

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
«Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

*Кафедра фундаментальной медицины и биологии*

Отчетная работа

по результатам выполнения индивидуальных заданий

профильной учебной практики:

«Профильная учебная практика по биохимии»

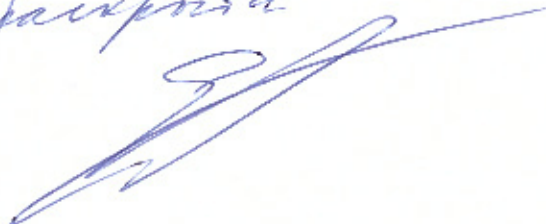
на тему:

«Принципы высокоэффективной жидкостной хроматографии. Основные виды детекторов. Области применения в биомедицинских исследованиях.»



*Отсутствует список софтверных,  
литературных источников, устаревшие,  
макет оформления выполнен неверно,  
отсутствует иллюстрация,  
но тема раскрыта*

24.07.2019



Выполнили: студентки

3 курса 302 группы

МБФ «Биология»

Вильд О.А., Ефимова Н.Д.

Проверил: доцент кафедры  
фундаментальной медицины  
и биологии Морковин Е.И.

## Содержание

Введение.....	3
1.Высокоэффективная жидкостная хроматография и ее виды.....	4
2. Методика проведения ВЭЖХ.....	6
3.Оборудование.....	8
3.1 Насосная система.....	8
3.2 Смесители.....	9
3.3 Инжекторы.....	9
3.4 Хроматографическая колонка.....	10
3.5 Неподвижная фаза (сорбент).....	10
3.6 Детекторы.....	12
4.Области применения.....	16
Заключение.....	17
Список литературы.....	18

## **Введение**

Хроматография как эффективный метод разделения и исследования состава сложных многокомпонентных смесей родилась в начале XX века и к настоящему времени сформировалась в самостоятельную научную дисциплину, изучающую распределение химических соединений в системе двух контактирующих несмешивающихся фаз, из которых, как правило, одна - подвижная, перемещается относительно другой – неподвижной.

Химики, экологи, медики, криминалисты в настоящее время не могут обойтись без применения в своей работе хроматографических методов, используемых для ранней диагностики заболеваний, изучения метаболизма лекарств и пищевых продуктов. Анализ компонентов запахов, органических загрязнителей в атмосфере городов, допинговый контроль на спортивных олимпиадах, поиск психотропных веществ в организме человека - все это под силу хроматографии. В последние годы разработаны специальные методики хроматографического анализа содержимого одной клетки, методики для расшифровки компонентов ДНК (международный проект "Геном человека").



## 1. Высокоэффективная жидкостная хроматография и ее виды.

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)**, называемая также жидкостной хроматографией высокого давления – это метод колоночной хроматографии, в котором подвижной фазой служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой (сорбентом). ВЭЖХ позволяет проводить одновременное **разделение** сложных проб на составляющие их компоненты, **детектирование** большинства компонентов, **измерение концентрации** одного или нескольких соединений (в зависимости от конкретных аналитических задач и наличия стандартных образцов).

В зависимости от механизма разделения веществ различают **следующие варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии**: адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, хиральную и др. в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий.

В **адсорбционной хроматографии** разделение веществ происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться с поверхности сорбента с развитой поверхностью, например, силикагеля.

В **распределительной** высокоэффективной жидкостной хроматографии разделение происходит за счет различия коэффициентов распределения разделяемых веществ между неподвижной (как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя) и подвижной фазами.

В зависимости от типа подвижной и неподвижной фазы различают **нормально-фазовую и обращенно-фазовую хроматографию**.

В **нормально-фазовой** высокоэффективной жидкостной хроматографии неподвижная фаза – полярная (чаще всего силикагель или силикагель с привитыми NH<sub>2</sub>- или CN-группами и др.), а подвижная фаза – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.). Удерживание веществ растет с увеличением их полярности. В

нормально-фазовой хроматографии элюирующая способность подвижной фазы увеличивается с ростом ее полярности. **В обращенно-фазовой хроматографии** неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C4, C8, C18 и др.); подвижная фаза – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.

**В ионообменной хроматографии** молекулы веществ смеси, диссоциированные в растворе на катионы и анионы, разделяются при движении через сорбент (катионит или анионит) за счет различной силы взаимодействия определяемых ионов с ионными группами сорбента.

**В эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной)** хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми из колонки выходят наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор неподвижной фазы, а последними выходят вещества с малыми размерами молекул.

