

Литература

- 1. Отто М. Современные методы аналитической химии. Т. 2. М.: Техносфера, 2004. 288с.
- 2. Основы аналитической химии. Кн. 1. Общие вопросы. Методы разделения. Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., Фадеева В.И. М.: Высш. шк., 2000. 351 с.
- 3. Основы аналитической химии. Задачи и вопросы: Учеб. Пособие для вузов. Фадеева В.И., Барбалат и др. Под ред. акад. Золотова Ю.А. М.: Высш. шк., 2002. 412 с.

- 4. Гольдберт К.А., Вигдергауз М.С. Введение в газовую хроматографию. М: Химия, 1990. 352 с.
- 5. Рудаков О.Б., Востров И.А. и др. Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии. Воронеж: Водолей, 2004. 528 с.
- 6. Барам Г.И. Курс лекций “ВЭЖХ для всех”. Новосибирск. 2007.
- 7. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. Москва, 1986. 280 с.
- 8. Руководство по капиллярному электрофорезу. / Под ред. А.М. Волощука, Научный совет по хроматографии. М.: Наука, 1996.

- 9. Пецев Н., Коцев Н. Справочник по газовой хроматографии: Пер. с болг. М:Мир, 1987. 260 с.

- 10. Король А.Н. Неподвижные фазы в газожидкостной хроматографии. М: Химия, 1985. 240 с

Основные понятия и определения

Хроматография

- – физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами: *неподвижной и подвижной*;
- – аналитический метод, позволяющий разделять многокомпонентную смесь (газообразные, жидкие и твердые вещества с различной молекулярной массой), идентифицировать компоненты и определять количественный состав смеси.

Основные понятия и определения

- **Сущность метода хроматографии** - разделяемые вещества перемещаются через слой *неподвижной фазы* вместе с *подвижной фазой* (жидкой или газообразной) с разной скоростью вследствие различной сорбируемости.
- Компоненты анализируемой смеси должны хорошо растворяться в подвижной фазе и иметь умеренное сродство к неподвижной фазе.
- Константы равновесия компонентов смеси должны достаточно различаться, чтобы было возможно их разделение.

Основные понятия и определения

- **Особенность процесса хроматографирования** - многократность повторения сорбции вещества на поверхности сорбента и десорбции с поверхности сорбента, что обеспечивает высокую эффективность разделения.
- Растворенное вещество, покидающее жидкую фазу вместе с элюентом называется **элюатом**.
- Процесс перемещения образца с элюентом называется **элюированием**.

Основные понятия и определения

Сорбцию можно осуществить двояко:

- статическая сорбция – процесс протекает при относительном покое обеих фаз и завершается установлением равновесного распределения веществ между фазами.

динамическая сорбция – процесс, в котором происходит направленное перемещение подвижной фазы относительно неподвижной

Основные понятия и определения

Классификация хроматографических методов

1. По агрегатному состоянию фаз

<i>по агрегатному состоянию ПФ</i>	
<i>Газовая</i>	<i>Жидкостная</i>
<i>по агрегатному состоянию НФ</i>	
<i>Газо-жидкостная:</i> колонка заполнена зернами твердого тела (носителя) с пленкой жидкости	<i>Жидкостно-жидкостная</i>
<i>Газо-адсорбционная:</i> колонка заполнена твердым телом – адсорбентом	<i>Жидкостно-адсорбционная</i>

Основные понятия и определения

Классификация хроматографических методов

2. По механизму взаимодействия сорбента и сорбата:

- - **распределительная**: основана на различии в растворимости разделяемых веществ в НФ;
- - **ионообменная**: основана на разной способности веществ к ионному обмену;
- - **адсорбционная**: основана на различной сорбируемости веществ твердым сорбентом;
- - **эксклюзионная**: на различии размеров и форм молекул разделяемых веществ;
- - **аффинная**: на специфических взаимодействиях.

Основные понятия и определения

Классификация хроматографических методов

3. По технике выполнения:

- - колоночная (набивные и капиллярные колонки);
- - плоскостная (бумажная и тонкослойная).

4. по способу проведения процесса:

- - фронтальная;
- - вытеснительная;
- - проявительная.

