

Г.И.Барам

**ВЭЖХ
для
ВСЕХ**

ЛЕКЦИИ



**Новосибирск
2007**

© 1989-2007, Барам Григорий Иосифович, д.х.н.

ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова"

630090, Новосибирск, ул. Николаева, 8, тел.: (383) 330-95-57

E-mail: gbaram@mail.ru

Лекция 1

Введение.

ВЭЖХ в аналитической химии

Г.И.Барам

Курс лекций "ВЭЖХ для ВСЕХ"

Новосибирск, 2007

ХИМИЯ И ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

РАЗДЕЛЕНИЕ:

низкоэффективное

адсорбция
диализ
дистилляция
зонная плавка
кристаллизация
осаждение

сублимация
разложение
ультрафильтрация
экстракция
электролиз
ультрацентрифугирование

высокоэффективное

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ
ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

МЕТОДЫ АНАЛИЗА:

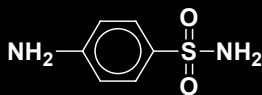
амперометрия	масс-спектрометрия	рефрактометрия
денситометрия	нефелометрия	термография
гравиметрия	оптическая дисперсия	титрование
ИК-спектрометрия	пламенная спектрометрия	турбодиметрия
поляриметрия	иммунохимический анализ	фотометрия
калориметрия	полярография	электродный анализ
кондуктометрия	проточно-инжекционный анализ	электронная спектрометрия
круговой дихроизм	радиохимический анализ	ЭПР-спектрометрия
кулонометрия	рамановская спектрометрия	ЯМР-спектрометрия

АРТЕФАКТЫ

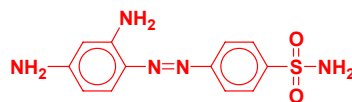
ПРОЕКТ: "Извлечение золота из морской воды"

СТРЕПТОЦИДЫ:

Белый



Красный (пронтозил)



СОДЕРЖАНИЕ РТУТИ В БАЙКАЛЬСКОЙ ВОДЕ:

Госкомгидромет СССР (1985 г.)
300 нг/л *нг/л*

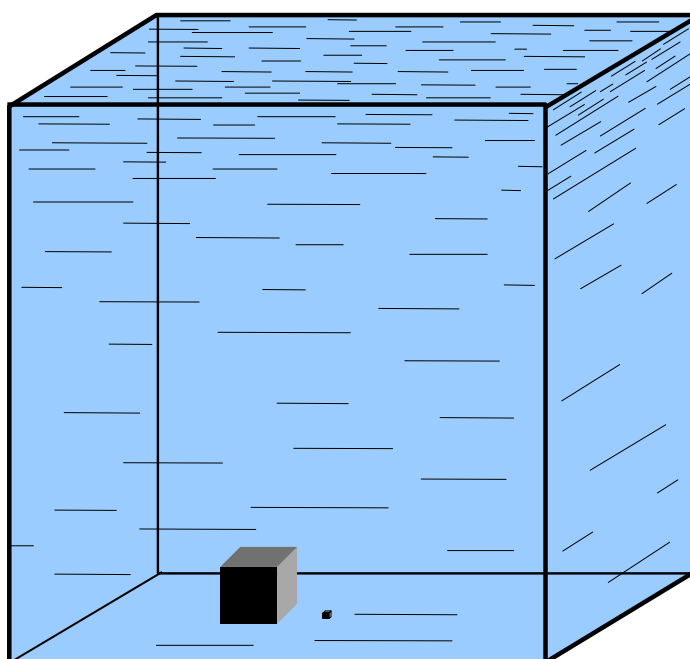
С.Meuleman и др. (1994 г.)
0.14÷0.77 нг/л *нг/л*

ФАЛЬСИФИКАЦИЯ



ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА

Концентрация



1 г/л

1 мг/л

1 мкг/л

1 нг/л

1 пг/л

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АНАЛИЗА

Избирательность

0.005 М раствор вещества "●" (M=100)
или 0.5 г/лг/л

1 молекула вещества "●"
на 10 000 молекул растворителя

1 г/л = 10^{-2} М
1: 5 000

1 мг/л = 10^{-5} М
1: 5 000 000

1 мкг/л = 10^{-8} М
1: 5 000 000 000

1 нг/л = 10^{-11} М
1: 5 000 000 000 000

РАЗДЕЛЕНИЕ

"DEVIDE ET IMPERE" - "Разделяй и властвуй"

Царь Филипп (отец Александра Македонского)

"Люди, знающие несколько химии, должны наиболее упражняться в количественных разложениях и быть убежденными в том, что познавши их несовершенно, они не могут быть способны ни к какому ученому исследованию"

Берцелиус



(Berzelius) Йенс Якоб (1779-1848), шведский химик и минералог, иностранный почетный член Петербургской АН.

Открыл церий, селен, торий. Создал электрохимическую теорию химического родства, на ее основе построил классификацию элементов, соединений и минералов. Определил атомные массы 45 элементов, ввел современные химические знаки элементов. Предложил термин "катализ".

ОТКРЫТИЕ ХРОМАТОГРАФИИ



"Особенно поучительно наблюдение адсорбционных явлений при фильтрации через порошок. Из нижнего конца воронки вытекает сначала бесцветная, потом желтая (каротин) жидкость, между тем как в поверхностных слоях инулинового столба образуется интенсивно-зеленое кольцо, на нижнем краю которого скоро дифференцируется желтая кайма. При последующем пропускании через инулиновый столб чистого лигрина, оба кольца, зеленое и желтое, значительно расширяются и распространяются вниз, до известного предела, чем доказывалось, что и здесь (как в известных уже разных случаях адсорбции) количество адсорбированного вещества зависит от концентрации, от осмотического напряжения его в растворе, но не пропорционально ему, так как не сводится к нулю при осмотическом напряжении равном нулю".

М. Цвет (1903 г.)

ОТКРЫТИЕ ХРОМАТОГРАФИИ



Михаил Семенович Цвет
1905 г.

"Подобно световым лучам в спектре различные компоненты сложного пигмента закономерно распределяются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступными качественному и количественному определению. Такой расцвеченный препарат я назвал **хроматограммом**, а соответствующий метод анализа **хроматографическим** методом".

М.Цвет (1906 г.)

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Сегодня

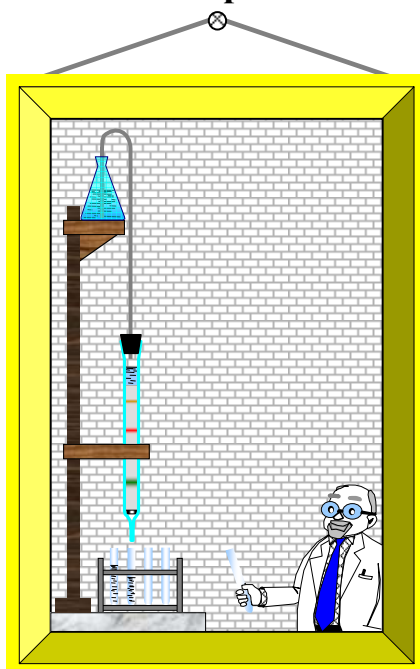
1970-2005 - выпущено около 800 книг на английском и русском языках
2005 - ежемесячно выходят более 12 специализированных международных журналов
1980-2004 - ежегодно проводится не менее 20 крупных международных симпозиумов
2004 - более 200 фирм произвели оборудование на 2.5 млрд долларов США
1997 - более 100 000 хроматографов в США
2005 - в Российской Федерации менее 10 000 хроматографов (оценка)

НОБЕЛЕВСКИЕ ПРЕМИИ

1952 - А.Мартин, Р.Синг - Разработка метода распределительной хроматографии
1955 - В.Дю Виньон - Работы по расшифровке структур и синтезу пептидных гормонов окситоцина и вазопрессина
1958 - Ф.Сенгер - Установление первичной структуры инсулина
1972 - К.Анфинсен, С.Мур, У.Стейн - Автоматический аминокислотный анализатор

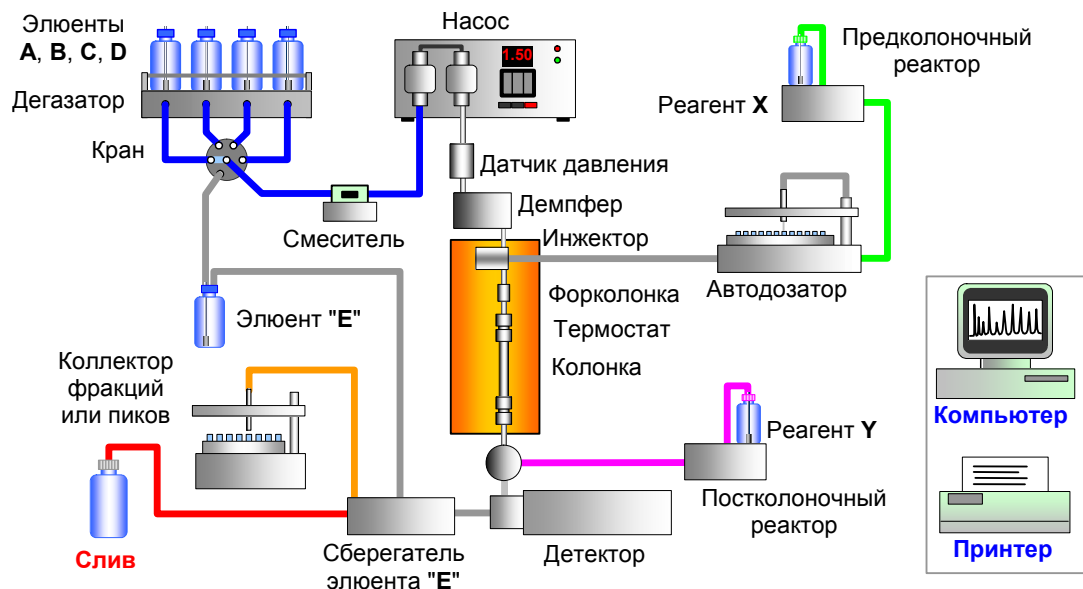
ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

Вчера



ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

Сегодня



ХРОМАТОГРАФИЯ

Определение

(Научный совет по хроматографии и адсорбции РАН)

НАУКА

о межмолекулярных взаимодействиях и переносе молекул или частиц в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз

МЕТОД

разделения смесей веществ или частиц, основанный на различии в скорости их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз

ПРОЦЕСС

дифференцированного многократного перераспределения веществ или частиц между несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами, приводящий к обособлению концентрационных зон индивидуальных компонентов исходных смесей этих веществ или частиц

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Классификация

По назначению: аналитическая, препаративная, пилотная, промышленная

По конфигурации разделяющей системы: колоночная, микроколоночная, многоколоночная, капиллярная, планарная, бумажная, тонкослойная, мембранная, непрерывная, циркуляционная, многомерная, перколяционная

По агрегатному состоянию фаз: твердо-жидкостная, жидко-жидкостная, мицеллярная, сверхкритическая (флюидная), полифазная

По способу перемещения сорбата: элюентная, вытеснительная, фронтальная, электрохроматография

По составу подвижной фазы: изократическая, ступенчатая, градиентная

С программированием: состав элюента, температура, давление, поток

По полярности фаз: нормально-фазная, обращенно-фазная

По механизму разделения: распределительная, ионообменная, эксклюзивная (эксклюзионная), ситовая, гель-проникающая, ион-парная, адсорбционная, аффинная, лигандообменная, ионная, гидродинамическая, фракционирование в поперечном поле сил, гидрофобная, гидрофильная, хиральная

По способу детектирования: одно- и многоканальное, прямое и не прямое (косвенное), пред- и постколоночная дериватизация, разрушающее и неразрушающее

По эффективности:

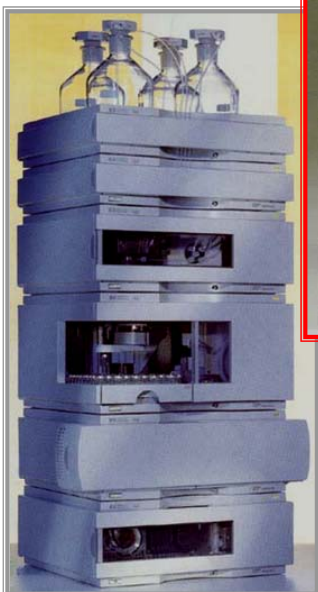
По давлению:

По скорости разделения:

Прочее:

КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХРОМАТОГРАФЫ



КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

ПРЕПАРАТИВНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ



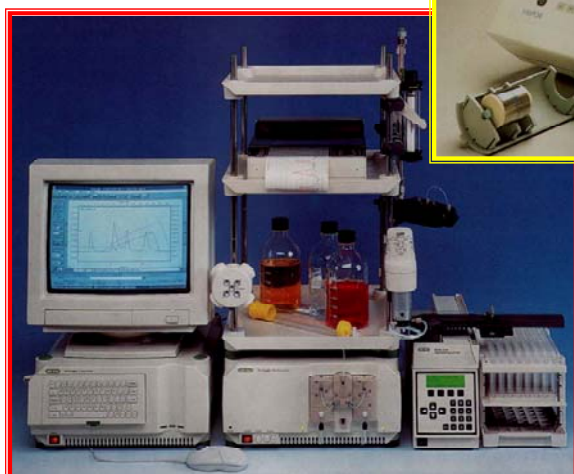
КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

ПРОМЫШЛЕННЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ



КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

БИОХРОМАТОГРАФЫ



КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

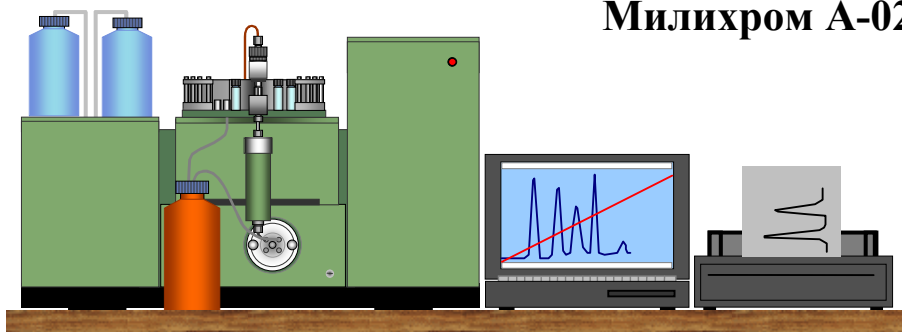
ПОЛЕВЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ



КАКИЕ БЫВАЮТ ХРОМАТОГРАФЫ?

ПОЛЕВЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ

Милихром А-02



"EnviroChrom", 1995 г.

ЗАО "ЭкоНова" (Новосибирск), "KNAUER, GmbH" (Берлин)

"Милихром А-02", 1996 г.

ЗАО "ЭкоНова" (г. Новосибирск) и АО "БЭМЗ" (г.Бердск)

ПРИКЛАДНАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В РФ (2004 г.)

ОБЛАСТНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ

- | | |
|--|-----------------------------------|
| 1. ЭКУ МВД | 9. Лаборатория охраны природы |
| 2. ЭКУ ФСКН | 10. Агрохимическая лаборатория |
| 3. Криминалистическая лаборатория ФСБ | 11. Лаборатория Госгидромета |
| 4. Лаборатория МЧС | 12. Лаборатория Облэнерго |
| 5. Пищевая лаборатория Санэпиднадзора | 13. Лаборатория Судмедэкспертизы |
| 6. Ветеринарная лаборатория | 14. Лаборатория Водоканала |
| 7. Пищевая лаборатория Госстандарта | 15. Лаборатория наркологии |
| 8. Фармацевтическая лаборатория Облздора | 16. Лаборатории Областных больниц |

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ЛАБОРАТОРИИ

- | | |
|---------------------------------|---|
| 1. Фармацевтические заводы | 7. Заводы безалкогольных напитков |
| 2. Ликеро-водочные заводы | 8. Масложиркомбинаты |
| 3. Мясокомбинаты | 9. Птицефабрики |
| 4. Витаминные заводы | 10. Химические заводы (пестициды, красители) и пр.) |
| 5. Теплоэлектростанции | 11. Алюминиевые заводы |
| 6. Нефтеперерабатывающие заводы | 12. Кондитерские фабрики |

ПРОЧИЕ ЛАБОРАТОРИИ

Наука, Высшие учебные заведения, Армия, Таможня

Лекция 2

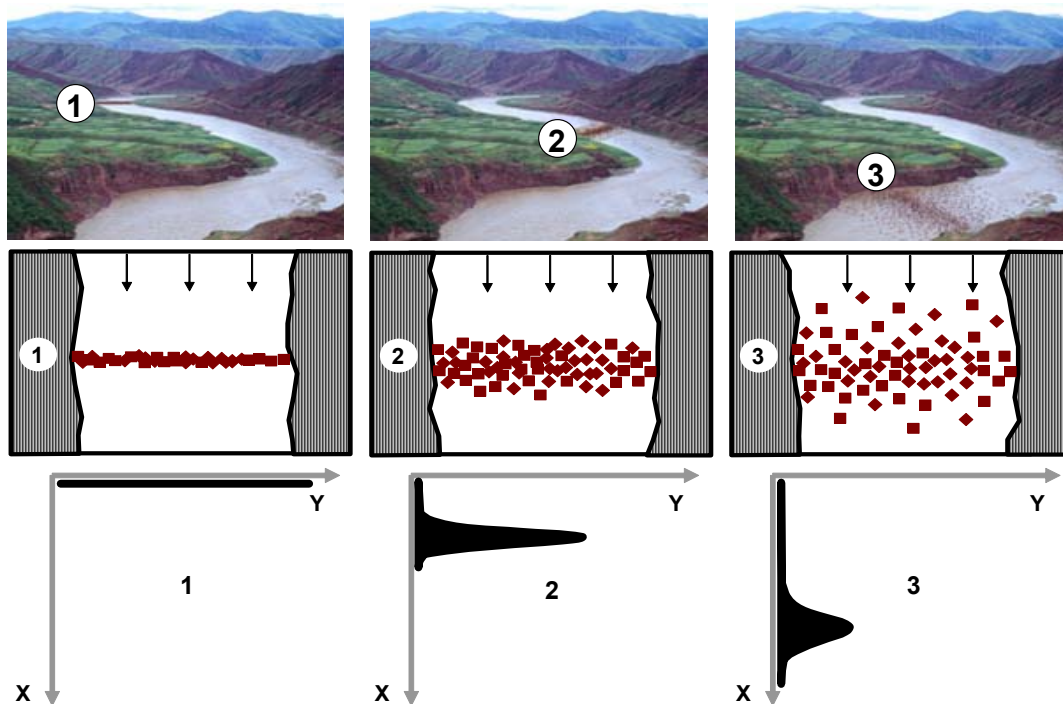
Терминология ВЭЖХ. Формальная колоночная хроматография.

Г.И.Барам

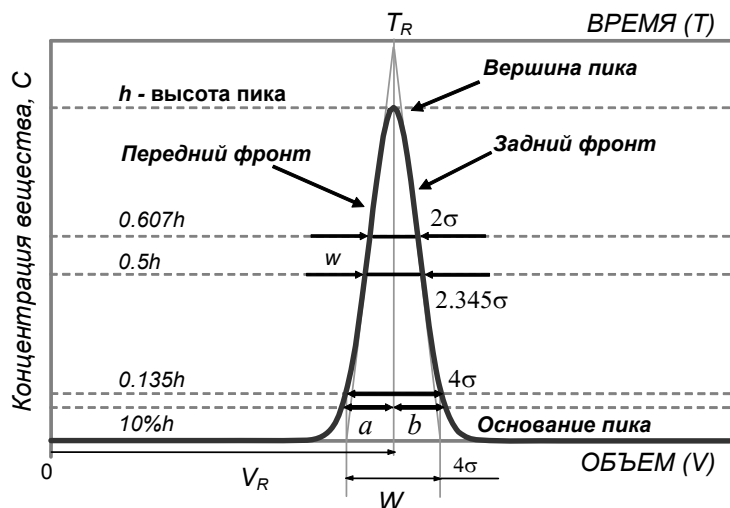
Курс лекций "ВЭЖХ для ВСЕХ"

Новосибирск, 2007

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПИК



ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПИК



$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\left(\frac{x}{2\sigma}\right)^2}$$

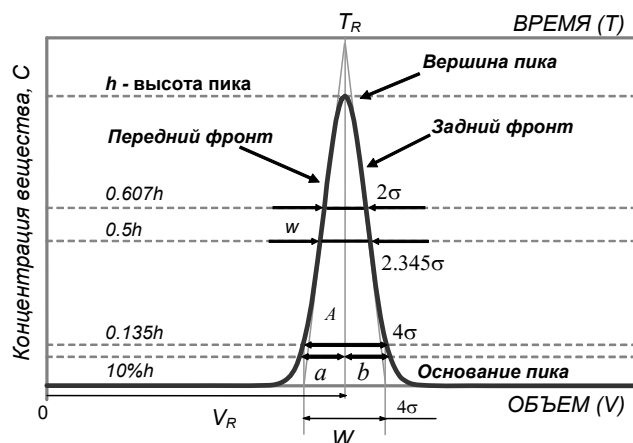
$$C(V) = h \cdot e^{-0.5\left(\frac{V-V_R}{\sigma}\right)^2}$$

$$C(T) = h \cdot e^{-0.5\left(\frac{T-T_R}{\sigma}\right)^2}$$

$$h = \frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi}}$$

V_R - объем удерживания вещества
 T_R - время удерживания вещества
 σ - дисперсия гауссова пика
 h - высота гауссова пика
 S - площадь гауссова пика

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПИК

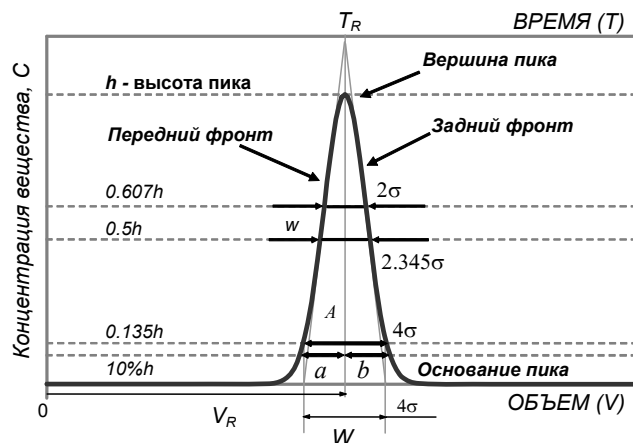


$$A_{10\%h} = b_{10\%h} / a_{10\%h} - \text{асиметрия пика на уровне } 10\%h$$

$$A_S = w_{5\%h} / 2a_{5\%h} - \text{асиметрия пика на уровне } 5\%h$$

(Британская и Европейская Фармакопеи)

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПИК



$$N = (V_R / \sigma)^2 \approx 5.54 (V_R / w)^2 \approx 16 (V_R / W)^2 - \text{эффективность колонки}$$

(число теоретических тарелок)

$$H = L / N - \text{высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ),}$$

где L - длина колонки

ХРОМАТОГРАММА

Хроматограмма - кривая, отображающая зависимость величины концентрации вещества в вытекающей из колонки подвижной фазе от объема вытекшей фазы или от времени



$V_e (T_e)$ - **исключенный объем (время) колонки**; равен объему подвижной фазы, находящейся снаружи зерен *пористой* стационарной фазы

$V_0 (T_0)$ - **свободный** или **мертвый объем (время) колонки**; равен полному объему находящейся в колонке подвижной фазы (объем удерживания несорбируемого вещества)

$V_R (T_R)$ - **объем (время) удерживания вещества**

ОБЪЕМ и ВРЕМЯ

F - объемная скорость потока подвижной фазы

U - линейная скорость потока подвижной фазы вдоль колонки

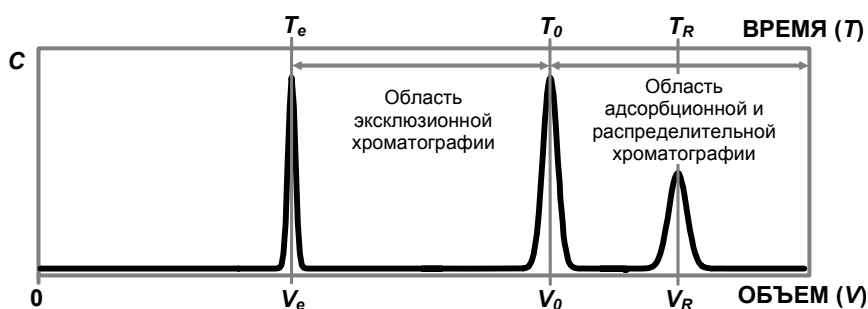
s - площадь сечения колонки

$$V = FT$$

$$V_R = FT_R \quad V_0 = FT_0 \quad U = F/s \quad T_0 = L/U$$

ХРОМАТОГРАММА

Удерживание вещества



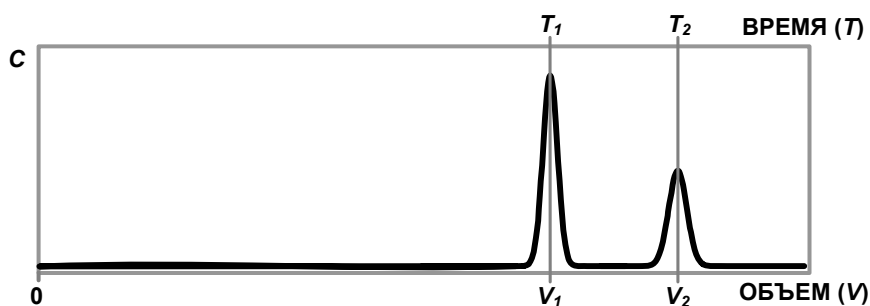
$$V_R = V_0 + V_0 \cdot k'$$

k' - фактор удерживания вещества (емкостное отношение)

$\alpha_{1,2} = k'_2 / k'_1$ - фактор разделения веществ 1 и 2 (селективность)

ХРОМАТОГРАММА

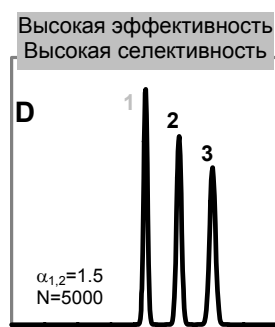
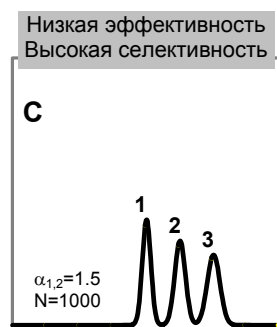
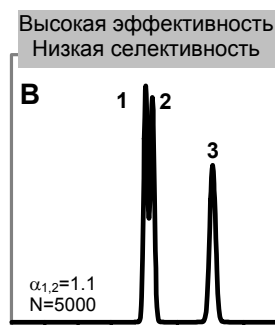
Разделение пиков



$$R_s = \frac{2(V_{r2} - V_{r1})}{W_1 + W_2} = \frac{2 \cdot \Delta V_r}{4\sigma_1 + 4\sigma_2} \approx \frac{\Delta V_r}{4\sigma}$$

разрешение пиков 1 и 2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СЕЛЕКТИВНОСТЬ



ЭФФЕКТИВНОСТЬ + СЕЛЕКТИВНОСТЬ

HPLC

High
Performance (**P**ressure, **P**erformance, **P**leasure, **P**...)
Liquid
Chromatography

HRLC™ - **H**igh **R**esolution **L**iquid **C**hromatography (Bio-Rad Lab.)

