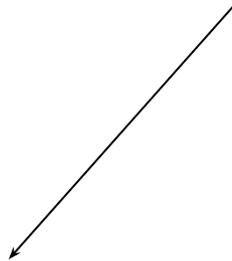


# Жидкостная хроматография

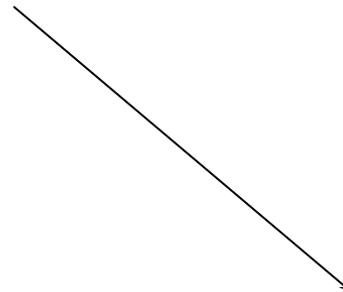
подвижная фаза – жидкость

неподвижная фаза – жидкость или сорбент



жидкостно-жидкостная

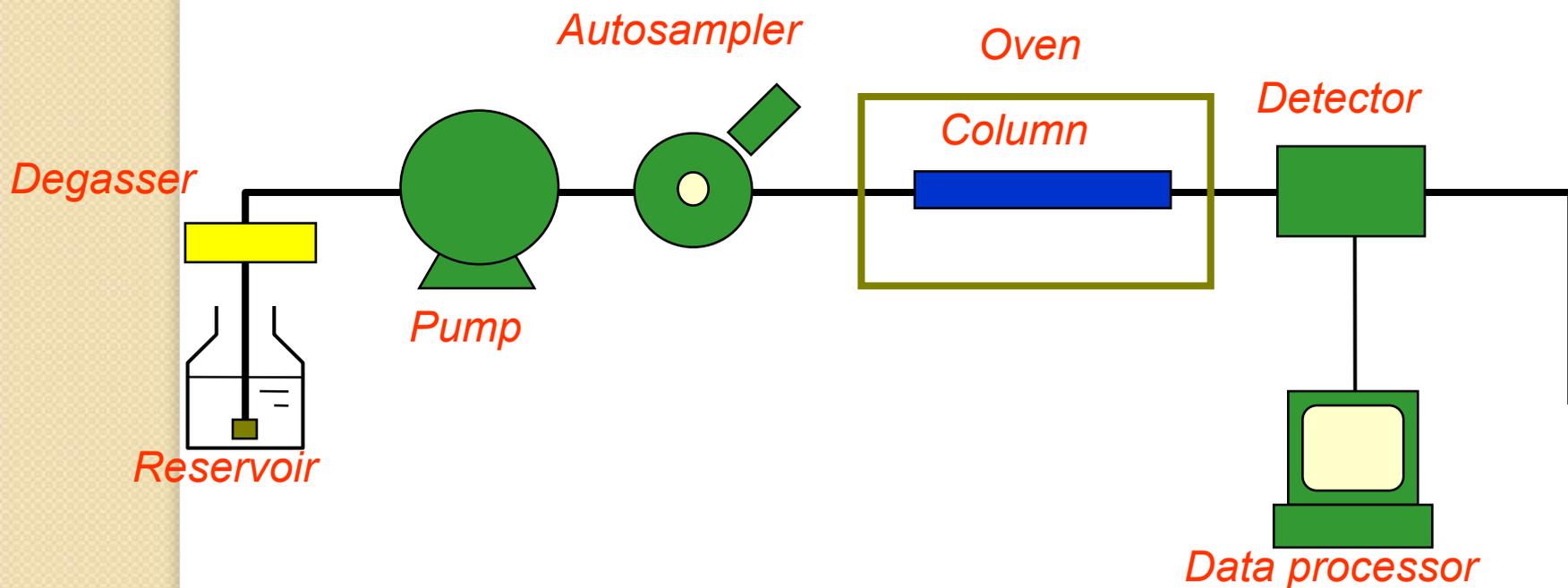
Распределительная  
бумажная  
осадочная



жидкостно-адсорбционная

ионообменная  
жидкостная низкого давления  
жидкостная высокого давления (ВЭЖХ)

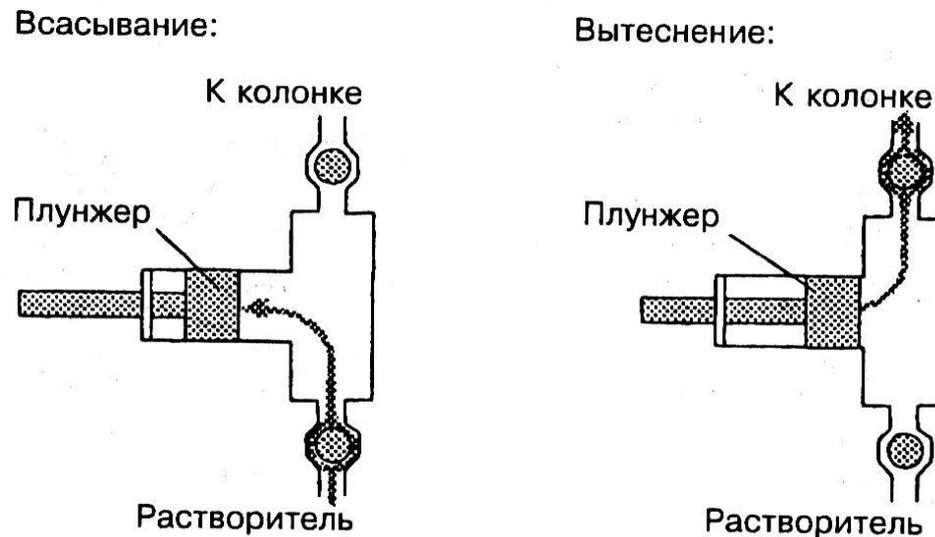
# Схема устройства для ВЭЖХ



# НАСОСНЫЕ СИСТЕМЫ

К насосам предъявляются следующие требования:

- ✓ генерация давления до 15 МПа
- ✓ химическая стойкость
- ✓ обеспечение скорости потока от 0,1 до 10 мл/мин



**Рис. 5.3-4.** Работа насоса с головкой из оксида алюминия (сапфиров) и с двойным клапаном.

Существуют вытеснительные и возвратно-поступательные насосы.

# СИСТЕМЫ ВВОД ПРОБЫ

Введение объемов от 5 до 500 мкл,  
петлевой дозатор

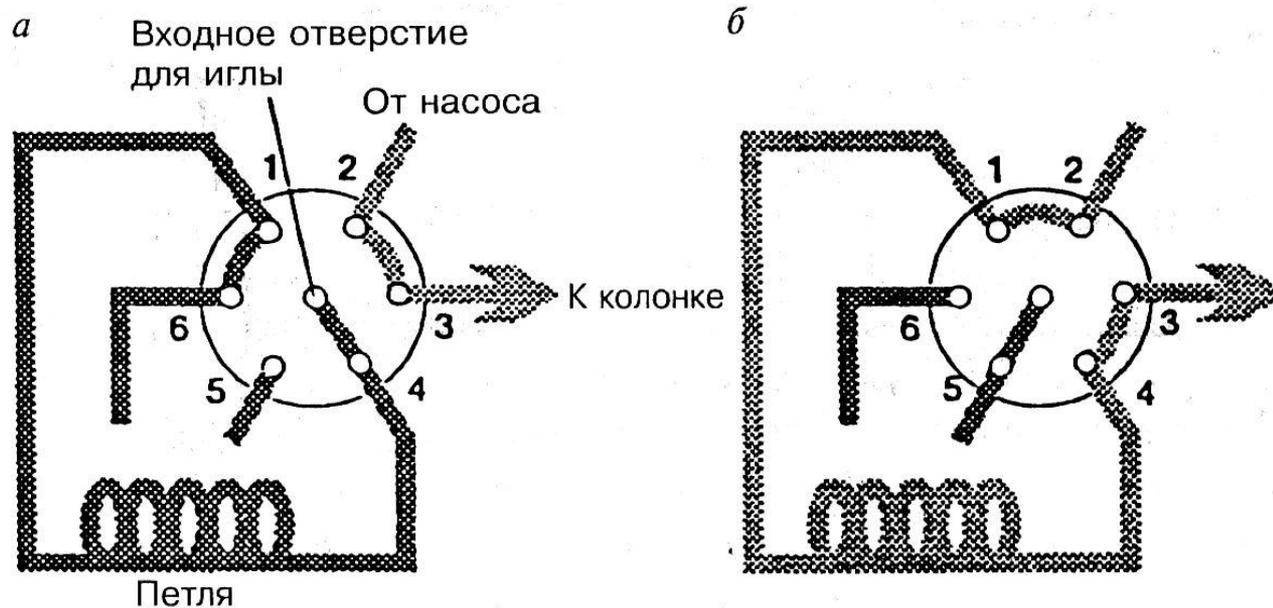


Рис. 5.3-5. Кран ввода пробы для ВЭЖХ. *a* — заполнение дозирующей петли; *b* — ввод пробы в систему

