

# Применение хроматографических методов для исследования свойств биологических объектов

Колобов Александр Александрович

СПбГУ, Биолого-Почвенный факультет, каф. Биохимии

Санкт-Петербург

2009 г

**Хроматография** - наука о межмолекулярных взаимодействиях и переносе молекул или частиц в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.

**Хроматография** - процесс дифференцированного многократного перераспределения веществ или частиц между несмешивающимися и движущимися относительно друг друга фазами, приводящий к обособлению и концентрационных зон индивидуальных компонентов исходных смесей этих веществ или частиц.

**Хроматография** - метод разделения смесей веществ или частиц основанный на различиях в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз.

# Основные термины

**Элюент** – жидкость или газ, используемые в качестве подвижной фазы.

**Элюат** - выходящий из колонки поток подвижной фазы с компонентами разделяемой смеси.

**Элюция** – выход разделяемых веществ из хроматографической колонки с током элюента.

В процессе хроматографического разделения состав элюента может оставаться неизменным (**изократическая элюция**), а может изменяться (**ступенчатая элюция** или **градиентная элюция**)

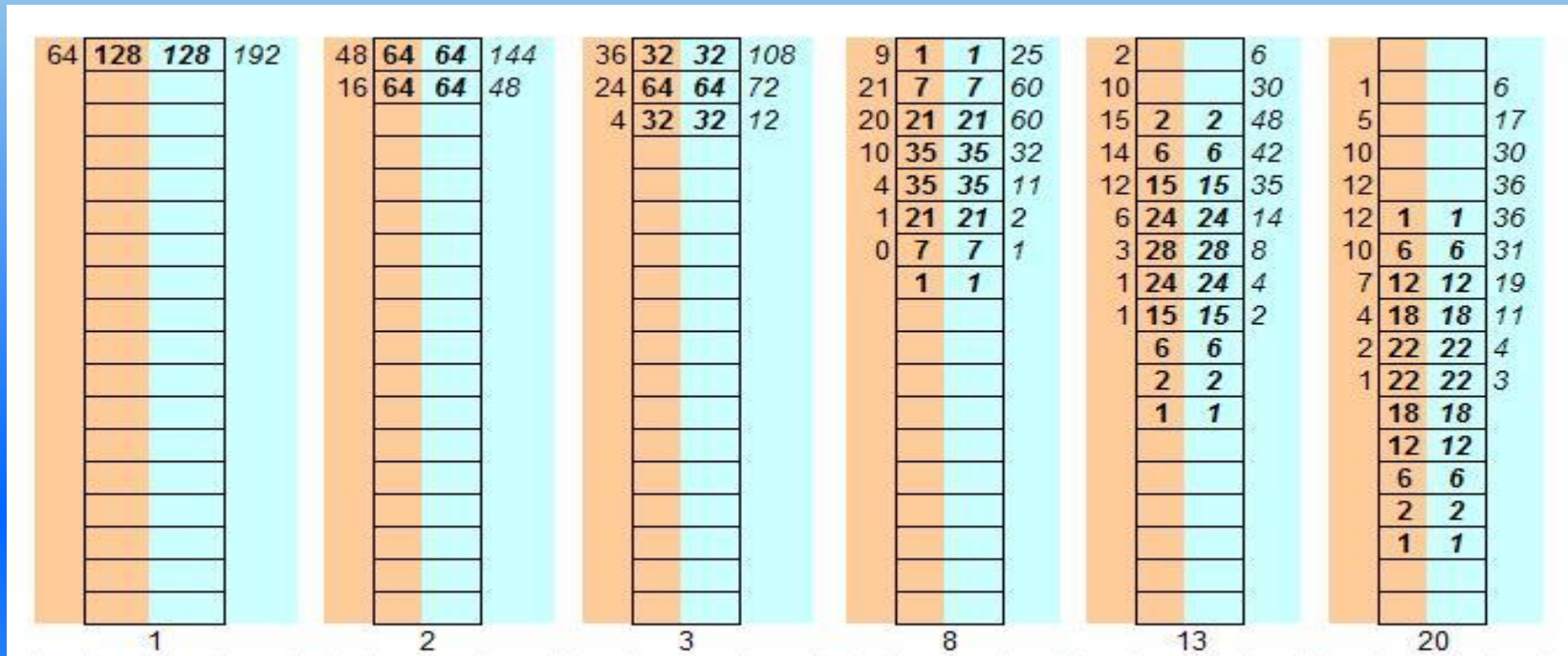
**Колонка** — содержит хроматографический сорбент, выполняет функцию разделения смеси на индивидуальные компоненты.

**Хроматограмма** — результат регистрирования зависимости концентрации компонентов на выходе из колонки от времени.

**Детектор** — устройство для регистрации концентрации компонентов смеси на выходе из колонки.

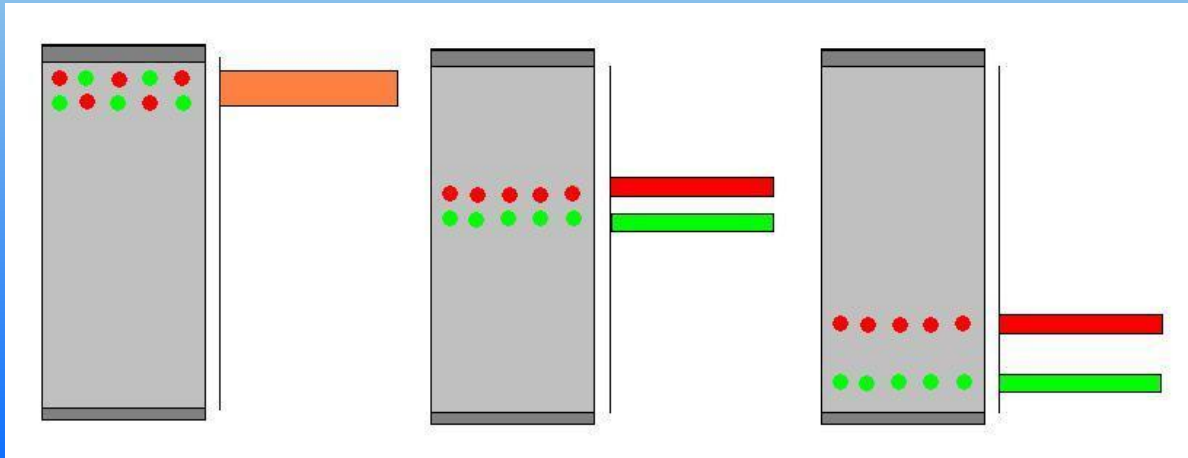
**Хроматограф** — прибор для проведения хроматографии.

# Концепция теоретических тарелок



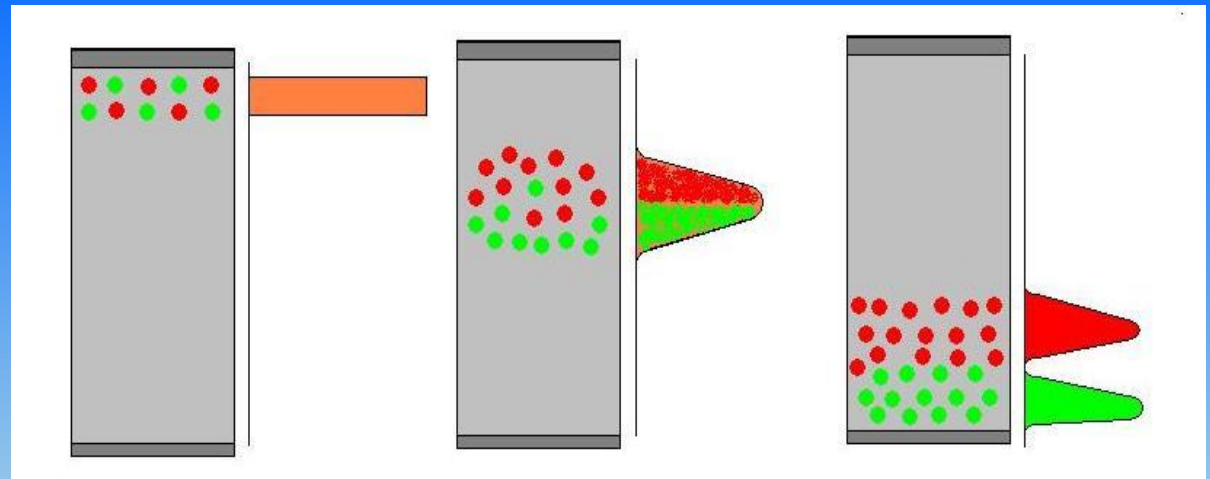
Колонка произвольно разделена на 18 теоретических тарелок. На колонку нанесено 512 молекул. Из них 256 (жирный шрифт) распределяются поровну (1:1) между подвижной фазой (прямой шрифт) и неподвижной фазой (курсив). Молекулы другого типа (тонкий шрифт) распределяются таким образом, что в подвижной фазе находится 25%, а в неподвижной — 75% молекул (1:3). При переносе все вещества в подвижной фазе переходят на следующую теоретическую тарелку. После каждого переноса число молекул каждой категории перераспределяется в соответствии с правилом 1:1 и 1:3.

