

Хроматографический анализ

Хроматография

- (от греч. **chroma**, родительный падеж **chromatos** — цвет, краска) - физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении компонентов смеси между двумя фазами — неподвижной и подвижной (элюент), протекающей через неподвижную фазу.
- **НФ** обычно твердое вещество (сорбент) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество
- **ПФ** представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу

Метод впервые был применен для разделения окрашенных растительных пигментов – хлорфиллинов русским ученым М.С. Цветом

В 1902-1903 годах после серии предварительных экспериментов М.С. Цвет достиг разделения сложной смеси растительных пигментов при пропускании вытяжки из листьев растений через стеклянную колонку, заполненную порошком карбоната кальция.



Сущность метода

Разделяемые вещества перемещаются через слой неподвижного сорбента (неподвижной фазы) вместе с подвижной фазой (жидкой или газообразной) с разной скоростью благодаря их различной сорбционной способности.

В процессе хроматографирования много раз повторяются процессы сорбции и десорбции компонентов в новых слоях сорбента, что обеспечивает высокую эффективность разделения.

Хроматография

– это динамический сорбционный способ разделения смесей, основанный на распределении вещества между двумя фазами, одна из которых подвижна, а другая – неподвижна, и связанный с многократным повторением сорбционных и десорбционных актов.

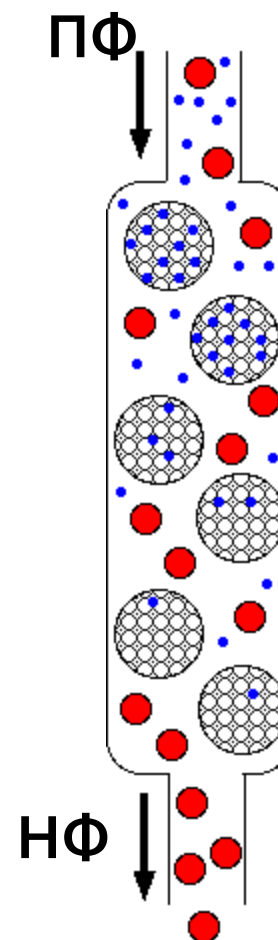
- 
- НФ чаще всего помещают в **колонку** (стеклянную или металлическую трубку), и компоненты анализируемой смеси вместе с ПФ перемещаются вдоль колонки
 - В процессе хроматографирования устанавливается динамическое равновесие между ПФ и НФ
 - Компоненты часть времени находятся в НФ, часть – в ПФ

Сорбент – неподвижная фаза (твердый сорбент или жидкость на поверхности твердого носителя), в которой поглощаются разделяемые вещества

Сорбат – поглощаемые неподвижной фазой вещества

Элюент – подвижная фаза (жидкость или газ)

Элюат – поток жидкости или газа, прошедшего слой неподвижной фазы



- 
- Молекулы разных компонентов разделяемой смеси обладают различной **адсорбируемостью** или **растворимостью**, так что средняя скорость передвижения их по колонке различна
 - Одни компоненты остаются в верхнем слое сорбента, другие, с меньшей адсорбируемостью, оказываются в нижней части колонки, некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой
 - Так достигается разделение компонентов

Классификация методов хроматографии

По агрегатному
состоянию фаз

Газовая
хроматография

Жидкостная
хроматография

По механизму
взаимодействия
сорбент-сорбат

Адсорбционная
хроматография

Распределительная
хроматография

Осадочная
хроматография

Ионообменная
хроматография

Эксклюзионная
хроматография

Аффинная
хроматография

По способу
перемещения фаз

Проявительная
хроматография

Фронтальная
хроматография

Вытеснительная
хроматография

По цели
применения

Аналитическая
хроматография
(качественный и
количественный
анализ)

Препаративная
хроматография

Промышленная
хроматография

Жидкостная хроматография -

это вид хроматографии, в котором **подвижной фазой**, называемой **элюентом**, является **жидкость**.

Неподвижной фазой может быть **твердый сорбент**, **твердый носитель** с **нанесенной на его поверхность жидкостью** или **гель**.

