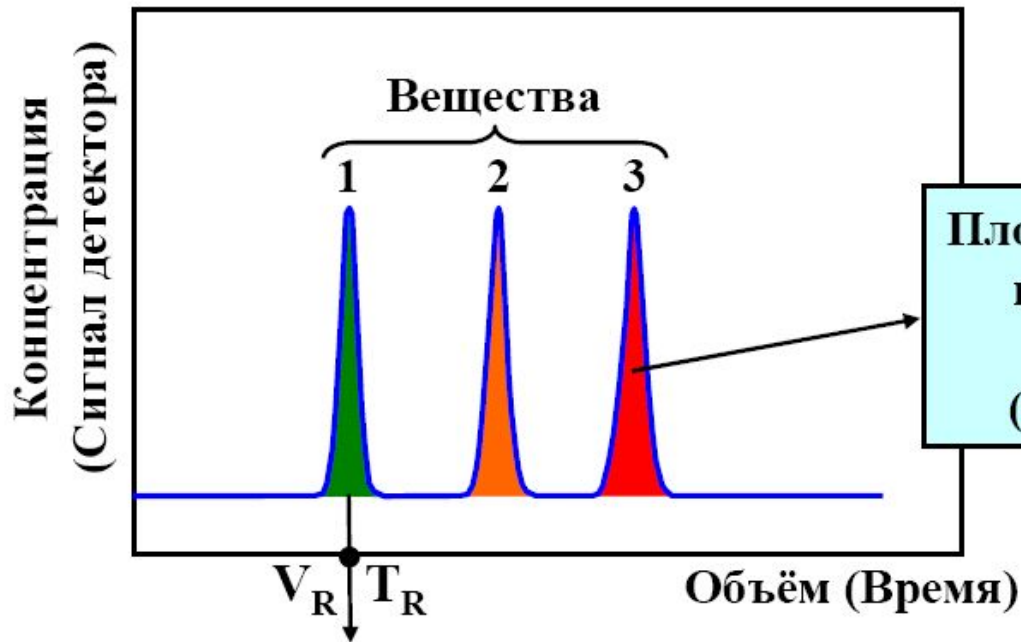


Оптимизация хроматографического процесса

Хроматографические параметры

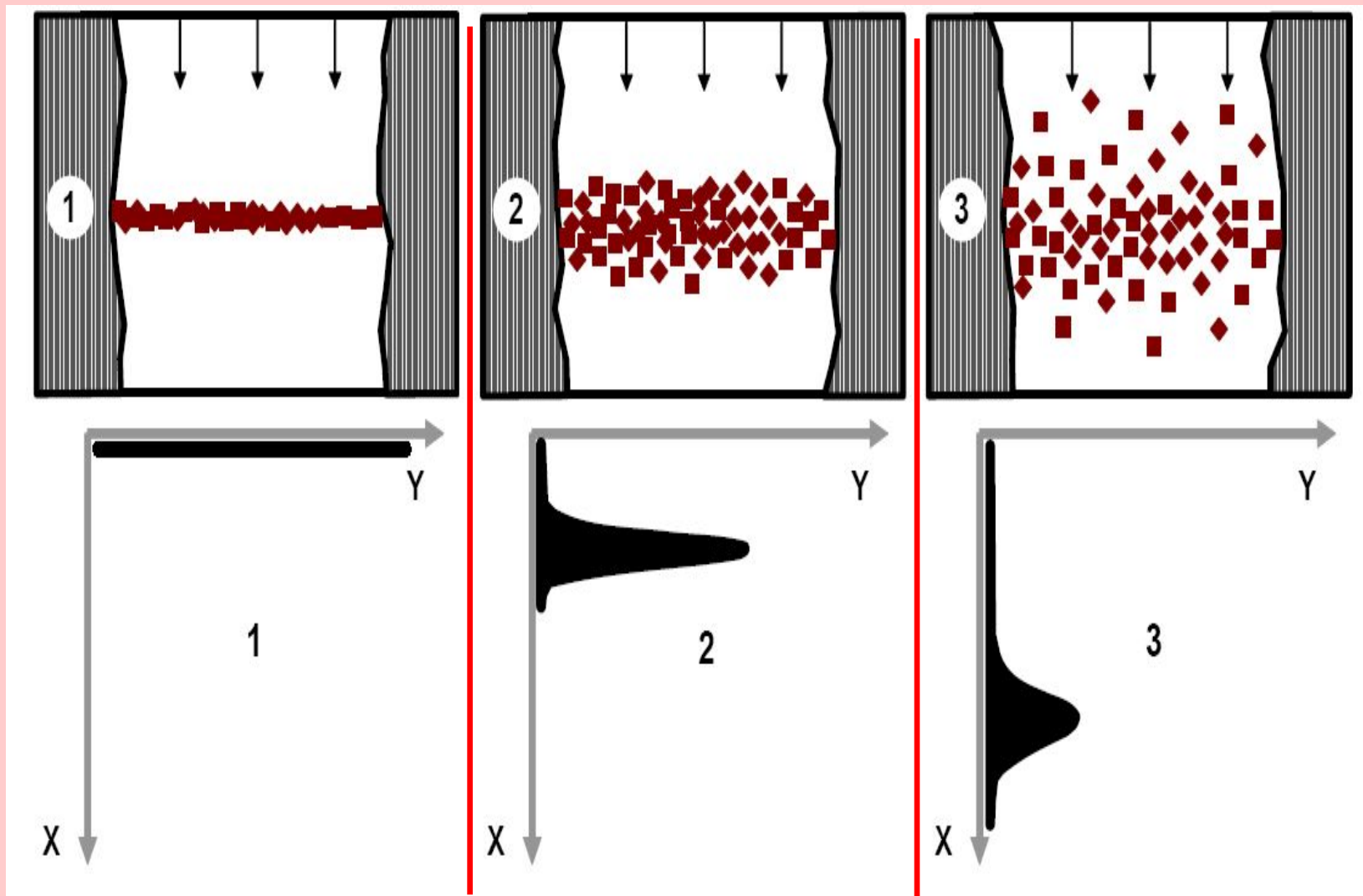
Цели разделения и анализа веществ пробы:



Площадь хроматографического пика вещества зависит от его количества
(**количественный анализ**)

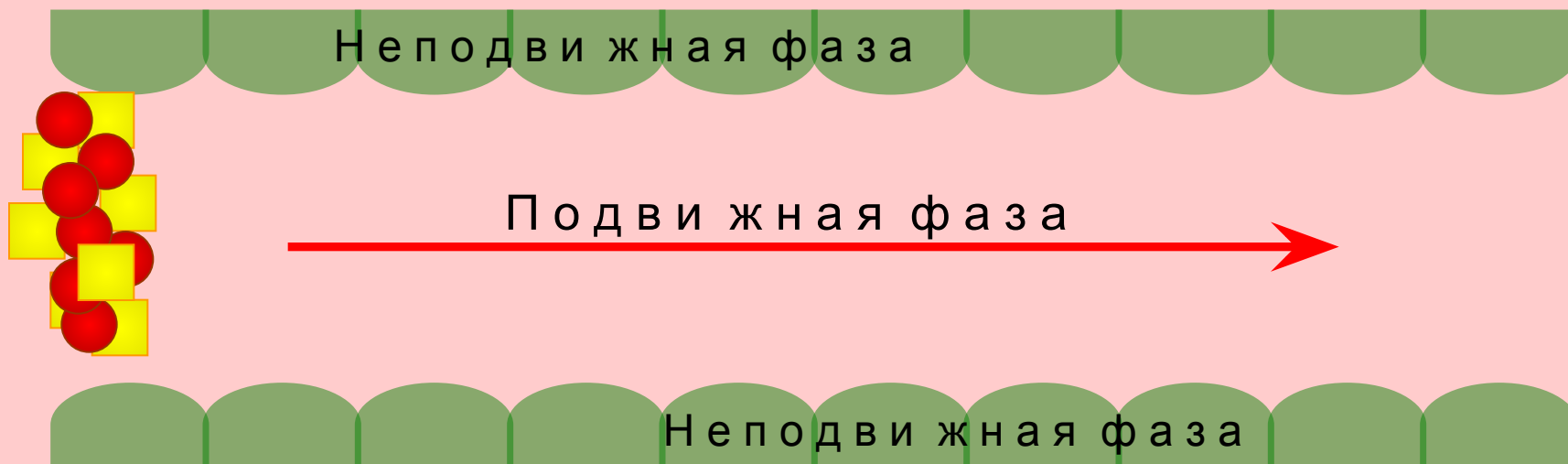
Объём или время удерживания вещества зависит от его химического строения
(**качественный анализ**)

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПИК – отражает движение молекул вещества в колонке



Формирование хроматографического пика

Перемещение молекул веществ между подвижной и неподвижной фазами



■ вещество 1

● вещество 2

время пребывания в подвижной фазе

■ = ●

время пребывания в неподвижной фазе

■ > ●

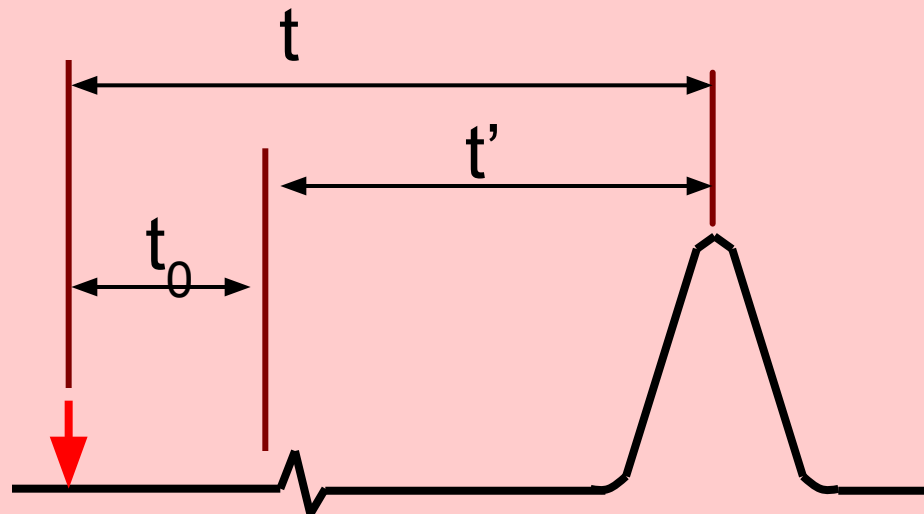
Хроматографические параметры

V_0 – свободный или мертвый объем системы, равен полному объему подвижной и неподвижной фаз в колонке;

t_0 – «мертвое» время системы, соответствует времени прохождения по колонке абсолютно не удерживаемого компонента $t_0 = V_0 / s$ (объемная скорость потока);

