



САМАРСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
SAMARA UNIVERSITY

## Лекция 2

«Современная ВЭЖХ. Круг анализируемых объектов. Сорбенты и подвижные фазы для ВЭЖХ. Трудности анализа сильно полярных и ионизированных проб рацематов. Современная планарная хроматография. ТСХ. ВЭТСХ»

Проф. Буланова Анджела Владимировна

Самара, 2018



**В настоящее время ВЭЖХ занимает ведущие позиции среди других методов хроматографии как по объему выпускаемой аппаратуры, так и по числу публикаций.**

**Современная ВЭЖХ реализована в различных вариантах. Эти варианты позволяют разделять различные смеси молекул (включая смеси всех типов изомеров); макромолекулы синтетических и биополимеров (включая вирусы и молекулы с массами от одного до нескольких миллионов); ионы и устойчивые радикалы.**

**Велика роль ВЭЖХ и в таких жизненно важных областях науки и производства, как *биология, биотехнология, пищевая промышленность, медицина, фармацевтика, судебно-медицинская экспертиза, контроль загрязнения окружающей среды и др.* ВЭЖХ сыграла одну из основных ролей в расшифровке генома человека, в последние годы успешно решает задачи *протеомики*. (Протеомика — область молекулярной биологии, основным предметом изучения которой являются белки, их функции и взаимодействия в живых организмах)**



**Нормально-фазовая** - жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза более полярна, чем подвижная.

**Обращенно-фазовая** - жидкостная хроматография, в которой неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная.

**Ионная** - ионообменная хроматография, в которой на первой стадии проводят разделение смеси компонентов в разбавленном растворе кислоты (основания), а затем удаляют избыток кислоты (основания) в элюате с целью повышения чувствительности определения разделенных ионов кондуктометрическим детектором.

**Ион-парная** - жидкостная хроматография, в которой подвижная фаза содержит сорбируемое ионогенное вещество (ион-парный реагент) и разделение смеси веществ происходит за счет различия в способности веществ к образованию ионных пар и/или в коэффициентах распределения ионных пар между подвижной и неподвижной фазами.



- **Ионообменная** - жидкостная хроматография, в которой неподвижной фазой служит катионит или анионит и разделение смеси ионизированных веществ происходит в результате различия в их константах ионного обмена.
- **Эксклюзионная** - жидкостная хроматография, в которой неподвижной фазой служит пористое тело или гель и разделение смеси веществ происходит в результате различия в размерах молекул веществ и/или их форме и способности проникать в поры неподвижной фазы.
- **Гель-проникающая** - хроматография, в которой неподвижной фазой служит гель
- **Лигандообменная** - хроматография, в которой неподвижная и/или подвижная фаза содержат комплексообразующий ион металла и разделение смеси веществ происходит за счет различия в константах образования комплекса и/или коэффициентов распределения комплексов между подвижной и неподвижной фазами.
- **Гидрофобная** - жидкостная хроматография на неполярных сорбентах, в которой в качестве подвижной фазы используются водные или водно-органические растворы и разделение смеси веществ происходит в результате различия в их взаимодействии с гидрофобными группами сорбента





## Основные современные варианты ВЭЖХ

- **Гидрофильная** - жидкостная хроматография на полярных сорбентах, в которой в качестве подвижной фазы используются водно-органические растворы и разделение смеси происходит в результате различия в их взаимодействии с полярными группами сорбента в условиях убывающего градиента органического модификатора в элюенте.
- **Энантоселективная (хиральная)** хроматография, в которой разделение энантиомеров происходит за счет энантоселективности их взаимодействия с хиральными компонентами (хиральными селекторами) неподвижной и/или подвижной фазы.
- **Аффинная (биоспецифическая)** - жидкостная хроматография, в которой разделение смеси биологически активных веществ происходит за счет различия в их биоспецифическом взаимодействии с комплементарными сорбционными центрами неподвижной фазы.
- **Мицеллярная хроматография** - жидкостная хроматография, в которой в качестве подвижной фазы служит раствор поверхностно-активного вещества с концентрацией выше критической концентрации мицеллообразования



## ЖИДКОСТНЫЙ ХРОМАТОГРАФ «МИЛИХРОМ – 6»





## НАИБОЛЕЕ ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ВЭЖХ

- **Обращенно-фазовая ВЭЖХ** – силикагель с привитыми группами ( $C_{18}$  – октадецилсиликагель,  $C_{16}$  – гексадецилсиликагель,  $C_8$  - октилсиликагель).
- **Нормально-фазовая ВЭЖХ** – силикагель, силикагель с привитыми группами (CN -,  $NH_2$  -, диолы,  $Al_2O_3$ ).
- **Ионообменная и ионная** – носители с привитыми анионами и катионами.
- **Углеродные сорбенты, циклодекстрины, полимеры с порами молекулярных размеров, сверхсшитые полистиролы, макроциклические антибиотики и др.**
- **Сверхсшитый полистирол** - новый класс полимерных сеток, полученный путем сшивания цепей полистирола жесткими мостиками-распорками. Все фрагменты сетки доступны окружающей жидкой или газообразной среде, что обеспечивает высокую сорбционную емкость, а возможность регулирования размера пор позволяет создавать высокоселективный сорбент.

