

Хроматография

Краткие сведения
о хроматографии

- хроматография - это способ разделения веществ, основанный на различии в их коэффициентах распределения между двумя фазами, одна из которых неподвижна.

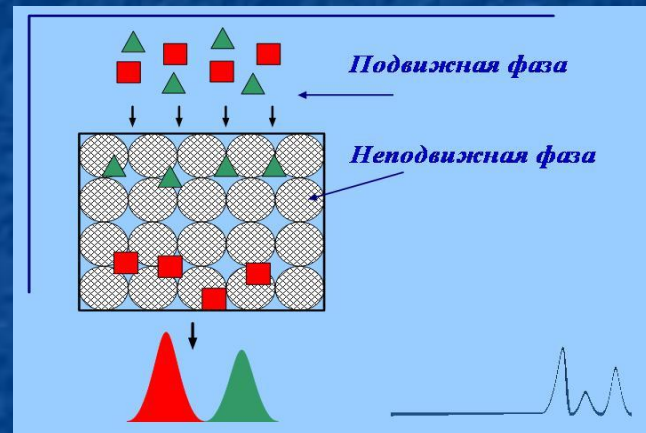
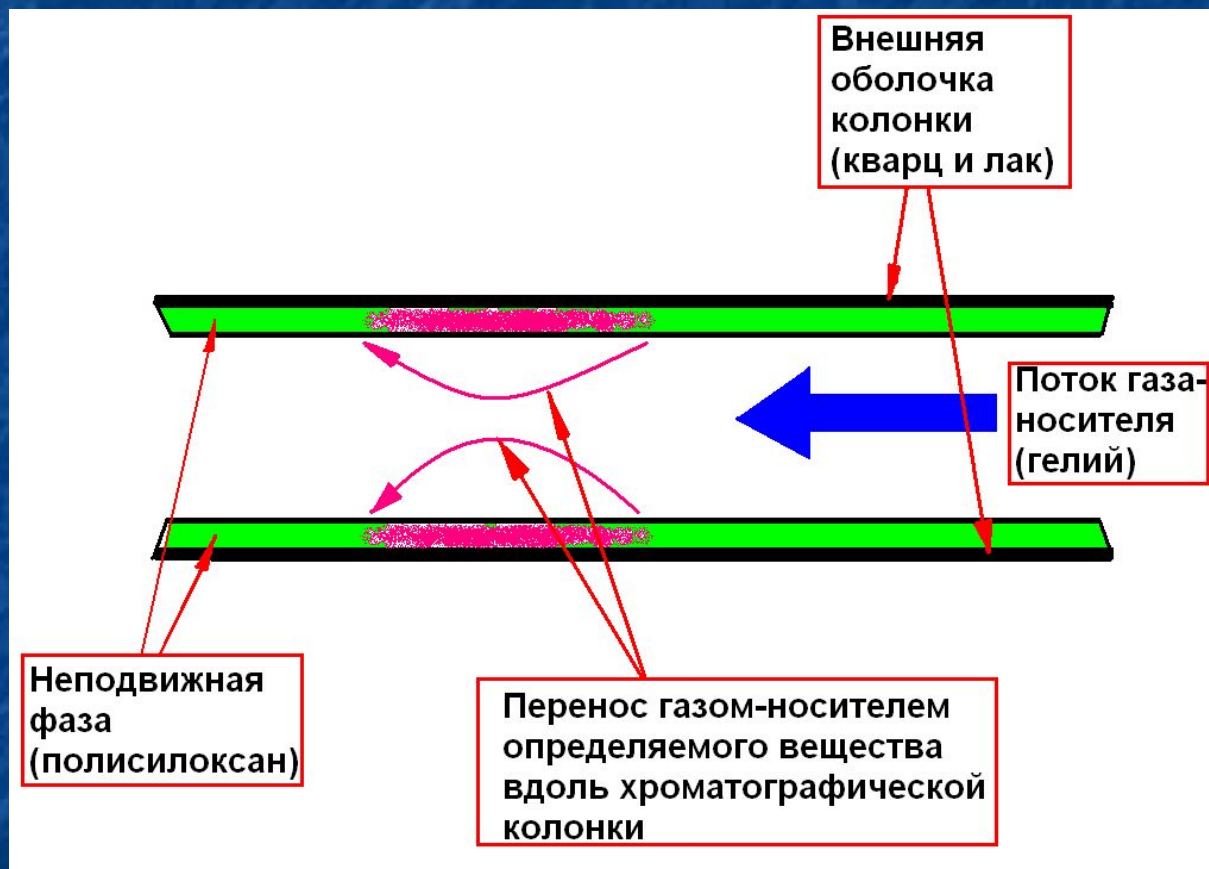


Рис. Схема работы хроматографической колонки на примере капиллярной газовой хроматографии

В случае **газовой хроматографии** подвижной чаще всего средой является **газ-носитель**, в нашем случае – гелий, неподвижной фазой в нашем случае является засыпанное («набитое») внутрь трубки из инертного материала либо нанесенное на внутреннюю поверхность кварцевой трубки-капилляра **твердое вещество**, в зависимости от решаемых задач имеющее ту или иную химическую природу, например:

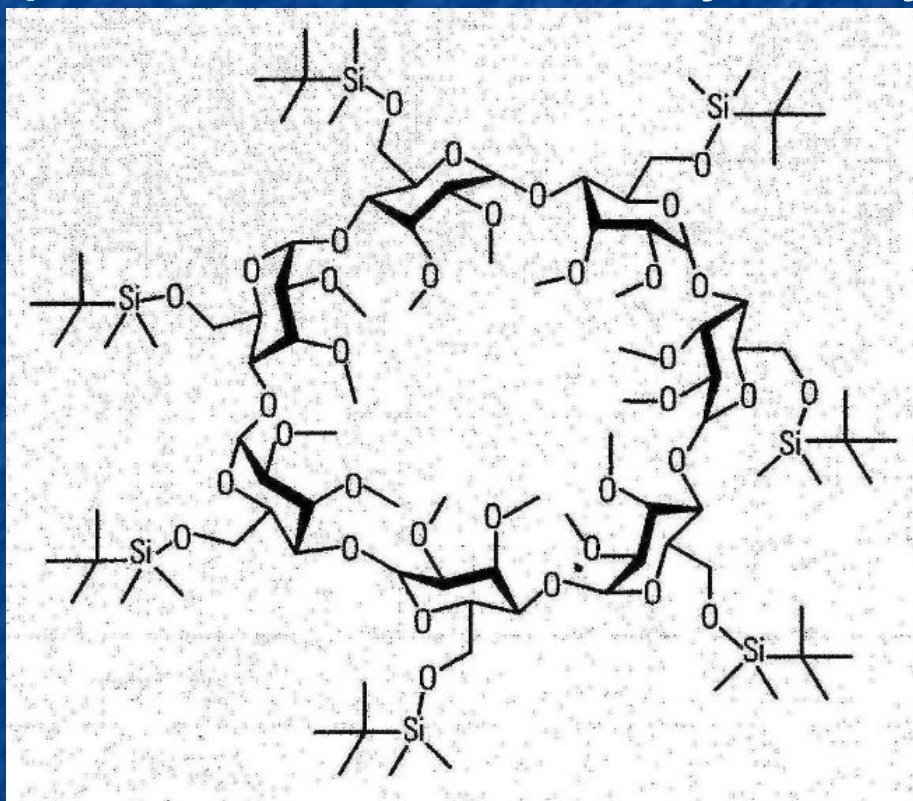


Рис. 30%-Гептакис-(2,3-ди-О-метил-6-О-трет-бутил-диметилсилил)-β-циклодекстрин, неподвижная фаза для разделения оптических изомеров

