

Занятие 28

Хроматография

Хроматография (от греч. chroma, chromatós - цвет, краска), физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами - неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную. Хроматографический анализ является критерием однородности вещества: если каким-либо хроматографическим способом анализируемое вещество не разделилось, то его считают однородным (без примесей).

Принципиальным отличием хроматографических методов от других физико-химических методов анализа является возможность разделения близких по свойствам веществ. После разделения компоненты анализируемой смеси можно идентифицировать (установить природу) и количественно определять (массу, концентрацию) любыми химическими, физическими и физико-химическими методами.

История метода:

Хроматографический метод анализа был впервые применён русским учёным-ботаником Михаилом Семеновичем Цветом в 1900 году. Он использовал колонку, заполненную карбонатом кальция для разделения пигментов растительного происхождения.

Хроматография широко применяется в лабораториях и в промышленности для качественного и количественного анализа многокомпонентных систем, контроля производства, особенно в связи с автоматизацией многих процессов, а также для препаративного (в т. ч. промышленного) выделения индивидуальных веществ (например, благородных металлов), разделения редких и рассеянных элементов.

В некоторых случаях для идентификации веществ используется хроматография в сочетании с другими физико-химическими и физическими

методами, например с масс-спектрометрией, ИК-, УФ-спектроскопией и др. Для расшифровки хроматограмм и выбора условий опыта применяют ЭВМ.

Основные достоинства хроматографического анализа:

- экспрессность; высокая эффективность; возможность автоматизации и получение объективной информации;
- сочетание с другими физико-химическими методами;
- широкий интервал концентраций соединений;
- возможность изучения физико-химических свойств соединений;
- осуществление проведения качественного и количественного анализа;
- применение для контроля и автоматического регулирования технологических процессов.

В зависимости от природы взаимодействия, обуславливающего распределение компонентов между элюентом и неподвижной фазой, различают следующие основные виды хроматографии - *адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную (молекулярно-ситовую) и осадочную.*

Адсорбционная хроматография основана на различии сорбируемости разделяемых веществ адсорбентом (твёрдое тело с развитой поверхностью);

- **распределительная хроматография** - на разной растворимости компонентов смеси в неподвижной фазе (высококипящая жидкость, нанесённая на твёрдый макропористый носитель) и элюенте;

- **ионообменная хроматография** - на различии констант ионообменного равновесия между неподвижной фазой (ионитом) и компонентами разделяемой смеси;

- **эксклюзионная (молекулярно-ситовая) хроматография** - на разной проницаемости молекул компонентов в неподвижную фазу (высокопористый неионогенный гель).

- **Осадочная хроматография** основана на различной способности разделяемых компонентов выпадать в осадок на твёрдой неподвижной фазе.

В соответствии с агрегатным состоянием элюента различают:

- газовую хроматографию ГХ (GC)
- жидкостную хроматографию ВЭЖХ (HPLC).

Газовая хроматография применяется для газов разделения, определения примесей вредных веществ в воздухе, воде, почве, промышленных продуктах; определения состава продуктов основного органического и нефтехимического синтеза, выхлопных газов, лекарственных препаратов, а также в криминалистике и т.д.

Жидкостная хроматография используется для анализа, разделения и очистки синтетических полимеров, лекарственных препаратов, детергентов, белков, гормонов и др. биологически важных соединений. Использование высокочувствительных детекторов позволяет работать с очень малыми количествами веществ (10^{-11} - 10^{-9} г), что исключительно важно в биологических исследованиях.

В зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы газовая хроматография ГХ (GC) бывает газо-адсорбционной (неподвижная фаза - твёрдый адсорбент) и газожидкостной (неподвижная фаза - жидкость), а жидкостная хроматография - жидкостно-адсорбционной (или твёрдо-жидкостной) и жидкостно-жидкостной.

Различают **колоночную** и **плоскостную хроматографию**. В колоночной сорбентом заполняют специальные трубки - колонки, а подвижная фаза движется внутри колонки благодаря перепаду давления. Разновидность колоночной хроматографии - капиллярная, когда тонкий слой сорбента наносится на внутренние стенки капиллярной трубки.

Плоскостная хроматография подразделяется на тонкослойную и бумажную.

- **в тонкослойной хроматографии** тонкий слой гранулированного сорбента или пористая плёнка наносится на стеклянную или металлическую пластинки;

- **в случае бумажной хроматографии** используют специальную хроматографическую бумагу. Тонкослойная (ТСХ) и бумажная

хроматография используются для анализа жиров, углеводов, белков и др. природных веществ и неорганических соединений.

