

«БУМАЖНАЯ И ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ»

Вопросы к занятию:

1. Сущность процесса хроматографии и его роль в методах разделения, обнаружения и концентрирования веществ.
2. Классификация хроматографических методов.
3. Понятие о хроматографических параметрах.
4. Методы идентификации веществ хроматографическими методами.
5. Методы выделения веществ хроматографическими методами.
6. Применение метода хроматографии в фармации.

§1. Сущность процесса хроматографии и его роль в методах разделения, обнаружения и концентрирования веществ.

Хроматография - это физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами -неподвижной и подвижной.

Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое вещество (его часто называют сорбентом) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу.

Компоненты анализируемой смеси вместе с подвижной фазой подвигаются вдоль стационарной фазы. Ее обычно помещают в стеклянную (или металлическую) трубку, называемую колонкой. В зависимости от сил взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому - либо механизму) компоненты перемещаются вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты остаются в верхнем слое, другие, с меньшей степенью взаимодействия с сорбентом, оказываются в нижней части колонки, некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой. Таким образом компоненты разделяются

Хроматография - это динамический метод обеспечивающий, многократность актов сорбции-десорбции разделяемых компонент, так как разделение происходит в потоке подвижной фазы. Этим обусловлена большая эффективность хроматографического метода по сравнению с методами сорбции и экстракции в статических условиях, именно поэтому хроматографическими методами возможно быстрое разделение сложных смесей, например, аминокислот или редкоземельных элементов.

Впервые хроматографический метод анализа предложил русский ученый-ботаник М.С. Цвет, который в 1903 году опубликовал сообщение "О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу".

§2. Классификация хроматографических методов.

В основу общепринятых классификаций многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки, агрегатное состояние подвижной и неподвижной фаз, механизм взаимодействия сорбент - сорбат, слой сорбента (техника выполнения), цель хроматографирования.

По агрегатному состоянию фаз хроматографию разделяют на *газовую и жидкостную*. Газовая хроматография включает *газожидкостную и газотвердофазную*, жидкостная - *жидкостно-жидкостную, жидкостно-твердофазную и жидкостно-гелевую*. Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе -неподвижной.

По механизму взаимодействия сорбента и сорбата можно выделить несколько видов хроматографии:

1. *Распределительная хроматография* основана на различии в растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (газовая хроматография) или на различии в растворимости веществ в подвижной и неподвижной жидких фазах;

2. *Ионообменная хроматография* - на различной способности веществ к ионному обмену; адсорбционная хроматография - на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ;

3. *Аффинная хроматография* - на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов. Существуют пары веществ, реагирующих в растворах с высокой избирательностью, например, антитело - антиген, фермент и его субстрат или ингибитор, гормон и соответствующий рецептор, и т.п. Если одно из соединений пары удерживается ковалентной связью на носителе, то последний можно использовать для избирательного извлечения второго соединения пары;

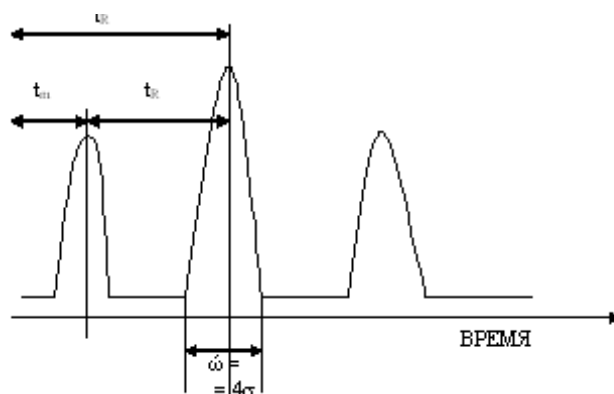
4. *Осадочная хроматография* - основана на образовании отличающихся на растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом.

По способу получения хроматограмм различают элюентную, вытеснительную и фронтальную.

Подвижную фазу, вводимую в слой неподвижной фазы, называют элюентом, а подвижную фазу, выходящую из колонки и содержащую разделенные компоненты – элюатом. В элюате тем или иным способом определяют содержание компонентов. Распределение разделяемых веществ в виде отдельных вдоль колонки представляет собой внутреннюю хроматограмму. Графическое изображение (получаемое, как правило, с помощью самописца) распределение веществ в элюате называют внешней хроматограммой, или просто хроматограммой.

Элюентная (проявительная) хроматография. Элюентом называют подвижную фазу, вводимую в слой неподвижной фазы. Элюент содержит исследуемые компоненты. Хроматографическую колонку промывают элюентом (раствором или растворителем), обладающим меньшей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. Затем в колонку вводят отделяемые вещества, растворенные в элюенте, и продолжают непрерывно пропускать элюент (процесс элюирования). При этом отделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями в соответствии с их сорбируемостью.

