

Инструментальные методы анализа: хроматографические методы

*Башкирский государственный университет
Кафедра аналитической химии*

Основные этапы развития хроматографии

- 1903 г. Открытие хроматографии (Цвет М.С.)
- 1938 г. Тонкослойная или планарная хроматография (Измайлов Н.А., Шрайберг М.С.)
- 1941 г. Жидкостная распределительная хроматография (Martin A.D.P., Synge R.L.M.)
- 1952 г. Газовая распределительная хроматография (Martin A.D.P., James A.)
- 1956 г. Капиллярная газовая хроматография (Golay M.)
- 1975 г. Ионная хроматография (Small H., Stevens T.S., Bauman W.W.)

ХРОМАТОГРАФИЯ

относится к 20 выдающимся открытиям XX века, которые в наибольшей степени преобразовали науку и определили уровень развития техники, промышленности, цивилизации

- самый распространенный и совершенный метод разделения смесей атомов, изотопов, молекул, всех типов изомерных молекул, включая и оптические изомеры, макромолекул (синтетических полимеров и биополимеров), ионов, устойчивых свободных радикалов, комплексов, ассоциатов, микрочастиц
- уникальный метод качественного и количественного анализа сложных многокомпонентных смесей
- самостоятельное научное направление и важный физико-химический метод исследования и измерения
- препаративный и промышленный метод выделения веществ в чистом виде
- мощная отрасль научного приборостроения

Ни один аналитический метод не может конкурировать с хроматографией по универсальности применения и эффективности разделения самых сложных многокомпонентных смесей

**более 1000 индивидуальных
компонентов в смесях**

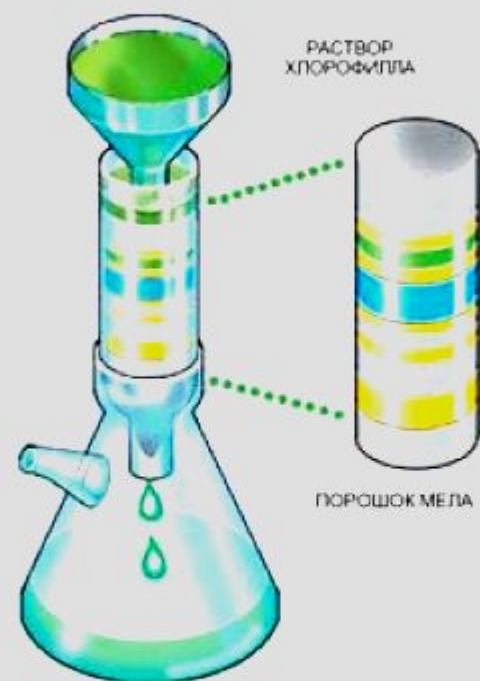
**до 2000 белков в биологических
объектах**

расшифровка нуклеотидной последовательности ДНК и завершение работ по программе "Геном человека"

Открытие хроматографии

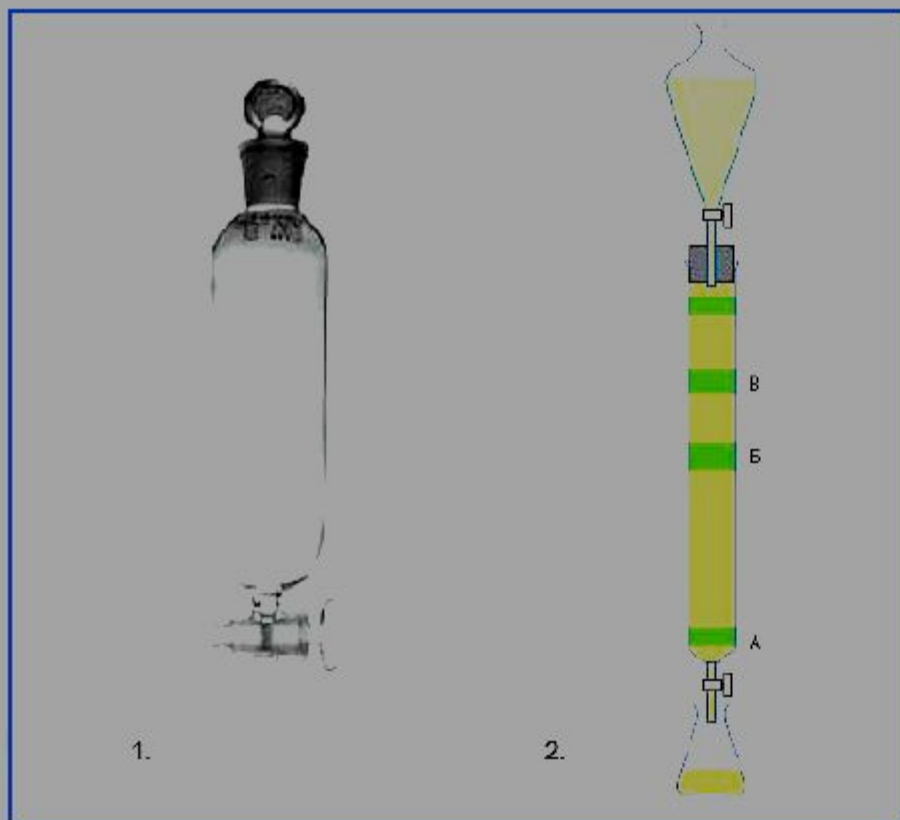


Михаил Семенович Цвет
14.05.1872-26.06.1919
1903



"О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биологическому анализу"

Открытие хроматографии

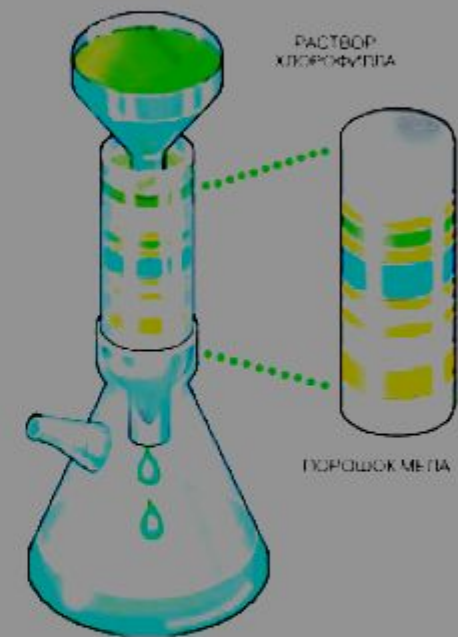
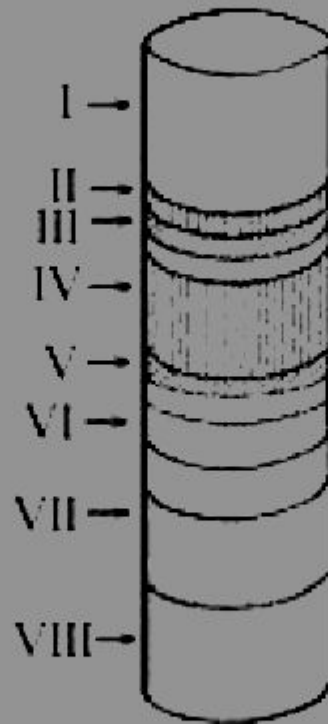


"Подобно световым лучам в спектре различные компоненты сложного пигмента закономерно распределяются друг за другом в столбе адсорбента и становятся доступными качественному и количественному определению. Такой расцветенный препарат я назвал **хроматограммом**, а соответствующий метод анализа **хроматографическим методом**".

