



# Хроматографияның заманауи аспектілері

Лекция тақырыбы: Сұйықтық  
хроматографиясы

Минажева Гүлшарат Салауатқызы – педагогика ғылымдарының  
докторы, химия ғылымдарының кандидаты, АКХжСЭТ  
кафедрасының профессоры

По механизму удерживания разделяемых веществ неподвижной фазой жидкостная хроматография делится на :

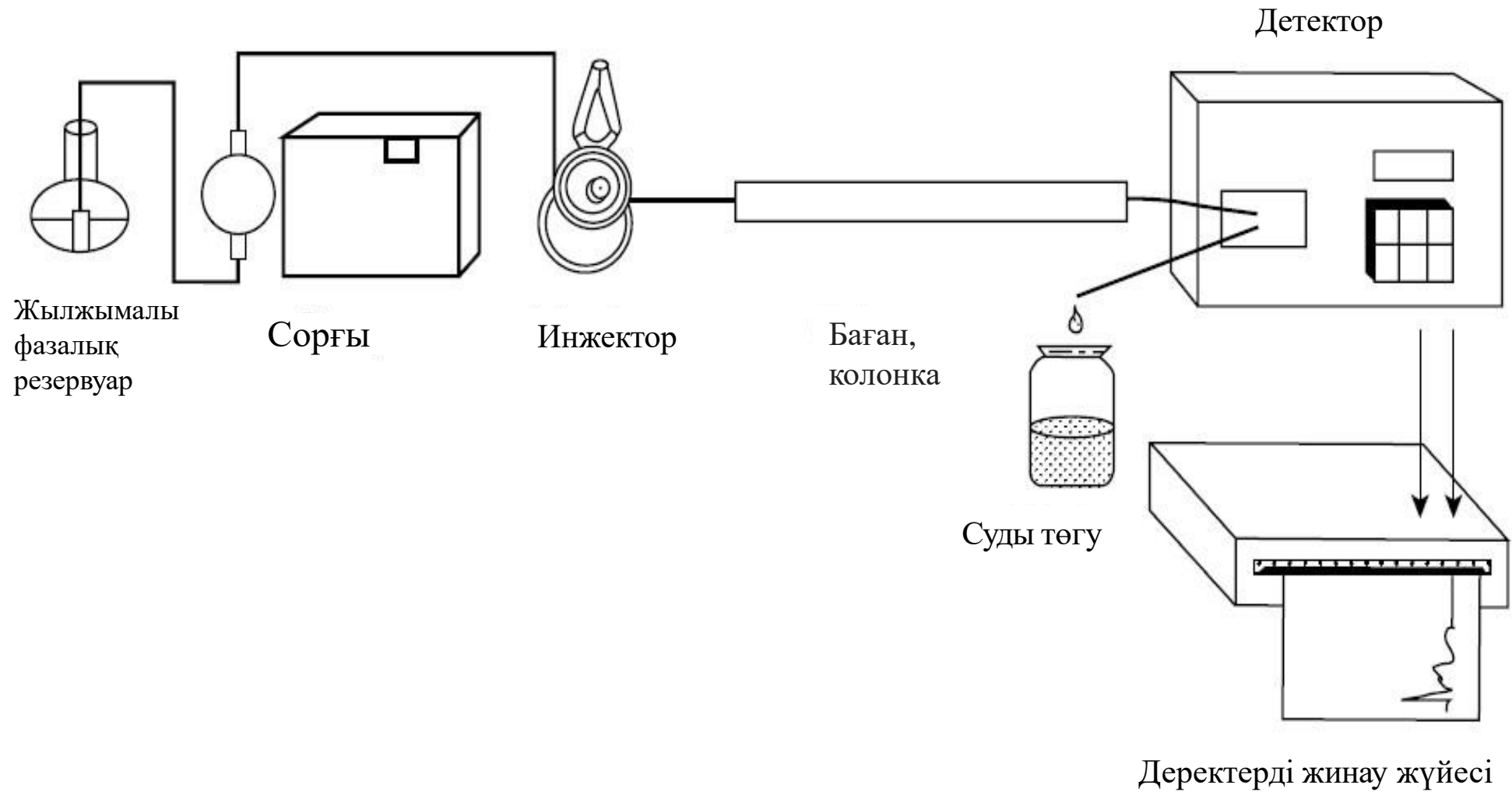
- осадочную хроматографию,
- адсорбционную,
- распределительную,
- ионообменную хроматографию (в т. ч. ионную хроматографию),
- ион-парную,
- лигандообменную хроматографию,
- эксклюзионную хроматографию (ситовую) и
- аффинную хроматографию (биоспецифическую).

Осадочная жидкостная хроматография основана на различной растворимости осадков, образующихся при взаимодействии компонентов анализируемой смеси с реагентом-осадителем.

Преимущества метода в том, что получающиеся вдоль сорбента зоны имеют резкие границы, содержат осадки только одного вещества и часто разделены зонами чистого сорбента.

Метод пока не нашел широкого распространения.

# Сұйықтықты хроматограф



Инжектор Injector



Filter Сүзгі



Pump (with damper)



Pre-column heat exchanger Бағана алдындағы жылу алмастырғыш



Solvent degasser



Қорғаныс бағаны

Guard Column

Бағана Column Thermostatted Compartment

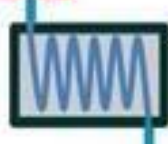


Еріткіш Solvent

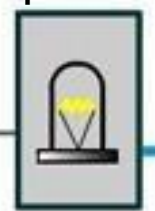


Бағанадан кейінгі жылу алмастырғыш

Post-Column heat exchanger



Детектор Detector



Splitter Ажыратқыш



Сорғы (бәсеңдеткішпен)

Еріткіш дегазаторы



## Аналиттер аумағы

Жақсы еритін қосылыстар:

- Аминоқышқылдар мен белоктар
- Көмірсулар
- Полифенолдар
- Полимерлер және т.б.

