

II. Основы хроматографических методов

Введение

Химию биологически активных веществ, как и любую химию сегодняшнего дня, невозможно представить без хроматографических методов анализа. Хроматографические методы используются как для качественного, так и количественного анализа БАВ.

Основные даты истории хроматографических методов

21 марта 1903г. (День рождения хроматографии) доклад Михаила Семеновича Цвета «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу». Свой метод М.С. Цвет назвал – «хроматография» (запись цвета).

1938г. Нобелевская премия по химии **Ричарда Куна** (институт фундаментальной медицины г. Гейдельберг) за работы по каротиноидам витаминам (использовал предложенную Цветом М.С. адсорбционную хроматографию)

1915г. Нобелевская премия **Альфреда Винтерштайна** по химии за исследования хлорофиллов хроматографическими методами.

1938г. Первые работы по тонкослойной хроматографии **Измаилова Николая Аркадьевича, Шрайбер Марии Сетеновны.**

1938г. Первый противоточный экстрактор с использованием воды и хлороформа для разделения олигопептидов;

1940г. Использование жидкость-жидкостной хроматографии для разделения аминокислот;

19 ноября 1941г. Статья «Новая форма использования двух жидких фаз для хроматографии» в «Biochemical journal»;

1952г. Нобелевская премия **Арчера Портера Мартина, Ричарда Лоуренса Миллингтона Синджея** за открытие распределительной хроматографии.

50-е годы XX в. Разработка первого газового хроматографа **Арчер Портер Мартин, Энтони Траффорд Джеймс;**

1956г. Использование **Э. М. Шталем** тонкослойной хроматографии как аналитического метода

2.1. Общие положения

Хроматография – физико-химический метод, основанный на разделении вещества между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая имеет постоянное направление движения.

Через неподвижную (стационарную) фазу протекает подвижная фаза. Молекулы разделяемых веществ могут находиться в обеих фазах. Эффект разделения основывается

на том, что соединения проходят расстояние, на котором происходит разделение, с некоторой, присущей этому соединению, задержкой.

Некоторые важные термины:

Адсорбция – концентрирование вещества твердой фазой.

Твердая фаза – адсорбент.

Хроматографическая колонка - кассета с адсорбентом, в данном случае адсорбент – неподвижная фаза; эффективность хроматографических колонок определяют числом теоретических тарелок.

Подвижная фаза – жидкость (жидкостная хроматография) или инертный газ (газовая хроматография).

Аналиты – соединения, выделенные в результате хроматографирования.

Таблица 1.1. Классификация хроматографических методов по агрегатному состоянию фаз, типам процессов разделения и техникам проведения

Название метода	Анг. аббр-ра	Агрегатное состояние		Процесс разделения	Техника проведения разделения
		подвижной фазы	неподвижной фазы		
Жидкость-жидкостная хроматография	LLC	жидкое	жидкое	распределение	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), TLC (ТСХ), РС (бумажн. хромат.)
Газо-жидкостная хроматография	GLC	газообразное	жидкое	распределение	GC (ГХ)
Жидкостная хроматография	LC	жидкое	твердое	адсорбция	LC (ЖХ), HPLC (ВЭЖХ), РС (бумажн. хромат.)
Газовая хроматография	GC	газообразное	твердое	адсорбция	GC (ГХ)

2.2. Выбор метода

Для быстрого (экспрессного) определения состава реакционных смесей (контроля за ходом химической реакции) наиболее часто используется метод тонкослойной хроматографии (ТСХ). Параметр, характеризующий индивидуальность исследуемого/ых соединения, – величина R_f (читается «эр эф»). Основная проблема метода – подбор подвижной фазы (элюента), обеспечивающей высокую эффективность разделения смеси веществ.

Для очистки синтезируемого вещества от примесей используется препаративная жидкостная хроматография. Основная проблема метода – подбор элюента для эффективного разделения смеси. Идентификацию отдельных компонентов смеси проводят методами ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрическими методами.

Для количественного определения наиболее часто используются методы газожидкостной хроматографии (ГЖХ) и высоко эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Параметр, характеризующий индивидуальность исследуемого/ых соединения, – величина времени удерживания.

Метод ГЖХ более экспрессен, чем ВЭЖХ, но не может быть использован для нелетучих или термически нестабильных веществ.

Метод ВЭЖХ наиболее универсален для исследования органических веществ, в том числе, биологически активных. Основная проблема метода – подбор оптимальных условий хроматографирования.

2.3. Жидкостная хроматография

Жидкостная хроматография низкого давления

(low pressure liquid chromatography, LPLC)

Используется в основном для выделения чистых веществ (препаративная хроматография) (рис. 2.1).

Механизм распределения – адсорбция. Для аналитических целей непригодна: низкая разрешающая способность, т.к. в качестве неподвижной фазы применяются адсорбенты (силикагель, оксид алюминия) с крупными частицами (0.1 мм).

Подвижная фаза (элюент) – растворитель (смесь растворителей), пропущенный через колонку.

Элюирование – пропускание элюента через хроматографическую колонку.

Элюат – фильтрат, вытекающий из хроматографической колонки.



Рис. 2.1. Колонка для препаративной хроматографии

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), или жидкостная хроматография высокого давления

(high performance liquid chromatography HPLC)

Механизм распределения – адсорбция. Используется для качественного и количественного анализа органических соединений.

Аппаратурное оформление эксперимента методом ВЭЖХ

Хроматографическая колонка – трубка длиной 15 – 25 см и внутренним диаметром 2 – 4.6 мм, плотно упакована мелким порошком со средним диаметром частиц 3 – 5 микрон (рис. 2.2.).



Рис. 2.2. Колонка для высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Хроматографическое разделение проходит под давлением порядка 100 – 200 атмосфер, для проведения определений методом ВЭЖХ используется прибор – жидкостный хроматограф. На рис. 2.3 представлена блок-схема жидкостного хроматографа.

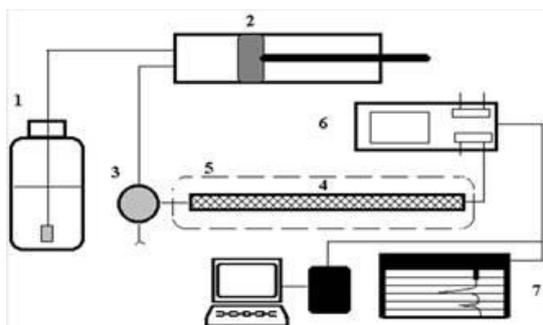


Рис. 2.3. Блок-схема жидкостного хроматографа

- 1- емкость для забора элюента
- 2 – насос
- 3 – инжектор, специальное устройство для ввода пробы под давлением
- 4 - колонка для ВЭЖХ
- 5 – термостат
- 6 – детектор (самый распространенный – фотометрический), «фиксирует» все вещества, выходящие из колонки
- 7 - регистрирующая система

Визуализация результатов хроматографирования методом ВЭЖХ

(Графическим представлением результата разделения является *хроматограмма* – зависимость сигнала детектора от времени элюирования (рис. 2.4).

