

# Хроматография

Краткие сведения  
о хроматографии



В случае **газовой хроматографии** подвижной чаще всего средой является **газ-носитель**, в нашем случае – гелий, неподвижной фазой в нашем случае является засыпанное («набитое») внутрь трубки из инертного материала либо нанесенное на внутреннюю поверхность кварцевой трубки-капилляра **твердое вещество**, в зависимости от решаемых задач имеющее ту или иную химическую природу, например:

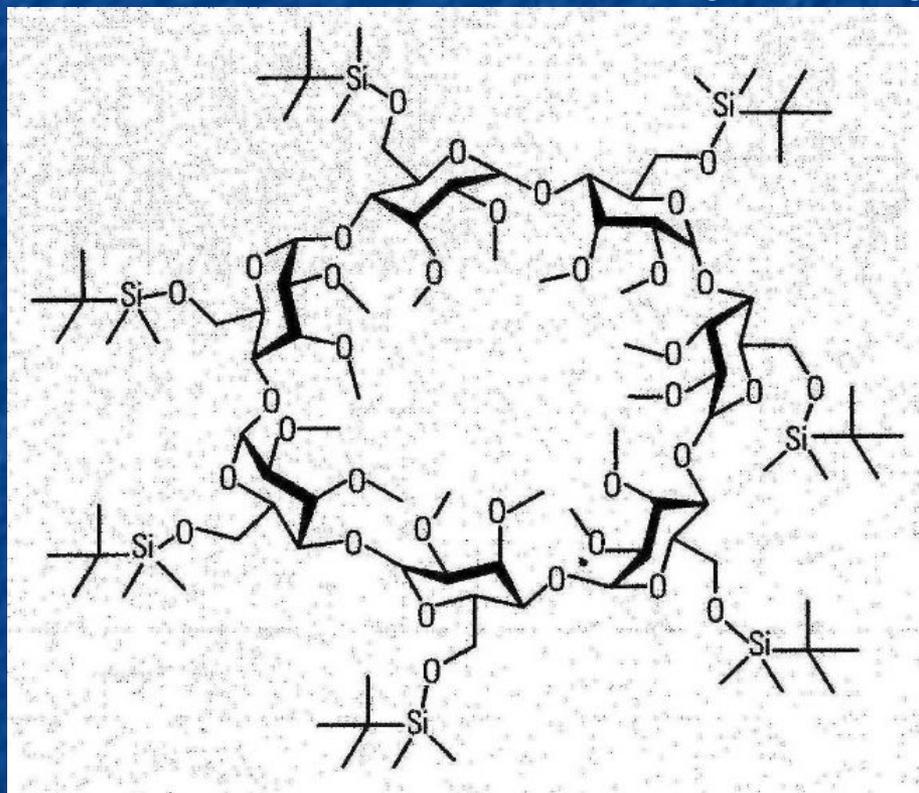


Рис. 30%-Гептакис-(2,3-ди-О-метил-6-О-трет-бутил-диметилсилил)-β-циклодекстрин, неподвижная фаза для разделения оптических изомеров

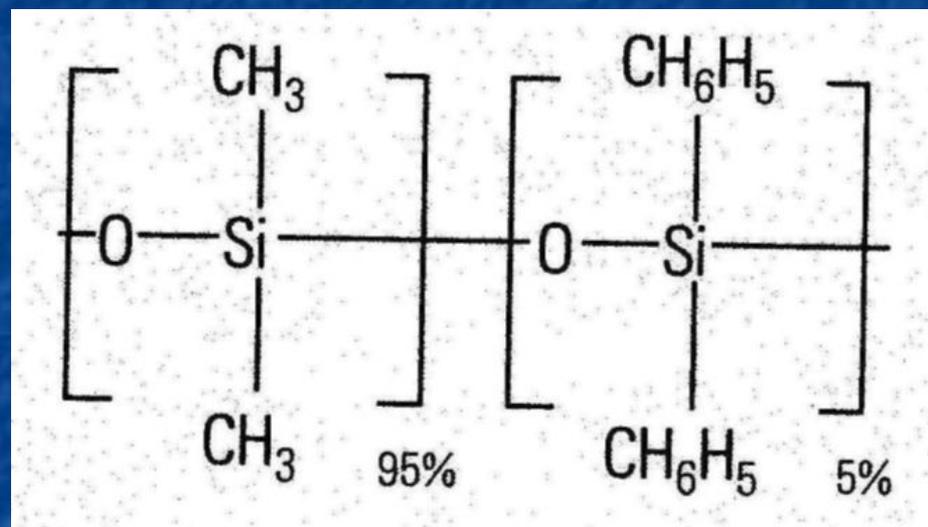
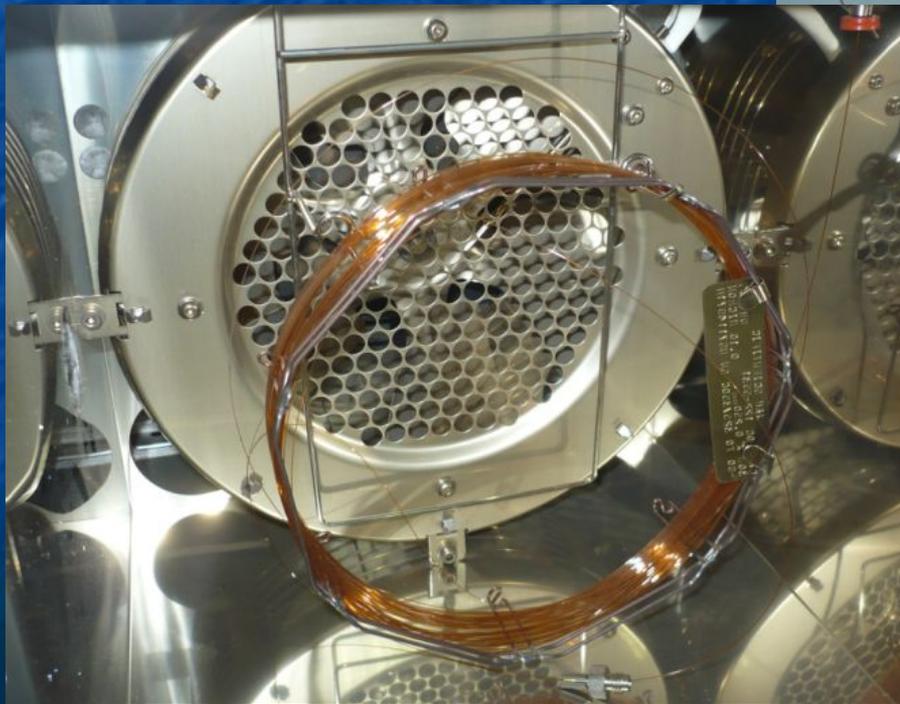
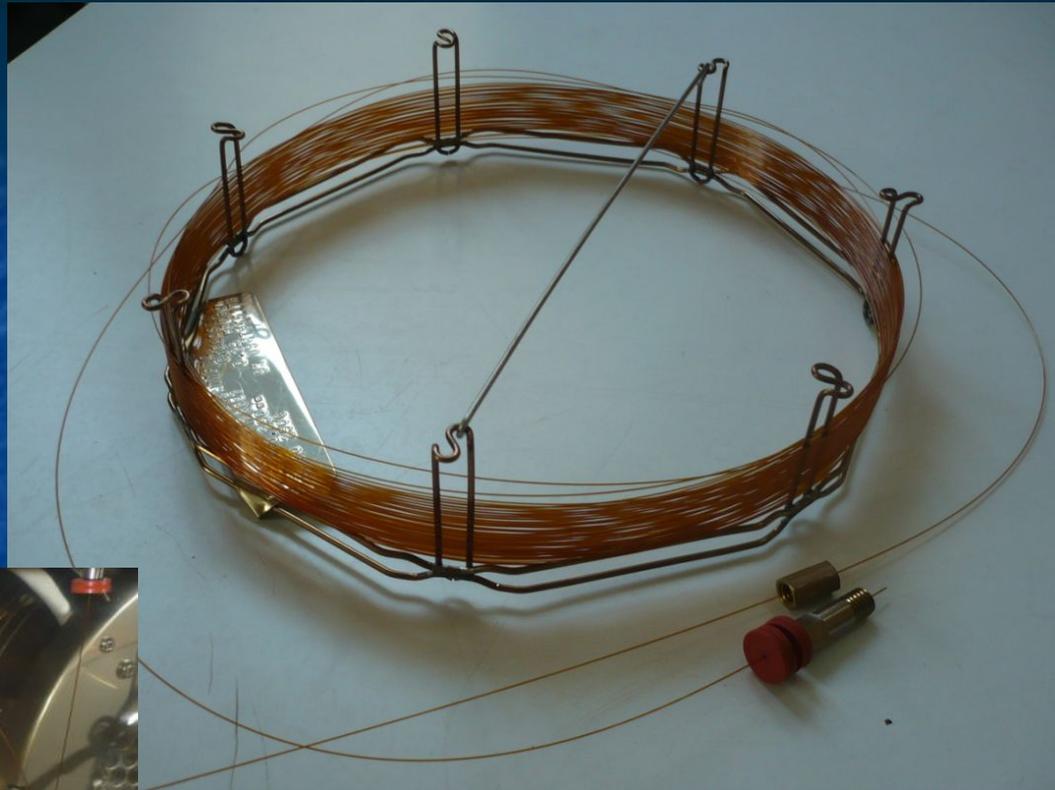


