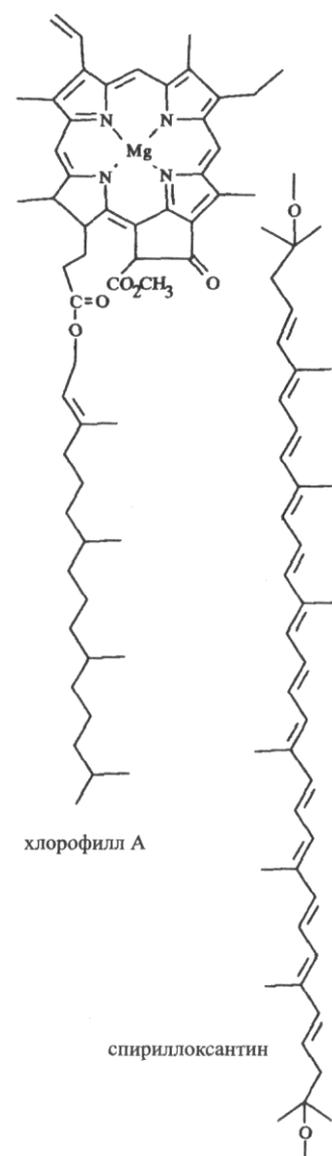


## Хроматографические методы анализа

Деятельность любого химика-аналитика связана с решением проблем разделения, идентификации и количественного определения компонентов, составляющих анализируемый объект. Вообще все, что нас окружает, - воздух, вода, почва, минералы и т.д., представляет собой многокомпонентные сложные смеси. Поэтому задача разделения является первостепенной для специалистов самых разных областей химии (геохимии, биохимии, медицины). И везде хроматография является незаменимым мощным методом разделения, по эффективности и распространенности не сравнимым с классическими методами разделения. По имеющимся оценкам, в настоящее время порядка 60% всех выполняемых в мире анализов проводятся с применением хроматографии.

**1. Основы процесса хроматографического разделения.** В химическом анализе эффективного многоступенчатого разделения можно достичь с помощью метода хроматографии. **Хроматография** – физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов сложных смесей газов, паров, жидкостей или растворенных веществ между двумя фазами – неподвижной и подвижной. *В основе хроматографического разделения лежит различие в сорбционной активности компонентов смеси по отношению к данному сорбенту и использование сорбционных процессов в динамических условиях.* Хроматография – гибридный аналитический метод, в котором сочетаются и разделение, и определение. Метод позволяет разделять многокомпонентную смесь, идентифицировать компоненты и определять ее количественный состав.



Метод колоночной хроматографии был предложен в 1903 г. русским ботаником Михаилом Семеновичем Цветом. Используя колонку, заполненную тонкодисперсным порошком карбоната кальция, и петролейный эфир, он сумел разделить окрашенные компоненты (хлорофилл и ксантофилл спириллоксантин) экстракта листьев растений. При этом он наблюдал на колонке окрашенные зоны компонентов и поэтому назвал метод *хроматографией* (дословно «цветопись» - от греческих слов «хрома» - цвет и «графо» - «пишу»).

В основе хроматографии лежит процесс распределения разделяемых компонентов между двумя несмешивающимися фазами. Пробу вводят в *подвижную фазу*, которой может быть жидкость, газ или сверхкритический флюид. Подвижная фаза движется относительно *неподвижной фазы*, находящейся на колонке или в плоском тонком слое. Различия в силе взаимодействия компонентов пробы с неподвижной фазой приводят к тому, что при достаточно большом времени движения компоненты разделяются.

В зависимости от способа регистрации различают внутренние и внешние хроматограммы. При *внутреннем* способе регистрации компоненты анализируемой смеси за одно и то же время проходят различные расстояния. По окончании процесса разделения все они находятся внутри разделяющего устройства и там детектируются. Этот способ регистрации характерен для *плоскостной* хроматографии - бумажной и тонкослойной. Здесь неподвижная фаза имеет форму тонкого слоя, вдоль которого подвижная фаза перемещается под действием капиллярных или гравитационных сил. **Внешние** хроматограммы регистрируют в *колоночной* хроматографии. Здесь все компоненты проходят одно и то же расстояние и регистрируются на выходе из колонки. Ввиду различного сродства компонентов пробы к неподвижной фазе их времена выхода оказываются различными.

