

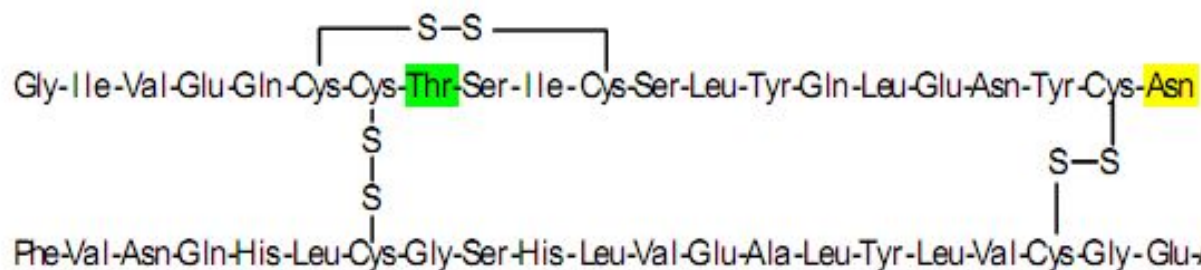
Хроматография

Редакция Андрея
Пирогова

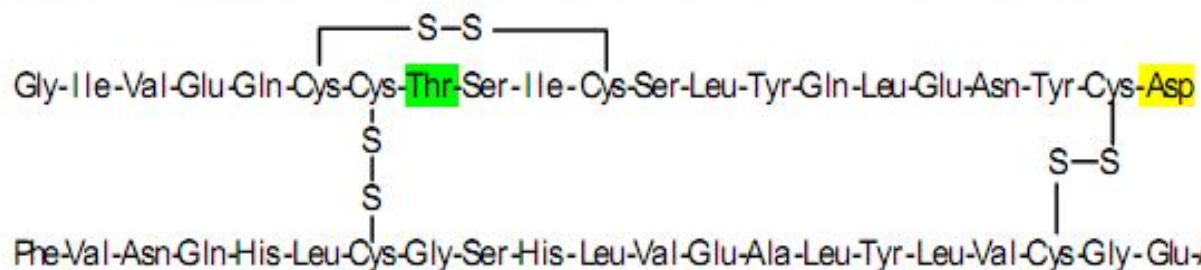
В чем причины широкого применения?

- Создание новых веществ, типов лекарств, красителей и т.п.
- Расширение списка контролируемых соединений
- Снижение ПДК вредных веществ
- Развитие науки и техники

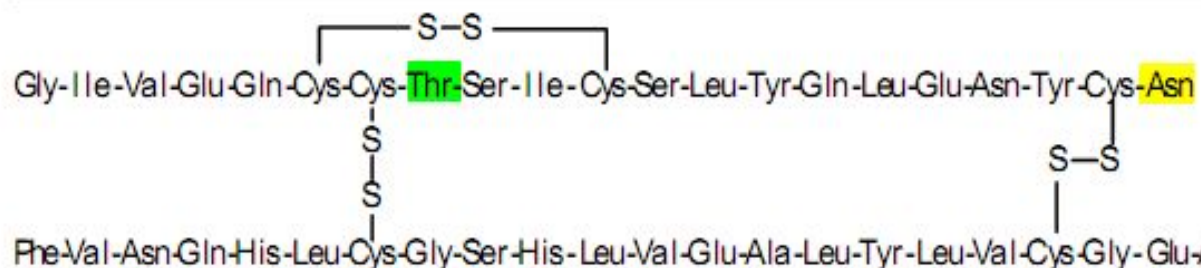
ФАЛЬСИФИКАЦИЯ



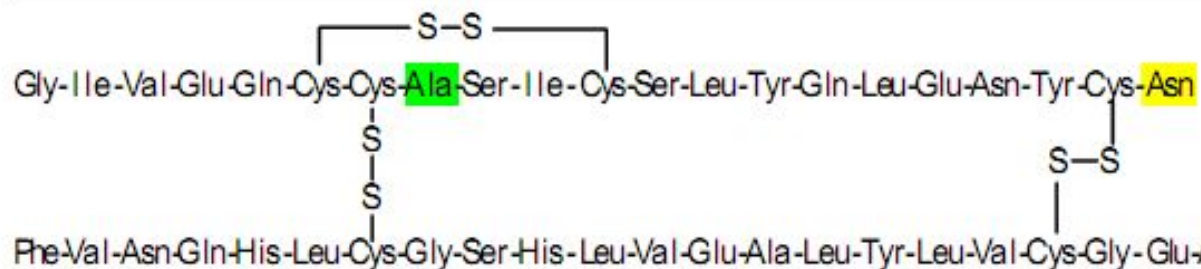
Инсулин человека



**Дезамидированный
инсулин человека**

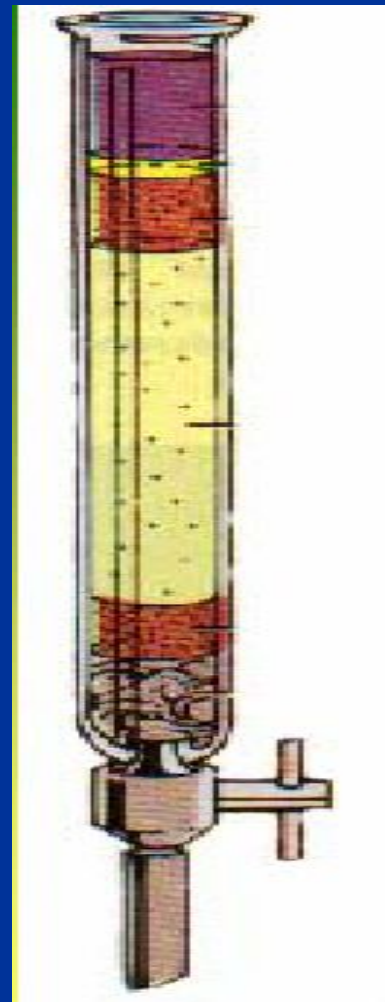
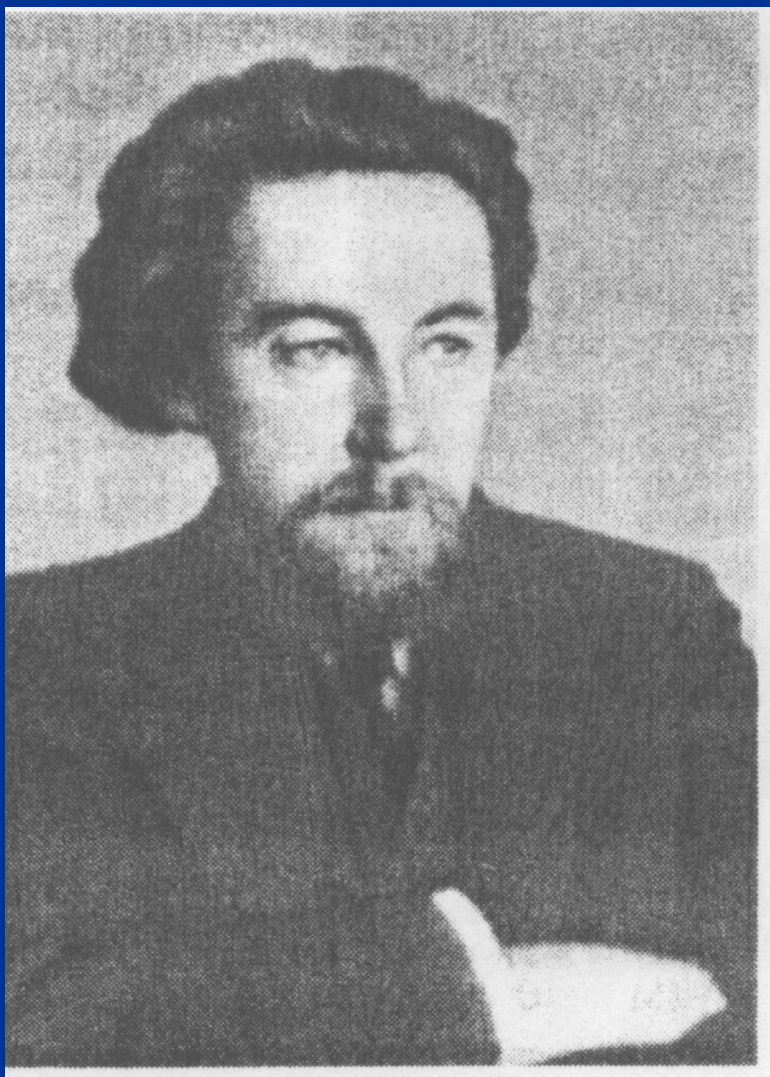


Инсулин свиньи



Инсулин быка

Михаил Семенович Цвет



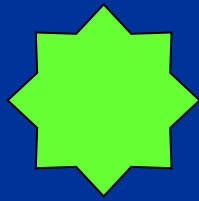
1903 г

Этапы развития хроматографии

- 1903 г. **Открытие хроматографии** (Цвет М.С.)
- 1938 г. **Тонкослойная или планарная хр-фия**
(Измайлов Н.А., Шрайберг М.С.)
- 1941 г. **Жидкостная распределительная хр-фия**
(Martin A.D.P., Synge R.L.M.)
- 1952 г. **Газовая распределительная хр-фия**
(Martin A.D.P., James A.)
- 1956 г. **Капиллярная газовая хр-фия** (Golay M.)
- 1975 г. **Ионная хроматография**
(Small H., Stevens T.S., Bauman W.W.)
- 1990+ **Хроматомасс-спектрометрия**

Процесс разделения

Учитывает природу вещества,
фаз,
условия распределения

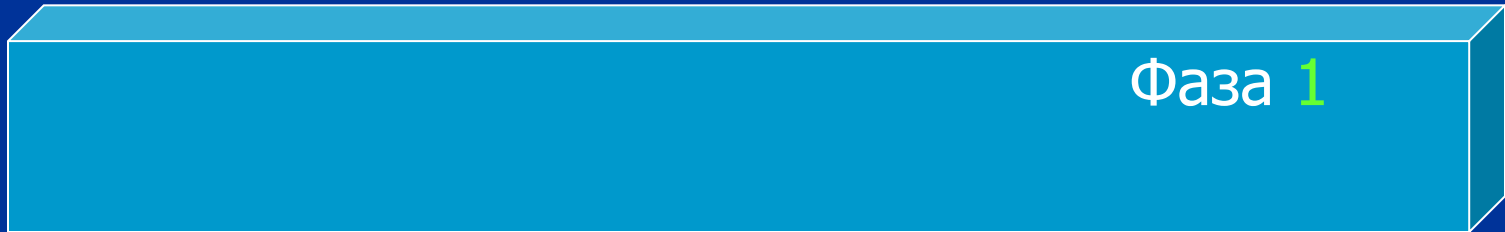


Коэффициент
распределения

$$K(D) = C_1 / C_2$$

Фаза 2

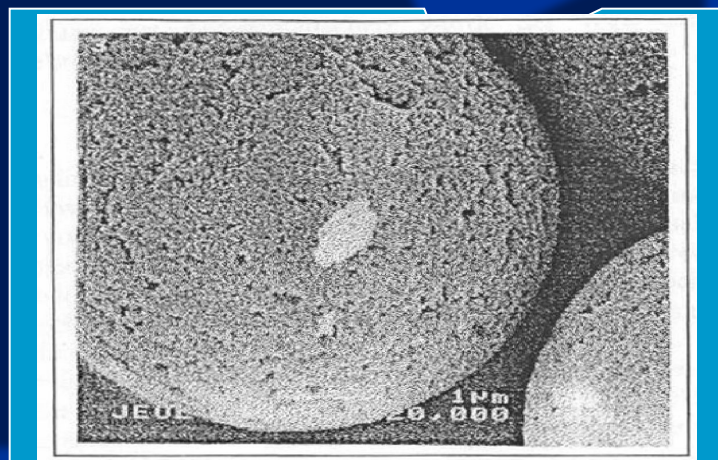
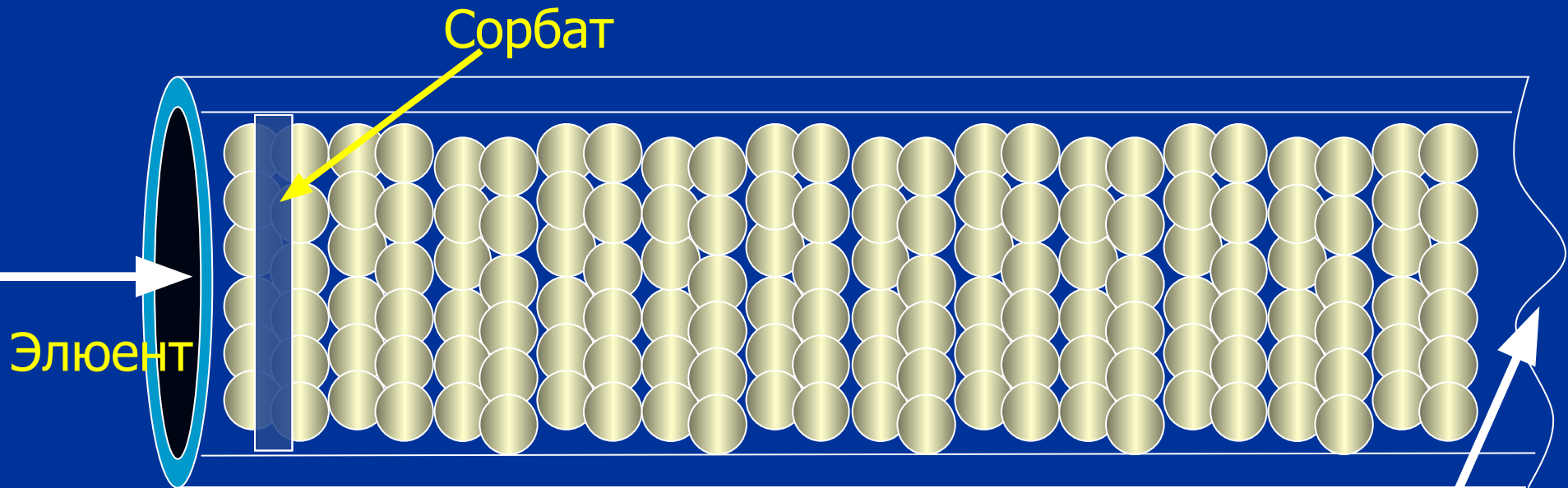
Фаза 1



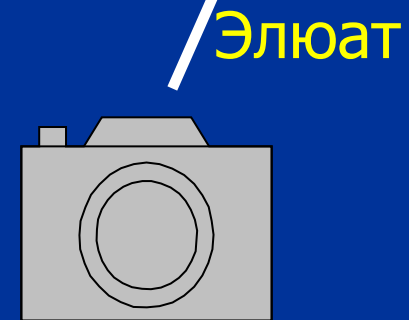
Процесс разделения



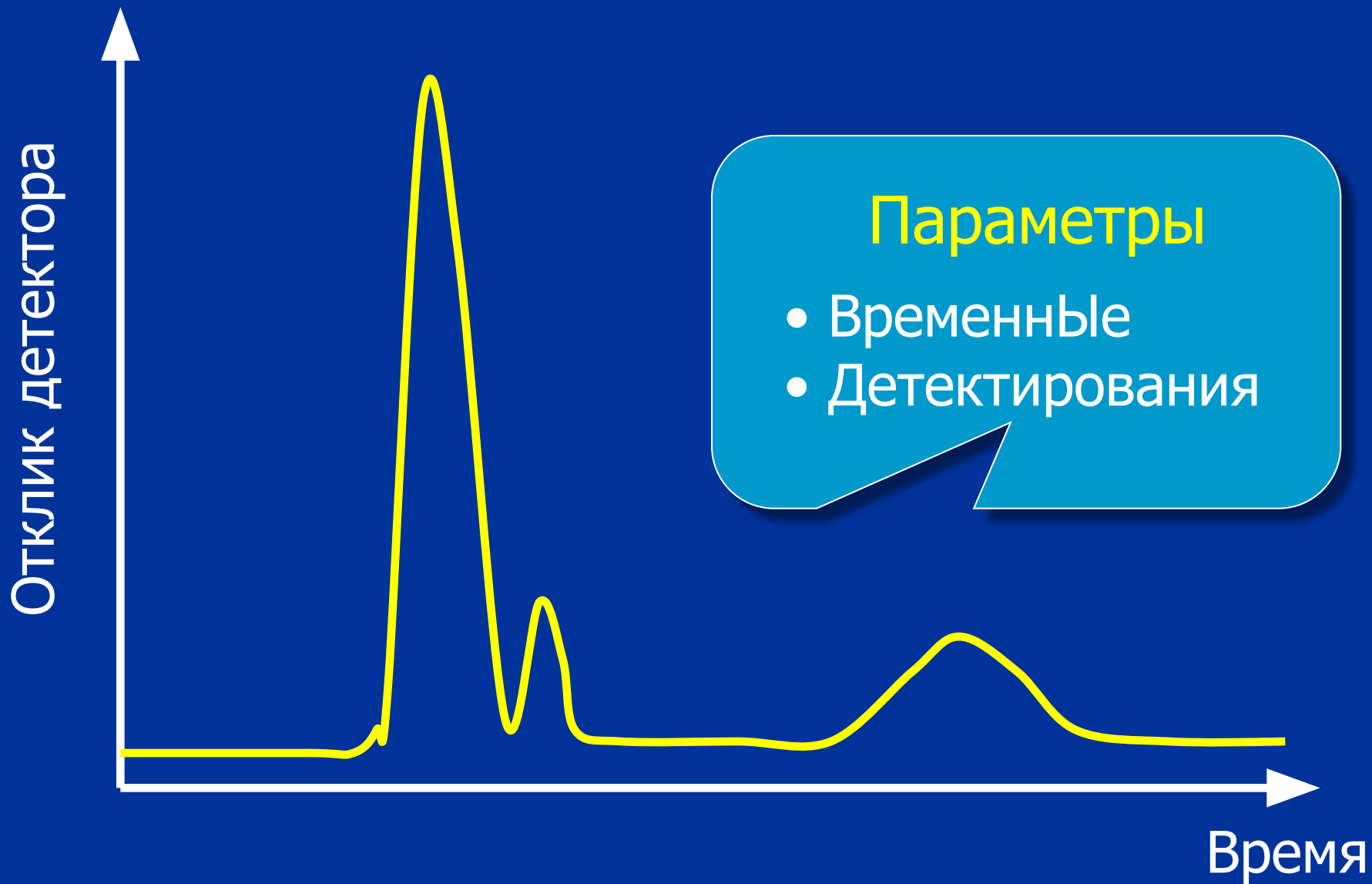
Процесс разделения



← Сорбент

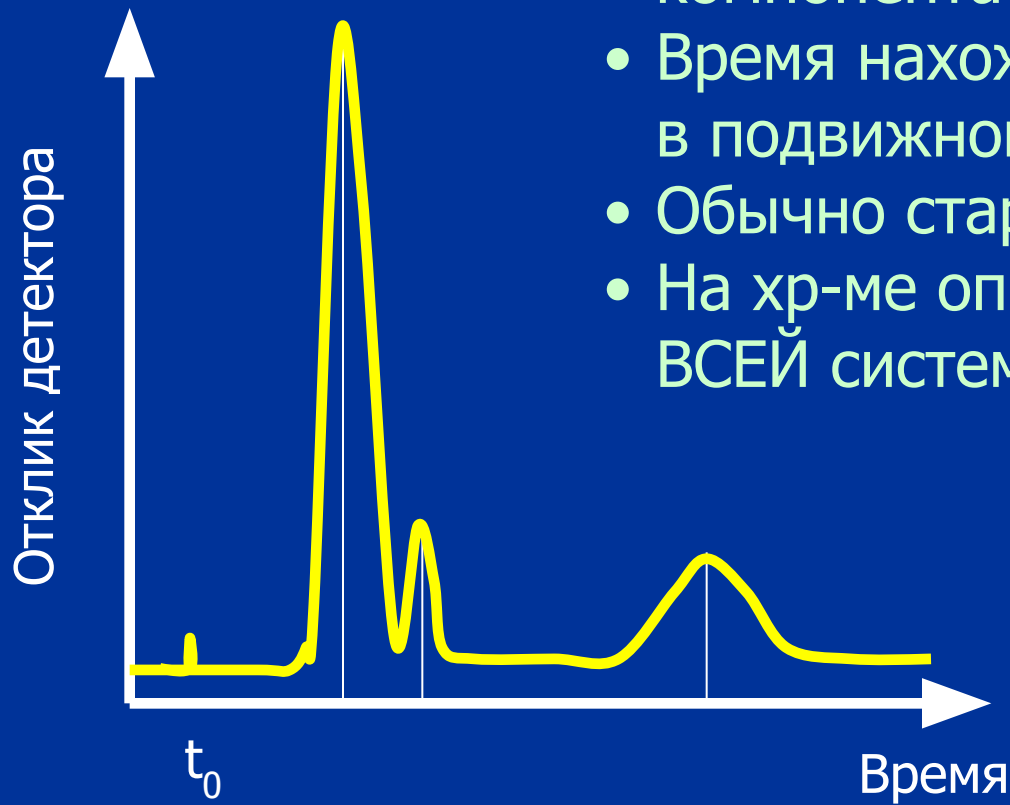


Хроматограмма



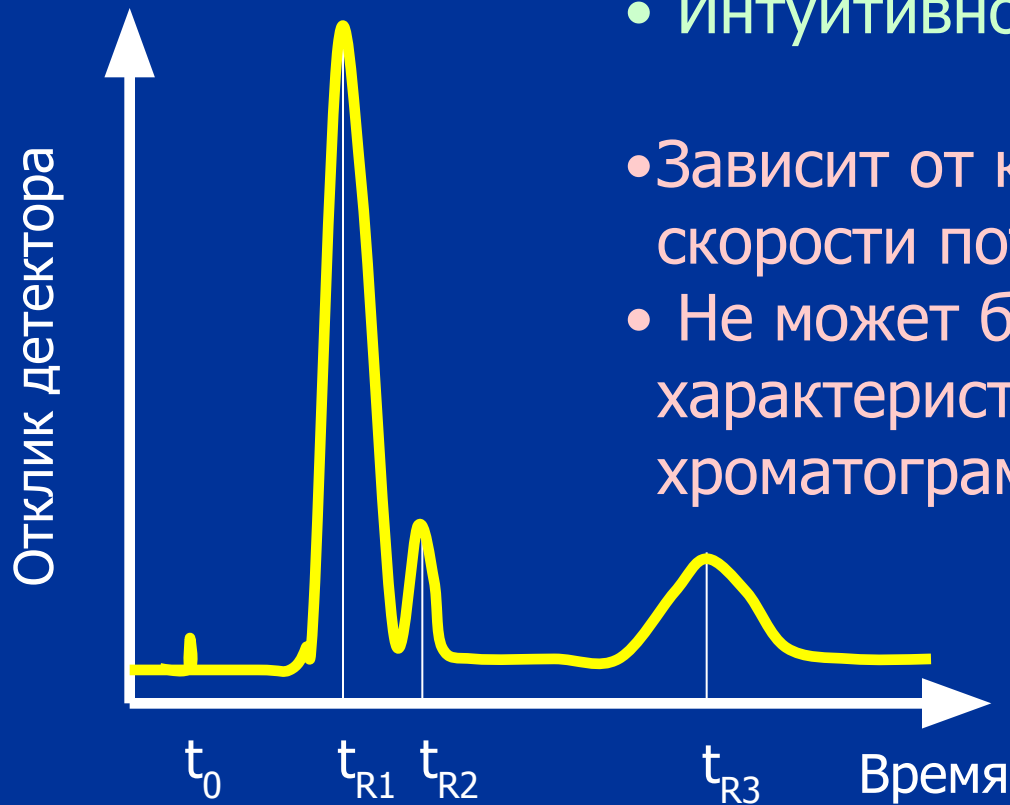
Мертвое время (t_0)

- Время выхода неудерживаемого компонента
- Время нахождения компонентов в подвижной фазе
- Обычно стараются минимизировать
- На хр-ме определяется мертвое время ВСЕЙ системы, а не колонки



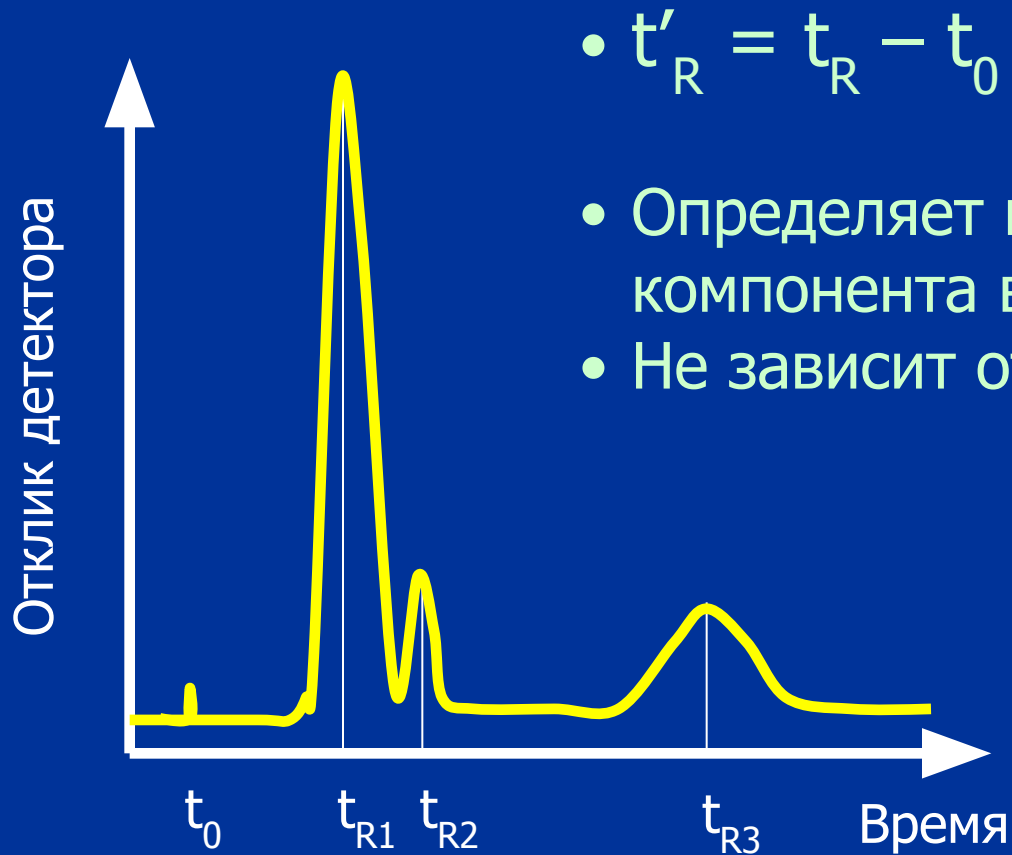
Время удерживания (t_R) (retention time)

- Легко определяется из хроматограммы
- Интуитивно понятно



- Зависит от конструкции системы и скорости потока элюента
- Не может быть адекватной характеристикой при сравнении хроматограмм

Исправленное время удерживания (t_R')



- $t_R' = t_R - t_0$

- Определяет время нахождения компонента в НЕПОДВИЖНОЙ фазе
- Не зависит от конструкции системы

Удерживаемый объем (V_x)

Объем подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной объемной скоростью F (мл/мин), чтобы элюировать в-во

$$V_R = t_R * F$$

! Не зависит от скорости потока подвижной фазы

1 хроматограмма: $F = 1$ мл/мин $t_0 = 2$ мин $t_{R1} = 5$ мин
2 хроматограмма: $F = 0.5$ мл/мин $t_0 = 4$ мин $t_{R1} = 10$ мин

$$V_R = 5 \text{ мл} = \text{const}$$

Исправленный удерживаемый объем (V'_x)

- $V'_R = t'_{Rx} * F$

- $V'_R = V_R - V_0$

Фактор удерживания K (коэффициент емкости)

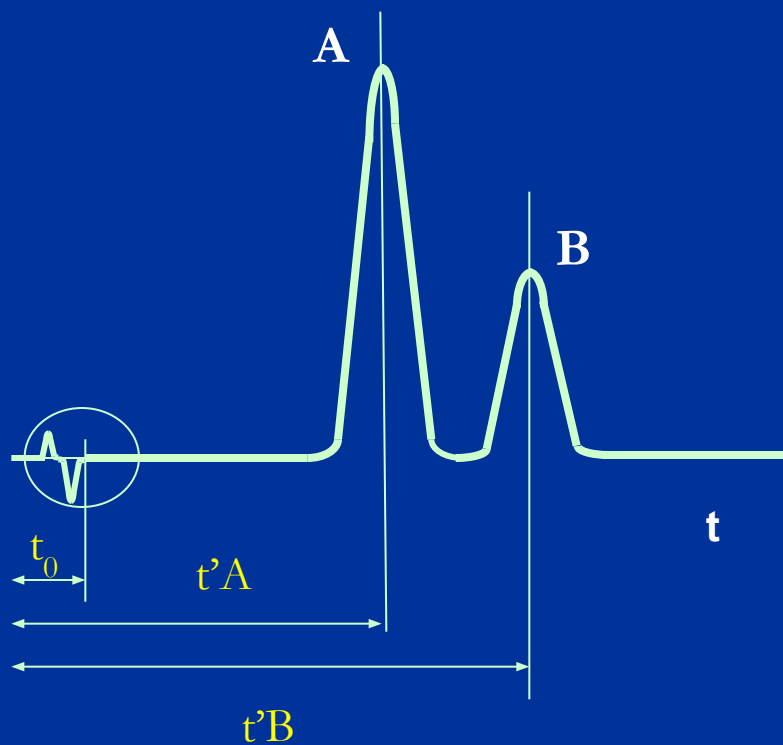
Фактор удерживания

$$K = (t_R - t_0) / t_0$$

- отношение исправленного времени удерживания
к мертвому времени

Этот параметр не зависит от размеров колонки,
и широко используется в хроматографической литературе и
расчетах.

