

Инструментальные методы анализа: колоночная хроматография

*Башкирский государственный университет
Кафедра аналитической химии*

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

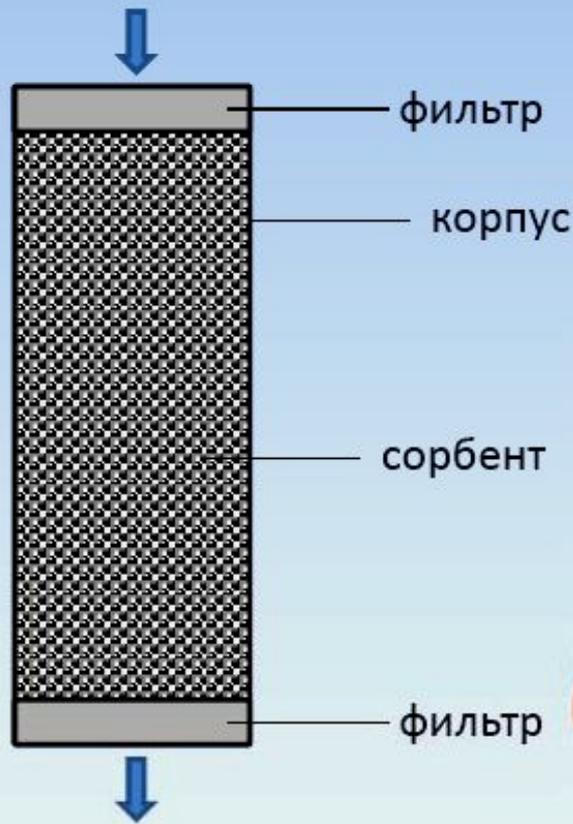
Колоночная хроматография

Хроматография в толстом слое

Тонкослойная хроматография

Бумажная хроматография

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 ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)
- силикагель ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$)
- 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

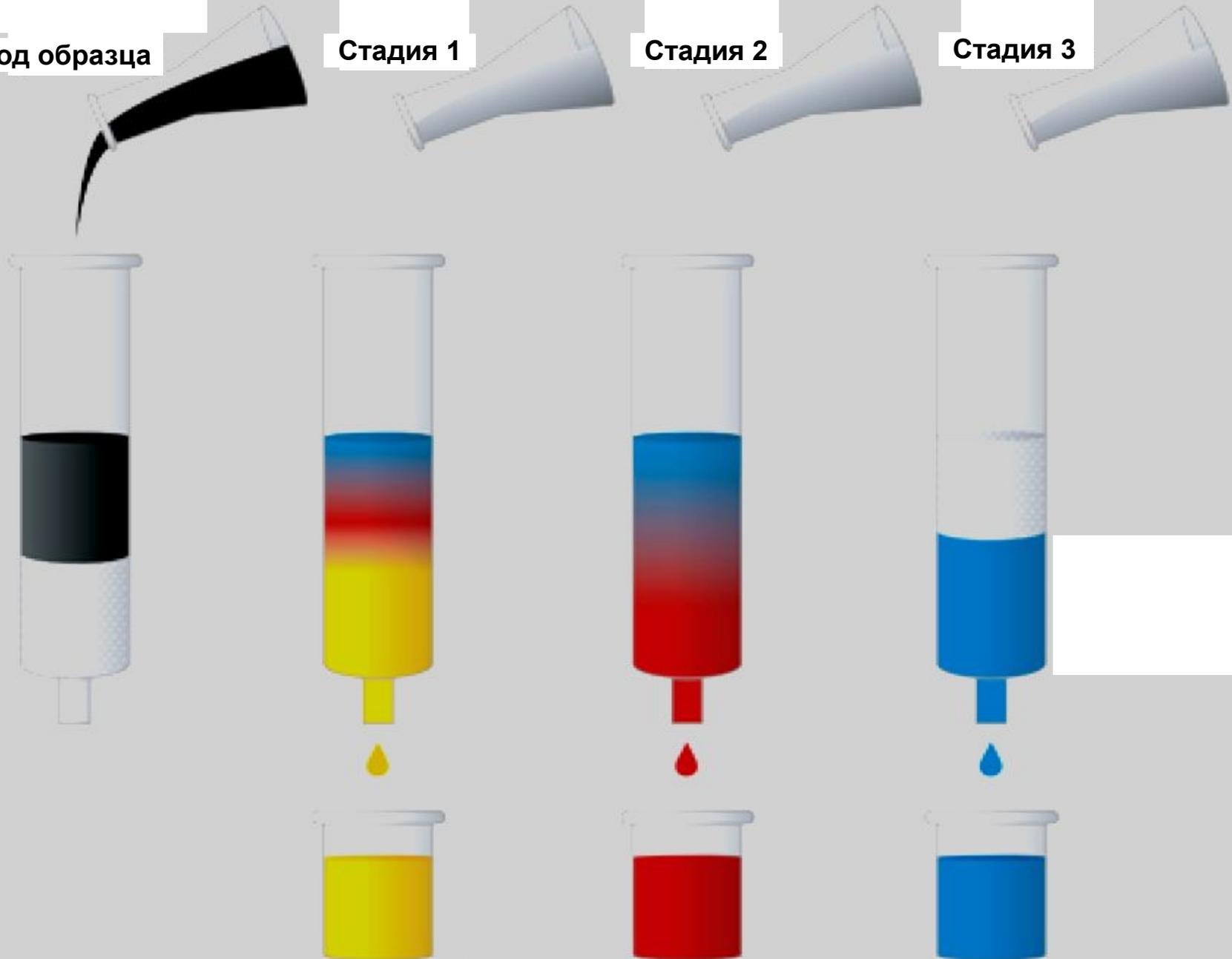
вода, спирты, бензол, гексан и другие углеводороды и смеси различных растворителей

Ввод образца

Стадия 1

Стадия 2

Стадия 3

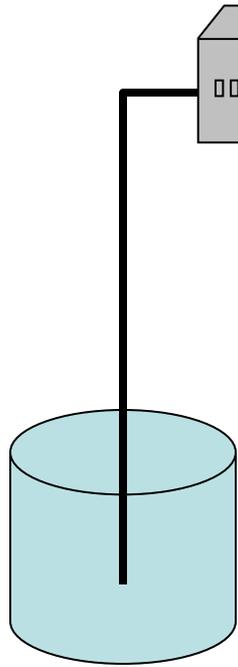


На одной колонке можно разделить несколько веществ

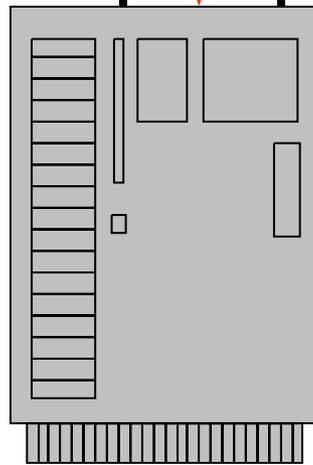
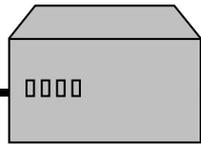
Высокоэффективная жидкостная хроматография

Насос высокого давления

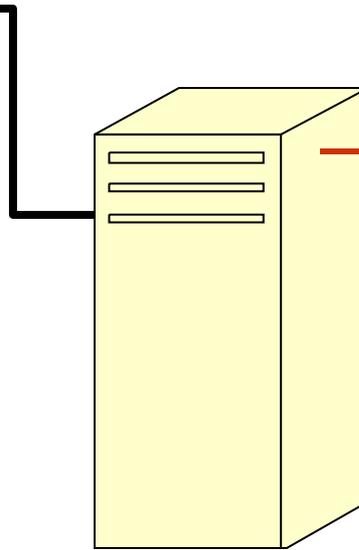
Ввод пробы



Источник подвижной фазы

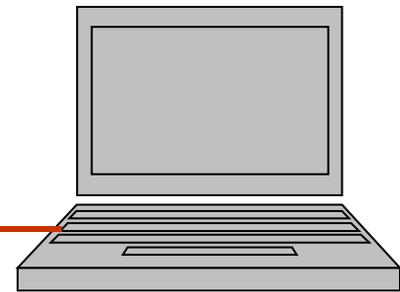


ВЭЖХ



Детектор

ПК

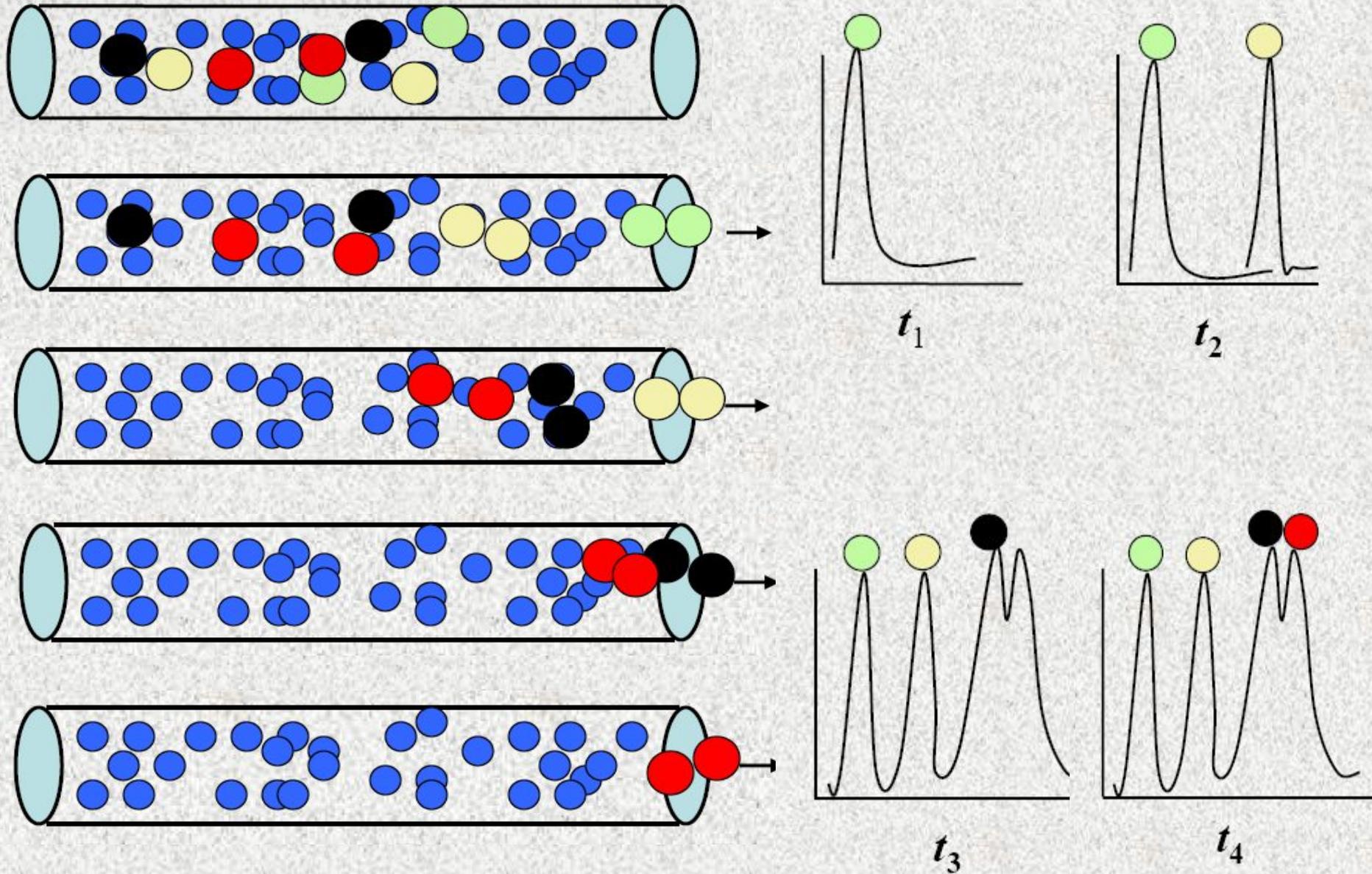


Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

- используют колонки диаметром до 5 мм, плотно упакованные сорбентом с частицами малого размера (3-10 мкм)
- давление для прокачивания элюента до $3 \cdot 10^7$ Па

