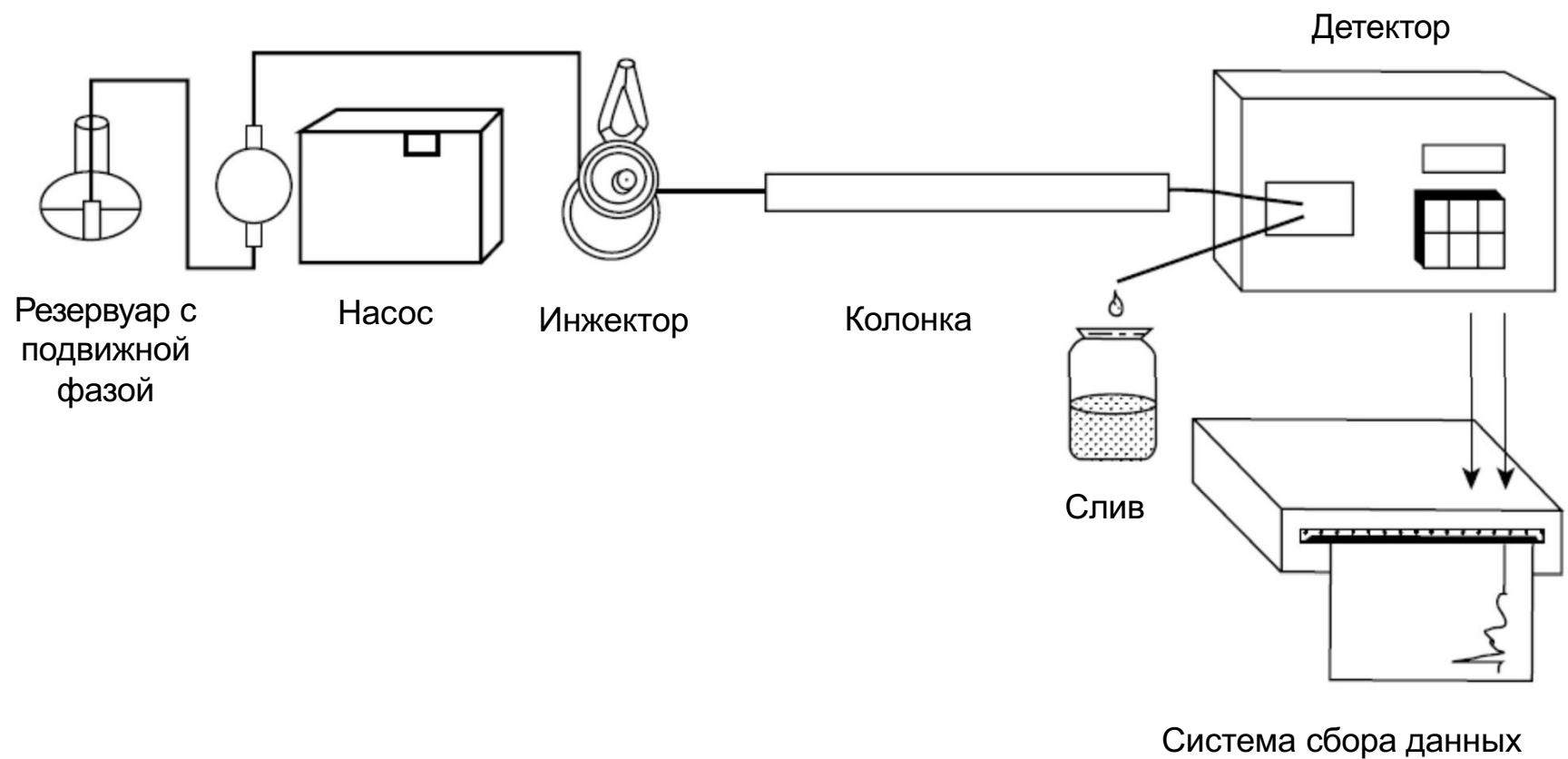


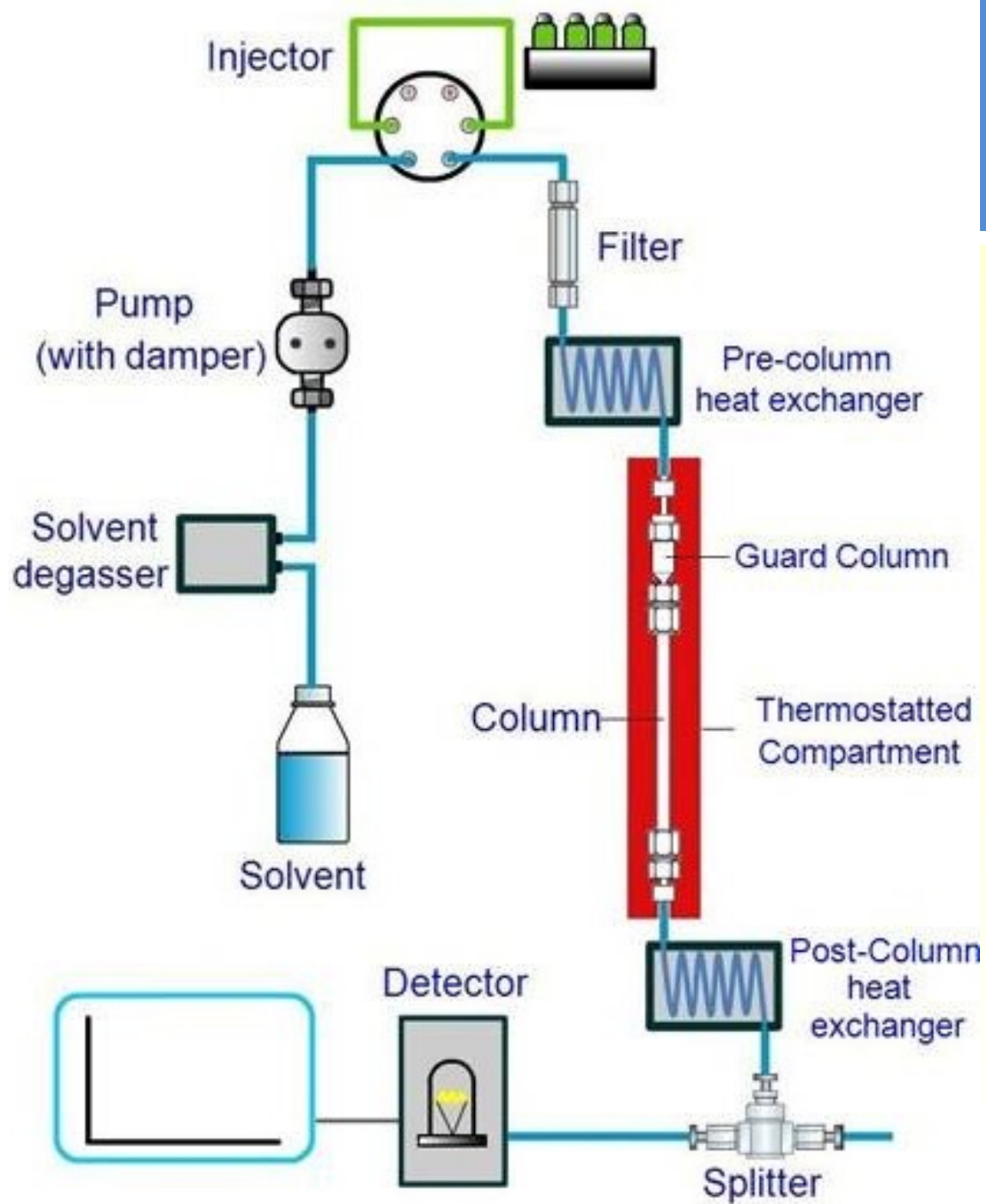
Жидкостная хроматография (ЖХ)

