Раздел курса: ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Л екция 39б

Тема лекции: АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

План лекции:

1. **Адсорбенты и требования к ним.**
2. **Влияние адсорбционных характеристик на время удерживания и форму пика.**
3. **Преимущества и недостатки адсорбционной хроматографии по сравнению с другими вариантами хроматографического анализа.**
4. **Тонкослойная хроматография.**
5. **Метод ВЭЖХ и его возможности.**
6. **Газоадсорбционная хроматография.**

Адсорбционная хроматография - метод, основанный на многократном перераспределении молекул определяемого компонента (сорбата) между подвижной фазой (элюентом) и поверхностью твердого сорбента вследствие адсорбции и десорбции этих молекул. Если адсорбционные свойства компонентов смеси различны, то при движении элюента через сорбент компоненты разделяются.

Метод предложен М.С.Цветом (1903)

Требования к адсорбенту

1. **Порошкообразное состояние** (размер частиц до 1 мм)
2. **Монодисперсность** (например, фракция 10-15 мкм)
3. **Высокая удельная поверхность** (свыше 50 $м^2/г$)
4. **Механическая прочность частиц**
5. **Химическая инертность**
6. **Термостойкость**
7. **Наличие активных центров на поверхности**

Адсорбенты для жидкостной хроматографии

Неорганические

оксид алюминия, силикагель, алюмосиликаты, графит и сажа, мел, тальк и др.

Органические

целлюлоза и ее производные, крахмал, тефлон, другие синтетические полимеры

На этих адсорбентах разделяют:

Малополярные органические вещества (углеводороды, их галоидопроизводные, углеводы)

Неорганические и сильнополярные органические вещества (соли, амино-кислоты, карбоновые кислоты и др.)

В качестве элюентов при этом используют:

Органические растворители (гексан, хлороформ и др.)

Водные и водно-органические растворы, ацетонитрил и др.

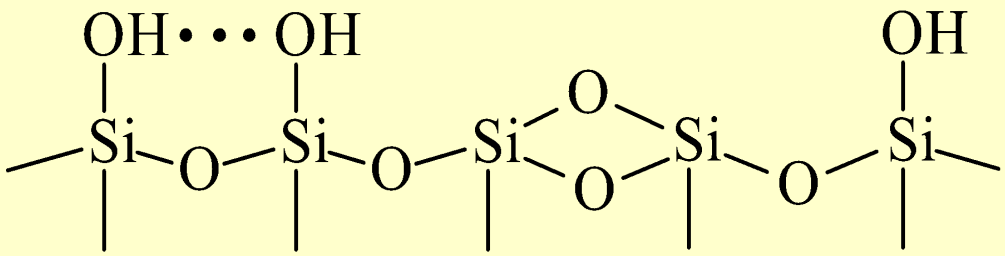
Соответствующие варианты ЖХ называют:

нормально-фазовая хроматография

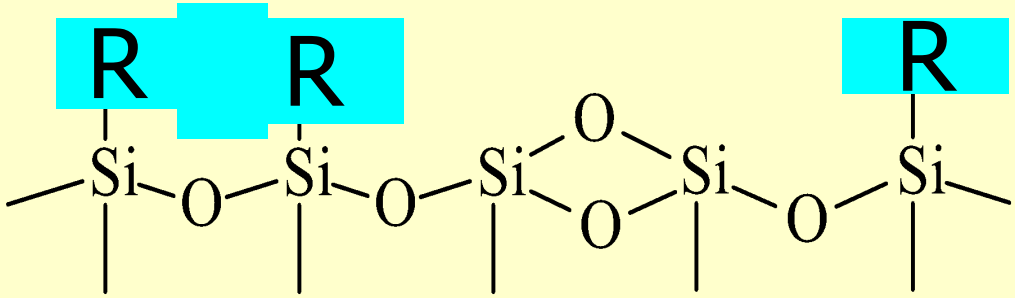
обращенно-фазовая хроматография

Активные центры

На поверхности адсорбента одновременно существуют разные активные центры, адсорбирующие из ПФ разные частицы.



Силанольные группы (кислотные центры) для нормально-фазовой хроматографии

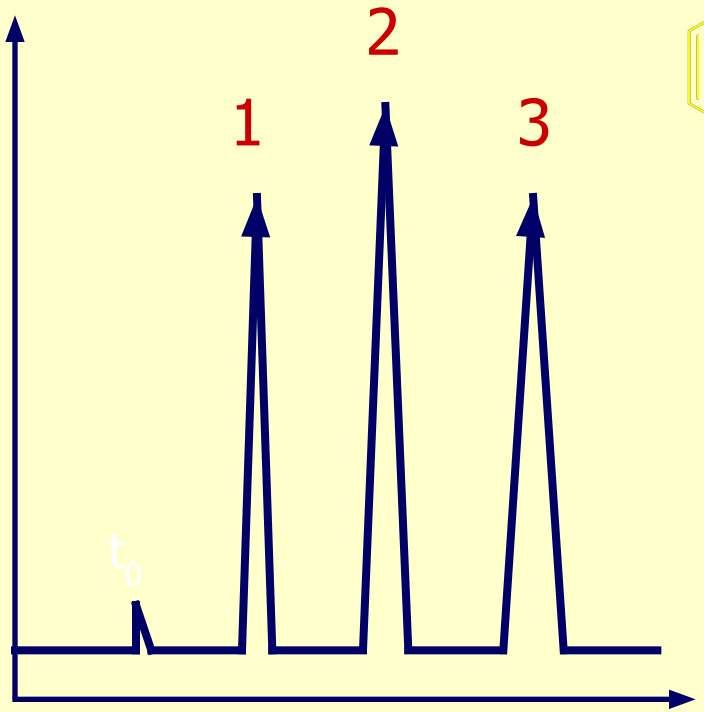


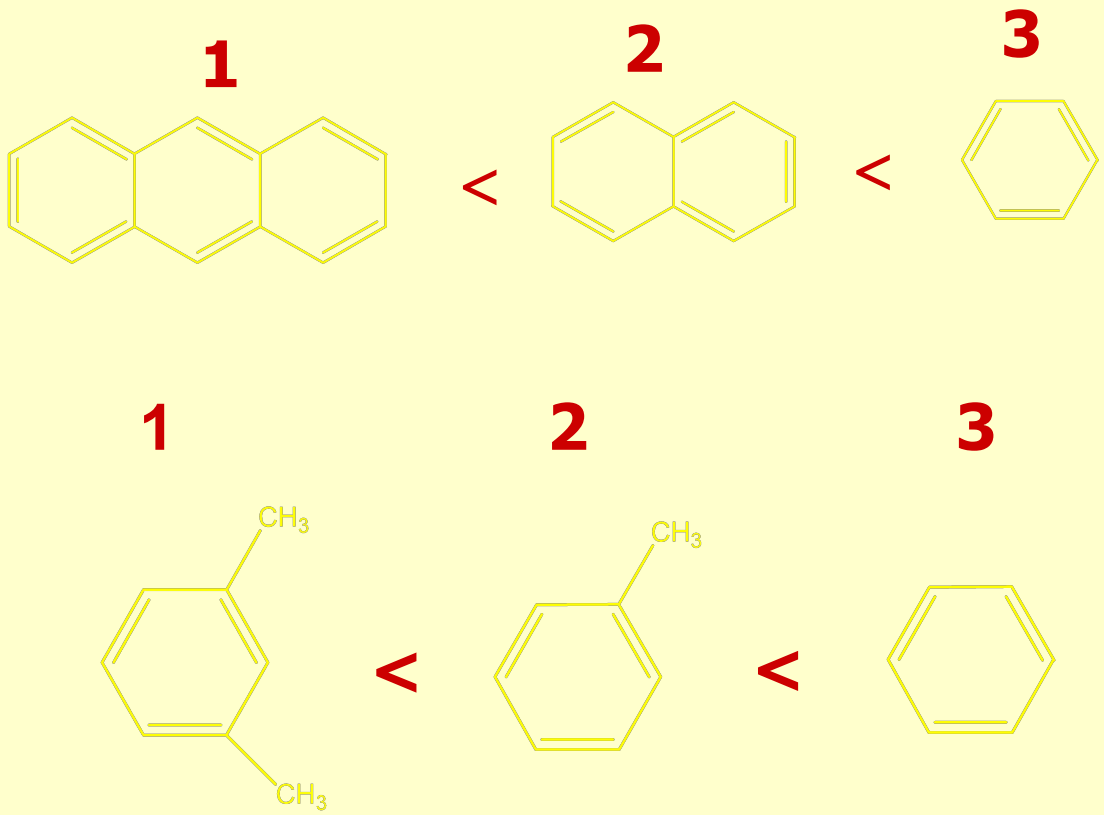
Алкильные группы (гидрофобные центры для обращенно-фазовой хроматографии)

