

# ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

ТИПЫ ХРОМАТОГРАФИИ

**Хроматография** - процесс, благодаря которому становится возможным разделение компонентов в смеси - является одним из важнейших методов исследования для идентификации и количественного анализа веществ, находящихся в жидкой или гомогенной газовой фазе.

Принцип основан на концентрационном равновесии исследуемых веществ между двумя фазами: стационарной (неподвижной в колонке) и мобильной (подвижной фазой или элюентом), которая является транспортным механизмом в системе. Разница в миграции веществ через колонку приводит к их разделению.

Хроматография – динамический метод, связанный с многократным повторением сорбционных и десорбционных процессов, так как разделение происходит в потоке подвижной фазы.

## Основные концепции хроматографии

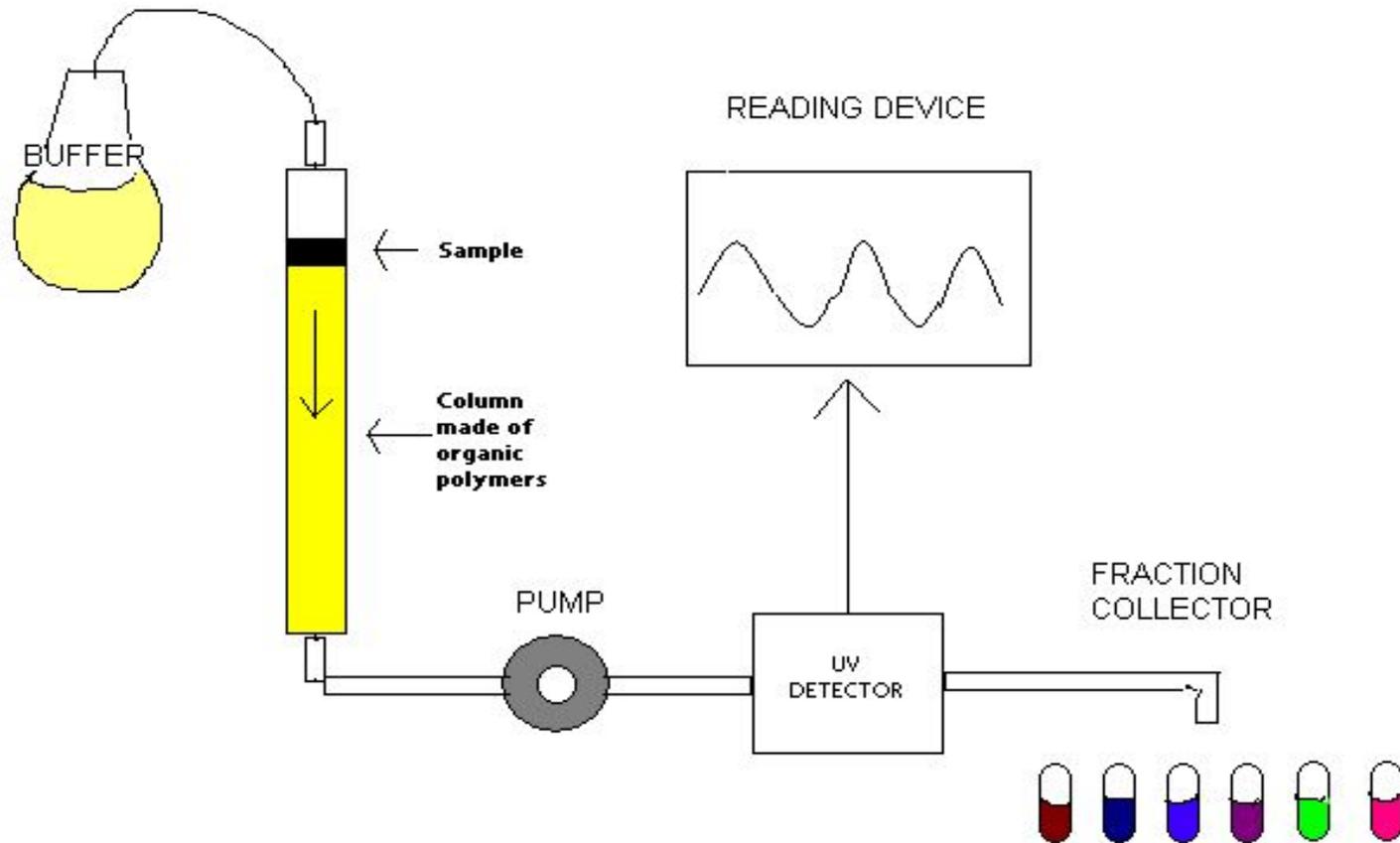
**Хроматография** - это физико-химический процесс, который относится к методам фракционирования, таким как дистилляция, кристаллизация или фракционная вытяжка. Первооткрывателем методов сепарации в современном понятии был русский физиолог и биохимик М.С. Цвет, который в начале XX в. и ввел понятия хроматография и хроматограмма.

В 1940 г. Было обнаружено, что применение оптики в самом конце колонки может определить время миграции компонентов без необходимого их сбора.

Позже разработка новых, чувствительных детекторов позволила увеличить чувствительность до нескольких нанограммов. Непрерывные сигналы детектора, передаваемые в виде хроматограммы, которая отражает состав вытекающих фаз со временем, распечатываются на принтере, отображаются на мониторе компьютера. В том случае если колонка снабжена надежными детекторами, хроматограмма хорошо воспроизводима, параметры сепарации четко контролируются. На графике хроматограмма получается как функция вариации электрических сигналов от времени, которая может быть сразу же распечатана или сохранена в цифровом виде.



# How does it work?



# КЛАССИФИКАЦИЯ ВИДОВ ХРОМАТОГРАФИИ

Методы хроматографии могут быть разделены на категории, различающихся по физической природе фаз, по используемому процессу или по физико-химическому свойству, которое является основой для **коэффициента распределения Нернста**, определяемого как

$$K = C_s / C_m$$

где  $C_s$ - концентрация растворенного вещества в стационарной фазе,  $C_m$ -концентрация растворенного вещества в мобильной фазе.

- Коэффициент распределения Нернста может быть вплоть до 100, если мобильной фазой является газ, а стационарной фазой – конденсат.

В основу классификации многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки:

- 1) агрегатное состояние фаз;
- 2) механизм взаимодействия сорбент – сорбат;
- 3) способы проведения хроматографического анализа;
- 4) аппаратное оформление (техника выполнения) процесса хроматографирования;
- 5) цель хроматографирования.

По агрегатному состоянию фаз хроматографию разделяют на **газовую** и **жидкостную**.

***Газовая хроматография*** включает газо-жидкостную и газо-твердофазную,

***Жидкостная хроматография*** включает жидкостно-жидкостную и жидкостно-твердофазную.

Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе – неподвижной.

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

**адсорбционная** основана на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом;

**распределительная** основана на различной растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (*газожидкостная хроматография*) или на различной растворимости веществ в подвижной и неподвижной фазах (*жидкостная хроматография*);

**ионообменная хроматография** – на разной способности веществ к ионному обмену;

**эксклюзионная хроматография (молекулярно-ситовая, гель-фильтрационная)**– на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ;

**Аффинная хроматография** – на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов (например, антитело и антиген, гормон и рецептор и др.).

Существует **осадочная хроматография**, основанная на образовании отличающихся по растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом,

**адсорбционно-комплексобразовательная**, основанная на образовании координационных соединений разной устойчивости в фазе или на поверхности сорбента, и др.

Следует помнить, что классификация по механизму взаимодействия весьма условна: ее используют в том случае, если известен доминирующий механизм; часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам.

По технике выполнения выделяют  
**колоночную хроматографию**, когда разделение  
проводится в специальных колонках, и

**Плоскостную хроматографию**, когда  
разделение проводится на специальной бумаге  
(бумажная хроматография) или в тонком слое  
сорбента (тонкослойная хроматография).

В колоночной хроматографии используют  
насадочные

или капиллярные колонки. Насадочную колонку  
заполняют сорбентом (насадкой), а внутреннюю  
стенку капиллярной колонки покрывают  
пленкой жидкости или пылью адсорбента.

