

Дисциплина
«Методы фармакопейного анализа»

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ФАРМАКОПЕЙНОГО АНАЛИЗА

Хроматографические методы

лекция 6

(лектор: доцент, к.фарм.н. Солодунова Г.Н.)

Хроматографические методы анализа

Классификация

Хроматография впервые была введена в аналитическую практику русским ботаником М.С. Цветом.

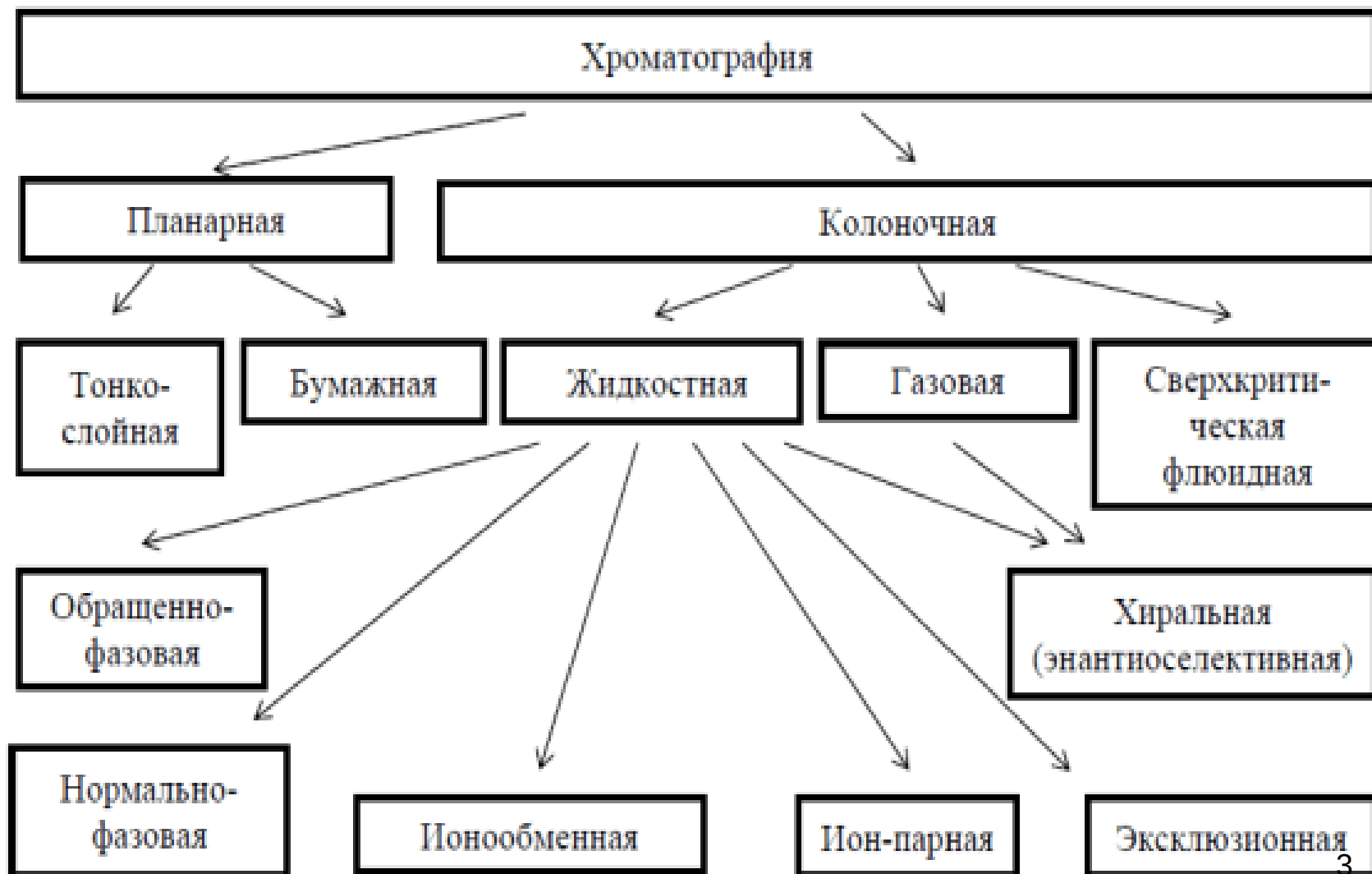
В первых же работах с помощью этого метода М.С. Цвет установил, что считавшийся однородным зеленый пигмент растений хлорофилл на самом деле состоит из нескольких веществ. При пропускании экстракта зеленого листа через колонку, заполненную порошком мела, и промывании петролейным эфиром он получил несколько окрашенных зон, что несомненно говорило о наличии в экстракте нескольких веществ. Впоследствии это было подтверждено другими исследователями. Этот метод он назвал хроматографией, хотя сам же указал на возможность разделения и бесцветных веществ.