**В хиральной хроматографии** происходит разделение оптически активных соединений на отдельные энантиомеры. Разделение может осуществляться на хиральных неподвижных фазах или на ахиральных неподвижных фазах с использованием хиральных подвижных фаз.



## 2. Методика проведения ВЭЖХ

ВЭЖХ реализуется с использованием блочно-модульной хроматографической системы – **жидкостного хроматографа**, в котором жидкая подвижная фаза (элюент) определенного состава (из 2–3 компонентов) с помощью **насосного блока** под высоким давлением (обычно 50–200 атмосфер) с заданной постоянной скоростью (100–1000 мкл/мин) непрерывно подается через **хроматографическую колонку** – стальную трубку длиной 50–250 мм, внутреннего диаметра 2–5 мм, плотно и равномерно заполненную однородными частицами сорбента диаметром 3–10 мкм. В качестве сорбента могут использоваться адсорбенты с развитой поверхностью или неподвижные жидкие фазы, привитые к поверхности твердого носителя (химически модифицированные сорбенты).

После соответствующей пробоподготовки определяемые компоненты вводятся в составе анализируемой пробы объемом 10–100 мкл в хроматографическую колонку с помощью специального **дозировочного устройства**. В процессе движения вдоль слоя сорбента в потоке подвижной фазы компоненты пробы многократно сорбируются неподвижной фазой, затем вновь десорбируются. Из-за неодинакового сродства к сорбенту разные соединения передвигаются по колонке с различной скоростью и достигают **детектора**, подключенного к выходу хроматографической колонки, последовательно, в разное время. Детектирование чаще всего осуществляется путем регистрации поглощения в УФ- или видимой области спектра или измерения флуоресценции (либо собственной флуоресценции анализируемого вещества, либо флуоресценции соответствующих производных, если само определяемое соединение не флуоресцирует). С использованием компьютерной системы сбора и обработки данных производится идентификация компонентов анализируемой смеси по времени удерживания и их количественное определение по величине аналитического сигнала (высота или площадь пика на хроматограмме).

При решении наиболее сложных аналитических задач, когда требуется определение малых концентраций соединений с низкими значениями ПДК (полициклические ароматические углеводороды, токсины) в реальных пробах сложного состава

(пищевые продукты, почвы), важнейшими характеристиками аналитического оборудования для ВЭЖХ являются следующие:

– **эффективность и селективность хроматографического разделения**, при этом за счет правильного выбора характеристик хроматографической колонки (природы сорбента, длины колонки) и условий хроматографирования (состав подвижной фазы, объемная скорость ее подачи через колонку, использование градиентной техники элюирования) достигается необходимое отделение определяемых соединений от матричных и сопутствующих компонентов пробы;

– **селективность и чувствительность детектирования**, когда применением подходящего хроматографического детектора (флуориметрического, спектрофлуориметрического или спектрофотометрического) в сочетании с установкой оптимальных параметров детектирования (длин волн возбуждения, флуоресценции или поглощения) обеспечиваются низкие значения предела обнаружения (при необходимости может производиться селективная регистрация анализируемых веществ на фоне матричных и сопутствующих компонентов пробы).

Для повышения эффективности хроматографического разделения и сокращения продолжительности анализа рекомендуется использовать термостатирование колонок при температуре до 60°C.

Блочно-модульный принцип построения позволяет производить комплектацию хроматографических систем под заказ для решения конкретной аналитической задачи пользователя.



### 3.Оборудование

Для проведения анализа используют соответствующие приборы – жидкостные хроматографы.

*В состав жидкостного хроматографа обычно входят следующие основные узлы:*

- узел подготовки подвижной фазы, включая емкость с подвижной фазой (или емкости с отдельными растворителями, входящими в состав подвижной фазы) и систему дегазации подвижной фазы;
- насосная система;
- смеситель подвижной фазы (при необходимости);
- система ввода пробы (инжектор), может быть ручным или автоматическим (автосамплер);
- хроматографическая колонка (может быть установлена в термостате);
- детектор (один или несколько с разными способами детектирования);
- система управления хроматографом, сбора и обработки данных.

*Помимо этого в состав хроматографа могут входить:* система пробоподготовки и предколоночный реактор, система переключения колонок, постколоночный реактор и другое оборудование.

