

# Хроматография

**Основы метода и  
ключевые параметры**

Пирогов Андрей Владимирович

(д.х.н., профессор)

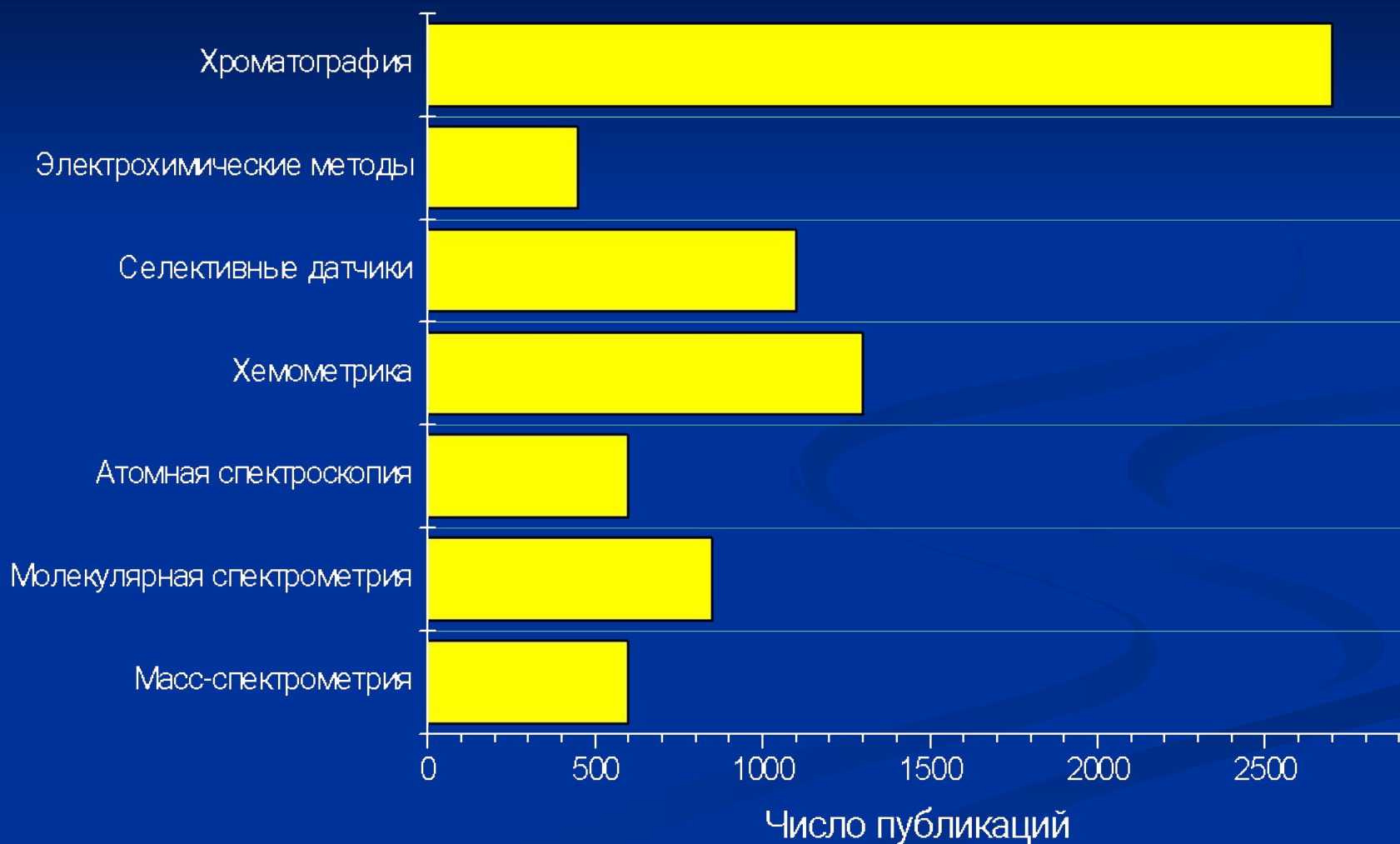
Тел.

КОМ.

# Рассмотрим:

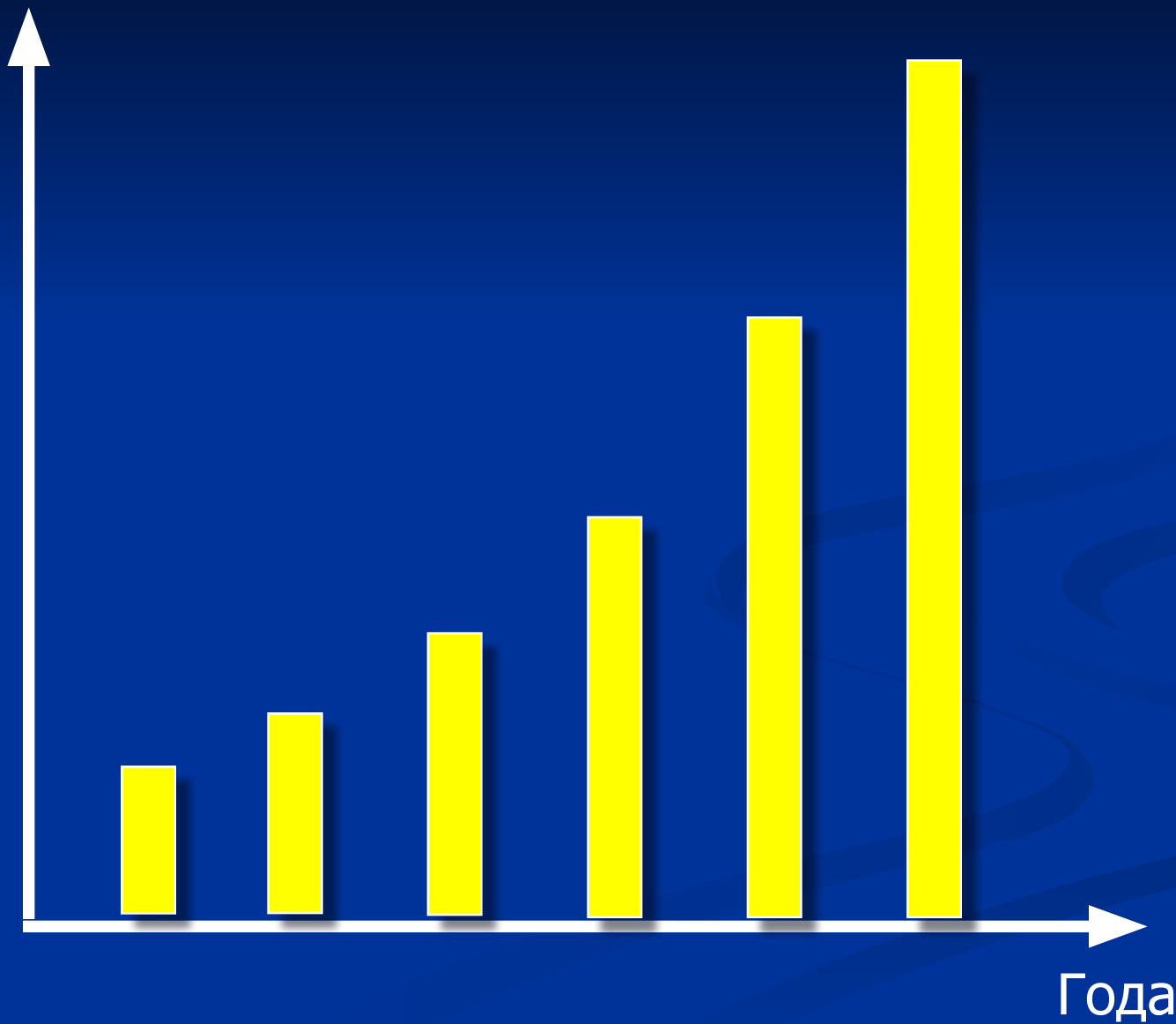
- Определение хроматографии и история метода
- Причины широкого распространения хроматографии в современной аналитической химии
- Основные понятия и параметры
- Классификация хроматографических методов

# Интенсивность публикаций статей по различным методам анализа



По данным А. Гуланицкого (1998 г.)

Число  
публикаций



# В чем причины?

- Создание новых веществ, типов лекарств, красителей и т.п.
- Расширение списка контролируемых соединений
- Снижение ПДК вредных веществ
- Развитие науки и техники

# Синтез потенциально биологически активного вещества

Контроль примесей

Неклинические исследования (животные)

Клинические испытания (люди)

Стандартизация

Производство

Оптовая торговля

Розничная торговля

Выявление долговременных факторов воздействия



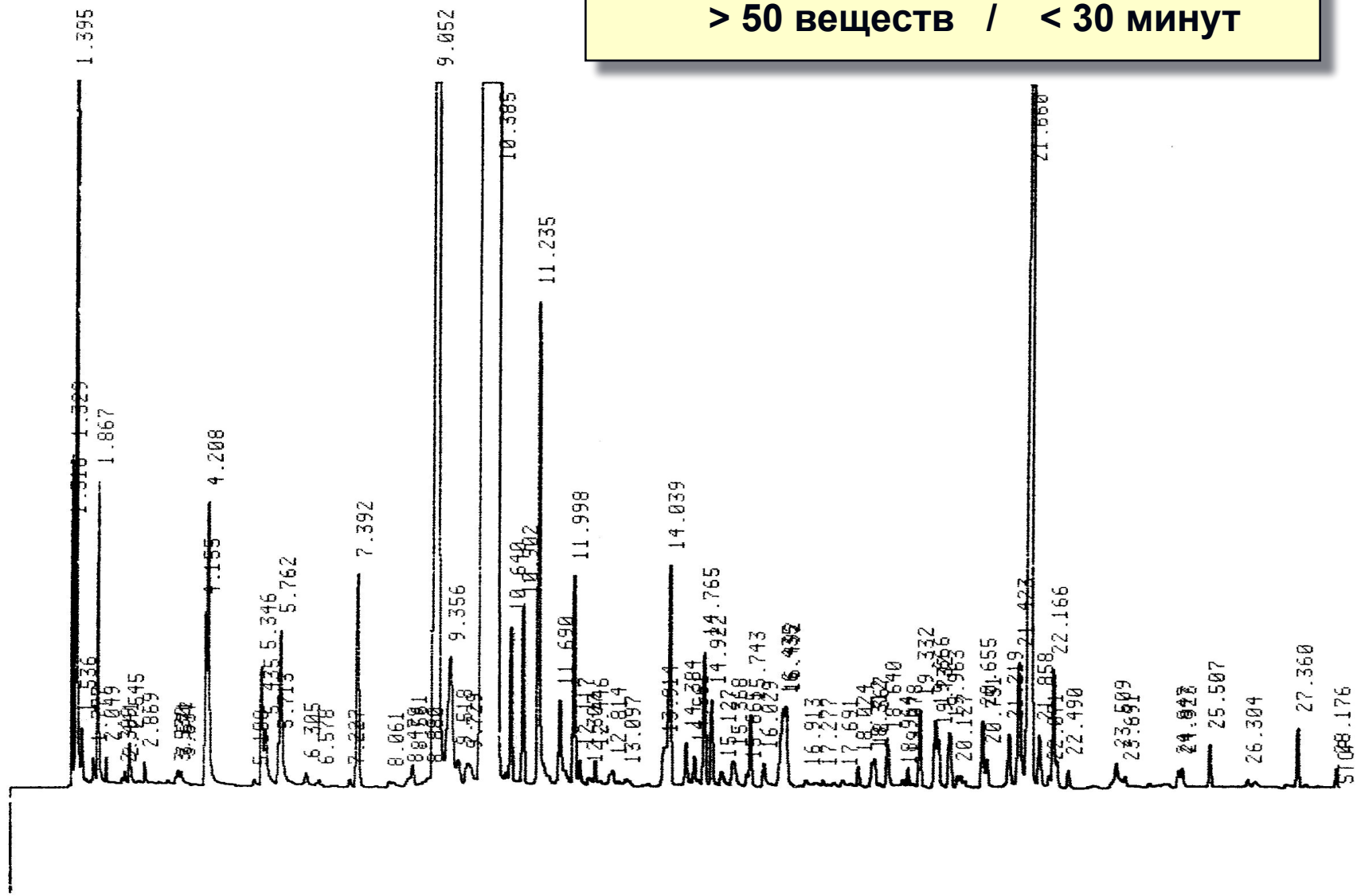
# Решаемые с помощью хроматографии фундаментальные задачи

- Изучение термодинамики и кинетики распределения неорганических веществ в двухфазной системе
- Исследование спектральных и электрохимических свойств органических и неорганических веществ
- Выявление биохимических процессов в организме (метаболизм, фармакокинетика и т.п.)

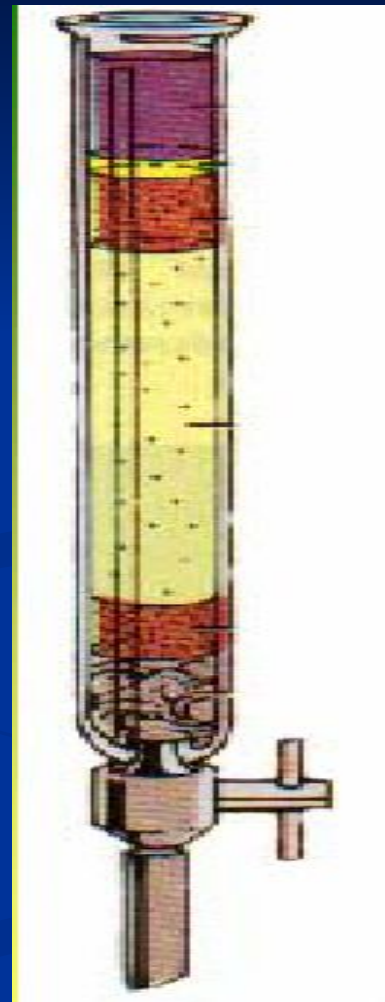
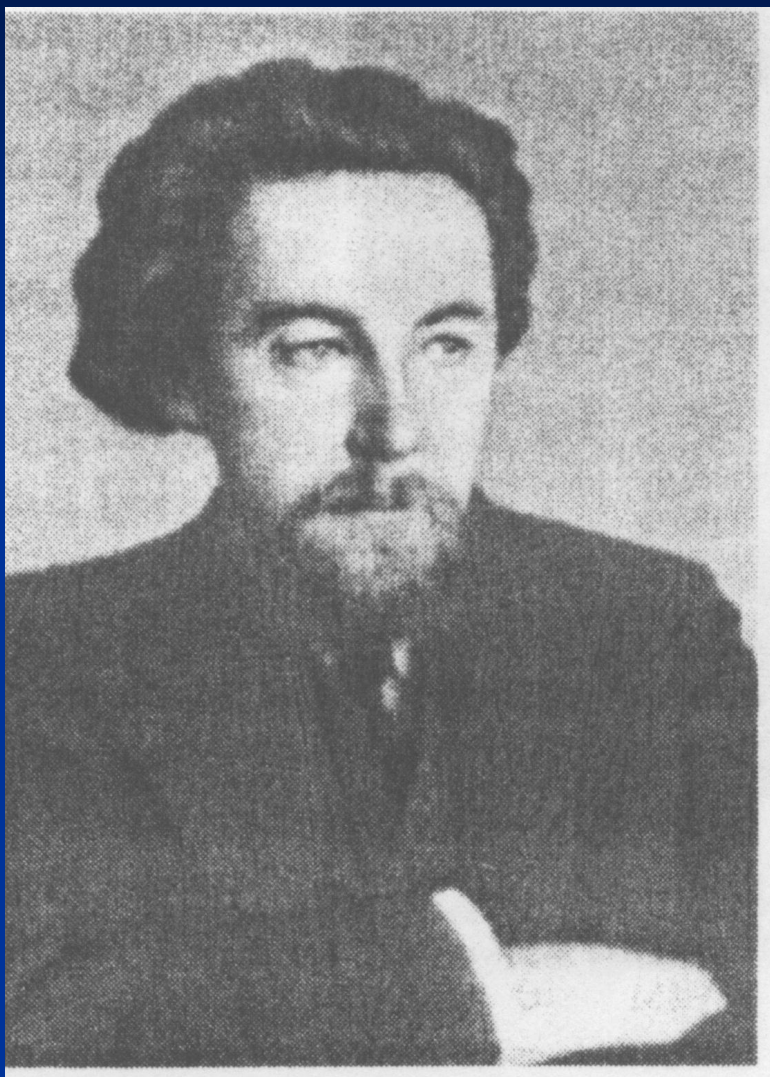


# Хроматограмма апельсинового сока

\* RUN # 176    AUG 1, 2001 23:25:55  
START

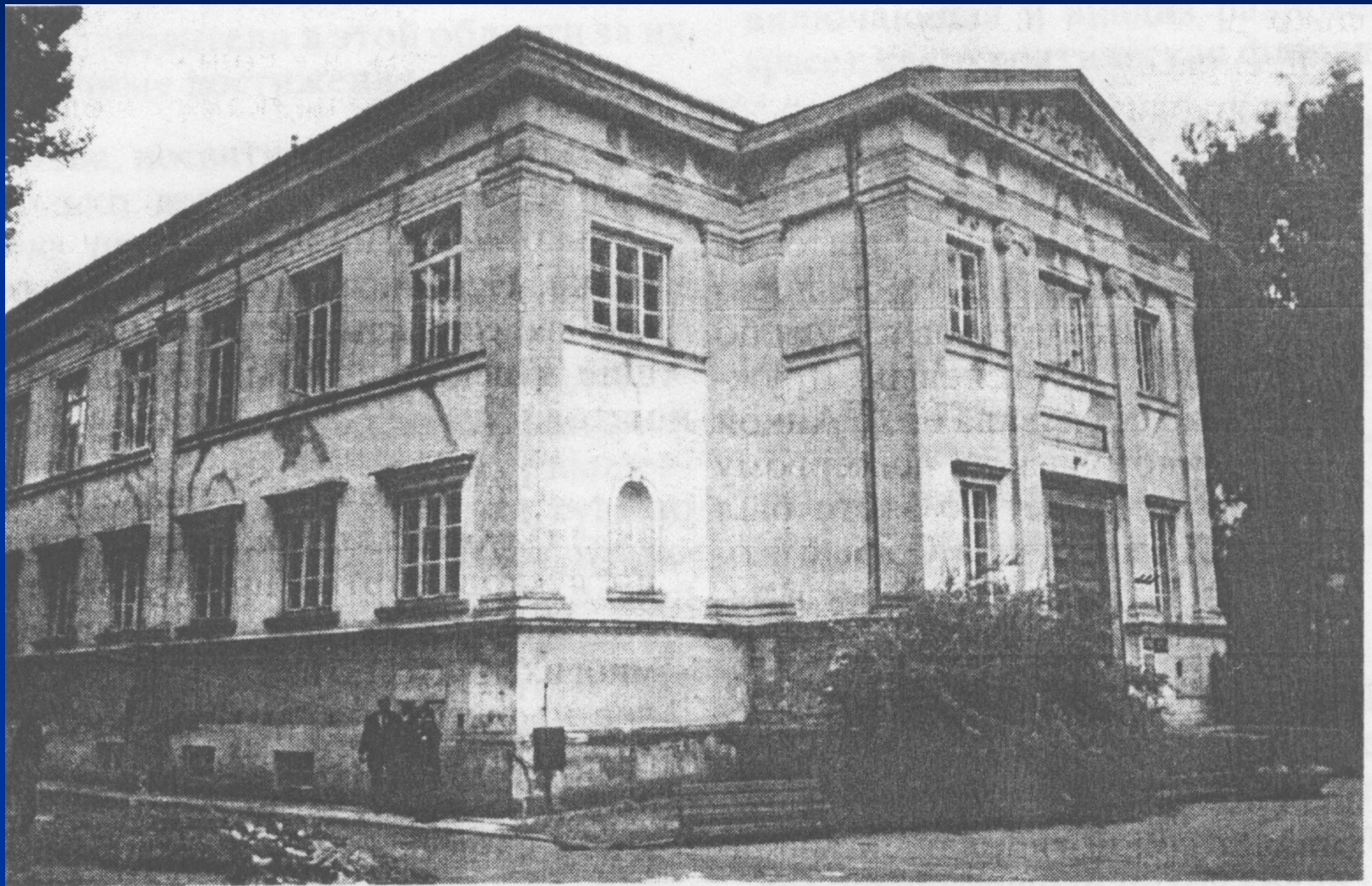


# Михаил Семенович Цвет



1903 г

Здесь была открыта хроматография



# Этапы развития хроматографии

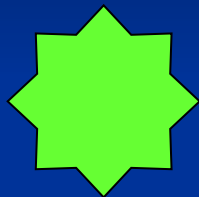
- 1903 г. **Открытие хроматографии** (Цвет М.С.)
- 1931 г. **Повторение опытов Цвета** (Кун Р.)
- 1938 г. **Тонкослойная или планарная хр-фия**  
(Измайлов Н.А., Шрайберг М.С.)
- 1941 г. **Жидкостная распределительная хр-фия**  
(Martin A.D.P., Synge R.L.M.)
- 1948 г. **Осадочная хроматография**  
(Гапон Е.Н., Гапон Т.Б.)
- 1952 г. **Газовая распределительная хр-фия**  
(Martin A.D.P., James A.)

# Этапы развития хроматографии (продолжение)

- 1956 г. Капиллярная газовая хр-фия (Golay M.)
- 1960е гг. Высокоэффективная жидкостная хр-фия
- 1960е гг. Хромато-масс-спектрометрия
- 1961 г. Лигандообменная хроматография (Гельферих Ф.)
- 1975 г. Ионная хроматография  
(Small H., Stevens T.S., Bauman W.W.)
- 1990+ Хромато-масс-спектрометрия
- 2004 г. Ультра-ВЭЖХ

# Процесс разделения

Учитывает природу вещества,  
фаз,  
условия распределения

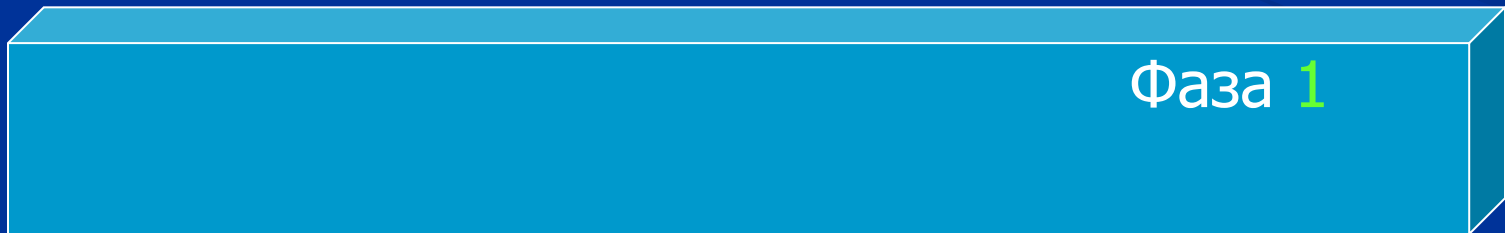


Коэффициент  
распределения

$$K(D) = C_1 / C_2$$

Фаза 2

Фаза 1



# Динамический процесс разделения



# ХРОМАТОГРАФИЯ

## Определение

(Научный совет по хроматографии и адсорбции РАН)

## **НАУКА**

О межмолекулярных взаимодействиях и переносе молекул или частиц в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз

## **МЕТОД**

Разделения смесей веществ или частиц, основанный на различии в скорости их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз

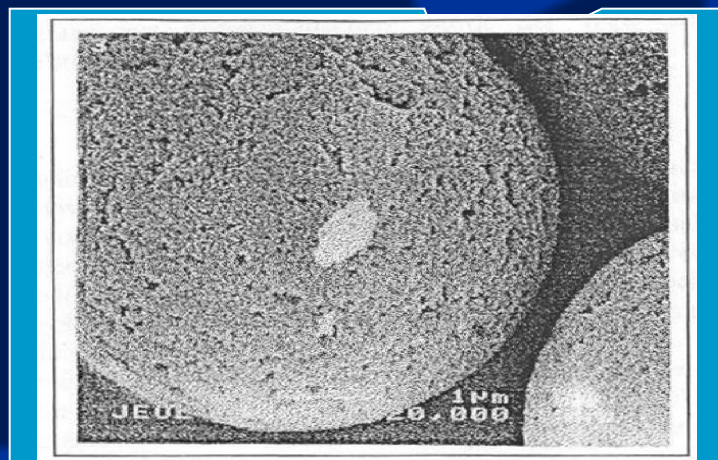
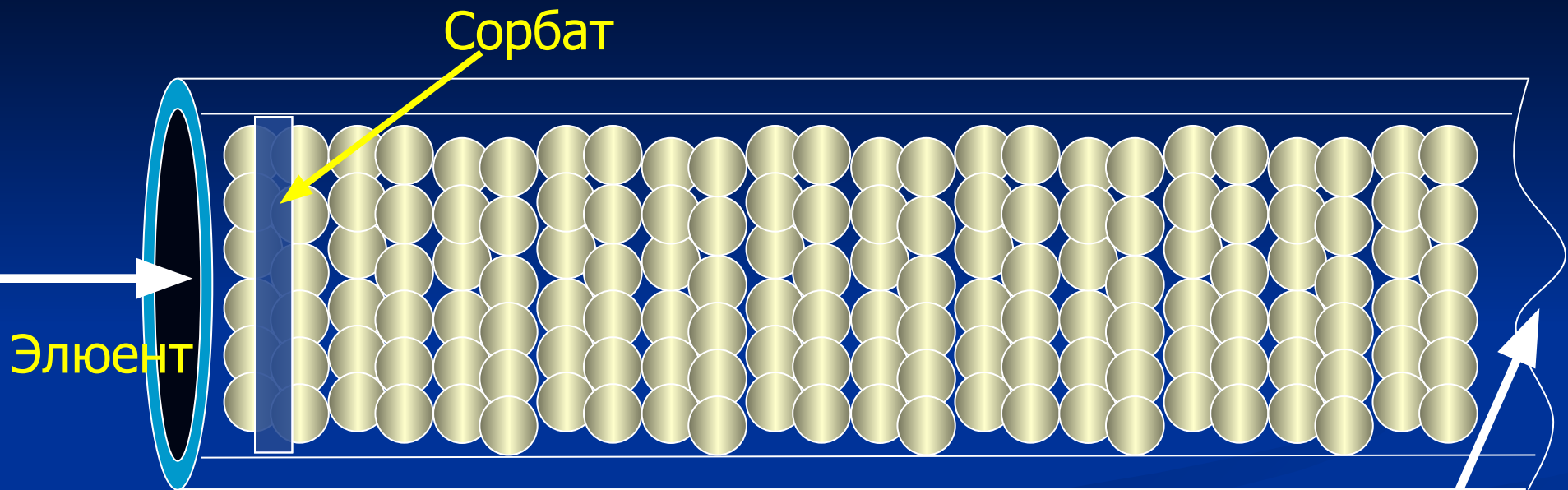
## **ПРОЦЕСС**

Дифференцированного многократного перераспределения веществ или частиц между несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами, приводящий к обособлению концентрационных зон индивидуальных компонентов исходных смесей этих веществ или частиц