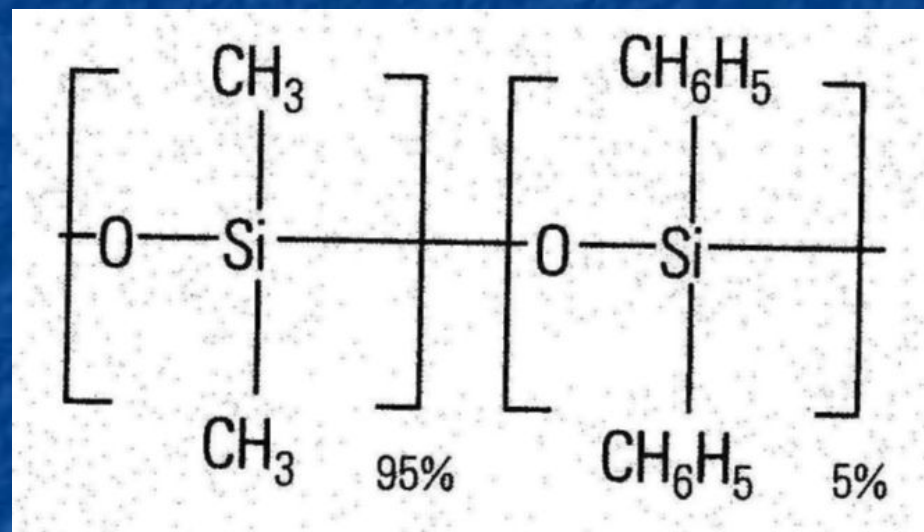
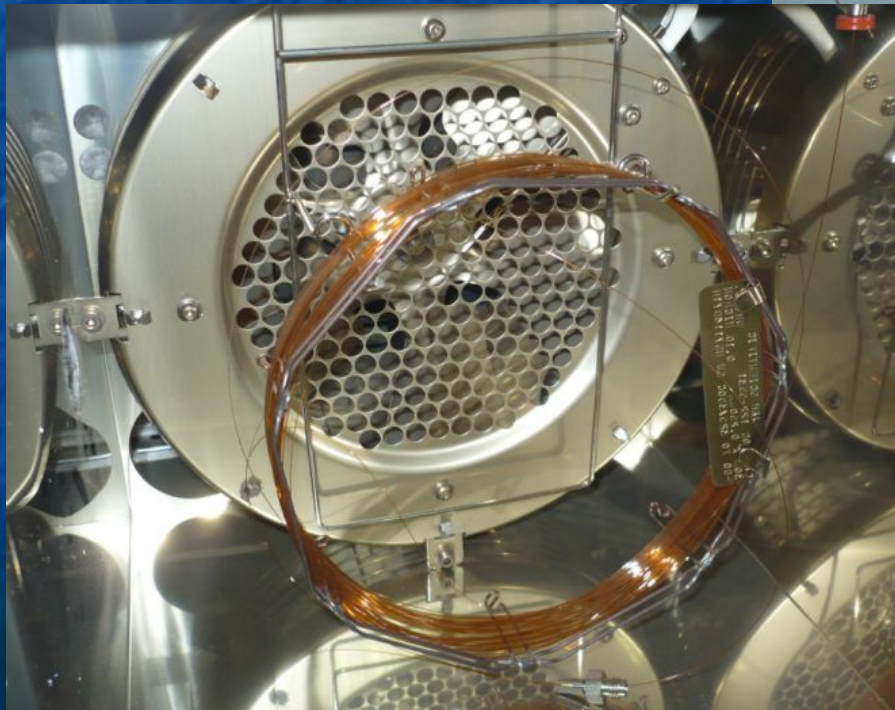
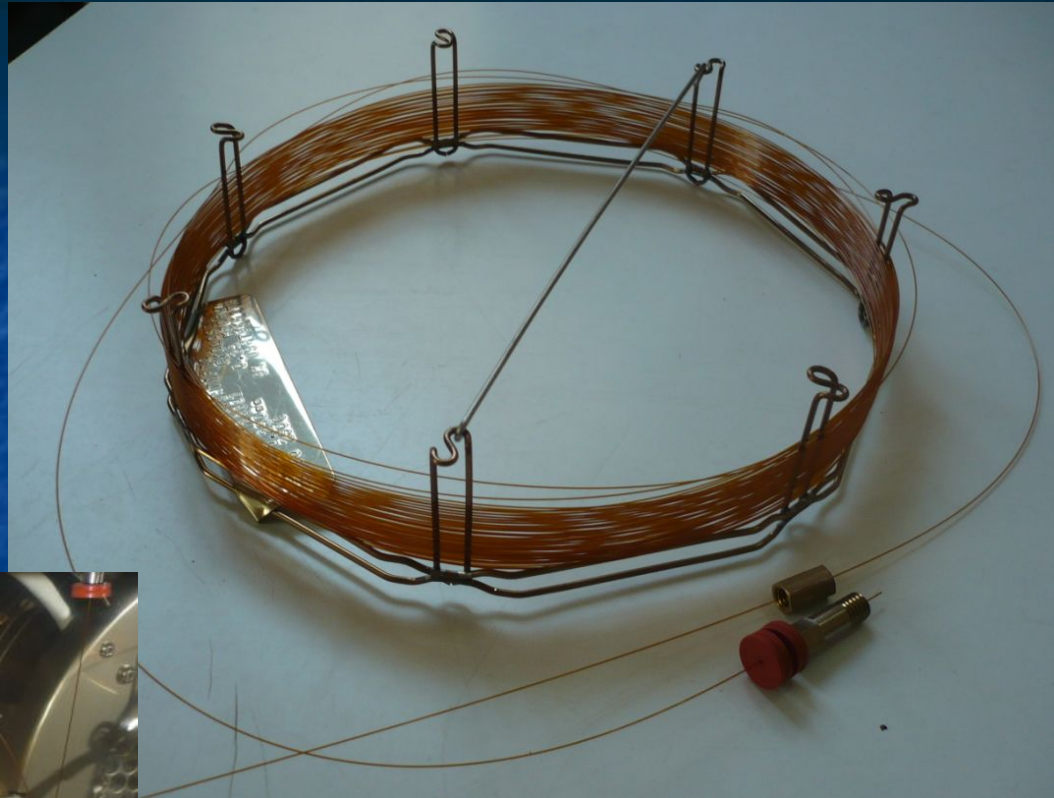


Рис. Диметилдифенилполисилоксан, неподвижная фаза для разделения органических соединений

Капиллярная газовая хроматографическая колонка HP-5MS общего назначения, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, внешний диаметр 0.30 мм



