Инструментальные методы анализа: колоночная хроматография

Башкирский государственный университет

Кафедра аналитической химии

Классификация методов хроматографии

По принципу фракционирования

- Аффинная хроматография
- Ионообменная хроматография
  - Катионообменная хроматография
  - Анионообменная хроматография
- Гель-фильтрация
- Адсорбционная хроматография
- Осадочная хроматография
- Распределительная хроматография
- Комплексообразовательная хроматография

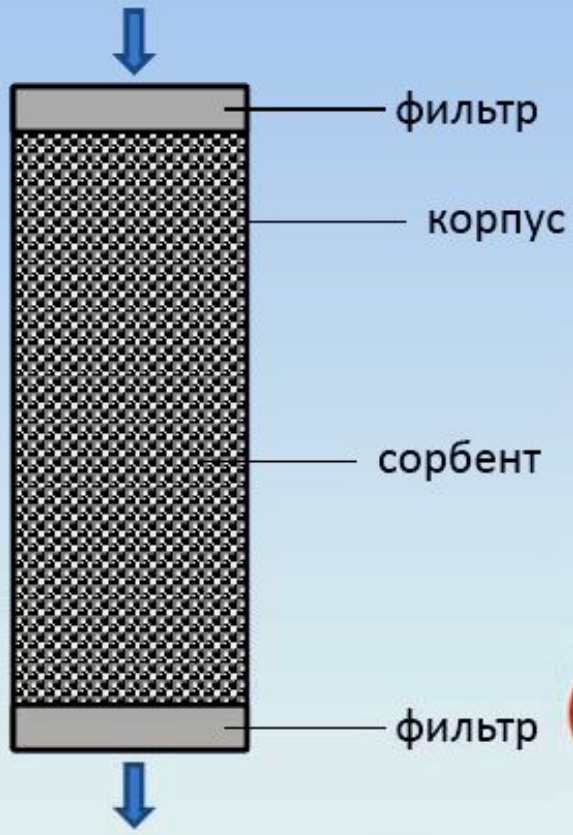
По способу элюирования

- Вытеснительная хроматография
- Элюентная хроматография
- Фронтальная хроматография

По расположению неподвижной фазы

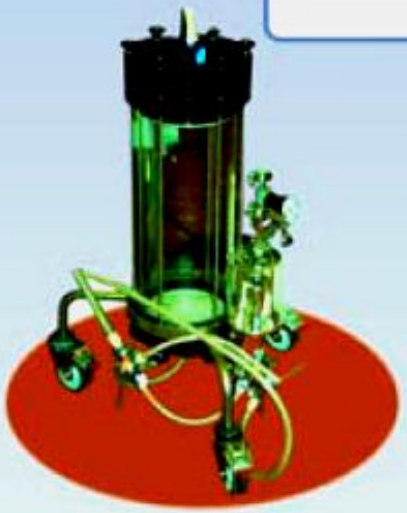
- Колоночная хроматография
- Хроматография в толстом слое
- Тонкослойная хроматография
- Бумажная хроматография

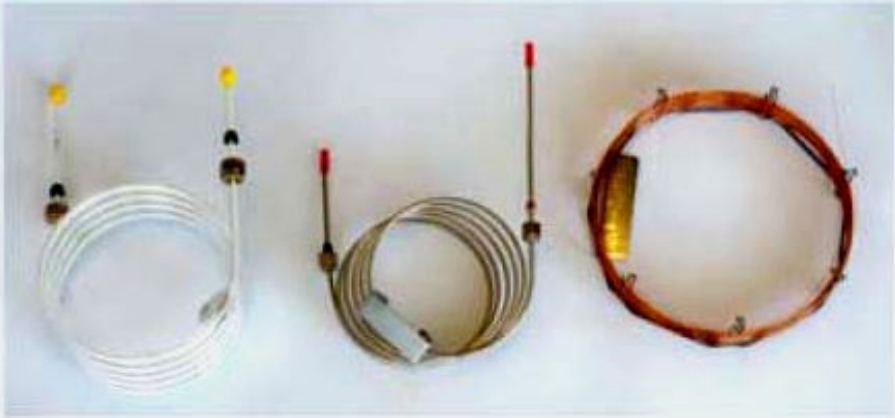
КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ



Хроматографические колонки

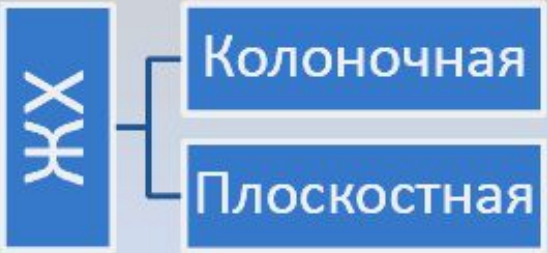
- Набивные
- Капиллярные





Жидкостная хроматография (ЖХ)

ЖХ – метод хроматографического анализа, в котором подвижной фазой (элюентом) служит жидкость



Неподвижная фаза:

- твердый сорбент
- твердый носитель с нанесенной на его поверхность жидкостью
- гель

По механизму удерживания разделяемых в-в неподвижной фазой жидкостная хроматография делится на осадочную, адсорбционную, распределительную, ионообменную хроматографию, лигандообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию (ситовую) и аффинную хроматографию (биоспецифическую)

Жидкостная хроматография применяется как аналитическая и препаративная

Сорбенты:

Полярные:

- оксид алюминия ($Al_2O_3 \cdot nH_2O$)
- силикагель ($SiO_2 \cdot nH_2O$)
- крахмал
- целлюлоза

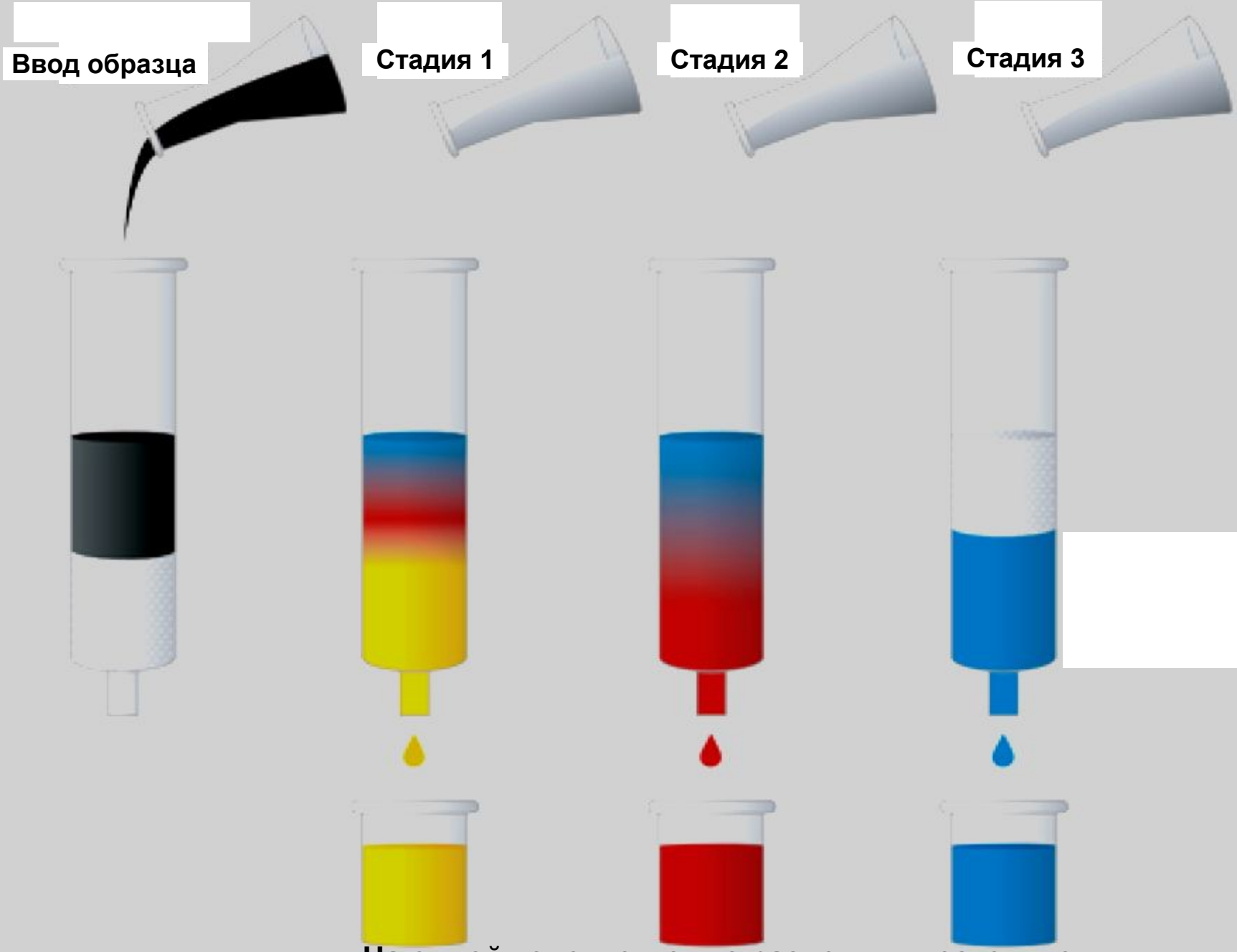
Неполярные:

- активированный уголь
- графитированная сажа

Элюенты:

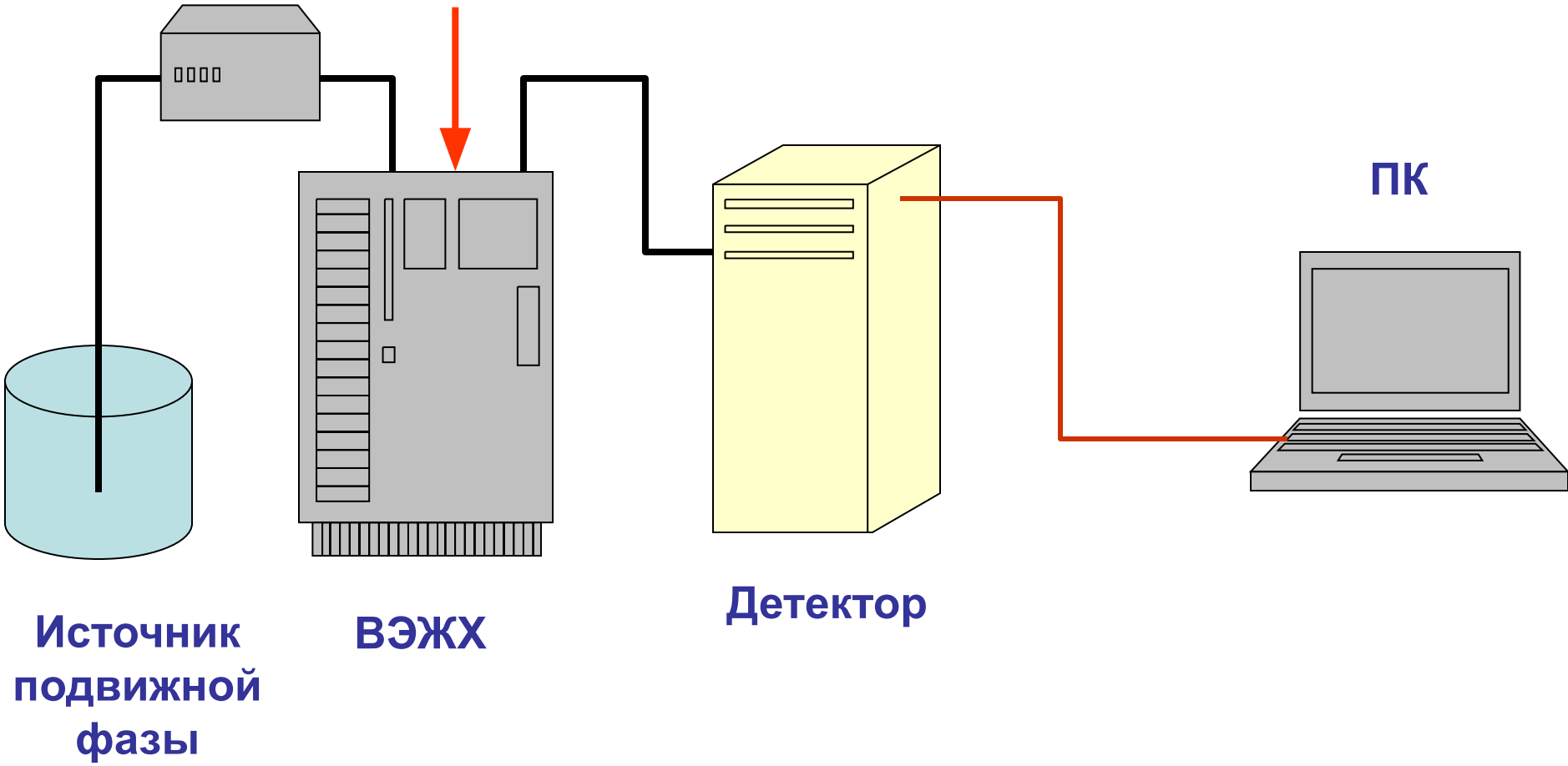
должны элюировать анализируемые соединения с оптимальными значениями k', обладать низкой вязкостью, обеспечивать необходимый уровень селективности, быть дешевыми, нетоксичными, инертными, совместимыми с методами детектирования

