

ТЕМА 5. СПЕКТРОСКОПІЯ ЯДЕРНОГО МАГНІТНОГО РЕЗОНАНСУ

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії ЯМР-спектроскопії, навчитися розшифровувати ЯМР-спектри органічних сполук на практиці.

План

1. Основні поняття спектроскопії ядерного магнітного резонансу.
2. Походження спектрів ЯМР.
3. Хімічний зсув.
4. Спін-спінова взаємодія.
5. Спектри ЯМР, зокрема спектри ПМР.
6. ЯМР-спектрометри.



Основні терміни та поняття: ЯМР-спектроскопія, ЯМР-спектри, хімічний зсув.

1. Основні поняття спектроскопії ядерного магнітного резонансу



Ядерним магнітним резонансом (ЯМР) називається явище вибіркового поглинання електромагнітних хвиль певної частоти речовиною, яка знаходиться в магнітному полі, внаслідок переорієнтації магнітних моментів ядер (ядер з ненульовим (нецілим) спіном – ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P та ін.).

Спектроскопія ядерного магнітного резонансу (ЯМР-спектроскопія, Nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR spectroscopy) – спектроскопічний метод ідентифікації та вивчення хімічних об'єктів, який використовує явище ядерного магнітного резонансу. ЯМР-спектроскопія відноситься до неруйнівних методів аналізу, найчастіше застосовується для органічних сполук. Найбільш важливими для хімії та практики є спектроскопія протонного магнітного резонансу (ПМР-спектроскопія), а також спектроскопія ЯМР на ядрах вуглецю-13 (^{13}C ЯМР-спектроскопія), фтору-19 (^{19}F ЯМР-спектроскопія), фосфору-31 (^{31}P ЯМР-спектроскопія). Одні й ті ж ядра атомів перебуваючи в різних фрагментах молекули органічної сполуки, дають різні сигнали ЯМР. Відмінність такого сигналу ЯМР від сигналу стандартної речовини дозволяє визначити так званий хімічний зсув, який обумовлений хімічною будовою досліджуваної речовини.

На сьогодні ЯМР-спектроскопія дозволяє ідентифікувати сполуку маючи менше 1 мг речовини. Зразок розчиняють у непротонному (часто дейтерованому) розчиннику, далі тонкостінну скляну трубку (ампулу) зі зразком поміщають у магнітне поле ЯМР-спектрометру, де ЯМР-активні ядра (такі як ^1H чи ^{13}C) поглинають електромагнітну енергію. Резонансна частота,

енергія абсорбції та інтенсивність випроміненого сигналу пропорційні силі магнітного поля. Так в полі в 21 Тесла, протон резонує при частоті 900 МГц. Після нетривалого (для простих сполук біля 30 сек.) накопичення сигналу отримують спектр, де за положенням піків (частотою поля збудження) окремих протонів (для ПМР) характеризують сполуку.

У звичайному спектрі ПМР кожен наявний у молекулі протон дає свій сигнал (сигнали двох або більше протонів можуть накладатися один на одного). Цей сигнал характеризується трьома параметрами:

- *інтенсивністю*, яка прямо пропорційна вмісту протонів даного типу в зразку;
- *величиною хімічного зсуву*, вимірюваного від деякого внутрішнього стандарту (найчастіше в ЯМР ^1H і ^{13}C застосовують тетраметилсилан (ТМС), $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) в одиницях м.ч. (тобто в мільйонних частках частоти приладу);
- *величиною константи спин-спінової взаємодії (КССВ)* з іншим (чи іншими) протонами в тій же молекулі. Ця константа, що виявляється в спектрі у вигляді розщеплення сигналів на окремі компоненти, вимірюється в герцах.

Якщо прийняти сигнал тетраметилсилану за 0, а зсув сигналу в слабке поле вважати позитивним хімічним зсувом, то ми отримуємо так звану шкалу δ . Якщо резонанс тетраметилсилану прирівняти 10 м.ч. і обернути знаки на протилежні, то результуюча шкала буде шкалою τ , яка практично не використовується на сьогодні. Якщо спектр речовини дуже складний для інтерпретування, можна скористатися квантово-хімічними методами розрахунку констант екранування і на їх підставі співвіднести сигнали.

Подібно ІЧ-спектроскопії, ЯМР виявляє інформацію про молекулярну будову хімічних речовин. Однак, він забезпечує більш повну інформацію, ніж ІЧ, дозволяючи вивчати динамічні процеси в зразку – визначати константи швидкості хімічних реакцій, величину енергетичних бар'єрів внутрішньомолекулярні обертання. У методиках ЯМР є багато можливостей визначати хімічну будову речовин, конформації молекул, ефекти взаємного впливу, внутрішньомолекулярні перетворення. Ці особливості роблять ЯМР-спектроскопію зручним інструментом як теоретичної органічної хімії, так і для аналізу біологічних об'єктів. Широкому використанню методу заважає тільки висока ціна пристроїв (від 1 мільйона гривень та вище).

1. Походження спектрів ЯМР

Ядра з нецілим спіном можуть вступати у взаємодію із зовнішнім магнітним полем, переходячи в результаті на інші енергетичні рівні. Енергія цих рівнів строго квантована і залежить від природи ядра, його електронного оточення, різних внутрішньо- і міжмолекулярних узаємодій. Вплив електронної оболонки на ЯМР виявляється, зокрема, у такий спосіб. Зовнішнє магнітне поле, в яке поміщений досліджуваний зразок, діє на електрони атомів або молекул зразка. У разі діамагнітного зразка в електронних оболонках його атомів зовнішнім полем \mathbf{B}^0 індуються такі струми, які створюють вторинне магнітне поле \mathbf{B}' , спрямоване в бік, протилежний полю \mathbf{B}^0 . Це вторинне поле

також діє на ядро атому. Поєднуючись із зовнішнім полем, воно зменшує дію останнього на ядро. Величина B' пропорційна B^0 : $B' = B^0(1 - \sigma)$, де σ - безрозмірна величина, яка називається константою екранування. Вона включає в себе три складники:

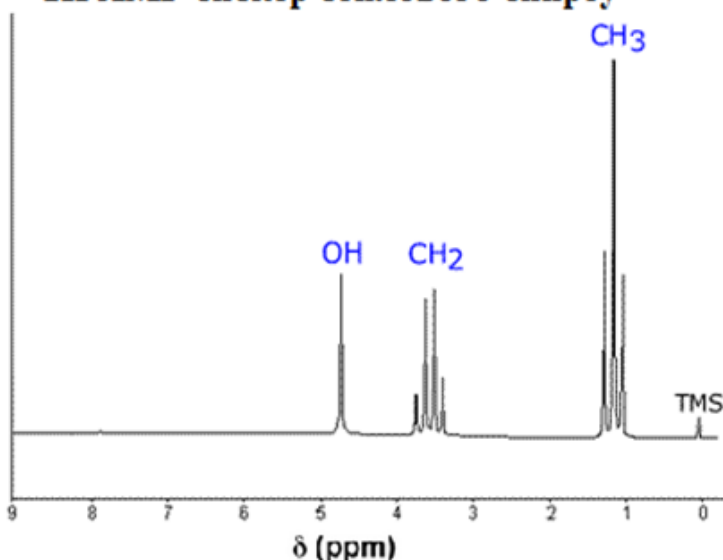
- атомний внесок у екранування, залежний від заступника, що стоїть поруч резонувального атому;
- внесок молекули загалом або окремих її складників (анізотропні ділянки);
- міжмолекулярний внесок, залежний від температури, розчинника та інших зовнішніх факторів.

2. Хімічний зсув

Величина хімічного зсуву визначається багатьма особливостями структури органічної молекули, а також низкою зовнішніх чинників (у першу чергу застосовуваного для зйомки спектру розчинника). Найбільший внесок у цю величину робить щільність електронної хмари навколо даного протону (ядра): чим більшою мірою електронна пара, що утворює зв'язок даного протона з найближчим атомом, відтягнута до цього останнього, тим більшою буде величина хімічного зсуву. У дуже грубому наближенні можна сказати, що чим більш кислим є даний протон, тим більший його хімічний зсув. Оскільки зсув електронів зв'язку визначається, в першу чергу, природою включеного в цей зв'язок атома, а в другу – найближчим оточенням цього атома, величина хімічного зсуву відображає положення даного протона в молекулі й тому знаходить досить різноманітне застосування у встановленні структури органічних сполук.

Залежно від місцевого електронного оточення різні протони в молекулі

1H ЯМР-спектр етилового спирту



резонують на частотах, які незначно відрізняються.

Оскільки це зміщення частоти і основна резонансна частота прямо пропорційні силі магнітного поля, то це зміщення перетворюється в незалежну від магнітного поля безрозмірну величину, відому як хімічний зсув. Хімічний зсув визначається як відносна зміна щодо деяких еталонних зразків. Частотний зсув екстремально малий у порівнянні з основною ЯМР-

частотою. Типовий зсув частоти дорівнює 100 Гц, тоді як базова ЯМР-частота має порядок 100 МГц. Хімічний зсув часто виражається в частинах на мільйон (м.ч. (укр.), м.д. (рос.), ppm (анг.)). Для того щоб виявити таку маленьку

відмінність частоти, прикладене магнітне поле має бути постійним усередині об'єму зразка.

Оскільки хімічний зсув залежить від хімічної будови речовини, він застосовується для отримання структурної інформації про молекули у зразку. Наприклад, спектр для етанолу дає 3 відмінні сигнали, тобто 3 хімічні зсуви: один для групи CH_3 , другий для CH_2 -групи і останній для OH . Типовий зсув для CH_3 -групи приблизно дорівнює 1 м.ч., для CH_2 -групи, приєднаної до OH , – 3-4 м.ч. і OH – приблизно 5 м.ч.

Через молекулярний рух при кімнатній температурі сигнали трьох метилових протонів усереднюються протягом ЯМР-процесу, який триває лише кілька мілісекунд. Ці протони вироджуються і формують піки при тому ж хімічному зсуві. Програмне забезпечення дозволяє проаналізувати розмір піків для того, щоб зрозуміти, як багато протонів роблять внесок у ці піки.

3. *Спін-спінова взаємодія*

КССВ описує спіновий зв'язок даного протона з іншими в тій же молекулі. Ця взаємодія здійснюється тільки по ланцюгу ковалентних зв'язків і тому швидко слабшає зі збільшенням відстані між ядрами. Величини КССВ також визначаються багатьма структурними чинниками. Головним із них є геометрія відповідного фрагменту. На цьому ґрунтується застосування спектроскопії ПМР для встановлення конфігурації асиметричних центрів у молекулі. Найбільш корисну інформацію для визначення структури в одновимірному ЯМР-спектрі дає спін-спінова взаємодія між активними ЯМР-ядрами. Ця взаємодія виникає в результаті переходів між різними спіновими станами ядер у хімічних молекулах, що призводить до розщеплення сигналів ЯМР. Це розщеплення може бути простим і складним. Така взаємодія забезпечує детальною інформацією про зв'язки атомів у молекулі.

4. *Сpektри ЯМР, зокрема спектри ПМР*

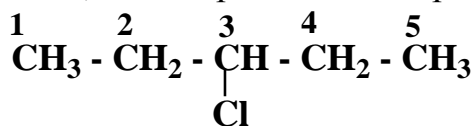
Для якісного аналізу за допомогою ЯМР використовують аналіз спектрів, заснований на таких властивостях даного методу:

- сигнали ядер атомів, що входять у певні функціональні групи, лежать у суворо визначених ділянках спектра;
- інтегральна площа, обмежена піком, суворо пропорційна кількості атомів, що резонують;
- ядра, що лежать через 1-4 зв'язки, здатні давати мультиплетні сигнали в результаті розщеплення один на одному.

ПМР-спектр дає п'ять основних аналітичних критеріїв: *загальне число сигналів* – дозволяє визначити число груп нееквівалентних протонів у зразку, який аналізується; *інтенсивність сигналів* – пропорційна числу протонів даного типу; *хімічний зсув* – дозволяє визначити положення протонів даного виду в молекулі; *мультиплетність сигналу* – дозволяє визначити число протонів у сусідніх вуглеводневих атомів; *константи спін-спінової взаємодії* –

характеризують просторове розташування протонів даного типу.

Розглянемо більш детально особливості інтерпретації ПМР-спектрів. Піки у спектрі ПМР є сигналами поглинання енергії зовнішнього магнітного поля, яке прикладається, протонами речовини. Кількість груп сигналів говорить про число протонів різних видів в молекулі. Хімічно еквівалентні протони (з однаковим оточенням) поглинають енергію в одній ділянці спектра. Наприклад, в спектрі ПМР 3-хлорпентана:



є три набори сигналів від трьох груп еквівалентних протонів: а) $^1\text{CH}_3$ – та $^{-5}\text{CH}_3$; б) $^{-2}\text{CH}_2$ – та $^{-4}\text{CH}_2$ –; в) $^{-3}\text{CHCl}$ –.

Хімічним зсувом (δ) називають зміщення сигналу спектра на шкалі в залежності від хімічного оточення протону. Електроноакцепторні атоми і групи атомів поблизу поглинаючого протону (через один-два хімічних зв'язки) зрушують поглинання в зону слабкого поля (великі значення δ). Сигнали ПМР досліджуваної речовини в спектрі проявляються зліва від сигналу еталону (ТМС), який приймають за 0 м.ч. Відносно великим значенням величини δ відповідає зона слабкого магнітного поля, і навпаки, малим значенням цієї величини – зона сильного магнітного поля, що показано на рис. 22.

