

**РОЗДІЛ: ТЕОРЕТИЧНІ ОСНОВИ
ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ**

ПІДРОЗДІЛ:

Інструментальні методи дослідження

ТЕМА:

**Хроматографічні методи
аналізу. Основні поняття
та принципи**



ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ

Хроматографія – це фізико-хімічний метод розділення речовин, заснований на розподілі компонентів між двома фазами – нерухомою і рухомою.

1. **Нерухомою (стационарною) фазою** звичайно служить тверда речовина (її часто називають сорбентом) або плівка рідини, нанесена на дисперсні частинки твердої речовини.
2. **Рухома фаза** являє собою рідину або газ, що проходить через нерухому фазу.



Компоненти аналізованої суміші разом з рухомою фазою пересуваються уздовж стаціонарної фази, яку звичайно поміщають у скляну трубку, що називається колонкою. У залежності від сили взаємодії з поверхнею сорбенту компоненти переміщаються уздовж колонки з різною швидкістю. Одні компоненти залишаються у верхньому шарі сорбенту, інші, з меншим ступенем взаємодії із сорбентом, виявляються в нижній частині колонки, деякі залишають колонку разом з рухомою фазою. У такий спосіб компоненти розділяються.



Хроматографія – це динамічний метод, що забезпечує багаторазовість актів сорбції-десорбції розділюваних компонентів, бо розділення відбувається в потоці рухомої фази. Цим обумовлена велика ефективність хроматографічного методу в порівнянні з методами сорбції й екстракції в статичних умовах, тому хроматографічними методами можливо розділення складних сумішей, які розділити іншими методами дуже важко, наприклад, суміші амінокислот або рідкісноземельних елементів.



КЛАСИФІКАЦІЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ МЕТОДІВ:

- ◊ агрегатний стан рухомої і нерухомої фаз,
- ◊ механізм взаємодії сорбент – сорбат,
- ◊ форма шару сорбенту (техніка виконання),
- ◊ мета хроматографування.

**ЗА АГРЕГАТНИМ СТАНОМ ФАЗ
ХРОМАТОГРАФІЮ РОЗДІЛЯЮТЬ
НА:**

1. ГАЗОВУ ХРОМАТОГРАФІЮ;
2. РІДИННУ ХРОМАТОГРАФІЮ.

1. ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ ВКЛЮЧАЄ:

- ГАЗО-РІДИННУ ХРОМАТОГРАФІЮ;
- ГАЗО-ТВЕРДОФАЗНУ
ХРОМАТОГРАФІЮ.

2. РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ ВКЛЮЧАЄ:

- РІДИННО-РІДИННУ
ХРОМАТОГРАФІЮ;
- РІДИННО-ТВЕРДОФАЗНУ
ХРОМАТОГРАФІЮ;
- РІДИННО-ГЕЛЕВУ ХРОМАТОГРАФІЮ.



**ЦИМИ ВИДАМИ НЕ ВИЧЕРПУЮТЬСЯ ВСІ МЕХАНІЗМИ РОЗДІЛЕННЯ,
НАПРИКЛАД ВІДОМА:**

- **осадова хроматографія**, заснована на утворенні осадів розділюваних речовин, що відрізняються по розчинності;
- **адсорбційно-комплексоутворювальна**, заснована на утворенні координаційних сполук різної стійкості у фазі або на поверхні сорбенту, тощо.

ЗА ТЕХНІКОЮ ВИКОНАННЯ ВИДІЛЯЮТЬ:

- **колоночну хроматографію**, коли розділення проводиться в спеціальних колонках;
- **площинну хроматографію**, коли розділення проводиться на спеціальному папері (паперова хроматографія) або в тонкому шарі сорбенту (тонкошарова хроматографія).



За метою хроматографування виділяють:

- аналітичну хроматографію (якісний і кількісний аналіз);
- препаративну хроматографію (для одержання речовин у чистому вигляді, для концентрування і виділення мікродомішок);
- промислову (виробничу) хроматографію (для одержання значних кількостей речовин у чистому вигляді).

