

## *Жидкостная колоночная хроматография*

Жидкостная хроматография (ЖХ) - это метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой служит жидкость. Метод ЖХ применим для разделения более широкого круга веществ, чем метод ГХ, поскольку большинство веществ не обладает летучестью, многие из них неустойчивы при высоких температурах (особенно высокомолекулярные соединения) и разлагаются при переведении в газообразное состояние. В ЖХ разделение чаще всего происходит при комнатной температуре. Особенности всех видов ЖХ обусловлены наличием жидкой подвижной фазы.

Сорбция компонентов из газа и жидкого элюента осуществляется по-разному. В отличие от газа, который выполняет только транспортную функцию и не сорбируется неподвижной фазой, жидкая подвижная фаза - активный элюент, молекулы которой могут сорбироваться на поверхности. При прохождении через колонку находящиеся в элюенте молекулы интересующего нас компонента должны вытеснить молекулы элюента с поверхностного слоя сорбента, что приводит к уменьшению энергии взаимодействия молекул вещества с поверхностью сорбента. Диапазон линейности изотермы сорбции в ЖХ больше.

Применяя различные элюенты, можно изменять параметры удерживания и селективность хроматографической системы. Возможно использование градиентного элюирования. Селективность в ЖХ определяется двумя факторами - природой подвижной (элюент) и неподвижной фаз.

В классическом варианте ЖХ в стеклянную колонку длиной 1 - 2 м, заполненную сорбентом (размер частиц  $> 100$  мкм), вводят анализируемую пробу и пропускают элюент. Скорость прохождения элюента под действием силы тяжести мала, а продолжительность анализа значительна. Классический вариант до сих пор применяют в лабораторной практике, поскольку он не требует дорогостоящего оборудования. Вследствие использования сорбентов с размером зерен 10 - 30 мкм, поверхностно- и объемно-пористых сорбентов

с размером частиц 5 - 10 мкм, нагнетательных насосов, чувствительных детекторов произошел переход от классической к высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Быстрый массоперенос при высокой эффективности разделения позволяет использовать ВЭЖХ для разделения и определения молекул (адсорбционная и распределительная хроматографии), для разделения и определения ионов (ионообменная, ионная, ион-парная хроматографии), для разделения макромолекул (эксклюзионная хроматография). Методами аффинной и лигандообменной хроматографии разделяют биологически активные молекулы и оптические изомеры.

### ***1. Адсорбционная хроматография***

В адсорбционном варианте жидкостной хроматографии в зависимости от полярности неподвижной и подвижной фаз различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографии. В НФХ используют полярный адсорбент и неполярные подвижные фазы, в ОФХ - неполярный адсорбент и полярные подвижные фазы. В обоих случаях выбор подвижной фазы часто важнее, чем выбор неподвижной. Неподвижная фаза должна удерживать разделяемые вещества. Подвижная фаза, т. е. растворитель, должна обеспечить различную емкость колонки и эффективное разделение за приемлемое время.

***Неподвижные фазы.*** Адсорбенты различных типов (полярные и неполярные) проявляют неодинаковую селективность по отношению к разделяемым соединениям. В качестве адсорбентов применяют тонкодисперсные пористые материалы с удельной поверхностью более 50 м<sup>2</sup>/г.

*Полярные адсорбенты* (SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, оксиды металлов, флорисил и др.) имеют на поверхности слабокислотные ОН-группы, способные удерживать вещества с основными свойствами. Эти адсорбенты применяют главным образом для разделения неполярных соединений и соединений со средней полярностью.

*Неполярные адсорбенты* (графитированная сажа, кизельгур, диатомит) не проявляют селективности к полярным молекулам. Используют также сорбенты с привитыми неполярными фазами, например силикагель с алкилсилильными группами от C<sub>2</sub> до C<sub>22</sub>.

Кроме указанных сорбентов, используют поверхностно-пористые носители (ППН). Это могут быть жесткие непористые носители (стеклянные шарики), покрытые тонким пористым слоем активного полярного или неполярного сорбента. Такие сорбенты оказывают малое сопротивление потоку, за счет чего увеличивается скорость анализа.

**Подвижные фазы.** Как уже отмечалось, в ЖХ важен выбор подвижной фазы, поскольку она оказывает большее влияние на селективность разделения, эффективность колонки и скорость движения хроматографической полосы. Подвижная фаза должна растворять анализируемую пробу, обладать малой вязкостью (коэффициенты диффузии компонентов анализируемой пробы должны быть достаточно большими), из нее должно быть возможным выделение разделенных компонентов.

Как было сказано, разделения достигают, меняя элюирующую силу подвижной фазы - растворителя. Элюирующая сила растворителя показывает, во сколько раз энергия сорбции данного элюента больше, чем энергия сорбции элюента, выбранного в качестве стандарта, например н-гептана. Растворители (элюенты) делят на слабые и сильные. Слабые растворители слабо адсорбируются неподвижной фазой, поэтому коэффициенты распределения сорбируемых веществ (сорбата) высокие. Сильные растворители сильно адсорбируются, поэтому D сорбата низкие. Имеются данные об относительной силе растворителей для разных адсорбентов. Для SiO<sub>2</sub> сила растворителей увеличивается в ряду: пентан (0) < CCl<sub>4</sub> (0,11) < бензол (0,25) < CHCl<sub>3</sub> (0,26) < CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,32) < ацетон (0,47) < диоксан (0,49) < ацетонитрил (0,5).

