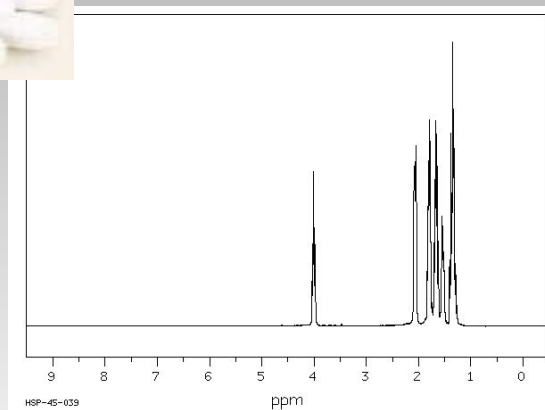
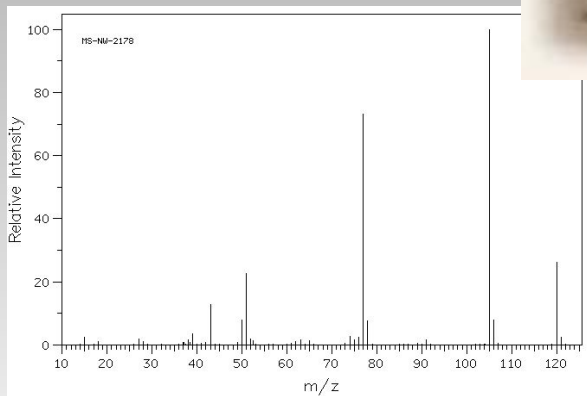
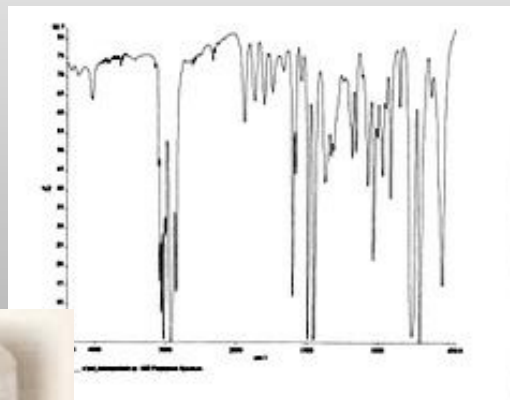
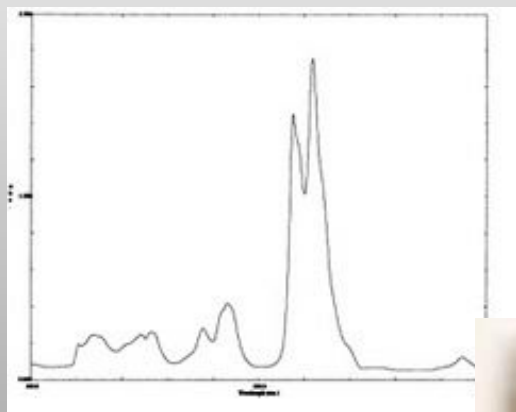


