

Лекция 9

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) Современная форма реализации классической жидкостной колоночной хроматографии

Характеристики ВЭЖХ

- **Высокая скорость процесса (сокращение времени анализа от нескольких часов и суток до нескольких минут)**
- **Минимальная степень размывания хроматографических зон (появляется возможность разделять соединения, незначительно различающихся по константам сорбции)**
- **Высокая степень механизации и автоматизации разделения, а также обработки информации (соответственно, высокий уровень воспроизводимости и точности)**

Определяемые вещества в ВЭЖХ

- 1. Различные смеси молекул, включая смеси всех типов изомеров.**
- 2. Макромолекулы синтетических и биополимеров (включая вирусы и молекулы с массами до нескольких миллионов).**
- 3. Ионы и устойчивые радикалы.**

Области использования ВЭЖХ

- Биология**
- Биотехнология**
- Пищевая промышленность**
- Фармацевтика**
- Контроль загрязнений окружающей среды**

Принципиальные различия между газовой и жидкостной хроматографией

Газовая хроматография

Жидкостная хроматография

1 Подвижная фаза (ПФ) - газ

Подвижная фаза (ПФ) - жидкость

2 Анализируемые вещества должны переводиться в пар

Анализируемые вещества должны растворяться в ПФ и сорбироваться на НФ

3 Более универсальный метод, т.к. газы смешиваются друг с другом в любых соотношениях

Менее универсальный

Газовая хроматография

Жидкостная хроматография

4 **Функция** **ПФ** **–**
транспортная.
Разделение происходит на
стационарной фазе

Происходят взаимодействия
между анализируемыми
молекулами, стационарной
фазой и элюентом + элюент
может взаимодействовать со
стационарной фазой

5 Для элюирования должны
изменяться чисто
физические параметры

Используют целенаправленные
химические взаимодействия

6 С увеличением
температуры десорбция
молекул происходит просто
и быстро

Увеличение температуры может
привести к необратимой
адсорбции и разрушению
поверхности сорбента

7 Поверхность сорбента 1 – 3
м²/г

Поверхность сорбента 100 –
500 м²/г

Принципиальная схема жидкостного хроматографа



Ввод пробы

Требования к устройству ввода пробы

- 1. Ввод пробы должен обеспечивать воспроизводимую подачу на колонку точно определённого объёма раствора пробы без прерывания потока элюента.**
- 2. Простота в обращении.**
- 3. Незначительный вклад в расширение пиков.**
- 4. Воспроизводимость объёма вводимой пробы.**
- 5. Возможность работы с высокими давлениями.**
- 6. Возможность работы с различными объёмами проб.**
- 7. Химическая инертность.**

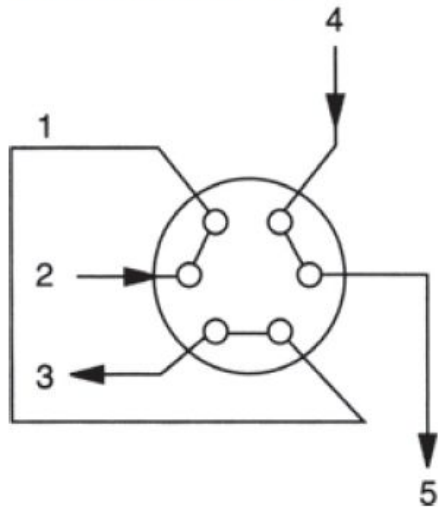
Способы ввода пробы

1. Ввод пробы со шприцем через мембрану в блоке ввода

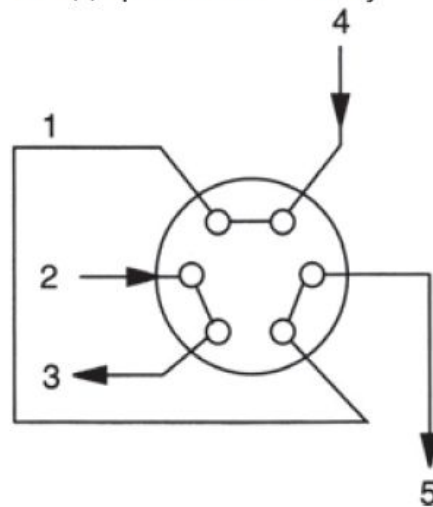
- простота
 - проба непосредственно впрыскивает в колонну
 - объём пробы можно варьировать
- +**
- недостаточная точность**

2. Дозирующая петля

Заполнение петли



Ввод пробы на колонку



- 1 – петля
- 2 – канал ввода пробы
- 3 – канал сброса избытка пробы
- 4 – канал соединения с насосом высокого давления
- 5 – канал соединения с колонкой

Насосы

В ВЭЖХ насосы необходимы для создания высокого давления ПФ, чтобы можно было её прокачать с необходимой скоростью через хроматографическую колонку, поскольку мелкие частицы, которыми заполнена колонка, создают высокое сопротивление потоку.

Требования к насосам высокого давления

- 1. Обеспечение с высокой точностью постоянного и равномерного потока.**
- 2. Отсутствие пульсаций в дрейфе базовой линии и в шумах детектора.**
- 3. Стабильность работы продолжительное время.**
- 4. Простота в обращении.**

Виды насосов

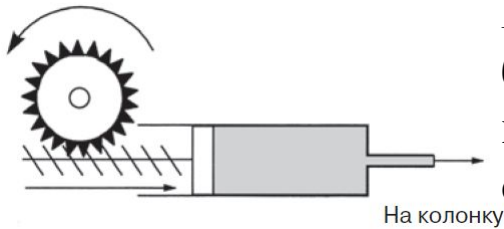
I. С постоянным давлением

II. С постоянным потоком

Независимо от возникшего падения давления в системе, скорость потока всегда поддерживается постоянной.