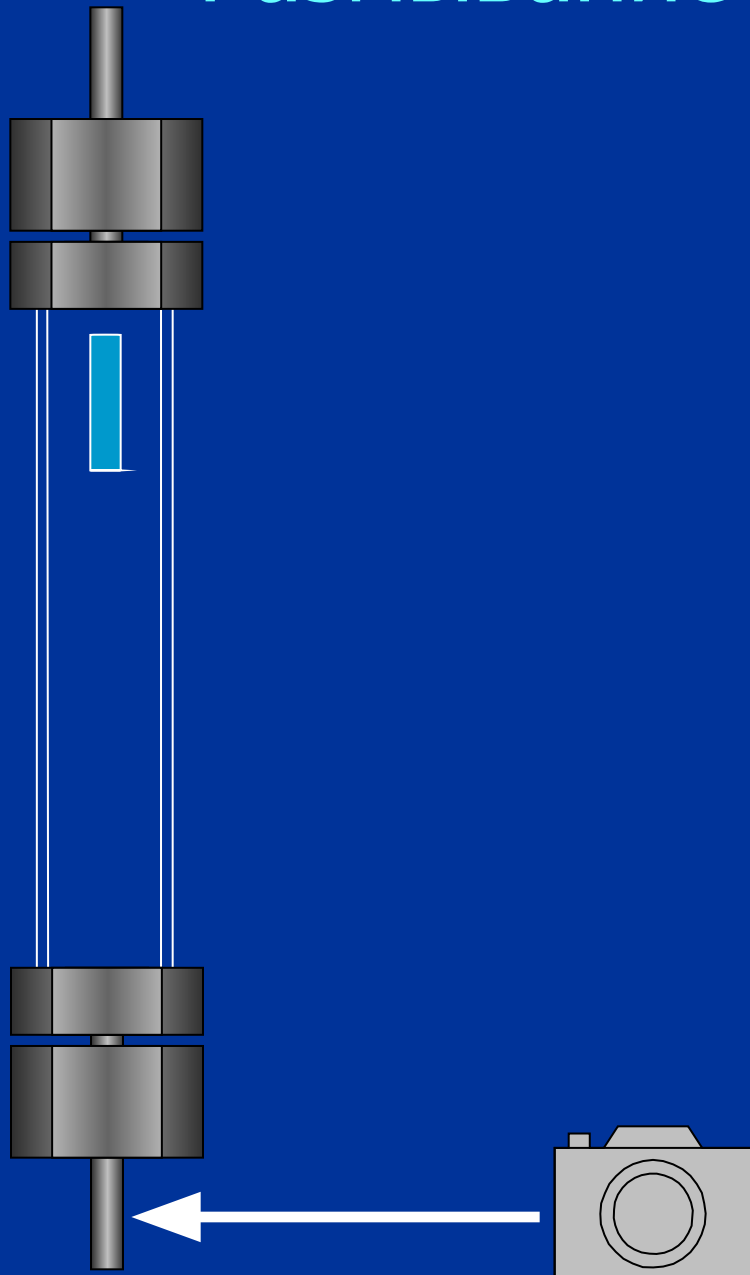
Относительное удерживание (или селективность) α



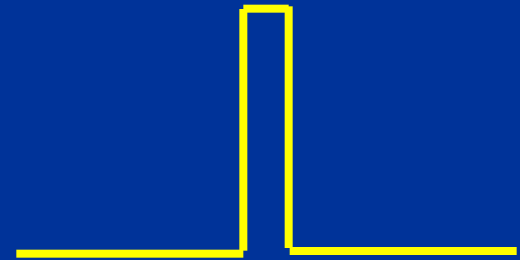
$$\alpha^B_A = t'_B / t'_A$$
$$\alpha^B_A > 1$$

Селективность — это **способность** хроматографической системы **разделять** данную пару веществ A и B.

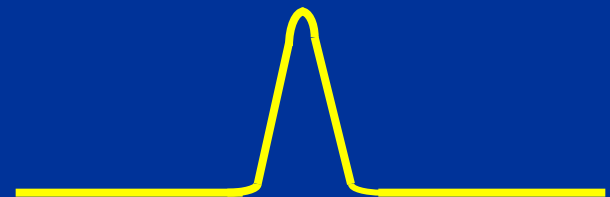
Размывание зоны компонента



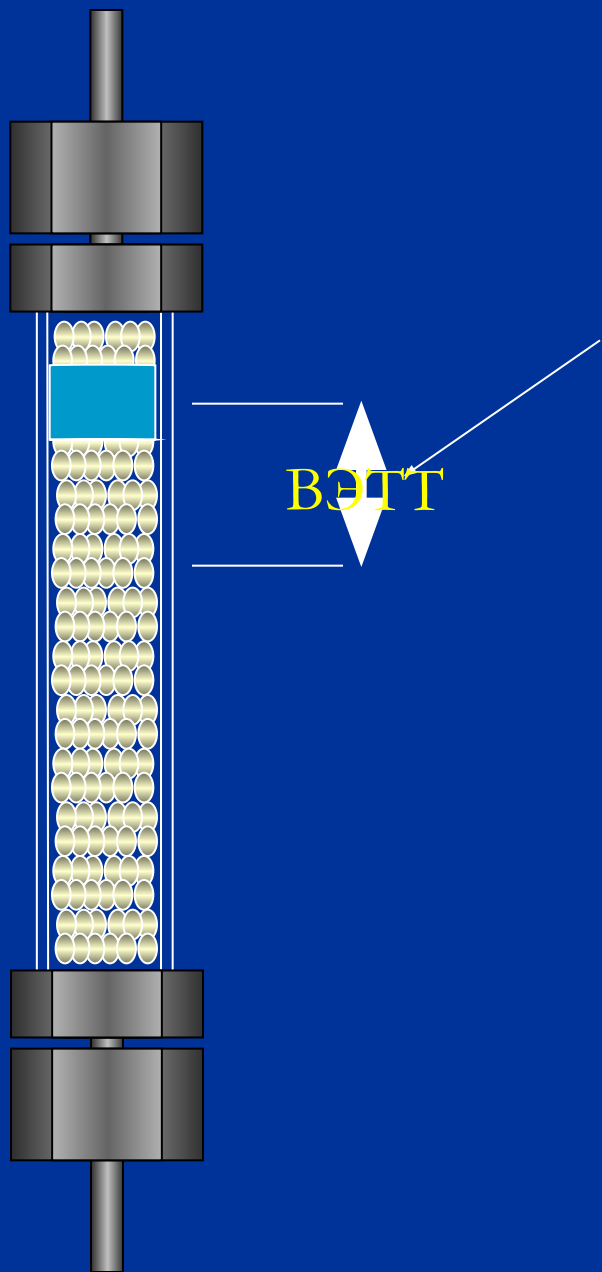
Теоретическая форма пика



Реальная форма пика



Теория теоретических тарелок



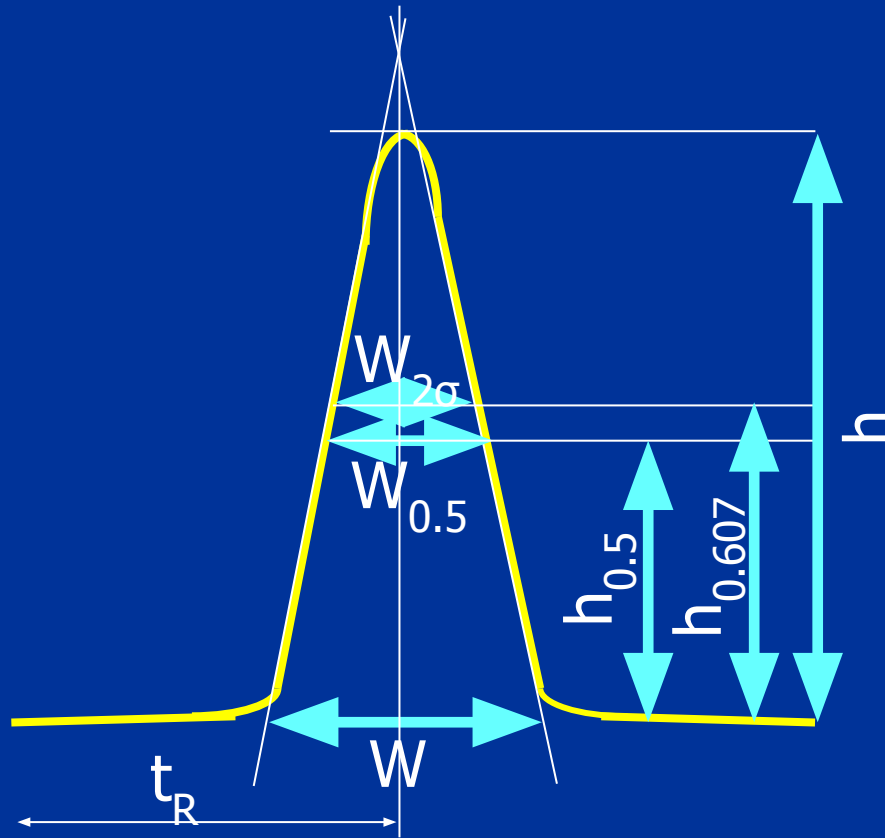
Высота эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

Соответствует высоте слоя сорбента, при прохождении которой акт сорбции—десорбции успевает совершиться в среднем один раз.

$$N = L / H_{\text{ВЭТТ}}$$

Отражает качество использованного сорбента и заполнения колонки.

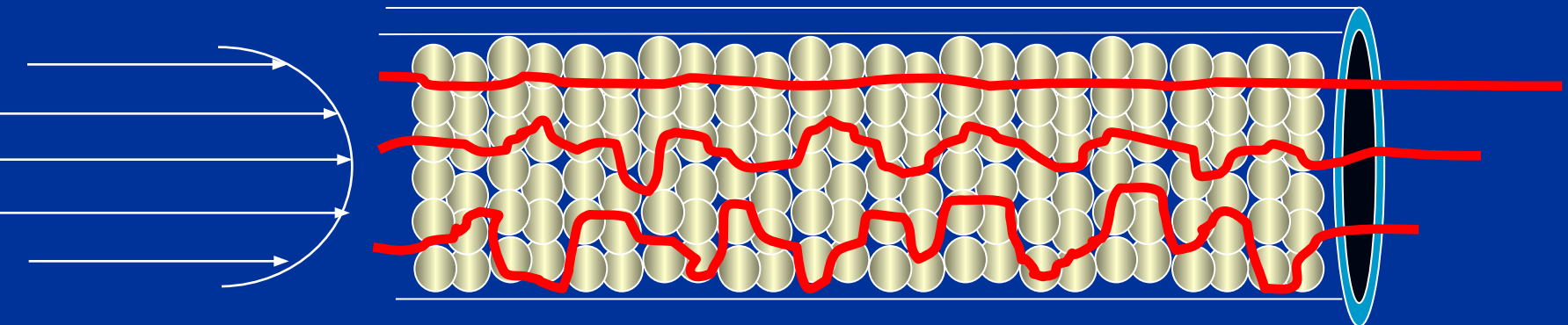
Эффективность колонки и ширина пика



$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2 = 4 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{2\sigma}} \right)^2$$

Кинетическая теория размывания

Скорость перемещения по колонке отдельных молекул отличается от средней скорости, характерной для данного соединения



- Неоднородность потока подвижной фазы.
- Продольная диффузия в неподвижной и подвижной фазах
- Кинетика массопередачи в неподвижной и подвижной фазах
- Неравновесность процесса внутри застойных зон

Кинетическая теория размывания

Эффективность зависит от:

- Диаметра зерен сорбента, их геометрии и монодисперсности
- Качества набивки колонки
- Мертвого объема системы
- Скорости потока элюента

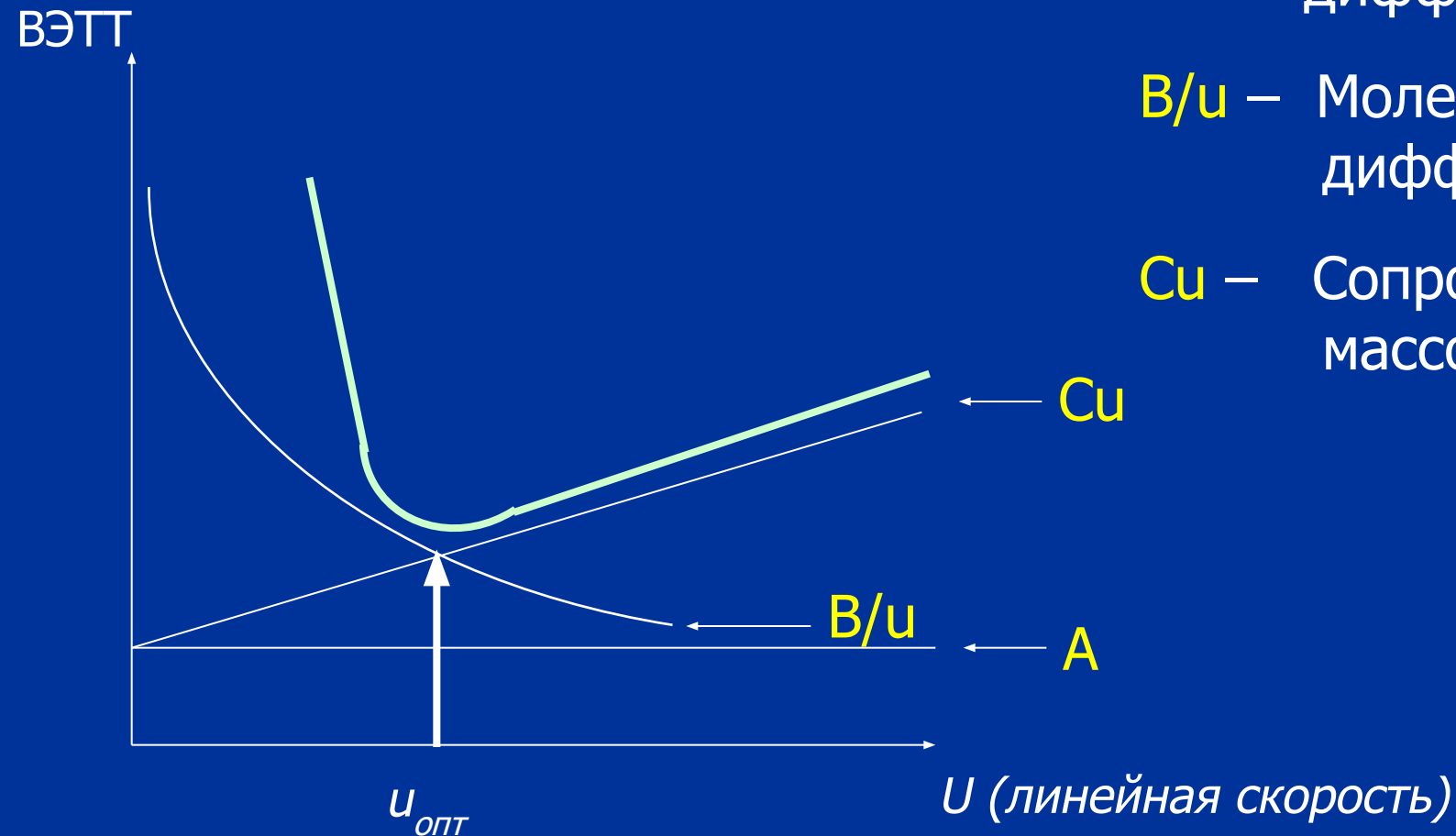
Уравнение Ван-Деемтера

$$H_{\text{ЭТТ}} = A + B/u + Cu$$

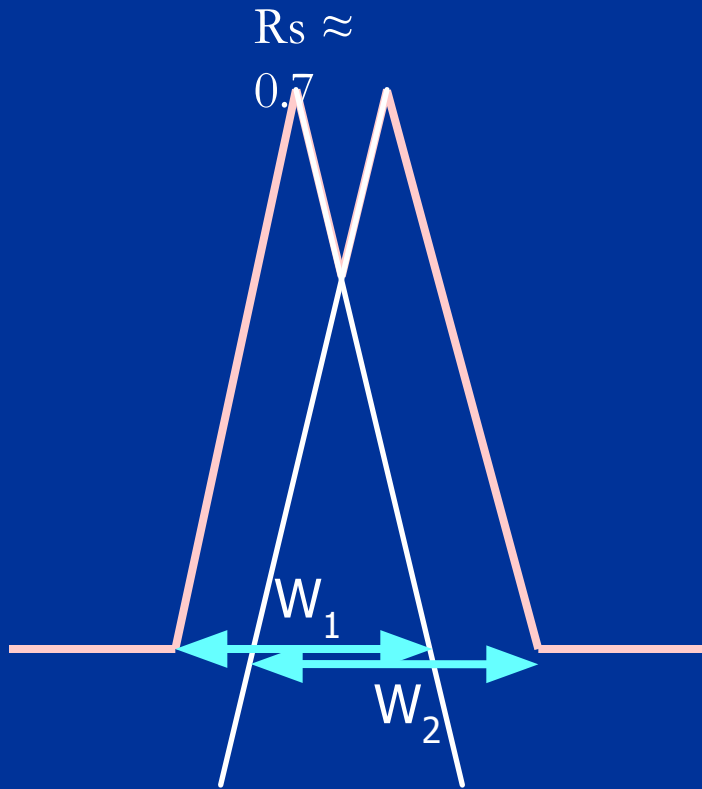
A – Вихревая
диффузия

B/u – Молекулярная
диффузия

Cu – Сопротивление
массопереносу



Критерий разделения R_s

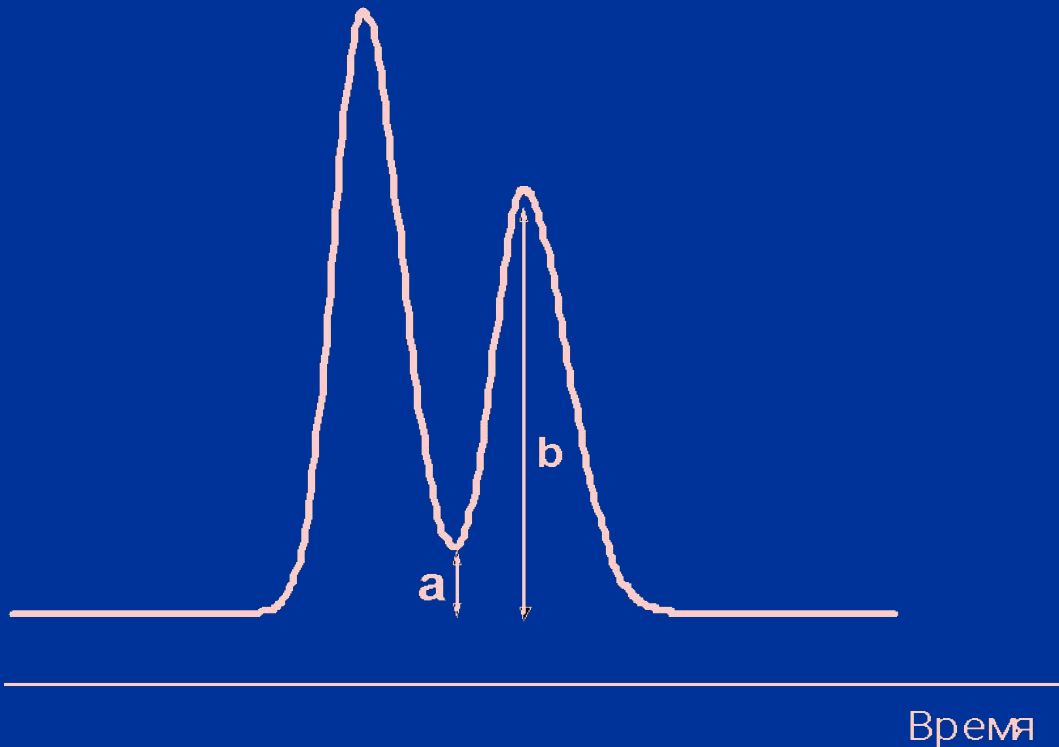


$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{\bar{K}'}{1 + \bar{K}'} \right) \cdot \sqrt{N}$$

- При количественном (100%) разрешении пиков $R_s = 1.5$
- Продолжает увеличиваться при увеличении времени второго пика и уже полном разрешении

Критерий Кайзера V

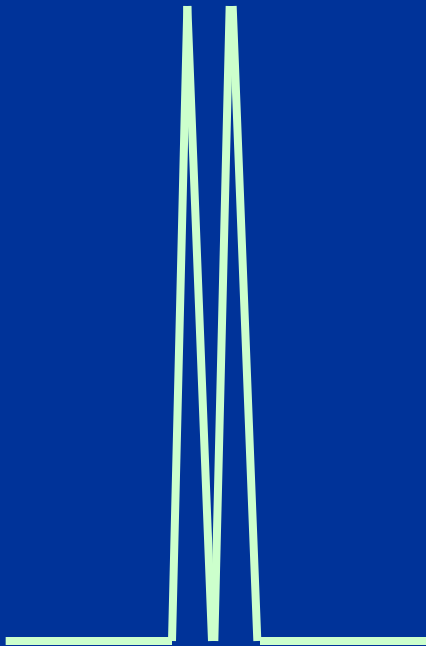


$$V = \frac{(b - a)}{b}$$

- Изменяется от 0 до 1
- Может применяться для несимметричных пиков

Влияние удерживания (K), селективности (α) и эффективности (N) на разделение

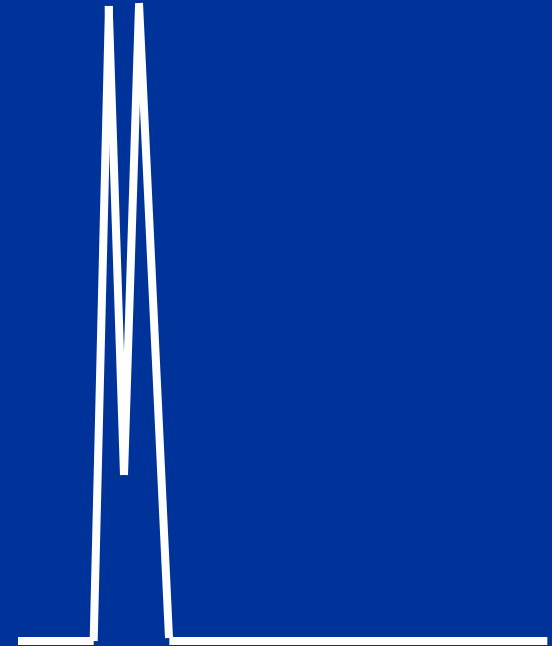
$K = 5$
 $\alpha = 1.2$
 $N = 10\ 000$



$K = 5$
 $\alpha = 1.7$
 $N = 400$

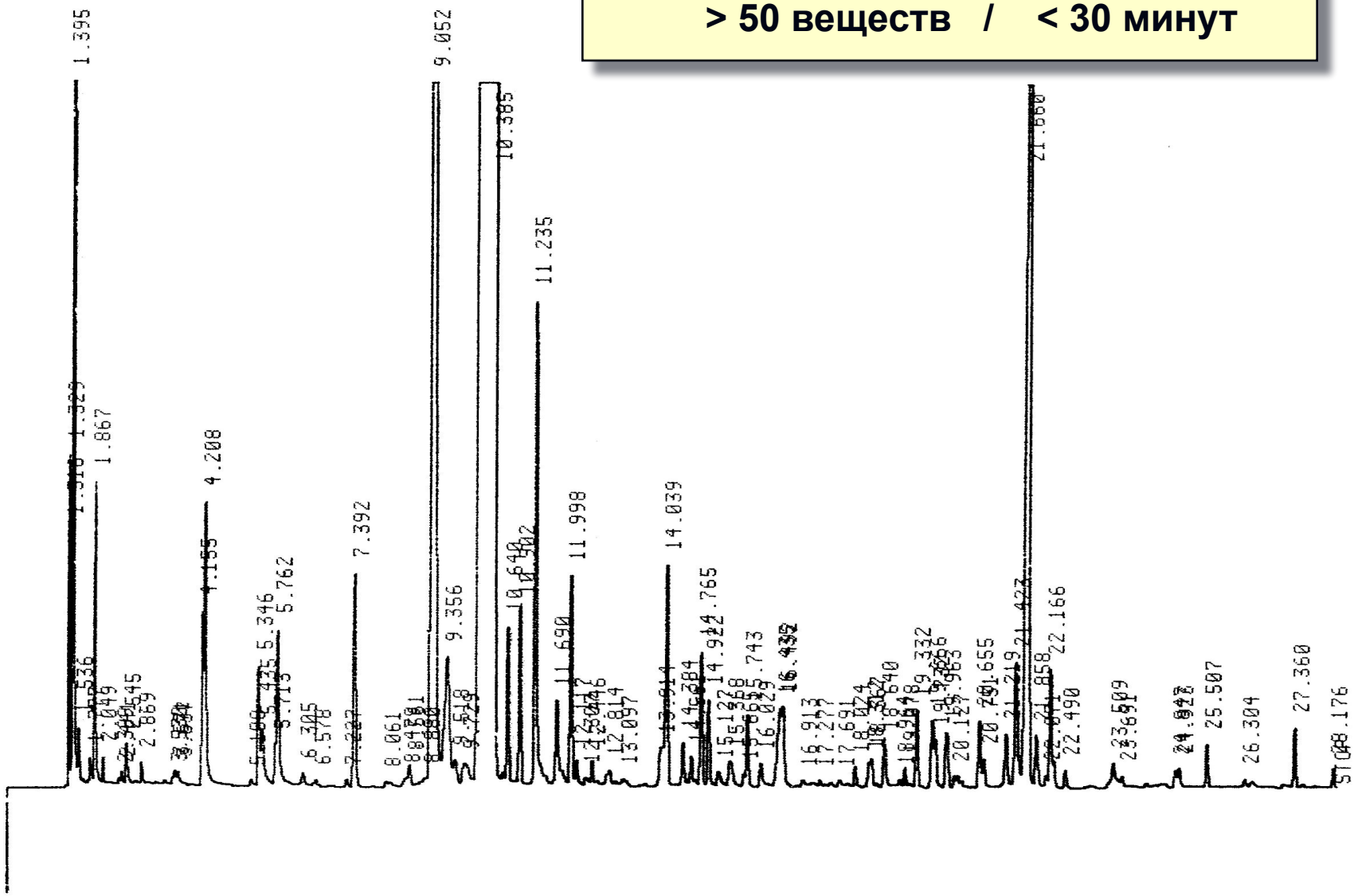


$K = 0.5$
 $\alpha = 1.4$
 $N = 15\ 000$



Хроматограмма апельсинового сока

* RUN # 176 AUG 1, 2001 23:25:55
START



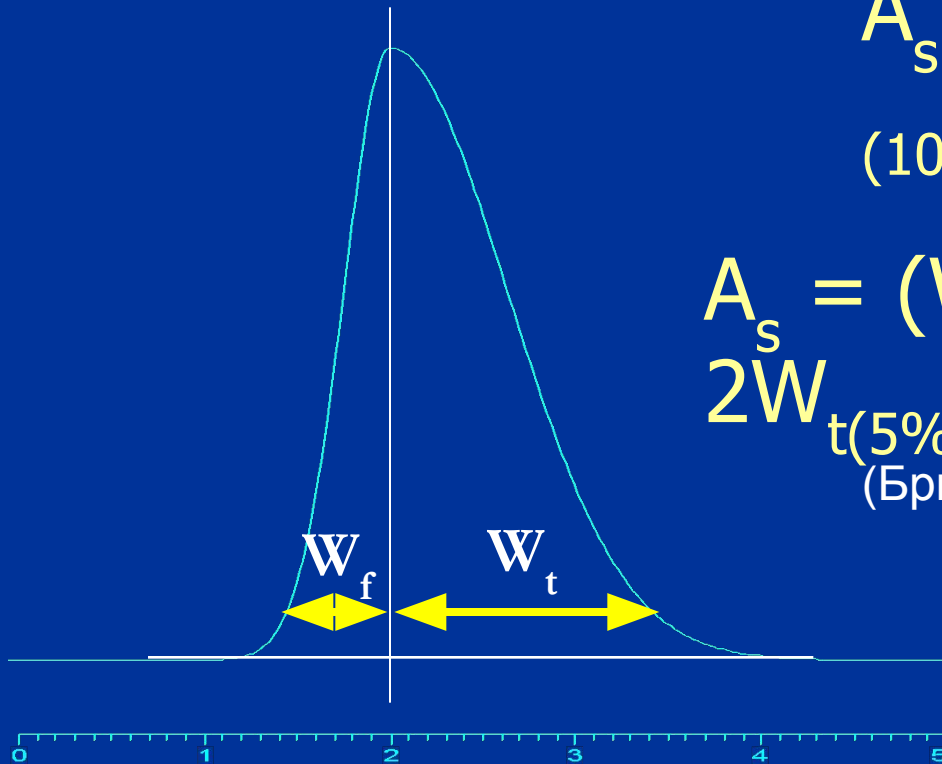
Коэффициент асимметрии, A_s

$$A_s = W_{t(10\%)} / W_f$$

(10%)