вода, спирты, бензол, гексан и другие углеводороды и смеси различных растворителей



На одной колонке можно разделить несколько веществ

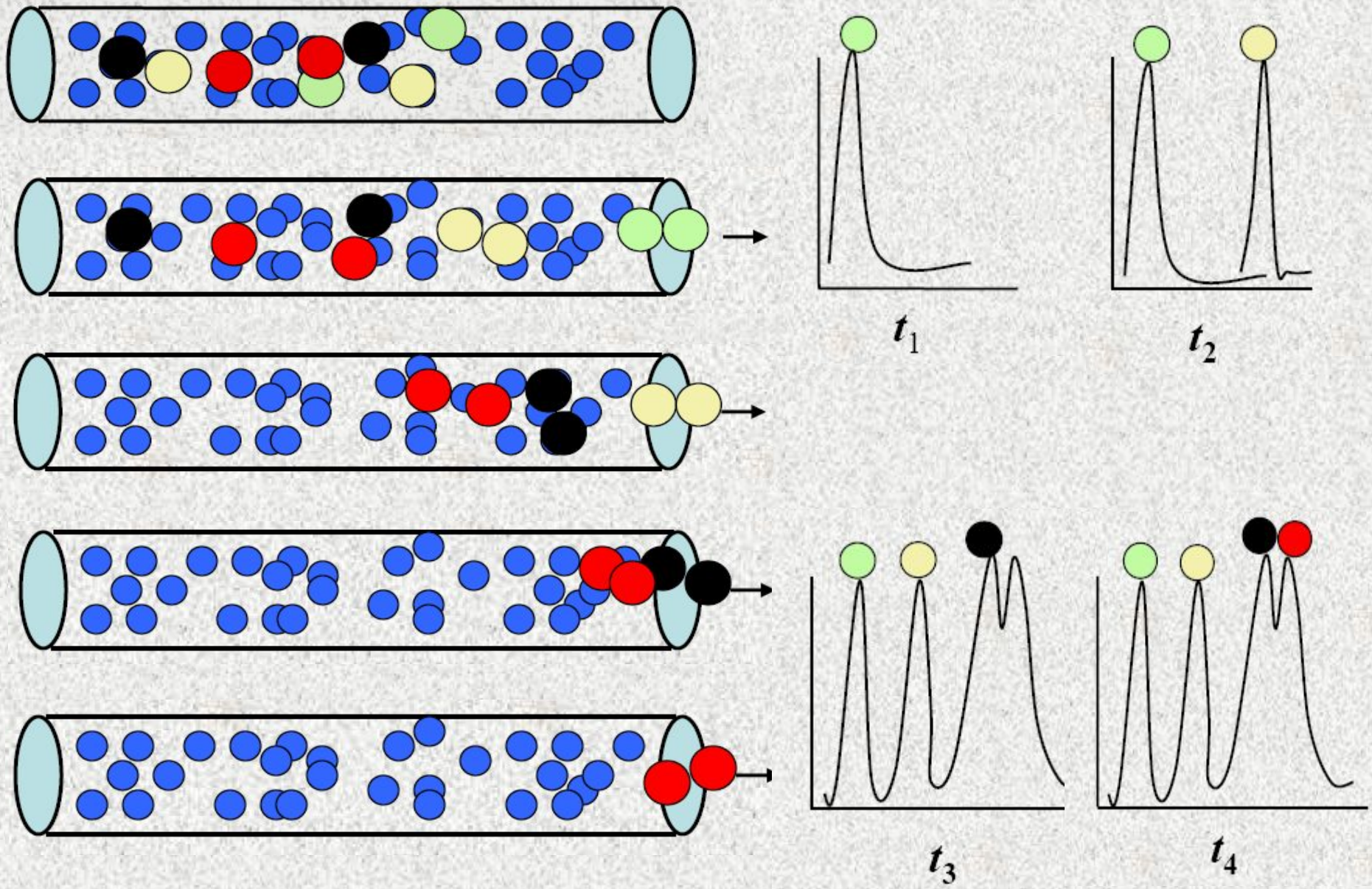
Высокоэффективная жидкостная хроматография



Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

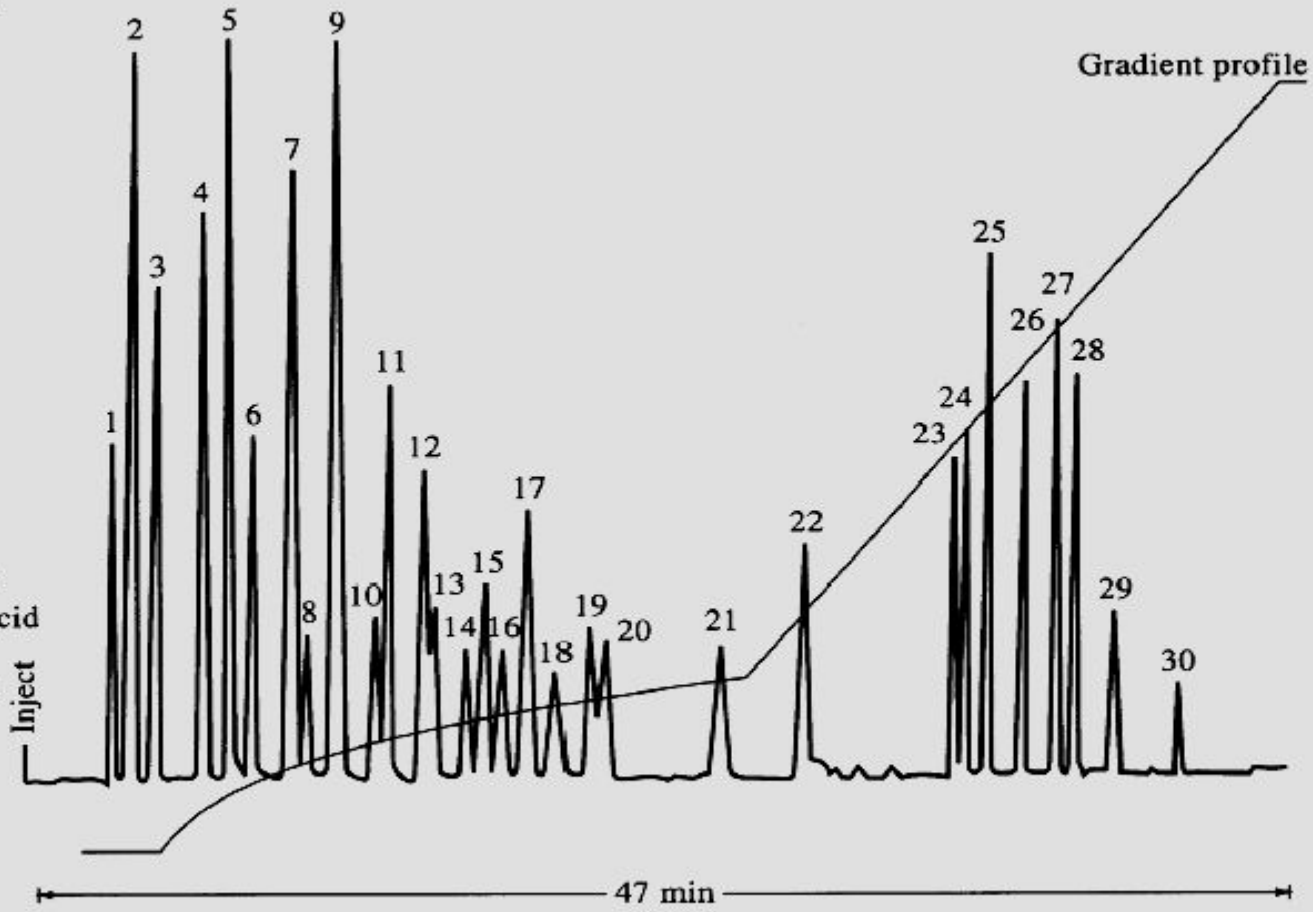
- используют колонки диаметром до 5 мм, плотно упакованные сорбентом с частицами малого размера (3-10 мкм)
- давление для прокачивания элюента до 3.107 Па

Хроматографическое разделение в ВЭЖХ



Пример хроматограммы ВЭЖХ аминокислот

1. Phosphoserine
2. Aspartic acid
3. Glutamic acid
4. α-Amino adipic acid
5. Asparagine
6. Serine
7. Glutamine
8. Histidine
9. Glycine
10. Threonine
11. Citrulline
12. 1-Methylhistidine
13. 3-Methylhistidine
14. Arginine
15. β-Alanine
16. Alanine
17. Taurine
18. Anserine
19. β-Aminobutyric acid
20. β-Aminoisobutyric acid
21. Tyrosine
22. α-Aminobutyric acid
23. Methionine
24. Valine
25. Tryptophan
26. Phenylalanine
27. Isoleucine
28. Leucine
29. δ-Hydroxylysine
30. Lysine



Система высокоэффективной жидкостной хроматографии PE 200 Series (PerkinElmer, США)

Детекторы в ВЭЖХ

- Рефрактометрический
- УФ-детектор
- Детектор на диодной матрице
- Флуоресцентный
- Электрохимический
- Масс-спектрометрический

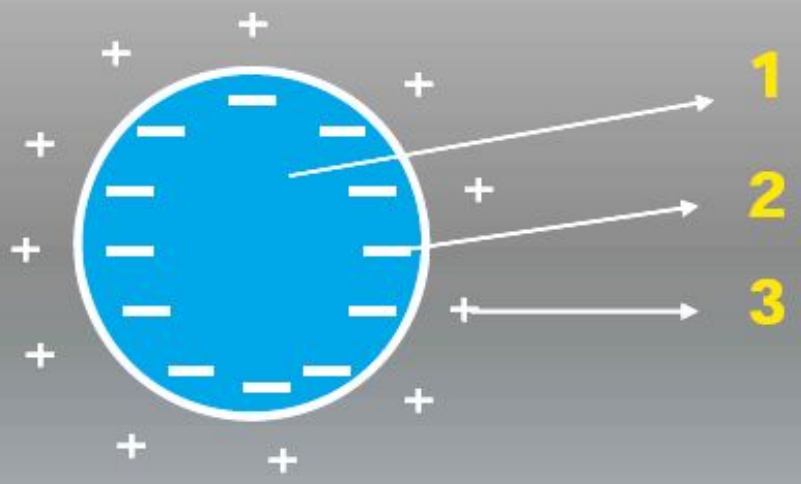
Ионнообменная хроматография (ИХ)

основана на адсорбции электролитов из водных растворов на твердых адсорбентах

СОРБЕНТЫ В ИХ

Иониты – твердые природные или синтетические вещества, содержащие в своем составе функциональные группы, ионы которых способны обмениваться на ионы того же знака, находящиеся в растворе

Схема структуры ионита (катионита)

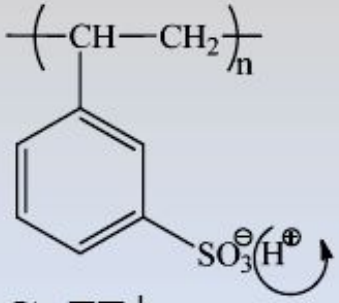


1 – матрица ионита (каркас)

2 – функциональные группы (ковалентно связаны с матрицей)

3 – противоионы (электростатически связаны с ионогенными группами)

Классификация ионитов



1. Катиониты:

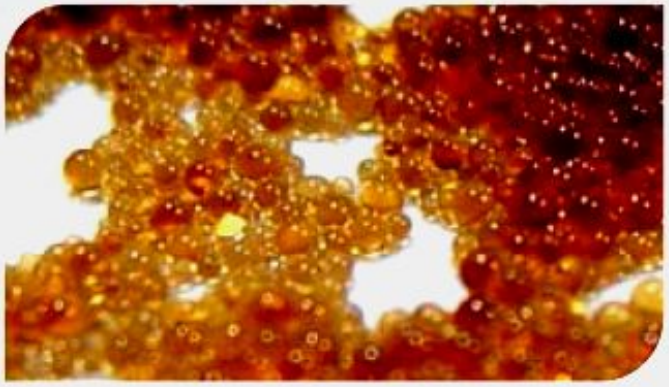
$$R - SO_3^- H^+ ; R - COO^- H^+ ; R - S^- H^+$$