Вопрос

- Что такое хроматография?
- Каковы основные преимущества хроматографических методов анализа?

Жидкостный хроматограф





www.chromacademy.com/

ВЭЖХ системы



Область аналитов

Любые растворимые соединения:

- Аминокислоты и белки
- Углеводы
- Полифенолы
- Полимеры и т.д.

Применение ЖХ

- Биохимия, медицина и фармацевтика
- Пищевая и экологическая безопасность
- Контроль качества полимеров
- Судебная экспертиза
- Самый перспективный метод, особенно в сочетании с масс-спектрометрией

Основные узлы

- Подвижная фаза (растворители)
- Насос с дегазатором
- Инжектор
- Колонка (в термостате)
- Детектор(ы)

Типы ЖХ

- Нормально-фазовая (normal-phase, NP LC)
- Обращенно-фазовая (reversed-phase, RP LC)
- Ионная (ion, IC)
- Эксклюзионная (size-exclusion, GPC, GFC)

Оптимизация анализа

- Скорость и состав подвижной фазы (**полярность**, pH)
- Природа и размер частиц стационарной фазы
- Температура хроматографирования
- Объем вводимой пробы
- Детектор и его параметры (длина волны и др.)

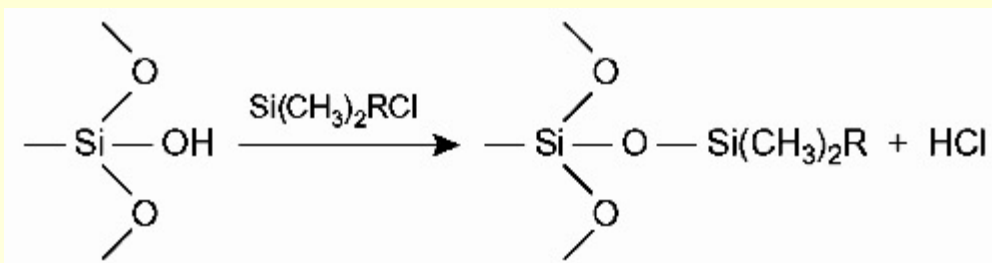
Цель оптимизации

- Максимально быстрое разделение
- Максимально эффективное разделение
- Максимальная чувствительность
- Максимальная точность
- Минимальные расходы растворителей

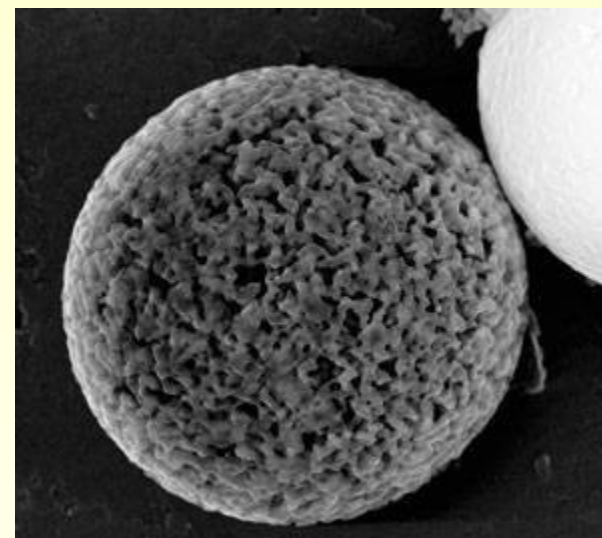
Колонки

- Аналитические ($d < 5$ мм)
- Препаративные ($d > 5$ мм)
- Защитные (для защиты колонок от загрязнения)

Стационарные фазы



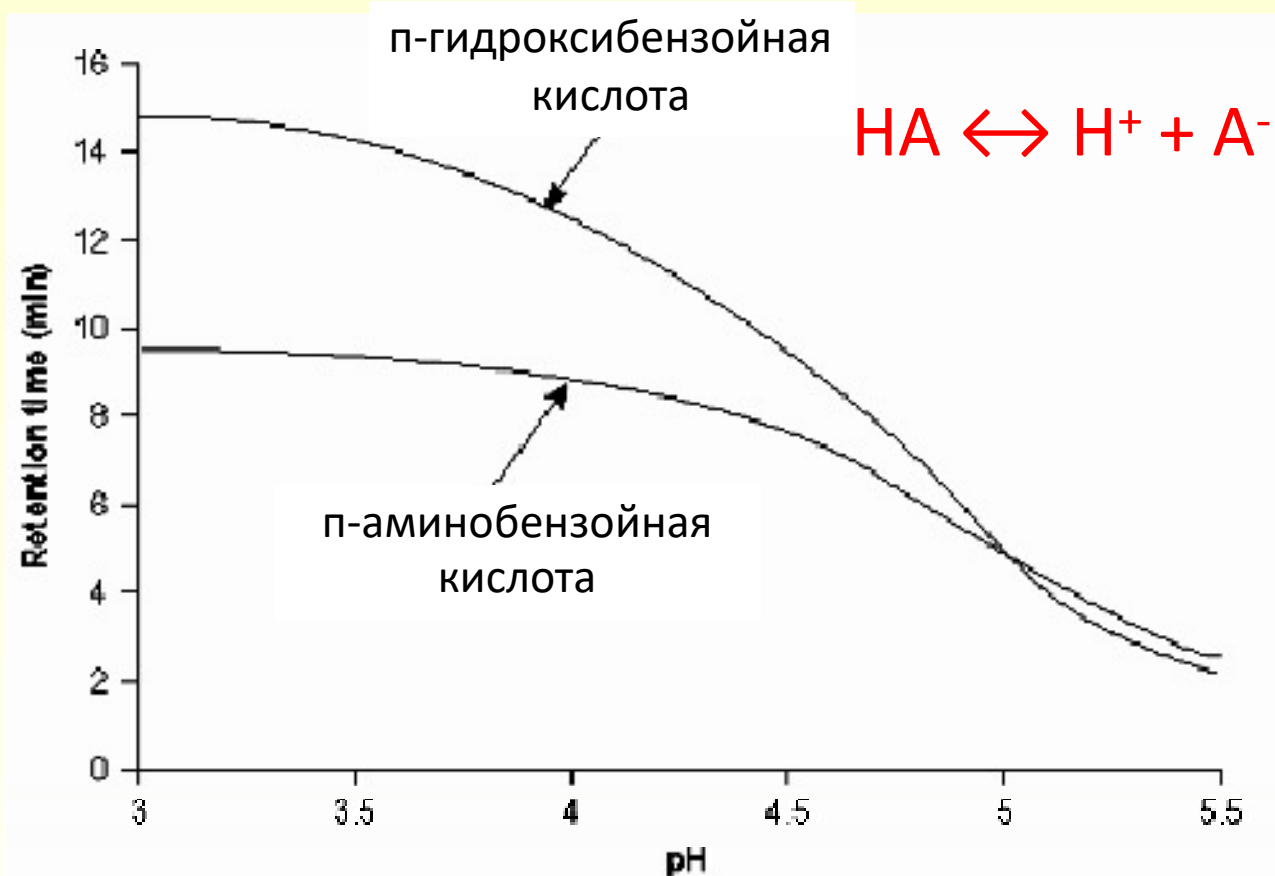
- Октадецил (C₁₈)
- Октил (C₈)
- Циано (CN-)
- Фенил (-C₆H₅)
- Амино (-NH₂)