Основные понятия и классификация методов жидкостной хроматографии

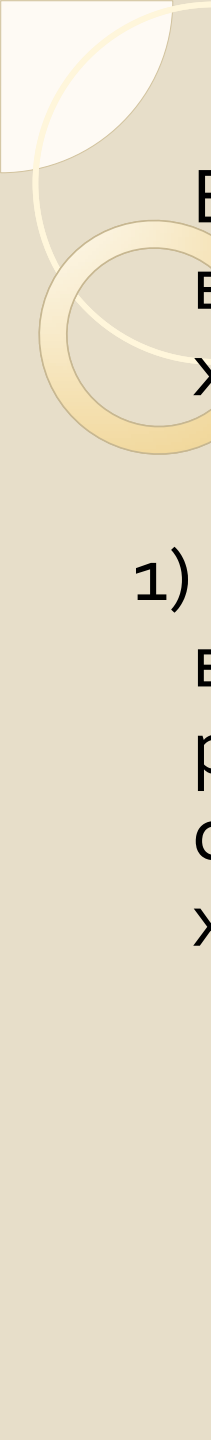


По механизму удерживания разделяемых веществ неподвижной фазой ЖХ различают:

- **Осадочная хроматография**, основанную на различной растворимости осадков, которые образуются при взаимодействии компонентов анализируемой смеси с осадителем. Преимуществом метода является то, что получающиеся вдоль сорбента зоны имеют резкие границы, содержат осадки только одного вещества и часто разделены зонами чистого сорбента. Однако этот метод пока не нашел широкого распространения.
- **Адсорбционная хроматография**, в которой разделение осуществляется в результате взаимодействия разделяемого вещества с **адсорбентом**, таким как, оксид алюминия или силикагель, **имеющим на поверхности активные полярные центры**. Растворитель (элюент) - **неполярная жидкость**.

- **Распределительная хроматография**, в которой разделение основано на распределении веществ между двумя жидкими фазами: неподвижной, нанесенной на поверхность носителя, и подвижной - элюентом.
- **Ионообменная хроматография**, которая основана на обратимом стехиометрическом обмене ионов, содержащихся в анализируемом растворе, на подвижные ионы, входящие в состав **ионитов**. В зависимости от знака заряда ионизирующих групп иониты подразделяют на **катиониты** и **аниониты**.
- **Ион-парная хроматография**, которую можно рассматривать как комбинацию адсорбционной и ионообменной хроматографии. В основу метода положена экстракция ионных веществ – перенос их из водной фазы в органическую фазу в виде ионных пар.

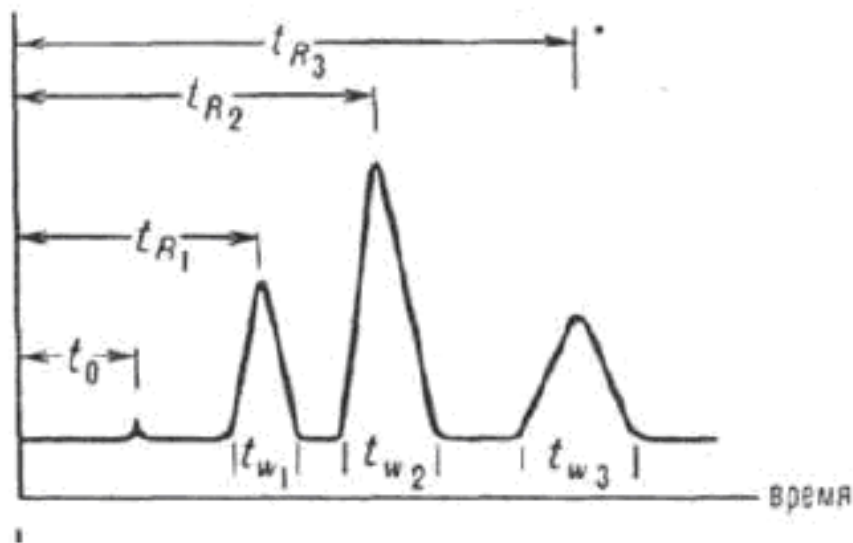
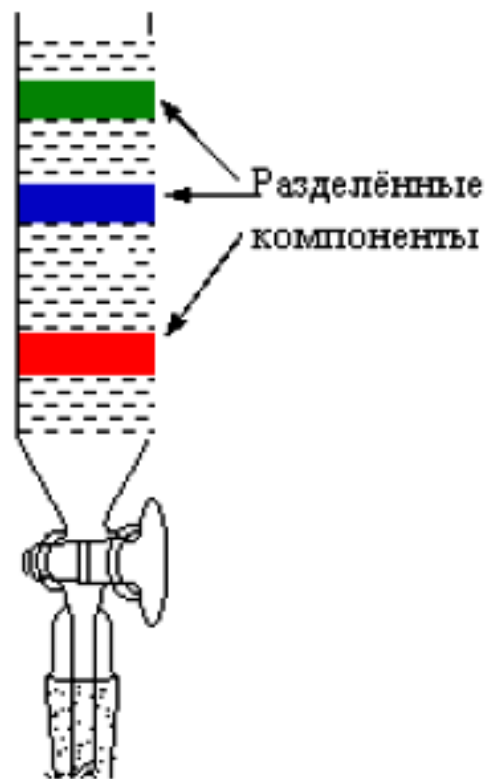
- **Аффинная хроматография** (биоспеци-фическую), основанную на том, что многие биологически активные макромолекулы, например, ферменты могут специфически связываться с определённым реагентом.
- **Лигандообменная хроматография**, основанную на различной способности разделяемых соединений образовывать комплексы с катионами переходных металлов – Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} и др. - и фиксирующими группами (лигандами) неподвижной фазы. Часть координационной сферы ионов металла занята молекулами воды или другими слабыми лигандами, которые могут вытесняться молекулами разделяемых соединений. Такой вид хроматографии используют для разделения оптических изомеров.
- **Эксклюзионная хроматография** (ситовую, гель-проникающую, гель-фильтрационную), в которой разделение основано на различиях в размерах молекул.



