

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 (НЖФ) является **неорганический адсорбент** или **органическое твердое вещество**, ковалентно связанное с частицами сорбента в колонке.

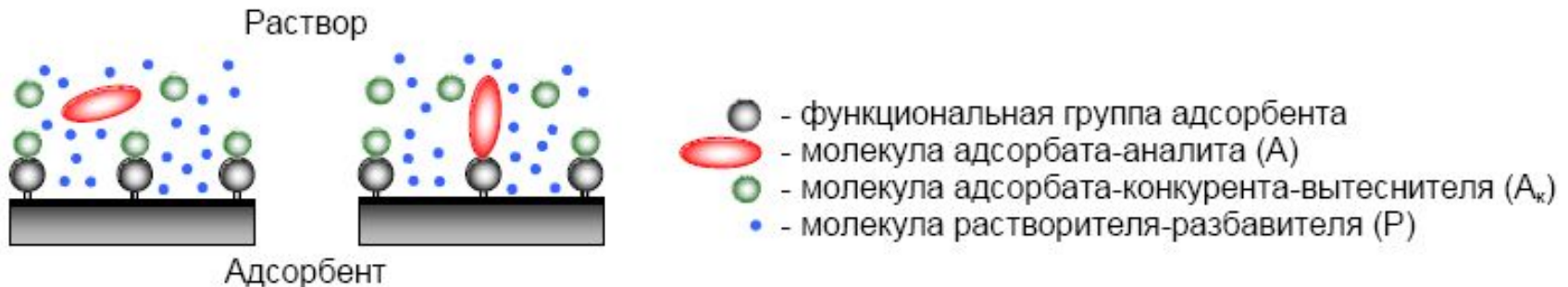
Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

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

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

*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

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

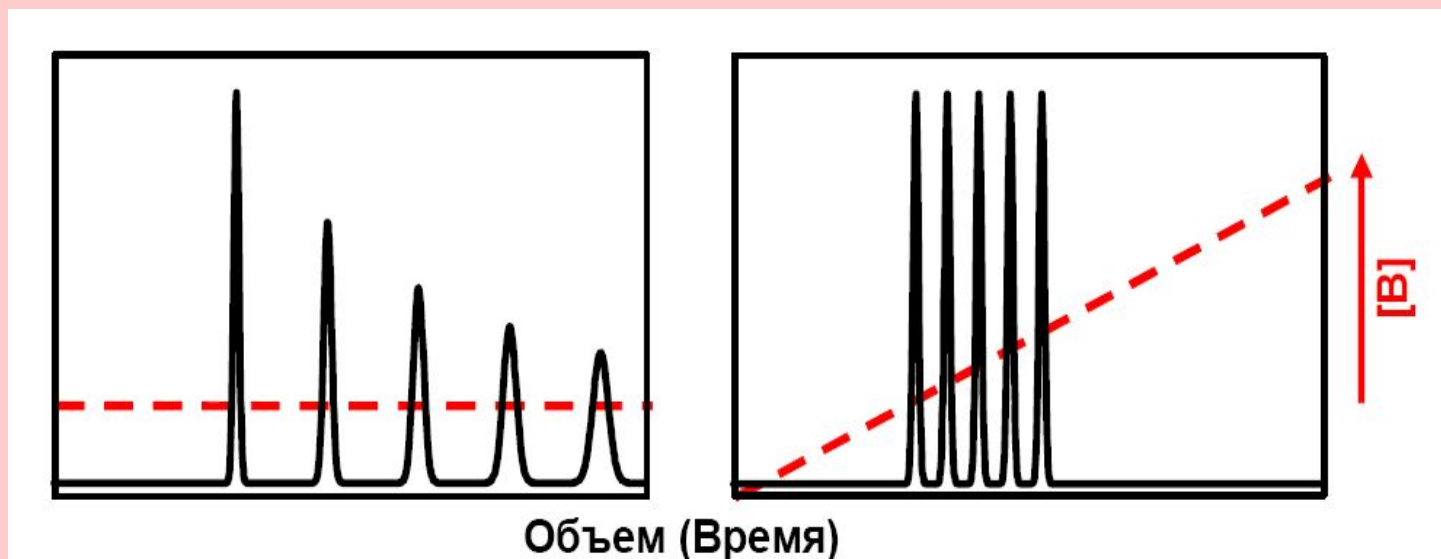
Элюотропный ряд – ряд, в котором растворители расположены в порядке возрастания элюирующей силы

Классификация жидкостной хроматографии

По составу подвижной фазы: изократическая, градиентная

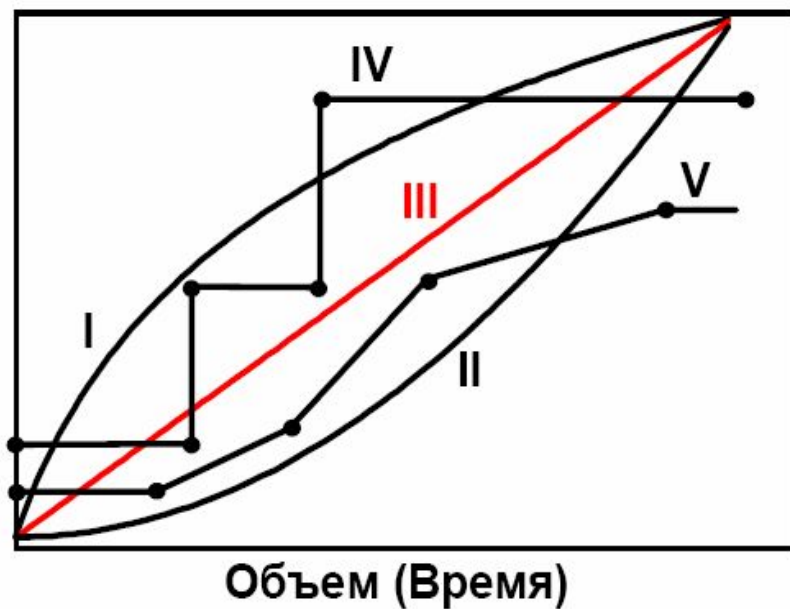
Изократический режим - состав растворителя остается постоянным во время всего хроматографического анализа. Его используют при разделении соединений с близким сродством к неподвижной фазе.