Вопросы

- Какие вещества будут удерживаться лучше гидрофобной стационарной фазой (полярные или неполярные)?

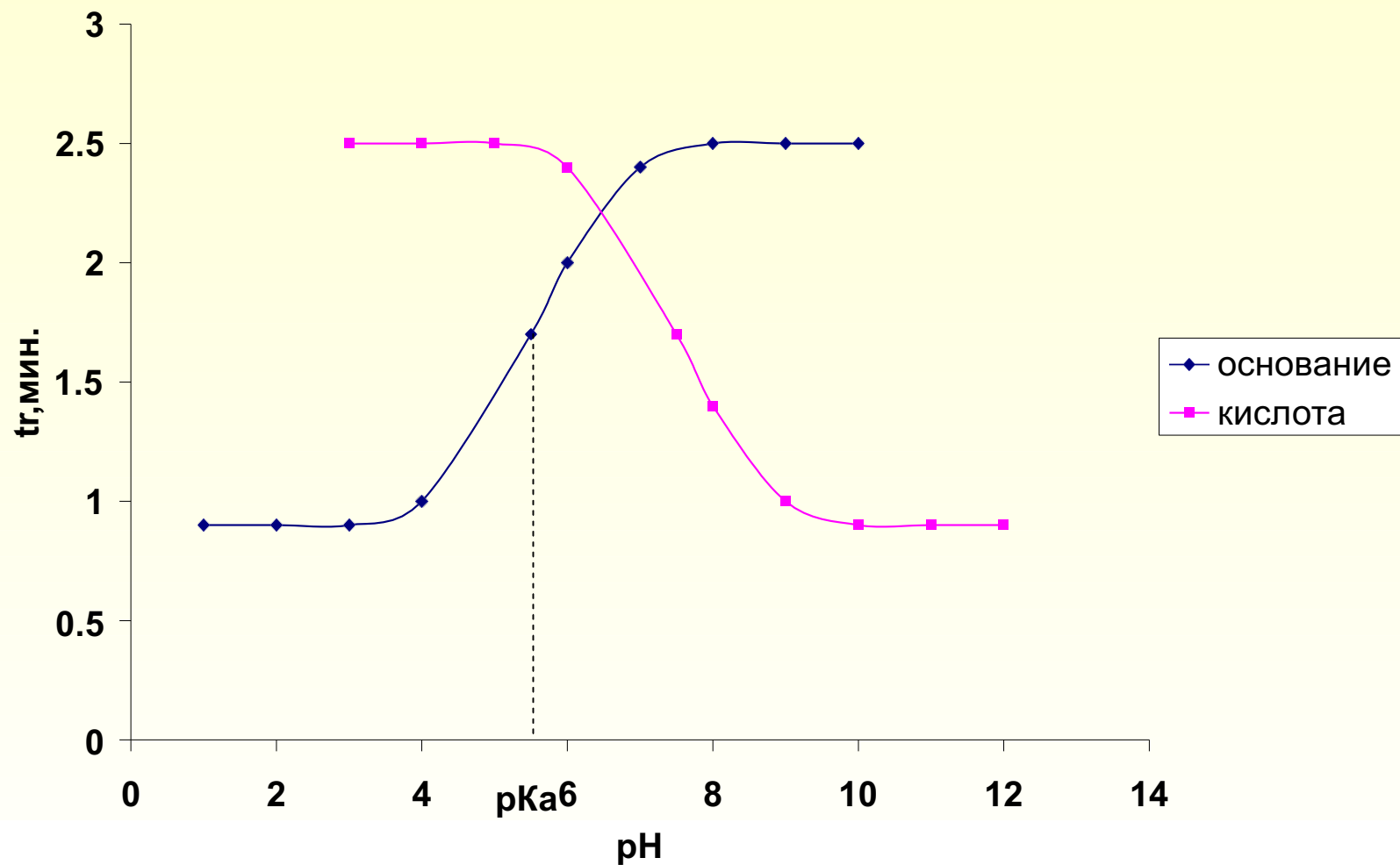
Влияние pH на удерживание кислот



Главное правило для ОФ ЖХ:

молекулярные формы аналитов удерживаются сильнее, чем ионные

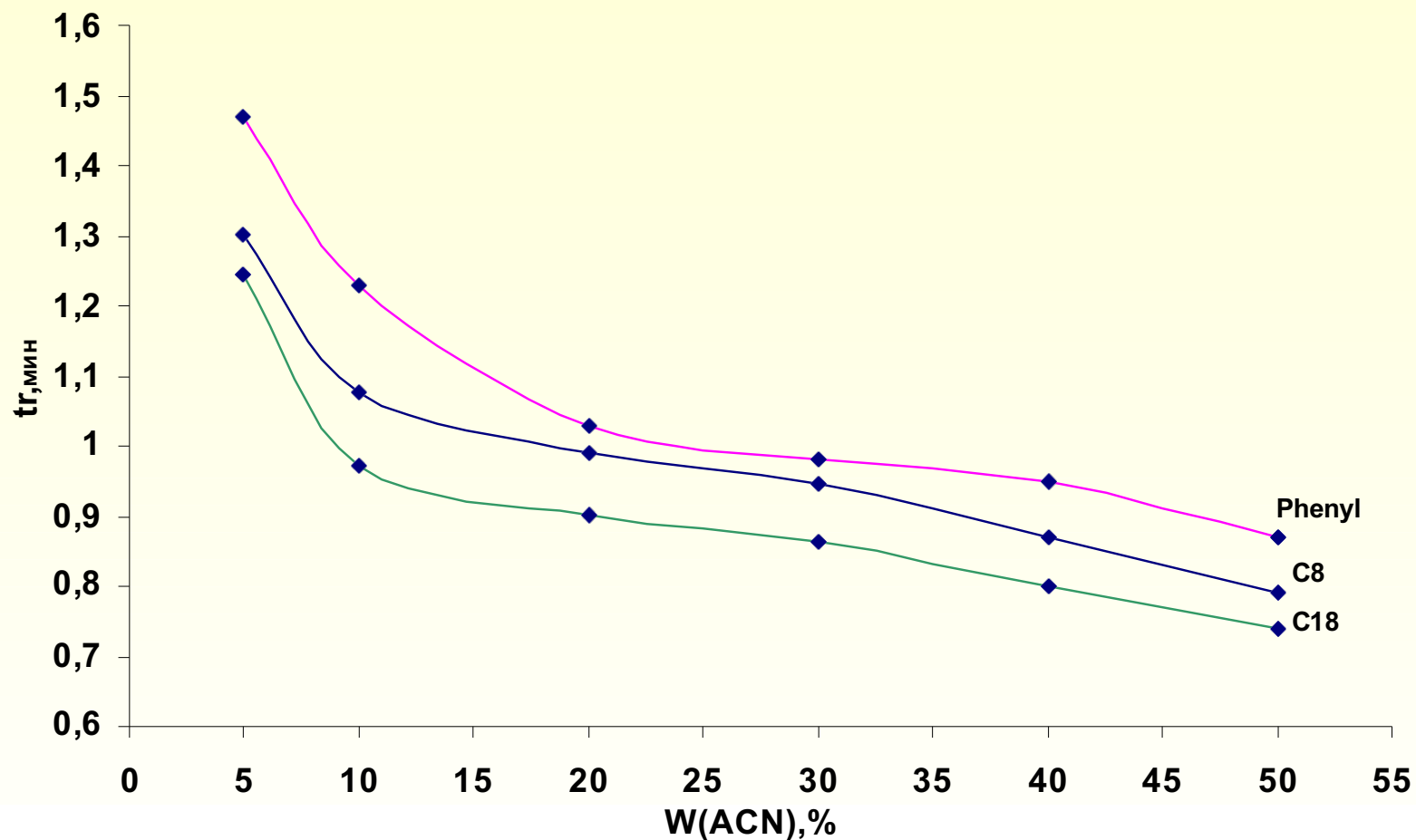
Удерживание органических кислот и оснований от pH



Растворители

Растворитель	УФ отсечка, нм	Показатель преломления при 20°C	Вязкость, сР	Температура кипения, °C	Индекс полярности
n-пентан	190	1.3575	0.23	36.07	0.0
n-гексан	195	1.3749	0.31	68.7	0.1
циклогексан	200	1.4242	1.00	80.72	0.2
толуол	284	1.4969	0.59	110.62	2.4
МТБЭ	210	1.3689	0.27	55.2	2.5
метилен хлорид	233	1.4241	0.44	39.75	3.1
изопропанол	205	1.3772	2.40	82.26	3.9
тетрагидрофуран	212	1.4072	0.55	66.0	4.0
хлороформ	245	1.4458	0.57	61.15	4.1
этиацетат	256	1.3724	0.45	77.11	4.4
ацетон	330	1.3587	0.36	56.29	5.1
метанол	205	1.3284	0.55	64.7	5.1
ацетонитрил	190	1.3441	0.38	81.60	5.8
вода	190	1.3330	1.00	100.0	10.2

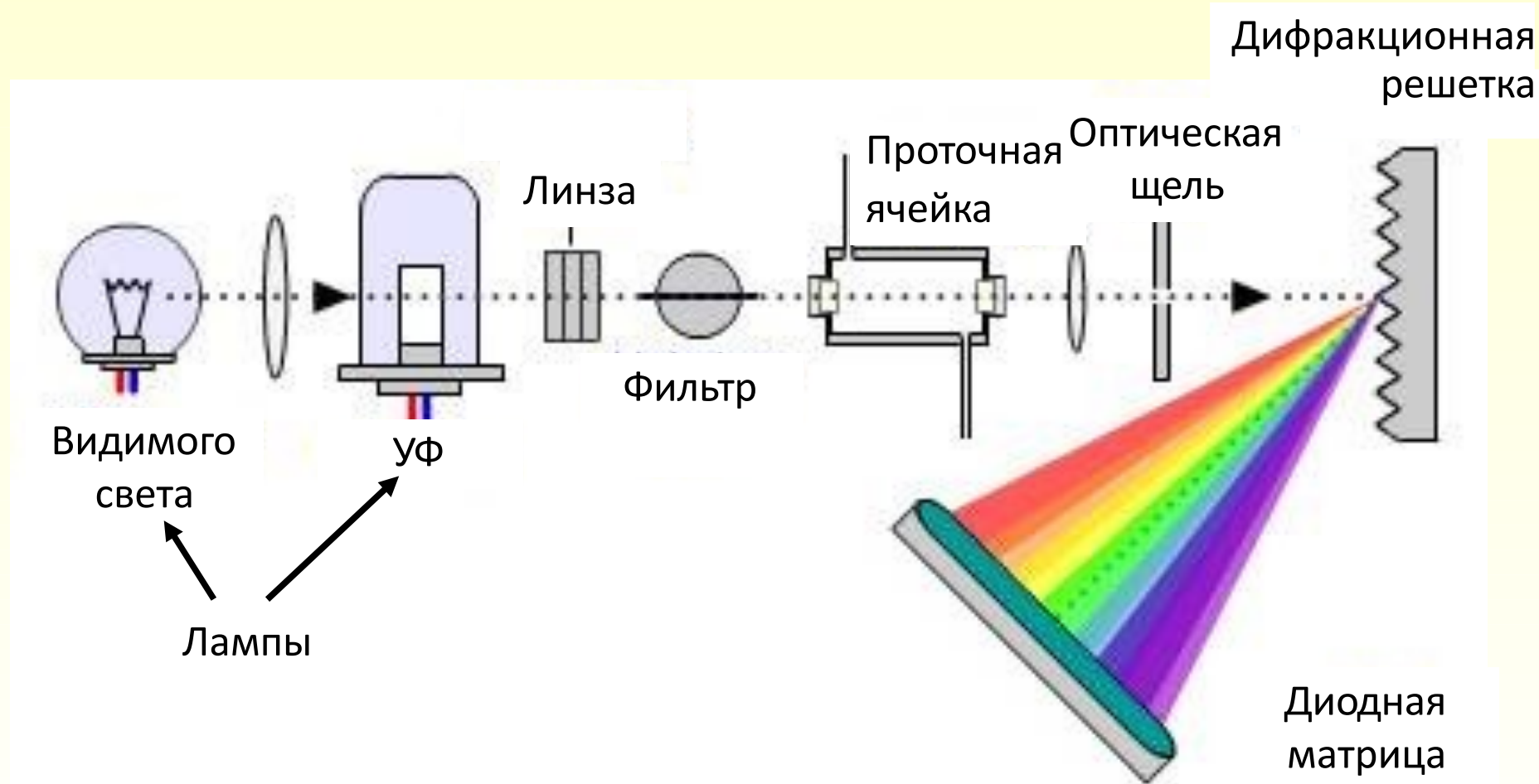
Удерживание полярного анализа обращенно-фазовыми стац. фазами