(Череватюк Г. В., Руденко А. А., Ярыгин Д. В., Гулая Ю. В., Дворницин А. А., Полищук Т. С., Лим Л. А. Сверхсшитый полистирол – особенности структуры // Молодой ученый. – 2017. — №2.1. — С. 44-46. — URL <https://moluch.ru/archive/136/39071>)





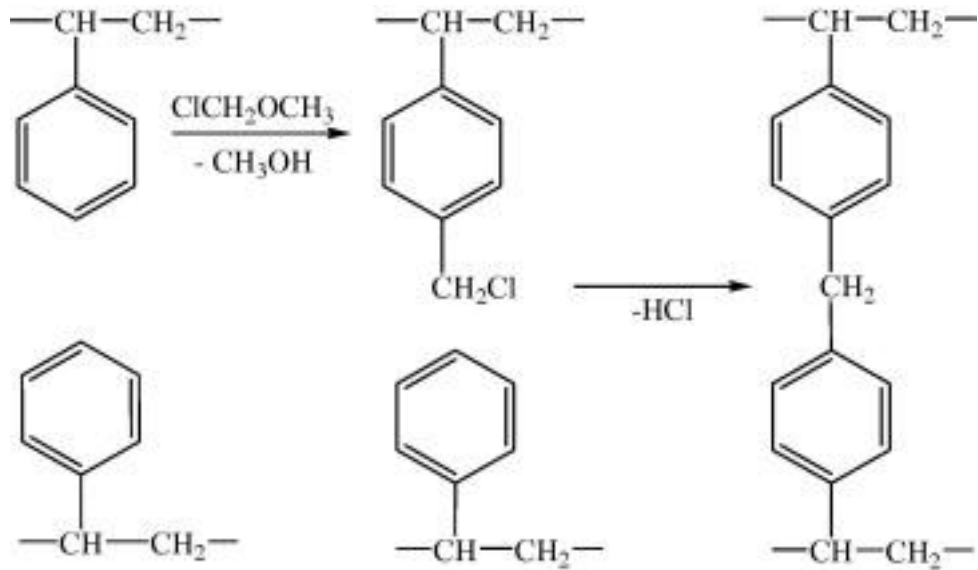
## СВЕРХСШИТЫЕ ПОЛИСТИРОЛЫ

- **Идея синтеза сверхсшитых полимерных материалов была впервые была предложена и реализована д.х.н., проф. Даванковым В.А. И д.х.н., проф. Цюрупой М.П. . Общий принцип синтеза сверхсшитых полимеров заключается в создании жесткой ажурной трёхмерной сетки в присутствии хорошо сольватирующего сетку растворителя. Этот общий принцип может быть реализован как процессами полимеризации полифункциональных мономеров, так и интенсивной сшивкой длинных полимерных цепей полифункциональными реагентами. Этот второй путь был осуществлен в промышленном масштабе реакцией бифункциональных реагентов с сильно сольватированными цепями полистирола в его гранульных сополимерах с дивинилбензолом. Степень сшивки таких сеток превышает 50%. Сверхсшитые полистиролы – единственные доступные нанопористые полимерные материалы являются сорбентами нового поколения. Они выгодно отличаются громадной внутренней удельной поверхностью (1000 и более м<sup>2</sup>/г), большим сорбционным объёмом (порядка 0.5 мл/г) и совместимостью с любыми жидкими средами.**





# СИНТЕЗ СВЕРХСШИТОГО ПОЛИСТИРОЛА



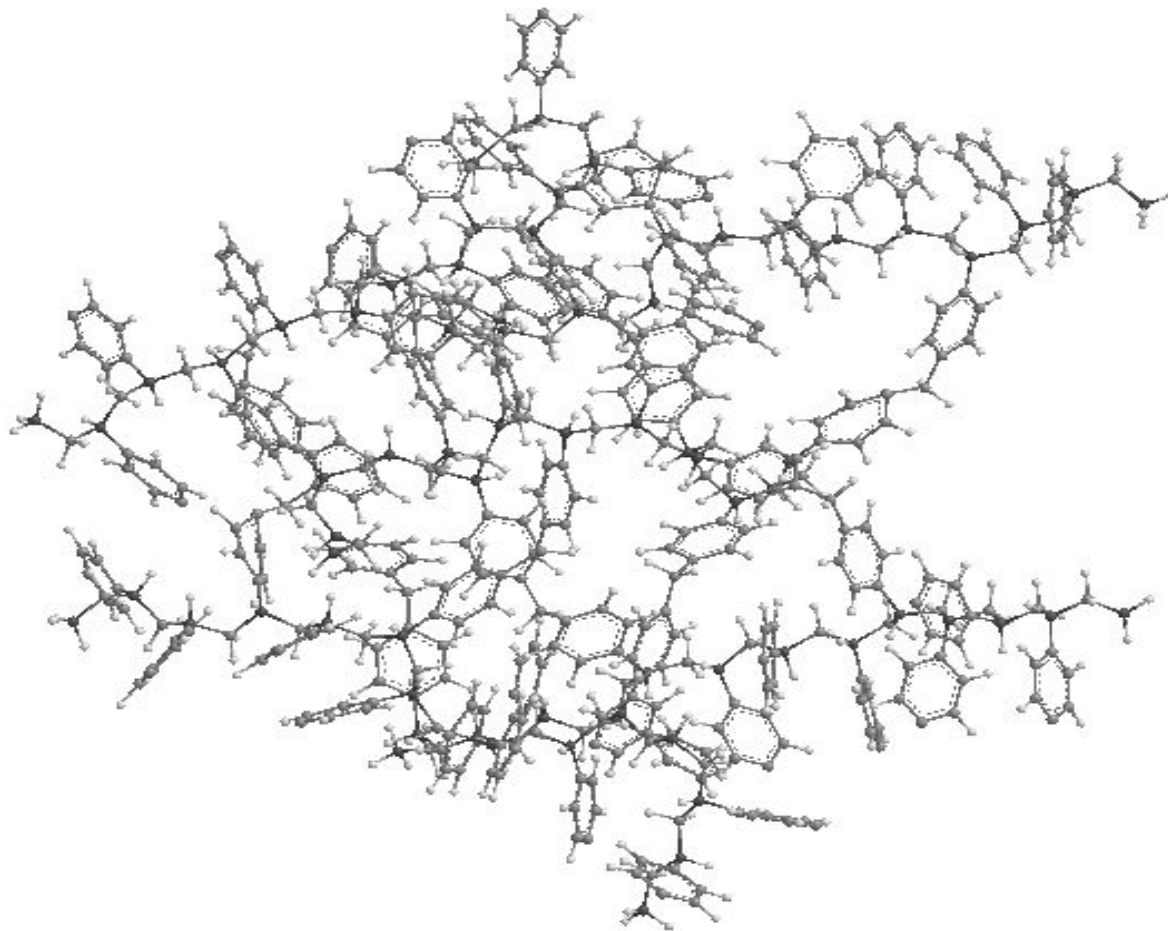
Реакция протекает в две стадии: сначала хлорметильные группы вводятся в исходные полимерные цепи, которые затем алкилируют фенильные кольца других молекул винилбензола.