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



Классификация жидкостной хроматографии

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



Градиенты концентрации "сильного" компонента "B" в двухкомпонентной подвижной фазе ("A" + "B")

- I - выпуклый градиент
- II - вогнутый градиент
- III - линейный градиент $c_B = a + bV$
- IV - ступенчатый градиент
- V - кусочно-линейный градиент

Классификация жидкостной хроматографии

По характеристикам и взаимодействиям неподвижной фазы:

Нормально-фазная

Обращенно-фазная

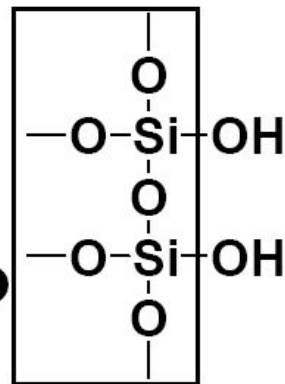
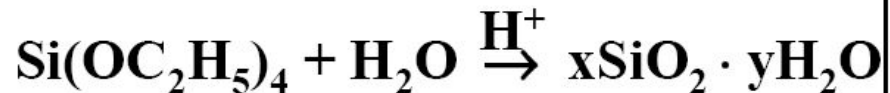
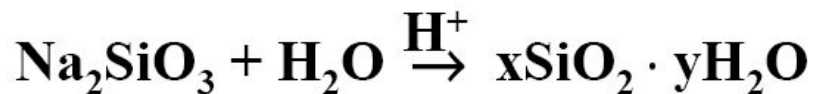
Ионообменная

Эксклюзионная

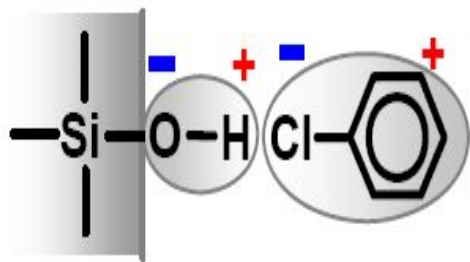
Неподвижные фазы

Нормально-фазная жидкостная хроматография: неподвижная фаза – полярная (силикагель), подвижная фаза – неполярная.

Синтез объемно-пористого силикагеля



Силанольные
группы



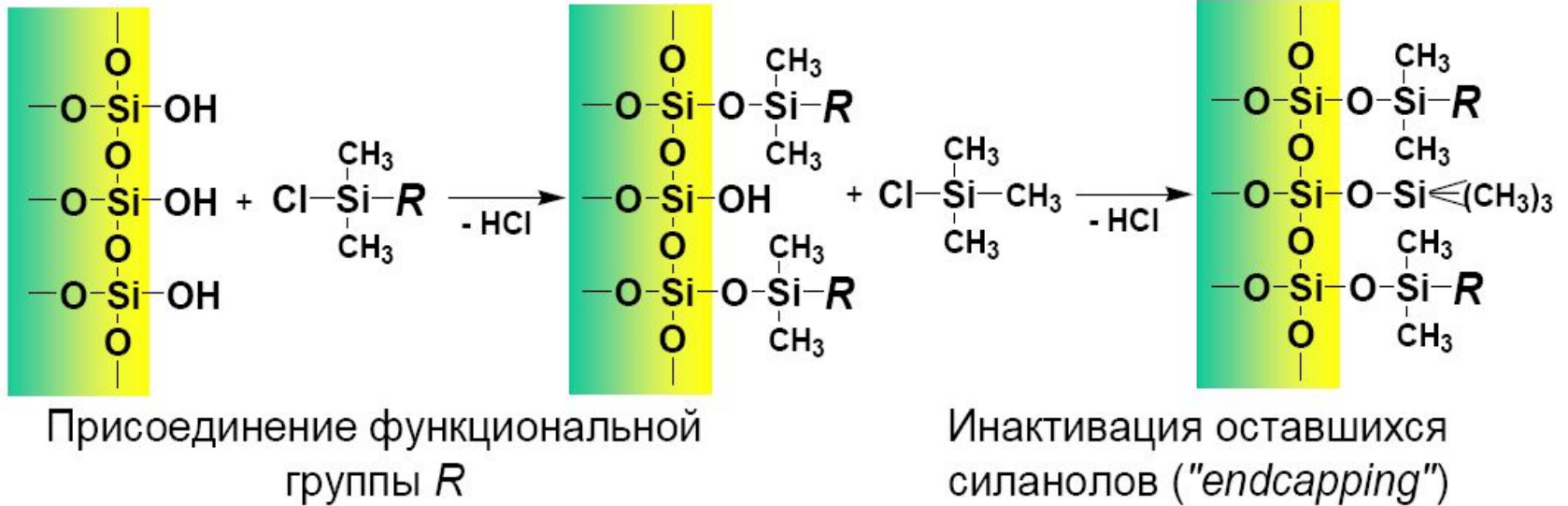
Элюенты: углеводороды, эфиры



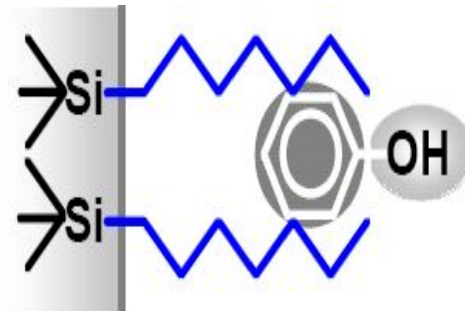
Неподвижные фазы

Обращенно-фазная жидкостная хроматография : неподвижная фаза – неполярная (модифицированный силикагель), подвижная фаза – полярная.