Основные детекторы

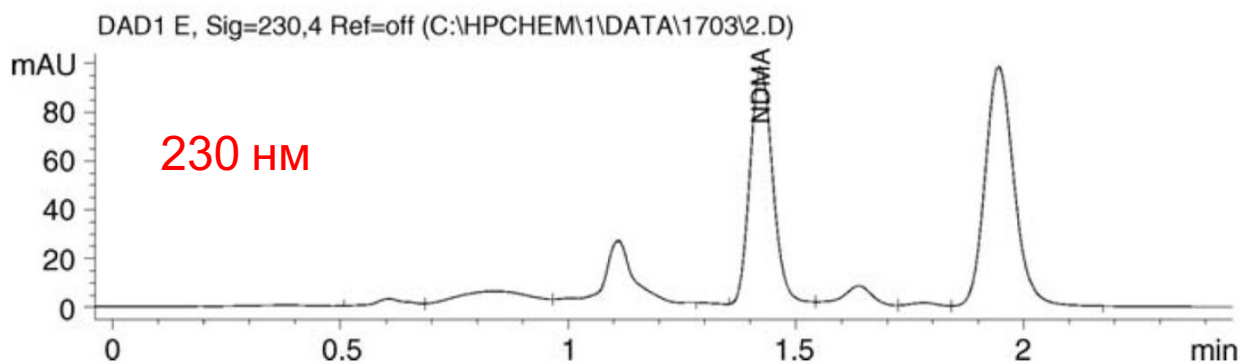
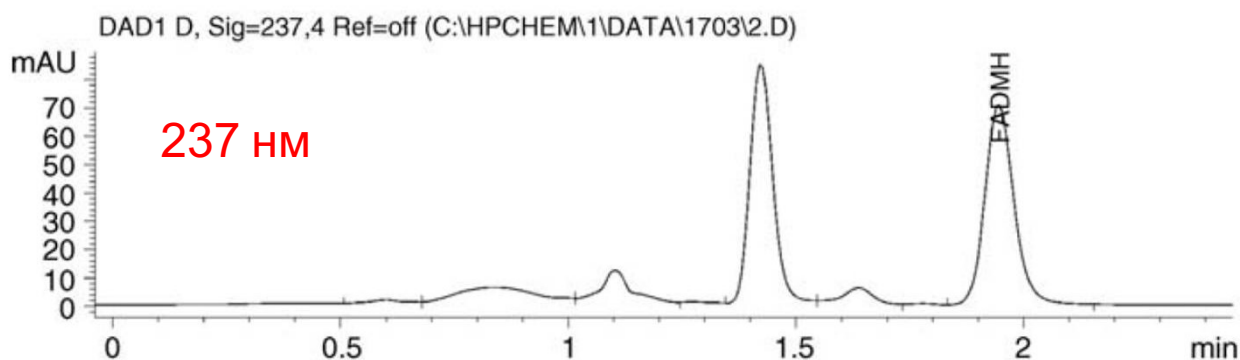
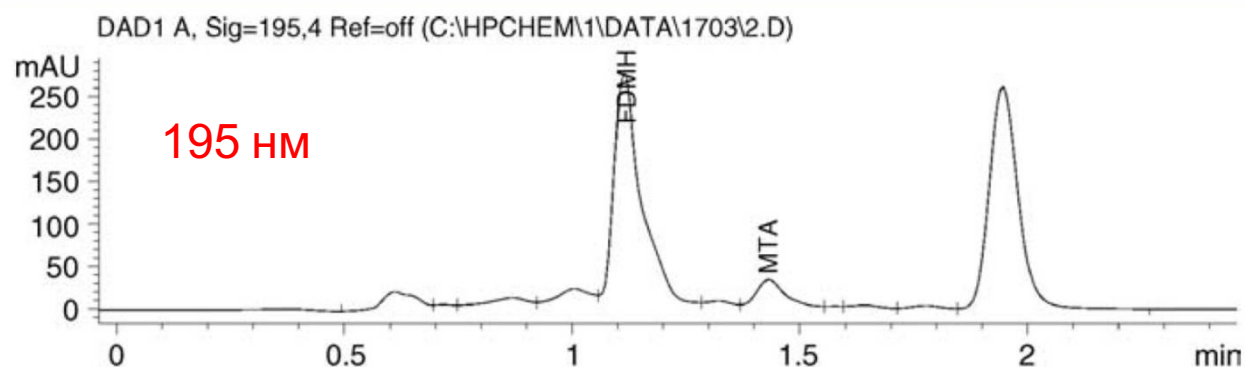
- **Спектрофотометрический и диодно-матричный**
- Флуоресцентный (*интенсивность флуоресценции*)
- Рефрактометрический (*показатель преломления*)
- Кондуктометрический (*электропроводность*)
- Амперометрический (*ток окисления или восстан.*)

Диодно-матричный детектор



Детектор регистрирует спектр поглощения в каждой точке хроматограммы и хроматограмму по множеству длин волн