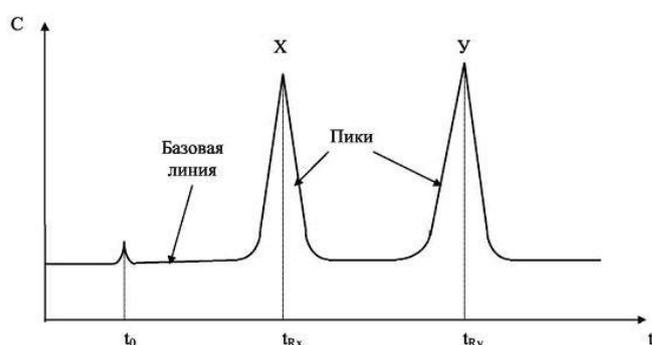


Рис. 2.4. Вид хроматограммы, полученной методом ВЭЖХ

- t_{Rx} – время удерживания;
- V_R – объем удерживания;
- t'_{Rx} – приведенное время удерживания ($t_{Rx} - t_0$);
- k' – фактор удерживания (t'_{Rx} / t_0);
- t_0 – мертвое время колонки;

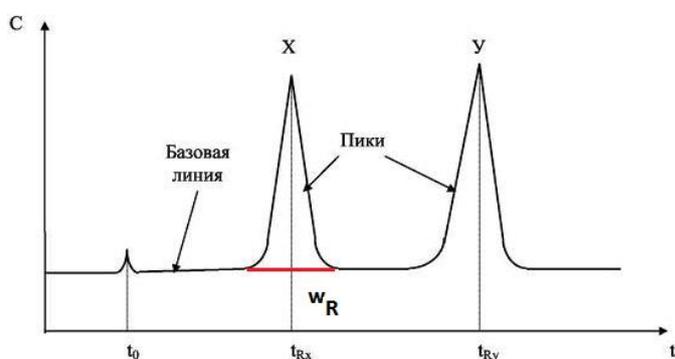
Пик – зависимость концентрации вещества в элюате от времени элюирования.
Площадь пика пропорциональна концентрации вещества в пробе.

Время удерживания - время, за которое анализируемое вещество доходит от места ввода пробы до детектора. *Удерживание* вещества в колонке – характеристика вещества в данной хроматографической системе.

Объем удерживания - произведение времени удерживания на объемную скорость подачи подвижной фазы.

Мертвое время колонки (время, необходимое подвижной фазе чтобы пройти по колонке от места подачи пробы к детектору);

Очевидно, что успех хроматографирования определяется степенью разделения компонентов исследуемой смеси веществ. Степенью разделения двух веществ называют *разрешение (R)*.



$$R = 2 \times (t_{Rx} - t_{Ry}) / (w_X + w_Y) \quad (1) \quad w_R - \text{ширина пика R у основания}$$

$R = 0$ (вещества не разделяются)

$R = 1$ (перекрывание ~ 2% площадей двух пиков)

$R \geq 1$ (пики разделяются до базовой линии)

Основными факторами, влияющими на разрешение, являются *удерживание, селективность, эффективность*.

На рис. 2.6 представлены результаты разделения четырех компонентной смеси в системах с одинаковой селективностью (избирательностью) по отношению к каждому компоненту 1, 2, 3, 4. При этом система (а) более эффективна, чем (б). Система (в) также эффективна, как (а), но обеспечивает другое время удерживания.

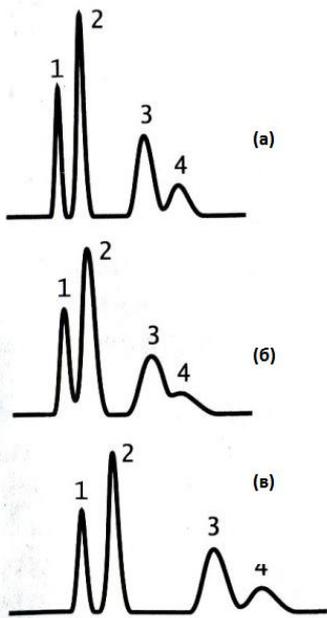


Рис. 2.5. Разделение четырех компонентной смеси системами одинаковой селективности, но различной эффективностью и удерживанием.

Основные факторы, влияющие на разрешение. Селективность

Величина, отражающая – способность хроматографической системы к разделению веществ, называется *селективностью* (α). При постоянной селективности хроматограмма выглядит одинаково (последовательность элюирования, пропорции между факторами удерживания постоянны).

На рис. 2.7. показаны результаты разделения с различной селективностью: (б) селективность отличается от (а), но порядок элюирования остается прежним; (в) селективность отличается от (а), но изменяется и сам порядок элюирования.

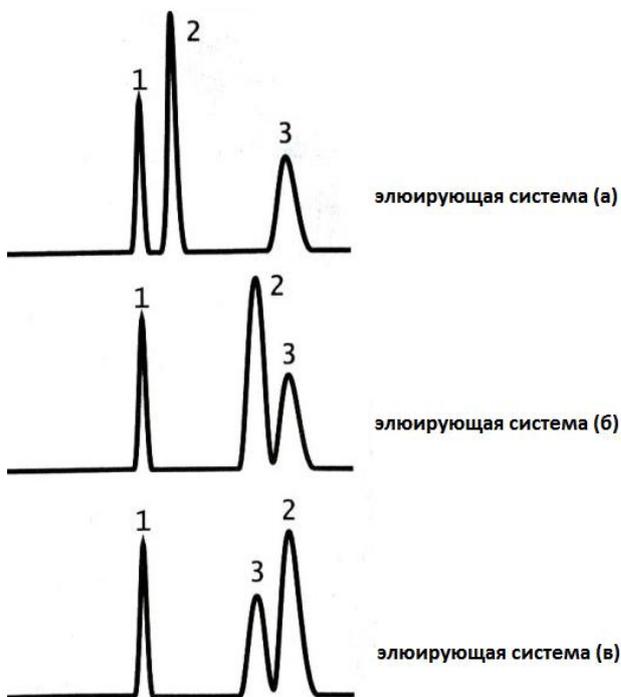


Рис. 2.6. Разделение трёхкомпонентной смеси в системах с различной селективностью

Для двух пиков селективность можно вычислить непосредственно из хроматограммы как отношение фактора удерживания более удерживаемого пика к фактору удерживания менее удерживаемого:

$$\alpha = k'_{Rx} / k'_{Ry}$$

$\alpha = 1$ (полное отсутствие селективности, т.е. разделение не происходит)

Разделение на данном адсорбенте при применении данного элюента принципиально возможно при $\alpha > 1$!

