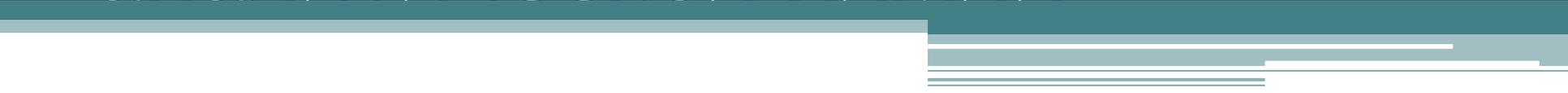


Хроматографические методы в аналитической химии



Хроматография

- **Хроматография** — область науки, изучающая процессы, основанные на перемещении зоны вещества вдоль слоя сорбента в потоке подвижной фазы и связанные с многократным повторением сорбционных и десорбционных актов.
- В хромаографических методах используется сочетание неподвижной (стационарной) фазы (НФ) и подвижной фазы (ПФ). Подвижная фаза (газ, жидкость) в процессе хроматографирования непрерывно перемещается вдоль неподвижной фазы (твердое тело, жидкость), так что частицы хроматографируемых веществ, переносимые вместе с ПФ, могут многократно переходить из подвижной фазы в неподвижную и наоборот.
- Разделение веществ с помощью хроматографии основано на различном сродстве разделяемых веществ к подвижной и неподвижной фазам. Различие в сродстве приводит к различию в скоростях движения частиц разделяемых веществ вместе с подвижной фазой и в конце концов к их разделению.

Условия, необходимые для проведения хроматографического анализа

- Наличие ПФ и НФ;
- Многократное повторение актов сорбции и десорбции разделяемых компонентов, перемещающихся вместе с ПФ вдоль НФ;
- Равновесие сорбция десорбция должно устанавливаться достаточно быстро.

Классификация хроматографических методов анализа

Классификация по механизму разделения веществ

- 1. Адсорбционная хроматография** — основана на использовании неодинаковой способности разделяемых компонентов вступать в специфическое взаимодействие с поверхностью адсорбента — НФ — за счет адсорбции.
- 2. Распределительная хроматография** — основана на использовании различий в коэффициентах распределения разделяемых компонентов между ПФ и НФ, представляющей собой жидкость.
- 3. Ионообменная хроматография** — основана на использовании различной способности ионов разделяемых компонентов, находящихся в ПФ (обычно — это жидкий раствор), к обмену с ионами НФ.

4. *Хемихроматография* — основана на использовании различной способности компонентов разделяемой смеси вступать в те или иные химические реакции с реагентами, входящими в состав НФ . Виды: осадочная, окислительно-восстановительная, лигандная, биоспецифическая хроматография.
5. *Эксклюзионная (ситовая, проникающая) хроматография* — основана на использовании различий между размерами (эффективными диаметрами) частиц разделяемых компонентов и размерами пор НФ, которая представляет собой сорбент — пористое вещество. Сорбенты здесь играют роль молекулярных сит; они проницаемы только для частиц определенных размеров. Разновидность — гель-хроматография; здесь неподвижная фаза представляет собой набухший гель с порами определенного размера.
6. *Другие хроматографические методы*, например, электрохроматография (электрофорез

Классификация по агрегатному состоянию фаз

Неподвижная фаза (НФ)	Подвижная фаза (ПФ)	Метод
Адсорбционная хроматография		
Твердое тело	Жидкость	Жидкостная адсорбционная хроматография
Твердое тело	Газ	Газо-адсорбционная хроматография
Распределительная хроматография		
Жидкость (тонкая пленка)	Жидкость (не смешивающаяся с НФ)	Жидкостная распределительная хроматография; высокоэффективная жидкостная хроматография
Жидкость (тонкая пленка)	Газ	Газожидкостная хроматография

Классификация по технике эксперимента

- **Колончатая хроматография** - для разделения компонентов используют хроматографические колонки, заполненные тем или иным сорбентом.
- **Капиллярная хроматография** - в качестве хроматографических колонок применяют капиллярные трубки из стекла или другого материала.
- **Плоскостная хроматография** - неподвижной фазой служит либо тонкий слой сорбента, нанесенный на плоскую поверхность — стеклянную, алюминиевую, пластмассовую пластинку (тонкослойная хроматография, хроматография в тонком слое сорбента), либо специальная хроматографическая бумага. Вдоль плоской поверхности сорбента (НФ) перемещается за счет капиллярных сил жидкая фаза — раствор, содержащий смесь разделяемых компонентов.

