

2.2.30. ЕКСКЛЮЗИЙНА ХРОМАТОГРАФІЯ

Ексклюзивна хроматографія являє собою ▽ метод рідинної хроматографії (2.2.29)▲, у якому процес розподілу молекул у розчині відбувається відповідно до їх розмірів. У разі використання органічної рухомої фази метод називають гель-проникаючою хроматографією, а у разі використання водної рухомої фази — гель-фільтраційною хроматографією. Проба вводиться в колонку, заповнену гелем або пористими частинками наповнювача, і переноситься рухомою фазою через колонку. Розподіл за розмірами відбувається за рахунок багаторазових обмінів молекул розчиненої речовини між розчинником рухомої фази і цим самим розчинником у нерухомій рідкій фазі (нерухома фаза) у порах матеріалу, яким заповнена колонка. Діапазон розмірів розділюваних молекул визначається діапазоном розмірів пор наповнювача.

Досить маленькі молекули, що здатні проникати в усі пори матеріалу, елюються у повному об'ємі колонки V_t (повний проникаючий об'єм ■). Молекули з розмірами, що перевищують ▽максимальний▲ розмір пор матеріалу колонки, мігрують лише крізь простір між частинками наповнювача без утримування й елюються у ▽об'ємі утримування неутриманого компонента▲ V_o (об'єм ексклюзії або «мертвий» об'єм). Розподіл молекул за розмірами відбувається між об'ємом ексклюзії і повним ■ об'ємом колонки; найбільш ефективний розподіл звичайно відбувається в перших двох третинах даного діапазону.

Обладнання. Обладнання включає хроматографічні колонки ▽різної довжини і внутрішнього діаметру▲ (\emptyset), заповнені матеріалом, що забезпечує розподіл молекул за розмірами у потрібному діапазоні. Якщо необхідно, колонку термостатують. Як наповнювач може використовуватися або м'який матеріал, такий як набряклий гель, або жорсткий ▽матеріал▲, такий як пористе скло, силікагель або підхожий для даного розчинника поперечноштитий органічний полімер. При використанні жорстких матеріалів звичайно застосовують примусову подачу рухомої фази під тиском, що прискорює розподіл.

До одного кінця колонки звичайно приєднують пристрій уведення проби, наприклад інжектор із припиненням потоку, шприцевий інжектор із мембраною для уведення проби без припинення потоку або петльовий інжектор із клапаном, що перемикає потік. До цього кінця колонки також може бути приєднаний відповідний насос для подачі елюента з контрольованою швидкістю. Проба може також наноситися безпосередньо на суху поверхню матеріалу колонки, або, якщо густина проби перевищує густина елюента, проба може нашаровуватися на поверхню матеріалу колонки під елюент.

Рухому фазу вибирають виходячи з природи проби, наповнювача і методу детектування. Через колонку з постійною швидкістю пропускають елюент.

Інший кінець колонки звичайно приєднують до відповідного детектора із автоматичним пристроєм, що реєструє і забезпечує контроль відносних концентрацій розділених компонентів проби. ▽ Можуть використовуватися спектрофотометри в ультрафіолетовому й видимому діапазоні (UV-Vis) (2.2.25), диференціальні рефрактометри (ДР; RI), люмінесцентні детектори, детектори багатокутового розсіяння світла (БКРС; MALS) та інші детектори. ▲ Якщо необхідно, може бути приєднаний автоматичний колектор фракцій.

▽ПРОЦЕДУРА

Перед проведенням розділення проводять обробку наповнювача та заповнення колонки як зазначено у монографії або відповідно до ▲ інструкції виробника.

Критерії оцінки придатності ■ системи ▽описані у загальній▲ статті 2.2.46. *Методи хроматографічного розділення.* У даній ▽загальній статті також зазначений можливий діапазон коригування хроматографічних умов.▲

ВИЗНАЧЕННЯ ВІДНОСНОГО КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ СУМІШЕЙ

▽Розділення▲ проводять, як описано в монографії. Якщо можливо, записують хроматограму, одержану в процесі ▽розділення▲, і вимірюють площі відповідних піків. ▽Якщо зразок контролюється за фізико-хімічною властивістю, еквівалентною для всіх компонентів проби▲ (наприклад, вони мають ▽однакову питому оптичну густина▲), відносний вміст кожного компонента обчислюють як відношення площі піка відповідного компонента до суми площ піків усіх компонентів. Якщо для різних компонентів проби ▽відповідь за властивістю, яка використовується для визначення компонентів,▲ різна, вміст кожного компонента розраховують за допомогою калібрувальних кривих, одержаних із використанням ▽калібрувальних стандартів▲, зазначених в монографії.

ВИЗНАЧЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАС

Ексклюзивна хроматографія може бути використана для визначення молекулярних мас речовин шляхом порівняння з відповідними ▽калібрувальними стандартами▲, зазначеними в монографії. Для ▽калібрувальних стандартів▲ будують графік залежності об'єму утримування від логарифма молекулярних мас. Графік, обмежуваний значеннями об'єму ексклюзії та ▽повного▲ проникаючого об'єму, звичайно апроксимують до прямої лінії для ▽застосованих умов розділення▲. З ▽калібрувальної кривої▲ можуть бути одержані значення молекулярних мас. ▽Калібрування за молекулярною масою є придатним▲ лише для окремих випадків сис-