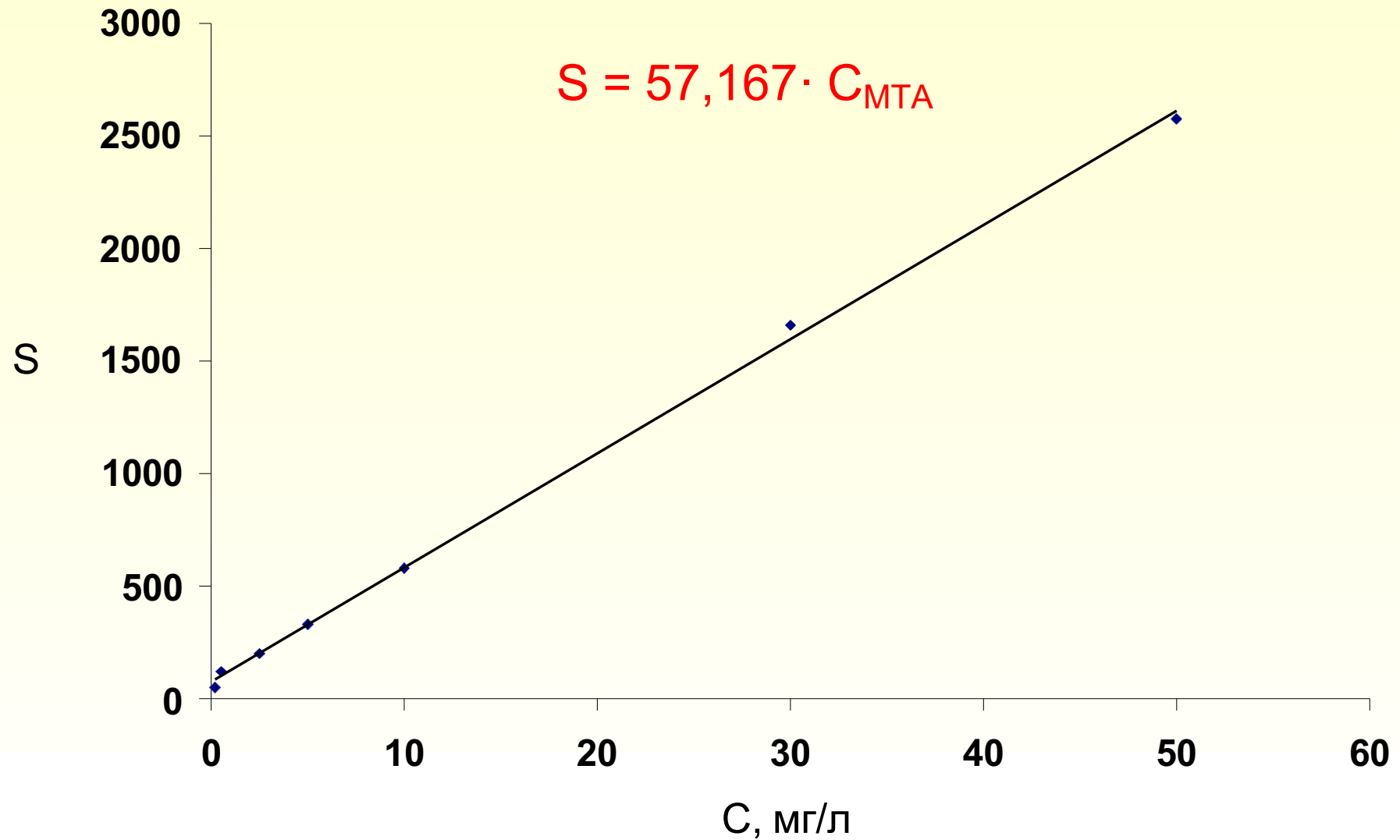
Хроматограммы, полученные на диодно-матричном детекторе



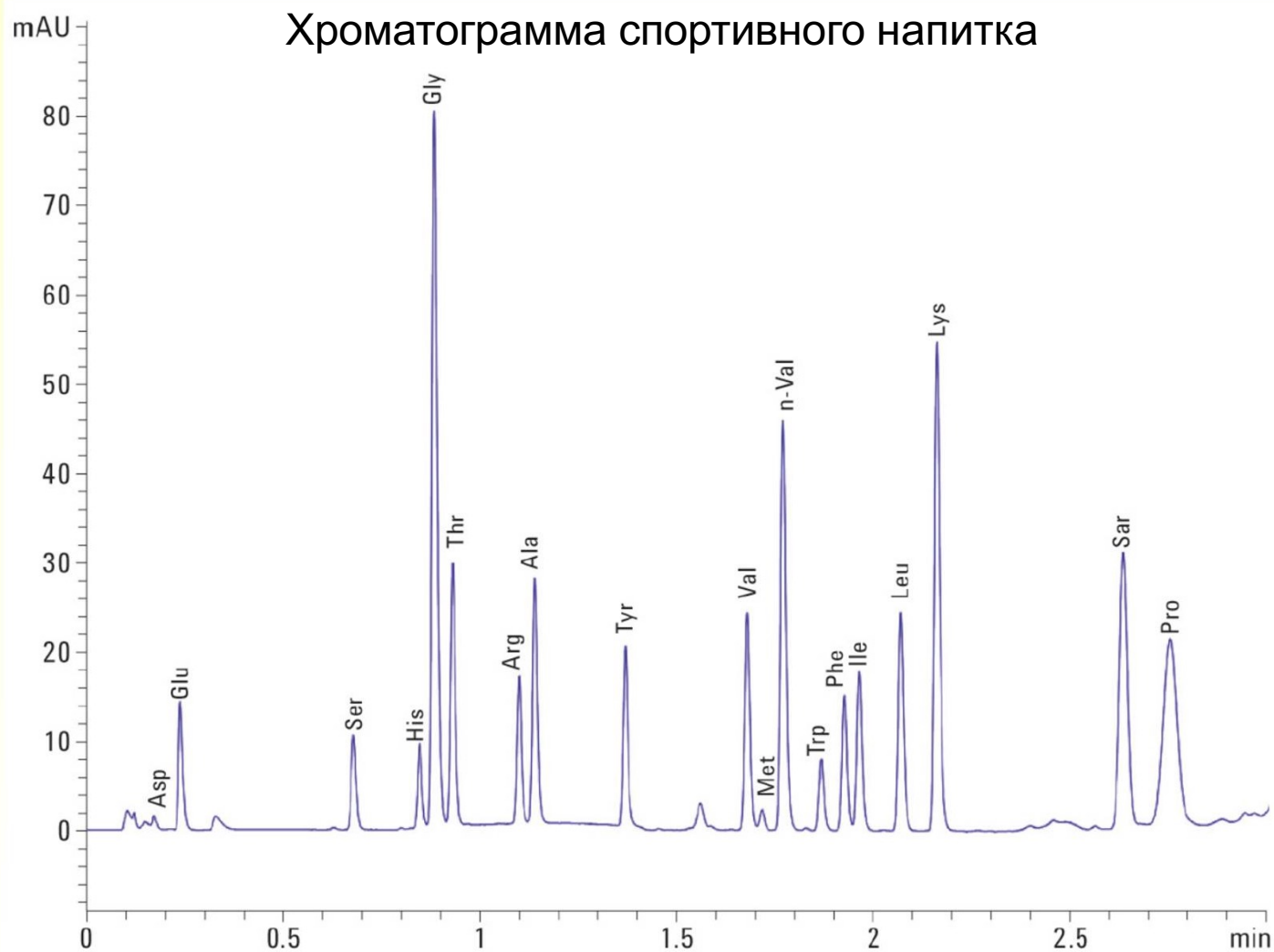
Вопрос

- Каким образом проводят качественный и количественный анализ в ЖХ?