В зависимости от способа перемещения вещества различают следующие виды жидкостной хроматографии:

- 1) проявительная - хроматография, при которой в колонку в потоке элюента вводят порцию разделяемой смеси. Выход компонентов смеси из колонки регистрируется на хроматограмме в виде пиков.

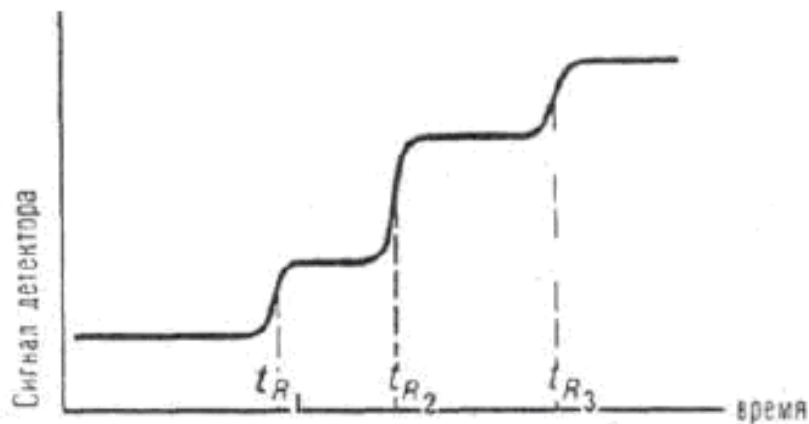
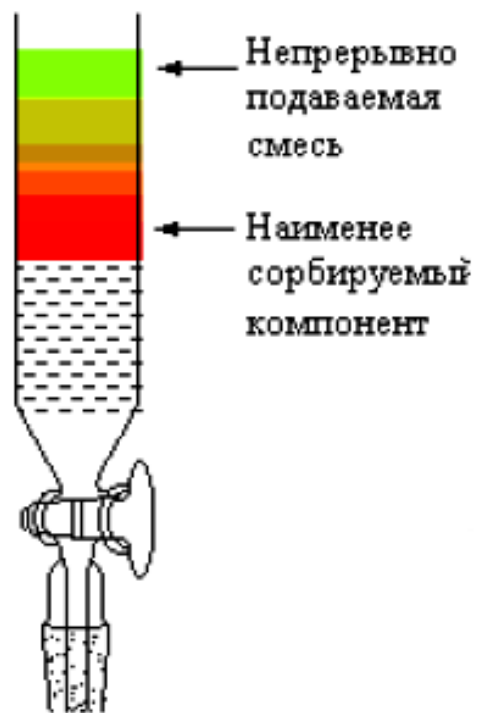
Схема проявительного варианта хроматографии





2) Фронтальная - хроматография , при которой через колонку непрерывно пропускают смесь разделяемых веществ, которая играет роль подвижной фазы. В итоге можно получить в чистом виде только вещество, которое менее всего сорбируется в колонке.