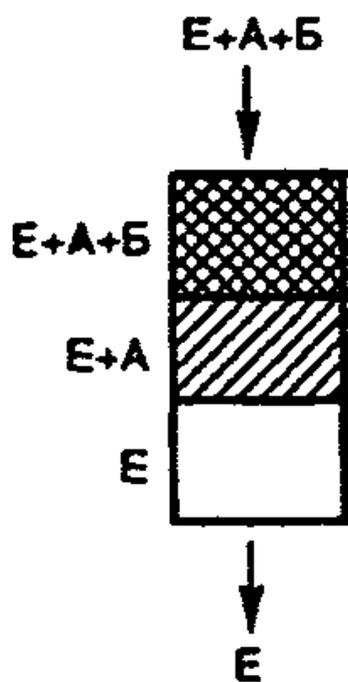
Классификация по способу
относительного перемещения фаз (по
способу получения хроматограммы).

- Фронтальная хроматография
- Элюентная (пронзительную)
хромоаография
- Вытеснительная хроматография

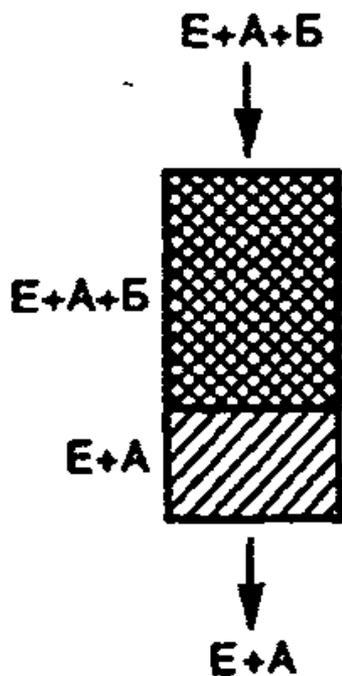
Фронтальная хроматография

- В заполненную сорбентом хроматографическую колонку непрерывно вводят анализируемый раствор, содержащий, помимо растворителя Е, разделяемые компоненты А и Б, вплоть до окончания процесса хроматографирования.
- В начале хроматографирования из колонки выходит чистый растворитель Е. Компонент А, обладающий меньшим сродством к сорбенту (НФ), чем компонент Б, перемещается быстрее компонента Б и опережает его.
- Затем из колонки выходит раствор компонента А в растворителе Е. Компонент Б «отстает» от зоны компонента А. В дальнейшем из колонки выходит смесь растворителя Е с обоими компонентами А и Б
- Фронтальная хроматография позволяет отделить только часть одного компонента (в данном случае — компонента А), поскольку в колонку непрерывно поступает смесь обоих компонентов.

