

Московский физико-технический институт
(Государственный университет)
Департамент молекулярной и биологической физики

Физические методы исследования

Лекция 9

Жидкостная хроматография Методы и техника

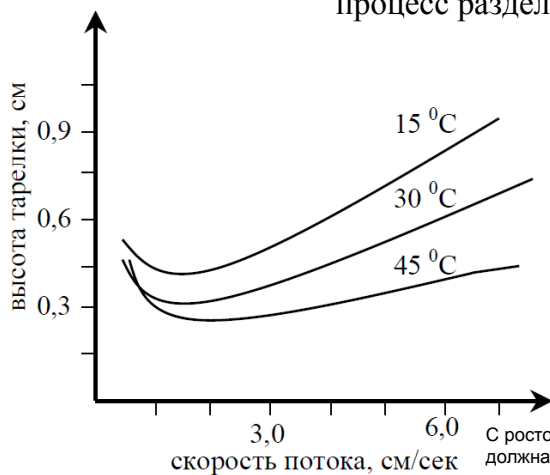
г. Долгопрудный, 31 октября 2015г.

1

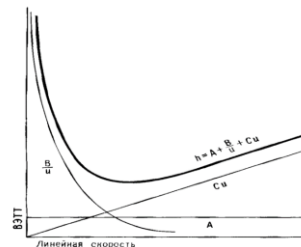
Литература

- Франкевич Е.А. Физические методы исследования. Учебное пособие /М.: МФТИ ч.1 (1986), ч.2 (1978), ч.3 (1980).
- Д.В. Сивухин. Общий курс физики, т.2
- Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. Под. Ред. А. Хеншен, К.-П. Хупе, Ф. Лотшпайх, В. Вёльтер, М.: Мир, 1988
- Максимычев А.В. Адсорбционная газовая хроматография. Учебно-методическое пособие. М.: МФТИ, 2009г.
- В.А. Винарский. Хроматография. Курс лекций. Минск, 2003г.

Газовая хроматография: влияние температуры на процесс разделения

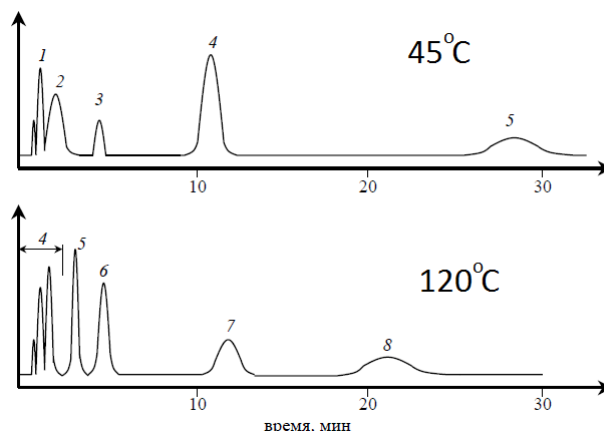


2,3 – диметилбутан
Колонка: длина 1 м, сорбент
содержит 39 % ПЭГ-400



С ростом температуры эффективность колонки должна улучшаться (высота, эквивалентная теоретической тарелке уменьшается), однако при любой постоянной температуре невозможно выбрать скорость потока газа-носителя такой, чтобы обеспечить максимальную эффективность колонки для всех разделяемых веществ, различающихся температурами кипения

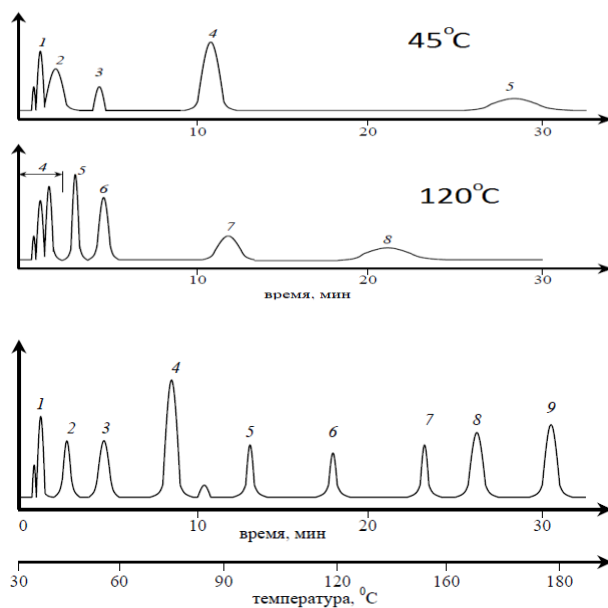
Влияние температуры на разделение в ГХ Хроматограммы в изотермическом режиме