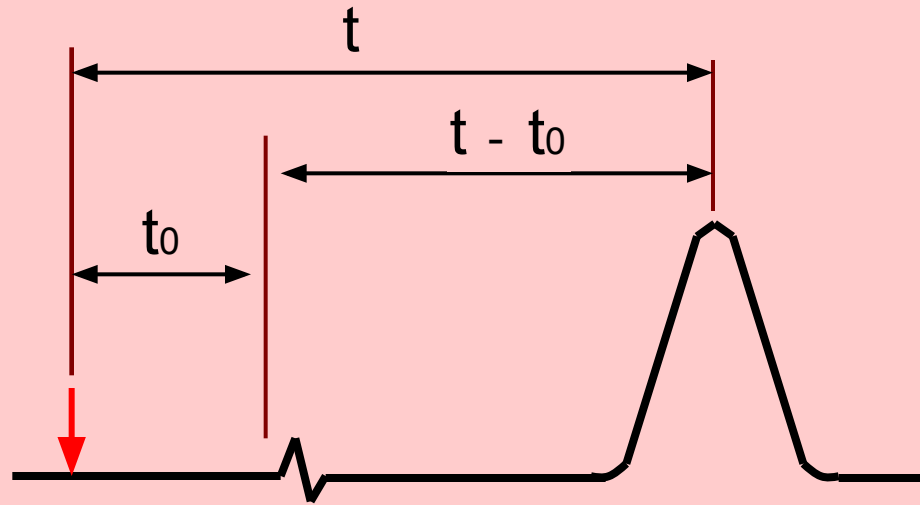
$t(V)$ – абсолютное время (объем) удерживания компонента, т.е. от момента ввода пробы до появления центра пика;

$t'(V')$ - исправленное время (объем) удерживания компонента, $t' = t - t_0$ или $(V' = V - V_0)$



Хроматографические параметры

Удерживание вещества



$$k' = \frac{t - t_0}{t_0}$$

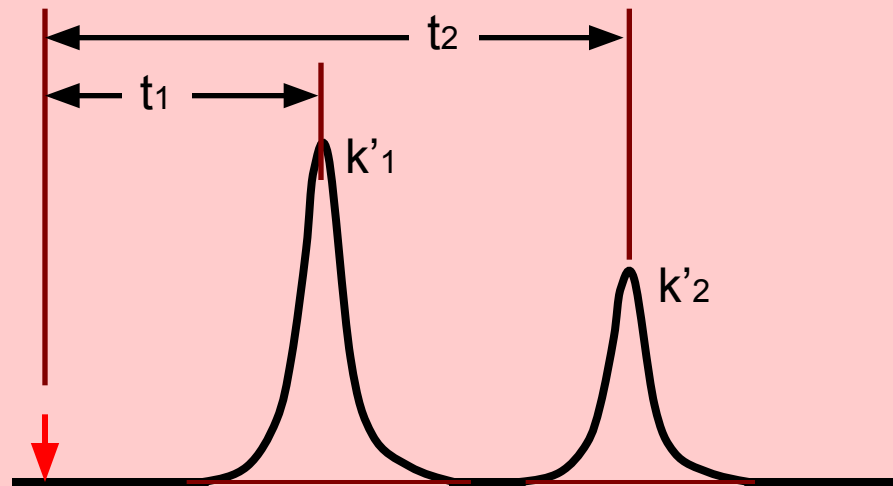
коэффициент емкости вещества;

должен быть > 0 ;

применим при данной колонке,
температуре, составе элюентов.

Хроматографические параметры

Разделение вещества



$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{t'_2}{t'_1}$$

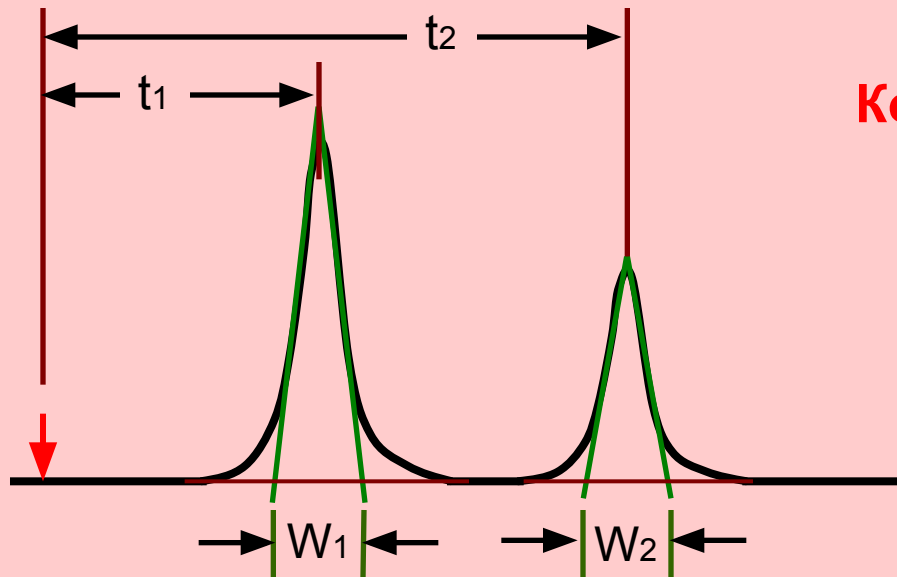
Коэффициент селективности,

определяется соотношением
исправленных времен удерживания,

должен быть $\neq 1$.

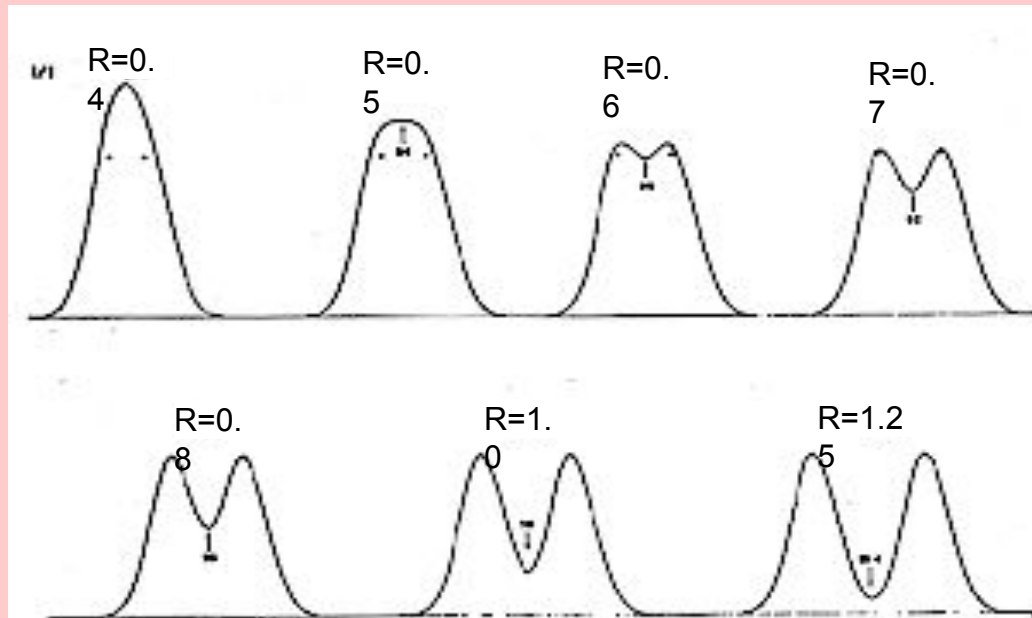
Хроматографические параметры

Разделение вещества



Коэффициент разрешения

$$R = 2 \cdot \frac{t_2 - t_1}{W_1 + W_2}$$



Хроматографические параметры

ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Число теоретических тарелок (N) – физический смысл:

- число элементарных актов сорбции-десорбции, произошедших с веществом при его движении по колонке;

Высота, эквивалентная теоретической тарелке (H) – физический смысл:

- высота слоя сорбента в колонке, на котором происходит единичный акт сорбции-десорбции.

$$H = \frac{L}{N} \quad \Rightarrow \quad \text{эффективность прямо пропорциональна длине колонки,}$$

где L - длина колонки.

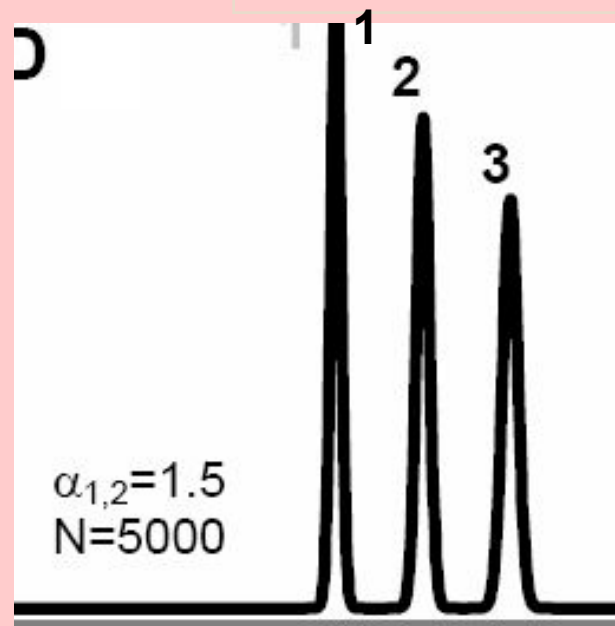
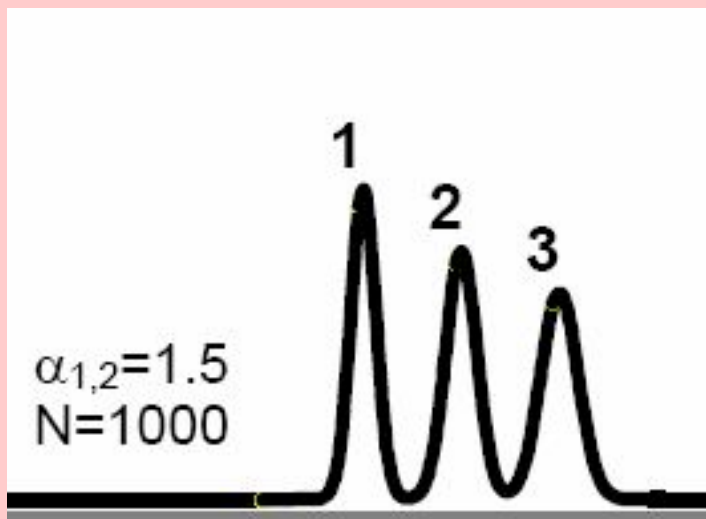
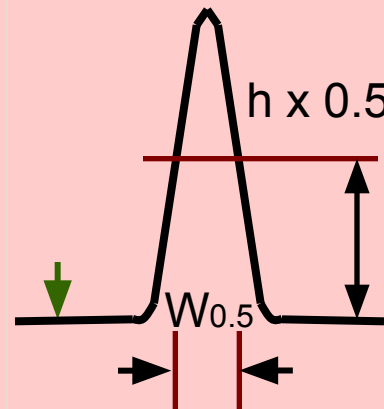
ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Чем эффективнее **колонка**, тем уже пик, тем большее число компонентов можно разделить за более короткое время.

