

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

HPLC – high **performance** liquid chromatography

or

HPLC – high **pressure** liquid chromatography

or

HPLC – high **price** liquid chromatography



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

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

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

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

Область применения ВЭЖХ

1. Углеводороды с различными заместителями:

Алканы и алкены, бензолы, многоядерные ароматические, гетероциклы

2. Биоорганические соединения:

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

3. Биоорганические соединения: Белки, ДНК, РНК

4. Полимеры, их моно- и олигомеры

5. Ионы: неорганические и органические

Модели аналитических хроматографов для ВЭЖХ

Agilent 1200, США



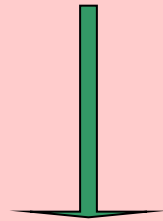
Alliance, Waters, США



МИЛИХРОМ А-02, Россия

Условия ВЭЖХ:

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



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

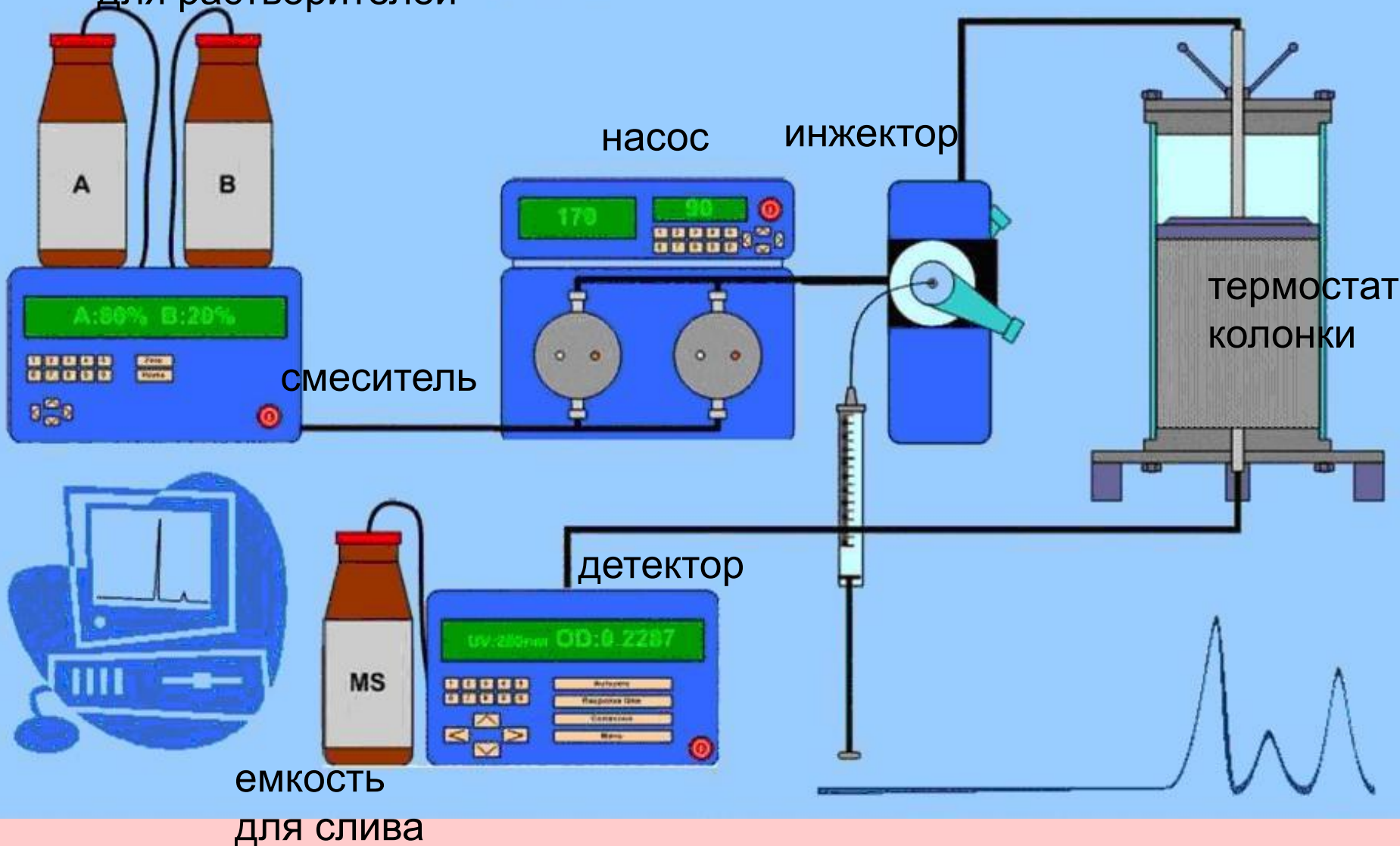
Препаративные хроматографы с коллекторами фракций



коллектор фракций

Схема хроматографов для ВЭЖХ

емкости
для растворителей



смеситель

насос

инжектор

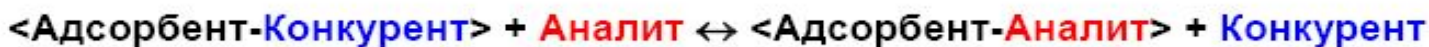
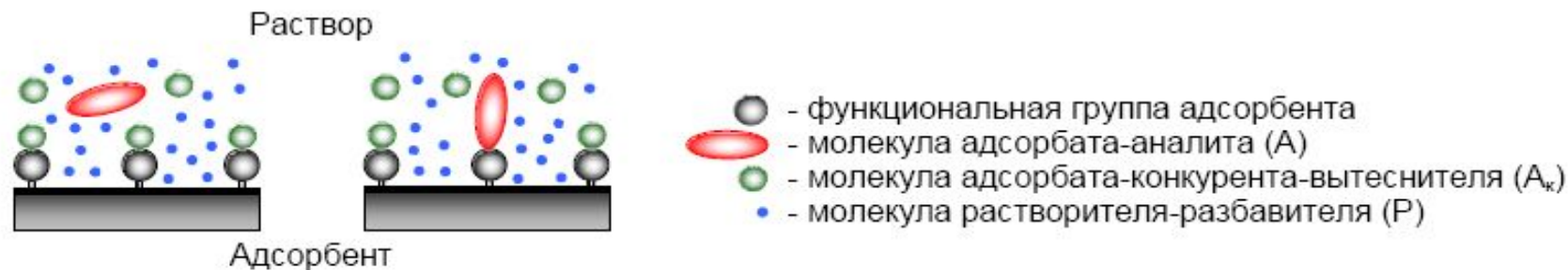
термостат
колонки

детектор

емкость
для слива

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

Адсорбция



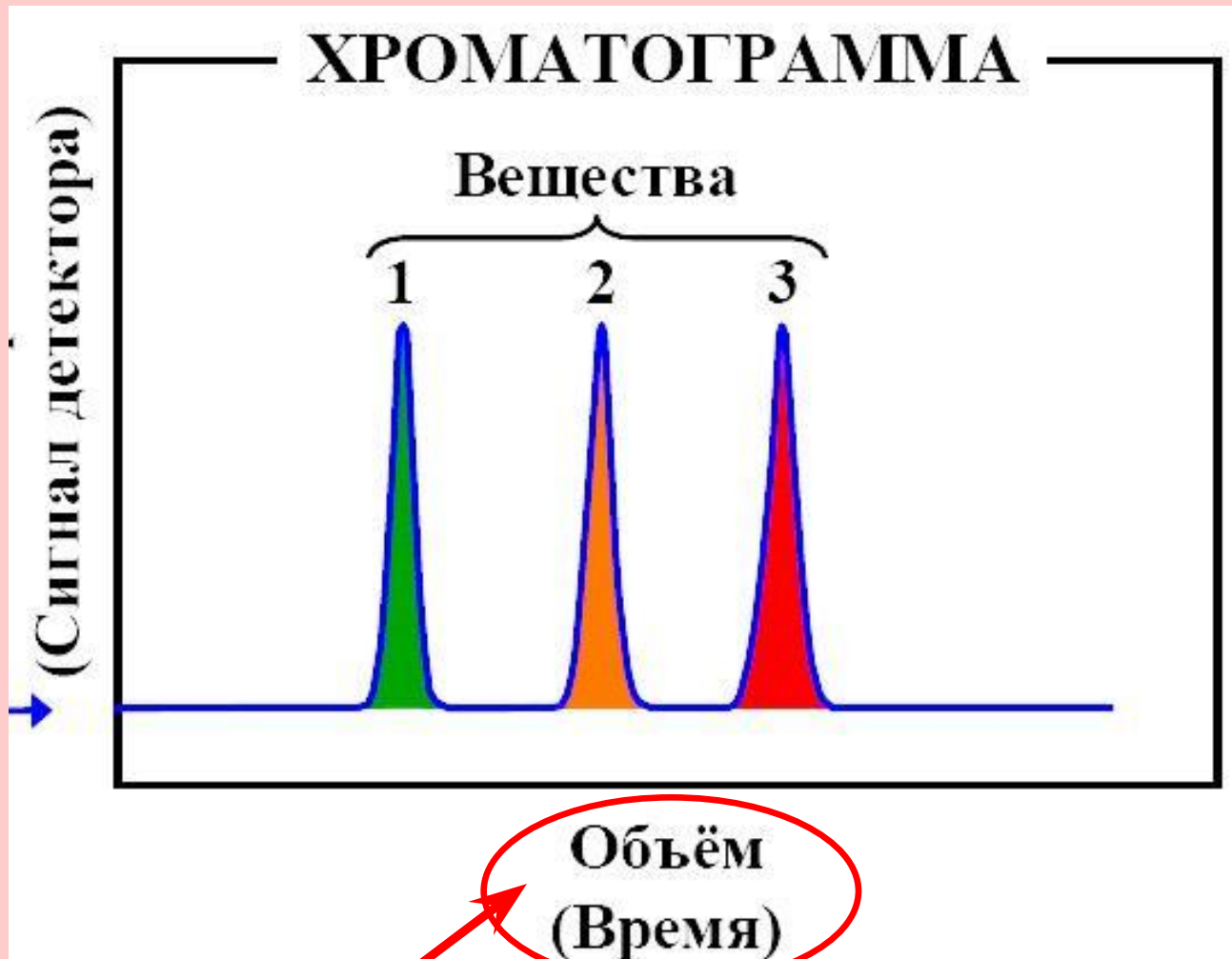
Элюция – процесс прохождения веществ через колонку с потоком подвижной фазы

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

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

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

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



Объем прошедшей подвижной фазы
при постоянной скорости потока

время удерживания ~ объем удерживания

Классификация жидкостной хроматографии

По характеристикам и взаимодействиям неподвижной фазы:

Нормально-фазовая

Обращенно-фазовая

Ионообменная

Эксклюзионная

Нормально-фазовая жидкостная хроматография:

неподвижная фаза – полярная,
подвижная фаза – неполярная.