Сұйықтықты хроматография (LC) - бұл ғылым мен өнеркәсіптің әртүрлі салаларында кеңінен қолданылатын перспективалық талдау әдісі (МС-мен бірге):

**1. Фармацевтика өнеркәсібі:**

- Дәрілік препараттардағы белсенді фармацевтикалық ингредиенттерді (API) анықтау, анықтау.
- Қоспаларды және дәрі-дәрмектерді шығарудың әртүрлі формаларын талдау (таблеткалар, капсулалар, ерітінділер және т.б.).
- Дәрілік заттар өндірісінің сапасын зерттеу мен әзірлеуден бастап дайын өнімнің өндірісі мен сапасын бақылауға дейінгі барлық кезеңдерде бақылау.

**2. Аналитикалық химия:**

- Азық-түлік, косметика, су, топырақ және т. б. сияқты әртүрлі материалдар мен үлгілердегі химиялық қосылыстардың құрамын анықтау.
- Үлгілердегі белгісіз қосылыстар мен қоспаларды анықтау.
- Органикалық және бейорганикалық қосылыстарды қоса алғанда, әртүрлі молекулалардың сандық талдауы. Сот сараптамасы.

**3. Биохимия және биология:**

- Белоктар, нуклеин қышқылдары, липидтер және көмірсулар сияқты биомолекулаларды талдау.
- Биомолекулалардың құрылымы мен конформациясын анықтау.
- Биомаркерлерді, фармакокинетиканы және фармакодинамиканы талдауды қоса алғанда, биомедициналық зерттеулер.

**4. Қоршаған ортаны қорғау:**

- Судың, топырақтың және ауаның ластануын бақылау.
- Пестицидтер, ауыр металдар, органикалық қосылыстар және т. б. сияқты әртүрлі ластаушы заттардың концентрациясын анықтау.

**5. Өнеркәсіп және өндіріс:**

- Азық-түлік, химия, мұнай өңдеу, фармацевтика және басқалары сияқты әртүрлі салалардағы шикізат пен соңғы өнімнің сапасын бақылау.
- Өндірістік процестерді оңтайландыру және өнімдерді синтездеу мен тазартудың жаңа әдістерін әзірлеу.
- Сұйық хроматография-бұл әр түрлі саладағы зерттеушілер мен инженерлерге олардың зерттеулері мен өндірістік процестерінің тиімділігі мен дәлдігін арттыруға көмектесетін жан-жақты талдау құралы.

**Масс-спектрометрия мен тандемі бар сұйықтықты хроматография**  
- сұйық хроматографияның (немесе жоғары тиімді сұйық хроматографияның) масс-спектрометриямен физикалық бөлінуін біріктіретін кең таралған химиялық талдау әдісі.

Сұйық хроматография бірнеше компоненттердің қоспаларын бөледі және масс-спектрометрия жоғары сезімталдығы бар жеке компоненттердің құрылымдық сәйкестігін қамтамасыз етеді.

Бұл қос әдісті биохимиялық, органикалық және бейорганикалық қосылыстарды талдау үшін қолдануға болады.

Оны Биотехнология, қоршаған ортаны бақылау, тамақ және фармацевтика, агрохимия және косметика

# Негізгі түйіндер

- ✓ Жылжымалы фаза (еріткіштер)
- ✓ Дегазатор сорғысы
- ✓ Инжектор
- ✓ Баған (термостатта)
- ✓ Детектор(лар)



# СХ түрлері

- Қалыпты-фазалы (normal-phase, NP LC)
- Кері-фазалы (reversed-phase, RP LC)
- Ионды (ион, IC)
- Эксклюзивті-айрықша (size-exclusion, GPC, GFC)

# Талдауды оңтайландыру

- Жылжымалы фазаның жылдамдығы мен құрамы (полярилық, рН)
- Тұрақты фазаның бөлшектердің табиғаты мен мөлшері
- Хроматографиялау температурасы
- Енгізілетін сынама көлемі
- Детектор және оның параметрлері (толқын ұзындығы және т.б.)

Хроматографиядағы жылжымалы фазаның жылдамдығы мен құрамы үлгі компоненттерін бөлуде және аналитикалық процестің тиімділігін анықтауда маңызды рөл атқарады.

### **Жылжымалы фазаның жылдамдығы:**

Ағын жылдамдығы (ағын жылдамдығы): бұл жылжымалы фазаның хроматограф бағанынан өту жылдамдығы. Ол минутына миллилитрмен (мл/мин) немесе сағатына литрмен (л/сағ) өлшенеді. Ағын жылдамдығы үлгі компоненттерінің бөлінуіне әсер етеді: тым жоғары жылдамдық жеткіліксіз бөлінуге әкелуі мүмкін, ал тым төмен болса, компоненттердің шамадан тыс ұсталуы (ұсталуы) мүмкін.

Сызықты жылдамдық (linear velocity): бұл жылжымалы фазаның уақыт бірлігінде баған ұзындығынан өту жылдамдығы. Ол минутына сантиметрмен (см/мин) немесе сағатына метрмен (м/сағ) өлшенеді. Компоненттерді оңтайлы бөлу үшін сызықтық жылдамдық әдетте белгілі бір диапазонда сақталады.

### **Жылжымалы фазаның құрамы полярлыққа және рН-қа ие:**

Полярлық: жылжымалы фазаның полярлығы оның талданатын қосылыстармен әрекеттесу қабілетімен анықталады. Полярлық қосылыстар полярлы стационарлық фазаларда, ал полярлы емес қосылыстар аз полярлы фазаларда жақсы бөлінеді. Жылжымалы фазаның полярлығын белгілі бір еріткіштерді (мысалы, су, метанол, ацетонитрил) және олардың концентрациясын таңдау арқылы реттеуге болады.