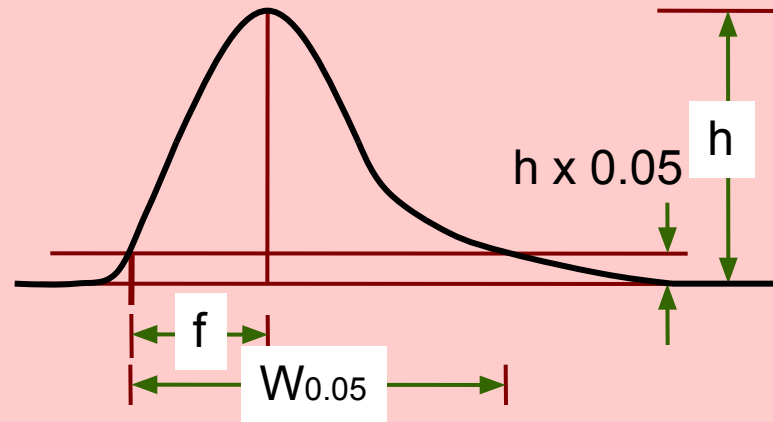
Количественно эффективность колонки выражают **числом теоретических тарелок N**.

Расчет числа т.т.

$$N = 5.545 \left(t / W_{0.5} \right)^2$$



Ассиметрия пиков



S – фактор симметрии

$$S = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

$S = 1$: Пик симметричен

$S > 1$: Наличие хвоста

$S < 1$: Наличие «бороды»

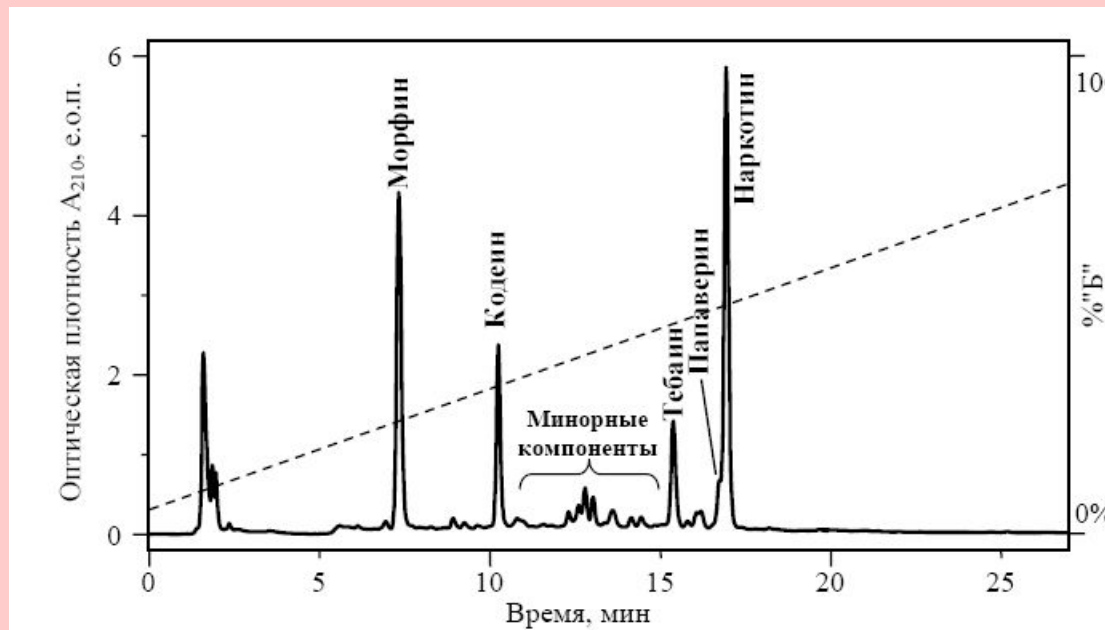
ОСНОВНАЯ ЗАДАЧА ОПТИМИЗАЦИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Получить хорошее разрешение (разделение) интересующих хроматографических пиков в разумно короткое время без потери эффективности (т.е., составить оптимальную хроматографическую систему, используя:

доступные адсорбенты,

набор растворителей,

и эксплуатационные возможности прибора (температура, скорость потока).



ОПТИМИЗАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Выбор вида хроматографии

*Определяется: а) задачей исследования,
б) свойствами, типом разделяемых веществ.*

Определение (выделение)
крупного класса органических
соединений, загрязнителей,
пищевых компонентов и т.п.



- Экстракция
- Тонкослойная хроматография
- Бумажная хроматография
- Колоночная хроматография
низкого давления
- Электрофорез

Определение (выделение)
индивидуальных (или небольшой группы)
органических соединений, загрязнителей,
пищевых компонентов и т.п.



- Газовая хроматография
- Высокоэффективная
жидкостная хроматография

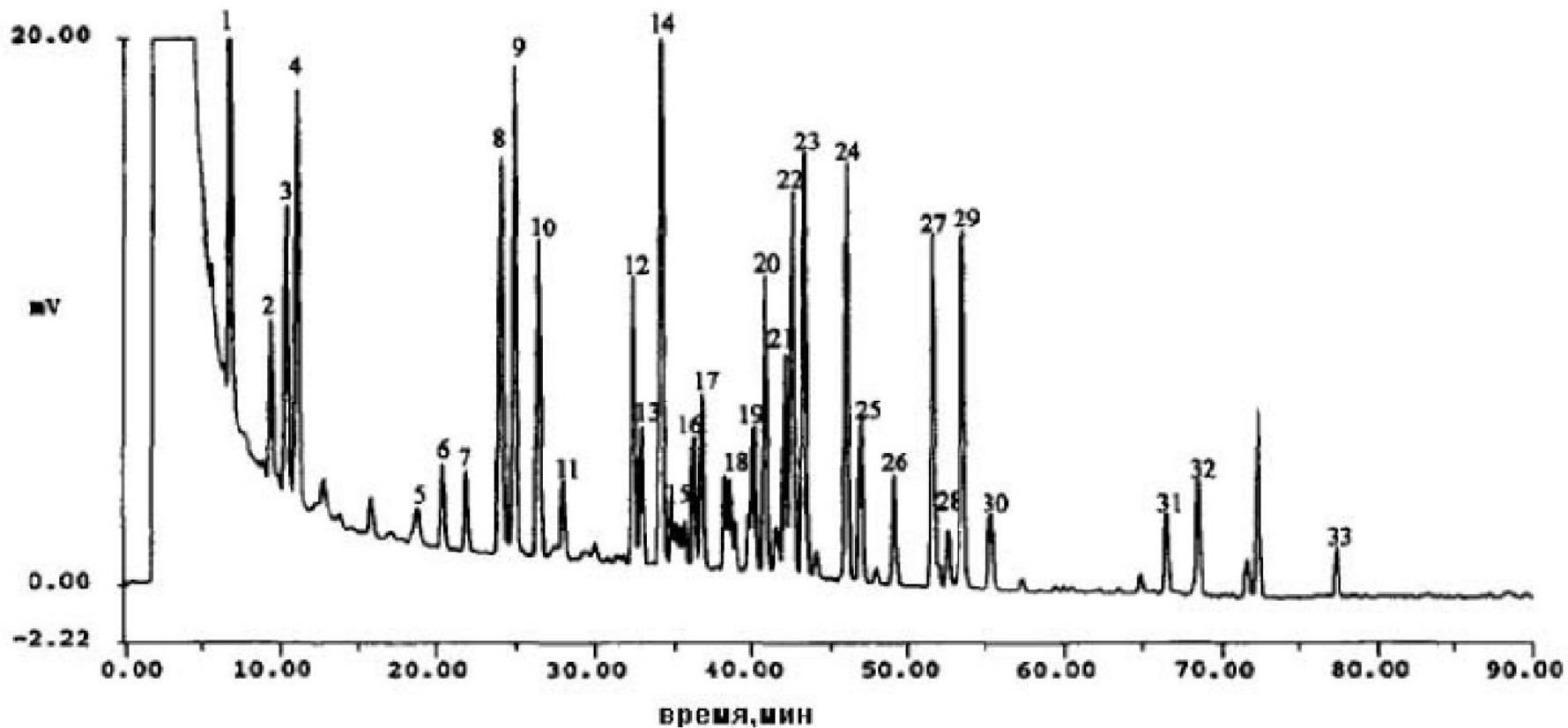
Выбор вида хроматографии для индивидуальных компонентов: газовая или высокоэффективная жидкостная?

ВЭЖХ



Примеры использования различных видов хроматографии для разделения биоорганических соединений и органических загрязнителей:

1. Классы липидов – ТСХ
2. Органические кислоты (цикл Кребса) – ТСХ, бумажная хроматография
3. Пигменты растений, животных – ТСХ, ВЭЖХ
4. Белки, пептиды – электрофорез, ВЭЖХ
5. Аминокислоты - ВЭЖХ, на ионообменных смолах
6. Углеводы, мономеры - ВЭЖХ, ТСХ
7. Витамины, кофакторы – ВЭЖХ
8. Эфирные масла, жирные кислоты, стерины – ГХ
9. Углеводороды, фенолы, их производные – ГХ, ВЭЖХ
10. Полимеры, олигомеры – ВЭЖХ, гель-проникающая
11. Синтетические орг. соединения - ГХ, ВЭЖХ



ВЭЖХ хроматограмма воды с добавкой **пестицидов** (0,2 мг/л) после сорбционного концентрирования: 1 – дис-изопропилатразин; 2 – метамитрон; 3 – хлордиазон; 4 – дис-этилатразин; 5 – кримидин; 6 – карбетамид; 7 – бромацил; 8 – симазин; 9 – цианазин; 10 – дис-этилтербутилазин; 11 – карбутилат; 12 – метабензтиазурон; 13 – хлортолурун; 14 – атразин; 15 – монолинурун; 16 – изопротурон; 17 – метазахлор; 18 – метапротрин; 19 – димефурун; 20 – себутилазин; 21 – пропазин; 22 – тетбутилазин; 23 – линурун; 24 – хлорхурун; 25 – прометрин; 26 – хлорпрофарм; 27 – тербутрин; 28 – метолахлор; 29 – пенцицурун; 30 – бифенокс; 31 – пердиметалин.

ОПТИМИЗАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

- Выбор адсорбента (неподвижной фазы) в ВЭЖХ или ГХ определяется характером разделяемых веществ:

ВЭЖХ: Силикагели, привитые неполярные фазы, ионообменные смолы

ГХ: Кремнийорганические неполярные и малополярные фазы, органические полярные фазы

- Выбор состава элюента: может включать несколько растворителей с разными пропорциями

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

Элюотропный ряд – повышение силы элюента в ВЭЖХ, ϵ

ОПТИМИЗАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Элюотропные ряды зависят от типа используемого адсорбента и фактически отражают полярность растворителей

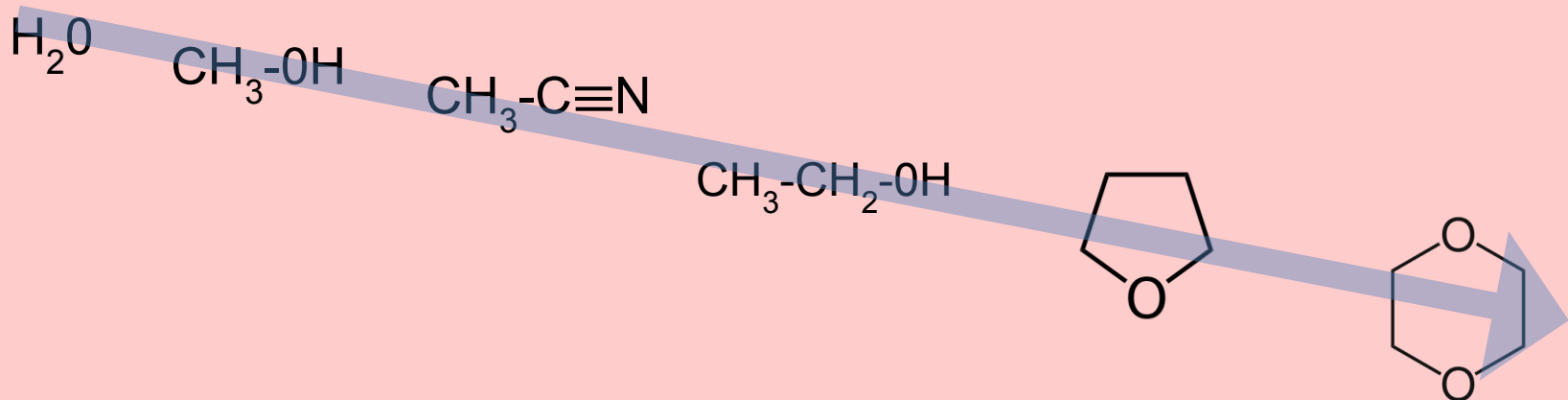
Элюотропный ряд - для нормально-фазовой ВЭЖХ

гексан < бензол < хлороформ < ацетон < ацетонитрил < пропанол < метанол

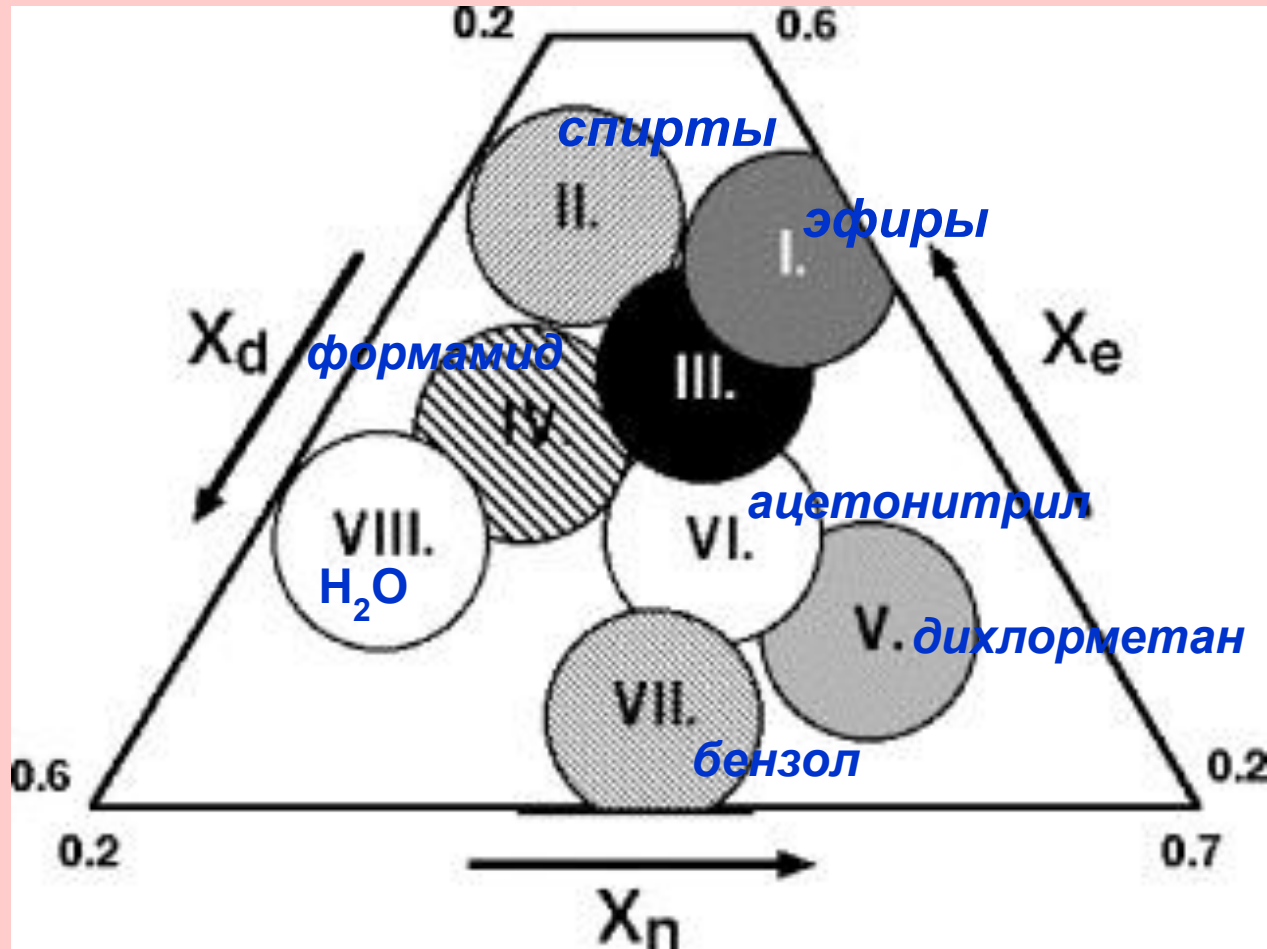
ϵ воды > 1, т.е. растворитель необратимо адсорбируется на поверхности адсорбента

Элюотропный ряд - для обращенно-фазовой ВЭЖХ

вода < метанол < ацетонитрил < этанол < тетрагидрофуран < диоксан



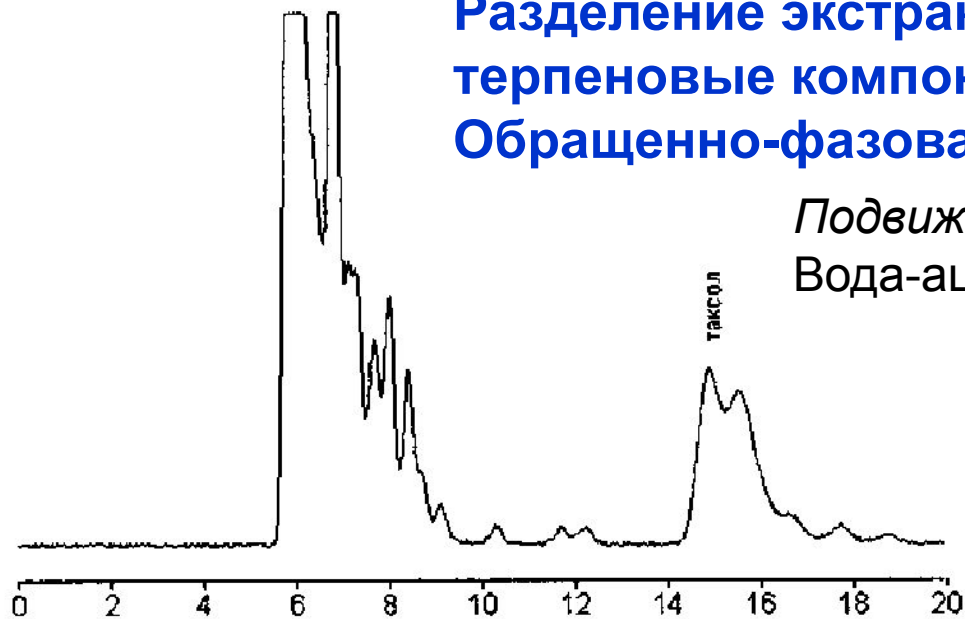
Классификация селективности растворителей по Снайдеру



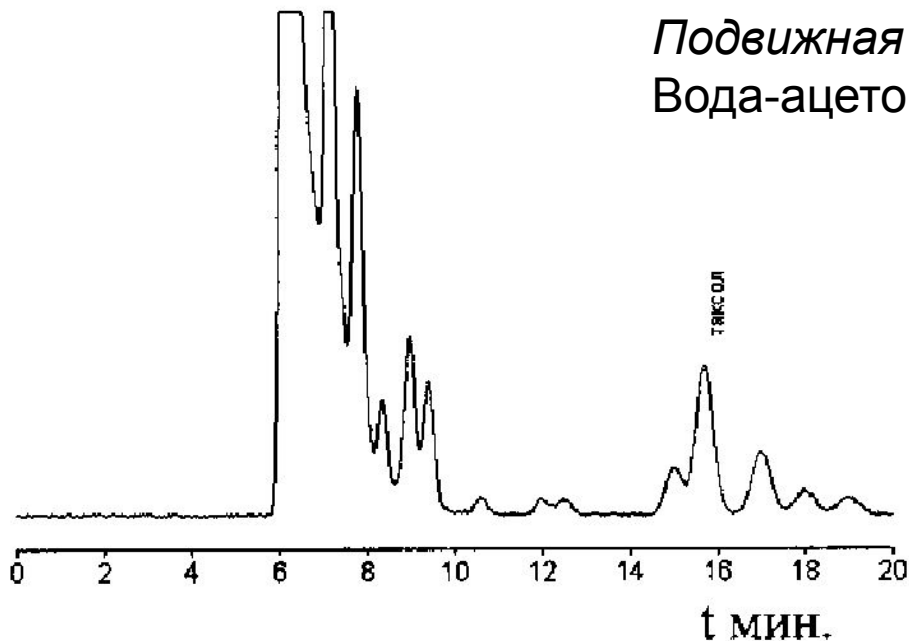
- X_d - протонакцепторные взаимодействия
- X_e – протондонорные взаимодействия
- X_n – диполь-дипольные взаимодействия