Способи одержання хроматограм

Рухому фазу, що вводиться в шар нерухомої фази, називають елюентом, а рухому фазу, що виходить з колонки і містить розділені компоненти, називають елюатом. В елюаті тим або іншим способом визначають вміст компонентів. Розподіл розділюваних речовин у вигляді окремих смуг (зон) уздовж колонки являє собою внутрішню хроматограму.

Графічне зображення розподілу речовин в елюаті (часто одержане за допомогою самописця) називають зовнішньою хроматограмою, або просто хроматограмою.



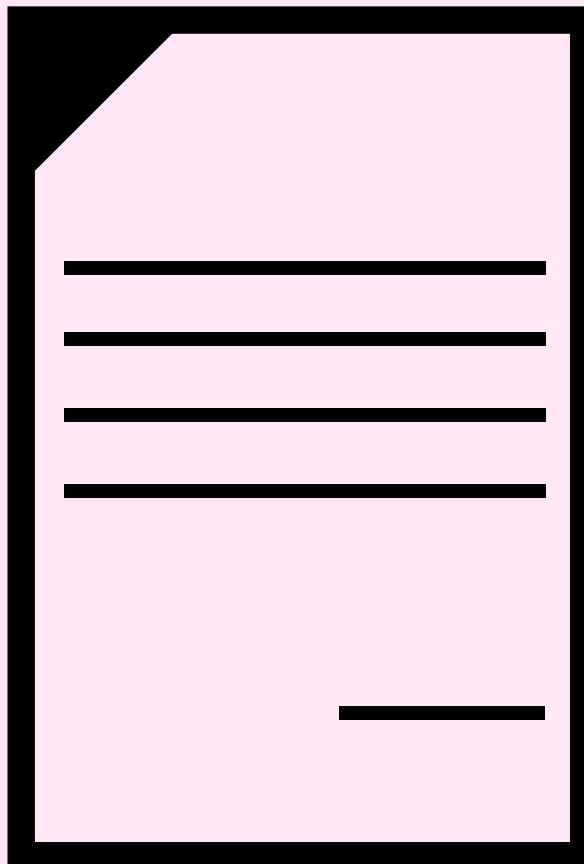
За способом одержання хроматограм розрізняють:

- **елюентну** - Елюентна (проявна) хроматографія полягає в тому, що колонку промивають елюентом, який менше сорбується, ніж речовини суміші. Потім у колонку вводять розчин суміші в елюенті й продовжують пропускати елюент. Компоненти рухаються з різними швидкостями залежно від їх здатності сорбуватись, тому на виході з колонки спочатку з'являється найменш сорбований, а потім більш сорбовані. На хроматограмі це відображається як піки гаусової форми. Найпростіший варіант елюювання – ізократичний (елуент незмінний), а в градієнтному елююванні склад елюенту поступово змінюють, що прискорює вихід сильно сорбованих речовин і покращує розділення.
- **витиснювальну** - У витиснювальній хроматографії в колонку вводять невелику кількість суміші, а потім пропускають речовину-вітиснювач, яка сильніше сорбується. Вона поступово витискує компоненти суміші: один витискає інший, і всі вони рухаються з однаковою швидкістю, як вітиснювач. У результаті речовини виходять послідовно одна за одною та виділяються у чистому вигляді, але не кількісно, бо їх зони не розділені чистим сорбентом.
- **фронтальну** хроматографії - У фронтальній хроматографії в колонку постійно вводять розчин суміші. Спочатку виходить чистий розчинник, потім речовина А (найменш сорбується), далі разом з'являються А і В, а згодом – А, В і С. Після повного насичення сорбенту елюат має такий самий склад, як вихідний розчин. У чистому вигляді можна виділити лише одну речовину, але метод дає уявлення про кількість компонентів у суміші.



РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ

Рідинна хроматографія (РХ, англ. Liquid Chromatography, LC) – це метод поділу та аналізу речовин, у якому рухомою фазою є рідина. Він широко застосовується у фармації, біохімії та аналітичній хімії, бо дозволяє аналізувати як органічні, так і неорганічні сполуки, у тому числі термолабільні.



ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ

Суть методу: суміш речовин розділяється в колонці завдяки різній швидкості руху компонентів під дією рідкого елюенту.

Фази:

- рухома фаза – розчинник або суміш розчинників (елюент);
- нерухома фаза – сорбент у колонці (силікагель, оксид алюмінію, полімери).

Речовини взаємодіють із сорбентом по-різному: одні затримуються сильніше, інші слабше → відбувається розділення.



види рідинної хроматографії

Адсорбційна – поділ за здатністю до адсорбції на поверхні сорбенту.

Розподільна – поділ за розчинністю у двох фазах (рухомій і нерухомій).

Іонообмінна – розділення за зарядом молекул на іонітах.

Гель-проникна (гель-хроматографія) – поділ за розміром молекул (молекулярна фільтрація).

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, HPLC) – сучасний варіант із високим тиском, що дає швидке і точне розділення.

ЗАСТОСУВАННЯ

1. Контроль якості лікарських препаратів.
2. Визначення домішок, продуктів розпаду, кількісне визначення діючих речовин.
3. Аналіз амінокислот, пептидів, вуглеводів, алкалоїдів тощо.
4. Дослідження біологічних рідин (сеча, плазма крові).

👉 В тестах КРОК часто зустрічається акцент:

- РХ застосовують для термолабільних речовин, які руйнуються при нагріванні (на відміну від газової хроматографії).
- ВЕРХ – найточніший метод кількісного аналізу ЛЗ.





МЕТОД ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ (ТШХ)

- метод поділу, запропонований у 1938 р. На пластиинку з тонким шаром сорбенту (силікагель, Al_2O_3 , целюлоза) наносять краплю суміші. Нижній край пластиинки занурюють у елюент, який за капілярними силами піднімається догори, несучи компоненти. Речовини по-різному взаємодіють із сорбентом → рухаються з різною швидкістю й утворюють окремі «плями».

Для уникнення випаровування процес проводять у закритій камері. Поділ можливий за різними механізмами: розподільним, адсорбційним, іонообмінним тощо. Після підйому елюенту пластиинку висушують, плями визначають візуально або за допомогою УФ-світла, парів йоду чи спеціальних реагентів.



Відносна швидкість руху і-го компонент або його рухливість (R_f) дорівнює:

$$R_f = \frac{l_x}{l_0}$$

Різниця коефіцієнтів розподілу різних компонентів приводить до неоднакової рухливості цих компонентів і, отже, до їхнього розділення. Після прояву буде спостерігатися стільки плям, скільки компонентів із різними коефіцієнтами розподілу спочатку було в пробі.

