

# **Жидкостная хроматография**

## **ВЭЖХ**

# Жидкостная хроматография

**В зависимости от:**

- диаметра и длины колонки
- размера частиц сорбента
- способа упаковки сорбента в колонке

**Низкоэффективная**

**Высокоэффективная**

# Жидкостная хроматография

## НЭЖХ

- диаметр колонки  $\approx n$  мм  $\div n$  см
- длина колонки  $\approx n \times 10$  см
- размер частиц сорбента  $> 10$  мкм
- заполнение колонки сорбентом -  
вручную



**В ПРЕПАРАТИВНЫХ ЦЕЛЯХ**

# ВЭЖХ

- Изократическая
- Градиентная
- Мультиколоночная
- Многоколоночная
- Микроколоночная
- Капиллярная



**В АНАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ**

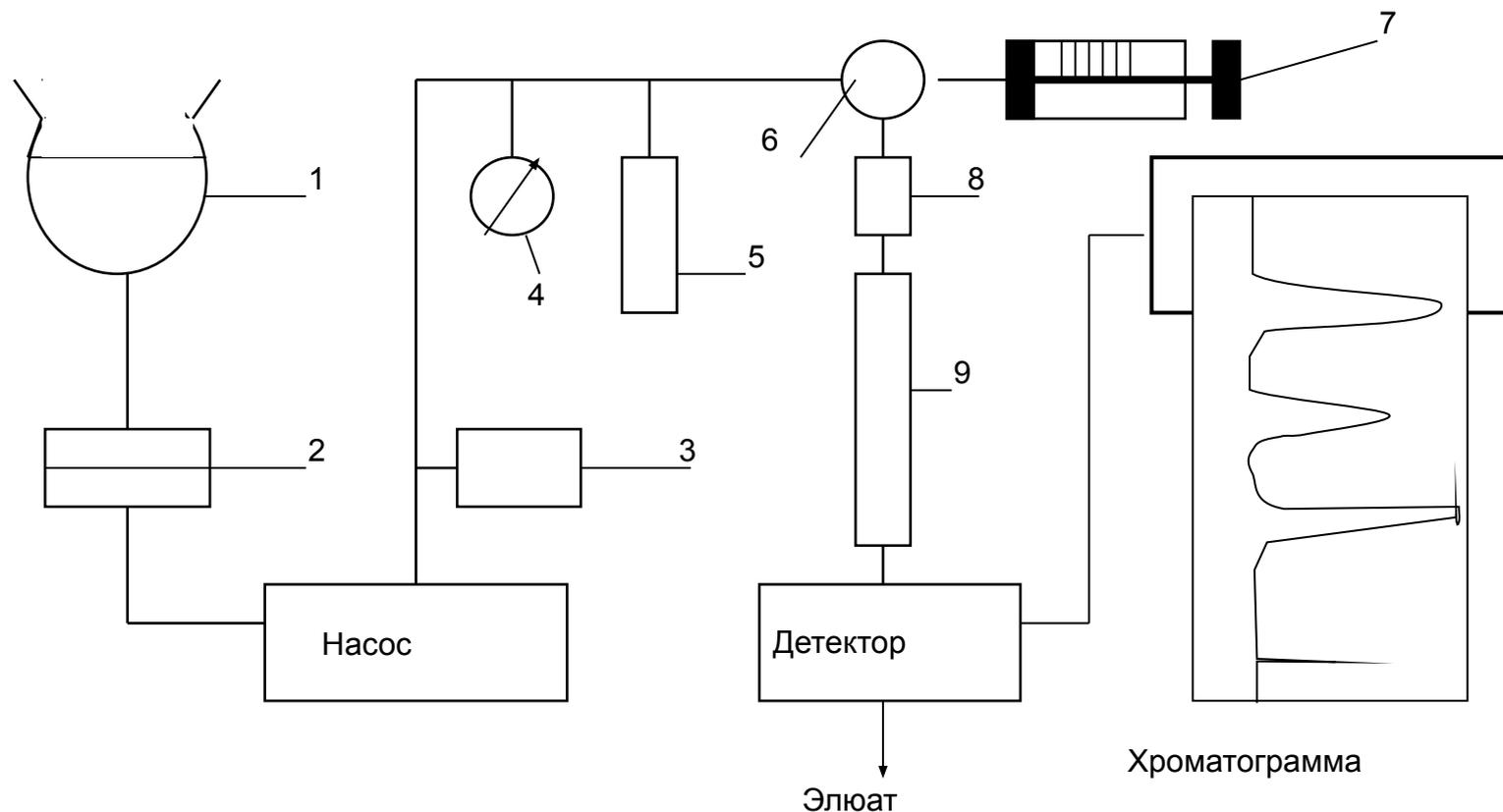
# Отличие ВЭЖХ от ГХ

- В **ГХ** газ-носитель не сорбируется неподвижной фазой, а в **ЖХ** молекулы ПФ могут сорбироваться **НФ**
- Молекулы **ЖПФ сорбируются** на поверхности **НФ**, молекулы определяемого соединения **вытесняют** молекулы элюента с поверхности сорбента  $\Rightarrow$   
 $\downarrow$  **энергия** взаимодействия молекул вещества с поверхностью сорбента  $\Rightarrow$   
 $V_R (\text{ЖХ}) < V_R (\text{ГХ})$ , диапазон линейности изотермы сорбции **ЖХ**  $>$  диапазона линейности изотермы сорбции **ГХ**.

# Особенности ВЭЖХ

- **Параметры удерживания** и селективность в ГХ зависят только от НФ, а в ЖХ – и от НФ, и от ПФ
- **Варьируя элюент**, можно менять параметры удерживания и селективность. Возможно **градиентное** элюирование.
- В ЖХ разделение обычно – при **комнатной температуре**
- Для ЖХ – более **сложное оборудование**: система дегазации, устройство создания градиента, насосы, измерители давления, смеситель...

