

ТЕМА 5. ХРОМАТОГРАФІЯ: ПАПЕРОВА, ТОНКОШАРОВА, ІОНООБМІННА

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії паперової, тонкошарової, іонообмінної хроматографії, навчитися використовувати метод паперової хроматографії на практиці.

План

1. Загальна характеристика хроматографічних методів та їх класифікація.
2. Паперова хроматографія.
3. Тонкошарова хроматографія.
4. Іонообмінна хроматографія.



Основні терміни та поняття: хроматографія, рухома фаза, нерухома фаза, елюент, сорбат, сорбент, адсорбція, хроматограма.

1. Загальна характеристика хроматографічних методів та їх класифікація



Хроматографія, хроматографічний аналіз (з грецьк. *Chroma* – колір + *grapho* – пишу) – високоефективний фізико-хімічний метод розділення та аналізу, що ґрунтується на різному розподілі речовин в динамічних умовах між рухомою (РФ) і нерухомою фазами (НФ). НФ може бути твердою, рідкою, нанесеною на твердий носій, гель, може бути упакована в колонку, нанесена як шар або як плівка. РФ (елюент) може бути газом, рідиною або флюїдом (газом у надкритичному стані). Розділення може ґрунтуватися на адсорбції, розподілі, іонному обміні та їх комбінації, на відмінностях у фізико-хімічних властивостях молекул (розмір, маса, об'єм тощо).

В основу класифікації численних хроматографічних методів покладено такі ознаки:

1. Агрегатний стан фаз.
2. Механізм взаємодії «сорбент-сорбат».
3. Способи проведення хроматографічного аналізу.
4. Апаратурне оформлення (техніка виконання) процесу хроматографування.
5. Мета хроматографування.

За агрегатним станом фаз хроматографію поділяють на газову та рідинну. Газова хроматографія включає газорідинну та газотвердофазну, рідинна – рідинно-рідинну та рідинно-твердофазну. Перше слово в назві методу характеризує агрегатний стан РФ, друге – НФ.

За механізмом взаємодії сорбенту та сорбату можна виділити кілька видів хроматографії:

- Адсорбційна – заснована на різній адсорбованості речовин твердим сорбентом. При цьому навіть близькі за складом чи будовою речовини по-різному поглинаються сорбентами, відбувається вибіркова адсорбція, сильно сорбуючі речовини поглинаються у верхній частині колонки, а слабо сорбуючі просуваються далі. Досягається розділення суміші на окремі компоненти по довжині колонки при повторюваних процесах сорбції та десорбції в елементарних шарах.

- Розподільна – заснована на різній розчинності речовин, що розділяються в НФ (газорідина хроматографія) або на різній розчинності речовин в РФ і НФ (рідина хроматографія).

- Іонообмінна – базується на різній здатності речовин до іонного обміну.

- Ексклюзивна – базується на розходженні в розмірах і формах молекул речовин, що розділяються.

- Афінна – заснована на специфічних взаємодіях, характерних для деяких біологічних і біохімічних процесів (наприклад, антитіло і антиген, гормон і рецептор та ін.).

- Осадова хроматографія – заснована на утворенні відмінних за розчинністю осадів речовин, що розділяються з сорбентом.

- Адсорбційно-комплексоутворювальна – заснована на утворенні координаційних сполук різної стійкості у фазі або на поверхні сорбенту.

Слід пам'ятати, що класифікація за механізмом взаємодії досить умовна: її використовують у тому випадку, якщо відомий домінуючий механізм; часто процес поділу протікає відразу за кількома механізмами.

За технікою виконання виділяють колонкову хроматографію (поділ проводиться в спеціальних колонках) і площинну хроматографію, коли поділ проводиться на спеціальному папері (паперова хроматографія) або в тонкому шарі сорбенту (тонкошарова хроматографія). У колонковій хроматографії використовують насадкові або капілярні колонки. Насадочну колонку заповнюють сорбентом (насадкою), а внутрішню стінку капілярної колонки покривають плівкою рідини або пилом адсорбенту.

