Современные методы исследования БАС

Методы выделения и анализа. Лекция 3

Михаил Семенович Цвет

(1872—1919)

1903 - дата открытия хроматографии

(от греч. chroma, родительный падеж chromatos — цвет, краска и grapho — пишу, черчу, рисую)

доклад «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу» —

на заседании биологического отделения Варшавского общества естествоиспытателей

1919 — 26 июня — умер от голода, похоронен в Воронеже.

Хроматография

физико-химический метод разделения и анализа смесей, основанный на распределении их компонентов между двумя фазами:

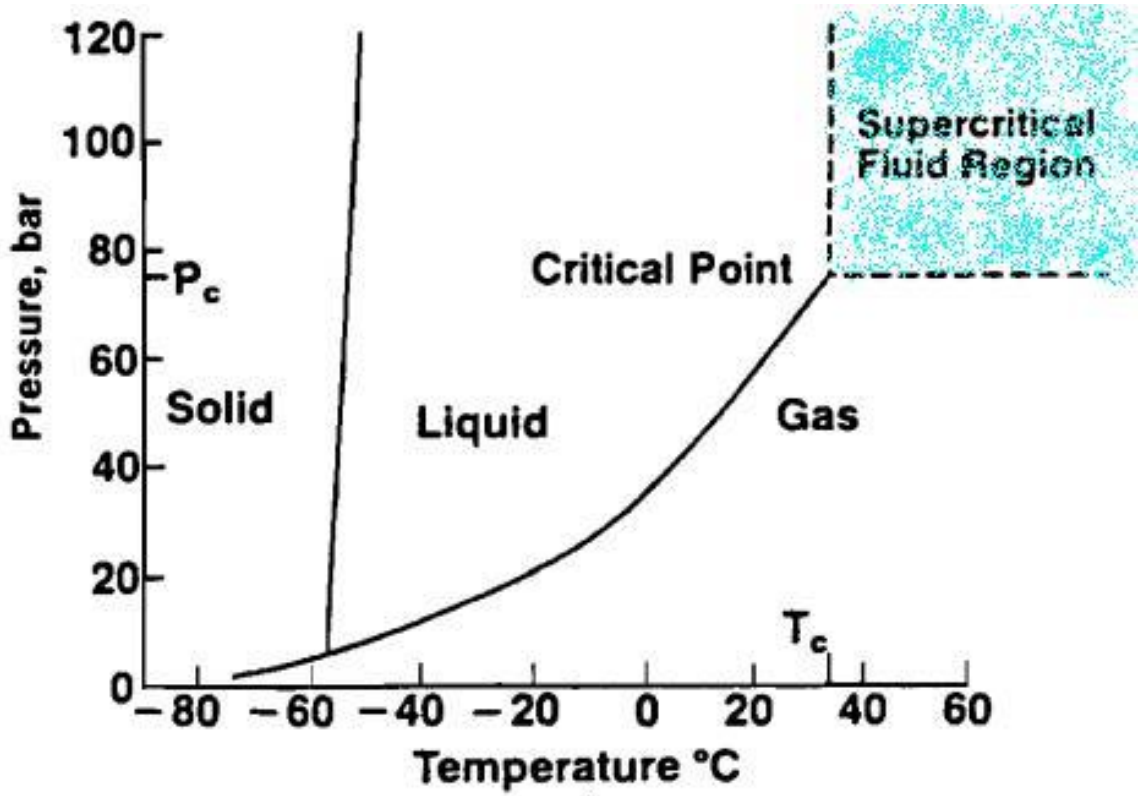
неподвижной - сорбентом и

подвижной - элюентом

Агрегатное состояние фаз

- Газо – жидкостная (ГЖХ)
- Газо - твердофазная (ГАХ)
- Жидко - твердофазная
- Жидко - жидкостная
- Сверхкритический флюид (СКФ)+

Сверхкритический флюид (СКФ)



CO_2

Свойства вещества в сверхкритическом состоянии промежуточные между его свойствами в газовой и жидкой фазе.

СКФ обладает высокой плотностью, близкой к жидкости, и низкой вязкостью, как и газы.

Коэффициент диффузии при этом имеет промежуточное между жидкостью и газом значение.

Задачи разделения

Аналитическая хроматография

Есть/нет, какое, сколько?

Препаративная хроматография

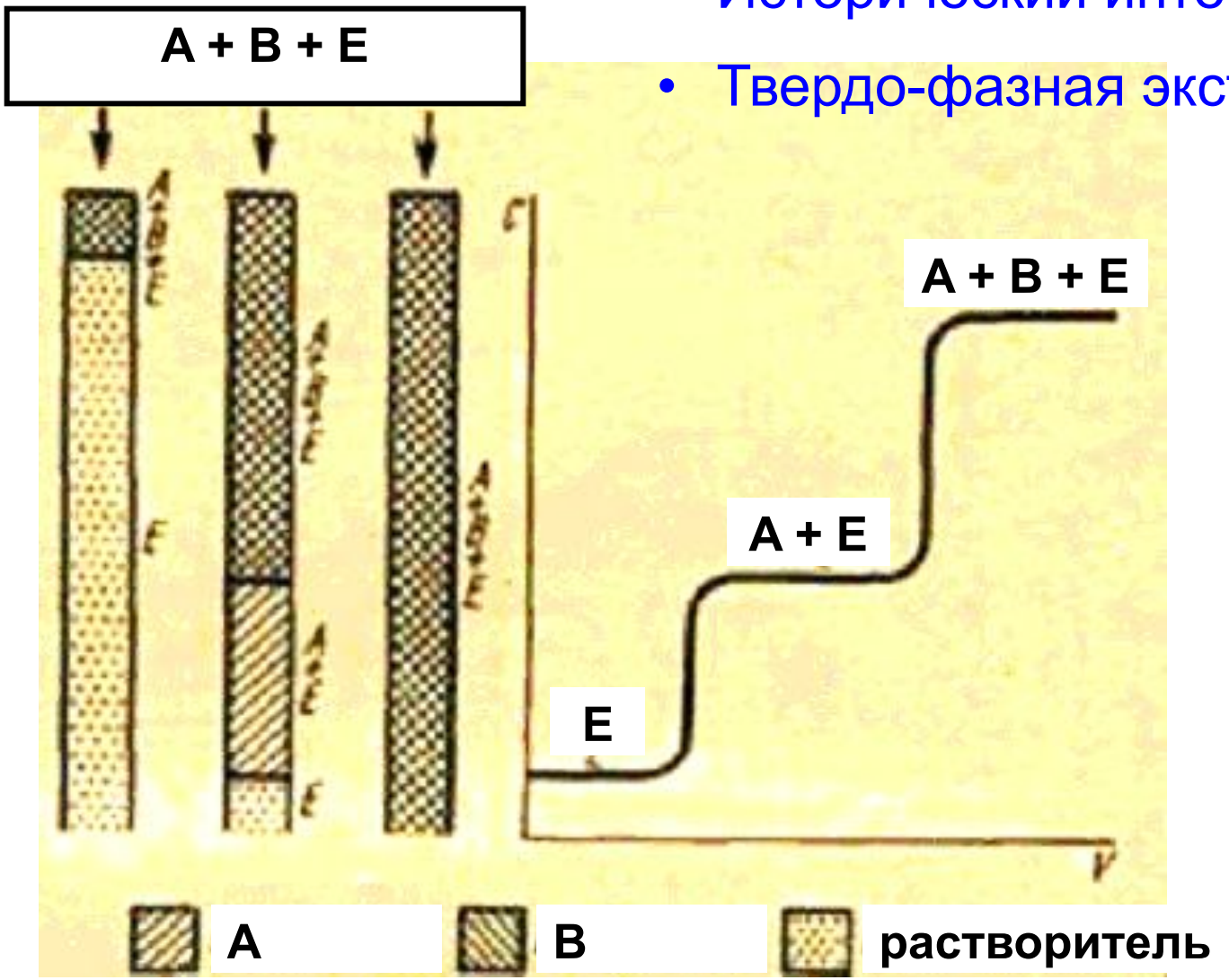
Получение вещества (в любом количестве)

Способ перемещения сорбата

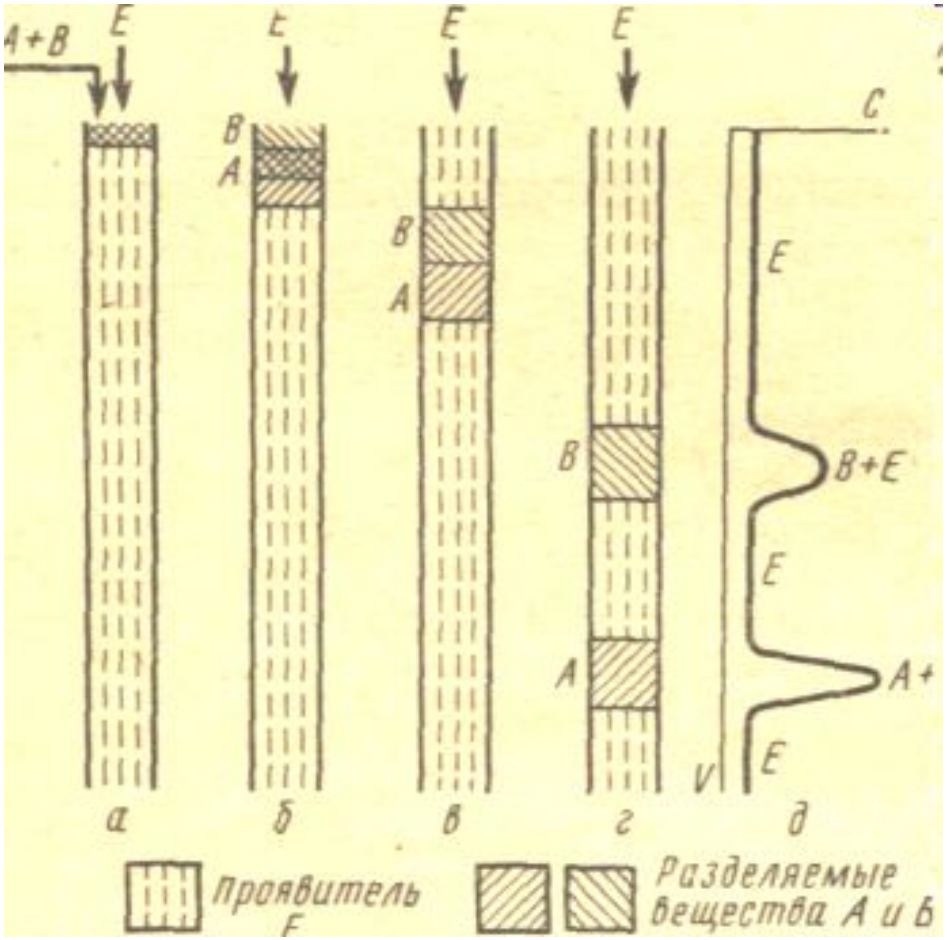
- Фронтальный анализ
- Проявительная хроматография
- Вытеснительная хроматография

