

Высокоскоростная хроматография

Растворители для
хроматографии и спектроскопии

Пути увеличения эффективности работы ВЭЖХ лаборатории.



- Автоматизация ВЭЖХ системы и круглосуточная работа оборудования.
- Оптимизация анализа на всех его этапах.
(Пробоподготовка, **разделение**, анализ полученных результатов)
- Скорость процесса разделения определяется свойствами доступных на сегодня ВЭЖХ сорбентов.

» Предел 3 мкм.

Монолитные ВЭЖХ сорбенты Chromolith®



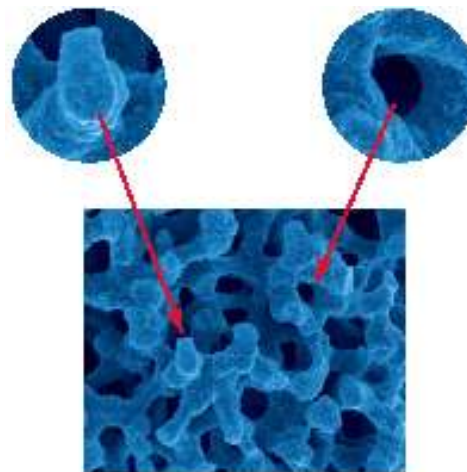
**Революционно новый подход к изготовлению сорбентов
-монолитный стержень из силикагеля вместо частиц.**

**ВЭЖХ колонки Chromolith® в отличие от обычных
заполнены не микрочастицами, а представляют из себя
цельный стержень изготовленный из высокочистого
монолитного силикагеля.**



Мезопоры: 13 nm

Макропоры: 2 μ m



Откуда название?

ChromolithTM

Chromatography

= 1. method for separating chemical substances

[Chrōma (χρῶμα) = colour] [Gráphein (γράφειν) = to write]

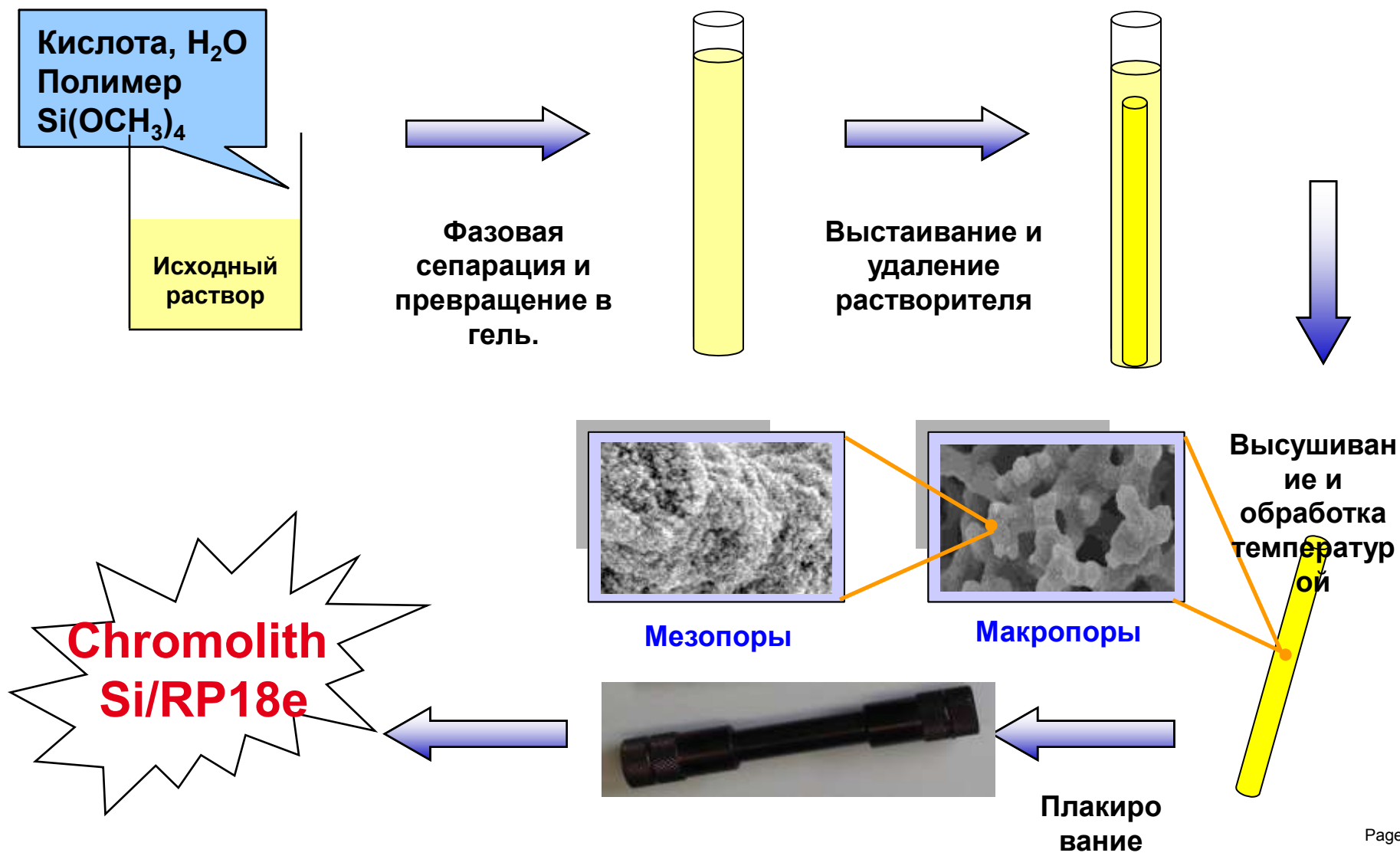
Monolithic

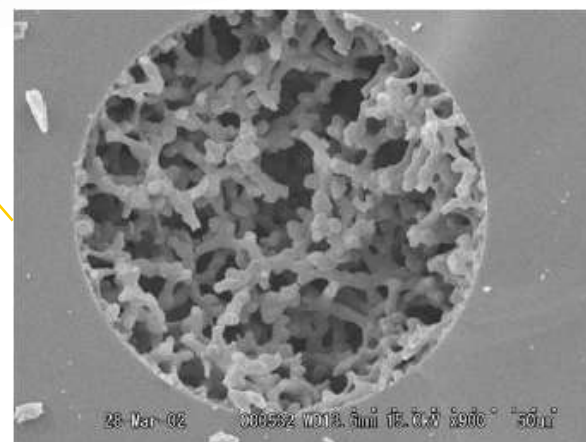
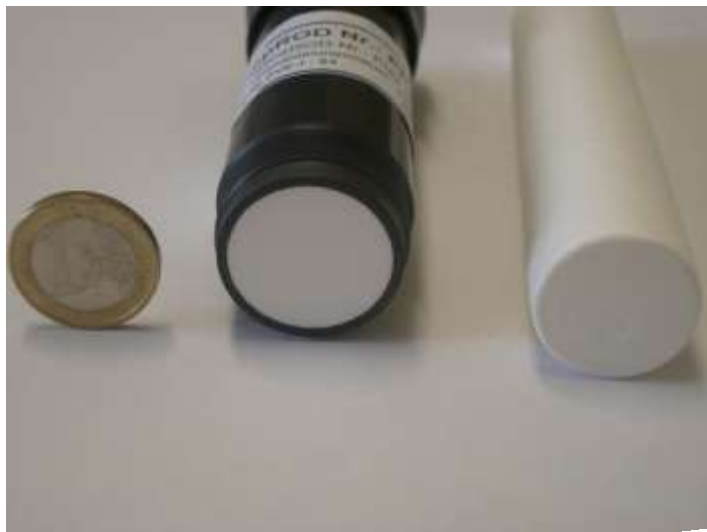
= 1. consisting of one stone

= 2. cast as a single piece

[mónos (μόνος) = one, alone, only] [Líthos (λίθος) = stone]

Синтез монолитного силикагеля. Технология SOL-GEL





Монолитный силикагелиевый стержень



Помещённый в оболочку из PEEK

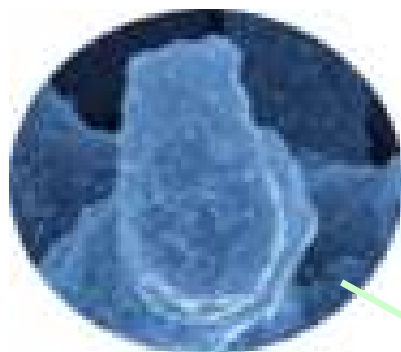
Фотография монолитного силикагеля полученная на электронном микроскопе.



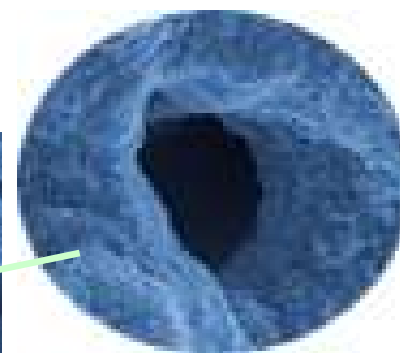
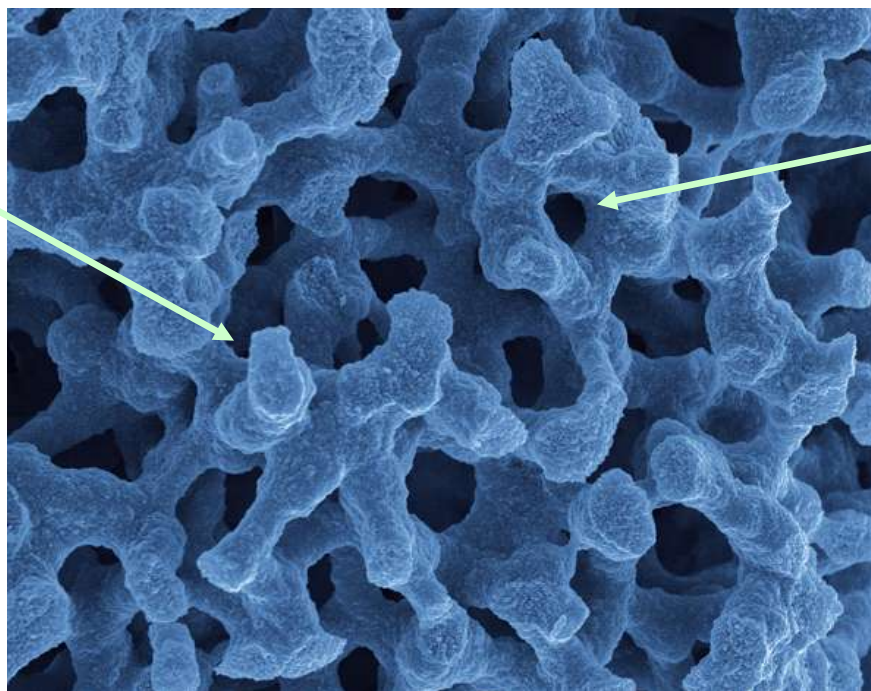
- мезопоры 13 нм

макропоры 2 μm

Бимодальная структура пор



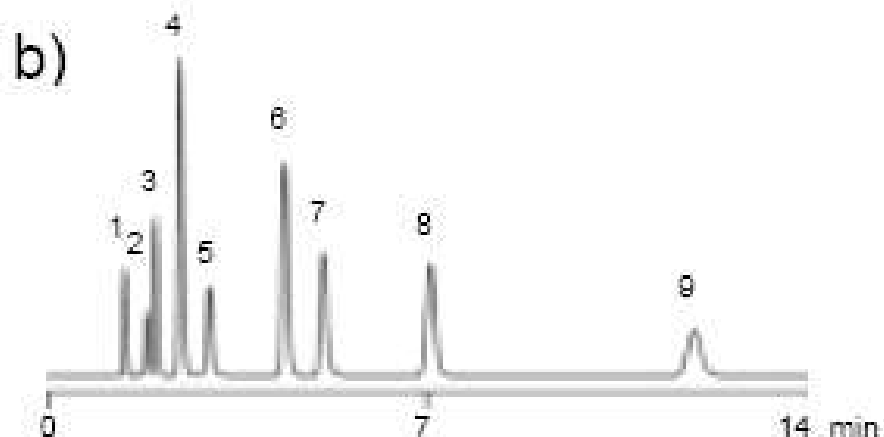
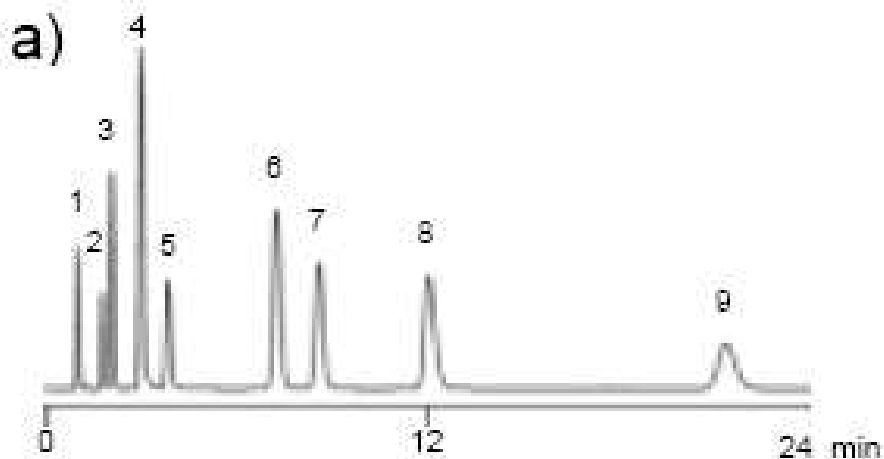
300 м²/г