Сшиванием набухших в 1,2-дихлорэтане микрогранул 1.5 и 2.5 моль моно хлордиметилового эфира по реакции Фриделя-Крафтса были получены сверхсшитые сетки с предельными степенями сшивания 300 и 500%. Все синтезированные полимеры являются пористыми материалами



# СВЕРХСШИТЫЕ ПОЛИСТИРОЛЫ

## Структура сверхсшитого полистирола





- **Роль подвижной фазы (растворителя) в жидкостной хроматографии весьма многообразна. Наряду с чисто транспортной функцией растворитель активно участвует в самом процессе разделения и оказывает существенное влияние на возможности детектирования. Часто незначительное изменение состава подвижной фазы дает возможность оптимизировать процесс, улучшить форму пиков, разрешение отдельных компонентов и даже изменить механизм разделения. Поэтому при выборе растворителей необходимо учитывать весь комплекс их свойств, в той или иной степени влияющих на проведение хроматографического эксперимента.**



## ОСНОВНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПФ

- Растворители, применяемые в ВЭЖХ, должны удовлетворять следующим основным требованиям:
- чистота,
- химическая инертность,
- совместимость с детектором,
- достаточная растворяющая способность по отношению к анализируемым веществам,
- низкая вязкость,
- безопасность, доступность.
- Чистота растворителя в жидкостной хроматографии имеет очень большое значение, так как различные примеси в подвижной фазе влияют на все основные стадии процесса: подачу растворителя, разделение в колонке, детектирование и воспроизводимость результатов. Требуемая степень чистоты растворителя определяется выбранным вариантом разделения и используемой аппаратурой.



## ВЛИЯНИЕ ПРИМЕСЕЙ В ПФ НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС В ВЭЖХ

- 1. Ухудшение эффективности разделения и воспроизводимости результатов.
- 2. Сильное отклонение нулевой линии и образование ложных пиков при градиентном элюировании.
- 3. Ухудшение возможностей детектирования (примеры — примеси олефинов в парафиновых углеводородах при УФ-детектировании, примесь этанола в хлороформе при ИК-детектировании).
- 4. Порча сорбента: примеси оснований приводят к растворению силикагеля; примеси диенов и других лабильных соединений осмоляются и блокируют поверхность адсорбентов, особенно оксида алюминия; примеси карбонильных соединений реагируют с привитыми сорбентами, содержащими аминогруппу; пероксиды окисляют привитые фазы и полистирольные гели.
- 5. Загрязнение веществ, выделяемых из элюата (особенно это влияет на выделение соединений из элюата в препаративной хроматографии).
- 6. Разложение или химическое изменение компонентов пробы (типичные примеры — гидролиз многих металлоорганических соединений, окисление лабильных веществ пероксидами или растворенным кислородом).
- 7. Коррозия аппаратуры (пример — примесь HCl в хлорсодержащих растворителях).



## ЭЛЮИРУЮЩАЯ СИЛА. ЭЛЮОТРОПНЫЕ РЯДЫ

- Одной из основных характеристик ПФ в ЖХ является ее *элюирующая сила*, т. е. способность десорбировать вещества из адсорбента.
- Взаимодействие растворителя с растворенным веществом определяется комплексом четырех основных типов межмолекулярных взаимодействий: *дисперсионного, индукционного, донорно-акцепторного (включая образование водородной связи) и диэлектрического (сольватация ионов)*. Суммарный эффект всех типов взаимодействий определяет *полярность растворителя*, а преимущественное проявление какого-либо из них — его *селективность*.
- Полярность растворителя определяет его элюирующую силу: в адсорбционной и нормально-фазовой распределительной хроматографии с увеличением полярности элюирующая сила растворителя возрастает, а в обращенно-фазовой — снижается. *Чем больше элюирующая сила подвижной фазы, тем меньше фактор удерживания для данного вещества на данном сорбенте (слабее удерживается)*. Расположение растворителей в соответствии с возрастанием их элюирующей силы называют *элюотропным рядом*.
- Мерой *элюирующей силы* растворителя служит величина  $\epsilon^\circ$ , экспериментально определенная для ряда растворителей на оксиде алюминия в сравнении с н-пентаном ( $\epsilon^\circ=0$ ). Величина  $\epsilon^\circ$  пропорциональна разности удельных энергий взаимодействий растворителя и пентана с чистой поверхностью адсорбента. Для силикагеля значения  $\epsilon^\circ$  в среднем в 1,25 раза ниже, чем для оксида алюминия. На основании сравнительных исследований ПФ в ВЭЖХ составлены *элюотропные ряды*.





## ЭЛЮОТРОПНЫЙ РЯД ПФ НА СИЛИКАГЕЛЕ

Растворитель (ПФ)	Элюирующая сила на силикагеле
Гексан	0.01
Бензол	0.10
Бутилхлорид	0.20
Хлороформ	0.26
Метиленхлорид	0.32
ИП эфир	0.34
Этилацетат	0.38
Тetraгидрофуран	0.44
Ацетонитрил	0.50
Метанол	0.70



# СВОЙСТВА РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ВЭЖХ

Свойства растворителей для ВЭЖХ (\* Значения параметров взяты из работы [256].)