Основные понятия и определения

Классификация хроматографических методов

5. По цели проведения хроматографических процессов:

- **Аналитическая хроматография** – установление качественного и количественного состава смесей;
- **Неаналитическая хроматография** – исследование физико-химических характеристик сорбатов: давления пара, теплот растворения, коэффициентов активности;
- **Препаративная хроматография** – получение веществ в чистом виде;
- **Промышленная хроматография** – получение индивидуальных веществ, например, лекарственных препаратов в больших количествах.

Основные понятия и определения

- **Хроматограф включает в свой состав:**
- **систему подготовки газов** (установка, стабилизация и очистка потоков газа);
- **систему подачи** в колонку газа-носителя с постоянной объемной скоростью.

Системы имеют автоматические регуляторы давления и (или) расхода газа-носителя.

- **систему ввода пробы** – дозирующее устройство, позволяющее вводить в поток газа-носителя непосредственно перед колонкой определенное количество анализируемой смеси в парообразном состоянии.

- Разделенные в колонке компоненты с газом-носителем подаются в детектор, который преобразует возникающее изменение физических или физико-химических свойств бинарных смесей (по сравнению с чистым газом-носителем) в электрический сигнал.
- Величина сигнала зависит как от природы компонента, так и от содержания его в анализируемой смеси.
- **детектор** с системой сбора и обработки данных;
- **систему термостатирования:** колонки, детекторы, дозирующие устройства помещены в термостаты, управляемые терморегулятором.
- Если необходимо повышать температуру кипения в процессе анализа, используют программатор температуры колонки.



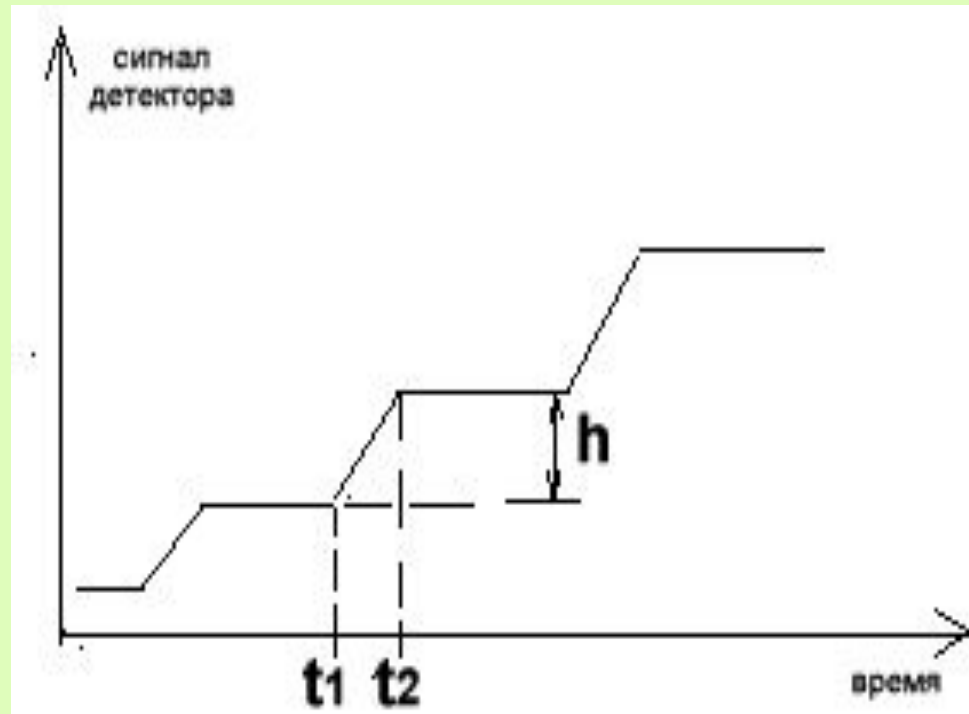
- **Детектор** – прибор непрерывного действия, дающий отклик на соединения в элюате.
 - Комплект современного газового хроматографа содержит 4-6 детекторов.
-

Подразделяются:

- – на **селективные** и **универсальные**;
 - – на **интегральные** и **дифференциальные**,
 - – на **потокосные** и **концентрационные**.
-
- Наибольшее распространение получили в силу универсальности, превосходных характеристик и высоких эксплуатационных качеств, детекторы ПИД и ДТП.