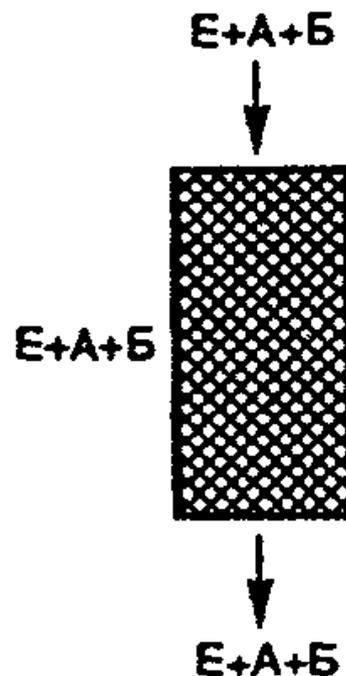
Фронтальная хроматография



начало
процесса



продолжение
процесса

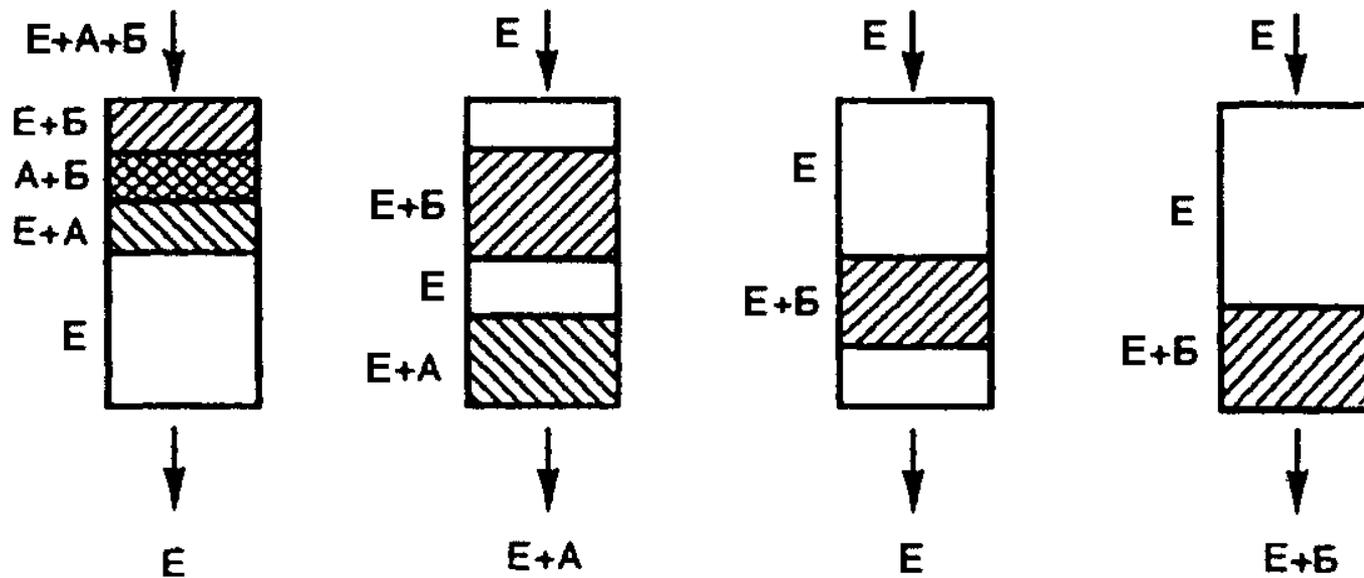


Завершение
процесса

Элюэнтная хроматография

- Вначале в хроматографическую колонку, заполненную сорбентом, вводят раствор разделяемых веществ А и Б в растворителе Е. Затем эти вещества вымывают {элюируют) чистым растворителем (элюентом) Е.
- При элюировании чистым растворителем Е компоненты А и Б перемещаются вдоль сорбента (НФ) с различной скоростью. Компонент А, обладающий меньшим сродством к НФ, переносится быстрее компонента Б, обладающего более высоким сродством к НФ. При достаточной длине колонки компоненты А и Б полностью разделяются: вначале элюируется зона компонента А, затем — зона чистого растворителя Е и, наконец, зона компонента Б.
- Процесс вымывания компонентов называют элюированием. Растворитель (или раствор), применяемый для элюирования, называют элюентом, а выходящий из колонки раствор (или растворитель) — элюатом.
- Элюэнтная хроматография позволяет практически полностью разделить компоненты анализируемой смеси.
- К недостаткам метода можно отнести разбавление компонентов А и Б растворителем Е на выходе из хроматографической колонки, что приводит к уменьшению их концентрации в элюате.

