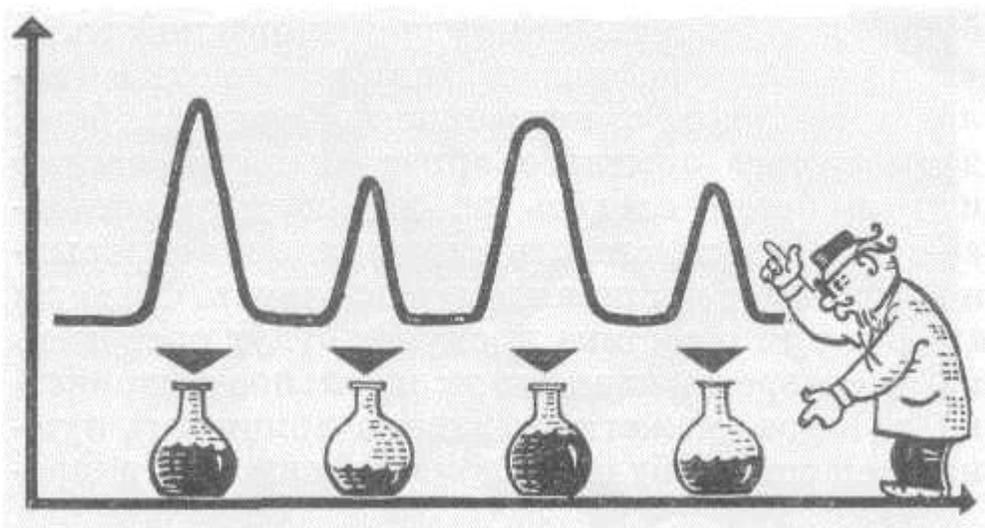


*Физико-  
химические  
методы  
анализа*

# Хроматография



# Основные этапы развития хроматографии

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

**В основе метода хроматографии лежит явление сорбции**

**Сорбция** – процесс поглощения газов, паров и растворенного вещества твердыми или жидкими сорбентами

Виды сорбции

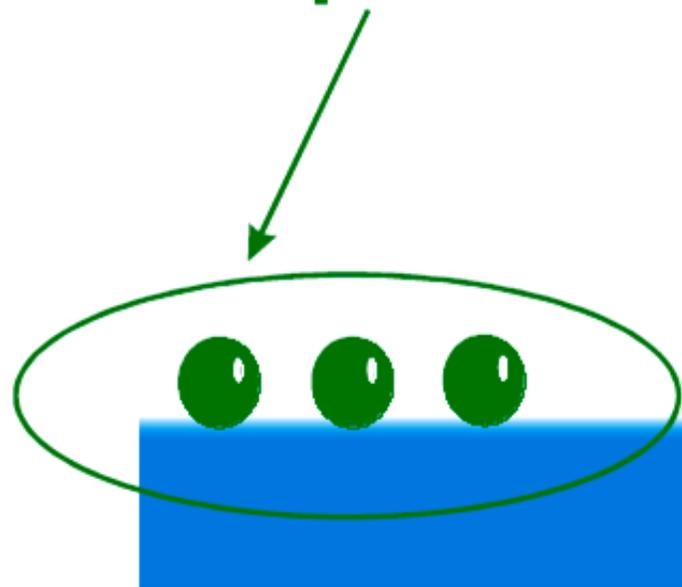
**Адсорбция** – концентрирование вещества на поверхности раздела фаз

**Абсорбция** – распределение веществ между двумя несмешивающимися фазами  
(растворитель и жидкая фаза на твердом носителе)

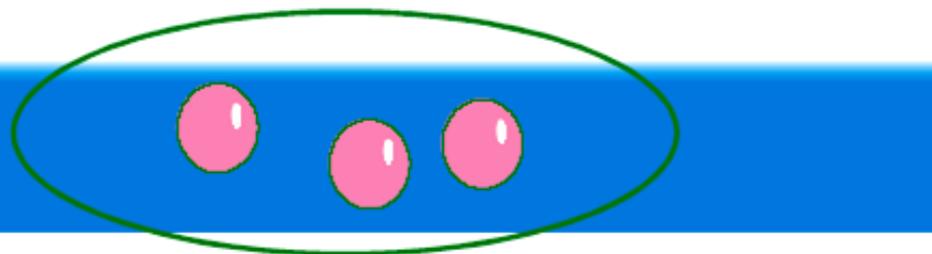
**Капиллярная конденсация** – образование жидкой фазы в порах и капиллярах твердого сорбента при поглощении паров вещества

**Обычно наблюдают смешанный механизм**

адсорбция



абсорбция



**Хроматография** – это физико-химический метод разделения и определения веществ, основанный на многократном повторении актов распределения компонентов между двумя фазами – *подвижной* и *неподвижной*

НФ обычно твердое вещество (сорбент) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество

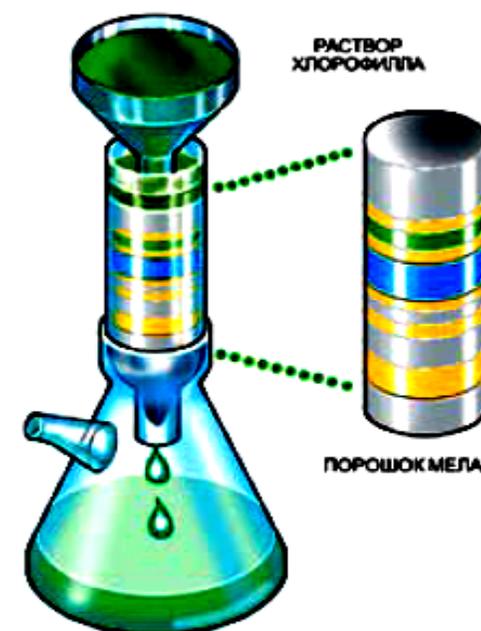
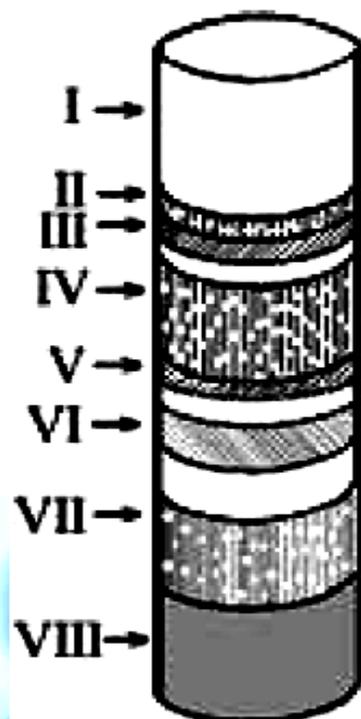
ПФ представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу

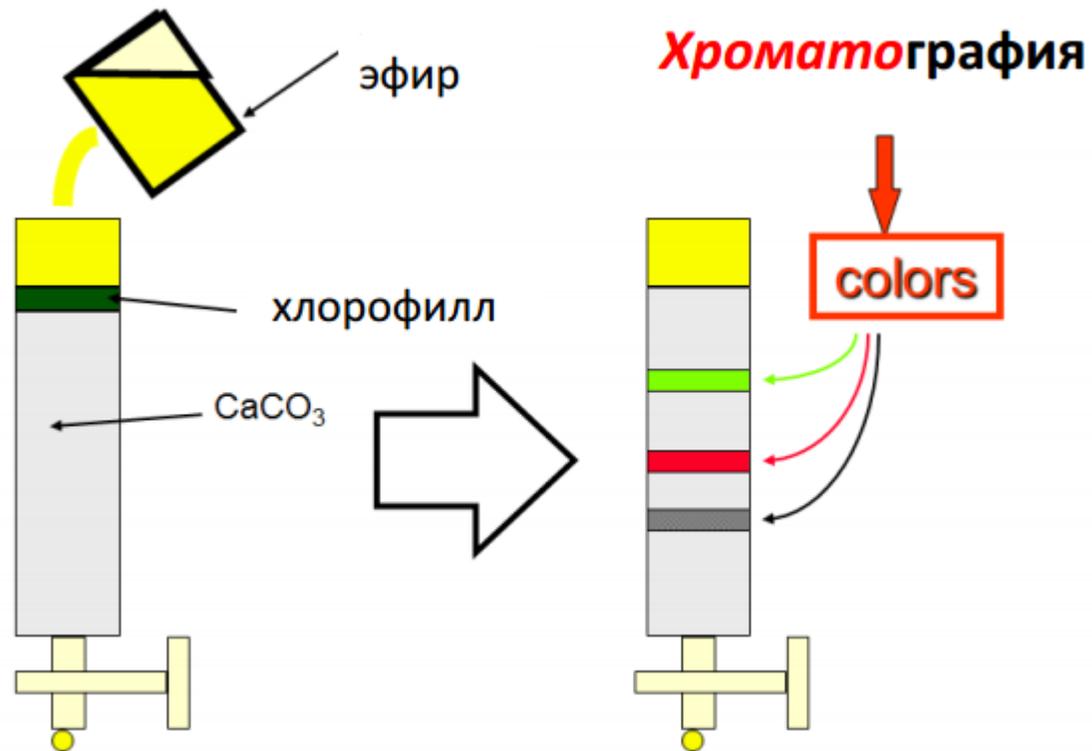
Метод хроматографии  
предложил русский  
ученый-ботаник **М.С.Цвет**,  
который впервые в 1903 г.  
применил явление  
адсорбции для анализа  
зеленой части  
хлорофилловых  
пигментов листьев



# Разделение раствора хлорофилла

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





# Преимущества хроматографии перед другими методами анализа:

- 1. одновременное разделение и анализ веществ**
- 2. высокая эффективность** разделения, т.к. происходит многократность процессов сорбция – десорбция
  - Это обеспечивает эффективность хроматографического метода по сравнению с методами сорбции в статических условиях*
- 3. экономическое преимущество**
- 4. не только разделяет и анализирует, но и препаративно выделяет необходимое вещество**

# Классификация хроматографических методов

по агрегатному состоянию подвижной и неподвижной фаз:

## 1.газовая (подв.)

а. газо-жидкостная(подв. + жидк.) *происходит растворение веществ в жидкой фазе.*

б. газо-твёрдофазная или газо-адсорбционная (подв. + тв.) *газы удерживаются поверхностью*

## 2.жидкостная(подв.)

а. жидкостно-жидкостная или распределительная(подв. + жидк.) *жидкости не смешиваются*

б. жидкостно-твёрдофазная или жидкостно-адсорбционная (подв. + тв.) *вещества удерживаются поверхностью*

# Классификация хроматографических методов

По механизму разделения веществ:

## 1. Адсорбционная

различные способности в сорбции

## 2. Распределительная

разделение веществ происходит на различии растворимостей веществ

## 3. Ионнообменная

разделение веществ происходит в результате различий в способности к ионному обмену

## 4. Активная

на поверхности сорбента присутствуют селективные сорбенты

## 5. Гель-проникающая или Эксклюзионная

основана на различной сорбции веществ разного размера внутри пор сорбента

# Классификация хроматографических методов

По технике выполнения:

## 1. Колоночная

*в колонке находится неподвижная фаза*

## 2. Плоскостная или Планарная

тонкий слой сорбента закрепляется на плоскости инертного вещества.

после чего край вещества погружают в емкость с жидкой фазой. за счет капиллярных свойства жидкость поднимается по сорбенту.. различные вещества имеют разную скорость. (могут окрашивать в разные цвета)

*используется для качественного анализа.*

# Классификация хроматографических методов

По относительной полярности подвижных и неподвижных фаз:

**Полярность** - заряд в молекулах фаз.

- полярность может быть привита неполярной молекуле путем нанесения на её поверхность другого вещества (пример :бензин на силикагель)

## 1. Нормально-фазная

*неподвижная фаза более полярна*

*Пример :карбонат кальция более полярен..... силикагель более полярен.*

## 2. Обращённо-фазная

*подвижная фаза более полярна чем неподвижная*

# Классификация хроматографических методов

По способу проведения процесса разделения:

Полярность - заряд в молекулах фаз.

## 1. Фронтальная

*через колонку непрерывно пропускается анализируемая смесь*

## 2. Проявительная

*через колонку непрерывно пропускается анализируемая смесь, далее добавляется компонент -проявитель*

## 3. Вытеснительная

*Вводится анализируемая смесь компонентов, Затем колонка промывается более сорбирующим компонентом.*

*Т.о. Происходит последовательное вытеснение компонентов смеси.*

## Фронтальный метод

Через хроматографическую колонку с сорбентом *непрерывным потоком* пропускают раствор или газовую смесь исследуемых веществ,

сорбируемость которых увеличивается в ряду  $A < B < C$

Соответственно этому компоненты располагаются в колонке

Однако они разделяются не полностью. В чистом виде можно выделить лишь часть наименее сорбирующегося компонента; он движется вдоль слоя сорбента впереди остальных

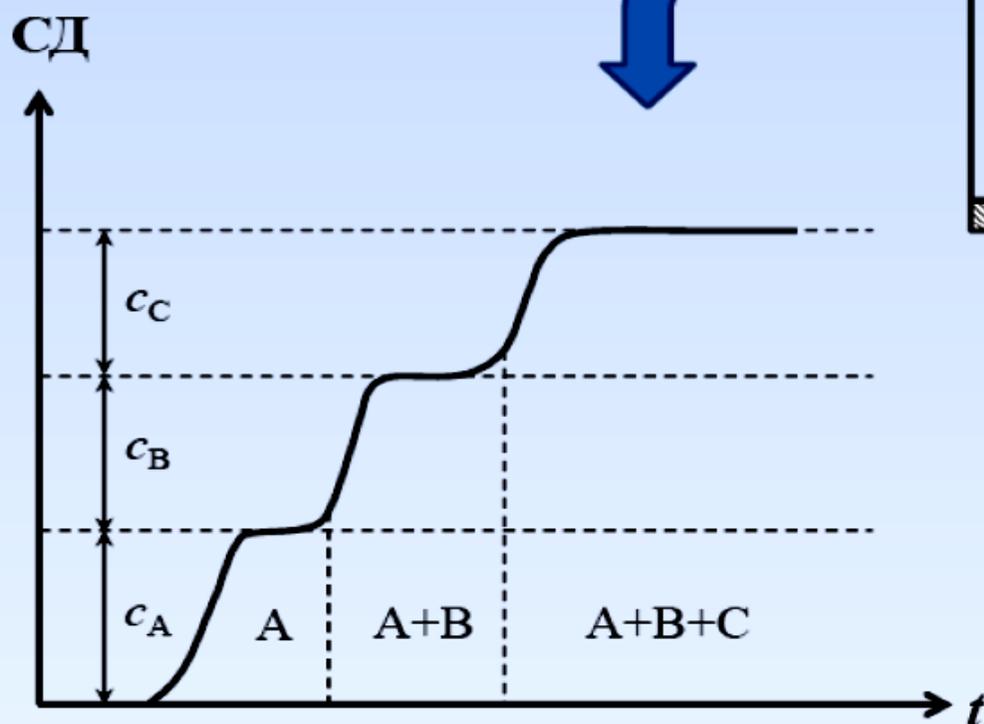
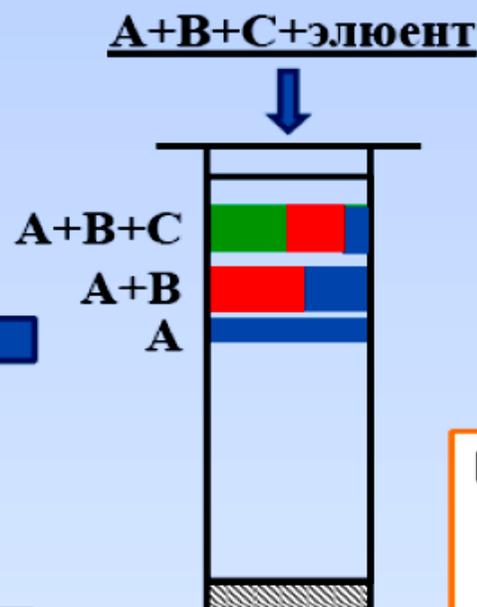
За зоной компонента А следует в непосредственном контакте зона, содержащая смесь компонентов А и В. Третья зона содержит смесь первого, второго и третьего компонентов

В некоторый момент времени сорбент насыщается, и наступает «проскок», т.е. из колонки начинают выходить компоненты в соответствии с их сорбируемостью

# Фронтальная хроматография (ФХ)

Наиболее проста в выполнении

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



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

# Вытеснительный метод

После введения порции исследуемой смеси колонку промывают подвижной фазой, к которой **добавлено вещество (вытеснитель), обладающее большей сорбируемостью**, чем любое из компонентов смеси:

$$A < B < C < D$$

По мере продвижения по колонке элюент вытесняет вещество *C*, которое в свою очередь вытесняет вещество *B* и т.д.

