ВЭЖХ для ВСЕХ

Лекции и Практикум

20-24 июня

Новосибирск
2011

© 1989-2011

Азарова Ирина Николаевна, ***к.х.н.*** azarova@econova.nsk.su
Барам Григорий Иосифович, ***д.х.н.*** baram@econova.nsk.su
Кожанова Людмила Алексеевна, ***к.х.н.*** kozhanova@econova.nsk.su
ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова"
630090, Новосибирск, ул. Николаева, 8, тел.: (383) 330-95-57

ЭкоНова'11

ВЭЖХ для ВСЕХ

1. Введение

Новосибирск – 2011

ЭкоНова'11

ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Низкоэффективные		Высокоэффективные
адсорбция	сублимация	ЭЛЕКТРОФОРЕЗ
диализ	разложение	
дистилляция	ультрафильтрация	ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
зонная плавка	ультрацентрифугирование	
кристаллизация	экстракция	ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
осаждение	электролиз	

МЕТОДЫ АНАЛИЗА

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

РАЗДЕЛЕНИЕ

***"DEVIDE ET IMPERE"* - "Разделяй и властвуй"**

Царь Филипп (отец Александра Македонского)

"Люди, знающие несколько химию, 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.

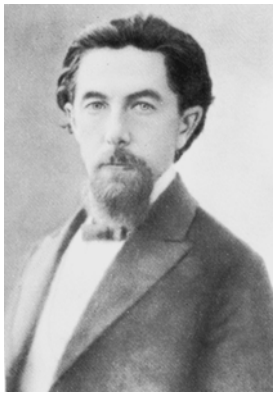
Открыл церий, селен, торий. Создал электрохимическую теорию химического сродства, на ее основе построил классификацию элементов, соединений и минералов. Определил атомные массы 45 элементов, ввел современные химические знаки элементов. Предложил термин "катализ".

ОТКРЫТИЕ ХРОМАТОГРАФИИ

"Особенно поучительно наблюденіе адсорбціонныхъ явленій при фильтраціи черезъ порошокъ. Изъ нижнего конца воронки вытекает сначала безцветная, потомъ желтая (каротинъ) жидкость, между темъ какъ въ поверхностныхъ слояхъ инулиноваго столба образуется интенсивно-зеленое кольцо, на нижнем краю котораго скоро дифференцируется желтая кайма. При последующем пропусканіи черезъ инулиновый столбъ чистаго лигроина, оба кольца, зеленое и желтое, значительно расширяются и распространяются внизъ, до известного предела, чем доказывается, что и здесь (как въ известных уже разныхъ случаяхъ адсорбціи) количество адсорбированнаго вещества зависит отъ концентраціи, отъ осмотическаго напряженія его въ растворе, но не пропорціонально ему, такъ какъ не сводится къ нулю при осмотическомъ напряженіи равномъ 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

1970-2010 - выпущено около 1000 книг на английском и русском языках
2010 - ежемесячно выходят более 10 специализированных международных журналов
1980-2010 - ежегодно проводится не менее 20 крупных международных симпозиумов
2006 - более 200 фирм произвели оборудование на 3 млрд долларов США
1997 - более 100 000 хроматографов в США
2010 - в Российской Федерации менее 25 000 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

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХРОМАТОГРАФЫ

Waters Corp. (*США*)
Agilent Technologies Inc. (*США*)
Shimadzu Corp. (*Япония*)

Thermo Fisher Scientific, Inc. (*США*)
Thermo Electron Corp. (*США*)
Varian, Inc. (*США*)
PerkinElmer, Inc. (*США*)
Hitachi High Technologies America, Inc. (*США*)
Jasco Corp. (*Япония*)
Bio-Rad Laboratories, Inc. (*США*)
Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH (*Германия*)
Gilson, Inc. (*Франция*)
Konik-Tech (*Испания*)

ЗАО "Аквилон" (Москва), ЗАО "Научприбор", НПО "Химавтоматика" (Москва), НПФ "Люмекс" (Санкт-Петербург), ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова" (Новосибирск), ООО "Хромос" (Дзержинск)

ХРОМАТОГРАФИЯ В РФ

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, электро-
По составу подвижной фазы: изократическая, ступенчатая, градиентная
С программированием: состав элюента, температура, давление, поток
По полярности фаз: нормально-фазовая, обращенно-фазовая
По механизму разделения: распределительная, ионообменная, эксклюзивная (эксклюзионная, ситовая, гель-проникающая), ион-парная, адсорбционная, аффинная, лигандообменная, ионная, гидродинамическая, в поперечном поле сил, гидрофобная, гидрофильная, хиральная
По способу детектирования: одно- и многоканальное, прямое и непрямое (косвенное), пред- и постколоночная дериватизация, разрушающее и неразрушающее
По эффективности:
По давлению:
По скорости разделения:
Прочее:

Аналитическая, твердо-жидкостная, элюентная, градиентная, обращенно-фазная, ион-парная высокоэффективная хроматография с многоволновым фотометрическим детектированием

ПРИКЛАДНАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В РФ (2011 г.)

ОБЛАСТНЫЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ ЛАБОРАТОРИИ

1. ЭКУ МВД РФ
2. ЭКУ ФСКН РФ
3. Криминалистическая лаборатория ФСБ РФ
4. Лаборатория МЧС РФ
5. Пищевая лаборатория Роспотребнадзора
6. Ветеринарная лаборатория Минсельхоза РФ
7. Пищевая лаборатория Ростехрегулирования
8. Лаборатория Росздравнадзора
9. Лаборатория охраны природы
10. Агрохимическая лаборатория
11. Лаборатория Госгидромета
12. Лаборатория Облэнерго
13. Лаборатория Судмедэкспертизы
14. Лаборатория Водоканала
15. Лаборатория наркологии
16. Лаборатории Областных больниц

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ ЛАБОРАТОРИИ

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

ГОСБЮДЖЕТНЫЕ ЛАБОРАТОРИИ

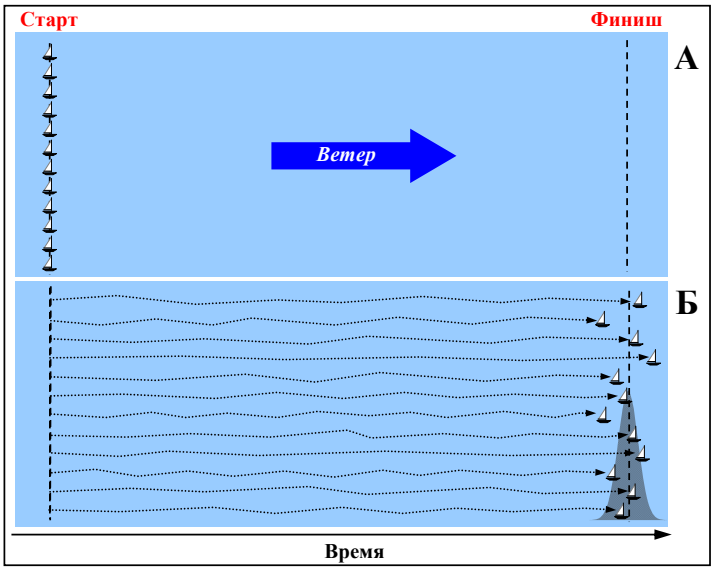
Наука, Высшие учебные заведения, Армия, Таможня

ВЭЖХ для ВСЕХ

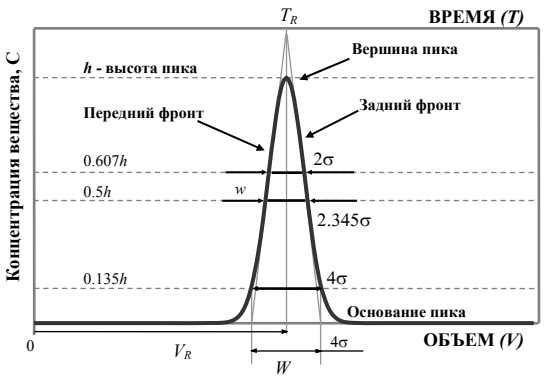
2. Формальная хроматография

Новосибирск – 2011

ХРОМАТОГРАФИЯ?



ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПИК



Распределение Гаусса

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

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

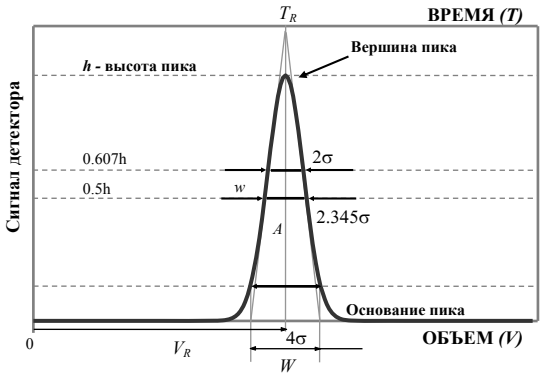
$$C(T) = h \cdot e^{-0.5\left(\frac{T-T_r}{\sigma}\right)^2}$$

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

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

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПИК

Эффективность колонки

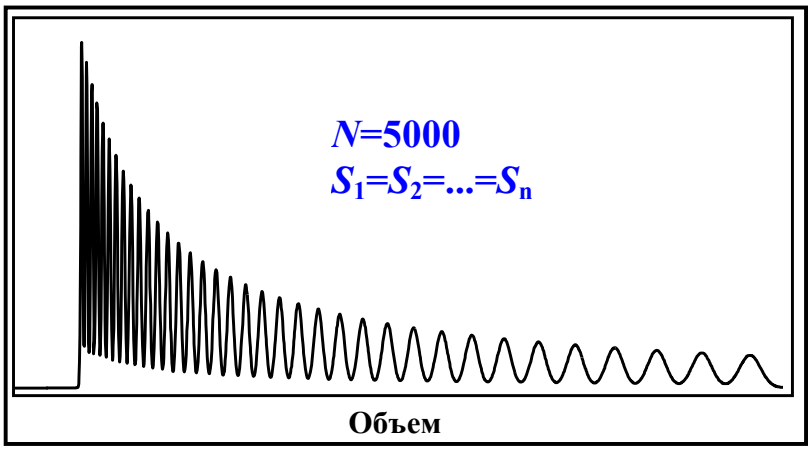


$N=(V_R/\sigma)^2 \approx 5.54(V_R/w)^2 \approx 16(V_R/W)^2$ - эффективность колонки (число теоретических тарелок)

$H=L/N$ - высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ), где L- длина колонки

ЭкоНова'11

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОЛОНКИ

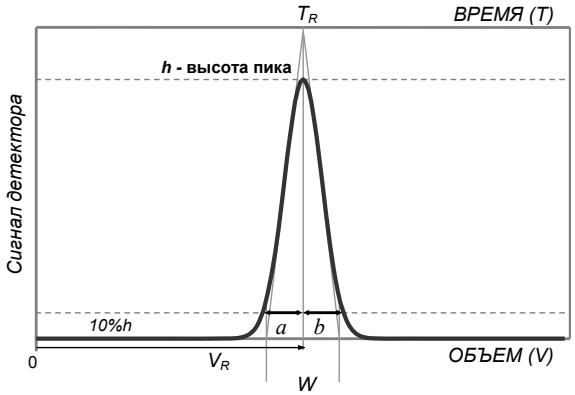


$$N=(V_R/\sigma)^2\approx5.54(V_R/w)^2\approx16(V_R/W)^2$$

ЭкоНова'11

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПИК

Асимметрия пика



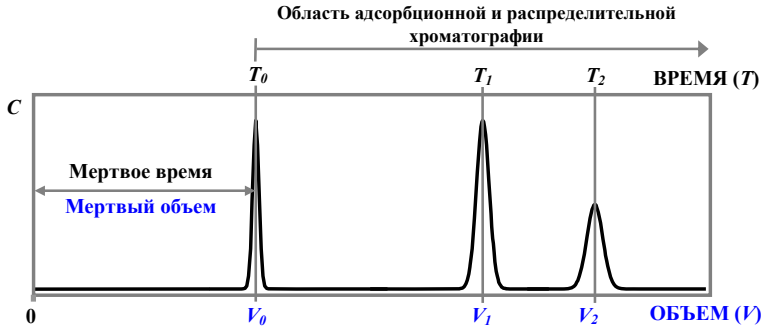
$A_{10\%h}=b_{10\%h}/a_{10\%h}$ - асимметрия пика на уровне 10%h

$A_S=w_{5\%h}/2a_{5\%h}$ - асимметрия пика на уровне 5%h
(Британская и Европейская Фармакопеи)

ЭкоНова'11

ХРОМАТОГРАММА

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



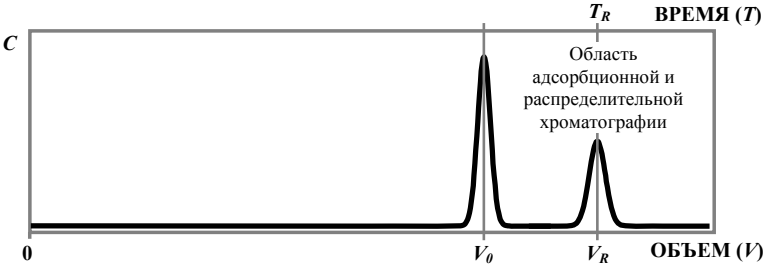
V_0 (T_0) - ***свободный*** или ***мертвый объем*** (*время*) ***колонки***; равен полному объему находящейся в колонке подвижной фазы (объем удерживания несорбируемого вещества)

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

ЭкоНова'11

ХРОМАТОГРАММА

Удерживание вещества



$$V_R = V_0 + V_0 \cdot k' \qquad T_R = T_0 + T_0 \cdot k'$$

k' - фактор удерживания вещества (емкостное отношение)

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

ОБЪЕМ и ВРЕМЯ

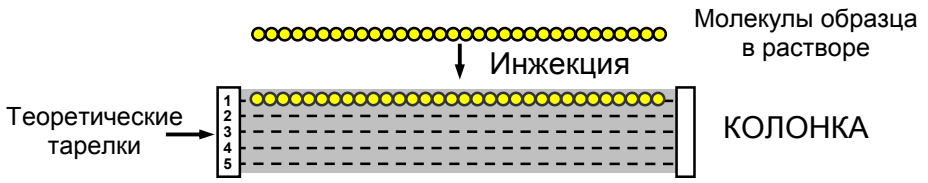
F - объемная скорость потока подвижной фазы

U - линейная скорость потока подвижной фазы вдоль колонки

s - площадь поперечного сечения колонки

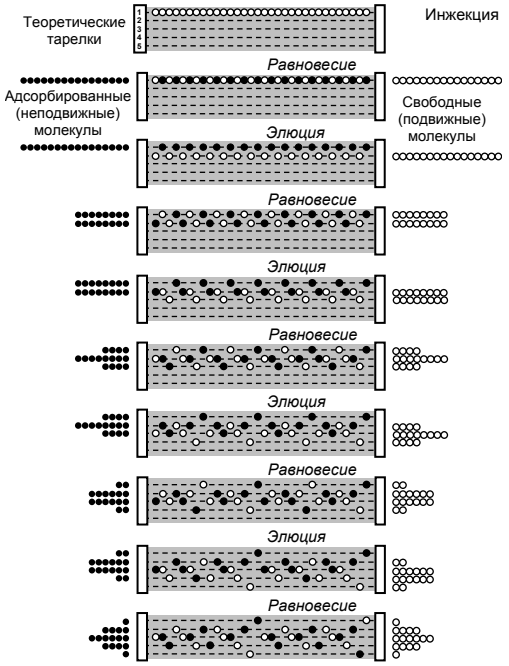
$V = FT \qquad V_r = FT_r \qquad V_0 = FT_0 \qquad U = F/s \qquad T_0 = L/U$

ФОРМА ПИКА



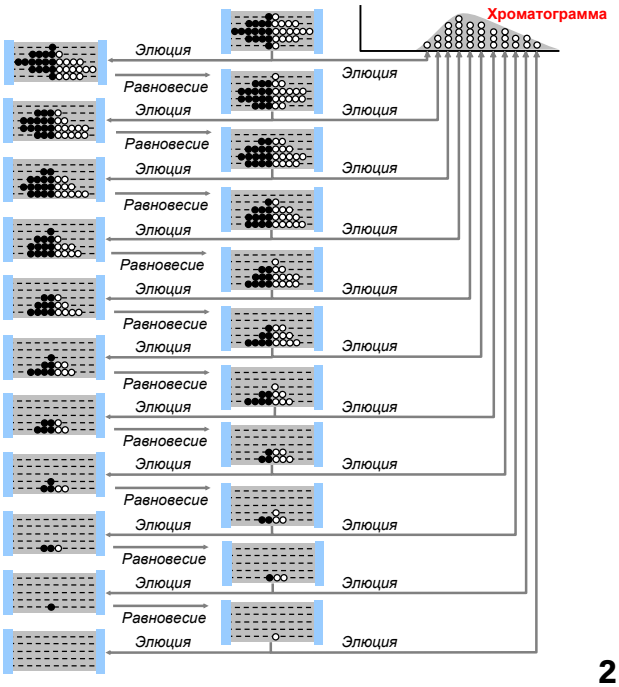
ФОРМА ПИКА (1)

***k'*=1; *N*=5**



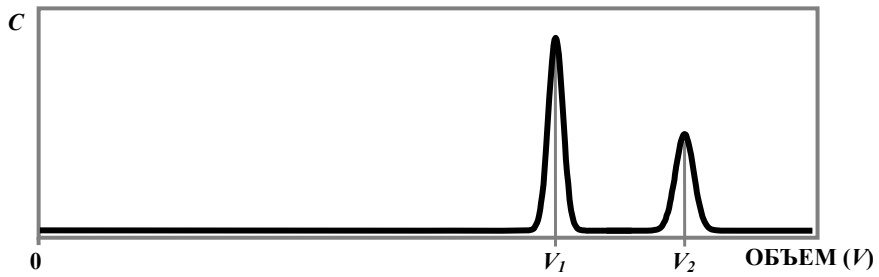
ФОРМА ПИКА (2)

***k'*=1; *N*=5**



ХРОМАТОГРАММА

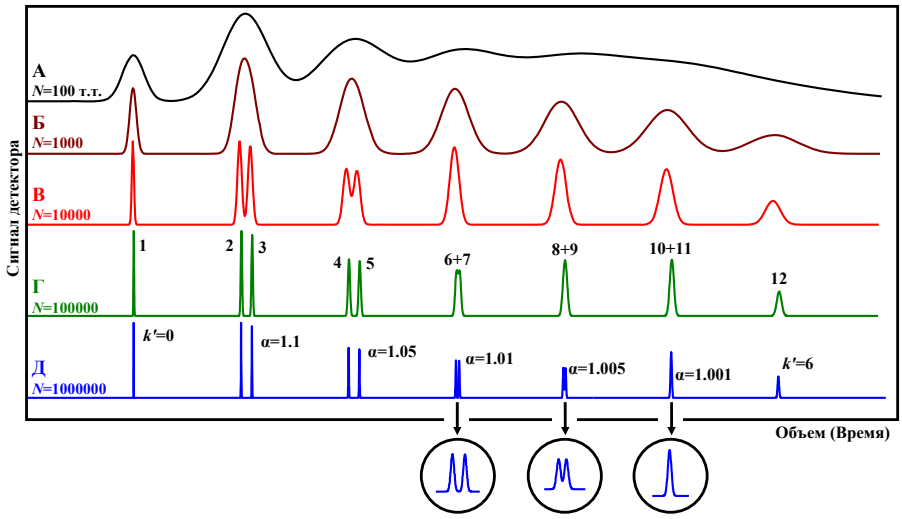
Разделение пиков



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

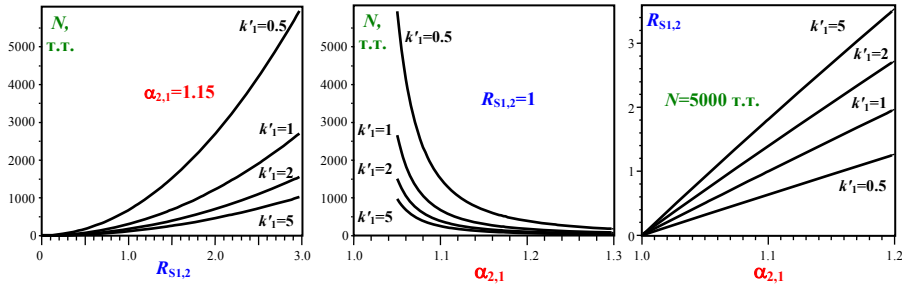
Разрешение пиков **1** и **2**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ, СЕЛЕКТИВНОСТЬ, РАЗДЕЛЕНИЕ



ЭФФЕКТИВНОСТЬ, СЕЛЕКТИВНОСТЬ, РАЗДЕЛЕНИЕ

$$R_{S1,2} = \frac{k'_1}{2} \cdot \frac{\alpha_{2,1} - 1}{k'_1 + k'_1 \cdot \alpha_{2,1} + 2} \cdot \sqrt{N}$$

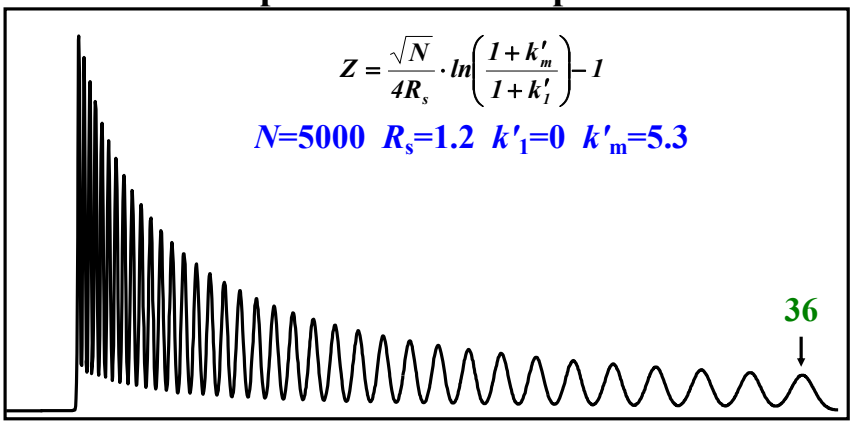


ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Изократическое элюирование

$$Z = \frac{\sqrt{N}}{4R_s} \cdot ln\left(\frac{1+k'_m}{1+k'_1}\right) - 1$$

N=5000 R_s=1.2 k'_1=0 k'_m=5.3

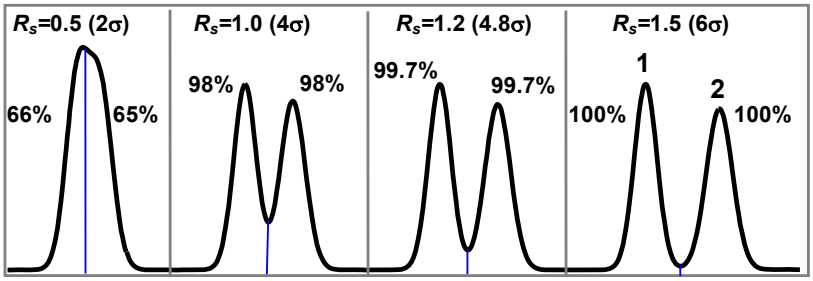


Объем

РАЗРЕШЕНИЕ ПИКОВ

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

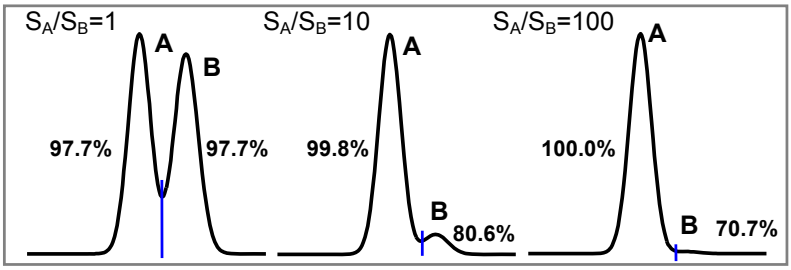
S_1=S_2 (площади пиков вычислены в интервале ±4σ)



РАЗРЕШЕНИЕ ПИКОВ

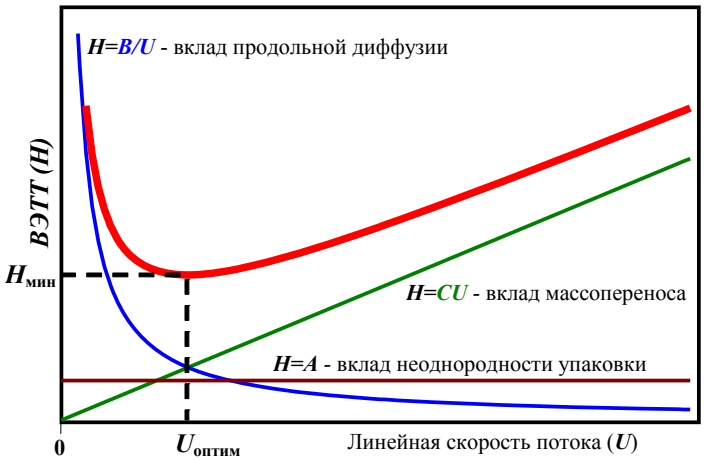
$$R_{S_{1,2}} = \frac{2(V_{R2} - V_{R1})}{4\sigma_1 + 4\sigma_2}$$

***R_S*=1 (4σ)** (площади пиков вычислены в интервале ±4σ)



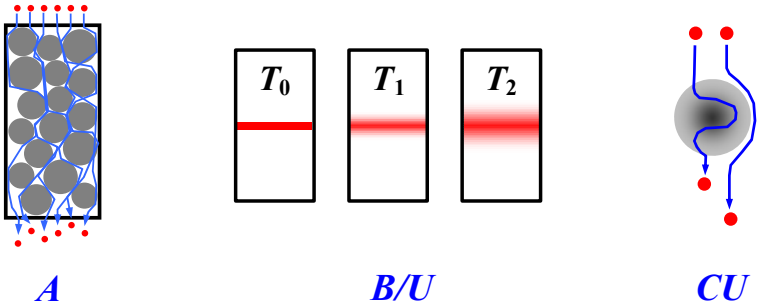
ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОЛОНКИ И СКОРОСТЬ ПОТОКА ЭЛЮЕНТА

***H* ≈ *A* + *B/U* + *CU* - уравнение Ван-Деемтера**

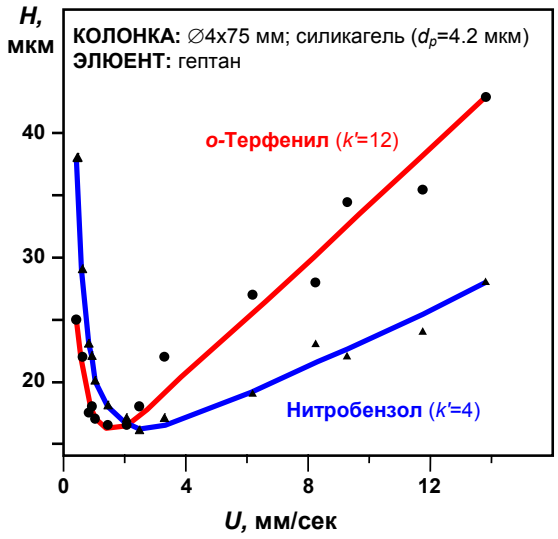


ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОЛОНКИ И СКОРОСТЬ ПОТОКА ЭЛЮЕНТА

$H \approx A + B/U + CU$ - уравнение Ван-Деемтера

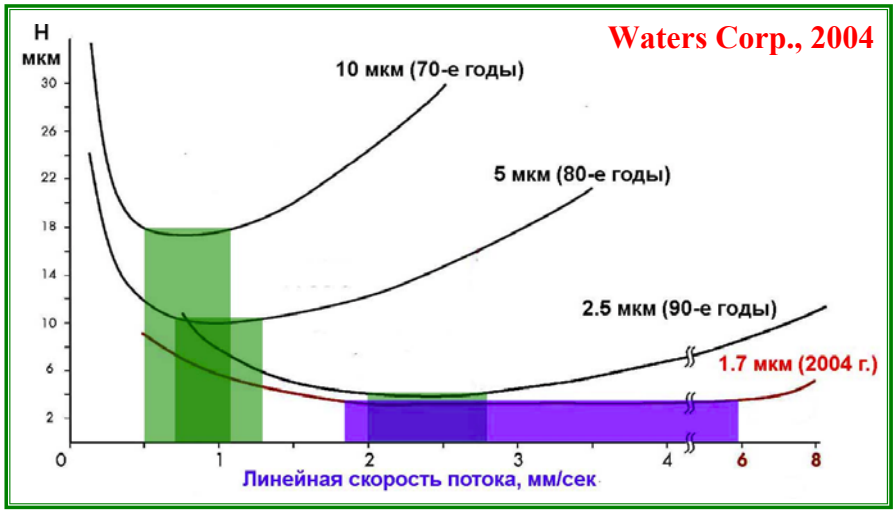


ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОЛОНКИ И СКОРОСТЬ ПОТОКА ЭЛЮЕНТА



СКОРОСТЬ АНАЛИЗА

Уменьшение диаметра зерна адсорбента



ЭФФЕКТИВНОСТЬ + СЕЛЕКТИВНОСТЬ

HPLC

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

HRLC™ -High **R**esolution **L**iquid **C**hromatography (Bio-Rad Lab.)
FPLC™ - Fast **P**olymer **(P**eptide, **P**rotein, **P**olynucleotide**) L**iquid **C**hromatography (Pharmacia)
UPLC™ - Ultra **P**erformance **L**iquid **C**hromatography (Waters Corp., 2004)
Ultra **P**ressure **L**iquid **C**hromatography (P≥1000 атм)

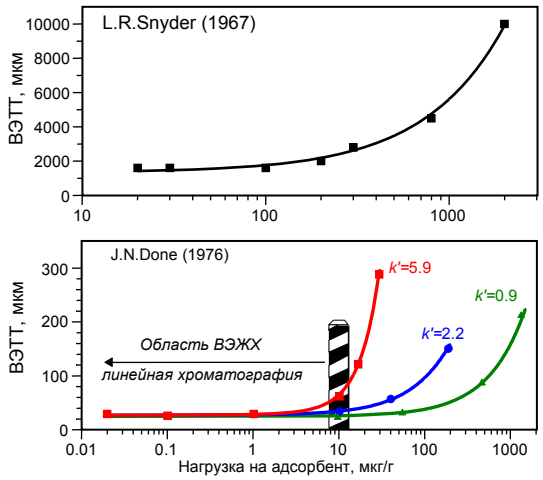
ВЭЖХ

Высоко**Э**ффективная **Ж**идкостная **Х**роматография

Современная ВЭЖХ - 1 вещество/мин

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

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

ТЕМПЕРАТУРА В ВЭЖХ

Изменение удерживания вещества

Термодинамические причины

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

где

T - абсолютная температура (°К);

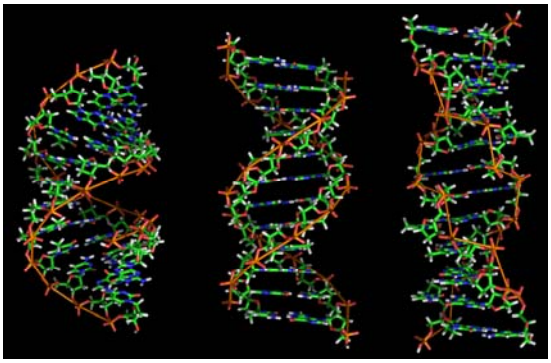
a и b - константы (обычно $a>0$).