Залежно від мети проведення хроматографічного процесу розрізняють:

- аналітичну хроматографію (якісний і кількісний аналіз);
- препаративну хроматографію (для отримання речовин у чистому вигляді, для концентрування і виділення мікродомішок);
- промислову (виробничу) хроматографію для автоматичного управління процесом (при цьому цільовий продукт з колонки надходить в датчик).

Хроматографію часто використовують із дослідницькою метою при вивченні розчинів, каталітичних процесів, кінетики хімічних процесів тощо

За способами проведення аналізу виокремлюють три види хроматографії: 1) фронтальна, 2) проявляюча, 3) витіснювальна.

За допомогою хроматографічного методу можна:

- провести якісний і кількісний аналіз досліджуваної речовини;
- провести концентрування речовин з дуже розбавлених розчинів;

- розділити складні суміші органічних і неорганічних речовин на окремі компоненти;
- очистити речовину від домішок (препаративна хроматографія);
- визначити фізико-хімічні характеристики розділених речовин, зокрема молекулярну структуру деяких сполук шляхом встановлення зв'язку між здатністю до сорбції і будовою даної речовини.

Хроматографічні методи мають найбільш ефективні розподільні можливості за рахунок використання великої кількості типів міжмолекулярних взаємодій. Стадія поділу в хроматографічній колонці або шарі сорбенту забезпечує отримання відносно простих сумішей, аналізованих потім звичайними хімічними, фізико-хімічними чи фізичним методами або спеціально створеними для хроматографії методами або прийомами.

Популярним та доступним методом є площинна (планарна) хроматографія. Це спосіб аналізу, в якому процеси розділення суміші сполук здійснюються у плоскому шарі сорбенту (НФ). Вона ділиться на паперову (ПХ) та тонкошарову хроматографію (ТШХ), які схожі за технікою виконання аналізу. Ці два види рідинної хроматографії прості за технікою виконання, експресні, не вимагають дорогого устаткування. Тонкошарову хроматографію використовують частіше, ніж паперову.

1. Паперова хроматографія

Паперова хроматографія (ПХ, paper chromatography) є різновидом розподільної хроматографії, розділення речовин відбувається внаслідок їх розподілу між волокнами целюлози (НФ) і розчинником (РФ).

У НФ речовина може утримуватися завдяки:

- розчиненню в адсорбованій папером воді (зв'язана вода навіть у висушеному папері міститься у значній кількості);
- адсорбційним ефектам на папері;
- іонообмінному механізму, бо целюлоза може частково окислюватися.

Для ПХ застосовується якісний папір, який може бути модифікованим відповідно до поставлених завдань. Хроматографічний папір має бути хімічно чистим, нейтральним, інертним по відношенню до компонентів розчину і РФ, бути однорідним по щільності. Розчинники РФ і НФ не повинні змішуватися, склад розчинника в процесі хроматографування не повинен змінюватися, розчинники повинні легко віддалятися з паперу. Індивідуальні розчинники використовуються досить рідко. Для поділу водорозчинних речовин, наприклад, неорганічних іонів, як РФ зазвичай беруть органічний розчинник, а як НФ – воду (папір заздалегідь змочують водою).

Розчинниками є спирти (метанол, етанол, н-пропанол, бутанол), прості ефіри (етиловий, метиловий), кетони (ацетон, ацетил-ацетон), ефіри органічних кислот (метилацетат, етилацетат), піридин, хлороформ. Частіше використовуються суміші розчинників.

Для поділу компонентів, добре розчинних в органічних розчинниках використовують *метод обернених фаз*. У цьому методі для надання паперу гідрофобного характеру його просочують нафталіном, парафіном, розчином каучуку, силіконом та ін., а як РФ використовують воду, водний розчин якої-небудь кислоти чи лугу, буферний розчин. Такий папір є носієм для неполярних розчинників. Обернено фазова ПХ використовується, наприклад, для розділення й ідентифікації полінасичених жирних кислот при вивченні складу ліпідів, виділених із тканин тварин.