Периодические

Шприцевые насосы



Поток растворителя без пульсаций подаётся с постоянной скоростью

+

Фаза работы и подачи элюента постоянно сменяется фазой всасывания и наоборот.

→ **Поршневые**

Скорость потока регулируется по частоте

→ **Мембранные**

Скорость потока регулируется по высоте подъёма поршня

- После опустошения резервуар надо снова заполнять ПФ

- Прокладка между поршнем и цилиндром создает проблемы при высоких давлениях

- Не подходит для градиентного элюирования

Колонки для ВЭЖХ

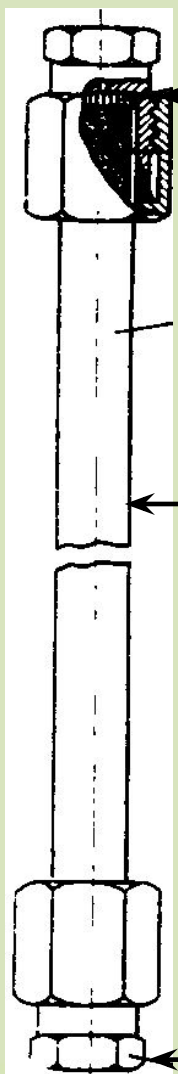
Характеристики некоторых типичных хроматографических колонок

Параметр	Колоночная хроматография	ВЭЖХ			
		аналитическая	скоростная аналитическая	микро-колоночная	препаративная
Размер частиц сорбента, мкм	100	5	3	5	5
Длина колонки, см	100	25	5	15	25
Внутренний диаметр, мм	20	4,6	4,6	1,0	21,2
Эффективность, тыс. теоретических тарелок	1	15	6	6	15
Линейная скорость подвижной фазы, см/мин	0,5	15	25	15	10
Расход подвижной фазы, мл/мин	1,5	1,5	2,5	0,1	30
Объем пика (мл) при $k' = 1$	40	0,1	0,04	0,006	3
$k' = 10$	220	0,7	0,23	0,034	16
Рабочее давление на входе в колонку, атм	0,01—0,1	50—200	100—200	50—150	50—200
Продолжительность цикла разделения, мин ($k' = 5$)	1000	10	1,2	6	15

- Размер частиц 3 – 10 мкм
- Узкое распределение частиц по размерам
- Устойчивость к высокому давлению



Колонки для ВЭЖХ



Фильтр: диск из пористой нержавеющей стали.

Назначение: - удерживать слой сорбента в колонке
- задерживать механические примеси из ПФ и образцов

Корпус: цилиндрическая трубка из нержавеющей стали, стекла или полимерных материалов. Служит ёмкостью для слоя сорбента.

Наконечник: - герметизирует всю колонку

- служит для подключения капиллярных трубок, соединяющих колонку с дозатором и детектором

Детекторы для ВЭЖХ

Требования к детекторам

1. **Высокая чувствительность и стабильность базовой линии.**
2. **Короткое время анализа.**
3. **Интеллект, или же интегрируемость в систему ВЭЖХ.**

Тем самым стремятся достичь полной автоматизации хроматографического процесса и настройки параметров детектора на оптимальное детектирование каждого пика.

УФ-детекторы (спектрофотометрические)

Принцип действия: основывается на ослаблении луча монохроматического света при прохождении через проточную кювету, заполненную веществом.

Закон Бугера – Ламберта- Бера

$$E = \varepsilon c d.$$

E – безразмерная величина поглощения (ослабление света)

ε – коэффициент поглощения света

c – концентрация компонента пробы в ПФ

d - толщина слоя

УФ-детекторы (спектрофотометрические)

Ограничение: Можно обнаруживать в элюате только такие компоненты, которые поглощают свет при больших длинах волн, чем сам элюент

Нижняя граница рабочей области для спектрофотометрических детекторов ограничена длиной волны **190 нм**.

Поглощение > 190 нм наблюдается для:

- соединений с двойной связью рядом с атомами, несущими неподеленную пару электронов: $C=C-O-C$
- соединений с гетероатомами: Br, I, S
- соединений с карбонильной группой: $-C=O$
- соединений с сопряженными двойными связями: $-C=C-C=C-$
- соединений с ароматическими кольцами