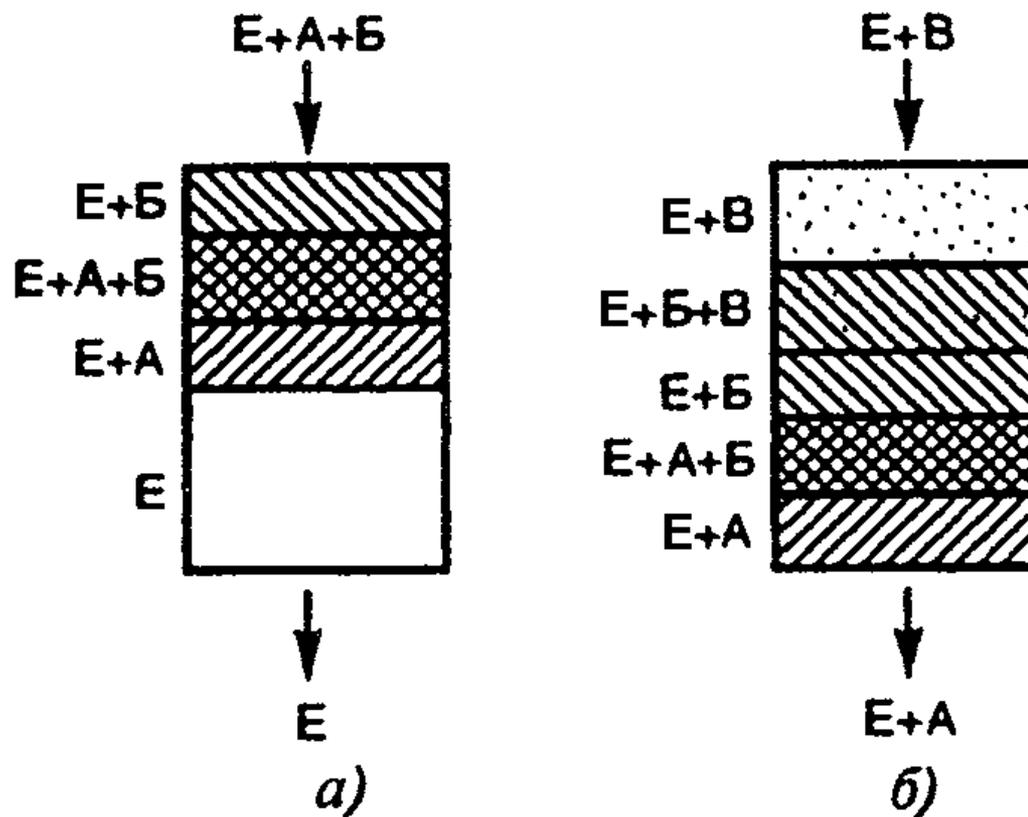
Элюэнтная хроматография



Вытеснительная хроматография

- В качестве элюента применяют не чистый растворитель E , а некоторое вещество B (например, его раствор в E), у которого сродство к сорбенту (НФ) больше, чем у компонентов A и B . Вещество B играет, таким образом, роль вытеснителя: оно вытесняет компоненты A и B из НФ.
- В хроматографическую колонку вводят смесь разделяемых компонентов A и B с растворителем E , после чего прибавляют раствор вытеснителя B в растворителе E .
- По мере элюирования вначале в элюат поступает чистый растворитель E , затем последовательно $E + A$, $E + A + B$, $E + B$, $E + B + B$ и $E + B$. Таким образом, наряду с зонами разделенных компонентов A и B (разбавленных растворителем E), в элюат переходят и разбавленные растворителем зоны смеси компонентов $A + B$ и $B + B$.

Вытеснительная хроматография



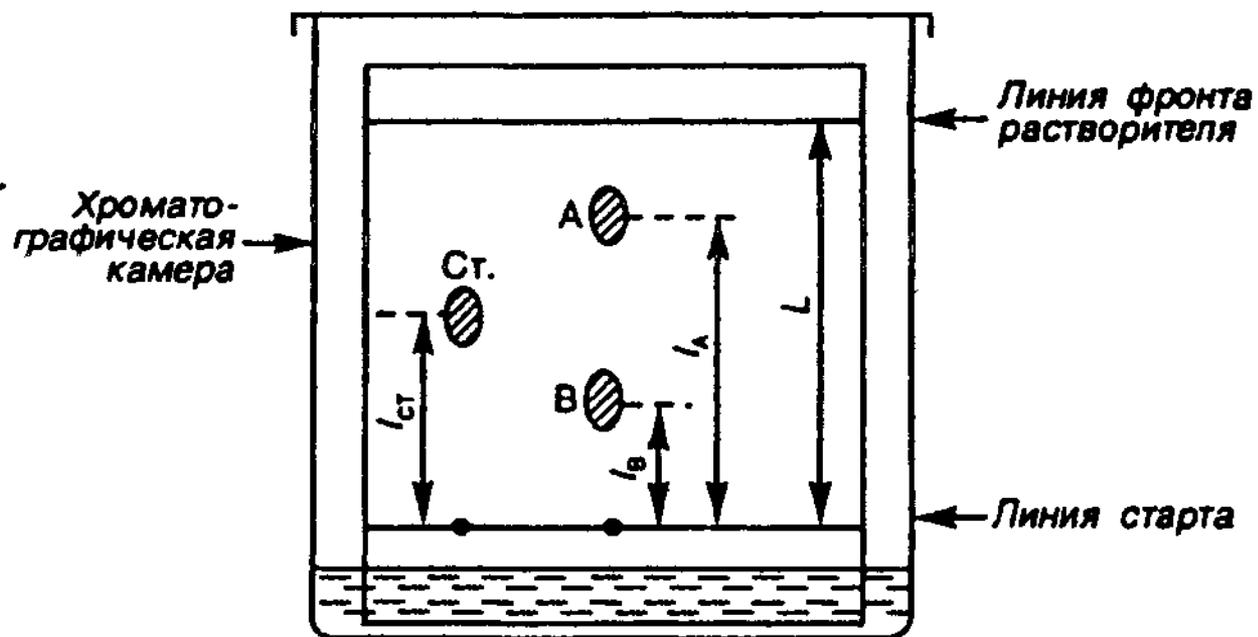
Тонкослойная хроматография

- Тонкослойная хроматография — сокращенно ТСХ — разновидность плоскостной хроматографии, при которой адсорбент используют в виде тонкого слоя на пластинке.
- На чистую плоскую поверхность (пластинку из стекла, металла, пластмассы) наносят тонкий слой сорбента, который чаще всего закрепляется на поверхности пластинки. На поверхности пластинки, без повреждения слоя сорбента, намечают линию старта (на расстоянии 2—3 см. от нижнего края пластинки) и линию финиша растворителя.
- На линию старта пластинки наносят (микрошприцом, капилляром) пробу — небольшое количество жидкости, содержащей смесь разделяемых веществ (А и В). Дают возможность испариться растворителю, после чего пластинку погружают в хроматографической камере в жидкую фазу ПФ,