R = C2, C4, C8, C18, C30

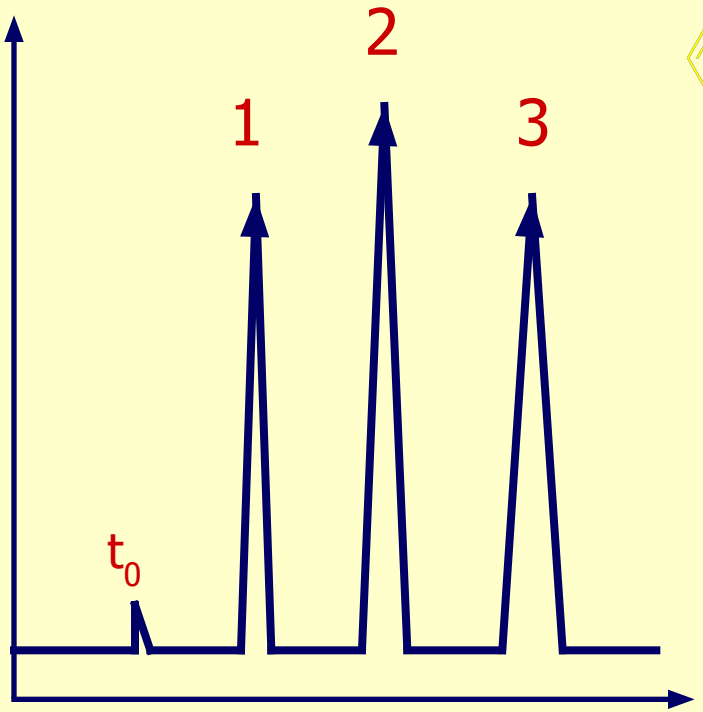
Предварительная обработка адсорбента (прокаливание, промывка реагентами, радиационная прививка и др.) приводит к доминированию тех или иных центров, то есть <u>к получению адсорбента с заданными свойствами</u>

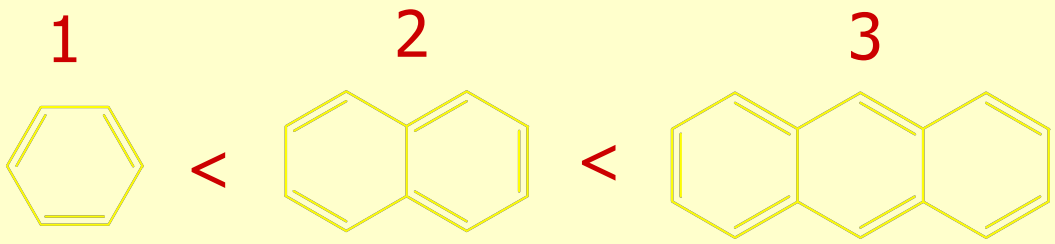
Порядок элюирования в нормально-фазовой хроматографии

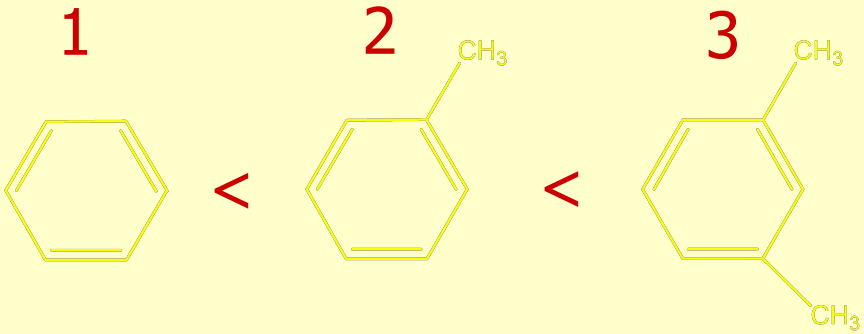




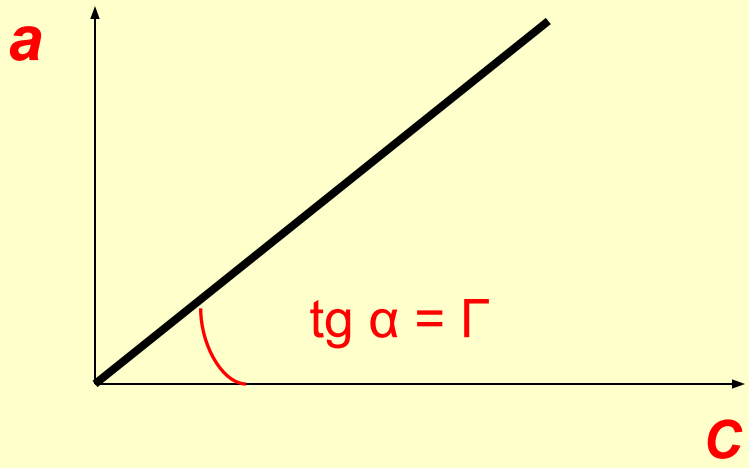
Порядок элюирования в обращенно-фазовой хроматографии







Скорости движения компонентов смеси в адсорбционной хроматографии зависят от их коэффициентов адсорбционного распределения (коэффициентов Генри)



$$\Gamma = da / dC = f(C,T)$$

При низких C $\Gamma = Const$,

$$a = \Gamma C$$

При $V_{нф} \approx V_{пф}$ и $\Gamma >> 1$:

$$w \approx \frac{u}{1 + \Gamma \frac{V_{НФ}}{V_{ПФ}}}$$

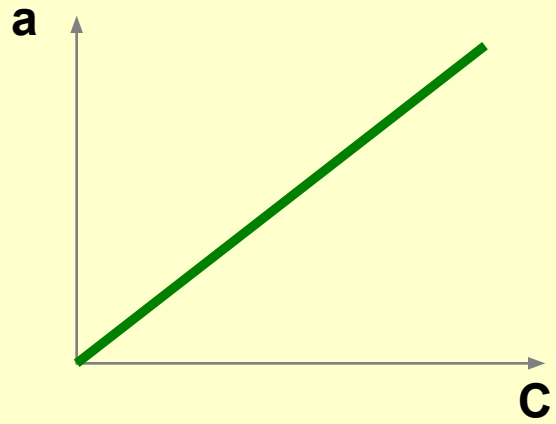
$$\frac{w_1}{w_2} = \frac{t_2}{t_1} \approx \frac{\Gamma_2}{\Gamma_1}$$

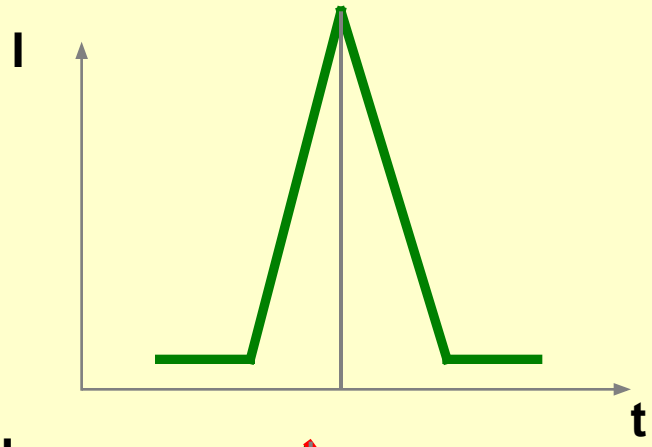
При $\Gamma_1 = \Gamma_2$ компоненты выходят из колонки одновременно, не разделяясь

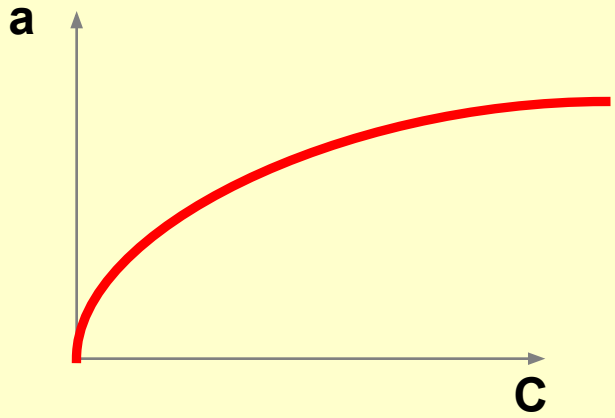
Скорости движения компонентов в адсорбционной хроматографии теоретически не должны зависеть ни от концентрации сорбата, ни от состава пробы.