Схема фронтального варианта хроматографии



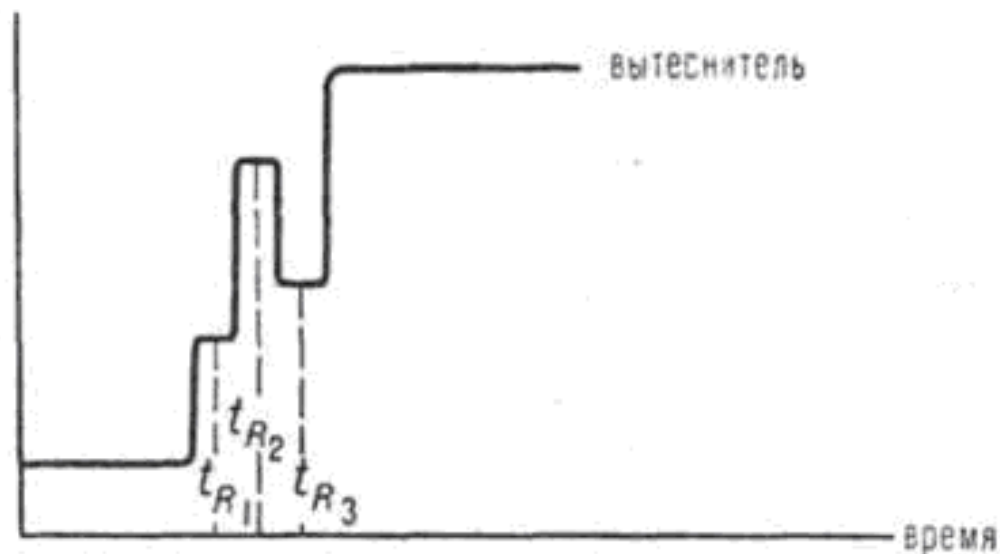
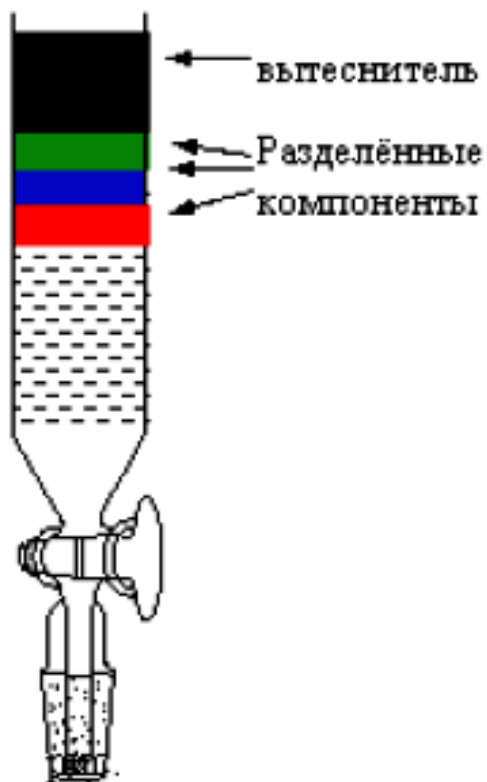


3) вытеснительная – хроматография, при которой компоненты смеси, введенной в колонку, вытесняются элюентом, который адсорбируется сильнее любого компонента.

В итоге получают примыкающие друг к другу фракции разделяемых веществ.

Порядок выхода компонентов определяется силой взаимодействия их с поверхностью сорбента

Схема вытеснительного варианта хроматографии



Адсорбенты жидкостной хроматографии

Хроматографическое разделение смеси будет эффективным, если правильно подобраны адсорбент и растворитель (элюент).

Требования к адсорбентам:

- не должен химически взаимодействовать с разделяемыми компонентами
- не должен проявлять каталитическое воздействие на растворитель
- должен обладать избирательностью по отношению к компонентам смеси

В качестве адсорбентов применяют оксид алюминия, активированные угли, силикагель, цеолиты, целлюлозу и некоторые минералы.

Оксид алюминия Al_2O_3 – амфотерный адсорбент - используют обычно для хроматографирования из неводных растворов предельных углеводородов, альдегидов, спиртов, фенолов, кетонов и эфиров. На нем можно разделять смеси веществ в полярных, так и в неполярных растворителях.





• **Силикагель** – (гидроксिलированный или химически модифицированный) – это высушенный желатинообразный диоксид кремния, который получают из пересыщенных растворов кремниевых кислот ($n\text{SiO}_2 \cdot m\text{H}_2\text{O}$) при $\text{pH} > 5-6$, твердый гидрофильный сорбент.



- **Активированные угли** - являются формой углерода, который в процессе обработки становится чрезвычайно пористым и приобретает очень большую площадь поверхности, предназначенную для адсорбции или химических реакций.