Рис. Диметилдифенилполисилоксан, неподвижная фаза для разделения органических соединений

Капиллярная газовая хроматографическая колонка HP-5MS общего назначения, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, внешний диаметр 0.30 мм



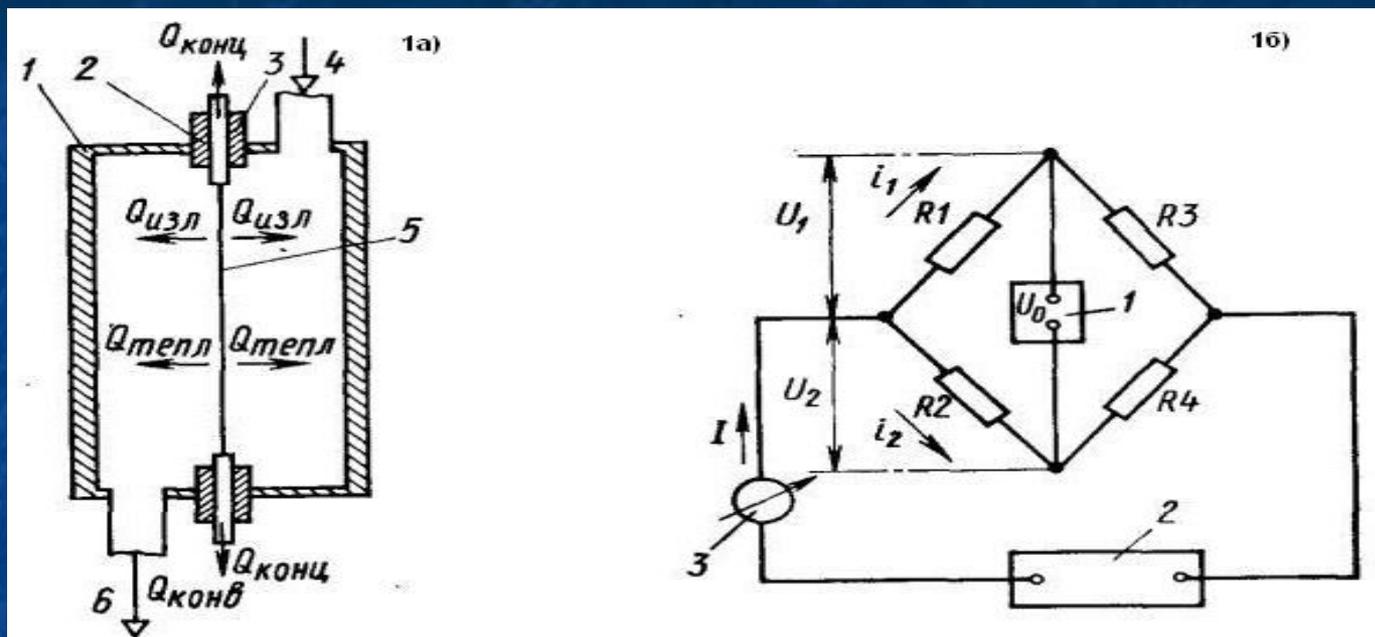
Капиллярная газовая хроматографическая колонка HP-5MS, установленная в хроматограф. Газ-носитель подают в колонку под давлением из баллона.

# К настоящему времени в ГХ предложено уже более 50 детекторов.

Таблица 1. Основные типы детекторов в газовой хроматографии и принцип их работы.

Наименование детектора	Принцип работы
По теплопроводности По плотности	Регистрируется различие в теплопроводности анализируемого вещества и газа-носителя Регистрируется различие плотностей смеси анализируемого вещества с газом-носителем и чистого газа-носителя
Пламенно-ионизационный Фотоионизационный	Образование и регистрация ионов при сгорании анализируемых веществ в пламени Фотохимическое образование и регистрация ионов под действием жесткого УФ-излучения на анализируемое вещество
Ультрафиолетовый	Поглощение УФ-света специфиче скими хромофорами анализируемого вещества
Электронозахватный	Захват анализируемым веще ством тепловых электронов, образованных при облучении β-частицами или в высокочастотных электрических полях электронами газа-носителя
Микроволновый плазменный	Возбуждение анализируемого вещества в микроволновой плазме и излучение света на длине характеристической линии присутствующего в веществе элемента
Пламенно-фотометрический	Возбуждение анализируемого вещества в пламени и излучение света в зависимости от типа присутствующего в веществе элемента
Атомно-абсорбционный спектрометр	Тепловая атомизация с последующим поглощением света на специфической длине волны
Электрохимический	Поглощение анализируемых веществ потоком жидкости и электрохимическое детектирование их в потоке
ИК-спектрометр	Поглощение света в ИК-области анализируемым веществом
Плазменно-эмиссионная спектроскопия постоянным токе	Тепловая атомизация, возбуждение, ионизация постоянным током, излучение света
Анализатор теплоэнергии	Тепловое разложение и нитрозоаминное с выделением оксида азота, который при реакции с озоном дает хемилуминесценцию
Масс-спектрометр	Образование молекулярных и фрагментарных ионов при электронном ударе или химической ионизации

# Детекторы по теплопроводности (ДТП)



- Рис. 1а. 1 — корпус камеры; 2 — держатели чувствительного элемента; 3 — изоляторы; 4 — вход газа-носителя; 5 — чувствительный элемент; 6 — выход газа-носителя.
- Рис. 1б. Электрическая мостовая схема ДТП в режиме постоянного напряжения:
- 1 — регистратор; 2 — источник питания; 3 — измеритель тока моста;  $R_1$  — чувствительный элемент рабочей камеры детектора;  $R_2$  — чувствительный элемент сравнительной камеры;  $R_3$ ,  $R_4$  — постоянные резисторы (плечи) мостовой схемы.