В зависимости от цели проведения хроматографического процесса различают **аналитическую хроматографию** (качественный и количественный анализ); **препаративную хроматографию** (для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей);

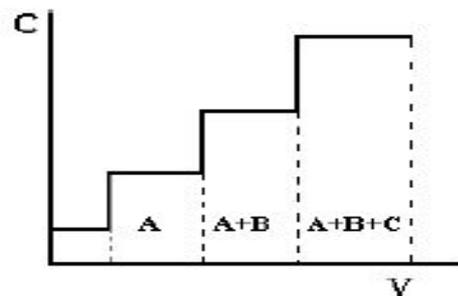
**промышленную** (производственную) хроматографию для автоматического управления процессом (при этом целевой продукт из колонки поступает в датчик). Хроматографию часто используют для исследовательских целей при изучении растворов, каталитических процессов, кинетики химических процессов и т.п.

Классификация по **способам проведения анализа** подразделяет хроматографию на три вида: 1) **фронтальный**, 2) **проявительный**, 3) **вытеснительный**.

**Фронтальный метод** наиболее прост по выполнению. Через хроматографическую колонку с сорбентом непрерывным потоком пропускают раствор или газовую смесь исследуемых веществ, сорбируемость которых увеличивается в ряду  $A < B < C$ . Соответственно этому компоненты располагаются в колонке. Однако они разделяются не полностью. В чистом виде может быть выделен лишь первый, наиболее слабо сорбирующийся компонент, который движется вдоль слоя сорбента впереди остальных. За зоной первого компонента следует в непосредственном контакте зона, содержащая первый и второй компоненты. Третья зона содержит смесь первого, второго и третьего компонентов. В некоторый момент времени сорбент насыщается, и наступает «проскок», т.е. из колонки начинают выходить компоненты в соответствии с их сорбируемостью. Если пропускать жидкость или газ, выходящие из колонки, через детектор концентраций и наносить показания его в течение всего опыта на график, то полученная выходная кривая будет иметь форму ступенчатой кривой.

Фронтальный метод не нашел широкого применения в анализе, т.к. не дает полного разделения компонентов анализируемой смеси. Однако этот метод весьма эффективен для препаративного выделения чистого вещества из технического образца при условии, что это вещество удерживается в колонке слабее всех других компонентов объекта анализа.

Типичные примеры применения фронтального анализа: очистка и умягчение воды ионообменными материалами; очистка воздуха активированными углями от отравляющих веществ в противогазах и вентиляционных фильтрах химических предприятий; концентрирование ценных веществ из сточных промышленных вод металлургических предприятий; очистка лекарственных препаратов и пищевых продуктов с помощью ионообменников и т.д.

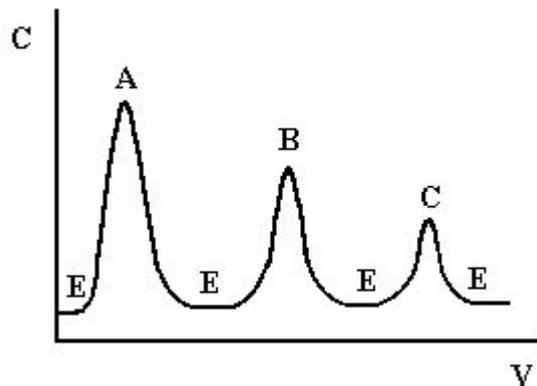


*Рис. 1.1. Выходная кривая фронтального анализа*

*А, В, С — разделяемые вещества*

**Проявительный (элюентный) метод** выгодно отличается от фронтального тем, что он позволяет полностью разделить многокомпонентную смесь. Хроматографическую колонку промывают растворителем или газом-носителем (элюентом), обладающим меньшей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. Затем в колонку вводят исследуемую смесь в виде порции раствора или газа, и непрерывно продолжают пропускать элюент. При этом разделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями в соответствии с их сорбируемостью. На выходе из колонки детектор фиксирует непрерывно концентрацию компонентов, а связанный с ним регистрирующий прибор записывает выходную кривую в виде ряда пиков, число которых

Проявительный метод анализа получил широкое применение как в жидкостной, так и в газовой хроматографии. Это объясняется тем, что при правильном выборе условий разделения компоненты смеси выходят из колонки в чистом виде, и их можно выделить для исследования другими методами анализа. Кроме того, качественный и количественный состав анализируемой смеси можно определить простым измерением объемов удерживания и площадей пиков соответствующих компонентов на полученной хроматограмме.



**Вытеснительный метод** отличается от фронтального и проявительного тем, что после введения пробы исследуемой смеси колонку промывают растворителем или газом-носителем, к которым добавляют раствор вещества (вытеснитель), обладающего 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 вытесняемая смесь перемещается впереди фронта вытеснителя и скорость движения вещества равна скорости движения вытеснителя. Разделяемые вещества и 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.

Невозможность получения на выходе из колонки достаточно чистых компонентов разделяемой смеси, а также длительность процесса

разделения затрудняют использование этого метода в аналитических це-

лях. Однако для препаративных целей метод не потерял значения, так

как возможность применения таких высокоактивных и доступных

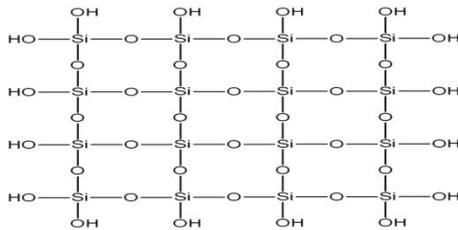
# ЖИДКО-ТВЕРДАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (LSC-Liquid-solid chromatography)

Мобильной фазой является жидкость, а стационарной - твердое вещество. Этот тип хроматографии может быть разделен на виды, в зависимости от удерживающего свойства:

- адсорбционная хроматография,
- распределительная хроматография,
- ионообменная хроматография

**Адсорбционная хроматография.** Этот метод хроматографии использовался еще в XIX в. как препаративный метод сепарации. Стационарная фаза теперь, конечно же, не та которую использовал Цвет - сахар, сода.

В этом виде хроматографии для разделения органических веществ используют тонкий слой силикагеля или оксида алюминия. Растворенные вещества взаимодействуют со стационарной фазой в результате как физической, так и химической адсорбции. Физико-химический параметр, который регулирует адсорбцию, называется коэффициентом адсорбции.

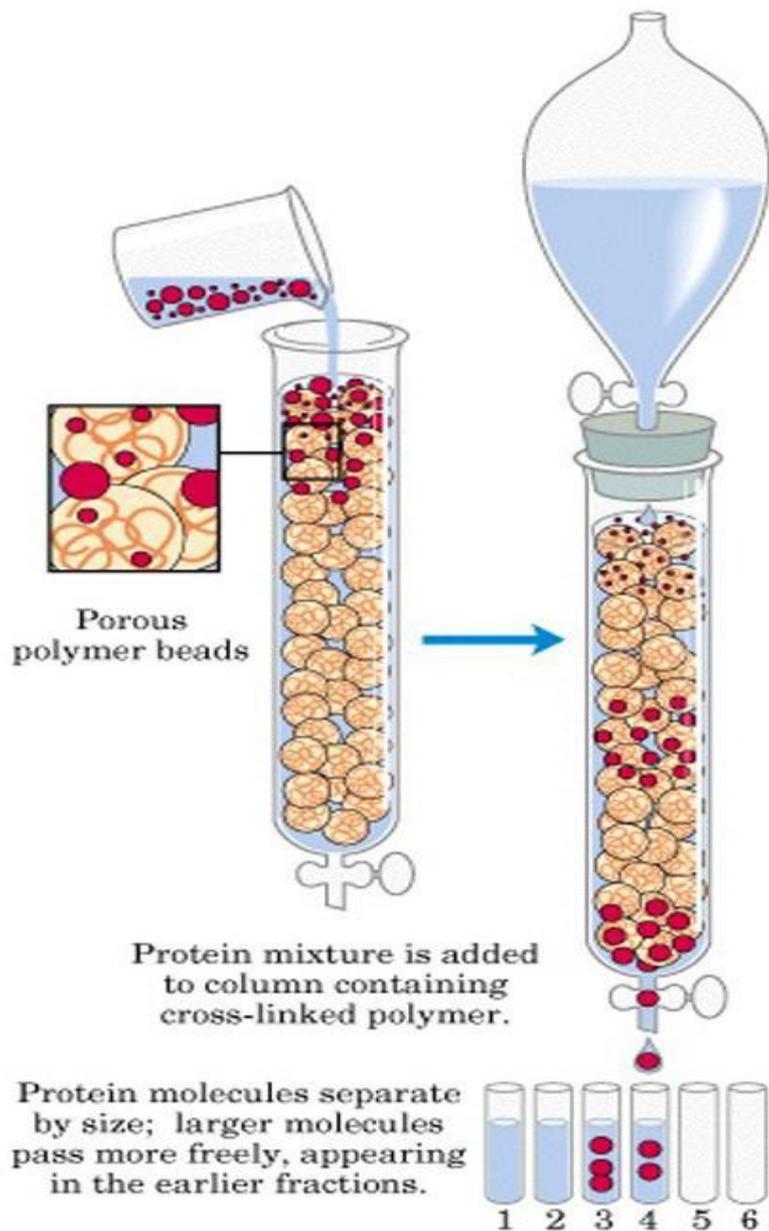


## **Распределительная хроматография.**

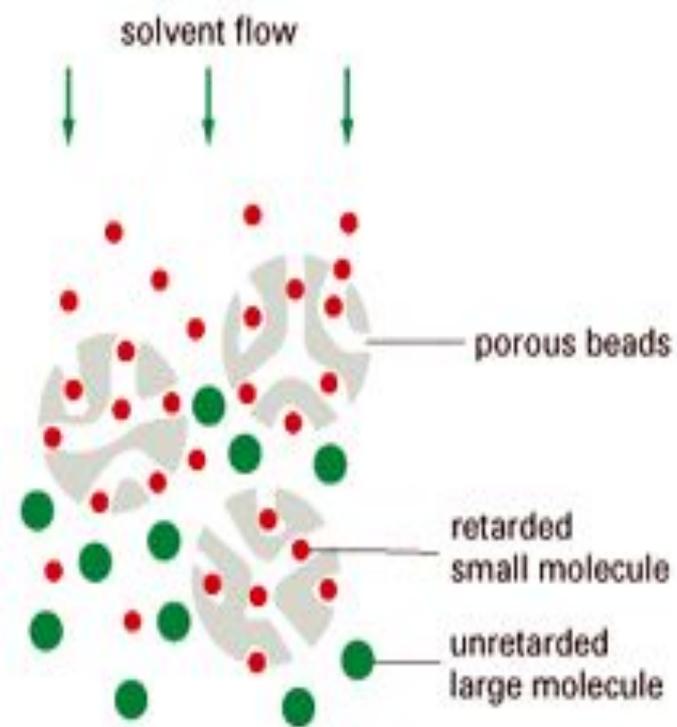
Неподвижной фазой является материал, покрытый порами, размер которых выбран таким образом, чтобы разделять, в зависимости от размера молекул, растворенные в элюенте исследуемые вещества. Данный процесс абсорбции может быть рассмотрен как селективное пропускание молекул сквозь молекулярное сито, называемое *гель-фильтрацией* или *гель-проникновением*, в зависимости от природы подвижной фазы – водного или органического растворов, соответственно. Коэффициент распределения Нернста в этом случае называется коэффициентом диффузии.

# Molecular Exclusion (Gel Filtration)

- Used to
  - Separate proteins based on size
  - Desalting
  - Estimation of molecular weight
- Advantages
  - Gentle technique
- Disadvantages-
  - Dilution of proteins
  - Cannot apply large volume of sample



(b)



## Ионная (ионообменная) хроматография.

В основе ионообменной хроматографии лежит обратимый стехио-

метрический обмен ионов, содержащихся в хроматографируемом

растворе, на ионы веществ, называемых ионитами или ионообменниками. Иониты могут быть органические и неорганические, природные и синтетические. По знаку обменивающихся ионов различают катиониты (для обмена катионов) и аниониты (для обмена анионов). К природным ионитам относятся алюмосиликаты, некоторые сорта

каменных углей, мягкие и твердые угли.

Мобильной фазой является буферный раствор, а стационарной фазой - полимерные сферические частички диаметром около микрометра (синтетические иониты). Поверхность этих частичек модифицирована химически, чтобы образовывать ионные центры. Эти фазы способствуют обмену ионов со сходными зарядами из мобильной фазы с ионами образца. Коэффициент ионного распределения управляет процессом сепарации.

В аналитической практике широко используют синтетические иониты. Ионообменники получают реакциями поликонденсации либо полимеризации, линейные цепи полимеров разветвлены и связаны друг с другом «мостиками», например, молекулами дивинилбензола;

в состав ионитов входят различные функциональные (ионогенные) группы, которые и определяют наиболее характерные свойства ионитов.

Иониты нерастворимы в воде, кислотах, щелочах и во многих органических растворителях, но способны набухать в воде за счет гидрофильных ионогенных групп.

Органические **катиониты** содержат кислотные функциональные группы:

- $\text{SO}_3^-$
- $\text{PO}_3^-$
- $\text{COO}^-$ ,
- $\text{OH}^-$ .

Органические **аниониты** содержат группы основного характера:

- $\text{NH}_2^+$
- $\text{NH}^+$ ,
- $\text{N}^+$ ,
- $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$

Катиониты представляют собой полиэлектролиты, диссоциирующие с образованием высокомолекулярного аниона (например,  $\text{RSO}_3^-$ ) и подвиж-

ного катиона (например,  $\text{H}^+$ - иона), легко обменивающегося на другие катионы.

Аниониты диссоциируют на высокомолекулярный катион (например,  $\text{RNH}^+$ ) и подвижный анион (например,  $\text{OH}^-$ ), способный обмениваться на другие анионы ( $\text{R}$  – высокомолекулярный углеводородный радикал ионообменной смолы).

Реакции ионного обмена можно представить схематично следующим образом:



(катионный обмен)

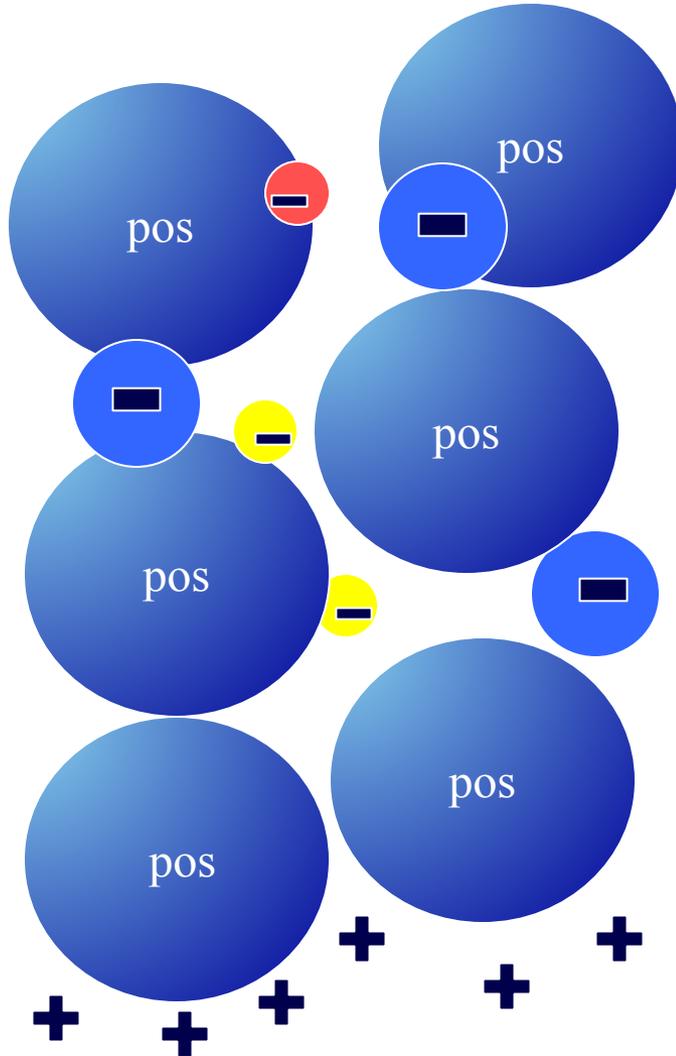


(анионный обмен)

Реакции ионного обмена обратимы и в первом приближении подчиняются закону действующих масс.

# Ion Exchange Chromatography

- Separates proteins based on charge
- Advantages
  - Concentration of fractions
  - Can load large volumes of sample
- Disadvantages
  - Don't know the effect of salt on protein



positively charged.

- Only the pos charged proteins run through the pos charged column. The others “stick” to the column.

Важной характеристикой ионита является его обменная емкость. **Обменная емкость (ОЕ)** – количественная мера способности ионита поглощать противоионы.

Численно обменную емкость выражают количеством поглощенных миллимоль эквивалентов ионов на 1г сухой смолы в H<sup>+</sup>-форме для катионита и Cl<sup>-</sup>-форме для анионита. Определение емкости можно отнести и к единице объема набухшего слоя ионита.

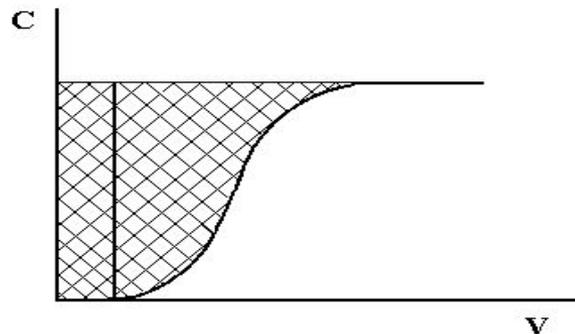
Обменная емкость, полученная в статических условиях,

когда навеску ионита помещают в раствор насыщающего иона определенной концентрации и выдерживают при встряхивании до полного насыщения ионита, называется **статической (СОЕ)**

Величина СОЕ отличается от величины обменной емкости, полученной в динамических условиях при пропускании насыщающего раствора через колонку с ионитом.

**Динамическая обменная емкость** характеризуется двумя показателями: динамической обменной емкостью до проскока (ДОЕ) и полной динамической емкостью (ПДОЕ). **ДОЕ** представляет собой емкость ионита, определяемую по появлению данного иона в вытекающем из колонки растворе. **ПДОЕ** определяется по полному прекращению извлечения данного иона из раствора.

ДОЕ определяется площадью прямоугольника, основанием которого является объем раствора, вытекающего из колонки до наступления проскока иона, а высотой – исходная концентрация обмениваемого иона. ПДОЕ выражается площадью над выходной хроматографической кривой. ДОЕ всегда меньше, чем полная динамическая обменная емкость, и зависит от ряда факторов: от типа ионита, состава раствора, размера зерен ионита и скорости протекания раствора.



Выходная хроматографическая кривая

# Классификация ионитов

От вида функциональных групп, входящих в состав ионита, зависит, насколько сильно выражены кислотные или основные его свойства.

В зависимости от этого различают четыре группы ионитов:

- Сильнокислотные катиониты,
- Слабокислотные катиониты,
- Сильноосновные (высокоосновные) аниониты,
- Слабоосновные (низкоосновные) аниониты

**1. Сильнокислотные катиониты** имеют в качестве функциональных групп сульфогруппу  $-SO_3-$  и фосфорную группу  $-PO_3-$ . Они используются в кислых, нейтральных и щелочных средах.

К сульфокислотным катионитам относятся полистирольного типа катиониты марок КУ-2, КУ-23, СДВ, СБС).

К фосфорнокислым относятся катиониты марок КФ-2, КФ-11.

Катиониты полистирольного типа выпускаются в виде сферических гранул и имеют либо янтарную, либо светло-желтую окраску. Катиониты фенольного типа, например, КУ-1, окрашены в черный цвет, их частицы имеют неправильную форму. Такие катиониты бифункциональны, т.е. наряду с группой  $-SO_3-$  имеют в своем составе группу  $-OH-$ .

Преимущество полистирольных катионитов – их монофункциональность, высокая обменная емкость, высокая термическая устойчивость.

2. **Слабокислотные катиониты** имеют в качестве функциональных групп карбоксильные группы – COO-, – OH-. Это катиониты марок КБ-1, КБ-4, КФУ-1. Катиониты с карбоксильными группами окрашены в белый или светло-зеленый цвет. Важным свойством подобных катионитов является их высокое сродство к иону водорода. Даже небольшого количества разбавленной соляной кислоты достаточно для полной регенерации катионита. Слабокислотные катиониты работают в щелочных и нейтральных средах.

3. **Сильноосновные (высокоосновные) аниониты** имеют в качестве

функциональных групп четвертичные аммониевые группы. Это аниониты марок АВ-16, АВ-17, АВ-18, АВ-20. Они могут применяться для хроматографирования в кислых, щелочных и нейтральных средах. Сильноосновные аниониты имеют желтую или светло-желтую окраску. Они часто используются для разделения большинства ионов металлов.

Ион щелочных, щелочноземельных, редкоземельных элементов, алюминия, никеля, меди и др. **не** сорбируются анионитами при любой концентрации соляной кислоты. Остальные ионы металлов в пределах концентрации HCl от 0,1 до 12 моль/л сорбируются анионитами в различной степени, т.к. образуют анионные хлоркомплексы, имеющие сильно отличающиеся

4. Слабоосновные (низкоосновные) аниониты в качестве функциональных групп имеют аминогруппы разной степени замещения: – NH<sub>2</sub>, NH<sup>+</sup>, N<sup>+</sup>. Это аниониты марок АН-2Ф, АН-1, АН-23 и др. Они работают в кислых и нейтральных средах. Анионит ЭДЭ-10П содержит несколько активных аминогрупп вторичного, третичного и четвертичного аммониевых оснований. Поэтому он обладает и слабоосновными, и в некоторой степени сильноосновными свойствами.

# Практическое применение ионообменной хроматографии

Методы ионообменной хроматографии используют преимущественно для разделения ионов. Простейшая методика разделения заключается в поглощении смеси компонентов и последовательном элюировании каждого компонента подходящим растворителем.

- Иониты используют также в водоподготовке (умягчение воды, опреснение морской воды);
- в гидрометаллургии и гальванотехнике (селективное извлечение

ценных металлов из производственных растворов и сточных вод;

- в пищевой и гидролизной промышленности (очистка сахаросодержащих растворов, осветление плодово-ягодных соков и т.д.);
- в медицине и фармацевтической промышленности (очистка лекарственных препаратов)

# ЖИДКО-ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (LLC, Liquid-liquid chromatography)

Стационарной фазой является жидкость, которая неподвижна в колонке. Поэтому очень важно уметь различать инертную механическую роль жидкости и ее селективную стационарную роль. Сделать жидкость неподвижной при помощи заполнения ею пористого материала самый простой метод, однако его не используют, т.к. существует риск потери стационарной фазы. Однако этот метод может быть использован, когда мобильной фазой является газ.

Чтобы сделать стационарную фазу неподвижной, ее фиксируют на

Механическую подложку, используя ковалентные связи. Несмотря на химическую связь, стационарная фаза «ведет себя» как жидкость, и процесс сепарации основан на разделении исследуемого вещества на межфазном пространстве. Основным параметром процесса является коэффициент отделения.

Жидкостной хроматограф – более сложный прибор по сравнению с газовым. Это связано с тем, что система подачи элюента включает ряд

дополнительных узлов: систему дегазации, градиентное устройство, на-

сосы и измерители давления.

Градиентное устройство должно обеспечить отбор элюентов из двух-трех емкостей в смеситель, затем в колонку. Насосы должны иметь

постоянную скорость потока от 0.1 до 10 мл/мин при давлении 400 атм.

Кроме того, необходимо тщательное удаление газа из всех используе-

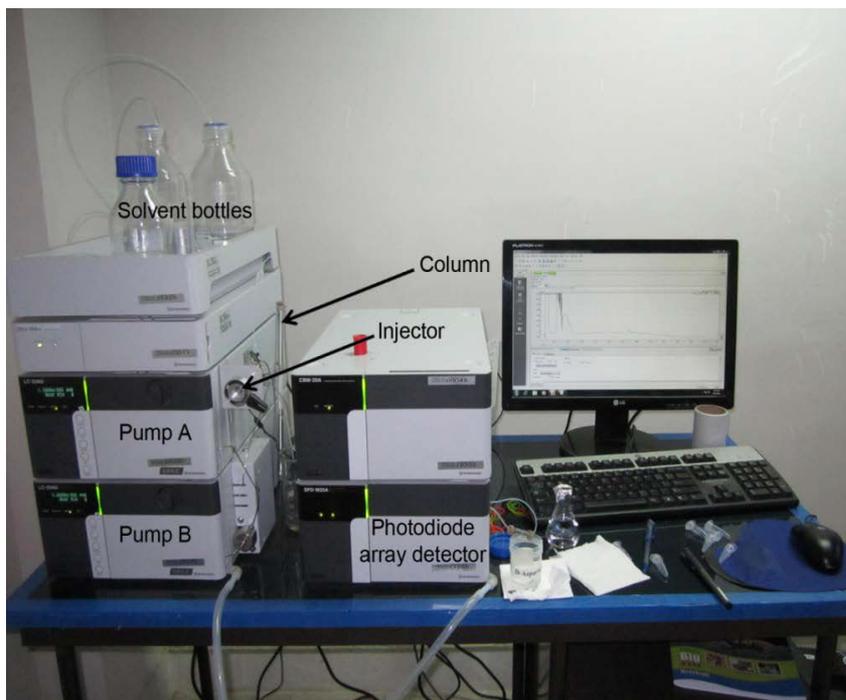
мых растворителей, так как появление пузырьков газа в детекторе недо-

пустимо. Проба вводится с помощью петлевых дозаторов или специаль-

ных микрошприцов через прокладку из специальных ненабухающих по-

лимерных материалов.

В ВЭЖХ обычно используют прямые колонки длиной 10, 15, 25 см



An HPLC instrument

# ПЛОСКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

К плоскостным видам хроматографии относят:

- бумажную (БХ) и
- тонкослойную (ТСХ).

Эти два вида **жидкостной** хроматографии просты по технике выполнения, экспрессны, не требуют дорогостоящего оборудования.

Разделение этими методами может быть выполнено с использованием хроматографических систем жидкость–твердый сорбент и жидкость–жидкость–твердый сорбент, поэтому выделяют

- Адсорбционную плоскостную хроматографию,
- Распределительную плоскостную хроматографию,
- обращенно-фазовую плоскостную хроматографию и
- ионообменную плоскостную хроматографию.

Метод тонкослойной хроматографии был разработан Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер еще в 1938 г. В методе ТСХ неподвижная твердая фаза (силикагель, оксид алюминия, порошок целлюлозы) тонким слоем наносится на стеклянную, пластмассовую или металлическую пластинку. В качестве подвижной фазы используют различные растворители или их смеси, органические и неорганические кислоты. Выбор растворителя зависит от природы сорбента и свойств анализируемых соединений. Например, при хроматографировании аминокислот используют смесь n-бутанола с уксусной кислотой и водой, при анализе неорганических ионов – водные буферные растворы, создающие постоянное значение pH.

В ТСХ чаще используют **восходящий способ получения** хроматограммы. Раствор образца наносят микропипеткой на не-  
большом расстоянии от края пластинки на стартовую линию, и край  
пластинки погружают в растворитель, который действует как подвиж-  
ная фаза жидкостной адсорбционной хроматографии. Под действием капиллярных сил растворитель поднимается вверх по пластинке и с разной скоростью переносит за собой компоненты смеси, что приводит к их пространственному разделению. Чтобы растворитель не испарялся с поверхности сорбента, пластинка на время разделения должна быть помещена в герметически закрытую прозрачную камеру. Разделяемые компоненты на пластинке образуют отдельные зоны (пятна). Хроматографирование продолжают до тех пор, пока растворитель не пройдет от линии старта около 10 см до так называемой линии фронта. После этого пластинку вынимают из хроматографической камеры, подсушивают на воздухе и определяют положение пятен.

## ***В нисходящей хроматографии***

растворитель передвигается по слою вниз под действием и капиллярных, и гравитационных сил. Горизонтальная хроматография выполняется в виде круговой и со свободным испарением растворителя. В круговой хроматографии в центр горизонтально установленной пластинки вносят каплю анализируемой смеси и непрерывно подают растворитель, который под действием капиллярных сил движется в радиальном направлении от центра. Компоненты смеси располагаются в слое в виде концентрических колец.

Сорбционные свойства системы в ТСХ характеризуются подвижностью  $R_f$  – относительной скоростью перемещения компонентов в тонком слое. Значения  $R_f$  рассчитываются из экспериментальных данных

$$R_f = l_i / L$$

где  $l_i$  – расстояние от стартовой линии до центра пятна,  $L$  – расстояние, пройденное растворителем от стартовой линии до границы фронта растворителя.

$R_f$  характеризует положение пятна на хроматограмме. Это константа для данного вещества на данном сорбенте в данной системе растворителей. На величину  $R_f$  влияют качество и активность сорбента, его влажность, толщина слоя, качество и природа растворителя, техника эксперимента (способ нанесения пробы, способ детектирования) и другие факторы.

## Качественный анализ.

Проще всего идентификация вещества может быть сделана, если пятно определяемого вещества имеет характерную окраску.

Невидимые хроматограммы проявляют соответствующими реагентами, как правило, групповыми. По характерной окраске образующихся цветных зон судят о составе анализируемой пробы. При обработке пластинки, например, парами иода четко проявляются неопредель-

ные соединения; при опрыскивании пластинки тиоцианатом кобальта

амины образуют голубые пятна на розово-белом фоне. В физических

методах проявления используется способность некоторых веществ флу-

оресцировать под действием УФ-излучения.

Самым надежным способом является метод свидетелей (стандарт-

ных веществ). Стандартное вещество в том же растворителе наносится

на стартовую линию рядом с анализируемой пробой и, таким образом,

хроматографируется в тех же условиях.

Таблица 1.1

*Подвижные фазы, проявители, величины  $R_f$  некоторых катионов при разделении на микрокристаллической целлюлозе методом ТСХ*

Катион	Подвижная фаза, %	Проявитель	$R_f$
Hg(I)	н-бутанол-вода (85:15); рН 3,0 (CH <sub>3</sub> COOH)	Водный раствор K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	0,13
Ag(I)			0,11
Pb(II)			0,05
Zn(II)	Этанол-5 М HCl(90:10)	Дитизон	0,93
Fe(III)		Самонидентификация	0,80
Co(II)		1-Нитрозо-2-нафтол	0,33
Ni(II)		Диметилглиоксим	0,33
Ca(II)	Изопропанол-вода- 1 М HCl (40:20:20)	Ализарин	0,73
Sr(II)		Родизонат калия	0,66
Ba(II)		Родизонат калия	0,55

Количественные определения в ТСХ могут быть сделаны непосредственно на пластинке, в этом случае каким-либо способом измеряют площадь пятна и по заранее построенному градуировочному графику находят количество вещества. Применяется также прямое спектрофотометрирование пластинки по спектрам отражения и по спектрам поглощения (фотоденситометрия), для количественных расчетов предварительно строят градуировочный график, используя оптическую плотность в центре пятна. Наиболее точным считается метод, когда анализируемое вещество удаляют с пластинки механическим путем или вымывают подходящим растворителем после вырезания зоны, а затем анализируют спектрофотометрическим, флуориметрическим, атомно-абсорбционным методами.

Метод ТСХ прост по методике выполнения и аппаратуре, экспрес

# •Бумажная хроматография (Бх)

Метод бумажной хроматографии, был впервые предложен в 1941 г.

Мартином и Синджем. Для разделения водорастворимых веществ, например, неорганиче-

ских ионов, в качестве подвижной фазы обычно берут органический растворитель, а в качестве неподвижной – воду (бумагу заранее смачивают водой). Для разделения компонентов, хорошо растворимых в органических растворителях, гидрофильную бумагу превращают в гидрофобную, пропитывая ее растворами органических веществ (парафина, растительного масла и др.), а в качестве подвижной фазы используют воду, водный раствор какой-либо кислоты или щелочи, буферный раствор.

Растворители подвижной и неподвижной фаз не должны смешиваться, состав растворителя в процессе хроматографирования не должен изменяться, растворители должны легко удаляться с бумаги. Индивидуальные растворители используются достаточно редко. Чаще для этой цели применяют смеси веществ, например, бутилового или амилового спирта с метиловым или этиловым, смеси бутилового спирта с уксусной кислотой, аммиаком и др.

По технике выполнения различают следующие виды бумажной хроматографии:

одномерную,  
двумерную,  
круговую и  
электрофоретическую.

Для получения двумерных хроматограмм хроматографирование проводят дважды: после обработки пробы одним растворителем хроматограмму поворачивают на  $90^\circ$  и хроматографируют вторично уже другим растворителем. Такая методика позволяет проводить более тонкие разделения компонентов смеси. Специфическим приемом является сочетание БХ и электрофореза. Для этого к влажному листу хроматографической бумаги прикладывают постоянное электрическое напряжение.

Дополнительное воздействие электрического поля приводит к более четкому разделению, особенно для ионов с разными зарядами.

Электрофорез можно проводить одновременно с хроматографированием, а также до или после хроматографирования.

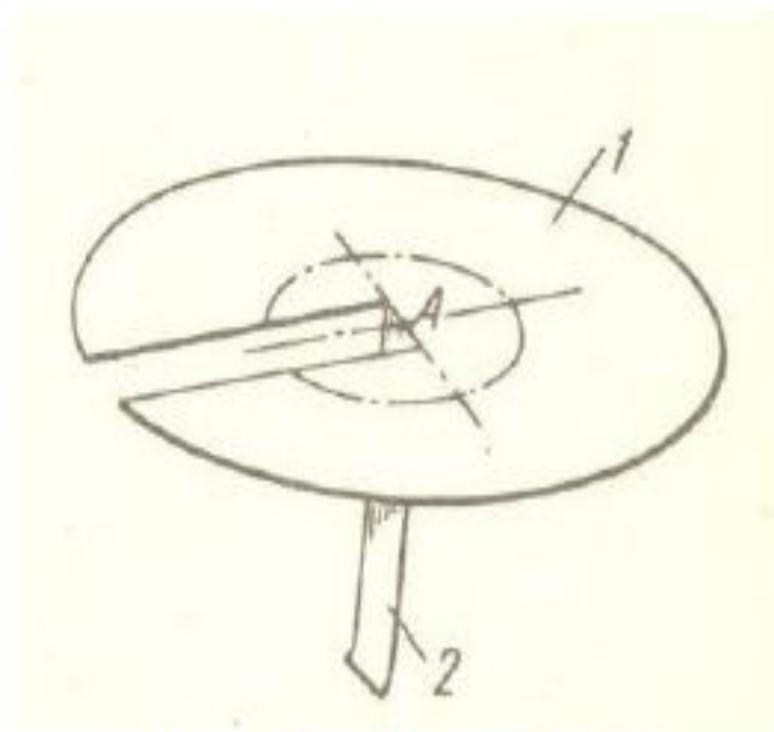


Рис.2.2. Круговая хроматограмма

1 – круглый фильтр; 2 – «фитиль», погружаемый в растворитель; А – место нанесения анализируемого раствора

Качественный состав пробы в методе бумажной распределительной хроматографии так же, как и в ТСХ, может быть установлен или по специфической окраске отдельных пятен на хроматограмме, или по численному значению  $R_f$  каждого компонента. Количественные определения в БХ выполняются по хроматографическим характеристикам (по площади пятна на хроматограмме и интенсивности его окраски) или после вымывания подходящим физико-химическим методом.

# ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

- **Газо-жидкостная хроматография** (GLC, Gas-liquid chromatography или GPC – Gas phase chromatography)

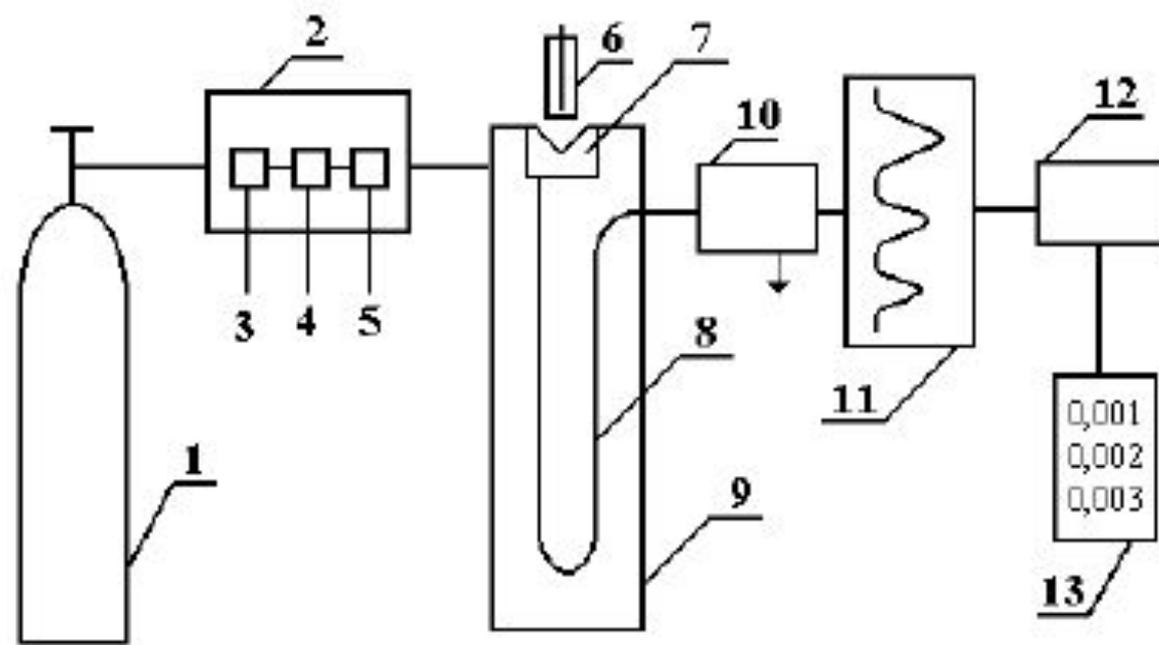
Элюентом в этом виде хроматографии, является газ, а неподвижной фазой - жидкость. Жидкость фиксируется на подложке, которой в случае колоночной хроматографии является внутренняя часть трубки или капилляра.

- **Газо-твердая хроматография** (GSC, Gas-solid chromatography) Стационарной фазой является твердое вещество (например, графит, силикагель, цеолит, полимеры и др.), а мобильной фазой – газ.

Этот тип хроматографии особенно чувствителен при анализе смеси газов или компонентов с низкой точкой кипения, используя процессы адсорбции.

- **Суперкритическая жидкостная хроматография** (SFC, Supercritical fluid chromatography)

В качестве элюента выступает жидкость в суперкритическом состоянии, такая как двуокись углерода при 50°C и давлении 15 МПа. Неподвижной фазой может быть жидкость или твердое вещество



*Рис. 1.5. Блок-схема газового хроматографа*

*1 – баллон со сжатым газом; 2 – блок подготовки газа-носителя; 3 – регулятор расхода газа; 4 – измеритель расхода газа; 5 – фильтр; 6 – микрошприц для введения пробы; 7 – испаритель; 8 – хроматографическая колонка; 9 – термостат; 10 – детектор; 11 – самописец; 12 – интегратор; 13 – цифронпечатающее устройство*

Газовая хроматография – метод разделения летучих соединений. Этим методом можно проанализировать газообразные, жидкие и твердые вещества с молекулярной массой меньше 400, удовлетворяющие определенным требованиям, главные из которых – летучесть, термостабильность, инертность и легкость получения.

Количественный

анализ можно провести только в том случае, если вещество термостой-

ко, т.е. испаряется в дозаторе воспроизводимо и элюируется из колонки

без разложения. При разложении вещества на хроматограмме появляются

ложные пики, относящиеся к продуктам разложения. Вещество не

должно образовывать устойчивых сольватов при растворении в непо-

движной жидкой фазе и реагировать с материалами, из которых

изготовлены детали хроматографа. Этим требованиям

В зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы газовая хроматография подразделяется на газоадсорбционную, когда неподвижной фазой является твердый адсорбент, и газожидкостную, когда неподвижной фазой является жидкость, нанесенная на поверхность твердого носителя. В газовой хроматографии преимущественно используется элюентный (проявительный) способ проведения процесса хроматографирования .

В газодсорбционной хроматографии в качестве неподвижной фазы применяют различные адсорбенты – высокодисперсные искусственные или природные тела с высокой удельной поверхностью (10–1000 м<sup>2</sup>/г), поглощающие газы или пары. Адсорбция молекул из газовой фазы происходит за счет межмолекулярных взаимодействий, имеющих электростатическую природу; возможно образование водородной связи, но вклад этого взаимодействия уменьшается с ростом температуры.

Основными адсорбентами, применяемыми в газо-адсорбционной хроматографии, являются активированные угли, силикагели, оксид алюминия. Неоднородность поверхности активных адсорбентов не дает возможности определять сильно адсорбирующиеся полярные молекулы, однако, в последнее время промышленностью выпускаются адсорбенты

с достаточно однородной поверхностью, такие, как пористые стекла, пористые полимеры, синтетические цеолиты (молекулярные сита), макропористые силикагели (силохром, порасил, сферосил), позволяющие проводить анализ смесей сильнополярных веществ.

Адсорбент должен обладать следующими основными свойствами:

необходимой селективностью, отсутствием каталитической активности

и химической инертностью к компонентам разделяемой смеси, доста-

точной механической прочностью.

Наиболее широко метод газoadсорбционной хроматографии применяют для анализа смесей газов и низкокипящих углеводородов, не содержащих активных функциональных групп. Например, для разделения  $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO$ ,  $CH_4$ ,  $CO_2$  с успехом применяют глинистые материалы, сорбенты, называемые порапаками, используют для разделения гидридов

металлов ( $Ge$ ,  $As$ ,  $Sn$ ,  $Sb$ ). Метод ГАХ на колонках с пористыми поли

мерными сорбентами – удобный и быстрый способ определения воды в неорганических и органических материалах.

# Газожидкостная хроматография

В аналитической практике чаще используют метод газожидкостной хроматографии. Это связано с чрезвычайным разнообразием жидких неподвижных фаз. В газожидкостной хроматографии неподвижной фазой служит практически нелетучая при температуре колонки жидкость, нанесенная на твердый носитель. Количество жидкой фазы составляет 5-30% от массы твердого носителя. Природа жидкой фазы является тем основным фактором, который определяет последовательность выхода компонентов из колонки. В качестве жидких фаз применяются неполярные парафины (например, сквалан, вазелиновое масло, апиезоны), умеренно полярные (сложные эфиры, нитрилы и др.) и полярные (полиэтиленгликоли или карбоваксы, гидроксилламины и др.)

К жидкой фазе предъявляется ряд жестких требований:

- 1) способность хорошо растворять компоненты смеси (если растворимость мала, компоненты выходят из колонки очень быстро);
- 2) инертность по отношению к компонентам смеси и твердому носителю;
- 3) малая летучесть (чтобы не испарялась при рабочей температуре колонки);
- 4) термическая устойчивость;
- 5) достаточно высокая селективность, т.е. способность разделять смесь компонентов;
- 6) небольшая вязкость (иначе замедляется процесс диффузии);
- 7) способность образовывать при нанесении на носитель равномерную пленку, прочно с ним связанную.

Твердым носителем обычно служит практически инертное твердое вещество, на которое наносят неподвижную жидкость. Основное назначение твердого носителя в хроматографической колонке – удерживать жидкую фазу на своей поверхности в виде однородной пленки. В связи с этим твердый носитель должен иметь значительную удельную поверхность (0,5-10 м<sup>2</sup>/г), причем она должна быть макропористой во избежание адсорбции компонентов пробы. Кроме того, твердый носитель должен обладать следующими качествами: отсутствием каталитической активности, достаточной механической прочностью, стабильностью при повышенных температурах, однородностью пор по размерам, максимальной однородностью размера зерен. Однако до настоящего времени не создано универсального носителя, удовлетворяющего всем перечисленным требованиям.

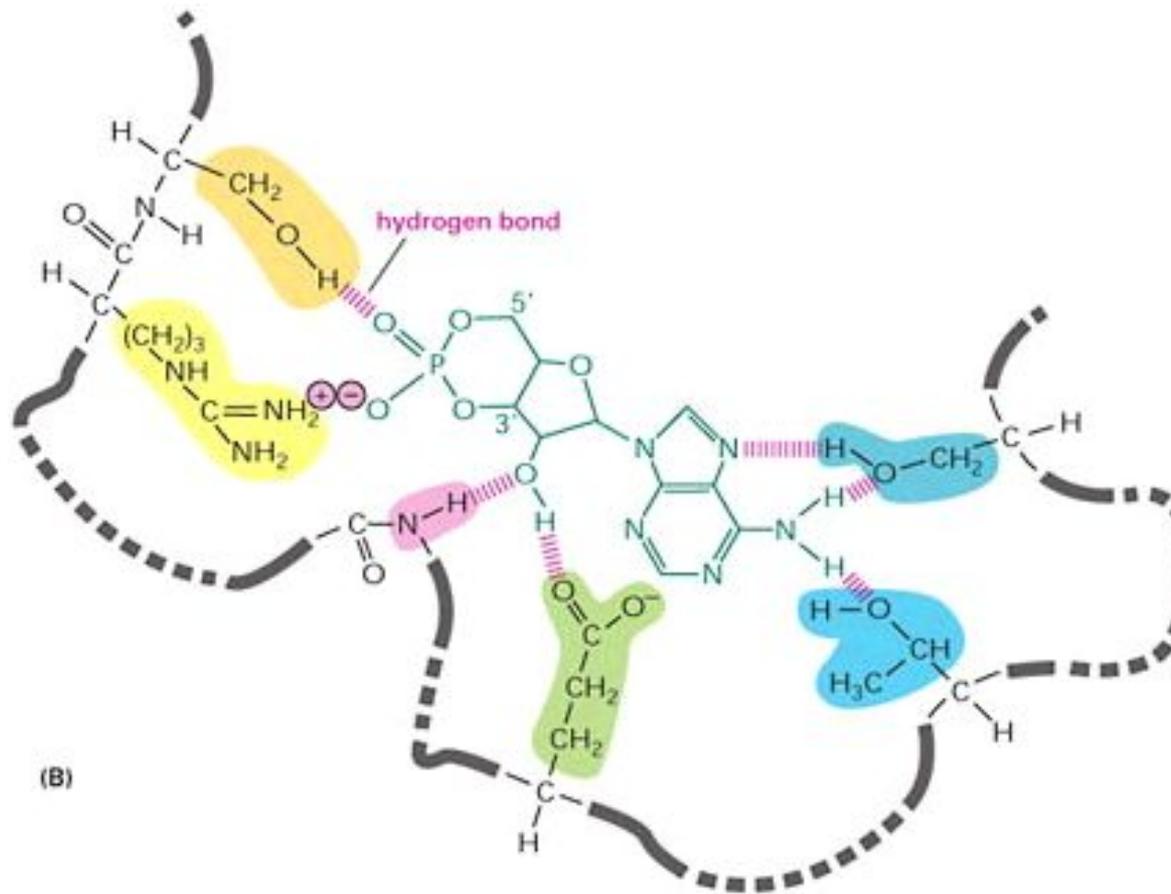
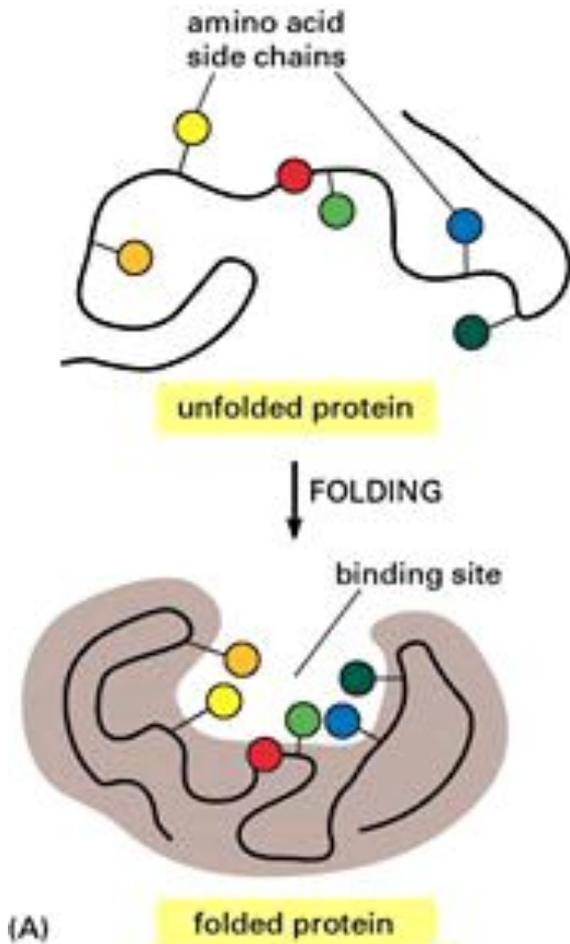
В качестве твердых носителей в газо-жидкостной хроматографии используются диатомиты (кизельгур, инфузорная земля), синтетические кремнеземы (макропористые силикагели, широкопористые стекла, аэросилогели), полимерные носители на основе политетрафторэтилена и т.д. Часто используют модифицированные носители, ковалентно связанные с «жидкой» фазой. При этом стационарная жидкая фаза более прочно удерживается на поверхности даже при самых высоких температурах колонки. Химически связанная неподвижная фаза более эффективна.