В основу общепринятых классификаций многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки: агрегатное состояние подвижной и неподвижной фаз, механизм взаимодействия сорбент –

сорбат, форма слоя сорбента (техника выполнения), цель хроматографирования.

В таблице 1 приведена классификация методов колоночной хроматографии в соответствии с природой подвижной и неподвижной фаз.

Неподвижная фаза	Подвижная фаза		
	<i>газовая</i>	<i>флюидная</i>	<i>жидкая</i>
<i>Твердая</i>	ГТХ - газотвердофазная хр-фия	СФР - сверхкритическая флюидная хр-фия	ЖТХ – жидкостно-твердофазная хроматография
<i>Жидкая</i>	ГЖХ – газо-жидкостная хр-фия		ЖЖХ – жидкостно-жидкостная хр-фия

Хроматографические методы можно классифицировать и с точки зрения механизма разделения веществ. Два самых важных из них – *распределительный* и *адсорбционный*.

Адсорбционная хроматография основана на непосредственном взаимодействии молекул вещества с поверхностью неподвижной фазы и на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом (газо-твердофазная, жидкостно-твердофазная хроматография).

В распределительной хроматографии неподвижной фазой служит жидкость, иммобилизованная на твердом носителе (газо-жидкостная, жидкостно-жидкостная хроматография).

Ионообменная хроматография – основана на разной способности веществ к ионному обмену.

Эксклюзионная хроматография – на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ.

Аффинная хроматография – на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов. Существуют пары веществ, реагирующих в растворах с высокой избирательностью, например антитело и антиген, фермент и его субстрат или ингибитор, гормон и соответствующий рецептор, и т. п. Если одно из

соединений пары удерживается ковалентной связью на носителе, то последний можно использовать для избирательного извлечения второго соединения пары.

Этим видами не исчерпываются все механизмы разделения. Например, существует *осадочная хроматография*, основанная на образовании отличающихся по растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом, *адсорбционно-комплексобразовательная*, основанная на образовании координационных соединений разной устойчивости в фазе или на поверхности сорбента, и др. Следует помнить, что классификация по механизму весьма условна: ее используют в том случае, если известен доминирующий механизм; часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам.

По технике выполнения выделяют *колоночную* хроматографию, когда разделение проводится в специальных колонках, и *плоскостную* хроматографию, когда разделение проводится на специальной бумаге (бумажная хроматография) или в тонком слое сорбента (тонкослойная хроматография).