# Чувствительность ДТП зависит от:

- теплопроводностей газа-носителя и смеси газа-носителя с анализируемым веществом;
- тока моста, причем с увеличением тока увеличивается чувствительность, но уменьшается стабильность нулевой линии;
- температуры чувствительного элемента детектора, так как ее увеличение приводит к увеличению чувствительности детектора;
- сопротивления чувствительного элемента;
- температуры детектора, так как с ее уменьшением повышается чувствительность;
- расхода газа-носителя, поскольку ДТП является типичным концентрационным детектором;

# Пламенно-ионизационный детектор

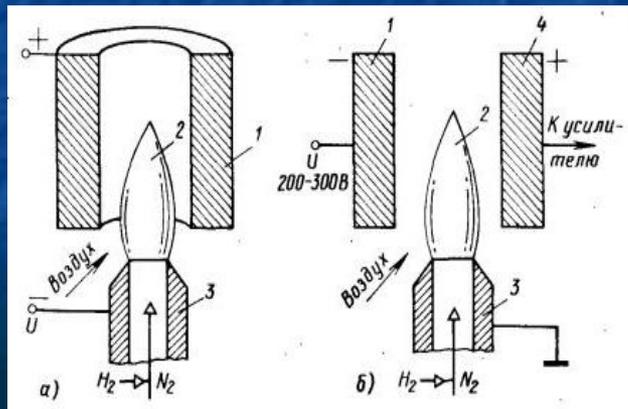
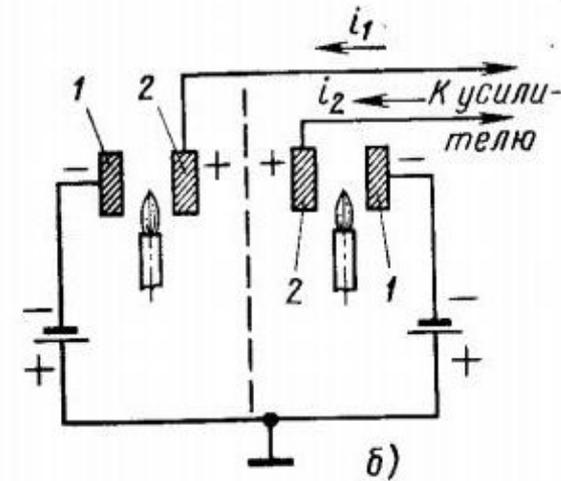
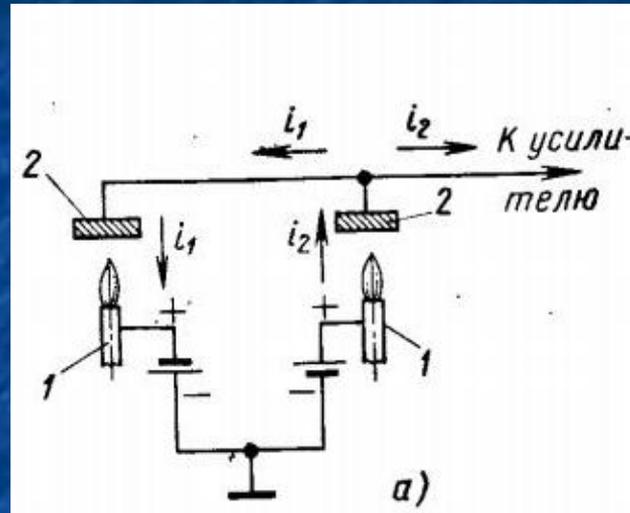
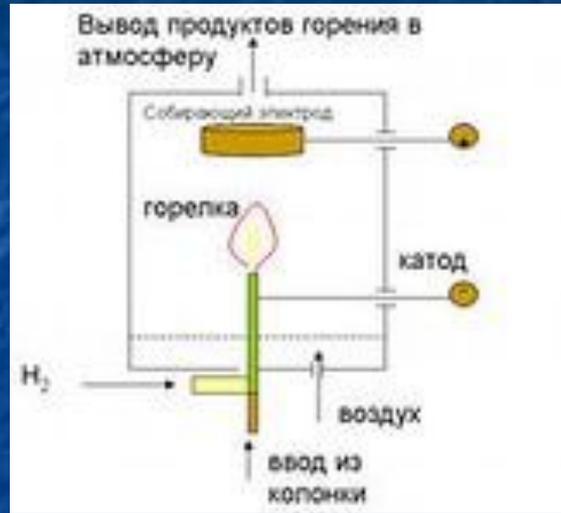
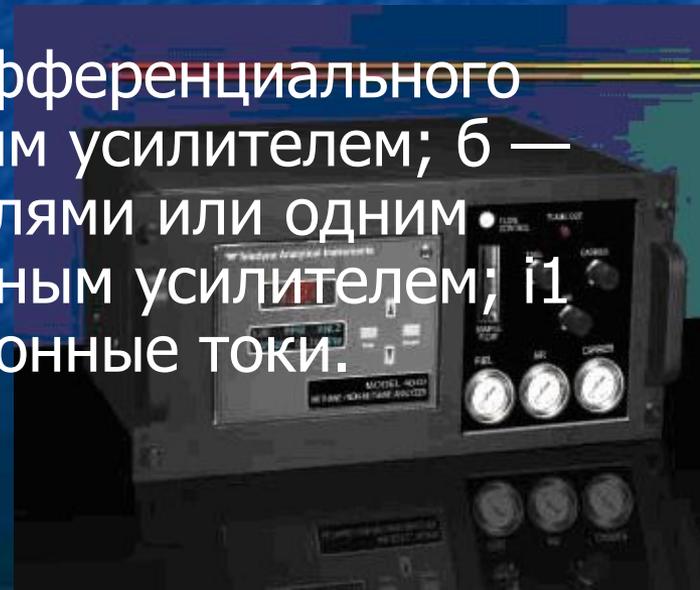
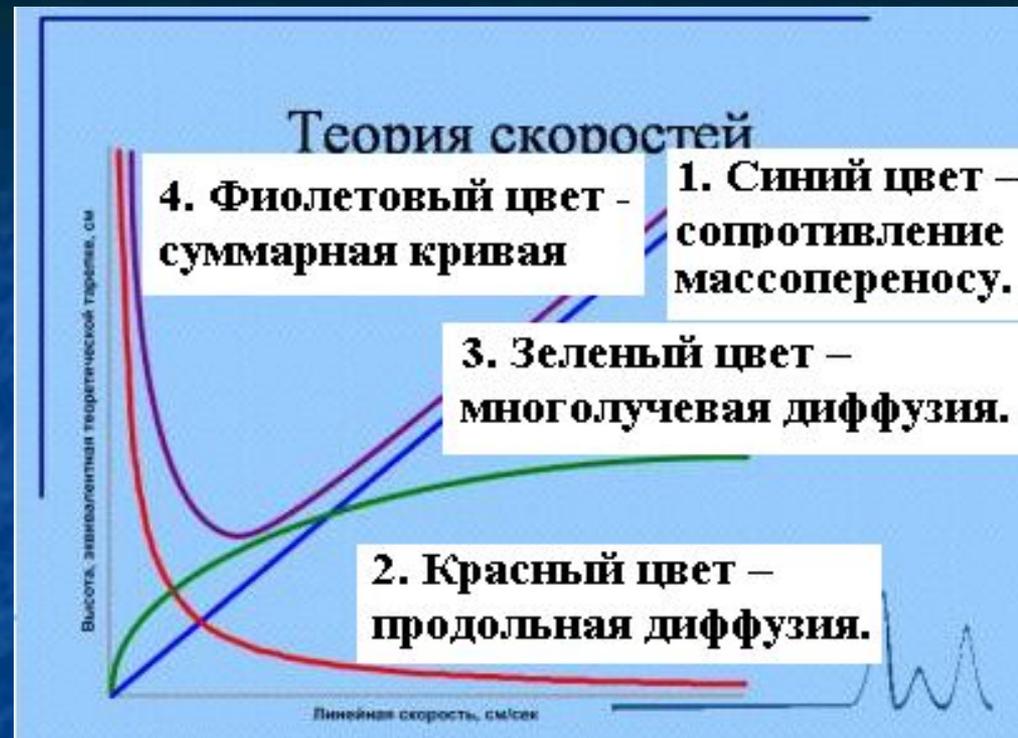