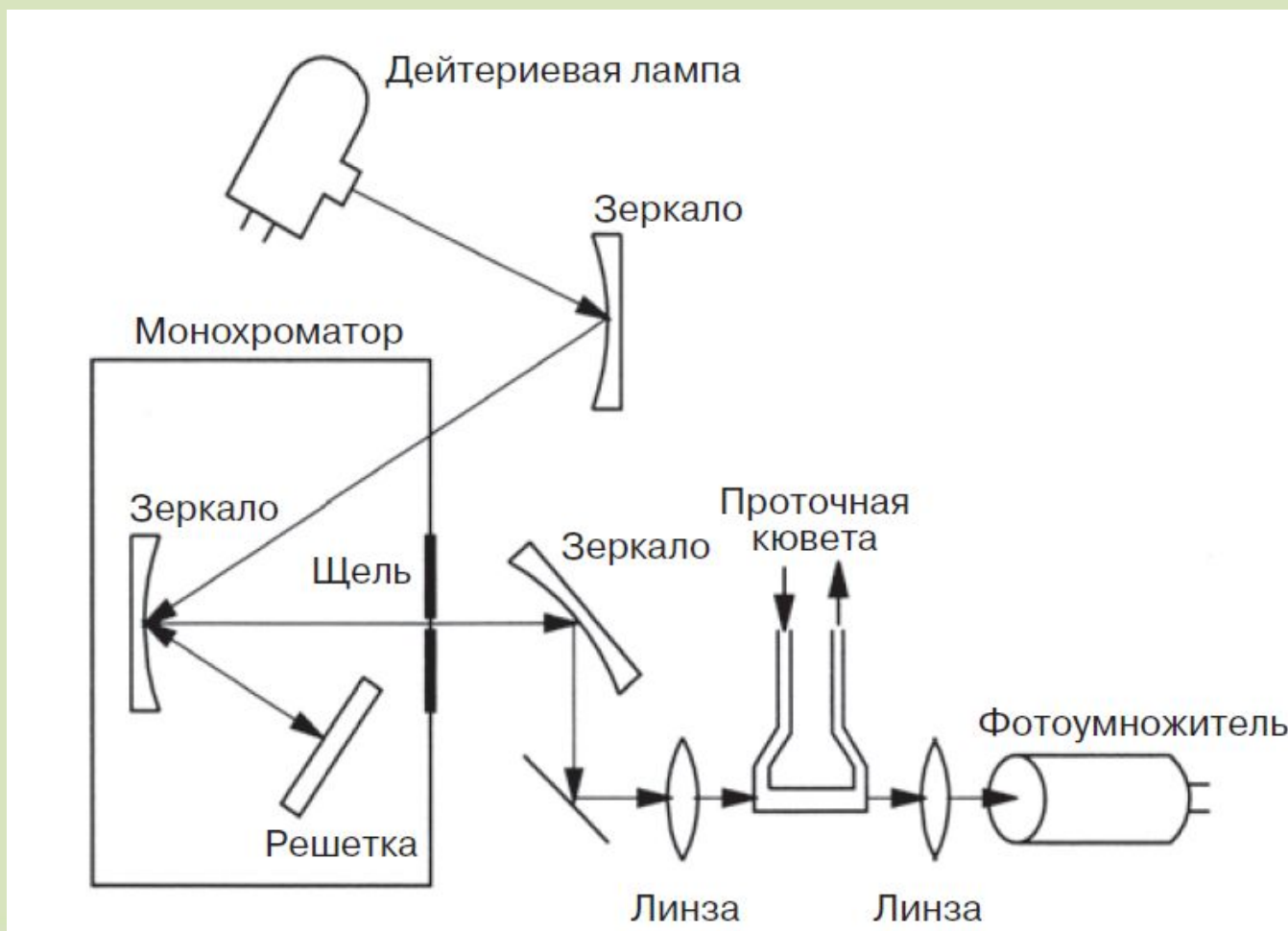
УФ-детекторы (спектрофотометрические)

Источники света в детекторах УФ и видимого диапазона

Фиксированная длина волны	Ртутные лампы пониженного давления	$\lambda = 253.7$ нм
Изменяемая длина волны	Дейтериевая лампа	$\lambda = 190 - 350$ нм
	Вольфрамовая лампа	$\lambda = 340 - 850$ нм (350 – 700)

УФ-детекторы (спектрофотометрические)

Оптическая схема однолучевого УФ-детектора с переменной длиной волны



Дифференциальный рефрактометр

Принцип действия: Регистрируются все вещества, у которых показатель преломления меньше, чем у чистой ПФ

Недостатки:

- Неселективный (используют в дополнение к УФ-детекторам)
- Чувствительность в ≈ 1000 меньше, чем у УФ-детектеров

Флуоресцентный детектор

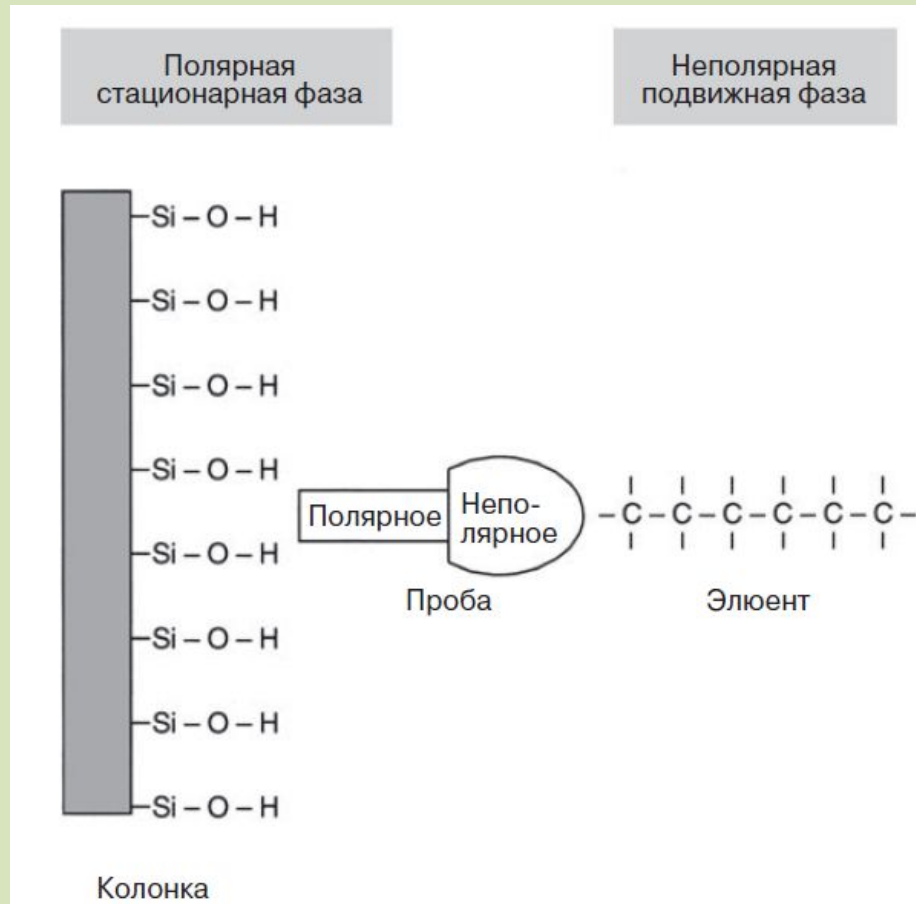
- Могут быть обнаружены вещества, которые флуоресцируют при облучении светом в близкой УФ и излучение которых находится в более длинноволновой области
- Чувствительность превосходит чувствительность УФ-детектора в ≈ 1000 раз при более высокой избирательности