рН: сұйық жүйелер қолданылған жағдайда, жылжымалы фазаның рН компоненттердің бөлінуіне де әсер етуі мүмкін, әсіресе ионогендік қосылыстар үшін. Әр түрлі рН мәндері молекулалардың зарядын және олардың стационарлық фазамен әрекеттесуін өзгерте алады, бұл бөліну жылдамдығы мен тиімділігіне әсер етеді.

Жылжымалы фазаның жылдамдығы мен құрамын дұрыс таңдау нақты талдау талаптарына, үлгі сипаттамаларына және стационарлық фазаға байланысты. Бұл параметрлерді оңтайландыру компоненттерді жақсы бөлуге және қажетті сезімталдық пен талдау дәлдігіне қол жеткізуге мүмкіндік береді.

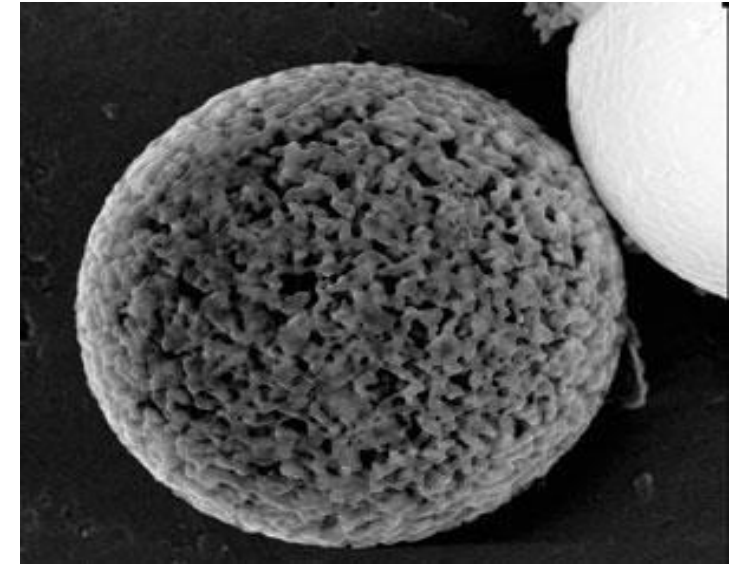
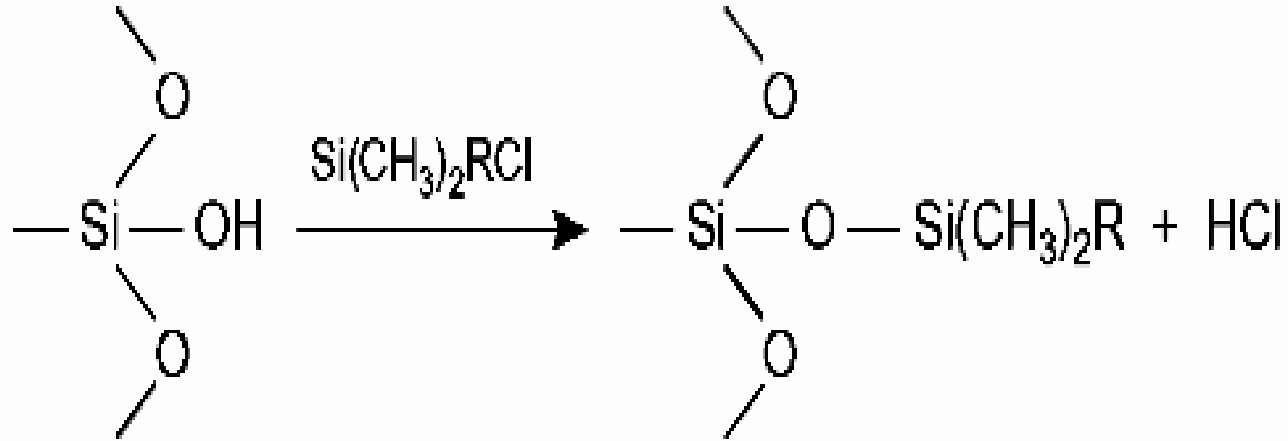
# Оңтайландыру мақсаты

- ❖ Максимальды түрде жылдам бөлу
- ❖ Максимальды түрде тиімді бөлу
- ❖ Максимальды сезімталдық
- ❖ Максимальды дәлдік
- ❖ Минимальды ерітінді шығыны

# БАҒАНДАР

- Аналитикалық ( $d < 5$  мм)
- Препаративті ( $d > 5$  мм)
- Қорғаныштық (бағандарды ластанудан қорғау үшін)

## Стационарлы фазалар



- ✓ Октадецил (C<sub>18</sub>)
- ✓ Октил (C<sub>8</sub>)
- ✓ Циано (CN-)
- ✓ Фенил (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)
- ✓ Амино (-NH<sub>2</sub>)