М.Цвет (1906 г.)

Разделение раствора хлорофилла

- I-бесцветный,
- II- ксантофилл *b* (желтый);
- III- хлорофиллин *b* - (желто-зеленый);
- IV- хлорофиллин (зелено-синий);
- V- ксантофилл (желтый);
- VI- ксантофилл *a'* (желтый);
- VII- ксантофилл *a* (желтый); VIII- хлорофиллин (серо-стальной)



По экспертным оценкам, хроматография относится к 20 выдающимся открытиям прошедшего столетия

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ХРОМАТОГРАФИИ

12 Нобелевских премий было присуждено с 1937 по 1972 год за работы, в которых хроматография играла важнейшую роль

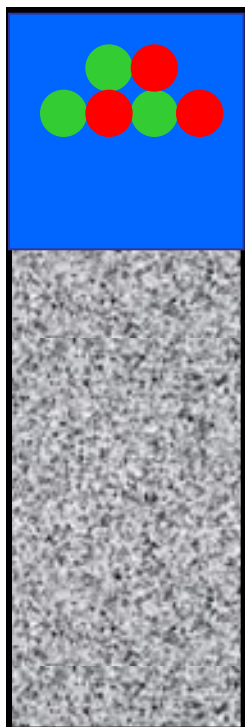


Принцип хроматографического разделения

Хроматография [гр. *chromatos* – цвет + *grapho* – пишу] — метод разделения, основанный на многократном повторении актов распределения вещества между двумя фазами при перемещении вещества с подвижной фазой относительно неподвижной фазы.



Принцип хроматографического разделения веществ

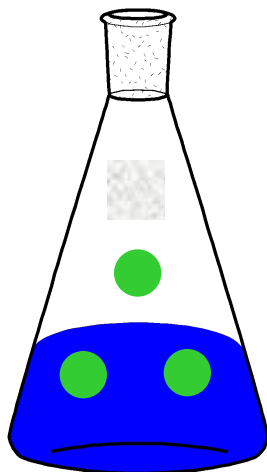


Молекулы разделяемых веществ

Подвижная фаза

Неподвижная фаза

Эффект разделения основывается на том, что соединения проходят расстояние, на котором происходит разделение, с некоторой, присущей этим соединениям задержкой



Хроматографический процесс состоит из целого ряда актов сорбции и десорбции, а также растворения и элюирования, которые каждый раз приводят к новому равновесному состоянию

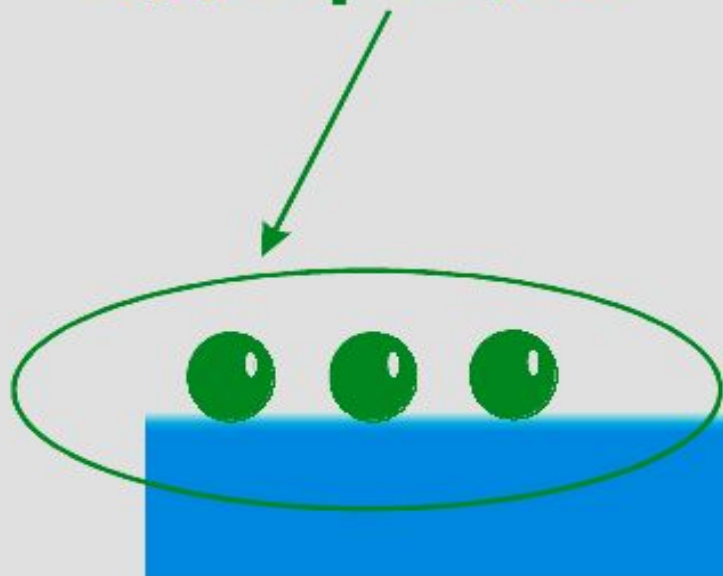
Процесс адсорбции. Определения

Сорбция - поглощение вещества через границу раздела двух фаз

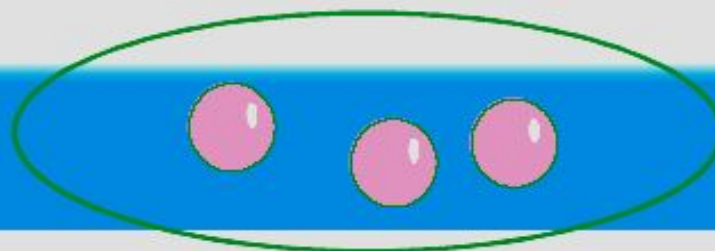
адсорбция - “прилипание”

абсорбция - “растворение”

адсорбция



абсорбция



Принципы и основы теории хроматографии

Сорбент – неподвижная фаза (твердый сорбент или жидкость на поверхности твердого носителя), в которой поглощаются разделяемые вещества

Сорбат – поглощаемые неподвижной фазой вещества

Элюент – подвижная фаза (жидкость или газ)