Доступность
поверхности
80%,

Оптимальное соотношение величины транспортных пор
к общей пористости и к толщине силикагелиевого скелета

Монолит в сравнении с микрочастицами



a) LiChroCART®

Purospher® RP-18e, 125–4 mm, 5 µm

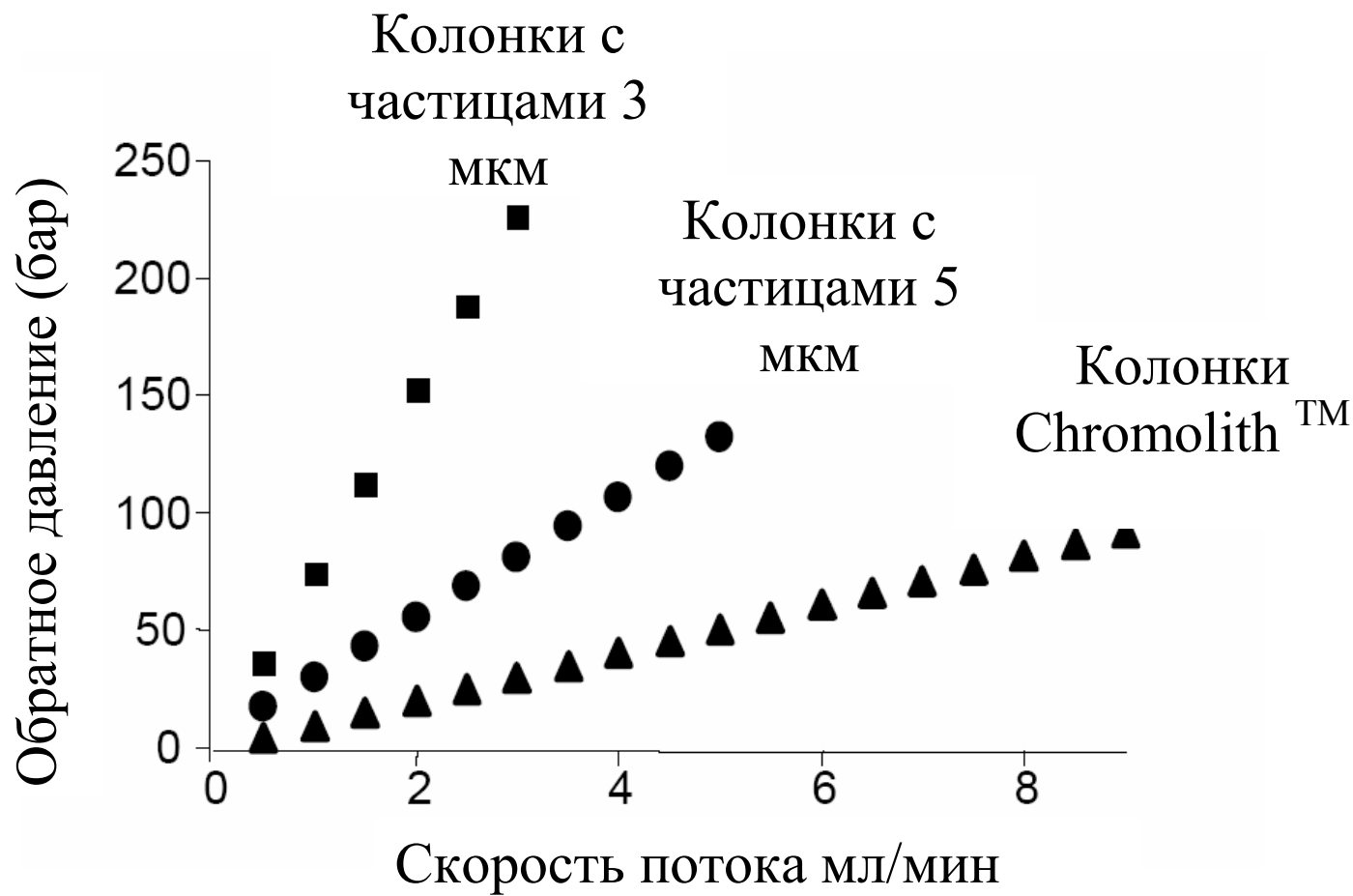
b) Chromolith™ Performance RP-18e,
100–4.6 mm.

Подвижная фаза: Метанол/вода
(55/45, v/v).

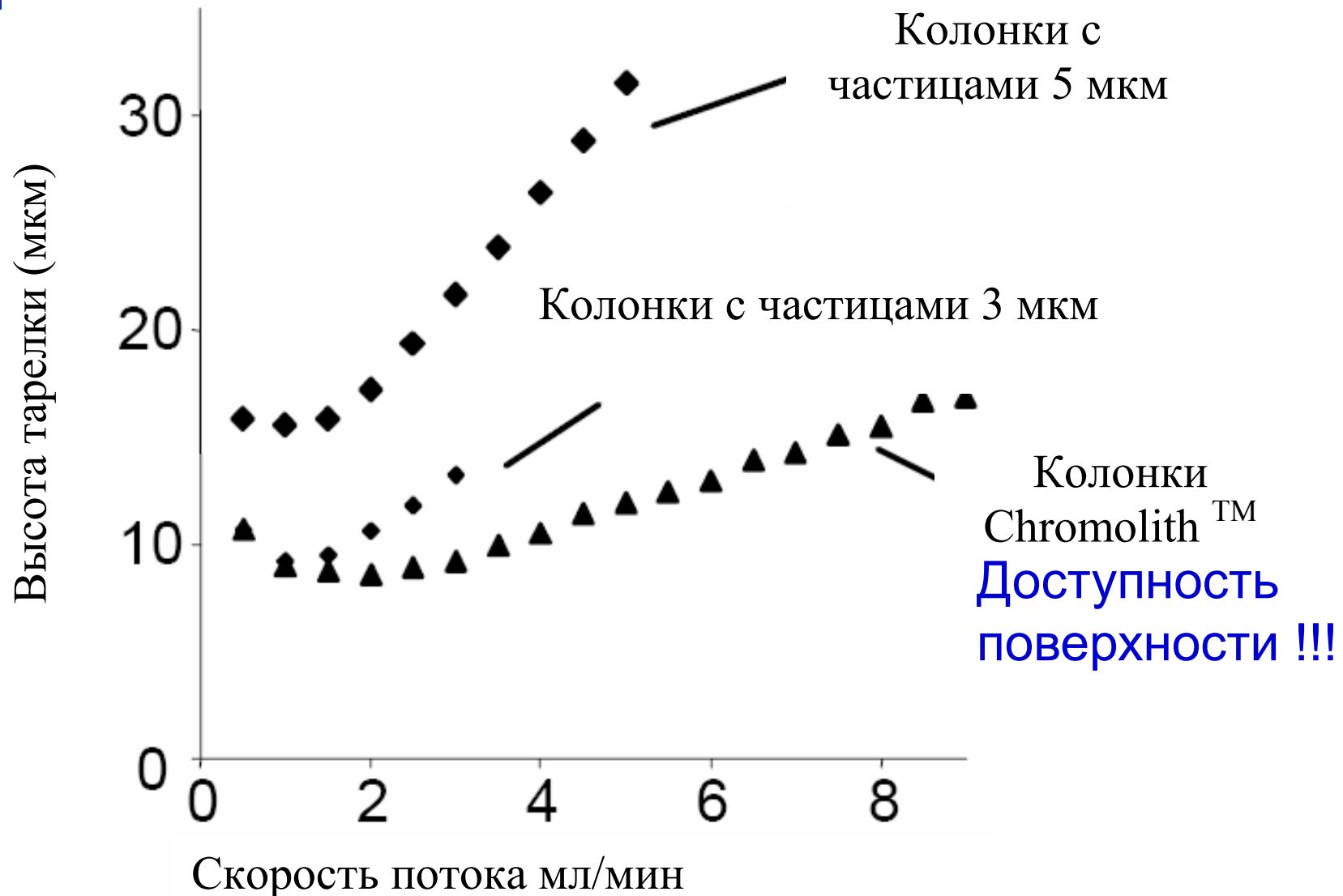
Детектирование UV @ 254 nm,
скорость потока 1 мл/мин.

Идентификация пиков: 1)
тиомочевина, 2) анилин,
3) фенол, 4) 2,3-
дигидроксинафталин, 5) 4-
этиланилин, 6) диэтилфталат, 7) N, N
диметиланилин, 8) толуол, 9)
этилбензол.

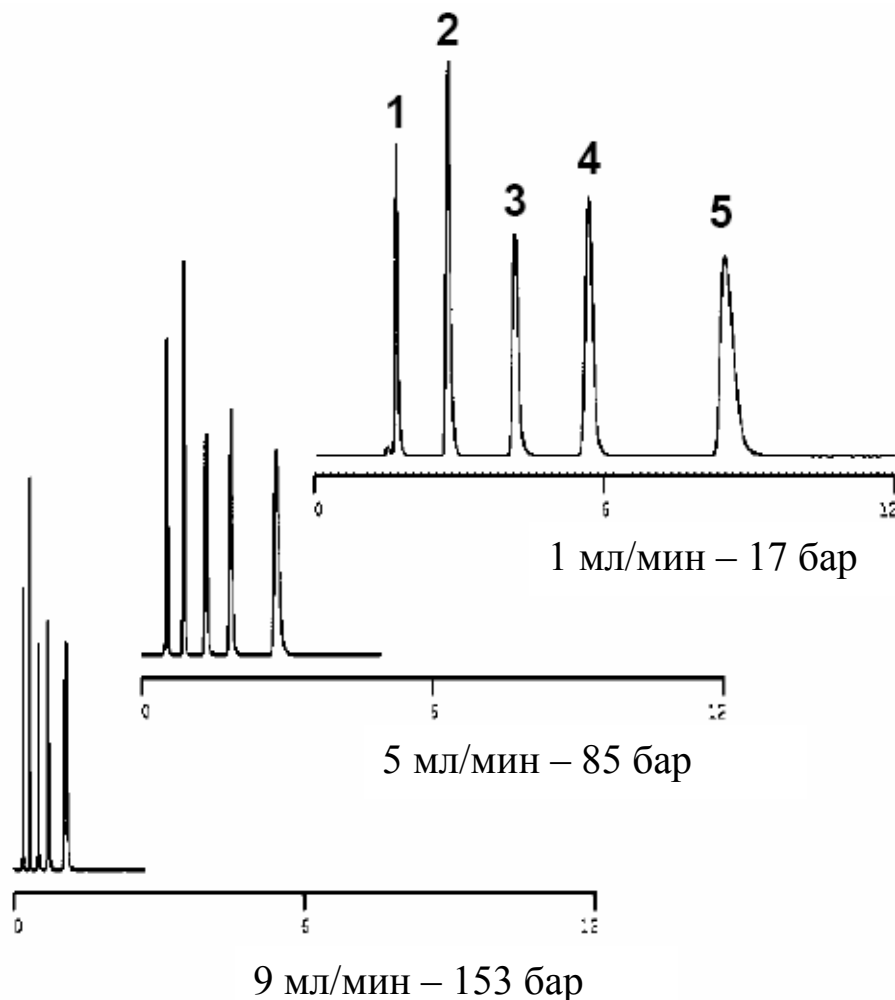
Зависимость величины обратного давления от скорости подачи ПФ.



Эффективность – кривая Ван Димтра.



Скорость и качество на практике.



Разделение пяти бета-блокирующих препаратов на колонке Chromolith™ Performance RP-18e, 100–4.6 мм при различных скоростях потока.

Подвижная фаза: ацетонитрил/0.1 % ТФУ в воде (20/80, об/об). Детектирование UV @ 254 нм.

Идентификация пиков 1) атенолол, 2) пиндолол, 3) метопролол, 4) целипролол и 5) бисопролол

Несколько колонок Chromolith™ HPLC могут быть легко соединены в одну колонну с большим числом теоретических тарелок.

