

ТЕМА 6. ГАЗОВА ТА РІДИННА ХРОМАТОГРАФІЯ

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

План

1. Загальна характеристика хроматографії.
2. Газова хроматографія.
3. Рідинна хроматографія.



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

1. Загальна характеристика хроматографії



Хроматографія – 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), 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.

2. 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-носії), він протікає через НФ, яка має велику поверхню. Як РФ можна використовувати водень, гелій, аргон, вуглекислий газ, але найчастіше використовують азот. Газ-носії забезпечує перенесення у пароподібній формі зразка, що аналізується за хроматографічною колонкою, 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, газотвердофазна 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

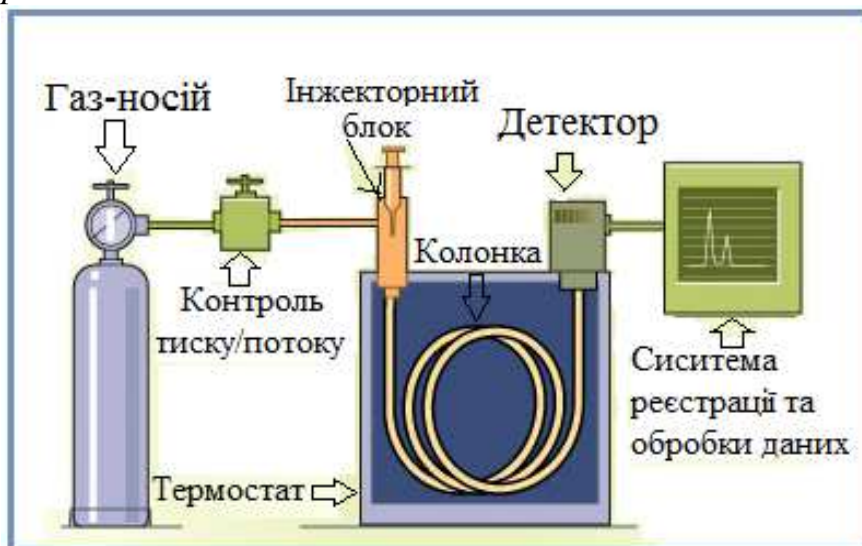


Рис. 20. Схема газового хроматографа

Газ-носіє подається з балона під певним постійним тиском, який встановлюється за допомогою спеціальних клапанів (рис. 20). Швидкість потоку в залежності від розміру колонки, як правило, становить $20-50 \text{ мл} \cdot \text{хв}^{-1}$. Пробу перед введенням у колонку дозують, рідкі проби вводять спеціальними інжекційними шприцами ($0,5-20 \text{ мкл}$) в потік газу-носія (у випарник) через мембрану із силіконової гуми, яка сама ущільнюється. 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, які можна поділити на інтегральні та диференціальні. *Інтегральні* – реєструють зміну в часі сумарної кількості всіх компонентів, *диференціальні* – вимірюють миттєву концентрацію компонентів.

Метод газової хроматографії *не дозволяє автоматично ідентифікувати* піки на кривій елюювання. Крива, наведена на рис. 26, лише показує, що зразок, який аналізується, містить 20 компонентів. Ідентифікація компонентів проводиться за *часом утримування tR* – 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.

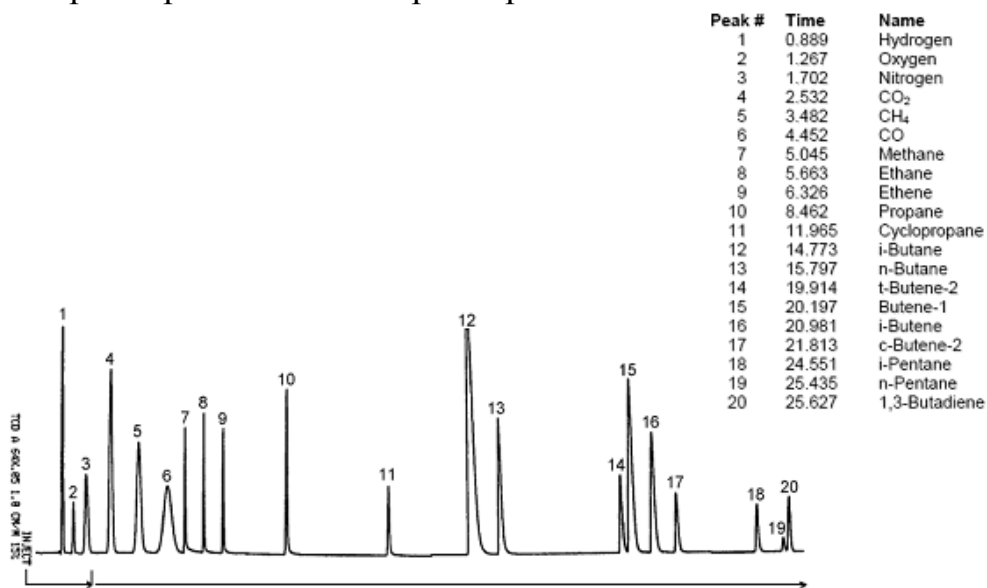


Рис. 21. Приклад розділення суміші газів із використанням газової хроматографії

3. 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 гідрофобного сорбенту з полярного елюенту завдяки дисперсійним (гідрофобним) взаємодіям поділюваних молекул з поверхнею (утворення водневого зв'язку уможлиблюється 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 рухомим елюентом. У залежності від полярності рідких фаз можливі *нормально-фазний* і *обернено-фазний* варіанти.

В іонообмінній рідинній хроматографії поділ ґрунтується на різниці між здатністю поділюваних іонів до реакції іонного обміну з фіксуючими іонами сорбенту, що утворюються в результаті дисоціації іоногенних груп останнього. У залежності від знаку заряду фіксуючих іонів розрізняють катіоніти (закріплений аніон) і аніоніти (закріплений катіон). Поділ іонів регулюють підбором оптимальних значень рН елюенту та його іонної сили.

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 витіснитися 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 ексклюзивній (ситовій, гель-проникаючій, гель-фільтраційній) рідинній хроматографії поділ ґрунтується на відмінностях у розмірах молекул; 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.

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. Сучасний прилад для ВЕРХ має модульний тип, який дозволяє швидко змінити конструкцію приладу для певних потреб.

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.