Тонкослойная хроматография

- Под действием капиллярных сил ПФ самопроизвольно перемещается вдоль НФ от стартовой линии до линии фронта растворителя, увлекая с собой компоненты А и В пробы, которые перемещаются с различной скоростью. В рассматриваемом случае сродство компонента А к НФ меньше сродства к той же фазе компонента В, поэтому компонент А перемещается быстрее компонента В. После достижения подвижной фазой линии фронта растворителя хроматографирование прерывают, пластинку извлекают из хроматографической камеры, высушивают на воздухе и определяют положение пятен веществ А и В на поверхности пластинки.
- Пятна (зоны) обычно имеют овальную или круглую форму. В рассматриваемом случае пятно компонента А переместилось от линии старта на расстояние la , пятно компонента В — на расстояние lv , а растворитель прошел расстояние L .
- Иногда одновременно с нанесением пробы разделяемых веществ на линию старта наносят небольшие количества вещества-стандарта, а также веществ-свидетелей (тех, которые предположительно содержатся в анализируемой пробе).

Тонкослойная хроматография



Коэффициент подвижности

Коэффициент подвижности R_f
применяется для характеристики разделяемых
компонентов в системе:

$$R_f = V_i / V_E = (l_i / t) / (L / t) = l_i / L$$

где $V_i = l_i / t$ и $V_E = L / t$ — соответственно скорости перемещения i -того 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 фронта растворителя. Расстояния l_i , отсчитывают от линии старта до центра пятна, соответствующего компонента.

Коэффициент подвижности зависит от :

- Природы и качества растворителя, его чистоты;
- Природы и качества сорбента (тонкого слоя), равномерности его зернения, толщины слоя;
- Активности сорбента (содержания в нем влаги);
- Техники эксперимента (массы образца, длины L пробега растворителя);
- Навыка экспериментатора

Относительный коэффициент подвижности

Для нивелирования влияния условий проведения процесса вводят *относительный коэффициент подвижности* R_s :

$$R_s = l/L = R_f/R_{f(cm)}$$

где $R_f = l/L$; $R_{f(cm)} = l_{cm}/L$; l_{cm} — расстояние от линии старта до центра пятна стандарта

В качестве стандарта часто выбирают такое вещество, для которого в данных условиях $R_f \approx 0,5$.

Для характеристики разделения двух компонентов А и В вводят *степень (критерий) разделения R(A/B)*:

$$R(A/B) = \Delta l / [a(A)/2 + a(B)/2] = 2 \Delta l / [a(A) + a(B)],$$

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

Чем больше величина $R(A/B)$, тем четче разделяются пятна компонентов А и В на хроматограмме.

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

$$\alpha = l_B / l_A$$

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

Сорбенты в методе ТХС

Важнейшей характеристикой сорбента является его активность - способность сорбировать (удерживать) компоненты разделяемой смеси.

Активность сорбента зависит от:

- природы активных центров и их концентрации на поверхности сорбента,
- степени дисперности частиц сорбента,
- размеров поверхности сорбента и содержания на нем воды,
- природы ПФ, взаимодействующей с сорбентом.

Чем больше воды содержит сорбент, тем меньше его активность, поскольку молекулы воды, связываясь с активными центрами сорбента, блокируют их.

В качестве сорбентов чаще всего применяют диоксид кремния — силикагель и оксид алюминия ? а также некоторые другие материалы (активированный уголь, сахарозу, карбонат кальция, целлюлозу, тальк, полиамидные смолы и т. д.).

Растворители в ТХС

- Выбор растворителя в методе ТСХ определяется природой сорбента и свойствами анализируемой смеси.
- При выборе растворителей учитывают их элюирующую способность, которая зависит от сочетания свойств растворителя и НФ. Существуют элюотропные ряды для данного сорбента, облегчающие выбор растворителя для ТСХ.
- Элюотропный ряд по Траппе. В этом ряду растворители расположены в порядке увеличения их элюирующей способности, в целом — в порядке возрастания их полярности (диэлектрической проницаемости): циклогексан, четыреххлористый углерод, трихлорэтилен, толуол, бензол, дихлорэтан, хлороформ, диэтиловый эфир, этилацетат, ацетон, пропанол, этанол, метанол, вода.
- Систему растворителей, используемую в качестве ПФ, подбирают, смешивая два растворителя из начала и конца элюотропного ряда. Меняя растворители и их количества, часто можно получать ПФ с приблизительно желаемыми свойствами.