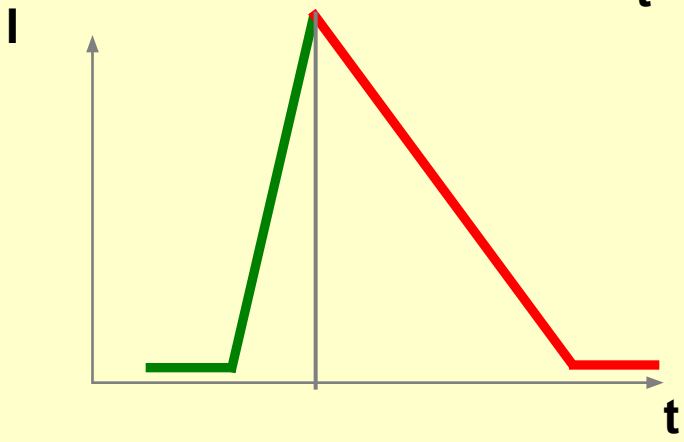
На практике эти положения иногда не выполняются, особенно при высокой концентрации компонентов и вводе большой пробы. Это ведет к ошибочным результатам анализа.

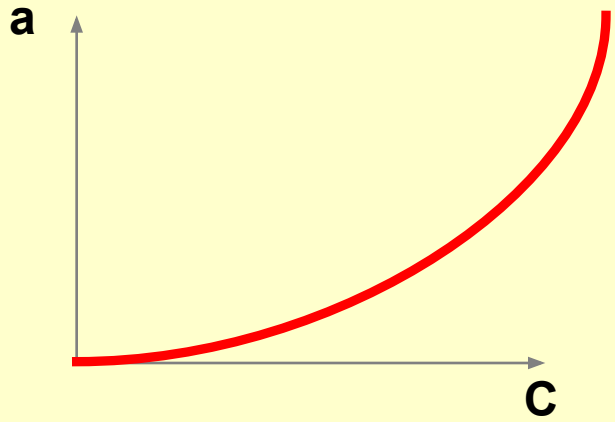
Связь изотермы и формы пика

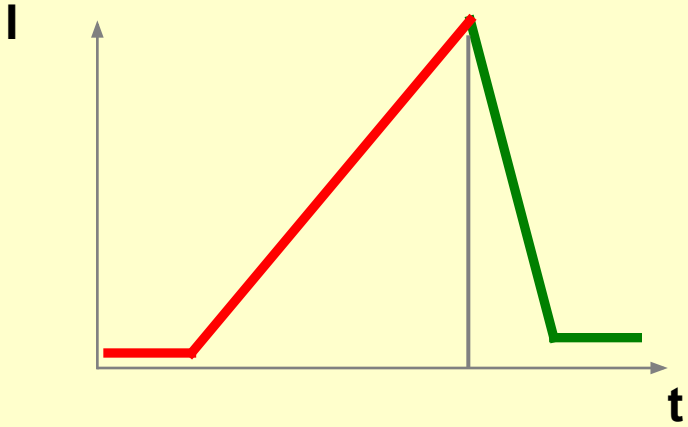












Преимущества и ограничения адсорбционной хроматографии

- Возможность работы при высоких температурах и давлениях;
- возможность направленной модификации свойств адсорбента;
- селективность адсорбции (вплоть до разделения изотопов и оптических изомеров);
- проявление дополнительного эффекта – разделение молекул по размерам.

- Выбор адсорбентов ограничен, а их свойства при повторном приготовлении колонки плохо воспроизводимы и теоретически не предсказуемы;
- возможность необратимой сорбции и химических превращений компонентов пробы на активных центрах;
- нелинейность изотерм адсорбции, ведущая к искажению формы пиков и неполному разделению компонентов.

Основные варианты адсорбционной хроматографии

- Классическая жидкостная хроматография (ЖХ)
- Тонкослойная жидкостная хроматография (ТСХ)
- Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, ЖХВД)
- Газоадсорбционная хроматография (ГАХ)

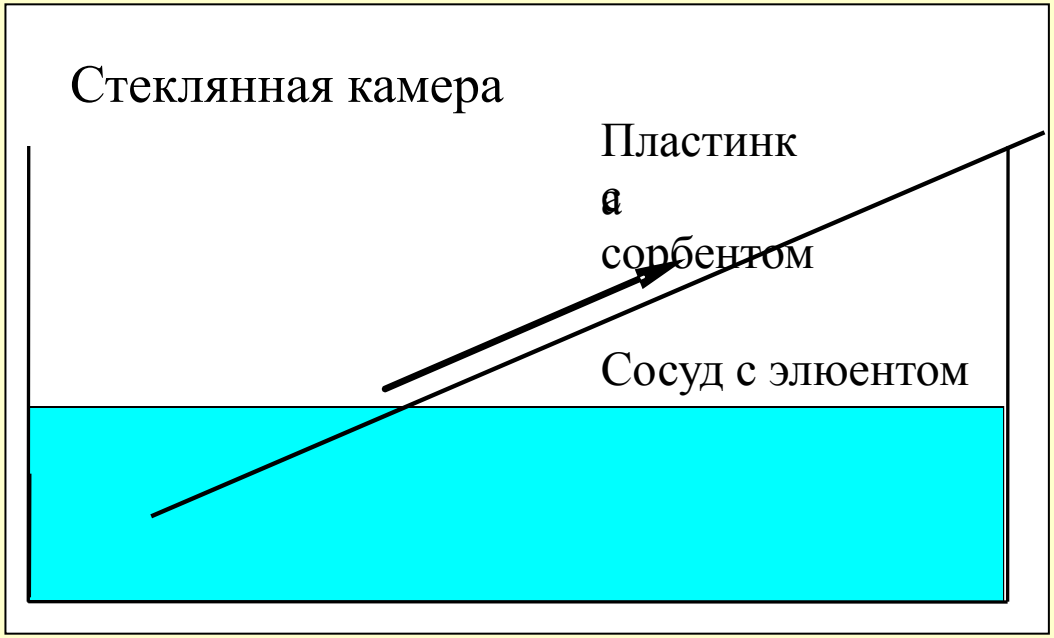
Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Метод ТСХ предложен в 1938 г. Измайловым и Шрайбер.

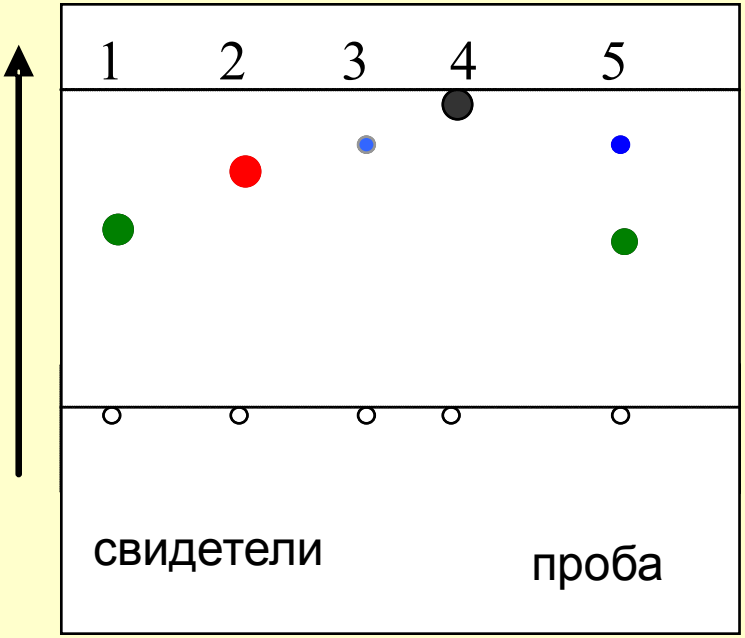
Используется для экспрессного полуколичественного и качественного анализа жидкостей (органический синтез, биохимические исследования, криминалистическая экспертиза, контроль качества пищевых продуктов, лекарств и других товаров.