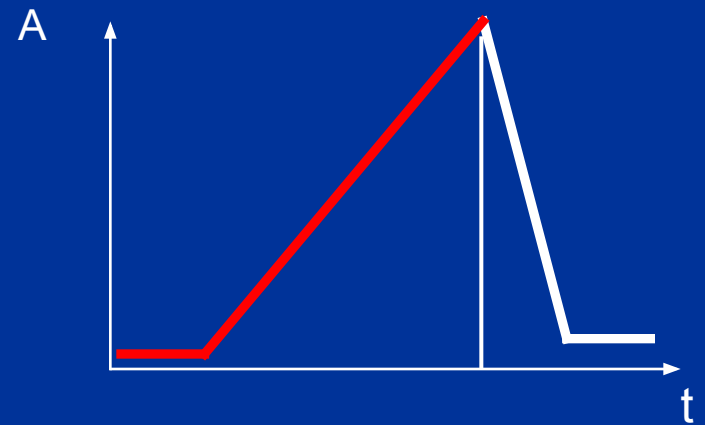
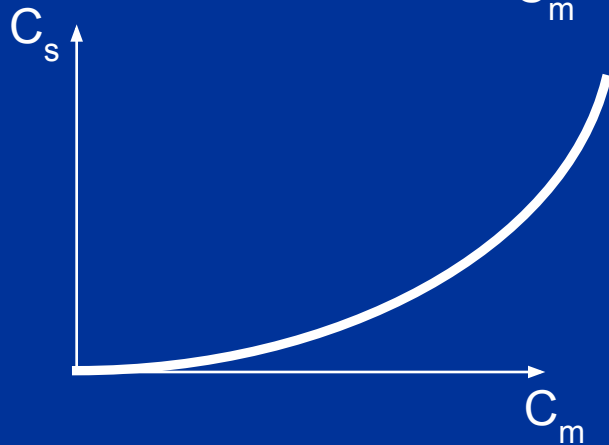
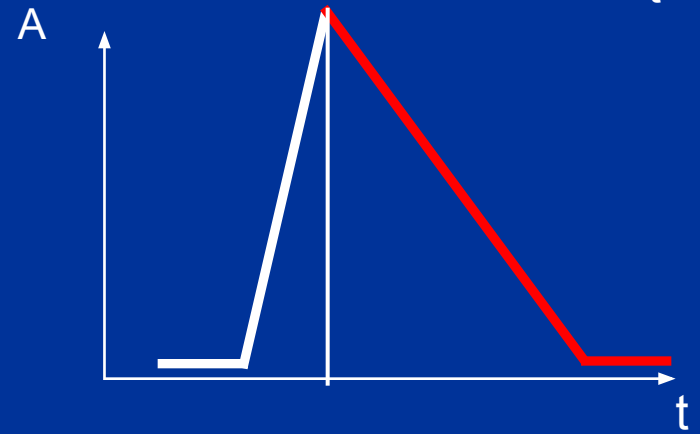
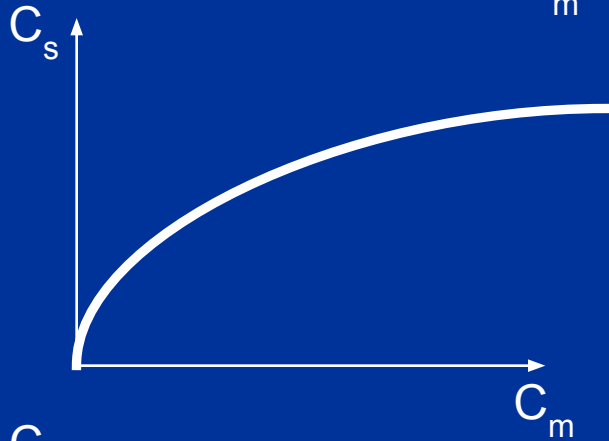
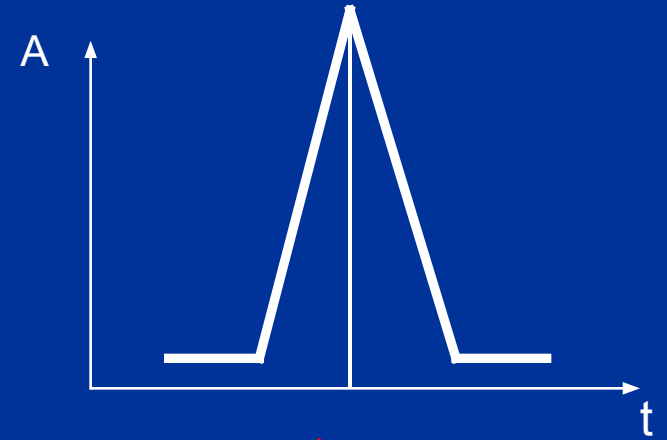
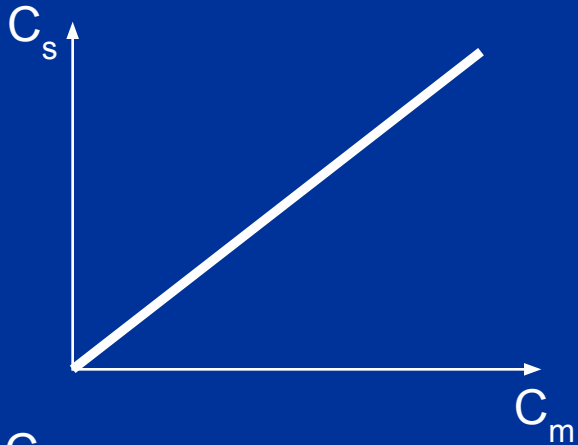
$$A_s = (W_{t(5\%)} + W_{f(5\%)}) / 2W_{t(5\%)}$$

(Британская и Европейская Фармакопеи)

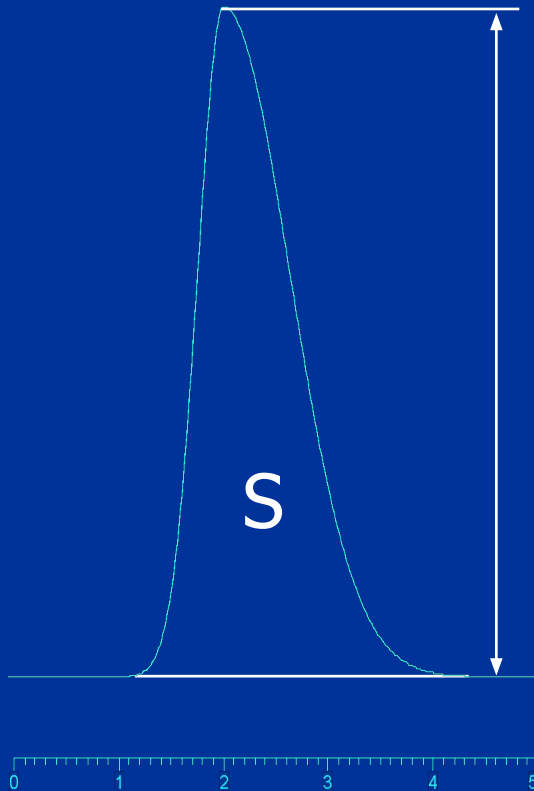


- Одна из основных причин – нелинейность изотермы сорбции

Связь изотермы и формы пика



Количественный анализ в хроматографии

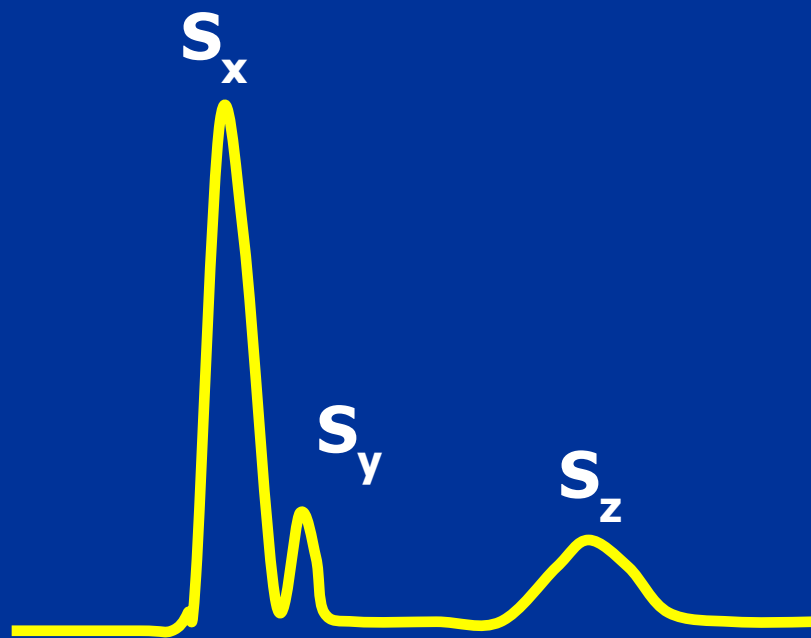


- Количественной характеристикой является **высота** или **площадь** пика
- При наличии маленьких или несимметричных пиков **предпочтительнее** использовать **расчет по площадям** пиков

Методы количественного анализа в хроматографии

- Метод внутренней нормализации
- Метод внешнего стандарта
- Метод добавок
- Метод внутреннего стандарта

Метод внутренней нормализации

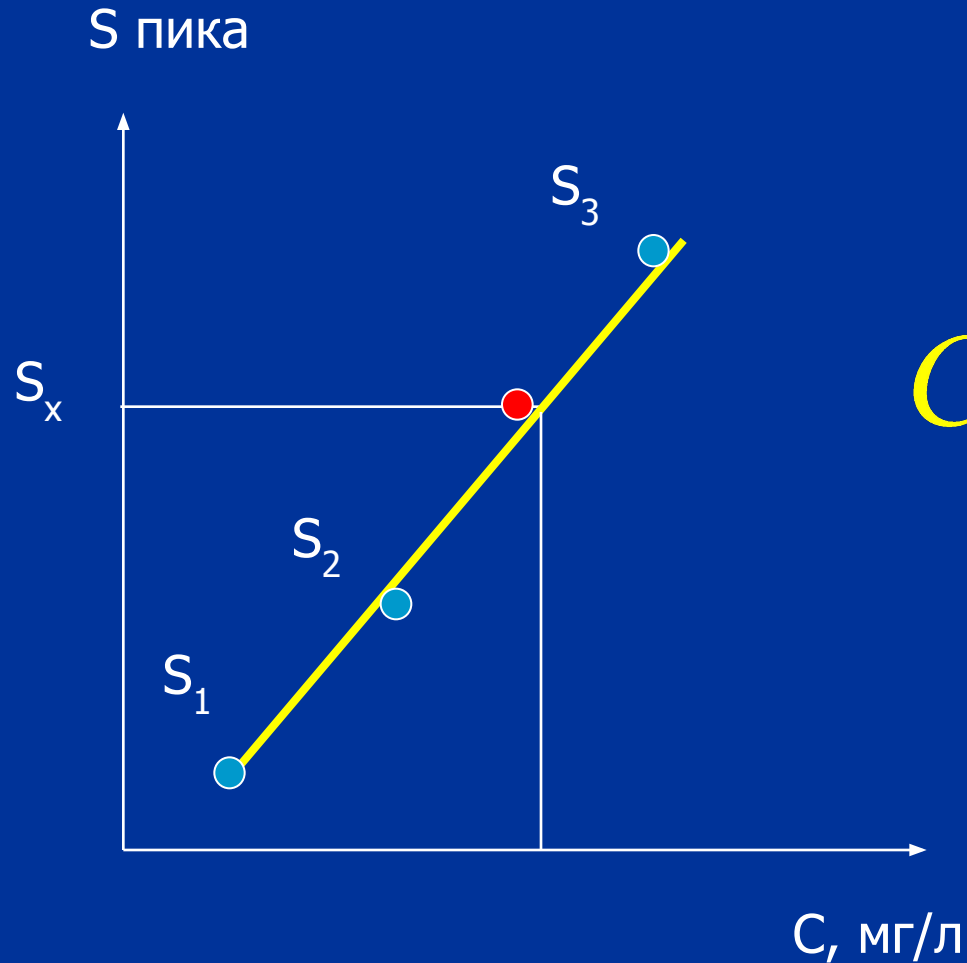


$$X, \% = \frac{S_x}{S_x + S_y + S_z} \cdot 100$$

$$X, \% = \frac{S_x f_x}{\sum_{i=1}^n S_n f_n} \cdot 100$$

$$f_{xm} = \frac{S_{cm}}{S_{xm}} \frac{C_x}{C} f$$

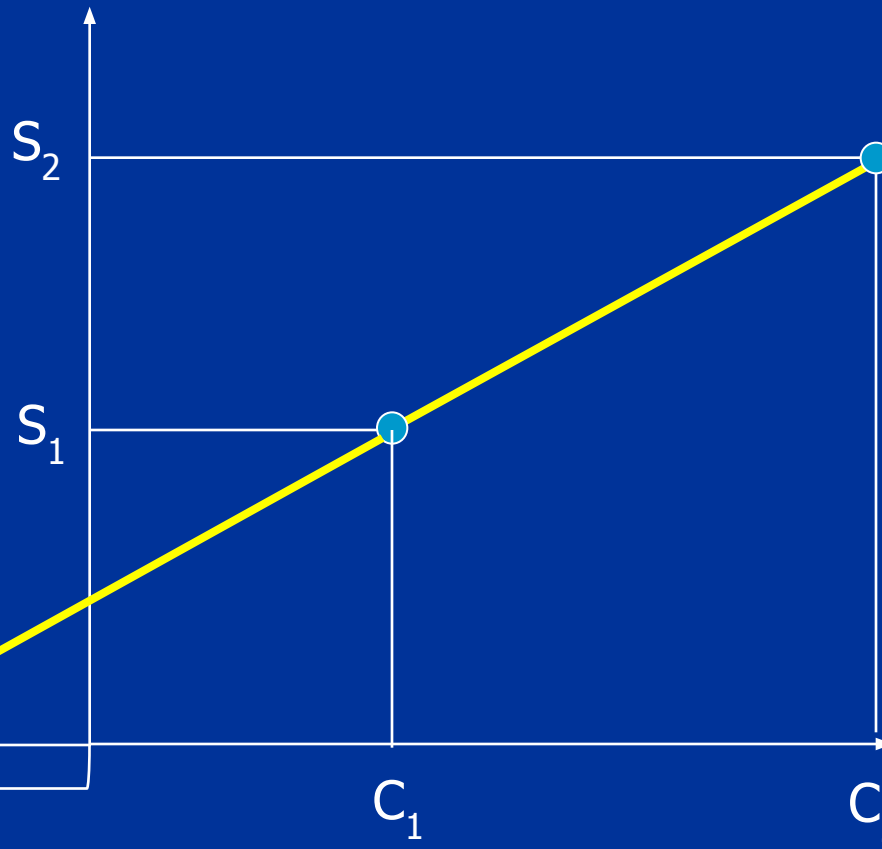
Метод внешнего стандарта



$$C_x = A \cdot S_x + B$$

Метод добавок

S пика



C добавки

C_x

Метод внутреннего стандарта

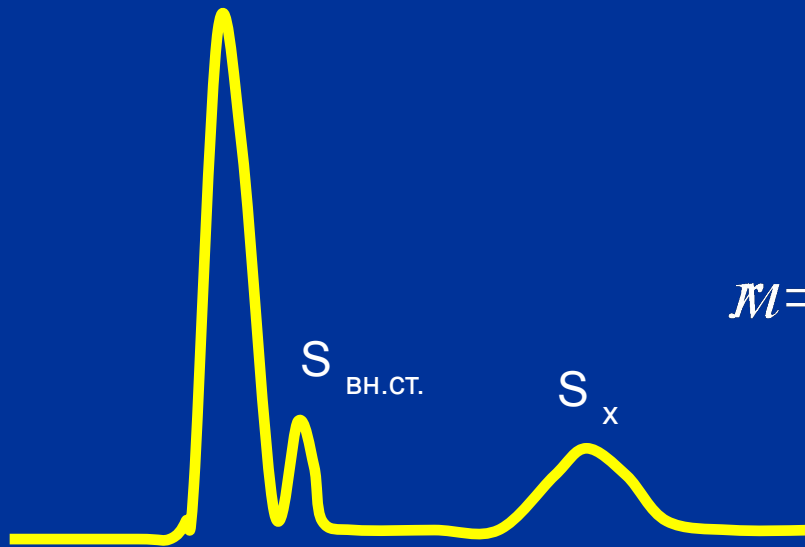
Основан на введении в анализируемую смесь определенного количества постороннего вещества
(внутреннего стандарта)

Требования к внутреннему стандарту

- отсутствовать в анализируемой пробе
- иметь структуру, время удерживания и концентрацию, близкие к определяемому веществу (ОВ)
- полностью отделяться от ОВ и др. компонентов пробы
- быть химически инертным

Метод внутреннего стандарта (продолжение)

$$k = \frac{S_{\text{вн.ст.}} \cdot C_x}{S_{\text{вн.ст.}} \cdot C}$$

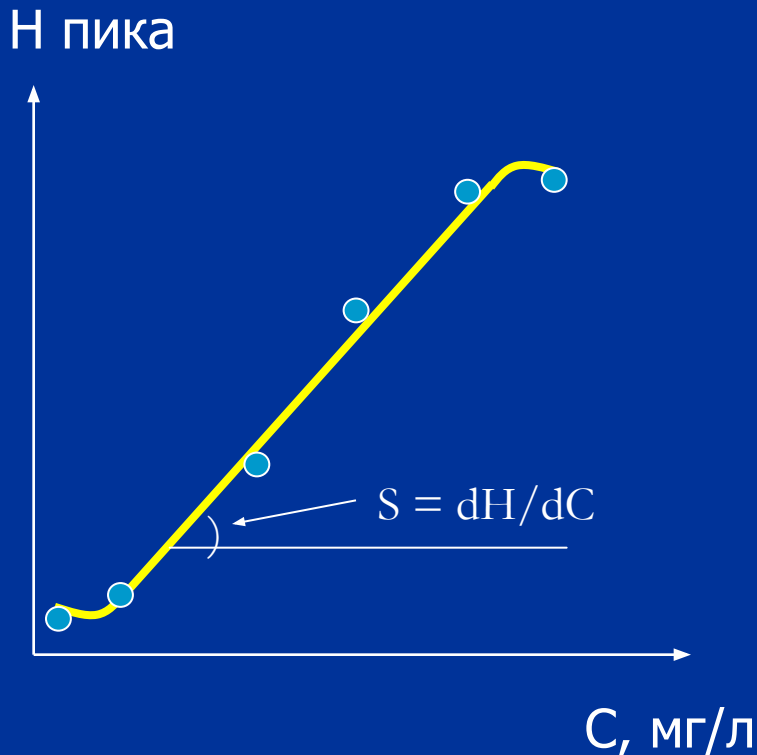


$$k = \frac{m_{\text{вн.ст.}}}{m_{\text{пробы}}} \left(= \frac{m_{\text{вн.ст.}}}{m_{\text{пробы}}} \right)$$

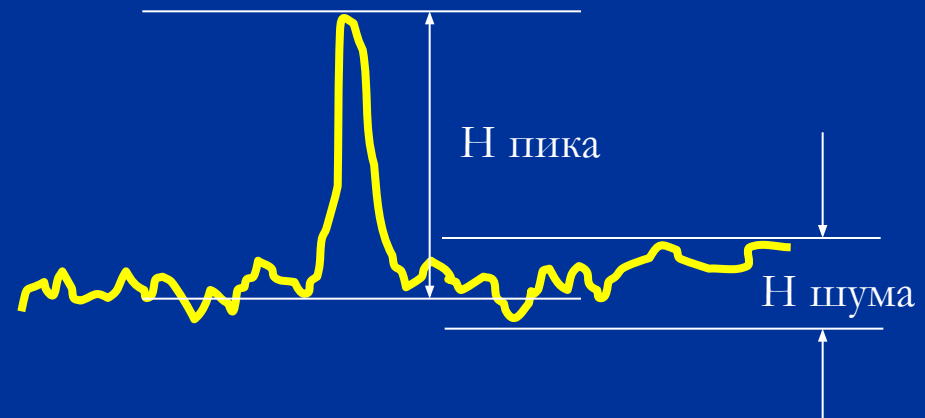
$$x, \% = kr \frac{S_x}{S_{\text{вн.ст.}}} \cdot 100$$

Чувствительность и предел обнаружения

Чувствительность – определяется наклоном градуировочного графика



Предел обнаружения – наименьшее содержание, при котором компонент можно обнаружить с заданной вероятностью по данной методике



$$H \text{ пика} = 3 * H \text{ шума}$$

Классификации хроматографических методов

Классификация хроматографических методов анализа

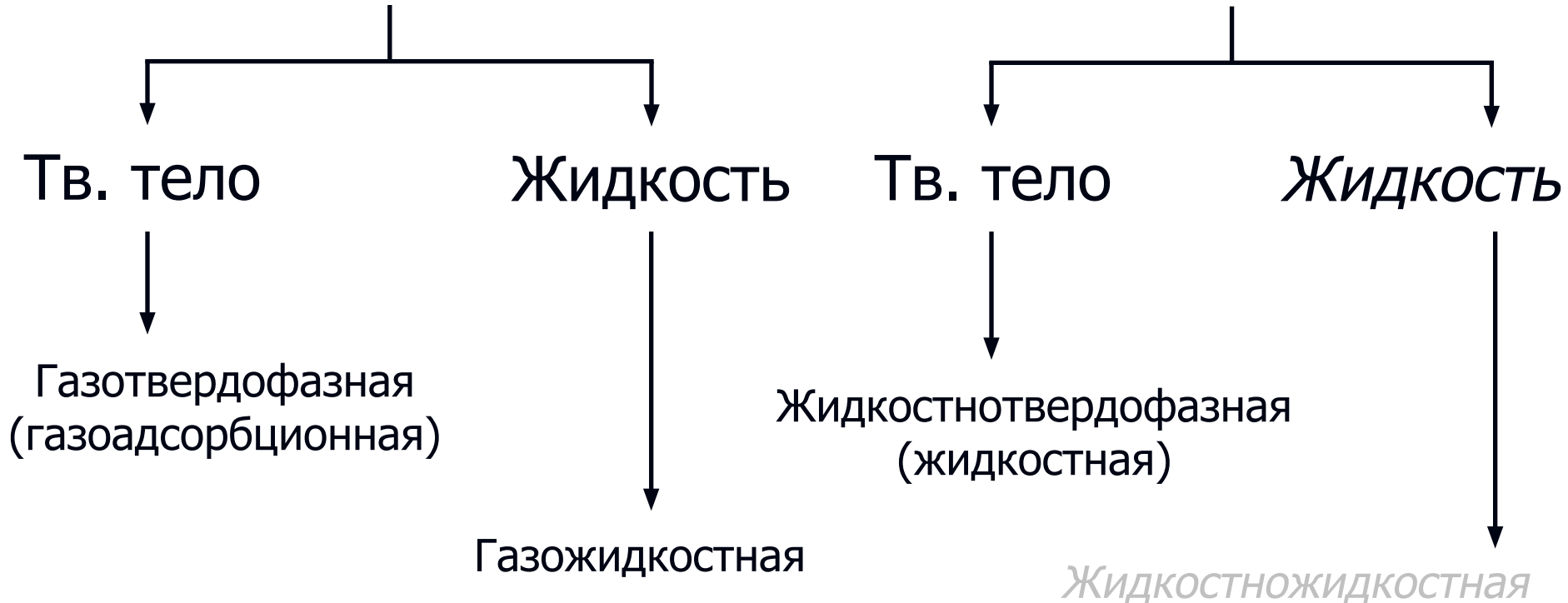
- По агрегатному состоянию подв. фазы (газовая, жидкостная, флюидная)
- По механизму разделения (распределительная, адсорбционная, ионообменная, эксклюзионная и др.)
- По технике исполнения (колоночная, планарная и др.)
- По целям и задачам (аналитическая, препаративная)
- По способу перемещения сорбата (элюентная, вытеснительная, фронтальная)
- По способу детектирования (прямой, косвенный)

Классификация по агрегатному состоянию фаз

1. Сначала классифицируют подвижную фазу



2. Затем классифицируют неподвижную фазу

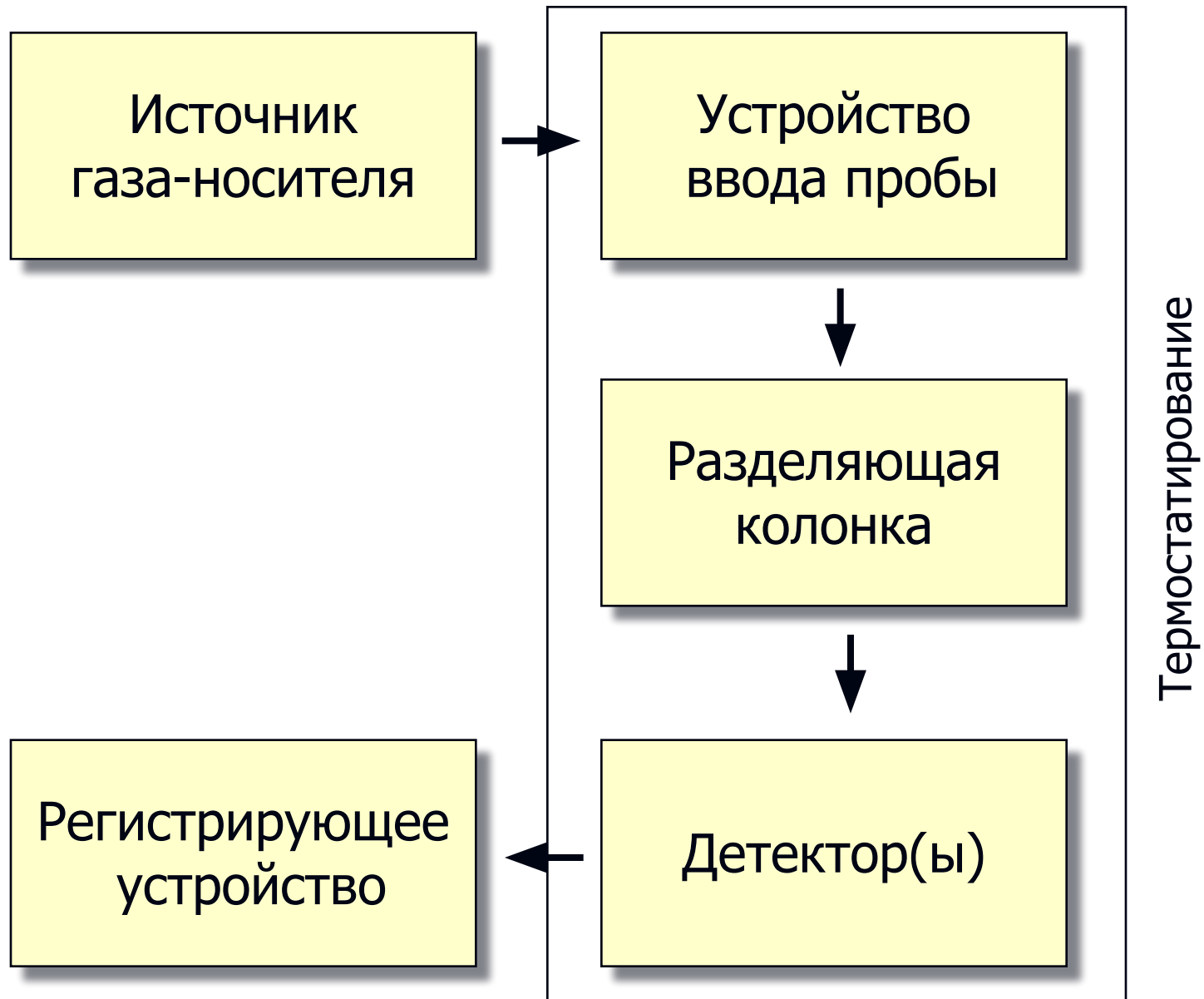


Газовая хроматография

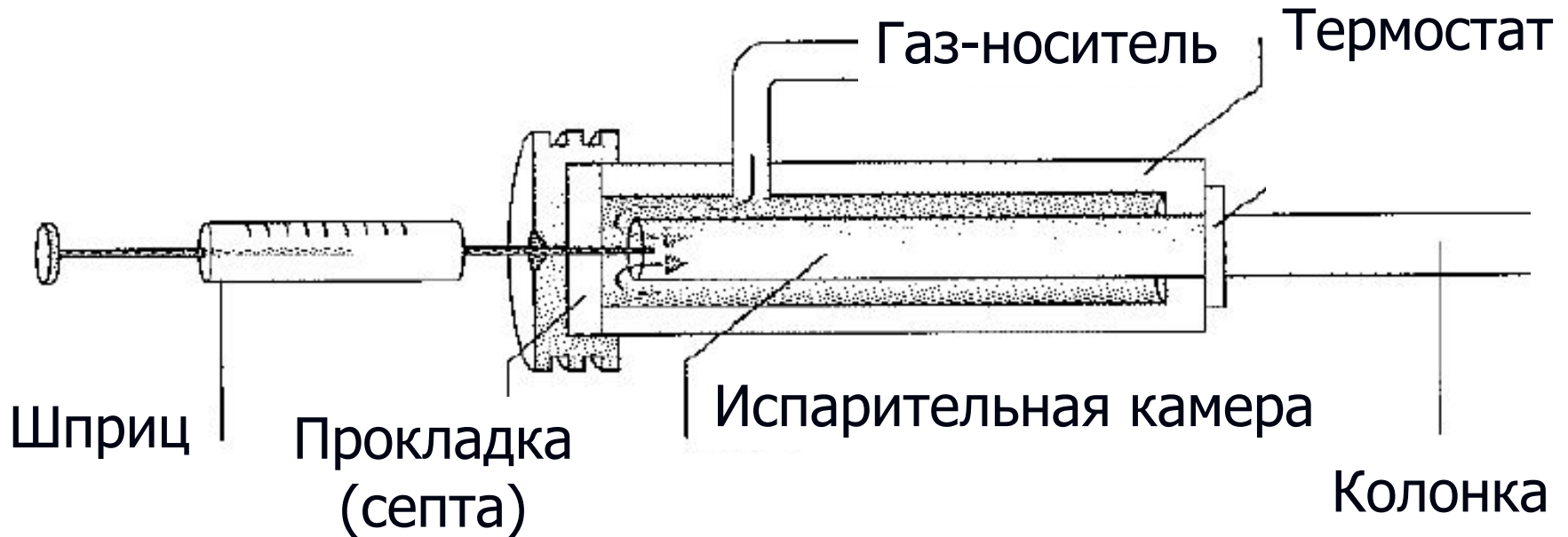
В качестве подвижной фазы используется газ

- Меньшая вязкость газов по сравнению с жидкостью и большие скорости диффузии
- Большая эффективность
- Экспрессный и многокомпонентный анализ

Газохроматографическое оборудование



Устройство ввода пробы



- Объем вводимой пробы легко дозируется
- Хорошая воспроизводимость дозирования даже микроколичеств образца
- Ввод пробы не направлен против потока газа-носителя
- Возможно дополнительное устройство для термодесорбции веществ из твердых образцов (почвы)

Колонки в газовой хроматографии

Капиллярные –

внутренний диаметр
0.25-0.5 мм., $l = 100$ м

Неподвижная фаза
нанесена на стенки.