2. Аниониты:

$$R^+ - OH^-$$

3. Амфолиты:

$$R \begin{cases} N^+(CH_3)OH^- \\ SO_3^- H^+ \end{cases}$$



R – матрица ионита

Ионная адсорбция зависит:

- **От величины заряда адсорбируемых ионов:**

$$K^+ < Ca^{2+} < Al^{3+} < Th^{4+}$$

- **От радиуса иона в сольватированном состоянии:**

$$Li^+ < Na^+ < K^+ < Rb^+ < Cs^+$$

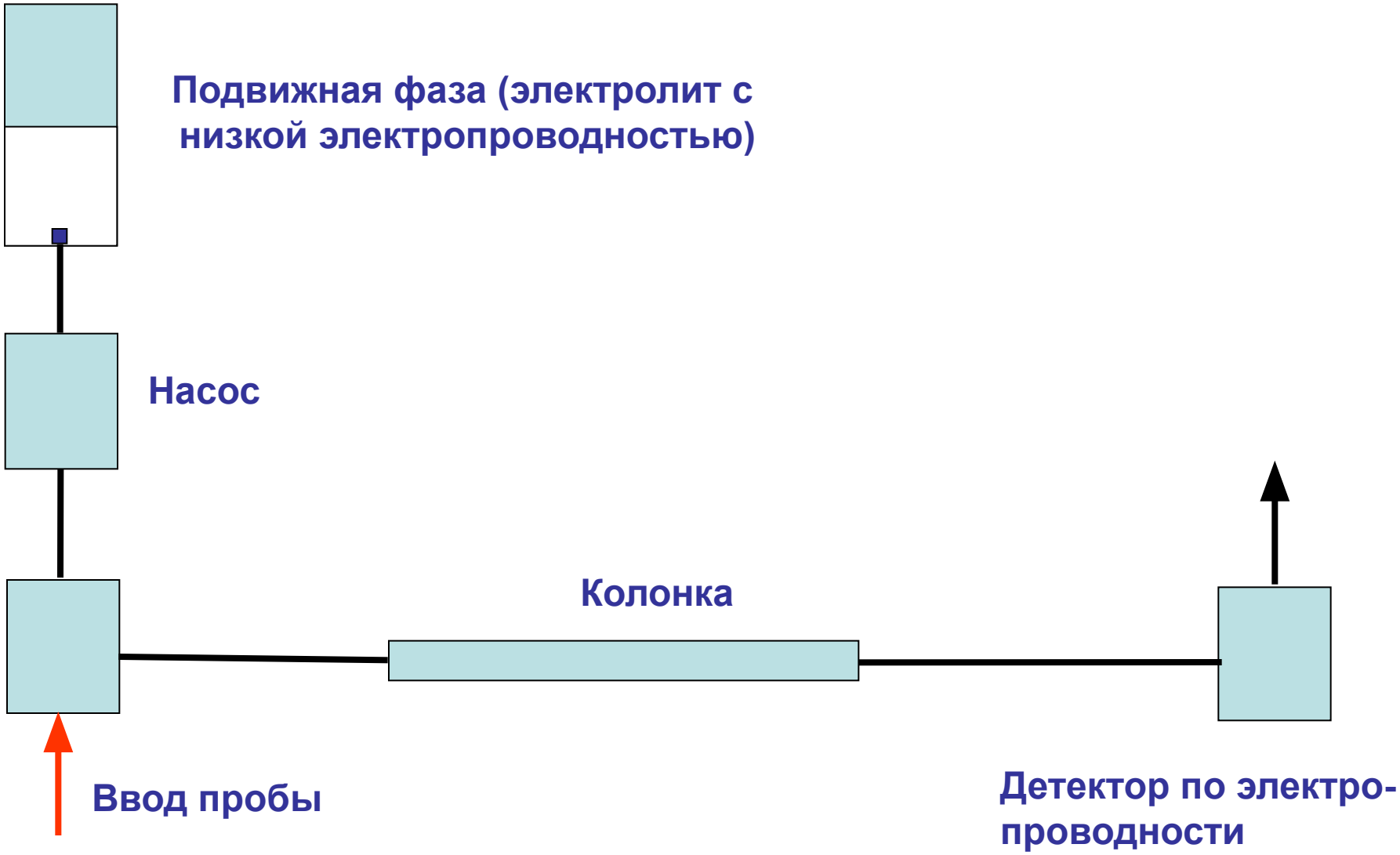
$\longleftarrow$

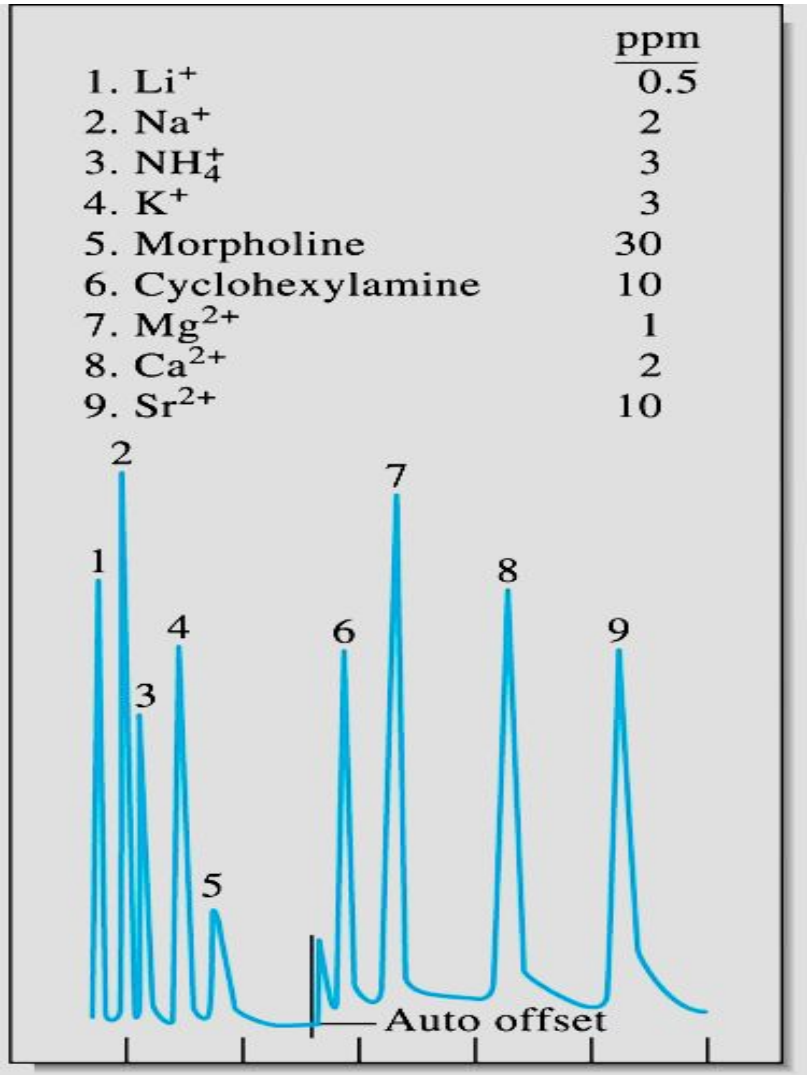
увеличение гидратации

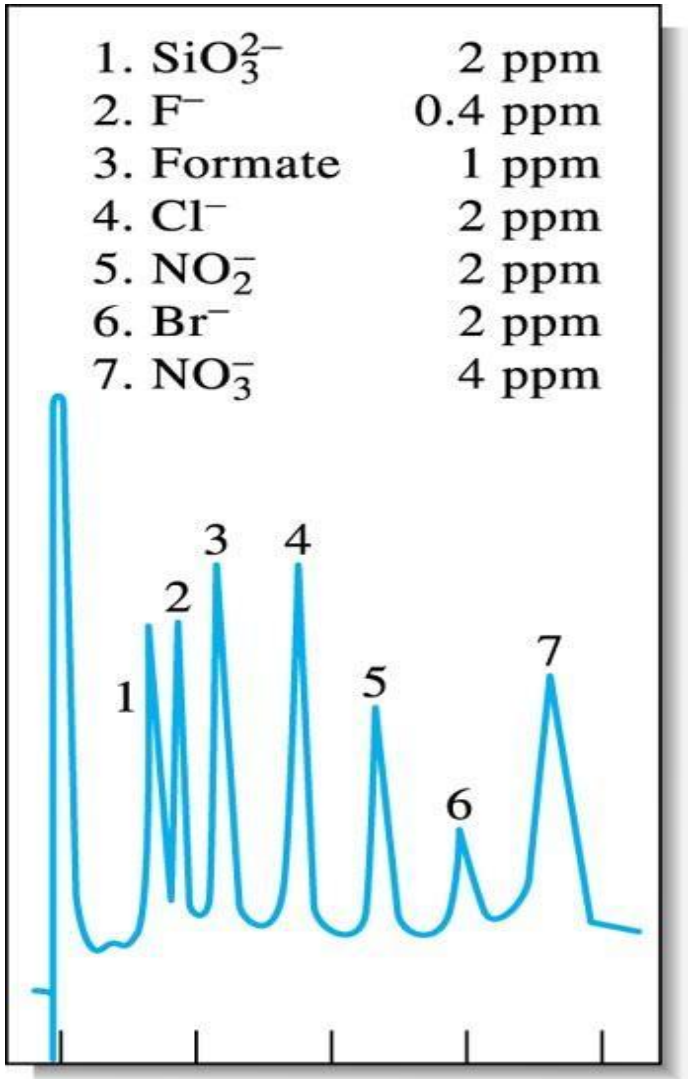
$\longrightarrow$

увеличение адсорбции

Схема ионного хроматографа







Ионные хроматограммы смесей катионов и анионов

Ионный хроматограф PIA 1000

Аффинная хроматография (АХ)

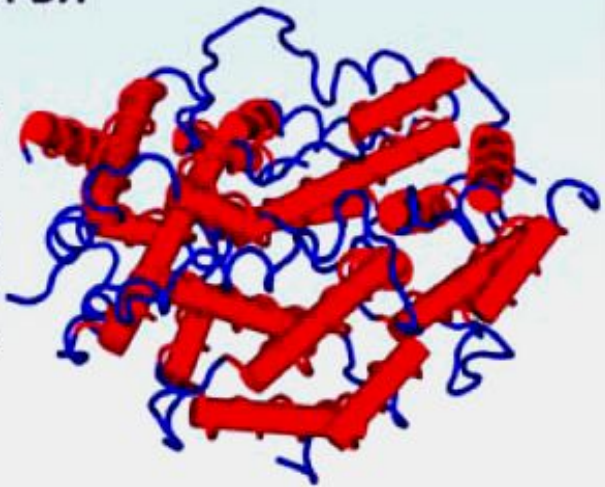
affinity – сродство

Разновидность лигандной хроматографии, в основе которой лежит реакция взаимодействия разделяемых примесей с лигандом, связанным с инертным носителем. В АХ в роли примесей выступают биологически активные вещества (белки, ферменты), вступающие с лигандом (тоже, как правило, органическим) в специфическое биохимическое взаимодействие. Например: антитело-антиген, гормон-рецептор и т.д. Высокая специфичность подобного взаимодействия обуславливает высокую эффективность аффинной хроматографии и её широкое (по сравнению с другими видами лигандной хроматографии) распространение.