Элюат – поток жидкости или газа, прошедшего слой неподвижной фазы

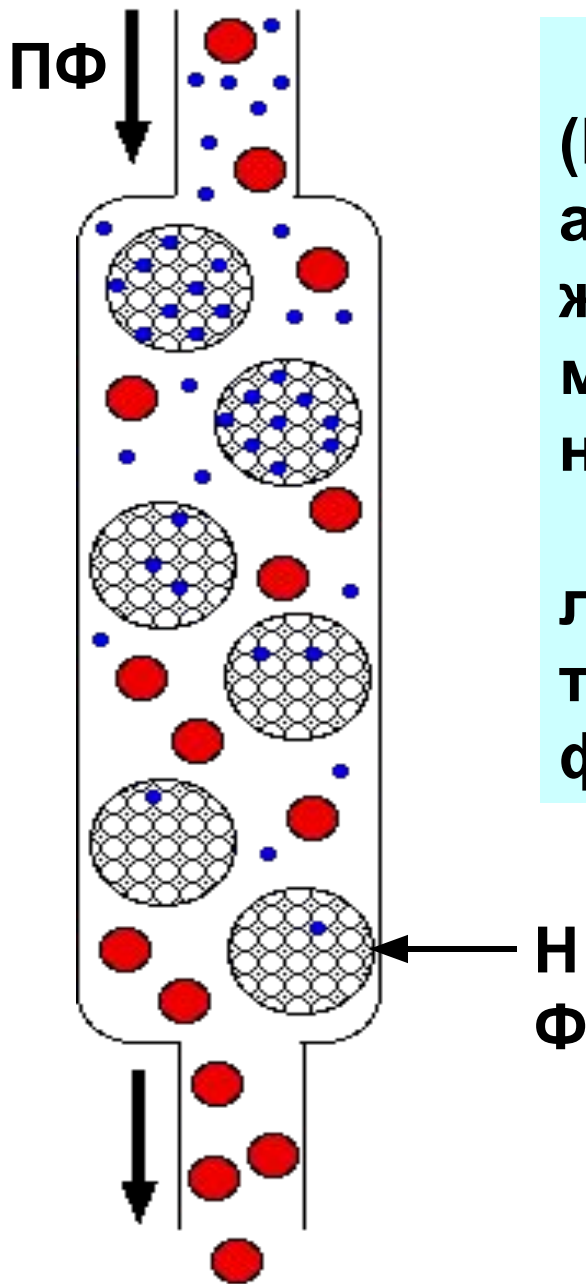


разделяемые компоненты пробы проходят разное расстояние за одинаковое время

плоскостная хроматография

все компоненты проходят одинаковый путь по колонке, а выходят через различные промежутки времени

колоночная хроматография



В качестве **неподвижной фазы** (НФ) может выступать твердый адсорбент, суспензия адсорбента в жидкости или жидкость, наносимая на поверхность твердого носителя.

Подвижная фаза (ПФ) представляет собой жидкость или газ, протекающие через неподвижную фазу.

Классификация методов хроматографии

По принципу фракционирования

Аффинная хроматография

Ионообменная хроматография

Гель-фильтрация

Катионообменная хроматография

Анионообменная хроматография

Адсорбционная хроматография

Осадочная хроматография

Распределительная хроматография

Комплексообразовательная хроматография

По способу элюирования

Вытеснительная хроматография

Элюентная хроматография

Фронтальная хроматография

По расположению неподвижной фазы

Колоночная хроматография

Хроматография в толстом слое

Тонкослойная хроматография

Бумажная хроматография

Классификация методов хроматографии

По агрегатному составу фаз

Сверхкритическая флюидная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖГХ, ЖЖХ, ЖТХ)

Газовая хроматография (ГЖХ, ГТХ)

По цели проведения

Аналитическая хроматография

Препаративная хроматография

Промышленная хроматография

По давлению в системе

Хроматография высокого давления

Хроматография низкого давления

Классификация методов хроматографии

По агрегатному
состоянию фаз

Газовая
хроматография

Жидкостная
хроматография

По природе
элементарного акта

Распределительная
хроматография

Адсорбционная
хроматография

По способу
перемещения фаз

Проявительная
хроматография

Фронтальная
хроматография

Вытеснительная
хроматография

По цели
применения

Качественный
анализ

Количественный
анализ

Препаративная
хроматография

Классификация методов хроматографии по агрегатному составу фаз

Газовая хроматография

Сверхкритическая флюидная хроматография

Жидкостная хроматография

Газо-твердофазная хроматография

Газо-жидкостная хроматография

Хроматография высокого давления

Жидкостно-жидкостная хроматография

Жидкостно-гелевая хроматография

Классификация хроматографии по механизму распределения

- **адсорбционная** хроматография - стационарная фаза - твердый сорбент;
- **распределительная** хроматография – неподвижная фаза жидкая (газовая хроматография) или подвижная и неподвижная фазы жидкие;
- **ионообменная** хроматография - неподвижная фаза ионообменник;
- **экслюзионная** хроматография – основана на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ;
- **аффинная** хроматография - на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов.



Классификация хроматографии по способу перемещения веществ

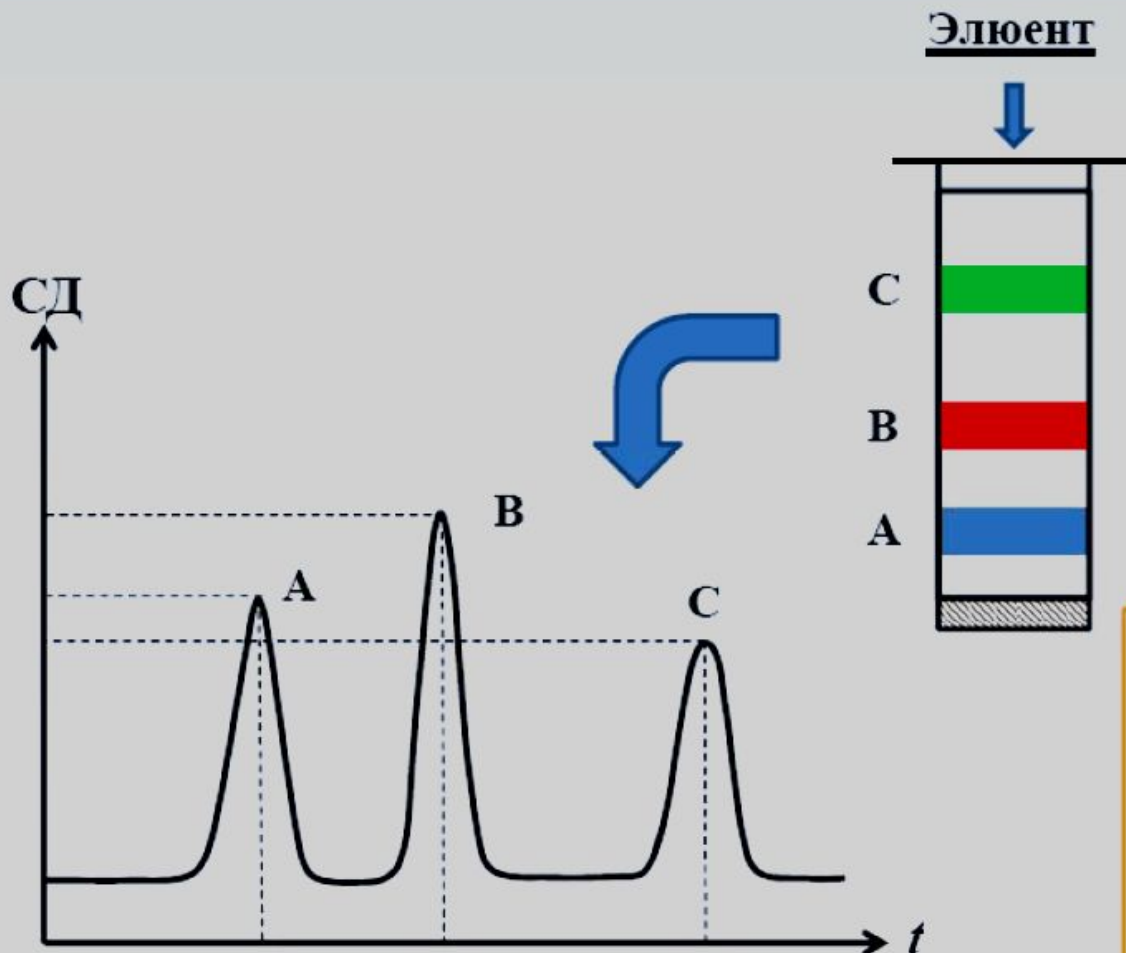
Проявительная (элюентная) хроматография - метод разделения и анализа веществ, в котором через колонку с сорбентом непрерывно проходит поток элюента с периодически вводимой в него смесью разделяемых веществ, причем элюент сорбируется слабее любого вещества разделяемой смеси. Разделяемые вещества размещаются зонами в потоке элюента. Выход компонентов смеси из колонки регистрируется на хроматограмме в виде пиков.