Для оцінки хроматографічної поведінки речовини в певних умовах використовують величину R_f , яка дорівнює відношенню відстані L_2 , пройденої речовиною, до відстані L_1 , пройденої розчинником:

$$R_f = \frac{L_2}{L_1}$$

R_f можуть мати значення від 0 до 1. При $R_f=0$ компонент суміші залишається на лінії старту, а при $R_f=1$ – рухається разом з фронтом розчинника. Значення R_f залежить від розподілу речовини, складу рухомої фази, типу паперу, температури, часу хроматографування, техніки експерименту.

За технікою виконання розрізняють такі види ПХ: одновимірна (висхідна і спадна), двовимірна, кругова й електрофоретична.

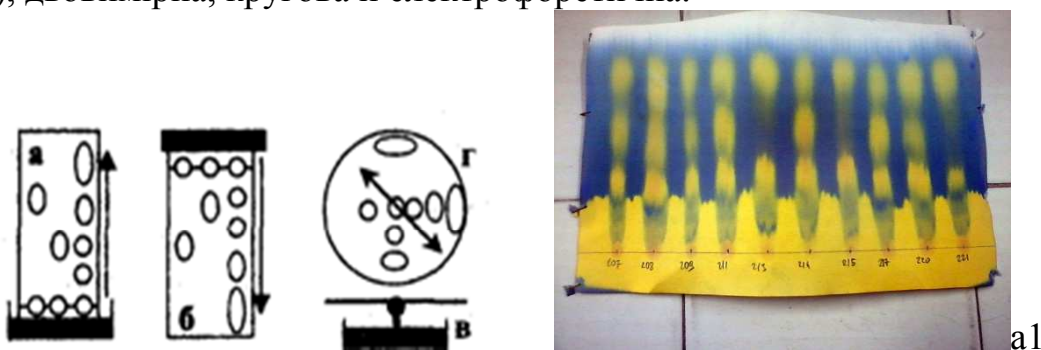


Рис.15. Види паперової хроматографії

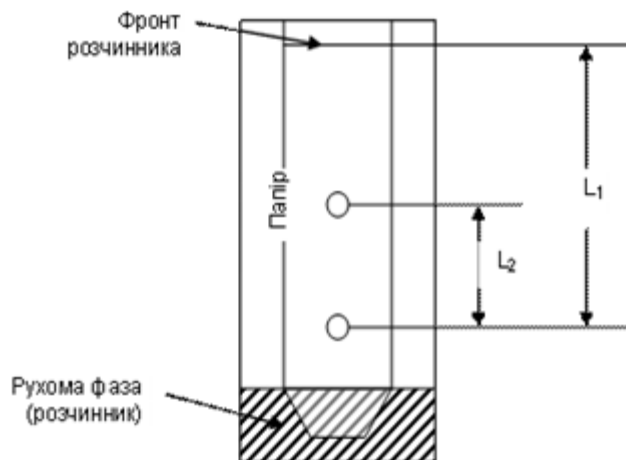
1) Одновимірна хроматографія

Для одновимірної хроматограми використовують скляні герметичні камери, паперові смуги шириною 4,5-5 см і завдовжки 30-50 см. Якщо елюент рухається на паперу вгору, метод називають висхідною ПХ (рис. 15., а, а1); при його русі зверху вниз – спадною ПХ (рис. 15, б).

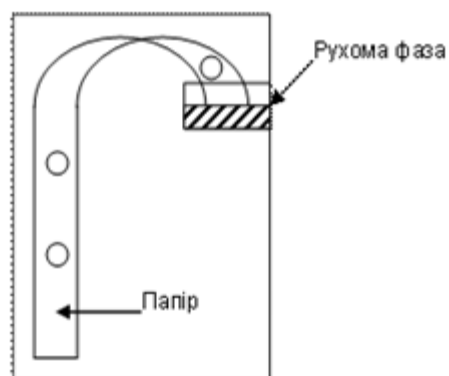
На нижню частину смужки фільтрувального паперу наносять краплину досліджуваного розчину. Папір уміщують у циліндр, на дно якого наливають РФ – розчинник. Нижній край паперової смужки занурюють у розчинник так, щоб нанесена пляма знаходилася трохи вище від рівня розчинника. Циліндр закривають кришкою. Під впливом капілярних сил РФ піднімається вгору. Завдяки різній розчинності компонентів суміші в розчиннику та їх різній адсорбційній здатності на папері утворюються зони, що відрізняються за складом. Коли рівень підйому досягне 2 см від верхнього краю, смужку паперу виймають, відзначають рівень фронту розчинника й висушують. Після цього, якщо потрібно, зони проявляють певними реагентами. Після проявлення розраховують значення R_f , для визначення L_2 знаходять відстані між точками в

