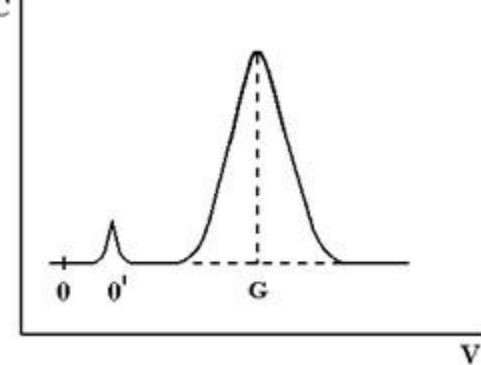
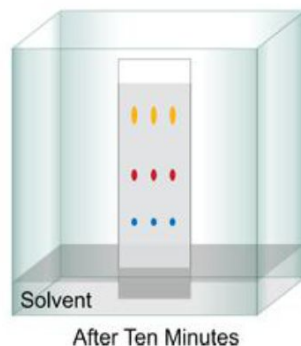
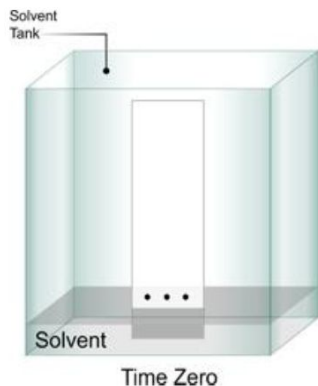
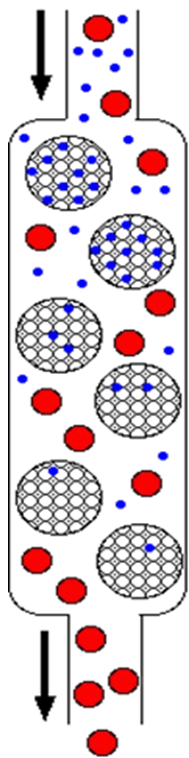




Хроматографические методы анализа

Основные положения хроматографии



ХРОМАТОГРАФИЯ

относится к 20 выдающимся открытиям XX века, которые в наибольшей степени преобразовали науку и определили уровень развития техники, промышленности, цивилизации

- ☐ самый распространенный и совершенный метод разделения смесей атомов, изотопов, молекул, всех типов изомерных молекул, включая и оптические изомеры, макромолекул (синтетических полимеров и биополимеров), ионов, устойчивых свободных радикалов, комплексов, ассоциатов, микрочастиц
- ☐ уникальный метод качественного и количественного анализа сложных многокомпонентных смесей
- ☐ самостоятельное научное направление и важный физико-химический метод исследования и измерения
- ☐ препаративный и промышленный метод выделения веществ в чистом виде
- ☐ мощная отрасль научного приборостроения

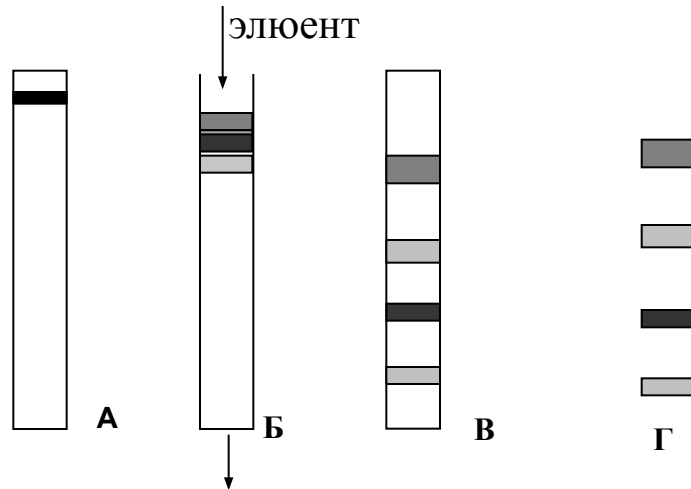
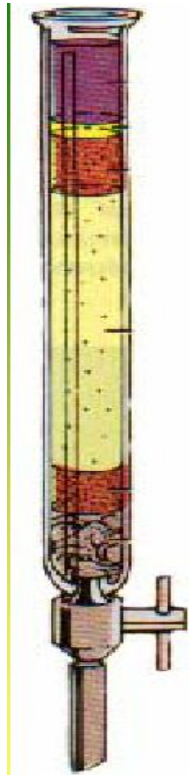
Ни один аналитический метод не может конкурировать с хроматографией по универсальности применения и эффективности разделения самых сложных многокомпонентных смесей

**более 1000 индивидуальных
компонентов в смесях**

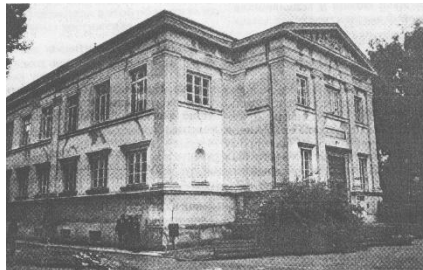
**до 2000 белков в биологических
объектах**

**расшифровка нуклеотидной последовательности ДНК и завершение
работ по программе "Геном человека"**

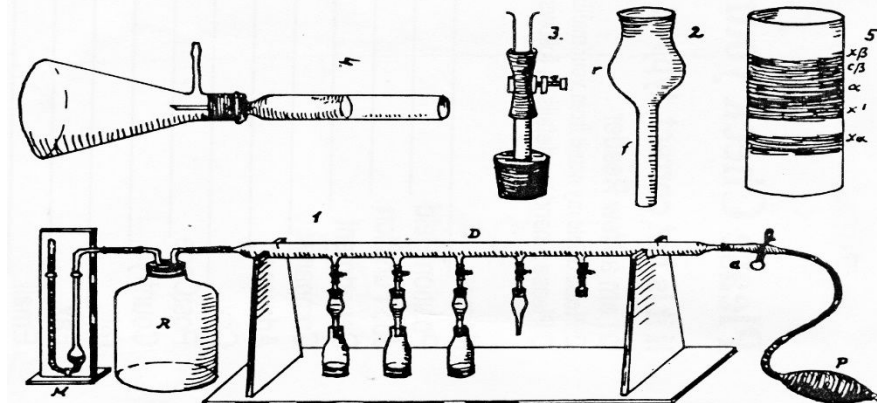
Михаил Семенович Цвет (1872 -1919)



Разделение хлорофилла
(1903)



Доктор Бугаев
М.С. Цвет



Аппаратура Цвета

История хроматографического анализа

- **1903** – первый доклад М.С.Цвета о разделении хлорофилла;
- **1931** – признание приоритета Цвета как создателя хроматографии в целом и адсорбционно-хроматографического анализа в частности;
- **1937** - ионообменная хроматография (Г.Шваб, США);
- **1938** - тонкослойная хроматография (Н.А.Измайлов, М.С. Шрайбер, СССР);
- **1941** - жидкостная распределительная хроматография как метод анализа смесей аминокислот (А.Мартин, Р.Синдж, Англия);
- **1944** - бумажная хроматография (А.Мартин, Р.Синдж, Англия);
- **1945** - первые публикации по газоадсорбционной хроматографии;
- **1952** - А.Джеймс и А.Мартин создали газожидкостную хроматографию и предложили первую теорию разделения («теорию тарелок»);
- **1953** - построен и применен в анализе первый газовый хроматограф.

История хроматографического анализа

(продолжение)

- **1956** - теория размывания хроматографических пиков (Я. Ван Деемтер, А.Клинкенберг, Голландия);
- **1956** - капиллярная газовая хроматография (М.Голэй, Франция);
- **1960-е годы** - массовый выпуск газовых хроматографов, препаративная хроматография, хромато-масс-спектрометрия;
- **1966-1971** - первые жидкостные хроматографы высокого давления (Ш.Хорват, США, Г.Киркланд, Англия). Развитие метода ВЭЖХ;
- **1975** - ионная хроматография (Х.Смолл, Т.Стивенс и В. Бауман, США);
- **1980-е годы** - флюидная (сверхкритическая) хроматография;
- **1990-е годы** – базы данных и системы компьютерной

История хроматографического анализа

- Основателем метода хроматографического разделения компонентов смесей веществ считается русский ботаник М. С. Цвет (*Tswett*).
- В 1903 г. он с помощью хроматографического метода сумел разделить сложную смесь растительных пигментов на несколько окрашенных компонентов.
- С этой целью он измельчал растения и смешивал полученную зеленую кашицу с петролейным эфиром. Конечную петролейно-эфирную смесь зеленого цвета он вводил в стеклянную колонку, заполненную карбонатом кальция (известью), и по каплям добавлял петролейный эфир, обеспечивая тем самым непрерывный ток подвижной фазы через колонку. В последней исходная смесь зеленого цвета распределялась на отдельные зоны, окрашенные в зеленый и оранжевый цвета (хлорофилл и каротин).
- Цвет дал своему методу название «хроматография», что означает «записывание с помощью цвета».
- Сначала этот метод разделения применяли преимущественно к липофильным соединениям (обладающим сродством к жирам, жирорастворимым).
- Со временем задачи, стоящие перед химией и биологией, изменились. Наибольшее распространение стали получать работы, направленные на исследование белков, аминокислот и сахаров.

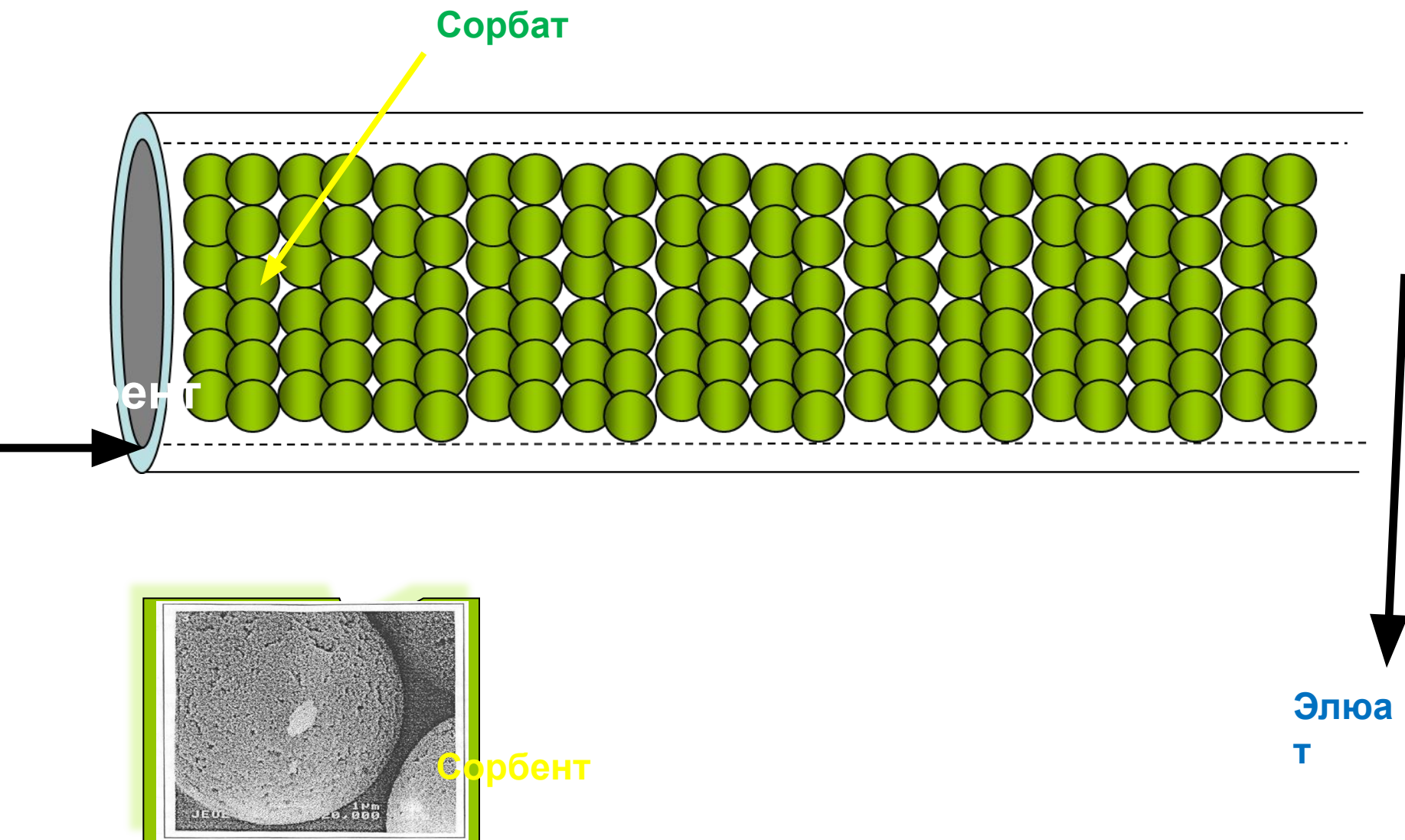
История хроматографического анализа

- Однако разработанное Цветом оборудование или обычные растворители не позволяли добиться оптимального разделения таких гидрофильных соединений.
- В 1941-1943 гг. Мартин (*Martin*), Герден (*Gorden*) и Линге (*Lyng*) провели серию опытов по разделению аминокислот. В колонку, заполненную силикагелем и предварительно насыщенную водой, они вводили пробу, компоненты которой требовалось разделить. Опыты привели к тому, что при обработке белковой смеси таким способом были выделены различные аминокислоты. За свою новаторскую работу Мартин и Линге в 1952 г. получили Нобелевскую премию по химии.
- Со временем приемы и техника выполнения хроматографического анализа были усовершенствованы. В 1949 г. был сконструирован первый в мире газовый хроматограф (Мартин и Джеймс (*James*)).
- В 1956 г. Е. Сталь (*Stahl*) опубликовал первые работы, где описал свои опыты разделения компонентов с помощью ТСХ.
- С 1970-х гг. резко возрос интерес к ВЭЖХ, который в наши дни используется практически в любой аналитической лаборатории.
- Хроматография относится к наиболее современным методам анализа и идентификации соединений общей аналитической химии и находит широкое применение в фармацевтической промышленности и нефтехимии. Этот метод разделения компонентов используют в клиниках, научно-исследовательских учреждениях, пищевой и парфюмерно-косметической промышленности для подтверждения подлинности компонентов, а также в криминалистике.