Разделение экстракта ягод тиса, терпеновые компоненты, Обращенно-фазовая ВЭЖХ

Подвижная фаза:
Вода-ацетонитрил 40:60



Подвижная фаза:
Вода-ацетонитрил-метанол 40:30:30



Для улучшения селективности и разделения возможны добавки солей, ионообразующих органических соединений, ведущие к изменению взаимодействий адсорбента и аналитов

Chromatographic conditions

The HPLC method presented here for the analysis of dyes is based on ion-pairing reversed-phase chromatography. UV spectra were evaluated as an additional identification tool.⁶

Sample preparation	injection without further preparation
Column	125 x 3 μ m Hypersil BDS, 3 mm
Mobile phase	A = 0.01 M NaH_2PO_4 + 0.001 M tetrabutylammoniumdihydrogenphosphate, pH = 4.2 B = ACN
Gradient	start with 15 % in 10 min to 40 % in 14 min to 90 % until 19 min at 90 % in 20 min to 15 % ACN
Stop time	20 min
Post time	4 min
Flow rate	0.8 ml/min
Column compartment	40 °C
Injection volume	1 μ l
Detector	UV-DAD signal A: 254/50 nm (for optimization of separation) signal B: 350/20 nm signal C: 465/30 nm signal D: 600/40 nm

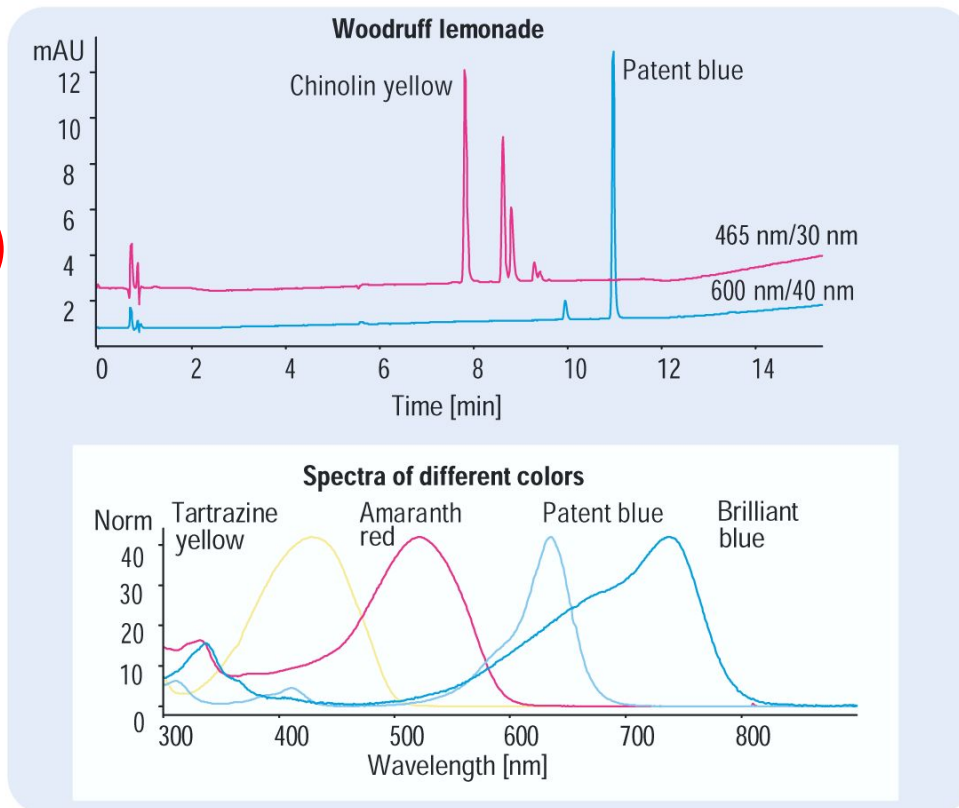
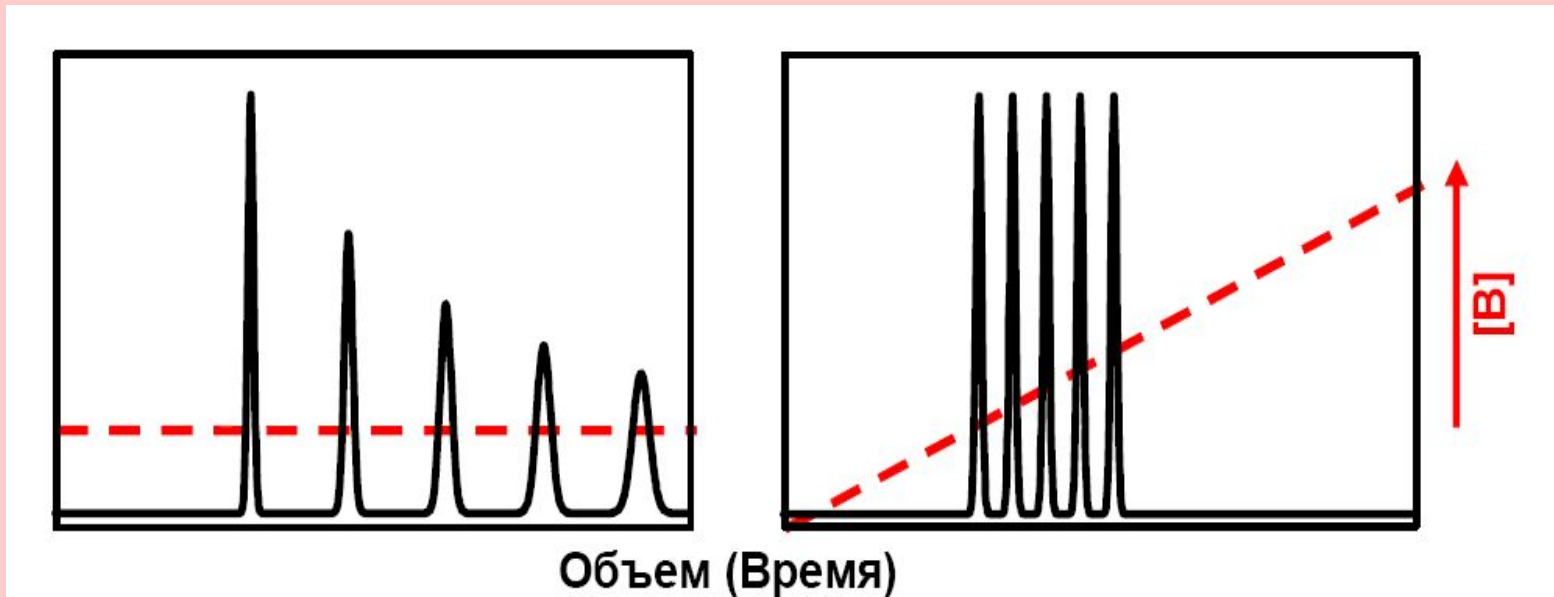


Figure 7
Analysis of synthetic colors in lemonade. Overlay of spectra of yellow, red, blue and "black" colors

Режимы элюирования

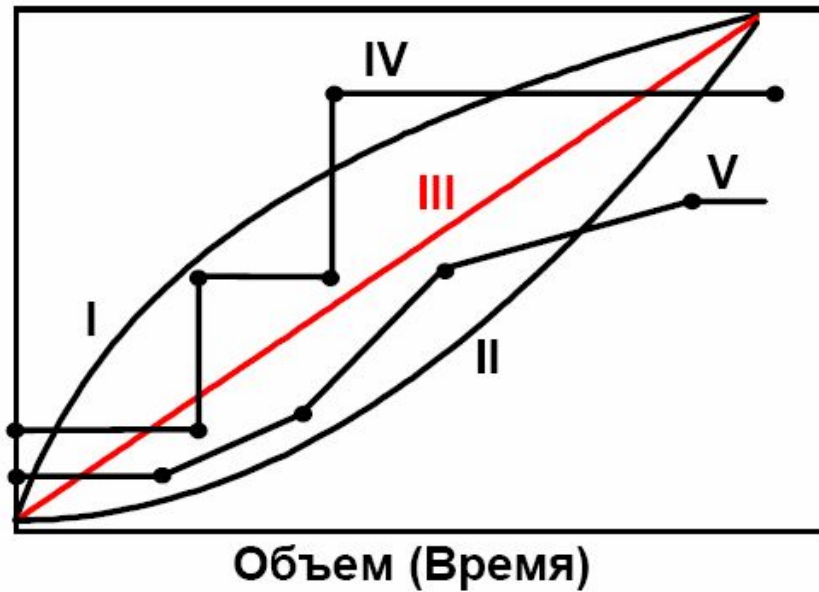
Изократический - постоянная элюирующая сила в ходе всего хроматографического процесса;

Градиентный – состав элюентов, т.е..элюирующая сила меняется в ходе анализа по заданной программе, что позволяет подобрать оптимальные условия разделения смесей вещества, ускоряет прохождение анализа.



B – концентрация сильного компонента в подвижной фазе

Градиентный режим - состав элюента в процессе разделения компонентов изменяется по заданному режиму.



Градиенты концентрации "сильного" компонента "В" в двухкомпонентной подвижной фазе ("А" + "В")