# Теоретическая и практическая хроматограммы

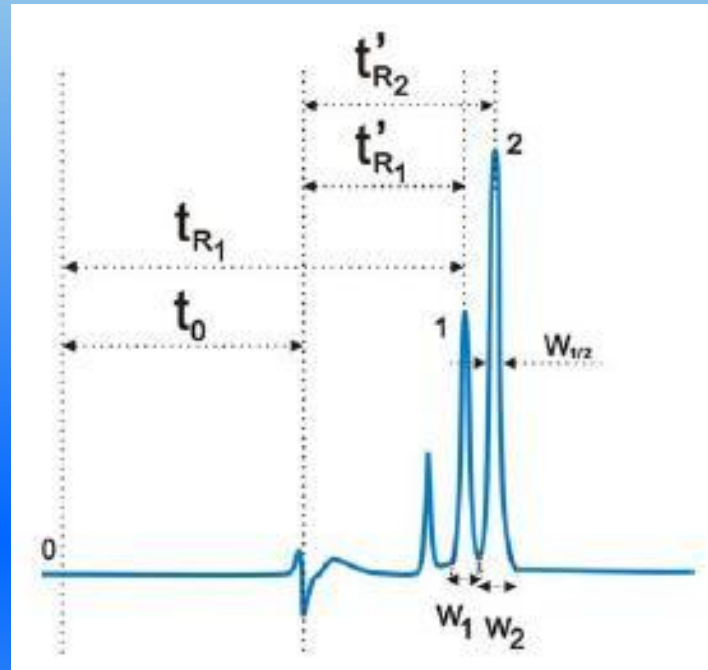


Идеальный вариант  
разделения смеси  
двух веществ

Более реальный  
вариант разделения  
смеси тех же двух  
веществ



# Основные параметры хроматограммы



$t_0$  – нулевое время

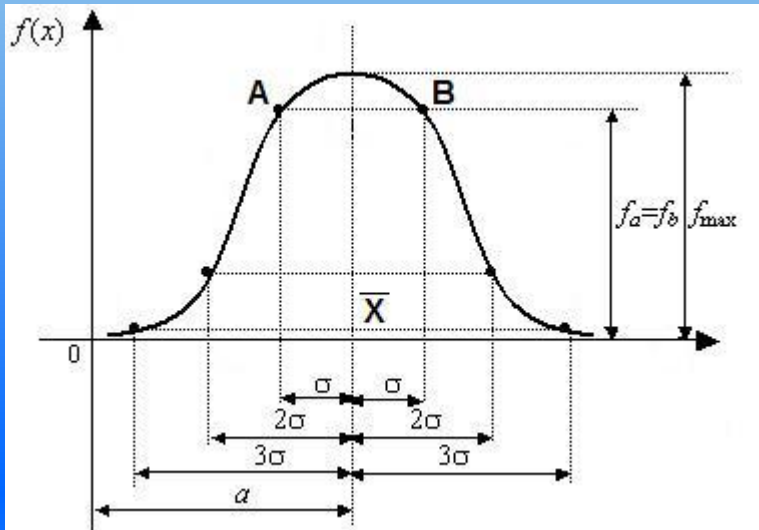
$t_{R1}$  – время удерживания для первого пика

$t'_{R1}$  – исправленное время удерживания для первого пика

$W_1$  – ширина первого пика у основания

$W_{1/2}$  – ширина пика на половине его высоты

# Нормальное (Гауссово) распределение



$$\varphi(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{(x-\bar{x})^2}{2\sigma^2}}$$

где  $H$  - высота, эквивалентная теоретической тарелке;

$L$  - длина колонки

$$H = L/N$$

$N$  - число теоретических тарелок

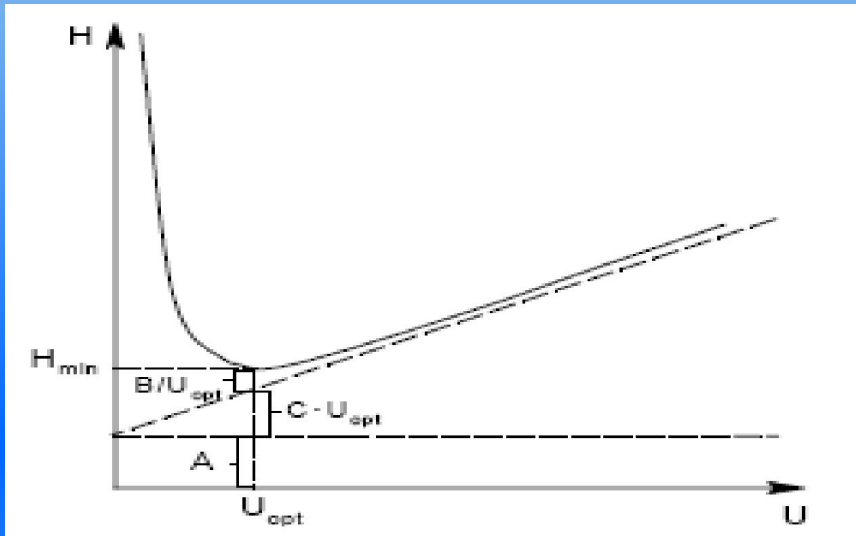
$$\sigma^2 = LH, \text{ или } \sigma = \sqrt{LH}$$

$$N = (L/\sigma)^2$$

$$N = 16(t_R/W_b)^2 = 5.545(t_R/W_h)^2,$$

где  $t_R$  - время удерживания пика,  $W_b$  - ширина пика на его полувысоте,  $W_h$  - ширина пика у основания.

# Влияние внешних факторов на высоту эквивалентную теоретической тарелке



Кривая Ван-Деемтера

$$H = A + B/U + C \cdot U$$

Где: H – высота, эквивалентная теоретической тарелке  
U – скорость потока подвижной фазы

A – соответствует вкладу неоднородности потока подвижной фазы

B – соответствует продольной диффузии в подвижной и неподвижной фазах

C – соответствует кинетике массопередачи

При малых скоростях потока увеличивается вклад продольной диффузии. При высоких – кинетики массопередачи