#### 3.1 Насосная система

Насосы обеспечивают подачу подвижной фазы в колонку с заданной скоростью. Состав подвижной фазы и скорость потока могут быть постоянными или меняющимся во время анализа. В случае постоянного состава подвижной фазы процесс называют изократическим, а во втором – градиентным. Современная насосная система жидкостного хроматографа состоит из одного или нескольких насосов, управляемых компьютером. Это позволяет менять состав подвижной фазы



по определенной программе при градиентном элюировании. Насосы для аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяют поддерживать скорость подачи подвижной фазы в колонку в интервале от 0,1 до 10 мл/мин при давлении на входе в колонку до 40 МПа. Пульсации давления минимизируются специальными демпферными системами, входящими в конструкцию насосов. Рабочие детали насосов изготавливаются из коррозионностойких материалов, что позволяет использовать в составе подвижной фазы агрессивные компоненты.

### 3.2 Смесители

В смесителе происходит образование единой подвижной фазы из отдельных растворителей, подаваемых насосами, если необходимая смесь не была приготовлена заранее. Смешение компонентов подвижной фазы в смесителе может происходить как при низком давлении (до насосов), так и при высоком давлении (после насосов). Смеситель можно использовать для подготовки подвижной фазы и при изократическом элюировании.

Объем смесителя может влиять на время удерживания компонентов при градиентном элюировании.

### 3.3 Инжекторы

Инжекторы могут быть универсальными, с возможностью изменения объема вводимой пробы, или дискретными для ввода пробы только определенного объема. Оба типа инжекторов могут быть автоматическими

(«автоинжекторы» или «автосэмплеры»). Инжектор для ввода пробы (раствора) расположен непосредственно перед хроматографической колонкой. Конструкция инжектора позволяет изменять направление потока подвижной фазы и осуществлять предварительное введение пробы в петлю-дозатор определенного объема (обычно от 10 до 100 мкл) или в специальное дозирующее устройство переменного объема. Объем петли указан на ее маркировке. Конструкция дискретного инжектора, как

правило, позволяет осуществлять замену петли. Современные автоматические инжекторы могут обладать рядом дополнительных функций, например, выполнять функцию станции пробоподготовки: осуществлять смешение и разбавление образцов, проводить реакцию предколоночной дериватизации.

### **3.4 Хроматографическая колонка**

Хроматографические колонки обычно представляют собой трубки из нержавеющей стали, стекла или пластика, заполненные сорбентом и закрытые с обеих сторон фильтрами с диаметром пор 2–5 мкм. Длина аналитической колонки может находиться в диапазоне от 5 до 60 см и более, внутренний диаметр – от 2 до 10 мм. Колонки с внутренним диаметром менее 2 мм используются в микроколоночной хроматографии. Существуют также капиллярные колонки с внутренним диаметром около 0,3–0,7 мм. Колонки для препаративной хроматографии могут иметь внутренний диаметр 50 мм и более.

Перед аналитической колонкой могут устанавливаться короткие колонки (предколонки), выполняющие различные вспомогательные функции, основная из которых - защита аналитической колонки. Обычно анализ проводят при комнатной температуре, однако для увеличения эффективности разделения и сокращения продолжительности анализа может быть использовано термостатирование колонок при температурах до 80 - 100 °С. Возможность использования повышенной температуры при разделении ограничивается стабильностью неподвижной фазы, поскольку при повышенных температурах возможна ее деструкция.

### **3.5 Неподвижная фаза (сорбент)**

В качестве сорбентов обычно применяются:

- силикагель, оксид алюминия, используются в нормально-фазовой хроматографии.

Механизм удерживания в данном случае – обычно адсорбция;

- силикагель, смолы или полимеры с привитыми кислотными или основными группами. Область применения – ионообменная и ионная хроматография;



- силикагель или полимеры с заданным распределением размеров пор (эксклюзионная хроматография);

- химически модифицированные сорбенты (сорбенты с привитыми фазами), приготовленные чаще всего на основе силикагеля. Механизм удерживания - адсорбция или распределение между подвижной и неподвижной фазами. Область применения зависит от типа привитых функциональных групп;

- химически модифицированные хиральные сорбенты, например, производные целлюлозы и амилозы, протеины и пептиды, циклодекстрины, хитозаны, используемые для разделения энантиомеров (хиральная хроматография).

Сорбенты с привитыми фазами могут иметь различную степень химической модификации. В качестве привитых фаз наиболее часто применяются:

– октадецильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3]$  (сорбент октадецилсилан (ODS) или C18);

– октильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3]$  (сорбент октилсилан или C8);

– фенильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}_6\text{H}_5)]$  (сорбент фенилсилан);

– цианопропильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}]$  (сорбент CN);

– аминопропильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2]$  (сорбент NH2);

– диольные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{OCH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}]$  (сорбент диол).