Основные принципы хроматографии

- В основе хроматографического анализа лежит **разделение компонентов смеси**.
- Практически во всех хроматографических методах речь идет о чисто *физическом* методе разделения компонентов. Это означает, что в процессе хроматографии компоненты смеси **не претерпевают химических превращений**.
- После хроматографического разделения компонентов пробы можно осуществить их идентификацию, определить количественное содержание каждого компонента смеси, а также выделить отдельные компоненты в небольших количествах.
- Во всех методах хроматографического анализа каждый анализируемый компонент смеси распределяется между **стационарной (неподвижной)** и **мобильной (подвижной) фазами**.
- В ТСХ и ВЭЖХ в качестве подвижной фазы используются смеси растворителей, в ГХ подвижной фазой является газ («газ-носитель»).
- В качестве неподвижной фазы в колоночной хроматографии (КХ) может использоваться либо жидкость, либо твердое вещество.
- В ТСХ неподвижная фаза (твердое вещество) наносится тонким слоем на стеклянную пластинку или алюминиевую фольгу.

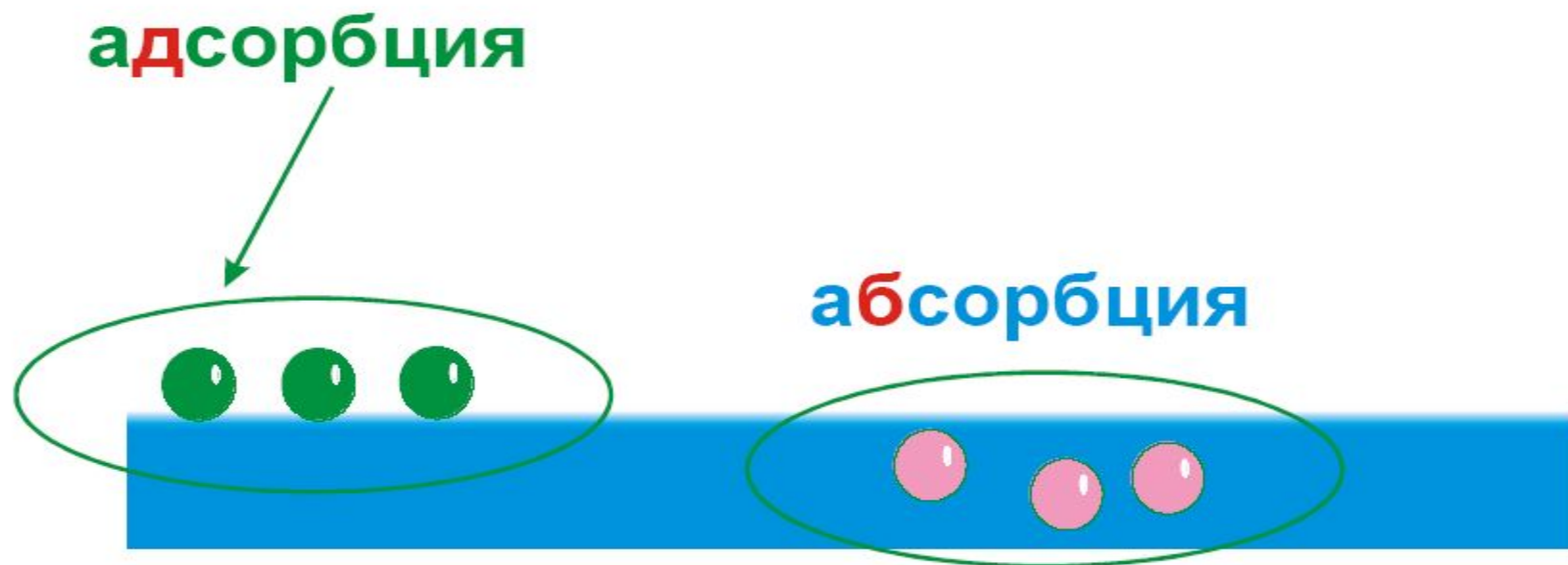
Процесс разделения



Основные принципы хроматографии

Хроматография – это метод разделения и анализа смесей, основанный на многократном перераспределении компонентов смеси между двумя фазами при прохождении подвижной фазы (ПФ) через неподвижную (НФ) при условии не смешивания этих фаз друг с другом.

Метод хроматографии предложил русский ученый-ботаник М.С.Цвет, который впервые в 1903 г. применил явление **адсорбции** для анализа зеленой части хлорофилловых пигментов листьев



Основные принципы хроматографии

В ходе хроматографического процесса подвижная фаза перемещается вдоль неподвижной, не смешиваясь с ней.

Разделение компонентов основывается:

- на различной степени **адсорбции** анализируемых компонентов **неподвижной фазой** и **различной их растворимости в подвижной фазе** (**адсорбционная хроматография**) или
- **неодинаковом распределении** компонентов между фазами — наподобие того, что наблюдается в случае жидкостно-жидкостной экстракции.

В опытах Цвета в качестве **неподвижной фазы**, **заполняющей колонку**, был использован карбонат кальция.

Петролейный эфир, который пропускали через колонку, представлял собой **подвижную фазу**.

Основные принципы хроматографии

- НФ чаще всего помещают в колонку (стеклянную или металлическую трубку), и компоненты анализируемой смеси вместе с ПФ перемещаются вдоль колонки
- В процессе хроматографирования устанавливается динамическое равновесие между ПФ и НФ
- Компоненты часть времени находятся в НФ, часть – в ПФ
- Молекулы разных компонентов разделяемой смеси обладают различной адсорбируемостью или растворимостью, так что средняя скорость передвижения их по колонке различна
- Одни компоненты остаются в верхнем слое сорбента, другие, с меньшей адсорбируемостью, оказываются в нижней части колонки, некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой
- Так достигается разделение компонентов
- **Хроматография – динамический метод, связанный с многократным повторением сорбционных и десорбционных процессов, так как разделение происходит в потоке подвижной фазы**
- Это обеспечивает эффективность хроматографического метода по сравнению с методами сорбции в статических условиях

Основные принципы хроматографии

На распределение анализируемых компонентов в процессе хроматографии можно оказывать целенаправленное воздействие. Прежде всего, это:

- выбор неподвижной фазы;
- выбор подвижной фазы;
- температура;
- расход подвижной фазы.

Обеспечение оптимальных условий проведения хроматографического анализа гарантирует более полное разделение компонентов, что важно помнить при разработке любого нового метода.

Основные принципы хроматографии

В основу классификации хроматографических методов положены следующие признаки:

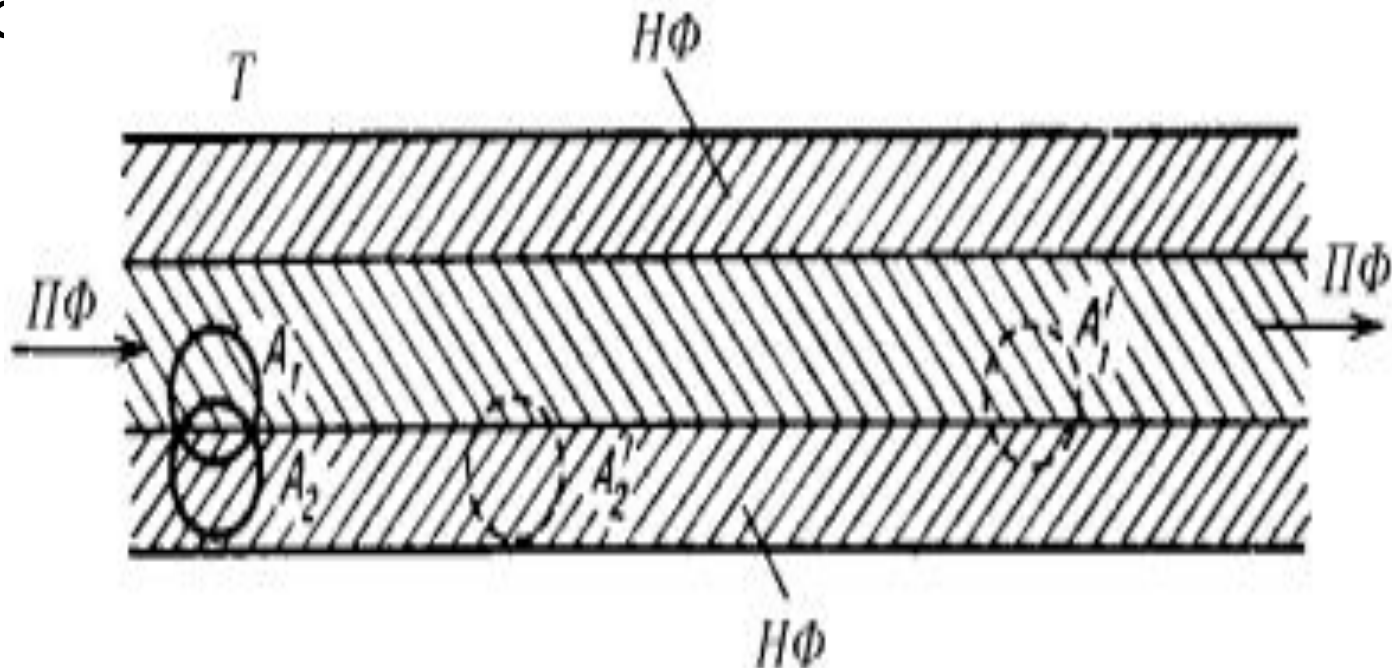
- агрегатное состояние фаз
- механизм взаимодействия сорбент – сорбат
- способы проведения хроматографического анализа
- аппаратное оформление (техника выполнения) процесса хроматографирования
- цель хроматографирования

Основные принципы хроматографии

Классификация по механизму взаимодействия сорбента и сорбата

По механизму взаимодействия сорбента и сорбата можно выделить несколько видов хроматографии:

- **адсорбционная** (НФ – Твердая) основана на различии в адсорбируемости веществ твердым сорб



Основные принципы хроматографии

Классификация по механизму взаимодействия

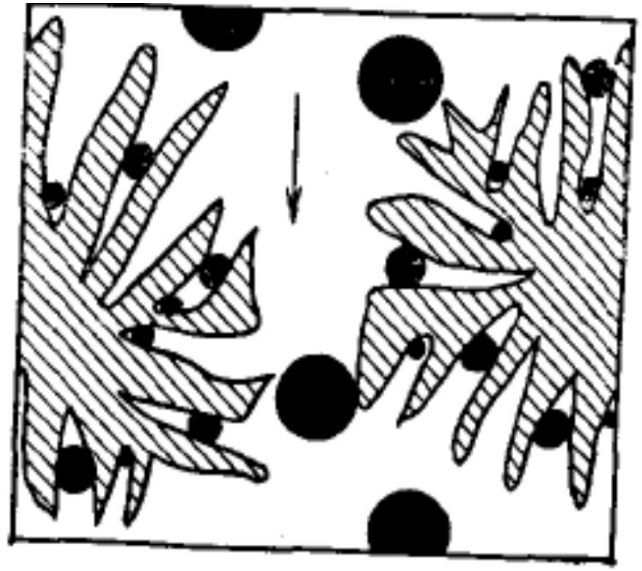
сорбента и сорбата

- **распределительная** (НФ – Жидкая) основана на различной растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (ГЖХ) или на различной растворимости веществ в подвижной и неподвижной фазах (жидкостная хроматография)
- **ионообменная хроматография** – на разной способности веществ к обмену между ионами разделяемой смеси и подвижными ионами сорбента

Основные принципы хроматографии

Классификация по механизму взаимодействия сорбента и сорбата

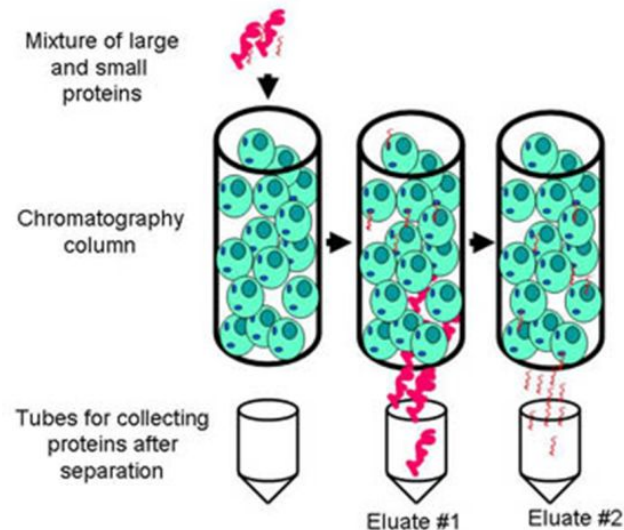
- **ЭКСКЛЮЗИОННАЯ** (гель-хроматография, молекулярно-ситовой анализ) – основана на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ. **НФ – растворитель – находится в порах сорбента.** Небольшие молекулы попадают в поры и удерживаются там, большие молекулы не могут проникнуть в поры и вымываются из колонки ПФ



Основные принципы хроматографии

Классификация по механизму взаимодействия сорбента и сорбата

- **аффинная** – основана на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов (например, антитело и антиген, фермент и ингибитор, гормон и рецептор и др.)



Классификация по механизму взаимодействия весьма условна: ее используют в том случае, если известен доминирующий механизм; часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам

Основные принципы хроматографии

Классификация по технике выполнения

По технике выполнения выделяют:

- **колоночную** хроматографию, когда разделение проводится в специальных колонках
- **плоскостную** хроматографию, когда разделение проводится на специальной бумаге (бумажная хроматография) или в тонком слое сорбента (*тонкослойная хроматография*)

В колоночной хроматографии используют **насадочные** и **капиллярные колонки**.