# Детектор: рефрактометр, УФ-детектор ЭХД

## рефрактометр (отклоняющий)

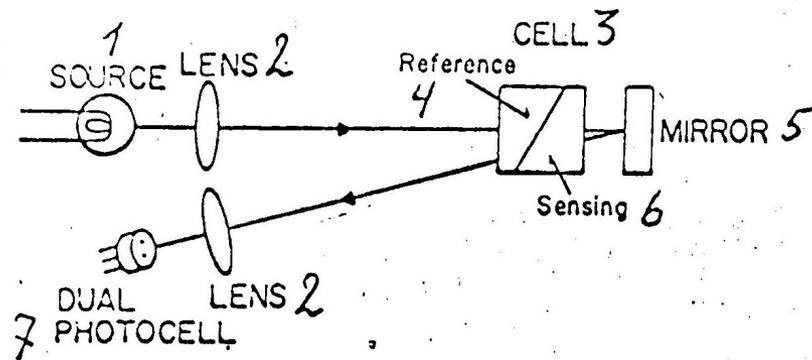


Рис.4-14. Оптическая схема детектора по индексам рефракции отклоняющего типа:

1 - источник; 2 - линза; 3 - ячейка; 4 - камера сравнения; 5 - зеркало; 6 - рабочая камера; 7 - фотоэлемент двойного типа

# УФ-детектор

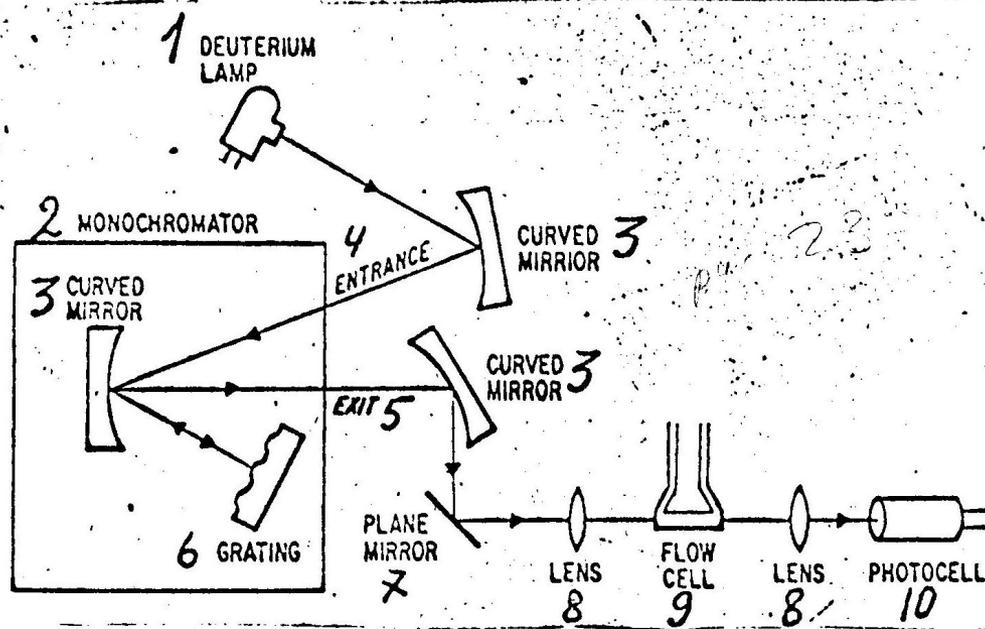


Рис.4-19. Оптическая схема типичного УФ детектора для жидкостной хроматографии:

1 - дейтериевая лампа; 2 - монохроматор; 3 - сферическое зеркало;  
4 - вход; 5 - выход; 6 - решетка; 7 - плоское зеркало; 8 - линза;  
9 - проточная кювета; 10 - фотоэлемент

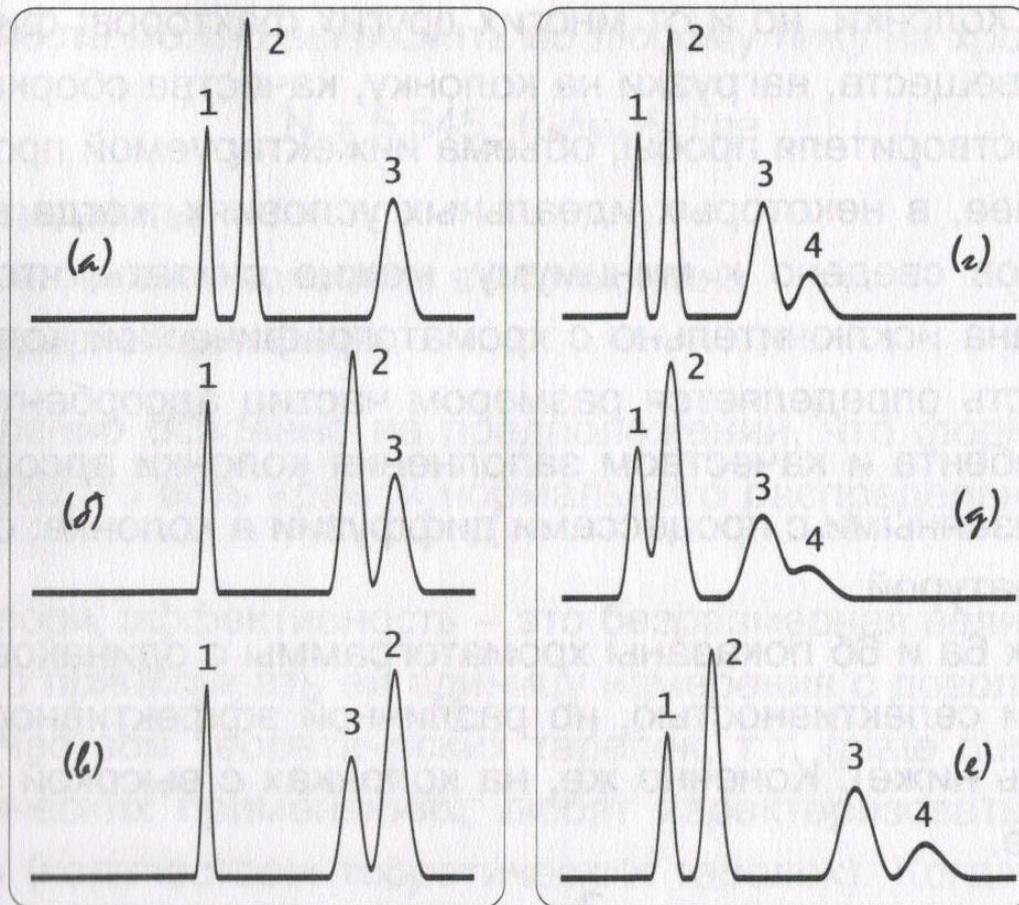
В ВЭЖХ вводится фактор ёмкости

$$K' = t'_R / t_0$$

Селективность – величина, отражающая способность колонки к разделению, т.е. избирательность:

$$\alpha = K'_2 / K'_1$$

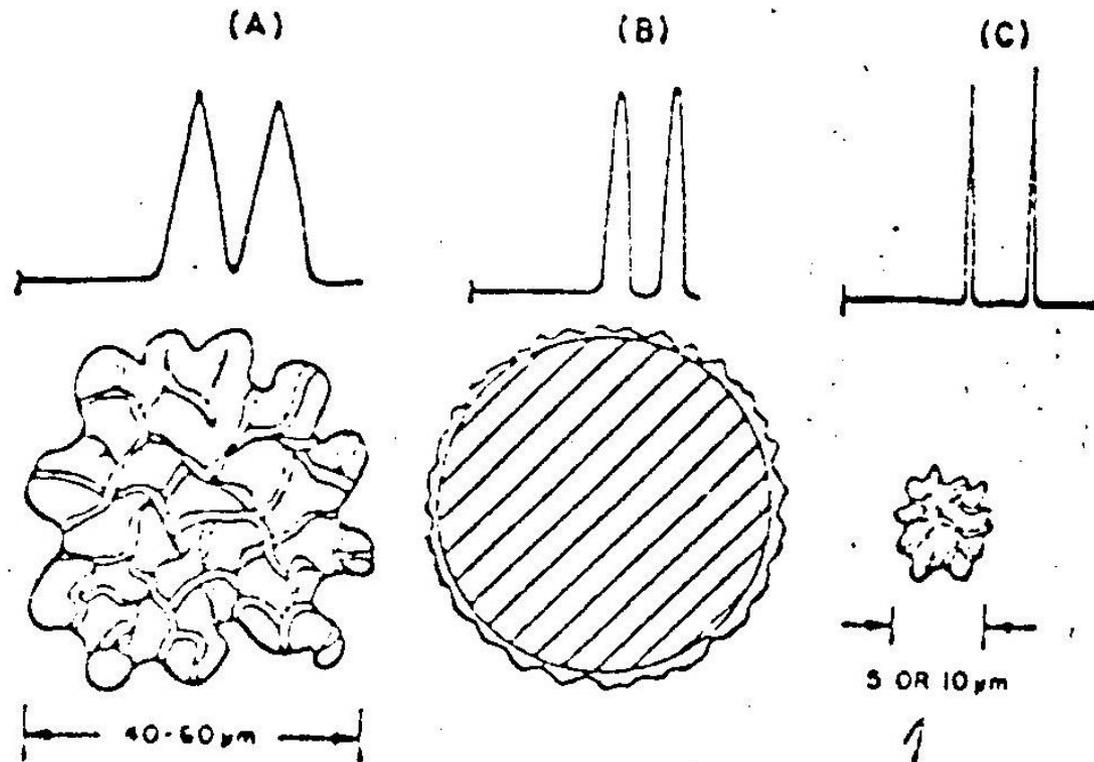
$\alpha = 1$  – разделения нет       $\alpha > 1$  то можно подбором элюента добиться хорошего разделения