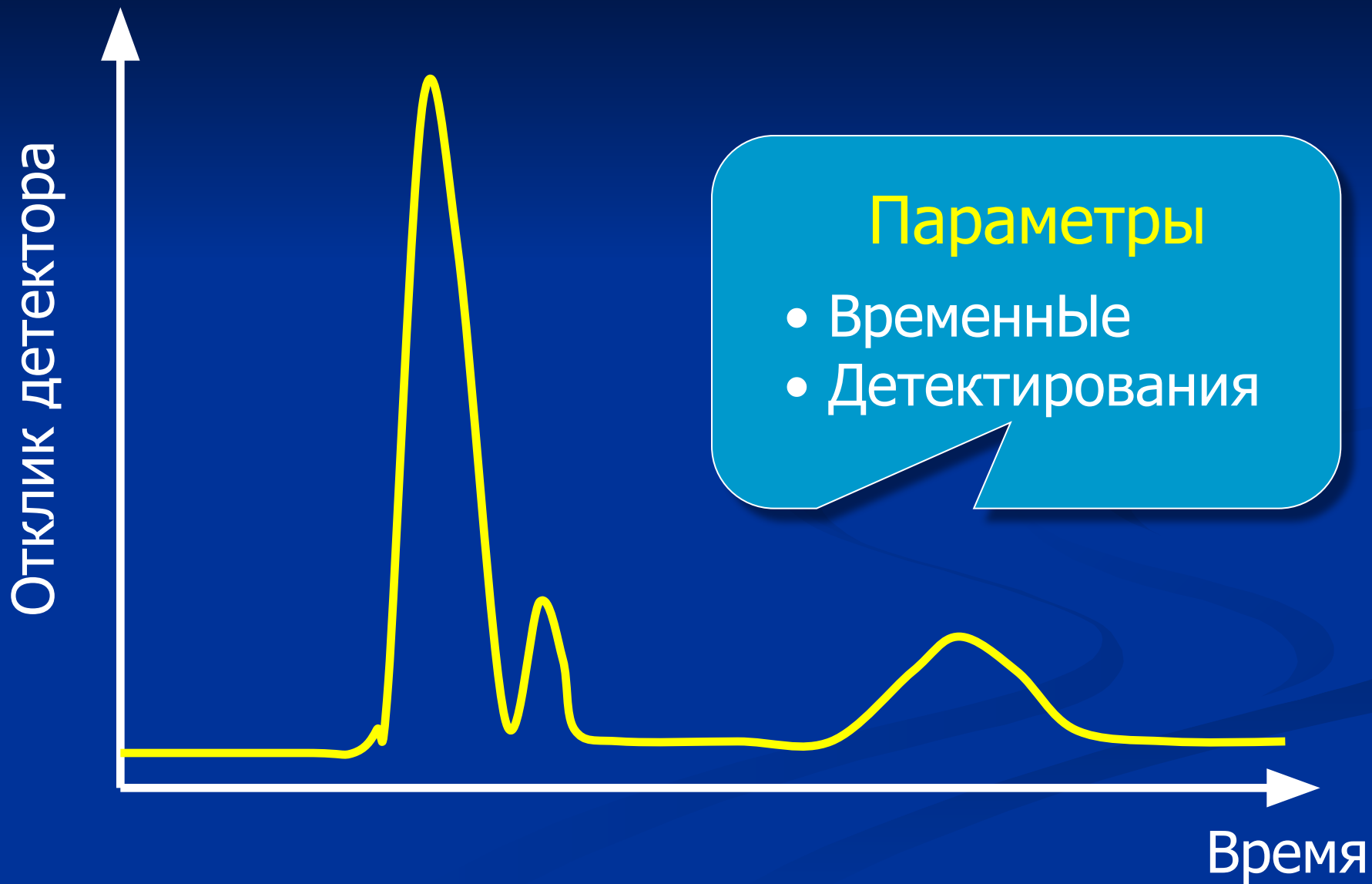
*Гибридный аналитический метод, основанный на дифференцированном многократном распределении компонентов в динамической системе состоящей из двух фаз — подвижной и неподвижной — и последующем их детектировании*



# Процесс разделения

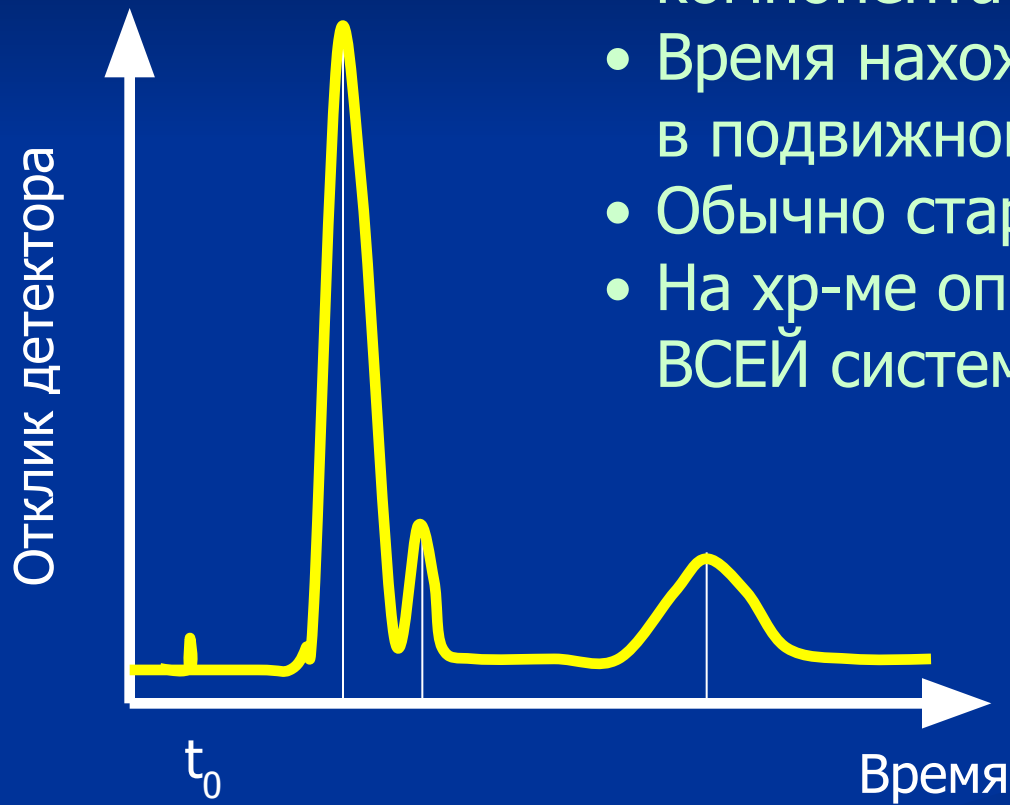


# Хроматограмма



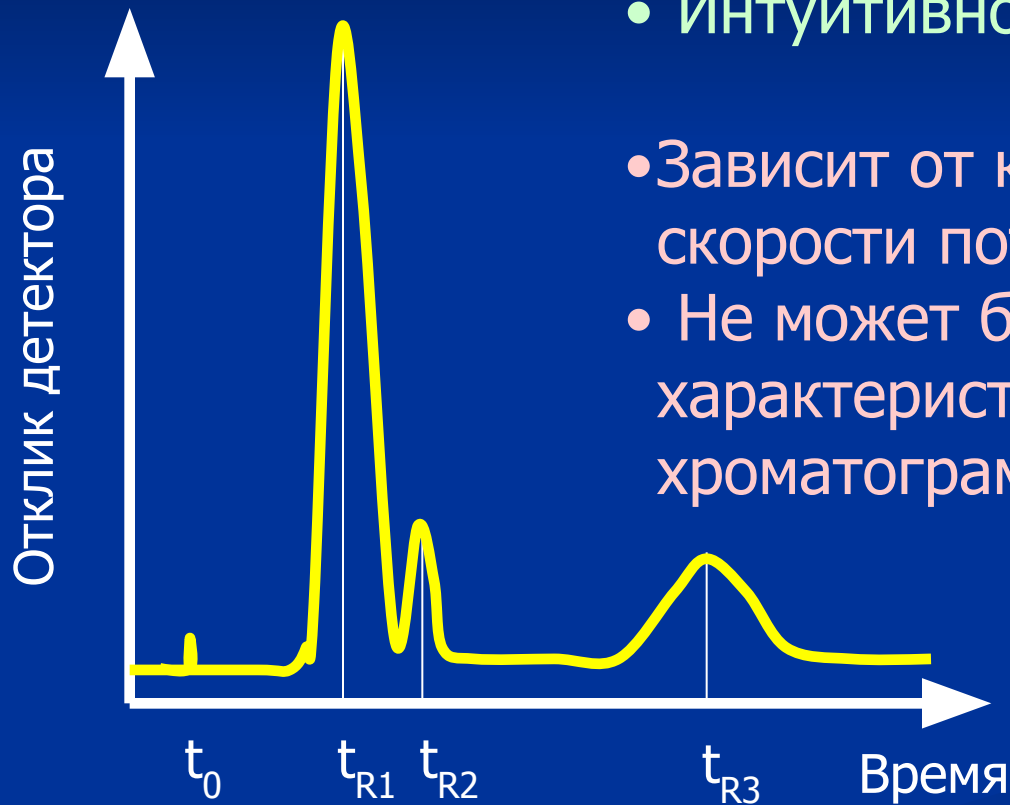
# Мертвое время ( $t_0$ )

- Время выхода неудерживаемого компонента
- Время нахождения компонентов в подвижной фазе
- Обычно стараются минимизировать
- На хр-ме определяется мертвое время ВСЕЙ системы, а не колонки



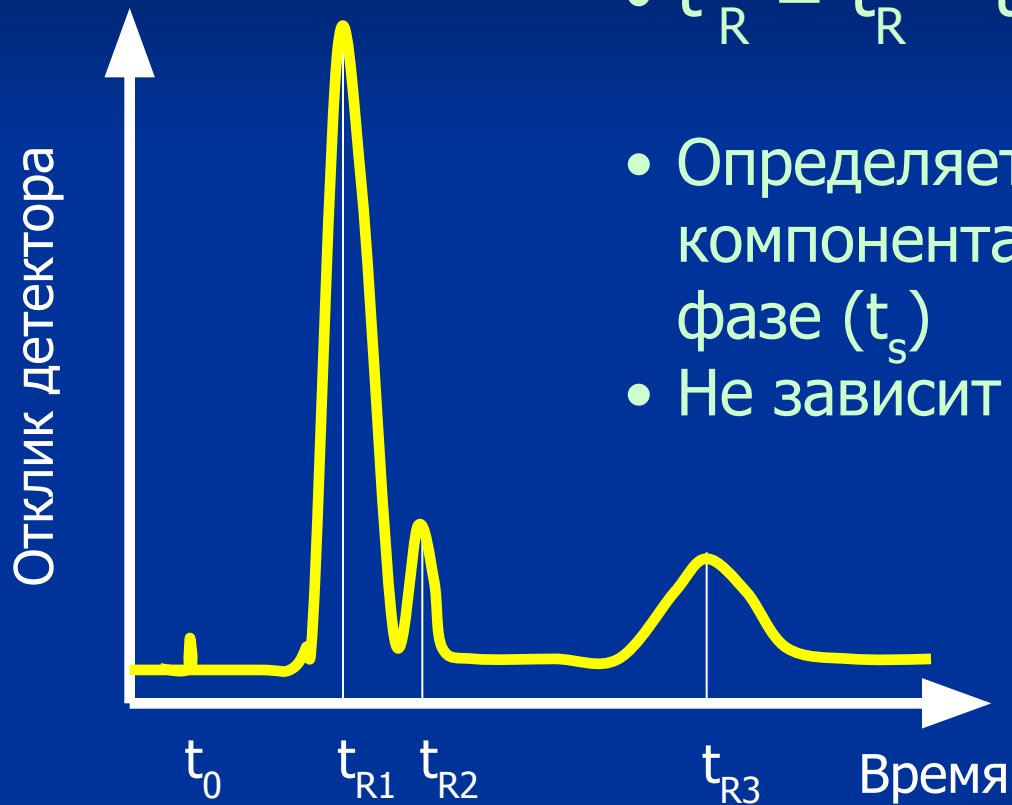
# Время удерживания ( $t_R$ ) (retention time)

- Легко определяется из хроматограммы
- Интуитивно понятно



- Зависит от конструкции системы и скорости потока элюента
- Не может быть адекватной характеристикой при сравнении хроматограмм

# Исправленное время удерживания ( $t_R'$ )



- $t_R' = t_R - t_0$

- Определяет время нахождения компонента в НЕПОДВИЖНОЙ фазе ( $t_s$ )

- Не зависит от конструкции системы

# Удерживаемый объем ( $V_x$ )

Объём подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определённой объёмной скоростью  $F$  (мл/мин), чтобы элюировать в-во

$$V_R = t_R * F$$

! Не зависит от скорости потока подвижной фазы

1 хроматограмма:  $F = 1$  мл/мин  $t_0 = 2$  мин  $t_{R1} = 5$

2 хроматограмма:  $F = 0.5$  мл/мин  $t_0 = 4$  мин  $t_{R1} = 10$  мин

$$V_R = 5 \text{ мл} = \text{const}$$

## Исправленный удерживаемый объём ( $V'_x$ )

- $V'_R = t'_{Rx} * F$
- $V'_R = V_R - V_0$

# Фактор удерживания $K$ (коэффициент емкости)

Коэффициент емкости

$$K = (t_{Rx} - t_0) / t_0$$

- отношение исправленного времени удерживания  
к мертвому времени

Этот параметр не зависит от размеров колонки,  
и широко используется в хроматографической литературе и  
расчетах.

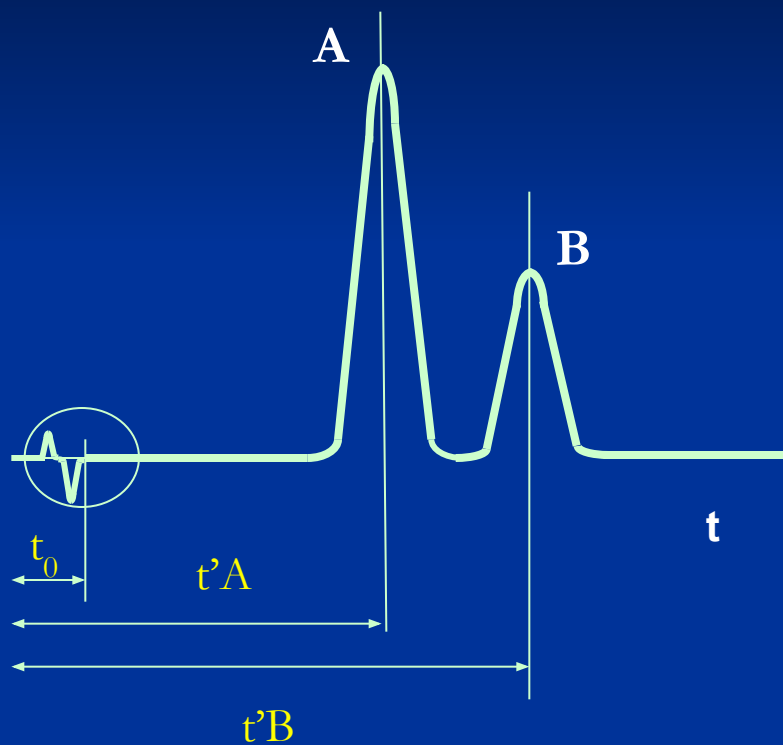
# Индекс удерживания $I$ (индекс Ковача)

$$I_i = 100n + 100 \frac{\lg(t'_{Rx}) - \lg(t'_{Rn})}{\lg(t'_{Rn+1}) - \lg(t'_{Rn})}$$

где  $t_{Rn-1}$  и  $t_{Rn+1}$  — время удерживания  $n$ -алканов с  $n$  и  $n+1$  атомами углерода, выходящих из колонки до и после рассматриваемого соединения с временем удерживания  $t_{Rx}$ .



# Относительное удерживание (или селективность) $\alpha$

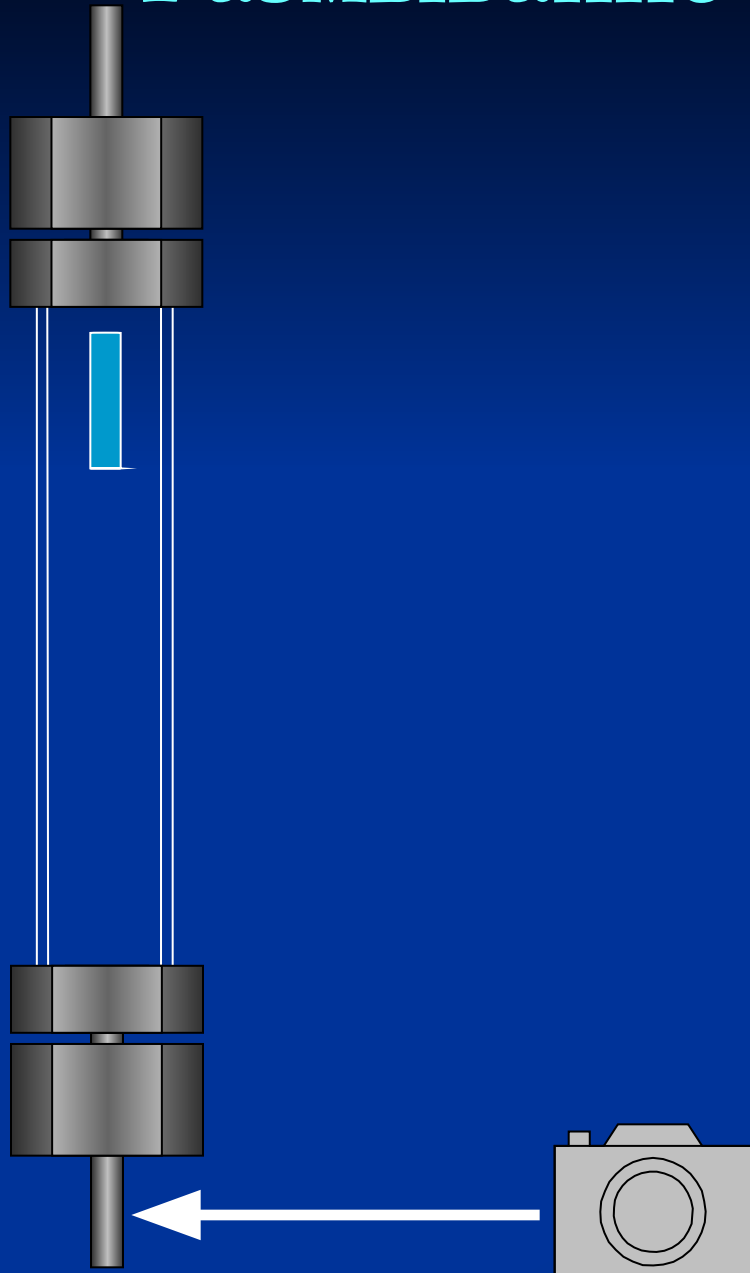


$$\alpha_{A}^{B} = t'_{B} / t'_{A}$$

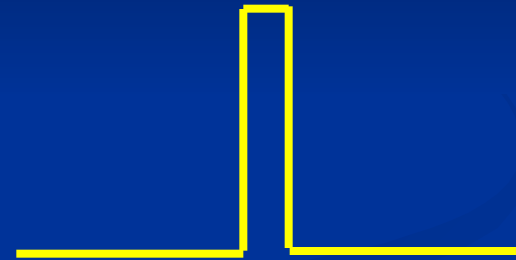
$$\alpha_{A}^{B} > 1$$

**Селективность** — это **способность** хроматографической системы **разделять** данную пару веществ A и B.

# Размывание зоны компонента



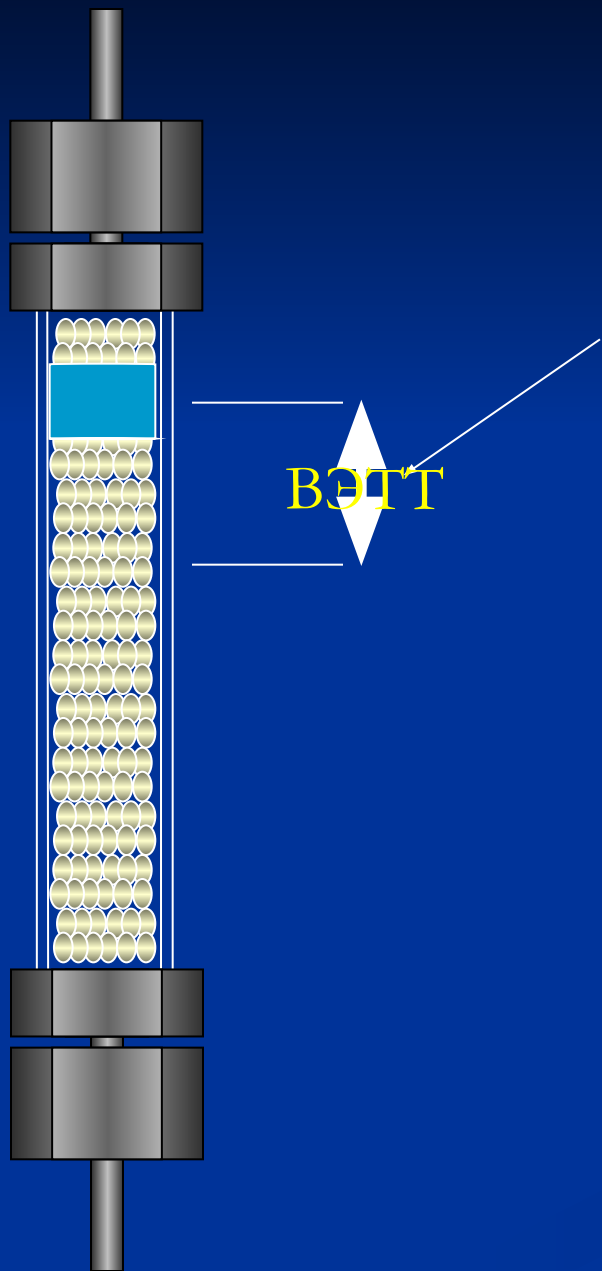
Теоретическая форма пика



Реальная форма пика



# Теория теоретических тарелок



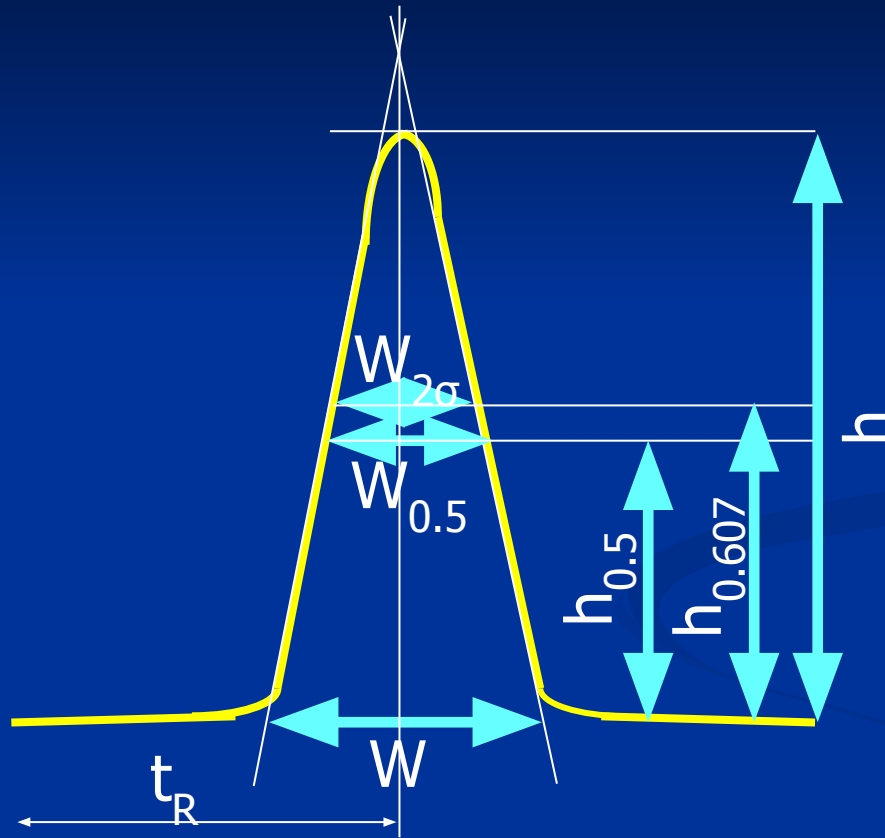
## Высота эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

Соответствует высоте слоя сорбента, при прохождении которой акт сорбции—десорбции успеваает совершиться в среднем один раз.

$$N = L / H_{\text{ВЭТТ}}$$

Отражает качество использованного сорбента и заполнения колонки.

# Эффективность колонки и ширина пика



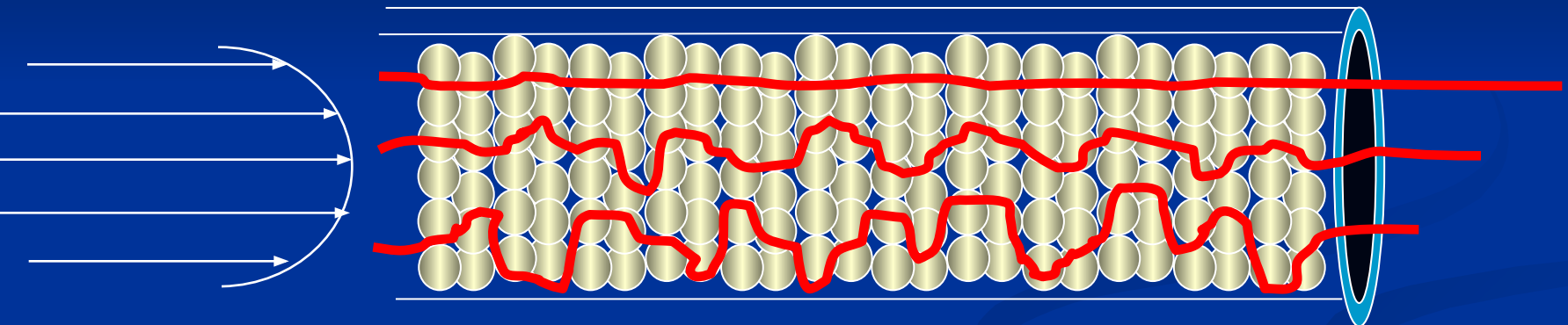
$$N = 16 \cdot \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.54 \cdot \left( \frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2 = 4 \cdot \left( \frac{t_R}{W_{2\sigma}} \right)^2$$

# Допущения теории теоретических тарелок

- Колонка состоит из ступеней (тарелок), на которых происходит разделение
- Равновесие на каждой тарелке устанавливается мгновенно
- Количество веществ в пробе существенно меньше, чем возможных мест для адсорбции
- Скорость потока элюента не учитывается (не влияет)

# Кинетическая теория размывания

Скорость перемещения по колонке отдельных молекул отличается от средней скорости, характерной для данного соединения



- Неоднородность потока подвижной фазы.
- Продольная диффузия в неподвижной и подвижной фазах
- Кинетика массопередачи в неподвижной и подвижной фазах
- Неравновесность процесса внутри застойных зон

# Кинетическая теория размывания

Эффективность зависит от:

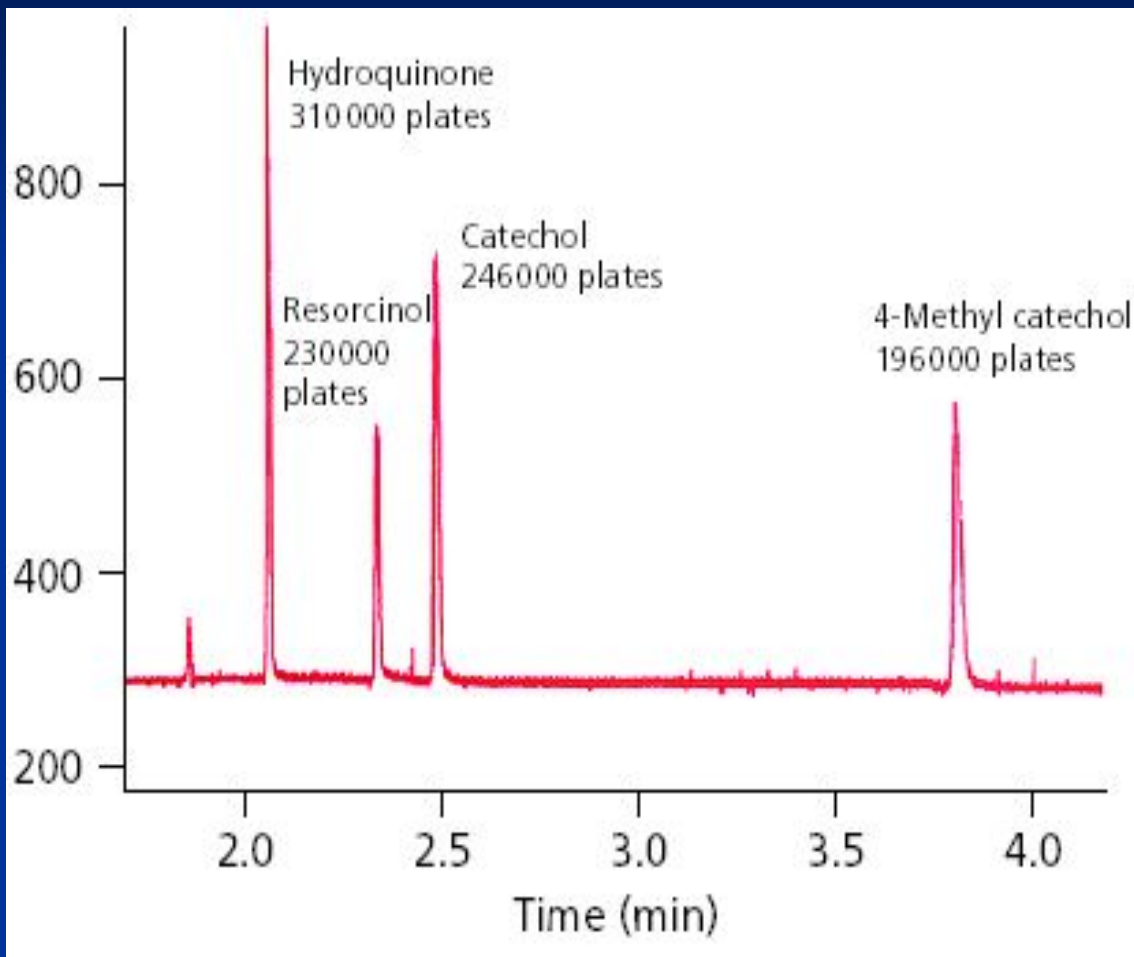
- Диаметра зерен сорбента, их геометрии и монодисперсности
- Качества набивки колонки
- Мертвого объема системы
- Скорости потока элюента

