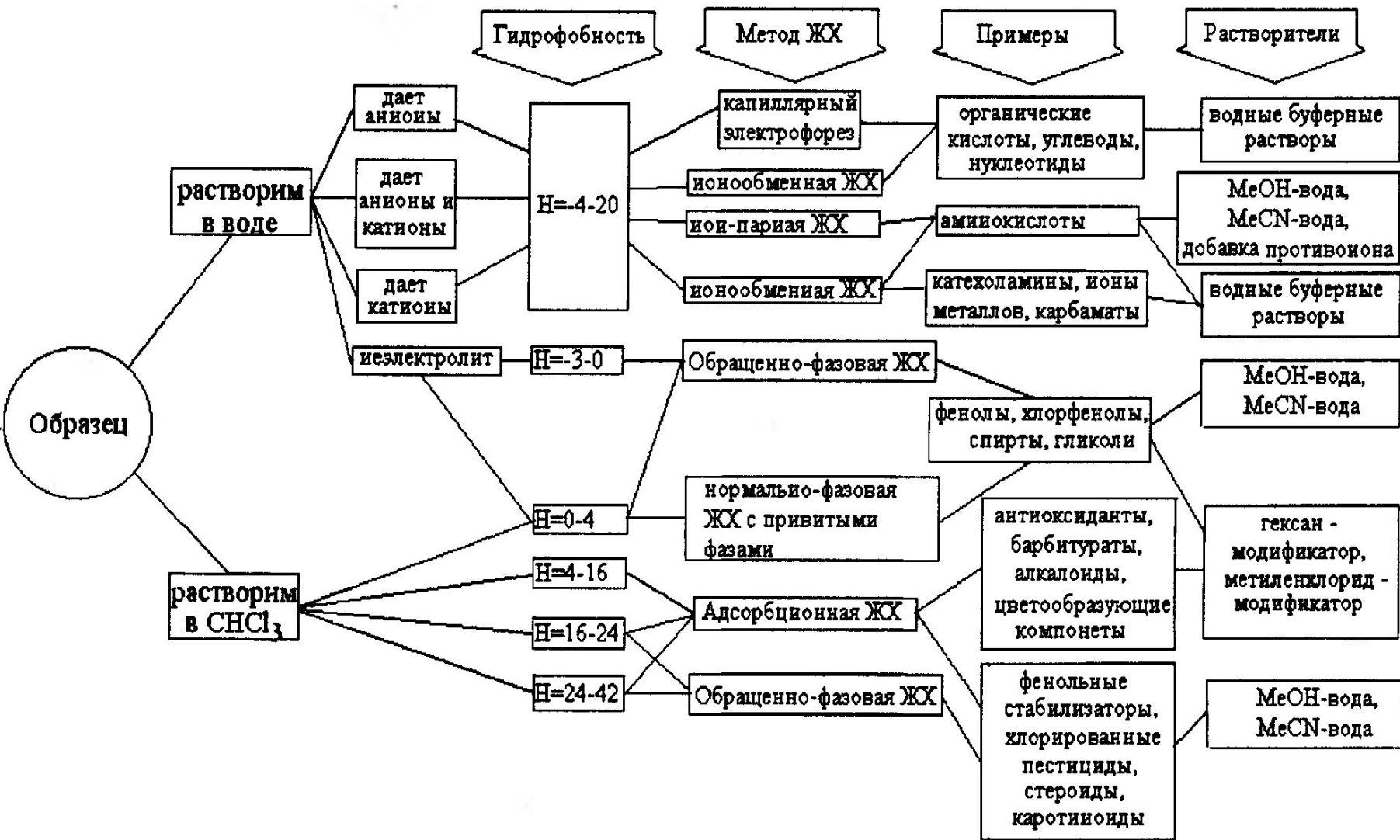
хроматография

Схема выбора оптимальных условий разделения методом ВЭЖХ, основанная на гидрофобности аналита и его растворимости в различных растворителях