Рис. 3 Схема дифференциального ДПИ: а — с одним усилителем; б — с двумя усилителями или одним дифференциальным усилителем;  $i_1$  и  $i_2$  — ионизационные токи.



# Теория скоростей

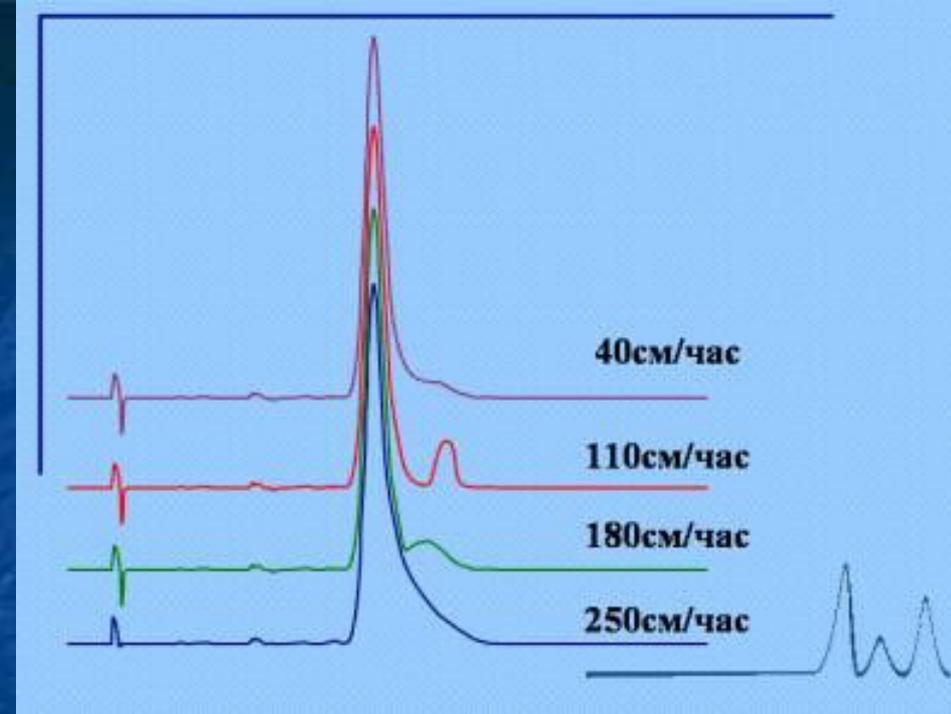
- - Многолучевое распространение потока и пристеночная диффузия.
- Продольная диффузия.
- Сопротивление массопереносу



- $H = A \cdot V + \frac{B}{V} + C$ ,  
где  $H$  - это ВЭТТ, см;  
 $A$  - вклад многолучевого распространения потока;  
 $B$  - вклад продольной диффузии;  
 $C$  - вклад сопротивления массопереносу;  
 $V$  - линейная скорость, см колонки/сек.

# Практические выводы:

- - чем выше скорость, тем выше вклад продольной диффузии. Очень высокие скорости приводят к размывам фронта и ухудшению разделительных способностей колонны. К тому же растет давление в системе.
- - чем ниже скорость, тем выше вклад пристеночной диффузии. Очень низкие скорости приводят к пристеночным размывам и также ухудшают разделение. К тому же падает производительность процесса хроматографии.



- **Практические выводы:**
- **нужно точно определить *оптимальную* скорость потока и вести процесс с такой скоростью.**

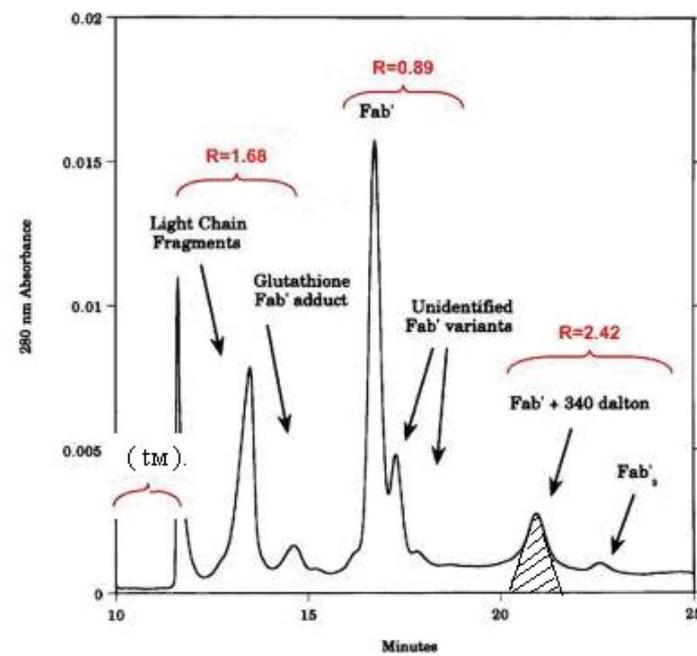
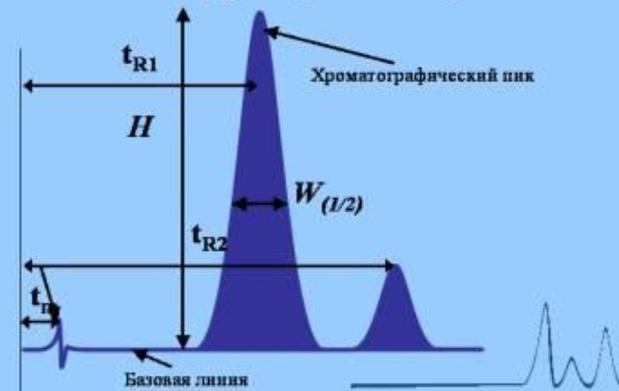
# Характеристики вещества, получаемые в хроматографическом методе

**Время удержания** (время выхода) — время, проходящее между моментом ввода анализируемой пробы в колонку, и моментом выхода вершины пика вещества из колонки.

**Объем удержания** — объем газа/жидкости-носителя, который проходит по хроматографической колонке с момента ввода анализируемой пробы в колонку до момента выхода вершины пика вещества из колонки.

**Площадь хроматографического пика** — параметр, характеризующий количество

Номенклатура хроматограммы



# Характеристики вещества, получаемые в хроматографическом методе

- - асимметрия пика ( $a=A/B$ ): характеристика качества упаковки (и не только) колонки, рассчитывается как отношение большего плеча пика к меньшему.

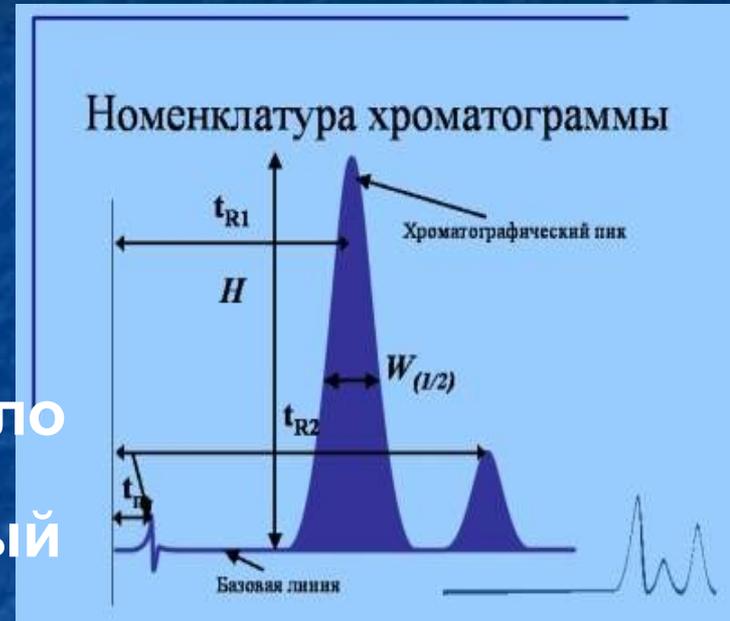


- **мертвый объем:** объем подвижной фазы между точкой ввода пробы и точкой ее обнаружения детектором ( $t_m$ ).

**Индекс удержания** – отношение времен удержания какого-то стандартного вещества (обычно для неполярных колонок какого-либо углеводорода известного строения) и определяемого вещества. Для одинаковых по химическому составу колонок является постоянной величиной.

# Характеристики хроматограммы

- - коэффициент распределения: отношение времени удержания (или объема удержания) к «мертвому» времени (или мертвому объему), т.е.  $k=(V_r)/(V_m)=(t_r)/(t_m)$ ;
- эффективность колонки, или число теоретических тарелок (N): рассчитываемая как приведенный квадрат отношения времени удержания к полуширине пика



$$N = 5,54 \left( t_R / W_{1/2} \right)^2$$

- Чем длиннее колонна, или чем меньше *размер частиц* сорбента, тем выше будет эффективность работы колонны, а, следовательно, и больше будет разделение между веществами.

# Типы хроматографирования по видам взаимодействия неподвижной фазы и образца:

- **Сорбционный** – взаимодействие активных центров сорбента с элюируемыми веществами.
- **Ионный** – взаимодействие заряда неподвижной фазы с противоположным зарядом подвижной фазы.
- **Распределительный** – «фильтрация» веществ между порами неподвижной фазы

# По способу элюирования:

- 1). **Элюентный:** вещества распределяются по активным центрам сорбента, десорбируясь в результате изменения элюентной активности подвижной фазы, что ослабляет сродство компонентов к активным центрам сорбента.
- 2). **Фронтальный.** Вещества распределяются по фронту элюции. В результате очищенным можно получить только тот компонент, который выходит во фронте, первым (т.е. тот, который обладает меньшим сродством к активным центрам сорбента).
- 3). **Вытеснительный.** Вещества вытесняются вытесняющим агентом или друг другом, что связано с конкурентным сродством к активным группам сорбента. Примеры: ИОХ (вытеснитель - соль), ВЭЖХ (вытеснитель - например, додецилсульфат натрия для обращенно-фазового режима), (вытеснитель - вещество, с большим сродством к сорбенту, чем образец).

# Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

## Распределительная хроматография

**Нормально-фазовая ВЭЖХ**  
подвижная фаза неполярна;  
неподвижная фаза полярна.

**Обращенно-фазовая ВЭЖХ**  
подвижная фаза полярна;  
неподвижная фаза неполярна

- **Нормально-фазовая:**

- 1. Неподвижная фаза с пропилнитрильной прививкой (нитрильной);
- 2. Неподвижная фаза с пропиламинной прививкой (аминной).

- **Обращенно-фазовая:**

- 1. Неподвижная фаза с алкильной прививкой;
- 2. Неподвижная фаза с алкилсилильной прививкой.

В случае **жидкостной хроматографии** подвижной средой является растворитель-носитель, в нашем случае – ацетонитрил, метанол, вода, смеси растворителей, неподвижной фазой в нашем случае является трубка-капилляр, в которую забит  $\text{SiO}_2$  или  $\text{Al}_2\text{O}_3$  с развитой поверхностью, на которую привиты кремнийсодержащие соединения, в зависимости от решаемых задач имеющие ту или иную химическую природу, например:

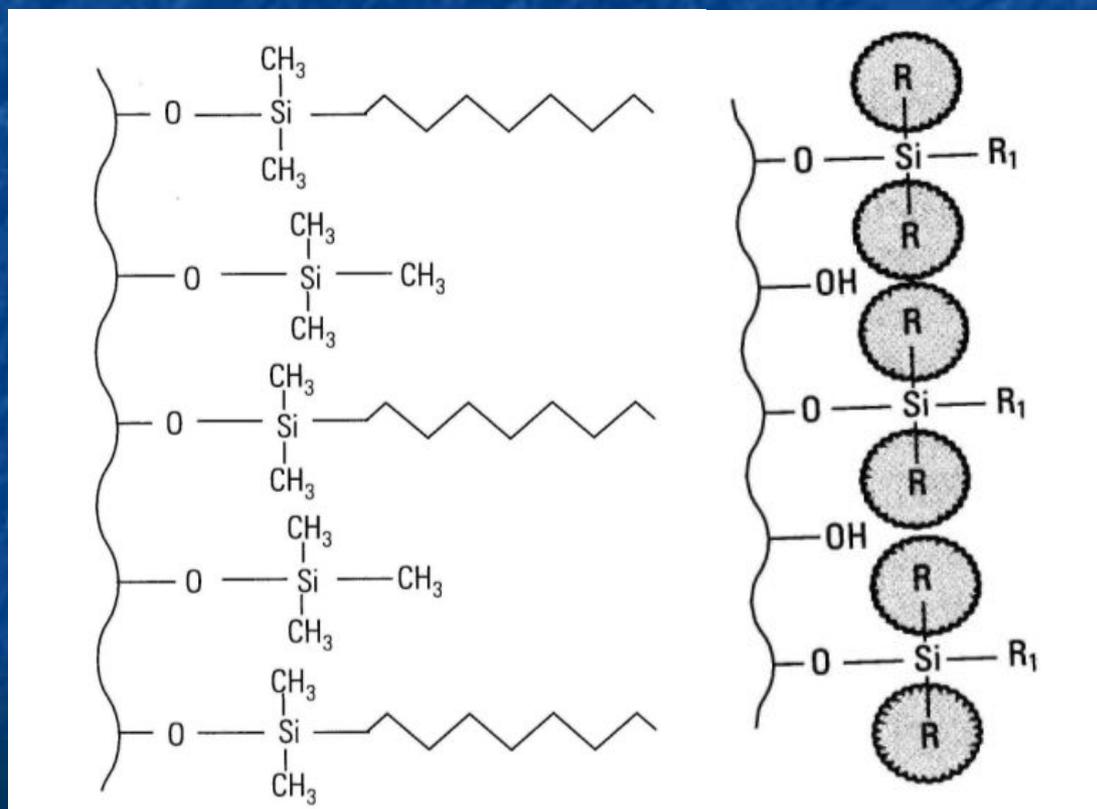
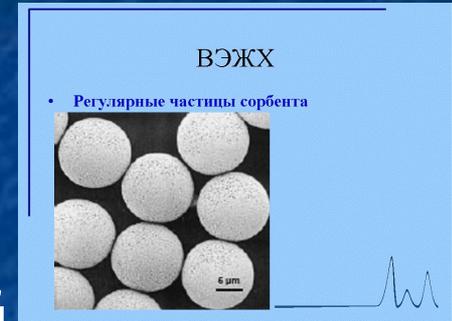