# Зависимость эффективности в ВЭЖХ от размера частиц сорбента

	Диаметр зерна, мкм	Эффективность, тг/м
1965	30	10 000
1971	10	30 000
1975	5	60 000
1978	3	100 000
1990	1.5	360 000



# Хроматография при ультравысоких давлениях



Колонка: 43 см x 30 мкм

Сорбент: 1 мкм

Давление: 7100 атм

Максимальная  
эффективность: 625000  
теор.т./м

Вес установки ~ 7 тонн

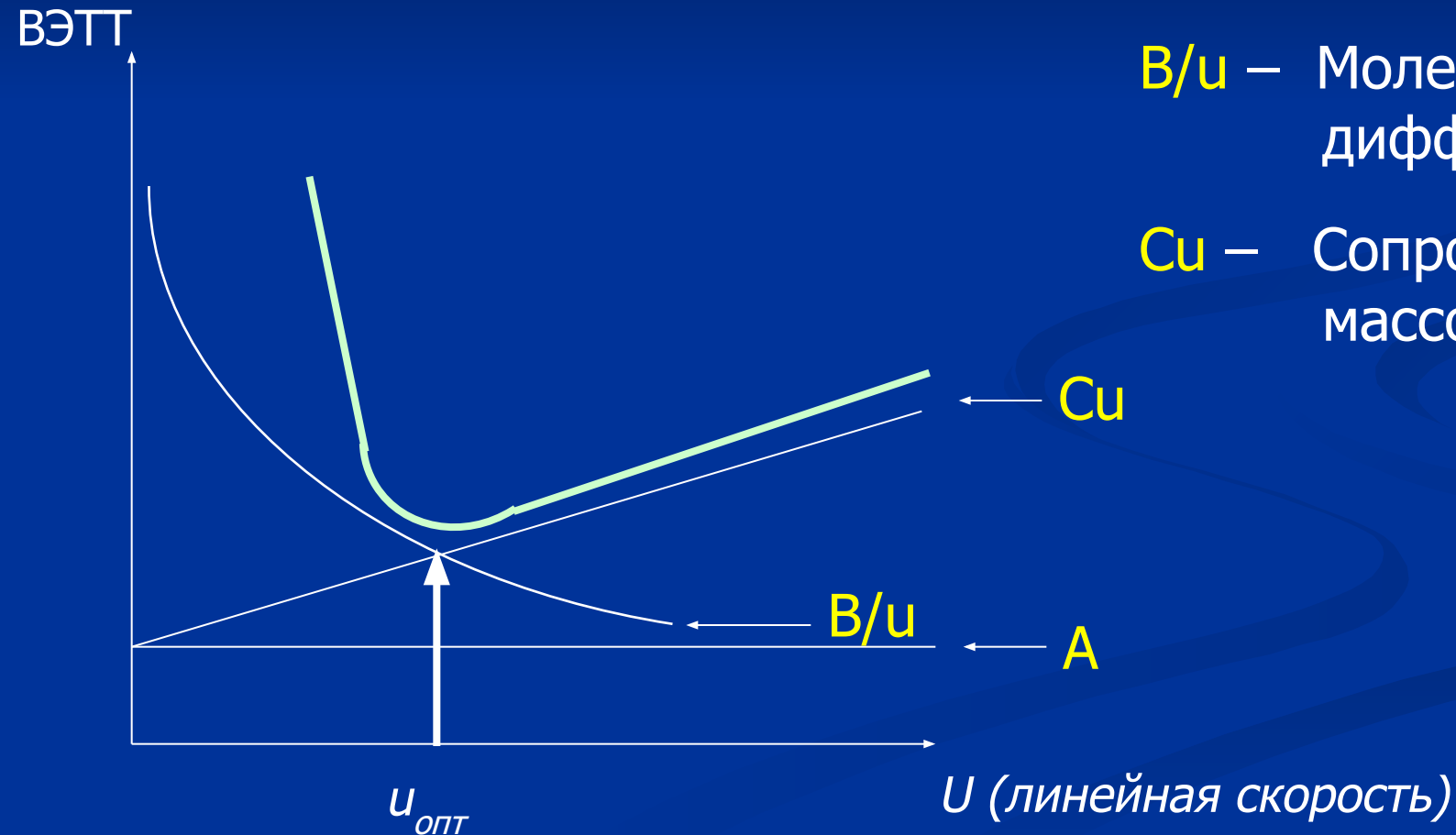
# Уравнение Ван-Деемтера

$$H_{\text{ЭТТ}} = A + B/u + Cu$$

$A$  – Вихревая диффузия

$B/u$  – Молекулярная диффузия

$Cu$  – Сопротивление массопереносу



# Что есть что в уравнении Ван-Деемтера

$$VЭТТ = A + B/u + Cu$$

**Вихревая диффузия:**  $A = 2\lambda d_r$

$\lambda$  – коэффициент гомогенности упаковки колонки (0.1-0.8)

$d_r$  – диаметр зерна сорбента

(влияние различных траекторий движения)

**Молекулярная диффузия:**  $B =$

$2\gamma D_m$   
 $\gamma$  – коэффициент (< 1)

$D_m$  – коэффициент диффузии пробы в подвижной фазе

(размывание пробы в результате диффузии)

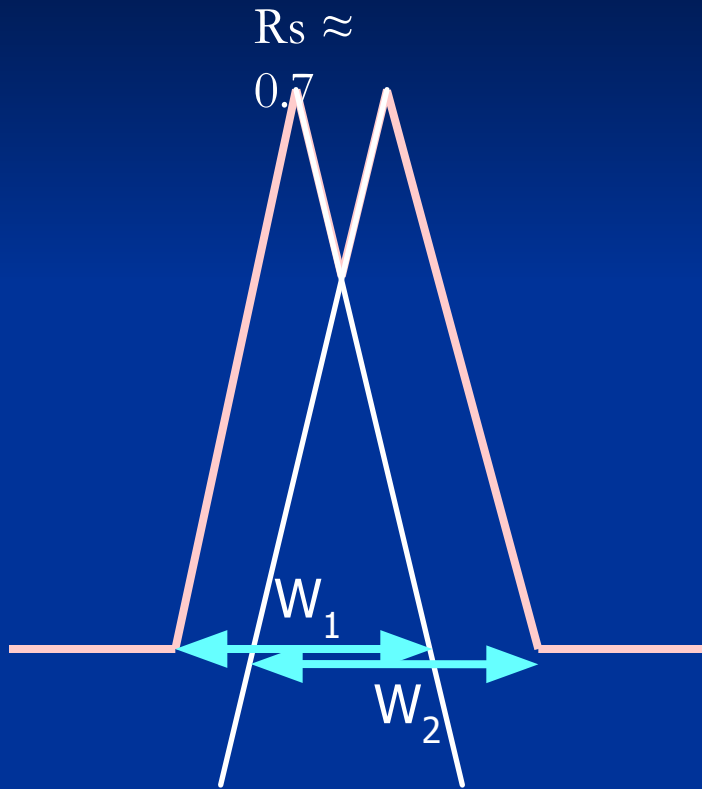
**Сопротивление массопереносу:**  $C \sim \phi d_r^2 / D_m$

$\phi$  – функция коэффициента емкости  $k'$

$d_r^2$  – толщина пленки неподвижной фазы (величина диффузионного пути)

(изменение кинетики сорбции-десорбции)

# Критерий разделения $R_s$

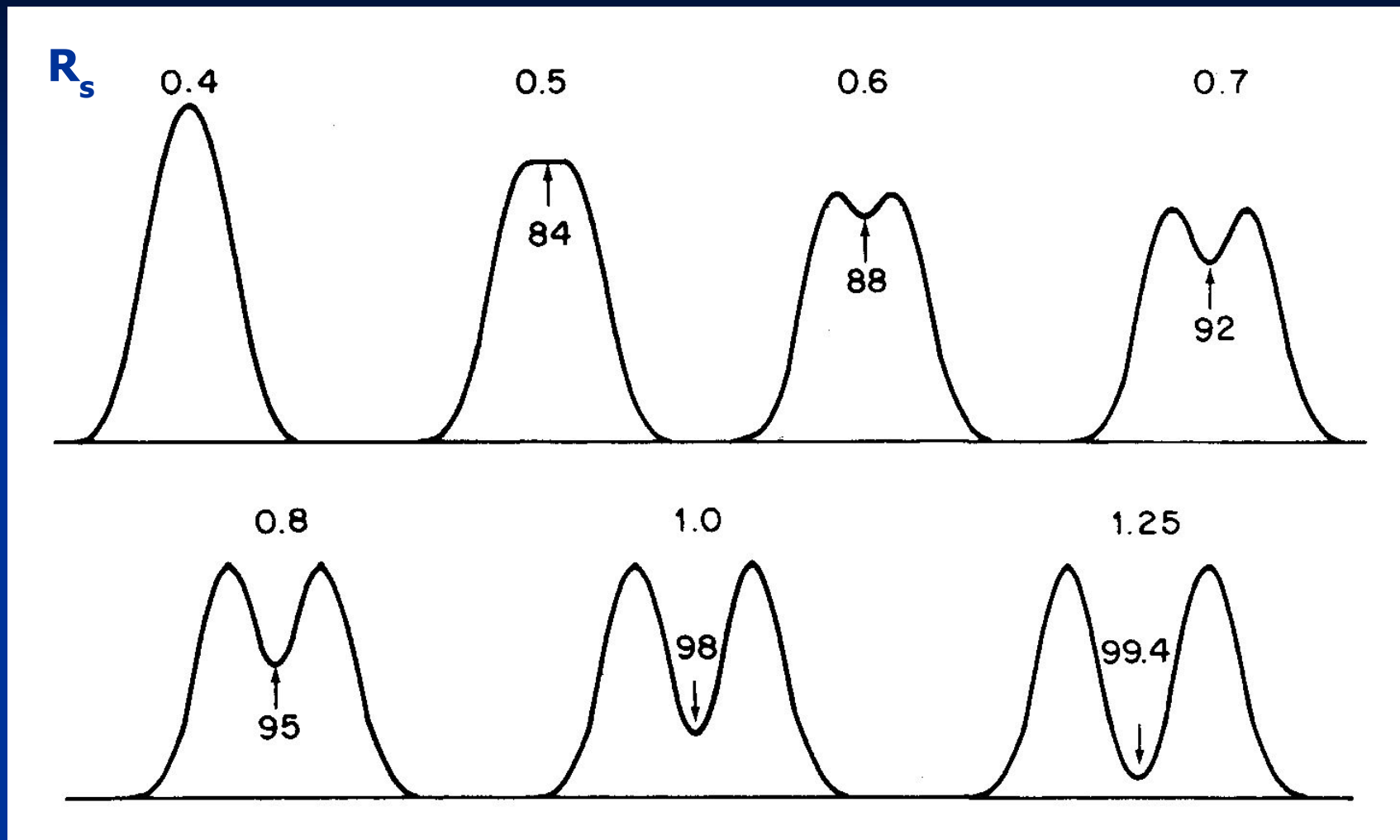


$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left( \frac{\bar{K}'}{1 + \bar{K}'} \right) \cdot \sqrt{N}$$

- Продолжает увеличиваться при увеличении времени второго пика и уже полном разрешении

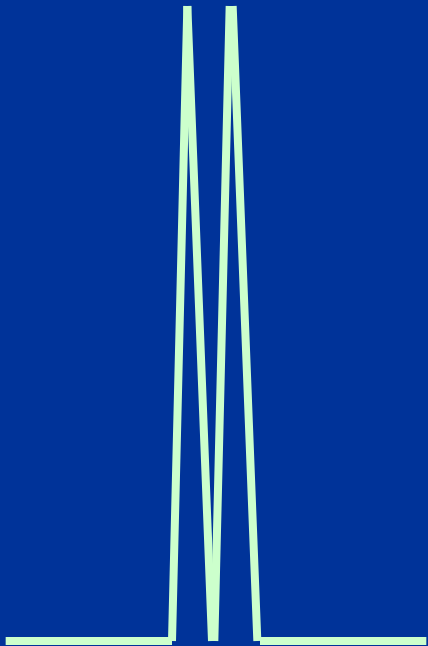
# Связь разрешения и перекрывания пиков



При количественном (100%) разрешении пиков  $R_s = 1.5$

# Влияние удерживания ( $K$ ), селективности ( $\alpha$ ) и эффективности ( $N$ ) на разделение

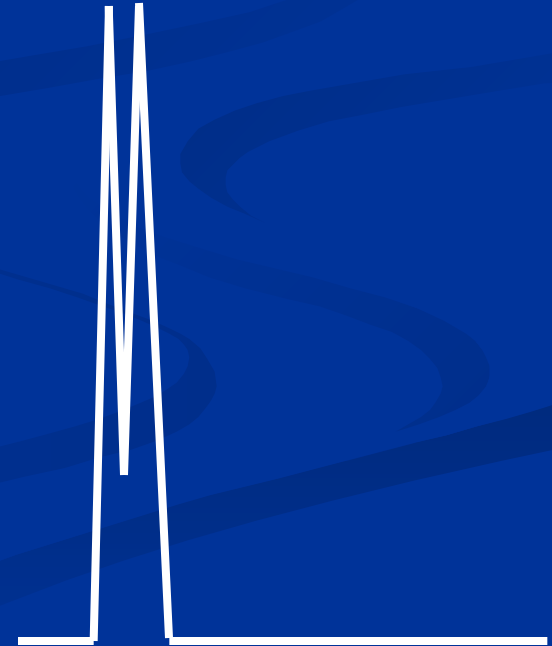
$K = 5$   
 $\alpha = 1.2$   
 $N = 10\ 000$



$K = 5$   
 $\alpha = 1.7$   
 $N = 400$



$K = 0.5$   
 $\alpha = 1.4$   
 $N = 15\ 000$

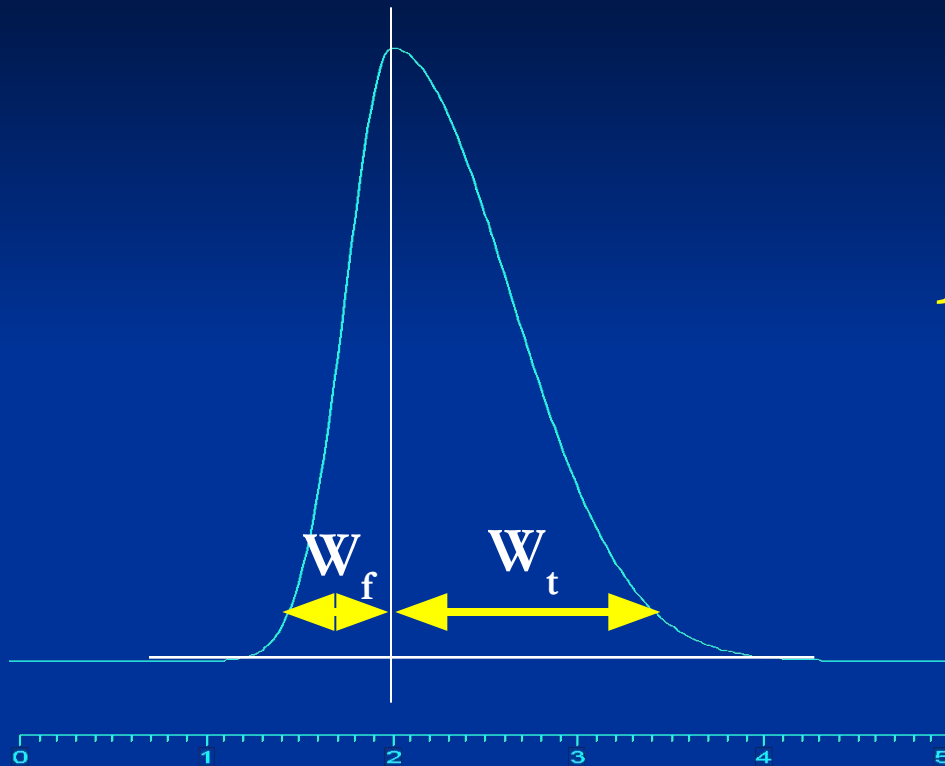


# Необходимая эффективность при заданной селективности

Селективность, $\alpha$	Эффективность, тт/м	
	$R_s = 1.0$	$R_s = 1.5$
1.005	650 000	1 450 000
1.05	7 100	16 000
1.15	940	2 100
1.25	400	900
1.50	140	320
2.00	65	145

Пороговая селективность – около 1.1

# Коэффициент асимметрии, $A_s$

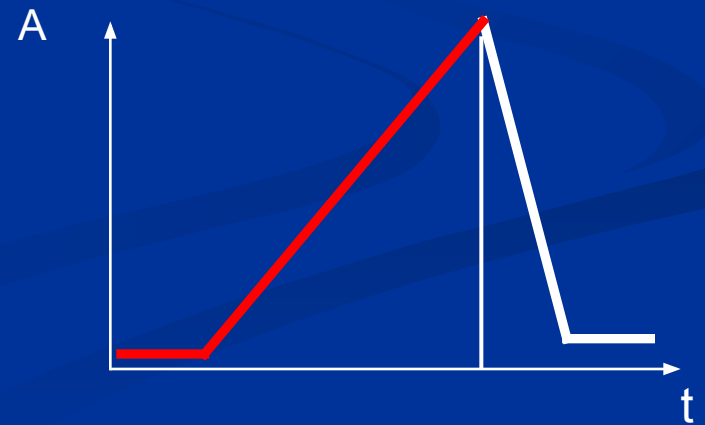
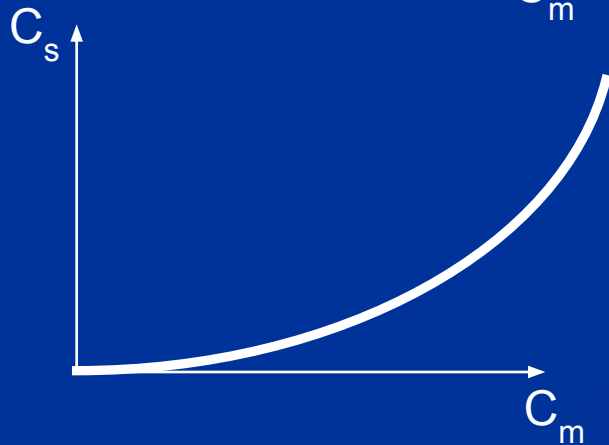
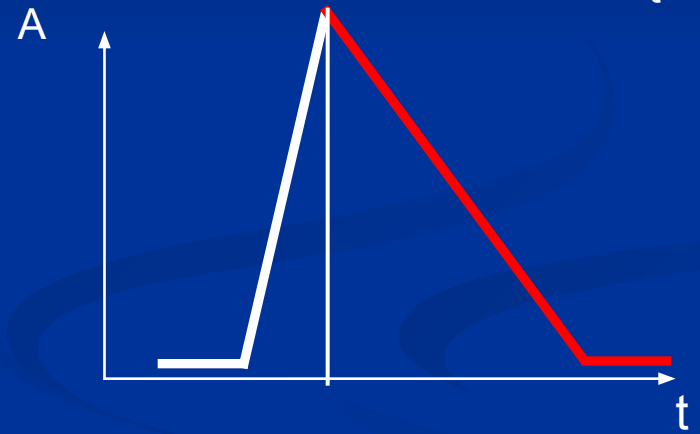
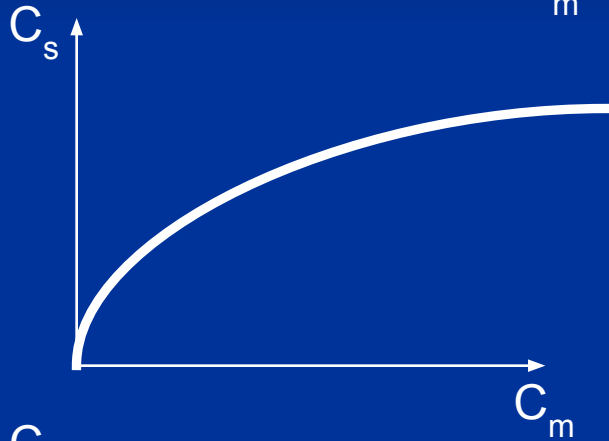
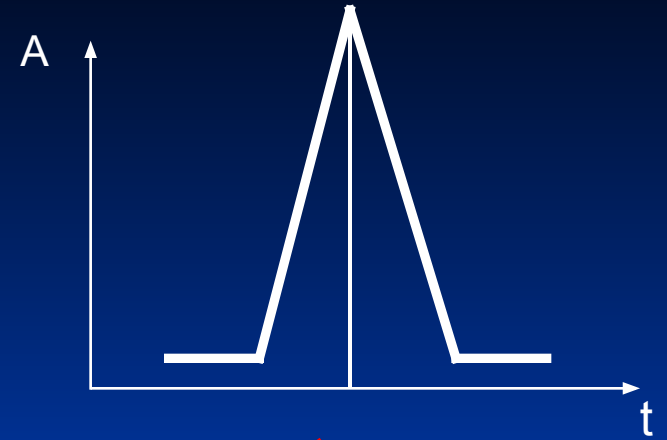
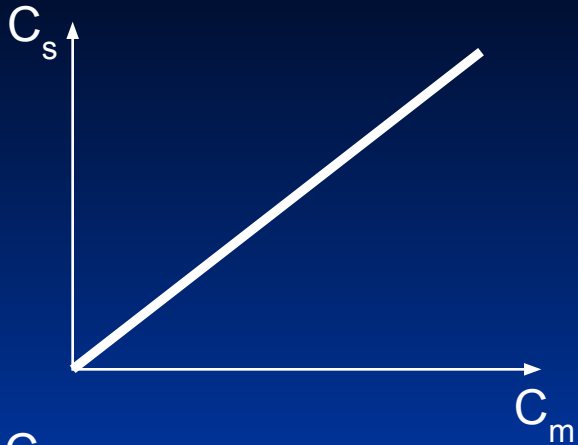


$$A_s = W_{t(0.1)} / W_{f(0.1)}$$

- Взаимодействие образца с силанольными группами сорбента
- Неоднородность сорбента (мелкая фракция, несферичность)
- Отравление колонки тяжелыми металлами (в ионной хр-фии)
- Образование полости в слое сорбента (или его проседание)



# Связь изотермы и формы пика



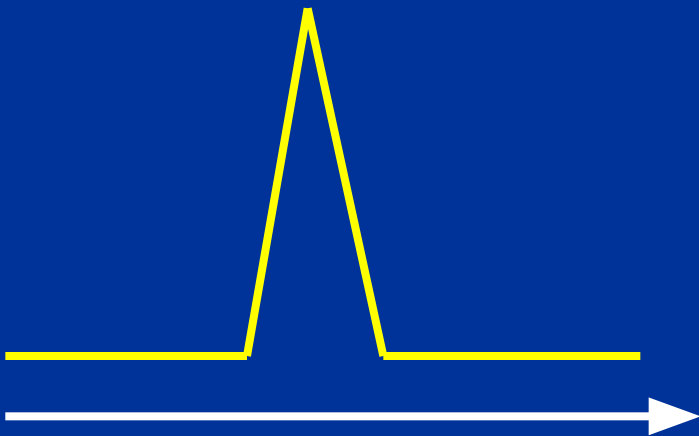
# Факторы, улучшающие разрешение пиков

- Увеличение длины колонки
- Уменьшение внутреннего диаметра колонки
- Оптимальная скорость потока элюента
- Однородность сорбента, его сферичность
- Однородность набивки колонки
- Уменьшение объема вводимой пробы
- Правильный выбор подвижной фазы
- Использование *градиентного элюирования*
- Правильный выбор неподвижной фазы

# Принципы прямого и косвенного детектирования

## Прямое

Аналитический сигнал дает определяемое вещество, сигнал элюента принимается нулевым

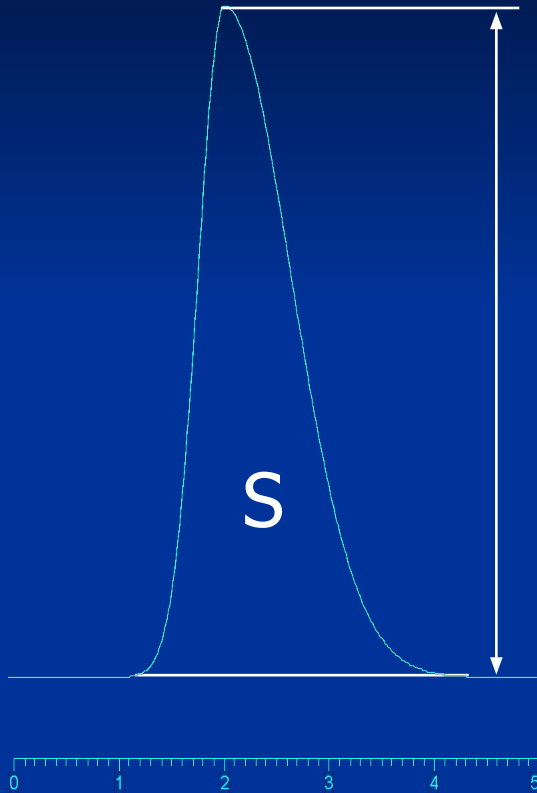


## Косвенное

Аналитический сигнал дает элюент, сигнал определяемого в-ва значительно меньше



# Количественный анализ в хроматографии

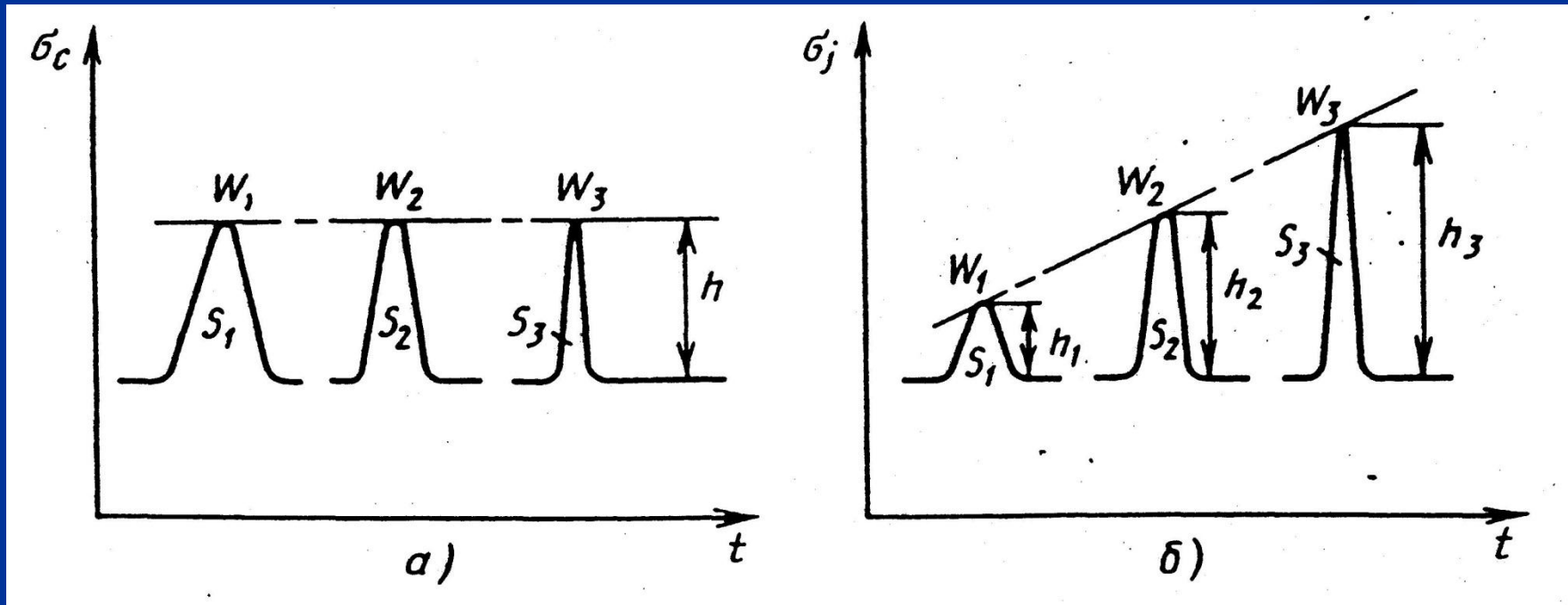


- Количественной характеристикой является **высота** или **площадь** пика
- При наличии маленьких или несимметричных пиков **предпочтительнее** использовать **расчет по площадям** пиков

# Концентрационные и потоковые детекторы в хроматографии

- В концентрационном детекторе его сигнал пропорционален **концентрации** определяемого вещества
- В потоковом детекторе - его **количеством**, попадающем в детектор в единицу времени.

