

Тема 6

РІДИННА ТА ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ. ГЕЛЬ-ФІЛЬТРАЦІЯ

Мета: розглянути основні принципи рідинної, газової хроматографії та гель-фільтрації, навчитися використовувати дані методи.

 **Основні терміни та поняття:** колоночна хроматографія, капілярна хроматографія, гель.

План

1. Високоєфективна рідинна хроматографія.
2. Використання газової хроматографії в аналізі.
3. Гель-хроматографія.

1. Високоєфективна рідинна хроматографія

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, англійською мовою – HPLC) – це метод розділення речовин, у якому рухомою фазою є рідина, а нерухомою фазою є тонкодисперсна тверда речовина, або рідина, нанесена на твердий носій, або твердий тонкодисперсний носій, хімічно модифікований введенням органічних груп. Розділення речовин у рідинній хроматографії базується на механізмах сорбції, розподілу, іонного обміну або розділення за розмірами молекул. Воно відбувається у колонці рідинного хроматографа, куди під високим тиском подається рідина.

Колонкова хроматографія – розділення, яке проводять у спеціальних колонках.

Капілярна хроматографія – розділення, яке проводять у спеціальних капілярних колонках (в газорідинній або в газо-твердофазній хроматографії). Рідка фаза або активна тверда речовина наносяться на внутрішні стінки капілярів і діють як нерухома фаза. Ефективність розділення сумішей суттєво підвищується у капілярній хроматографії. Капілярні колонки в газо-рідинній хроматографії бувають двох типів:

1. Капілярні колонки, що не містять носія. У цьому випадку нерухома рідка фаза розподілена на стінках капіляра. Це можна виконати пропускаючи через колонкукапіляр концентрований розчин рідкої фази або випарюючи розчинник із колонки, що повністю заповнена сильно розведеним розчином. Товщина плівки складає 0,01–1 мкм.

2. Капілярні колонки з пористим шаром носія, просоченого рідкою фазою (товщина шару 1–5 мкм). Капілярні колонки можуть бути довжиною 10–100 м і внутрішнім діаметром 0,25–0,35 мм і менше. Приготування капілярних колонок в лабораторії пов'язано з великими труднощами, тому їх доцільно купувати в готовому вигляді. Проба для аналізу в капілярних колонках зменшується в 1000 разів і більше, порівняно з набивними колонками; значно скорочується витрата газу-носія і тривалість аналізу.

Рідинний хроматограф (рис.6.1, 6.2) складається з системи подачі рухомої фази, блока вводу проби, хроматографічної колонки, детектора і реєструючого пристрою. Рухома фаза звичайно подається під тиском із однієї або декількох посудин і протікає через блок вводу проби, колонку, а потім через детектор із заданою швидкістю. Сигнал від детектора перетворюється, підсилюється і реєструється у вигляді хроматограми, аналогічно до хроматограми у газовій хроматографії. Для вводу проби використовують петлеві дозатори, спеціальні мікрошприци або систему автоматичного пробовідбору.

Рідинний хроматограф – це складніший ніж газовий хроматографічний прилад. Це пов'язано з тим, що система подачі елюента містить деякі додаткові вузли: систему дегазації, пристрій для створення градієнту, насоси та вимірювачі тиску. Насоси повинні забезпечити швидкість потоку від 0,1 до 10 мл/хв при тиску до 400 атм.

Температуру хроматографічної колонки підтримують постійною. Склад рухомої фази може або залишатись постійним протягом всього аналізу (*ізократичне елюювання*), або може змінюватись відповідно до заданої програми (*градієнтне елюювання*).

У ВЕРХ звичайно використовують прямі колонки довжиною 10, 15, 25 см з внутрішнім діаметром 4-5,5 мм. У мікроколонкових хроматографах використовують колонки довжиною 5-6 см і діаметром 1-2 мм. Колонки виготовляють зі скла або нержавіючої сталі.

Колонки заповнюють частинками сорбенту або твердого носія, на поверхню частинок якого нанесена тонка плівка рідкої нерухомої фази. Розмір частинок твердого носія становить 5-10 мкм. Твердий носій готують з поверхнево-пористих матеріалів – силікагелю з привитими на поверхні різними функціональними групами, алюмогелю, пористого скла, полімерних сорбентів.

Рідка нерухома фаза, нанесена на поверхню твердого носія, становить 0,75-1,5 % від маси твердого носія. Звичайно для розділення полярних речовин використовують полярні нерухомі фази і неполярні рухомі фази. Неполярні речовини ділять на неполярних нерухомих фазах з використанням полярних рухомих фаз. Рідкими нерухомими фазами служать речовини різної хімічної природи: гліколі, нітрили, силікони тощо.

У ВЕРХ використовують як нормально-фазовий, так і обернено-фазовий варіанти. У першому випадку полярність нерухомої фази вища за полярність рухомої фази, у другому, навпаки, полярність нерухомої фази є нижчою від полярності рухомої фази. Для безперервного контролю складу елюату, який витікає з колонки, у рідинній хроматографії звичайно використовують диференційні рефрактометри, фотометричні, УФ-спектрофотометричні, люмінесцентні і кондуктометричні детектори.

Диференційний рефрактометр – це універсальний детектор. Він дозволяє визначити загальний показник заломлення системи проба-елюент, тобто сигнал дають усі компоненти, показник заломлення яких відрізняється від показника заломлення елюенту. Його чутливість 10^{-6} г, діапазон

лінійності

становить

4 порядки. Цей детектор чутливий до зміни температури, тому вимагає термостатування.