Смесь веществ с температурами кипения до 226 °C

Пики 1–6 соответствуют н-алканам от пропана до октана;
7 – бромформ; 8 – м-хлортолуол.

Роль программируемого нагрева Хроматограммы в режиме линейного роста



Смесь веществ с температурами кипения до 226 °C

Пики 1– 6 соответствуют н-алканам от пропана до октана;
7 – бромформ;
8 – м-хлортолуол;
9 – м-бромтолуол.

Жидкостная хроматография



Подвижная фаза в жидкостной хроматографии:

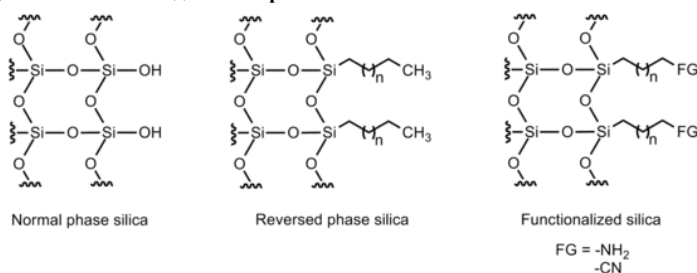
- 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии);
- 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ.



Mobile Phase Chromatographic Polarity Spectrum

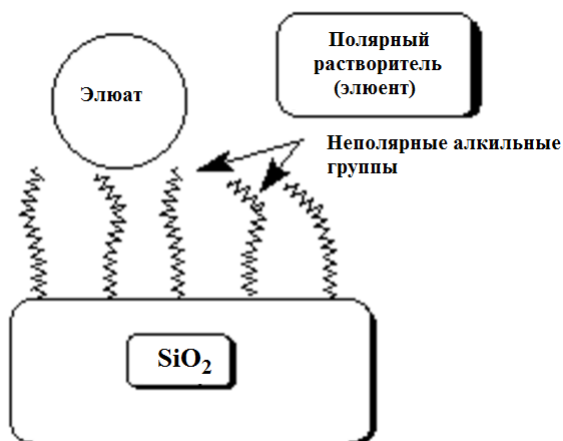
В нормально-фазовой ВЭЖХ НФ – полярная (чаще всего силикагель), а ПФ – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.). Удерживание веществ растет с увеличением их полярности. Разделения компонентов достигают, меняя элюирующую силу подвижной фазы, которая зависит от энергии взаимодействия компонентов ПФ с поверхностью НФ. В нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность ПФ увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C8, C18); ПФ – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Наименьшей элюирующей способностью обладает вода, а для повышения элюирующей способности в ПФ вводят ацетонитрил, метанол и другие растворители. **Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.**





При **нормально-фазовом** варианте распределительной жидкостной хроматографии используются неполярный элюент и полярные группы, привитые к поверхности сорбента (чаще всего силикагеля). В качестве модификаторов поверхности силикагеля (привитых фаз) используются замещенные алкилхлорсиланы, содержащие полярные группы, такие как нитрильная, аминогруппа и т. д. Применение привитых фаз позволяет тонко управлять сорбционными свойствами поверхности неподвижной фазы и добиваться высокой эффективности разделения.