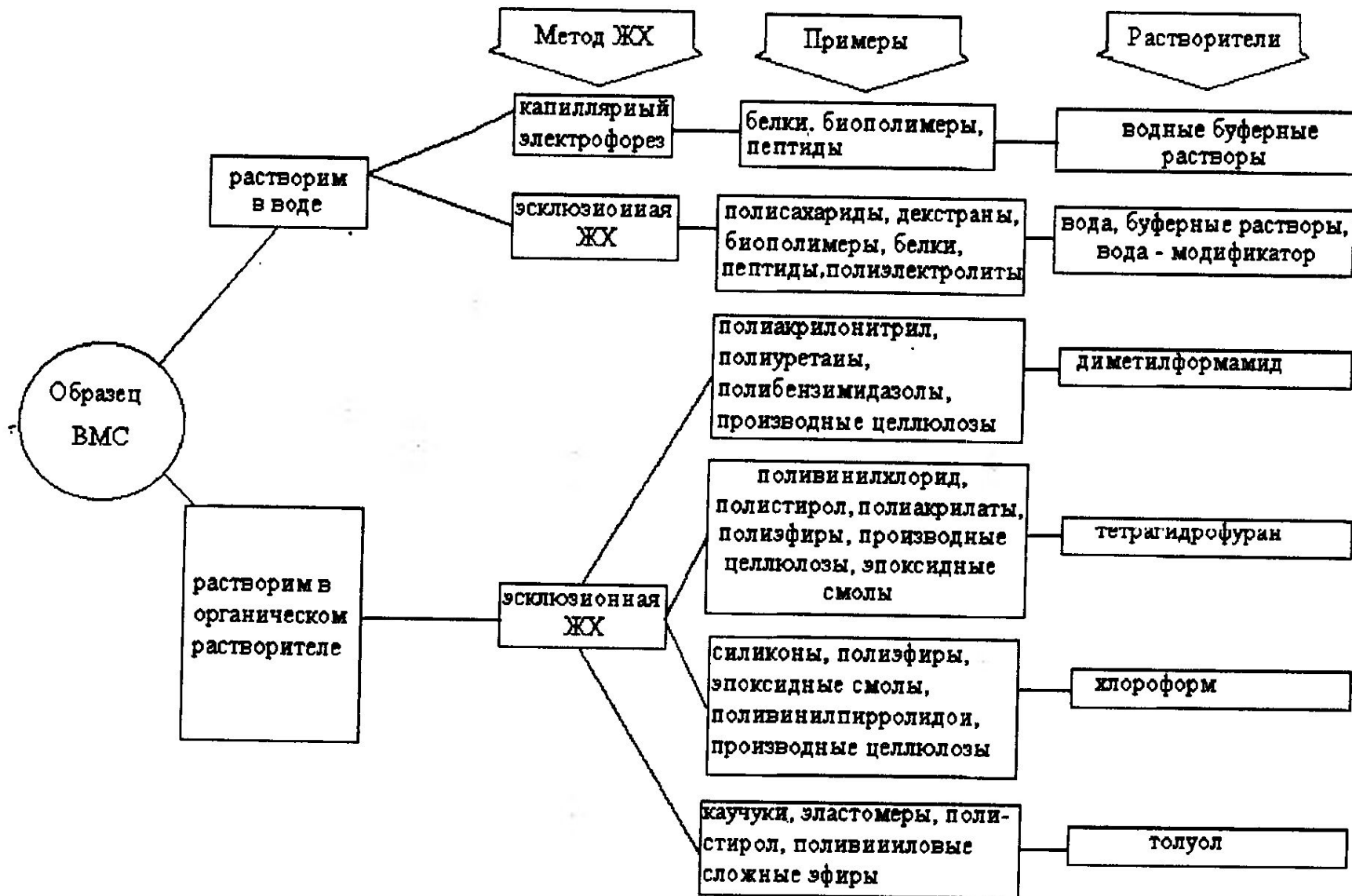
хроматография

Выбор условий ВЭЖХ с учетом гидрофобности анализта



хроматография

Выбор варианта ВЭЖХ для разделения полимеров



Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография

5.5. Смешиваемость (миксотропный ряд)

При приготовлении смешанных подвижных фаз, при регенерации колонок, переводе их на другой вариант ЖХ, при подготовке пробы для анализа важна информация о взаимной растворимости и совместимости растворителей. Эта информация полезна также для подбора экстрагентов. Зачастую при подготовке пробы в воде, почве, продуктах, биоматериалах требуется выделить и сконцентрировать аналит. Взаимную растворимость двух веществ определяет не правило “подобное растворяется в подобном”, а взаимодействия между молекулами растворенного вещества и растворителя. Соединение A растворяется в растворителе B только тогда, когда силы взаимодействия $A \cdots B$ в растворе могут преодолеть межмолекулярные силы притяжения $A \cdots A$ и $B \cdots B$, действующие в соответствующих чистых соединениях. Суммарный эффект взаимодействий между молекулами растворителя и растворенного вещества можно связать с *полярностью* A и B . Назвав сильно взаимодейству-