*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

В аналитических целях метод не используется, т.к. невозможно количественно получить компоненты разделяемой смеси

**Для препаративных целей** метод не потерял значения, так как высокоактивные и доступные адсорбенты (например, активированные угли) позволяют достигнуть высокой производительности

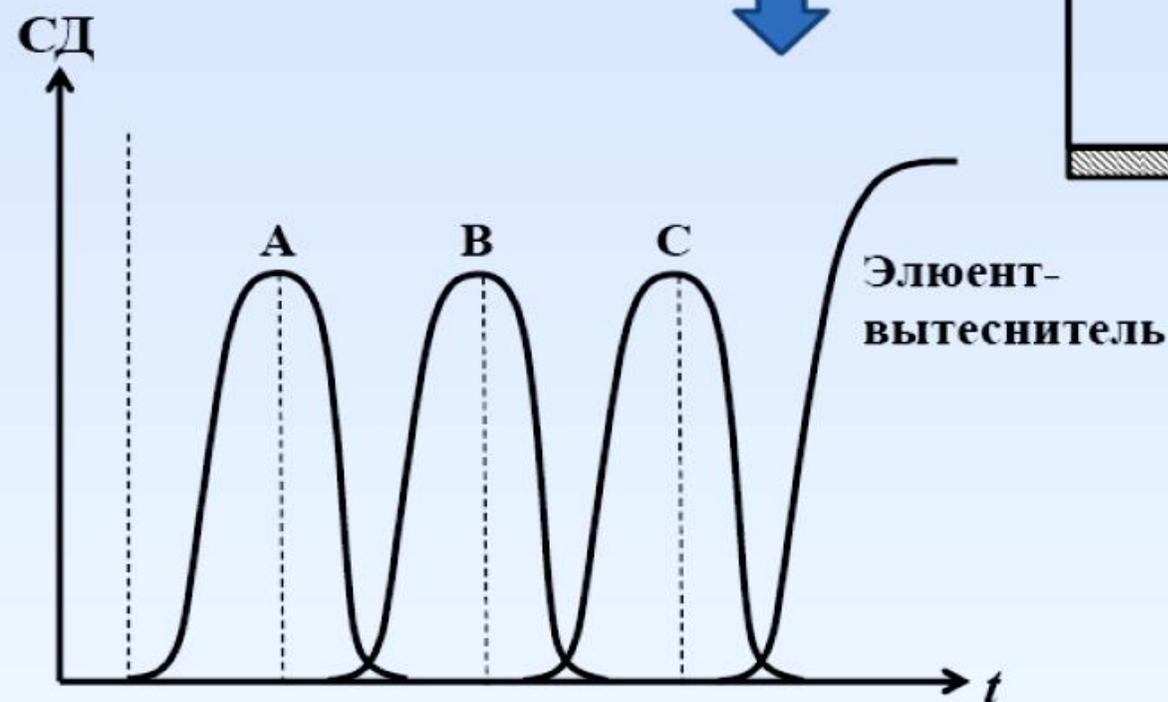
Еще одно достоинство метода - зоны не размываются в отличие от проявительного анализа

## а Вытеснительная хроматография (ВХ)

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



Элюент-вытеснитель



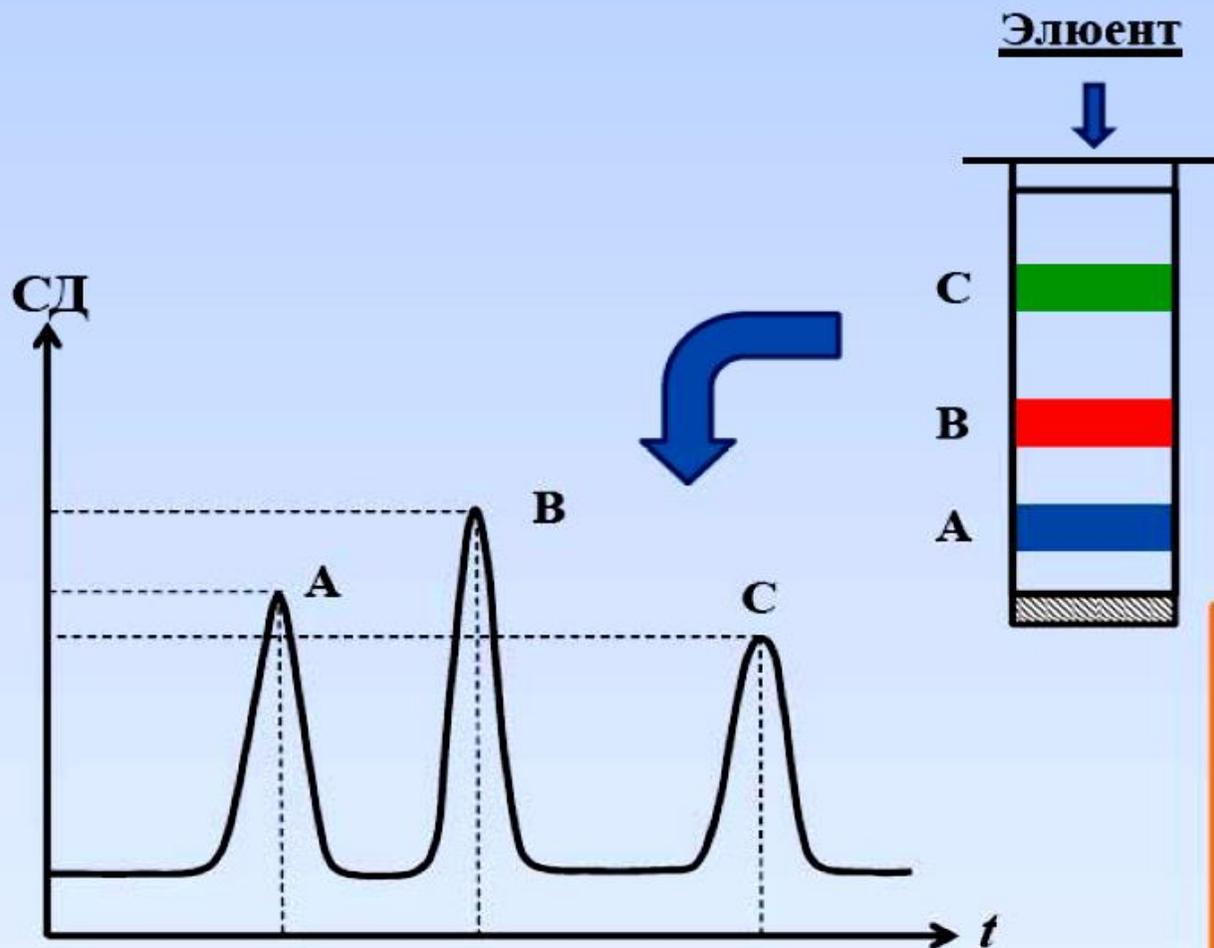
- Компоненты смеси не разбавляются р-телем, поэтому их концентрации мало изменяется
- Недостаток – образование между зонами разделяемых в-в смешанной зоны, содержащей два компонента.
- Метод редко применяется в анализе, но используется в препаративных целях

# Элюентная (проявительная) хроматография (ЭХ)

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



Элюент



**ЭХ позволяет разделять многокомпонентные смеси**

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

# Классификация методов хроматографии

По агрегатному  
состоянию фаз

Газовая  
хроматография

Жидкостная  
хроматография

По механизму  
взаимодействия  
сорбент-сорбат

Адсорбционная  
хроматография

Распределительная  
хроматография

Осадочная  
хроматография

Ионообменная  
хроматография

Эксклюзионная  
хроматография

Аффинная  
хроматография

По способу  
перемещения фаз

Проявительная  
хроматография

Фронтальная  
хроматография

Вытеснительная  
хроматография

По цели  
применения

Аналитическая  
хроматография  
(качественный и  
количественный  
анализ)

Препаративная  
хроматография

Промышленная  
хроматография

# Плоскостная хроматография

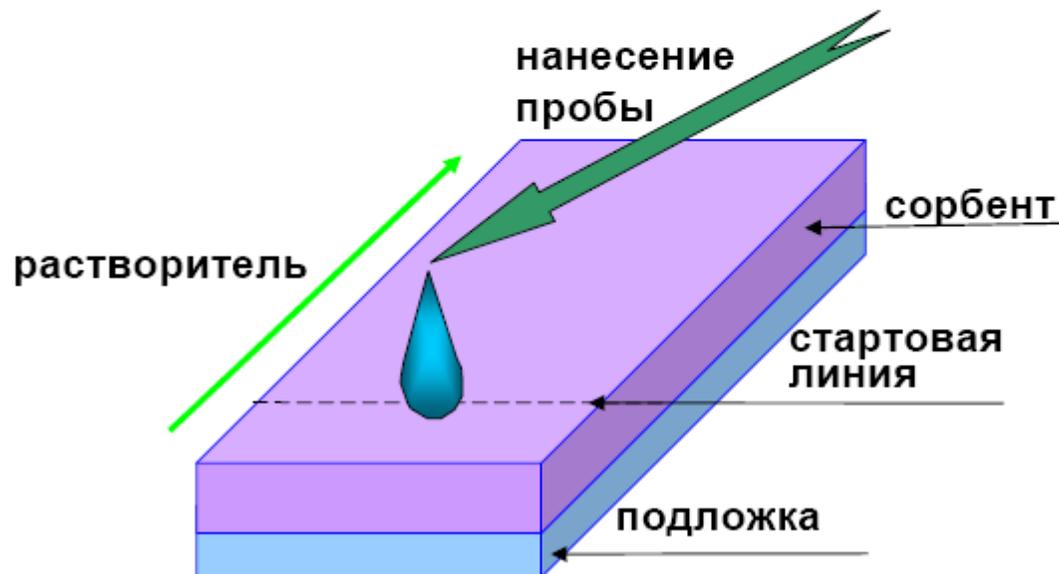
## Подложка

- стекло
- пластмасса
- алюминий

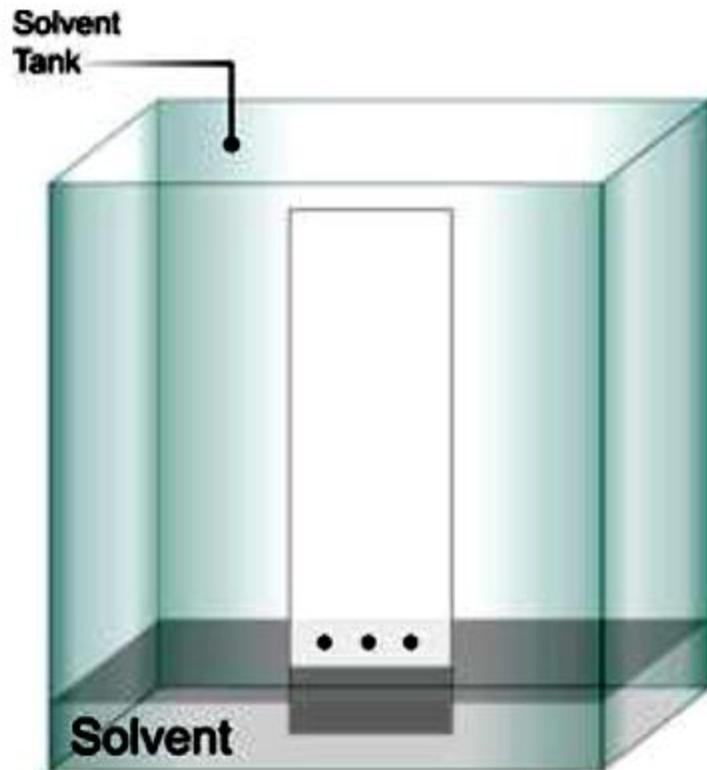
+

## Сорбент

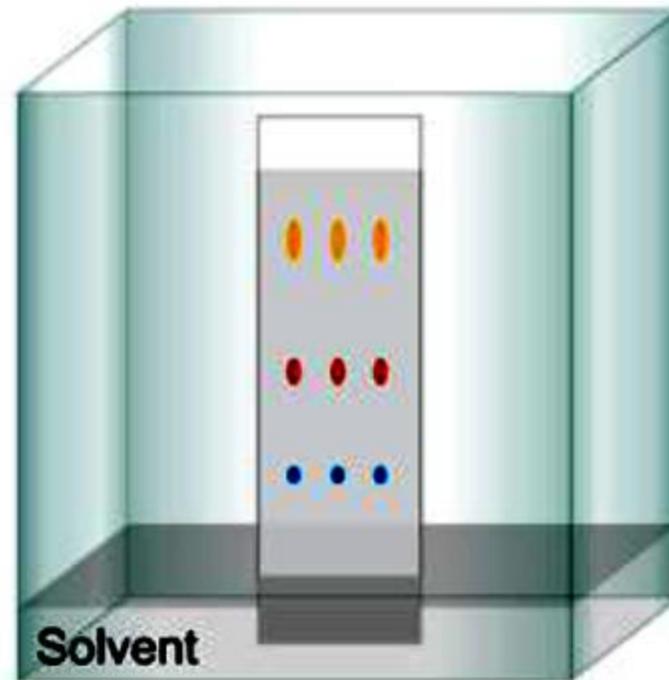
- силикагель
- целлюлоза
- оксид алюминия