# Физико-химические методы исследования биологически активных веществ

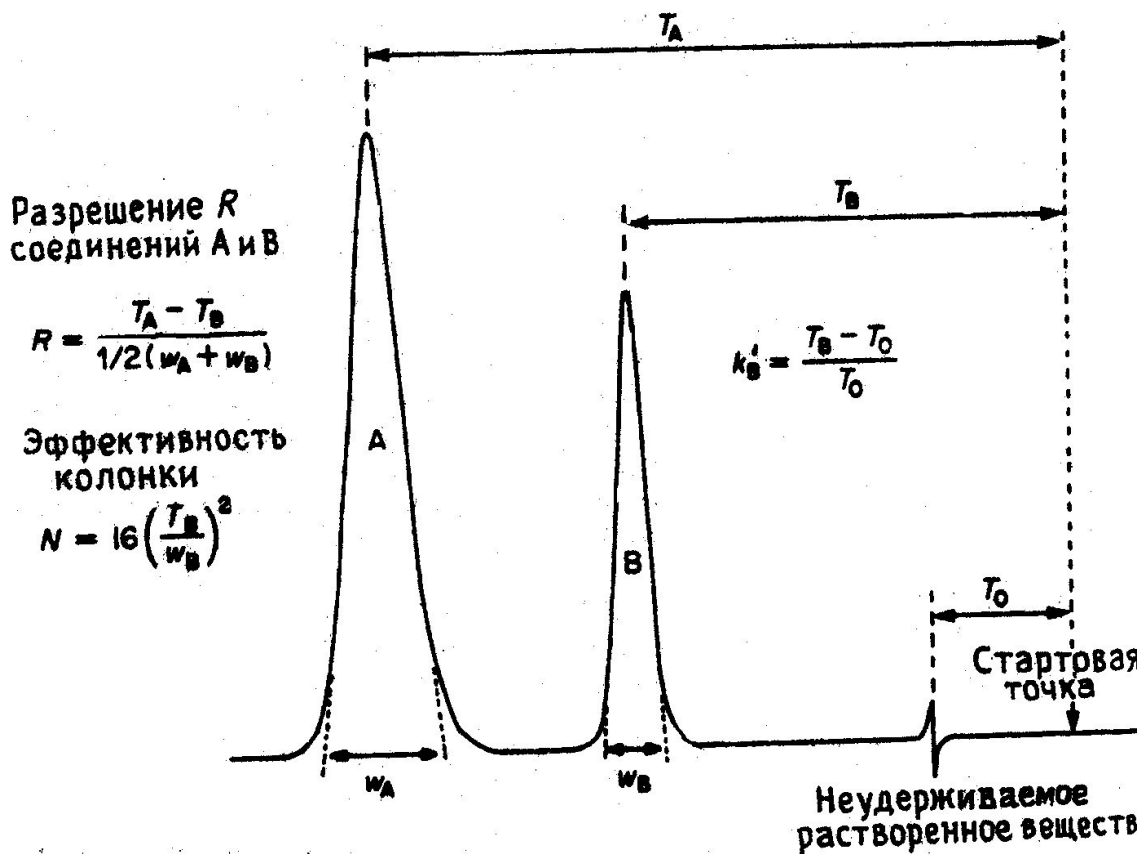


# Лекция №16

- Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)
  - Жидкостно-адсорбционная хроматография
  - Жидкостная-жидкостная (распределительная) хроматография (ЖЖХ)
- Тонкослойная хроматография (ТСХ)
  - Общее описание метода
  - Определение величины  $R_f$
  - Основные правила идентификации с помощью ТСХ-анализа
  - Методы визуализации хроматографической картины
- Препаративная колоночная хроматография

# Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Высокоэффективная жидкостная хроматография - универсальный метод количественного и качественного анализа смесей соединений всех классов веществ (летучих и нелетучих, термически стабильных и нестабильных, полярных и неполярных)



Каждое соединение при данном наборе рабочих условий имеет определенное время удерживания (объем удерживания)

# Распространенными видами ВЭЖХ являются:

- 

- **Жидкостно-адсорбционная хроматография**

Используется для разделения широкого круга неионных соединений, от умеренно неполярных до умеренно полярных

Углеводороды, амины, спирты и кислоты

Неподвижная фаза - мелкие частицы  
твёрдого сорбента (силикагель,  
окись алюминия)

