

**Тема №3**

# **Хроматография**

# Вопросы

- особенности метода хроматографии
- история развития хроматографии
- классификация хроматографических методов
- термины
- теория хроматографической элюции
- материалы матриц сорбентов и обменников
- техника хроматографии
- методы хроматографии

# Особенности метода хроматографии

**Хроматография** – это физический метод разделения смеси веществ на компоненты, при котором разделяемые вещества (компоненты смеси) распределяются между двумя фазами, одна из которых (**подвижная фаза**) перемещается в определенном направлении относительно другой (**неподвижной фазы**).

**Хроматография** – это метод анализа веществ и их смесей, основанный на разделении компонентов за счет различных скоростей перемещения веществ через слой неподвижной фазы потоком подвижной фазы вследствие различий в силе взаимодействия (связывания) с неподвижной фазой. Чем сильнее взаимодействие компонента с неподвижной фазой, тем медленнее вещество движется потоком подвижной фазы.

# Особенности метода хроматографии

## Особенности хроматографии как метода разделения веществ:

- высокая разрешающая способность, дающая возможность разделения даже близких по природе, структуре и свойствам веществ;
- мягкие условия разделения (как правило, мягкие физиологические условия при невысоких температурах, атмосферном давлении и нейтральных рН);
- широта свойств, по которым происходит разделение смеси на компоненты;
- простота масштабирования (от микроанализа до препаративного разделения веществ)

# Особенности метода хроматографии

## Основные задачи хроматографии:

- Аналитические
- Препаративные
- Производственные



# Особенности метода хроматографии

## Основные задачи хроматографии:

1. Аналитические (разделение многокомпонентных по составу смесей на индивидуальные компоненты для их последующей идентификации).

## 2. Препаративные

- выделение отдельных компонентов из смеси;
- концентрирование веществ;
- очистка продуктов, доведение этих продуктов до заданной степени химической чистоты;
- проверка веществ на чистоту, идентификация веществ.

3. Производственные (контроль различных производств методами хроматографии).

# История развития хроматографии

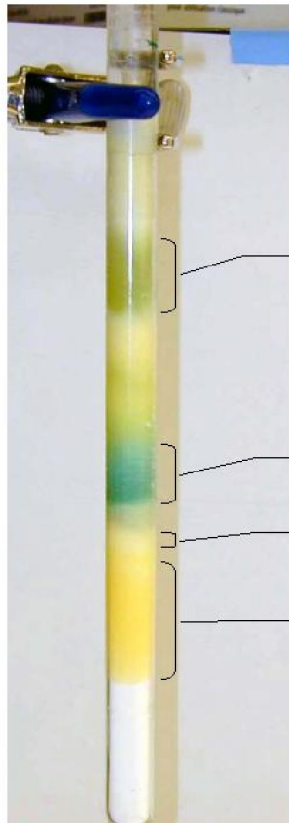
Основы метода впервые были изложены в работе русского ученого, ботаника-биохимика Михаила Семеновича Цвета “О новой категории адсорбционных явлений и их применению к биохимическому анализу” (1903).

Ему удалось открыть явление разделения сложной по составу смеси на компоненты на примере разделения пигментов зеленых листьев растений.



# История развития хроматографии

Расцветенный препарат разделения пигментов зеленого листа он назвал **хроматограммой**, а соответствующий метод анализа - **хроматографическим**.

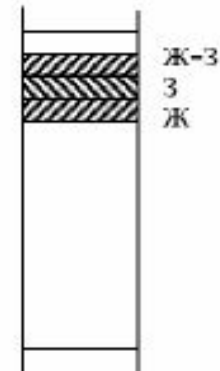


хлорофилл б

хлорофилл а

ксантофилл

каротин





# **История развития хроматографии**

**1938 г. - Н.А. Измайлов и М.С. Шрайбер в Харьковском химико-фармацевтическом институте разработали метод хроматографии тонких слоев.**

**1940 г. - А. Мартин и Д. Синг открыли вариант жидкостной распределительной хроматографии.**

**1952 г. - А. Мартин и Д. Синг - Нобелевская премия по химии.**

**1953 г. - А. Мартин и Д. Синг осуществили газовую распределительную хроматографию.**

**1956 г. - М. Голей создал высокоэффективную капиллярную газовую хроматографию.**

**1962 г. - М. Порат и Д. Флодин разработали вариант ситовой хроматографии.**

**середина 70-х гг. - разработка высокоэффективной жидкостной хроматографии.**

**середина 80-х гг. - разработка флюидной хроматографии и компьютеризация процесса хроматографии.**

# Классификация хроматографических методов

## Основные варианты хроматографии, различающиеся по агрегатному состоянию фаз

Подвижная фаза	Неподвижная фаза	Название варианта	
		общее	частное
газ	адсорбент	газовая	газо-адсорбционная
	жидкость		газо-жидкостная
жидкость	адсорбент	жидкостная	жидкостно-адсорбционная
	жидкость		жидкостно-жидкостная
газ или пар в сверхкритическом состоянии	адсорбент	флюидная	флюидно-адсорбционная
	жидкость		флюидно-жидкостная
коллоидная система	композиция твердых и жидких компонентов	полифазная	