**Рисунок 5.**

Разделения одинаковой и различной селективностями. А, б, в – разделение трехкомпонентной смеси в системах с различной селективностью: б – селективность отлична от а), но порядок элюирования сохраняется, в – селективность отлична от а), причем изменяется и сам порядок элюирования. Г, д, е – разделения четырехкомпонентной смеси в системах с одинаковой селективностью: д – при отличной от г) эффективности, е – при отличном от г) удерживании

# Типы набивок в жидкостной хроматографии



А – объемно-пористые макрочастицы (40-60 мкм)

В – поверхностно-пористые

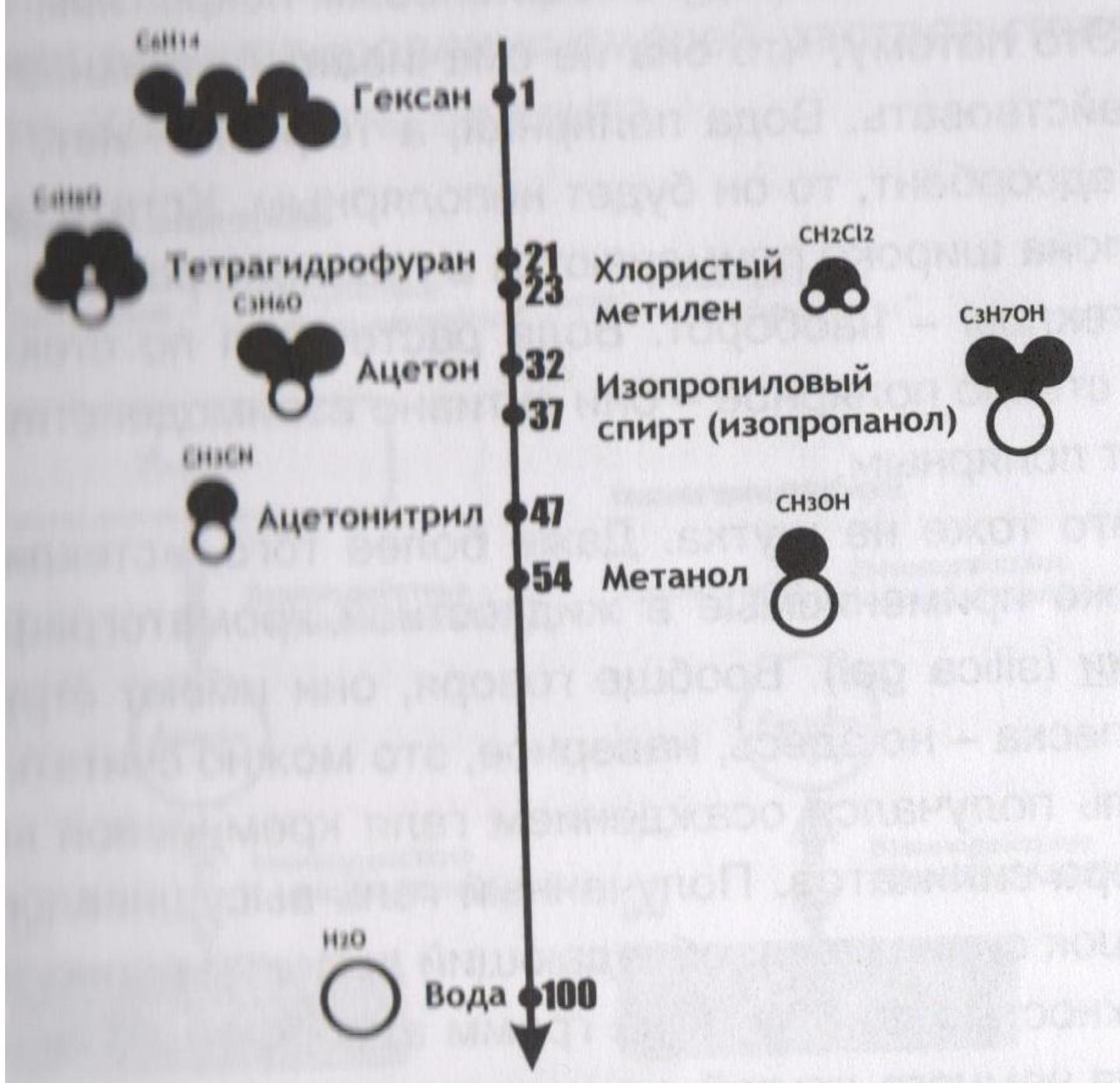
С – объемно-пористые микрочастицы (5-10 мкм)

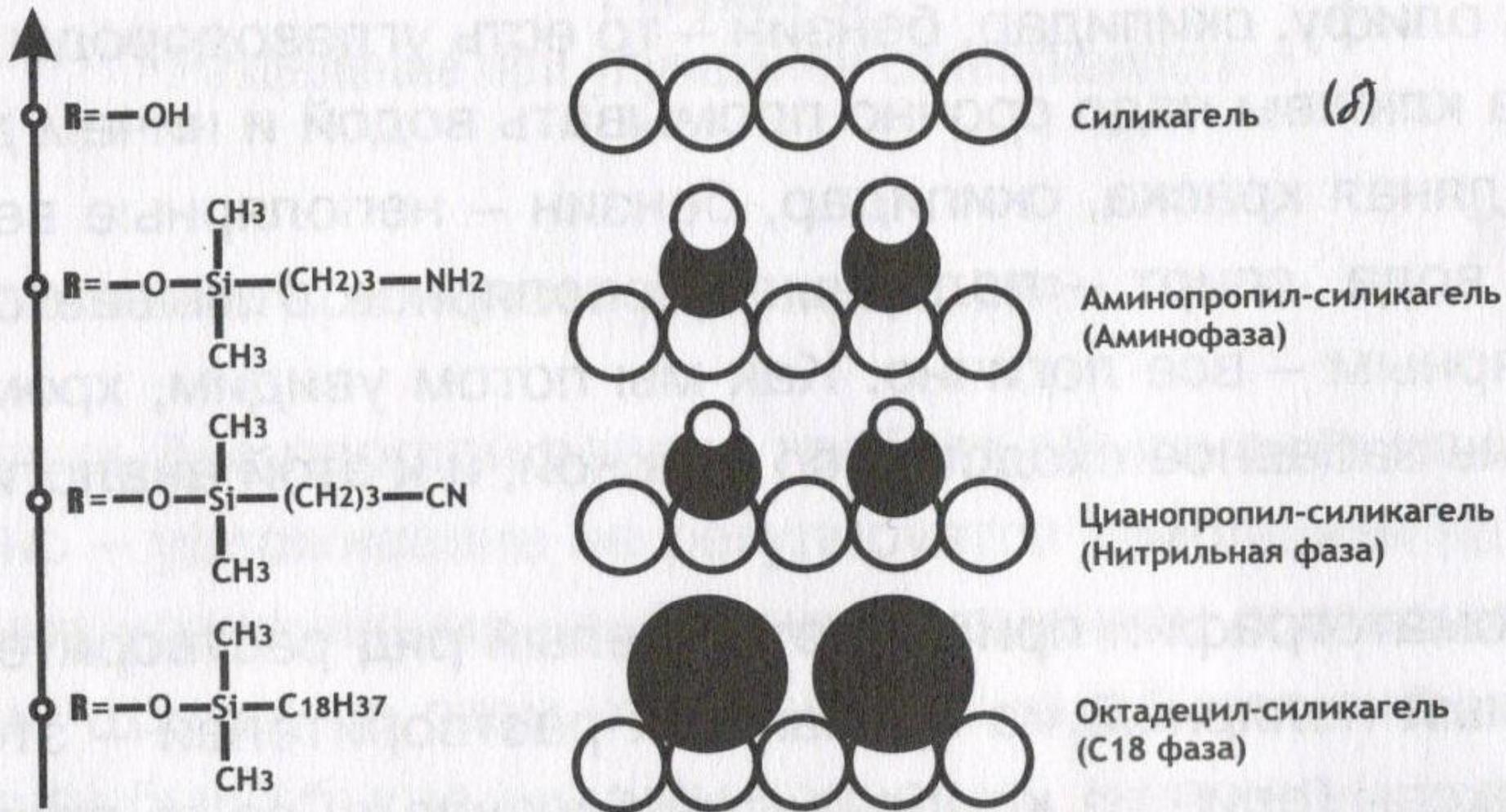
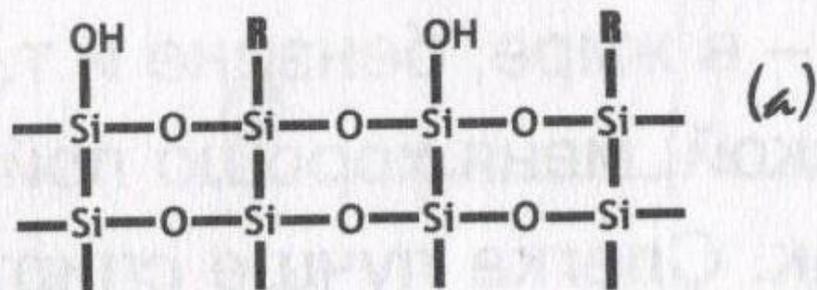
## Размер частиц