## Стационарлы (жылжымалы емес) фаза

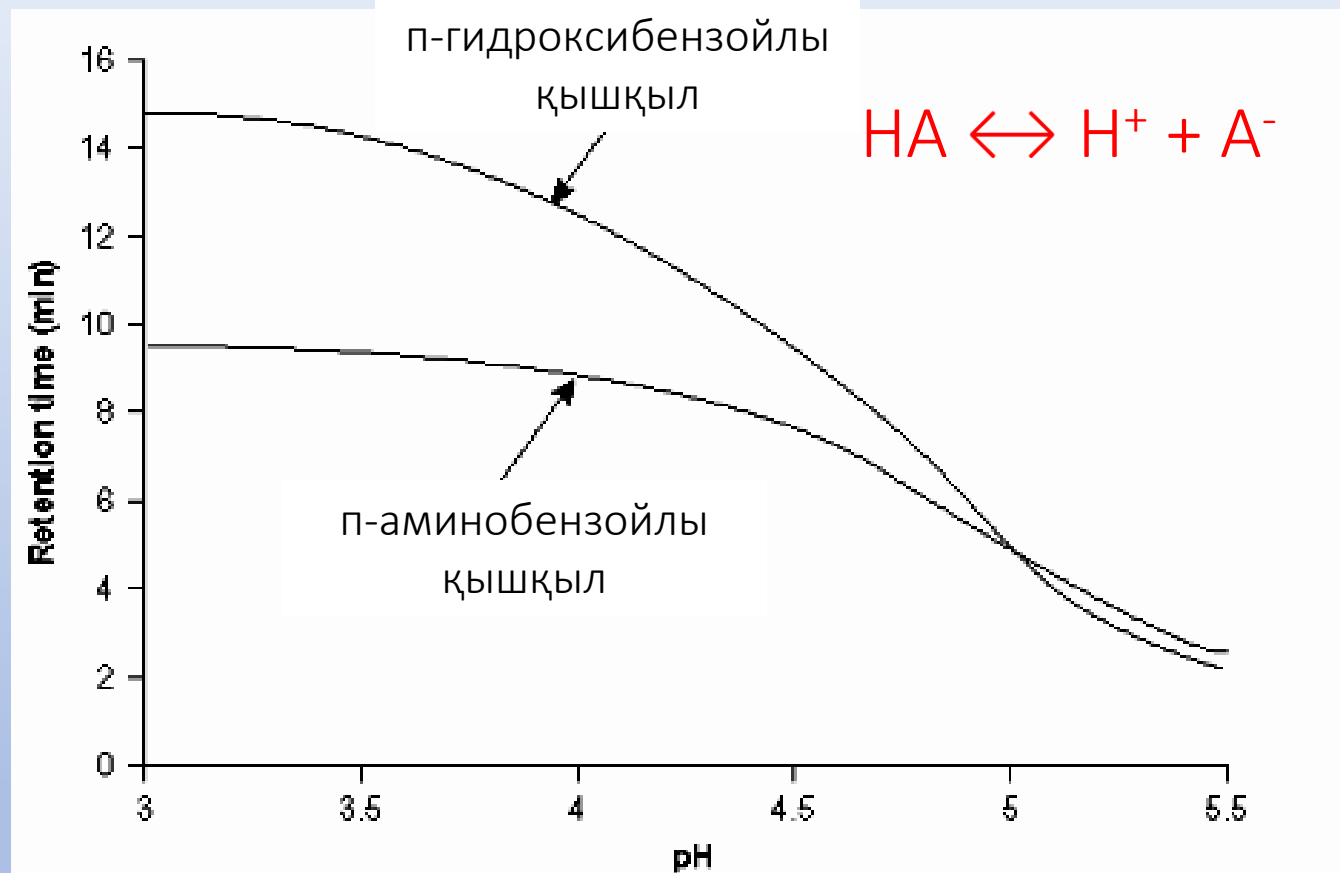
Таблица 1. Основные стационарные фазы, применяемые в обращённо-фазовой ВЭЖХ.

Обозначение	Описание	Структура
C1, TMS, SAS, триметил	Обладает высокой селективностью при разделении полярных соединений и соединений с большим количеством функциональных групп. Меньше всего удерживает соединения с алкильными группами в неполярных растворителях.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — CH}_3 \\   \end{array}$
C2, RP-2, диметил	Обладает большим удерживанием, чем C1, и меньшим, чем C4, C8 и C18.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — C}_2\text{H}_5 \\   \end{array}$
C3, Пропил	Применяется в хроматографии гидрофобного взаимодействия (НГ) пептидов и белков.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — C}_3\text{H}_7 \\   \end{array}$
C4, Бутил	Применяется для НГ и нон-парной хроматографии. В неполярных растворителях обладает меньшим удерживанием, чем фазы C8 и C18. Данный материал с диаметром пор 300Å идеален для анализа больших белков и гидрофобных пептидов.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — C}_4\text{H}_9 \\   \end{array}$
C5, Пентил	С диаметром пор 300Å используется для обращённо-фазового разделения гидрофобных белков и пептидов. Более устойчив к гидролизу, чем C4.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — C}_5\text{H}_{11} \\   \end{array}$
C6, Гексил	Применяется для нон-парной хроматографии. Обладает меньшим удерживанием, чем C8 и C18.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — C}_6\text{H}_{13} \\   \end{array}$
C8, MOS, RP-8, LC8, Октил	По селективности близок к C18, но обладает меньшим удерживанием. Широко используется в анализе лекарств, нуклеотидов, стероидов и т.д. С диаметром пор 300Å этот материал хорошо подходит для разделения пептидов и небольших гидрофильных белков.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — C}_8\text{H}_{17} \\   \end{array}$
C12, Додецил	Благодаря более короткой углеродной цепи, чем у C18, обеспечивает хорошее взаимодействие и более чёткую форму пиков для неполярных и умеренно полярных соединений.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — C}_{12}\text{H}_{25} \\   \end{array}$

