

Тема 9. Хроматографія. Мікрогетерогенні дисперсні системи.

9.1. Хроматографія

Серед хімічних, фізико–хімічних методів розділення, аналізу, досліджень структури та властивостей індивідуальних хімічних сполук та їх сумішей провідне місце займає хроматографія.

Російський вчений Михайло Семенович Цвет (1872-1919 рр.) у 1903 році відкрив хроматографію під час дослідження механізму перетворення сонячної енергії у рослинних пігментів. Він є засновником наукового методу –хроматографії. Вчений створив основу багатоступеневого розділення сумішей, пов'язав різні варіанти хроматографії єдиною теорією. Останнім часом широко використовують інструментальні методи аналізу (газову, рідинну, високоефективну рідинну хроматографії) для швидкого і якісного аналізу води, ґрунту, повітря, біологічного матеріалу навколишнього середовища і тваринного світу, а також при розділенні сумішей.

Хроматографічний метод аналізу ґрунтується на вибіркового поглинанні окремих компонентів суміші, що вивчається, різними адсорбентами. В процесі переміщення однієї фази (рухомої) відносно іншої (стаціонарної) відбувається хроматографічне розділення. Рідина, газ є **рухомою** фазою, а **нерухомою** фазою є твердий пористий матеріал або нелетка рідина.

Хроматографічний процес здійснюють у колонках, тонкому шарі і на папері.

Хроматографічні методи залежно від процесу, що полягає в основі розділення речовин, поділяють на такі:

-адсорбційну хроматографію, що ґрунтується на відмінностях здатності компонентів суміші до вибіркової адсорбції на сорбенті;

-роздільну хроматографію, що ґрунтується на різному розподілі розчинених речовин між двома розчинниками, які не змішуються:

-іонообмінну хроматографію, що ґрунтується на різниці здатності компонентів суміші до обмінної адсорбції:

-осадову хроматографію, яка використовує осадження малорозчинних сполук.

Газова хроматографія (ГХ). Газова хроматографія поєднує всі хроматографічні методи аналізу, в яких рухомою фазою є газ. За характером взаємодії між сорбентом та розділюваними речовинами цей метод відносять до розподілення нейтральних молекул між фазою сорбенту і газовою фазою, він може реалізовуватися або в розподіленні їх між твердою і газовою фазами, яке ґрунтується на адсорбції речовин на поверхні твердого носія (газоадсорбційна хроматографія – ГАХ), або у розподіленні між рідкою і газовою фазами, яке ґрунтується на розчиненні газоподібних речовин в тонкому шарі рідкої плівки – нерухокої фази, яка нанесена на пористий інертний носій (газорідинна хроматографія – ГРХ).

Газова хроматографія почала розвиватися з 1952 р., коли А. Джеймсом і А. Мартіном був запропонований метод газорідинної хроматографії.

На цей час газова хроматографія – один з поширених методів аналізу. У світі більше ста фірм розробляють і серійно випускають сотні різних моделей газових хроматографів. Експлуатуються декілька сот тисяч хроматографів. За випуском приладів і широтою застосування газова хроматографія значно випереджає інші фізико-хімічні методи аналізу. Цим методом користуються для визначення хлорорганічних сполук, хлоропохідних аліциклічних вуглеводнів, поліхлорованих біфенілів, пестицидів.

Газова адсорбційна хроматографія. Розділення компонентів у газоадсорбційній хроматографії відбувається за процесами адсорбції – десорбції на поверхні твердого носія – адсорбенту при проходженні газової рухокої фази.

Процес розділення полягає у такому. Газовою сумішшю, яка складається з декількох компонентів, насичують верхній шар адсорбенту, що міститься в колонці. Потім крізь колонку пропускають інертний газ–носії. Внаслідок повторення актів адсорбції і десорбції відбувається розділення суміші на компоненти. При виході з колонки речовини ідентифікують і визначають кількісно.

Адсорбенти поділяють на дві основні групи: полярні (гідрофільні) – силікагель, оксид алюмінію, штучні та природні силікати; неполярні (гідрофобні) – активоване вугілля, кізельгур, діатоміт. Залежно від конкретних умов проведення процесу за *газ–носії*, як правило, використовують азот, гелій, аргон, діоксид вуглецю, повітря, водень. Всі ці гази практично інертні до більшості речовин, які розділяються, та сорбентів.

На практиці рідинної адсорбційної хроматографії як адсорбенти найчастіше застосовують силікагель та оксид алюмінію

Силікагель. В адсорбційній хроматографії найширше використовують адсорбенти із загальною формулою $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ – силікагелі. Силікагель характеризується високою ємністю, інертний по відношенню до багатьох сполук та цілком доступний. Він є кращим адсорбентом для хроматографічного розділення сумішей нафтових вуглеводнів, вищих жирних кислот та їх складних ефірів, нітро– та нітросопохідних, ароматичних амінів та багатьох інших органічних сполук.

Оксид алюмінію – один із найчастіше використовуваних адсорбентів, на якому вдається хроматографічно розділити велику кількість різних сумішей речовин. Оксид алюмінію, як і силікагель, – полярний адсорбент, тому порядок елюювання розчинених речовин на цих двох адсорбентах однаковий. Незважаючи на близькість їх характеристик, існують деякі особливості оксиду алюмінію, які мають важливе значення в його практичному застосуванні. Оксид алюмінію – амфотерний адсорбент, що дозволяє проводити розділення сумішей як з полярних, так і неполярних розчинників.

Оксид алюмінію містить ряд сильноосновних центрів і тому краще адсорбує сполуки кислотного характеру. Активність оксиду алюмінію значною мірою залежить від вмісту в ньому води. Це має важливе практичне значення для адсорбційної хроматографії, тому що дозволяє замінити набір адсорбентів різної адсорбційної ємності одним адсорбентом. Зволожуючи найактивнішу форму оксиду алюмінію різними кількостями води, можна отримати набір адсорбентів з різною ємністю (I – 0 %; II – 3 %; III – 6 %; IV – 10%; V – 15 %).

Газорідинна хроматографія (ГРХ). Найзручнішим та практично важливим хроматографічним методом є газорідинна хроматографія. У газорідинній хроматографії використовуються прилади такого самого типу, як в газоадсорбційній хроматографії. Установки відрізняються тільки твердими носіями. Вміст етилового спирту в крові та сечі, а також отруйних речовин у біологічному матеріалі визначають методом тонкошарової рідинної хроматографії.

Рідинна хроматографія (РХ). Хроматографічні методи з рідкою рухомою фазою на практиці розрізняють за формою та виглядом твердої стаціонарної фази, яку застосовують, або твердого носія для нерухомої рідкої фази, тобто: хроматографія на колонці (КХ); хроматографія в тонкому шарі (тонкошарова ТШХ); хроматографія на папері (ПХ), причому дві останні можна розглядати як особливі двовимірні варіанти тривимірної хроматографії на колонці (“відкриті колонки”). Якщо нерухома фаза тверда, звичайно переважає адсорбція; рідку нерухома фазу (воду, органічні розчинники) наносять на тверді носії, які утримують її адсорбційно, частково при набряканні. Внаслідок цього адсорбційні та розподільчі рівноваги до можливого ступеня завжди співіснують.

Рідинна колонкова хроматографія. Основа рідинної колонкової хроматографії – розділення речовин, які містяться у розчині (рухома фаза), на колонках, що заповнені нерухомою фазою. Рухома фаза переміщується (фільтрується) вздовж шарів нерухомої фази зі швидкістю, яка залежить від сили взаємодії

компонентів з рухомою та нерухомою фазами. Колонки, що містять нерухому фазу, забезпечують розподіл молекул речовин.

Рідинна розподільча хроматографія. У розподільчій хроматографії розділення речовин відбувається внаслідок різного розподілення їх молекул між двома рідкими фазами, одна з яких нерухома, а інша – рухома. Речовини, які розділяються, наявні в обох фазах у вигляді розчину.

Колонка у рідинно–розподільчій хроматографії складається з шару тонкоподрібненої твердої речовини (носія), звичайно інертної, на якій сорбується нерухома розподільча фаза. Рухома фаза проходить крізь колонку і таким чином на найбільшій поверхні вступає в контакт з нерухомою фазою. При цьому відбувається перерозподіл компонентів між рухомим і нерухомих розчинниками внаслідок різної спорідненості компонентів з розчинниками. Різниця у розподілі компонентів між двома фазами, обумовлена різницею у їх спорідненості з рухомих розчинником, визначає неоднакову швидкість їх руху в колонці, що і призводить до розділення.

Рідинний хроматограф – універсальний прилад, принципова схема якого зображена на рис. 9.1.

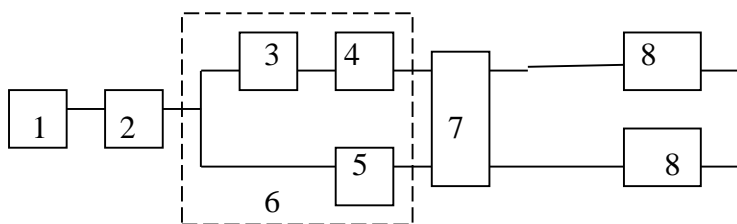


Рисунок 9.1 – Схема рідинного хроматографа: 1 – резервуар для елюенту; 2 – насос; 3 – блок введення проби; 4, 5 – колонки; 6 – детектор та самописець; 7 – колектор фракцій; 8 – вимірювач потоку

Хроматограф працює так: проба вводиться в блок дозатора, звідки потоком розчинника (рухомою фазою) переноситься в колонку з сорбентом. У колонці суміш розподіляється на окремі компоненти, які при подальшому рухові розчинника потрапляють в детектор у визначеній послідовності та реєструються на стрічці самописця. Після детектора компоненти потрапляють у збірник фракцій та можуть бути використані для подальшої роботи.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Рух рідини через пористий носій під дією сили тяжіння дуже малий і є поступовим процесом при хроматографічному рідинному аналізі на колонці. Для прискорення процесу хроматографії її можна проводити під тиском. Такий метод називають *високоєфективною рідинною хроматографією (ВЕРХ)*. ВЕРХ дозволяє скоротити час аналізу.

Недоліком ВЕРХ є те, що при підвищенні швидкості руху рідини не встигає встановлюватися рівновага між фазами, яка контролюється дифузією речовин, і у рідинах відбувається дуже поступово. Для зведення до мінімуму впливу дифузії та прискорення масообміну потрібно, щоб гранули носія мали як можна менший розмір, а плівка нанесеного розчинника була як можна тонша. Як і у випадку газової хроматографії, у ВЕРХ можна застосовувати декілька високочутливих детекторів; УФ-, флуорометричний та електрохімічний детектори дозволяють визначати малий вміст. Для досягнення максимальної чутливості при *флуорометричному* детектуванні реєстрацію сигналів різних речовин слід проводити при оптимальних довжинах хвиль збудження та випускнення. *Електрохімічний* детектор дуже зручний в роботі, особливо для визначення фенолів і амінів у водах. У сучасних приладах використовуються самоочисні електроди, які забезпечують стабільність сигналу протягом тривалого часу.

На цей час даний метод використовується для розділення, ідентифікації і кількісного визначення таких складних речовин, як суміші вуглеводнів, ароматичних карбонових кислот,

стероїдів, гербіцидів, пестицидів, антибіотиків, фарбників та їх напівпродуктів, алкалоїдів, різних нуклеїнових кислот.

Молекулярно-ситова хроматографія (МСХ) Метод молекулярно–ситової хроматографії (гель–хроматографії, гель–проникної хроматографії або ексклюзійної хроматографії) – це вид твердорідинної хроматографії, що базується на різній здатності молекул речовин, які відрізняються за своїми розмірами, яки можуть проникати вглиб заповнених розчинником пор нерухомої фази і затримуватися там на різний час. Молекули, які мають великий розмір, не проникають зовсім або проникають тільки у частину пор носія і вимиваються з колонки раніше, ніж маленькі молекули, що забезпечує розділення за розмірами молекул у розчині.

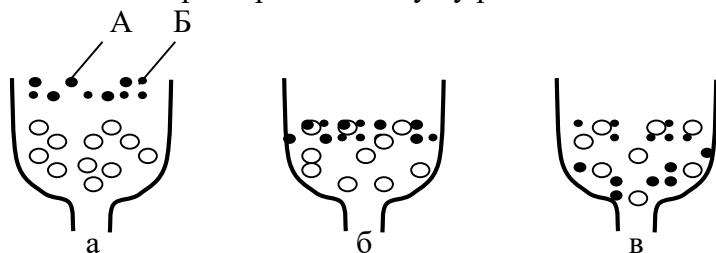


Рисунок 9.2 – Схема розділення компонентів у молекулярно–ситовій хроматографії

Якщо в колонку, наповнену пористим носієм, разом з розчинником внести суміш двох речовин А і В, які відрізняються розміром молекул (рис.9.2а), то невеликі молекули (речовина В) за рахунок дифузії вільно проникнуть в пори, а великі (речовина А) залишаться у навколишній частині носія шару розчинника (рис.9.2б).

При промиванні колонки чистим розчинником починає переміщуватися спочатку речовина А, яка перебуває у зовнішньому об'ємі. Тому великі молекули переміщуються по колонці з більшою швидкістю, ніж дрібні (рис.9.2в), рух яких постійно гальмується дифузиею у нерухому фазу.

Молекулярно–ситова хроматографія має порівняно коротку історію, вона сформувалася як самостійний метод в 50–х роках ХХ сторіччя. Завдяки своїй простоті молекулярно–ситова хроматографія дуже швидко почала застосовуватися в багатьох хімічних, біохімічних і клінічних лабораторіях. На сьогодні вона застосовується скрізь, де ставлять завдання розділення, очищення або аналізу природних сполук білків і синтетичних полімерів.

Хроматографія на папері (ПХ). Метод розділення речовин, заснований на різниці їх коефіцієнтів розподілу між двома рідкими фазами, що не змішуються, одна з яких нанесена на папері, називається розподільчою паперовою хроматографією.

У цьому виді хроматографічного аналізу роль колонки виконує смуга фільтрувального паперу для хроматографування, на яку наноситься невелика порція дослідного розчину, а потім промивається сумішшю води з органічним розчином або сумішшю двох (або декількох) органічних розчинників. Вода або органічний розчинник, який закріплюється на волокнах паперу, виконує роль нерухої рідкої фази; роль рухої рідкої фази виконує інший органічний розчинник (або їх суміш).

Теорія розподільчої колонкової хроматографії, розроблена А.Мартіном, Р.Сінджем і І.А.Фуксом, може бути поширена також на варіант паперової хроматографії.

У розподільчій колонковій хроматографії рух компонентів суміші, яка розподіляється, кількісно описується рухливістю R_f , яка є функцією поперечних розтинів рухої та нерухої фаз і коефіцієнта розподілу. Для паперової хроматографії величину R_f виміряти не можна, оскільки важливо визначити коефіцієнти розподілу. Тому для кількісної оцінки здатності розподілення речовин на папері вводиться коефіцієнт R_f , який є відношенням зсуву зони речовини до зсуву фронту розчинника:

$$R_f = \frac{\text{Швидкість руху зони одного компонента}}{\text{Швидкість руху фронту розчинника}}$$

Швидкість руху фронту рухливої фази

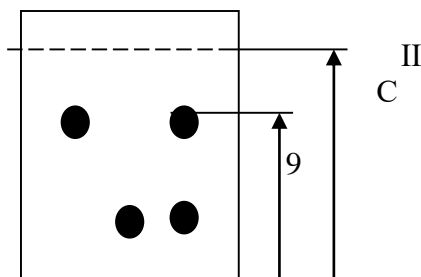
Тонкошарова хроматографія (ТШХ). У звичайному варіанті тонкошарова хроматографія є твердорідинною адсорбційною хроматографією, в якій замість заповненої адсорбентом колонки застосовують пластинки з поверхнями, вкритими тонким шаром адсорбенту.

Метод хроматографії в тонкому шарі був вперше описаний в 1938 р. російськими вченими Н.А. Измайловим і М.С. Шрайбергом, які поділили екстракти лікарських рослин на адсорбенти, що містилися у вигляді тонкого шару на покривному склі для мікроскопа.

У даний час хроматографія в тонкому шарі – один із найпростіших, дешевих та ефективних методів розділення важколетких компонентів складних органічних сумішей. Цей метод широко використовується для якісного і напівкількісного експресного контролю промислових процесів органічного синтезу в багатьох лабораторіях при проведенні наукових досліджень в хімії природних сполук, фармакології, клінічній діагностиці тощо.

Схема розподілення суміші речовин методом ТШХ показана на рис. 9.3.

На пластинку з тонким шаром адсорбенту (нерухома фаза) на визначеному місці (“стартова лінія”) наносять проби речовин і їх сумішей. Потім пластинку нижче стартової лінії занурюють в розчинник (рухома фаза). У міру руху розчинника (елюенту) на пластині відбуваються процеси адсорбції, які багаторазово повторюються, і десорбції речовин, які аналізуються, в результаті чого вони розподіляються. Відмітивши межу піднімання розчинника (лінію фронту), пластинку сушать і проводять операції з виявлення та визначення речовин, що аналізуються.



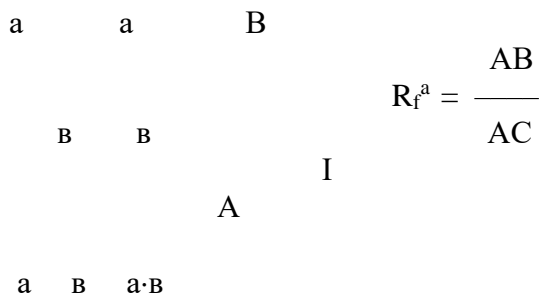


Рисунок 9.3 – Принципова схема розподілення суміші речовин методом тонкошарової хроматографії: а, в – індивідуальні речовини; (а + в) – суміш речовин а і в; I – лінія старту; II – фронт розчинника; АВ – висота підняття речовини; АС – межа підняття розчинника

Розташування плям речовин, які розподіляються в ТШХ аналогічно паперовій хроматографії, описують константою R_f , яка характеризує розташування речовини на даній хроматограмі.

Найбільше застосування тонкошарова хроматографія набула в аналізі органічних сполук природного і синтетичного походження. В цей час розроблена велика кількість методик розподілення і визначення різних класів органічних речовин – від простіших вуглеводнів до вітамінів, антибіотиків і нуклеїнових кислот.

Іонообмінна хроматографія – це рідинна хроматографія, яка заснована на різній здатності іонів, що поділяються, до іонного обміну з фіксованими іонами сорбенту, які утворюються внаслідок дисоціації іоногенних груп останнього. Різновидом іонообмінної хроматографії є іонна хроматографія, в якій іони, що поділяються, визначають у проточному, як правило, кондуктометричному детекторі (аналіз відбувається в іонному хроматографі). Іонообмінна хроматографія відбувається за рахунок сил електровалентного хімічного зв'язку.

Високоєфективна іонообмінна хроматографія дозволяє проводити аналіз суміші нуклеотидів, нуклеозидів, пуринових і піримідинових основ та їх метаболітів у біологічних рідинах, що широко використовуються у медичній практиці при діагностиці захворювань.

З препаративною метою цей метод використовують для виділення алкалоїдів, антибіотиків, ферментів.

Осадова хроматографія В осадовій хроматографії основним фактором є утворення малорозчинних речовин внаслідок взаємодії дослідної речовини з осаджувачем, який міститься на носії. Осадова хроматографія запропонована російськими вченими Е.Н. Гапоном і Т.Б.Гапон. Пізніше В.Б.Алеськовський і З.І.Хейфец запропонували замість суміші носія і осаджувача застосовувати іонообмінні смоли, які “заряджені” іонами, здатними створювати високорозчинні осади з іонами дослідного розчину. *Осаджувачі* – це реагенти, які утворюють важкорозчинні осади з дослідною речовиною. *Носіями* для осадової хроматографії можуть бути: силікагель (гель H_2SiO_3), гідроксид алюмінію, оксид алюмінію, сульфат барію, крохмаль, пісок та інші. Носій повинен бути індиферентним до осаджувача дослідних речовин та осадів, які утворюються. Осадові хроматограми можуть бути одержані на колонці, на папері, у тонкому шарі сорбенту.

Колонки, які застосовують для аналізу, складаються з носія і осаджувача. Для цього носій обробляють розчином осаджувача і висушують (суха колонка) або не висушують (мокра колонка). Потім через колонку пропускають суміш двох або більше речовин, які при проходженні реагують з осаджувачем і утворюють важкорозчинні осади. При цьому у верхній зоні колонки утворюється осад з найменшою розчинністю, а в нижній – осад з найбільшою розчинністю. Потім ці зони можуть бути послідовно вимиті з колонки розчинником і суміш буде розділена.

Цей метод застосовується в аналітичному аналізі для визначення якісного і кількісного вмісту катіонів та аніонів

окремих речовин, а також для маркування сплавів, тому що кожен сплав має притаманну тільки йому хроматограму.

Афінна хроматографія, або хроматографія за спорідненістю заснована на здатності біологічно активних сполук взаємодіяти з певною специфічною функціональною групою нерухомого сорбенту (сефароза, агроза, колаген, поліуретан), утворюючи нековалентно зв'язаний комплекс, який вимивається з нерухомого шару під дією промивального розчину (елюенту).