Вещество подвижной фазы непрерывно вступает в контакт с новыми участками адсорбента и частью адсорбируется, а адсорбированное вещество контактирует со свежими порциями подвижной фазы и частично десорбируется.

Таким образом, основным условием для осуществления хроматографического процесса – процесса разделения веществ на колонке – М.С. Цвет считал различие в адсорбируемости.



- В настоящее время используются следующие хроматографические методы анализа:



- Хроматография – это физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами - неподвижной и подвижной. Неподвижной (стационарной) фазой обычно служит твердое вещество (его часто называют *сорбентом*) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество.
- Хроматография – процесс, основанный на *многократном повторении* актов сорбции и десорбции вещества при перемещении его в потоке подвижной фазы вдоль неподвижного сорбента.

Разделение сложных смесей хроматографическим способом основано на различной сорбируемости компонентов смеси. В процессе хроматографирования так называемая подвижная фаза (элюент), содержащая анализируемую пробу, перемещается через неподвижную фазу. Неподвижная фаза представляет собой вещество с развитой поверхностью, а подвижная – поток газа или жидкости, фильтрующейся через слой сорбента.

Неподвижную фазу обычно помещают в стеклянную (или металлическую) трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента компоненты перемещаются вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты остаются в верхнем слое сорбента, другие, с меньшей степенью взаимодействия с сорбентом, оказываются в нижней части колонки, некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой. Таким образом компоненты разделяются.

Классификация хроматографических методов

В основу общепринятых классификаций многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки:

По агрегатному состоянию подвижной и неподвижной фаз.

По агрегатному состоянию фаз хроматографию разделяют на **газовую** и **жидкостную**.

Газовая хроматография включает *газожидкостную* и *газотвердо-фазную*.

Жидкостная – *жидкостно-жидкостную, жидкостно-твердофазную и жидкостно-гелевую*.

Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе – неподвижной.

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

распределительная хроматография основана на различии в растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (газожидкостная хроматография) или на различии в растворимости веществ в подвижной и неподвижной жидких фазах;

ионообменная хроматография — на разной способности веществ к ионному обмену;

адсорбционная хроматография — на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом;

эксклюзионная хроматография — на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ,

- *аффинная хроматография* — на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов.
- *осадочная хроматография*, основанная на образовании, отличающихся на растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом,
- *адсорбционно-комплексобразовательная*, основанная на образовании координационных соединений разной устойчивости в фазе или на поверхности сорбента, и др. Следует помнить, что классификация по механизму весьма условна: ее используют в том случае, если известен доминирующий механизм; часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам.

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).

По цели хроматографирования выделяют
аналитическую хроматографию (качественный и количественный анализ);
препаративную хроматографию (для получения веществ а чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей;
промышленную (производственную) хроматографию для автоматического управления процессом (при этом целевой продукт из колонки поступает в датчик).

Хроматографию широко используют для исследования растворов, каталитических процессов, кинетики химических процессов и т. п.

Способы получения хроматограмм

Подвижную фазу, вводимую в слой неподвижной фазы, называют *элюентом*, а подвижную фазу, выходящую из колонки и содержащую разделенные компоненты, - *элюатом*. В элюате тем или иным способом определяют содержание компонентов. Распределение разделяемых веществ в виде отдельных полос (зон) вдоль колонки представляет собой внутреннюю хроматограмму. Графическое изображение (часто получаемое с помощью самописца) распределения веществ в элюате называют внешней хроматограммой, или просто хроматограммой.

По **способу получения** хроматограмм различают *элюентную*, *вытеснительную* и *фронтальную* хроматографии.

Способы получения хроматограмм

Элюентная (проявительная) хроматография

Хроматографическую колонку промывают элюентом (раствором или растворителем), обладающим меньшей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. Затем в колонку вводят разделяемые вещества, растворенные в элюенте, и продолжают непрерывно пропускать элюент (процесс элюирования). При этом разделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями в соответствии с их сорбируемостью. Если скорости перемещения компонентов достаточно различаются, то на выходе из колонки сначала появляется наименее сорбируемый компонент, затем следующий компонент и т. д. В этом случае хроматограмма представляет собой несколько пиков.

