**5 занятие. Метод колоночной хроматографии.**

**Разделение твердых смесей и смесей типа жидкость-жидкость.**

**Колоночная хроматография**– способ препаративного разделения смесей жидких или твердых веществ, основанный на различном сродстве разделяемых веществ к неподвижной (сорбент) и подвижной (элюент) фазам. Как правило, чем лучше вещество сорбируется неподвижной фазой - тем медленнее вещество выходит с колонки.

Колоночная хроматография – это единственный наиболее важный метод для разделения смесей жидких или твердых органических веществ в препаративном масштабе (от нескольких миллиграммов до десятков граммов). Обычно разделение проводят жидкостно-адсорбционной хроматографией (физическая природа та же, что и в случае ТСХ), которая эффективна для большинства неионных соединений.

Разделение проводят на колонке, представляющую собой стеклянную трубку, заполненную сорбентом (обычно силикагелем), играющим роль пористого слоя, через который протекает подвижная фаза (элюирующий растворитель, например, гексан, хлороформ).

Разделяемая смесь подается в верхнюю часть колонки, где она сорбируется неподвижной фазой, а затем через колонку непрерывно подается элюент. Каждый компонент смеси переносится вниз по колонке подвижной фазой (элюентом) со скоростью, которая зависит от сродства к сорбенту (ее можно оценить по величине *R*f метод ТСХ). В идеальном случае смесь разделяется на ряд отдельных компонентов (полос), которые медленно опускаются по колонке и в конечном счете собираются в приемник. После отгонки растворителя из соответствующих приемников выделяют чистые вещества.

Элюент для колоночной хроматографии выбирают с помощью метода тонкослойной хроматографии. Смесь хроматографируют в нескольких элюентах, и для колоночной хроматографии используют тот, в котором расстояние между пятнами больше. Как правило, менее полярные растворители позволяют более эффективно разделять смеси методом хроматографии. По возрастанию полярности и способности «смывать» вещества с поверхности силикагеля (элюирующей способности) растворители располагаются в следующий ряд:

циклогексан < гептан < пентан < четыреххлористый углерод < бензол < хлороформ < диэтиловый эфир < этилацетат < ацетон < этанол < метанол < вода < уксусная кислота.

**Область применения**

-Разделение смесей жидких или твердых веществ, различающихся по [R](http://orgchemlab.com/chromatography.html)**[f](http://orgchemlab.com/chromatography.html)**[(или t](http://orgchemlab.com/chromatography.html)**[R](http://orgchemlab.com/chromatography.html)**[)](http://orgchemlab.com/chromatography.html).

-Отделение целевого вещества от не сорбирующихся примесей.

**1.Элюент.**

**Требования к элюенту**.

1.Выделяемые вещества не должны взаимодействовать с элюентом или разрушаться при его присутствии.

2.Элюент может быть или индивидуальным растворителем или смесью нескольких растворителей. Растворители должны легко удаляться после выделения веществ (поэтому диметилсульфоксид (ДМСО) или диметилформамид (ДМФА) не подходят из-за высокой температуры кипения).

3.Элюент подбирают таким образом, чтобы на сорбенте, Rf продуктов различался не менее 0.15, и пятна выходили с Rf не более 0.5-0.6 после одного прогона хроматограммы.

4.Если под действием растворителей различной полярности: полярных (метанол, возможно с добавлением уксусной кислоты или триэтиламина) и неполярных (гексан, пентан)) вещество не сдвигается со старта или двигается с фронтом, следует перейти к другому сорбенту

Подбор элюента начинают с наименее полярных растворителей, таких как н-гептан, н-гексан, н-пентан, циклогексан.

**Добавление элюента.**

Элюент добавляется или непосредственно, или при помощи капельной (делительной) воронки. При проведении хроматографирования **слой сорбента ни в коем случае не должен пересыхать**, иначе может произойти его растрескивание, приводящее к снижению разделяющей способности.

**2.Хроматографическая колонка и количество сорбента**.

Представляет собой стеклянную трубку, один из концов которой имеет пористую насадку или заткнут кусочком ваты, для того чтобы сорбент не высыпался. Длина колонки зависит от Rf разделяемых веществ. Чем меньше разница в Rf - тем длиннее колонка (слой сорбента).