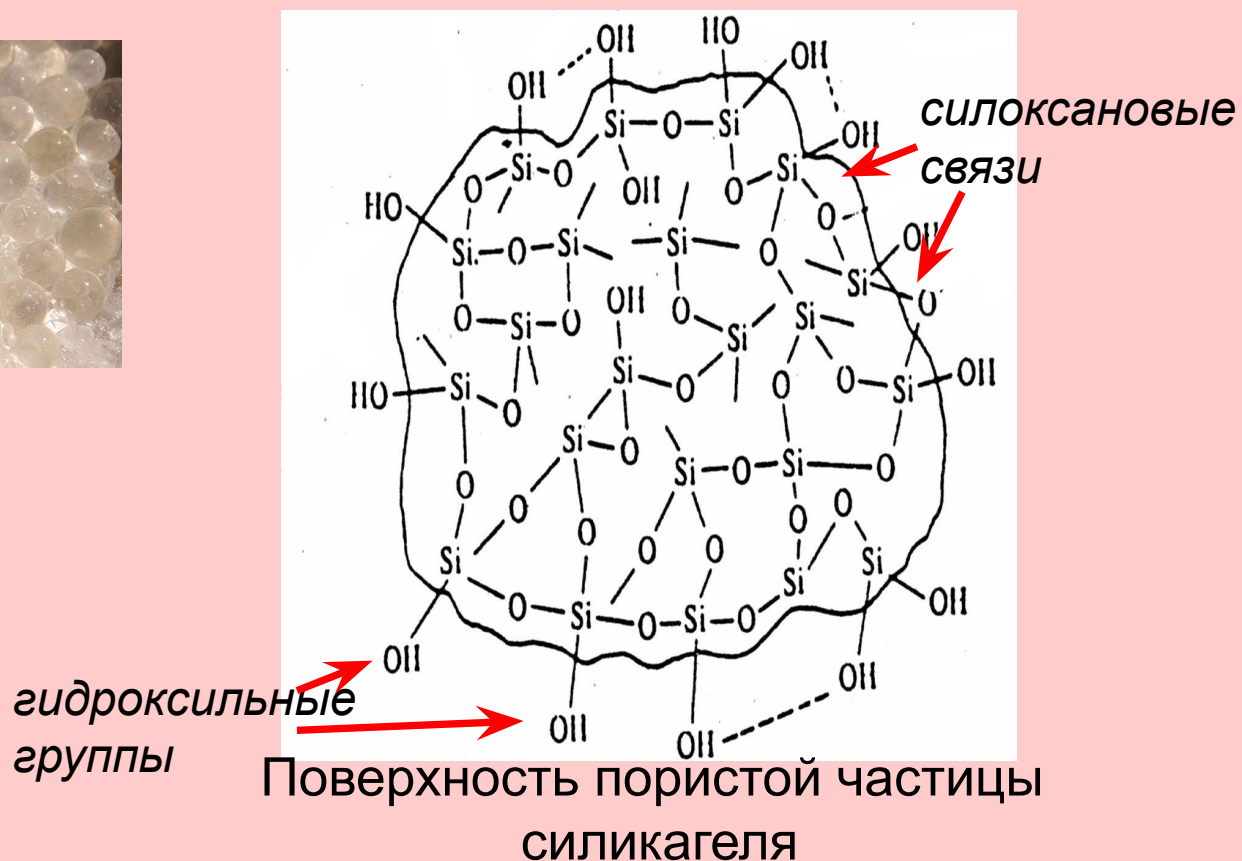
Неподвижные фазы:

силикагель и его модификации, оксид алюминия

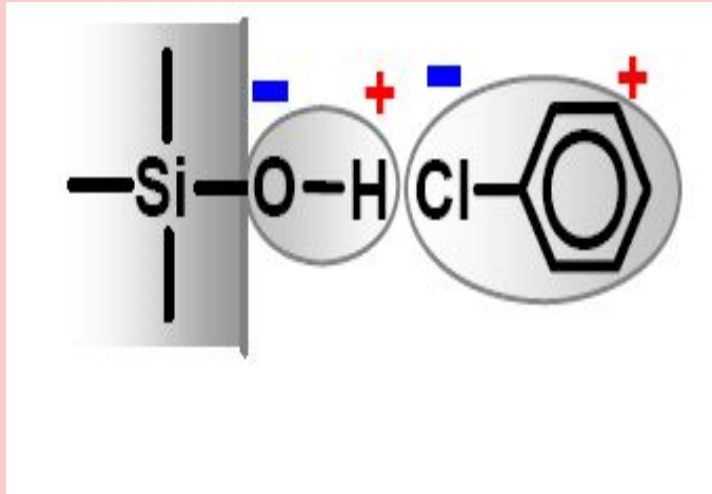


Элюенты:

углеводороды,
эфиры,
спирты и пр.



Нормально-фазовая жидкостная хроматография:



Взаимодействия
веществ и
неподвижной фазы

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

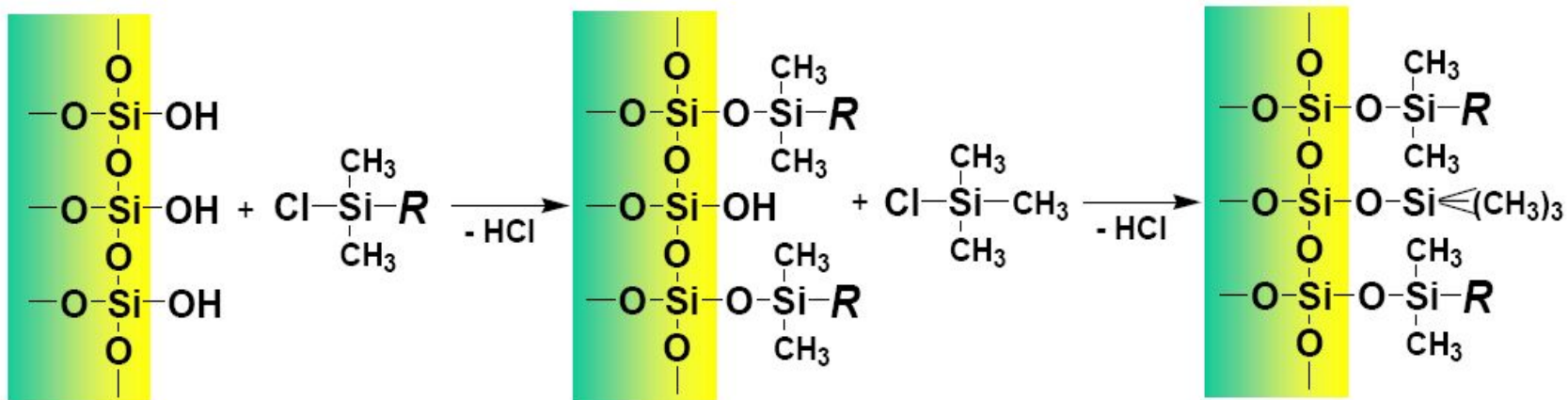
! *Практическое использование нормально-фазовой хроматографии затруднено из-за микроколичеств воды, содержащейся в растворителях, которая закрывает адсорбционные центры силикагеля, что ведет к значительному изменению хроматографических параметров.*

Обращенно-фазовая жидкостная хроматография:

неподвижная фаза – неполярная,
подвижная фаза – полярная.

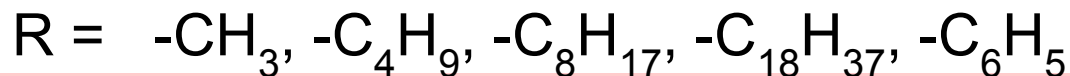
Неподвижные фазы: модификации силикагеля

Синтез привитых мономерных фаз



Присоединение функциональной группы R

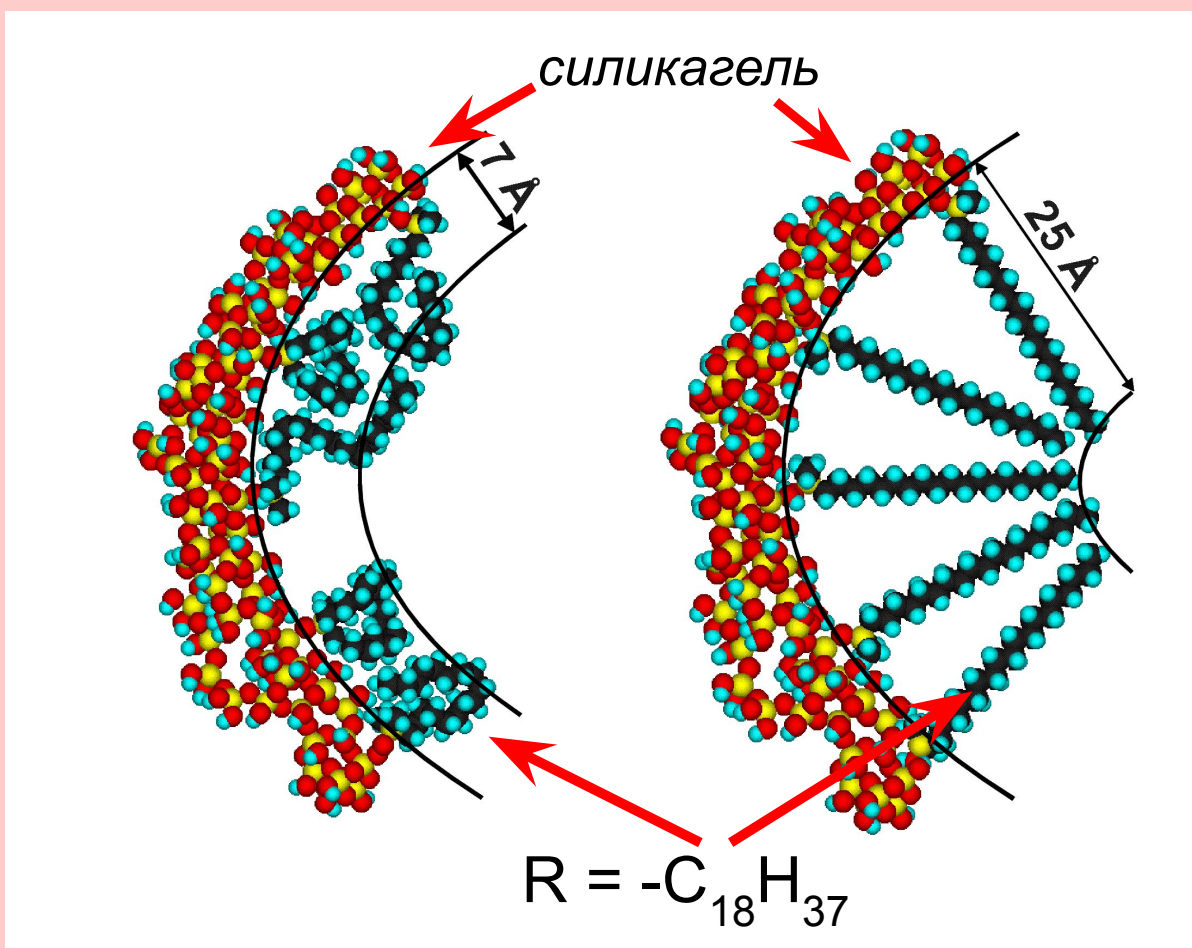
Инактивация оставшихся силанолов ("*endcapping*")