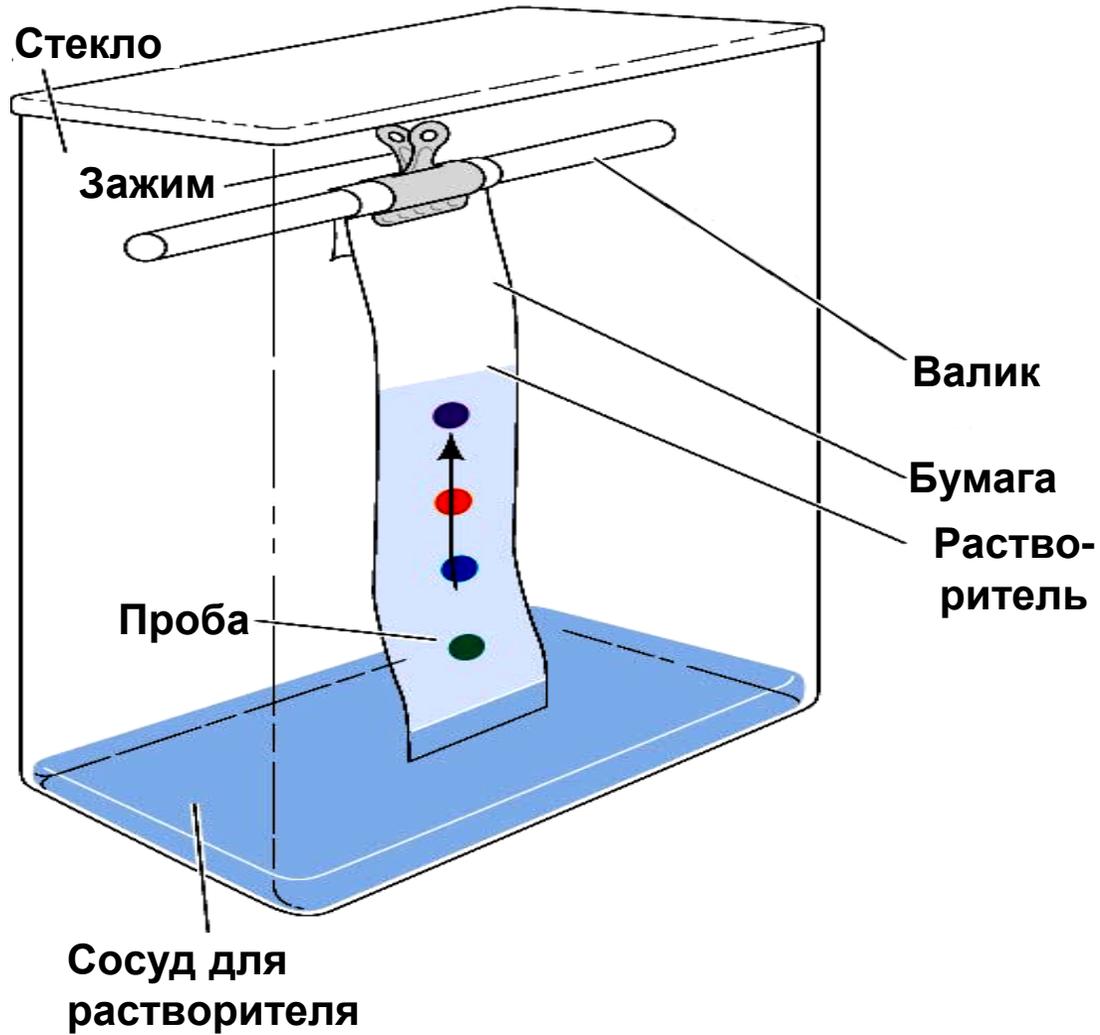
# Восходящая тонкослойная хроматография



Time Zero

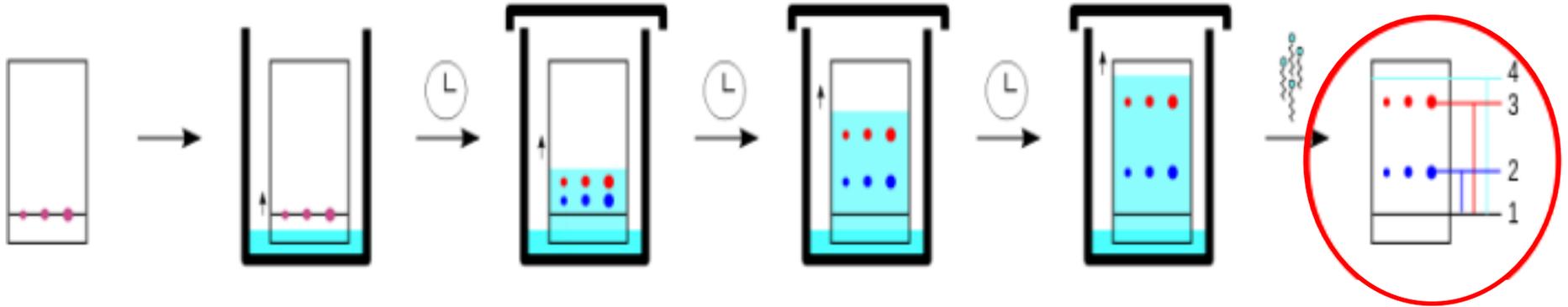


After Ten Minutes



**Устройство камеры для бумажной хроматографии**

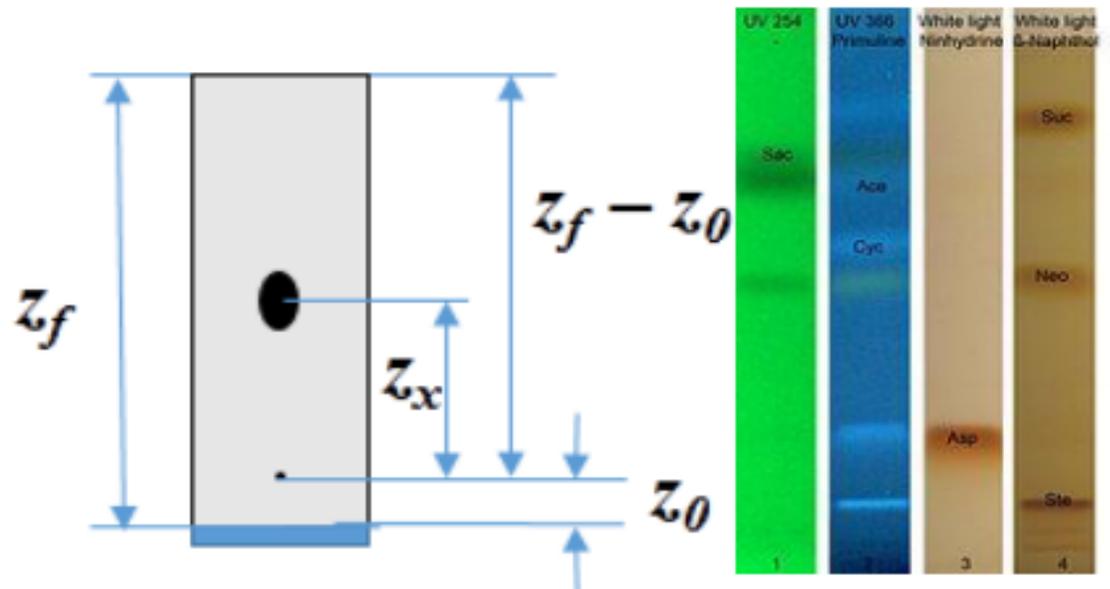
ТСХ является планарной разновидностью жидкостной хроматографии, в которой подвижная фаза движется в пористой среде слоя адсорбента



Элюирование в ТСХ: 1. Линия старта; 2. Зоны первого вещества; 3. Зоны второго вещества; 4. Линия фронта

$$R_f = \frac{z_x}{z_f - z_0}$$

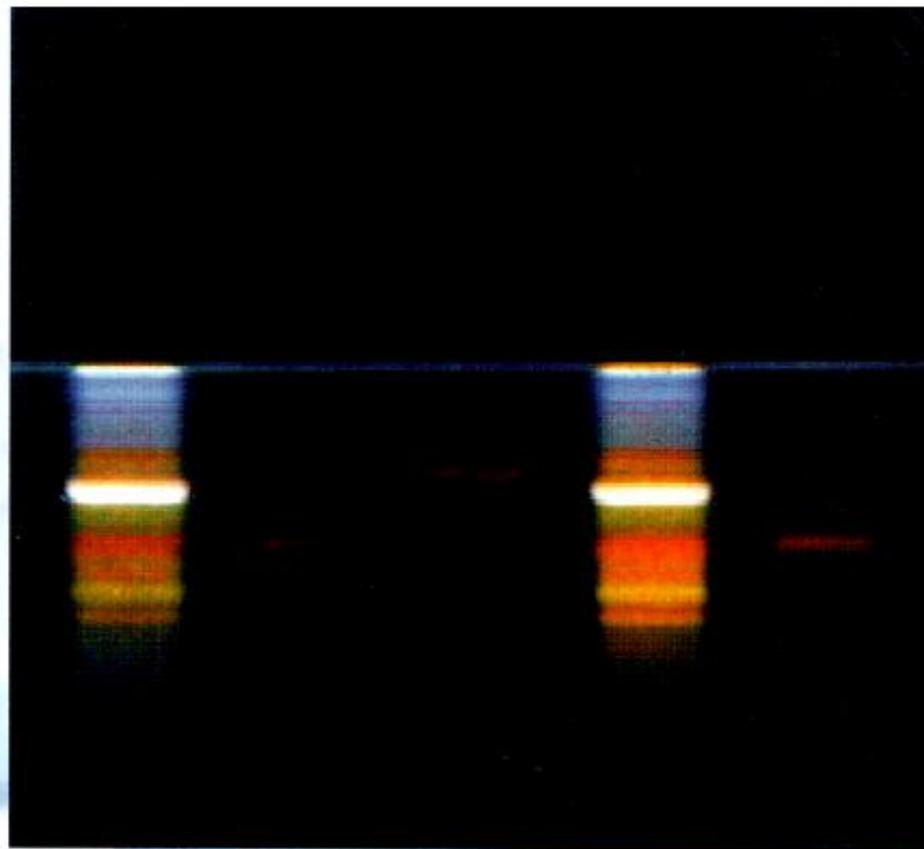
где  
 $R_f$  - коэффициент удерживания,  
 $z_x$  - расстояние, пройденное  
 зоной,  
 $z_f - z_0$  - расстояние от  
 линии старта до фронта  
 растворителя.



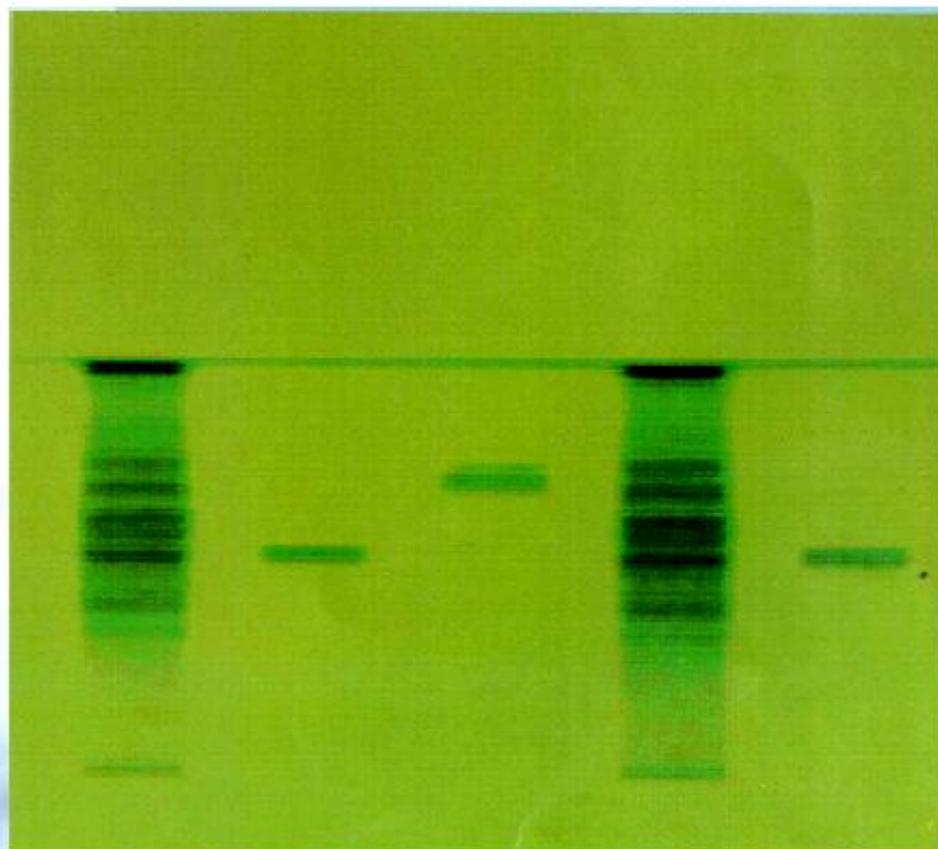


**УФ-облучатель для обнаружения веществ на хроматограммах**

## Наблюдения под УФ-светом



366 нм

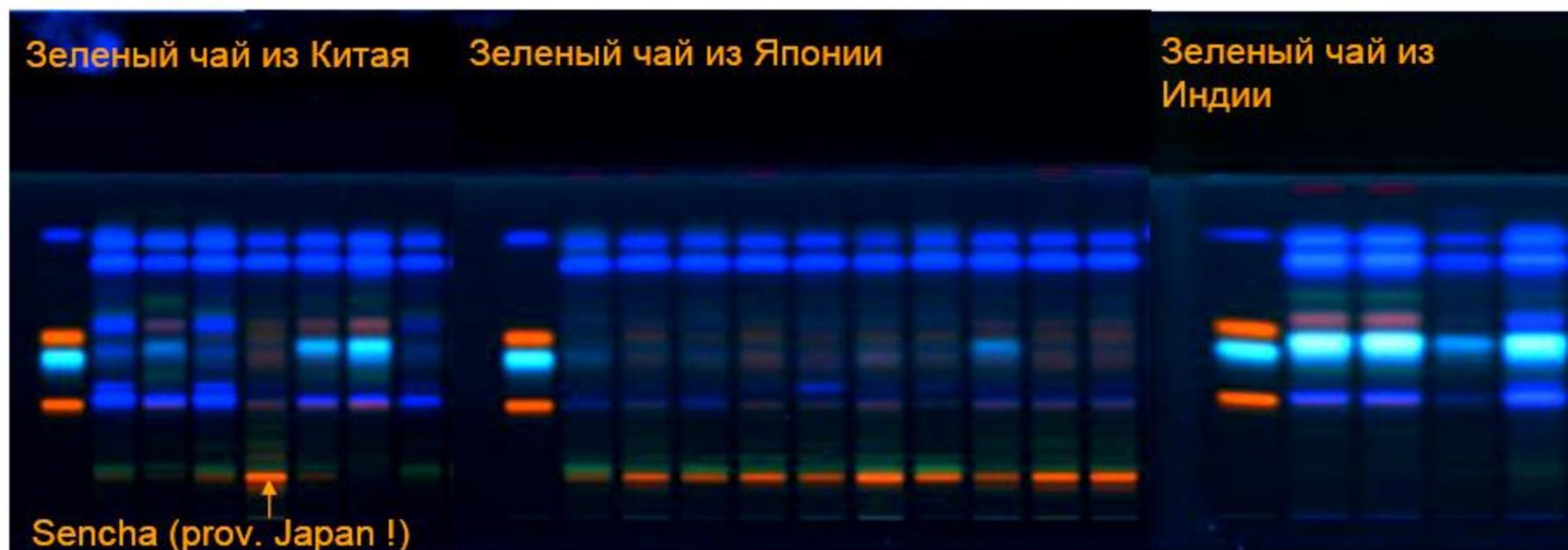


254 нм

# «Отпечатки пальцев» образцов зеленого чая из разных географических зон

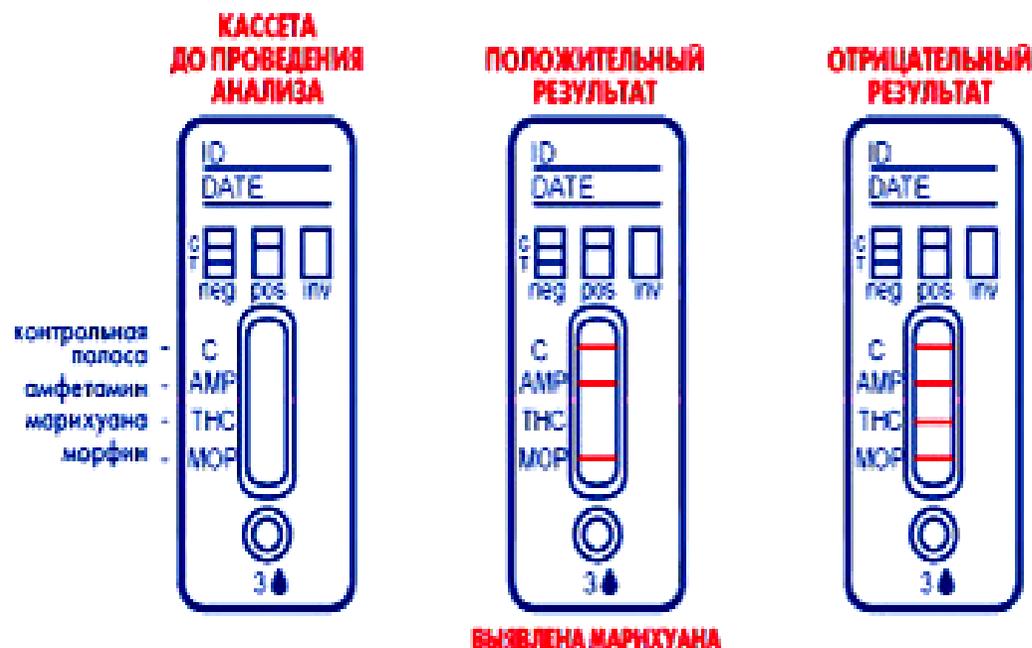


Травы, фито  
препараты



## Инструкция по применению:

- Вскрыть пакет, извлечь кассету и положить её на горизонтальную поверхность.
- С помощью пипетки внести 3 капли образца мочи в круглое окошко кассеты и оценить результат в течение 1-5 минут.



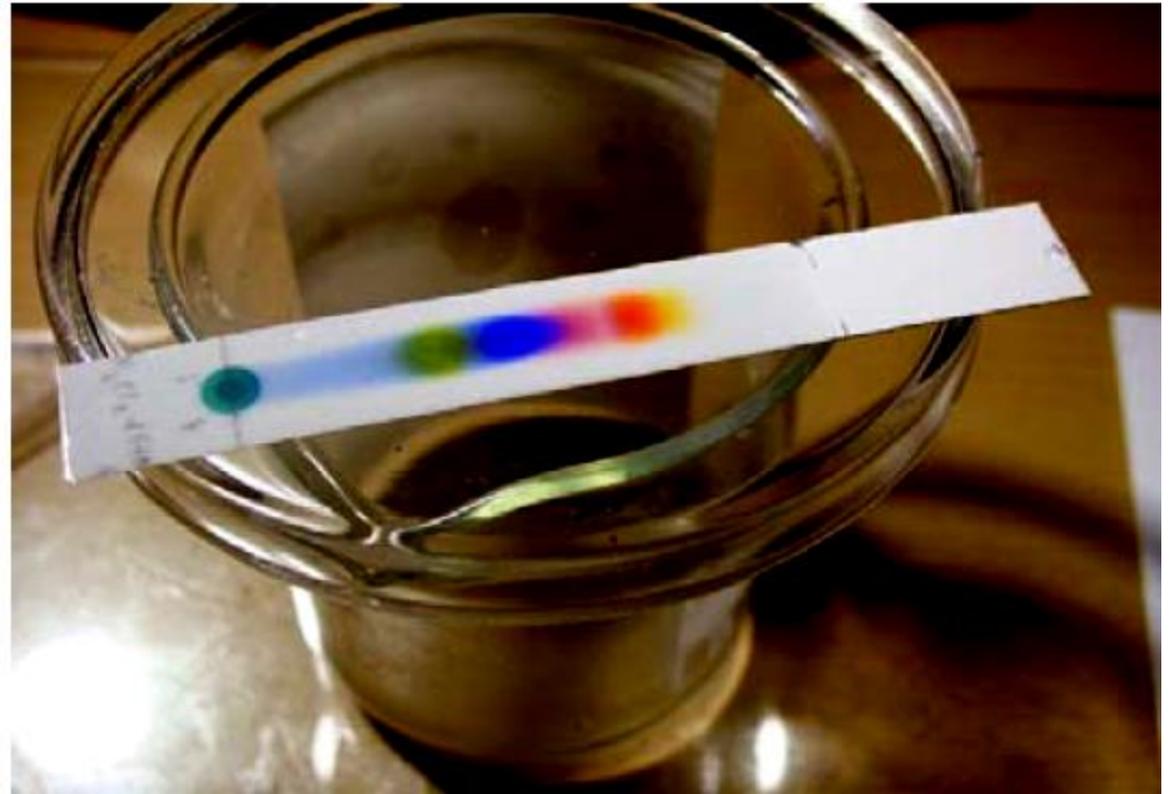
Только для  
in vitro  
диагностики

Чувствительность:  
MOR (морфин) - 300нг/мл  
THC (марихуана) - 50нг/мл  
AMP (амфетамин) - 1000нг/мл

Экспресс-тест для выявления 3 видов наркотиков  
(морфин, марихуана, амфетамин)

## Достоинства метода ТСХ:

- ✚ прост по технике выполнения
- ✚ позволяет анализировать микрообъекты
- ✚ экспрессен
- ✚ не требует дорогостоящего оборудования



# ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ



Клиника



Продукты  
питания



Фарма



Травы, фито  
препараты



Косметика



Промышленное  
применение

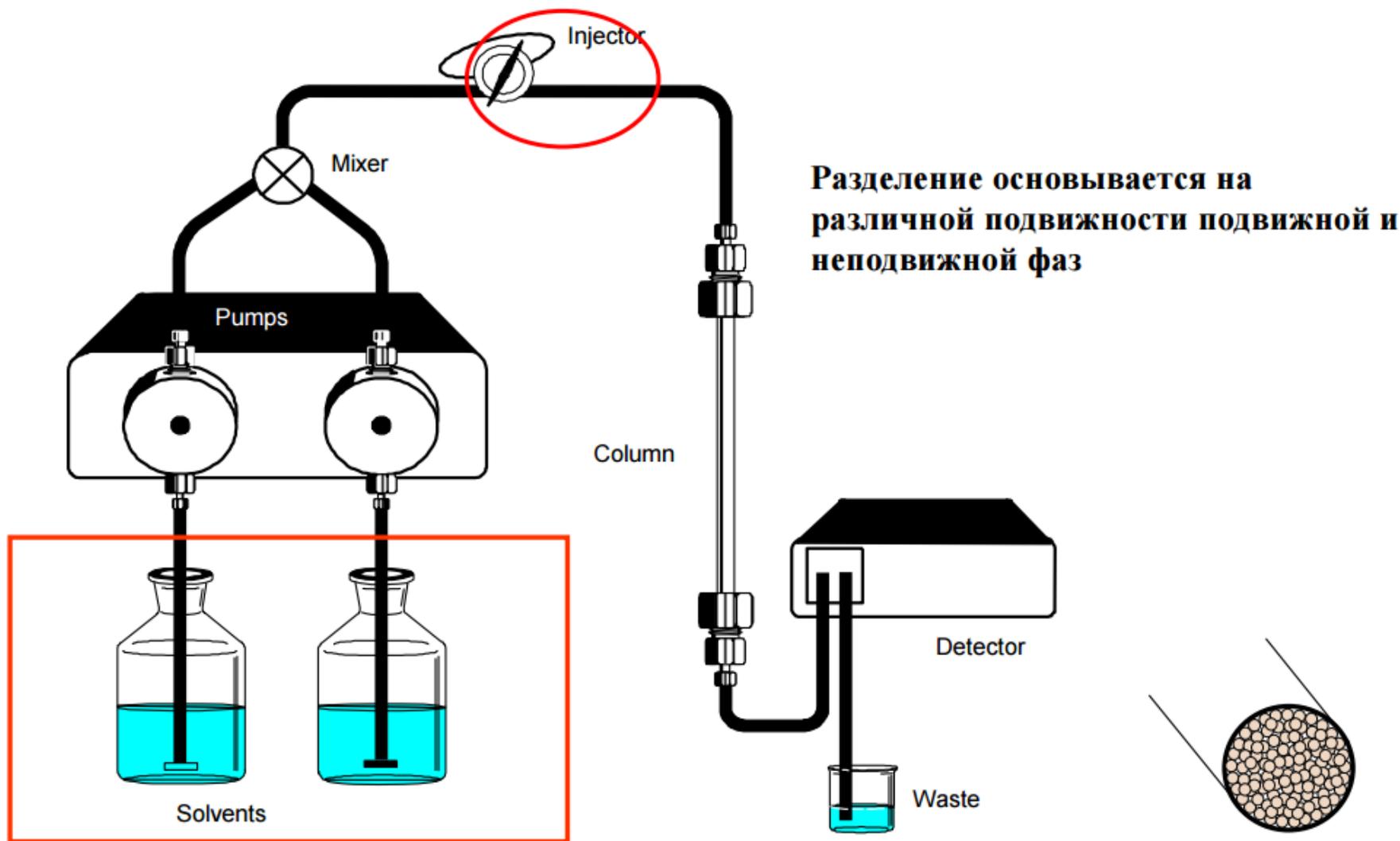


Криминалистика

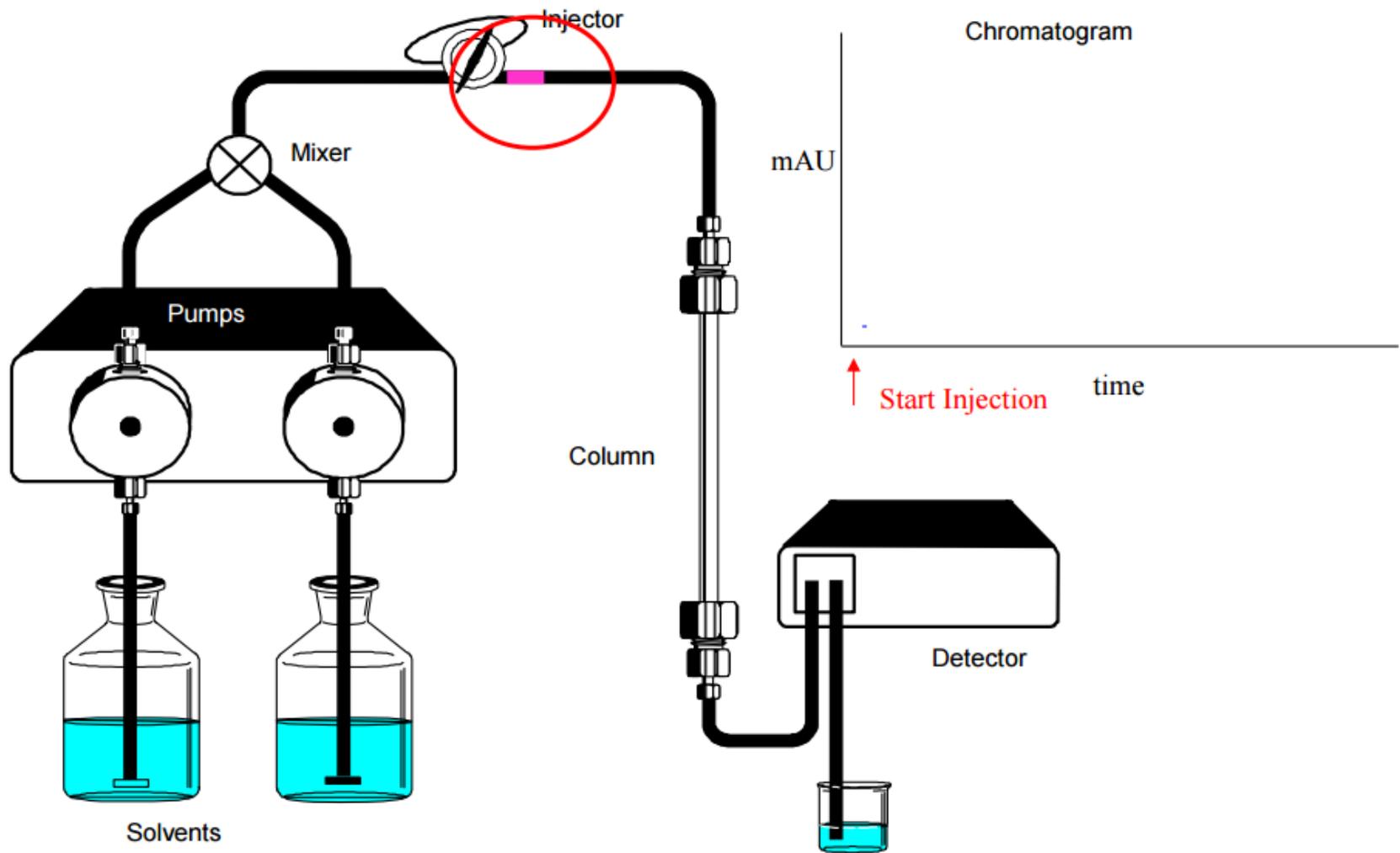


Окружающая  
среда

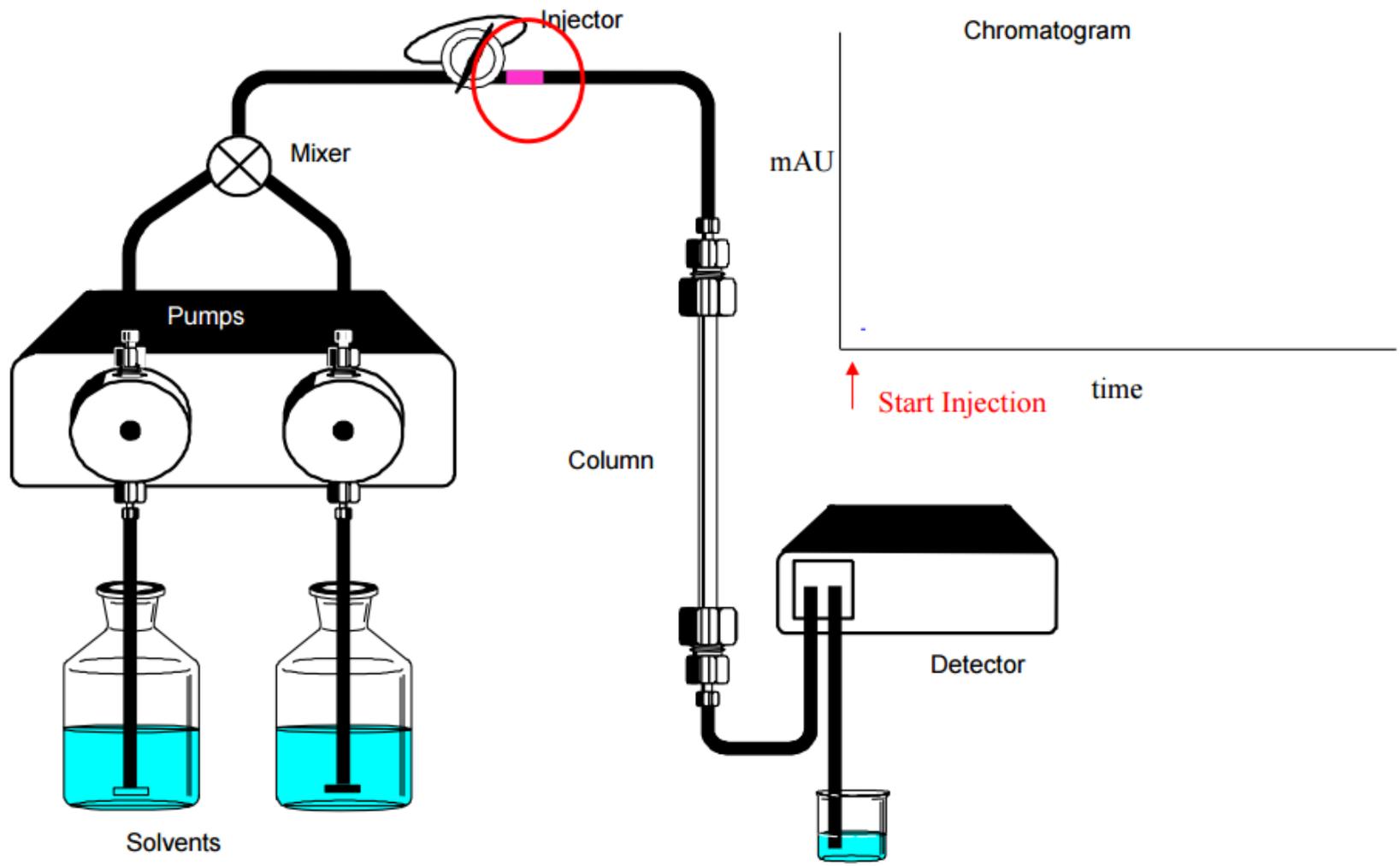
# Жидкостная хроматография

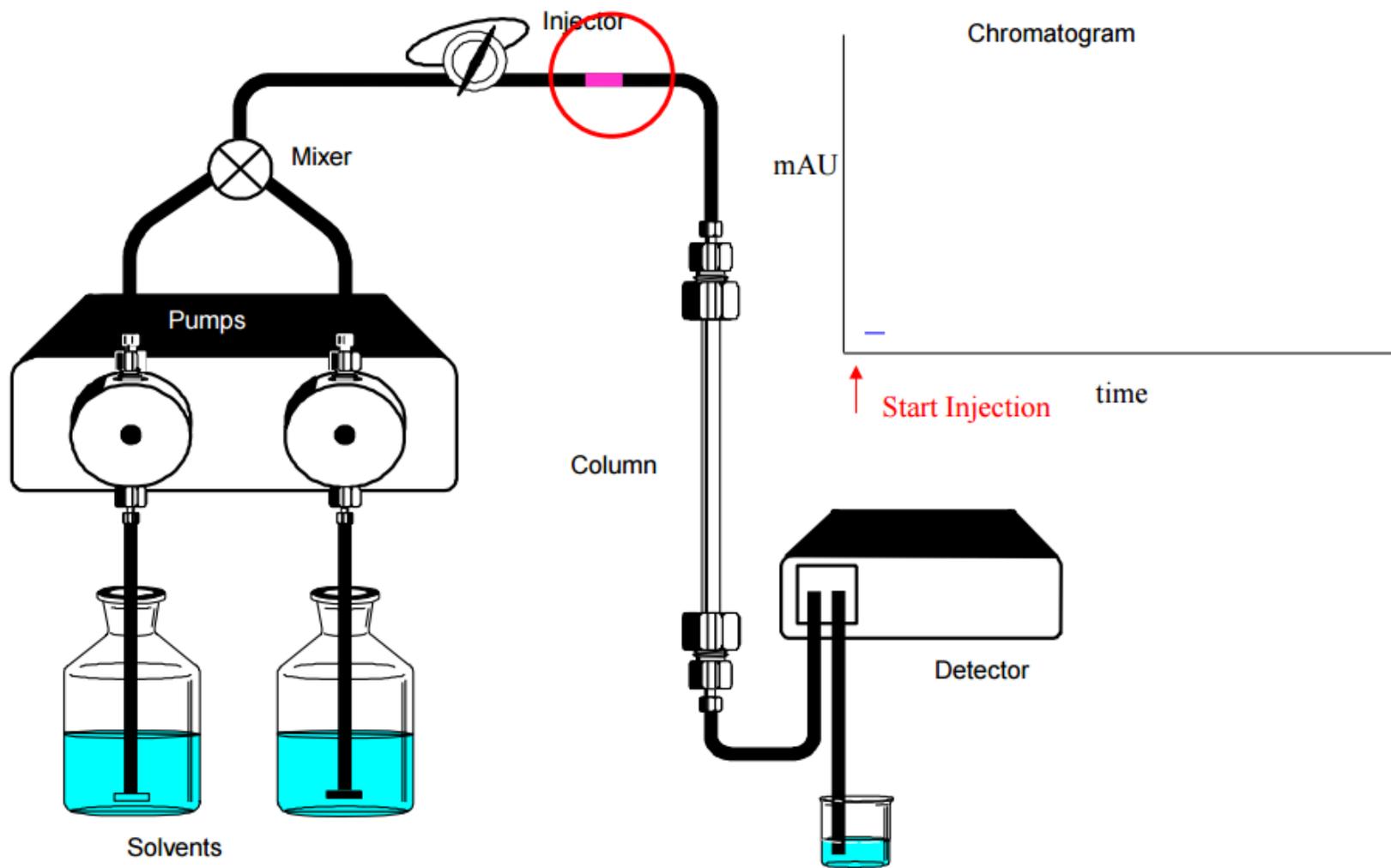


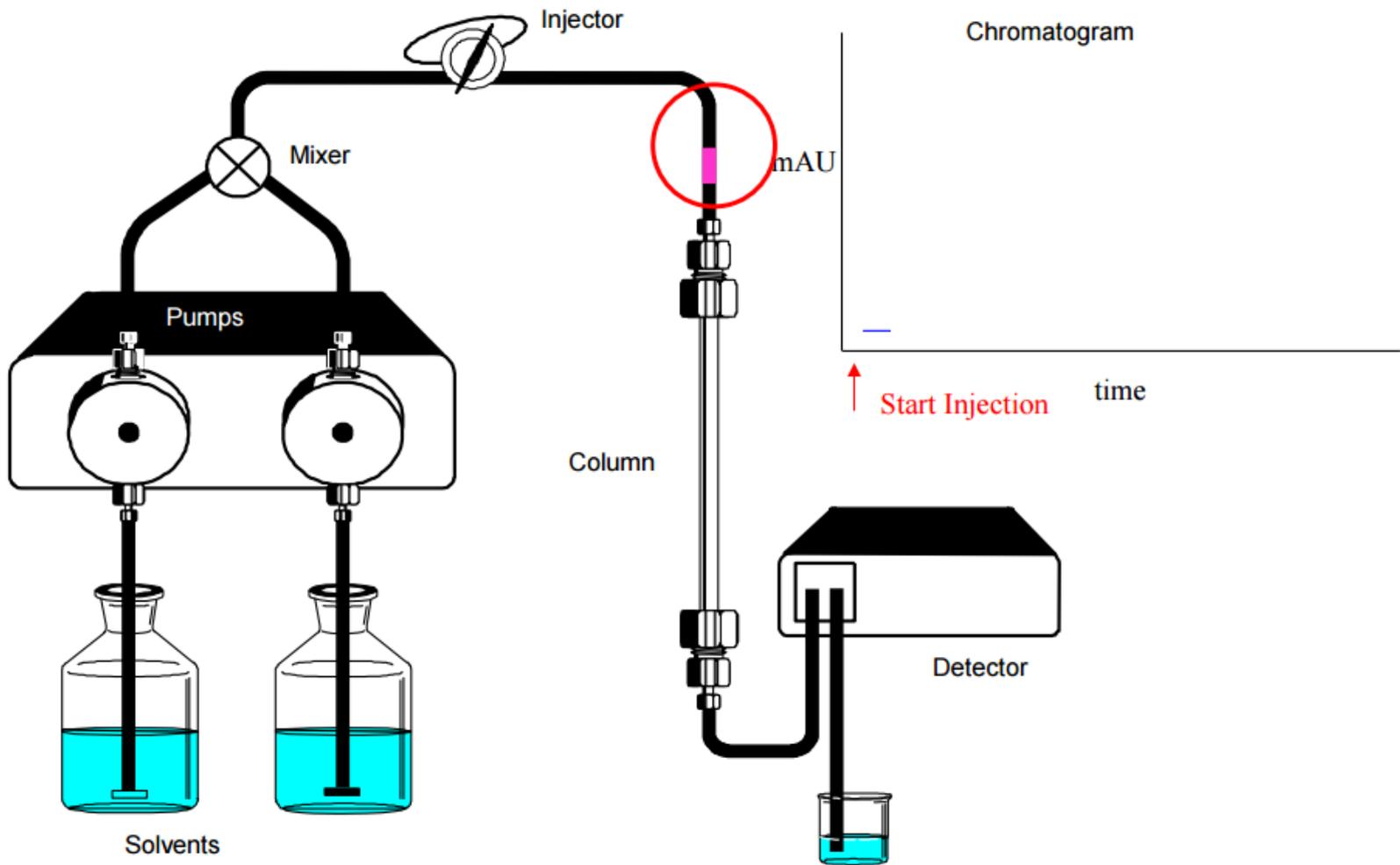