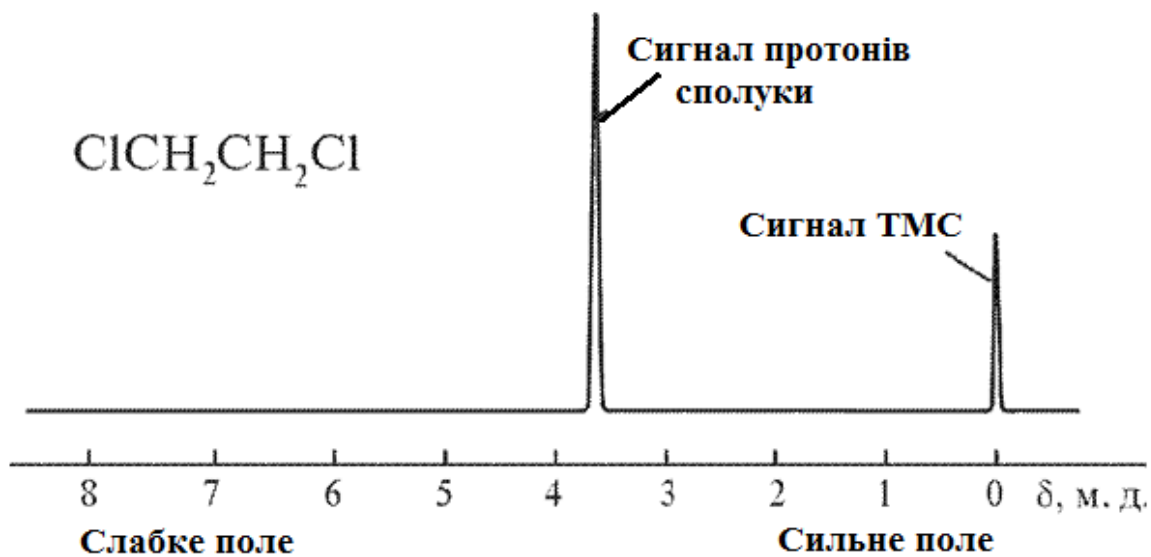


Рис. 22. Спектр ПМР 1,2-дихлоретану

Площа піку сигналу (окреслена самописцем) – інтенсивність сигналу – показує відносний вміст протонів кожного виду в молекулі.

Розщеплення сигналу на декілька піків свідчить про взаємодію розглянутого протона з іншими нееквівалентними протонами (з різним оточенням) або деякими іншими ядрами з непарними масовими числами (^{19}F , ^{31}P та ін.).

Існують довідкові таблиці, в яких зазначено діапазон хімічних зсувів протонів різних видів. За ними можна визначити, в якій ділянці спектра дає сигнал той чи інший протон (табл. 4).

Таблиця 4. Хімічні зсуви протонів різних видів у спектрах ПМР

Вид протону	Хімічний зсув, м.ч.	Вид протону	Хімічний зсув, м.ч.
$\text{H}-\text{C}-\text{R}$	0,9-1,8	$\text{H}-\text{C}-\text{NR}$	2,2-2,9
$\text{H}-\text{C}-\text{C}=\text{C}$	1,6-2,6	$\text{H}-\text{C}-\text{Cl}$	3,1-4,1
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}-\text{C}- \\ \quad \parallel \\ \quad \text{O} \end{array}$	2,1-2,5	$\text{H}-\text{C}-\text{Br}$	2,7-4,1
$\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-$	2,5	$\text{H}-\text{C}-\text{O}$	3,3-3,7
$\text{H}-\text{C}-\text{Ar}$	2,3-28	$\text{H}-\text{NR}$	1-3*
$\text{H}-\text{C}=\text{C}-$	4,5-6,5	$\text{H}-\text{OR}$	0,5-5*
$\text{H}-\text{Ar}$	6,5-8,5	$\text{H}-\text{C}-\text{Cl}$	6-8*
$\begin{array}{c} \text{H}-\text{C}- \\ \quad \parallel \\ \quad \text{O} \end{array}$	9-10	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{O}-\text{C}- \\ \quad \parallel \\ \quad \text{O} \end{array}$	10-13*

* Хімічні зсуви протонів, з'єднаних з азотом і киснем, залежать від температури та концентрації розчину.

Часто в спектрах ПМР сигнал від еквівалентних протонів проявляється не окремим піком (синглет), а їх набором. Сигнал може розщеплюватися на два (дублет), три (триплет), чотири (квартет) і більше число піків. Таке розщеплення сигналів обумовлено взаємодією нееквівалентних ядер водню (протонів). Ця спін-спінова взаємодія здійснюється через електрони хімічних зв'язків, що з'єднують ядра атомів.

Число піків, на які розщеплюється сигнал від еквівалентних протонів, називають мультиплетністю. У простих випадках використовують правило: мультиплетність сигналу від еквівалентних протонів дорівнює $n + 1$, де n – число протонів, які знаходяться при сусідніх атомах вуглецю. Такі протони виду $\text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H}$, розділені трьома зв'язками, називають віцинальними протонами. За мультиплетністю сигналу можна судити про кількість протонів, віцинальних по відношенню до протонів, відповідальних за конкретний сигнал.

Приклад 1.

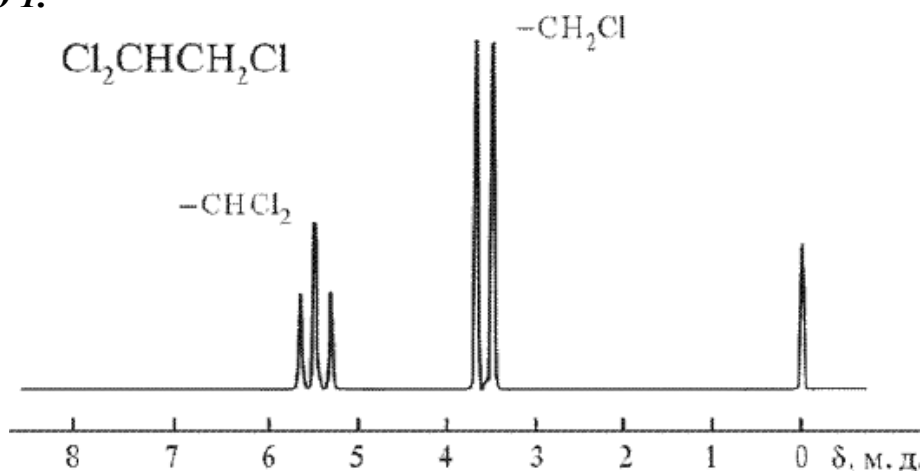


Рис. 23. Спектр ПМР 1,1,2-трихлоретану

1,1,2-Трихлоретан $\text{Cl}_2\text{CH}-\text{CH}_2\text{Cl}$ містить два типи протонів - метиленові (у групі $-\text{CH}_2\text{Cl}$) і метиновий (у групі $-\text{CHCl}_2$), які характеризуються в спектрі двома сигналами: $\delta(\text{CH}_2\text{Cl})=3,5$ м.ч. і $\delta(\text{CHCl}_2)=5,5$ м.ч., як показано на рис. 23.

Сигнал від $-\text{CH}_2\text{Cl}$ має два піки (дублет), сигнал від $-\text{CHCl}_2$ - три піки (триплет). Скористаємося правилом: мультиплетність сигналу дорівнює $n + 1$, де n – число віцинальних протонів.

Приклад 2. На рис. 24 – спектр ПМР 1,1-дихлоретану. Метильні протони в спектрі характеризуються дублетом з центром при $\delta=2,0$ м.ч., метиновий протон дає квартет із центром при $\delta=5,9$ м.ч.

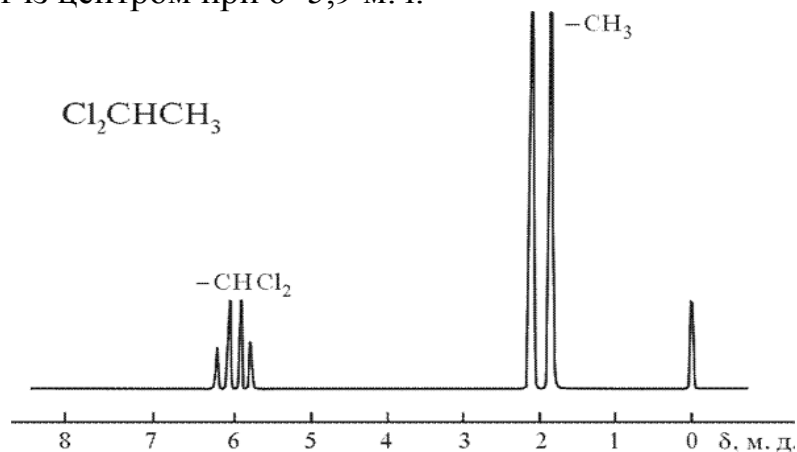


Рис. 24. Спектр ПМР 1,1-дихлоретану

Важливою особливістю спін-спінової взаємодії є те, що протони з однаковим хімічним зсувом (еквівалентні протони) не розщеплюють сигнали один від одного, що підтверджується наступними прикладами.

Приклад 3. У 1,2-дихлоретану $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$ усі протони еквівалентні, в спектрі буде один сигнал у вигляді синглету. Значення хімічного зсуву $\delta(\text{CH}_2\text{Cl})=3,69$ м.ч. (див. рис. 24).

Приклад 4. Речовина 2,3-диметилбутан $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2$ складається з двох ізопропільних груп. Сигнали еквівалентних протонів чотирьох CH_3 -груп розщеплюються протонами метинових груп у дублет. У свою чергу сигнал метинового протону розщеплюється шістьма віцинальними протонами метильних груп в гептет (рис. 25).

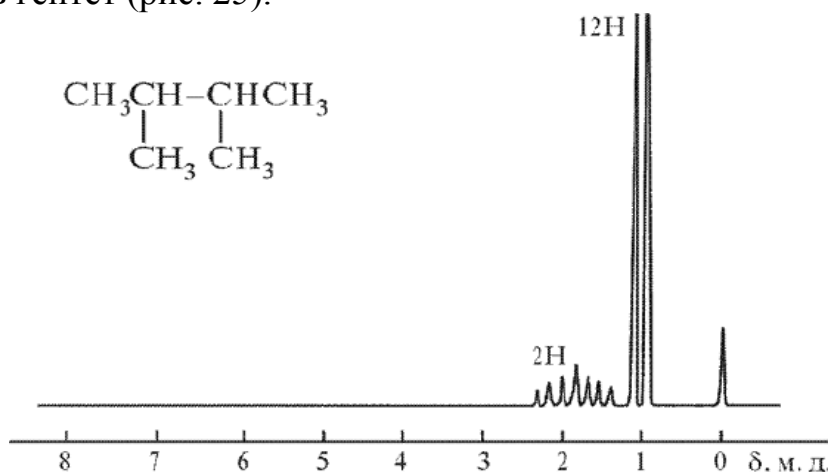


Рис. 25. Спектр ПМР 2,3-диметилбутану

За допомогою спектрів ПМР можна розрізнити ізомери речовин (вони мають однакову молекулярну формулу). Наприклад, спектри ізомерів 1,1-дихлоретану (рис. 24) і 1,2-дихлоретану (рис. 23) зовсім різні.

Приклад 5. Спектр речовини складу $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3$, що належить

1,1,2-трихлоретану (рис. 23), містить два сигнали: $\delta(\text{CH}_2\text{Cl})=3,5$ м.ч. (дублет) і $\delta(\text{CHCl}_2)=5,5$ м.ч. (триплет). Спектр ізомерного йому 1,1,1-трихлоретану містить один синглет від еквівалентних протонів метильної групи $\delta(\text{CH}_3)=2,7$ м.ч.

Для полегшення інтерпретації спектрів ЯМР доцільно побудувати теоретичні спектри, використовуючи сучасний хімічний софт (наприклад ChemDraw, ISIS та ін.).

5. ЯМР-спектрометри

Для реєстрації спектрів ЯМР можуть бути використані 2 принципово різні типи спектрометрів:

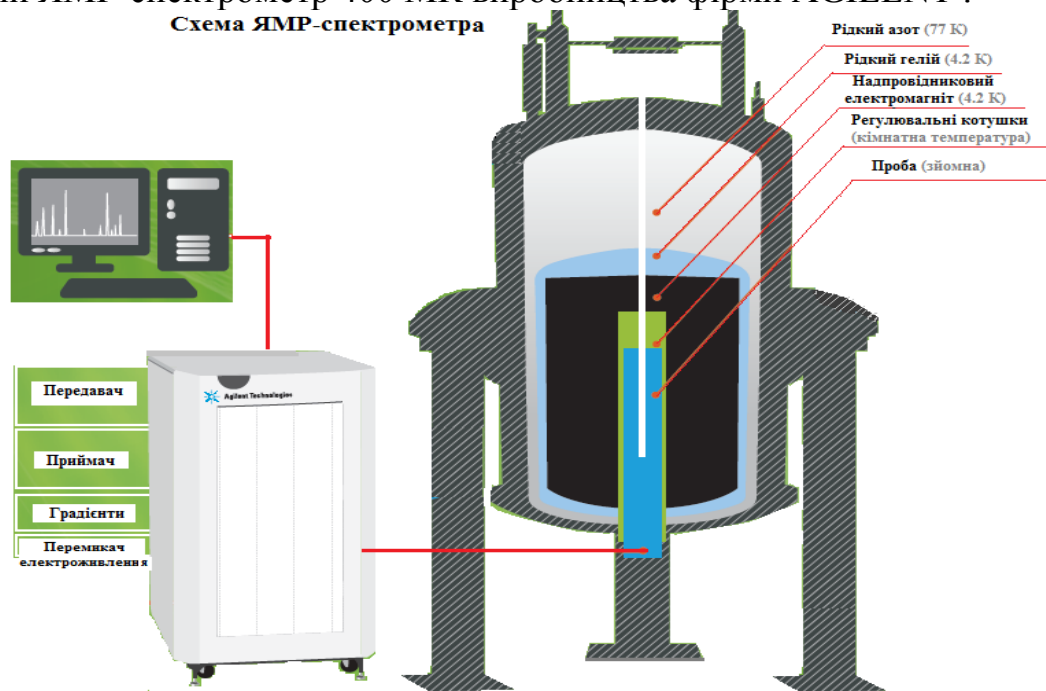
1. *Спектрометри з безперервною розгорткою радіочастоти або магнітного поля.*

Експеримент має такий вигляд: досліджуваний зразок поміщають у скляну ампулу, яка обертається в магнітному полі (обертанням досягається компенсація неоднорідності поля). Ампулу охоплює котушка, в яку при відповідній величині індукції магнітного поля подається змінний струм певної частоти (наприклад, при реєстрації ^1H ЯМР спектрів величина індукції – 1.41 Тл, частота – 60 МГц, причому детектор налаштовують на ту ж частоту). Частоту генератора підтримують постійною, а магнітне поле поступово змінюють до досягнення резонансу для кожної групи сигналів – і в результаті отримують спектр. Можна змінювати також частоту генератора при постійному магнітному полі – з тим же результатом. Цей тип приладів можна використовувати для реєстрації спектрів ЯМР на ядрах із високим гіромагнітного відношення γ і високим природним вмістом (^1H , ^{19}F , ^{31}P). Для реєстрації ^{13}C -ЯМР спектрів вони малоефективні.