Самый простой вариант элюирования — *изократический*, при котором состав элюента не меняется. Его используют при разделении соединений с близким сродством к неподвижной фазе. В некоторых случаях используют градиентное элюирование, при котором состав элюента в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону. В этом случае элюирующая сила подвижной фазы возрастает, в результате чего сокращается время удерживания сильно сорбируемых веществ и улучшается разделение смеси.

Элюентная хроматография является наиболее распространенной в современном хроматографическом анализе.

Вытеснительная хроматография

Сначала в колонку вводят небольшое количество раствора разделяемых веществ. Затем через колонку непрерывно пропускают раствор вещества (вытеснитель), обладающего большей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. По мере продвижения по колонке элюент вытесняет вещество А, которое в свою очередь вытесняет вещество В, и т.д. В результате анализируемая смесь перемещается впереди фронта вытеснителя и скорость движения веществ равна скорости движения вытеснителя. 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.

Фронтальная хроматография.

В колонку непрерывно вводят раствор разделяемых веществ, сорбируемость которых увеличивается в ряду $A < B < C$. Из колонки сначала будет вытекать чистый растворитель, затем, когда сорбент насытится наименее сорбируемым веществом А, оно появится в элюате. Когда сорбент насытится веществом В, элюат будет содержать оба эти вещества и т.д. Когда же сорбент будет полностью насыщен всеми компонентами смеси, состав элюата совпадет с составом раствора, вводимого в колонку. При фронтальном способе получения хроматограммы в чистом виде можно выделить лишь одно вещество. Однако внешняя хроматограмма дает представление о числе компонентов в анализируемом растворе.

Хроматография в тонком слое сорбента

Хроматографический процесс, протекающий при движении подвижной фазы в тонком слое сорбента (носителя), нанесенном на инертную поверхность, называется **хроматографией в тонком слое сорбента**. Неподвижной фазой в данном случае являются сам твердый сорбент, либо вещества, предварительно на него нанесенные. Чаще всего механизм хроматографического разделения является адсорбционным. Перемещение подвижной фазы в слое сорбента осуществляется восходящим методом. Для хроматографирования могут использоваться готовые пластинки с закрепленным слоем сорбента, выпускаемые промышленностью, и пластинки со специально приготовленным тонким слоем сорбента.

Нанесение проб

Нанесение проб осуществляют:

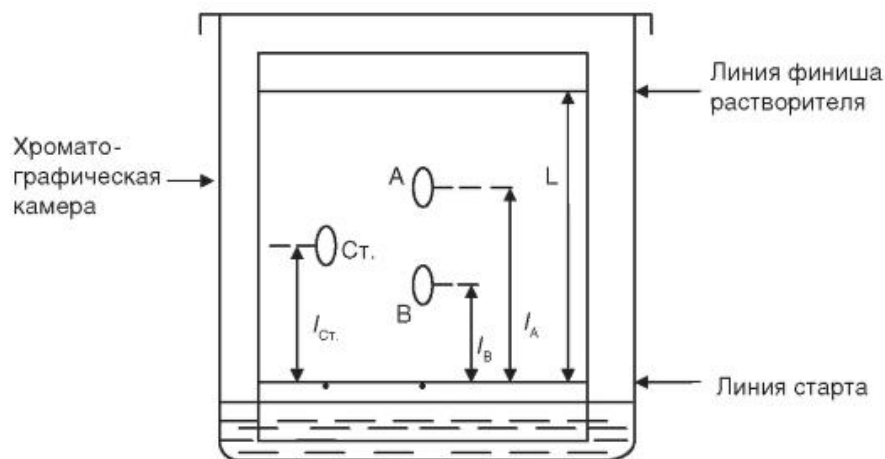
- калиброванными капиллярами с тупым концом;
- поршневыми микрошприцами с тупым концом иглы;
- полуавтоматическими или автоматическими приборами для нанесения образцов.

Визуальная оценка

Обнаружение (детектирование) зон адсорбции после проведения качественной и полуколичественной ТСХ осуществляют следующими способами:

- в видимом и ультрафиолетовом свете (при определенной длине волны);
- опрыскиванием растворами обнаруживающих реагентов;
- выдерживанием в парах обнаруживающего реагента;
- погружением в растворы обнаруживающих реагентов с использованием для этих целей специальных камер.

При хроматографировании анализируемые вещества образуют на пластинке круглые или овальные пятна (зоны). Совокупность пятен, полученных при хроматографировании анализируемого образца, называется **хроматограммой**.