3.**Сорбент.**

Выбирается исходя из свойств разделяемой смеси.

**Требования к сорбенту.**

1.Разделяемые вещества не должны разрушаться в присутствии сорбента.

2. Если под действием растворителей различной полярности (полярных (метанол, возможно с добавлением уксусной кислоты или триэтиламина) и неполярных (гексан, пентан)) вещество не сдвигается со старта или двигается с фронтом, следует перейти к другому сорбенту (от полярного сорбента к неполярному и наоборот).

Одним из наиболее распространенных сорбентов, используемых в колоночной хроматографии, является силикагель. Использование метанола и этанола в качестве подвижной фазы снижает активность силикагеля. Окись алюминия для хроматографии бывает основная, нейтральная и кислая. В колоночной хроматографии обычно используют основную (рН 9,0-10,0) и нейтральную окись алюминия. При использовании окиси алюминия нельзя применять в качестве элюентов ацетон и этилацетат. Свойства магнезии (окиси магния) сходны со свойствами окиси алюминия, однако магнезия более эффективна для разделения ненасыщенных соединений. Активированный древесный уголь пригоден для разделения углеводов, пептидов, аминокислот. Он избирательно сорбирует ароматические углеводороды.

**4.Приемники фракций.**

Для сбора фракций можно использовать как обычные плоскодонные колбы, так и пробирки. Когда разделяемые вещества окрашены, видно как они выходят с колонки. Каждое вещество собирают в отдельный приемник. Если вещества выходят смесью - смесь собирают отдельно. Если разделяемые вещества не окрашены, ведут сбор фракций определенного объема, который зависит от размеров колонки и от степени разделения веществ (R**f**).

5.**Лапка**.

Колонку закрепляют на штативе при помощи лапки.

Металлическая лапка **НЕ должна соприкасаться со стеклом**, для избежания растрескивания колбы при перегонке. Для этого между колбой и лапкой помещают резиновые прокладки.

**Рекомендации при проведении**

Современные методы колоночной хроматографии позволяют, пожалуй, разделять смеси любого состава. Для этого необходимо тщательно подобрать для каждого компонента смеси: элюент и сорбент.

1.Перед проведением колоночной хроматографии необходимо подобрать элюент и сорбент при помощи тонкослойной хроматографии. Для эффективной очистки выделяемого компонента смеси должно иметь значение Rf должно быть ~0.5. Примеси должны отличаться по Rf не менее, чем на 0.15.

2.Элюент для колоночной хроматографии должен быть менее полярным, чем для ТСХ анализа.

3.Для эффективного разделения смеси нескольких веществ можно использовать градиентное элюирование, т.е. (на примере хроматографии на силикагеле), начинать элюировать неполярными растворителями (пентан, гексан), далее постепенно увеличивать полярность смеси (смеси: гексан/этилацетат от 20:1 до 1:5) и, наконец, переходить к высоко полярным растворителям и смесям (метанол, смеси метанол/триэтиламин 20:1).

**4.Способы заполнения колонки сорбентом:**

**1.Сухой способ.**Колонка заполняется сорбентом. После чего сразу наносят вещество и приступают к элюированию. Большой минус этого способа - частое растрескивание слоя сорбента - из-за чего плохое разделение. Данный способ подходит для флеш-хроматографии, т.е. отделения целевого вещества от примесей с Rf ~0.

**2.Элюент затем сорбент.** Колонку заполняют до половины длины элюентом, затем порциями засыпают сорбент, следя, чтобы он полностью смачивался. Минус этого способа - если сорбент достаточно мелкий, он слипается комками и падает на дно колонки в виде шариков. Способ часто применяют при работе с крупнозернистым силикагелем.

**3.Сорбент в виде суспензии в элюенте.**В колонку засыпают необходимое количество сухого сорбента (чтобы определить необходимое количество), высыпают его из колонки в химический стакан. Заливают сорбент элюентом и перемешивают для равномерного смачивания. Через некоторое время суспензию взбалтывают и выливают при помощи химической воронки на колонку. Остатки сорбента смывают со стенок химического стакана элюентом.