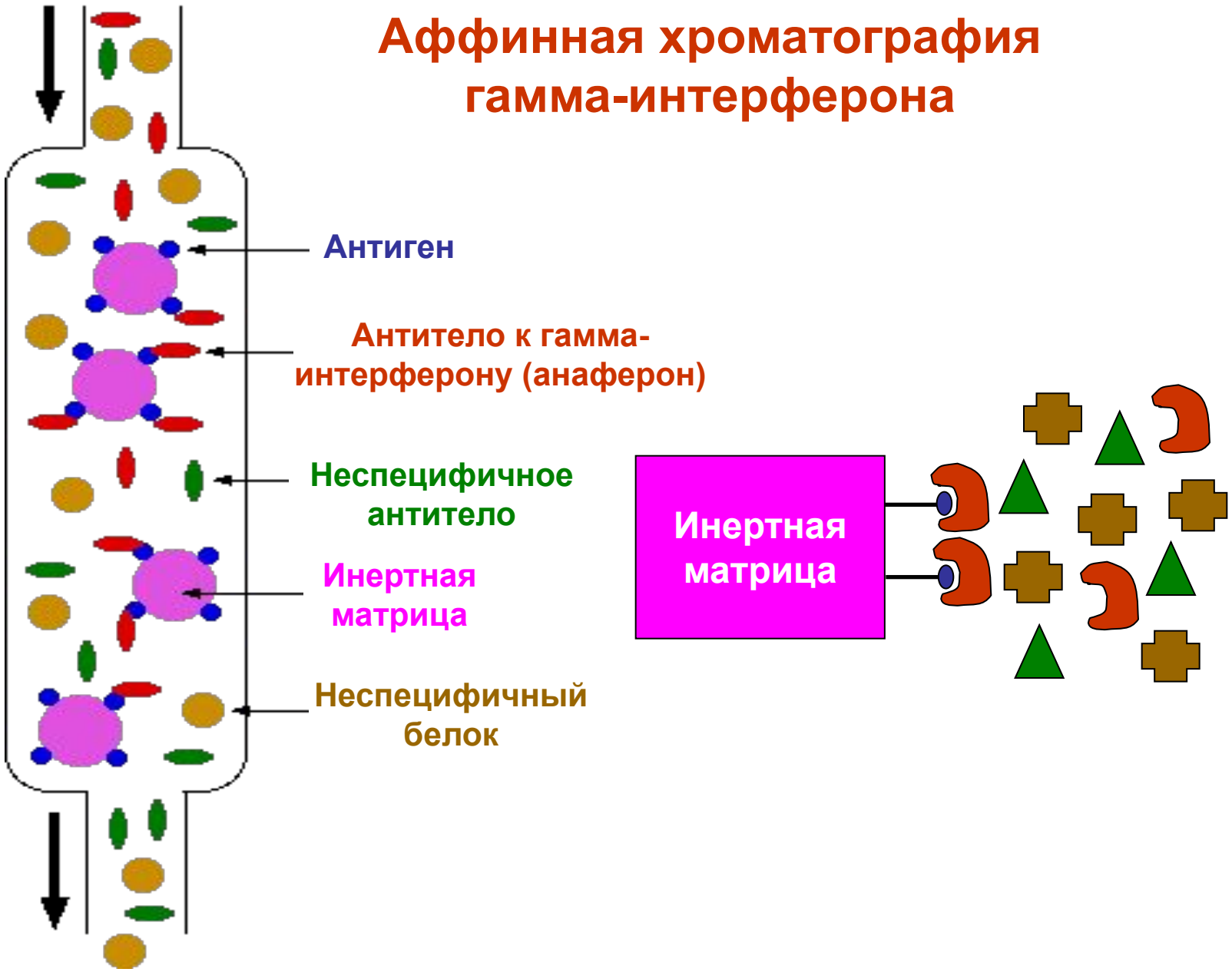
АНАФЕРОН – аффинно очищенные антитела к γ-интерферону человека

иммуномодулятор широкого спектра действия для лечения и профилактики гриппа, ОРВИ

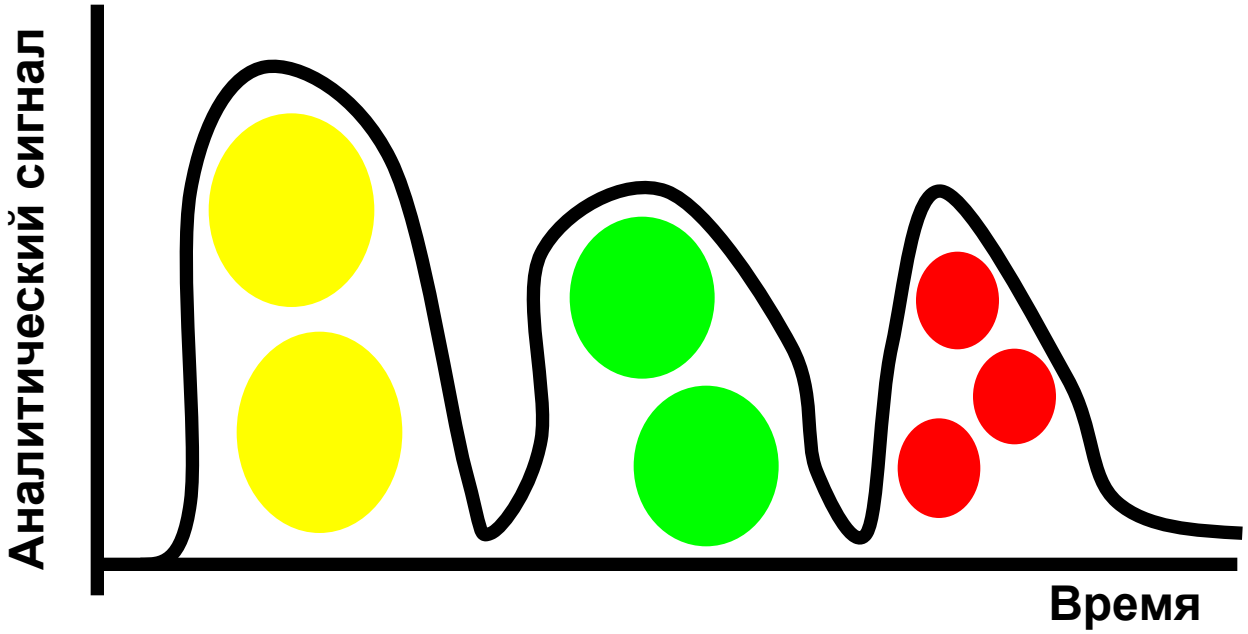
Технология производства: иммунизация кроликов гамма-интерфероном человека для получения антител к гамма-интерферону человека. Из сыворотки крови иммунизированного животного методом афинной хроматографии на адсорбционной колонке выделяют антитела к гамма-интерферону человека

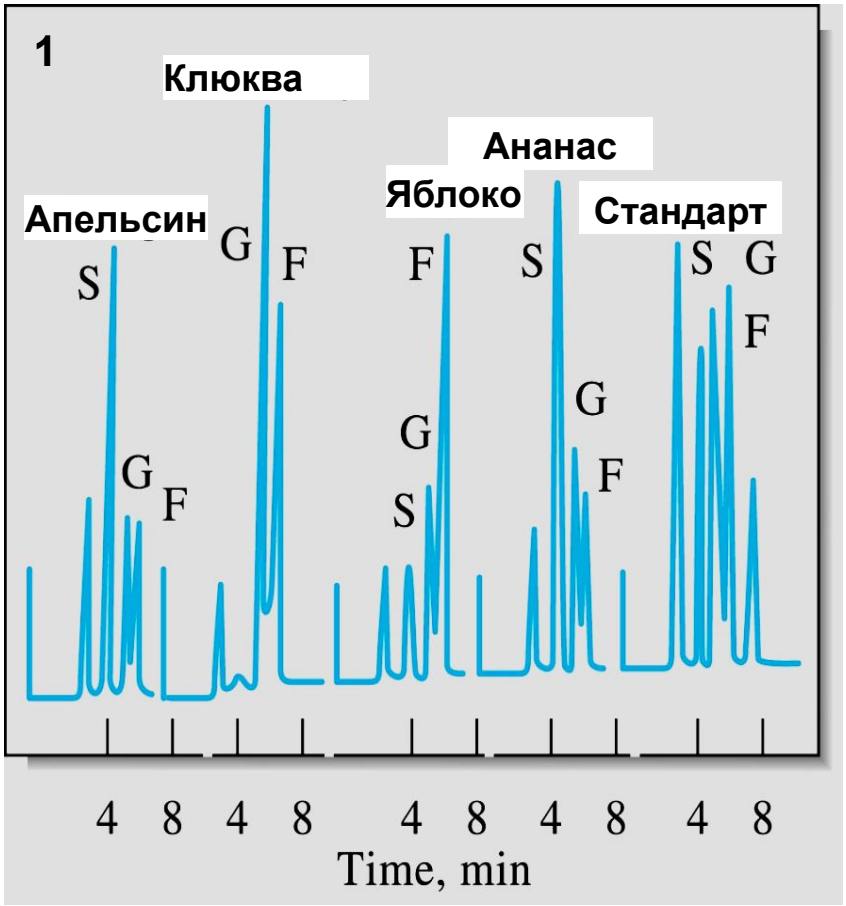


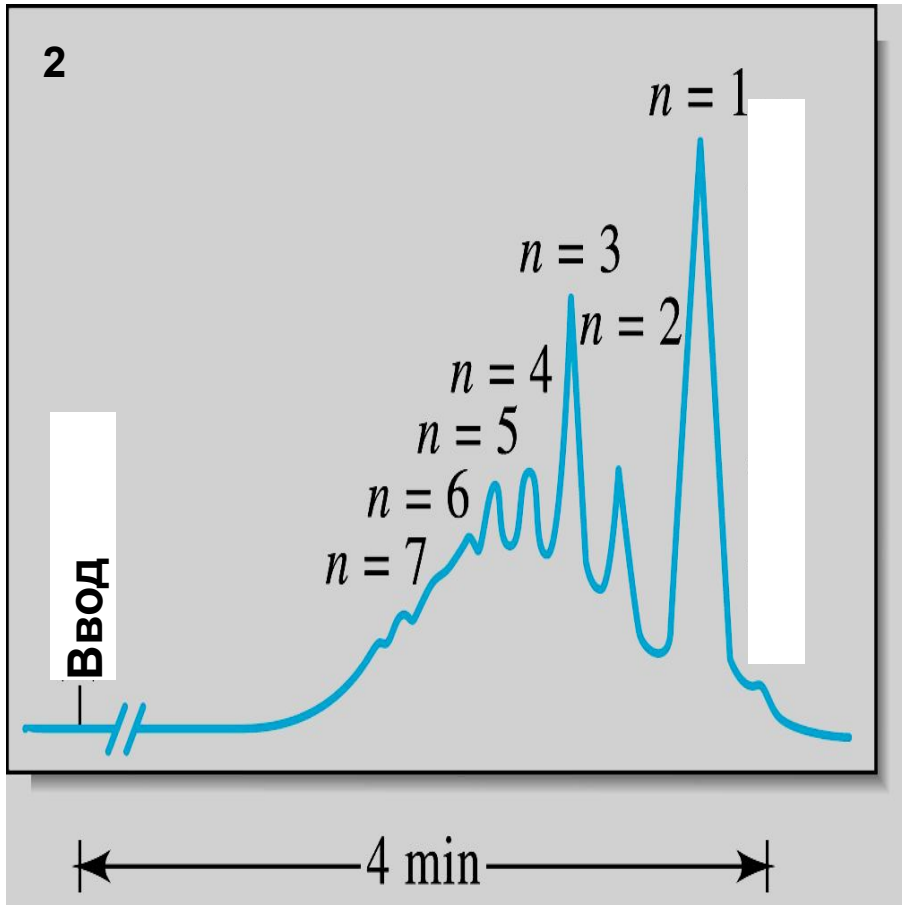
Аффинная хроматография гамма-интерферона



Гель-фильтрация или **эксклюзионная хроматография** - разновидность хроматографии, в ходе которой молекулы веществ разделяются по размеру за счёт их разной способности проникать в поры неподвижной фазы (**геля**). Первыми выходят из колонки наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор неподвижной фазы. Последними выходят вещества с малыми размерами молекул, свободно проникающие в поры.







1. Гель-хроматограммы глюкозы (G), фруктозы (F) и сукрозы (S), содержащихся в соках.

2. Гель-хроматограмма компонентов эпоксидной смолы.