Меньше частицы >>> выше эффективность >>> выше давление (или ниже скорость элюции)

Длина колонны, мм	Эффективность, Ч.Т.Т.		
	10 мкм	5 мкм	3 мкм
250	9 000	18 000	36 000
125	4 500	9 000	18 000
60	2 250	4 500	9 000
30	1 125	2 250	4 500







# СОРБЕНТЫ

Заполнение колонок частицами размером менее 20мкм является отдельной проблемой. Высокая поверхностная энергия и связанный с ней электростатический заряд не позволяют проводить сухое заполнение. Для заполнения колонки сорбент суспендируется в жидкости, еще лучше использование плавающих суспензий.

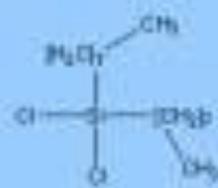
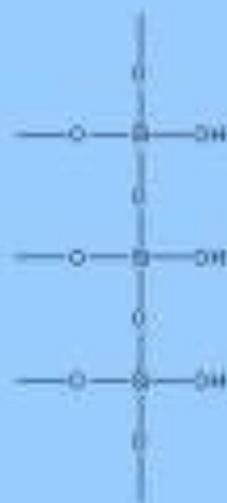
# НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ

В качестве неподвижных фаз могут служить жидкости иммобилизованные на носители.

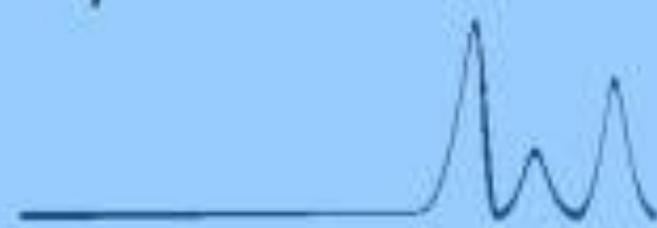
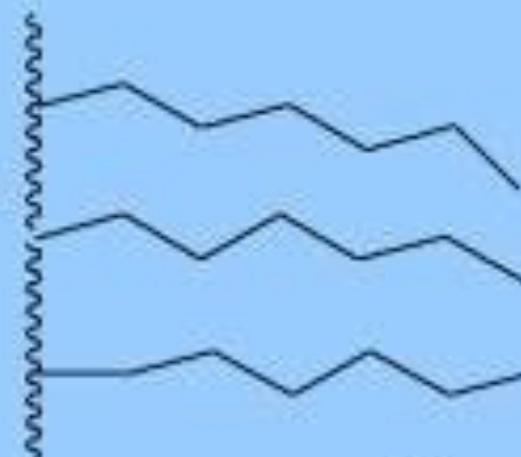
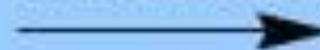
Носитель может быть модифицирован с помощью химической реакции, при этом получают химически закрепленные фазы.

# ВЭЖХ

- **Методика прививки неподвижной фазы:**



$\Gamma^{\ominus}$ , waterless solvent



## Жидкостная хроматография

Удерживание = Взаимодействие "Адсорбат-Адсорбент" минус Взаимодействие "Адсорбат-Элюент"

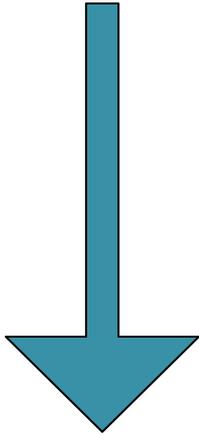


## Газовая хроматография

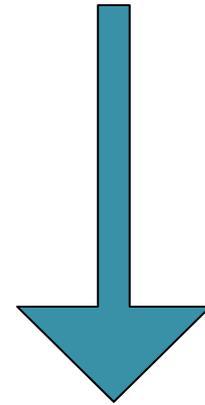
Удерживание = Взаимодействие "Адсорбат-Адсорбент"



# Виды ВЭЖХ

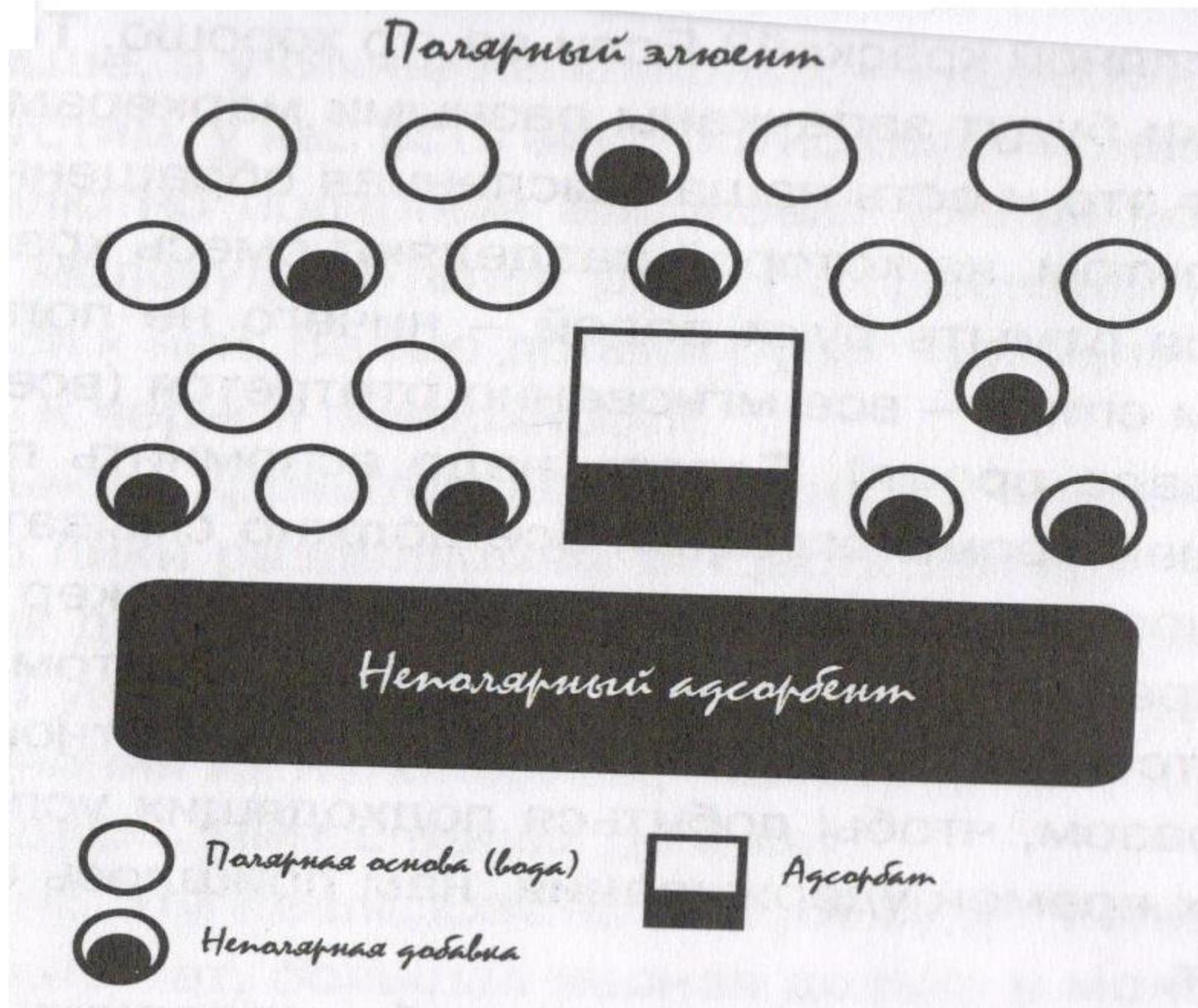


нормально-фазовая  
НФ  
сорбент – полярный  
элюент - неполярный



обращённо-фазовая  
ОФ  
сорбент – неполярный  
элюент - полярный

# Обращённо-фазовая хроматография



Наиболее часто используются алкильные группы  $C_{18}$ ,  $C_8$  – они образуют цепочную поверхность

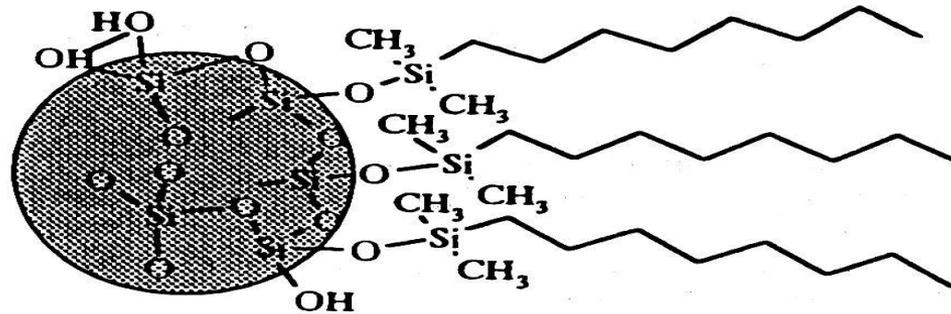


Рис. 5.3-10. Часть поверхности  $C_8$  (октильной)-обращенной фазы. Остаточные силанольные группы, выступающие с поверхности, частично связаны водородными связями, а также кислородными атомами в силоксановые связи.

