

# ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ЖУРНАЛ

2

1963

ДЕРЖМЕДВИДАВ  
УРСР

# ВИБІР МЕТОДУ ХРОМАТОГРАФІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

*І. М. ПЕРЦЕВ, І. В. КРАСОВСЬКИЙ, Г. П. ПІВНЕНКО*  
(Харківський фармацевтичний інститут)

## ПОВІДОМЛЕННЯ II

### 4. Аналіз рідких хроматограм

Методи проточної хроматографії, як правило, складніші за описані в першому повідомленні варіанти аналізу, побудовані на спостереженні за стовпчиком адсорбенту, тому переходити до них слід після того, як виявлено непридатність методів першої групи.

Проточна хроматографія полягає в промиванні хроматографічної колонки свіжими порціями чистого розчинника або сумішшю розчинників, аж поки всі компоненти не пройдуть послідовно у фільтрат (елюат).

Рідинна хроматографія останнім часом набирає чимраз більшого значення з огляду на широке впровадження до хроматографічної практики фізичних методів аналізу. Цей метод придатний для перших-ліпших адсорбентів і для будь-яких речовин.

За ходом хроматографічного поділу компонентів стежать, досліджуючи фільтрат, що витікає з колонки. Для цього використовують дуже різноманітні фізичні й хімічні методи: кольорові реакції з відповідними реактивами (1, 2), мікроскопічні дослідження кристалічного залишку після випаровування краплинки фільтрату (3), визначення температури топлення (4, 5), титрування (6), колориметрію (7), визначення йодного числа (8), ультрафіолетову спектrophотометрію (9), визначення електропровідності або теплопровідності, визначення показника заломлення (за допомогою рефрактометра або інтерферометра (11—13), флуоресценції (14), визначення біологічної активності, оптичної активності тощо.

При емпіричному відборі окремих порцій фільтрату (фракцій) не вдається використати всі переваги адсорбційного аналізу, особливо його

високу вибірність, хоч останнім часом і сконструйовано дуже ефективні пристосування для відбирання фракцій (15).

Тепер метод рідинної хроматографії існує в трьох варіантах, які, залежно від складності проведення аналізу, слід розглянути в такому порядку:

- а) аналіз промиванням (елюентний);
- б) витискне проявлення;
- в) фронтальний аналіз.

#### а) Аналіз промиванням (елюентний)

Цей спосіб, аналогічний класичному хроматографічному методу М. С. Цвета, є найбільш поширеним. Базується він на диференціальному вимиванні з колонки в елюат окремих або всіх компонентів досліджуваної суміші свіжими порціями одного розчинника або суміші кількох розчинників, які адсорбуються менше, ніж усі або деякі компоненти, що їх належить аналізувати.

Зображення процесу хроматографування трикомпонентної суміші елюентним методом показано на рис. 1. Як видно з рис. 1-б, при утворенні «первинної хроматограми» суміш не поділяється на окремі зони. Компоненти суміші цілком диференціюються під час проявлення первинної хроматограми тим самим розчинником, з якого суміш «посаджено» на колонку, або ж іншим, який «оформляє» зони швидше (16, 17). Розчинник у цьому разі називається проявником.

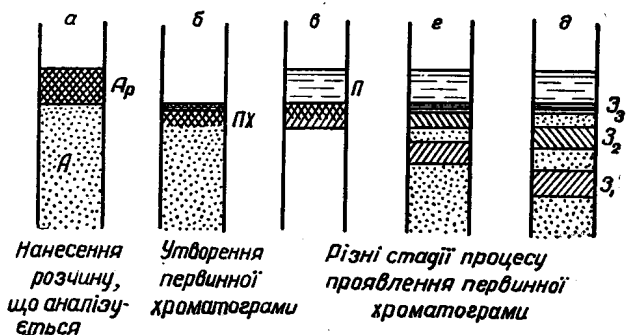


Рис. 1. Хроматографія трикомпонентної суміші:

A — адсорбент,  $A_p$  — аналізований розчин,  $P_x$  — первинна хроматограма,  $P$  — проявник,  $Z_1, Z_2, Z_3$  — відповідні зони.