Области применения (ЖХ)

ЖХ – важнейший физ.-хим. метод исследования в химии, биологии, биохимии, медицине, биотехнологии

МЕТОД ИСПОЛЬЗУЮТ ДЛЯ:

- анализа, разделения, очистки и выделения аминокислот, пептидов, белков, ферментов, вирусов, нуклеотидов, нуклеиновых к-т, углеводов, липидов, гормонов и т. д.
- изучения процессов метаболизма в живых организмах лек. Препаратов
- диагностики в медицине
- анализа продуктов химического и нефтехимического синтеза, полупродуктов, красителей, топлив, смазок, нефтей, сточных вод
- изучения изотерм сорбции из р-ров, кинетики и селективности хим. процессов.
- анализа загрязнений окружающей среды, в криминалистике

Хроматография как метод разделения в-в предложена М.С. Цветом на примере жидкостной хроматографии

Газовая хроматография (ГХ)

ГХ – метод хроматографического анализа, в котором подвижной фазой служит газ (пар)

Разделение компонентов в ГХ основано на различии скоростей движения и размывания концентрационных зон исследуемых веществ, движущихся в потоке газовой фазы относительно слоя неподвижной, причем эти в-ва распределены между обеими фазами

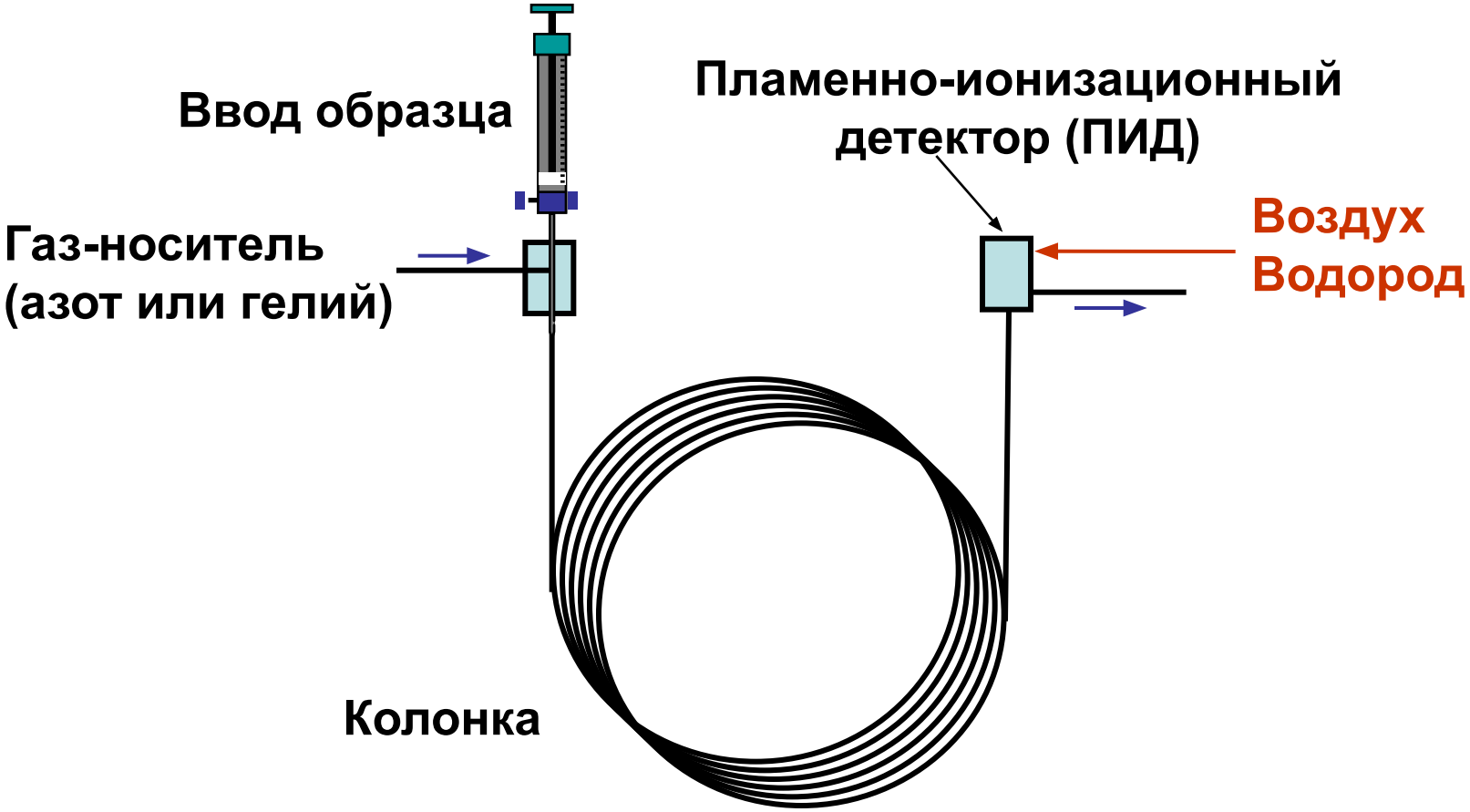
Газ-носитель (H_2, He, воздух, N_2, Ar, CO_2 и др.) должен иметь небольшую вязкость и обеспечивать высокую чувствительность детектирования

ГХ используют для анализа газообразных, жидких и твёрдых веществ с молекулярной массой меньше 400, которые должны удовлетворять определённым требованиям:

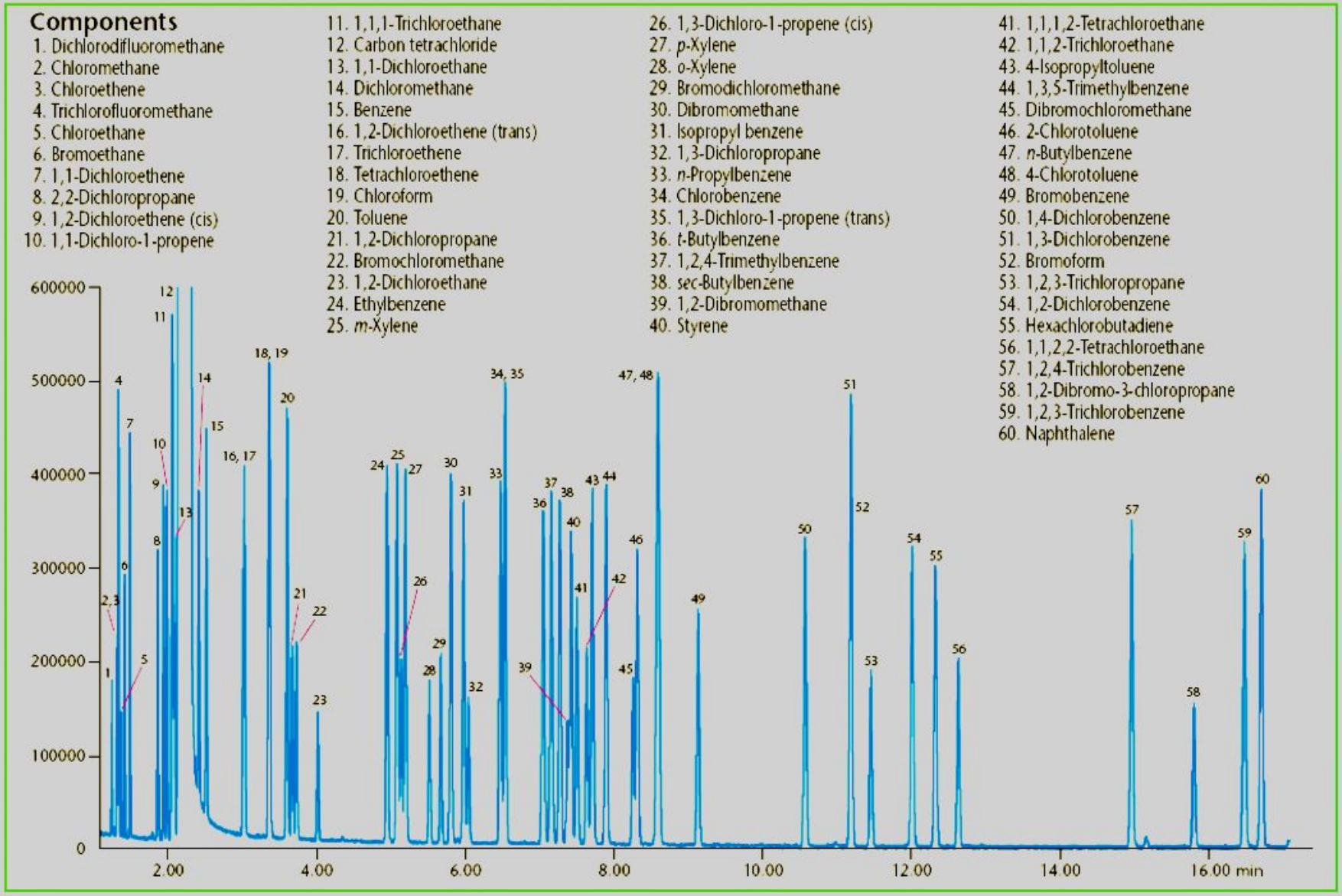
- **летучесть, термостабильность, инертность, лёгкость получения**

Этим требованиям в полной мере удовлетворяют, как правило, органические вещества, поэтому газовую хроматографию широко используют как серийный метод анализа органических соединений.

Принципиальная схема газового хроматографа



Газовая хроматограмма смеси веществ



Колонки в ГХ различаются:

- **По форме:** U- и W-образные, спиральные
- **По размеру:** - насадочные (L = 1-4 м, d = 2-4 мм)

- капиллярные (25-200 м, 0.2-0.5 мм)

- поликапиллярные (блоки по ~ 1000 шт)

- **По материалу:**

- сталь

- стекло

- кварц

- медь

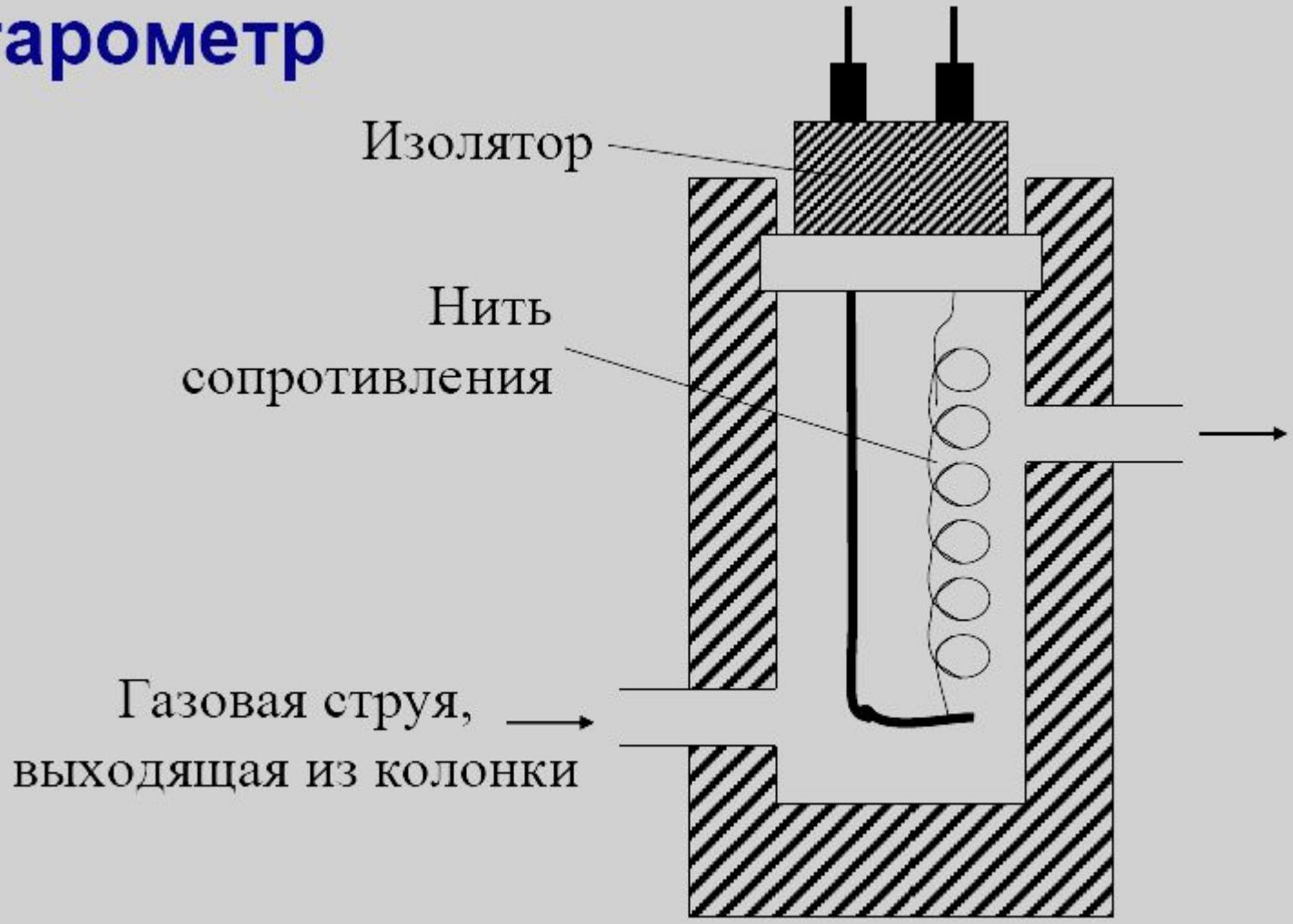
- полимеры

- **Материал колонок:**
  - металлы
  - пластмассы
  - стекло
- **Требования к колонкам:**
  - постоянный диаметр
  - однородная поверхность
  - инертность
  - низкая сорбционная емкость
  - механическая прочность