Схема выполнения (А) и результат разделения (Б) двухкомпонентной смеси методом ТСХ

А



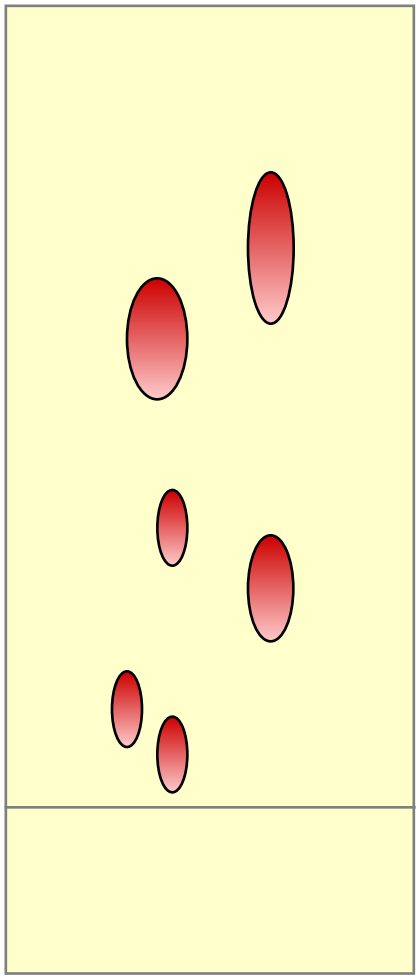
Б



Сорбенты для ТСХ:

оксид алюминия, силикагель, мел, целлюлоза, а также композиции этих материалов со связующими (силуфол)

Толщина слоя – не более 1 мм.



Подвижные фазы:

смеси органических растворителей

Нередко сорбент заранее пропитывают растворителем 1, а используют в качестве элюента растворитель 2. Это меняет механизм разделения – молекулы X распределяются между двумя жидкими фазами (не адсорбционная, а распределительная ТСХ).

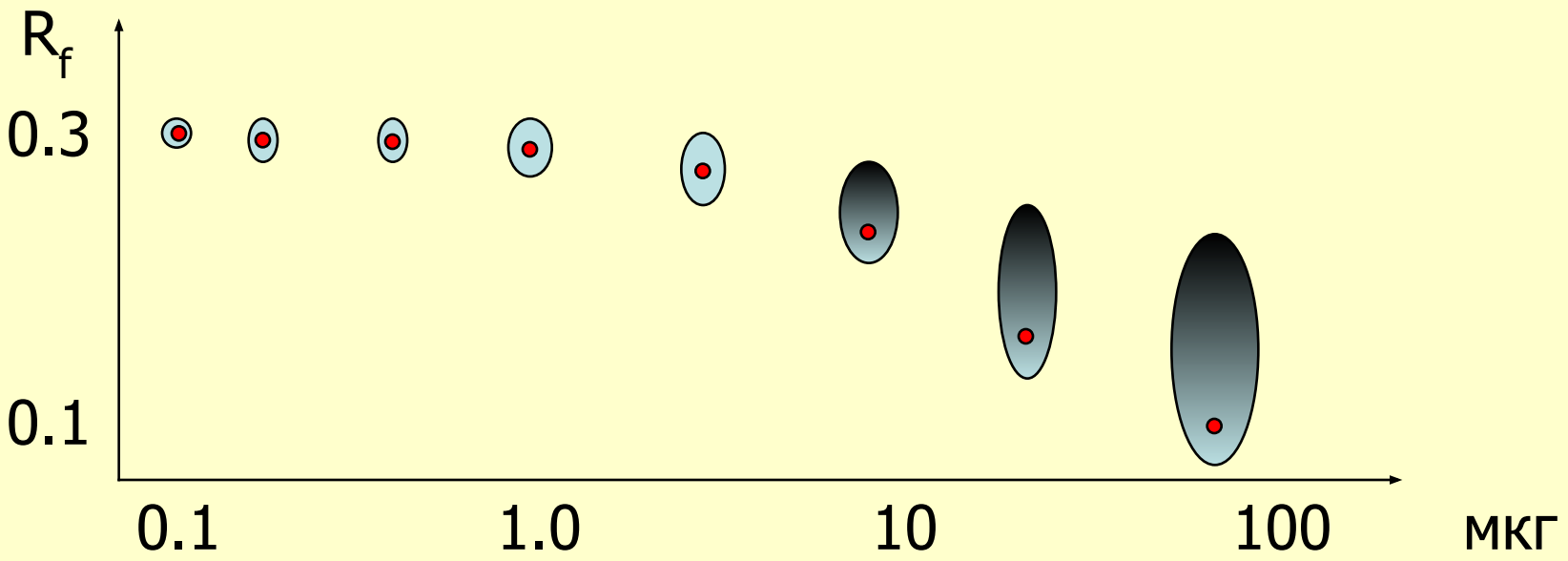
Требования к подвижной фазе

- Смачивать сорбент, но не взаимодействовать с ним;
- Растворять все компоненты пробы (но не одинаково!);
- Не затруднять детектирование компонентов;
- Легко и количественно удаляться после разделения;
- Низкая вязкость, доступность, безвредность.

Проявление хроматограммы в методе ТСХ

- Опрыскивание пластины раствором реагента (дитизон, нингидрин и др.), обработка парами иода.
- Спектроскопические методы (УФ, люминесценция).
- Радиохимические методы

Объем пробы должен быть минимальным (около 0,01 мл), чтобы не изменить R_f и правильно опознать компонент.

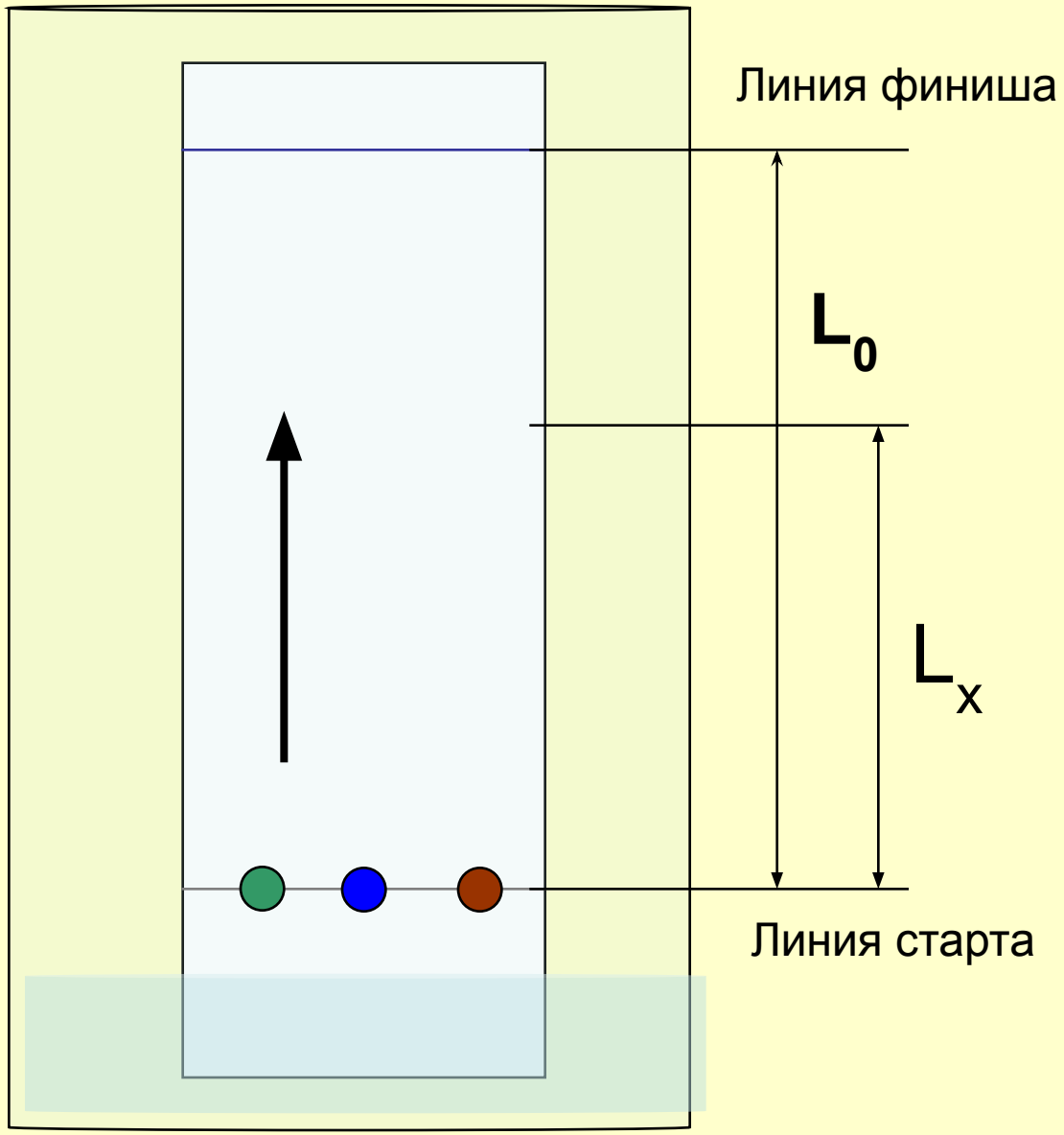


Индивидуальная характеристика каждого компонента смеси в методе ТСХ – его подвижность R_f