Элюенты жидкостной хроматографии

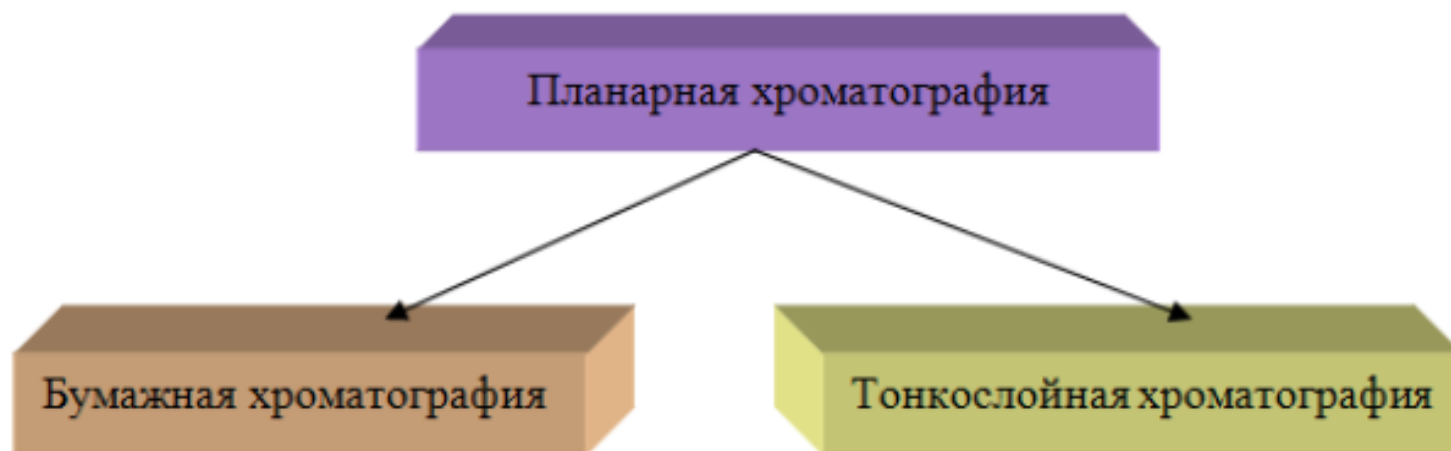
При выборе растворителя (элюента) нужно учитывать природу адсорбента и свойства веществ в разделяемой смеси.

Элюенты должны хорошо растворять все компоненты хроматографируемой смеси, обладать низкой вязкостью, обеспечивать необходимый уровень селективности, быть дешевыми, нетоксичными и инертными.

Обычно используют углеводороды (гексан, гептан, изооктан, циклогексан) с добавлением небольших количеств хлороформа CHCl_3 , изо-пропанола $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$, диизопропилового эфира

Планарная хроматография

- Метод анализа, в котором процессы разделения смеси веществ осуществляются в плоском слое сорбента.



Бумажная хроматография

Метод был открыт в 1944г Констоном Гордоном Мартином и Синджем, которые использовали его для анализа смесей аминокислот.

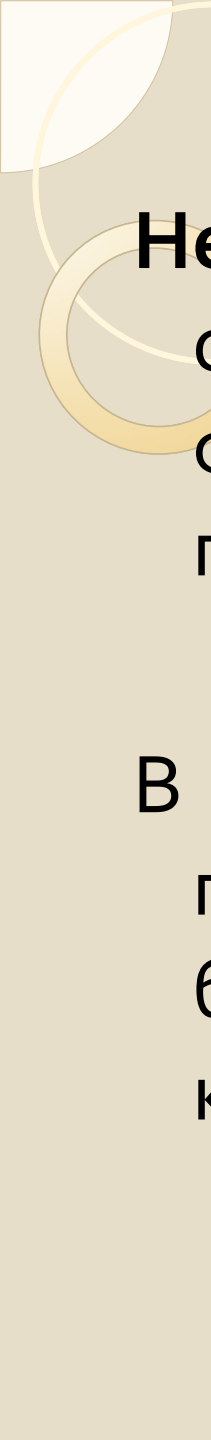
Хроматография на бумаге или «бумажная» хроматография – это один из видов распределительной хроматографии.



Роль **носителя** выполняет специальная бумага для хроматографии или обычная фильтровальная бумага хорошего качества.

Требования к носителю:

- должна быть химически чистой,
- однородной по плотности, толщине и плотности,
- обеспечивать определенную скорость движения растворителя
- содержать нужное количество неподвижной фазы, где происходит разделение смеси веществ.



Неподвижной жидкой фазой чаще всего служит вода, адсорбированная волокнами фильтровальной бумаги, или другой полярный растворитель.