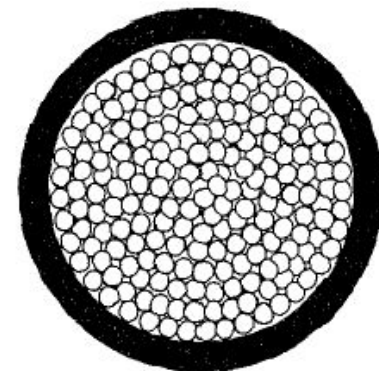
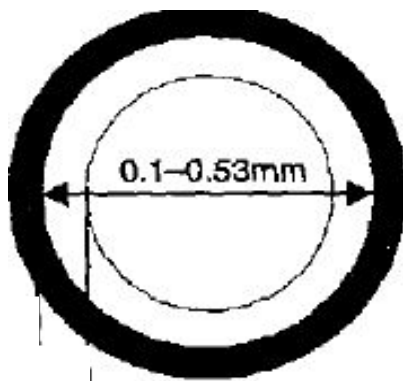
Высокая **эффективность**
(до $1 \cdot 10^6$ ТТ/м),
иногда **недостаточная**
селективность

Набивные (насадочные) –

внутренний диаметр
3-10 мм., $l = 10$ м

Неподвижная фаза
нанесена на сорбент.

Высокая **селективность**,
часто **недостаточная**
эффективность
($\sim 1 \cdot 10^5$ ТТ/м)



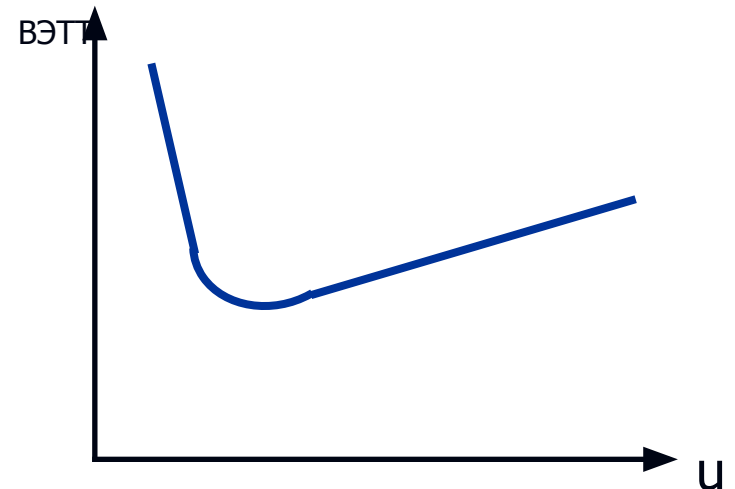
Капиллярные колонки

- Сейчас в основном делаются из плавленного кварца
 - Нанесение полиамидной пленки делает их гибкими
 - Легко крепятся к держателям, инжектору, детектору
 - Длина 10-30 (до 100 м); внутр. диаметр ~ 0.1-1 мм
- Используют ту же неподвижную фазу, что и набивные колонки
- Неподвижную фазу в принципе можно заменить
- Высокая эффективность за счет ламинарного потока газа-носителя

Re (крит.) = 2300

$Re = 3-50$

$$ВЭТТ = A + B/u + Cu; \quad A \approx 0$$



Капиллярные колонки

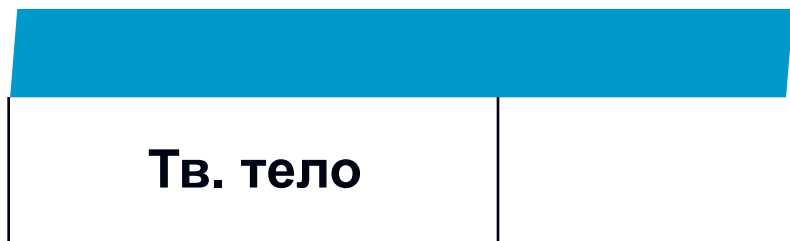


Принцип разделения веществ

Адсорбционная

- Различная адсорбция молекул из газовой фазы (подвижная фаза) на твердом адсорбенте (неподвижная фаза)

Газ



Распределительная

- Различное распределение молекул между газом (подвижная фаза) и жидкостью, нанесенной на поверхность твердого носителя (неподвижная фаза)

Газ



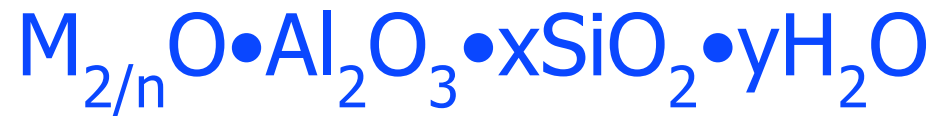
Газо-адсорбционная хроматография

Общие положения

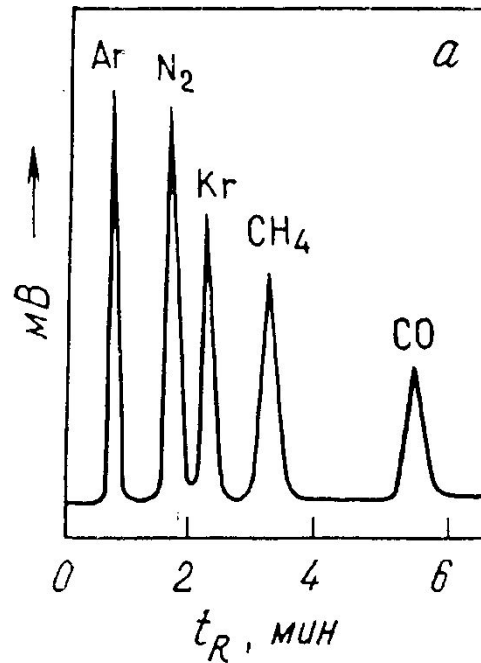
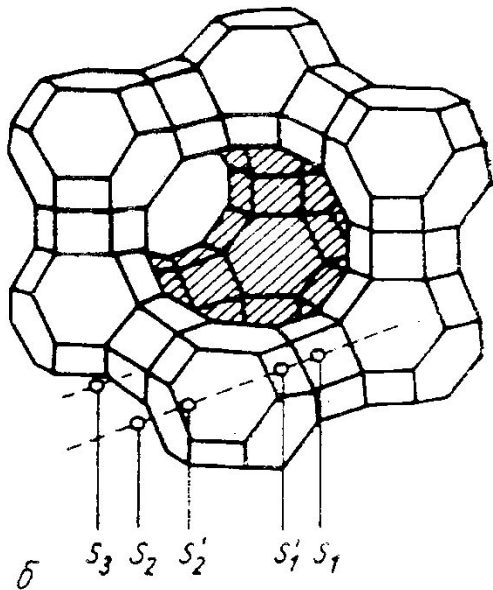
- Основана на адсорбции веществ из газовой фазы на твердом сорбенте
- Обычно используют для разделения и определения атмосферных газов (O_2 , N_2 , Ar, CO_2 , H_2S , CO, SO_x , CH_4 .)
- Реализуется как на набивных, так и на капиллярных колонках
 - В капиллярных колонках тонкий слой пористого адсорбента фиксируется на внутренних стенках колонки



Цеолитовые молекулярные сита

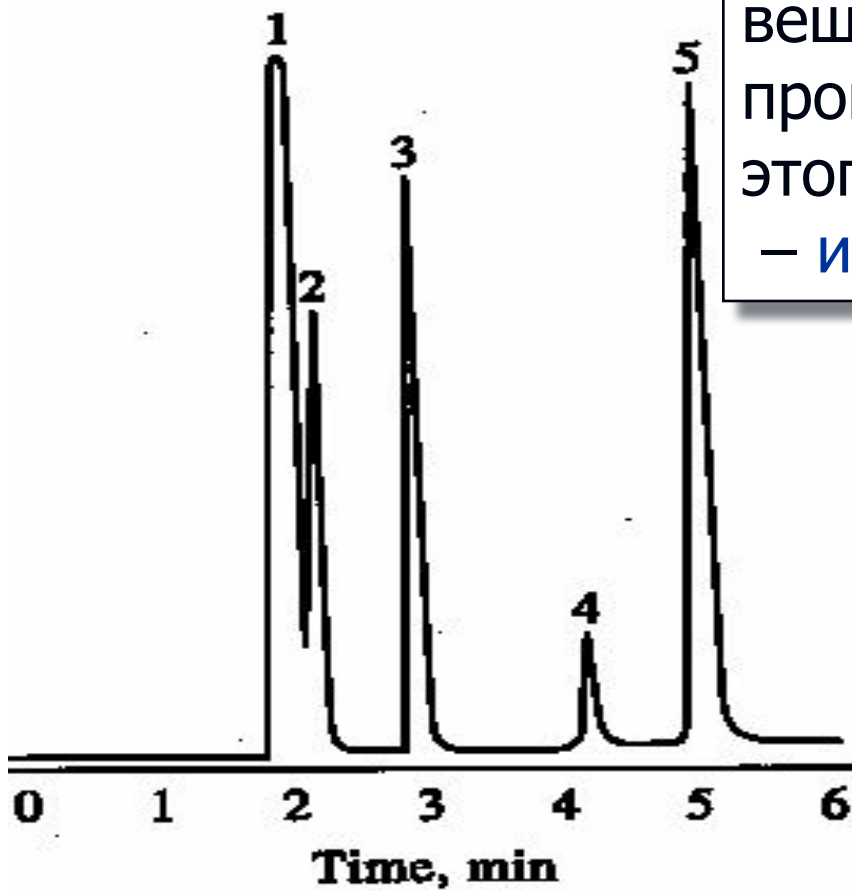


Структура элементарной ячейки цеолитов

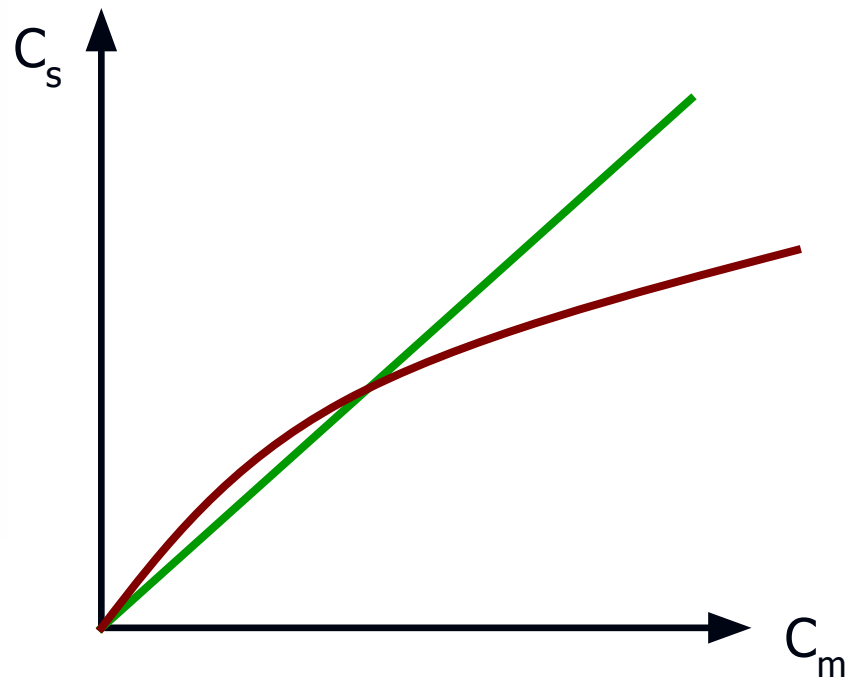


Пример разделения газов методом ГАХ

1. Air; 2. Methane; 3. Carbon dioxide; 4. Ethylene; 5. Nitrogen



Если при постоянной температуре количество адсорбированного вещества на неподвижной фазе C_s пропорционально концентрации этого вещества в подвижной фазе C_m — изотерма линейна. $K(D) = \text{const}$



Достоинства и недостатки ГАХ

Достоинства

- Простой метод определения неорганических газов
- Возможна реализация дополнительного эффекта – распределение молекул по размерам
- Пригоден для разделения несложных смесей молекулярных органических веществ, стабильных при очень высоких температурах (до 300 °С)

Недостатки

- Изотерма сорбции часто нелинейна
- Алюмосиликаты и цеолиты – кислоты Льюиса, следовательно, реакционноспособны
- Неоднородность поверхности сорбента приводит к «хвостованию» пиков
- Метод чувствителен к парам воды

Газо-жидкостная хроматография

Газо-жидкостная хроматография

Механизм основан на различном **распределении** определяемых компонентов в газовой и жидкой фазах

Селективность зависит от
температуры кипения вещества
и от его **растворимости** в неподвижной фазе

- Чем ниже температура кипения вещества, тем слабее удерживание
- Чем лучше растворяется в-во в неподвижной фазе, тем сильнее удерживание

Требования к неподвижной фазе в ГЖХ

- Малая летучесть ($T_{\text{кип}}$ на 200°C выше T колонки)
- Устойчивость при рабочих температурах
- Химическая инертность
- Определенная растворяющая способность
(принцип «подобное растворяется в подобном»)
- Способность хорошо смачивать носитель
(образование тонкой пленки)

Часто используемые неподвижные фазы

Полярность	Неподвижная фаза, название	Формула	Применение
Не полярная	Парафины (Squalane)	$\left[\text{CH}_2 - \underset{ }{\text{CH}} - \overset{\text{Y}}{\text{CH}} - \text{CH}_2 \right]$	Углеводороды, ПАУ, бензол
Слабо полярная	Полифенилметил-диметилсилоксаны (HP-5, ZB-5, OV-17)	$\left[\begin{array}{c} \text{Me} \\ \\ \text{Si} - \text{O} - \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \\ \quad \quad \\ \text{Me} \quad \text{Ph} \quad \text{Me} \end{array} \right]$	Эфиры, спирты, лекарственные препараты, наркотики
Полярная	Полиэтиленгликоли Carbowax 20M	$\text{HO} - \left[-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O}- \right]_n - \text{H}$	Кислоты, сложные эфиры, гликоли

Как выбрать неподвижную фазу в ГЖХ?

- Наиболее важный параметр – полярность определяемых соединений (используется принцип «подобное растворяется в подобном»)
- Температура кипения определяемых веществ – фаза не должна испаряться
- Посмотреть таблицы с индексами удерживания (Ковача)
- Каталоги, CD-ROM, интернет
- Научная литература (более 100 000 публикаций)
- Спросить у того, кто знает...

Детекторы в газовой хроматографии

Детектор по теплопроводности (катарометр, TCD)

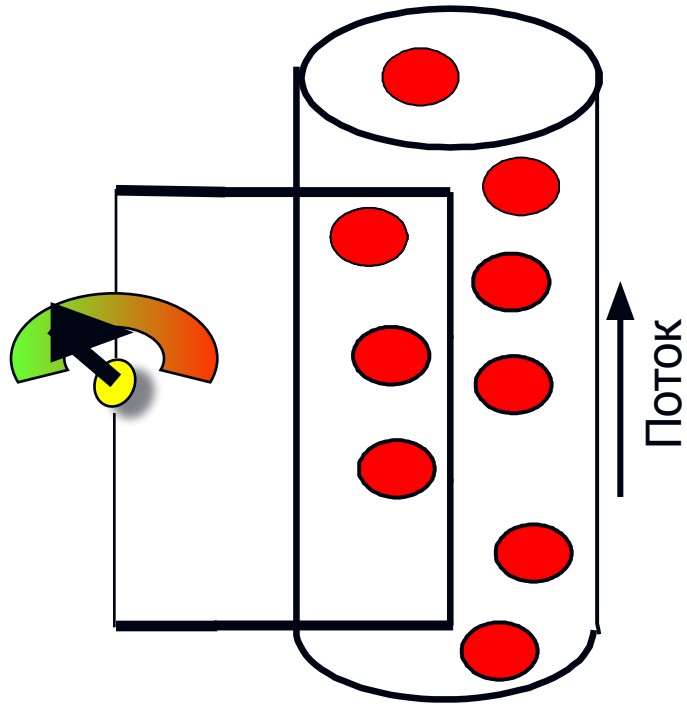
Изменение теплопроводности при
прохождении зоны вещества, элюирующегося
с колонки

Газ-носитель – гелий

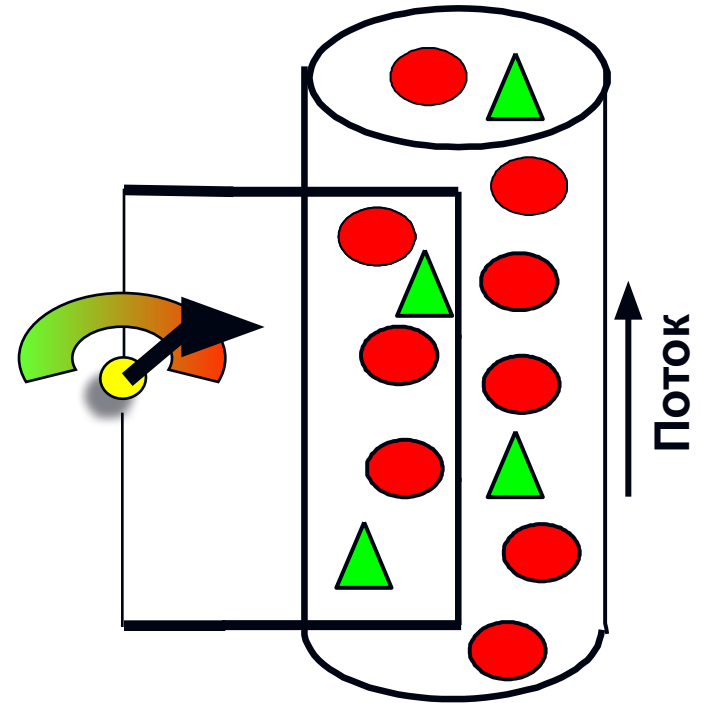
- Широкий линейный диапазон (до 5 порядков)
- Относительно простой и недорогой
- Недеструктивен
- Чувствительность – на уровне микрограмм
- Малоселективен
- Отклик зависит от природы веществ, T^0 и F

Устройство детектора по теплопроводности

Поток газа-носителя ● протекает через нагретые нити и охлаждает их



При прохождении зоны образца ▲, охлаждающий эффект газа-носителя меняется



Относительная теплопроводность веществ

Вещество	Относительная теплопроводность
Четыреххлористый углерод	0.05
Бензол	0.11
Гексан	0.12
Аргон	0.12
Метанол	0.13
Азот	0.17
Гелий	1.00
Водород	1.28

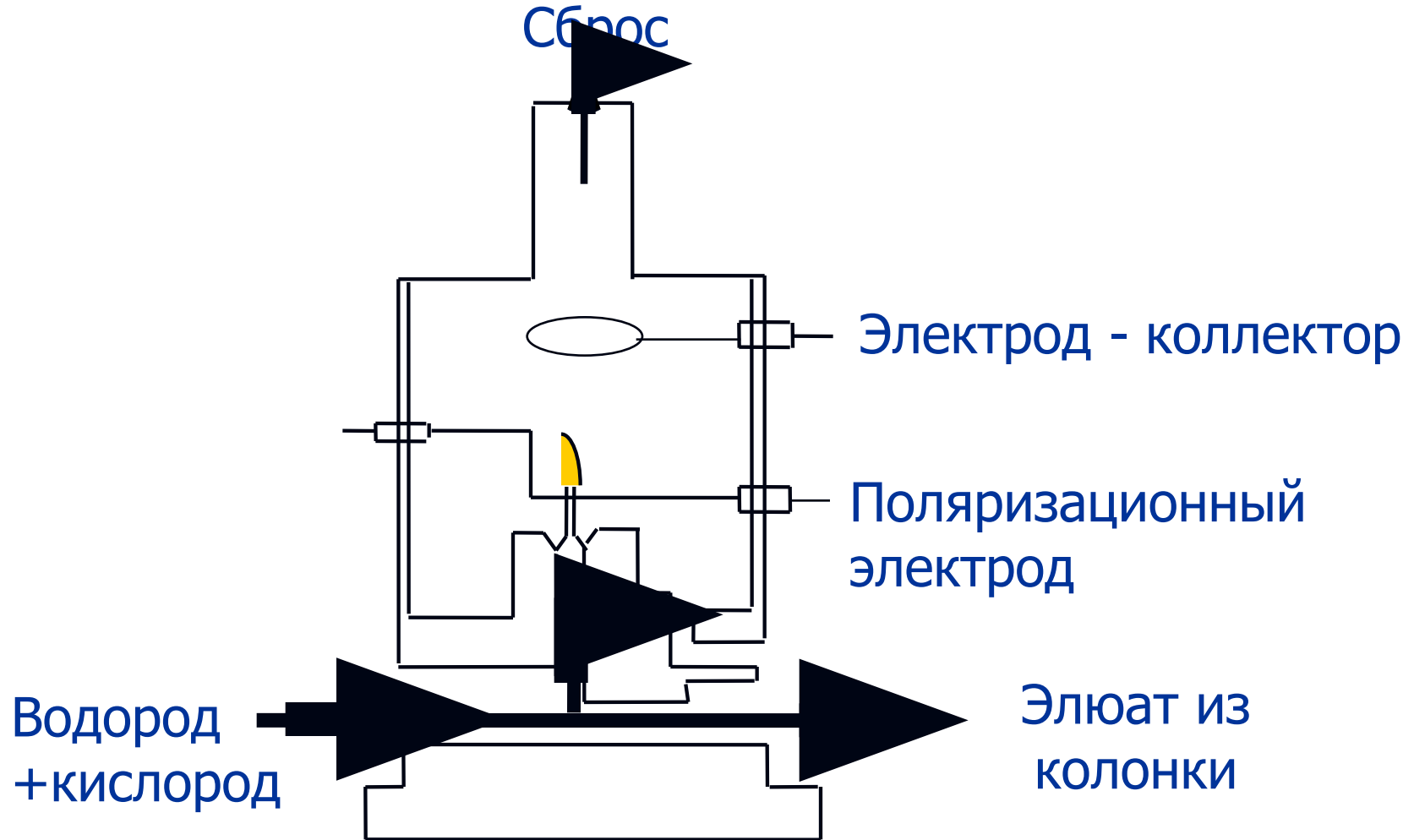
Пламенно-ионизационный детектор (ПИД ,FID)

Высокотемпературное пламя ($\text{H}_2 + \text{O}_2 + \text{N}_2$) ионизует компоненты пробы, элюирующиеся с колонки. Ионы поступают на электрод, увеличивая ток. Текущий ток регистрируется самописцем или компьютером

Газ-носитель – гелий, азот

- Широкий линейный диапазон (до 6 порядков)
- Чувствительность – на уровне нанограмм
- Деструктивен – разрушает пробу
- Сигнал зависит от #C в определяемом веществе
- Слабая чувствительность к аминам, спиртам

Устройство пламенно-ионизационного детектора



Масс-спектрометрический детектор (GC-MS)

Детектирование по отношению
массы иона к его заряду (m/z)

ЭЛЕКТРОННЫЙ УДАР (Electron Impact)

Молекулы вещества поступающие из хроматографа бомбардируются потоком высокоэнергетичных электронов

(70 эВ – де Бройлевская длина волны электрона, близкая к усредненной длине ковалентной связи)



ион-радикал

Пример масс-спектра

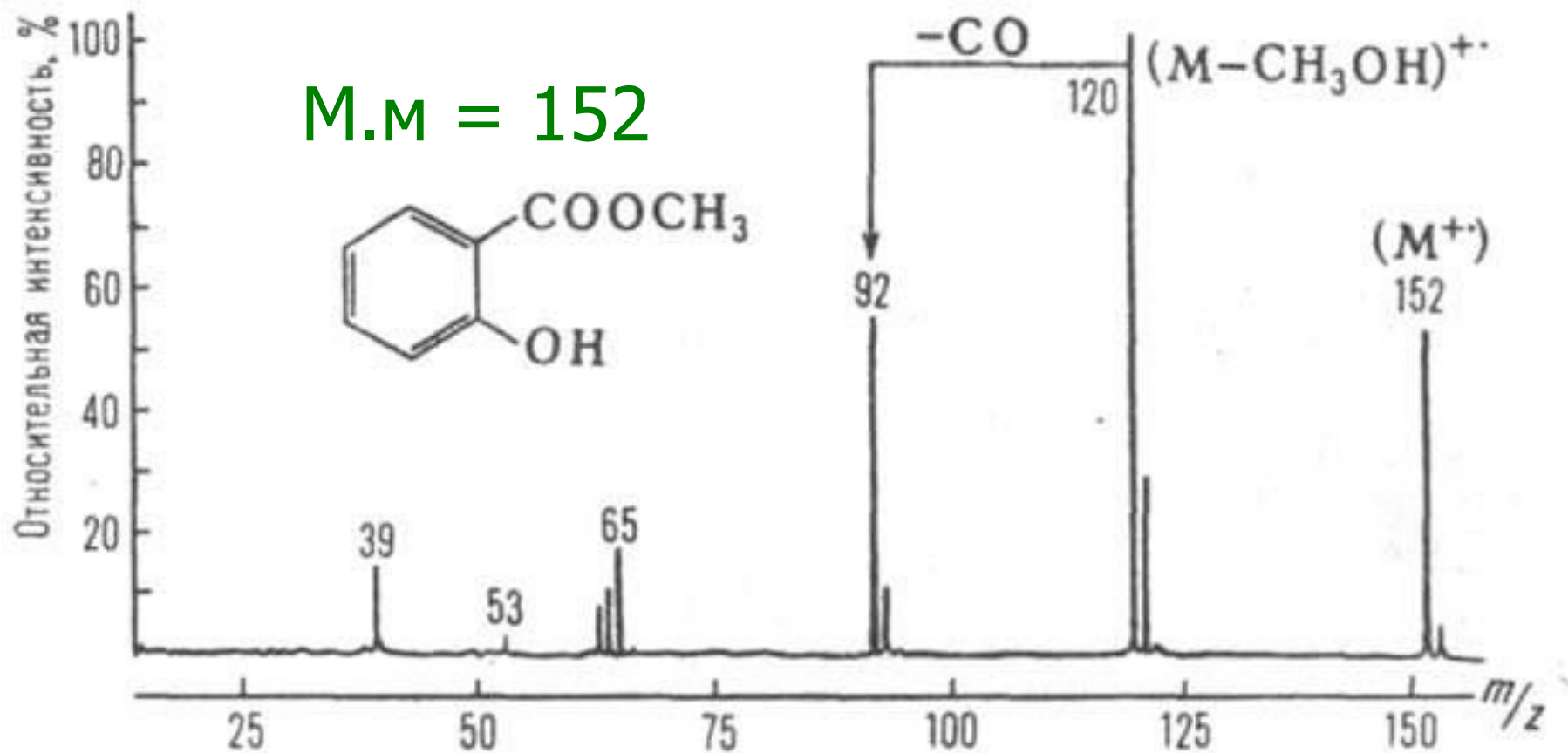
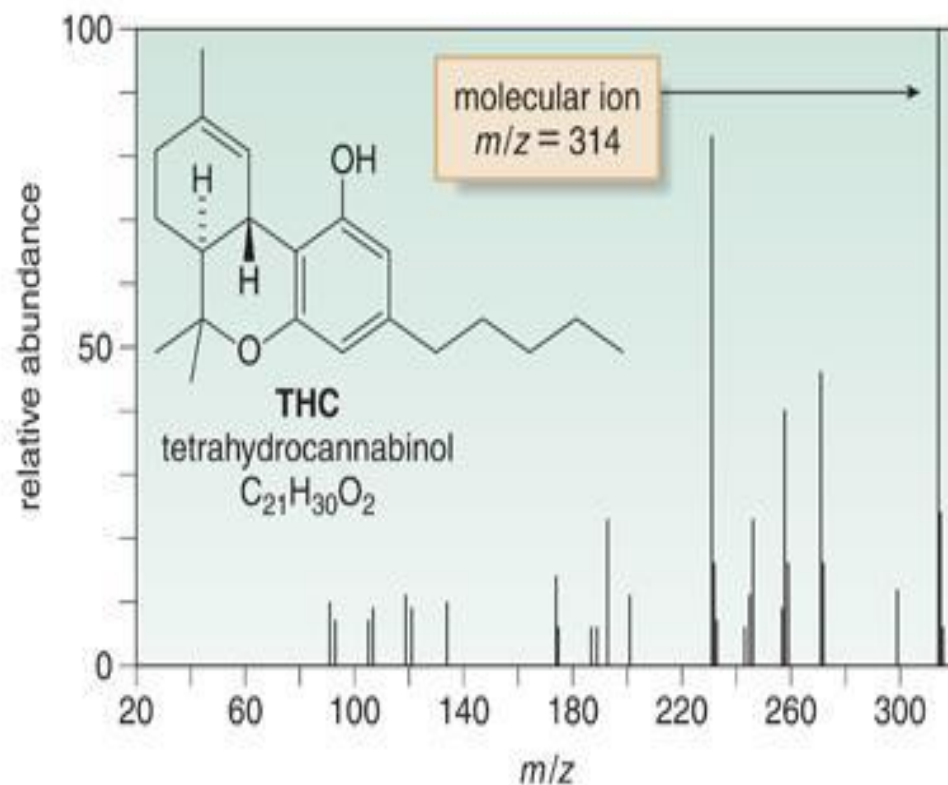


Рис. 1. Масс-спектр метилсалицилата.