2. *Імпульсні спектрометри ЯМР із Фур'є-перетворенням (їх іноді називають просто Фур'є-спектрометрами ЯМР.)*

Магнітне поле, в якому знаходиться досліджуваний зразок, у цих приладах постійне. Як правило, використовують дуже сильні поля, створювані надпровідниковими магнітами (чим і обумовлена висока вартість цих приладів). Зразок піддають не тривалому безперервному опроміненню, а впливу короткочасного потужного радіочастотного прямокутного імпульсу, повторюваного через певні проміжки часу. Тривалість імпульсу дуже мала (1-50 мікросекунд), що відповідно до принципу невизначеності призводить до того, що фактично імпульс генерує радіочастотне поле в широкому діапазоні, збуджуючи одночасний резонанс усіх ядер даного типу. Після завершення імпульсу індукована намагніченість ядер швидко зникає внаслідок релаксації T_1 і відновлюється звичайний больцманівський розподіл. Процес цього відновлення називається "*спадом вільної індукції*" (СВІ), описується великим числом затухаючих синусоїдальних кривих у тимчасовій шкалі, кожна з яких відповідає якійсь резонансній частоті. Лінія СВІ є набором гармонійних функцій, її можна проаналізувати за допомогою ЕОМ на базі математичної операції – Фур'є-перетворення – і в результаті перетворення тимчасової шкали

в частотну виходить звичайна спектральна картина, залежність поглинання випромінювання зразка від частоти. Багаторазово повторюючи цю процедуру, отримують усереднений спектр, при цьому знижується співвідношення сигнал-шум. У результаті з використанням Фур'є-спектроскопії ЯМР можна реєструвати спектри ядер ^{13}C (та інших ядер з низьким природним вмістом), до того ж істотно скорочується час звичайного експерименту, а одержуваний спектр стає істотно інформативнішим. На малюнку зображено 400 МГц імпульсний ЯМР-спектрометр 400 MR виробництва фірми AGILENT.



Література: 2, 5, 7, 9 Інформаційні ресурси: 1-5

ТЕМА 6. МАС-СПЕКТРОСКОПІЯ

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теорії мас-спектрометрії, хромато-мас-спектрометрії, навчитися розшифровувати на практиці Мас-спектри органічних сполук.

План

1. Основні поняття мас-спектрометрії та хромато-мас-спектрометрії.
2. Теоретичні основи методу мас-спектрометрії.
3. Апаратура для проведення мас-спектроскопії.
4. Розшифровка мас-спектрів.
5. Хромато-мас-спектроскопія.



Основні терміни та поняття: мас-спектроскопія, хромато-мас-спектроскопія, мас-спектри.

1. Основні поняття мас-спектрометрії та хромато-мас-спектрометрії



Мас-спектроскопія (mass spectrometry) – метод дослідження речовин, який заснований на іонізації атомів і молекул, що входять до складу проби речовини і реєстрації спектру мас утворених іонів. Мас-спектрометрію описували як найдрібніші ваги у світі, які можуть зважити молекули. За останній час мас-спектроскопія зазнала приголомшливого технологічного підйому, що дозволяє застосовувати її для білків, пептидів, ДНК, ліків та багатьох інших біологічно активних молекул. Завдяки таким способам іонізації, як іонізація електроспрею (ESI) або лазерна десорбція/іонізація з матриці (MALDI), мас-спектроскопія стала незамінним інструментом для біохімічних досліджень.

Мас-спектроскопія є одним з найбільш ефективних експресних методів аналізу й установлення будови як індивідуальних органічних сполук, так і синтетичних, природних сполук та їхніх сумішей. Завдяки своїй винятково високій чутливості й можливості використання в комбінації з газовою й рідинною хроматографією цей метод широко застосовується в органічній, біоорганічній, біологічній, фізичній, аналітичній, медичній хімії, у нафтохімії, фармакології, токсикології, охороні навколишнього середовища, судово-медичній експертизі й у контролі виробництва. Традиційно органічна мас-спектроскопія використовується для рішення двох основних проблем: ідентифікації речовин та вивченні фрагментації іонізованих молекул органічних сполук в газовій фазі в іонному джерелі.

Для отримання мас-спектру достатньо 10^{-2} - 10^{-12} г індивідуальної речовини. Для отримання звичайного спектру електронного удару індивідуальної сполуки необхідно затратити усього 1-2 хв., а час аналізу складної суміші органічних сполук у режимі хромато-мас-спектрометрії визначається винятково хроматографічним часом утримання компонентів. Варіації ізотопного складу елементів можуть бути визначені з відносною похибкою $\pm 10^{-2}\%$, а маси ядер – з відносною похибкою $\pm 10^{-5}\%$ для легких й $\pm 10^{-4}\%$ – для важких елементів.

Цей метод принципово відрізняється від інших спектрометричних методів, оскільки структурна мас-спектроскопія заснована на руйнуванні органічної молекули в результаті іонізації тим чи іншим способом. Ще одна істотна відмінність мас-спектрометрії від інших аналітичних фізико-хімічних методів полягає в тому, що оптичні, рентгенівські та деякі інші методи детектують випромінювання або поглинання енергії молекулами чи атомами, а мас-спектроскопія детектує безпосередньо самі частинки речовини.

2. Теоретичні основи методу мас-спектрометрії

Мас-спектрометр визначає масу молекули, вимірюючи відношення маси до заряду (m/z) її іона. Мас-спектрометр є вакуумним приладом, що використовує фізичні закони руху заряджених частинок у магнітних і електричних полях, необхідного для отримання мас-спектра (рис. 32).

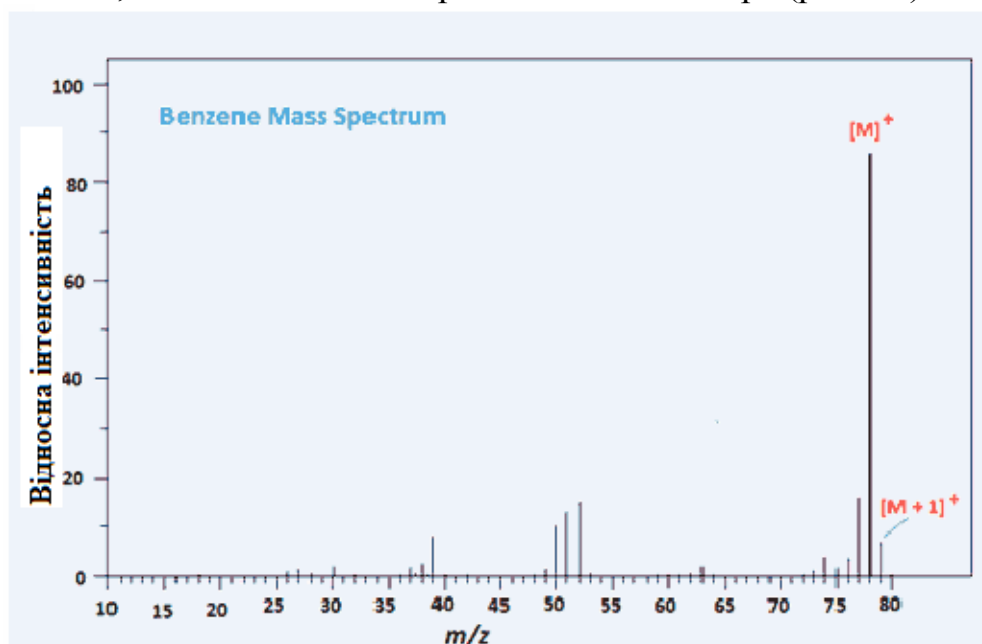


Рис. 32. Мас-спектр бензену

Ідею методу можна описати наступною схемою:

1. Перетворити нейтральні частинки – атоми або молекули – в заряджені частинки – іони. Цей процес називається **іонізацією**. Він по-різному здійснюється для органічних і неорганічних речовин. Частіше досліджуються позитивні іони, тому що наявні методи іонізації дозволяють одержувати їх

більш простими шляхами й у більших кількостях, ніж негативні. Однак у ряді випадків досліджують і негативні іони.

2. Розділити іони, що утворилися в просторі, відповідно до їх m/z за допомогою електричного або магнітного поля, частіше у вакуумі.

3. Провести детектування. Вимірюючи електричний струм, утворений направлено рухомими іонами, можна говорити про ізотопний, атомарний та молекулярний склад аналізованої речовини на якісному та кількісному рівнях.

Результатом іонізації молекул, поділу іонів і детектування іонів є спектр, за яким можна визначити молекулярну масу і навіть отримати деяку інформацію про будову речовини. Мас-спектр, як і будь-який спектр, у вузькому сенсі – це залежність інтенсивності іонного струму (кількості) від відношення маси до заряду (якості). Мас-спектр з характерною структурою фрагментації є «відбитком пальців» молекули і може служити для ідентифікації невідомих сполук шляхом бібліотечного пошуку.

Крім наданої вище графічної форми, мас-спектри можуть бути представлені алгебраїчно у вигляді m/z (I), наприклад, спектр метилсаліцилату: 153(3), 152(60), 121(31), 120(98), 93(12), 92(59), 65(18), 64(12), 63(9), 53(2), 33339(14). Перше із значень у спектрі характеризує відношення m/z частинки, а інше (у лапках) – відносний вміст частинок, які характеризуються даним відношенням. Для рішення багатьох задач достатньо скороченої форми мас-спектру, на якому представлені найбільш інтенсивні сигнали (5-10), розташовані за зменшенням інтенсивності.

Перші мас-спектри були отримані у Великобританії Дж. Дж. Томсоном (1910), а потім Ф. Астоном (1919). Вони призвели до відкриття стабільних ізотопів.

Здатність мас-спектрометра розділяти іони описується величиною R , яка називається *роздільною здатністю*, вона визначається як: $R = M/\Delta M$, де M – максимальна маса, для якої перекриття піків менше, ніж за 10%, а ΔM – одна атомна одиниця маси. Ця величина визначає максимальну масу іонів, які відрізняються на одну атомну одиницю, для яких прилад розділяє піки не менш, ніж на 90%. Ділянка значень R зазвичай знаходиться в інтервалі між 100 і 500 000. Роздільна здатність є важливою характеристикою мас-спектрів. У залежності від роздільної здатності розрізняють спектрометри низької ($R \approx 5000/1$) і високої (10 000/1 – 100 000/1) роздільної здатності. Завдяки приладам високої роздільної здатності можна визначити різницю в молекулярній масі іону до 0,0001 а.о.м. Наприклад, можна розрізнити наступні іони:



У спектрах низької роздільної здатності цим частинкам відповідає один сигнал з масою, яка дорівнює 29 а.о.м.

Чутливістю в мас-спектроскопії є величина, що показує, яку кількість речовини потрібно ввести в мас-спектрометр для того, щоб її можна було із високою мірою достовірності виявити.

Типова величина порогу виявлення хорошого хромато-мас-спектрометра, який використовують для аналізу органічних сполук, становить 1 пікограм при введенні 1 мікролітра рідини. Межа виявлення для ряду металів становить одну частку на квадрильйон. Це значить, що чутливість приладу достатня, щоб детектувати 1 кілограм металу (наприклад, ртуті, свинцю), розчиненого в озері Байкал (за умови його перемішування й повного розчинення). Вона дозволяє виявити всі елементи періодичної системи із чутливістю 10^{-12} г. Такі прилади як DELTAPlus, DELTA Plus XL і MAT253 здатні визначити різницю в один ізотоп серед десяти мільйонів атомів.

3. Апаратура для проведення мас-спектроскопії

Кожен мас-спектрометр незалежно від деталей конструкції складається з наступних основних елементів:

- 1) системи введення речовини в прилад;
- 2) джерела іонів, призначеного для отримання іонів з аналізованих речовин;
- 3) мас-аналізатора, призначеного для поділу іонів за масами (вірніше, по відношенню маси до заряду – t/z);
- 4) детектора і реєстру вального пристрою, призначеного для реєстрації кількості іонів різної маси.