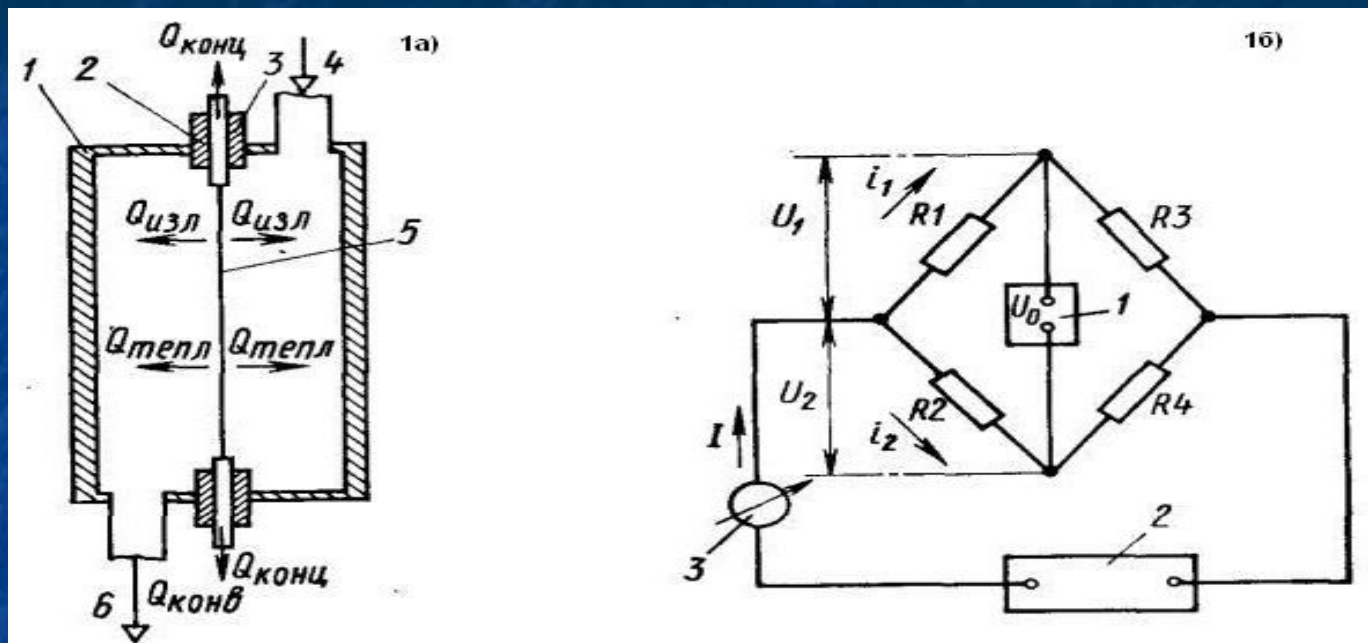
Капиллярная газовая хроматографическая колонка HP-5MS, установленная в хроматограф. Газ-носитель подают в колонку под давлением из баллона.

К настоящему времени в ГХ предложено уже более 50 детекторов.

Таблица 1. Основные типы детекторов в газовой хроматографии и принцип их работы.

Наименование детектора	Принцип работы
По теплопроводности По плотности	Регистрируется различие в теплопроводности анализируемого вещества и газа-носителя Регистрируется различие плотностей смеси анализируемого вещества с газом-носителем и чистого газа-носителя
Пламенно-ионизационный Фотоионизационный	Образование и регистрация ионов при сгорании анализируемых веществ в пламени Фотохимическое образование и регистрация ионов под действием жесткого УФ-излучения на анализируемое вещество
Ультрафиолетовый Электронозахватный	Поглощение УФ-света специфиче скими хромофорами анализируемого вещества Захват анализируемым веще ством тепловых электронов, образованных при облучении β-частицами или в высокоосна рженных скими электронами газа-носителя
Микроволновый плазменный	Возбуждение анализируемого вещества в микроволновой плазме и излучение света на длине характеристической волны присутствующего в веществе элемента
Пламенно-фотометрический	Возбуждение анализируемого вещества в пламени и излучение света в зависимости от типа присутствующего в веществе элемента
Атомно-абсорбционный спектрометр	Тепловая атомизация с последующим поглощением света на специфической длине волны
Электрохимический	Поглощение анализируемых веществ потоком жидкости и электрохимическое детектирование их в потоке
ИК-спектрометр	Поглощение света в ИК-области анализируемым веществом
Плазменно-эмиссионная спектроскопия при постоянном токе	Тепловая атомизация, возбуждение, ионизация постоянным током, излучение света
Анализатор термоэнергии	Тепловое разложение и нитрозоаминное с выделением оксида азота, который при реакции с озоном дает хемилуминесценцию
Масс-спектрометр	Образование молекулярных и фрагментарных ионов при электронном ударе или химической ионизации

Детекторы по теплопроводности (ДТП)



- Рис. 1а. 1 — корпус камеры; 2 — держатели чувствительного элемента; 3 — изоляторы; 4 — вход газа-носителя; 5 — чувствительный элемент; 6 — выход газа-носителя.
- Рис. 1б. Электрическая мостовая схема ДТП в режиме постоянного напряжения:
- 1 — регистратор; 2 — источник питания; 3 — измеритель тока моста; R_1 — чувствительный элемент рабочей камеры детектора; R_2 — чувствительный элемент сравнительной камеры; R_3 , R_4 — постоянные резисторы (плечи) мостовой схемы.

Чувствительность ДТП зависит от:

- теплопроводностей газа-носителя и смеси газа-носителя с анализируемым веществом;
- тока моста, причем с увеличением тока увеличивается чувствительность, но уменьшается стабильность нулевой линии;
- температуры чувствительного элемента детектора, так как ее увеличение приводит к увеличению чувствительности детектора;
- сопротивления чувствительного элемента;
- температуры детектора, так как с ее уменьшением повышается чувствительность;
- расхода газа-носителя, поскольку ДТП является типичным концентрационным детектором;