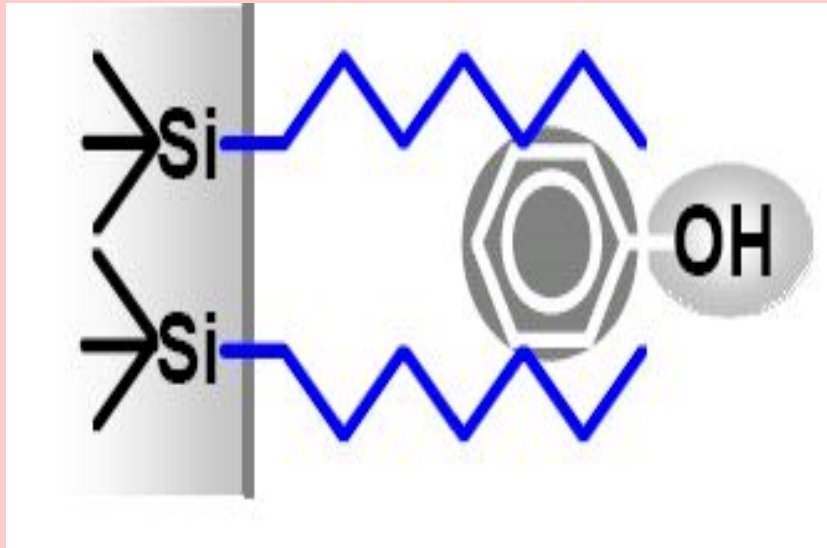
Элюенты: спирты, нитрилы, вода и пр., добавки солей

Обращенно-фазовая жидкостная хроматография

Неподвижные фазы: расположение привитых остатков на поверхности силикагеля



Обращенно-фазовая жидкостная хроматография



Взаимодействия
веществ и
неподвижной фазы

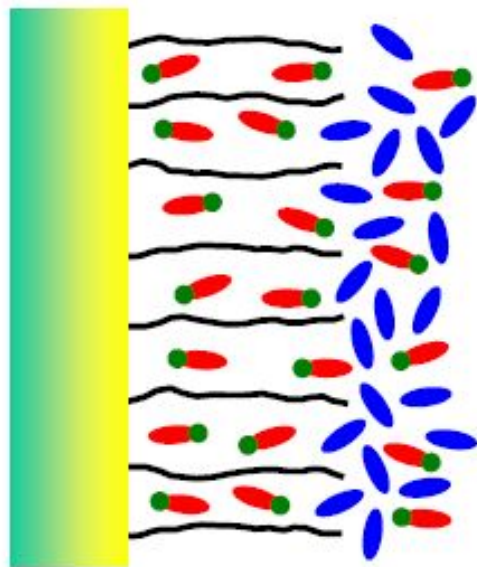
Разделение: нейтральные органические вещества, слабые кислоты, слабые основания и пр.

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

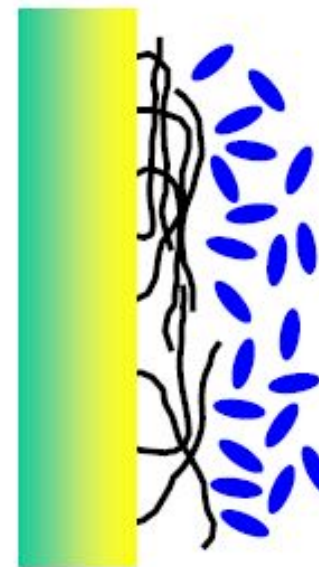
Обращенно-фазовая жидкостная хроматография

Коллапс обращенной фазы

Малое содержание
ВОДЫ



Высокое содержание
ВОДЫ

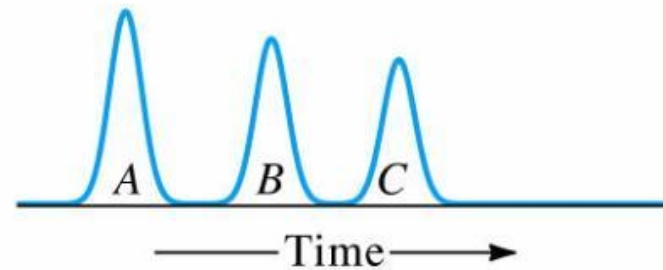
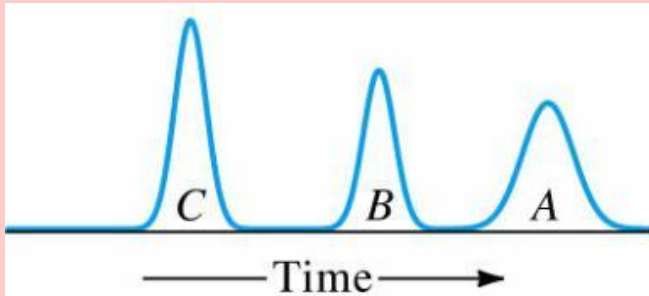


● - Вода ● - Метанол

Выход веществ с разной полярностью на разных неподвижных фазах

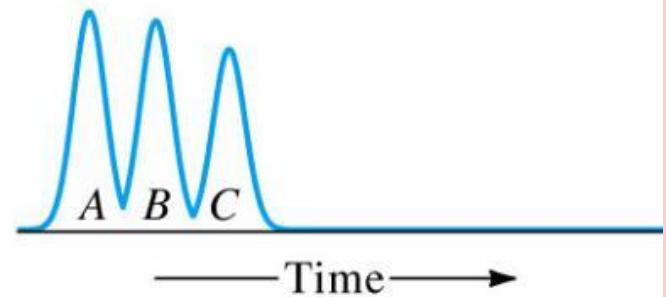
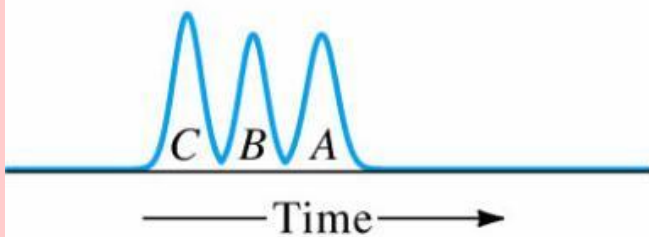
Нормальная фаза

Обращенная фаза



Слабополярный элюент

Сильнополярный элюент



Среднеполярный элюент

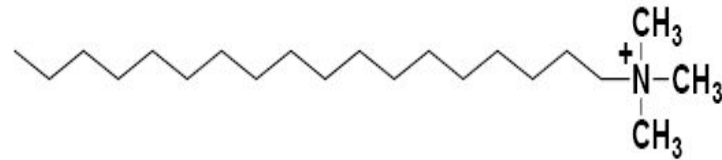
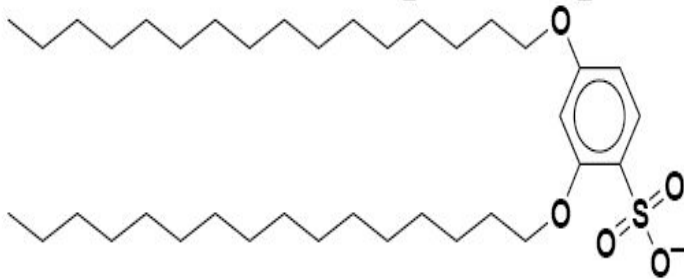
Среднеполярный элюент

Полярность веществ: $A > B > C$

Ионообменная хроматография

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

модификаторы обращенной фазы:

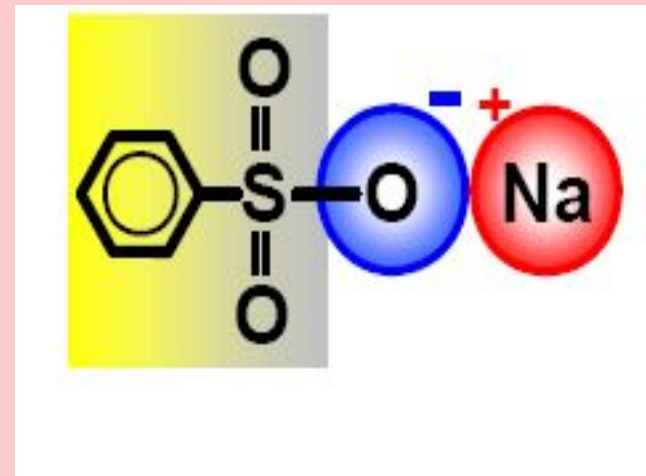


Катионит: делит катионы

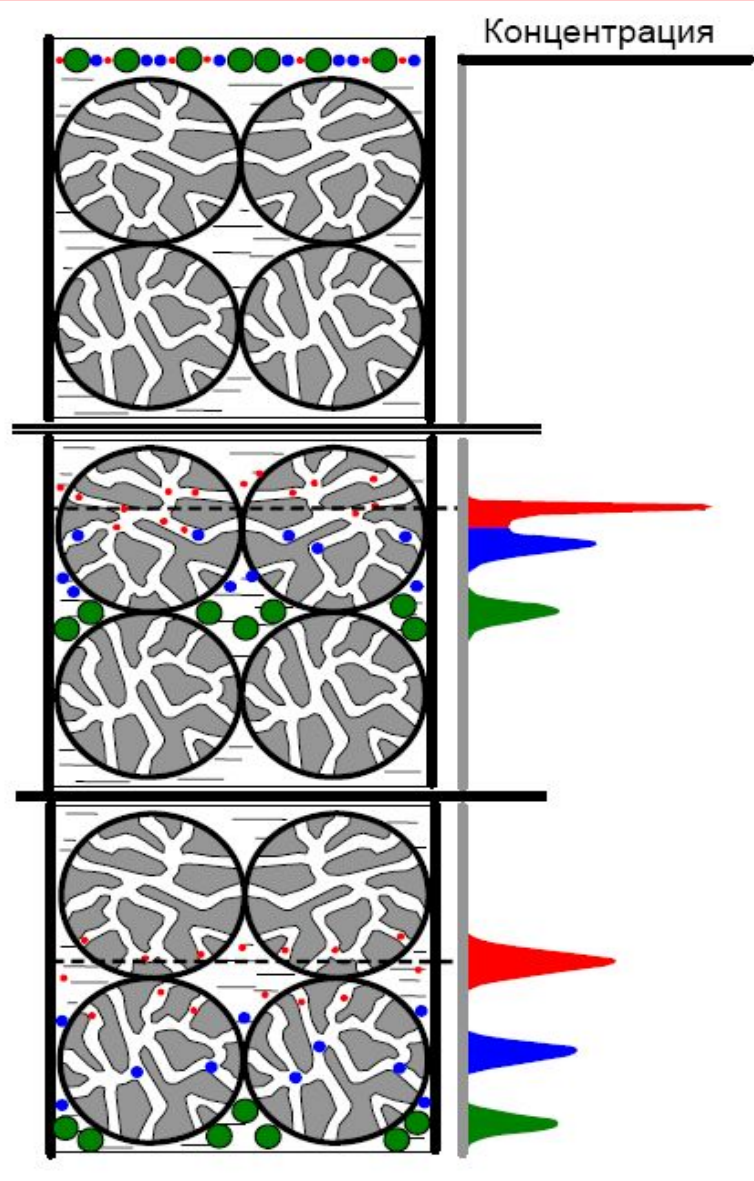
Анионит: делит анионы

Элюенты: водные растворы солей, кислот, щелочей

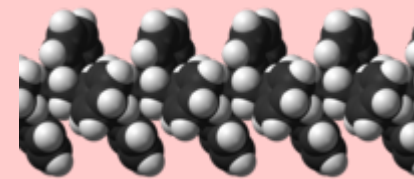
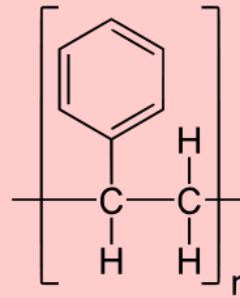
Пример разделения: аминокислоты



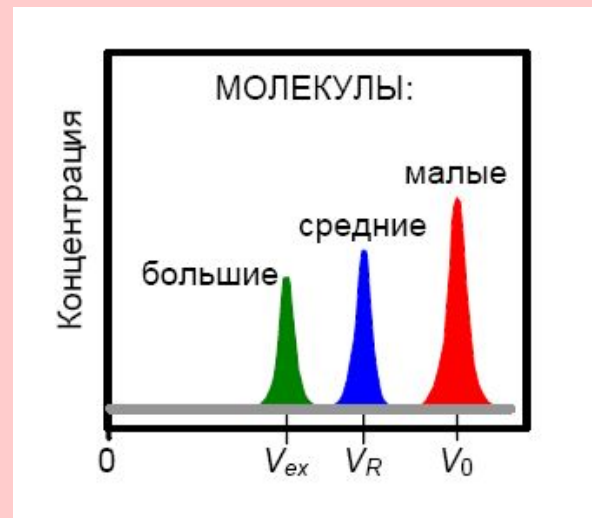
Эксклюзионная или гель-проникающая хроматография



Неподвижные фазы имеют выраженную поровую систему: макропористые стекла, полистирол



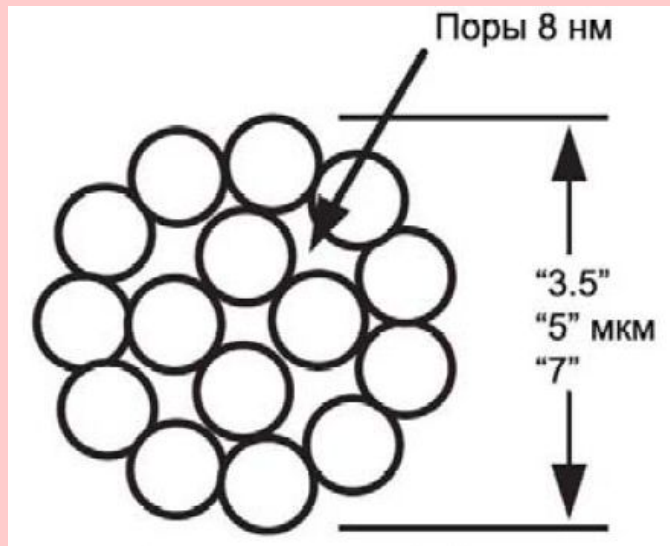
Звено полистирола
(поливинилбензола)



Применение: анализ полимеров по молекулярному весу молекул

КОЛОНКА – «СЕРДЦЕ» ХРОМАТОГРАФА

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



«Идеальная» частица адсорбента с порами

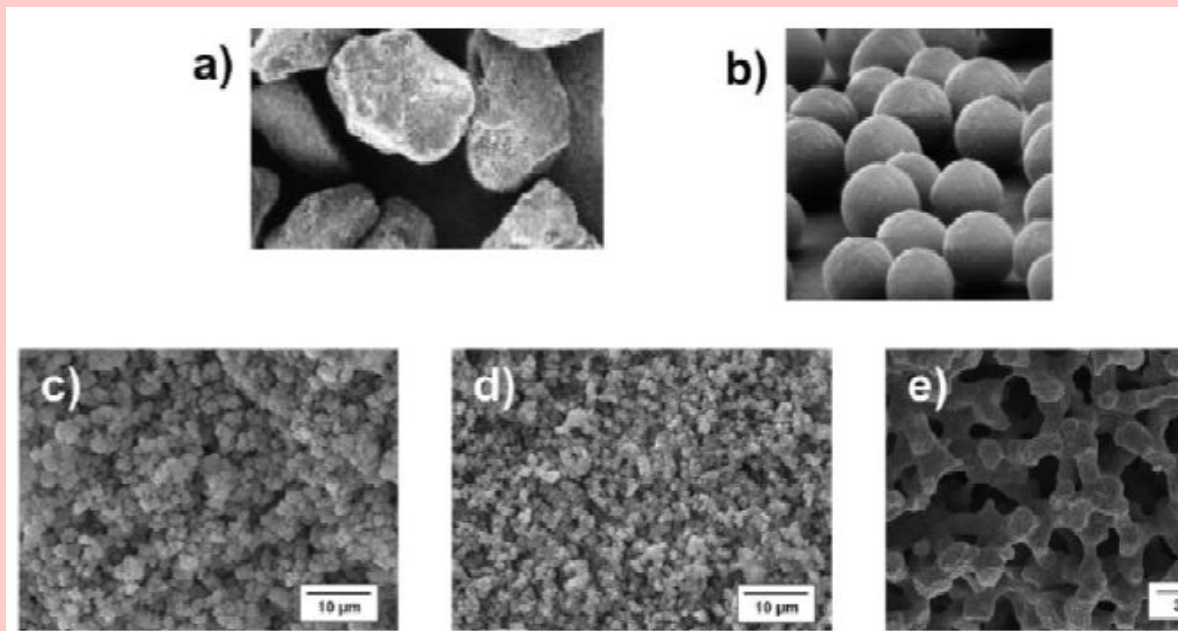
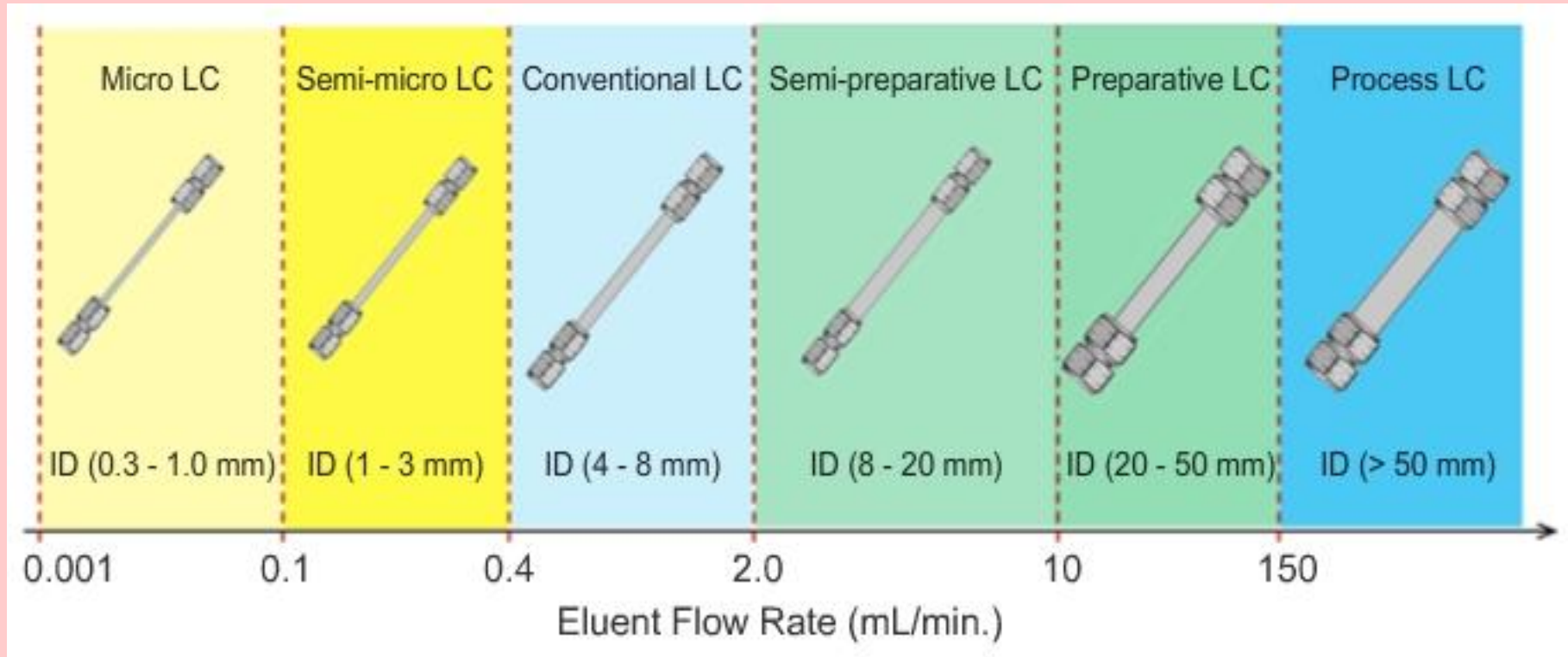


Fig. 1. Scanning electron microscopy pictures of different types of porous chromatographic materials. (a) Irregularly-shaped silica particles, (b) spherical silica particles, (c) organic polymer monolith A (UNO S), (d) organic polymer monolith B (CIM Disk), and (e) organic polymer monolith C (Chromolith).