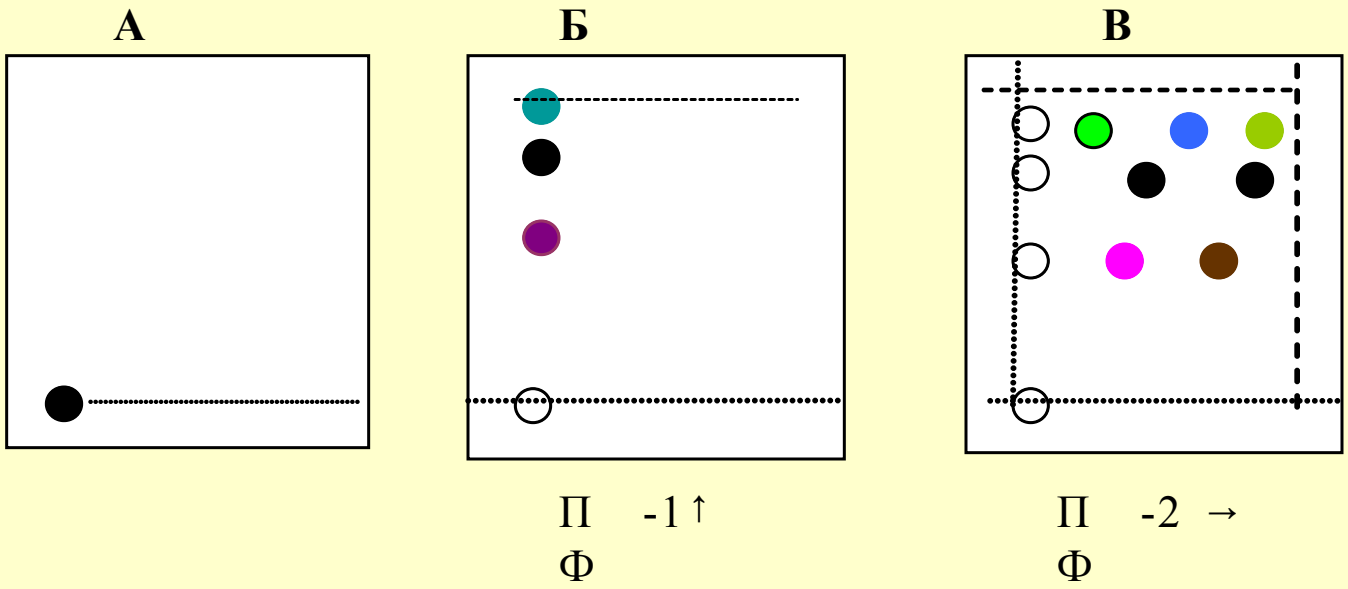
$$R_f = L_x / L_0$$

$$0 < R_f < 1$$

Величина ***Rf*** зависит от природы сорбата, сорбента и элюента, но от концентрации сорбата и присутствия примесей не зависит.



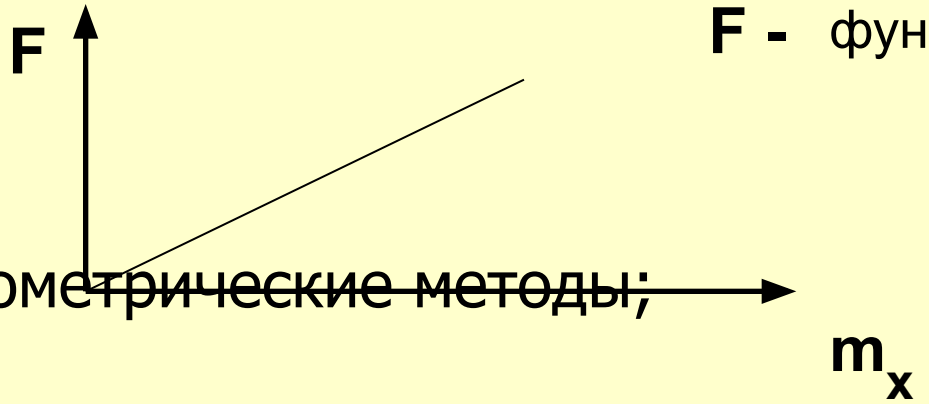
Метод ТСХ.
Двумерная хроматография смеси красителей



А — ввод пробы;
Б — после обработки первым элюентом;
В — после обработки вторым элюентом.

Измерение сигнала в методе ТСХ

- Визуально - по величине и интенсивности пятен;
- спектроскопия диффузного отражения;



F - функция Кубелки-Мунка

- радиометрические методы;
- экстрагируют компонент из пятна и измеряют аналитический сигнал в полученном экстракте (фотометрия, флуориметрия, кинетические методы и др.)

Прибор для ТСХ

Особенности метода ТСХ

Достоинства

- Простота и дешевизна оборудования,
- Возможность внелабораторного применения (тест-метод),
- Нередко - низкие пределы обнаружения,
- Возможность разделения веществ с сильно различными свойствами.

Недостатки

- Плохая сходимость и очень плохая межлабораторная
- воспроизводимость результатов;
- Невозможность разделения веществ с близкими свойствами
- Низкая эффективность (размывание пятен).

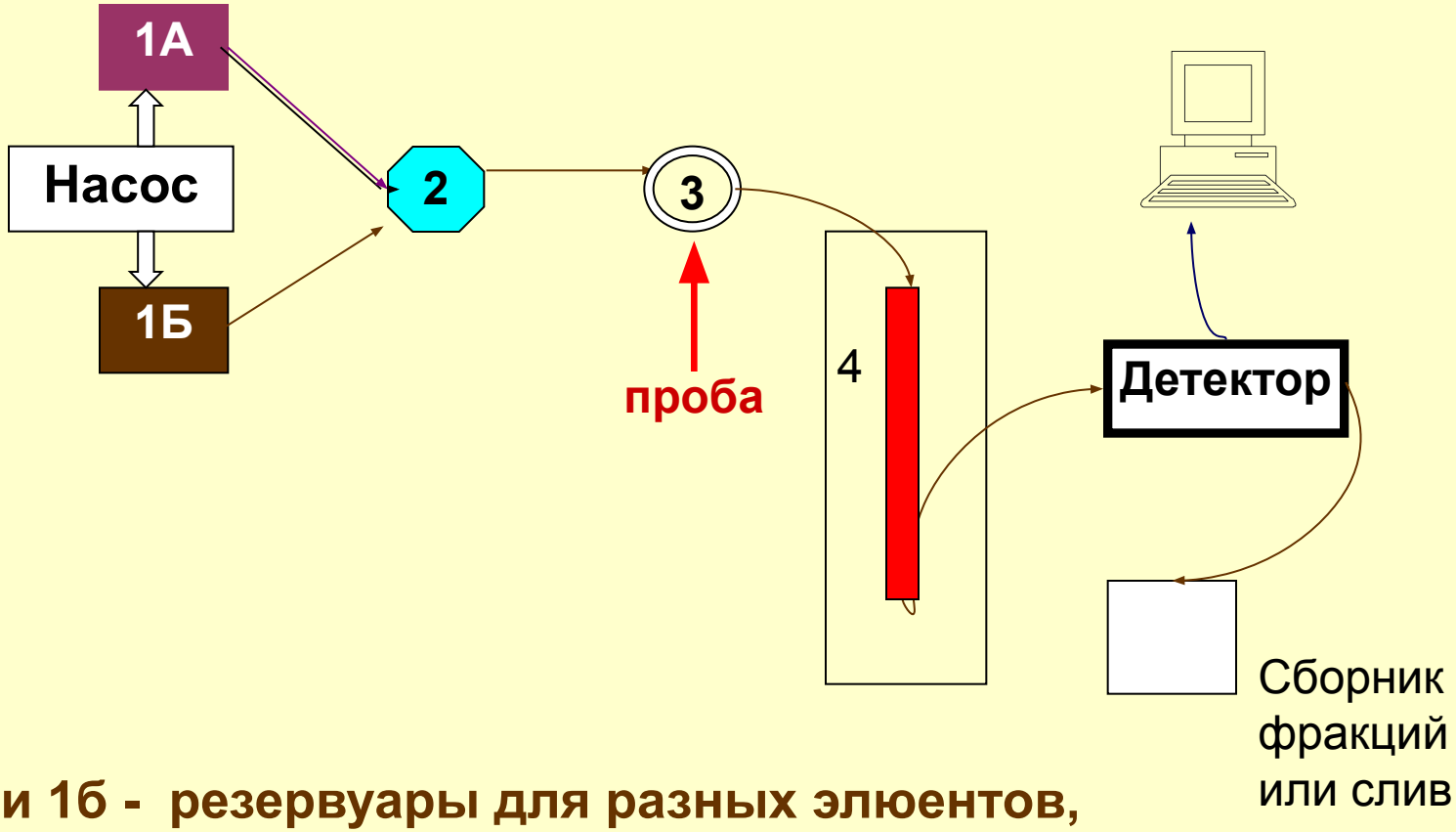
Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, ЖХВД, HPLC)