Пламенно-ионизационный детектор

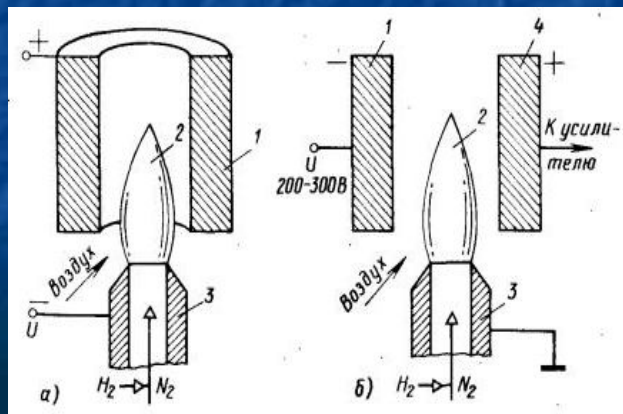
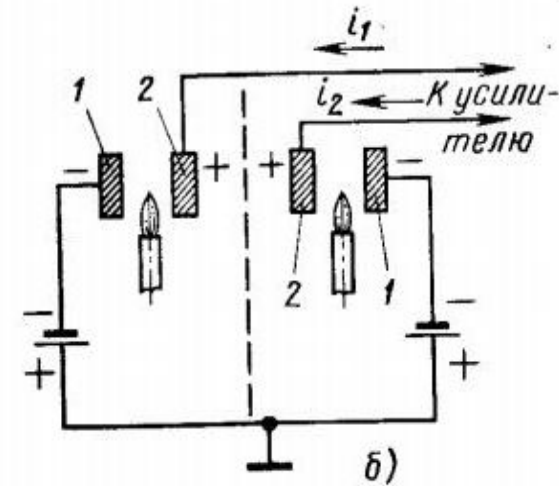
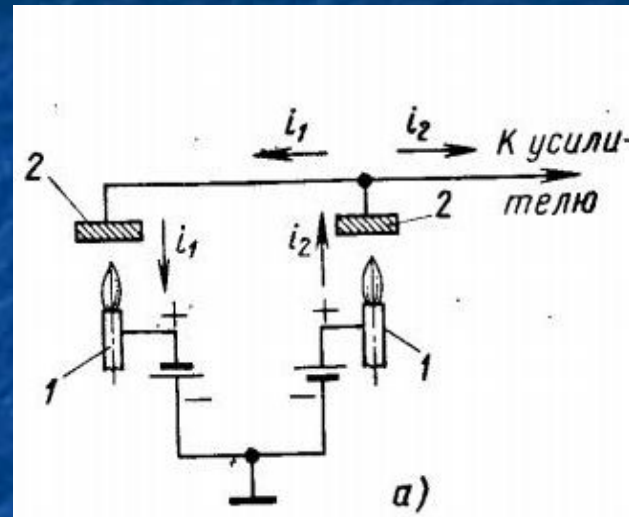
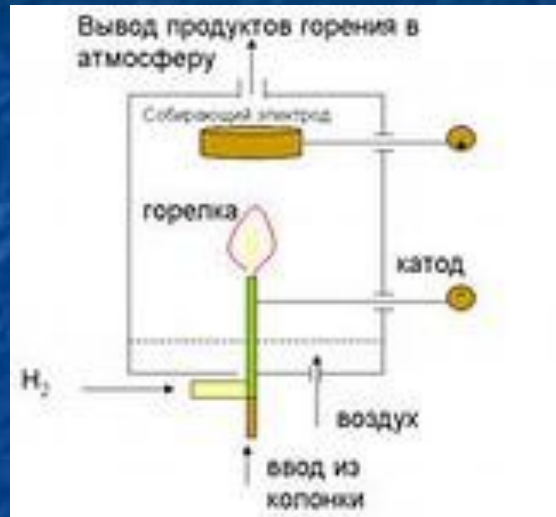


Рис. 3 Схема дифференциального ДПИ: а — с одним усилителем; б — с двумя усилителями или одним дифференциальным усилителем; i_1 и i_2 — ионизационные токи.



Теория скоростей

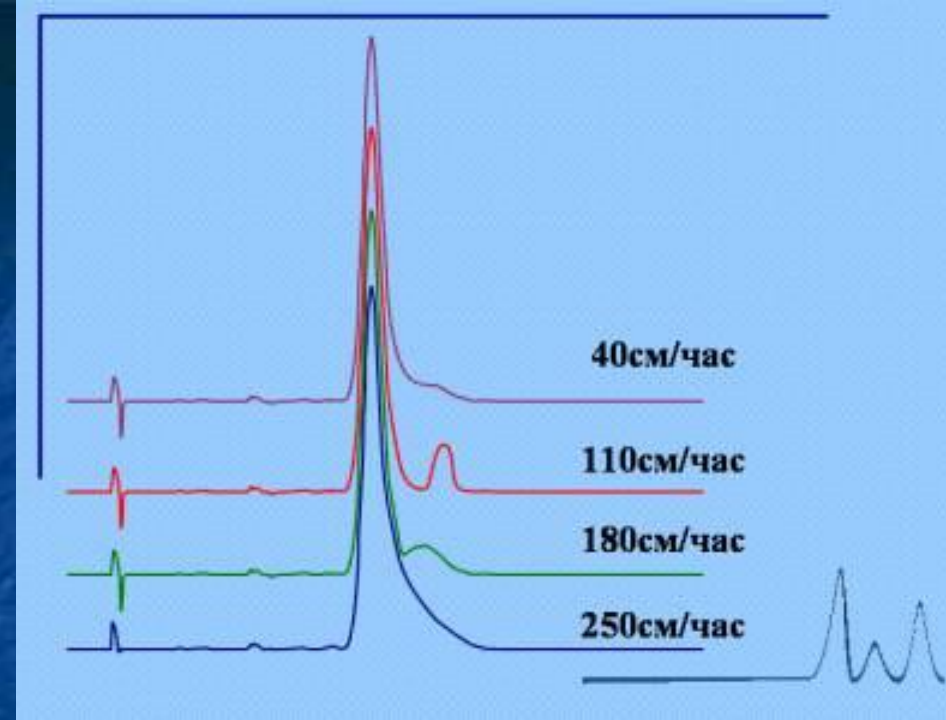
- - Многолучевое распространение потока и пристеночная диффузия.
- Продольная диффузия.
- Сопротивление массопереносу



- $H = A \cdot V + \frac{B}{V} + C$,
где H - это ВЭТТ, см;
 A - вклад многолучевого распространения потока;
 B - вклад продольной диффузии;
 C - вклад сопротивления массопереносу;
 V - линейная скорость, см колонки/сек.

Практические выводы:

- - чем выше скорость, тем выше вклад продольной диффузии. Очень высокие скорости приводят к размывам фронта и ухудшению разделительных способностей колонны. К тому же растет давление в системе.
- - чем ниже скорость, тем выше вклад пристеночной диффузии. Очень низкие скорости приводят к пристеночным размывам и также ухудшают разделение. К тому же падает производительность процесса хроматографии.



- Практические выводы:
- нужно точно определить **оптимальную** скорость потока и вести процесс с такой скоростью.

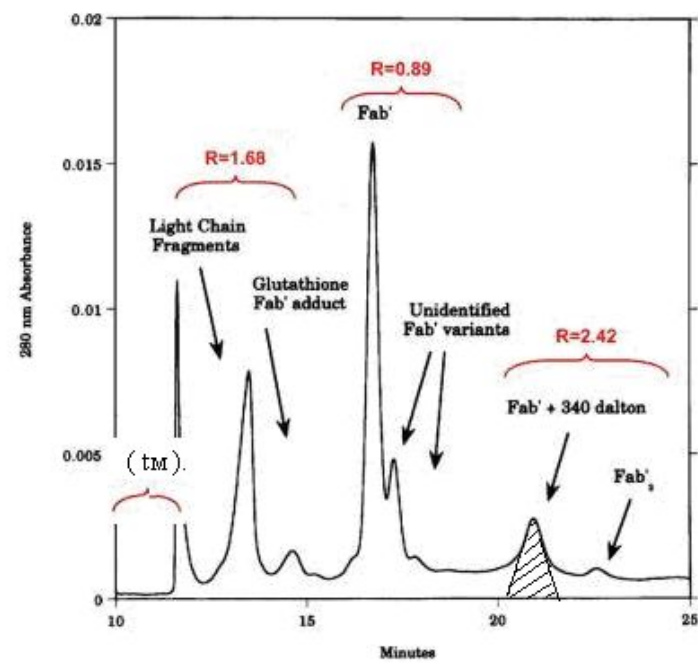
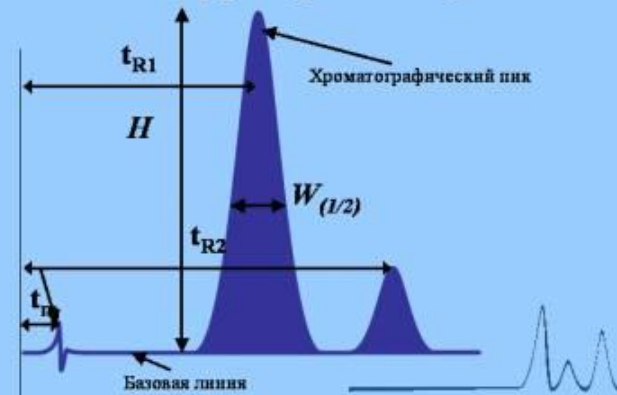
Характеристики вещества, получаемые в хроматографическом методе

Время удержания (время выхода) — время, проходящее между моментом ввода анализируемой пробы в колонку, и моментом выхода вершины пика вещества из колонки.