Рисунок 6.1 – Система вискоєфективної рідинної хроматографії

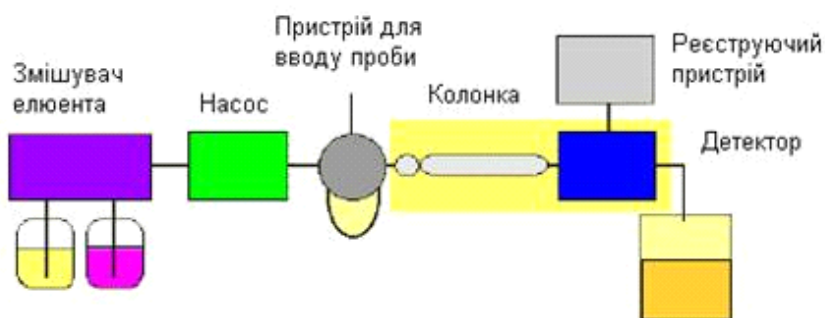


Рисунок 6.2 – Схема рідинного хроматографа

УФ-детектор – працює при одній і тій же довжині хвилі, що відповідає найбільш інтенсивній лінії ртутної лампи низького тиску $\lambda = 253,7$ нм. Флуоресцентна приставка дозволяє збуджувати випромінювання з $\lambda = 280$ нм. УФ-детектор найбільш чутливим є у випадках, коли молярні коефіцієнти світлопоглинання компонентів високі, а елюент не поглинає в ультрафіолетовій області спектру. У цьому випадку можна використовувати метод градієнтного елюювання. При $\lambda = 254$ нм можна визначати будь-які ароматичні сполуки, більшість кетонів та альдегідів ($\epsilon = 20 \cdot 10^4$). УФ-детектор селективний, дає можливість визначати 10^{-9} г, його діапазон лінійності 5 порядків.

Фотометри та спектрофотометри дають можливість працювати при будь-якій довжині хвилі (190-650 нм), вони реєструють зміну поглинання в часі при певній довжині хвилі або в зупиненому потоці елюенту знімають спектр. Швидкозаписуючий спектрофотометр записує всю спектральну область за 20 с. Спектрофотометричний детектор з лінійкою із 211 діодів на підкладці із кремнію дає можливість вимірювати одночасно велику кількість

смуг у вузькому інтервалі довжин хвиль. Отриману інформацію обробляє комп'ютер і зберігає в пам'яті для побудови графіка. Флуоресцентні детектори чутливіші від спектрофотометричних приблизно у сто разів. Їх застосовують для визначення мікродомішок.

Кондуктометричний детектор використовують у іонообмінній хроматографії для вимірювання провідності розчинів (Om^{-1}), пропорційної до числа іонів у розчині, їх рухливості. Сигнал детектора лінійно залежить від концентрації іонів у широкому інтервалі – від 0,01 мкг/мл до 100 мкг/мл. Високочутливе кондуктометричне детектування з автоматичним записом сигналу дає межу визначення 10^{-3} мкг/мл. Використання концентруючої колонки дає можливість знизити межу визначення на 2-3 порядки.

Проточний лазерний нефелометр, а також мікрокомп'ютери, які видають результати визначення середніх молекулярних мас за спеціальними програмами, використовують у ексклюзивній хроматографії для аналізу полімерів.

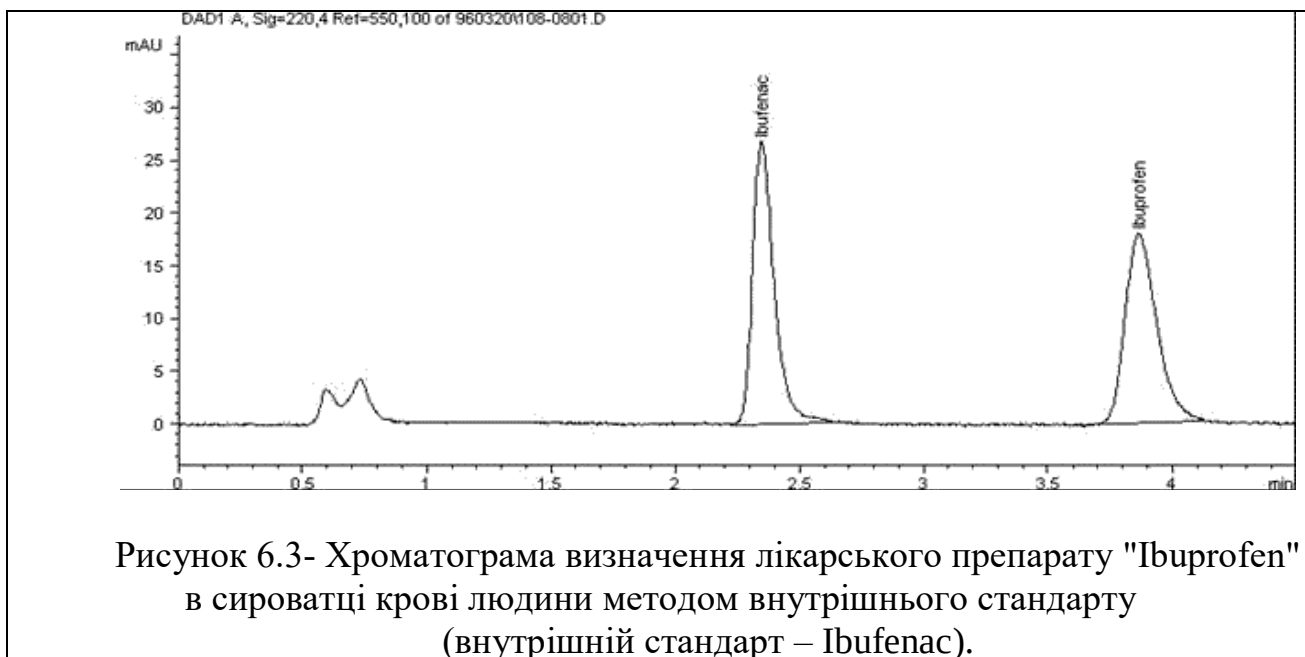
Ідентифікацію речовин у ВЕРХ звичайно проводять одним із таких способів:

- порівняння часу утримування досліджуваної речовини у випробовуваній пробі і розчині порівняння. Розчин порівняння – це розчин чистої досліджуваної речовини, присутність якої передбачається у випробовуваній пробі.