Фронтальный анализ

- Исторический интерес
- Твердо-фазная экстракция

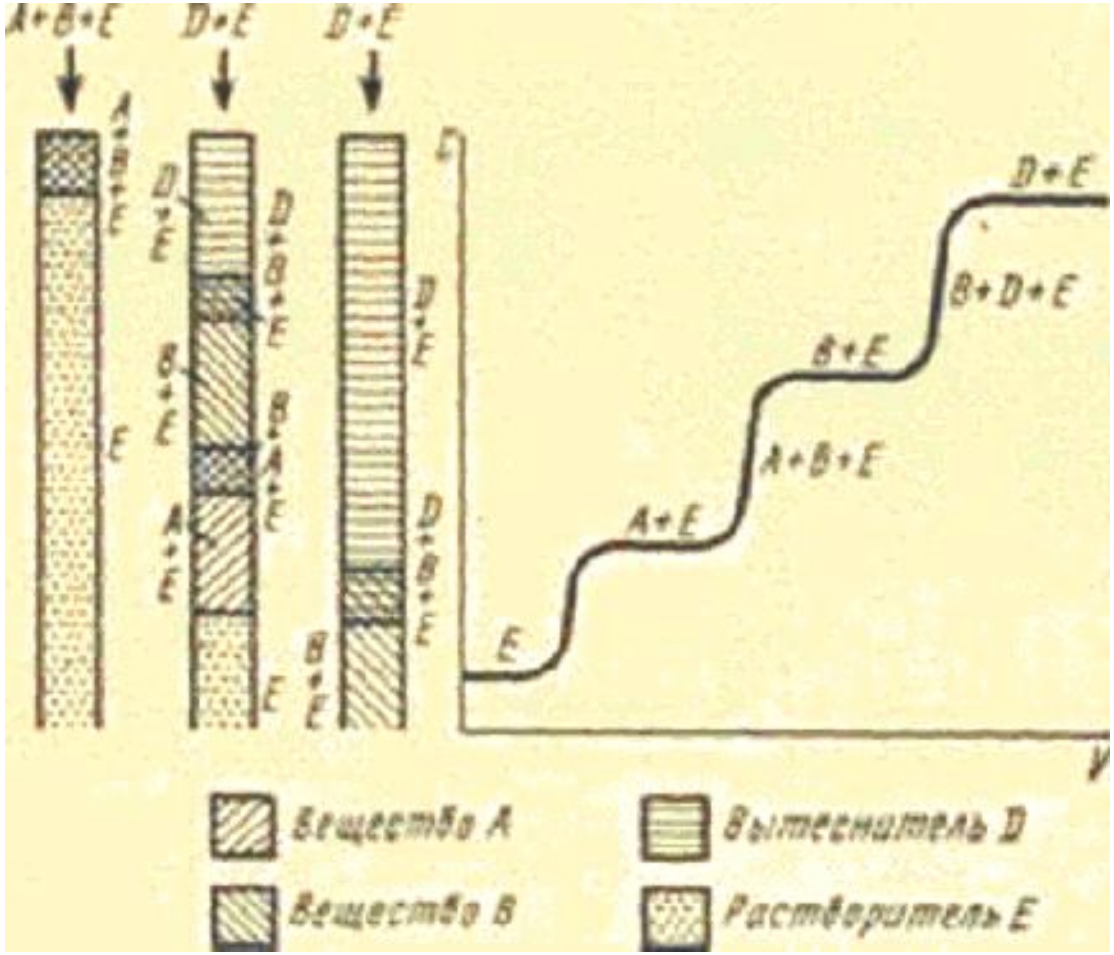


Прявительная хроматогрфия



- Основной современный метод

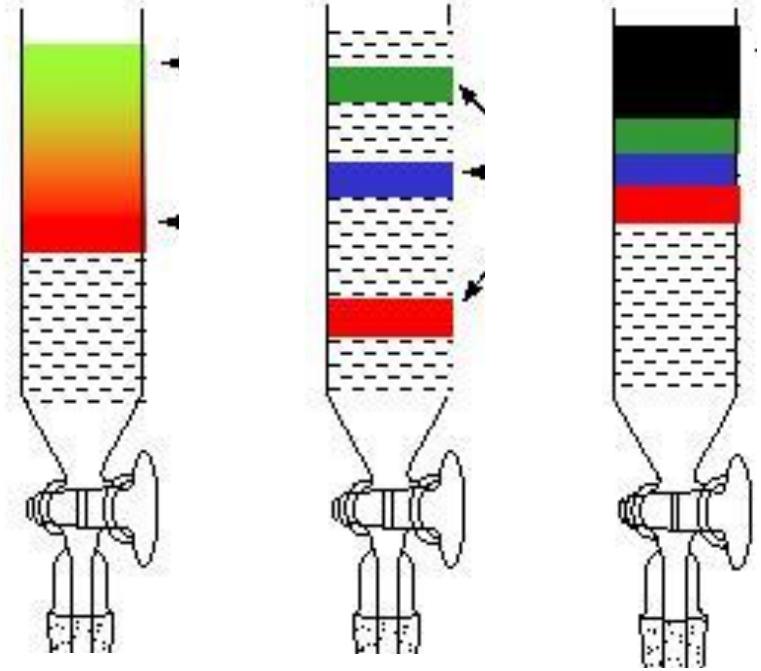
Вытеснительная хроматография

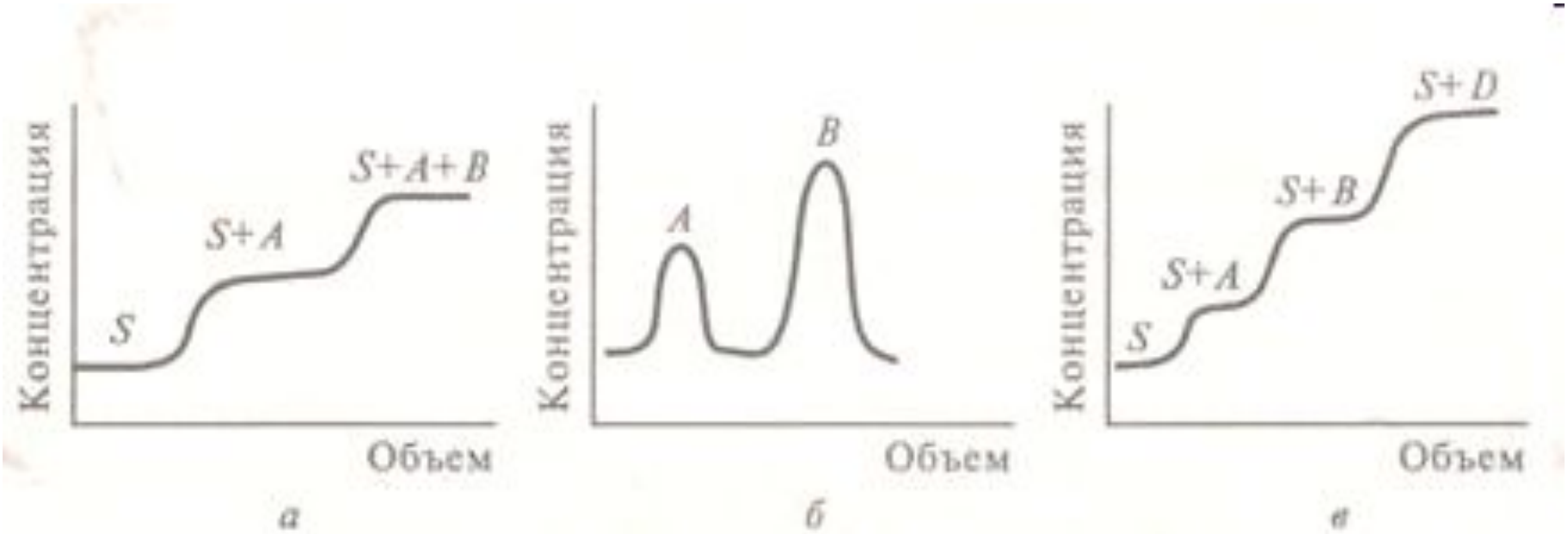


- Высокая нагрузочная способность при невозможности полного разделения
- Препаративная хроматография

Способ перемещения сорбата

- Фронтальный анализ (а)
- Проявительная (б)
- Вытеснительная (в)





Техника исполнения

Планарная

- Бумажная
- Тонкослойная

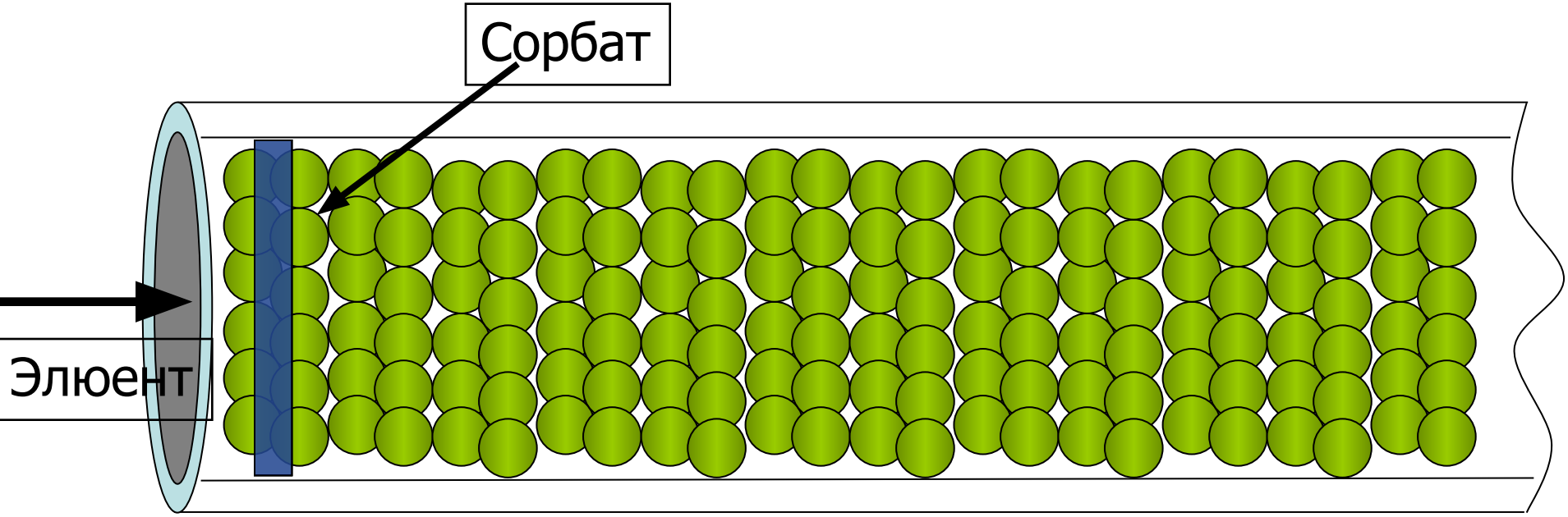
Колоночная

- Низкого давления
- Среднего давления
- ВЭЖХ = HPLC (High-performance liquid chromatography)

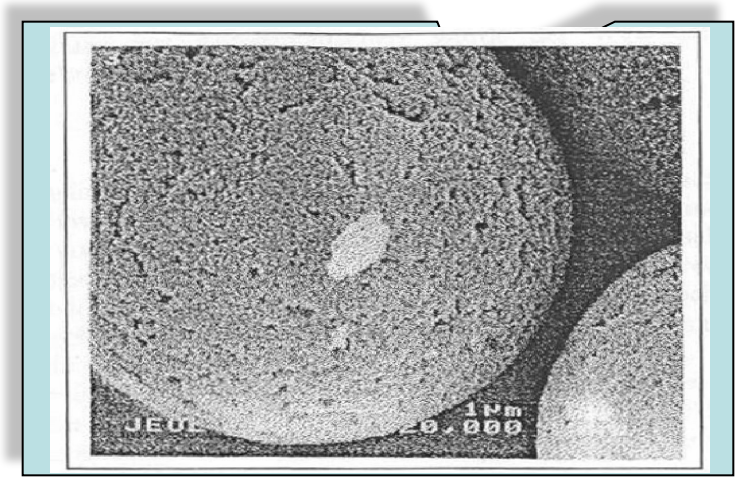
Механизмы разделения

- Адсорбционная
- Распределительная
- Эксклюзионная
- Ионобменная
- Обращенно-фазовая