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

ТЕМПЕРАТУРА В ВЭЖХ

Изменение удерживания вещества

Изменение конформации молекулы полимера



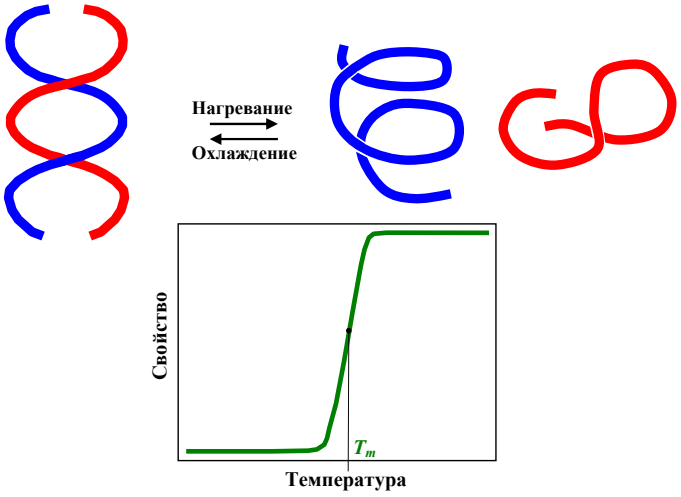
Двойная спираль ДНК: формы *A*, *B* и *Z*

Ширина двойной спирали: 2.2-2.4 нм
Длина каждого нуклеотида: 0.33 нм

ТЕМПЕРАТУРА В ВЭЖХ

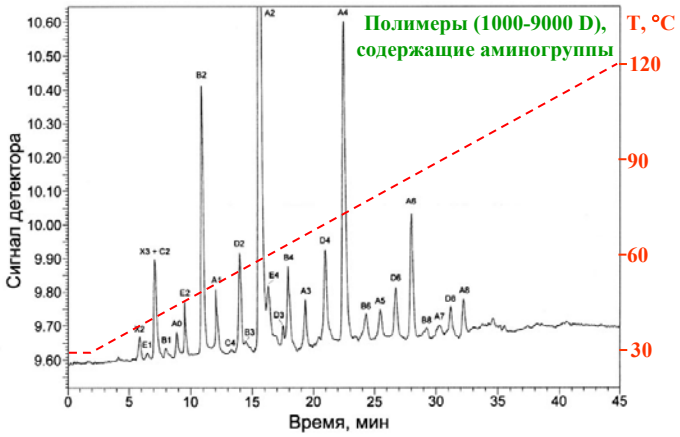
Изменение удерживания вещества

Изменение конформации молекулы полимера



ТЕМПЕРАТУРА В ВЭЖХ

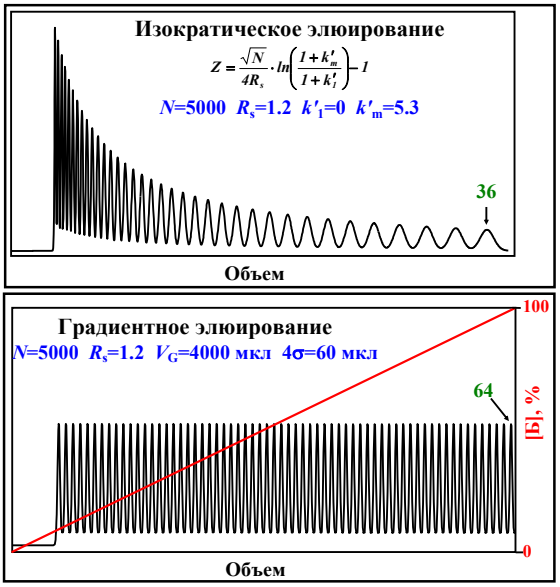
Изменение удерживания вещества



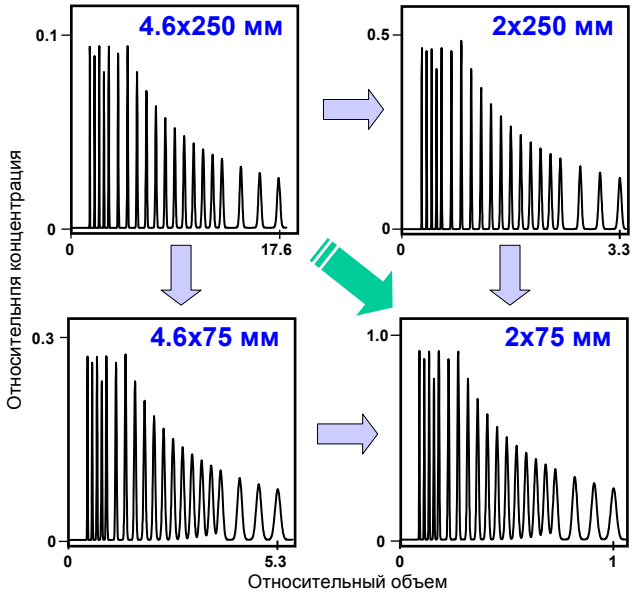
Колонка: 0.32 мм x 30 см с Hypersil ODS-100 (3 мкм)
Скорость потока: 5 мкл/мин
Элюент: этилацетат-CH_3CN-$(C_2H_5)_3N$-CH_3COOH (45:44.9:10:0.1)

T.Andersen et al. *J.Chromatogr. A, 2004,* ***1029****, 49–56*

ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ



КОЛОНКИ ДЛЯ ВЭЖХ



КОЛОНКИ ДЛЯ 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	**∅2x60÷80**	**∅4.6x250**
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 ДЛЯ ВЭЖХ

Классификация ВЭЖХ по диаметру колонок

Тип хроматографии	$\varnothing_{внутр}$, 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 капилляре Open tubular LC	0.005-0.05

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

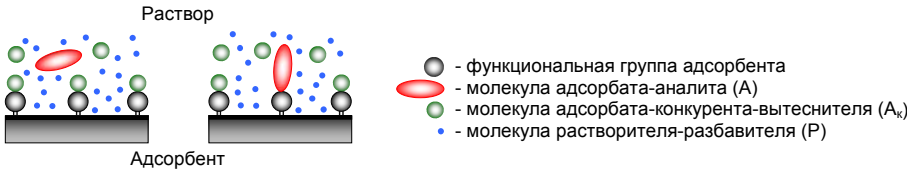
ВЭЖХ для ВСЕХ

3. Механизмы хроматографии

Новосибирск – 2011

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АДСОРБЕНТ⇔АДСОРБАТ

Адсорбция



<Адсорбент-Конкурент> + Аналит ↔ <Адсорбент-Аналит> + Конкурент

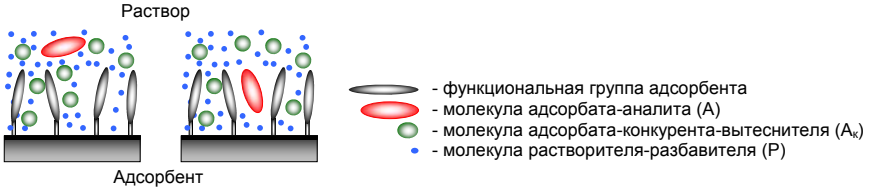
$$K = \frac{[\text{Адсорбент-Аналит}]\times[\text{Конкурент}]}{[\text{Адсорбент-Конкурент}]\times[\text{Аналит}]}$$

Константа равновесия

Хроматография: адсорбционная, ионообменная, аффинная

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АДСОРБЕНТ⇔АДСОРБАТ

Распределение



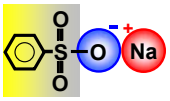
$$K = \frac{[\text{Аналит в неподвижной фазе}]}{[\text{Аналит в подвижной фазе}]}$$

Коэффициент распределения

Хроматография: распределительная

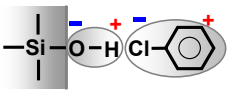
ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Адсорбент⇔Адсорбат



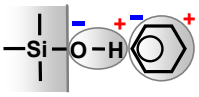
Взаимодействие: "ион ↔ ион"
Адсорбент: ионообменник (*сульфополистирол*)
Растворитель: полярный (*вода*)

Конкуренты аналита: ионы с зарядом того же знака



Взаимодействие: "диполь ↔ диполь"
Адсорбент: полярный (SiO_2, Al_2O_3)
Растворитель: малополярный (*хлороформ*)

Конкуренты: полярные молекулы (*спирт, вода*)

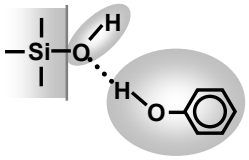


Взаимодействие: "диполь ↔ наведенный диполь"
Адсорбент: полярный (SiO_2, Al_2O_3)
Растворитель: неполярный (*гексан*)

Конкуренты: малополярные молекулы (*хлороформ*)

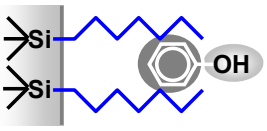
ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Адсорбент⇔Адсорбат



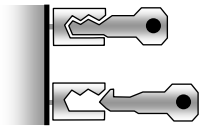
Взаимодействие: "водородная связь"
Адсорбент: донор/акцептор электронов
Растворитель: не образующий Н-связи (*ACN*)

Конкуренты: образующие Н-связи молекулы (*вода*)



Взаимодействие: "гидрофобное"
Адсорбент: неполярный (*обращенная фаза*)
Растворитель: полярный (*вода*)

Конкуренты: полярные молекулы (*спирт, ACN*)

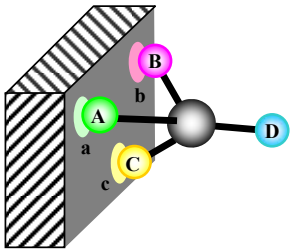


Взаимодействие: аффинное (биоспецифическое)
Сумма взаимодействий всех типов
Адсорбент: аффинный (*антиген*)
Растворитель: вода

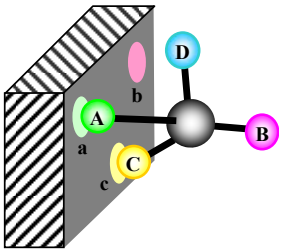
Конкуренты: ионная сила, температура, pH и пр.

ТИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Адсорбент⇔Адсорбат



Трёхточечное ("сильное") взаимодействие



Двухточечное ("слабое") взаимодействие

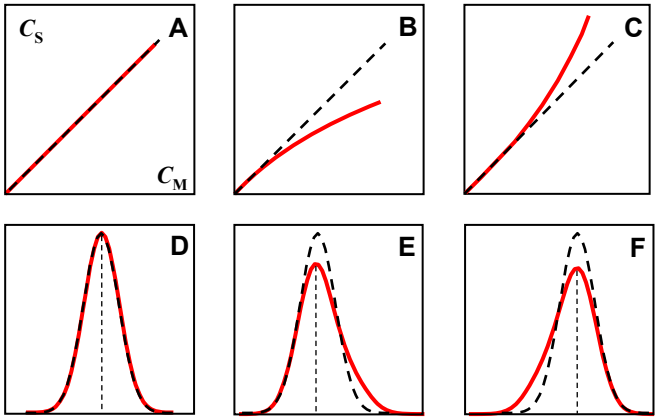
Взаимодействие: хиральное (стереоспецифическое)
Адсорбент: хиральный (*оптически активный*)
Растворитель: вода, органический растворитель

Конкуренты: ионная сила, pH, полярность и пр.

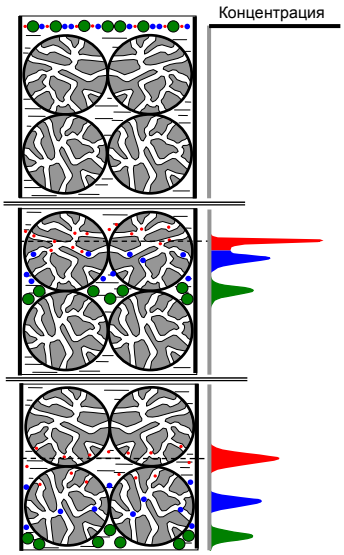
ИЗОТЕРМА АДСОРБЦИИ

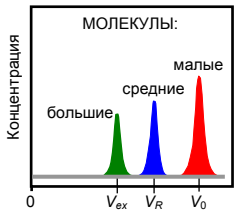
Форма пика

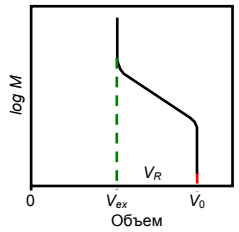
C_S - концентрация вещества в твердой фазе
C_M - концентрация вещества в жидкой фазе



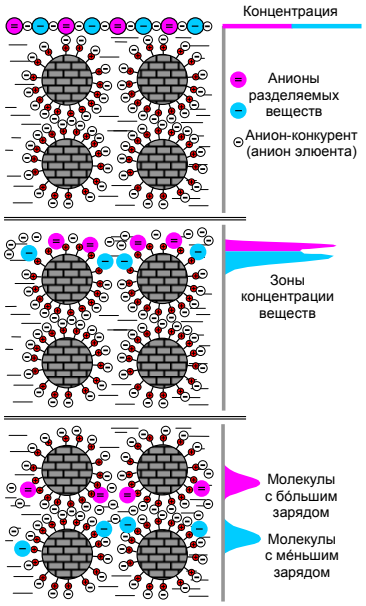
ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

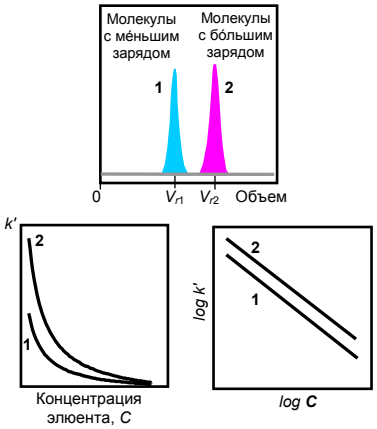






АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

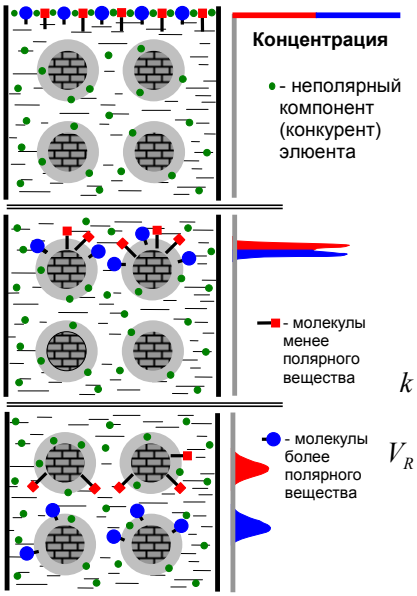


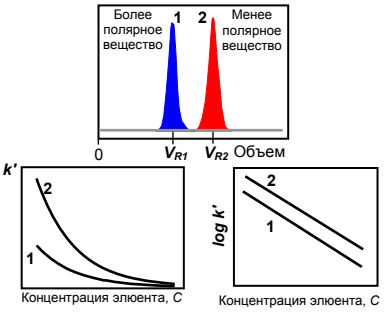


$$k' = k_0' \cdot c^{-n} \quad \text{где } n \text{ и } k_0' - \text{константы}$$

$$V_R \approx \frac{1}{b}\left[(n+1)\cdot b \cdot k_0' \cdot V_0 + a^{n+1}\right]^{\frac{1}{n+1}} - \frac{a}{b}$$

РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

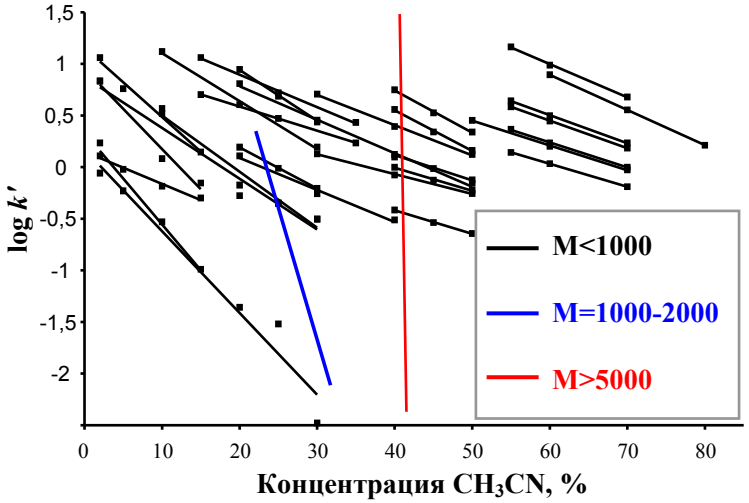




$$k' = k_0' \cdot 10^{-n \cdot C} \quad \text{где } n \text{ и } C - \text{константы}$$

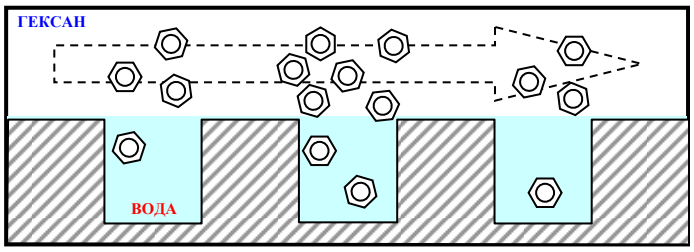
$$V_R \approx \frac{1}{n \cdot b} \cdot \log\left[2.3 \cdot n \cdot b \cdot V_0 \cdot k_0' + e^{2.3 \cdot n \cdot a}\right] - \frac{a}{b}$$

РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

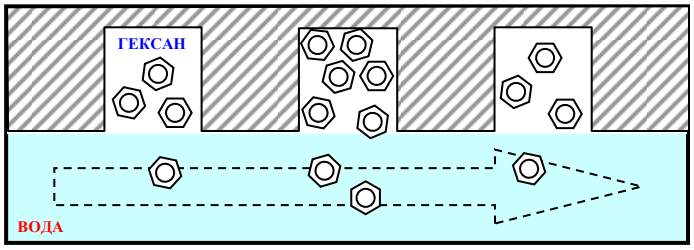


РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Нормально-фазовая жидкостная хроматография

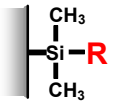


Обращенно-фазовая жидкостная хроматография



НЕПОДВИЖЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Привитые фазы на основе силикагеля

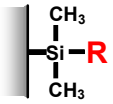


ОБРАЩЕННЫЕ ФАЗЫ

Фаза	R	Назначение
C18 RP18 Octadecyl ODS	$-CH_2(CH_2)_{16}CH_3$	Универсальная фаза с высокой емкостью. Разделение гидрофильных веществ методом ион-парной хроматографии.
C8 RP8 Octyl	$-CH_2(CH_2)_6CH_3$	Универсальная фаза со средней емкостью. Разделение липофильных веществ.
C4 Butyl	$-CH_2(CH_2)_2CH_3$	Разделение белков и пептидов методом обращенно-фазовой и гидрофобной хроматографии.
C1	$-(CH_3)_3$	Фаза с очень низкой емкостью.
Phenyl	$-C_6H_5$	Фаза со средней емкостью.
Nitryl CN	$-CH_2CH_2CH_2-CN$	Фаза с низкой емкостью.
Nitro NO_2	$-CH_2CH_2CH_2-NO_2$	Фаза с низкой емкостью; селективна к ароматическим соединениям.

НЕПОДВИЖЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Привитые фазы на основе силикагеля



ОБРАЩЕННЫЕ ФАЗЫ

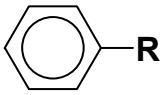
Элюотропный ряд (повышение силы элюента):

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

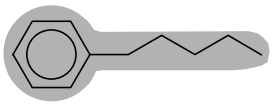
Смешивающиеся с водой и
прозрачные в УФ области спектра растворители

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "С18"

Эффективность колонки: 4000-6000 теоретических тарелок
Разрешение пиков: $R_{s(i,\ i+1)}$ >1 или >4σ



$Ph\text{-}H < Ph\text{-}CH_3 < Ph\text{-}CH_2CH_3 < ... < Ph\text{-}CH_2(CH_2)_{25\text{-}30}CH_3$



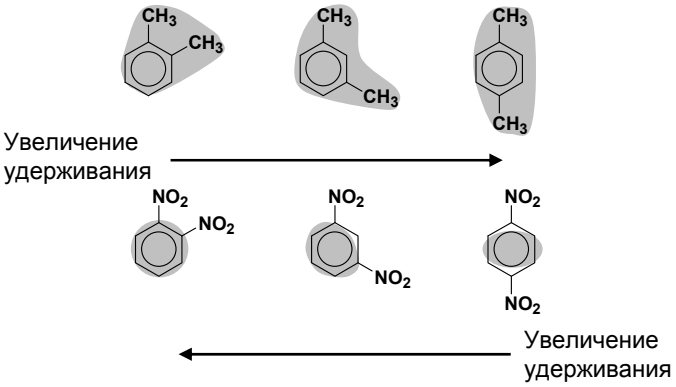
Поверхность гидрофобного контакта

Хорошая корреляция величины удерживания со значением константы распределения вещества в системе "октанол-вода"

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "С18"

Эффективность колонки: 4000-6000 теоретических тарелок
Разрешение пиков: $R_{s(i,\ i+1)}$ >1 или >4σ

Поверхность гидрофобного контакта

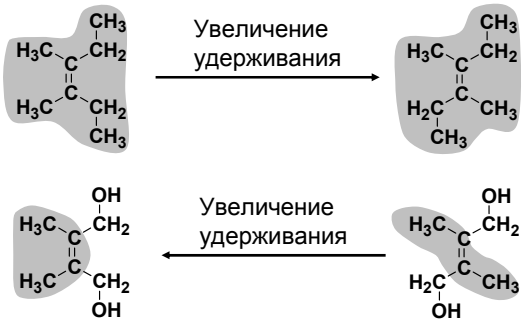


СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "С18"

Эффективность колонки: 4000-6000 теоретических тарелок
Разрешение пиков: $R_{s(i,\ i+1)}$ >1 или >4σ

Поверхность гидрофобного контакта

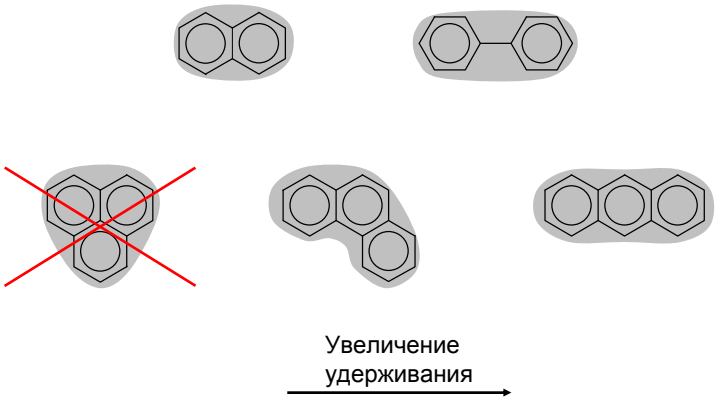
***Цис*-изомеры** ***Транс*-изомеры**



СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "С18"

Эффективность колонки: 4000-6000 теоретических тарелок
Разрешение пиков: $R_{s(i,\ i+1)}$ >1 или >4σ

Поверхность гидрофобного контакта

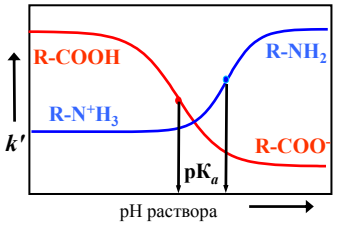


ХРОМАТОГРАФИЯ ИОНОВ НА ОБРАЩЕНОЙ ФАЗЕ

Слабые кислоты и основания

$R-N^{+}H_3 \Leftrightarrow R-NH_2 + H^{+}$ $\qquad$ $R-COOH \Leftrightarrow R-COO^{-} + H^{+}$

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



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

ВЭЖХ для ВСЕХ

4. Неподвижные фазы

Новосибирск –2011

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Механическая прочность

Мягкие фазы
на основе целлюлозы, декстрана, полиакриламида, полистирола и др.
для колоночной ЖХ низкого давления
($P_{макс}$<0.2 МПа)

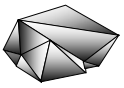
Полужесткие фазы
на основе поливинилового спирта, полистирола
для ВЭЖХ на коротких колонках
($P_{макс}$ до 10 МПа)

Жесткие фазы
на основе окисей кремния, алюминия, циркония, стекла
($P_{макс}$ до 150 МПа).

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Форма частиц

- сферическая



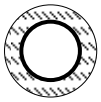
- неправильная

- неправильная (скругленная)

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Площадь поверхности

непористая фаза



"открытая" колонка

поверхностно-пористая (pellicular) фаза

объемно-пористая фаза

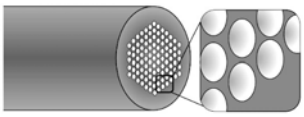
Zorbax® (DuPont)

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Механическая прочность

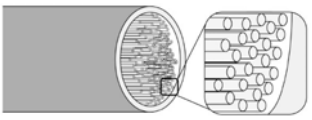
перфузионная фаза

монолитная колонка



поликапиллярная колонка

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

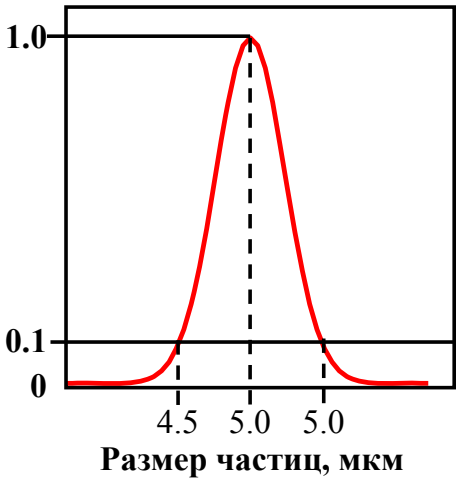


поливолоконная колонка

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

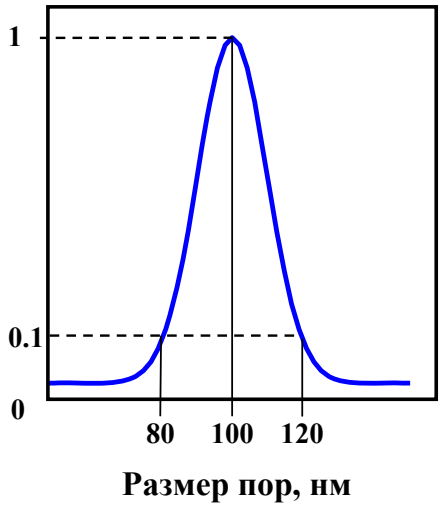
НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Распределение частиц по размерам



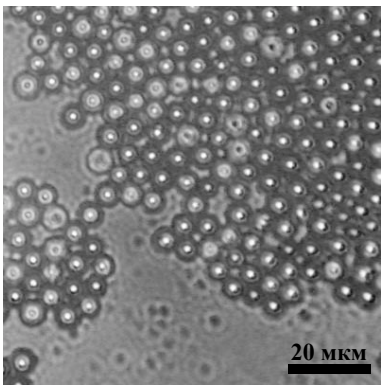
НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Распределение пор по размерам

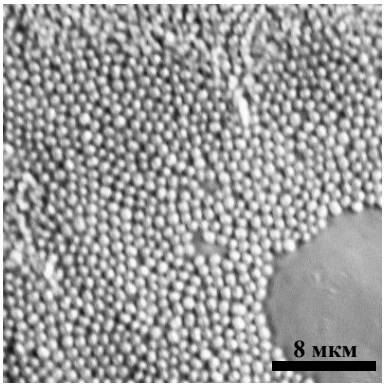


НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Распределение частиц по размерам

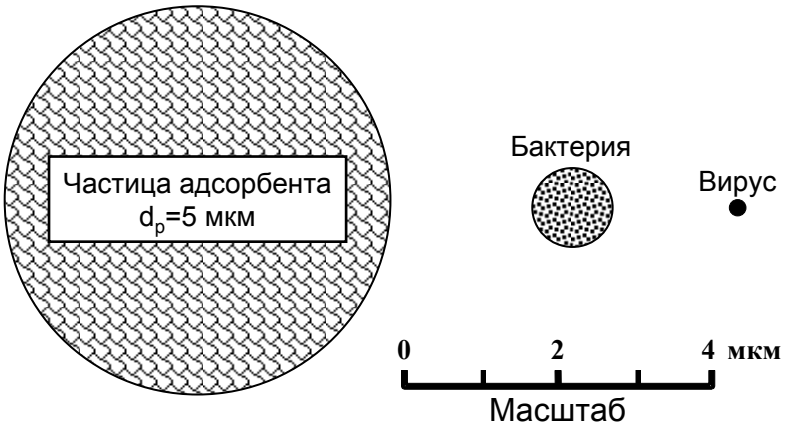


Диасфер-250-СТ (5 мкм)



Золотистый стафилококк

НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

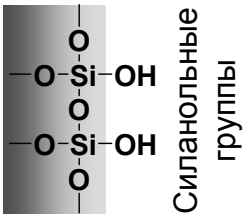


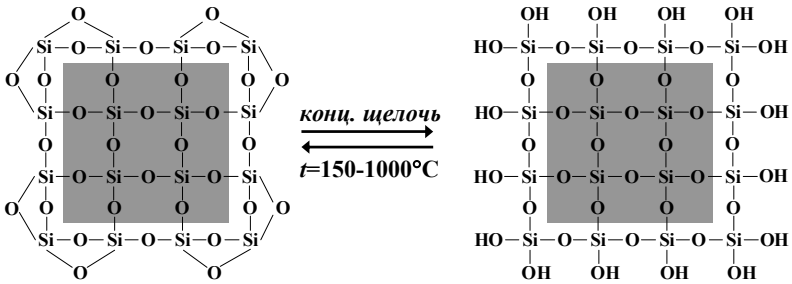
АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Синтез объемно-пористого силикагеля

$$Na_2SiO_3 + H_2O \xrightarrow{H^+} xSiO_2 \cdot yH_2O$$

$$Si(OC_2H_5)_4 + H_2O \xrightarrow{H^+} xSiO_2 \cdot yH_2O$$





АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Объемно-пористый силикагель

Типичный силикагель для ВЭЖХ

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

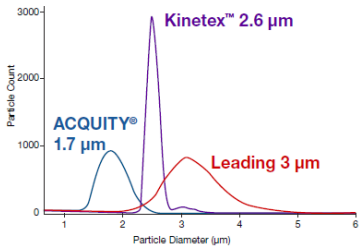
Nucleosil 100-5, LiChrosorb Si 60, LiChrospher Si 100, Zorbax BP-Sil и т.д.

Плотность силанолов: 1 группа на 0.2 нм^2

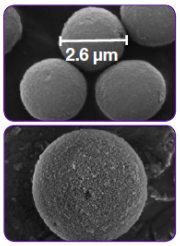
НЕПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Площадь поверхности и размер частиц

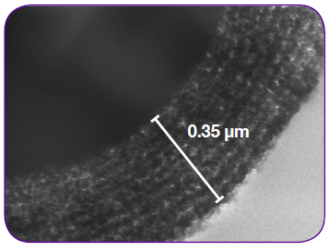
Uniform Particle Size Distribution



Final Kinetex™ 2.6 µm Particle with 0.35 µm Porous Shell



Cross-section image of Kinetex™ 2.6 µm Core-Shell Particle

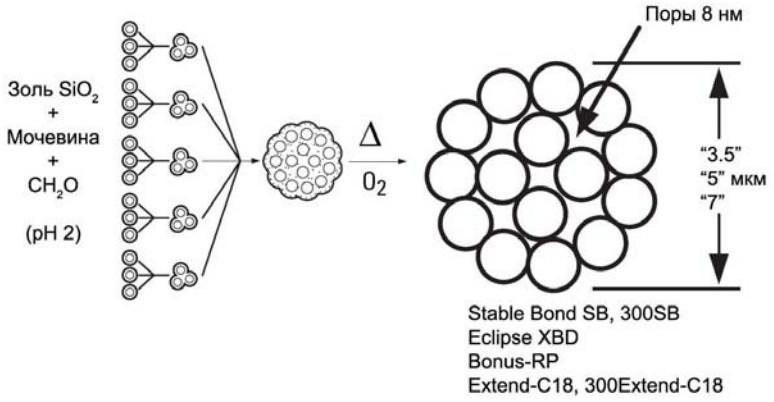


phenomenex ...breaking with tradition™

АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Синтез объемно-пористого силикагеля

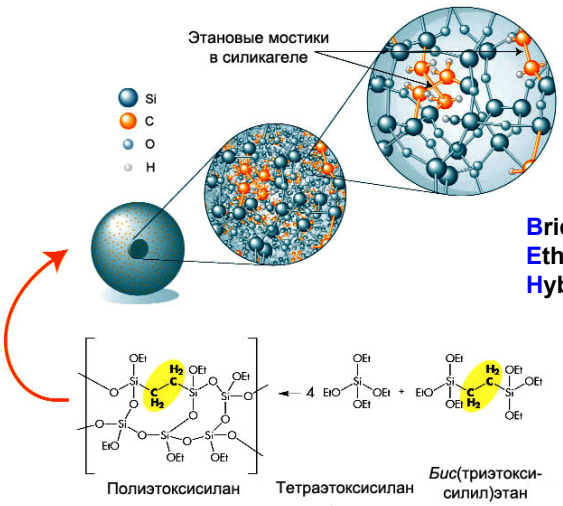
Технология Zorbax®



АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Синтез объемно-пористого силикагеля

технология ACQUITY UPLC (Waters)

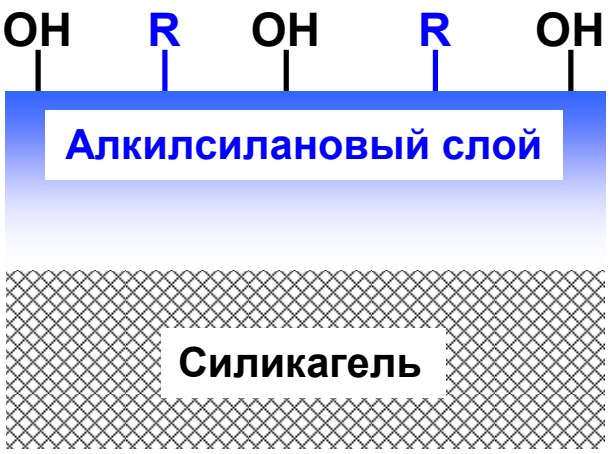


BEH:
Bridged
Ethyl-siloxane
Hybrid

АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

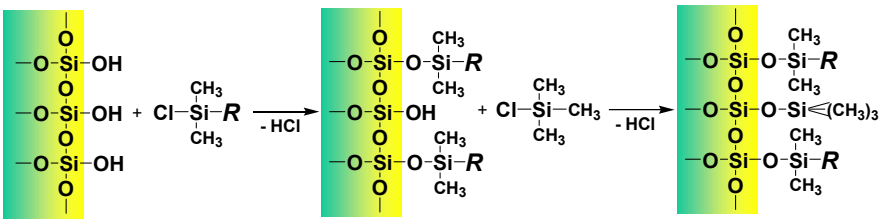
Объемно-пористый силикагель

Kromasil® Eternity™ *(AkzoNobel)*



АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Синтез привитых мономерных фаз

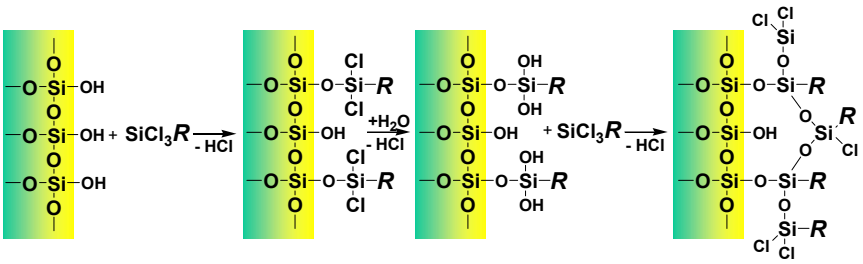


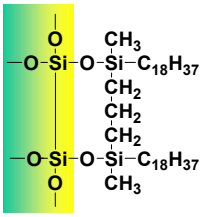
Присоединение функциональной группы *R*

Инактивация оставшихся силанолов (*"endcapping"*)

АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Синтез привитых полимерных фаз

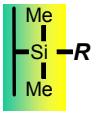




Bidentate C18
(Zorbax Extend-C18)

НЕПОДВИЖЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Привитые обращенные фазы на основе силикагеля



Фаза	*R*	Назначение
C18 RP18 Octadecyl ODS	$-CH_2(CH_2)_{16}CH_3$	Универсальная фаза с высокой емкостью. Разделение гидрофильных веществ методом ион-парной хроматографии.
C8 RP8 Octyl	$-CH_2(CH_2)_6CH_3$	Универсальная фаза со средней емкостью. Разделение липофильных веществ.
C4 Butyl	$-CH_2(CH_2)_2CH_3$	Разделение белков и пептидов методом обращенно-фазовой и гидрофобной хроматографии.
C1	$-(CH_3)_3$	Фаза с очень низкой емкостью.
Phenyl	$-C_6H_5$	Фаза со средней емкостью.
Nitryl CN	$-CH_2CH_2CH_2-CN$	Фаза с низкой емкостью.
Nitro NO_2	$-CH_2CH_2CH_2-NO_2$	Фаза с низкой емкостью; селективна к ароматическим соединениям.

НЕПОДВИЖЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Привитые обращенные фазы на основе силикагеля

Какие обращенные фазы использовать?

Результаты опроса журнала LC-GC (2009 г.)

C18	- 81%
C8	- 6%
C4	- 3%
C1/C2	- 1%
Phenyl	- 5%
Cyano	- 2%
Другие	- 3%

НЕПОДВИЖЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Обращенные фазы на основе силикагеля

Nucleosil 100-5 C18; Nucleosil 100-5 C18 PAH; Nucleosil 100-5 C18 AB
LiChrosorb RP18; LiChrospher RP8
Zorbax ODS

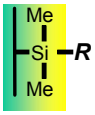
Количество ковалентно связанного углерода:
- 2-3.5 мкмоль/м^2
- 6-10% для фаз C8
- 12-17% для фаз C18
- 18-25% для полимерных фаз

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

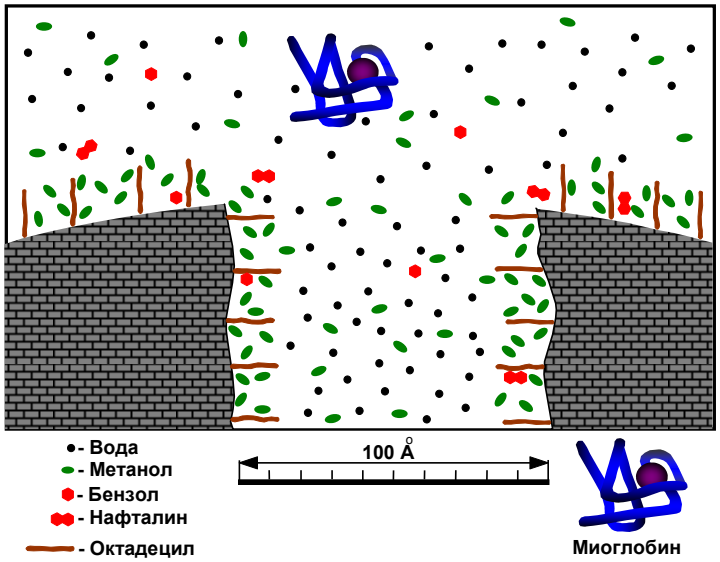
Привитые фазы на основе силикагеля



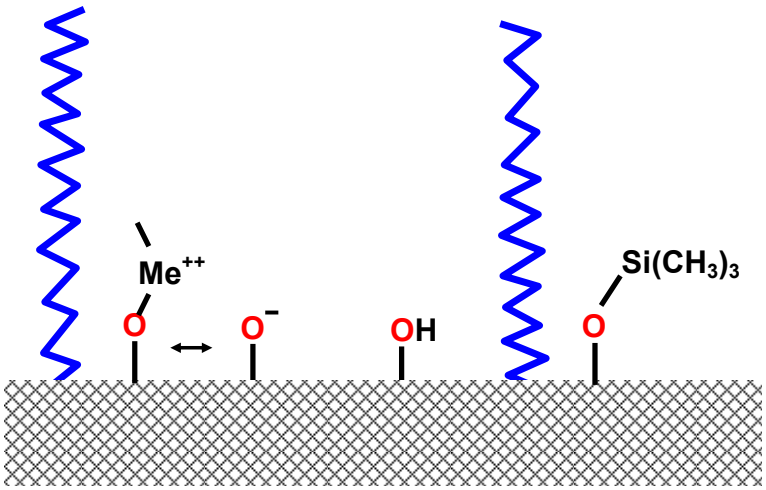
ПРИВИТЫЕ ФАЗЫ

Фаза	*R*	Назначение
Amino NH_2	$–CH_2CH_2CH_2–NH_2$	Разделение веществ методом нормально-фазовой и анионообменной хроматографии. Разделение сахаров.
Diol OH	$–CHOHCH_2–OH$	Эксклюзионная хроматография белков.
SA	$–CH_2CH_2CH_2–C_6H_4SO_3^-$	Сильный катионообменник.
SB	$–CH_2CH_2CH_2–N^+(CH_3)_3$	Сильный анионообменник.

