

Лекция 1

Хроматографические методы анализа *(часть 1)*

1. Сущность хроматографии

Хроматография - метод **разделения** веществ смеси путем их избирательного поглощения (**сорбции**), при **распределении** компонентов между двумя фазами - **подвижной и неподвижной**.

Хроматография - **динамический** метод, связанный с многократным повторением **сорбционных** и **десорбционных** процессов.

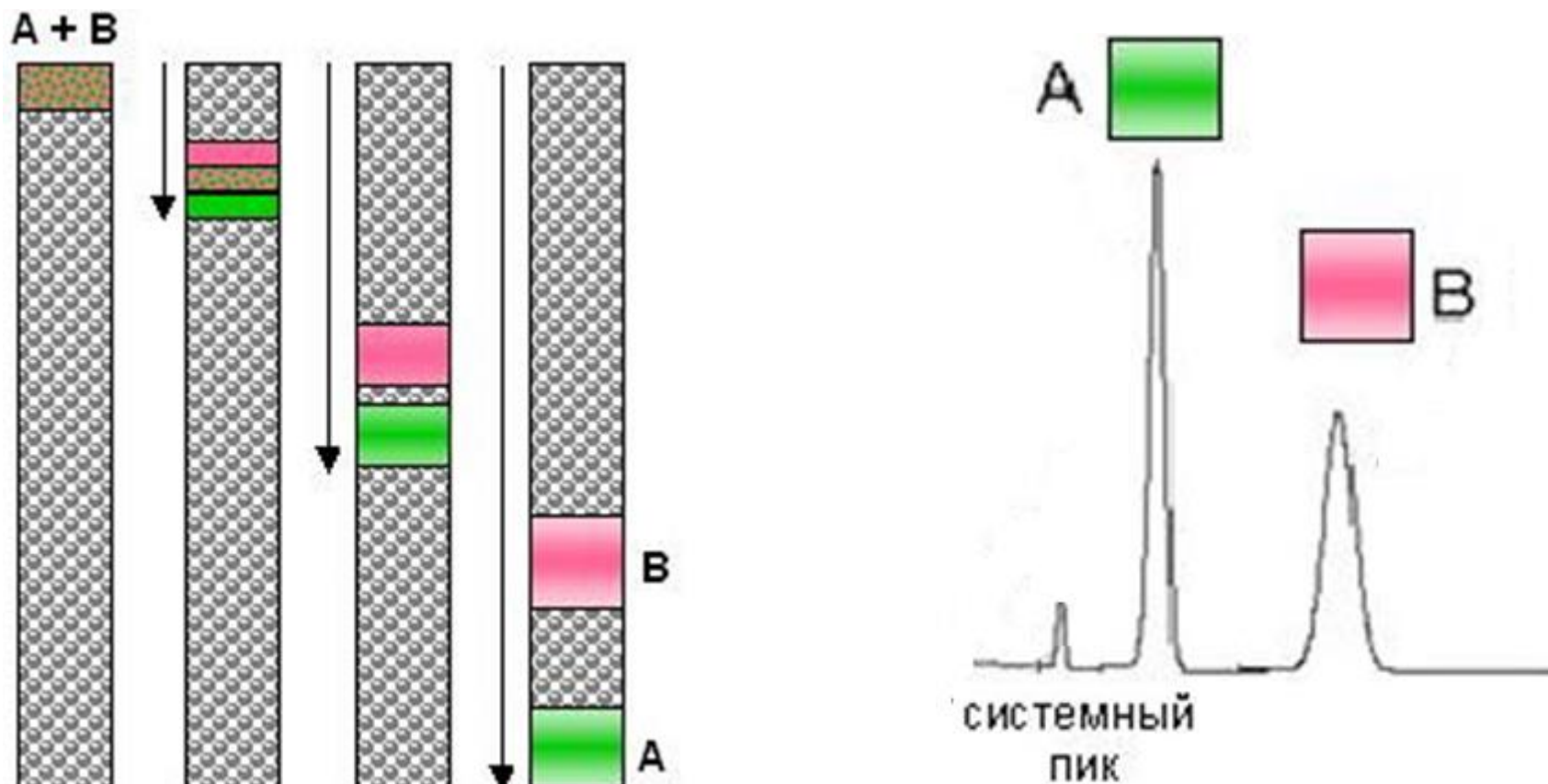
Неподвижная фаза (сорбент) - твердое вещество или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество.

Подвижная фаза - газ (*газ-носитель*) или жидкость (*элюент*), протекающий через неподвижную фазу.

Сорбат - вещество, удерживаемое сорбентом (компоненты разделяемой смеси)

Элюат - выходящий из колонки поток подвижной фазы с компонентами разделяемой смеси

Хроматографическое разделение смеси на компоненты А и В



Смесь вместе с подвижной фазой перемещаются вдоль неподвижной фазы.

Молекулы разных компонентов разделяемой смеси обладают различной адсорбируемостью или растворимостью.

Скорость их передвижения вместе с подвижной фазой через слой сорбента вдоль колонки различны.

Через одно и тоже время одни компоненты будут находиться в верхнем слое сорбента, другие, из-за меньшей степени взаимодействия с сорбентом или растворимости в неподвижной фазе, окажутся в нижней части колонки.

Так достигается разделение компонентов, которые будут выходить из колони по очереди.

Применение:

- определяют газообразные, жидкие, и твердые вещества с молекулярной массой от единиц до 10^6 (ионы металлов ÷ полимеры)
- получают обширную информацию о строении и свойствах органических соединений многих классов

Области:

- биохимия и медицина,
- фармацевтика,
- криминалистика,
- пищевой промышленность,
- мониторинг окружающей среды.