Чудовим прикладом того, як впливає проявник на поділ компонентів складної суміші, є хроматографування трьох ізомерних динітродифеніламінів. Схематично це показано на рис. 2. При хроматографічному аналізі суміші елюентним методом процес промивання можна провести так, що речовини з кожної зони перейдуть у фільтрат окремо.

Швидкість міграції зон залежить від швидкості витікання даного розчинника, від його фізичних властивостей, а також від сили адсорбції речовин на даному адсорбенті. Речовина, що найменше адсорбується, міститься в нижній зоні і вимивається першою; речовина, що найбільше адсорбується, міститься у верхній зоні і вимивається останньою.

Самий лише перелік процесів (промивання колонки чистим розчинником, «посадка» суміші, яка піддається аналізу, на колонку, проявлення первинної хроматограми, формування компактних зон, вимивання) говорить про те, що ефективність хроматографічного поділу суміші визначається багаторазовістю адсорбційно-десорбційних актів (18), в яких одне з головних місць належить розчинникові. Тому в аналізі промивання розчинник має таке саме значення, як і адсорбент.

Оскільки неможливо визначити вплив природи розчинника на адсорбційність, не згадавши про природу адсорбента, ми змушені насам-

перед звернутися до відомої роботи Л. Гурвича (19), в якій автор поклав початок класифікації сорбентів на гідрофобні (аполярні) і гідрофільні (полярні). До першого класу належить активоване вугілля, яке адсорбує з полярних розчинників значно краще, ніж з аполярних; до другого класу — силікагель, окис алюмінію, активні глини та ін., які дають протилежну картину — спадання адсорбції при зростанні полярності розчинника.

М. С. Цвет у своїй першій роботі з хроматографії (20) також відмітив великий вплив розчинників на адсорбційність хлорофілу та ряду інших речовин на полярних адсорбентах. Він виявив максимальну адсорбцію пігментів у лігроїнових розчинах і мінімальну — в спиртових, причому вже невелике додавання спирту до лігроїну приводило майже до цілковитої десорбції адсорбованих речовин. Ці спостереження становлять основу хроматографії — одержання первинної хроматограми з аполярних розчинів і проявляння її більш полярним розчинником або сумішшю розчинників.

М. М. Дубинін показав зв'язок адсорбції речовини з полярністю розчинника (21), діелектричною сталою, рефракцією та іншими фізико-хімічними властивостями розчинника.

Дальший розвиток цього питання ми знаходимо в роботах Траппе (22), який на підставі експериментальних даних розташував усі досліджені ним розчинники в порядку спадання властивості елюювати і назвав цей ряд елуотропним.

Таблиця

Полярність і десорбуюча властивість розчинників (елуотропний ряд Траппе)

Розчинники	Фізичні властивості розчинників				Сорбенти							
					алюмосилікагель			силікагель			окис алюмінію (за Брокманом)	
	$C_0$	$\delta_{12}$	$\epsilon$	$\mu \cdot 10^{18}$	олеїнова кислота	холестерин	стеарат холестерину	олеїнова кислота	холестерин	стеарат холестерину	холестерин	ацетат холестерину
Вода	—	—	81,0	1,84	—	—	—	—	—	—	—	—
Метанол	8	—	31,2	1,73	0	0	0	0	0	0	0	0
Етанол	8	—	25,8	1,72	32	0	0	0	0	0	4,4	0
Пропанол	8	—	22,2	1,65	44	0	0	0	0	0	2,8	0
Ацетон	8	—	21,5	2,79	47	0	0	0	0	0	3,8	0
Етилацетат	3,0	6,3	6,1	1,74	72	0	0	0	0	0	15	0
Етиловий ефір	1,3	9,7	4,4	1,14	81	0	0	0	0	0	63	0
Хлороформ	0,1	27,7	5,2	0,95	89	0	0	70	43	0	24	0
Хлористий метилен	—	—	—	1,59	90	0	0	72	54	0	53	0
Бензол	0,06	32,6	2,3	0,08	98	76	0	88	76	0	95	11
Толуол	0,04	36,0	2,3	0,4	98	79	0	90	87	0	97	13
Трихлоретилен	0,02	—	3,4	—	99	86	0	97	98	33	96	22
Чотирихлористий вуглець	0,01	43,4	2,2	0	99	96	21	98	100	74	98	53
Циклогексан	0,01	—	2,0	0,2	100	99	86	100	100	98	100	97
Петролейний ефір	0,007	50,4	1,9	0	100	100	94	100	100	99	100	98