- порівняння відносного часу утримування аналізованої речовини у випробовуваній пробі і розчині порівняння. **Відносний час утримування** – це відношення часу утримування аналізованої речовини до часу утримування речовини, взятої за стандарт;

- порівняння хроматограми випробовуваної проби з хроматограмою розчину порівняння або хроматограмою, наведеною у окремій статті.

Найчастіше використовують перший спосіб. Другий спосіб доцільно використовувати, якщо умови хроматографування є важко відтворюваними. Третій спосіб доцільно застосовувати для препаратів рослинного і тваринного походження.



Кількісне визначення проводять методом абсолютного калібрування та методом внутрішнього стандарту.

Абсолютне калібрування. Цей метод полягає у побудові калібрувального графіку залежності площі піків досліджуваної речовини від її вмісту (концентрації) в пробі. Для цього готують ряд стандартних розчинів з різною концентрацією досліджуваної речовини (не менше 5 розчинів кожної концентрації) і аналізують на хроматографі. Для кожного значення концентрації розраховують середнє значення площі піків і будують градувальний графік – графік залежності площі хроматографічного піку досліджуваної речовини від концентрації або вмісту цієї сполуки у розчині. Після цього у тих самих умовах хроматографують досліджувану пробу з невідомою концентрацією (декілька паралельних досліджень), вимірюють площу піку досліджуваної речовини і розраховують середні значення площі піків. За градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованої речовини у випробовуваному розчині.

Метод внутрішнього стандарту. Цей метод полягає у внесенні до розчину досліджуваної речовини внутрішнього стандарту. Внутрішній стандарт (речовина-стандарт) – це, як правило, близька за хімічною структурою до досліджуваної речовини сполука, пік якої на хроматограмі знаходиться поруч з піком досліджуваної речовини (рис. 6.3).

Градувальним графіком цього методу є графік залежності відношення площ піків досліджуваної речовини до площ піків внутрішнього стандарту від вмісту (концентрації) досліджуваної речовини в пробі. Для цього готують ряд стандартних розчинів з різною концентрацією досліджуваної речовини (не менше 5 розчинів кожної концентрації) і однакової концентрації внутрішнього стандарту. З цих розчинів готують проби змішуванням однакових об'ємів розчинів досліджуваної речовини і внутрішнього стандарту, які аналізують на хроматографі. Для кожного значення концентрації розраховують середнє значення площі піків і будують

градувальний графік – графік залежності відношення площі піків досліджуваної речовини і внутрішнього стандарту від концентрації або вмісту досліджуваної речовини у розчині. Для випробовуваного розчину пробу готують аналогічно. За градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованої речовини у випробовуваному розчині.

Дані, отримані в результаті аналізу методом ВЕРХ, представляють, вказуючи, звичайно, наступні характеристики: розміри хроматографічної колонки і матеріал, з якого вона виготовлена, тип нерухомої фази, розмір частинок нерухомої фази, температуру колонки, швидкість і склад рухомої фази, тип детектора.

Обов'язковою умовою є попередня перевірка придатності хроматографічної системи для розділення досліджуваної суміші, зокрема:

- відносні часи утримування досліджуваних речовин мають бути близькими до зазначених у методиці величин;
- число теоретичних тарілок (ефективність хроматографічної системи), розраховане за зазначеним піком, має бути не меншим зазначеної величини;
- коефіцієнт розділення зазначених піків, розрахований з хроматограм розчину порівняння, має бути не менше зазначеної величини;
- відносне стандартне відхилення, розраховане для висоти або площі зазначеного піка або їхніх відношень до висоти або площі піка внутрішнього стандарту з хроматограм розчину порівняння, має бути не більше зазначеної величини; для розрахунку відносного стандартного відхилення використовують дані звичайно п'яти паралельних хроматограм.

Результати кількісного аналізу потребують їх статистичної обробки.

Апаратура для рідинної хроматографії. У сучасній рідинній хроматографії використовують прилади різного ступеня складності – від найпростіших систем, до хроматографів високого класу, забезпечених різними додатковими пристроями. На рис. 6.4 представлена блок-схема рідинного хроматографа, що містить мінімально необхідний набір складових частин, у тому чи іншому вигляді, присутніх у будь-якій хроматографічній системі.