Для изменения селективности меняют либо адсорбент, либо состав элюента.

Основные факторы, влияющие на разрешение. Эффективность

Эффективность (N) является свойством хроматографической колонки и определяется величиной размывания хроматографической зоны; численно выражается числом теоретических тарелок. Эффективность можно вычислить по любому пику на хроматограмме:

$$N = 5.545 \times (t_{Rx} / w_{1/2})^2 \quad (2)$$



Эффективность хроматографической колонки зависит от:

- размером частиц адсорбента (μ)
- качеством изготовления адсорбента;
- качеством упаковки колонки адсорбента.

Определение эффективности колонки (тестирование) проводят при скорости подвижной фазы 1мл/мин (Ø 4.6 мм), определенным адсорбатом (толуол, нафталин).

Оценивать эффективность хроматографической колонки удобно через удельную эффективность: $N / \text{длину колонки}$. Для современных колонок ВЭЖХ удельная эффективность: 80 – 230 тысяч теоретических тарелок.

При оценки разрешающей способности колонки используют не значение эффективности, а величину пиковой плотности (n). *Пиковая плотность* – число пиков,

которые могут быть расположены на хроматограмме друг за другом с разрешением, равным единице:

$$n = 1 + 0.6 \times \sqrt{N} \times \lg(1 + k') \quad (3)$$

где, N – эффективность, k' – фактор удерживания последнего компонента

Подведем промежуточные итоги

1. Есть три фактора, влияющих на разрешение: селективность хроматографирующей системы, эффективность хроматографической колонки и величина удерживания разделяемых веществ.

2. Самым главным фактором является селективность α . Изменить ее – значит либо изменить неподвижную фазу (адсорбент), либо состав элюирующей системы (подвижная фаза).

3. Вторым фактором по значимости является эффективность хроматографической колонки. Увеличить ее – значит взять другую более эффективную колонку.

4. Наименее значимым фактором, влияющим на разрешение является величина удерживания k' . Только для наименее удерживаемых компонентов $k' < 2$ увеличение удерживания приводит к улучшению разрешения.

5. Удерживание аналитов должно быть не менее $k' = 2$.

Основная формула хроматографии

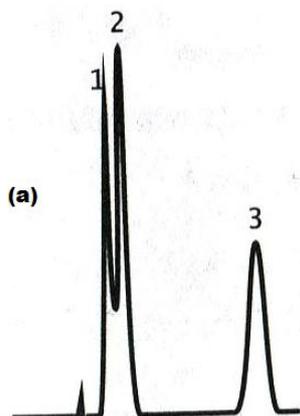
$$R = 1/4 \times (\alpha - 1) / \alpha \times \sqrt{N} \times k'_{RY} / (k'_{RY} + 1)$$

R – разрешение; α - селективность; N – эффективность; k'_{RY} – фактор удерживания второго пика

Как улучшить разрешение?

Для каждого случая – свой рецепт.

Пример



Слабое удерживание

Плохое разрешение обусловлено слабым удерживанием (a).

Разрешение можно значительно улучшить, увеличив удерживание (б), но при этом увеличится время анализа:



Время удерживания можно увеличить настолько, чтобы достичь компромисса между хорошим разрешением и временем анализа (в):



Как управлять временем удерживания?

Основные факторы, влияющие на разрешение. Фактор удерживания

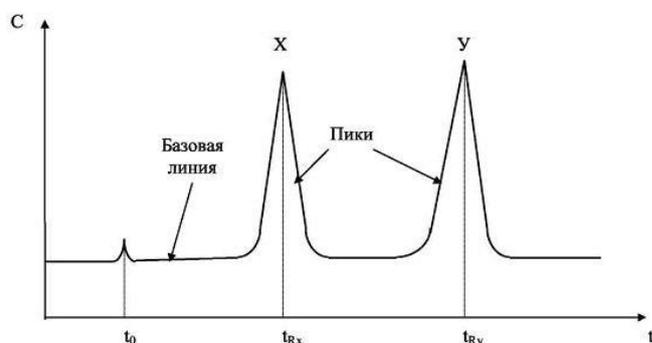


Рис. 2.4. Вид хроматограммы, полученной методом ВЭЖХ

t_{Rx} – время удерживания;

V_R – объем удерживания;

t'_{Rx} – приведенное время удерживания ($t_{Rx} - t_0$);

k' – фактор удерживания (t'_{Rx}/t_0);

t_0 – мертвое время колонки;

Фактор удерживания (коэффициент емкости), k' - величина, характеризующая удерживание вещества и равная отношению абсолютного объема удерживания к свободному объему колонки, а также отношению приведенного времени удерживания к мертвому времени

$$k' = V_R/V_0, \quad k' = t_{Rx}/t_0 \quad (4)$$

Для изменения удержания необходимо изменить соотношение компонентов элюента.

Как происходит удерживание?

В жидкостной хроматографии адсорбат взаимодействует и с адсорбентом, и с элюентом (рис. 2.7).

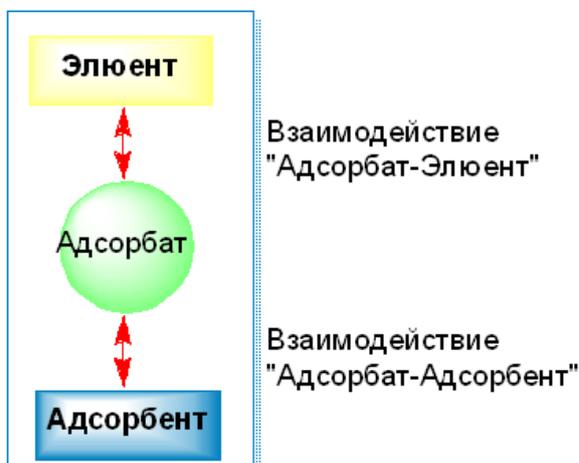


Рис. 2.7 Схема взаимодействия адсорбата в жидкостной системе

В жидкостной хроматографии удерживание определяется разностью двух взаимодействий: адсорбат-элюент («А-Э») и адсорбат-адсорбент («А-А»). А потому всегда можно компенсировать взаимодействие «А-А» взаимодействием («А-Э»).