Элюентная (проявительная) хроматография (ЭХ)

сорбируемость веществ увеличивается в ряду: $A < B < C$



Элюент

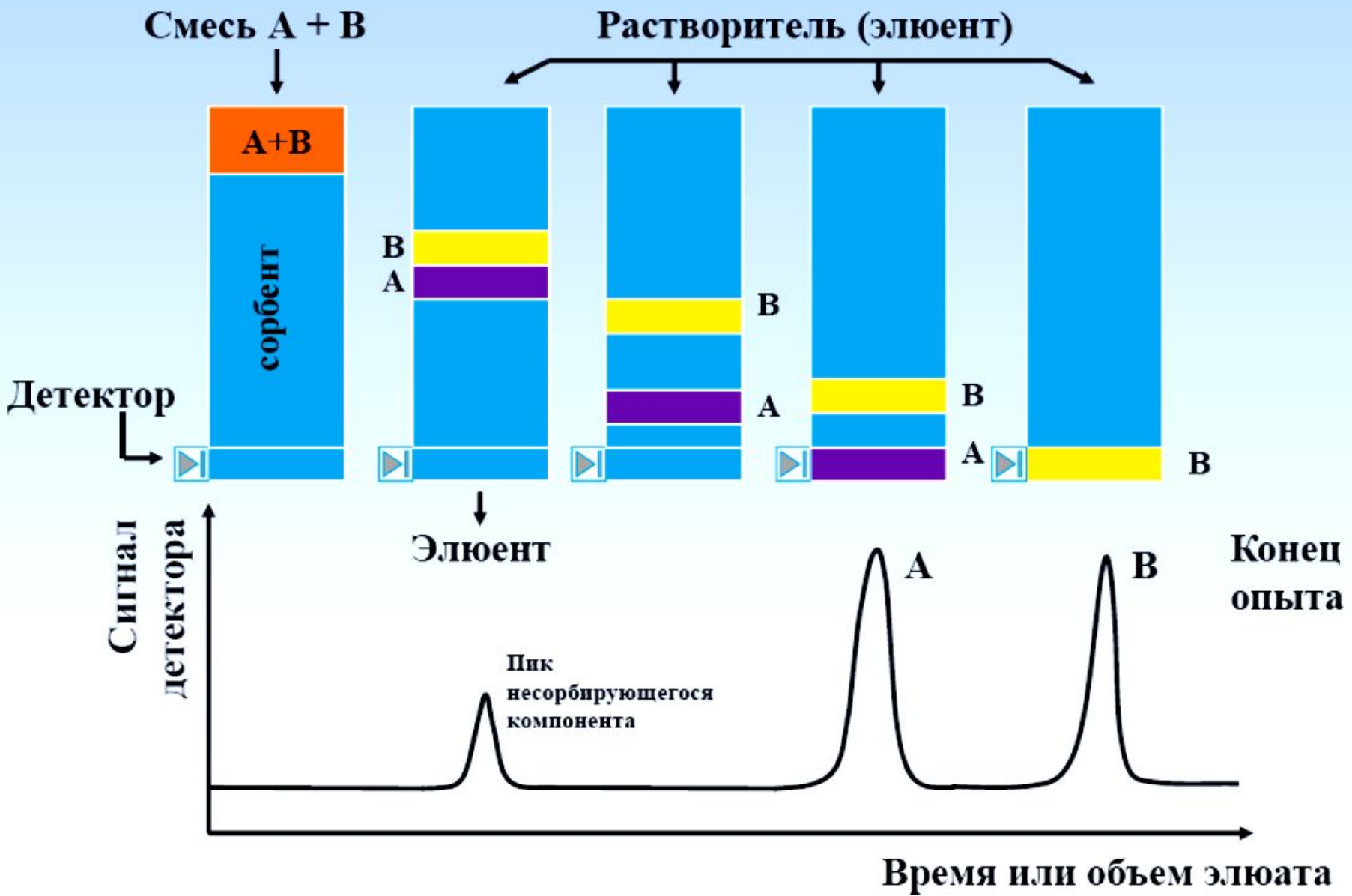


ЭХ позволяет разделять многокомпонентные смеси

- Преимущество – практически полное разделение компонентов многокомпонентной смеси
- Недостаток – необходимость разбавления

Схема элюентной хроматографии двухкомпонентной смеси

Процесс вымывания из колонки растворенных веществ пропусканием чистого растворителя называется **элюированием**, а такой способ разделения – **элюентной хроматографией**



Классификация хроматографии по способу перемещения веществ

В случае **фронтальной хроматографии** через колонку с адсорбентом непрерывно пропускают поток элюента с растворенной в нем смесью разделяемых веществ. При этом образуются зоны, содержащие увеличивающееся число компонентов в порядке возрастания их сорбируемости. Выход компонентов смеси из колонки регистрируется на хроматограмме в виде ступеней.

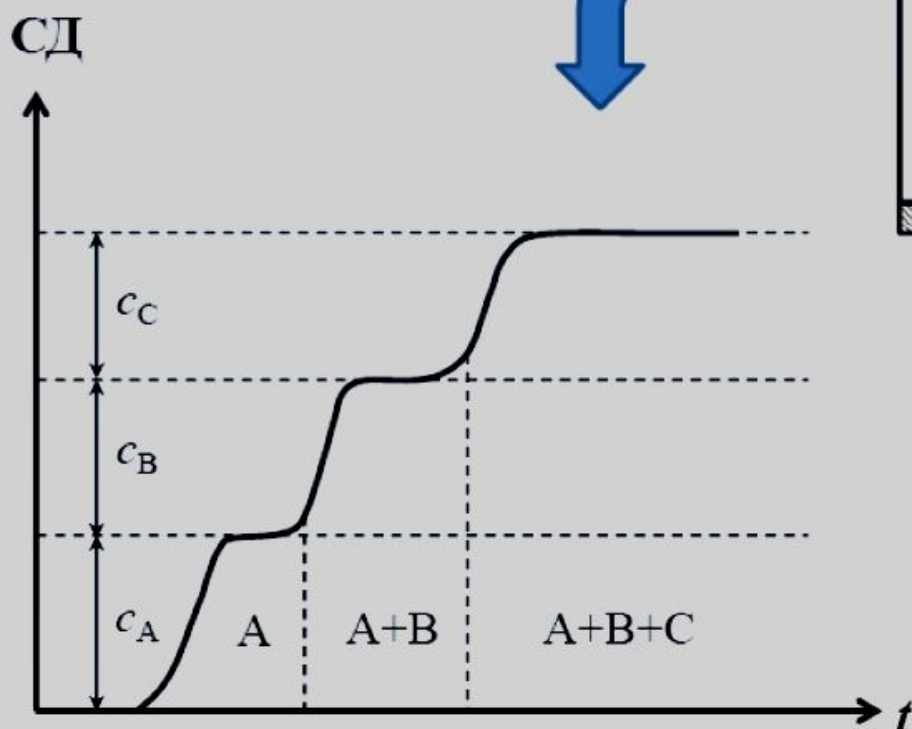
Фронтальная хроматография (ФХ)

Наиболее проста в выполнении

сорбируемость веществ увеличивается в ряду: $A < B < C$



A+B+C+элюент



- Метод не нашел широкого применения в анализе, т.к. не дает полного разделения смеси
- Метод эффективен для очистки веществ от примесей, если они сорбируются лучше, чем основной компонент
- Метод применяется при изучении изотерм сорбции из растворов

Классификация хроматографии по способу перемещения веществ

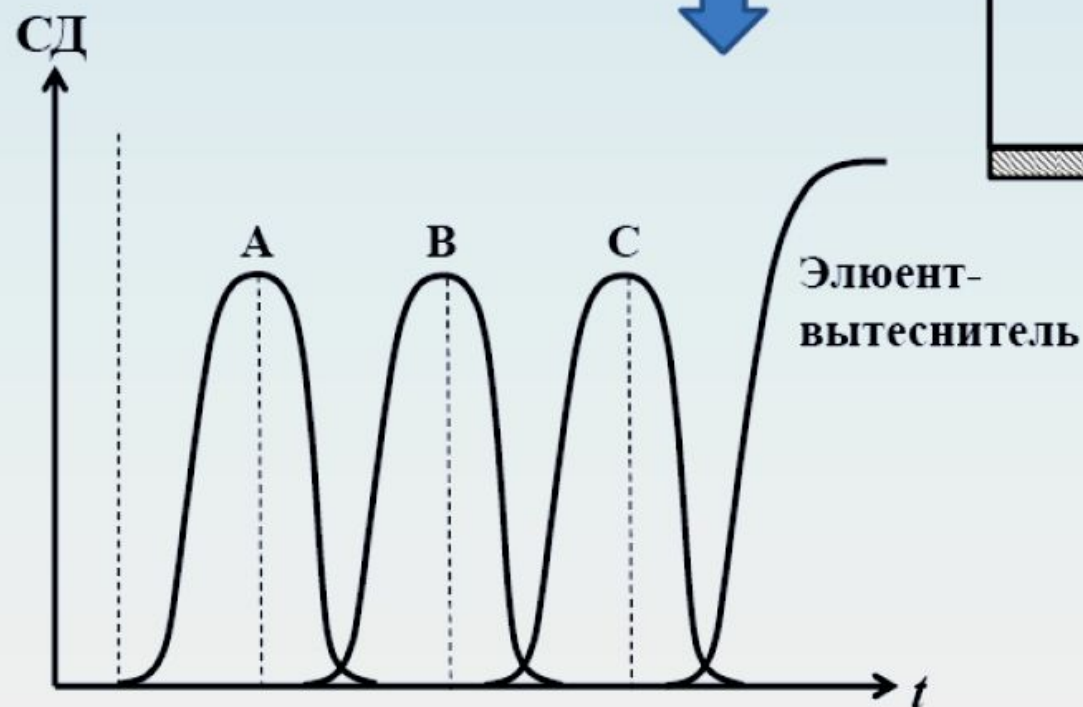
В вытеснительной хроматографии в колонку после ввода разделяемой смеси вводят специальное вещество - вытеснитель, которое удерживается сильнее любого из компонентов смеси. Образуются примыкающие друг к другу отдельные зоны разделяемых веществ, которые располагаются в порядке увеличения их сорбируемости.

аВытеснительная хроматография (ВХ)

сорбируемость веществ увеличивается в ряду: $A < B < C$



Элюент-вытеснитель

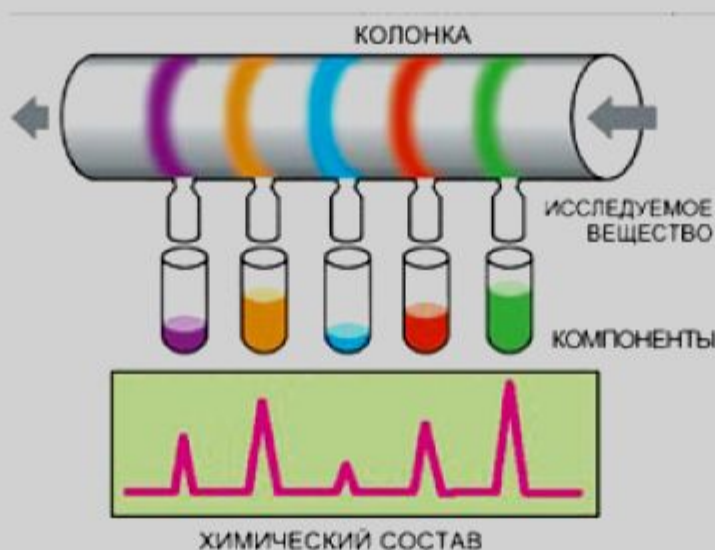


- Компоненты смеси не разбавляются р-телем, поэтому их концентрации мало изменяется
- Недостаток – образование между зонами разделяемых в-в смешанной зоны, содержащей два компонента.
- Метод редко применяется в анализе, но используется в препаративных целях

Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз, типам процессов разделения и техникам проведения

Название метода	Английская аббревиатура	Агрегатное состояние подвижной фазы	Агрегатное состояние стационарной фазы	Процесс разделения	Техника проведения разделения
Жидкость-жидкостная хроматография	LLC	жидкое	жидкое	распределение	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), TLC (ТСХ), PC (бумажн. хромат.)
Газожидкостная хроматография	GLC	газообразное	жидкое	распределение	GC (ГХ)
Жидкостная хроматография	LSC	жидкое	твердое	адсорбция	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), PC (бумажн. хромат.)
Газовая хроматография	GSC	газообразное	твердое	адсорбция	GC (ГХ)

Хроматограмма, ее характеристики.