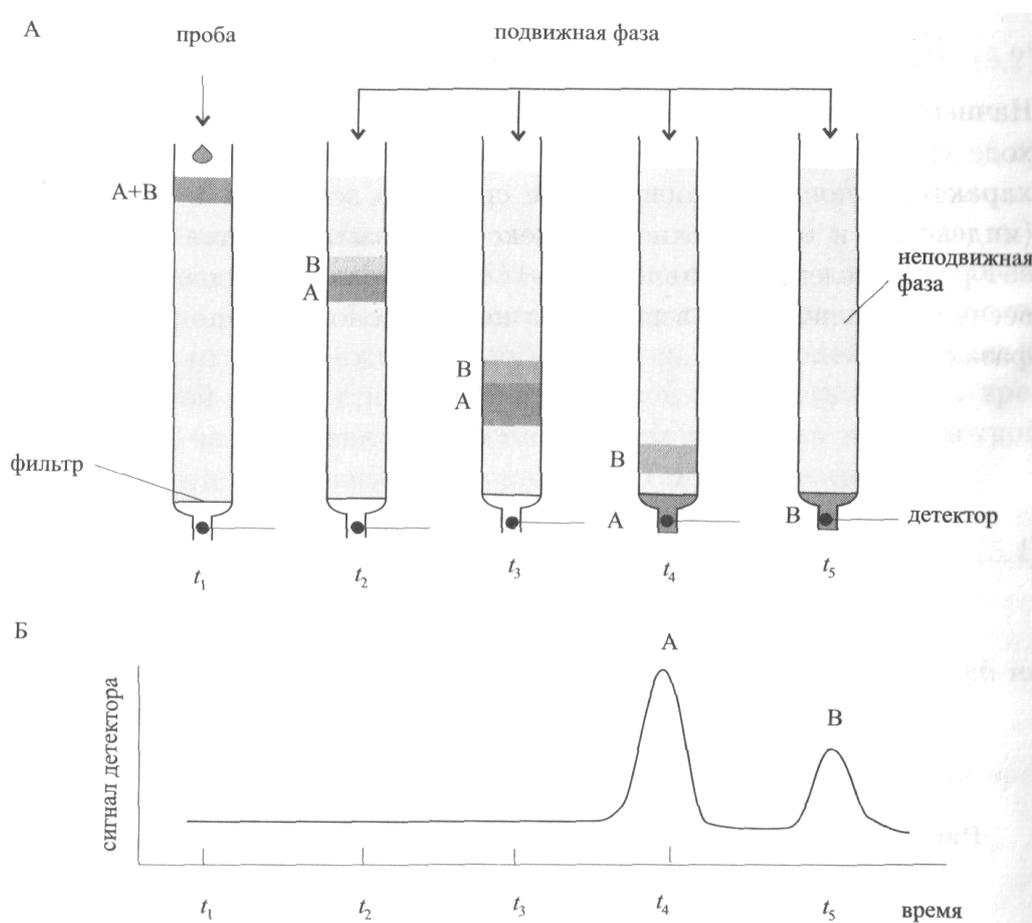
По цели хроматографирования выделяют *аналитическую* хроматографию (качественный и количественный анализ); *препаративную* хроматографию (для получения веществ в чистом виде, для концентрирования и выделения микропримесей); *промышленную* (производственную) хроматографию для автоматического управления процессом (при этом целевой продукт из колонки поступает в датчик). Хроматографию широко используют для исследования растворов, каталитических процессов, кинетики химических процессов и т. п.

Жидкостную хроматографию можно осуществлять как в колоночном, так и в плоскостном вариантах. Газовая хроматография осуществляется только в колоночном варианте. Мы рассмотрим теоретические основы хроматографических методов главным образом применительно к *колоночной хроматографии*.

**2. Способы получения хроматограмм.** Подвижную фазу, вводимую в слой неподвижной фазы, называют *элюентом*, а подвижную фазу, выходящую из колонки и содержащую разделенные компоненты, - *элюатом*. В элюате тем

или иным способом определяют содержание компонентов. По способу получения хроматограмм различают элюативную, вытеснительную и фронтальную хроматографии. В химическом анализе преобладающим способом получения хроматограмм является *элюативный*.

В *элюативной* хроматографии пробу, растворенную в подвижной фазе, помещают на вершину колонки. Затем через колонку пропускают подвижную фазу до тех пор, пока все компоненты пробы не выйдут из колонки и не будут зарегистрированы на выходе из нее. На рис. 1 схематически показан процесс элюативной хроматографии на примере разделения смеси двух веществ А и В.



**Рис.1.** Разделение двух веществ А и В при помощи элюативной хроматографии.  
 А - формирование внутренней хроматограммы на неподвижной фазе.  
 В - внешняя хроматограмма, регистрируемая детектором.

В ходе хроматографического процесса компоненты пробы непрерывно распределяются между все новыми и новыми порциями неподвижной и подвижной фазы (называемой также *элюентом*).

Средняя скорость движения вещества вдоль колонки определяется силой его взаимодействия с неподвижной фазой. Чем сильнее вещество взаимодействует с неподвижной фазой, тем медленнее оно движется, тем большее время оно находится в колонке. В идеальном случае по истечении некоторого времени вещества полностью разделяются и могут быть отдельно зарегистрированы на выходе; из колонки.

Зависимость сигнала детектора от времени называется *хроматограммой*. Если следить за изменениями зон веществ внутри колонки, то в ходе процесса можно наблюдать два эффекта. Расстояния между зонами компонентов непрерывно увеличиваются. В то же время сами эти зоны непрерывно уширяются, что снижает эффект разделения. Таким образом, улучшить разделение компонентов можно за счет двух факторов:

- увеличения *различия в скоростях движения зон*;
- уменьшения *уширения зон* (хроматографических пиков).