Насадочную колонку заполняют сорбентом (насадкой), а внутреннюю стенку капиллярной колонки покрывают пленкой жидкости или пылью адсорбента

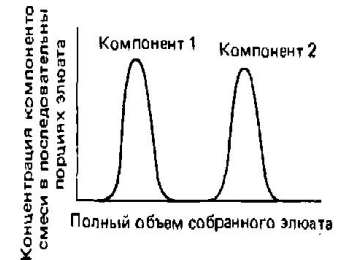
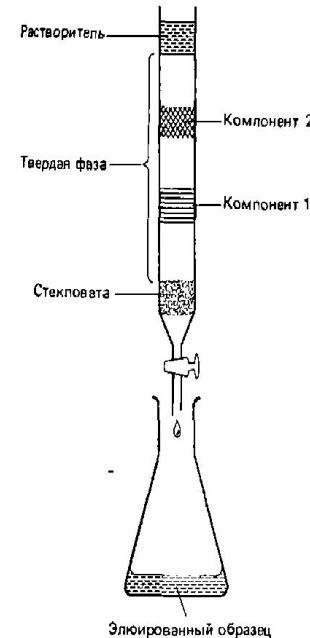
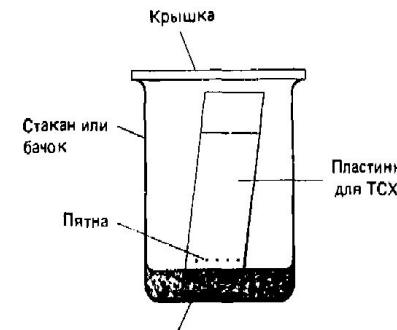


Рис. 6.42. Пики элюирования (идеализированные)



Основные принципы хроматографии

Классификация по цели проведения

- В зависимости от **цели проведения** хроматографического процесса различают
- **аналитическую** хроматографию (качественный и количественный анализ)
- **препаративную** хроматографию (для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей)
- **промышленную** (производственную) хроматографию для автоматического управления процессом (при этом целевой продукт из колонки поступает в датчик)

Классификация по целям и задачам

[Цели хроматографии

Аналитическая
Препаративная
Промышленная



Основные принципы хроматографии

Классификация по способам проведения

Классификация **по способам проведения анализа** подразделяет хроматографию на три вида:

- фронтальный
- проявительный
- элюэнтная (вытеснительный)

Фронтальная хроматография

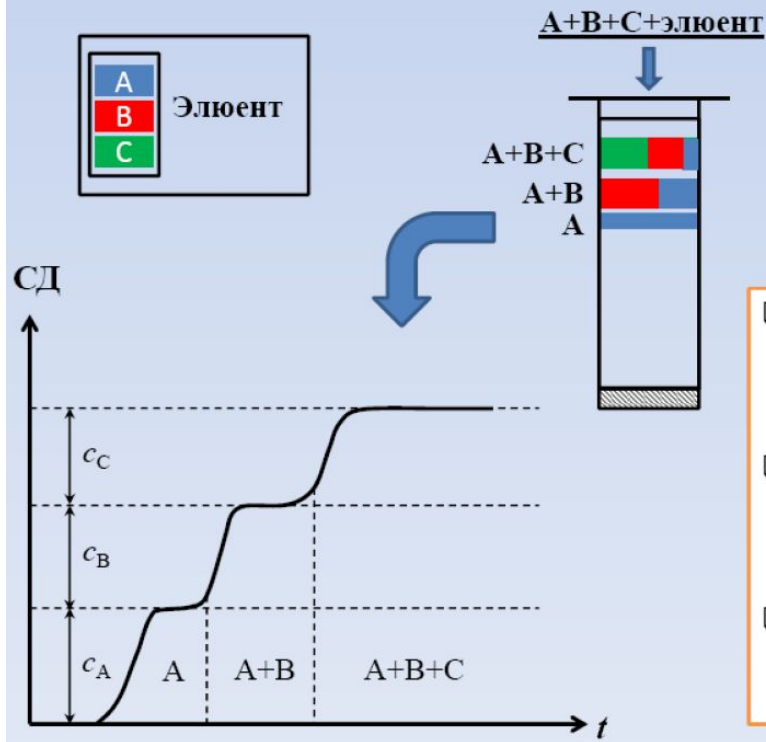
- Через хроматографическую колонку с сорбентом *непрерывным потоком* пропускают раствор или газовую смесь исследуемых веществ, сорбируемость которых увеличивается в ряду $A < B < C$ Соответственно этому компоненты располагаются в колонке
- Однако они разделяются не полностью. В чистом виде можно выделить лишь часть наименее сорбирующегося компонента; он движется вдоль слоя сорбента впереди остальных
- За зоной компонента А следует в непосредственном контакте зона, содержащая смесь компонентов А и В. Третья зона содержит смесь первого, второго и третьего компонентов
- В некоторый момент времени сорбент насыщается, и наступает «проскок», т.е. из колонки начинают выходить компоненты в соответствии с их сорбируемостью

Фронтальная хроматография

Фронтальная хроматография (ФХ)

Наиболее проста в выполнении

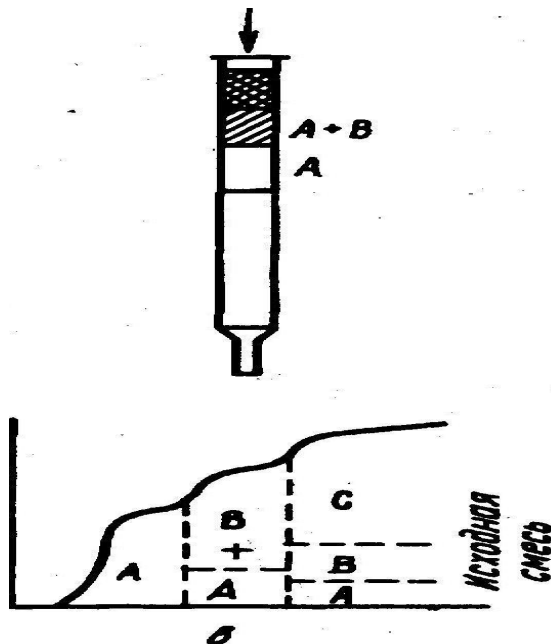
сорбируемость веществ увеличивается в ряду: $A < B < C$



- ☐ Метод не нашел широкого применения в анализе, т.к. не дает полного разделения смеси
- ☐ Метод эффективен для очистки веществ от примесей, если они сорбируются лучше, чем основной компонент
- ☐ Метод применяется при изучении изотерм сорбции из растворов

Фронтальная хроматография

Схема разделения и
выходная кривая
фронтального
метода



Если на выходе из колонки фиксировать концентрацию вещества в ПФ, полученная выходная кривая будет иметь форму ступенчатой кривой

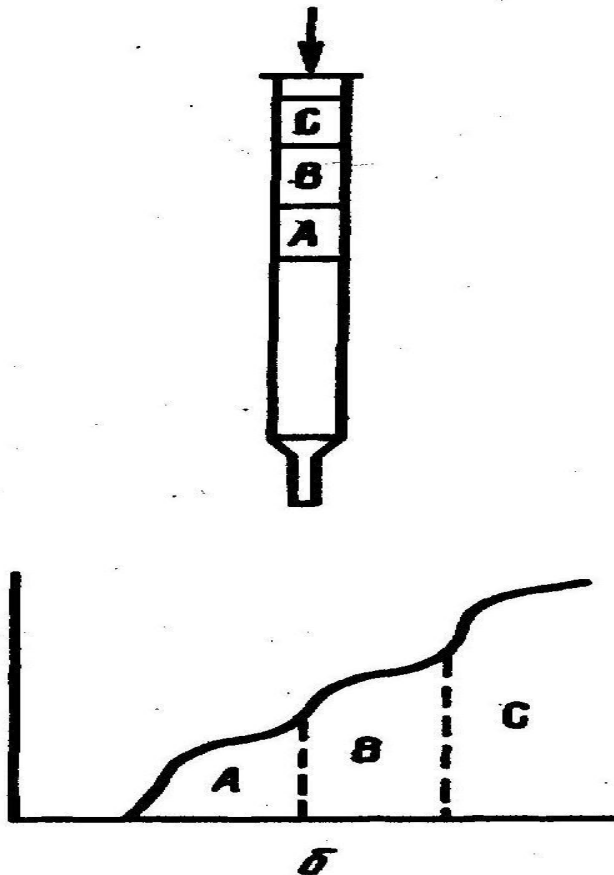
Для разделения метод используется мало

Применим для:

- очистки, умягчение воды
- очистка воздуха от ОВ в противогазах
- очистка лекарственных веществ
- концентрирование ценных примесей в сточных водах

Вытеснительная хроматография

Схема разделения и выходная кривая вытеснительного метода



- После введения порции исследуемой смеси колонку промывают подвижной фазой, к которой добавлено вещество (вытеснитель), обладающее большей сорбируемостью, чем любое из компонентов смеси:

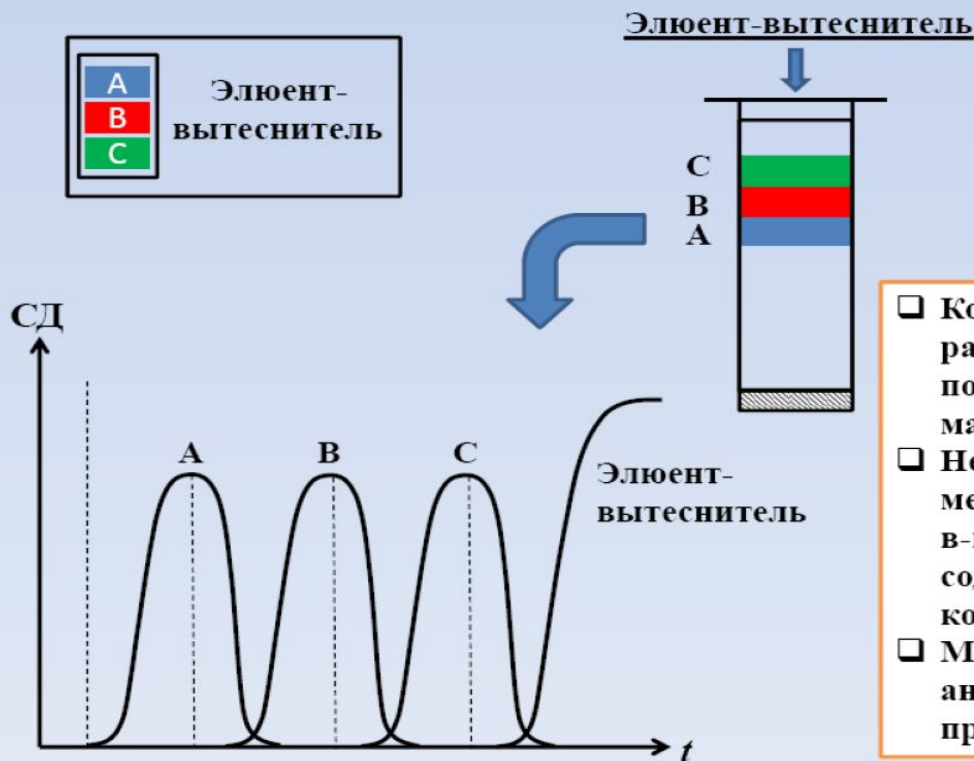
$$A < B < C < D$$

- По мере продвижения по колонке элюент вытесняет вещество *C*, которое в свою очередь вытесняет вещество *B* и т.д.
- Разделяемые вещества и на колонке, и в элюате располагаются последовательно друг за другом
- Каждый из компонентов выделяется в чистом виде, но не количественно, так как зоны компонентов не разделены промежутками чистого сорбента**
- В аналитических целях метод не используется, т. к. невозможно количественно получить компоненты разделяемой смеси
- Для препаративных целей метод не потерял значения, так как высокоактивные и доступные адсорбенты (например, активированные угли) позволяют достигнуть высокой производительности
- Еще одно достоинство метода - зоны не размываются в отличие от проявительного анализа

Вытеснительная хроматография

Элюентная (проявительная) хроматография (ЭХ)

сорбируемость веществ увеличивается в ряду: $A < B < C$



- ☐ Компоненты смеси не разбавляются р-телем, поэтому их концентрации мало изменяется
- ☐ Недостаток – образование между зонами разделяемых в-в смешанной зоны, содержащей два компонента.
- ☐ Метод редко применяется в анализе, но используется в препаративных целях

Элюэнтная хроматография

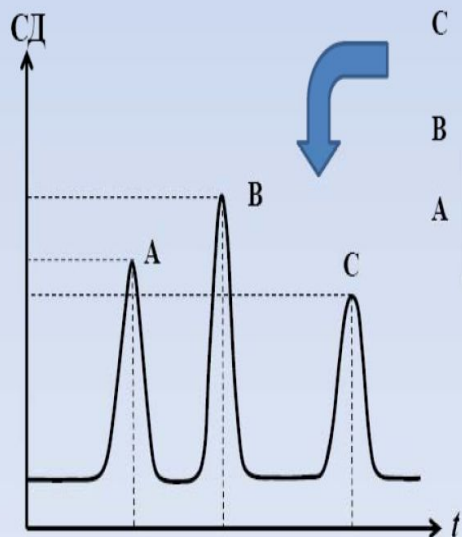
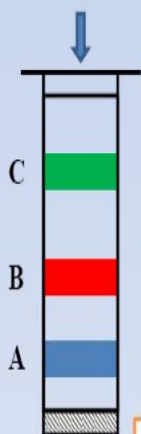
Элюэнтная (проявительная) хроматография (ЭХ)

сорбируемость веществ увеличивается в ряду: $A < B < C$



Элюент

Элюент



ЭХ позволяет разделять
многокомпонентные смеси

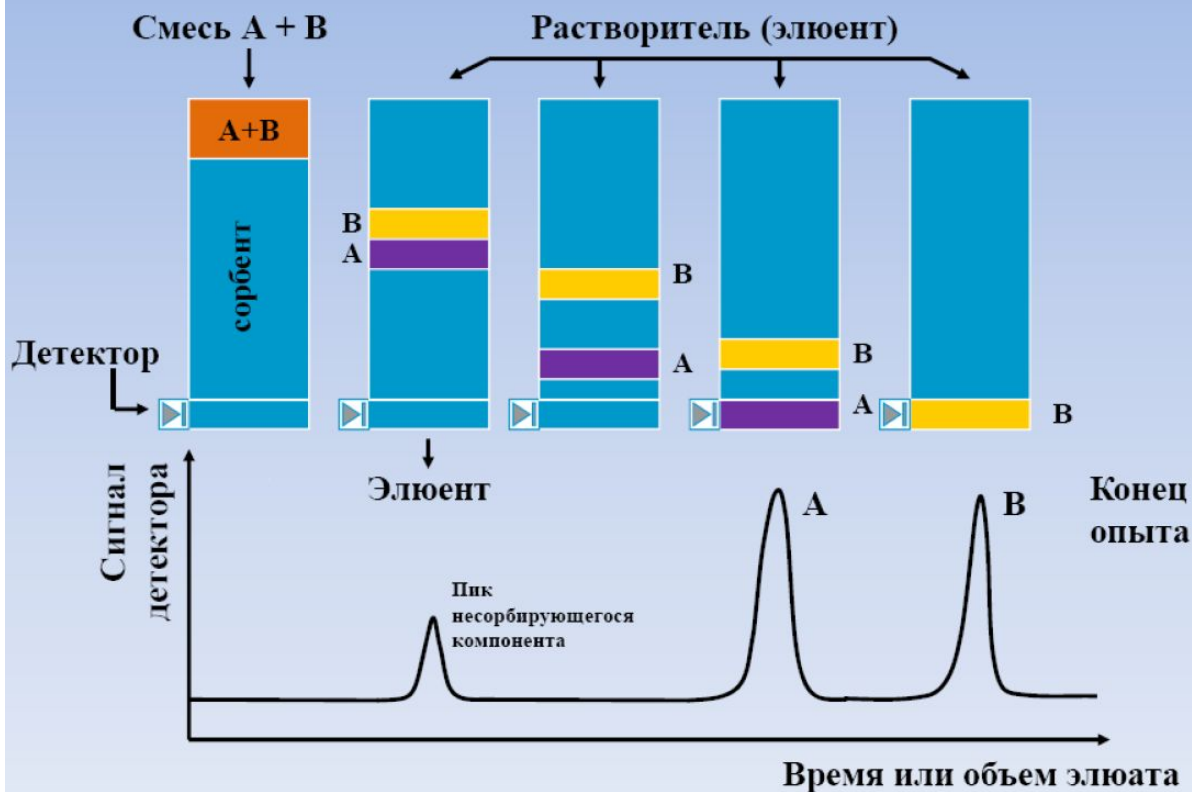
- ☐ Преимущество – практически полное разделение компонентов многокомпонентной смеси
- ☐ Недостаток – необходимость разбавления