Растворитель	Температура кипения, °С	Плотность $d_{20}$	Вязкость, сП, 25 °С	Коэффициент преломления $n_D^{20}$	Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила, e°	
						на окиси алюминия	на силикагеле
Ацетон	56	0,79	0,30	1,356	330	0,56	
Ацетонитрил	82	0,78	0,34	1,341	190	0,65	0,50
Бензол	80	0,88	0,60	1,498	280	0,32	
Вода	100	1,00	0,89	1,333			
Гексан	69	0,66	0,30	1,372	190	0,01	0,01
Гептан	98	0,68	0,40	1,385	195	0,01	0,01
Дибутиловый эфир	142	0,77	0,64	,397	220		
Диметилформамид	153	0,94	0,80	,428	268		
Диоксан	101	1,03	1,2	,420	215	0,56	
Дихлорэтан	83	1,25	0,78	,442	228	0,44	
Диэтиловый эфир	35	0,71	0,24	,350	218	0,38	
Изооктан	99	0,69	0,47	,389	197	0,01	0,01
Изопропиловый эфир	68	0,73	0,38	,365	220	0,25	0,34
Метанол	65	0,79	0,54	,326	205	0,95	0,7
Метиленхлорид	40	1,33	0,41	,421	233	0,42	0,32
Метилэтилкетон	80	0,86	0,38	,376	329	0,51	
Метилцеллозольз	125	0,97	1,60	,400	210		
Пентан	36	0,63	0,22	,355	205		





## СВОЙСТВА РАСТВОРИТЕЛЕЙ ДЛЯ ВЭЖХ

Растворитель	Температура кипения, °С	Плотность $d_{20}$	Вязкость, сП, 25 °С	Коэффициент преломления $n_D^{20}$	Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила, $\epsilon^\circ$	
						на окиси алюминия	на силикагеле
Пропанол-1	97	0,80	1,9	,385	205	0,82	
Пропанол-2	82	0,79	1,9	,384	205	0,82	
Тетрагидрофуран	66	0,89	0,46	,405	212	0,57	0,44
Толуол	ПО	0,87	0,55	,494	285	0,29	
Триэтиламин	89	0,73	0,36	,398		0,54	
Уксусная кислота	118	1,05	1,1	,370	230		
Хлороформ	61	1,49	0,53	,443	245	0,40	0,26
Циклогексан	81	0,78	0,90	,423	200	0,04	
Четыреххлористый углерод	77	1,60	0,90	,457	265	0,18	
Этанол	78	0,79	1,08	,359	210	0,88	
Этилацетат	77	0,90	0,43	,370	256	0,58	0,38
Этиленгликоль	182	1,1	16,5	1,431	210	1,11	



## Детекторы для ВЭЖХ

Детектор	Измеряемое свойство подвижной фазы	Ориентировочная чувствительность, мг	Селективность
1. Фотометрический	Оптическая плотность на определенной длине волны, пропускаемой фильтром	10 <sup>-10</sup>	Высокая
2. Спектрофотометрический	Оптическая плотность на выбранной длине волны монохроматора	10 <sup>-9</sup>	Высокая
3. Рефрактометрический	Разность показателей преломления растворителя и раствора с пробой	10 <sup>-6</sup>	Низкая
4. Флуориметрический	Интенсивность излучения молекул пробы в элюенте	10 <sup>-11</sup>	Очень высокая
5. Амперометрический	Ток окисления или восстановления электрохимически активных соединений	10 <sup>-9</sup> -10 <sup>-11</sup>	Очень высокая
6. Кондуктометрический	Электропроводность ионов пробы в элюенте (воде)	10 <sup>-10</sup>	Низкая