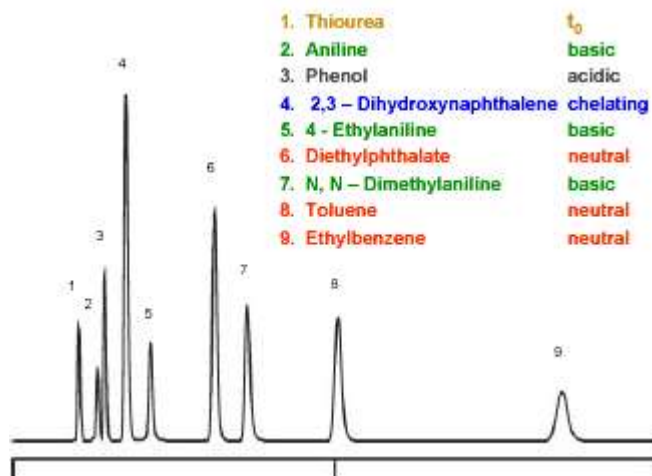


Число Chromolith™ Performance в системе	Общая длина (мм)	Давление (бар)	Эффективность колонки. по антрацену (т.т.)
Chromolith™ Performance 1x	100	30	10000
Chromolith™ Performance 2x	200	60	19000
Chromolith™ Performance 3x	300	90	27000
Chromolith™ Performance 4x	400	120	35000
Chromolith™ Performance 5x	500	150	41000

Chromolith® - Низкое сопротивление сорбента позволяет соединять до 10 колонок для получения высочайшей эффективности разделения

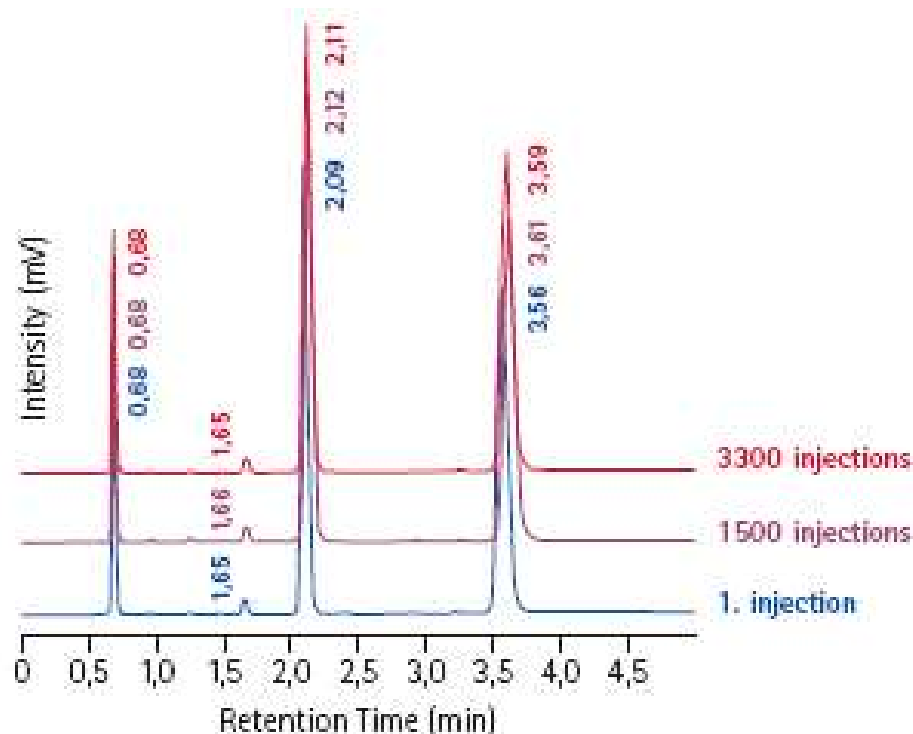


1.51467.0001
Chromolith Column Coupler



Единый, монолитный,
полимермеризованный
силикагель

Долгое время работы колонок Chromolith и их устойчивость к забиванию уменьшает стоимость анализа и обеспечивает целостность аналитических данных.



Три наложенные друг на друга хроматограммы демонстрируют воспроизводимость первой, 1500й и 3000й инъекции

Высокая надежность

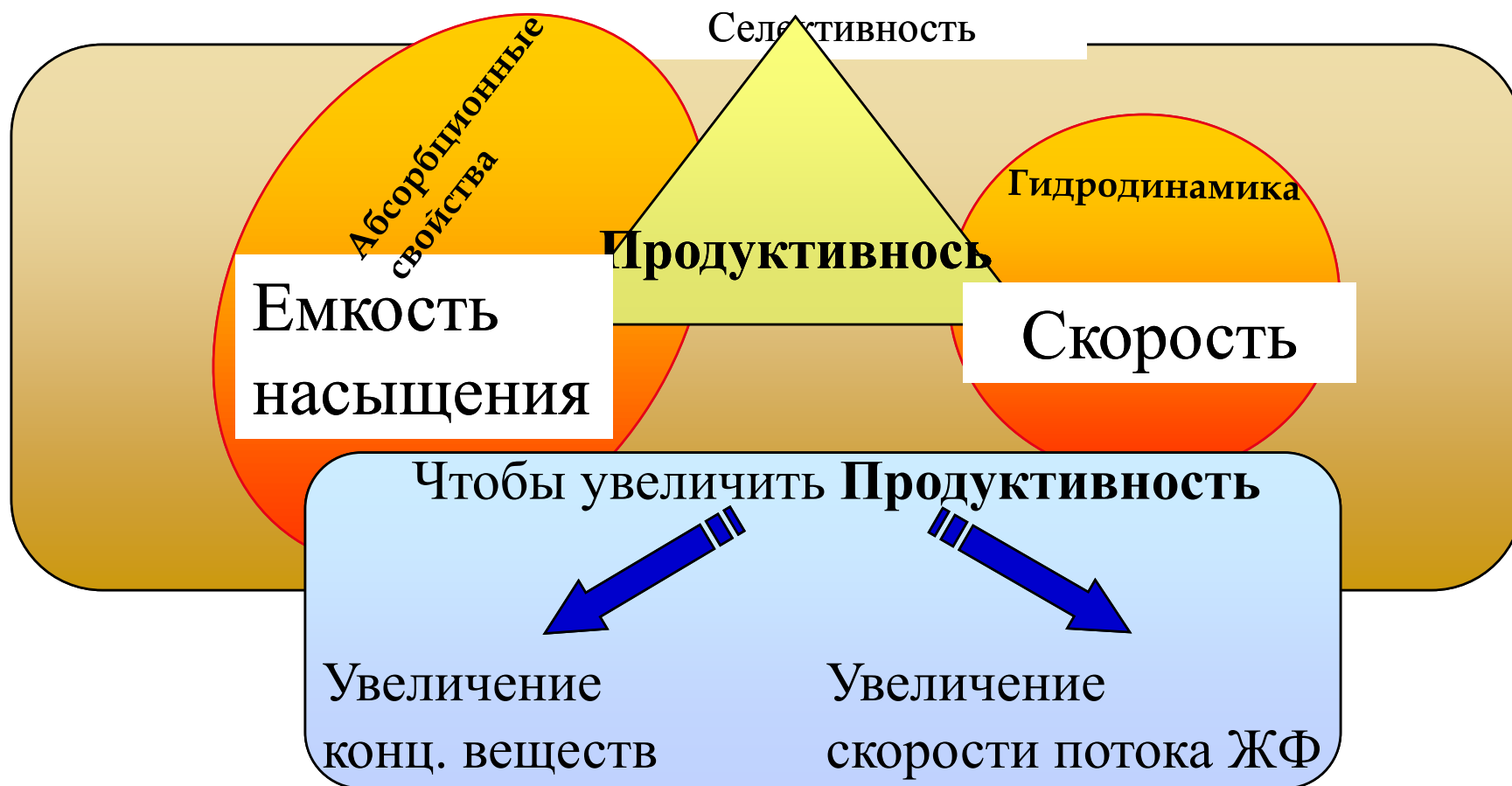
Исключено засорение или разрушение сорбента у входного отверстия колонки, которое обычно происходит при высоких давлениях.