Объем удержания — объем газа/жидкости-носителя, который проходит по хроматографической колонке с момента ввода анализируемой пробы в колонку до момента выхода вершины пика вещества из колонки.

Площадь хроматографического пика — параметр, характеризующий количество

Номенклатура хроматограммы



Характеристики вещества, получаемые в хроматографическом методе

- - асимметрия пика ($a=A/B$): характеристика качества упаковки (и не только) колонки, рассчитывается как отношение большего плеча пика к меньшему.

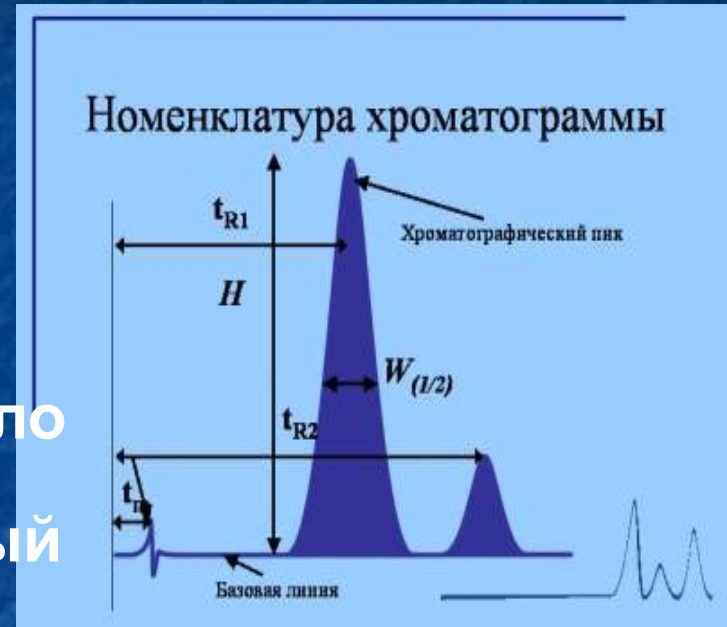


- **мертвый объем:** объем подвижной фазы между точкой ввода пробы и точкой ее обнаружения детектором (t_m).

Индекс удержания – отношение времен удержания какого-то стандартного вещества (обычно для неполярных колонок какого-либо углеводорода известного строения) и определяемого вещества. Для одинаковых по химическому составу колонок является постоянной величиной.

Характеристики хроматограммы

- - коэффициент распределения: отношение времени удержания (или объема удержания) к «мертвому» времени (или мертвому объему), т.е. $k=(V_r)/(V_m)=(t_r)/(t_m)$;
- эффективность колонки, или число теоретических тарелок (N): рассчитываемая как приведенный квадрат отношения времени удержания к полуширине пика



$$N = 5,54 \left(t_R / W_{1/2} \right)^2$$

- Чем длиннее колонна, или чем меньше *размер частиц* сорбента, тем выше будет эффективность работы колонны, а, следовательно, и больше будет разделение между веществами.

Типы хроматографирования по видам взаимодействия неподвижной фазы и образца:

- **Сорбционный** – взаимодействие активных центров сорбента с элюируемыми веществами.
- **Ионный** – взаимодействие заряда неподвижной фазы с противоположным зарядом подвижной фазы.
- **Распределительный** – «фильтрация» веществ между порами неподвижной фазы

По способу элюирования:

- 1). **Элюентный:** вещества распределяются по активным центрам сорбента, десорбируясь в результате изменения элюентной активности подвижной фазы, что ослабляет сродство компонентов к активным центрам сорбента.
- 2). **Фронтальный.** Вещества распределяются по фронту элюции. В результате очищенным можно получить только тот компонент, который выходит во фронте, первым (т.е. тот, который обладает меньшим сродством к активным центрам сорбента).
- 3). **Вытеснительный.** Вещества вытесняются вытесняющим агентом или друг другом, что связано с конкурентным сродством к активным группам сорбента. Примеры: ИОХ (вытеснитель - соль), ВЭЖХ (вытеснитель - например, додецилсульфат натрия для обращенно-фазового режима), (вытеснитель - вещество, с большим сродством к сорбенту, чем образец).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Распределительная хроматография

Нормально-фазовая ВЭЖХ
подвижная фаза неполярна;
неподвижная фаза полярна.

Обращенно-фазовая ВЭЖХ
подвижная фаза полярна;
неподвижная фаза неполярна

- Нормально-фазовая:

- 1. Неподвижная фаза с пропиленнитрильной прививкой (нитрильной);
- 2. Неподвижная фаза с пропиламинной прививкой (аминной).

- Обращенно-фазовая:

- 1. Неподвижная фаза с алкильной прививкой;
- 2. Неподвижная фаза с алкилсилильной прививкой.

В случае **жидкостной хроматографии** подвижной средой является растворитель-носитель, в нашем случае – ацетонитрил, метанол, вода, смеси растворителей, неподвижной фазой в нашем случае является трубка-капилляр, в которую забит SiO_2 или Al_2O_3 с развитой поверхностью, на которую привиты кремнийсодержащие соединения, в зависимости от решаемых задач имеющие ту или иную химическую природу, например:

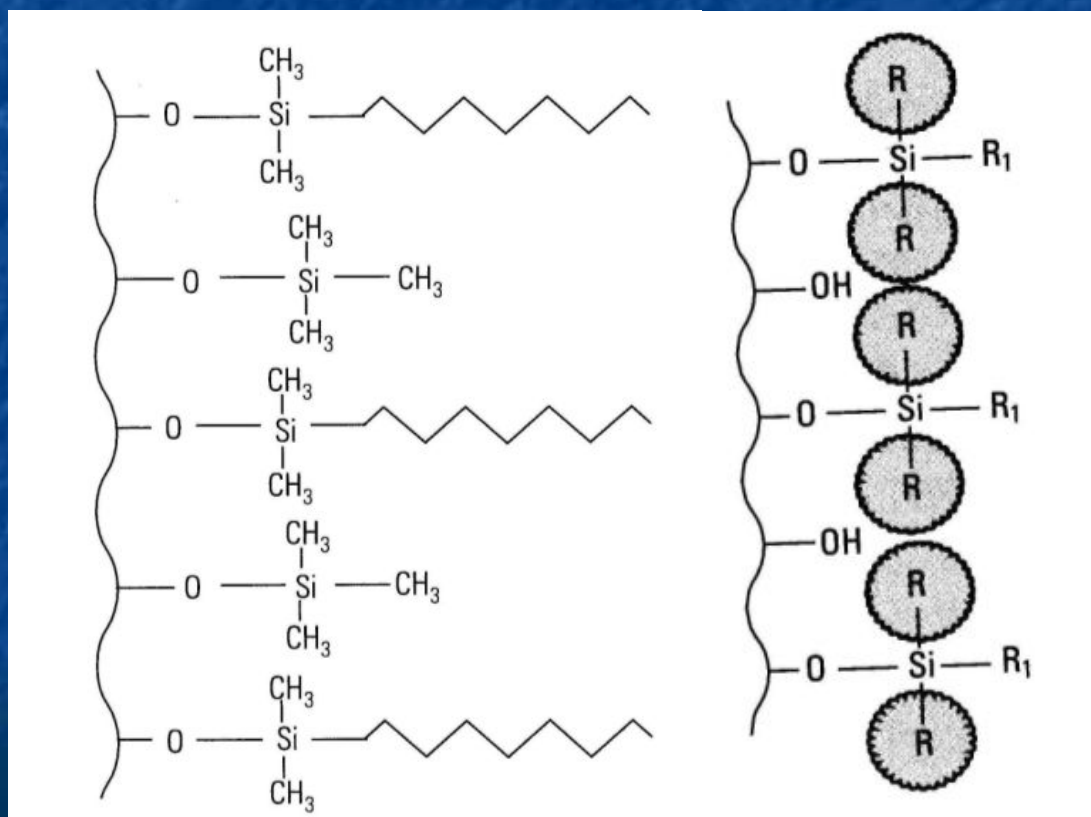


Рис. Неподвижные фазы для жидкостной хроматографии фирмы ZORBAX

Основные характеристики матрицы:

- 1.Размер частиц (мкм);
- 2.Размер внутренних пор (Å, нм).
- Получение силикагеля для ВЭЖХ:
 - 1.Формование микросфер поликремневой кислоты.
 - 2.Сушка частиц силикагеля.
 - 3.Воздушное сепарирование.
- Частицы сорбента:
 - Регулярные (сферические): выше устойчивость к давлению, выше стоимость;
 - Несферические: ниже устойчивость к давлению.



Размер частиц

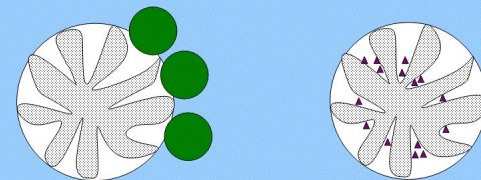
Меньше частицы >>> выше эффективность >>> выше давление (или ниже скорость элюции)

Длина колонны, мм	Эффективность, ч.т.т.		
	10 мкм	5 мкм	3 мкм
250	9 000	18 000	36 000
125	4 500	9 000	18 000
60	2 250	4 500	9 000
30	1 125	2 250	4 500

Размер пор в ВЭЖХ

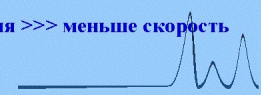
- Чем меньше размер пор, тем хуже их проницаемость для молекул элюируемых веществ. А следовательно, тем хуже сорбционная емкость сорбентов.
- Чем крупнее поры, тем, во-первых, меньше механическая устойчивость частиц сорбента, а во-вторых, тем меньше сорбционная поверхность, следовательно, хуже эффективность.

Размер пор

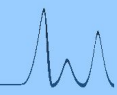
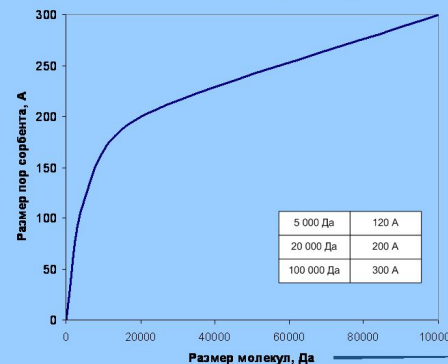


Меньше поры >>> хуже сорбция >>> меньше емкость сорбента

Больше поры >>> хуже диффузия >>> меньше скорость элюции



Размер пор



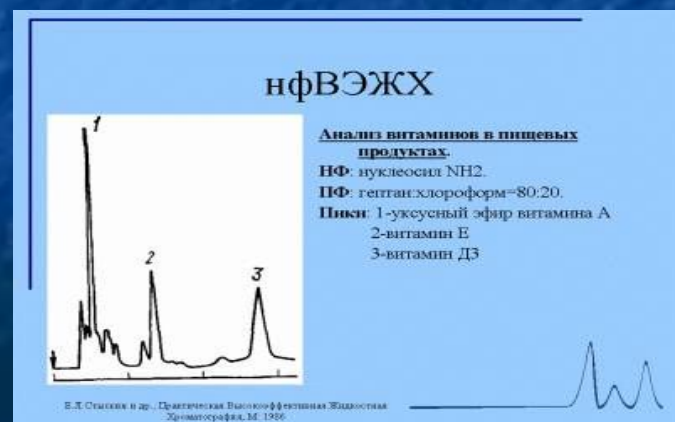
НОРМАЛЬНО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ

- Неподвижная фаза более полярна, чем подвижная
- в составе элюента преобладает неполярный растворитель:
- Гексан:изопропанол=95:5 (для малополярных веществ)
- Хлороформ:метанол=95:5 (для среднеполярных веществ)
- Хлороформ:метанол=80:20 (для сильнополярных веществ)

ВЭЖХ

- Методика прививки неподвижной фазы:

The diagram shows the chemical reaction of a silica gel surface with a chlorosilane reagent. The silica gel surface is represented by a vertical chain of silicon atoms (Si) bonded to oxygen atoms (O) and hydroxyl groups (OH). The chlorosilane reagent is shown as a silicon atom bonded to a chlorine atom (Cl) and three other groups (R, R', R''). The reaction is catalyzed by heat (T°) in a waterless solvent, resulting in the formation of a siloxane bond (Si-O-Si-R) and the release of HCl. The resulting silica gel surface is now covered with the stationary phase (R). Below the diagram is a chromatogram showing a single sharp peak.



ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЭЖХ

- **Неподвижная фаза менее полярна, чем подвижная**
 - в составе элюента почти всегда присутствует вода:
 - **ВСЕГДА** можно обеспечить полное растворение БАС в подвижной фазе
 - Почти всегда возможно использовать УФ-детекцию;
 - Почти все подвижные фазы взаимно смешиваются;
 - Можно использовать градиентное элюирование;
 - Можно быстро переуравновесить колонну;
 - Колонну можно регенерировать

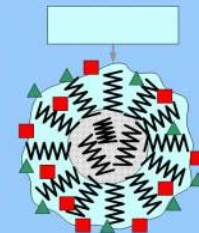
Принцип офВЭЖХ

- Шаг 1. Уравновешивание колонны (рН, ионная сила, полярность)