Самый простой вариант элюирования – *изократический*, при котором состав элюента не меняется. Его используют при разделении соединений с близким сродством к неподвижной фазе. В некоторых случаях используют *градиентное элюирование*, при котором состав элюента в процессе разделения компонентов изменяют по заданному закону. В этом случае элюирующая сила подвижной фазы возрастает, в результате чего сокращается время удерживания сильно сорбируемых веществ и улучшается разделение смеси.

***Вытеснительная хроматография.*** Сначала в колонку вводят небольшое количество раствора разделяемых веществ. Затем через колонку непрерывно пропускают раствор вещества D (вытеснитель), обладающего большей сорбируемостью, чем любое из разделяемых веществ. По мере продвижения по колонке элюент вытесняет вещество С, которое в свою очередь вытесняет вещество В, и т. д. В результате анализируемая смесь перемещается впереди фронта вытеснителя и скорость движения веществ равна скорости движения вытеснителя. Разделяемые вещества и на колонке, и в элюате располагаются последовательно друг за другом. Каждый из компонентов выделяется в чистом

виде, но не количественно, так как зоны компонентов не разделены промежутками чистого сорбента.

**Фронтальная хроматография.** В колонку непрерывно вводят раствор разделяемых веществ, сорбируемость которых увеличивается в ряду  $A < B < C$ . Из колонки сначала будет вытекать чистый растворитель, затем, когда сорбент насытится наименее сорбируемым веществом А, оно появится в элюате. Когда сорбент насытится веществом В, элюат будет содержать оба эти вещества и т. д.. Когда же сорбент будет полностью насыщен всеми компонентами смеси, состав элюата совпадет с составом раствора, вводимого в колонку. При фронтальном способе получения хроматограммы в чистом виде можно выделить лишь одно вещество. Однако хроматограмма дает представление о числе компонентов в анализируемом растворе.

### 3. Хроматографические параметры.

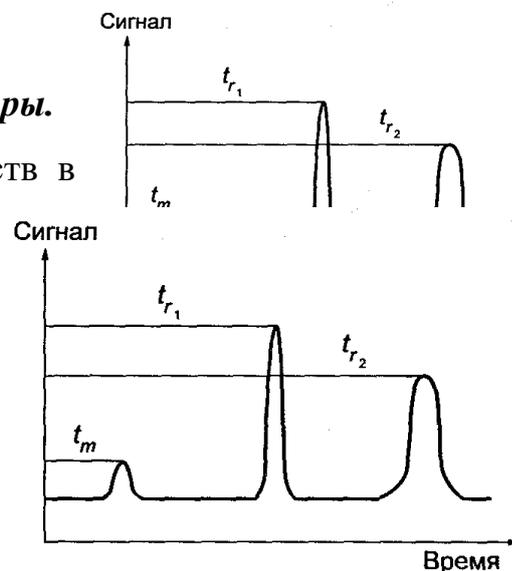
характеризующих скорости движения веществ в процессе.

Время от момента ввода пробы до момента записи вершины пика называется **временем удерживания** ( $t_R$ ) данного вещества. Время удерживания складывается из двух составляющих – времени пребывания

вещества в подвижной фазе ( $t_m$ ) и времени пребывания в неподвижной фазе ( $t_s$ ):

$$t_m + t_s = t_R$$

Значение времени удерживания не зависит от количества пробы, вводимой в колонку, но зависит от природы вещества и сорбента, а также от упаковки сорбента, может меняться от колонки к колонке. Поэтому для характеристики истинной удерживающей способности колонки следует ввести *исправленное время удерживания*  $t_R' = t_R - t_m$ , где  $t_m$  – время выхода вещества, не взаимодействующего с неподвижной фазой. **Мертвое время** – это время, которое затрачивает молекула подвижной фазы на прохождение всего пути



вдоль колонки. Если быть точнее, то мертвое время — это время от момента ввода неудерживаемого компонента до момента его детектирования.