Примітки.  $C_0$  — розчинність води в грамах на 100 г розчинника;  $\epsilon_{12}$  — поверхневий натяг на поверхні поділу води і розчинника;  $\epsilon$  — діелектрична стала;  $\mu$  — дипольний момент розчинника.

Як видно з таблиці, адсорбційність речовин на гідрофільних адсорбентах збігається з розташуванням розчинників і, за небагатьма винятками, підвищується із зменшенням їх полярності. Цілковитого паралелізму між десорбуючою властивістю розчинника і його діелектричною сталою і не можна було сподіватися з огляду на складний характер залежності між цими величинами. З таблиці також видно, що дипольний момент гірше характеризує десорбційну властивість, ніж діелектрична стала. Про загальний характер цієї закономірності судити дуже важко через недостатню кількість дослідного матеріалу. Відомі роботи, які підтверджують це положення (23) і заперечують його (24).

Зв'язок між адсорбційністю і полярністю адсорбента, між розчиною речовиною і розчинником сформулював П. А. Ребіндер (25).

Це правило, згідно з яким адсорбційність з певного розчинника є антибатною розчинності в ньому, добре передає тільки загальну тенденцію у хроматографії, приклади протилежної залежності можна знайти, зокрема, в роботах Цвета (26).

Більшість дослідників пов'язує адсорбційність речовини з різних розчинників з її розчинністю: чим більша розчинність — тим менша адсорбція.

Н. А. Ізмайлов, С. Х. Мушинська та А. В. Алапіна (27) пов'язують розчинність речовини з її адсорбційним потенціалом. Вони встановили, що при наявності кількох розчинників з близькою розчинністю речовини в них кращим для десорбції буде той, адсорбційність якого на аполлярному адсорбенті краща.

Висловлені вище загальні положення і правила, особливо елюотропний ряд, надзвичайно корисні в хроматографічній практиці, оскільки полегшують експериментаторові вибір потрібної серії елюентів для послідовного вимивання з хроматографічної колонки окремих компонентів. Більше того, знаючи загальні положення хроматографії, експериментатор у своїй роботі може використати і деякі відхилення від зазначених закономірностей. Наприклад, відомо, що зменшення адсорбційності при переході до полярного розчинника неоднакове для різних речовин. Тому в одному розчиннику може більше адсорбуватися одна речовина, в іншому — друга і зміна розчинника може привести до зміни послідовності компонентів у колонці.

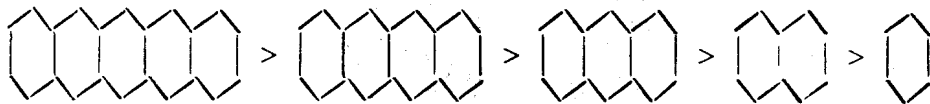
Адсорбційність залежить не тільки від розчинника і адсорбента, а й від будови самих органічних сполук; тому ми вважаємо потрібним згадати про ті роботи й теоретичні припущення, які відбивають загальну закономірність з даного питання. Багато з них містять дуже суперечливі дані і тому тут потрібні додаткові дослідження.

Досить ґрунтовно вивчено адсорбцію вуглеводнів. На активованому вугіллі найбільше адсорбуються ароматичні вуглеводні, менше — парафіни з нормальним ланцюгом, далі — нафтени і, нарешті, — парафіни з розгалуженим ланцюгом (28). Адсорбційність помітно зростає в міру здовження вуглецевого ланцюга. Особливо це помітно у сполуках з полярними групами: спиртах, карбонових кислотах та ін.