центрі плям. Для розділення іонів металів зазвичай використовують РФ, що складається з ацетону та соляної кислоти.

Висхідна паперова хроматографія



Спадна хроматографія



2) Двомірна хроматографія

Іноді при складному вмісті проби не вдається розділити її компоненти за допомогою одного розчинника, тоді застосовують *двомірну хроматографію*. Для цього методу застосовують листи паперу розміром $\approx 20 \times 25 - 40 \times 45$ см. Використовуючи принцип висхідної хроматографії, розділяють суміш на ряд зон. У кут квадратного аркуша наносять розчин проби і хроматографують спочатку в одному елюенті, папір висушують. Потім, повернувши хроматограму на 90° , щоб одержані зони знаходились над розчинником, – в іншому. При цьому кожна зона знову розділяється на плями (рис. 16). Методика дозволяє проводити більш точний поділ суміші.

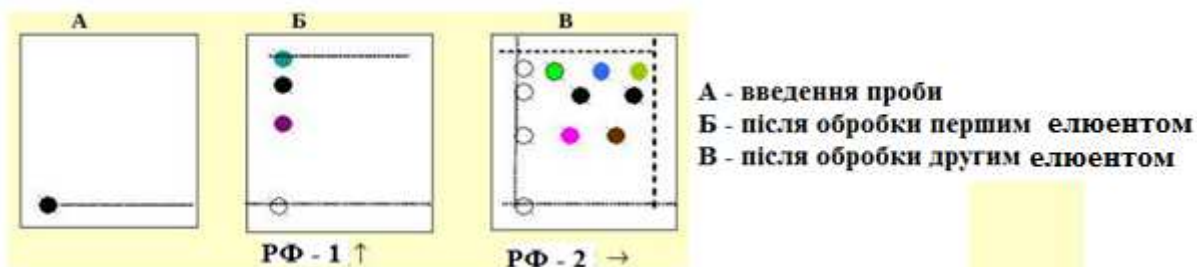


Рис. 16. Двомірна хроматографія суміші барвників

3) Радіальна хроматографія

Дуже швидко можна здійснити хроматографічний аналіз методом радіальної ПХ (рис.15, в), в якому використовується паперове коло (рис.15, г) з ґнотом, опущеним у елюент. Краплину досліджуваного розчину вміщують в центр кола зверху і висушують. Потім папір поміщають у герметичну камеру і один її кінець занурюють в розчинник, який є РФ. Розчинник підводиться знизу до центру за допомогою паперової смужечки, він переміщується від центру кола до периферії, розчиняючи і захоплюючи за собою компоненти зразка. Після того, як розчинник пройде певну відстань, лист виймають і сушать. Плями, які утворилися, можуть бути як видимими, так і невидимими, виявляють і відзначають. Радіальну хроматографію можна проводити в чашці Петрі. Окремі зони розташовуються навколо плями у вигляді концентричних кіл, як показано на рис. 17.



Рис. 17. Кругова хроматографія:

а) вигляд приладу збоку;

б) вигляд хроматограми зверху.

4) Електрофоретична хроматографія

Електрофоретичні хроматограми на папері отримують шляхом поєднання розподільної хроматографії з електрофорезом при проведенні їх одночасно або роздільно. Додатковий вплив електричного поля призводить до більш чіткого розподілу, особливо для іонів з різними зарядами.