**5.Способы нанесения вещества на колонку:**

**1.Сухой способ**. Вещества наносятся в индивидуальном виде - твердом (просто насыпают на колонку) или жидком (переносят пипеткой на колонку).

**2.В растворе**. Вещество растворяют в **минимальном количестве** элюента или менее полярном растворителе, чем элюент и наносят пипеткой. **Растворитель должен быть менее полярный, чем элюент, иначе вещество вытянется с колонки вместе с этим растворителем. Чем уже слой раствора с веществом - тем лучше разделение.**

**3.В виде твердой смеси с сорбентом.** Вещество смешивают с сорбентом с добавлением небольшого количества растворителя. Растворитель удаляют на [**роторном испарителе**](http://orgchemlab.com/evaporation-by-rotary-video.html). Сухой сорбент с веществом насыпают на колонку.

6.Наносить вещество на колонку (жидкое или в растворе) следует по стенкам колонки, чтобы не размывать слой сорбента.  **Чем ровнее нанесено вещество, тем лучше его разделение.**

7.После нанесения вещества верхний слой сорбента на колонке можно накрыть ваткой или фильтровальной бумагой, чтобы при добавлении элюента не происходило размывание слоя сорбента. **Чем ровнее слой сорбента, тем лучше разделение веществ.**

**8.Элюирование под давлением.**В принципе, в большинстве случаев элюирование проводят при атмосферном давлении. Так как чем быстрее скорость элюирования - тем хуже разделение. Однако, при использовании мелкозернистых сорбентов без элюирования при избыточном давлении не обойтись из-за крайне низкой скорости процесса. В этих случаях применяют **колбы Бунзена** (**А**), в которые помещают хроматографические колонки и подключают к вакуумному насосу (наиболее подходит при проведении флеш-хроматографии на фильтре Шотта) или нагнетают давление при помощи груши (**Б**).

9.При проведении хроматографирования слой сорбента ни в коем случае не должен пересыхать, иначе может произойти его растрескивание, приводящее к снижение разделяющей способности.

10.Вещество должно быть растворимо в применяемом элюенте, иначе произойдет его кристаллизация в колонке, что ухудшает разделение. Если кристаллизация все же произошла, можно:

* 1. сменить элюент, на тот, который растворяет полученное вещество;
	2. в элюент добавить близкий по полярности растворитель, который растворяет полученное вещество;
	3. слегка нагреть слой сорбента, до температуры менее температуры кипения элюента.
	4. ничего не делать, возможно, вещество постепенно растворится в большом количестве элюента.

Успех хроматографирования на колонке зависит главным образом от правильного выбора сорбента и подвижной фазы.

К недостаткам адсорбционной колоночной хроматографии относится длительность элюирования.

Распределительная колоночная хроматография напоминает противоточную экстракцию. Она основана на распределении растворенных веществ между подвижной органической фазой и водной фазой, удерживаемой твердым носителем. Носитель должен быть инертен по отношению к разделяемым веществам, но должен хорошо удерживать неподвижную жидкую фазу. Обычно применяемые носители (силикагель, кизельгур, целлюлоза) удерживают 0,5-1 мг жидкой фазы на 1 г собственной массы. В качестве неподвижной жидкой фазы чаще всего используют воду. При разделении веществ, хорошо растворимых в органических растворителях, часто поступают наоборот: твердый носитель пропитывают органическим растворителем, а в качестве подвижной жидкой фазы используют воду.

Колоночной распределительной хроматографией удобно пользоваться для препаративного выделения чистых веществ.

**Разделение твердых смесей и смесей типа жидкость-жидкость.**

**Способы разделения смесей** - важнейшие аналитические операции, необходимые когда  [обнаружению](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%B0%D1%87%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7) и [количественному](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9A%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D0%B9_%D0%B0%D0%BD%D0%B0%D0%BB%D0%B8%D0%B7) определению одного элемента (вещества) мешают многие другие элементы.