Электрохимический детектор

- Метод применим для веществ, которые можно электрохимически окислить или восстановить в соответствующих элюентах
- Измерительная схема базируется на системе трёх электродов: рабочий и вспомогательный (плоские пластинки из стеклоуглерода) и электрод сравнения (второго рода)
- Ограничение: недостаточная чистота элюентов и содержание в них кислорода, быстрое загрязнение рабочего электрода
- Определяют: амины, аминокислоты, нитросоединения, фенолы, альдегиды

Нормальнофазовый вариант ВЭЖХ

Полярность неподвижной фазы больше полярности подвижной фазы.



Нормальнофазовый вариант ВЭЖХ

Химически привитые полярные фазы

Силикагель, поверхность которого модифицирована полярными функциональными группами.

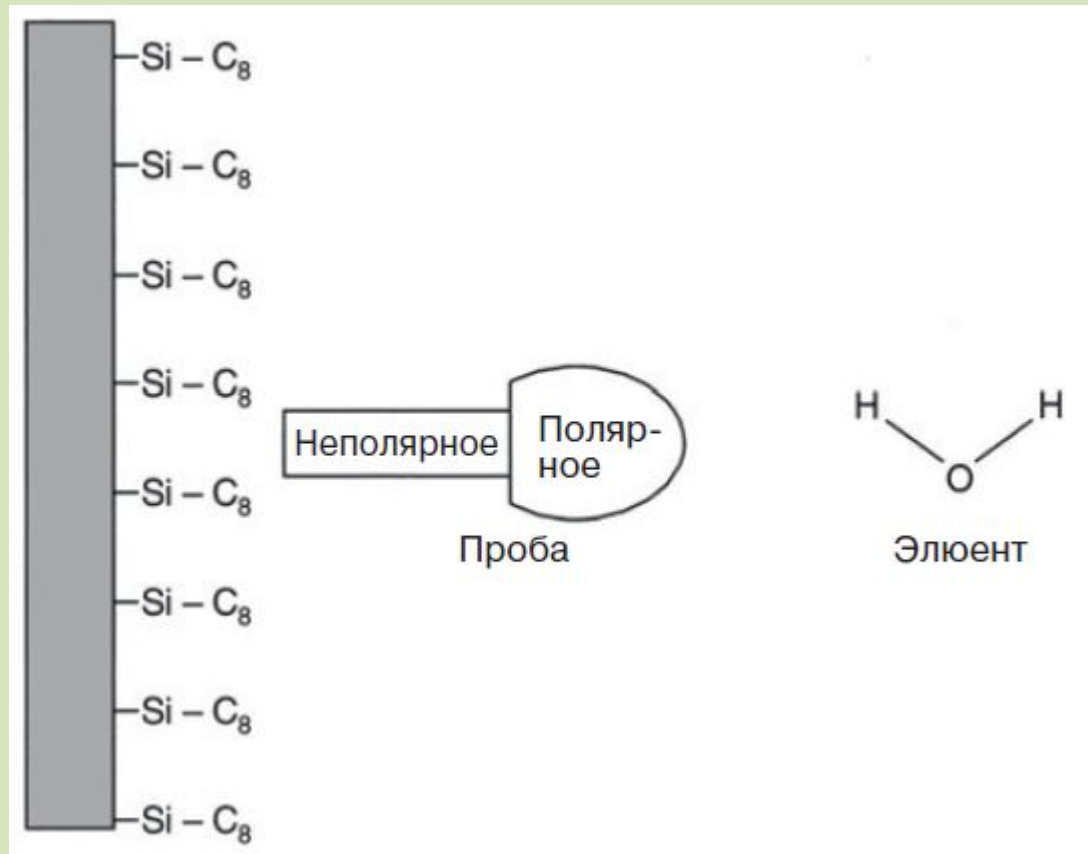
Особенности:

- **показывают обычно разную селективность**
- **менее чувствительны к следам воды в подвижной фазе**

Обозначение	Функциональные группы	Применение
NH ₂	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	Адсорбционная хроматография, ионо-обменная хроматография, обращенно-фазовая хроматография
CN	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CN	Адсорбционная хроматография, обращенно-фазовая хроматография
ДИОЛ	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O-CHON-CH ₂ -OH	Адсорбционная хроматография, эксклюзионная хроматография

Обращеннофазовый вариант ВЭЖХ

Полярность неподвижной фазы меньше полярности подвижной фазы.



Обращеннофазовый вариант ВЭЖХ

Модификация	Функциональная группа
C ₂	Этил
C ₄	Бутил
C ₈	Октил
C ₁₈	Октадецил
C ₆ H ₅	Фенил

Механизм разделения - притяжение за счет Ван-дер-Ваальсовых сил. Чем больше углеводородная часть в молекулах, тем сильнее они притягиваются.