High Performance Liquid Chromatograph

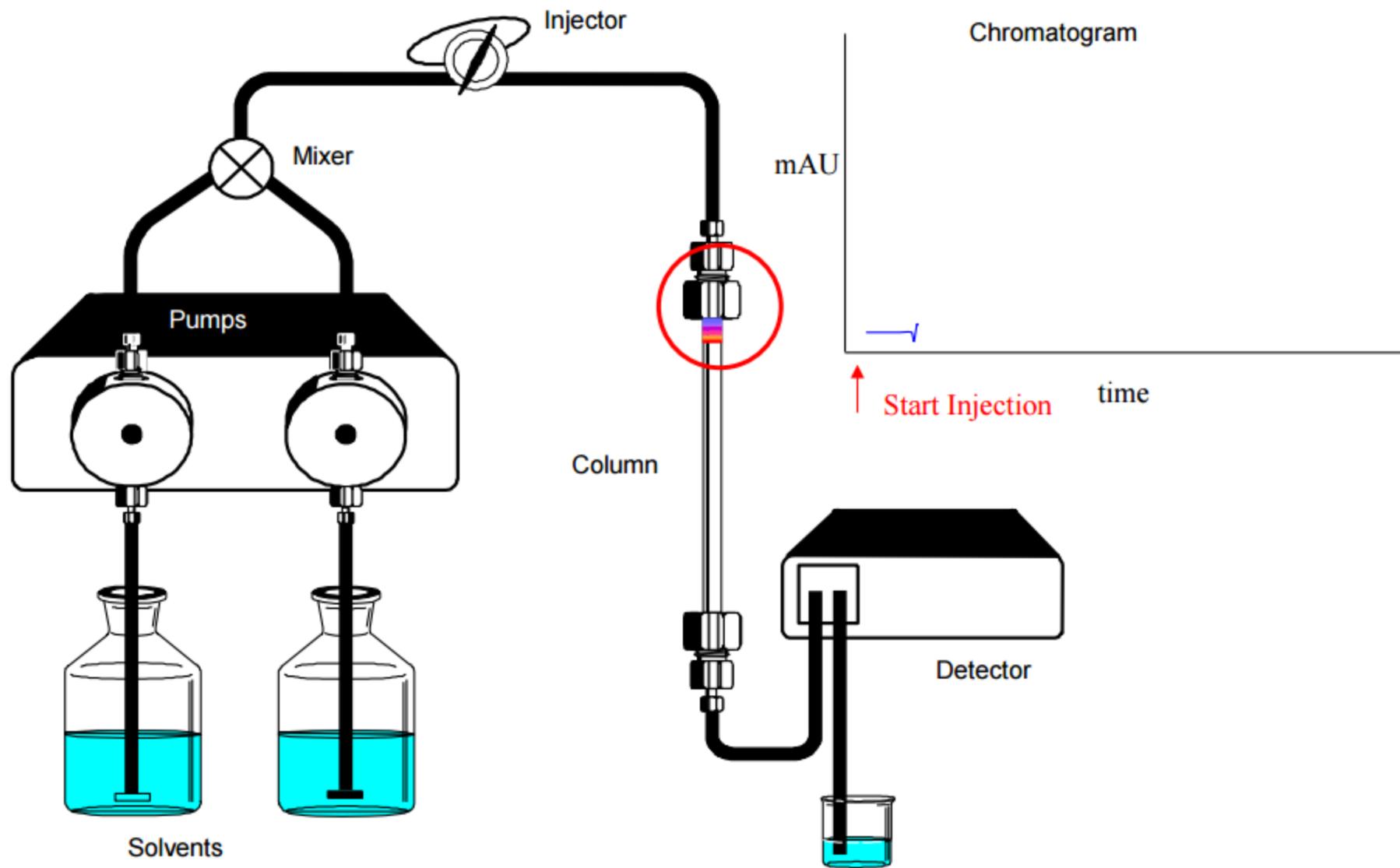


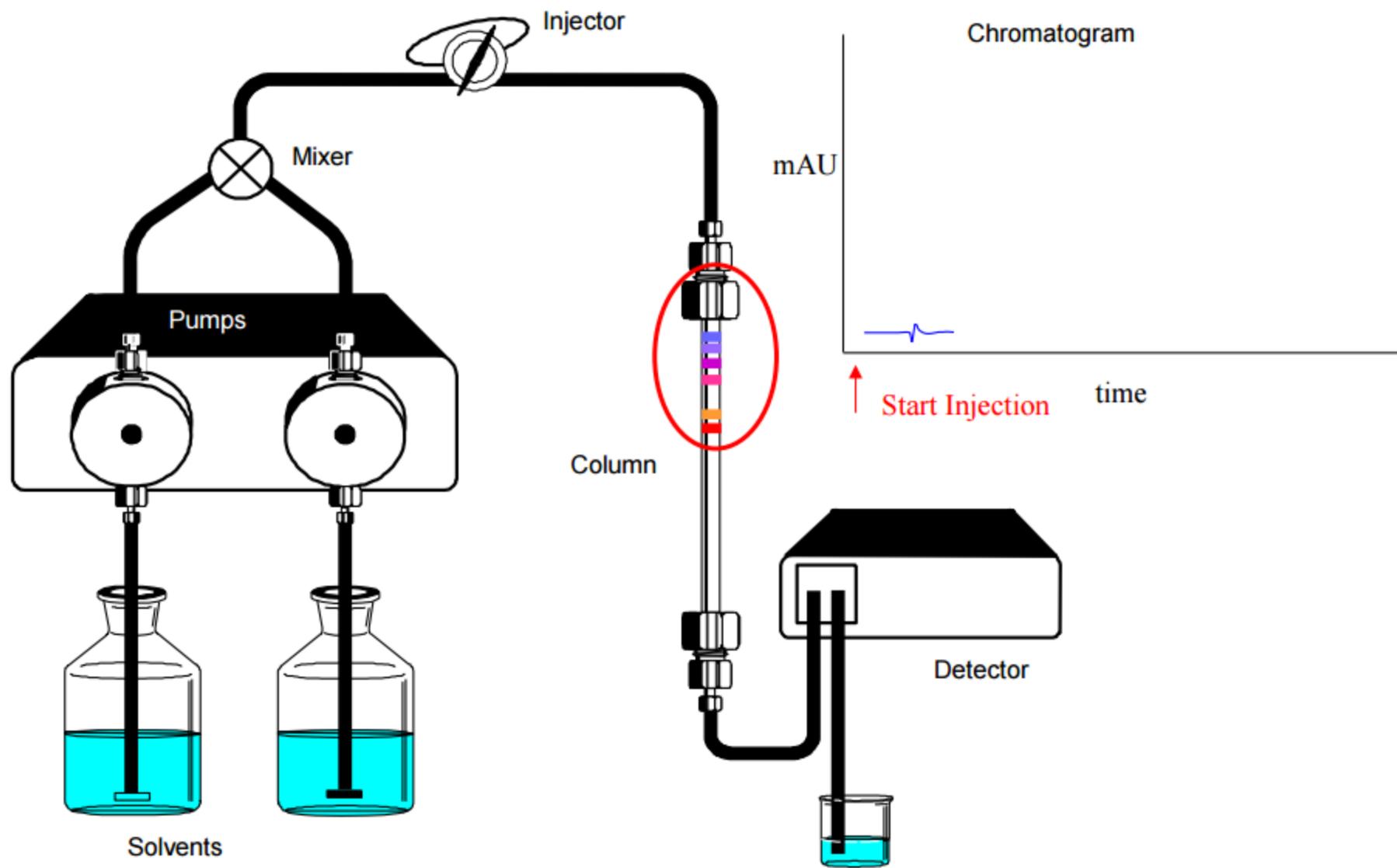
High Performance Liquid Chromatograph

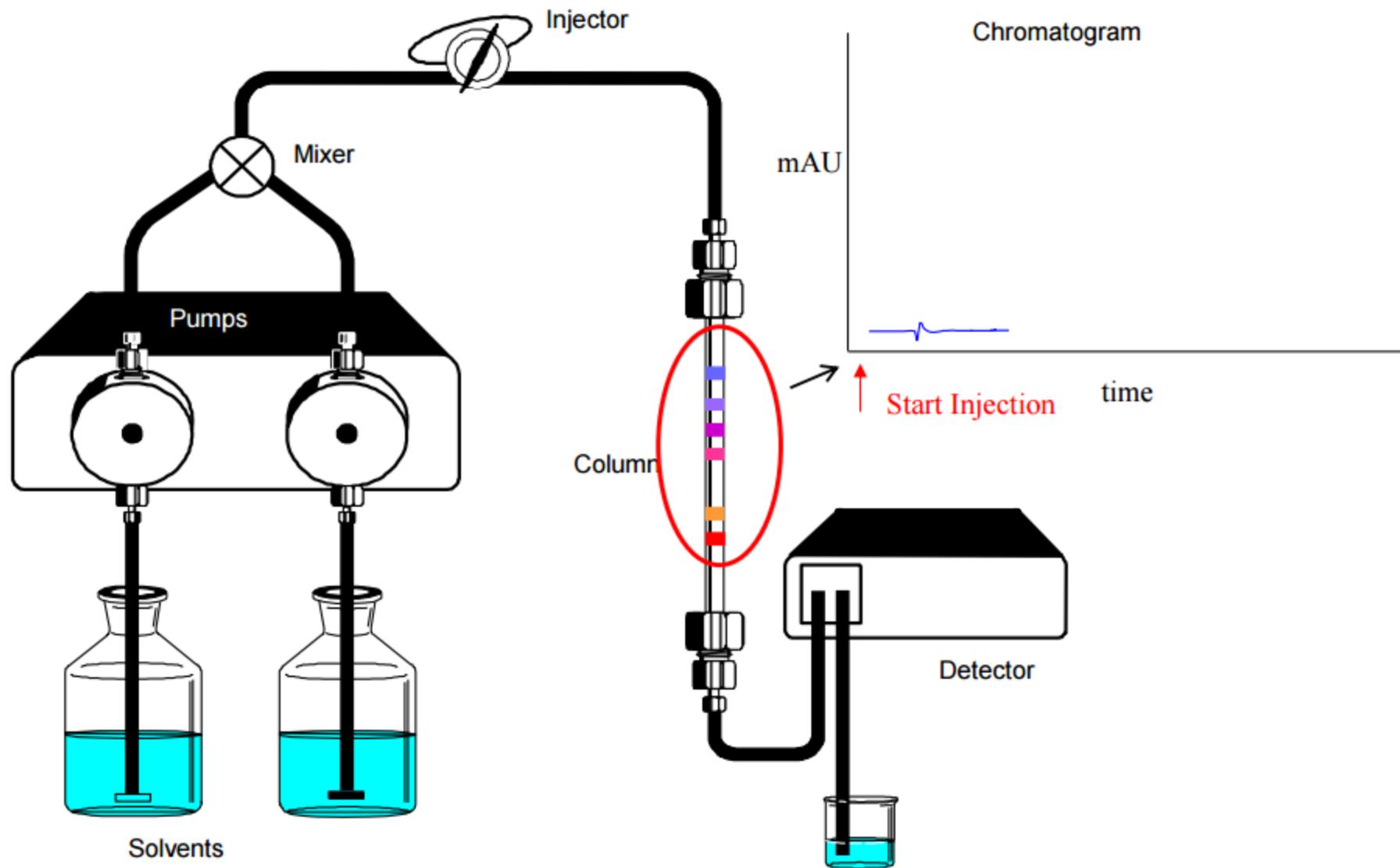


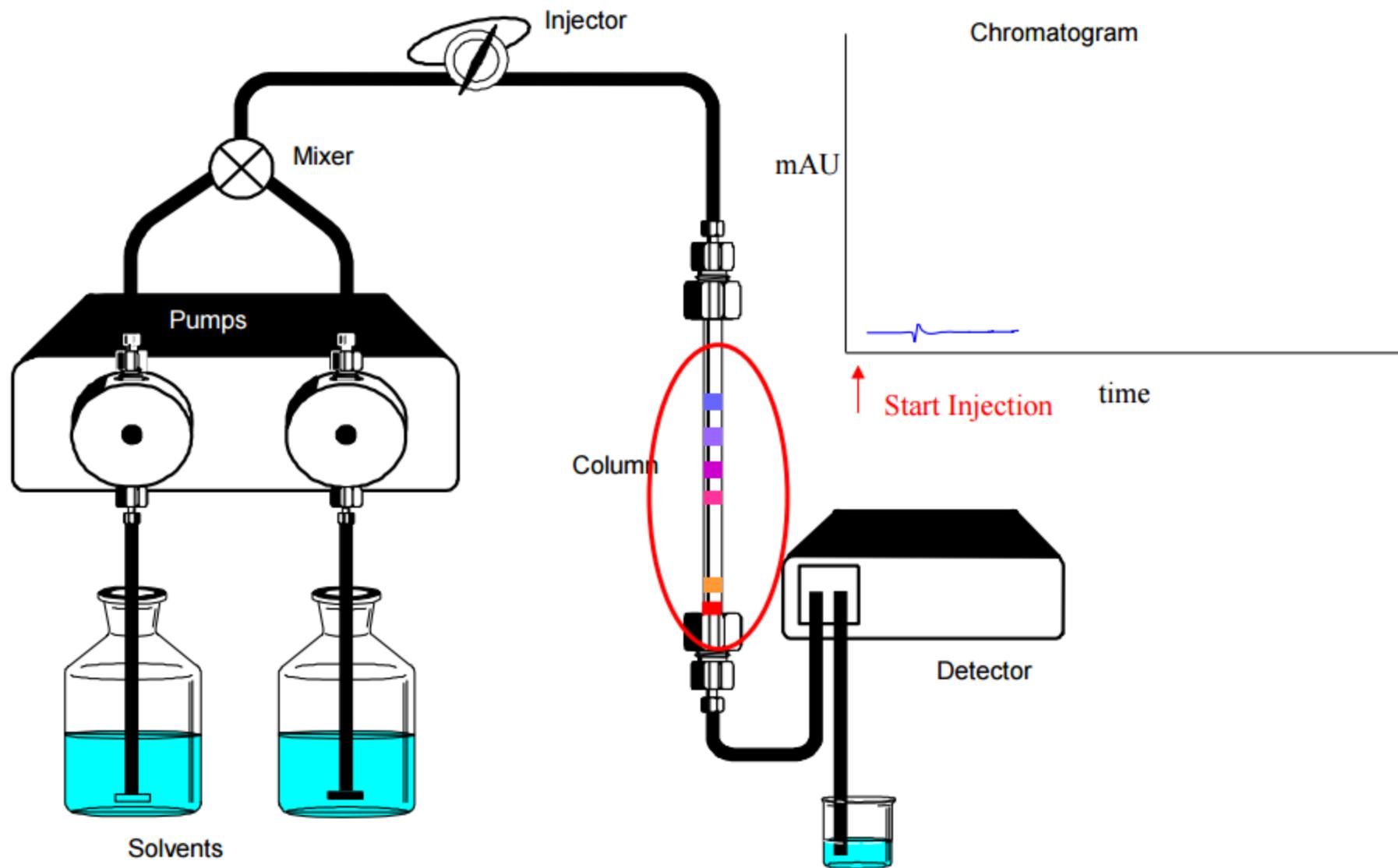


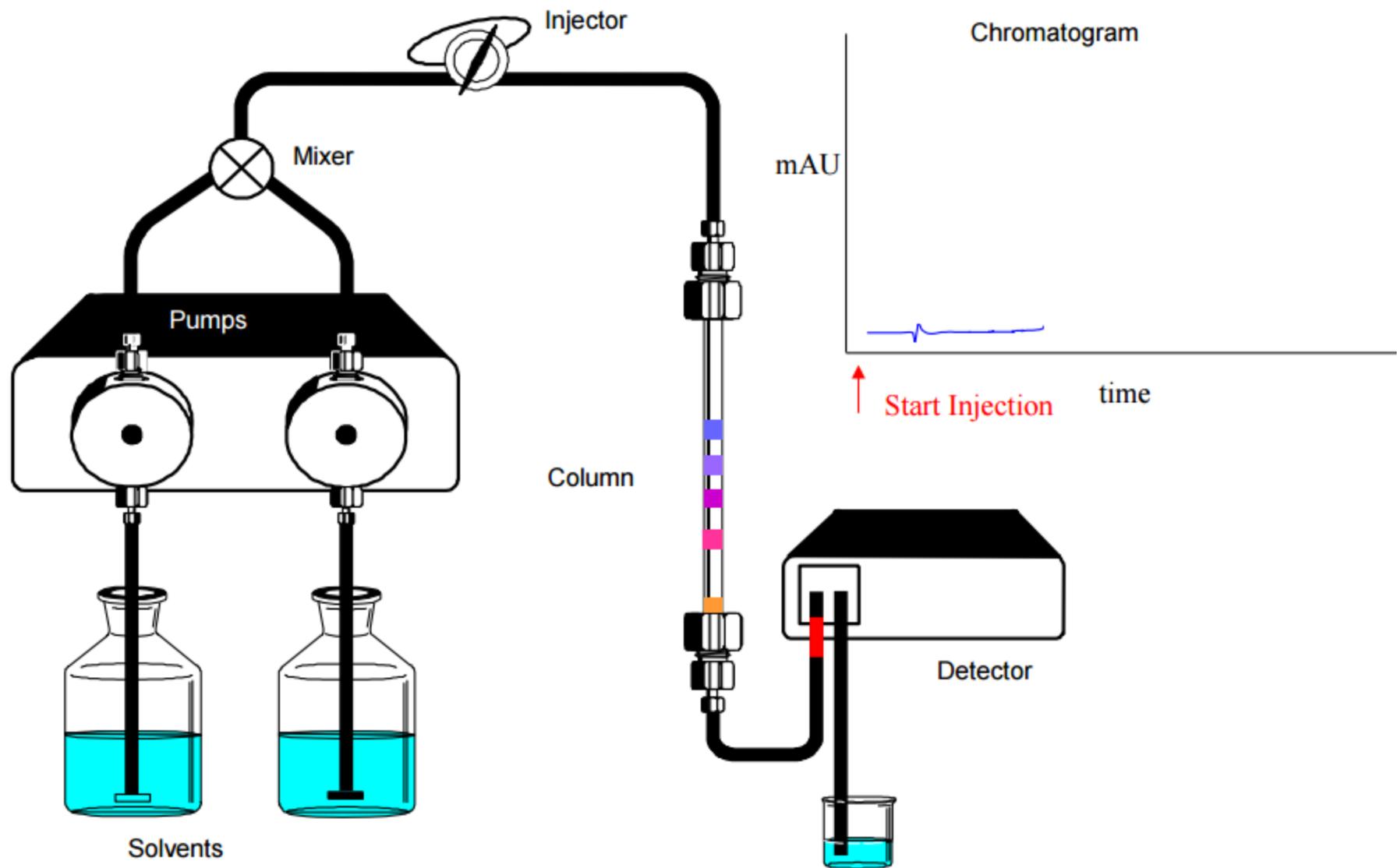


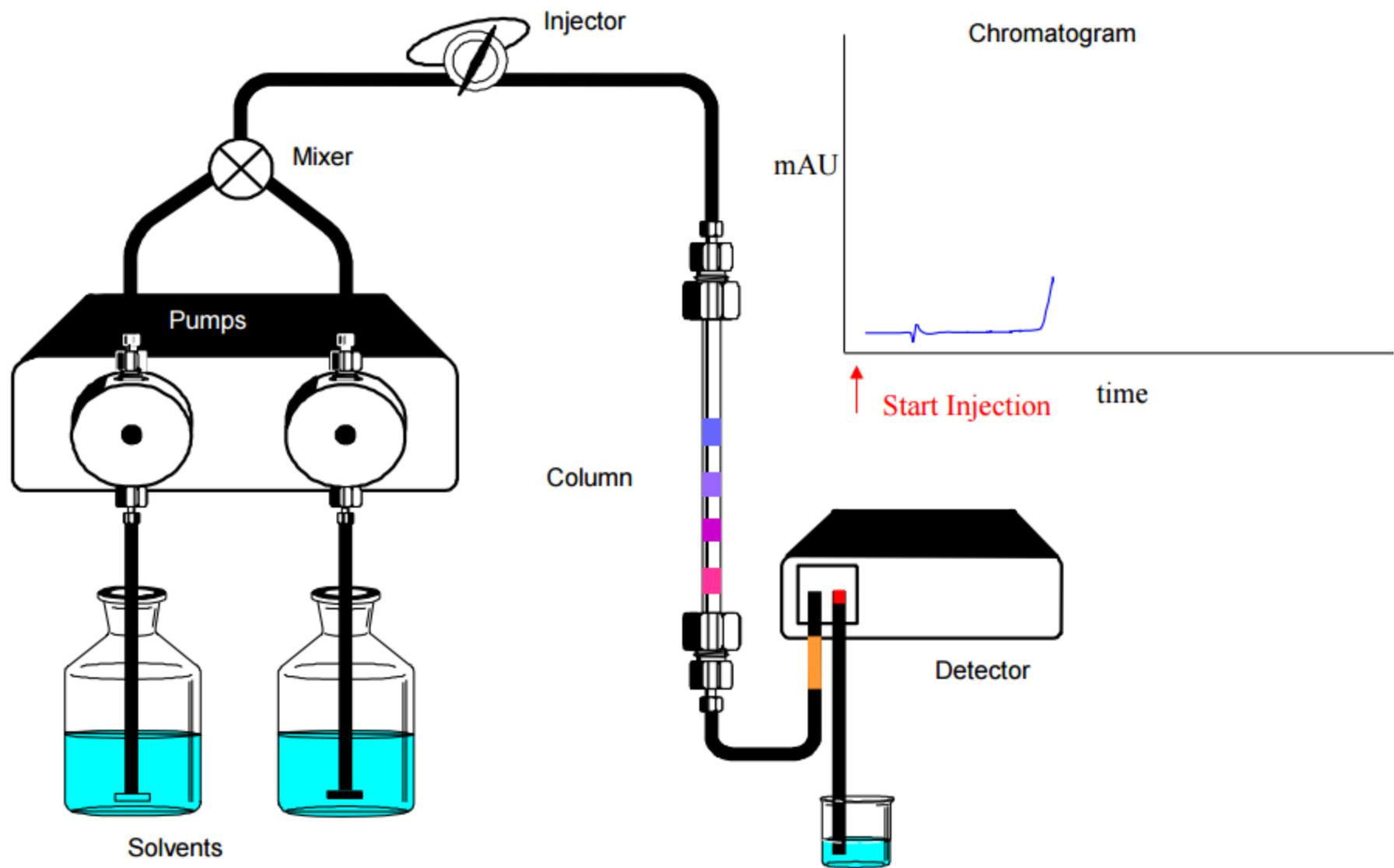


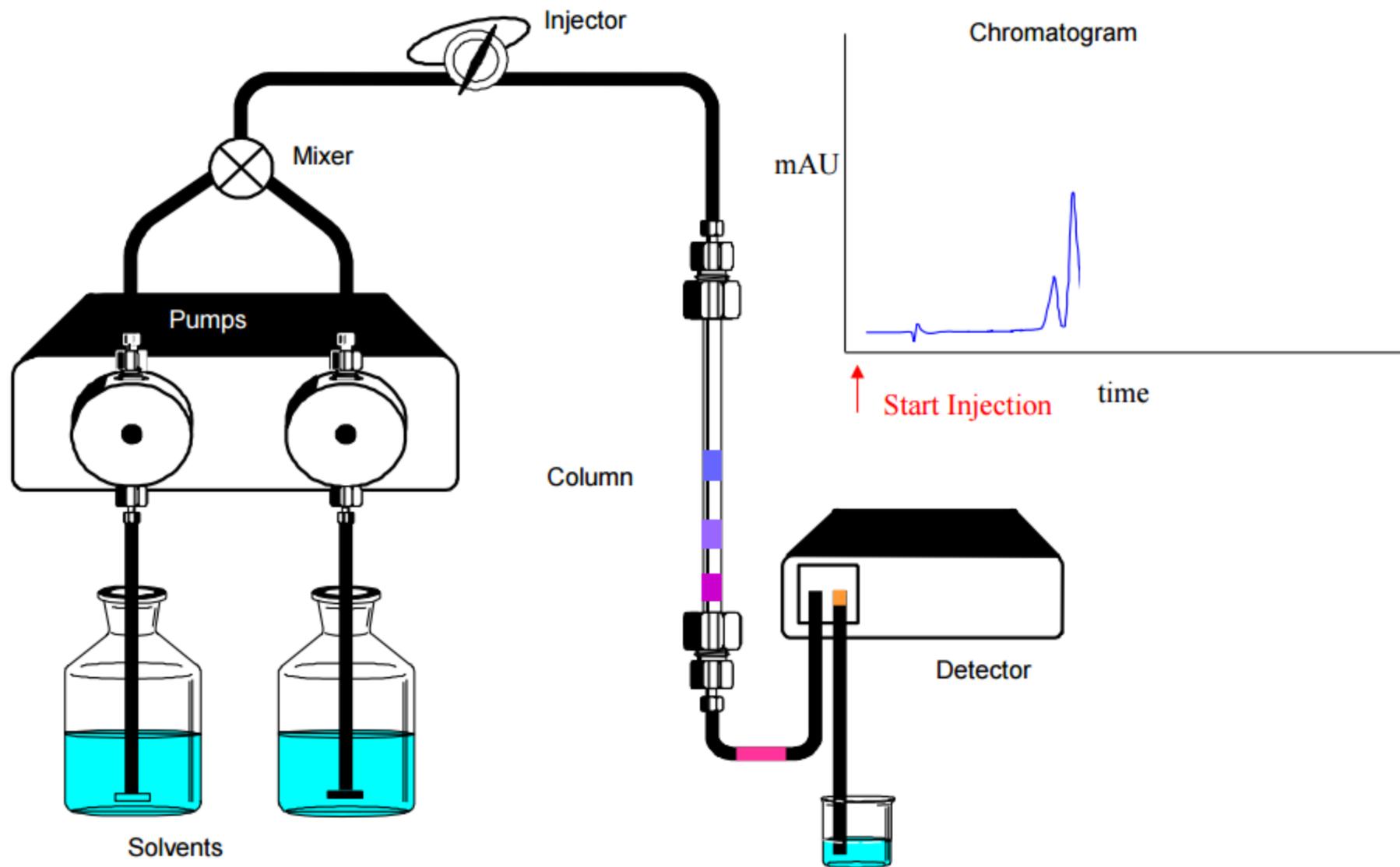


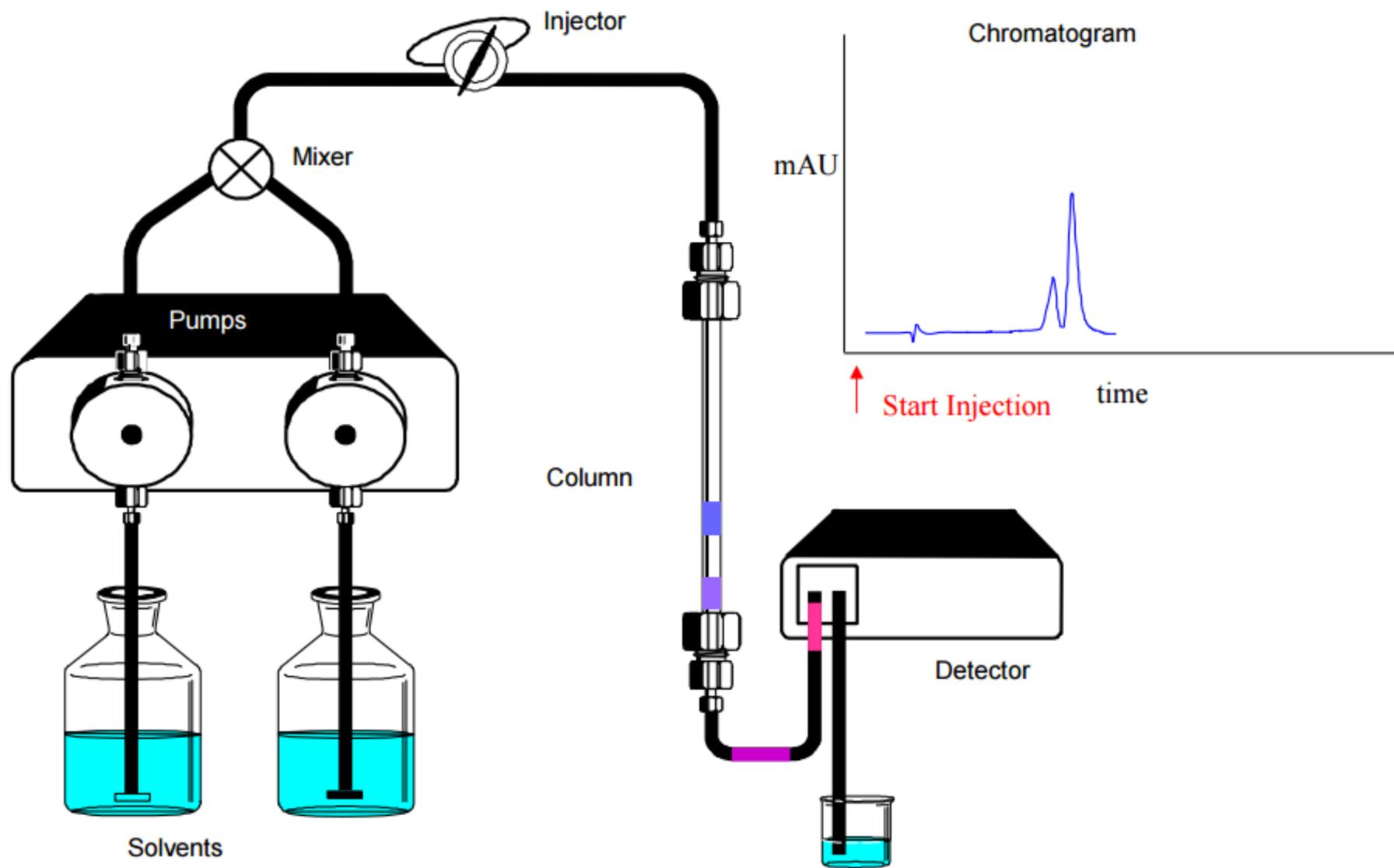


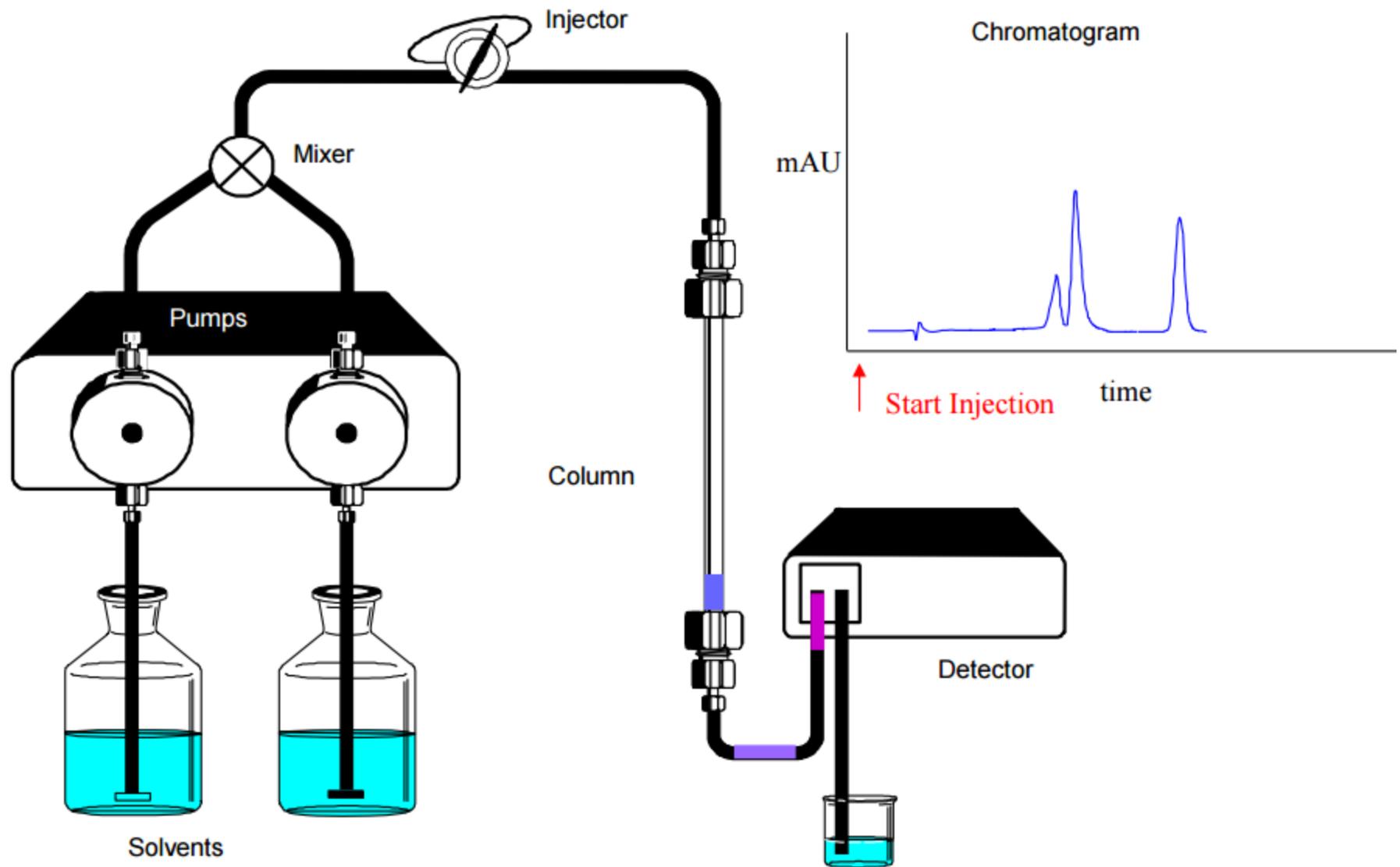