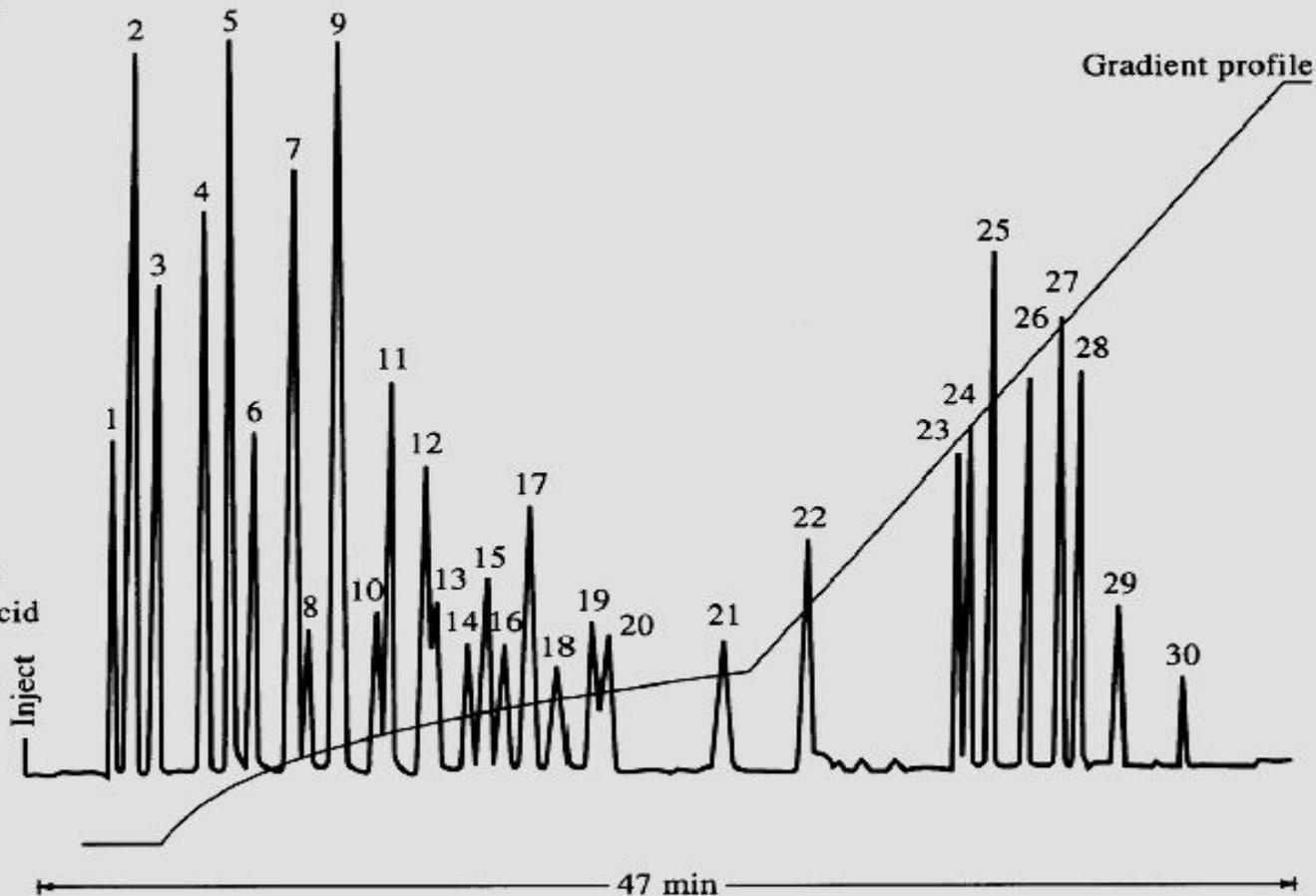


Хроматографическое разделение в ВЭЖХ



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

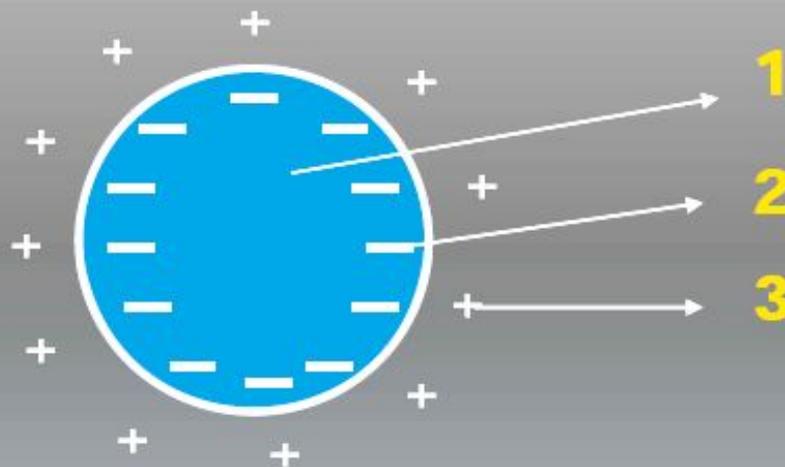
Ионнообменная хроматография (ИХ)

основана на адсорбции электролитов из водных растворов на твердых адсорбентах

СОРБЕНТЫ В ИХ

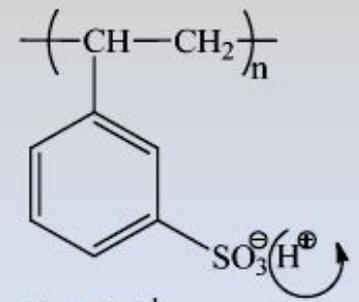
Иониты – твердые природные или синтетические вещества, содержащие в своем составе функциональные группы, ионы которых способны обмениваться на ионы того же знака, находящиеся в растворе

Схема структуры ионита (катионита)



- 1** – матрица ионита (каркас)
- 2** – функциональные группы (ковалентно связаны с матрицей)
- 3** – противоионы (электростатически связаны с ионогенными группами)

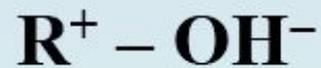
Классификация ионитов



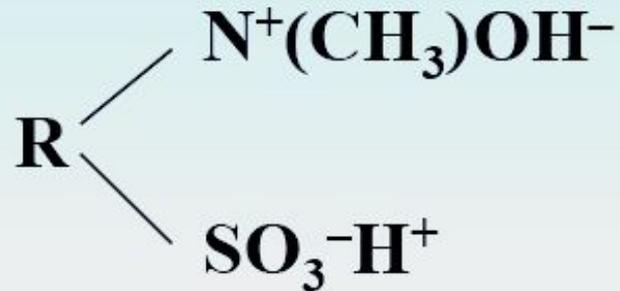
1. Катиониты:



2. Аниониты:



3. Амфолиты:



R – матрица ионита

Ионная адсорбция зависит:

- От величины заряда адсорбируемых ионов:



- От радиуса иона в сольватированном состоянии:

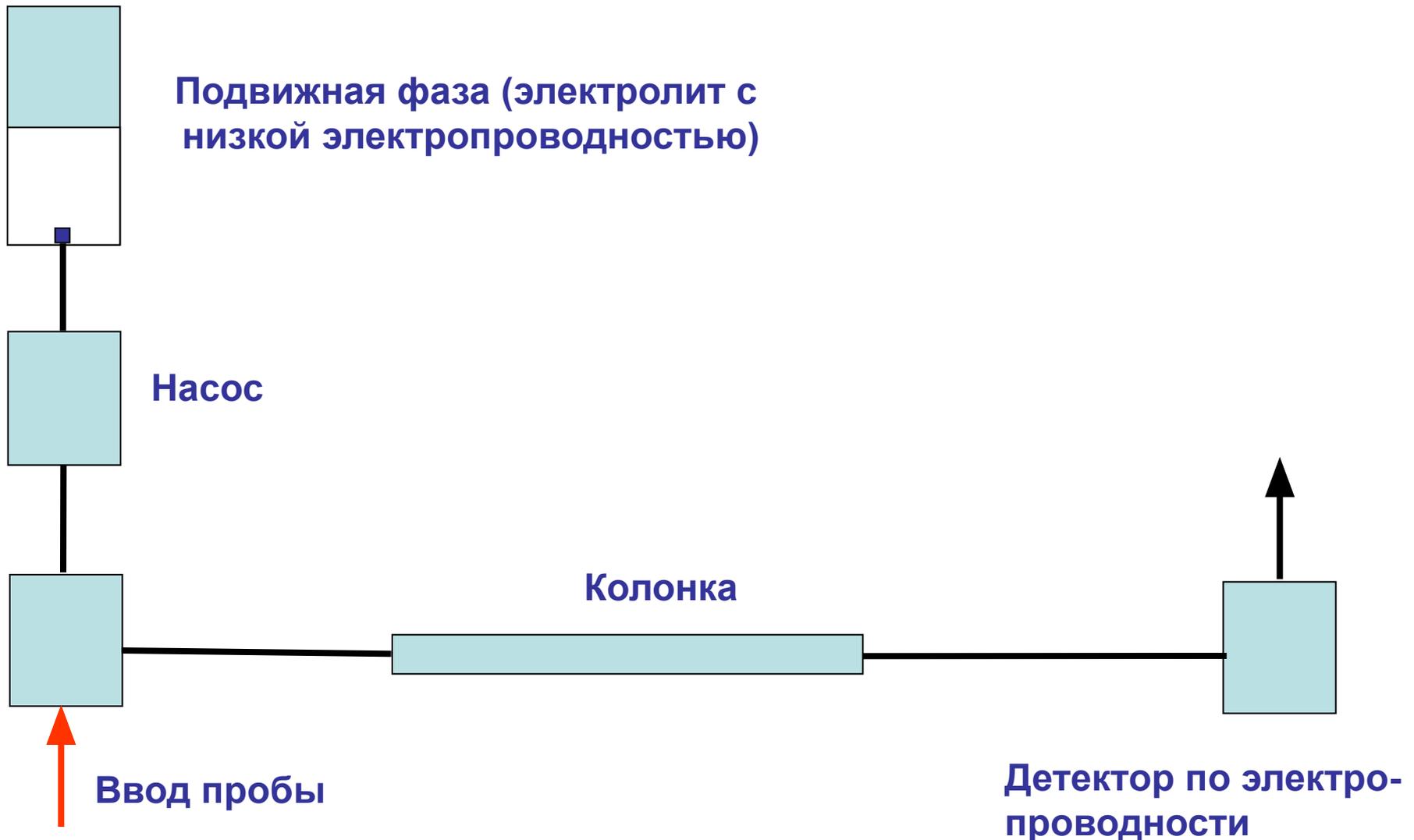


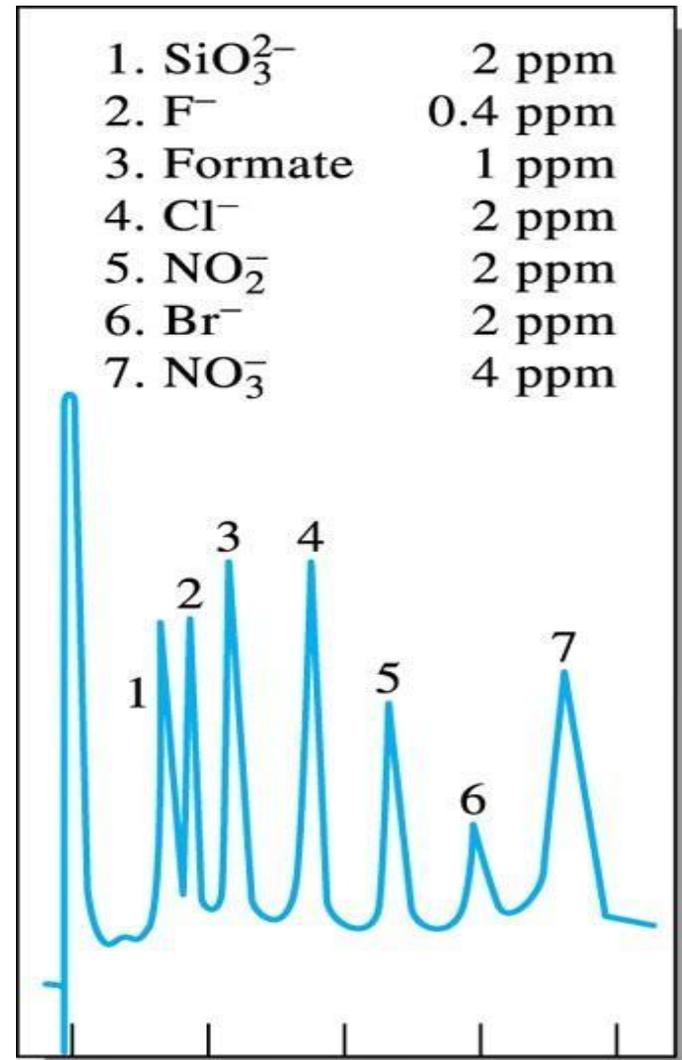
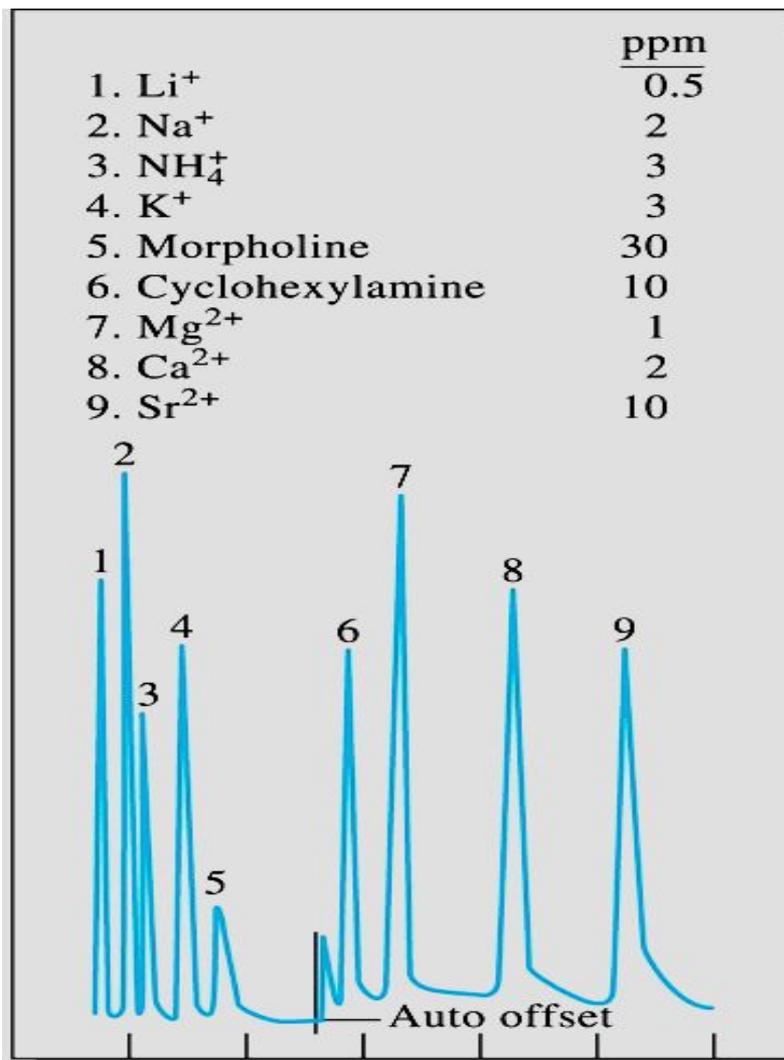
увеличение гидратации



увеличение адсорбции

Схема ионного хроматографа





Ионные хроматограммы смесей катионов и анионов



Ионный хроматограф PIA 1000

Аффинная хроматография (АХ)

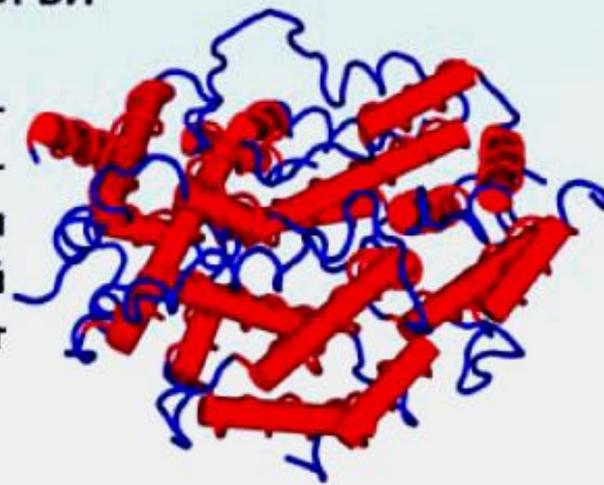
affinity – сродство

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.

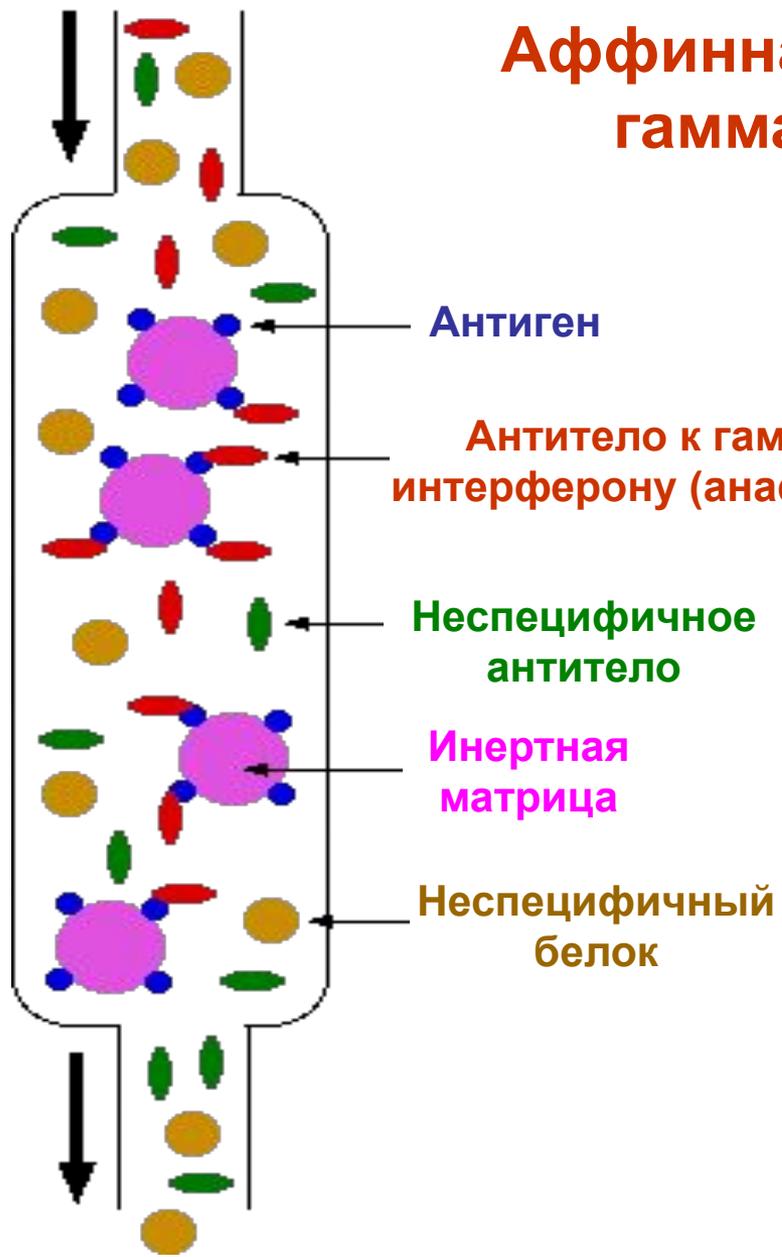
АНАФЕРОН – аффинно очищенные антитела к γ -интерферону человека

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 аффинной хроматографии на адсорбционной колонке выделяют антитела к гамма-интерферону человека



Аффинная хроматография гамма-интерферона



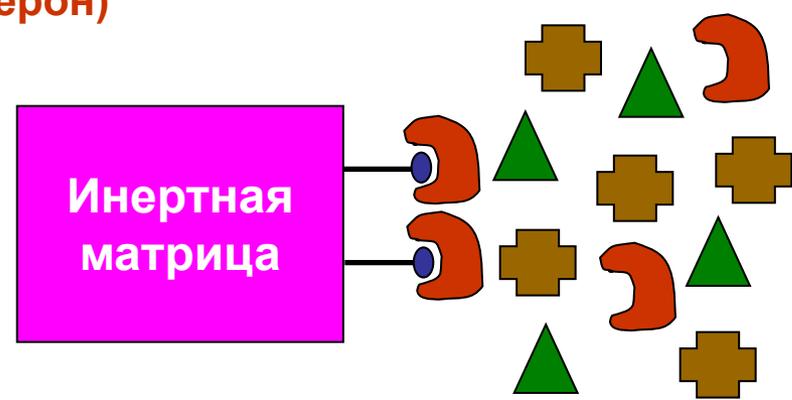
Антиген

Антитело к гамма-
интерферону (анаферон)