История развития



Цвет Михаил Семенович

Разделение хлорофилла (1903)

История развития

С **1931** получила свое второе рождение, продемонстрировав ценность открытия М.Цвета

В 1938-1941 ТСХ и БХ

С **30-х** ИОХ, синтез ионообменных смол

С середины **50-х** ГХ

С **60-х** ЖХ

С середины **70-х** ВЭЖХ

С середины **80-х** началась компьютеризация метода

2. Классификация хроматографии

В основу классификации многочисленных хроматографических методов положены различные признаки:

По агрегатному состоянию фаз:

- *газовая*
 - газотвердофазная
 - газожидкостная
- *жидкостная*
 - жидкостно-твердофазная
 - жидкостно-жидкостная

По механизму взаимодействия сорбента и сорбата:

- *адсорбционная* - на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом
- *распределительная* - на различной растворимости разделяемых веществ
- *ионообменная* - на разной способности веществ к ионному обмену
- *осадочная* - на образовании отличающихся по растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом

- *адсорбционно-комплексобразовательная* - на образовании координационных соединений разной устойчивости в фазе или на поверхности сорбента
- *Эксклюзионная (гель-проникающая)* - на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ
- *аффинная* - на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов

По цели проведения:

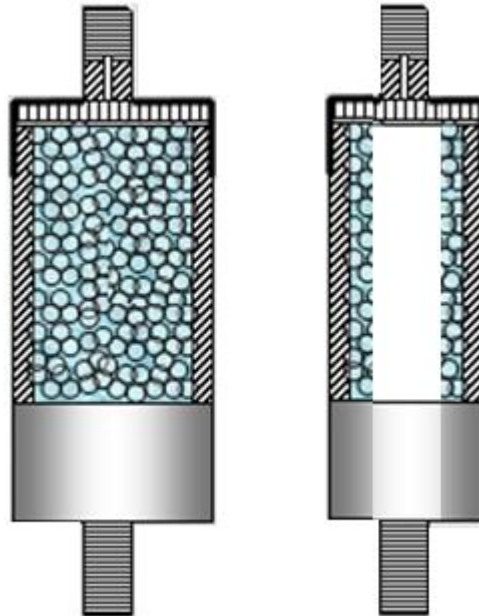
- *аналитическая* - для проведения качественного и количественного анализа
- *препаративная* - для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей
- *промышленная* - для автоматического управления процессом
- *исследовательская* - при изучении растворов, каталитических процессов, кинетики химических процессов

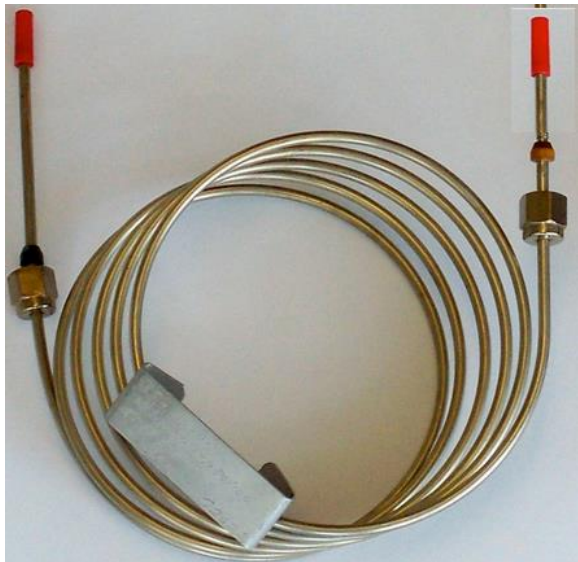
По технике выполнения:

- **КОЛОНОЧНАЯ** - разделение проводится в специальных колонках

- **насадочная** - полностью заполнена сорбентом (насадкой)

- **полая (капиллярная)** - внутренняя стенка покрыта пленкой жидкости или пылью адсорбента