Реальные частицы адсорбента,
заполняющие колонку

Колонки для ВЭЖХ



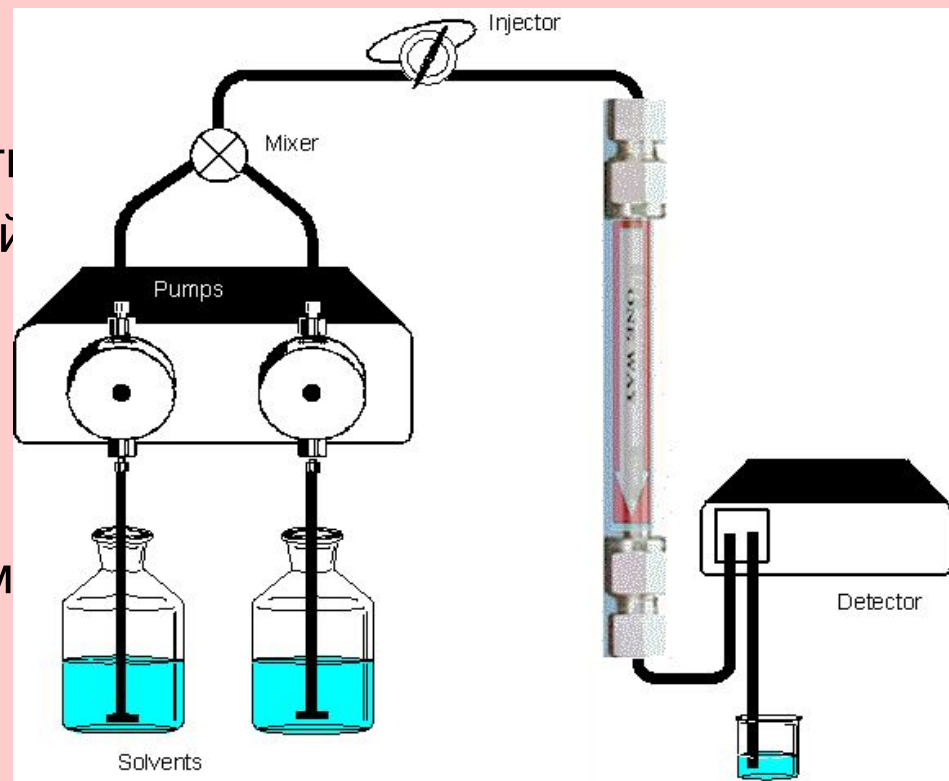
Колонки для аналитических разделений

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

Колонки для ВЭЖХ



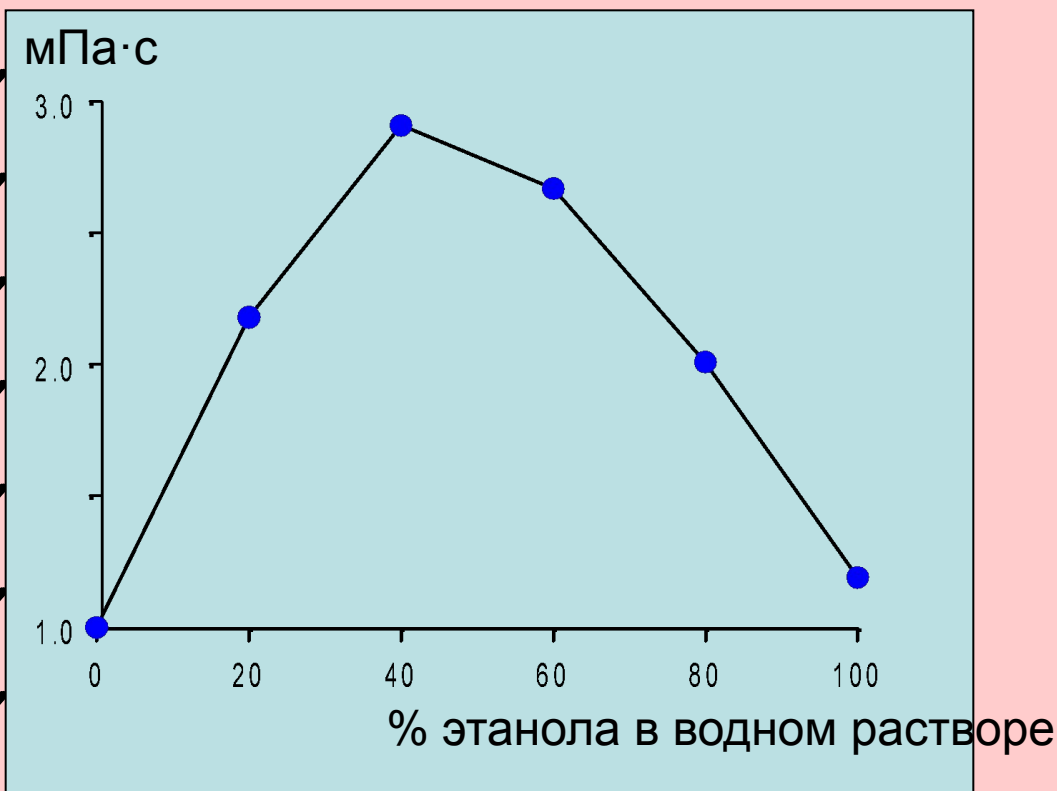
- Имеют указатель направления потока, который не следует менять
- Внутренняя поверхность – гладкий металл, давление до 300 атм.
- Плавный переход от большего внутреннего диаметра к малому внешнему диаметру (под штуцер)
- Фильтры с диаметром пор 2-5 мкм на входе и выходе
- Возможно использование предколонки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



Выбор состава элюента:

свойства разделяемых веществ,
свойства неподвижной фазы

У элюентов важны свойства:



Вязкость жидкостей
при 25 °С, [мПа·с]

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

Свойства элюентов: смешиваемость

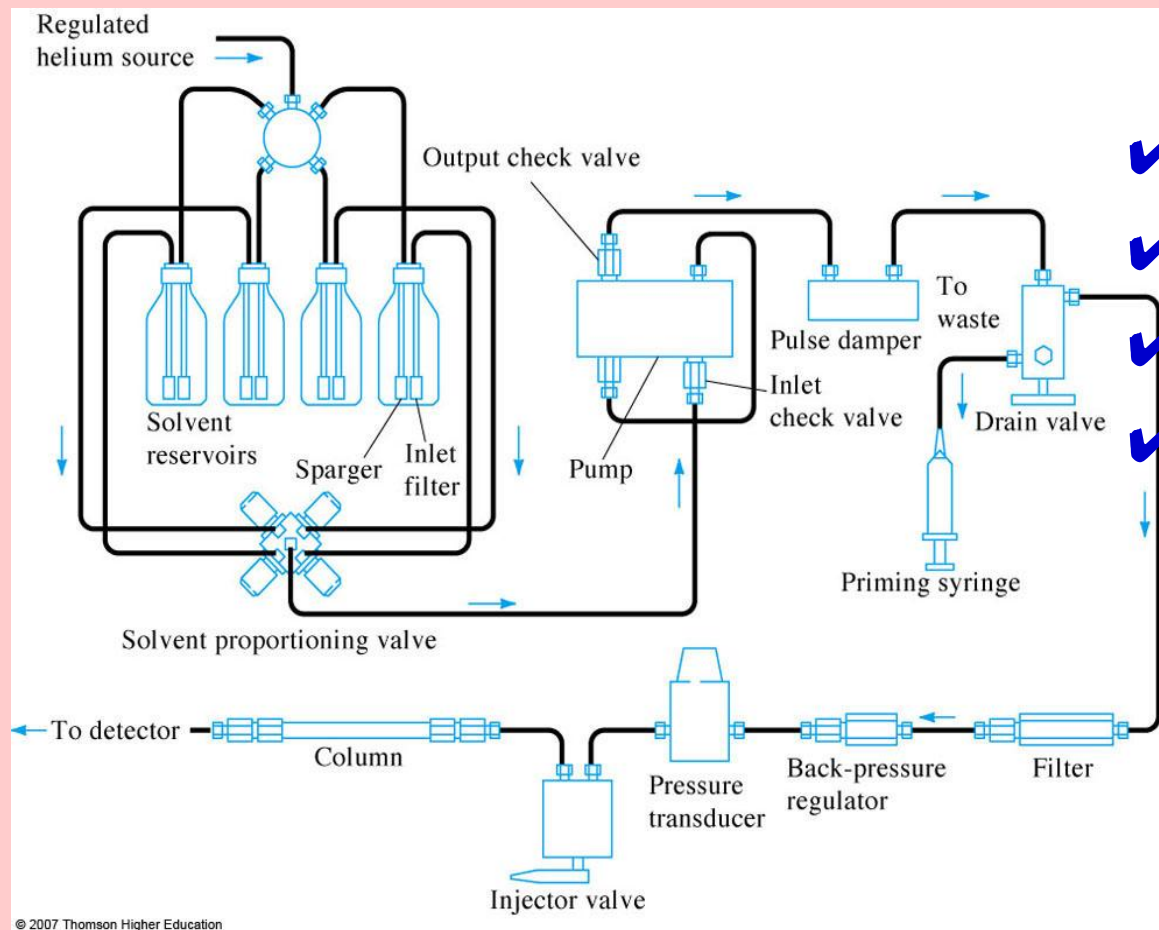


Свойства элюентов: элюирующая сила

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

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

Компоненты ВЭЖХ прибора: Система подачи элюентов



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

Система дегазации растворителя

Функция – удаление растворенного воздуха - пузырьков.

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



Насосы

Назначение: Подача подвижной фазы

Требования к насосам:



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

Типы насосов:

- Шприцевые
- Пневматические
- Плунжерные возвратно-поступательные

Шприцевые насосы

Преимущества:

- Простой
- Недорогой
- Отсутствие пульсаций потока

Недостатки:

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



Низкие скорости потока
1-10 мл/мин

Плунжерные возвратно-поступательные насосы

Это 90 % от всей массы насосов в ВЭЖХ

Наиболее часто используется насос с двойным ходом поршня.