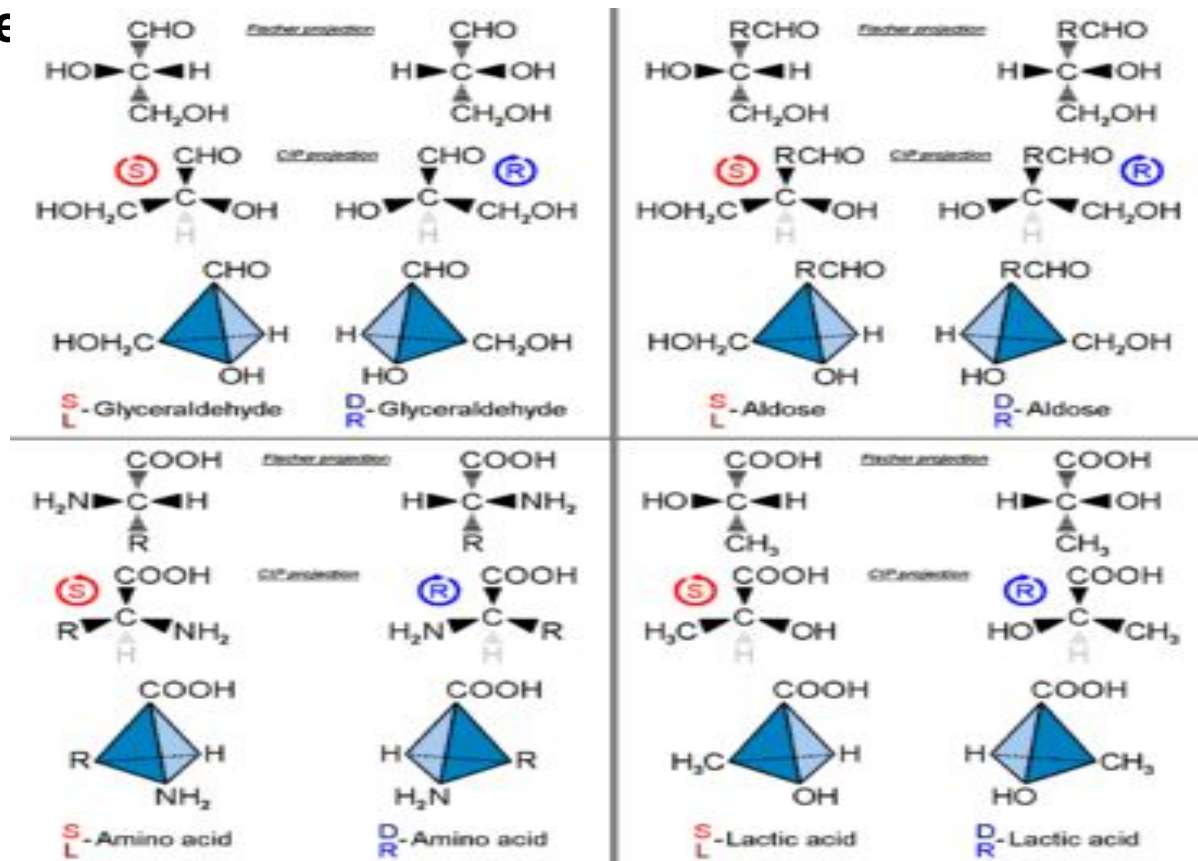


- 
- Для ВЭЖХ-анализа сильно полярных соединений наиболее подходящей является нормально-фазовая хроматография, в которой неподвижная фаза (НФ) полярна, содержит на поверхности полярные группы. Подходящей НФ в этом случае является силикагель. Для разделения сложных смесей, содержащих соединения разной полярности, в том числе и сильно полярные, используется вариант обращенно-фазовой ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) с добавками буферных растворов для создания необходимых значений рН ПФ.
- На удерживание полярных ионогенных соединений большое влияние оказывает рН раствора. Причем при изменении рН среды не только молекулы сорбатов могут находиться в ионизированной или молекулярной форме, но также и поверхностные кислотные и основные группы сорбента могут находиться в диссоциированной форме или протонироваться.



- **Рацемат** – эквимольная смесь двух энантиомеров. Рацематы не обладают оптической плотностью, а также отличаются по свойствам от индивидуальных энантиомеров.

- **Приме**





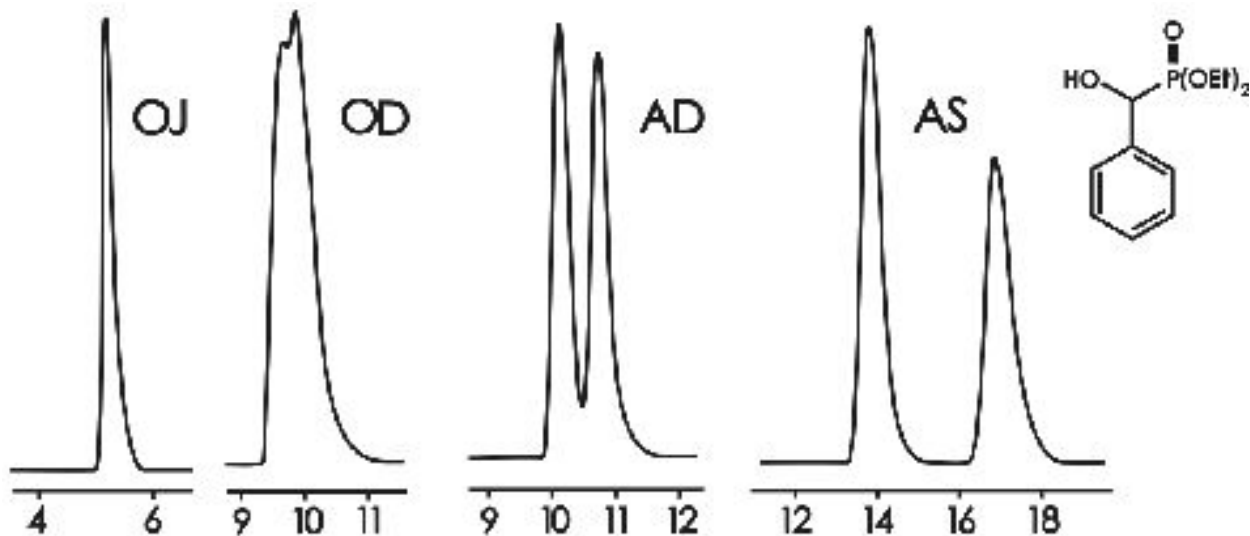
- Многие лекарства представляют собой рацемическую смесь двух оптически активных изомеров (например, бета-блокаторы, нестероидные противовоспалительные препараты и др.) Биологическая активность энантиомеров может быть различной. Это стало очевидным после трагической истории с талидомидом – лекарственным средством, которое в 60-е гг. прошлого века врачи во многих странах прописывали беременным как эффективное снотворное и успокаивающее. Только со временем обнаружилось его ужасное побочное действие: препарат оказался тератогенным, и на свет появилось множество младенцев с врожденными уродствами. Лишь в конце 80-х гг. выяснилось, что причиной несчастий была только правовращающая форма энантиомера в талидомиде, являющемся рацемической смесью обоих антиподов
- Т.о., один из энантиомеров /гой - яд.