Другими словами: *регулирование времени удерживания в жидкостной хроматографии достигается путем подбора состава элюента, при котором достигается хороший баланс двух взаимодействий.*

Полярные и неполярные растворители и адсорбенты

В жидкостной хроматографии применяется ряд растворителей различной полярности (рис. 2.8).

Самый полярный – вода, самый неполярный – гексан.

Адсорбенты также обладают различной полярностью. В качестве адсорбентов используются модифицированные силикагели.

Самый неполярный – октадецил-силикагель (С18 фаза) (читается «це восемнадцать»).

Полярные силикагели: аминопропил-силикагель (аминофаза), цианопропил-силикагель (нитрильная фаза) (рис. 2.8)

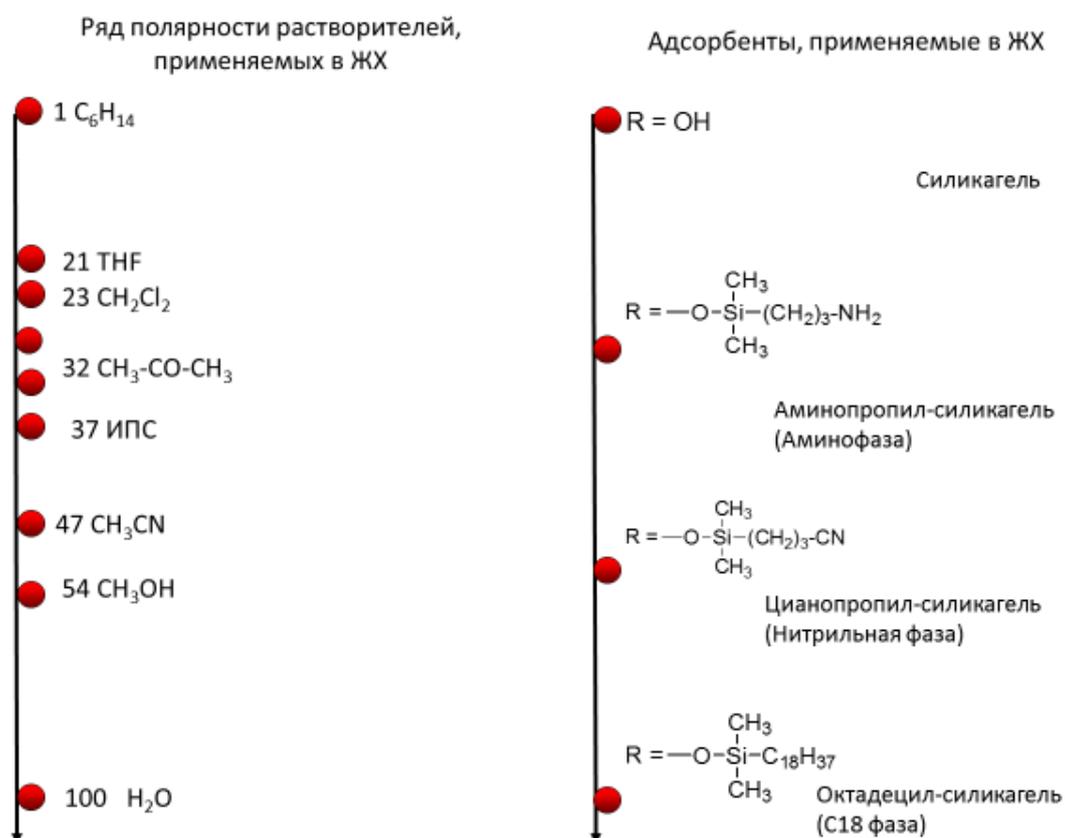


Рис. 2.8. Растворители и адсорбенты, применяемые в жидкостной хроматографии

Хроматографические системы

Обращенно-фазовая хроматографическая система

(ОФ, reversed-phase, RP)

Обращенная фаза (ОФ) – хроматографическая система, основанная на неполярном адсорбенте

Основа – основной компонент элюента (растворитель)

Добавка – дополнительный компонент элюента

В ОФ хроматографии основа – всегда более полярный растворитель, чем добавка.

Для ОФ ВЭЖХ: адсорбент - C18 силикагель; основа элюента – H_2O или водно-солевой буфер; добавка – ацетонитрил, метанол, реже ТГФ или ИПС.

Чем больше в элюенте доля неполярной добавки – тем меньше удерживание!

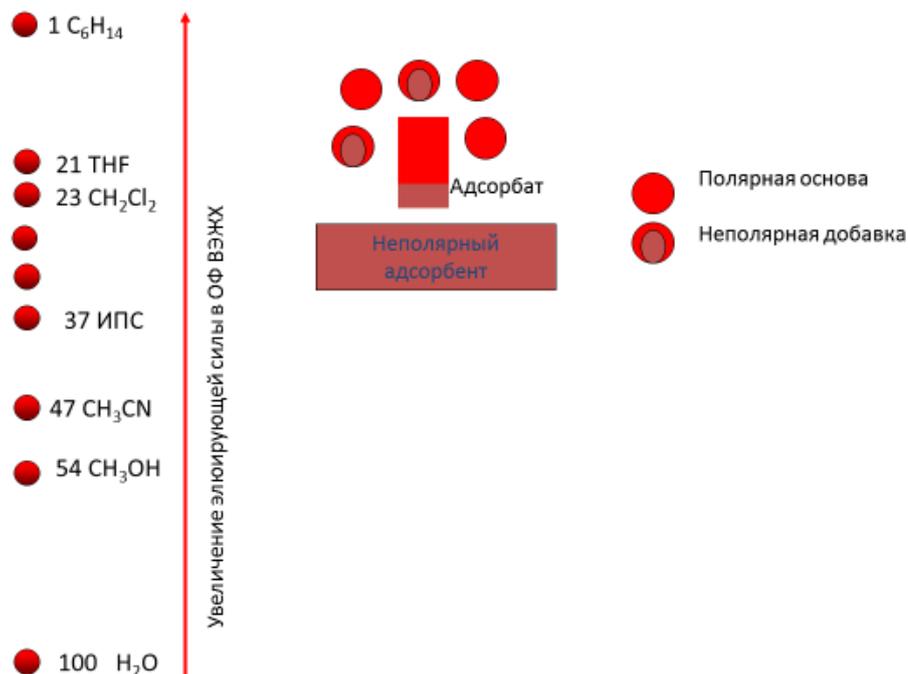


Рис. 2.9. Схема поверхностного слоя в обращенно-фазовой системе

Нормально-фазовая хроматографическая система

(НФ, normal phase, NP)

Нормально-фазовая система - хроматографическая система, основанная на полярном адсорбенте.