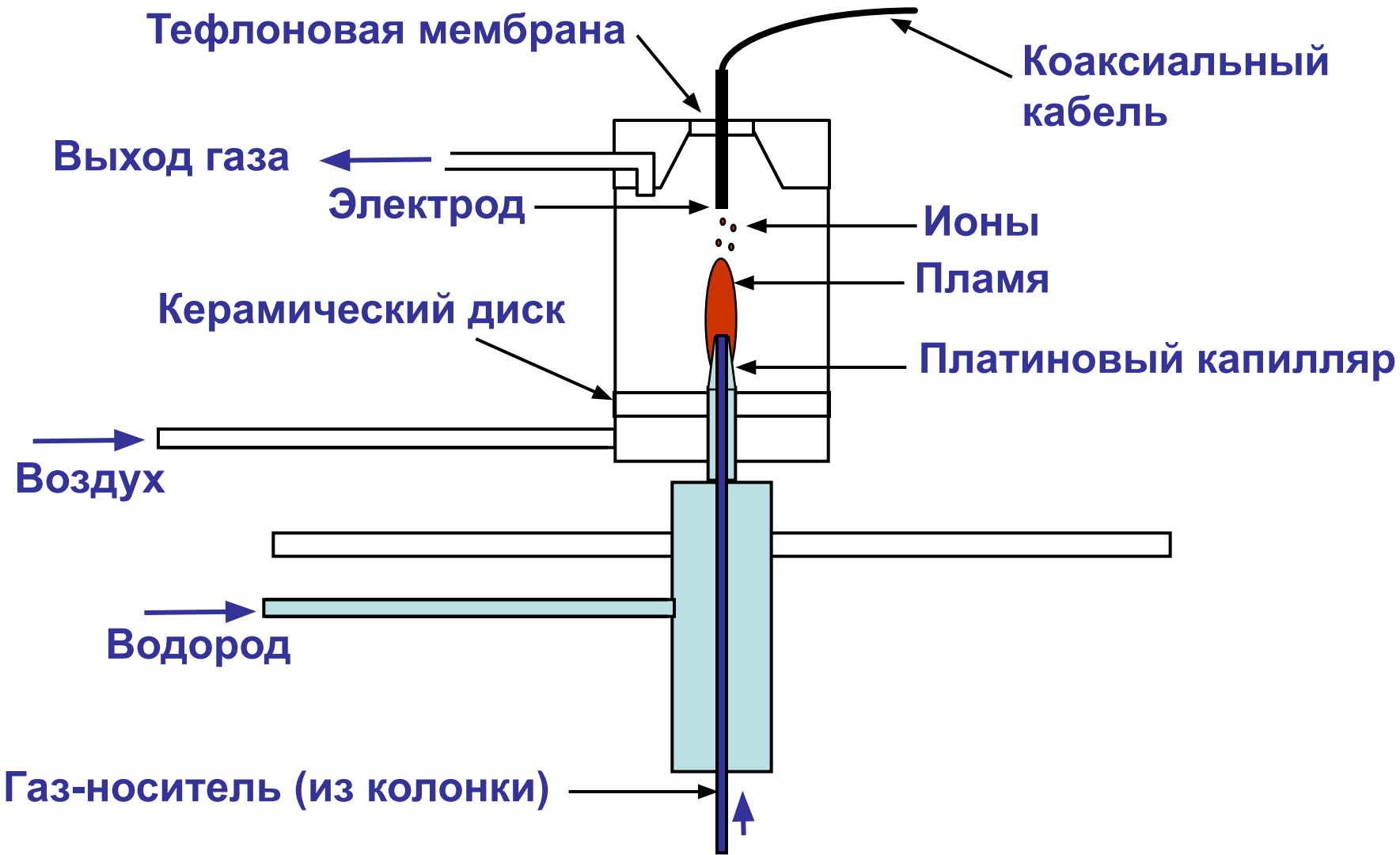
Детекторы в газовой хроматографии

- Пламенно-ионизационный (ПИД)
- Ионизационный
- Фотоионизационный (ФИД)
- Пламенно-фотометрический (ПФД)
- Электронно-захватный (ЭЗД)
- Катарометр
- Термохимический
- Термоионный (ТИД)
- Масс-спектрометр
- ИК-спектрометр
- Плотномер

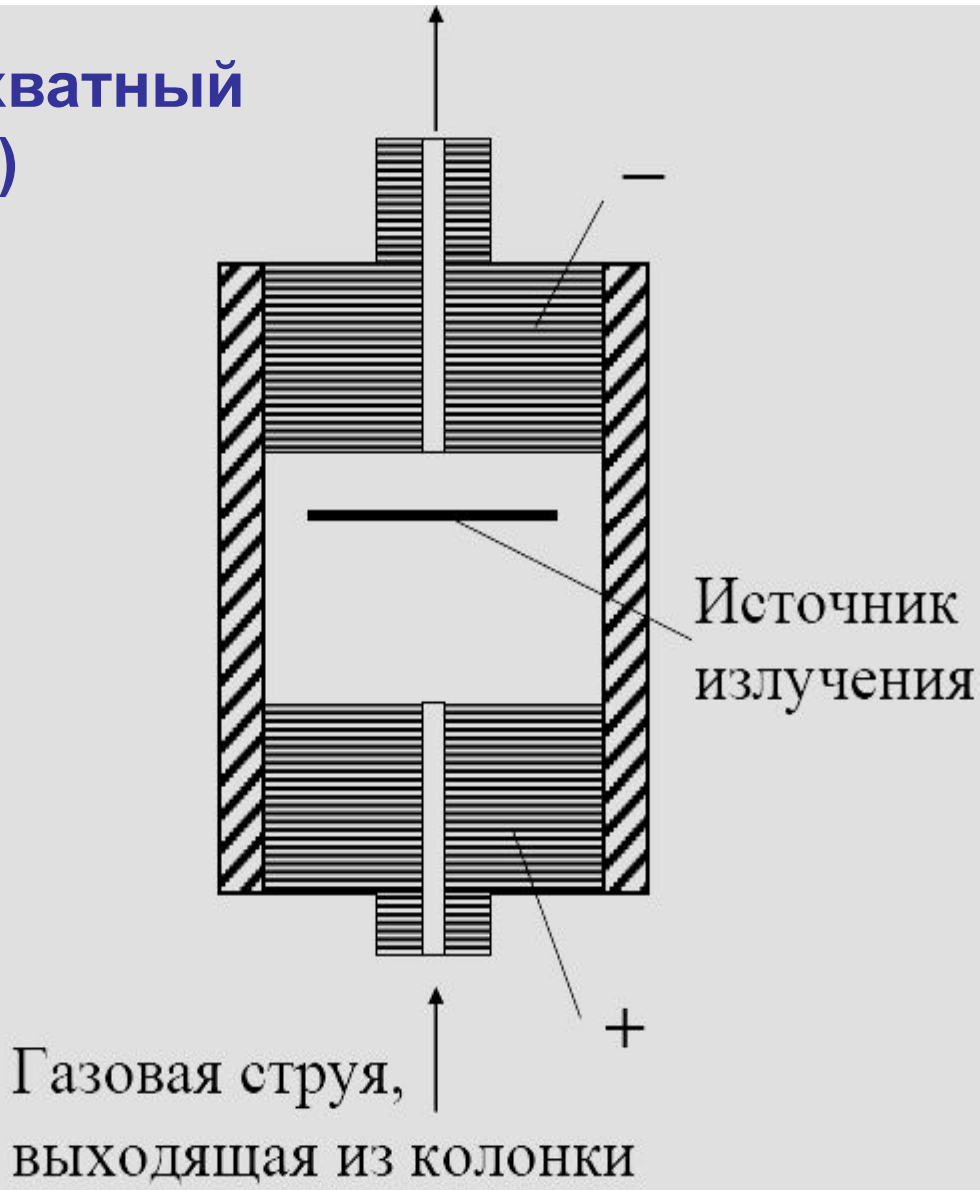
катарометр


Изолятор
Нить
сопротивления
Газовая струя,
выходящая из колонки

Пламенно-ионизационный детектор



Электроно-захватный детектор (ДЭЗ)



Требования к детекторам в ГХ

- - низкая инерционность
- - чувствительность
- - линейность зависимости сигнала от концентрации
- - непрерывность регистрации сигнала в процессе анализа
- **Универсальные и селективные**
- **Дифференциальные и интегральные**

Основные характеристики аппаратуры:

- Эффективность 10^3-10^6 ТТ
- Масса пробы 10^{-6}-10^{-11} г
- t^0 анализа – от криогенной до 1350 ^{0}С
- Давление в колонке – от вакуума до 2000 атм
- Продолжительность определения – от секунд до часа
- Число пиков на хроматограмме – 1-10000
- Предел обнаружения – до 10^{-10} %

Достоинства:

- универсальность
- экспрессность
- высокая селективность
- низкий предел обнаружения и возможность анализа микропроб
- возможность автоматизации

Классификация методов газовой хроматографии

По природе НФ:

- газо-жидкостная
- газо-адсорбционная

По природе и свойствам ПФ:

- барохроматография
- парофазная
- сверхкритическая флюидная
- плотностная

Газо-адсорбционная хроматография

Газ-носитель:

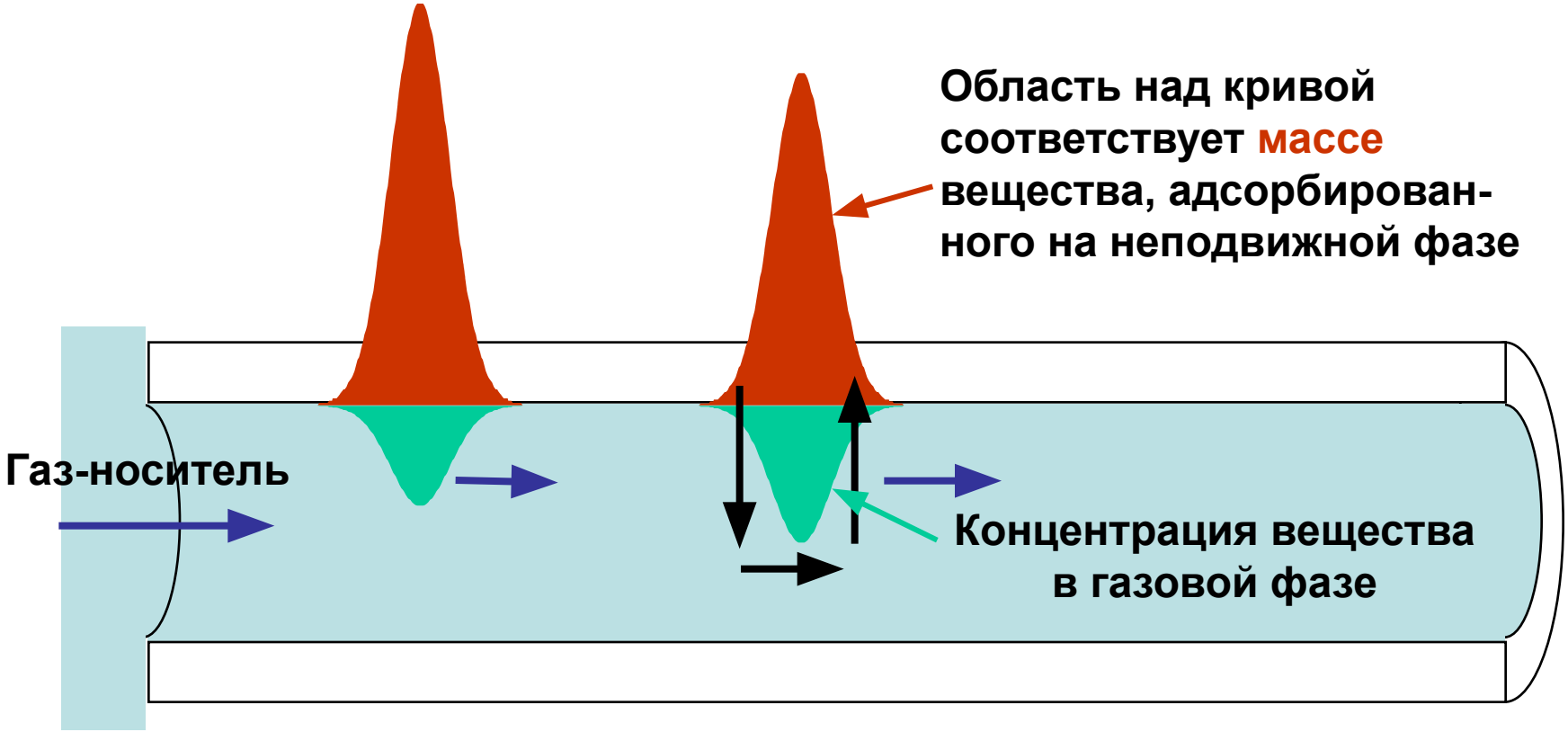
He, Ar, H_2, CO_2, N_2, воздух, H_2O-пар, органические пары и др.