Синтез привитых мономерных фаз

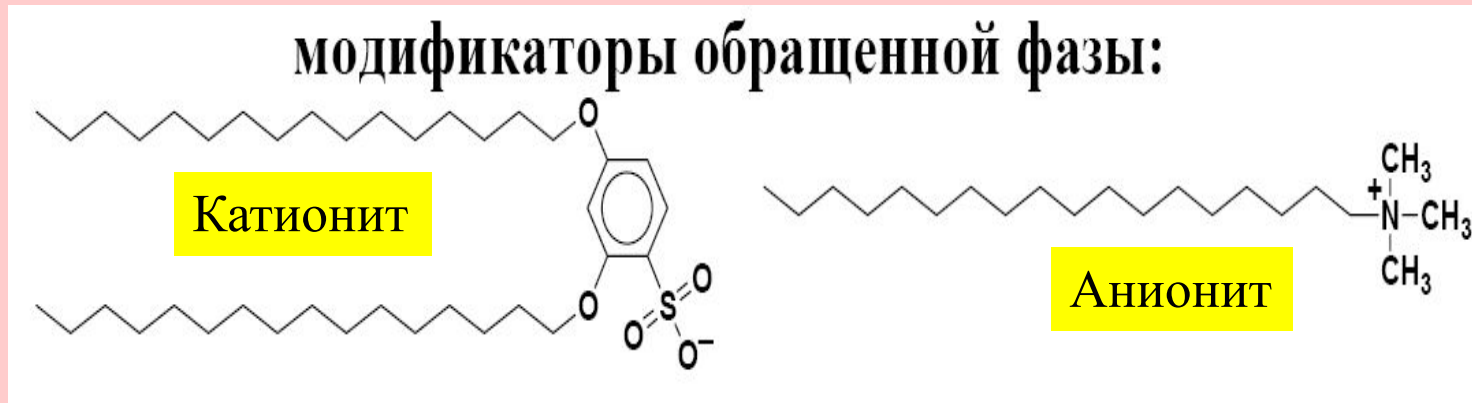


Элюенты: спирты, нитрилы, вода

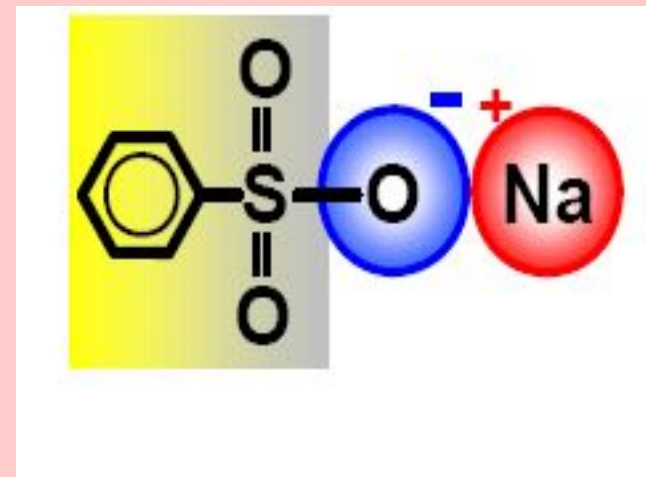


Неподвижные фазы

Фаза в **ионообменной хроматографии** имеет заряженные функциональные группы, которые взаимодействуют с анализируемыми ионизированными молекулами противоположного заряда. Может быть двух типов — **катионной** и **анионной**.

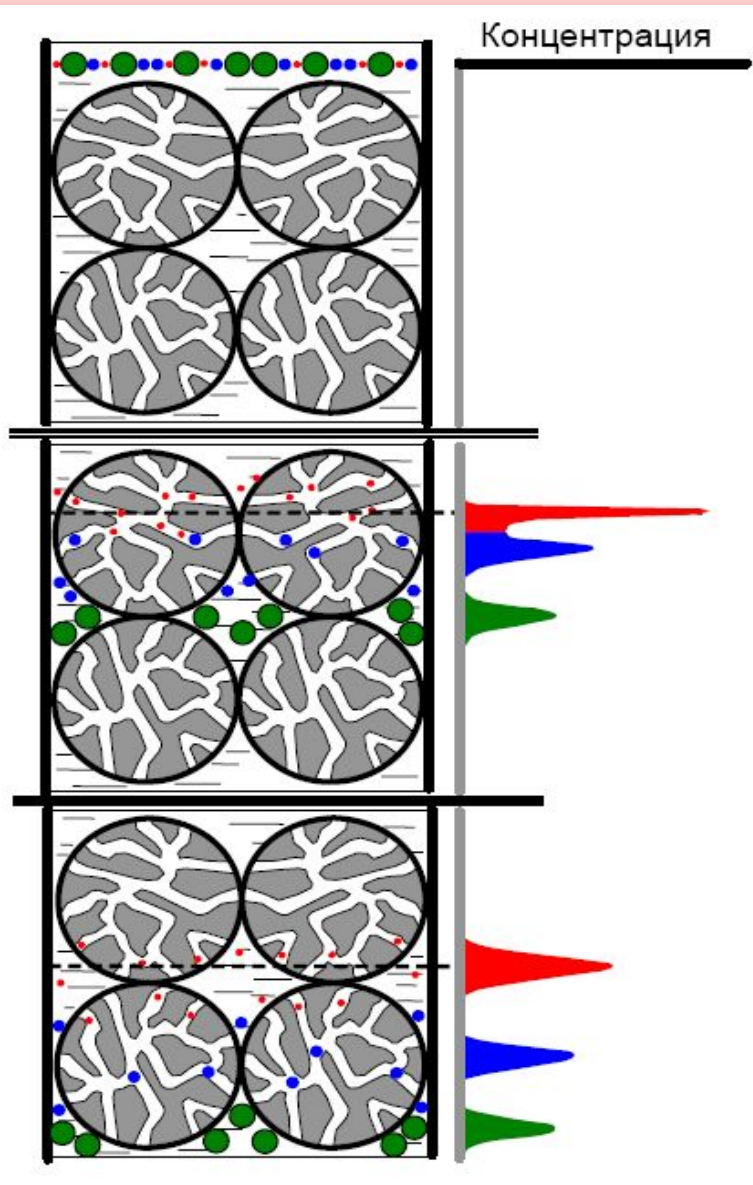


Элюенты: водные растворы солей



Неподвижные фазы

Эксклюзионная или гель-проникающая хроматография



Сорбенты: макропористые стекла, силикагель, полистирол, имеющие выраженную поровую систему