Ряд видов хроматографии осуществляется с помощью приборов, называемых **хроматографами**, в большинстве из которых реализуется проявительный вариант хроматографии. Хроматографы используют для анализа и для препаративного (в т. ч. промышленного) разделения смесей веществ. При анализе разделённые в хроматографической колонке вещества вместе с элюентом попадают в установленное на выходе из колонки специальное устройство – детектор, регистрирующее их концентрации во времени.

Полученную в результате этого выходную кривую называют **хроматограммой**.

Для качественного **хроматографического анализа** определяют время от момента ввода пробы до выхода каждого компонента из колонки при данной температуре и при использовании определённого элюента.

Для количественного анализа определяют высоты или площади **хроматографических пиков** с учётом коэффициентов чувствительности используемого детектирующего устройства к анализируемым веществам.

Принципы и классификация

Хроматографический метод основан на распределении вещества между двумя несмешивающимися фазами, одна из фаз подвижна — ПФ, а другая неподвижна — НФ. Метод можно представить как процесс многократного повторения фактов сорбции и десорбции вещества при движении его в потоке ПФ вдоль неподвижного сорбента — НФ, это наблюдается при прохождении потока газов, паров, жидкостей через колонку, содержащую зернённый слой сорбента.

Подвижной фазой является смесь, она может быть жидким раствором или газовой смесью, неподвижной фазой является сорбент твёрдый с большой поверхностью, сорбент может быть жидким, нанесённый тонкой плёнкой на поверхность твёрдого носителя.

Хроматографические методы анализа получили широкое распространение благодаря своей универсальности, экспрессивности и высокой чувствительности. Применяется широко в различных областях промышленности, науки и техники, в экологии, медицине, биологии, криминалистике и т.д.

Классификация хроматографических методов анализа

I. По агрегативному состоянию подвижной фазы:

А) Газовая хроматография — подвижная жидкость — газ.

Б) Жидкостная хроматография — подвижная фаза — жидкость.

II. По механизму разделения смеси:

а) Адсорбционная хроматография основана на различной адсорбционной способности веществ на данной адсорбенте.

б) Ионно-обменная хроматография основана на способности веществ обмениваться ионами друг с другом.

в) Осадочная хроматография основана на различной растворимости осадков.

г) Распределительная хроматография основана на различном распределении веществ (с разными коэффициентами распределения).

Определение аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге

Хроматографические методы применяют для сорбционно-динамического разделения смесей аминокислот, белков, углеводов, липидов и их метаболитов. Существует множество видов хроматографии, каждый из которых имеет свои биохимические основы.

Достаточно точным и доступным является метод распределительной хроматографии (модификация адсорбционной хроматографии). В данной работе в качестве адсорбента используется специальная фильтровальная бумага.

Принцип

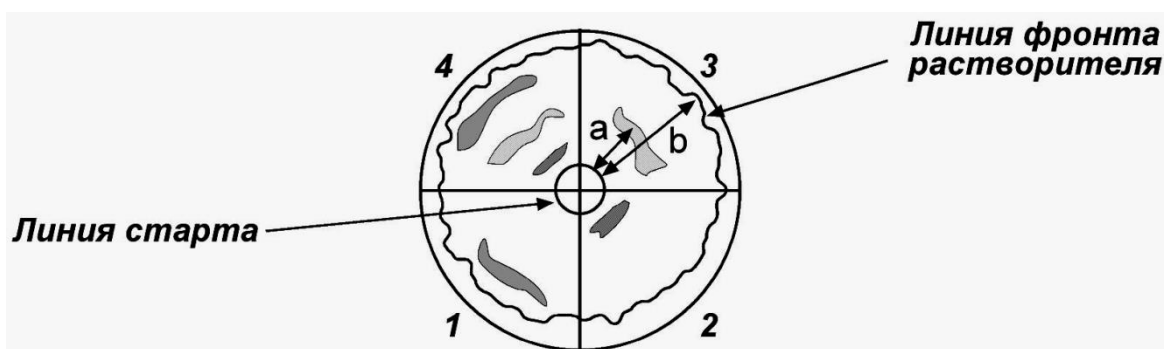
В основе распределительной хроматографии лежит различная растворимость аминокислот в полярных и неполярных растворителях. При

использовании двух жидкостей, одна из которых полярна, а другая неполярна, гидрофобные аминокислоты будут переходить в неполярную жидкость, гидрофильные аминокислоты – в полярную. Если какая-либо из этих жидкостей движется, то вместе с ней будут передвигаться соответствующие аминокислоты.

При хроматографии на бумаге вода (полярная жидкость) находится между целлюлозными волокнами и является неподвижной полярной фазой. В качестве подвижной неполярной фазы используется органический растворитель бутанол.

При проведении анализа более гидрофобная аминокислота, лучше растворяющаяся в подвижном неполярном растворителе, движется с большей скоростью от линии старта, чем гидрофильная аминокислота, которая переходит в неподвижный водный слой. В результате этого отдельные аминокислоты по окончании хроматографического разделения оказываются на разном расстоянии от линии старта.