Анализ наркотических веществ



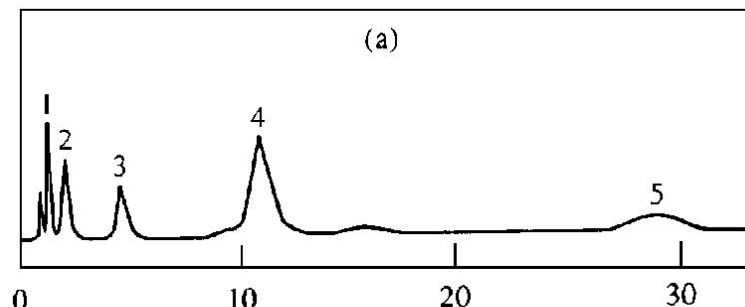
- Для определения тетрагидроканнабинола (ТНС) – основного действующего психоактивного вещества марихуаны, мочи экстрагируется, очищается, концентрируется и вводится в хроматограф.
- Присутствие ТНС доказывает специфический спектр соединения.



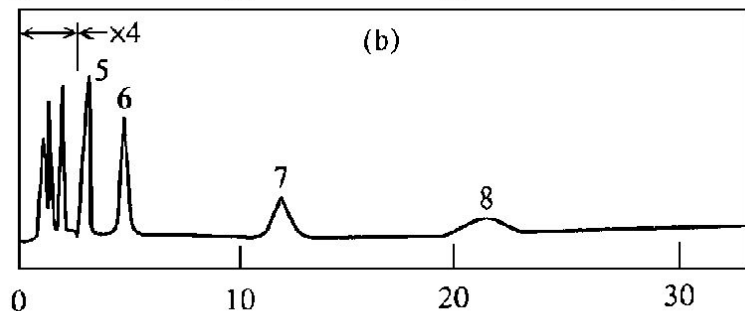
Ионизация в МС-детекторе

- Происходит значительная фрагментация молекул.
- Фрагментация воспроизводима – возможна интерпретация структуры вещества
 - Очень высокая чувствительность (фемтограммы)
 - Возможность идентификации соединения
 - Установление структуры неизвестного соединения
 - Возможность анализа очень сложных смесей
 - Диапазон линейности градуировочного графика
 - до 7 порядков
 - Огромные библиотеки масс-спектров (до 500 тыс.)

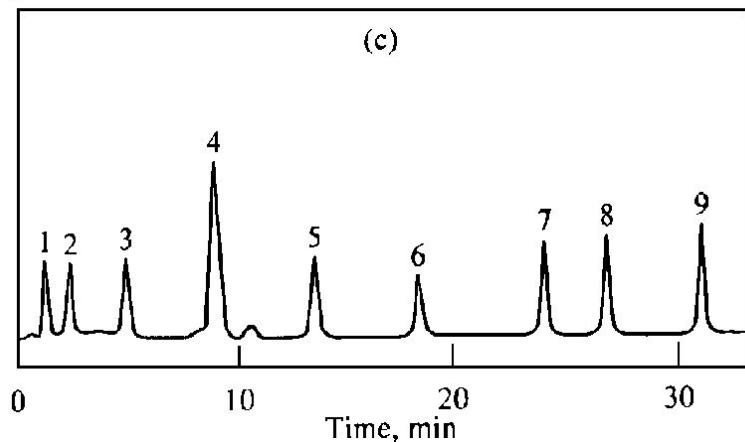
Общие проблемы удерживания в ГХ



(a) низкая температура (45 °C) – хорошее разрешение в начале, но слишком долго



(b) высокая температура (145 °C) – намного быстрее, но плохое разрешение легкокипящих компонентов



30° 60° 90° 120° 150° 180°
Temperature, °C

Если определяемые вещества имеют широкий диапазон температур кипения, то необходимо использовать **программирование температуры** (градиент)

Достоинства и недостатки ГЖХ

Достоинства

- Высокая селективность и эффективность
- Правильность и воспроизводимость анализа
- Высокая экспрессность (обычно 5-20 минут)
- Требуется малый объем пробы (микролитры)
- Большой выбор детекторов
- Высокая степень автоматизации анализа
- Относительно низкая стоимость прибора (~ 15 000 \$)

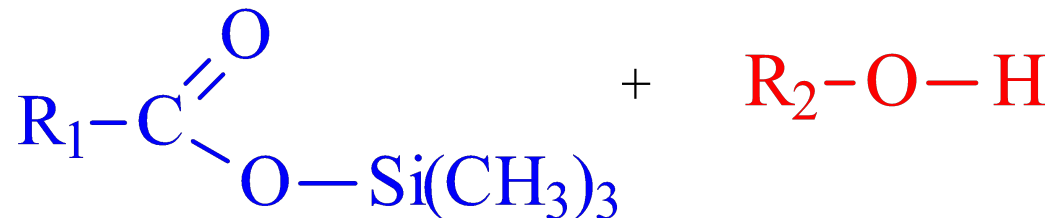
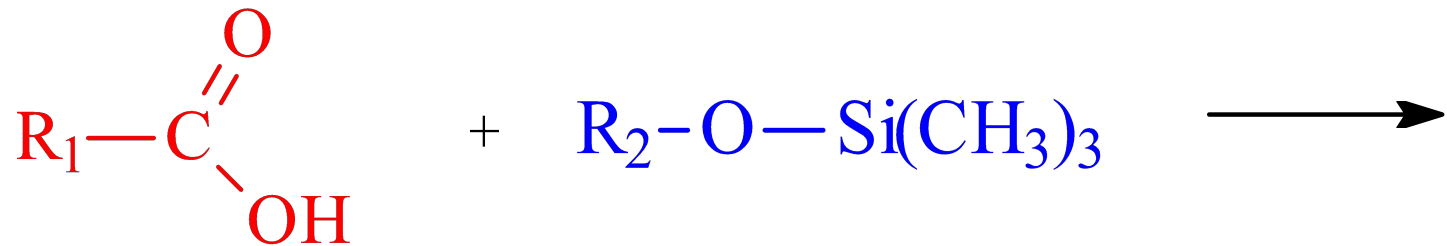
Недостатки

- Можно определять только летучие в-ва ($T_{\text{кип.}} < 250^{\circ}\text{C}$)
- Нельзя определять термонестойкие в-ва
- Иногда требуется длительная пробоподготовка
- Возможны ошибки идентификации веществ

Дериватизация веществ (реакционная газовая хроматография)

Используются НАПРАВЛЕННЫЕ химические превращения:

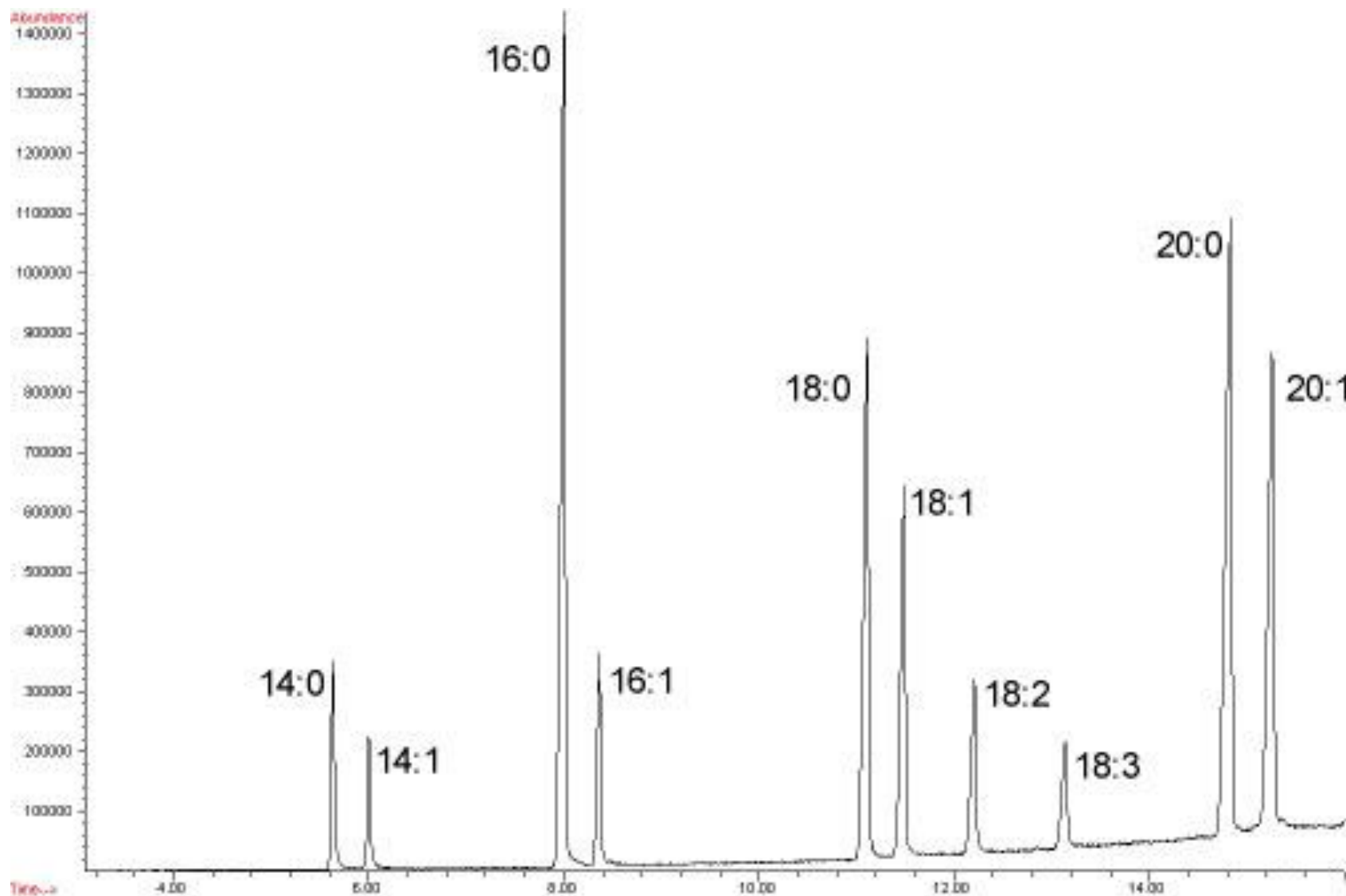
нелетучих соединений в летучие,
неустойчивых соединений в устойчивые



Хороший способ определения
высших алифатических карбоновых кислот



Определение карбоновых кислот методом ГХ с предварительной дериватизацией



Достоинства и недостатки реакционной ГХ

Достоинства

- Расширение области применения
- Увеличение селективности
(индивидуальные св-ва соединений проявляются сильнее)
- Улучшение чувствительности определения
- Лучшая сохранность хроматографической колонки

Недостатки

- Возможны ошибки из-за усложнившейся пробоподготовки
- Снижение эффективности разделения
- Увеличение времени анализа

Жидкостная хроматография

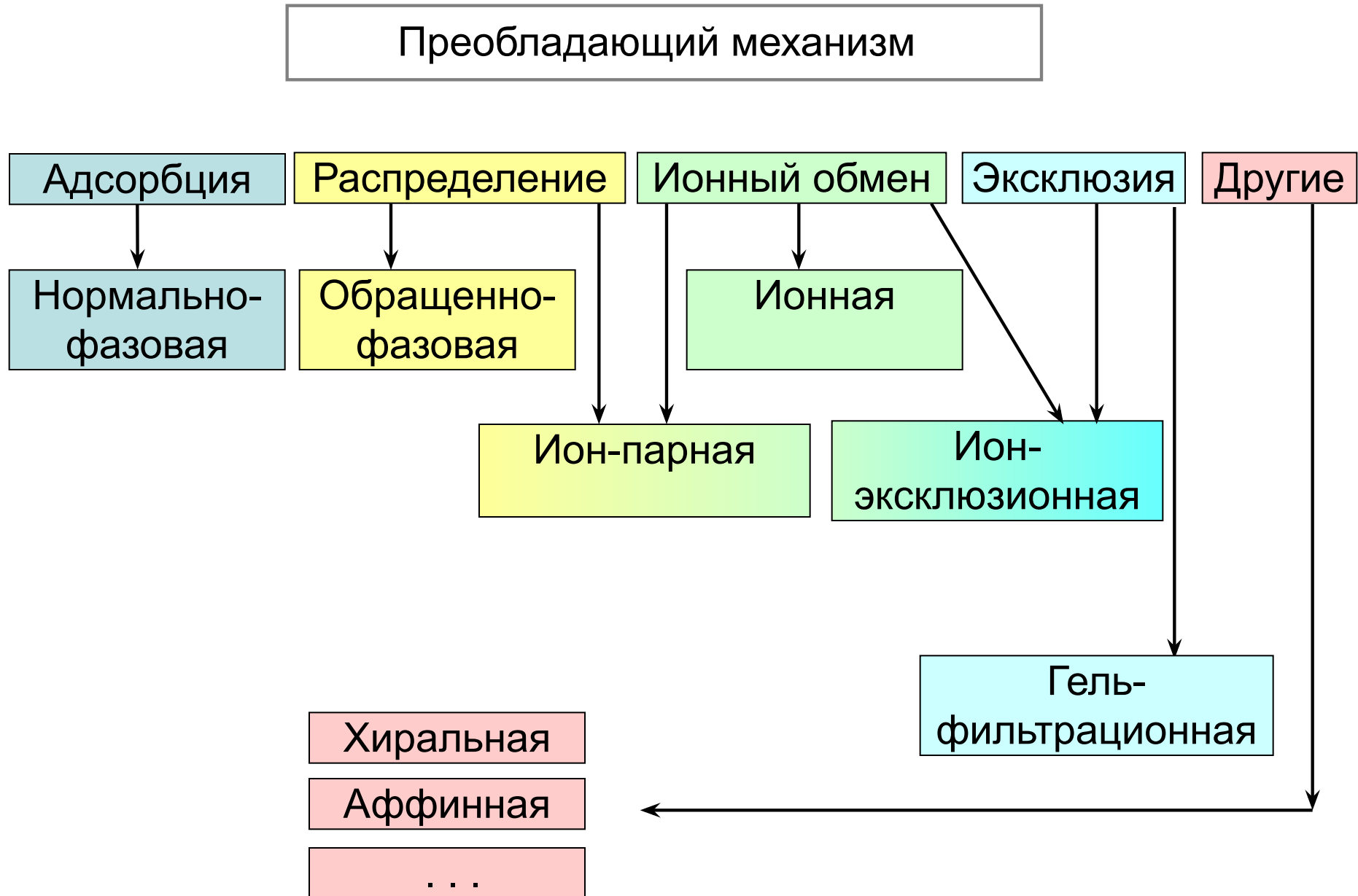
Подвижная фаза – жидкость
Неподвижная фаза – твердое вещество

5 основных механизмов взаимодействия сорбат-сорбент

1. Распределение
2. Адсорбция
3. Ионный обмен
4. Эксклюзия (проникновение)
5. Специфические (комплексобразование и др.)

Часто присутствуют одновременно несколько механизмов.
При классификации выделяют основной.

Виды ВЭЖХ по механизму взаимодействий



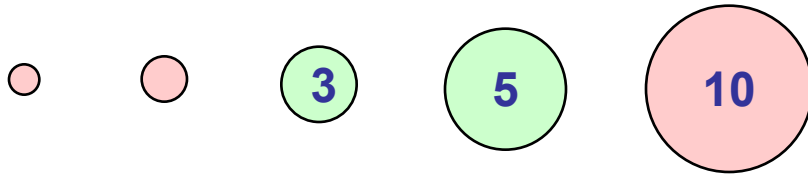
Неподвижные фазы в жидкостной хроматографии

Основной тип матриц в ВЭЖХ – силикагель

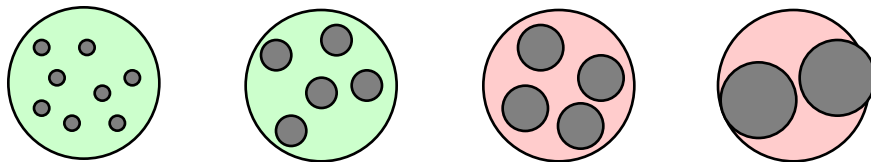
Сферичность



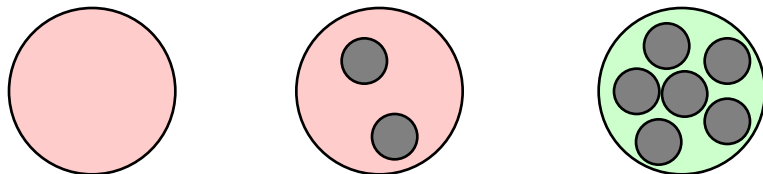
Размер частиц, мкм



Размер пор, А



Площадь поверхности, м²/г



Достоинства

- Отработанная технология синтеза
- Доступность и относительно низкая цена
- Большой диапазон свойств
- Механическая прочность
- Химическая активность
ОН-групп на поверхности

Недостатки

- Химическая активность
ОН-групп на поверхности
- рН стабильность (2-9)
- Адсорбированная вода

Нормально-фазовая хроматография

(основной механизм – адсорбция)

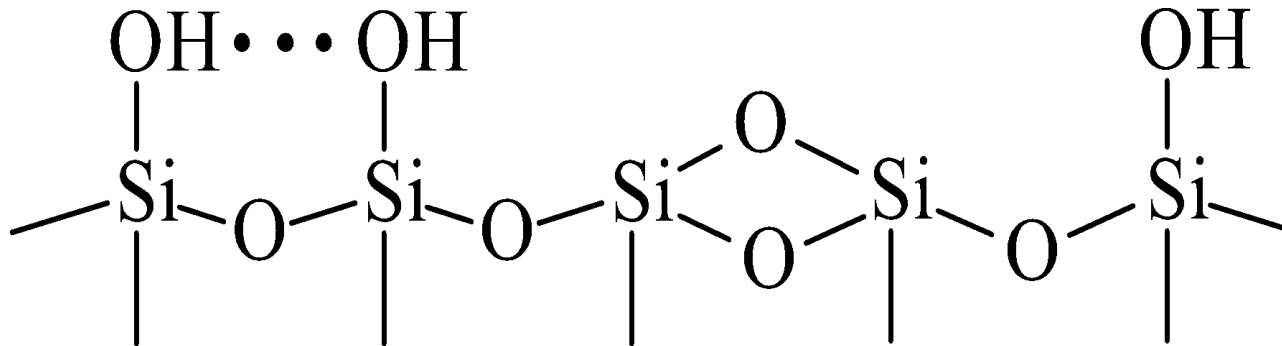
Нормально-фазовая хроматография



Нормально-фазовая хроматография

Подвижная фаза: гексан + этилацетат (хлороформ)

Неподвижная фаза: силикагель, оксид алюминия



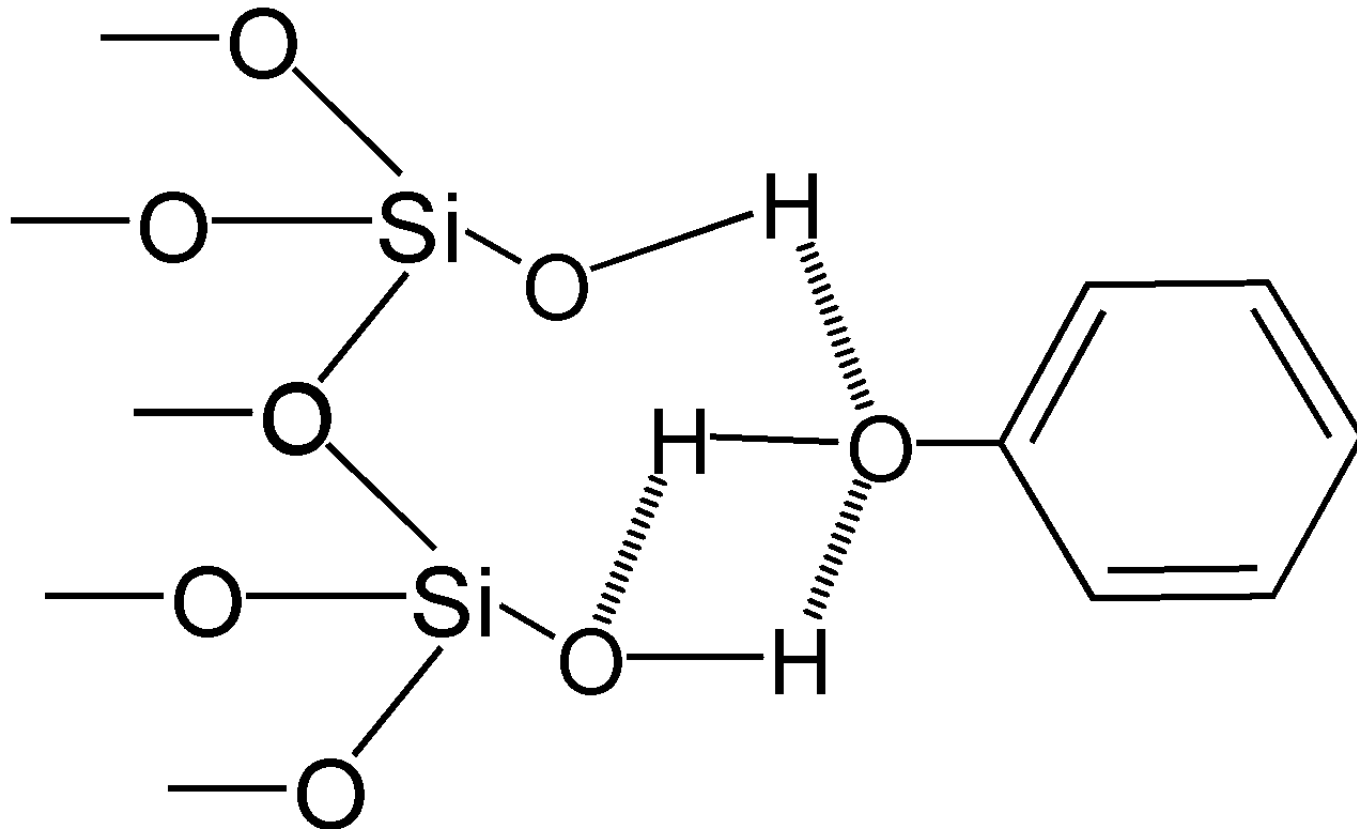
Координированные
силанольные
группы

силоксановые
группы

силанольные
группы

Нормально-фазовая хроматография

Удерживание соединений за счёт
диполь-дипольных взаимодействий



Нормально-фазовая хроматография

Закономерности удерживания

- Полярные соединения удерживаются сильнее, чем неполярные
- Пространственные изомеры (*o*-, *m*-, *p*-) разделяются лучше, чем гомологи
- Вывод:
наиболее подходит для разделения позиционных изомеров неполярных или слабополярных веществ, растворимых в гексане, эфире, углеводородах.

Обращенно-фазовая хроматография

(основной механизм – распределение)