Неспецифичное
антитело

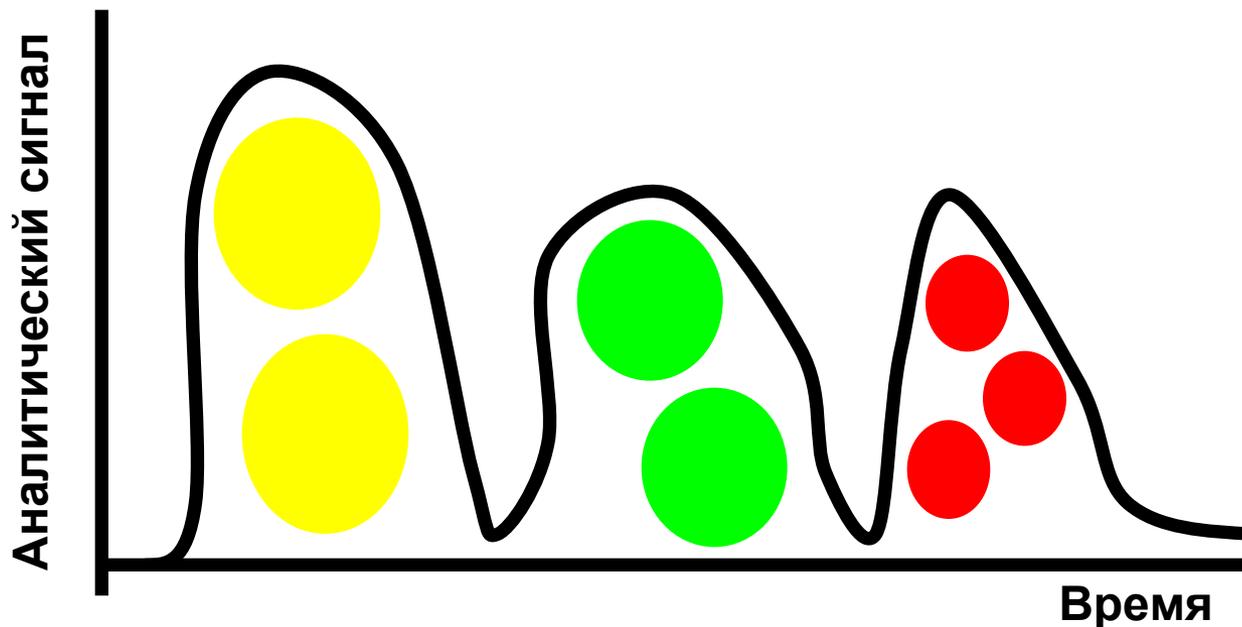
Инертная
матрица

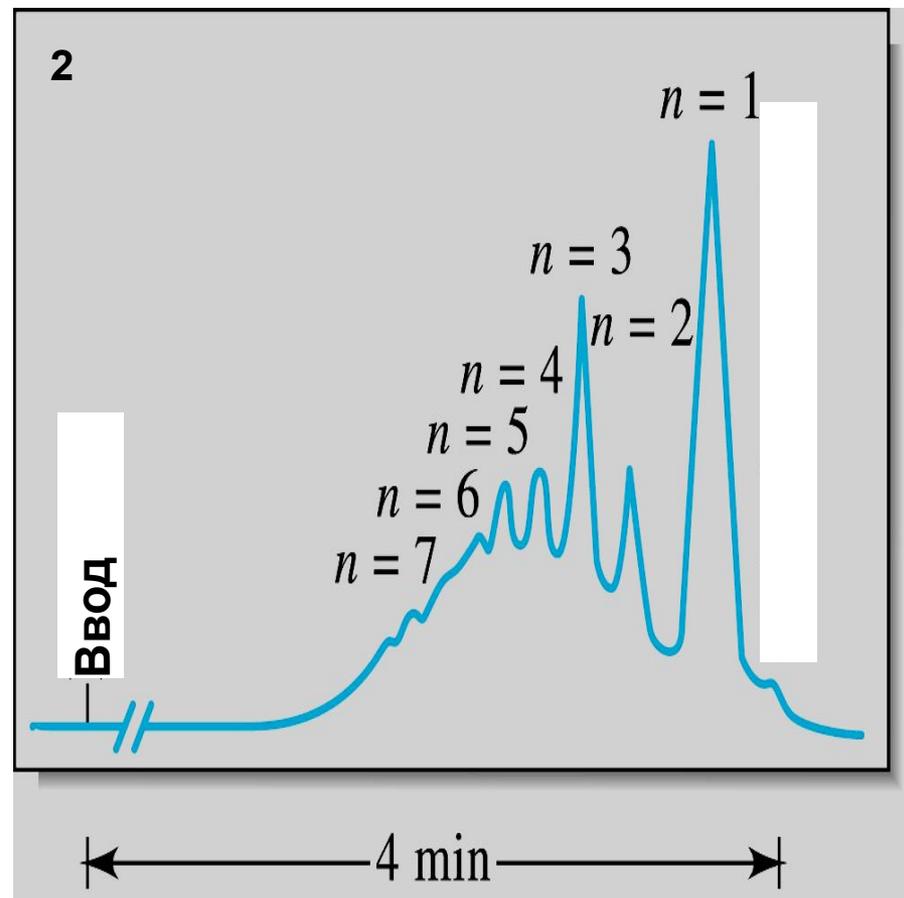
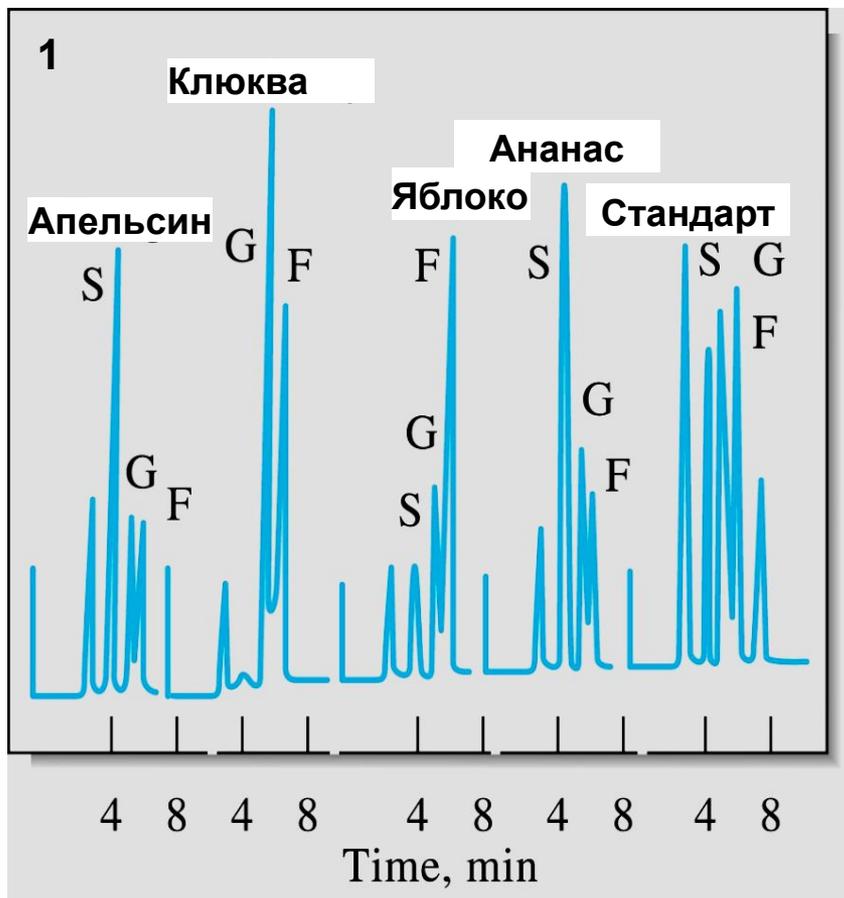
Неспецифичный
белок



Инертная
матрица

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 сахарозы (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

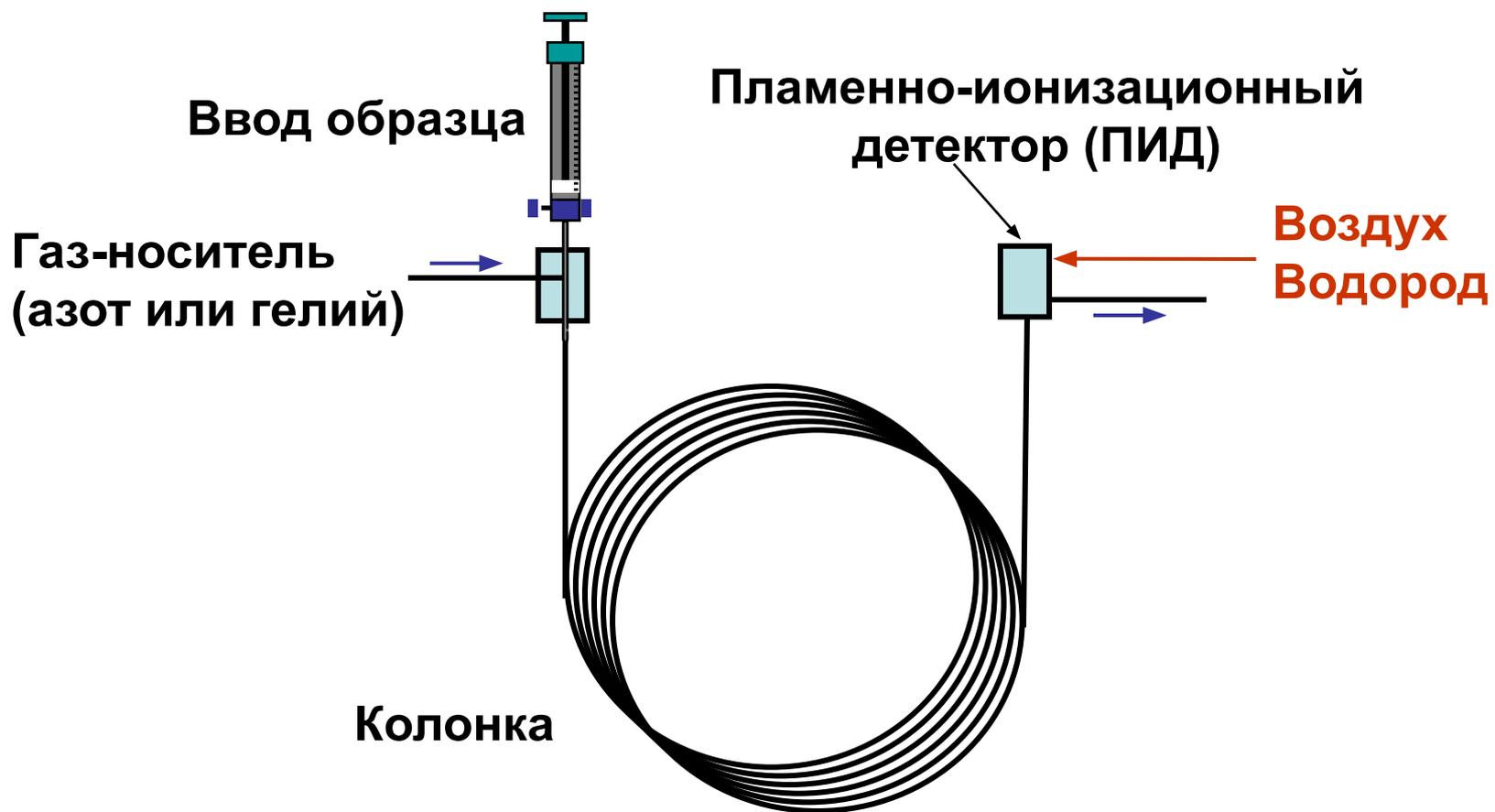
Газ-носитель (H_2 , He, воздух, N_2 , Ar, CO_2 и др.) должен иметь небольшую вязкость и обеспечивать высокую чувствительность детектирования