ФАЗА "С18" ПОД МИКРОСКОПОМ



ФАЗА "С18" ПОД МИКРОСКОПОМ

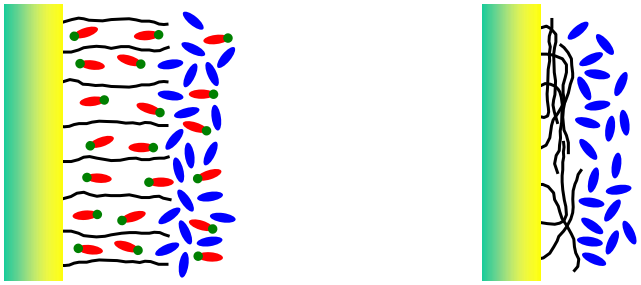


ФАЗА "С18" ПОД МИКРОСКОПОМ

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: CH_3CN - KH_2PO_4 (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

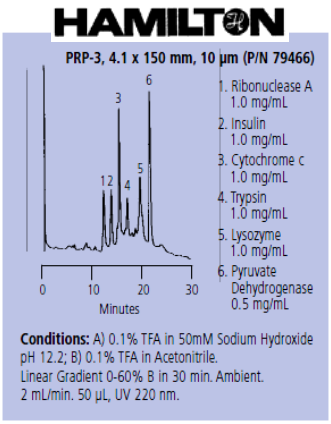
P - пиридин, ***N*** - *N,N*-диметиланилин, ***L*** - фенол,
B - 4-бутилбензойная кислота, ***T*** - толуол

Фактор удерживания k'

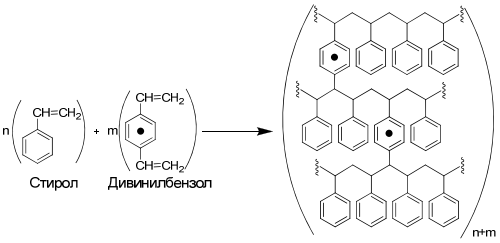
	0	1	2	3	4	5
Adsorbosphere UHS C18	P	L			NB	T=6.9
AltimaC18	P L		N	B	T	
KromasilC18	P L		N	B	T	
Luna C18	P L		N	B	T	
Spherisorb ODS-2	PL		NB	T		
Ultrasphere ODS	P L		N B	T		
YMC ODS-A	P L		N B	T		
Microsorb-MVC18	P LN			T		B=18.7
NucleosilC18AB	P L	N	B	T		
Vydac 201TP,C18	PL N BT					
Vydac 218TP,C18	PL NBT					
Partisphere C18	PL NBT					

НЕПОДВИЖЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Полистирол как обращенная фаза



Хроматография белков при pH 13

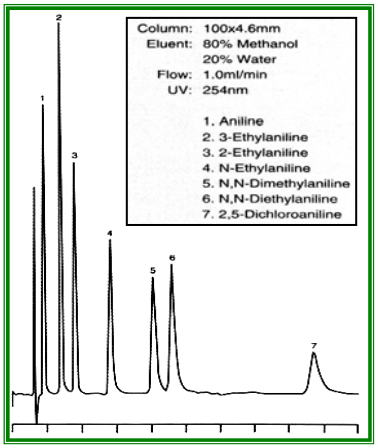


Фаза устойчива в диапазоне pH 1-13

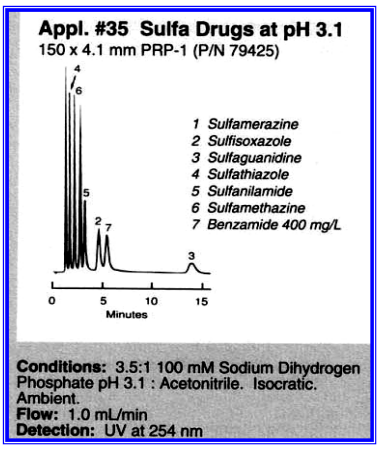
НЕПОДВИЖЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

"Несиликагельные" обращенные фазы

ГРАФИТ

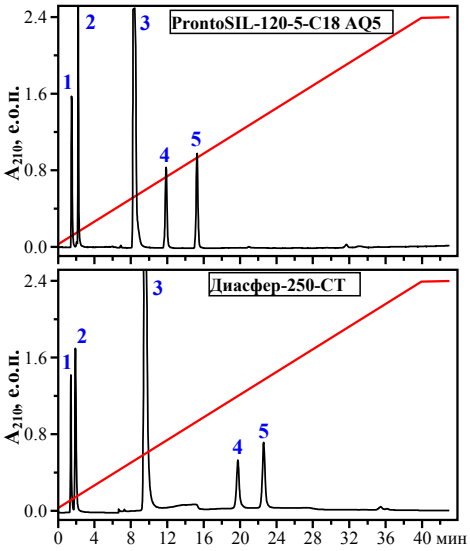


ПОЛИСТИРОЛ



НЕПОДВИЖЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Полистирол как обращенная фаза

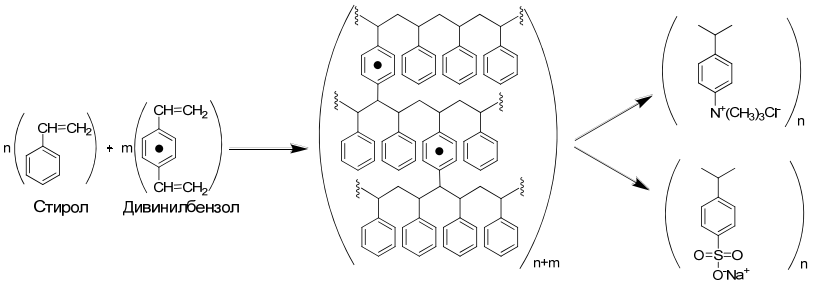


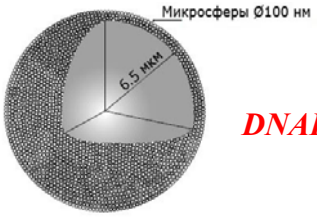
Колонки: 2x75 мм
Поток: 100 мкл/мин

1- Бромид-анион
2- Уридин
3- Кофеин
4- *м*-Нитроанилин
5- *п*-Нитроанилин

НЕПОДВИЖЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Ионообменики на основе полистирола





DNAPac PA-100 **(Dionex Co., США)**

ВЭЖХ для ВСЕХ

5. Подвижные фазы

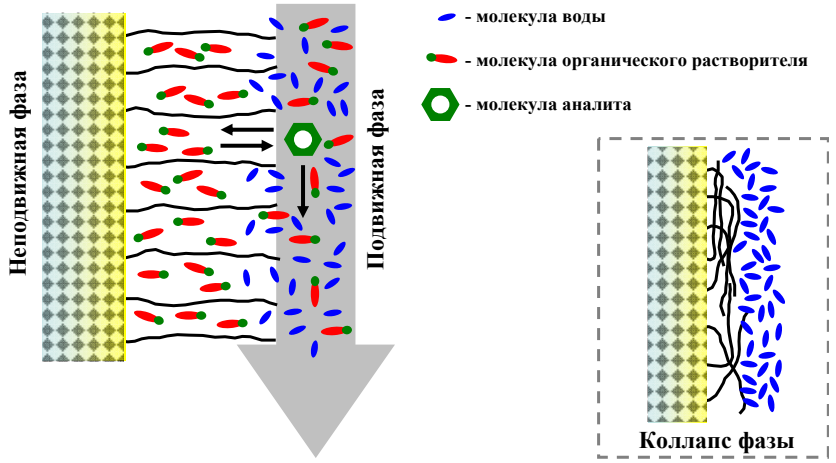
Новосибирск – 2011

ПОДВИЖНЫЕ ФАЗЫ ДЛЯ ВЭЖХ

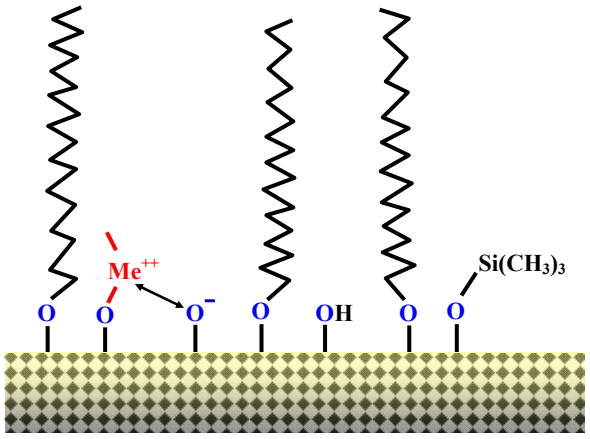
Важнейшее преимущество метода ЖХ перед ГХ:
возможность изменения селективности путем изменения состава подвижной фазы

Обращенно-фазовая, ионообменная, ион-парная, гидрофобная, эксклюзионная, хиральная...

ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ

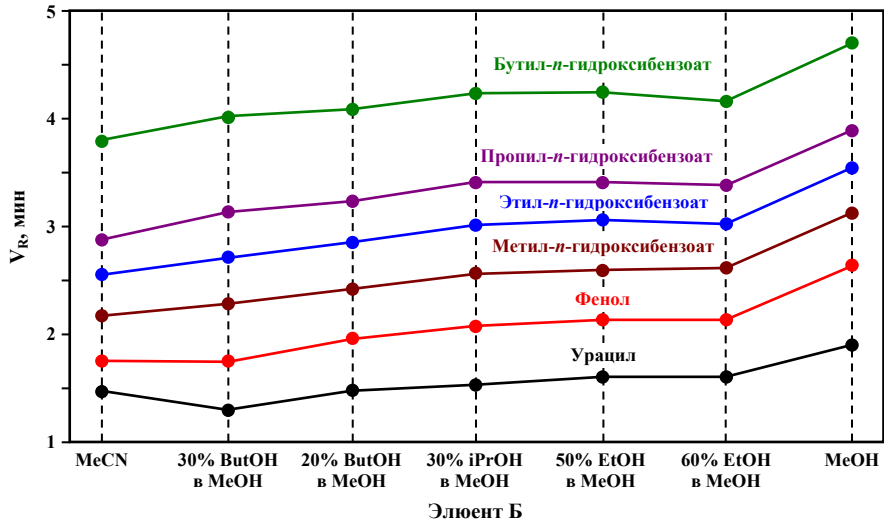


ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ

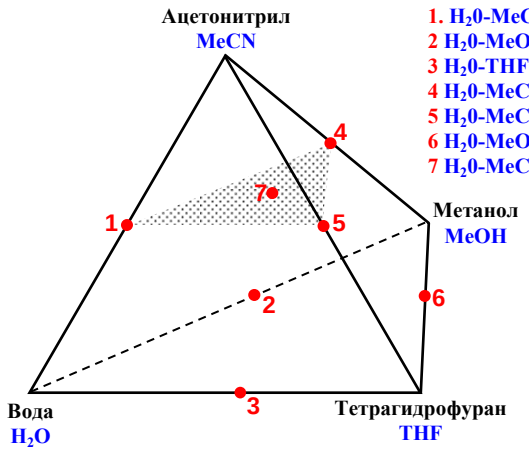


СРАВНЕНИЕ ПОДВИЖНЫХ ФАЗ

Хроматографический способ



СЕЛЕКТИВНОСТЬ И ОРГАНИЧЕСКИЙ РАСТВОРИТЕЛЬ

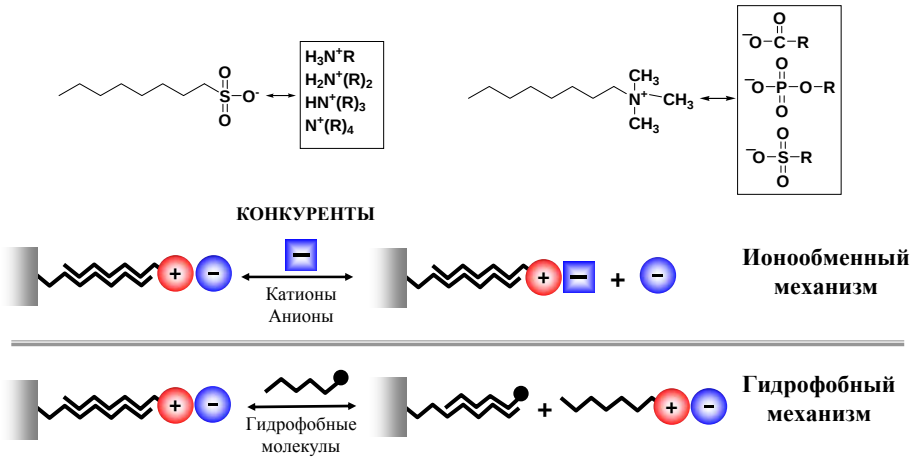


1. H_20-MeCN=1:1
2 H_20-MeOH=1:1
3 H_20-THF=1:1
4 H_20-MeCN-MeOH=2:1:1
5 H_20-MeCN-THF=2:1:1
6 H_20-MeOH-THF=2:1:1
7 H_20-MeCN-MeOH-THF=3:1:1:1

Dolan J.W. Selectivity in RP LC Separations, Part I: Solvent-Type Selectivity. *LC-GC North America, 2010, v.28, No.12, pp.1022-1027*

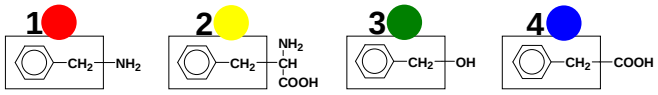
ХРОМАТОГРАФИЯ ИОНОВ НА ОБРАЩЕННОЙ ФАЗЕ

Ион-парная хроматография



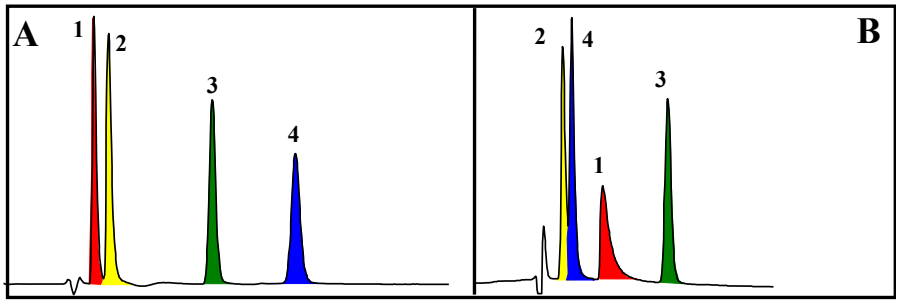
СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "С18"

I. Обращенно-фазовая ЖХ



H_2O - MeOH - H_3PO_4 (pH 2)

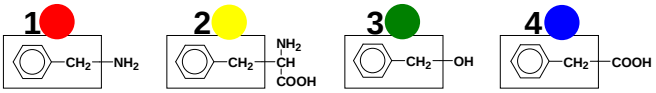
H_2O - MeOH - K_2HPO_4 (pH 7)



ЭкоНова'11

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "С18"

II. Ион-парная ЖХ

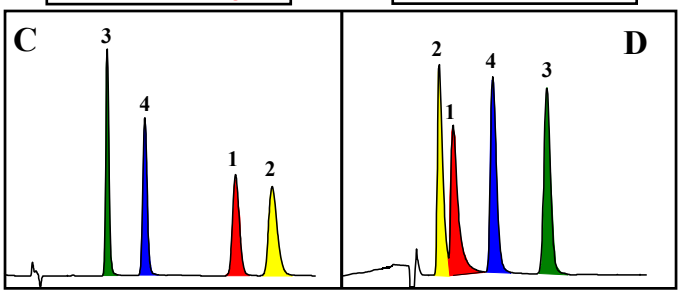


H_2O - MeOH - KH_2PO_4

$H_3C-(CH_2)_6-CH_2-S(=O)_2-O^-$

H_2O - MeOH - K_2HPO_4

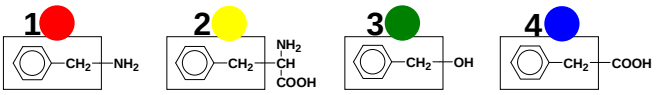
$H_3C-(CH_2)_6-CH_2-NH_3^+$



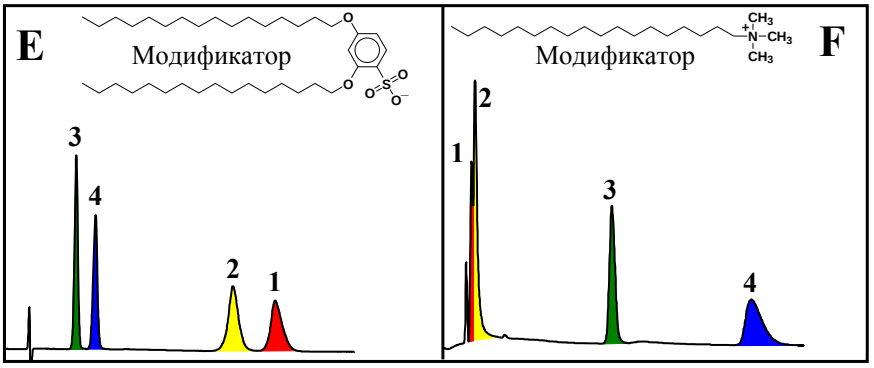
ЭкоНова'11

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ФАЗЫ "С18"

III. Ионообменная ЖХ



H_2O - K_2HPO_4 (pH 7)



ИОН-ПАРНЫЕ АГЕНТЫ

Гидрофобные анионы

Sodium 1,2-ethanedisulfonate
Sodium 1-decanesulfonate
Sodium 1-dodecanesulfonate
Sodium 1-heptanesulfonate
Sodium 1-hexadecanesulfonate
Sodium 1-hexanesulfonate
Sodium 1-nonanesulfonate
Sodium 1-octadecanesulfonate
Sodium 1-octanesulfonate
Sodium 1-pentanesulfonate
Sodium 1-propanesulfonate
Sodium 1-tetradecanesulfonate
Sodium 1-undecanesulfonate
Sodium 2-naphthalenesulfonate
Sodium 2-propanesulfonate
Sodium decyl sulfate
Sodium dodecyl sulfate
Sodium octyl sulfate

Трифторуксусная кислота (0.005-0.03 M)
Перфтормасляная кислота (0.005-0.01 M)
Муравьиная кислота (pH>4)
Уксусная кислота (pH>5)
Пропионовая кислота (pH>5)
Перхлораты лития и натрия (C>0.1 M)

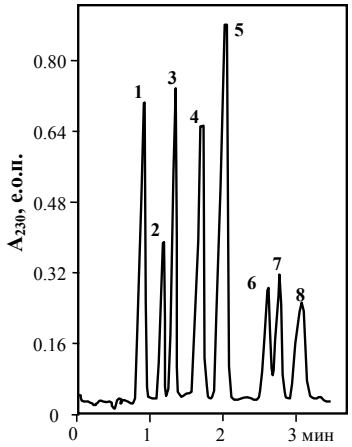
Chen Y., Mehok A.R., Mant C.T., Hodges R.S. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited. *J. Chromatogr. A, 1043 (2004) 9–18*

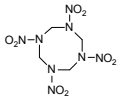
ИОН-ПАРНЫЕ АГЕНТЫ

Гидрофобные катионы

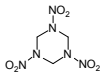
Tetrabutylammonium chloride
Tetrabutylammonium phosphate monobasic solution
Tetrabutylphosphonium bromide
Tetraethylammonium hydrogen sulfate
Tetraheptylammonium bromide
Tetrahexylammonium bromide
Tetrahexylammonium dihydrogen phosphate solution
Tetrahexylammonium hydrogensulfate
Tetrakis(decyl)ammonium bromide
Tetramethylammonium bisulfate
Tetramethylammonium bromide
Tetramethylammonium chloride
Tetramethylammonium sulfate
Tetraoctylammonium bromide
Tetrapentylammonium bromide
Tetrapropylammonium bisulfate
Tetrapropylammonium bromide

ИОН-ПАРНАЯ ВЭЖХ

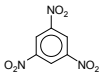




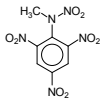
1. Октоген (150 нг)



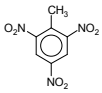
2. Гексоген (150 нг)



3. Тринитробензол (75 нг)

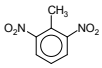


4. Тетрил (150 нг)

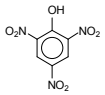


5. Тринитротолуол (75 нг)

6. 2,4-Динитротолуол (150 нг)



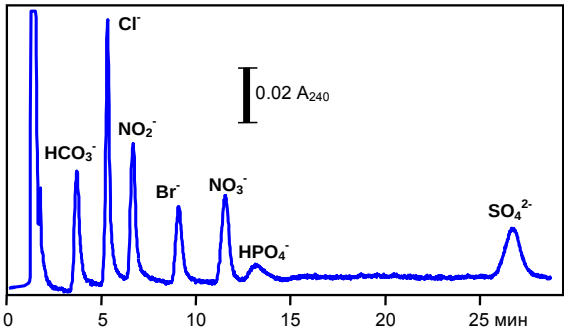
7. 2,6-Динитротолуол (150 нг)



9. Пикриновая кислота (150 нг)

Колонка: 2x64 мм, Eurosphere-80-5-C18
Элюент: CH_3OH : H_2O : 0.1 M $(But)_4N$ H_2PO_4, pH 6.8=50:40:10
Скорость потока: 280 мкл/мин
Давление: 5 МПа **Температура:** 45°C
Образец: 3 мкл раствора веществ в элюенте

ИОНООБМЕННАЯ ВЭЖХ



КОЛОНКА: **2x75 мм с Nucleosil 100-5 C18**
модификатор: бромид 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)

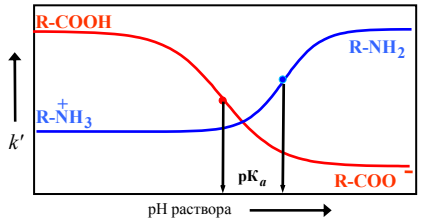
Г.И.Барам, А.Л.Верещагин, Л.П.Голобокова. *Ж.аналит. химии. 1999. Т.54. №9. С.962-965*

ХРОМАТОГРАФИЯ ИОНОВ НА ОБРАЩЕНОЙ ФАЗЕ

Слабые кислоты и основания

$$R-COOH \Leftrightarrow R-COO^- + H^+ \qquad R-N^+H_3 \Leftrightarrow R-NH_2 + H^+$$

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

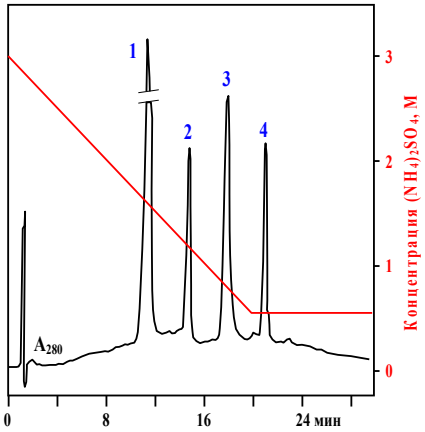


ХРОМАТОГРАФИЯ ИОНОВ НА ОБРАЩЕНОЙ ФАЗЕ

Буфер	pK_a	ΔpH
CF_3COOH, $HClO_4$	<<2	1.5-2.5
$NaHSO_4$ / H_2SO_4	1.2	1-2
KH_2PO_4 / H_3PO_4	2.12	1.1-3.1
HCOONa / HCOOH	3.8	2.8-4.8
CH_3COONa / CH_3COOH	4.8	3.8-5.8
CH_3COOH / NH_4OH	4.8 9.2	3.8-5.8 8.2-10.2
KH_2PO_4 / K_2HPO_4	7.21	6.2-8.2
Трис HCl / Трис	8.2	7.2-9.2
NH_4OH / NH_3	9.2	8.2-10.2
$N(C_2H_5)_3$ HCl / $N(C_2H_5)_3$	11.0	10-12

ИОННАЯ СИЛА ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

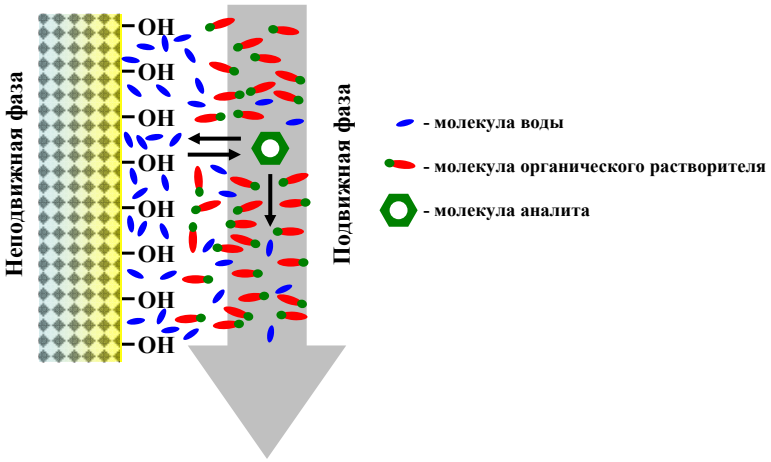
Гидрофобная хроматография
(Hydrophobic Interaction Chromatography)



Колонка: SUPELCOSIL LC-HINT
4.6x100 мм (5 мкм)
Элюенты: *A*- 3.0 M $(NH_4)_2SO_4$: 0.5 NH_4OAc
(pH 6.0, CH3COOH)
B- 0.5 M $(NH_4)_2SO_4$: 0.5 NH_4OAc
(pH 6.0, CH3COOH)
Градиент: 20 мин от 0 до 100% B
Поток: 1 мл/мин
Детектор: 280 нм
Проба: 10 мкл раствора
1- Цитохром С
2- Рибонуклеаза А
3- Овальбумин
4- α-Химотрипсиноген А

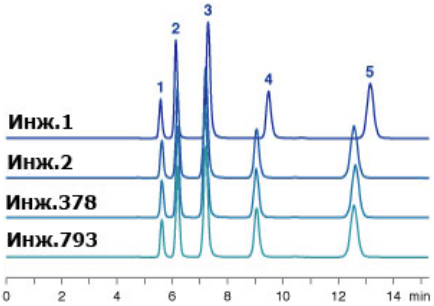
Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography (HILIC)

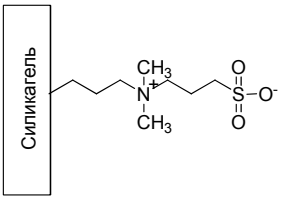
Гидрофильная хроматография



Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography (HILIC)

Гидрофильная хроматография





Колонка: 4x250 мм; Nucleodur-100-5 HILIC
Элюент: MeCN - 5 мМ CH_3COONH_4 (80:20)
Поток: 0.6 мл/мин
Температура: 25 °C
Детектор: УФ, 254 нм
Пики: 1- Тимин 2- Урацил 3- Аденин 4- Цитозин 5- Гуанозин

ЭкоНова'11

ВЭЖХ для ВСЕХ

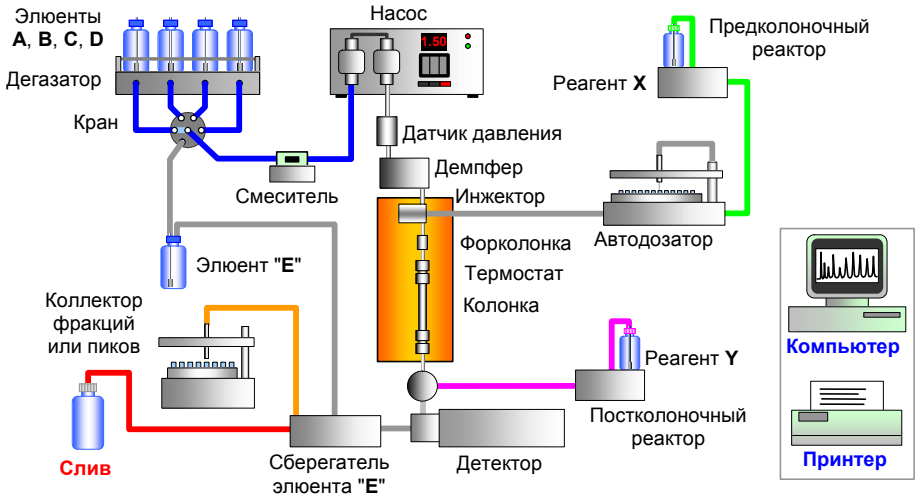
6. Аппаратура

Новосибирск –2011

ЭкоНова'11

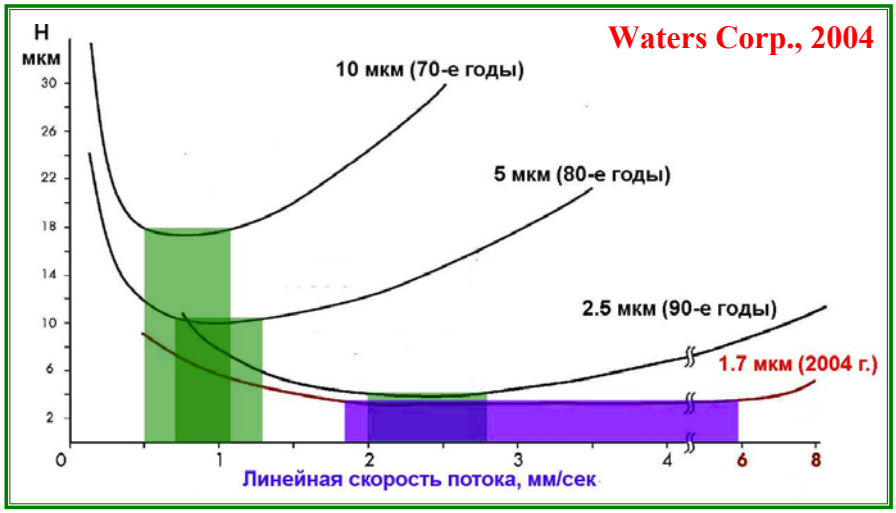
ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

Аналитический хроматограф



СКОРОСТЬ АНАЛИЗА

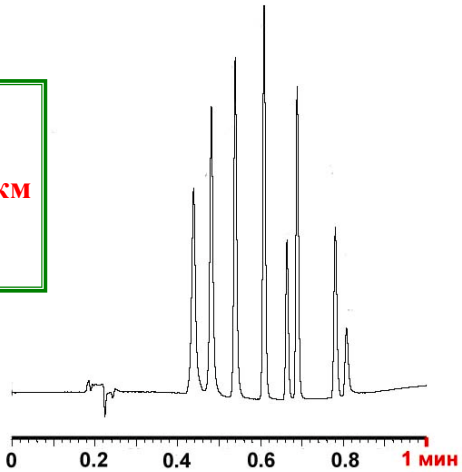
Уменьшение диаметра зерна адсорбента



СКОРОСТЬ АНАЛИЗА

Уменьшение диаметра зерна адсорбента

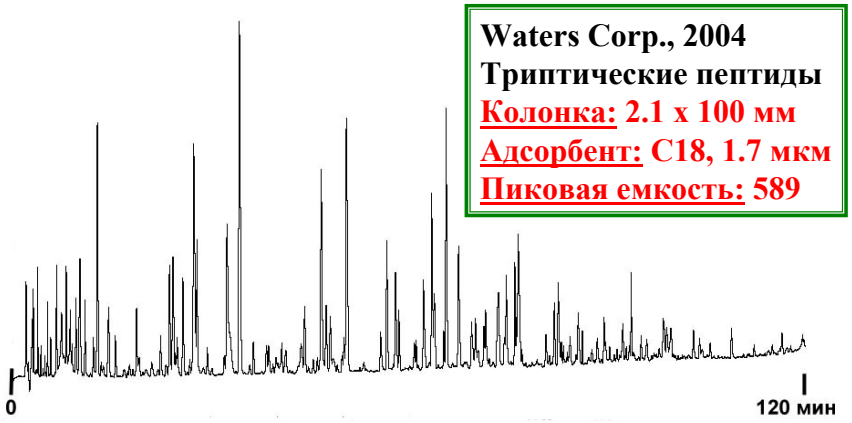
Waters Corp., 2004
Колонка: 2.1 x 50 мм
Адсорбент: C18, 1.7 мкм
Пиковая емкость: 54
Давление: 980 атм



ЭкоНова'11

СКОРОСТЬ АНАЛИЗА

Уменьшение диаметра зерна адсорбента



Waters Corp., 2004
Триптические пептиды
Колонка: 2.1 x 100 мм
Адсорбент: C18, 1.7 мкм
Пиковая емкость: 589

6-04

ЭкоНова'11

Waters Alliance HPLC System

Waters Corp.

6-05

ЭкоНова'11

Waters Breeze HPLC System (2001)

Waters Corp.

6-06

ЭкоНова'11

Waters AQUITY UPLC (2005)

The ACQUITY UPLC system and column.

Waters Corp.

6-07

ЭкоНова'11

Waters AQUITY UPLC/MS (2007)

Waters Corp.

6-08

ЭкоНова'11

Agilent 1200 Series

LC Systems and Modules

1100 - HPLC

1200 - UFLC

1290 - UPLC

Agilent Technologies

6-09

Agilent 1120 Compact LC

Isocratic with Integrated Dual-Channel Degasser

Gradient Pump with Integrated Dual-Channel Degasser

Manual Injector

Autosampler

Column Oven

Variable Wavelength Detector

Refractive Index Deterctor

Fluorescence Detector

Evaporative Light Scattering Detector

Agilent Technologies

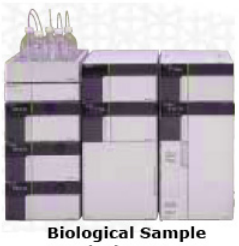
Prominance

Access to your success SHIMADZU

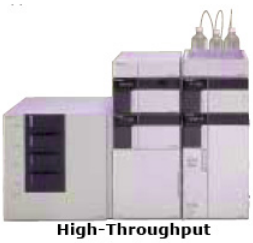
Isocratic System

Low-Pressure Gradient System

High-Pressure Gradient System



Biological Sample Analysis System



High-Throughput System

Dual High-Pressure Gradient System

Prominence *Nano*

Ultra High Pressure Liquid Chromatography X-LC

FLEXIBLE
Capable of UHPLC and conventional HPLC

MODULAR
Configure each system to meet individual requirements

JASCO, Inc.

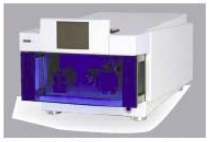
Hitachi, Ltd.