Процесс разделения

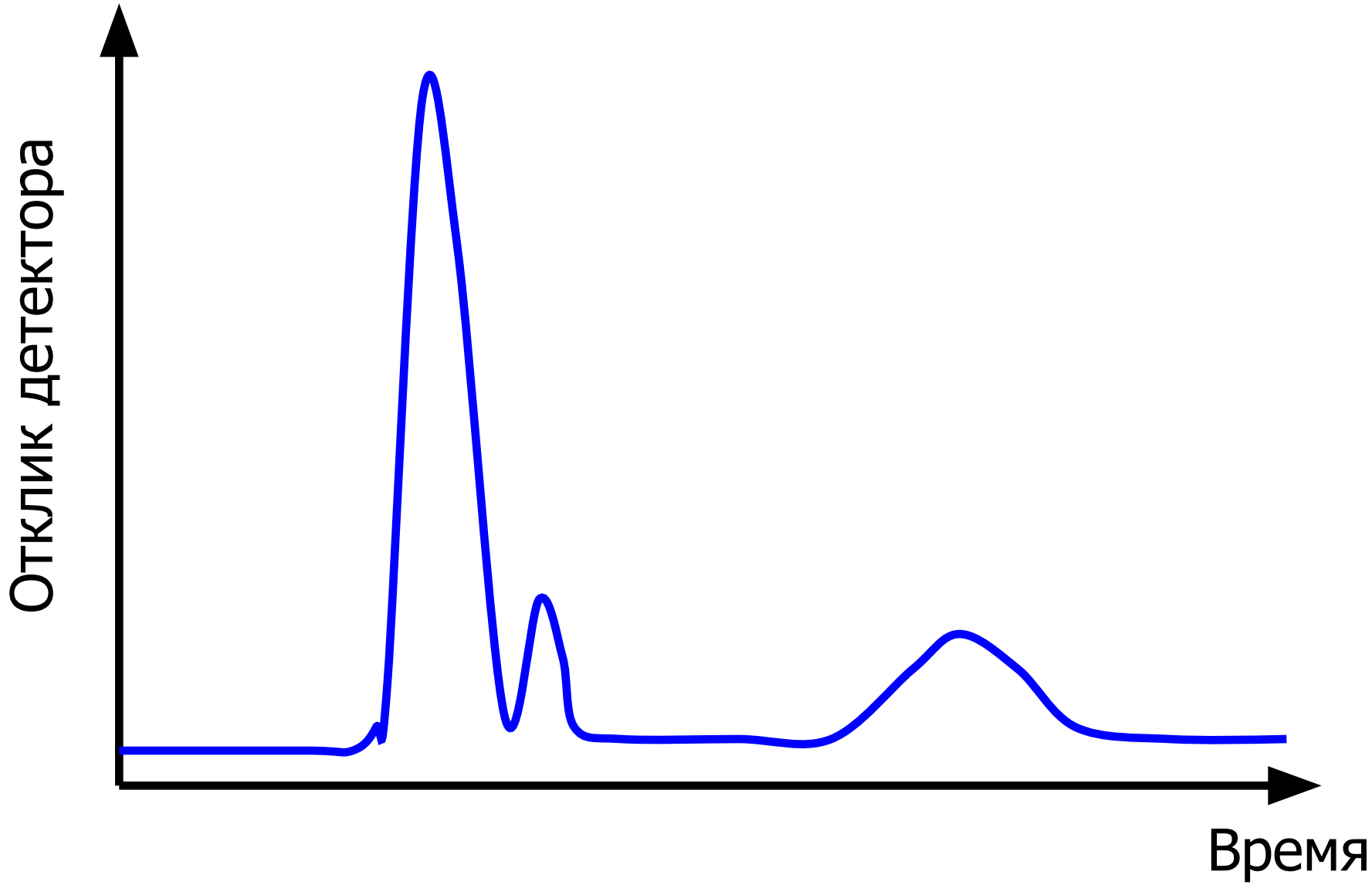


Элюат

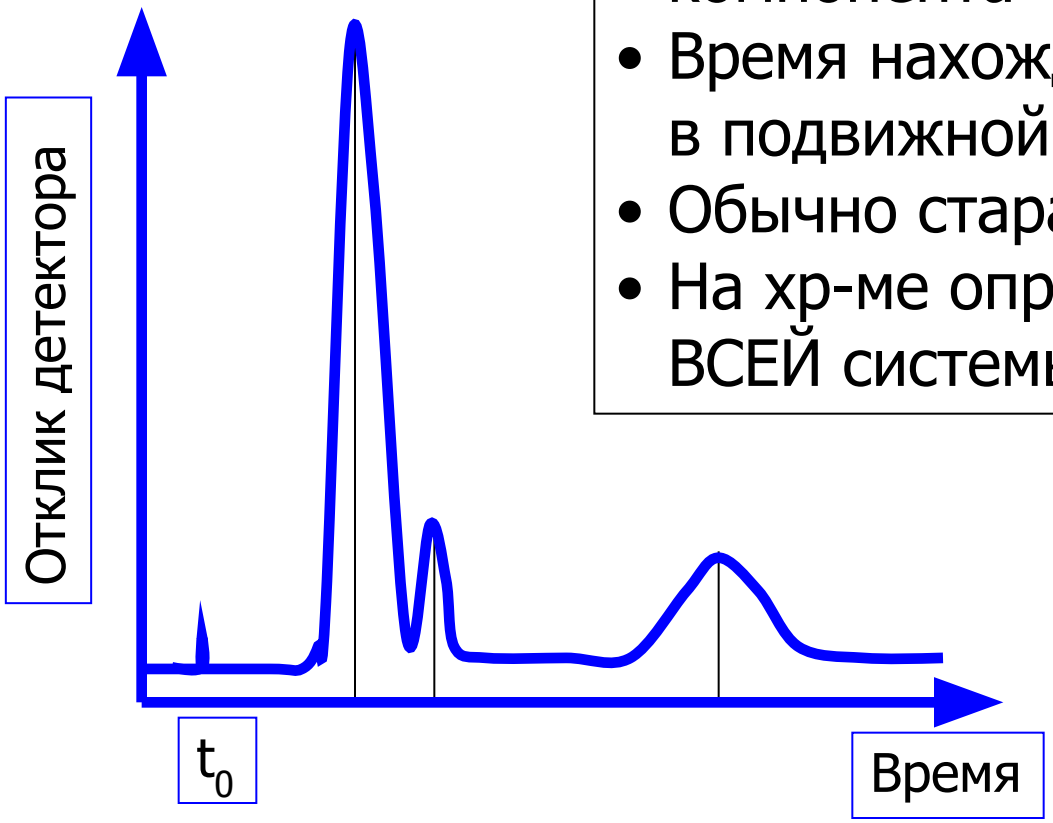


Сорбент

Хроматограмма

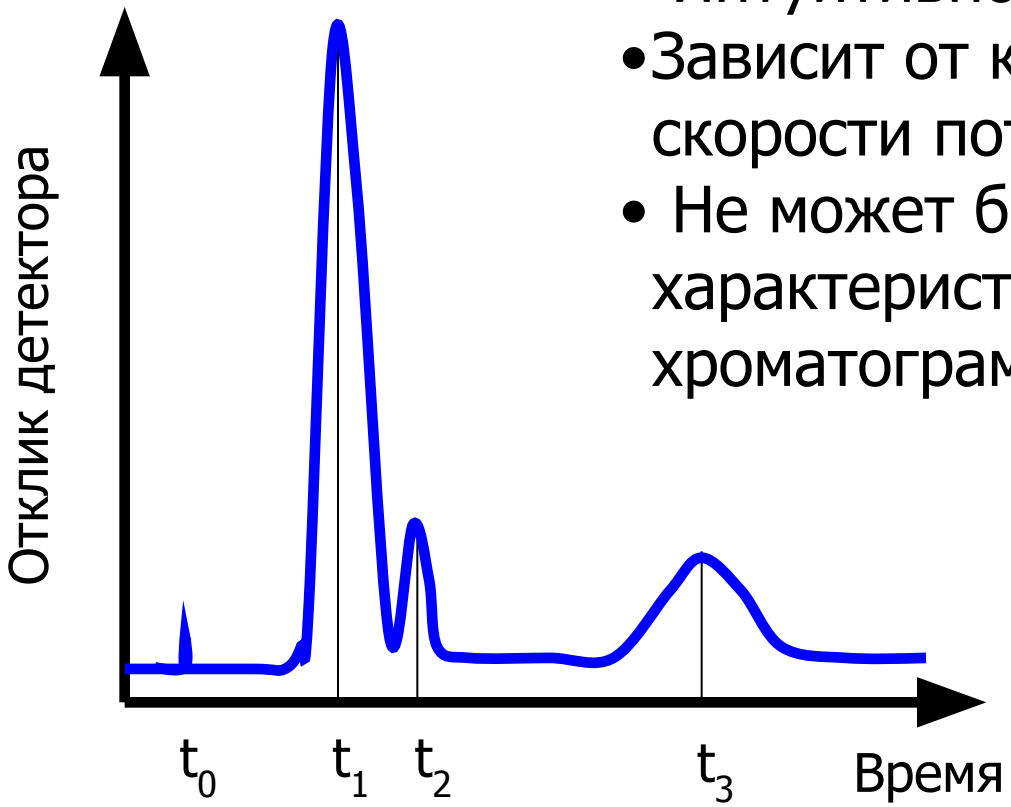


Мертвое время (t_0)



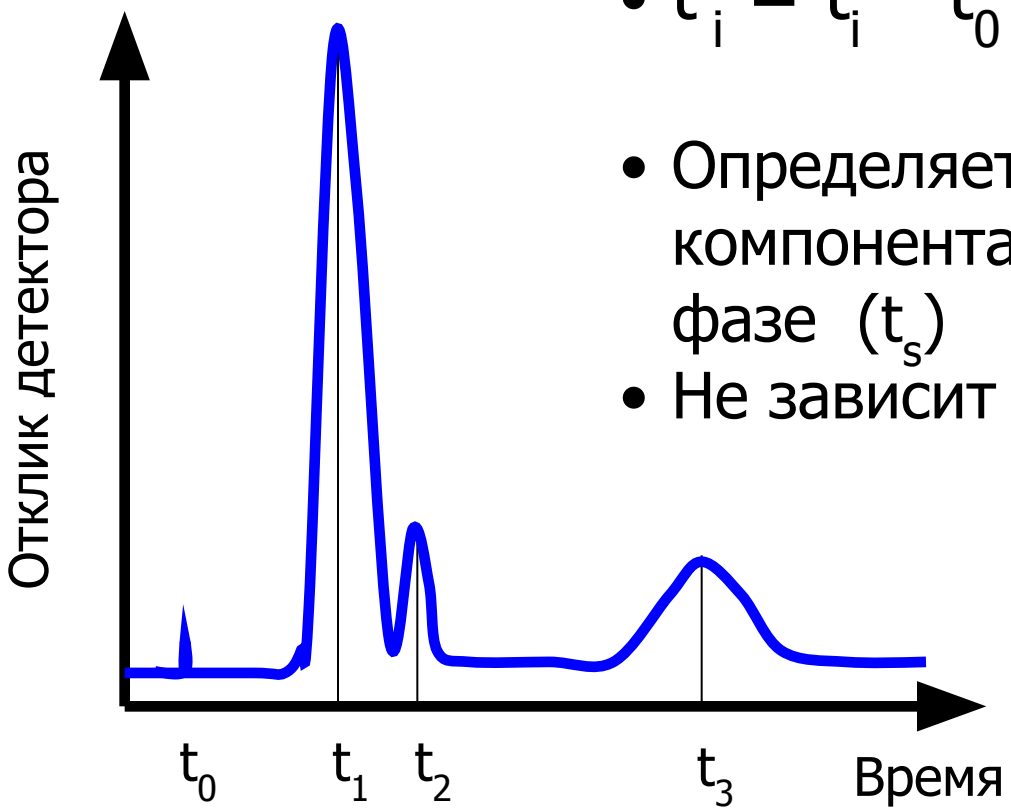
- Время выхода неудерживаемого компонента
- Время нахождения компонентов в подвижной фазе
- Обычно стараются минимизировать
- На хр-ме определяется мертвое время ВСЕЙ системы, а не колонки

Время удерживания (t_i)



- Легко определяется из хроматограммы
- Интуитивно понятно
- Зависит от конструкции системы и скорости потока элюента
- Не может быть адекватной характеристикой при сравнении хроматограмм

Исправленное время удерживания (t'_i)



- $t'_i = t_i - t_0$
- Определяет время нахождения компонента в НЕПОДВИЖНОЙ фазе (t_s)
- Не зависит от конструкции системы

Удерживаемый объем (V_x)

1 хроматограмма: $F = 1$ мл/мин $t_0 = 2$ мин $t_1 = 5$ мин

2 хроматограмма: $F = 0.5$ мл/мин $t_0 = 4$ мин $t_1 = 10$ мин

- $V'_x = t'_x * F$
- $V'_x = V_x - V_0$
- Не зависит от скорости потока подвижной фазы

Свободный объем

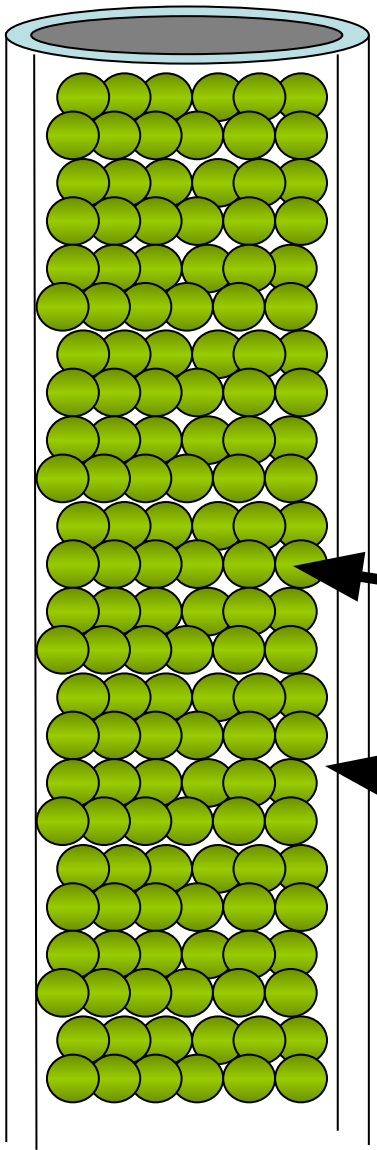
Свободный объем системы V_{oc} — это объем, занимаемый подвижной фазой от устройства для ввода пробы до детектора

Свободный объем колонки V_m - часть свободного объема системы, находящаяся в пределах колонки

В современных хроматографах $V_{oc} \rightarrow V_m$

Удерживаемый объем является константой данного вещества на данной колонке в подвижной фазе данного состава, но на колонке других размеров он изменяется, несмотря на то, что используются те же сорбент и подвижная фаза.

Фазовое отношение ϕ (фи)



Фазовое отношение колонки

$$\phi = V_s / V_m$$

- отношение объемов неподвижной и подвижной фаз в колонке

$$V_s = \Sigma (V_s)$$

$$V_m = \Sigma (V_m)$$

Коэффициент емкости К
(фактор удерживания)

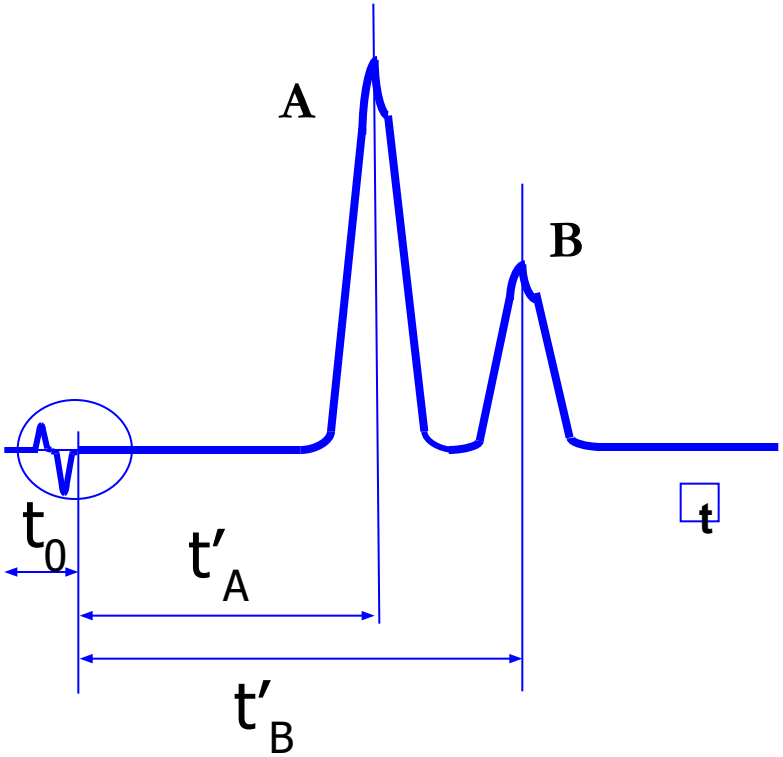
Коэффициент емкости

$$K_i = (t_i - t_0) / t_0$$

- отношение исправленного времени удерживания к мертвому времени

Этот параметр не зависит от размеров колонки, непосредственно связан с коэффициентом распределения в данной системе и широко используется в хроматографической литературе и расчетах. Инвариант!

Относительное удерживание (селективность) α (альфа)