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

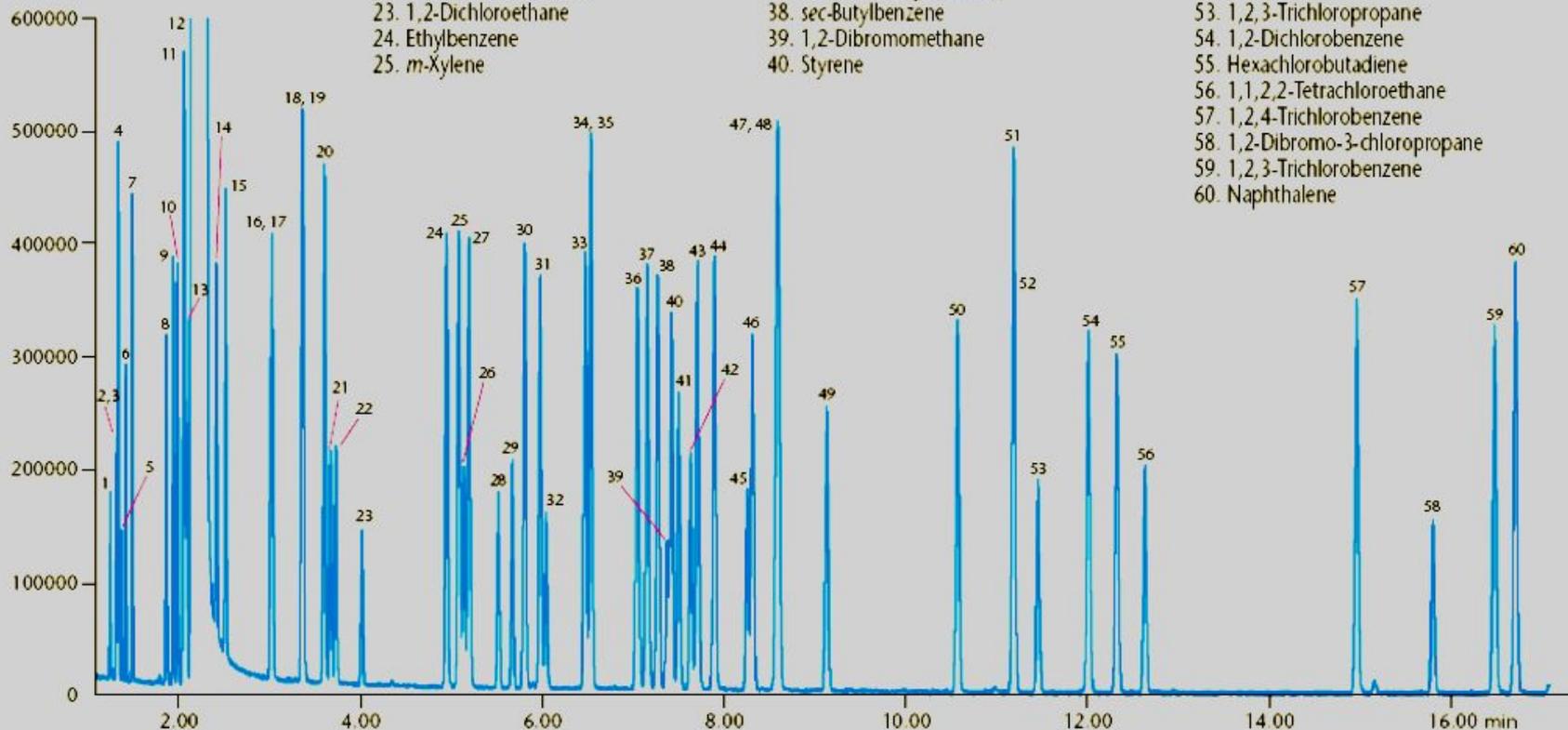
Components

1. Dichlorodifluoromethane
2. Chloromethane
3. Chloroethene
4. Trichlorofluoromethane
5. Chloroethane
6. Bromoethane
7. 1,1-Dichloroethene
8. 2,2-Dichloropropane
9. 1,2-Dichloroethene (cis)
10. 1,1-Dichloro-1-propene

11. 1,1,1-Trichloroethane
12. Carbon tetrachloride
13. 1,1-Dichloroethane
14. Dichloromethane
15. Benzene
16. 1,2-Dichloroethene (trans)
17. Trichloroethene
18. Tetrachloroethene
19. Chloroform
20. Toluene
21. 1,2-Dichloropropane
22. Bromochloromethane
23. 1,2-Dichloroethane
24. Ethylbenzene
25. *m*-Xylene

26. 1,3-Dichloro-1-propene (cis)
27. *p*-Xylene
28. *o*-Xylene
29. Bromodichloromethane
30. Dibromomethane
31. Isopropyl benzene
32. 1,3-Dichloropropane
33. *n*-Propylbenzene
34. Chlorobenzene
35. 1,3-Dichloro-1-propene (trans)
36. *t*-Butylbenzene
37. 1,2,4-Trimethylbenzene
38. *sec*-Butylbenzene
39. 1,2-Dibromomethane
40. Styrene

41. 1,1,1,2-Tetrachloroethane
42. 1,1,2-Trichloroethane
43. 4-Isopropyltoluene
44. 1,3,5-Trimethylbenzene
45. Dibromochloromethane
46. 2-Chlorotoluene
47. *n*-Butylbenzene
48. 4-Chlorotoluene
49. Bromobenzene
50. 1,4-Dichlorobenzene
51. 1,3-Dichlorobenzene
52. Bromoform
53. 1,2,3-Trichloropropane
54. 1,2-Dichlorobenzene
55. Hexachlorobutadiene
56. 1,1,2,2-Tetrachloroethane
57. 1,2,4-Trichlorobenzene
58. 1,2-Dibromo-3-chloropropane
59. 1,2,3-Trichlorobenzene
60. Naphthalene



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

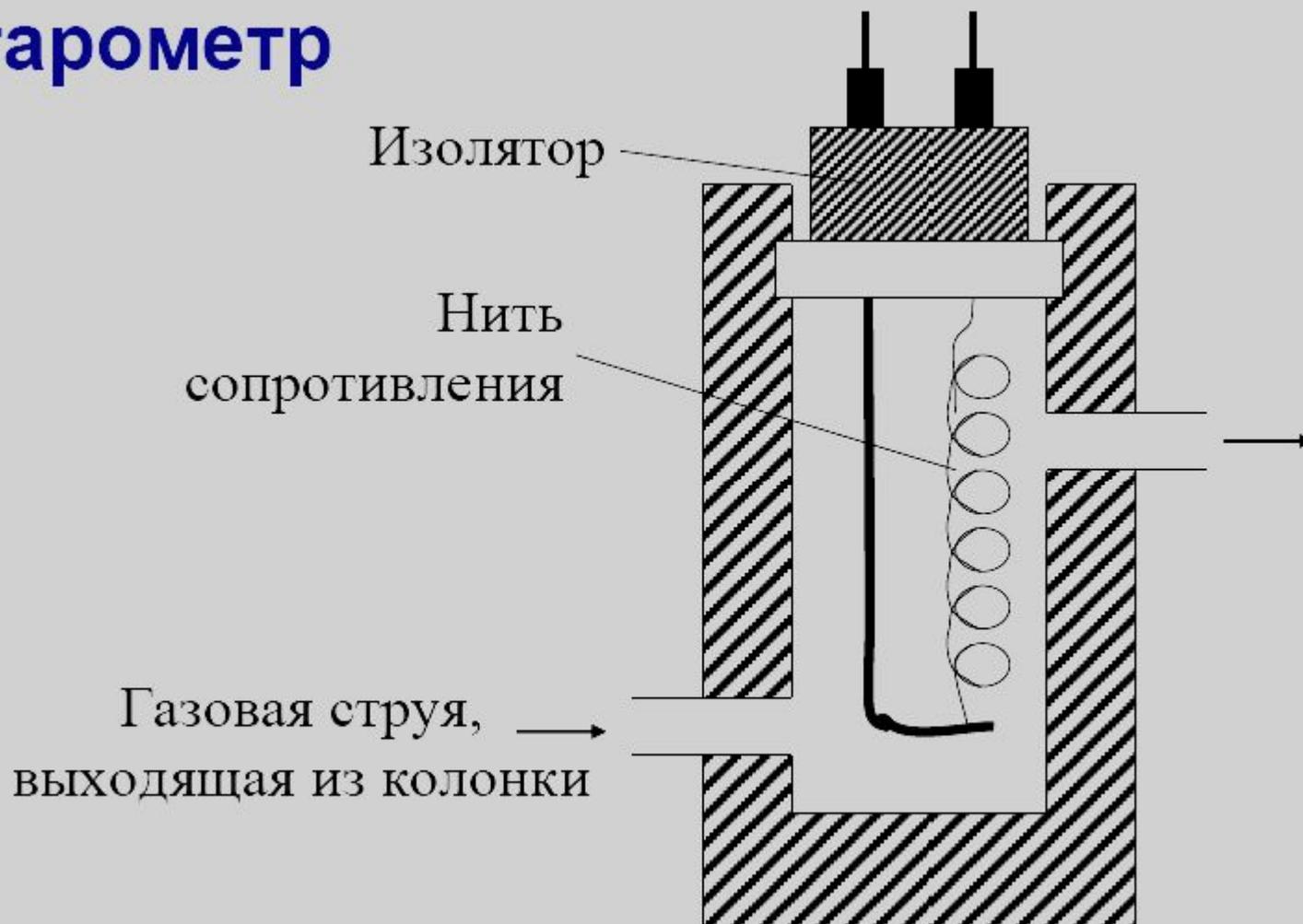
Требования к колонкам:

- постоянный диаметр
- однородная поверхность
- инертность
- низкая сорбционная емкость
- механическая прочность