# Общая схема прибора для ВЭЖХ

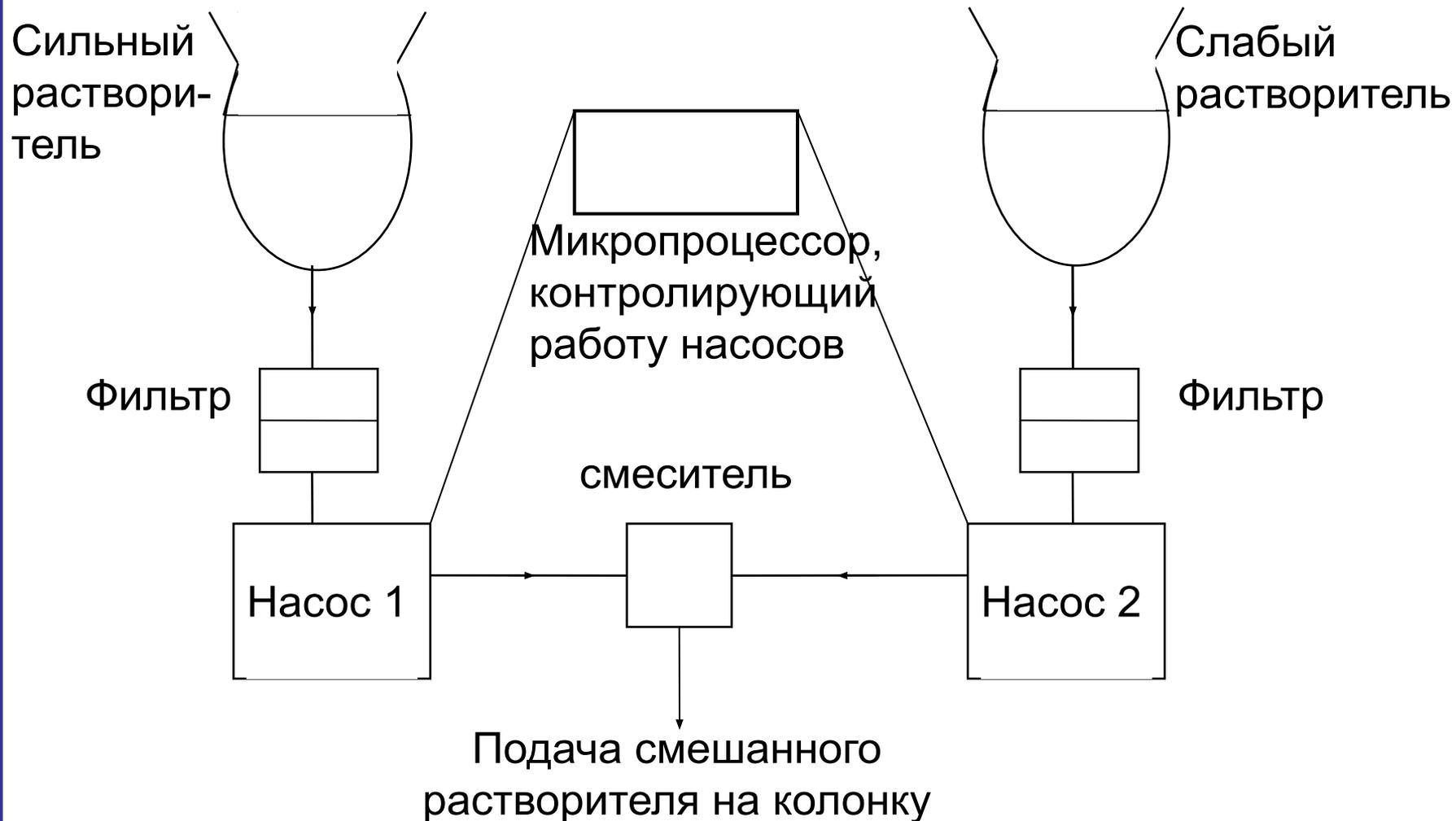


1 - емкость для элюента, 2 - фильтр, 3 - регулятор для выравнивания пульсации при подаче элюента, 4 - манометр, 5 - клапан, регулирующий давление, 6 - кран для ввода пробы, 7 - шприц, 8 - предохранительная колонка, 9 - аналитическая колонка.