AKTA LC Systems

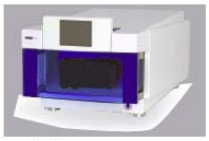
GE Healthcare
Amersham Biosciences AB

UPLC from Knauer

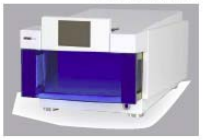
Ultra-fast PLATINblue



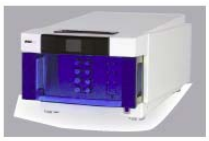
Ultra High Pressure Pump



Diode Array Detector

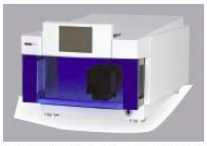


Column Temperature Manager



Modular Eluent Manager

Autosampler



Multiple Wavelength Detector

Хроматографы “Стайер”

Изократический

Базовые комплекты

Градиентный

Ионные хроматографы

АКВИЛОН

ЭкоНова'11

Хроматографы “Милихром”

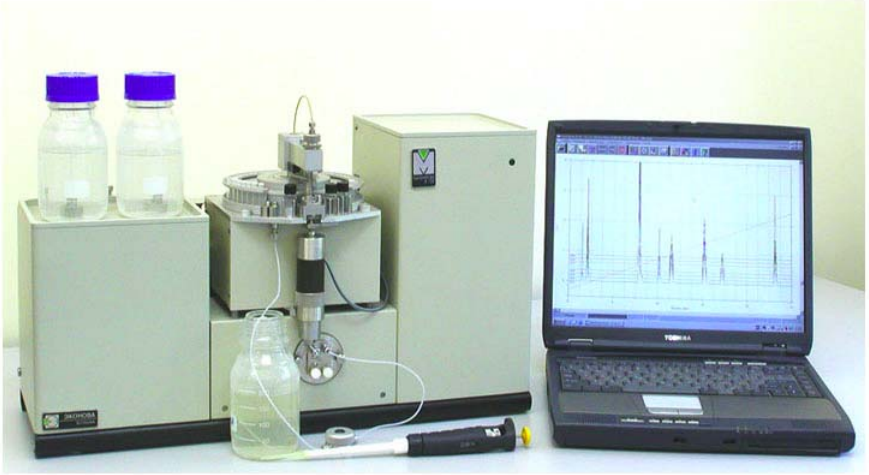
Жидкостный микроколоночный хроматограф "Милихром-5"

Жидкостный микроколоночный хроматограф "Милихром-6"

НАУЧПРИБОР

2011

Хроматограф “Милихром А-02”



ЭКОНОВА
ECONOVA

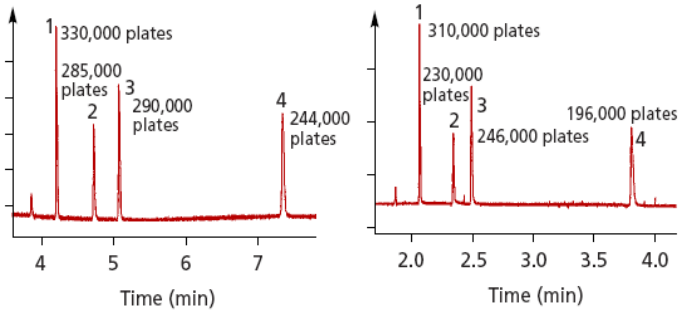
Хроматограф “Альфахром”

ЭКОНОВА
ECONOVA

SUHPLC

Колонка: ∅1 x 430 мм; d_P = 1 мкм

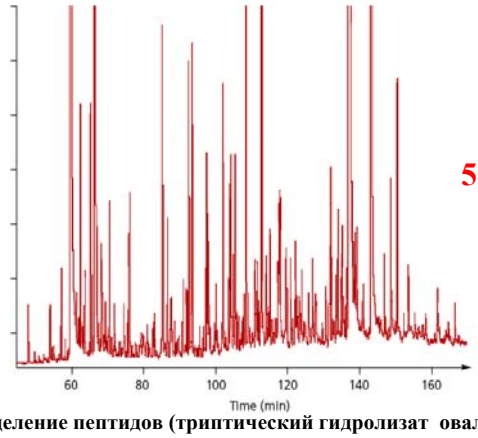
ΔP = 3000 атм **ΔP = 6900 атм**



Jerkovich A.D., Mellors J.S., Jorgenson J.W. *LC-GC North America. 2003. V.21*

SUPLC

Колонка: ∅1 x 380 мм; *C*18 (d_P = 1 мкм); *P*=3600 атм

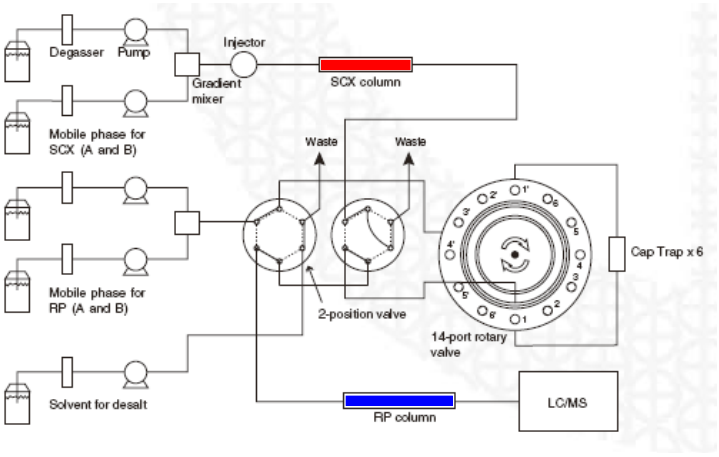


500 пиков (48-168 мин)

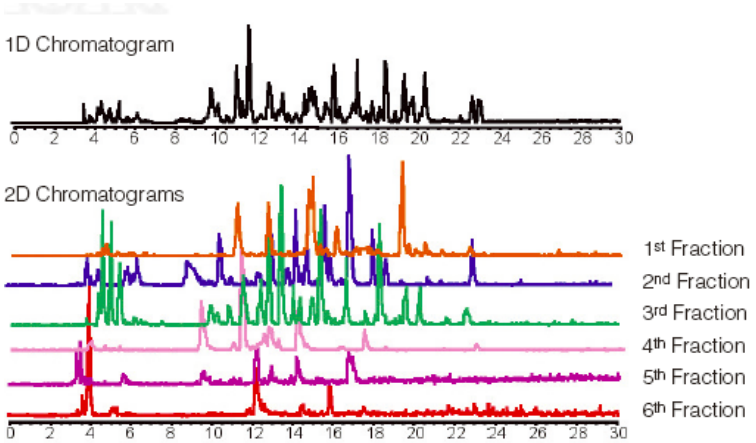
Разделение пептидов (триптический гидролизат овальбумина) в градиентном режиме.

Jerkovich A.D., Mellors J.S., Jorgenson J.W. ***LC-GC North America. 2003. V.21***

2D HPLC



2D HPLC – 2006

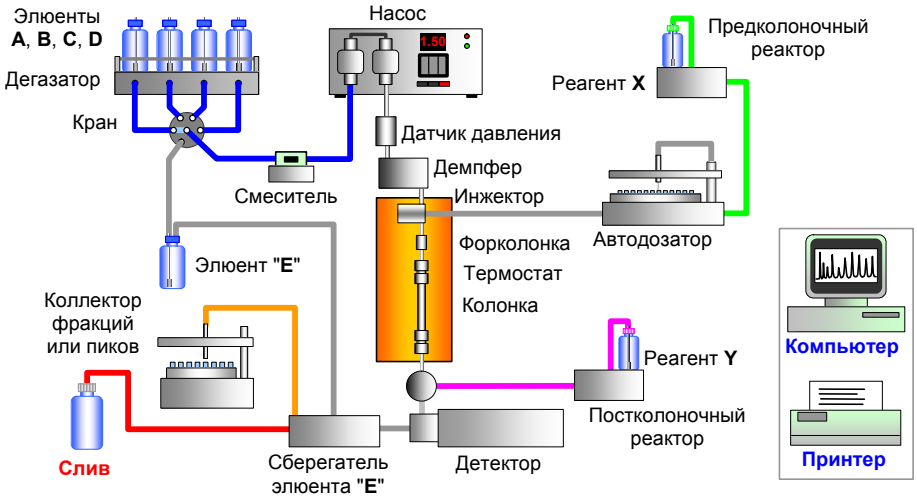


Analysis Example for a Trypsin Fragment of Proteins

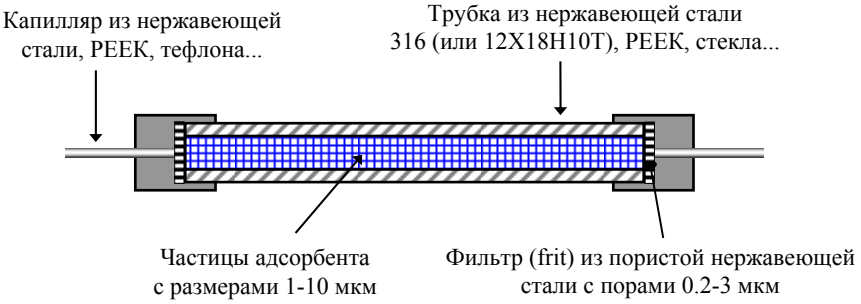
Takahashia N., Takahashia Y., Putnama F.W. *J. Chromatogr., 266 (1983) 511-522*

ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

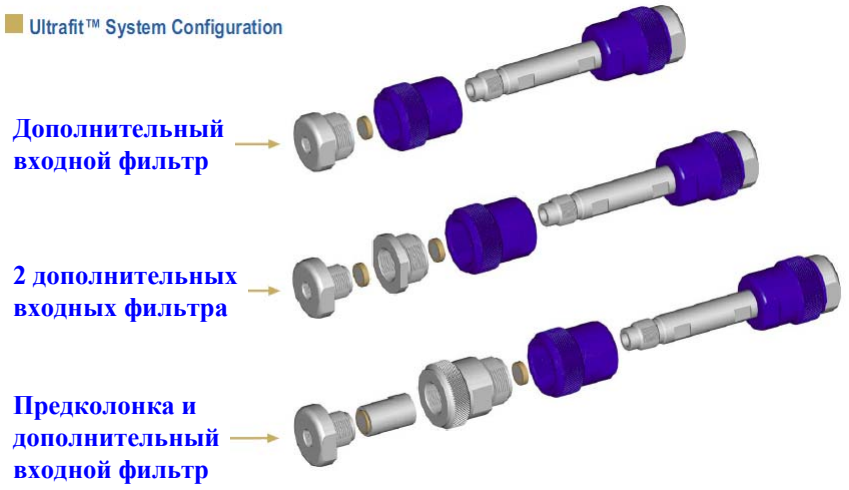
Аналитический хроматограф



КОЛОНКИ ДЛЯ ВЭЖХ



КОЛОНКИ ДЛЯ ВЭЖХ



ЭкоНова'11

КОЛОНКИ ДЛЯ ВЭЖХ

Good Laboratory Practice (GLP)

Waters Acquity UPLC Column

Waters

ЭкоНова'11

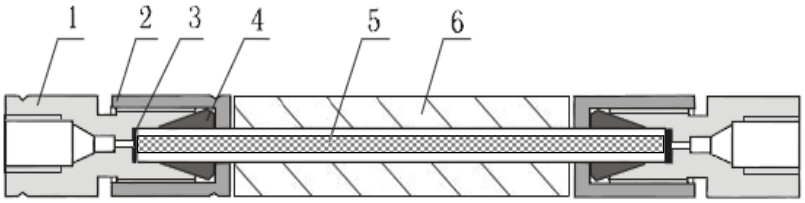
КОЛОНКИ ДЛЯ микро- и нано-ВЭЖХ

Колонка ∅0.3x50 мм

HotSep® nano-HPLC columns (100 and 75 µm)

КОЛОНКИ ДЛЯ ВЭЖХ

Колонка ∅2x75 мм ("Милихром А-02")

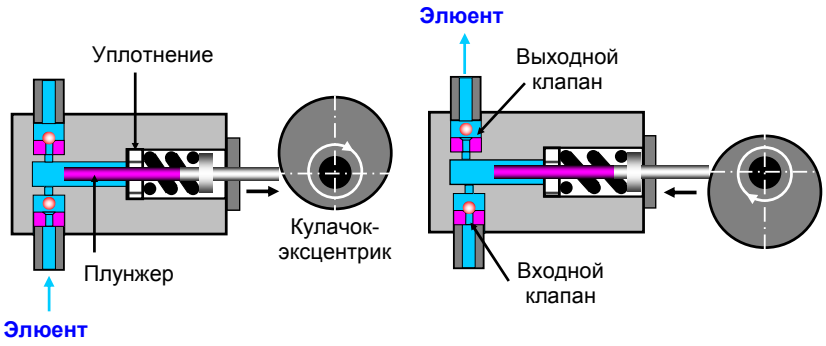


НАСОСЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Плунжерный насос

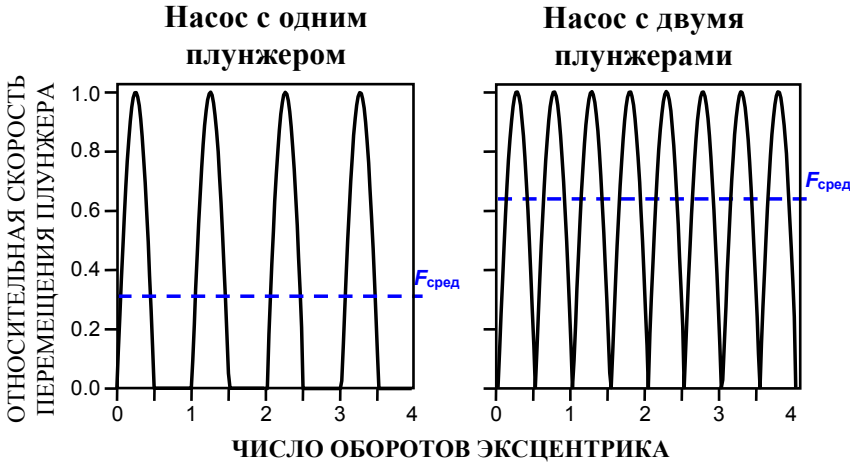
НАБОР В КАМЕРУ

ВЫДАВЛИВАНИЕ ИЗ КАМЕРЫ



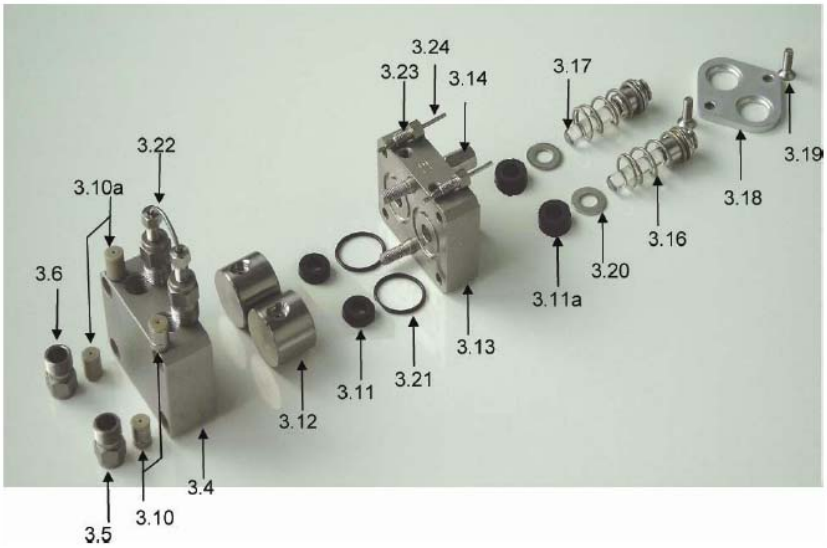
НАСОСЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Циклограмма плунжерного насоса



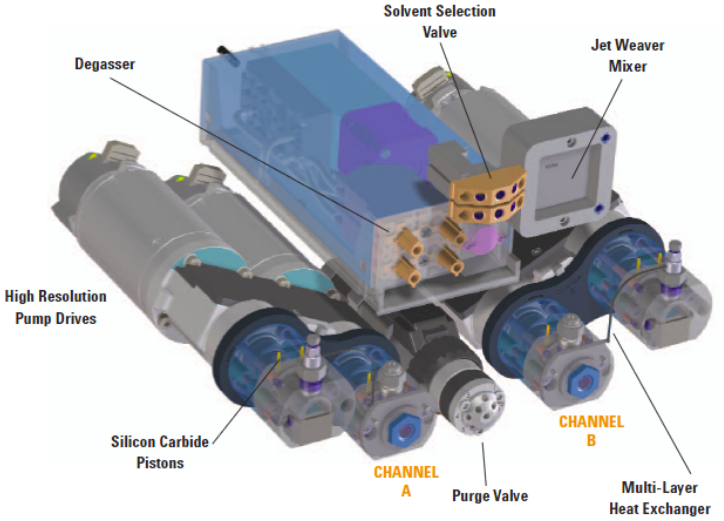
НАСОСЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Устройство головки плунжерного насоса



НАСОСЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Устройство плунжерного насоса *Agilent 1290 Infinity LC*



Isco Syringe Pumps

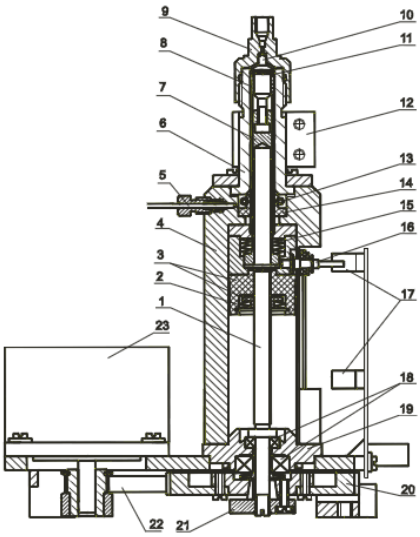
Model 65D Syringe Pump

Capacity: 67.97 mL
Flow range: 0.00001 – 25 ml/min
Flow accuracy: ± 0.3%
Replacement resolution: 2.5 nl/step
Motor stability: ± 0.001% per year
Pressure range: 0.7 - 1,390 bar
Standard pressure accuracy: 0.5% FS
Optional pressure accuracy: 0.1% FS
Wetted materials (standard): Nitronic 50
Graphite filled PTFE
TFE, Hastelloy C-276
inert polymers
Titanium
Gold
Dimensions (H x W x D): 103cm x 27cm x 45cm (pump only)
Weight: Pump unit – 33.2 kg
Controller – 2.96 kg

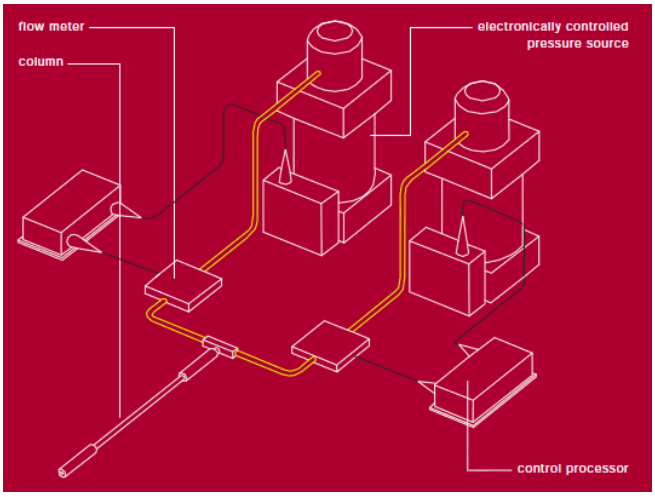
Isco, Inc.
www.isco.com

НАСОСЫ ДЛЯ ВЭЖХ

Шприцевый насос хроматографа "Милихром А-02"



НАСОС ДЛЯ *nano*-LC

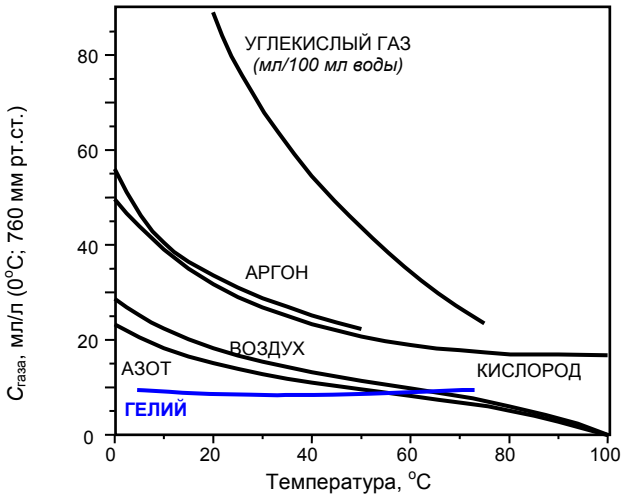


Скорость потока 20-1000 нл/мин

eksigent
rethinkHPLC

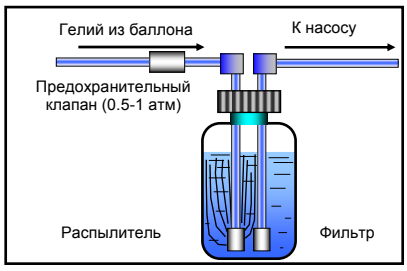
ДЕГАЗИРОВАНИЕ ЭЛЮЕНТОВ

Растворимость газов в воде

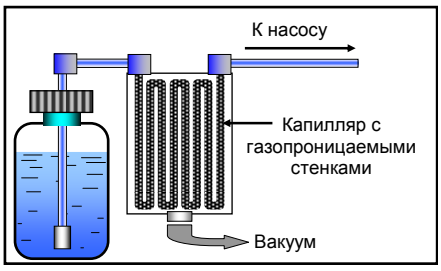


ДЕГАЗИРОВАНИЕ ЭЛЮЕНТОВ

Гелиевый дегазатор

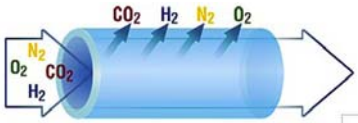


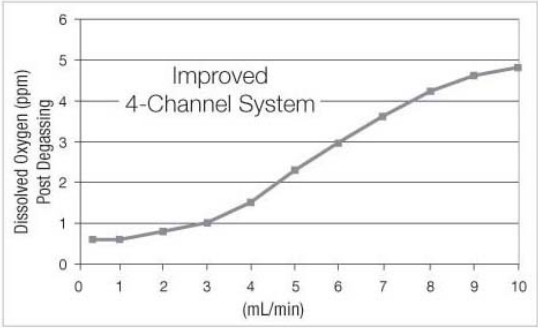
Вакуумный дегазатор



ДЕГАЗИРОВАНИЕ ЭЛЮЕНТОВ

Вакуумный дегазатор

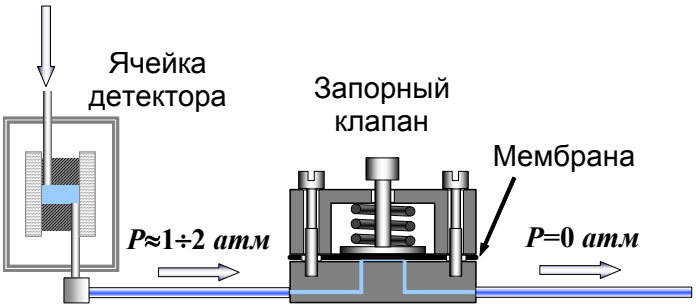




Water exposed to air at room temperature.
Degassex™ single-channel connection

ДЕГАЗИРОВАНИЕ ЭЛЮЕНТОВ

Детектирование при повышенном давлении

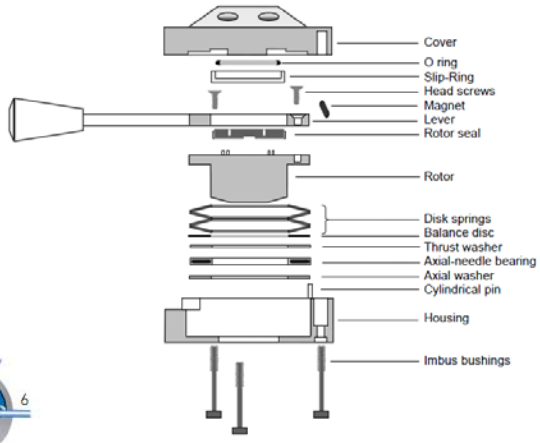


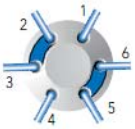
ДРУГИЕ СПОСОБЫ ДЕГАЗИРОВАНИЯ:

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

ИНЖЕКЦИЯ ОБРАЗЦА В КОЛОНКУ

Кран





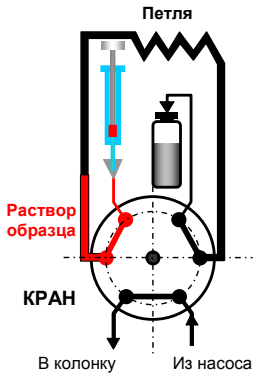
ИНЖЕКЦИЯ ОБРАЗЦА В КОЛОНКУ

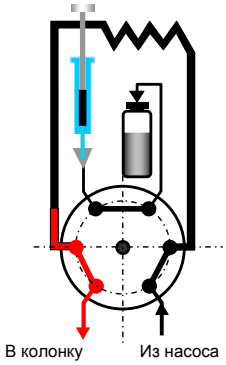
Кран

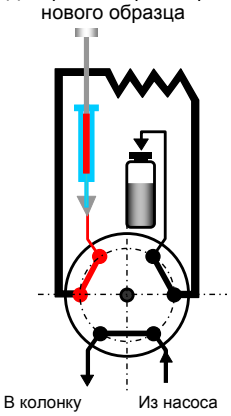
Дозирование раствора образца в петлю

Инжектирование раствора образца в колонку
Промывка крана

Дозирование раствора нового образца

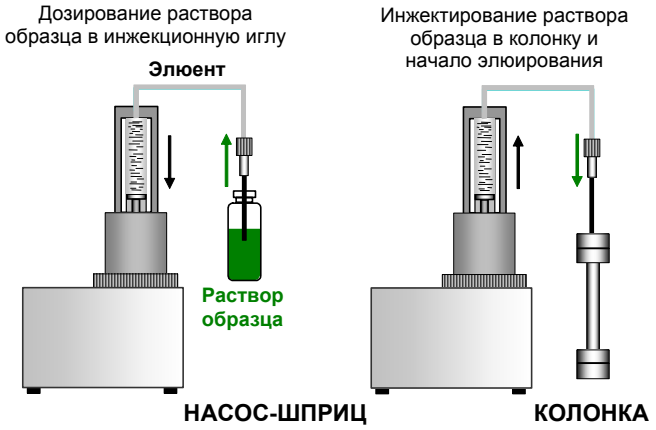






ИНЖЕКЦИЯ ОБРАЗЦА В КОЛОНКУ

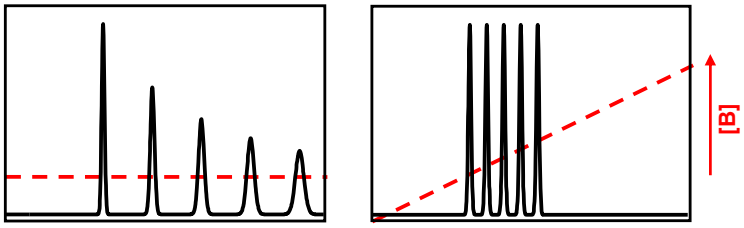
"Милихром"

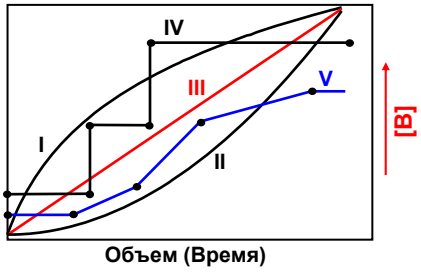


АВТОМАТИЧЕСКАЯ ИНЖЕКЦИЯ

Автодозатор (Autosampler)

ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ



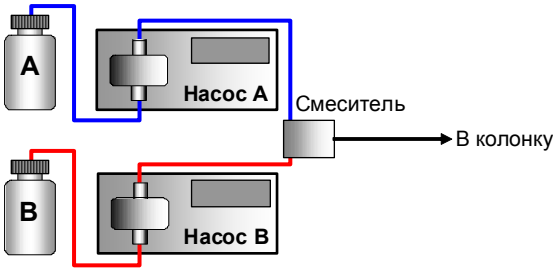


Градиенты концентрации "сильного" компонента "B" в двухкомпонентной подвижной фазе ("A" + "B")

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

ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

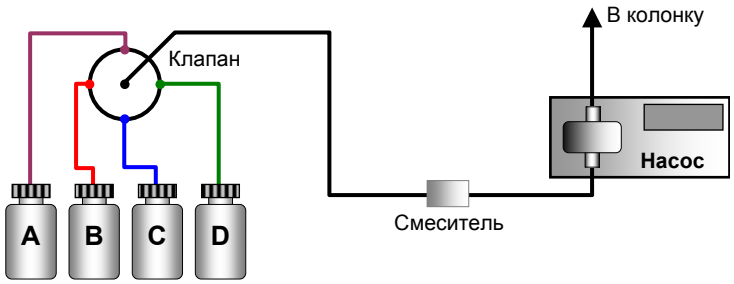
Формирование подвижной фазы при высоком давлении



$$F_A + F_B = F_{const}$$

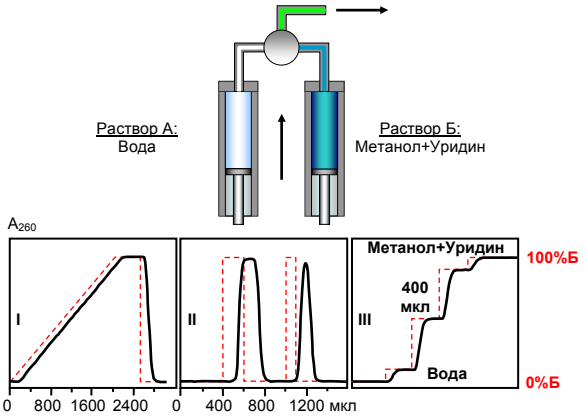
ГРАДИЕНТНОЕ ЭЛЮИРОВАНИЕ

Формирование подвижной фазы при низком давлении



ХРОМАТОГРАФ "МИЛИХРОМ А-02"

Градиентное элюирование



F=5÷1000 мкл/мин; $V_{макс}$=4800 мкл

ВНЕКОЛОНОЧНОЕ УШИРЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИОННЫХ ЗОН (ПИКОВ)

Эффективность колонки

$$N_K = \left(\frac{V_R}{\sigma_K}\right)^2$$

V_R - объем удерживания
σ_K - стандартное отклонение зоны

Эффективность хроматографа

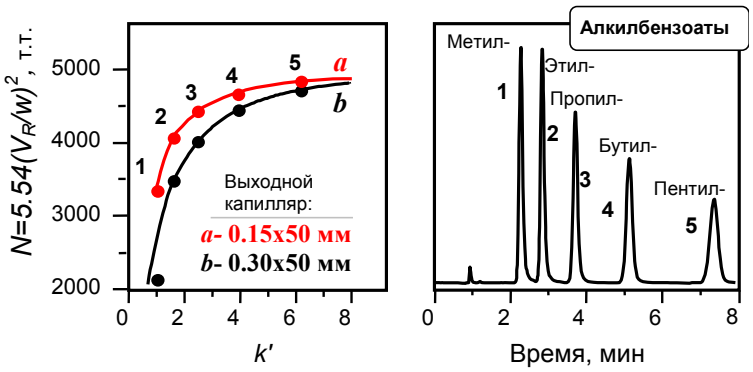
$$N_{XP} = \left(\frac{V_R}{\sqrt{\sigma_K^2 + \sigma_И^2 + \sigma_C^2 + \sigma_Д^2}}\right)^2$$

V_R - объем удерживания
$\sigma_И$ - стандартное отклонение зоны после инжектора
σ_C - стандартное отклонение зоны после соединительных капилляров
$\sigma_Д$ - стандартное отклонение зоны после детектора

ХРОМАТОГРАФ "МИЛИХРОМ А-02"

Внеколоночное уширение пиков

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

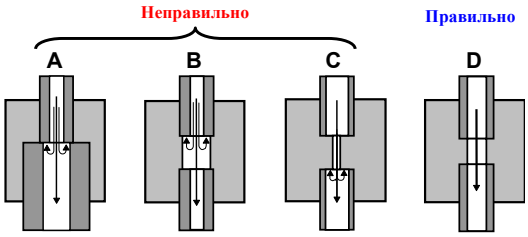


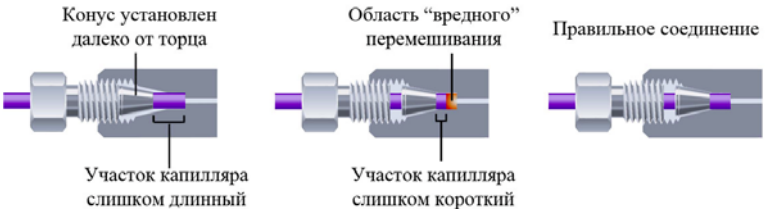
Для пика метилбензоата:

$W_{N=5000}$=21 мкл; $W_{N=3500}$=24 мкл; $W_{N=2100}$=32 мкл

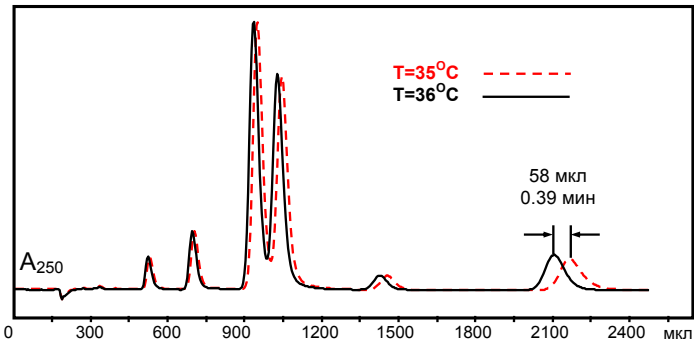
РАЗМЫВАНИЕ КОНЦЕНТРАЦИОННЫХ ЗОН

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**

В обращенно-фазовой хроматографии "чувствительность" удерживания в единицах k' при $k' \approx 10$ составляет до 0.1 на 1°C

ЭкоНова'11

ВЭЖХ для ВСЕХ

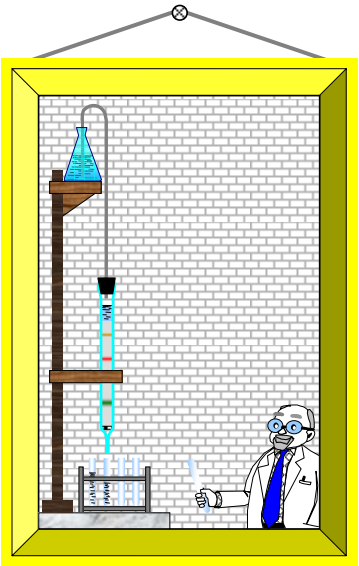
7. Детекторы

Новосибирск – 2011

ЭкоНова'11

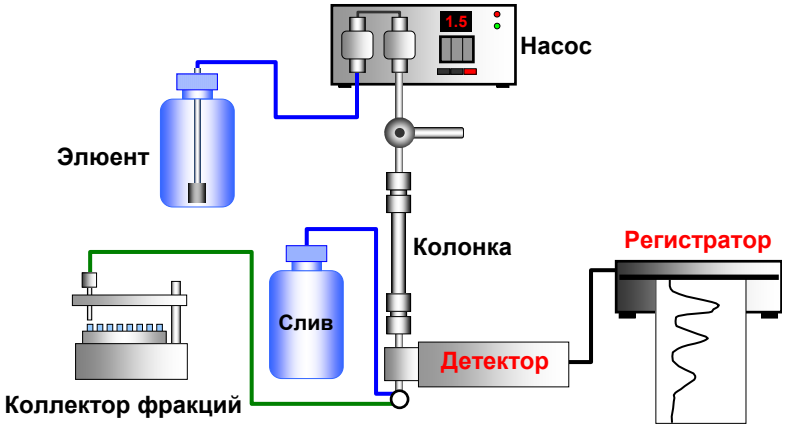
ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

1903-195... годы



ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ

Последние 50 лет



МЕТОДЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

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

... и другие

Сигнал=$f(C)$

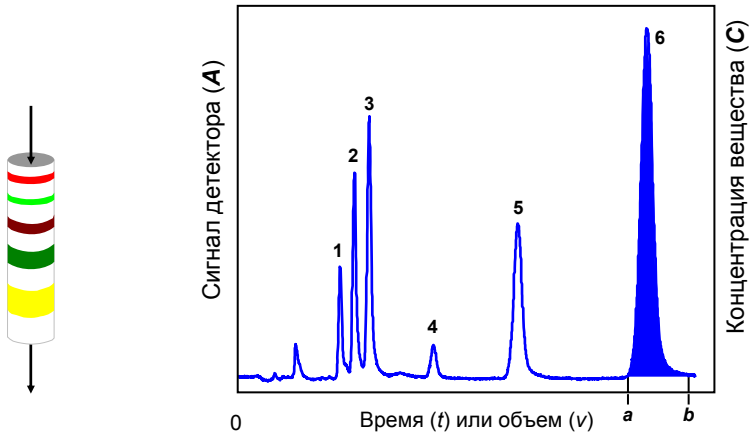
Сигнал=$k \cdot C$

ДЕТЕКТОРЫ В ВЭЖХ

L- линейный динамический диапазон
Q- типичная чувствительность

Детектор	L	Q	Градиентный режим
УФ-спектрофотометр	**10^4**	**нг-пг**	**да**
Кондуктометр	10^3	нг	нет
Рефрактометр	10^3	мкг	нет
Флуориметр	10^3-10^4	пг	да
Детектор по светорассеиванию	10^3	мкг-нг	да
Детектор заряда аэрозоля	10^4	нг	да
Электрохимический детектор	10^5	пг-фг	нет
Детектор радиоактивности	10^3	нг	да
Масс-спектрометр	10^3-10^4	пг	да

ХРОМАТОГРАММА



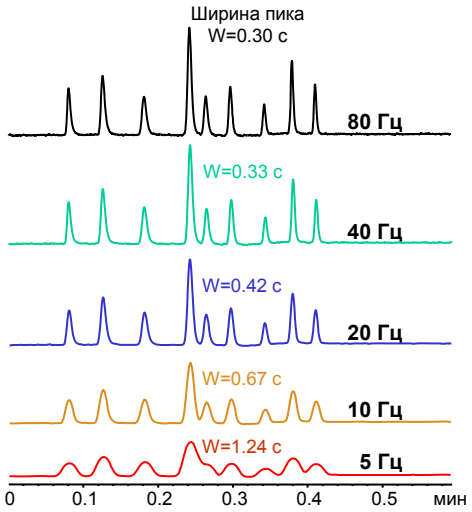
$$Q_6 = S_6 = \int_a^b C dv = \frac{\int_a^b A dv}{k}$$ - количество вещества **6** в пике

ХАРАКТЕРИСТИКИ ДЕТЕКТОРА

1. Селективность (*избирательность*)
2. Линейный диапазон (*A=k·C*)
3. Чувствительность (*шум сигнала*)
4. Быстродействие (*постоянная времени*)
5. Стабильность во времени (*дрейф сигнала*)
6. Потребительские характеристики:
   - *сложность эксплуатации*
   - *стоимость, включая расходные материалы*
   - *портативность*
   - ...