C. 468-498

Высокоэффективная жидкостная хроматография

более 300 привитофазных сорбентов этого типа. Можно отметить следующие преимущества, обеспечивающие преобладающее использование привитых сорбентов на основе силикагеля: механическая прочность к высоким давлениям; отсутствие перехода привитой фазы в растворитель в процессе хроматографического разделения (если протекают реакции, приводящие к химическому отщеплению привитой фазы); устойчивость к действию растворителей, температур, pH; быстрота установления равновесия при смене элюента обеспечивает оперативность работы и возможность работы в градиентном режиме с быстрым возвратом к исходному режиму; возможность варьировать в широких пределах селективность за счет изменения степени прививки, дополнительной химической обработки сорбента, смены растворителя. Если в классической газовой хроматографии подвижная фаза практически не оказывает влияния на селективность разделения, то в жидкостной хроматографии ее влияние огромно. Так как в разделение весьма активно участвуют как привитая фаза, так и адсорбированные (абсорбированные) компоненты подвижной фазы, широкий ассортимент сорбентов для ВЭЖХ в большинстве случаев не нужен. Изменением состава подвижной фазы зачастую удается добиться той же селективности, что и за счет применения нового дорогостоящего привитофазного сорбента. Достаточно иметь в комплекте лаборатории 3-4 сорбента и широкий ассортимент растворителей и добавок разного типа. Наиболее распространены привитые амидные ($\equiv\text{S}-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, возможна вторичная или третичная амидная группа), алкилдиольные ($\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$) и алкилнитрильные ($\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{CN}$) фазы.

Алкилнитрильную, алкиламинную и алкилдиольную привитую фазы можно использовать в разных вариантах хроматографии. Прежде всего они могут быть применены для работы с неполярными растворителями типа гексан – 2-пропанол, где они проявляют свойства, близкие к свойствам силикагеля без привитой фазы. Однако их селективность отличается от селективности силикагеля, что позволяет подобрать наилучший сорбент для каждого анализа. Кроме того, их преимуществом перед силикагелем является быстрое установление равновесия с подвижной фазой, и это позволяет

Высокоэффективная жидкостная хроматография

2.5. Сорбенты для обращенно-фазовой хроматографии

Модифицированными сорбентами с химически привитыми группами, используемыми в обращенно-фазовой жидкостной хромато-

лишены также полимерные сорбенты PRP-1 (Polymer Reversed Phase) фирмы "Гамильтон". Эти сорбенты представляют собой жесткий стирол-дивинилбензолный гель, $S_p = 415 \text{ м}^2/\text{г}$, $V_p = 0.79 \text{ см}^3/\text{г}$, $d_p = 7.5$, размер частиц 5,10 мкм. По селективности сорбент аналогичен октадецильным силикагелям, в то же время работоспособен при $\text{pH} = 1-13$ и концентрации буферных солей до 0.5-1 М.

Фирма "Шова Денко" выпускает на основе различных пористых полимеров сорбенты RS-пак серии D, в частности, DS-613, DE-613, DM-614, устойчивые при $\text{pH} = 2-12$, характеризующиеся полной адсорбционной инертностью и высокой разделяющей способностью.

По гидрофобным свойствам сорбент DS-613 аналогичен полимерному сорбенту PRP-1 и силикагелям с октадецильной привитой фазой. Материалы DE-613, DM-614 и DC-613 изготавливают на базе полиметилметакрилата, гидрофильного сложного полиэфира и полистирола с гидрофильными заместителями. Они по гидрофобности занимают промежуточное положение между сорбентами с C_8 - и NH_2 -фазами и могут применяться как в обращенно-фазовом, так и в нормально-фазовом варианте ВЭЖХ.

рафии, являются силикагели, на поверхности которых по связям – Si-C- ковалентно привиты алкильные группы $\text{C}_2\text{-C}_8$, октадецильные группы C_{18} , фенильные, алкиламино-, amino-, нитро- и диольные группы. Наиболее вероятные механизмы реакций взаимодействия силикагеля с модификатором приведены в [13,57,113,131-133].