До відмінності в будові адсорбованих речовин полярні адсорбенти більш чутливі, ніж вугілля. Так, на полярних сорбентах олефіни адсорбуються більше, ніж парафіни.

На полярних адсорбентах ароматичні вуглеводні адсорбуються значно сильніше, ніж парафіни й нафтени. Подовження ланцюга, його розгалуження і впровадження аліфатичних заміників зменшує адсорбційність парафінів і всіх інших сполук. Виняток становлять вищі жирні кислоти під час адсорбції на окису алюмінію, причому розгалуженість ланцюга нерідко більш впливає, ніж його довжина.

Збільшення числа ароматичних кілець і гетероциклів у молекулі, навпаки, так сильно приводить до зростання адсорбційності, що можливим є їх цілковитий поділ. Як приклад можна навести такий ряд поліциклічних вуглеводнів, розташованих у порядку спадання їх адсорбції на окису алюмінію:

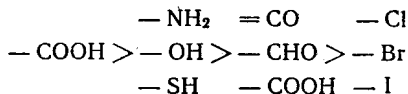


Прийнято вважати насичені вуглеводні найменш адсорбованим класом сполук на полярних адсорбентах. Наявність подвійного зв'язку різко збільшує адсорбційність першої-ліпшої сполуки, і тим більше, чим більше подвійних зв'язків.

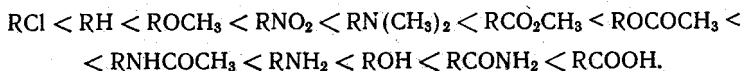
Виняток являє олеїнова кислота та деякі її ефіри, що адсорбуються на колонці з окису алюмінію або окису магнію слабше, ніж відповідні насичені сполуки (29).

Якщо при цьому також подовжується вуглецевий ланцюг, то адсорбційність все-таки зростає, тобто вплив подвійних зв'язків сильніший, ніж зворотний вплив довжини ланцюга (30). Супражені подвійні зв'язки дають більший ефект, ніж ізольовані, а подвійний зв'язок у боковому ланцюгу ефективніший за подвійний зв'язок у циклі (31).

Адсорбційність зростає при впровадженні в молекулу різних радикалів, за винятком алкіль, які знижують адсорбцію. Ефект, викликаний заміщенням радикалів, різний (32). За величиною впливу на адсорбційність їх можна розташувати в такому порядку:



У літературі подається також такий адсорбційний ряд похідних стильбену:



У результаті етерифікації вплив гідроксильних груп і карбоксилу дуже знижується (33).

В ароматичних сполуках з двома полярними групами адсорбційність знижується від пара- до мета-ізомерів і від них — до орто-ізомерів (34).

Адсорбційність сполук залежить не тільки від числа радикалів, але й від їх положення в молекулі. Цю властивість використовують при поділі ізомерів, які найважче поділяються.

Хроматографічний метод дозволяє досягти дуже великих успіхів у галузі стереохімії, яких неможливо домогтися методами, що застосовувалися досі.

До питання, що тут розглядається, можливий і інший підхід. Як показують експерименти деяких дослідників (23), а також теоретичні роботи (35), адсорбційність на полярних адсорбентах досить правильно зростає із збільшенням полярності сполук, яка кількісно виражається величиною їх діелектричної сталості. Проте цілковитого паралелізму тут не спостерігається.

Викладені вище правила про залежність адсорбційності речовин від їх будови не мають вичерпного характеру. Їм не можна також надавати загального значення, про що найкраще свідчать зазначені винятки і те, що порівняльна адсорбційність сполук більшою мірою залежить від розчинника і адсорбенту.

Перехід до іншого розчинника може помітно змінити перший-ліпший з наведених вище рядів завдяки зміні розчинності речовин, що входять до цього ряду.

