

Жидкостная хроматография

1. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Жидкостной хроматографией называется хроматографический метод с использованием жидкой подвижной фазы. В классическом варианте жидкостной хроматографии, берущей начало с основополагающей работы Цвета, использовали стеклянные колонки с внутренним диаметром от 1 до 5 см и длиной 50-500 см. Частицы наполнителя имели размер 150-200 мкм. При этом скорость потока подвижной фазы составляла не более 1 мл/мин, и разделение оказывалось слишком длительным. Попытки увеличить скорость потока путем использования вакуумных насосов обычно приводили лишь к ухудшению разделения. Этот результат вполне объясним, поскольку из хроматографической теории известно, что увеличение линейной скорости потока подвижной фазы при прочих равных условиях уменьшает число ТТ. Довольно скоро стало понятно, что увеличения эффективности можно достичь только за счет уменьшения размеров зерен наполнителя. Однако при этом резко возрастает сопротивление потоку жидкости, преодолеть которое можно лишь путем увеличения давления. Работа с тонкодисперсными наполнителями требовала столь высоких давлений, что обычные стеклянные колонки его не выдерживали. Только в конце 1960 годов появились технические возможности создания аппаратуры, позволяющей работать с колонками, заполненными наполнителем с размерами зерен 3 -10 мкм. С этого времени классическая жидкостная хроматография низкого давления стала применяться для препаративных целей. Аналитическая жидкостная хроматография высокого давления в новом аппаратурном оформлении получила название *высокоэффективной жидкостной хроматографии* (ВЭЖХ).

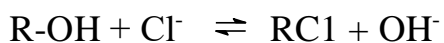
В жидкостной хроматографии существует 4 основных механизма разделения веществ: *адсорбционный, распределительный, ионообменный, эксклюзионный.*

Первым был реализован адсорбционный механизм в форме жидкостно-твердофазной хроматографии. Распределительный механизм лежит в основе жидкость-жидкостной хроматографии. К ней относятся методы нормально-фазовой и обращено-фазовой хроматографии. Последний в настоящее время является самым распространенным аналитическим методом. Ионообменная хроматография представляет собой реализацию явления ионного обмена в хроматографическом варианте. Высокоэффективная ионообменная хроматография называется *ионной* хроматографией. Эксклюзионная хроматография основана на молекулярно-ситовом эффекте, т.е. разделении молекул на пористом материале в соответствии с их размерами. Методы эксклюзионной хроматографии обычно называют гель-хроматографией.

2. Классическая ионообменная хроматография. В основе метода ионообменной хроматографии лежит динамический процесс замещения ионов, связанных с неподвижной фазой, ионами элюента, поступающими в колонку. Основная цель хроматографического процесса - разделение органических или неорганических ионов с зарядом одного и того же знака. Для этой цели используются главным образом ионообменные смолы на основе сополимера стирола и дивинилбензола. Катионообменники представляют собой специально синтезированные полимерные нерастворимые в воде вещества, содержащие в своей структуре группы кислотного характера: $-\text{SO}_3\text{H}$; $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$; AsO_3H_2 . Химические формулы катионообменников схематически можно изобразить следующим образом: RSO_3H ; RSO_3Na или просто R-H , R-Na . В первом случае катионообменник находится в H-форме, во втором - в Na-форме; R - полимерная матрица. Катионообменные реакции записывают как обычные химические гетерогенные реакции: $\text{RH} + \text{Na}^+ \rightleftharpoons \text{RNa} + \text{H}^+$

Анионообменники содержат в своей структуре ионогенные группы основного характера: $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$; $=\text{NH}_2^+$; $\equiv\text{NH}^+$ и др. Их химические формулы могут быть изображены как RNH_3OH и RNH_3Cl (или R-OH , R-Cl). В первом

случае анионообменник находится в ОН-форме, во втором - в С1-форме. Анионообменную реакцию можно записать следующим образом:



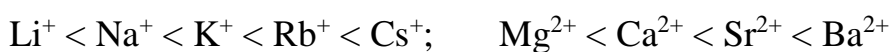
Известны *амфотерные* ионообменники, содержащие в своей структуре и кислотные и основные группы. Например, продукт поликонденсации диэтилентриамина, фенола и формальдегида.