Техника эксперимента в ТХС

1. Нанесение пробы

2. Развитие хроматограммы

В зависимости от направления движения ПФ различают:

- восходящую;
- нисходящую ;
- горизонтальную хроматографии.

В методах ТСХ используют:

- одномерную;
- двумерную;
- многократную (повторную);
- ступенчатую хроматографию.

3. Расшифровка хроматограмм.

- Если пятна на хроматограмме окрашены, то после высушивания пластинок определяют расстояние от линии старта до центра каждого пятна и вычисляют коэффициенты подвижности.
- Если же в состав анализируемой пробы входят бесцветные вещества, дающие неокрашенные, т. е. визуально не идентифицируемые пятна на хроматограмме, то необходимо провести детектирование этих пятен, для чего хроматограммы проявляют:
 1. Облучение ультрафиолетовым светом.
 2. Термическая обработка.
 3. Химическая обработка

Бумажная хроматография

Бумажная хроматография относится к распределительной хроматографии. В этом методе применяют специальную хроматографическую бумагу, по которой, пропитывая ее, перемещается жидкая ПФ во время хроматографирования от линии старта до линии финиша растворителя.

Различают **нормальнофазовую** и **обращеннофазовую** бумажную хроматографию.

Нормальнофазовая бумажная хроматография

- Жидкой НФ является вода, сорбированная в виде тонкого слоя на волокнах и находящаяся в порах гидрофобной бумаги (до ~25% по массе). Эта связанная вода по своей структуре и физическому состоянию сильно отличается от обычной жидкой воды. В ней и растворяются компоненты разделяемых смесей.
- Роль ПФ, перемещающейся по бумаге, играет другая жидкая фаза, например, органическая жидкость с добавлением кислот и воды.
- Жидкую органическую ПФ перед хроматографированием насыщают водой для того, чтобы ПФ не растворяла в себе воду, сорбированную на волокнах гидрофильной хроматографической бумаги.
- В нормальнофазовом варианте в качестве ПФ чаще всего применяют жидкие смеси, составленные из различных растворителей. Классическим примером такой ПФ является смесь уксусной кислоты, и-бутанола и воды в объемном отношении 1:4:5.

Обращеннофазовая бумажная хромаография

- Жидкая НФ представляет собой органический растворитель, тогда как в роли жидкой ПФ выступает вода, водные или спиртовые растворы, смеси кислот со спиртами.
- Процесс проводят с использованием гидрофобной хроматографической бумаги. Ее получают обработкой (пропиткой) бумаги нафталином, силиконовыми маслами, парафином и т. д. Неполярные и малополярные органические растворители сорбируются на волокнах гидрофобной бумаги и проникают в ее поры, образуя тонкий слой жидкой НФ. Вода не удерживается на такой бумаге, не смачивает ее.

Требования к хроматографической бумаге

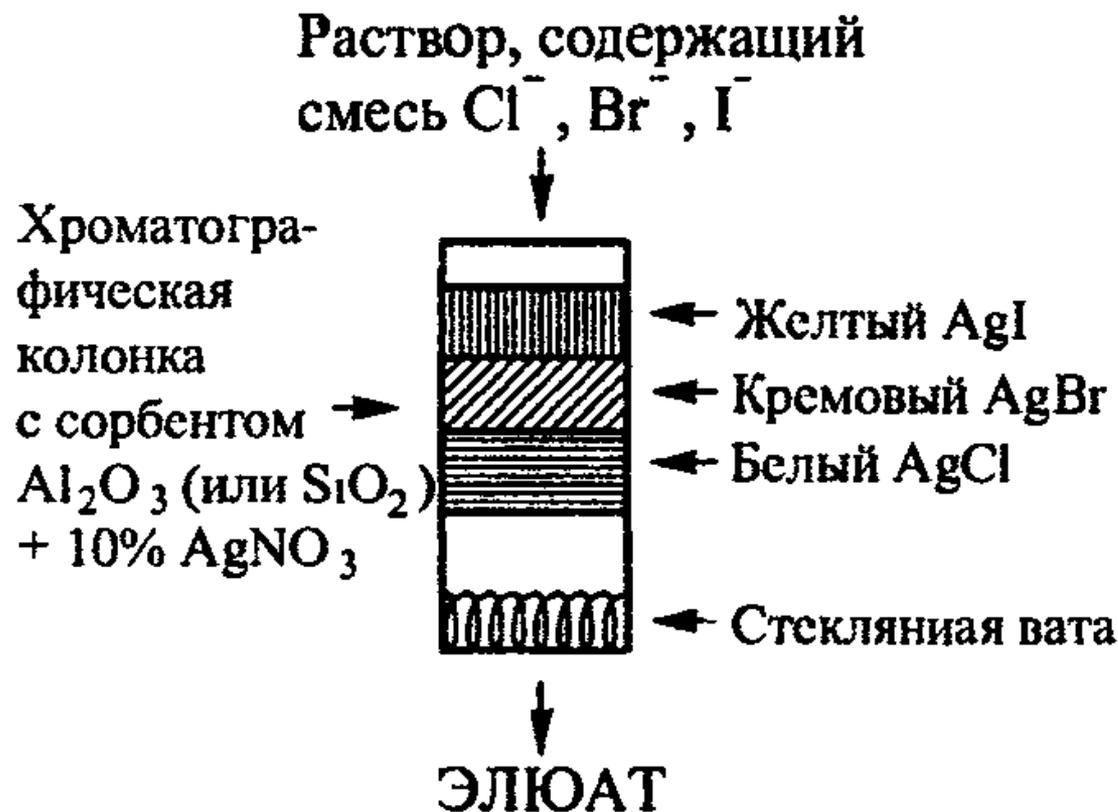
- Готовиться из высококачественных волокнистых сортов хлопка
- Быть однородной по плотности и толщине, по направлению ориентирования волокон
- Быть химически чистой
- Инертной по отношению к НФ и разделяемым компонентам.