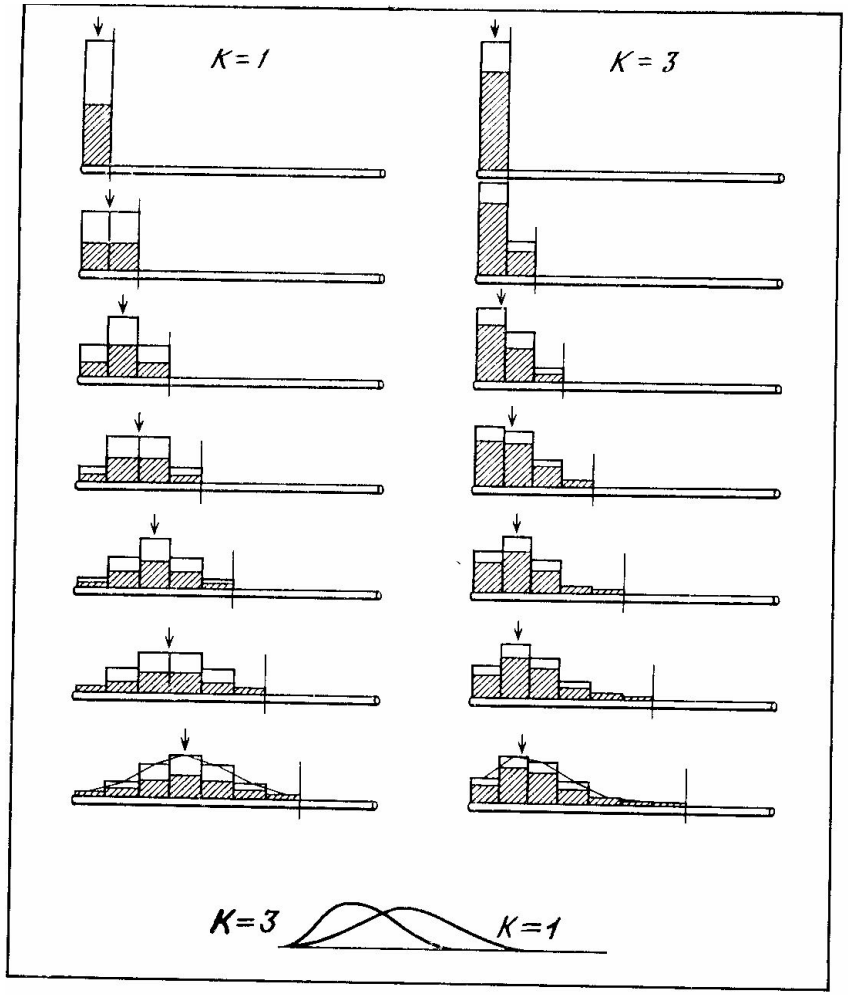
$$\alpha_{BA} = t'_B / t'_A$$

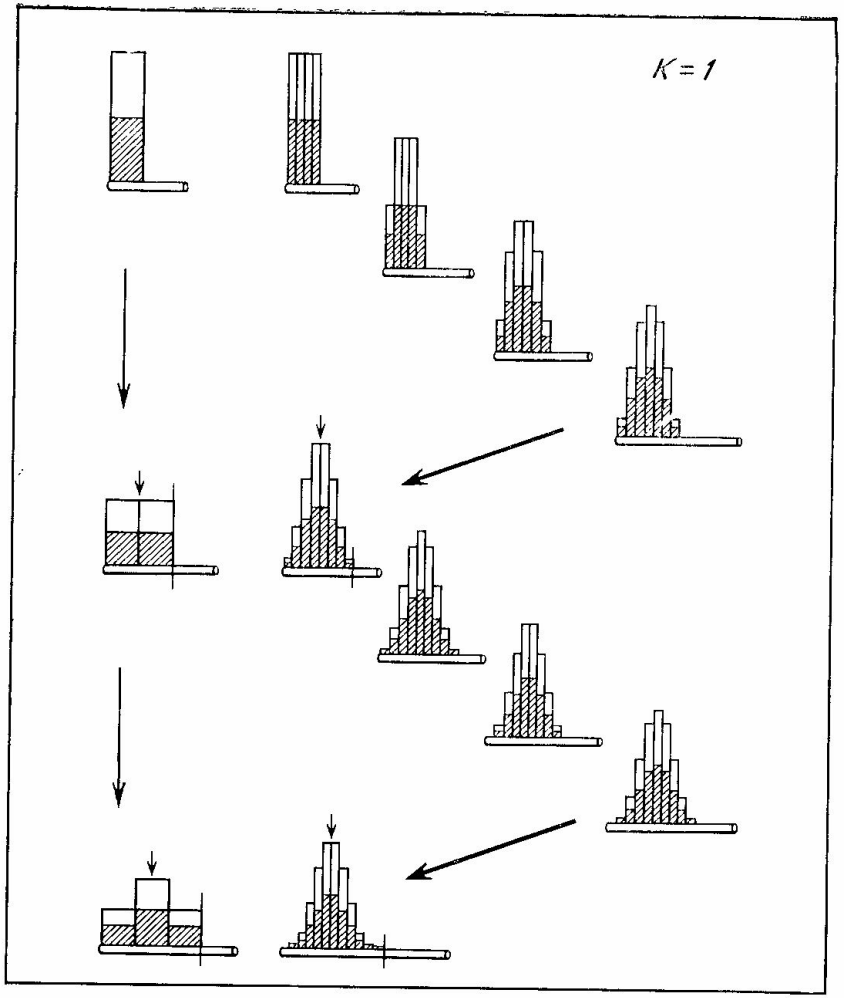
$$\alpha_{BA} = t_B / t_A$$

$$\alpha \geq 1$$

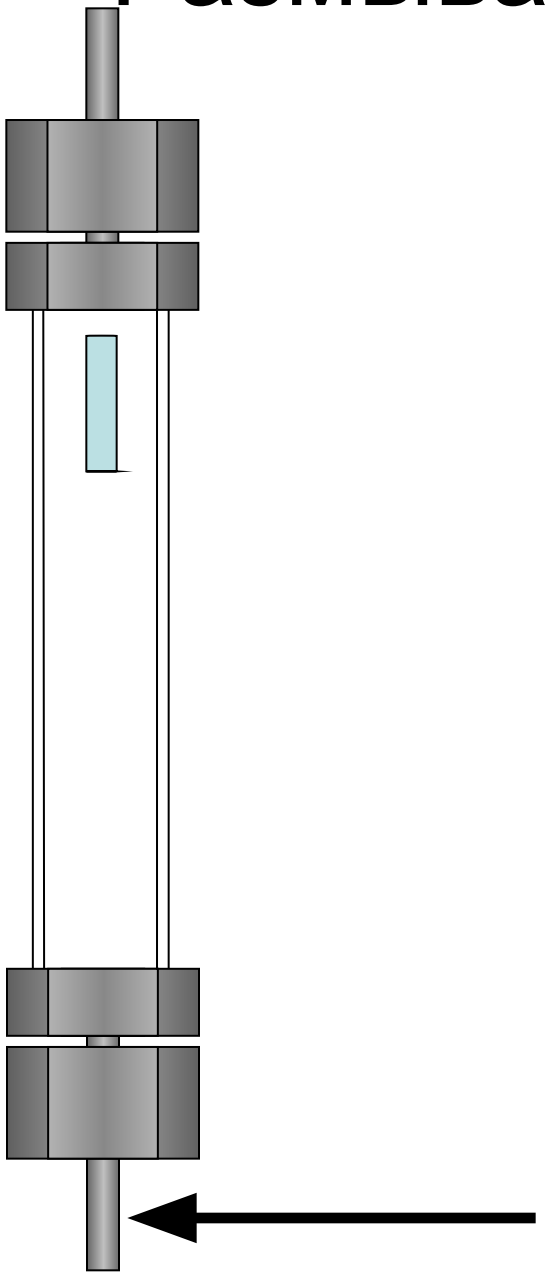
Селективность — это способность хроматографической системы разделять данную пару веществ А и В.

Эффективность

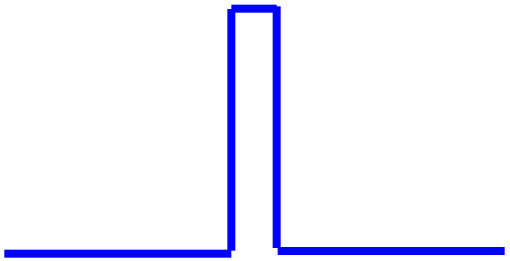




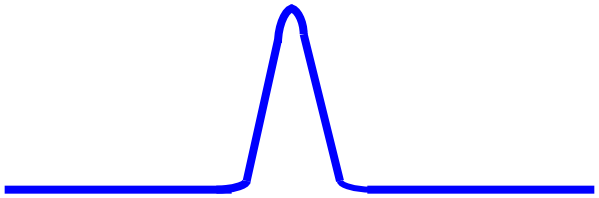
Размывание зоны компонента



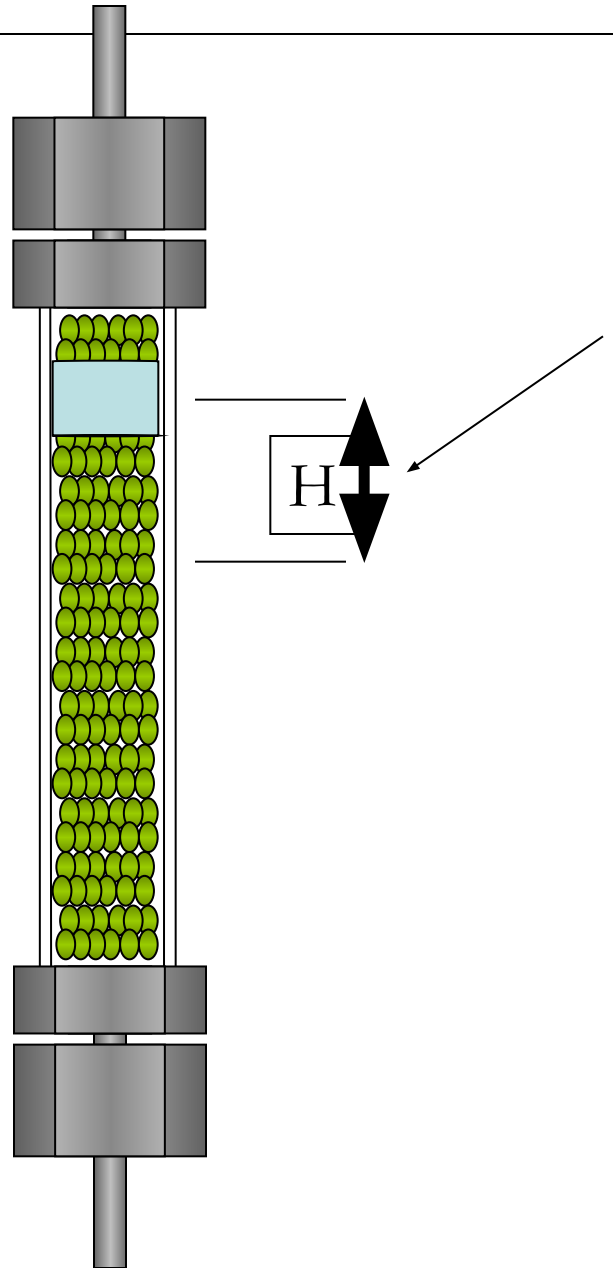
Теоретическая форма пика



Реальная форма пика



Теория теоретических тарелок



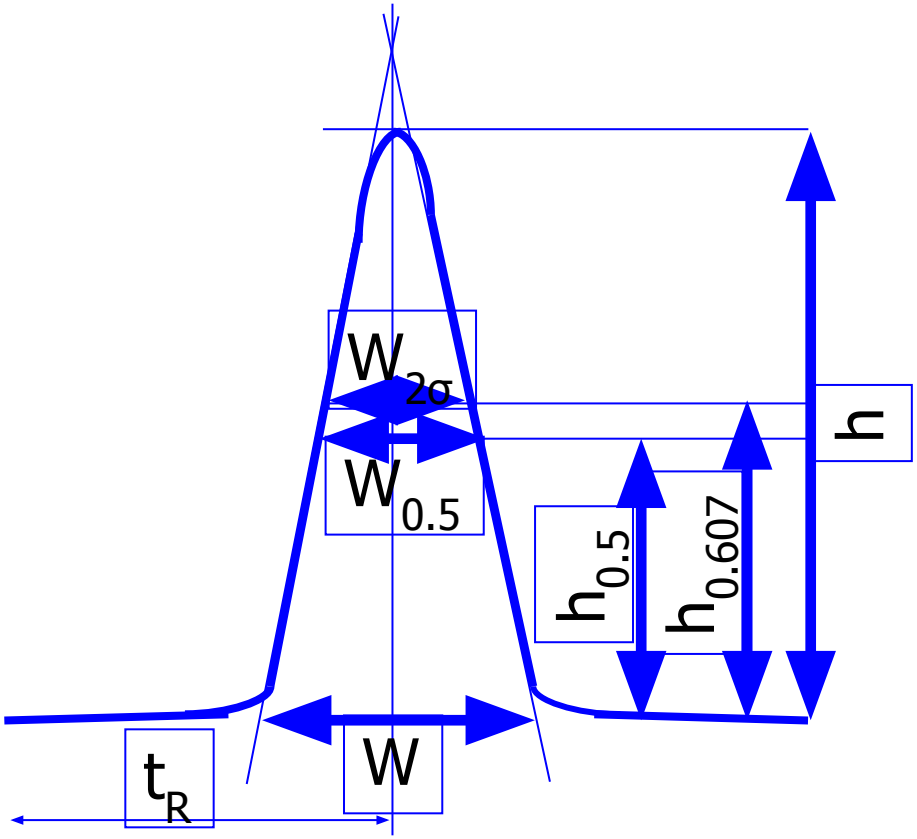
Высота эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

Соответствует высоте слоя сорбента, при прохождении которой акт сорбции—десорбции успевает совершиться в среднем один раз.

$$N = L / H_{ВЭТТ}$$

Отражает качество использованного сорбента и заполнения колонки.

Эффективность колонки и ширина пика



$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{0.5}}\right)^2 = 4 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{2\sigma}}\right)^2$$

Кинетическая теория размывания

Скорость перемещения по колонке отдельных молекул отличается от средней скорости, характерной для данного соединения

- Неоднородность потока подвижной фазы.
- Продольная диффузия в неподвижной и подвижной фазах
- Кинетика массопередачи в неподвижной и подвижной фазах
- Неравновесность процесса внутри застойных зон

Кинетическая теория размывания

Эффективность зависит от:

- Диаметра зерен сорбента, их геометрии и монодисперсности
- Качества набивки колонки
- Мертвого объема системы
- Скорости потока элюента