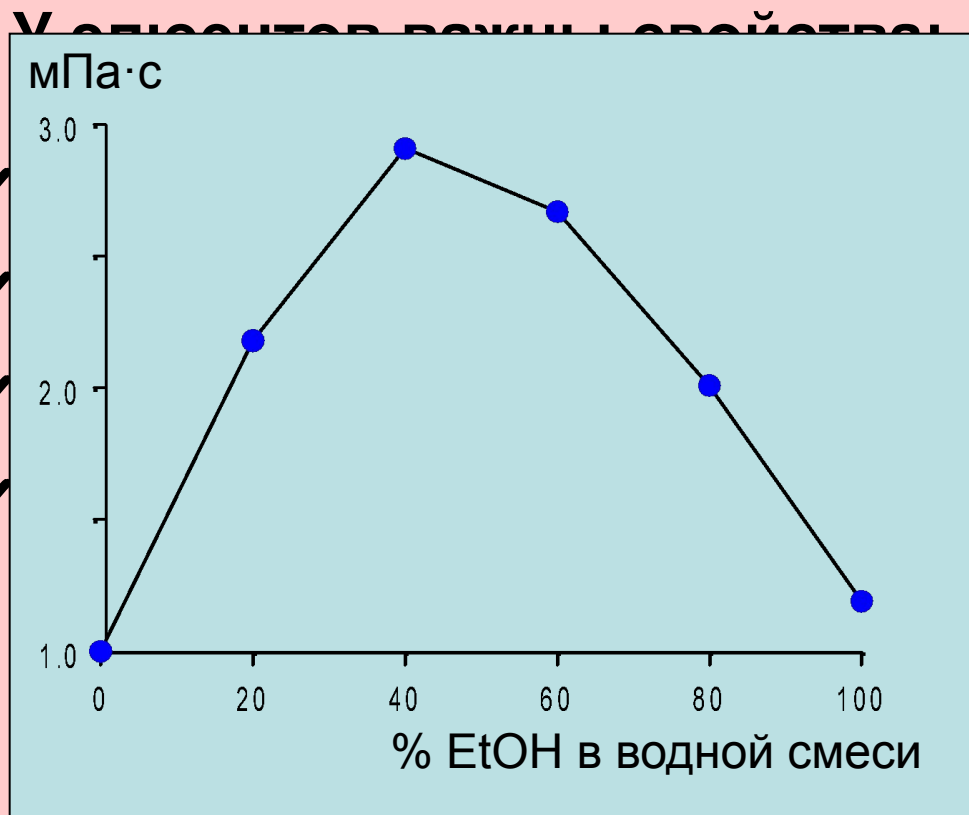
Область применения: анализ полимеров по молекулярному весу молекул.



Выбор адсорбента: определяется свойствами разделяемых веществ

Выбор состава элюента: свойства разделяемых веществ, свойства неподвижной фазы

Вязкость жидкостей при 25 °С, [мПа·с]

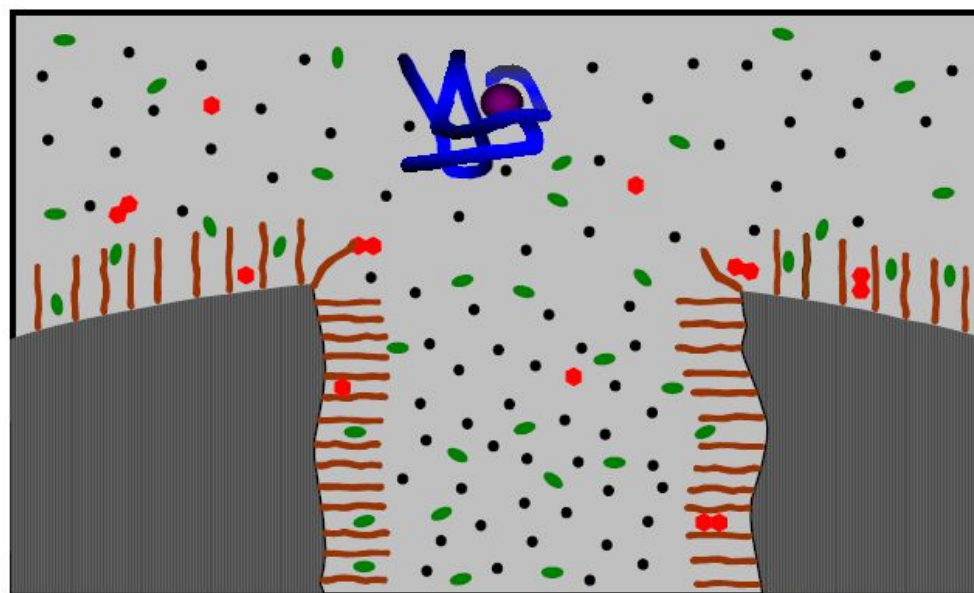


| | |
|------------------------------|-------|
| <u>ацетон</u> | 0.306 |
| <u>бензол</u> | 0.604 |
| <u>кровь</u> (при 37 °С) | 3–4 |
| <u>касторовое масло</u> | 985 |
| <u>этиловый спирт</u> | 1.074 |
| <u>этиленгликоль</u> | 16.1 |
| <u>глицерин</u> (при 20 °С) | 1490 |
| <u>мазут</u> | 2022 |
| <u>ртуть</u> | 1.526 |
| <u>метиловый спирт</u> | 0.544 |
| <u>жидкий азот</u> (при 77К) | 0.158 |
| <u>пропанол</u> | 1.945 |
| <u>оливковое масло</u> | 81 |
| <u>серная кислота</u> | 24.2 |
| <u>вода</u> | 0.894 |