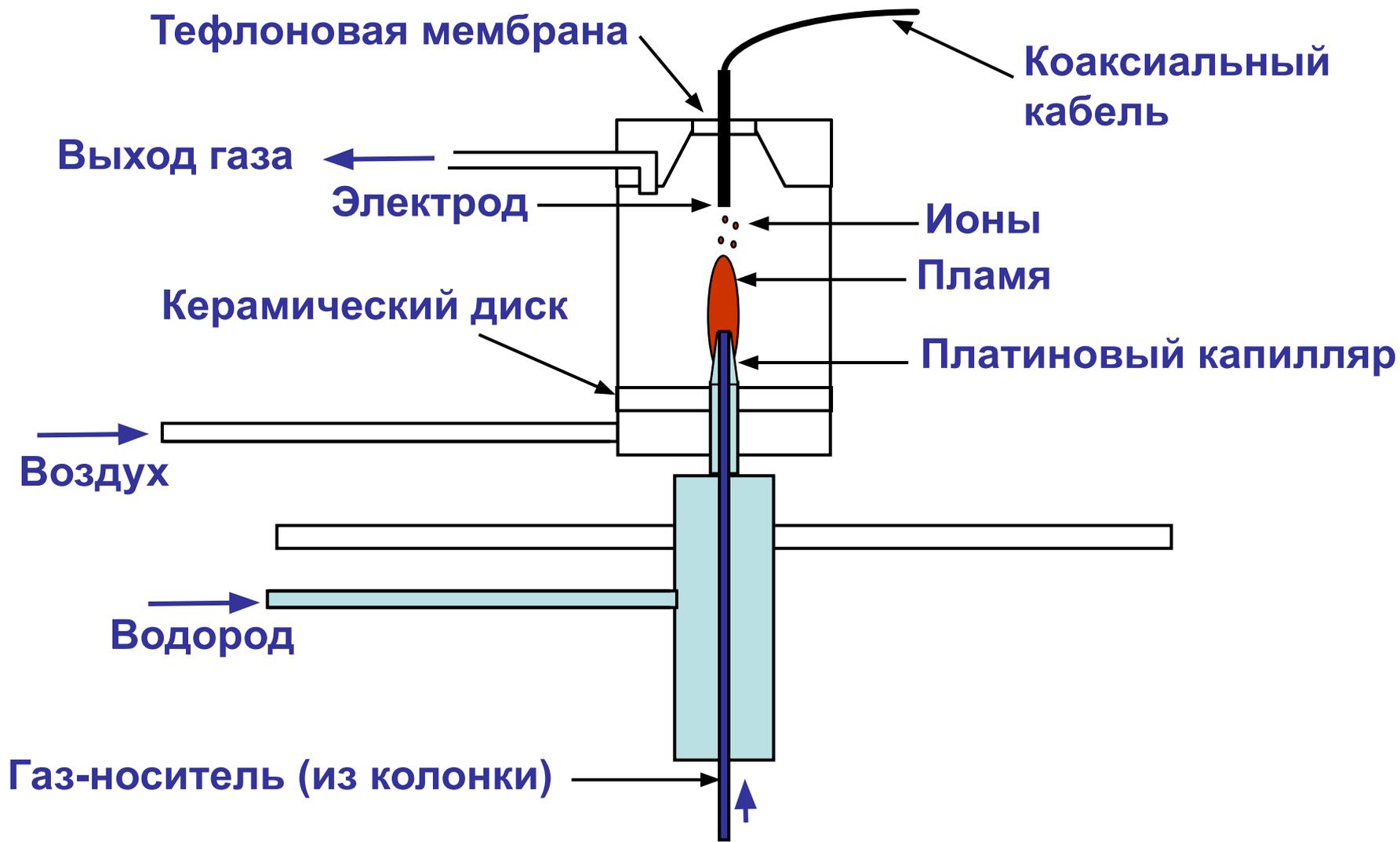
Детекторы в газовой хроматографии

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

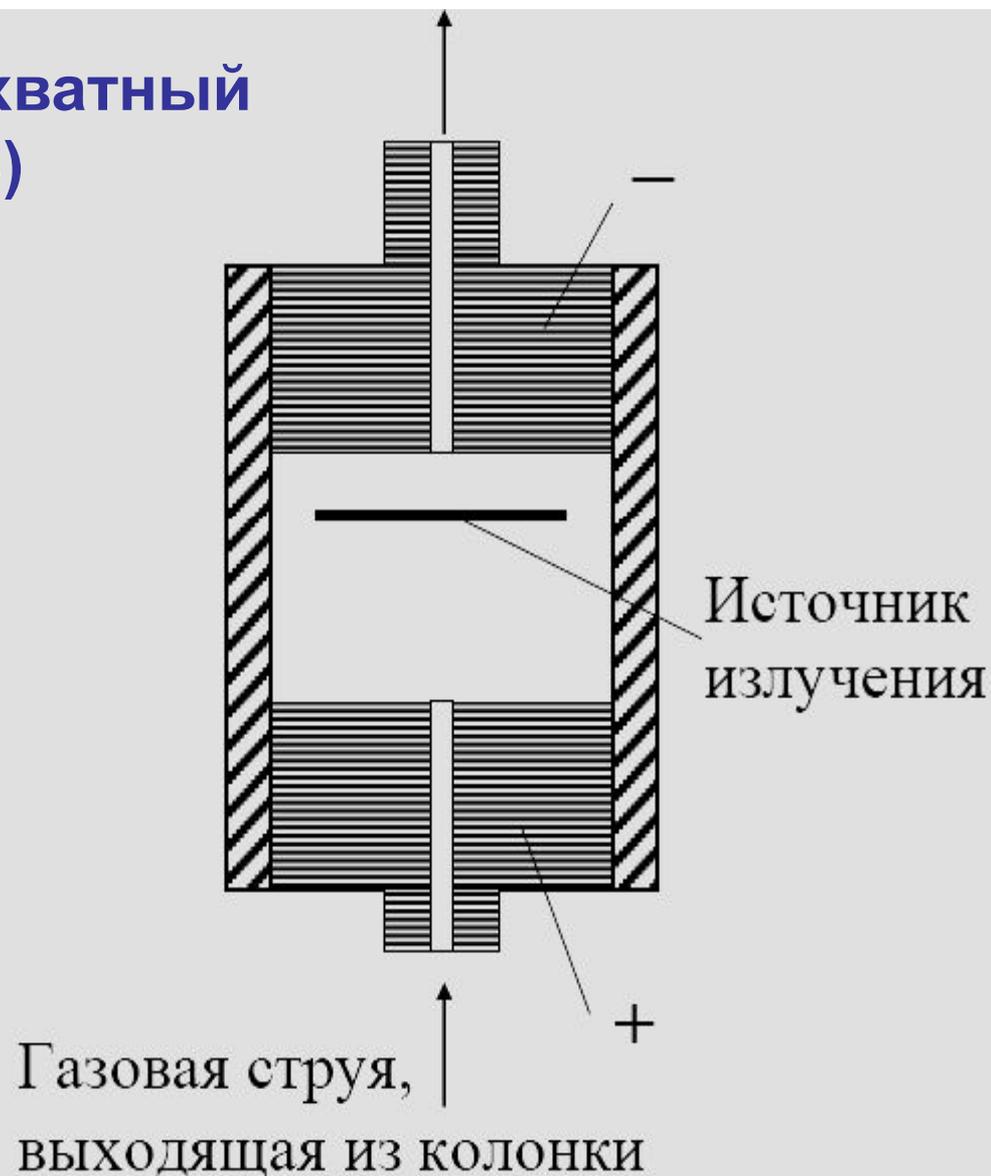
катарометр



Пламенно-ионизационный детектор



Электронно-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 °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:

- ✚ газожидкостная
- ✚ газодсорбционная

По природе и свойствам ПФ:

- ✚ барохроматография
- ✚ парофазная
- ✚ сверхкритическая флюидная
- ✚ плотностная

Газо-адсорбционная хроматография

Газ-носитель:

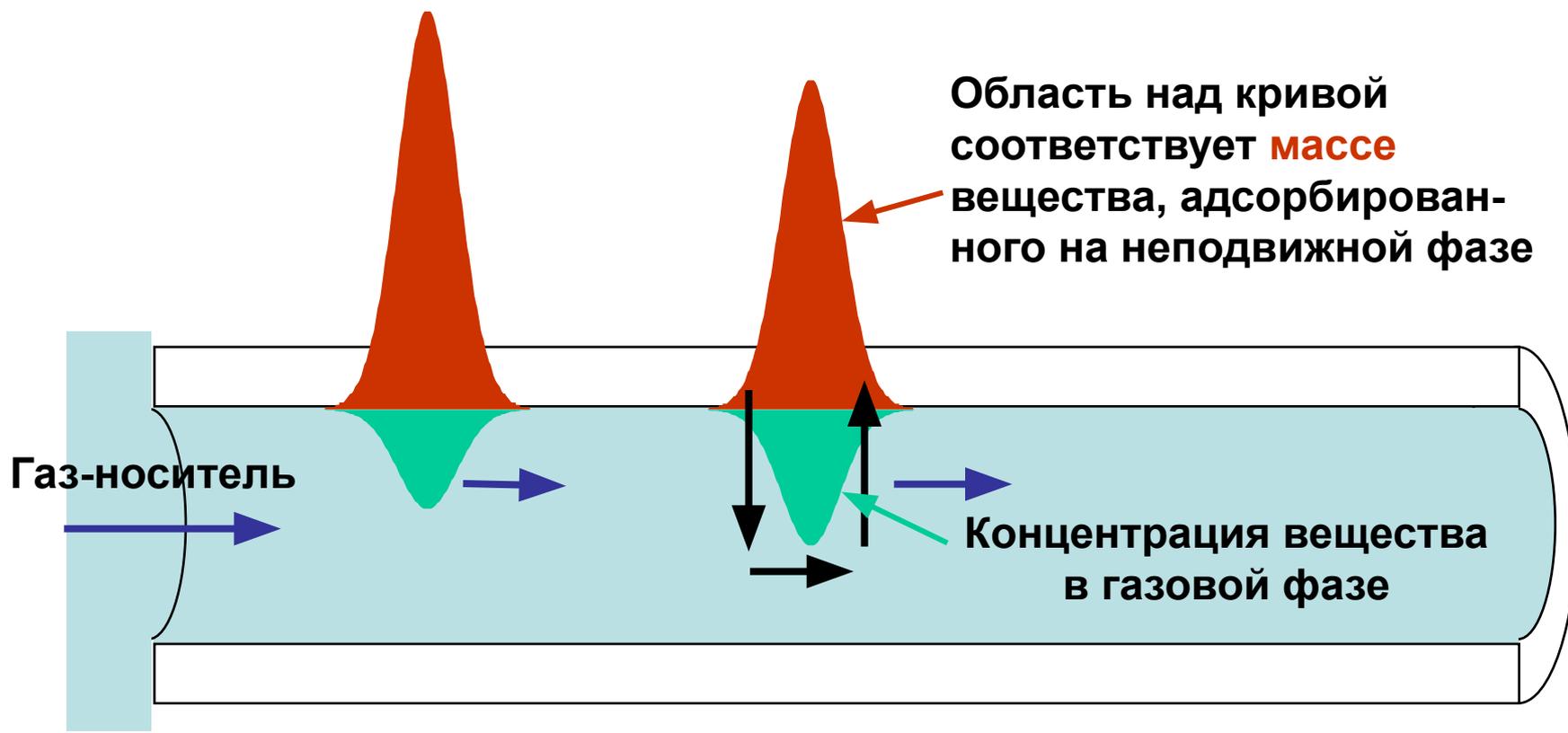
He, Ar, H₂, CO₂, N₂, воздух, H₂O-пар, органические пары и др.