# Классификация хроматографических методов

## По агрегатному состоянию фаз

Газовая хроматография

Газо-жидкостная хроматография

Газо-твёрдофазная хроматография

Жидкостная хроматография

Жидкостно-жидкостная хроматография

*Жидкостно-твёрдофазная хроматография*

Жидкостно-гелевая хроматография

## По механизму взаимодействия

Ионообменная хроматография

Адсорбционная хроматография

Адсорбционно-комплексобразовательная хроматография

Эксклюзионная хроматография

Осадочная хроматография

*Распределительная хроматография*

## По цели проведения

*Аналитическая хроматография*

Препаративная хроматография

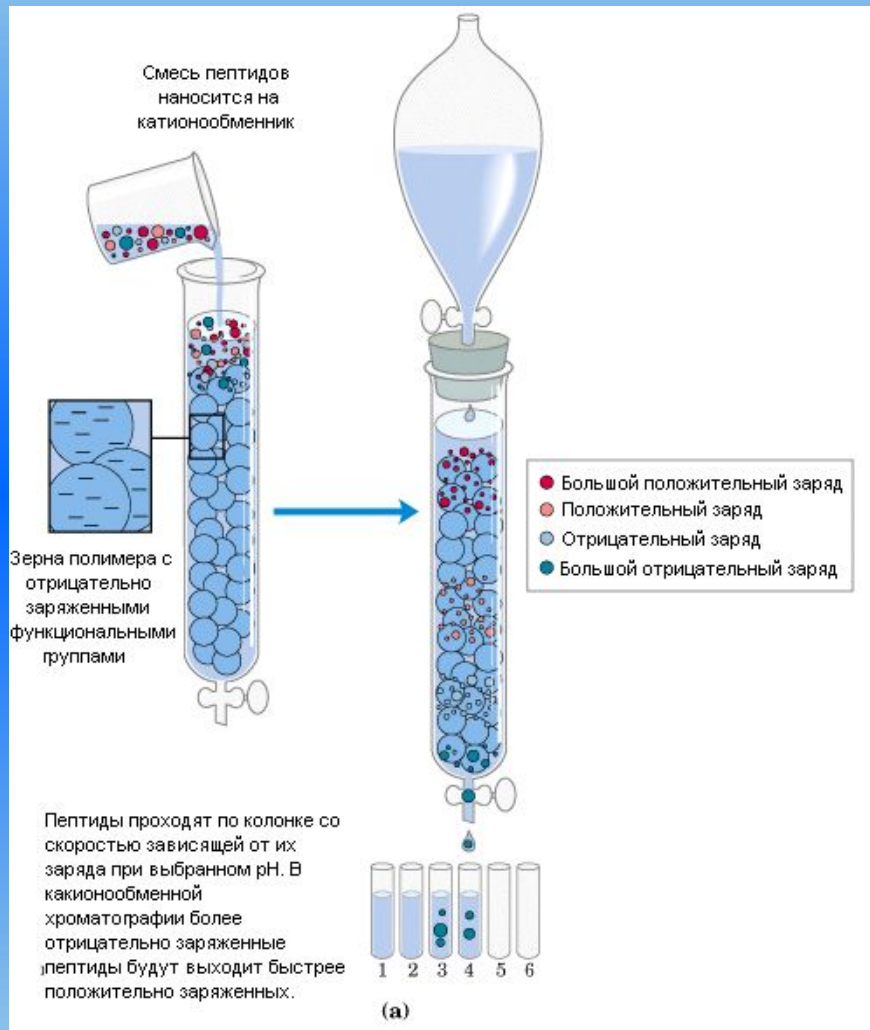
Промышленная хроматография

# Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография позволяет разделить молекулы, основываясь на ионных взаимодействиях. Неподвижная фаза имеет заряженные функциональные группы, которые взаимодействуют с анализируемыми ионизированными молекулами противоположного заряда. Этот вариант хроматографии классифицируется на два типа — катионную и анионную ионообменную хроматографию:

Высокоэффективная ионообменная хроматография (колонки, упакованные сорбентом с размером зерен 5-10 мкм, давление до 10 МПа) смесей нуклеотидов, нуклеозидов, пуриновых и пиримидиновых оснований и их метаболитов в биол. жидкостях (плазма крови, моча, лимфа и др.) используется для диагностики заболеваний. Белки и нуклеиновые кислоты разделяют с помощью ионообменной хроматографии на гидрофильных высокопроницаемых ионитах на основе целлюлозы, декстранов, синтетических полимеров, широкопористых силикагелей; гидрофильность матрицы ионита уменьшает неспецифические взаимодействия биополимера с сорбентом.

# Принципиальная схема



**Катионная ионообменная хроматография** задерживает положительно заряженные катионы, так как неподвижная фаза имеет отрицательно заряженные функциональные группы, например, фосфат ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

**Анионная ионообменная хроматография** задерживает отрицательно заряженные анионы, так как неподвижная фаза имеет положительно заряженные функциональные группы, например,  $+\text{N}(\text{R})_4$ .

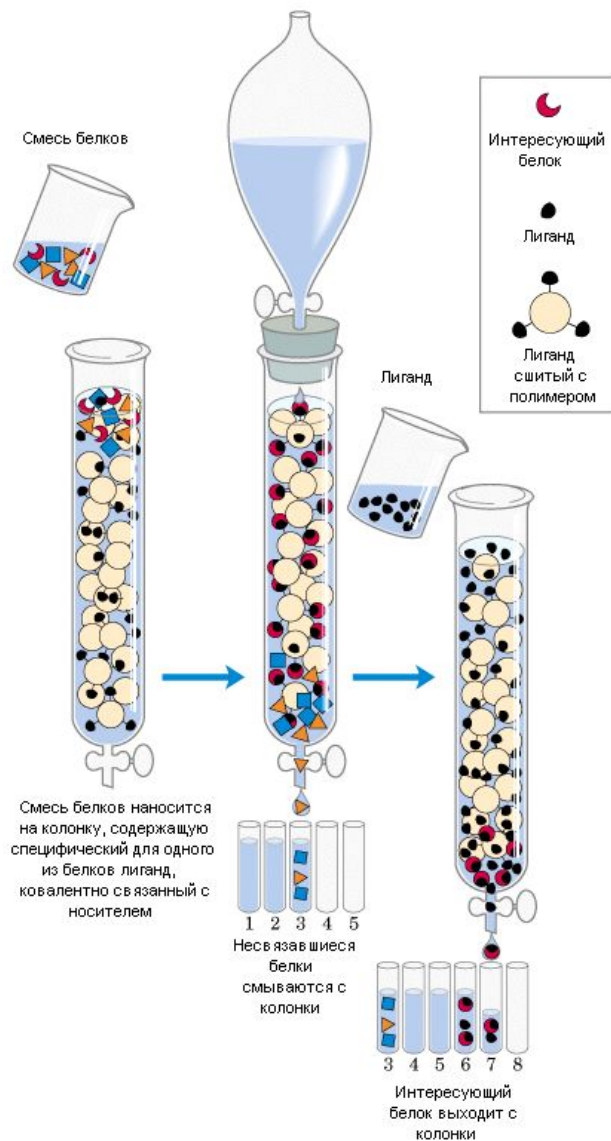
# Адсорбционная хроматография

Вид хроматографии основанный на способности твёрдого вещества — неподвижной фазы — сорбировать примеси, находящиеся в подвижной фазе. При этом эффективность разделения примесей пропорциональна их величинам адсорбции при условиях эксперимента. Процесс взаимодействия может сопровождаться химическим взаимодействием примесей с неподвижной фазой, то есть хемосорбцией.

## Адсорбционно-комплексобразовательная (аффинная) хроматография

Разновидность лигандной хроматографии. В основе последней лежит реакция взаимодействия разделяемых примесей с лигандом, связанным с инертным носителем. В случае аффинной хроматографии в роли примесей выступают биологически активные вещества (белки, ферменты), вступающие с лигандом (тоже, как правило, органическим) в специфическое биохимическое взаимодействие. Например: антитело-антиген, гормон-рецептор и т. д. Именно высокая специфичность подобного взаимодействия обуславливает высокую эффективность аффинной хроматографии и её широкое (по сравнению с другими видами лигандной хроматографии) распространение.

# Принципиальная схема



В качестве лиганда могут выступать:

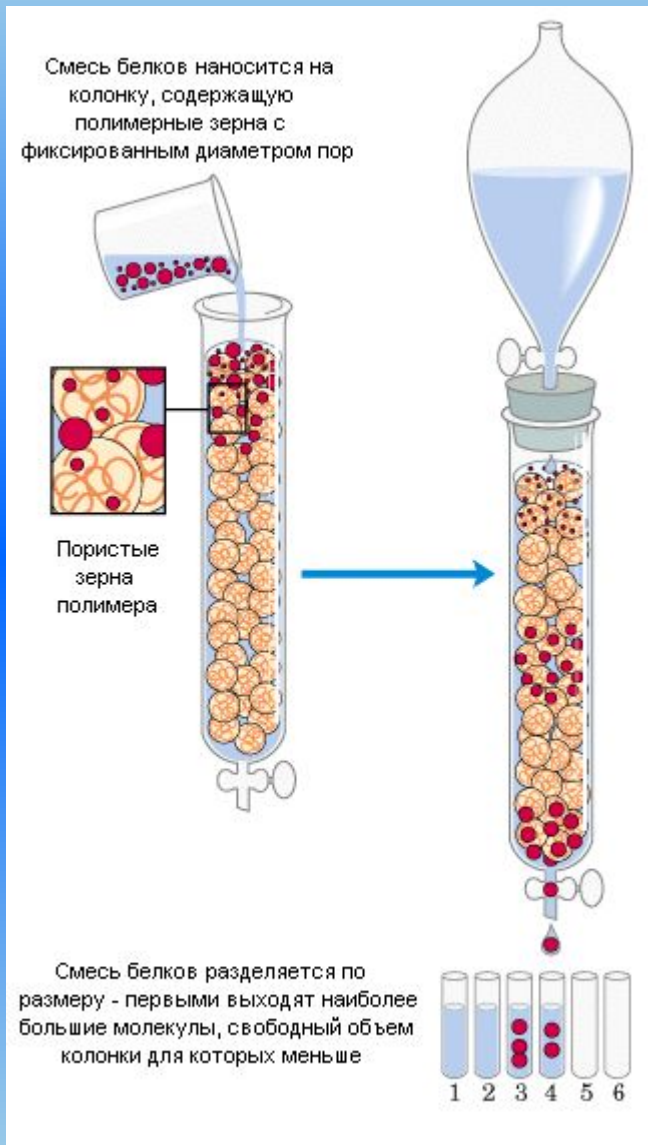
- Антитела
- Хелатирующие агенты
- Комплексообразующие агенты
- и т. д.