Осадочная хроматография

Осадочная хроматография основана на использовании химических реакций осаждения разделяемых компонентов смеси с реагентом-осадителем, входящим в состав НФ. Разделение осуществляется вследствие неодинаковой растворимости образующихся соединений, которые переносятся подвижной фазой с различной скоростью: менее растворимые вещества переносятся с ПФ медленнее, чем более растворимые.

Метод осадочной хроматографии применяется преимущественно для разделения и идентификации неорганических ионов, входящих в состав смесей.

Осадочная хроматография



Классификация методов осадочной хроматографии по технике эксперимента

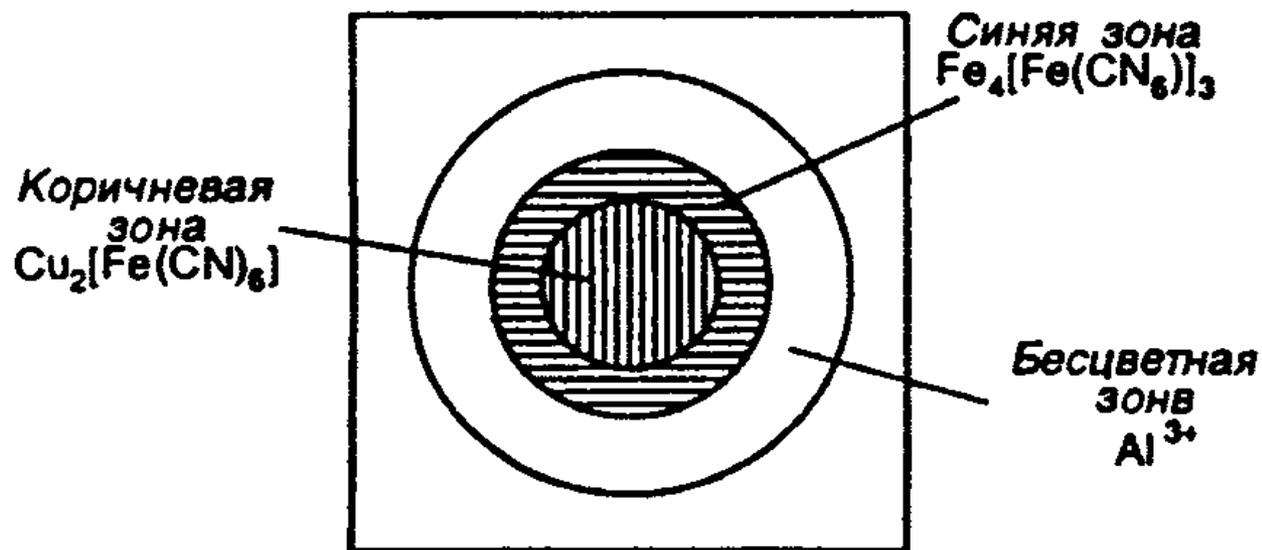
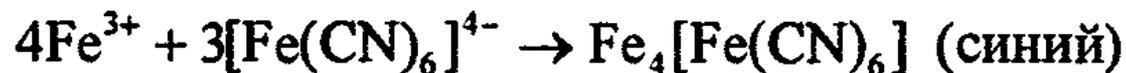
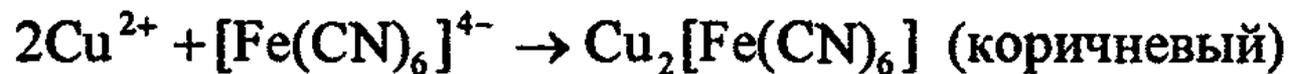
- ***Колончатая осадочная хроматография***