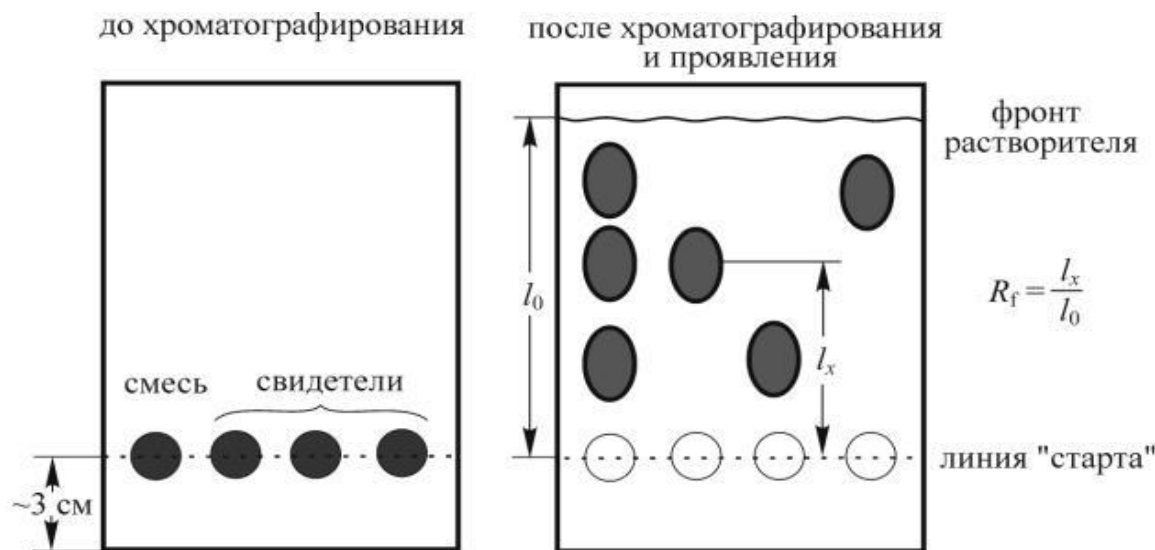
Подвижность вещества при хроматографировании характеризуется величиной **R_f** представляющей собой отношение средних скоростей перемещения вещества и подвижной фазы за время получения хроматограммы. На экспериментально определяемые значения R_f заметно влияют условия хроматографирования. Более

точной оценкой хроматографической подвижности, мало чувствительной к влиянию случайных отклонений, является величина **R_s** , представляющая собой отношение величины R_f одного вещества к величине R_f другого вещества, принятого за стандарт.

Обработка хроматограмм:

Для обнаруженных пятен вычисляют величину R_f по уравнению:

$R = \frac{a}{b}$, где "a" - расстояние от линии старта до центра пятна; "b" - расстояние от линии старта до фронта подвижной фазы.

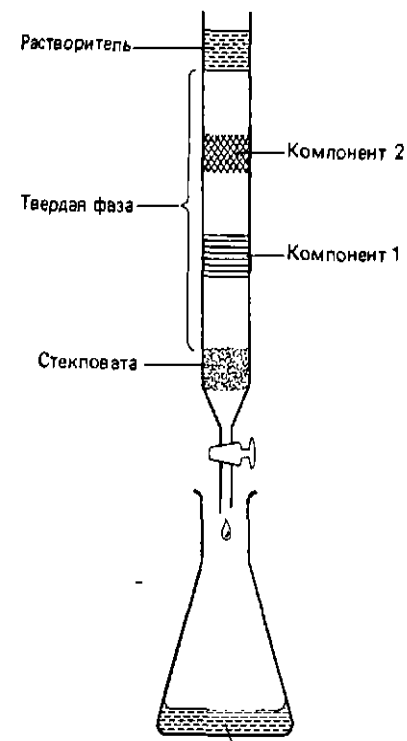


$$R_f = \frac{\text{Расстояние от линии старта до середины пятна вещества } (l_x)}{\text{Расстояние, пройденное растворителем от линии старта } (l_0)}$$

Колоночная адсорбционная хроматография

Раствор смеси веществ, подлежащих разделению, пропускают через стеклянную трубку, т. е. адсорбционную колонку (в случае проведения колоночной хроматографии), заполненную адсорбентом (силикагелем, Al_2O_3 , CaCO_3 и др.) (рис.4). При этом вещества, которые легче адсорбируются, будут располагаться в верхней части колонки, а те, которые адсорбируются труднее, образуют нижнюю зону. Если адсорбент был бесцветным или белым, а адсорбируемые вещества – окрашенными, то на адсорбенте появляются цветные зоны.

Если адсорбируемые вещества бесцветны, то образуемые ими зоны тоже бесцветны. В этом случае их приходится «проявлять» пропусканием через колонку реактива, который образует с адсорбируемыми веществами или ионами цветные соединения, окрашивая бесцветные зоны в соответствующие цвета.