Якісний склад проби в методі ПХ так само, як і в ТШХ, може бути встановлений або за специфічним забарвленням окремих плям на хроматограмі, або за чисельним значенням кожного компоненту. Кількісні визначення в ПХ виконуються за хроматографічними характеристиками (за площею плями на хроматограмі та інтенсивності її забарвлення) або після вимивання відповідним фізико-хімічним методом.

Метод ПХ застосовують для якісного аналізу суміші катіонів, амінокислот та інших органічних кислот, пептидів, пестицидів, фенолів, барвників, синтетичних ПАВ та ін.

3. Тонкошарова хроматографія

Тонкошарова хроматографія (ТШХ, Thin-layer chromatography, TLC) є площинним різновидом рідинної хроматографії, в якій елюент (РФ) рухається в шарі сорбенту за рахунок так званих капілярних сил. ТШХ може бути адсорбційного (більш поширений) і розподільного типів. ТШХ зайняла особливе місце серед інших хроматографічних методів завдяки простоті методики та доступності обладнання, великій швидкості проведення експерименту, широкій зоні застосування, високій економічності, достатньо високій селективності та чутливості. ТШХ єдиний хроматографічний метод, який дозволяє проводити повний аналіз невідомої суміші, оскільки дослідник може перевірити, чи не залишилося на старті нерозділених компонентів. ТШХ, маючи високий ступінь чутливості (низький поріг виявлення) та вибірковості, дозволяє визначати 10-20 мкг речовин з точністю до 7%, що є дуже високим показником. Вона посідає провідне місце в питаннях кількісного та напівкількісного аналізу складних фармацевтичних, природних, медико-біологічних, технологічних, хімічних і багатьох інших речовин. ТШХ найдоступнішим методом масового аналізу практично для будь-яких класів речовин.

Можливості ТШХ як аналітичного або дослідницького методу можуть бути істотно розширені завдяки поєднанню з інструментальними методами, такими, наприклад, як спектрофотометрія, полярографія, радіоактиваційний і кінетичний методи. Крім того, дуже корисним є поєднання ТШХ з колоночною хроматографією.

Адсорбція здійснюється за рахунок сил Ван дер Вальса, що є основою фізичної адсорбції, полімолекулярних взаємодій (утворення декількох шарів адсорбата на поверхні адсорбенту) і хемосорбції (хімічної взаємодії адсорбенту та адсорбату).

У ТШХ тверда фаза (силікагель, оксид алюмінію, целюлоза, кизельгур, гіпс) наноситься на підкладку – пластину зі скла (найменш використовувана), алюмінієвої фольги, полімеру (в основному використовуються пластини заводського виготовлення). Аналізована рідка проба наноситься на лінію старту (2-3 см від краю пластинки). Платівку занурюють у рухому фазу – розчинник. Розчинник під дією капілярних сил рухається вздовж шару сорбенту і з різною швидкістю переносить компоненти суміші, розділяючи їх.

Спільні компоненти на платівці утворюють окремі зони (плями), положення яких на хроматограмі характеризується величиною R_f . Вибір розчинника визначається властивостями аналізованих речовин і природою сорбенту. Найчастіше застосовують такі розчинники: петролейний ефір, бензол, ацетон, етиловий спирт та інші спирти, діетиловий ефір, етилацетат, вода. Використовуються також суміші з декількох розчинників.

У ТШХ використовують висхідний, спадний і горизонтальний спосіб отримання хроматограм.

Після закінчення хроматографування безбарвні зони на хроматограмі проявляють хімічним або фізичним способом. При хімічному способі пластинку обприскують розчином реактиву, який з компонентом суміші утворює забарвлену сполуку. Фізичний спосіб прояву заснований на здатності деяких речовин флюоресциувати під дією ультрафіолетового випромінювання.

Для якісної ідентифікації речовин найбільш надійним способом є метод свідків, коли на стартову лінію поруч з пробкою наносять індивідуальні речовини, відповідні тим, які очікують виявити в суміші. Збіг R_f компонента проби і свідка є підставою для ототожнення речовин.