ПФ: вода, полярные органические растворители (метанол, ацетонитрил) или их смеси.

Можно разделять широкий круг соединений, так как многие вещества растворимы в воде или подобных растворителях.

Вода не может смачивать аполярные (гидрофобные) алкильные группы и не вступает с ними во взаимодействие. Поэтому это самая слабая из всех мобильных фаз и медленнее всего элюирует пробу. Чем больше содержание воды в элюенте, тем дольше время удержания.

С ростом длины алкильных групп поверхность становится неполярной.

Подвижная фаза в ВЭЖХ

Требования к ПФ

- 1. Должна растворять анализируемую пробу**
- 2. Должна обладать малой вязкостью**
- 3. Должна быть нелетучей**
- 4. Из неё должно быть возможным выделение разделённых компонентов**
- 5. Должна быть инертна по отношению к материалам всех частей хроматографа, без механических примесей**
- 6. Безопасная**
- 7. Дешевая**

Подвижная фаза в ВЭЖХ

Функции ПФ

1. **Транспорт десорбированных молекул в колонке.**

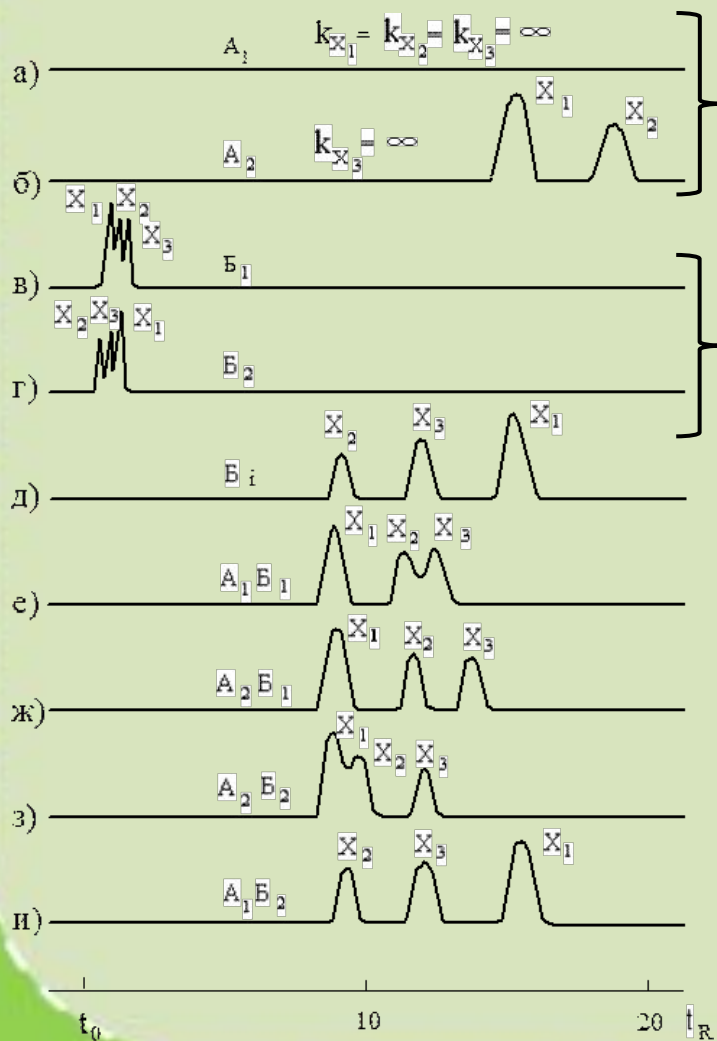
Для этого важны физические параметры ПФ: вязкость, летучесть и т.д.

2. **Регулирование констант равновесия, величин удерживания.**

Поскольку молекулы ПФ взаимодействуют с другими компонентами системы (молекулами разделяемых веществ и НФ)

Подвижная фаза в ВЭЖХ

Элюирующая сила ПФ



Растворитель обладает недостаточной элюирующей силой

Растворитель обладает избыточной элюирующей силой

Свойство ПФ вступать в такие межмолекулярные взаимодействия с компонентами системы, которые способствуют десорбции разделяемых соединений и более быстрому перемещению хроматографических зон.

Подвижная фаза в ВЭЖХ

Элюирующая сила ПФ

В качестве ПФ – смесь растворителей.

Растворитель типа

A



выполняет преимущественно
транспортную функцию

Растворитель типа

B



служит для регулирования
равновесия

Роль одного и того же компонента в различных подвижных фазах и в зависимости от характера неподвижной фазы различна

Гексан - Хлороформ



Растворитель типа B

Хлороформ - Мтенол



Растворитель типа A

Подвижная фаза в ВЭЖХ

Элюотропные ряды

Простейшая форма оценки индивидуальных растворителей. Дают количественную оценку адсорбционной способности растворителей в тех или иных режимах хроматографического разделения.

Основная идея: элюенты упорядочены согласно своей полярности

Параметр полярности P' по Снайдеру



Подвижная фаза в ВЭЖХ

Градиентное элюирование

Постоянный состав элюента



Градиентное элюирование



**Слабый
растворитель:**
разрешение первых
пиков улучшится,
последние не
элюируются.

**Сильный
растворитель:**
ухудшится
разрешение первых
пиков, остальные же
компоненты нельзя
будет определить

Подвижная фаза в ВЭЖХ

Градиентное элюирование

Градиентное элюирование – это элюирование растворителями возрастающей полярности

Ступенчатое

Элюирующая сила ПФ изменяется ступенчато. Состоит в последовательном введении в колонку с адсорбентом определённых объёмов растворителей увеличивающейся полярности.