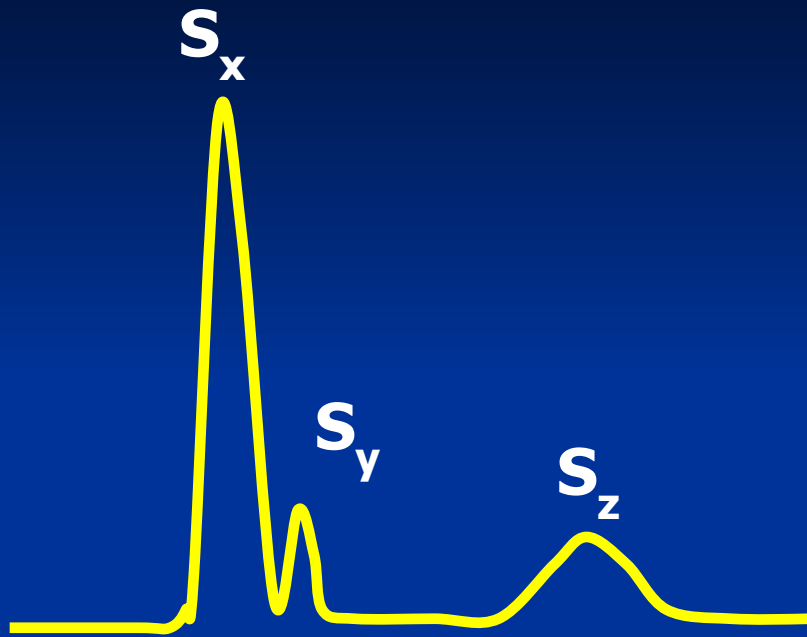
Зависимость показаний детекторов от расхода подв. фазы



# Методы количественного анализа в хроматографии

- Метод нормировки
- Метод внешнего стандарта
- Метод добавок
- Метод внутреннего стандарта

# Метод внутренней нормализации

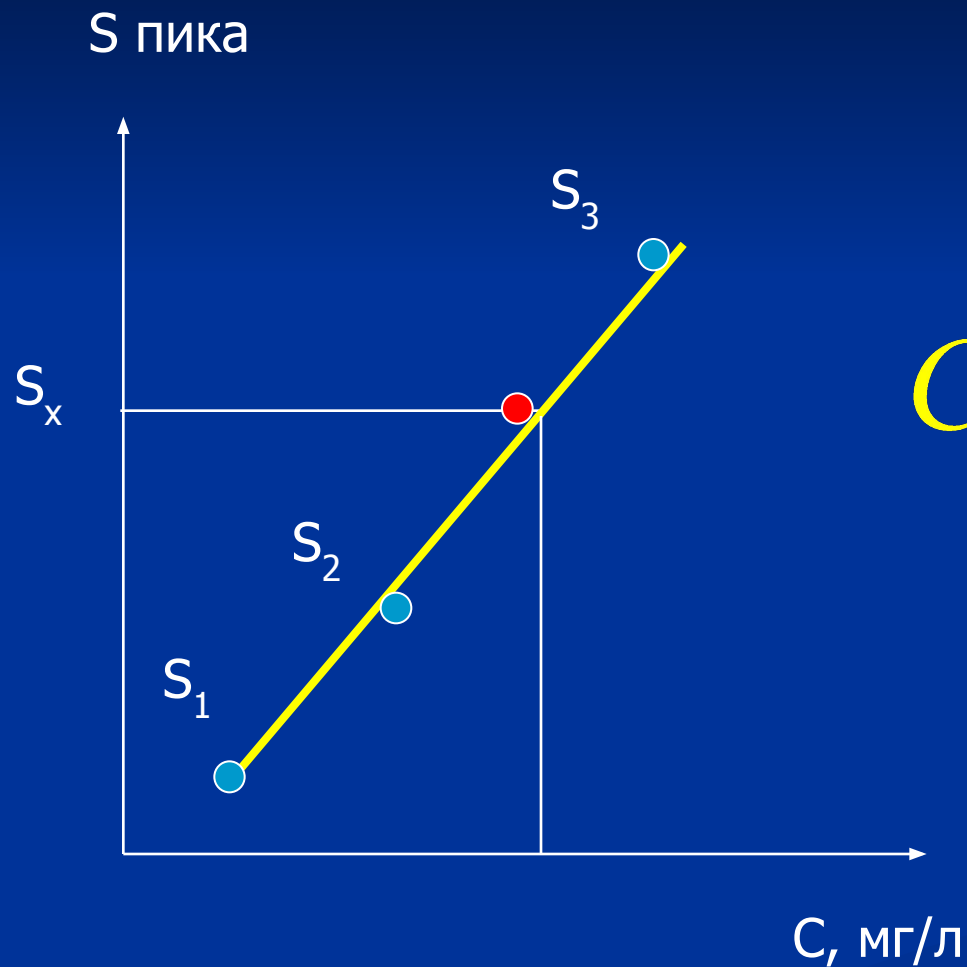


$$X, \% = \frac{S_x}{S_x + S_y + S_z} \times 100$$

$$X, \% = \frac{S_x f_x}{\sum_{i=1}^n S_n f_n} \times 100$$

$$f_{xm} = \frac{S_{cm}}{S_{xm}} \frac{C_x}{C} f$$

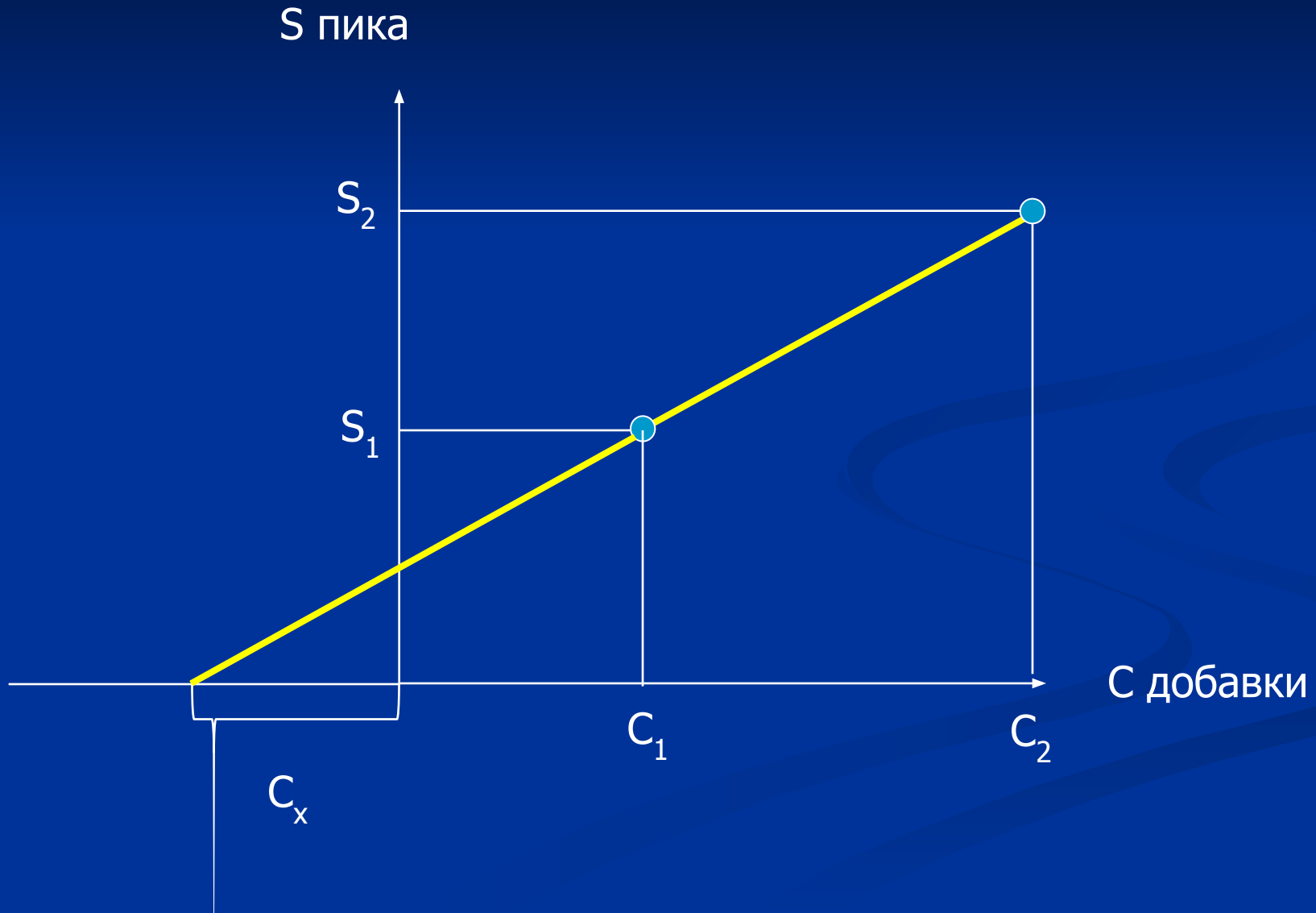
# Метод внешнего стандарта



$$C_x = A \cdot S_x + B$$



# Метод добавок



# Метод внутреннего стандарта

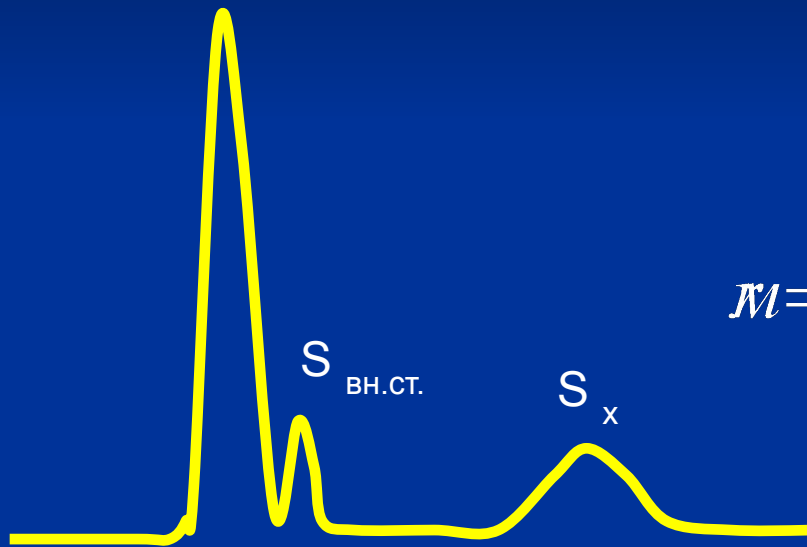
Основан на введении в анализируемую смесь определенного количества постороннего вещества  
(внутреннего стандарта)

## Требования к внутреннему стандарту

- отсутствовать в анализируемой пробе
- иметь структуру, близкую к определяемому веществу (ОВ)
- иметь время удерживания, близкое к ОВ
- иметь концентрацию, близкую к ОВ
- давать отклик, сходный с ОВ
- полностью отделяться от ОВ и др. компонентов пробы
- быть химически инертным

# Метод внутреннего стандарта (продолжение)

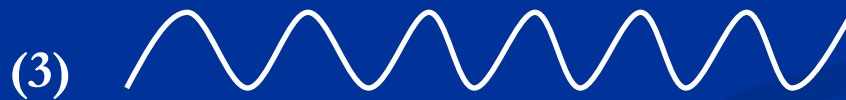
$$k = \frac{S_{\text{вн.ст.}} \cdot C_x}{S_{\text{вн.ст.}} \cdot C}$$



$$k = \frac{m_{\text{вн.ст.}}}{m_{\text{пробы}}} \left( = \frac{m_{\text{вн.ст.}}}{m_{\text{пробы}}} \right)$$

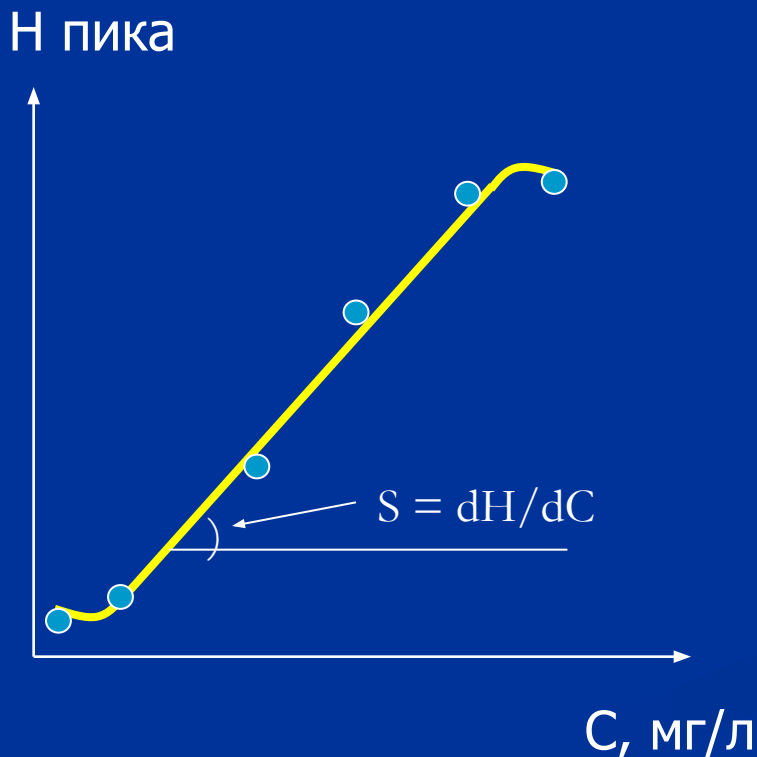
$$x, \% = kr \frac{S_x}{S_{\text{вн.ст.}}} \cdot 100$$

# Флуктуации базовой линии в хроматографии

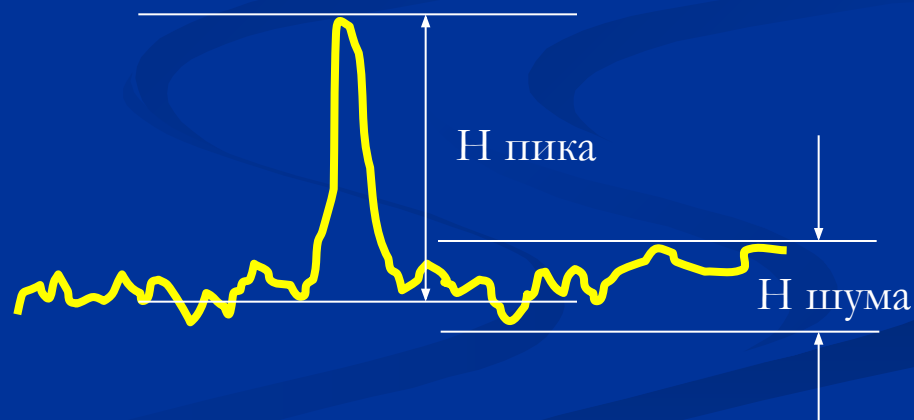


# Чувствительность и предел обнаружения

**Чувствительность** – определяется наклоном градуировочного графика



**Предел обнаружения** – наименьшее содержание, при котором компонент можно обнаружить с заданной вероятностью по данной методике



$$H \text{ пика} = 3 * H \text{ шума}$$

# Российское хроматографическое приборостроение

- **АКВИЛОН**, *Москва* (жидкостная и ионная)
- **ХИМАВТОМАТИКА**, *Москва* (жидкостная, газовая, детекторы)
- **ЛЕНХРОМ**, *Санкт-Петербург* (тонкослойная)
- **ЛЮМЭКС**, *Санкт-Петербург* (жидкостная и газовая, электрофорез)
- **СОРБПОЛИМЕР**, *Краснодар* (тонкослойная)
- **МЕТА-ХРОМ**, *Йошкар-Ола* (газовая)
- **ХРОМАТЭК**, *Йошкар-Ола* (газовая)
- **ЭКОНОВА**, *Новосибирск* (жидкостная)

# Мировое хроматографическое приборостроение

- **AGILENT** (жидкостная, газовая, детекторы, электрофорез)
- **THERMO** (жидкостная, газовая, детекторы)
- **WATERS** (жидкостная)
- **PERKIN-ELMER** (жидкостная)
- **SHIMADZU** (жидкостная)
- **DIONEX** (ионная)
- **METROHM** (ионная, жидкостная)
- **VARIAN** (жидкостная, детекторы, спектральные приборы)
- **KNAUER** (препаративная жидкостная)
- **САМАК** (тонкослойная)

# Основные журналы по хроматографии

- Журнал аналитической химии
- Журнал физической химии
- Заводская лаборатория
- Analytical Chemistry
- Journal of Chromatography A, B
- Chromatographia
- Journal of High Resolution Chromatography
- Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies
- Analytical Science
- Analytical Biochemistry
- Ion exchange and Membranes



## Дополнительная литература по хроматографии

- *Сакодынский К.И., Бражников В.В. и др.* Аналитическая хроматография. М.: Химия. 1993, 464 с.
- *Киселев А.В., Яшин Я.И.* Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. М.: Химия. 1979, 288 с.
- *Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография М.: Химия. 1986, 172 с.
- *Шпигун О.А., Золотов Ю.А.* Ионная хроматография. М.: Изд-во Моск. Ун-та. 1990. 198с.
- *Схунмакерс П.* Оптимизация селективности в хроматографии М.: Мир. 1989. 399 с.
- *Даванков В.А., Навратил Дж., Уолтон Х.* Лигандообменная хроматография. М.: Мир. 1989. 294 с.
- *Руководство по современной тонкослойной хроматографии / Под ред. О.Г.Ларионова.* - М. : Научный Совет по хроматографии РАН, 1994. - 312 с.

# **Классификации хроматографических методов**

# Классификация хроматографических методов анализа

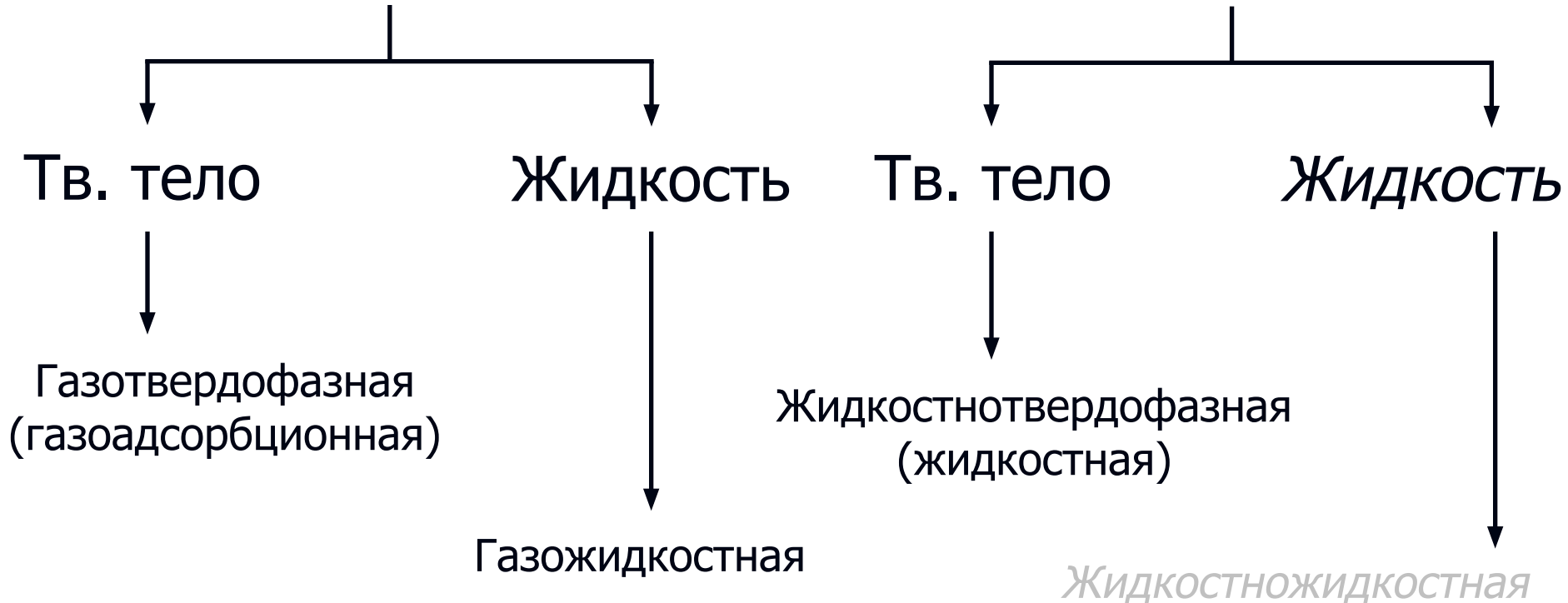
- По агрегатному состоянию подв. фазы (газовая, жидкостная)
- По механизму разделения (распределительная, адсорбционная, ионообменная, эксклюзионная и др.)
- По технике исполнения (колоночная, планарная и др.)
- По целям и задачам (аналитическая, препаративная)
- По способу перемещения сорбата (элюентная, вытеснительная, фронтальная)
- По способу детектирования (прямой, косвенный)

# Классификация по агрегатному состоянию фаз

1. Сначала классифицируют подвижную фазу



2. Затем классифицируют неподвижную фазу



# Классификация по механизму взаимодействия

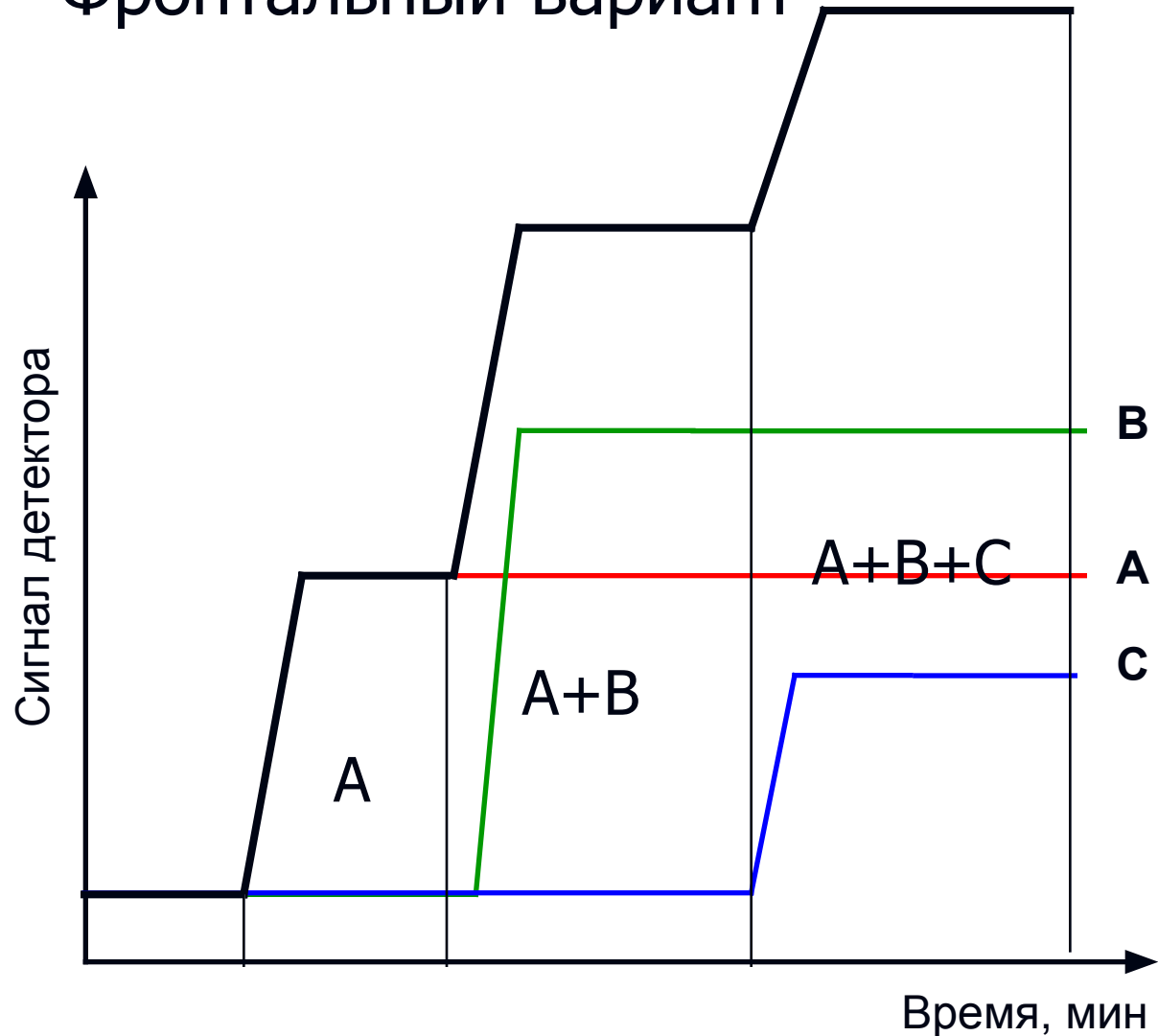
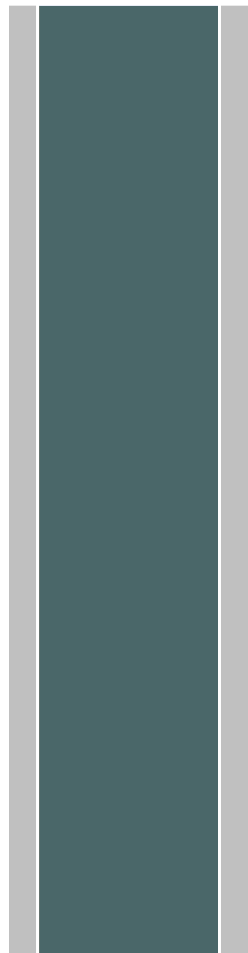
- Распределительная
- Адсорбционная
- Ионообменная
- Комплексообразовательная
- Лигандообменная
- Эксклюзионная
- Аффинная

# Классификация по способу перемещения сорбата



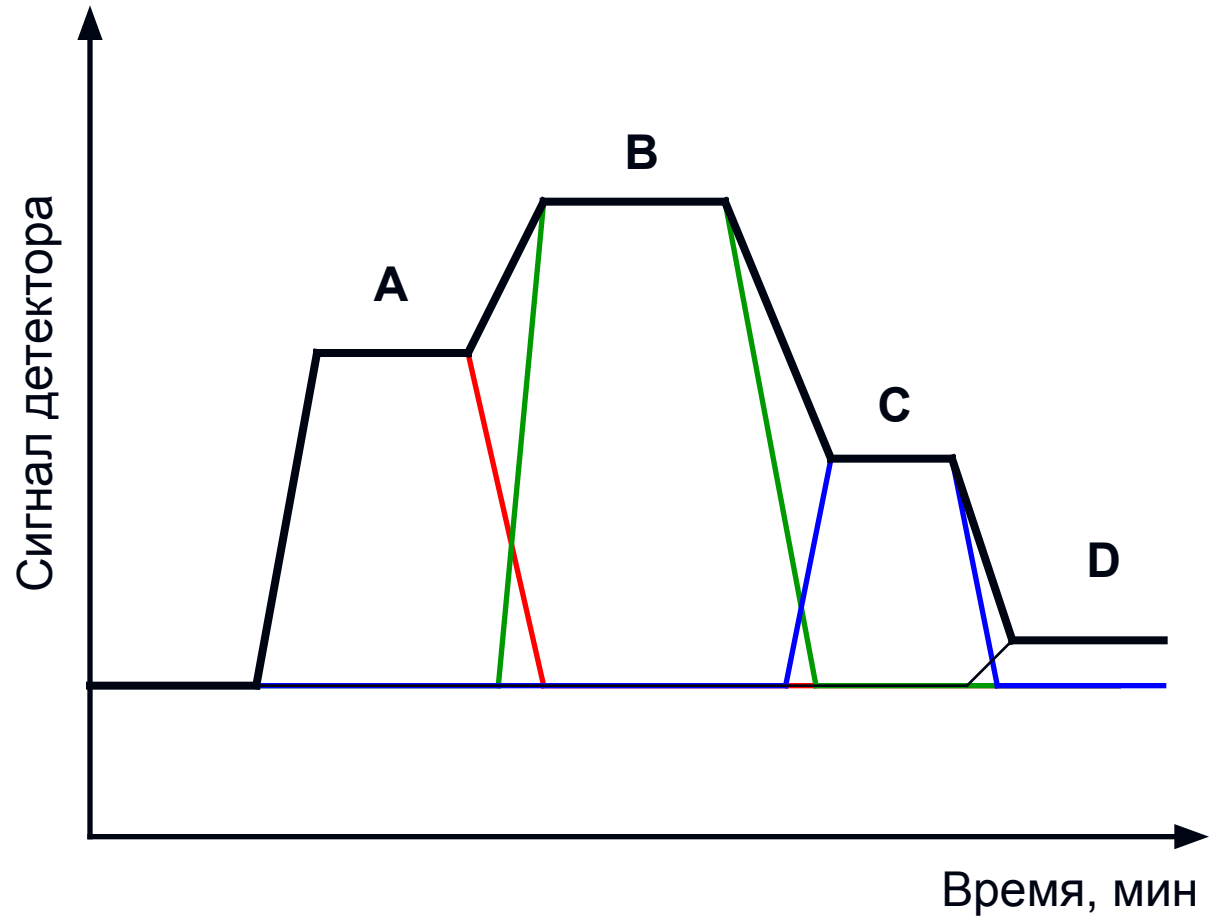
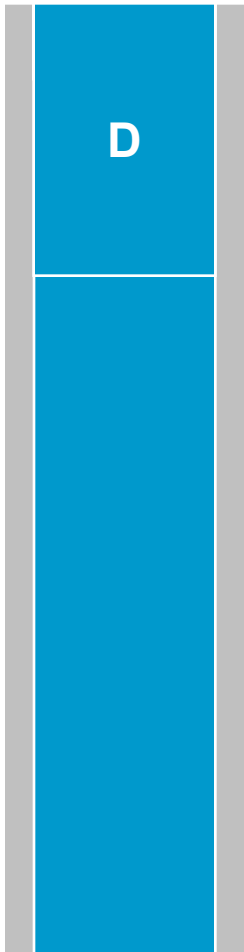
с

