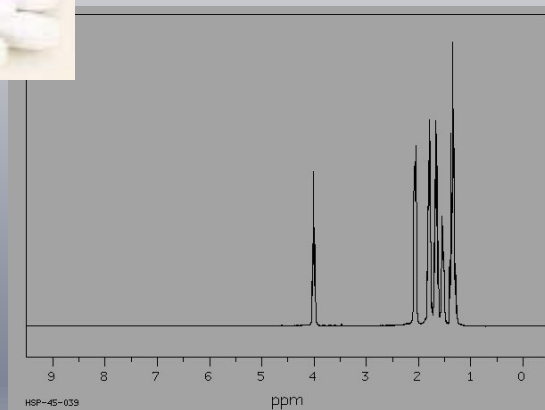
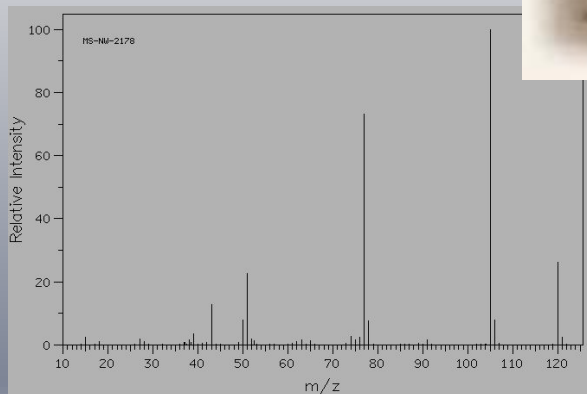
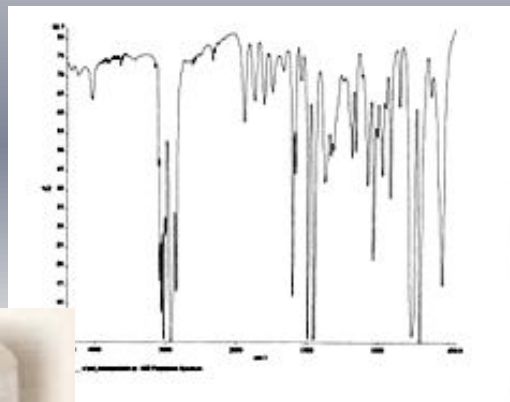
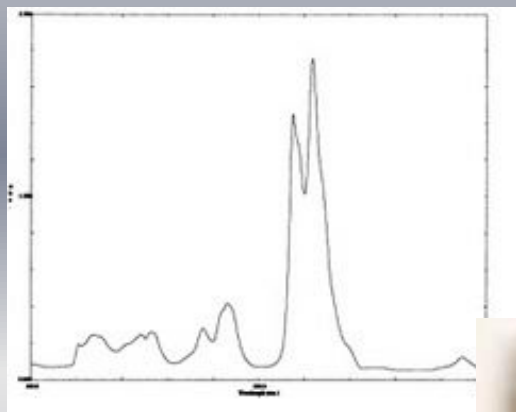
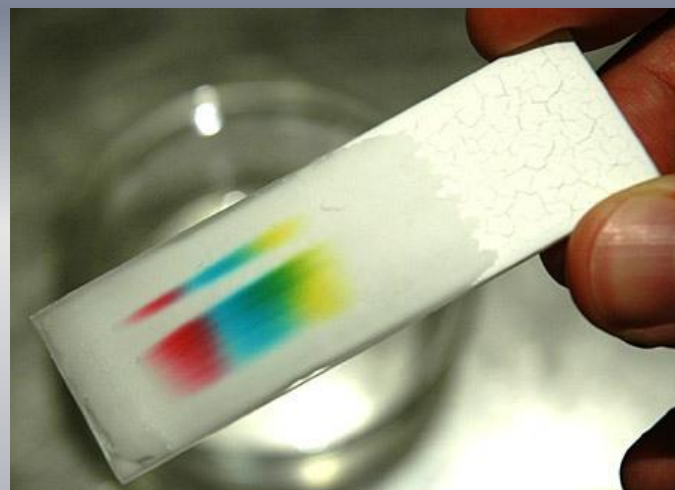


Физико-химические методы исследования биологически активных веществ



«Никакое другое открытие не оказало на исследования в органической химии такого огромного продолжительного влияния, как анализ с помощью адсорбционной хроматографии Цвета...» П. Каррер, 1947г.

ОСНОВЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ



Из истории хроматографии

День рождения хроматографии – 21 марта 1903г.

Доклад М.С. Цвета «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу».

Свой метод М.С. Цвет назвал – «хроматография» (запись цвета)



Михаил Семёнович Цвет
(1872—1919)

Ричард Кун (институт фундаментальной медицины г. Гейдельберг) (1938г. Нобелевская премия по химии за

предложенную Цветом адсорбционную хроматографию каротиноидов и витаминов):

Альфред Винтерштайн (1915г. Нобелевская премия по химии за исследования хлорофиллов)

Арчер Портер Мартин, Ричард Лоуренс Миллингтон Синдж (1938г. первый противоточный экстрактор с использованием воды и хлороформа для разделения олигопептидов;
1940г. Использование жидкость-жидкостной хроматографии для разделения аминокислот;
19 ноября 1941г. Статья «Новая форма использования двух жидких фаз для

хроматографии» в

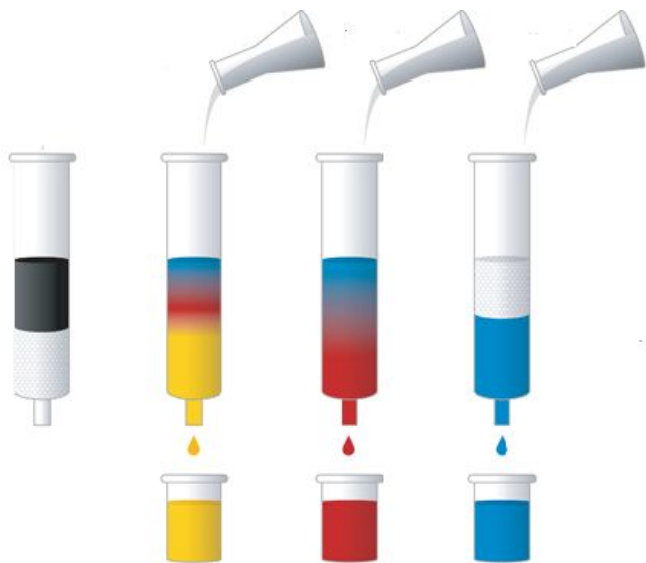
«Biochemical journal»; **1952г. Нобелевская премия за открытие распределительной хроматографии**