Кількісне визначення вмісту компонентів у пробі здійснюють двома способами: спеціальними приладами (хроматографами) або після видалення речовини з пластини. Для визначення кількості речовини безпосередньо на платівці використовують фотометричний метод кількісного детектування за допомогою спектроденсітометра.

Спектроденсітометр визначає вміст речовини в плямі шляхом вимірювання інтенсивності відбитого світла: білий шар сорбенту відбиває практично все світло, а пляма поглинає частину світлового потоку.

Більш простим методом визначення кількості речовини в плямі є вимірювання її площі (за допомогою міліметрової кальки). При вмісті речовини в межах від 1 до 80 мкг залежність площі плями від маси речовини носить лінійний характер.

4. Іонообмінна хроматографія (ІОХ, Ion exchange chromatography)

В основі методу лежить зворотній процес обміну між іонами аналізованої речовини (РФ, розчин) та іоногенними групами сорбентів (іонітів) у результаті електростатичних взаємодій

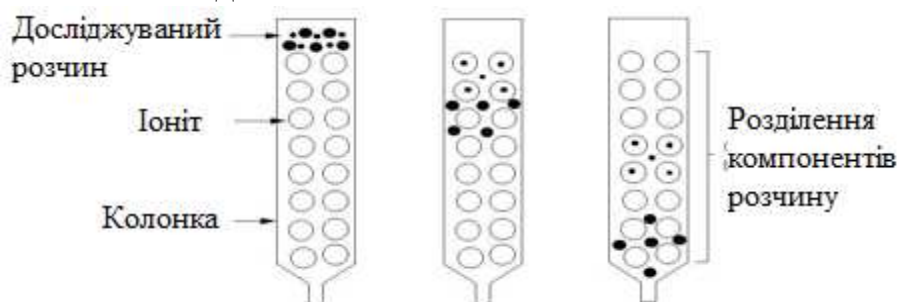


Рис. 18. Розділення компонентів у ІОХ

Іоніти (іоннообмінники) – це тверді речовини мінерального або органічного походження, практично нерозчинні у воді та органічних розчинниках, але здатні до набухання в них. За характером іоногенних груп іоніти розподіляють на *катіоніти* (катіонообмінники), *аніоніти* (аніонообмінники). Катіоніти обмінюються з розчином катіонами, а аніоніти – аніонами. Існують також *амфотерні іоніти*, здатні обмінюватися і катіонами, і аніонами. Такі іоніти називаються *амфолітами*.

Іоніт складається з каркасу (*матриці*), який має позитивний або негативний заряд, що компенсується зарядом іонів протилежного знаку, тому загалом іоніт електронейтральний. Іони іонообмінника, які компенсують заряд каркаса і здатні до обміну, мають назву *протиіони*. Здатність іоніту до обміну протиіонів на іони з розчину обумовлена тим, що протиіони мають певну рухливість у межах каркасу. У порах іоніту містяться не тільки протиіони, але й розчинник та розчинені речовини. Тому поряд з обміном в іоніті відбуваються такі процеси, як *набрякання*, що пов'язане з поглинанням розчинника, і *адсорбція* розчинених речовин.

Процеси іонного обміну на іонітах можна проілюструвати наступними реакціями:



аніонний обмін: $\text{RKt}^+ \text{OH}^- + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{RKt}^+ \text{Cl}^- + \text{OH}^-$, де R – каркас іоніту, що містить іоногенну групу An^- або Kt^+ , яка обумовлює заряд каркасу; H^+ і OH^- – протиіони.

У зв'язку з тим, що властивості іоніту залежать від природи його протиіона, при характеристиці іоніту вказують, який іон є протиіоном. Якщо, наприклад, протиіонами будь-якого катіоніту є іони H^+ , то вважається, що цей катіоніт знаходиться у гідрогенній формі (H^+ -формі). Аніоніт, для якого протиіоном є, наприклад, хлорид-іон, буде знаходитись в хлоридній формі (Cl^- -формі).