Подвижная фаза (элюент) -  
органический растворитель

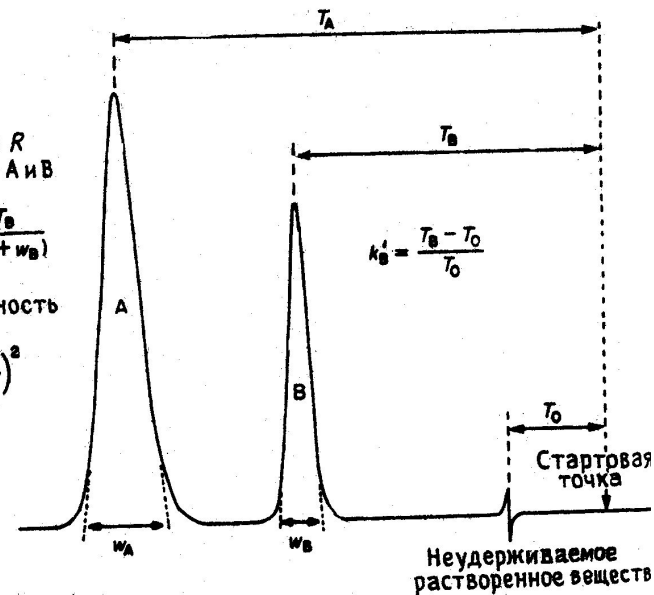
$$k'_A = n_S^A / n_M^A$$

Разрешение  $R$   
соединений А и В

$$R = \frac{T_A - T_B}{1/2(w_A + w_B)}$$

Эффективность  
колонки

$$N = 16 \left( \frac{T_B}{w_B} \right)^2$$



$n_S^A$  – общее число молекул соединения А, адсорбированных твердым веществом;  
 $n_M^A$  – общее число молекул соединения А, растворенных в элюенте.

## Активность сорбента

( $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ) и гидратированный оксид алюминия ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )

**Общее правило: чем более полярна молекула, тем сильнее она сорбируется**

**Адсорбционную активность можно регулировать содержанием воды в сорбенте**

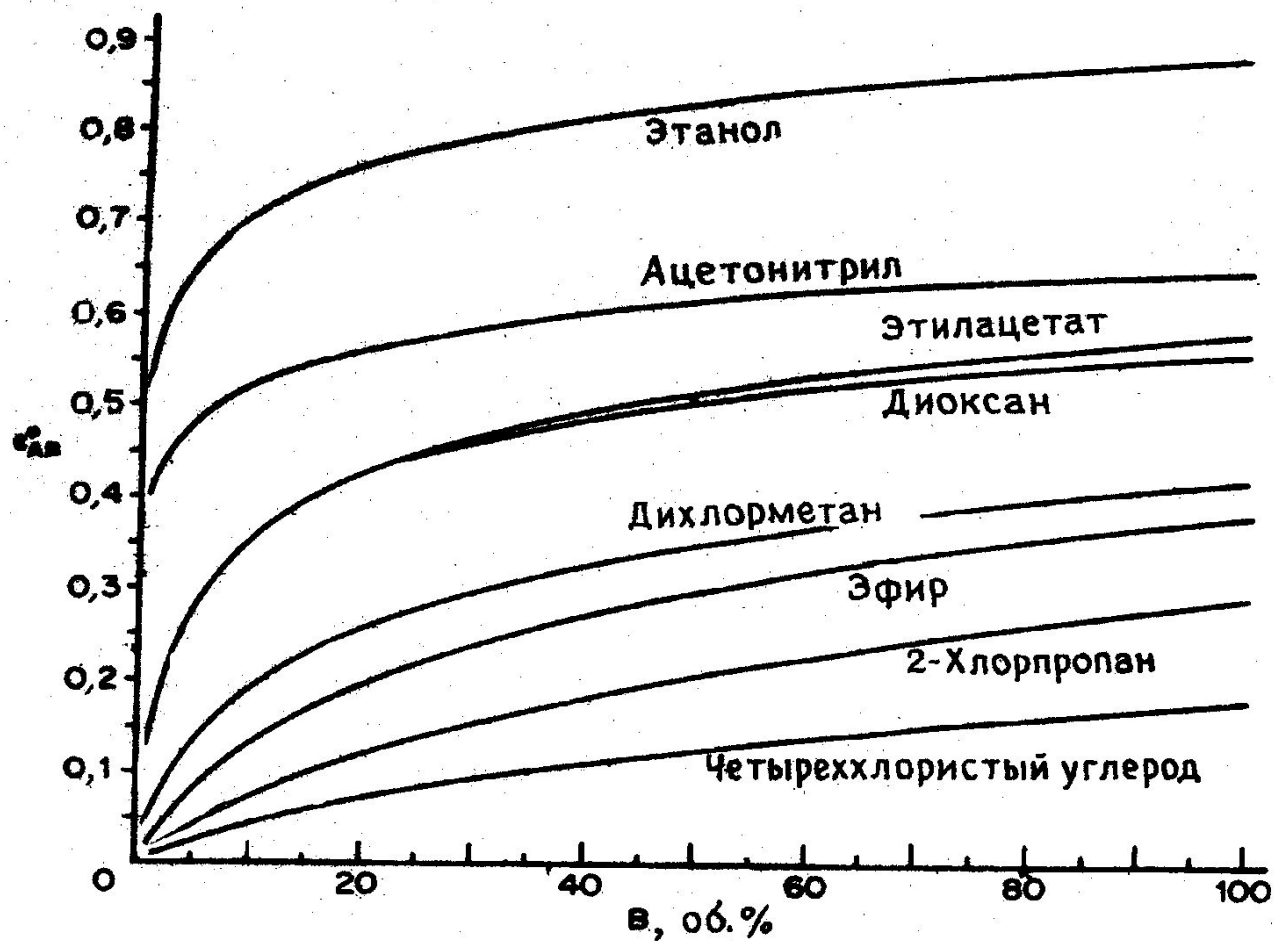
### Определение степени активности по Брокману