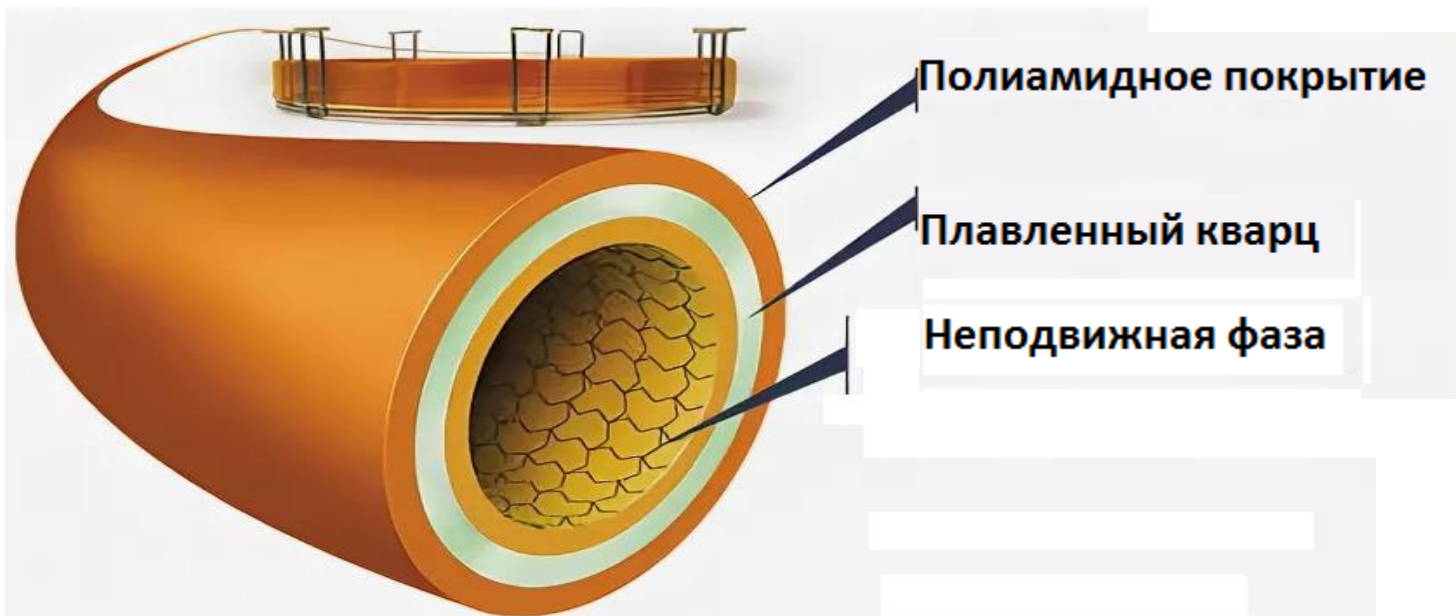




Н-гх) L 1-6 м, D 2-5 мм

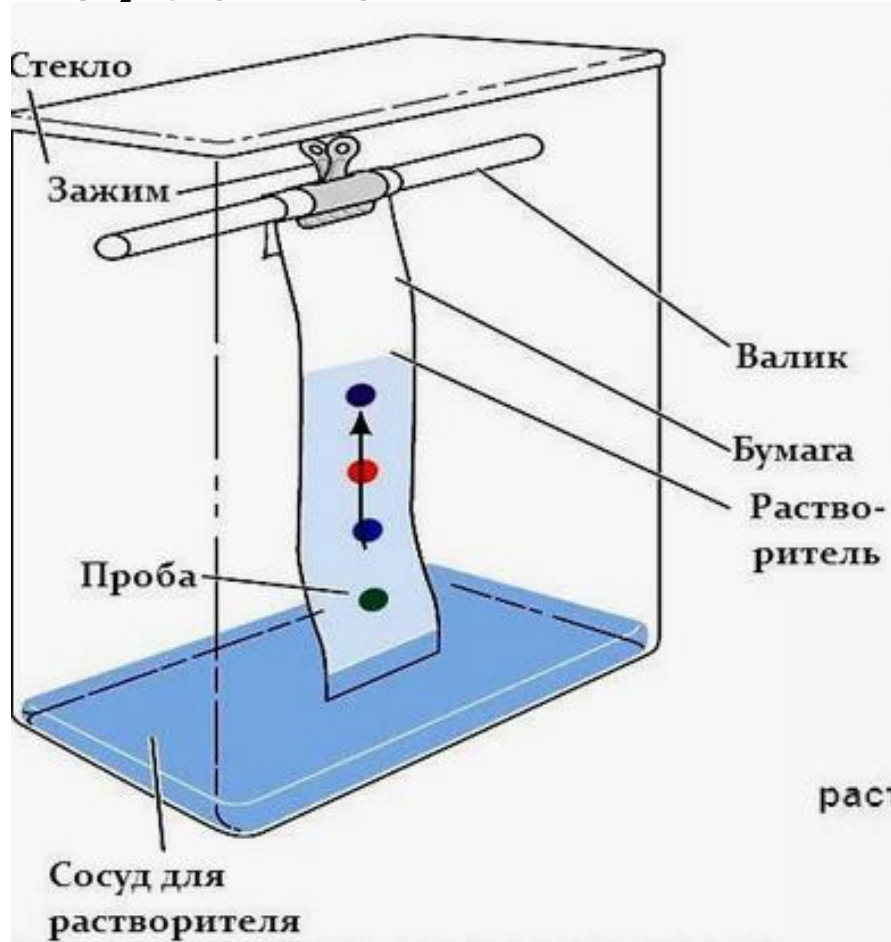
ЖХ) L 10-30 см, D 2-5 мм

К-гх) L 10-100 м, D 0,1-0,5 мм

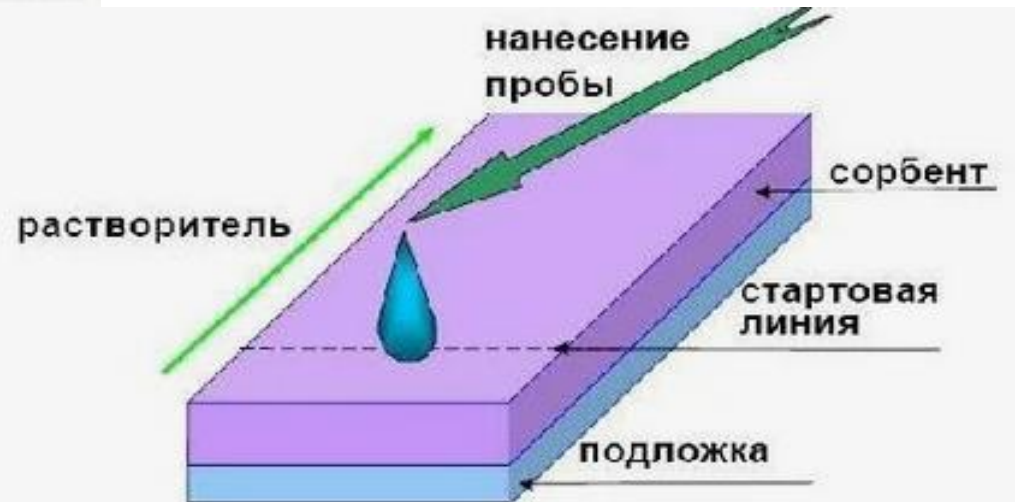


- **плоскостная** - разделение проводится на плоскости на плоскости

бумажная

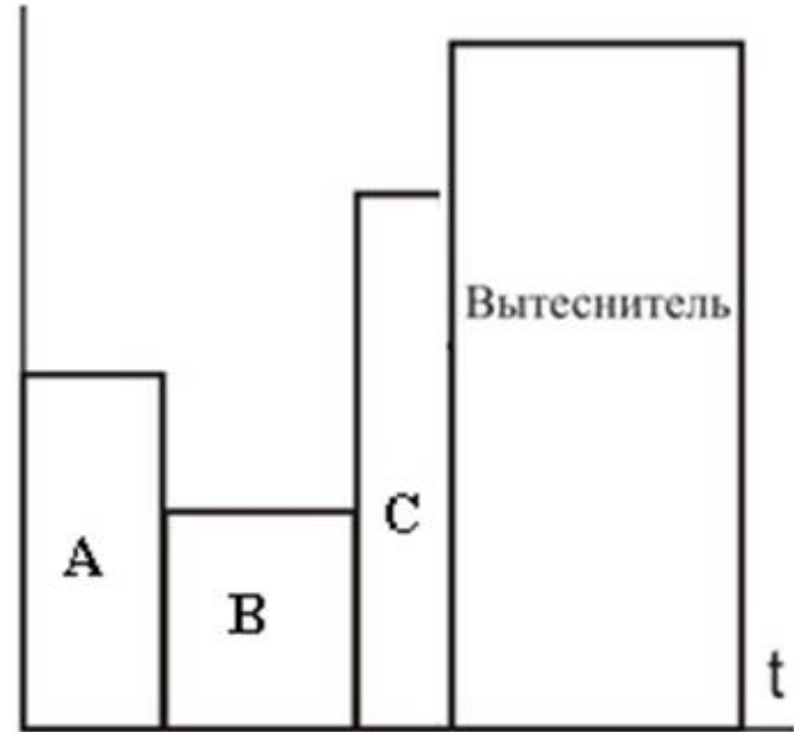
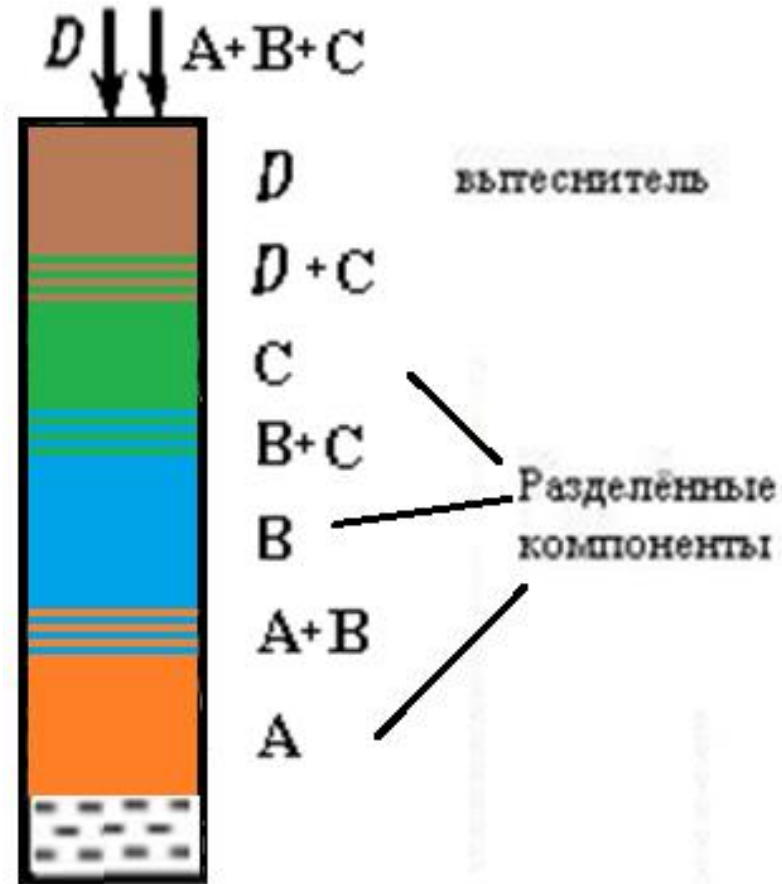


тонкослойная



По способам проведения:

- Вытеснительный метод



Выходная кривая

A, B, C - разделяемые вещества,
 D - вытеснитель

- **Вытеснительный метод**

После **введения** пробы исследуемой смеси колонку промывают элюентом, к которому **добавляют** раствор вещества (**вытеснитель D**), обладающего **большей** сорбируемостью.

По мере продвижения по колонке **D вытесняет** вещество **C** , которое в свою очередь вытесняет вещество **B** и т.д. В результате вытесняемая смесь перемещается впереди фронта вытеснителя и скорость движения вещества равна скорости движения вытеснителя.