Сорбенты с привитыми фазами, полученные на основе силикагеля, химически устойчивы при значениях pH от 2,0 до 7,0, если другое специально не оговаривается производителем. Частицы сорбента могут иметь сферическую или неправильную форму и разнообразную пористость. Размер частиц сорбента в аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии обычно составляет 3–10 мкм, в препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии – 50 мкм и более. Существуют также монолитные колонки, в которых сорбент представляет собой монолит со сквозными порами, заполняющий весь объем колонки. Высокая

эффективность разделения обеспечивается высокой площадью поверхности частиц сорбента (которая является следствием их микроскопических размеров и наличия пор), а также равномерностью состава сорбента и плотной и равномерной его упаковкой.

### 3.6 Детекторы

В высокоэффективной жидкостной хроматографии используются различные способы детектирования. В общем случае подвижная фаза с растворенными в ней компонентами после хроматографической колонки попадает в ячейку детектора, где непрерывно измеряется то или иное ее свойство (поглощение в ультрафиолетовой или видимой области спектра, флуоресценция, показатель преломления, электропроводность и др.). Полученная при этом хроматограмма представляет собой график зависимости некоторого физического или физико-химического параметра подвижной фазы от времени.

Наиболее распространенными детекторами в высокоэффективной жидкостной хроматографии являются **спектрофотометрические**. В процессе элюирования веществ в специально сконструированной микроювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны. Широкая область линейности детектора позволяет анализировать как

примеси, так и основные компоненты смеси на одной хроматограмме.

Спектрофотометрический детектор позволяет проводить детектирование при любой длине волны в его рабочем диапазоне (как правило, 190-600 нм). Применяются также мультиволновые детекторы, позволяющие проводить детектирование при нескольких длинах волн одновременно и детекторы на диодной матрице, позволяющие регистрировать оптическую плотность одновременно во всем рабочем диапазоне длин волн (как правило, 190-950 нм). Это позволяет регистрировать спектры поглощения проходящих через ячейку детектора компонентов.

**Флуориметрический детектор** применяется для определения флуоресцирующих соединений или не флуоресцирующих соединений в виде их флуоресцирующих



производных. **Принцип действия флуориметрического детектора** основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного света. Поглощение обычно проводят в ультрафиолетовой области спектра, длины волн флуоресцентного излучения превышают длины волн поглощенного света. Флуориметрические детекторы обладают очень высокой чувствительностью и селективностью. Чувствительность флуоресцентных детекторов примерно в 1000 раз выше чувствительности спектрофотометрических. Современные флуоресцентные детекторы позволяют не только получать хроматограммы, но и регистрировать спектры возбуждения и флуоресценции анализируемых соединений.

Для определения соединений, слабо поглощающих в ультрафиолетовой и видимой областях спектра (например углеводов), используют **рефрактометрические детекторы** (рефрактометры). Недостатки этих детекторов – их низкая (по сравнению со спектрофотометрическими детекторами) чувствительность и значительная температурная зависимость интенсивности сигнала (детектор необходимо термостатировать), а также невозможность их использование в режиме градиентного элюирования.

Принцип работы **испарительных детекторов лазерного светового рассеяния** основан на различии давлений паров хроматографических растворителей, входящих в состав подвижной фазы, и анализируемых веществ. Подвижная фаза на выходе из колонки вводится в распылитель, смешивается с азотом или CO<sub>2</sub> и в виде мелкодисперсного аэрозоля попадает в обогреваемую испарительную трубку с температурой 30 – 160 °С, в которой подвижная фаза испаряется. Аэрозоль из нелетучих частиц анализируемых веществ рассеивает световой поток в камере рассеивания. По степени рассеивания светового потока можно судить о количестве определяемого соединения. Детектор более чувствителен, чем рефрактометрический, его сигнал не зависит от оптических свойств пробы, от типа функциональных групп в определяемых веществах, от состава подвижной фазы и может быть использован в режиме градиентного элюирования.

Электрохимические детекторы (кондуктометрические, амперометрические, кулонометрические и др.). **Амперометрический детектор** применяют для определения электроактивных соединений, которые могут быть окислены или восстановлены на поверхности твердого электрода. Аналитическим сигналом является величина тока окисления или восстановления. В ячейке детектора имеется по крайней мере два электрода – рабочий и электрод сравнения (хлоридсеребрянный или стальной). К электродам прикладывается рабочий потенциал, величина которого зависит от природы определяемых соединений. Измерения могут проводиться как при постоянном потенциале, так и в импульсном режиме, когда задается профиль изменения потенциала рабочего электрода в течении одного цикла регистрации сигнала. В амперометрическом детекторе используют рабочие электроды из углеродных материалов (наиболее часто стеклоуглеродный или графитовый), и металлические: платиновый, золотой, медный, никелевый.