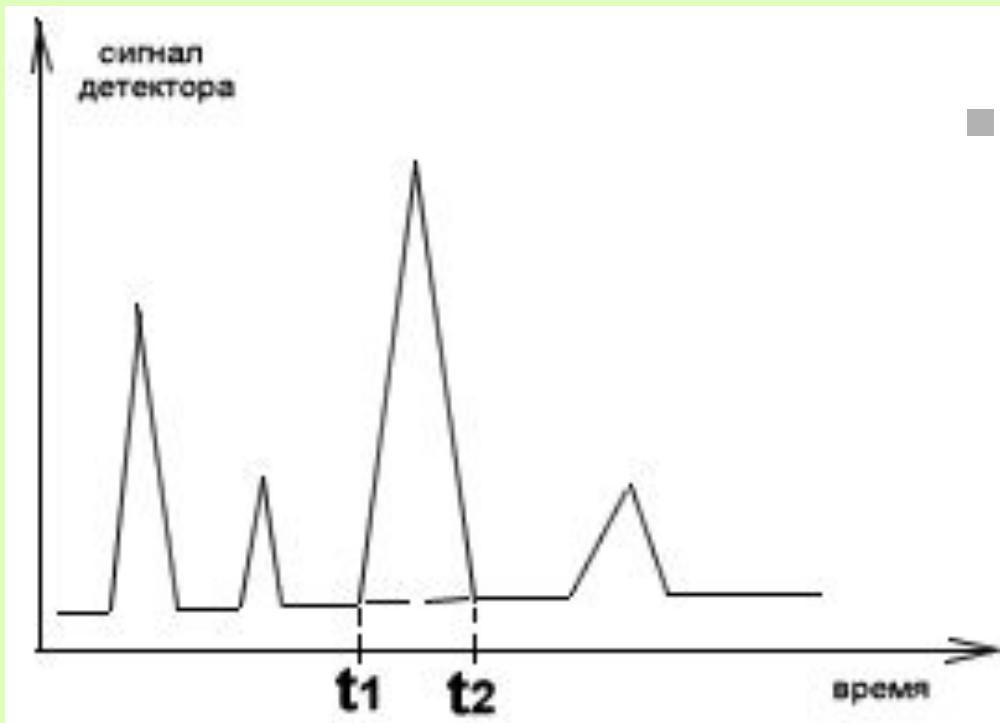
- **Интегральный детектор** – регистрирует изменение во времени суммарного количества выходящего из колонки компонента, например, общий объем или количество раствора, израсходованного на нейтрализацию анализируемого вещества.
- Эти детекторы имеют весьма ограниченное применение из-за большой инерционности и недостаточной универсальности.

Хроматограмма получается в виде ступеней, каждая из которых по высоте пропорциональна количеству компонента, прошедшего через детектор за время $t_2 - t_1$.



- Интегральная хроматограмма

- **Дифференциальный детектор** – измеряет мгновенную концентрацию или массовую скорость вещества в потоке газа-носителя.
- Хроматограмма представляет собой ряд пиков, причем количество каждого компонента пропорциональна площади A соответствующего пика.



- Дифференциальная хроматограмма

- При использовании **потокowego детектора** все количество анализируемого компонента успевает однократно зарегистрироваться вне зависимости от скорости пропускания (ПИД - сгорание органических соединений);
- тогда как в **концентрационном детекторе** от скорости зависит число актов регистрации каждой молекулы и, чем больше скорость, тем меньше актов взаимодействия при одном и том же числе молекул (ДТП).
- При измерении площадей пиков потоковые детекторы более предпочтительны из-за независимости их показаний от колебаний давления и расхода.