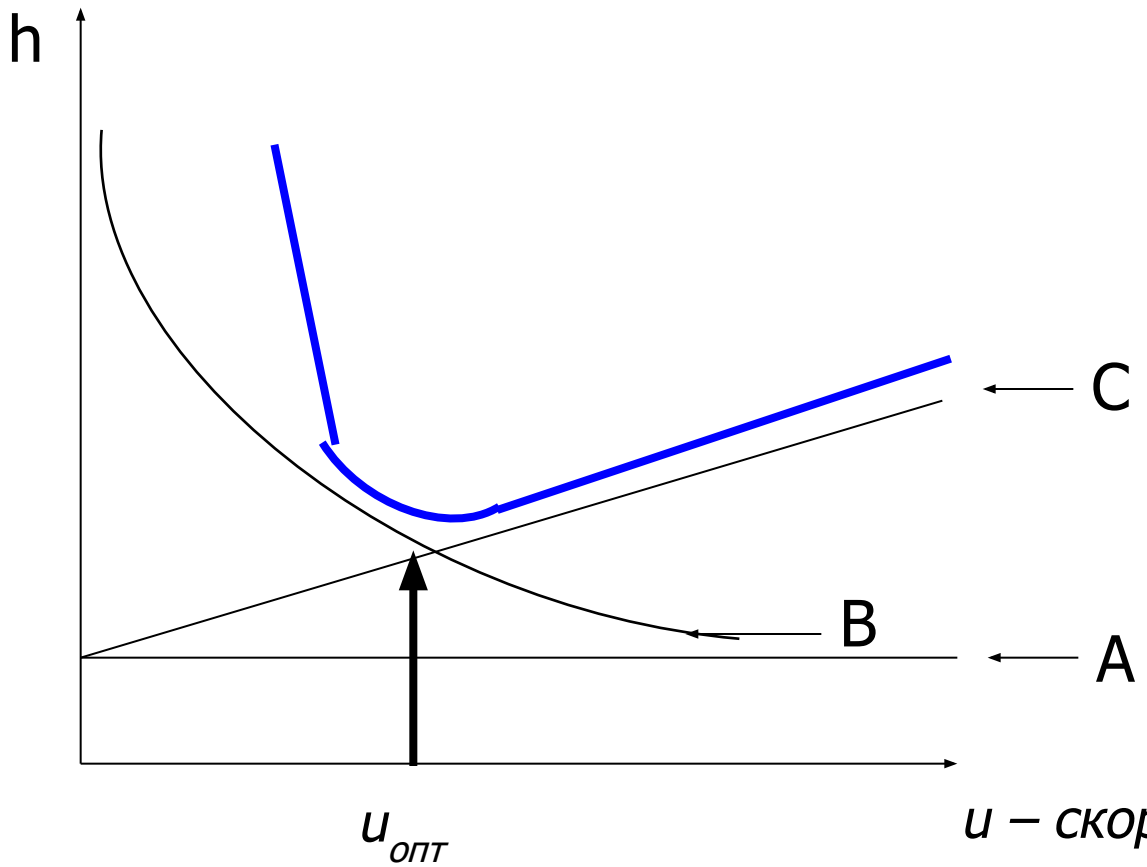
Уравнение Ван-Деемтера

$$НВЭТТ = A + B/u + Cu$$

A – Вихревая диффузия

B – Молекулярная диффузия

C – Сопротивление массопереносу



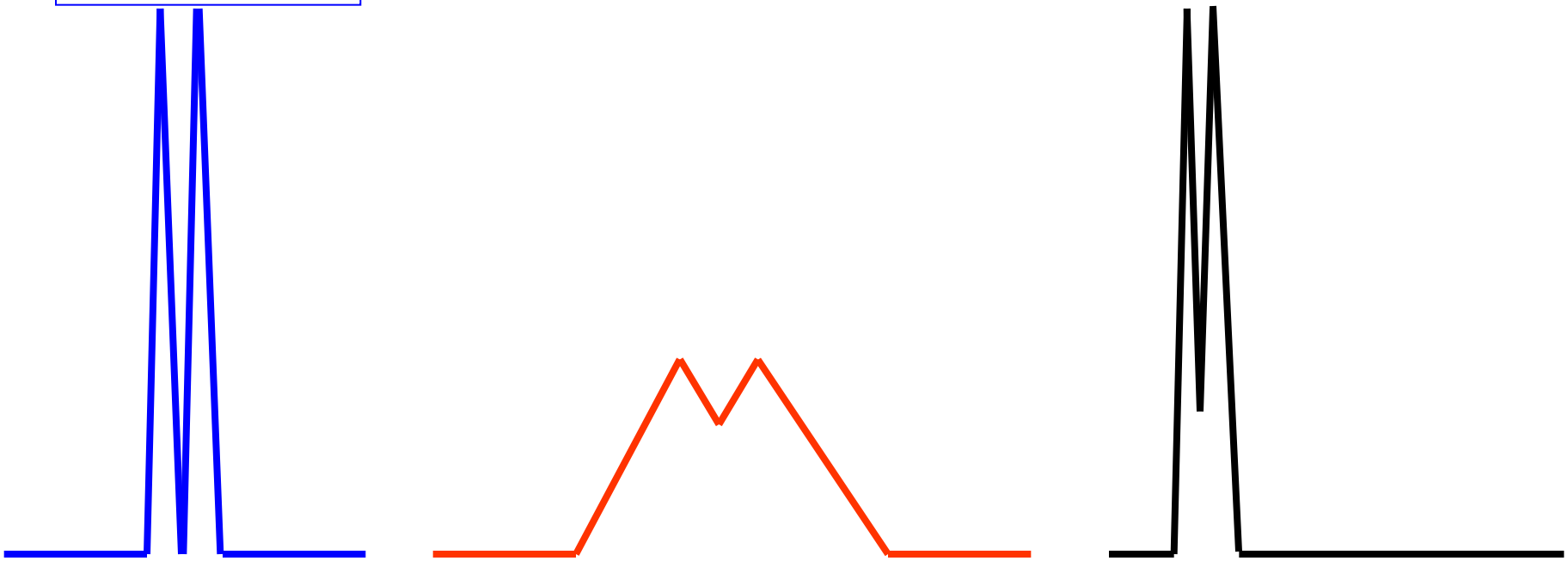
u – скорость потока ПФ

Влияние удерживания (K), селективности (α) и эффективности (N) на разделение

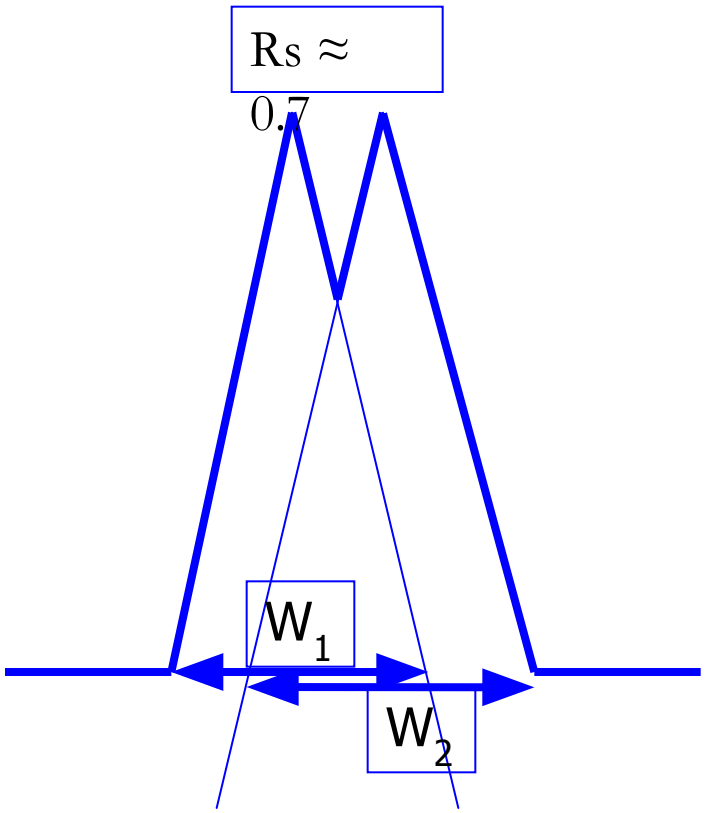
K = 5
α = 1.2
N = 10 000

K = 5
α = 1.7
N = 400

K = 0.5
α = 1.4
N = 15 000



Критерий разделения Rs

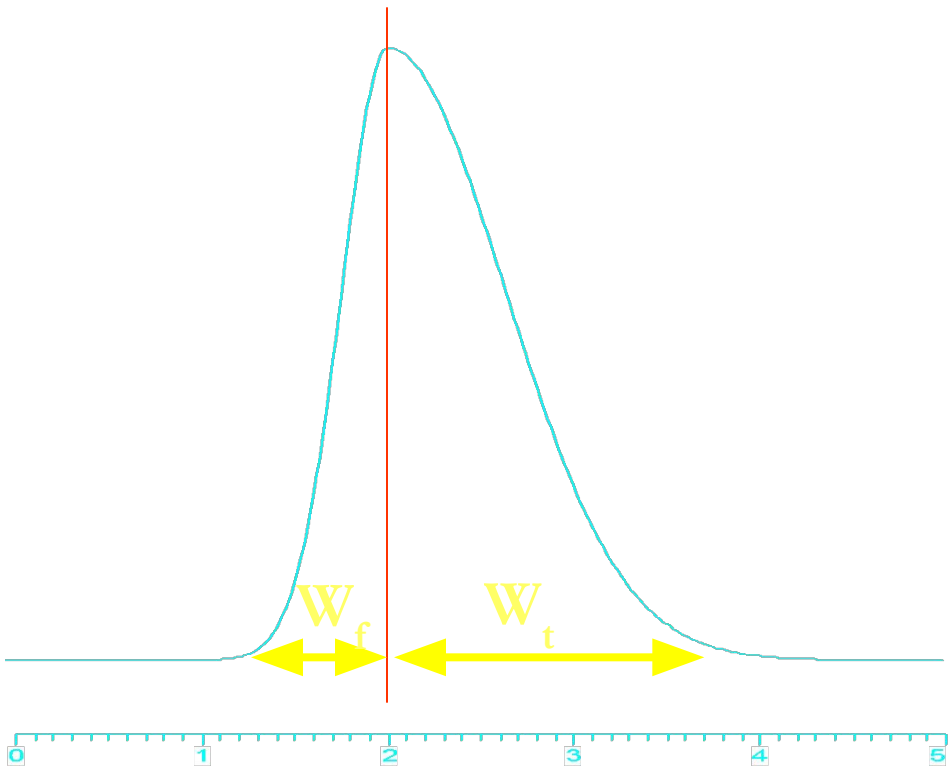


$$Rs = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

$$Rs = \frac{1}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{\bar{K}'}{1 + \bar{K}'} \right) \cdot \sqrt{N}$$

- Продолжает увеличиваться при увеличении времени второго пика и уже полном разрешении

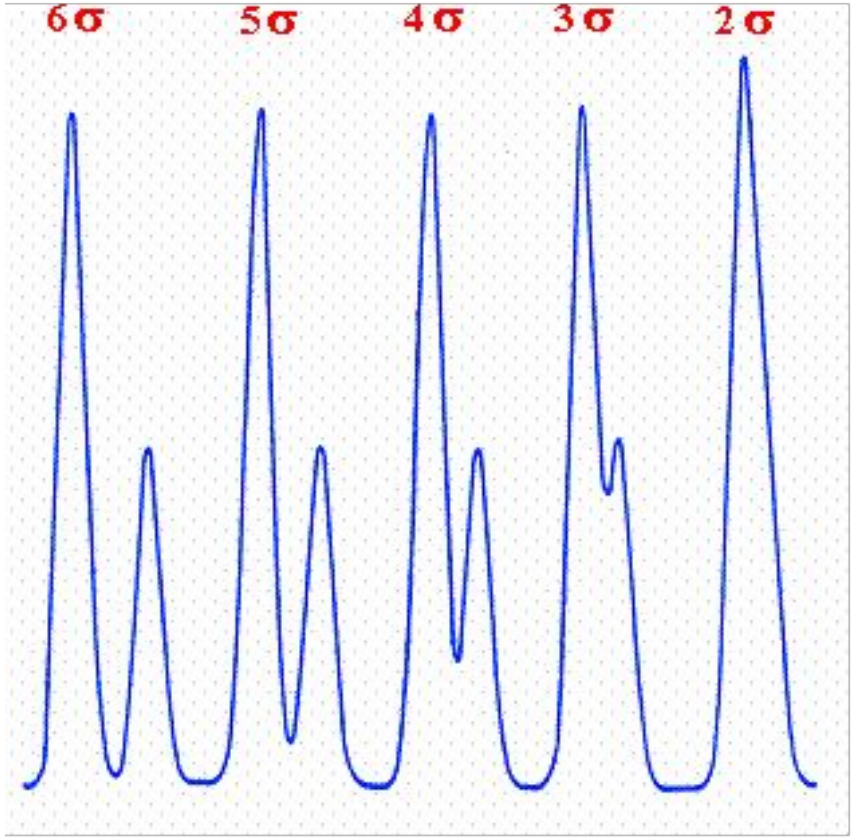
Коэффициент асимметрии, A_s

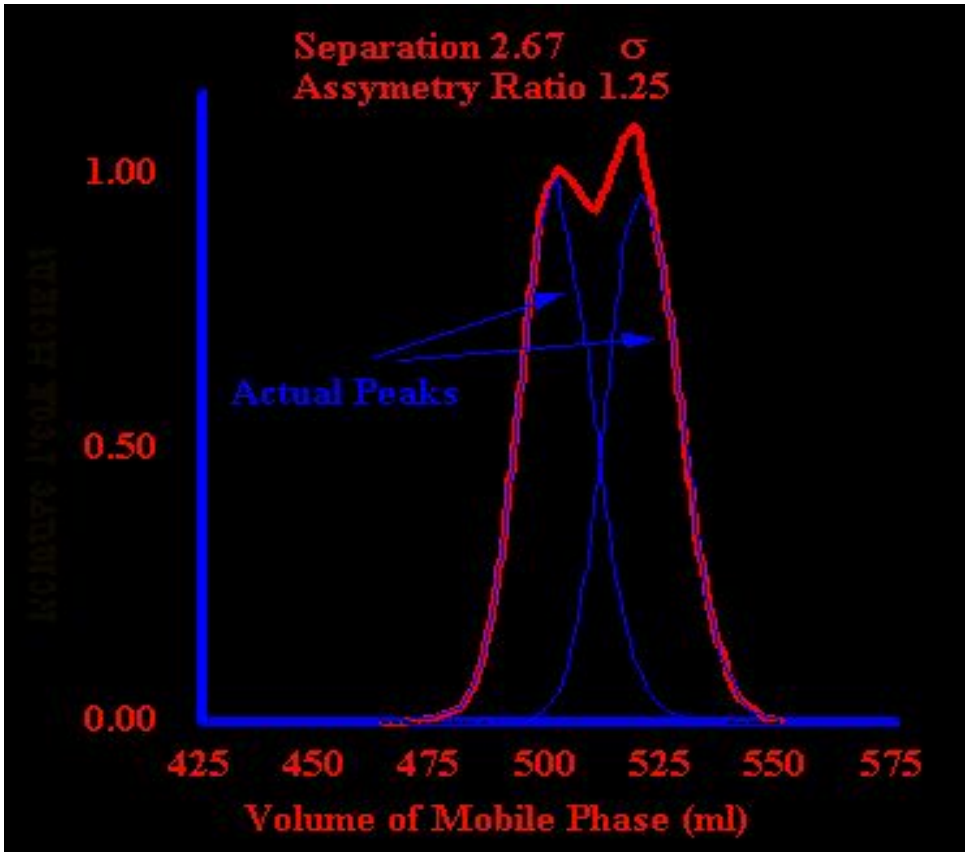


$$As = W_t / W_f$$

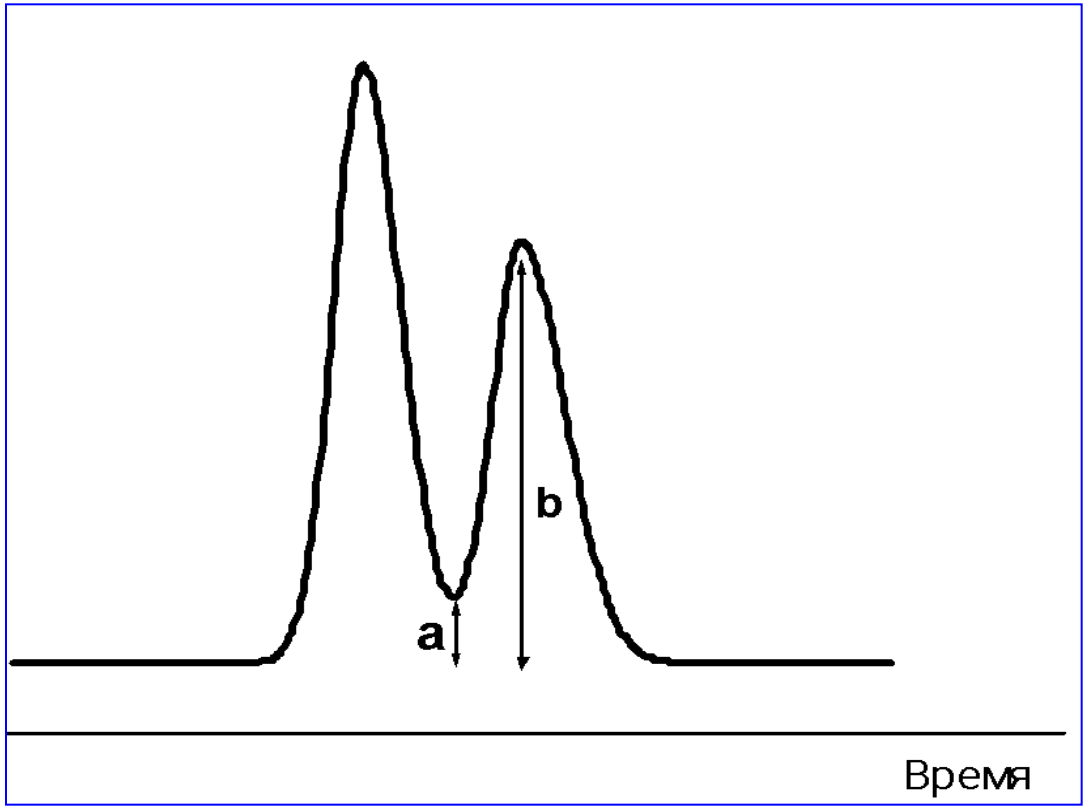
- Взаимодействие образца с силанольными группами сорбента
- Неоднородность сорбента (мелкая фракция, несферичность)
- Отравление колонки тяжелыми металлами (в ионной хр-фии)
- Образование полости в слое сорбента (или его проседание)