Преимущества:

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

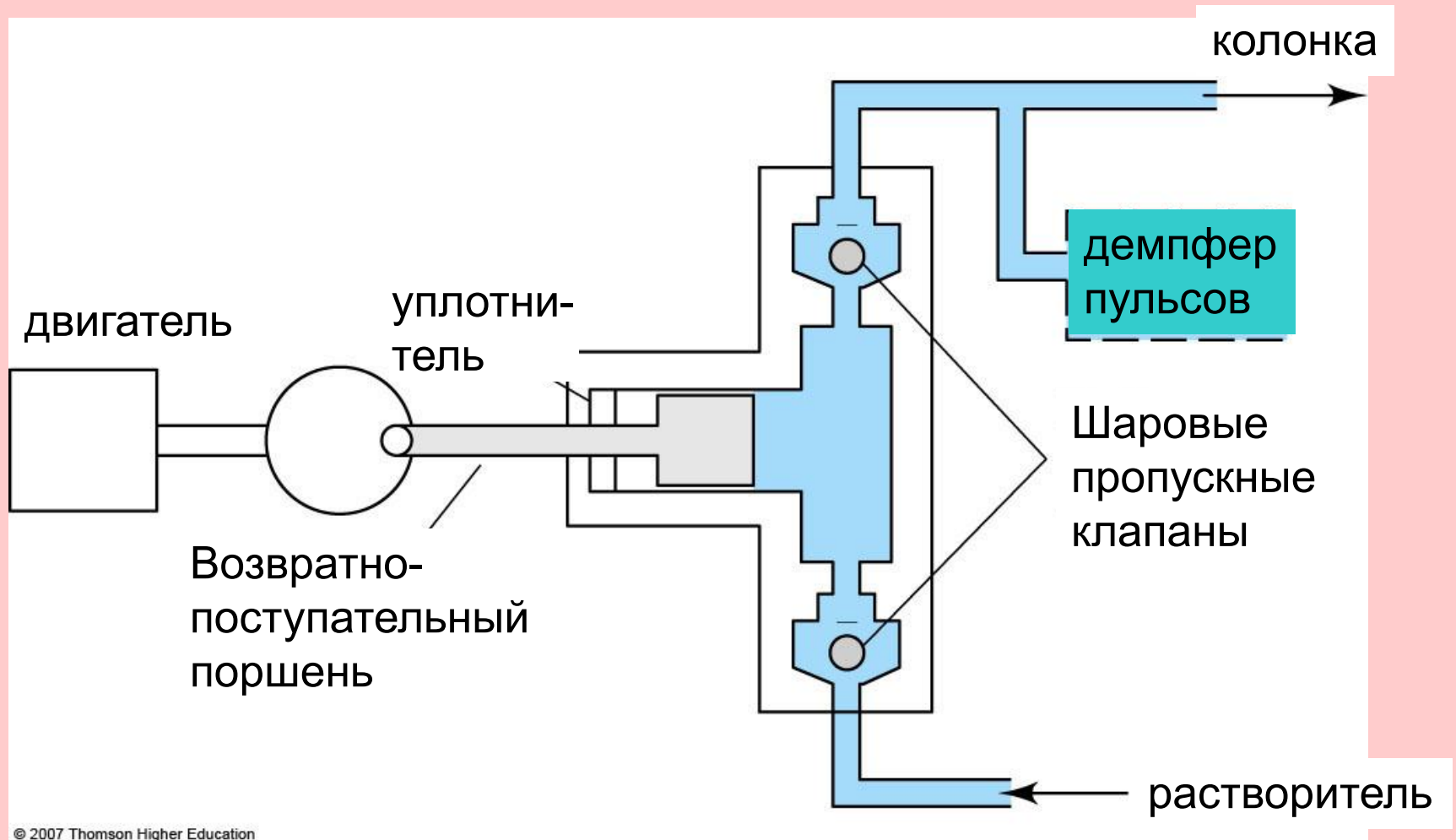
Недостатки:

- Создают пульсацию потока
- Дорогие

Способы борьбы с пульсацией

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

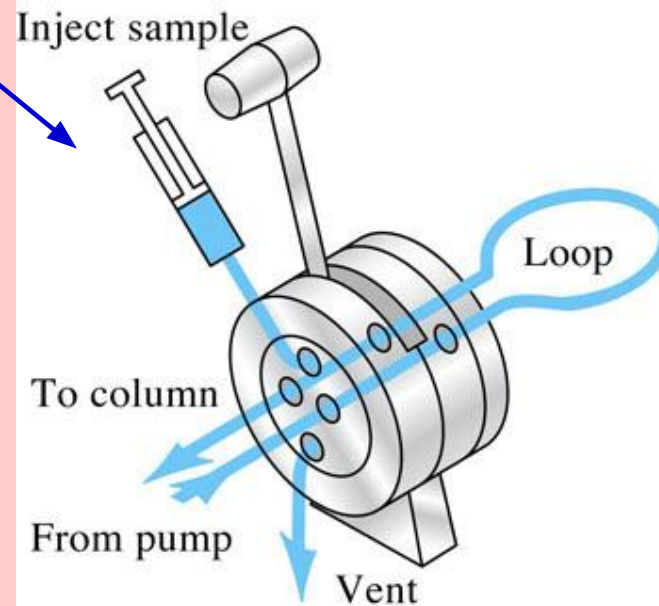
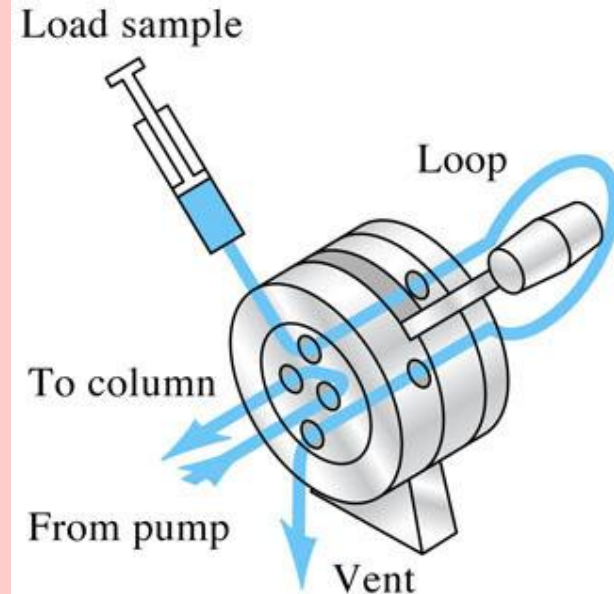
Схема плунжерного насоса возвратно-поступательного типа



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

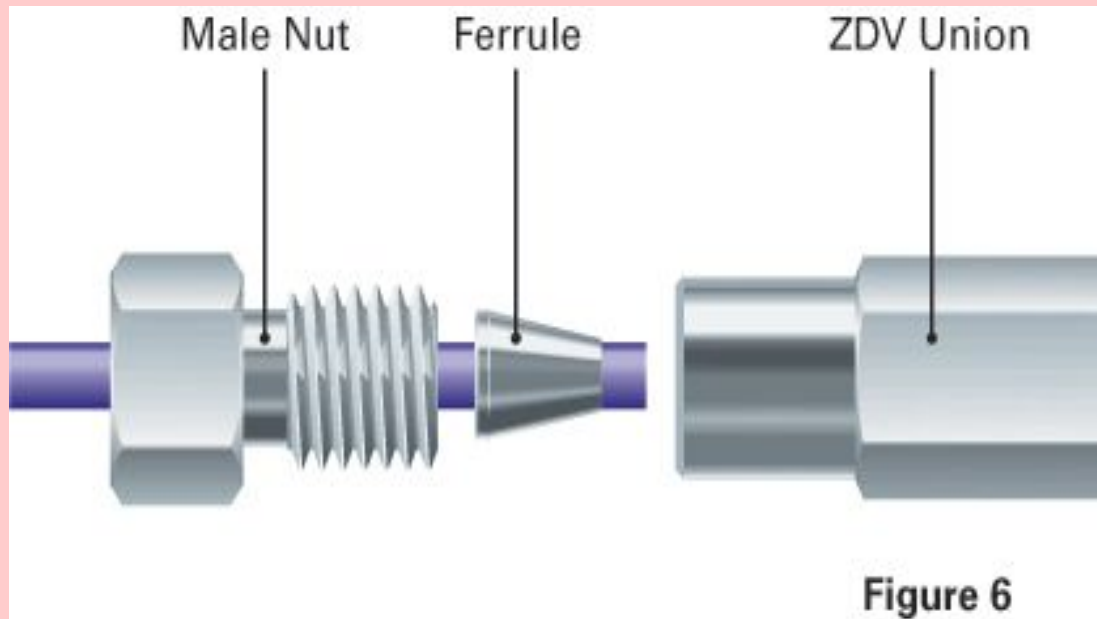
Система дозирования проб

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



Соединения в ВЭЖХ

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



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

ДЕТЕКТОР – «ГЛАЗА» ХРОМАТОГРАФА

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

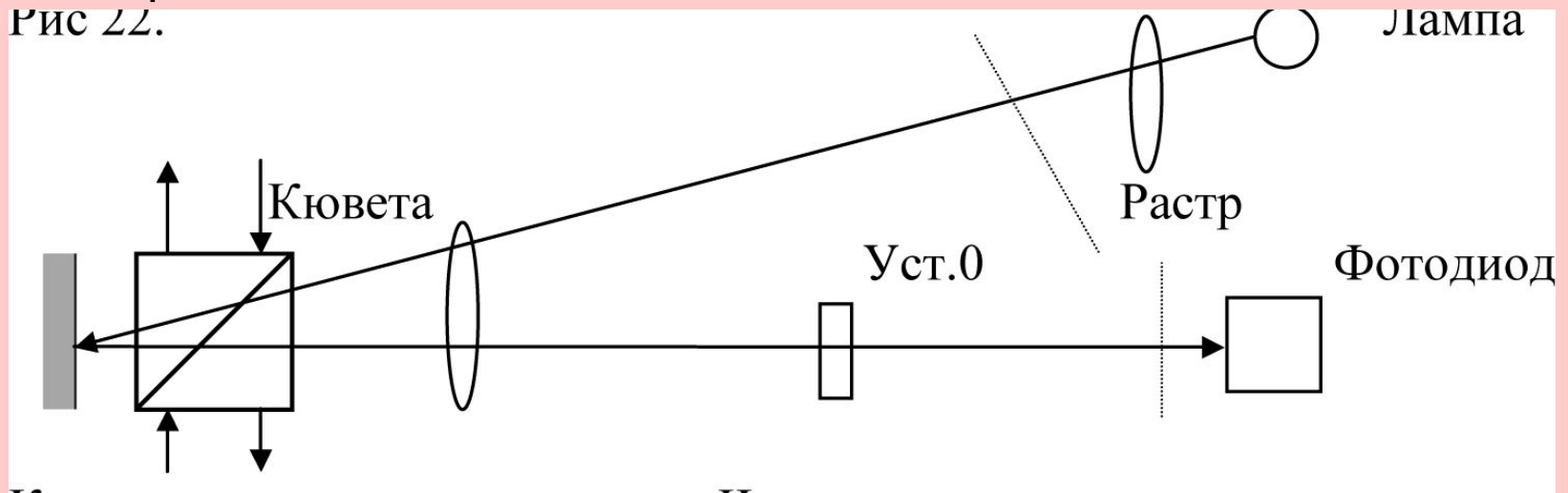
Детектор	Измеряемое физическое свойство	Чувствительность, г	Селективность
Спектрофотометрический	Оптическая плотность на определенной длине волны (фильтр или монохроматор)	10^{-9}	Высокая
Рефрактометрический	Разность показателя преломления	10^{-6}	Низкая
Флуориметрический	Излучение света на определенной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