Блок-схема типового мас-спектрометра



Перш за все досліджувану речовину треба іонізувати. Найбільш поширеним методом іонізації в органічній мас-спектрометрії є бомбардування речовини електронами в газовій фазі. Система введення речовини в прилад необхідна для переведення досліджуваної сполуки в газову фазу і безперервної подачі її з постійною швидкістю (мономолекулярне натікання) на джерело іонів, де відбувається іонізація. У джерелі іонів в умовах глибокого вакууму

(10^{-5} - 10^{-9} мм рт. ст.) електрони, що утворюються за рахунок розпеченого катоду, отримують за рахунок прискорення між зарядженими пластинами певну енергію (зазвичай 70-100 еВ (електронвольт). Проходячи через розріджений газ, ці електрони зіштовхуються з молекулами досліджуваної речовини. Як тільки енергія електронів стає трохи вищою від потенціалу іонізації (9-12 еВ), стає можливим процес іонізації. Глибокий вакуум забезпечує безперешкодний рух іонів всередині мас-спектрометра, а при його відсутності іони розсіюються і рекомбінують (перетворюються знову в незаряджені частки).

Наприклад, при цій енергії процес взаємодії електрона з молекулою метану має вигляд: $\text{CH}_4 + e^- \rightarrow \text{CH}_4^+ + 2e^-$. Іон CH_4^+ , маса якого з точністю до одного електрона дорівнює молекулярній масі метану, називається *молекулярним іоном* (M^+).

При енергіях бомбардування електронів у межах 30-100 еВ відбувається не тільки іонізація, але й розрив хімічних зв'язків у молекулі, яка піддалась бомбардуванню з утворенням позитивно заряджених іонів і нейтральних осколків. Сукупність усіх процесів, що призводять до утворення іонів різного виду, називається *дисоціаційною іонізацією*. Крім дисоціації, можливі процеси асоціації і перегруповання. У результаті дисоціаційної іонізації в джерелі іонів утворюються позитивні іони з різною масою. Усі ці іони виштовхуються електричним полем з камери, формуються в пучок і, прискорюючись різницею потенціалів в 2-4кВ, вилітають у мас-аналізатор, у якому тим чи іншим способом діляться на групи або пучки іонів так, що в кожній з груп містяться тільки іони однакової маси.

Змінюючи напруженість магнітного поля **H** при постійно прискорювальній напрузі **U**, можна послідовно подавати на колектор реєструвального пристрою іони з тією чи іншою масою. Так здійснюється розгортання спектру.

Класифікація іонів, які утворюються в іонізаційній камері мас-спектрометра:

- *молекулярні іони*
- *осколкові іони*
- *перегруповані іони*
- *метастабільні іони*
- *позитивні іони*
- *негативні іони*
- *багатозарядні іони.*

Існують *неперервні* та *імпульсні* мас-аналізатори. Різниця між ними полягає в тому, що в перші іони надходять безперервним потоком, а в другі – порціями, через певні інтервали часу. Мас-спектрометр може мати два мас-аналізатори (тандемний мас-спектрометр). Тандемні мас-спектрометри застосовуються, як правило, разом з "м'якими" методами іонізації, при яких не відбувається фрагментації іонів аналізованих молекул (молекулярних іонів). Так перший мас-аналізатор аналізує молекулярні іони. Залишаючи перший мас-аналізатор, молекулярні іони фрагментуються під дією зіткнень з молекулами

інертного газу або випромінювання лазера, після чого їх фрагменти аналізуються в другому мас-аналізаторі.

Останнім елементом мас-спектрометра є детектор заряджених частинок. Детектором у перших мас-спектрометрах була фотопластинка. Зараз використовуються діодні вторинно-електронні помножувачі, в яких іон, потрапляючи на перший диод, вибиває з нього пучок електронів, які, в свою чергу, потрапляючи на наступний диод, вибивають із нього ще більшу кількість електронів і т.д. Інший варіант – фотопомножувачі, які реєструють світіння, що виникає при бомбардуванні іонами люмінофора. Крім того, використовуються мікроканалні помножувачі, системи на зразок діодних матриць і колектори, що збирають всі іони, які потрапили в дану точку простору (колектори Фарадея).

4. Розшифровка мас-спектрів

Зазвичай органічні сполуки дають складні мас-спектри, в яких удається виділити найбільш характерні та найбільш інтенсивні піки, що відповідають основним шляхам розпаду досліджуваної сполуки. «Читають» спектри справа наліво – від більших мас до менших. Великі фрагменти найбільш інформативні, для них можлива обмежена кількість шляхів утворення.

Перший пік у спектрі – пік молекулярного іона, тобто іонізованої вихідної молекули. При описі спектру його позначають буквою **M**. Уже з цього піку можна отримати багато корисних відомостей. Імовірність утворення **M** підвищується зі зростанням стійкості вихідної молекули. Розпад **M** відбувається значно легше за вихідну молекулу, оскільки він менш стабільний. У спектрах ароматичних і поліциклічних сполук молекулярні іони мають інтенсивні сигнали, низька інтенсивність сигналу – у алканів та спиртів. За відносною величиною інтенсивності сигналу можливо відносно судити про клас, до якого відноситься сполука. Наприклад, значення молекулярної маси **M** дає можливість визначити в молекулі непарну кількість атомів азоту («азотне правило»), у цьому випадку молекулярна маса сполуки непарна. Для молекул, які не містять атоми азоту чи містять парну його кількість, значення маси завжди парне.

Вони можуть мати тільки дискретні значення, що підкоряються цілком певним закономірностям. Зокрема, будь-яка сполука складу $C_xH_yO_z$ може мати тільки парну молекулярну масу. Значення молекулярної маси відразу різко обмежує число можливих структур, а більш докладний аналіз спектра в ділянці піку молекулярного іона дозволяє отримати ще цілий ряд додаткових даних. Наприклад, природний бром складається з двох ізотопів ^{79}Br і ^{81}Br у співвідношенні 1:1. Тому молекулярний іон будь-якої сполуки, що містить один атом бром, дає в мас-спектрі два піки однакової інтенсивності, що розрізняються на дві одиниці маси. Такий дуплет у спектрі дуже характерний і відразу вказує на наявність в аналізованій сполуці одного атома бром. А якби в ньому було два атоми бром, то відповідні іони дали б пік у вигляді триплетів

з відстанню між компонентами в дві одиниці маси і співвідношенням інтенсивностей 1: 2: 1.

Далі за спектром ідуть піки осколків. Молекулярний іон розпадається на дві частки: заряджену та нейтральну. Остання часто виявляється стійкою малою молекулою типу H_2O , CO і т.п. Ці фрагменти нейтральні, проте їх можна ідентифікувати побічно – за різницею мас молекулярного іона і зарядженого осколка. Тому останні часто описують у різницевому виразі, наприклад: MH_2O , або M-18; M-CO, або M-28; M- CH_3 , або M-15; M- $\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$, або M-42 і т.д. Склад таких великих осколків зазвичай легко ідентифікувати, оскільки число варіантів складу малих осколків досить невелике. Наприклад, для звичайних органічних сполук M-18 – це завжди MH_2O . Таких первинних осколків, тобто тих, які виникають безпосередньо за розпадом молекулярного іона, може бути декілька, тому що розпад може протікати за декількома напрямками. Первинні осколки, в свою чергу, підлягають розпаду, а продукти розпаду теж розпадаються. Так виникають серії іонів, що відповідають певним шляхам розпаду, або, як частіше говорять, фрагментації молекулярного іона. Мистецтво розшифровки спектра значною мірою полягає в умінні з великого числа піків виділити такі, які об'єднуються в певні серії – послідовності фрагментації вихідного іона. Коли такі серії виявлені, відновити картину розпаду і, отже, структуру аналізованого речовини вже значно простіше, особливо якщо дослідник спирається на загальні дані про характерні шляхи фрагментації сполук даного класу.

Великі принципові можливості мас-спектрометрії з'являються при поєднанні її з іншими методами. Поєднання методів значно розширює можливості кожного з них, дозволяючи одержувати більше інформації про об'єкт дослідження.

5. Хромато-мас-спектроскопія

Хромато-мас-спектроскопія (chromato-mass-spectrometry) – гібридний метод аналізу сумішей головним чином органічних речовин та визначення слідових кількостей речовини в об'ємі рідини. Метод заснований на комбінації двох самостійних методів – *хроматографії* та *мас-спектрометрії*. За допомогою першого здійснюють розділення суміші на компоненти, за допомогою другого – ідентифікацію та визначення будови речовини, кількісний аналіз. Спочатку сполуки розділяються на колонці хроматографа з послідовним виходом компонентів з колонки в іонне джерело мас-спектрометра, де відбувається їх іонізація. Процеси розділення та аналізу тут протікають абсолютно незалежно один від одного. Відомо 2 варіанти хромато-мас-спектрометрії, що представляють собою комбінацію мас-спектрометрії з газовою хроматографією (*gas chromatography-mass spectrometry*), або з високоефективною рідинною хроматографією (ВЕРХ, *high-performance liquid chromatography, HPLC*).

Поєднання газової хроматографії з мас-спектрометрією дає метод, за допомогою якого всі компоненти складної трьохсоткомпонентної суміші можна

розділити й ідентифікувати, якщо навіть їх вміст у пробі становить до 10^{-12} м. Незважаючи на вражаючі можливості, фізичні принципи обох методів досить прості.

Газова хроматографія – різновид хроматографії, метод поділу летючих компонентів, при якому рухомою фазою служить інертний газ (газ-носій), що протікає через нерухому фазу з великою поверхнею. Хроматографічні колонки повинні містити важко летючі, термостабільні стаціонарні рідкі фази, щоб мас-спектр їхніх парів не накладався на спектр аналізованої речовини. Цей метод можна використовувати для аналізу газоподібних, рідких і твердих речовин з молекулярною масою менше за 400, які повинні відповідати певним вимогам, головні з яких – термостабільність, інертність, хроматографічна рухливість в інтервалі робочої температури колонки, легкість переведення в парову фазу при температурі випарника. Цим вимогам повною мірою відповідають, як правило, органічні речовини, тому газову хроматографію широко використовують як серійний метод аналізу органічних сполук.

Газова хроматографія якнайкраще підходить для поєднання з іонним джерелом мас-спектрометра з іонізацією електронним ударом, хімічною або польовою іонізацією, оскільки в колонці хроматографа сполуки вже знаходяться в газовій фазі. Прилади, в яких мас-спектрометричний детектор скомбінований з газовим хроматографом, називаються *хромато-мас-спектрометрами*.

Коли ці два прилади безпосередньо з'єднують в єдину хромато-мас-спектрометричну систему, можливості такої системи не дорівнюють просто сумі можливостей кожного приладу; аналітичні можливості збільшуються експоненціально. Отримані за допомогою мас-спектрометричного детектора спектри дають таку інформацію про якісний склад проби, яку не можуть дати інші газохроматографічні детектори. Мас-спектрометричний детектор має більшу чутливість, він руйнує пробу, дає інформацію про масу та розрізняє швидше гомологи, ніж ізомери.

Принципова сумісність мас-спектрометра та газового хроматографа обумовлена тим, що в обох випадках аналізована речовина знаходиться в газовій фазі, робочі температурні інтервали однакові, межі виявлення (чутливість) близькі. Різниця полягає в тому, що в іонному джерелі мас-спектрометра підтримується високий вакуум (10^{-5} - 10^{-6} Па), тоді як тиск у хроматографічній колонці 10^5 Па.

Для зниження тиску використовують сепаратор, який одним кінцем з'єднаний з виходом хроматографічної колонки, а іншим – з іонним джерелом мас-спектрометра. Сепаратор видаляє з газового потоку, що виходить з колонки, основну частину газу-носія, а органічну речовину пропускає в мас-спектрометр. При цьому тиск на виході колонки знижується до робочого тиску в мас-спектрометрі. Принцип дії сепараторів заснований або на відмінності рухливості молекул газу-носія й аналізованої речовини, або на їх різній проникності через напівпроникну мембрану. У промисловості найчастіше застосовують ежекторні сепаратори, що працюють за першим принципом. Одностадійні сепаратори цього типу містять дві форсунки з отворами невеликого діаметру, які встановлені точно навпроти один одного. В обсязі між

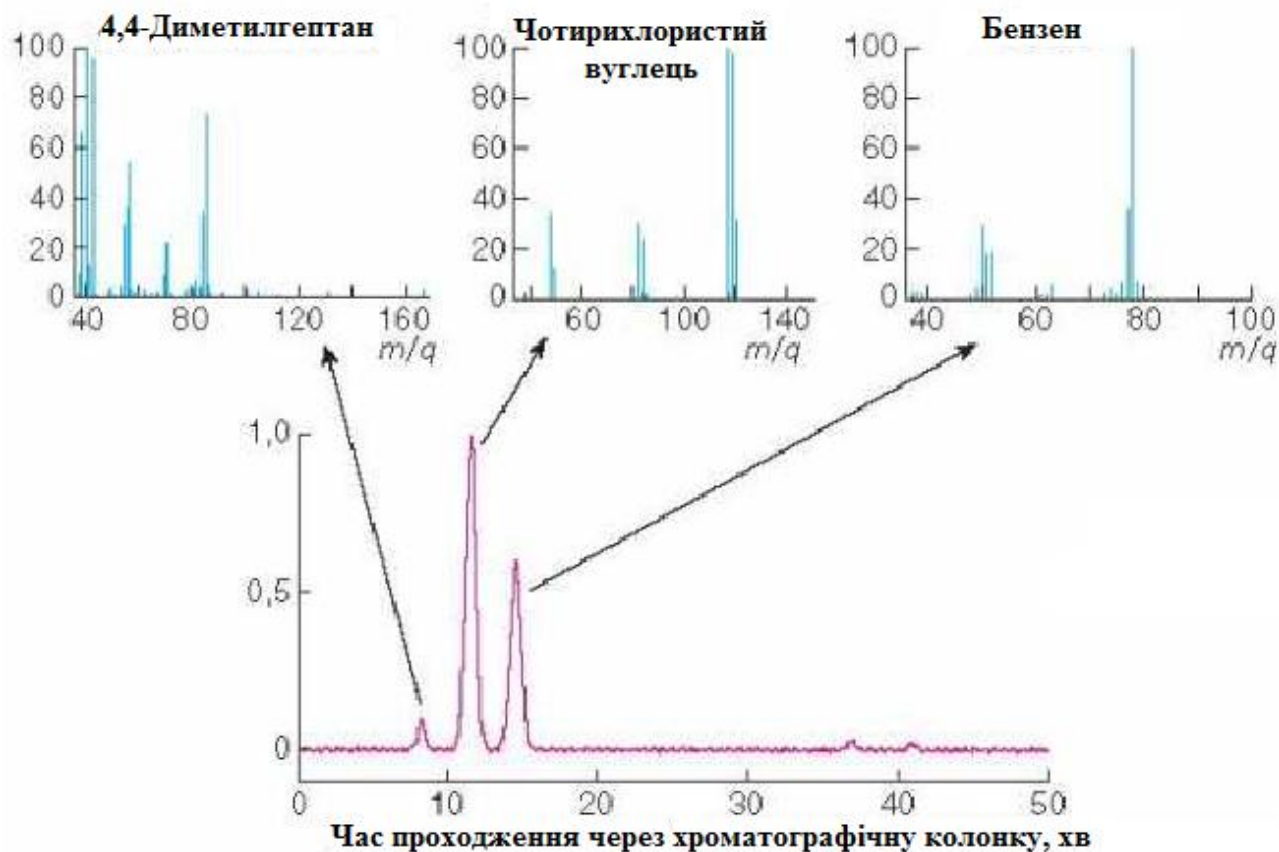
форсунками створюється тиск 1,33 Па. Газовий потік з хроматографічної колонки через першу форсунку з надзвуковою швидкістю потрапляє в зону вакууму, де молекули поширюються зі швидкостями, обернено пропорційними їх масі. У результаті більш легкі та швидкі молекули газу-носія відкачуються насосом, а більш повільні молекули органічної речовини потрапляють в отвір другої форсунки, а потім в іонне джерело мас-спектрометра. Найбільш зручний для хромато-мас-спектрометрії газ-носії – гелій.