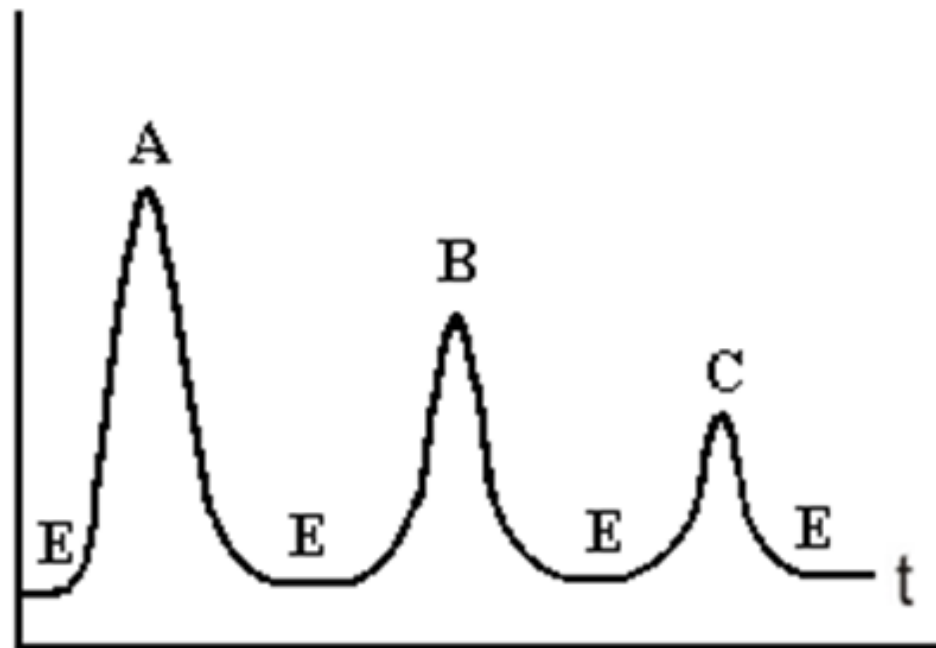
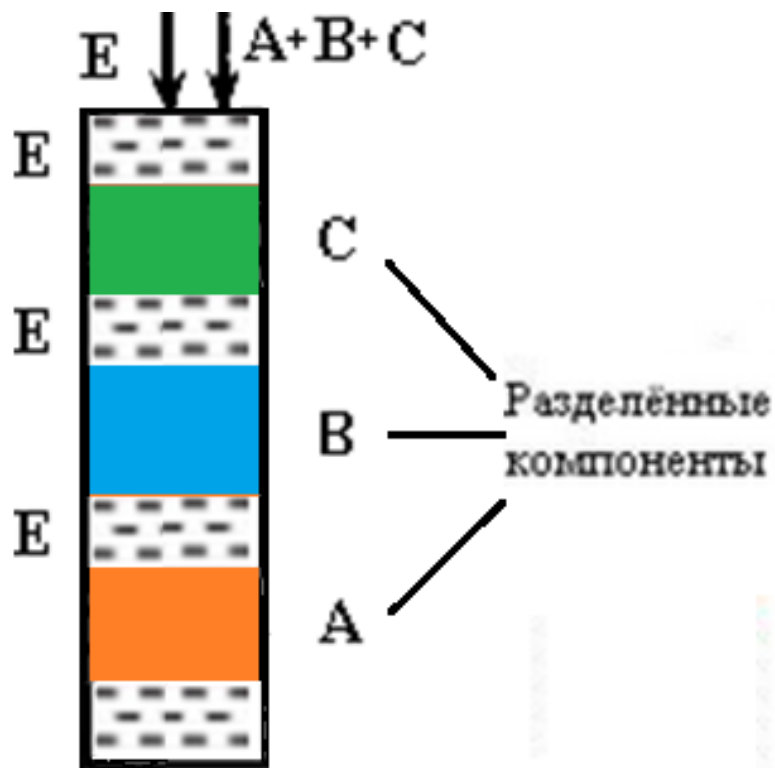
Разделяемые вещества и на колонке, и в элюате располагаются **последовательно** друг за другом.

Каждый из компонентов выделяется в чистом виде, но **не количественно**, так как зоны компонентов не разделены промежутками чистого сорбента.

Вытеснительный метод

- невозможность получения на выходе из колонки достаточно **ЧИСТЫХ** компонентов разделяемой смеси,
- длительность процесса разделения
- для **препаративных** целей

- *Проявительный (элюентный) метод*



Выходная кривая

A, B, C - разделяемые вещества,
E - элюент

- *Проявительный (элюентный) метод*

Хроматографическую колонку промывают **элюентом**, обладающим **меньшей** сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ.

В колонку вводят **порцию** исследуемой смеси и **продолжают** пропускать элюент. Разделяемые вещества перемещаются вдоль колонки с разными скоростями в соответствии с их сорбируемостью.

Разделенные компоненты анализируемой смеси выходят из колонки в **потоке** элюента отдельными зонами, между которыми выходит чистый элюент.

Регистрируют **выходную** кривую в виде **ряда пиков**, число которых соответствует числу разделенных компонентов.

- *Проявительный (элюентный) метод*

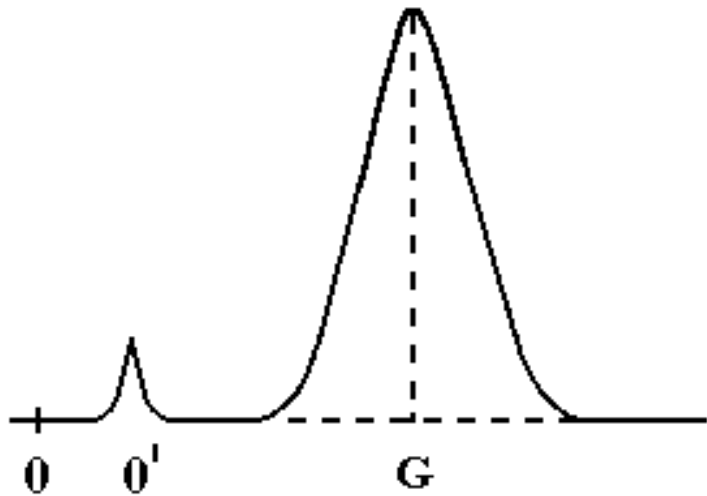
Проявительный метод анализа получил широкое применение:

-при правильном выборе условий разделения компоненты смеси **выходят** из колонки **в чистом виде**

-качественный и количественный **состав** анализируемой смеси можно определить простым измерением из полученной **хроматограммы**.