Рис. Неподвижные фазы для жидкостной хроматографии фирмы ZORBAX

# Основные характеристики матрицы:

- 1.Размер частиц (мкм);
- 2.Размер внутренних пор (Å, нм).
- Получение силикагеля для ВЭЖХ:
  - 1.Формование микросфер поликремневой кислоты.
  - 2.Сушка частиц силикагеля.
  - 3.Воздушное сепарирование.
- Частицы сорбента:
  - Регулярные (сферические): выше устойчивость к давлению, выше стоимость;
  - Несферические: ниже устойчивость к давлению.



Размер частиц

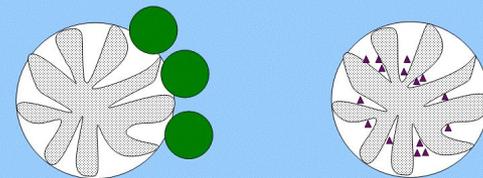
Меньше частицы >>> выше эффективность >>> выше давление (или ниже скорость элюции)

Длина колонны, мм	Эффективность, ч.т.т.		
	10 мкм	5 мкм	3 мкм
250	9 000	18 000	36 000
125	4 500	9 000	18 000
60	2 250	4 500	9 000
30	1 125	2 250	4 500

# Размер пор в ВЭЖХ

- Чем меньше размер пор, тем хуже их проницаемость для молекул элюируемых веществ. А следовательно, тем хуже сорбционная емкость сорбентов.
- Чем крупнее поры, тем, во-первых, меньше механическая устойчивость частиц сорбента, а во-вторых, тем меньше сорбционная поверхность, следовательно, хуже эффективность.

## Размер пор

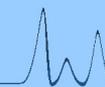
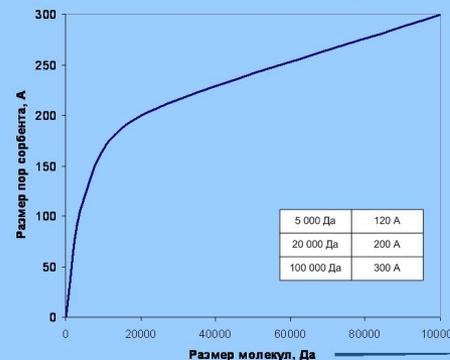


Меньше поры >>> хуже сорбция >>> меньше емкость сорбента

Больше поры >>> хуже диффузия >>> меньше скорость элюции



## Размер пор



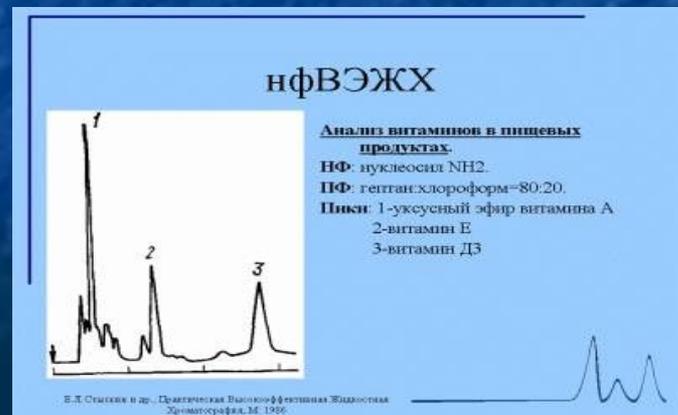
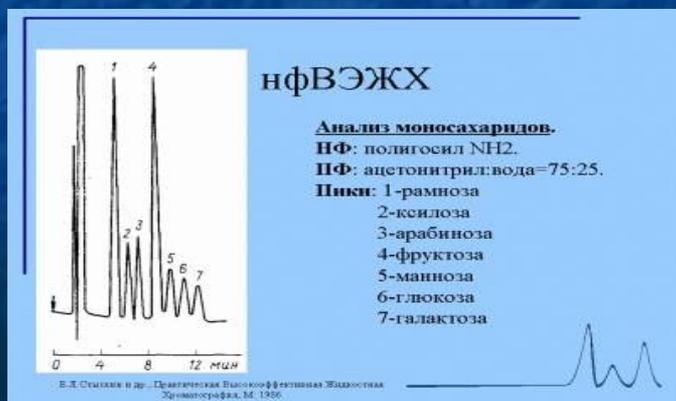
# НОРМАЛЬНО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ

- Неподвижная фаза более полярна, чем подвижная
- в составе элюента преобладает неполярный растворитель:
- Гексан:изопропанол=95:5 (для малополярных веществ)
- Хлороформ:метанол=95:5 (для среднеполярных веществ)
- Хлороформ:метанол=80:20 (для сильнополярных веществ)

## ВЭЖХ

- Методика прививки неподвижной фазы:

The diagram shows a silica gel surface with silanol groups (Si-OH) reacting with a chlorosilane reagent (R-Si-Cl) in the presence of a waterless solvent to form a siloxane bond (Si-O-Si-R). The resulting surface is covered with a layer of the stationary phase (R).



# ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ

- **Неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная**
  - в составе элюента почти всегда присутствует вода:
  - **ВСЕГДА** можно обеспечить полное растворение БАС в подвижной фазе
  - Почти всегда возможно использовать УФ-детекцию;
  - Почти все подвижные фазы взаимно смешиваются;
  - Можно использовать градиентное элюирование;
  - Можно быстро переуравновесить колонну;
  - Колонну можно регенерировать

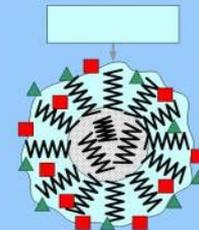
## Принцип офВЭЖХ

- Шаг 1. Уравновешивание колонны (рН, ионная сила, полярность)