- Хроматографическую колонку промывают растворителем или газом-носителем (*элюентом*), обладающим меньшей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ: $E < A < B < C$
- Затем в колонку вводят исследуемую смесь в виде *порции* раствора или газа и продолжают пропускать элюент
- Разделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями в соответствии с их сорбируемостью
- Выходная кривая в виде ряда пиков, число которых соответствует числу разделенных компонентов

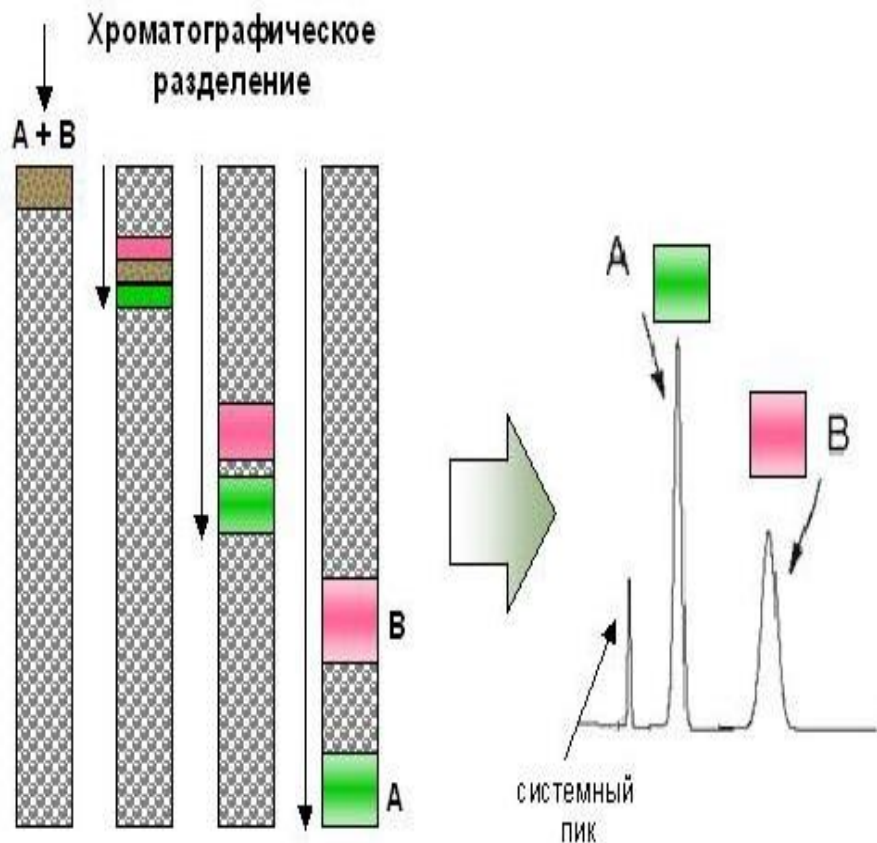
Элюэнтная хроматография

Схема элюэнтной хроматографии двухкомпонентной смеси

Процесс вымывания из колонки растворенных веществ пропусканьем чистого растворителя называется **элюированием**, а такой способ разделения – **элюэнтной хроматографией**



Элюэнтная хроматография



- Элюентный метод используют чаще всего, т.к.
 - по хроматограмме можно установить качественный и количественный состав смеси
 - он позволяет выделить компоненты в чистом виде и исследовать другими методами анализа

Классификация хроматографических методов

Признак	Виды
По агрегатному состоянию фаз	Газовая хроматография, жидкостная, флюидная и др.
По механизму межфазного распределения	распределительная, адсорбционная, ионообменная и др.
По способу проведения	колоночная, планарная (ТСХ, БХ)
По способу перемещения сорбата	элюентная, вытеснительная, фронтальная
По целям и задачам	аналитическая, препаративная

- Так, метод Цвета – жидкостная адсорбционная колоночная элюентная препаративная хроматография

ВИДЫ ХРОМАТОГРАФИИ

Классификация по фазовым состояниям

ПФ	НФ	Общее название	Варианты
Газ	Твердая	Газовая хроматография	Газоадсорбционная (ГАХ)
	Жидкая		Газожидкостная (ГЖХ)
Жидкость	Твердая	Жидкостная хроматография	Жидкостно-адсорбционная
	Жидкая		Жидкость-жидкостная
Флюид	Твердая	Флюидная хроматография	Флюидно-адсорбционная
	Жидкая		Флюидно-жидкостная

Метод	Принятая аббревиатура	Подвижная фаза	Неподвижная фаза	Физические основы процесса разделения
Тонкослойная хроматография (жидкостно-абсорбционная хроматография, жидкость/ твердое вещество)	ТСХ	Жидкость	Твердое Вещество	Адсорбция
Тонкослойная хроматография (жидкостно-жидкостная хроматография, жидкость/жидкость)	ТСХ	Жидкость	Жидкость	Распределение
Газовая хроматография (газожидкостная хроматография, газ/жидкость)	ГХ (ГЖХ)	Газ	Жидкость	Распределение
Газовая хроматография (газотвердофазная хроматография, газ/твердое вещество)	ГХ (ГАХ)	Газ	Твердое вещество	Адсорбция
Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостно-абсорбционная хроматография, жидкость/ твердое вещество)	ВЭЖХ	Жидкость	Твердое вещество	Адсорбция
Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостно-жидкостная хроматография, жидкость/жидкость)	ВЭЖХ	Жидкость	Жидкость	Распределение

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

- Как и при жидкостно-жидкостной экстракции, в распределительной хроматографии разделение анализируемых компонентов основывается на их различном распределении в подвижной и неподвижной фазах.
- В качестве неподвижной фазы при этом используется *жидкость*, которую наносят на материал-носитель в виде тонкой пленки.
- В качестве подвижной фазы используют смесь растворителей (жидкостно-жидкостная хроматография) или газ (газожидкостная хроматография).
- Обе фазы *не смешиваются между собой*.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

- Если в систему двух несмешивающихся фаз нанести пробу, то ее компоненты будут распределяться между двумя фазами.
- Если растворенное вещество в обеих фазах находится в одной и той же форме, то можно использовать **закон распределения Нернста**

$$K = \frac{C_{\text{фаза1}}}{C_{\text{фаза2}}},$$

- Где, K — коэффициент распределения Нернста;
 $C_{\text{фаза1}}$ — концентрация растворенного вещества в неподвижной фазе;
 $C_{\text{фаза2}}$ — концентрация растворенного вещества в подвижной фазе.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

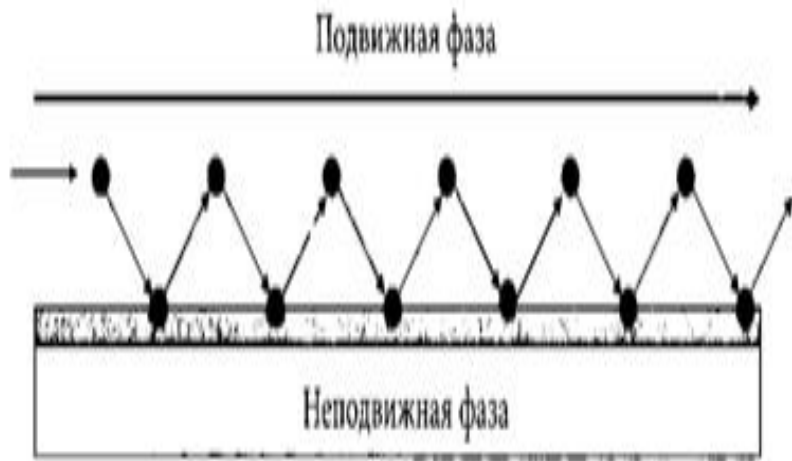


Рис. 2.1. Схема распределительного хроматографического процесса

- После многократного повторения процессов распределения («шагов») происходит разделение анализов при различии коэффициентов их распределения.
- Этот вид хроматографии можно представить в виде непрерывной жидкостно-жидкостной экстракции вдоль колонки.
- На рис. 2.1 схематически представлен процесс распределения компонентов.
- **Если значения коэффициентов распределения K различаются в достаточной степени, то возможность полного разделения компонентов зависит только от общей длины слоя неподвижной фазы (длины колонки).**

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

- Колонку наполняют **носителем (силикагель, окись алюминия, кизельгур и др.)**-веществом, индифферентным к хроматографируемым веществам и в отношении к применяемому растворителю.
- **Носитель удерживает на своей поверхности жидкую фазу — неподвижный растворитель.**
- Пробу хроматографируемого раствора, содержащего несколько компонентов, вносят в колонку и после того, как раствор впитается, промывают колонку подвижным растворителем.
- При этом происходит перераспределение веществ смеси между двумя несмешивающимися жидкими фазами.
- **Для** получения четкого **разделения смеси** необходимо, **чтобы компоненты ее не взаимодействовали с носителем** и **чтобы коэффициенты распределения их сильно различались между собой.** Только соблюдение этих условий дает возможность получать отдельные зоны чистых веществ при промывании колонки подвижным растворителем

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

Свойства подвижной и неподвижной фаз.

- При подборе подвижной и неподвижной фаз, а также носителя необходимо учитывать их свойства.
- Если носителем является гидрофильное вещество, то в качестве **неподвижного растворителя** применяют воду, а в качестве подвижного — органический растворитель.
- Например, для разделения смесей полярных веществ (**аминокислот**, производных пиридина и других) применяют полярный неподвижный растворитель — воду, который хорошо удерживается на таких гидрофильных носителях, как **силикагель**, **порошок целлюлозы** и др. **Подвижной фазой** в этом случае может служить насыщенный водный **раствор фенола**, **-бутанол** и др.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

- Если же **носитель — гидрофобное вещество**, то **неподвижным** растворителем должно быть **неполярное вещество** (масло, керосин, бензол, парафин), а **подвижным — полярные органические вещества и вода**.
- Разделение происходит вследствие различной растворимости компонентов в неподвижной фазе.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

- Распределительная хроматография — это вариант ВЭЖХ, в котором разделение смеси на компоненты осуществляется за счет различия их коэффициентов распределения между двумя несмешивающимися фазами: растворителем (подвижная фаза) и фазой на сорбенте (неподвижная фаза).
- Исторически первыми были сорбенты такого типа, которые получали нанесением жидких фаз (**оксидипропионитрила, парафинового масла и др.**) на пористые носители, аналогично тому, как готовили и готовят сорбенты для газожидкостной хроматографии (ГЖХ).
- Однако сразу же обнаружились и недостатки таких сорбентов, основным из которых было относительно быстрое смывание фазы с носителя. За счет этого количество фазы в колонке постепенно уменьшалось, времена удерживания также уменьшались, на начальном участке колонки появлялись не покрытые фазой центры адсорбции, вызывавшие образование хвостов пиков..

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

- Логическим оказалось привить химическими связями жидкую фазу к носителю таким образом, чтобы унос ее стал физически невозможен, т.е. превратить носитель и фазу в одно целое — в так называемый **привито-фазный сорбент**.
- Таковыми реагентами стали **алкилхлорсиланы** и их производные, позволившие по сходной технологии получать привито-фазные сорбенты разного типа и с разными как полярными, так и неполярными группами на поверхности.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

- Основным адсорбентом для молекулярной ВЭЖХ является силикагель. Он же во многих случаях является матрицей при создании модифицированных сорбентов.
- Разнообразные методы химического модифицирования позволяют закрепить на поверхности силикагеля практически любой класс химических соединений, любую функциональную группу или их сочетание.