# Эксклюзионная хроматография

В **эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной) хроматографии** молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры носителя. При этом первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы (бóльшей молекулярной массы), способные проникать в минимальное число пор носителя. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры сорбента.

**Эксклюзионную хроматографию** эффективно применяют при разработке новых полимеров, технол. процессов их получения, контроле произ-ва и стандартизации полимеров. **Эксклюзионную хроматографию** используют для анализа MW полимеров, исследования, выделения и очистки полимеров, в т. ч. биополимеров.

# Принципиальная схема



Наиболее распространенные сорбенты:

- Сефадекс
- Сефакрил
- Агарозные частицы (Биогели)

# Осадочная хроматография

Метод хроматографии, основанный на способности разделяемых веществ образовывать малорастворимые соединения с различными произведениями растворимости.

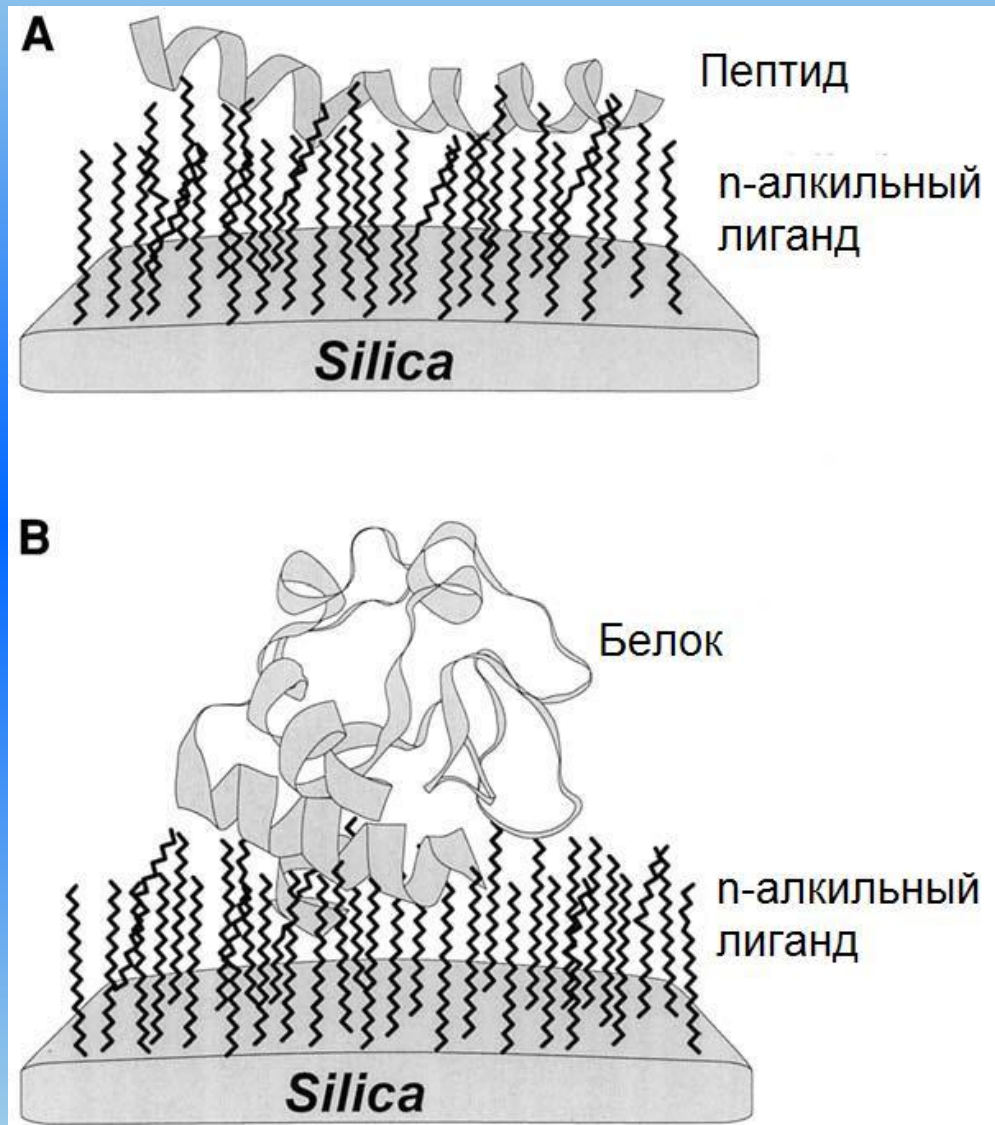
В качестве неподвижной фазы выступает инертный носитель, покрытый слоем осадителя; разделяемые вещества, находящиеся в подвижной фазе, вступают во взаимодействие с осадителем и образуют малорастворимые вещества — осадки. При дальнейшем пропускании растворителя происходят поочерёдно: растворение этих осадков, перенос вещества по слою неподвижной фазы, снова осаждение и т. д. При этом скорость перемещения осадка по неподвижной фазе пропорциональна его произведению растворимости (ПР). Хроматограммой в данном случае будет являться распределение осадков по слою носителя.



# Распределительная хроматография

В **распределительной ВЭЖХ** разделение происходит за счет разной растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе, как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя, и в подвижной фазе - растворителе. Этот метод разделения наиболее популярен, особенно в случае, когда привитая фаза представляет собой неполярный алкильный остаток от C4 до C18, а подвижная фаза более полярна, например смесь метанола или ацетонитрила с водой. Это так называемая **обращённо-фазная (обратно-фазная, или с обращением фаз) хроматография**.