FPLC™ - **F**ast **P**olymer (**P**eptide, **P**rotein, **P**olynucleotide) **L**iquid **C**hromatography (Pharmacia)

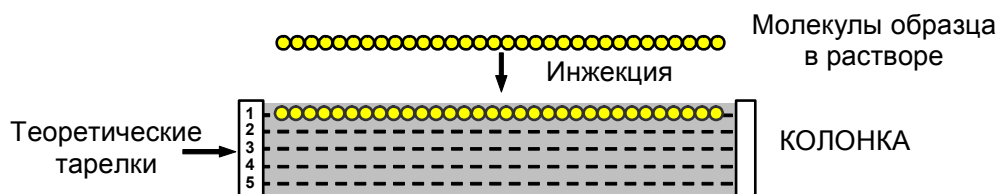
UPLC™ - **U**ltra **P**erformance **L**iquid **C**hromatography (Waters Corp., 2004)
Ultra **P**ressure **L**iquid **C**hromatography ($P \geq 1000$ атм)

ВЭЖХ

ВысокоЭффективная Жидкостная Хроматография

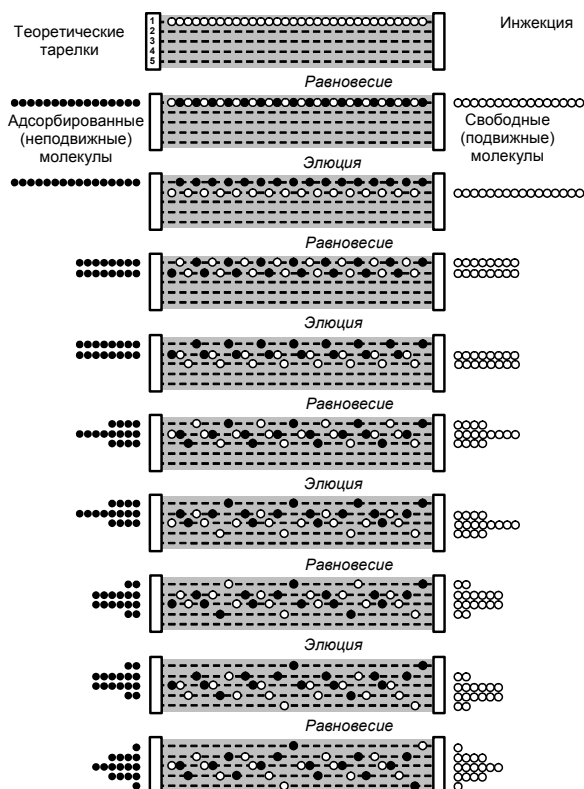
Современная ВЭЖХ - 1 вещество/мин

ФОРМА ПИКА



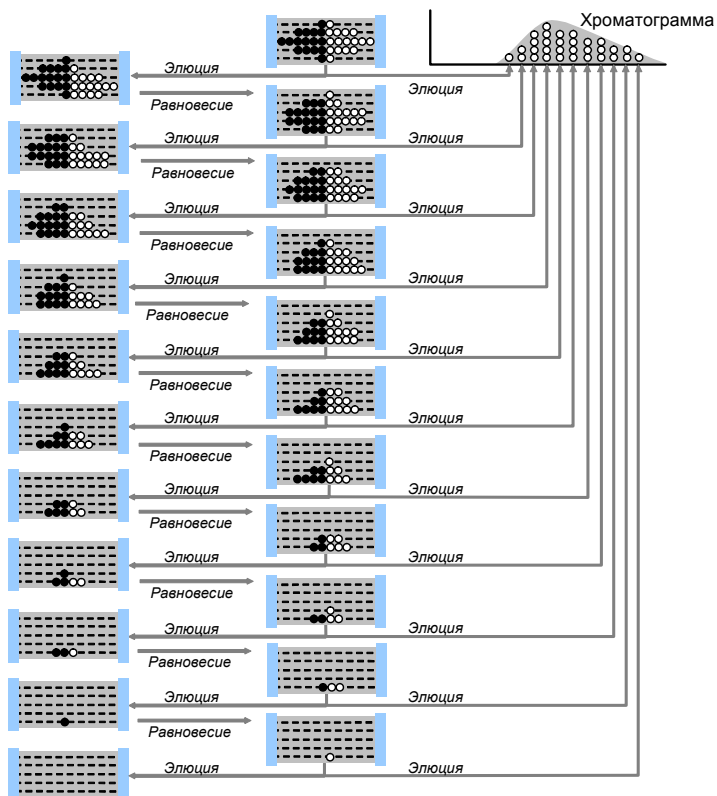
ФОРМА ПИКА (1)

$k'=1; N=5$



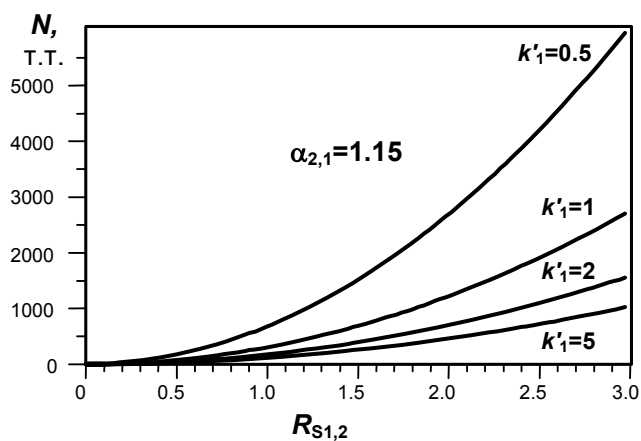
ФОРМА ПИКА (2)

$k'=1; N=5$



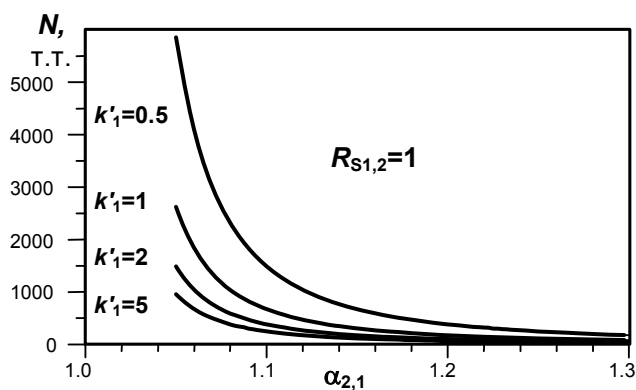
ЭФФЕКТИВНОСТЬ, СЕЛЕКТИВНОСТЬ, РАЗДЕЛЕНИЕ

$$R_{s1,2} = \frac{k'_1}{2} \cdot \frac{\alpha_{2,1} - 1}{k'_1 + k'_1 \cdot \alpha_{2,1} + 2} \cdot \sqrt{N}$$



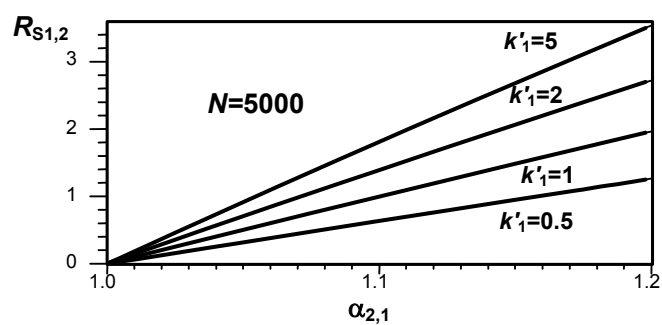
ЭФФЕКТИВНОСТЬ, СЕЛЕКТИВНОСТЬ, РАЗДЕЛЕНИЕ

$$R_{s1,2} = \frac{k'_1}{2} \cdot \frac{\alpha_{2,1} - 1}{k'_1 + k'_1 \cdot \alpha_{2,1} + 2} \cdot \sqrt{N}$$



ЭФФЕКТИВНОСТЬ, СЕЛЕКТИВНОСТЬ, РАЗДЕЛЕНИЕ

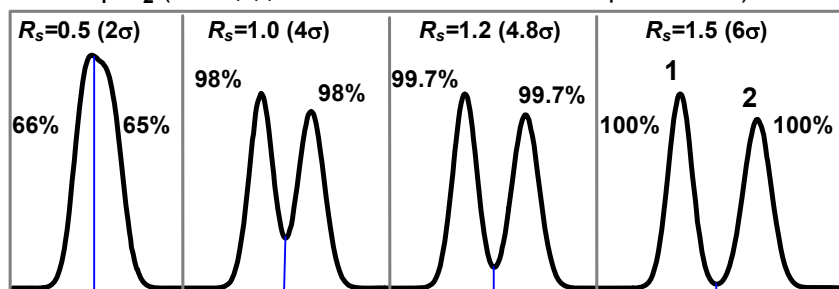
$$R_{s_{1,2}} = \frac{k'_1}{2} \cdot \frac{\alpha_{2,1} - 1}{k'_1 + k'_1 \cdot \alpha_{2,1} + 2} \cdot \sqrt{N}$$



РАЗРЕШЕНИЕ ПИКОВ

$$R_{s_{1,2}} = \frac{2(V_{r2} - V_{r1})}{4\sigma_1 + 4\sigma_2}$$

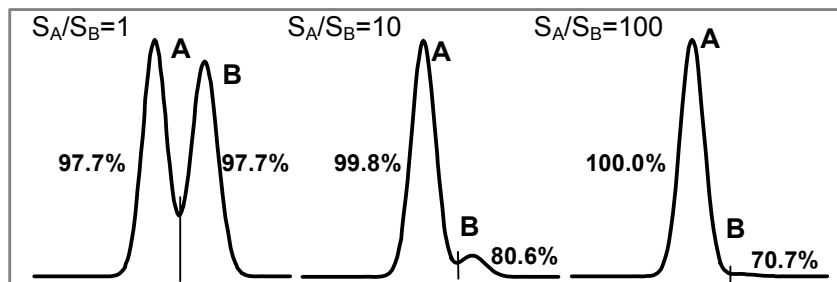
$S_1 = S_2$ (площади пиков вычислены в интервале $\pm 4\sigma$)



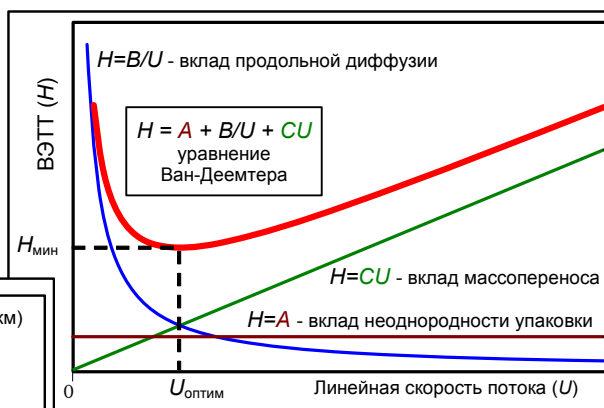
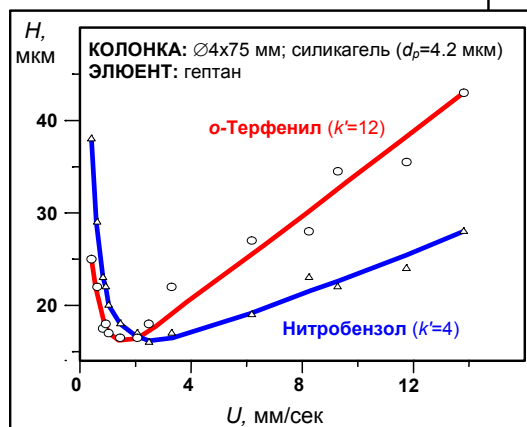
РАЗРЕШЕНИЕ ПИКОВ

$$R_{s_{1,2}} = \frac{2(V_{r2} - V_{r1})}{4\sigma_1 + 4\sigma_2}$$

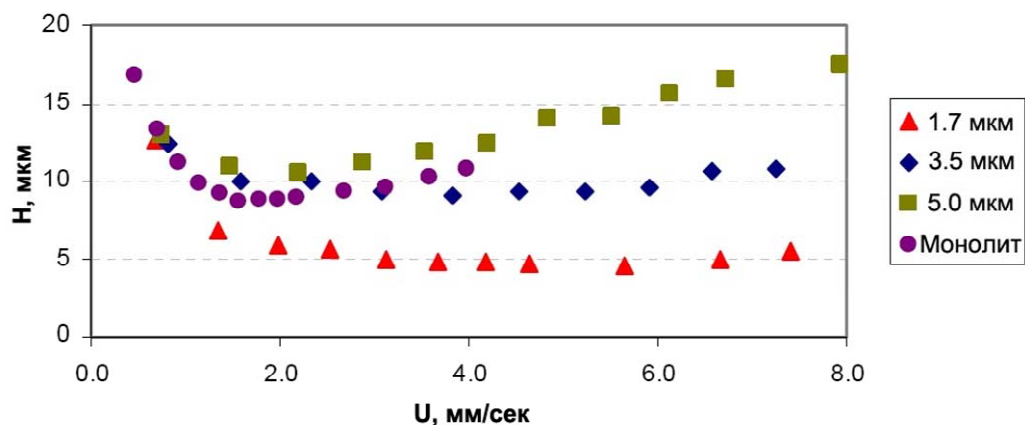
$R_s=1 (4\sigma)$ (площади пиков вычислены в интервале $\pm 4\sigma$)



ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СКОРОСТЬ ПОТОКА ЭЛЮЕНТА



ЭФФЕКТИВНОСТЬ И СКОРОСТЬ ПОТОКА ЭЛЮЕНТА В UPLC

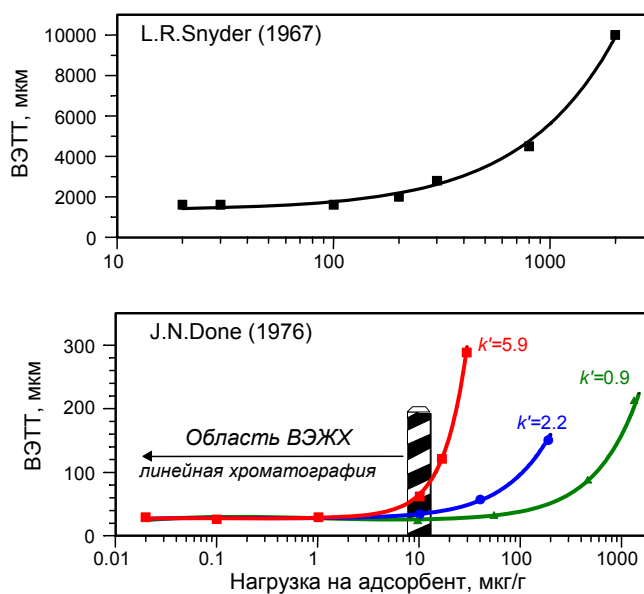


$L=50 \text{ мм}$; элюент - $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (30:70); анализ - гексилбензол

M.Kele *et al.*, Waters Corp., 2004

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И НАГРУЗКА НА КОЛОНКУ

Хроматография на силикагеле



ДАВЛЕНИЕ В ВЭЖХ

$$P \approx 21 \cdot \frac{F \cdot L \cdot \eta}{d_p^2 \cdot \varnothing^2}$$

P - давление на входе в колонку, МПа **F** - скорость потока, мл/мин
η - вязкость подвижной фазы, спз **L** - длина колонки, мм
d_p - диаметр частиц сорбента, мкм **∅** - диаметр колонки, мм

Примеры вычисления:

1. ∅=2 мм; L=75 мм; d_p=5.0 мкм; η=1 спз; F=0.2 мл/мин; **P≈3 МПа**
2. ∅=2 мм; L=75 мм; d_p=1.7 мкм; η=1 спз; F=0.2 мл/мин; **P≈26 МПа**
3. ∅=2 мм; L=75 мм; d_p=1.7 мкм; η=1 спз; F=2.0 мл/мин; **P≈275 МПа**

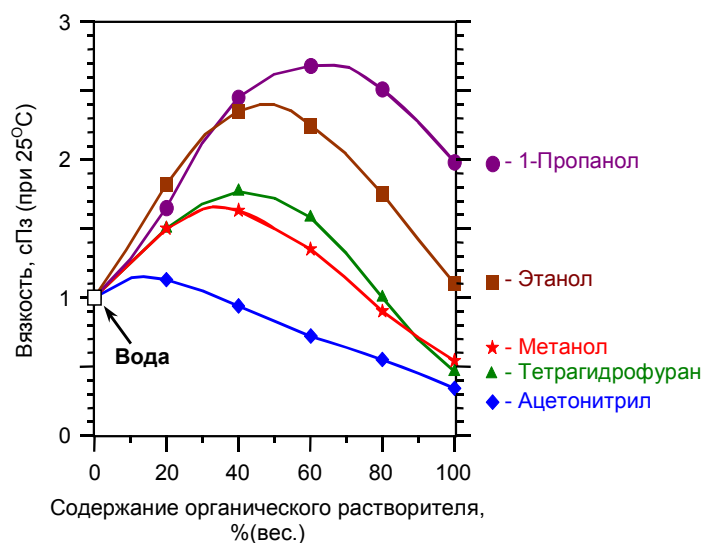
ВЯЗКОСТЬ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

Влияние температуры

Растворитель	η (спз) при температуре, °C					
	10	20	30	40	50	60
Ацетонитрил	0.396	0.357	0.325	-	-	-
Вода	1.308	1.005	0.801	0.656	0.549	0.469
Гексан	0.343	0.307	0.290	0.253	0.248	0.222
Метанол	0.690	0.597	0.510	0.450	0.396	0.350
Этанол	1.466	1.200	1.003	0.834	0.702	0.592

ВЯЗКОСТЬ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

Водноорганические смеси



ТЕМПЕРАТУРА В ВЭЖХ

Изменение удерживания вещества

Термодинамические причины

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

где

T - абсолютная температура (°K);

a и b - константы (обычно $a > 0$).

В обращенно-фазовой хроматографии "чувствительность" удерживания в единицах k' при $k' \approx 10$ составляет около 1 на 10°C.

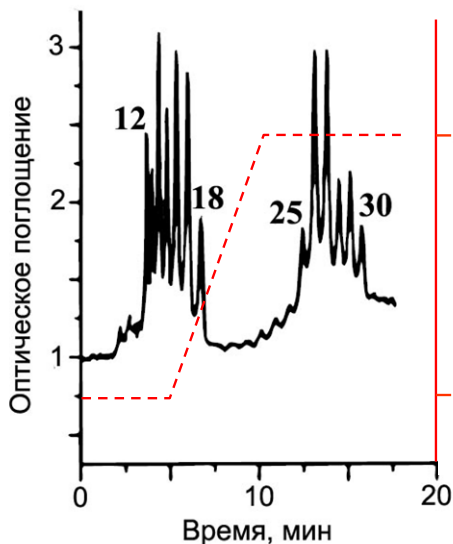
Изменение конформации биомолекул

(белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды)

ТЕМПЕРАТУРА В ВЭЖХ

Изменение удерживания вещества

Разделение дезоксиолигонуклеотидов



Колонка: 2x250 мм

Сорбент: YMC ODS-AQ ($d_p=3$ мкм)

Элюент: 10 мМ ТЭАА в 7% CH_3CN

Скорость потока: 0.3 мл/мин

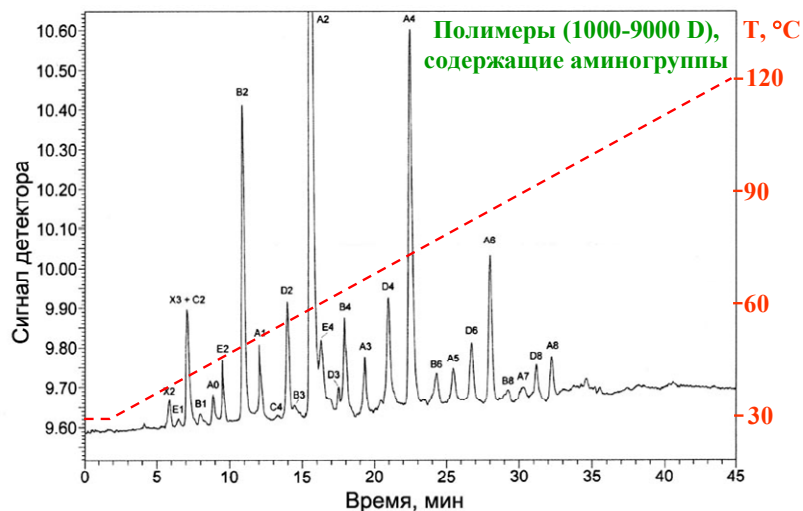
Детектор: $\lambda=260$ нм

Образец: сумма pd(A)_{12-18} и pd(A)_{25-30}

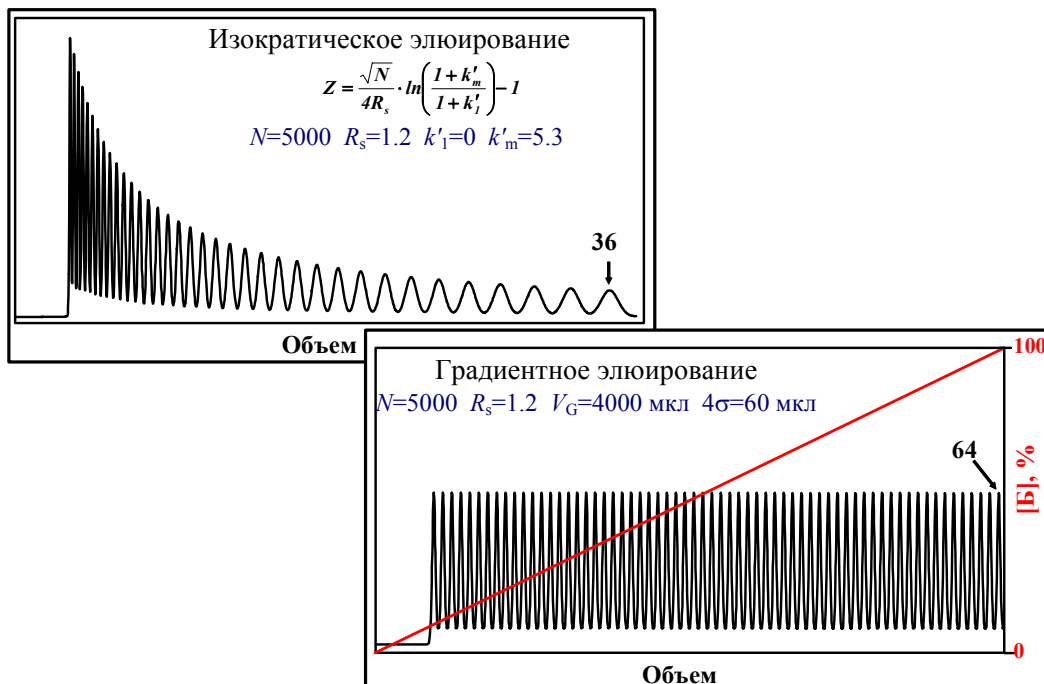
N.M.Djordjevic, F.Houdiere, P.Fowler,
F.Natt. *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 1921-1925

ТЕМПЕРАТУРА В ВЭЖХ

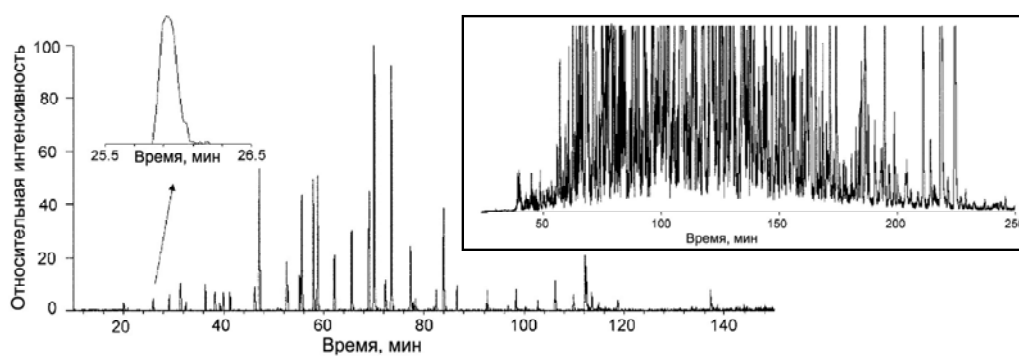
Изменение удерживания вещества



ПИКОВАЯ ЕМКОСТЬ КОЛОНКИ



ПИКОВАЯ ЕМКОСТЬ КОЛОНКИ



Колонка: 0.05x1500 мм с фазой Phenomenex C18 (30 нм, 3 мкм)

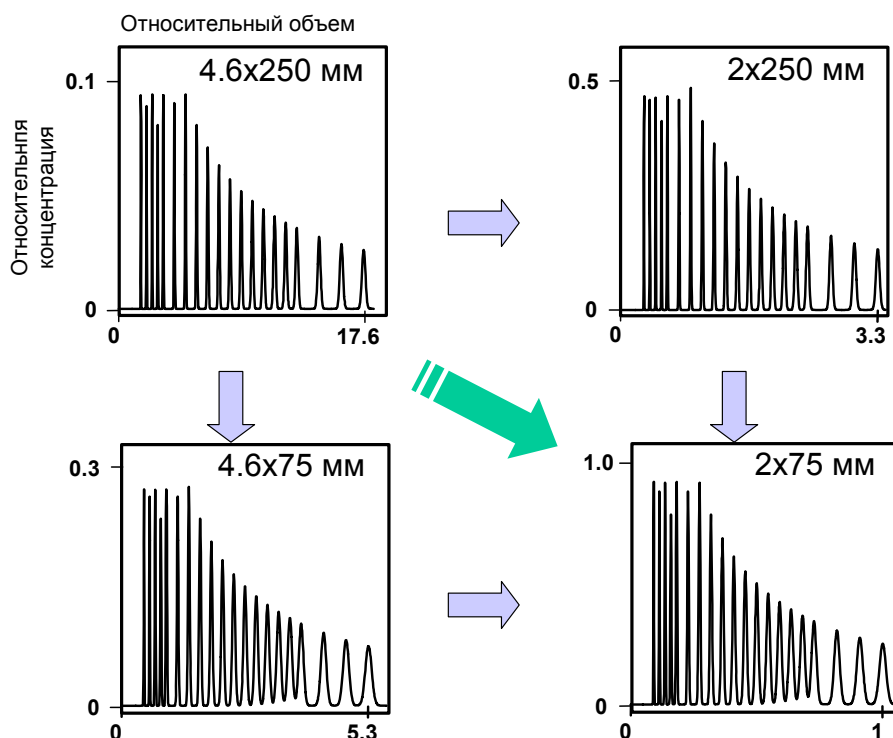
Скорость потока: 0.15 мкл/мин

Давление: 115 МПа

Образец: триптический гидролизат 20 мкг белка

M.-S. Kim, W.-S. Choie, Y.S. Shin, M.-H. Yu, S.-W. Lee.
Bull. Korean Chem. Soc. **2004**, Vol. 25, No. 12, 1833-1839.

КОЛОНКИ В ВЭЖХ



КОЛОНКИ В ВЭЖХ

Колонка, мм	N, т.т.	P, отн.	k'=10		
			V _R , отн.	T _R , отн.	h, отн.
250x4.6	20000	3	17.6	3	0.1
250x2	20000	3	3.3	3	0.5
75x4.6	6000	1	5.3	1	0.3
75x2	6000	1	1	1	1

МИКРОКОЛОНОЧНАЯ И ОБЫЧНАЯ ВЭЖХ

	МК ВЭЖХ	ВЭЖХ
Размеры колонки, мм	Ø2x60÷80	Ø4.6x250
Эффективность колонки, т.т.	5000÷6000	15000÷20000
Пиковая емкость колонки, пики*	40÷45	70÷85
Линейная скорость элюции, мм/сек	0.5÷1	1÷2
Объемная скорость элюции, мл/мин	0.1÷0.2	1÷2
Рабочее давление, МПа	2÷4	15÷30
Расход элюента на 1 анализ, мл**	2	40
Время анализа, мин**	10÷20	20÷40

КОЛОНКИ В ВЭЖХ

Классификация ВЭЖХ по диаметру колонок

Тип хроматографии	Ø _{внутр} , мм
Обычная ВЭЖХ Conventional HPLC	3-5
ВЭЖХ на узких колонках Narrow-bore HPLC	2
Микроколоночная ЖХ Micro LC	0.5-1
Капиллярная ВЭЖХ Capillary LC	0.1-0.5
Нано ВЭЖХ Nano LC	0.01-0.1
ВЭЖХ на полом каилляре Open tubular LC	0.005-0.05

Y.Saito, K.Jinno, T.Greibrokk. *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 1379–1390

Лекция 3

Механизмы жидкостной хроматографии

Г.И.Барам

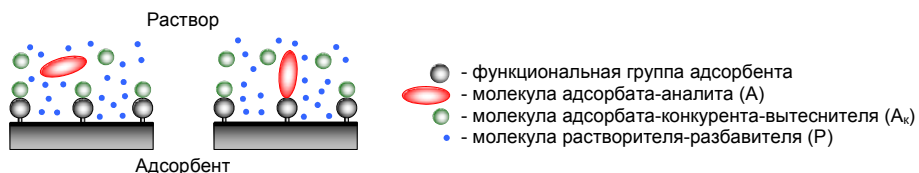
Курс лекций "ВЭЖХ для ВСЕХ"

Новосибирск, 2007

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Адсорбент \Leftrightarrow Адсорбат

Адсорбция



$$K = \frac{[\text{Адсорбент-Аналит}]x[\text{Конкурент}]}{[\text{Адсорбент-Конкурент}]x[\text{Аналит}]}$$

Константа равновесия

Хроматография: адсорбционная, ионообменная, аффинная

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

Адсорбент \Leftrightarrow Адсорбат

Экстракция



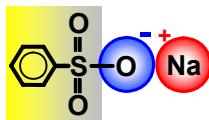
$$K = \frac{[\text{Аналит в неподвижной фазе}]}{[\text{Аналит в подвижной фазе}]}$$

Коэффициент распределения

Хроматография: распределительная

ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Адсорбент \leftrightarrow Адсорбат

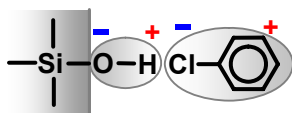


Взаимодействие: "ион \leftrightarrow ион"

Адсорбент: ионообменник (сульфополистирол)

Растворитель: полярный (вода)

Конкуренты аналита: ионы с зарядом того же знака

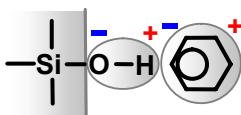


Взаимодействие: "диполь \leftrightarrow диполь"

Адсорбент: полярный (SiO_2 , Al_2O_3)

Растворитель: малополярный (хлороформ)

Конкуренты: полярные молекулы (спирт, вода)



Взаимодействие: "диполь \leftrightarrow наведенный диполь"

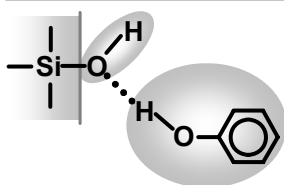
Адсорбент: полярный (SiO_2 , Al_2O_3)

Растворитель: неполярный (гексан)

Конкуренты: малополярные молекулы (хлороформ)

ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Адсорбент \leftrightarrow Адсорбат

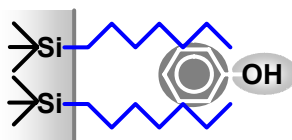


Взаимодействие: "водородная связь"

Адсорбент: донор/акцептор электронов

Растворитель: не образующий Н-связи (ACN)

Конкуренты: образующие Н-связи молекулы (вода)

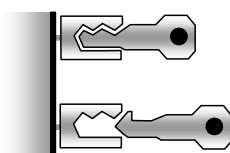


Взаимодействие: "гидрофобное"

Адсорбент: неполярный (обращенная фаза)

Растворитель: полярный (вода)

Конкуренты: полярные молекулы (спирт, ACN)



Взаимодействие: аффинное (биоспецифическое)

Сумма взаимодействий: ионные, дипольные, гидрофобные, Н-связи

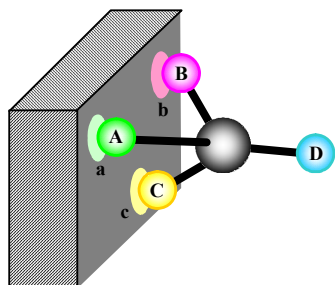
Адсорбент: аффинный (антиген)

Растворитель: вода

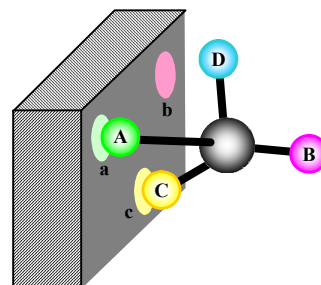
Конкуренты: ионная сила, температура, pH и пр.

ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Адсорбент \Leftrightarrow Адсорбат



Трёхточечное ("сильное")
взаимодействие



Двухточечное ("слабое")
взаимодействие

Взаимодействие: хиральное (стереоспецифическое)

Адсорбент: хиральный (*оптически активный*)

Растворитель: вода, органический растворитель

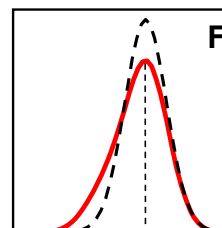
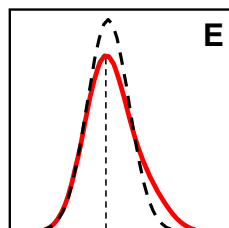
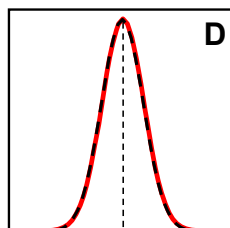
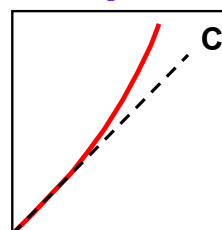
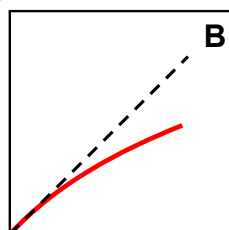
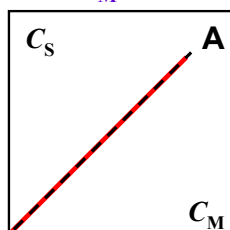
Конкуренты: ионная сила, pH, полярность и пр.

ИЗОТЕРМА АДсорбЦИИ

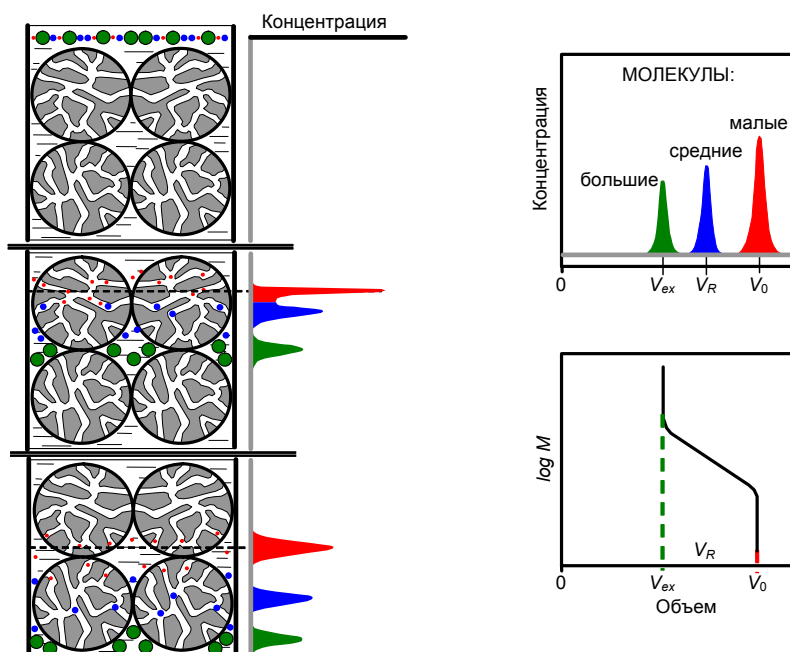
Форма пика

C_s - концентрация вещества в твердой фазе

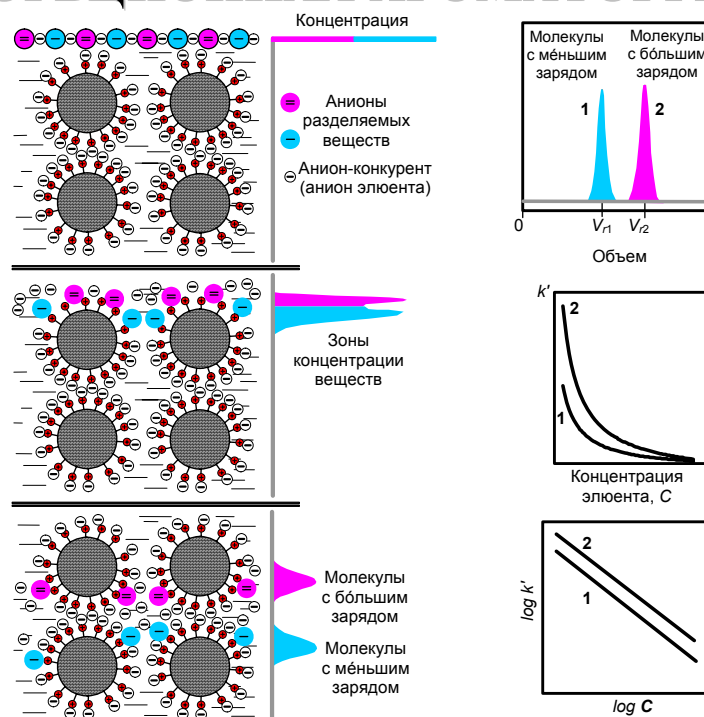
C_m - концентрация вещества в жидкой фазе



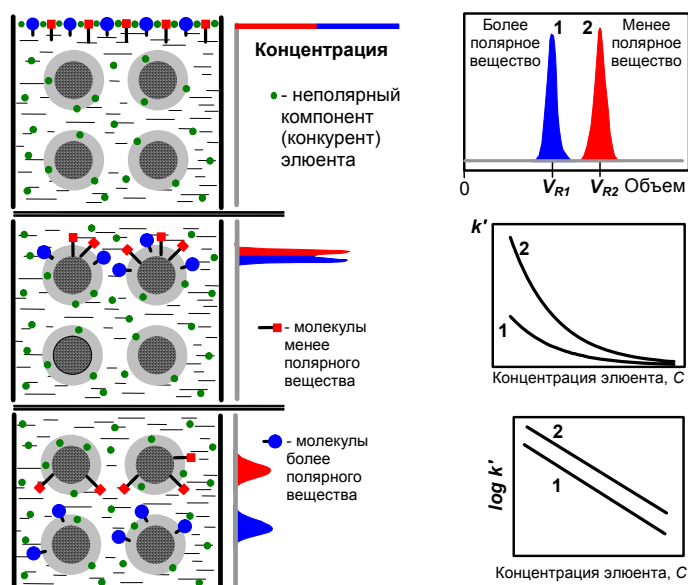
ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ



АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

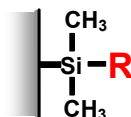


РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ



НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Привитые фазы на основе силикагеля

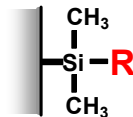


ОБРАЩЕННЫЕ ФАЗЫ

Фаза	R	Назначение
C18 RP18 Octadecyl ODS	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$	Универсальная фаза с высокой емкостью. Разделение гидрофильных веществ методом ион-парной хроматографии.
C8 RP8 Octyl	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	Универсальная фаза со средней емкостью. Разделение липофильных веществ.
C4 Butyl	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	Разделение белков и пептидов методом обращенно-фазовой и гидрофобной хроматографии.
C1	$-(\text{CH}_3)_3$	Фаза с очень низкой емкостью.
Phenyl	$-\text{C}_6\text{H}_5$	Фаза со средней емкостью.
Nitryl CN	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CN}$	Фаза с низкой емкостью.
Nitro NO ₂	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NO}_2$	Фаза с низкой емкостью; селективна к ароматическим соединениям.

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Привитые фазы на основе силикагеля



ОБРАЩЕННЫЕ ФАЗЫ

Элюотропный ряд (повышение силы элюента):

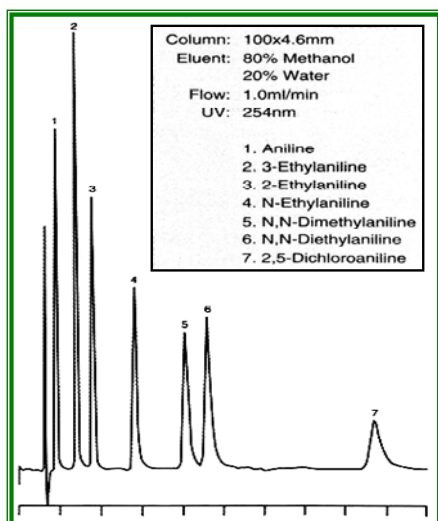
Вода < MeOH < ACN < EtOH ≤ Тетрагидрофуран ≤ Пропанол < Диоксан

*Смешивающиеся с водой и
прозрачные в УФ области спектра растворители*

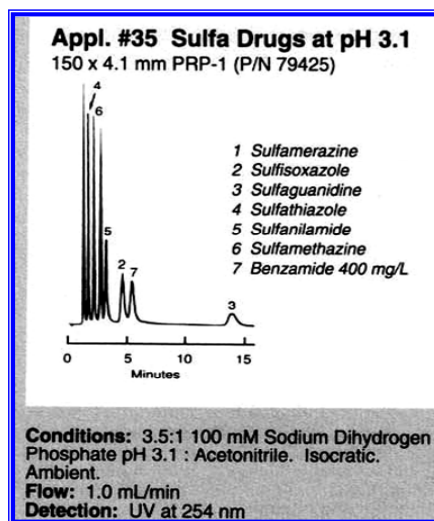
НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

"Несиликагельные" обращенные фазы

ГРАФИТ

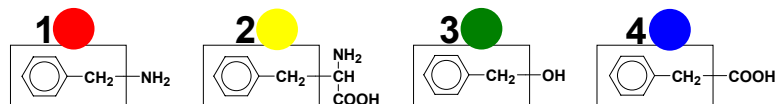


ПОЛИСТИРОЛ

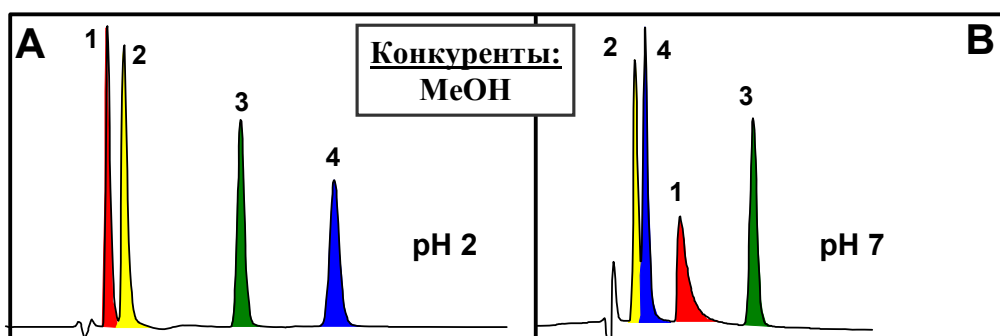


СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

I. Обращенно-фазная хроматография

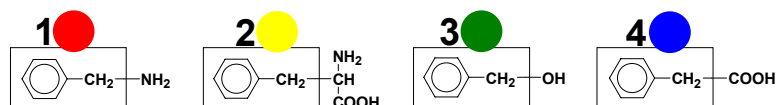


Изменение степени ионизации

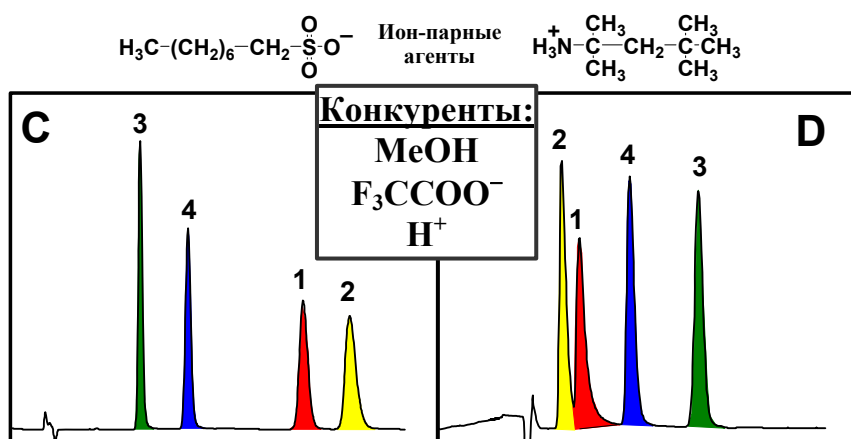


СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

II. Ион-парная хроматография

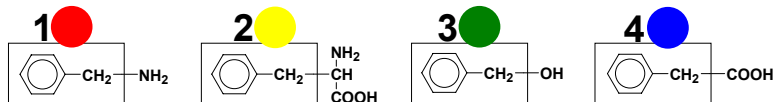


Образование гидрофобных ионных пар

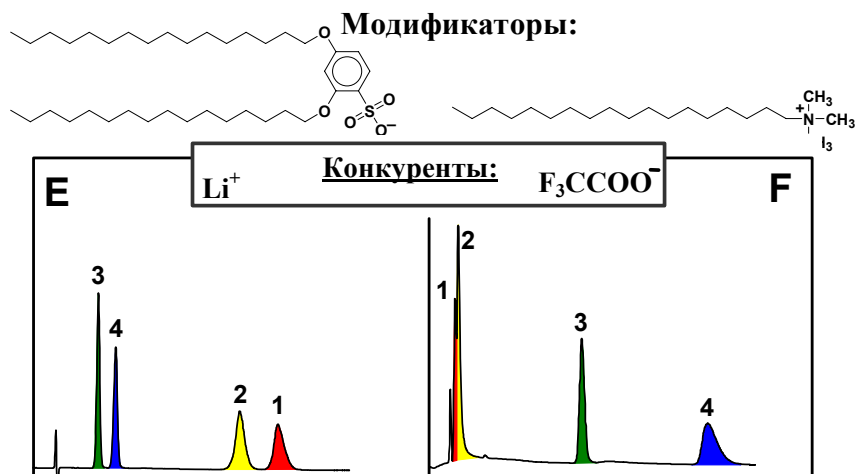


СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

III. Ионообменная хроматография



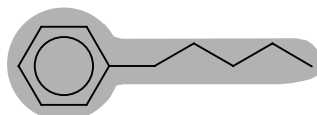
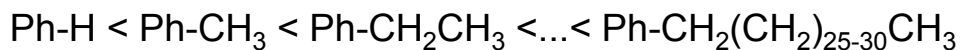
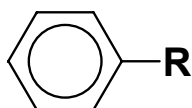
Модификация поверхности сорбента



СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

Эффективность колонки: 4000-6000 теоретических тарелок

Разрешение пиков: $R_{s(i, i+1)} > 1$ или 4



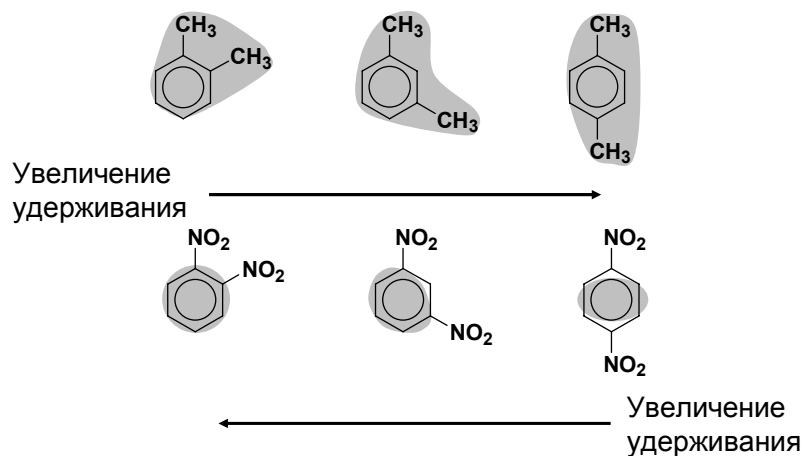
Поверхность гидрофобного контакта

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

Эффективность колонки: 4000-6000 теоретических тарелок

Разрешение пиков: $R_{s(i, i+1)} > 1$ или 4

Поверхность гидрофобного контакта



СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

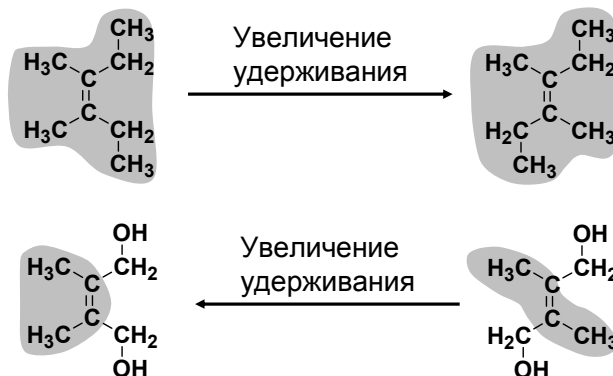
Эффективность колонки: 4000-6000 теоретических тарелок

Разрешение пиков: $R_{s(i, i+1)} > 1$ или 4

Поверхность гидрофобного контакта

Цис-изомеры

Транс-изомеры

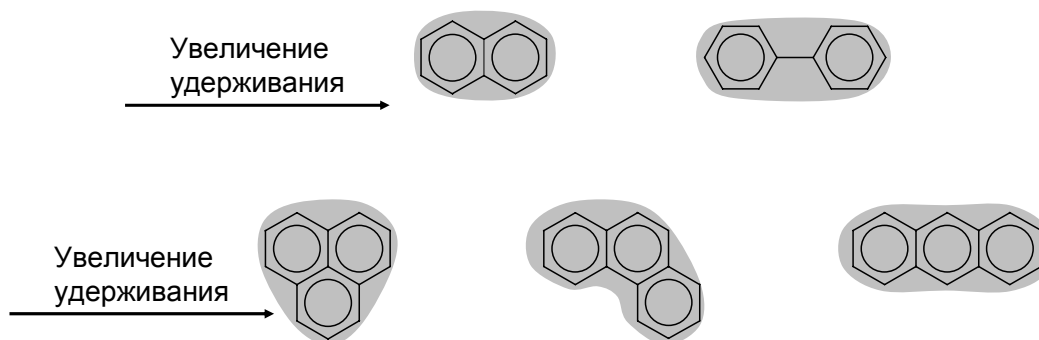


СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

Эффективность колонки: 4000-6000 теоретических тарелок

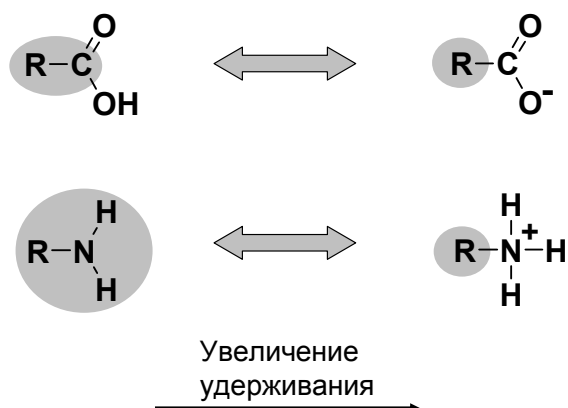
Разрешение пиков: $R_{s(i, i+1)} > 1$ или 4

Поверхность гидрофобного контакта



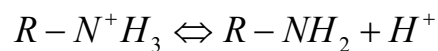
СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

Поверхность гидрофобного контакта



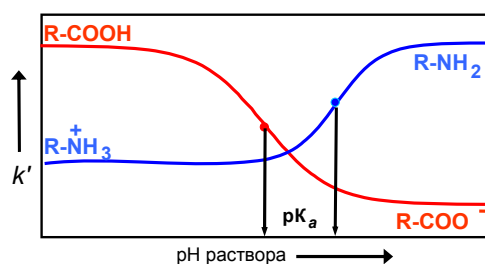
ХРОМАТОГРАФИЯ ИОНОВ НА ОБРАЩЕННОЙ ФАЗЕ

Слабые **кислоты** и **основания**



$$K_a = \frac{[R-COO^-] \cdot [H^+]}{[R-COOH]}$$

$$K_a = \frac{[R-NH_2] \cdot [H^+]}{[R-N^+H_3]}$$

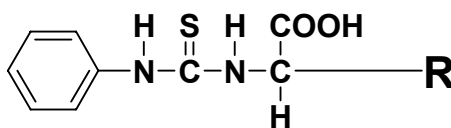


СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

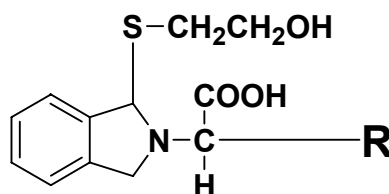
химическая дериватизация

Производные аминокислот:

с фенилизотиоцианатом (ФТК-АК)



с орто-фталевым альдегидом (ОФА-АК)



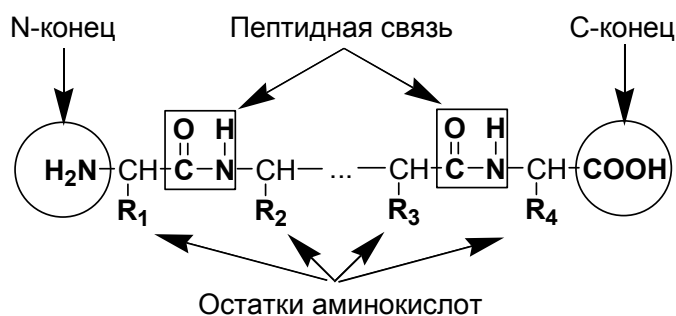
СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

Порядок элюирования производных аминокислот
из колонок с обращенной фазой

Аминокислота	Код	Структура радикала R	ФТК-АК	ОФА-АК
Аспарагиновая кислота	Asp	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	1	1
Глутаминовая кислота	Glu	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	2	2
Серин	Ser	$-\text{CH}_2\text{OH}$	3	3
Глицин	Gly	$-\text{H}$	4	7
Гистидин	His	$-\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$	5	4
Треонин	Thr	$-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	6	6
Аланин	Ala	$-\text{CH}_3$	7	9
Аргинин	Arg	$-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{H})\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$	8	5
Тирозин	Tyr	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	9	8
Валин	Val	$-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	10	11
Метионин	Met	$-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SCH}_3$	11	10
Изолейцин	Ile	$-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	12	13
Лейцин	Leu	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	13	14
Фенилаланин	Phe	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	14	12

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

Предсказание удерживания сложных молекул: пептиды



$$V_R \sim f(Z_i, V_0)$$

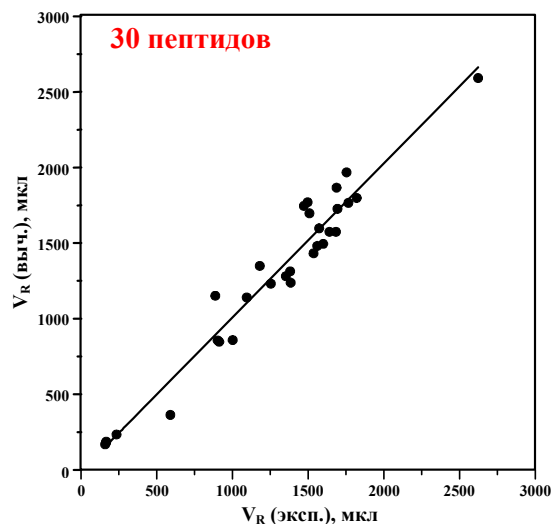
Z_i - вклад i -того структурного элемента пептида в его удерживание

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

Предсказание удерживания пептидов

Структурный элемент пептида	Код	Объем, мкл	
		V_R	Z_i
Asn	N	162	0
Ser	S	164	0
Asp	D	164	0
Gln	Q	165	0
Gly	G	170	5
His	H	175	10
Glu	E	177	12
Thr	T	180	15
Lys	K	182	17
Ala	A	183	18
Cys	C	244	79
Arg	R	196	31
Pro	P	215	50
Val	V	309	144
Met	M	354	189
Tyr	Y	512	347
Ile	I	643	478
Leu	L	686	521
Phe	F	811	646
Trp	W	1029	864
$[(\text{-COOH}) + (\text{-NH}_2)]_{\text{end}}$	CN	-	15

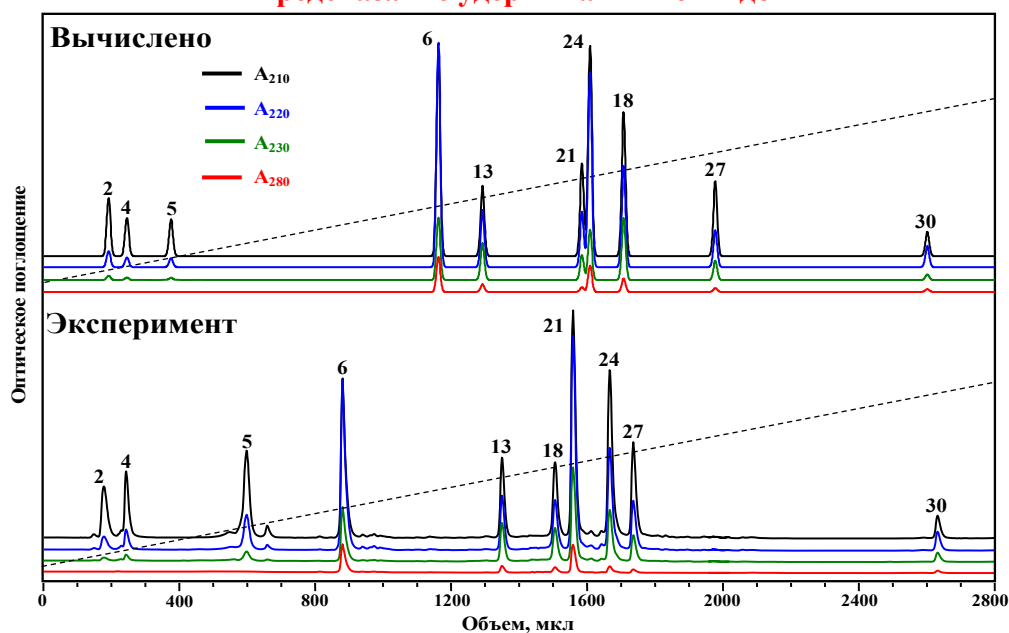
$$V_R = 209 \cdot [(\sum Z_i) + Z_{\text{CN}} + V_0]^{1/3} - 990$$



Азарова И.Н., Барам Г.И., Гольдберг Е.Л. *Биоорганич. химия*, 2005, в печати

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "C18"

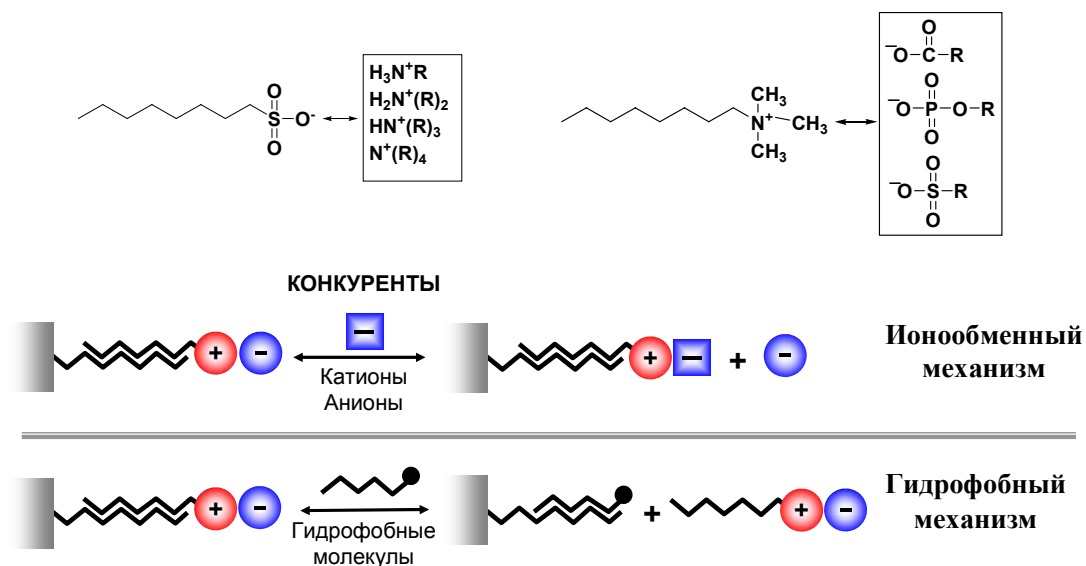
Предсказание удерживания пептидов



Азарова И.Н., Барам Г.И., Гольдберг Е.Л. *Биоорганич. химия*, 2005, в печати

ХРОМАТОГРАФИЯ ИОНОВ НА ОБРАЩЕННОЙ ФАЗЕ

Ион-парная хроматография



Лекция 4

Неподвижные фазы для колоночной жидкостной хроматографии

Г.И.Барам

Курс лекций "ВЭЖХ для ВСЕХ"

Новосибирск, 2007

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Механическая прочность

Мягкие фазы

на основе целлюлозы, декстрана, полиакриламида, полистирола и др.
для колоночной ЖХ низкого давления

($P_{\text{макс}} < 0.2$ МПа)

Полужесткие фазы

на основе поливинилового спирта, полистирола
для ВЭЖХ на коротких колонках

($P_{\text{макс}}$ до 10 МПа)

Жесткие фазы

на основе окисей кремния, алюминия, циркония, стекла

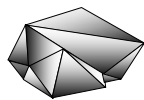
($P_{\text{макс}}$ до 50 МПа).