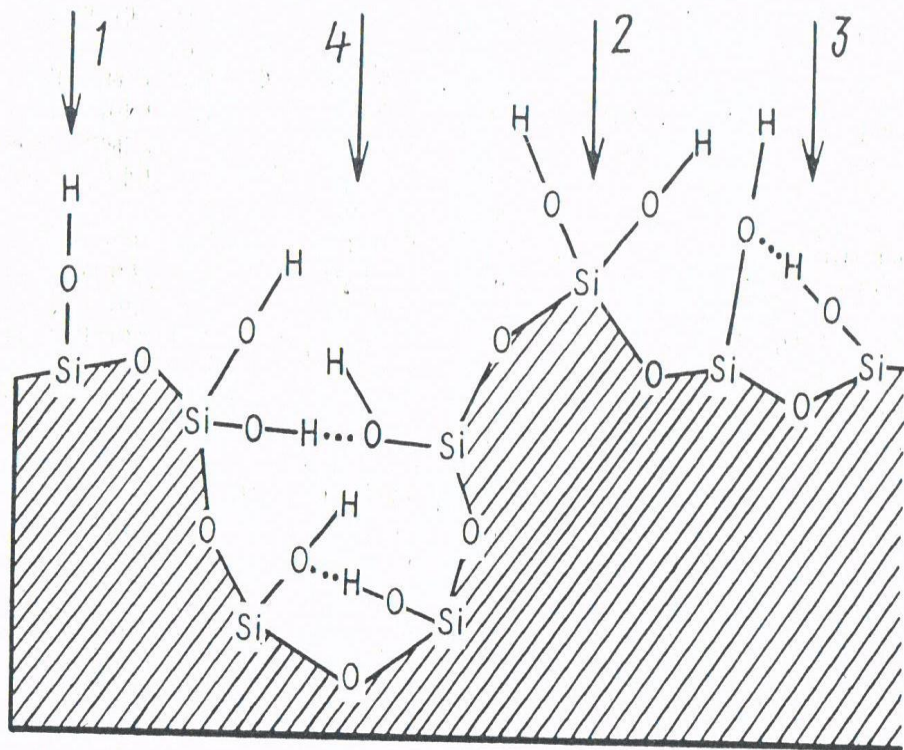


Рис. III.2. Схемы покрытия поверхности силикагеля различными типами силанольных групп

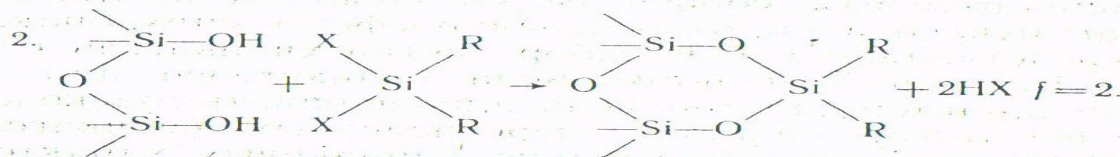
Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Распределительная хроматография

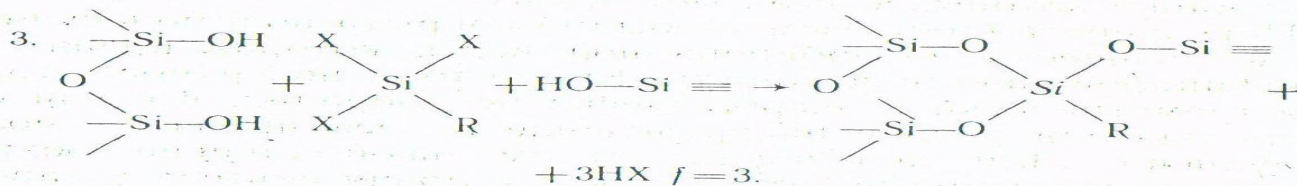
с монофункциональным модификатором



с дифункциональным модификатором



с трифункциональным модификатором



R — алкил, X — галоген.

- Наиболее вероятный механизм реакций взаимодействия силикагеля с модификатором различной функциональности следующий:

Нормально-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами

- Основными привитыми фазами **для нормально-фазной** распределительной хроматографии в настоящее время являются **нитрильная и аминная**.
- Каждая из них прививается с использованием соответствующего силана (**диметиламинопропилхлор** или **диметилцианпропилхлорсилана**).
- Нитрильная и аминная привитые фазы могут быть поэтому использованы в двух вариантах: для нормально-фазной (с неполярными элюентами) и обращенно-фазной (с полярными элюентами) распределительной ВЭЖХ.
- В качестве нормально-фазных сорбентов они работают, подобно силикагелю или оксиду алюминия, с теми же элюотропными рядами растворителей и близкими (но не идентичными) порядками элюирования соединений разных классов
- Достаточно широко применяют также еще одну привитую полярную фазу — так называемую «**диольную**», или просто «**диол**», которая содержит в составе привитой группы две гидроксильные группы.

Обращенно-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами

- Вариант распределительной хроматографии, в котором используют **сорбент с привитыми неполярными** (как правило, длинными **алкильными или алкилсилильными**) **группами** и **полярный растворитель**, например водный метанол, получил название **обращенно-фазной ВЭЖХ**.
- Этот не совсем удачный термин, указывающий на перемену полярности неподвижной и подвижной фаз на противоположные в данном варианте ВЭЖХ прижился и стал общепринятым, означая: **подвижная фаза полярна, неподвижная — неполярна**.
- В отличие от недостаточно удачного названия сам метод оказался настолько удачным, что в настоящее время является основным в ВЭЖХ.
- По общим оценкам, каждые два разделения из трех, появляющихся в литературе и используемых в практической работе, относятся к обращенно-фазной ВЭЖХ в ее разных вариантах, т.е. 60—70% работы в данное время проводят этим методом.
- В чем же причина такой популярности обращенно-фазной хроматографии, что на все остальные варианты ВЭЖХ (адсорбционную, распределительную нормально-фазную, ионообменную, эксклюзионную и другие) приходится менее одной

Обращенно-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами

- Причин таких несколько, и каждая сыграла роль в широком использовании метода обращенно-фазной ВЭЖХ.
- Были разработаны и быстро внедрены в производство сорбенты для этого метода, имеющие привитые алкилсилильные группы разной длины (от C_2 до C_{18} с прямой алкильной цепью, фенильной и дифенильной группами).
- Растворители, используемые для этого метода (ацетонитрил, метанол, вода, в меньшей мере — тетрагидрофуран), позволяют работать в широком УФ-диапазоне, так как они УФ-прозрачны со 190-210 (ТГФ — с 220) нм.
- Это позволяет применять наиболее популярный детектор — УФ-спектрофотометр как при 190-210 нм, где он детектирует неселективно, и поэтому приближается к универсальному детектору (анализ Сахаров, жиров, сложных эфиров, спиртов, олефинов), так и при любой длине волны, обеспечивающей селективное детектирование (например, витамина А при 325 нм).
- **Растворители**, используемые в обращенно-фазных разделениях, относительно легко растворяют практически все важнейшие группы веществ, находящихся в организме человека, биологических объектах, используемых в виде лекарственных препаратов, пестицидов, гербицидов широко используемых в органической химии, нефтехимии, биоорганической химии.

Обращенно-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами

- **Сорбенты в обращенно-фазной ВЭЖХ быстро приходят в равновесие с новыми растворителями и при изменении состава растворителя, что позволяет переходить от одной методики к другой с использованием одной и той же колонки, а также широко применять градиентное элюирование с быстрым восстановлением равновесия сорбента с исходным растворителем.**
- **Сорбенты дают возможность использовать растворители в широком диапазоне свойств, а также добавки разных типов (соли, кислоты и основания, ион-парные реагенты, органические модификаторы).**
- **Регенерация растворителей высокой чистоты может быть осуществлена с использованием четкой ректификации.**
- **Загрязненный сорбент в колонке может быть промыт и приведен снова в рабочее состояние при прокачивании через колонку растворителей, удаляющих загрязнения.**

Обращенно-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами

- В качестве растворителей для обращенно-фазной ВЭЖХ используют преимущественно **метанол и ацетонитрил**.
- Другие спирты, кроме метанола, используют редко, так как их вязкость значительно выше и при работе возникает слишком большое давление, а эффективность падает вследствие затрудненной диффузии в подвижной фазе.
- Ацетонитрил имеет ряд преимуществ перед метанолом. При хорошей очистке он лучше пропускает в ближнем ультрафиолетовом диапазоне (ниже 210 нм) и позволяет работать в смеси вода — ацетонитрил при 200 и даже 190 нм.
- Он обычно обладает лучшими растворяющими свойствами для проб, чем метанол.

Обращенно-фазная распределительная хроматография с привитыми фазами

- Наконец, не малую роль играет и то обстоятельство, что **метанол относится к группе особо опасных ядов**, находящихся на строгом контроле и учете, тогда как ацетонитрил к этой группе не относится.
- **К недостаткам ацетонитрила**, несколько ограничивающим его использование, относятся его довольно **высокая стоимость** (особенно высокочистых сортов, предназначенных для ВЭЖХ и УФ-спектроскопии), **некоторая токсичность, требующая предосторожностей при работе**, а также то, что его труднее, чем метанол, освободить от воды, так как он образует азеотропную смесь с водой.
- Это **затрудняет его регенерацию** из отработанного растворителя, что особенно важно при большом масштабе работы, например, при препаративной работе.

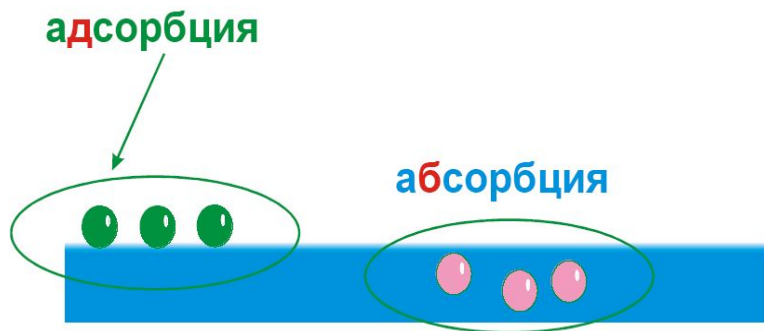
Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- При адсорбционной хроматографии *взаимодействие* между анализируемым соединением (аналитом), растворенным в элюенте, и твердым веществом (сорбентом) хроматографической колонки или пластинки *протекает на границе раздела фаз.*
- При этом анализируемый компонент удерживается на поверхности неподвижной фазы

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография



- Сорбцию используют для разделения и концентрирования веществ
- Процесс сорбции можно вести в статических и динамических условиях
- Динамический вариант положен в основу хроматографических методов разделения

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- Физическая адсорбция компонентов в большинстве случаев протекает за счет сил **вандерваальсового взаимодействия**.
- При использовании в качестве адсорбентов **оксида алюминия** или **силикагеля** адсорбция компонентов может основываться на **диполь-дипольном взаимодействии** между полярной поверхностью адсорбента и полярными участками адсорбированных анализируемых молекул.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- Неподвижная фаза в адсорбционной хроматографии имеет и «внутреннюю поверхность», т. е. поры. В зависимости от количества и размеров пор увеличивается и общее количество адсорбированного анализа.
- Другим параметром, влияющим на адсорбцию веществ, является температура. При более низкой подвижности частиц (т. е. при пониженной температуре) анализируемый компонент активнее адсорбируется на поверхности.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- **Десорбцию** (отделение) анализируемых компонентов из неподвижной фазы можно осуществить с помощью повышения температуры (ВЭЖХ и ГХ) либо изменением состава растворителя (ВЭЖХ).
- Между актами адсорбции и десорбции устанавливается равновесие, которое соответствует разделяемой смеси.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- Если требуется разделить несколько анализируемых компонентов (основная задача хроматографии), то **обязательным условием этого является различие соотношения их адсорбции/десорбции.** Адсорбция/десорбция компонентов может быть описана следующим уравне

$$\gamma = \frac{V_{\text{подв}}}{1 + \frac{V_{\text{неподв}}}{V_{\text{подв}}} K}, \quad (2.2)$$

- где γ — скорость перемещения анализируемого компонента;
- $v_{\text{подв}}$ — скорость потока подвижной фазы;
- $V_{\text{неподв}}$ — объем неподвижной фазы;
- $V_{\text{подв}}$ — объем подвижной фазы;
- K — постоянная адсорбции вещества.

Если разделяемые аналиты имеют различные постоянные адсорбции K , то при соответствующей длине колонки (неподвижной фазы) можно осуществить разделение

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- Метод адсорбционной хроматографии преимущественно применяется в ТСХ и ВЭЖХ.
- Результаты любого хроматографического разделения компонентов предста

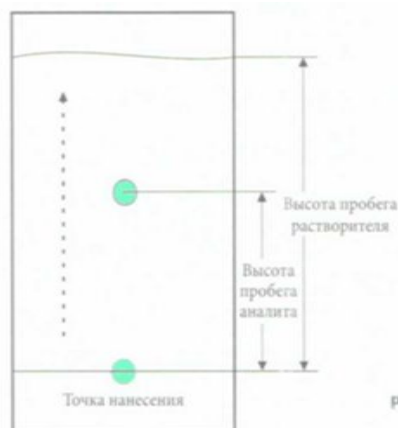
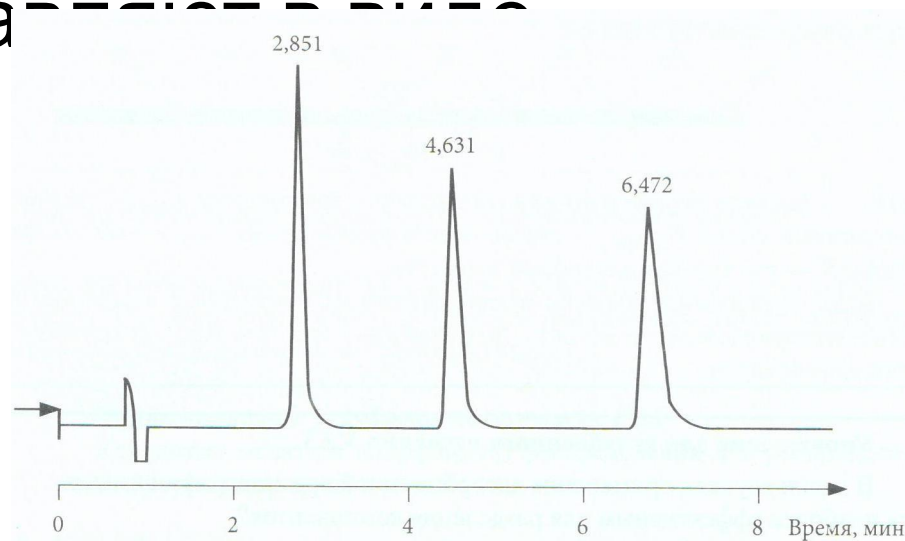


Рис. 2.22. Параметры, используемые для расчета значений R_f



Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

Типы жидкостной адсорбционной хроматографии

(хроматография разделения по фазе)

- 1. Нормально фазовая хроматография (**НФХ**) или прямая (полярный адсорбент, неполярный элюэнт).
- 2. Обращенно-фазовая хроматография (**ОФХ**) (неполярный адсорбент, полярный элюэнт)

	НФХ	ОФХ
Полярность адсорбента	полярная	неполярная
Полярность растворителя	Неполярный до средней полярности	От средней полярности до полярного
Порядок элюирования в колонке	Первым выходит неполярное вещество	Первым выходит полярное вещество
Увеличение полярности растворителя	Время удерживания уменьшается	Время удерживания увеличивается

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- В качестве адсорбентов в адсорбционно-жидкостной хроматографии применяют органические и неорганические вещества: сахарозу, инулин, молочный сахар, целлюлозу, крахмал, активированную окись алюминия, карбонат кальция, силикагель, окиси металлов, активированный уголь, некоторые природные минералы и другие.
- Таким образом, ЖАХ на силикагеле - **нормально-фазовая хроматография**, в которой неподвижная фаза более полярна, чем подвижная.
- для формирования ПФ в этом варианте хроматографии в качестве растворителей применяют неполярные алифатические углеводороды или дихлорметан, а в качестве модифицирующих добавок - спирты, простые ациклические и циклические эфиры, сложные эфиры, галогеналканы.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- Главные преимущества **силикагеля**- относительная инертность, большая адсорбционная емкость, он легко поддается модификации: различные его типы значительно отличаются по размерам пор и суммарной удельной поверхности, измеренным в стандартных условиях.
- Поверхность силикагеля также можно модифицировать или покрыть пропитывающей средой.
- В настоящее время известно более ста сортов (различных модификаций) силикагеля, а также ряд силикагелей с химически модифицированной поверхностью, **однако выбор элюента в ЖАХ играет более значимую роль, чем выбор неподвижной фазы.**
- Меняя природу ПФ, можно в широких пределах изменять объемы удерживания и селективность разделения на одних и тех же адсорбентах.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- В колоночной жидкостной хроматографии в качестве неподвижных фаз широкое распространение получили **оксид алюминия и силикагель**.
- Реже применяют **синтетический силикат магния (флоризил), оксид магния, пористые стекла, пористые полимеры и неполярный адсорбент - активированный уголь**.
- **С появлением ВЭЖХ силикагель стал основной полярной неподвижной фазой.**
- Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) - колоночная хроматография, в которой применяют сорбенты с размером частиц 3-10 мкм, в результате чего резко возрастает эффективность хроматографического разделения.