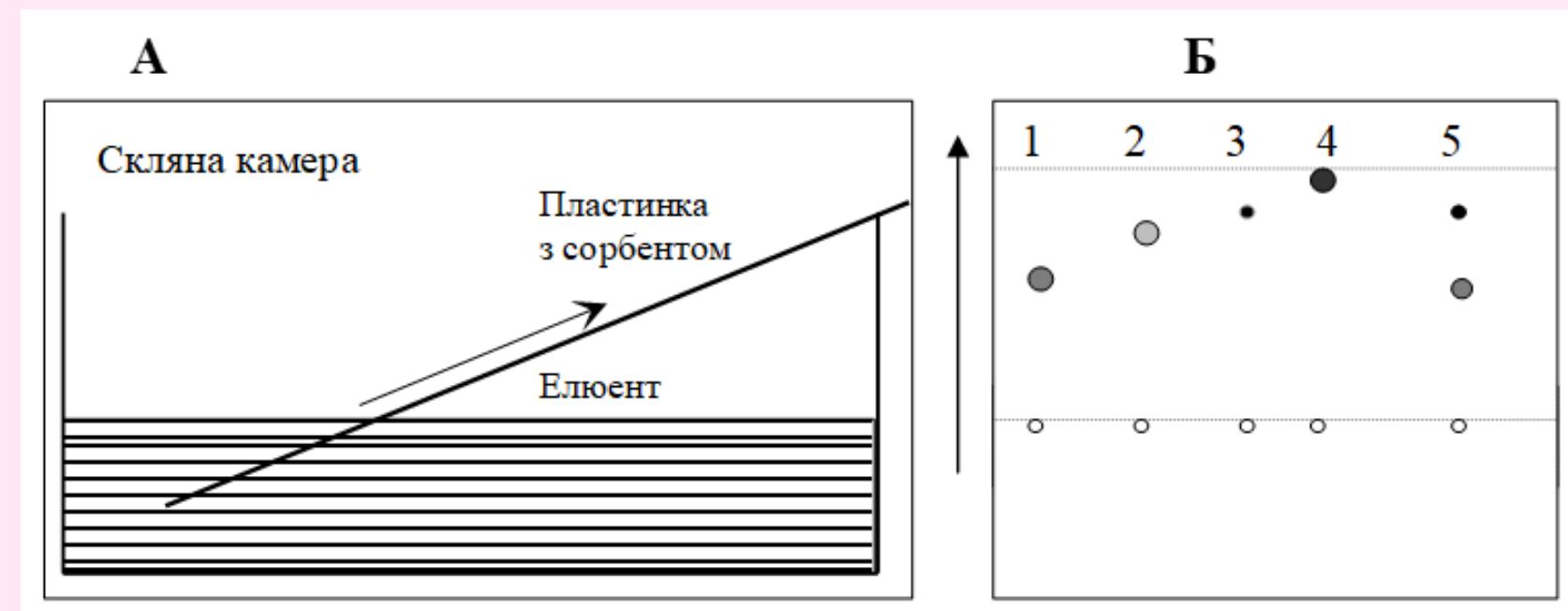
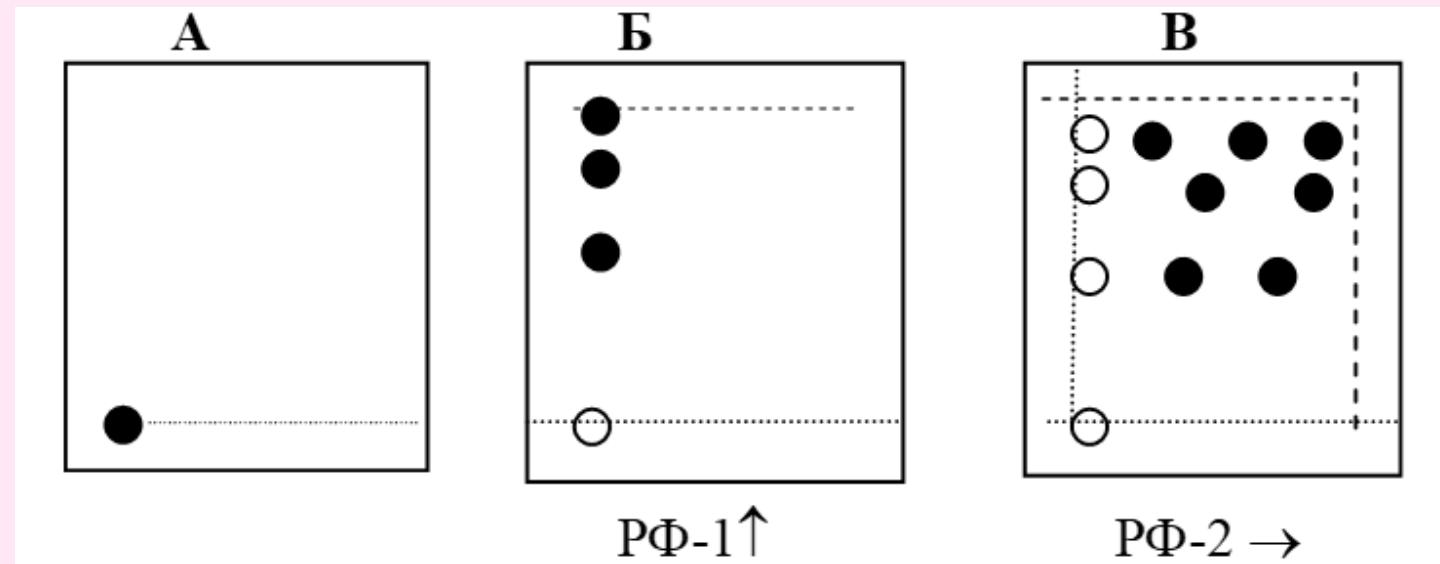