Обращенно-фазовая жидкостная хроматография основана на распределении компонентов смеси между полярным элюентом и неполярными группами (длинными алкильными цепочками), привитыми к поверхности сорбента

Элюирующая способность подвижной фазы – это ее способность вступать в межмолекулярные взаимодействия с разделяемыми соединениями и группами на поверхности сорбента. Эти взаимодействия способствуют десорбции разделяемых соединений, более быстрому перемещению хроматографических зон. Многократное увеличение гибкости метода ВЭЖХ достигается за счет применения в качестве подвижных фаз смесей растворителей.

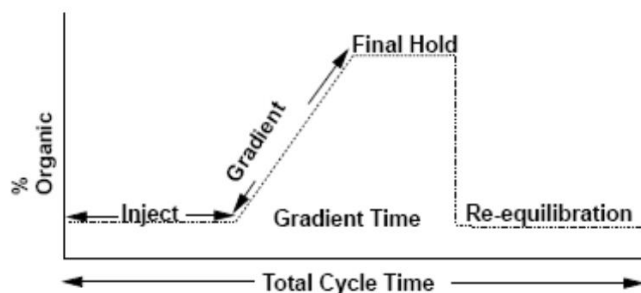
Растворитель	Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила ϵ^0 на силикагеле	Параметр Р'	Параметр S	Группа селективности
Ацетонитрил	190	0,50	5,8	3,1	VI
Вода	-	1.50	10,2	0,0	VIII
Гексан	190	0,01	0,1	-	-
Диоксан	215	0,45	4,8	3,5	VI
Метанол	205	0,7	5,1	3,0	II
Метиленхлорид	233	0,32	3,1	-	V
Пропанол-2	205	0,55	3,9	4,2	II
Тетрагидрофуран	212	0,44	4,0	4,4	III
Толуол	285	0,1	2,4	-	VII
Триэтиламин	-	-	1,9	-	I
Уксусная кислота	-	-	6,0	-	VI
Хлороформ	245	0,26	4,1	-	VIII
Этанол	210	0,6	4,3	-3,6	II
Этилацетат	256	0,38	4,4	-	VI

- параметр адсорбционной силы растворителя ϵ^0 , который представляет собой относительную энергию взаимодействия молекул подвижной фазы с поверхностью адсорбента;
- параметр Р' (параметр Снайдера), который рассчитывают как сумму логарифмов коэффициентов распределения стандартных веществ (этанола, диоксана и нитрометана) между паровой фазой и испытуемым растворителем;
- параметр S, который отражает чувствительность величин удерживания к изменению состава подвижной фазы. Эта величина предложена для ОФ ВЭЖХ.

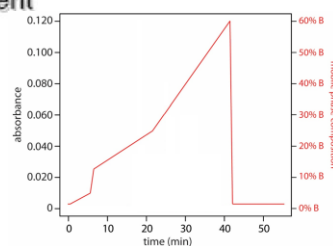
Растворитель	Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила ϵ^0 на силикагеле	Параметр Р'	Параметр S	Группа селективности
Ацетонитрил	190	0,50	5,8	3,1	VI
Вода	-	1.50	10.2	0,0	VIII
Гексан	190	0,01	0,1	-	-
Диоксан	215	0,45	4,8	3,5	VI
Метанол	205	0,7	5,1	3,0	II
Метиленхлорид	233	0,32	3,1	-	V
Пропанол-2	205	0,55	3,9	4,2	II
Тетрагидрофуран	212	0,44	4,0	4,4	III
Толуол	285	0,1	2,4	-	VII
Триэтиламин	-	-	1,9	-	I
Уксусная кислота	-	-	6,0	-	VI
Хлороформ	245	0,26	4,1	-	VIII
Этанол	210	0,6	4,3	-3,6	II
Этилацетат	256	0,38	4,4	-	VI

- ϵ^0 - энергию взаимодействия молекул подвижной фазы с поверхностью адсорбента;
- параметр Р' - который рассчитывают как сумму логарифмов коэффициентов распределения стандартных веществ (этанола, диоксана и нитрометана) между паровой фазой и испытуемым растворителем;
- параметр S - чувствительность величин удерживания к изменению состава подвижной фазы.