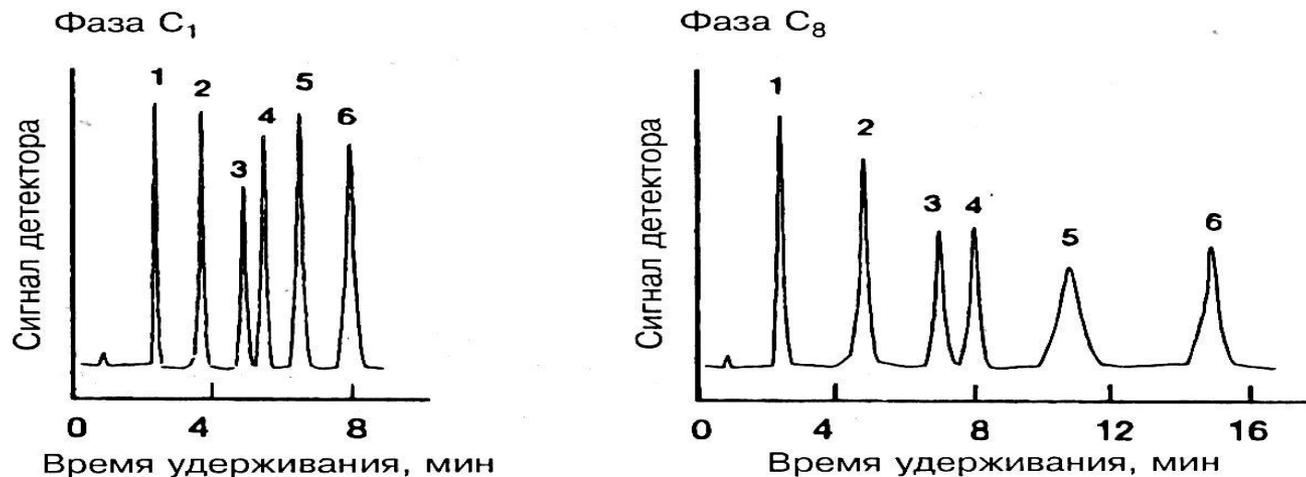
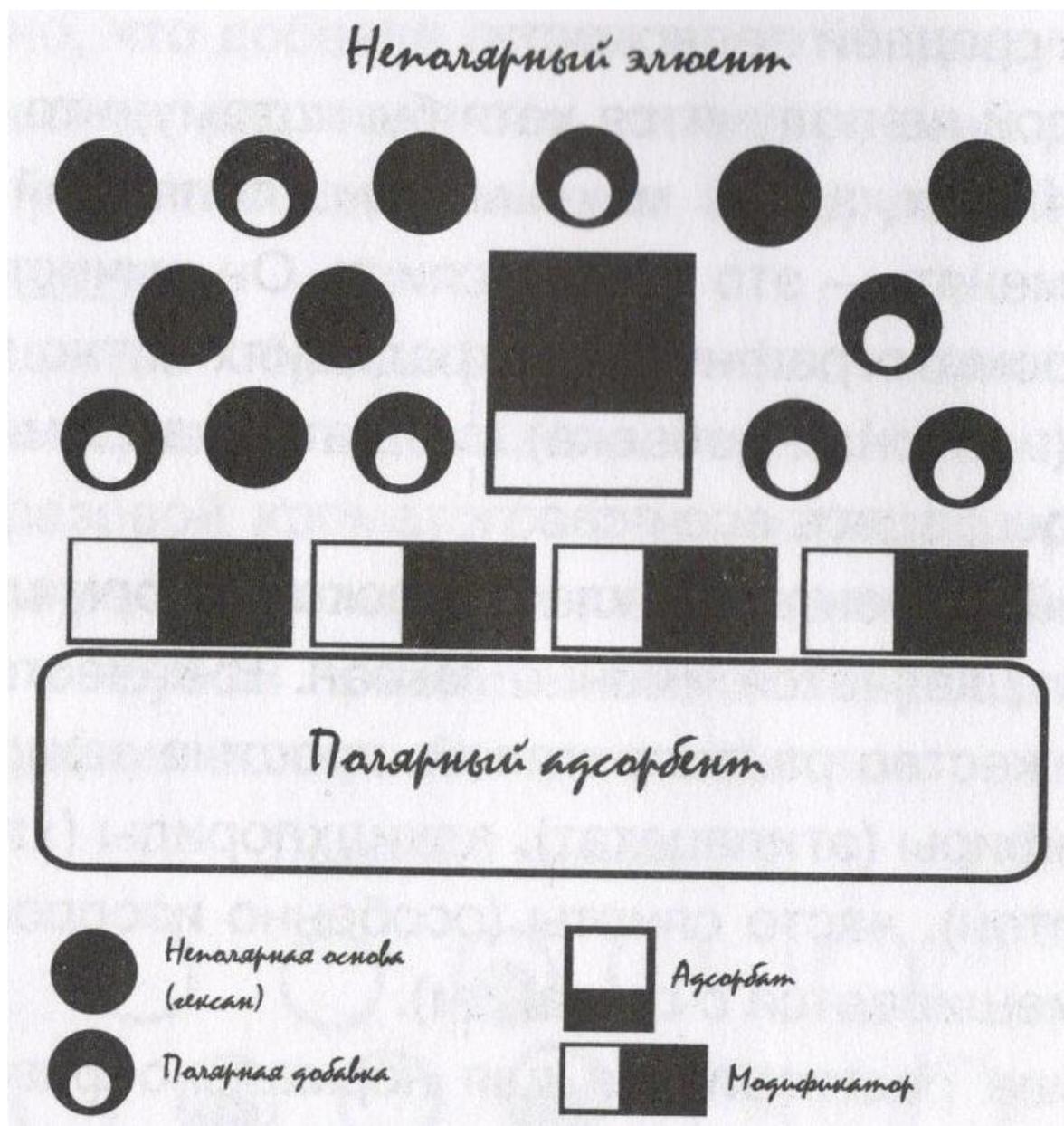


Рис. 5.3-11. Сравнение удерживания с использованием силоксановых обращенных фаз с алкильными группами метил ( $C_1$ ) и октил ( $C_8$ ). 1 – урацил, 2 – фенол, 3 – ацетофенон, 4 – нитробензол, 5 – метилбензоат, 6 – толуол. Подвижная фаза – 50/50 (об.) метанол/вода; скорость потока 1 мл/мин.