Различают «классическую» и «гидрофильную» нормально-фазовую систему.

В классической НФ основа – гексан (неполярный растворитель), добавка – полярный растворитель (диоксан, ТГФ, EtOAc, $CHCl_3$, CH_2Cl_2 , ацетон, ИПС) Растворители максимальной элюирующей силы (H_2O , AcOH, ТЭА) используются в качестве модификатора.

Роль добавки-модификатора - модифицировать поверхность адсорбента, подавляя влияние остаточной влаги (стабилизирует удерживание).

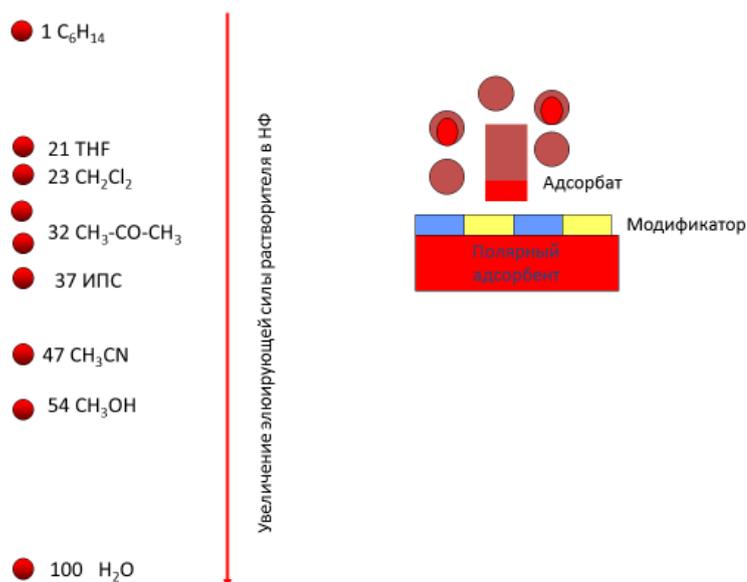


Рис. 2.10 Схема поверхностного слоя в нормально-фазовой системе

Нормально-фазовая гидрофильная хроматографическая система

(HILIC, hydrophilic interaction chromatography)

Гидрофильная хроматография – НФ ВЭЖХ, но с более полярным элюентом. Применяется для разделения сильнополярных веществ.

Основна – ацетонитрил; полярная добавка и модификатор – вода или водно-солевой буфер. Чем больше в элюенте воды – тем меньше удерживание.

Удерживание ионных соединений на обращенной фазе.

Для того чтобы в ОФ хроматографии получить высокую эффективность разделения ионных соединений и стабильные времена элюирования, необходимо подобрать такой рН элюента, чтобы анализируемое соединение существовало исключительно в одной форме – молекулярной или ионной.

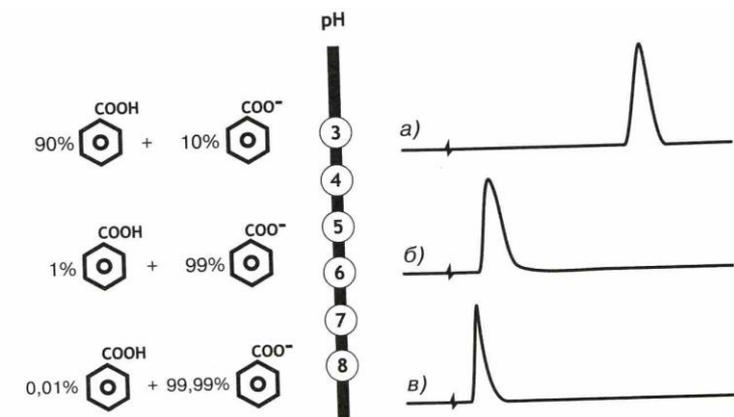
В ОФ ВЭЖХ аналиты предпочтительно переводить в молекулярную форму.

Органические кислоты.



При $\text{pH} = \text{pKa}$ [молекулярная форма] = [ионная форма]

Величина $\text{pH} = 3$ достаточна для обращенно фазового хроматографирования большинства органических кислот (используют H_3PO_4).



ХР16 Рис. 2.11. Равновесие форм бензойной кислоты в водном растворе при различных рН. Вид хроматограммы бензойной кислоты в зависимости от рН водной основы элюента

Удержание ионных соединений на обращенной фазе.

Органические основания

Органические основания в ОФ ВЭЖХ разделяются в виде ионных форм. При этом основная проблема – широкий пик на хроматограмме (рис. 2.12).

Уширение пиков оснований происходит в результате взаимодействия аналитов с примесями металлов и активными силанольными группами, присутствующими на поверхности адсорбента. Активная силанольная группа отличается от обычной тем, что около нее находится примесь металла. В результате группа Si-OH приобретает высокую кислотность (рис. 2.12).

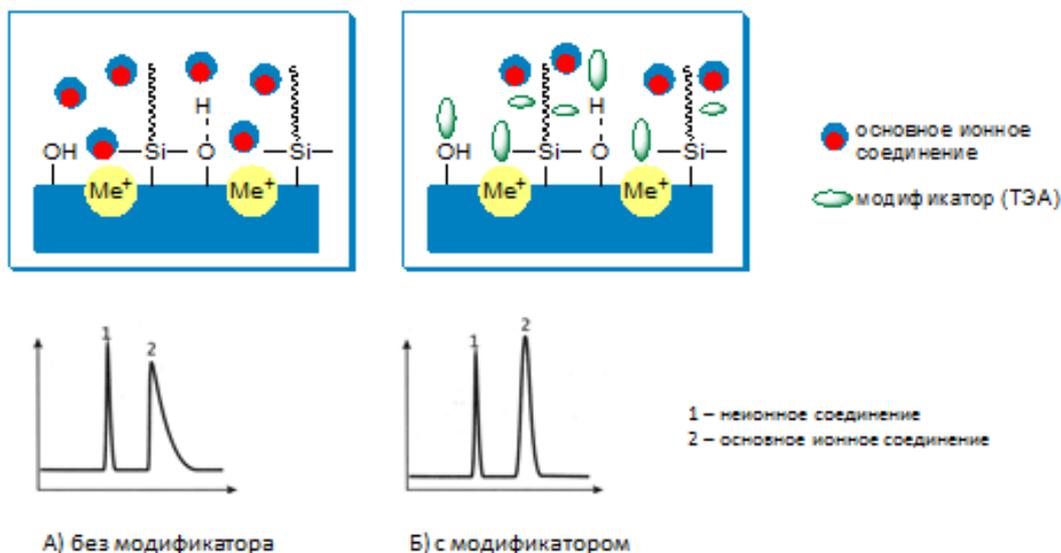


Рис. 2.12 Разделение на обращенной фазе неионного соединения (1) и ионного основного соединения (2)

Эффективность разделения достигается введением в элюент модификатора – триэтиламина (ТЭА) (концентрация 1- 2%) или диэтиламина.