# Классификация хроматографических методов

**Основные варианты хроматографии, различающиеся по принципу фракционирования (по характеру взаимодействия разделяемых соединений с неподвижной фазой)**

Механизм процесса разделения	Название варианта
по размеру молекул	ситовая хроматография
за счет физической адсорбции	молекулярная хроматография
за счет растворения	распределительная хроматография
за счет ионного обмена	ионообменная хроматография
за счет образования водородной связи, проявления химического сродства и др.	хемосорбционная хроматография
за счет образования координационных связей разделяемых органических молекул с катионами металлов в привитых на поверхности адсорбента группах (лигандах)	лигандообменная хроматография
за счет образования прочного комплекса только одним из разделяемых компонентов с привитой специфической группой неподвижной фазы	аффинная хроматография

# Классификация хроматографических методов

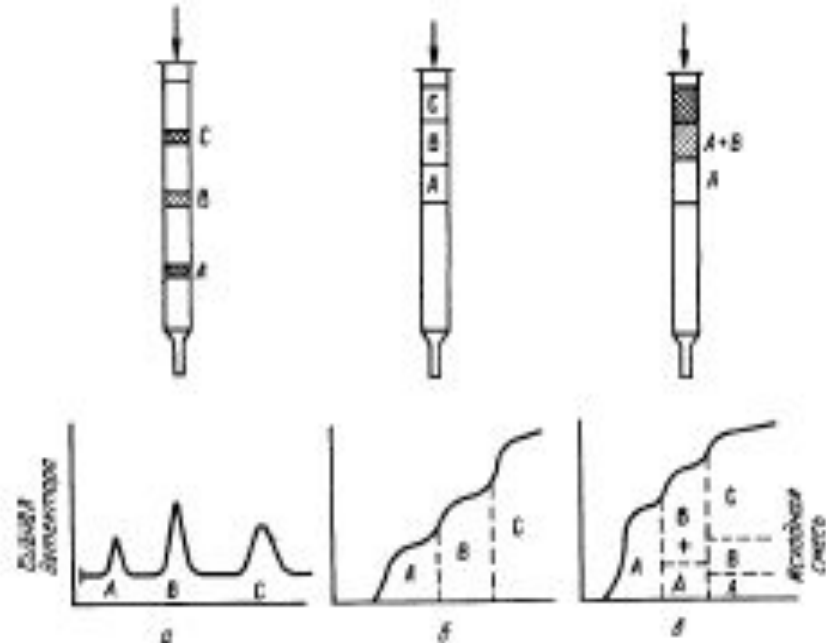
## Основные варианты хроматографии, различающиеся по расположению неподвижной фазы (по способу проведения)

Способ проведения процесса разделения	Название варианта
в цилиндрическом слое сорбента	колоночная хроматография
в слое сорбента на плоской поверхности	хроматография в тонких слоях
в пленке жидкости, содержащейся в полоске бумаги	хроматография на бумаге
в пленке жидкости или тонком слое адсорбента, размещенном на внутренней стенке капилляра	капиллярная хроматография
в полях электрических, магнитных, центробежных и других сил	хроматография в полях сил