I - выпуклый градиент

II - вогнутый градиент

III - линейный градиент $c_B = a + bV$

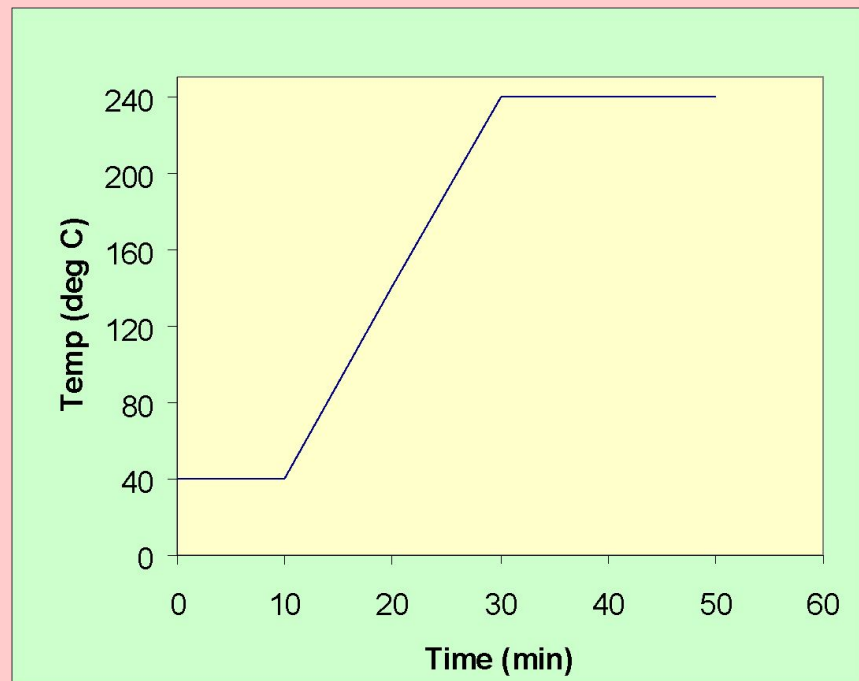
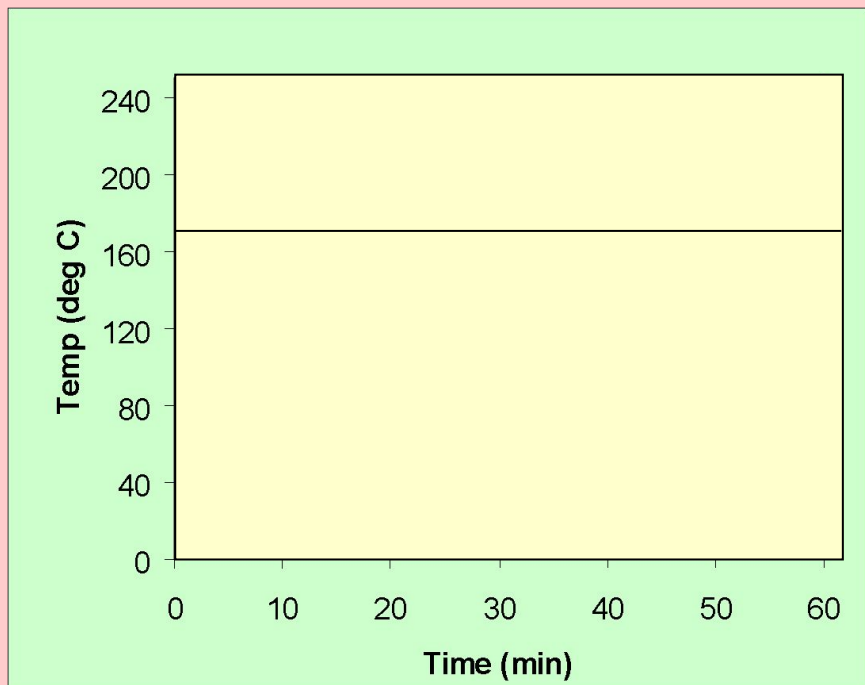
IV - ступенчатый градиент

V - кусочно-линейный градиент

Температурные режимы в газовой хроматографии подобны режимам элюирования в ВЭЖХ

Изотермальный (ГХ) ~ Изократический (ВЭЖХ)

Программирование температуры (ГХ) ~ Градиентный (ВЭЖХ)



ОПТИМИЗАЦИЯ: ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

$$V_R = V_0 + V_0 * k'$$

$$\lg k' = a/T + b$$

где T – абсолютная температура в ($^{\circ}\text{K}$);
 a и b – константы (обычно $a > 0$).

Понижение температуры замедляет массообмен между сорбентом и элюентом и, следовательно, способствует размыванию пиков.

Повышение температуры может вызывать изменение конформации макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды)

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ПОТОКА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Основные причины размывания пиков

1. Неоднородность потока по сечению колонки

- ✓ Влияние этого фактора – константа; минимизируется равномерностью заполнения колонки и малой вариабельностью размеров частиц.



2. Продольная и поперечная молекулярная диффузия

- ✓ Чем больше скорость потока, тем меньше размывание по этой причине;

3. Сопротивление массопередаче молекул, перемещающихся из одной фазы в другую.

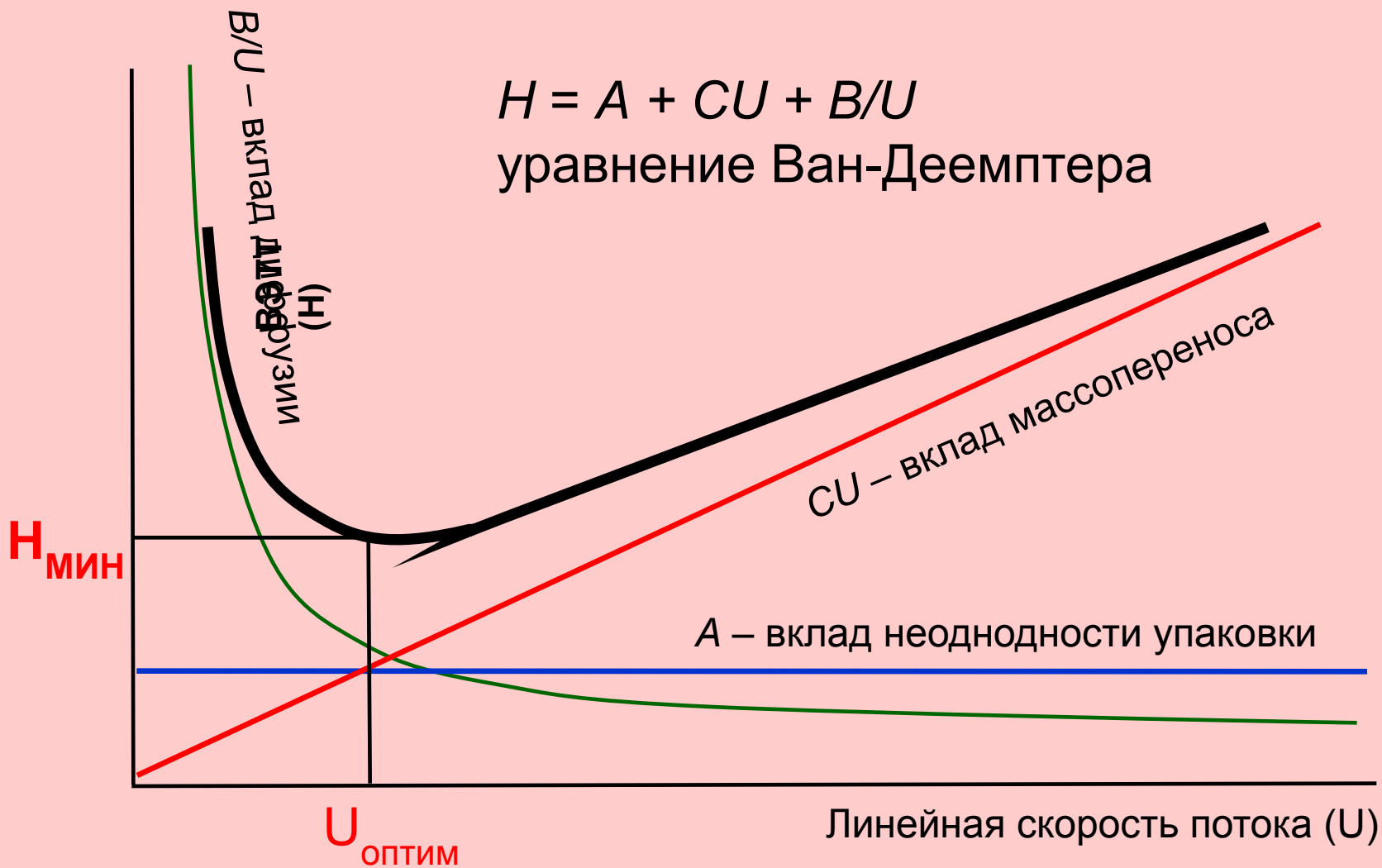
- ✓ Чем больше скорость потока, тем больше размывание по этой причине.

$$H = A + B/U + CU$$

уравнение
Ван-Деемтера

где H – высота, эквивалентная теоретической тарелке, U – линейная скорость потока, A , B , C – коэффициенты

ВЛИЯНИЕ СКОРОСТИ ПОТОКА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ



ВЛИЯНИЕ ОБЪЕМА ПРОБЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОЛОНКИ

увеличение объема
пробы

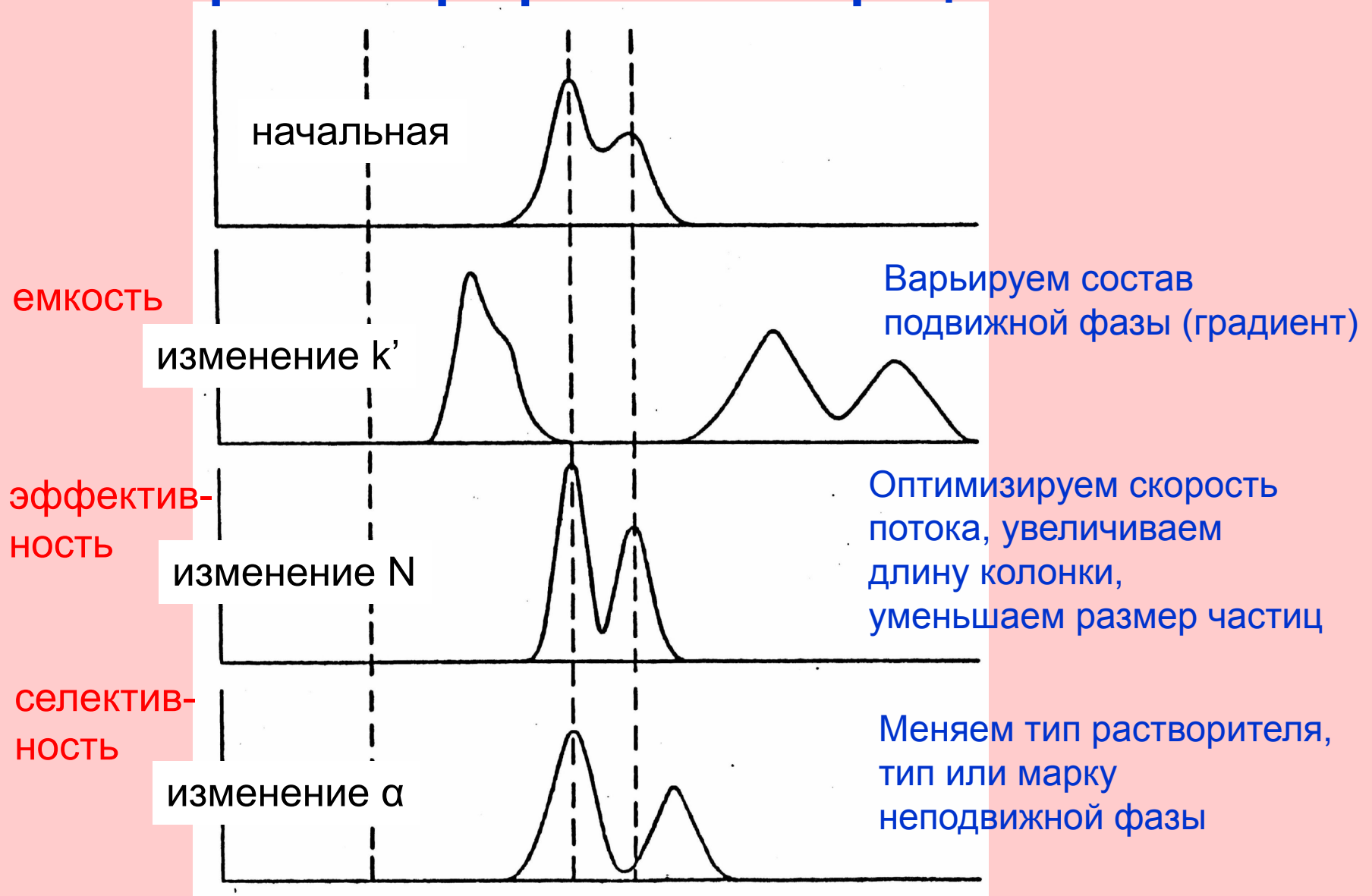


перегрузка
колонки



уменьшение
эффективности

Шаги оптимизации хроматографического процесса



КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Количественный анализ проводят после идентификации компонента, при которой с достаточной степенью уверенности соотносят пик на хроматограмме с конкретным веществом.