<b>C18, ODS, RP-18, LC-18, Октадецил</b>	Классический обращённо-фазовый материал, обладающий наибольшим удерживанием в неполярных растворителях. Прекрасно работает в ион-парной хроматографии. Имеет широчайший спектр применений (разделение пептидов, нуклеозидов, нуклеотидов, стероидов, фармпрепаратов, витаминов, жирных кислот, пестицидов и пр.). С диаметром пор 300Å этот материал используют для разделения небольших гидрофобных пептидов.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — C}_{18}\text{H}_{37} \\   \end{array}$
<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, Phenyl</b>	Обладает уникальной селективностью, используется для разделения ароматических соединений. С диаметром пор 300Å этот материал используют для НИС.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \text{ } \langle \text{C}_6\text{H}_5 \rangle \\   \end{array}$
<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (линкер C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O), Фенил-эфир</b>	Используется для разделения высокополярных ароматических веществ. Отличается по селективности от фенил- и фенил-гексил- фаз.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O } \langle \text{C}_6\text{H}_5 \rangle \\   \end{array}$
<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (линкер C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>), Фенил-гексил</b>	Обладает селективностью как у фенил-фазы, но со значительно большей стабильностью.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \text{ } \langle \text{C}_6\text{H}_5 \rangle \\   \end{array}$
<b>C<sub>6</sub>F<sub>5</sub>, PFP</b>	Используется для анализа замещённых ароматических соединений. Отличается по селективности от фенил-гексил, классических фенил- и алкил-фаз.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 \text{ } \langle \text{C}_6\text{F}_5 \rangle \\   \end{array}$
<b>CN, CPS, PCN, циано, цианопропил, нитрил</b>	<p>Может применяться как обращённо-фазовый или как нормально-фазовый материал. Будучи слегка полярной, эта фаза обладает отличной селективностью при разделении полярных соединений. Кроме того, она быстро уравнивается, что является ценным свойством при работе</p> <p>в режиме градиентного элюирования. Используется для анализа различных фармпрепаратов (например, антидепрессантов и пр.)</p>	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN} \\   \end{array}$
<b>NH<sub>2</sub>, APS, амино, аминопропилсилил</b>	Может использоваться для обращённо-фазовой, нормально-фазовой и ионообменной хроматографии (слабый анионообменник). В обращённо-фазовой хроматографии используется для разделения углеводов.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \\   \end{array}$
<b>ОН, Диол, глицерол</b>	Может применяться как обращённо-фазовый или как нормально-фазовый материал. При работе в качестве обращённой фазы используется в гель-фильтрационной хроматографии (GFC) пептидов и белков.	$\begin{array}{c}   \\ \text{— Si — CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2 \\   \end{array}$

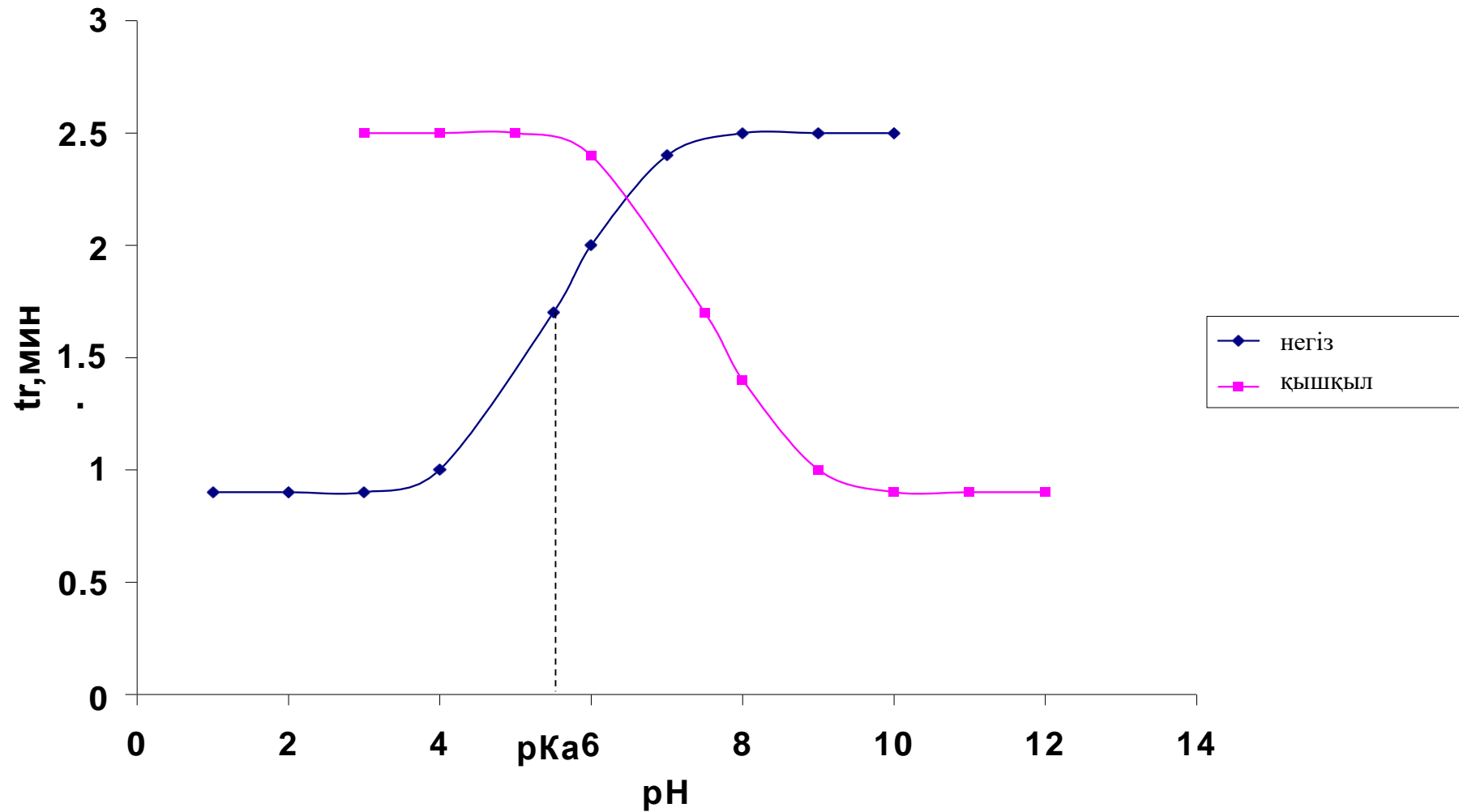


# Қышқылдардың ұсталуына рН-тың әсері



КФ СХ үшін негізгі ереже: аналиттердің молекулалық формалары иондық формаларға қарағанда қатты ұсталады

# Органикалық қышқылдар мен негіздердің ұсталудың рН-қа байланыстылығы



Қалыпты фазалық хроматографияда әдетте жылжымалы фазаның элюциялық Күшін реттейтін полярлы органикалық қосылыстардың шағын қоспалары бар полярлы емес Органикалық еріткіштер (*гексан, циклогексан, гептан және т.б.*) қолданылады.