# Классификация хроматографических методов

## Основные варианты хроматографии, различающиеся по свойствам подвижной фазы (по способу элюции)

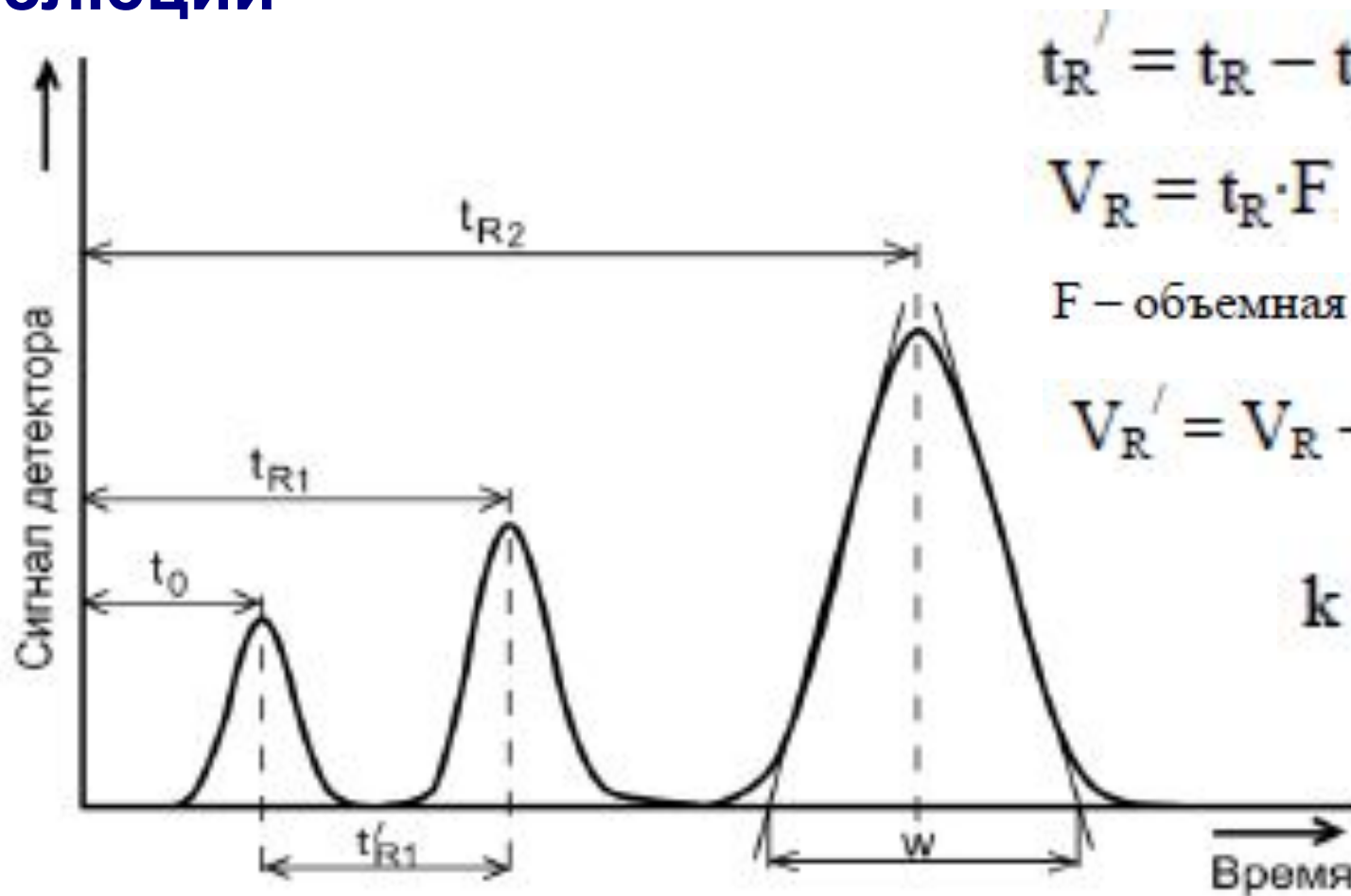
- элюентная хроматография (вещества подвижной фазы взаимодействуют с неподвижной фазой слабее, чем любой из компонентов разделяемой смеси);
- вытеснительная хроматография (вещества в составе подвижной фазы взаимодействуют с неподвижной фазой сильнее, чем любой из компонентов разделяемой смеси);
- фронтальная хроматография



# Термины

Подвижная фаза	– поток жидкости или газа, перемещающий компоненты разделяемой смеси вдоль неподвижной фазы.
Неподвижная фаза	– твердый сорбент или несмешивающаяся с подвижной фазой жидкость, на которых осуществляется различное удерживание и разделение компонентов смеси.
Сорбент	– твердое вещество, жидкость или их смеси, способные удерживать газы, пары или растворенные вещества.
Адсорбент	– твердый сорбент, концентрирующий на своей поверхности газы, пары или растворенные вещества.
Абсорбент	– твердый или жидкий сорбент, растворяющий в своем объеме газы, пары или компоненты жидких смесей.
Сорбат	– вещество, удерживаемое сорбентом (в хроматографии – компоненты разделяемой смеси).
Элюент	– жидкость или газ, используемые в качестве подвижной фазы.
Элюат	– выходящий из колонки поток подвижной фазы с компонентами разделяемой смеси.

# Теория хроматографической элюции



$$t_R' = t_R - t_0.$$

$$V_R = t_R \cdot F$$

$F$  – объемная скорость потока элюента.

$$V_R' = V_R - V_0.$$

$$k = t_R' / t_0.$$

Хроматограмма смеси двух веществ, полученная элюентным методом.

$$D = C_{н.ф.} / C_{п.ф.}$$

Коэффициент распределения

$$\alpha = t_{R'(2)} / t_{R'(1)} = k_1 / k_2 = D_2 / D_1.$$

Фактор разделения

# Теория хроматографической элюции

Время от момента ввода анализируемой пробы до регистрации максимума пика называют временем удерживания (элюирования)  $t_R$ . Время удерживания складывается из двух составляющих – времени пребывания вещества в подвижной ( $t_{п.ф.}$ ) – и неподвижной ( $t_{н.ф.}$ ) фазах:  $t_R = t_{п.ф.} + t_{н.ф.}$ . Величина  $t_{п.ф.}$  равна времени прохождения через колонку несорбируемого компонента ( $t_{п.ф.} = t_0$ ). Время удерживания  $t_R$  зависит от природы вещества и сорбента, а также упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке. Поэтому для характеристики "истинной" удерживающей способности следует ввести приведенное время удерживания  $t_R'$ :

$$t_R' = t_R - t_0.$$

Для характеристики удерживания часто используют понятие удерживаемого объема  $V_R$ . Он равен объему подвижной фазы, который необходимо пропустить, чтобы элюировать вещество:

$$V_R = t_R \cdot F,$$

где  $F$  – объемная скорость потока элюента.