Качественный и количественный анализ в хроматографии

Качественный анализ



Отрезок OG (t_R) - время удерживания - время от момента ввода анализируемой пробы до регистрации максимума пика

Не зависит от количества пробы, **но зависит** от природы вещества и сорбента, скорости потока подвижной фазы, упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке.

Отрезок OO' (t_0) - время прохождения через колонку несорбируемого компонента

Качественный анализ

Идентификация по **параметрам удерживания** в определенных условиях проведения опыта (**постоянные** *скорость потока, давление, температура, состав фаз*):

- **исправленное время удерживания** (мин)

$$t_R^* = t_R - t_0$$

время пребывания вещества в неподвижной фазе

- **исправленный удерживаемый объем** (мл)

$$V_R^* = V_R - V_0 = F_c t_R^*$$

объем подвижной фазы, необходимый для вымывания вещества

Качественный анализ

Относительное удерживание

Эта величина **зависит только** от состава фаз.

Приведенное время (объем) удерживания **какого-либо вещества** относят к приведенному времени (объему) удерживания **стандартного вещества** :

$$t_{\text{отн.}} = t_R^* / t_{\text{ст.}}^*$$

$$V_{\text{отн.}} = V_R^* / V_{\text{ст.}}^*$$

Качественный анализ

Методы идентификации

- применение **индивидуальных** эталонных веществ
- использование **табличных данных** о характеристиках удерживания.
- использование **графических** или **аналитических зависимостей** между физико-химическими свойствами веществ.
- **нехроматографические** методы идентификации.

Количественный анализ

Основан на измерении различных параметров пика, зависящих от концентрации хроматографируемых веществ.

Чаще всего измеряют **площадь пика** (S).

Ошибка

- метод построения треугольника - **4%**
- метод произведения высоты (h) на ширину, измеренную на половине высоты ($w_{1/2}$) - **2.5%**
- электронный цифровой интегратор - **0.4%**

Количественный анализ

Методы расчета

- абсолютной калибровки
- внутреннего стандарта

$$\omega_i = \frac{S_i}{S_{ст}} \cdot r \cdot 100\%$$

$$r = (m_{ст} / m_{пр})$$

отношение массы
внутреннего стандарта
к массе пробы

- простой нормировки

$$\omega_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i} \cdot 100$$

*при различной чувствительности
детектора по отношению к каждому
из компонентов пробы используют
поправочные коэффициенты

$$k_i S_i$$

ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Ионообменная хроматография - обратимый эквивалентный обмен ионов, содержащихся в хроматографируемом растворе, на подвижные ионы, входящие в состав ионитов.

Иониты могут быть:

- органические и неорганические,
- природные и синтетические,
- катиониты (для обмена катионов) и аниониты (для обмена анионов).

Природные иониты

- алюмосиликаты,
- некоторые сорта каменных углей,
- мягкие и твердые угли даже без предварительной обработки.

Синтетические ионообменники

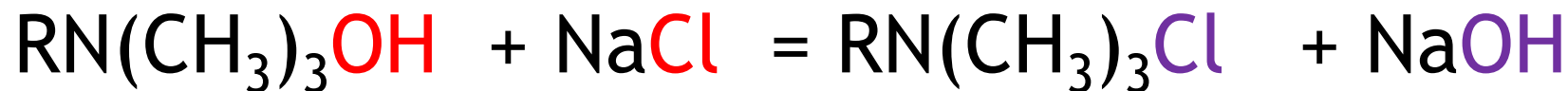
- нерастворимые в воде, кислотах, щелочах и во многих органических растворителях, полиэлектролиты сетчатого строения, имеющие в своем составе различные функциональные (ионогенные) группы, кислотного или основного характера.

1. Сильноосновные аниониты

четвертичные аммониевые группы.

2. Слабоосновные аниониты

аминогруппы разной степени
замещения : - NH₂⁺, = NH⁺, N⁺.



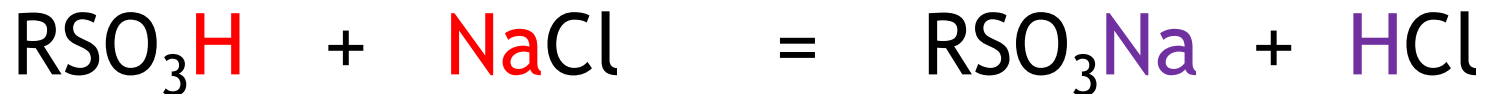
(анионный обмен)

3. Сильнокислотные катиониты

сульфогруппа - SO_3^- и фосфорная
группа - PO_3^- .

4. Слабокислотные катиониты

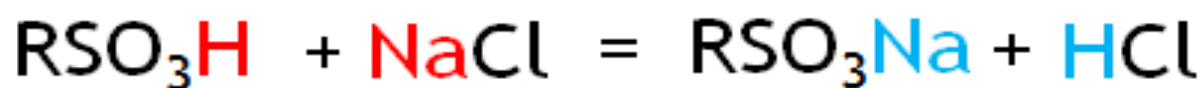
- COO^- , - OH .