Знання всіх цих загальних положень дає можливість експериментаторові не тільки припустити можливість поділу компонентів аналізованої суміші, а й впливати на процес хроматографічного поділу, а також, якщо це можливо, відповідно спрямовувати його.

У всіх випадках, коли адсорбційні умови дозволяють добрати розчинники, здатні успішно елюювати компоненти з колонки послідовно один за одним, віддають перевагу елюєнтному аналізу як простішому, а також придатному в препаративних цілях. При цьому зручно користуватися апаратурою М. С. Цвета. А для кількісного аналізу дуже підходять апаратура і прийоми, описані Классоном (12) та іншими дослідниками.

Недоліком елюєнтного аналізу є утворення довгих «хвостів», які відповідають речовинам, що дуже адсорбуються. Це робить його мало-придатним для кількісного аналізу. Цей метод не дозволяє використовувати емкі адсорбенти, бо в цьому разі важко перевести компоненти в елюат.

## б) Витискне проявлення

Недоліків елюєнтного аналізу (12) можна уникнути, застосовуючи метод витискного проявлення, при якому, як і при елюєнтному аналізі, невеликий об'єм досліджуваного розчину вводять у колонку і потім промивають її не чистим розчинником, а розчином відповідного «витискувача», тобто речовини, яка адсорбується сильніше за кожний з компонентів суміші.

Успіх проведення витискного проявлення залежить від правильно-го добору витискувача і його концентрації у проявляючому розчині. Слід мати на увазі, що використання надто сильного витискувача надмірно збільшує тривалість експерименту, а інколи може призвести до одночасної десорбції компонентів, що розділяються і, таким чином, аналіз стане неможливим. Проте концентрація витискувача у проявляючому розчині не повинна бути й надто низькою, бо тоді, замість витискного проявлення, може виникнути дуже тривалий аналіз промивання.

Проявник добирають або емпірично, або на підставі знання ізотерм адсорбції чистих речовин на даному адсорбенті і з даного розчинника.

Витискне проявлення дає можливість провадити хроматографічний аналіз на дуже емких адсорбентах, що істотно підносить ефективність процесу, бо зона речовини займає при цьому меншу висоту. Це збільшує кратність процесу на колонці заданої довжини. Оскільки на адсорбенті один компонент витискується іншим, то вони пересуваються в колонці в порядку зростання адсорбційної спорідненості: зона найбільше адсор-

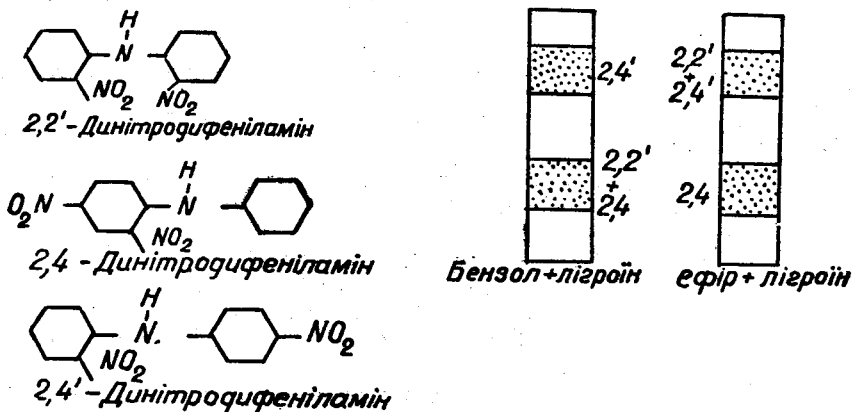


Рис. 2. Поділ ізомерних динітродіфеніламінів.

бованої речовини рухається останньою, безпосередньо попереду фронту витискувача; найменш адсорбована речовина йде попереду решти, першою доходить до нижнього кінця колонки і переходить у фільтрат.