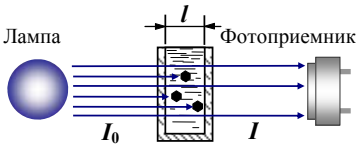
ХАРАКТЕРИСТИКИ ДЕТЕКТОРА

Быстродействие



Agilent Technologies

ФОТОМЕТРИЯ



Ячейка с раствором вещества с концентрацией C

Закон Бугера-Ламберта-Бера

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

<u>Пропускание</u> света (100 ⇒ 0%)

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

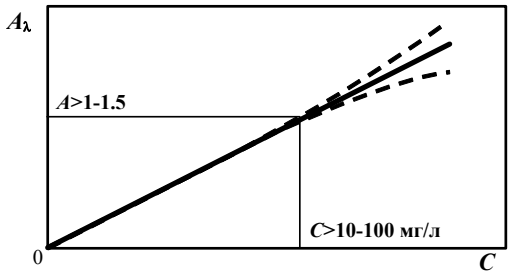
<u>Поглощение</u> света (0 ⇒ ∞)

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

Поглощение раствора вещества при длине волны λ прямо пропорционально концентрации вещества

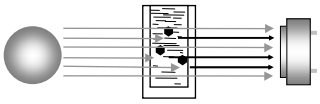
ФОТОМЕТРИЯ

Линейность

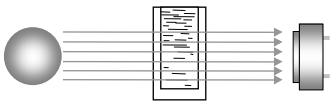


Измерение темнового тока

Измерение рассеяного света



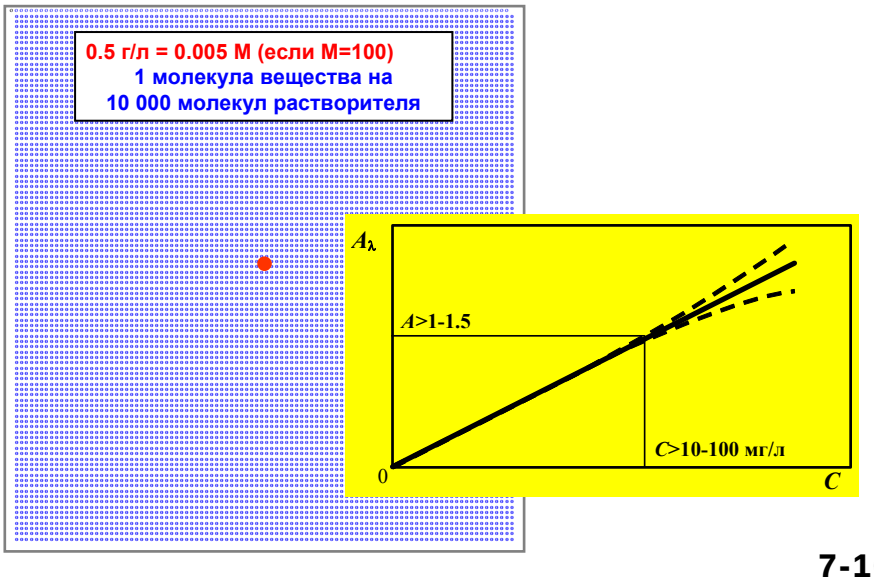
Измерение флуоресценции



Измерение поглощения элюента

ФОТОМЕТРИЯ

Линейность

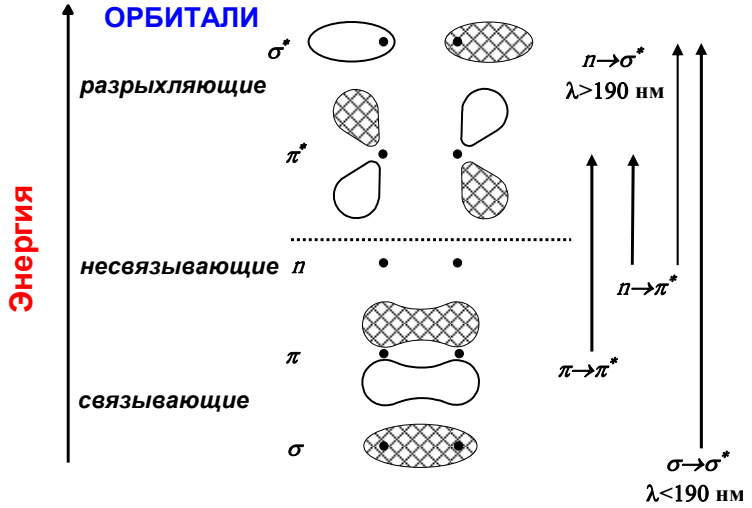


ЭЛЕКТРОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Область спектра электромагнитного излучения	Длина волны, нм	Электронный переход
Вакуумный ультрафиолет	<190	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
Ультрафиолетовая (UV)	190-360	$\pi \rightarrow \pi^*$ $n \rightarrow \pi^*$
Видимая (VIS)	400-800	$\pi \rightarrow \pi^*$ $n \rightarrow \pi^*$

УФ-ФОТОМЕТРИЯ

λ=190÷360 нм



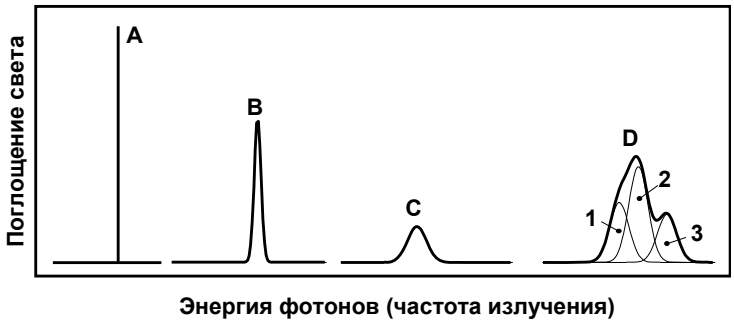
УФ-ФОТОМЕТРИЯ

Хромофоры

НАЗВАНИЕ	СТРУКТУРА	$\lambda_{макс}$, нм	$a_м$, $М^{-1}\cdot л\cdot см^{-1}$
Простой эфир	–O–	185	1000
Бромид	–Br	208	300
Иодид	–I	260	400
Амин	$–NH_2$	195	2800
Тиол	–SH	195	1400
Дисульфид	–S–S–	255	5500
Оксим	–N–OH	190	5000
Азидо-	>C=N–	190	5000
Этилен	>C=C<	190	8000
Кетон	>C=O	195	1000
Сложный эфир	–COOR	205	50
Альдегид	–CHO	210	Большая величина
Карбоксил	–COOH	200-210	50-70
Сульфоксид	>S→O	210	1500
Нитро-	$–NO_2$	210	Большая величина
Нитрит	–O–N=O	220-230	1000-2000
Азо-	–N=N–	285-400	2-25
Нитрозо-	–N=O	302	100
(ациклическая)	$–(C=C)_2–$	210-230	21000
(ациклическая)	$–(C=C)_4–$	300	52000
(ациклическая)	$–(C=C)_5–$	330	118000

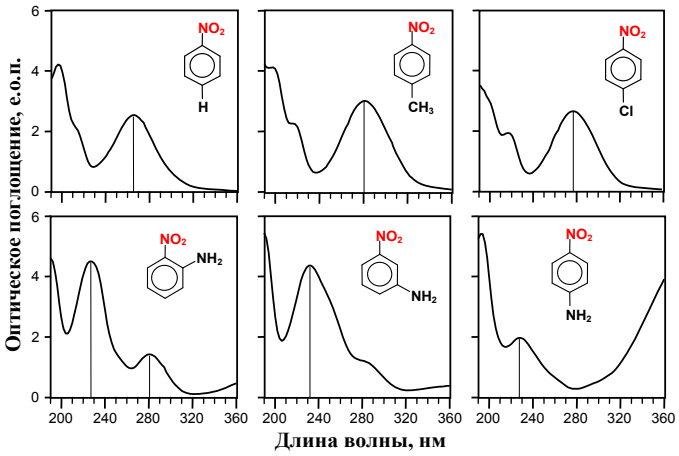
ЭЛЕКТРОННАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

Спектр



A- моноэнергетическая спектральная линия поглощения атома.
B- спектральная одноэлектронная полоса поглощения молекулы.
C- спектральная одноэлектронная полоса поглощения молекулы, уширенная в результате внутри- и межмолекулярных взаимодействий.
D- спектральная кривая (спектр вещества) как сумма трех полос поглощения **1**, **2** и **3**.

УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ



Концентрация вещества: 0.04 мг/мл
Растворитель: $[CH_3CN]:[H_2O]:[1\ M\ CH_3COONa,\ pH\ 5.5]=100:100:1$
Спектрофотометр: детектор хроматографа "Милихром А-02"

УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ

Растворители для диапазона длин волн 190-350 нм

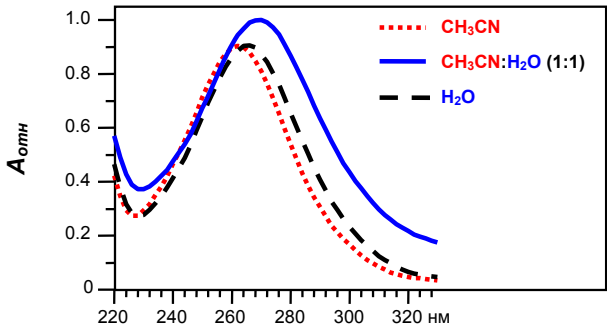
1. Вода (190-350 нм)
2. Метанол, этанол, пропанол, изопропанол (200-350 нм)
3. Ацетонитрил (190-350 нм)
4. Тетрагидрофуран, диоксан (210-350 нм)
5. Ацетон (280-350 нм)

---

6. Хлороформ, хлористый метилен (250-350 нм)
7. Диэтиловый эфир (230-350 нм)
8. Пентан, гексан, гептан (200-350 нм)

УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ

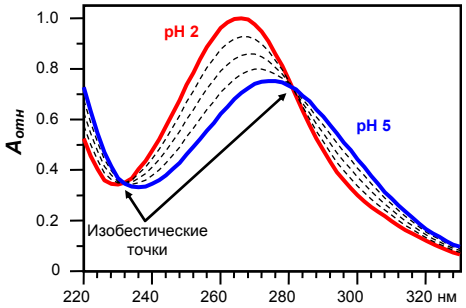
Влияние состава растворителя



Спектры растворов нитробензола, нормированные относительно спектра раствора в $CH_3CN:H_2O$ (1:1)

УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ

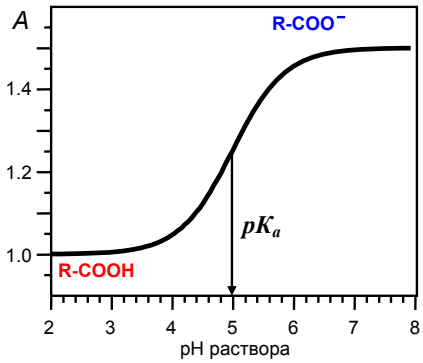
Влияние состава растворителя



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

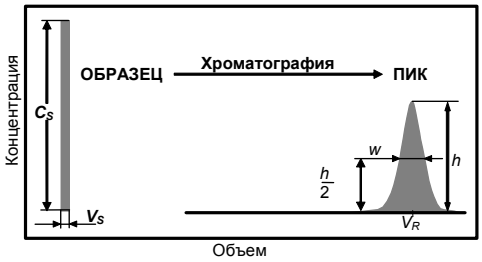
УФ-СПЕКТРОСКОПИЯ

Влияние состава растворителя



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

МАТЕРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС В ХРОМАТОГРАФИИ

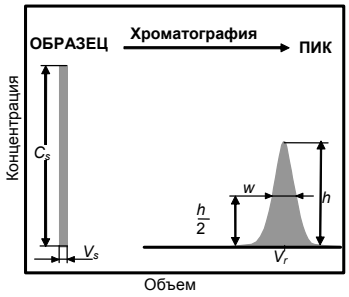


Количество вещества в образце равно количеству вещества в соответствующем ему хроматографическом пике

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

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:

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

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

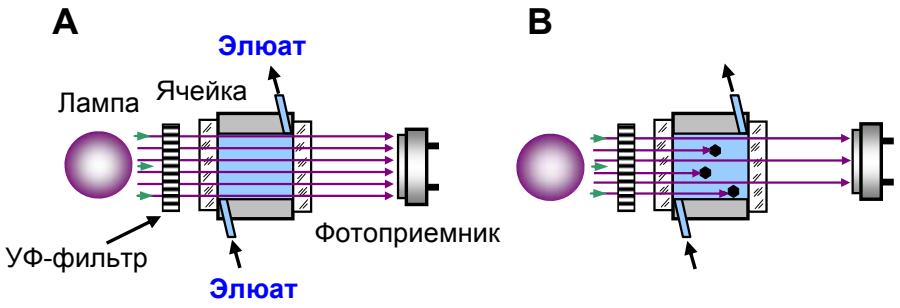
$$h = \frac{\varepsilon \cdot C_s \cdot l \cdot V_s \sqrt{N}}{V_0 \left(1 + k'\right) \sqrt{2\pi}}$$

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

A_s - поглощение раствора образца
h - высота пика в единицах оптической плотности
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

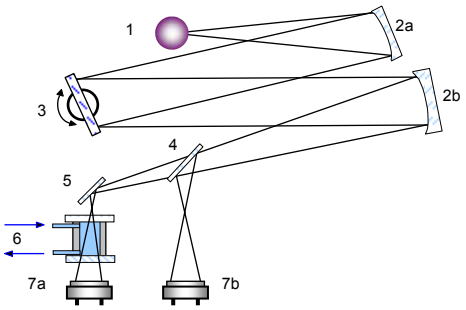
ДЕТЕКТОРЫ В ВЭЖХ

Фотометр с Hg-лампой низкого давления (λ=254 нм)



МНОГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

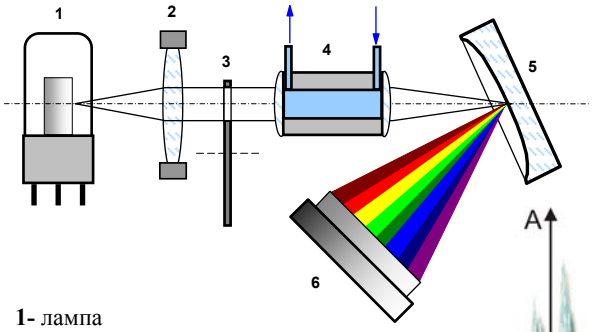
Двухлучевой спектрофотометрический детектор

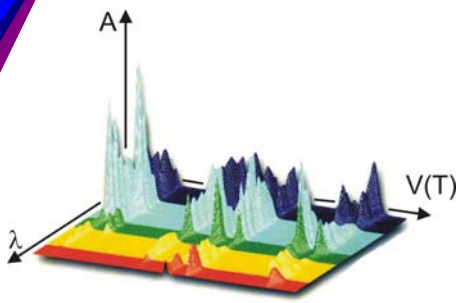


1- лампа
2- зеркала
3- поворачивающаяся дифракционная решетка
4- полупрозрачное плоское зеркало
5- плоское зеркало
6- проточная измерительная ячейка
7- фотоприемники

МНОГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Спектрофотометр с диодной линейкой (матрицей)

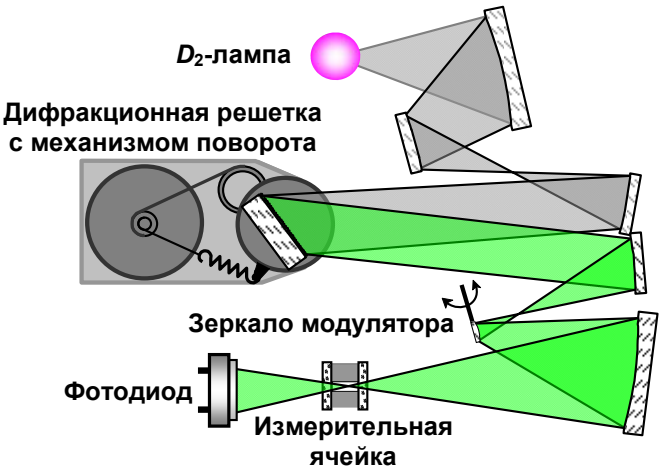




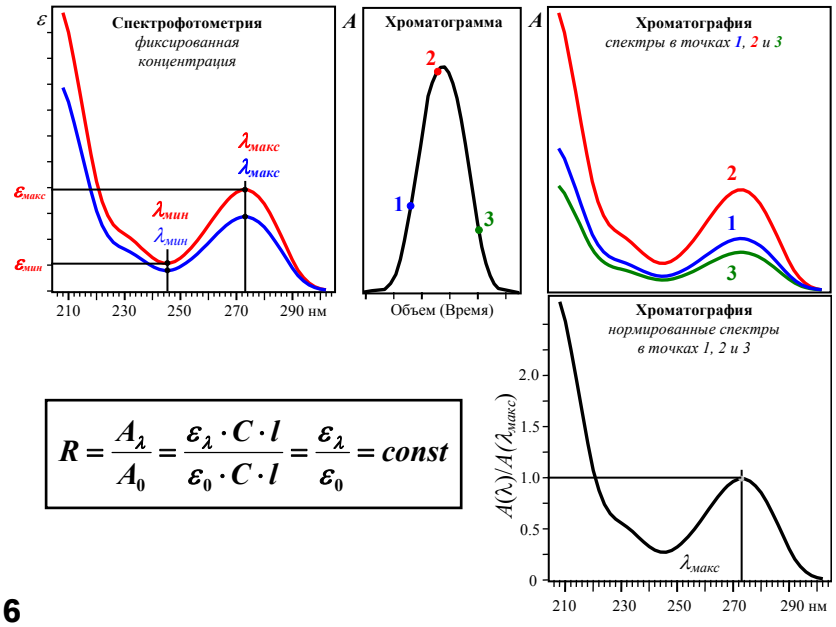
1- лампа
2- линза
3- заслонка, перекрывающая световой поток для измерения темнового тока
4- проточная измерительная ячейка
5- дифракционная решетка
6- линейка (матрица) фотодиодов

МНОГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Спектрофотометрический УФ-детектор хроматографа "Милихром А-02"



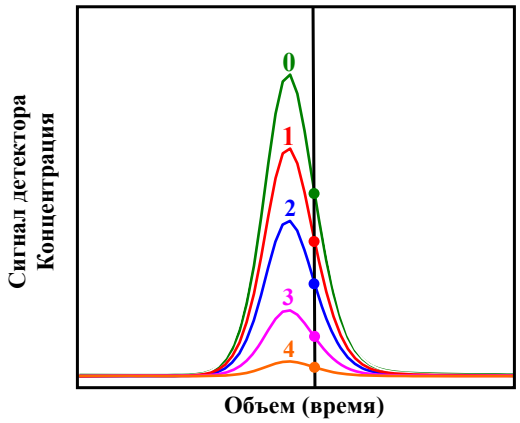
СРАВНЕНИЕ СПЕКТРОВ



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

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

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

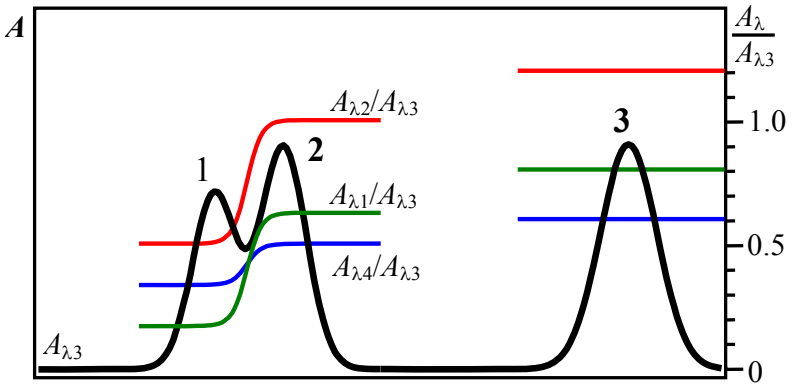


Для гомогенного пика

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

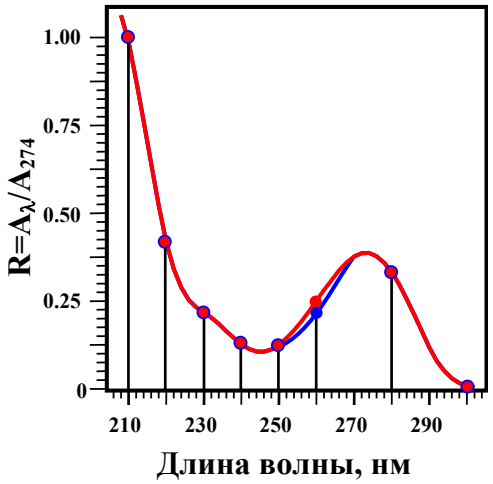
МНОГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Правильность анализа



МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Фотометрическая детекция при 8 λ



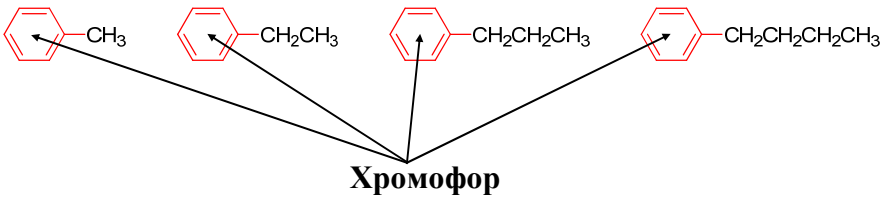
МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Ограничение: интервал значений R=(0±1)

Погрешность R:		0.1	0.05	0.02
N	A_N/A_0	Количество разрешенных веществ (D)		
2	1	10^1	$2\cdot10^1$	$5\cdot10^1$
3	2	10^2	$4\cdot10^2$	$2.5\cdot10^3$
4	3	10^3	$8\cdot10^3$	$1.3\cdot10^5$
5	4	10^4	$1.6\cdot10^5$	$6.3\cdot10^6$
6	5	10^5	$3.2\cdot10^4$	$3.1\cdot10^8$
7	6	10^6	$6.4\cdot10^7$	$1.6\cdot10^{10}$
8	7	10^7	$1.3\cdot10^9$	$7.8\cdot10^{11}$

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Недостаток: неразличимость спектров многих гомологов



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 $Q=10^{11}$

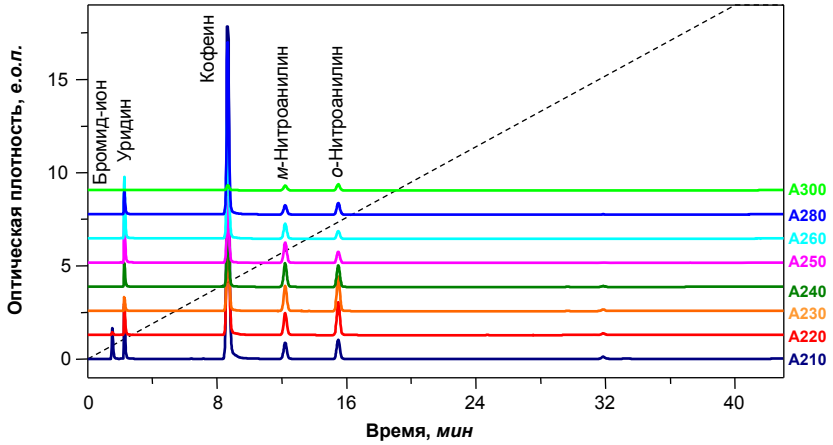
СРАВНЕНИЕ ДЕТЕКТОРОВ

ВЭЖХ на фазе С18
(данные по 48 хроматографам "Милихром А-02")

Спектральные отношения бенз(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: ∅2x75 мм; ProntoSIL-120-5-C18
Элюент А: 0.2 М $LiClO_4$-0.005 М $HClO_4$
Элюент Б: Ацетонитрил
Градиент: 40 мин от 5-100% Б; 10 мин 100% Б
Скорость потока: 100 мкл/мин
Температура: 40°С
λ_1-λ_8: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм
Проба: 4 мкл

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФА

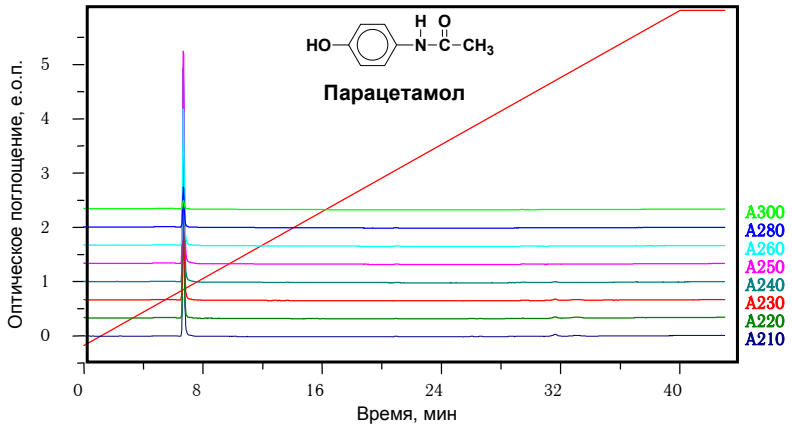
Вещество	Измеряемый параметр ± Δ	Контролируемый показатель
Бромид-ион	V_R	Объем колонки
Уридин	S_{280}/S_{250}	Погрешность детектора при λ=280 нм
Кофеин	S_{260}/S_{280}	Линейность детектора
***м*-Нитроанилин**	S_{230}/S_{260}	Погрешность значения pH элюента **А**
***о*-Нитроанилин**	V_R S_{210} $A_{10\%}$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



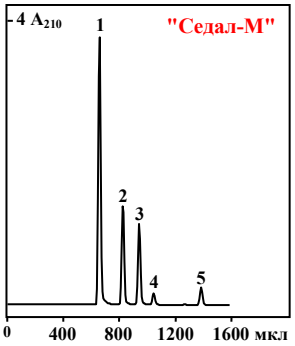
БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Формирование базы данных

Название	V_R, мкл	S_{210}, $\frac{\text{е.о.п.} \cdot \text{мкл}}{\text{мг/мл}}$	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**
Теофиллин	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

Пик 5 - ?

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

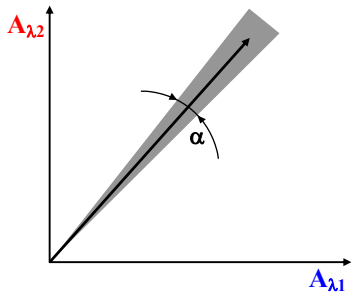
Фармакопейный анализ: "Седал-М"

Название	V_R, мкл	Спектральные отношения S_λ/S_{210}						
		220	230	240	250	260	280	300
Пик 5	**1384**	**0.50**	**0.16**	**0.09**	**0.06**	**0.04**	**0.01**	**0.00**
Хинин	**1343**	0.60	0.39	0.59	0.94	0.33	0.05	0.10
Диэтилпропион	**1351**	0.17	0.40	0.95	1.45	1.18	0.19	0.10
Платифиллин	**1383**	1.21	0.96	0.50	0.18	0.04	0.00	0.00
Фенобарбитал	**1394**	**0.51**	**0.19**	**0.11**	**0.06**	**0.04**	**0.00**	**0.00**
Бромурал	**1398**	0.46	0.17	0.09	0.06	0.04	0.00	0.00
Кислота салициловая	**1398**	0.22	0.30	0.34	0.08	0.01	0.06	0.17
Кетамин	**1405**	0.74	0.12	0.01	0.02	0.04	0.03	0.00
Фенацетин	**1426**	0.45	0.80	1.26	1.41	0.98	0.22	0.06

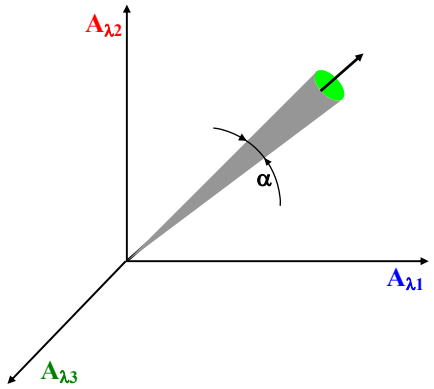
БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Идентификация пиков по спектральным параметрам

2 канала детектирования



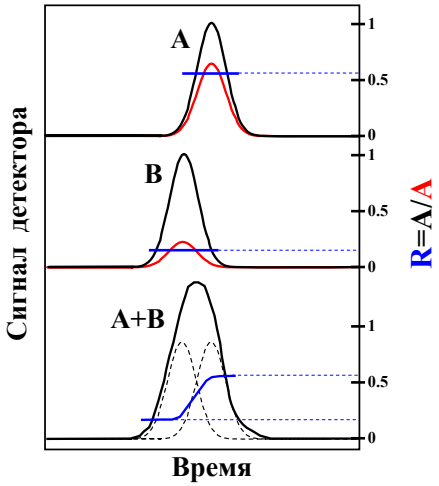
3 канала детектирования



8 каналов детектирования – вектор в восьмимерном пространстве

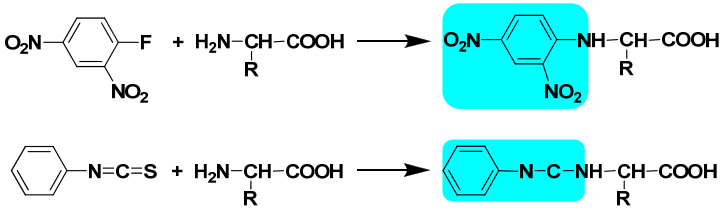
НАДЕЖНОСТЬ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВЕЩЕСТВ

Многоканальное детектирование: гомогенность пика



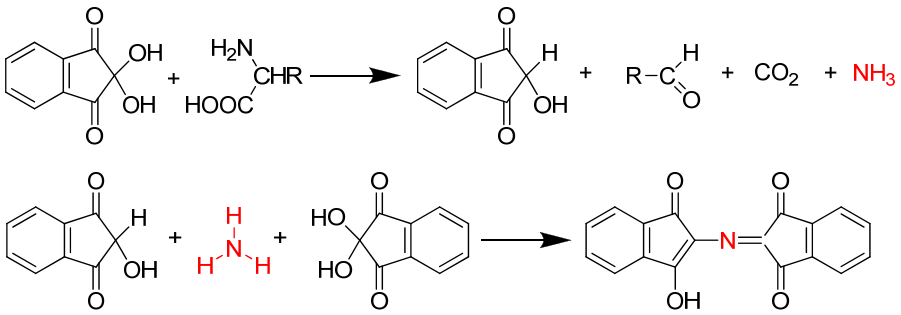
КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Предколоночная дериватизация



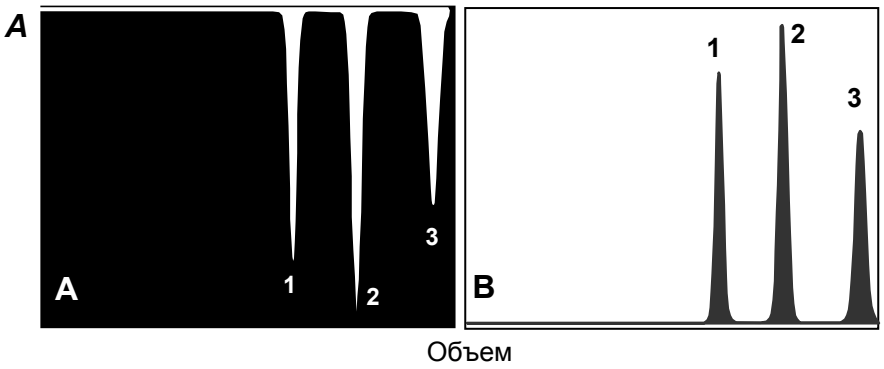
КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Постколоночная дериватизация



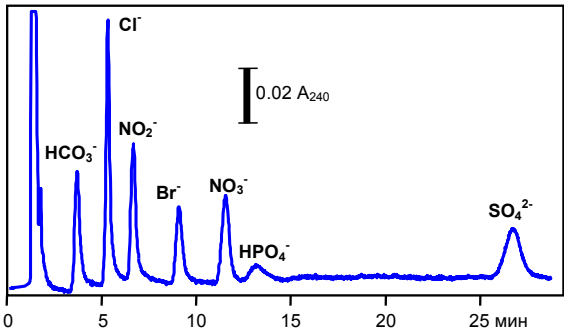
КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Непрямое фотометрирование



КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Непрямое 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