Взаимодействие разделяемых компонентов при хроматографии

Адсорбционная хроматография

- **Полярность сорбата** определяется числом и характером полярных функциональных групп.
- Ниже приведены ряды функциональных групп органических веществ, расположенных в порядке возрастания адсорбируемости на силикагеле:
 - $-\text{CH}_2- < -\text{CH}_3 < -\text{CH}=\text{CH}- < -\text{S}-\text{R} < -\text{OR} < \text{NO}_2 < -\text{NH}-$ (карбазол) $< -\text{C}(=\text{O})\text{OR} < -\text{C}(=\text{O})\text{H} < -\text{C}(=\text{O})\text{R} < -\text{OH} < -\text{NH}_2 < -\text{C}(=\text{O})\text{OH}.$
 - $\text{F}- < \text{Cl}- < \text{Br}- < \text{I}- < -\text{OR} < -\text{NR}_2 < -\text{NO}_2 < -\text{C}(=\text{O})\text{OR} < -\text{C}(=\text{O})\text{R} < -\text{C}(=\text{O})\text{H} < -\text{NH}_2 < -\text{NH}-\text{C}(=\text{O})\text{R} < -\text{OH} < -\text{C}(=\text{O})\text{OH} < -\text{SO}_3\text{H}.$

Ионная хроматография

- В ионообменной хроматографии **метод основан на притяжении противоположно заряженных частиц**, где **неподвижная твердая фаза** обычно состоит из **сорбента («смолы»)** с **ковалентно связанными анионами или катионами**.
- **Противоположно заряженные ионы растворенного вещества в жидкой, подвижной фазе электростатическими силами притягиваются к ионам сорбента**.
- Адсорбированные компоненты образца затем элюируют с применением солевого градиента, который постепенно десорбирует молекулы образца в порядке увеличения электростатического взаимодействия, с ионами в колонке.

Ионная хроматография

- Ионообменная хроматография характерна высоким разрешением, большой емкостью и **не заменима при разделении высокополярных веществ**, которые без перевода в производные не могут быть проанализированы методом ГЖХ.
- К таким соединениям относятся **аминокислоты, пептиды, сахара. нуклеиновые кислоты, полинуклеотиды и другие заряженные молекулы.**

Ионная хроматография

Область применения

Ионообменную хроматографию широко применяют:

- в медицине,
- биологии, биохимии,
- для контроля окружающей среды,
- при анализе содержания лекарств и их метаболитов в крови и моче.
- для анализа ядохимикатов в пищевом сырье,
- для разделения неорганических соединений, в том числе радиоизотопов, лантаноидов, актиноидов и др.
- анализ биополимеров (белков, нуклеиновых кислот и др.), на который обычно затрачивали часы или дни, с помощью ионообменной хроматографии проводят за 20–40 мин с лучшим разделением.

Ионная хроматография

- Разделение конкретных веществ зависит в первую очередь от выбора наиболее подходящего сорбента и подвижной фазы.
- В качестве неподвижных фаз в ионообменной хроматографии применяют ионообменные смолы и силикагели с привитыми ионогенными группами.

Существует два типа ионообменников – **катионообменники и анионообменники**.

- **Катионообменники** содержат отрицательно заряженные группы и притягивают положительно заряженные частицы – катионы.
- Такие ионообменники называют также **кислотными ионообменниками**, поскольку их отрицательный заряд возникает в результате ионизации групп с кислотными свойствами.
- **Анионообменники** содержат положительно заряженные группы, которые притягивают отрицательно заряженные частицы – анионы. По аналогии, для них применяется термин **основные ионообменники**, поскольку их положительный заряд обычно является результатом присоединения протона к

ИОНИТЫ ДЕЛЯТ НА:

- * катиониты, способные к катионному обмену;
- * аниониты способные к анионному обмену;
- * ионообменные вещества, обладающие амфотерными свойствами, т. е. способные и к анионному, и к катионному обмену.



Ионная хроматография

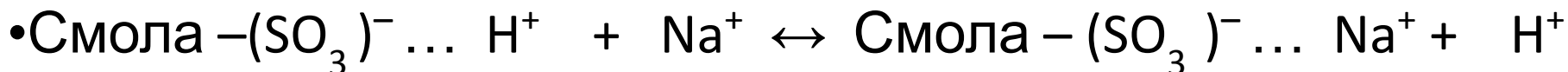
Механизм ионного обмена принято рассматривать из следующих этапов:

- *диффузия иона к поверхности ионообменника (в гомогенных растворах происходит быстро)*
- *диффузия иона сквозь матрицу ионообменника к участку обмена (зависит от количества перекрестных сшивок в матрице и концентрации раствора).*

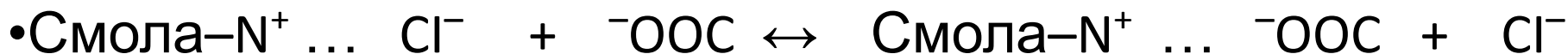
Считается, что данная стадия определяет скорость ионного обмена в целом.

- *Обмен ионов происходит мгновенно и представляет собой равновесный процесс.*

Катионообменник



Анионообменник



Ионная хроматография

- Чем больше заряд на обмениваемой молекуле, тем прочнее она связывается с ионообменником и тем труднее ее вытеснить другими ионами.
- Сохранение электронейтральности сорбента обеспечивается наличием способных к ионному обмену противоионов, расположенных в непосредственной близости к поверхности.
- Ион введенного образца, взаимодействуя с фиксированным зарядом сорбента, обменивается с противоионом.
- Вещества, имеющие разное сродство к фиксированному зарядом, разделяются на анионитах или на катионитах.
- Аниониты имеют на поверхности положительно заряженные группы и сорбируют из подвижной фазы анионы.
- Катиониты соответственно содержат группы с отрицательным зарядом, взаимодействующие с катионами.

Ионная хроматография

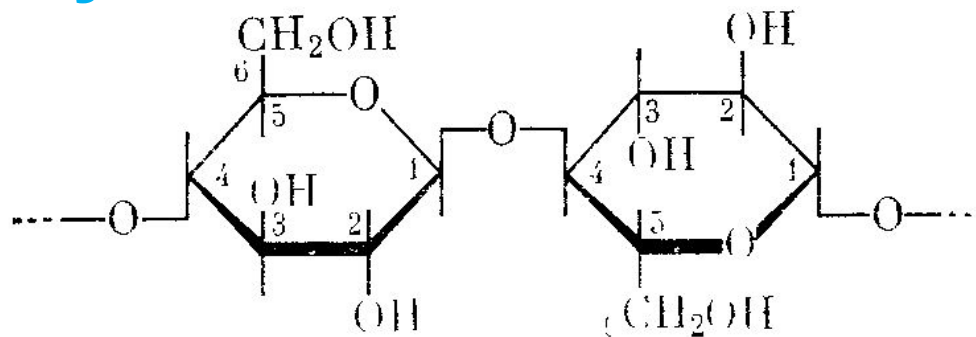
- В качестве подвижной фазы используют водные растворы солей кислот, оснований и растворители типа жидкого аммиака, т.е. системы растворителей, имеющих высокое значение диэлектрической проницаемости и большую тенденцию ионизировать соединения.
- Обычно работают с буферными растворами, позволяющими регулировать значение pH.
- При хроматографическом разделении ионы анализируемого вещества конкурируют с ионами, содержащимися в элюенте, стремясь вступить во взаимодействие с противоположно заряженными группами ионообменника.
- Отсюда следует, что **ионообменную хроматографию можно применять для разделения любых соединений, которые могут быть каким-либо образом ионизированы.**

Ионная хроматография

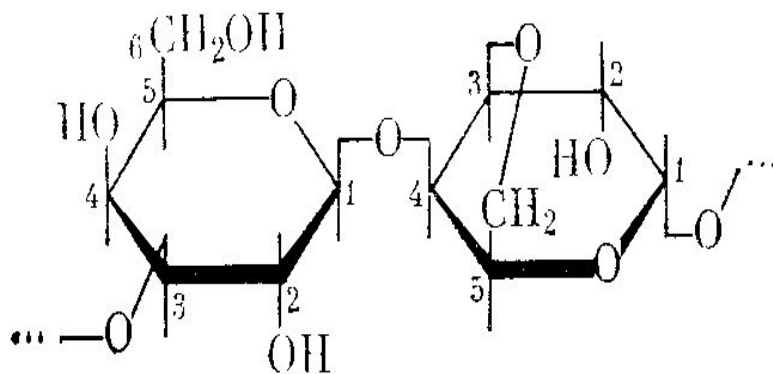
- Естественно, что ионы образца, слабо взаимодействующие с ионообменником, при этой конкуренции будут слабо удерживаться на колонке и первыми вымываются с нее и, наоборот, более сильно удерживаемые ионы будут элюировать из колонки последними.
- Обычно возникают вторичные взаимодействия неионной природы за счет адсорбции или водородных связей образца с неионной частью матрицы или за счет ограниченной растворимости образца в подвижной фазе.
- Трудно выделить «классическую» ионообменную хроматографию в «чистом» виде, и поэтому некоторые хроматографисты исходят из эмпирических, а не теоретических закономерностей при ионообменной хроматографии.

Ионная хроматография

- Среди матриц можно назвать полистирол, целлюлозу, агарозу.



Структура целлюлозы



Структура агарозы

Ионная хроматография

- Функциональные ионизируемые группы **сульфонатная ($-\text{SO}_3^-$)** и **четвертичная аммонийная ($-\text{N}^+\text{R}_3$)** – **сильные ионообменники**, поскольку они полностью ионизированы при стандартных рабочих значениях pH ;
- **карбоксильная ($-\text{COO}^-$)** группа и **диэтиламмоний ($-\text{HN}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)** – **слабые ионообменники**, поскольку они ионизированы лишь в узком диапазоне pH .

Ионная хроматография

Свойства некоторых важных ионообменников

Функциональная группа	Типы ионообменника	Интервал pH
$\begin{array}{c} \backslash \\ -\text{N}^+ - \text{CH}_3 \\ / \end{array}$	Четвертичный амин (сильный анион)	1-11
$-\text{NH}_2$	Первичный амин (слабый анион)	1-8
$\begin{array}{c} \backslash \\ \text{NH} \\ / \end{array}$	Вторичный амин (слабый анион)	1-7
$\begin{array}{c} \backslash \\ -\text{N} \\ / \end{array}$	Третичный амин (слабый анион)	1-6
$-\text{COO}^-$	Угловая кислота (слабый катион)	6-14
$-\text{SO}_3^-$	Сульфокислота (сильный катион)	1—14

Ионная хроматография

- Применяемые в ВЭЖХ ионообменные смолы представляют собой в основном **сополимеры стирола и дивинилбензола**. Обычно добавляют 8–12% последнего.
- Чем больше содержание **дивинилбензола**, тем больше жесткость и прочность полимера, выше емкость и, как правило, селективность и тем меньше набухаемость. Диаметр частиц таких сорбентов составляет от 5 до 25 мкм.
- Большинство ионообменников для ВЭЖХ стабильны до 60 °С., так, что разделение можно осуществлять при этой температуре: **с ростом температуры падает вязкость подвижной фазы и следовательно, увеличивается эффективность разделения**.
- Некоторые полимерные катионообменники выдерживают температуру и даже до 80 °С.

Ионная хроматография

Выбор подвижной фазы и условий разделения.

- Ионообменное, разделение обычно выполняют при применении водных растворов солей, которым придаются буферные свойства.
- Иногда добавляют в ПФ небольшое количество смешивающихся с водой органических растворителей – метанола, этанола, ацетонитрила, тетрагидрофурана.
- Сила и селективность растворителя зависят от типа и концентрации буферных ионов и других солей, от значения pH и от вида и концентрации добавленных органических растворителей.
- Удерживание в ионообменной хроматографии зависит от двух процессов: распределения образца между водной подвижной фазой и органической неподвижной и образования ионных пар (т.е. анионного или катионного обмена), причем последний процесс доминирует.