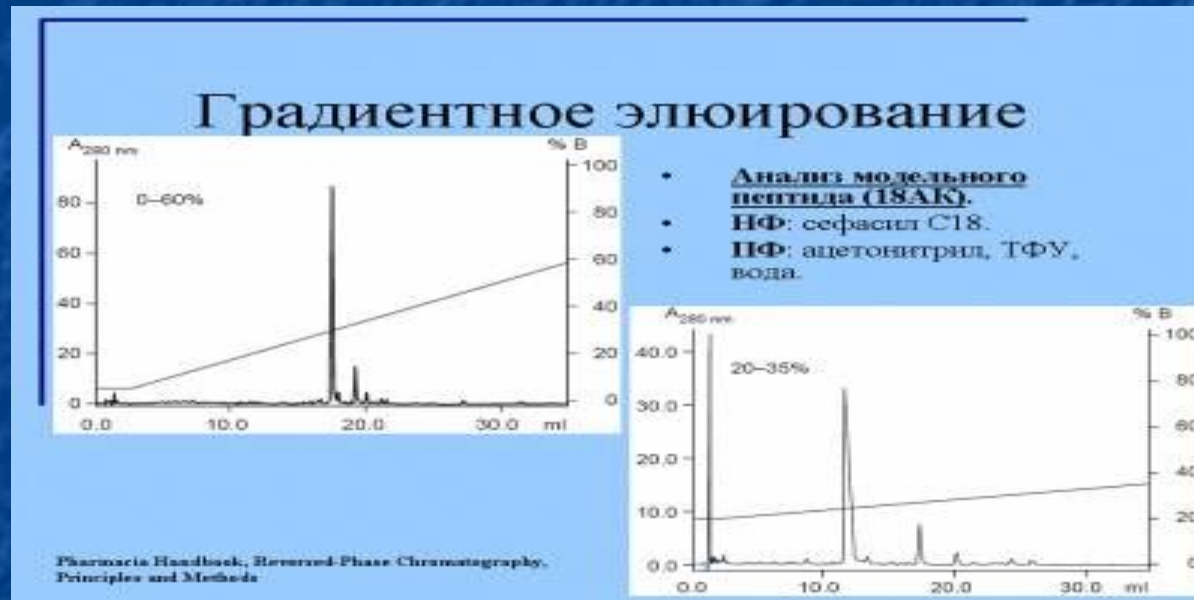


Принцип офВЭЖХ

- Шаг 2. Нанесение образца и переуравновешивание



Градиентное элюирование в обращенно-фазовой ВЭЖХ:



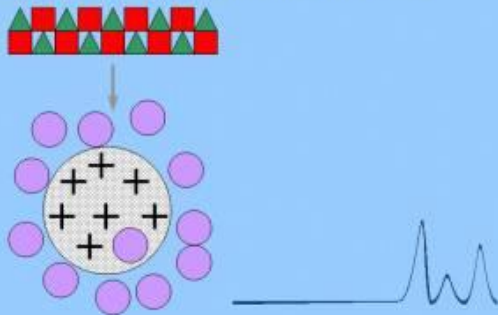
- Можно постепенно изменять концентрацию элюента в подвижной фазе, тем самым добиваясь постепенности десорбции компонентов с сорбента:

Ионообменная хроматография

- Это взаимодействие зарядов молекул разделяемых веществ и противоположных зарядов компонентов, связанных ковалентно с хроматографической матрицей. Метод: вытеснительный.
- Существует два вида неподвижных фаз (сорбентов):
- - **анионообменник**, заряжен **ПОЛОЖИТЕЛЬНО**;
- - **катионообменник**, заряжен **ОТРИЦАТЕЛЬНО**

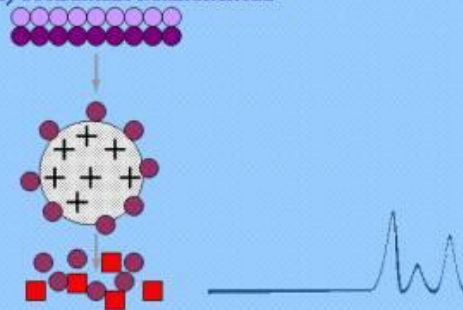
Принцип обмена ионами

- Шаг 1. Уравновешивание колонны (рН, ионная сила)



Принцип обмена ионами

- Шаг 4. Градиентное элюирование и вытеснение (десорбция) остальных компонентов



Неподвижная фаза в ИОХ

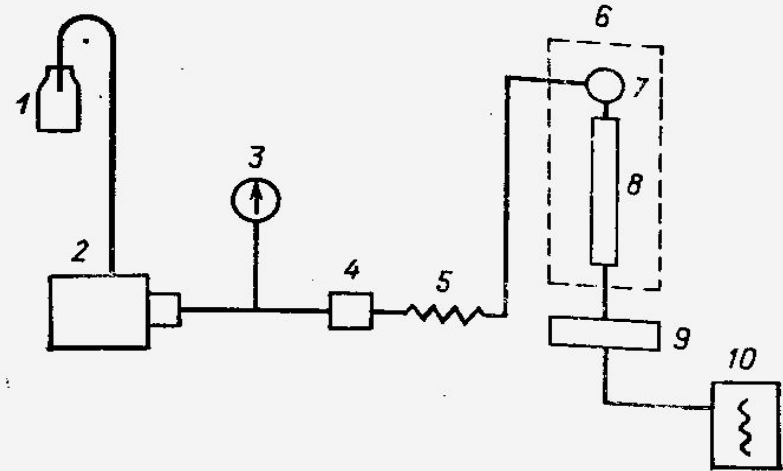
- НФ состоит из двух основных частей: матрица, на которую привит химически лиганд, несущий заряд.
- Матрицы бывают совершенно различной природы: неорганические соединения (например, силикагель) и органические (синтетические полимеры, такие как полиметакрилат и полистирол; а также полисахариды, которые находят самое что ни на есть широкое применение, например, сефароза).



Хроматографическая система СОСТОИТ ИЗ:

Рис. 8.1. Принципиальная схема жидкостного хроматографа:

1 — сосуд для подвижной фазы; 2 — насос;
3 — манометр; 4 — фильтр; 5 — демпфер;
6 — термостат; 7 — инжектор; 8 — колонка;
9 — детектор; 10 — самописец



- Принципиальная схема жидкостного хроматографа:
- / — сосуд для подвижной фазы; 2 — насос; 3 — манометр; 4 — фильтр; 5 — демпфер; 6 — термостат; 7 — инжектор; 8 — колонка; 9 — детектор; 10 — самописец

Насос и градиентный задатчик

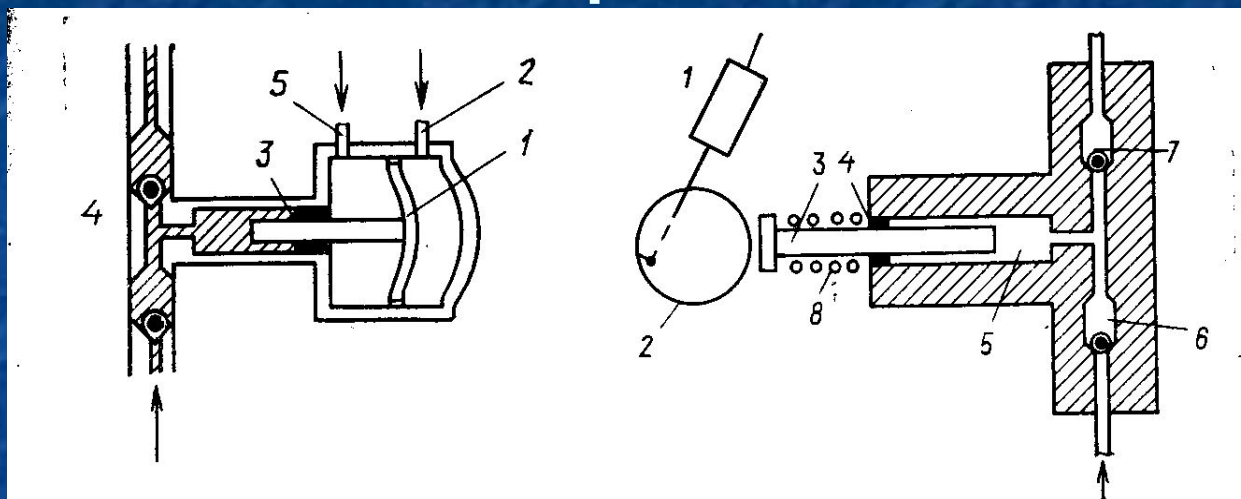


Рис. 8.2. Схема насоса постоянного давления:

1 — поршень воздушного цилиндра; 2, 5 — штуцеры подачи воздуха; 3 — поршень насоса; 4 — клапаны

Рис. 8.3. Схема поршневого насоса постоянного расхода:

1 — электродвигатель; 2 — эксцентрик; 3 — поршень; 4 — уплотнение; 5 — цилиндр; 6 — входной клапан; 7 — выходной клапан; 8 — возвратная пружина

Все насосы для ВЭЖХ делятся на две группы: постоянного расхода и постоянного давления

- для упаковки колонок, давление достигает 100 МПа.
- (1 мегапаскаль [МПа] = 10.2 технических атмосфер)



Рис. Капиллярные хроматографические колонки для жидкостной хроматографии, слева – аналитическая колонка диаметром 5 микрон с предколонкой, справа – аналитическая колонка диаметром 1.8 микрон

Оборудование для ВЭЖХ



УФ-детектор



ИК-детектор



Рефрактометр



Флуориметр



Детектор по радиоактивности



Амперометр



- Детекторы для ВЭЖХ

Хроматограф «Милихром»

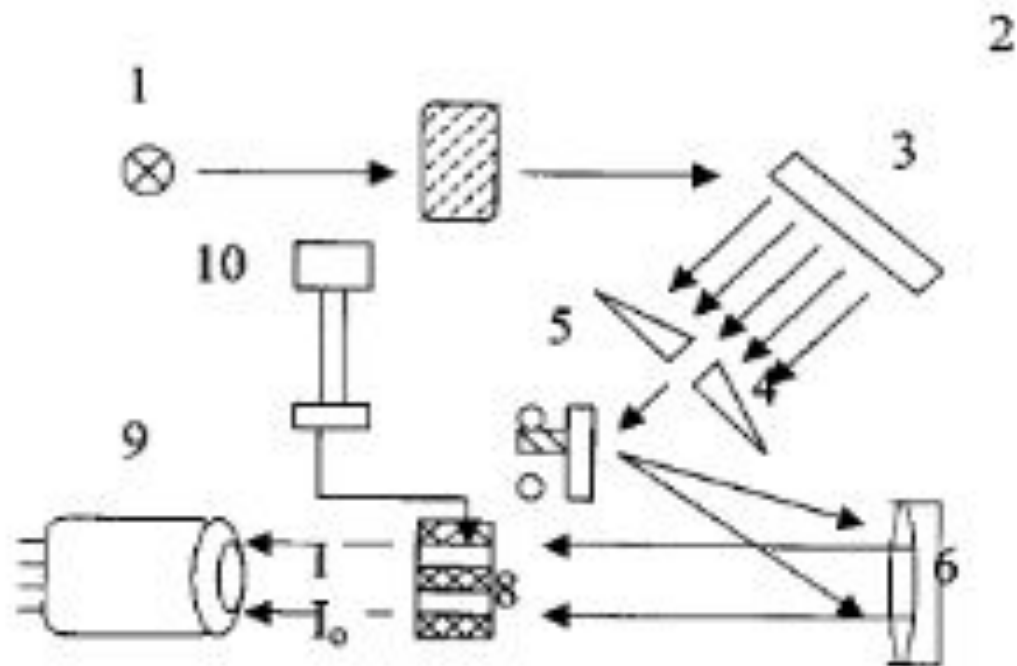
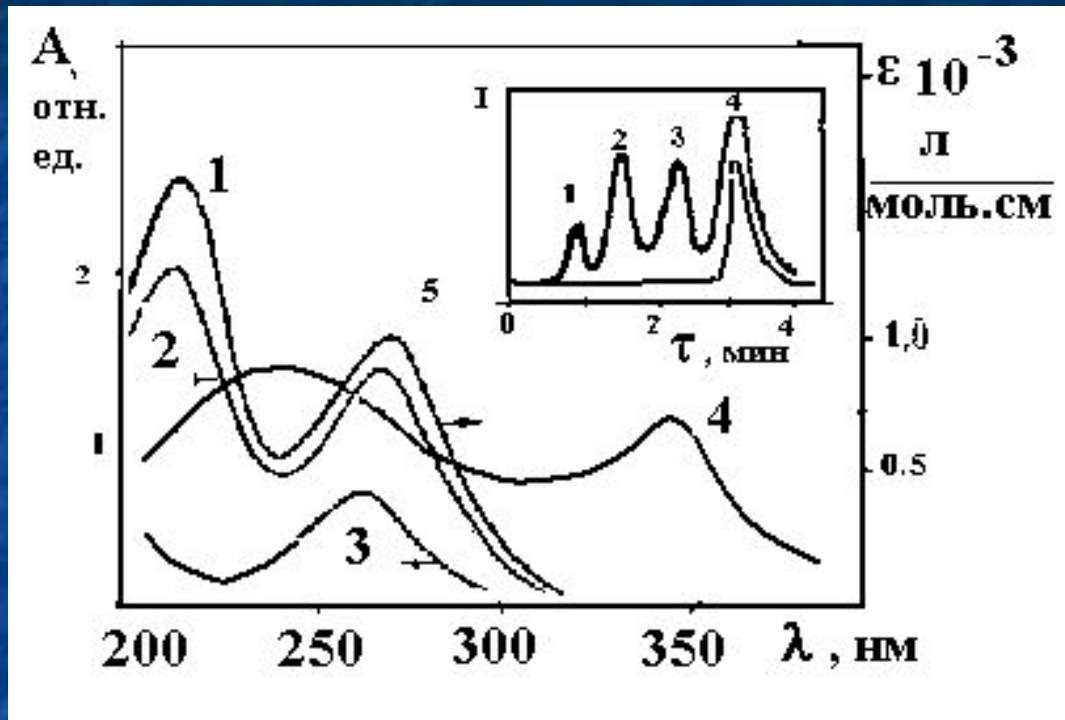


Рис. 5.3. Принципиальная схема спектрофотометрического детектора хроматографа "Милихром": 1 - лампа ДДС-30; 2 - оптическая система; 3 - управляемая дифракционная решетка; 4 - щель монохроматора, 5 - зеркало модулятора; 6 - вогнутое зеркало; 7 - рабочая кювета, 8 - сравнительная кювета; 9 - ФЭУ; 10 - хроматографическая колонка

Хроматограммы облученного раствора лигнина при различных длинах волн



- Спектры оптического поглощения отдельных продуктов радиолиза лигнина