Хроматограмма – зависимость концентрации веществ в подвижной фазе на выходе из колонки от времени

ХРОМАТОГРАММА



Хроматографический пик

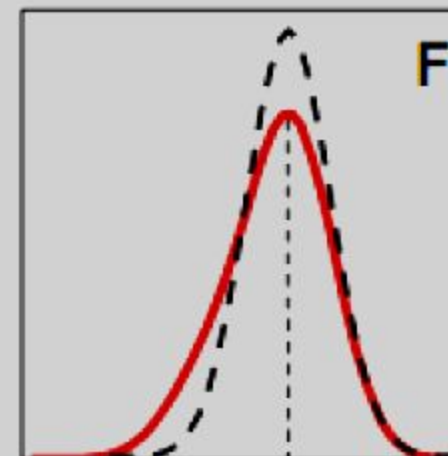
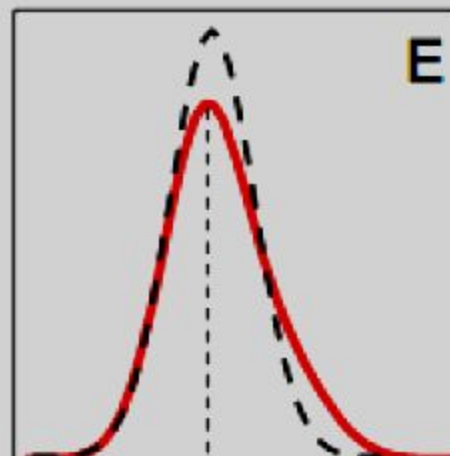
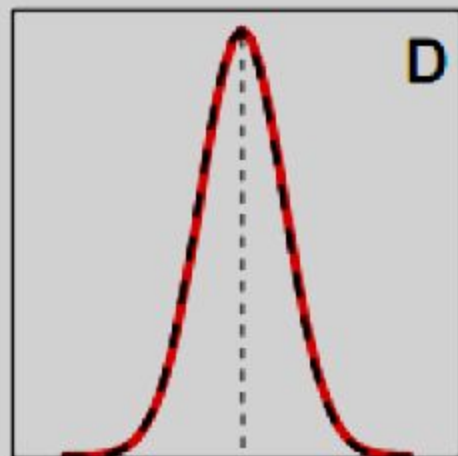
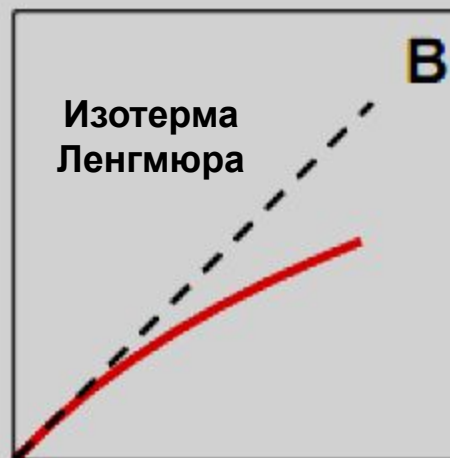
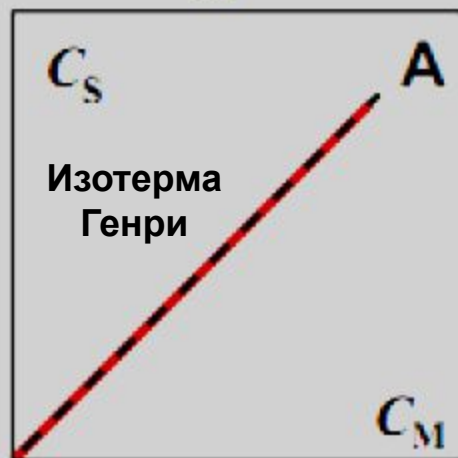
Сигнал



Изотерма сорбции и форма пика

C_S - концентрация вещества в твердой фазе

C_M - концентрация вещества в жидкой фазе



Основные параметры хроматограмм

Время удерживания – t_R

Мертвое время - t_M

Приведенное время удерживания – $t'_R = t_R - t_M$

Объемная скорость подвижной фазы - v

Удерживаемый объем - $V_R = t_R \cdot v$

Мертвый объем удерживания - $V_M = t_M \cdot v$

Приведенный объем удерживания – $V'_R = V_R - V_M$

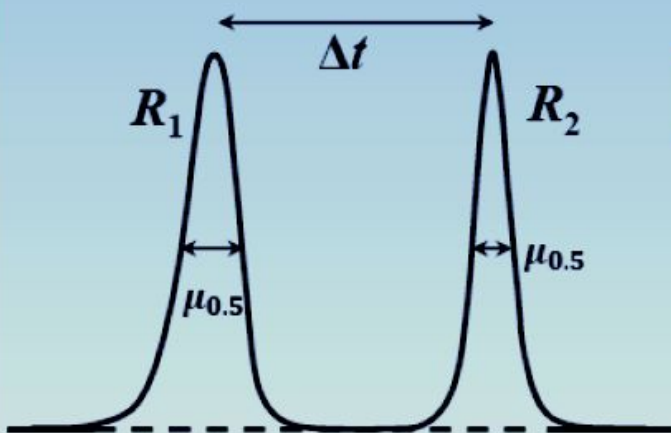
Фактор емкости - k

Разрешение - R_s

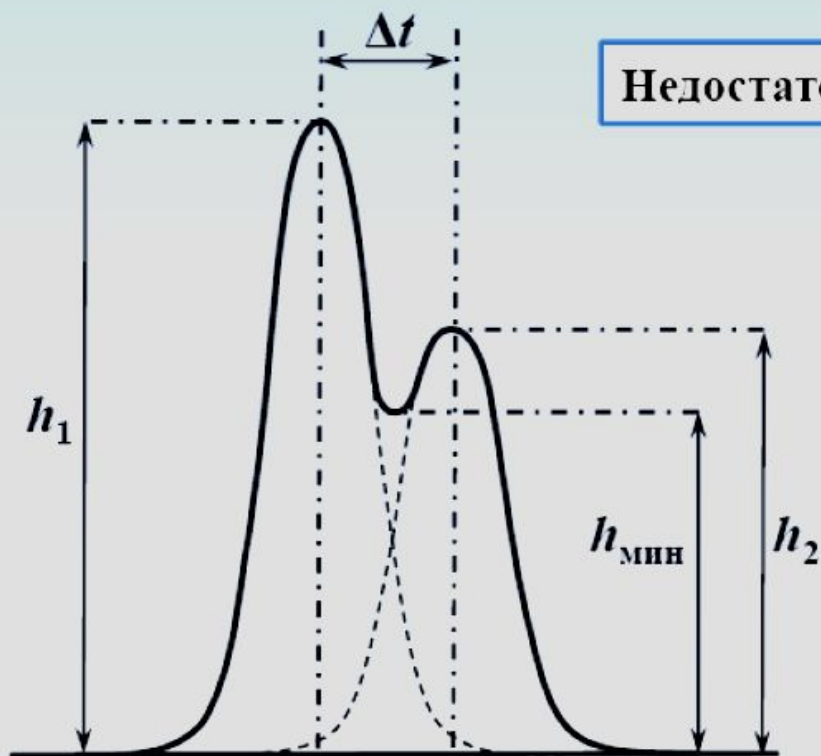
Критерии разделения пиков – q, ϕ, α

Критерий разделения характеризует разделение двух соседних пиков

$$q = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\mu_{0.5}(R_1) + \mu_{0.5}(R_2)}$$