Ефективність роботи сепаратора, тобто ставлення кількості органічної речовини в газовому потоці, що виходить з колонки, до його кількості, що надходить в мас-спектрометр, значною мірою залежить від витрати газу-носія, що потрапляє в сепаратор. При оптимальній витраті 20-30 мл/хв видалається до 93% газу-носія, а в мас-спектрометр надходить більше 60% аналізованої речовини. Така витрата газу-носія типова для насадкових колонок. У разі використання капілярної хроматографічної колонки витрата газу-носія не перевищує 2-3 мл/хв, тому на її виході в газовий потік додають додаткову кількість газу-носія, щоб швидкість потоку, що надходить у сепаратор, досягла 20-30 мл/хв. Тим самим забезпечується найкраща ефективність сепаратора.

Коротко алгоритм роботи хромато-мас-спектрометра можна описати так: аналізована речовина (зазвичай – розчин) вводиться у випарник хроматографа, де миттєво випаровується, а пари в суміші з газом-носієм під тиском надходять у колонку. Тут відбувається розділення суміші, і кожен компонент у струмі газу-носія в міру елюювання з колонки надходить у сепаратор. У сепараторі газ-носії в основному віддаляється і збагачений органічною речовиною газовий потік надходить у іонне джерело мас-спектрометра, де молекули іонізуються. Число іонів, які утворюються при цьому, пропорційне кількості речовини, яка надходить. За допомогою встановленого в мас-спектрометрі датчика, що реагує на зміну повного іонного струму, записують хроматограми. Отже, мас-спектрометр можна розглядати як універсальний детектор до хроматографа. Одночасно із записом хроматограми в будь-якій її точці, зазвичай на вершині хроматографічного піку, може бути зареєстрований мас-спектр, що дозволяє встановити будову речовини. Важлива умова роботи приладу – швидкий запис мас-спектра, який повинен реєструватися за час, набагато менший, ніж час виходу хроматографічного піку. Повільний запис мас-спектра може спотворити співвідношення інтенсивностей піків у ньому. Швидкість реєстрації мас-спектра (швидкість сканування) визначається мас-аналізатором.

Найменший час сканування повного мас-спектра (кілька мілісекунд) забезпечує квадрупольний аналізатор. Через однакові проміжки часу мірі елюювання компонентів суміші реєструються мас-спектри, кількісні характеристики яких накопичуються в пам'яті ЕОМ. Для кожного сканування виробляється складання інтенсивностей всіх реєстрованих іонів. Оскільки ця сумарна величина (повний іонний струм) пропорційна концентрації речовини в іонному джерелі, то її використовують для побудови хроматограми (ця величина відкладається за віссю ординат, по осі абсцис – час утримування й номер сканування). Задаючи номер сканування, можна викликати з пам'яті мас-спектр у будь-якій точці хроматограми.

Хромато-мас-спектр промислових газових викидів



Чутливість методу (зазвичай 10^{-6} - 10^{-9} г) визначається чутливістю детектора мас-спектрометра. Більш чутливий (10^{-12} - 10^{-15} г) різновид – *мас-фрагментографія*, називається також селективним іонним або багатоіонним детектуванням. Цей вид хромато-мас-спектрометрії використовують для пошуку, ідентифікації та кількісного аналізу речовини з відомим мас-спектром у складі складної суміші, наприклад, при кількісному визначенні слідів речовин у великих обсягах біологічних рідин (медицина, фармакологія, токсикологія, допінг-контроль, біохімія). Здійснюють мас-фрагментографію на хромато-мас-спектрометрах із використанням спеціального пристрою – багатоіонного детектора або за допомогою ЕОМ, яка може будувати хроматограми за одним або декількома іонами. Така хроматограма, на відміну від звичайної, містить піки лише тих компонентів, у мас-спектрах яких є такі іони. Аналіз проводять із застосуванням внутрішнього стандарту, яким найчастіше виступає мічений стабільними ізотопами (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O) аналог речовини, яку шукають.

Інший варіант хромато-мас-спектрометрії полягає в поєднанні вискоєфективної рідинної хроматографії та мас-спектрометрії. Метод призначений для аналізу сумішей важколетких, полярних речовин, що не піддаються аналізу методом ГР хромато-мас-спектрометрії. Для збереження вакууму в іонному джерелі мас-спектрометра необхідно видаляти розчинник, який надходить з хроматографа зі швидкістю 0,5-5 мл хв. Для цього частину рідкого потоку пропускають через отвір в декілька мкм, у результаті чого утворюються краплі, які далі потрапляють в зону, що обігрівається, де велика

частина розчинника випаровується, а решта разом з речовиною потрапляє в іонне джерело й іонізується хімічно.

У ряді промислових приладів реалізований принцип стрічкового транспортера. Елюат з колонки потрапляє на рухому стрічку, яка проходить через обігрівану ІЧ-випромінюванням камеру, де випаровується розчинник. Потім стрічка з речовиною проходить через зону, що обігрівається іншим нагрівачем, де випаровується аналізована речовина, після чого вона надходить в іонне джерело й іонізується. Більш ефективний спосіб поєднання вискоєфективного газо-рідинного хроматографа та мас-спектрометра заснований на електро- і терморозпиленні. У цьому випадку елюат пропускають через капіляр, нагрітий до 150 °С, і розпилюють у вакуумну камеру. Іони буфера, присутні в розчині, беруть участь в іоноутворенні. Утворені краплі несуть позитивний або негативний заряд. Уздовж краплі через малий її діаметр створюється високий градієнт електричного поля, причому в міру розпаду крапель цей градієнт зростає. При цьому відбувається десорбція з крапель протонуваних іонів або кластерів (молекула речовини + катіон буфера).

Метод **хромато-мас-спектрометрії** використовують при структурно-аналітичних дослідженнях в органічній хімії, нафтохімії, біохімії, медицині, фармакології, для охорони навколишнього середовища та ін.

Хромато-мас-спектрометр (ХМС)

Хроматографічні детектори забезпечують отримання інформації про аналізовані речовини за часом утримування, амплітудою та площею піків. Мас-спектрометричний детектор розширює можливості аналізу за рахунок отримання додаткової спектральної інформації про хроматографічні піки.



Література: 2, 5, 7, 9 Інформаційні ресурси: 1-5

ТЕМА 7 ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ. ОСНОВИ ПРОЦЕСУ. ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ.

Мета: поглибити, розширити і закріпити знання з теоретичних основ методу хроматографії, навчитися використовувати метод паперової хроматографії на практиці.

План

1. Загальна характеристика хроматографічних методів та їх класифікація.
2. Теоретичні основи методу.
3. Газова 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) – вискоєфективний фізико-хімічний метод розділення і 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 сорбата 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 й 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; розділити і виділити рослинні і тваринні пігменти, ізотопи, рідкоземельні елементи та ін.;

– 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.

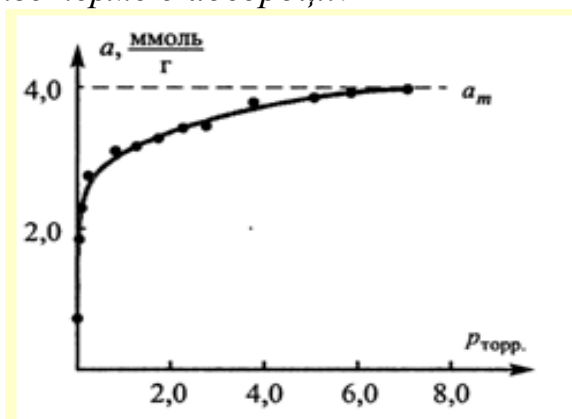
Хроматографічні методи мають найбільш ефективні розподільні можливості за рахунок використання великої кількості типів міжмолекулярних взаємодій. Стадія поділу в хроматографічній колонці або шарі сорбенту забезпечує отримання відносно простих сумішей, аналізованих потім звичайними хімічними, фізико-хімічними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

2. Теоретичні основи методу

Хроматографія – це процес, який базується на багатократному повторенні актів сорбції та десорбції речовини при переміщенні її в потоці рухомої фази вздовж нерухомого сорбенту.

Речовина рухомої фази безперервно вступає в контакт з новими ділянками сорбенту й частково *сорбується*, а сорбована речовина контактує із свіжими порціями рухомої фази й частково *десорбується*.

При постійній температурі адсорбція збільшується із зростанням концентрації розчину або тиску газу. Залежність кількості поглинутої речовини від концентрації розчину або тиску газу при постійній температурі називається *ізотермою адсорбції*:



Математично ця залежність може бути виражена *рівнянням Ленгмюра*:

$$a = a_m \frac{Kp}{1 + Kp},$$

де a – кількість адсорбованої речовини при рівновазі; a_m – максимальна кількість речовини, яка може бути адсорбована на даному сорбенті; K – постійна; p – концентрація.

На ділянці невеликих концентрацій ізотерма лінійна. Дійсно, при $Kp \ll 1$, тоді $a = a_m Kp$; $K_{\Gamma} = a_m K$

Це рівняння лінійної адсорбції. Воно відповідає *рівнянню Генрі* (Γ – коефіцієнт Генрі). Ізотерма адсорбції може бути також увігнутою, S-подібною і т.д., що пов'язано з утворенням полімолекулярних шарів на поверхні сорбенту, неоднорідністю поверхні сорбенту.

Сутність хроматографічного процесу можна з'ясувати на такому прикладі. Наприклад, маємо колонку, заповнену гранульованою твердою

речовиною, через яку протікає потік рідини з розчиненими у ньому речовинами **A** та **B**. Кожна молекула речовин **A** та **B** певний час перебуває в потоці РФ, а решту часу за рахунок адсорбції утримується на поверхні НФ.

Відношення концентрації речовини **A** чи **B** у НФ до концентрації тієї ж речовини в РФ є константою (коефіцієнтом) розподілу для цієї речовини. Можливість розділення речовин **A** та **B** зумовлена тим, що одна із них перебуває більше часу в РФ і швидше досягне кінця колонки. Швидкість руху зони певної речовини через колонку, яка визначає цей час, є обернено пропорційною коефіцієнтові розподілу.

Якщо на виході колонки реєструвати зміну в часі чи об'ємі РФ будь-яку її властивість, то на стрічці реєстратора отримаємо вихідну хроматографічну криву – хроматограму (рис. 33).

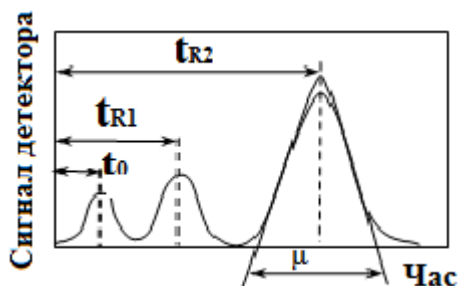


Рис. 33. Параметри хроматограми: μ – ширина піку, t_R – утримання

Сорбційна здатність НФ за відношенням до речовин, які розділяємо, характеризується часом утримання t_R . Час утримання – це відстань на хроматограмі від моменту введення проби в шар сорбенту до моменту появи на виході з цього шару речовини максимальної концентрації в потоці РФ. Об'єм РФ, який пройшов при цьому через шар сорбенту, є об'ємом утримання V_R . Цей об'єм і час утримання пов'язані співвідношенням:

$$V_R = t_R \cdot v \quad (1), \text{ де } v - \text{об'ємна швидкість РФ.}$$

Висота вихідної кривої (піка) h є довжиною перпендикуляра від максимуму піка на нульову лінію. Нульова лінія відповідає сигналу детектора при виході РФ без проби.

Ширина піка μ – відрізок на нульовій лінії, утворений дотичними до кривої в точках її перегинів.