(значение Rf на силикагеле или оксиде алюминия при использовании элюэнта 20% толуола + 80% петролейного эфира)

Краситель	Степень активности			
	II	III	IV	V
азобензол	0.59	0.74	0.85	0.95
п-метоксиазобензол	0.16	0.49	0.69	0.89
п-аминоазобензол	0.00	0.03	0.08	0.19

# Сила растворителя

Количественно сила растворителя определяется величиной диэлектрической проницаемости  $\epsilon^0$



# Жидкостная-жидкостная (распределительная) хроматография (ЖЖХ)

Метод применим для разделения практически всех типов соединений, особенно полярных соединений, которые не разделяются ЖТХ

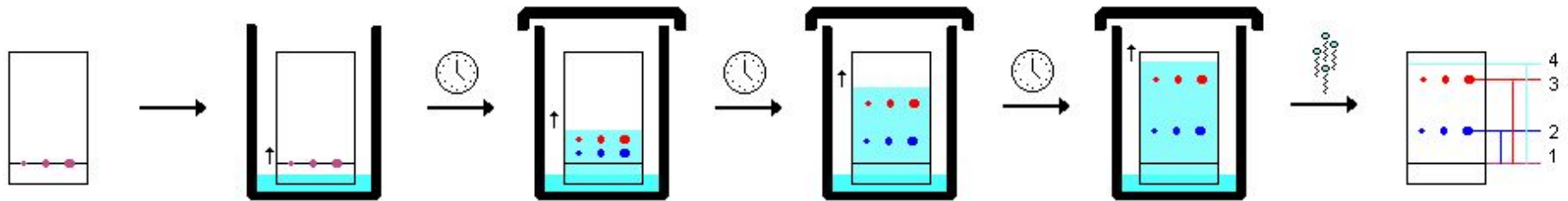
жидкость	Подвижная фаза
	Неподвижная фаза (жидкость химически связана с твердым носителем)

# Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Хроматография в тонких слоях, или тонкослойная хроматография имеет огромное значение для:

- быстрого качественного анализа смесей,
- контроля хода реакций,
- определения рабочих параметров для препаративной колоночной хроматографии.