Элюотропный ряд (повышение силы элюента) в обращенно-фазовой ВЭЖХ

Вода < MeOH < ACN < EtOH < Тетрагидрофуран < Пропанол < Диоксан

ФАЗА "C18" ПОД МИКРОСКОПОМ

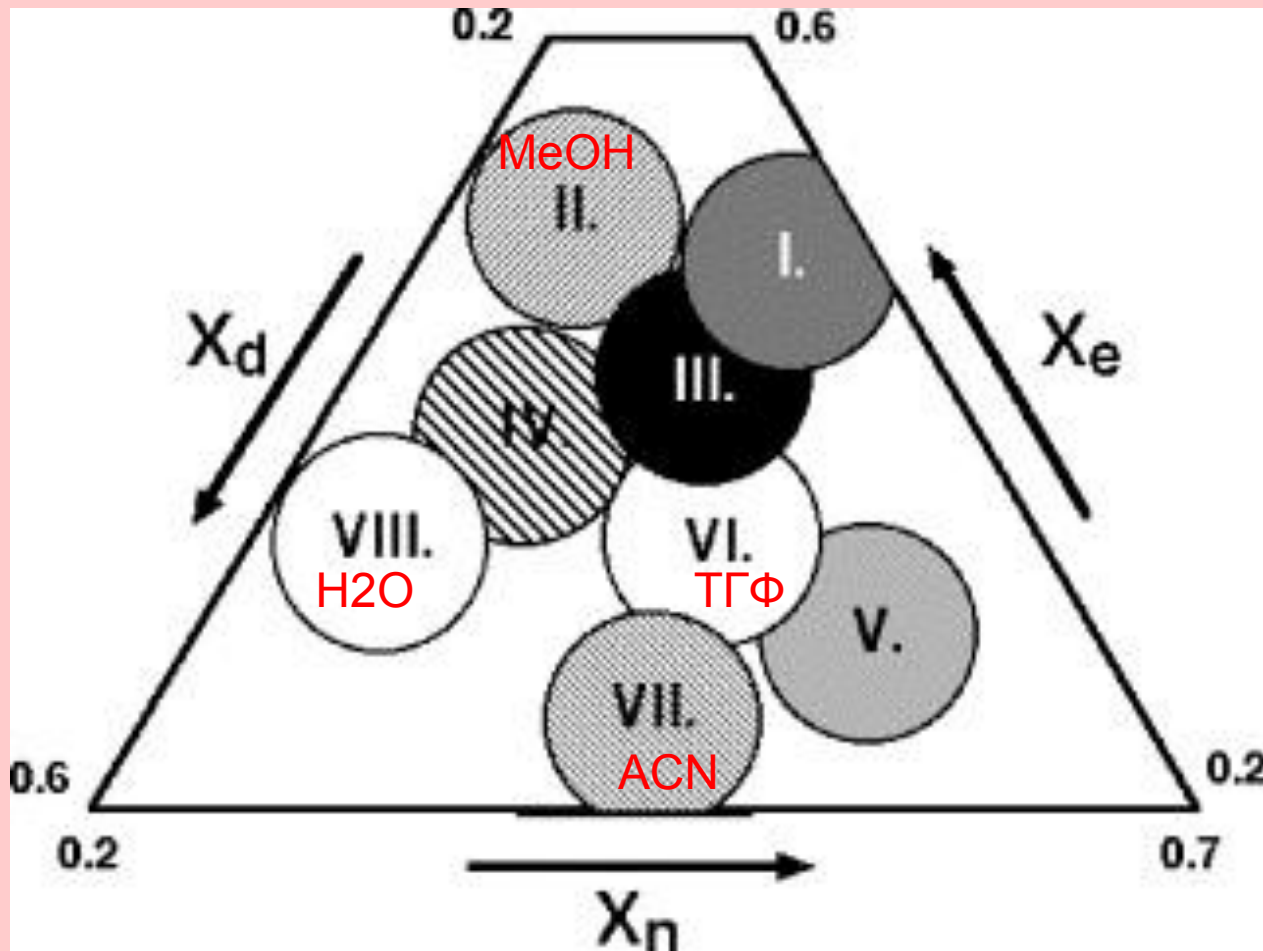


- - Вода
- - Метанол
- - Бензол
- - Нафталин
- - Октадецил

100 Å

Миоглобин

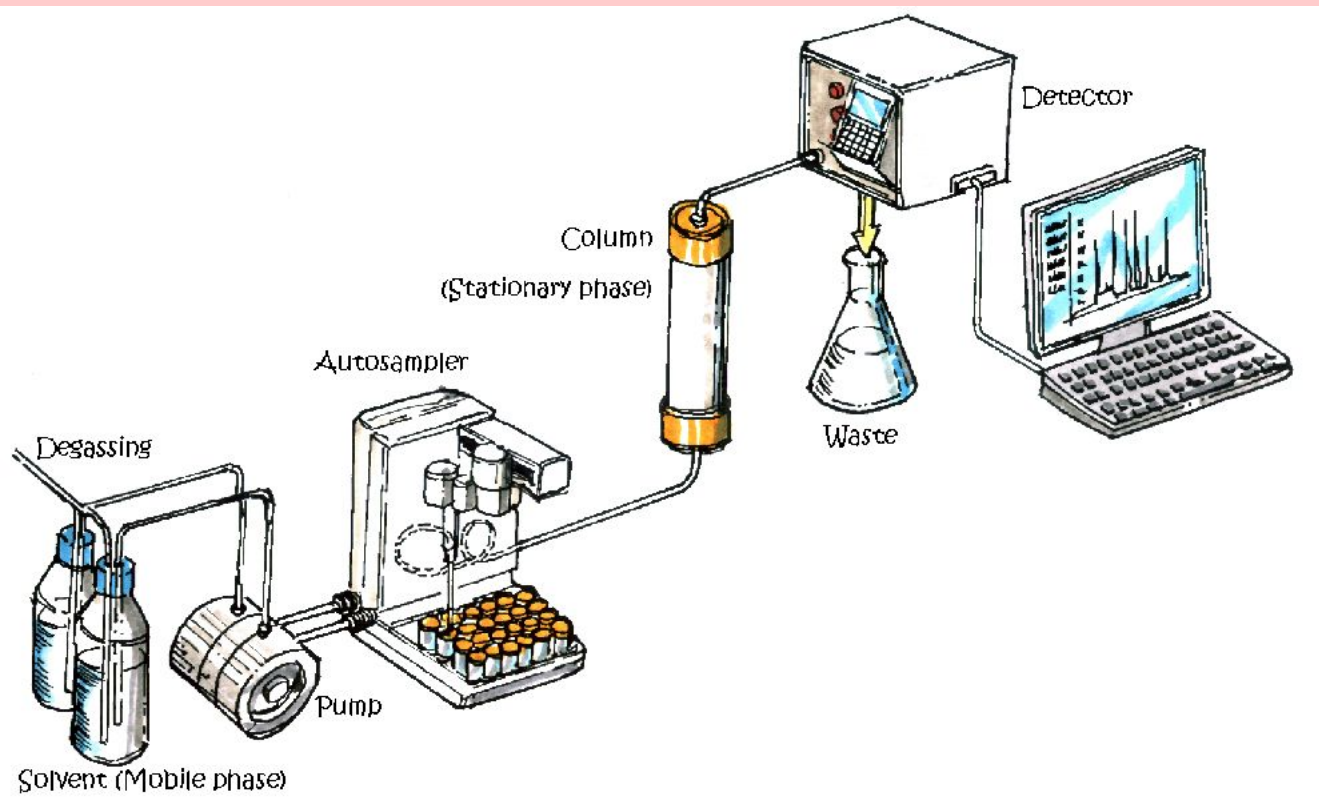
Классификация селективности растворителей по Снайдеру



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

Компоненты ВЭЖХ прибора

Система растворителей, насосы, система дозирования, колонка, детектор, обрабатывающий модуль