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

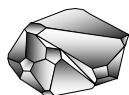
Форма частиц



- сферическая



- неправильная



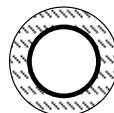
- неправильная (скругленная)

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

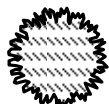
Площадь поверхности



непористая фаза



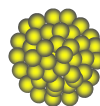
"открытая" колонка



поверхностно-пористая (pellicular) фаза



объемно-пористая фаза



Zorbax® (DuPont)

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

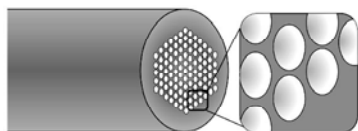
Площадь поверхности



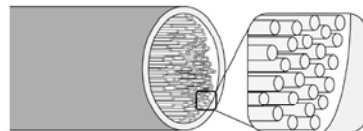
перфузионная фаза



монолитная колонка



поликапиллярная колонка



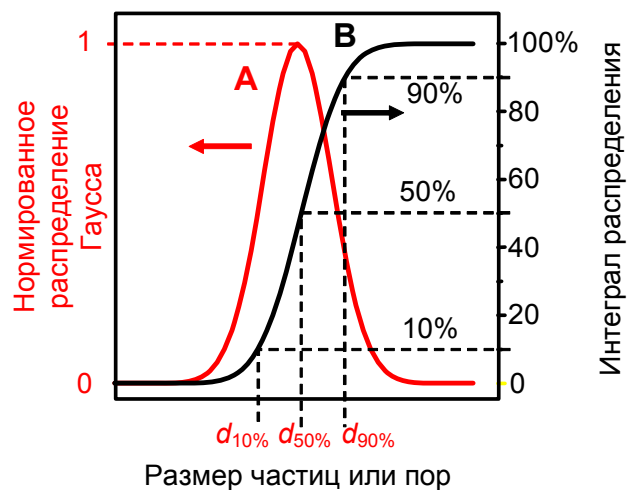
поливолоконная колонка

Y. Saito *et al. Anal. Chem.*, 2003, **75**, 5525–5531

R.K. Marcus *et al. J. Chromatogr. A*, 2003, **986**, 17–31.

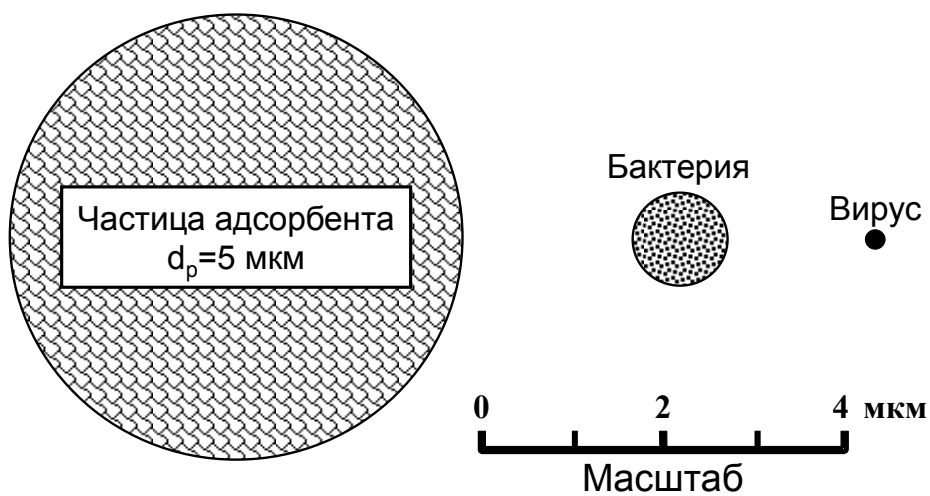
НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Распределение частиц и пор по размеру



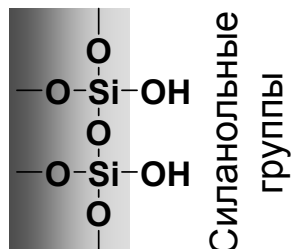
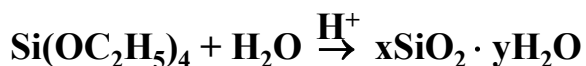
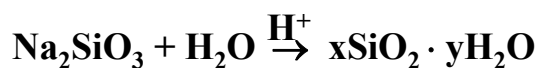
НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Соотношение размеров



АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Синтез объемно-пористого силикагеля



Типичный
силикагель
для ВЭЖХ

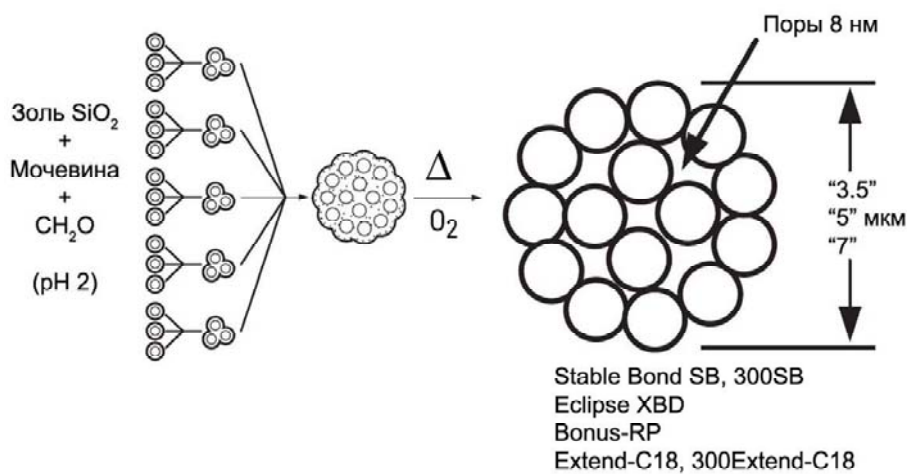
концентрация силанолов: 7-8 мкмоль/м²
размер частиц: 3, 5±1, 7, 10
диаметр пор: 10±2 нм
удельная поверхность: 300 м²/г
удельный объем пор: 0.8 мл/г

Nucleosil 100-5, LiChrosorb Si 60, LiChrospher Si 100, Zorbax BP-Sil и т.д.

АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

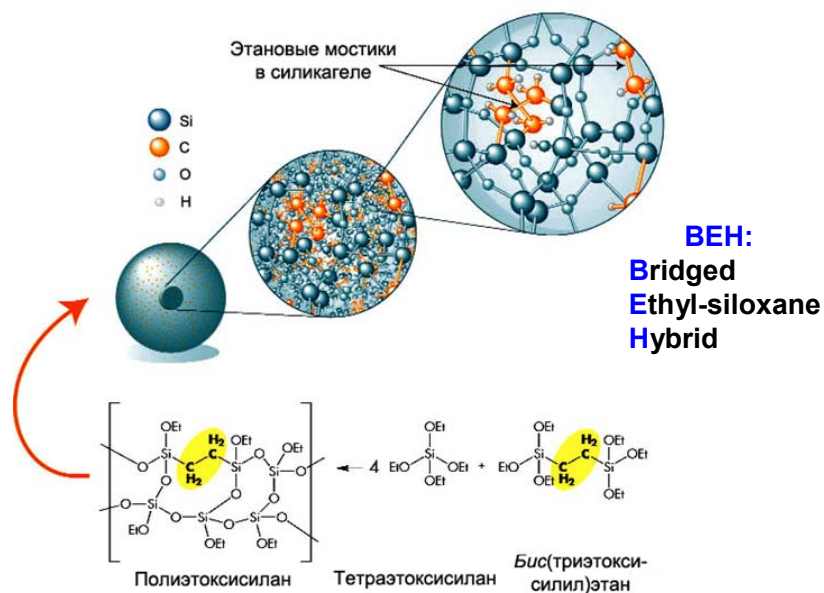
Синтез объемно-пористого силикагеля

Технология Zorbax®



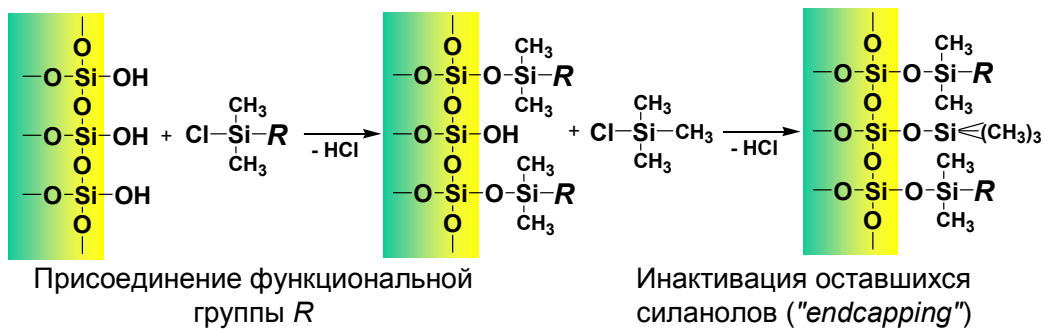
АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Синтез объемно-пористого силикагеля: технология ACQUITY UPLC (Waters)



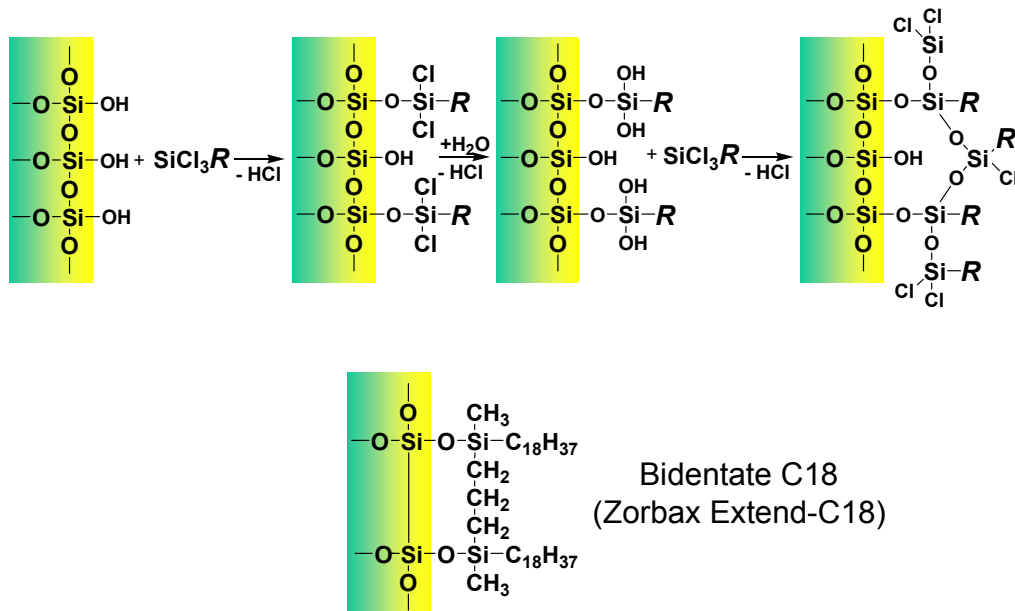
АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Синтез привитых мономерных фаз



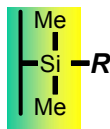
АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Синтез привитых полимерных фаз



НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Привитые фазы на основе силикагеля



ОБРАЩЕННЫЕ ФАЗЫ

Фаза	R	Назначение
C18 RP18 Octadecyl ODS	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$	Универсальная фаза с высокой емкостью. Разделение гидрофильных веществ методом ион-парной хроматографии.
C8 RP8 Octyl	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	Универсальная фаза со средней емкостью. Разделение липофильных веществ.
C4 Butyl	$-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	Разделение белков и пептидов методом обращенно-фазовой и гидрофобной хроматографии.
C1	$-(\text{CH}_3)_3$	Фаза с очень низкой емкостью.
Phenyl	$-\text{C}_6\text{H}_5$	Фаза со средней емкостью.
Nitryl CN	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CN}$	Фаза с низкой емкостью.
Nitro NO_2	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NO}_2$	Фаза с низкой емкостью; селективна к ароматическим соединениям.

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Обращенные фазы на основе силикагеля

Nucleosil 100-5 C18; Nucleosil 100-5 C18 PAH; Nucleosil 100-5 C18 AB
LiChrosorb RP18
Zorbax ODS

Количество ковалентно связанного углерода:

2-3.5 мкмоль/м²

6-10% для фаз C8

12-17% для фаз C18

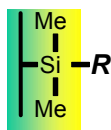
18-25% для полимерных фаз

Предельная емкость фаз C18 для веществ с M=100-500
составляет 200 мг вещества на 1 г адсорбента

Все фазы стабильны в растворах с pH 2÷8 (3÷6)

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

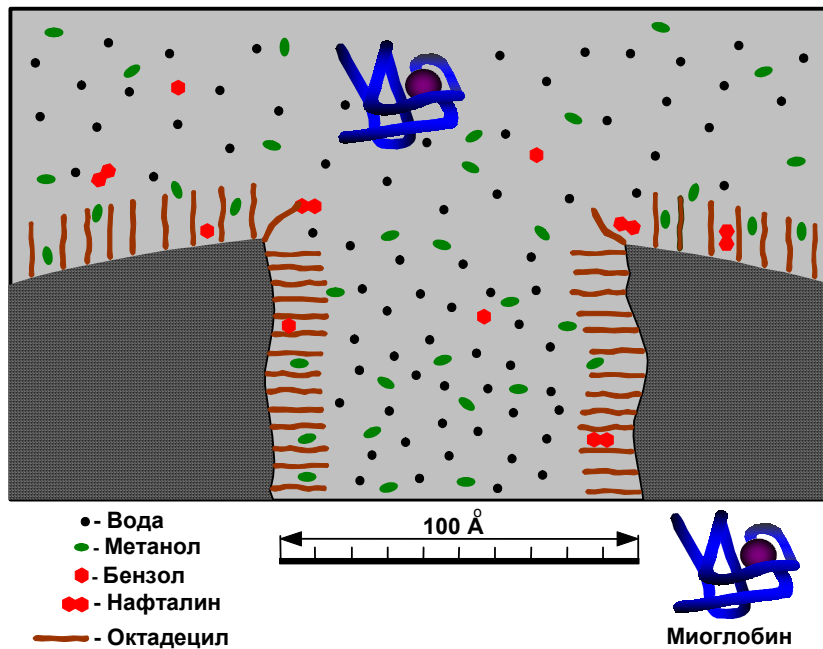
Привитые фазы на основе силикагеля



ДРУГИЕ ПРИВИТЫЕ ФАЗЫ

Фаза	R	Назначение
Amino NH ₂	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ —NH ₂	Разделение веществ методом нормально-фазовой и анионообменной хроматографии. Разделение сахаров.
Diol OH	—CHONCH ₂ —OH	Эксклюзионная хроматография белков.
SA	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ —C ₆ H ₄ SO ₃ ⁻	Сильный катионообменник.
SB	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃	Сильный анионообменник.

ФАЗА "C18" ПОД МИКРОСКОПОМ

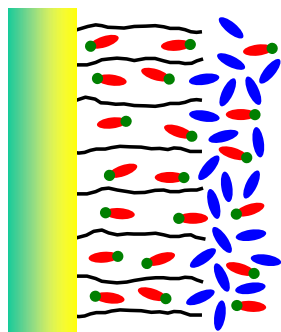


НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

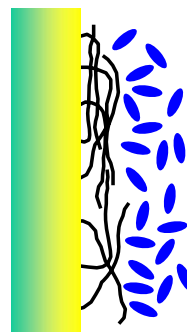
Обращенные фазы на основе силикагеля

Коллапс обращенной фазы

Малое содержание
ВОДЫ



Высокое содержание
ВОДЫ



• - Вода • - Метанол

СРАВНЕНИЕ ОБРАЩЕННЫХ ФАЗ

хроматографический способ

Состав тестовой смеси:

- урацил - маркер свободного объема колонки;
- пиридин (**P**) - основной аналит;
- N,N-диметиланилин (**N**) - основной аналит;
- фенол (**L**) - кислый аналит;
- 4-бутилбензойная кислота (**B**) - кислый аналит;
- толуол (**T**) - нейтральный аналит.

Элюент: CH₃CN - KH₂PO₄ (pH 3.2) = (65:35).

Величина k' вычислялась для всех пиков как

$$k' = (t_R - t_0) / t_0,$$

где t_R - время удерживания вещества,

t_0 - время удерживания урацила ("мертвое" время)

СРАВНЕНИЕ ОБРАЩЕННЫХ ФАЗ

хроматографический способ

P - пиридин, **N** - N,N-диметиланилин, **L** - фенол,
B - 4-бутилбензойная кислота, **T** - толуол

	Фактор удерживания k'					
	0	1	2	3	4	5
Adsorbosphere UHS C18	P	L			NB	T=6.9
AlltimaC18	P	L		N B	T	
KromasilC18	P	L		N B	T	
Luna C18	P	L		N B	T	
Spherisorb ODS-2	PL		NB	T		
Ultrasphere ODS	P L		N B	T		
YMC ODS-A	P L		N B	T		
Microsorb-MVC18	P LN			T		B=18.7
NucleosilC18AB	P L		N B	T		
Vydac 201TP,C18	PL	N BT				
Vydac 218TP,C18	PL	NBT				
Partisphere C18	PL	NBT				

Лекция 5

Аппаратура для ВЭЖХ

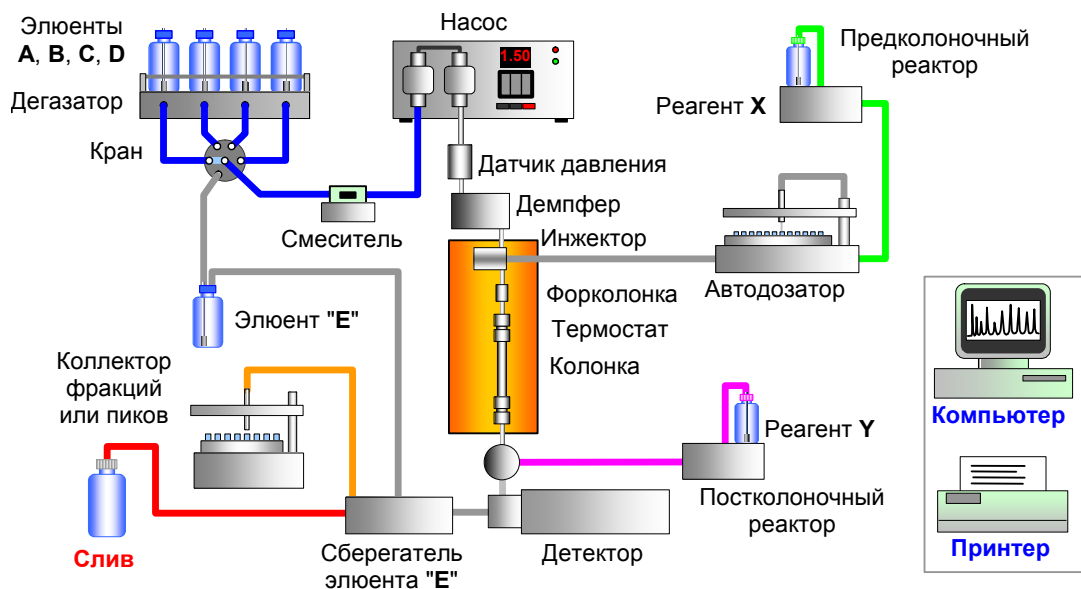
Г.И.Барам

Курс лекций "ВЭЖХ для ВСЕХ"

Новосибирск, 2007

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

Аналитический хроматограф



ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ



Rainin, США



Knauer, Германия

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ



"АКТА",
Pharmacia,
Швеция

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ



Perkin-Elmer,
США

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ



Shimadzu,
Япония

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ



Agilent 1100, США

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

Waters Corp., США



Alliance

Breeze



ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

Waters, Corp., 2004



По сравнению с традиционной ВЭЖХ системы *Acquity* это:

- скорость, увеличенная в 9 раз;
- чувствительность, увеличенная в 3 раза;
- разрешение, увеличенное в 1,7 раза.

Основные блоки системы:

- Детектор
- Модуль нагрева колонок
- Автоинжектор
- Модуль подготовки образцов
- Бинарный градиентный насос

Максимальное давление - 1000 атм

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

Jasco, Inc., 2005

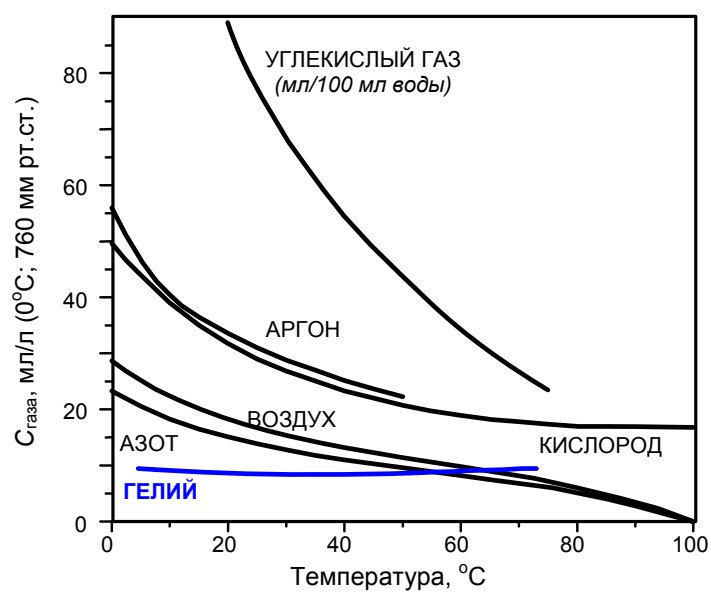
X-LC System



Максимальное давление - 1000 атм

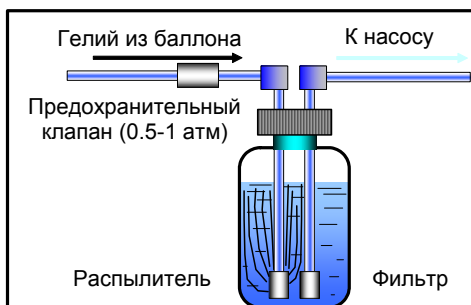
ДЕГАЗИРОВАНИЕ ЭЛЮЕНТОВ

Растворимость газов в воде

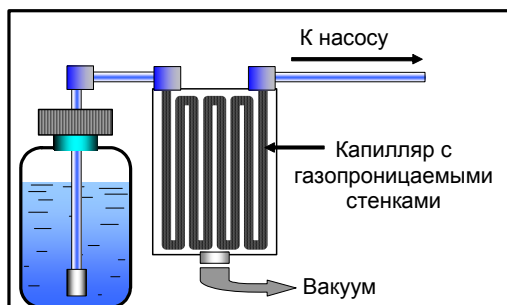


ДЕГАЗИРОВАНИЕ ЭЛЮЕНТОВ

Гелиевый дегазатор



Вакуумный дегазатор

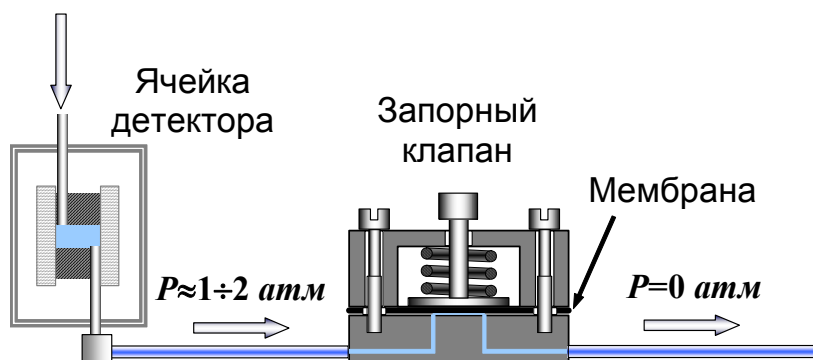


ДРУГИЕ СПОСОБЫ ДЕГАЗИРОВАНИЯ:

- кипячение
- вакуумирование
- обработка ультразвуком
- разовая продувка гелием
- содержание в теплой бане

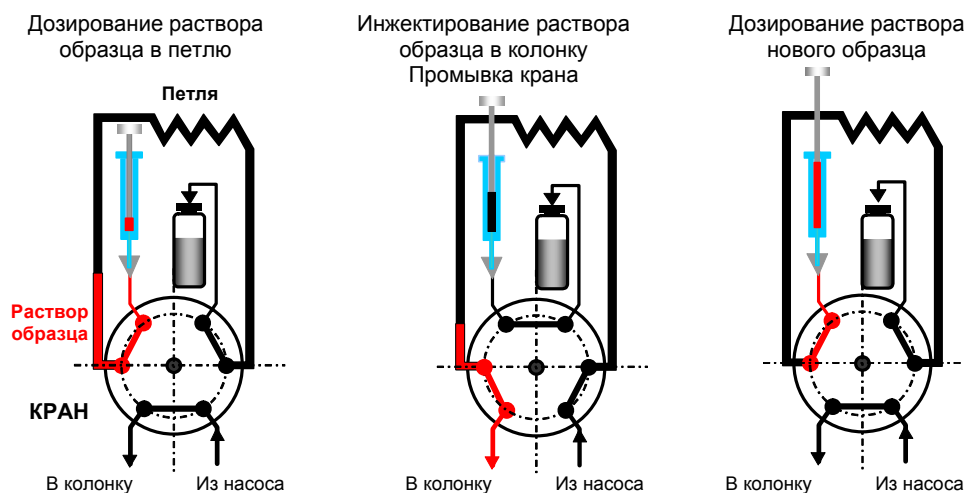
ДЕГАЗИРОВАНИЕ ЭЛЮЕНТОВ

Детектирование при повышенном давлении



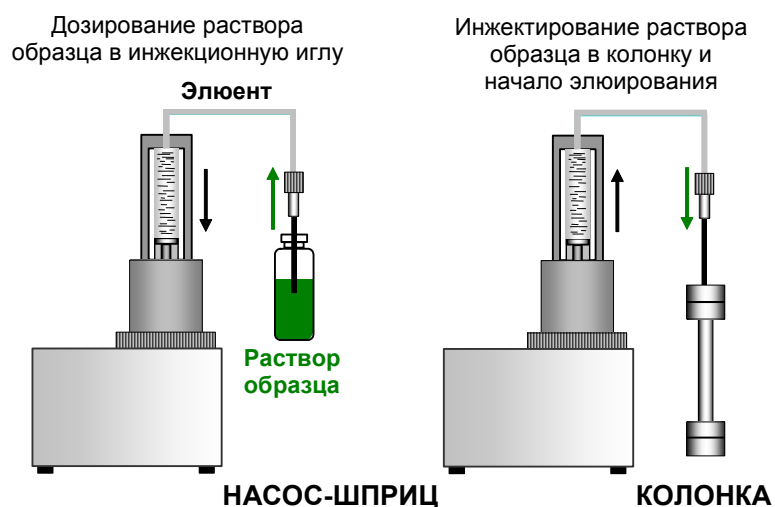
ИНЖЕКТИРОВАНИЕ ОБРАЗЦА В КОЛОНКУ

Инжекмирование без остановки потока



ИНЖЕКТИРОВАНИЕ ОБРАЗЦА В КОЛОНКУ

Инжекмирование с остановкой потока

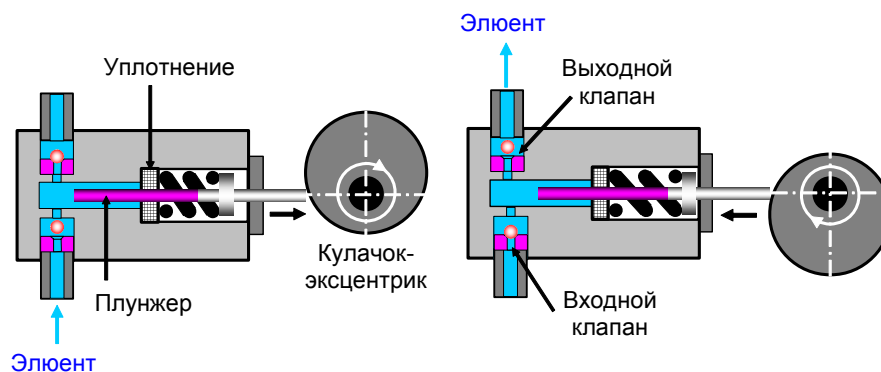


НАСОСЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Плунжерный насос

НАБОР В КАМЕРУ

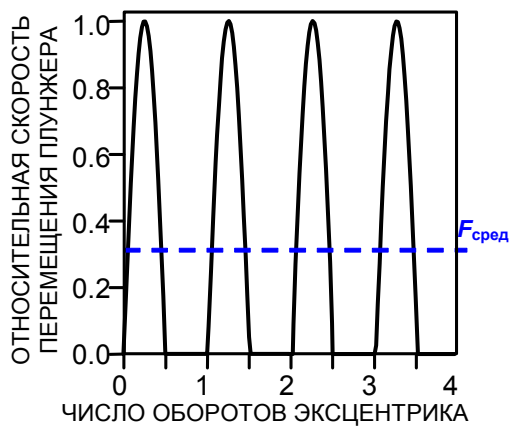
ВЫДАВЛИВАНИЕ ИЗ КАМЕРЫ



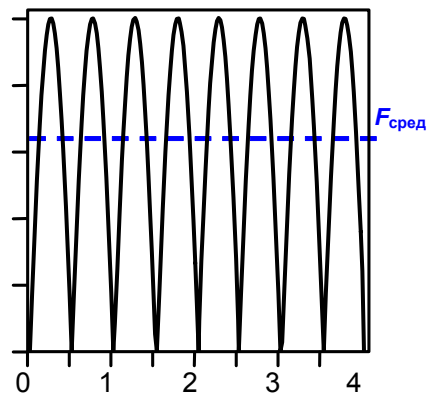
НАСОСЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Циклограмма плунжерного насоса