Ионная хроматография

- Сила электростатического взаимодействия заряженных ионизированных групп вещества с заряженными группами ионообменника влияет на распределение вещества между фазами. Некоторые гидрофобные соединения или вещества, способные образовывать водородные связи, могут взаимодействовать с материалом матрицы неспецифически.
- Степень удерживания образца снижается с увеличением ионной силы подвижной фазы и увеличивается с увеличением ионообменной емкости сорбента.
- **Ионная сила подвижной фазы возрастает при возрастании концентрации буфера и сохранении неизменным pH или при добавлении соли.**
- Важна также концентрация буферных растворов, так как в растворе наблюдается конкуренция между ионами образца и буфера.
- **Уменьшение концентрации буферного раствора увеличивает сродство смолы к образцу, что приводит к увеличению времени удерживания. Концентрация буферного раствора обычно находится от 0,001 до 6 моль/л, причем верхняя граница определяется растворимостью соли,** используемой в качестве буфера, а нижняя – самой буферной силой, так как в слабом буферном растворе нельзя контролировать уровень pH.
- **Сильных буферных растворов также следует избегать, так как**

Ионная хроматография

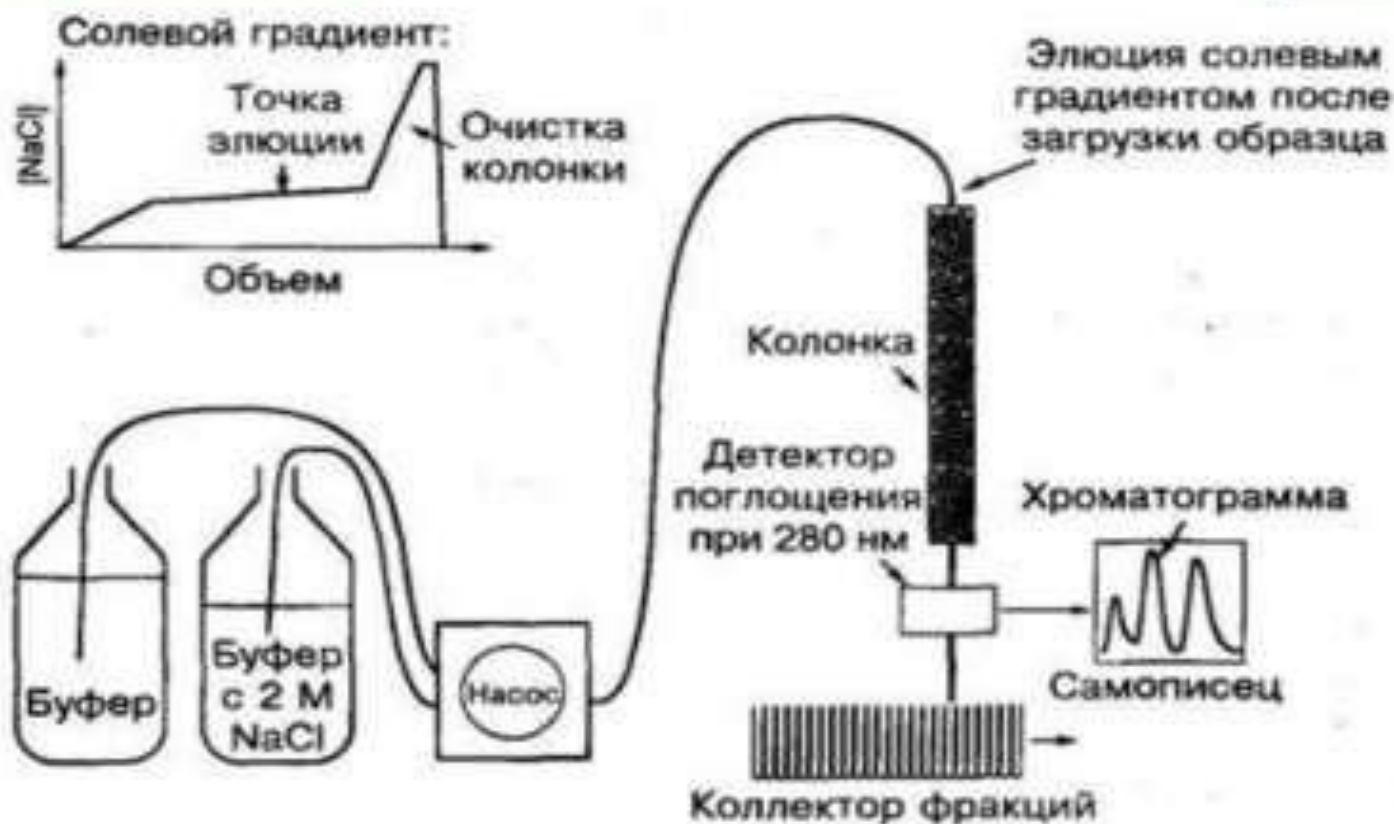
- В ионообменной хроматографии применяют следующие буферные растворы: **ацетатный, фосфатный, цитратный, формиатный, аммиачный, боратный.**
- Селективность разделения в ионообменной хроматографии зависит от концентрации и вида буферных ионов и органических растворителей, а также от pH среды.
- Биохимические пробы принято разделять при низких температурах, часто при 4 °С, хотя в современной ВЭЖХ при быстрых разделениях вероятность разрушения образца при 20–30 °С резко снижается.
- Повышение температуры может привести к снижению k' для всех компонентов образца, а снижение ионной силы подвижной фазы может привести к обратному явлению.
- Вводимые количества образца не должны превышать 5 % суммарной ионообменной емкости. Так, для соединений с молекулярной массой 200–500 предполагается введение около 50 мг пробы на 1 г полимерного сорбента.
- Желательно, чтобы вводимый объем образца не превышал $1/3$ объема первого интересующего пика.

Ионная хроматография

- Если исследуют смесь элементов разных групп периодической системы, то разделение при помощи элюирования растворами электролитов облегчается тем, что элементы разной валентности обладают различным сродством к иониту. Сорбируемость ионов возрастает от одновалентных к двух- и трехвалентным. Приблизительную закономерность сорбируемости ионов с одинаковой валентностью можно представить в виде «сорбционных рядов»:
- $\text{Cs}^+ > \text{Pb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+$; $\text{Ba}^{+2} > \text{Sr}^{+2} > \text{Ca}^{+2} > \text{Mg}^{+2}$;
 $\text{Zn}^{+2} > \text{Cu}^{+2} > \text{Ni}^{+2} > \text{Co}^{+2}$ и тд
- Эти ряды изменяются в зависимости от природы сорбента, хроматографируемых веществ, растворов, применяемых при элюировании, и внешних условий эксперимента.

Ионная хроматография

ТИПИЧНАЯ УСТАНОВКА ИОНООБМЕННОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ. ПОСЛЕ ЗАГРУЗКИ ОБРАЗЦА НАСОС СОЗДАЕТ СОЛЕВОЙ ГРАДИЕНТ ДЛЯ ЭЛЮЦИИ ОБРАЗЦА.



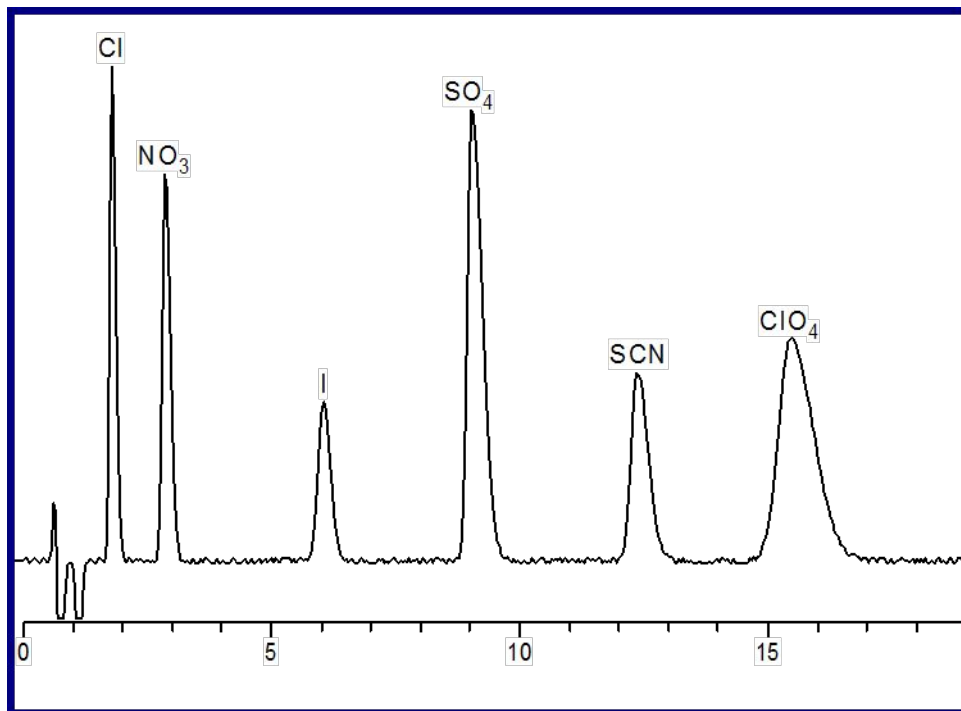
Ионная хроматография

СХЕМА ИОННОГО ХРОМАТОГРАФА



Анионообменник Силасорб-5 с нанесенным 6,10-ионеном.
Колонка: 50x3 мм.
Элюент: 0.3 мМ гидрофталат калия. Расход 1.0 мл/мин.
УФ-детектор ($\lambda=254$ нм).

- Весьма эффективный метод определения любых ионов.
- Лучший метод определения неорганических анионов.
- Чувствительность - 1-10 нг/мл (без дополнительного концентрирования).



Ионная хроматография

Колонки, применяемые в ионообменной хроматографии

- **Ионообменные колонки** бывают разнообразных типов. Колонки, используемые **в качественном анализе** неорганических веществ, представляют собой трубки длиной **100—120 мм, с внутренним диаметром 3—6 мм**. Перед использованием колонки нижний конец ее закрывают ватным тампоном.
- **Адсорбенты (в большинстве случаев для качественного анализа неорганических веществ используют «окись алюминия для хроматографии»)** помещают в колонку при помощи стеклянных воронок диаметром 30—50 мм, с оттянутым нижним концом. Адсорбент вносят в колонку сразу всей порцией, после чего слой его уплотняют на ручной центрифуге (75 об/мин) или вручную постукиванием о твердую поверхность
- После уплотнения адсорбент должен занимать приблизительно половину объема колонки.
- Окись алюминия вносят в колонку в сухом виде.
- Растворы в колонку вносят пипетками с оттянутыми капиллярными концами.
- Фильтраты собирают в пробирки, применяемые в качественном полумикрометодe.
- В литературе описаны автоматические коллекторы для сбора фракций фильтратов при хроматографическом анализе.

Ионная хроматография

Колонки, применяемые в ионообменной хроматографии

- Для ионообменной хроматографии в количественном анализе применяют в большинстве случаев **стеклянные колонки** высотой **200—300 мм** и **диаметром 10—20 мм**, имеющие в нижней части дренажное устройство (стеклянная пластинка с отверстиями) и кран для регулирования скорости вытекания жидкости.
- Колонкой может служить стеклянная трубка с оттянутым нижним концом (диаметр 5 мм), на который надевают резиновую трубку.
- Скорость протекания жидкости через колонку в этом случае регулируется винтовым зажимом на трубке. Колонкой может служить бюретка, применяемая в объемном анализе, емкостью 25, 50.
- Вместо стеклянной пластинки, удерживающей **слой зерен ионита**, применяют также стеклянную вату. Колонку закрепляют в металлическом штативе.

Ионная хроматография

Колонки, применяемые в ионообменной хроматографии

- В тех случаях, когда при анализе приходится **использовать фтористоводородную кислоту**, колонки изготавливают из пластмасс.
- Для регенерации и промывки ионита в колонке ее присоединяют к склянке с нижним тубусом, наполненной регенерирующим раствором. Скорость протекания жидкости через ионит регулируют винтовым зажимом.
- **Колонки заполняют ионитами во влажном состоянии.** Для этого сухой ионит помещают в стакан, заливают дистиллированной водой и оставляют стоять на 30 мин для набухания зерен, затем отмывают декантацией от пыли и постепенно переносят ионит в стеклянную колонку.
- В колонку помещают предварительно небольшое количество воды, чтобы предотвратить попадание пузырьков воздуха. Если в слой ионита попадают пузырьки воздуха, то образуются каналы, понижающие эффективность действия ионообменной колонки.

Аффинная хроматография

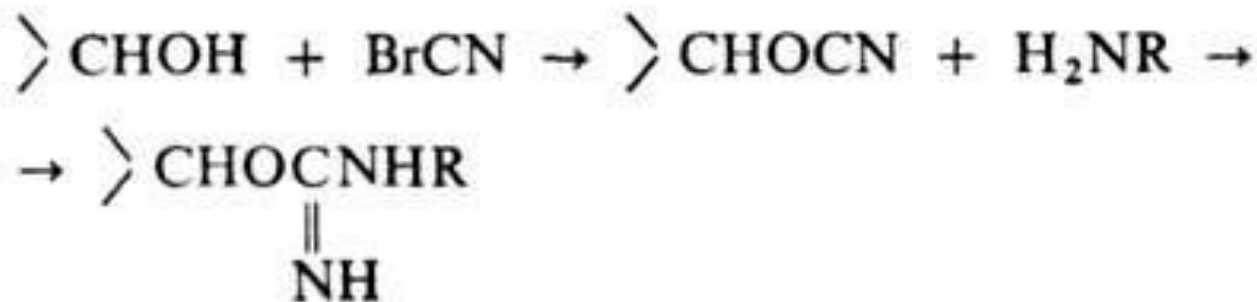
- Аффинная хроматография (от лат. affinis - родственный) (биоспецифическая. хроматография, хроматография по сродству), **метод очистки и разделения белков, основанный на их избирательном взаимодействии с лигандом, ковалентно связанным с инертным носителем.**
- В качестве лигандов используют соединения, взаимодействие которых с разделяемыми веществами основано на биологической функции последних.
- Так, **при разделении ферментов** (для чего преимущественно и применяется аффинная хроматография) **лигандами служат их субстраты, ингибиторы**

Аффинная хроматография

- Главная особенность, которая обуславливает высокую эффективность аффинной хроматографии, состоит в том, что **разделение основано на различии не физико-химических признаков молекулы (заряда, формы и размера), а специфически функциональных свойств, отличающих данный фермент от множества других.**

Аффинная хроматография

- **Неподвижная фаза в аффинной хроматографии** представляет собой специально получаемый сорбент, построенный обычно по схеме:
- **носитель - соединяющее звено ("ножка") - специфический лиганд.**
- Носителем служит чаще всего **сефарозапроизводное агарозы**, имеющее поперечные сшивки.
- Присоединение к ней лиганда или "ножки", содержащих, как правило, аминогруппу, осуществляется после активации сефарозы бромцианом:



Аффинная хроматография

- Содержание лиганда колеблется от 0,1 до 10 мкмоль на 1 г влажного сорбента.
- Сефароза, однако, малоустойчива к действию ряда химических веществ и микроорганизмов.
- Более стабильны макропористые неорганические носители (кремнезем, стекло) и органические полимеры.
- Если лиганд присоединяется непосредственно к носителю, эффективность специфического взаимодействия с ферментом заметно снижается вследствие пространственных затруднений.
- "Ножка", как правило, устраняет стерическое препятствия, отдаляя лиганд от носителя. Как и носитель, она должна быть инертной и не влиять на процессы в ходе аффинной хроматографии, чего, однако, не всегда удается достигнуть.
- Например, присоединение "ножки" по приведенной выше реакции приводит к образованию катионной группировки изомочевины, и сорбент приобретает свойства анионита.
- В качестве "ножки" используют обычно ди- и полиамины аминокислоты, пептиды, олигосахариды.