## Трудности анализа сильно полярных и ионизированных проб рацематов

- При синтезе субстанций лекарств необходимо разделять рацемическую смесь действующего препарата. Для разделения энантиомеров в рацематах применяют хиральную хроматографию.
- Наиболее универсальными и широко применяющимися являются фазы с хиральными селекторами на основе модифицированных полисахаридов (карбаматов и эфиров). Считается, что, имея линейку трех или четырех фаз этого типа (Chiralcel OD, AD, OJ, AS), можно разделить до восьмидесяти процентов всех хиральных соединений (рис. РАН). Рис. Разделение рацемата (структурная формула приведена на рисунке) на четырех различных фазах Chiralcel. Элюент гексан-изопропанол 100:10. Хроматограмма получена Ильиным М.М. (лаборатория ССП ИНЭОС РАН)





## Типы хиральных неподвижных фаз

Источник	Тип селектора	Хиральный селектор
Натуральные	Протеины	Альбумины
		Гликопротеины
		Энзимы
	Олигосахариды	$\alpha$ -Циклодекстрин
	$\beta$ -Циклодекстрин	
	$\gamma$ -Циклодекстрин	
Антибиотики	Ванкомицин	
	Тейкопланин	
	Ристоцетин	
Алкалоиды	Хинин	
	Хинидин	
Полусинтетические	Модифицированные олигосахариды	Дериватизированные циклодекстрины
		Карбаматы полисахаридов
	Модифицированные полисахариды	Сложные эфиры полисахаридов
		Ионообменные селекторы
Модифицированные низкомолекулярные природные соединения	Производные пролина и других аминокислот (лигандообменные селекторы)	
Синтетические	Низкомолекулярные синтетические соединения	Пиркловские фазы (фазы браш-типа)
		Сшитые тартрамыды
	Синтетические полимеры	Полиакрилаты и полиакриламиды
Импринтные материалы		





# Современная планарная жидкостная хроматография (ТСХ) Высокоэффективная ТСХ

- Такие характеристики метода ТСХ как простота, доступность и относительная дешевизна оборудования, возможность одновременного анализа нескольких образцов, легкая и быстрая смена растворителей при оптимизации разделения и др. делают его привлекательным при использовании. В настоящее время для решения важнейших аналитических задач наряду с обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией и ТСХ широко используется метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) в сочетании с различными видами детектирования.
- В практике аналитической химии применяют следующие типы планарной хроматографии: бумажная, классическая линейная одномерная и многомерная ТСХ, круговая и антикруговая ТСХ, ТСХ под давлением и планарная электрохроматография. ВЭТСХ обладает рядом очевидных достоинств (экспрессность, возможность одновременного количественного определения различных образцов, детектирование на слое сорбента), но в отличие от других методов разделения пределы обнаружения аналитов достаточно высоки, что затрудняет активное использование его в практике клинической медицины. Актуальным направлением современной клинической медицины становится экспресс-диагностика разнообразных заболеваний по характеристическим хроматографическим и электрофоретическим профилям биологически активных соединений. Исследования в этой области объединены в новое направление под названием **«метабономика»**, целью которого является изучение изменений состава эндогенных метаболитов с использованием аналитических методов и многомерного анализа полученных данных, что позволяет обнаруживать новые диагностические биомаркеры и осуществлять контроль эффективности проводимой лекарственной терапии.







- ВЭТСХ как метод была окончательно сформулирована немецкими учеными А.Златкисом и Р. Кайзером, выпустившими в 1977 году книгу «Высокоэффективная ТСХ». Современное состояние тонкослойной хрома-тографии детально изложено в монографии [1], которая издана в двух томах, и в работе [2]. Фирмы “Merck” и “Macherey and Nagel” – основные поставщики носителей для ТСХ. Сюда же можно отнести фирмы «Camag» (Швейцария) и “Desaga” (Германия). Развитие ТСХ повлекло за собой и возобновление интереса к электрофорезу на твердых носителях. Наиболее интересные результаты получаются при сочетании ТСХ и электрофореза в виде двухмерного фракционирования.
  
- 1. Т.Н. Dzido, P.W. Płocharz, A. Chomicki, A. Nałka-Grysin’ska, B. Polak // J. Chromatogr. A. 2011. V. 1218. P. 2636–2647.
- 2. В.Д. Красиков. Современная планарная хроматография // Журн. анал. химии.2003. Т. 58. С. 792–807.



# Современная планарная жидкостная хроматография (ТСХ) Высокоэффективная ТСХ

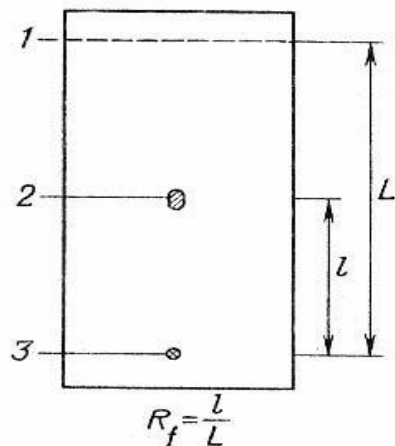
- В настоящее время ВЭТСХ широко применяется в биомедицинских исследованиях.
- Ее положительные особенности:
  - - движение элюента за счет капиллярных сил (простота хроматографического эксперимента, простота и низкая стоимость оборудования);
  - - использование дешевого универсального адсорбента – силикагеля (однократное использование пластинки, отсутствие требований к чистоте пробы); в качестве адсорбента можно применять целлюлозу;
  - - открытый слой адсорбента (одновременный анализ большого числа проб, отсутствие требований к УФ–прозрачности элюента, простота наблюдения, отсутствие необходимости в оптическом детектировании, большие возможности селективного детектирования, в том числе радиоактивных изотопов, детектирование всех компонентов пробы, легкость осуществления градиентной ТСХ, малое время анализа);
  - - обеспечивается возможность одновременного элюирования различными растворителями (до шести растворителей при элюировании по соседним до-рожкам) и регулируемого воздействия газовой фазы на разделение, можно изменить селективность за считанные секунды или минуты;
  - - за счет подбора условий элюирования (хроматографического разделения) может быть оптимизирована разрешающая способность только по интересующим исследователя веществам; благодаря этому экономится время, затрачиваемое на анализ;
  - - возможность хранить пластинку с разделенными образцами и детектировать вещества позже (независимо от процедуры разделения), тонкослойная пластинка может обследоваться так долго, сколько потребуются, или столь быстро, насколько это позволяет детектор (и соответствующие электронные схемы). Обеспечивается возможность выполнять спектральную идентификацию какое-то время спустя после разделения (в любом диапазоне волн, включая инфракрасную область спектра);
  - - затраты средств на количественный анализ составляют 1/3 от затрат на колоночную жидкостную хроматографию. При хорошей организации хроматографического процесса количественная оценка результатов оказывается более точной, чем в случае колоночной жидкостной хроматографии.