Общепризнанный стандарт

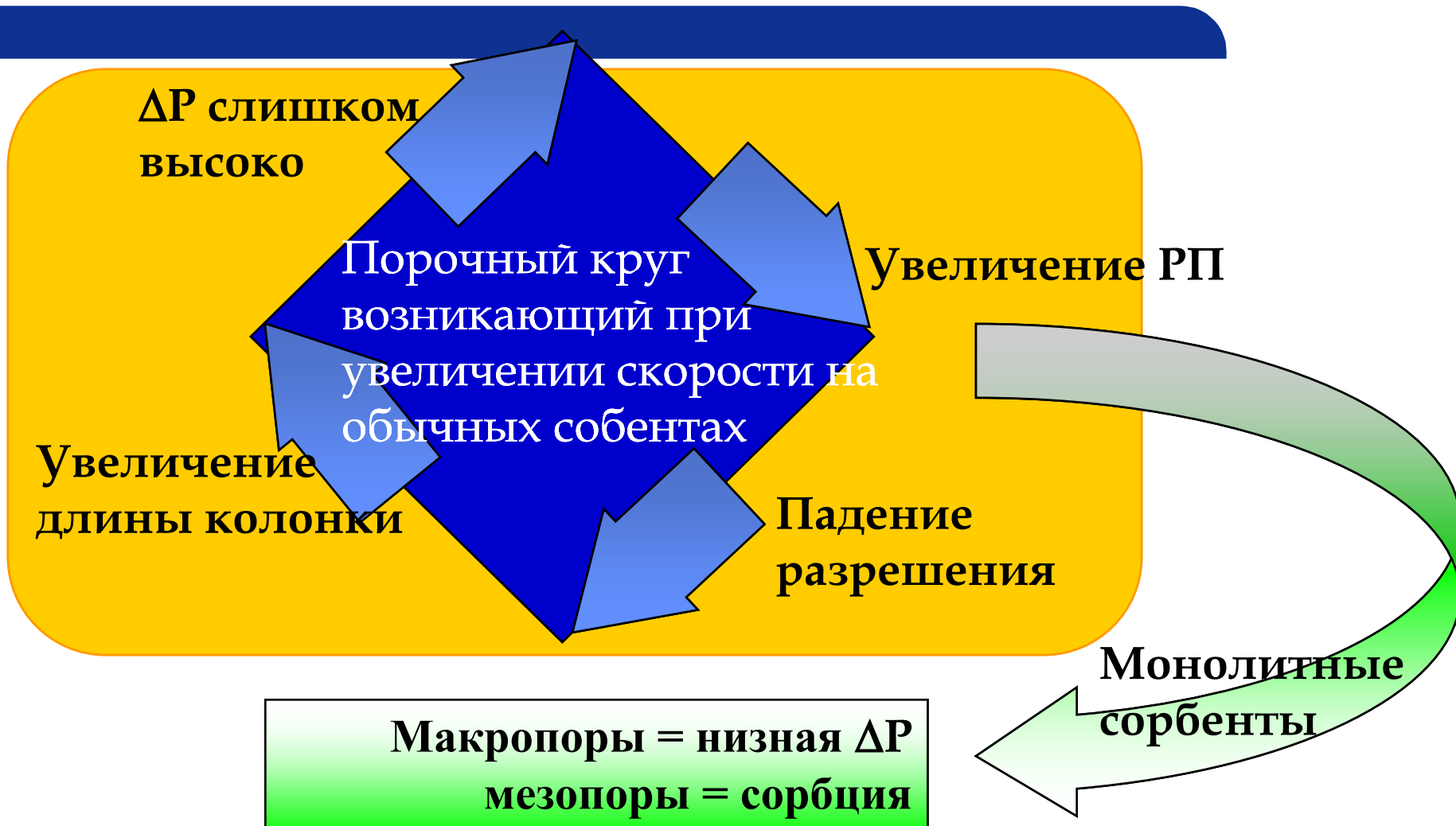


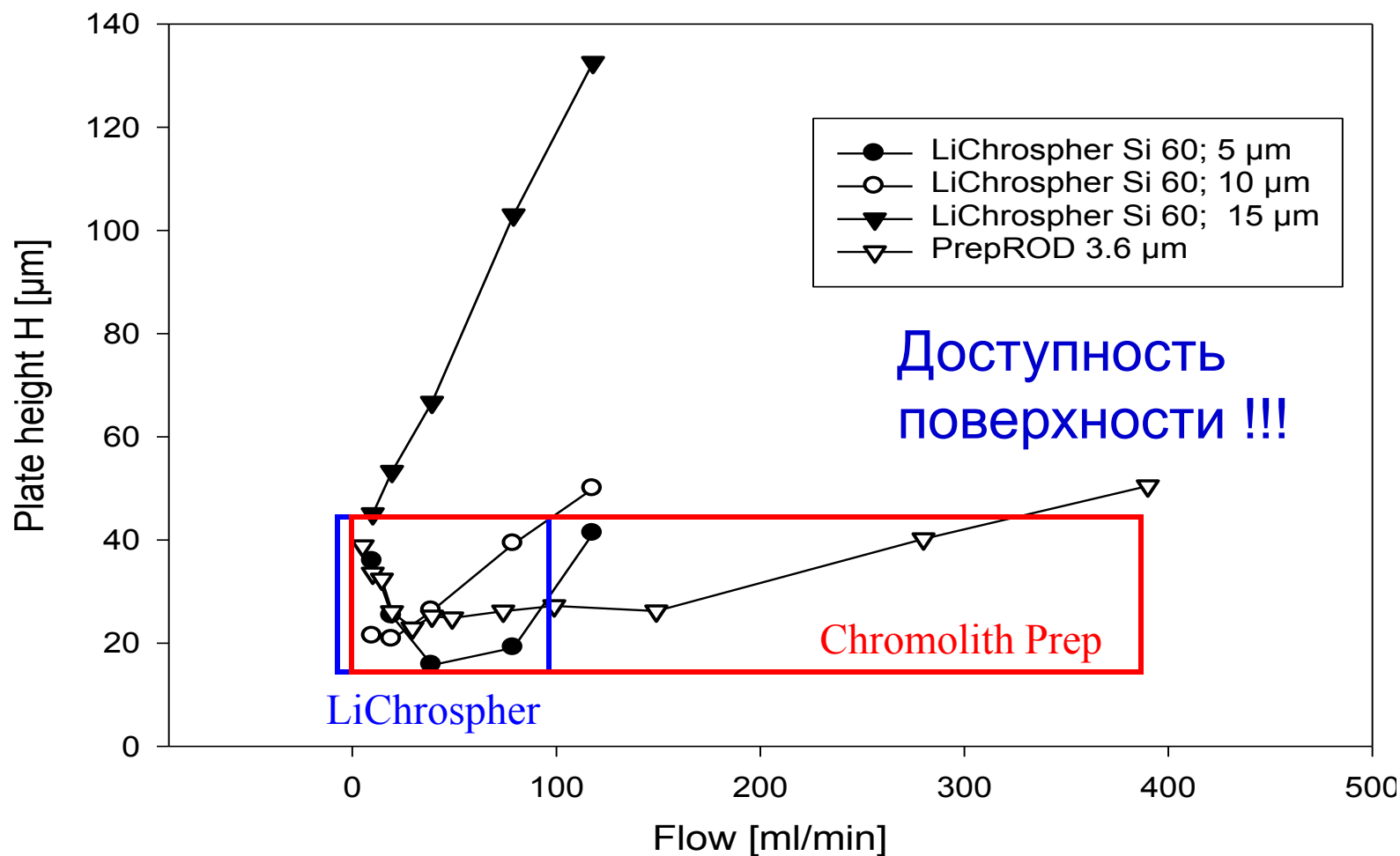
- Chromolith® HPLC теперь и в американской фармакопее USP(29)

Цели в препаративной хроматографии

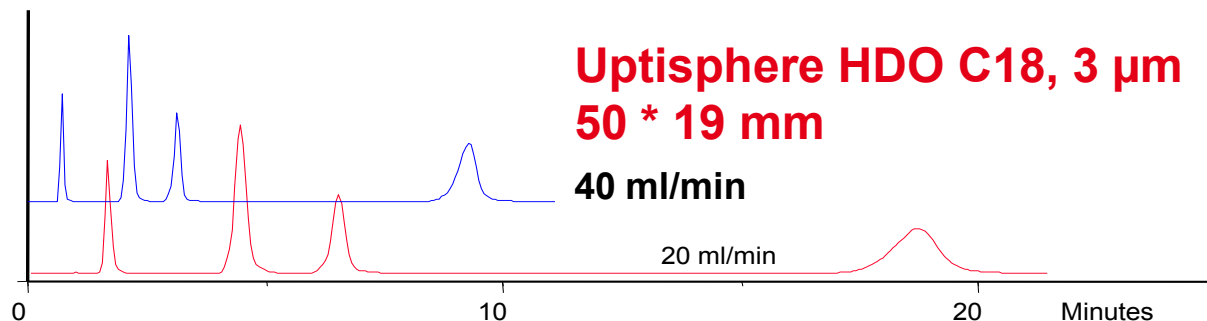
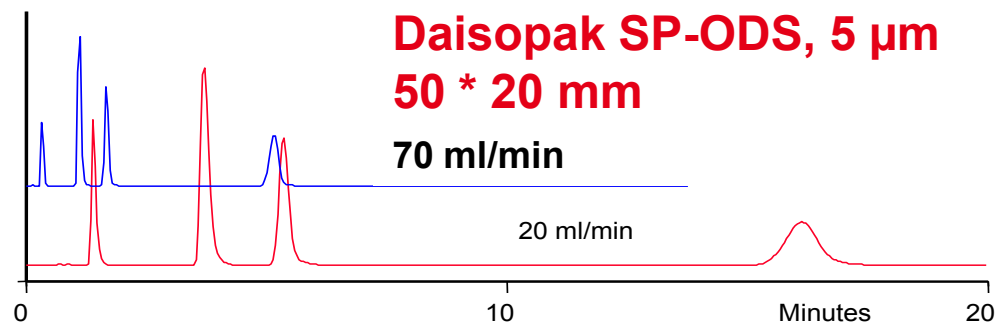
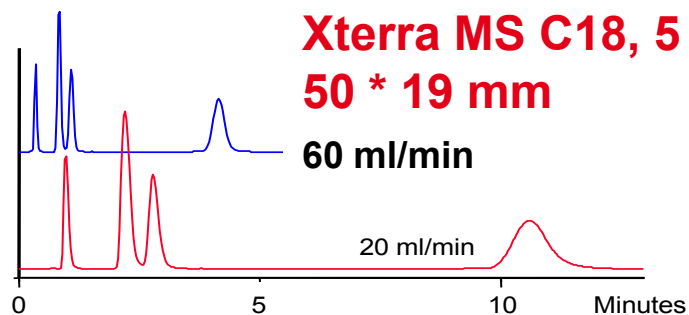


Сложности возникающие в препаративной хром.
при увеличении скорости потока.





Сравнение колонок.



Chromolith Prep RP18

100 * 25 mm

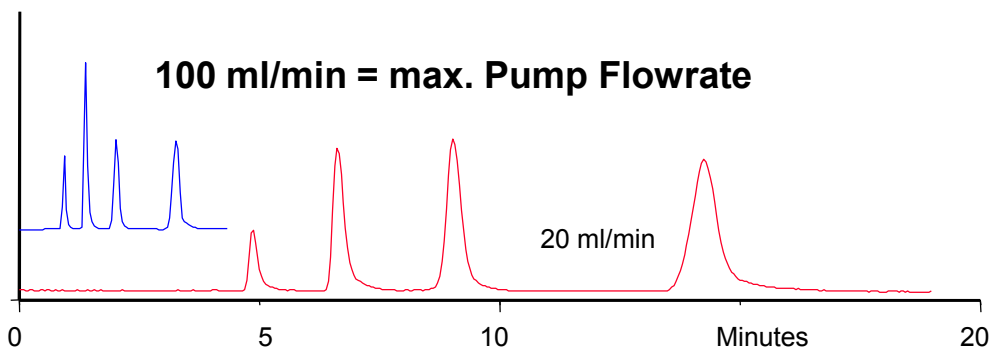
→ лучшее разрешение

→ самый короткий цикл

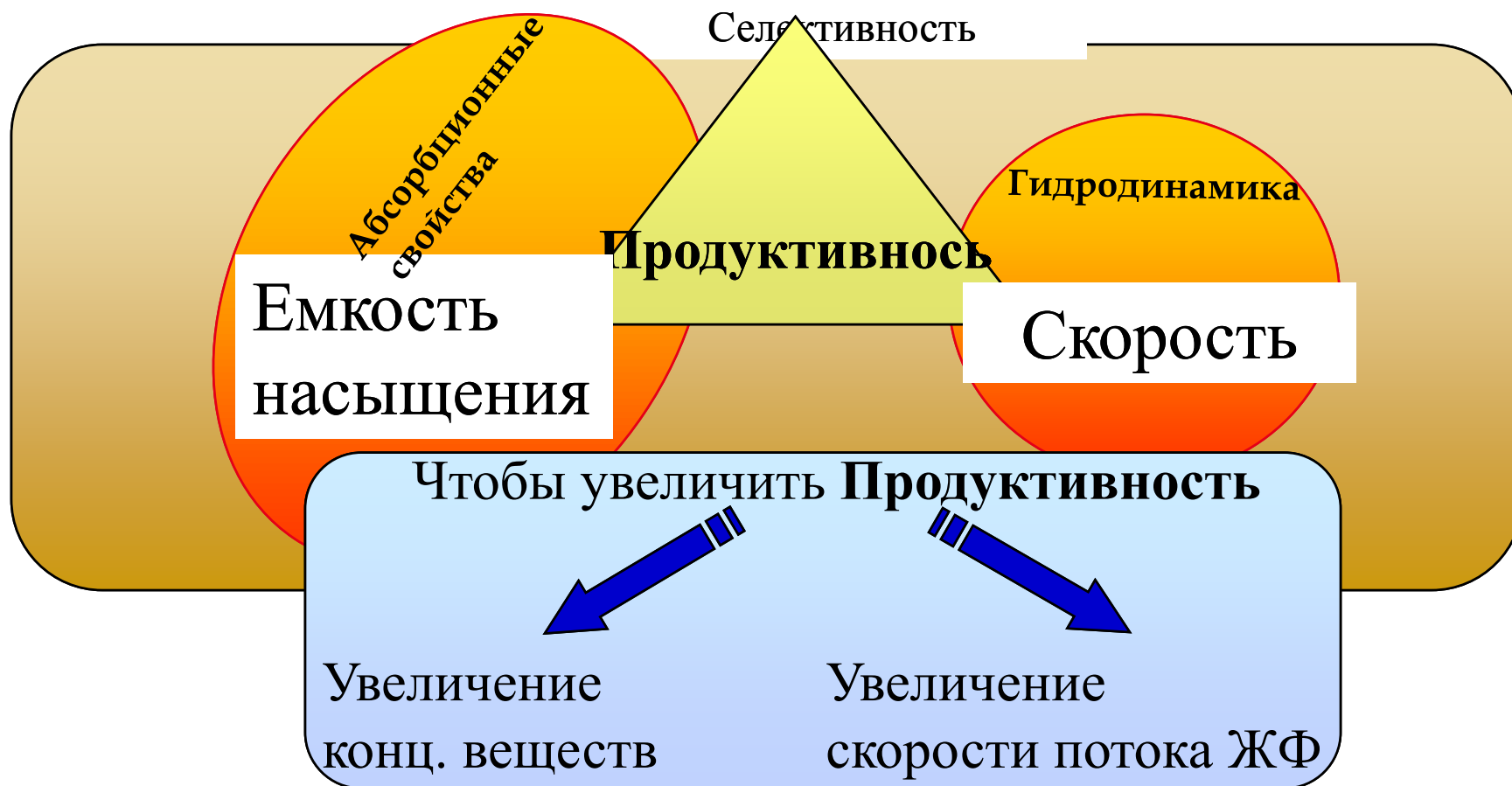
разделения

(ограничение =

производительность насоса)



Цели в препаративной хроматографии



Как зависит разделение от концентраций разделяемых веществ.

Разделение смеси гетероциклических рацематов.