Разделение методом ТСХ – одна из форм жидкостно-адсорбционной хроматографии

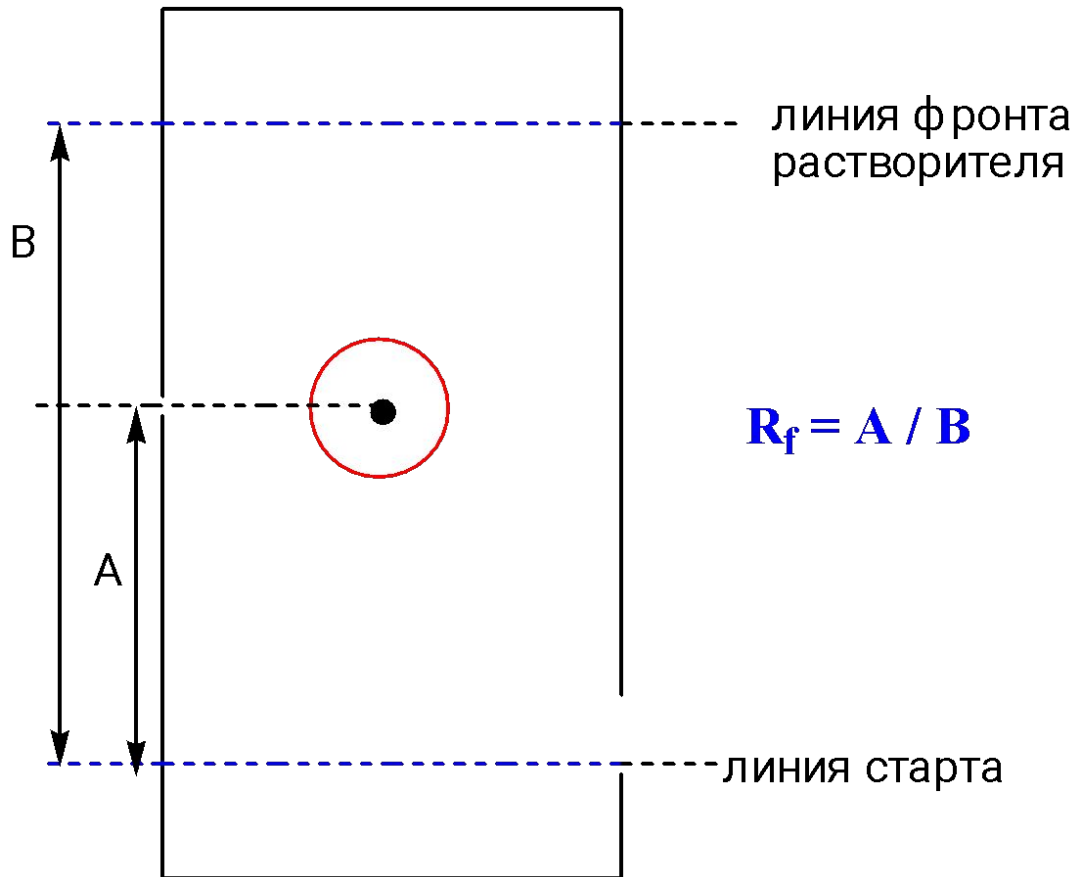


**Получение начальной зоны (пятна) должно занимать минимальную площадь!**



# Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Величиной, характеризующей данное соединение, является величина  $R_f$



**$R_f$  - расстояние от линии старта до середины пятна, отнесенное к расстоянию от линии старта до линии фронта растворителя**

Воспроизводимость величин  $R_f$  зависит от сорбента, его пористости (емкости), толщины, насыщения камер, температуры, угла наклона пластины, величины фронта растворителя и получения начального пятна