## Фронтальный вариант



# Классификация по способу перемещения сорбата

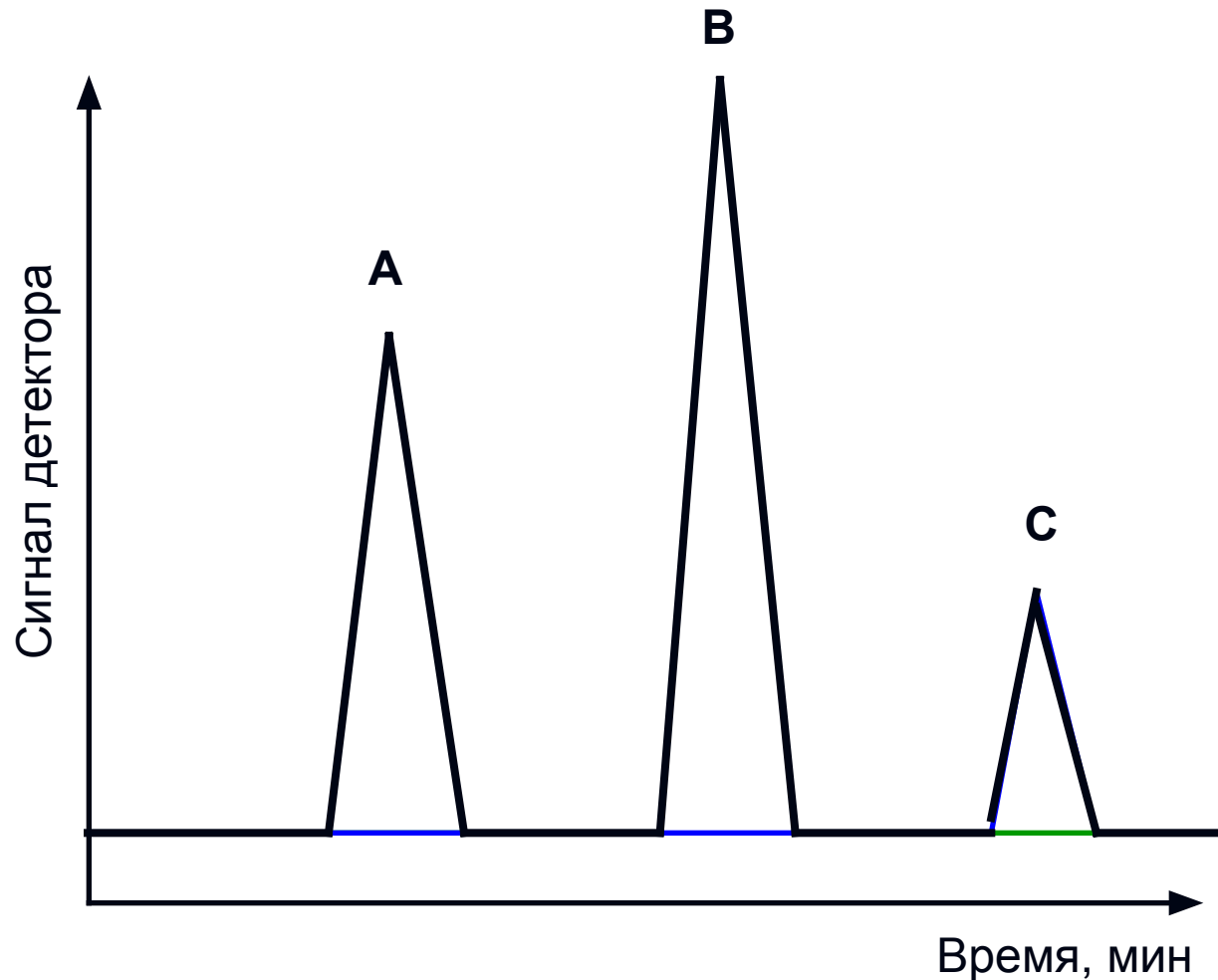
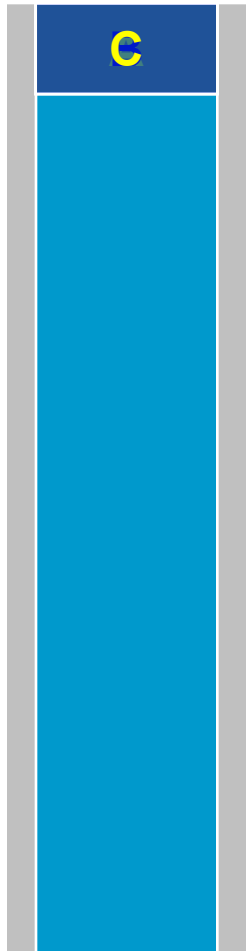
Вытеснительный вариант



# Классификация по способу перемещения сорбата

Элюент ↓

Элюентный вариант





# Классификация по целям и задачам

Аналитическая

Препаративная

Задача разделения  
и определения веществ  
(малых количеств)

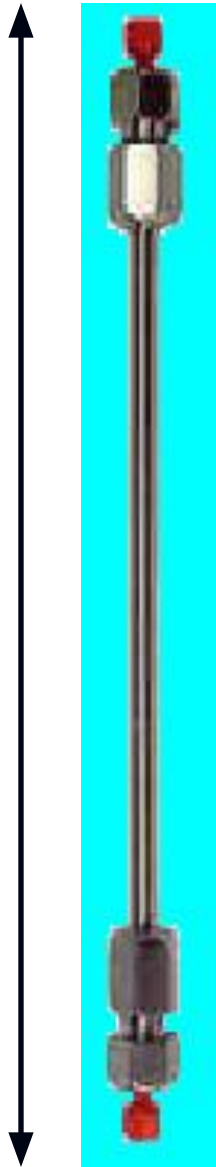
Задача выделения  
веществ  
(больших количеств)

↓  
Малый объем вводимой пробы,  
Элюентный вариант хр-фии  
и т.д.

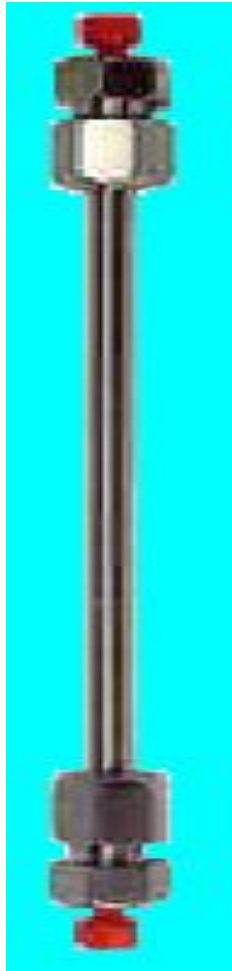
↓  
Большой объем вводимой пробы,  
Вытеснительный или  
фронтальный варианты хр-фии  
и т.д.

# Аналитические и препаративные колонки

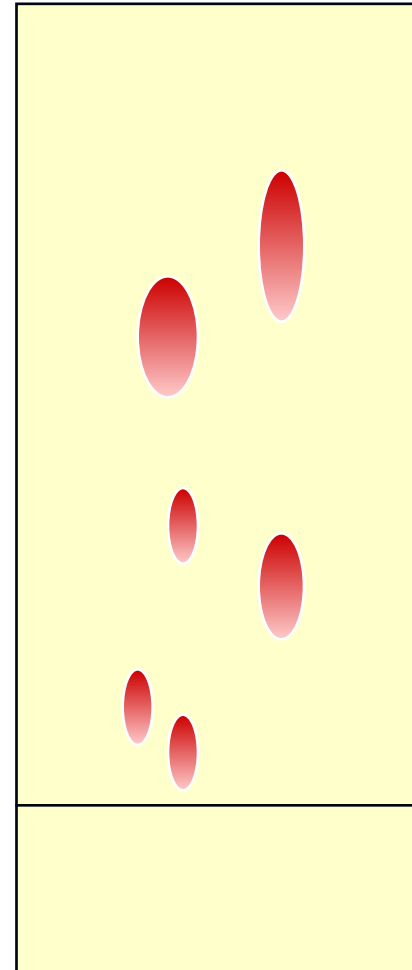
5-25 см



# Классификация по технике исполнения



Колоночная



Планарная (плоскостная)

# Подходы к поиску оптимальных условий хроматографического анализа

# ~~Optimization~~ of HPLC Separations

## Adequatization



Поиск условий, которые годны для целей анализа...

... и ВСЁ!!!

1. Установить требования



2. Составить план действий



Не пренебрегайте поиском литературы,  
информации в Интернете, чтобы не «изобретать колесо»

**Выбор  
варианта хроматографии  
в зависимости от задачи**

Определяемое  
вещество

М.м. < 2000

М.м. > 2000

М.м. ?

Летучее в-во?

Варианты  
эксклюзивной  
хроматографии

Да

Нет

Неорган. газы?

Можно ли перевести  
в летучее ?

Нет

Да

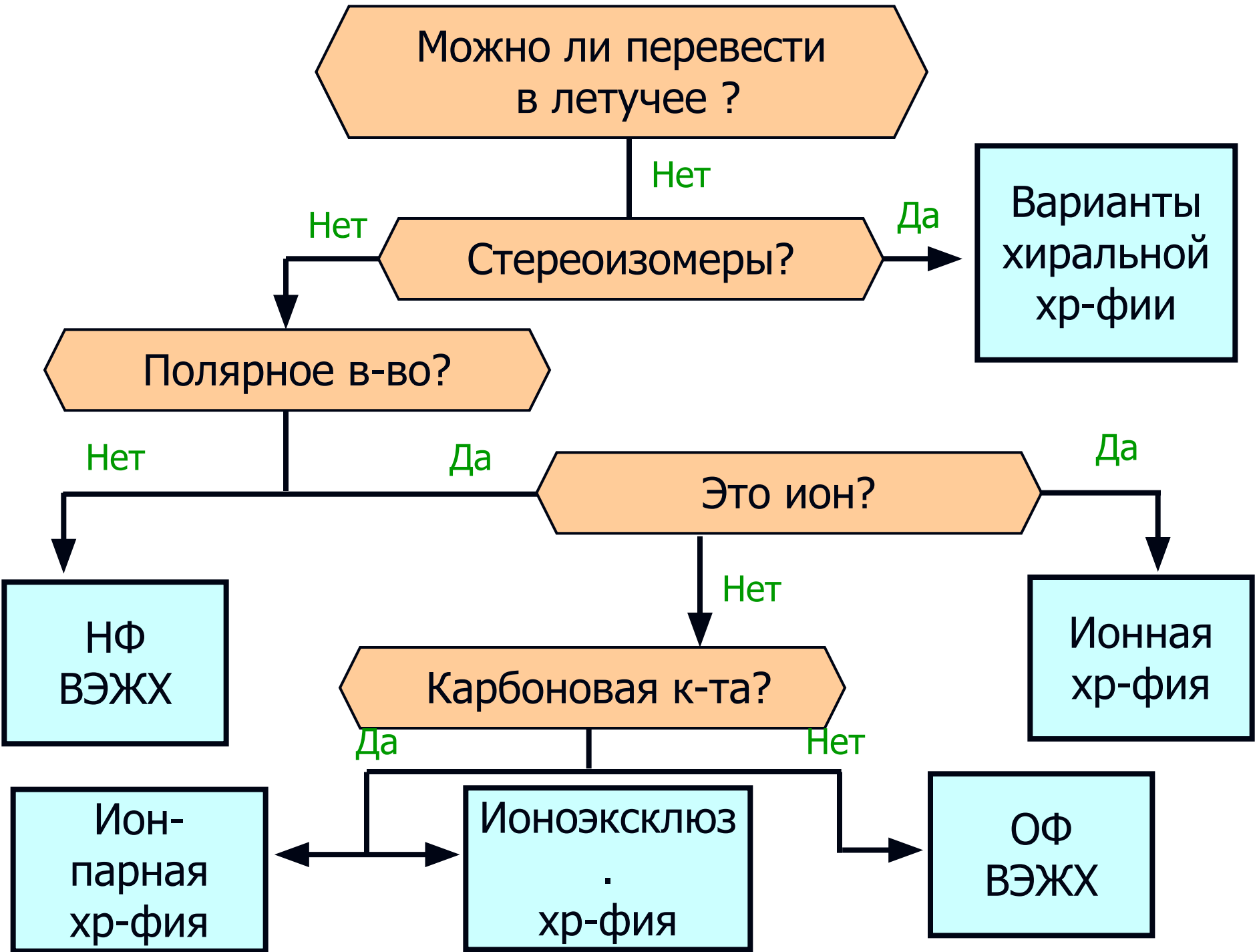
ГАХ

Нет

ГЖХ

Да





**Изменение параметров**

Physics  
(kinetics)

Chemistry  
(thermodynamics)

$$R_s \approx \frac{1}{4} N^{1/2} (\alpha - 1) [k' / (k' + 1)]$$

efficiency

selectivity

retention

При поиске условий анализа больше уделяйте внимания «химическим» нежели «физическим» параметрам

Наиболее важны данные об удерживании веществ.  
Сильно зависят от композиции элюента  
и от параметров градиента.  
Должны определяться в первую очередь.

# Параметры, обычно варьируемые в ВЭЖХ

Частота использования

- Содержание ацетонитрила (метанола)
- pH
- Содержание специальных добавок
- Время и скорость изменения градиента
- Тройная композиция органич. модификаторов
- Температура
- Ионная сила

# Зависимость времени анализа, давления и эффективности от некоторых параметров

	Длина колонки, L	Скорость потока элюента, F	Температура, T	Концентрация органич. растворителя, C	Размер частиц, d
Время анализа	+	-	-	-	0
Давление	+	+	-	±	- -
Эффективность	+	±	+	+	-

**+** - возрастает

**-** - уменьшается

**±** - не

однозначно

**0** - не зависит

# Непрерывно и дискретно изменяемые параметры

## Непрерывно изменяемые

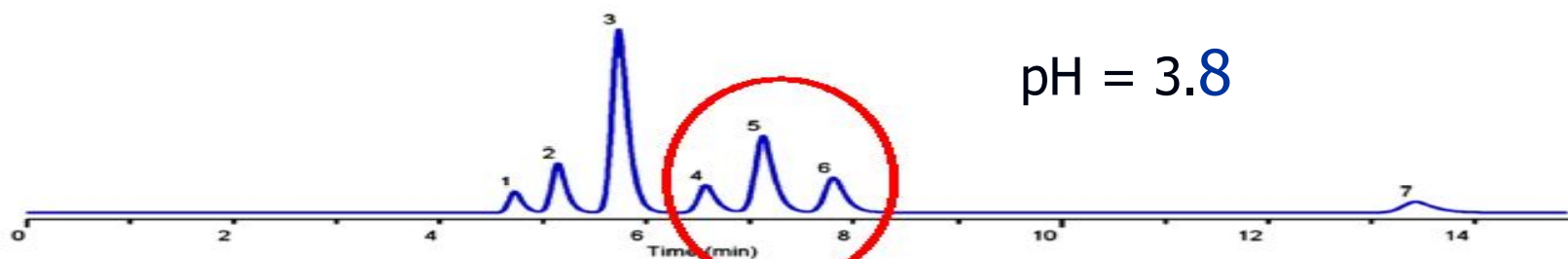
- Концентрация элюента
- Температура
- Скорость потока элюента

## Дискретно изменяемые

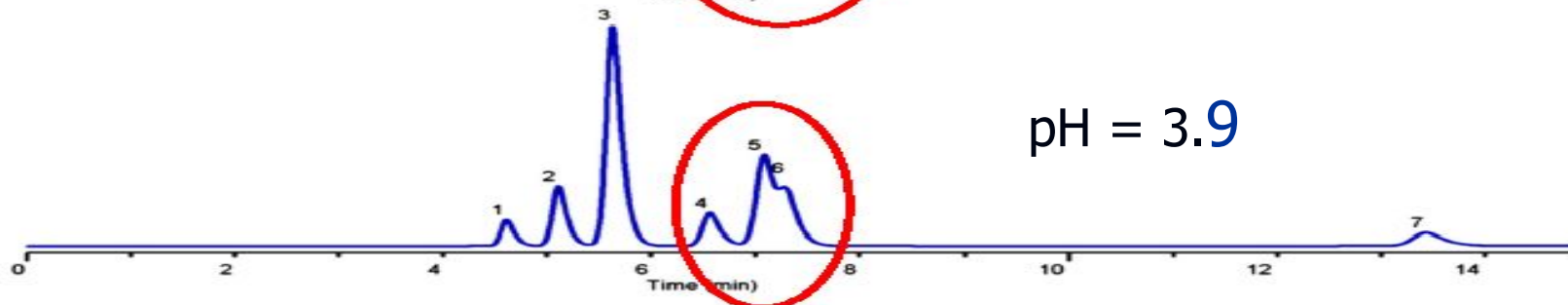
- Геометрия колонки
- Хроматограф

## «Квази-непрерывно» изменяемые

- pH
- Добавки в элюент

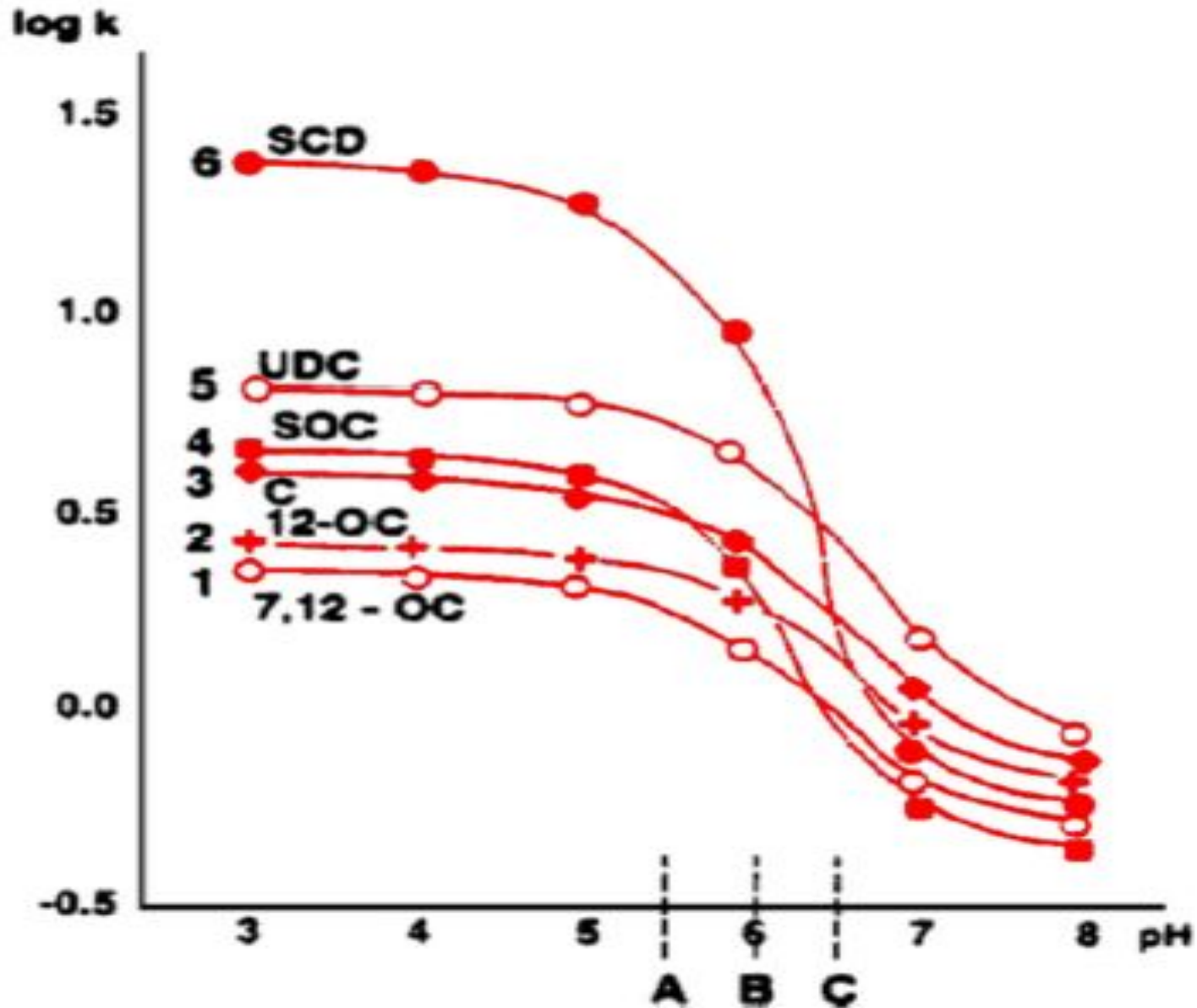


pH = 3.8



pH = 3.9

# Эффект рН на удерживание желчных кислот в ВЭЖХ



# Подходы к выбору условий

## Одна переменная за раз

### Преимущества

- Легко контролируется, автоматизируется
- Число экспериментов минимально

### Недостатки

- Можно не достичь результата

## Несколько переменных за раз

### Преимущества

- Выгоден для сложных систем
- Большая вероятность нахождения оптимума

### Недостатки

- Необходимо большое число экспериментов
- Часто трудно интерпретировать результаты



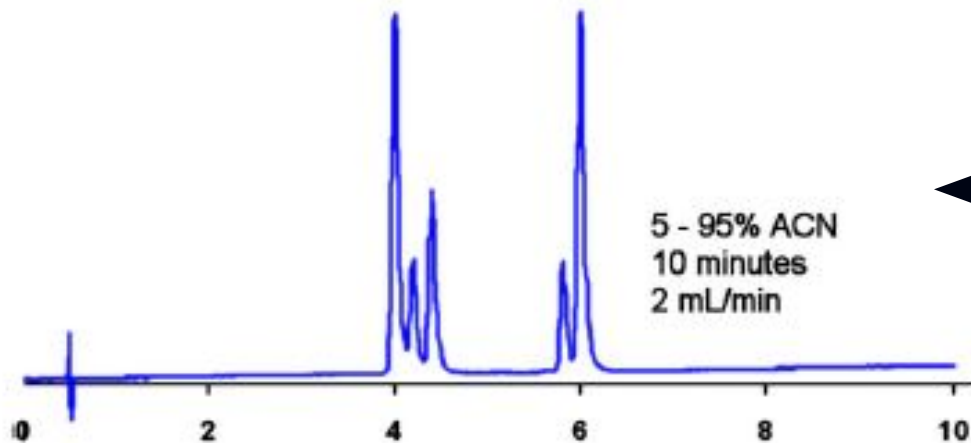
# «Однопараметрические» подходы к поиску условий анализа

- Начните с ОФ варианта ВЭЖХ
- Проведите начальный градиент ацетонитрила (от 0 до 95 %)
- Определите удерживание веществ
- Введите индивидуальные растворы веществ
- ПРИКИНЬТЕ, возможно ли провести разделение  
в изократических условиях так, чтобы ( $1 < K < 10$ )  
и при каком проценте ацетонитрила
- Далее можно менять другие параметры

Неполярные соединения: % ацетонитрила, добавки, температура

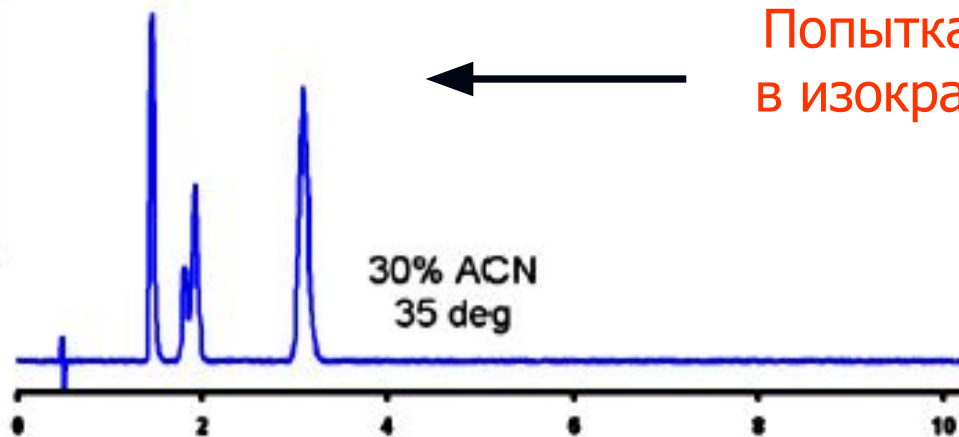
Полярные соединения: рН, тип органического растворителя, температура

# Иллюстрации к однопараметрическому подходу к поиску оптимума



Начальный градиент  
ацетонитрила

1. benzyl alcohol
2. 1,3 dihydroxy naphthalene
3. phenol
4. 3-phenyl propanol
5. 2,3 dihydroxy-naphthalene



Попытка провести анализ  
в изократических условиях

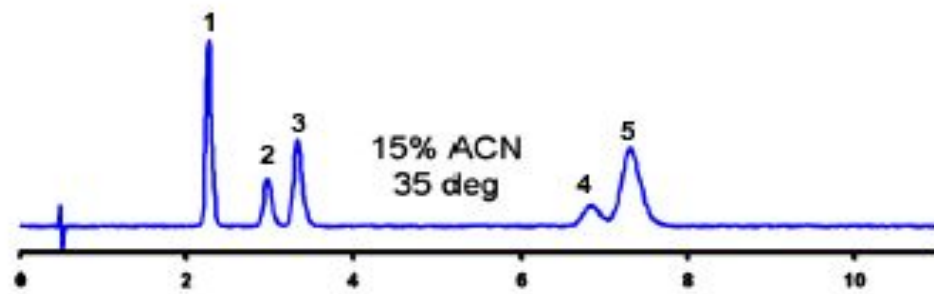
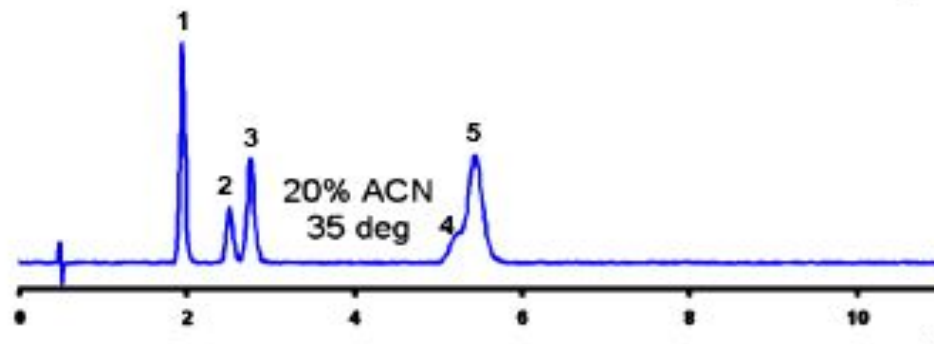
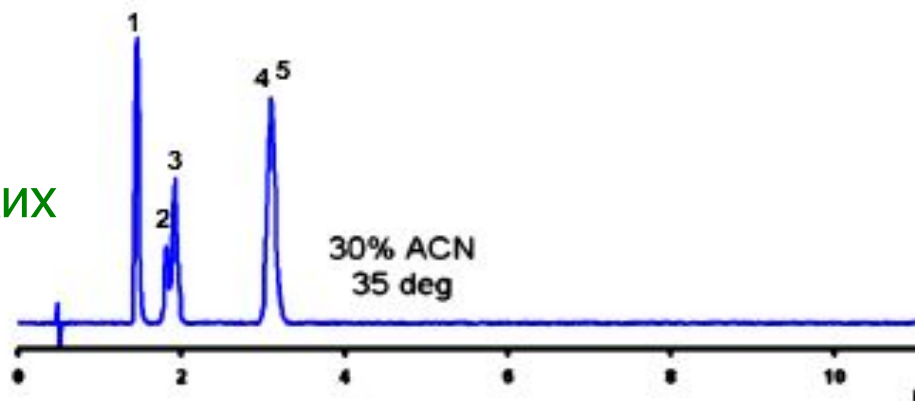
100 x 4.6 mm  
3.5  $\mu$ m C18