Неподвижная фаза – свойства зависят от природы, способа приготовления и обработки.

Al_2O_3, силикагели, синтетические цеолиты, активные угли, термическая сажа, пористые полимеры, неорганические соли, углеродные молекулярные сита, модифицированные сорбенты и др.

Разделение компонентов в газо-адсорбционной хроматографии

Скорость переноса разделяемых компонентов в колонке зависит от их сродства к неподвижной фазе. Чем выше адсорбционная способность, тем медленнее скорость переноса разделяемых компонентов.



Требования к подвижной фазе в газо-адсорбционной хроматографии

- - инертность по отношению к НФ и разделяемым веществам
- - низкая вязкость
- - обеспечение высокой чувствительности детектора
- - низкая стоимость
- - взрывобезопасность
- - высокая чистота

Требования к неподвижной фазе в газо-адсорбционной хроматографии

- селективность
- высокая сорбционная ёмкость
- отсутствие каталитической активности
- химическая инертность
- механическая прочность
- линейность изотермы сорбции
- доступность

Недостатки сорбентов

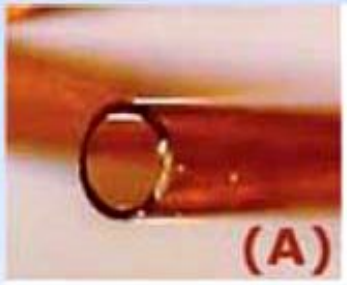
Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ)

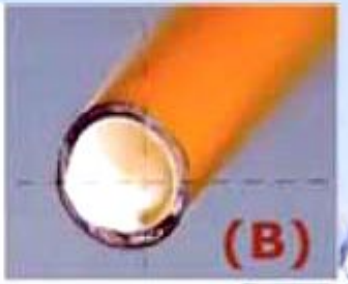
- ГЖХ используется для разделения «летучих» соединений, т.е. соединений с молекулярной массой до 500.
- Чувствительность метода: позволяет определить до 10^{-6}г количества соединения
- Неподвижной фазой является жидкость, подвижной – газ

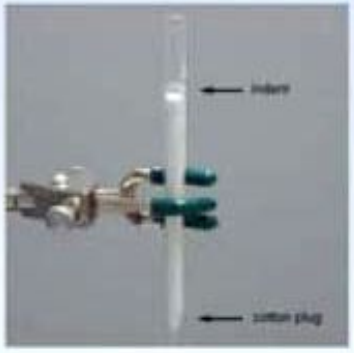
Жидкая неподвижная фаза - высокомолекулярную нелетучую жидкость (силиконовые масла, углеводородные смазки и высокомолекулярные полиэфиры)

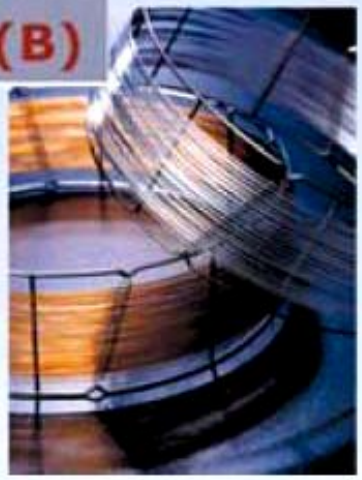
Колонки

- **Набивные** 2 - 10 мм
- **Капиллярные** 0.2-0.5 мм

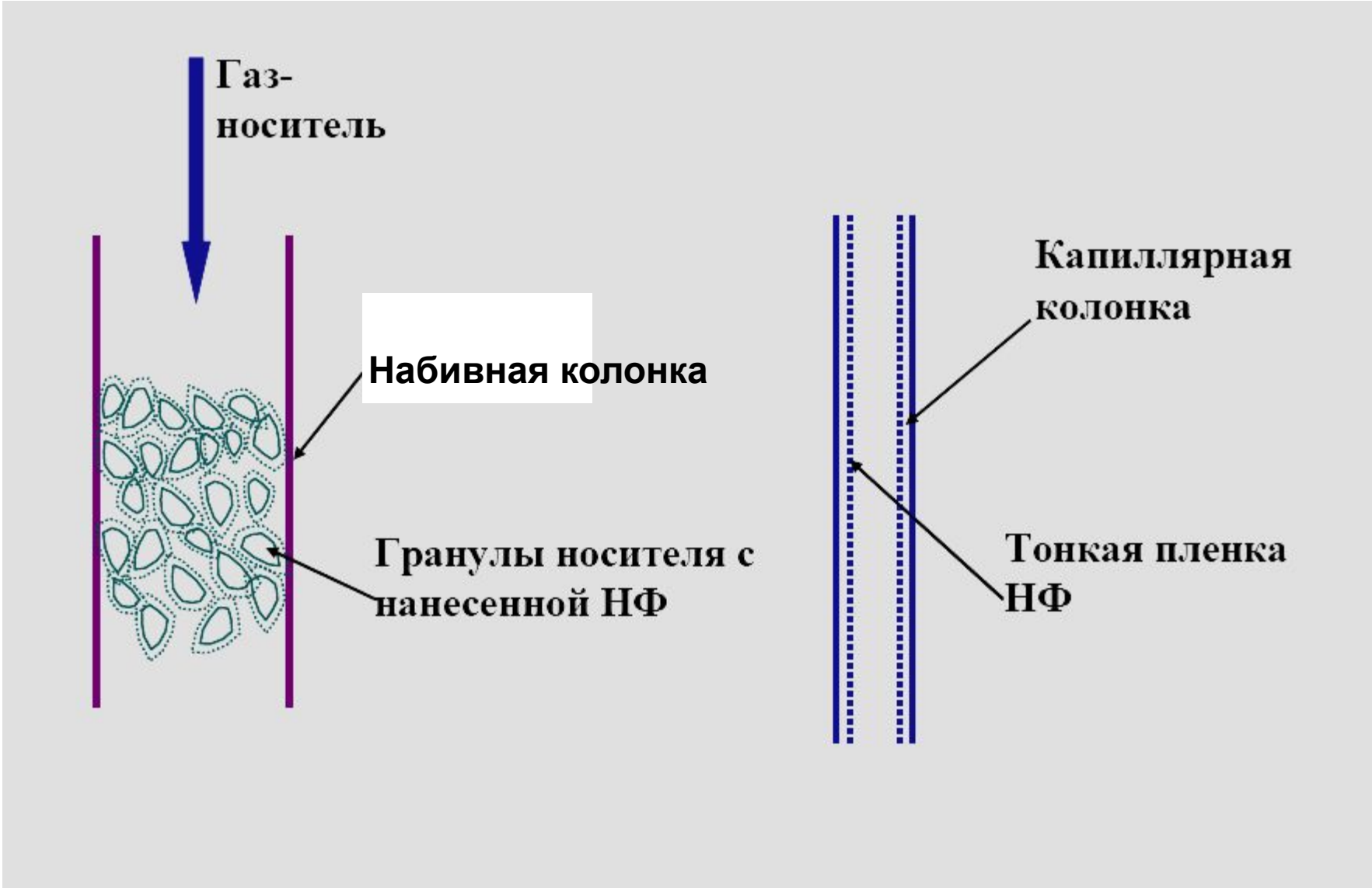






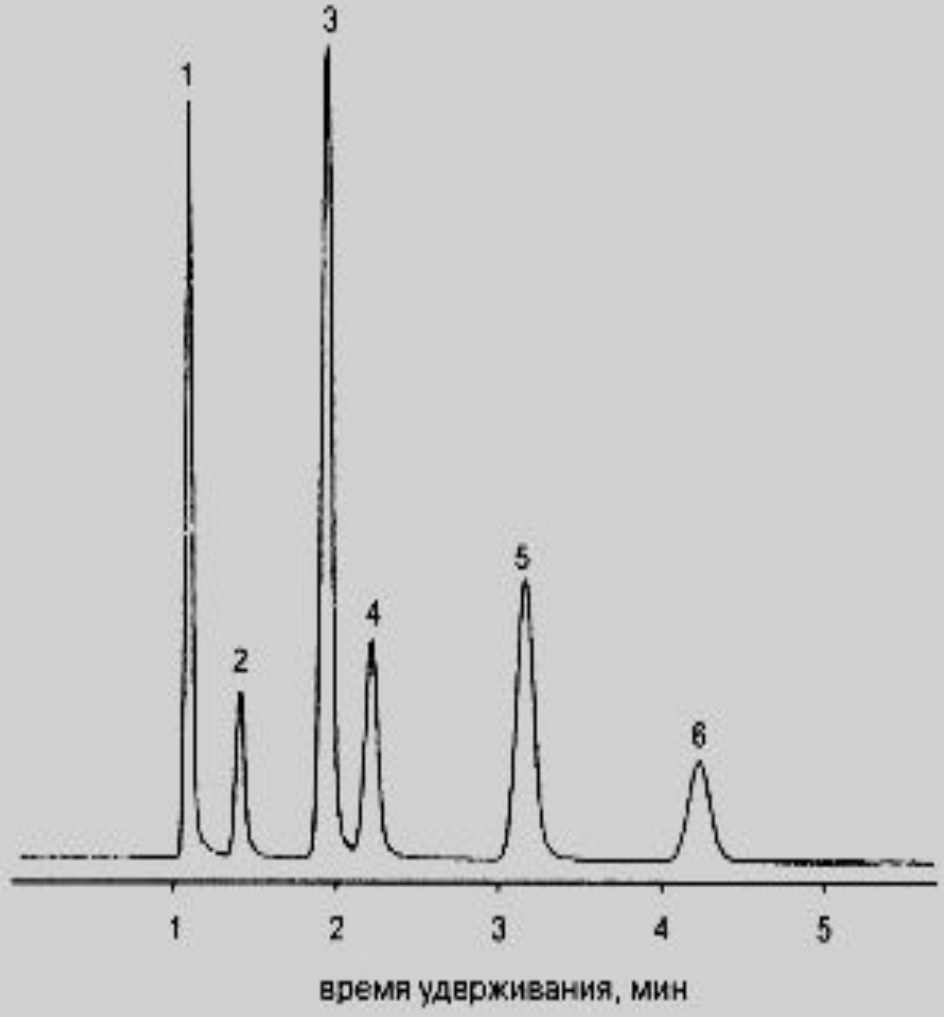


Колонки в газо-жидкостной хроматографии



Неподвижные фазы в газо-жидкостной хроматографии

		Рабочая t^0
Сквалан $C_{30}H_{62}$	$-(CH(CH_3)-(CH_2)_3-)-$	**125**
Апиезон	смешанные УВ	**300**
Силикон	$(R=C_6H_5)$ $(CH_3)_3Si-Si(CH_3)(R)-O-Si(CH_3)_3$	**325**
Карбовакс 20М	$HO-(-CH_2-CH_2-O-)_n-H$	**210**
ДЕ	$HO-CH_2-(-CH_2-O-C(O)-CH_2-)_n-CH_2-OH$	**200**



Определение следов алкоголя в крови: 1 – ацетальдегид; 2 – метанол; 3 – ацетон; 4 – этанол; 5 – изопропанол 6 – *трет*.бутанол.
Кварцевая колонка размером 180х0,3 см, сорбент – 5% полиэтиленгликоля Карбовакс20М на углеродном носителе КарбоБлэк Б, размер зерна 80–120 меш; температура 90° С; газ-носитель – гелий, 18 мл/мин; величина парообразной пробы – 500 мкл