При хроматографуванні утворюються зони розділених речовин. Ці зони при русі в колонці розмиваються. Чим більша розмитість зон, тим важче їх розділити. Мірою розмитості є так звана висота еквівалентної теоретичної тарілки (ВЕТТ).

Теоретична тарілка – це абстрактна величина, образом якої є вузький шар колонки, у якому досягається рівновага між рухомою та нерухомою фазами. Чим більше подібних станів рівноваги, тим краще розділення. Отже, кількість теоретичних тарілок засвідчує ефективність колонки. ВЕТТ є висотою шару рівноважного стану. Вона пов'язана з параметрами хроматограми так:

$$\text{ВЕТТ} = \frac{L}{N}, \text{ де } L - \text{довжина колонки, } N - \text{число теоретичних тарілок,}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{\mu} \right)^2. \text{ Отже, ВЕТТ} = \frac{L}{16} \left(\frac{\mu}{t_R} \right)^2 \quad (2).$$

Чим менша величина ВЕТТ (вужчий пік), тим краще розділення. Ступінь розділення двох хроматичних зон описує параметр розділення R_s , який визначається так:

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R1} - t_{R2}}{\mu_1 + \mu_2} \right).$$

Розглянуті найважливіші параметри хроматограми відображають індивідуальні характеристики речовин, тому дотримання незмінності умов хроматографування є інструментом ідентифікації цих речовин. Хроматограма дає змогу оцінювати ступінь чистоти багатьох сполук. Поява додаткових піків (крім основного) свідчить про забруднення.

Крім якісного аналізу, хроматографічна інформація дає змогу здійснювати кількісні визначення. Основою кількісного аналізу є залежність висоти піка h та його площі S від кількості речовини. Сучасні хроматографи (рис. 34) мають спеціальні пристрої для вимірювання цих параметрів.

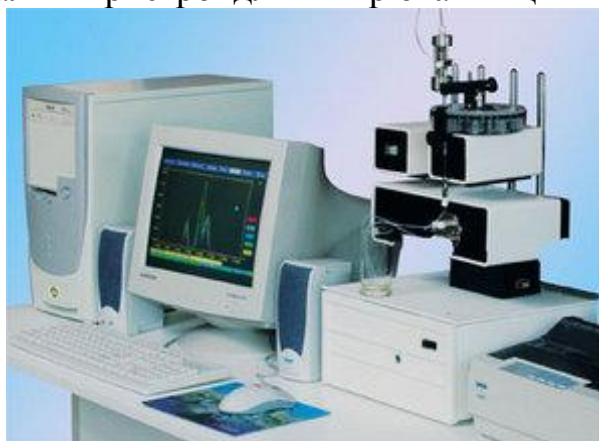


Рис. 34. Зовнішній вигляд хроматографічної установки

Для визначення концентрацій зазвичай використовують метод калібрувального графіка: будують графіки залежності h або S від концентрації для кожного компонента суміші.

3. Газова хроматографія

Газова хроматографія (ГХ, *gas chromatography*) є методом поділу летких, термостабільних сполук (РФ – газ). Цим вимогам відповідає до 5% відомих органічних сполук, але саме вони складають 70-80% сполук, які використовує людина в сфері виробництва й побуту. РФ служить інертний газ (газ-носіє), він протікає через НФ, яка має велику поверхню. Як РФ можна використовувати водень, гелій, аргон, вуглекислий газ, але найчастіше використовують азот. Газ-носіє забезпечує перенесення у пароподібній формі зразка, що аналізується, він не взаємодіє ні з поділюваними речовинами, ні з НФ. Розділення сумішей проводять у спеціальних приладах – *хроматографах*.

Розрізняють *газо-адсорбційну* і *газо-рідинну* хроматографію. У першому випадку НФ є твердий носій (силікагель, вугілля, оксид алюмінію), у другому – в'язка, нелетка рідина, нанесена на поверхню інертного носія.

Газо-рідинна хроматографія (gas-liquid chromatography) – розділення газової суміші внаслідок різної розчинності компонентів проби в рідині або різної стабільності комплексів, що утворюються. НФ служить рідина, нанесена на інертний носій, РФ – газ. Поділ ґрунтується на відмінності в летючості і розчинності (або адсорбованості) компонентів поділюваної суміші, в колонці відбувається процес розчинення газів або парів, що розділяються по всій масі тонкого шару рідини НФ і виділення їх. Цей метод можна використовувати для аналізу газоподібних, рідких і твердих речовин з молекулярною масою менше 400, які повинні відповідати певним вимогам, головні з яких – летючість, термостабільність, інертність, легкість отримання. Цим вимогам повною мірою відповідають, як правило, органічні речовини, тому газову хроматографію широко використовують як серійний метод аналізу органічних сполук.

Газо-адсорбційна хроматографія (gas-solid chromatography, газо-твердофазна хроматографія, ГАХ). Особливість методу ГАХ полягає в тому, що як НФ застосовують адсорбенти з високою питомою поверхнею ($10-1000 \text{ м}^2\text{г}^{-1}$), і розподіл речовин між НФ і РФ визначається процесом адсорбції. Це метод аналізу сумішей газів і легколетких речовин. Розділення речовин у ГАХ відбувається за рахунок численних актів адсорбції на твердій поверхні фази та десорбції з неї. Адсорбція молекул із газової фази може бути обумовлена неспецифічними (орієнтаційними, індукційними, дисперсійними) і специфічними взаємодіями (комплексоутворенням або утворенням водневого зв'язку), а також залежить від природи адсорбенту й сорбату.

За адсорбент беруть пористі носії, які мають хімічну, фізичну та термічну стабільність; однорідну поверхню, рівномірний розподіл за розміром пор і відому адсорбційну активність. Адсорбційна активність залежить від питомої поверхні (визначається геометричною структурою носія) і питомої поверхневої енергії (визначається хімічною структурою поверхні). Перевагами таких адсорбентів є здатність витримувати високі температури, відсутність фонового сигналу при роботі з іонізаційними детекторами та висока селективність.

Адсорбенти діляться на неорганічні, полімерні (органічні) та модифіковані. Серед неорганічних адсорбентів особливо важливі сорбенти на основі вуглецевих матеріалів (неполярні сорбенти). Широко використовуються полярні неорганічні сорбенти на основі двоокису кремнію (цеолітові молекулярні сита ($M_2/nO \cdot Al_2O_3 \cdot xSiO_2 \cdot yH_2O$)).

Метод ГАХ зазвичай використовують для оцінки вмісту в атмосферному повітрі O_2 , H_2 , CH_4 , CO_2 , CO , оксидів азоту, Cl_2 , SO_2 , H_2S , CS_2 .

Перевагами газової хроматографії є:

- порівняно просте апаратне оформлення;
- широкі межі застосування (можна визначати сполуки, для яких досягається тиск насиченої пари 0,001-1 мм рт.ст.);
- можливість визначення з високою точністю малих кількостей газів органічних сполук;

- швидкість аналізу та висока гнучкість зміни умов поділу;
- широкий вибір сорбентів і НФ;
- можливість здійснення хімічних реакцій у хроматографічній колонці або детекторі, що розширює коло аналізованих сполук (реакційна ГХ);
- підвищення інформативності при поєднанні з різними інструментальними методами (мас-спектрометрією, ІЧ(Фур'є)-спектрометрією та ін.).

Апаратура

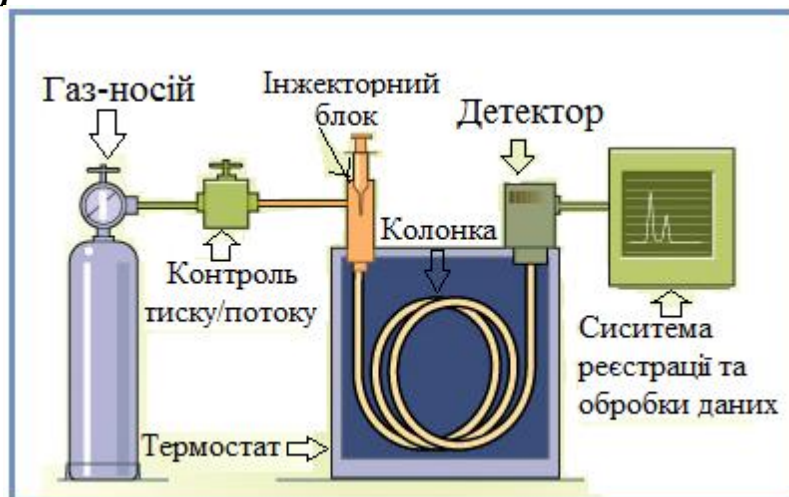


Рис. 35. Схема газового хроматографа

Газ-носієв подається з балона під певним постійним тиском, який встановлюється за допомогою спеціальних клапанів (рис. 35). Швидкість потоку в залежності від розміру колонки, як правило, становить $20\text{-}50\text{ мл}\cdot\text{хв}^{-1}$. Пробу перед введенням у колонку дозують, рідкі проби вводять спеціальними інжекційними шприцами ($0,5\text{-}20\text{ мкл}$) в потік газу-носія (у випарник) через мембрану із силіконової гуми, яка сама ущільнюється. Для введення твердих проб використовують спеціальні пристосування. Проба повинна випаровуватися практично миттєво, інакше піки на хроматограмі розширюються і точність аналізу знижується. Тому дозувальний пристрій хроматографа забезпечено нагрівачем, що дозволяє підтримувати температуру дозатора приблизно на 50°C вище, ніж температура колонки. При проходженні отриманої газової суміші вздовж сорбенту в колонці відбувається поділ. З колонки газовий потік, що несе в певній послідовності розділені компоненти, надходить у детектор. Електричний сигнал від детектора реєструється у вигляді хроматограми.

Отже, основними системами будь-якого газового хроматографа є колонка і детектор. Хроматографічна колонка розділяє, а детектор кількісно визначає компоненти газової суміші, які проходить через неї.

У газовій хроматографії використовують насадочні (набивні), капілярні та полікапілярні колонки. Використання капілярних колонок дозволяє істотно підвищити ефективність розділення, а полікапілярних – не тільки отримати високу ефективність, але й провести поділ за дуже короткий час.

У ГХ використовують широке коло детекторів (табл. 3), які можна

поділити на інтегральні та диференціальні. *Інтегральні* – реєструють зміну в часі сумарної кількості всіх компонентів, *диференціальні* – вимірюють миттєву концентрацію компонентів.

Таблиця 3. Газохроматографічні детектори

Детектор	Газ-носії	Аналізовані гази	Нижня межа детектування
Катарометр	He, H ₂ , N ₂	Будь-які гази	10 нг
Детектор іонізації в полум'ї	He, N ₂	Органічні гази	100 пг
Лужний полуменово-іонізаційний (термоіонний) детектор	He, N ₂	Гази, що містять N і P	1-10 пг
Детектор електронного захоплення	N ₂ , Ar + 10% CH ₄	Гази, що містять Hal, S, N	1,0-0,001 пг
Аргоновий іонізаційний детектор	Ar	-	0,01 пг
Гелієвий детектор	He	Будь-які гази	0,01 пг

Метод газової хроматографії *не дозволяє автоматично ідентифікувати* піки на кривій елюювання. Крива, наведена на рис. 36, лише показує, що зразок, який аналізується, містить 20 компонентів. Ідентифікація компонентів проводиться за *часом утримування t_R* – період від моменту введення проби до моменту елюювання речовини щодо її максимальної концентрації.

Якщо час утримування компонента невідомий, то цей компонент збирають по мірі виходу його з колонки та ідентифікують, наприклад, за ІЧ-спектром. Іноді для ідентифікації речовину виводять із колонки безпосередньо в ІЧ-спектрометр або мас-спектрометр.

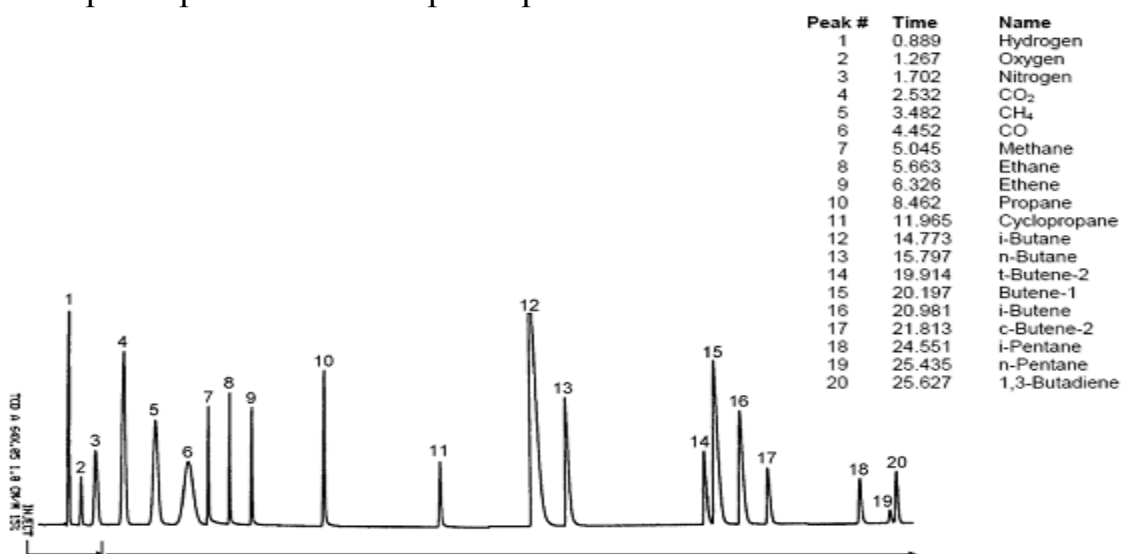


Рис. 36. Приклад розділення суміші газів із використанням газової хроматографії

Література: 3, 5, 6, 8 Інформаційні ресурси: 1-5

ТЕМА 8. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ АНАЛІЗУ. РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ

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

План

1. Загальна характеристика хроматографії.
2. Рідинна хроматографія.
3. Паперова хроматографія.
4. Тонкошарова хроматографія.
5. Іонообмінна хроматографія.