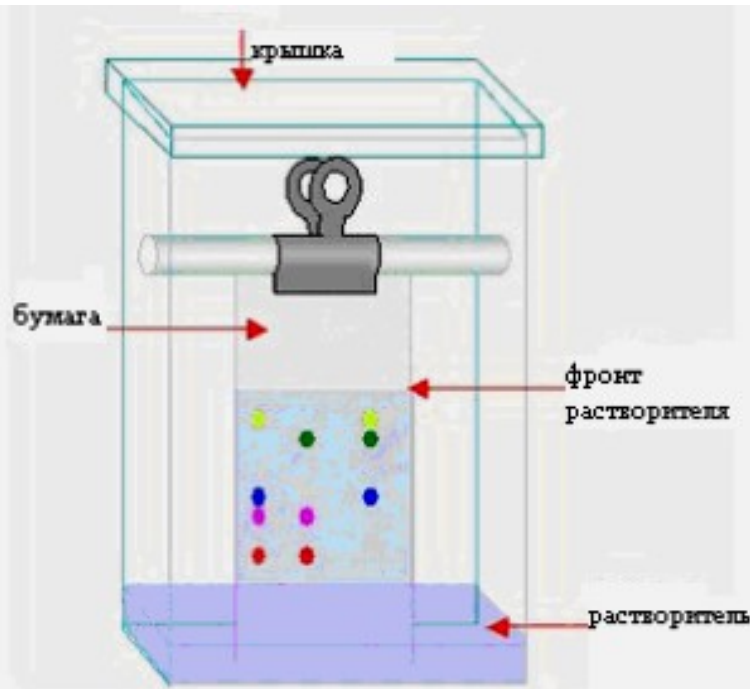
В качестве **подвижной фазы** применяют полярные растворители, например, бутанол, бензиловый спирт, фенол, крезолы и их смеси.

**Подвижные фазы, наиболее часто применяемые в бумажной
хроматографии для разделения смесей
(неподвижная фаза – вода)**

Растворители (подвижная фаза)	Соотношение растворителей	Разделяемые смеси веществ
н-бутанол, уксусная кислота, вода	4:1:5 (по объему)	аминокислоты, углеводы и другие органические вещества
н-бутанол, муравьиная кислота (20%-ный раствор), вода	5:1:1 (по объему)	аминокислоты
этилацетат, пиридин, вода	2:1:2 (по объему)	сахара
н-бутанол, насыщенный аммиаком (1,5 н)	1:1 (по объему)	алифатические кислоты
тетрахлорид углерода, уксусная кислота, вода	5:1:1 (по объему)	алифатические кислоты и их натриевые соли