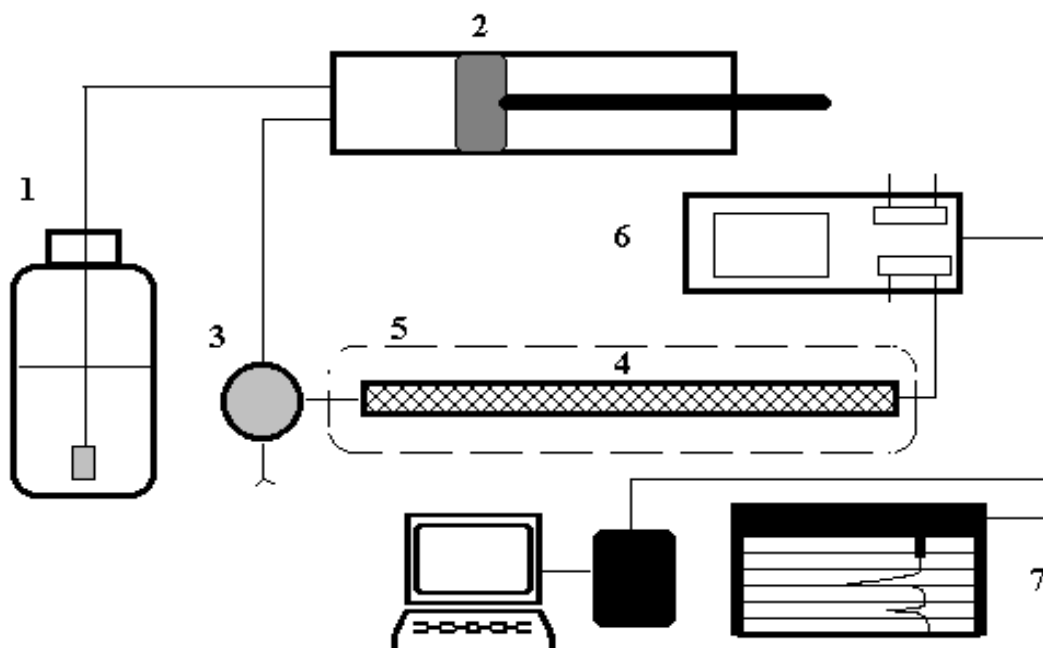


Рисунок 6.4 Блок-схема рідинного хроматографа.

Насос (2) призначений для створення постійного потоку розчинника. Його конструкція визначається, перш за все, робочим тиском у системі. Для роботи в діапазоні 10-500 МПа використовуються насоси плунжерного (шприцевого), або пістоного типів. Недоліком перших є необхідність періодичних зупинок для заповнення елюентом, а друге – велика складність конструкції і, як наслідок, висока ціна. Для простих систем із невисокими робочими тисками 1-5 МПа з успіхом застосовують недорогі перистальтичні насоси, але так як при цьому важко домогтися сталості тиску та швидкості потоку, їх використання обмежене препаративних завданнями. Інжектор (3) забезпечує введення проби суміші поділених компонентів у колонку з досить високою відтворюваністю. Прості системи введення проби – "stop-flow" вимагають зупинки насоса і, тому, менш зручні, ніж петльові дозатори, розроблені фірмою Reodyne. Колонки (4) для ВЕРХ представляють собою товстостінні трубки з нержавіючої сталі, здатні витримати високий тиск. Велику роль відіграє щільність і рівномірність набивання колонки сорбентом. Для рідинної хроматографії низького тиску з успіхом використовують товстостінні скляні колонки. Постійність температури забезпечується термостатом (5). Детектори (6) для рідинної хроматографії мають проточну кювету, в якій відбувається неперервне вимірювання якої-небудь властивості протікає елюента. Найбільш популярними типами детекторів загального призначення є рефрактометри, що вимірюють показник заломлення, і спектрофотометричні детектори, що визначають оптичну щільність розчинника на фіксованій довжині хвилі (як правило, в ультрафіолетовій області). До переваг рефрактометрів (і недоліків спектрофотометрів) слід віднести низьку чутливість до типу визначається з'єднання, яке може і не містити хромофорних груп. З іншого боку, застосування рефрактометрів обмежено

ізократіческімі системами (з постійним складом елюента), так що використання градієнта розчинників у цьому випадку неможливо. Колонки для ВЕРХ, які найчастіше використовують в аналізах забруднювачів навколишнього середовища, мають довжину 25 см і внутрішній діаметр 4,6 мм, Заповнюються вони сферичними частинками силікагелю розміром 5-10 мкм з прищепленими октадецильними групами. В останні роки з'явилися колонки з меншим внутрішнім діаметром, заповненими частками меншого розміру. Використання таких колонок призводить до зменшення витрат розчинників і тривалості аналізу, збільшення чутливості та ефективності поділу, а також полегшує проблему підключення колонок до спектральним детекторів. Колонки з внутрішнім діаметром 3,1 мм постачають запобіжним картриджем (форколонкой) для збільшення терміну служби та поліпшення відтворюваності аналізів. Як детектори в сучасних приладах для ВЕРХ використовуються зазвичай УФ-детектор на діоднійматриці, флуоресцентний і електрохімічний. Слід мати на увазі, що в практичній роботі поділ часто протікає не за одним, а за декількома механізмами одночасно.

2. Використання газової хроматографії в аналізі

Методи газової хроматографії доповнюють можливості ВЕРХ і навпаки. Методом газової хроматографії можна розділяти і аналізувати *термічно стійкі та леткі речовини*, тобто речовини з температурами кипіння до 400 С, молекулярною масою до 400 а.о. В основному це органічні сполуки. Нелеткі та полярні сполуки аналізують методом ВЕРХ. Деякі органічні сполуки з помірною леткістю та полярністю, можна аналізувати як ГХ, так і ВЕРХ. Це ароматичні аміни, триазини, фталати, вітаміни, гліколі, бензидини, антиоксиданти, нітрили, альдегіди, кетони.

Методом ГХ можна проводити розділення, якісний і кількісний аналіз, препаративне розділення. Також можна досліджувати фізико-хімічні параметри та властивості речовин: коефіцієнти розподілу, ізотерми сорбції, структуру сполук, пружність пари, температуру кипіння, площу поверхні, полярність тощо.

Будова та принцип роботи газового хроматографа

Лабораторні газові хроматографи призначені для аналізу газових і рідких сумішей органічного та неорганічного походження. Розділення компонентів може відбуватися в ізотермічному або програмованому режимах нагріву колонок. Для детектування використовуються різноманітні детектори.

Сигнал детектора за допомогою відповідного інтерфейсу перетворюється в цифрову форму для наступної комп'ютерної обробки.