Разрешение пары соседних пиков





Критерий Кайзера *V*



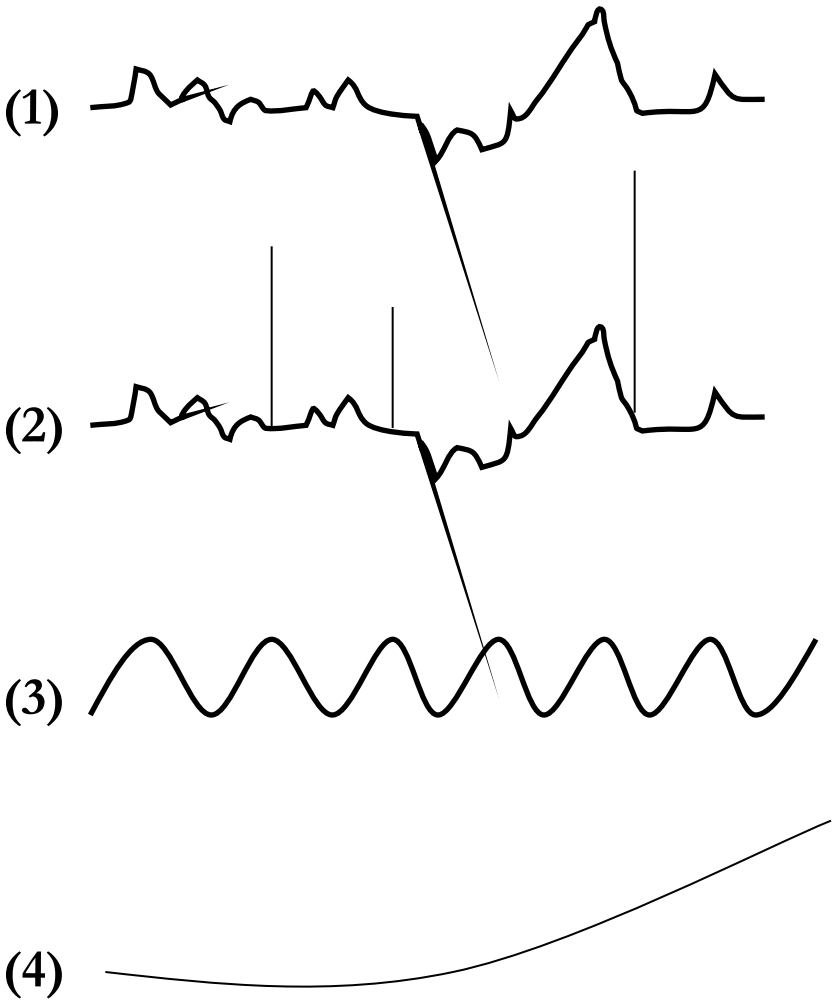
$$V = \frac{(b-a)}{b}$$

- Изменяется от 0 до 1
- Может применяться для несимметричных пиков

Факторы, улучшающие разрешение пиков

- Увеличение длины колонки
- Уменьшение внутреннего диаметра колонки
- Оптимальная скорость потока элюента
- Однородность сорбента, его сферичность
- Однородность набивки колонки
- Уменьшение обьема вводимой пробы
- Правильный выбор подвижной фазы
- Использование градиентного элюирования
- Правильный выбор неподвижной фазы

Флуктуации базовой линии в хроматографии



«Белый» шум

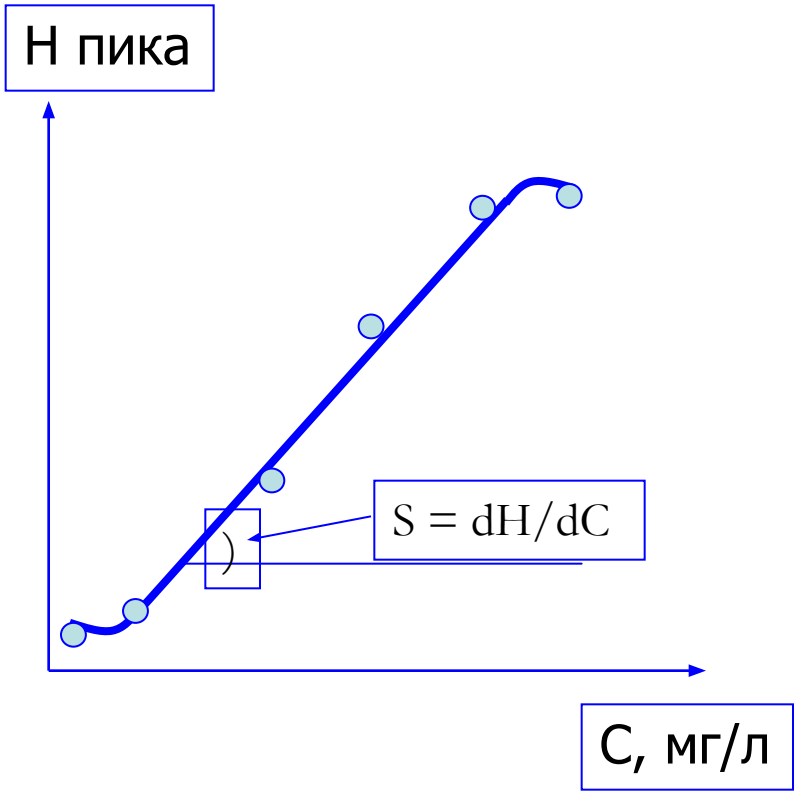
«Белый» шум со всплесками

Периодичный шум

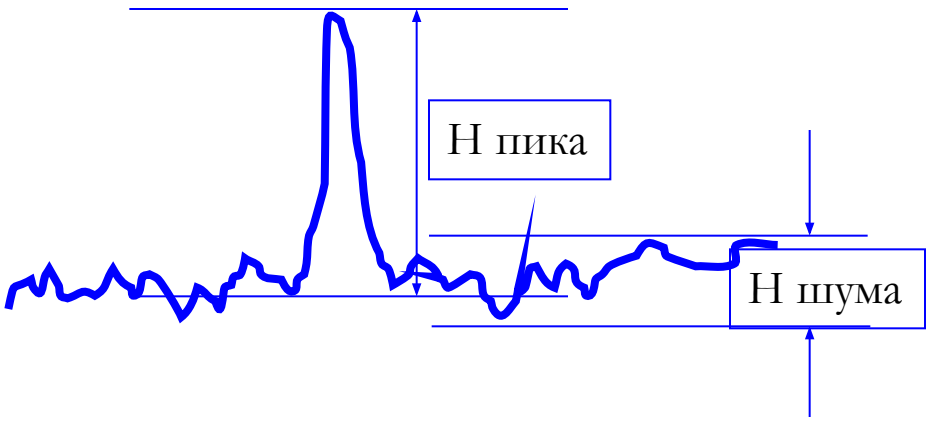
Дрейф нулевой линии

Чувствительность и предел обнаружения

Чувствительность – наклон градуировочного графика



Предел обнаружения – наименьшее содержание, при котором компонент можно обнаружить с заданной вероятностью по данной методике

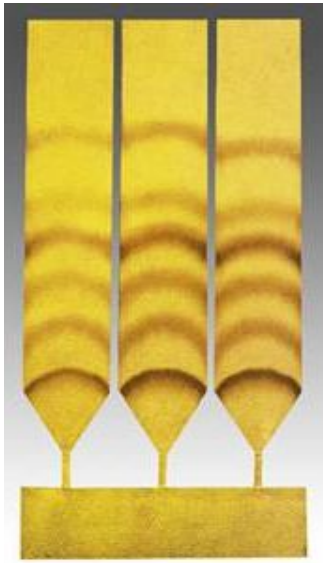


H пика = 3 * H шума

Планарная - бумажная

Рис.7.4.1. Виды бумажной хроматографии

A. Восходящая
B. Нисходящая
C. Радиальная



Механизм разделения – распределительный, нормально-фазовый. Бумага полярна.

Применяется редко, замена – ТСХ

Применяется для комбинации с электрофорезом – 2D метод

Планарная - ТСХ

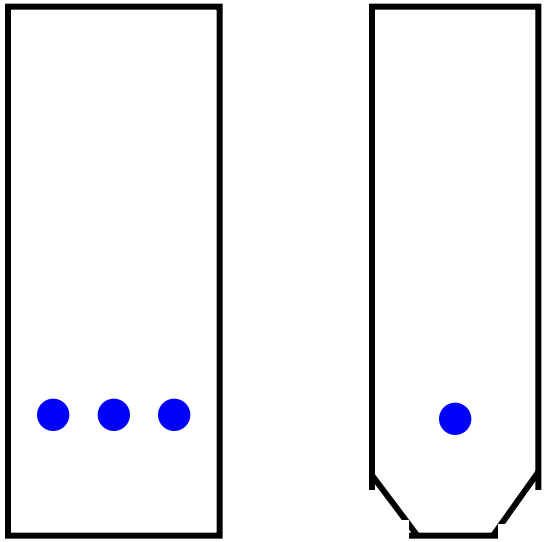
- Подложка – фольга, стекло, полимерные пленки
- Толщина сорбента – 100-200 мкм (аналитика), 1-3 мм (препаратив)
- Сорбенты – силикагель, окись алюминия, С18 etc.

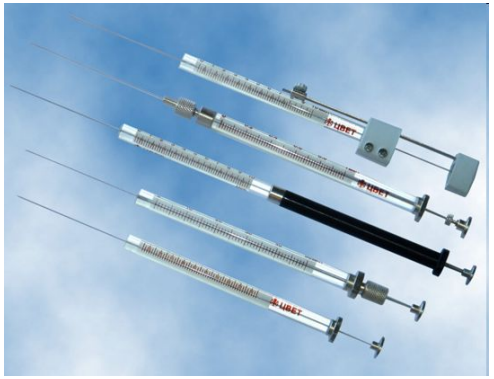
1. Отрезать или взять пластину
2. [Кондиционировать сорбент]
3. Нанести образец
4. Провести разделение – «ПРОЯВЛЕНИЕ»
5. Визуализировать, Rf
6. Перевести в компьютер (картинка или хроматограмма)

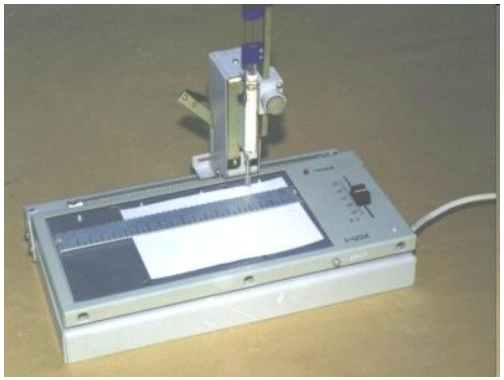
Планарная - ТСХ

1. Отрезать или взять пластину
2. [Кондиционировать сорбент]
3. Нанести образец

Нанесение образца проводится в случае качественного анализа капилляром, в случае колличественного анализа – микрошприцем или специальным прибором - аппликатором

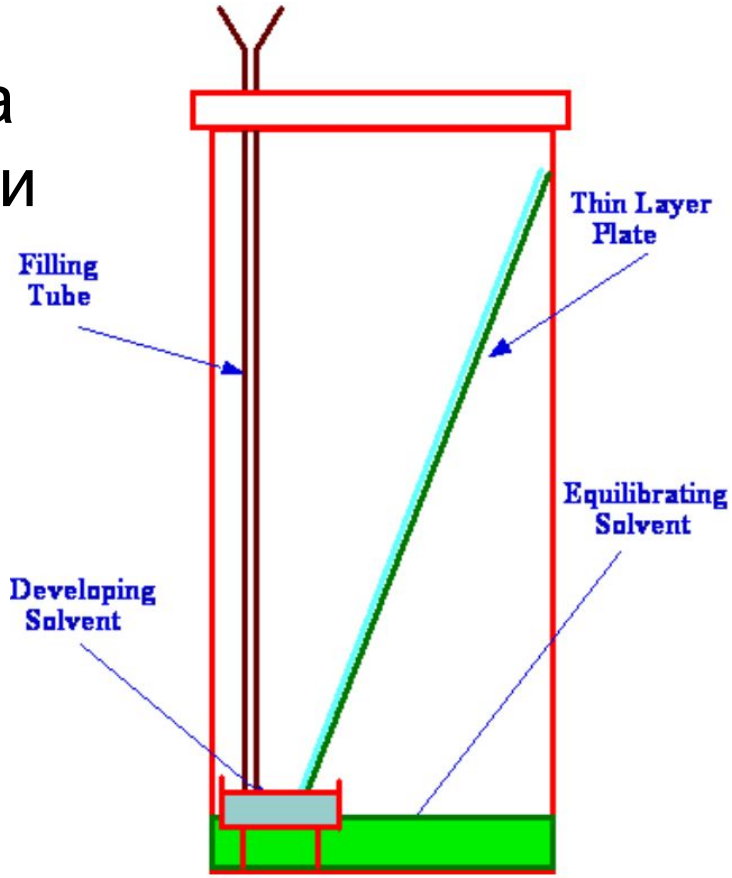






Планарная - ТСХ

N-камера – нормальная, пластина приводится в равновесие с парами элюента



Разделение начинают только после уравновешивания!