Схема виконання (А) і результат (Б) розділення суміші методом ТШХ. На стартову лінію були нанесені: передбачувані компоненти проби порізно (1–4) і сама проба (5), що містить компоненти 1 і 3. Стрілкою показаний напрямок руху елюенту



Вибір розчинника для методу ТШХ визначається природою сорбенту і властивостями передбачуваних компонентів проби. Часто застосовують суміші двох-трьох розчинників. Зокрема, при **ідентифікації індивідуальних амінокислот** у їхній суміші в якості РФ використовують **суміш оцтової кислоти, води і н-бутанолу**



Двовимірна хроматографія семикомпонентної суміші барвників за методом ТШХ:
А — введення проби,
Б — хроматограма після обробки першим елюентом,
В — хроматограма після обробки другим елюентом.
Зазначені стартові лінії та лінії підйому фронту розчинника

Якщо розділення або не відбулося або нема гарантії, що розділилися усі компоненти проби, треба використовувати інший елюент.

Зручно, зокрема, повернути уже проявлену пластинку на 90° і занурити її в новий розчинник. Цей варіант аналізу називають **двовимірною тонкошаровою хроматографією**



Принцип методу

1. На пластиинку з тонким шаром сорбенту (0,1–1 мм) наносять краплю досліджуваної суміші.
2. Нижній край пластиинки занурюють у розчинник (елюент).
3. Елюент піднімається догори завдяки капілярним силам, захоплюючи компоненти проби.
4. Речовини переміщуються з різною швидкістю залежно від їх сорбції та розчинності → відбувається розділення.

Сорбенти (нерухома фаза)

- Силікагель
- Оксид алюмінію
- Целюлоза

Іноді з добавкою гіпсу або крохмалю (для закріплення шару)

Рухома фаза (елюент)

Органічні розчинники або їх суміші

Вибір залежить від природи речовин, що аналізуються

Механізми розділення

- Розподільний (між тонким шаром води на частинках сорбенту і рухomoю фазою)
 - Адсорбційний
 - Іонообмінний
 - Молекулярно-ситовий
- Змішаний



ХІД АНАЛІЗУ

1. Нанесення проби на пластиинку.
2. Занурення пластиинки в елюент.
3. Рух розчинника вгору по шару сорбенту.
4. Розділення компонентів у вигляді плям.
5. Сушка пластиинки.

ВИЯВЛЕННЯ ПЛЯМ:

1. УФ-світло
2. Пари йоду
3. Хімічні реагенти

РЕЗУЛЬТАТ

Кожен компонент утворює окрему пляму.

Її положення характеризують коефіцієнтом Rf:

$$R_f = \frac{\text{відстань, пройдена речовиною}}{\text{відстань, пройдена фронтом розчинника}}$$

ПЕРЕВАГИ ТШХ

- Простота та дешевизна
- Швидкість аналізу
- можливість одночасно досліджувати кілька зразків
- Універсальність (органічні й неорганічні сполуки)

НЕДОЛІКИ

Менша точність порівняно з ВЕРХ
(високоефективна рідинна хроматографія)

Обмежена кількісна оцінка

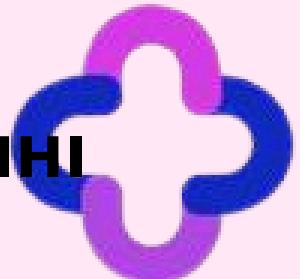


ПАПЕРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ

Замість пластиинок із нанесеним тонким шаром сорбенту можна використовувати смужки або листки спеціального паперу (типу фільтрувального). Інші операції в методі паперової хроматографії проводяться приблизно так само, як і в тонкошаровій. Для розділення на папері речовин, розчинних у воді (наприклад, неорганічних іонів), у якості РФ беруть органічний розчинник, а папір заздалегідь змочують водою. Для розділення компонентів, добре розчинних в органічних розчинниках, папір заздалегідь просочують придатним органічним розчинником, а як рухому фазу беруть воду, водний розчин якої-небудь кислоти або лугу. Ще краще використовувати буферний розчин із відомою величиною pH, тому що при розділенні речовин, здатних брати участь у процесах протолізу, величина pH водної фази сильно впливає на величину R_f .