Арчер Портер Мартин, Энтони Траффорд Джеймс (50-е годы первый газовый хроматограф)

Измаилов, Шрайбер (1938г. Первые работы по тонкослойной хроматографии)

Шталь (1956г. Использование тонкослойной хроматографии как аналитического метода)

Хроматография – физико-химический метод, основанный на разделении вещества между двумя несмешивающимися фазами



Через неподвижную (стационарную) фазу протекает подвижная фаза.
Молекулы разделяемых веществ могут находиться в обеих фазах.
Эффект разделения основывается на том, что соединения проходят расстояние, на котором происходит разделение, с некоторой, присущей этому соединению, задержкой.

Современные хроматографические методы:

- капиллярная газовая хроматография (**КГХ**),
- высокоэффективная жидкостная хроматография (**ВЭЖХ**),
- высокоэффективная тонкослойная хроматография (**ВЭТСХ**),
- высокоэффективная ионная хроматография (**ВЭИХ**),
- сверхкритическая флюидная хроматография (**ВЭИХ**),
- капиллярный электрофорез (**КЭ**)

Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз, типам процессов разделения и техникам проведения

Название метода	Английская аббревиатура	Агрегатное состояние		Процесс разделения	Техника проведения разделения
		подвижной фазы	стационарной фазы		
Жидкость-жидкостная хроматография	LLC	жидкое	жидкое	распределение	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), TLC (ТСХ), PC (бумажн. хромат.)
Газожидкостная хроматография	GLC	газообразное	жидкое	распределение	GC (ГХ)
Жидкостная хроматография	LC	жидкое	твердое	адсорбция	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), PC (бумажн. хромат.)
Газовая хроматография	GC	газообразное	твердое	адсорбция	GC (ГХ)

Название метода	Английская аббревиатура	Агрегатное состояние		Процесс разделения	Техника проведения разделения
		подвижной фазы	стационарной фазы		
Жидкостная хроматография	LC	жидкое	твердое	адсорбция	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), PC (бумажн. хромат.)
Газовая хроматография	GC	газообразное	твердое	адсорбция	GC (ГХ)

Адсорбция – концентрирование вещества твердой фазой;

Твердая фаза – адсорбент;

Хроматографическая колонка - кассета с адсорбентом , в данном случае адсорбент – неподвижная фаза;

Подвижная фаза – жидкость (жидкостная хроматография) или инертный газ (газовая хроматография);

Аналиты – соединения, выделенные в результате хроматографирования

Жидкостная хроматография низкого давления

(low pressure liquid chromatography, LPLC)

используется в основном для выделения чистых веществ (препаративная хроматография)

Основные понятия:

Подвижная фаза (элюент) – растворитель (смесь растворителей), пропущенный через колонку;

Элюирование – пропускание элюента через хроматографическую колонку;

Элюат – фильтрат, вытекающий из хроматографической колонки;



Элюент

Хроматографическая колонка

Силикагель
(μ 100 микрометров, т.е. 0.1 мм)

Элюат

Недостаток LPLC – низкая разрешающая способность (хроматографические зоны компонентов широкие)

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

high performance liquid chromatography HPLC
(жидкостная хроматография высокого давления)

Используется для аналитических целей

Колонка ВЭЖХ (l ~ 15-25
см;
Ø 2-4.6 мм;
и 3-5 микрометров)