# Иллюстрации к однопараметрическому подходу к поиску оптимума (продолжение)

Изменяем концентрацию ацетонитрила в изократических условиях анализа

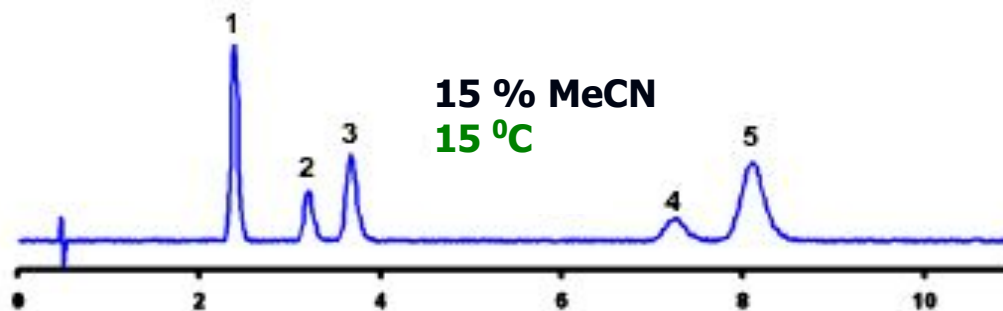
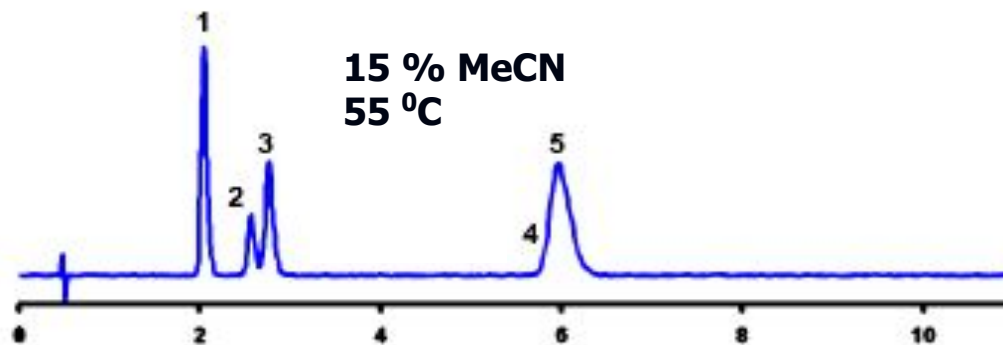
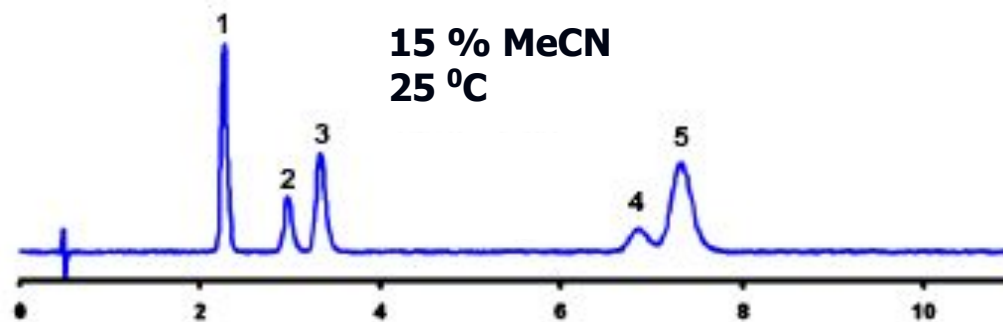
100 x 4.6 mm  
3.5  $\mu$ m C18

1. benzyl alcohol
2. 1,3 dihydroxy naphthalene
3. phenol
4. 3-phenyl propanol
5. 2,3 dihydroxy-naphthalene



# Иллюстрации к однопараметрическому подходу к поиску оптимума (продолжение)

100 x 4.6 mm  
3.5  $\mu$ m C18



1. benzyl alcohol
2. 1,3 dihydroxy naphthalene
3. phenol
4. 3-phenyl propanol
5. 2,3 dihydroxy-naphthalene

# «Многопараметрические» подходы к поиску условий анализа

## Обычно совместно варьируемые параметры

### Температура и элюирующая сила

- легко автоматизировать
- эффект относительно независим
- обычно приводит к положительным результатам

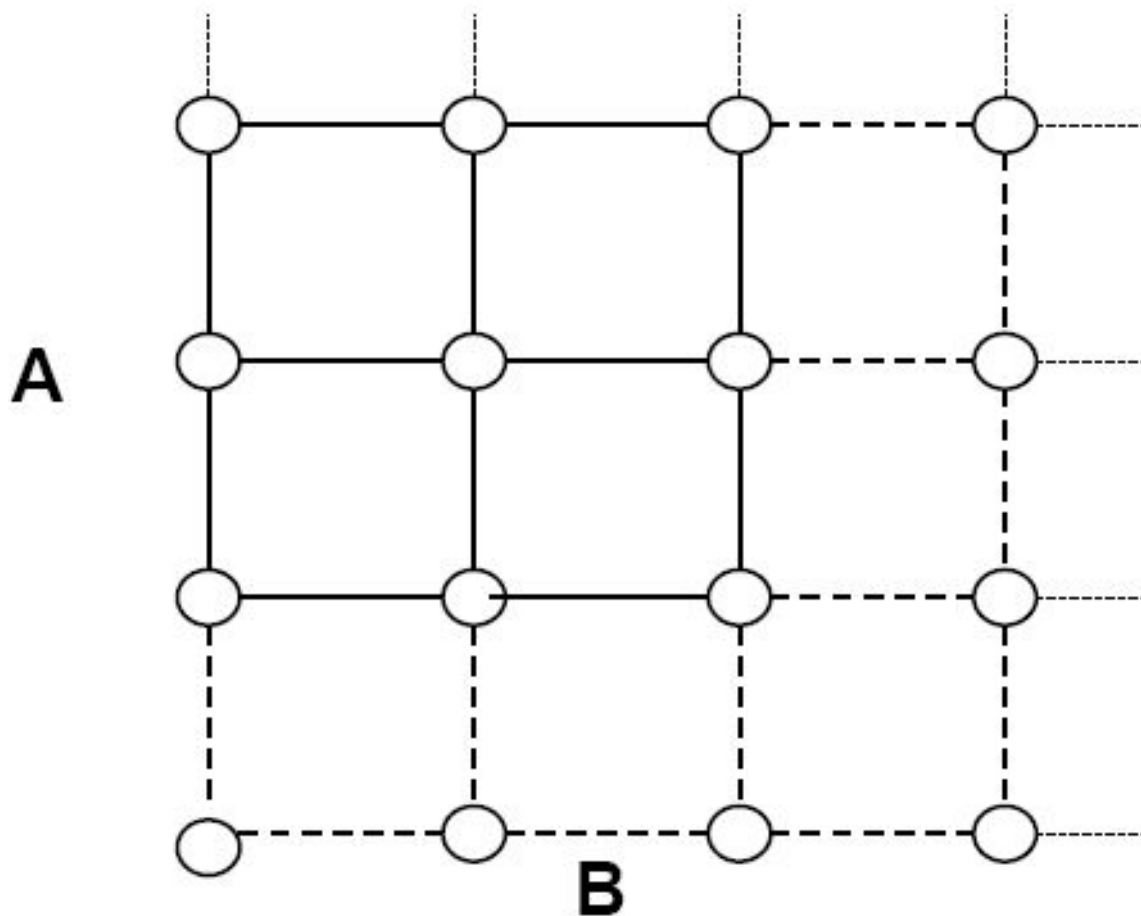
### Тип растворителя и элюирующая сила

- классический треугольник Снайдера
- хорош для смесей «разнополярных» веществ

### pH и элюирующая сила

- для слабых кислот/оснований и амфолитов
- в ион-парной и ионной хроматографии

## Любые два параметра (A, B)



Получаем много информации о системе  
(зависимости удерживания и т.п.)

Необходимо очень большое число экспериментов

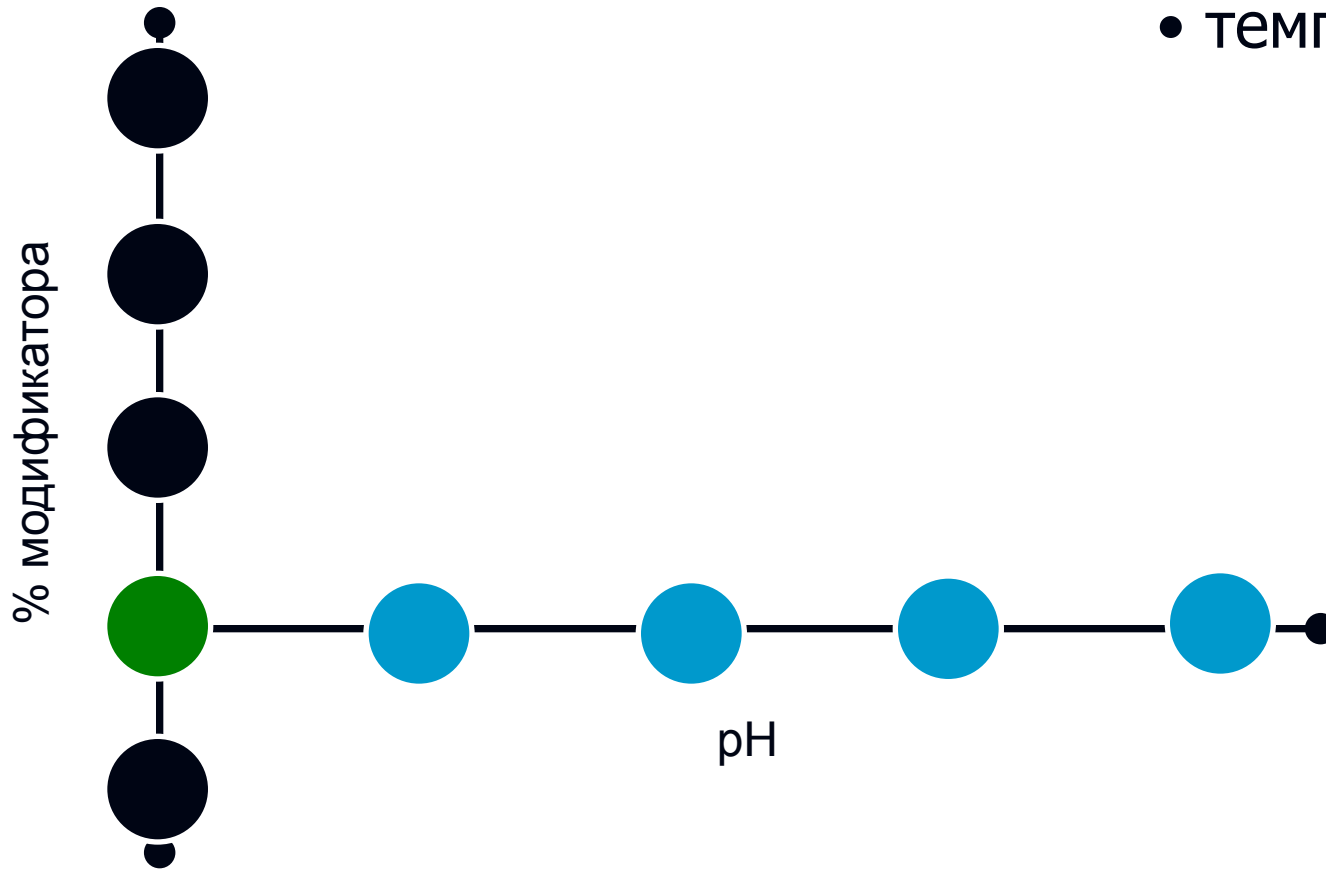
# Подход к поиску оптимальных условий изменяя один параметр и фиксируя остальные



- % модификатора
- pH
- температура

# Стадия 2

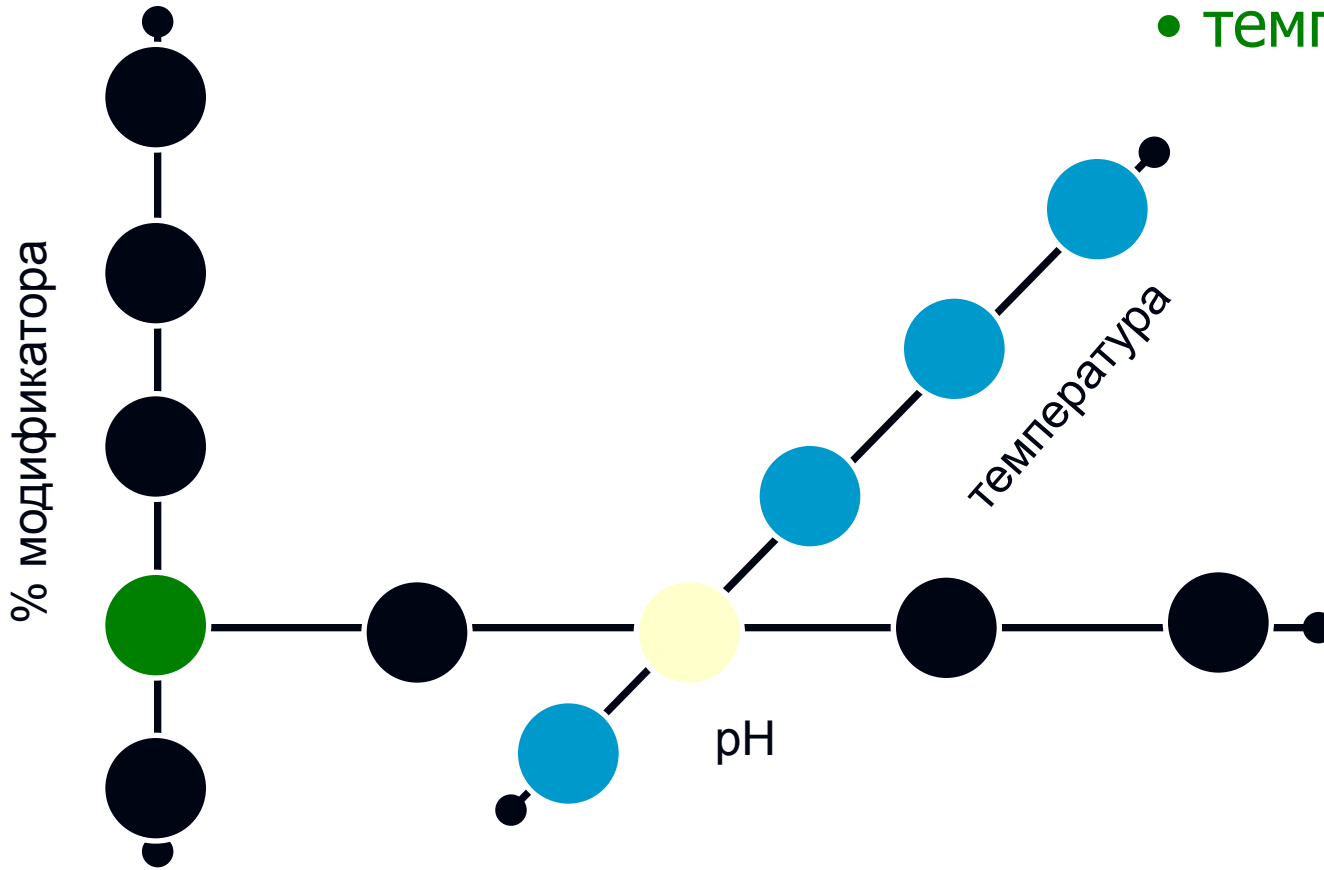
- % модификатора
- pH
- температура





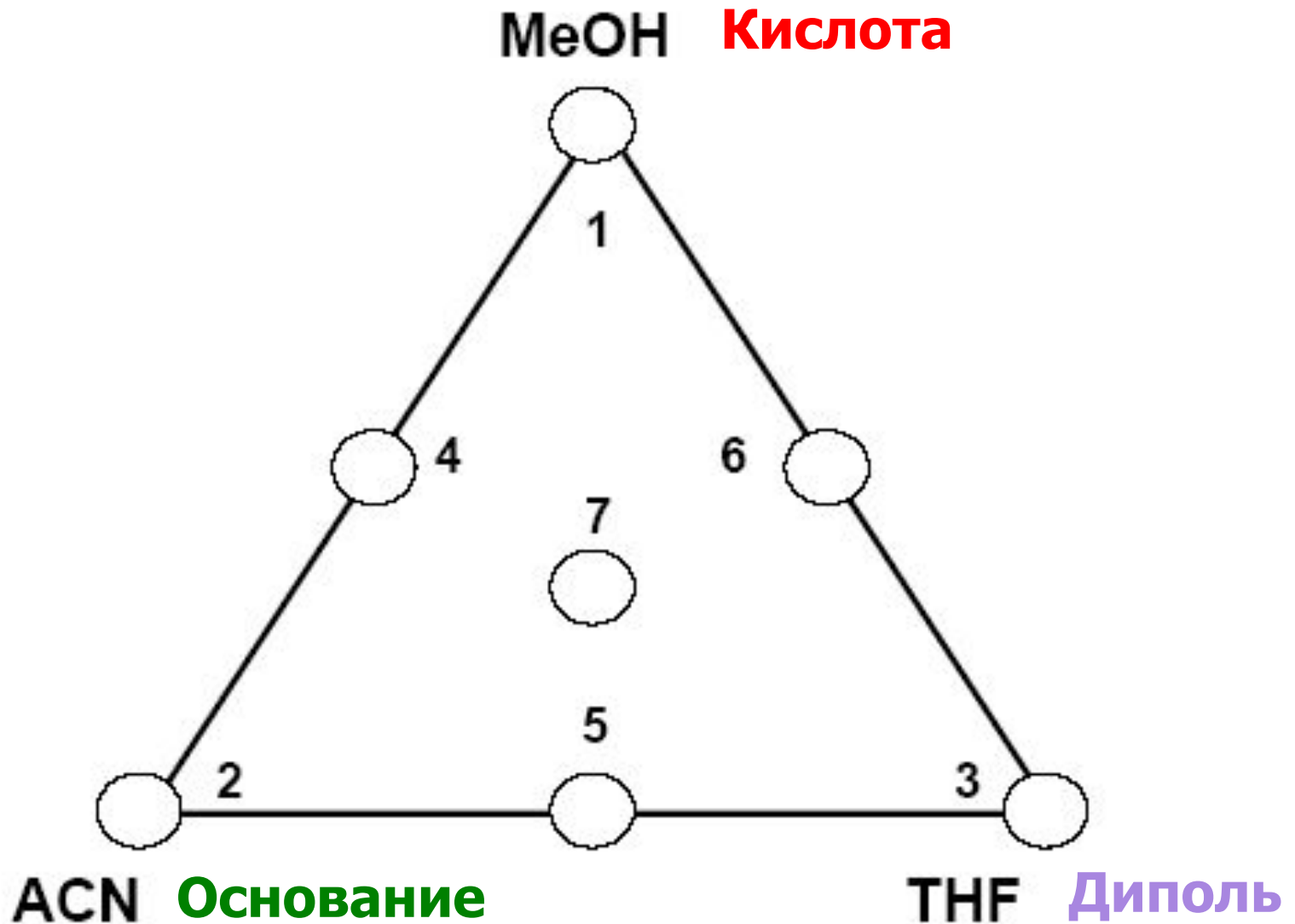
# Стадия 3

- % модификатора
- рН
- температура



**Оптимум?**

# Классификация растворителей (треугольник Снайдера)



# Компьютеризированные подходы к поиску оптимальных условий анализа

## Сущность подходов

Применить математические методы поиска максимума функции нескольких переменных

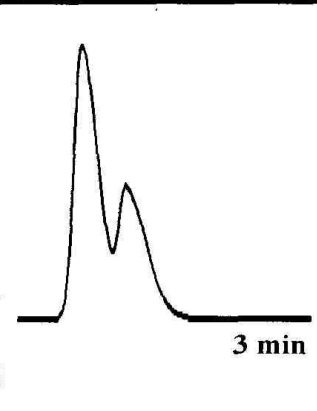
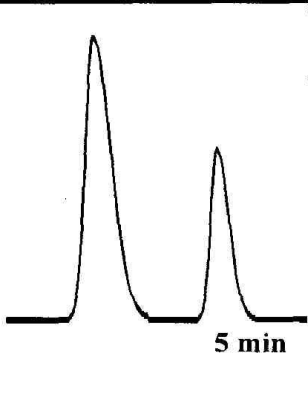
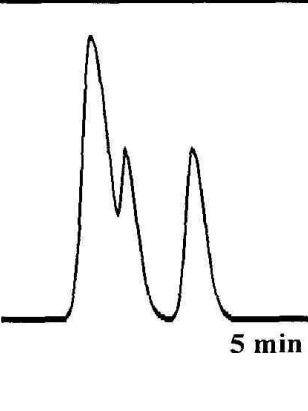
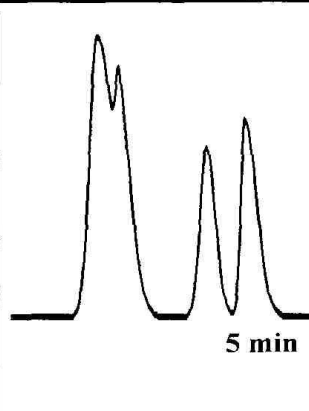
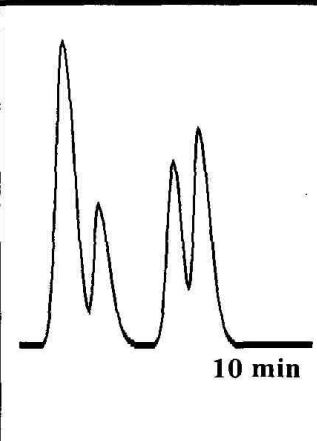
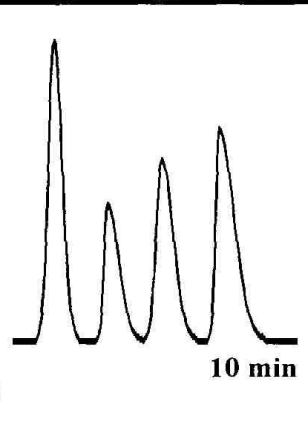
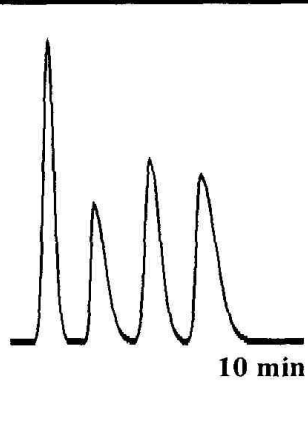
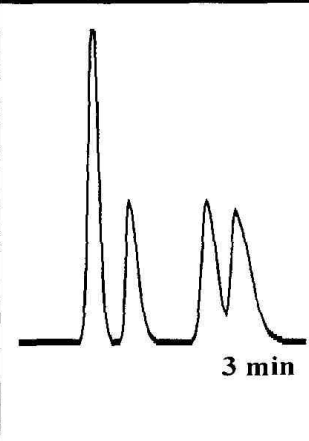
При этом варьируемые параметры называют

**параметрами оптимизации,**  
а максимизируемую функцию -  
**критерием оптимизации**

## Возникающие проблемы

- Вид функции невозможно определить алгебраически
- Значения функции можно лишь определять экспериментально в точках  
(одна точка – один эксперимент)
- Ошибки эксперимента вносят помехи
- Не совсем понятно что максимизировать

# Хроматограммы и их экспертная оценка

Chromatogram				
Estimate	<b>1.9*</b>	<b>1.5</b>	<b>4.0</b>	<b>5.6*</b>
Chromatogram				
Estimate	<b>7.3</b>	<b>8.6</b>	<b>8.7</b>	<b>8.5</b>

Критерий оптимизации должен учитывать количество пиков на хроматограмме, их разрешение и общее время анализа

# Оконные диаграммы

# Принцип – предсказать хроматограмму, не проводя эксперимент

Ограниченный  
набор  
экспериментов



Компьютерная  
модель  
(интерполяция)