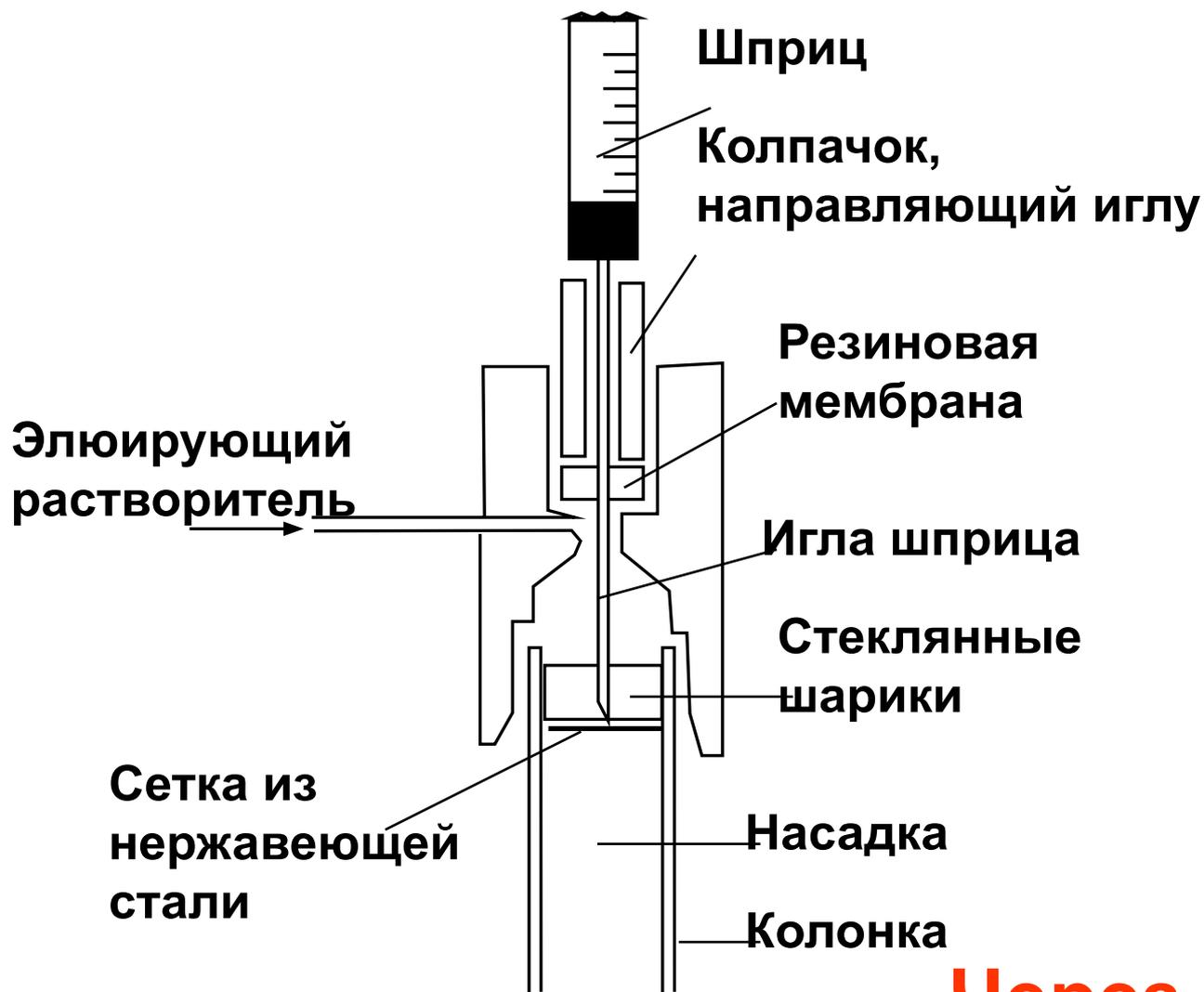
# Колонки

- **Предохранительная колонка** - короткая, защищает аналитическую колонку от пыли, смол и других примесей. Используется для предварительного разделения или сорбции мешающих анализу компонентов.