1- емкость для забора
элюента

2 – насос

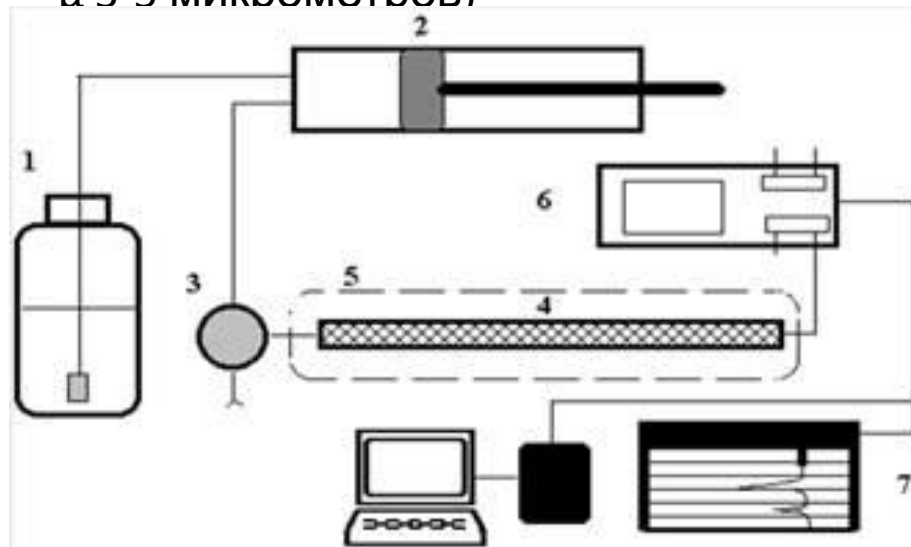
3 - инжектор

4 - колонка для ВЭЖХ

5 – термостат

6 – детектор

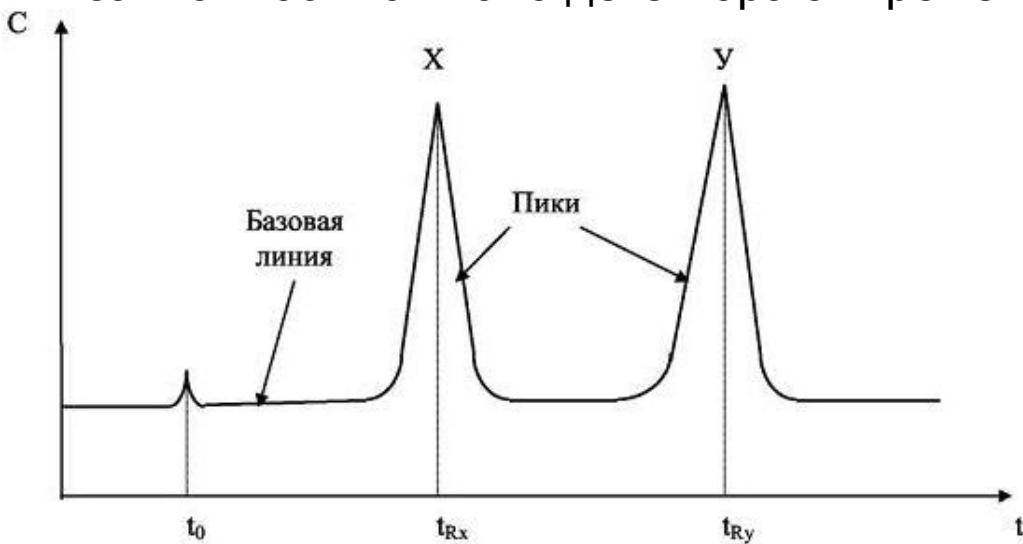
7 - регистрирующая система



Блок-схема жидкостного
хроматографа

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Хроматограмма (графическое представление результата разделения) – зависимость сигнала детектора от времени элюирования



Пик – зависимость концентрации вещества в элюате от времени элюирования.

Площадь пика пропорциональна концентрации вещества в пробе.

Удерживание вещества в колонке – характеристика вещества в данной хроматографической системе

t_{Rx} – **Время удерживания** (время, за которое анализируемое вещество доходит от места

ввода пробы до детектора;

V_R - **Объем удерживания** (произведение времени удерживания на объемную скорость

подачи подвижной фазы)

t'_{Rx} – **Приведенное время удерживания** ($t_{Rx} - t_0$)

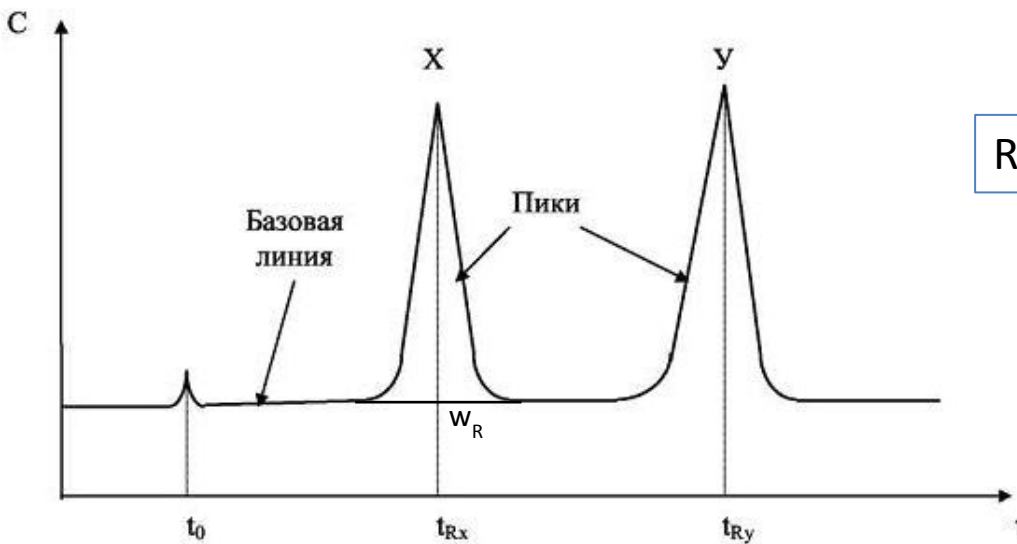
k' – **Фактор удерживания**

$$\left(\frac{t'_{Rx}}{t_0} \right)$$

t_0 – **Мертвое время колонки** (время, необходимое подвижной фазе чтобы пройти по

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Разрешение (R) – степень разделения двух



$$R = 2 \times (t_{Rx} - t_{Ry}) / (w_X + w_Y)$$

w_R – ширина пика R у основания

- R = 0 (вещества не разделяются)
- R = 1 (перекрывание ~ 2% площадей двух пиков)
- R ≥ 1 (пики разделяются до базовой линии)

Факторы, влияющие на разрешение:

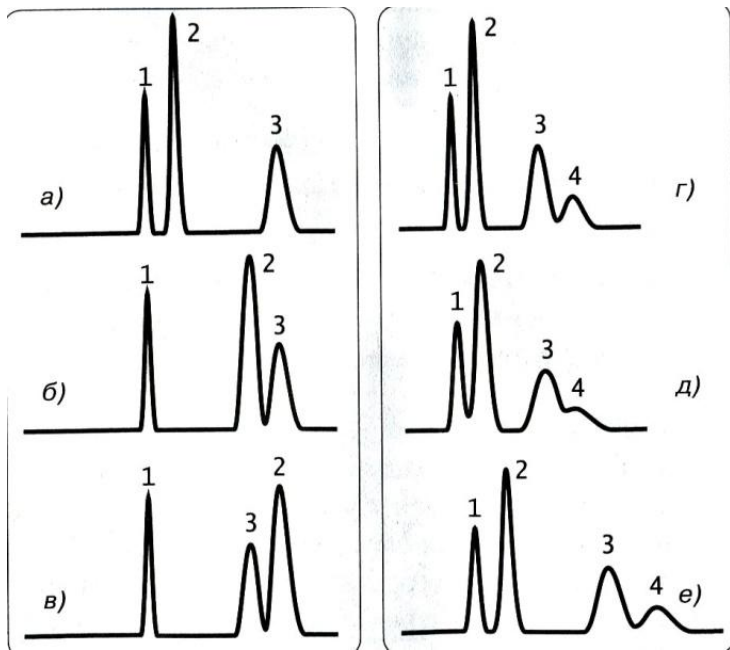
- удерживание,
- селективность,
- эффективность

Селективность – способность хроматографической системы к разделению веществ

$$\alpha = k'_{Rx} / k'_{Ry}$$

$\alpha = 1$ (полное отсутствие селективности, т.е. разделение не происходит)

Разделение на данном адсорбенте при применении данного элюента принципиально возможно при $\alpha > 1$!