Agilent 1200

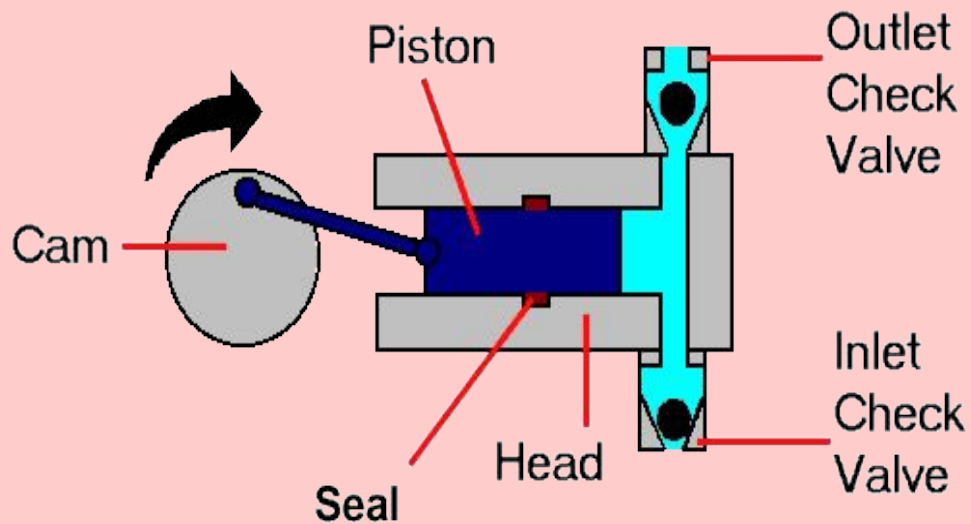
Система растворителей

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

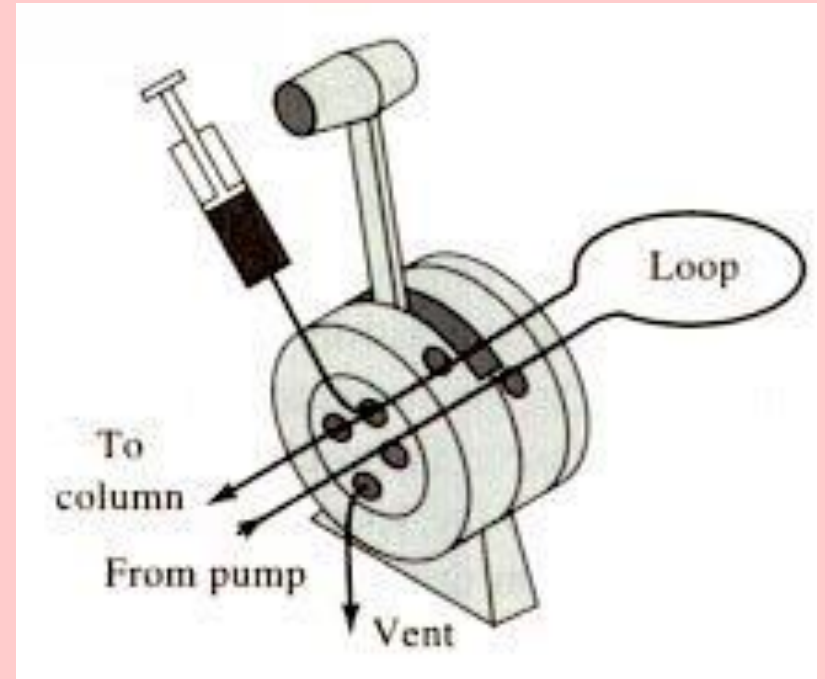
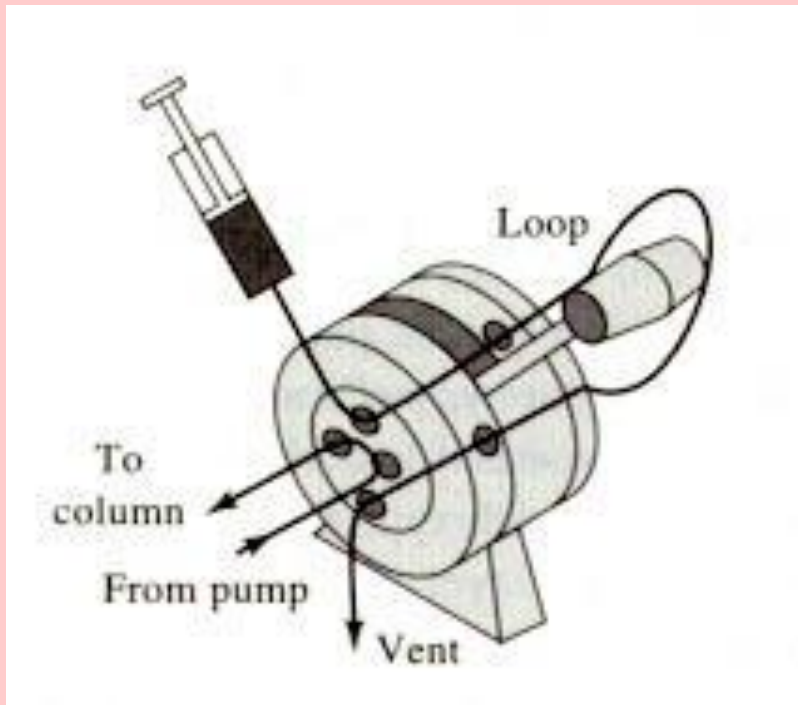
Насосы