Қалыпты фазалық хроматографияда қайталанатын нәтижелерге қол жеткізу үшін жылжымалы фазада қолданылатын еріткіштердегі судың құрамын қатаң бақылау қажет.

Кері фазалық хроматографияда құрамында органикалық еріткіштері бар немесе жоқ сулы жылжымалы фазалар қолданылады.

Органикалық қоспалар әдетте полярлы органикалық еріткіштер (*ацетонитрил және метанол*) ретінде қызмет етеді.

Бөлуді оңтайландыру үшін белгілі бір рН мәні бар сулы ерітінділерді, атап айтқанда буферлік ерітінділерді, сондай-ақ жылжымалы фазадағы әртүрлі қоспаларды қолдануға болады: қышқылдық сипаттағы қосылыстарды бөлу кезінде *фосфор және сірке қышқылдары*; негізгі сипаттағы қосылыстарды бөлу кезінде *аммиак және алифатты аминдер және басқа модификаторлар*.

# Еріткіштер

Еріткіштер	УФ үзілім, нм	20°C – дағы сыну көрсеткіші	Тұтқырлық, сР	Қайнау температурасы, °C	Полярлық индексі
п-пентан	190	1.3575	0.23	36.07	0.0
п-гексан	195	1.3749	0.31	68.7	0.1
циклогексан	200	1.4242	1.00	80.72	0.2
толуол	284	1.4969	0.59	110.62	2.4
МТБЭ	210	1.3689	0.27	55.2	2.5
метилен хлорид	233	1.4241	0.44	39.75	3.1
изопропанол	205	1.3772	2.40	82.26	3.9
<b>тетрагидрофуран</b>	212	1.4072	0.55	66.0	4.0
хлороформ	245	1.4458	0.57	61.15	4.1
этиацетат	256	1.3724	0.45	77.11	4.4
ацетон	330	1.3587	0.36	56.29	5.1
<b>метанол</b>	205	1.3284	0.55	64.7	5.1
<b>ацетонитрил</b>	190	1.3441	0.38	81.60	5.8
<b>вода</b>	190	1.3330	1.00	100.0	10.2

## Кері фазалы ВЭЖХ:

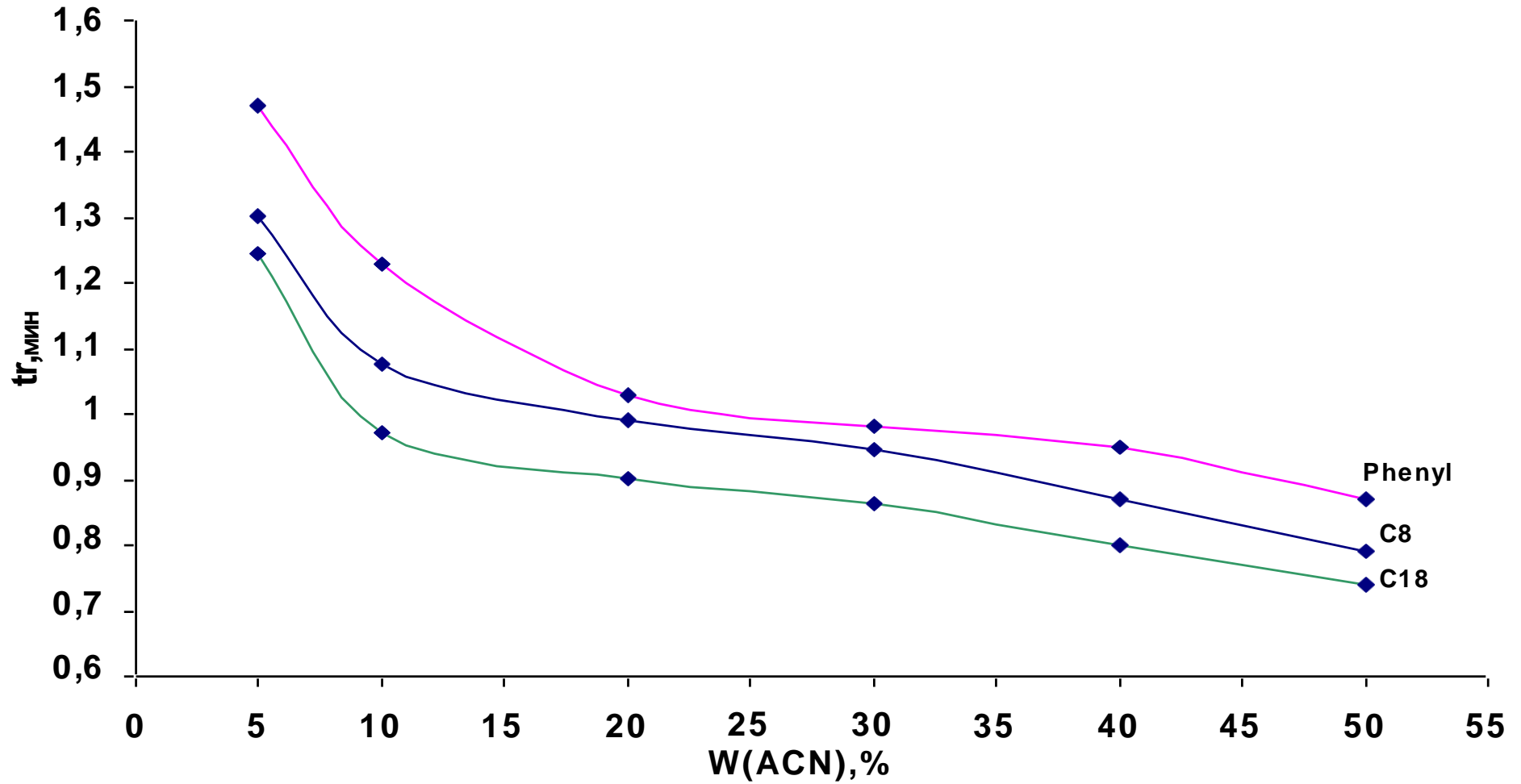
А) жылжымайтын фаза тым полярлы емес;