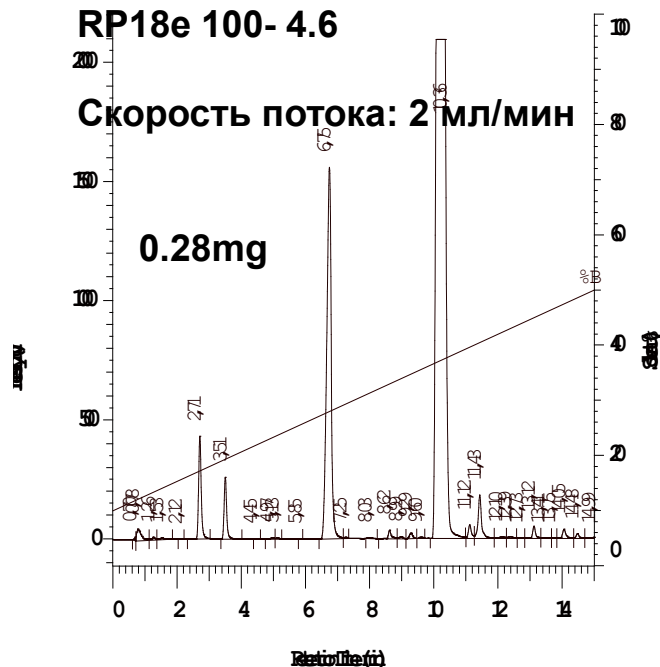
Элюент А: вода + 0.1% муравьиная кислота

Элюент В: ацетонитрил

Линейный градиент: 10 мин до 50%B

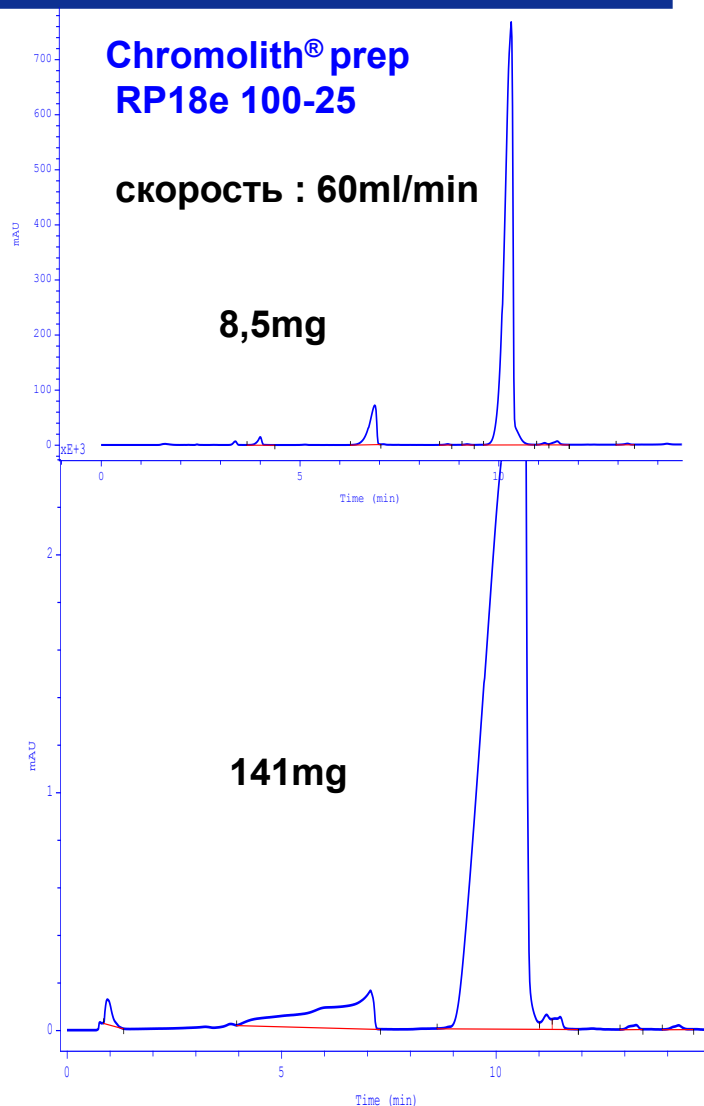
**Chromolith® performance
RP18e 100- 4.6**

Скорость потока: 2 мл/мин

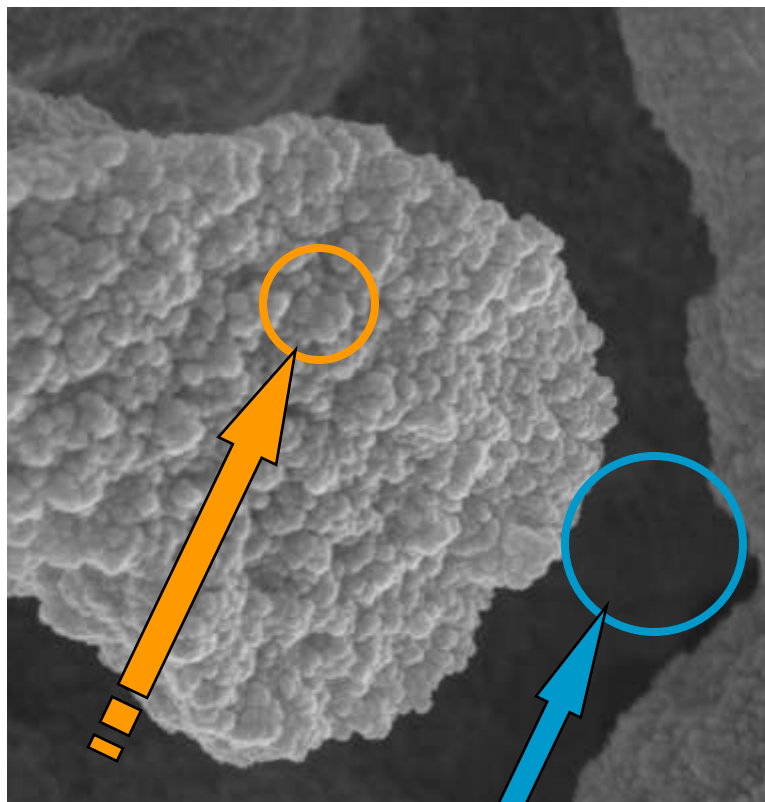


**Chromolith® prep
RP18e 100-25**

скорость : 60ml/min



Структура Монолитного Силикагеля



Мезопоры

Макропоры

Бимодальная структура пор

Макропоры:

Средний диаметр 3 мкм

(достигается высокая скорость)

Мезопоры:

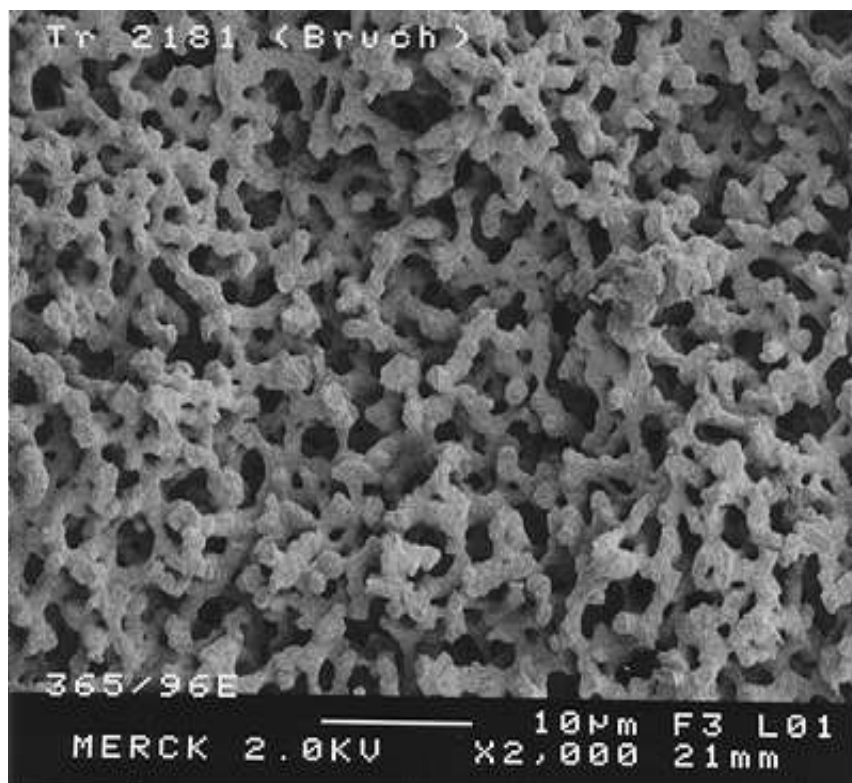
Средний диаметр 12 нм

(Большая поверхность,
которая обеспечивает сорбционную
способность)

Структура монолитного силикагеля



ЭСМ-фото



Губчатая структура

Общая пористость: $\pm 80 \%$
(Колонки с частицами
сорбента $\pm 60 \%$)

The Pittcon Gold Award

Best New Product 2001

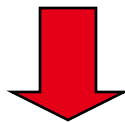


New Orleans, 7th March 2001

Макропоры обеспечивают пористость 80%

Что это дает?

- **высокая проницаемость**
- **низкое обратное давление**
- **Высокие скорости потока**

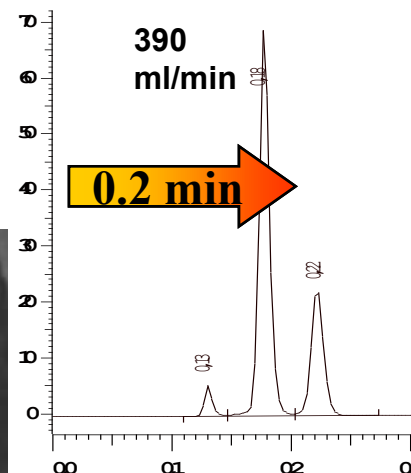
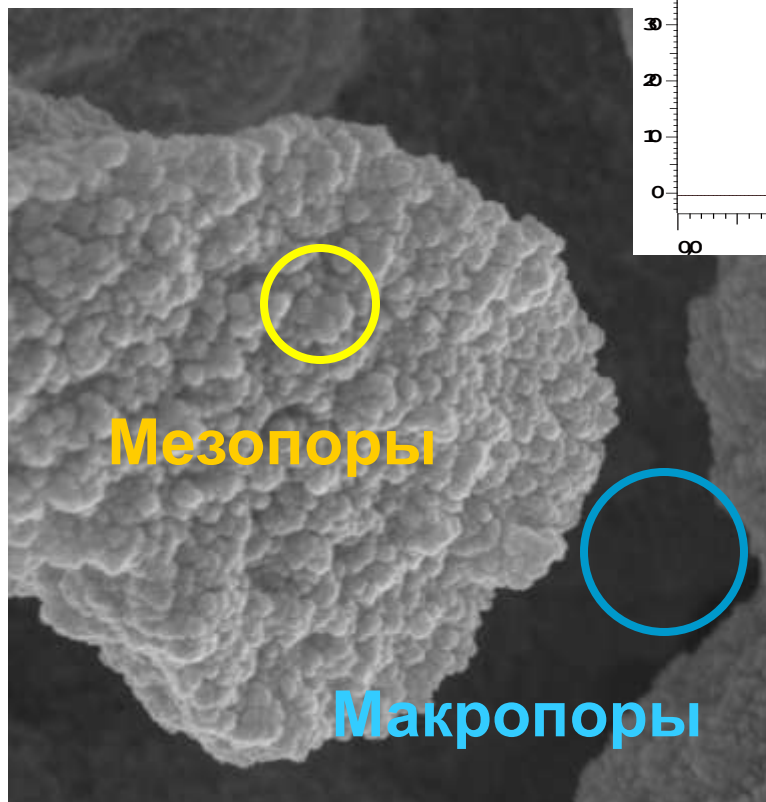


**Монолитные сорбенты
идеально подходят для быстрых разделений !!!**

Преимущества монокристаллических сорбентов



Монокристаллические
сорбенты.



Преимущества
монокристаллического
силикагеля:

Неограниченная длина колоки
= лучшее разрешение между
пиками

Очень высокая пористость
= увеличенный срок службы
сорбента

Competition - Waters Acquity UPLC™



Waters

ULTRA PERFORMANCE LC™ BY DESIGN

- Are some laboratory challenges limiting your ability to be more productive?
- Has HPLC performance reached its limit?
- Are you confident with the level of information you obtain from your sample?

Waters® ACQUITY Ultra Performance LC™ Systems have been holistically designed with innovative new technologies to dramatically improve resolution, sample throughput and sensitivity.

Great Advancements in Analytical Sciences

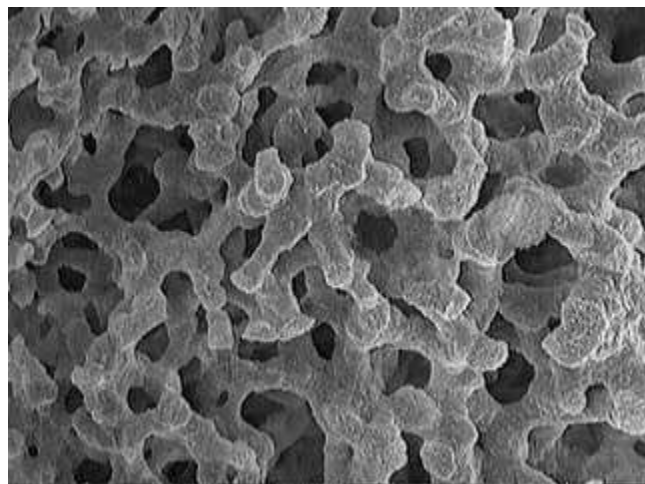
- » Small, pressure-tolerant particles
- » High pressure fluidic modules
- » Minimized system volume
- » Negligible carryover
- » Reduced cycle times
- » High speed detectors
- » Integrated system software

A circular diagram with three overlapping circles. The top circle is labeled 'Speed' and contains a speedometer. The right circle is labeled 'Resolution' and contains a chromatogram. The bottom circle is labeled 'Sensitivity' and contains a signal waveform. Arrows indicate a clockwise flow between the three concepts.