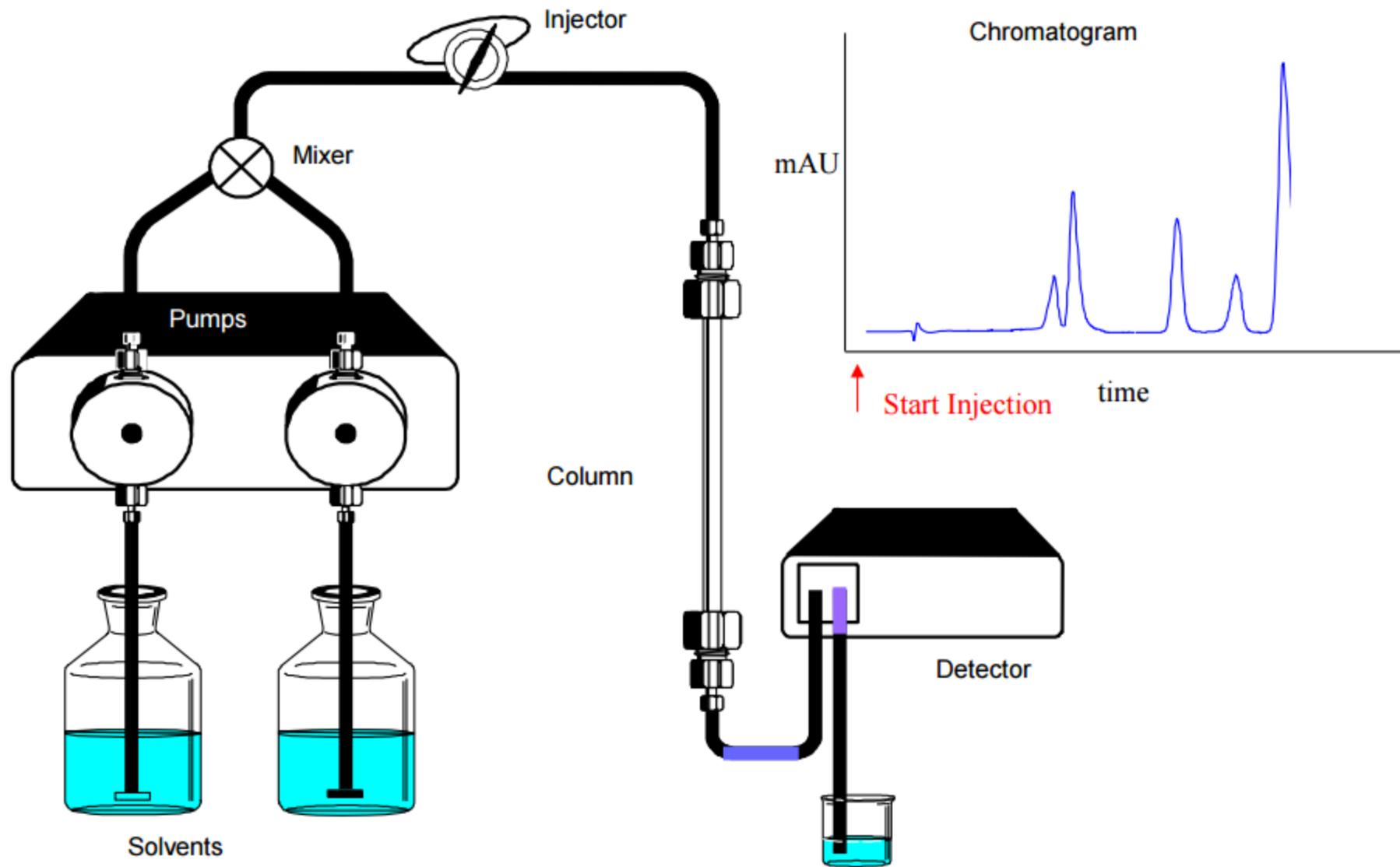


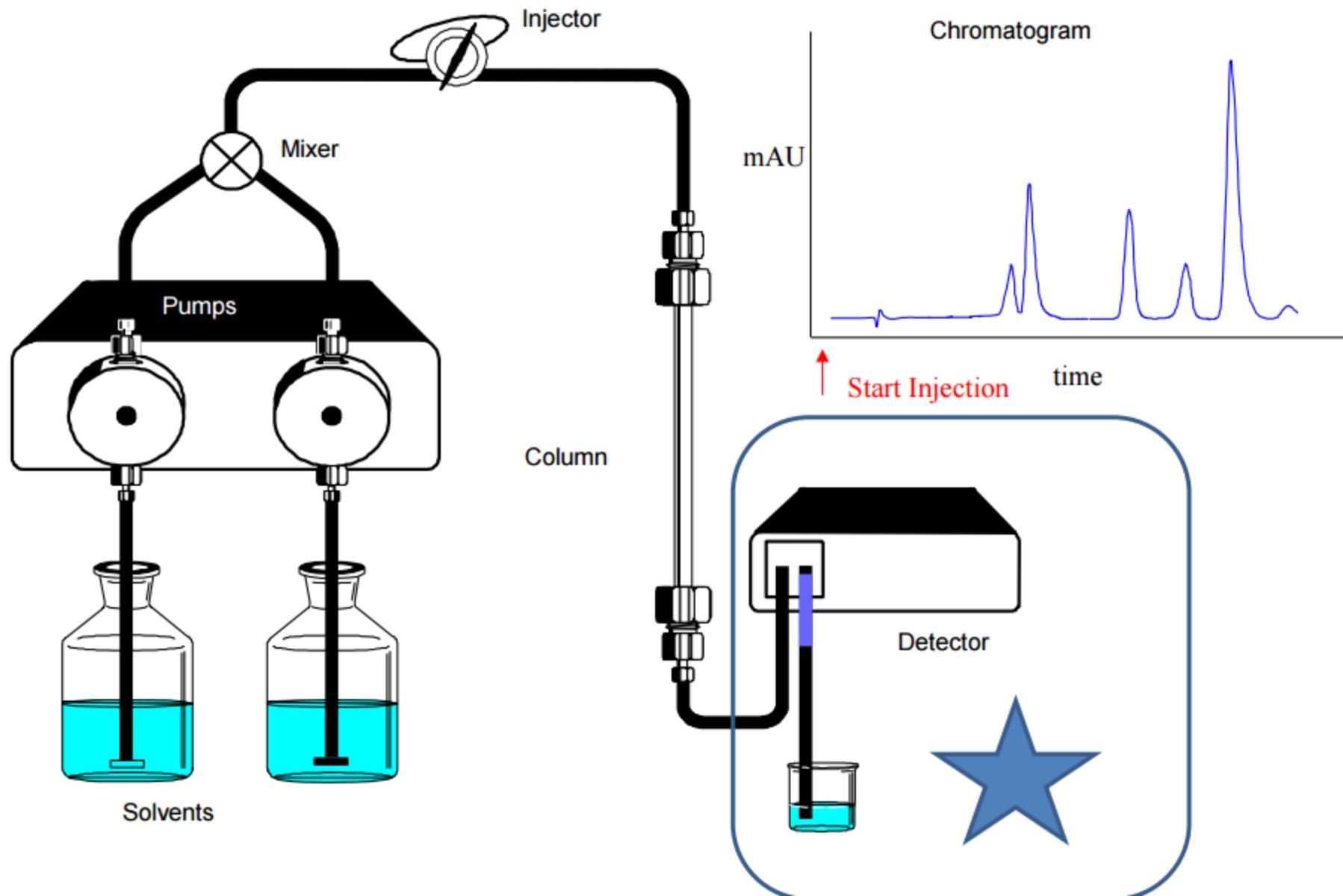


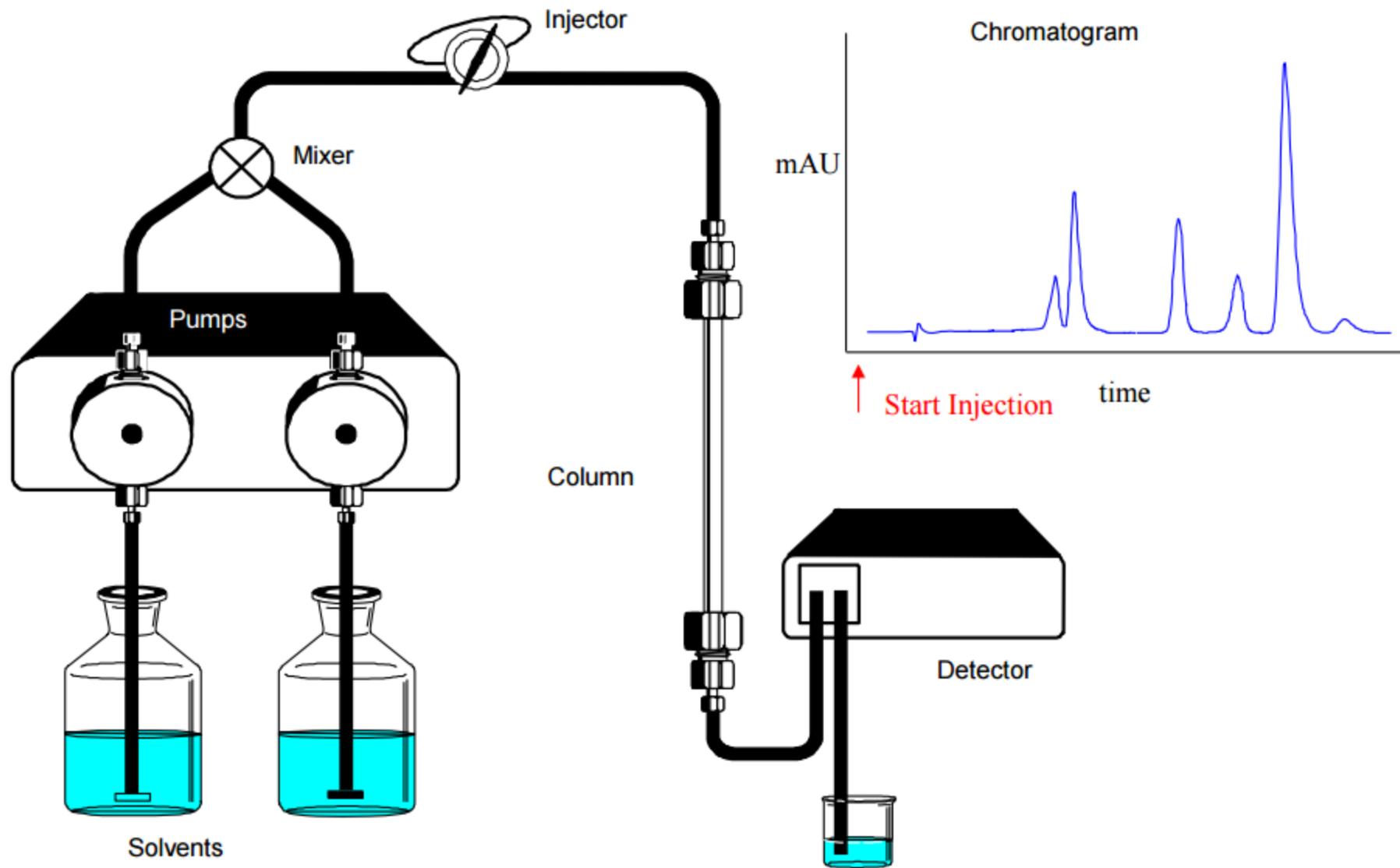






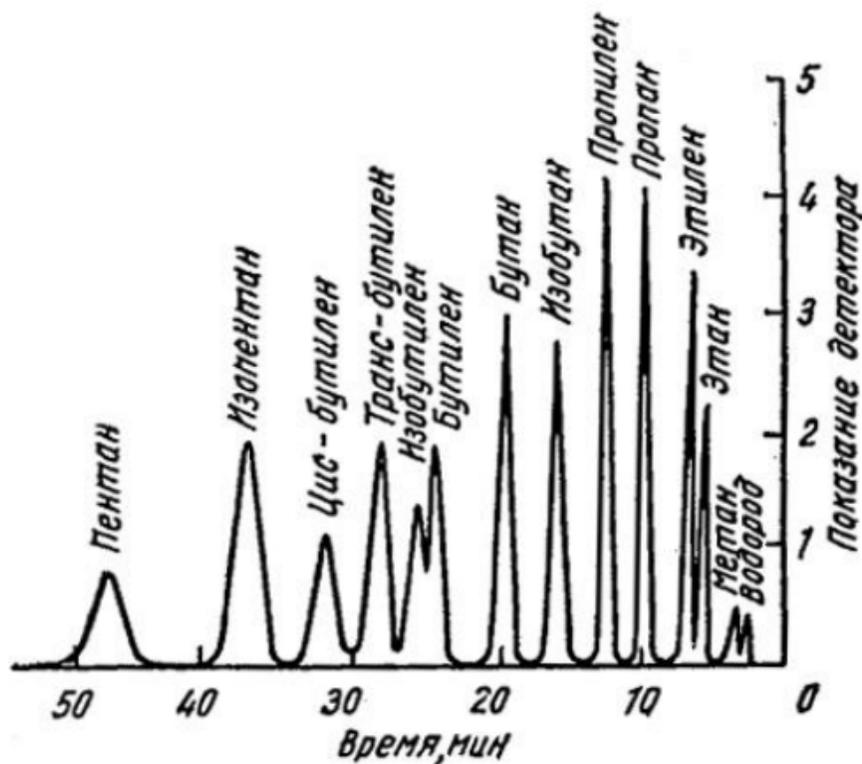




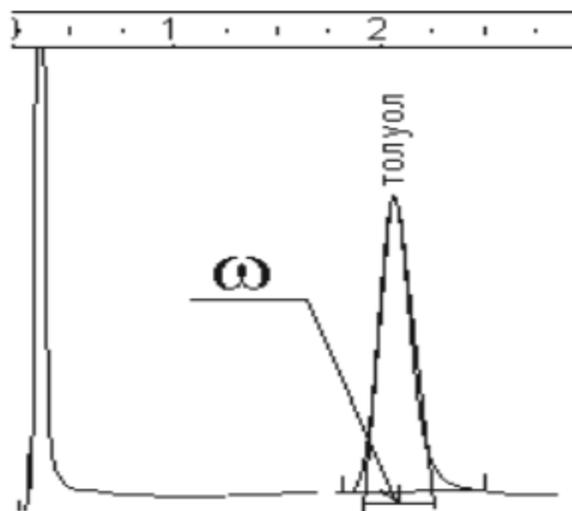


# Экспериментальные хроматографические данные

- *Времена выхода компонентов, отсчитываемые от момента ввода пробы до момента регистрации вершины пика, или, иначе, объемы подвижной фазы, затраченные на перенос