Разделение с различной α

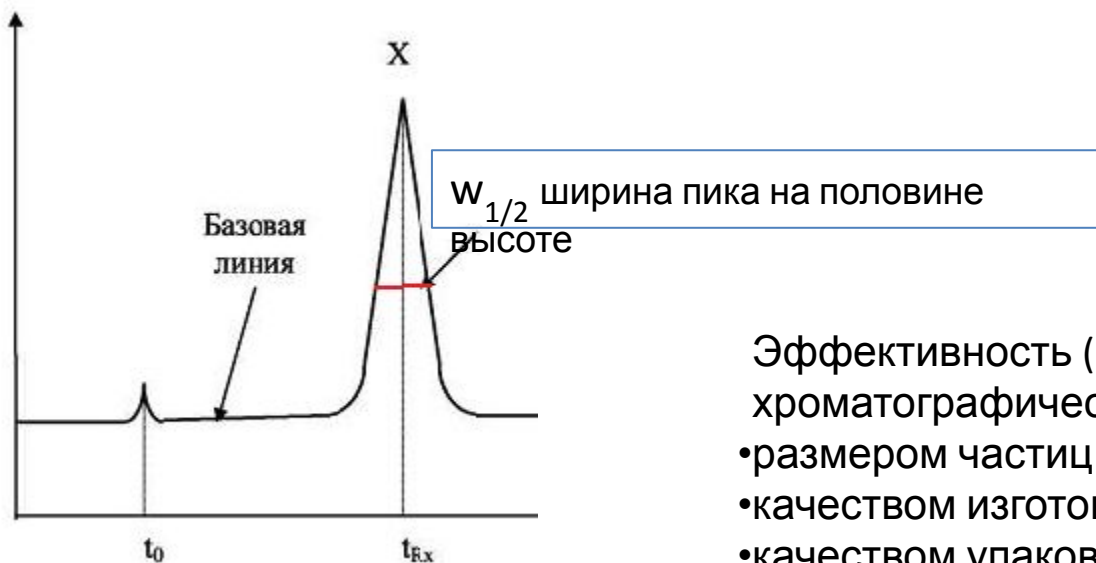
Разделение с одинаковой α

При постоянной селективности хроматограмма выглядит одинаково (последовательность элюирования, пропорции между факторами удерживания постоянны)

Для изменения селективности меняют либо адсорбент, либо состав элюента

Эффективность хроматографической колонки – величина размывания хроматографической зоны

$$N = 5.545 \times (t_{R_x} / w_{1/2})^2$$



- Эффективность (N) – свойство хроматографической колонки, определяется:
- размером частиц адсорбента (μ)
 - качеством изготовления адсорбента;
 - качеством упаковки колонки адсорбента

Определение эффективности колонки (тестирование колонки) проводят при: скорости подвижной фазы 1мл/мин (\varnothing 4.6 мм), определенным адсорбатам (толуол, нафталин)

Пиковая плотность (n) – число пиков, которые могут быть расположены на хроматограмме друг за другом с разрешением, равным единице

$$n = 1 + 0.6 \times \sqrt{N} \times \lg(1 + k')$$

N – эффективность
k' – фактор удерживания последнего компонента

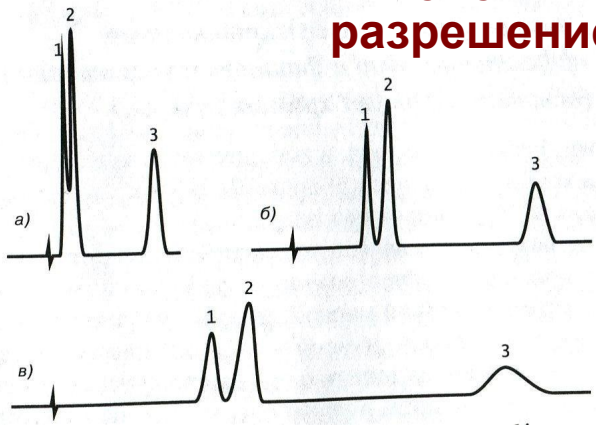
Основная формула

хроматографии

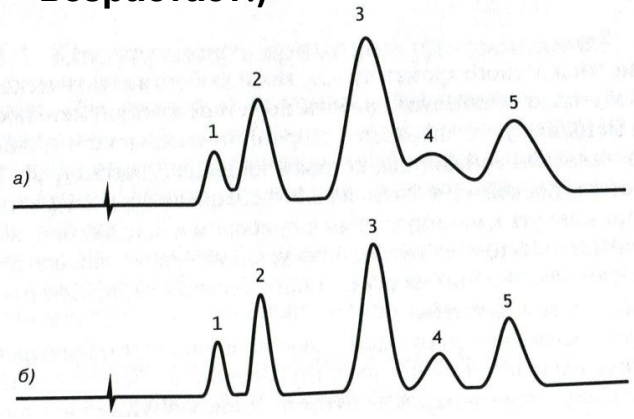
$$R = 1/4 \times (\alpha - 1) / \alpha \times N \times k'_{RY} / (k'_{RY} + 1)$$

R - разрешение
 α - селективность
 N – эффективность
 k'_{RY} – фактор удерживания второго пика

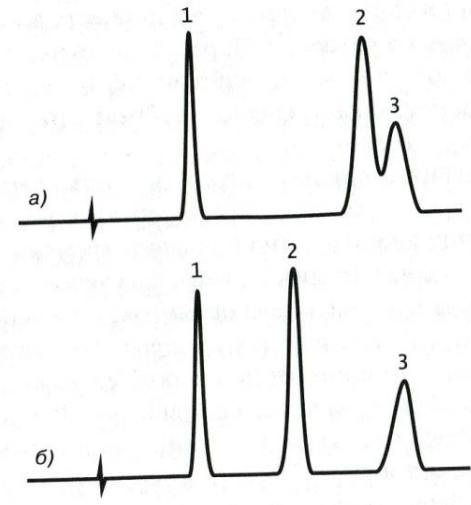
Как улучшить разрешение?



Разделение при увеличении k'
 (время анализа сильно возрастает!)