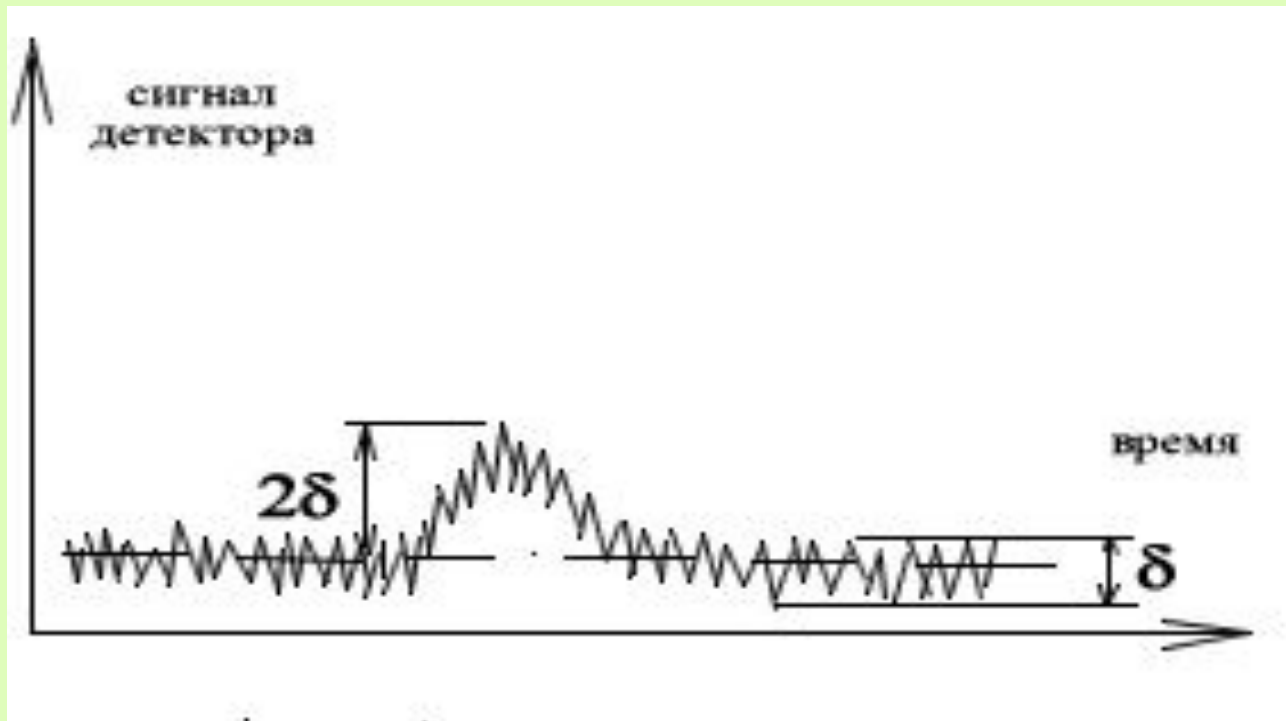
Характеристики детекторов

- **Чувствительность** – характеризует отношение сигнала детектора к количеству вещества.
- От чувствительности зависит выбор величины пробы и возможность использования различных типов колонок.
- Применение высокочувствительных детекторов позволяет уменьшить величину вводимой пробы, что улучшает качество разделения компонентов анализируемой смеси.

- **Предел детектирования** - минимальная концентрация анализируемого вещества в потоке газа-носителя, которая может быть зарегистрирована C_{\min} .
- Для этого нужно знать, какое наименьшее значение сигнала детектора можно измерить, учитывая уровень флуктуационных шумов нулевой линии прибора.
- ***Нулевая линия*** (Base Line). Сигнал детектора, когда из колонки не элюируется вещество.

- Нестабильностями нулевой линии являются дрейф и шумы.
- ***Дрейф нулевой линии*** (Base Line Drift). Любое низкочастотное изменение сигнала детектора.
- Дрейф часто возникает из-за изменений объемной скорости газа-носителя, иногда связанных с дрейфом температуры термостата колонок.
- В анализе с программированием температуры обусловлен уносом неподвижной фазы из колонки.
- Может быть обусловлен элюированием больших количеств очень сильно удерживаемого вещества, введенного задолго до того, как был начат текущий анализ.
- ***Шумы*** (Noise). Высокочастотные флуктуации сигнала нулевой линии детектора.

- Минимальным сигналом E_{min} , поддающимся измерению, принято считать сигнал, амплитуда которого вдвое превышает уровень шумов δ : $E_{min} = 2\delta$.



Наименьший
детектируемый
полезный сигнал

- Концентрация анализируемого вещества, вызывающего этот сигнал, для **концентрационного детектора:**



- $C_{\min} = E_{\min} / R_c = 2 \delta / R_c$, где



- $R_c = A * V * F / qw$, где A -площадь пика,
- V -чувствительность,
- F -скорость газа-носителя, мл/с,
- q -масса компонента,
- w -скорость ленты, см/с.