$V_{п.ф.}$  (или  $V_0$ ) включает в себя объем колонки, незанятый сорбентом, объем коммуникаций от устройства ввода пробы до колонки и от колонки до детектора. Исправленный (приведенный) удерживаемый объем равен:

$$V_R' = V_R - V_0.$$

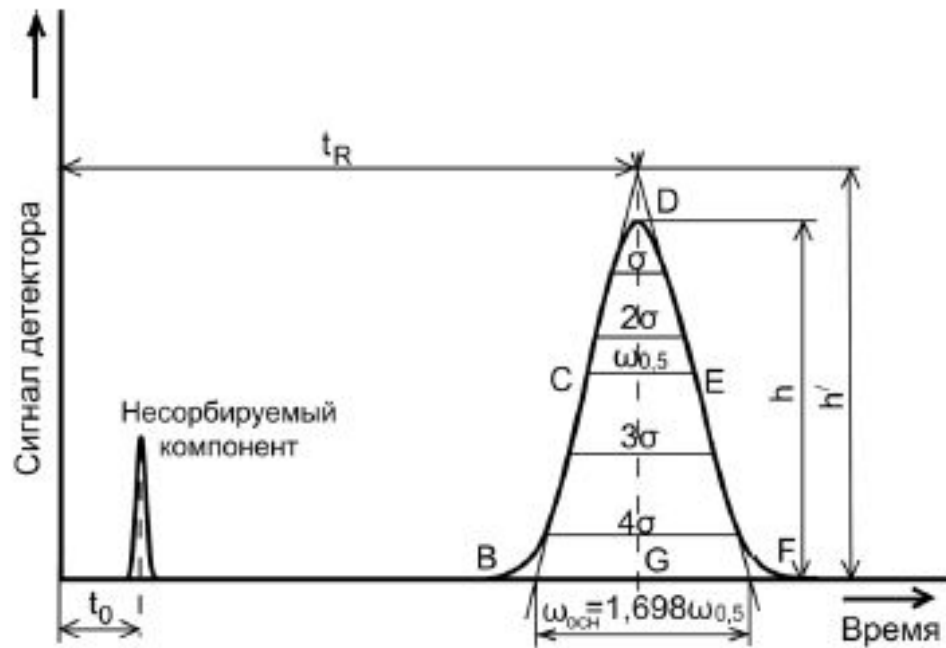
При постоянных условиях хроматографирования (скорость потока элюента, состав фаз, давление, температура) значения  $t_R$  и  $V_R$  достаточно хорошо воспроизводимы и могут быть использованы для идентификации веществ.

Безразмерный числовой параметр  $k$  – фактор удерживания позволяет провести сравнение различных хроматографических систем. Этот параметр дает информацию о том, насколько дольше вещество находится в сорбенте, чем в подвижной фазе:

$$k = t_R' / t_0.$$



# Теория хроматографической



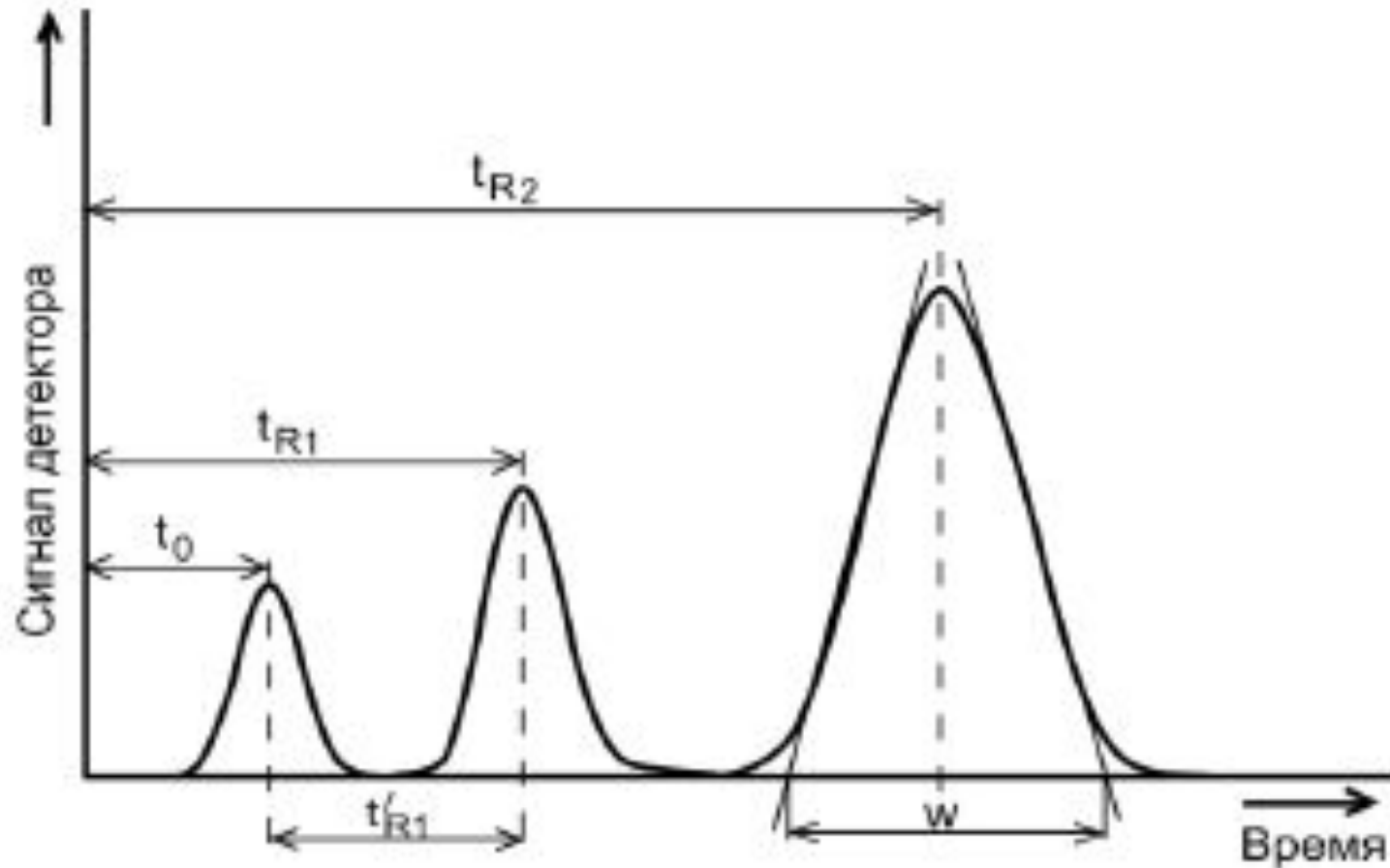
Кривая Гаусса описывается уравнением:

$$y = A \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{x}{\sigma} \right)^2 \right] / \sigma \cdot \sqrt{2\pi},$$

где  $y$  – высота точки на кривой (ордината), измеренная на расстоянии  $x$  от ординаты максимума (вершины пика);  $A$  – площадь;  $\sigma$  – стандартное отклонение гауссова пика. Стандартное отклонение  $\sigma$  отвечает ширине пика в точке, расположенной на расстоянии  $0.882h$  от основания ( $\omega_{0.882}$ ). Величина  $\sigma^2$  называется дисперсией хроматографического пика. Стандартное отклонение может быть также определено из соотношений, справедливых для гауссовых пиков:

$$2\sigma = \omega_{0.607}; \quad 3\sigma = \omega_{0.324}; \quad 4\sigma = \omega_{0.134};$$

# Теория хроматографической элюции

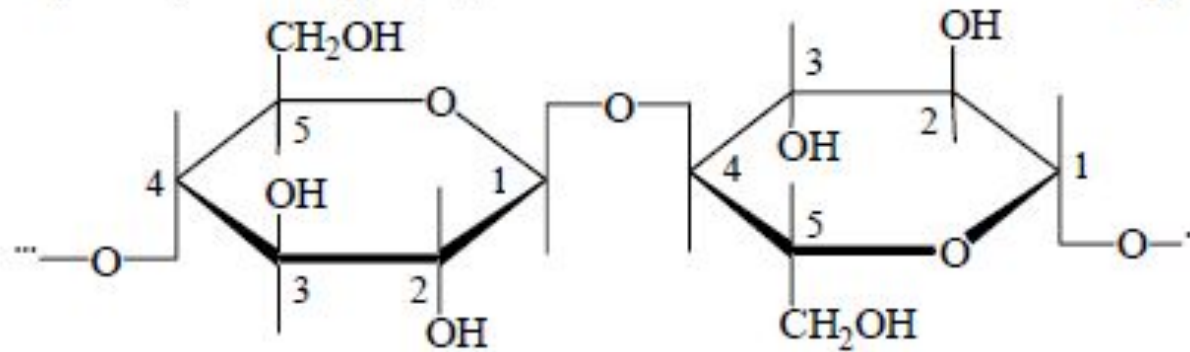


$$R_s = \left( \frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{k_2 + 1} \right)$$

где  $k_2$  – фактор удерживания для второго пика,  $N$  – число теоретических тарелок,  $\alpha$  – фактор разделения.

# Материалы матриц сорбентов и обменников

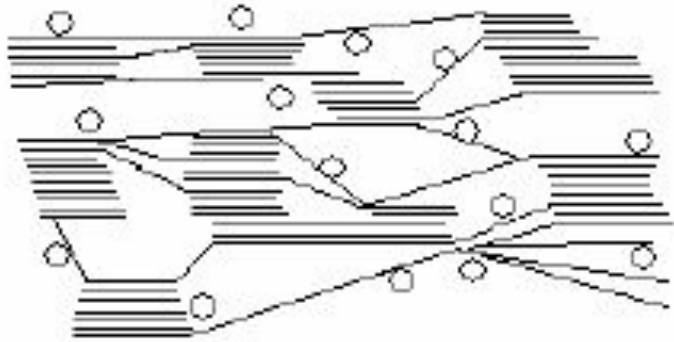
*Целлюлоза* – полисахарид, линейный полимер, образованный остатками глюкозы. Каждое звено глюкозы имеет три свободные OH-группы, таким образом, полимер представляет собой полиатомный спирт:



# Материалы матриц сорбентов и обменников

Для целлюлозы характерна высокая степень гидрофильности и склонность к образованию многочисленных водородных связей между нитями полимеров. Наличие множества ОН-групп позволяет легко модифицировать целлюлозу путем химического присоединения разнообразных заместителей, например, ионогенных групп или биологически активных молекул. Вместе с тем целлюлоза достаточно химически инертна и не вступает в реакции с белками, нуклеиновыми кислотами и их компонентами. Целлюлоза неустойчива к воздействию сильных кислот, щелочей и окислителей. Она выдерживает контакт с минеральными кислотами и щелочами, концентрация которых не превышает 0,5н, и то не более 2 ч при комнатной температуре. Рабочий интервал рН для обменников на основе обычной целлюлозы составляет 3–10. Целлюлоза охотно атакуется микроорганизмами даже на холоде, поэтому ее водные суспензии хранят в присутствии антисептиков. Водородные связи между линейными цепями в целлюлозе могут образовывать псевдокристаллические структуры, которые варьируются с рыхлыми участками, аморфными, “порами”. Так формируются макроскопические нити целлюлозы, легко набухающие в поперечном направлении. “Кристаллические” участки мало доступны для присоединения модифицирующих заместителей, которые из-за этого располагаются главным образом на поверхности нитей и в порах (кружками обозначены модифицирующие заместители):

# Материалы матриц сорбентов и обменников

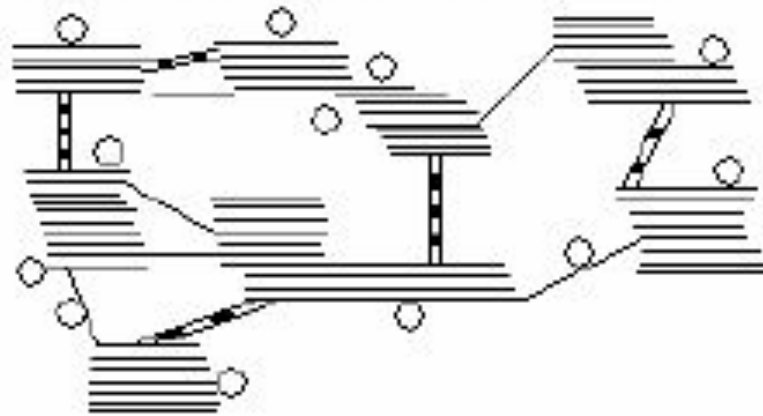


Кристаллическая целлюлоза

Сушка также существенно влияет на свойства целлюлозы. При удалении воды образуется множество дополнительных водородных связей на аморфных участках матрицы, так что объем пор резко уменьшается. Далеко не все эти связи разрываются при простом замачивании целлюлозы в воде, поэтому необходима специальная обработка (“cycling”) как сухой продажной целлюлозы, так и уже использованного сорбента после каждого его высухания. Такая обработка заключается в суспензировании целлюлозы в 15 объемах 0,5н NaOH на 30 мин и последующей промывке водой на фильтре до рН 8. Смысл этой обработки – в диссоциации OH-групп, после чего нити “расталкиваются” взаимодействием отрицательных зарядов, а дополнительные водородные связи рвутся. Ионообменники на основе целлюлозы обрабатываются аналогично. При набухании 1 г сухой целлюлозы связывает около 2,5 г воды.

# Материалы матриц сорбентов и обменников

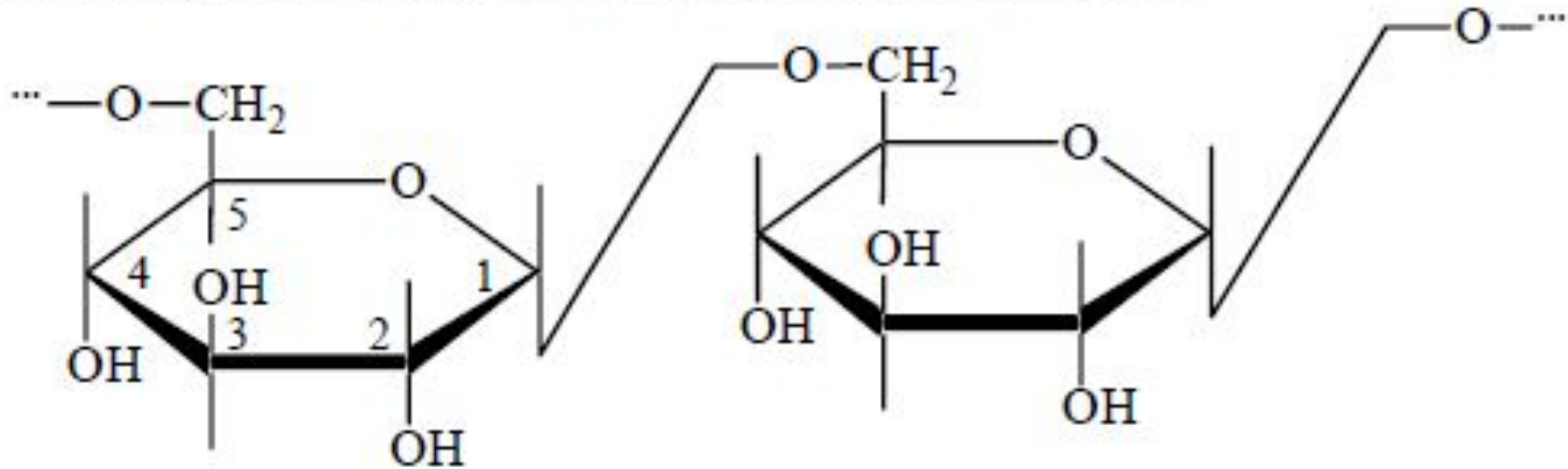
*Микрогранулированная целлюлоза.* Для повышения жесткости матриц на основе целлюлозы проводят частичный кислотный гидролиз, который разрушает аморфные участки матрицы. На их место между “кристаллическими” участками вводят химические сшивки. Одновременно увеличивается степень “кристалличности”, а поры становятся просторнее. Схема структуры получающейся микрогранулированной целлюлозы имеет вид:



«Лесенками» обозначены химические сшивки между нитями полисахарида. Такую целлюлозу выпускают многие фирмы. Помимо повышенной жесткости, она более гомогенна, что обеспечивает более высокую по сравнению с волокнистой (обычной) целлюлозой разрешающую способность.

# Материалы матриц сорбентов и обменников

*Декстран* – полисахарид, в основном линейный полимер на основе глюкозы, где звенья связаны  $\alpha$ -1,6-глюкозидной связью:

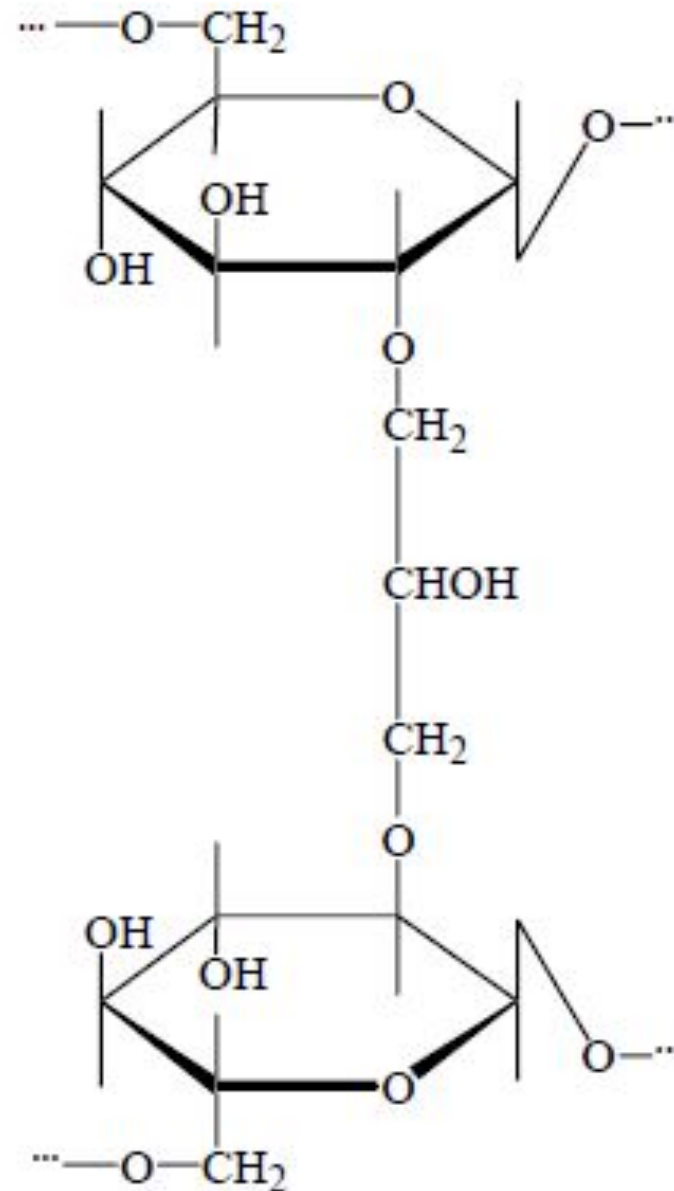


Это тоже полнотомный спирт с высокой степенью гидрофильности, представляющий столь же широкие, как и целлюлоза, возможности для модификации, и также химически инертный. Устойчивость к действию кислот у декстрана еще меньше, чем у целлюлозы. Его не следует обрабатывать более крепким раствором, чем 0,1н HCl (в течение 2 часов). К щелочи гели на основе декстрана более устойчивы: они сохраняют свои свойства в 0,25н NaOH до 2 мес., даже при температуре 60 °С. Рабочий диапазон pH составляет 2÷12. Существенное отличие от целлюлозы состоит в том, что нити декстрана не образуют агрегатов, так как они не вполне линейны – имеются достаточно многочисленные ответвления (по связям 1,2–, 1,3– и 1,4–).