Шприцевого
типа

Плунжерного
типа

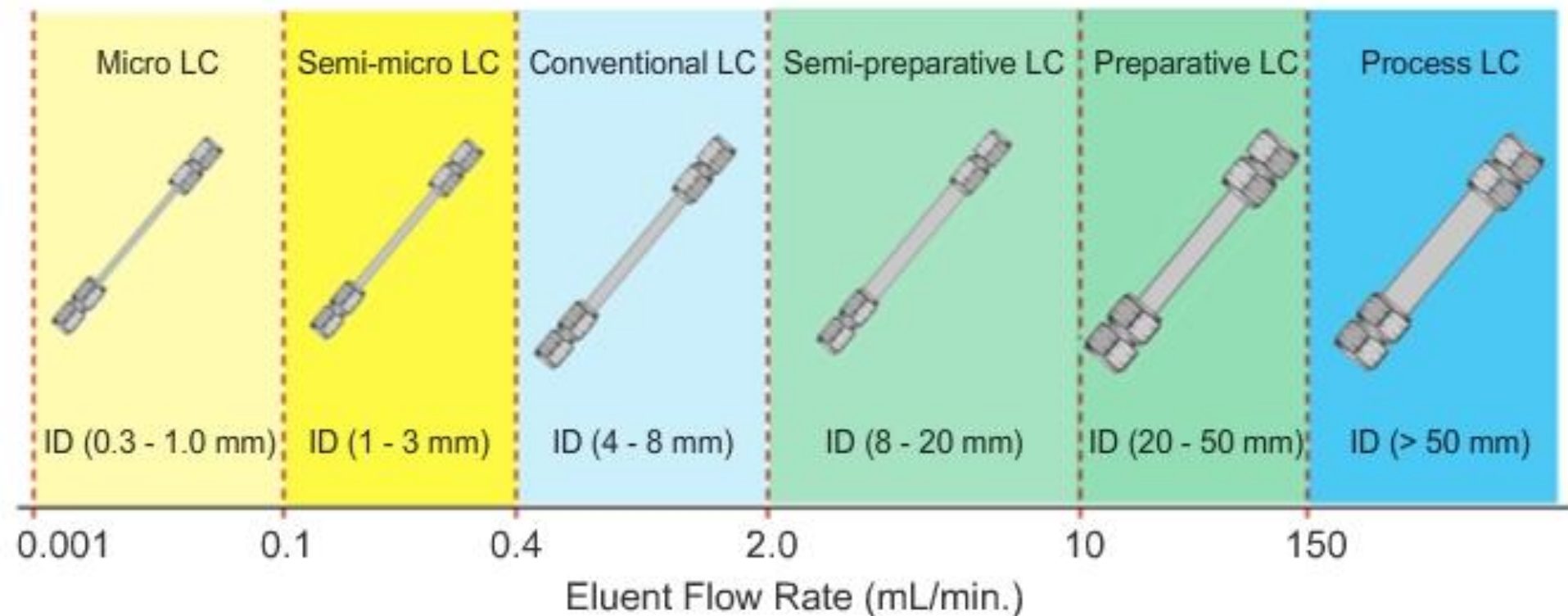


Система дозирования



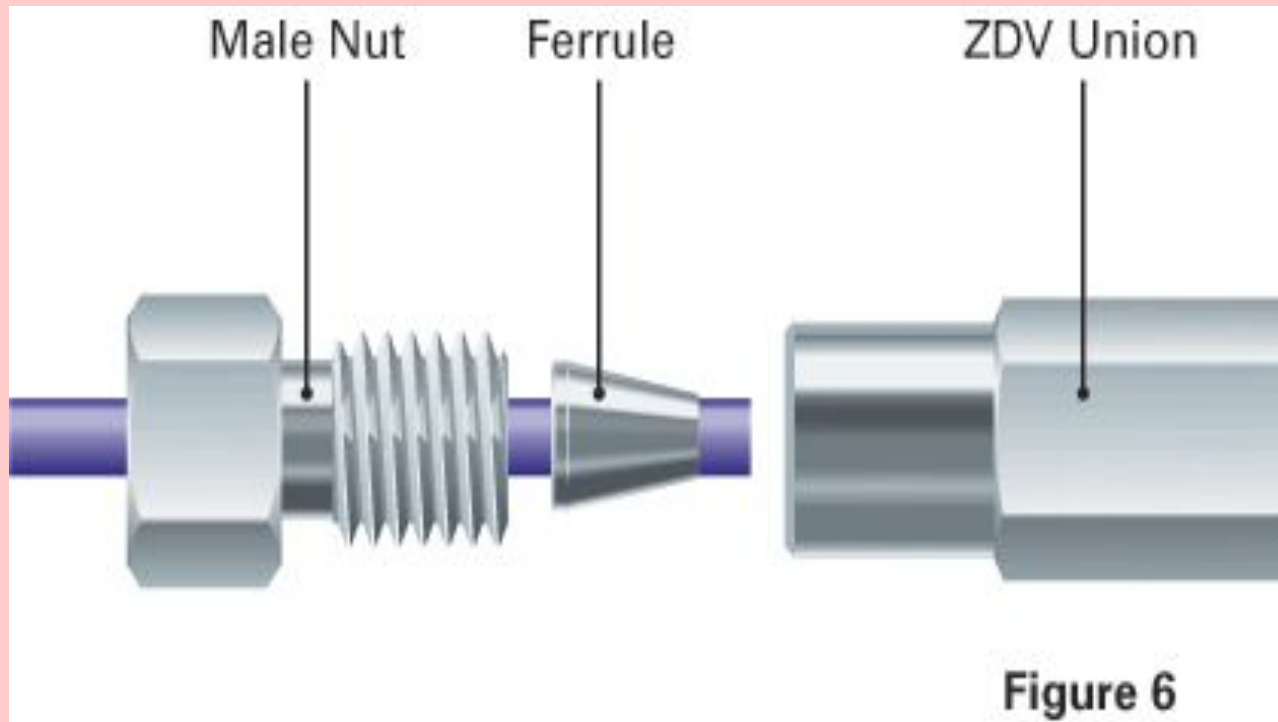
Петля объемом 5-100 мкл, 6-ходовый кран

Колонки для ВЭЖХ

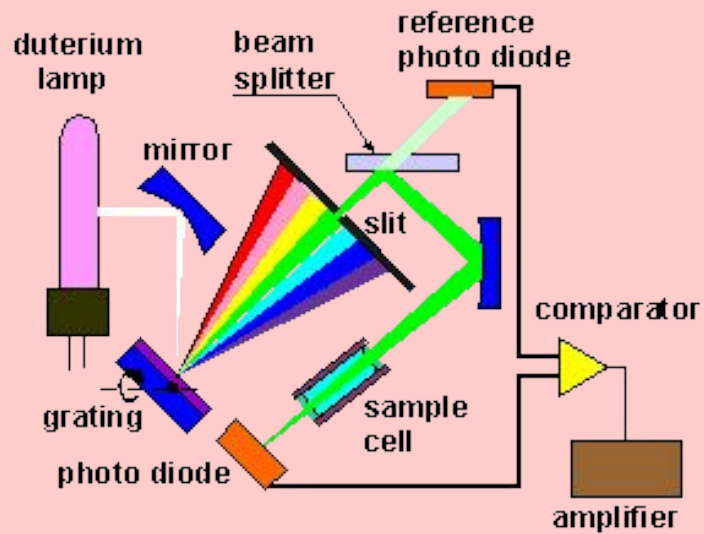


Соединения в ВЭЖХ

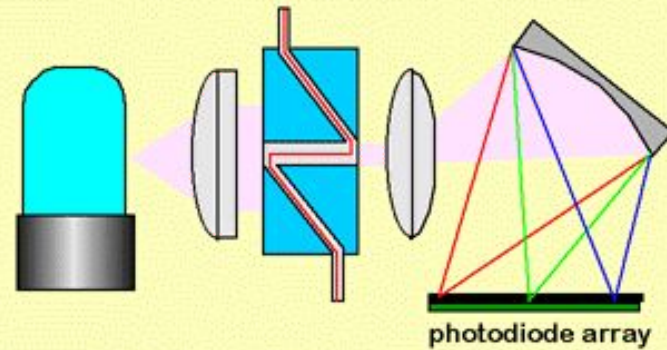
Важны! Отсутствие течи дает постоянное давление и скорость потока, как следствие эффективное разделение