**Кондуктометрический детектор** используют для детектирования анионов и катионов в ионной хроматографии. Принцип его работы основан на измерении электропроводности подвижной фазы в процессе элюирования вещества.

Исключительно информативным является масс-спектрометрический детектор, который обладает высокой чувствительностью и селективностью. В высокоэффективной жидкостной хроматографии используются также, Фурье-ИК-детекторы, радиоактивности и некоторые другие.

#### Характеристики детекторов для вэжх

Детектор	Измеряемое физическое свойство	Чувствительность, мг в пробе	Селективность
Фотометрический	Оптическая плотность при фиксированной длине волны	$10^{-10}$	высокая
Спектрофотометрический	Оптическая плотность при выбираемой длине	$10^{-9}$	высокая



	волны		
Рефрактометрический	Разность показателей преломления в сравнительной и измерительной ячейках	$10^{-5}$	малая
Флуориметрический	Интенсивность флуоресценции исследуемых веществ в подвижной фазе	$10^{-11}$	очень высокая
Амперометрический	Ток окисления или восстановления электрохимически активных соединений	$10^{-9} - 10^{-10}$	очень высокая

#### 4.Области применения

ВЭЖХ используется в биологии и биотехнологии (в т. ч. при расшифровке генома человека, решении задач протеомики, пептидомики, метаболомики), в медицине (напр., для ранней диагностики заболеваний с использованием биохимических маркеров), в фармацевтике при создании новых лекарств и анализе их чистоты (в т. ч. энантиомерной), в судебно-медицинских экспертизах, в контроле окружающей среды и промышленных выбросов, технологических процессов и качества продукции в химической, нефтехимической, пищевой, микробиологической промышленности. Препаративную жидкостную хроматографию используют для выделения и очистки множества природных и синтетических веществ, в т. ч. биологически активных соединений, вирусов (гриппа, энцефалита и др.), белков и полипептидов; в промышленности – фуллеренов, инсулина, сапонинов, интерлейкина-2 человека, гистонов, плазмид ДНК, антибиотиков, оптических изомеров и др.



## Заключение

Начало XX века ознаменовалось открытием хроматографического метода анализа, обогатившего и объединившего различные области науки, без которых немислим научный прогресс XXI века. Внедрение хроматографических методов, и в первую очередь жидкостной хроматографии, в медицину позволило решить многие жизненно важные проблемы: исследование степени чистоты и стабильности лекарственных средств, препаративное выделение индивидуальных гормональных препаратов (например, инсулина, интерферона), количественное определение в биологических объектах нейромедиаторов: адреналина, норадреналина. С наличием этих веществ в живом организме связывают способность к запоминанию, обучению, приобретению каких-либо навыков. Идентификация методами ВЭЖХ стероидов, аминокислот, аминов и других соединений оказалась крайне важной при диагностике некоторых наследственных заболеваний: инфаркта миокарда, диабета, различных заболеваний нервной системы. Одной из актуальных задач клинической медицины для экспресс-диагностики является проведение так называемого профильного анализа компонентов биологического объекта, осуществляемого методами жидкостной хроматографии, что позволяет не проводить идентификацию каждого пика, а сопоставлять профили хроматограмм для заключения о норме или патологии. Обработка огромного массива информации осуществляется только с использованием ЭВМ (метод получил название "метод распознавания образов")

## Список литературы

1. Столяров Б.В., Савинов И.М., Витсиберг А.Г., Карцова А.А. Практическая газовая и жидкостная хроматография. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 1998. 610 с.
2. Евгеньева И.И. Планарная хроматография и анализ органических веществ // Там же. 1999. № 11. С. 50-55.
3. Киселев А. В., Яшин Я. И. Адсорбционная газовая и жидкостная хроматография. М., 1979;
4. Яшин Я. И., Яшин А. Я. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Состояние и перспективы // Российский химический журнал. 2003. Т. 47. № 1.
5. Даванков В. А., Яшин Я. И. Сто лет хроматографии // Вестник РАН. 2003. Т. 73. № 7;
6. Стыскин Е. Л., Ициксон Л. Б., Брауде Е. В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М., 1986
7. Москвин Л.Н., Царицына Л.Г. Методы разделения и концентрирования в аналитической химии . – Л.: Химия, 1991. – 256 с