Наиболее распространенными в практике ОФХ хроматографии из указанных сорбентов являются октадецильные фазы (C_{18}). Плотность прививки составляет 1.1-2.3 нм^2 . Привитые сорбенты разных производителей отличаются как по типу модификатора, так и по концентрации органического модификатора и концентрации оставшихся после прививки силанольных групп на поверхности силикагеля. Содержание углерода в сорбентах составляет 5-20%. Степень покрытия поверхности силикагеля органическим модификатором обычно составляет 10-60%. В лучших случаях степень покрытия достигает 95%. Наличие остаточных силанольных групп приводит к тому, что адсорбционный и ионообменный механизмы удерживания всегда сопутствуют обращенно-фазовому. Для уменьшения числа силанольных групп сорбенты зачастую дополнительно обрабатывают триметилхлорсиланом. Такую обработку называют эндкеппингом (end capping). Размер пор S_p модифицированных сорбентов находится в пределах 150-550 $\text{м}^2/\text{г}$. Удерживание и селективность сорбентов, несмотря на идентичность модифицирующих групп, варьируют достаточно сильно. Причинами невоспроизводимости являются различия в свойствах исходных силикагелей и условий модифицирования. Современные разработки фирм направлены на уменьшение вариативности свойств выпускаемых сорбентов. В табл. 2.2 приведены характеристики сорбентов двойного назначения, а в табл. 2.3 представлены типичные обращенно-фазовые сорбенты.

Недостатками обращенно-фазовых сорбентов на основе силикагеля являются ограниченно допустимый диапазон pH и сорбционная активность остаточных силанольных групп. С этим недостатком в результате качественного эндкеппинга и других усовершенствований удается справляться лидеру по производству колонок нового поколения американской фирме "Феноменекс" (например, одна из наиболее популярных обращенно-фазовых колонок в мире – Луна C18 – обладает стабильностью в диапазоне значений pH 1,5 – 10). Их

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Как видно из табл. 2.3, практически все производители сорбентов выпускают привитые обращенные фазы C_{18} и C_8 , причем в нескольких вариантах, с разной плотностью прививки. Что касается NO_2 - и NH_2 -фазы, то их применение в ОФХ основано на том, что они имеют короткий алифатический мостик (C_3), связывающий полярную группу с поверхностью силикагеля. Полярная группа не участвует в разделении по обращенно-фазовому механизму или играет второстепенную роль, несколько изменяя селективность для веществ с определенной химической структурой.

Таблица 2.3. Свойства сорбентов для ОФХ с привитой фазой

Сорбент	$S_p, м^2/г$	$d_p, нм$	$d, мкм$	Форма частиц
Адсорбосил C_8	450	6	5,10	Нерегулярная
Адсорбосил C_{18}	450	6	5,10	-/-
Адсорбсфер C_8	200	8	3,5,10	Сферическая
Адсорбсфер C_{18}	200	8	3,5,10	-/-
Аллитима C_8	-	10	5,10	-/-
Аллитима C_{18} NUC	-	10	5,10	-/-
АльфаБонд C_8	300	12,5	5,10	Нерегулярная
АльфаБонд C_{18}	300	12,5	10	-/-
м-Бондапак C_{18}	300	10	10	-/-
м-Бондапак Фенил	300	10	10	-/-
Версапак C_8	200	60	10	-/-
Версапак C_{18}	200	60	10	-/-
Видак ТП201 C_{18}	100	30	10	Сферическая
Видак Дифенил	100	30	10	-/-
Гиперсил C_8	170	10	3,5,10	-/-
Гиперсил ОДС (C_{18})	170	10	3,5,10	-/-
Зорбакс C_8	350	7	8	-/-
Зорбакс ОДС	350	7	8	-/-
Диасорб-130-С1	300-330	11	5,7,10	Нерегулярная
Диасфер-130-С4	300-330	11	5,7,10	Сферическая
Диасфер-130-С8	300-330	11	5,7,10	-/-
Диасфер-130-С18Т	300-330	11	5,7,10	-/-
Диасфер-130-Фенил	300-330	11	5,7,10	-/-
Лихросорб РП-18	300	10	5,7,10	Нерегулярная
Лихросорб РП-8	300	10	10	-/-
Лихросорб РП-2	500	6	5,10	-/-
Лихросфер РП-18	300	10	5	Сферическая
Луна C_{18}	300		3,5	-/-
Луна C_5	100		5	-/-
Луна C_8	300		5	-/-
Нуклеосил C_{18}	300	10	3,5,7,10	-/-
Партисил ОДС-1	400	5	10	Нерегулярная
Партисил ОДС-2	400	5	10	-/-я
Партисил ОДС-3	400	5	5,10	-/-я
РоСил C_{18}	400	8	3,5,8	Сферическая
РоСил C_8	400	8	3,5,8	-/-
РоСил Фенил	400	8	3,5,8	Сферическая
РСил C_{18} ХЛ	550	6	6,10	-/-
РСил C_8	550	6	6,10	-/-

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография