

Основы хроматографического анализа

Хроматография - один из наиболее используемых методов.

Открыт русским ботаником М.С. Цветом.

Общая характеристика метода

Хроматография – это физический метод разделения веществ, в котором разделяемые компоненты распределяются между двумя фазами, одна из которых неподвижна, а другая движется в определенном направлении относительно первой. (*IUPAC, Nomenclature for Chromatography. Pure and Appl. Chemistry, 65(4), 1993, 819-872*)//

П.ф. – жидкость, газ, флюид.

Н.ф. (сорбент) - твердое вещество, жидкость иммобилизованная на твердом носителе.

Общая характеристика метода

- Хроматография основана на прохождении разделяемых компонентов через систему подвижной и неподвижной фаз.
- Анализируемую пробу вместе с подвижной фазой пропускают через неподвижную фазу, находящуюся в колонке.
- Компоненты пробы с различной силой взаимодействуют с поверхностью сорбента
- $X_{пф} \leftrightarrow X_{нф}$
- Равновесие описывается константой распределения:

$$K = \frac{[X_{нф}]}{[X_{пф}]}$$

- $[X_{нф}]$, $[X_{пф}]$ – равновесные концентрации компонента X в неподвижной и подвижной фазах, соответственно, при достижении равновесия.

Общая характеристика метода

- На величину константы распределения влияют температура, природа неподвижной и подвижной фаз.
- Вещества с большими константами распределения удерживаются неподвижной фазой сильнее, чем вещества с меньшими константами, и выходят из колонки позже.
- Таким образом достигается разделение веществ.
- Эффективность разделения даже химически подобных соединений обусловлена многократностью чередования актов «сорбция-десорбция», так как разделение происходит в потоке подвижной фазы.

Общая характеристика метода

- **1903 год – русский ученый М.С. Цвет сообщил о разделении окрашенных компонентов экстрактов из листьев растений на колонке, заполненной кальций карбонатом.**
- **Июнь 1941 года – английские ученые А. Дж. П. Мартин и Р. Л. М. Синдж сообщили о разделении аминокислот белка шерсти методом жидкостной хроматографии.**
- **Практически в это же время опубликовали, что подвижная фаза может быть не только жидкостью, но и *«паром»*.**
- **1950 год - А. Дж. П. Мартин выступил с докладом о газожидкостной хроматографии.**
- **1952 год - – английские ученые А. Дж. П. Мартин и Р. Л. М. Синдж удостоены Нобелевской премии за открытие распределительной хроматографии.**

Общая характеристика метода

Хроматография используется для:

- ✓ **разделения многокомпонентных смесей;**
- ✓ **очистки веществ от примесей;**
- ✓ **оценки однородности веществ;**
- ✓ **идентификации веществ;**
- ✓ **количественного анализа;**
- ✓ **молекулярно-структурного анализа.**

Достоинства хроматографии:

- ✓ **экспрессность;**
- ✓ **высокая чувствительность;**
- ✓ **универсальность – позволяет анализировать жидкие, твердые, газообразные вещества с молярной массой до 1000000 г/моль.**

Метод широко применим в исследовательских и клинических целях в различных областях химии, медицины и фармации.

Хроматография- фармакопейный метод анализа.

Классификация хроматографических методов

1. По агрегатному состоянию п.ф. и н.ф.



1.2 По механизму разделения (по типу устанавливаемых равновесий)

Вид хроматографии	Преобладающий механизм разделения
Адсорбционная	Различие в адсорбируемости разделяемых веществ твердым сорбентом (н.ф. – твердые сорбенты)
Распределительная	Различие в растворимости разделяемых веществ в н.ж.ф. или в н.ж.ф. и п.ж.ф. (н.ф. - жидкости)
Ионообменная	Избирательный обмен ионами фазой сорбента и раствором, содержащим разделяемую смесь (н.ф. - иониты)
Эксклюзионная	Различие в размерах и формах молекул разделяемых веществ (н.ф. – пористые гели)
Афинная	Различие в способности разделяемых веществ к биоспецифическим взаимодействиям (н.ф. – БАВ – гормон, фермент – закрепленные на носителе)
Хемотроматография	Различие в способности разделяемых веществ вступать в химические реакции с реагентами, входящими в состав н.ф.

1.3 По технике эксперимента

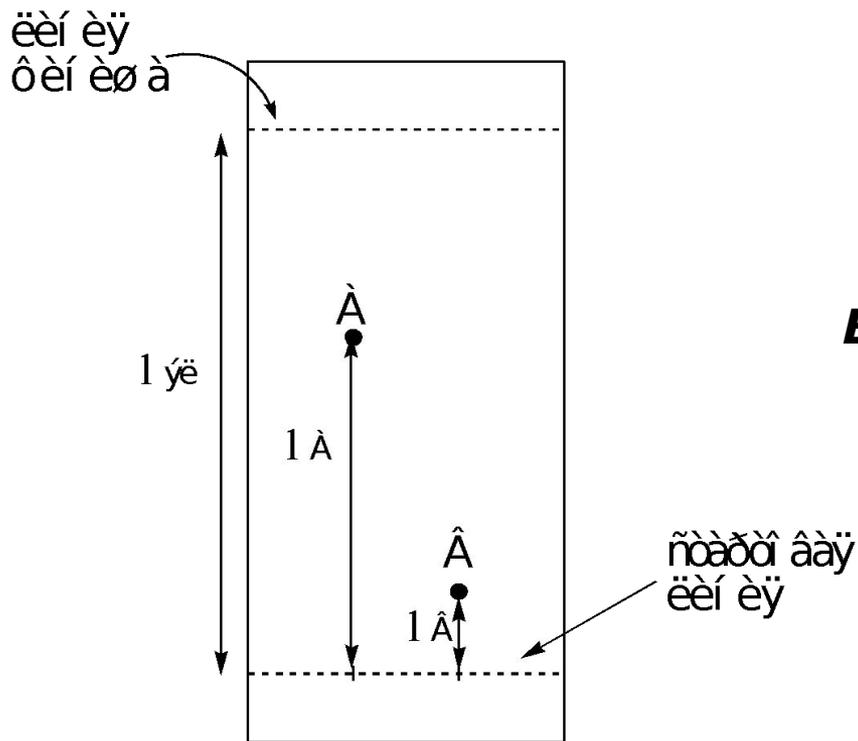
- **Колоночная (капиллярная) хроматография**
- **Плоскостная хроматография (ТСХ, бумажная)**

1.4 По цели хроматографирования

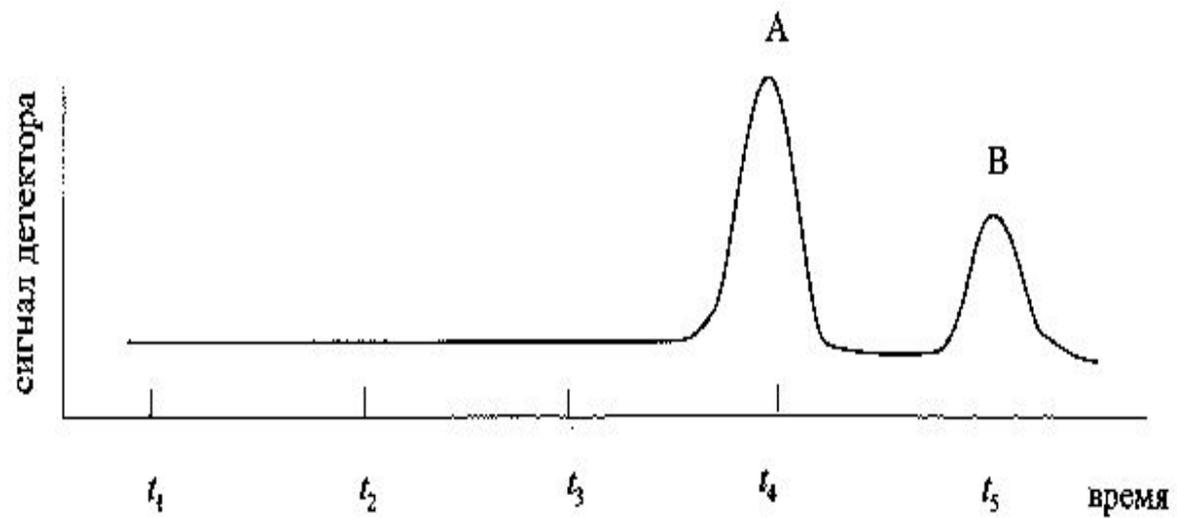
- **Аналитическая хроматография** –
качественный, количественный, молекулярно-
структурный анализ
- **Препаративная хроматография** –
выделение индивидуальных веществ
очистка от примесей
концентрирование

Виды хроматограмм, способы их получения

Хроматограммы бывают *внутренними* (в плоскостной хроматографии) и *внешними* (в колоночной хроматографии)



Внутренняя хроматограмма

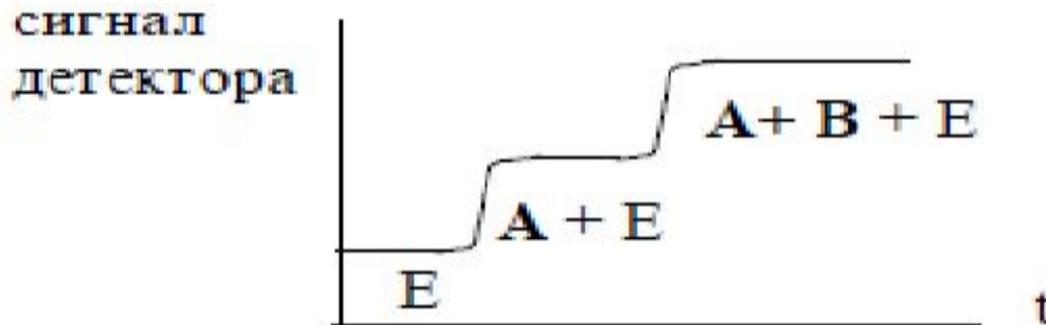


Внешняя хроматограмма

Способы получения хроматограмм

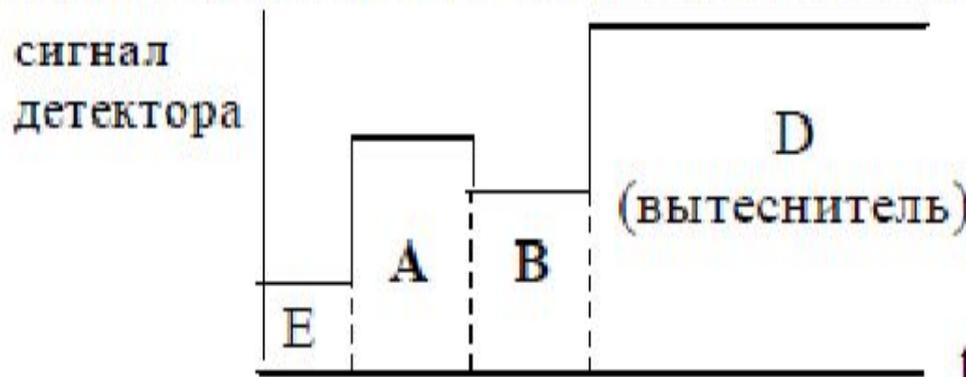
1. Фронтальный способ

- ✓ В колонку, заполненную сорбентом, непрерывно вводят раствор разделяемых веществ.
- ✓ Данным способом в чистом виде можно получить только один наименее сорбируемый компонент.
- ✓ Фронтальный способ используется для очистки, обезвоживания растворителей и т.д.

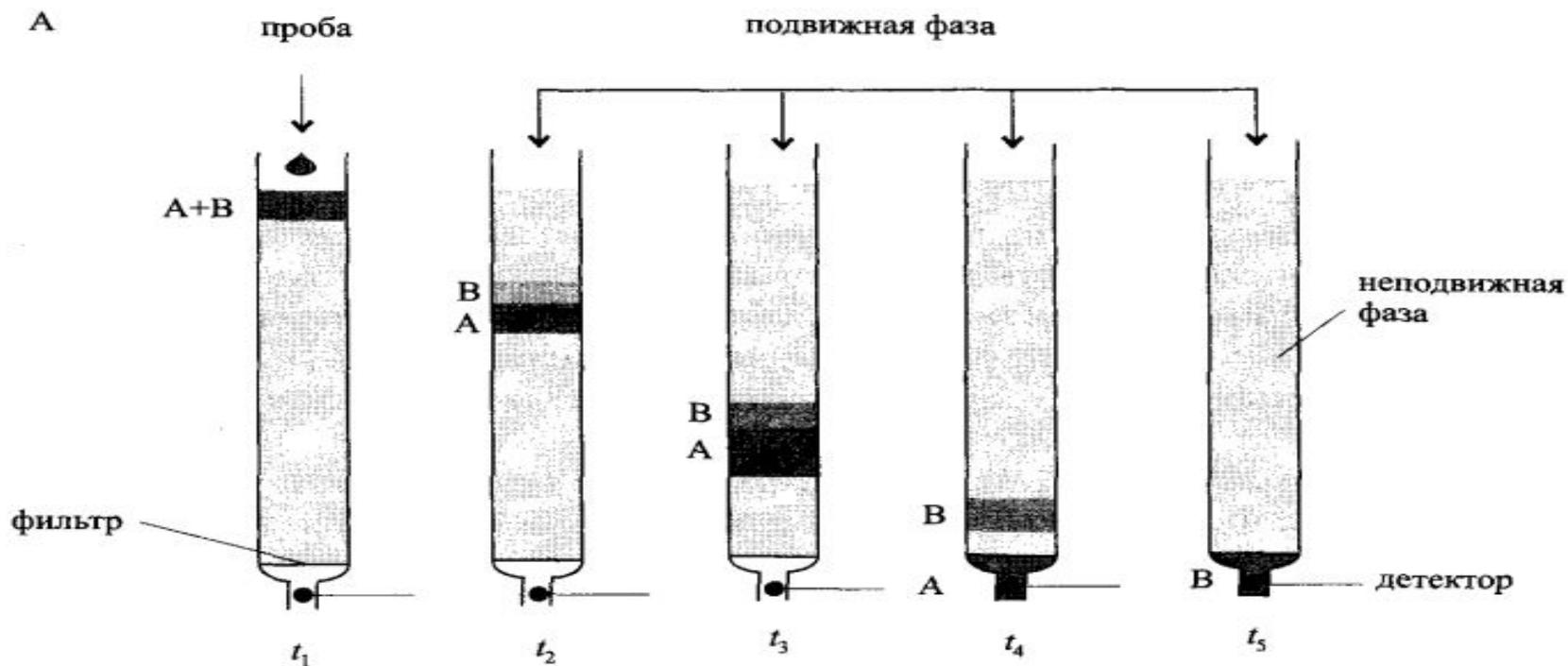


Способы получения хроматограмм

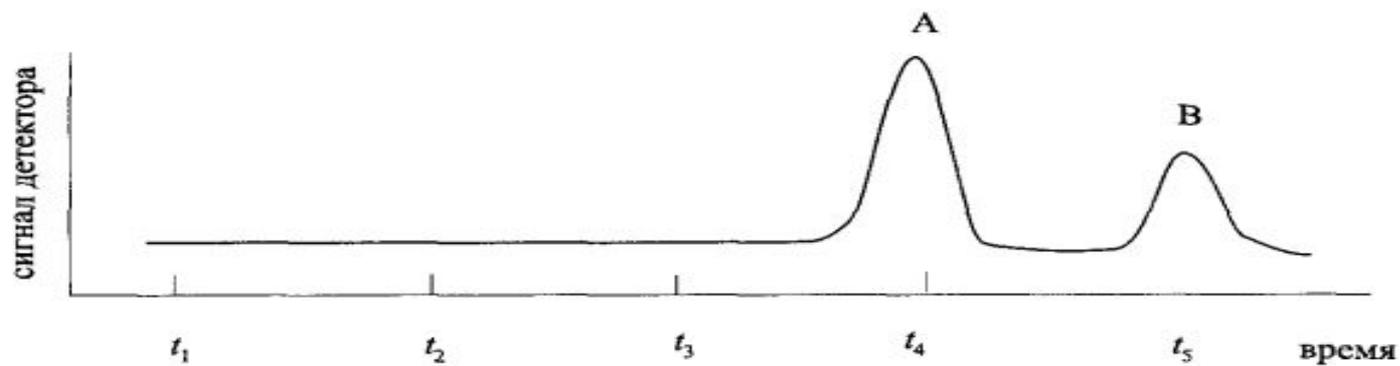
- **2. Вытеснительный способ.**
- **В колонку вводят порцию раствора разделяемых веществ, после чего через колонку непрерывно пропускают раствор вещества (вытеснитель), сорбируемость которого выше, чем у любого из разделяемых веществ.**
- **Вытеснительный способ применяют для разделения макроколичеств для препаративных целей.**



3. Элюентный



Б

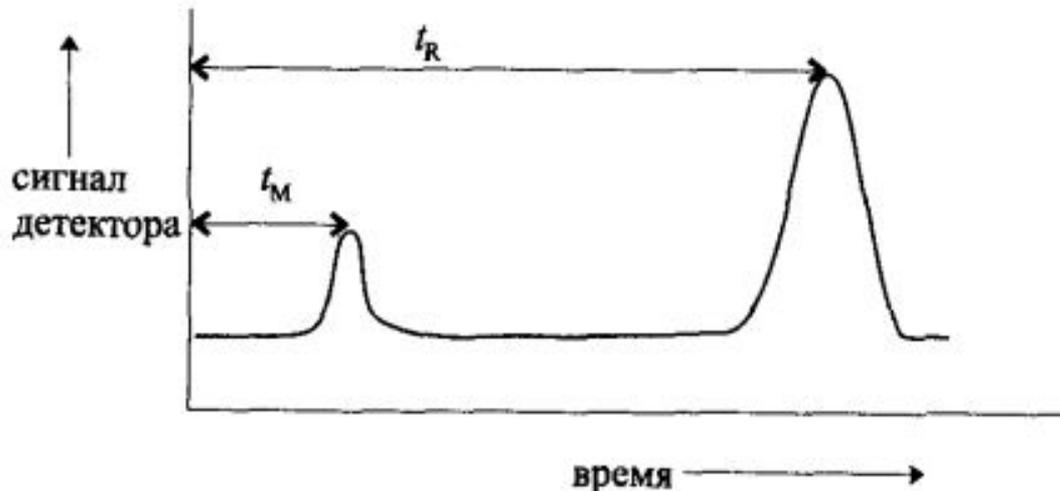


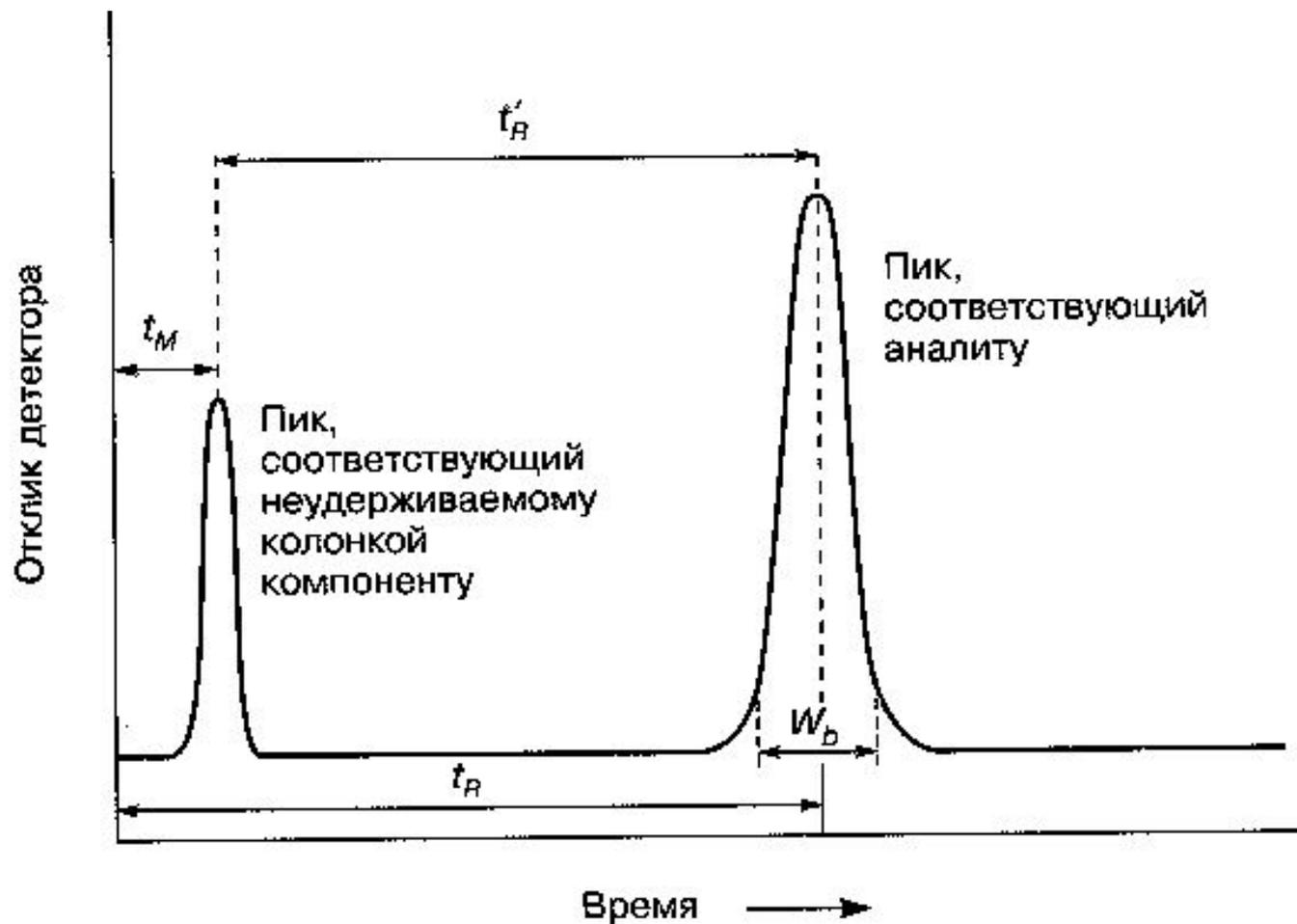
Основные хроматографические параметры (на примере колоночной хроматографии)

1. **Общее время удерживания t_R** – время от момента ввода пробы до регистрации максимума пика на хроматограмме.
2. **Исправленное время удерживания –**

$$t_R' = t_R - t_M$$

t_M – «мертвое» время колонки, т.е. время выхода несорбирующегося в данных условиях компонента. Соответствует времени, за которое молекулы подвижной фазы проходят через колонку





Основные хроматографические параметры

3. Удерживаемый объем V_R – объем подвижной фазы, который нужно пропустить через колонку с определенной скоростью, чтобы элюировать вещество.

$$V_R = t_R \cdot F$$

F – объемная скорость потока подвижной фазы, мл/с.

4. Исправленный удерживаемый объем V_R' -

$$V_R' = t_R' \cdot F$$

5. Коэффициент распределения

$$K = \text{Сн.ф.} / \text{Сп.ф.}$$

Сп.ф., Сн.ф. – концентрации вещества в подвижной и неподвижной фазах

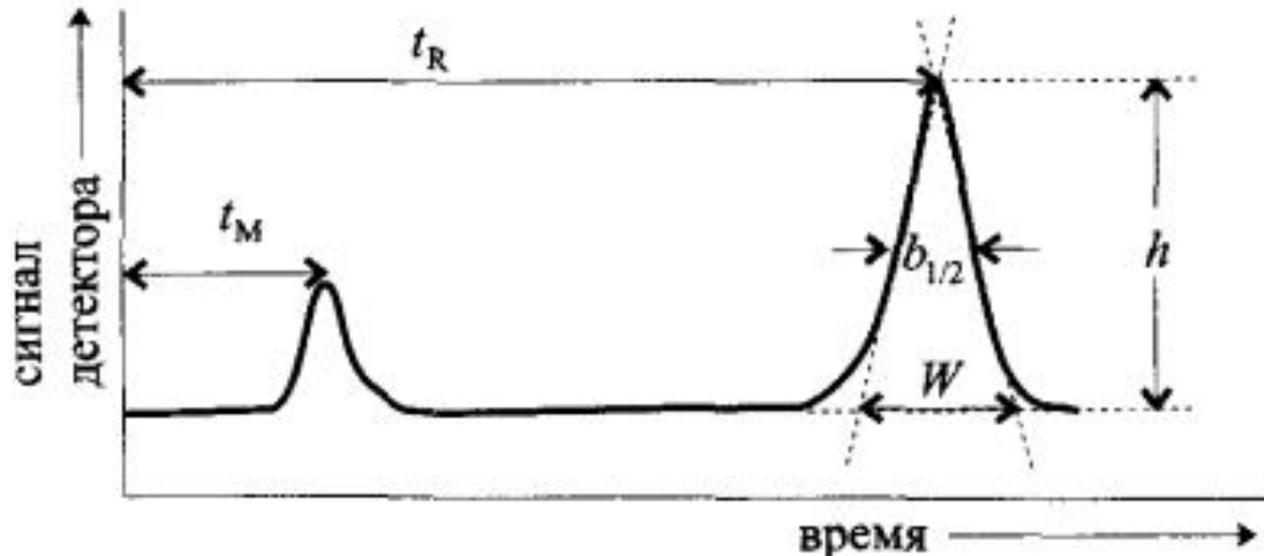
Основные хроматографические параметры

6. Площадь хроматографического пика, S .

7. Высота хроматографического пика, h .

8. Ширина пика у его основания, W .

9. Ширина пика на половине его высоты $b_{1/2}$



Теории хроматографического разделения

Теория теоретических тарелок

(1952 г , Мартин и Синдж, Нобелевская премия за открытие распределительной хроматографии)

Т.т.т. основана на некоторых допущениях:

1. Колонка состоит из определенного числа теоретических тарелок.

Теоретическая тарелка – гипотетическая зона в колонке, высота которой соответствует достижению равновесия в одном элементарном акте «сорбция-десорбция» между двумя фазами.

Чем больше теоретических тарелок в колонке, тем большее число раз устанавливается равновесие , тем эффективнее колонка.

$$N = L/H \quad \text{или} \quad H = L/N$$

N- число теоретических тарелок

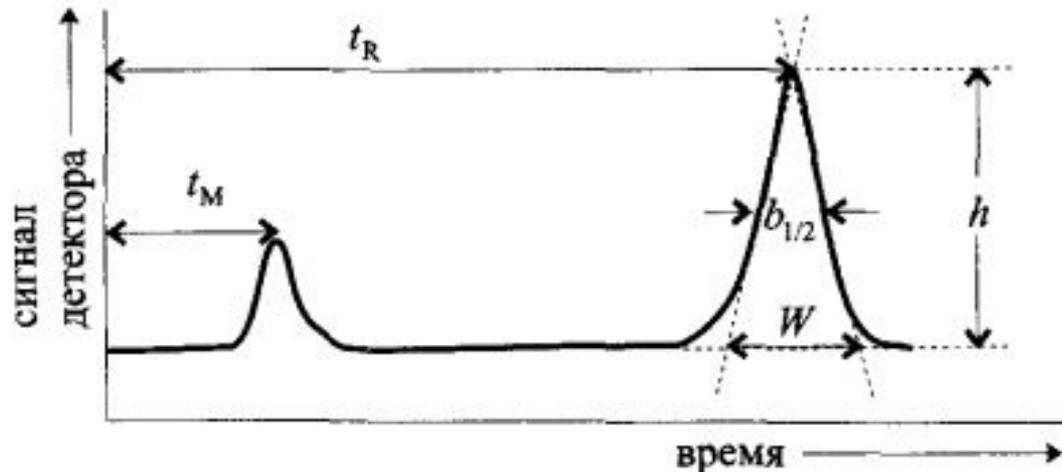
L- длина колонки

H – высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ)

Теории хроматографического разделения

- Число теоретических тарелок можно рассчитать из хроматограммы:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$



Теория теоретических тарелок

2. Равновесие на каждой тарелке устанавливается мгновенно, до того как п.ф. переместится на следующую тарелку.
3. Переход вещества с одной тарелки на другую тарелку происходит дискретно.
4. Все протекающие в колонке процессы взаимонезависимы.

Число теоретических тарелок – мера эффективности колонки и постоянно для всех пиков на хроматограмме.

Кинетическая теория хроматографии (Ван-Деемтер и Клинкаенберг)

Согласно этой теории размывание хроматографического пика обусловлено следующими процессами:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Уравнение Ван-Деемтера

H – ВЭТТ

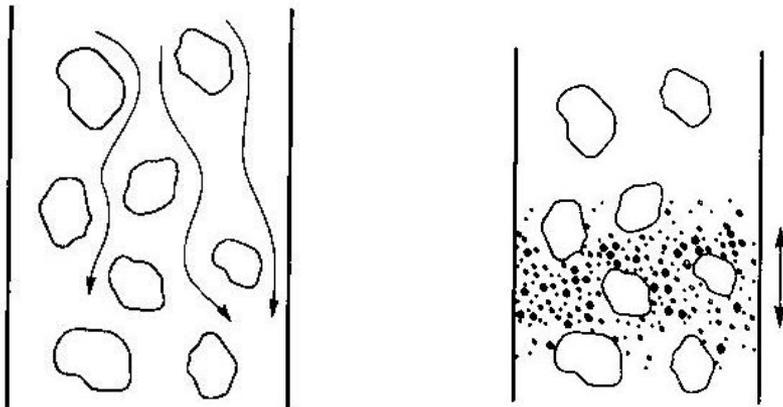
A – вихревая диффузия

B – молекулярная диффузия

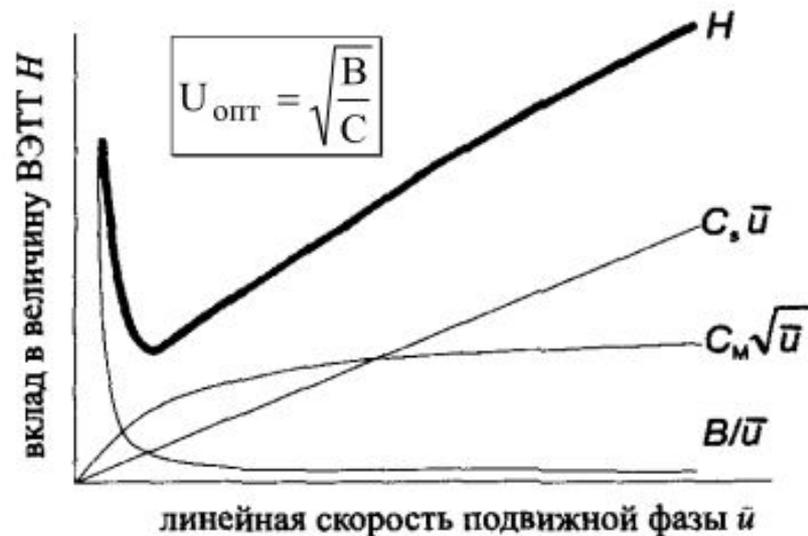
C – сопротивление массопереносу

u – линейная скорость потока п.ф.

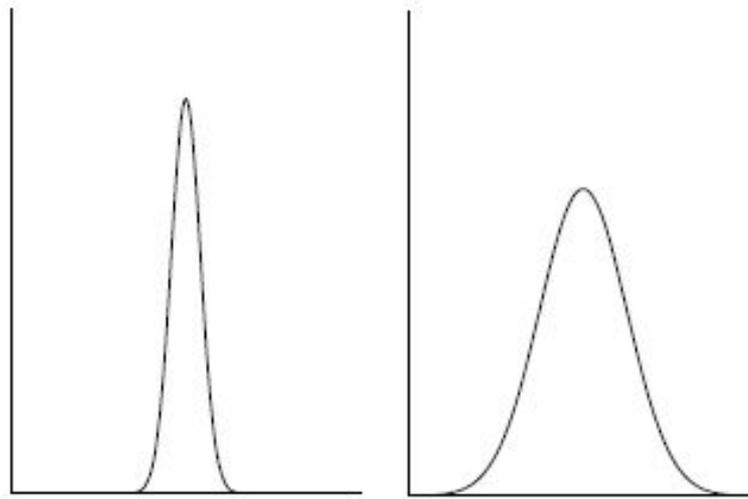
$$C = \frac{1}{6} \frac{d^2}{D}$$



Вихревая диффузия Продольная диффузия



Кинетическая теория хроматографии (Ван-Деемтер и Клинкенберг)



Хроматограмма вещества, полученного на колонках с разной эффективностью

Количественный анализ в колоночной хроматографии

Количественный анализ в колоночной хроматографии предполагает:

•определение абсолютного содержания обнаруживаемых компонентов в анализируемой пробе;

•определение соотношения компонентов анализируемой смеси.

Методы количественного анализа в колоночной хроматографии основаны на предположении, что *площадь* хроматографического пика пропорциональна *количеству вещества*.

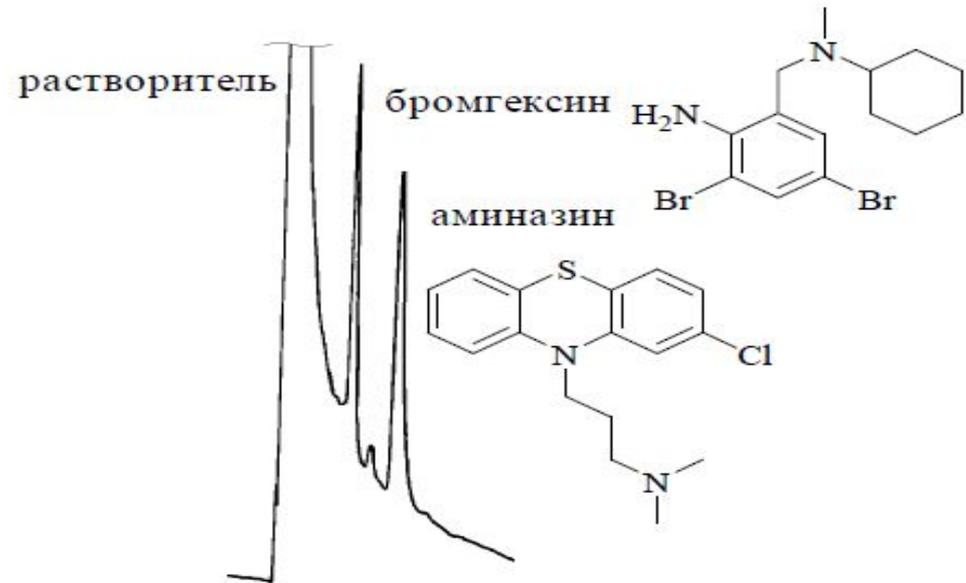
Методы определения абсолютного содержания компонентов

1. Метод абсолютной калибровки (внешнего стандарта)

Для каждого компонента смеси получают калибровочный график зависимости площади пика от количества введенного в колонку вещества. Для построения калибровочных графиков необходимо иметь в наличии чистые образцы всех компонентов смеси.

2. Метод внутреннего стандарта

К исследуемой смеси добавляют точно известное количество вещества-стандарта, которое само в анализируемой смеси отсутствует и дает пик на хроматограмме в области, где оно не перекрывается с компонентами смеси.



Строят калибровочный график в координатах $S_{ст}/S_x - C$, где $S_{ст}$ – площадь пика вещества стандарта; S_x – площадь пика определяемого вещества; C – концентрация.

Методы определения соотношения компонентов смеси

1. Метод нормировки

Сумма площадей всех пиков на хроматограмме принимается за 100%, тогда доля отдельного компонента рассчитывается:

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

C_i – содержание в смеси компонента i , %;

S_i – площадь пика компонента i .

Условия применения метода нормировки:

- анализируют смеси, содержащие химически родственные компоненты;
- обязательна регистрация всех компонентов анализируемой смеси;
- отклик детектора на компоненты смеси должен быть одинаков.

Методы определения соотношения компонентов смеси

2. Метод нормировки с поправочными коэффициентами

В случае, если отклик детектора на компоненты смеси неодинаков, в расчетную формулу для каждого компонента вводят поправочный коэффициент, учитывающий чувствительность детектора к данному компоненту.

$$C_i = 100 \frac{S_i f_i}{\sum_{i=1}^n S_i f_i}$$

Качественный анализ: идентификация известных соединений

- 1. Совпадение хроматографических параметров ($t_{R'}$, $t_{R''}$, $V_{R'}$, $V_{R''}$) неизвестного и стандартного соединений (при одинаковых условиях эксперимента) говорит о том, что эти соединения могут быть идентичны.**

Условия эксперимента – скорость потока п.ф., природа п.ф., природа неподвижной фазы, размер колонки (длина и внутренний диаметр) и т.д..

Качественный анализ: идентификация известных соединений

2. Применение индексов удерживания

Индекс удерживания данного вещества – это число, в 100 раз превышающее число атомов углерода гипотетического *n*-алкана, обладающего тем же временем удерживания.

Индекс удерживания вещества в 100 раз превышает число его атомов углерода (например, индекс удерживания гексана равен 600, октана – 800).

Индексы удерживания рассчитываются по результатам хроматографического эксперимента.

Например, индекс удерживания Ковача:

$$I = 100y \left(\frac{\lg t_{R_x} - \lg t_{R_z}}{\lg t_{R_{x+y}} - \lg t_{R_z}} \right) + 100z$$

z, y – число атомов углерода у ближайших алканов гомологического ряда.

Индексы удерживания множества веществ определены и собраны в базы данных.

Заключение

Хроматографию используют для:

- **разделения многокомпонентных смесей;**
- **очистки веществ от примесей;**
- **оценки однородности веществ;**
- **идентификации веществ;**
- **количественного определения веществ;**
- **молекулярно-структурного анализа.**

Хроматография обладает рядом достоинств:

- **экспрессность;**
- **высокая чувствительность;**
- **универсальность – позволяет анализировать жидкие, твердые, газообразные вещества с молекулярной массой до 1000000 г/моль.**