Газовая хроматография

Газовая хроматография - *метод разделения летучих веществ.*

Подвижной фазой служит инертный газ (газ-носитель), протекающий через неподвижную фазу, обладающую большой поверхностью. В качестве подвижной фазы используют водород, гелий, азот, аргон, углекислый газ. Газ-носитель не взаимодействует с разделяемыми веществами и неподвижной фазой.

В зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы различают два вида газовой хроматографии

газотвердофазную (неподвижная фаза – твердый носитель: силикагель, уголь, оксид алюминия) и

газожидкостную (неподвижная фаза – жидкость, нанесенная на инертный носитель).

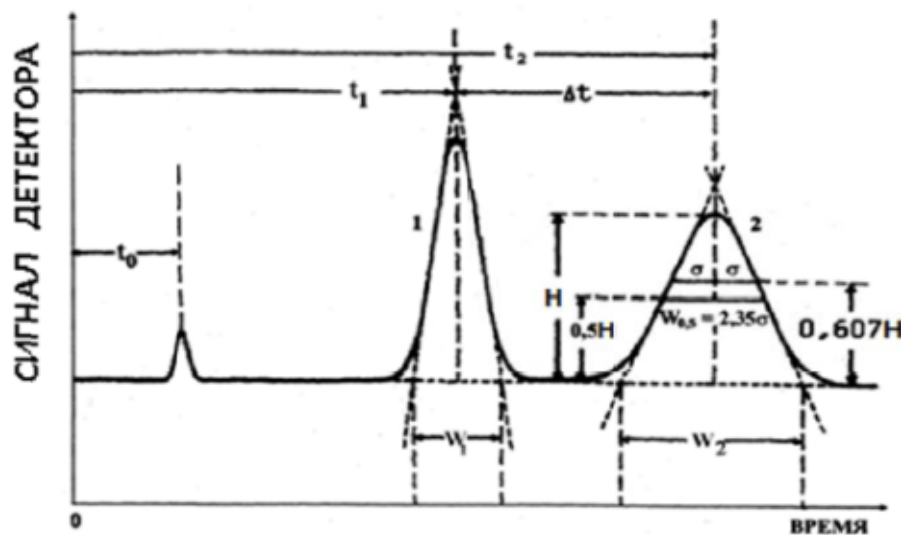
Газохроматографическим методом могут быть проанализированы газообразные, жидкие и твердые вещества с молекулярной массой меньше 400, удовлетворяющие определенным требованиям, главные из которых — *летучесть, термостабильность, инертность и легкость получения.*

Газовая хроматография

Результат хроматографического разделения представляется в виде хроматограммы. Хроматограмма представляет собой графическое представление сигнала детектора характеризующего концентрации веществ в элюате, от времени или объема подвижной фазы.

Схематически хроматограммы представляют собой последовательность гауссовых пиков на базовой линии

Хроматограмма и основные хроматографические параметры:



1 и 2 – пики соединений 1 и 2;

t_1 и t_2 – соответствующие времена удерживания;

t_0 – время удерживания несорбирующегося вещества;

W_1 и W_2 – ширина пиков у основания;

$W_{0,5}$ – ширина пика на половине его высоты

(предполагается гауссова форма пиков)

Базовая линия – сигнал от подвижной фазы.

Пик – часть хроматограммы, регистрирующая отклик детектора. Пик отображает постепенное нарастание концентрации вещества и последующее ее уменьшение.

Основание пика — продолжение базовой линии, соединяющее начало и конец пика.

Площадь пика (S) – площадь хроматограммы, заключенная между кривой, описывающей пик, и его основанием.

Высота пика (H) – расстояние от максимума пика до его основания, измеренное параллельно оси отклика детектора.

Время удерживания (t_R или t) – время, необходимое для элюирования вещества. Соответствует времени появления максимума пика на хроматограмме.

Объем удерживания (V_R) – объем подвижной фазы, необходимый для элюирования вещества. Может быть вычислен по времени удерживания и скорости потока (F).

$$V_R = F \cdot t_R.$$

Объем удерживания, в отличие от времени удерживания, не зависит от скорости потока.

Содержание компонентов смеси вычисляется по формуле:

$$\omega_i = S_i \cdot k_i / \sum S_i \cdot k_i \cdot 100\% ,$$

где: ω_i – массовая доля i -го компонента в смеси, %;

S_i – площадь пика i -го компонента;

k_i – поправочный коэффициент, определяемый чувствительностью детектора к i -му компоненту.

**Возникшие вопросы по материалам лекции
просьба направлять на почту**

gn_solodunova@mail.ru

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!