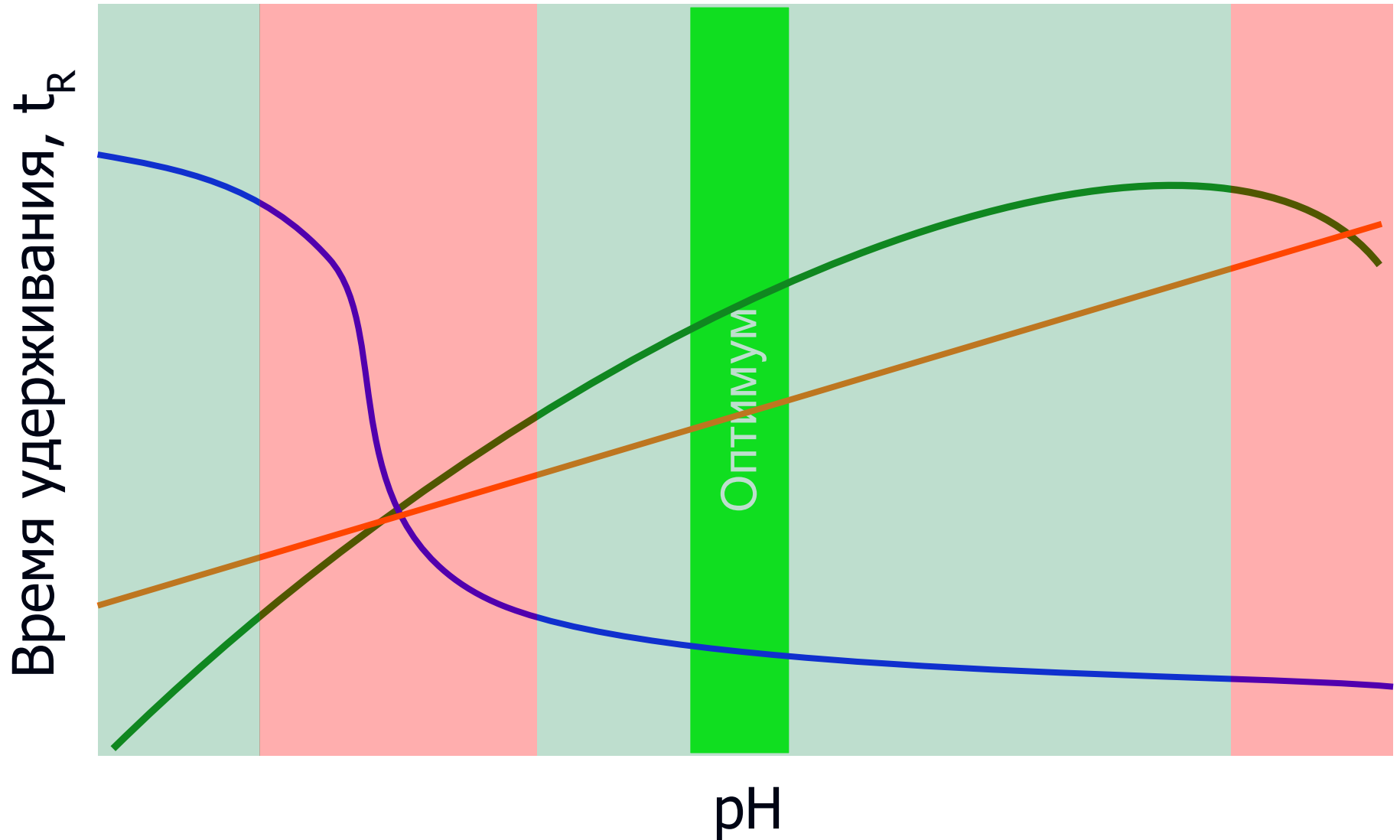


Выбор  
оптимальных  
условий



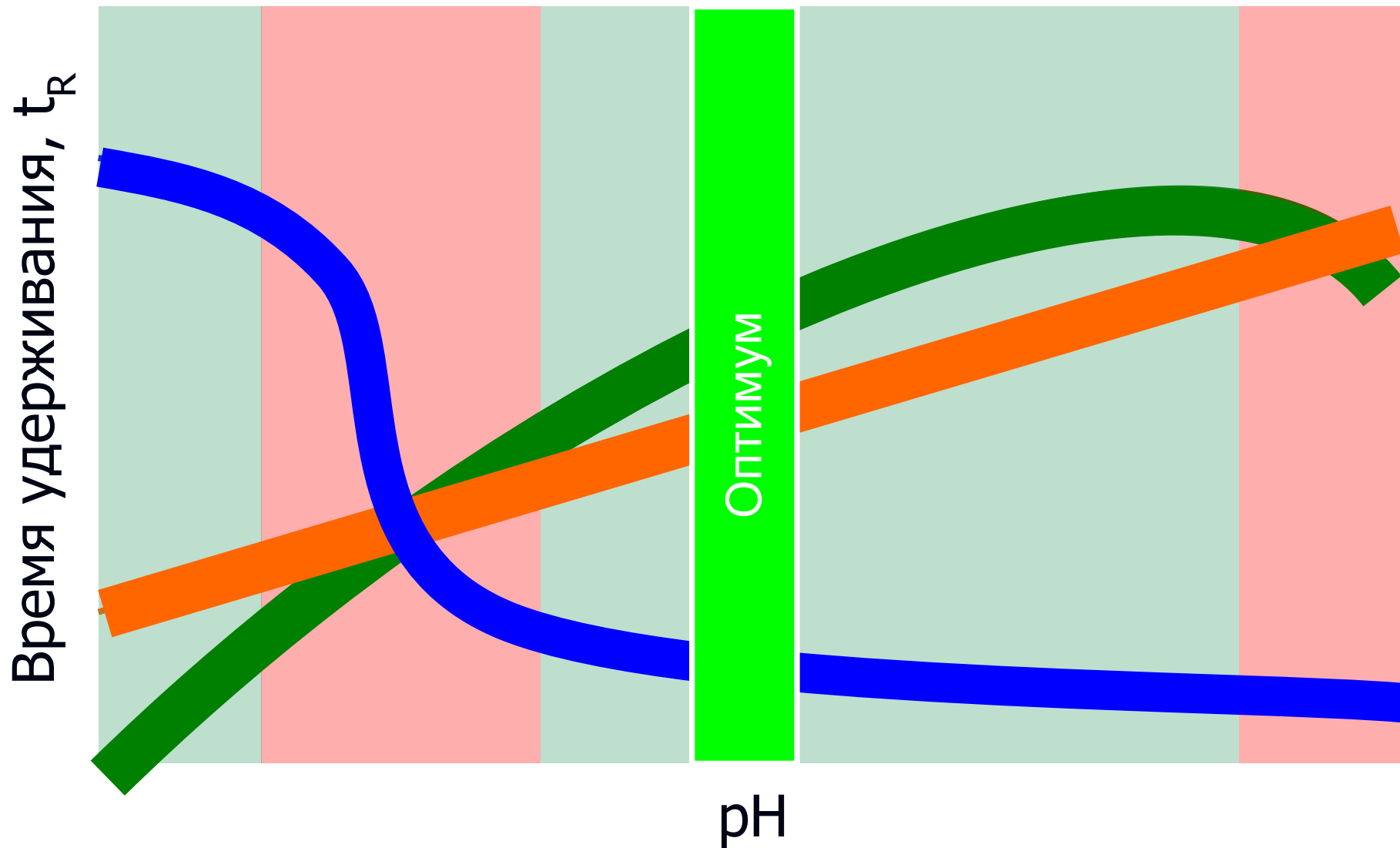
Предсказание  
( $R_s$ ,  $T_R$ ,  $\alpha$ )

# Оконные диаграммы Лауба и Пурнелля

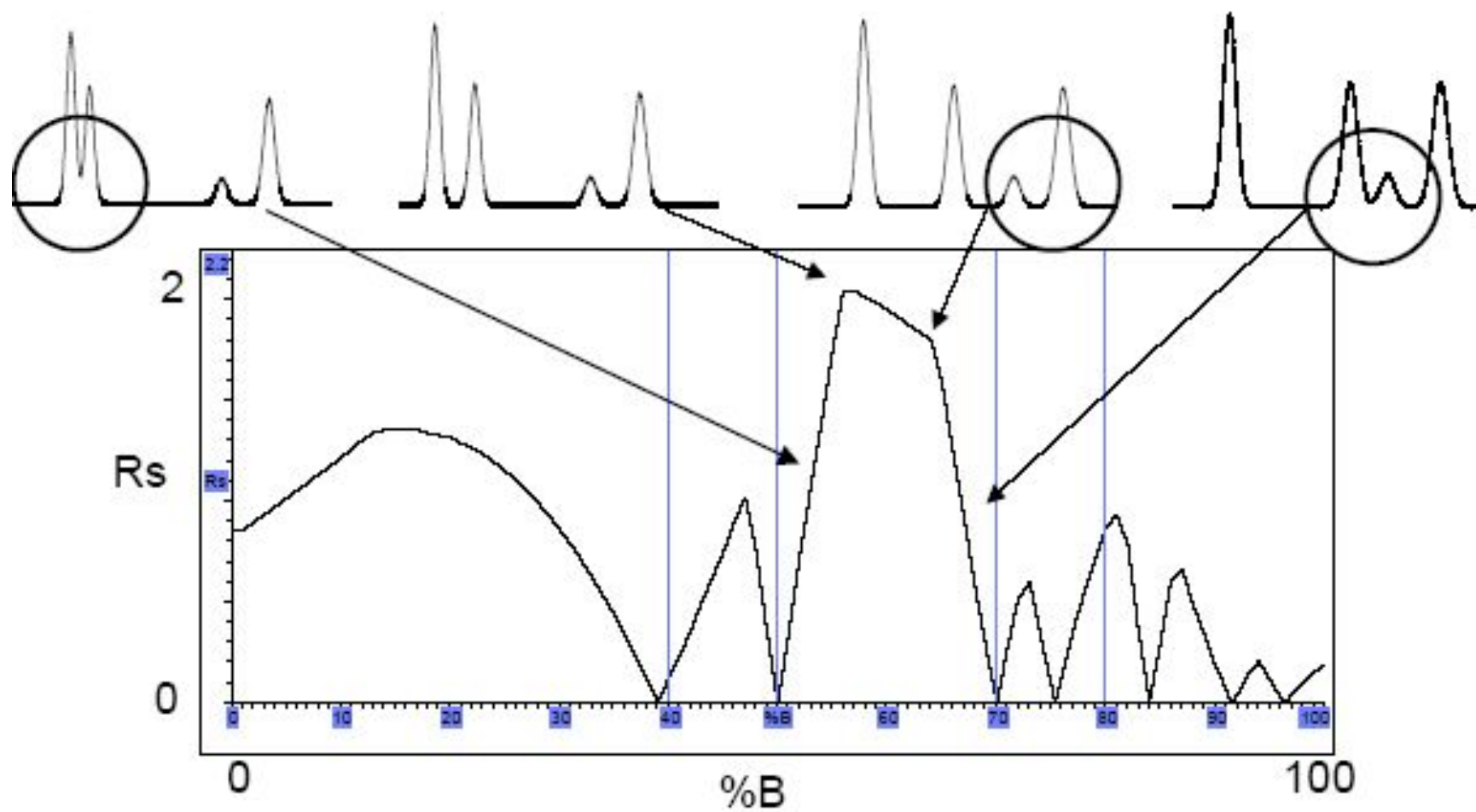




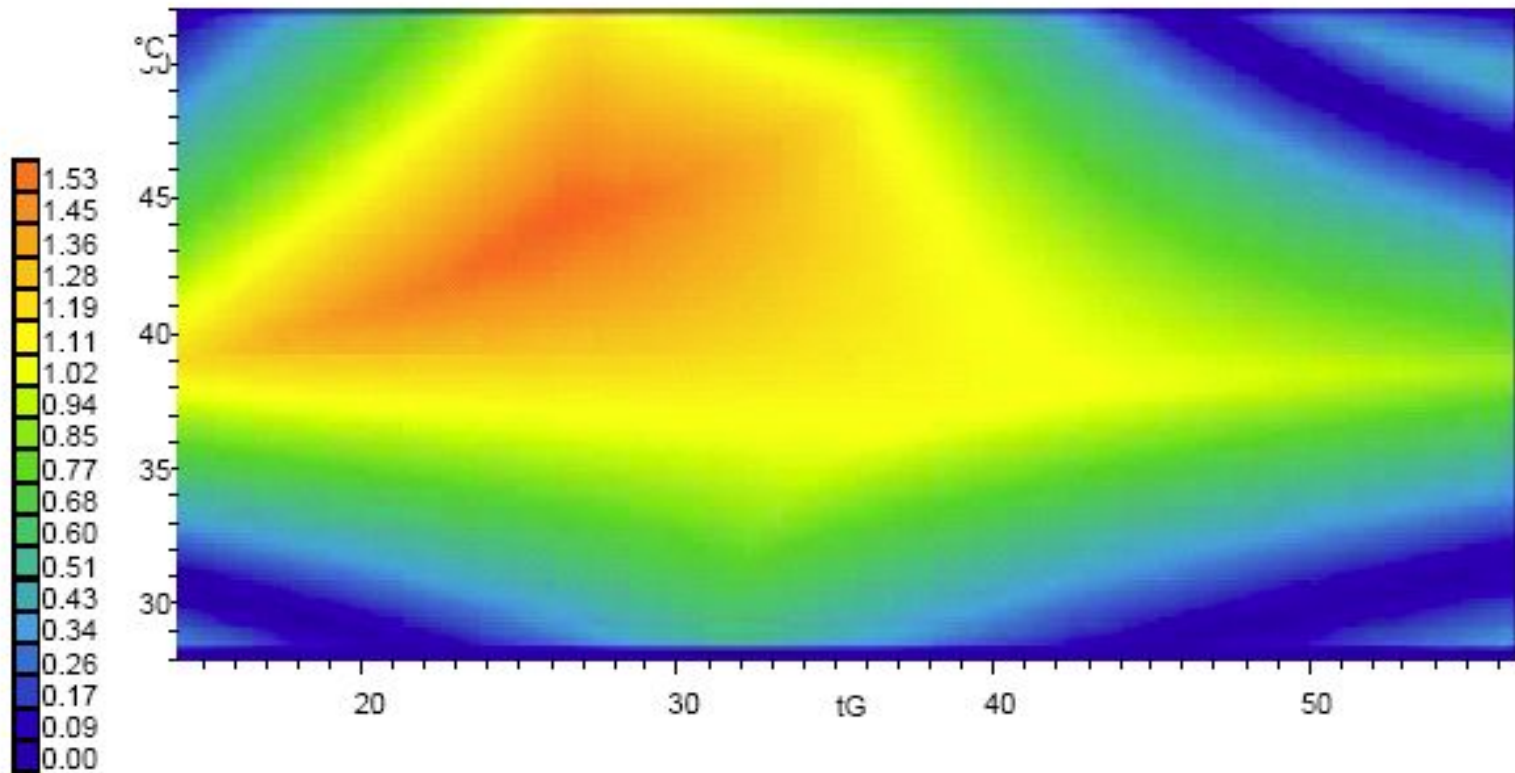
# Метод критических зон



# Resolution Map



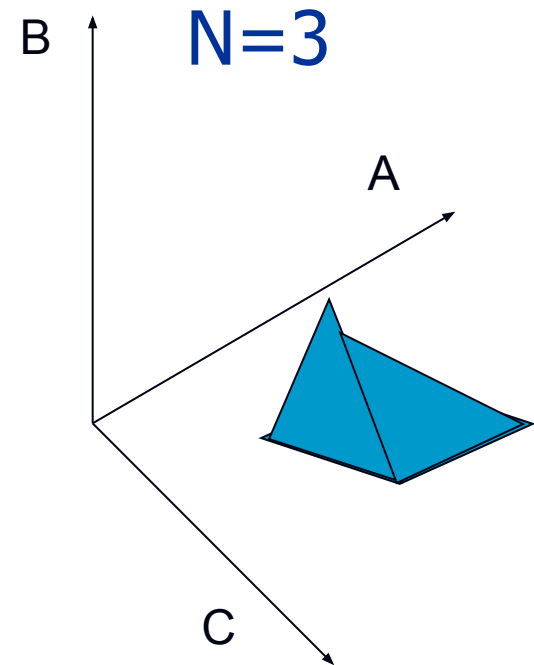
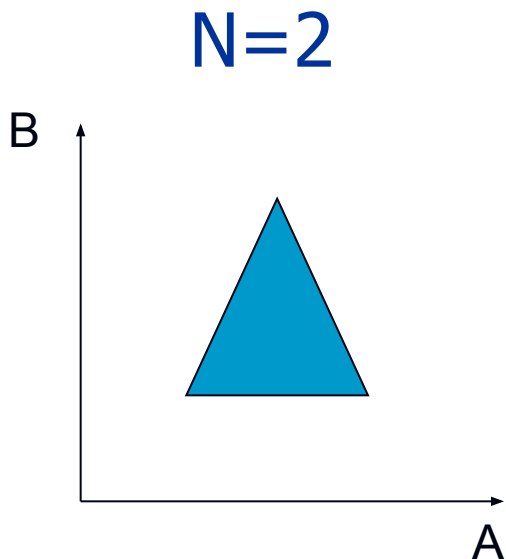
# Testosterone Resolution Map



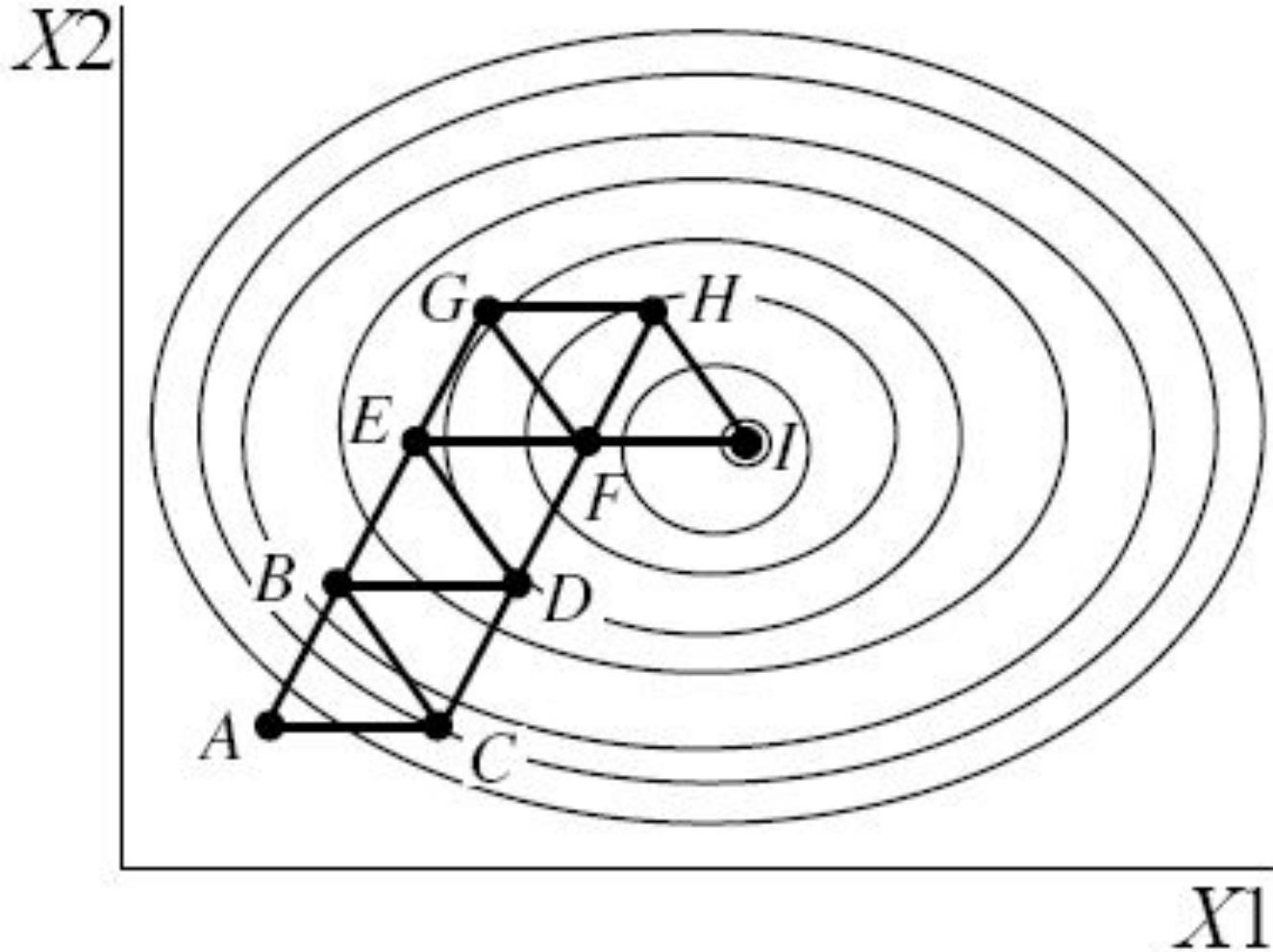
# Симплексный метод

# Симплексный метод

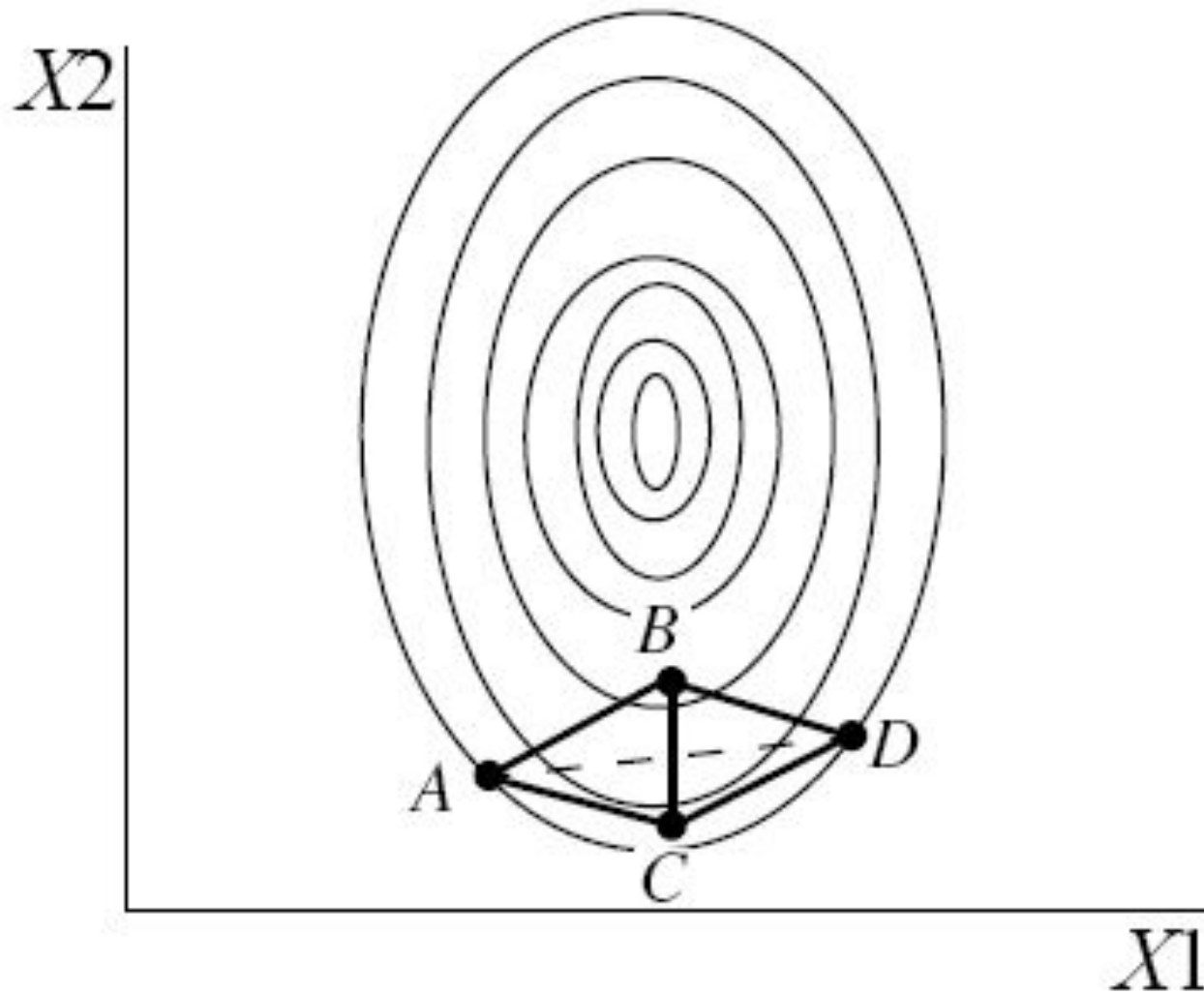
Симплекс представляет собой геометрическую фигуру в  $N+1$  мерном пространстве, где  $N$ -количество параметров оптимизации



# Движение симплекса к оптимальным условиям

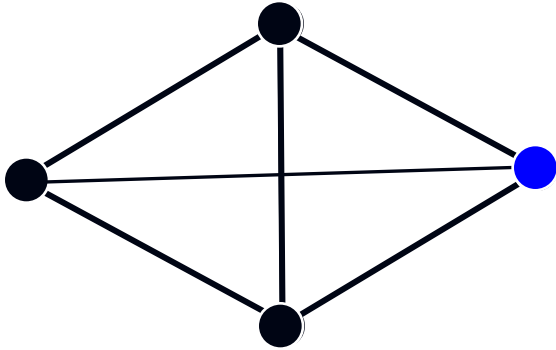


# Возможная «осцилляция» симплекса

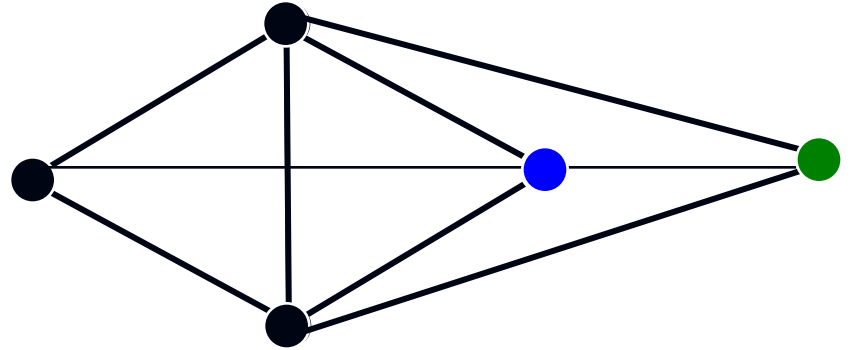


# Алгоритм Нелдера-Мида

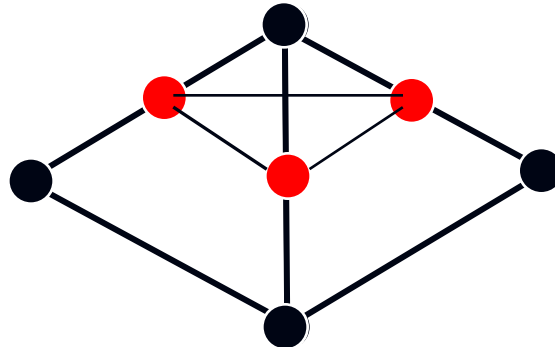
Отражение



Расширение



Массивное сжатие





# Примеры использования симплексного метода в ВЭЖХ

<b>Определяемые компоненты</b>	<b>Параметры оптимизации</b>
Фенол, 3-гидроксибензальдегид, пропилгидроксибензоат, бутилгидроксибензоат, диэтилфталат, толуол	Концентрация метанола и тетрагидрофурана в подвижной фазе
Примеси в органических соединениях	Скорость потока элюента, объем вводимой пробы
8 ароматических соединений	Концентрация метанола в подвижной фазе, скорость потока элюента
Гликозиды	Концентрация метанола, ацетонитрила и тетрагидрофурана в элюенте
Лактоны	Скорость изменения профиля градиента, температура элюента
Карбоновые кислоты в вине	pH, скорость потока элюента, температура
Алифатические амины	Концентрации ацетонитрила и ионов калия в элюенте
Органические амиды	Концентрация ацетонитрила в элюенте
Эфиры	Концентрация гексана и изопропанола в элюенте
Гентамицин	Концентрация трифторуксусной кислоты и метанола в элюенте

# Достоинства и недостатки симплексного метода

## Достоинства

- Понятен, легко программируется
- Эффективен на реальных «хроматографических» поверхностях
- Может быть применен к системе «черного ящика»

## Недостатки

- Мало получаемой информации о зависимостях качества хроматограммы от параметров оптимизации
- Число шагов к оптимуму может быть достаточно велико и резко возрастает при увеличении числа параметров

# Общие выводы

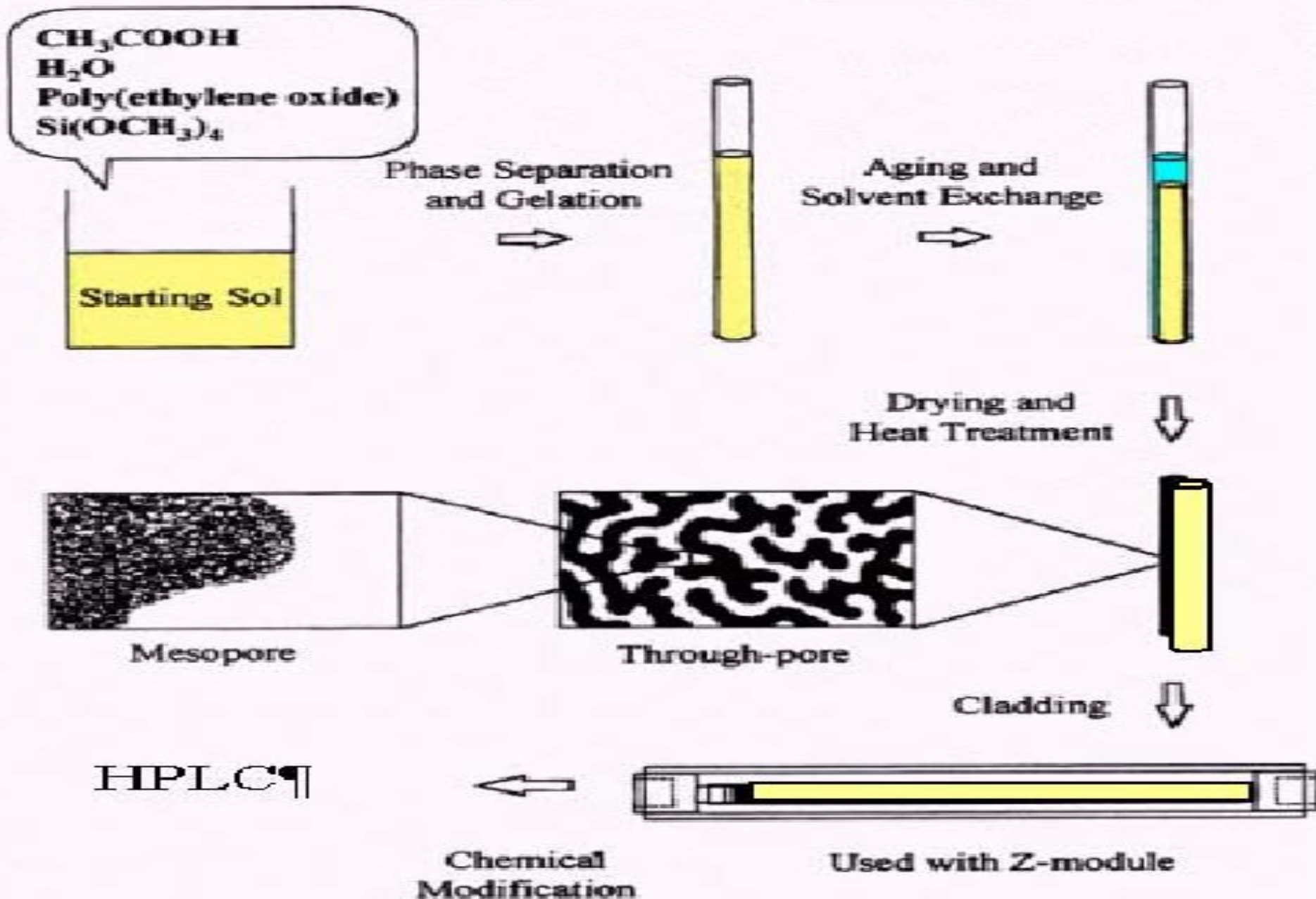
- Многие проблемы разделения веществ в ВЭЖХ можно решить с помощью варьирования **ОДНОГО** параметра
- Практически все остальные проблемы решаются варьированием **ДВУХ** параметров
- При варьировании **ТРЕХ и БОЛЕЕ** параметров необходимы компьютерные методы оптимизации
- Компьютер все еще не заменяет опыт специалиста-хроматографиста