- Для потокового детектора:

- $C_{\min} = 2 \delta / R_j * F$, где

- $R_j = A * V / q * w$

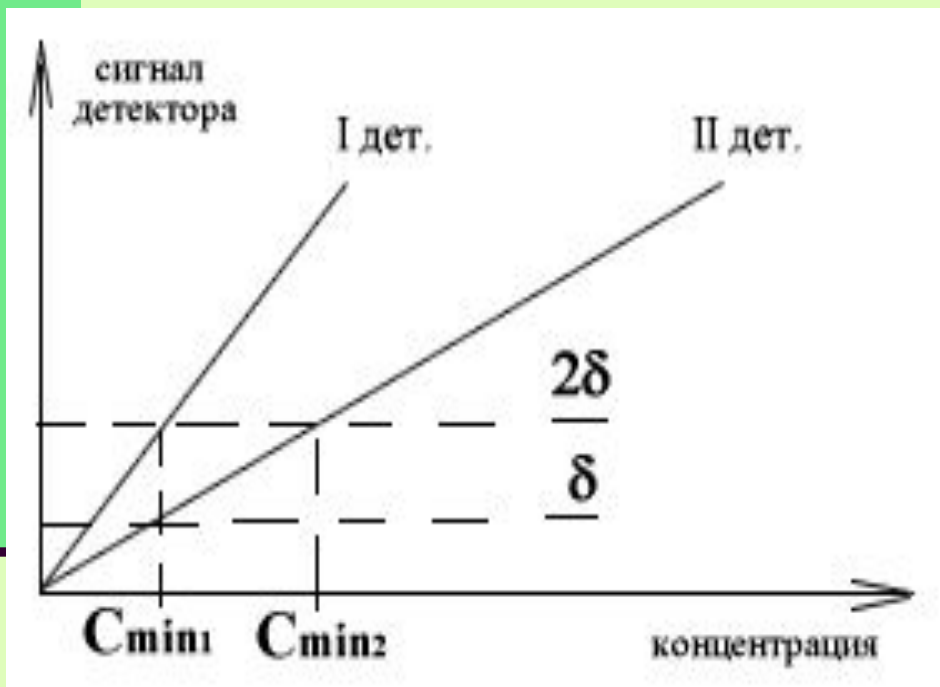
- Предел детектирования наиболее часто выражают в мг/мл; мл/мл; %об.

- В повседневной практике часто путают понятия «чувствительность» и «предел детектирования», понимая под чувствительностью минимальные концентрации, определяемые детектором.

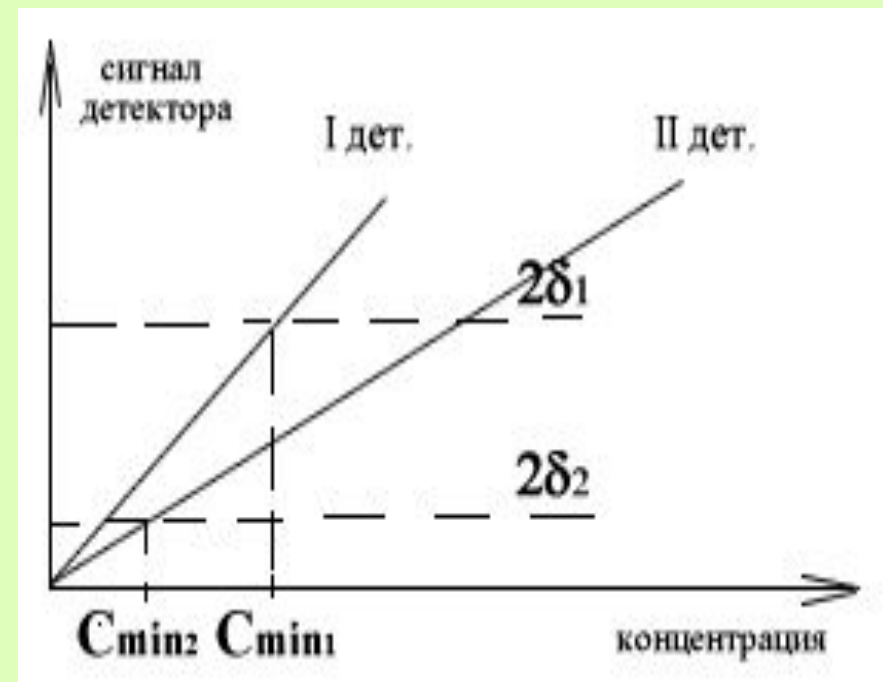
- **Чувствительность** характеризуется наклоном зависимости сигнал детектора - концентрация вещества,

- а **предел детектирования** – отрезком на оси абцисс, соответствующим точке пересечения градуировки с ординатой, равной минимальному сигналу, доступному для измерения (двойной уровень шума 2δ).