Обращенно-фазовая хроматография

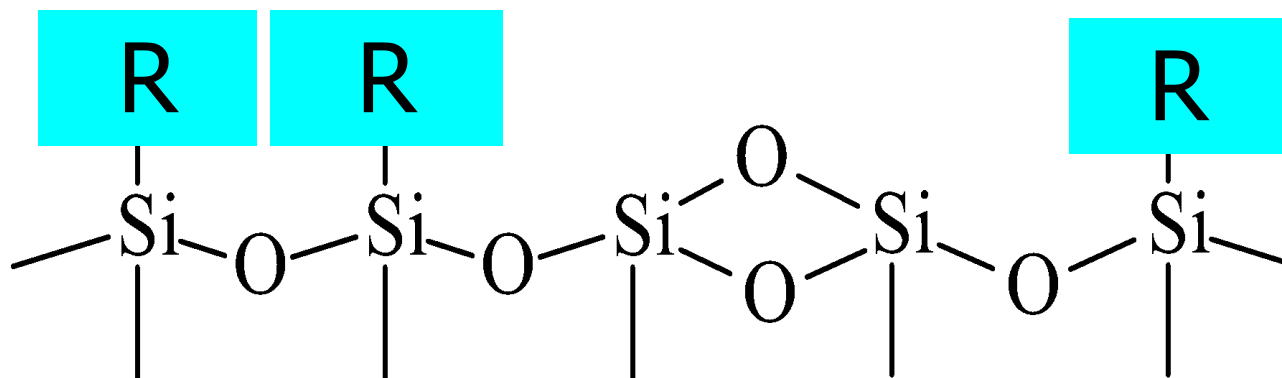


Обращенно-фазовая хроматография

Подвижная фаза более полярна, чем неподвижная

Ацетонитрил-вода

Метанол-вода



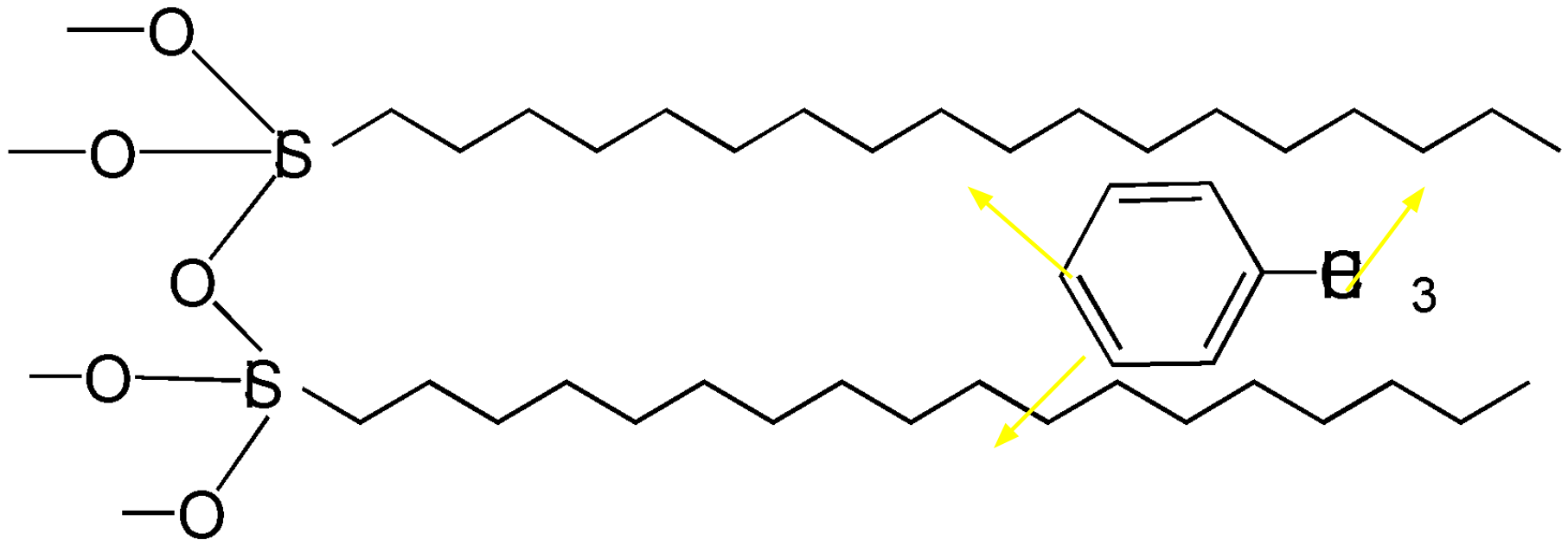
Неподвижные фазы

химически модифицированные силикагели

R = C₂, C₄, C₈, C₁₈, C₃₀

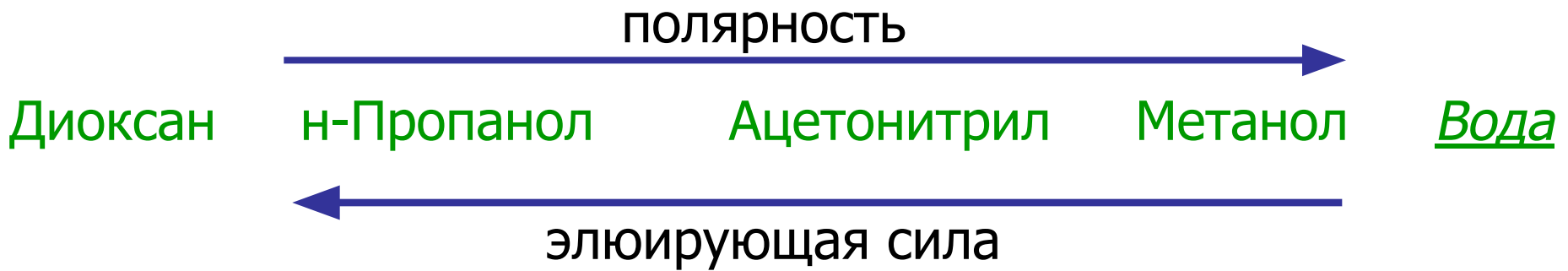
Обращенно-фазовая хроматография

Удерживание соединений за счёт гидрофобных взаимодействий

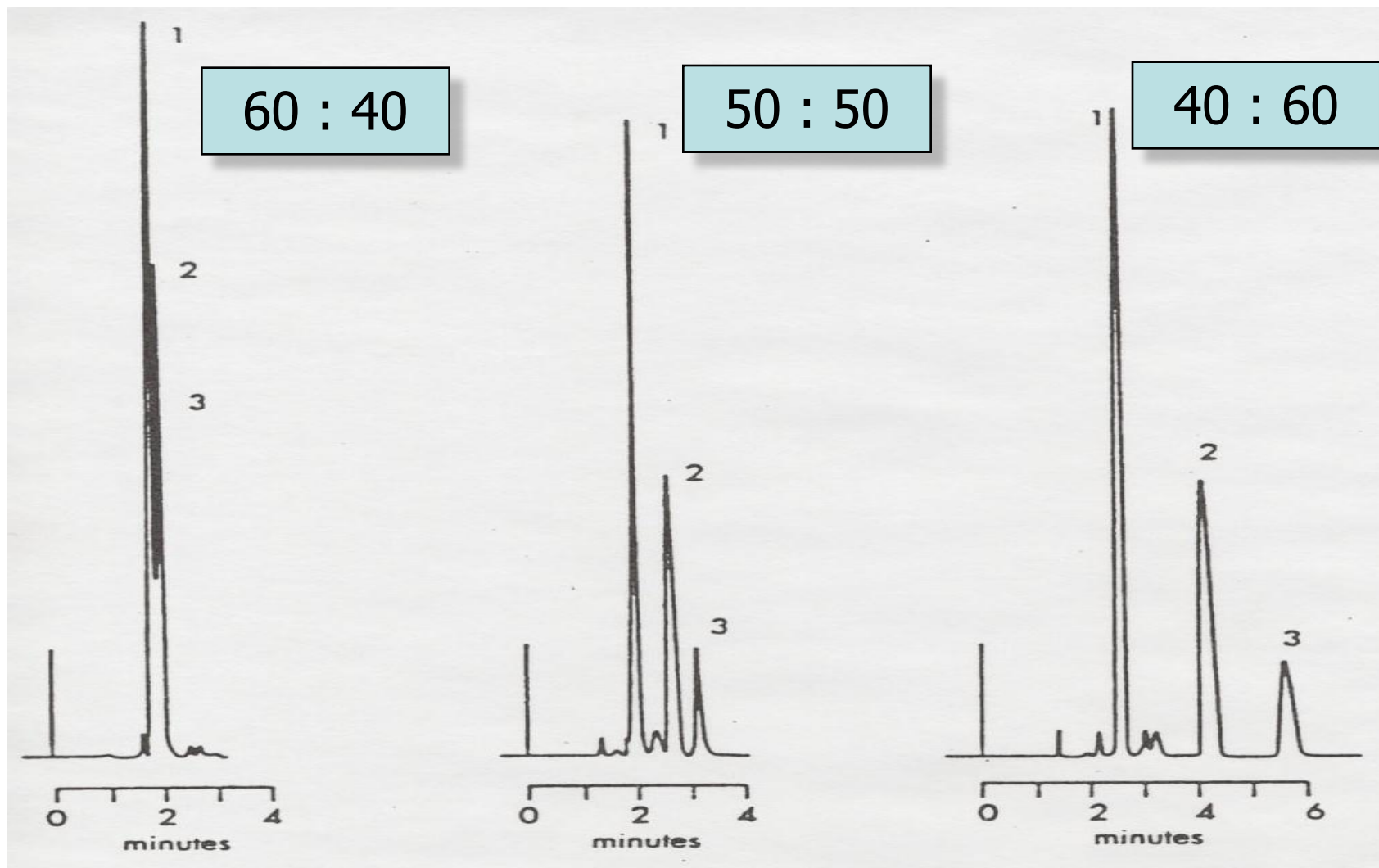


Элюирующая сила подвижной фазы

В обращенно-фазовой хроматографии

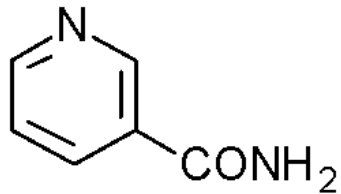


Удерживание веществ в ОФ-ВЭЖХ в зависимости от соотношения ацетонитрил-вода в элюенте

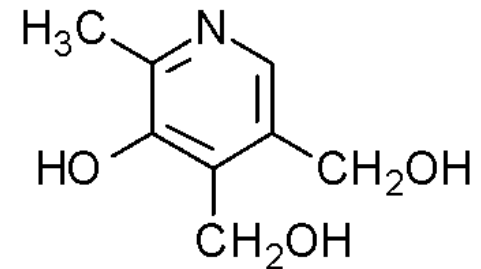


Водорастворимые витамины

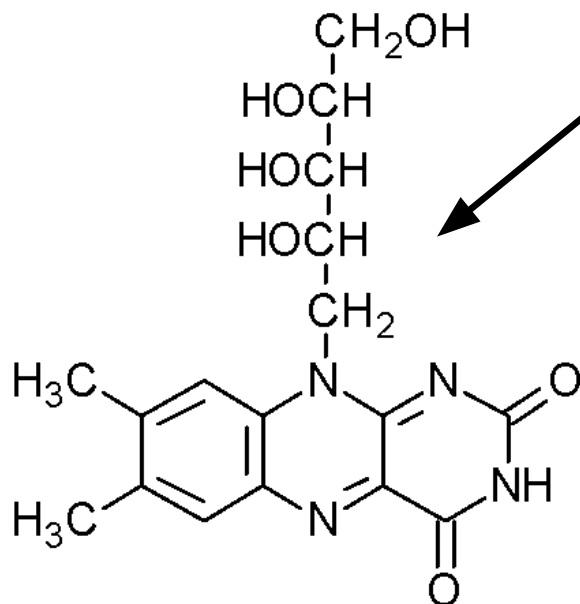
Никотинамид (В₃)



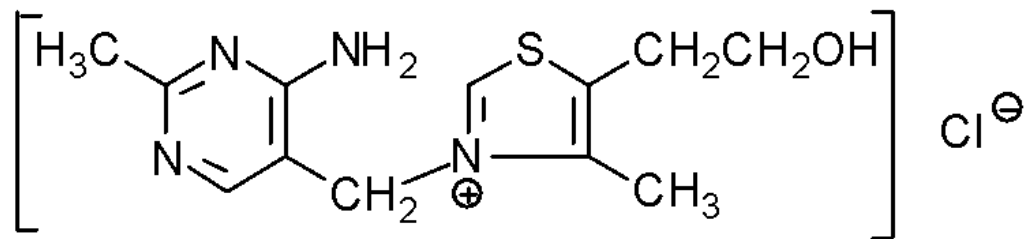
Пиридоксин (В₆)



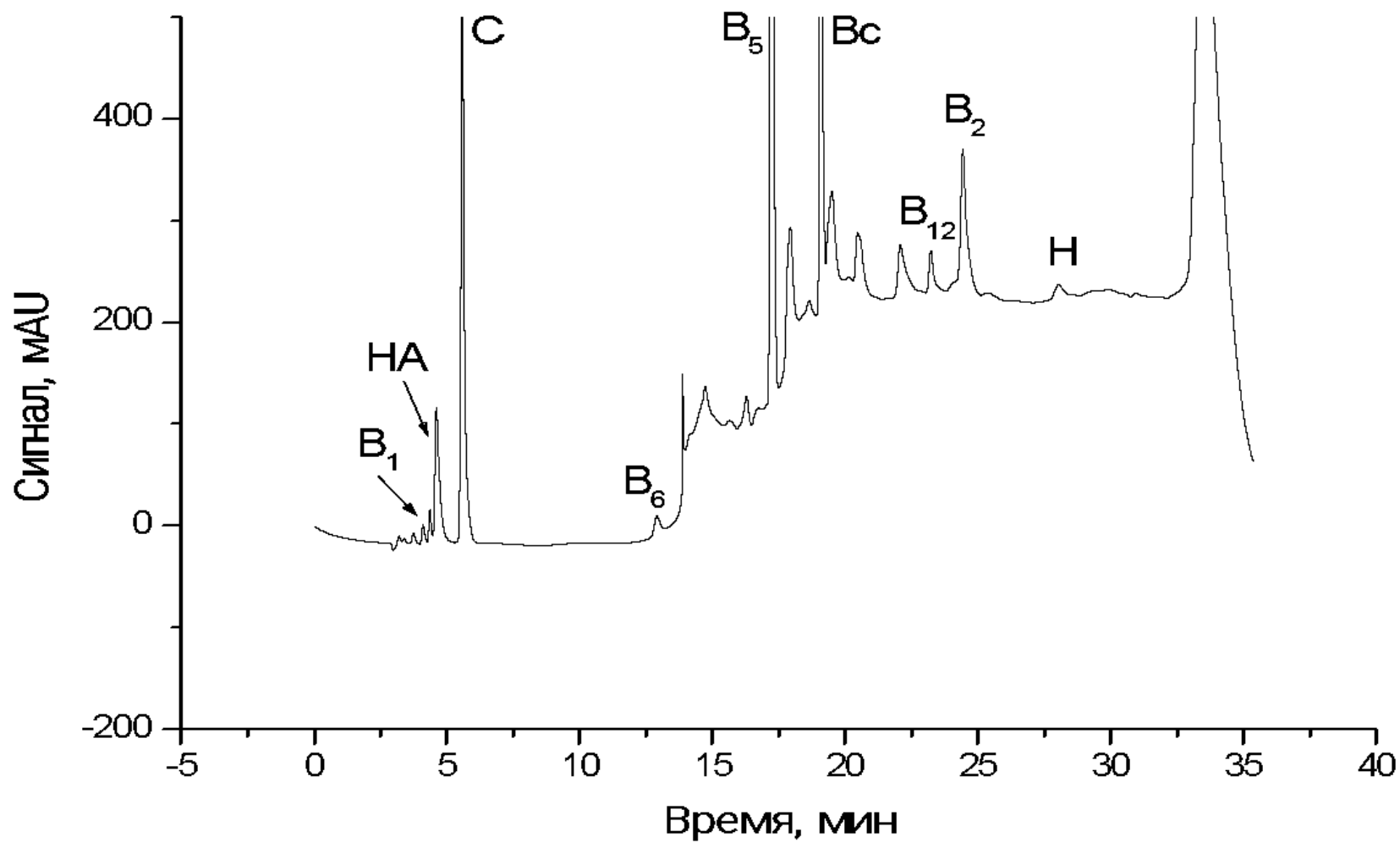
Рибофлавин (В₂)



Тиамин (В₁)



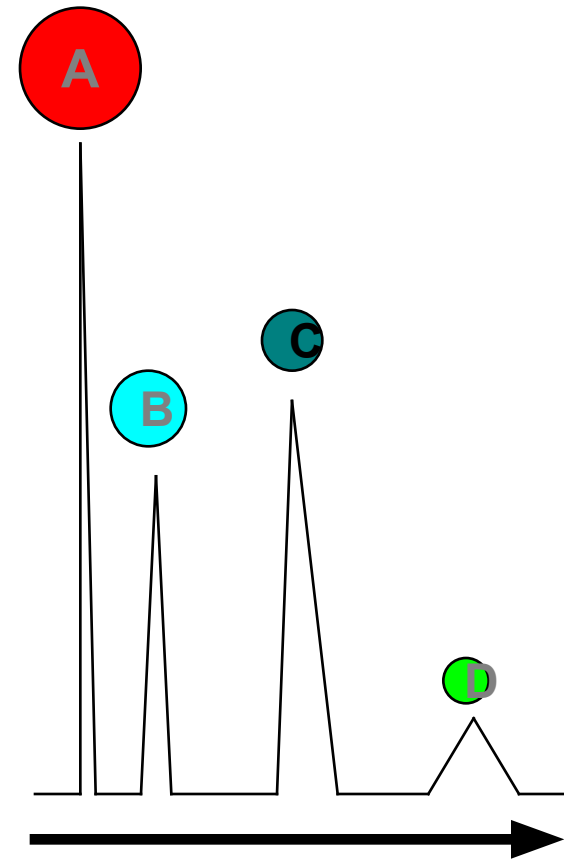
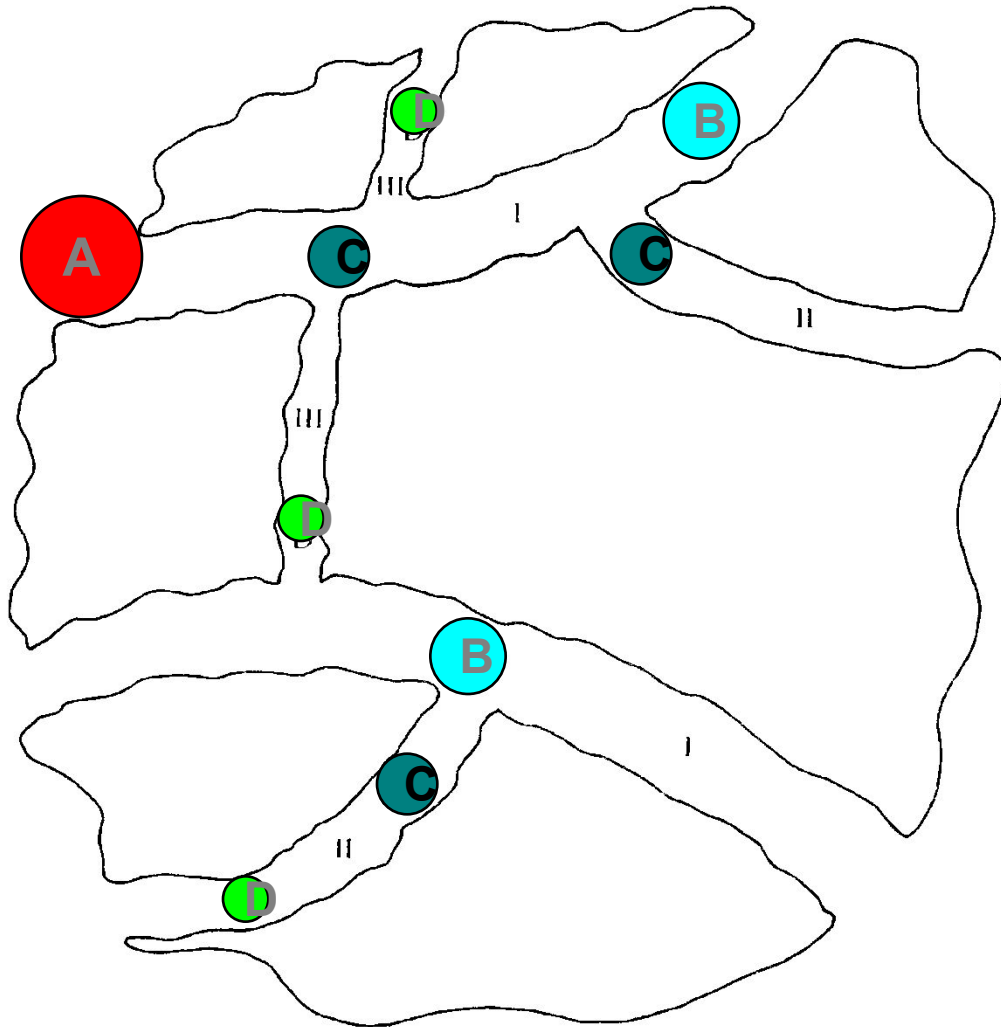
Определение водорастворимых витаминов в таблетках



Эксклюзионная хроматография

(основной механизм – проникновение в поры)

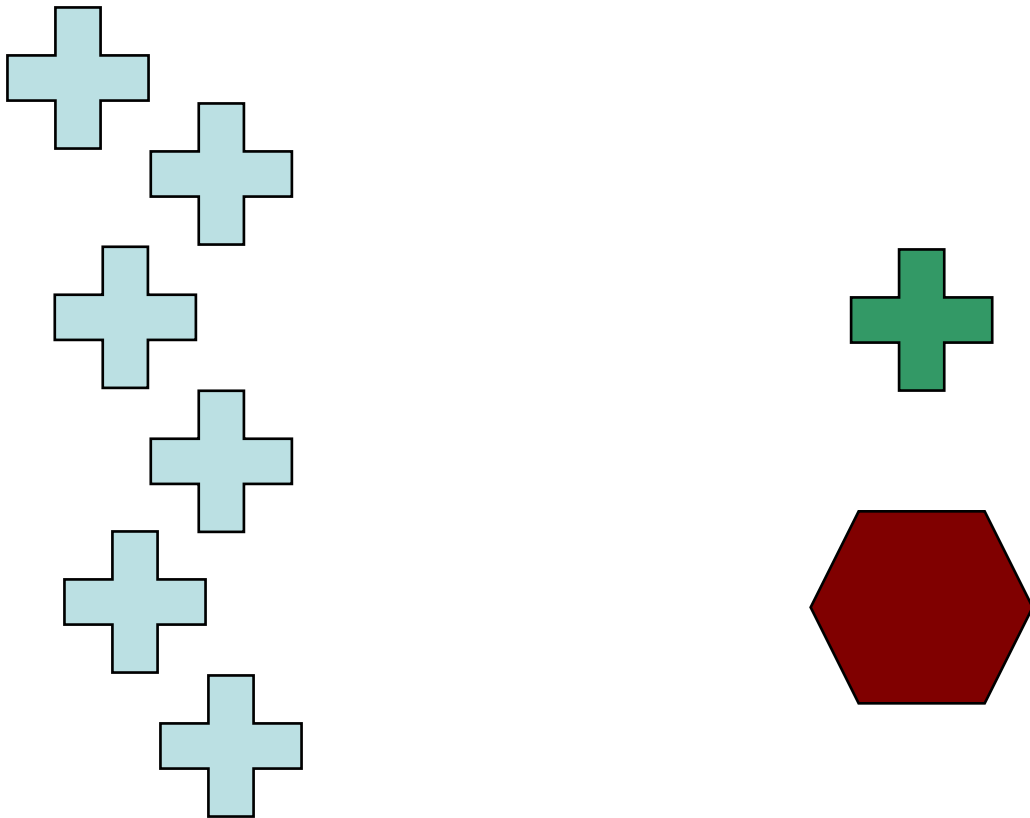
Механизм эксклюзионной хроматографии



Жидкостная хроматография специфических взаимодействий

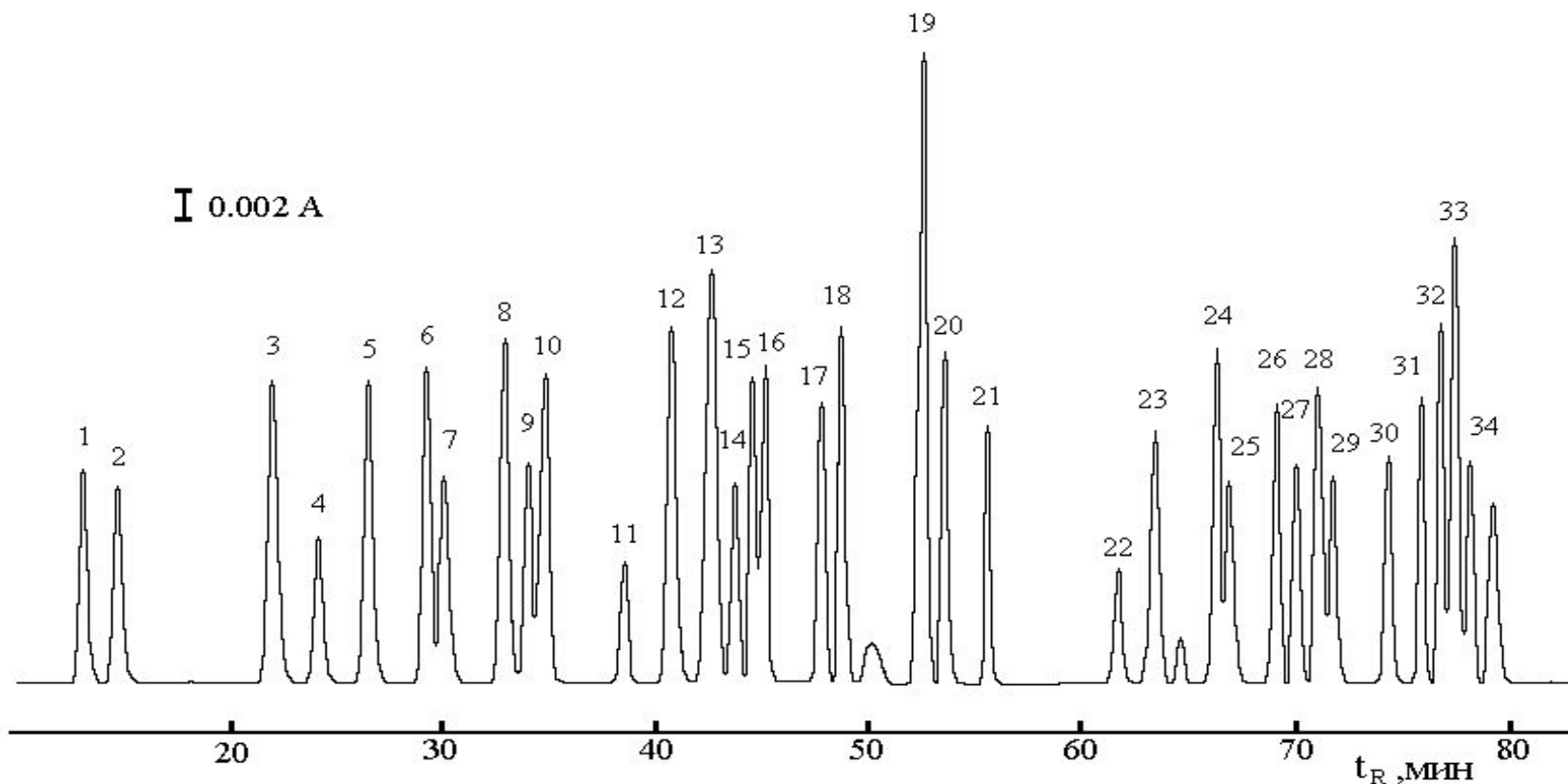
(основной механизм – «другие»)

Хиральная хроматография (Разделение стереоизомеров)



Неподвижная фаза для
разделения стереоизомеров

Разделение оптических изомеров аминокислот



Column, Mightysil RP-18 (150x4.6 I.D.); mobile phase: methanol-0.01 M Na₂HPO₄, pH 6.0, gradient elution flow-rate, 0,5 ml/min. Detection: DAD, $\lambda=340$ nm.

Peaks: 1=L-Asp, 2=D-Asp, 3=L-Glu, 4=D-Glu, 5=L-Asn, 6=D-Asn, 7=L-Ser, 8=L-Gln, 9=D-Ser, 10=D-Gln, 11=D-His, 12=L-Thr, 13=Gly+L-His, 14=D-Thr, 15=D-Arg, 16=L-Arg, 17= β -Ala, 18=L-Ala, 19=L-Tyr+GABA, 20=D-Ala, 21=D-Tyr, 22=L-Met+L-Trp, 23=L-Val, 24=L-Phe, 25=D-Met, 26=D-Trp, 27=D-Val, 28=D-Phe, 29=L-Ile, 30=L-Leu, 31=L-Lys, 32=D-Ile, 33=D-Lys, 34=D-Leu.

Результаты определения аминокислот и их энантиомеров в моче здоровых и больных людей (n=3, P=0.95)

Аминокислота	Норма мужчины, мг/сутки	Норма женщины, мг/сутки	Больная женщина, (2 стадия рака молочной железы) мг/сутки
L-Asp	-	-	91±3
L-Asn	-	-	9.0±0.3
L-Ser	27-65	22-61	9.9±0.3
L-Gln	0	0	31±1
D-Gln	0	0	0.79±0.05
L-His	20-213	79-208	56±2
L-Thr	2-35	5-33	21±1
Gly	53-189	67-312	89±2
L-Arg	8-24	8-26	5.3±0.2
D-Arg	0	0	0.89±0.06
L-Ala	5-32	9-44	10.4±0.2
L-Tyr	15-40	15-49	2.0±0.1
D-Tyr	0	0	0
L-Val	4-17	0-30	2.1±0.1
L-Met	5-11	3-12	0
L-Ileu	8-24	5-20	16.3±0.3
L-Trp	--	-	5.8±0.2
L-Phe	8-15	6-41	2.4±0.1
L-Lys	0-14	0-16	7.9±0.2
L-Leu	6-20	2-16	1.5±0.1

Аффинная хроматография (избирательное связывание)

Основана на способности некоторых веществ
(в основном – белков)

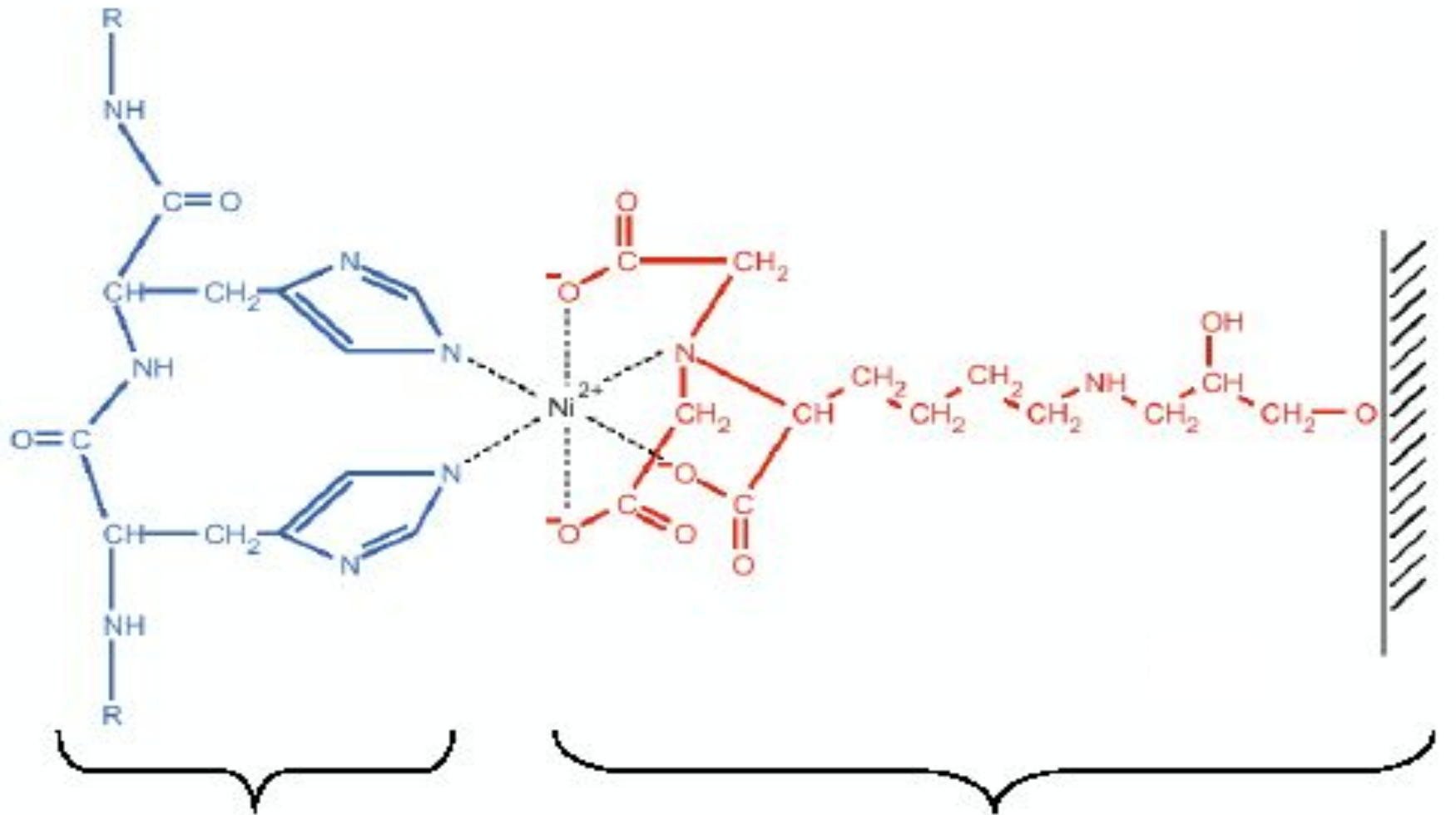
нековалентно и обратимо связываться со специфическим
молекулами или ионами (лигандами)

Лиганд **закреплен** на пористом сорбенте

Из множества веществ в анализируемой смеси
с лигандом реагируют **один или несколько**