Максимальное количество ионов, которое может связать ионообменник, определяется его теоретической емкостью - содержание в ионообменнике ионогенных групп. Емкость относят к единице массы или объема и обычно выражают в миллиэквивалентах или миллимолях на 1 г сухого или на 1 мл набухшего ионообменника в Н- или С1-форме.

Ионообменники нерастворимы в воде, но если сухой ионообменник поместить в воду, он будет ее поглощать, происходит его набухание. Причиной набухания является наличие в структуре ионообменников гидрофильных ионогенных групп. Чем их больше, чем выше емкость сорбента, тем более он склонен к набуханию. Набухание зависит не только от числа ионогенных групп, но и от их природы, степени ионизации, заряда противоиона, от концентрации внешнего раствора (чем она меньше, тем больше набухание). Конечно, чем больше плотность матрицы (т. е. содержание ДВЕ), тем меньше набухание. В аналитической практике набухание может играть отрицательную роль - нарушается упаковка колонки (слой «дышит»). Поэтому в высокоэффективной ионной хроматографии применяют ионообменники малой емкости со сравнительно прочной структурой матрицы (практически ненабухающие).

Селективность ионного обмена. Ионообменники, содержащие в своей структуре сильнокислотные или сильноосновные группы, вступают в реакции обмена с любыми ионами раствора, обладающими зарядом того же знака, что и знак противоиона. Такие ионообменники называют универсальными.

Экспериментально установлены ряды сродства, или селективности, ионов по отношению к ионообменникам. Так, на катионообменниках ионы с одинаковым зарядом сорбируются в такой последовательности:

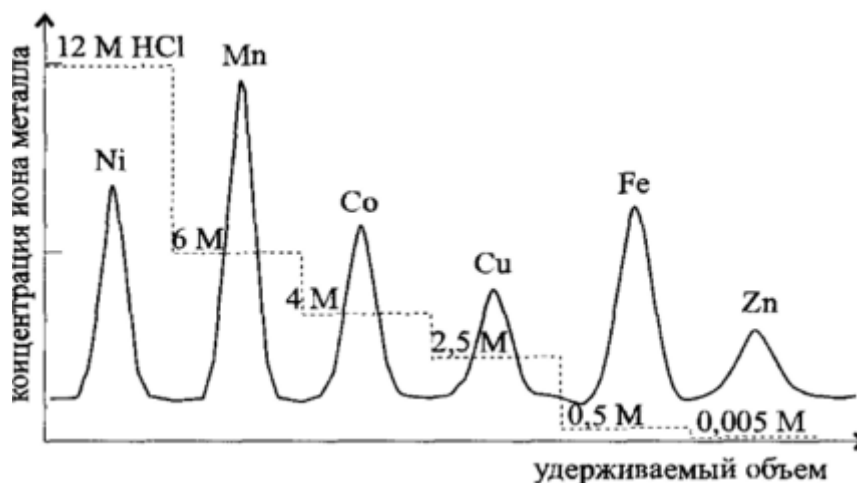


Для ионов с разными зарядами сорбируемость увеличивается с увеличением заряда: $\text{Na}^+ < \text{Ca}^{2+} < \text{Al}^{3+} < \text{Th}^{4+}$

Ряды сродства установлены и для анионообменников, например для сильноосновного анионообменника сорбируемость анионов увеличивается в ряду:



Для решения практических задач варьируют условия разделения элементов подбором подходящей подвижной фазы. Способы достижения селективности различны (например, присутствие органического растворителя в подвижной фазе). Влияя на устойчивость и состав комплексов разделяемых компонентов, можно выделить многие элементы. Например, разделение ионов металлов в виде их хлоридных комплексов на анионообменнике с использованием градиентного элюирования раствором HCl. Экспоненциальный градиент, концентрация ацетона изменяется от 40% до 95%



В качестве универсального метода детектирования неорганических ионов используют *кондуктометрию*.

Повышения селективности ионообменников можно добиться и другими путями. Так, изменяя пористость сорбента, т. е. число поперечных связей в матрице, можно создать ионитовые сита, проницаемые для одних ионов и способные к их обмену и непроницаемые для других.

Высокой селективностью обладают хелатообразующие ионообменники, содержащие в своей структуре комплексообразующие группы диметилглиоксима, дитизона, 8-оксихинолина и др. Так, сорбенты, содержащие краун-эфиры, поглощают ионы щелочных и щелочноземельных элементов.

3. Ионная хроматография. Современная ионная хроматография возникла в середине 1970-х годов, как высокоэффективный вариант ионообменной хроматографии. При этом требовалось решить две основные проблемы. Во-первых, создать ионообменные материалы, пригодные для работы в условиях ВЭЖХ. Классические ионообменные смолы не годились ввиду их малой механической прочности, набухаемости и малой скорости диффузии в поры частиц сорбента. Во-вторых, требовалось разработать универсальный способ автоматического детектирования, пригодный для всех неорганических ионов. Взамен классических ионообменных смол были разработаны специальные материалы. Они представляют собой сферические частицы (диаметром 30-40 мкм) непористого стекла или высокопрочного полимера, покрытые тонким слоем пористого ионообменника. Толщина пленки 1 мкм, общий диаметр частицы 40 мкм. В ионной хроматографии часто используют «щеточные» сорбенты - силикагели с привитыми обращенными фазами C_8 , C_{18} .

Силикагель – аморфные формы диоксида кремния (кремнезема), состоящие коллоидных сферических частиц размером 10 – 100 нм. Формы отличаются по степени гидратации. Структура силикагеля состоит из цепочечных трехмерных агрегатов с силоксановой связью. Структура силикагеля построена из тетраэдров. Поверхность может быть полностью гидроксильной. Силанольные (гидроксильные) группы дезактивируют,

прививая к ним алкилсилильные радикалы путем обработки поверхности силикагеля алкилхлорсиланами. При этом образуется химически закрепленная фаза силоксана, содержащая Si – O – Si – связи. Чаще всего алкильным остатком является н-октадецил и н-октил. В результате поверхность становится гидрофобной.

Эта фаза легко превращается в катионо- или анионообменник при поглощении из подвижной фазы ионогенных поверхностно-активных веществ, например алкилсульфатов или солей четвертичных аммониевых оснований.

Подвижные фазы. Хроматографические разделения с использованием ионообменников чаще всего проводят в водных растворах, так как вода обладает прекрасными растворяющими и ионизирующими свойствами. Под действием воды молекулы пробы мгновенно диссоциируют на ионы, ионогенные группы ионообменников гидратируются и также переходят в полностью или частично диссоциированную форму. Это обеспечивает быстрый обмен противоионов. На элюирующую силу подвижной фазы основное влияние оказывают рН, ионная сила, природа буферного раствора, содержание органического растворителя или поверхностно-активного вещества (ион-парная хроматография).

Значение рН выбирают в зависимости от природы ионогенных групп разделяемых ионов, природы матрицы. С сильнокислотными и сильноосновными ионообменниками можно работать в интервале рН 2 - 12, со слабокислотными 5 - 12, слабоосновными 2 - 6. Сорбенты на основе кремнезема из-за растворения матрицы нельзя использовать при рН > 9. Ионная сила подвижной фазы влияет на емкость ионообменника. Обычно с увеличением ионной силы сорбция ионов уменьшается, возрастает элюирующая сила подвижной фазы. Поэтому в начале разделения подвижная фаза должна иметь малое значение ионной силы (0,05 - 0,1), конечное значение не должно превышать 2. При градиентном элюировании часто используют буферы с увеличивающейся ионной силой.

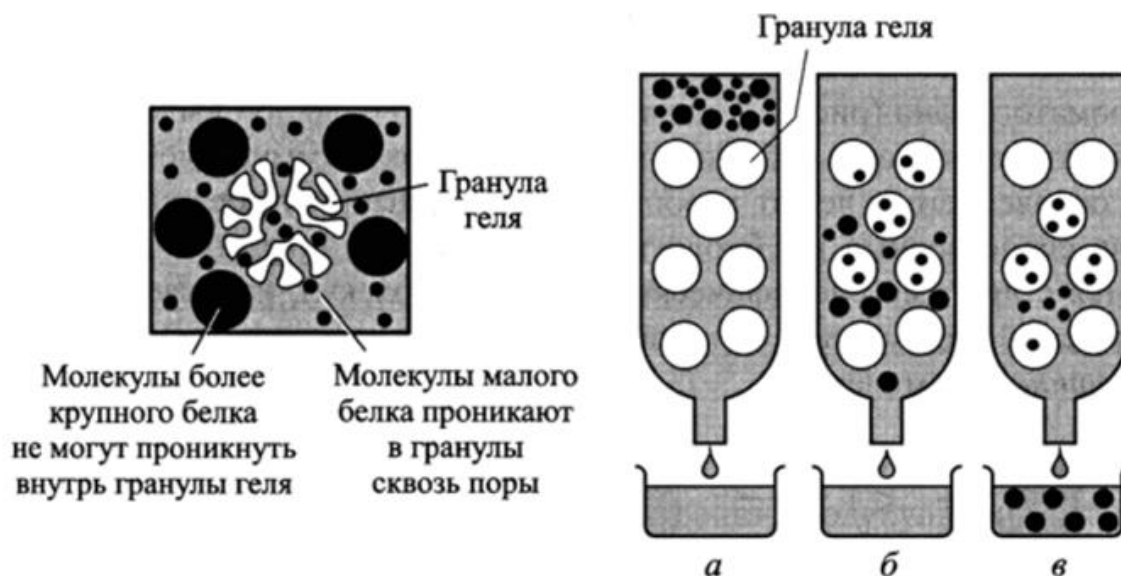
Для селективного элюирования поглощенных ионов можно использовать воду, буферный раствор с определенным значением рН и ионной силы, растворы минеральных и органических (фенол, лимонная, молочная, винная, щавелевая, ЭДТА) кислот. Выбор элюента облегчается тем, что предельные коэффициенты распределения большинства элементов между водными (водно-органическими) растворами многих комплексообразующих реагентов и ионообменниками стандартного типа определены и представлены в таблицах.

Особенности метода ионной хроматографии. Это экспрессный метод определения органических и неорганических ионогенных соединений, сочетающий ионообменное разделение с высокочувствительным кондуктометрическим детектированием.

4. Эксклюзионная хроматография (гель-хроматография) - Эксклюзионная хроматография - это разновидность жидкостной хроматографии, в которой разделение компонентов происходит в соответствии с их размером. Неподвижной фазой являются частицы пористого инертного материала (силикагель, полимеры) с определенным размером частиц. В процессе разделения небольшие молекулы попадают в сетку полимера и удерживаются там, большие молекулы не могут проникнуть в полимерную сетку и вымываются из колонки подвижной фазой. Вначале элюируются самые большие, затем средние и потом небольшие молекулы. Поэтому эксклюзионную хроматографию называют также молекулярно-ситовой.

В отличие от всех рассмотренных ранее видов жидкостной хроматографии, в ходе гель-хроматографического разделения не происходит никаких физико-химических взаимодействий разделяемых частиц с неподвижной фазой. Эксклюзионная хроматография подразделяется на гель-проникающую и гель-фильтрационную. В гель-проникающей хроматографии разделение осуществляется на полимерах, набухающих в

органических растворителях; если же полимеры набухают в воде, то обычно говорят о гель-фильтрационном варианте. Удерживание молекул в эксклюзионной хроматографии определяется их диффузией в поры сорбента и зависит как от размера молекул, так и от размера пор неподвижной фазы.



Гель-хроматография – важный метод анализа высокомолекулярных соединений, в частности, белков или синтетических полимеров. $M > 2000$. Ее широко применяют для определения молекулярных масс природных и синтетических полимеров.

Для определения молекулярных масс используют тот факт, что зависимость между логарифмом удерживаемого объема и логарифмом молекулярной массы в некотором диапазоне является линейной. Предварительно колонку калибруют, используя стандартные вещества с известными значениями молекулярных масс и близкие по своей природе и свойствам к анализируемым. Уравнение калибровки $\lg M_r = b_0 - b_1 \lg V_R$.

Гель-хроматографию широко используют при исследовании полимеров, определении их молекулярных масс, а также в биологии и медицине для анализа белков, крови и других объектов. Этот метод удобен для исследования образцов неизвестного состава, так как можно не опасаться нежелательных превращений веществ в колонках.

Метод эксклюзионной хроматографии можно использовать и в неорганическом анализе. Например, при помощи некоторых природных цеолитов можно разделить ионы в зависимости от их размера. Гидратированные ионы или многоатомные частицы не могут проникнуть в поры цеолита, их легко отделить от ионов малого размера, проникающих в матрицу цеолита.