- **Дегазация ПФ** - удаление воздушных пузырьков
- **Фильтрование** – внутри колонки фильтры для очистки ПФ от механических примесей, для удаления пыли.

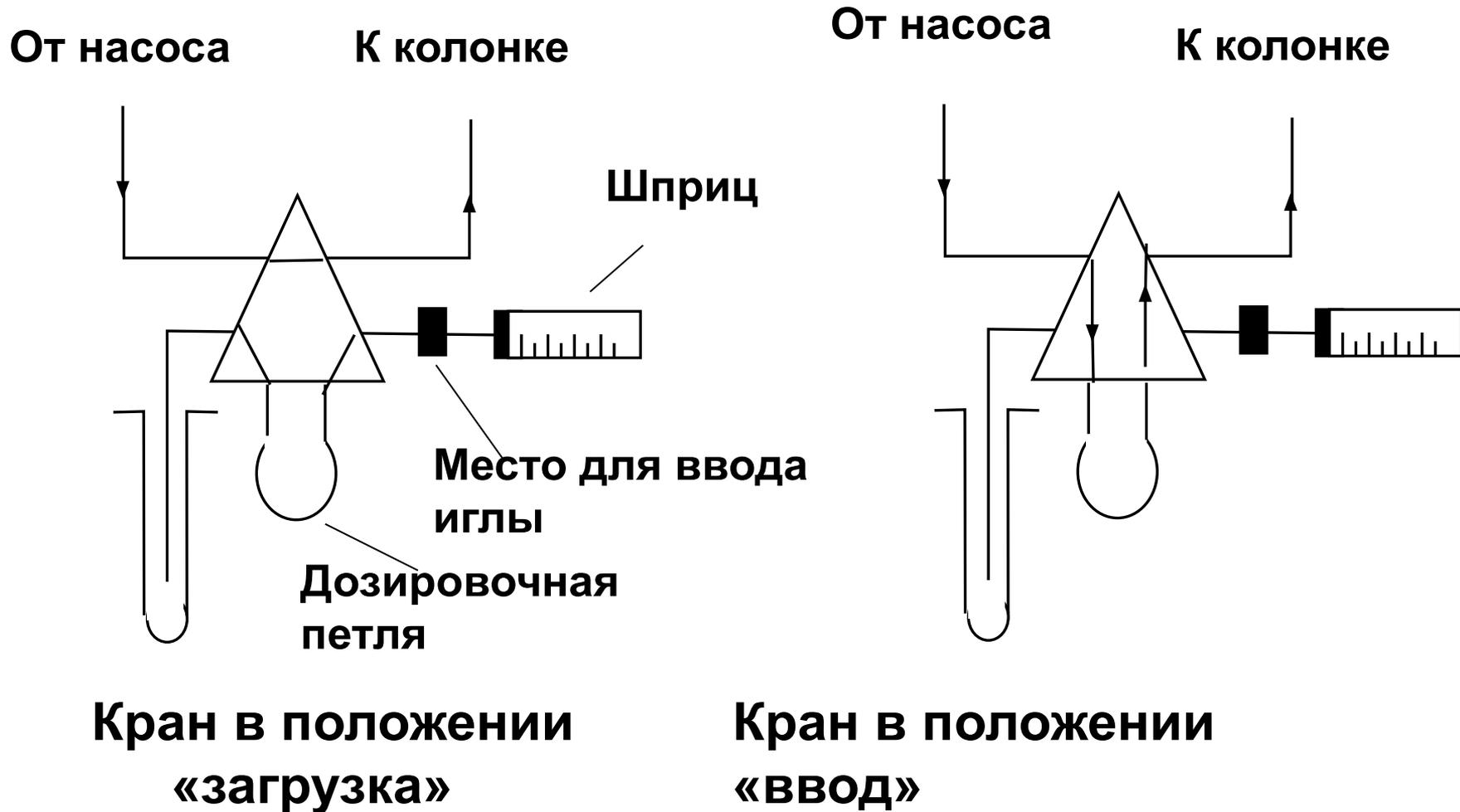
# Двухнасосная система для градиентного элюирования в ВЭЖХ