через колонку каждого компонента, дают **КАЧЕСТВЕННУЮ** характеристику веществ.*
- *Сопоставление площадей (высот) пиков позволяет выполнять **КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ** определения.*

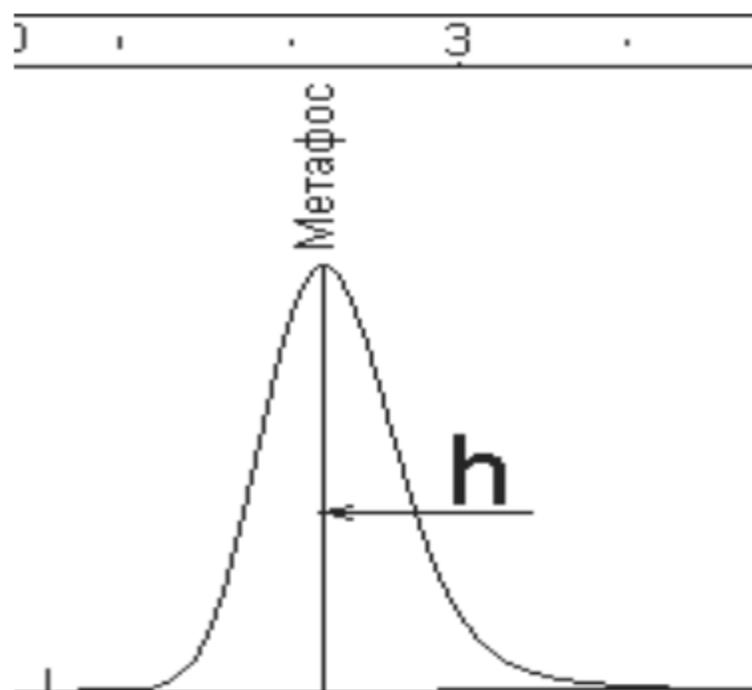


# Экспериментальные хроматографические данные



- **Ширина пика  $\omega$**  – ширина пика измеряется между точками пересечения с нулевой линией двух касательных в точках перегиба пика