Постепенное и непрерывное увеличение силы растворителя

Осуществляют путём непрерывного увеличения элюирующей силы растворителей по заранее заданной программе. Это достигается путём смешения двух или более растворителей в определённом соотношении с помощью специальных дозирующих устройств.

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

НЕФТЕПРОДУКТЫ

Определение типов ароматических углеводородов в средних дистиллятах. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием по коэффициенту рефракции

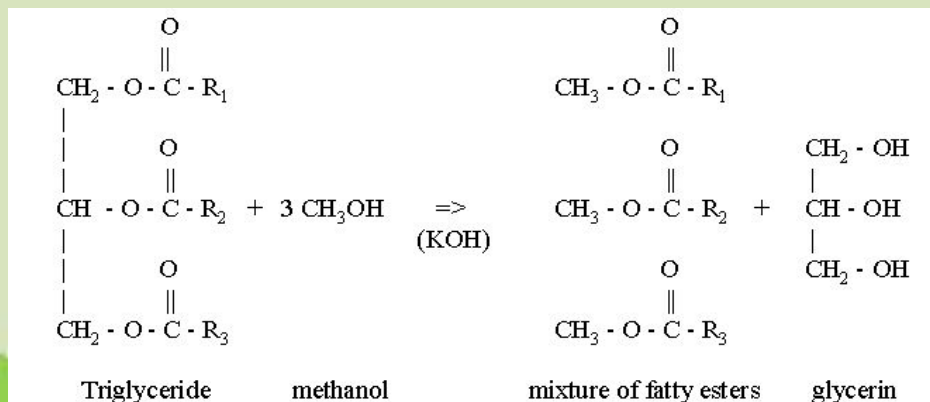
ГОСТ Р ЕН 12916-2008

Распространяется на дизельные топлива, которые могут содержать не более 5 % об. сложных метиловых эфиров жирных кислот (FAME) и нефтяные дистилляты диапазоном кипения от 150 °С до 400 °С.

Устанавливает метод определения массовой доли моноароматических, диароматических и три+-ароматических углеводородов высокоэффективной жидкостной хроматографией с детектированием по коэффициенту рефракции.

Массовые доли полициклических ароматических углеводородов вычисляют суммированием массовых долей отдельных групп диароматических и три+-ароматических углеводородов; общую массовую долю ароматических соединений вычисляют по сумме индивидуальных групп ароматических углеводородов.

Серосодержащие и азотсодержащие соединения могут мешать определению; моноолефины не влияют на результат определения в отличие от сопряженных ди- и полиолефинов, присутствие которых в продукте может изменить полученные результаты.



ГОСТ Р ЕН 12916-2008

Сущность метода:

Образец определённой массы разбавляют гептаном

Известный объём полученного раствора вводят в высокоэффективный жидкостной хроматограф, снабженный полярной колонкой

Колонка обладает слабым сродством к неароматическим углеводородам, но обладает определённой селективностью в отношении ароматических углеводородов. Вследствие этого ароматические углеводороды разделяются в зависимости от числа ароматических колец: т.е. на соединения моноароматические углеводороды (МАУ), диароматические углеводороды (ДАУ) и три+ароматические углеводороды (Т+АУ)

Колонка соединена с дифференциальным рефрактометром, который детектирует различные соединения по мере их выхода из колонки

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

Сигнал детектора непрерывно регистрируется системой накопления данных

Амплитуды сигналов, соответствующих ароматическим соединениям в образце, сравниваются с сигналами, полученными при анализе эталонных растворов

Определяют массовые доли МАУ, ДАУ и Т+АУ

Массовая доля (ДАУ), % + Массовая доля (Т+АУ), % =
Массовая доля (ПОЛИ-АУ), %

Массовая доля (МАУ), % + Массовая доля (ДАУ), % + Массовая доля (Т+АУ), % = Общая массовая доля ароматических соединений, %

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

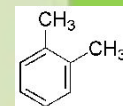
Реактивы и материалы

Циклогексан, с массовой долей основного вещества не менее 99 %

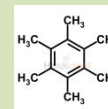
Гептан, квалификации чистый для хроматографии, в качестве подвижной фазы

1-Фенилдодекан, с массовой долей основного вещества не менее 98 %

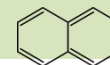
1,2-Диметилбензол (о-ксилол), с массовой долей основного вещества не менее 98 %



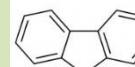
Гексаметилбензол, с массовой долей основного вещества не менее 98 %



Нафталин, с массовой долей основного вещества не менее 98 %



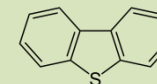
Флуорен, с массовой долей основного вещества не менее 98 %



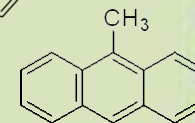
Фенантрен, с массовой долей основного вещества не менее 98 %



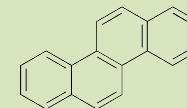
Дибензотиофен, с массовой долей основного вещества не менее 95 %