# Нормально-фазовая хроматография



# нфВЭЖХ

## Анализ моносахаридов.

**НФ:** полигосил NH<sub>2</sub>.

**ПФ:** ацетонитрил:вода=75:25.

**Пики:** 1-рамноза

2-ксилоза

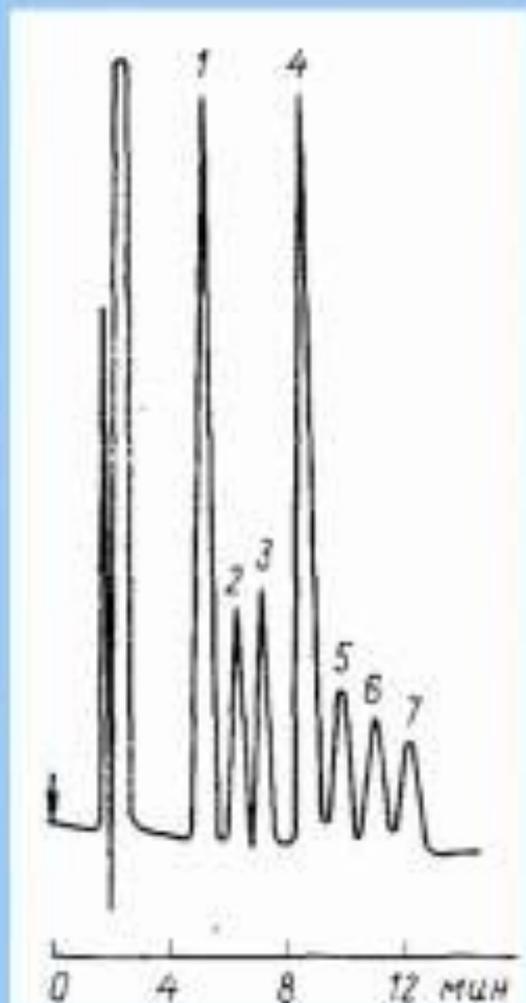
3-арабиноза

4-фруктоза

5-манноза

6-глюкоза

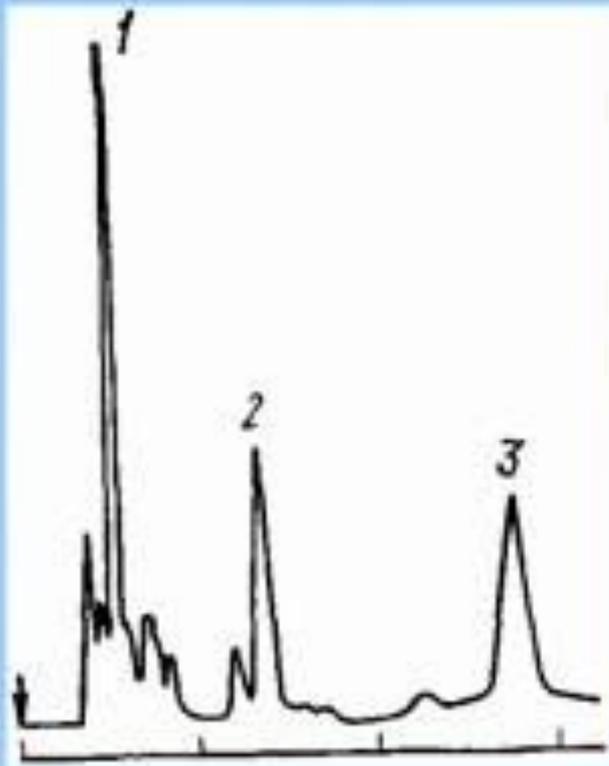
7-галактоза



В.Л.Сытник и др., Практическая Высокоэффективная Жидкостная Хроматография, М: 1986



# нфВЭЖХ



## Анализ витаминов в пищевых продуктах.

НФ: нуклеосил NH<sub>2</sub>.

ПФ: гептан:хлороформ=80:20.

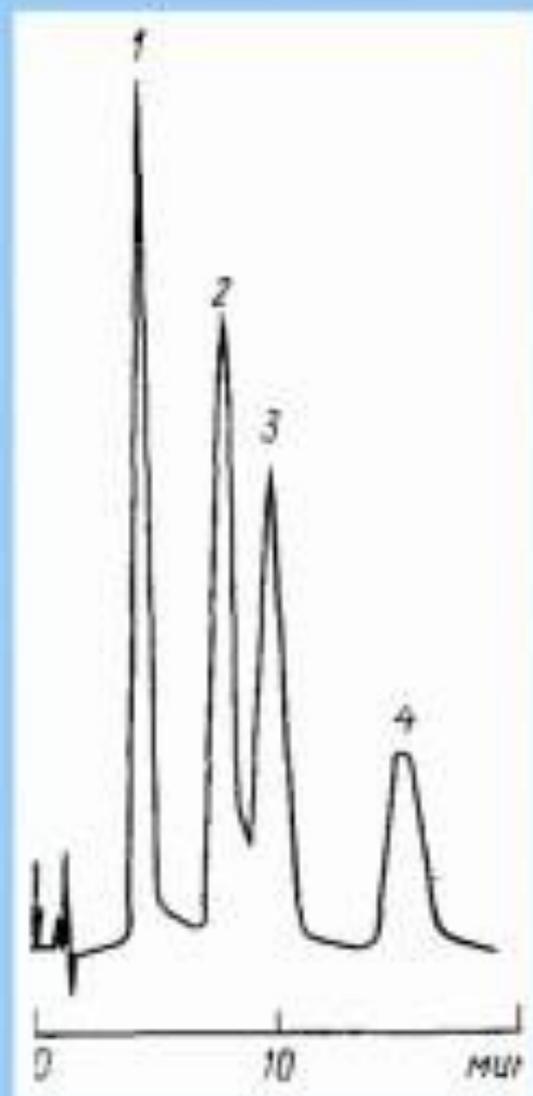
Пики: 1-уксусный эфир витамина А

2-витамин Е

3-витамин Д<sub>3</sub>



# нфВЭЖХ



Анализ цитохромов С разного происхождения.

**ИФ:** нуклеосил CN.

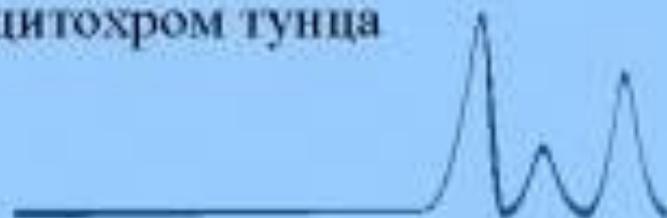
**ИФ:** ацетонитрил:фосфатный буфер (рН 2)=22,5:77,5.