# Основные правила идентификации с помощью ТСХ-анализа



1. Проявительная камера изнутри должна быть выложена фильтровальной бумагой

Краевой эффект- искажение хроматографической картины

2. Успех анализа зависит от правильного подбора элюэнта

Когда разделению препятствует сильное перекрывание двух пятен, попытайтесь предпринять следующее:

- а) Изменить химическую природу проявляющего растворителя при сохранении его силы
- б) Изменить природу неподвижной фазы (замена пластинок)

3. Линии старта и фронта растворителя наносятся простым карандашом на пластинку

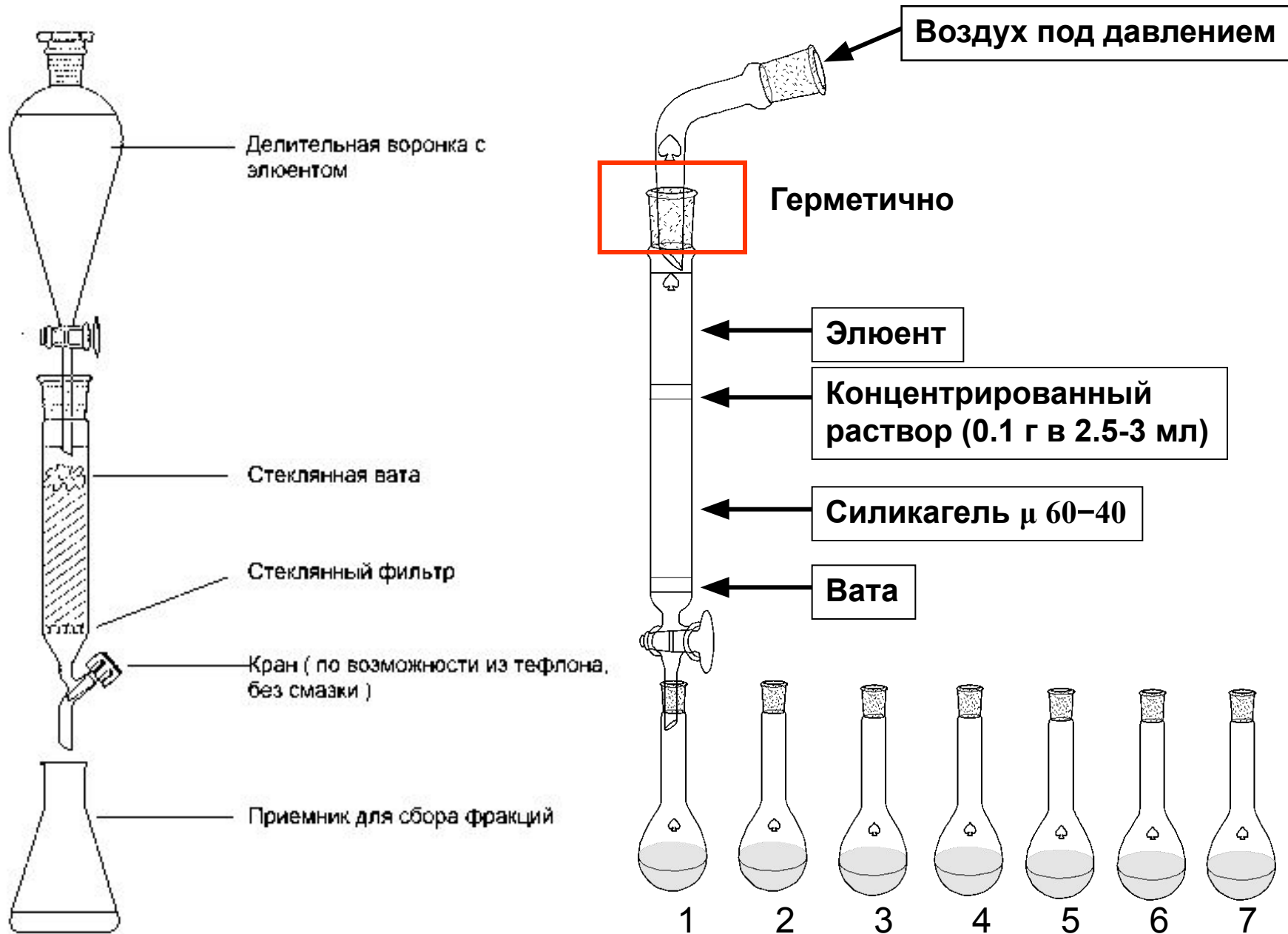
**Высота линии старта должна быть выше уровня растворителя в камере!**