Элюирующая сила определяется полярностью растворителя. В нормально-фазовой хроматографии с увеличением полярности растворителя

элюирующая сила растворителя растёт, в обращенно-фазовом варианте - снижается. Расположение растворителей в соответствии с возрастанием их элюирующей силы называют элюотропным рядом. В жидкостной адсорбционной хроматографии *элюотропный ряд Снайдера* имеет вид (в скобках приведены значения элюирующей силы): пентан (0) < н-гексан (0,01) < гептан (0,01) < циклогексан (0,04) <  $CCl_4$  (0,18) < бензол (0,32) <  $CHCl_3$  (0,38) < ацетон (0,51), этанол (0,88) < вода,  $CH_3COOH$  (очень большая).

Для обращенно-фазовой хроматографии на  $C_{18}$  элюотропный ряд имеет вид: метанол (1,0) < ацетонитрил (3,1), этанол (3,1) < изопропанол (8,3) < н-пропанол (10,1) < диоксан (11,7).

Часто применяют не индивидуальные растворители, а их смеси. Незначительные добавки другого растворителя, особенно воды, существенно увеличивают элюирующую силу элюента. Например, н-пентан (0,00), н-пентан + 10% изопропилхлорида (0,10), н-пентан + 4% эфира (0,2) и т. д.

При разделении многокомпонентных смесей одна подвижная фаза в качестве элюента может не разделить все компоненты пробы за приемлемое время, в этом случае применяют метод ступенчатого или градиентного элюирования. Для увеличения силы элюента в процессе хроматографирования последовательно применяют все более сильные элюенты. Это позволяет элюировать все более сильноудерживаемые вещества за меньшее время.

Установлены некоторые эмпирические правила, помогающие при выборе элюента. Сорбция, как правило, увеличивается с ростом числа двойных связей и ОН-групп в соединениях. Сорбция уменьшается в ряду органических соединений: кислоты > спирты > альдегиды > кетоны > сложные эфиры > ненасыщенные углеводороды > насыщенные углеводороды. Для разделения веществ разной полярности и для разделения соединений разных классов применяют нормально-фазовую хроматографию: из неполярных подвижных фаз соединения разных классов выходят из колонки с полярным адсорбентом за разное время. Для очень полярных

молекул  $t_R$  так велики, что при использовании неполярного элюента анализ невозможен. Для уменьшения времени удерживания полярных сорбатов переходят к полярным элюентам.

Механизм удерживания в ЖХ чаще бывает смешанным, т. е. удерживание происходит по адсорбционному, распределительному, эксклюзионному механизмам. Выделить преобладающий тип часто сложно или невозможно. Механизм удерживания зависит от природы сорбента. На полярных адсорбентах удерживание компонентов пробы обусловлено их взаимодействием с гидроксильными группами адсорбента (силикагель, оксид алюминия и др.) с образованием Н-связей. Полярные молекулы удерживаются сильнее неполярных. На обращенно-фазовых сорбентах с привитыми фазами С 8-16 механизм удерживания более сложен. Разделение на «щеточных» сорбентах иногда относят к | распределительной хроматографии. Четко разграничить адсорбционную и распределительную хроматографии трудно.

**2. *Распределительная хроматография.*** Метод распределительной, или жидкостно-жидкостной, хроматографии основан на распределении вещества между двумя несмешивающимися жидкостями, подобно тому, как это происходит в многократной ступенчатой экстракции. Жидкую неподвижную фазу наносят на пористый достаточно инертный сорбент, как в газожидкостной хроматографии, и заполняют им разделительную колонку. При пропускании жидкой подвижной фазы через колонку смесь разделяется на компоненты главным образом за счет их различной растворимости в жидкой неподвижной фазе и в основном по тем же механизмам, что и в газожидкостной хроматографии. Обычно растворимость компонентов пробы в подвижной и неподвижной жидких фазах, обладающих разной полярностью, сильно различается. Если растворимость пробы выше в неподвижной фазе, время удерживания компонентов значительно возрастает, если растворимость выше в подвижной фазе, то время удерживания может быть близким к  $t_m$  - времени удерживания несорбируемого компонента.

Чтобы добиться разделения, в подвижную фазу включают третий компонент, снижающий различие в полярности подвижной и неподвижной фаз, например к смеси из неполярного (гексан) и полярного (вода) растворителей прибавляют спирт. Только в этом случае удастся подобрать оптимальные условия для разделения компонентов смеси.

Обычно полярный растворитель (вода, спирт) фиксирован на твердом носителе - силикагеле, диатомите, целлюлозе, оксиде алюминия. Подвижной фазой в этом случае служат неполярные растворители - изооктан, бензол и др. Такие системы используют в нормально-фазовой распределительной хроматографии.