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

Al₂O₃, 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

Нелинейная изотерма сорбции

Каталитическая активность

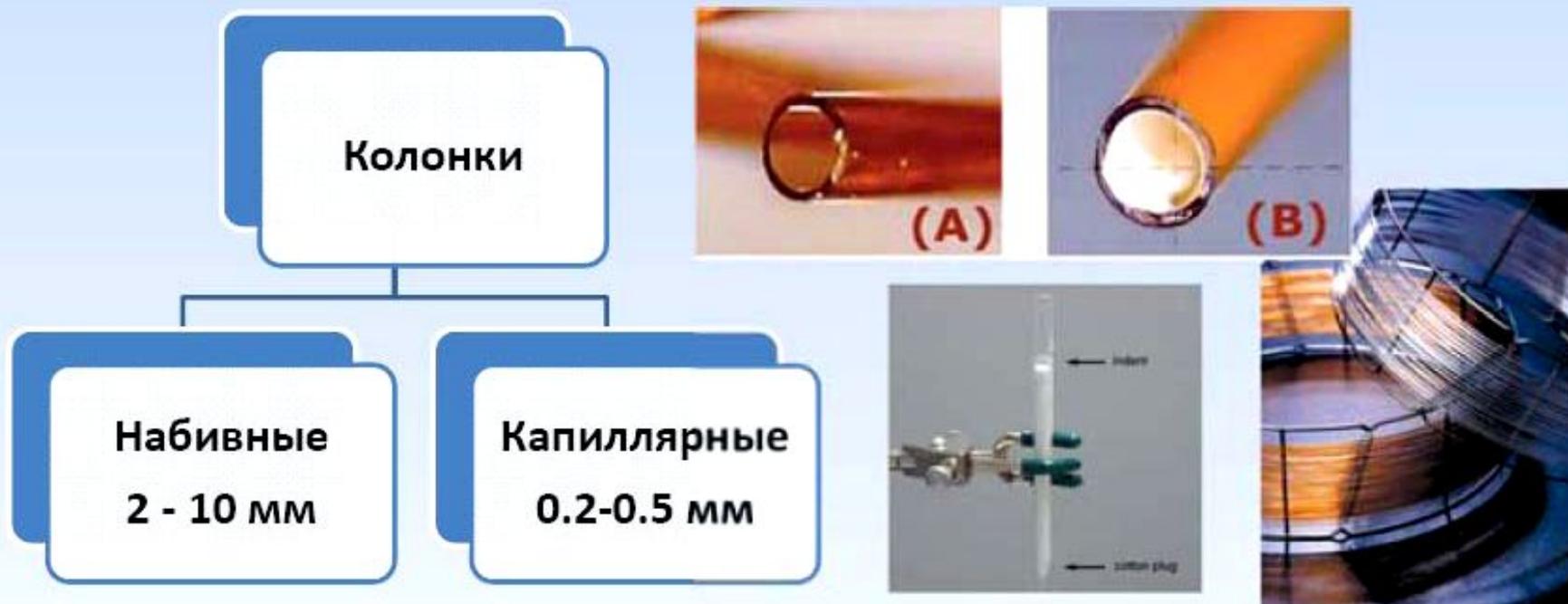
Модифицирование сорбентов

The diagram illustrates a flow from two identified issues to a solution. At the top, two green ovals contain the text 'Нелинейная изотерма сорбции' (Non-linear adsorption isotherm) and 'Каталитическая активность' (Catalytic activity). A red bracket connects these two ovals, with a large red arrow pointing downwards to a light blue starburst shape containing the text 'Модифицирование сорбентов' (Adsorbent modification).

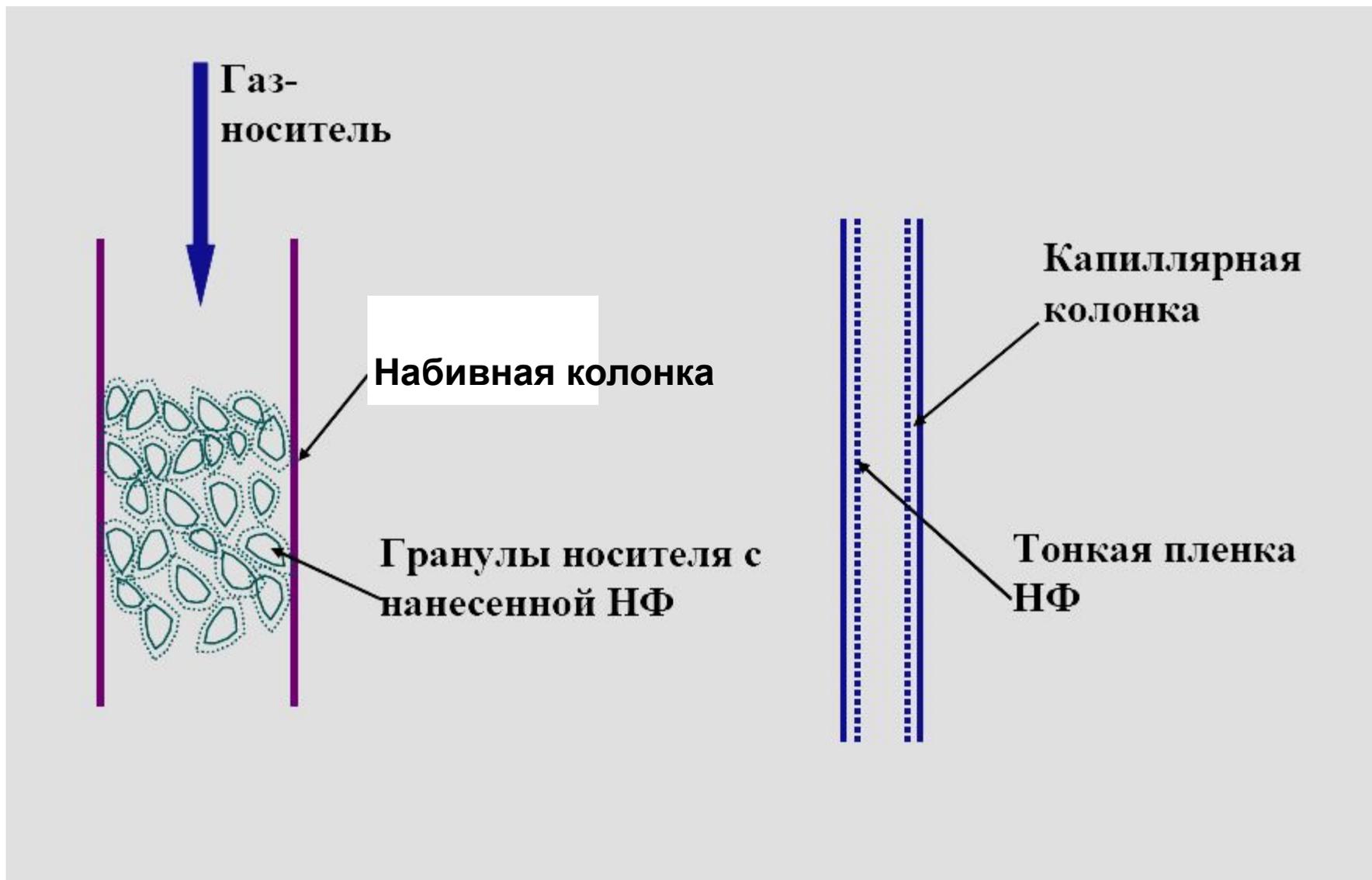
Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ)

- ❑ 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 полиэферы)

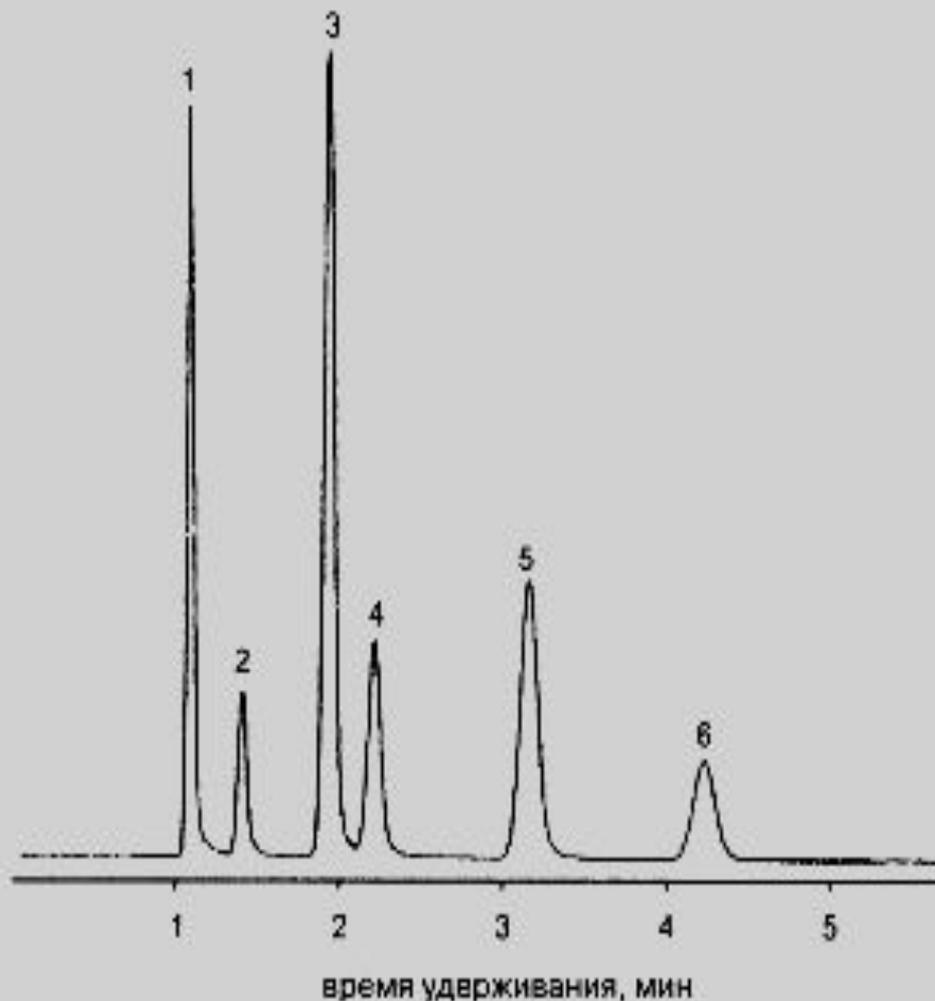


Колонки в газо-жидкостной хроматографии



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 180x0,3 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 паровообразной пробы – 500 мкл