**Пики:** 1-цитохром лошади

2-цитохром КРС

3-цитохром собаки

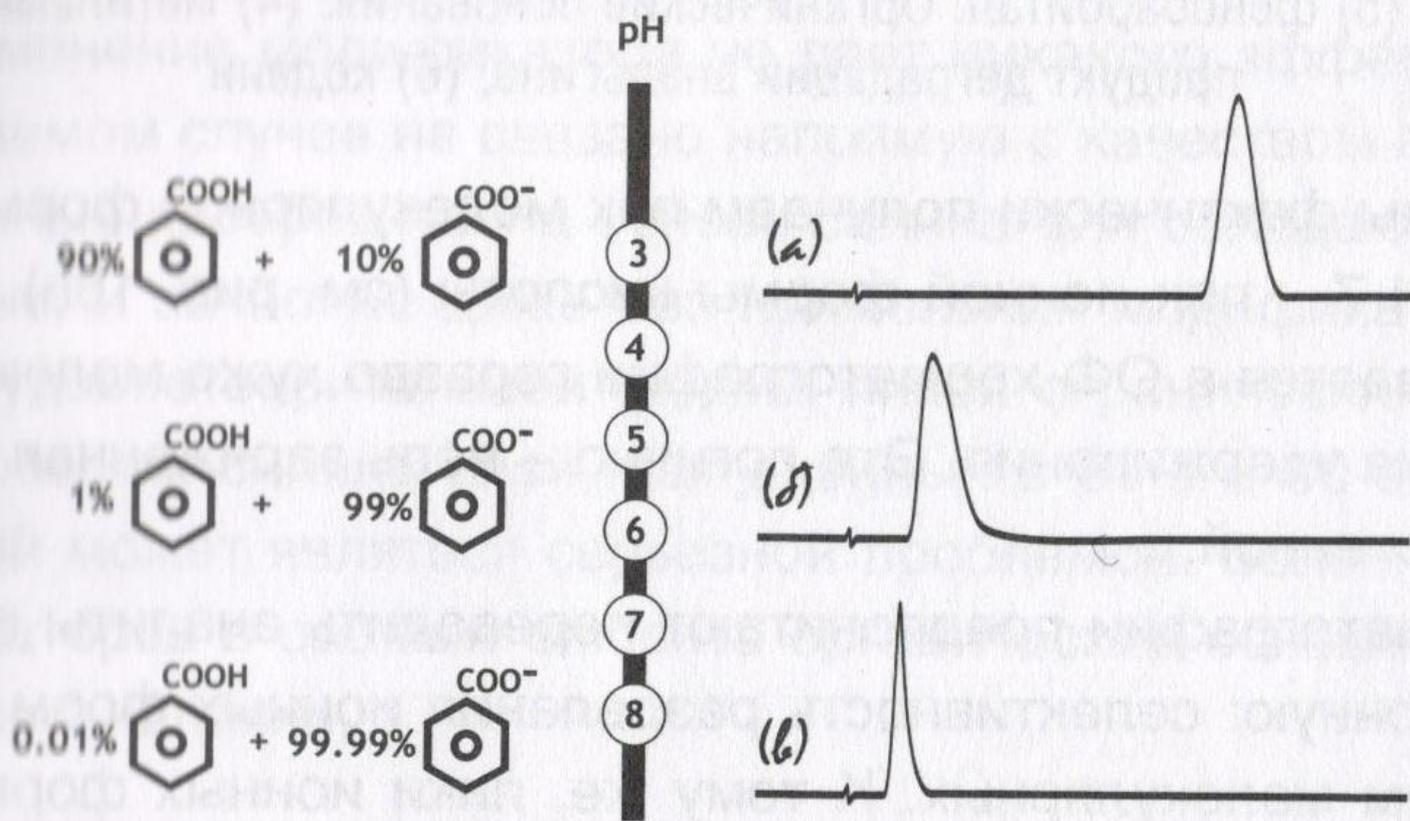
4-цитохром тунца



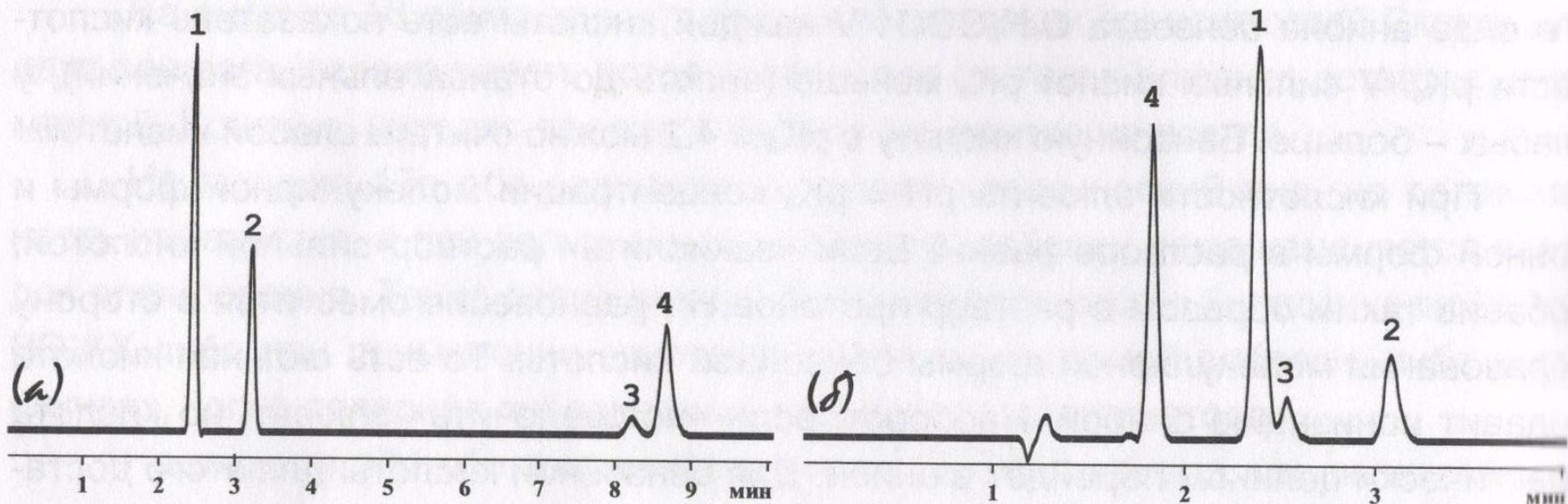
# Ион-парный ОФ-режим

Для ионных соединений характерно, что в зависимости от рН они могут существовать в разных формах: молекулярные и ионные.

Ионные формы удерживаются в ОФ-режиме хуже, чем молекулярные.

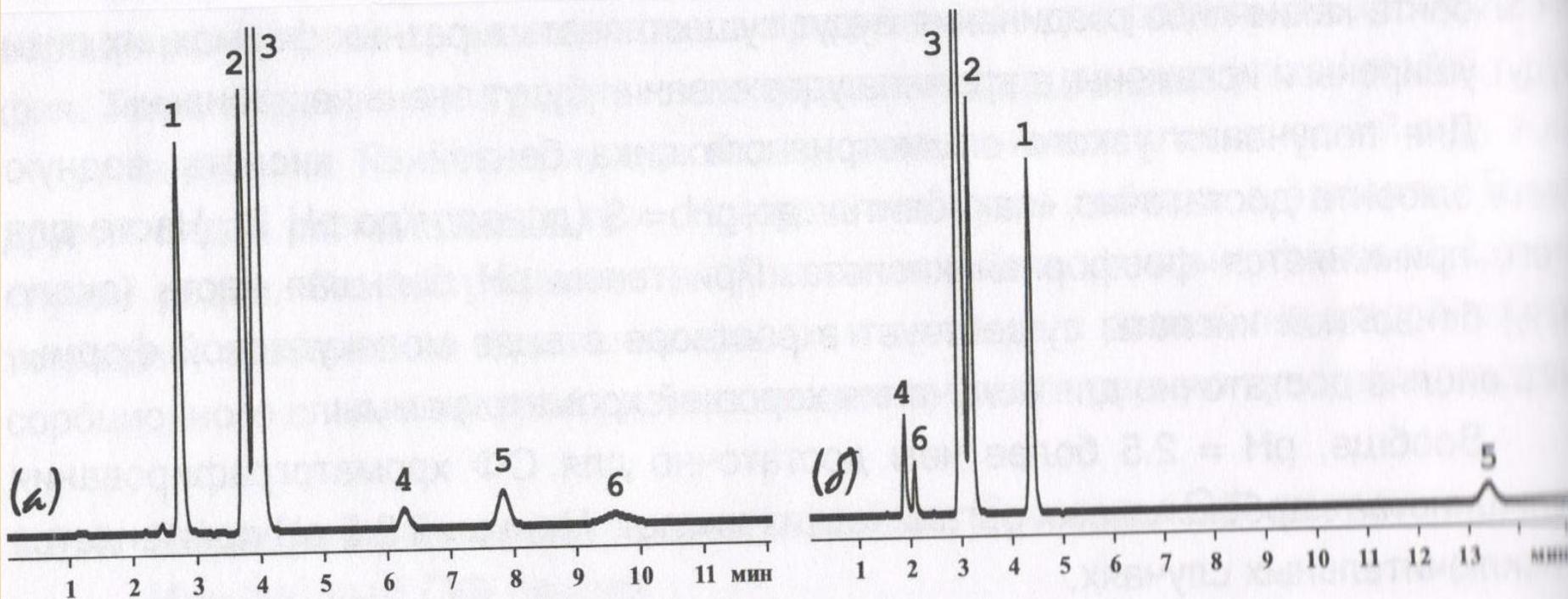


# Примеры



**Рисунок 19.**

Хроматограммы компонентов препарата «Аскофен» в обращенно-фазовом режиме при кислотном (а) и нейтральном (б) рН. а) рН = 2.5, б) рН = 6.5. Нейтральные вещества: (1) парацетамол, (2) кофеин. Слабые кислоты: (3) салициловая кислота, (4) ацетилсалициловая кислота



**Рисунок 20.**

Хроматограммы компонентов препарата «Седалгин» в обращенно-фазовом режиме при нейтральном (а) и кислом (б) рН. а) рН = 6.5, б) рН = 2.5. Нейтральные вещества: (2) кофеин, (3) парацетамол, (5) фенобарбитал. Органические основания: (4) метиламиноантипирин – продукт деградации анальгина, (6) кодеин

Растворенные газы, которые могут приводить к образованию пузырьков и мешать детектированию, а также нерастворенные вещества должны быть удалены из растворителей.

Существует 2 вида элюирования  
изократическое  
и градиентное.

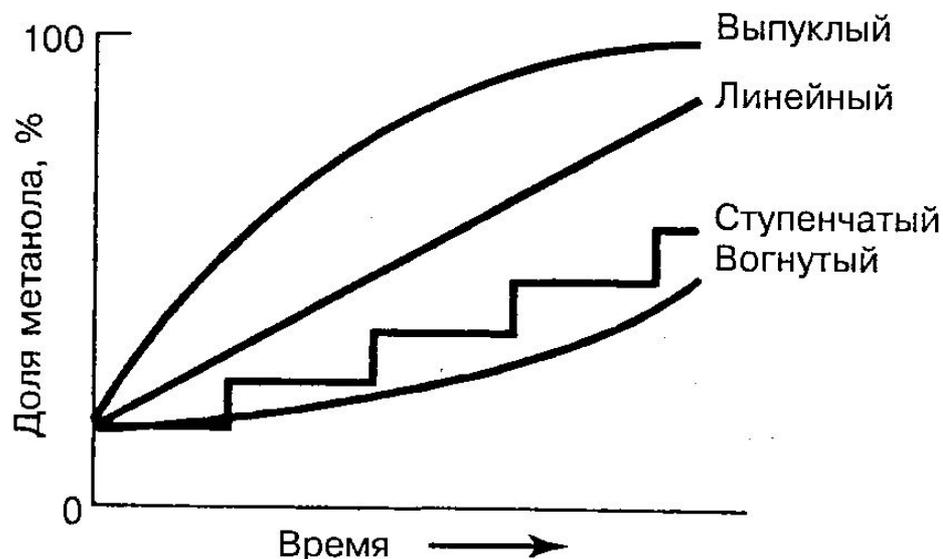
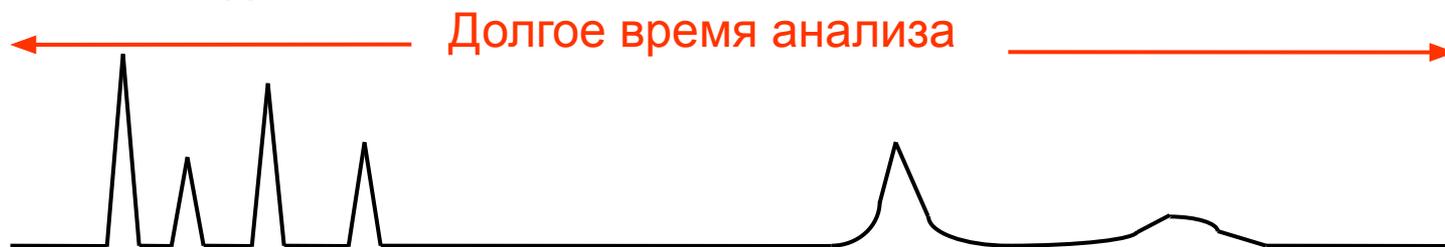


Рис. 5.3-3. Форма градиента для бинарного элюента, состоящего из метанола и воды.