Рефрактометрический детектор

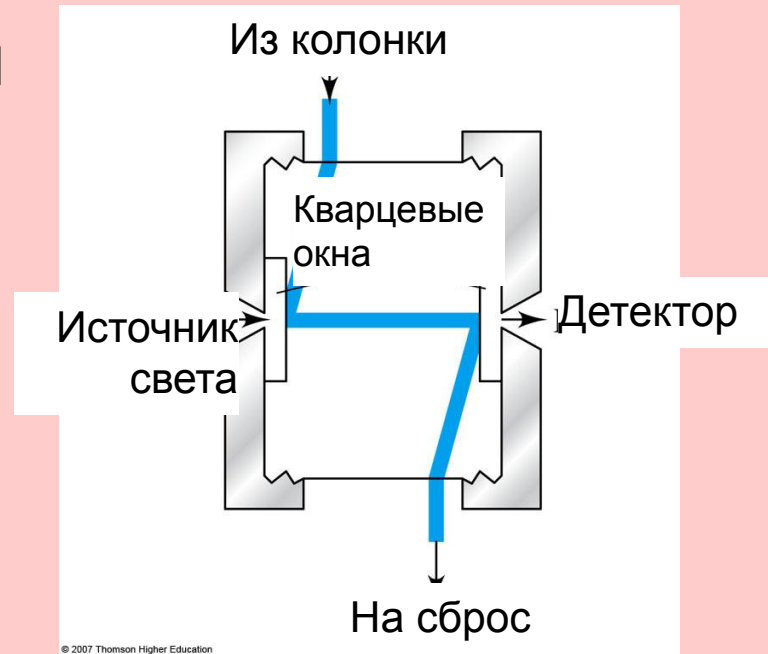
Достоинства:

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

Рис 22.



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



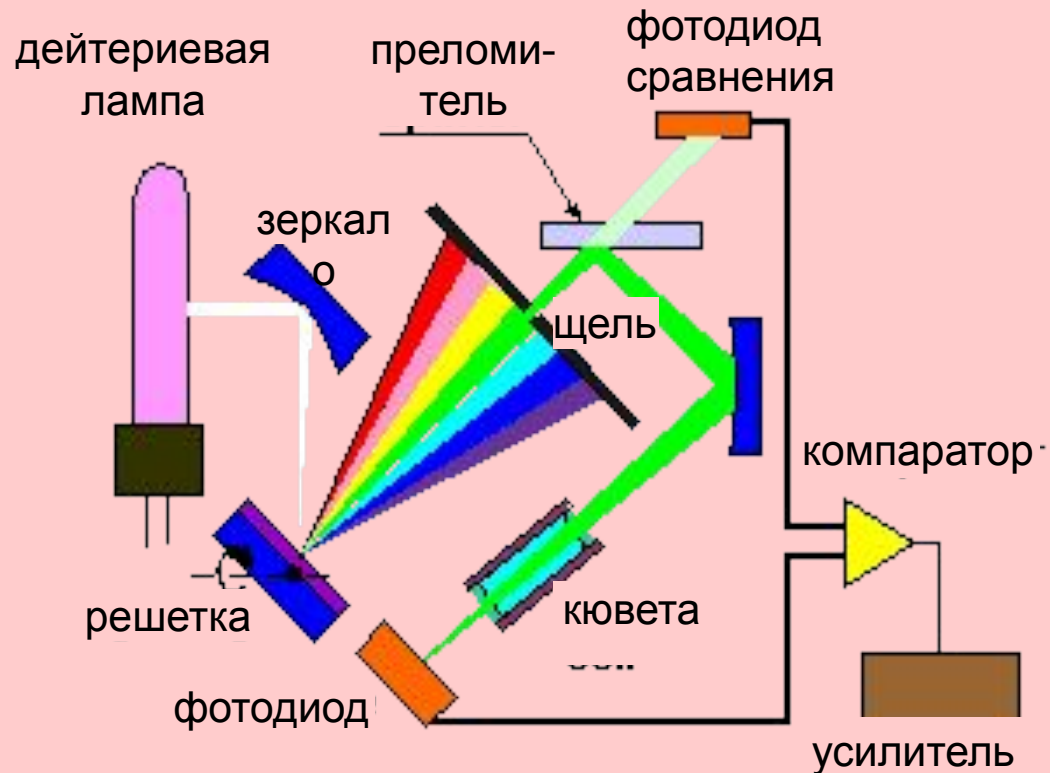
Достоинства

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

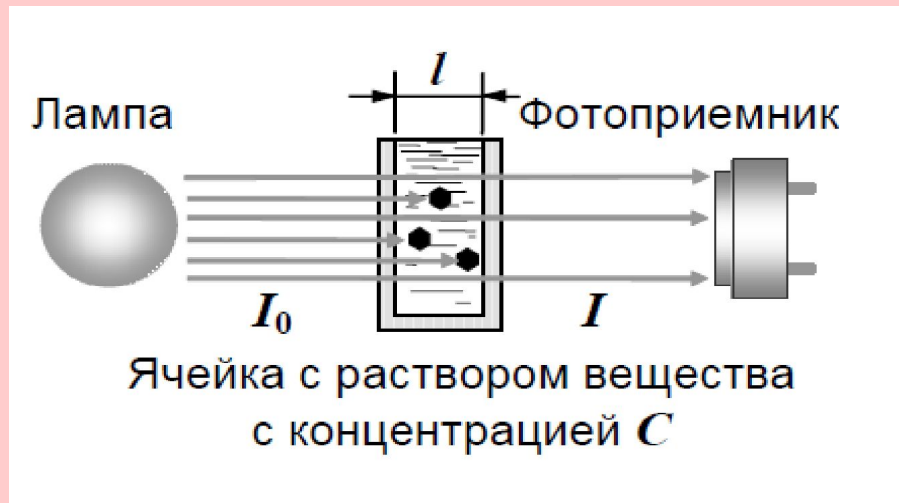
Объем кюветы 1-10 мкл

Типы фотометрических детекторов:

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



СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВЭЖХ



Закон Бугера-Ламберта-Бера

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

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

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

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВЭЖХ

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

Пропускание света
(100 \Rightarrow 0%)

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

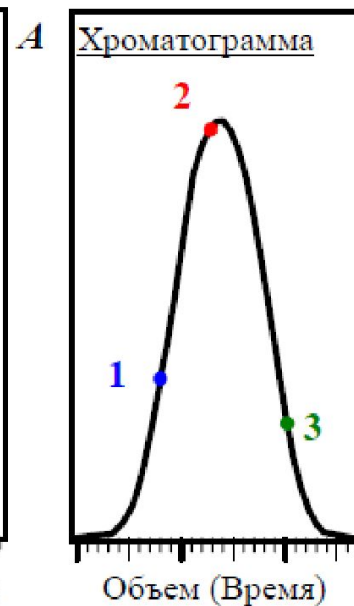
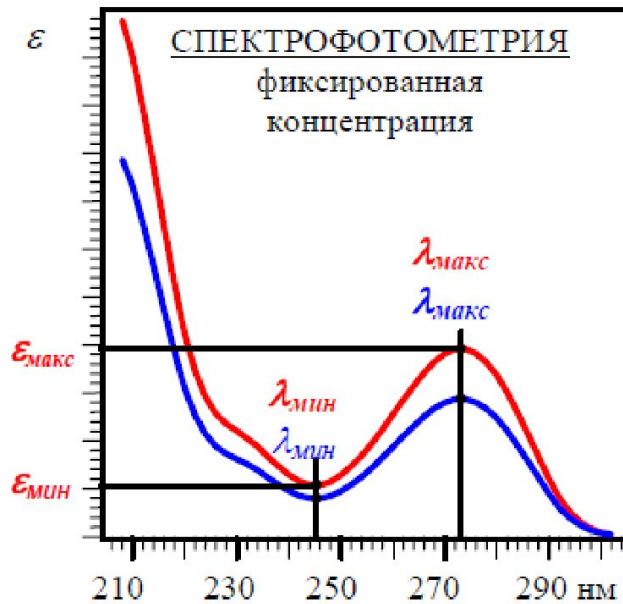
Поглощение света
(0 \Rightarrow ∞)

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

Поглощение раствора вещества при длине волны λ
прямо пропорционально концентрации вещества