Для цього варіанту хроматографії специфічними є **два** прийоми:

1. **Хроматографія з електрофорезом** – до вологого листка прикладають електричну напругу, що підсилює розділення, особливо іонів різного заряду. Електрофорез можна проводити одночасно або послідовно з хроматографією.
2. **Кругова хроматографія з випаровуванням розчинника** – краплю розчину наносять на горизонтальний листок, висушують, а елюент подають у центр плями; компоненти рухаються радіально і утворюють концентричні кільця, число яких відповідає числу компонентів суміші.



ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ

Метод хроматографії, при якому розділювані компоненти суміші перебувають у газоподібному стані і переносяться через колонку інертним газом (газ-носієм).

Основні елементи ГХ:

1. Рухлива фаза (газ-носій):

- Інертний газ, який не взаємодіє з аналізованими речовинами.
- Найчастіше використовують: гелій, азот, водень.

2. Нерухома фаза (сорбент):

- Може бути твердою або рідкою на носії.
- Компоненти суміші сорбуються на ній і розділяються за різною швидкістю руху.

3. Колонка:

Може бути капілярною (тонка трубка, велика роздільна здатність) або колонкою заповненою сорбентом.

Принцип роботи:

- Суміш газів або летких рідин вводять у колонку.
- Газ-носій рухає суміш крізь колонку.
- Компоненти взаємодіють з нерухомою фазою з різною інтенсивністю → рухаються з різними швидкостями.
- На виході колонки компоненти реєструються детектором, утворюючи хроматограму з піками.



Що запам'ятати:

- Рухлива фаза: інертний газ (гелій, азот, водень).
- Нерухома фаза: тверда/рідина на носії.

Компоненти рухаються з різною швидкістю → піки на хроматограмі.

- Детектори: TCD, FID, мас-спектрометр.
- КРОК 1 питання:

Газ-носії та нерухома фаза.

Принцип роботи (різна сорбція → розділення).

Типи детекторів і що вони фіксують.

Переваги ГХ:

- Висока чутливість і роздільна здатність.
- Швидкість аналізу.
- Можливість розділяти легкі компоненти у суміші.
- Використання у кількісному та якісному аналізі.



ТЕСТИ-КРОК

Провізор-аналітик проводить аналіз лікарського препарату. У Фармакопейній статті наведено значення величини Rf.

Величина Rf є:

Для розділення суміші речовин застосовують хроматографічний метод. **Хроматографія** - це метод аналізу, який базується на **перерозподілі речовини між**:

- абсолютною характеристикою речовини
- **показником рухливості речовини**
- показником швидкості руху розчинника у шарі сорбенту
- показником сорбційної здатності твердої фази

- **рухомою і нерухомою фазами**
- двома рідкими фазами, які не змішуються між собою
- рідкою і твердою фазами
- рідкою і газовою фазами



ТЕСТИ-КРОК

У хімічну лабораторію поступив препарат, який є **сумішшю глюкози і манози**. Для ідентифікації цих речовин в суміші можна використати метод:

- полярографії
- поляриметрії
- хроматографії в тонкому шарі сорбенту
- амперометричного титрування



ТЕСТИ-КРОК

Хроматографічне розділення може проводитися двома способами:
планарним (на пластинках) та
колонковим.

У колонкових (проточних) хроматографічних методах аналізу
кількість досліджуваної речовини
визначається за:

- об'ємом утримування
- часом утримування
- шириною хроматографічного піка
- площею хроматографічного піка