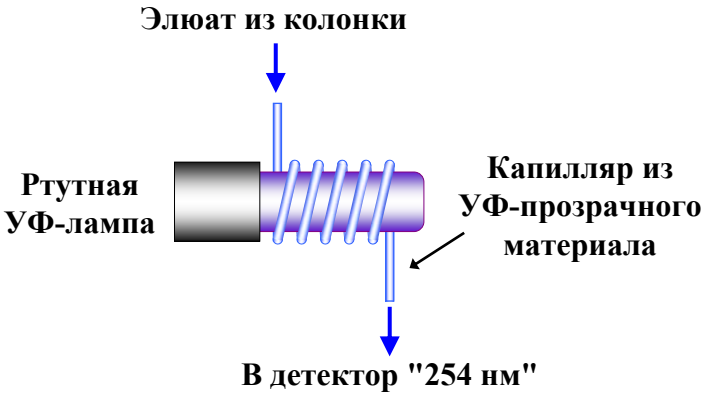
ТЕМПЕРАТУРА: 35°C

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

Г.И.Барам, А.Л.Верещагин, Л.П.Голобокова. *Ж.аналит. химии. 1999. Т.54. №9. С.962-965*

КОСВЕННОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Фотометрирование продуктов фотолиза



ВЭЖХ для ВСЕХ

8. Подготовка пробы

Новосибирск – 2011

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

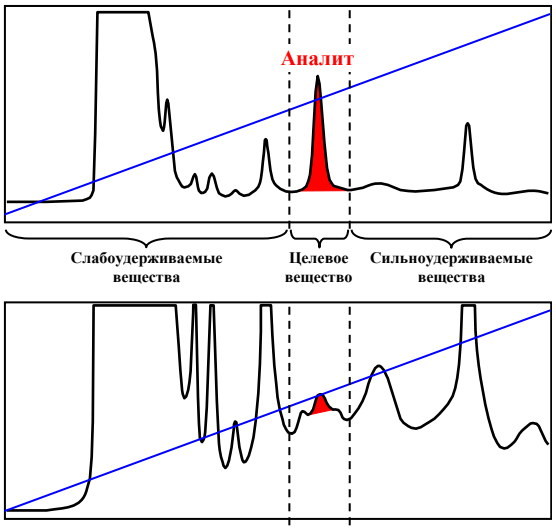
Работа с микрообъемами растворов

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 аналитам 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; водные растворы лучше хранить в замороженной виде

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

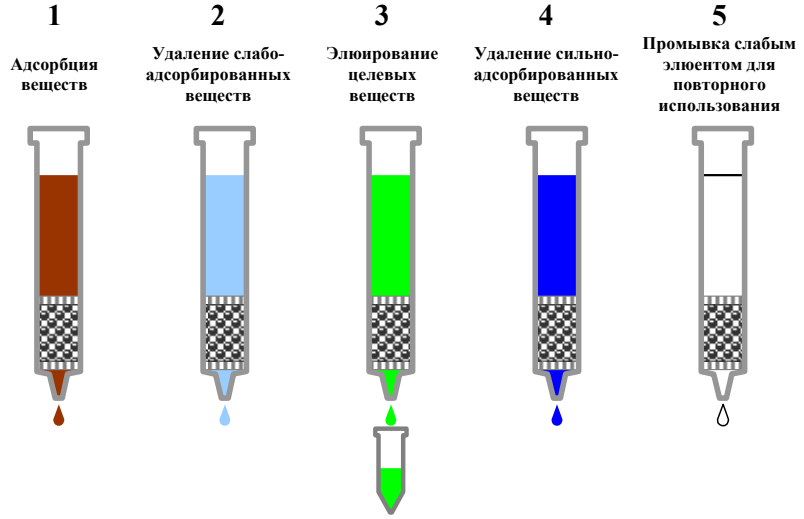
Очистка и концентрирование



ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Твердофазная экстракция

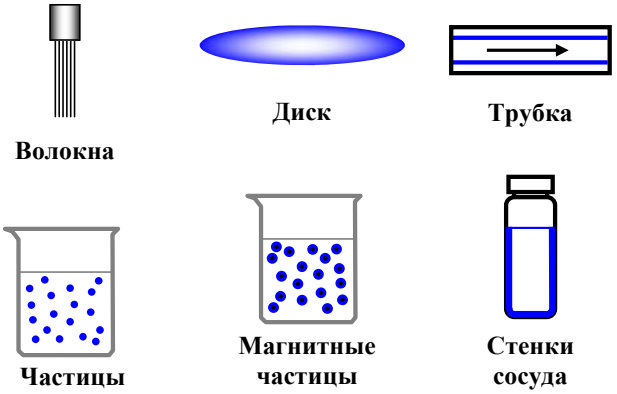
Solid-Phase Extraction (SPE)



ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

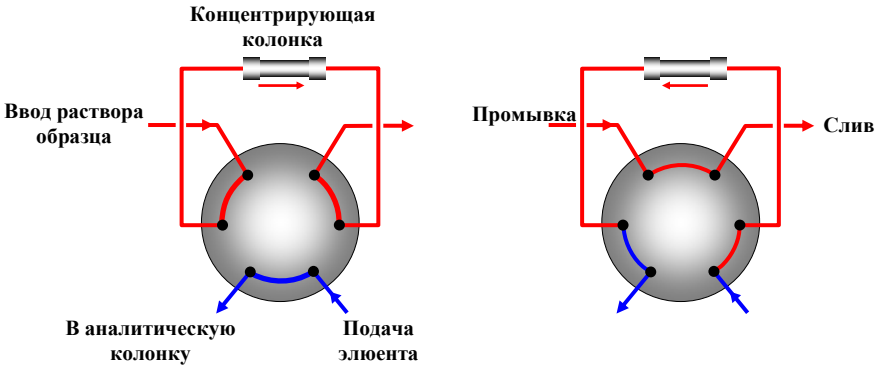
Твёрдофазная микроэкстракция

Solid-Phase Micro Extraction (SPME)



ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Концентрирование "*on line*"

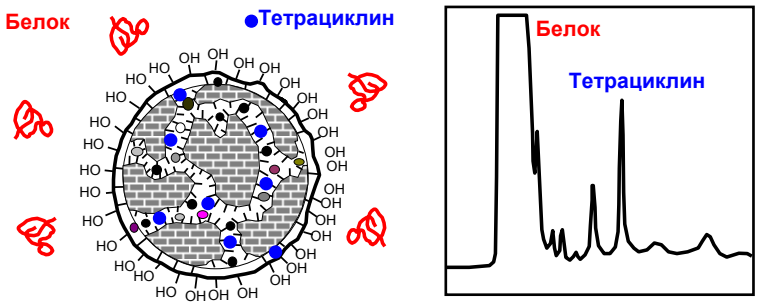


А. Ввод раствора образца в концентрирующую колонку
Анализ предыдущего образца

Б. Промывка крана от раствора образца
Начало анализа

ВЭЖХ НА СПЕЦИАЛЬНЫХ ФАЗАХ

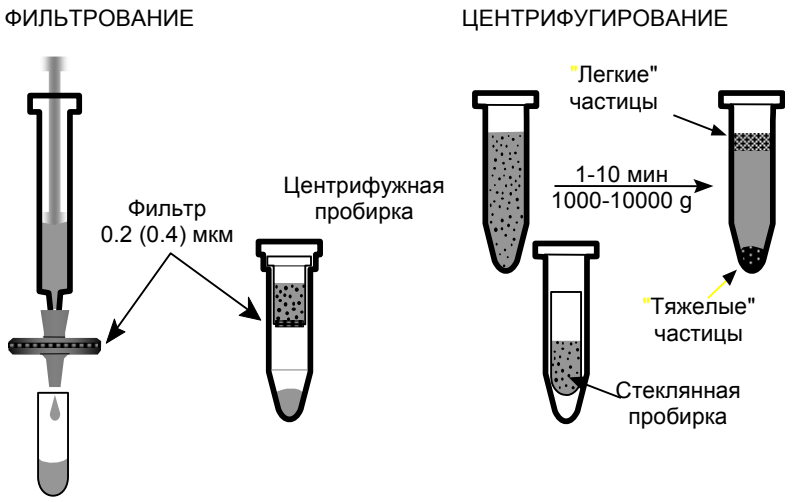
Прямое определение тетрациклина в сыворотке крови на колонке с "бифильной" фазой



LiChrospher® ADS (Merk KGaA, Германия) ADS = Alkyl-DIOL-Silica
Внешняя поверхность - DIOL
Внутренняя поверхность - C4, C8 или C18
Размер пор - 6 нм; диаметр частиц - 25 мкм

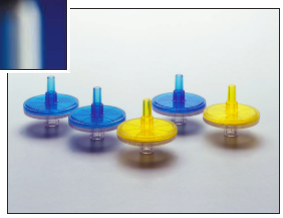
ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Работа с микрообъемами растворов: фильтрование



ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Работа с микрообъемами растворов: фильтрование



Millipore Corporation, США

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Работа с микрообъемами растворов: фильтрование

Solvent	Material									
	MV	CA	RC	PA	PTFE	PVDF	PES	PET	GF	PP
Acetaldehyde	⊖	⊖	⊕	○	⊕	⊕		⊕	⊕	○
Acetic acid, 100 %	⊖	⊖	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Acetone	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕
Acetonitrile	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Ammonia, 25 %	⊖	⊖	○	⊖	⊕	⊕	⊕	○	⊕	⊕
Benzene	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	○		⊕	⊕	○
n–Butanol	⊕	⊕	⊕	○	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Cyclohexane	⊕	⊕	⊕	○	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Dichloromethane	⊕	⊖	⊕	⊖	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊖
Diethyl ether	○	○	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	○
Dimethylformamide	⊖	⊖	○	⊕	⊕	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕
1,4–Dioxane	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕	○	⊖	⊕	⊕	○
Ethanol	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Ethyl acetate	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	○
Ethylene glycol	○	○	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Formic acid, 100 %	⊕	⊖	○	⊖	⊕	⊕	⊕	○	⊕	⊕
Hydrochloric acid, 30 %	⊖	⊖	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕
Methanol	⊖	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Nitric acid, 65 %	⊖	⊖	⊖	⊖	○	○		○	⊕	⊖
Oxalic acid, 10 % aqueous	⊕	⊖	⊕	⊖	⊕	⊕		⊕	⊕	⊕
Petroleum ether	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Phosphoric acid, 80 %	⊖	⊖	○	⊖	⊕	○		⊕	⊕	⊕
Potassium hydroxide, 1 mol/l	⊖	⊖	○	⊕	⊕	○	⊕	○	⊕	⊕
2–Propanol	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Sodium hydroxide, 1 mol/l	⊖	⊖	○	⊕	⊕	○	○	○	○	⊕
Tetrachloromethane	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	○		⊕	⊕	○
Tetrahydrofuran	⊖	⊖	⊕	○	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	○
Toluene	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	○
Trichloroethylene	⊕	⊕	⊕	○	⊕	⊕		⊕	⊕	○
Trichloromethane	⊕	⊖	⊕	⊖	⊕	⊕	⊖	⊕	⊕	⊖
Urea	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕		⊕	⊕	⊕
Water	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

⊕ resistant, ⊖ not resistant, ○ limited resistance

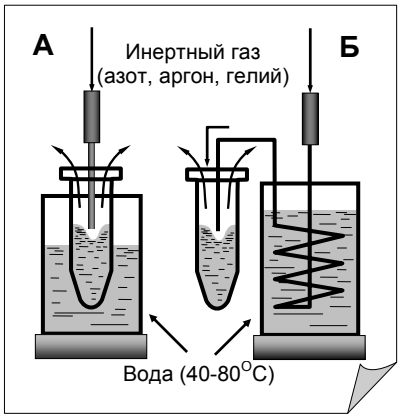
MV = cellulose mixed esters
CA = cellulose acetate
RC = regenerated cellulose
PA = polyamide
PTFE = polytetrafluoroethylene (Teflon)
PVDF = polyvinylidene difluoride
PES = polyethersulfone
PET = polyester
GF = glass fibre
PP = polypropylene (housing material)

www.mn-net.com

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Работа с микрообъемами растворов

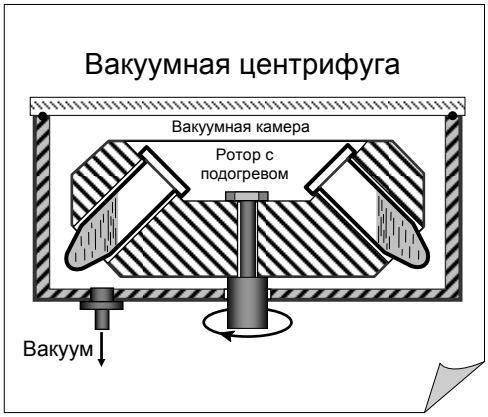
КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ РАСТВОРОВ УПАРИВАНИЕМ



ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Работа с микрообъемами растворов

КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ РАСТВОРОВ УПАРИВАНИЕМ

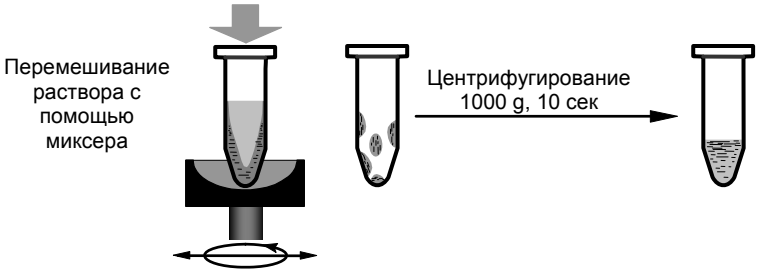


Vacufuge® plus centrifugal vacuum concentrator

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

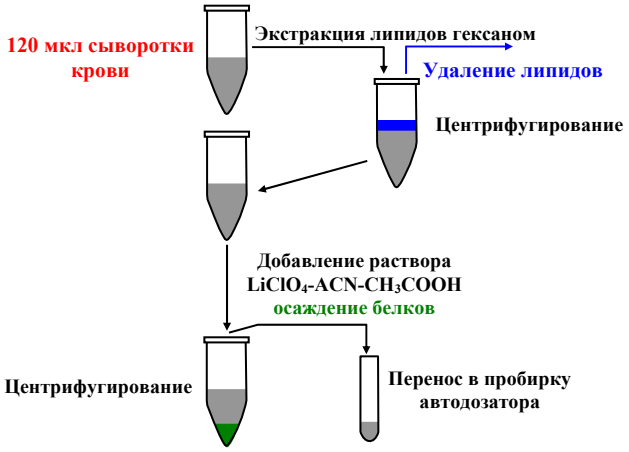
Работа с микрообъемами растворов

РАСТВОРЕНИЕ ВЕЩЕСТВ, ЭКСТРАКЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ РЕАКЦИЙ В МИКРООБЪЕМЕ



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ В СЛОЖНЫХ ОБРАЗЦАХ

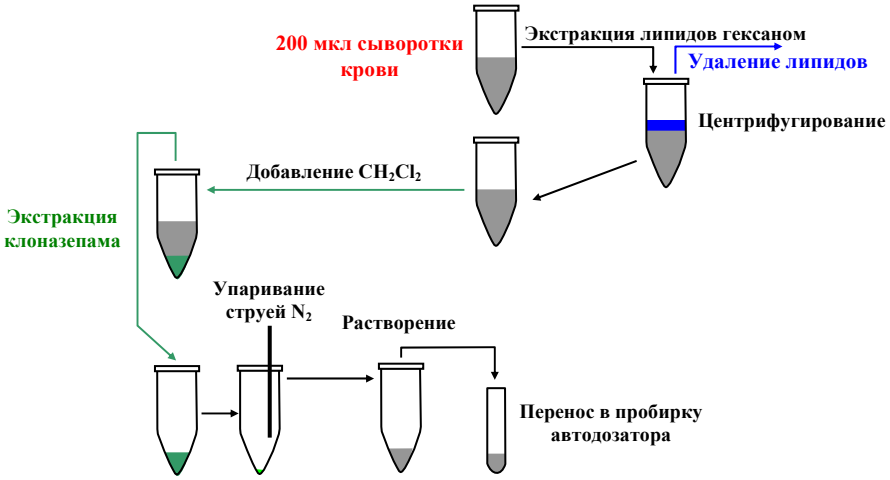
Фенобарбитал, бензонал, ламиктал, дифенин, этосуксимид, карбамазепин и метотрексат в крови



Федорова Г.А. *Кандидатская диссертация. 2003 г.*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЩЕСТВ В СЛОЖНЫХ ОБРАЗЦАХ

Клоназепам в крови



Федорова Г.А. *Кандидатская диссертация. 2003 г.*

ЭкоНова'11

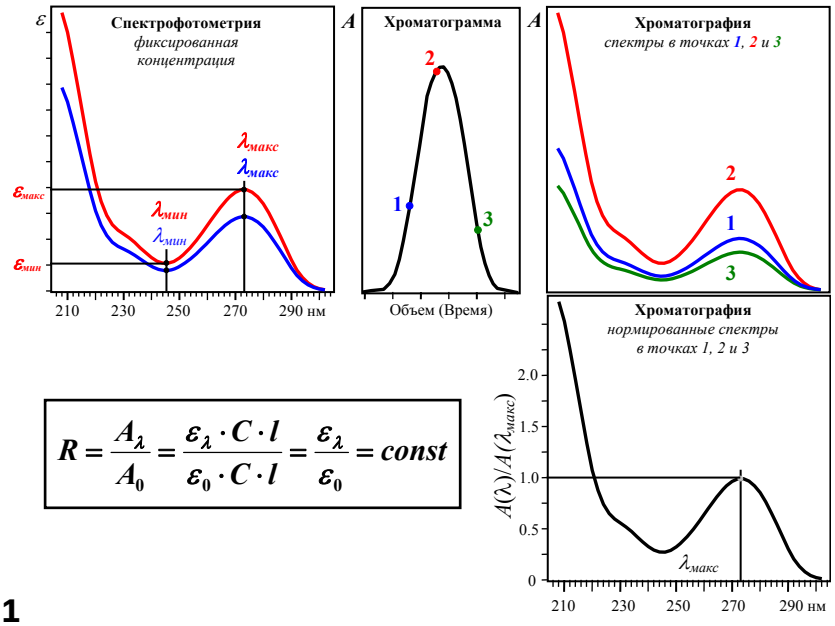
ВЭЖХ для ВСЕХ

9. База данных "ВЭЖХ-УФ"

Новосибирск – 2011

ЭкоНова'11

СРАВНЕНИЕ СПЕКТРОВ

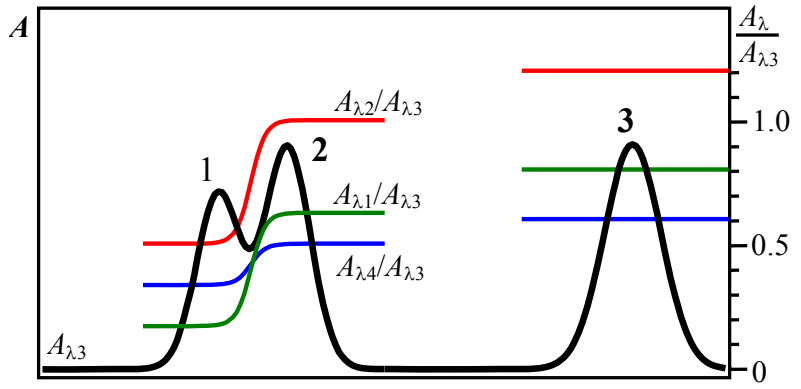


$$R = \frac{A_\lambda}{A_0} = \frac{\varepsilon_\lambda \cdot C \cdot l}{\varepsilon_0 \cdot C \cdot l} = \frac{\varepsilon_\lambda}{\varepsilon_0} = const$$

ЭкоНова'11

МНОГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

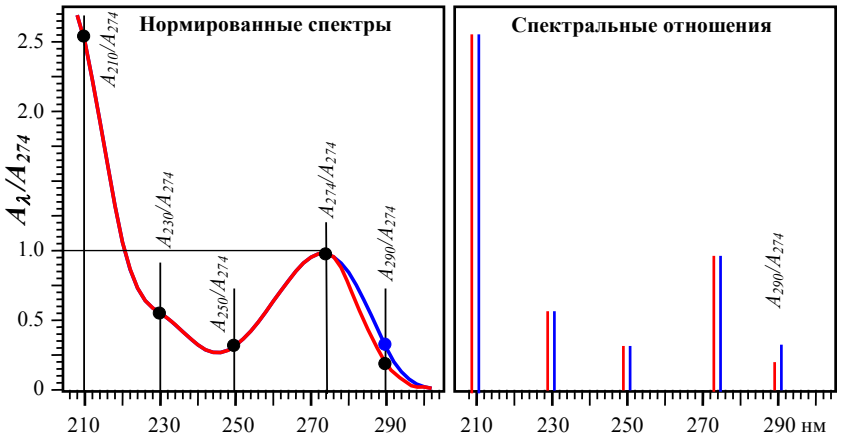
Правильность анализа



9-02

ЭкоНова'11

СРАВНЕНИЕ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ



9-03

МЕТОД ВЭЖХ В СОВРЕМЕННОМ ОБЩЕСТВЕ

Важнейшие области применения ВЭЖХ	Число 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 ∅4.6x250 мм с обращенной фазой C18 (5 мкм)
- градиентное и изократическое элюирование (60 мин)
- УФ-детектирование при λ=254 нм

НЕДОСТАТКИ ВЭЖХ

фармакопейный анализ

AMPICILLIN SODIUM

European Pharmacopoeia 1998:0578

1. Приготовление растворов:

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

НЕДОСТАТКИ ВЭЖХ

фармакопейный анализ

AMPICILLIN SODIUM

European Pharmacopoeia 1998:0578

2. Хроматографический анализ

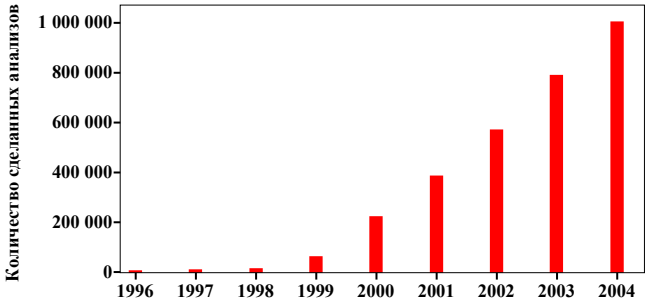
- кондиционирование колонки (1 час)
- анализ раствора 8 (1 час)
- контрольная хроматография без образца (1 час)
- анализ раствора 5 (1 час)
- корректировка программы элюирования, если R_s<3 (1 час)
- анализ раствора 6 (1 час)
- 6 анализов раствора 1 (6 часов)
- по одному анализу растворов 2, 3 и 9 (3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

ИТОГО: более 18 часов

ВЭЖХ - МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

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

Судебно-медицинская экспертиза, наркологический контроль, лекарственный мониторинг



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)

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 Indeces and UV Spectra. *J.Analyt. Toxicology, 1998, v.22, 279.*

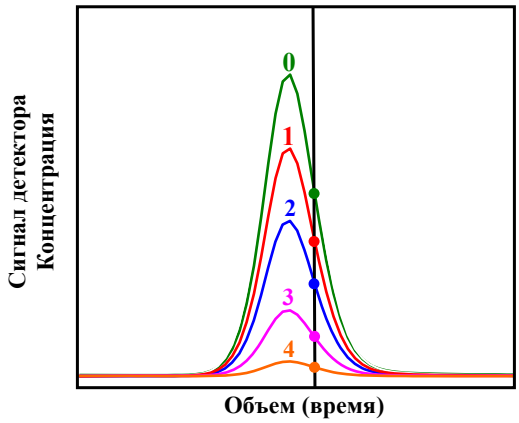
Lambert W.E., Van Bocxlaer J.F., De Leenheer A.P. Potential of HPLC-DAD in Forensic Toxicology. *J.Chromatogr. B, 1997, v.689, 45.*

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 ($A_N = a_N \cdot C$)



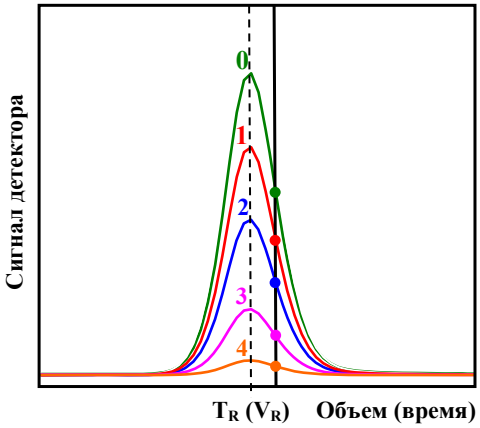
Для гомогенного пика

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

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

Параметры идентификации хроматографического пика:

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

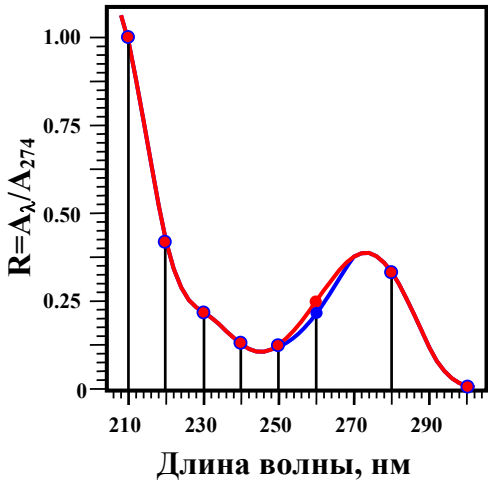


Количество веществ, разрешаемых колонкой, равно ее пиковой емкости (*Z*)

Сколько веществ можно разрешить при *N*-канальном детектировании?

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Фотометрическая детекция при 8 λ



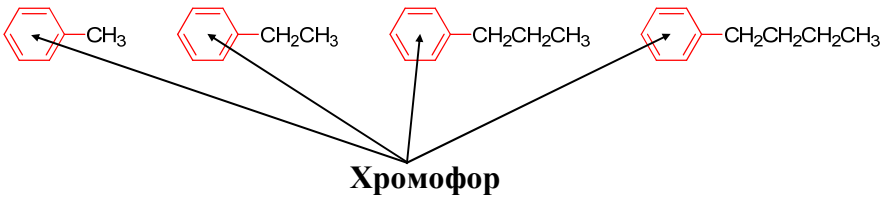
МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Ограничение: интервал значений R=(0±1)

Погрешность R:		0.1	0.05	0.02
N	A_N/A_0	Количество разрешенных веществ (D)		
2	1	10^1	$2\cdot10^1$	$5\cdot10^1$
3	2	10^2	$4\cdot10^2$	$2.5\cdot10^3$
4	3	10^3	$8\cdot10^3$	$1.3\cdot10^5$
5	4	10^4	$1.6\cdot10^5$	$6.3\cdot10^6$
6	5	10^5	$3.2\cdot10^4$	$3.1\cdot10^8$
7	6	10^6	$6.4\cdot10^7$	$1.6\cdot10^{10}$
8	7	10^7	$1.3\cdot10^9$	$7.8\cdot10^{11}$

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Недостаток: неразличимость спектров многих гомологов



МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

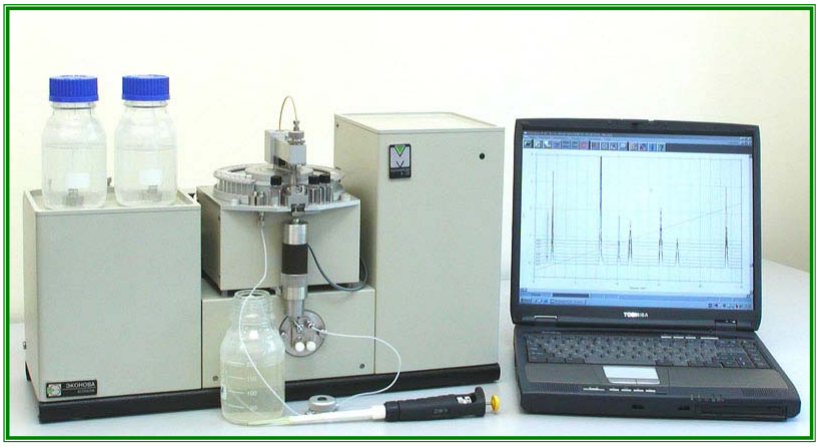
Емкость базы данных (Q)- максимальное количество веществ, имеющих отличающиеся наборы идентификационных параметров

$$Q=Z\cdot D$$

Если Z=100 и $D=10^9$, то $Q=10^{11}$

МНОГОКАНАЛЬНОЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЕ

Фотометрическая детекция при 8 λ

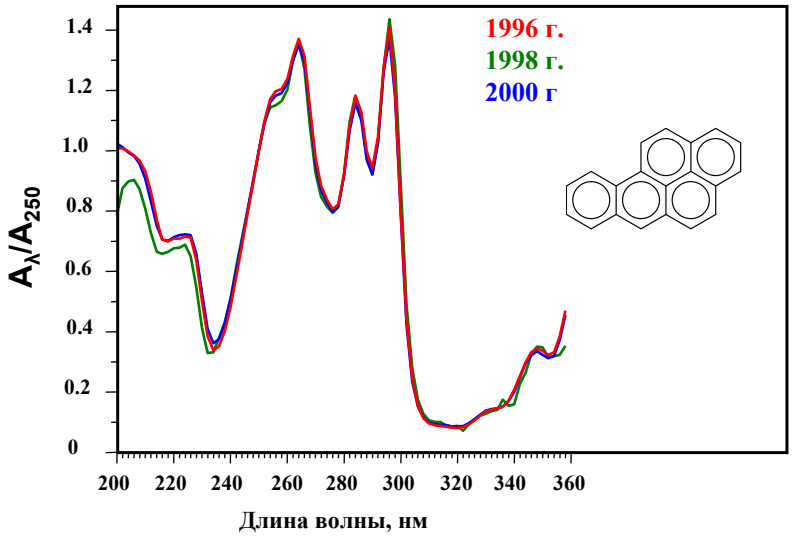


Хроматограф "Милихром А-02"

ЗАО "ЭкоНова" (Новосибирск)

СРАВНЕНИЕ ДЕТЕКТОРОВ

Спектр бенз(а)пирена



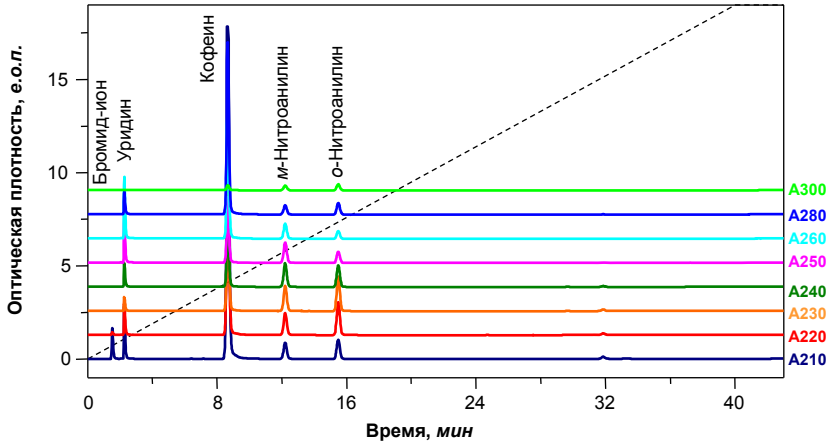
СРАВНЕНИЕ ДЕТЕКТОРОВ

ВЭЖХ на фазе С18
(данные по 48 хроматографам "Милихром А-02")

Спектральные отношения бенз(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: ∅2x75 мм; ProntoSIL-120-5-C18
Элюент А: 0.2 М $LiClO_4$-0.005 М $HClO_4$
Элюент Б: Ацетонитрил
Градиент: 40 мин от 5-100% Б; 10 мин 100% Б

Скорость потока: 100 мкл/мин
Температура: 40°С
λ_1-λ_8: 210, 220, 230, 240, 250, 260, 280, 300 нм
Проба: 4 мкл

ВАЛИДАЦИЯ ХРОМАТОГРАФА

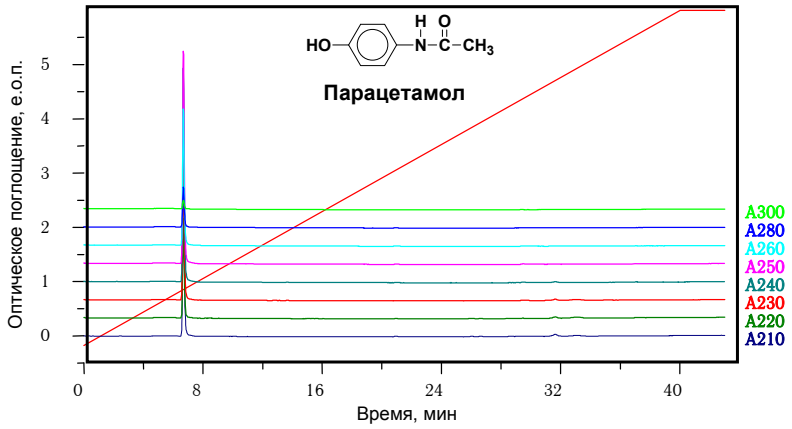
Вещество	Измеряемый параметр ± Δ	Контролируемый показатель
Бромид-ион	V_R	Объем колонки
Уридин	S_{280}/S_{250}	Погрешность детектора при λ=280 нм
Кофеин	S_{260}/S_{280}	Линейность детектора
***м*-Нитроанилин**	S_{230}/S_{260}	Погрешность значения pH элюента **А**
***о*-Нитроанилин**	V_R S_{210} $A_{10\%}$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



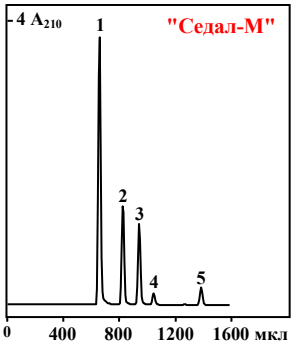
БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Формирование базы данных

Название	V_R, мкл	S_{210}, $\frac{\text{е.о.п.} \cdot \text{мкл}}{\text{мг/мл}}$	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**
Теофиллин	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

Пик 5 - ?