4. Исследуемое вещество обычно наносится в виде 1-2% раствора в летучем растворителе ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , эфира)

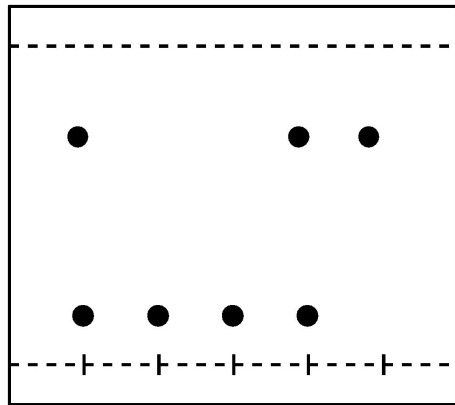
**Избегать сильнополярных растворителей!**

5. Детектирование пятен хроматограммы проводится подходящим методом

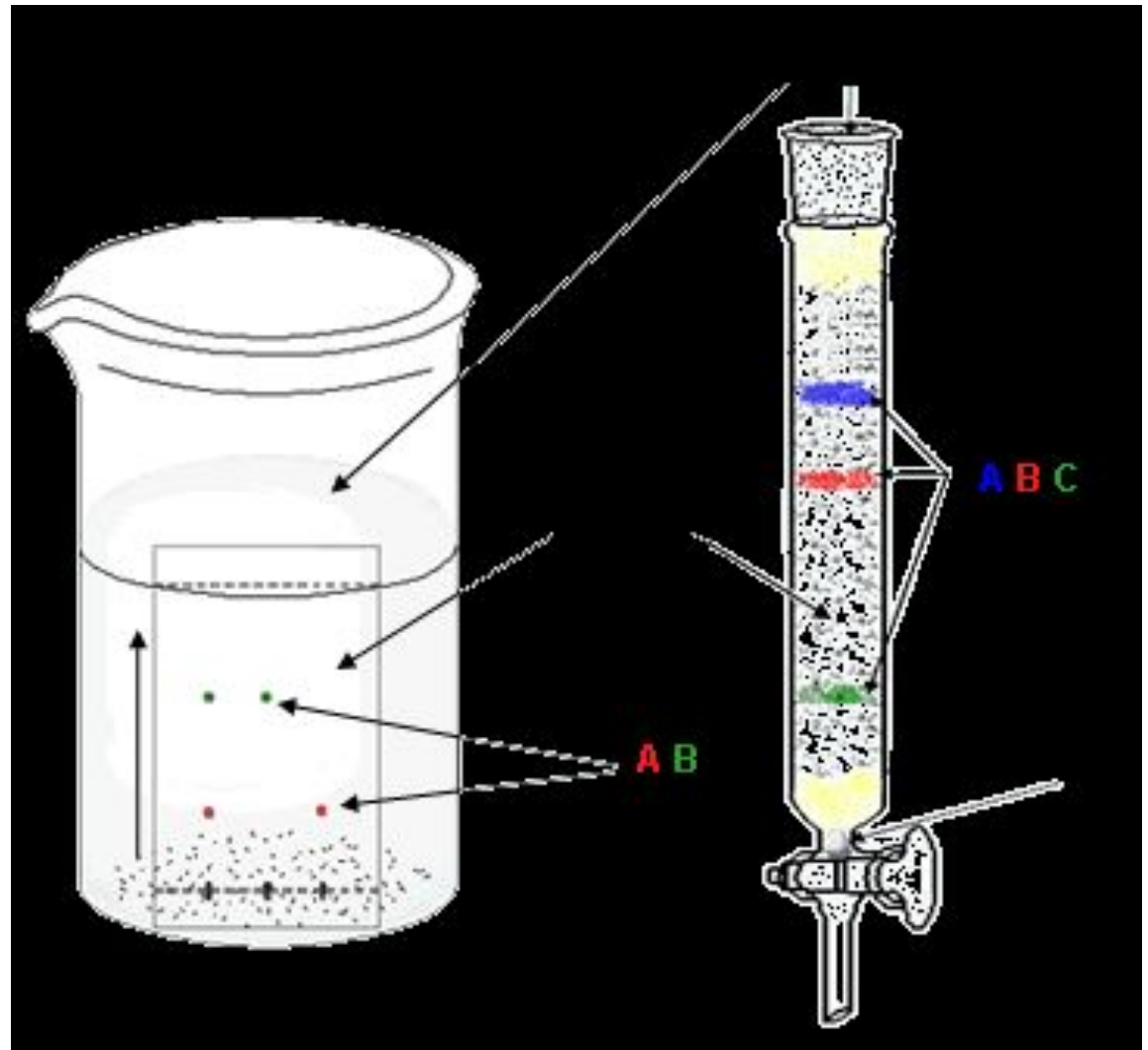
# Препаративная колоночная хроматография