Удержание ионных соединений на обращенной фазе.

Смесь нейтральных соединений, органических кислот и оснований

В случае, когда в пробе есть и нейтральные соединения, и кислоты, и основания, используют систему: органический растворитель, модификатор ТЭА и H_3PO_4 для обеспечения pH 2-3. В этом случае уширение пиков от ионных соединений минимизируется (рис. 2.13).

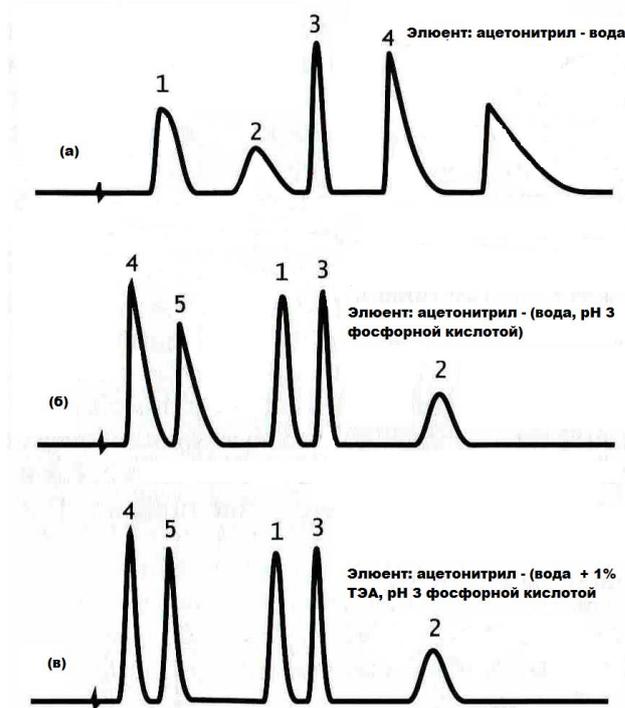


Рис. 2.13. Изменение ОФ хроматограммы смеси нейтральных, кислотных и основных веществ в зависимости от состава водной основы.

2.2. Газовая хроматография

2.2.1. Общие положения

Впервые газовая хроматография была описана в 1952г. для исследования жидкостей А. Мартином и Э. Джеймсом. Первый коммерческий газовый хроматограф введен фирмой Перкин-Эльмер (Perkin-Elmer) в 1955г.

В газовой хроматографии подвижная фаза – газ (азот, водород).

В зависимости от стационарной фазы различают, собственно, *газовую хроматографию* (ГХ) (стационарная фаза – полимерное вещество) и *газо-жидкостную хроматографию* (ГЖХ) (стационарная фаза – жидкость). ГЖХ более распространенный метод, используется для разделения «летучих» соединений (м.м. до 500). Чувствительность ГЖХ позволяет определить до 10^{-6} г количества соединения.

Разделение в ГХ основывается на различных эффектах: температура кипения пробы; растворимость вещества в стационарной фазе; процесс адсорбции.

Соединения с высоким давлением пара и/или низкой растворимостью удерживаются в стационарной (жидкой) фазе лишь на короткое время.

Соединения с низким давлением пара и/или более высокой растворимостью медленно элюируются со стационарной фазы.

Транспорт пробы проходит в газовой фазе; разделение – в стационарной фазе, поэтому разрешение зависит от вида и частоты взаимодействий между пробой и стационарной фазой.

Каждое вещество имеет отличное от других время удерживания стационарной фазой, что обусловлено молекулярным весом сорбата, формой его молекулы, наличием функциональных групп. Даже если времена удерживания отличаются мало, то вещества разделяются благодаря многократному повторению процесса распределения.

Коэффициент распределения k' - отношение количества вещества в неподвижной фазе к количеству вещества в подвижной фазе. Коэффициент распределения, зависит от природы растворенного вещества и количества неподвижной фазы.

Визуализированным результатом эксперимента ГХ является хроматограмма (рис. 2.1). Инжекционный пик на хроматограмме соответствует моменту ввода образца. Каждый последующий пик – компоненту исследуемой смеси. Расстояние от инжекторного пика до пика компонента (в шкале времени) является временем удерживания этого компонента. Величина времени удерживания определяется химической природой компонента и условиями эксперимента.

Идентификацию соединения в смеси, проводят путем сравнения его времени удерживания с временем удерживания «подлинного» образца соединения (метчик, или вещество сравнения), записанного отдельно.

2.2.2. Аппаратурное оформление анализа методом ГХ

В методе ГЖХ используют два вида хроматографических колонок:

1. Насадочного типа. Жидкая неподвижная фаза наносится в виде пленки на поверхность гранулированного твердого вещества – носителя. Носитель с неподвижной жидкой фазой («насадка колонки») набивают в свернутую в спираль стеклянную или металлическую трубку диаметром 2 - 4 мм. Эффективность колонок насадочного типа примерно 20000 теоретических тарелок (как в ректификации).

2. Капиллярные колонки. Неподвижная фаза наносится в виде тонкой пленки на внутреннюю стенку капиллярной трубки узкого диаметра (0.2-0.5 мм). Капиллярные колонки изготавливают из кварца, они могут быть до 100 м длиной. Эффективность капиллярных колонок примерно 250000 теоретических тарелок.