# Аффинная хроматография

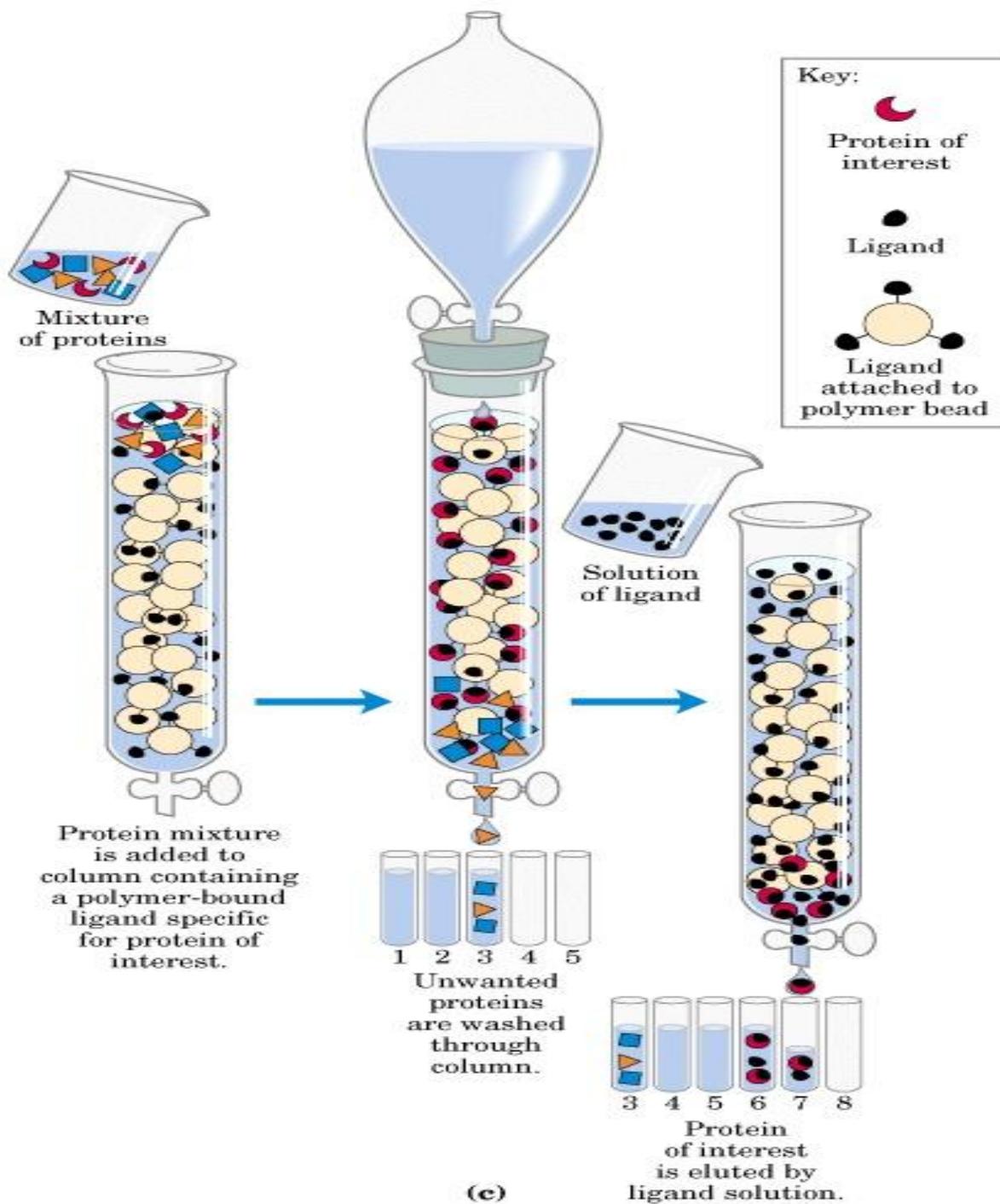
По механизму взаимодействия сорбента и сорбата аффинная хроматография основана на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов (например, антитело и антиген, гормон и рецептор и др.).

# Affinity Chromatography

- Uses structural features of proteins to separate
- Advantages
  - High degree of purification
- Disadvantages
  - Contamination by ligand



(A) The folding of the polypeptide chain typically creates a crevice or cavity on the protein surface. (B) Close-up view of an actual binding site showing the hydrogen bonds and ionic interactions formed between a protein and its ligand (in this example, cyclic AMP is the bound ligand).



# Хроматограмма

Хроматограмма - это двумерная диаграмма, описываемая функцией времени и параметра, зависящего от мгновенной концентрации растворенного вещества в момент его выхода из хроматографической колонки. Время (или, как альтернатива, объем элюента) отмеряется по абсцисс, а сигнал детектора - по оси ординат.

Процесс разделения, осуществляемый в колонке, ведет к появлению серии разделенных пиков на базовой линии, которая не изменяется в отсутствие анализируемого вещества в растворителе. Составная часть характеризуется временем удержания  $t_r$ , определяемым с момента введения в хроматограф исследуемого вещества до появления максимума пика на хроматографе. В идеальном случае  $t_r$  не зависит от количества вводимого вещества. Вещество, которое не удержалось в колонке, будет выведено из нее вместе с растворителем через время  $t_m$ , (в прежнем значении это время называлось мертвым). Разделение считается законченным, когда на хроматограмме появляются столько же пиков, сколько и компонентов в смеси. Однако определение веществ только по анализу хроматограммы может быть выполнено лишь в очень узкоспециализированных областях, и поэтому является произвольным методом. В связи с этим, для анализа исследуемого вещества и более точного определения его состава, наряду с хроматографом применяется масс-спектрометр или инфракрасный спектрофотометр. Современные производители, как правило, поставляют хроматографы в комплекте с другими аналитическими приборами с которым совмещается их оборудование.