# Принципиальная схема



# HPLC/ВЭЖХ

## HPLC

high-performance liquid chromatography  
high-pressure liquid chromatography

## ВЭЖХ

высокоэффективная  
жидкостная хроматография



По агрегатному  
состоянию фаз

*Жидкостно-  
твёрдофазная  
хроматография*

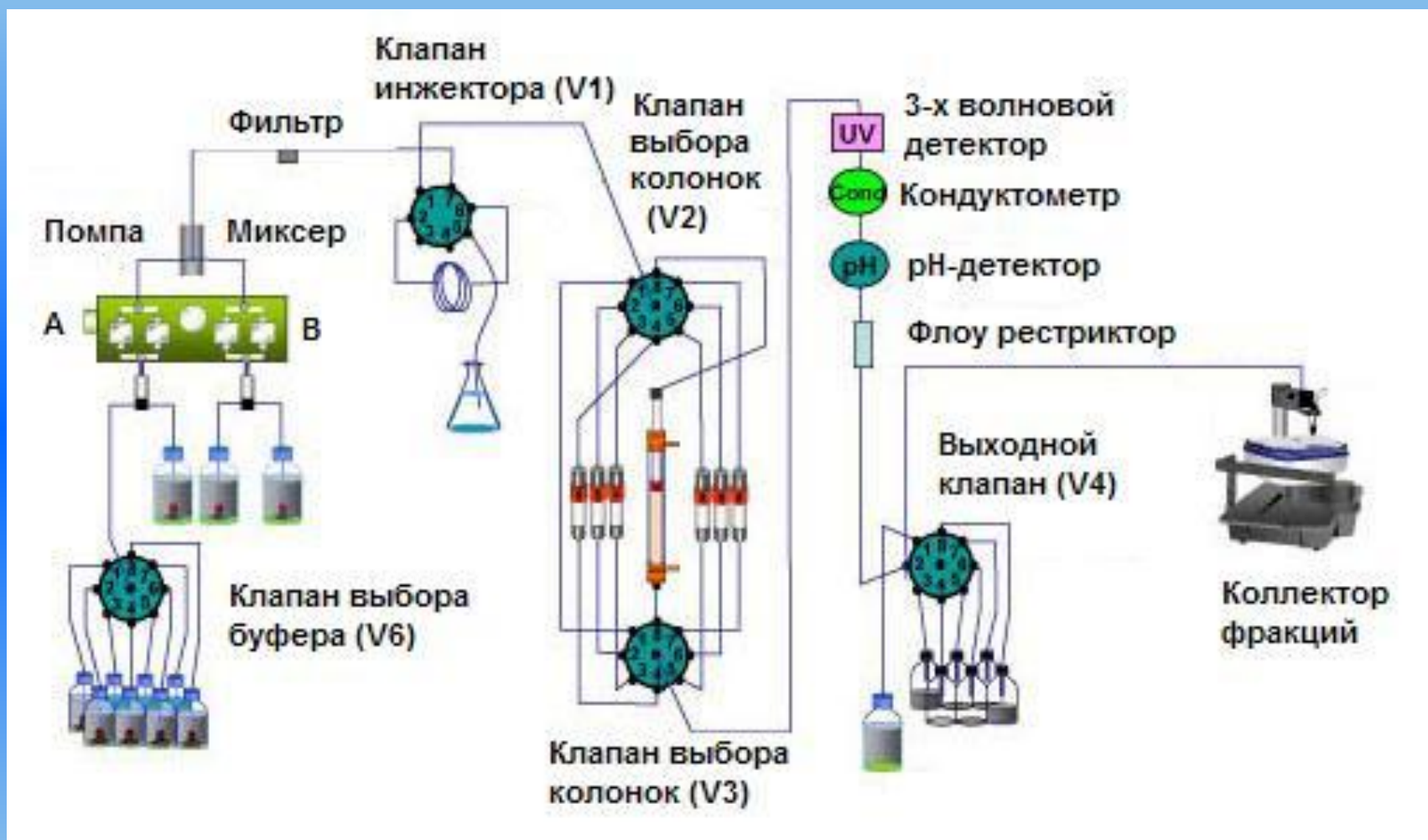
По механизму  
взаимодействия

*Распределительная  
хроматография  
(обращенно-фазовая)*

По цели проведения

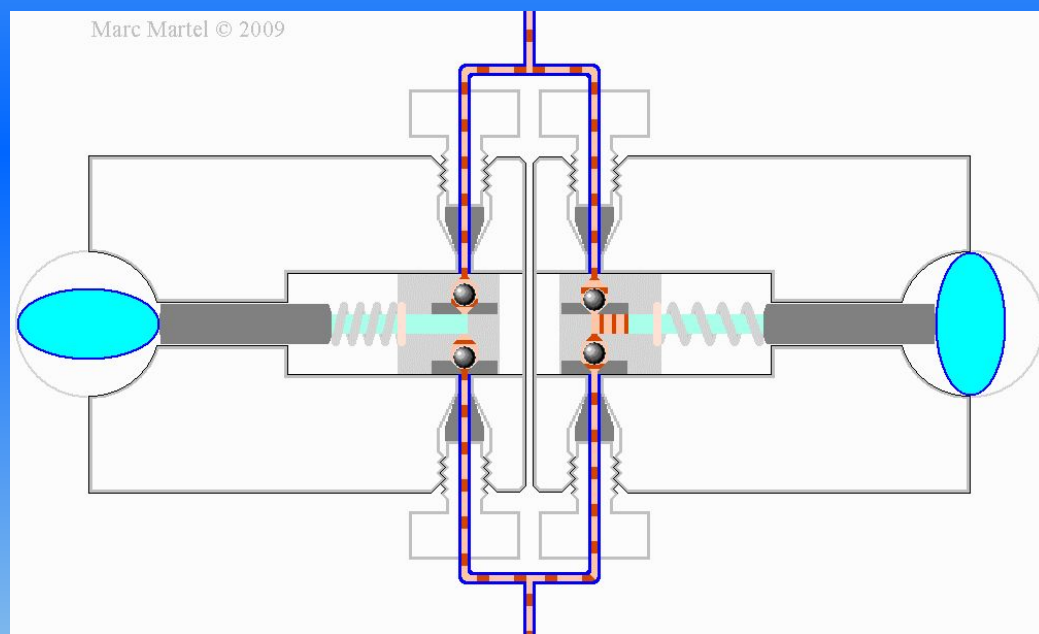
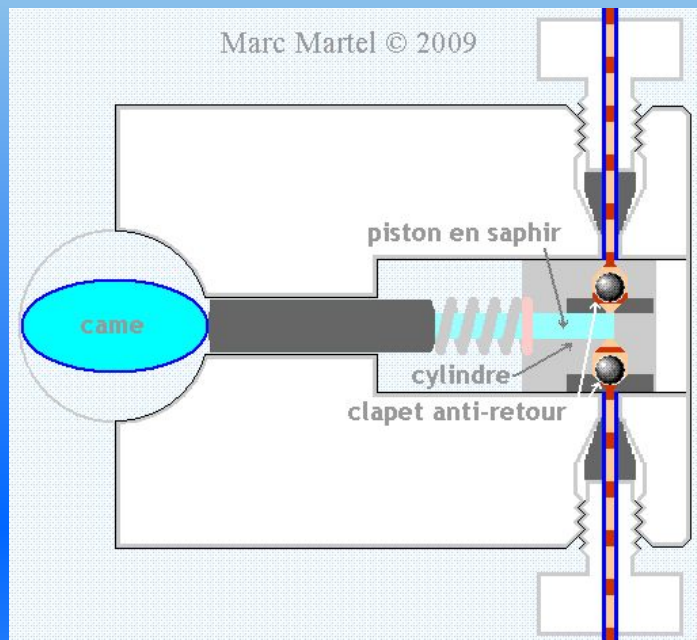
*Аналитическая  
хроматография*

# Блок-схема жидкостного хроматографа



# Принцип работы помпы

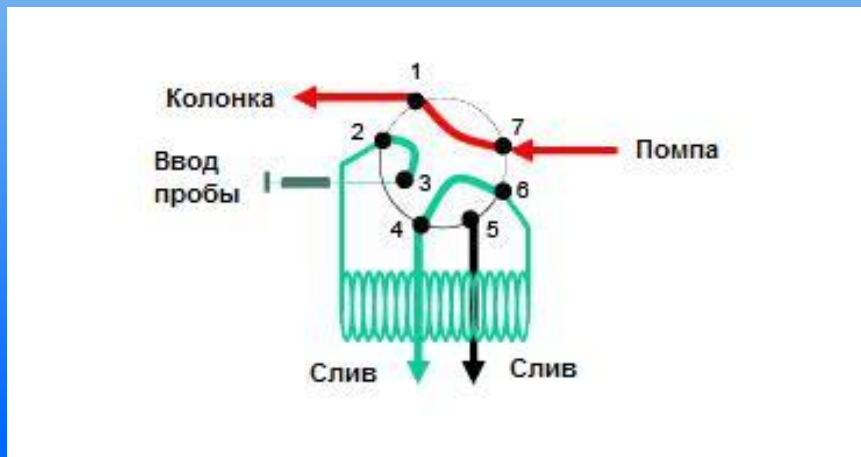
Одноплунжерная помпа



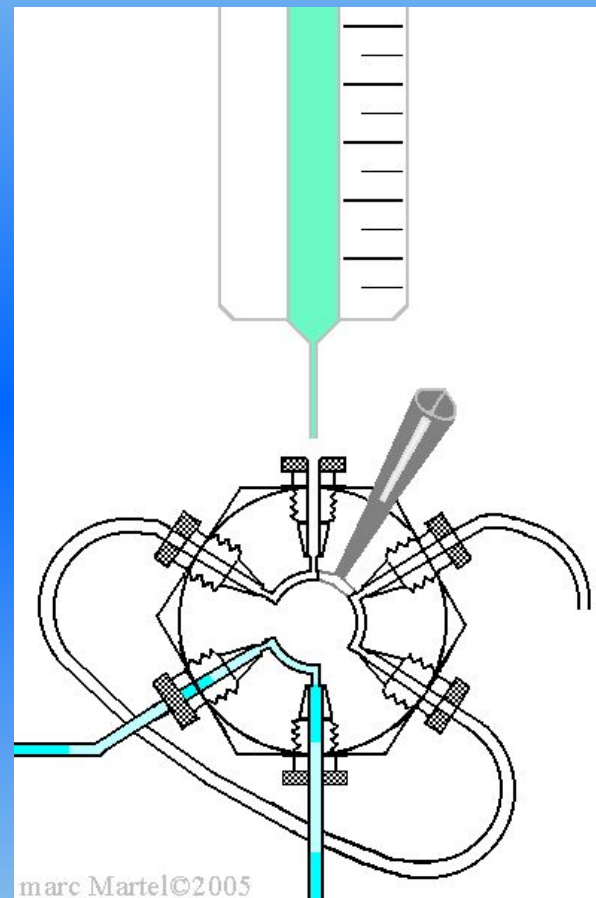
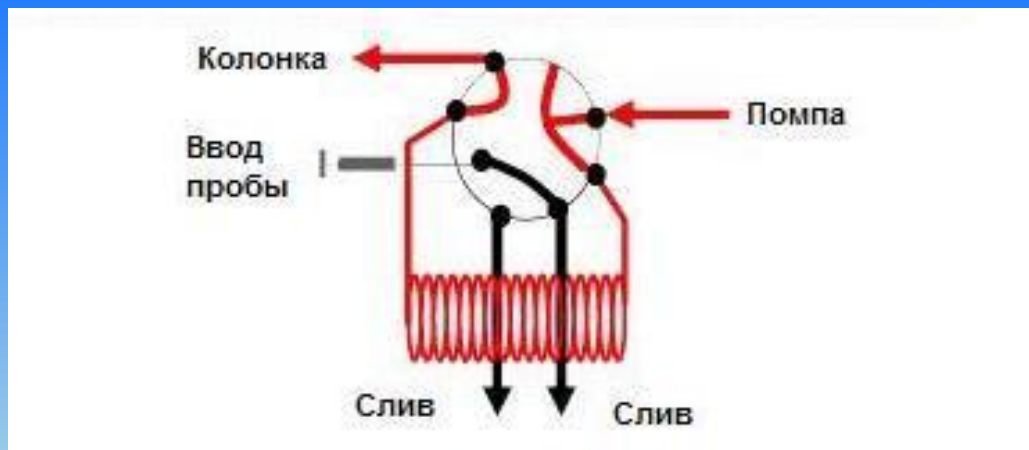
Двуплунжерная помпа