- **Физические основы метода**

- Разделение в ТСХ осуществляется вследствие многократного пересечения молекулами веществ границы фаз твердое вещество – жидкость (Т– Ж) или жидкость – жидкость (Ж – Ж), т.е. вследствие многократного процесса распределения вещества между подвижной и неподвижной фазами. Неподвижной фазой служит либо сухой сорбент (адсорбционная хроматография), либо сорбент, покрытый жидкой фазой (распределительная хроматография). Систему растворителей подбирают в соответствии со свойствами разделяемых веществ. Следует запомнить, что полярные вещества следует разделять в полярных растворителях, неполярные – в менее полярных или неполярных растворителях.
- В различных системах растворителей вещества обладают различной подвижностью. Количественно подвижность выражается величиной  $R_f$  и иначе называемой фактором удерживания (фактором задержки) (рис. 1).



**Рис. 1. Пластика ТСХ:**

- 1 – фронт растворителя; 2 – пятно анализируемого вещества;
- 3 – стартовая точка; L – расстояние старт – фронт растворителя;
- l – расстояние старт – пятно анализируемого вещества



# Современная планарная жидкостная хроматография (ТСХ) Высокоэффективная ТСХ

- Исходя из уравнения Ван-Деемтера (1), снижение размера частиц приводит к синбатному изменению величины высоты, эквивалентной теоретической тарелке ( $H$ ), и, следовательно, увеличению эффективности, на значение которой влияет и расстояние, пройденное элюентом (рис. 1).

- $$H = A + B/u + Cu, \quad (1)$$

- $$A = 2\lambda dp,$$

где  $u$  – линейная скорость потока подвижной фазы (см/с),  $\lambda$  – константа, отображающая зависимость от микроструктуры разделяющего слоя,  $dp$  – диаметр частиц сорбента (см),  $B$  – член, определяющий диффузию вещества в растворе,  $C$  – член, ответственный за процесс массообмена

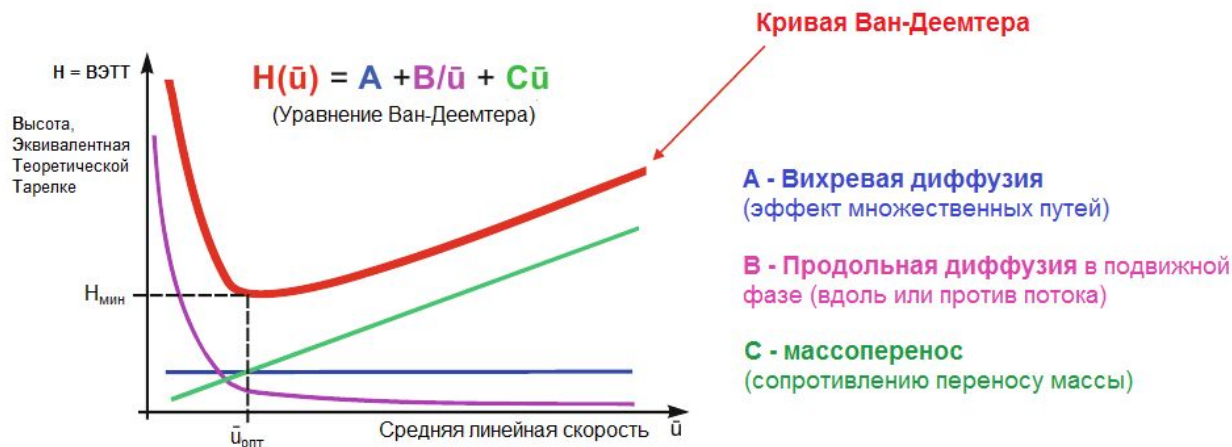


Рис. 2. Кривая Ван-Деемтера





- Таблица 1. Характеристики ТСХ и ВЭТСХ-пластин.

	ТСХ	ВЭТСХ
Средний размер частиц	10-15 мкм	5-7 мкм
Распределение частиц по размеру	широкое	узкое
Толщина слоя	250 мкм	100-200 мкм
Количество проб	макс. 12	36-72
Длина пробега фронта растворителя	100-150 мм	30-50 мм



- Возможности ТСХ за последнее время значительно увеличились с развитием методов детектирования, а также с сочетанием метода ТСХ со спектрометрическими методами, например, **ТСХ-МС**. В пространстве между слоем пластины и масс-спектрометром происходит извлечение молекул определяемых соединений в жидкую или газовую фазу. Аналиты удаляют из слоя лазерной десорбцией или с помощью матрично-активированной и поверхностно-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ), совмещенной с времяпролетным детектором (MALDI-TOF-MS, SALDI-TOF-MS), с использованием ионных ловушек, масс-спектрометра с Фурье-преобразованием или ионизацией электроспреем (ESI –electrosprayionization). Методы электронной и химической ионизации, в основном, применяются в газовой фазе. Такой подход обеспечивает полную экстракцию веществ с ТСХ-пластины и детектирование аналитов на уровне пикограмм. Возможно сочетание **ТСХ и с тандемной масс-спектрометрией**.
- В настоящее время применяют ТСХ-МС с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для анализа пептидов. Выявлены возможности различных матриц для определения ряда пептидов (брадикинин, ангиотензин и энкефалин, с молекулярными массами в диапазоне 500–1500 а.е.м.). Наиболее низкие пределы обнаружения (2–4 нг) достигнуты при использовании в качестве матрицы феруловой кислоты/фукозы и синапиновой кислоты.