Разделение при
 улучшении α

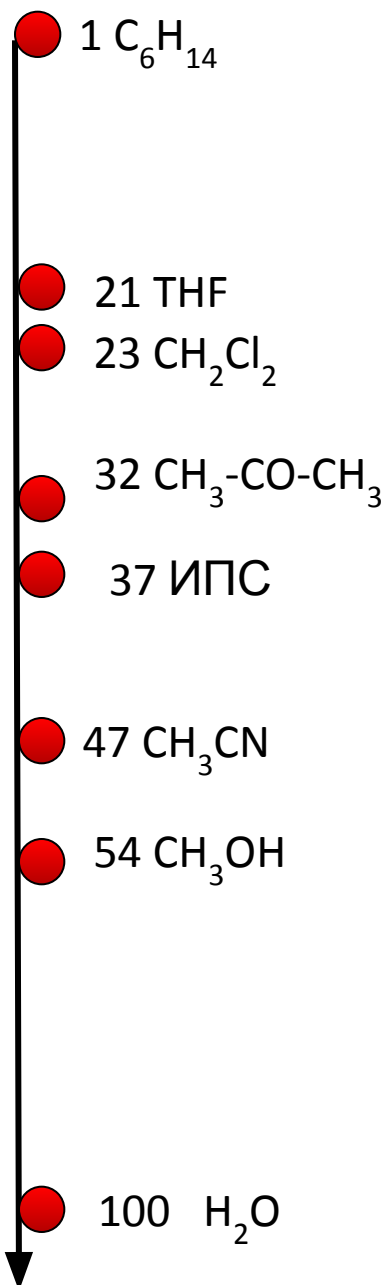


Разделение при
 увеличении N

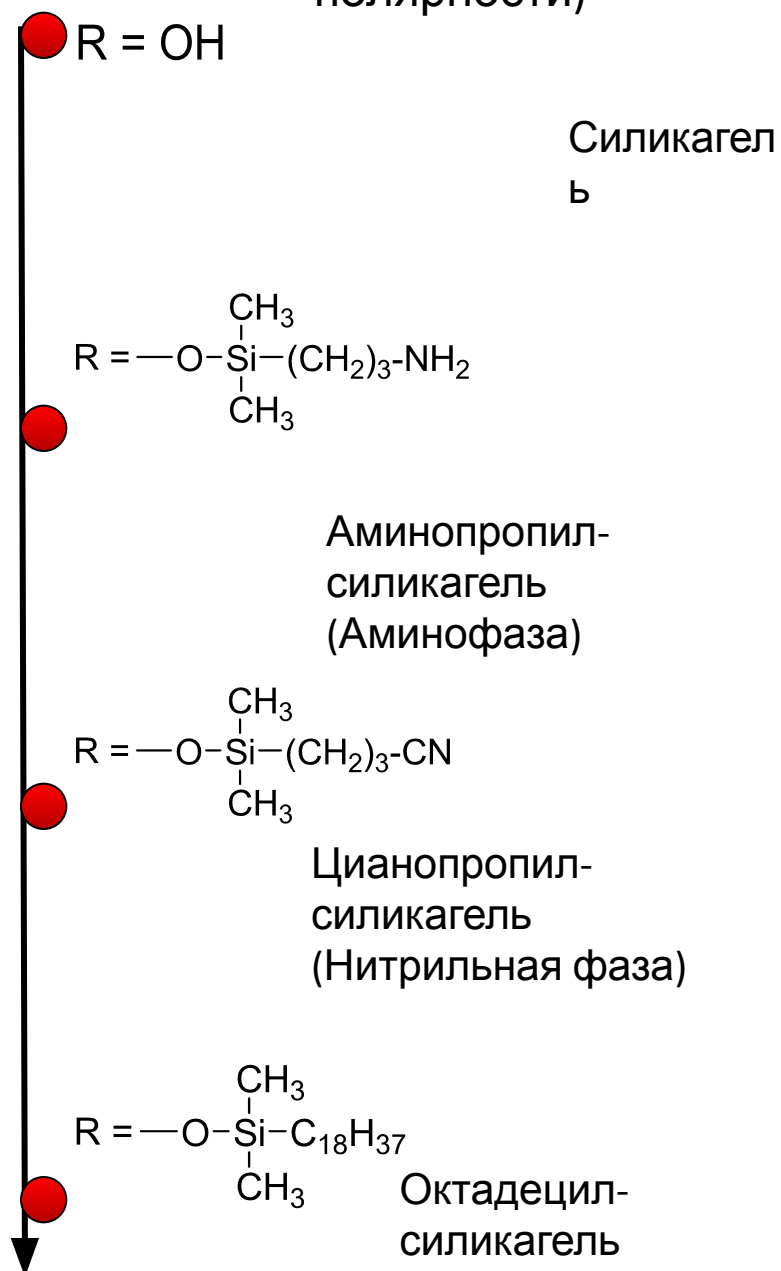
**Как управлять временем
удерживания?**

**Принцип «Подержать и отпустить»:
в хроматографии все должно смываться, но постепенно**

Ряд полярности растворителей,
применяемых в ЖХ



Адсорбенты, применяемые в ЖХ
(в порядке уменьшения
полярности)



Как происходит удерживание

В жидкостной хроматографии

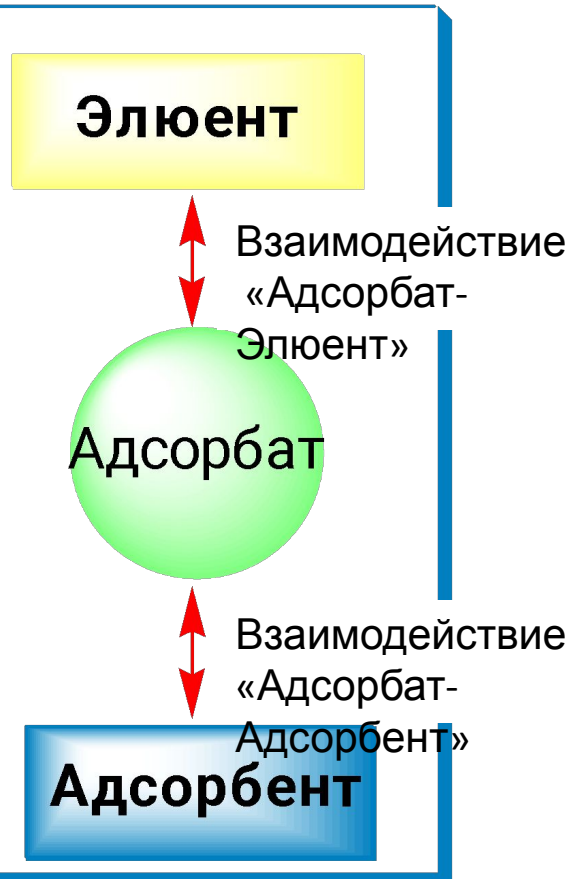
Удерживание =

Взаимодействие «А-А» -

Взаимодействие «А-Э»

Нормально-фазовая (НФ, normal phase, NP) – хроматографическая система, основанная на полярном адсорбенте

Обращенно-фазовая (ОФ, reversed-phase, RP) – хроматографическая система, основанная на неполярном адсорбенте



Обращенная фаза (неполярный адсорбент)

Основа – основной компонент элюента (растворитель)

Добавка – дополнительный компонент элюента

В ОФ хроматографии основа – всегда более полярный растворитель, чем добавка (т.е., основа – полярная, добавка - неполярная)

Для ОФ ВЭЖХ:

Адсорбент - C18 силикагель;

Основа элюента – H₂O или водно-солевой буфер

Добавка – ацетонитрил, метанол, реже ТГФ или ИПС

Чем больше в элюенте доля неполярной добавки – тем меньше удерживание!