Властивості іонітів має велика кількість різноманітних природних і синтетичних речовин. Найбільше практичне значення мають синтетичні орг.

іоніти. За своєю хімічною будовою матриці іонообмінника поділяють на:

- синтетичні смоли на основі полістиролу або поліакриламідю;
- сефадекси на основі зшитого декстрану;
- сефарози (на основі агарози);
- целюлозні іонообмінники;
- неорганічні іоніти на основі поверхнево-модифікованих сілікагелей.

Іонний обмін, як правило, проводять в *динамічних* умовах шляхом пропускання розчину, який містить іони, що обмінюються, через колонку з іонітом. Іонний обмін можна також провести в *статичних* умовах, коли наважку іоніту вносять у розчин, який містить іони, що обмінюються, і витримують при струшуванні до повного обміну (тонкошарова іонообмінна хроматографія).

Усередині зерен іоніту розділення залежить ще й від швидкості дифузії іонів, яка визначається щільністю іоніту (частотою зшивань). Спорідненість іоніту до іону пропорційна заряду іона й обернено пропорційна радіусу гідратованого іона.

Для близьких за властивостями іонів, що мають однаковий заряд, іонний обмін буде тим повніший, чим більший радіус іона. Оптимальне розподілення відповідає стану рівноваги, тому всі фактори (зменшення зерен іоніту, підвищення температури, оптимальна швидкість потоку рухомої фази), які прискорюють досягнення рівноваги, сприяють покращанню розділення.

При виборі іоніту користуються таблицями, в яких наведено характеристики іонітів різноманітних типів (розмір і форма зерен, обмінна ємність, кислотно-основні властивості; густина, ступінь набухання).

Час і порядок елюювання катіонів і аніонів визначається їх зарядом і розміром гідратованого іона. Іони затримуються тим сильніше, чим більший їх заряд та розмір гідратованого іона. Елюювальна здатність рухомої фази зростає з підвищенням концентрації іонів, які містяться в ній, та їх спорідненістю з іонообмінником.

Основні стадії технологічної процедури аналізу при проведенні іонообмінної хроматографії такі:

1. Підготовка проби. Уміст солей в пробі має бути мінімальним, тому при необхідності проводиться її знесолення за допомогою гель-хроматографії чи діалізу або її розбавлення.

2. Підготовка іоніту. Необхідну кількість іоніту розраховують за його ємністю, але не більше 10% обсягу сорбенту, оскільки в іншому обсязі здійснюється власне процес поділу. Перед кожним циклом поділу іоніт обов'язково піддається повній регенерації (переводиться в активну форму).

3. Заповнення колонки.

4. Внесення проби. Невеликі обсяги вносять за допомогою шприца. Якщо обсяг проби становить кілька літрів, то розчин подається на колонку за допомогою насоса.

5. Поділ. Проводять градієнтне елюювання, причому формують рухливу фазу з градієнтом іонної сили (за допомогою градієнтного змішувача). При

цьому сумарний обсяг елюенту повинен дорівнювати приблизно п'яти обсягам колонки.

Іонна хроматографія – вискоєфективний варіант колонкової іонообмінної хроматографії з кондуктометричним детектуванням розділених іонів.

Методом ІОХ можна розділяти катіони й аніони, четвертинні основи, аміни, амінокислоти, білки, продукти гідролізу пептидів, фізіологічні рідини, гідролізати клітинних оболонок мікробів, антибіотики, вітаміни, нуклеїнові кислоти або очищувати воду.

Хроматографія – сучасний і вискоєфективний метод, який дозволяє достатньо швидко та надійно визначати вміст окремих компонентів у сумішах, концентрувати та ідентифікувати ці компоненти. Вона ефективна не тільки в хімічному аналізі, але й у хімічній технології. У біології та агропромисловій сфері хроматографічне розділення та концентрування використовують перед кількісним визначенням мікроелементів, а також для виявлення пестицидних сполук у навколишньому середовищі. При технологічному контролі харчових виробництв хроматографія служить для очищення речовин, аналізу сумішей органічних кислот, амінокислот та інших продуктів.