

2.2.29. РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ

Рідинна хроматографія (РХ) — це метод хроматографічного розділення, що ґрунтується на різниці в розподілі компонентів між двома фазами, що не змішуються, де рухома фаза, що є рідиною, яка проходить крізь нерухому фазу, що міститься в колонці.

РХ переважно ґрунтується на механізмах адсорбції, масового розподілу, іонного обміну, ексклюзії за розміром або стереохімічної взаємодії.

Якщо немає інших зазначень, уся наведена нижче інформація застосовна як для класичної РХ, так і для РХ з використанням колонок зі зменшеним розміром частинок (наприклад, до 2.0 мкм).

В останньому випадку потрібно використовувати обладнання, що здатне витримувати більш високий тиск (зазвичай до 100 МПа, тобто 15 000 фунт / кв. дюйм), що утворює вужчу зону позаколонкового розмивання, забезпечує поліпшене градієнтне змішування і дозволяє більш високу частоту реєстрування сигналу в детекторі.

ОБЛАДНАННЯ

Обладнання зазвичай складається з:

- насосної системи;
- інжектора;
- хроматографічної колонки (може використовуватися регулятор температури колонки);
- одного або декількох детекторів;
- системи збирання даних.

Рухома фаза зазвичай подається з одного або декількох резервуарів і прокачується насосом до інжектора, потім через колонку, зазвичай з постійною швидкістю, а потім через детектор(-и).

НАСОСНІ СИСТЕМИ

Насосні системи РХ подають рухому фазу з регульованою швидкістю потоку. Коливання тиску слід мінімізувати, наприклад, пропусканням розчинника, що є під тиском, через пристрій амортизації пульсацій. Трубки й з'єднання мають витримувати тиск, що розвивається насосною системою. Насоси РХ можуть бути оснащені пристроєм для звільнення системи від захоплених бульбашок повітря.

Насосні системи, керовані мікропроцесором, мають справно подавати рухому фазу як постійного складу (ізократичне елюювання), так і змінного складу (градієнтне елюювання) відповідно до визначеної програми. У разі градієнтного елюювання є насосні системи, що подають розчинник(-и) з декількох резервуарів, і змішування розчинників може відбуватися як на стороні низького тиску, так і на стороні високого тиску насоса(-ів).

ІНЖЕКТОРИ

Розчин зразка вводять у потік рухомої фази безпосередньо в колонку або близько до її верхньої частини за допомогою системи інжектування, що може функціонувати за високого тиску. Використовують петльові дозатори або пристрої з регульованим об'ємом, які приводяться в дію вручну або за допомогою автосамплера. Часткове заповнення петель під час ручного введення може негативно вплинути на точність об'єму інжекції.

НЕРУХОМІ ФАЗИ

Існує багато типів стаціонарних фаз, що використовуються в РХ, зокрема:

- силікагель або глинозем, які зазвичай використовуються в нормальнофазовій РХ (полярна нерухома фаза та неполярна рухома фаза), де розділення засноване на різниці в адсорбції на нерухомій фазі й/або масовому розподілі між рухомою та нерухомою фазою (розподільна хроматографія);
- низка хімічно модифікованих носіїв, виготовлених із полімерів, силікагелю або пористого графіту, які використовуються в нормальнофазовій та оберненофазовій РХ (неполярна нерухома фаза й полярна рухома фаза), де розділення засноване переважно на розподілі молекул;
- смоли або полімери з кислотними або основними групами, що використовуються в іонообмінній хроматографії, де розділення засноване на конкуренції між іонами, що підлягають розділенню, й іонами, що містяться в рухомій фазі;
- пористі силікагелі й полімери, що використовуються в ексклюзійній хроматографії (2.2.30), де розділення засноване на відмінностях між об'ємами молекул, що підпадають під стеричну ексклюзію;
- спеціальні модифіковані нерухомі фази, наприклад похідні целюлози або амілози, білки або пептиди, циклодекстрини тощо, для розподілу енантіомерів (хіральна хроматографія).

Найчастіше для розділення застосовується оберненофазова РХ з використанням модифікованого РХ з використанням силікагелю як нерухомої фази. Поверхня носія, наприклад силанольні групи силікагелю, обробляється різними силановими реагентами для утворення ковалентно зв'язаних силільних похідних, що покривають різну кількість активних центрів поверхні носія. Природа цієї зв'язаної фази є важливим параметром для визначення розділювальних властивостей хроматографічної системи.

Якщо виробником не зазначено інше, колонки з оберненою фазою на основі силікагелю вважаються стабільними в рухомих фазах, що мають значення рН у діапазоні від 2.0 до 8.0. Колонки, що містять пористий графіт або частинки полімерних матеріалів, таких як сополімер стиролу-дивінілбензолу, стабільні в більш широкому діапазоні значень рН.