Основні терміни та поняття: газова хроматографія, рідинна хроматографія, хроматограф, колонка, детектор.

1. *Загальна характеристика хроматографії*



Хроматографія (chromatography) – це метод розподілу та визначення речовин, заснований на розподілі компонентів між двома фазами – рухомою і нерухомою. НФ (стаціонарною) служить тверда пориста речовина (сорбент) або плівка рідини, нанесена на тверду речовину. РФ являє собою рідину або газ, що протікає через НФ, іноді під тиском. Компоненти аналізованої суміші (сорбат) разом із РФ пересуваються вздовж НФ. Її зазвичай поміщають в скляну або металеву трубку, яка називається колонкою. Залежно від сили взаємодії з поверхнею сорбенту (за рахунок адсорбції або за іншим механізмом) компоненти будуть переміщуватися вздовж колонки з різною швидкістю. Одні з них залишаться у верхньому шарі сорбенту, інші, що менше взаємодіють із сорбентом, виявляться в нижній частині колонки, а деякі й зовсім залишать колонку разом із РФ (це компоненти, що не утримуються, а період їх утримування визначає "мертвий час" колонки). Отже, відбувається швидкий поділ складних сумішей компонентів.

Сучасні хроматографи оснащені комп'ютерами, що дозволяє прискорити аналіз речовин (за рахунок створення бібліотеки речовин в пам'яті), зробити аналіз більш достовірним, точним, а також простим у виконанні. Перераховані факти роблять метод хроматографічного аналізу одним із найбільш використовуваних у сучасних експертних лабораторіях, оскільки він дозволяє швидко та якісно розділити й проаналізувати суміші близьких за властивостями речовин.

Популярним та доступним методом є площинна (планарна)

хроматографія. Це спосіб аналізу, в якому процеси розділення суміші сполук здійснюються у плоскому шарі сорбенту (нерухомій фазі, 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. Розподіл цими методами може бути виконано з використанням хроматографічних систем рідина-твердий сорбент і рідина-рідина-твердий сорбент, тож виділяють адсорбційну, розподільну, обернено-фазову і іонообмінну площинну хроматографію. Тонкошарову хроматографію використовують частіше, ніж паперову.

2. Рідинна хроматографія

Рідинна хроматографія (liquid chromatography, РХ) – вид хроматографії, в якій РФ (елюентом) служить рідина. НФ може бути твердий сорбент, твердий носій з нанесеною на його поверхню рідиною або гелем. Метод РХ застосовується для розділення ширшого кола речовин, ніж ГХ, оскільки панівна більшість частина речовин не леткі та не стійкі при високих температурах. В РХ поділ зазвичай відбувається при кімнатній температурі.

Розрізняють *колонкову РХ*, у якій через колонку, заповнену НФ, пропускають порцію суміші, речовин у потоці елюенту (під тиском або під дією сили тяжіння), і *тонкошарову РХ*, у якій елюент переміщується під дією капілярних сил плоским шаром сорбенту, нанесеним на скляну пластинку або металеву фольгу, уздовж пористої полімерної плівки, поверхнею циліндричної кварцевої або керамічної палички, смужкою хроматографічного паперу.

Сучасним варіантом РХ є *високоєфективна РХ* (high-performance liquid chromatography, HPLC, рідинна хроматографія високого тиску, ВЕРХ). Відмінною особливістю ВЕРХ є використання високого тиску та дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3-5 мкм, часто до 1,8 мкм). Це дозволяє розділяти складні суміші речовин швидко й повно (середній час аналізу від 3 до 30 хвилин). У ВЕРХ використовують колонки діаметром до 5 мм, щільно упаковані сорбентом; тиск для прокачування елюенту – до 3.107 Па. Варіанти ВЕРХ – *мікроколонкова хроматографія* на наповнених колонках малого діаметру і *капілярна хроматографія* на порожніх і наповнених сорбентом капілярних колонках.

До РХ зазвичай відносять також *гідродинамічну хроматографію*, де НФ відсутня. У цьому випадку використовують той факт, що швидкість потоку елюенту максимальна в центрі порожнього капіляра й мінімальна біля його стінок, а колективні компоненти розподіляються між рухомими з різною швидкістю шарами елюенту відповідно до своїх розмірів або під впливом накладеного в поперечному напрямку зовнішнього силового поля (відцентрового, електричного, магнітного).

За механізмом утримування поділюваних речовин НФ рідинна хроматографія ділиться на осадову, адсорбційну, розподільну, іонообмінну (в т.ч. іонну), лігандообмінну, ситову та афінну (біоспецифічну).

Осадова рідинна хроматографія заснована на різниці між розчинністю осадів, що утворюються при взаємодії компонентів аналізованої суміші з реагентом-осаджувачем. Переваги методу виявляються в тому, що отримувані вздовж сорбенту зони мають різні межі, містять осади тільки однієї речовини й часто розділені зонами чистого сорбенту.

Адсорбційна рідинна хроматографія в залежності від відносної полярності сорбенту та елюенту поділяється на *нормально-фазну* та *обернено-фазну*. У першому випадку адсорбція речовин відбувається на полярному сорбенті (напр., силікагелі, що містить гідроксильні (силанольні) групи) з неполярного елюенту завдяки донорно-акцепторним взаємодіям або утворенню водневих зв'язків. У другому – на поверхні гідروفобного сорбенту з полярного елюенту завдяки дисперсійним (гідروفобним) взаємодіям поділюваних молекул з поверхнею (утворення водневого зв'язку уможливується в РФ з молекулами елюенту, який, як правило, містить воду).

У розподільній рідинній хроматографії поділ ґрунтується на розподілі речовин між двома рідкими фазами: нерухомою, нанесеною на поверхню носія, і рухомих елюентом. У залежності від полярності рідких фаз можливі *нормально-фазний* і *обернено-фазний* варіанти. У першому випадку на поверхню або в пори пористого носія наноситься полярна рідина, не змішувана з неполярним елюентом, у другому – використовується неполярна НФ і полярний елюент. До розподільчої рідинної хроматографії відноситься також екстракційна рідинна хроматографія, в якій НФ служить органічний екстрагент, нанесений на твердий носій, а рухомою – водний розчин поділюваних сполук. Як екстрагенти використовують діалкілфосфорні та алкілсульфонової кислоти, феноли (кислотні екстрагенти), триалкілфосфати, фосфіноксиди та ін. (нейтральні екстрагенти), аміни, четвертинні амонієві основи, а також сірковмісні фосфорорганічні сполуки, хелатоутворювальні реагенти та ін. Застосовується для розділення та концентрування неорганічних сполук, наприклад, іонів лужних металів, актиноїдів та інших близьких за властивостями елементів, у процесах переробки відпрацьованого ядерного пального.

В іонообмінній рідинній хроматографії поділ ґрунтується на різниці здібності поділюваних іонів до реакції іонного обміну з фіксуєчими іонами сорбенту, що утворюються в результаті дисоціації іоногенних груп останнього. В залежності від знаку заряду фіксуєчих іонів розрізняють катіоніти (закріплений аніон) і аніоніти (закріплений катіон). Поділ іонів регулюють підбором оптимальних значень рН елюенту і його іонної сили. Варіант іонообмінної рідинної хроматографії – іонна хроматографія, в якій розділені аніони (катіони) детектують у вигляді кислот (відповідних основ) високочутливим кондуктометричним детектором, а вискоефективні колонки наповнені поверхнево-активним іонітом з невеликою ємністю.

Лігандообмінна рідинна хроматографія заснована на різній здатності поділюваних сполук утворювати комплекси з катіонами перехідних металів – Cu(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Co(II) тощо – і фіксованими групами (лігандами) нерухомої фази. Частина координаційної сфери іонів металу зайнята

молекулами води або іншими слабкими лігандами, які можуть витіснятися молекулами поділюваних сполук.

Найбільш ефективна для поділу оптичних ізомерів – **афінна рідинна хроматографія** (біоспецифічна), заснована на утворенні міцного зв'язку зі специфічними групами НФ (лігандами, афінантами). Взаємодія лігандів з речовинами, що розділяються, заснована на біологічній функції останніх. Зокрема, при поділі ферментів лігандами служать їх субстрати, інгібітори або коферменти, токсинів – рецептори, білків – антитіла і т. д. Цей вид хроматографії досить ефективний у біотехнології та біомедицині для виділення ферментів, білків, гормонів.

В **ексклюзійній (ситовій, гель-проникаючій, гель-фільтраційній) рідинній хроматографії** поділ ґрунтується на відмінностях у розмірах молекул (рис. 38); молекули малих розмірів проникають у порівняно тонкі пори сорбенту (молекулярні сита) і затримуються в них, великі молекули або не проникають в пори, або проникають лише в широкі пори і проходять колонку з незначним утримуванням. Поверхня сорбенту та склад елюенту підбирають так, щоб виключити або зменшити енергію адсорбційної взаємодії (однак іноді при поділі олігомерів зручніше використовувати адсорбційний механізм). Для гель-фільтрації застосовують гелі на основі декстрану (сефадексе), поліакриламід (акрілекс, біогель Р), агарози (сефароза, біогель А, сагавак), поліакрилоїлморфіна (ензокрилгель), полістиролів (Біо-Бідзія S). Метод простий у виконанні й проводиться в м'яких умовах, що виключають денатурацію біологічно активних білків, що важливо при роботі, наприклад, з ферментами. Детекторами в цьому методі є *УФ-денситометри*. Широко використовується для визначення величин молекулярних мас, знесолення розчинів нативних білків, концентрування розчинів полімерів, у медицині: для діагностичного розділення білків сироватки крові (наприклад, при макроглобулінемії, гемоглобінопатіях, при ранній діагностиці вагітності, для отримання очищених препаратів ферментів).

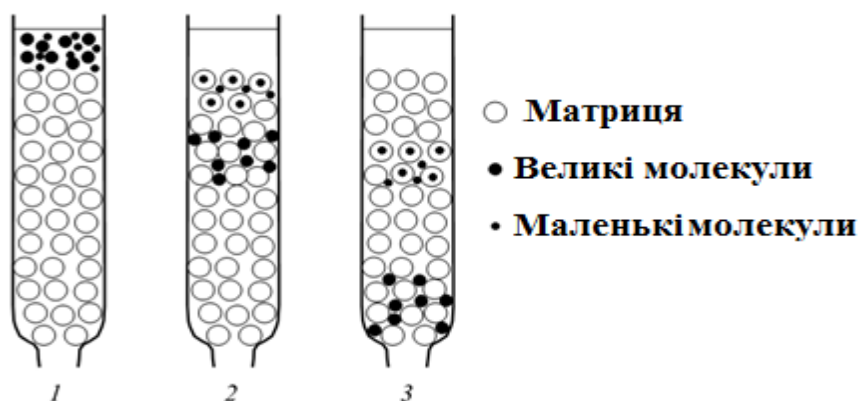


Рис. 38. Поділ речовин методом гель-фільтрації: 1 – момент внесення суміші на колонку; 2 – початок фракціонування; 3 – початок виходу з колонки фракції найбільш великих молекул.

Сучасна модифікація методу – високоефективна рідинна хроматографія, дозволяє провести аналіз, ідентифікацію і поділ дуже малих кількостей речовин (~ 0.000001 р.) за дуже короткий час – 15-20 хвилин.

Апаратура

У залежності від методу РХ використовують різні модифікації хроматографів (прилади або установки для хроматографічного розділення і аналізу сумішей речовин). Основними частинами хроматографа є: система для введення досліджуваної суміші речовин (проби); хроматографічна колонка; детектувальний пристрій (детектор); системи реєстрації та термостатування; пристосування і приймачі для розділених компонентів. Більш детально розглянемо особливості хроматографів для ВЕРХ. Сучасний прилад для ВЕРХ має модульний тип, який має наступну будову:

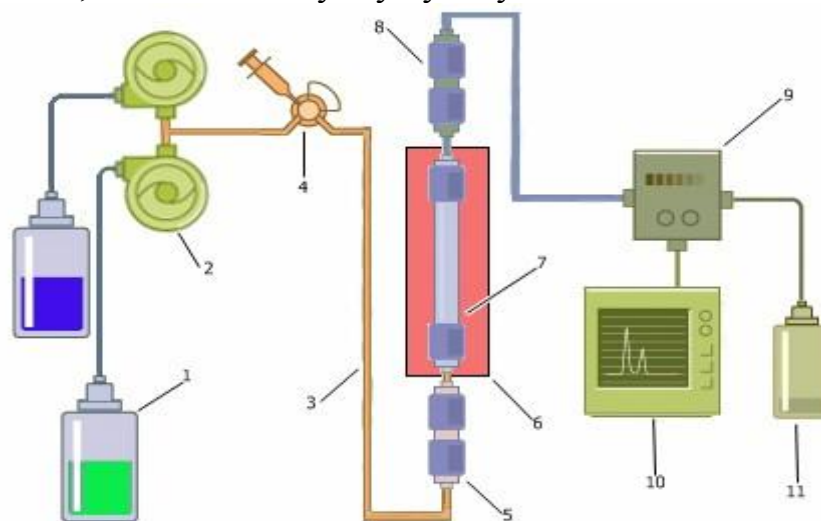


Рис. 39. Схема хроматографа для ВЕРХ.

1. Резервуар з розчинником і вхідним насосом.
2. Насос (2 шт. для градієнтних систем) з датчиком тиску.
3. Трубопровід високого тиску.
4. Ручний чи автоматичний інжектор – автосамплер.
5. Захисна передколонка.
6. Термостат.
7. Аналітична колонка.
8. Постколонковий реактор чи блок пост-колонкової дериватизації.
9. Детектор.
10. Прилад для збору та обробки даних.
11. Резервуар для відпрацьованого розчинника.