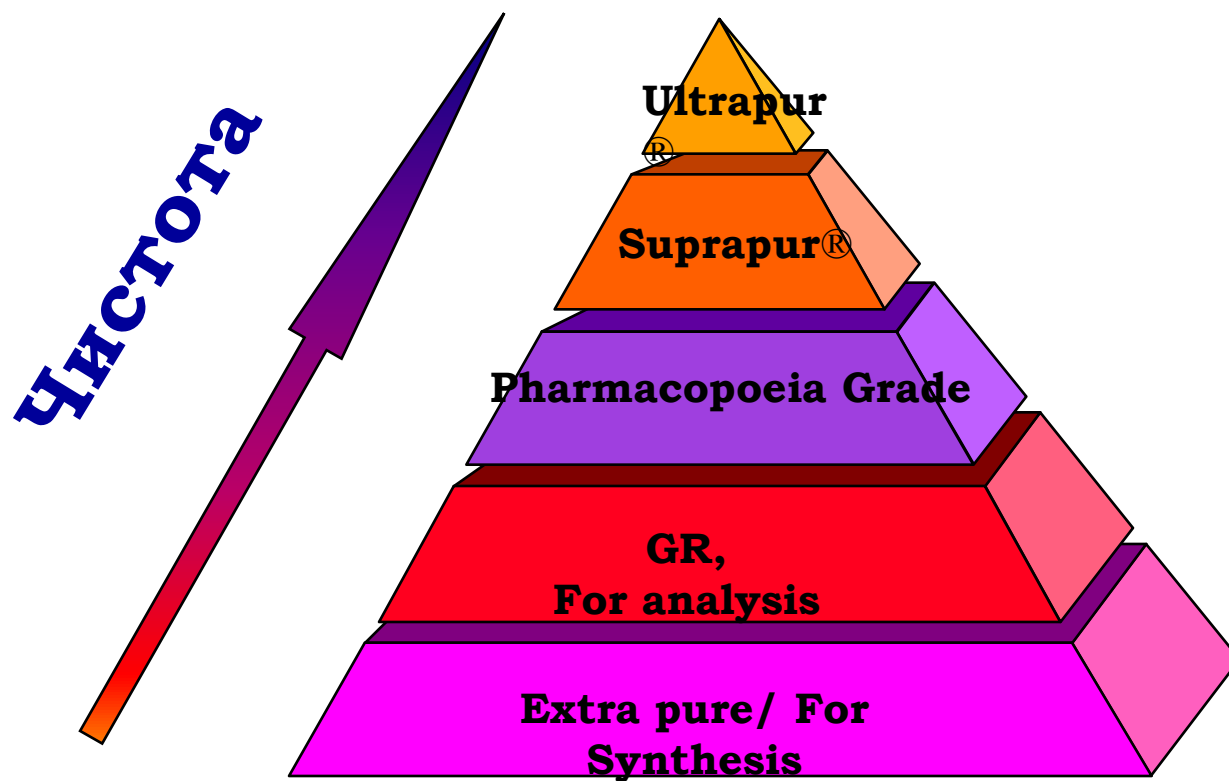
A photograph of the Waters Acquity UPLC system, a tall, dark blue instrument with two sample vials on top. To its left is a computer monitor displaying a software interface.

Acquity

Ultra Performance LC™



Пирамида качества продуктов Merck. Растворители и реактивы.



Философия продуктового ассортимента „Самое верное качество для самого важного назначения“



**Certipur®
стандарты**

Certipur®
not all
reference materials
are the same



**LiChropur®
Ион-парные
реагенты**



**LiChrosolv для
аналитической
ВЭЖХ**

**SupraSolv/UniSolv
Растворители для ГХ**



**UVASOL
Растворители для UV
& IR методов**



**SeccoSolv
сухие
растворители**



**PrepSolv для
препаративной
хроматографии**

Растворители высокой чистоты: Растворители для ГХ

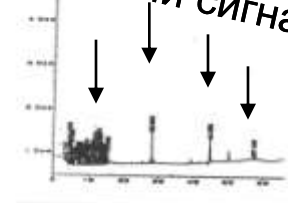


Торговая марка	Применение	Аппаратура
SupraSolv® Для ГХ	Подготовка пробы (Экстрагирование) Анализ веществ, имеющих среднюю и высокую температуру кипения, таких как пестициды	Газовый хроматограф, подходящий для определения ГХ-ДЭЗ
UniSolv® для органического анализа следовых количеств	Подготовка пробы (Экстрагирование). Анализ веществ, имеющих как низкую температуру кипения (хлорированные углеводороды), так и высокую, например, анализ сточных вод и почвы	Газовый хроматограф, подходящий для определения ГХ-ДЭЗ ГХ-ДИП ГХ-МС

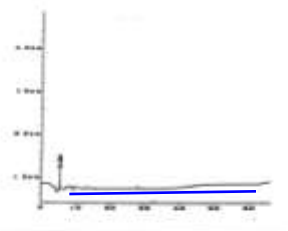
Растворители для ГХ: специальные растворители SupraSolv® и UniSolv® ?



Фоновый сигнал в ГХ



Обычный n-Гексан



Чистая базовая линия

n-Гексан SupraSolv®

Приемущество:
Точный и воспроизводимый
результат



Оптическая чистота:

Детализация минимальной пропускающей способности для 5 типичных длин волн.

Максимальная пропускающей способности в УФ зоне и наиболее полно описанный УФ интервал → конкуренты указывают только 3 длины волны.

Химическая чистота:

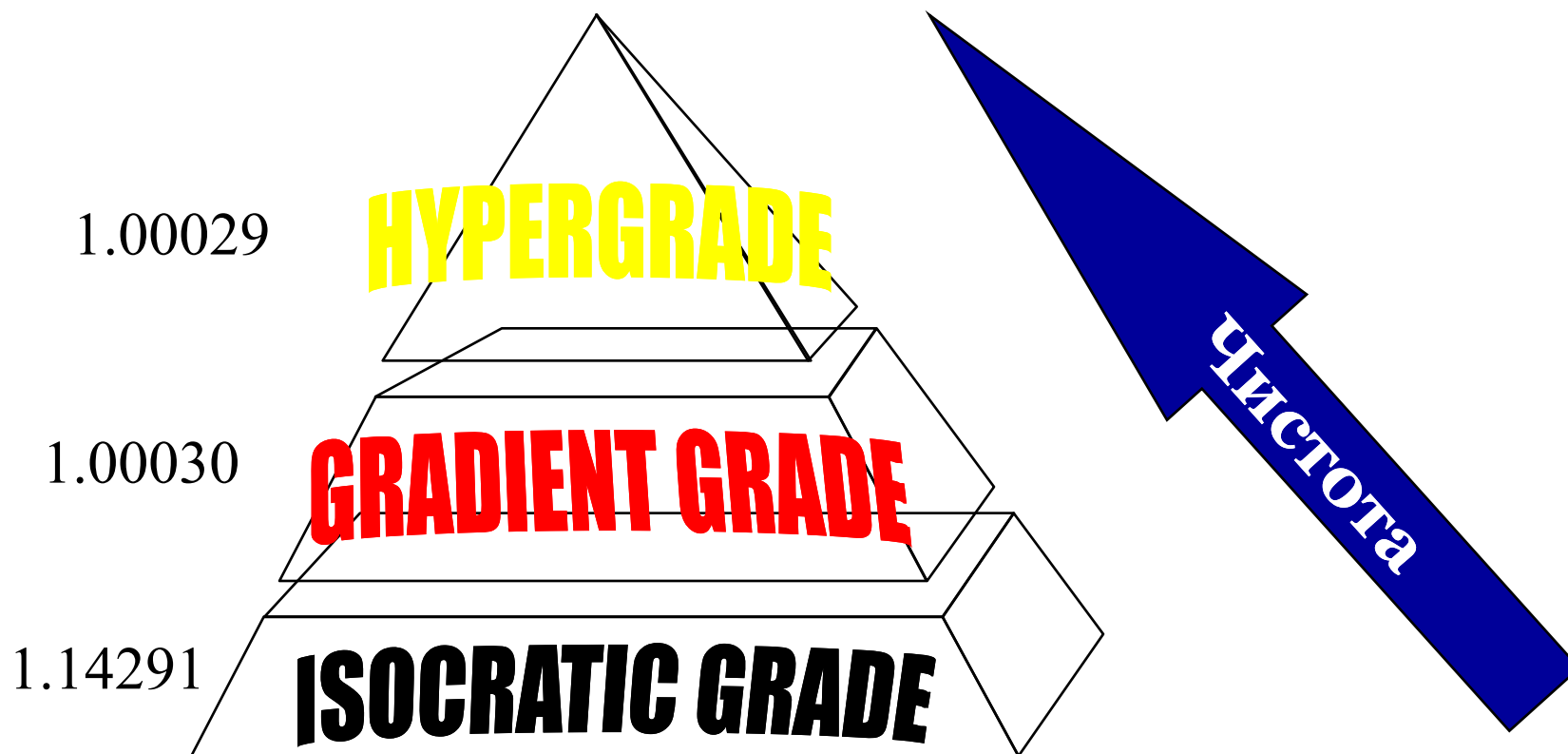
Флуоресценция <1ppb (минимальная флуоресценция примесей)

Вода < 0,005% (минимальное содержание воды)

не испаряющиеся остатки <0,0005% (минимальное количество)

Проверенное качество – Лидер на мировом рынке с долей рынка - 70%

Ацетонитрил LiChrosolv®



Основные требования предъявляемые к растворителям для хроматографии.



- Низкое количество сухого остатка.
- Высокая УФ-прозрачность.
- Низкое содержание воды
- Низкая кислотность и щелочность.
- Низкое содержание ионов металлов.
- Высокое качество упаковки (обеспечение безопасной транспортировки). Совместимость бутылок с устройствами отбора растворителей в ВЭЖХ системе.

Общее УФ поглощение.



Общее УФ поглощение – один из параметров, дающий наиболее важную информацию о общей степени чистоты растворителей.

- Высокая концентрация примесей воздействуют на базовую линию и увеличивают поглощение....

В итоге:

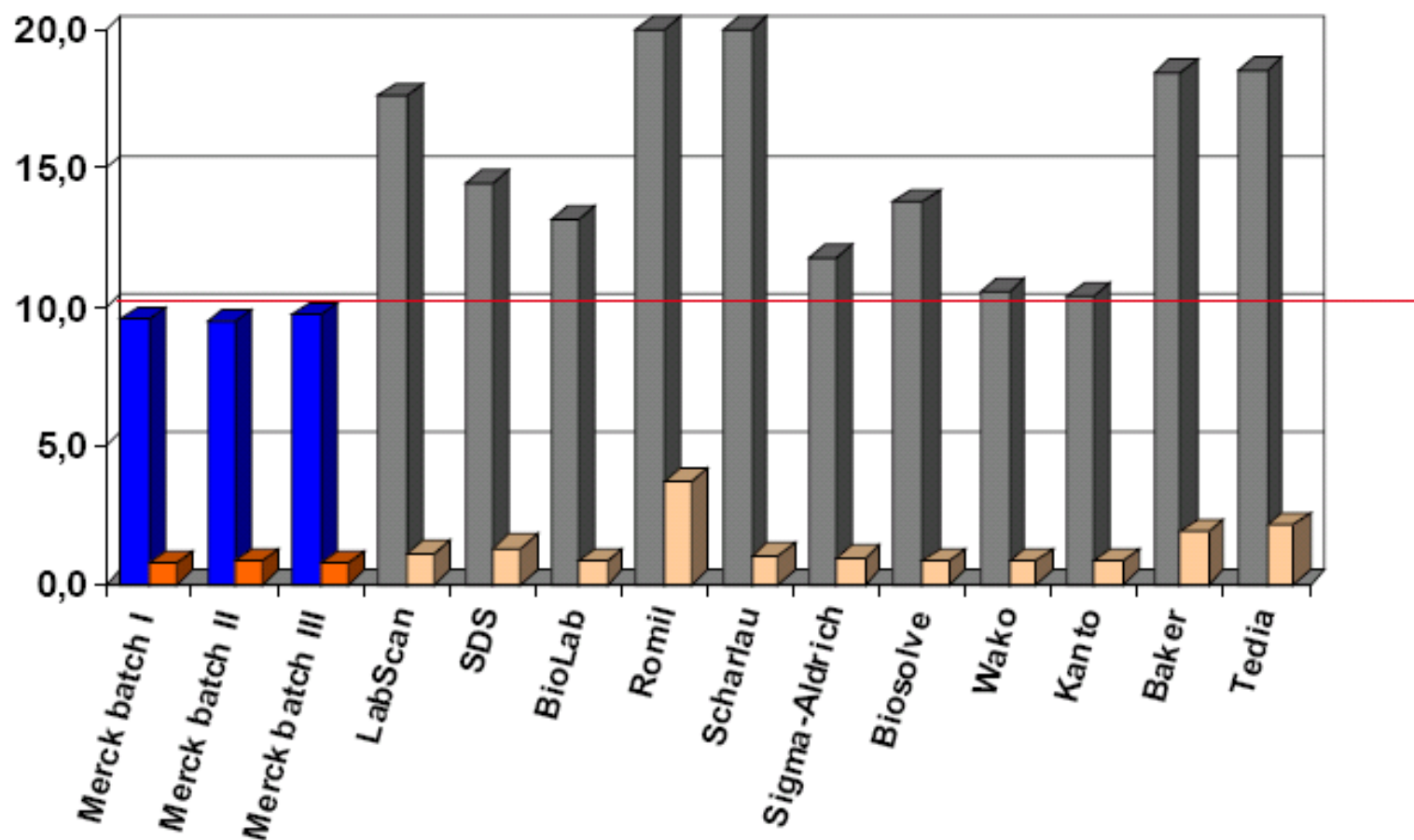
- ☐ *Потеря чувствительности детектора - результаты не надежные*
- ☐ *Дрейф и нестабильность базовой линии при градиентном элюировании*