# Материалы матриц сорбентов и обменников

Структура сефадекса имеет вид:

В гелях для хроматографии (сефадексах) нити декстрана химически сшиты эпихлоргидрином. Однако сшивка не очень жесткая – сефадексы относительно мягки и легко сжимаются, в водных растворах сильно набухают. Изменяя долю сшивки, можно регулировать средний размер пор, образуемых пространственной сеткой сшитого геля. Ввиду статистического распределения сшивок по объему геля разброс размеров пор невелик, и сефадексы заметно более однородны, а свойства их лучше воспроизводимы, чем у целлюлозы. Они “не боятся” высушивания и при замачивании не требуют специальной обработки. Сефадексы можно автоклавировать как в сухом, так и во влажном виде – в нейтральной среде при 120 °С в течение 30 мин.



Сефадекс



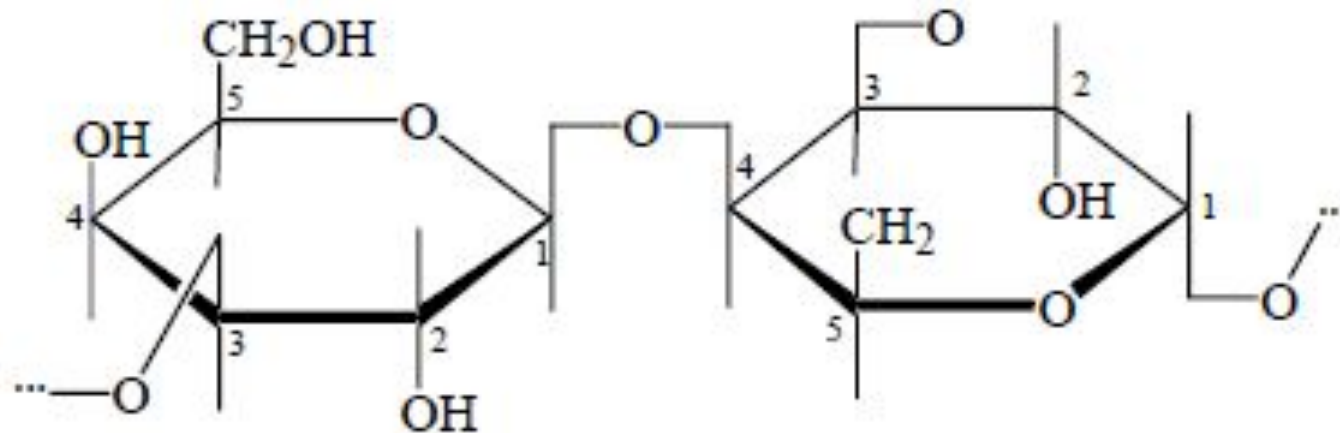
# Материалы матриц сорбентов и обменников

Суспензию сефадекса (наполненную колонку) следует хранить с антисептиком, так как он, подобно целлюлозе, легко атакуется микроорганизмами. Сефадексы способны адсорбировать ароматические и гетероциклические молекулы. Это дает возможность разделять (фракционировать) нуклеиновые основания, ароматические аминокислоты и пептиды. Продажные сефадексы содержат в своем составе небольшое количество карбоксильных групп, что придает им некоторое сродство с катионами.

К некоторым недостаткам сефадекса можно отнести мягкость, что накладывает ограничения на допустимое значение скорости хроматографической элюции. Ионообменники на основе сефадекса также могут деформироваться за счет электростатического отталкивания ионогенных групп. В последние годы разрабатываются более жесткие матрицы.

# Материалы матриц сорбентов и обменников

*Агароза* – полисахарид – полиатомный спирт. Его элементарное звено – дисахарид агаробиоза, в состав которого входит необычный сахар – 3,6-ангидро-L-галактоза:



Агароза более устойчива к действию микроорганизмов, чем целлюлоза и сефадексы, однако ее тоже следует хранить в присутствии антисептика. Агароза – гидрофильна, нити способны в большей степени, чем нити целлюлозы, к образованию водородных связей. Благодаря этому горячий 2-6%-ный раствор агарозы застывает в виде жесткого и очень крупнопористого геля. Нити полимера собираются в пучки и образуют жесткий пространственный каркас с пустотами внутри. При 100 °С гель агарозы плавится, поэтому его нельзя автоклавировать. В условиях хроматографии агароза химически неактивна, но уязвима для действия щелочей, кислот и окислителей. Рабочий диапазон pH 4–9.

# Материалы матриц сорбентов и обменников

*Полиакриламидный гель (ПААГ)* – нити линейного полимера акриламида, сшитые  $N,N'$ -метилен-бис-акриламидом, образуют относительно жесткую и химически инертную пространственную сетку геля, хорошо удерживающую воду. Пористость и жесткость определяются процентным содержанием в нем полимера. Полярные амидные группы ( $-CO-NH_2$ ) способствуют сольватации его в водной среде. В зависимости от условий полимеризации (соотношения мономеров, концентрации) получают сферические гранулы полимера с различными диаметрами пор. При высокой концентрации сшивающего агента образуется высокопористый гель.