● 1 C₆H₁₄

● 21 THF

● 23 CH₂Cl₂

● 32

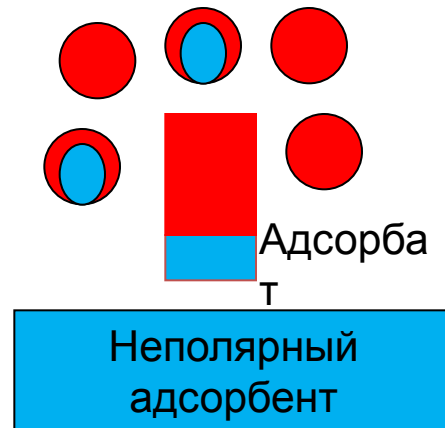
● Ацетон
● ИПС

● 47 CH₃CN

● 54 CH₃OH

● 100 H₂O

Увеличение элюирующей силы в ОФ ВЭЖХ ↑



Полярная основа



Неполярная добавка

Нормально-фазовая система

(«классическая»)

Модификатор – растворитель, способный модифицировать поверхность адсорбента.

Подавляет влияние остаточной влаги (стабилизирует удерживание)

● 1 C₆H₁₄

● 21 THF

● 23 CH₂Cl₂

● 32 CH₃-CO-CH₃

● 37 ИПС

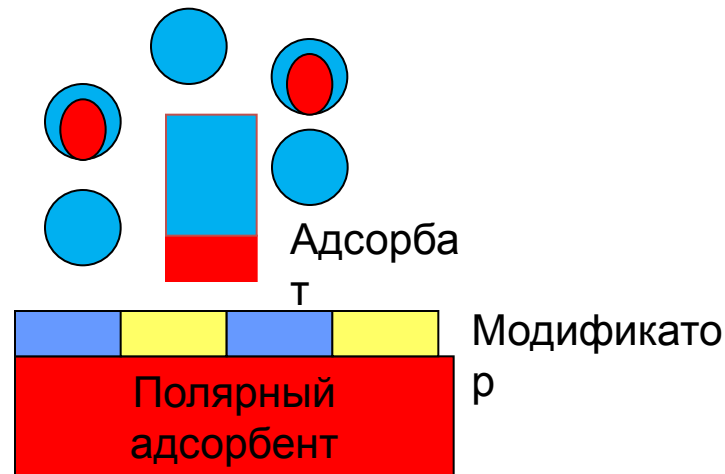
● 47 CH₃CN

● 54 CH₃OH

● 100 H₂O

Увеличение элюирующей силы растворителя в НФ

Для НФ ВЭЖХ:
Основа – гексан
Полярная добавка – диоксан, ТГФ, EtOAc, CHCl₃, CH₂Cl₂, ацетон, ИПС
Модификаторы: H₂O, AcOH, ТЭА



Нормально-фазовая гидрофильная хроматографическая система (ННФС, hydrophilic interaction chromatography)

Гидрофильная хроматография – НФ ВМЖХ, но с более полярным элюентом.

Применяется для разделения сильнополярных

Для ННФС:
веществ.