Метод ВЭЖХ разработан в 1960-х гг. Ш.Хорватом (США) и, независимо от него, Г.Киркландом (Англия).

Используется для качественного и количественного анализа смесей органических веществ в следующих областях:

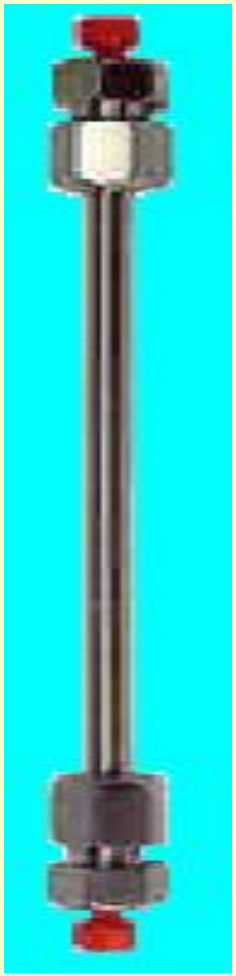
- **химическая технология и нефтехимия,**
- **производство лекарственных препаратов,**
- **биохимические исследования и клинический анализ,**
- **криминалистическая экспертиза,**
- **контроль качества пищевых продуктов, лекарств и др.**
- **мониторинг состояния окружающей среды.**

Принципиальная схема хроматографа для ВЭЖХ



1а и 1б - резервуары для разных элюентов,
2 - смеситель для градиентного элюирования,
3 - кран-дозатор,
4 – микроколонка с сорбентом

Колонки для ВЭЖХ

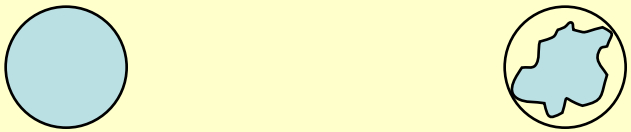


Длина колонки – до 25 см, внутренний диаметр – до 5 мм, внешний – 1-2 см. Материал – сталь + стекло. Некоторые колонки выдерживают давление до 1000 атм.

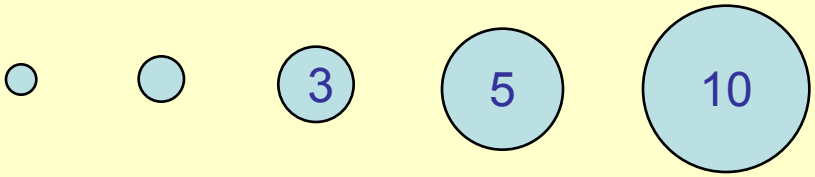
Набивка – модифицированный силикагель или оксид алюминия, сферические частицы диаметром 5 – 10 мкм.

Основной тип матриц в ВЭЖХ – силикагель

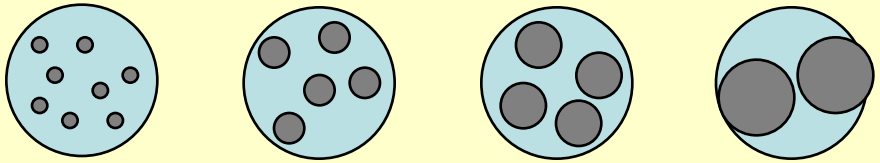
Сферичность



Размер частиц, мкм



Размер пор, А



Достоинства

- Отработанная технология синтеза
- Доступность и относительно низкая цена
- Большой диапазон свойств
- Механическая прочность

Недостатки

- Химическая активность ОН-групп на поверхности
- pH стабильность (2-9)
- Адсорбированная вода

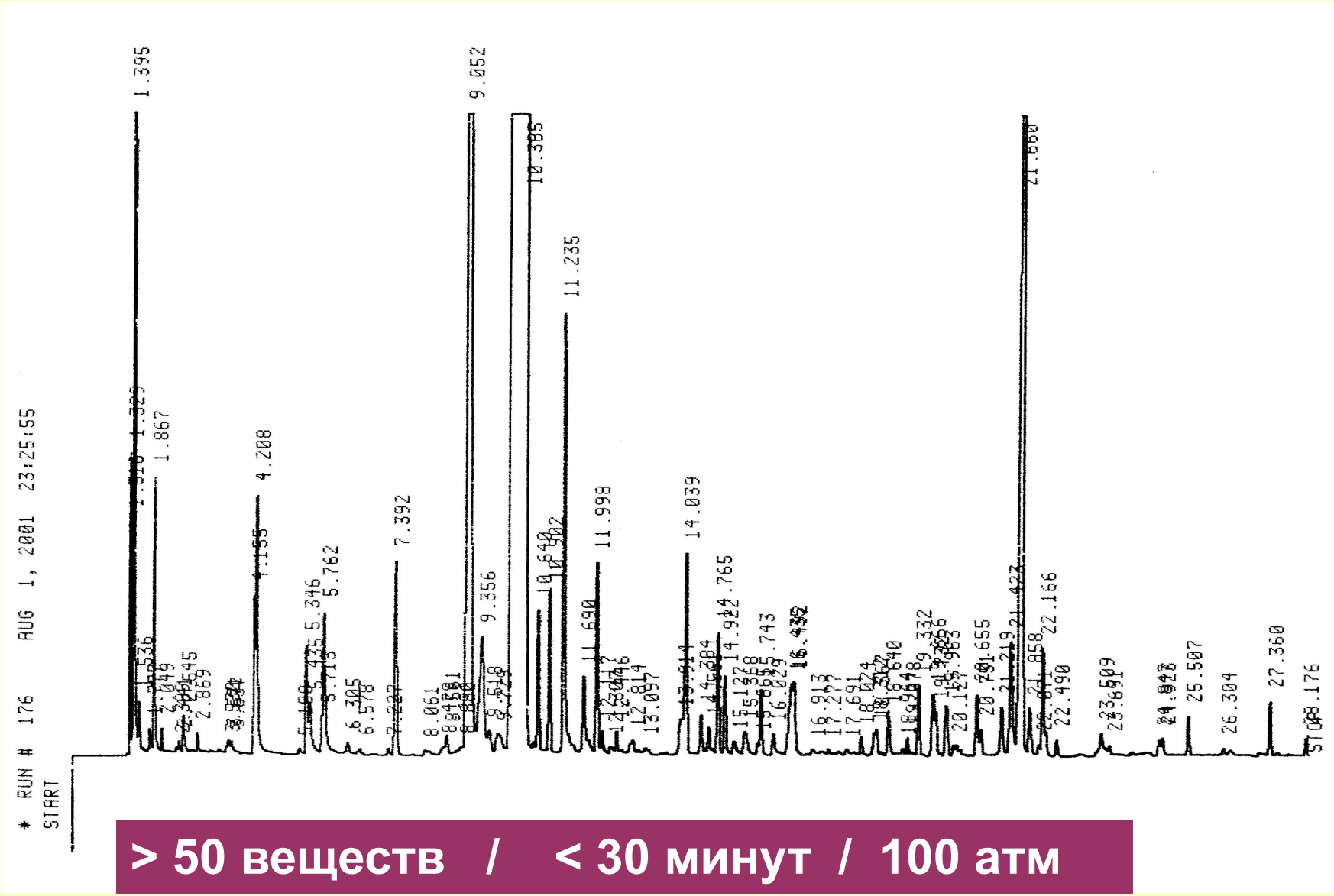
Один из наиболее распространенных и современных жидкостных хроматографов фирмы Shimadzu