Часто для характеристики удерживания используют *удерживаемый объем* ( $V_R$ ) – объем подвижной фазы, который необходимо пропустить через колонку, чтобы элюировать вещество:  $V_R = F \cdot t_R$ , где  $F$  – объемная скорость потока подвижной фазы (см<sup>3</sup>/с или мл/мин). *Исправленный объем удерживания* равен:  $V_R' = V_R - V_m$ . Объем для вымывания несорбируемого компонента, мертвый объем, выражается через  $t_m$ :  $V_m = F \cdot t_m$  - это объем колонки, не занятый сорбентом, объем коммуникаций от устройства ввода пробы до колонки и от колонки до детекторы.

Время удерживания и удерживаемый объем ( $t_r$  и  $V_r$ ) являются качественной характеристикой вещества. При постоянных условиях хроматографирования (скорость потока, давление, температура, состав фаз) их значения строго воспроизводимы и могут быть использованы для идентификации вещества.

Количество вещества, вымываемого из колонки, можно найти по площади под кривой элюирования:  $m = cdV$

По полученной хроматограмме смеси можно рассчитать экспериментальные значения хроматографических параметров, например, значения коэффициента емкости. Отношение количеств (а не концентраций) вещества между двумя фазами определяет величина «фактора емкости» («коэффициента емкости»), а в последнее время «фактора удерживания» ( $k'$ ):

$$k' = V_R - V_m / V_m = V_R' / V_m \quad k' = t_R - t_m / t_m.$$

Эта величина показывает, во сколько раз вещество дольше находится в неподвижной фазе, чем в подвижной. Оптимальные значения фактора удерживания  $k'$  лежат в пределах 1.5 – 4.

Фундаментальной величиной, характеризующей относительное сродство вещества к подвижной (индекс M) и неподвижной (индекс S) фазам, является коэффициент распределения. Он равен отношению равновесных концентраций вещества в неподвижной  $c_s$  и подвижной  $c_m$  фазах:  $D = c_s / c_m$

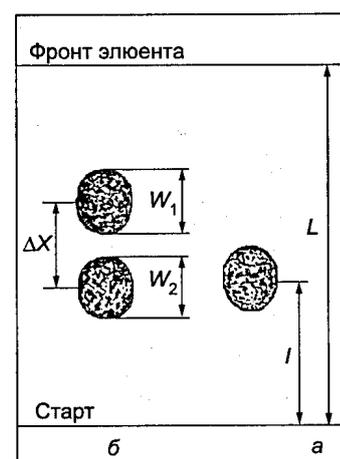
Отношение объемов фаз  $\beta = V_m/V_s$  называется *фазовым отношением*. С его помощью можно выразить важнейшую характеристику удерживания вещества при заданных условиях эксперимента - *коэффициент емкости  $k'$* :

$k' = D \cdot V_s / V_m$  Исправленный удерживаемый объем связан с  $D$  простым соотношением  $V_R' = D V_s$ .

В соответствии с коэффициентами распределения в *плоскостной* хроматографии разделяемые компоненты переносятся подвижной фазой вдоль слоя сорбента, образуя отдельные зоны, положение которых характеризуется величинами  $R_f$  – *относительной скоростью перемещения компонентов в тонком слое*. Экспериментально величину  $R_f$  определяют как отношение расстояния  $l$ , пройденного веществом от точки нанесения пробы до центра зоны, к расстоянию  $L$ , пройденному элюентом от линии старта до линии фронта элюента за то же время  $R_f = l/L$ .

Величина  $R_f$  является индивидуальной характеристикой соединения, хроматографируемого в данном растворителе в условиях опыта, и изменяется от 0 до 1.

Здесь  $l$  – расстояние от центра пятна до стартовой линии,  $W_1$ , и  $W_2$  – диаметр пятен,  $\Delta X$  – расстояние между центрами пятен



Оптимальным для практической тонкослойной хроматографии является интервал изменения  $R_f$  от 0,2 до 0,8. При  $R_f = 0$  вещество не движется, при  $R_f = 1$  вещество не задерживается неподвижной фазой и движется с фронтом растворителя.