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

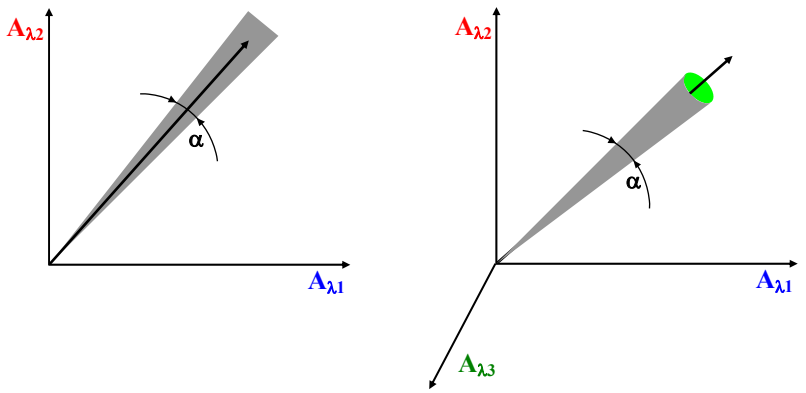
Фармакопейный анализ: "Седал-М"

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"

Идентификация пиков по спектральным параметрам

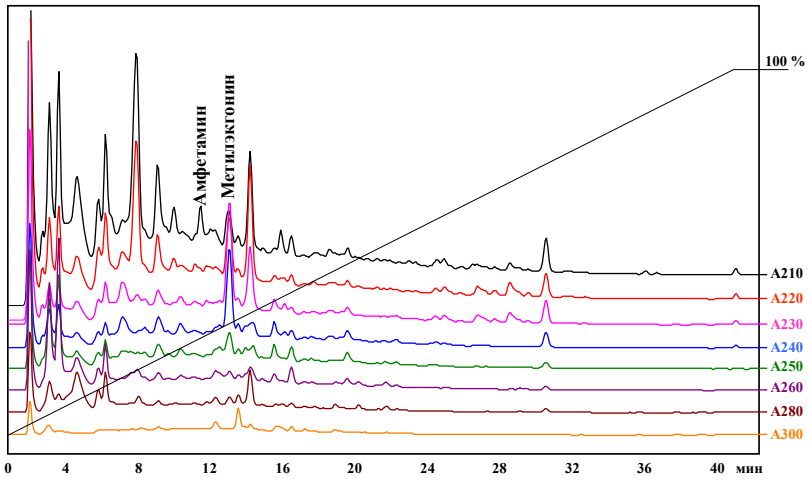
2 канала детектирования **3 канала детектирования**



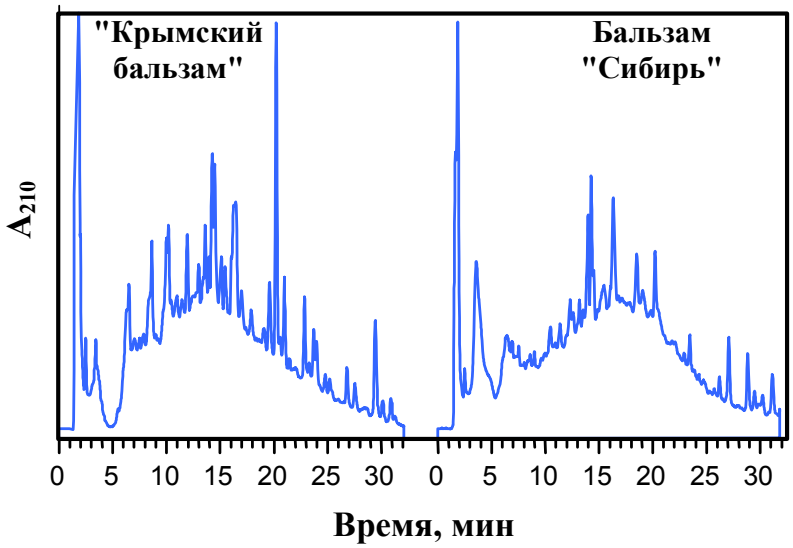
8 каналов детектирования – вектор в восьмимерном пространстве

БАЗА ДАННЫХ "ВЭЖХ-УФ"

Определение наркотиков в экстракте из мочи



СРАВНЕНИЕ МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ ОБРАЗЦОВ



ЭкоНова'11

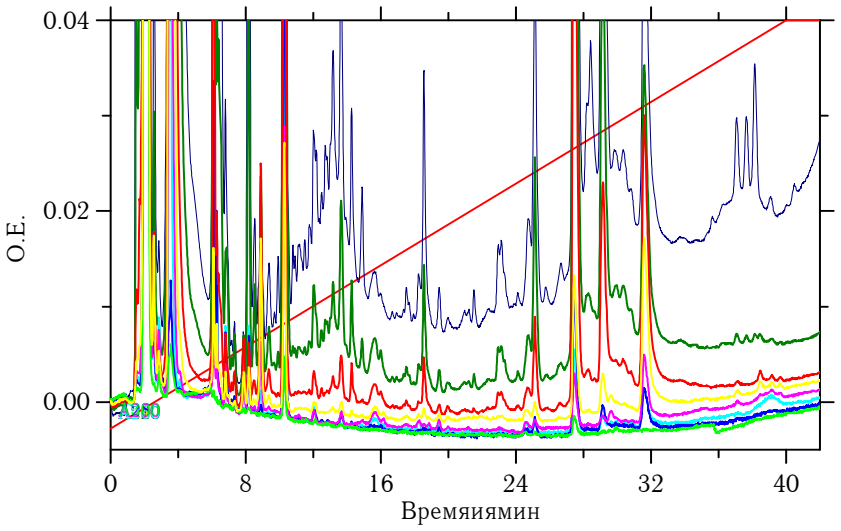
СРАВНЕНИЕ БАЛЬЗАМОВ

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

ЭкоНова'11

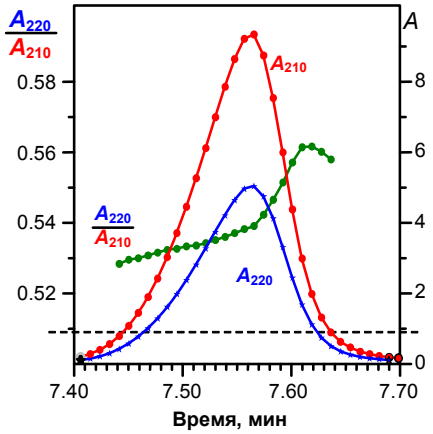
ХРОМАТОГРАММА СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА



МНОГОВОЛНОВАЯ ДЕТЕКЦИЯ

Правильность анализа

Спектральный анализ пика ампициллина



ЗАО Институт хроматографии "ЭкоНова"

Применение микроколоночной ВЭЖХ в медицине

Кожанова Людмила Алексеевна
кандидат химических наук
kozhanova@econova.nsk.su

Новосибирск - 2011

Причины ограниченного применения ВЭЖХ в медицине

- отсутствие унифицированных методик анализа
- дорогие расходные материалы (колонки, элюенты)
- дорогостоящая аппаратура
- отсутствие квалифицированных специалистов

Масштаб ВЭЖХ

➢ колонка – **∅4,6x250 мм** (70-85 пиков)

➢ колонка – **∅2x75 мм** (40-45 пиков)

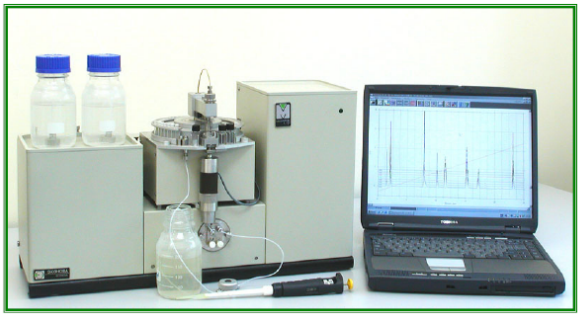
Переход от колонки ∅4,6x250 мм к колонке ∅2x75 мм:

- ✦ экономия элюента в 10 -20 раз
- ✦ увеличение чувствительности анализа в 10 -20 раз
- ✦ уменьшение времени анализа в 3 раза
- ✦ снижение давления в 3 раза

Микроколоночная хроматография

“Милихром А-02“

ЗАО “ЭкоНова“(Новосибирск)



- колонка – ∅2х75 мм
- многоканальное детектирование (8λ)
- градиентный режим элюирования

Области применения ВЭЖХ в медицине

- фармакокинетические исследования, терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ)
- диагностические исследования (определение эндогенных метаболитов в биологических жидкостях)
- контроль качества лекарственных препаратов
- токсикология
- наркология

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ В МЕДИЦИНЕ

Цели анализа	Количество контролируемых веществ
Контроль качества лекарств	3000
Токсикология	2000
Наркология	500

Медицинские задачи

Фармакокинетические исследования
Терапевтический лекарственный мониторинг

- Цель: разработка унифицированных, экспрессных, экономичных ВЭЖХ методик для больших групп различных лекарственных препаратов в сыворотке крови

Диагностические исследования

- Цель: определение эндогенных метаболитов в биологических жидкостях

Терапевтический лекарственный мониторинг

Контроль концентрации препарата и/ или его метаболитов в организме пациента в течение всего периода лечения

Противосудорожные препараты, метотрексат, циклоспорин

Фармакокинетика

Наука, изучающая динамику процессов абсорбции, распределения и элиминации препарата в организме

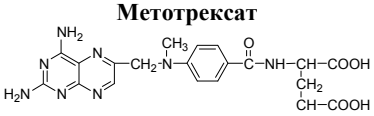
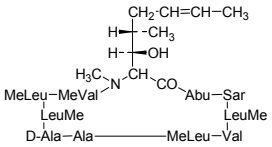
Противотуберкулезные препараты и их метаболиты

Список лекарственных веществ, подлежащих мониторингу в РФ

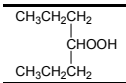
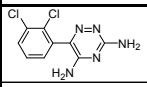
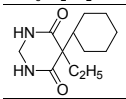
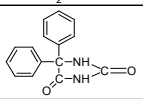
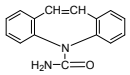
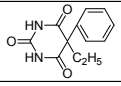
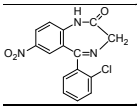
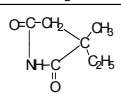
Амикацин	**Дизопирамид**	**Хлордиазепоксид**
Амитриптилин	**Имипрамин**	**Хлорпромазин**
Амфотерицин	**Индометацин**	**Вальпроат натрия**
Ацетаминофен	**Лидокаин**	**Карбамазепин**
Ванкомицин	**Мексилетин**	**Клоназепам**
Галоперидол	**Оксазепам**	**Фенитоин**
Гентамицин	**Препараты лития**	**Фенобарбитал**
Диазепам	**Сиднокарб**	**Этосуксимид**
Дигитоксин	**Теофиллин**	**Метотрексат**
Дигоксин	**Хинидин**	**Циклоспорин**

* Приказ №64 МЗ РФ от 21 февр. 2000 г.

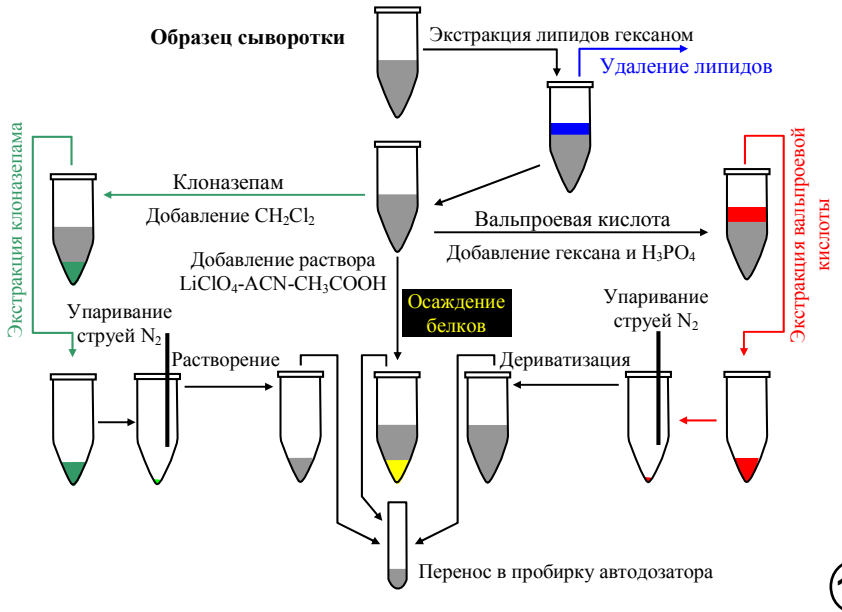
Метотрексат, циклоспорин

Препарат	Концентрация, мкг/мл	
	Терапевтическая	Токсическая
Химиотерапевтический препарат **Метотрексат** 	0,23	**0,45**
Антибиотик **Циклоспорин А** 	0,1-0,4	**0,4**

Противосудорожные препараты

Препарат		Конц, мкг/мл		Препарат		Конц, мкг/мл	
		Тер	Токс			Тер	Токс
	Вальпроевая кислота	40-100	**150**		Ламиктал	0,5-12	**2-20**
	Гексамидин	5-12	**15**		Фенитоин	5-20	**20**
	Карбамазепин	2-12	**10**		Фенобарбитал	10-40	**30**
	Клоназепам	0,01-0,08	**0,1**		Этосуксимид	30-100	**100**

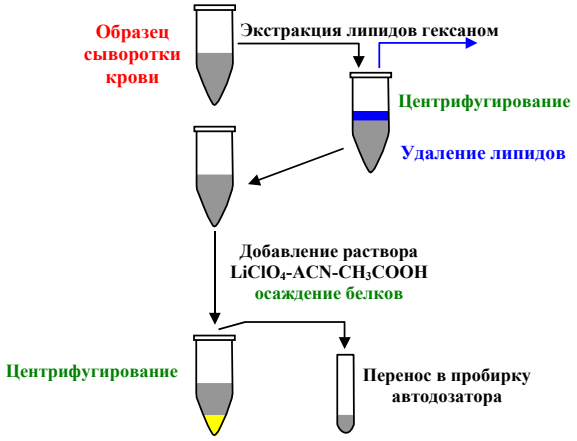
Подготовка пробы



Подготовка пробы

Прямое определение в крови

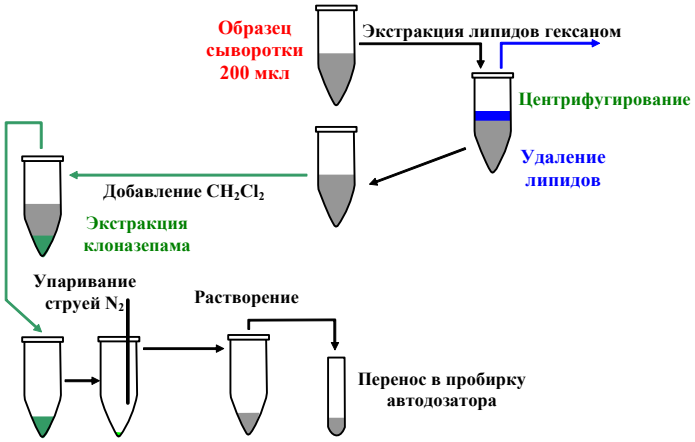
гексамидин, фенобарбитал, бензонал, ламиктал, дифенин, этосукцимид, карбамазепин и метотрексат



Подготовка пробы

Концентрирование

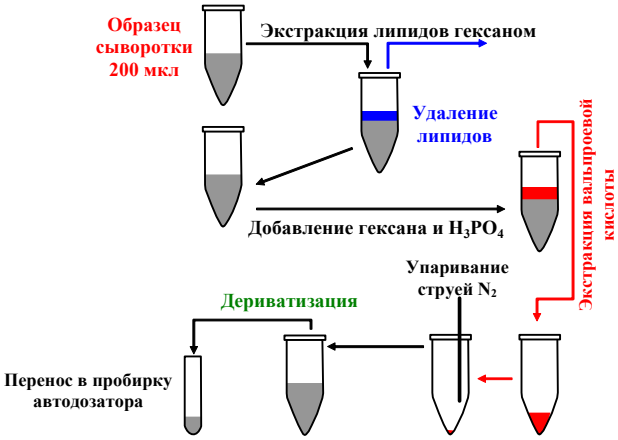
клоназепам в крови



Подготовка пробы

Дериватизация

вальпроевая кислота в крови



Длины волн максимумов поглощения и детектирования

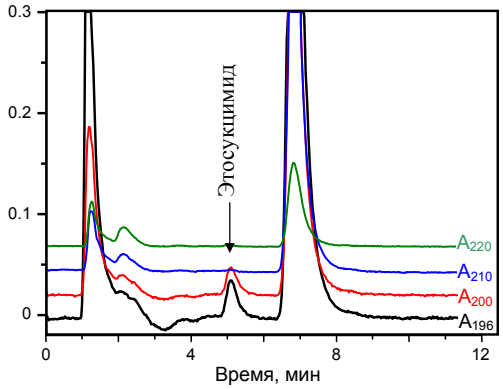
Определяемое соединение	$\lambda_{мах}$, нм	$\lambda_{дет}$, нм
Фенобарбитал	194	210, 220, 230, 240
Карбамазепин	214, 284	210, 220, 230, 240
Гексамидин	194	210, 220, 230, 240
Ламиктал	212, 266	210, 220, 230, 240
Дифенин	198	210, 220, 230, 240
Клоназепам	196, 310	310, 320, 330, 340
Этосуксимид	196	196, 200, 210, 220
Вальпроевая кислота (в виде производного)	200, 256	250, 260, 270, 280
Циклоспорин А	200	200, 204, 210, 214
Метотрексат	202, 304	280, 300, 310, 320

% MeCN в подвижной фазе и k'

Лекарственное вещество	Определяемое соединение	Содержание MeCN, %	k'	Коэффициент асимметрии, $A_{10\%}$
Фенобарбитал	Фенобарбитал	20	5,21	1,12
Бензонал	Фенобарбитал	20	5,21	1,12
Карбамазепин	Карбамазепин	30	4,49	1,12
Гексамидин	Гексамидин	15	3,94	1,12
	Фенобарбитал	15	10,61	1,12
Ламиктал	Ламиктал	20	5,66	1,02
Дифенин	Дифенин	30	4,61	1,12
Клоназепам	Клоназепам	35	4,06	1,15
Этосуксимид	Этосуксимид	10	4,14	1,15
Депакин	*n*-БФЭ ВК	65	6,16	1,08

Изократическое элюирование: 0.2M LiClO4 (pH 3) - MeCN

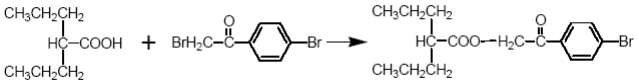
Определение этосуксимида в сыворотке крови

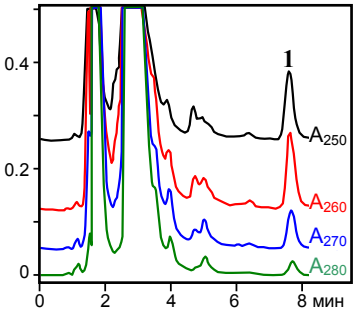


Концентрация этосуксимида в исходной сыворотке 28 мкг/мл

Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18.
Элюенты: "А"- 0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4 (pH 3); "Б"- ACN.
Подвижная фаза: 10% Б. ***F***=150 мкл/мин. ***t***=40°C.

Определение вальпроевой кислоты в экстракте сыворотки в виде *пара*-бромфенацилового эфира (1)

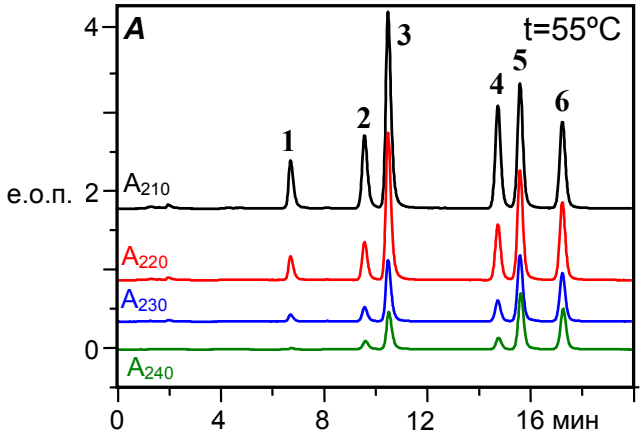




Колонка: 2 x 75 мм; Nucleosil 100-5 C18.
Элюенты: "А"- 0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4 (pH 3); "Б"- MeCN.
Подвижная фаза: 65% **Б.** ***F***=150 мкл/мин. ***t***=40°C

Концентрация вальпроевой кислоты в сыворотке 67±8 мкг/мл

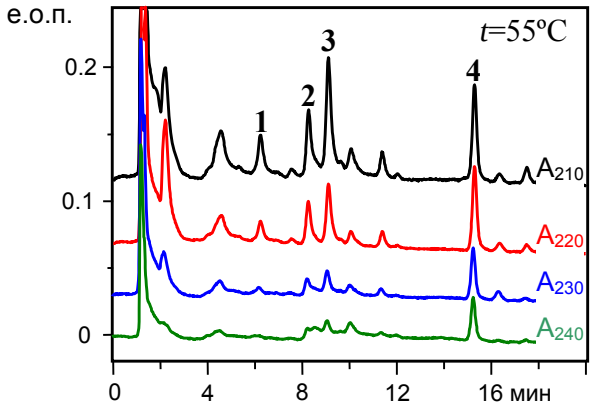
Хроматограмма смеси противосудорожных препаратов (стандартный образец)



Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18
Элюенты: "А"- 0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4 (pH 3); "Б"- ACN
Градиент: 2000 мкл от 10 до 30% Б, 1000 мкл 30% Б. ***F***=150 мкл/мин.
1– гексамидин; **2–** фенобарбитал; **3 –** ламиктал;
4– дифенин; **5–** карбамазепин; **6–** клоназепам.

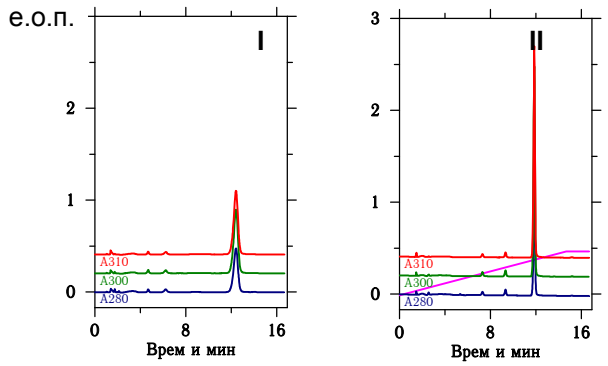
Хроматограмма сыворотки пациента при комплексной терапии

Суточная доза: гексамидин– 400 мг, ламиктал– 50 мг, карбамазепин– 600 мг



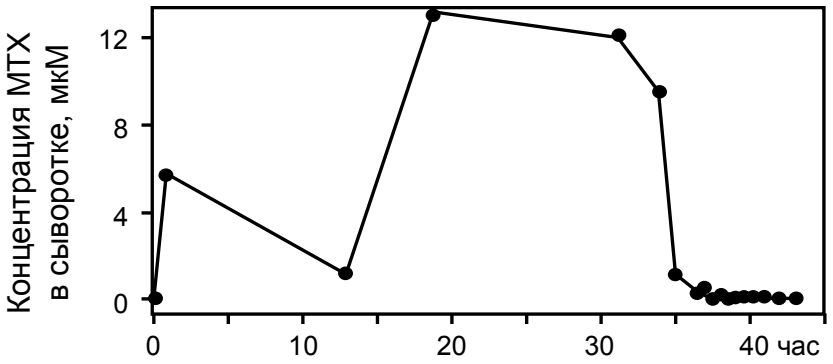
1– гексамидин (14,7±0,7 мкг/мл); **2**– фенобарбитал (21±1 мкг/мл);
3– ламиктал (1,8±0,2 мкг/мл); **4**– карбамазепин (8,0±0,4 мкг/мл)

Хроматограммы стандартного раствора метотрексата в режиме изократического (I) и градиентного (II) элюирования



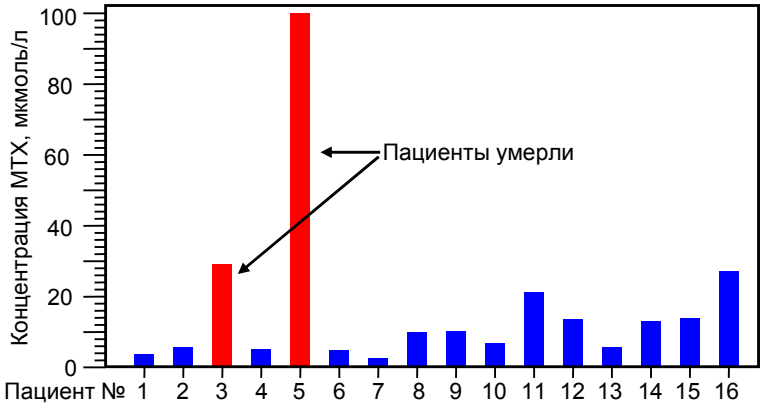
Элюенты: А- 0.2 М $LiClO_4$ - H_3PO_4, pH 3; **Б**- MeCN
I- 10% **Б; II**-- линейный градиент, 2200 мкл от 5% до 20% **Б**; 500 мкл 20% **Б**
Скорость потока: 150 мкл/мин. **Температура:** 40°С. **УФ-детектор:** λ=300 нм.
Проба: 2 мкл стандартного раствора метотрексата в воде (0,5 мг/мл).

Изменение концентрации метотрексата (МТХ) в сыворотке крови пациента в процессе лечения высокими дозами МТХ

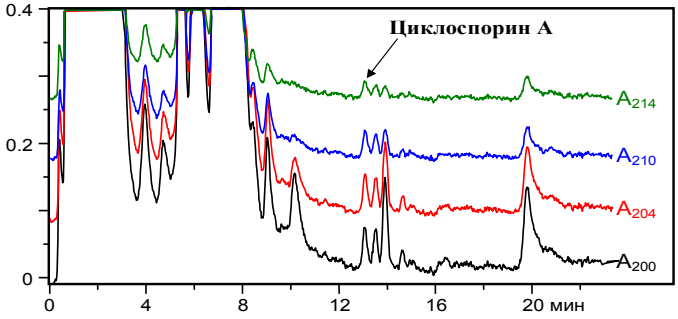


Доза: 1000 мг/ м² поверхности тела.
При снижении дозы на 10% $C_{МТХ}$ снижается в 3-5 раз

Максимальная найденная концентрация метотрексата в крови пациентов в процессе инфузии при дозе 1000 мг/м



Хроматограмма экстракта сыворотки крови пациента, принимающего циклоспорин А



Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18.
Элюенты: "А"- 0.2 М $LiClO_4$-H_3PO_4 (pH 3); "Б"- ACN.
Градиент: 2500 мкл от 50% Б до 80% Б, 1000 мкл 80% Б.
F=150 мкл/мин; ***t***=70°С.
Объем пробы: 100 мкл.

Суточная доза: 200 мг,
концентрация в сыворотке: 98±10 мкг/мл.

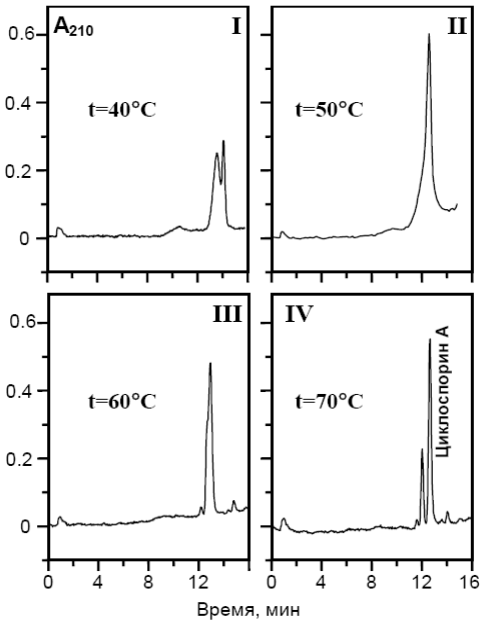


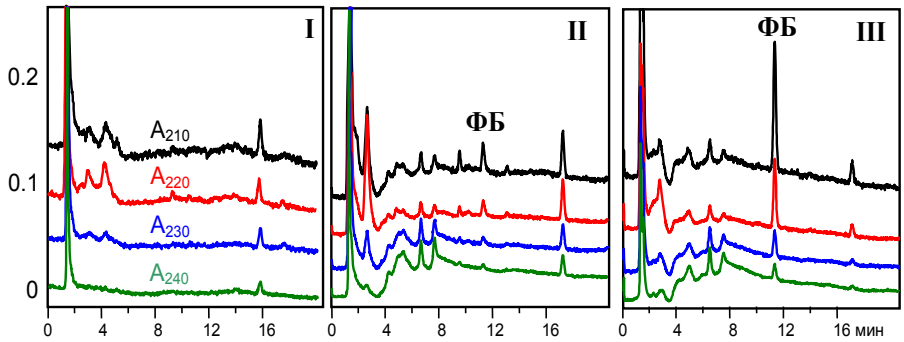
Рис. 9. Хроматограммы стандартного раствора лекарственной формы циклоспорина А (Neoral, Novartis) при различных температурах на колонке с ОФ Nucleosil 100-5 C18.

Метрологические характеристики унифицированной методики

Определяемое соединение	Объем пробы, мкл	Длина волны определения, нм	Предел детектирования, мкг/мл (S/N=3)	Предел количественного определения, мкг/мл (S/N=10)	Верхняя граница линейного диапазона, мкг/мл	Терапевтическая концентрация, мкг/мл [2]
Вальпроевая к-та	5	260	7	15	200	40-100
Гексамидин	5	210	1,3	4,3	200	5-12
Дифенин	5	210	1,0	3,3	200	5-20
Карбамазепин	5	210	0,35	1,2	200	2-12
Клоназепам	30	310	0,003	0,01	2	0,01-0,08
Ламиктал	10	210	0,15	0,5	100	(0,5) 1-3 (12)**
Фенобарбитал	5	210	0,75	2,5	200	10-40
Этосуксимид	2	196	1	3,3	200	30-100
Метотрексат	20	300	0,02	0,07	100	0,23
Циклоспорин А	100	200	0,01	0,03	5	0,1-0,4

СКО в терапевтическом диапазоне - не более 15%

Определение фенобарбитала (ФБ) в сыворотке крови



I– холостая проба; **II**– $C_{ФБ}$=5,8 мкг/мл; **III**–$C_{ФБ}$=33 мкг/мл.

Колонка: 2x75 мм; Nucleosil 100-5 C18.
Элюенты: "А"- 0.2М $LiClO_4$-H_3PO_4 (pH3); "Б"- ACN.
Градиент: 2000 мкл от 10% Б до 30% Б, 1000 мкл 30% Б.
F=150 мкл/мин. ***t***=40°C.
Проба: 5 мкл обработанной сыворотки крови.

Преимущества унифицированной методики

- ✓ Унифицированные хроматографические условия для определения ПСП, метотрексата, циклоспорина;
- ✓ Одновременное определение шести ПСП за 20 мин;
- ✓ Объем сыворотки крови: 50 - 100 мкл;
- ✓ Многоволновое детектирование: 4 длины волны;
- ✓ 400 анализов на одной колонке;
- ✓ Экономичность и экспрессность.

Метрологические характеристики

- ✓ Воспроизводимость и правильность: не хуже **15%;**
- ✓ Пределы обнаружения: **0,003 – 7,0 мкг/мл.**

Количество выполненных анализов

препараты для лечения детей:

Противосудорожные препараты – мониторинг более 900 больных

Метотрексат – 30 больных

В 75% случаев была необходима коррекция дозы

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ МОНИТОРИНГ:

эпилепсия у детей

По данным шестилетнего мониторинга для **25%** **из 700** пациентов, проходивших лечение в Областной Государственной детской клинической больнице г. Иркутска, была необходима коррекция дозы лекарственных препаратов.

Фармакокинетика

Наука, изучающая динамику процессов абсорбции, распределения и элиминации препарата в организме

Противотуберкулезные препараты и их метаболиты

Исследования необходимы при:

- разработке новых препаратов и их лекарственных форм;
- клинических испытаниях лекарственных средств;
- определении дозы, оптимального пути введения, схемы применения, продолжительности лечения.

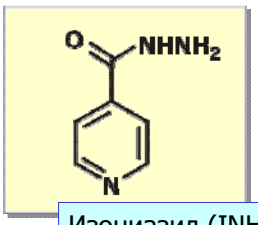
Туберкулез – одна из самых опасных болезней в мире, приводящая к смерти более 3 миллионов людей в год.

Препараты, применяемые для лечения туберкулеза, обычно подразделяются на две основные группы.

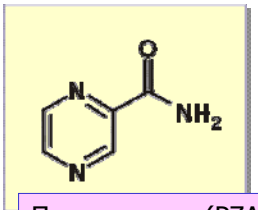
Лекарства первой линии, сочетающие хорошую эффективность с приемлемым уровнем токсичности, включают изониазид (INH), пиразинамид (PZA), рифампицин (RIF) и этамбутол. Они наиболее часто используются в комбинированной терапии.

В случае устойчивости к микроорганизмам или ВИЧ инфекции применяют лекарства второй линии.

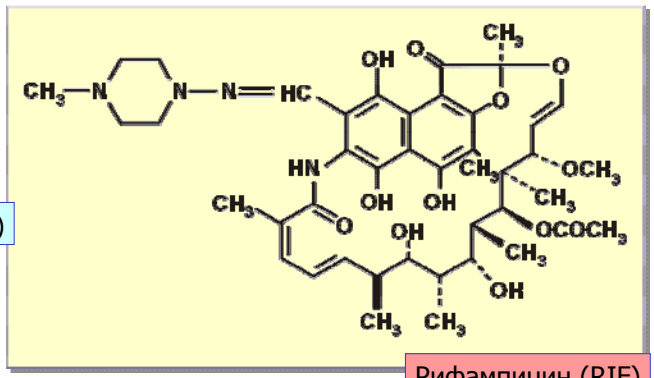
Молекулярная структура противотуберкулезных лекарств



Изониазид (INH)



Пиразинамид (PZA)

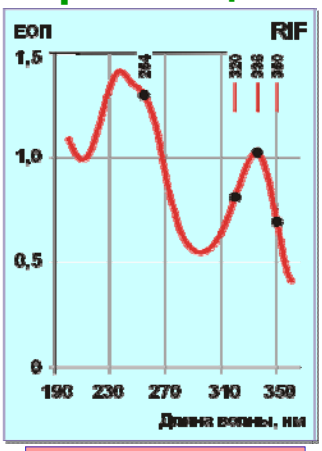


Рифампицин (RIF)

Подготовка пробы

Процедура осаждения белков для RIF	Процедура осаждения белков для INH, AcINH, PZA и PA
100 мкл сыворотки с аскорбиновой кислотой + 200 мкл ацетонитрила	200 мкл сыворотки + 100 мкл 10% трихлоруксусной кислоты
перемешать 1 мин, центрифугировать при 2000g 5 мин.	перемешать 1 мин, центрифугировать при 2000g 5 мин.