При использовании метода колоночной осадочной хроматографии после пропускания через колонку чистого растворителя получают четко разделенные зоны, каждая из которых содержит только один компонент (в том случае, когда растворимости осадков различаются не менее чем в три раза). Метод отличается хорошей воспроизводимостью результатов.

- ***Плоскостная осадочная хроматография***, реализуемую на бумаге или в тонком слое сорбента.

- **Сорбенты в осадочной хроматографии** : смеси инертных носителей с осадителем; сорбенты, удерживающие осадители в виде ионов (ионообменные смолы) или в виде молекул (активированный уголь); бумагу, пропитанную раствором осадителя.
- **Носители**: силикагель, крахмал, оксиды алюминия, кальция, сульфат бария, ионообменные смолы. Носитель используется в тонкодисперсном состоянии с размерами частиц около 0,02—0,10 мм.
- **Осадители**: реагенты, которые образуют малорастворимые осадки с хроматографируемыми ионами, например, иодид натрия, сульфид, сульфат серебра.
- **Проявление**. В случае образования бесцветных зон осадков хроматограмму проявляют, либо пропуская через колонку раствор-проявитель, дающий с осадками окрашенные продукты реакции, либо сразу вводя проявитель в ПФ или в НФ.

Осадочная хроматография на бумаге



Ситовая (эксклюзионная) хроматография

- Метод ситовой (эксклюзионной) хроматографии основан на использовании в качестве НФ пористых веществ — так называемых молекулярных сит, размеры пор которых могут быть больше или меньше размеров частиц разделяемых компонентов. Частицы с размерами, меньшими размеров пор сорбента, проникают вместе с растворителем ПФ в эти поры и могут удерживаться в них, тогда как более крупные частицы не могут проникнуть в поры из-за своих размеров и уносятся с ПФ. Происходит разделение мелких и крупных частиц. Крупные частицы элюируются, таким образом, первыми. Более мелкие частицы, попавшие в поры НФ, элюируются после крупных частиц.
- Методом ситовой хроматографии можно разделять высокомолекулярные и низкомолекулярные вещества, проводить обессоливание растворов, удалять примеси из газов, жидкостей.

Гель-хроматография

- Ситовая хроматография, в которой в качестве НФ применяют гели, называется гель-хроматография (гель-проникающая хроматография).
- Гели представляют собой вещества, способные к набуханию и имеющие поры разного размера. Применяют гидрофильные и гидрофобные гели.
- К гидрофильным гелям относятся декстрановые (сефадексы, малселекты), полиакриламидные (биогели), оксиалкилметакрилатные (сфероны) и некоторые другие гели.
- К гидрофобным гелям относятся некоторые сефадексы, полистирольные (стирогель, поргель), поливинилацетатные гели, пористый силикагель, пористое стекло (порасил).
- В зависимости от способа решения поставленных задач иногда различают:
 1. гель-фильтрацию (гель-фильтрацию) — отделение очень больших по размеру молекул от меньших;
 2. собственно гель-хроматографию — разделение смеси частиц с неодинаковыми, но не экстремально различными размерами;
 3. определение молекулярной массы полимеров.

Гели, применяемые в хроматографии, характеризуются пределом ситового исключения, который определяется величиной молекулярной массы вещества, выше которой частицы не способны проникать в поры геля. Вещества с молекулярной массой, превышающей предел ситового исключения, элюируются первыми. Некоторые гели имеют предел ситового исключения от 700 до -200000.

Типы гелей применяемых в хроматографии

- **Мягкие гели** — это высокомолекулярные органические соединения с малым числом поперечных связей. Они способны поглощать сравнительно большие количества растворителя, увеличиваясь в объеме (набухают).
- **Полужесткие гели** — это часто продукты сополимеризации стирола и дивинилбензола с большим числом поперечных связей (стирогели).
- **Жесткие гели** — это пористые гели и пористое стекло. Диаметр пор у них меняется в довольно узком интервале. Такие материалы стойки термически (до $-500\text{ }^{\circ}\text{C}$) и химически (за исключением воздействия фтороводородной кислоты).