Градиентное элюирование



The following diagram illustrates the cycle time parameters that are used in a typical gradient



Устройство жидкостного хроматографа

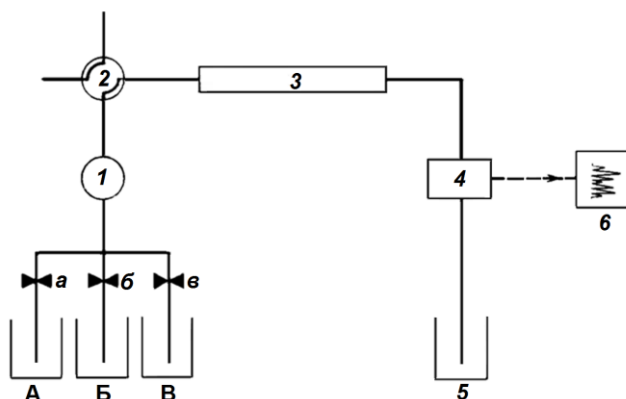


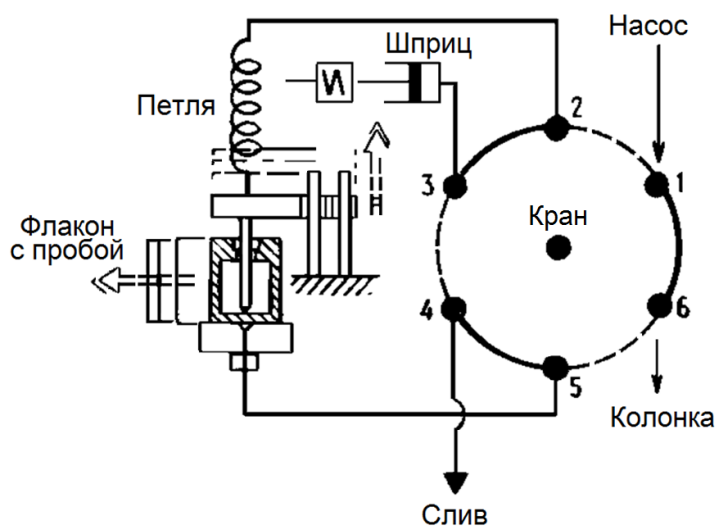
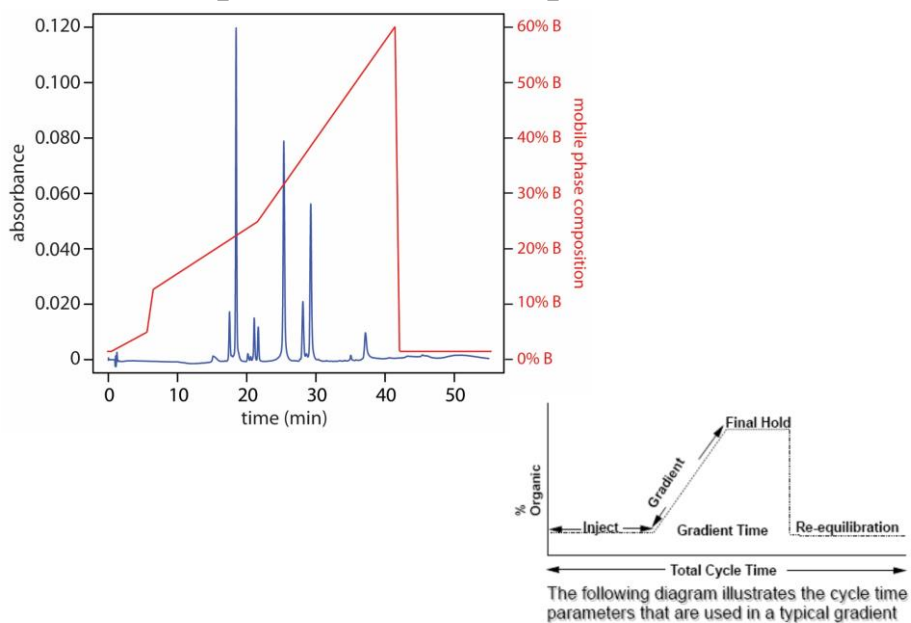
Схема жидкостного хроматографа