Принципова схема хроматографа наведена на рис. 6.5. Газ-носіє із балону через стандартний балонний редуктор потрапляє на вхід пневматичного модуля і далі – у випарник. Проба (рідка або газова)

вводиться у випарник, там підхоплюється газом-носієм і потрапляє до колонки.

Серцем будь-якого хроматографу є хроматографічна колонка, яка розташовується у термостаті. Через колонку постійно тече потік газу-носія. Цей потік можна регулювати вручну або автоматично. В колонці сполуки розділяються і по черзі потрапляють у детектор на виході з колонки. Сигнал детектора обробляється комп'ютером і подається як залежність сигналу від часу розділення.

Термостат може підтримувати температуру від -80 до 450°C . Температура термостату під час хроматографування може бути або сталою, або програмованою, тобто змінюватися з певною швидкістю.

Сучасний газовий хроматограф керує газовими потоками випарників, детекторів за допомогою вмонтованої системи *електронного керування потоками газів* (ЕКПГ).

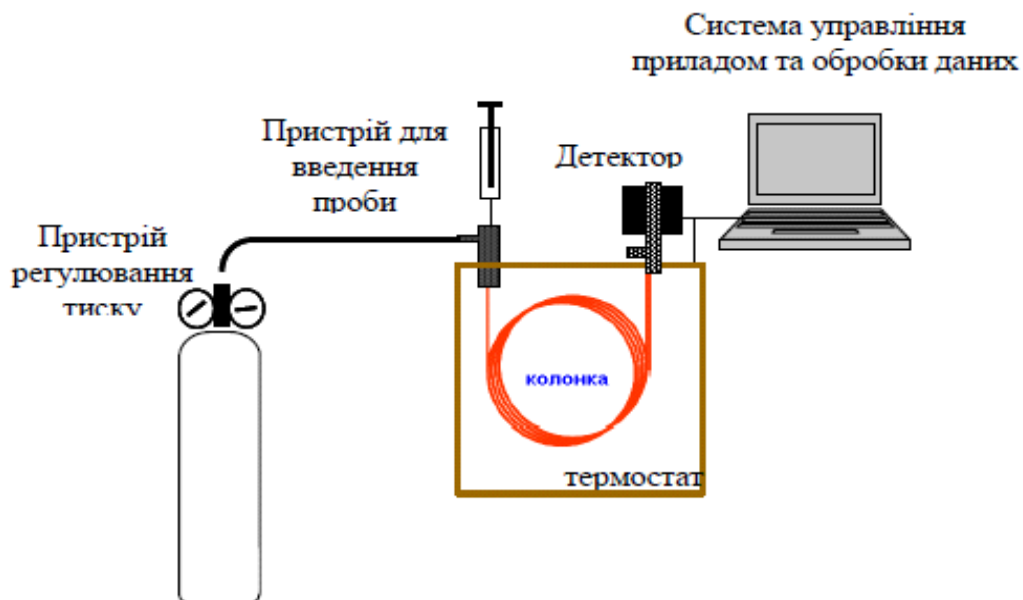


Рисунок 6.5 – Схема будови газового хроматографа

Треба зауважити, що хроматографа як окремого приладу не існує, так як і комп'ютера. Існує хроматографічна система в певній конфігурації або комплектації.

Характеристики хроматограми

Під час хроматографування на екрані комп'ютера записується *хроматограма* – *залежність сигналу детектора від часу аналізу*. Хроматограму інакше ще називають кривою елювання. На рис. 6.6 схематично зображено хроматограму одного компонента, що утримується, і одного, що не утримується.

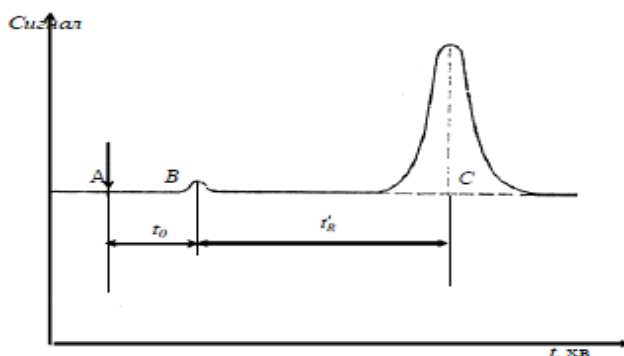


Рисунок 6.6 – Хроматограма: а-момент введення проби; в-пік речовини, яка не сорбується; сигнал-сигнал детектора

В деякий момент часу **A** ($t=0$) у колонку вводять речовину і пропускають газ-носіє з сталою швидкістю. Інтервал часу від моменту введення проби до досягнення максимуму піку називають часом утримування t_R . Час утримування аналіту визначається не тільки часом його перебування у сорбенті, але й часом перебування поза сорбентом (t_0) у мертвому об'ємі: між зернами сорбенту або в порожнині капіляру, у випарнику, у детекторі. Це не ефективний час, тому його називають мертвим. Він дорівнює часу виходу з колонки компонента, який зовсім не утримується. Вільний час (t_0) хроматографічної системи в цілому залежить від геометричних розмірів колонки: довжини, діаметру, для набивних колонок – від діаметру зерна сорбенту та щільності його упакування, для капілярних – від величини порожнини колонки. Також t_0 прямо пропорційно залежить від об'єму лайнеру і об'єму комірки детектора. Через це в хроматографічних системах з однаковою нерухомою фазою, але з різними геометричними розмірами колонки, інжектора і детектора, вільний час може бути різним. Тому справжню сорбційну здатність даної хроматографічної системи, від якої залежить швидкість просування речовини, характеризують так званим виправленим часом утримування t'_R .