# Экспериментальные хроматографические данные

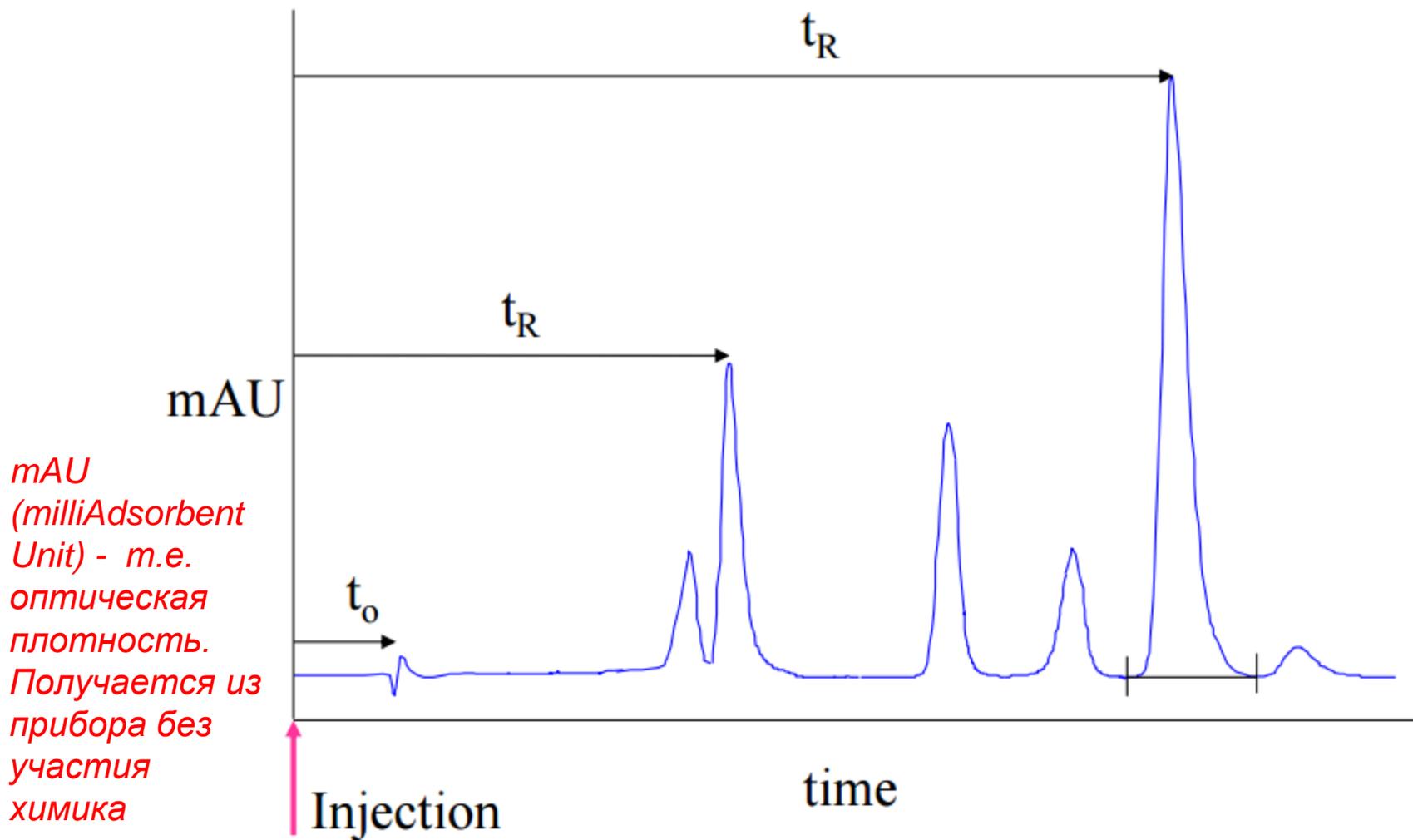


- **Высота пика  $h$**  – расстояние между нулевой линией и максимумом пика

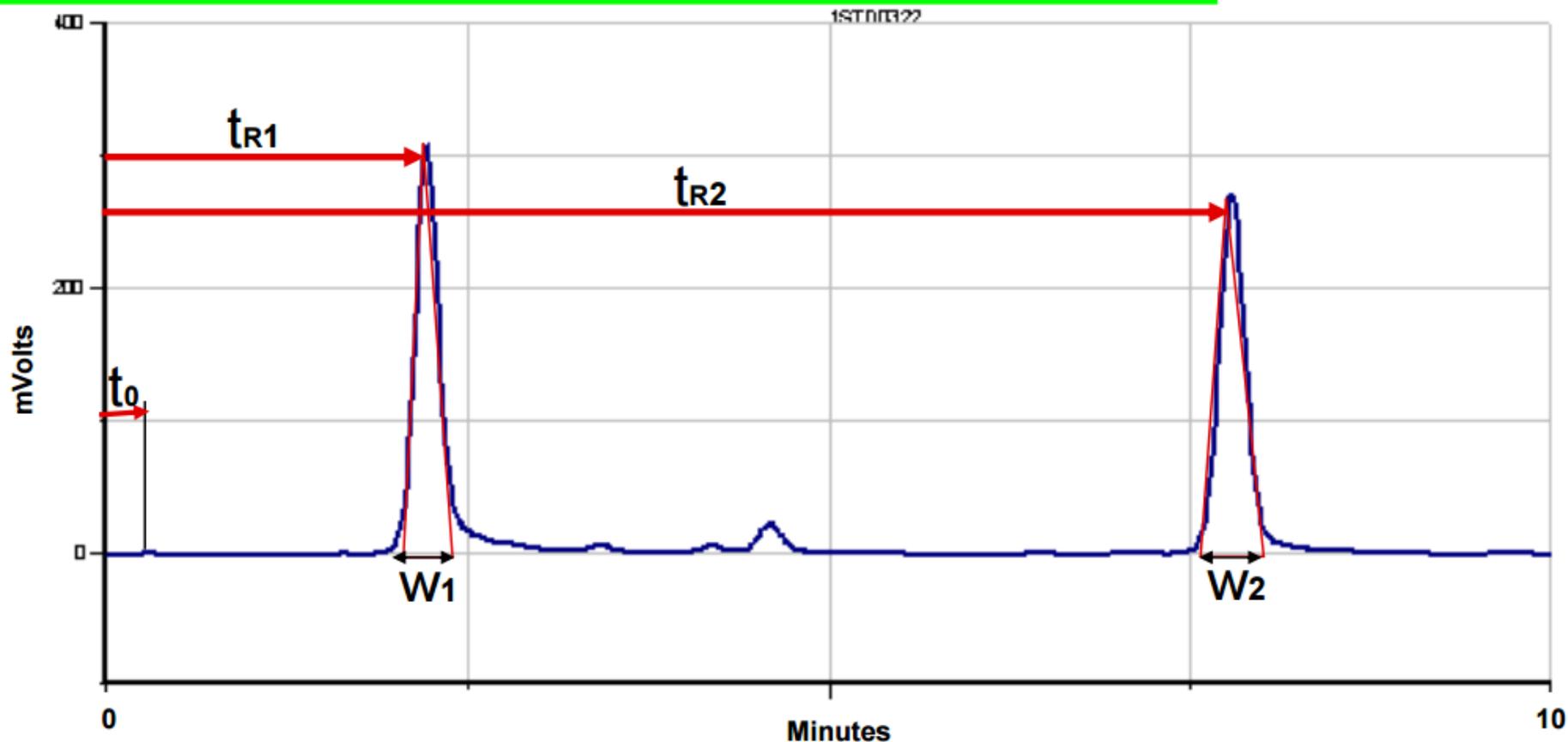
# Хроматограмма

$t_0$  – время выхода красителя, определение свободного объема колонки

$t_R$  – время выхода основного пика



# Основы хроматографии – $k$ , $\alpha$ , $N$ , $R_s$



$$k = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0}$$

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

$$N = 16 \left[ \frac{t}{W_i} \right]^2$$

$$R_s = 0.25 (\alpha - 1) N^{0.5} \frac{k}{k + 1}$$

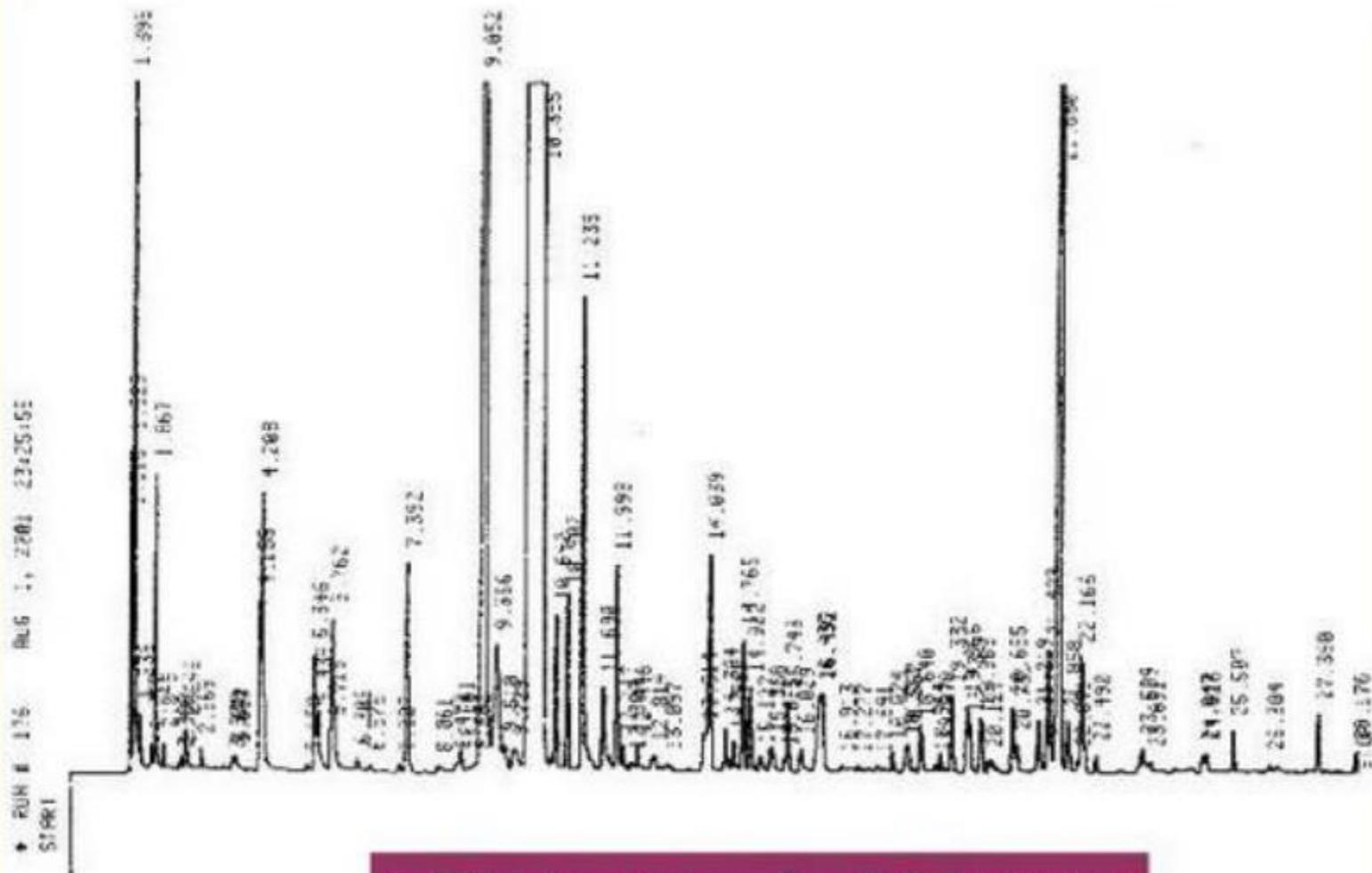
Разрешающая способность

Фактор  
(коэффициент)  
удерживания

Селективность

Эффективность  
(число тарелок)

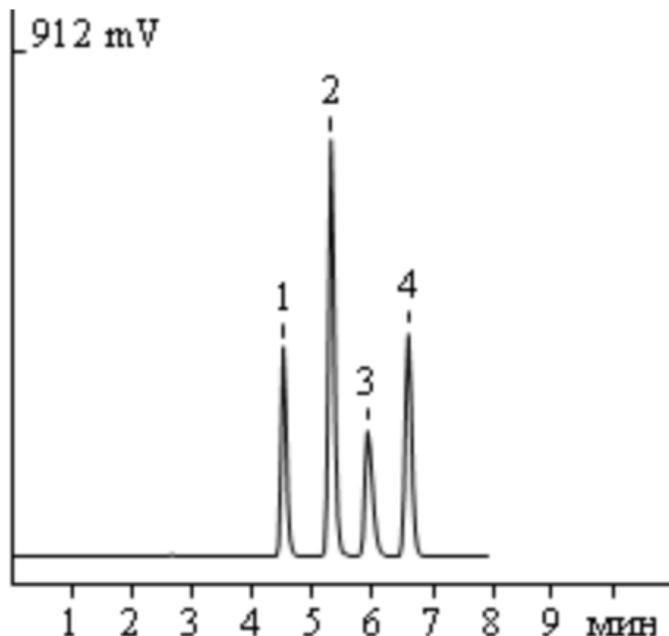
# Хроматограмма апельсинового сока (метод ВЭЖХ, режим градиентного элюирования)



> 50 веществ / < 30 минут

# Хроматограммы

## «Бромгексин»



### Компоненты:

1. [Сахарин](#)
2. [Ванилин](#)
3. [Бромгексин](#)
4. [Бензоат натрия](#)

Колонка: [Synergi Max-RP](#) 250x4.6 мм 4 мкм

Режим разделения: Изократический

Подвижная фаза: 10 ммоль р-р пентилсульфоната натрия в дистиллированной воде / ацетонитрил (57:43)

Расход: 0.9 мл/мин

Температура колонки: комнатная

Объем пробы: 20 мкл

Детектор: [Спектрофотометрический](#)

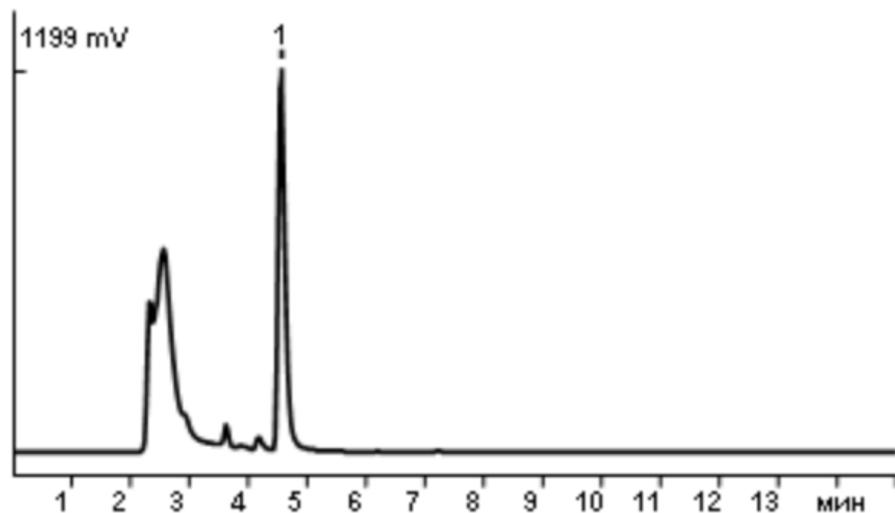
Параметры детектирования: длина волны 232 нм

Объект исследования: [Фармацевтические препараты](#)

Группы веществ: [Подсластители](#), [Ароматизаторы пищевые](#), [Лекарственные средства](#), [Консерванты](#)

Образец: «Бромгексин» сироп 8 мг/5 мл

## Кофеин в напитке «Coca-Cola»



Компоненты:

1. [Кофеин](#)

Колонка: [Luna C18\(2\)](#) 250x4.6 мм 5 мкм

Защитная колонка: [SecurityGuard](#) C18 4x3.0 мм

Режим разделения: Изократический

Подвижная фаза: ацетонитрил/вода (22:78) + 0.5% ортофосфорной кислоты (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

Расход: 1.0 мл/мин

Температура колонки: 20°C

Объем пробы: 20 мкл

Детектор: [Спектрофотометрический](#)

Параметры детектирования: длина волны 230 нм

Объект исследования: [Напитки безалкогольные](#)

Группы веществ: [Алкалоиды](#)

Образец: напиток «Coca-Cola»

Методическое обеспечение: ГОСТ 30059-93. Напитки безалкогольные. Методы определения аспартама, сахарина, кофеина и бензоата натрия.

# Колонки в хроматографии