Аффинная хроматография

- Лигандами могут служить субстраты (например, крахмал или гликоген при разделении амилаз), однако их превращение в ходе аффинной хроматографии, катализируемое разделяемым ферментом, постоянно изменяет свойства сорбента. Поэтому, как правило, применяют аналоги субстратов, устойчивые к дальнейшему превращению, т.е. ингибиторы ферментов.
- Так, для выделения протеиназ используют нерасщепляемые ими пептиды D-аминокислот.
- Эффективны природные ингибиторы ферментов, например пепстатин - ингибитор аспартильных протеиназ.
- Иногда применяют лиганды, связывающие большие группы родственных ферментов (в частности, киназы и дегидрогеназы).
- Примеры таких "группоспецифических" лигандов - антрахиноновые красители, аналоги никотинамида дениндинуклеотида.
- Известны лиганды (например, производные фенилборной кислоты), имитирующие при взаимодействии с ферментом структуру переходного комплекса с субстратом. Такие лиганды эффективны при выделении сериновых гидролаз

Аффинная хроматография

- Разделение в аффинной хроматографии обычно проводят на хроматографических колонках;
- иногда разделяемую смесь помещают в сосуд с сорбентом и выдерживают до полного связывания исследуемого компонента. Затем сорбент (в колонке или сосуде) промывают буферным раствором для удаления несвязавшихся веществ, после чего десорбируют исследуемый компонент.
- Десорбция (элюция) последнего обычно достигается повышением ионной силы, изменением pH буферного раствора или добавлением в него органического растворителя, что ослабляет взаимодействие лиганд - фермент.
- Более избирательна десорбция раствором лиганда.

Аффинная хроматография

- Помимо ферментов методом аффинной хроматографии можно выделять также **токсины, рецепторы, ингибиторы, транспортные белки и др. биологически активные вещества.**
- Высокой избирательностью отличается так называемая иммуносорбция, при которой в качестве лиганда используют **антитела**, обладающие специфичностью к выделяемым белкам; особенно эффективны моноклональные антитела.
- Для разделения белков применяется также ряд других аналогичных методов. Так называемая ковалентная хроматография основана на избирательном образовании и последующем расщеплении ковалентных связей между выделяемым веществом и носителем, например, между белком с SH-группами и ртуть-органическими производными агарозы.

Аффинная хроматография

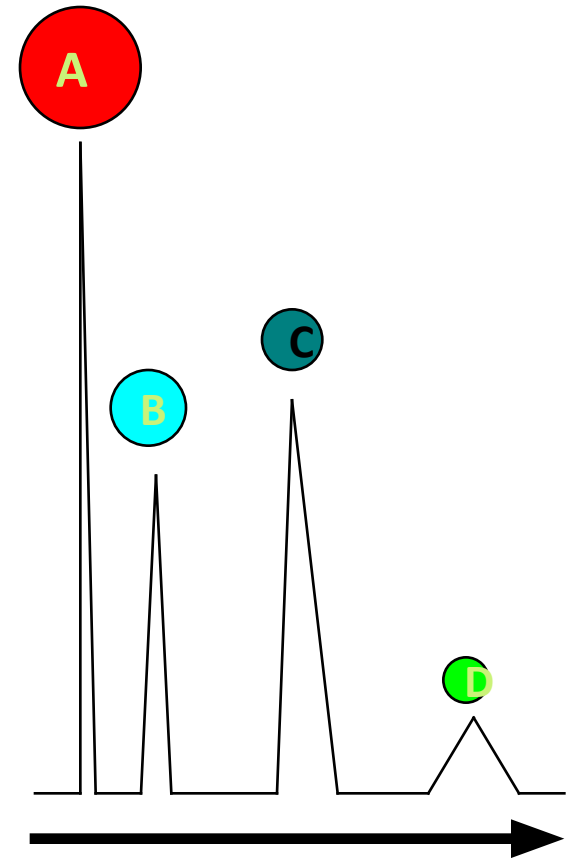
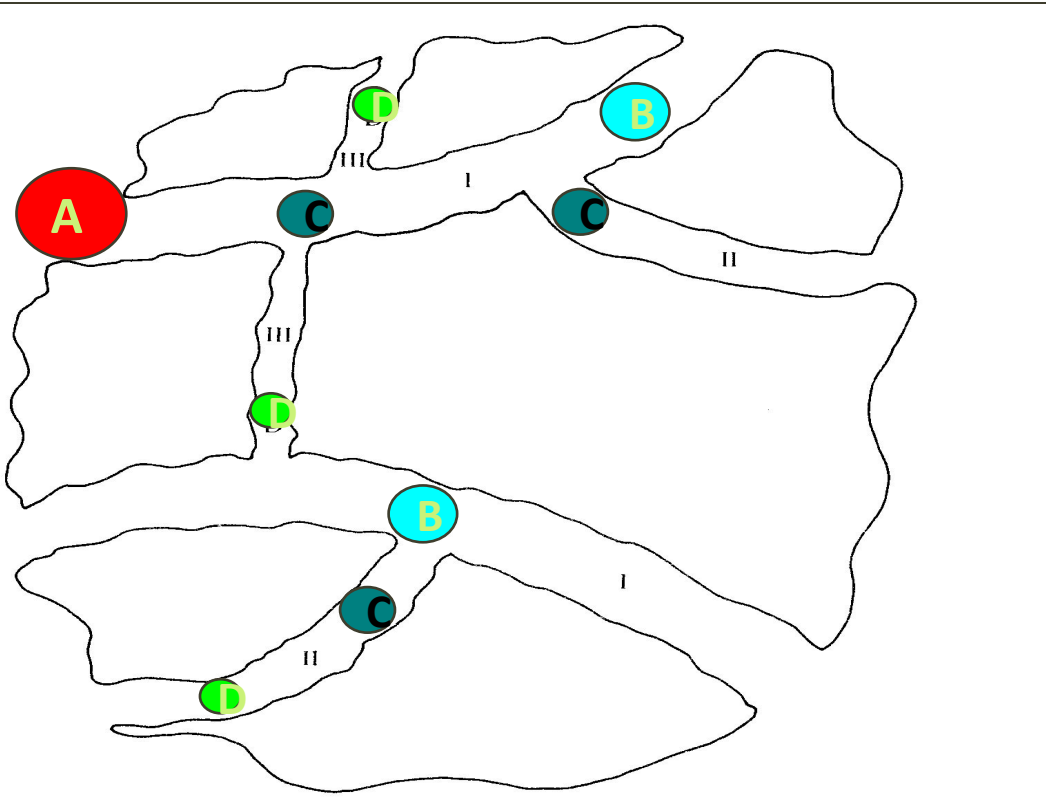
- Применяется также лигандообменная хроматография, при которой ферменты связываются через функциональный ион металла с комплексом, иммобилизованным на носителе.
- Получила распространение гидрофобная хроматография, при которой сорбент (например, фенилсефароза), содержащий гидрофобные группировки, вкрапленные в гидрофильную матрицу, взаимодействует с гидрофобными участками, содержащимися на поверхности белков. Нередко при этом наблюдаются также ионообменные взаимодействия, как, например, при использовании в качестве сорбента алкиламиносефароз.
- **Избирательное выделение гликопротеинов** обеспечивают иммобилизованные на носителях **пектины - белки**, специфически взаимодействующие с концевыми моносахаридными звеньями углеводных цепей.
- Иммобилизованные субъединицы ряда белков с четвертичной структурой могут быть использованы для извлечения этих белков из сложных смесей вследствие специфических межсубъединичных контактов.
- **Аффинная хроматография сформировалась как метод в конце**

ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- Эксклюзионная хроматография представляет собой вариант жидкостной хроматографии, в котором разделение происходит за счет распределения молекул между растворителем, находящимся внутри пор сорбента, и растворителем, протекающим между его частицами.
- В отличие от остальных вариантов ВЭЖХ, где разделение идет за счет различного взаимодействия компонентов с поверхностью сорбента, роль твердого наполнителя в эксклюзионной хроматографии заключается только в формировании пор определенного размера, а неподвижной фазой является растворитель, заполняющий эти поры. Поэтому применение термина «сорбент» к данным наполнителям в определенной степени условно.

Механизм эксклюзионной хроматографии

Разделение смеси полипептидов разного размера
на колонке с молекулярными ситами



ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- Принципиальной особенностью метода является возможность разделения молекул по их размеру в растворе в диапазоне практически любых молекулярных масс — от 10^2 до 10^8 , что делает его незаменимым для исследования биополимеров.
- По традиции процесс, проводимый в органических растворителях, все еще часто называют **гель-проникающей**, а в водных системах — **гель-фильтрационной** хроматографией.

ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- Объем эксклюзионной колонки можно выразить суммой трех слагаемых:

$$V_c = V_o + V_i + V_d..$$

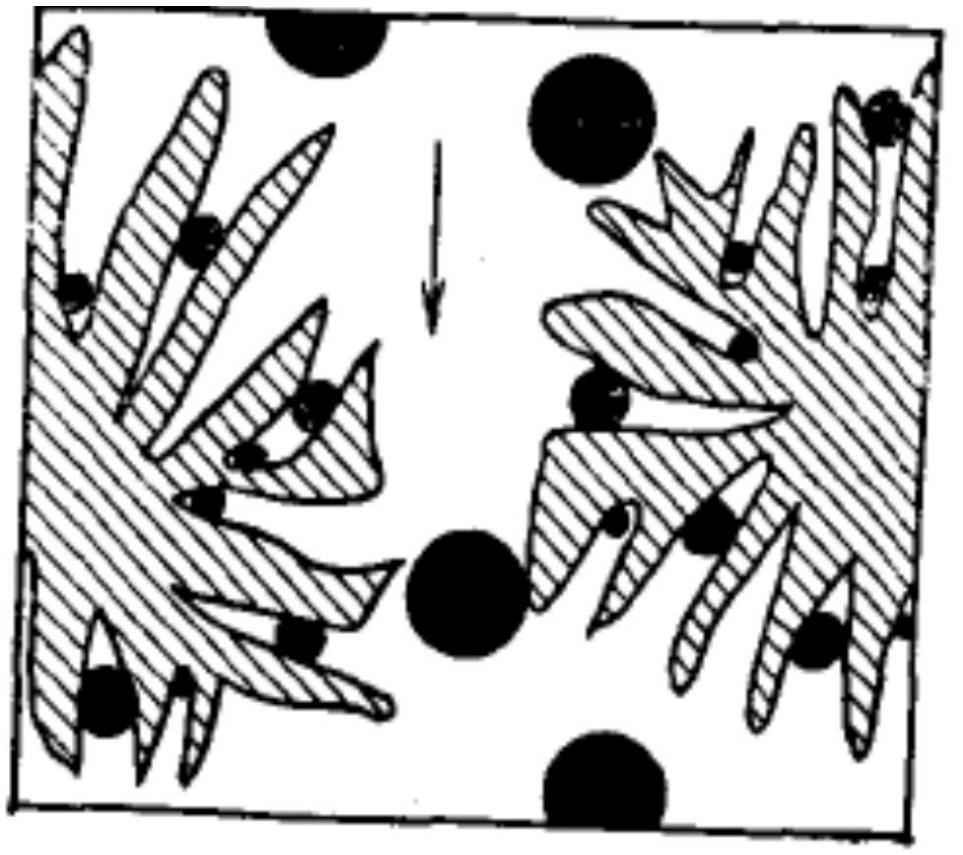
- где V_o — мертвый объем — объем растворителя между частицами сорбента (объем подвижной фазы);
- V_i — объем пор, занятый растворителем (объем неподвижной фазы);
- V_d — объем матрицы сорбента без учета пор.
- Полный объем растворителя в колонке V_t (его часто называют полным объемом колонки, так как V_d не принимает участия в хроматографическом процессе) представляет собой сумму объемов подвижной и неподвижной фаз:

$$V_t = V_o + V_i.$$

- Удерживание молекул в эксклюзионной колонке определяется вероятностью их диффузии в поры и зависит от соотношения размеров молекул и пор.
- Коэффициент распределения K_d , как и в других вариантах хроматографии, представляет собой отношение концентраций вещества в неподвижной и подвижной фазах:

$$K_d = C_i / C_o.$$

Модель разделения молекул по размеру в эксклюзионной хроматографии



ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- Так как подвижная и неподвижная фазы имеют одинаковый состав, то K_d вещества, для которого обе фазы одинаково доступны, равен единице.
- Эта ситуация реализуется для молекул с самыми малыми размерами (в том числе и молекул растворителя), которые проникают во все поры и поэтому движутся через колонку наиболее медленно.
- Их удерживаемый объем равен полному объему растворителя V_t .

ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- Все молекулы, размер которых больше размера пор сорбента, не могут попасть в них (полная эксклюзия) и проходят по каналам между частицами. Они элюируются из колонки с одним и тем же удерживаемым объемом, равным объему подвижной фазы V_0 . Коэффициент распределения для этих молекул равен нулю.
- Молекулы промежуточного размера, способные проникать только в какую-то часть пор, удерживаются в колонке в соответствии с их размером. Коэффициент распределения этих молекул изменяется в пределах от нуля до единицы и характеризует долю объема пор, доступных для молекул данного размера. Их удерживаемый объем определяется суммой V_0 и доступной части объема пор:

$$V^* = V_0 + K_d V_i.$$

ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- Принципиальными отличиями эксклюзионной хроматографии от других вариантов являются **заранее известная продолжительность анализа в конкретной используемой системе, возможность предсказания порядка элюирования компонентов по размеру их молекул**, примерно одинаковая ширина пиков во всем диапазоне селективного разделения и уверенность в выходе всех компонентов пробы за достаточно короткий промежуток времени, соответствующий объему V_t .
- Хотя данный метод применяют, главным образом, для исследования молекулярно массового распределения (ММР) полимеров и анализа макромолекул биологического происхождения (белки, нуклеиновые кислоты и т.д.), **указанные особенности** делают его чрезвычайно перспективным для анализа низкомолекулярных примесей в полимерах и **предварительного разделения проб неизвестного состава.**

ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- Получаемая при этом информация существенно облегчает выбор наилучшего варианта ВЭЖХ для анализа данной пробы. Кроме того, микропрепаративное эксклюзионное разделение часто **используют в качестве первого этапа при разделении сложных смесей** путем комбинации различных видов ВЭЖХ.
- Ограниченный диапазон коэффициентов распределения определяет и главный недостаток эксклюзионной хроматографии — заметно меньшее, чем в других вариантах ВЭЖХ, число пиков, которые могут быть полностью разделены на колонке заданной эффективности.
- Однако в последнее время благодаря успехам достигнутым в технологии **изготовления высокоэффективных колонок**, этот метод все шире применяют и для разделения малых молекул.