# Принцип работы инжектора

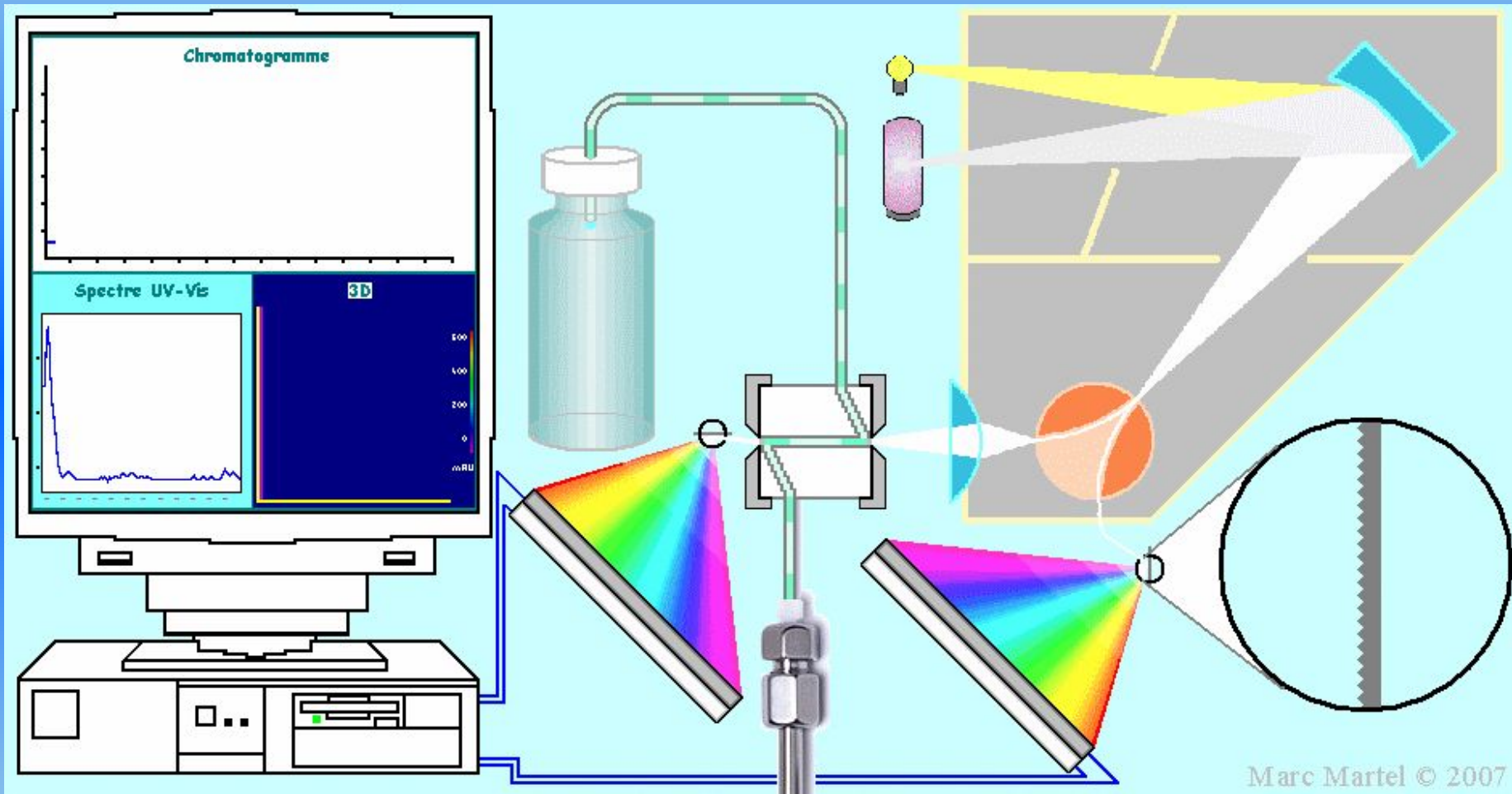
## Загрузка пробы в петлю



## Нанесение пробы на колонку

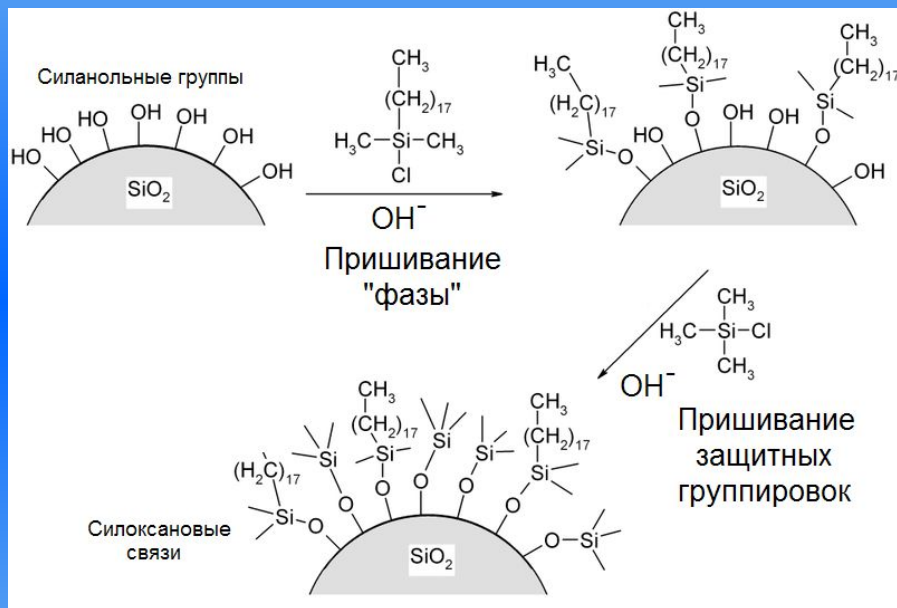
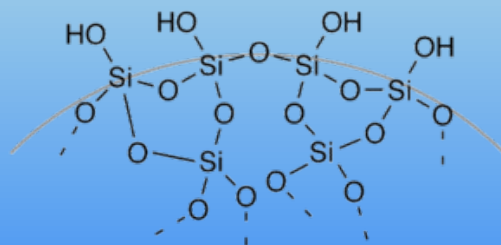


# Принцип работы UV-VIS детектора

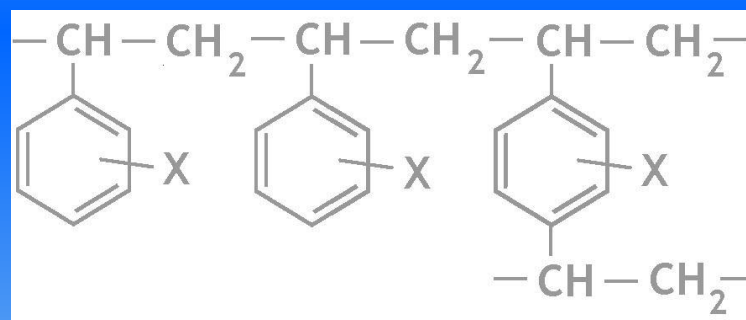


# Матрицы ОФ-ВЭЖХ

## Силикагель



## Полистирол, сшитый дивинилбензолом



## Оксиды алюминия, титана, циркония



# Наиболее распространенные фазы

## Обращенные фазы

			
Фенил-3-пропилдиметил силан (Фенил)	Диметилпропилсилан (C4)	Диметилоктилсилан (C8)	Диметилоктадецилсилан (C18)

## Нормальные фазы

			
Нитро-4-фенил-3-пропил диметилсилан (Нитро)	Циано-3-пропилдиметил силан (Циано)	Дигидрокси-2,3-пропилоксидиметил силан (Диол)	Амино-3-пропилдиметил силан (Амино)