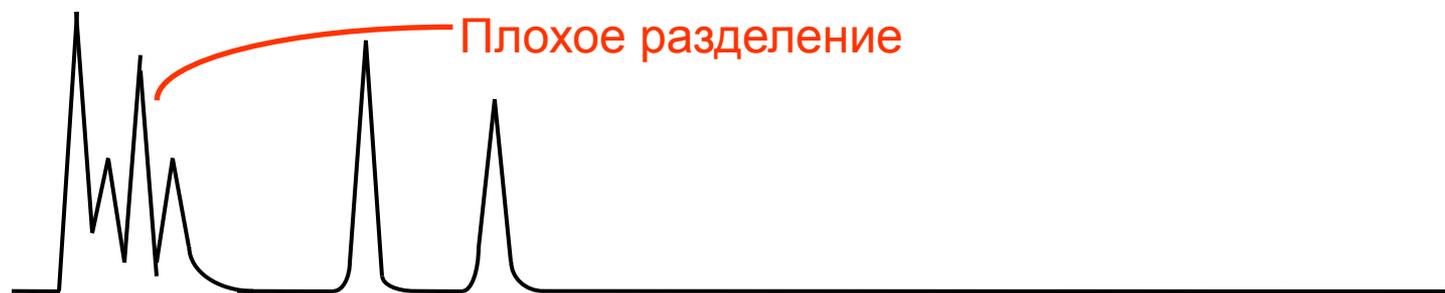
# Цель градиентного элюирования - проблемы в изократическом режиме-

- В изократическом режиме

метанол / вода = 6 / 4



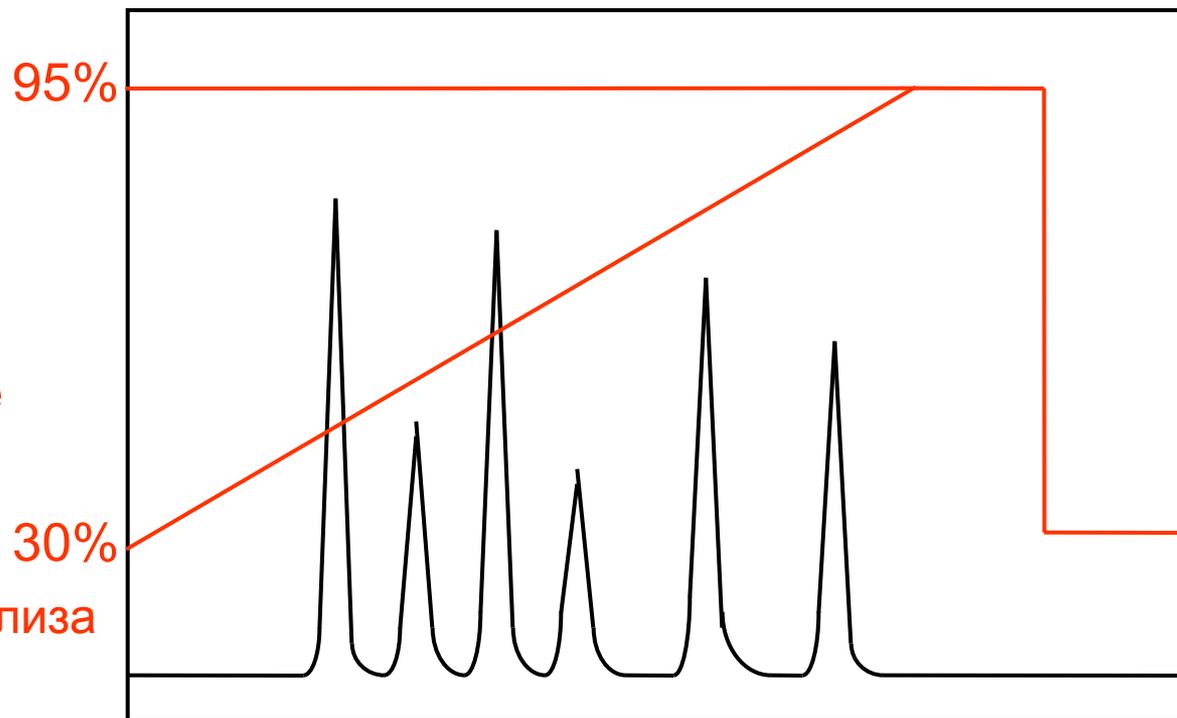
метанол / вода = 8 / 2



(Column : ODS type)

# - Решение -

- Градиентное изменение состава подвижной фазы



Концентрация  
метанола в  
подвижной фазе

Короткое время анализа  
&  
Отличное разделение

# ВЭЖХ ионной хроматографии для разделения ионов с использованием ионообменников

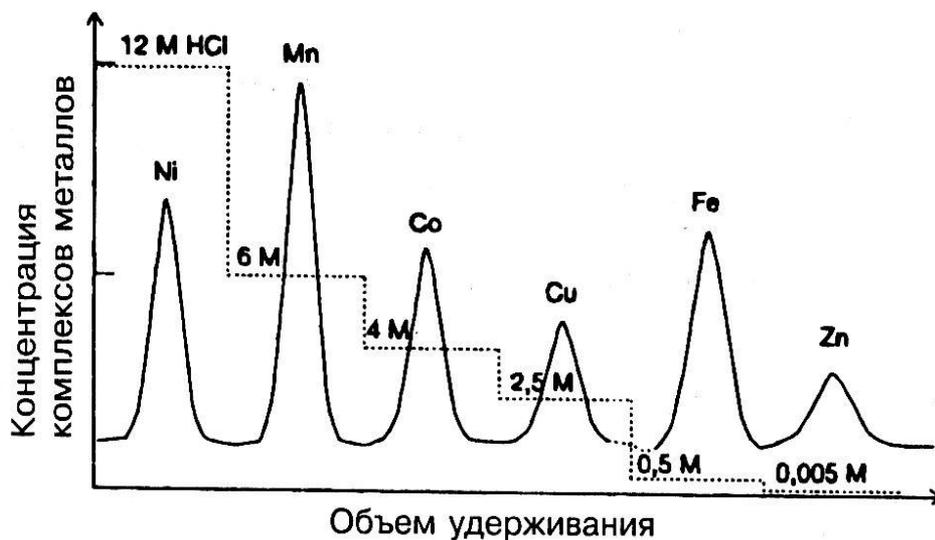
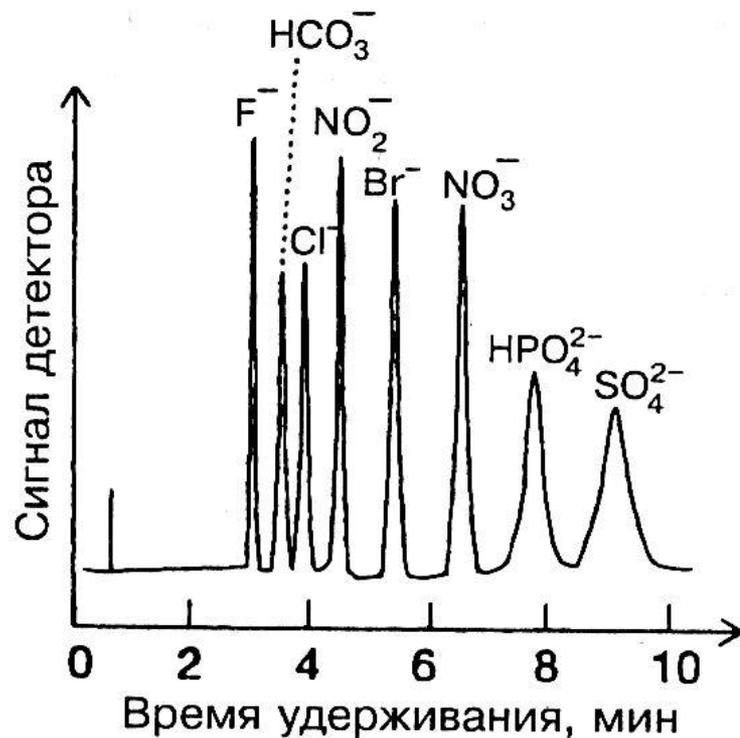


Рис. 5.3-15. Разделение ионов металлов в виде хлоридных комплексов на сильно основном анионообменнике методом ступенчатого градиентного элюирования соляной кислотой.



**Рис. 5.3-16.** Ионохроматографический анализ смеси анионов с использованием элюента 2,8 мМ NaHCO<sub>3</sub>/2,3 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

В качестве универсального принципа детектирования неорганических ионов используется измерение электропроводности