9-Метилантрацен, с массовой долей основного вещества не менее 95 %



Хризен, с массовой долей основного вещества не менее 95 %

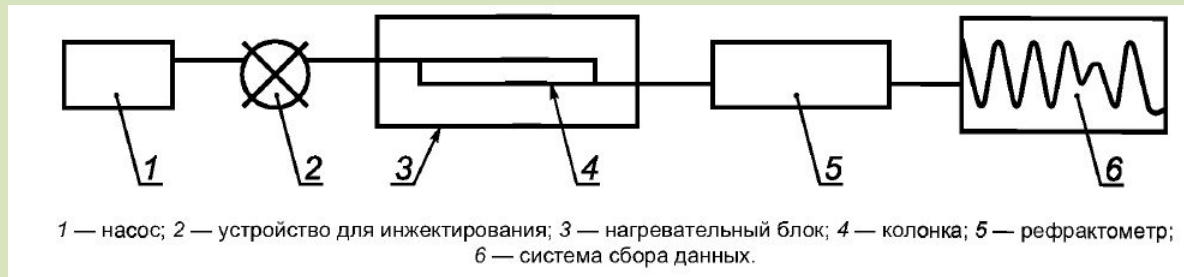


FAME

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

Аппаратура

Жидкостной хроматограф



Устройство для ввода пробы

Фильтр для пробы (предназначен для задержания твёрдых частиц, возможно присутствующих в пробе)

Система колонок, состоящая из высокоэффективной жидкостной хроматографической (ВЭЖХ) колонки (колонок) из нержавеющей стали, заполненной неподвижной кремниевой фазой с аминогруппой (или амино/циано-группой), с гранулами размером 3, 5 или 10 мкм

Устройство для регулирования температуры (нагревательный блок или система с циркуляцией воздуха, или термостат для колонки ВЭЖХ, или любую другую систему с регуляцией температуры), способное поддерживать температуру в интервале от $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ до $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

Рефрактометр, пригодный для работы в интервале значений коэффициента рефракции от 1.3 до 1.6



Система накопления данных (компьютер или интегратор)

Мерные колбы вместимостью 10 и 100 см³

Весы, обеспечивающие точность взвешивания + 0.0001 г

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

Подготовка аппаратуры

1. Настраивают хроматограф, устанавливают постоянную скорость потока жидкой фазы в пределах от 0.8 до 1.2 см³/мин и убеждаются в том, что кювета сравнения рефрактометра заполнена подвижной фазой.
2. Готовят стандартный *раствор 1* (СКС 1) для калибровки. Для этого в мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают с точностью ± 0.0001 г:
 - (1.0 \pm 0.1) г циклогексана
 - (0.1 \pm 0.01) г 1-фенилдодекана
 - (0.5 \pm 0.05) г 1,2-диметилбензола
 - (0.1 \pm 0.01) г гексаметилбензола
 - (0.1 + 0.01) г нафталина
 - (0.05 \pm 0.005) г дибензотиофена
 - (0.05 \pm 0.005) г 9-метилантрацена
3. Помещают колбу с ее содержимым в ультрафиолетовую ванну и выдерживают до тех пор, пока визуально не станет видно, что все компоненты растворились в смеси 1,2-диметилбензола/ циклогексана.
4. Удаляют колбу с раствором из ультрафиолетовой ванны и доводят до метки гептаном.

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

5. Готовят стандартный *раствор 2* для калибровки (СКС 2). Для этого в мерную колбу вместимостью 100 см³ помещают с точностью ±0.0001 г:

(0.4 ±0.1) г FAME

(0.04 ±0.01) г хризена

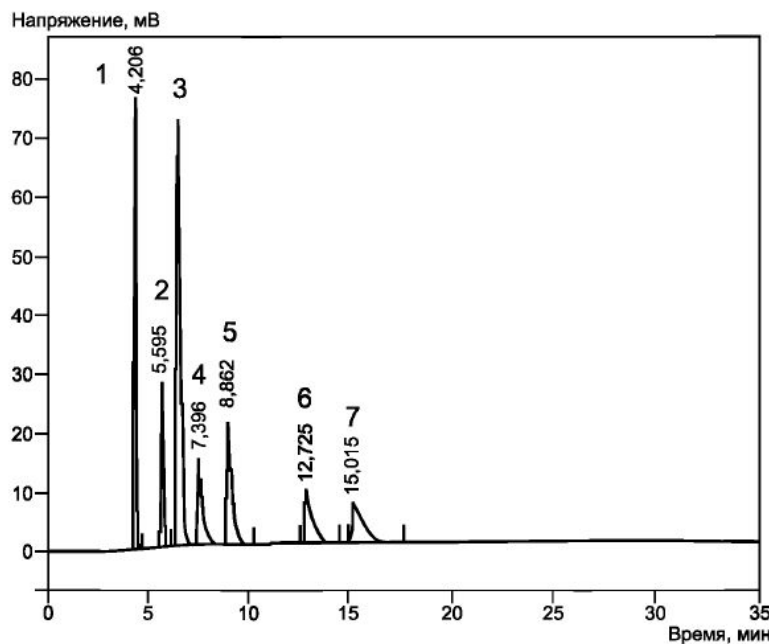
6. Раствор в колбе доводят до метки гептаном.

7. Выдерживают раствор в ультразвуковой ванне при температуре 35 °С до тех пор, пока визуально раствор не будет гомогенным, без отложений хризена на дне.

8. Инжектируют 10 мкл СКС 1.

9. Убеждаются в том, что все компоненты СКС 1 элюируют в следующем порядке: циклогексан, фенилдодекан, 1,2-диметилбензол, гексаметилбензол, нафталин, дибензотиофен и 9-метилантрацен.

10. Вводят 10 мкл СКС 2 и проверяют, как элюирует пик хризена — перед первым пиком FAME или вместе с ним. Обеспечивают, чтобы пик, соответствующий времени удерживания хризена, был выше, чем пик, соответствующий времени удерживания 9-метилантрацена.