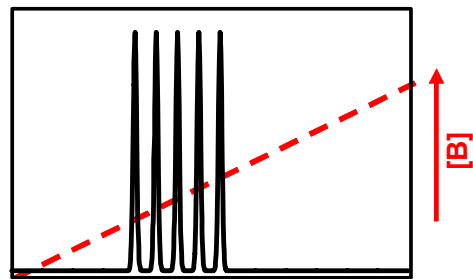
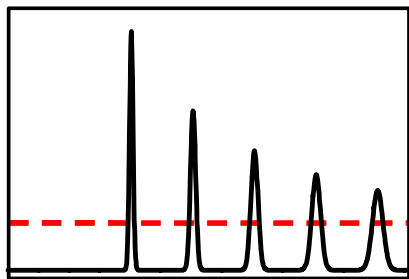
Насос с одним плунжером



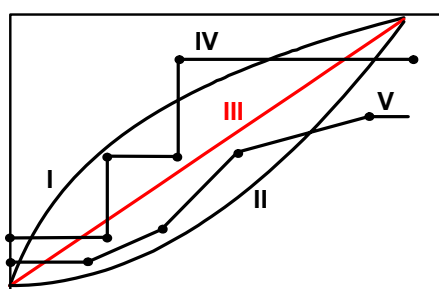
Насос с двумя плунжерами



ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ



Объем (Время)



Объем (Время)

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

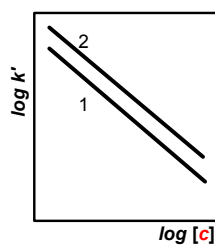
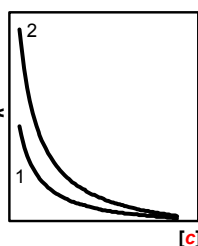
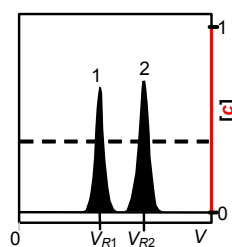
V - кусочно-линейный градиент

ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Адсорбционная хроматография

Для изократического элюирования

$$k' = k'_0 \cdot c^{-n} \quad \text{где } n \text{ и } k'_0 - \text{константы}$$



Для линейного градиента $c = a + bV$

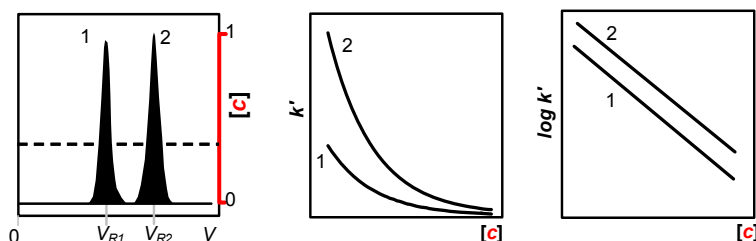
$$V_R \approx \frac{1}{b} \left[(n+1) \cdot b \cdot k'_0 \cdot V_0 + a^{n+1} \right]^{\frac{1}{n+1}} - \frac{a}{b}$$

ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Распределительная хроматография

Для изократического элюирования

$$k' = k'_0 \cdot 10^{-n \cdot c} \quad \text{где } n \text{ и } k'_0 - \text{константы}$$

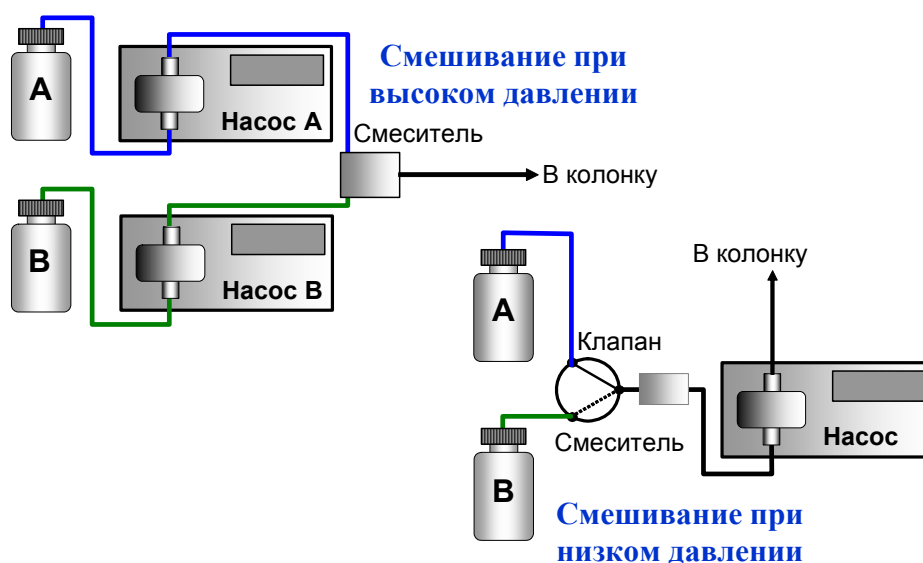


Для линейного градиента $c=a+bV$

$$V_R \approx \frac{1}{n \cdot b} \cdot \log(2.3 \cdot n \cdot b \cdot V_0 \cdot k'_0 + e^{2.3 \cdot n \cdot a}) - \frac{a}{b}$$

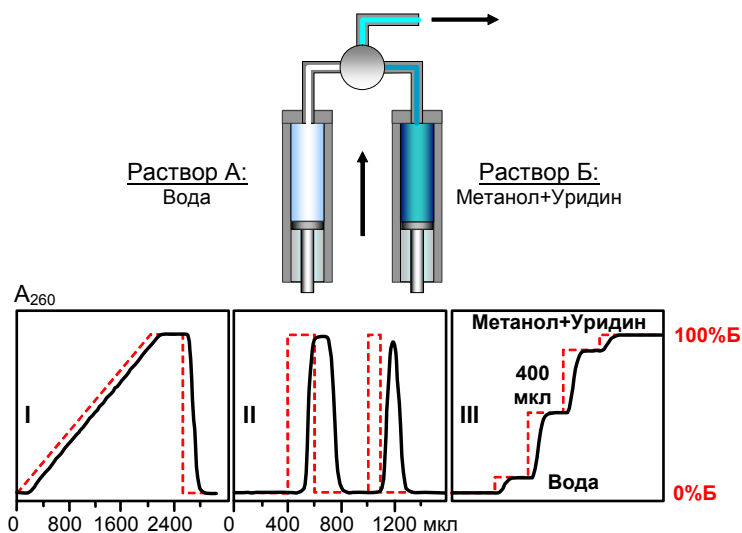
ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Способы формирования градиента



ХРОМАТОГРАФЫ "МИЛИХРОМ"

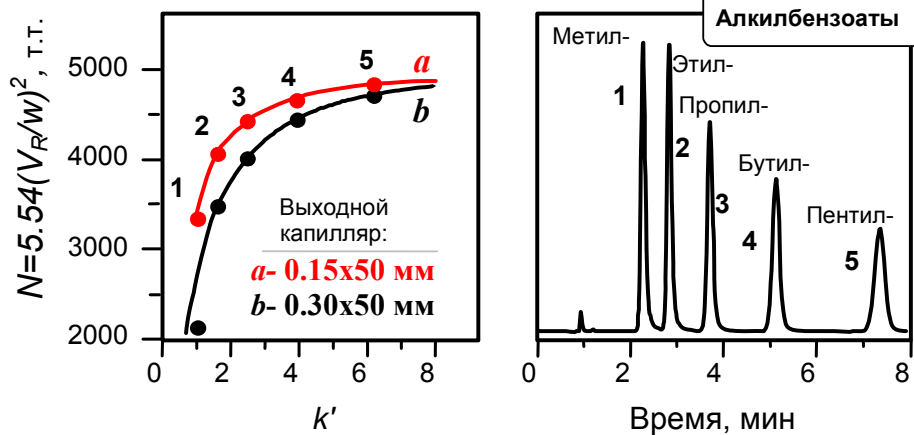
Градиентное элюирование "Милихром А-02"



ХРОМАТОГРАФ "МИЛИХРОМ А-02"

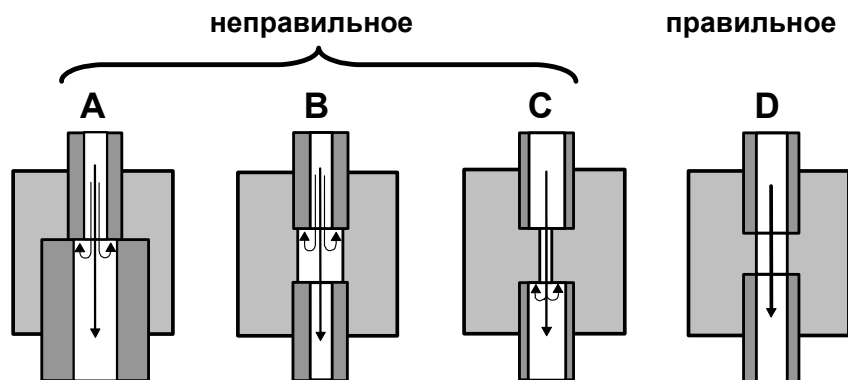
Внеколоночное уширение пиков

Колонка: 2x75 мм, Nucleosil 100-5 C18, 150 мкл/мин

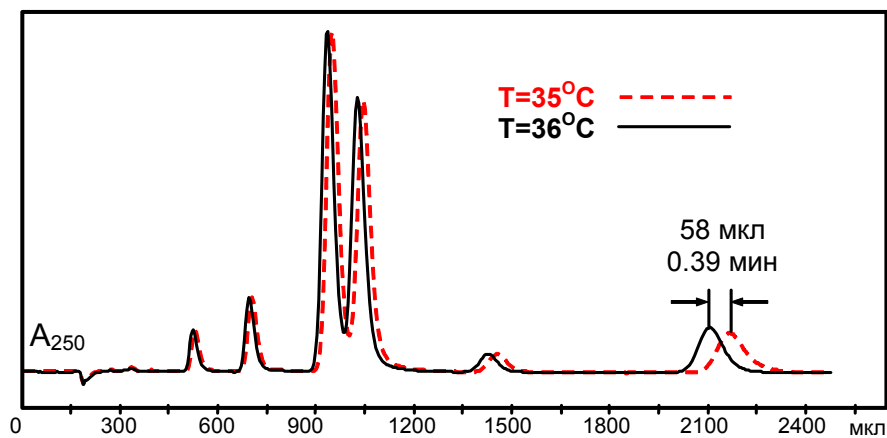


РАЗМЫВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИОННЫХ ЗОН

Соединение капилляров



ТЕРМОСТАТИРОВАНИЕ КОЛОНКИ



Хроматограф: "Милихром А-02"

Колонка: 2x75 мм, Nucleosil 100-5 C18

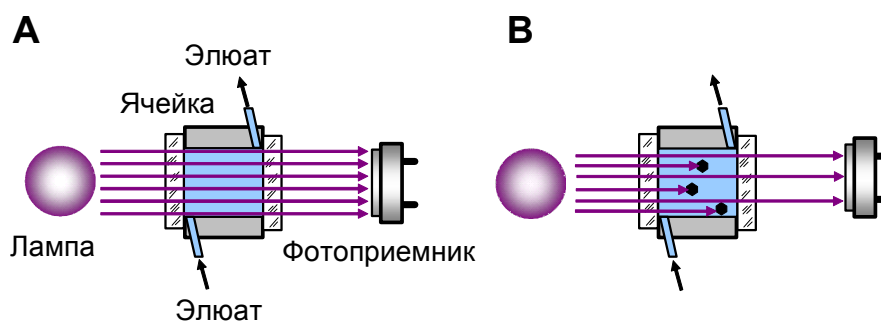
Элюент: Вода:Метанол (25:75)

Скорость потока: 150 мкл/мин

Образец: 5 мкл раствора изопропилбензола, нафталина, бифенила, антрацена, пирена и хризена в метаноле

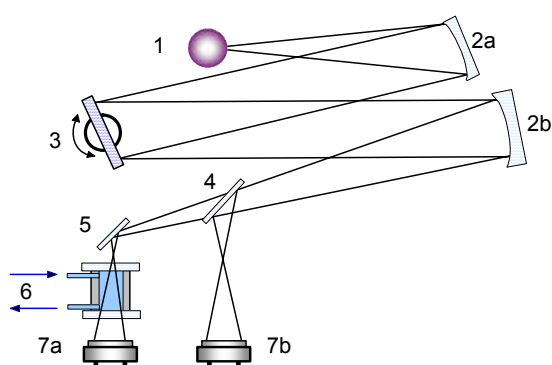
ДЕТЕКТОРЫ В ВЭЖХ

Фотометр



МНОВОЛОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

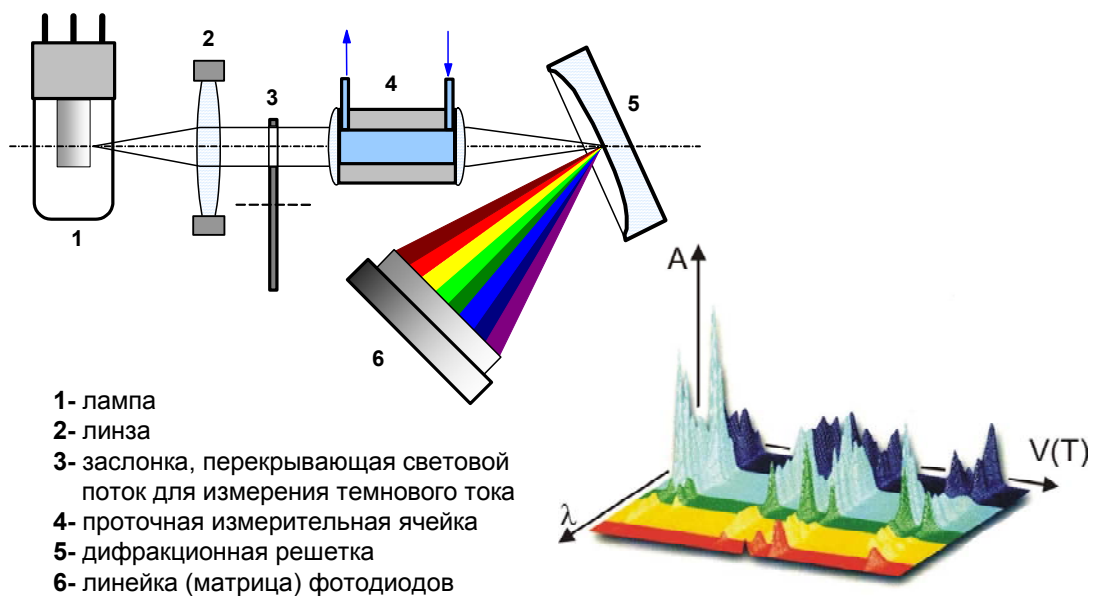
Двухлучевой спектрофотометрический детектор



- 1- лампа
- 2- зеркала
- 3- поворачивающаяся дифракционная решетка
- 4- полупрозрачное; плоское зеркало
- 5- плоское зеркало
- 6- проточная измерительная ячейка
- 7- фотоприемники

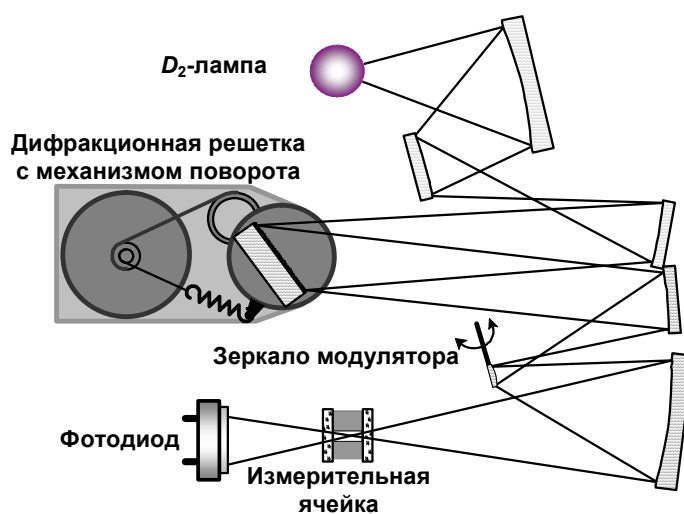
МНГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Спектрофотометр с диодной линейкой (матрицей)



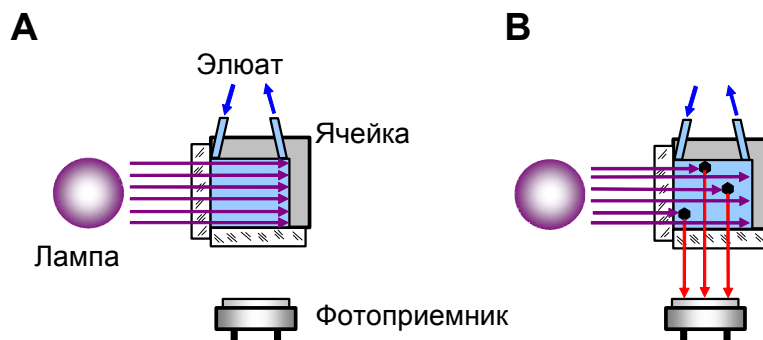
МНГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Спектрофотометрический УФ-детектор хроматографа "Милихром А-02"



ДЕТЕКТОРЫ В ВЭЖХ

Флуориметр

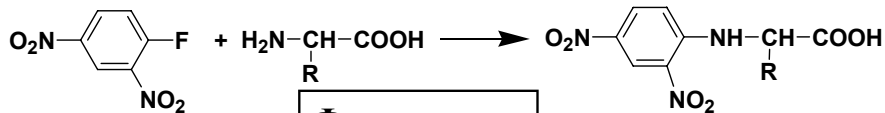


ДЕТЕКТОРЫ В ВЭЖХ

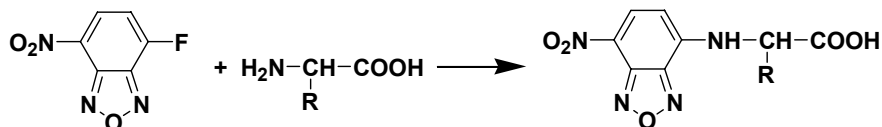
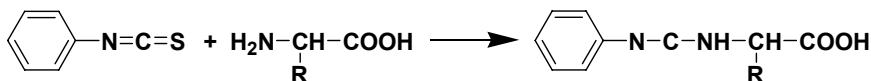
Рефрактометр
 Поляриметр
 Радиометр
 Кондуктометр
 рН-метр
 Полярограф
 Диэлкометр
 ИК-спектрометр
 ЯМР-спектрометр
 и др.

КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

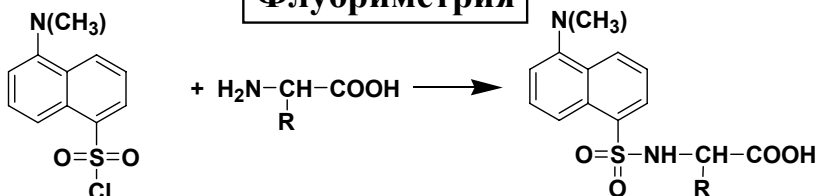
ПРЕДКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ



Фотометрия



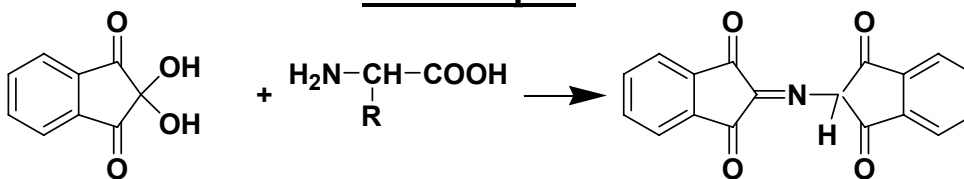
Флуориметрия



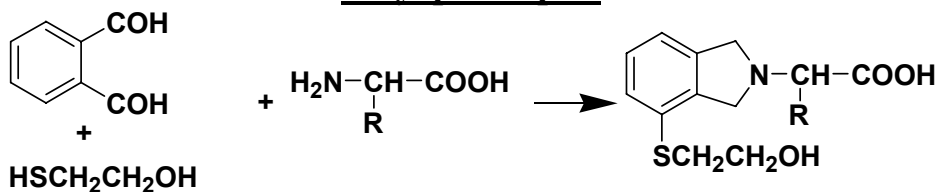
КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

ПОСТКОЛОНОЧНАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ

Фотометрия

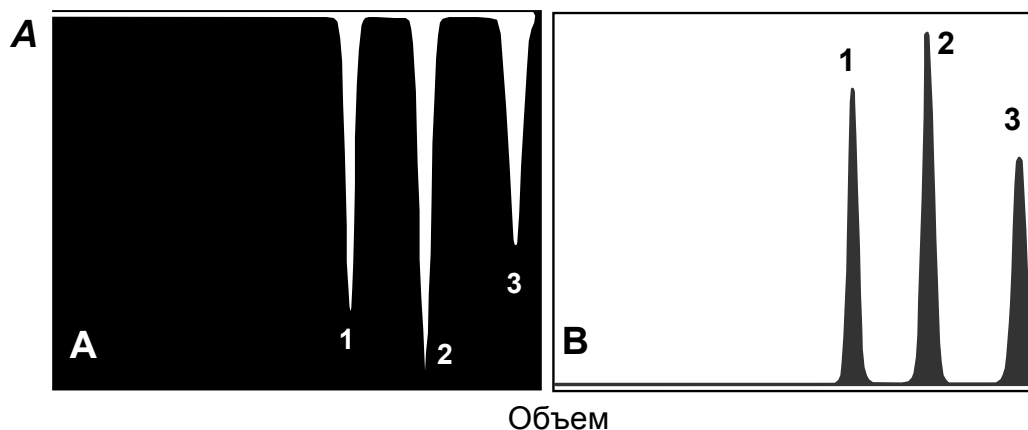


Флуориметрия



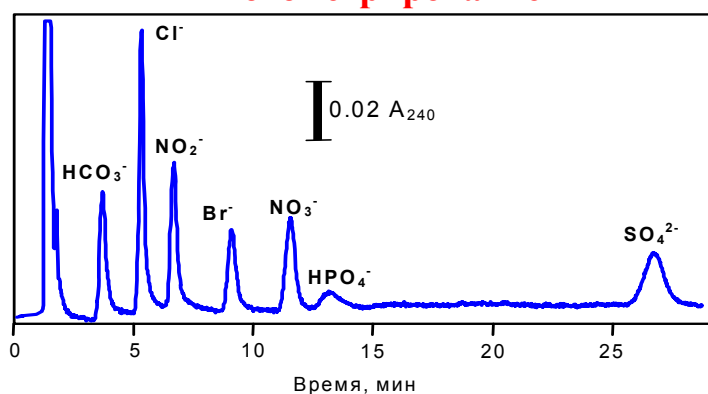
КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Фотометрирование



КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Фотометрирование



ХРОМАТОГРАФ: "Милихром А-02"

КОЛОНКА: 2x75 мм с Nucleosil 100-5 C18 (модифицирована бромидом триметилоктадециламмония)

ЭЛЮЕНТ: H_2O - CH_3CN - **16 мМ фталат натрия, pH 8.9** (80:10:10)

СКОРОСТЬ ПОТОКА: 0.1 мл/мин

ТЕМПЕРАТУРА: 35°C

ОБРАЗЕЦ: 10 мкл натриевых солей (по 10 мг/мл каждой в воде)

Лекция 6

ВЭЖХ и скрининговые задачи.

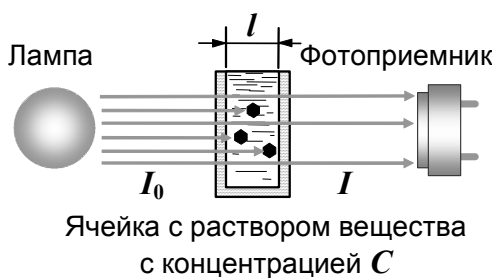
Базы данных "ВЭЖХ-УФ"

Г.И.Барам

Курс лекций "ВЭЖХ для ВСЕХ"

Новосибирск, 2007

ФОТОМЕТРИЯ



Закон
Ламберта-Бургера-Бера

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot C \cdot l}$$

Пропускание света
(100 \Rightarrow 0%)

Поглощение света
(0 \Rightarrow ∞)

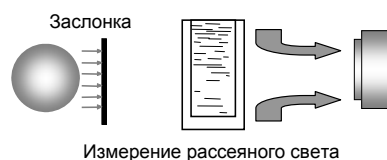
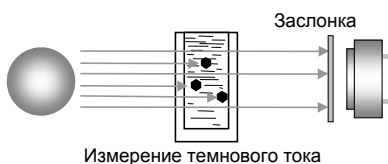
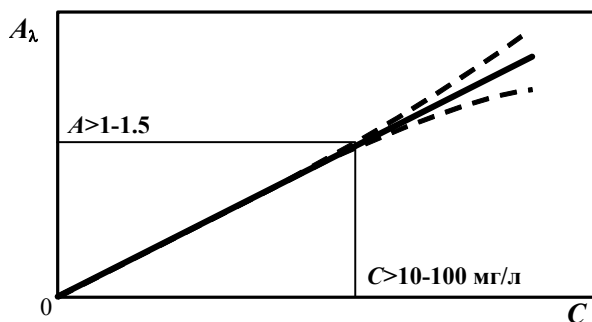
$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100\%$$

$$A_\lambda = -\log T = \varepsilon_\lambda \cdot C \cdot l$$

Поглощение раствора вещества при длине волны λ прямо пропорционально концентрации вещества

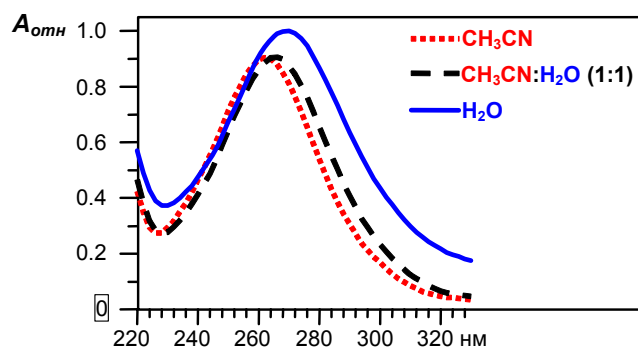
ФОТОМЕТРИЯ

Линейность



УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ

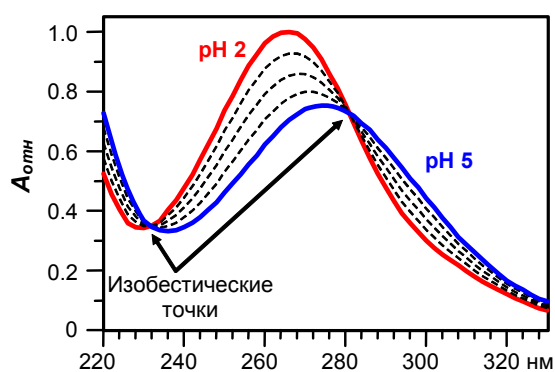
Влияние растворителя



Спектры растворов нитробензола, нормированные относительно спектра водного раствора

УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ

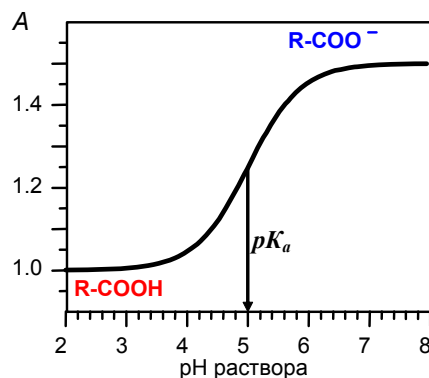
Влияние растворителя



Спектры растворов 4-нитробензойной кислоты (pK_a 4-нитробензойной кислоты 3.4)

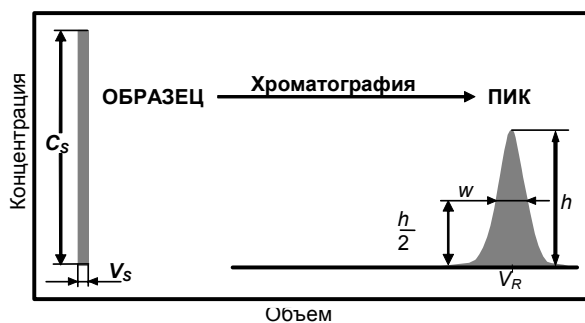
УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ

Влияние растворителя



Величина pH и поглощение раствора кислоты
 $pK_a=5$; $C_0=0.0001$ M; $\epsilon_{\text{RCOO}^-}=10000$; $\epsilon_{\text{RCOOH}}=15000$; $l=1$ см

МАТЕРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС В ХРОМАТОГРАФИИ

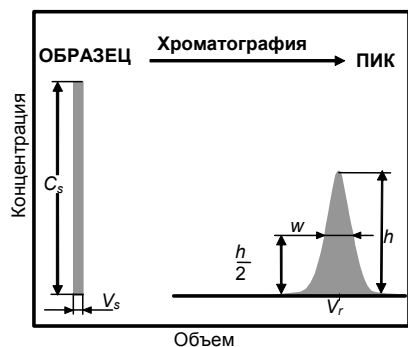


Количество вещества в образце равно количеству вещества в соответствующем ему хроматографическом пике

$$Q_s = C_s \cdot V_s = \int C \cdot dV$$

где Q_s - количество вещества в введенном в колонку образце
 C_s - концентрация вещества в образце;
 V_s - объем образца
 C - текущая концентрация вещества в элюате
 V - текущий объем элюата

МАТЕРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС В ХРОМАТОГРАФИИ



Для фотометрического детектора:

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot l$$

$$A_s \cdot V_s = h \cdot \sigma \sqrt{2\pi} \approx 1.06 \cdot h \cdot w$$

$$h = \frac{\varepsilon \cdot C_s \cdot l \cdot V_s \sqrt{N}}{V_0 (1 + k') \sqrt{2\pi}}$$

A_s - поглощение раствора образца

h - высота пика в единицах оптического поглощения

σ - стандартное отклонение гауссова пика

w - ширина пика на половине его высоты

ε - коэффициент экстинкции вещества

l - длина оптического пути измерительной ячейки

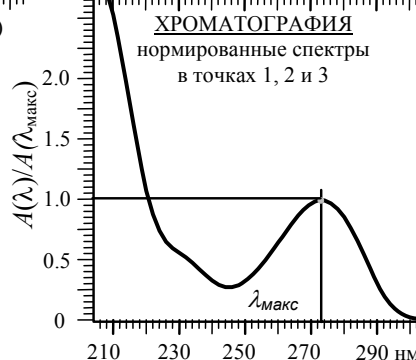
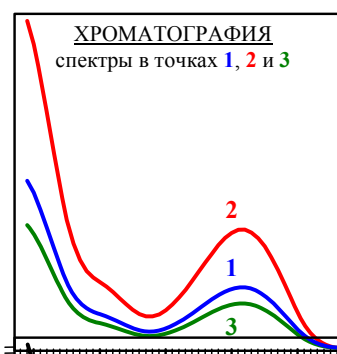
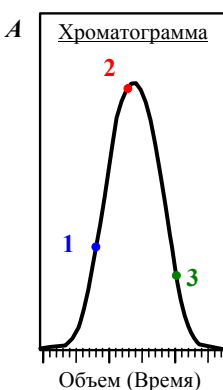
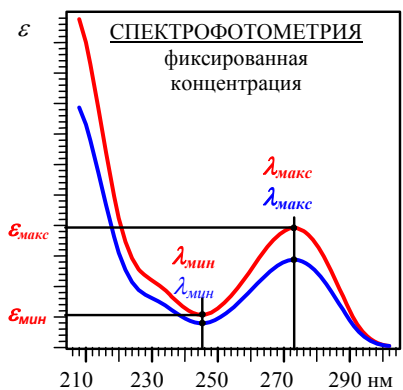
N - эффективность хроматографической колонки

V_0 - свободный (мертвый) объем колонки

k' - фактор удерживания вещества

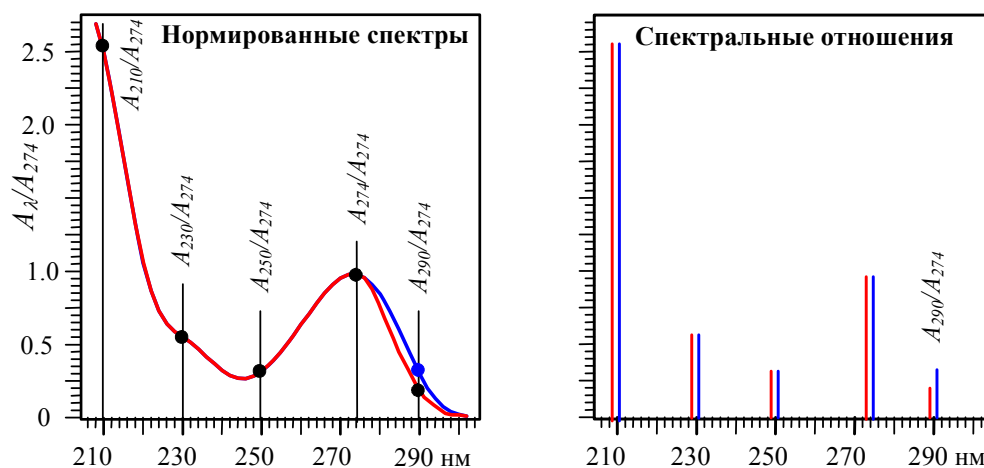
$$C_{\min} = \frac{2A_{\text{шум}} \cdot V_0 (1 + k') \sqrt{2\pi}}{\varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot V_s \sqrt{N}}$$

СРАВНЕНИЕ СПЕКТРОВ



$$R = \frac{A_{\lambda}}{A_0} = \frac{\varepsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l}{\varepsilon_0 \cdot C \cdot l} = \frac{\varepsilon_{\lambda}}{\varepsilon_0} = \text{const}$$

СРАВНЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ



МЕТОД ВЭЖХ В СОВРЕМЕННОМ ОБЩЕСТВЕ

Важнейшие области применения ВЭЖХ	Количество контролируемых веществ
Контроль качества лекарств	2000
Токсикология	1000
Экология	500
Химическая безопасность продовольствия	500
Оборот наркотиков	300
Фармакология	100

МЕТОД ВЭЖХ В СОВРЕМЕННОМ ОБЩЕСТВЕ

Аналитическая задача:
определить концентрацию вещества N
из заданного списка веществ

Скрининг

НЕДОСТАТКИ ВЭЖХ

Отсутствие "универсальных" методик анализа
Каждому веществу - своя "уникальная" методика

Калибровка хроматографа перед анализом
Хроматограф - "черный" ящик

Многократное повторение анализа
Доверие только к усредненным результатам

НЕДОСТАТКИ ВЭЖХ: фармакопейный анализ

AMPICILLIN SODIUM

European Pharmacopoeia 1998:0578

Определение основного вещества и примесей:

- колонка Ø4.6x250 мм с обращенной фазой C18 (5 мкм)
- градиентное и изократическое элюирование (60 мин)
- УФ-детектирование при $\lambda=254$ нм

НЕДОСТАТКИ ВЭЖХ: фармакопейный анализ

AMPICILLIN SODIUM

European Pharmacopoeia 1998:0578

1. Приготовление растворов:

- элюент А: CH_3COOH - 0.2 М KH_2PO_4 - ACN - H_2O = (0.5:50:50:899.5);
элюент В: CH_3COOH - 0.2 М KH_2PO_4 - ACN - H_2O = (0.5:50:400:549.5);
раствор 1: 31.0 мг субстанции в 50 мл элюента А;
раствор 2: 31.0 мг субстанции в 10 мл элюента А;
раствор 3: 27.0 мг безводного ампициллина в 50 мл элюента А;
раствор 4: 2.0 мг цефрадина в 50 мл элюента А;
раствор 5: смесь 1 мл раствора 3 с 20 мл элюента А;
раствор 6: смесь 1 мл раствора 5 с 25 мл элюента А;
раствор 7: смесь 5 мл раствора 4 с 5 мл раствора №3;
раствор 8: смесь 1 мл раствора 3 с 20 мл элюента А);
раствор 9: 200 мг субстанции в 1 мл воды греть при 60°C 1 час
и смешать со 100 мл элюента А).

НЕДОСТАТКИ ВЭЖХ: фармакопейный анализ

AMPICILLIN SODIUM

European Pharmacopoeia 1998:0578

2. Хроматографический анализ

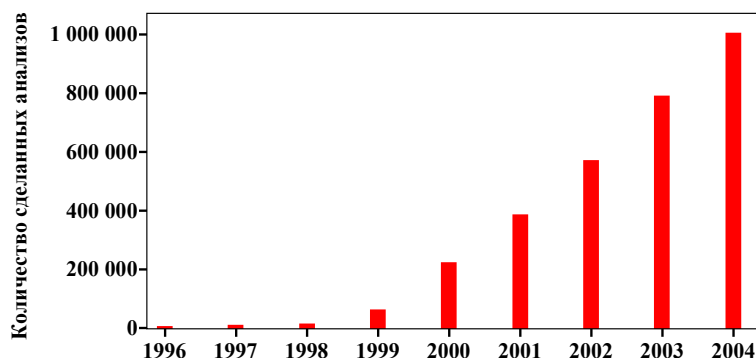
- кондиционирование колонки (1 час)
- анализ раствора 8 (1 час)
- контрольная хроматография без образца (1 час)
- анализ раствора 5 (1 час)
- корректировка программы элюирования, если $R_s < 3$ (1 час)
- анализ раствора 6 (1 час)
- 6 анализов раствора 1 (6 часов)
- по одному анализу растворов 2, 3 и 9 (3 часа)
- обработка результатов (1 час)

ИТОГО: более 18 часов

СОЧЕТАНИЕ ВЭЖХ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

K.Zahlsen, T.Aamo, J.Zweigenbaum - University Hospital of Trondheim, Norway
August, 2004

Судебно-медицинская экспертиза, наркологический контроль,
лекарственный мониторинг



СОЧЕТАНИЕ ВЭЖХ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ

2003 г. в Лаборатории было проанализировано:

- 800 000 образцов мочи
- 30 000 образцов сыворотки крови

Оборудование:

- 12 LC/MS с ESI (5 амфетаминов и 4 опиата)
- 12 LC/MS (APCI (6 бензодиазепинов)
- 6 GC/MS (арбитраж)



ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ БЕЗ СТАНДАРТОВ

Baker J.K., Skelton R.E., Ma C-Y. Identification of Drugs by HPLC with Dual Wavelength Ultraviolet Detection. *J.Chromatogr.*, 1979, v.168, 417.

Jinno K., Hayashida M., Watanabe T. Computer-Assisted Liquid Chromatography for Automated Qualitative and Quantitative Analysis of Toxic Drugs. *J.Chromatogr.Sciences*, 1990, v. 28, 367.

Bogusz M., Wu M. Standartized HPLC/DAD System, Based on Retention Indices and Library, Applicable for Systematic Toxicological Screening. *J.Analyt. Toxicology*, 1991, v.15, 188.

Зенкевич И.Г. Формирование базы данных по индексам удерживания лекарственных веществ в обращенно-фазовой ВЭЖХ. *Ж.прикладной химии*, 1994, т.67, №11, 1877.

Koves E.M. Use of HPLC-DAD in Forensic Toxicology. *J.Chromatogr. A*, 1995, v.692, 103.

Maier R.D., Bogusz M. Identification Power of Standardized HPLC-DAD System for Systematic Toxicological Analysis. *J.Analyt. Toxicology*, 1995, v.19, 79.

Gaillard Y., Pepin G. Use of HPLC with Photodiodearray UV Detection for the Creation of a 600 Compound Library. Application to Forensic Toxicology. *J.Chromatogr. A*, 1997, v.763, 149-163.

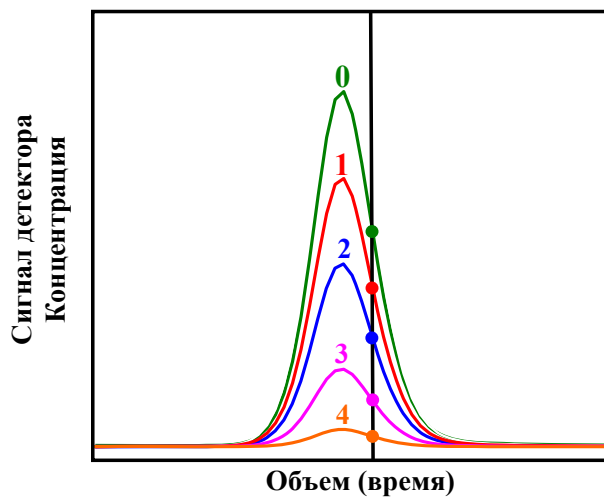
Elliot S.P., Hale K.A. Applications of an HPLC-DAD Drug-Screening System Based on Retention Indices and UV Spectra. *J.Analyt. Toxicology*, 1998, v.22, 279.

Lambert W.E., Van Bocxlaer J.F., De Leenheer A.P. Potential of HPLC-DAD in Forensic Toxicology. *J.Chromatogr. B*, 1997, v.689, 45.

Herzler M., Herre S., Pragst F. Selectivity of Substance Identification by HPLC-DAD in Toxicological Analysis using a UV Spectra Library of 2682 Compounds. *J.Analyt. Toxicology*, 2003, v.27, 233-242.

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

Необходимое условие:
сигнал канала детектора пропорционален
концентрации вещества ($A_N = a_N \cdot C$)

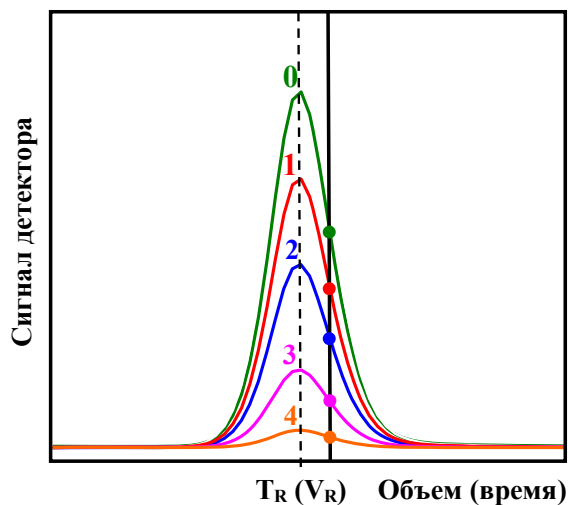


Для гомогенного пика

$$\frac{A_N}{A_0} = \frac{a_N}{a_0} = \frac{S_N}{S_0} = R = \text{const}$$

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

Параметры идентификации хроматографического пика:
 $T_R(V_R)$ и R_1, R_2, \dots, R_{N-1}

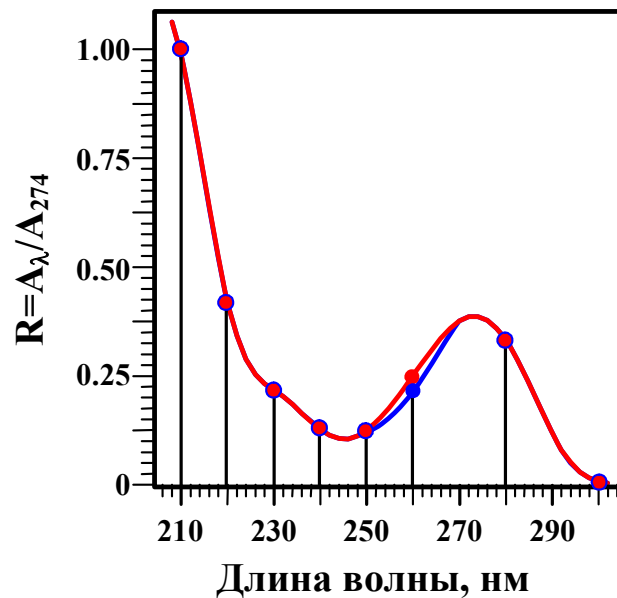


Количество веществ, разрешаемых
колонкой, равно ее пиковой
емкости (Z)

Сколько веществ можно разрешить
при N -канальном детектировании?

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Фотометрическая детекция при 8λ



МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Ограничение: интервал значений $R=(0\pm1)$

Погрешность R :		0.1	0.05	0.02
N	A_N/A_0	Количество разрешенных веществ (D)		
2	1	10^1	$2 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$
3	2	10^2	$4 \cdot 10^2$	$2.5 \cdot 10^3$
4	3	10^3	$8 \cdot 10^3$	$1.3 \cdot 10^5$
5	4	10^4	$1.6 \cdot 10^5$	$6.3 \cdot 10^6$
6	5	10^5	$3.2 \cdot 10^4$	$3.1 \cdot 10^8$
7	6	10^6	$6.4 \cdot 10^7$	$1.6 \cdot 10^{10}$
8	7	10^7	$1.3 \cdot 10^9$	$7.8 \cdot 10^{11}$

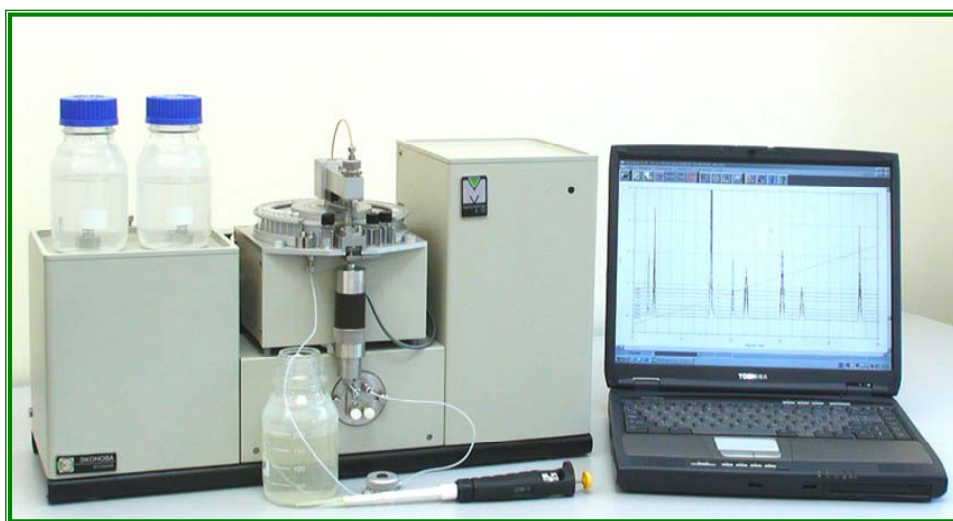
МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

Емкость базы данных (Q)- максимальное количество
веществ, имеющих отличающиеся наборы
идентификационных параметров

$$Q=Z \cdot D$$

Если $Z=100$ и $D=10^9$, то $Q=10^{11}$

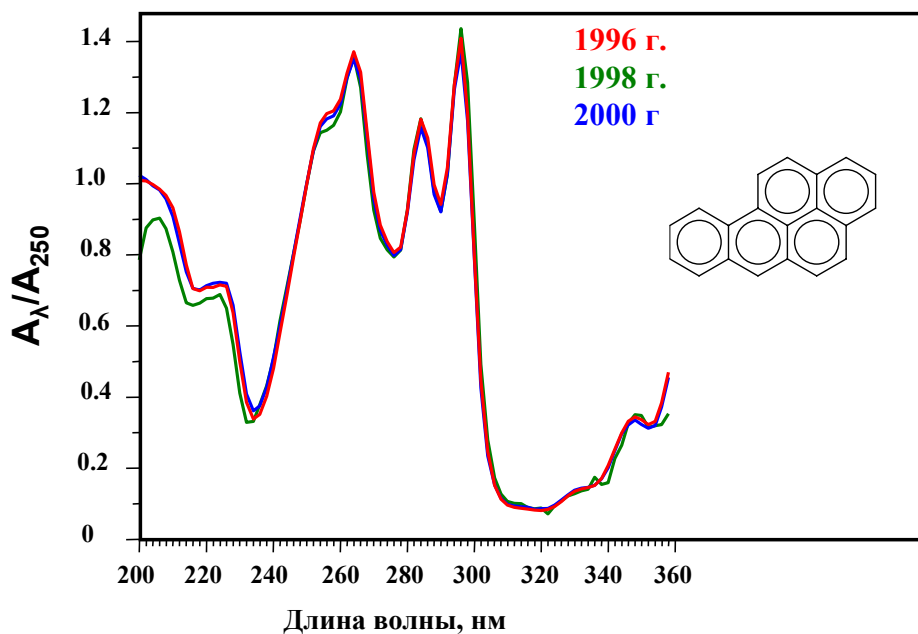
МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ Фотометрическая детекция при 8 λ



Хроматограф "Милихром А-02"
ЗАО "ЭкоНова" (Новосибирск)

СРАВНЕНИЕ ДЕТЕКТОРОВ

Спектр бензо(а)пирена



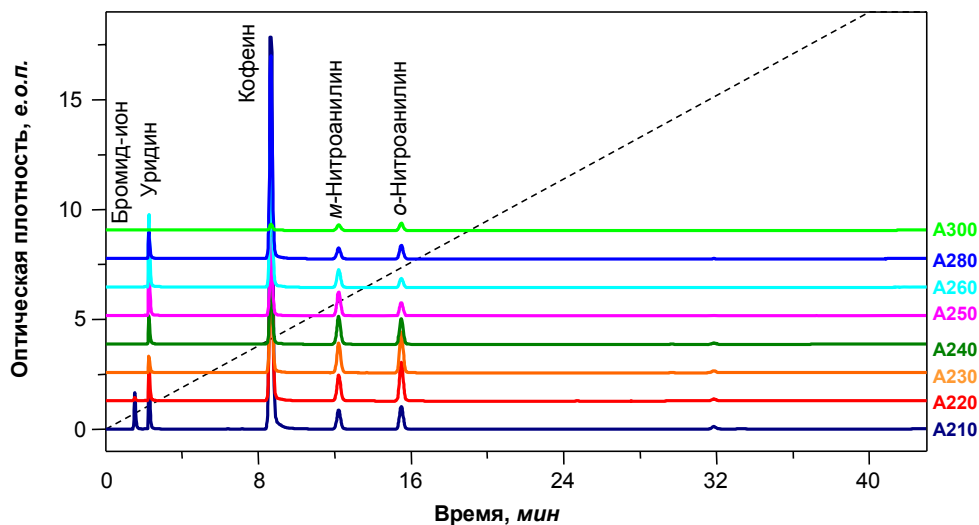
СРАВНЕНИЕ ДЕТЕКТОРОВ

ВЭЖХ на фазе C18 (данные по 48 хроматографам "Милихром А-02")

Спектральные отношения бензо(а)пирена $R=S_{\lambda}/S_{250}$

S_{220}	S_{260}	S_{274}	S_{284}	S_{348}
0.69 ± 0.02	1.22 ± 0.02	0.80 ± 0.03	1.15 ± 0.03	0.33 ± 0.01

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФА



Колонка: Ø2x75 мм; ProntoSIL-120-5-C18

Элюент А: 0.2 М LiClO₄-0.005 М HClO₄

Элюент Б: Ацетонитрил

Градиент: 40 мин от 5-100% Б; 10 мин 100% Б

Скорость потока: 100 мкл/мин

Температура: 40°C

λ_1 - λ_2 : 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм

Проба: 4 мкл

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФА

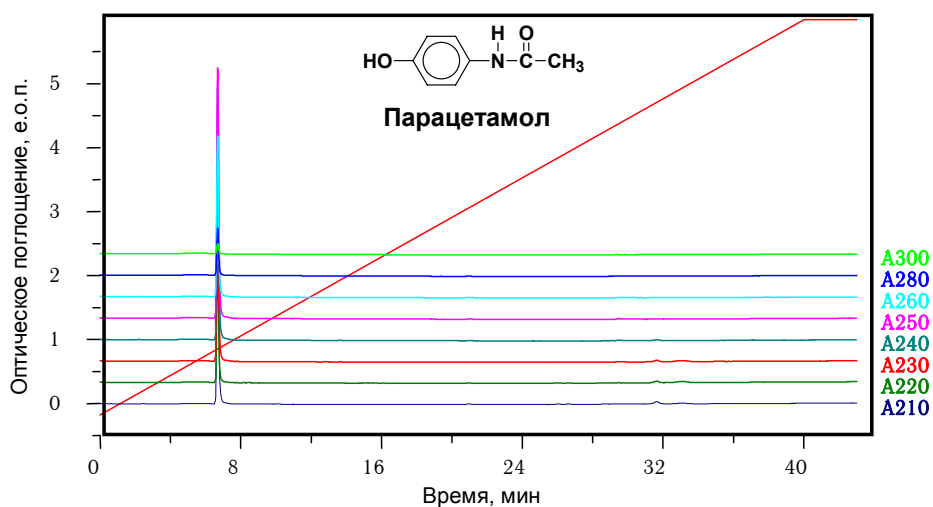
Вещество	Измеряемый параметр $\pm \Delta$	Контролируемый показатель
Бромид-ион	V_R	Объем колонки
Уридин	S_{280}/S_{250}	Погрешность детектора при $\lambda=280$ нм
Кофеин	S_{260}/S_{280}	Линейность детектора
м-Нитроанилин	S_{230}/S_{260}	Погрешность значения pH элюента А
о-Нитроанилин	V_R S_{210} $A_{10\%}$ S_{λ}/S_{210}	Погрешность скорости потока Погрешность объема пробы "Качество" смешивания элюентов А и Б $\pm \lambda$ детектора в диапазоне 210-300 нм

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФА

Вещество	Наименование параметра	Аттестованное значение параметра	Границы относительной погрешности, %, $P=0,95$
Бромид-ион	V_R , мкл	150	± 6
Уридин	$R=S_{280}/S_{250}$	0,50	± 6
Кофеин	$R=S_{260}/S_{280}$	0,76	± 5
м-Нитроанилин	$R=S_{260}/S_{230}$	0,60	± 4
о-Нитроанилин	V_R , мкл	1525	± 4
	$R=S_{220}/S_{210}$	1,69	± 3
	$R=S_{230}/S_{210}$	1,74	± 5
	$R=S_{240}/S_{210}$	1,07	± 7
	$R=S_{250}/S_{210}$	0,57	± 7
	$R=S_{260}/S_{210}$	0,39	± 6
	$R=S_{280}/S_{210}$	0,59	± 4
	$R=S_{300}/S_{210}$	0,31	± 7
	$A_{10\%}$	1,04	± 7
	S_{210} , е.о.п.·мкл	24,8	± 4

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Формирование базы данных



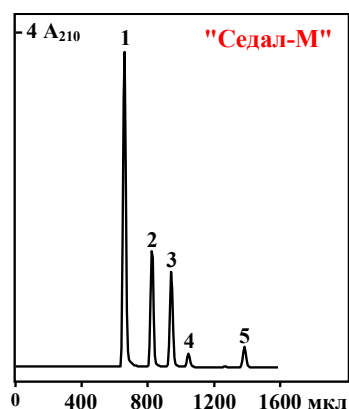
БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Формирование базы данных

Название	V _R , мкл	S ₂₁₀ , е.о.п. · мкл мг/мл	Спектральные отношения (S _λ /S ₂₁₀)						
			220	230	240	250	260	280	300
Мезатон	618	123,53	0,86	0,23	0,02	0,04	0,12	0,24	0,00
Диоксидин	620	147,01	1,05	1,71	2,51	2,20	3,19	0,26	0,27
Теобромин	643	423,50	0,43	0,24	0,14	0,16	0,33	0,44	0,01
Сульфацил-натрий	662	193,88	0,64	0,15	0,21	0,52	1,00	1,10	0,27
Парацетамол	669	213,50	0,58	0,92	1,25	1,24	0,79	0,23	0,05
Теofilлин	713	411,80	0,36	0,23	0,14	0,18	0,37	0,42	0,01
Сульфазин	715	293,17	0,81	0,54	0,52	0,60	0,80	0,66	0,23
Серотонин	731	402,84	0,98	0,64	0,15	0,10	0,16	0,25	0,20
Фолиевая кислота	762	206,87	0,88	0,63	0,48	0,41	0,47	0,88	0,84

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Фармакопейный анализ



Пик	Название	V _R , мкл	Концентрация, мг/мл (±10%)
1	Парацетамол	669	0.334
2	Кофеин	846	0.059
3	Анальгин	986	0.180
4	Кодеин	1013	0.014

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

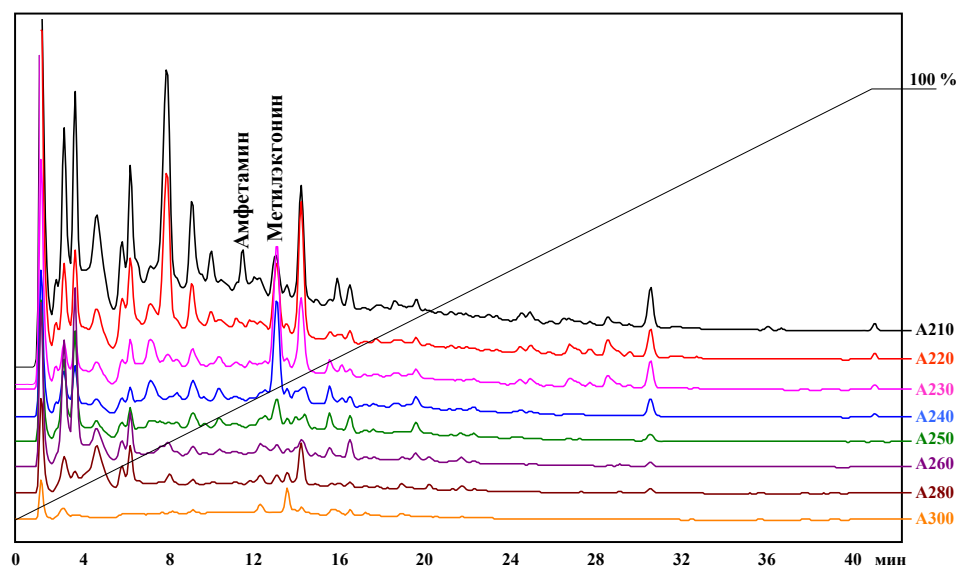
Фармакопейный анализ

"Седал-М"

Название	V _R , мкл	Спектральные отношения S _λ /S ₂₁₀						
		220	230	240	250	260	280	300
Пик 5	1384	0.499	0.162	0.090	0.058	0.038	0.005	0.000
Хинин	1343	0.600	0.391	0.591	0.944	0.332	0.046	0.095
Диэтилпропион	1351	0.171	0.401	0.954	1.451	1.177	0.192	0.096
Платифиллин	1383	1.209	0.959	0.503	0.179	0.041	0.002	0.002
Фенобарбитал	1394	0.506	0.194	0.113	0.062	0.039	0.003	0.000
Бромурал	1398	0.459	0.174	0.089	0.059	0.035	0.004	0.001
Кислота салициловая	1398	0.218	0.298	0.337	0.081	0.013	0.059	0.165
Кетамин	1405	0.743	0.115	0.006	0.015	0.038	0.031	0.003
Фенацетин	1426	0.454	0.804	1.256	1.413	0.980	0.223	0.057