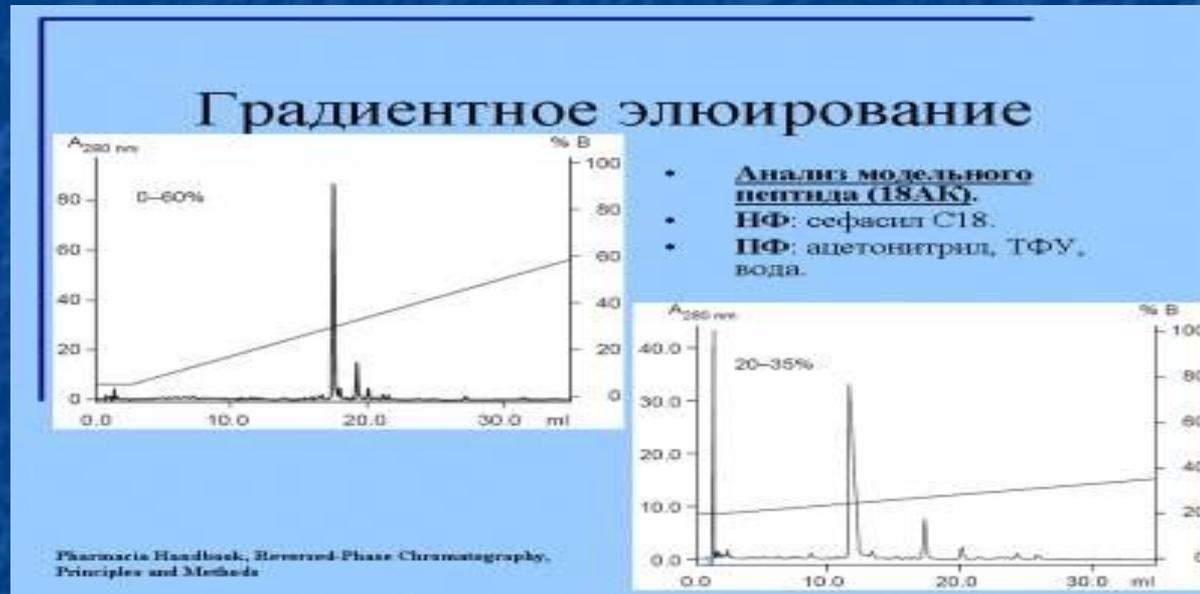


## Принцип офВЭЖХ

- Шаг 2. Нанесение образца и переуравновешивание



# Градиентное элюирование в обращенно-фазовой ВЭЖХ:



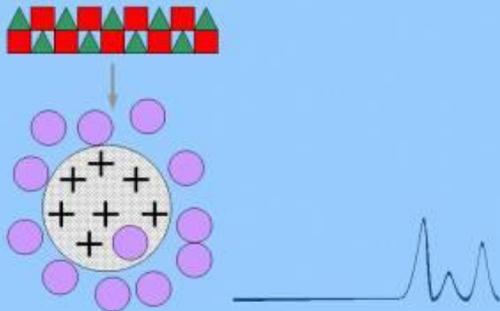
- Можно постепенно изменять концентрацию элюента в подвижной фазе, тем самым добиваясь постепенности десорбции компонентов с сорбента:

# Ионообменная хроматография

- Это взаимодействие зарядов молекул разделяемых веществ и противоположных зарядов компонентов, связанных ковалентно с хроматографической матрицей. Метод: вытеснительный.
- Существует два вида неподвижных фаз (сорбентов):
- - **анионообменник**, заряжен **ПОЛОЖИТЕЛЬНО**;
- - **катионообменник**, заряжен **ОТРИЦАТЕЛЬНО**

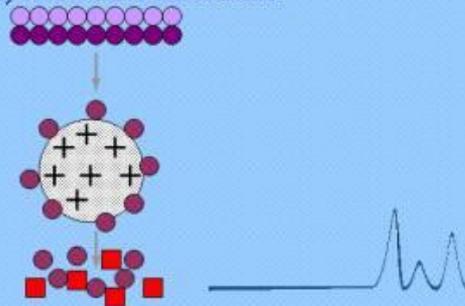
## Принцип обмена ионами

- Шаг 1. Уравновешивание колонны (рН, ионная сила)



## Принцип обмена ионами

- Шаг 4. Градиентное элюирование и вытеснение (десорбция) остальных компонентов



# Неподвижная фаза в ИОХ

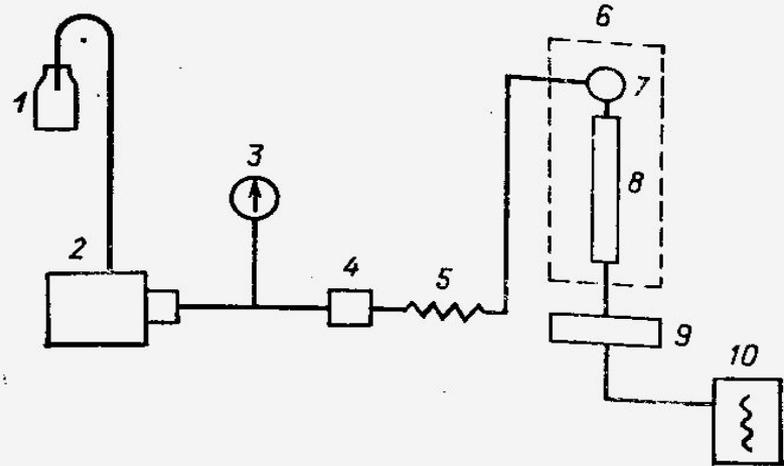
- НФ состоит из двух основных частей: матрица, на которую привит химически лиганд, несущий заряд.
- Матрицы бывают совершенно различной природы: неорганические соединения (например, силикагель) и органические (синтетические полимеры, такие как полиметакрилат и полистирол; а также полисахариды, которые находят самое что ни на есть широкое применение, например, сефароза).



# Хроматографическая система СОСТОИТ ИЗ:

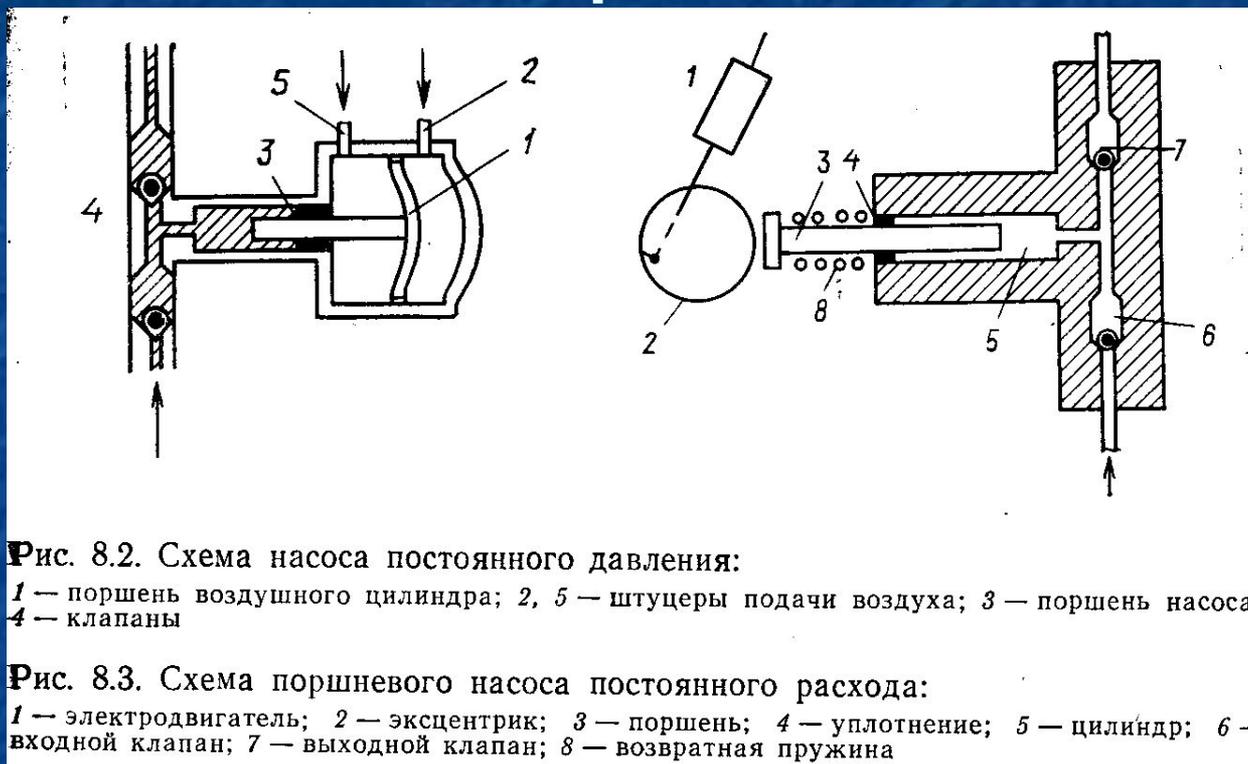
**Рис. 8.1. Принципиальная схема жидкостного хроматографа:**