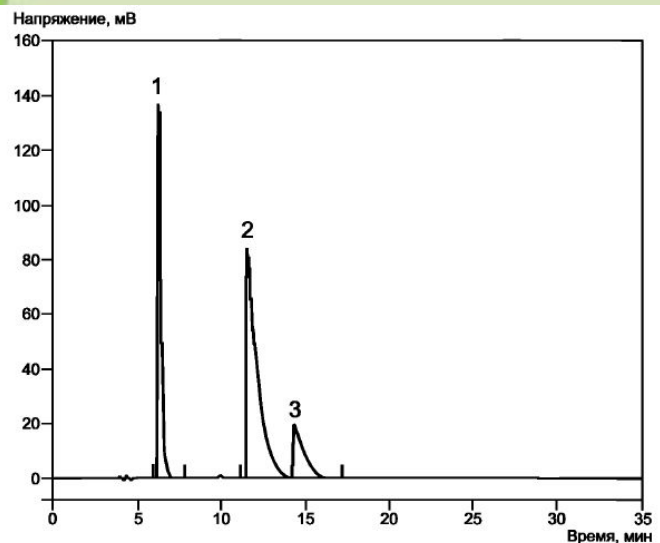
1 — циклогексан; 2 — фенилдодекан; 3 — 1,2-диметилбензол; 4 — гексаметилбензол; 5 — нафталин;
6 — дибензотиофен; 7 — 9-метилантрацен

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

Калибровка

1. Готовят четыре калибровочных раствора А, В, С и D с приблизительной (но точно известной) концентрацией (указана в таблице), для чего в мерные колбы с точностью 0.0001 г взвешивают соответствующие соединения и доводят до метки гептаном.

Калибровочный раствор	1,2-Диметилбензол, г/100 см ³	Флуорин, г/100 см ³	Фенантрен, г/100 см ³
А	4,0	2	0,4
В	1,0	1,0	0,2
С	0,25	0,25	0,05
Д	0,05	0,02	0,01



2. Вводят 10 мкл калибровочного раствора А. Записывают хроматограмму и измеряют площадь пика для каждого ароматического соединения калибровочного раствора.

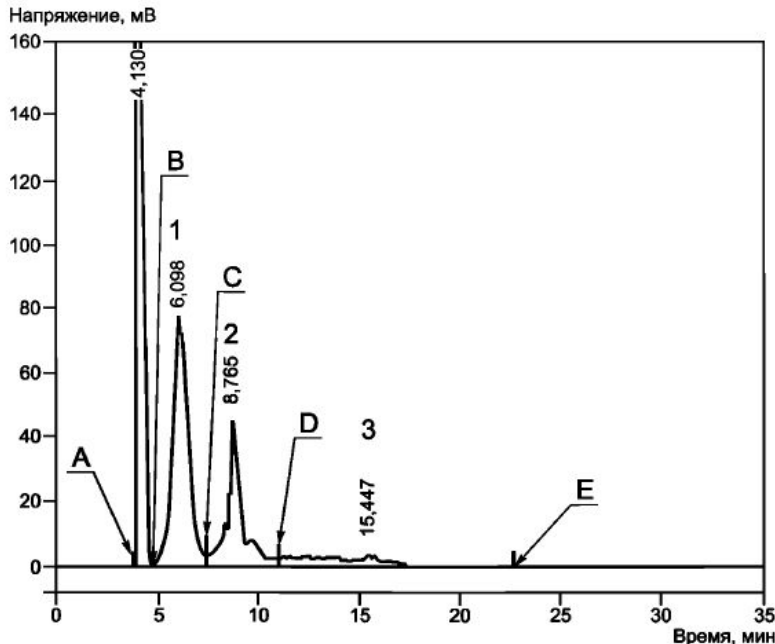
3. Те же процедуры повторяют для остальных калибровочных растворов.

4. Строят график зависимости рассчитанной площади от концентрации (г/100 см³) для каждого ароматического соединения в растворе.

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

Проведение испытания

1. В мерной колбе вместимостью 10 см³ взвешивают от 0.9 до 1.1 г образца с точностью 0.001 г и доводят гептаном до метки. Энергично встряхивают колбу для перемешивания. Дают раствору постоять в течение 10 мин и, если необходимо, используют фильтр для удаления нерастворимых веществ.
2. Когда условия проведения испытания станут стабильными и идентичными условиям калибровки, инжигируют 10 мкл раствора образца и начинают сбор данных.



1 — моноароматические углеводороды; 2 — диароматические углеводороды;
3 — три+-ароматические углеводороды

3. Проводят идентификацию пиков, соответствующих МАУ, ДАУ и Т+-АУ.

ГОСТ Р ЕН 12916-2008

Обработка результатов

1. Содержание C МАУ, ДАУ и Т+-АУ в процентах по массе определяют как:

$$C = \frac{[(AS) + I]V}{M},$$

A - площадь пика МАУ, ДАУ или Т+-АУ образца

S - тангенс угла наклона калибровочной прямой МАУ, ДАУ или Т+-АУ (концентрация в г/100 см³ в зависимости от площади пика);

I - начальная ордината калибровочной прямой для МАУ, ДАУ или Т+-АУ

V - объем раствора образца, см³

M - масса отобранного образца, г

2. Рассчитывают содержание полициклических ароматических углеводородов образца в процентах по массе путем сложения диароматических и три+-ароматических углеводородов (т.е. ДАУ и Т+-АУ) и общее содержание ароматических углеводородов в пробе в процентах по массе путем сложения процентов по массе различных групп ароматических углеводородов (т.е. МАУ, ДАУ или Т+-АУ).