Программное обеспечения  
для моделирования хроматограмм  
и/или поиска оптимальных условий ВЭЖХ анализа

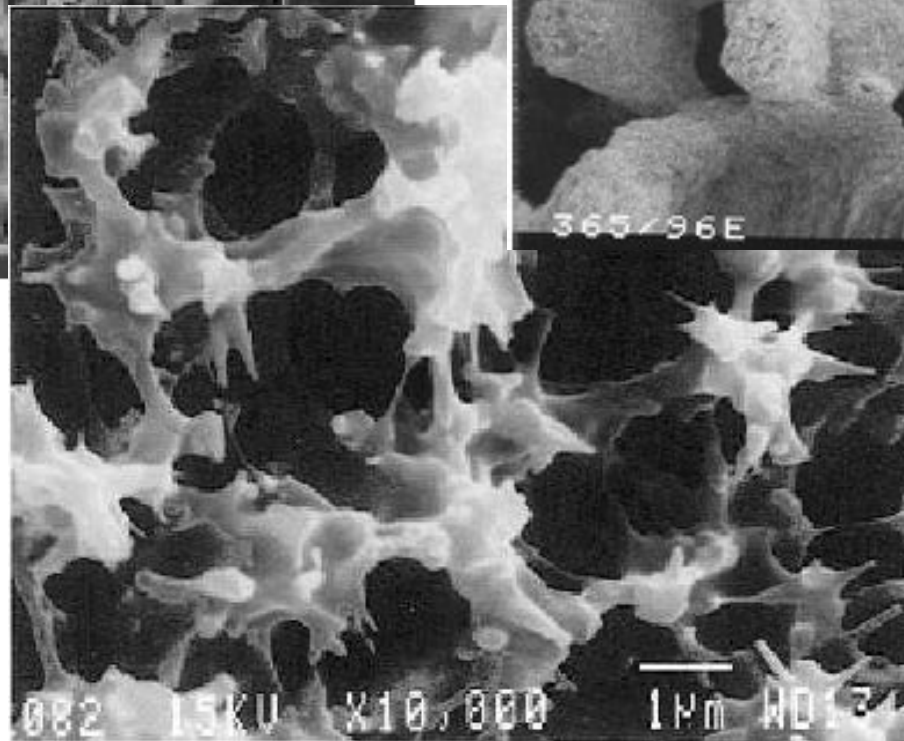
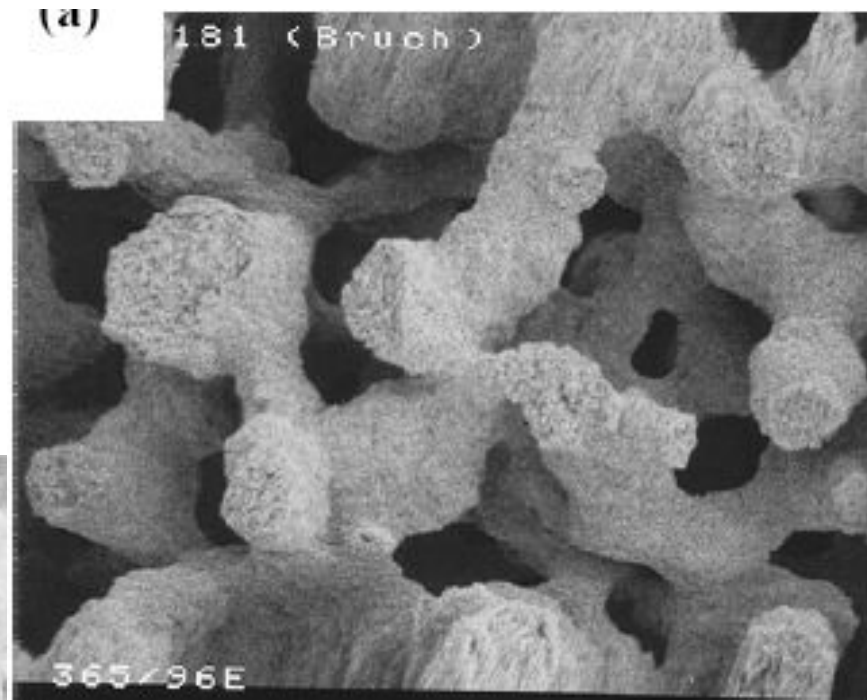
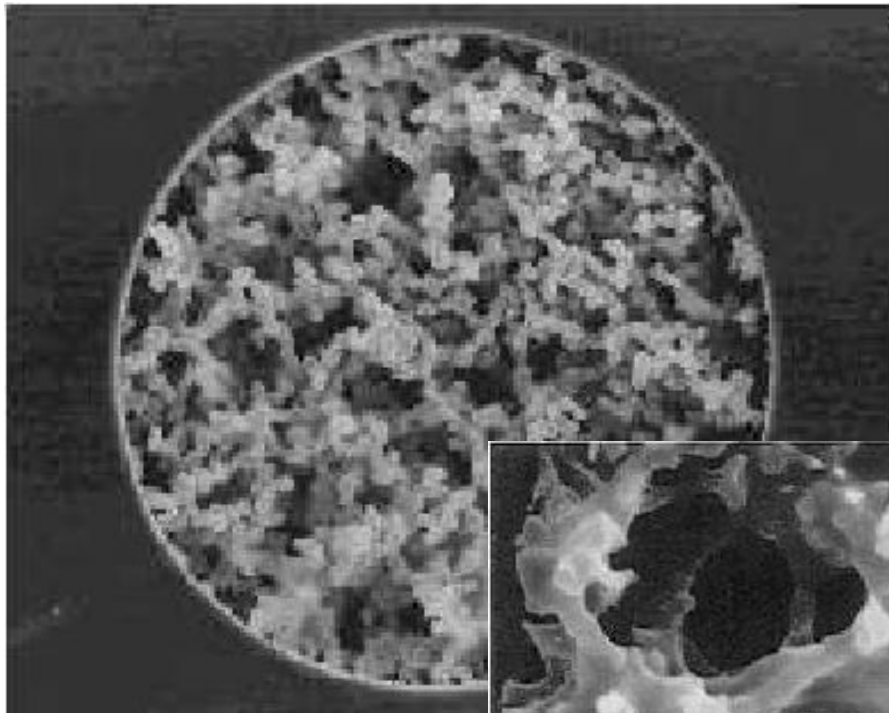
- **DryLab<sup>®</sup>** ([www.rheodyne.com](http://www.rheodyne.com))
- **ACD LC Simulator<sup>™</sup>** ([www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com))
- **ChromSword<sup>®</sup>**  
([www.iristechnologies.net](http://www.iristechnologies.net))
- **Osiris** ([www.datalys.net](http://www.datalys.net))
- **Fusion AE<sup>™</sup>** ([www.smatrix.com](http://www.smatrix.com))

Монолитные колонки,  
как альтернатива традиционным

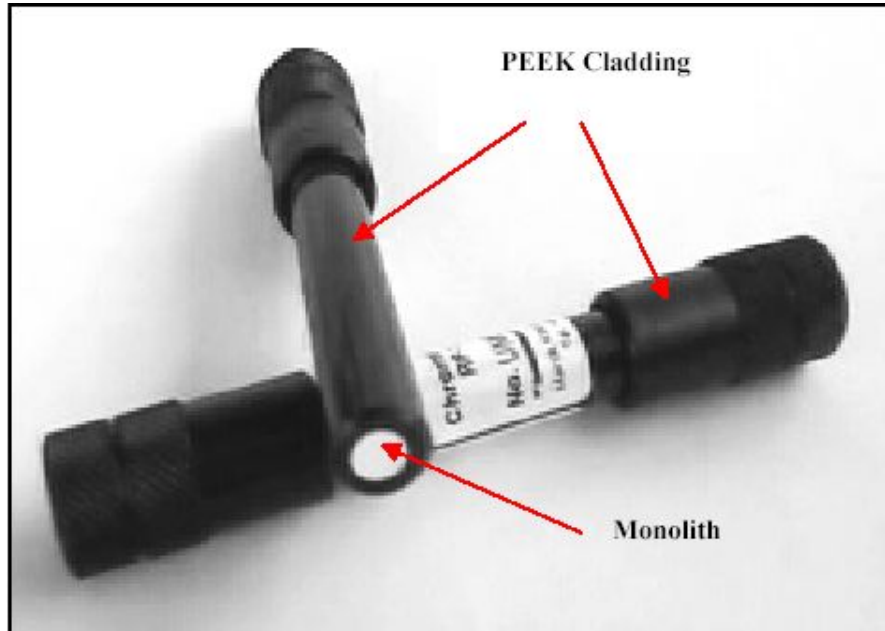
# Схема синтеза монолитных колонок



# Микрофотографии монолитных колонок

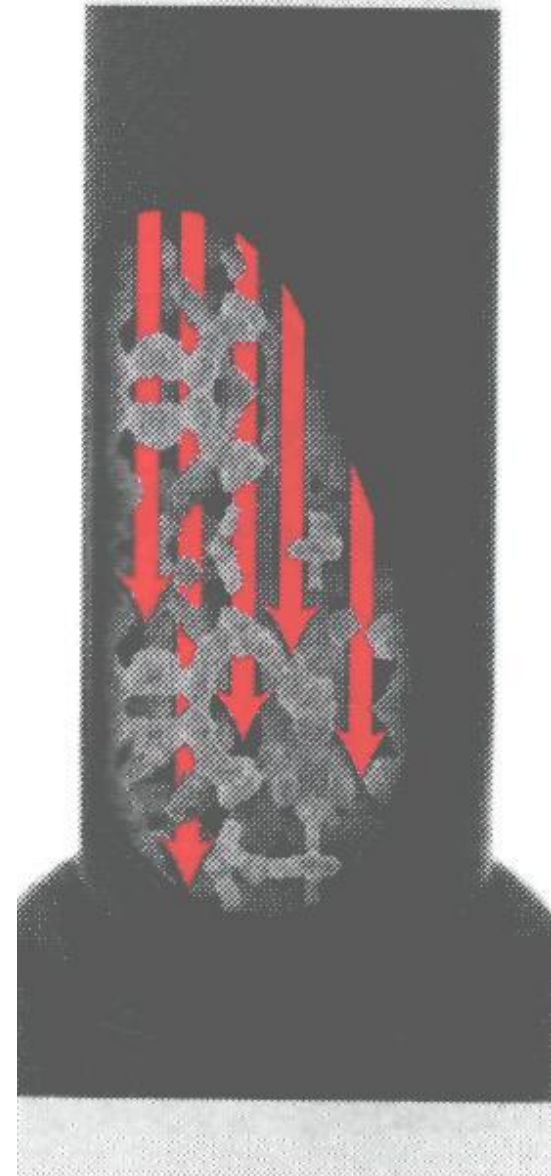
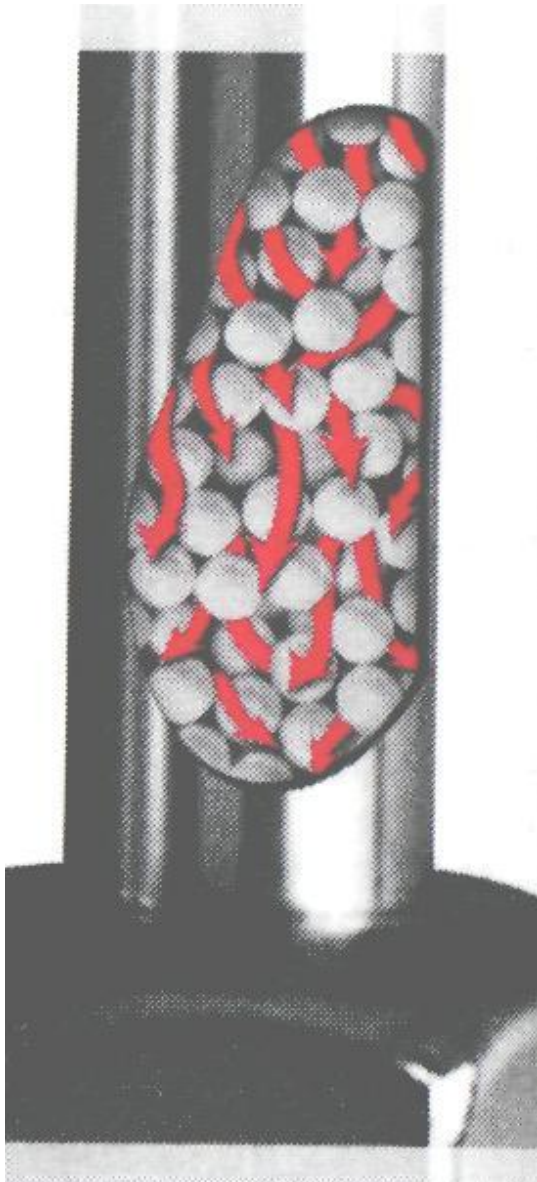


# Различные форматы монолитных колонок

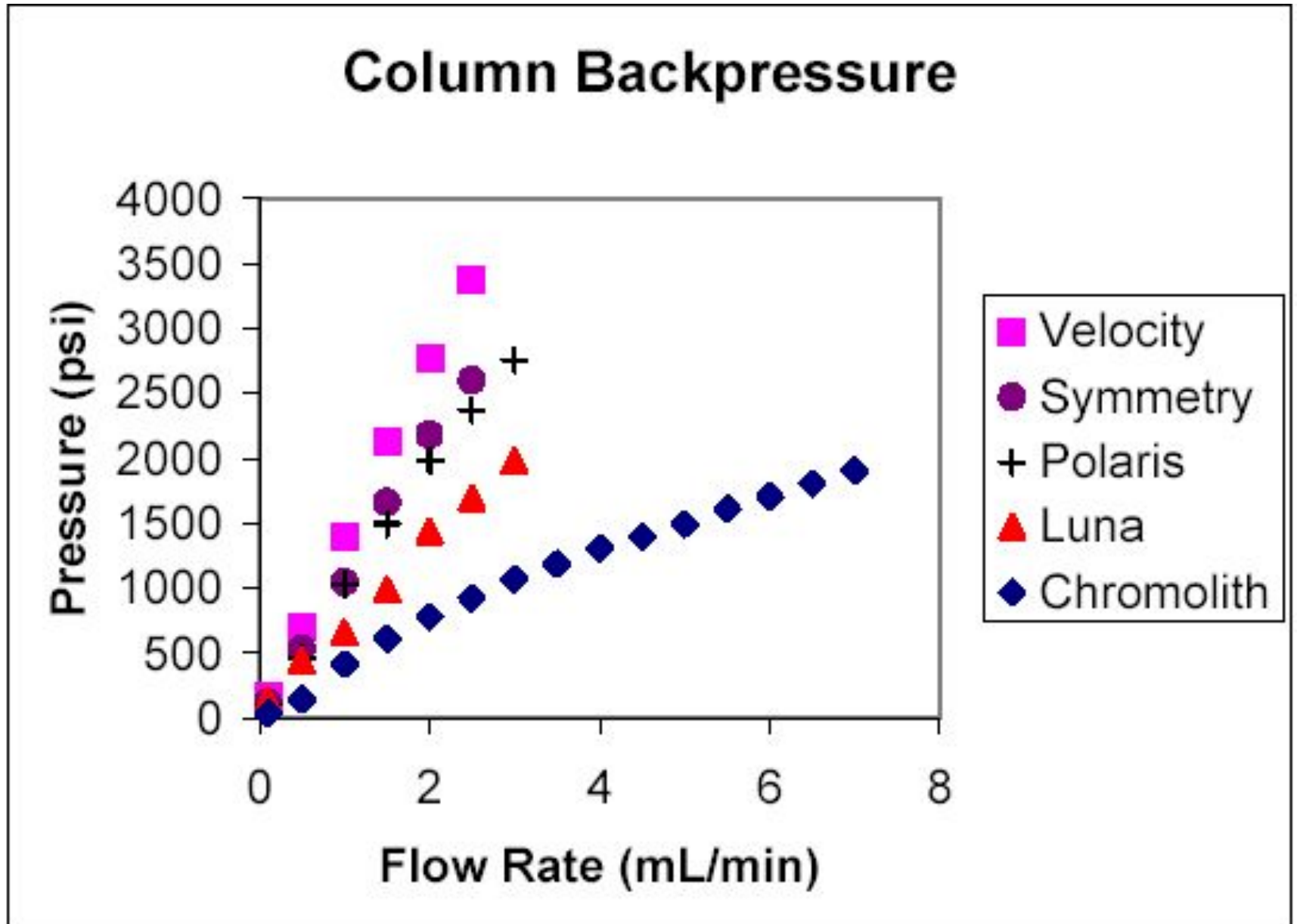




# Поток подвижной фазы в традиционной и монолитной колонке



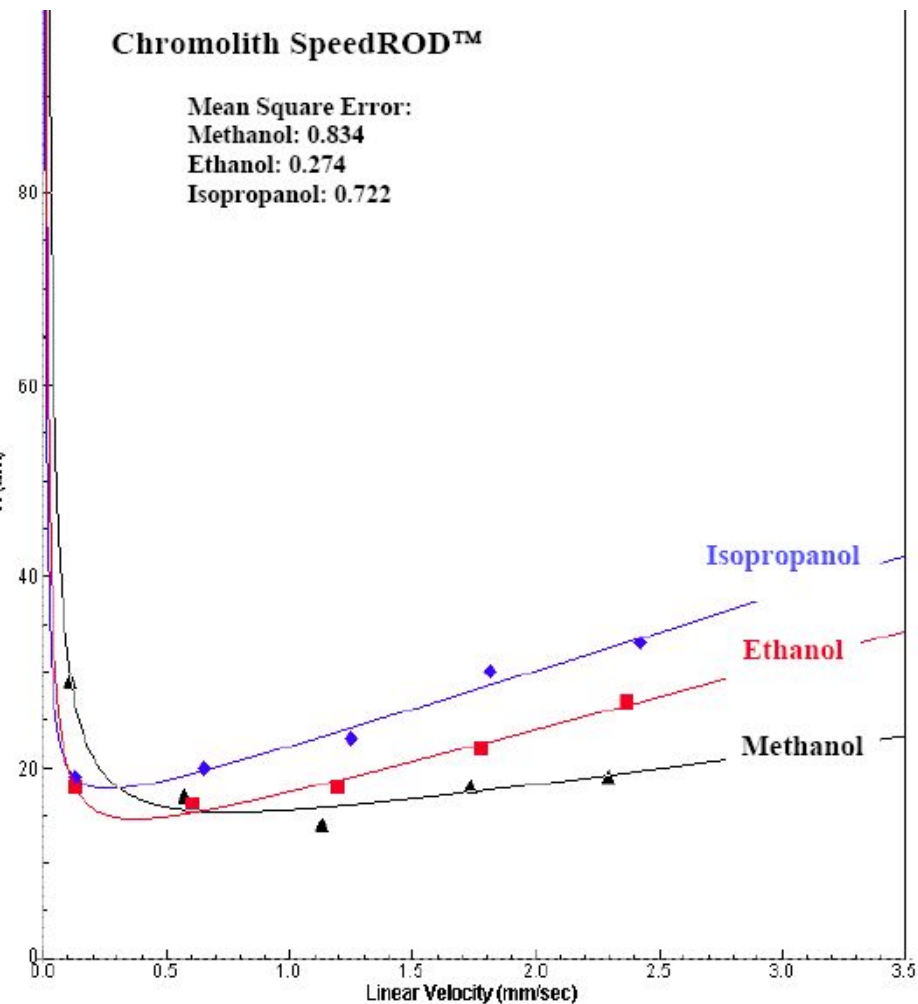
# Зависимость давления от скорости потока элюента в традиционных и монокитных колонках



# Кривая Ван-Деемпера для монолитной и традиционной колонок

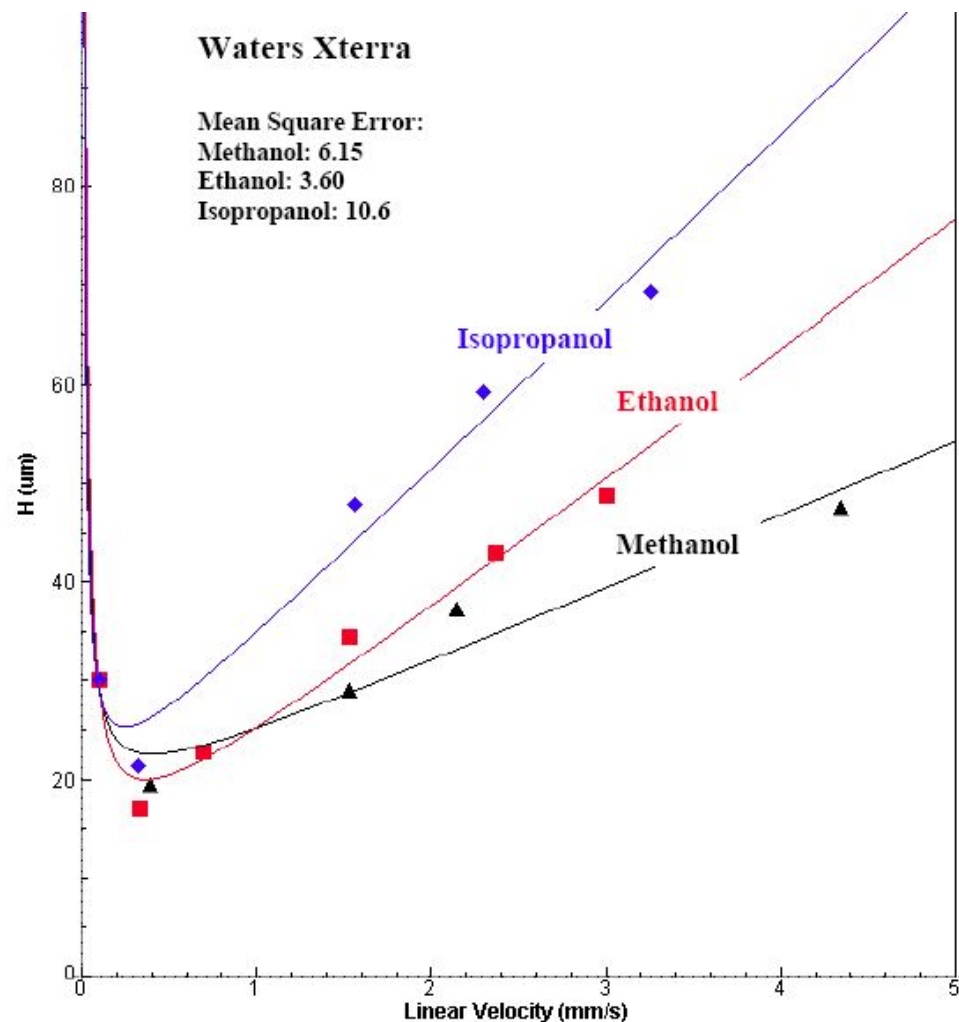
## Chromolith SpeedROD™

Mean Square Error:  
Methanol: 0.834  
Ethanol: 0.274  
Isopropanol: 0.722



## Waters Xterra

Mean Square Error:  
Methanol: 6.15  
Ethanol: 3.60  
Isopropanol: 10.6



# Пример быстрого разделения органических веществ на монолитной колонке

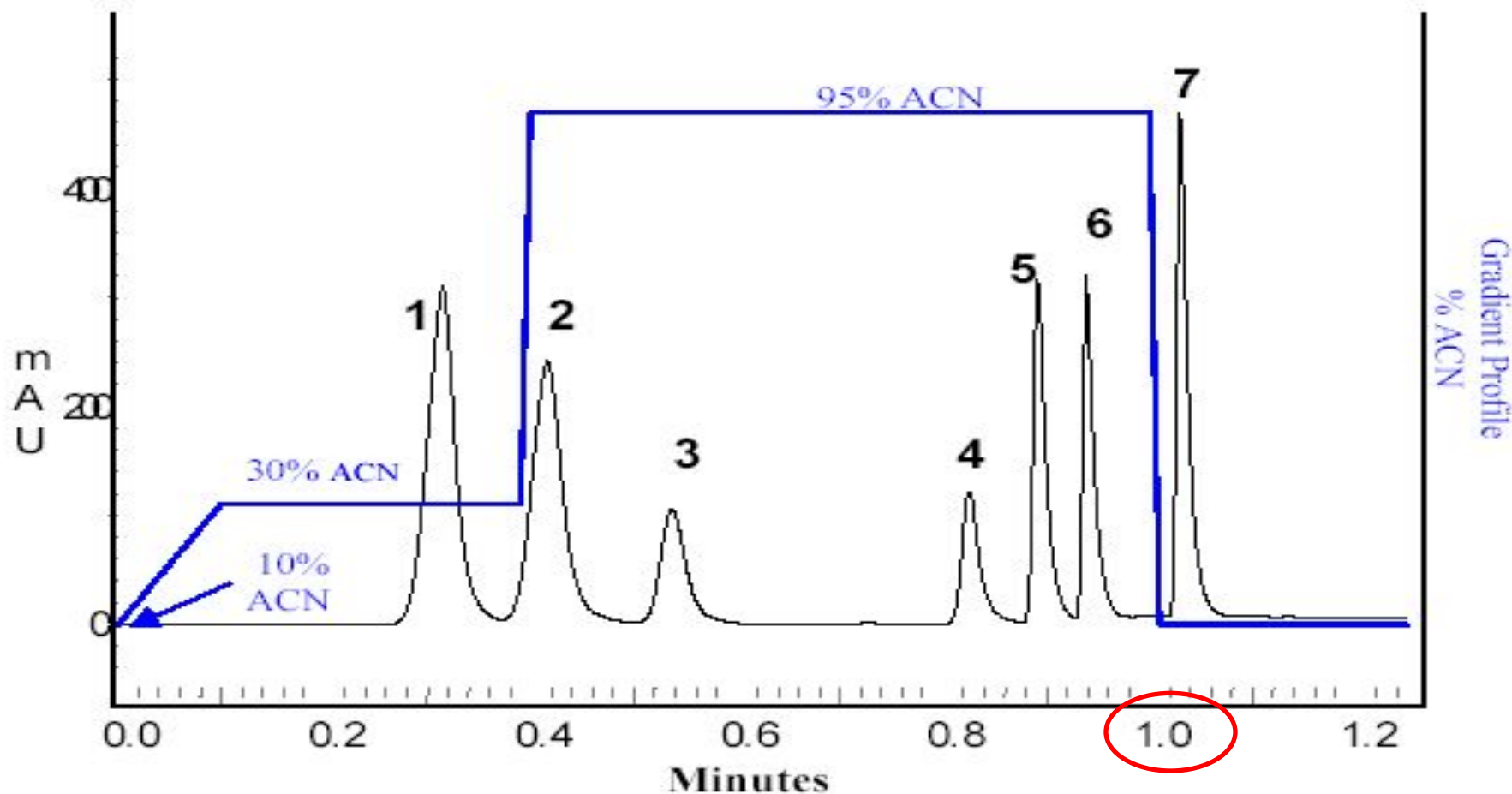


Figure 35: Chromatogram of a seven-component mixture analyzed under fast gradient conditions. Peaks as shown above: (1) benzamide, (2) N-methyl benzamide, (3) benzyl alcohol, (4) acetophenone, (5) ethyl paraben, (6) propyl paraben, (7) biphenyl, each approximately 70 ppm. Flow Rate, 8.0 mL/min, 10  $\mu$ L injection (manual). UV detection at 220 nm. Ambient temperature. Gradient conditions: 10/90 ACN/Water to 30/70 ACN/Water linearly in 0.10 minutes, hold at 30/70 for 0.30 minutes; step to 95/5 ACN/Water at 0.40 minutes hold for 0.60 minutes; then step to 10/90ACN/Water (initial conditions) at 1.01 minute

**FINISH FIRST WITH  
MONOLITHIC SILICA HPLC  
COLUMNS**

**Material Characteristics**

Packing Material	Macropore Size (µm)	Mesopore Size (Å)	Pore Volume (mL/g)	Surface Area (m <sup>2</sup> /g)	Carbon Load (%)	Calculated Bonded Phase Coverage (µmole/m <sup>2</sup> )	End Capping
Onyx Silica	2	130	1.0	300	0	0	No
Onyx C8	2	130	1.0	300	11	—	Yes
Onyx C18	2	130	1.0	300	18	3.6	Yes

*Maximum Pressure: 200 Bar; pH Range: 2.0-7.5*