Хроматограмма следов алкоголя в крови

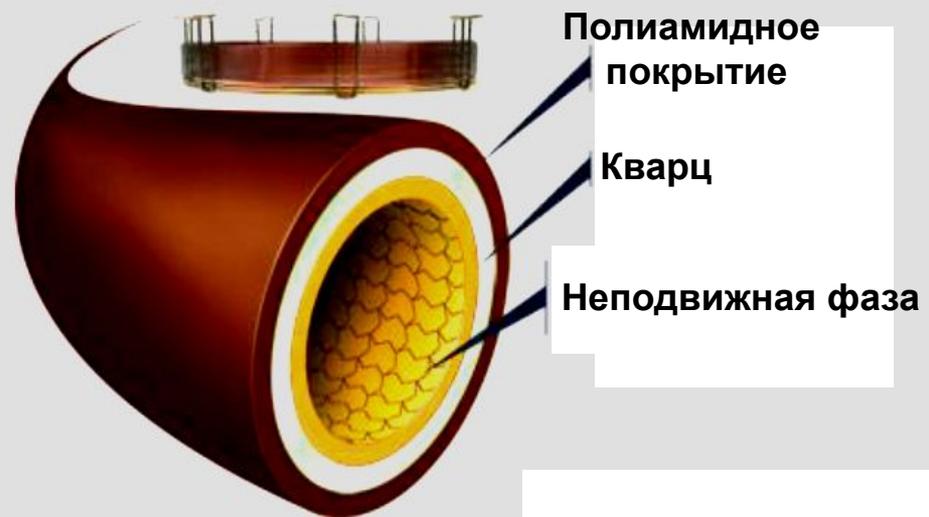
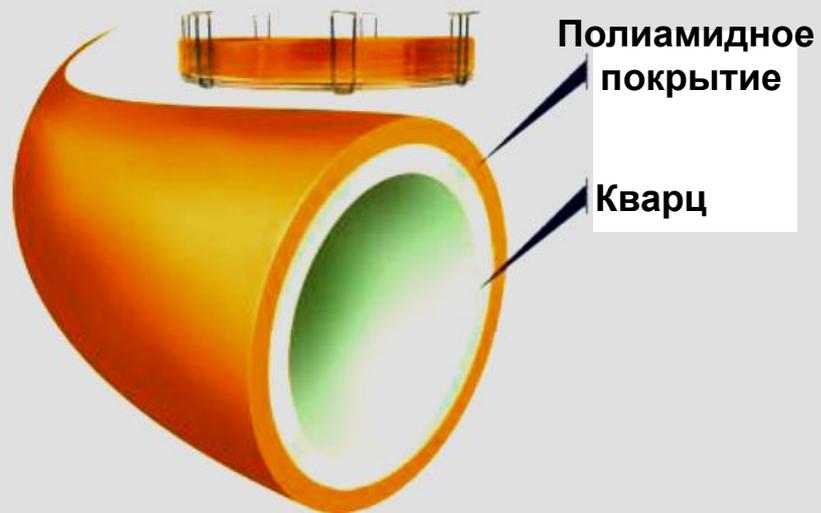
Капиллярная ГЖХ

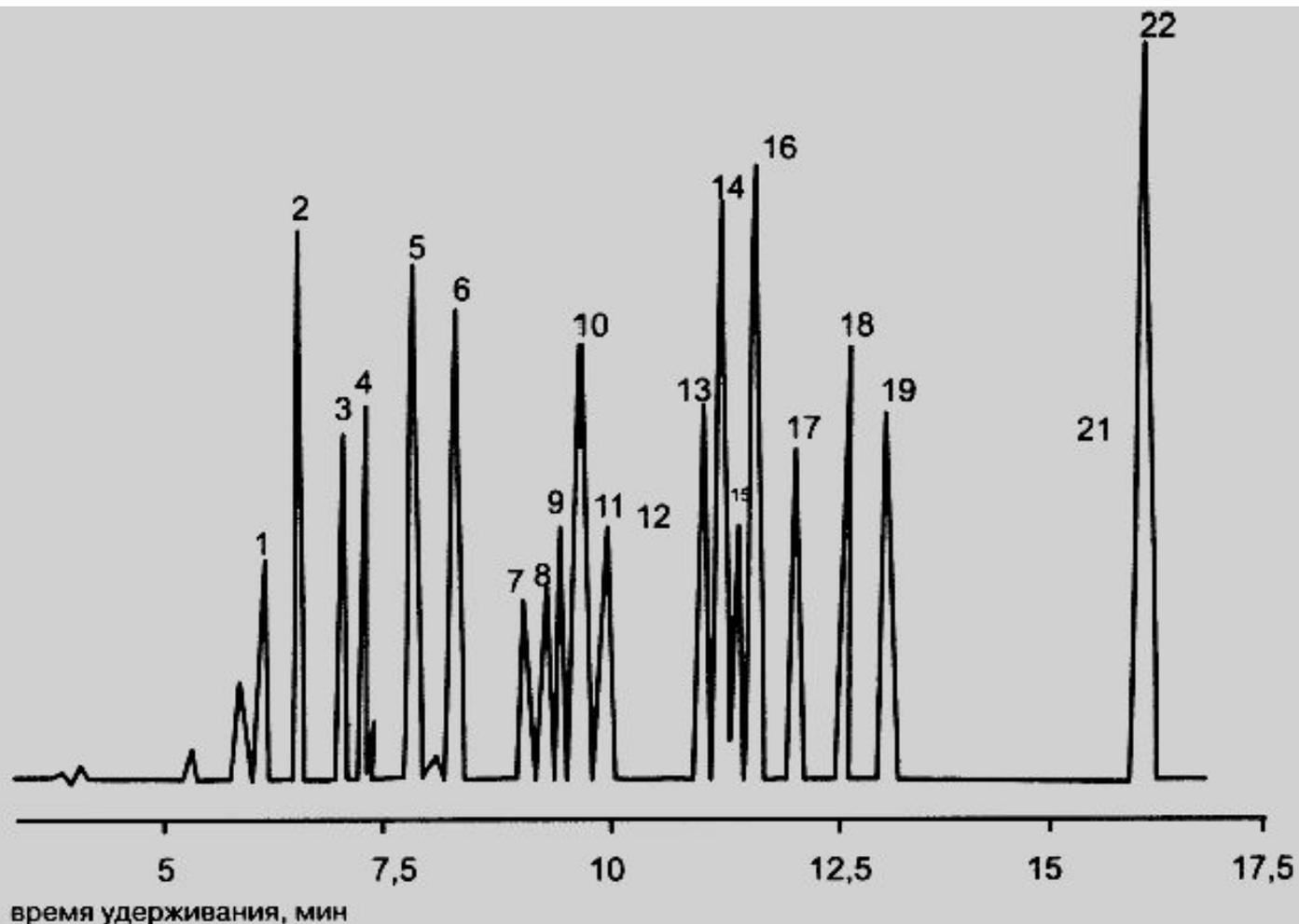
- ✚ Для ↑ эффективности надо ↑ соотношение «длина/диаметр»
- ✚ Хроматографические колонки
 $d = 0.01-1.0$ мм
 $l \geq 50-100$ м, до 1000 м
- ✚ Предназначены для разделения близких по свойствам веществ и многокомпонентных смесей.
- ✚ Эффективность
 $N = n \cdot 10^5$

Преимущества капиллярных колонок

- облегчается движение газа-носителя, не нужно **высокое давление** газа-носителя;
- отношение **$V_{\text{газ}}/V_{\text{жид}}$ ($V_{\text{пф}}/V_{\text{нф}}$)** в капиллярных колонках = **500-1000**, в насадочных колонках = **30-50**;
- удельная проницаемость капиллярных колонок в **100 раз** превышает проницаемость насадочной колонки.

Конструкция капиллярных колонок



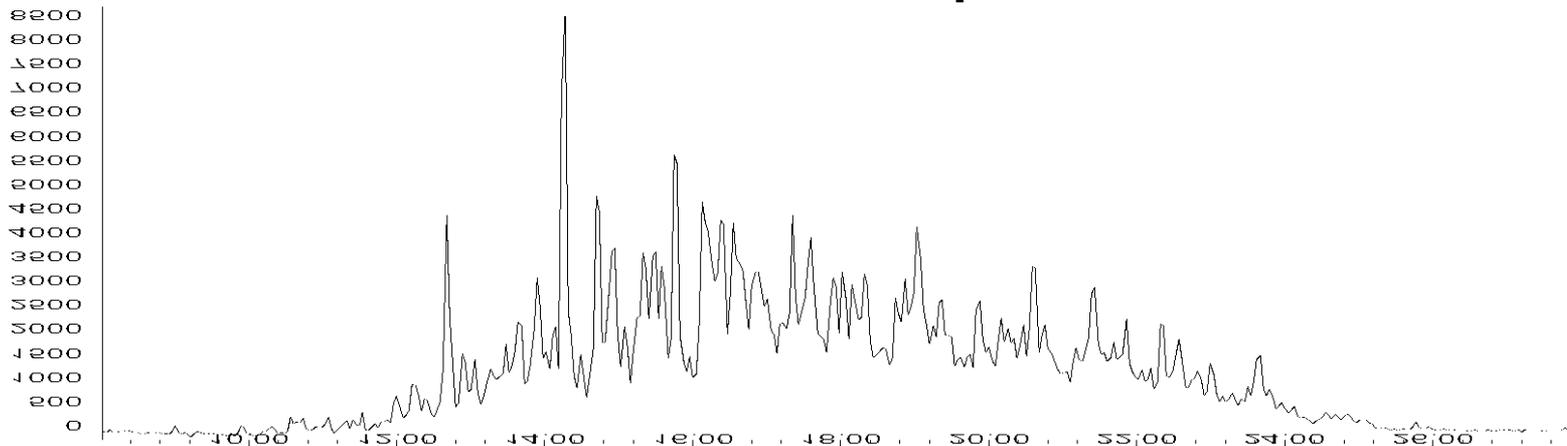


время удерживания, мин

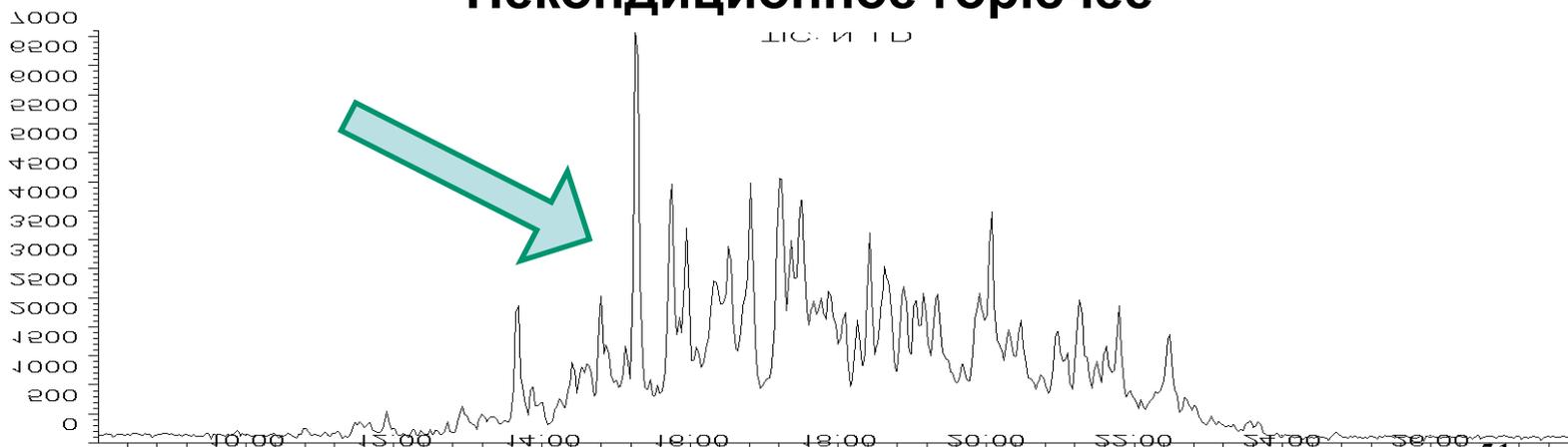
Хроматограмма смеси симпатомиметических аминов: 1 – фенилэтиламин; 2 – амфетамин; 3 – фентермин; 4 – метамфетамин; 5 – фенфлурамин; 6 – мефентермин; 7 – катинон; 8 – фенилпропаноламин; 9 – меткатинон; 10 – никотин; 11 – эфедрин; 12 – псевдоэфедрин; 13 – фенметразин; 14 – фендиметразин; 15 – метилендиоксиамфетамин; 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 x 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.**