A, Б, В – резервуары для растворителя (носителя)

a, б, в – дозирующие устройства

1 – насос, **2** – кран для ввода пробы, **3** – колонка, **4** – детектор, **5** – ёмкость для элюата, **6** – детектор

Градиентное элюирование

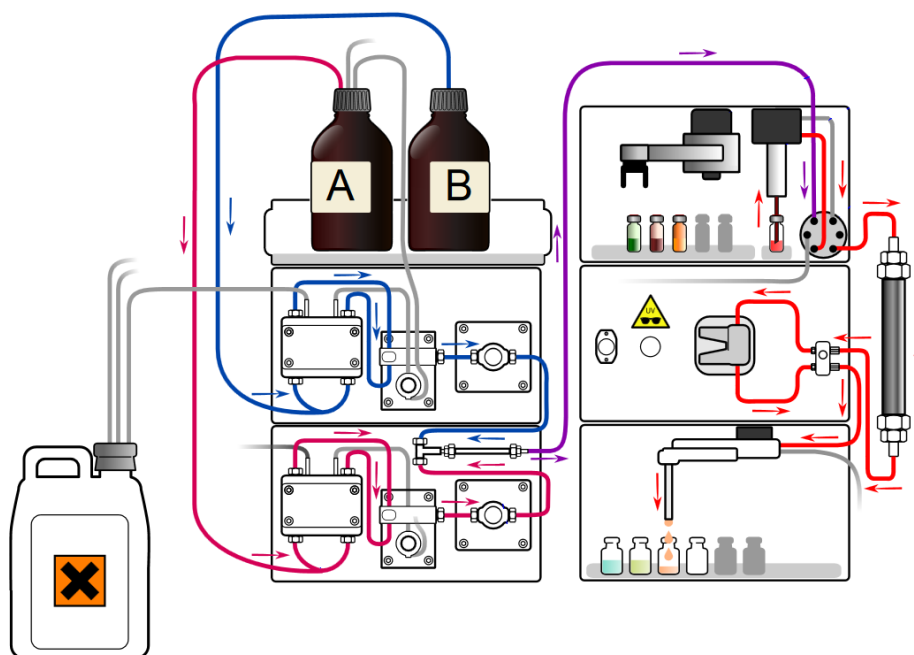


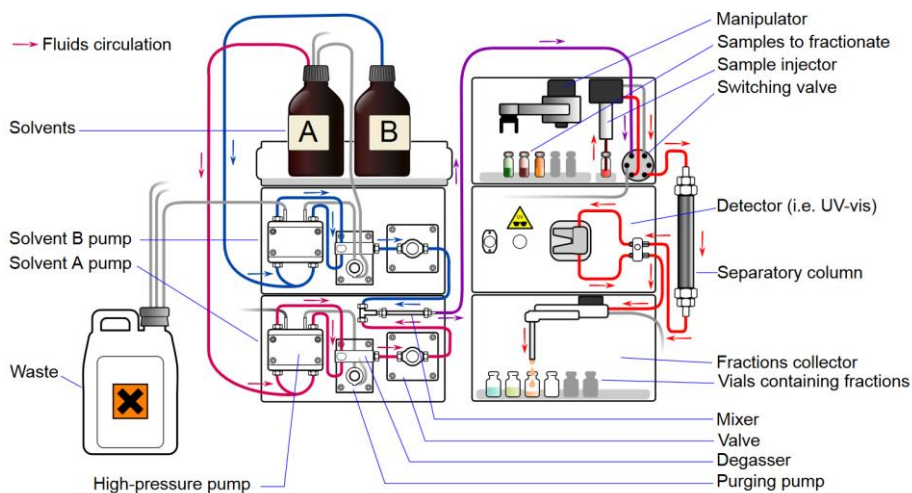
Автоматическая система ввода пробы

Роботизированные системы для ввода пробы



Схема препаративного жидкостного хроматографа

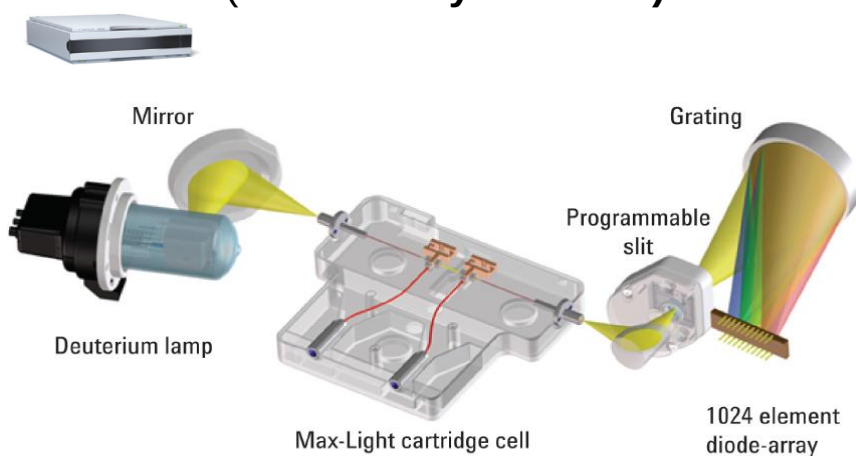




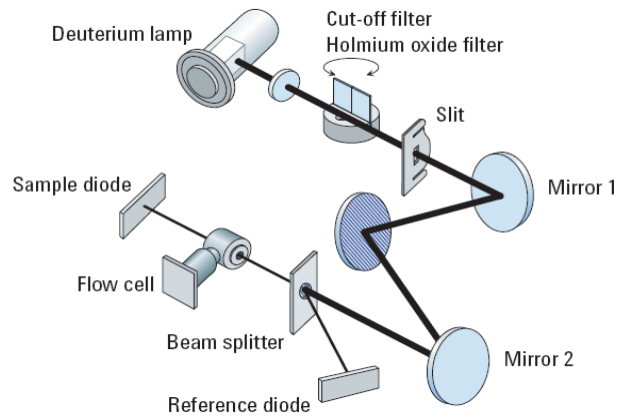
Детекторы в ЖХ