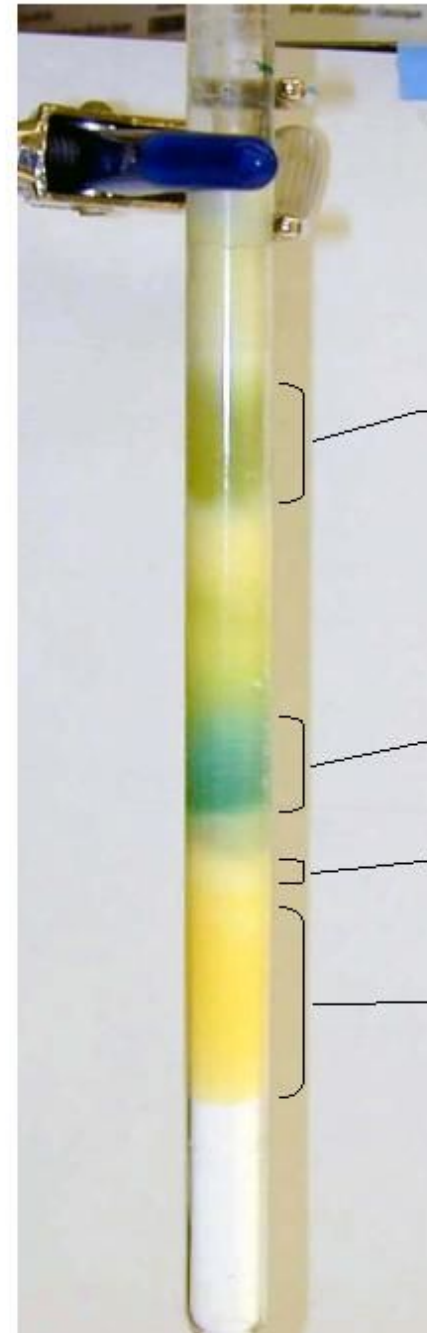
# Препаративная колоночная хроматография



Р.М. 1 3 5 7



# Препаративная колоночная хроматография



# Информационные источники

- Карасек Ф., Клемент Р. введение в хромато-масс-спектрометрию. М.: Мир. -1993. -236с.
- Шарп Дж, госни И., Роули А. Практикум по органической химии. М.: Мир. -1993. -240с.