(катионный обмен)

NaCl

колонка, наполненная катионообменником в H-форме



$$n(\text{NaCl}) = n(\text{HCl}) - \text{ОИХ}$$

титруют стандартным раствором NaOH

$$n(\text{HCl}) = n(\text{KOH}) - \text{КОТ}$$

HCl

$$m(\text{NaCl}) = (CV)_{\text{KOH}} * M(\text{NaCl})$$

Обменная емкость - количественная мера способности ионита поглощать противоионы.

Численно выражают количеством поглощенных миллимоль эквивалентов ионов на **1 г сухого** ионита

$$OE = n/m \text{ [ммоль/г]}$$

Определение емкости можно отнести и к **единице объема набухшего** слоя ионита

$$OE = n/V \text{ [ммоль/м}^3\text{]}$$

Статическая ОЕ

навеску ионита помещают в раствор насыщающего иона определенной концентрации и выдерживают при встряхивании до полного насыщения ионита

Динамическая ОЕ

пропускание насыщающего раствора через колонку с ионитом

ДООЕ - появление (*проскок*) поглощаемого иона в вытекающем из колонки растворе.

ПДООЕ - момент **выравнивания** концентрации поглощаемого иона в растворе и элюате при пропускании раствора через колонку с ионитом

Применение:

➤ В ВОДОПОДГОТОВКЕ

для умягчения воды, для обессоливания морской воды;

➤ В ГИДРОМЕТАЛЛУРГИИ И ГАЛЬВАНОТЕХНИКЕ

для селективного извлечения ценных металлов из производственных растворов и сточных вод;

➤ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

для очистки плодово-ягодных соков и сахаросодержащих растворов, в производстве дрожжей, для очистки глюкозы, желатина

➤ **в медицине, биологии и фармацевтической промышленности**

для очистки лекарственных препаратов, антибиотиков; для извлечения Ca^{2+} - ионов из крови для увеличения срока ее хранения

➤ **в химии и химической промышленности**

для целей разделения (разделения ионов при переработке руд, для очистки реактивов от примесей нежелательных ионов)

Теоретические представления в хроматографии

Одна из основных задач хроматографии

- получить хорошее разделение хроматографических полос (пиков)

Одна из главных задач теории хром-фии

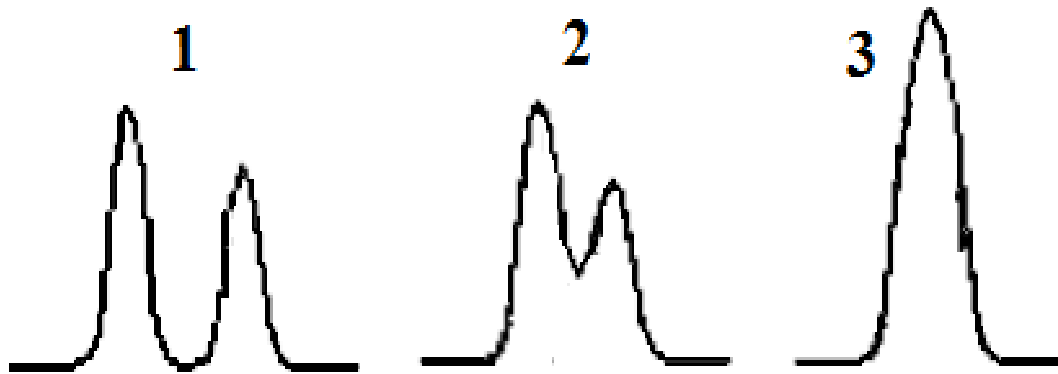
- изучить размывания хроматографических полос

Размывание обусловлено разными факторами:

- процессами, протекающими в колонке
- медленностью сорбции и десорбции

Данные факторы вызывают:

- **расширение** хроматографических полос
- **перекрывание** пиков на хроматограмме
- **разделение** компонентов может **не произойти**



Наибольшее распространение:

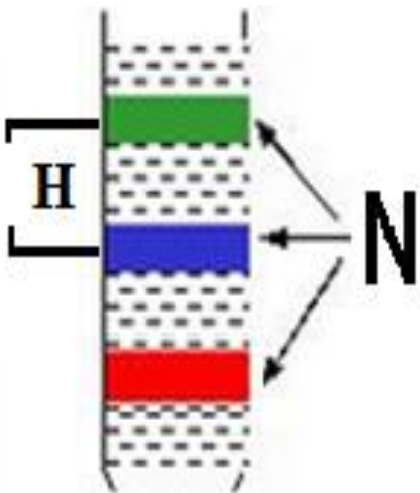
➤ теория теоретических тарелок
(теория Мартина и Синджа)

➤ диффузионно - массообменная
теория
(кинетическая теория Ван-Деемтера)

Теория эквивалентных теоретических тарелок

$$N = 5.54 \left(t_R / w_{1/2} \right)^2$$

где $w_{1/2}$ - полуширина пика ($b_{0.5}$)



$$H \text{ (ВЭТТ)} = L / N$$

L - длина хроматографической колонки, см

N - число теоретических тарелок

H - высота, эквивалентная теоретической тарелке, см

ВЭТТ - количественная мера размывания хроматографических полос, т.е.

эффективности колонки

Теория эквивалентных теоретических тарелок

По аналогии с теорией дистиляционных колонн хроматографическая колонка мысленно разбивается на ряд последовательных теоретических ступеней - тарелок, через которые периодически проходят порции анализируемой смеси.

Каждая тарелка содержит подвижную и неподвижную фазы. Предполагается, что за время нахождения порции анализируемой смеси на тарелке успевает установиться равновесие между подвижной и неподвижной фазами для всех компонентов.