Блочный жидкостной хроматограф Agilent 1100

Детекторы для ВЭЖХ

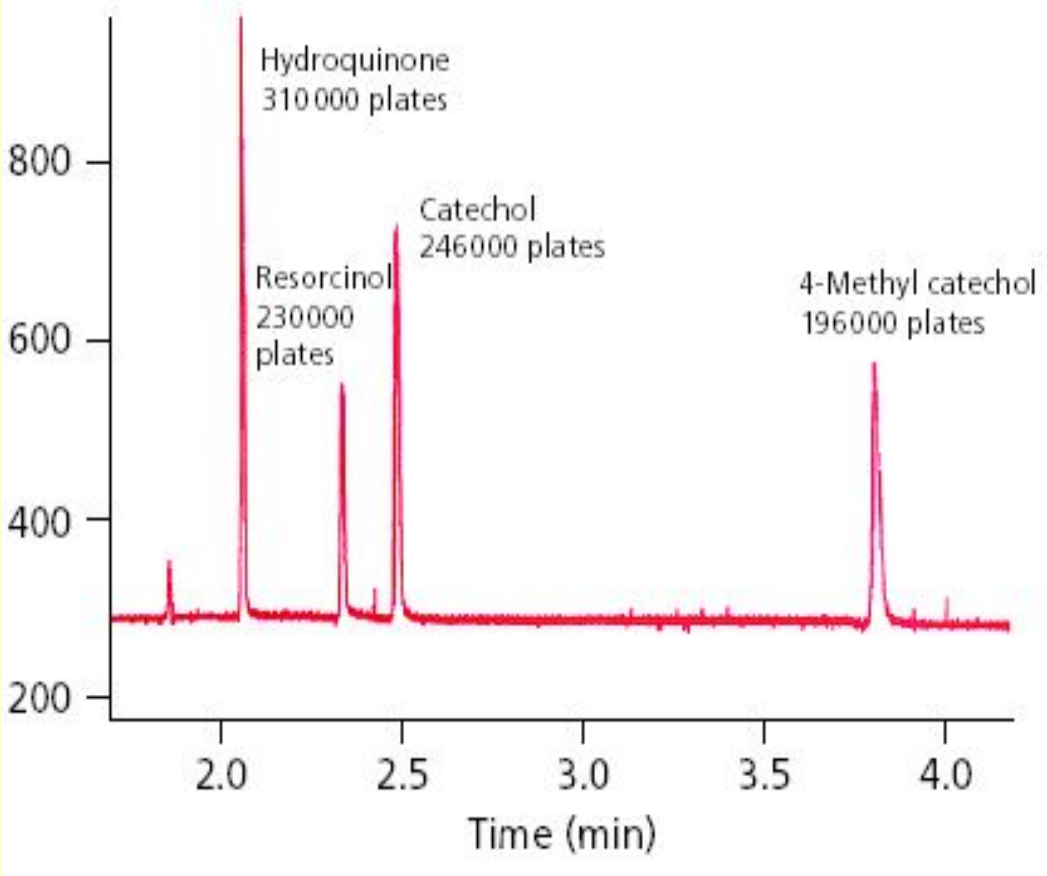
Тип детектора	Предел обнаружения, г/мл	Диапазон линейности сигнала	Селектив-ность
Флуориметр	10^{-9}-10^{-11}	10^{5}	Да
Кондуктометр	10^{-8}-10^{-9}	10^{5}	Да
Спектрофотометр	10^{-7}-10^{-8}	10^{4}	Да/Нет
Масс-спектрометр	10^{-6}-10^{-7}	10^{5}	Нет
Рефрактометр	10^{-5}-10^{-6}	10^{3}	Нет

Хроматограмма апельсинового сока



> 50 веществ / < 30 минут / 100 атм

Хроматография при ультравысоких давлениях



Колонка: 43 см x 30 мкм

Сорбент: 1 мкм

Давление: 7100 атм

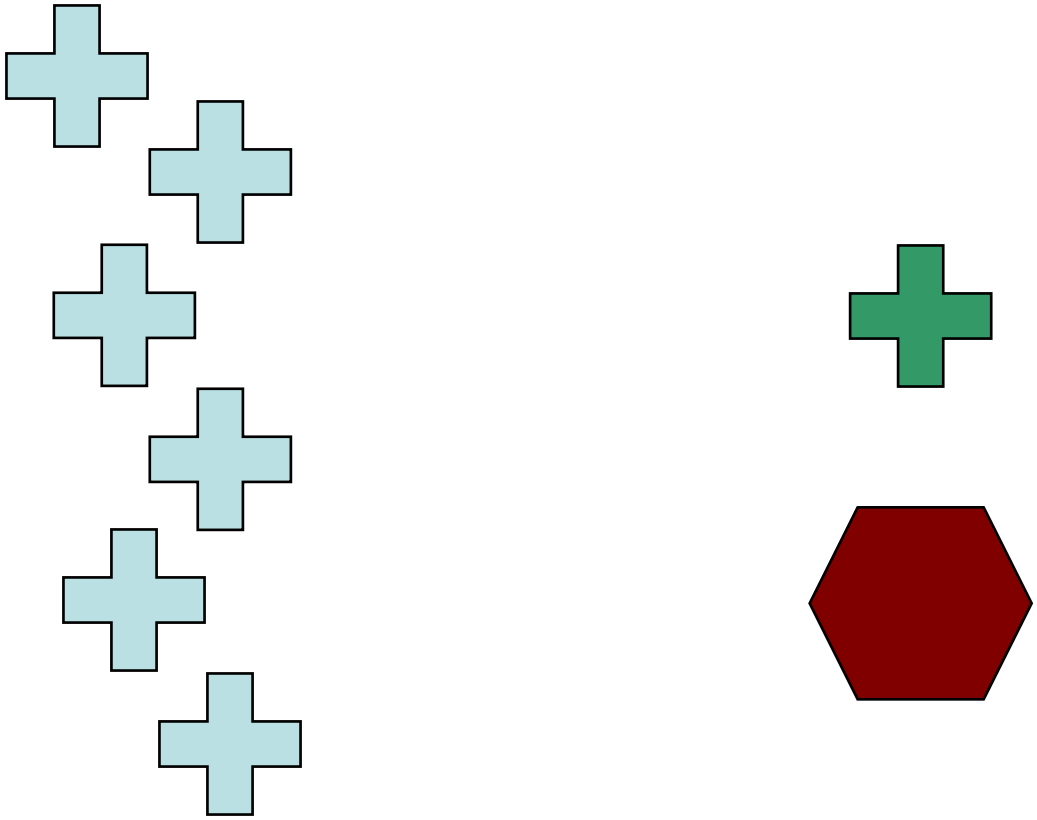
Максимальная эффективность: 625000 теор.тарелок / метр