Б) жылжымалы фаза салыстырмалы түрде полярлы (судан тетрагидрофуранға дейін);

В) су сияқты полярлы ерітінді одан гөрі полярлығы төмен ацетонитрил сияқты еріткішке қарағанда баяу элюирленеді;

*Жалпы ереже:* полярлы емес қосылыстар полярлылар мен салыстырғанда кешірек элюирленеді.

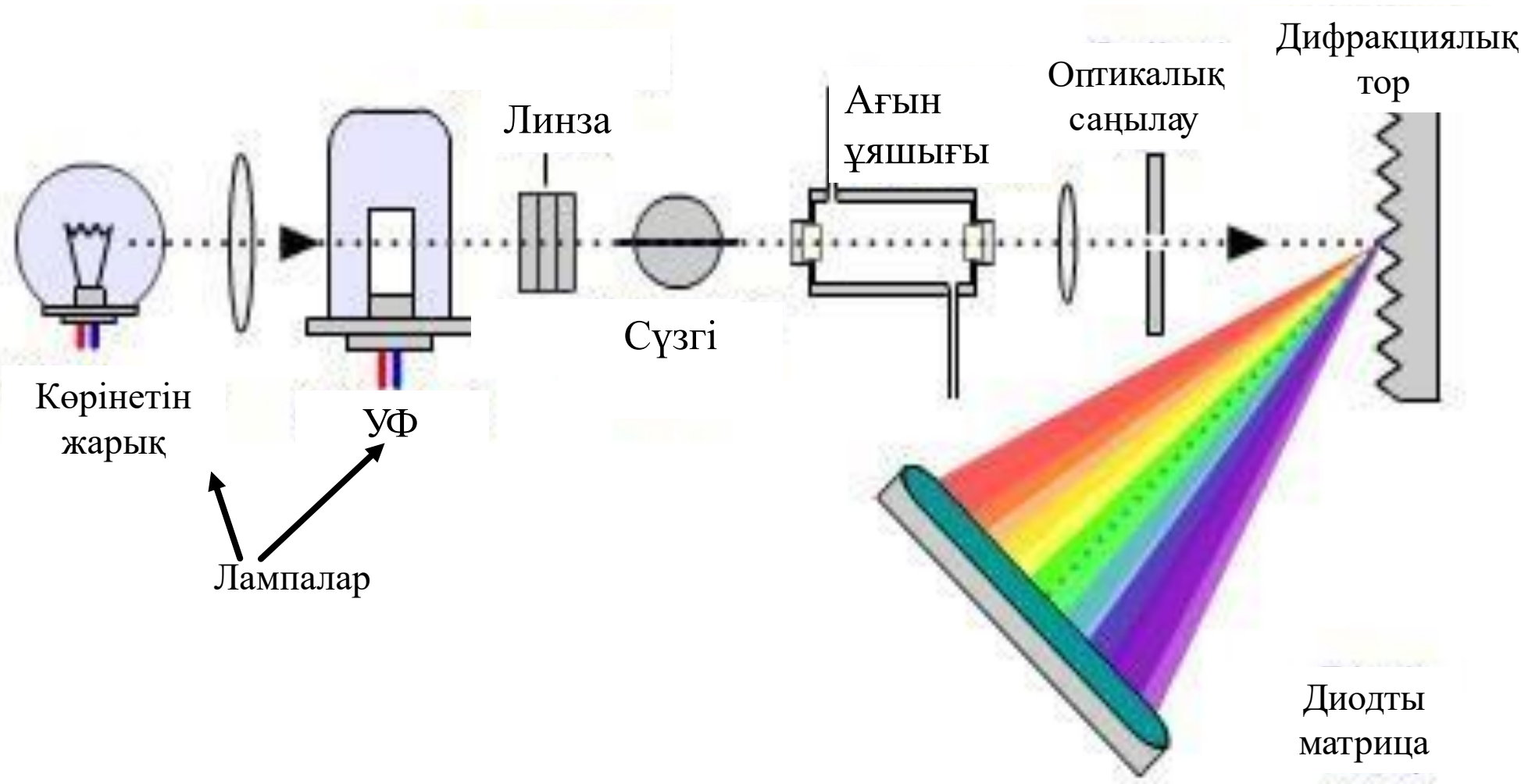
# Полярлы аналитті кері фазалық стационарлы фаза арқылы ұстау



# Негізгі детекторлар

- Спектрофотометриялық және диодты-матрицалы
- Флуоресценті (флуоресценция қанықтығы)
- Рефрактометриялық (сыну көрсеткіші)
- Кондуктометриялық (электр өткізгіштік)
- Амперометриялық (тотығу немесе тотықсыздану тогы)