Радиальную хроматографию проводят на бумаге в чашке Петри. Растворитель перемещается от центра к периферии и захватывает аминокислоты, которые распределяются концентрическими кругами и обнаруживаются после высушивания бумаги и проведения нингидриновой реакции.



Рассчитывают коэффициент распределения R_f для каждой аминокислоты:

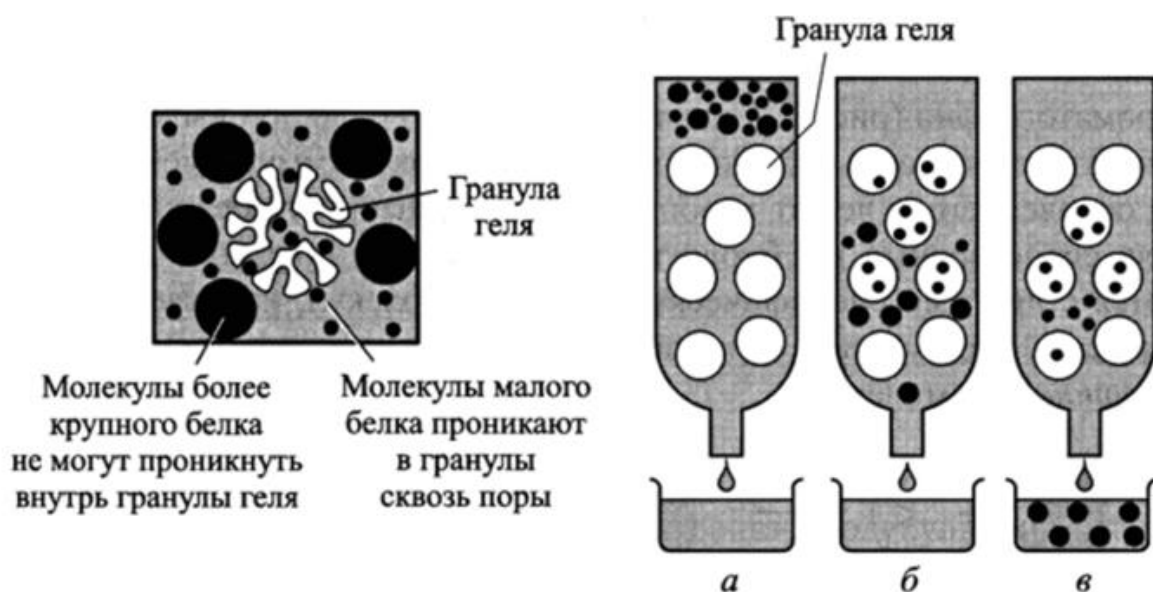
$$R_f = \frac{a}{b}, \text{ где}$$

a – расстояние, пройденное от линии старта аминокислотой (мм), b – расстояние, пройденное фронтом растворителя (мм).

Идентифицируют аминокислоты, находящиеся в исследуемом растворе (сектор 4), путем сравнения их положения (коэффициент R_f) с положением соответствующих аминокислот, используемых в качестве "свидетелей" (сектора 1, 2, 3).

Гель-проникающая хроматография (гель-фильтрация).

Гель-проникающая хроматография (ее иногда называют молекулярно-ситовой хроматографией) является методом распределительной хроматографии, так как основана на разделении молекул за счет различия их размеров. Этот метод позволяет разделить белки как по форме, так и по величине. Разделение проводят на хроматографических колонках, заполненных сферическими гранулами набухшего геля полимера (размеры гранул геля могут



a - на колонку, заполненную декстриновыми гранулами, наносится смесь больших и маленьких белков; $б$ - по мере прохождения вниз по колонке

молекулы малого белка проникают в гранулы и задерживаются; *в* - молекулы более крупного белка первыми выходят из колонки (изменяются от 10 до 500 мкм). Гранулы геля имеют внутренние каналы (поры), характеризующиеся определенным средним размером, от которого зависит их проницаемость. Смесь белков при пропускании ее через колонку в зависимости от размеров отдельных белковых молекул пространственно разделяется. Крупные белковые молекулы, не способные проникать в гранулы геля, перемещаются по колонке с высокой скоростью. Средние и мелкие белковые молекулы удерживаются в порах геля в зависимости от размера. В верхней части колонки удерживаются самые мелкие молекулы из-за их высокой способности проникать внутрь частиц геля. При элюировании буферным раствором первыми выходят наиболее крупные молекулы белков. Элюат собирают отдельными фракциями. Чем выше объем элюата, затраченного на выход из колонки определенной фракции белка, тем ниже молекулярная масса белка в данной фракции.