Метод витискного проявлення вільний від недоліків елюентного аналізу, бо не утворюються розмиті «хвости», але, на жаль, він не завжди придатний. Деякі речовини адсорбуються необоротно і не можуть бути ні витиснуті, ні елюювані. У цих випадках єдино можливим способом хроматографії на колонці залишається фронтальний аналіз. Проте для аналізу в гомологічних рядах та інших складніших сумішей метод витискного проявлення є незмінний (12), бо неможливо знайти проявник, який елюював би, наприклад, пальмітинову кислоту і не елюював би стеаринову.

### в) Фронтальний аналіз

Цей метод являє собою найпростіший вид адсорбційного аналізу, проте він потребує відповідної апаратури і деяких розрахунків під час його проведення.

У верхню частину колонки безперервно вводять суміш, що аналізують. Як видно з рис. 1-б, вже при нанесенні досліджуваного розчину на колонку відбувається частковий поділ компонентів. Якщо суміш трикомпонентна, розподіл компонентів у первинній хроматограмі має ступінчастий характер (див. рис. 3): у першій зоні міститься одна речовина, в другій — дві, в третій — усі компоненти суміші. При дальшому пропусканні досліджуваного розчину через колонку первинна хроматограма розширюватиметься, її фронт досягне нижнього кінця колонки, після чого з неї почне витікати розчин спочатку одного компоненту, потім двох і, нарешті, вихідний розчин.

Цей метод дозволяє одержати в чистому вигляді лише один, найменш адсорбований компонент, який рухається на колонці найшвидше. Це, з одного боку, істотно знижує препаративну цінність методу, а з другого — дозволяє проводити визначення складу суміші, не поділяючи її на компоненти.

Фронтальний аналіз не має дефектів елюентного аналізу і витиску-ного проявляння, не потребує спеціального добору елюенту й витиску-вача, цим методом можна досліджувати будь-яку суміш.

Важливою позитивною якістю цього методу є також його чутли-вість: досить зовсім малої різниці в адсорбційності компонентів, щоб це виявилось на хроматограмі. Особливо ефективним є даний метод при дослідженні складних сумішей гомологів, жирних кислот, спиртів

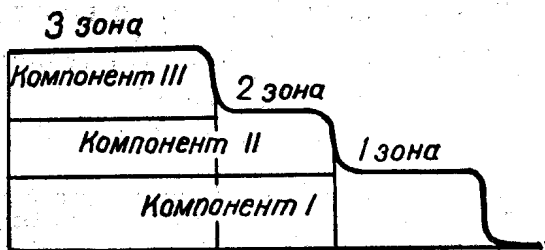


Рис. 3. Розподіл компонентів у первинній хро-матограмі.

та інших речовин (36, 37), аналіз яких звичайними методами хромато-графії (38) зустрічає деякі утруднення.

Знаючи ізотерми адсорбції компонентів суміші, можна на підставі хроматограми послідовно розрахувати концентрацію компонентів і встановити склад вихідного розчину.