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Определение наркотиков в моче



БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ ПАУ"

Колонка 2x75 мм с Nucleosil 100-5 C18 PAH

Линейный градиент ACN от 50 до 100%

ВЕЩЕСТВО	V _R , мкл	S ₂₆₀ ое*мкл (1 мкг)	R=S _λ /S ₂₆₀						
			S ₂₃₀	S ₂₅₀	S ₂₇₀	S ₂₈₀	S ₂₉₀	S ₃₀₀	S ₃₄₀
Бензо[е]пирен	2632	59.60	1.06	0.84	1.01	1.34	1.67	0.50	0.08
Перилен	2656	21.77	1.09	2.68	0.39	0.13	0.09	0.06	0.10
Бензо[б]флуорантен	2666	77.89	0.94	0.98	0.63	0.63	0.68	0.74	0.28
5-Метилхризен	2681	201.4	0.37	0.44	1.50	0.22	0.15	0.15	0.01

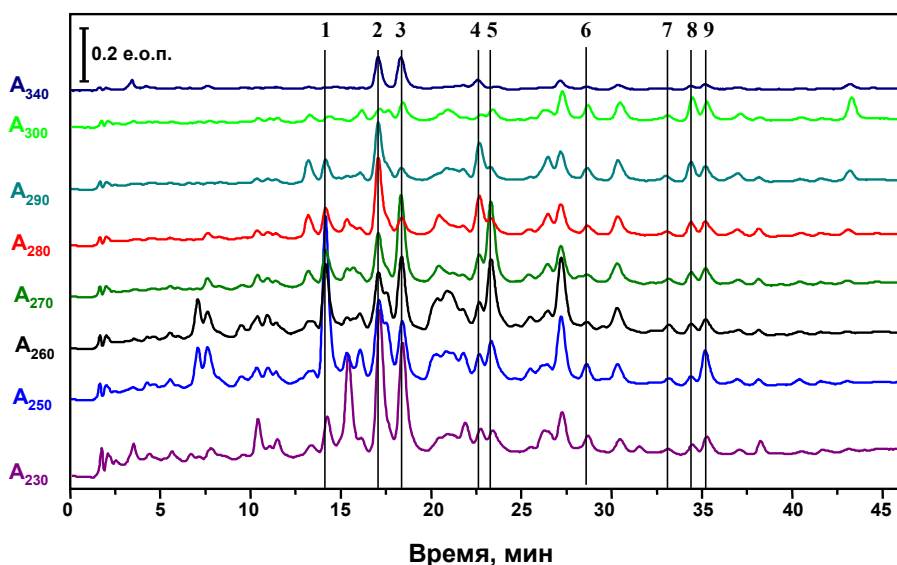
1. Азулен
2. Антрацен
3. Аценафтен
4. Аценафтилен
5. 9-Бензилантрацен
6. Бензо[а]антрацен
7. Бензо[а]пирен
8. Бензо[а]флуорен
9. Бензо[а]хризен
10. Бензо[б]антрацен
11. Бензо[б]флуорантен
12. Бензо[е]пирен
13. Бензо[г, h, i]перилен
14. Бензо[к]флуорантен
15. Бензол
16. Бифенил
17. Дибензил
18. Дибензо[а, c]антрацен

19. Дибензо[а, h]антрацен
20. Дибензотиофен
21. 9, 10-Дигидроантрацен
22. 1, 1-Диметилинден
23. 1, 3-Диметилнафталин
24. 1, 4-Диметилнафталин
25. 1, 5-Диметилнафталин
26. 1, 6-Диметилнафталин
27. 2, 3-Диметилнафталин
28. 3, 6-Диметилнафталин
29. 1, 1-Диметилтетралин
30. 1, 2-Диметилтетралин
31. Диноилфталат
32. Изопропилбензол
33. Инден
34. Индено[1, 2, 3-с, d]пирен
35. Карбазол
36. Коронен

37. орто-Ксилол
38. пара-Ксилол
39. 1-Метилнафталин
40. 9-Метилфенантрен
41. 5-Метилхризен
42. Нафталин
43. Перилен
44. Пирен
45. Рубрен
46. Тетралин
47. Толуол
48. 1, 1, 2-Триметилтетралин
49. Трифенилен
50. Фенантрен
51. Флуорантен
52. Флуорен
53. Хризен
54. 4Н-Циклопентафенантрен

ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИЕ АРОМАТИЧЕСКИЕ УГЛЕВОДОРОДЫ

Атмосферный аэрозоль

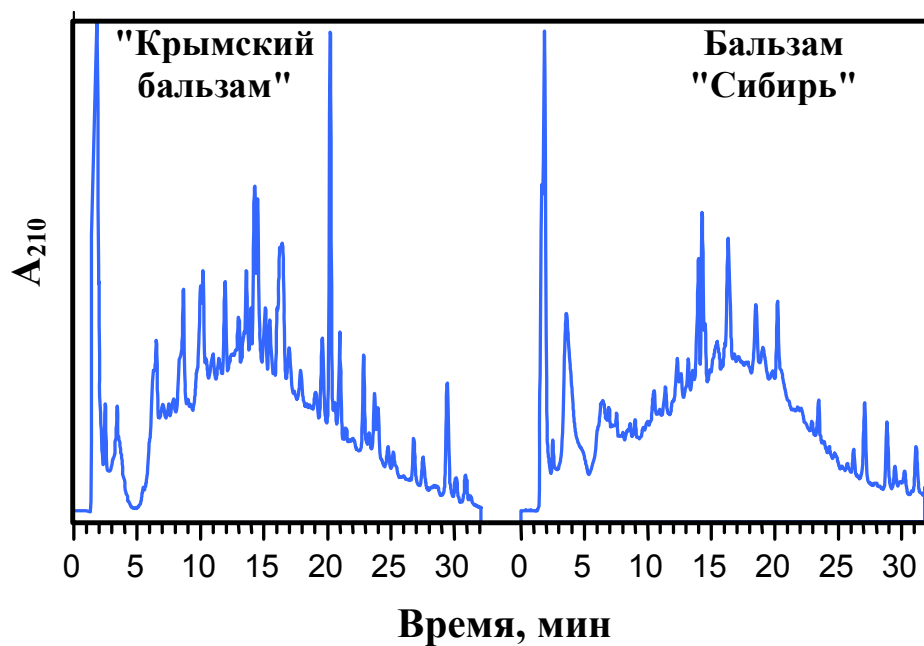


ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИЕ АРОМАТИЧЕСКИЕ УГЛЕВОДОРОДЫ

Атмосферный аэрозоль

№	ВЕЩЕСТВО	T _R , мин	S _i /S ₂₆₀						
			S ₂₃₀	S ₂₅₀	S ₂₇₀	S ₂₈₀	S ₂₉₀	S ₃₀₀	S ₃₄₀
1	Фенантрен	13.97	0.57	2.49	0.51	0.42	0.33	0.06	0.01
		14.15	0.53	2.53	0.49	0.40	0.32	0.06	0.01
2	Флуорантен	16.84	2.83	1.28	0.95	1.52	1.13	0.19	0.65
		17.06	2.62	1.36	0.89	1.46	1.10	0.19	0.58
3	Пирен	18.12	1.89	0.56	1.49	0.22	0.18	0.31	0.55
		18.36	1.49	0.70	1.25	0.21	0.15	0.24	0.44
4	Бенз[а]антрацен	22.26	0.91	0.96	1.22	1.79	1.79	0.22	0.20
		22.64	0.88	0.96	1.13	1.71	1.68	0.21	0.29
5	Хризен	22.91	0.25	0.48	1.18	0.17	0.14	0.14	0.01
		23.32	0.21	0.48	1.19	0.15	0.13	0.14	0.00
6	Бензо[к]флуорантен	27.97	2.10	2.35	0.93	0.98	1.48	1.98	0.25
		28.61	2.09	2.28	0.82	1.00	1.49	1.87	0.28
7	Бензо[а]пирен	29.66	0.40	0.81	0.78	0.76	0.76	0.64	0.16
		33.18	0.36	0.73	0.68	0.71	0.70	0.57	0.12
8	Бензо[ghi]перилен	33.69	1.01	0.84	1.27	1.38	2.03	2.41	0.34
		34.40	1.08	0.86	1.25	1.44	2.07	2.44	0.35
9	Индено[1,2,3-c,d]пирен	34.96	1.33	2.81	0.96	0.94	1.06	1.30	0.38
		35.19	1.29	2.68	1.03	0.97	1.04	1.26	0.35

СРАВНЕНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ОБРАЗЦОВ



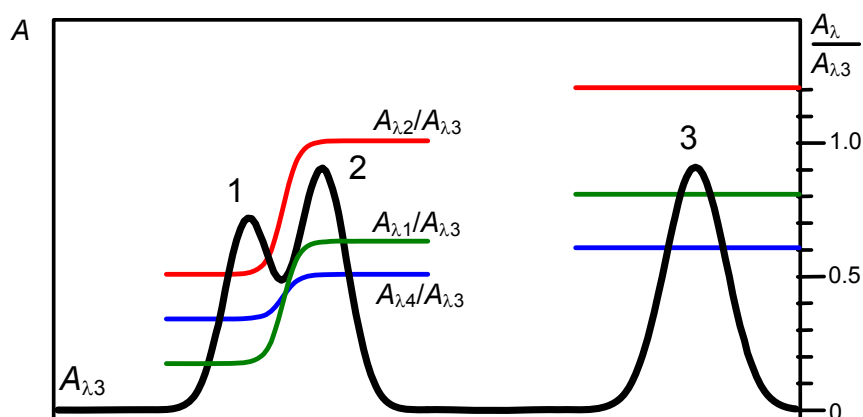
СРАВНЕНИЕ БАЛЬЗАМОВ

по восьми "главным" пикам

	T _R , мин	Спектральные отношения S _λ /S ₂₁₀						
		S ₂₂₀	S ₂₃₀	S ₂₅₀	S ₂₆₀	S ₂₈₀	S ₃₀₀	S ₃₄₀
"Крымский бальзам"	12.04	1.03	0.34	0.22	0.35	0.40	0.16	0.02
	13.75	0.86	0.54	0.37	0.42	0.33	0.26	0.19
	14.41	0.64	0.52	0.84	0.80	0.33	0.29	0.58
	14.63	0.34	0.20	0.22	0.23	0.09	0.08	0.18
	16.54	0.63	0.39	0.27	0.34	0.46	0.40	0.36
	19.71	0.73	0.37	0.18	0.11	0.29	0.51	0.52
	20.33	0.71	0.52	0.53	0.48	0.34	0.41	0.63
	29.55	0.59	0.34	0.20	0.29	0.26	0.26	0.38
Бальзам "Сибирь"	12.35	0.84	0.56	0.61	0.50	0.25	0.28	0.24
	14.02	0.59	0.35	0.51	0.53	0.22	0.21	0.40
	14.32	0.59	0.39	0.57	0.57	0.23	0.23	0.53
	16.40	0.69	0.46	0.33	0.28	0.50	0.53	0.53
	18.57	0.69	0.67	0.75	0.65	0.44	0.34	0.21
	20.27	0.79	0.69	0.60	0.58	0.48	0.44	0.43
	28.89	0.81	0.79	0.96	1.03	0.55	0.29	0.24
	31.18	0.68	0.33	0.25	0.30	0.19	0.20	0.31

МНОГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

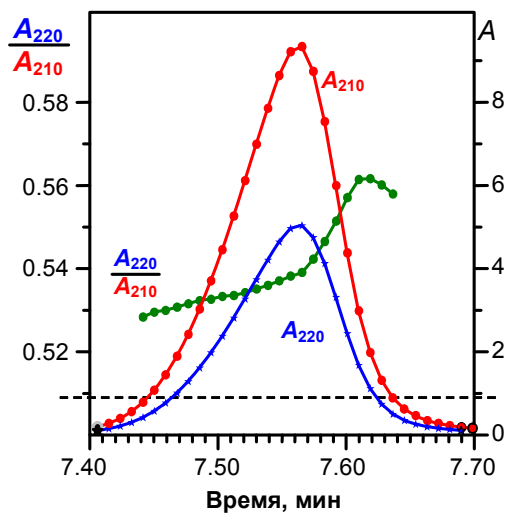
Правильность анализа



МНОГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Правильность анализа

Спектральный анализ пика ампициллина



Лекция 7

Подготовка пробы для ВЭЖХ анализа

Г.И.Барам

Курс лекций "ВЭЖХ для ВСЕХ"

Новосибирск, 2007

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Работа с микрообъемами растворов

ОБЩИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

для минимизации потери вещества при работе с образцами,
концентрация аналита в которых составляет менее 10 мг/л

1. Для гидрофобных аналитов следует использовать посуду из стекла
2. Для гидрофильных аналитов следует использовать посуду из полимерных материалов (фторопласты, полипропилен)
3. Коэффициент заполнения посуды раствором образца должен быть максимально большим
4. С окисляемыми аналитами исследует работать в инертной атмосфере (аргон) или в присутствии антиокислителей
5. С фоточувствительными аналитами следует работать в темной или непрозрачной посуде
6. С термолабильными аналитами следует работать при пониженной температуре
7. Хранить растворы образцов следует при низких температурах в герметичной посуде; нейтральные водные растворы лучше хранить в замороженной виде

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Обогащение образца

ЭКСТРАКЦИЯ

Пример 1. Экстракция ароматических полициклических углеводородов из воды гексаном для определения *бензо(а)пирена*.

Пример 2. Удаление ароматических полициклических углеводородов из воды экстракцией гексаном перед определением *бензойной кислоты*.

АДСОРБЦИЯ

Пример 1. Адсорбция катионов из воды на полистирольном катионообменнике с последующим его озолением для определения *тяжелых металлов*.

Пример 2. Удаление воды из моторного топлива адсорбцией на активированной окиси алюминия перед определением *алканов* методом адсорбционной хроматографии

ОСАЖДЕНИЕ

Пример 1. Концентрирование *ионов железа (III)* путем их осаждения в виде сульфида железа.

Пример 2. Удаление хлорид-иона (осаждение нитратом серебра), мешающего определению *нитрит-иона* методом ионной ВЭЖХ.

Пример 3. Удаление белков из сыворотки крови после добавления в нее равного объема CH_3CN перед определением *мочевой кислоты*.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Обогащение образца

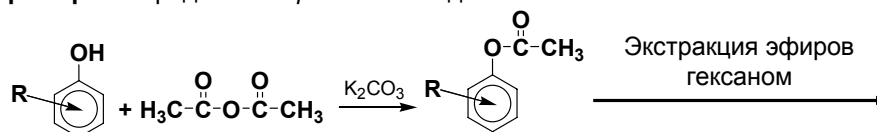
РАЗЛОЖЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Пример 1. Озоление органических веществ перед определением *тяжелых металлов* в зерне.

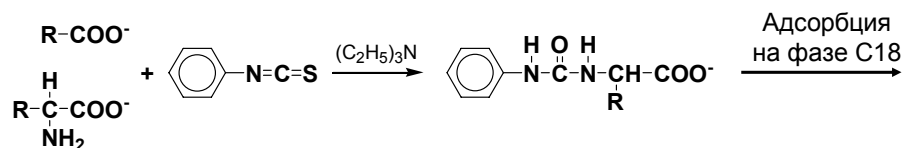
Пример 2. Щелочной гидролиз триглицеридов перед определением в жире полихлорбифенилов.

ХИМИЧЕСКАЯ ДЕРИВАТИЗАЦИЯ

Пример 1. Определение *фенолов* в воде:



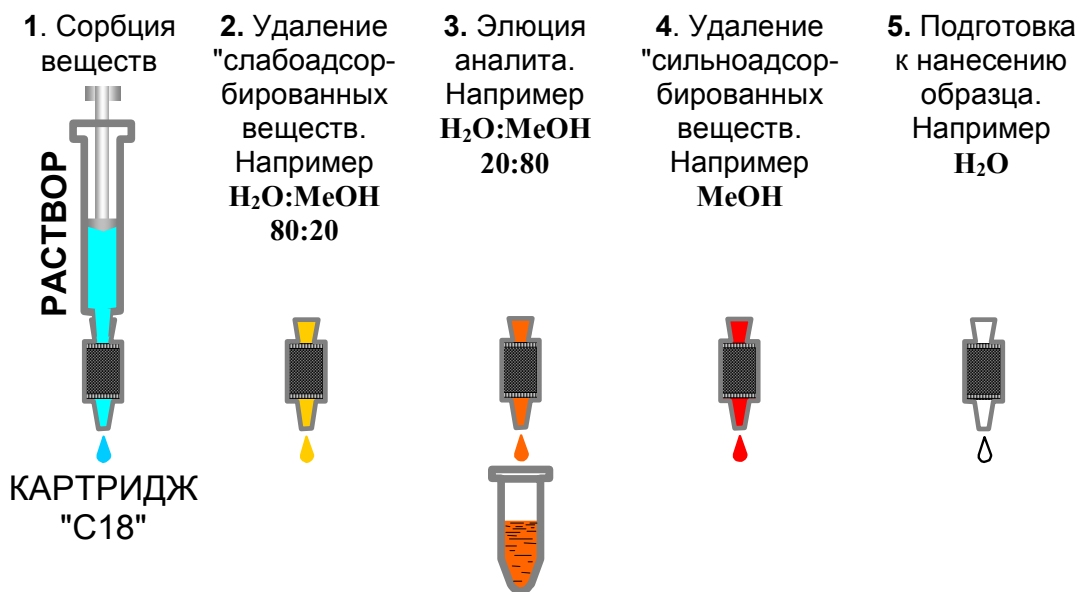
Пример 2. Определение *карбоновых кислот* в присутствии аминокислот:



ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

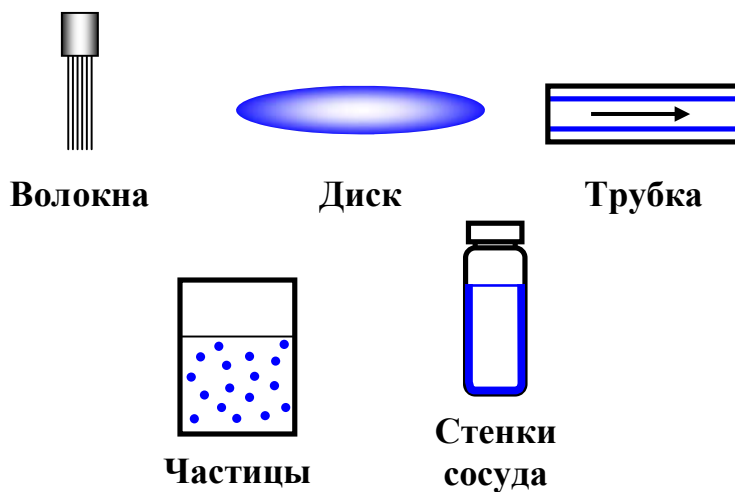
Твердо-фазная экстракция

Solid-Phase Extraction (SPE)



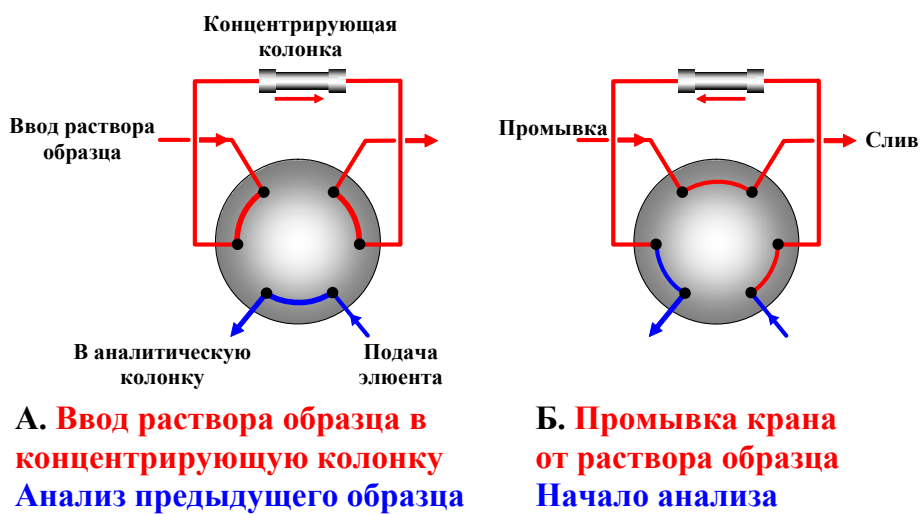
ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Твёрдо-фазная микроэкстракция Solid-Phase MicroExtraction (SPME)



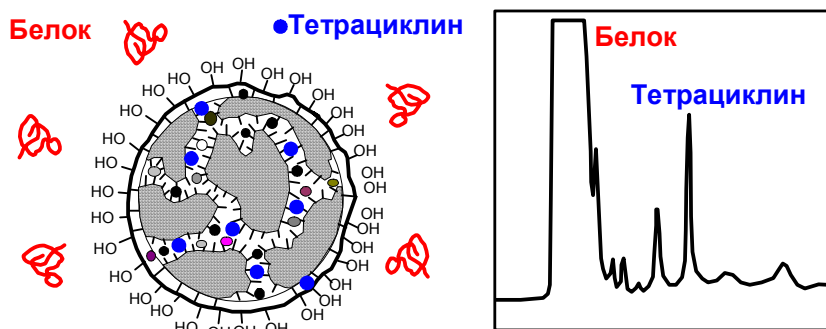
ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Концентрирование "on line"



РАЗДЕЛЕНИЕ НА СПЕЦИАЛЬНЫХ ФАЗАХ

Прямое определение тетрациклина в сыворотке крови на колонке с "бифильной" фазой

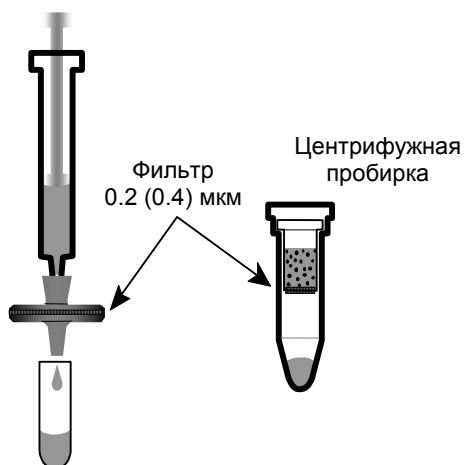


ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

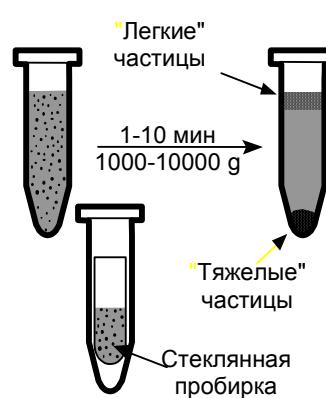
Работа с микрообъемами растворов

ОЧИСТКА РАСТВОРОВ ОТ МЕХАНИЧЕСКИХ ПРИМЕСЕЙ

ФИЛЬТРОВАНИЕ



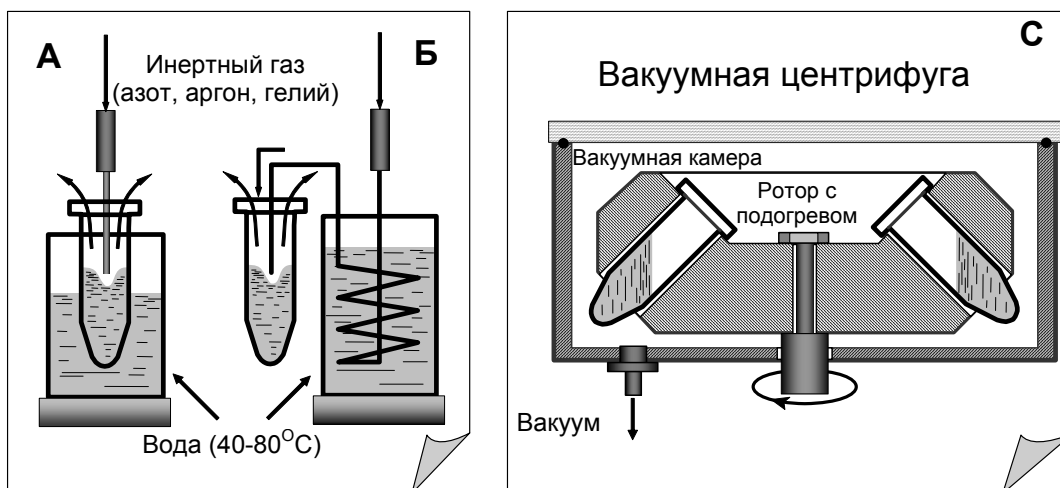
ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕ



ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Работа с микрообъемами растворов

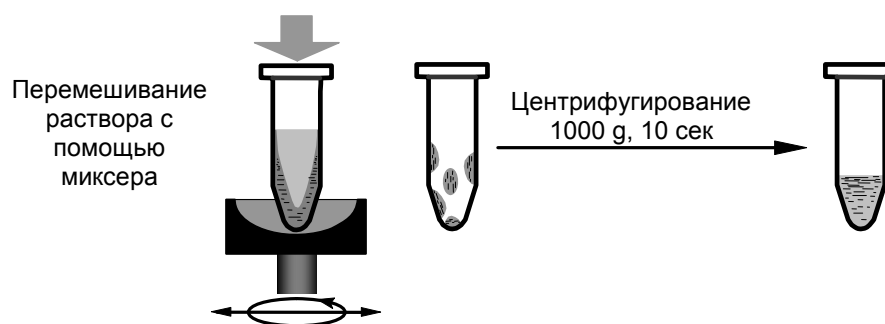
КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ РАСТВОРОВ УПАРИВАНИЕМ



ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

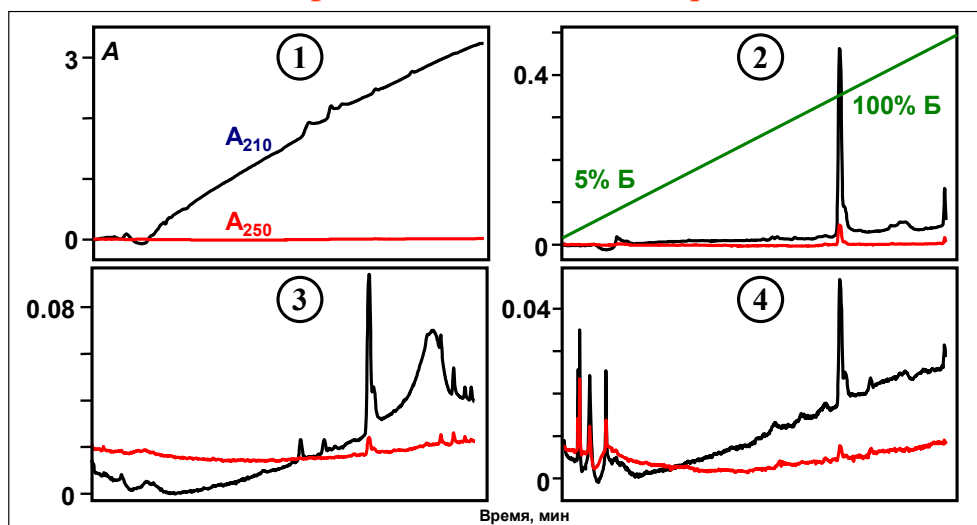
Работа с микрообъемами растворов

РАСТВОРЕНИЕ ВЕЩЕСТВ, ЭКСТРАГИРОВАНИЕ
И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИЙ В МИКРООБЪЕМЕ



ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Примеси в подвижных фазах



1- Вода "Milli-Q" / ACN "254"

2- Вода "Дист" / ACN "№2"

3- Вода "Milli-Q" / ACN "№2-1"

4- Вода "Milli-Q" / ACN "№2-2"

Лекция 8

Применение ВЭЖХ в химико- токсикологическом анализе наркотических и одурманивающих веществ

Г.И.Барам

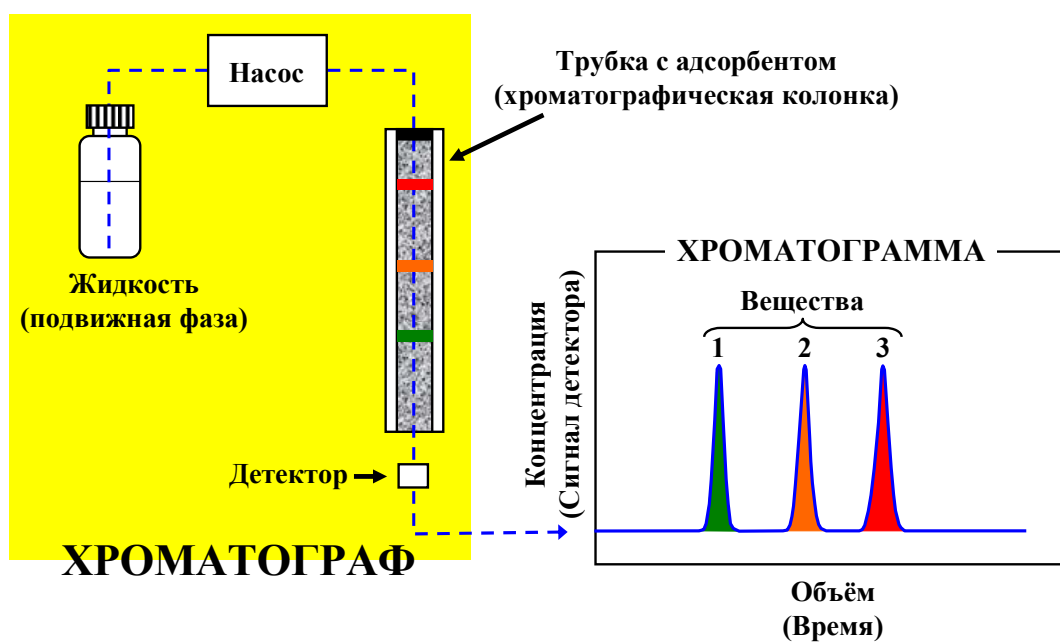
Курс лекций "ВЭЖХ для ВСЕХ"

Новосибирск, 2007

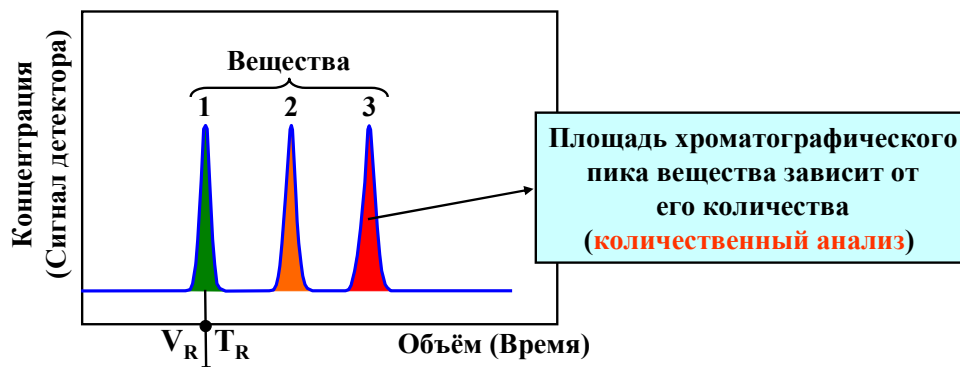
ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ?