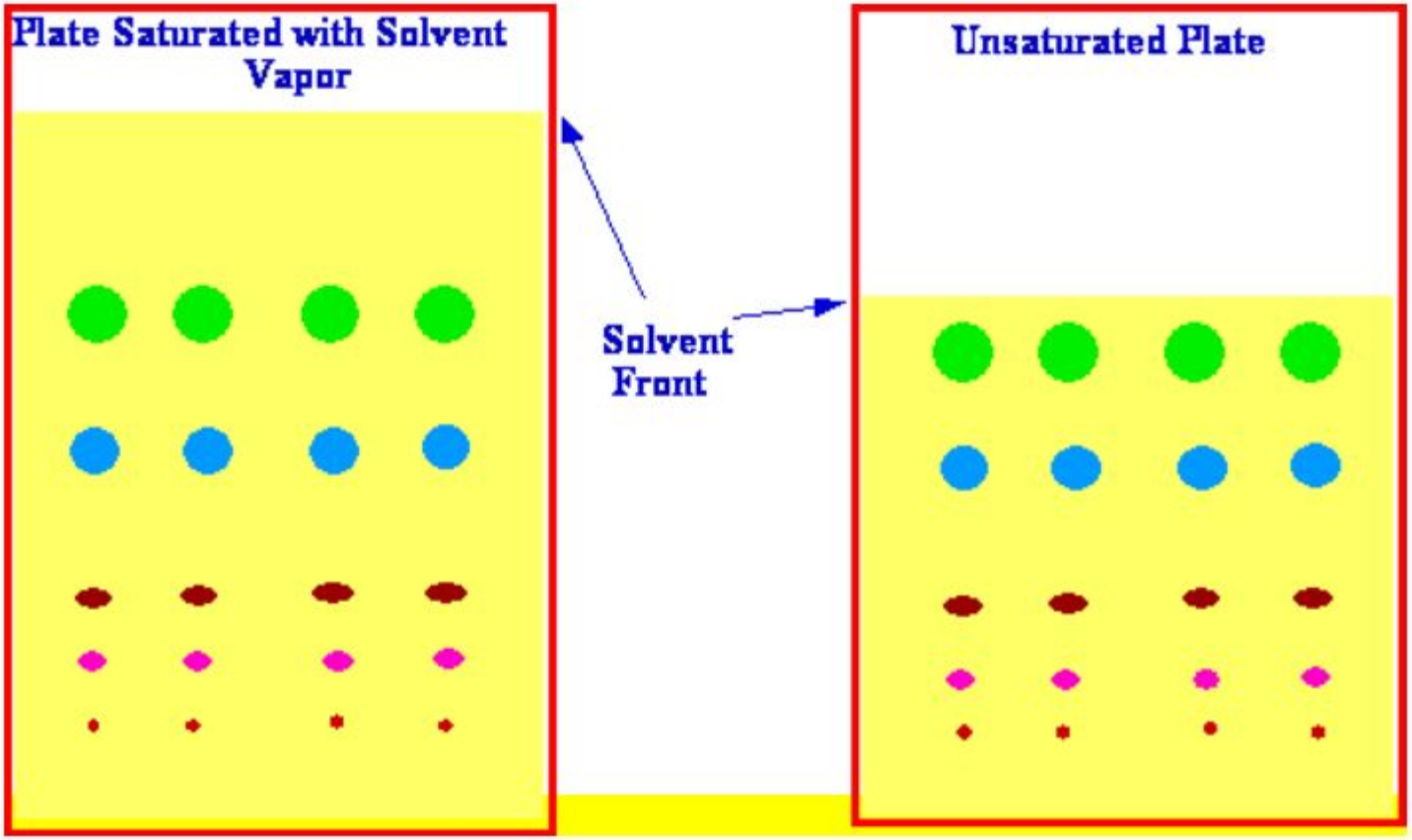
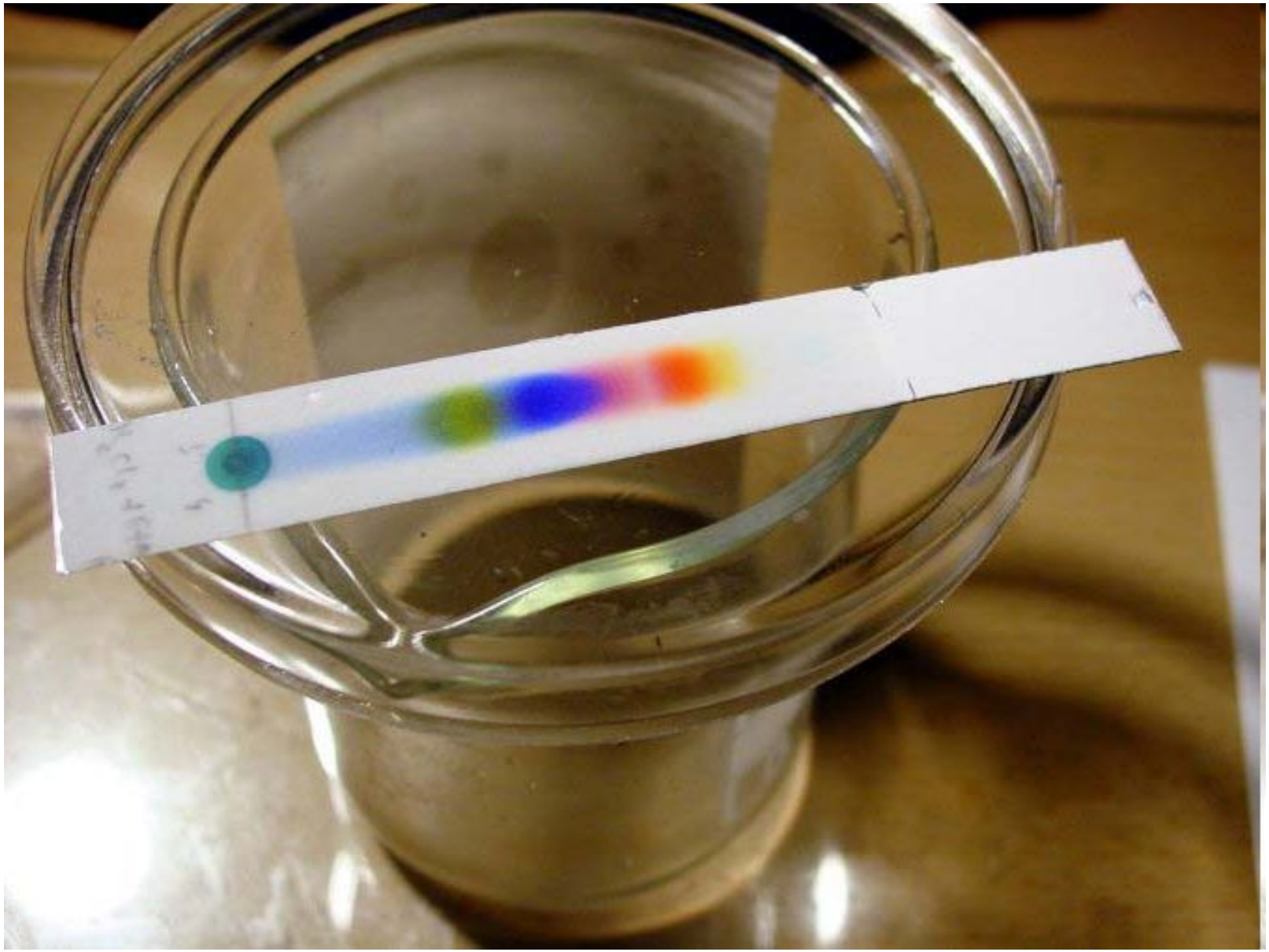


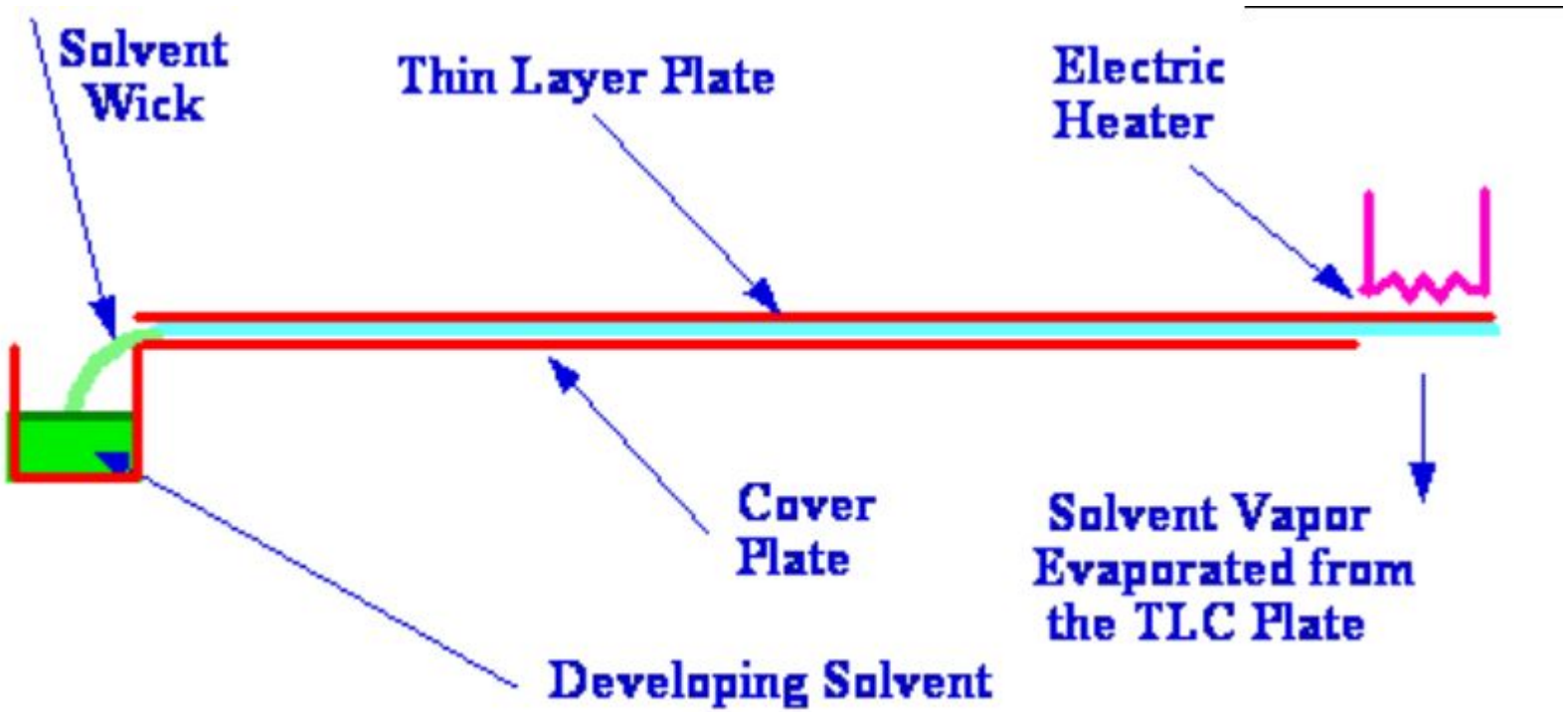
Figure 5. Effect of Plate Saturation on Plate Development

Планарная - ТСХ



Планарная - ТСХ

S-камера – сэндвич, неравновесные условия, обратный градиент. Часто используется в варианте «**Continuous**»



Разделение за счет капиллярных сил

Одномерное разделение

Одноступенчатое элюирование

Горизонтальное

Антипараллельное

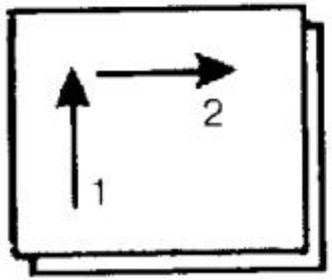
Круговое

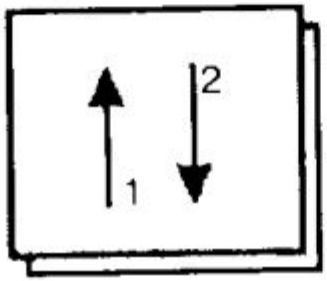
Антикруговое

Многоступенчатое элюирование

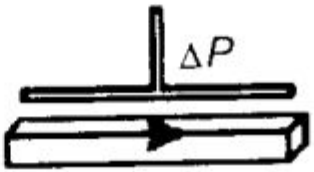
Элюирование под действием вынуждающей силы

Двумерное элюирование

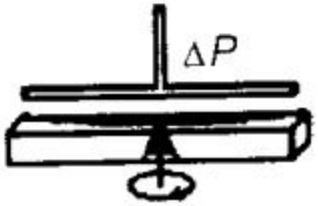




Горизонтальная планарная хроматография под давлением



Ротационная планарная хроматография



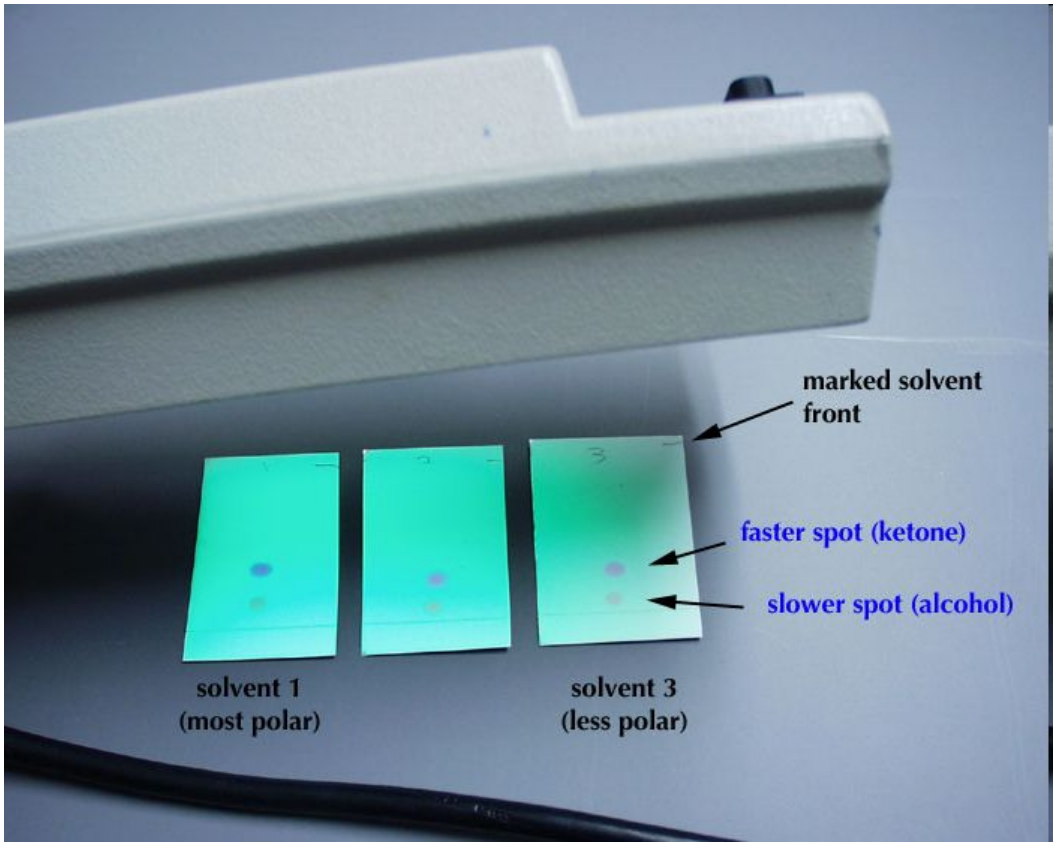
Визуализация

- Универсальная
- Специфическая

- Физическая
  - UV облучение
  - Прожигание
- Химическая
  - H_2SO_4
  - Перманганат калия
  - etc.
- Смешанная – J_2