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВЭЖХ

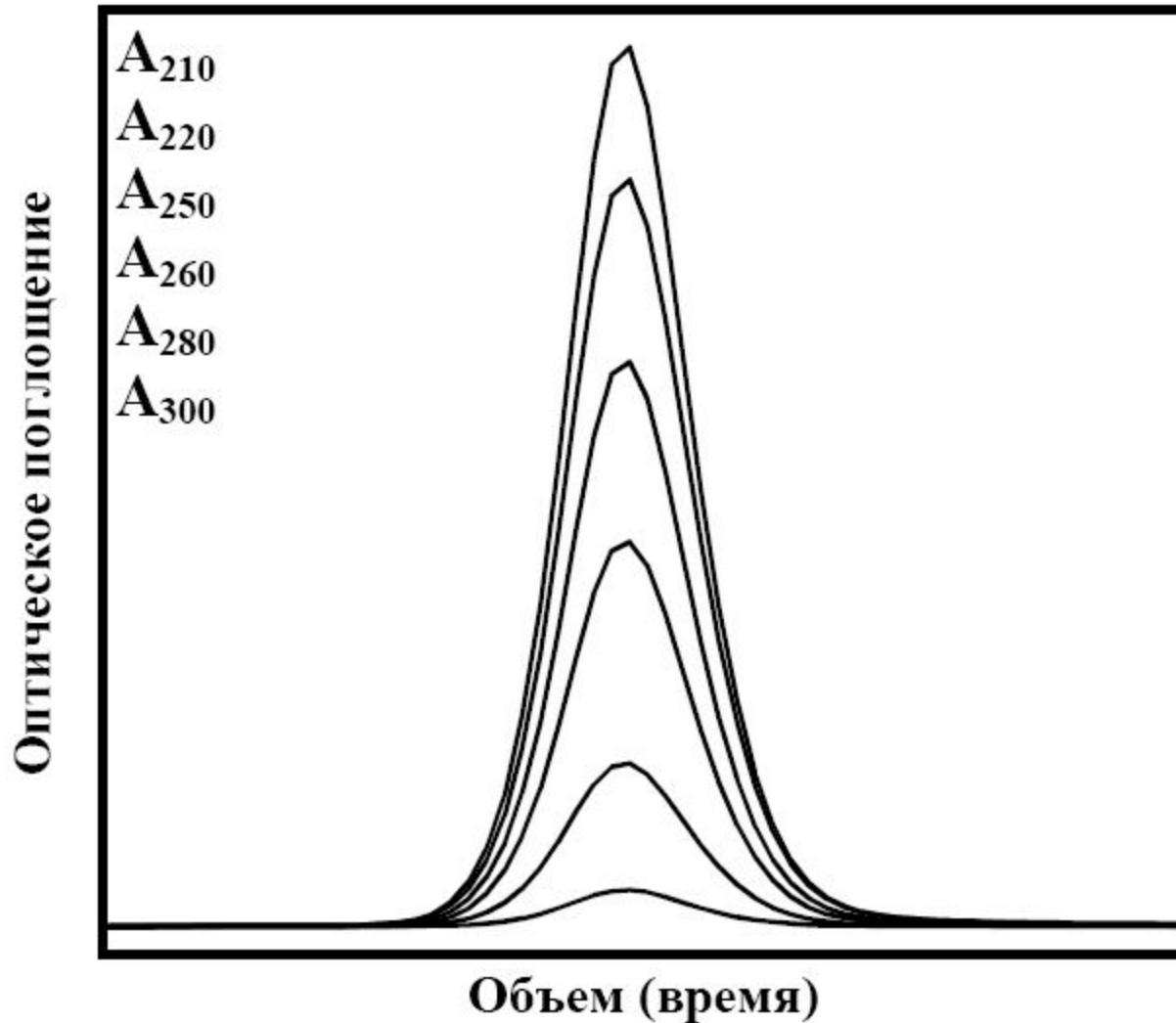
СРАВНЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ



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

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ВЭЖХ

МНГОВОЛНОВОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

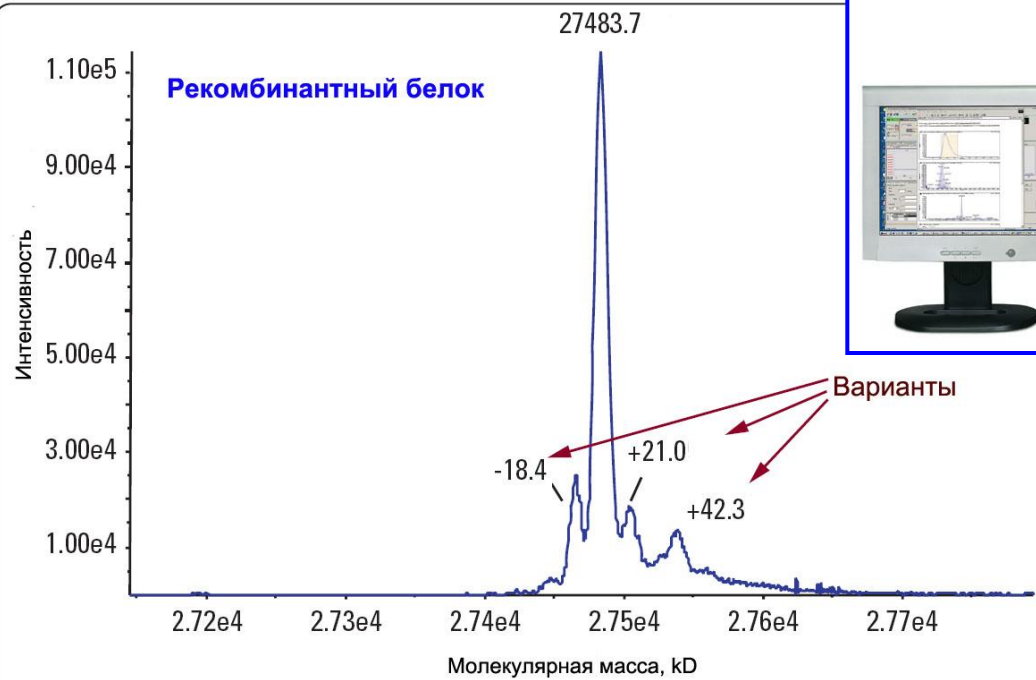


$$R = \frac{S_{\lambda}}{S_0} = \text{const}$$

Масс-спектрометрический детектор в ВЭЖХ



Времяпролетный масс-спектрометр



Подготовка биологических образцов для хроматографических анализов

Биологические пробы часто не подходят для прямого анализа приборной хроматографией !



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

Методические приемы подготовки биологических образцов



Гомогенизация (измельчение)

Добавление реагентов

Установка pH

Смешивание (встряхивание)

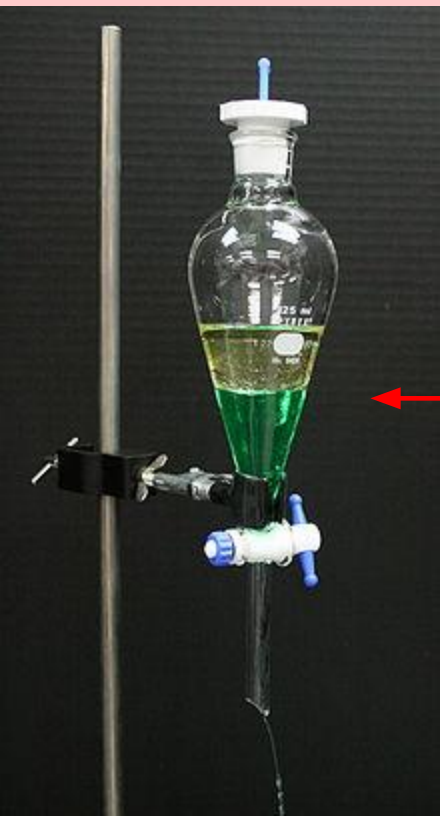
Нагревание (охлаждение)

Осаждение

Фильтрование

Центрифугирование

Выпаривание

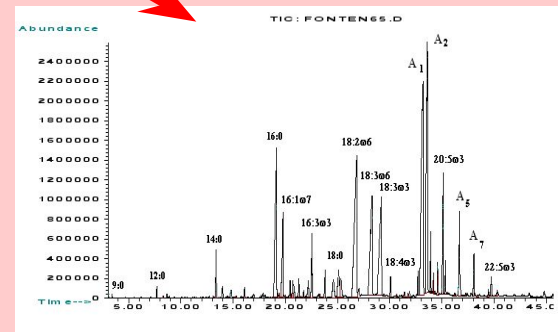
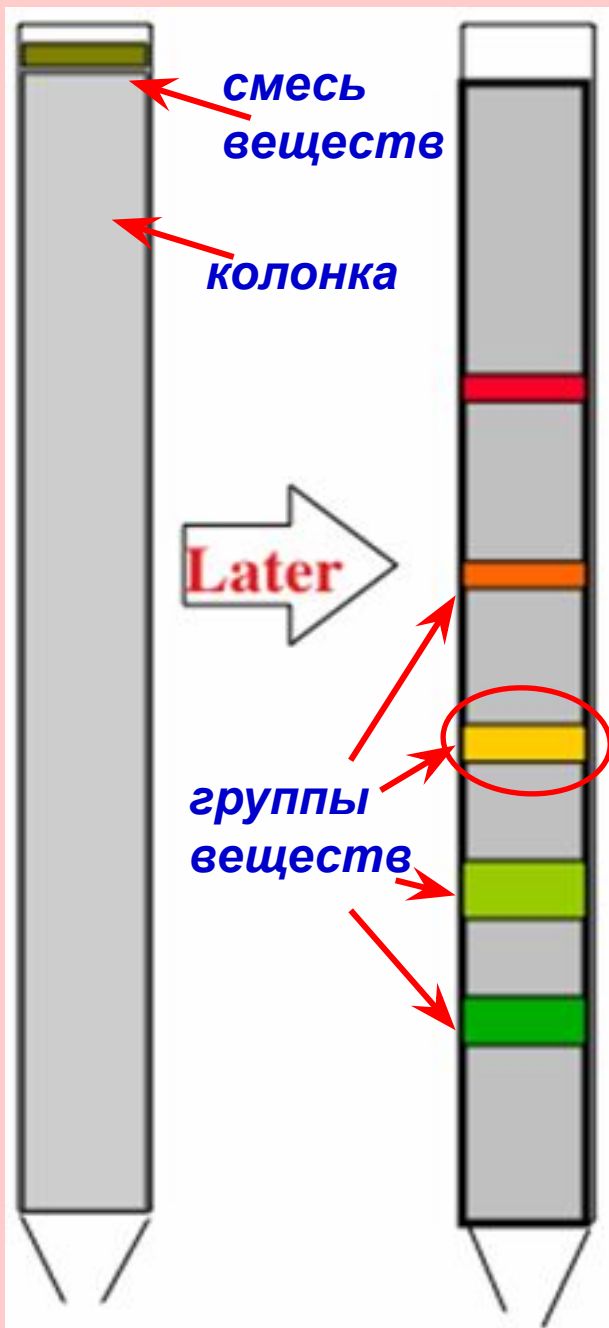


Жидкофазная и твердофазная экстракция

Очистка на колонках или в тонком слое

Очистка на колонках или в тонком слое

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



Хроматограмма

Реакционная газовая хроматография

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

Один из способов: получение сложных эфиров

На практике используют:

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

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