Спектрофотометрическая детекция



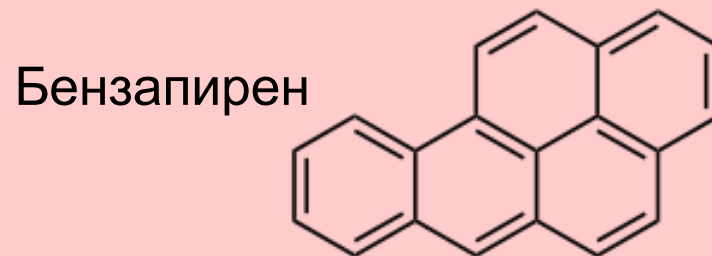
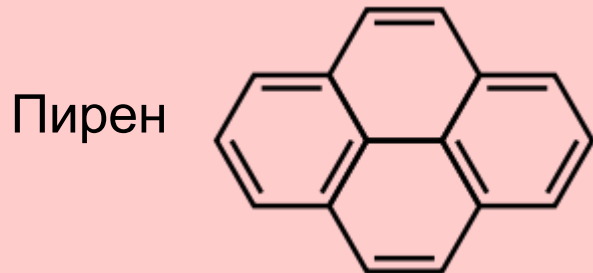
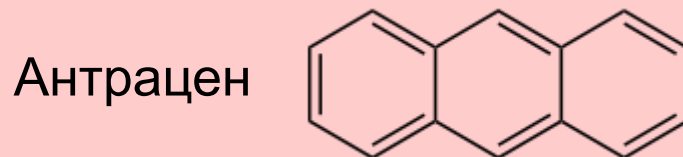
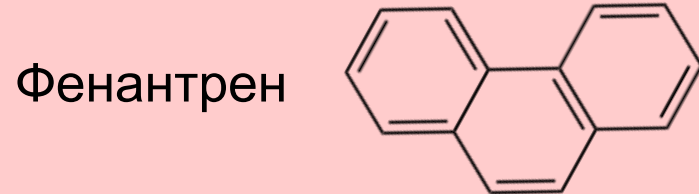
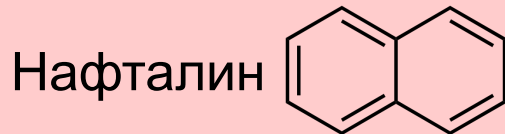
Photodiode array detector



The photodiode array allow you to simultaneously monitor a range of λ or obtain complete spectra.

Исследуемые смеси:

Полиароматические углеводороды (ПАУ)



В химической структуре – от двух и более конденсированных колец. При комнатной t – твердые вещества, хорошо растворимы в орг. растворителях, малорастворимы в воде.

Полиароматические углеводороды (ПАУ)

Техногенные источники:

- предприятия энергетического комплекса,
- автомобильный транспорт,
- химическая и нефтеперерабатывающая промышленность.
- термические процессы, связанные со сжиганием и переработкой нефтепродуктов, угля, древесины, мусора, пищи, табака и др.



Природные источники:

- репеленты некоторых растений и животных,
- летучие метаболиты грибов,
- процессы горения биомассы,
- извержения вулканов,
- обнаружены на метеоритных частицах.



Courtesy F. L. Knopf, USGS

Полиароматические углеводороды (ПАУ)

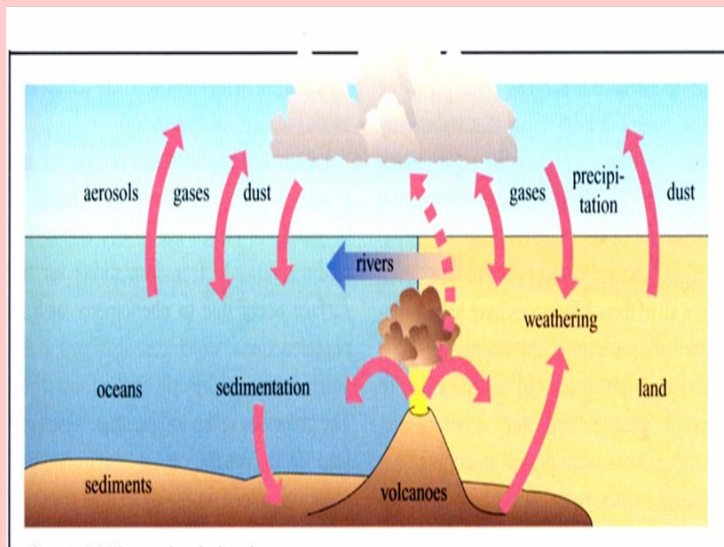
Получение: из каменноугольной смолы



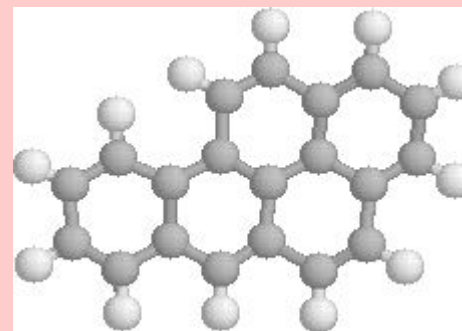
Продукты переработки каменного угля



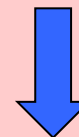
Применение и значение ПАУ



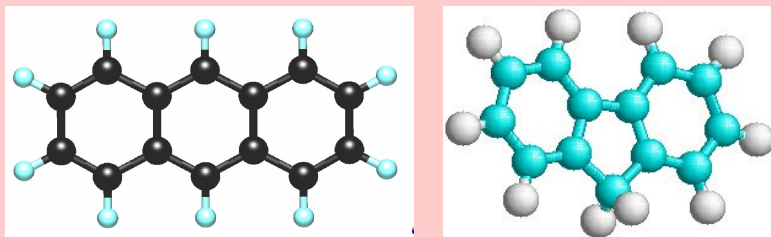
Перенос в биогеохимических циклах, накопление в тканях организмов



Канцерогенное, мутагенное, тератогенное воздействие, кожные и аллергические заболевания



Необходимость мониторинга в окружающей среде: воздухе, воде, почвах



Синтез красителей, взрывчатых веществ, инсектицидов и пр.