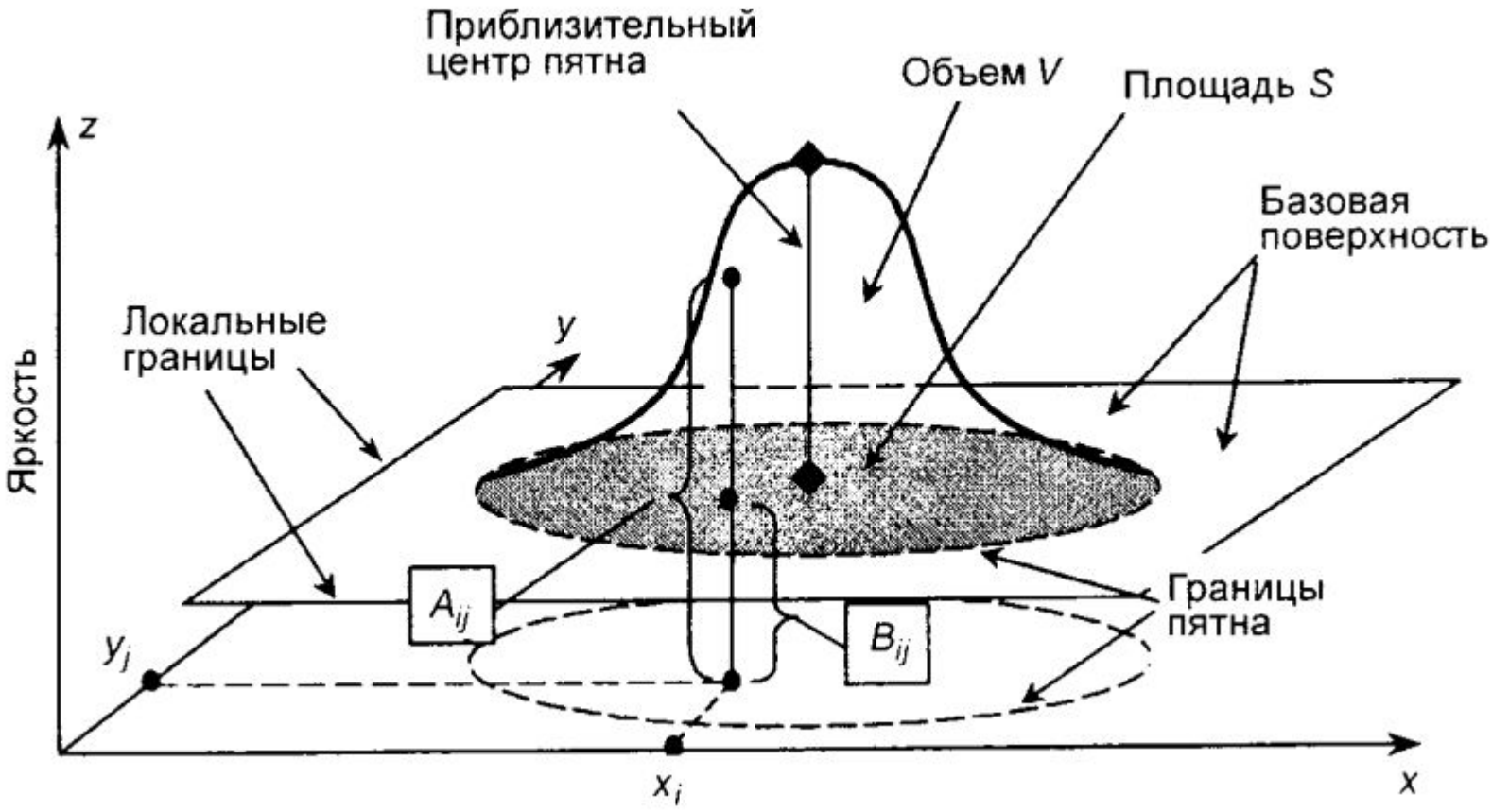
УФ - лампы

- UV 254 nm
- UV 360 nm



УФ + компьютер

Интегрирование



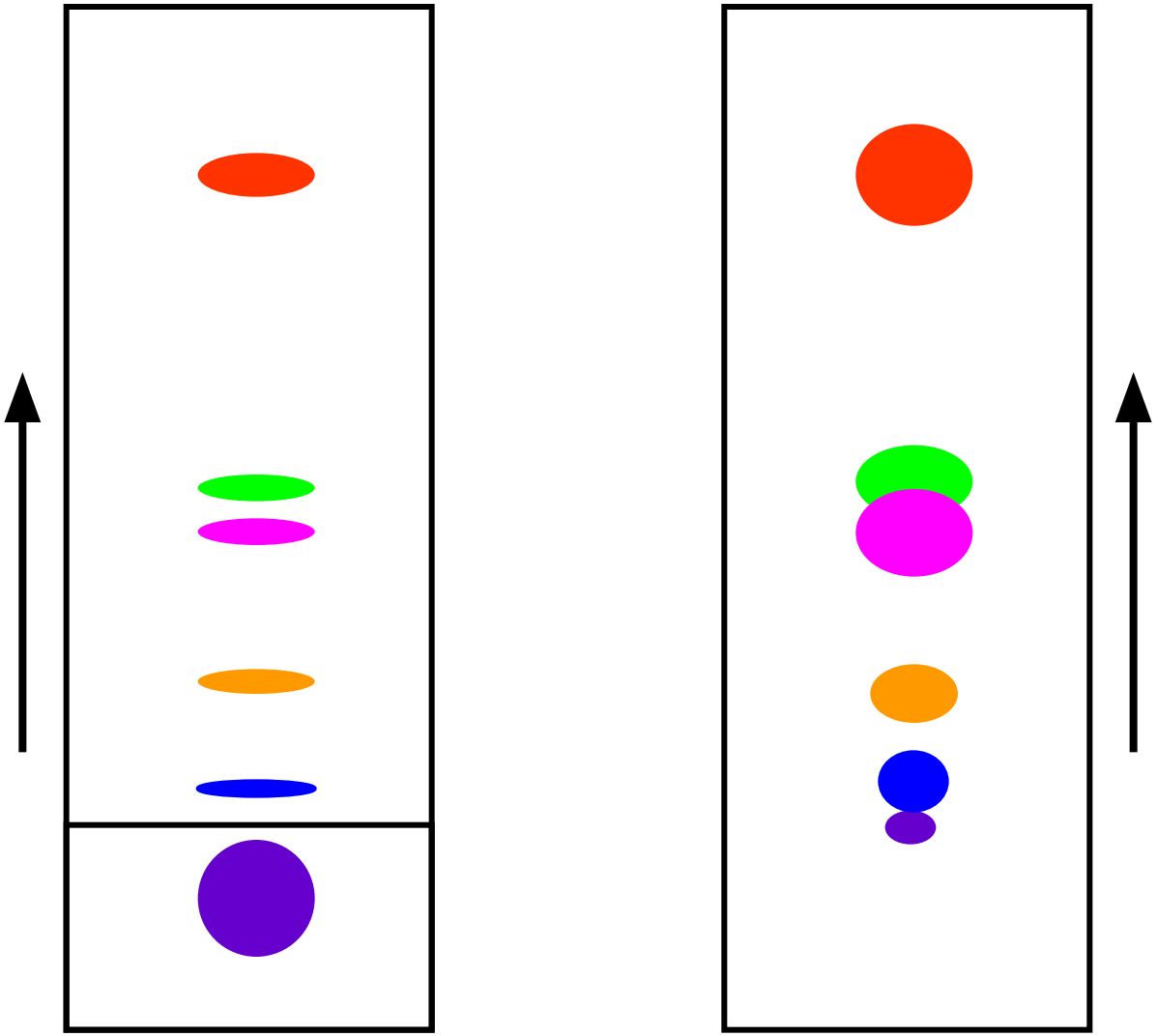
HPTLC

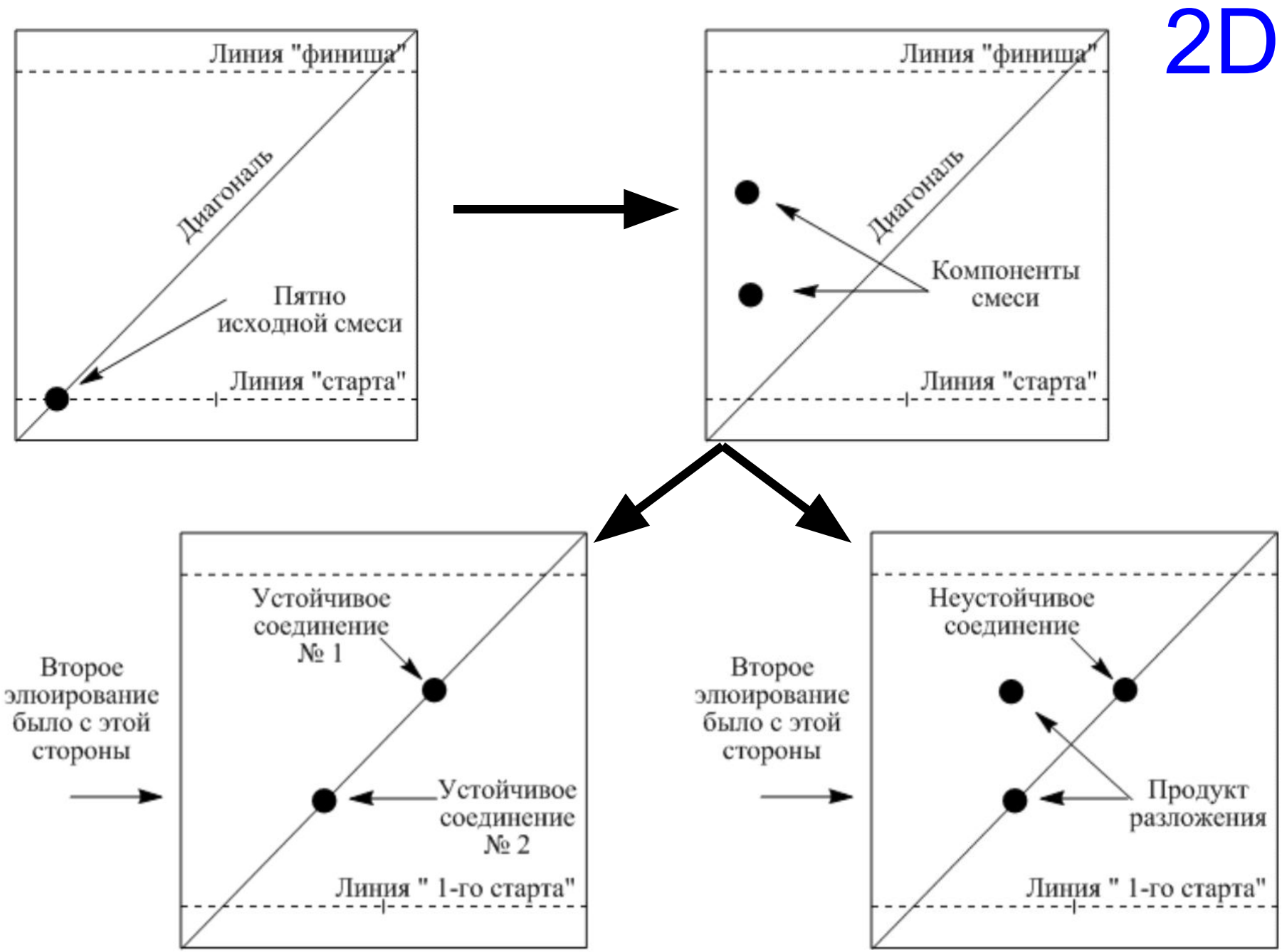
- Сорбент

Характеристики	ТСХ	ВЭТСХ
Средний размер частиц, мкм	5 – 20	5 – 7
Толщина слоя, мкм	250	100, 200
Количество проб	12	36 – 72
Длина пробега фронта растворителя, мм	100 – 150	30 – 50
Время разделения, мин	30 – 200	3 – 20
Количество растворителя, мл	50	5 – 10
Предел детектирования, нг		
поглощение	100 – 1000	10 – 100
флуоресценция	1 – 100	0,1 – 10

HPTLC

- Преконцентрирование




2D
Линия "финиша"
Диагональ
Пятно
исходной смеси
Линия "старта"
Линия "финиша"
Диагональ
Компоненты
смеси
Линия "старта"
Второе
элюирование
было с этой
стороны
Устойчивое
соединение
№ 1
Устойчивое
соединение
№ 2
Линия " 1-го старта"
Второе
элюирование
было с этой
стороны
Неустойчивое
соединение
Продукт
разложения
Линия " 1-го старта"

Достоинства ТСХ

- полный анализ неизвестной смеси (старт?)
- производительность, параллельность
- более простое и дешевое оборудование;
- высокая селективность, в отличие от ВЭЖХ нет ограничений в выборе растворителей;
- оптимизация только для интересующих компонентов
- игры с детектированием – проявляющие реагенты

Недостатки ТСХ

- ограниченная разделяющая способность из-за сравнительно небольшой длины разделяющей зоны (3-10 см);
- чувствительность ниже, чем в случае ВЭЖХ;
- зависимость результатов анализа от окружающей среды: относительной влажности, температуры, а также наличия загрязняющих веществ в воздухе;
- трудности в работе с образцами, имеющими высокую летучесть, а также с веществами, чувствительными к действию кислорода воздуха или света.