Знаючи об'ємну швидкість потоку рухомої фази **F**, можна обчислити утримуваний об'єм **VR**:

$$VR = t_R F \quad (6.1).$$

За дотримання однакових умов проведення хроматографічного виправлений час утримування t'_R є характеристичною величиною для кожної речовини. Його використовують для ідентифікації компонентів суміші.

Для кількісного хроматографічного аналізу використовують висоту (**h**) хроматографічного піку або його площу (**S**).

3. Гель-хроматографія

Гель-хроматографія – особлива форма хроматографії, що дозволяє розділити молекули за їх розміром, формою і молекулярною масою. Як сорбент використовують пористе скло, частки силікагелю або полімеру,

полісахариди. Розмір часток сорбенту 5-10 мкм, а розмір пор, в залежності від природи сорбенту, в межах 102-106 Å.

Вибір рухомої фази залежить від типу нерухомої фази. Гель-хроматографічні системи розділяють на гель-фільтраційну і гель-проникаючу хроматографію. В гель-фільтраційній хроматографії проводять розділення водорозчинних речовин на гідрофільних сорбентах; в гель-проникаючій хроматографії застосовують гідрофобні сорбенти, і відповідно, неполярні органічні розчинники і проводять розділення сполук, малорозчинних у воді.

На відміну від усіх методів рідинної хроматографії, гель-хроматографія не базується ні на хімічній, ні на фізичній взаємодії з нерухою фазою. В гель-хроматографії розподілення молекул між нерухою і рухою фазами ґрунтується на розмірі молекул та частково на їх формі і полярності.

При взаємодії молекул з пористою нерухою фазою розрізняють два крайніх випадки. Молекули з діаметром, більшим, ніж середній діаметр пор, повністю виключаються з сорбенту і рухаються в потоці елюенту. Молекули з діаметром, значно меншим, ніж пори сорбенту, можуть вільно проникати крізь нього і залишаються в нерухомій фазі найдовший проміжок часу і тому виходять останніми. Молекули середнього діаметру проникають в пори сорбенту в залежності від розміру і, в певній мірі, від форми молекули. Вони виходять з різним часом утримування між піками двох крайніх випадків.

Принцип гель-хроматографії приведений на рис. 6.7.

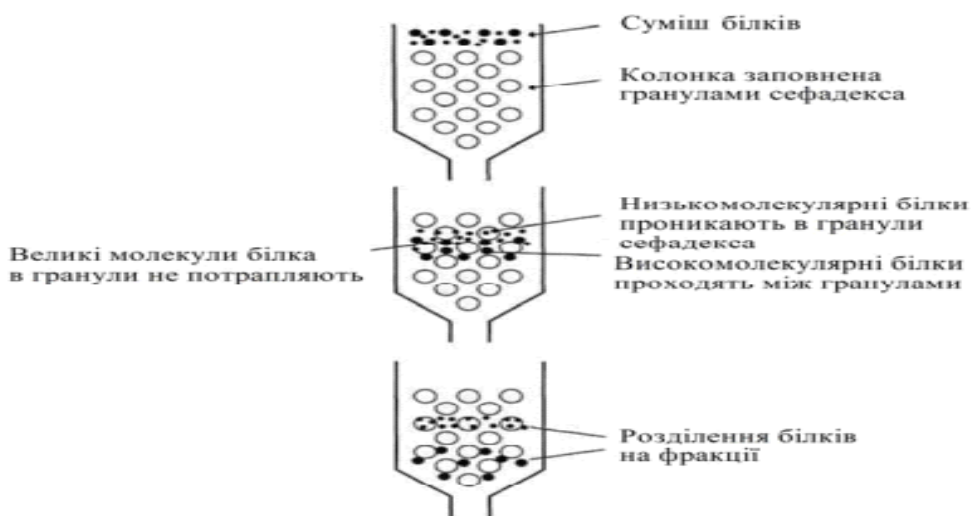


Рисунок 6.7 – Принцип гель-хроматографії

Гель-хроматографія використовується для визначення речовин з відносною молекулярною масою більше 2000. У випадку гель-фільтрації розділяють природні високомолекулярні речовини від більш низькомолекулярних сполук і солей. Наприклад, білки можуть бути відділені від амінокислот та низькомолекулярних пептидів. Гель-проникаюча хроматографія використовується для розділення гомологів і олігомерів. Наприклад, можна розділити жирні кислоти з відносною молекулярною масою між 100 і 350.

Гель-хроматографія (ексклюзійна, молекулярно-ситова) є різновидом рідинної хроматографії, в якій розділення компонентів суміші ґрунтується на розподілі молекул відповідно до їхніх розмірів між розчинником, який знаходиться в порах сорбенту, і тим самим розчинником, який тече між його гранулами. Отже, на відміну від усіх інших методів хроматографічного аналізу, в гель-хроматографії нерухомою і рухомою фазами є одна й та сама речовина-розчинник.

Механізм розділення компонентів суміші. У процесі розділення невеликі за розміром молекули дифундують у сорбент, у порах якого знаходиться рідка нерухома фаза, а великі молекули, розмір яких перевищує діаметр пор (каналів) сорбенту, не проникають у нього і вимиваються з колонки рухомою фазою. Отже, ефективність розділення речовин залежить від розміру їх молекул та розміру пор сорбенту.

Носії. Хроматографію, яка ґрунтується на розподілі молекул відповідно до їх розмірів, у літературі називають по-різному: молекулярно-ситовою, якщо для розділення молекул використовують цеоліти, які інакше називають молекулярними ситами; гель-проникною, якщо для розділення застосовують полімерні сорбенти, які набухають в органічних розчинниках (полістирол), або гель-фільтраційною у випадку використання сорбентів, які набухають у воді (сефадекс). Носії, які застосовують у гель-хроматографії, повинні мати строго певний розподіл розміру пор, що дає змогу використати їх для розділення сумішей речовин, молекули яких мають певний розмір. Адсорбційна здатність носія має бути мінімальною. Час утримування речовин повинен визначатися лише так званою *інклюдзією* (проникненням) або *ексклюзією* (непроникненням) молекул у пори.