- ТСХ-МС позволяет определять пептиды большего размера и небольшие белки (В-цепи бычьего инсулина, инсулин, цитохром С, миоглобин), однако селективность их разделения невелика. Тонкослойная хроматография активно применяется и для контроля чистоты лекарственных препаратов. Предложена альтернатива МАЛДИ – десорбционная ионизация электроспреем (DESI–desorption electrospray ionization). Для ее реализации не требуется наличие вакуума или матрицы. Полученные масс-спектры идентичны спектрам МС с ионизацией электроспреем. Данный подход использован при ТСХ анализе смеси аспирина, ацетаминофена и кофеина. Для получения масс-спектра потребовалось 2,5–10 мкг вещества.





# Современная планарная жидкостная хроматография (ТСХ) Высокоэффективная ТСХ

- *Планарная электрохроматография (ПЭХ) и планарная электрохроматография под давлением (ПЭХД)*
- Преториус первым описал высокоскоростную ТСХ, в которой для движения элюента используется электроосмотический поток [K. Ferenczi-Fodor, Z. Vegh, B. Renger. // Trends Analyt. Chem. 2006. V. 25. P. 778 –789.]. Позже подобная техника была применена на изначально сухом слое и названа планарной электрохроматографией [M. Pukl, M. Prosek, R.E. Kaiser. // Chromatographia. 1994. V. 38. P. 83–87.]. Если же приложить давление к системе, то будет осуществляться вариант планарной электрохроматографии под давлением, которая позволяет разделять аналиты с высокой эффективностью (удаётся достигнуть значений до 100000 т.т./м) за короткое время. Так, в [D. Nurok, J.M. Koers, A.L. Novotny, M.A. Carmichael, J.J. Kosiba, R.E. Santini, G.L. Hawkins, R.W. Replogle. // Anal. Chem. 2004. V. 76. P. 1690–1695.] за 1 мин разделены 9 пятикомпонентных систем, содержащих 4-холестен-3-он, 17 $\alpha$ -ацетоксипрогестерон, 2'-ацетонафтон, бензанилид, о-ин (рис. 3).



Рис. 3. Разделение пятикомпонентных систем методом ПЭХД на LiChrospherC18 пластинах при 59 атм. и 7 кВ [A. Mendes, L.C. Branco, C. Morais, A.L. Simplicio. // Electrophoresis. 2012. V. 33. P. 1182–1190.].







- Эффективность в ТСХ определяется числом теоретических тарелок

$$\bullet N = 16 \cdot (z_f/w)^2,$$

- где  $w$  – ширина пятна,  $z_f$  – путь, пройденный анализом.
- Фактор селективности ( $\alpha$ ) рассчитывается по формуле

$$\bullet \alpha = (R_{fA}/R_{fB}),$$

- Где  $R_{fA}$ ,  $R_{fB}$  – параметры удерживания КОМПОНЕНТОВ.



- *Методы детектирования в тонкослойной хроматографии*
- Детектирование в ТСХ может осуществляться или непосредственно на слое (по окончанию или в ходе процесса хроматографического разделения), либо после извлечения аналитов со слоя сорбента. Возможно применение
  - **физических** (оптические методы, масс-и Раман-спектроскопия),
  - **микрoхимических** (опрыскивание универсальными или групповыми реагентами),
  - **биохимических** (ферментативные реакции) методов.
- Для проведения количественного определения в ТСХ чаще используют оптические методы детектирования, основанные на регистрации взаимодействия электромагнитного излучения с исследуемым веществом. Оптические методы детектирования в ТСХ характеризуются высокой чувствительностью, многообразием способов осуществления и их комбинацией, возможностью качественной и количественной оценки аналитов различной природы.





- **Основы денситометрии. Видеоденситометрия.**
- Денситометры позволяют измерять поглощение света веществом на хроматограмме в режиме пропускания или отражения, а также флуоресценции или ее гашения. Режим пропускания доступен, если исследуемые вещества имеют полосы поглощения в видимой области спектра. Поглощение света в УФ-области регистрируется в режиме отражения (режим пропускания осуществить нельзя вследствие собственного поглощения силикагеля).
- Свет, падающий на поверхность хроматограммы в области локализации пятна определяемого соединения, в значительной степени, поглощается пятном, поэтому интенсивность отраженного света уменьшается. В основу принципа работы щелевого денситометра положено измерение разницы между интенсивностью отраженного света, падающего на участок хроматограммы, не содержащий пятна определяемого вещества, и интенсивностью света, отраженного от зоны, содержащей пятно анализа.
- Принцип метода видеоденситометрии заключается во введении изображения хроматограммы в компьютер с помощью видео или цифровой камеры с последующим сопоставлением интенсивностей пятен стандартных и определяемых соединений. Количественную обработку проводят по двум характеристикам: площади пятна и его «объему» в пространстве; в качестве третьей координаты используют интенсивность окраски пятна.
  - **Таким образом, наряду с методами ВЭЖХ и капиллярного электрофореза высокоэффективная тонкослойная хроматография является перспективным и активно развивающимся методом для анализа смесей стероидных гормонов и лекарственных препаратов в биологических жидкостях.**





**САМАРСКИЙ** УНИВЕРСИТЕТ  
SAMARA UNIVERSITY

# БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ

По желанию – личные контактные  
данные автора,  
телефон,  
e-mail

ул. Московское шоссе, д. 34, г. Самара, 443086  
Тел.: +7 (846) 335-18-26 , факс: +7 (846) 335-18-36  
Сайт: [www.ssau.ru](http://www.ssau.ru), e-mail: [ssau@ssau.ru](mailto:ssau@ssau.ru)