**Разделение смесей** — процесс выделения чистых [веществ](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%92%D0%B5%D1%89%D0%B5%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%BE) из [смесей](https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%BC%D0%B5%D1%81%D1%8C_%28%D1%85%D0%B8%D0%BC%D0%B8%D1%8F%29). Разделяемые продукты имеют различные химические и физические свойства.

Индивидуальные вещества можно выделить из смесей. В составе смесей индивидуальные вещества сохраняют свои свойства. Для этого существуют различные способы. Разделение смесей на индивидуальные вещества основано на различии физических свойств компонентов, их составляющих.

**Разделение неоднородных смесей.**

Отстаивание. Метод используют для разделения нерастворимых веществ, обладающих различной плотностью, например речного песка и угля. Смесь растворяют в воде и перемешивают. Песок, плотность которого больше плотности угля, оседает на дно, а уголь всплывает на поверхность воды. Уголь удаляют с поверхности воды, после чего с осадка аккуратно, по стеклянной палочке сливают воду.

Отстаиванием можно разделить также смесь двух несмешивающихся жидкостей, например масла и воды. Для этого используют делительную воронку с краном на конце. В воронку помещают разделяемую смесь и дожидаются появления границы, разделяющей две жидкости. В верхнем слое оказывается жидкость с меньшей плотностью — масло, а в нижнем — с большей плотностью — вода. После этого кран открывают, вода вытекает, а в делительной воронке остаётся масло.

*Декантация* – отделение твердой фазы суспензии/взвеси от жидкой фазы, осуществляемое выливанием раствора с осадка после отстаивания.

Фильтрование позволяет отделить осадок от раствора. С помощью фильтрования можно очистить воду от нерастворимых в ней примесей, например от песка, глины, мела. В лаборатории для фильтрации используют фильтровальную бумагу. Размеры пор в фильтре беспрепятственно пропускают молекулы воды и растворённых в ней веществ, но задерживают частицы нерастворённых веществ. Фильтр складывают вчетверо и вставляют в стеклянную воронку. Стеклянную воронку затем помещают в колбу или в стакан и осторожно фильтруют разделяемую смесь. Жидкость, которая проходит через фильтр и собирается в колбе или в стакане, называется фильтратом.

Разделение с помощью магнита используют для разделения смесей, в составе которых одни вещества обладают магнитными свойствами, например железо, кобальт, никель, а другие магнитных свойств не проявляют, например сера. С использованием магнита можно разделить смесь железа и серы, железа и меди, железа и углерода (сажи).

**Разделение однородных смесей.**

Для выделения растворимых твёрдых веществ из растворов применяют выпаривание. Для этого раствор аккуратно нагревают в выпарительной фарфоровой чашке. После испарения воды на дне чашки остаются твёрдые вещества, которые содержались в растворе. Если выпаривание проводить медленно, то из раствора можно выделить растворённое в нём вещество в виде достаточно крупных кристаллов. Такой метод называется кристаллизацией.

*Возгонка* (сублимация) и последующую после охлаждения кристаллизацию используют для очистки веществ с низкой температурой возгонки, например кристаллического йода.

При нагревании твердой смеси необходимое вещество возгоняется и принимает газообразное состояние, потом его охлаждают. Отличительной особенностью сублимации является то, что вещество, подвергнутое возгонке, переходит из твердого состояния в газ, минуя жидкую стадию.

Для разделения смешивающихся друг с другом жидкостей или газов, имеющих разные температуры кипения, применяют *перегонку*, или *дистилляцию*. При нагревании смеси содержащиеся в ней жидкие компоненты последовательно испаряются в порядке увеличения их температур кипения. Испаряющиеся пары собирают и конденсируют при охлаждении. Таким способом можно разделить  на фракции нефть, разделить воду и ацетон, воду и спирт. С помощью перегонки можно также очистить воду от содержащихся в ней растворимых солей.

Природная вода всегда содержит растворённые соли, от которых воду можно очистить с помощью перегонки. Воду нагревают, пары воды собирают и охлаждают, получая *дистиллированную воду*. Дистиллированная вода необходима для приготовления растворов в лаборатории, для изготовления лекарств. Однако применение дистиллированной воды в пищу не рекомендуется.