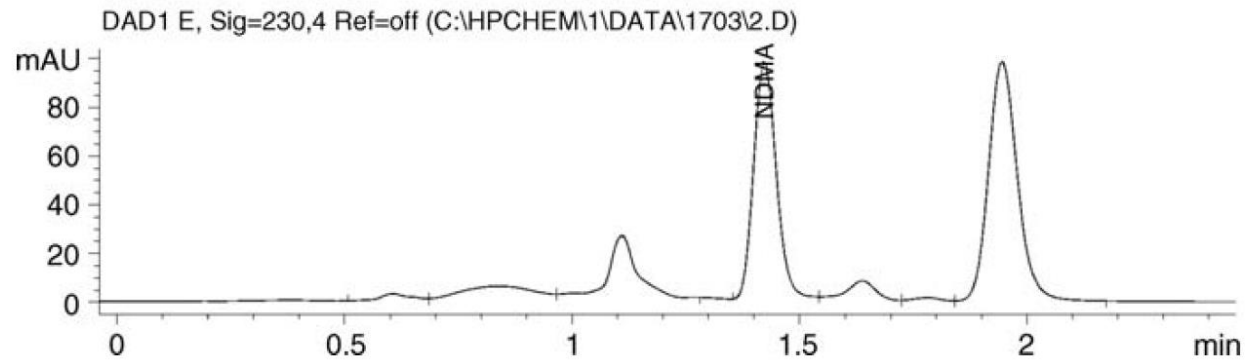
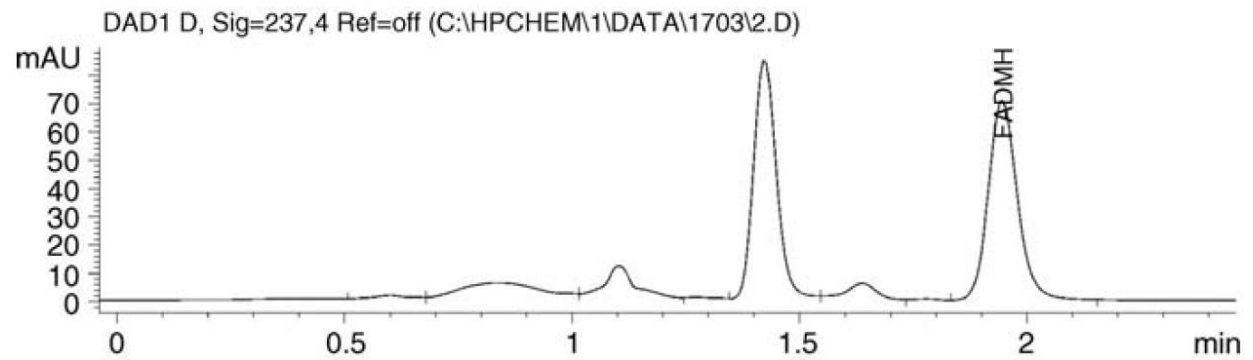
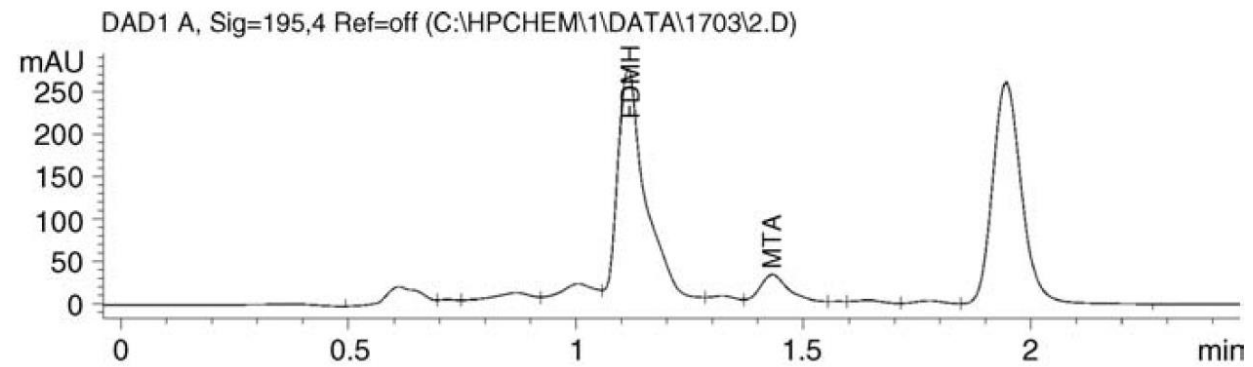
# Диодты-матрицалы детектор



Детектор хроматограмманың әр нүктесіндегі жұтылу спектрін және бірнеше толқын ұзындығындағы хроматограмманы жазады.



# Диодты-матрицалы детектордан алынған хроматограмма



## Тест 1/5

Судағы сульфат иондарын анықтау үшін қандай СХ түрі қолайлы?

1 – қалыпты фазалы

2 – кері фазалы

3 – ионды

4 – гельді-сүзгіш

## Тест 2/5

Органикалық негіздерді рН – тың қандай мәнінде бөлген дұрыс?

1- қатты қышқыл (<1)

2– әлсіз қышқыл (1-4)

3- бейтарап (4-10)

4- сілтілік (> 10)

## Тест 3/5

Қандай кері фазалық СХ параметрі орташа және жоғары гидрофобты анализтардың сақталу уақытына әсер етеді?

1 - жылжымалы фазаның полярлығы

2 - жылжымалы фазаның рН

3 - бағанның температурасы

4 - стационарлық фазаның құрамы

## Тест 4/5

СХ сақтау тиімділігін сақтай отырып, аналитикалық шыңның енін қалай азайтуға болады?

- 1 - ағынның жылдамдығын арттыру
- 2 - ацетонитрил концентрациясын жоғарылату
- 3 - температураны жоғарылату
- 4 - қозғалмайтын фазаның бөлшек мөлшерін азайту

## Тест 5/5

Аталған әдістердің қайсысы анализтерді бөлудің ең жоғары тиімділігін қамтамасыз етуге қабілетті?

1 - газды хроматография

2 - сұйық хроматография

3 - сыни хроматография

4 - қағаз хроматографиясы



**СҰРАҚТАР ???**

# Қорытынды (МӨЖ бойынша)

- ❖ Сұйық хроматографияның қандай түрлерін білесіз?
- ❖ Сұйық хроматография әдістерінің артықшылықтары қандай?
- ❖ СХ-да сапалық және сандық талдау қалай жүргізіледі?





**СҰРАҚТАР ???**