Хорошо разделенные пики



Недостаточно разделенные пики

Критерии описания недостаточно разделенных пиков:

$$\varphi = \frac{h_2 - h_{\text{мин}}}{h_2}$$

$$\alpha = \frac{h_1 - h_{\text{мин}}}{h_1}$$

Разрешение R_S как характеристика разделения пиков

Разрешение R_S характеризует возможность хроматографической колонки разделить два вещества.

Хроматографическое разрешение R_S используется как характеристика всей системы. Для разделения двух пиков R_1 и R_2 разрешение рассчитывается с использованием ширин пиков у основания:

$$R_S = \frac{\Delta t}{\frac{\mu_{R_1} + \mu_{R_2}}{2}}$$

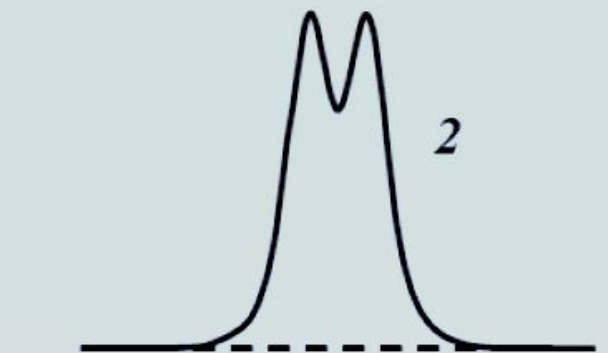
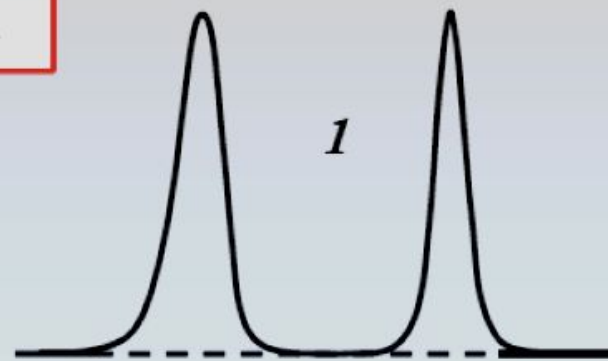
$$\mu_{R_1} \approx \mu_{R_2} = \mu$$

$$R_S = \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\mu}$$

R_S можно рассчитать с использованием критерия разделения q ,

массового коэффициента распределения D_m и числа теоретических тарелок N :

$$R_S = \frac{1}{4} \left(\frac{q - 1}{q} \right) \sqrt{N} \left(\frac{D_{m_2}}{1 + D_{m_2}} \right)$$



- 1 – недостаточное разделение
- 2 – увеличение эффективности
- 3 – увеличение селективности

Классическая теория хроматографии

теория теоретических тарелок

Адсорбционный слой – набор равновесных зон (теоретических тарелок)

Равновесие считается достигнутым до того, как вещество переместится на следующую тарелку

теория позволяет описать движение зоны в слое неподвижной фазы и оценить эффективность колонки



Количественная мера эффективности колонки – H и N

$$N=L/H$$

Чем меньше H и больше N , тем эффективнее колонка

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\mu} \right)^2$$

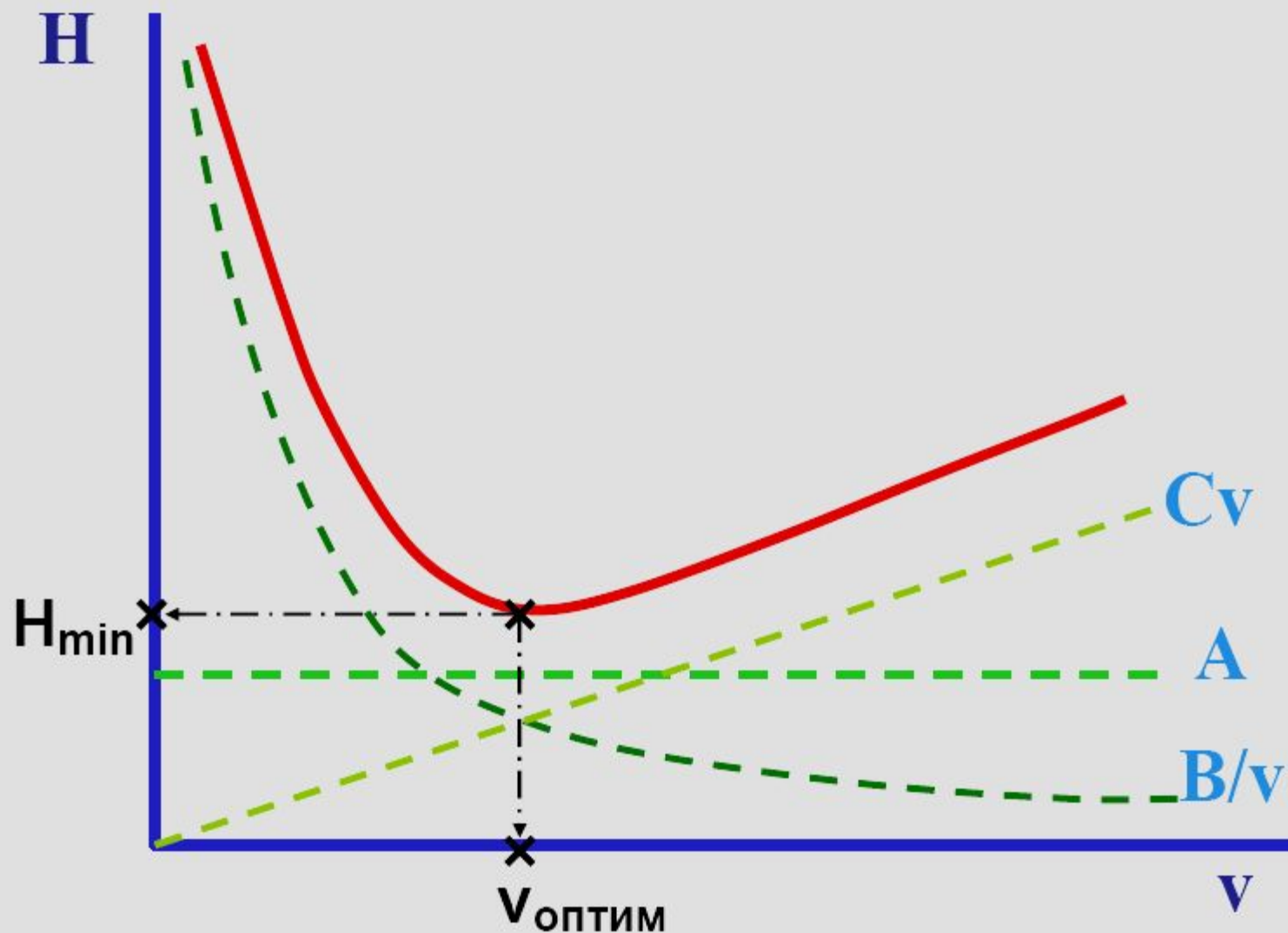
$$H = \frac{\mu^2}{16} \frac{L}{(t_R)^2}$$