Характеристикою пористості гелю є ступінь набухання (ємність за розчинником) S_r , тобто кількість розчинника у г, яку поглинув 1 г сухого гелю. У гель-хроматографії як носії використовують: м'які гелі – органічні полімери, такі як целюлоза, полістирол, полідекстран, агароза, поліакриламід, які сильно набухають і мають високу ємність за розчинником; жорсткі гелі, такі як силікагель, скло, які мало або зовсім не набухають і мають фіксований розмір пор. Перевагу віддають органічним гелям, на яких сорбція речовин відсутня або незначна. Процес розділення зумовлений практично тільки розмірами пор сорбенту і розмірами молекул сорбатів. Носії на основі силікагелів менш зручні, через те що на розділення речовин впливає також їхня адсорбційна здатність, яку важко передбачити.

Для розділення речовин із водних розчинів зазвичай використовують гідрофільні гелі на основі декстрину – поліатомного спирту, який складається із залишків глюкози. Декстрини, зшиті нитками епіхлоргідрину, підготовлені для хроматографії мають фірмову назву – сефадекси. Розділення з органічних розчинників проводять на гідрофобних полістиролах, що мають різний ступінь зшивання (стирогель, поражель тощо). Для детектування сполук у гель-хроматографії можна використовувати спектрофотометричний і рефрактометричний детектори. Частіше застосовують рефрактометричний

детектор, оскільки він є універсальним і витримує високі температури, необхідні для аналізу високомолекулярних важкорозчинних полімерів.

Використання гель-хроматографії

Передусім гель-хроматографію застосовують для відокремлення дуже великих молекул, розміри яких значно більші за розміри пор сорбенту, від малих молекул (іонів), які вільно проникають у фазу сорбенту. Такий процес відбувається, наприклад, при знесоленні білків та інших природних високомолекулярних сполук або при очищенні гемоглобіну від кухонної солі. Гель-хроматографія знайшла широке застосування для розділення близьких за розмірами молекул органічних речовин, наприклад, тригліцеридів. Цей різновид хроматографії використовують також для розділення комплексних сполук металів, зокрема тих, що утворюються в природних водах з органічними лігандами різної молекулярної маси. Нарешті, гель-хроматографію застосовують для визначення молекулярних мас органічних сполук, полімерів синтетичного та природного походження і комплексів металів з високомолекулярними органічними лігандами.

Афінна хроматографія

Очищені білки широко використовують у фармацевтиці і дослідницькій діяльності, тому отримання високочистих білкових препаратів є важливою лабораторною задачею. Ензим, що цікавить дослідника, знаходиться у клітинах у невеликих кількостях разом з іншими білками, які часто мало відрізняються один від одного за фізико-хімічними властивостями. Це робить процес їх розділення можливим лише при застосуванні низки різнорідних трудомістких операцій (осадження, екстракція, гель-хроматографія тощо).

Ензимам притаманна певна активність, наприклад ферментативна, імунологічна, або вони мають специфічну спорідненість до іншого білка чи небілкової сполуки, з якою вони взаємодіють у ході біохімічної реакції. Біохімічні реакції специфічні. Ферменти, які прискорюють певну реакцію, взаємодіють тільки з тими субстратами, які задовольняють їхнім структурним вимогам, тобто ферменти розпізнають лише "свої" субстрати. Так само антитіла розпізнають лише "свої" антигенні детермінанти з дуже високим ступенем вибірконості.

Отже, ферменти, антитіла, цукри – органічні сполуки природного походження – можуть селективно і зворотно взаємодіяти одна з одною за рахунок точної стеричної придатності і паралельно діючих полярних, неполярних, іонних та водневих взаємодій, тобто ці сполуки розпізнають одна одну у природних рідинах. Цю особливість біохімічних реакцій використовують в афінній хроматографії, яку ще називають хроматографією за біоспецифічною спорідненістю.

Один із компонентів біохімічної реакції, його називають афінним лігандом, прищеплюється до поверхні сорбента. Афінними лігандами можуть бути різноманітні сполуки: білки (антигени, інгібітори ферментів, антитіла, білки-репресори), нуклеїнові кислоти, нуклеотиди, стероїди. Носії та способи

прищеплення афінного ліганду до них. Носії мають задовольняти таким вимогам:

- нерозчинність;
- адсорбційна інертність;
- достатня пористість і велика питома поверхня;
- механічна стійкість;
- хімічна стійкість в умовах, необхідних для сорбції і десорбції;
- стійкість до дії ферментів і мікробів.

Як носії використовують целюлозу, декстранові гелі, агарозу, поліакриламід, скло, силікагель тощо.

Отже, в афінній хроматографії до поверхні носія прищеплюють *афінний ліганд*, який за рахунок біоспецифічної спорідненості може приєднувати певну органічну сполуку природного походження. Особливості поведінки біополімерів у розчинах зумовлюють специфічні особливості афінної хроматографії та її переваги. Молекули певного білка мають сталу конфігурацію. Вона задана первинною структурою білка, тобто послідовністю амінокислот, поєднаних пептидними зв'язками.