Подвижную фазу, выходящую из колонки и содержащую разделенные компоненты называются элюентом. Если скорости перемещения компонентов достаточно различаются, то на выходе из колонки сначала появляется наименее сорбируемый компонент, затем следующий компонент и т.д. В этом случае хроматограмма может представлять собой несколько пиков, каждый из которых отвечает соответствующему компоненту смеси. Графическое изображение (получаемое с помощью самописца) распределения веществ в элюате называют хроматограммой (рис. 1).



t_R – время элюирования анализируемой пробы от момента ввода в колонку до регистрации максимума пика.

t_m - время прибывания веществ в подвижной фазе (объяснения в тексте).

Вытеснительная хроматография. Сначала в колонку вводят небольшое количество раствора разделяемых веществ. Затем через колонку непрерывно пропускают раствор вещества (вытеснитель), обладающий большей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. По мере продвижения по колонке элюент вытесняет вещество С, которое, в свою очередь, вытесняет вещество В, и т.д.

В результате анализируемая смесь перемещается впереди вытеснителя и скорость движения веществ равна скорости движения вытеснителя. Разделяемые вещества на колонке и в элюате располагаются последовательно друг за другом. Каждый из компонентов выделяется в чистом виде, но не количественно так как зоны компонентов не разделены промежутками чистого сорбента.

Фронтальная хроматография. В колонку непрерывно вводят раствор разделяемые вещества, которые распределяются в колонке в соответствии с сорбируемостью. Из колонки сначала будет вытекать чистый растворитель, когда сорбент насытится вторым, менее сорбируемым веществом В, элюат будет содержать оба этих вещества и т.д. Когда же сорбент будет полностью насыщен всеми компонентами смеси, состав элюата совпадет с составом раствора, вводимого в колонку. При фронтальном способе получения хроматограммы в чистом виде можно выделить лишь одно вещество. Однако внешняя хроматограмма дает представление о числе компонентов в анализируемом растворе.

Плоскостная хроматограмма. К плоскостным видам хроматографии относят бумажную, тонкослойную (ТСХ). Эти два вида хроматографии просты по технике выполнения, экспрессны и не требуют дорогостоящего оборудования.

В методе бумажной хроматографии в качестве носителя неподвижной фазы, например, воды используют целлюлозное волокно бумаги, в методе ТСХ - различные сорбента (оксид алюминия, силикагель, целлюлозу и др.), нанесенные на пластинку тонким слоем, хроматографическое разделение в плоскостных видах хроматографии, как и в колонке, обусловлено переносом компонентов подвижной фазы вдоль слоя неподвижной фазы с различными скоростями в соответствии с коэффициентами распределения разделяемых компонентов.

Тонкослойная хроматография

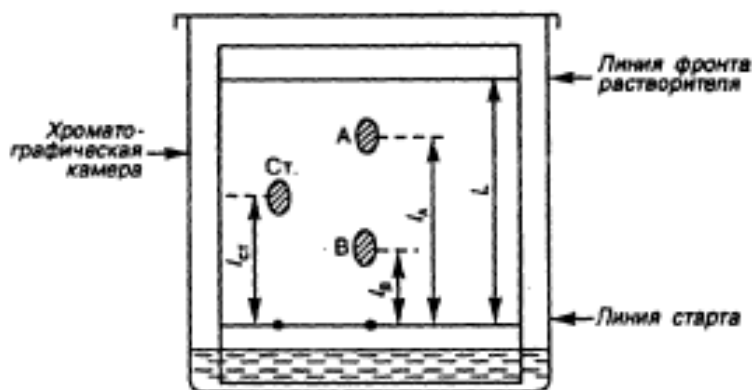
Н.А.Измайлов и М.С.Шрайбер в 1938г разработали новый вид хроматографии, названный тонкослойной хроматографией. Ими были разделены алкалоиды, экстрагированные из лекарственных растений на оксиде алюминия, нанесенном на стекло. Тонкослойная хроматография (ТСХ) – вид хроматографии, в которой разделение обеспечивается движением подвижной фазы через нанесенный на подложку тонкий слой сорбента. Продвижение элюента по пластине обеспечивается *капиллярными силами*.

Принципы и основные понятия

На чистую ровную поверхность (пластинку из стекла, металла, пластмассы) наносят тонкий слой сорбента, который закрепляется на поверхности пластинки. На поверхность пластинки осторожно, чтобы не повредить слой сорбента, намечают *линию старта и линию финиша растворителя* (рисунок 16.1)

Рисунок 16.1

Схема разделения компонентов А и В методом ТСХ



На линию старта наносят (микрошприцем) пробу, содержащую смесь разделяемых веществ (А и В) в подходящем растворителе. Дают возможность испариться растворителю. После чего пластинку погружают в хроматографическую камеру, содержащую жидкую фазу ПФ, представляющую собой специально подобранный для данного случая растворитель или смесь растворителей. Под действием капиллярных сил ПФ самопроизвольно перемещается вдоль НФ от старта линии до линии фронта (финиша) растворителя, увлекая с собой компоненты А и В пробы, которые перемещаются с различной скоростью. После достижения за время t подвижной фазой линии фронта

(финиша) растворителя, хроматографирование прерывают. Пластинку извлекают из камеры, высушивают на воздухе и определяют положение пятен В и А на поверхности пластинки. В рассматриваемом случае пятно компонента А переместилось от линии старта на расстояние l_A , пятно компонента В – на расстояние l_B , а растворитель прошел расстояние L . Для характеристики разделяемых компонентов в системе вводят коэффициент подвижности D (распределения):

$$D = \frac{V_i}{V_E} = \frac{l_i}{L}$$

где $V_i = l_i/t$ и $V_E = L/t$ – соответственно скорости перемещения i -го компонента и растворителя E ; l_i и L – путь, пройденный i -м компонентом и растворителем соответственно; t – время, необходимое для перемещения растворителя от линии старта до линии финиша растворителя. Расстояния l_i отсчитывают от линии старта до центра пятна, соответствующего компонента.