Сопоставление продукции конкурентов

Общее поглощение – Ацетонитрил



- В разных партиях показатель абсорбции в [mAU] @ , 254nm



Качество (I) - Ацетонитрил для градиента. Сопоставление спецификаций различных производителей

Merck best specification in UV transmission [%] in the range for pharma application relevant wavelengths



Спецификация: длины волн [nm] / UV пропускание [%]

Производители

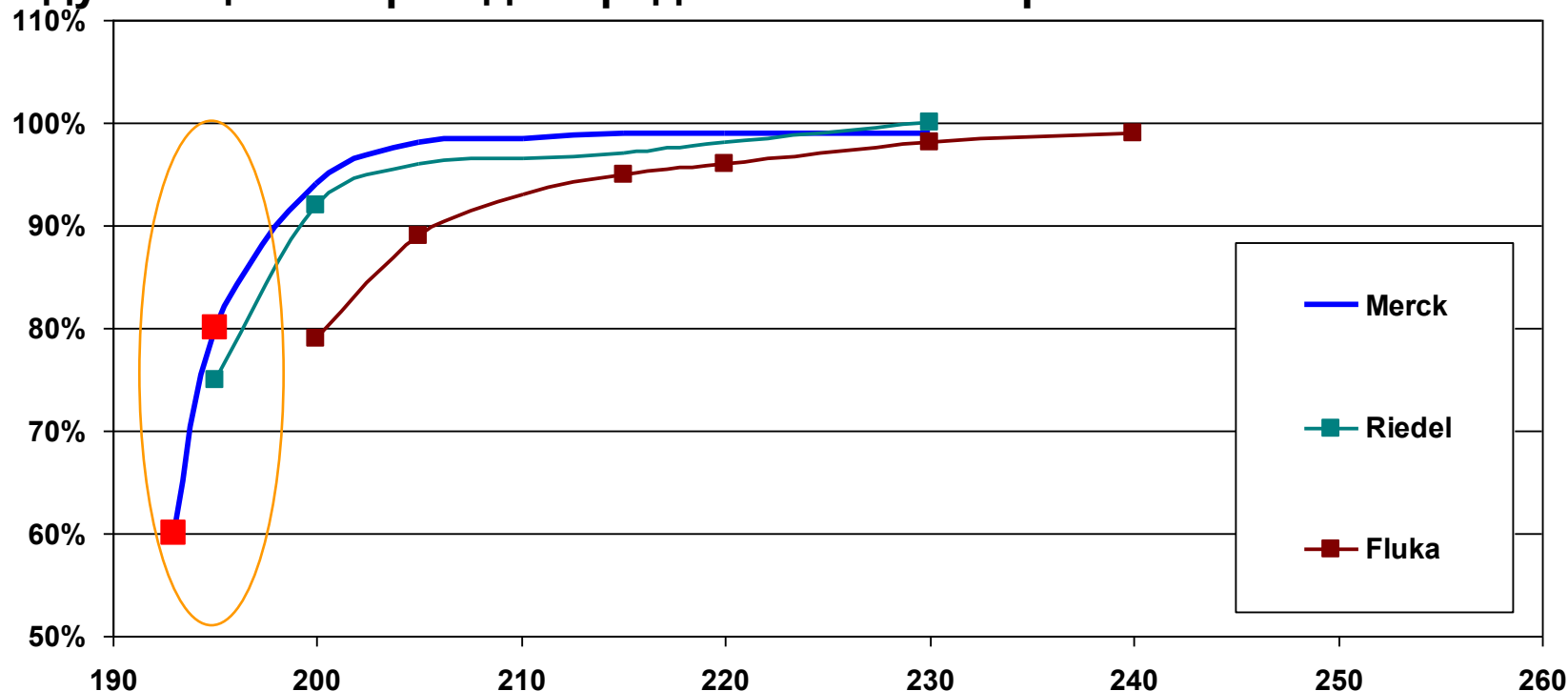
	193 nm	195 nm	197 nm	200 nm	205 nm	210 nm	215 nm	220 nm	225 nm	230 nm	240 nm	254 nm	350 nm	400 nm
Merck 1.00030	60%	80%				96%				99%				
Riedel		75%								99%				
Fluka				75%	90%		95%	96%		98%	99%			
Baker				80%		90%		98%		98%				
Scharlau				90%	92%	95%		98%						
Carlo Erba					90%				98%					
Romil				75%	80%		90%		95%		99%			
LabScan				80%		90%		98%		99%				
Biosolve	50%			95%				98%		98%		99%		
SDS			82%	90%		94%		96%		98%				
B&J				90%					98%				98%	98%
Tedia				90%		93%		95%	98%			99%		99%

Качество (II)

Ацетонитрил для градиента

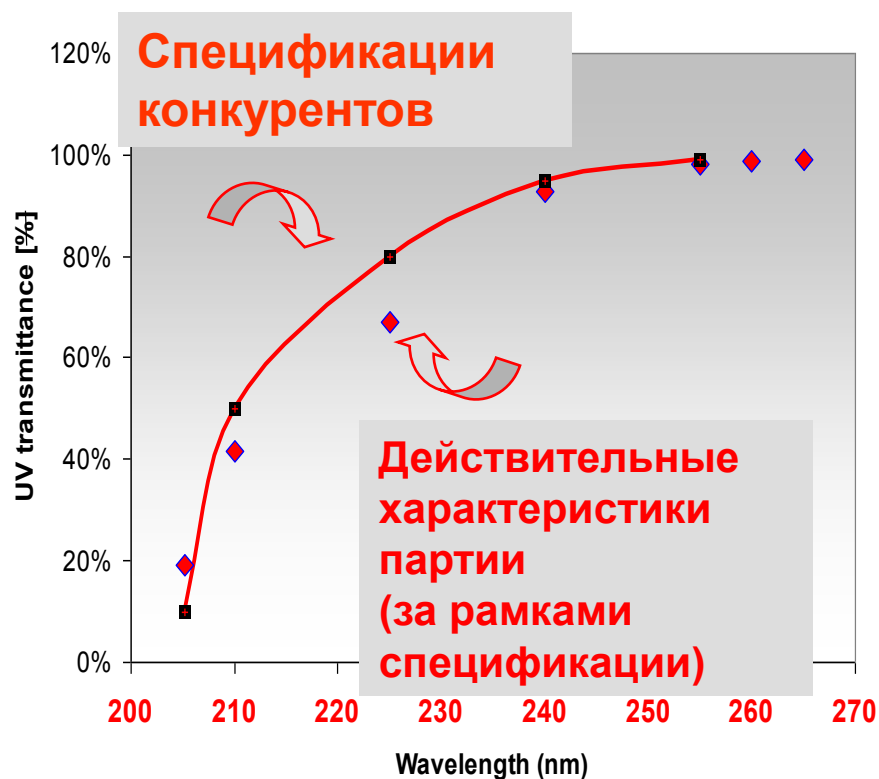


**Сравнение спецификаций T% на разных длинах волн.
Продукт: Ацетонитрил для градиентного элюирования**

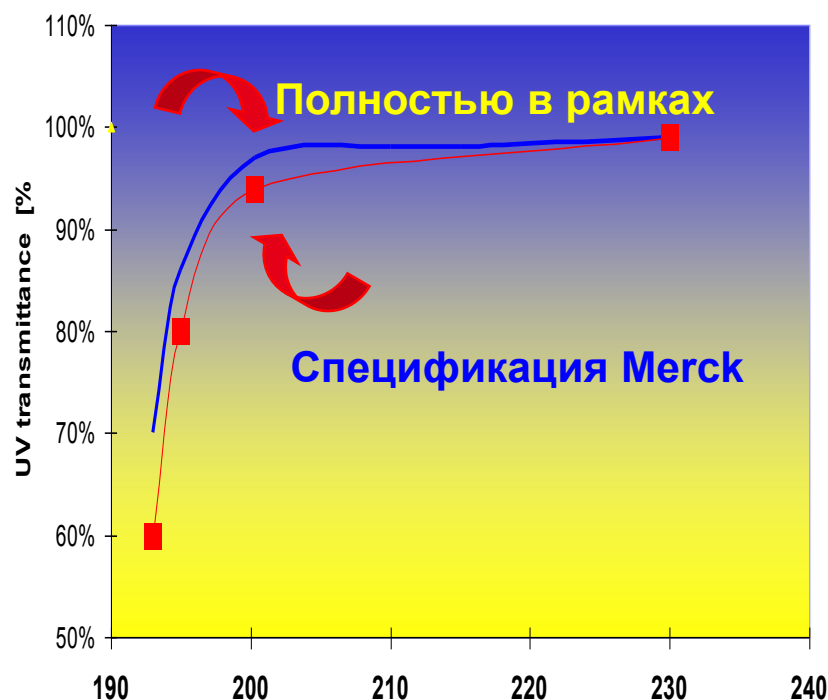


Merck имеет наилучшие спектральные спецификации по сравнению с конкурентами
Merck сосредотачивает особое внимание на основных и наиболее важных для фармацевтических применений длинах волн (между 190 – 210 nm)
Контроль качества Мерк обеспечивает надежные результаты и чрезвычайно хорошие значения UV пропускания

Надежность (II)



Ацетонитрил LiChrosolv®

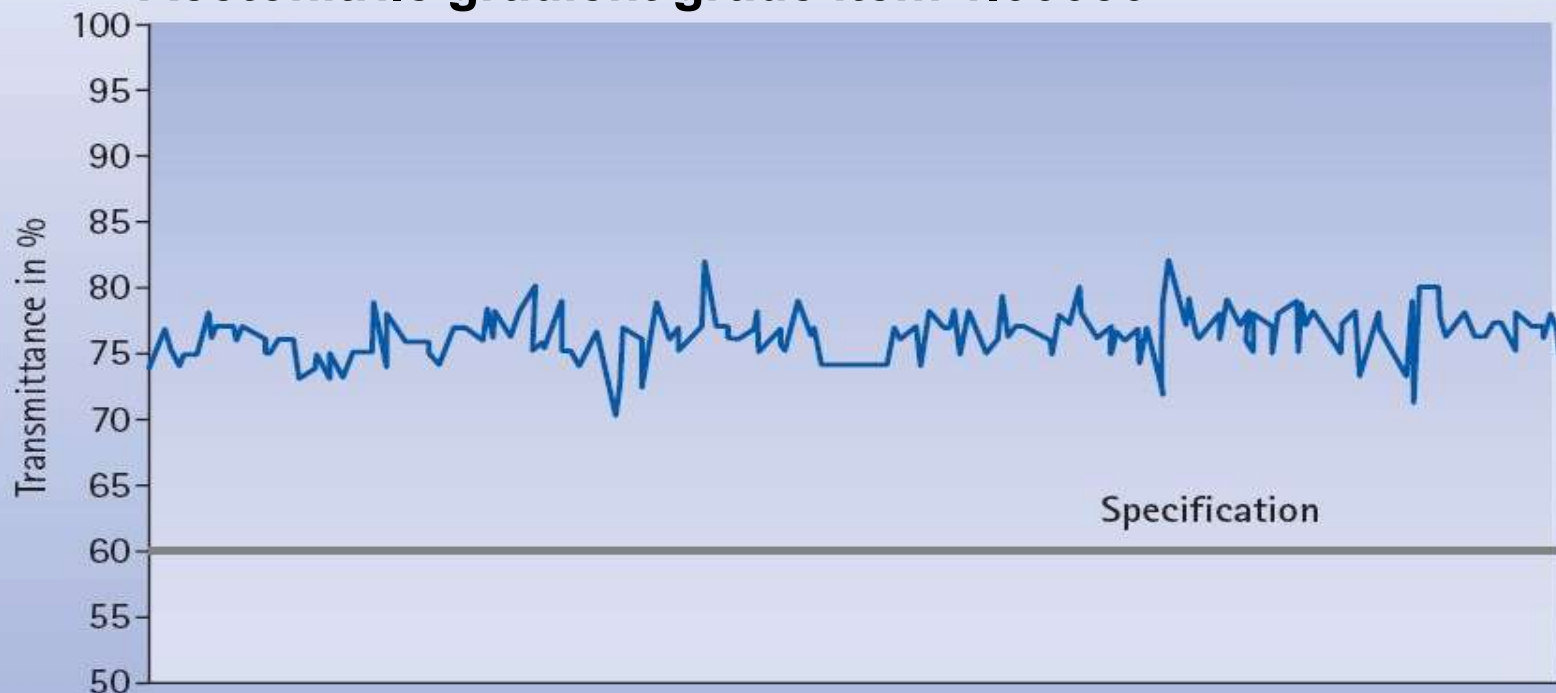


Merck всегда удовлетворяет заявленным спецификациям ВЭЖХ сольвентов; лучшие спецификации по сравнению с конкурентами и абсолютно все партии удовлетворяют требованиям спецификации