Основа – ацетонитрил

Полярная добавка и модификатор – вода или водно-солевой

буфер

Чем больше в элюенте воды – тем меньше удерживание

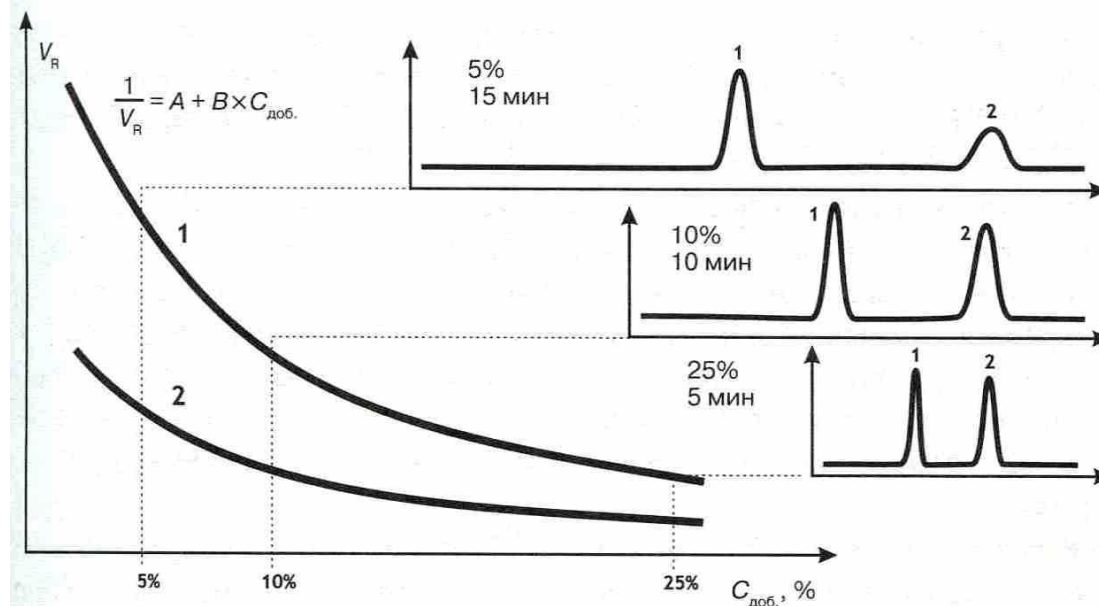
Уравнение Скотта

$$1/V_R = A + B \times C_{\text{доб.}}$$

V_R – удерживаемый объем

$C_{\text{доб.}}$ – доля добавки в элюенте

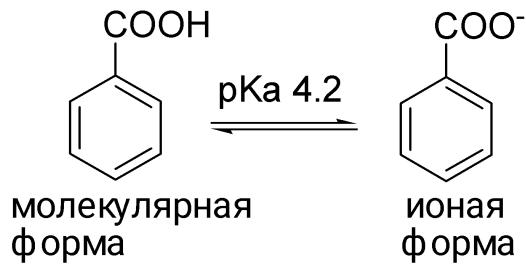
A, B - коэффициенты



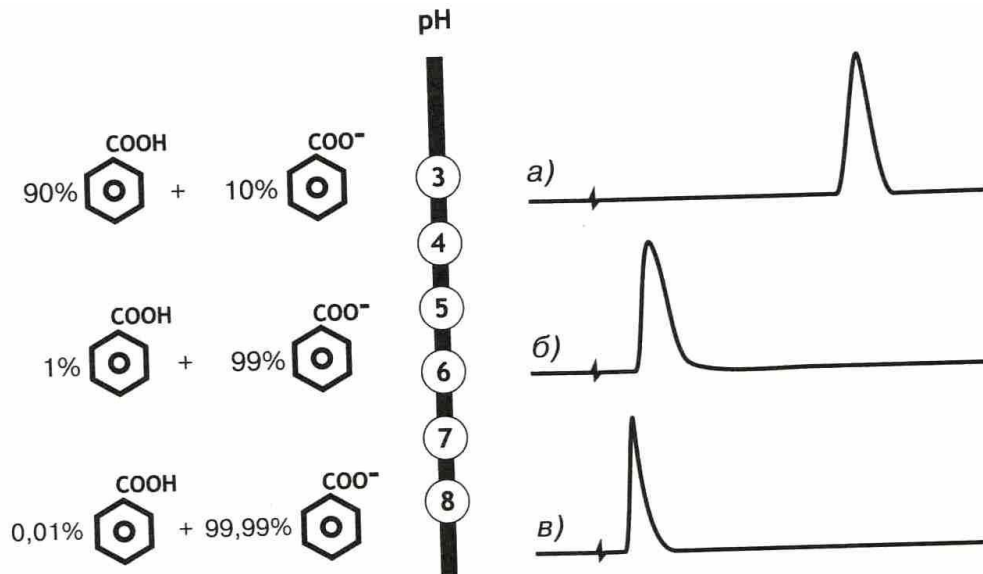
Вид зависимости удерживания от концентрации добавки в элюенте

Удерживание ионных соединений на обращенной фазе.

Органические кислоты



При $pH = pKa$ [молекулярная форма]
=
[ионная форма]



В ОФ ВЭЖХ аналиты предпочтительно переводить в молекулярную форму.

$pH = 2.5$ достаточно для ОФ хроматографирования большинства органических кислот (используют H_3PO_4)

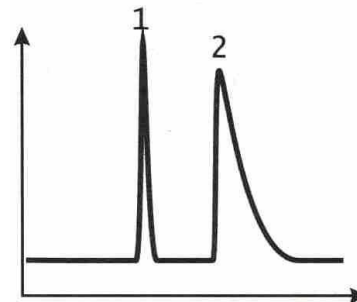
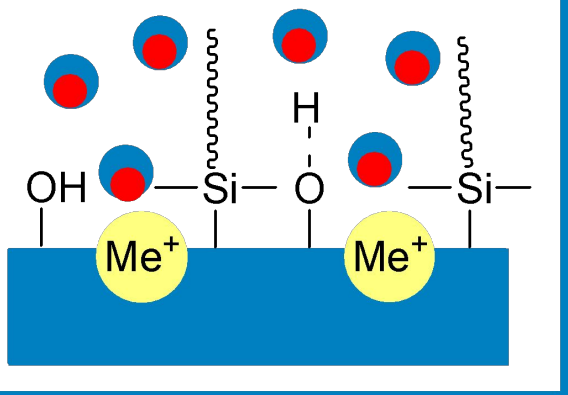
Равновесие форм бензойной кислоты в водном растворе при различных pH. Вид хроматограммы бензойной кислоты в зависимости от pH водной основы элюента

Удержание ионных соединений на обращенной фазе.

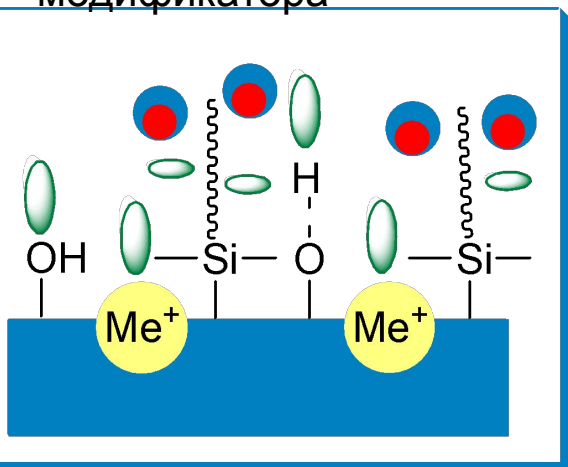
Органические основания

Схема действия модификатора:

Органические основания в ОФ ВЭЖХ разделяются в виде ионных форм

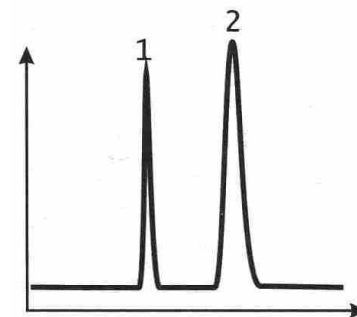


А) без модификатора



● основное ионное соединение
● модификатор (ТЭА)

Содержание модификатора (ТЭА) в элюенте (1-2%)