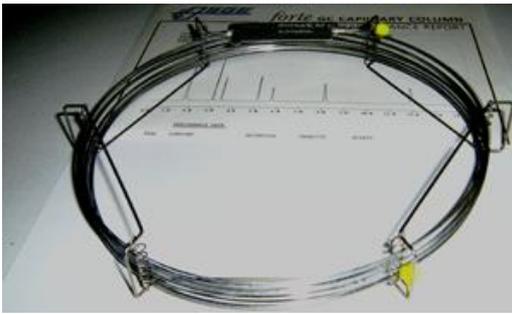


Рис. 2.1. Капиллярная ГХ колонка. Параметры капиллярных колонок, пригодных для большинства задач: длина 25 м (можно увеличить до 50 м), I_d 0.32 мм (широкие колонки) и I_d 0.25 мм узкие колонки

Принцип разделения в газовой хроматографии. Блок-схема газового хроматографа.

Анализируемые вещества вводятся в поток газа-носителя, испаряются и в парообразном состоянии проходят через колонку, распределяясь в результате многократного повторения актов сорбции и десорбции между газовой и жидкой фазами. Разделенные вещества элюируются из хроматографической колонки потоком газа-носителя, регистрируются детектором и фиксируются на хроматограмме в виде пиков.

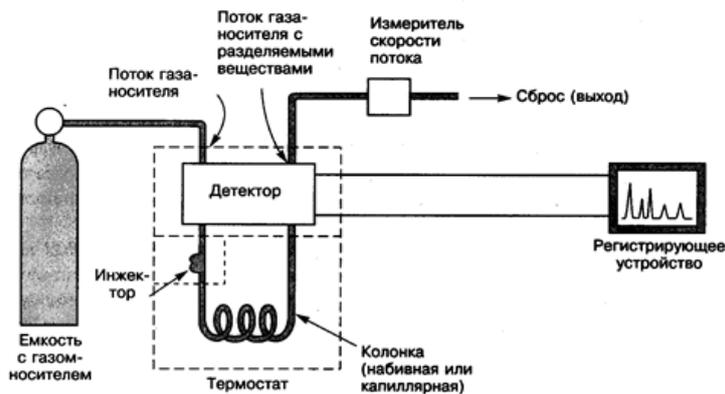


Рис. 2.1. Схема газового хроматографа [Кристиан Г. Аналитическая химия: в 2 т. – Т. 2 – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 504 с. – Рис.20.1, С. 157.]

Важным моментом является тип детектора, который передает сигнал самописцу.

Наиболее распространенные виды детекторов, используемых в газовых хроматографах.

Детектор по теплопроводности (ДТП) – один из наиболее распространенных, измеряет различие в теплопроводности чистого газа-носителя и содержащего выделенный компонент смеси. Используют для исследования как неорганических, так и органических соединений.

Пламенно-ионизационный детектор (ПИД) - используется при разделении органических соединений. Газ-носитель, содержащий разделенные компоненты, сжигают в водородном пламени. Концентрацию ионов, образуемых в пламени, измеряют по его электропроводности.

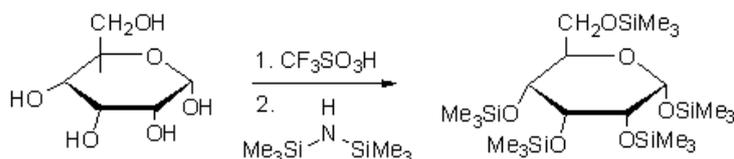
Детектор электронного захвата (ДЭЗ) используется для анализа соединений, содержащих галогены, серу, фосфор, азот. Электроны ионизируют газ-носитель, превращая его в электропроводную среду. Компоненты образца восстанавливаются электронами и поэтому поглощают их, каждый в различной степени. Уменьшение электропроводности, вызываемое этим, связано с концентрацией анализируемого компонента смеси. Такой способ детектирования обладает очень высокой чувствительностью. Он используется для количественного определения инсектицидов, содержащих галогены, в различных пищевых продуктах и других анализируемых веществах.

Как бороться с «нелетучестью» органических соединений?

Летучесть (фугитивность) — свойство жидких и твердых веществ переходить в газообразное состояние. Мерой летучести является концентрация насыщенного пара данного вещества при рассматриваемой температуре и выражается в мг/м³ или в мг/л. При данной температуре вещество с более высоким давлением паров испаряется более легко, чем вещество с более низким давлением паров. Летучесть вещества повышается с повышением температуры.

Для повышения летучести исследуемых веществ их путем химических трансформаций переводят в более летучие соединения, чаще всего эфиры. Этот процесс называется дериватизацией (от немец. «Derivaten» - производные). На схеме 1 показаны основные синтетические приемы для проведения дериватизации:

1. Силилирование:



2. Ацилирование и получение сложных эфиров:

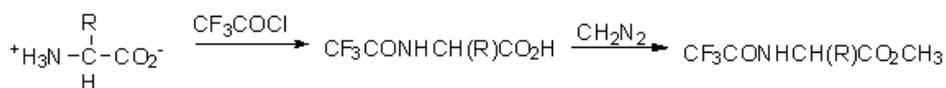


Схема 1. Основные методы дериватизации органических соединений для проведения эксперимента ГХ

2.3. Тонкослойная хроматография

Хроматография в тонких слоях, или тонкослойная хроматография (ТСХ) – один из наиболее широко используемых хроматографических методов.

ТСХ имеет большое значение для быстрого качественного анализа смесей, контроля хода реакций и определения рабочих параметров, необходимых для осуществления препаративной колоночной хроматографии. Процесс разделения методом ТСХ – одна из форм жидкостно-адсорбционной хроматографии.

2.3.1 Общее описание метода

Разделение проводят на плоской пластине, покрытой тонким слоем сорбента – силикагелем или оксидом алюминия. Разделяемую смесь, растворенную в соответствующем растворителе, наносят в виде капель на пластинку и после испарения растворителя помещают пластинку в проявительную камеру, в которую налит подходящий элюэнт (рис. 3.1). Растворитель поднимается по слою сорбента под действием капиллярных сил. При этом различные соединения, находящиеся в смеси, поднимаются с разными скоростями в зависимости от их сродства к сорбенту и силы растворителя. Далее пластинку вынимают из камеры, сушат и детектируют пятна тем или иным способом.



Рис. 3.1. Проведение эксперимента ТСХ

Величиной, характеризующей данное соединение, является следующее отношение: расстояние от линии старта до середины пятна, отнесенное к расстоянию от линии старта до линии фронта растворителя и обозначается R_f (рис. 3.1). Разработка методик хроматографического разделения невозможна без получения воспроизводимых результатов в величинах R_f .

Величины воспроизводимости значения R_f зависят от условий применения одинаковых сорбентов, от насыщения камер, температурных режимов и относительной влажности.