Надежность (I)



Acetonitrile gradient grade item 1.00030



UV-Transmittance of Acetonitrile hypergrade at 193 nm (batches during the last 12 months)

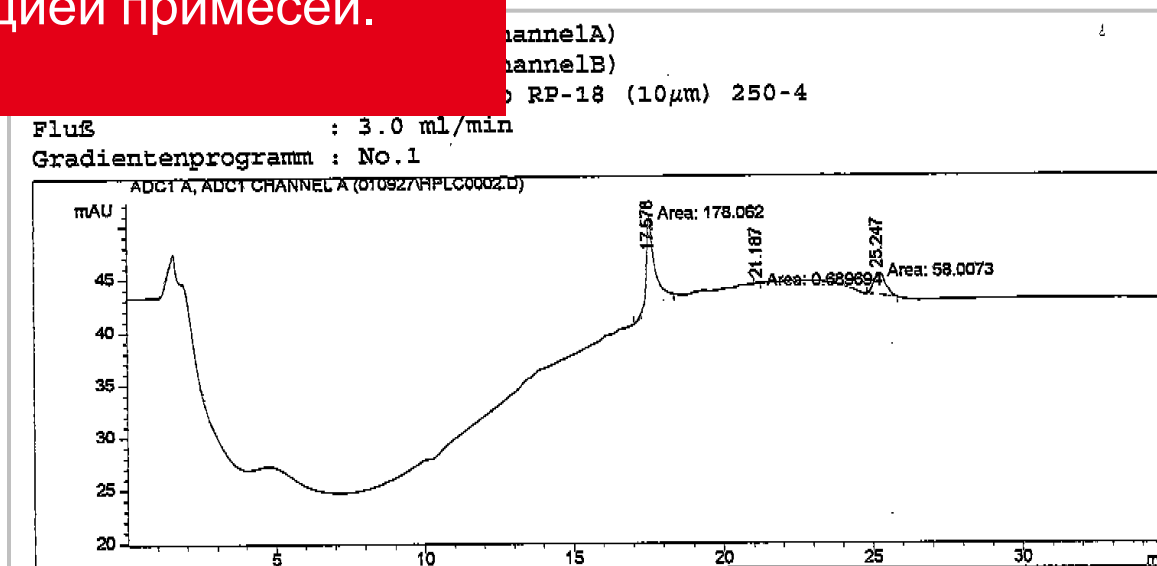
Наилучшие и стабильные характеристики на UV 193 нм от партии к партии.

Постоянное и высокое качество – результат внедренных технологий и передовых процессов очистки, которые гарантируют потребителю надежный, уверенный и воспроизводимый результат.

Влияние чистоты растворителей на характеристики базовой линии.



- Нестабильность и дрейф базовой линии при градиентном элюировании обусловлены высокой концентрацией примесей.



Надежность (V)



Acetonitrile Gradient Grade Градиентное элюирование Тест на

пригодность

Instrument: EZChrom Elite

Mobile Phase

Solvents A: Merck LiChrosolv® Water

Solvents B: Merck LiChrosolv® Acetonitrile

Column: Chromolith performance RP-18e 1

Flow Rate: 5.0 ml/min

Wavelength: 210 nm

Gradient Elution

Time	% Solvent A	% Solvent B
------	-------------	-------------

0.0	97.0	3.0
-----	------	-----

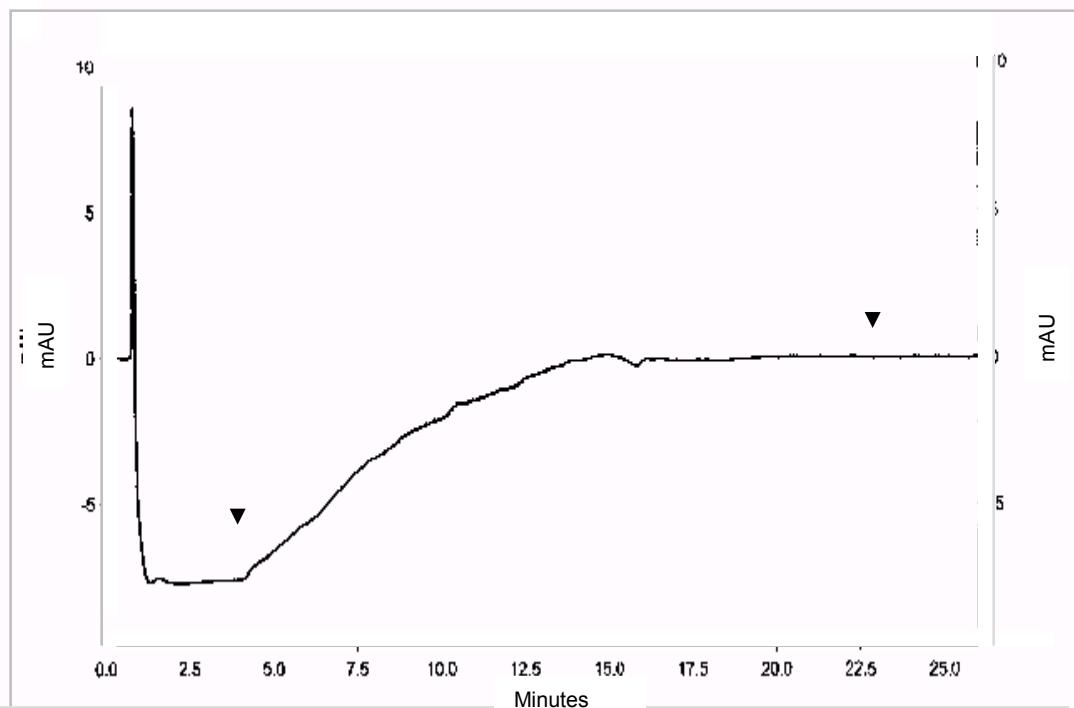
0.1	0.0	100.0
-----	-----	-------

3.0	0.0	100.0
-----	-----	-------

23.0	100.0	0.0
------	-------	-----

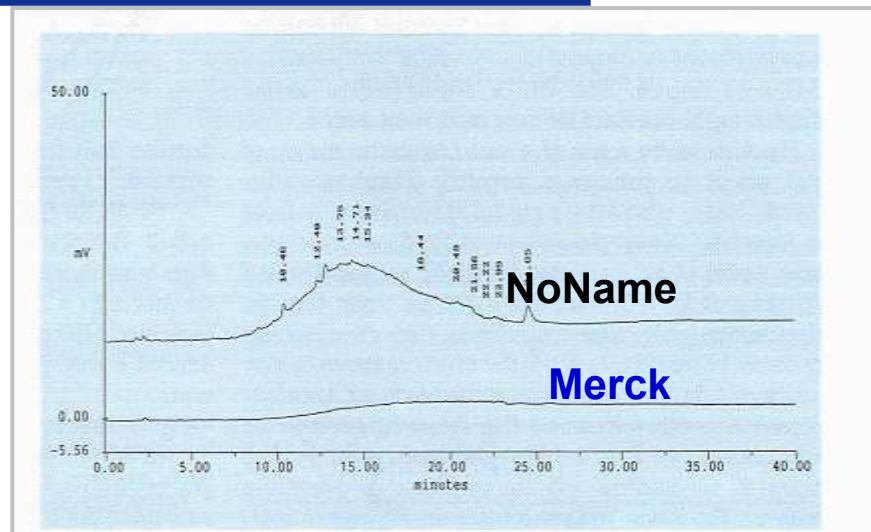
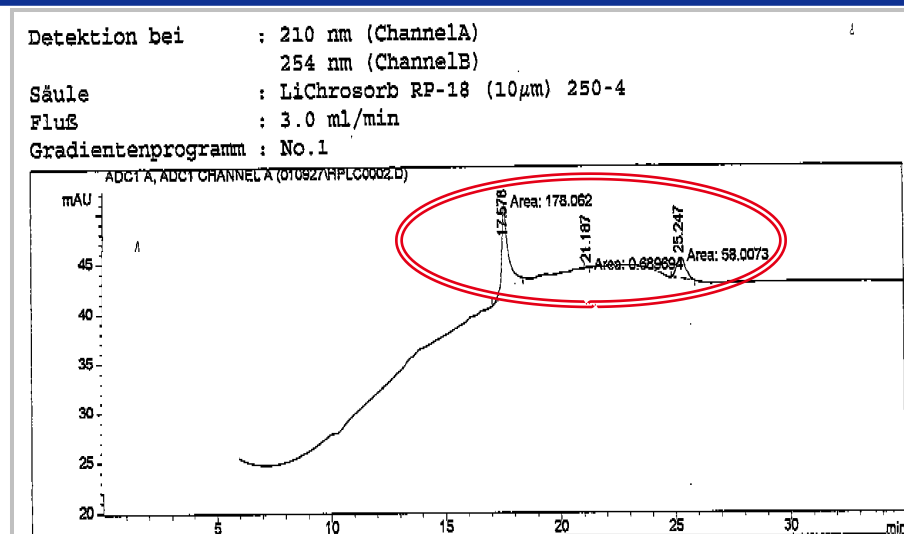
23.1	97.0	3.0
------	------	-----

33.0		
------	--	--



Надежные качество позволяющее избежать неверных интерпретаций результата – результат отсутствие влияния растворителя во время элюирования.

Градиентное элюирование. Сравнение разных марок.



Тестирование ацетонитрила для градиентной ВЭЖХ различных производителей на длине волны 210 нм в режиме градиентного элюирования.

Высокий риск концентрирования примесей на колонке – накопление примесей на колонке будет происходить на колонке изо дня в день.

- Потеря эффективности разделения.
- Разрушение и загрязнение колонки результат использования растворителей ненадлежащего качества. Экономя на растворителях вы увеличиваете свои затраты.

Необходимо ли фильтровать ВЭЖХ растворители производства Merck?



- **Нет,** В этом нет необходимости. Все ВЭЖХ растворители профильтрованы через 0.2µm фильтр.
- Фильтр изготовлен из инертного материала. Нет никакого риска загрязнения материалом фильтра.
- Растворители можно использовать сразу после открытия бутылки. Отпадает необходимость в ежедневных дополнительных манипуляциях, требующих затрат времени и денег.



- **Система хранения растворителей**
 - Отсутствие взаимодействий растворителей с материалом контейнера
 - Высокая стабильностью
 - Малые потери растворителей
 - Возможность подсоединения дополнительного оборудования
 - Малый риск попадания загрязнений
 - Большой безопасностью работы

- Полиэтиленовые материалы непригодны для хранения ВЭЖХ растворителей. Образующиеся при взаимодействии с ПЭ вещества ухудшают чувствительность детектора и загрязняют колонку.
- Происходят изменения свойств продукта при хранении.

К чему приводит использование неверно подобранных сольвентов?



- Загрязнение целевого выделяемого компонента
- Разрушение, загрязнение и быстрая деградация колонки.
- Ухудшение хроматографических характеристик.

Экономя на растворителях вы увеличиваете свои затраты.

Удобство использования.



Merck разработан специальный
S40 Adapter (#109996)

Полностью закрытая ВЭЖХ
система

- легко устанавливается
- Устраняет запах растворителей
- Предотвращает загрязнение
растворителей



Информация для заказа готовых смесей LiChrosolv®



Название	Каталожный номер.	Содержание ТФУ	Объём
Ацетонитрил + 0.1% об. ТФУ	4.80448.2500 4.80448.9030 4.80448.9185	0.095- 0.105%	2.5л 30л 185л
Вода + 0.1% об. ТФУ	4.80112.2500 4.80112.9030 4.80112.9185	0.095- 0.105%	2.5л 30л 185л
Ацетонитрил + Вода 80:20	4.80159.2500		2.5л

Using - Acetonitrile 1.00030 Gradient Grade and TFA - UV grade
- Water 1.15333 Gradient grade and TFA – UV grade

Важность качества стандартов

Не все стандарты одинаково стандартны

A close-up photograph of an open oyster shell. Inside the shell, a single, lustrous, golden-yellow pearl is visible. The shell's interior is wet and glistening. The background is a soft, out-of-focus blue.

Certipur®

not all
reference materials
are the same

Риск неверной
интерпретации
полученных результатов.

Результат сильно зависит от
качества стандартов именно
в Хроматографических
методах анализа



Спасибо за внимание



- По всем вопросам обращаться в ООО «Химмед»
- Адрес: 115230, г.Москва, Каширское шоссе, д.9, корп.3
- Тел.: (495) 728-4192, 742-8265/66, (499) 613-2964,
- Факс: (495) 742-8341
- E-mail : mail@chimmed.ru www.chimmed.ru