# Система ввода пробы



# Система ввода пробы



**Через кран**

# Детекторы

- **УФ (254 нм)**
- **Альдегиды, кетоны, ароматические соединения.**
- **Требования к элюенту: прозрачность для УФ-излучения.**
- **Флуоресцентный (280 нм)**  
**ПО  $10^{-9}$  -  $10^{-10}$  г, диапазон линейности ~5 порядков концентрации**

# Детекторы

- **Дифференциальный рефрактометр**
- **ПО  $10^{-6}$  г, диапазон линейности ~4 порядка концентрации. Предельные соединения**
- **Кондуктометр**
- **ПО  $10^{-3}$  мкг/мл, диапазон линейности ~4 порядка концентрации. Ионная хр-фия.**
- **Нефелометр проточный лазерный**
- **В эксклюзионной хроматографии полимеров**

# Детекторы

- **СФМ (190-650 нм)**
- Поглощение при постоянной длине волны во времени или спектр в диапазоне длин волн в остановленном потоке
- **Вольтамперометрические детекторы**
- С плёночной ячейкой – стеклоуглеродный дисковый электрод, объем 0.06-0.3 мкл.
- С трубчатой ячейкой – графитовое волокно.
- ПО – пг, диапазон линейности 3 порядка

# Качественный анализ

Построение зависимости

$t_{R_1} - t_{R_2}$  или  $\lg t_{R_1} - \lg t_{R_2}$ ,

где  $t_{R_1}$  и  $t_{R_2}$  - времена появления  
на хроматограмме пиков  
искомых веществ на колонках с  
НЖФ различной полярности

# Адсорбционная - ЖТХ

- Для разделения **неионных соединений** – от умеренно неполярных до умеренно полярных.
- **Нельзя** - совсем **неполярные** (УВ) и **сильнополярные** (амины, спирты, кислоты).

# Сорбенты (НФ)

- **Сорбенты** правильной сферической формы с узким распределением по размерам ( $3\pm 0.5$ ,  $5\pm 1$ ,  $10\pm 1$  мкм) с поверхностью 200-600 м<sup>2</sup>/г.
- **Силикагель**  $\equiv \text{Si-OH}$
- **$\text{Al}_2\text{O}_3$**
- **Модифицированные сорбенты:**  
 **$\equiv \text{Si-O-Si-R}$ , где R =**
  - полярные:  $-(\text{CH}_2)_4\text{-CN}$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{-NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_4\text{-OH}$
  - неполярные:  $-\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_7\text{-CH}_3$ ,  
 $-(\text{CH}_2)_{17}\text{-CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_6$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$

# Требования к ПФ

- Чистота
- Химическая инертность
- Совместимость с детектором
- Оптимальная вязкость
- Безопасность
- Доступность
- Достаточная растворяющая способность по отношению к анализируемым веществам
- Смешиваемость друг с другом
- Температура кипения
- Возможность извлечения веществ из элюата

# Элюенты (ПФ)

- **Элюотропный ряд** – расположение растворителей в соответствии с возрастанием их элюирующей силы.
- **Элюирующая сила растворителя** – безразмерный параметр, который зависит от физических (поверхностное натяжение, вязкость) и химических (полярность) свойств ПФ
- **ЭСР** показывает, во сколько раз энергия сорбции данного элюента больше, чем энергия сорбции элюента, выбранного в качестве стандарта.