# Параметры и методы оценки сорбентов для обращенно-фазной хроматографии

Параметр	Метод оценки
Эффективность $N$	Число теоретических тарелок на метр длины колонки
Фактор удерживания $K_{AB}$	Для пентилбензола время выхода несорбируемого компонента определяется по метанолу; оценка плотности прививки на поверхности силикагеля
Гидрофобность, или гидро-фобная селективность $a_{CH_2}$	Отношение факторов удерживания пентилбензола и бутилбензола $a_{CH_2} = K_{ПБ} / K_{ББ}$ . Это мера плотности покрытия поверхности фазой и ее лигандной емкости
Стерическая селективность $a_{T/O}$	Отношение факторов удерживания между трифениленом и терфенилом $a_{T/O} = K_T / K_O$ . Этот показатель оценивает селективность к молекулам разной геометрической формы и связи с типом силилирующего реагента
Емкость взаимодействия по типу водородной связи $a_{K/Ф}$	Отношение факторов удерживания между кофеином и фенолом $a_{K/Ф} = K_T / K_Ф$ . Это оценивает число свободных гидроксильных групп и степень дозакрытия (экранирования)
Ионообменная емкость при $pH = 7,6$ $a_{Б/Ф}$	Отношение факторов удерживания бензиламина и фенола $a_{Б/Ф} = K_Б / K_Ф$ . Эта величина определяет общую силанольную активность
Ионообменная емкость при $pH = 2,7$ $a_{Б/Ф}$	Отношение факторов удерживания бензиламина и фенола в кислой среде. Этот параметр определяет общую кислотную активность силанольных групп

# Характеристики коммерческих сорбентов C18 для обращенно-фазной хроматографии

Название	Фирма	$K_{AB}$	$a_{CH_2}$	$a_{T/O}$	$a_{K/\Phi}$	$a_{B/\Phi}$		N
						pH 7.6	pH 2.7	
Develosil ODS	Phenomenex	6,7	1,49	1,24	0,51	0,1	0,07	63000
Discovery C <sub>18</sub>	Supelco	3,32	1,48	1,51	0,39	0,28	0,1	80000
Hypersil Elite C <sub>18</sub>	Waters	3,2	1,47	1,6	0,37	0,29	0,1	79000
Luna C <sub>18</sub> (16,5% C)	Phenomenex	5,97	1,47	1,17	0,4	0,24	0,68	90000
Novapak C <sub>18</sub>	Waters	4,49	1,49	1,44	0,48	0,27	0,14	70000
Optimal-ODS H	Phenomenex	6,15	1,48	1,38	0,44	0,24	0,09	83000
Prodigy ODS 3	Phenomenex	7,27	1,49	1,26	0,42	0,27	0,09	73000
Purospher RP18c	Merck	6,51	1,48	1,75	0,46	0,34	0,08	66000
Selectosil C <sub>18</sub>	Waters	4,94	1,45	1,69	0,68	1,98	0,14	61000
Summit ODS (W)	Supelco	5,45	1,47	1,29	0,56	0,4	0,1	88000
Supelcosil LCI 8	Supelco	4,82	1,47	1,42	0,46	1,93	0,89	61000
Superspher RP18c	Merck	5,47	1,47	1,64	0,44	0,42	0,11	50000
Symmetry C <sub>18</sub>	Waters	6,51	1,46	1,49	0,41	0,68	0,01	56000
Symmetry Shield	Waters	4,66	1,41	1,22	0,27	0,2	0,04	83000
Xterra RP18	Agilent	2,38	1,29	1,83	0,33	0,2	0,07	41000
Zorbax Extend C18	Agilent	6,66	1,5	1,49	0,38	0,55	0,11	88000
	Среднее	5,4	1,47	1,52	0,52	0,81	0,21	65000

# Специализированные колонки в ВЭЖХ

<b>Сорбент</b>	<b>Назначение колонок</b>
Hypersil Green Env	Для анализа загрязнений окружающей среды (фенолов, фталатов, пестицидов и др.)
Hypersil Green PAH	Для анализа полиароматических соединений, включая и 1,2-бензопирен
Hypersil Green Carbamate	Для анализа карбаматных пестицидов (по методу EPA)
Hypersil PeP	Для анализа и выделения синтетических и природных пептидов и белков (размер пор 100 и 300 Å)
Hypersil Duet (C18/SAX C18/SCX)	Колонки со смешанными фазами, для анализа одновременно гидрофобных и ионных соединений, для анализа метаболитов лекарственных препаратов
HyperREZ XP CarboHydrate	Для анализа спиртов, сахаров (высокая стабильность при низких значениях pH)

# Сорбенты для обращенно-фазной хроматографии, приготовленные по нетрадиционной технологии или на несиликагелевой основе

Сорбент	Характеристики
<b>Diamond Band C18</b> ZirChrom Separation	Фаза C18 на оксиде циркония, рекомендуется для работы при высоких pH и температурах
<b>Hydrocell RP 10D</b> BioChrom Labs. Inc	На основе сополимера стирола и дивинилбензола, размер пор 1000 Å, сферические частицы 10 мкм, рекомендуется для разделения белков
<b>Poroshell 300SB-C18</b> Agilent Technologies	Фаза C18 на поверхностно-пористом сферическом силикагеле (зерна 5 мкм), колонка 75x2,1 мм для быстрого разделения белков
<b>Presto FT-C18</b> Irritant Corp	Фаза C18 на непористых частицах сферического кремнезема (зерна 2 мкм), колонка 30x4,6 мм для сверхбыстрого разделения
<b>Aquasil C18</b> Hypersil	Наличие гидрофильных и гидрофобных групп, предназначенных для анализа полярных соединений, в частности, водорастворимых витаминов, сорбент устойчив в водных элюентах (до 100%)
<b>Fluophase PFP</b> Thermo Hypersil	Перфторированные фенильные группы

Сорбент	Характеристики
<b>Fluophase RP</b> Thermo Hypersil	Перфторированные алкильные цепи
<b>Fluophase WP</b> Thermo Hypersil	Перфторированные алкильные цепи на силикагеле (зерна 300 А), перфторированные сорбенты рекомендуются для разделения фос-фолипидов, галогенсодержащих соединений, фенолов, изомеров
<b>Aster Polymer C18</b> Astec	На основе поливинилового спирта
<b>Spherisorb ASY</b> Waters	На основе оксида алюминия
<b>Supelcogel ODS (W)</b> Supelco	На основе сополимера стирола и дивинилбензола
<b>ZirChrom PBD</b> ZirChrom Separation	На основе оксида циркония
<b>Hy Purity</b> THKSo	Сферические частицы силикагеля 3 и 5 мкм (диаметр пор - 180 А), фазы C18, C8 и CN для приготовления капиллярных колонок
<b>Pico Frit New</b> Objective Inc	Для капиллярных колонок 75 мкм x 10;50;100 мм

# Свойства растворителей для ВЭЖХ

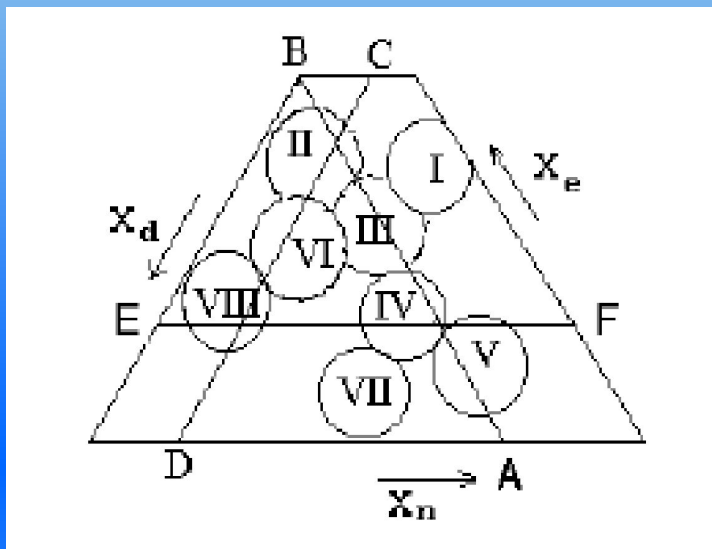
Растворитель	Предел прозрачности для УФ-света, нм	Элюирующая сила $\epsilon_0$ на силикагеле	Параметр Р'	Параметр S	Группа селективности
Ацетонитрил	190	0,50	5,8	3,1	VI
Вода	-	1.50	10.2	0,0	VIII
Гексан	190	0,01	0,1	-	-
Метанол	205	0,7	5,1	3.0	II
Метиленхлорид	233	0,32	3,1	-	V
Пропанол-2	205	0,55	3,9	4,2	II
Тетрагидрофуран	212	0.44	4,0	4,4	III
Толуол	285	0,1	2,4	-	VII
Триэтиламин	-	-	1,9	-	I
Хлороформ	245	0,26	4,1	-	VIII
Этилацетат	256	0,38	4,4	-	VI

Адсорбционная сила растворителя  $\epsilon_0$  – относительная энергия взаимодействия молекул подвижной фазы с поверхностью адсорбента;

Параметр Р' (параметр Снайдера) – сумма логарифмов коэффициентов распределения стандартных веществ (этанола, диоксана и нитрометана) между паровой фазой и испытуемым растворителем;

Параметр S –отражает чувствительность величин удерживания к изменению состава подвижной фазы. Эта величина предложена для ОФ ВЭЖХ.