Удобна для выделения нужного биоматериала
из большого количества веществ матрицы

Селективное взаимодействие лиганда с белками, содержащими парный гистидин

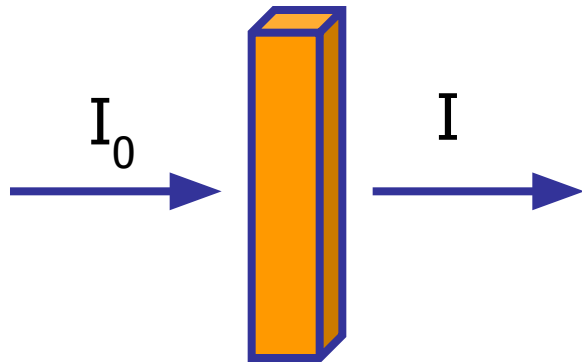


Белок

Агароза с никелевым комплексом НТА

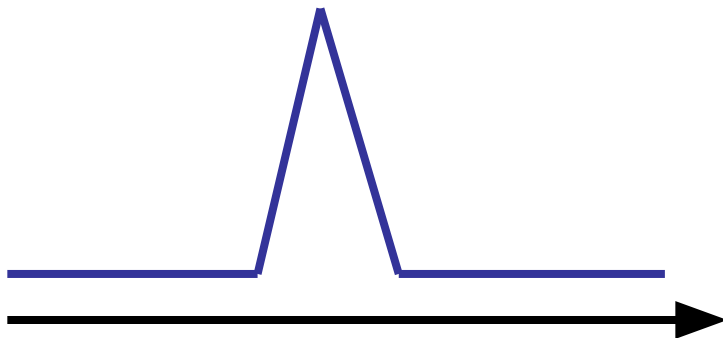
Детектирование в ВЭЖХ

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР

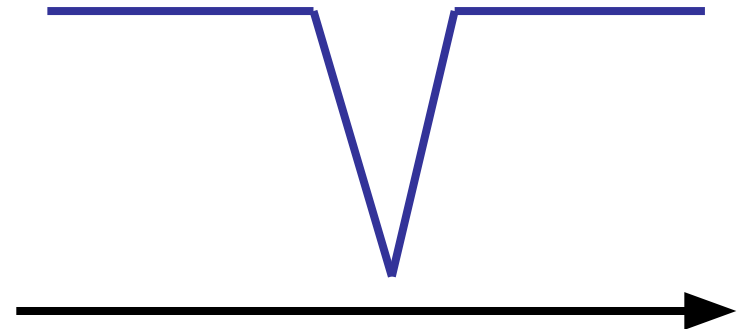


$$\lg \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Прямое



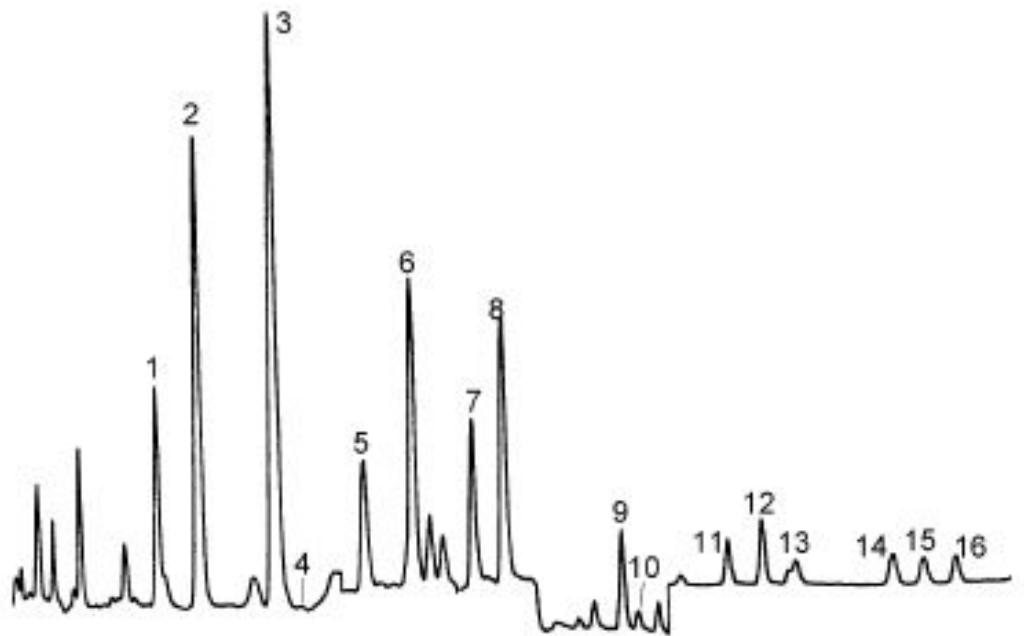
Косвенное



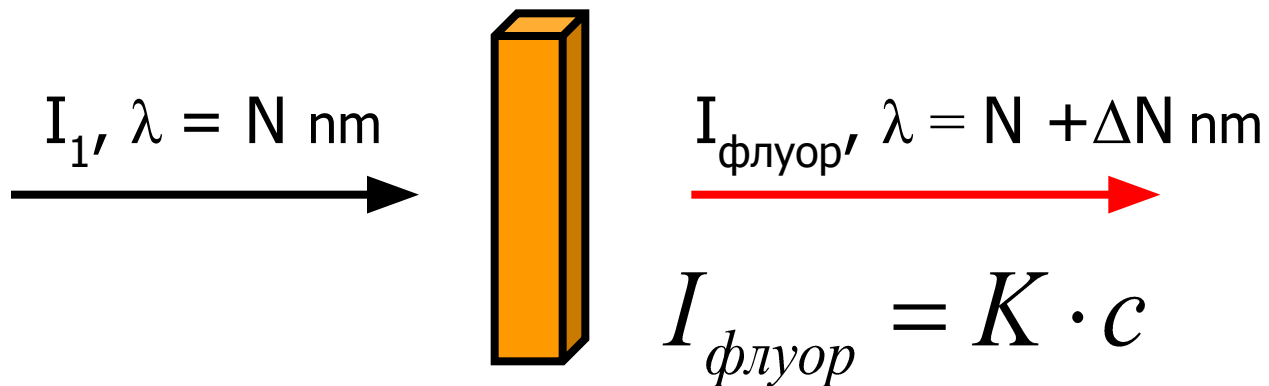
Область применения

- Ароматические соединения (при 230-270 нм)
- Гетероциклические соединения
- Непредельные углеводороды
- В-ва, поглощающие в видимой области спектра

Хроматограмма ПАУ



ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР



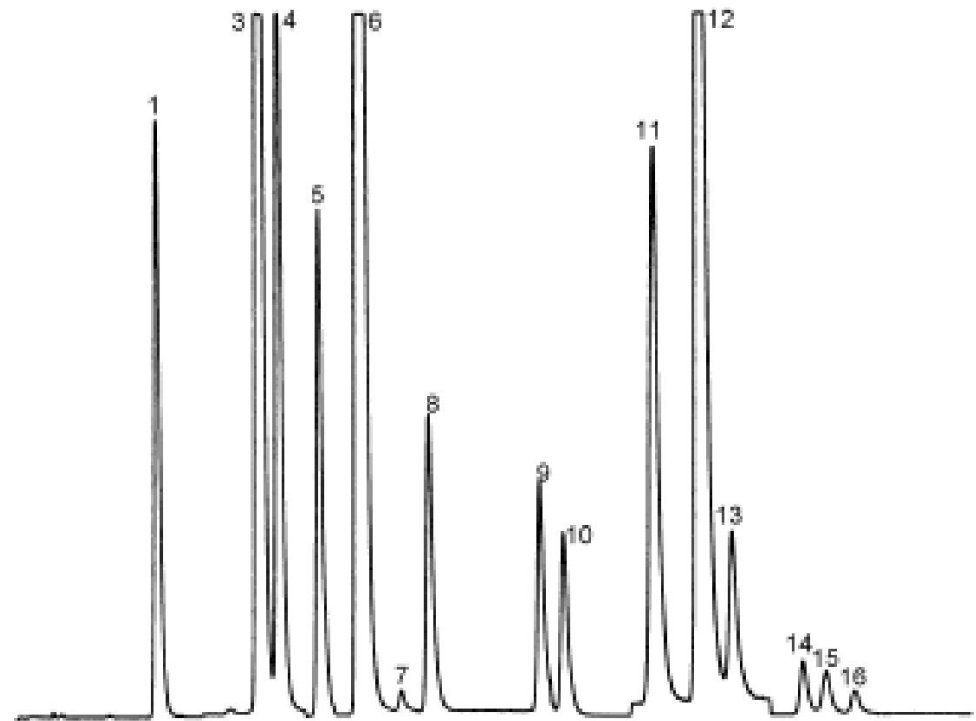
Высокая чувствительность $\sim 10^{-12}$ г

Растворенный кислород может тушить флуоресценцию

Каждое вещество характеризуется своим **КВАНТОВЫМ ВЫХОДОМ** излучения

Области применения

- Полиароматические углеводороды
- Хиноны
- Производные аминокислот
- Некоторые витаминов (B_2 , B_6 и др.)



Хроматограмма ПАУ

РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР

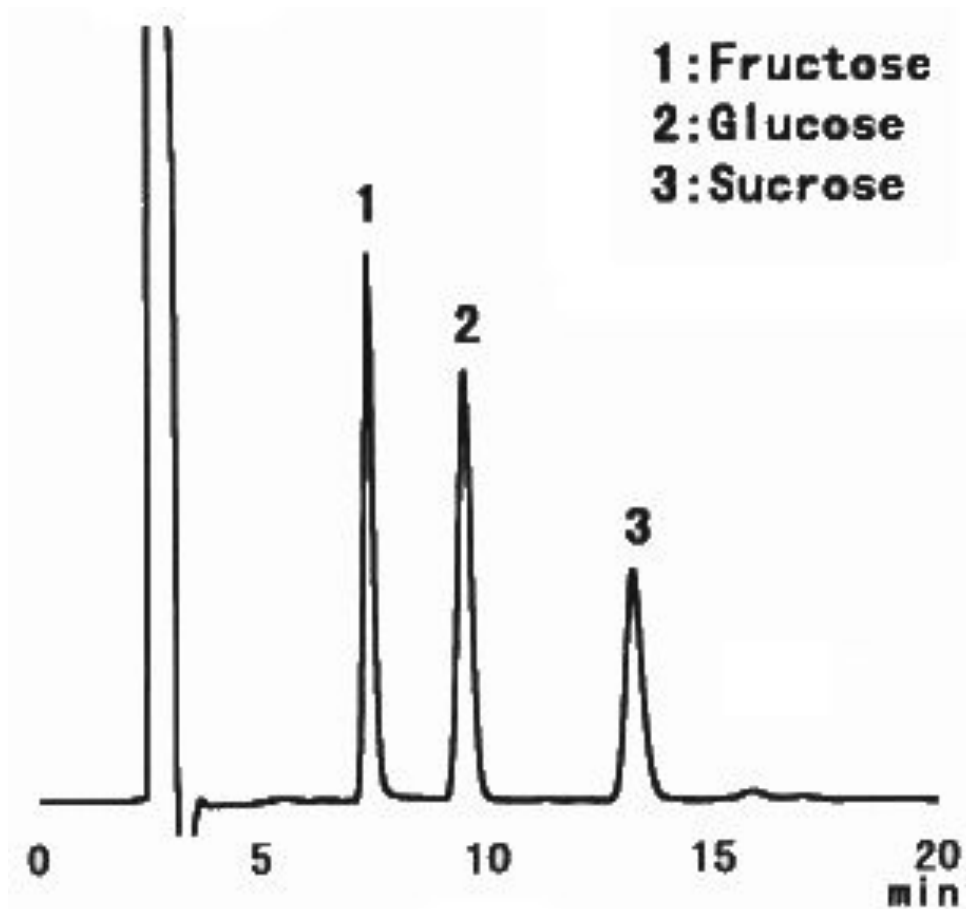
Коэффициент преломления разбавленных растворов изменяется пропорционально изменению концентрации растворенного соединения

Современные рефрактометры фиксируют до $1 \cdot 10^{-8}$ изменения показателя преломления

Сильно зависит от температуры, в меньшей степени от давления и насыщения элюента газами

Области применения

- Сахара
- Алифатические карбоновые кислоты
- Амины



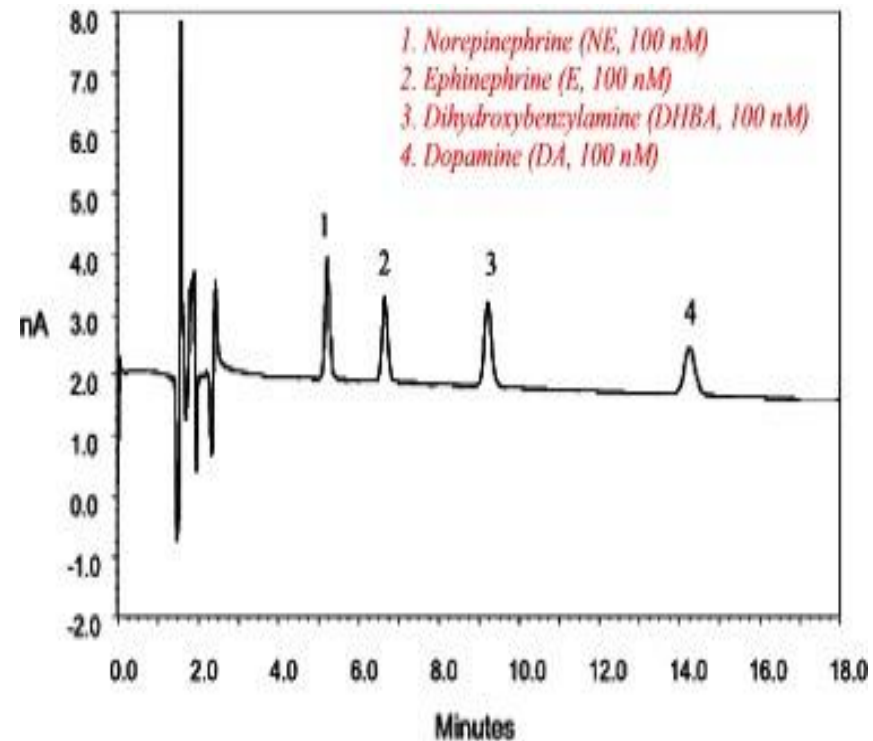
Хроматограмма сахаров

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР

Используют эффект окисления-восстановления соединений при определенных потенциалах

Области применения

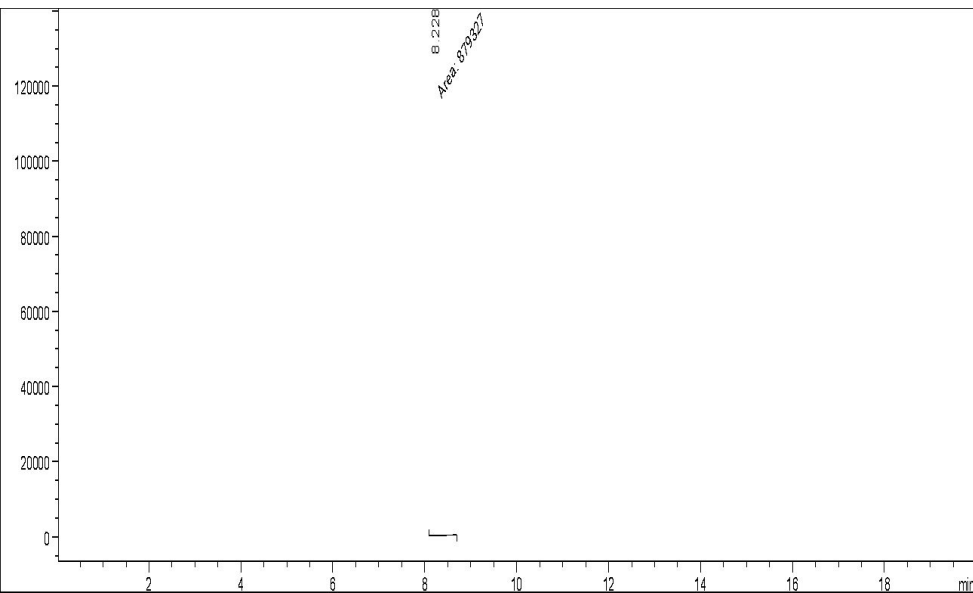
- Гидразины
- Нитрофенолы, аминифенолы
- Сахара
- Биогенные аминов
(путресцин, тирамин и др.)
- Жирорастворимые витамины



МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР

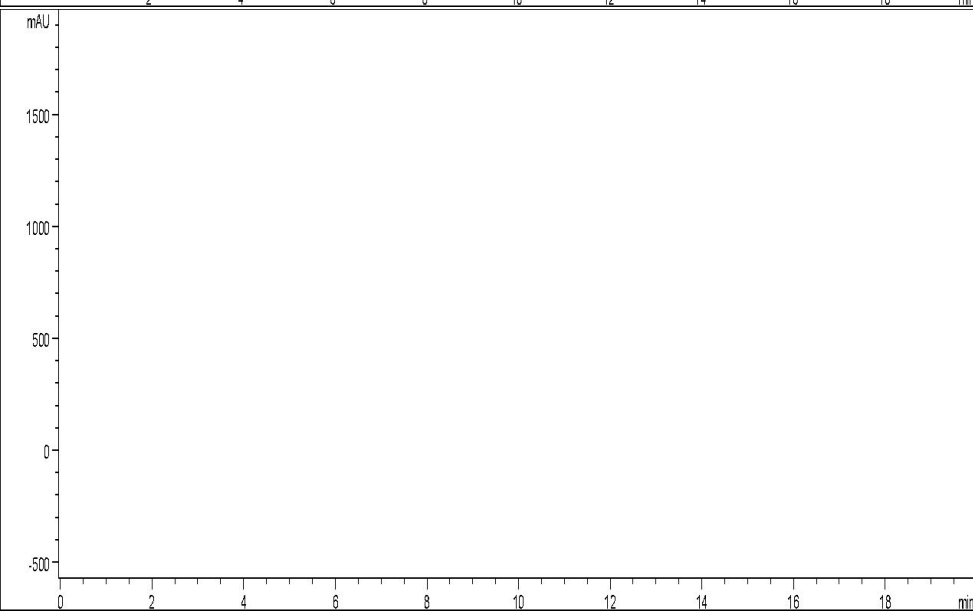


Определение пантотеновой¹ кислоты в яблочном соке



МС-детектирование (m/z 220)

Найдено В ₅ , мг/100 мл	Содержание по паспорту, мг/100 мл
0,6	0,5-0,8



СФ-детектирование (200 нм)

Найдено В ₅ , мг/100 мл	Содержание по паспорту, мг/100 мл
2,6	0,5-0,8

ЖХ-МС против ГХ-МС

- **Возможность определять термически неустойчивые и нелетучие соединения**
- **Вещества с большой молекулярной массой (протеины и полимеры)**
- **Определение в сложной матрице**
- **Сложность составления баз спектров**

Преимущества жидкостной хроматографии

- Более гибкие методы (многообразие вариаций подвижной и неподвижной фаз, механизмов разделения)
- Лучше воспроизводимость (жидкости легче поддаются стандартизации)
- Подходит для разделения полярных и неполярных веществ, а также высококипящих и термонеустойчивых соединений
- Высокая чувствительность и более высокая точность
- Мощный метод изучения механизма метаболизма веществ и т.п.

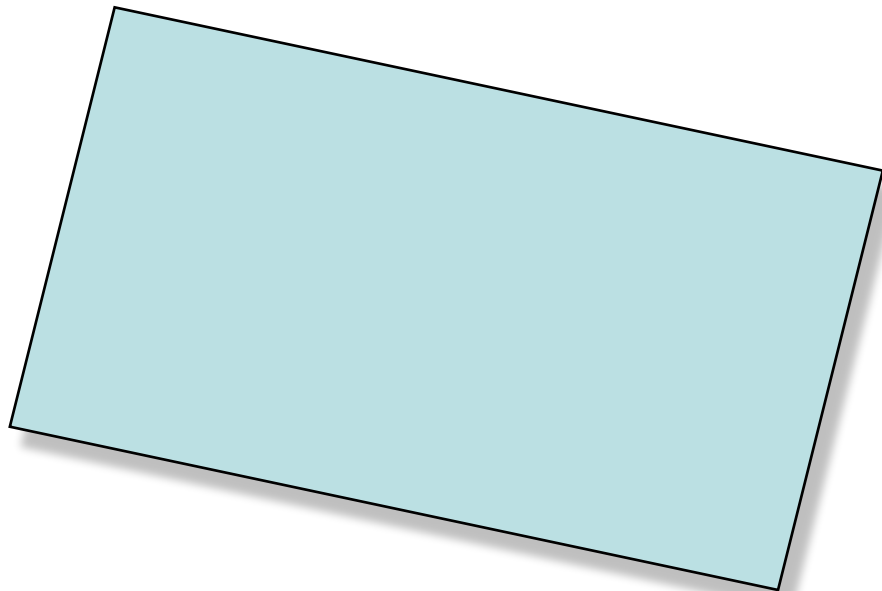
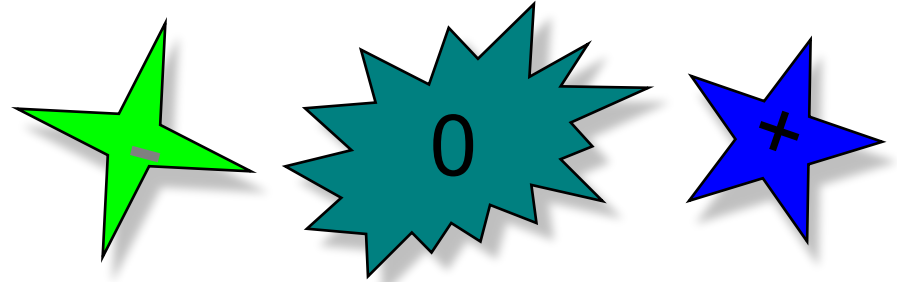
ПРОБЛЕМА

КАК РАЗДЕЛИТЬ ЗАРЯЖЕННЫЕ
ВЕЩЕСТВА?

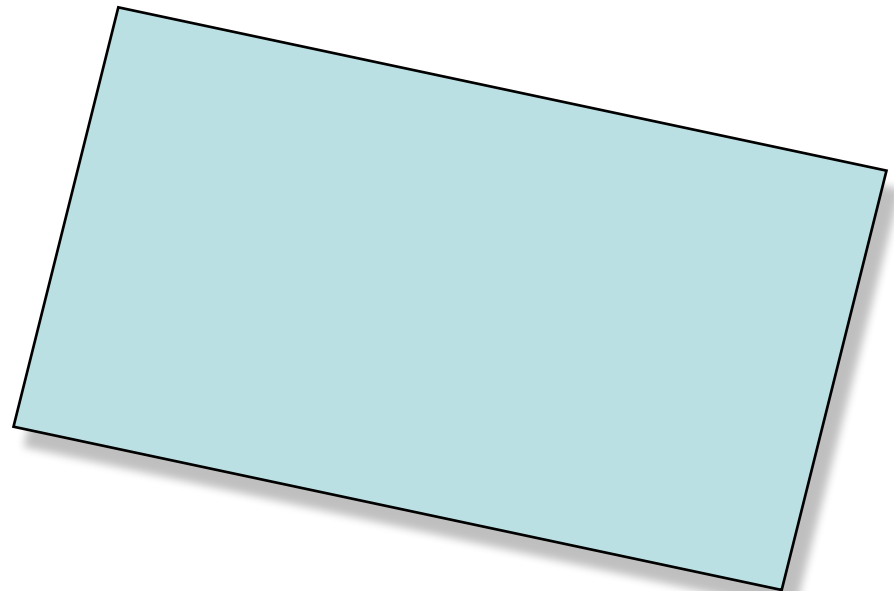
Ион-парная хроматография

(основной механизм –
распределение + ионный обмен)