# Элюенты (ПФ)

- В нормально-фазовой хроматографии стандарт – пентан, для него  $\epsilon^0 = 0$ .
- По элюирующей силе растворители делятся на **слабые** и **сильные**.
- **Слабые** – слабо сорбируются НФ, коэффициенты распределения сорбируемых веществ между ПФ и НФ высокие.
- **Сильные** – сорбируются сильно.
- Растворитель тем **сильнее**, чем выше растворимость в нем пробы и чем сильнее взаимодействие растворитель-сорбат.

# Элюенты (ПФ)

- **Элюотропный ряд** зависит от полярности сорбента, т.е. вида хроматографии
- В **нормально-фазовой** при увеличении полярности растворителя ЭСР растет
- В **обращенно-фазовой** при увеличении полярности растворителя ЭСР снижается
- **Элюотропный ряд Снайдера:**  
 $C_5H_{12} < \textit{ц}\text{-}C_6H_{12} < CCl_4 < \text{бензол} < CHCl_3 < CH_2Cl_2 < CH_3CN < \text{ацетон} < C_2H_5OH < \text{диоксан} < CH_3OH < \text{вода (для силикагеля)}$

# Распределительная - ЖЖХ

- **Распределение** вещества между двумя несмешивающимися жидкостями, разделение - за счет различной растворимости в жидкой НФ.
- **ЖЖХ** - для разделения почти всех типов соединений, особенно полярных.

# Ионообменная хроматография

- Динамический процесс замещения ионов, связанных с НФ, ионами элюента.
- Соотношение концентраций обменивающихся ионов в растворе и в фазе сорбента определяется **ионообменным равновесием.**

# Ионообменная хроматография

- Ионообменники при погружении в раствор электролита поглощают из него катионы (**катионообменник**) или анионы (**анионообменник**), выделяя в раствор эквивалентное количество других ионов с тем же зарядом.
- **Природные ионообменники:**  
глины и цеолиты.
- **Синтетические:**  
высокомолекулярные материалы, напр., с матрицей из сшитого полистирола.
- **Сшивающий реагент** - дивинилбензол.

# Ионообменная хроматография

- **Катионообменники** содержат **кислотные** группы:  
 $-\text{SO}_3\text{H}$ ,  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{PO}_3\text{H}_2$ ,  $-\text{AsO}_3\text{H}_2$ .
- **Анионообменники** содержат **основные** группы:  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ ,  $=\text{NH}_2^+$ ,  $\equiv\text{NH}^+$ .
- **Свойства** ионообменника зависят от:
  - природы ионогенных групп
  - степени сшивания
  - числа фиксированных ионов на 1 г ионообменника.

# Ионообменная хроматография

- Катионообменная реакция:



- Анионообменная реакция:



- **Монофункциональные** и **полифункциональные** ионообменники.
- **Характер** ионогенных групп – потенциометрическим титрованием.
- **Емкость** ионообменника – число ионогенных групп (ммоль на г или мл)

# Ионообменная хроматография

- **Набухание ионообменника в воде**
- **Набухание зависит от:**
  - количества гидрофильных ионогенных групп (чем их  $\uparrow$ , тем  $\uparrow$  емкость и  $\uparrow$  набухание),
  - природы ионогенных групп,
  - степени ионизации,
  - заряда противоиона,
  - концентрации внешнего раствора (чем  $\downarrow$  концентрация, тем  $\uparrow$  набухание),
  - плотности матрицы, т.е. содержания ДВБ (чем она  $\uparrow$ , тем  $\downarrow$  набухание).

# Ионообменная хроматография

- Ионы удерживаются тем сильнее, чем больше их **заряд** и **размер**.
- **Элюирующая способность** ПФ возрастает с увеличением:
  - концентрации ионов, содержащихся в ней
  - их сродства к ионообменнику.