1 — сосуд для подвижной фазы; 2 — насос;  
3 — манометр; 4 — фильтр; 5 — демпфер;  
6 — термостат; 7 — инжектор; 8 — колонка;  
9 — детектор; 10 — самописец



- Принципиальная схема жидкостного хроматографа:
- / — сосуд для подвижной фазы; 2 — насос; 3 — манометр; 4 — фильтр; 5 — демпфер; 6 — термостат; 7 — инжектор; 8 — колонка; 9 — детектор; 10 — самописец

# Насос и градиентный задатчик



Все насосы для ВЭЖХ делятся на две группы: постоянного расхода и постоянного давления

- для упаковки колонок, давление достигает 100 МПа.
- (1 мегапаскаль [МПа] = 10.2 технических атмосфер)



Рис. Капиллярные хроматографические колонки для жидкостной хроматографии, слева – аналитическая колонка диаметром 5 микрон с предколонкой, справа – аналитическая колонка диаметром 1.8 микрон

# Оборудование для ВЭЖХ



- Детекторы для ВЭЖХ

# Хроматограф «Милихром»

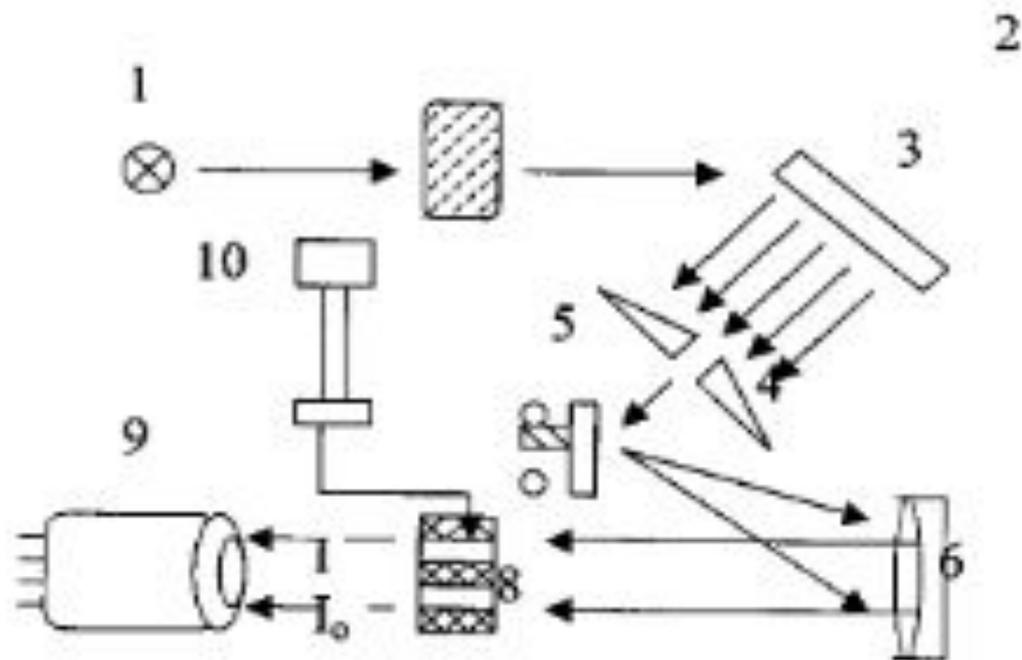
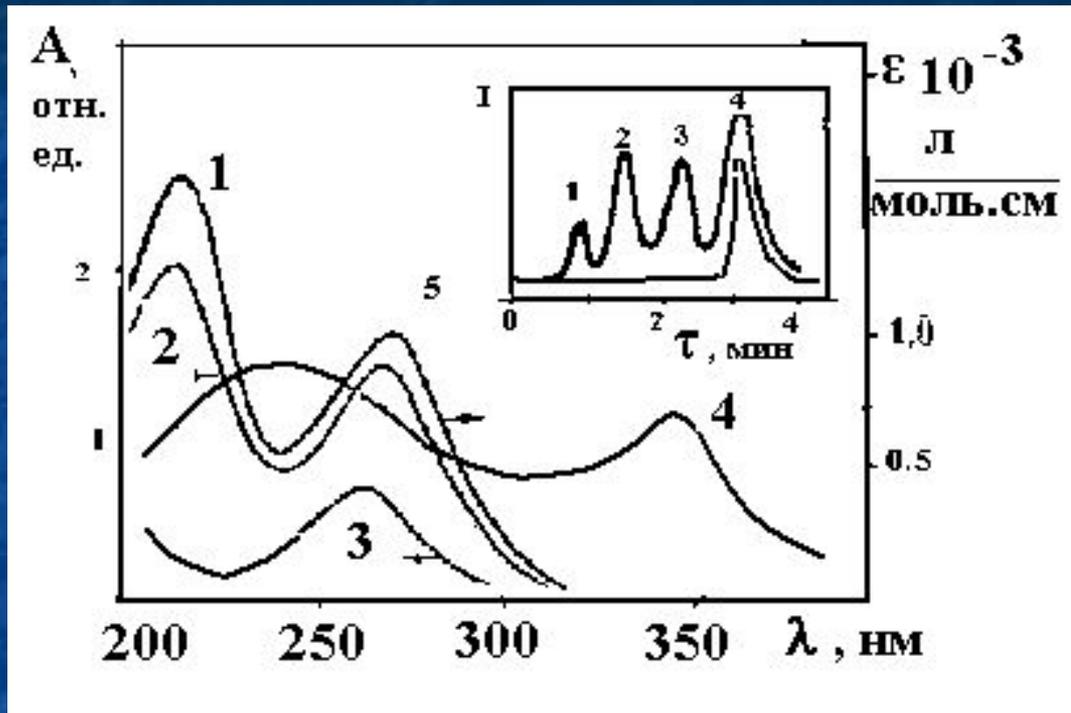


Рис. 5.3. Принципиальная схема спектрофотометрического детектора хроматографа "Милихром": 1 - лампа ДДС-30; 2 - оптическая система; 3 - управляемая дифракционная решетка; 4 - щель монохроматора, 5 - зеркало модулятора; 6 - вогнутое зеркало; 7 - рабочая кювета, 8 - сравнительная кювета; 9 - ФЭУ; 10 - хроматографическая колонка

# Хроматограммы облученного раствора лигнина при различных длинах волн



- Спектры оптического поглощения отдельных продуктов радиоллиза лигнина