# Классификация растворителей по Снайдеру



Кругами выделены области, в которых группируются растворители по селективности:

$X_e$  – способность к протонодонорным взаимодействиям;

$X_d$  – способность к протоноакцепторным взаимодействиям;

$X_n$  – способность к диполь-дипольным взаимодействиям.

AB, CD и EF- тренды изменения способности к соответствующим взаимодействиям

I – алифатические простые эфиры, амины;

II – алифатические спирты;

III – пиридины, тетрагидрофуран, амиды (кроме формамида);

IV – гликоли, уксусная кислота, формамид;

V – метиленхлорид, этиленхлорид;

VI – алифатические кетоны и сложные эфиры, диоксан, сульфоны, нитрилы;

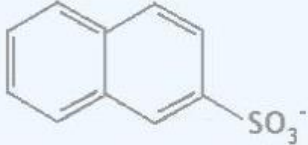
VII – ароматические углеводороды, нитросоединения;

VIII – фторированные спирты, вода, хлороформ.



# Противоионы ион-парной хроматографии

## Анионы

$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_4 - \text{SO}_3^-$	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_5 - \text{SO}_3^-$	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{12} - \text{SO}_3^-$	
Пентансульфонат	Гексансульфонат	Додекансульфонат	Нафталенсульфонат
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_5 - \text{SO}_4^-$	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{SO}_4^-$	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_9 - \text{SO}_4^-$	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{11} - \text{SO}_4^-$
Гексилсульфат	Октилсульфат	Децилсульфат	Додецилсульфат
$\text{F}_3\text{C} - \text{COO}^-$	$\text{Cl}_3\text{C} - \text{COO}^-$	$\text{PO}_4^{3-}$	$\text{ClO}_4^-$
Трифторацетат	Трихлорацетат	Фосфат	Перхлорат

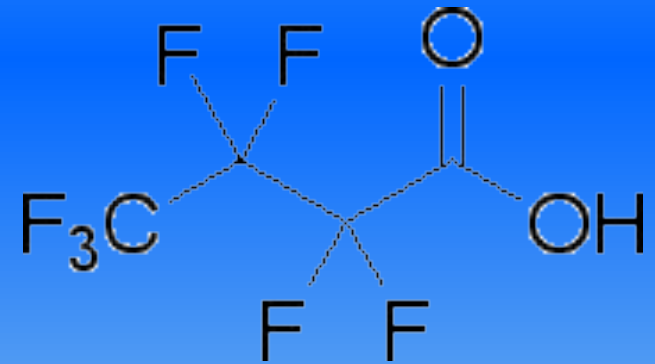
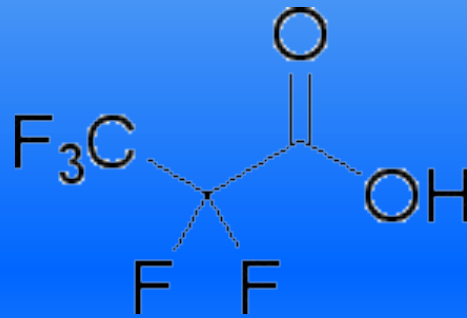
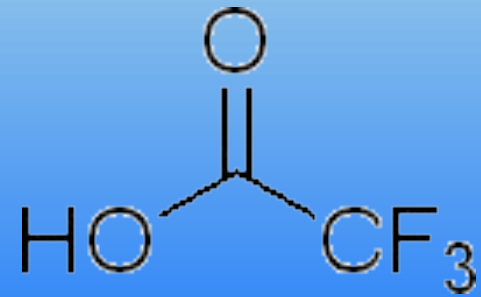
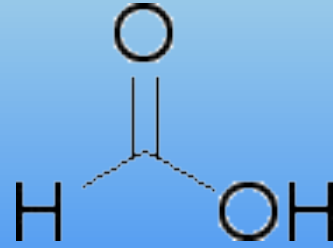
## Катионы

$\text{N} (\text{CH}_3)_4^+ \text{X}^-$	$\text{N} (\text{C}_2\text{H}_5)_4^+ \text{X}^-$	$\text{N} (\text{C}_4\text{H}_9)_4^+ \text{X}^-$	$\text{N} (\text{C}_7\text{H}_{15})_4^+ \text{X}^-$
Тетраметиламмоний	Тетраэтиламмоний	Тетрабутиламмоний	Тетрагептиламмоний
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{15} \text{N} (\text{CH}_3)_3^+ \text{X}^-$		$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_7 - \text{NH}_2$	$(\text{C}_8\text{H}_{17})_3\text{N}$
Цетилтриметиламмоний или Пальмитилтриметиламмоний		Октиламин	Триоктиламин

# Классические противоионы ОФ-ВЭЖХ хроматографии

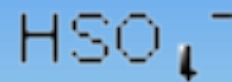
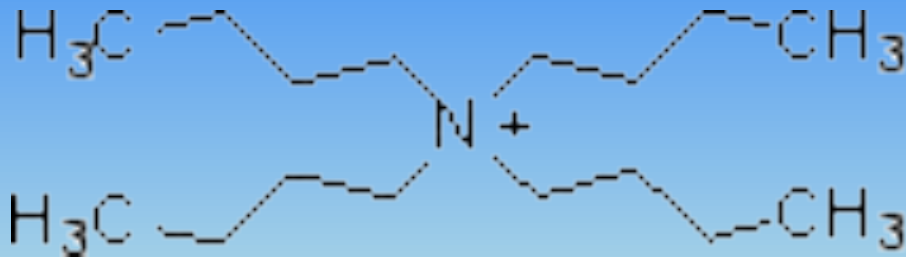
## Анионы:

- Муравьиная кислота
- Трифторуксусная кислота
- Гептафтормасляная кислота



## Катионы:

- Соли тетраалкиламмония  
(например, тетрабутиламмоний)



# Регенерация обращённо-фазовых колонок с внутренним диаметром 4.6 мм

1. Подсоедините колонку к хроматографу в противоположном направлении.
2. Промойте колонку от буферных растворов и солей обратным током 25 мл воды со скоростью 0.2-0.3 мл/мин.
3. Промойте колонку 25 мл пропан-2-ола с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
4. Промойте колонку 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин.
5. Промойте колонку 25 мл гексана с расходом не более 0.5 мл/мин.
6. Промойте колонку ещё раз 25 мл метиленхлорида с расходом не более 0.5 мл/мин.
7. Промойте колонку ещё раз 25 мл пропан-2-ола с расходом 0.2-0.3 мл/мин.
8. Подсоедините колонку в обычном направлении. Промойте колонку подвижной фазой, не содержащей буферный раствор, только после этого добавьте в подвижную фазу буферный раствор с рабочим расходом.
9. Приведите колонку в равновесие 25 – 50 мл подвижной фазы.
10. Введите пробу или стандарт, чтобы убедиться, что колонка регенерирована.

# Несколько стандартных вопросов-ответов

Причины плохой воспроизводимости	Симптомы	Необходимые действия
Колонка неуравновешенна	– Постоянное увеличение или уменьшение времён удерживания – Неправильная форма пика	1) Уделяйте больше времени уравниванию колонки. Перед вводом пробы промойте колонку как минимум 15 объёмами подвижной фазы (35 мл для колонки 250 x 4.6 мм). 2) Если для анализа необходим слабый элюент, промойте колонку сначала более сильным растворителем.
Загрязнённая колонка.	– Продолжительное уменьшение времени удерживания – Неправильная форма пика – Увеличивающееся давление	1) Промойте колонку обратным током сильным растворителем с расходом в 5 раз меньшим по сравнению с рабочим. 2) Если промывка не помогает, замените колонку. В следующий раз используйте предколонку.
Перегрузка колонки	– Уменьшение времени удерживания при увеличении массы введённого образца	1) Разбавьте пробу перед вводом. 2) Подберите колонку с большим внутренним диаметром.