Модульний тип дозволяє швидко змінити конструкцію приладу для певних потреб.

Існує декілька типів детекторів, які використовуються для ідентифікації різних класів сполук:

1. Спектрофотометричний на діодній матриці (реєструє поглинання світла в УФ і видимій ділянці в широкому діапазоні довжин хвиль).
2. Спектрофотометричний (реєструє поглинання світла в УФ і видимій ділянці при обраній довжині хвилі).
3. Флюорометричний (вимірює енергію випромінювання збуджених УФ-світлом молекул).
4. Рефрактометричний (реєструє зміну показника заломлення).

5. Електрохімічний (визначає електрохімічні властивості сполуки).
6. Мас-спектрометричний (визначення молекулярного іону).

Усі ці види детекції спільно з певним сорбентом дозволяють досить ефективно визначити кількість сполук у складних сумішах.

Хроматографічні методи широко використовують для розділення речовин дуже близької будови, природних сполук, білків, нуклеїнових кислот, і навіть деяких біологічних об'єктів. Метод хроматографічного аналізу є одним із найбільш використовуваних у сучасних експертних лабораторіях, оскільки він дозволяє швидко та якісно розділити й проаналізувати суміші близьких за властивостями речовин. Рідинна хроматографія застосовується як аналітична і препаративна.

3. 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 окислюватись.

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. Мають значення структура молекул целюлози в папері, орієнтація волокон та інші властивості, що впливають на швидкість руху РФ. Для цієї мети використовують декілька сортів хроматографічного паперу № 1, 2, 3, 4, із збільшенням номера щільність паперу зростає. Від щільності паперу залежить швидкість руху розчинника. Основні операції в ПХ проводяться так само, як і в ТШХ.

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. Зокрема, для поділу неорганічних неполярних речовин використовують системи:

- ацетон : НСl : H₂O (у різних співвідношеннях);
- Н-бутанол : насичений НСl (різної концентрації);
- Н-бутанол : 0,1 М HNO₃ : ацетилацетон.

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. Оберненофазова паперова хроматографія використовується, наприклад, для розділення й ідентифікації полінасичених жирних кислот при вивченні складу ліпідів, виділених із тканин тварин. Папір просочують 5% розчином силікону, як РФ використовують 85% розчин оцтової кислоти.

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.

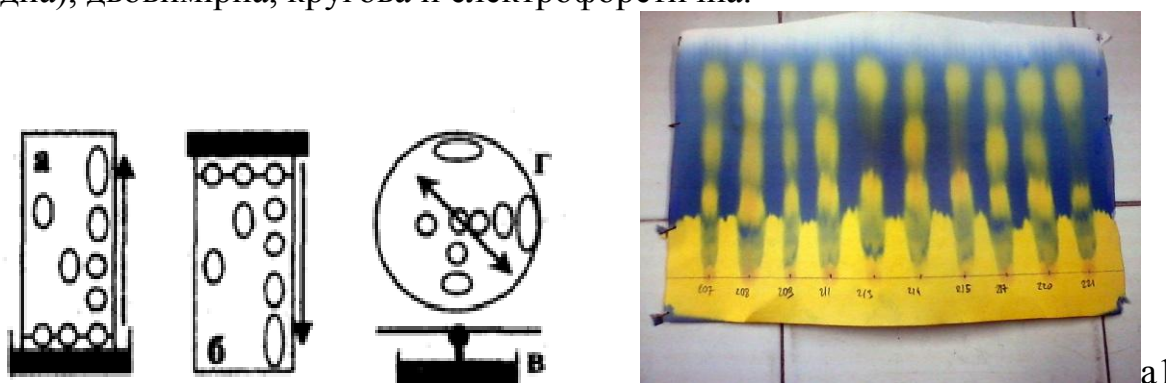


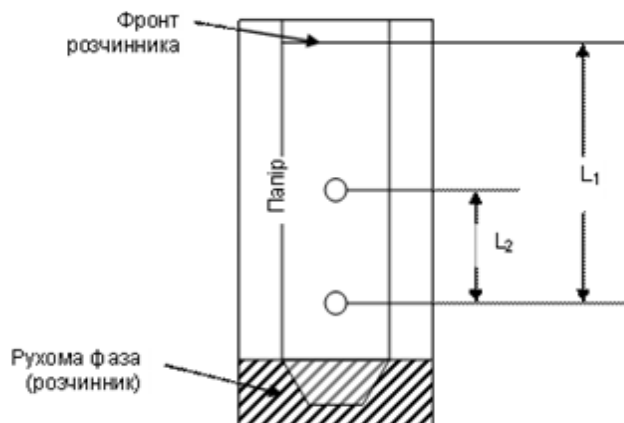
Рис.40. Види паперової хроматографії

1) Одновимірна хроматографія

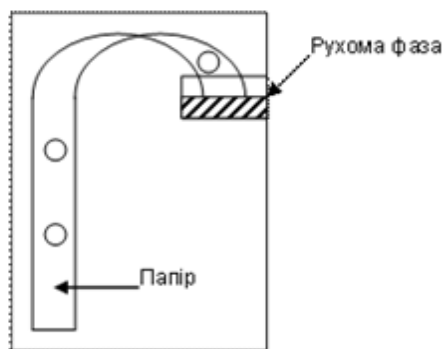
Для одновимірної хроматограми використовують скляні герметизовані камери, паперові смуги шириною 4,5-5 см і завдовжки 30-50 см. Якщо елюент рухається на паперу вгору, метод називають висхідною ПХ (рис. 40., а, а1); при його русі зверху вниз – спадною ПХ (рис. 40, б).

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.

Висхідна паперова хроматографія



Спадна хроматографія



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.

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. 41). Методика дозволяє проводити більш точний поділ компонентів суміші, зокрема цим методом вдалося розділити на компоненти суміш амінокислот.

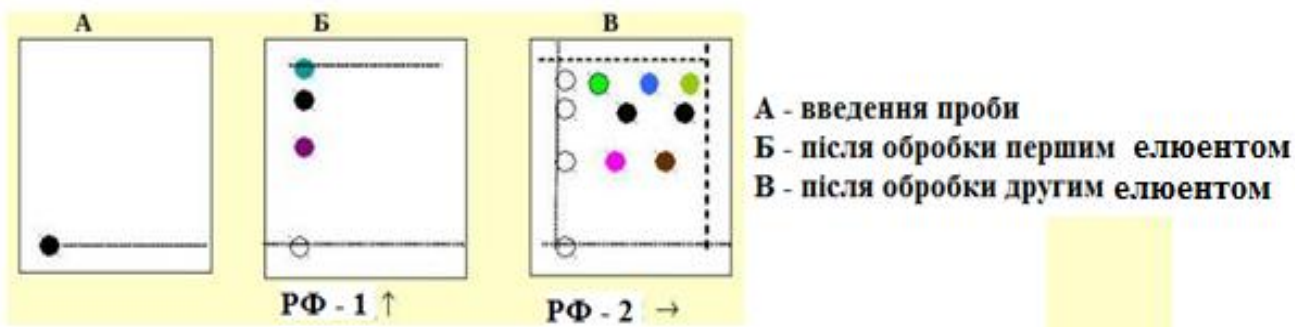


Рис. 41. Двомірна хроматографія суміші барвників

3) Радіальна хроматографія

Дуже швидко можна здійснити хроматографічний аналіз *методом радіальної ПХ* (рис.40, в), в якому використовується паперове коло (рис.1, г) з гнотом, 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 переміщається 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. 42.



Рис. 42. 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.

Відзначимо, що метод ПХ, запропонований в 1941 р. Мартіном і Сінгом (нагороджені Нобелівською премією за відкриття розподільної хроматографії), в даний час використовують в аналітичних лабораторіях досить рідко.

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 вибіркової, 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.

Метод ТШХ був запропонований у 1938 році вченими Н.А. Измайловим та М.С. Шрайбер. Проте широкі можливості методу були відкриті пізніше завдяки роботам Ю. Кірхнера та Е. Шталя.

Адсорбція здійснюється за рахунок сил Ван дер Ваальса, 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. Наприклад, при хроматографуванні амінокислот використовують суміш *n*-бутанолу з

оцтовою кислотою і водою. При аналізі неорганічних йонів як розчинники використовують буферні розчини, що створюють постійне значення рН.

У ТШХ використовують висхідний, низхідний 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.

Найбільш точним є метод, коли речовина, яка визначається, після поділу видаляється з платівки (зазвичай механічним шляхом), а потім її визначають методом кількісного аналізу.

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). За заздалегідь побудованим градувальним графіком залежності площі плями від маси речовини знаходять кількість адсорбованої в плямі аналізованої речовини. При вмісті речовини в межах від 1 до 80 мкг залежність площі плями від маси речовини носить лінійний характер.

4. Іонообмінна хроматографія

В основі методу *іонообмінної хроматографії (ІОХ, Ion exchange chromatography)* лежить зворотній процес обміну між іонами аналізованої речовини (РФ, розчин) та іоногенними групами сорбентів (іонітів) у результаті електростатичних взаємодій.

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*.

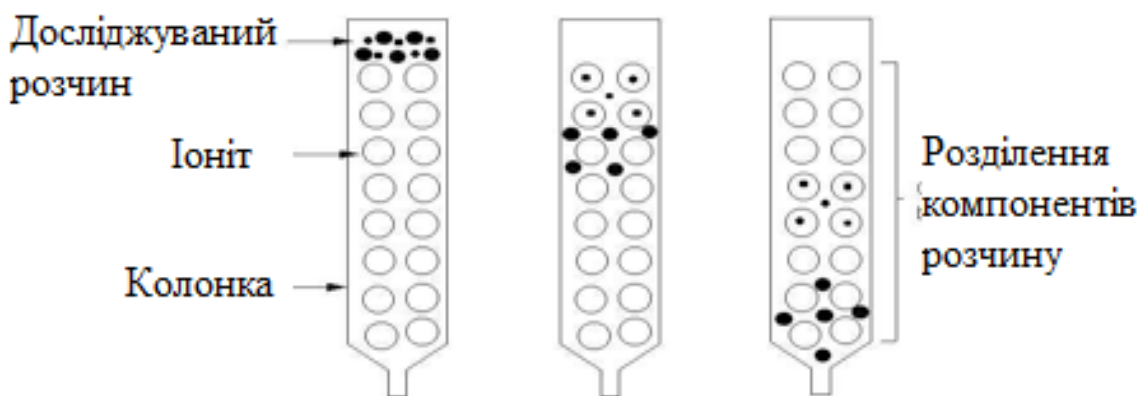


Рис. 43. Розділення компонентів у ІОХ

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 катионіту є іони H^+ , то вважається, що цей катионіт знаходиться у гідрогенній формі (H^+ -формі). Аніоніт, для якого протиіоном є, наприклад, хлорид-іон, буде знаходитись в хлоридній формі (Cl^- -формі).

Іонообмінні сорбенти повинні відповідати наступним вимогам:

- 1) володіти високою поглинальною здатністю;
- 2) володіти вибірковою сорбцією по відношенню до речовин суміші, що розділяється;
- 3) бути однорідними, мати достатній ступінь дисперсності для забезпечення необхідної швидкості сорбції та рівномірного проходження розчину через колонку з необхідною швидкістю;
- 4) мати обмежене набрякання, не розчинятись у розчині, який хроматографують, володіти механічною міцністю;
- 5) виробництво сорбентів має бути економічно доцільним.

Властивості іонів має велика кількість різноманітних природних і синтетичних речовин. Найбільше практичне значення мають синтетичні орг. іони. За своєю хімічною будовою матриці іонообмінника поділяють на:

- синтетичні смоли на основі полістиролу або поліакриламід;
- сефадекси на основі зшитого декстрану;
- сефарози (на основі агарози);
- целюлозні іонообмінники;
- неорганічні іони 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.

Наприклад, для сильно дисоційованих іонів їх селективність до іонів може бути показана рядами:



- 1) $\text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$;
- 2) $\text{Ti}^{+} > \text{Ag}^{+} > \text{Cu}^{+} > \text{Pb}^{+} > \text{K}^{+} > \text{NH}_4^{+} > \text{Na}^{+} > \text{Li}^{+}$;
- 3) $\text{I}^{-} > \text{NO}_3^{-} > \text{Br}^{-} > \text{SCN}^{-} > \text{Cl}^{-} > \text{F}^{-}$.

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 іонів різноманітних типів (розмір і форма зерен, обмінна ємність, кислотно-основні властивості; густина, ступінь набухання).

Розділення неорганічних сполук проводять на неорганічних іонітах (цеолітах, гідроксидах алюмінію, феруму (III) тощо) або смолах (співполімерах стирола з дивінілбензолом).

Для *розділення біополімерів* (білків, нуклеїнових кислот тощо) застосовують великопористі іони – похідні целюлози та полідекстрану.

Розділення катіонів відбувається на катіонообмінниках, які містять фіксовані групи $-\text{HSO}_3^{-}$; $-\text{PO}_3^{2-}$; $-\text{COO}^{-}$ і катіони як протиіони. Рухомою фазою при розділенні катіонів найчастіше є розчини хлороводневої та нітратної кислот або їх солей. Досліджувані катіони елюються з колонки внаслідок їх заміщення у фазі іонообмінника катіонами, які містяться в рухомій фазі.

Розділення аніонів здійснюється на аніонообмінниках, які містять фіксовані групи $-\text{NH}_3$, NHR_2 , NH_2R і аніони як протиіони. Найбільш поширеними елюентами при визначенні аніонів є розчини карбонату або гідроксиду натрію.

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 – вискоефективний 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 вискоефективний 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.