Таким образом, хроматографический процесс - многоступенчатый, а сама колонка рассматривается как система, состоящая из совокупности многих ступеней, хотя в действительности слой адсорбента или пленка неподвижной жидкой фазы в колонке является непрерывным.

Кинетическая теория Ван - Деемтера

Рассматривает **динамику** процесса распределения вещества между двумя фазами.

Величина N зависит от ряда параметров хроматографической колонки:

$$N = A + B / F + C F$$

где N - ВЭТТ

F - линейная скорость потока

A, B, C - константы.

Размывание хроматографической полосы и связаны с тремя основными факторами

1. Вихревая диффузия

(слагаемое А)

Характеризует размывание пиков вследствие **изменения линейной скорости потока** подвижной фазы по сравнению с ее средним значением.

Вихревая диффузия **уменьшается**, если частицы твердого сорбента имеют одинаковые размеры, правильную форму, плотно упакован

2. Молекулярная диффузия

(слагаемое B)

Характеризует размывание пиков **за счет молекулярной диффузии**, обусловленной миграцией анализируемого вещества в подвижной фазе (газе-носителе).

Эффективность **возрастает** при использовании подвижных фаз, в которых **коэффициенты диффузии низки** при высокой линейной скорости потока.

! В ЖХ **роли не играет**: диффузия в жидкой фазе ничтожно мала.

3. Сопротивление массопередаче

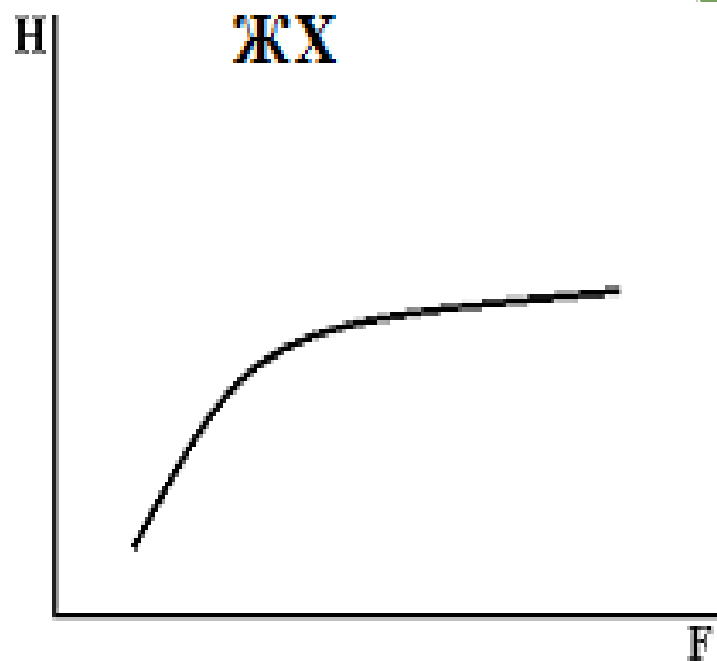
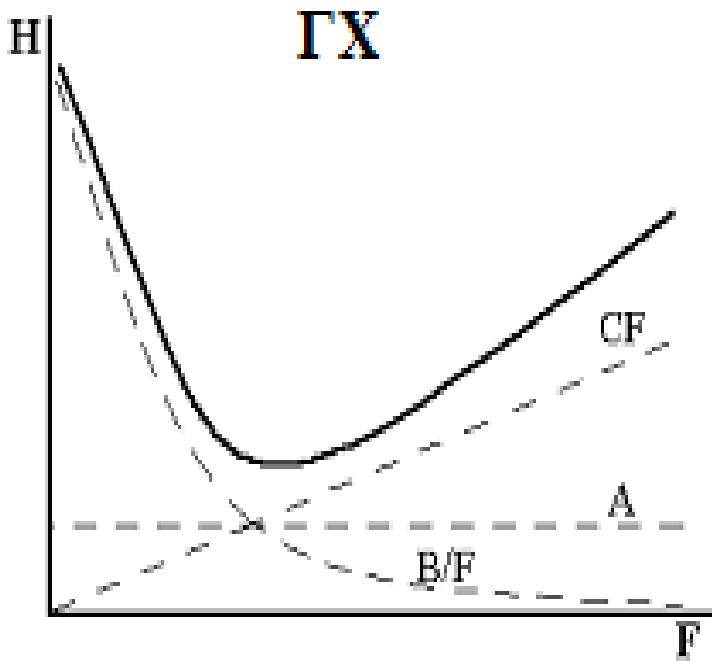
(слагаемое C)

Характеризует размывание пиков за счет сопротивления массопереносу при распределении вещества между подвижной и неподвижной фазой.

Чем меньше толщина слоя жидкости на твердом носителе и чем меньше вязкость этой жидкости, тем быстрее устанавливается равновесие.

Влияние каждого слагаемого уравнения на величину H в зависимости от линейной скорости подвижной фазы:

- ▶ A не зависит от скорости газа - носителя и он весьма низкий в хорошо заполненной колонке.
- ▶ B с ростом скорости газа - носителя уменьшается, а C увеличивается.



Влияние каждого слагаемого уравнения на **величину H** (ВЭТТ) в зависимости от линейной скорости подвижной фазы (F)

При выборе колонки необходимо решать, **уменьшить величину N** или увеличить **время разделения**, повышая скорость потока газа - носителя, но сохраняя приемлемо малое значение **N** .

Поэтому стараются подобрать такую скорость **F** , при которой **B** и **C** компенсировали бы друг друга, а величина **N** была **минимальной**.