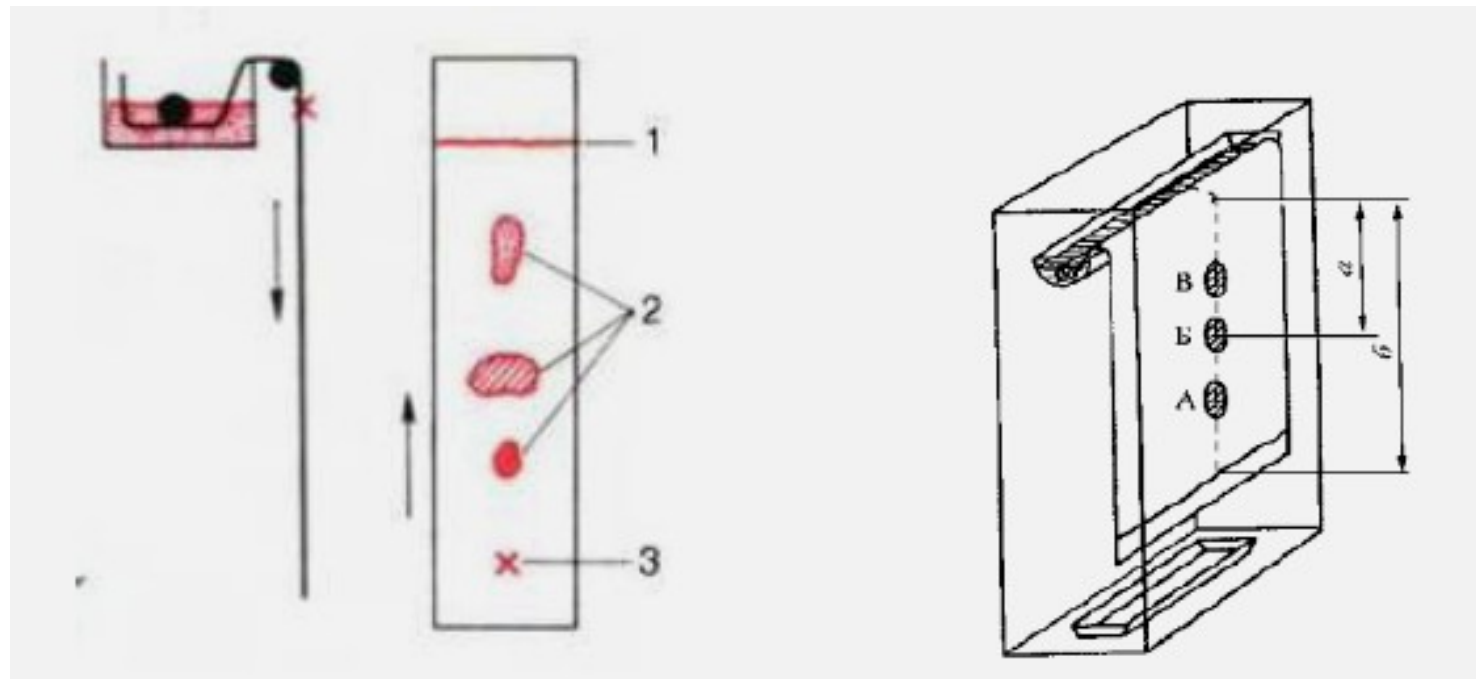
Восходящая хроматография

- В процессе хроматографирования подвижная фаза под действием капиллярных сил поднимается вверх по бумаге, разделяя компоненты на отдельные зоны. Так как компоненты смеси движутся с разной скоростью, то они выходят на различном расстоянии от линии старта.



Нисходящая хроматограмма

- Подвижный растворитель, насыщенный неподвижным растворителем, наливают в кювету, закрепленную в верхней части камеры. Подвижный растворитель, насыщенный неподвижным растворителем, наливают в кювету, закрепленную в верхней части камеры.

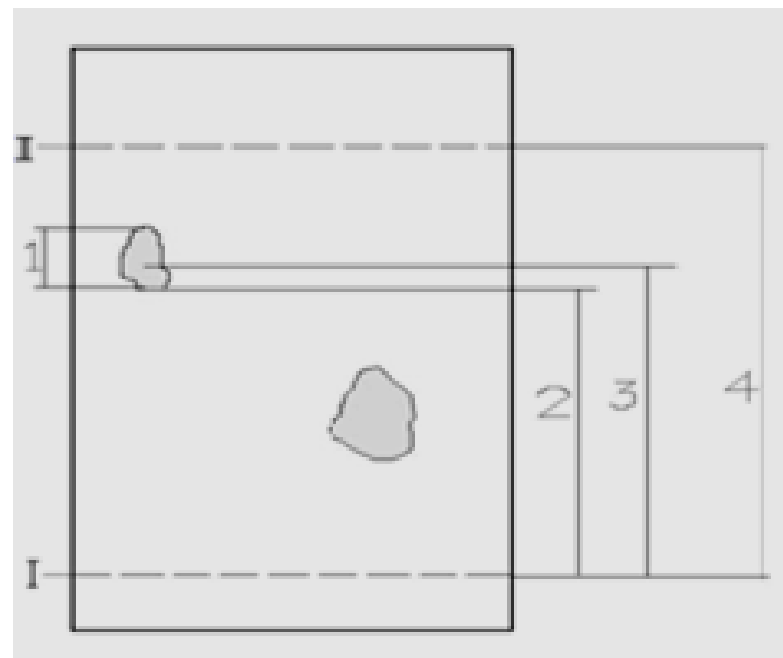


Качественная и количественная оценка хроматографического разделения на бумаге .

Для оценки способности разделения веществ на бумаге используют коэффициент **R_f** – отношение расстояния от центра пятна на бумаге (x) до линии старта к расстоянию, пройденному растворителем (x_f) от линии старта до линии финиша.

$$R_f = x / x_f$$

- I – линия старта
- II – линия фронта
- 1 – длина пятна
- 2 – отрезок от линии старта до пятна
- 3 – отрезок от линии старта до центра пятна X₁
- 4 – отрезок от линии старта до линии фронта X_f



Достоинства и недостатки метода

Достоинства бумажной хроматографии: возможность разделения малых количеств веществ (0,001-1 мкг), высокая чувствительность, простота аппаратуры.

Недостаток метода: сильное размывание хроматографических зон, связанное с неоднородностью бумаги. Это приводит к увеличению длительности эксперимента (для двумерной бумажной хроматографии до 15-20 ч) и большому расходу растворителя.

Тонкослойная хроматография

Метод анализа смесей жидких или твердых веществ, основанный на различном сродстве разделяемых веществ к неподвижной (сорбент) фазе. элюенту – подвижной фазе.

В основу метода заложены явления сорбции-десорбции. Метод открыт в 1938 году Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер.

Измайлов Н.А.



Преимущества тонкослойной хроматографии

- скорость выполнения эксперимента
- значительно большая чувствительность
- возможность широкого выбора сорбента и проявляющего растворителя.

Сорбенты тонкослойной хроматографии

Современная пластинка ТСХ представляет собой основу из стекла, алюминия или полимера.

- ***Силикагель*** - гидратированная кремниевая кислота, образующаяся при действии минеральных кислот на силикат натрия с последующим высушиванием образовавшегося золя.
- ***Оксид алюминия*** - является слабо основным адсорбентом и используется в основном для разделения соединений слабоосновного и нейтрального характера.
- ***Кремнекислый магний*** - менее полярный сорбент, чем силикагель. Обычно его используют в случаях, когда адсорбенты с большей полярностью не дали эффективного разделения.