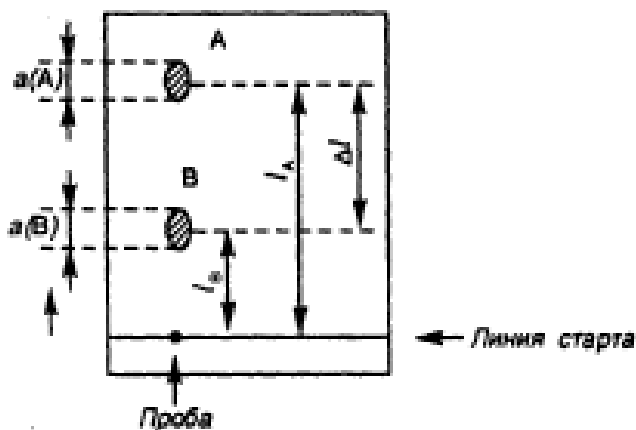
Для более надежной идентификации разделяемых компонентов используют «свидетели» – эталонные вещества, наличие которых предполагается в анализируемой пробе. Для характеристики разделения двух компонентов А и В вводят степень (критерий) разделения R_s :

$$R_s = \frac{\Delta l}{[a(A)/2 + a(B)/2]} = \frac{2\Delta l}{[a(A) + a(B)]}$$

где Δl – расстояние между центрами пятен компонентов А и В; $a(A)$ и $a(B)$ – соответственно диаметры пятен А и В на хроматограмме (рисунок 16.2).

Рисунок 16.2

Определение степени разделения R_s компонентов А и В



Чем больше R_s , тем четче разделяются пятна компонентов А и В на хроматограмме. Обычно коэффициент подвижности лежит в пределах $R_s = 0 - 1$. Оптимальное значение составляет 0,3 – 0,7. Условия хроматографирования подбирают так, чтобы величина R_s отличалась от нуля и единицы.

Для оценки селективности разделения двух компонентов А и В используют коэффициент разделения α :

$$\alpha = \frac{l_B}{l_A}$$

Если $\alpha = 1$, то компоненты А и В не разделяются.

§3. Понятие о хроматографических параметрах.

Разделяемые компоненты на пластинке или на бумаге образуют отдельные зоны (пятна), положение которых на хроматограмме характеризуется величинами R_f .

Величина R_f - это отношение расстояний, которые пройдены исследуемым веществом и подвижной фазой соответственно:

$$R_f = \frac{L_s}{L_m} \quad (1)$$

R_f - основная качественная характеристика бумажной и ТСХ. В соответствии с определением величина R_f всегда меньше 1.

Величина R_f зависит от природы носителя (бумага, активность и природа сорбента, толщина слоя сорбента), качества и природы растворителя, способа нанесения пробы и способа детектирования.

Величину R_f формально отождествляют с V_R и t_R , характеризующими скорость движений веществ вдоль колонки, а длину зоны (пятна) – с шириной хроматографического пика. Очевидно, что основное уравнение колоночной хроматографии:

$$V_R = V_m + DV_s \quad (2)$$

Применимо и в случае ТСХ.

Величина R_f , характеризующая положение зоны вещества на хроматограмме связана с коэффициентом распределения в данной системе следующим уравнением:

$$D = (V_s/V_m) (1/R_f - 1)$$

Из этого следует, что существует определенная связь между основными параметрами удерживания в ТСХ и в колоночной хроматографии

$$R_f = k_f (t_s/t_m) \quad (3)$$

где k_f - коэффициент перехода от жидкостной колоночной хроматографии к тонкослойной.

Число теоретических тарелок рассчитывают по формуле:

$$N = 16 [x/y]^2$$

Где $x = t_R$, $y = \omega$.

Мерой эффективности разделения в хроматографии, является величина N :

$$N = L / N = L / 16 [y/x]^2$$

Критерий разделения определяют исходя из хроматограммы по формуле:

$$R = \frac{2\Delta x_1}{(y_1 + y_2)}$$

где индексы 2,1 - номера компонентов.

Разделение двух веществ с R_{f1} и R_{f2} практически возможно, если $R_{f1} > R_{f2}$ и $R_f > 0,1$.

Эффективность выбранного варианта ТСХ (адсорбционного, распределительного, ионообменного) и хроматографической системы можно оценить по фактору разделения (селективности) двух веществ с разными коэффициентами распределения:

$$\alpha = \frac{D_2}{D_1} = \frac{(1/R_{f2} - 1)}{(1/R_{f1} - 1)}$$