Кинетическая теория Ван-Деемтера (для газовой хроматографии)

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

$$H = \left\{ 2\lambda d_p \right\} + \left\{ \frac{2\gamma D_m}{u} + \frac{2\gamma_s D_s}{u} \right\} + \left\{ 2 \left(\frac{t_r - t_0}{t_r} \right)^2 \frac{u}{K_A} + \frac{\omega d_p^2 u}{2D_M} + \frac{C' d_p^2 u}{D_m} \right\}$$

Связь ВЭТТ с линейной скоростью потока (u), неоднородностью потока (A), массопередачей (B) и продольной диффузией (C)



Зависимость высоты теоретической тарелки от скорости потока

Качественный анализ

1. Времена удерживания соединений.
2. Корреляционные зависимости параметров удерживания.
3. **Индексы удерживания Ковача.**

Индексы удерживания Ковача отражают хроматографические характеристики веществ в единой шкале, определяемой серией однотипных стандартов, в качестве которых используются *n*-алканы. Если в качестве нулевого алкана принять водород (C_0H_{2*0+2}) и принять его индекс удерживания за 0, то в данной системе можно представить практически все вещества.

Индексы удерживания веществ рассчитывают по формуле:

$$I = 100N + 100n \frac{\lg R_x - \lg R_N}{\lg R_{N+n} - \lg R_N}$$

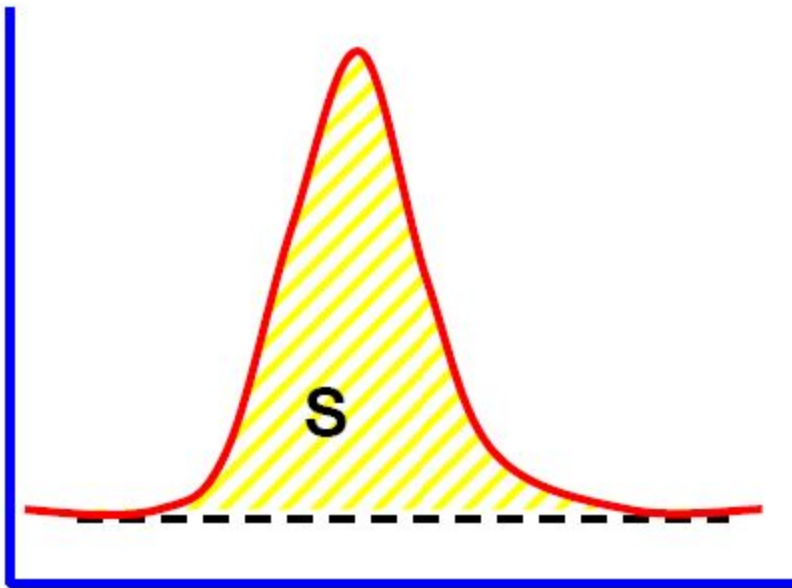
$$R_n < R_x < R_{N+n}$$

Здесь R_x , R_N и R_{N+n} - приведенные величины удерживания (объемы, времена или расстояния на хроматограммах) исследуемого вещества и алканов с N и $N + n$ углеродными атомами.

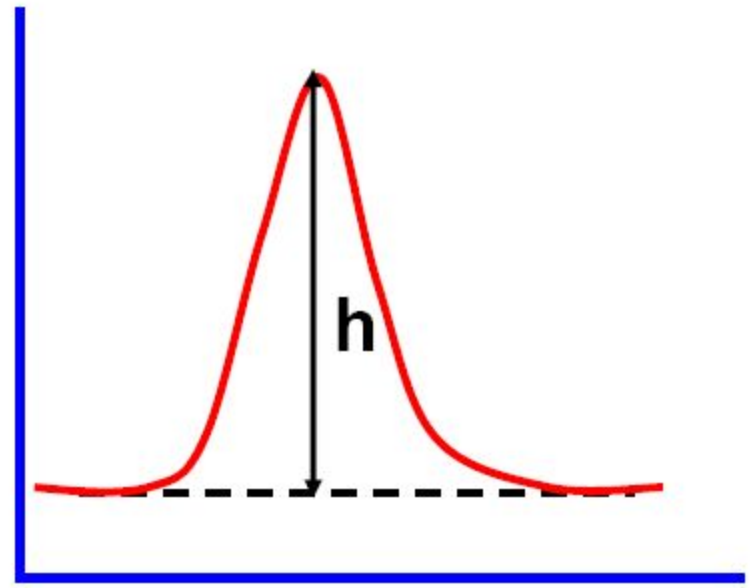
Индекс удерживания любого n -алкана равен числу его углеродных атомов, умноженному на 100: этана - 200, бутана – 400 и т. д. Если индекс удерживания какого-либо вещества равен 930, то это вещество будет выходить из колонки после n -нонана.

Количественный анализ

По площади или по высоте
хроматографического пика



$$S = f(C)$$



$$h = f(C)$$

Литература

1. Основы аналитической химии. Кн. 2. Методы химического анализа. / Под ред. Ю. А. Золотова. 2-е изд. М.: Высшая школа, 2004.
2. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа. Под ред. О. М. Петрухина. М.: Химия, 2001.

Дополнительная литература

1. Кристиан Г. Аналитическая химия. В 2-х т. М.: БИНОМ, 2009.
2. Аналитическая химия. Проблемы и подходы: В 2 т. / Под ред. Р. Кельнера, Ж-М. Мерме, М. Отто, Н. Видмера. М.: Мир, 2004.
3. Отто М. Современные методы аналитической химии. В 2 т. М.: Техносфера, 2003.
4. Сакодынский К. И. и др. Аналитическая хроматография. М.: Химия, 1993.
5. Столяров Б. В. и др. Практическая газовая и жидкостная хроматография. СПб: Изд-во СПбГУ, 1998.