Хроматограмма следов алкоголя в крови

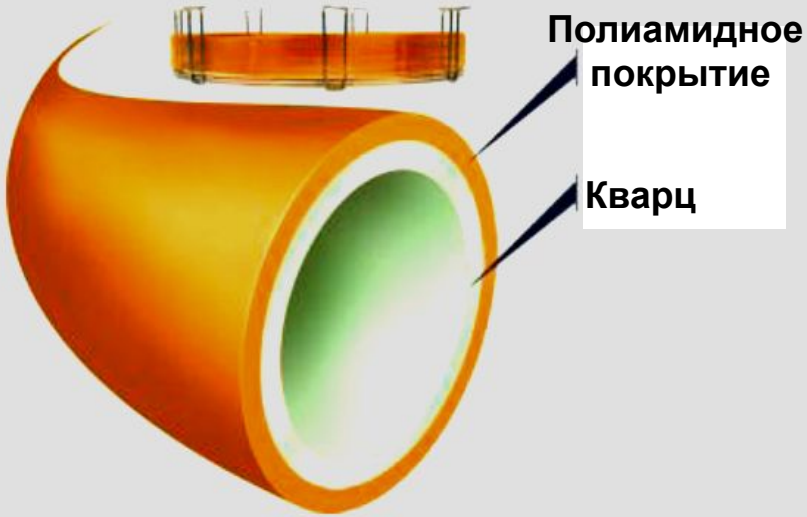
Капиллярная ГЖХ

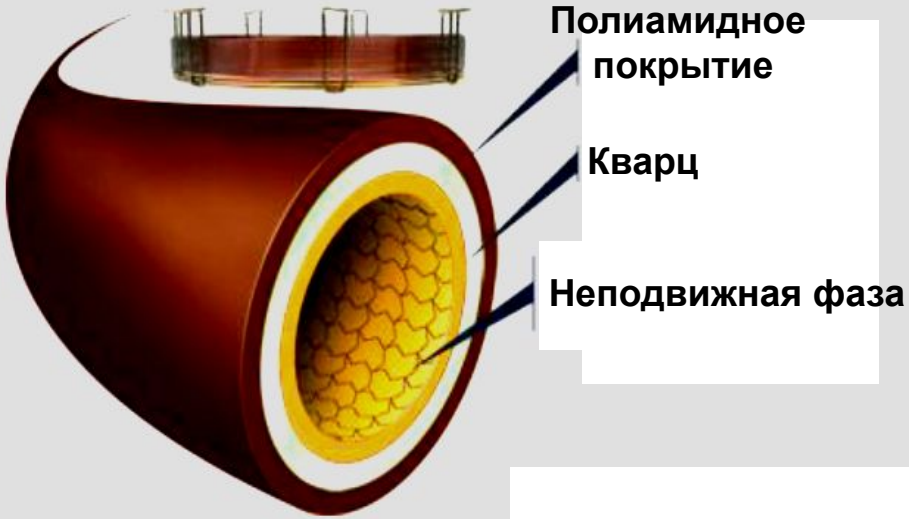
- Для ↑ эффективности надо ↑ соотношение «длина/диаметр»
- Хроматографические колонки
  d = 0.01-1.0 мм
  l ≥ 50-100 м, до 1000 м
- Предназначены для разделения близких по свойствам веществ и многокомпонентных смесей.
- Эффективность
  $N = n \cdot 10^5$

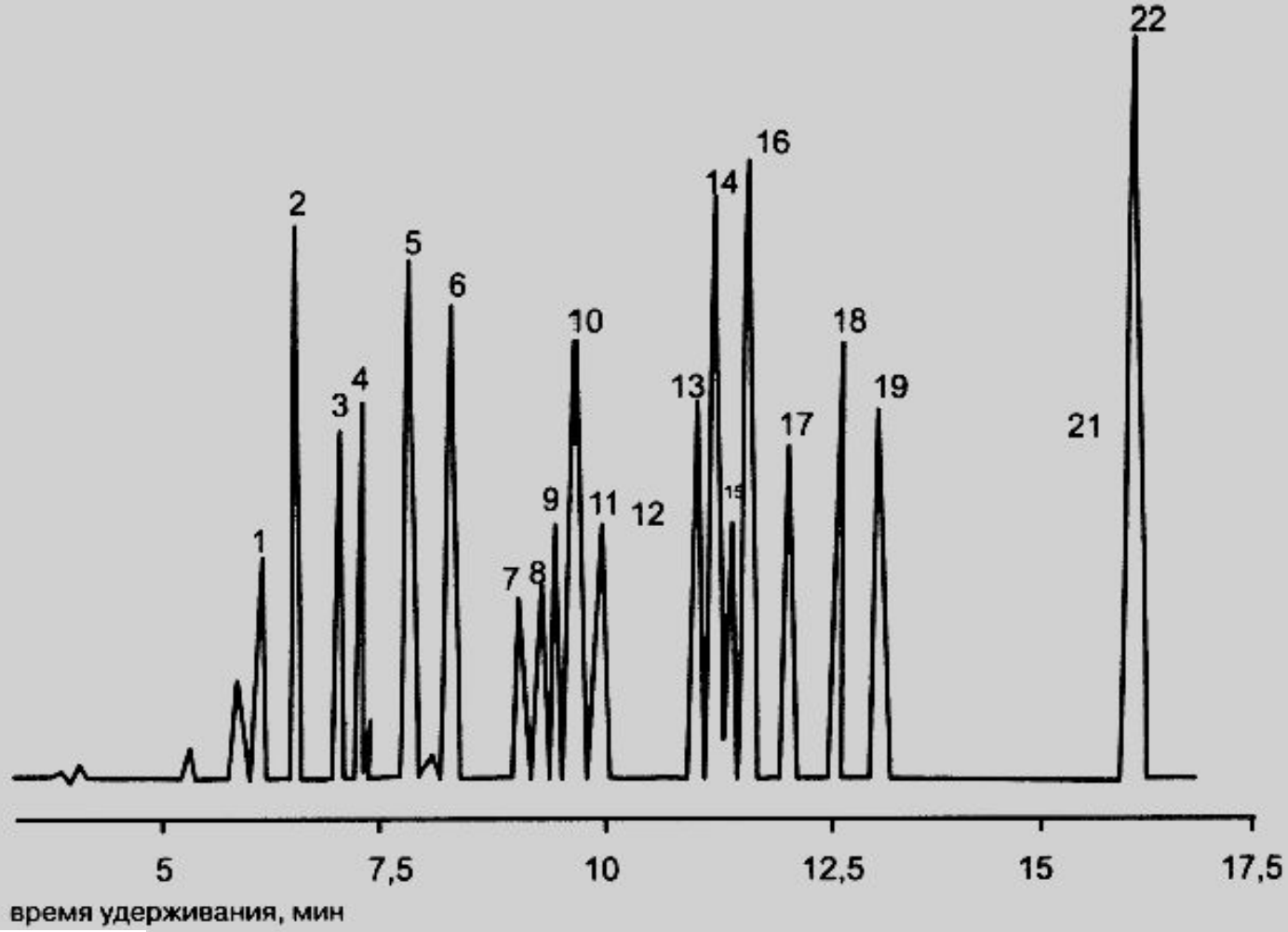
Преимущества капиллярных колонок

- облегчается движение газа-носителя, не нужно **высокое давление** газа-носителя;
- отношение **Vгаз/Vжид** (**Vпф/Vнф**) в капиллярных колонках = **500-1000**, в насадочных колонках = **30-50**;
- удельная проницаемость капиллярных колонок в **100 раз** превышает проницаемость насадочной колонки.

Конструкция капиллярных колонок



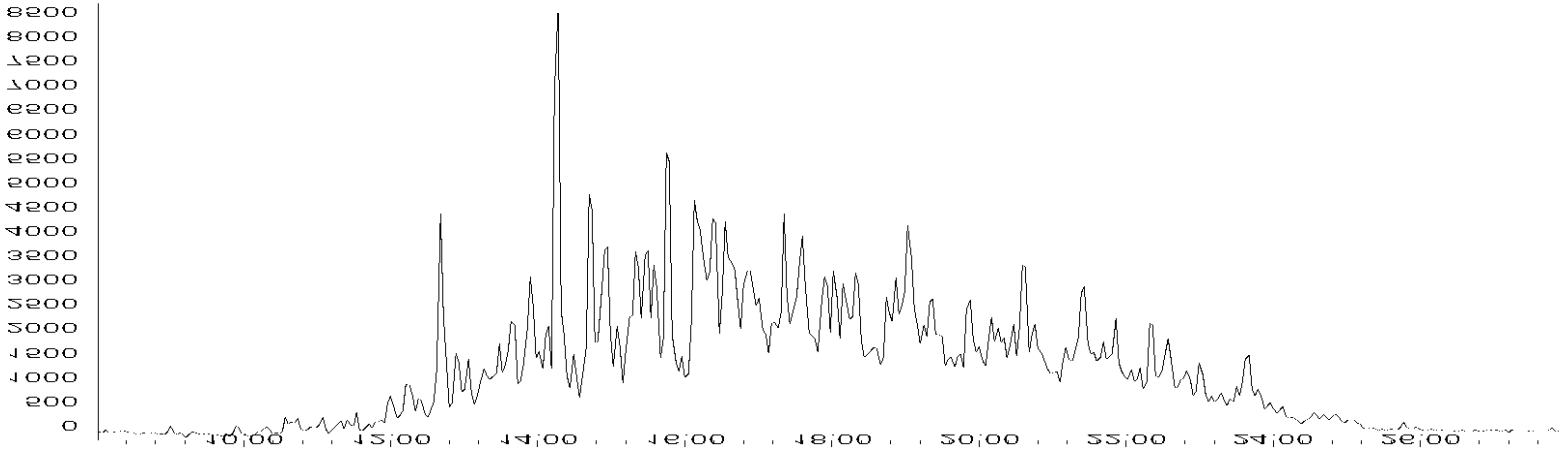




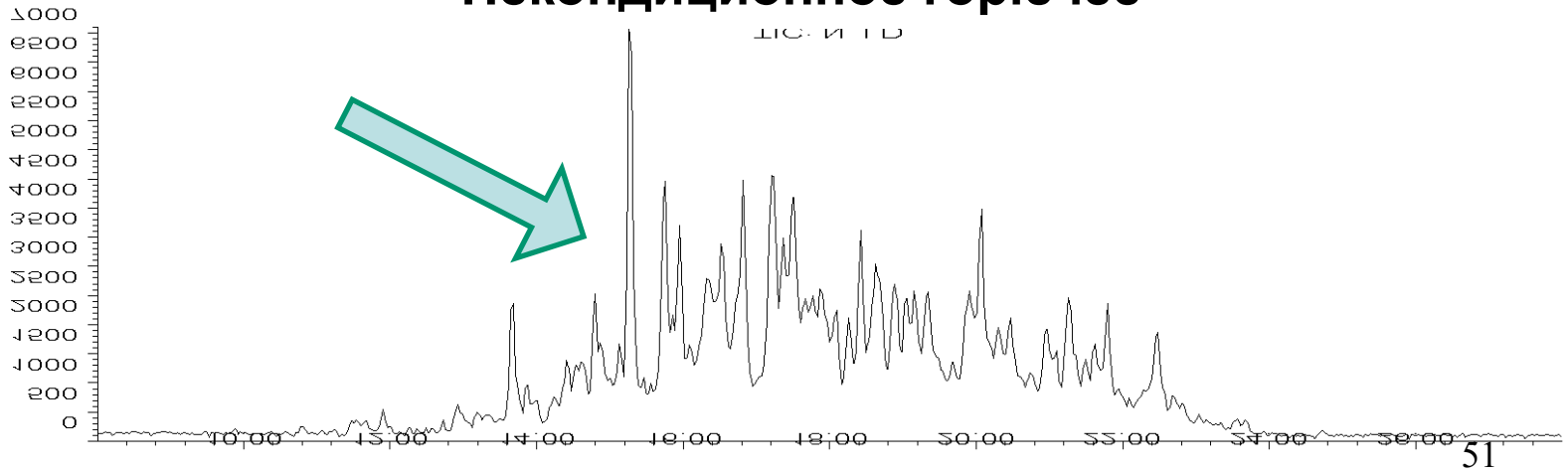
Хроматограмма смеси симпатомиметических аминов: 1 – фенилэтиламин; 2 – амфетамин; 3 – фентермин; 4 – метамфетамин; 5 – фенфлурамин; 6 – мефентермин; 7 – катинон; 8 –фенилпропаноламин; 9 – меткатинон; 10 – никотин; 11 – эфедрин; 12 – псевдоэфедрин; 13 – фенметразин; 14 – фендиметразин; 15 – метилендиоксиамфетамин; 16, 17 – метамфетамин; 18 – метилендиоксиэтиламфетамин; 19 – 4-метил-2,5-диметокси-амфетамин; 21 – кофеин; 22 – бензфетамин. Кварцевая капиллярная колонка длиной 30 м и диаметром 0,25 мм с неподвижной фазой Rtx-5Amine (фирма «Рестек», США), толщина пленки 0,5 мкм; программирование температуры от 100 до 310° С со скоростью нагрева 10 град/мин. Деление потока на входе 1:45

Хроматограммы двух образцов горючего, полученные на капиллярной колонке 30 м х 0,53 мм с НЖФ DB-5

Кондиционное горючее



Некондиционное горючее



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.
6. Шпигун О. А., Золотов Ю. А. Ионная хроматография. М.: Изд-во МГУ, 1990.