- Рефрактометрический
- Абсорбционные детекторы (УФ, видимый диапазоны)
- Флуориметрический
- Электрохимический
- И др.

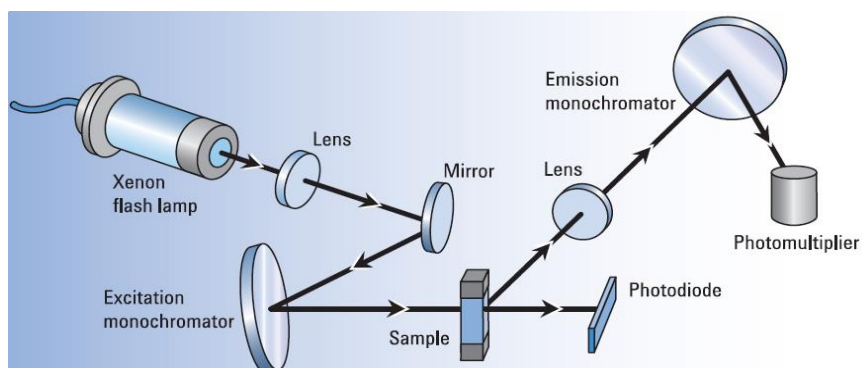
Multiple wavelength detector (Diode Array Detector)



Variable wavelength detector



Fluorescence Detector



Refractive Index Detector



Countercurrent heat exchangers keep the optical unit – and the flow cells – at constant temperature.

Tungsten lamp

Condenser lens

Light-receiving elements

"Zero" glass

Heat exchangers

Collimator lens

Flow cells

Mirror