Вес установки ~ 7 тонн

Факторы, улучшающие разрешение пиков в методе ВЭЖХ

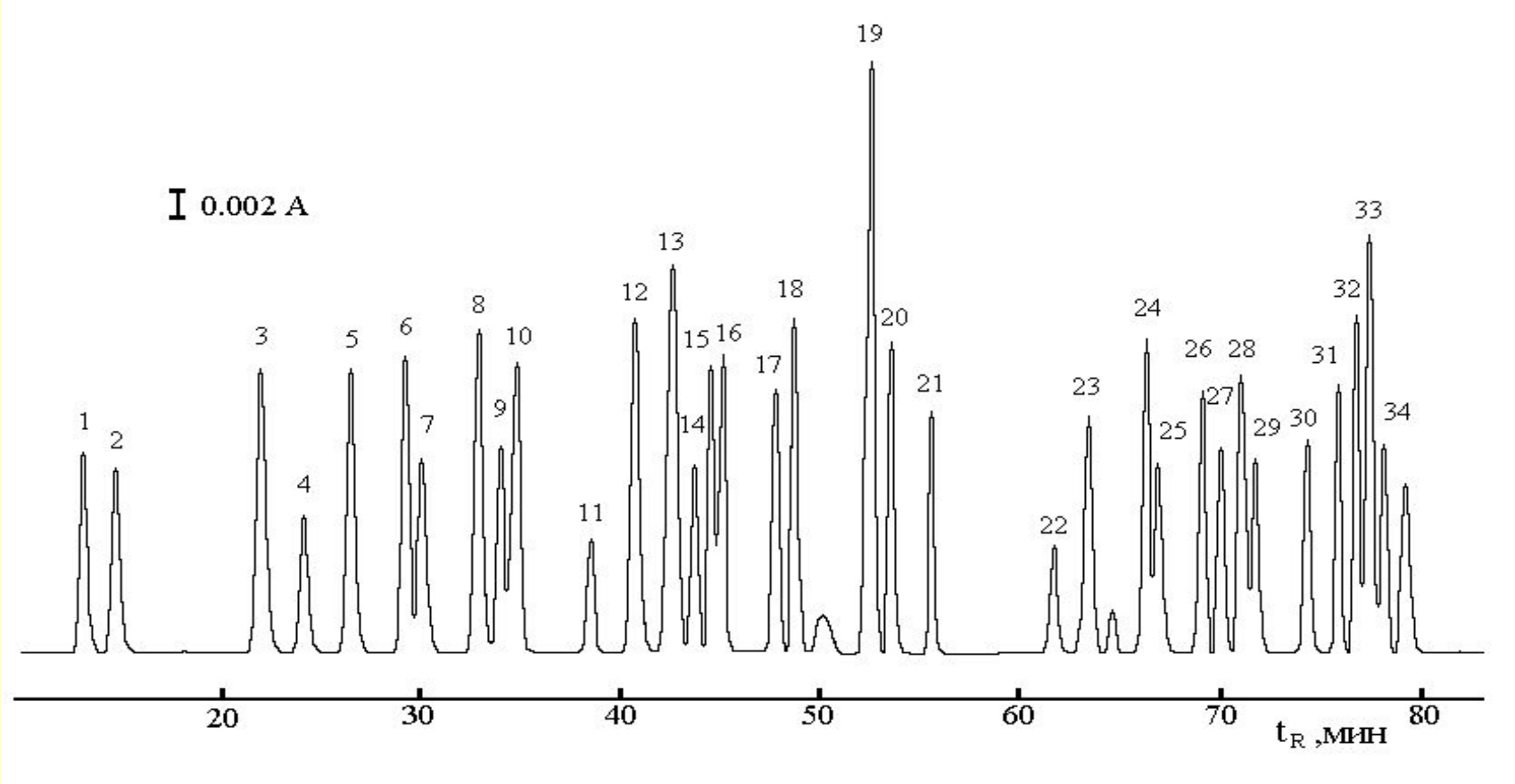
- Правильный выбор неподвижной фазы;
- однородность сорбента, его сферичность;
- однородность набивки колонки;
- увеличение длины колонки;
- уменьшение внутреннего диаметра колонки;
- правильный выбор подвижной фазы;
- использование градиентного элюирования;
- оптимальная скорость потока элюента;

Хиральная хроматография
(Разделение стереоизомеров в методе ВЭЖХ)



Неподвижная фаза для разделения стереоизомеров

Разделение оптических изомеров аминокислот

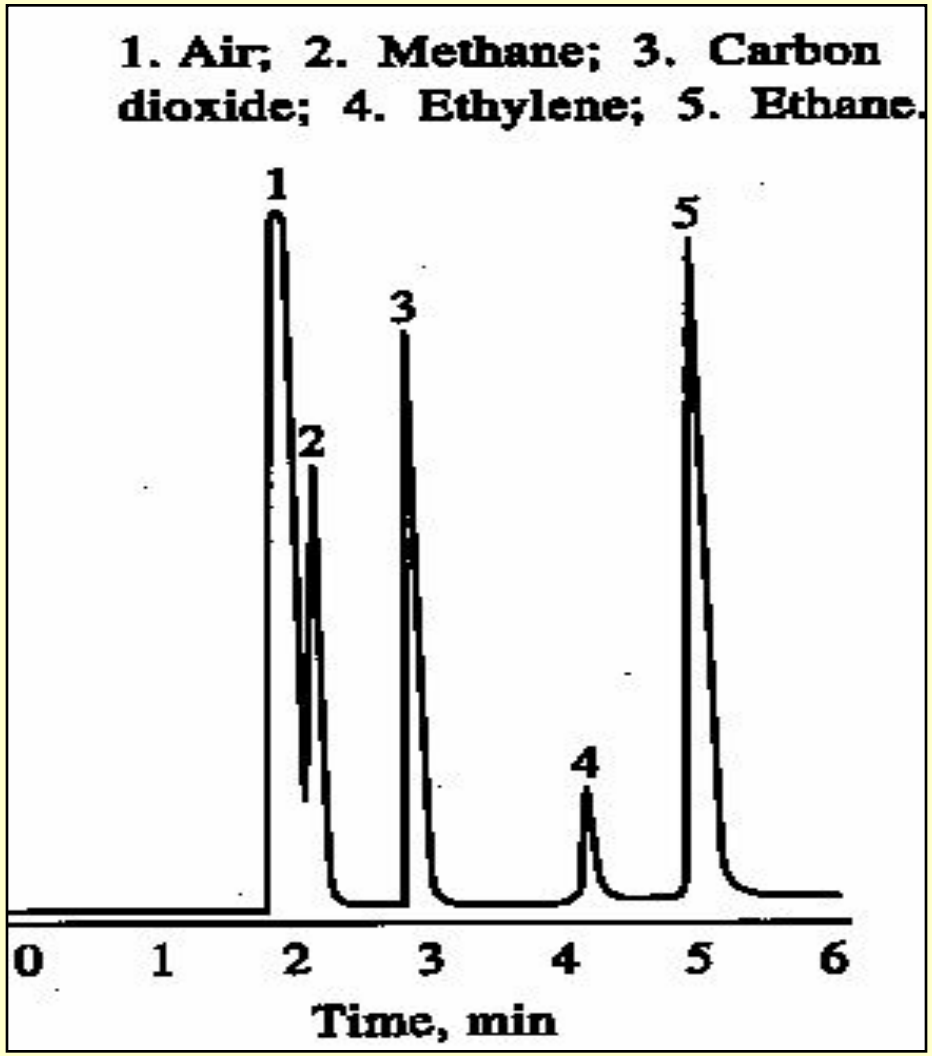


Column, Mightysil RP-18 (150x4.6 I.D.); mobile phase: methanol-0.01 M Na2HPO4, pH 6.0, gradient elution flow-rate, 0,5 ml/min. Detection: DAD, λ=340 nm.
Peaks: 1=L-Asp, 2=D-Asp, 3=L-Glu, 4=D-Glu, 5=L-Asn, 6=D-Asn, 7=L-Ser, 8=L-Gln, 9=D-Ser, 10=D-Gln, 11=D-His, 12=L-Thr, 13=Gly+L-His, 14=D-Thr, 15=D-Arg, 16=L-Arg, 17=β-Ala, 18=L-Ala, 19=L-Tyr+GABA, 20=D-Ala, 21=D-Tyr, 22=L-Met+L-Trp, 23=L-Val, 24=L-Phe, 25=D-Met, 26=D-Trp, 27=D-Val, 28=D-Phe, 29=L-Ile, 30=L-Leu, 31=L-Lys, 32=D-Ile, 33=D-Lys, 34=D-Leu.

(NMC)

Газоадсорбционная хроматография (ГАХ)

Метод ГАХ предложен в 1945-1948 гг. Эрикой Кремер (Австрия)

Сейчас в основном используется для быстрого анализа атмосферного воздуха и легких газовых смесей (в химической технологии). Определяют O_2, N_2, CO_2, CO, H_2S, SO_x, NO_x CH_4. Тем же методом анализируют высококипящие органические жидкости. В остальных случаях возможности метода ГАХ уступают возможностям ГЖХ. Метод ГАХ реализуют на насадочных (набивных), а также на капиллярных колонках (тонкий слой пористого адсорбента фиксируется на внутренних стенках колонки).

Пример разделения газовой смеси методом ГАХ