Активна конфігурація білкових молекул підтримується великою кількістю слабких (нековалентних) вандерваальсових і водневих зв'язків, що зумовлює термодинамічну стабільність системи. Біологічно важливі взаємодії виникають на малих відстанях (0,3-0,5 нм). Якщо конфігурація двох молекул така, що їхні поверхні можуть стикатися великою кількістю атомів, то виникає сильна взаємодія. Послідовність розділення в афінній хроматографії включає: пропускання проби крізь колонку, вимивання речовини, яка не взаємодіє із сорбентом, елюювання досліджуваної сполуки з колонки. Для оптимальної сорбції нерозчинний носій повинен мати достатньо пористу поверхню, щоб макромолекула мала достатній простір для взаємодії з афінним лігандом. Важливими є також стеричний фактор, концентрація ліганду, іонна сила, рН, швидкість потоку. Елюювання є особливим етапом в афінній хроматографії, оскільки більшість звичайних розчинників не забезпечує вимивання речовин із колонки.

Органічні розчинники, які спричиняють денатурацію білків, є несумісними з більшістю матеріалів афінної хроматографії на основі ферментів. Процес денатурації часто є незворотним. Тому на етапі елюювання слід застосовувати конкуруючий ліганд або звільняючий реагент, який не викликає денатурацію, наприклад сечовину за малих концентрацій. Конкурентний ліганд витісняє досліджувану молекулу з комплексу. Білки, які мають біоспецифічну спорідненість до певних сполук, швидко і зворотно змінюють свою просторову конфігурацію у розчині за наявності відносно низьких концентрацій цих сполук навіть у тому випадку, коли їх наявність не змінює рН, іонну силу або температуру розчину. Ця обставина дає змогу елюювати білок зв'язаний з афінним лігандом, уведенням до складу елюенту невеликої кількості вільного ліганду без зміни рН, іонної сили або температури розчину. Інший спосіб вилучення речовини з колонки – зміна температури або рН розчину.

Для контролю елюювання речовин можна застосовувати радіоактивно мічені зразки. Для цього використовують ^{14}C , ^{125}I . Радіоактивність вимірюють сцинтиляційним лічильником, γ -лічильником. Детектування також можна проводити за світлопоглинанням розчинів в УФ ділянці спектра.

Використання афінної хроматографії.

Методом афінної хроматографії можна розділяти широкий спектр біологічних сполук: антитіла, антигени, клітинні органели, кофактори, вітаміни, ферменти, гормони, інгібітори, пектини, ліпіди, білки, пептиди, амінокислоти, віруси. Крім того, у фармацевтичній промисловості важливим завданням є розділення і кількісне визначення хіральних сполук. У багатьох випадках терапевтичний ефект забезпечує лише один із набору енантіомерів лікарського засобу.

Тому, важливо їх розділяти й отримувати у чистому вигляді.

? Контрольні питання та завдання:

1. Які речовини використовують у газовій хроматографії як рухому фазу?
2. На чому ґрунтується поділ у газо-адсорбційній хроматографії?
3. На які види ділиться рідинна хроматографія за механізмом розділення речовин нерухомою фазою?
4. На скільки (нм) детектори ВЕРХ органічних речовин поглинають світло?
5. Опишіть основні елементи обладнання, яке використовується для визначення ВЕРХ.
6. Які переваги методу гелі-фільтрації порівняно з іншими методами хроматографії?
7. Який вид рідинної хроматографії найбільш ефективний для поділу оптичних ізомерів?
8. Чим відрізняються між собою газова та рідинна хроматографія?

Тестові завдання:

1. При переносі речовин, які розділяють, газ-носії

- а) не взаємодіє ні з поділюваними речовинами, ні з нерухомою фазою;
- б) взаємодіє з нерухомою фазою;
- в) взаємодіє з поділюваними речовинами та рухомою фазою;
- г) взаємодіє з поділюваними речовинами.

2. Які функції виконує хроматографічна колонка?

- а) розділяє компоненти аналізованої суміші;
- б) кількісно визначає компоненти суміші;
- в) реєструє аналітичний сигнал;
- г) перетворює аналітичний сигнал.

3. Афінна хроматографія використовується при розділенні

- а) оптичних ізомерів;

- б) при розділенні суміші газів;
- в) при розділенні високомолекулярних і низькомолекулярних речовин;
- г) при розділенні насичених і ненасичених вуглеводнів.

4. *Рухома фаза в рідинній хроматографії –*

- а) рідина;
- б) суміш кислотних оксидів;
- в) інертний газ;
- г) атмосферне повітря.

5. *Основні системи будь-якого газового хроматографа:*

- а) колонка;
- б) детектор;
- в) реєстратор;
- г) пристрій для введення проби.

6. *На чому ґрунтується поділ в газо-адсорбційній хроматографії?*

- а) на відмінності в адсорбції на поверхні твердого носія;
- б) на відмінності розміру молекул аналізованої суміші;
- в) на взаємодії рухомої фази з аналізованою сумішшю;
- г) на утворенні осаду в порах сорбенту.

7. *Який прилад використовують найчастіше в газовій хроматографії?*

- а) газовий хроматограф;
- б) спектрометр;
- в) хроматометр.

8. *Хроматографія – це метод аналізу, який базується на перерозподілі речовини між*

- а) рідкою і твердою фазами;
- б) двома рідкими фазами, що не змішуються між собою;
- в) рухомою і нерухомою фазами;
- г) рідкою і газовою фазами;
- д) твердою та газовою фазами.

9. *Виберіть гази, які можуть використовуватися в газовій хроматографії як рухома фаза:*

- | | |
|------------|--------------|
| а) гелій; | г) ацетилен; |
| б) ксенон; | е) аргон; |
| в) кисень; | ж) азот. |

10. *Гель-хроматографія – це один із різновидів ... хроматографії.*

- а) рідинної;
- б) газової;
- в) адсорбційної;
- г) тонкошарової.

11. *У методі гель-фільтрації першими вільно проникають у пори*

- а) молекули з меншою молекулярною масою;
- б) молекули з більшою молекулярною масою;
- в) одночасно молекули з більшою та меншою молекулярними масами;
- г) усі молекули одночасно.