Метод химического анализа, при котором растворенные вещества разделяются и анализируются каждый в отдельности

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ?



ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ?



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

Обязательное условие:

перед анализом хроматограф необходимо калибровать по всем анализируемым веществам

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ?

1970

High Performance Liquid Chromatography (**HPLC**)

ВысокоЭффективная Жидкостная Хроматография
(**ВЭЖХ**)

Скорость анализа - 1 вещество в минуту
Анализ 20-ти веществ в одной пробе

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ В МЕДИЦИНЕ

Цели анализа	Количество контролируемых веществ
Контроль качества лекарств	3000
<u>Токсикология</u>	2000
<u>Наркология</u>	500
Фармакология	200

ФОРМУЛИРОВКА АНАЛИТИЧЕСКОЙ ЗАДАЧИ

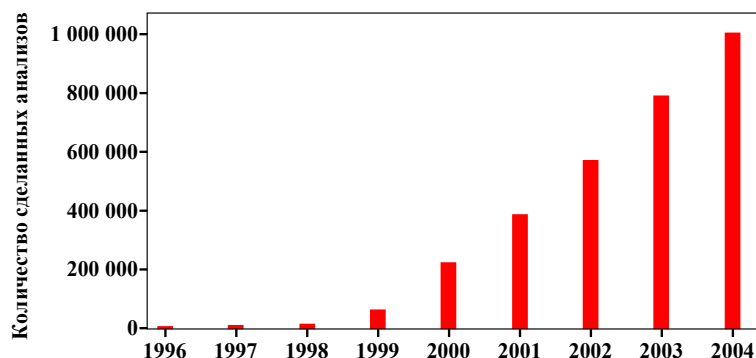
Аналитическая задача:
определить концентрацию вещества N
из заданного списка веществ

Скрининг

СКРИНИНГ МЕТОДОМ ВЭЖХ•МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

K.Zahlsen, T.Aamo, J.Zweigenbaum - University Hospital of Trondheim, Norway
August, 2004

Судебно-медицинская экспертиза, наркологический контроль,
лекарственный мониторинг



СКРИНИНГ МЕТОДОМ ВЭЖХ•МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

2003 г. в Лаборатории было проанализировано:

- 800 000 образцов мочи
- 30 000 образцов сыворотки крови

Оборудование:

- 12 LC/MS с ESI (5 амфетаминов и 4 опиата)
- 12 LC/MS с APCI (6 бензодиазепинов)
- 6 GC/MS (арбитраж)



СКРИНИНГ МЕТОДОМ ВЭЖХ•УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ

Baker J.K., Skelton R.E., Ma C-Y. Identification of Drugs by HPLC with Dual Wavelength Ultraviolet Detection. *J.Chromatogr.*, 1979, v.168, 417.

Jinno K., Hayashida M., Watanabe T. Computer-Assisted Liquid Chromatography for Automated Qualitative and Quantitative Analysis of Toxic Drugs. *J.Chromatogr.Sciences*, 1990, v. 28, 367.

Bogusz M., Wu M. Standartized HPLC/DAD System, Based on Retention Indices and Library, Applicable for Systematic Toxicological Screening. *J.Analyt. Toxicology*, 1991, v.15, 188.

Зенкевич И.Г. Формирование базы данных по индексам удерживания лекарственных веществ в обращенно-фазовой ВЭЖХ. *Ж.прикладной химии*, 1994, т.67, №11, 1877.

Koves E.M. Use of HPLC-DAD in Forensic Toxicology. *J.Chromatogr. A*, 1995, v.692, 103.

Maier R.D., Bogusz M. Identification Power of Standardized HPLC-DAD System for Systematic Toxicological Analysis. *J.Analyt. Toxicology*, 1995, v.19, 79.

Gaillard Y., Pepin G. Use of HPLC with Photodiodearray UV Detection for the Creation of a 600 Compound Library. Application to Forensic Toxicology. *J.Chromatogr. A*, 1997, v.763, 149-163.

Elliot S.P., Hale K.A. Applications of an HPLC-DAD Drug-Screening System Based on Retention Indices and UV Spectra. *J.Analyt. Toxicology*, 1998, v.22, 279.

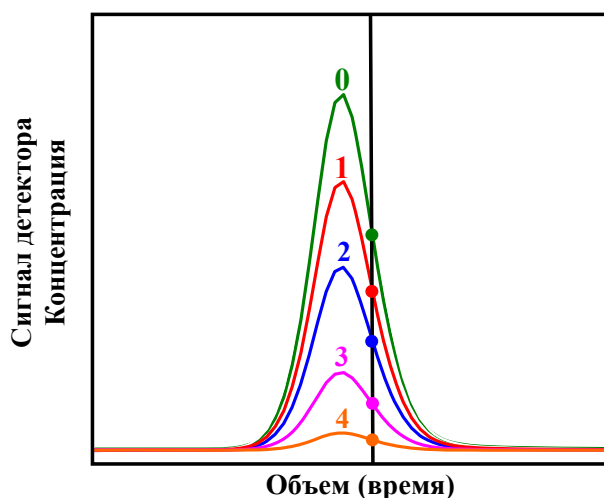
Lambert W.E., Van Bocxlaer J.F., De Leenheer A.P. Potential of HPLC-DAD in Forensic Toxicology. *J.Chromatogr. B*, 1997, v.689, 45.

Herzler M., Herre S., Pragst F. Selectivity of Substance Identification by HPLC-DAD in Toxicological Analysis using a UV Spectra Library of **2682** Compounds. *J.Analyt. Toxicology*, 2003, v.27, 233-242.

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

Необходимое условие:

сигнал канала детектора пропорционален
концентрации вещества ($A_N = a_N \cdot C$)



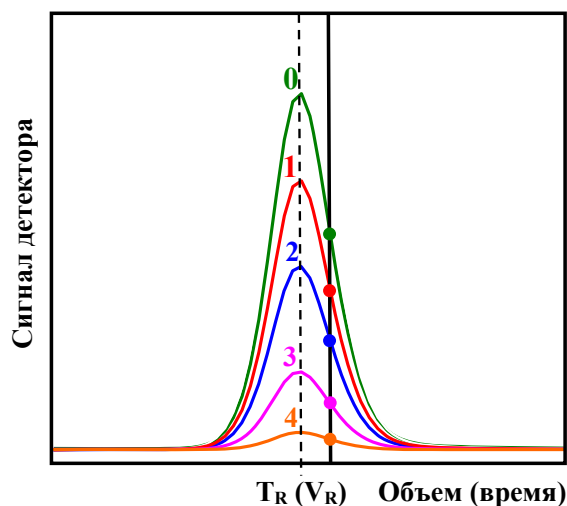
Для гомогенного пика

$$\frac{A_N}{A_0} = \frac{a_N}{a_0} = \frac{S_N}{S_0} = R = \text{const}$$

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

Параметры идентификации хроматографического пика:

$$T_R(V_R) \text{ и } R_1, R_2, \dots, R_{N-1}$$

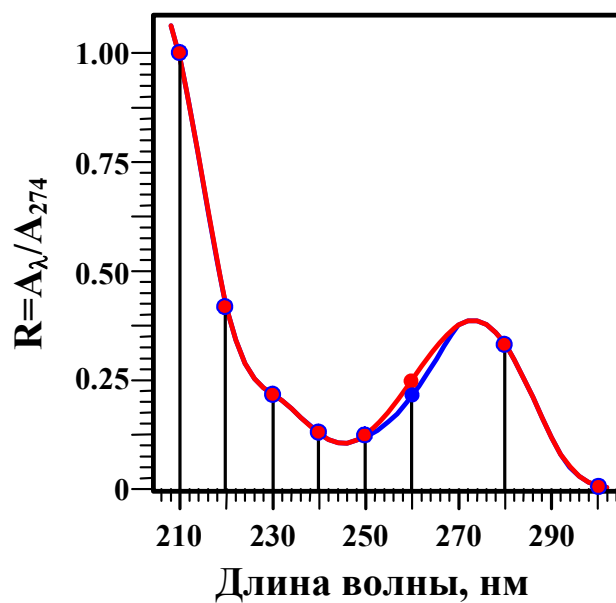


Количество веществ, разрешаемых колонкой, равно ее пиковой емкости (Z)

Сколько веществ можно разрешить при N -канальном детектировании?

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Фотометрическая детекция при 8λ



МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Ограничение: интервал значений $R=(0\pm1)$

Погрешность R :		0.1	0.05	0.02
N	A_N/A_0	Количество разрешенных веществ (D)		
2	1	10^1	$2 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$
3	2	10^2	$4 \cdot 10^2$	$2.5 \cdot 10^3$
4	3	10^3	$8 \cdot 10^3$	$1.3 \cdot 10^5$
5	4	10^4	$1.6 \cdot 10^5$	$6.3 \cdot 10^6$
6	5	10^5	$3.2 \cdot 10^4$	$3.1 \cdot 10^8$
7	6	10^6	$6.4 \cdot 10^7$	$1.6 \cdot 10^{10}$
8	7	10^7	$1.3 \cdot 10^9$	$7.8 \cdot 10^{11}$

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

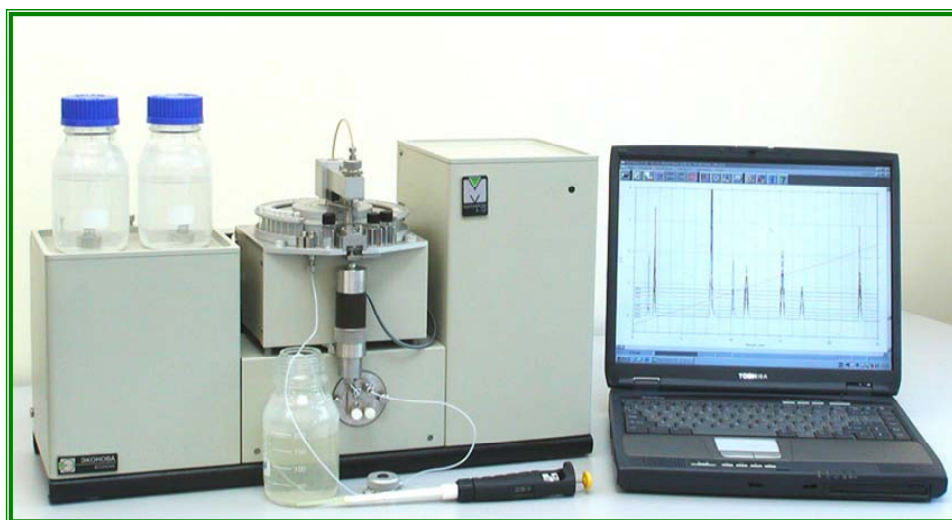
**Емкость базы данных (Q)- максимальное количество
веществ, имеющих отличающиеся наборы
идентификационных параметров**

$$Q=Z \cdot D$$

Если $Z=100$ и $D=10^9$, то $Q=10^{11}$

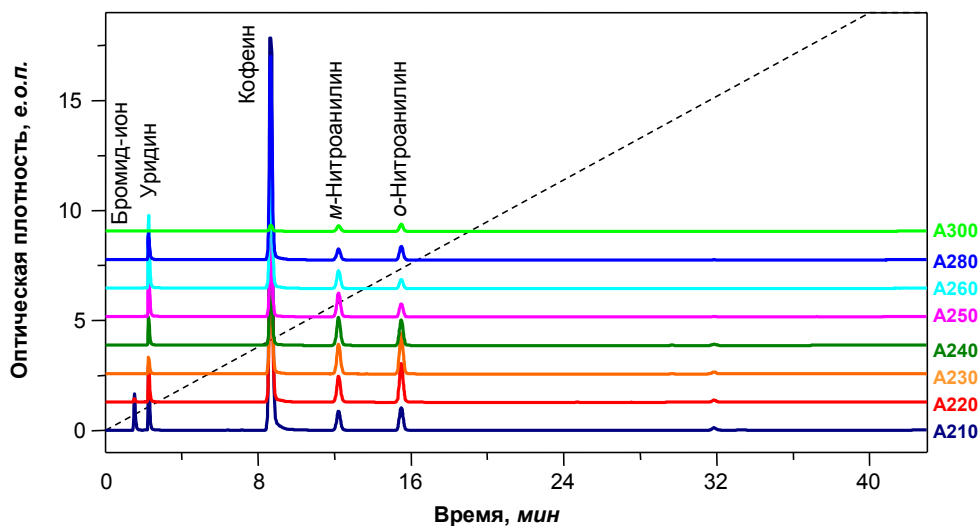
МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Фотометрическая детекция при 8 λ



Хроматограф "Милихром А-02"
ЗАО "ЭкоНова" (Новосибирск)

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФА



Колонка: Ø2x75 мм; ProntoSIL-120-5-C18

Элюент А: 0.2 М LiClO₄-0.005 М HClO₄

Элюент Б: Ацетонитрил

Градиент: 40 мин от 5-100% Б; 10 мин 100% Б

Скорость потока: 100 мкл/мин

Температура: 40°C

λ_1 - λ_8 : 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм

Проба: 4 мкл

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФА

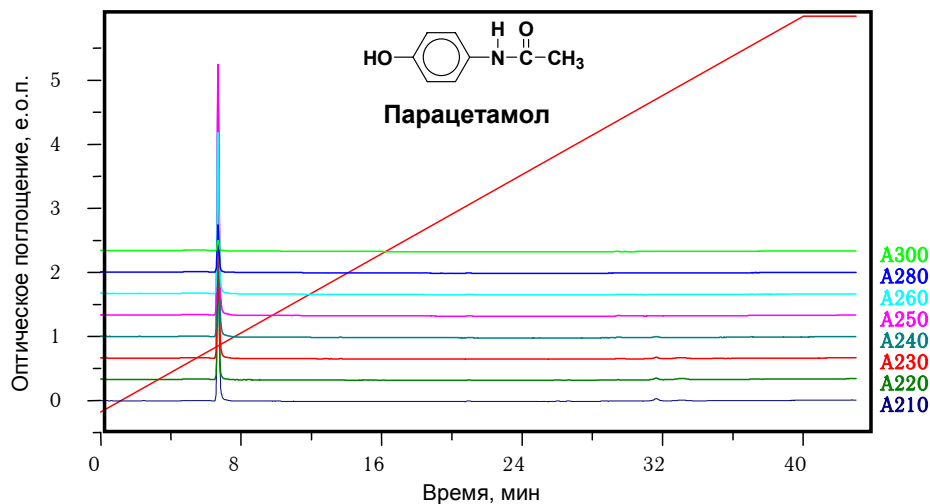
Вещество	Измеряемый параметр $\pm \Delta$	Контролируемый показатель
Бромид-ион	V_R	Объем колонки
Уридин	S_{280}/S_{250}	Погрешность детектора при $\lambda=280$ нм
Кофеин	S_{260}/S_{280}	Линейность детектора
<i>m</i> -Нитроанилин	S_{230}/S_{260}	Погрешность значения pH элюента А
<i>o</i> -Нитроанилин	V_R S_{210} $A_{10\%}$ S_{λ}/S_{210}	Погрешность скорости потока Погрешность объема пробы "Качество" смешивания элюентов А и Б $\pm \lambda$ детектора в диапазоне 210-300 нм

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФА

Вещество	Наименование параметра	Аттестованное значение параметра	Границы относительной погрешности, %, $P=0,95$
Бромид-ион	V_R , мкл	150	± 6
Уридин	$R=S_{280}/S_{250}$	0,50	± 6
Кофеин	$R=S_{260}/S_{280}$	0,76	± 5
<i>m</i> -Нитроанилин	$R=S_{260}/S_{230}$	0,60	± 4
<i>o</i> -Нитроанилин	V_R , мкл	1525	± 4
	$R=S_{220}/S_{210}$	1,69	± 3
	$R=S_{230}/S_{210}$	1,74	± 5
	$R=S_{240}/S_{210}$	1,07	± 7
	$R=S_{250}/S_{210}$	0,57	± 7
	$R=S_{260}/S_{210}$	0,39	± 6
	$R=S_{280}/S_{210}$	0,59	± 4
	$R=S_{300}/S_{210}$	0,31	± 7
	$A_{10\%}$	1,04	± 7
	S_{210} , е.о.п.·мкл	24,8	± 4

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Формирование базы данных



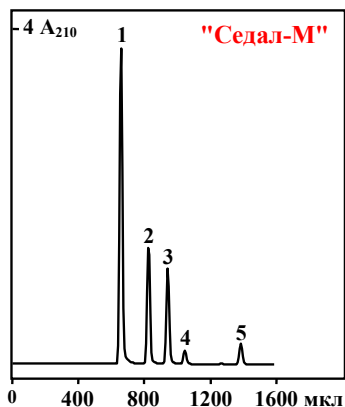
БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Формирование базы данных

Название	V _R , мкл	S ₂₁₀ , е.о.п. · мкл мг/мл	Спектральные отношения (S _λ /S ₂₁₀)						
			220	230	240	250	260	280	300
Мезатон	618	123,53	0,86	0,23	0,02	0,04	0,12	0,24	0,00
Диоксидин	620	147,01	1,05	1,71	2,51	2,20	3,19	0,26	0,27
Теобромин	643	423,50	0,43	0,24	0,14	0,16	0,33	0,44	0,01
Сульфацил-натрий	662	193,88	0,64	0,15	0,21	0,52	1,00	1,10	0,27
Парацетамол	669	213,50	0,58	0,92	1,25	1,24	0,79	0,23	0,05
Теofilлин	713	411,80	0,36	0,23	0,14	0,18	0,37	0,42	0,01
Сульфазин	715	293,17	0,81	0,54	0,52	0,60	0,80	0,66	0,23
Серотонин	731	402,84	0,98	0,64	0,15	0,10	0,16	0,25	0,20
Фолиевая кислота	762	206,87	0,88	0,63	0,48	0,41	0,47	0,88	0,84

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ":

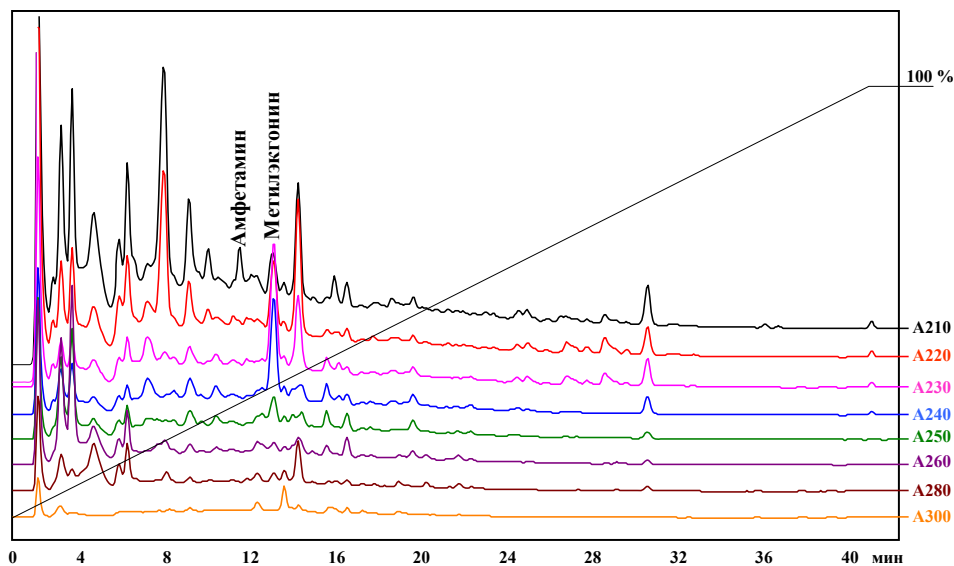
Фармакопейный анализ



Пик	Название	V _{R'} мкл	Концентрация, мг/мл (±10%)
1	Парацетамол	669	0.334
2	Кофеин	846	0.059
3	Анальгин	986	0.180
4	Коденн	1013	0.014
5	Фенобарбитал	1384	0.020

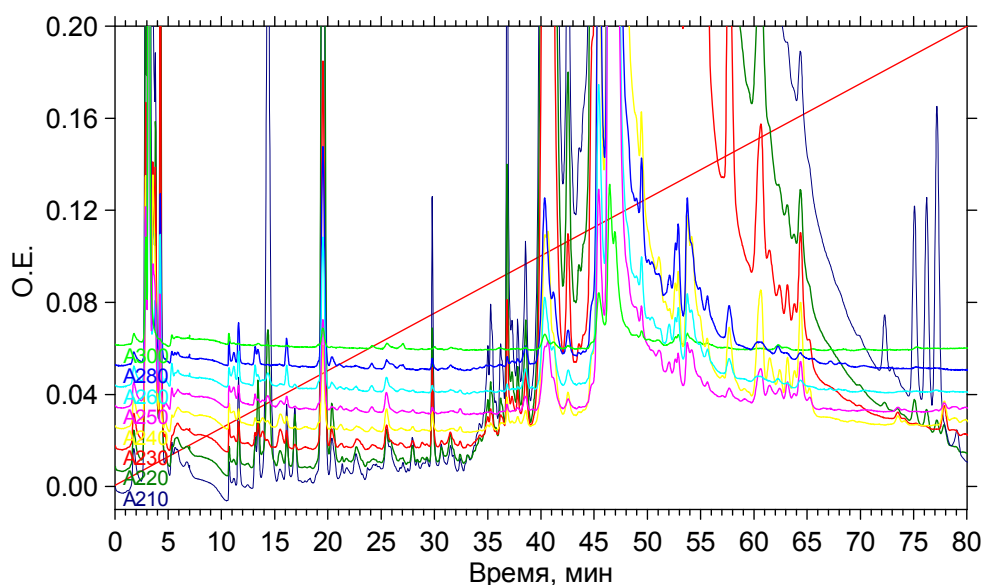
БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Определение наркотиков в экстракте мочи



БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Определение веществ в крови

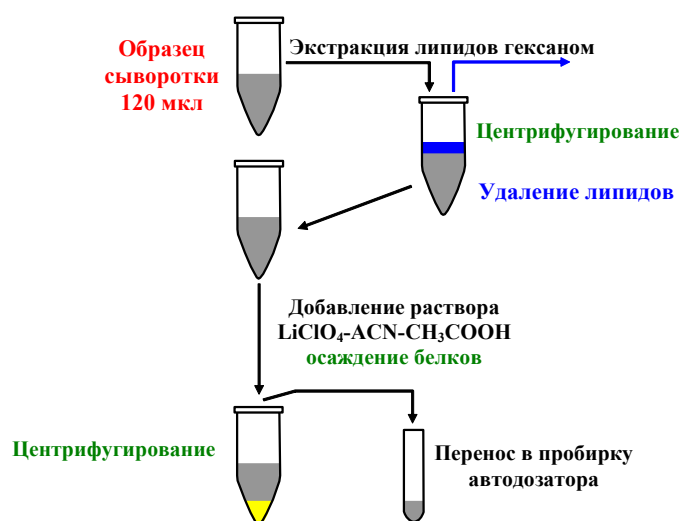


Обзорная хроматограмма сыворотки крови

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ":

гексамидин, фенобарбитал, бензонал, ламиктал,
дифенин, этосукцимид, карбамазепин и метотрексат

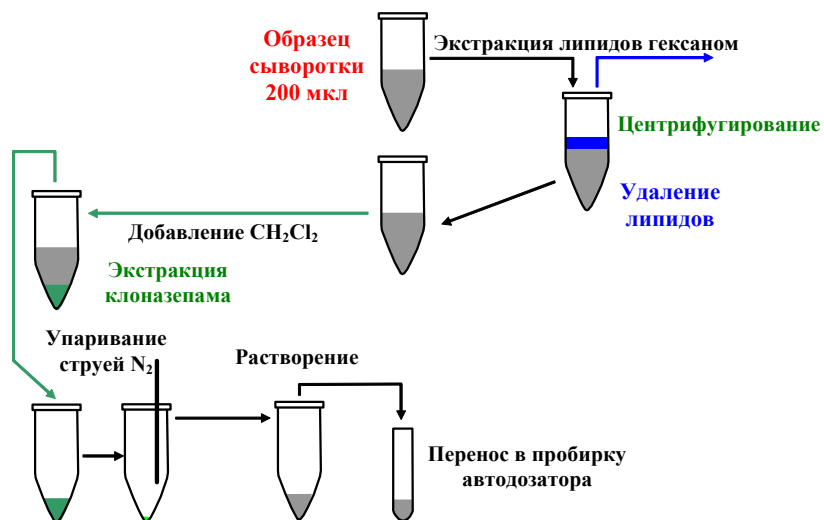
Прямое определение в крови



БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ":

клоназепам в крови

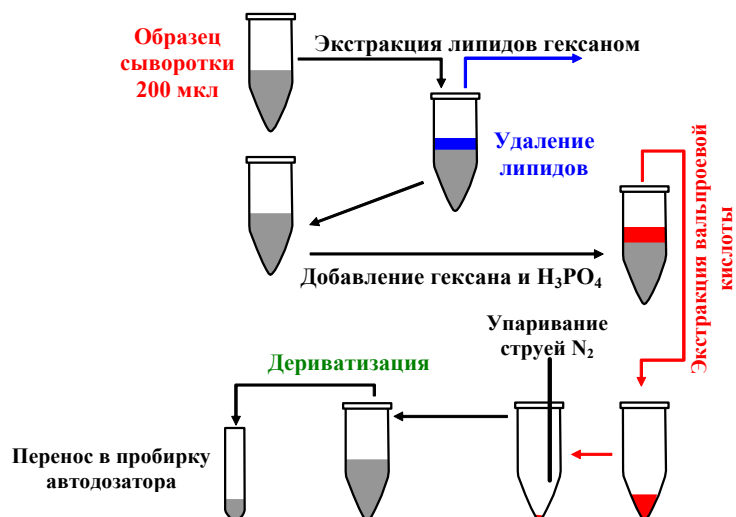
Концентрирование



БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ":

вольпроевая кислота в крови

Дериватизация



ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ МОНИТОРИНГ:

эпилепсия у детей

По данным мониторинга за 1997-2003 гг. для 25% из 700 пациентов, проходящих лечение в Областной Государственной детской клинической больнице г. Иркутска с диагнозом "эпилепсия" требуются изменение "стандартных" доз лекарственных препаратов.

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ": организации, участвующие в Проекте

- 1. ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова" (Новосибирск)**
- 2. Институт криминалистики ФСБ РФ (Москва)**
- 3. Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)**
- 4. Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова (Москва)**
- 5. НИИ фармакологии СО РАМН (Томск)**
- 6. Филиал НИИ специальной техники МВД РФ (Новосибирск)**
- 7. Центр контроля качества лекарственных средств
Администрации Президента РФ**
- 8. Экспертно-криминалистический центр МВД РФ (Москва)**

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ":
организации, использующие "Милихром А-02"

Анализ лекарств, наркотиков	Неврология, токсикология, наркология, психиатрия, фармакокинетика	Судебно- медицинская экспертиза
Барнаул – 1 Бийск – 3 Благовещенск – 1 Иркутск – 3 Казань – 1 Магадан – 1 Москва – 6 Новосибирск – 4 Омск – 1 Пермь – 1 Пятигорск – 1 Ростов-на-Дону – 1 С.-Петербург – 1 Томск – 4 Чебоксары – 1	Барнаул – 2 Благовещенск – 1 Владикавказ – 1 Иркутск – 1 Кемерово – 2 Краснодар – 1 Москва – 4 Нижний Новгород – 1 Новокузнецк – 1 Новосибирск – 2 Ростов-на-Дону – 1 Самара – 1 Сызрань – 1 Томск – 1 Тюмень – 2	Барнаул – 1 Горно-Алтайск – 1 Иркутск – 1 Краснодар – 1 Кемерово – 1 Междуреченск – 1 Новокузнецк – 1 Новосибирск – 2 Салехард – 1 Ханты-Мансийск – 1