# Детекторы

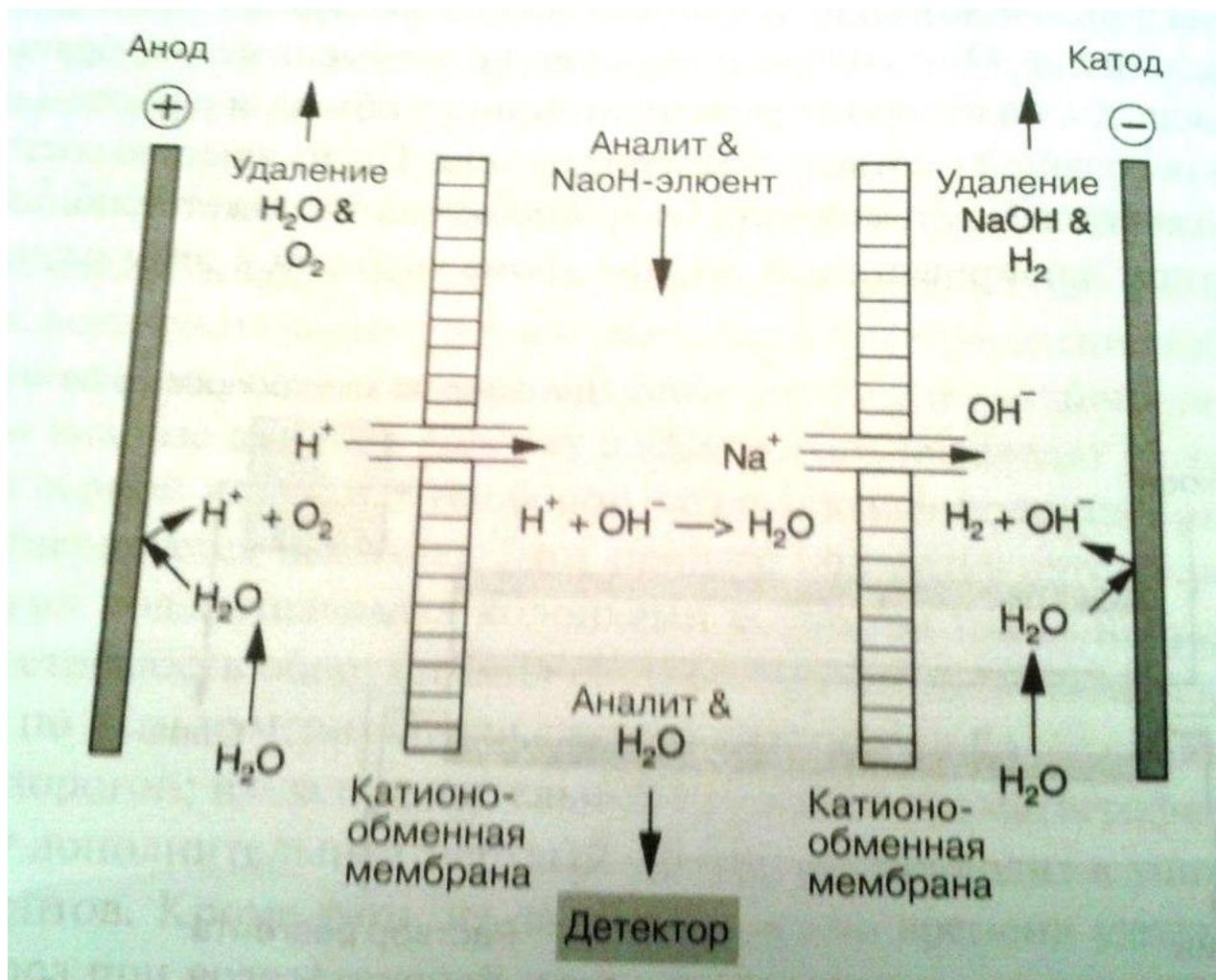
- **Кондуктометрический** детектор - измерение электропроводности элюата.  
Для снижения фоновой электропроводности после **разделяющей колонки – подавляющая (компенсационная)**, где элюент преобразуется в воду или раствор с очень низкой электропроводностью, а разделяемые ионы – в сильные электролиты.  
**Достоинство двухколоночной ИХ** - ↓ПО и широкий диапазон линейности.  
**Одноколоночная ИХ** - элюенты с низкой электропроводностью (ароматические кислоты и их соли, рН = 3-8).

# Детекторы

- **Спектрофотометрический**
- **Люминесцентный**
- **Полярографический**

# Электрохимическое подавление для анионов

- На электродах – разложение воды



# Электрохимическое подавление для катионов