Задача: определение содержания одного или нескольких компонентов в пробе

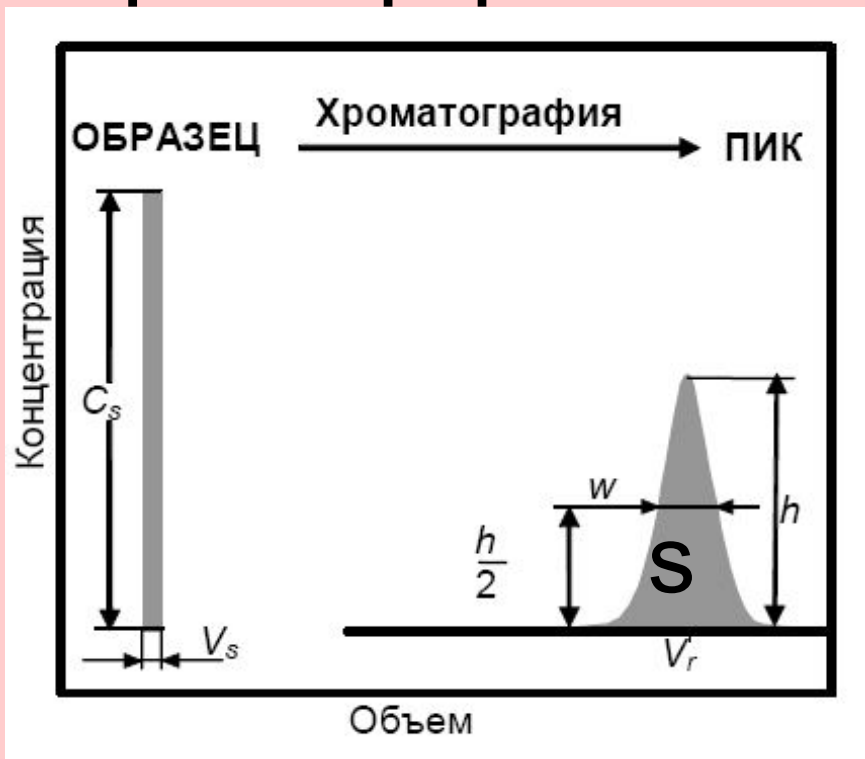
Мера количества вещества в хроматографии: площадь соответствующего ему пика на хроматограмме.

Для отнесения площади пика компонента к его концентрации в пробе необходимо выполнить калибровку – установление количественной зависимости концентрации от площади пика.

Методы количественного анализа

1. нормализация;
2. абсолютная калибровка по внешнему стандарту;
3. метод добавок;
4. калибровка по внутреннему стандарту.

Количество вещества во введенной пробе равно количеству вещества в соответствующем ему хроматографическом пике



$$S = w \cdot h$$

нулевая (базовая) линия

V_r - объем элюента, вытекающий за время удерживания;

h - высота пика в единицах детектирования

w - ширина пика на половине его высоте;

S - площадь хроматограммы, заключенная между пиком и его основанием (нулевой линией).

Нулевая (базовая) линия - соответствует нулевой концентрации анализируемых веществ

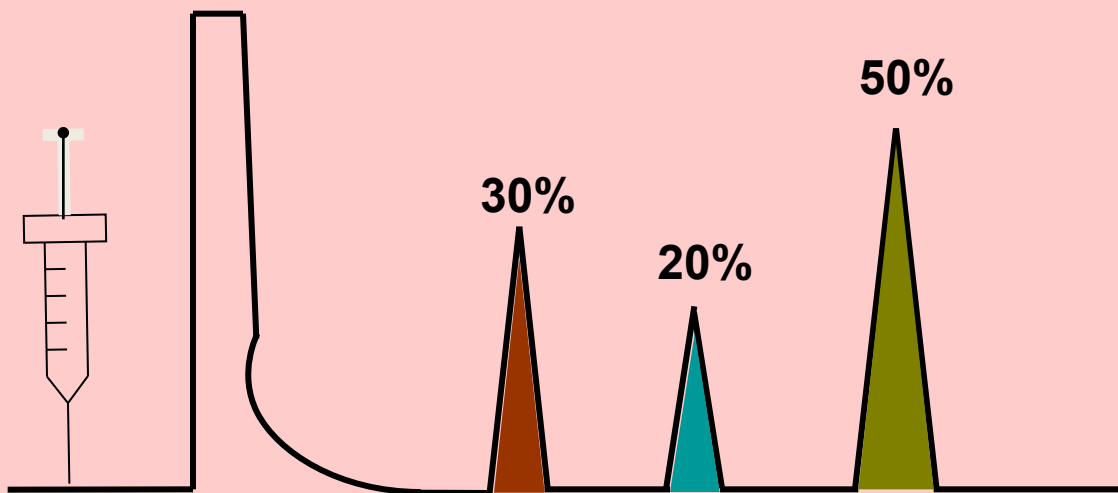
КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Метод нормализации

Нормализация - отношение площади данного пика к сумме всех площадей пиков на хроматограмме.

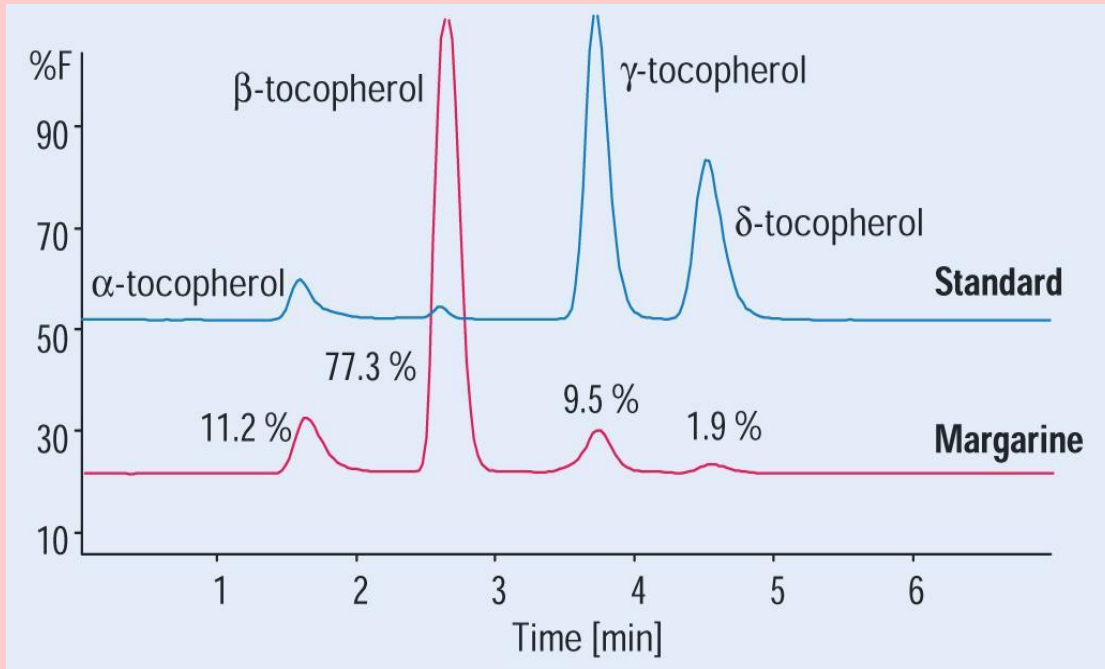
$$C_i(\%) = 100 * S_i / \Sigma S$$

Где С – процентное содержание вещества i, S_i – площадь пика вещества i

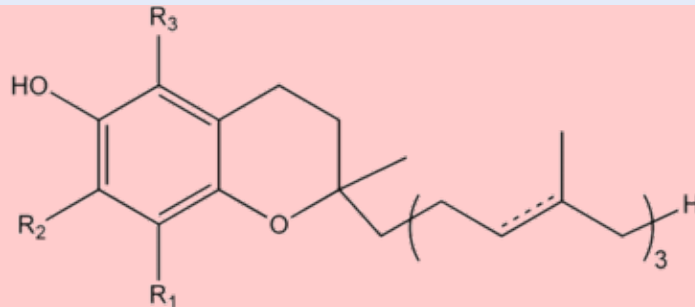


Метод нормализации пригоден для оценочной характеристики состава разделяемой смеси, либо для биохимических показателей.

Метод нормализации



Пример расчета процентного содержания **токоферолов**, разделяемых ВЭЖХ, флуорометрический детектор



α -tocopherol, $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$

α -tocotrienol, $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$

β -tocopherol, $R_1 = R_3 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

β -tocotrienol, $R_1 = R_3 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

γ -tocopherol, $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ $R_3 = \text{H}$

γ -tocotrienol, $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ $R_3 = \text{H}$

δ -tocopherol, $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

δ -tocotrienol, $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Метод абсолютной калибровки

Для реализации метода необходимо анализируемое вещество в чистом виде - стандарт

Суть метода:

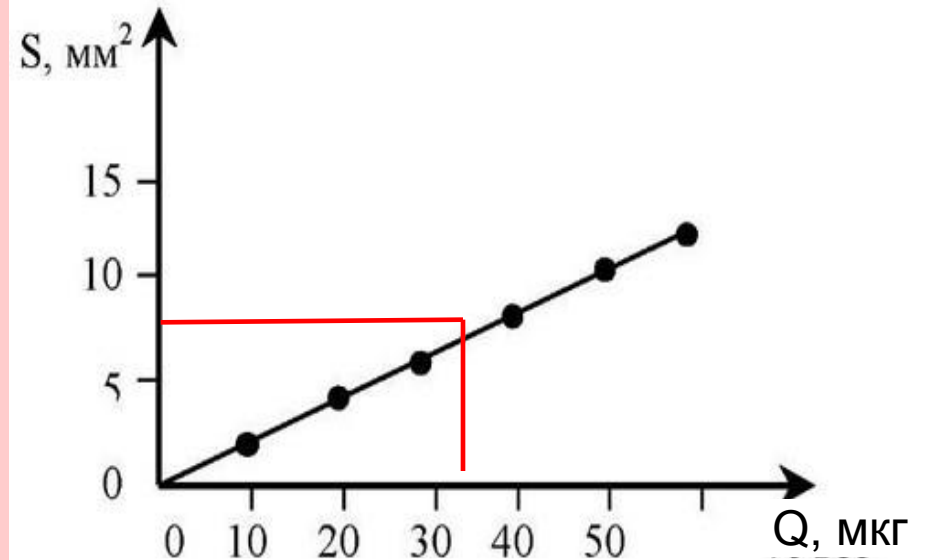
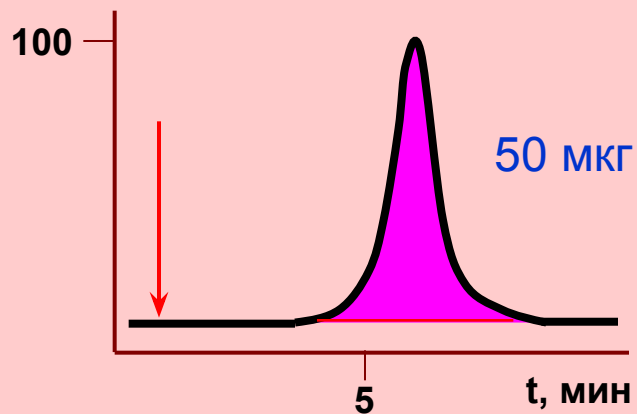
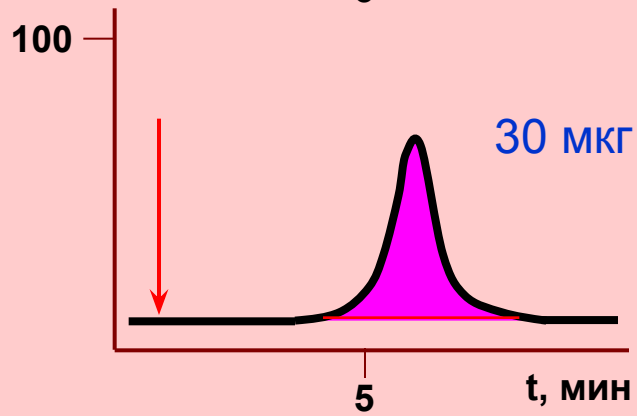
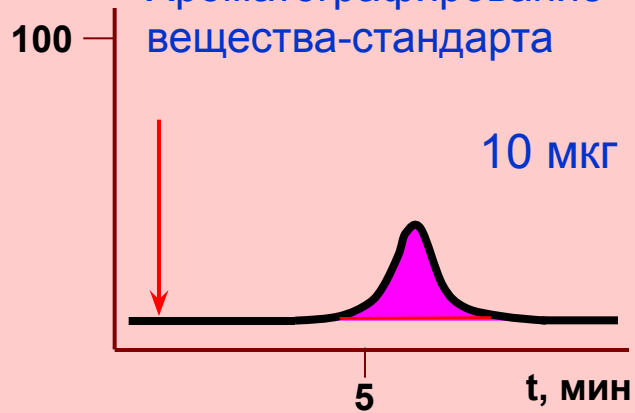
- готовят ряд растворов с известными концентрациями стандарта, перекрывающими ожидаемый диапазон содержания анализируемого компонента в пробе;
- растворы последовательно хроматографируют в одинаковых условиях и получают ряд площадей пиков, соответствующих концентрационному ряду калибровочных растворов;
- На основании полученных данных строят калибровочный график, по которому определяют концентрацию данного компонента в пробе, находя соответствие площади пика количеству компонента.

Недостатки метода:

- необходимость использования стандарта (может быть недоступен в чистом виде, химически лабилен, летуч, токсичен)

Метод абсолютной калибровки

Хроматографирование
вещества-стандарта



Построение зависимости
площади пика от количества
введенного вещества

Аппроксимация: $S = a \cdot Q + b$

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Метод добавок

Для реализации метода необходимо анализируемое вещество в чистом виде - стандарт

Суть метода:

- в исследуемую пробу вводят известные количества стандарта;
- растворы хроматографируют в одинаковых условиях;
- на хроматограмме пик определяемого компонента увеличивается пропорционально количеству введенного стандарта;
- строят калибровочный график, по которому определяют концентрацию данного компонента в пробе, находя соответствие высоты пика количеству компонента.

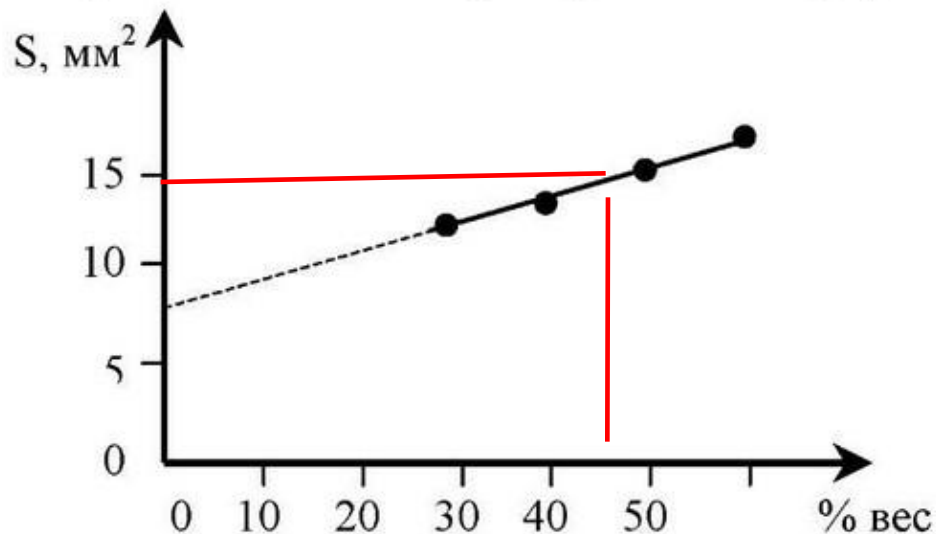


Рис. 51. График зависимости площади пика от величины добавки исследуемого соединения

Основной недостаток метода:

необходимость использования стандарта (может быть недоступен в чистом виде, химически лабилен, летуч, токсичен)

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

Метод внутреннего стандарта

Для реализации метода необходимо вещество в чистом виде, по свойствам близкое к определяемому, – внутренний стандарт.

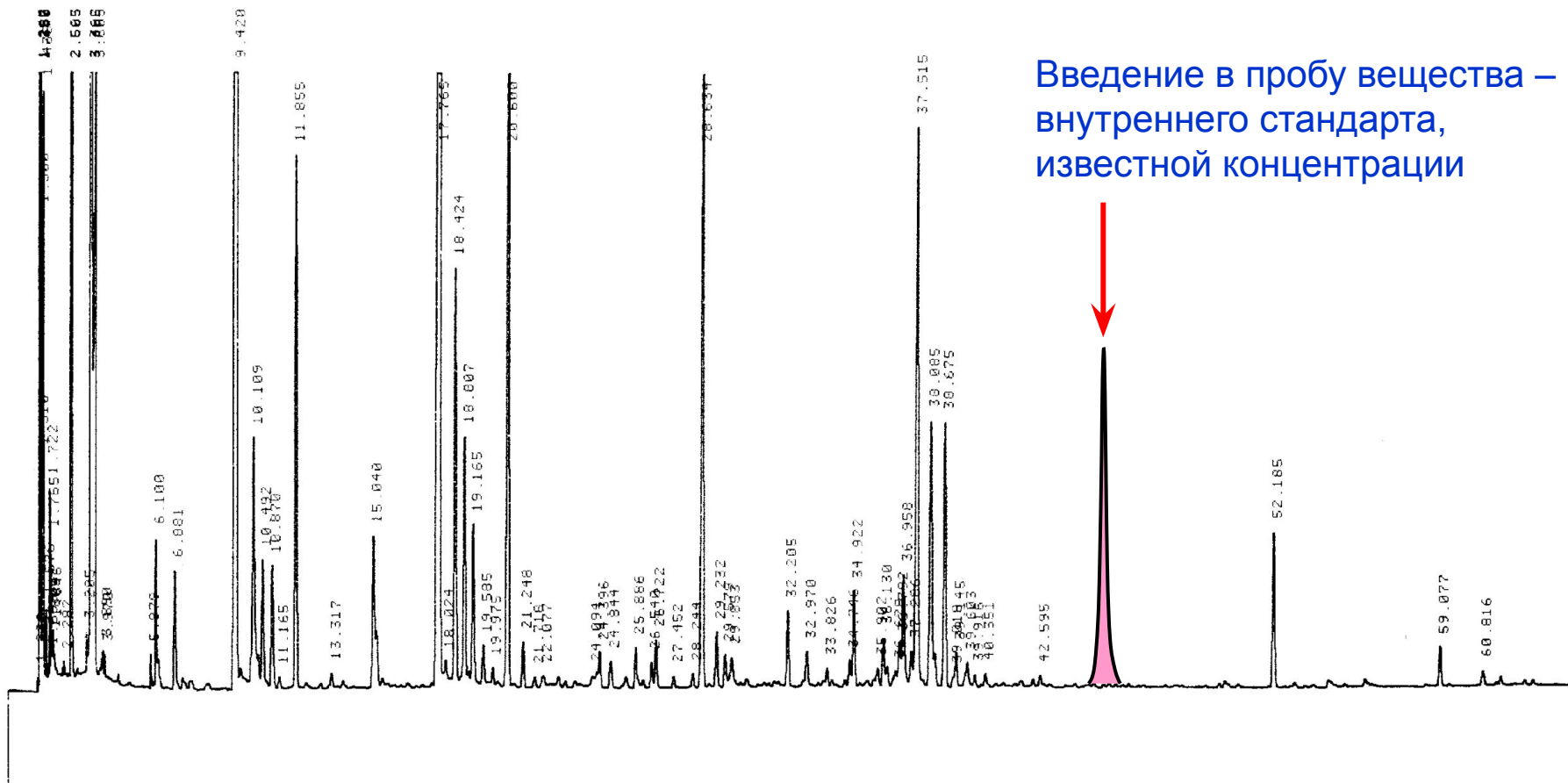
Суть метода:

- внутренний стандарт добавляется в анализируемую пробу в известной концентрации;
- раствор хроматографируют (необходимо, чтобы при данных условиях разделения внутренний стандарт выходил на хроматограмме в области, свободной от других компонентов пробы);
- вычисление концентрации определяемого компонента в пробе проводят по соотношению:

$$C_i = (S_i * C_{st}) / S_{st}$$

При использовании метода внутреннего стандарта линейность детектирования необходимо проверять по отношению ко всем веществам.

Хроматограмма экстракта ферментированной капусты



Введение в пробу вещества –
внутреннего стандарта,
известной концентрации