Коли за ходом поділу спостерігають шляхом безперервного вимі-рювання показника заломлення або іншої якої-небудь фізичної вла-стивості розчину, що витікає, треба застосовувати як розчинник інди-відуальну речовину (наприклад *n*-гексан), замість суміші (петролей-ний ефір тощо). Спостерігаючи за ходом хроматографічного поділу звичайними методами, звертають увагу на чистоту розчинників. Особ-ливо важливо, щоб аполярні розчинники не містили домішки полярних (води, спирту і т. п.), які різко знижують адсорбцію.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Г. А. Чижилова, И. В. Красовский, Тр. Харьковского госфармин-ститута, вып. I, Харьков, 1957, 168. — 2. L. Ruzicka, E. Rey, *Helv. chim. acta*, **26**, 2143 (1943). — 3. Wm. R. Crowell, O. König, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **16**, 347 (1944). — 4. И. Постовский, Н. Беднягина, М. Михайлова, *ДАН*, **44**, 403 (1944). — 5. J. W. Sease, *J. Amer. Chem. Soc.*, **69**, 2242 (1947). — 6. M. Gates, *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 617 (1948). — 7. H. Reich, T. Reichstein, *Helv. chim. acta*, **26**, 562 (1943). — 8. Е. М. Брумберг, Хроматография, сб. статей изд. Ленин-градского университета, 1956, 87. — 9. И. Валяшко, Ю. Розум, *ЖОХ*, **17**, 755 (1947). — 10. Н. Н. Strain, *J. Amer. Chem. Soc.*, **57**, 758 (1935). — 11. М. Дубинин, М. Хренова, *ЖПХ*, **9**, 1204 (1936). — 12. С. Классон, Адсорбционный анализ сме-сей, М., 1950, 18, 31, 43. — 13. Н. Фукс, *Усп. хим.*, **18**, 206 (1949). — 14. Е. М. Брум-берг и др., *ДАН СССР*, **74**, 747 (1950). — 15. К. В. Чмутов, В. Т. Авгуль, *Зав. лаб.*, **1**, 107 (1954); **9**, 1115 (1957). — 16. Е. Ледерер, *Усп. хим.*, **9**, 1124 (1940). — 17. В. Шредер, Хроматография, сб. ст., ИИЛ, М., 1949, 77. — 18. М. М. Сенявин, *Усп. хим.*, **18**, 183 (1949). — 19. Л. Гурвич, *ЖРХО*, **47**, 805 (1915). — 20. М. С. Цвет, Хроматографический адсорбционный анализ, Избранные работы, изд. АН СССР, 1946, 42. — 21. М. М. Дубинин, Физико-химические основы сорбционной техники, ОНТИ, 1935, 232, 236. — 22. W. Traupe, *Biochem. Z.*, **305**, 150 (1940). — 23. Jean Jacque-ès, Jean-Paul Mathien, *Bull. Soc. chim. France*, **3**, 94 (1946). — 24. Schroeder, *Ann N. Y. Acad. Sci.*, **49**, 204 (1948). — 25. П. А. Ребиндер, *Журнал эксп. биол. и мед.*, **4**, 1939 (1927); *Biochem. Z.*, **187**, 19 (1927). — 26. М. С. Цвет, Хромато-графический адсорбционный анализ, Избранные работы, изд. АН СССР, 1946, 138. — 27. Н. А. Измайлов, С. Х. Мушинская, А. В. Алапина, *Укр. хим. ж.*, **20**, 478 (1954). — 28. A. J. P. Martin, R. Z. M. Synge, *Biochem. J.*, **35**, 1358 (1941). — 29. M. H. Patterson, M. J. Johnson, *J. Biol. Chem.*, **174**, 775 (1948). — 30. Z. Zech-meister, Z. Cholnoky, *Justus Liebig's Annalen der Chemie*, **516**, 30 (1935). — 31. O. Jeger, J. Norymberski, S. Szpilfogel, V. Prelog, *Helv. chim. acta*,



29, 684 (1946).—32. H. Strain, Chromatographic Adsorption Analysis, New York, 1942, 15.—33. W. W. Binkley, M. L. Wolfrom, J. Amer. Chem. Soc., 68, 1720 (1946).—34. M. Orchin, J. Amer. Chem. Soc., 68, 571 (1946).—35. Б. В. Ильин, В. В. Тарасов, Молекулярные силы и их электрическая природа, М., 1929, 45, 129.—36. H. G. Gassidy, J. Amer. Chem. Soc., 63, 2735 (1941).—37. M. Graff, E. Ska u, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 15, 340 (1943).—38. Н. А. Фукс, Реакция и методы исследования органических соединений, 1, 1951, 222.

Надійшла 2.VII 1962 р.

## **ВЫБОР МЕТОДА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

*И. М. ПЕРЦЕВ, И. В. КРАСОВСКИЙ, Г. П. ПИВНЕНКО*

### **СООБЩЕНИЕ II**

#### **РЕЗЮМЕ**

Приводится краткая характеристика отдельных методик анализа жидких хроматограмм (анализ промыванием, вытеснительное проявление, фронтальный анализ), а также указывается влияние на скорость миграции зон, скорости вытекания растворителя из колонки, его физических свойств, силы адсорбции вещества, природы адсорбента и других свойств.

---