Механизм (I) ион-парной хроматографии

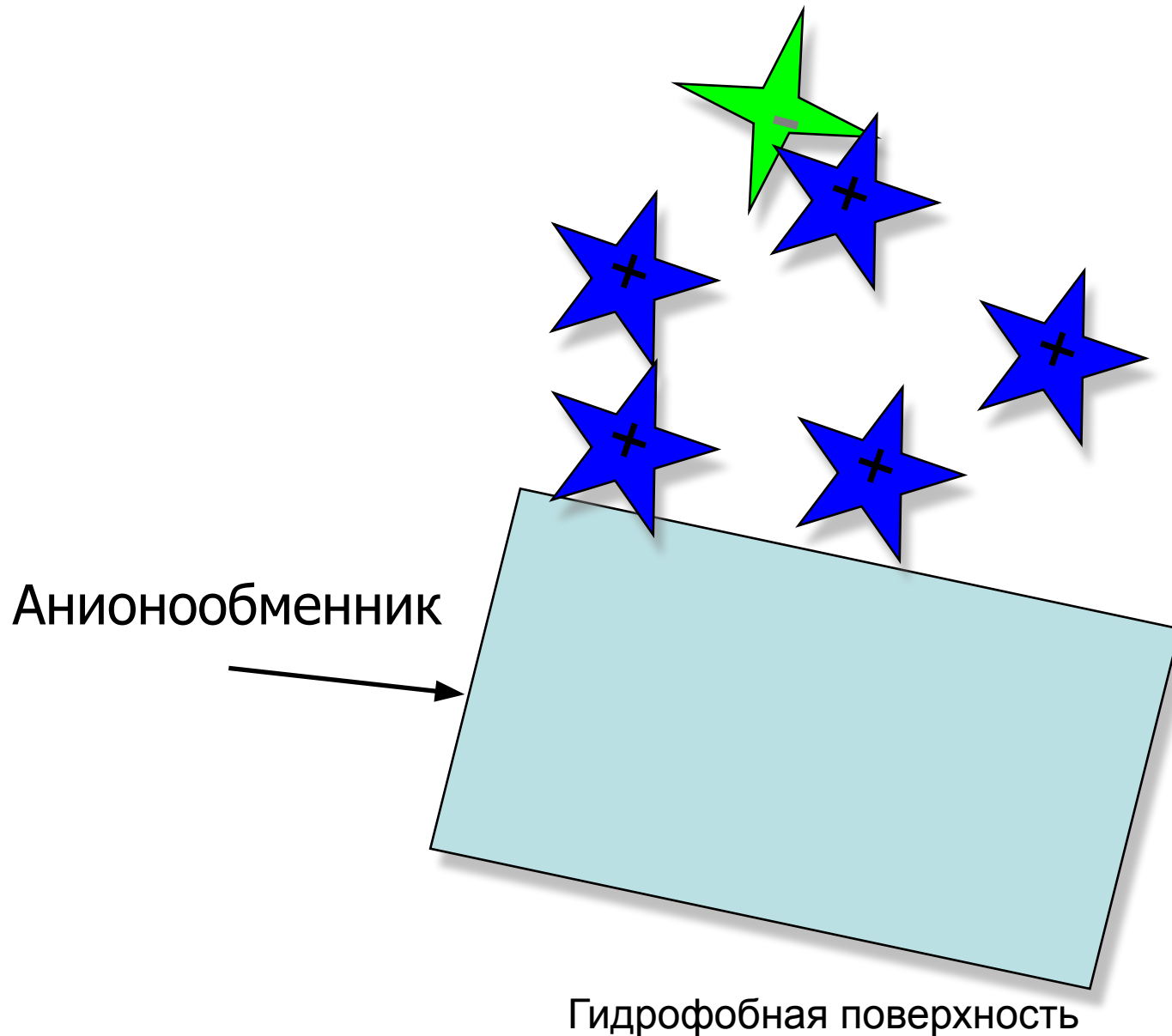


Гидрофобная поверхность



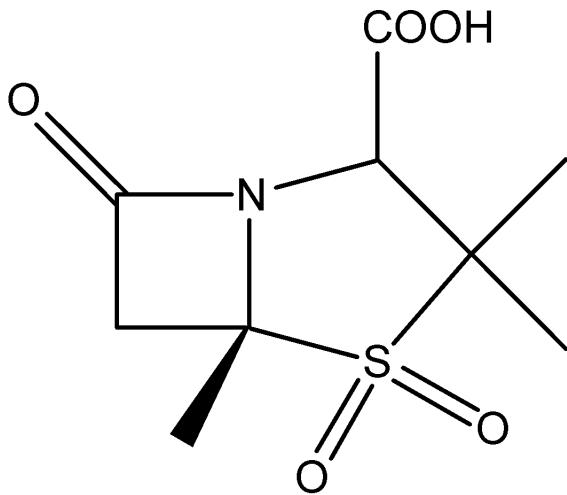
Гидрофобная поверхность

Механизм (II) ион-парной хроматографии

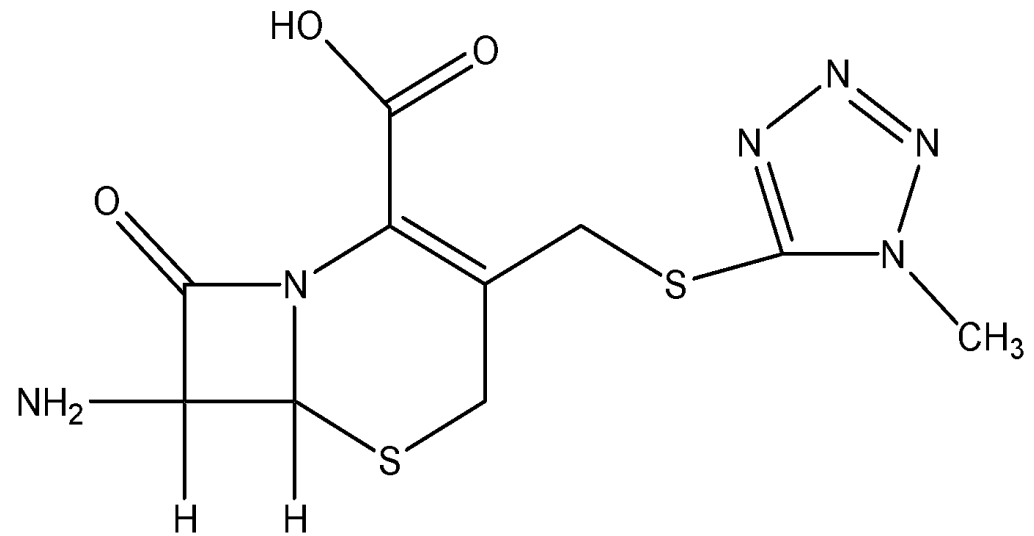


Определение лекарственных веществ в плазме крови

Сульбактам

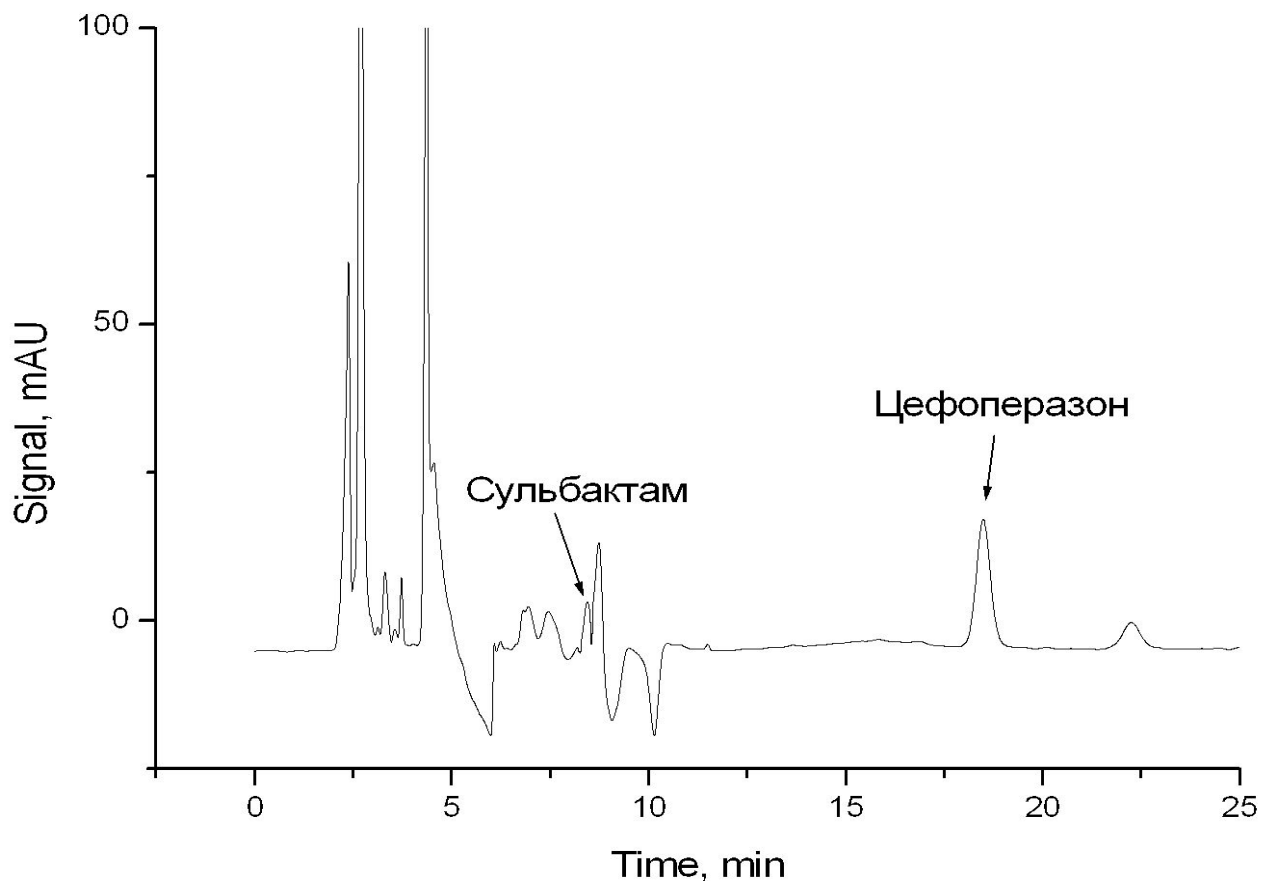


Цефоперазон



Хроматограмма образца плазмы крови содержащей сульбактам и цефоперазон

Предел обнаружения 4 мг/л



В элюенте – добавка бромида тетрабутиламмония

Ион-парная хроматография (ИПХ)

Достоинства

1. Возрастает удерживание заряженных веществ.
2. Одновременное определение заряженных и незаряженных соединений.
3. Многопараметрическая система позволяет достигать лучшего разделения.

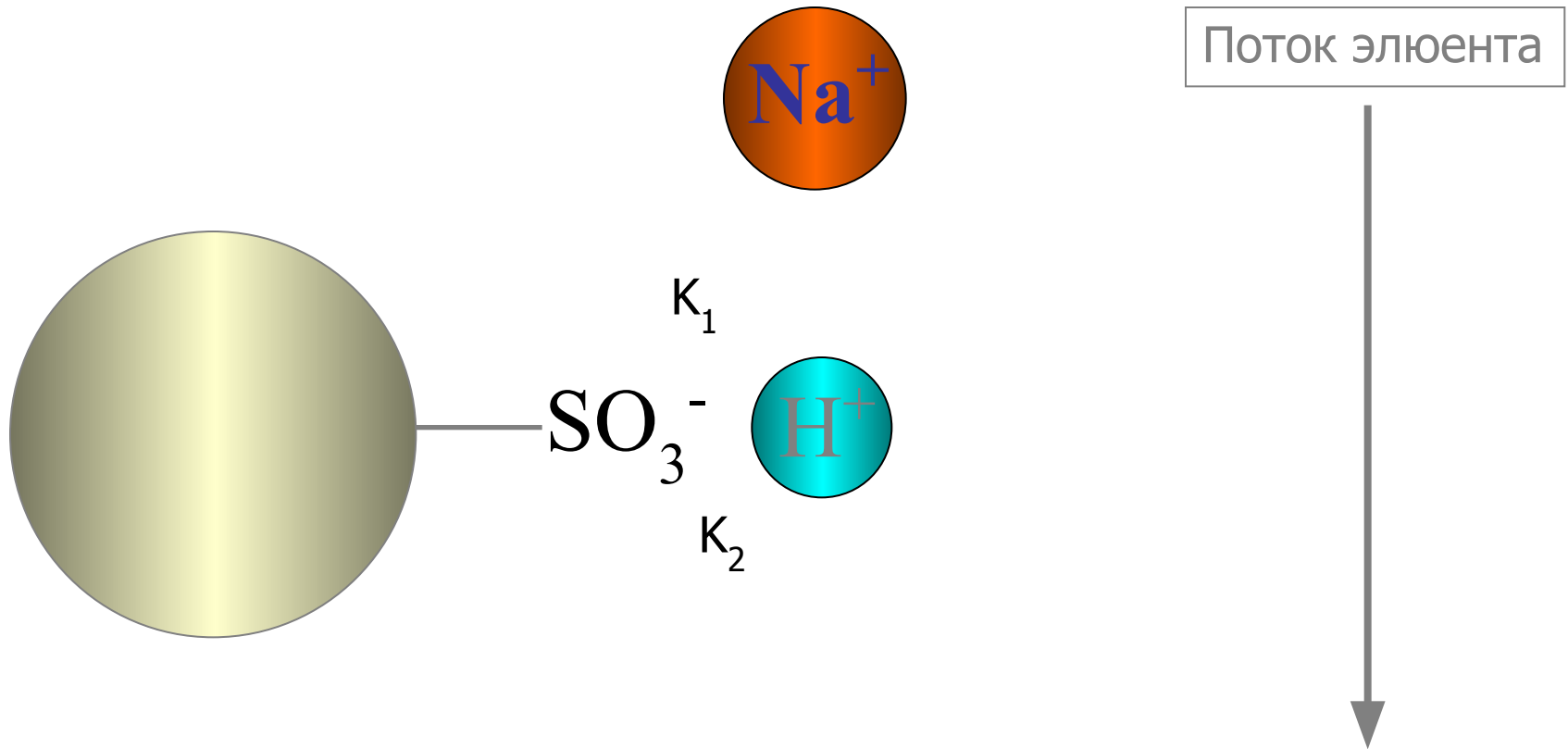
Недостатки

1. Длительное уравнивание хроматографической системы.
2. Меньшая устойчивость к изменению хроматографических условий: (худшая воспроизводимость свойств при приготовлении элюента).
3. Возможны системные пики на хроматограммах.

Ионная хроматография

(основной механизм – ионный обмен)

Схема ионного обмена



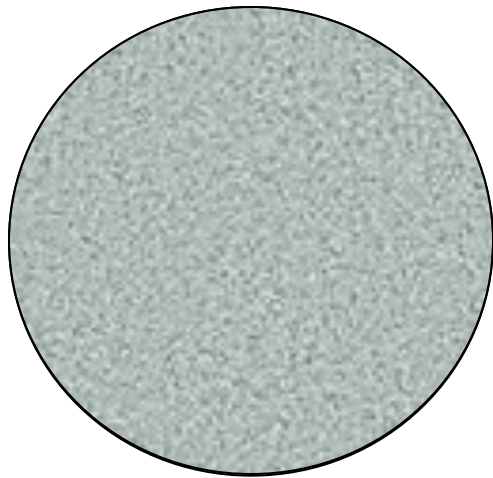
Для превращения ионообменной хроматографии в современный аналитический метод требовалось:

Проблема	Как была решена
Сделать ее высокоэффективной	Сорбенты малого диаметра, сферические, высокопористые, с ионообменными группами только на поверхности
Возможность работать с малыми количествами (концентрациями) веществ	Уменьшение емкости сорбентов (количества ионообменных групп на грамм сорбента) на 2 порядка
Найти надежный и чувствительный способ детектирования ионов	Подавление фоновой электропроводности элюента, кондуктометрический детектор

Неподвижные фазы в ионной хроматографии

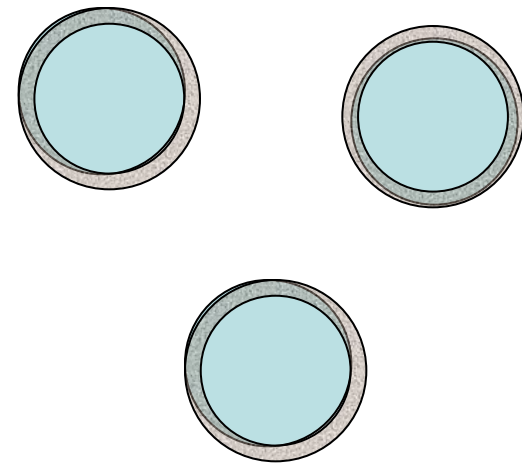
Строение сорбентов

Ионообменная хр-фия



- Объемно-модифицированные
- Емкость до 10 мМ/г
- Диаметр 200-2000 мкм

Ионная хр-фия



- Поверхностно-модифицированные
- Емкость 0.01-0.05 мМ/г
- Диаметр 5-10 мкм

Детектирование в ионной хроматографии

Детектирование в ионной хроматографии

- Кондуктометрическое
- Спектрофотометрическое
- Другие

Достоинства кондуктометрического детектора

- Универсален для детектирования заряженных веществ
- Простой, надежный, недорогой

Недостатки кондуктометрического детектора

- Возможная недостаточная чувствительность в ИХ
- Сильная зависимость сигнала от температуры
- Не очень широкий диапазон линейности

Ключевая проблема –
как обеспечить большую чувствительность?

Колоночное подавление

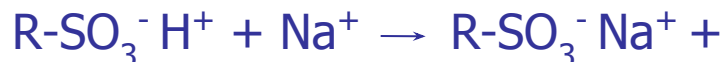


В детектор

Катионообменник
высокой емкости
в H^+ форме



Из разделяющей колонки

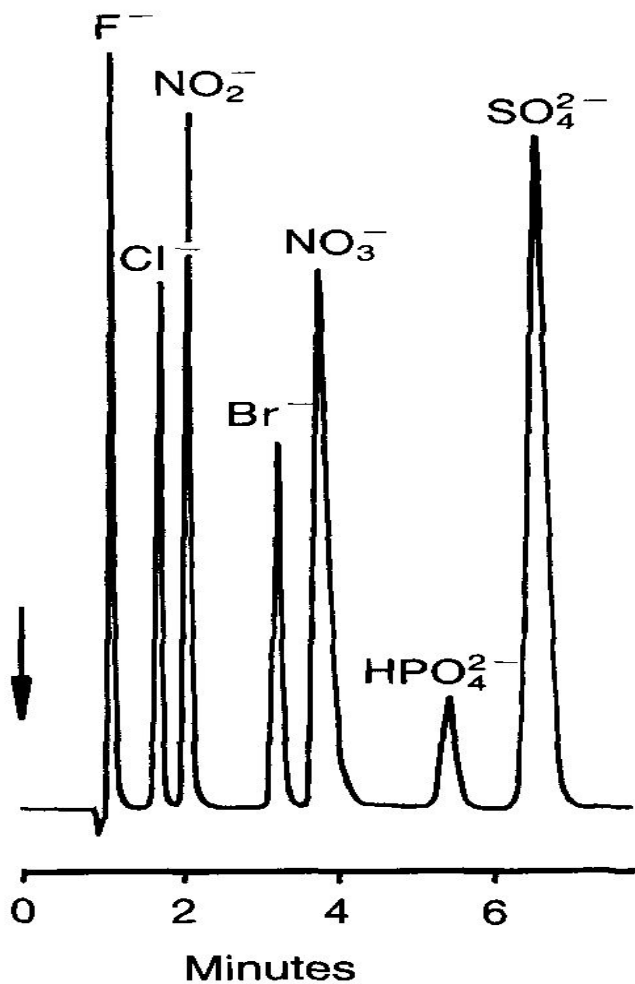


H^+

Определение анионов
методом ионной хроматографии

«Стандартные» анионы

F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-}



Элюент: 1.7 мМ $NaHCO_3$ + 1.8 мМ Na_2CO_3

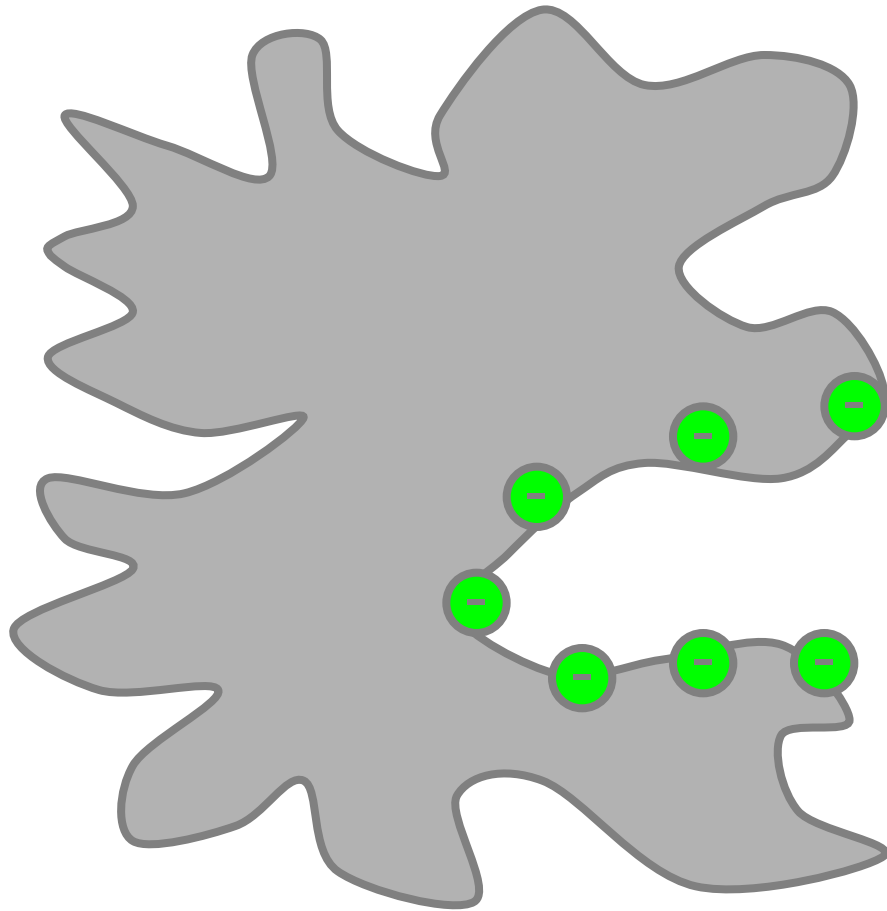
Вариант: ПФ

С мин. - на уровне 1-10 мкг/л

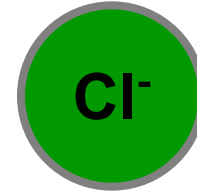
Ион-эксклюзионная хроматография

(основной механизм –
проникновение в поры + ионный обмен)

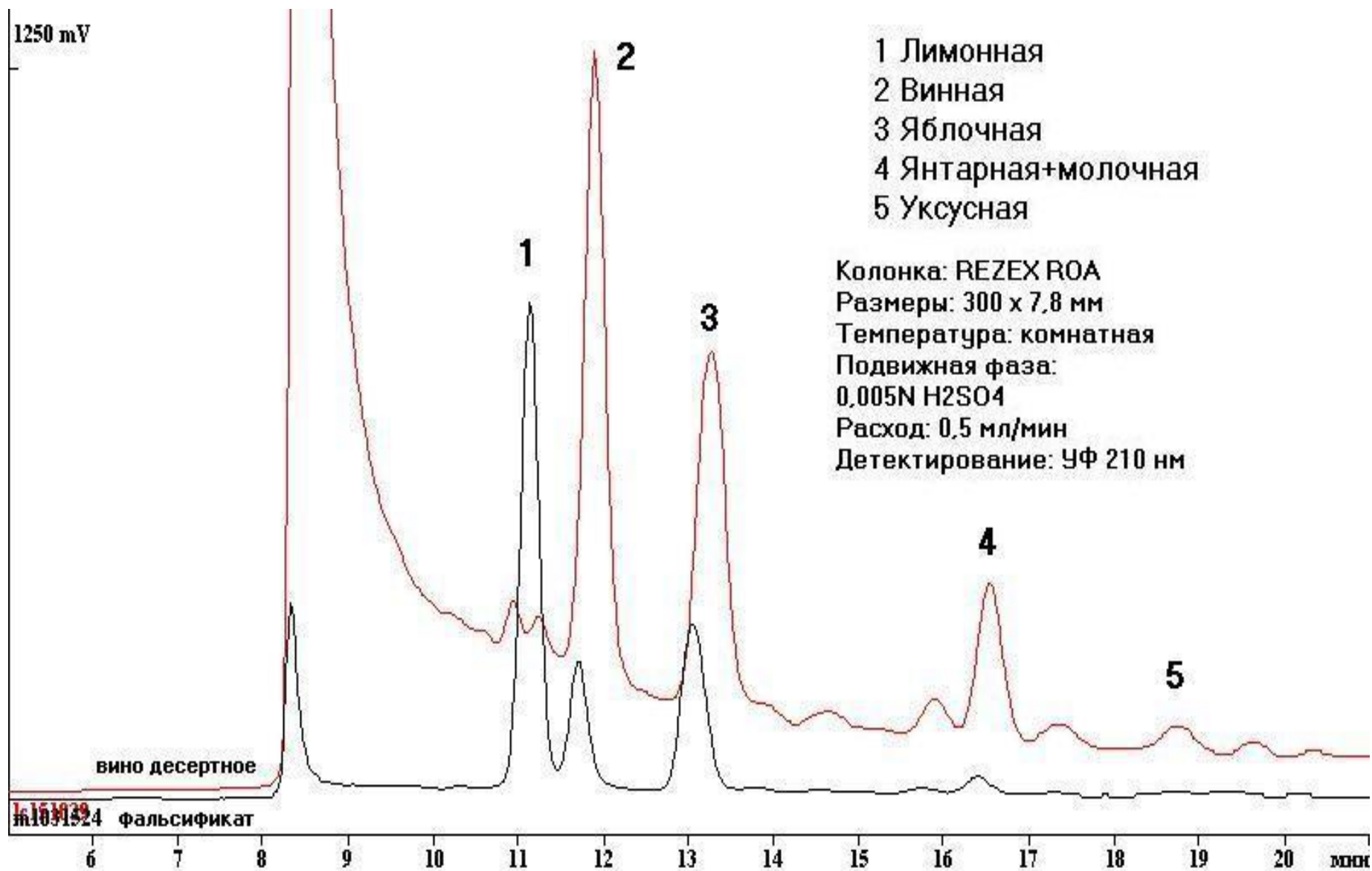
Принцип ион-экслюзионной хроматографии



pH < 3

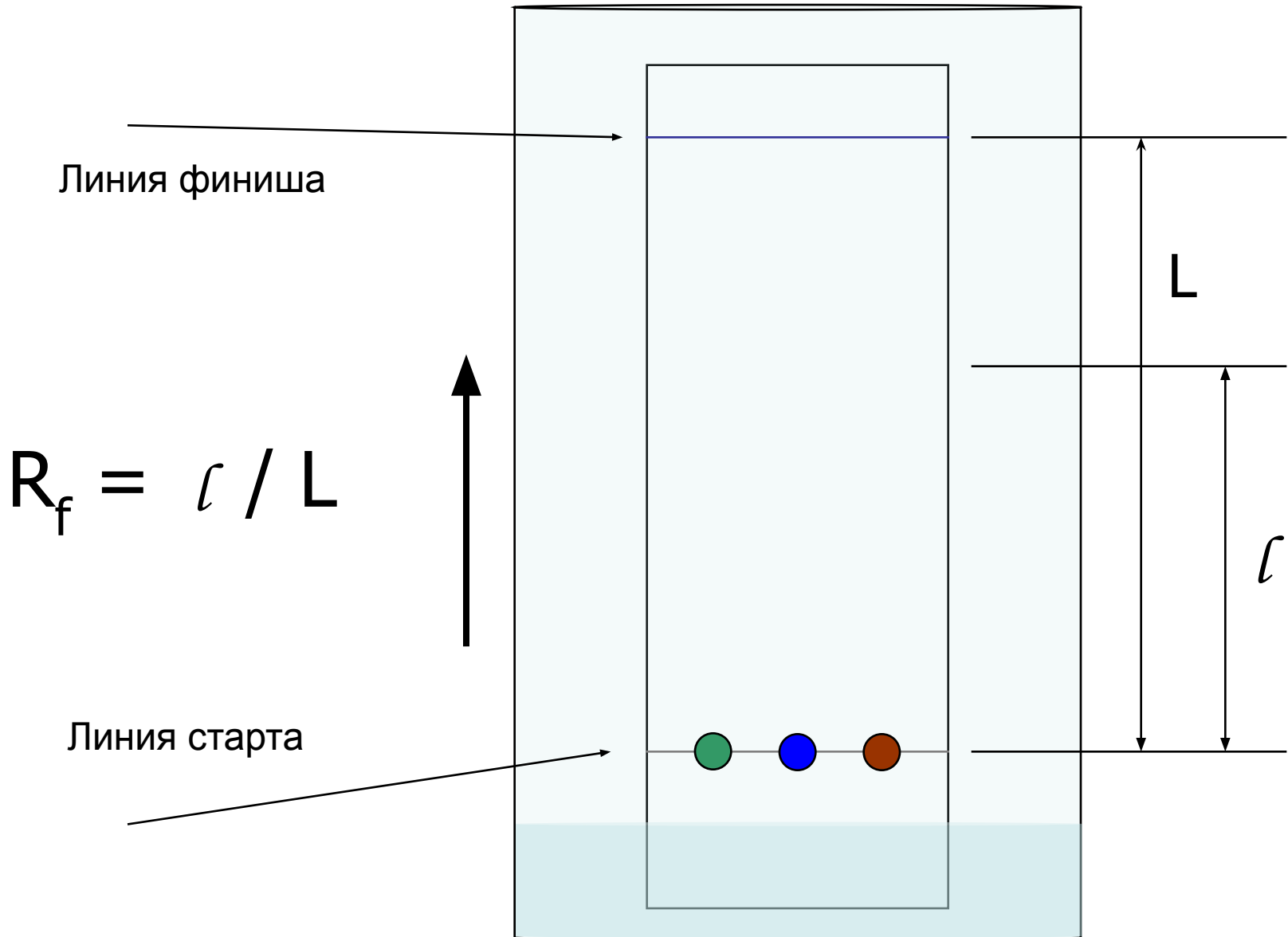


Контроль качества напитков



Тонкослойная хроматография (ТСХ, Thin layer chromatography)

Принцип тонкослойной хроматографии



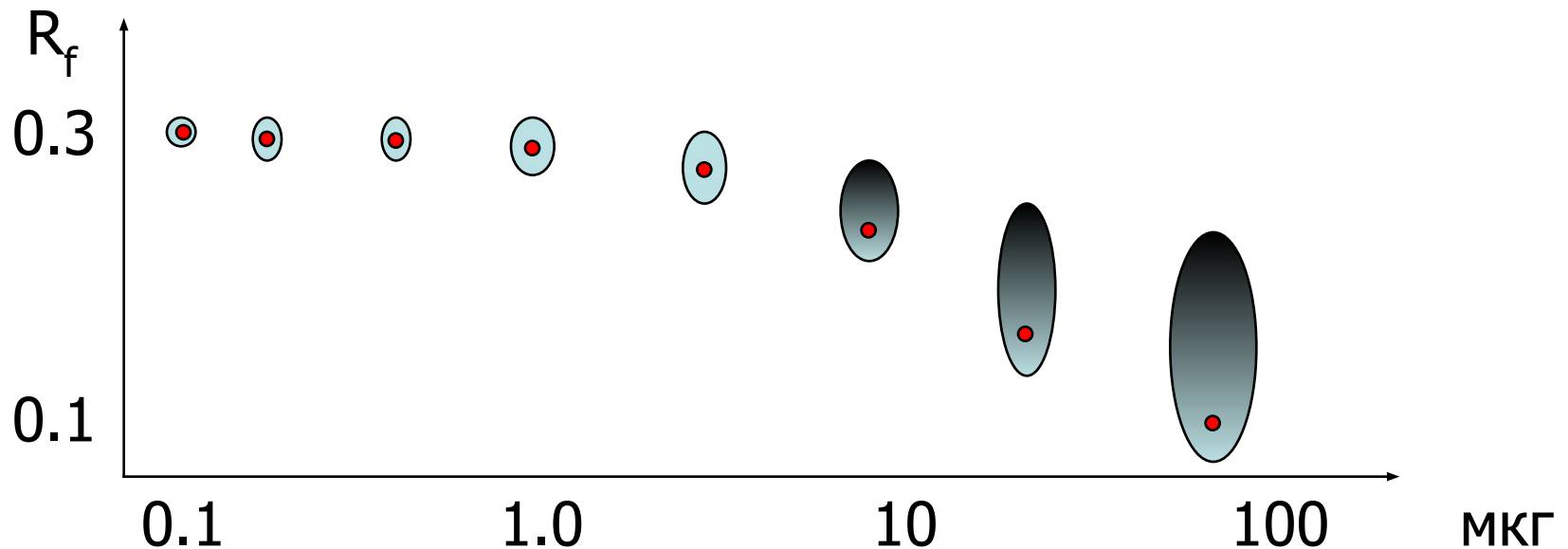
Прибор для ТСХ



Проявление ТСХ

- Опрыскивание пластины различными реагентами (дитизон, нингидрин и др.)
- Спектроскопические методы (УФ, люминесценция)
- Радиохимические методы

Объем пробы в ТСХ должен быть минимальным (чтобы не изменить R_f и правильно определить вещество)



Количественный анализ в ТСХ (БХ)

- Визуально на бумаге по величине и интенсивности пятен
- Используют спектроскопию диффузного отражения (фотоденситометрический метод)
- Измеряют радиоактивность (заранее помеченные в-ва)
- Элюируют пятна в подходящий растворитель и аналитический сигнал измеряют подходящим инструментальным методом

Области применения ТСХ

- Идентификация лекарственных и биохимических препаратов
- Проверка чистоты исследуемого вещества (реактива)
- Анализ природных продуктов

Достоинства и недостатки ТСХ

Достоинства

- Простота
- Иногда низкие пределы обнаружения
- Универсальные проявители
- Разделение веществ с сильно различающимися свойствами

Недостатки

- Недостаточная эффективность (а иногда и селективность)
- Зависимость от условий
- Плохая межлабораторная воспроизводимость

Выбор
варианта хроматографии
в зависимости от задачи

Определяемое
вещество

М.м. < 2000

М.м. > 2000

М.м. ?

Летучее в-во?

Варианты
эксклюзивной
хроматографии

Да

Нет

Неорган. газы?

Можно ли перевести
в летучее ?

Нет

Да

ГАХ

Нет

ГЖХ

Да