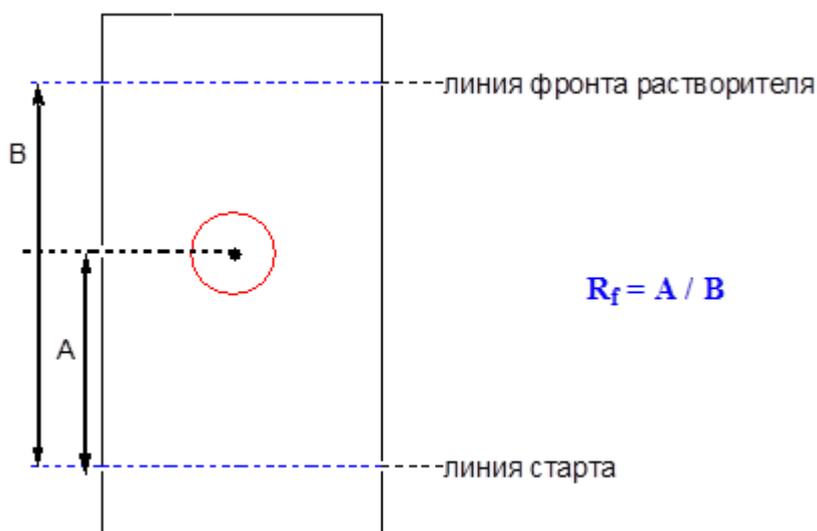


Рис. 3.2. Параметры ТСХ

Степень насыщения камер играет большую роль не только при получении одинаковых величин R_f с использованием одинаковых пластин, но также при получении одинаковых величин R_f на одной и той же пластине.

При равномерном насыщении камер величина R_f зависит от толщины слоя (концентрации) нанесенного образца, величины фронта растворителя и угла наклона пластины. Поэтому для воспроизводимости результатов ТСХ-анализа необходимо строго соблюдать стандартность в условиях хроматографирования.

Температура и относительная влажность могут также оказывать значительное влияние на величину R_f . Чем выше относительная влажность, тем больше изменяется R_f от повышения температуры.

Таким образом, воспроизводимость величин R_f зависит от сорбента, его пористости (емкости), толщины, насыщения камер, температуры, угла наклона пластины, величины фронта растворителя и получения начальной зоны (пятна). Получение начальной зоны (пятна) должно занимать минимальную площадь. Только при этом условии можно получить отчетливые хроматографические пятна.

3.2 Основные правила идентификации органических соединений с помощью ТСХ-анализа

1. Проявительная камера изнутри должна быть выложена фильтровальной бумагой для того, чтобы насыщенность парами в камере была одинакова. Это условие обеспечивает отсутствие так называемого краевого эффекта (в общем случае искажение хроматографической картины).

2. Успех данного вида анализа зависит от правильного подбора элюэнта.

Силу растворителя легче всего регулировать, используя смеси сильного и слабого растворителей. Обычно начинают с 1:1-смеси эфира (сильный растворитель) с гексаном (слабый растворитель) и затем соответственно меняют соотношение.

В случаях, когда разделению препятствует сильное перекрытие двух пятен, даже если они хорошо поднимаются по пластине (R_f 0.6-0.9), можно попытаться улучшить разделение двумя путями:

а) изменением химической природы проявляющего растворителя при сохранении его силы;

б) изменением природы неподвижной фазы (замена пластинок).

3. В случаях, когда смесь содержит несколько полярных и неполярных соединений, может потребоваться двукратное проявление – сначала в слабом растворителе для отделения неполярных соединений (полярные остаются на старте), а затем в более сильном растворителе для отделения полярных соединений (неполярные соединения при этом уходят с фронтом растворителя).

4. Линии старта и фронта растворителя обычно аккуратно наносятся простым карандашом на пластинку. Высота линии старта должна быть выше уровня растворителя в камере. В противном случае пятна образцов «размоются» на пластине.

5. Нанесение вещества на пластину проводится тонким стеклянным капилляром. Важно лишь слегка прикоснуться заполненным кончиком капилляра к сорбенту, стараясь не разрушить его поверхность. Исследуемое вещество обычно наносится в виде 1-2% раствора в летучем растворителе типа дихлорметана или эфира (по возможности избегать сильнополярных растворителей, например, этанола).

6. Если исследуемая смесь веществ содержит окрашенные вещества, то после проявления в камере их легко различить визуально. Однако для бесцветных веществ требуется тот или иной метод визуализации.

Методы визуализации результатов эксперимента ТСХ

1. В большинстве случаев используют специальные пластины, сорбент которых содержит неорганический флуоресцентный агент (0.5%). При освещении такой пластинки УФ-лампой (254 нм) сорбент начинает светиться бледно-зеленым или голубым светом, а органические соединения, которые гасят флуоресценцию, выделяются в виде темных пятен.

2. Другим распространенным методом является использование так называемой «иодной или азотной камеры».

На дно проявительной камеры помещают несколько кристалликов иода. Сухую, предварительно проявленную пластину помещают в иодную камеру на несколько минут, пары иода растворяются в органических «пятнах», окрашивая их в коричневый цвет.

Аналогичную операцию проводят и в случае азотной камеры, на дно которой помещают небольшое количество нитрита натрия. Перед тем как поместить пластину для детектирования пятен, в камеру капают несколько капель азотной кислоты, при этом камера наполняется рыжими парами NO_2 .

3. Имеется целый ряд реагентов, нанесение которых из пульверизатора на пластинку после проявления хроматограммы окрашивает соединения определенных классов в различные цвета, например: раствор 2,4-динитрофенилгидразина окрашивает карбонилсодержащие соединения в желто-оранжевый цвет.

Вопросы для самоконтроля

1. Какова область применения жидкостной, газовой и тонкослойной хроматографии?
2. Какие физические явления лежат в основе каждого из методов?
3. Перечислите основные параметры, характеризующие индивидуальное вещество, определяемые методами ВЭЖХ, ГХ, ТСХ.
4. Перечислите основные элементы блок-схемы жидкостного хроматографа. Каково назначение каждого из них?
5. Какие факторы оказывают основное влияние на разрешение хроматографирования методом ВЭЖХ?
6. Что называется обращенно-фазовой и нормально-фазовой хроматографической системой?
7. Перечислите основные элементы блок-схемы жидкостного хроматографа. Каково назначение каждого из них?
8. Какие приемы используются для повышения летучести органических соединений?
9. Перечислите основные этапы эксперимента ТСХ.
10. Какие методы визуализации результатов эксперимента ТСХ Вам известны?
11. Попробуйте сформулировать основные правила идентификации органических соединений с помощью ТСХ-анализа.