Калибровочная зависимость

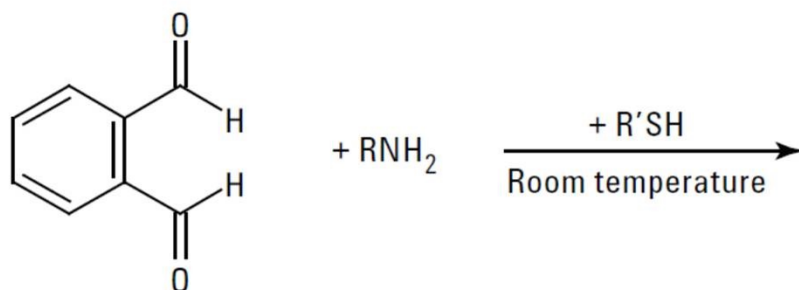


Анализ аминокислот



Автоматическая дериватизация в автосамплере перед инъекцией

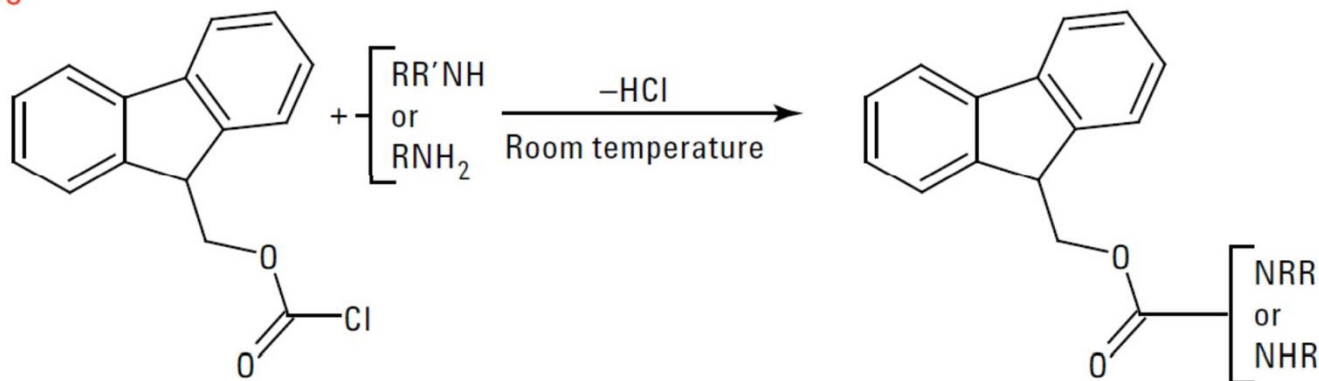
OPA



Non-fluorescent
Absorbs at 230 nm
Does not absorb at 338 nm

Fluorescent: Ex 230 nm, Em 450 nm
DAD: 338, 10 nm; Reference 390, 20 nm
Absorbs at 230 nm and 338 nm

FMOC



Fluorescent
Absorbs at 266 nm and
Fluoresces at 305 nm

Fluorescent: Ex 266 nm, Em 305 nm
DAD: 262, 16 nm; Reference 324, 8 nm

Альдегиды в воздухе

DNPH-Derivatized Aldehydes Obtained from Air

Column:

ZORBAX ODS

884950-543

4.6 x 250 mm, 5 µm

Mobile Phase:

A = 100% Water, B = 100% ACN

Flow Rate:

1.0 mL/min

Gradient:

60-75%B in 30 min; Wash: From 75 -100%B in 5 min, after
5 min return to 60% B

Temperature:

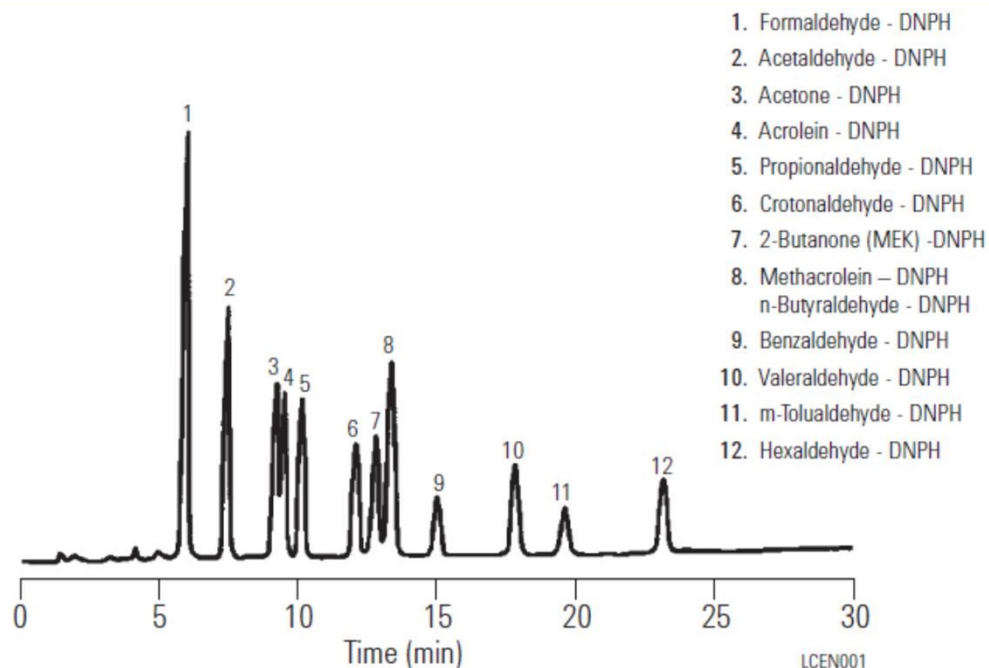
35°C

Detector:

UV 230 nm

Sample:

DNPH -Derivatized Aldehydes

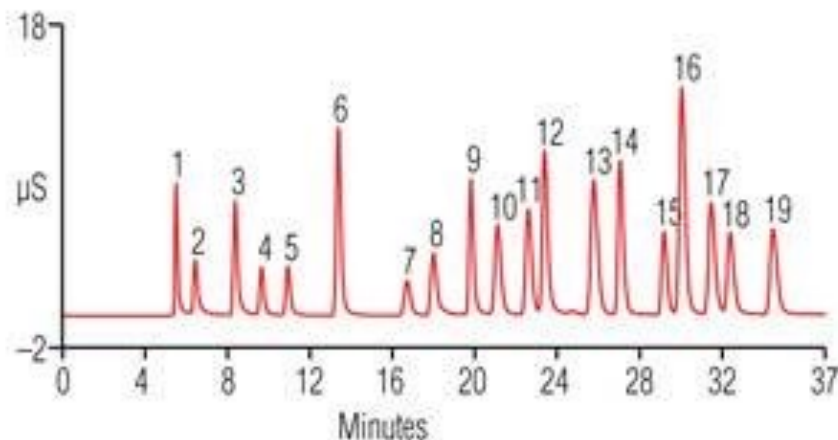


Неорганические и органические анионы

Anion Separation Including Inorganic Anions, Organic Acids, Oxyanions, and Oxyhalides on an IonPac[®] AS24 Column Using a Potassium Hydroxide Eluent Delivered by an Eluent Generator

Column: IonPac AG24, AS24 2 mm
 Eluent Source: EGC II KOH Cartridge
 Eluent: Potassium hydroxide,
 5 mM to 15 mM KOH
 from 0 to 10 min,
 15 mM to 30 mM KOH
 from 10 to 20 min,
 30 mM to 60 mM KOH
 from 20 to 38 min

Temperature: 15 °C
 Flow Rate: 0.3 mL/min
 Inj. Volume: 5 µL
 Detection: Suppressed conductivity,
 ASRS ULTRA II 2 mm,
 AutoSuppression[®]
 recycle mode



Peaks:	mg/L (ppm)				
1. Fluoride	5	8. Nitrite	15	14. Phosphate	40
2. Acetate	15	9. Sulfate	15	15. Arsenate	40
3. Formate	15	10. Chlorate	25	16. Thiosulfate	40
4. Chlorite	15	11. Bromide	25	17. Chromate	40
5. Bromate	15	12. Oxalate	25	18. Citrate	40
6. Chloride	15	13. Nitrate	25	19. Isocitrate	40
7. Trifluoroacetate	15				

24303

Взрывчатые вещества

Explosives and Related Compounds: Qualitative and Quantitative Analysis

Column A: ZORBAX SB-C18
883700-922

2.1 x 150 mm, 5 µm

Column B: ZORBAX SB-CN
883700-905

2.1 x 150 mm, 5 µm

Mobile Phase:
A = ACN + 5% H₂O + 5 mM CF₃COONH₄
B = H₂O + 5% ACN + 5 mM CF₃COONH₄, pH 2.7 (CF₃COOH)

Flow Rate: 0.23 mL/min

Gradient:
a:
0 min. 80%B
2 min. 80%B
10 min. 70%B
20 min. 65%B
25 min. 60%B
35 min. 30%B
40 min. 30%B
42 min. 80%B

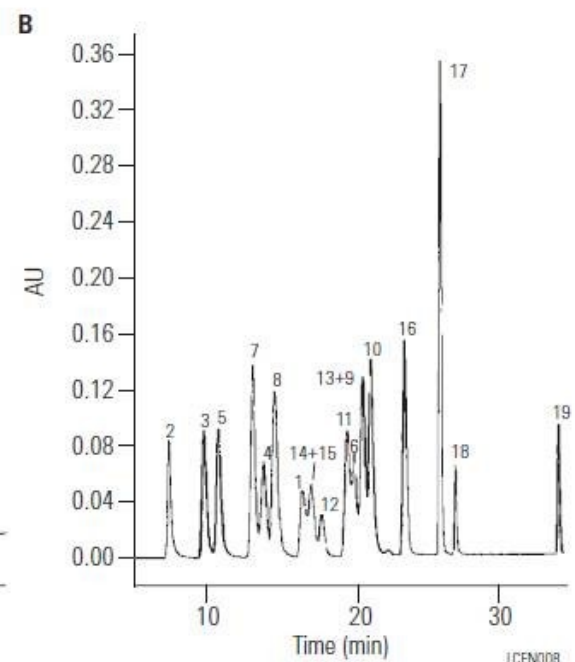
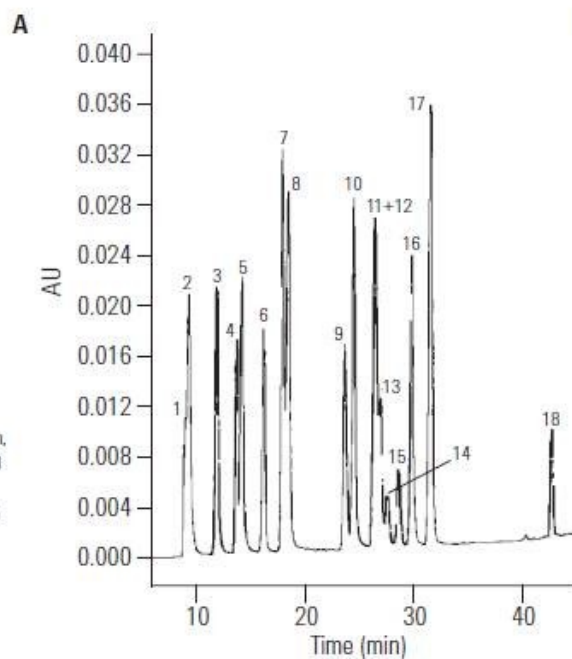
b:
0 min. 80%B
1 min. 80%B
15 min. 70%B
30 min. 20%B
35 min. 20%B
37 min. 80%B

Temperature: 18°C

Detector: UV 210, 240, 360 nm,
wavelength switching
for each compound

Sample: 10 µL of 19 explosive
compounds in
ACN/H₂O (20/80)

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 1. Picric acid | 11. 4-Amino-4,6-dinitrotoluene |
| 2. 4-Amino-2-nitrotoluene | 12. 2-Nitrotoluene |
| 3. 2-Amino-6-nitrotoluene | 13. 2,6-Dinitrotoluene |
| 4. RDX | 14. 4-Nitrotoluene |
| 5. 2-Amino-4-nitrotoluene | 15. 3-Nitrotoluene |
| 6. HMX | 16. 2,4,6-Trinitrotoluene |
| 7. 1,3-Dinitrobenzene | 17. Tetryl |
| 8. 1,3,5-Trinitrobenzene | 18. Diphenylamine |
| 9. 2-Amino-4,6-dinitrotoluene | 19. Hexyl |
| 10. 2,4-Dinitrotoluene | |



LCEN008