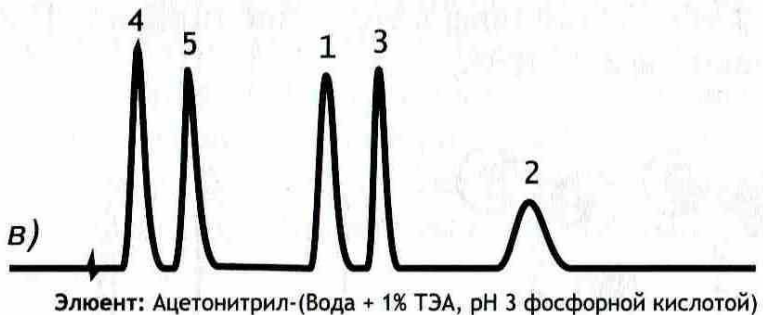
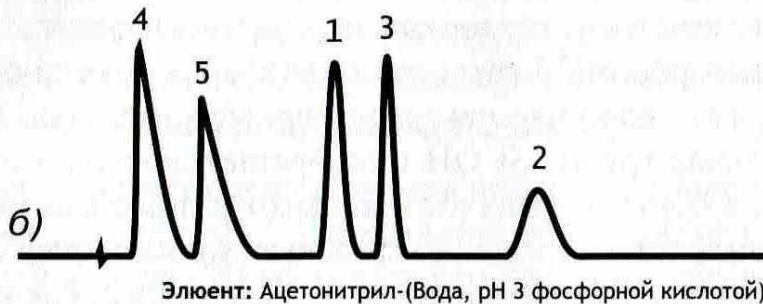
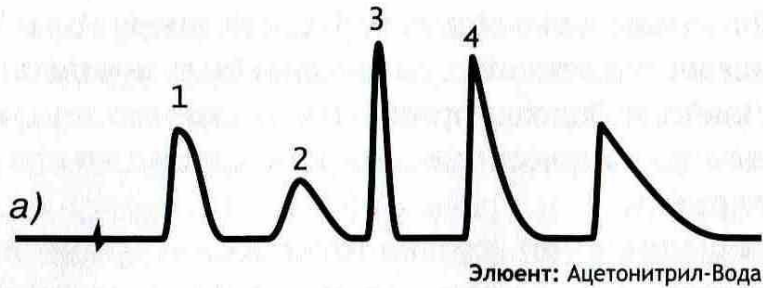
1 – неионное соединение
2 – основное ионное соединение

Б) с модификатором

Удерживание ионных соединений на обращенной фазе. Смесь нейтральных соединений, органических кислот и оснований

Изменение ОФ хроматограммы смеси нейтральных и ионных соединений в зависимости от состава водной фазы

- 1,2 – органические кислоты
- 4,5 - органические основания
- 3 - неионное соединение



Уникальная ОФ система:
элюент органический
растворитель (1% водный р-р ТЭА, pH 2,5 фосфорной кислотой)

Наиболее распространенные ОФ элюенты, применяемые с С18 силикагелем

Объект анализа	Элюент
Фруктовые орг. кислоты (щавелевая, винная, аскорбиновая, молочная, уксусная, лимонная)	25 мМ (миллимоль/литр) водн. р-р KH_2PO_4 , рН 2 фосфорной кислотой
Водорастворимые витамины (никотиновая кислота, никотинамид, пиридоксин, кофеин, тиамин, биотин, рибофлавин)	Ацетонитрил-(10 мМ водн. р-р гептилсульфоната Na с 1% ТЭА, рН 2.5 фосфорной кислотой) 10:90
Природные алкалоиды (скополамин, атропин, бруцин)	Ацетонитрил-(вода, рН 2.5 фосфорной кислотой) 20:80
Фармпрепараты (парацетамол, кофеин, салициловая кислота, ацетилсалициловая кислота), консерванты и подсластители (сахарин, аспартам, бензойная кислота, сорбиновая кислота)	Ацетонитрил-(1% водн. р-р ТЭА, рН 2.5 фосфорной кислотой) 20:80
Пиридины и аналины	Ацетонитрил-(1% водн. р-р ТЭА, рН 3.5 фосфорной кислотой) 50:50
Фармпрепараты (трициклические антидепрессанты)	Ацетонитрил-(1% водн. р-р ТЭА, рН 3.5 фосфорной кислотой) 60:40

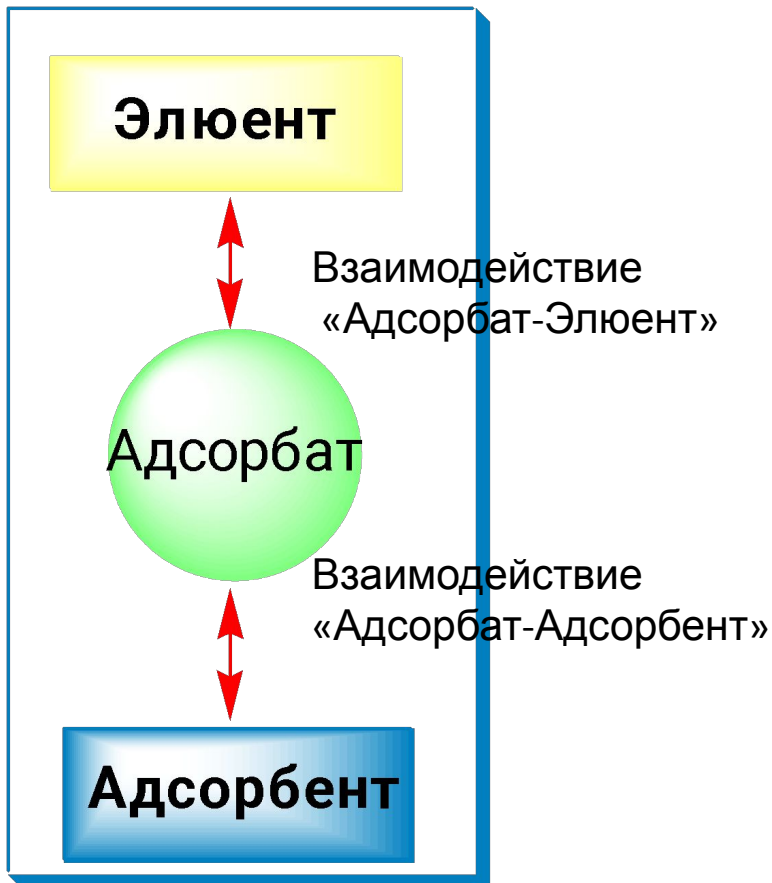
Принцип «Поддержать и отпустить»

ЖХ:

Удерживание =

Взаимодействие «А-А» -

Взаимодействие «А-Э»



ГХ:

Удерживание =

Взаимодействие «А-А»