Растворители (элюенты) тонкослойной хроматографии

В тонкослойной хроматографии в качестве подвижной фазы - элюента - используют либо чистые вещества (этилацетат, бензол и т.п.), либо смеси веществ (системы) в определенном соотношении.

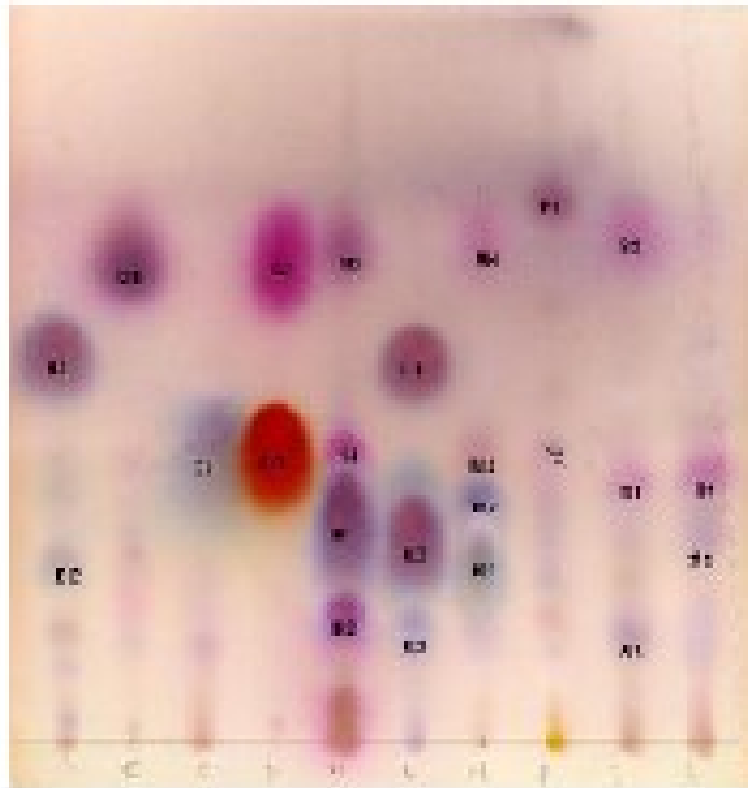
Растворители должны легко удаляться после проведения анализа.



Для проведения ТСХ необходимо:

- нанести анализируемую смесь (0,5 – 5,0 мкл) и стандартные вещества на линию старта
- Подготовить хроматографическую пластинку
- Поместить пластинку в герметичную хроматографическую камеру с растворителем (элюентом)
- После достижения элюентом линии финиша извлечь пластинку из камеры, высушить растворитель
- Проявить хроматограмму известными методами

Хроматограмма 10 эфирных масел проявленная ванилином.

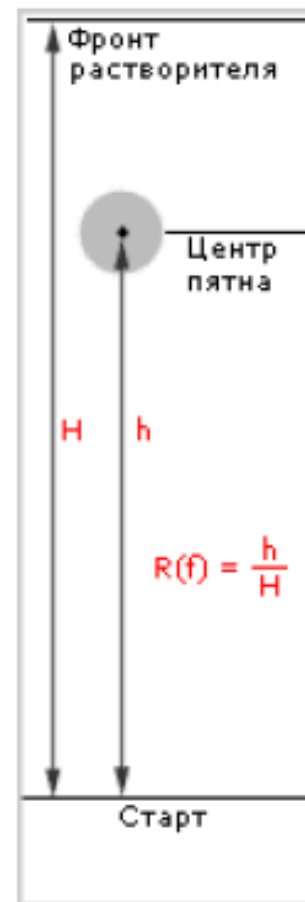


Количественная оценка хроматографического разделения на ТСХ

Главной количественной характеристикой метода аналогично бумажной хроматографии является время удерживания **R_f**

R_f – коэффициент удерживания (время удерживания) - отношение расстояния пройденного определяемым веществом **h** к расстоянию, пройденному подвижной фазой – элюентом **H**

$$R_f = \frac{h}{H}$$



Применение ТСХ

- Этим методом можно разделить практически все неорганические катионы и многие анионы, близкие по свойствам ионы благородных металлов, лекарственные и наркотические средства, пестициды, аминокислоты, липиды, алкалоиды.

- **Хроматография** дает возможность проводить **качественный** и **количественный анализ** исследуемых объектов, изучать физико-химические свойства веществ, осуществлять контроль и автоматическое регулирование технологических процессов. В последнее время хроматография – один из основных разделения и концентрирования.