Спектр поглощения рифампицина

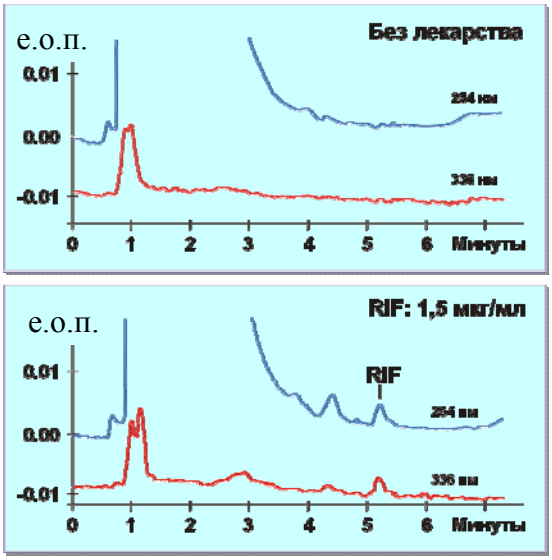


Рифампицин (RIF)

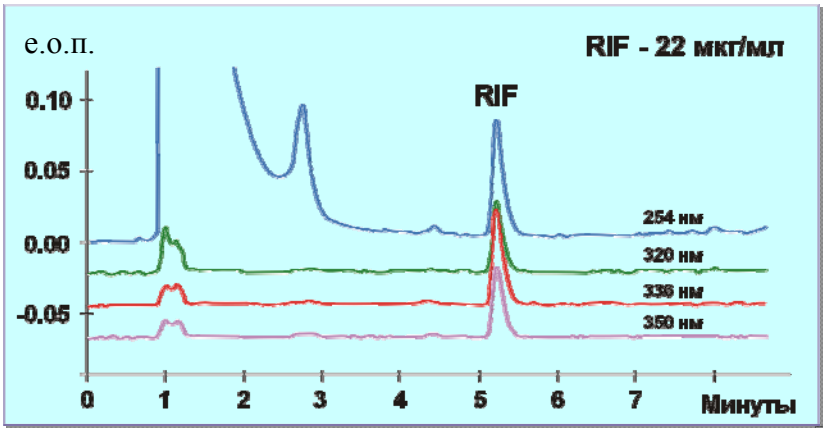
Условия хроматографического определения рифампицина

- Колонка — ProntoSIL 120-5-C18 AQ, 2*75 мм
- Элюент А — 0.01M $(NH_4)_2HPO_4$ (pH 6.5)
- Элюент В — Ацетонитрил
- Градиент — 1100 мкл от 30 до 80% Б (линейный)
- Скорость потока — 150 мкл/мин
- Объем образца — 10 мкл
- Детекция — 254, 320, 336, 350 нм
- Температура — 35ºC
- Давление — 2.5-3.0 MPa

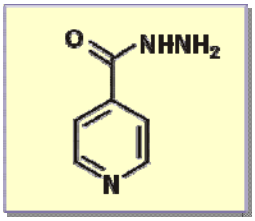
Хроматограммы сыворотки крови с RIF и без него



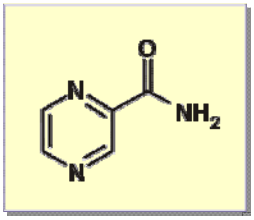
Хроматограмма сыворотки крови пациента с большим содержанием RIF



Молекулярная структура изонизида и пиразинамида

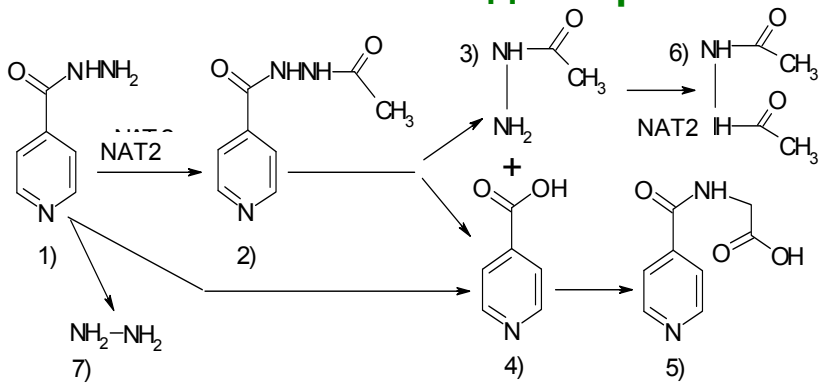


Изониазид (INH)



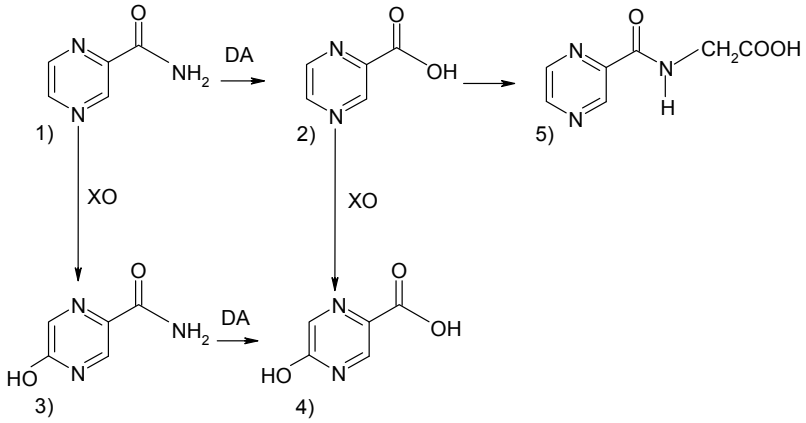
Пиразинамид (PZA)

Метаболизм изониазида в организме



1)изониазид (INH); 2) ацетилизониазид (AcINH);
3) ацетилгидразин; 4) изоникотиновая кислота;
5) изоникотинил глицин; 6) диацетилгидразин;
7) гидразин; NAT2 – ариламин-N-ацетилтрансфераза 2
Ацетилятор – человек, обладающий определенной активностью NAT2

Метаболизм пиразинамида в организме



1) пиразинамид (PZA); 2) пиразиноевая кислота (PA);
3) 5-гидроксипиразинамид; 4) 5-гидроксипиразиноевая кислота;
5) N-(пиразинилкарбонил) глицин;
DA – деамидаза; XO - ксантиноксидаза

Подготовка пробы

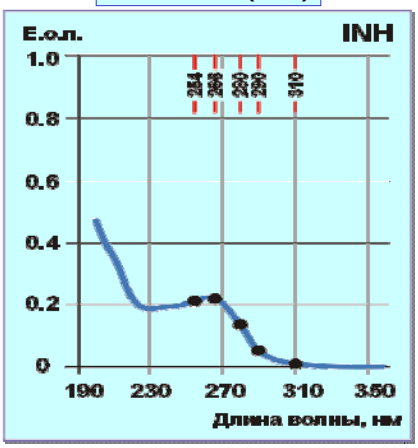
Процедура осаждения белков для
INH, AcINH, PZA и PA

~~200 мкл сыворотки +~~
100 мкл 10% трихлоруксусной кислоты

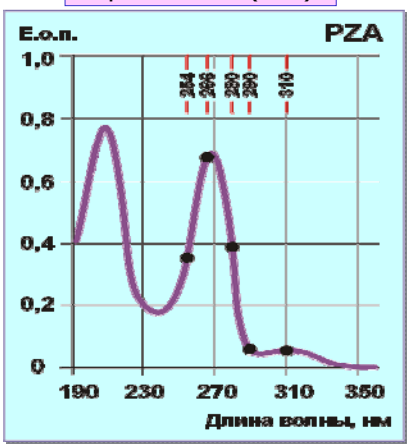
~~перемешать 1 мин, центрифу-~~
гировать при 2000g 5 мин.

Спектры поглощения лекарств

Изониазид (INH)

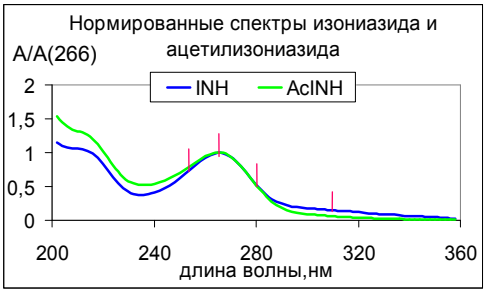


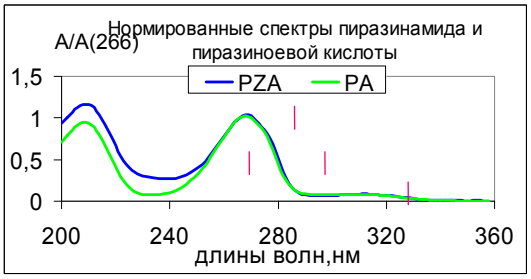
Пиразинамид (PZA)



Из анализа спектров поглощения INH, PZA были выбраны длины волн для регистрации хроматограмм 250, 266, 280 и 310 нм и аналитическая длина волны для количественного определения - 266 нм.

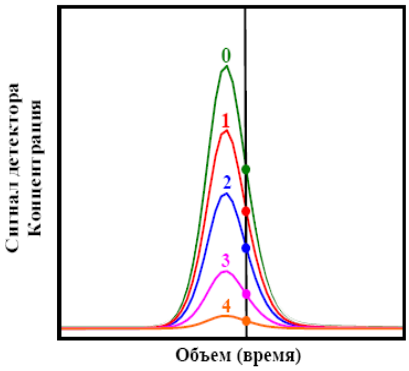
Спектры поглощения лекарств (pH 2,2)





Многоканальное детектирование

Спектральное отношение (R)



$$A_N = a_N\, C\, l,$$

Закон Бугера- Ламберта-Бера

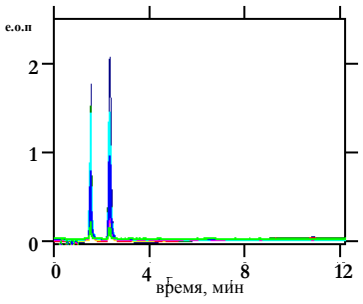
Для гомогенного пика

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

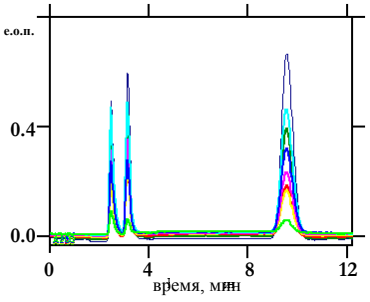
Спектральные отношения пиразинамида и пиразиноевой кислоты

Вещество	Уровни концен-трации, мг/л	Спектральные отношения (x ± 2*S)			Объем удержи-вания (x ± 2*S), мкл
		S_{250}/S_{266}	S_{280}/S_{266}	S_{310}/S_{266}	
Пиразиноевая кислота, PA	5	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,08 ± 0,03	594 ± 33
	25	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,08 ± 0,01	
Пиразинамид, PZA	10	0,53 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,09 ± 0,01	707 ± 41
	50	0,52 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,08 ± 0,01	

Оптимизация условий элюирования INH, AcINH, PZA при pH 2,3



градиент: 5 –100% Б за 4000 мкл (условия базы данных), поток 150 мкл/мин



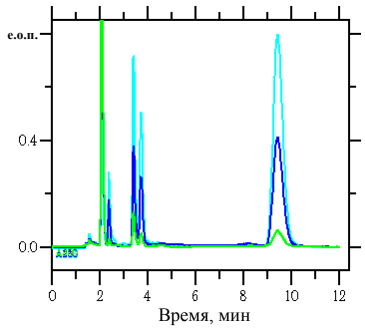
градиент: 0 –20% Б за 2000 мкл, поток 100 мкл/мин

Условия хроматографического определения INH, AcINH, PZA

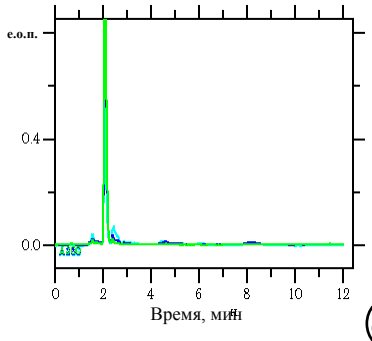
без ион- парного реагента

- элюент А – 0,01 М $LiClO_4$ - $HClO_4$, pH 2,3;
- элюент Б – ацетонитрил;
- градиент 0-20% Б за 1200 мкл;
- расход элюента - 100 мкл/мин;
- длины волн детектора - 250, 266, 280, 310 нм;
- постоянная времени детектора – 0,18 с;
- температура – 40°С;
- объем пробы - 10 мкл;
- предобразец - 1М $(NH_4)_2HPO_4$ (pH 8,6) 2 мкл

Хроматограммы сливной сыворотки с добавками лекарств и без добавок, полученные в оптимизированных условиях



Хроматограмма сыворотки крови с добавками лекарств 25-50 мкг/мл (R=1.5)



Хроматограмма сыворотки крови без добавок лекарств

Средняя концентрация препаратов в сыворотке крови, $\bar{C}$±S, мкг/мл (n=34)

Лекарство/ Время (час)	PZA	INH	RIF
0	16.8±2.3	0	0
1	**20.0 ±1.5**	**19.1 ±1.3**	0
2	19.5 ±1.5	11.3 ±0.7	**16.4 ±1.5**
4	12.3 ±2.0	5.7 ±0.7	5.3 ±0.4
24	2.2 ±0.5	0	0

Концентрационные профили препаратов

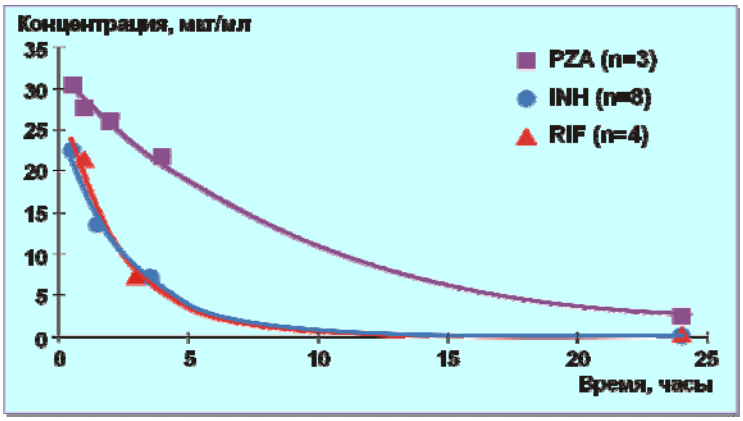
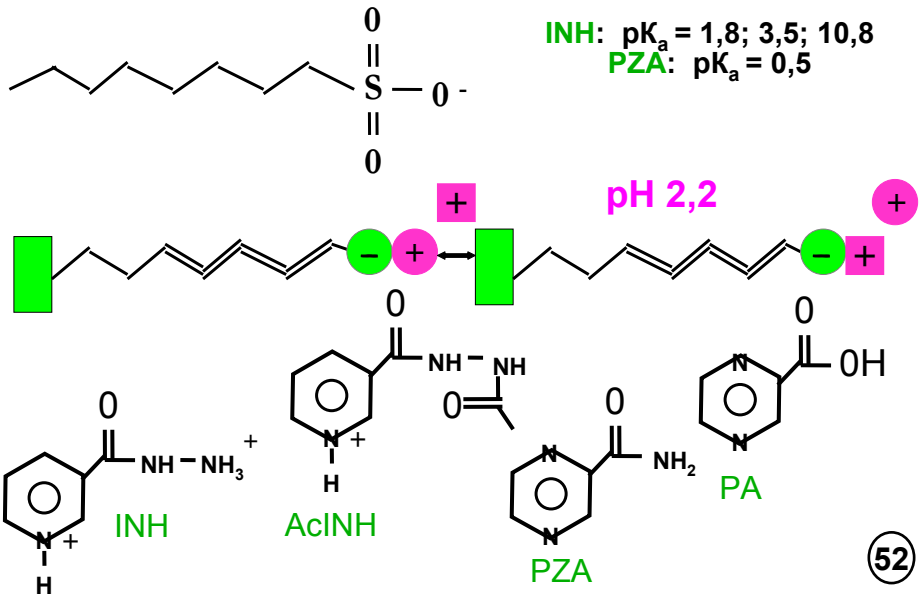


Схема взаимодействия лекарств с ион-парным реагентом

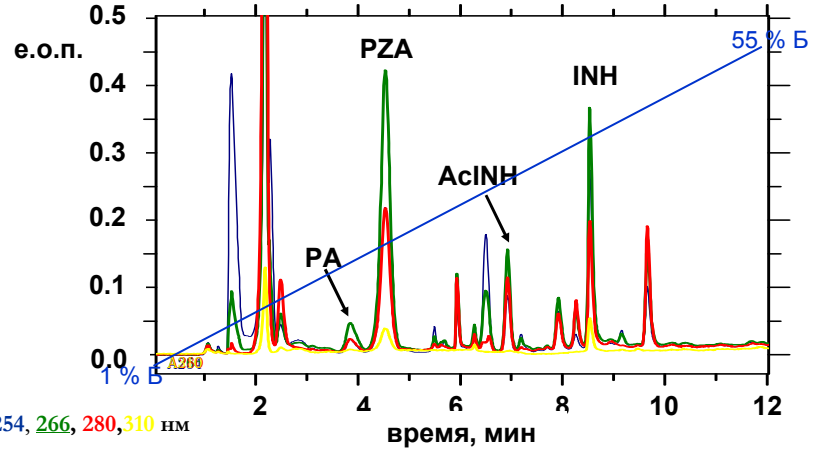


Условия хроматографического определения INH, AcINH, PZA, PA с ион-парным реагентом:

- хроматограф - «Милихром А-02»
- колонка - ProntoSIL 120-5-C18 AQ, 2x75 мм
- элюент А – 0,1 % ТФУ - 0,4 % октилсульфонат натрия, pH 2,2;
- элюент Б – ацетонитрил;
- градиент - 2000 мкл 1- 60%Б, 800 мкл 100%Б;
- длины волн детектора - 254, 266, 280, 310 нм;
- расход элюента - 150 мкл/мин;
- объем образца 20 мкл;
- температура - 40 ° С.

ЭкоНова'11

Хроматограмма сыворотки крови в оптимизированных условиях, элюент с ион-парным реагентом



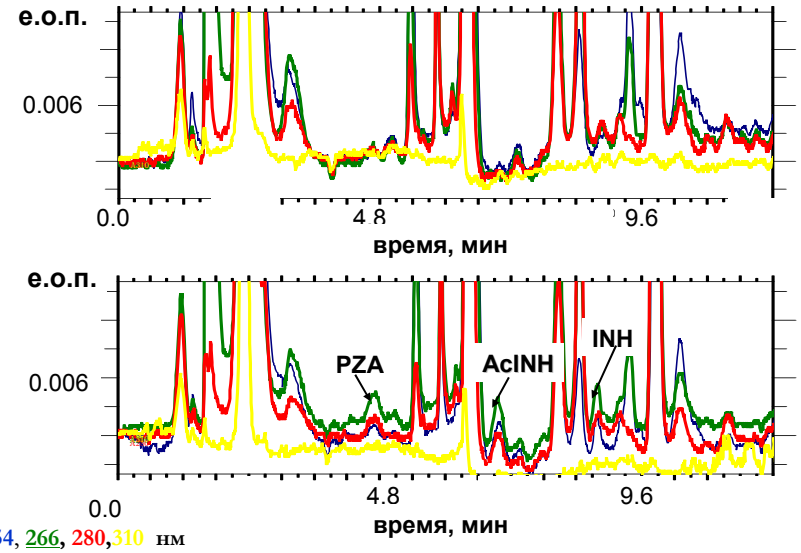
254, 266, 280, 310 нм

PA -3,9, PZA -31,7, AcINH -7,0, INH -10,1 мкг/мл

54

ЭкоНова'11

Хроматограммы сыворотки крови без лекарств и на пределе обнаружения



254, 266, 280, 310 нм

PZA –0,06, AcINH –0,3, INH –0,2 мкг/мл

55

Валидация биоаналитических методов

- Валидация оборудования
- Валидация подготовки СО
- Валидация аналитической методики (первичная)
- Валидация аналитической методики (рутинная)
- Валидация документации

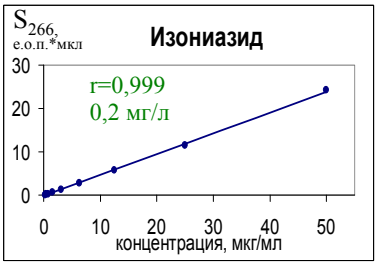
Селективность
Точность
Воспроизводимость
Степень извлечения
Правильность градуировки
Стабильность пробы

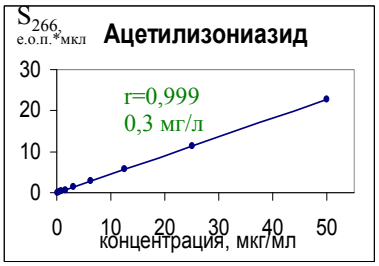
1). Guidance for Industry. Bioanalytical Method validation. //Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, U/S/ Department of Health and Human Services, Rockville, Maryland, May 2001.

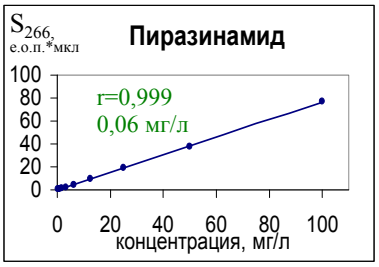
2). ОСТ 42-510-98. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP): Стандарт отрасли, М.,1998.

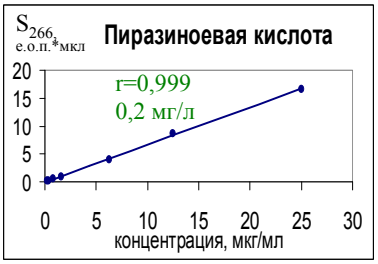
3). О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследованийв учреждения здравоохранения РФ. Приказ МЗ РФ от 7 февр. 2000г. №45. // Рос. Газ. - 2000.-20 февр. - С.4.

Градуировочные графики









ЭкоНова'11

Регрессионная статистика для градуировочных кривых y=A+Bx и пределы обнаружения

Вещество	PZA	AcINH	INH	PA
Диапазон концентрации, мг/л	0,4-100	0,4-50	0,2-50	0,2-25
Отсечение, A	0,12	-0,04	-0,14	-0,08
Наклон, B	0,768	0,456	0,484	0,671
Коэффициент корреляции, r	0,99999	0,99999	0,99992	0,99962
СКО,%	1,05	0,8	2,8	4,1
Пределы обнаружения, мг/л	0,06	0,3	0,2	0,2
Наименьшая определяемая концентрация, мг/л	0,2	1,0	0,6	0,6

ЭкоНова'11

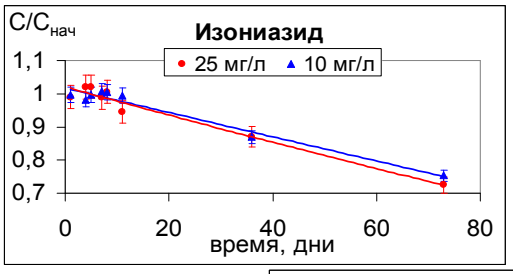
Сходимость и воспроизводимость метода

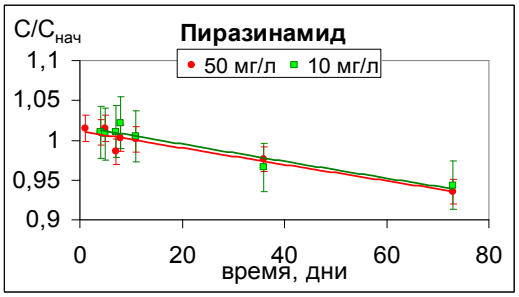
Вещество	Уровень концентрации, мг/л	Сходимость: СКО, %	n	Воспроизводи-мость: СКО,%	n
Пиразинамид	2	1,9	7	4,8	7
	10	1,4	7	3,2	7
	20	1,1	7	2,1	7
	50	1,2	6	1,6	7
Ацетилизониазид	1	4,4	6		
	5	1,3	6		
	10	1,0	6		
	25	1,0	6		
Изониазид	1	4,8	7	6,2	6
	5	1,4	7	4,0	6
	10	1,2	6	2,3	6
	25	1,3	6	3,5	6
Пиразиноевая кислота	1	4,6	7		
	5	1,6	7		
	10	1,3	7		

Правильность метода

Вещество	Введено, мг/л	Найдено (X ± tS/√n, P=0,95), мг/л	Найдено/введено, %	n
Пиразинамид	2	2,09 ± 0,04	105	7
	10	10,2 ± 0,1	102	7
	20	20,8 ± 0,2	104	7
	50	50,7 ± 0,7	101	6
Ацетил-изониазид	1	1,07 ± 0,06	107	7
	5	5,05 ± 0,07	101	6
	10	10,1 ± 0,1	101	6
	25	25,2 ± 0,3	101	6
Изониазид	1	1,08 ± 0,05	108	7
	5	4,9 ± 0,1	98	7
	10	10,1 ± 0,1	101	6
	25	25,3 ± 0,4	101	6
Пиразиноевая кислота	1	1,03 ± 0,05	103	7
	5	4,9 ± 0,1	98	7
	10	10,2 ± 0,1	102	7
	25	25,8 ± 0,9	103	6

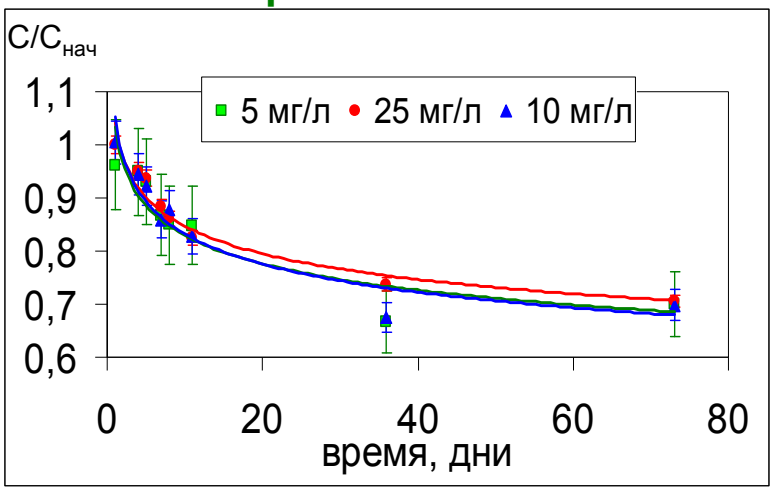
Изменение концентраций лекарств при хранении проб при Т = - 20º С)





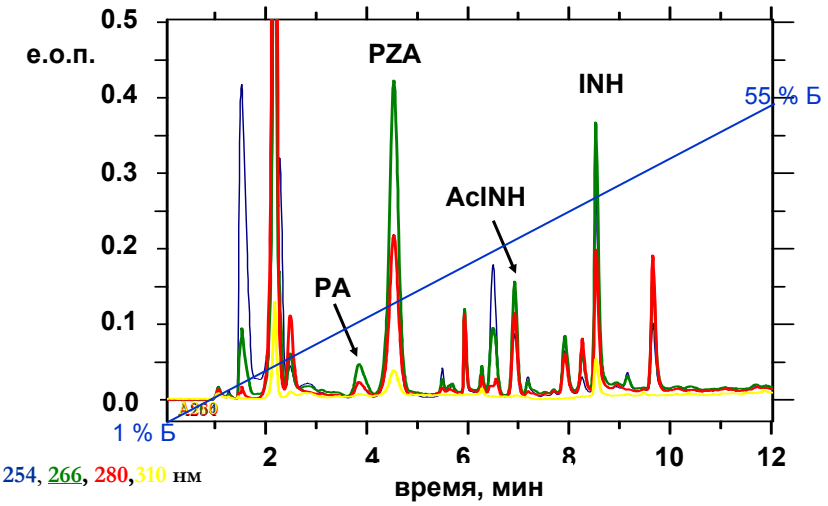
ЭкоНова'11

Изменение концентрации ацетилизониазида при хранении проб при Т = - 20° С



ЭкоНова'11

Хроматограмма сыворотки крови пациента через час после приема препаратов



254, 266, 280, 310 нм

PA -3,9, PZA -31,7, AcINH -7,0, INH -10,1 мкг/мл

Преимущества унифицированной методики

- ✓ Одновременное определение изониазида, пиразинамида и двух их основных метаболитов за 15 – 20 мин;
- ✓ Экспрессность и экономичность (подготовка пробы <10мин);
- ✓ Объем сыворотки крови : 200 мкл;
- ✓ Многоволновое детектирование: 4 длины волны.

Метрологические характеристики

- ✓ Воспроизводимость: СКО 1,6 – 6,2 %;
- ✓ Правильность: 98 – 108 %;
- ✓ Пределы обнаружения: 0,06 – 0,3 мкг/мл.

Фармакокинетические параметры

K_{el} (1/ч) – константа элиминации (характеризует скорость выведения лекарства из организма)

$T_{1/2}$ (ч) – период полуэлиминации (время, необходимое для уменьшения вдвое концентрации лекарства в крови)

Cl (мл/мин*кг) – общий клиренс (объем крови, очищающийся от препарата в единицу времени)

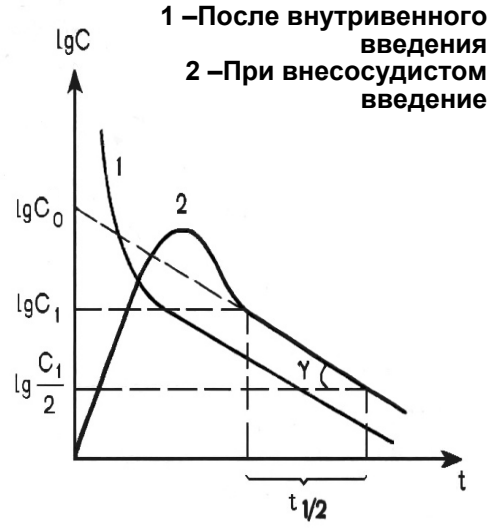
D (мкг/кг) – доза

C_0 (мг/л) – кажущаяся начальная концентрация (концентрация препарата, которая была бы достигнута при мгновенном его распределении по органам и тканям)

V (л/кг) – кажущийся объем распределения (характеризует степень захвата препарата тканями из сыворотки крови)

AUC (мкг*ч/мл) – площадь под кинетической кривой «концентрация - время» (пропорциональна дозе препарата, попавшего в системный кровоток)

Фармакокинетические параметры



$t_{1/2}=\ln 2/K_{el}$ – период полувыведения

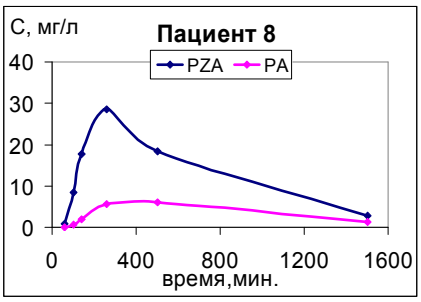
$K_{el}=\ln 10 \times tg\gamma$ – константа элиминации

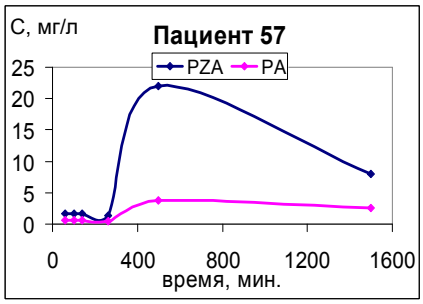
$Cl=K_{el} \times V$ – клиренс

$V=D/C0$ – кажущийся объем распределения

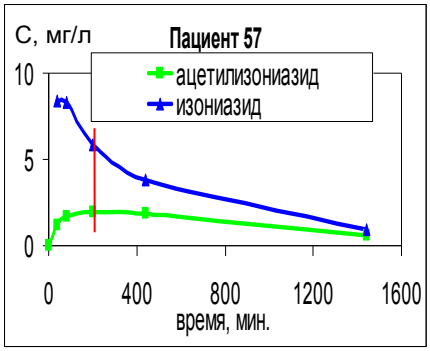
$AUC=D/(K_{el} \times V)$ – площадь под кривой

Кинетические кривые для PZA и PA





Кинетические кривые для INH и AcINH

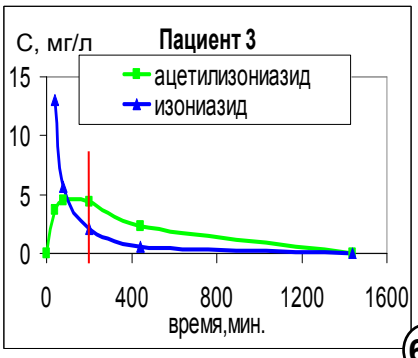


Через 3 часа
AcINH/ INH <0,48

Медленный ацетилятор

Через 3 часа
AcINH/ INH >0,77

Быстрый ацетилятор



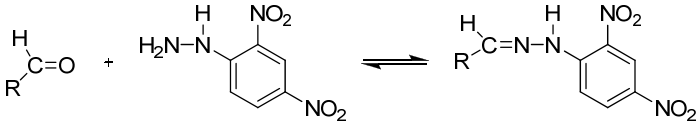
Сравнение экспериментальных и литературных фармакокинетических параметров для INH

Расчетный параметр	Экспериментальные данные		Литературные данные	
	МА	СА/БА	МА	СА/БА
t1/2, ч	3,7	1,35	3,3; 3-5	1,2; 1
Kel, ч-1	0,19	0,54	0,19	0,43/0,68
V, л/кг	0,67		0,6 – 0,8	

МА - медленные, СА - средние, БА - быстрые ацетиляторы

Диагностические исследования
Сахара в моче

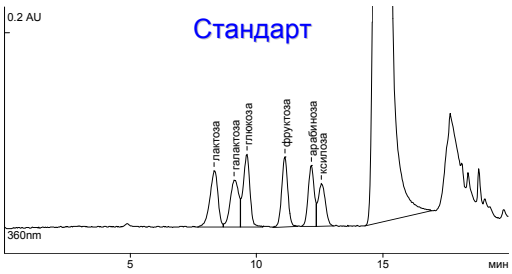
Реакция дериватизации

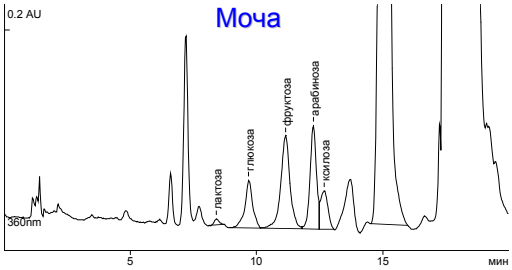


Условия хроматографического определения

- **хроматограф - «Милихром А-02»;**
- **колонка – Nucleosil 100-5 C18, 2х75 мм;**
- **элюент А – 0,1 % ТФУ, элюент Б – 0,1 % ТФУ, 70% ACN;**
- **градиентное элюирование: 2200 мкл 16-27%Б , 200 мкл 27-100%Б, 600 мкл 100%Б; расход элюента - 150 мкл/мин;**
- **длины волн детектора - 250, 340, 360 нм;**
- **объем образца 5 мкл;**
- **температура - 35 º С.**

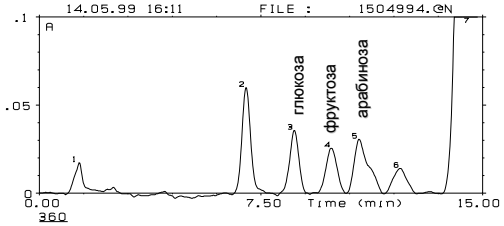
Сахара в моче



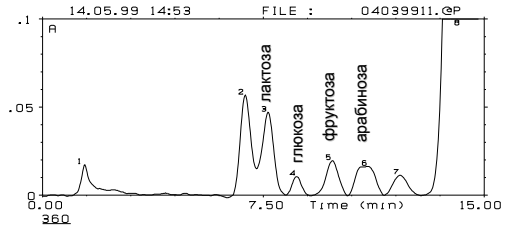


Сахара в моче

Здоровый человек



Больной лактозурией



Количество выполненных анализов

противотуберкулезные препараты:

получены фармакокинетические кривые для INH, AcINH, PZA и PA для 33 пациентов (около 400 анализов)

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫЙ МОНИТОРИНГ:

туберкулез легких

За три года в Новосибирском научно-исследовательском институте туберкулеза выполнено **2,5 тыс.** анализов INH, PZA, RIF для оптимизации индивидуальной дозировки лекарств.

Сахара: в Областном диагностическом центре г. Новосибирска обследовано более 80 больных.

Преимущества микроколоночных методов

с многоволновым детектированием и градиентным элюированием

- ✓ Одновременное определение группы веществ за 15-20 минут по унифицированным методикам :
  - ПСП (8 веществ), метотрексат, циклоспорин;
  - RIF, INH, PZA и их метаболиты (5 вещества);
  - Сахара (6 веществ).
- ✓ Небольшой объем сыворотки крови: 50 - 200 мкл;
- ✓ Многоволновое детектирование: 4 длины волны;
- ✓ 400 анализов на одной колонке;
- ✓ Простая подготовка пробы;
- ✓ Экономичность и экспрессность.

Метрологические характеристики

- ✓ Воспроизводимость и правильность: не хуже 15%;
- ✓ Пределы обнаружения: 0,003 – 7,0 мкг/мл.

Ссылки по теме

CD-Милихром А-02/ Научные публикации/ Диссертации/

1) 2003-Федорова Г.А. Кандидатская диссертация. «Оптимизация м етода ВЭЖХ для терапевтического лекарственного мониторинга противосудорожных препаратов, метотрексата и циклоспорина А». Автореферат кандидатской диссертации.

CD-Милихром А-02/ Научные публикации/ Статьи/

1) Федорова Г.А., Кожанова Л.А. Применение микроколоночной жидкостной хроматографии для анализа биологических жидкостей. В кн. «Хроматография на благо России» (ред. Курганов А. А.), Москва, «Граница», 2007, с.666-684.
2) Федорова Г.А., Кожанова Л.А., Полянская. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине. Часть 1. /Вестник восстановительной медицины, 2008, №1(23), с.35-41.
3) Федорова Г.А., Кожанова Л.А., Азарова И.Н. Применение микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине. Часть 2. /Вестник восстановительной медицины, 2008, №2(24), с.47-50.

CD-Милихром А-02/ Учебный центр «Хроматография»/ Дипломные работы студентов/

1) Полянская Е.М. Диплом НГУ. «Определение противотуберкулезных препаратов методом ВЭЖХ для оценки их фармакокинетики и анализ ее соответствия генетическим предикторам больных туберкулезом легкого».