- Графически это можно выразить:



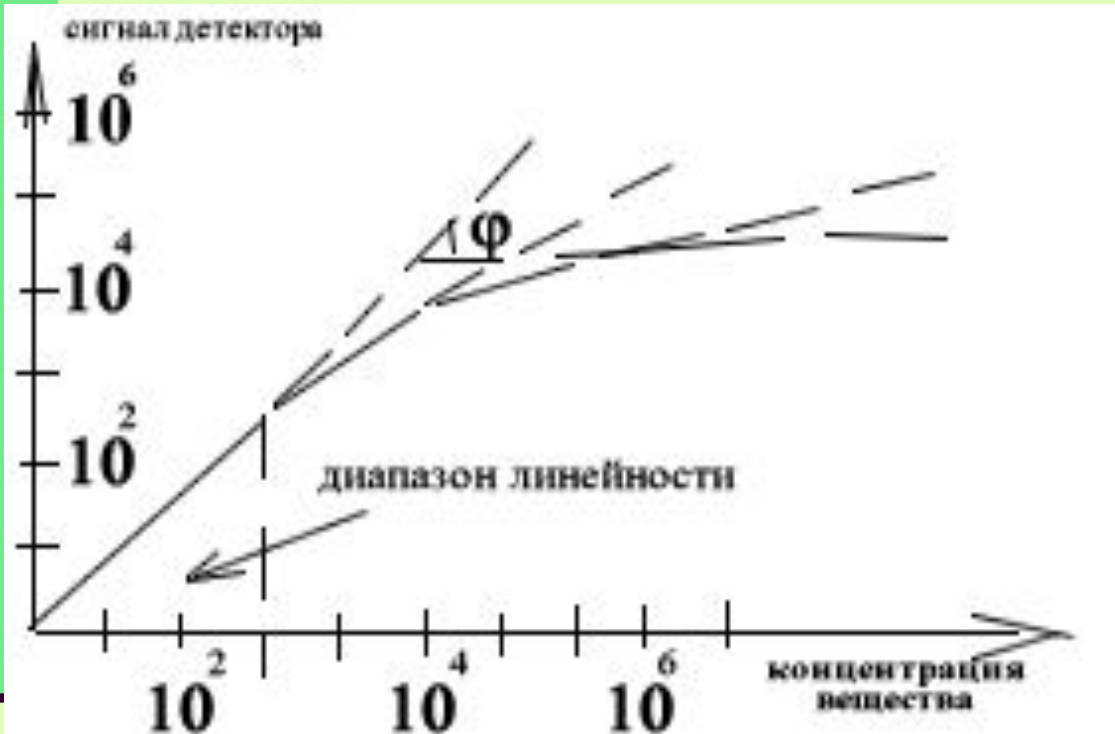
Одинаковый уровень шума



Различный уровень шума

- Предельные возможности хроматографа в отношении измерения малых концентраций могут быть расширены двумя независимыми путями: *увеличением чувствительности и уменьшением шумов.*
- Следует подчеркнуть, что предел детектирования соответствует концентрации вещества в ПФ, а не концентрации анализируемых веществ в пробе при введении в колонку.
- Учитывая процесс размывания пробы нужно иметь ввиду, что практически измеренная минимальная концентрация вещества в пробе, по крайней мере, в 5-10 раз выше предела детектирования.

- **Линейность** – пропорциональность между концентрациями анализируемого вещества на выходе из колонки и сигналом детектора.



Диапазон линейности представляет собой интервал концентраций от предела детектирования до концентраций, при которых наблюдается значительное

отклонение (3-5%) от пропорциональности.

В пределах диапазона линейности чувствительность детектора не зависит от концентрации.

- **Селективность** детектора

определяют по отношению чувствительности одного детектора к двум веществам

- $S = R_a / R_b$

- При этом детектор считается селективным, если его чувствительность для двух веществ различается не меньше, чем на порядок.

-
- **Воспроизводимость** – характеризуется стандартным отклонением серии сигналов при вводе одних и тех же проб.
 - **Стабильность работы** – характеризуется низкой чувствительностью к колебаниям температуры и скорости потока подвижной фазы.

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

- Коэффициент распределения D - описывает равновесие при распределении вещества между неподвижной и подвижной фазами

$$D = c_{\text{неподв}} / c_{\text{подв}} = c_s / c_m ,$$

Для каждого вида хроматографии D имеет свое название:

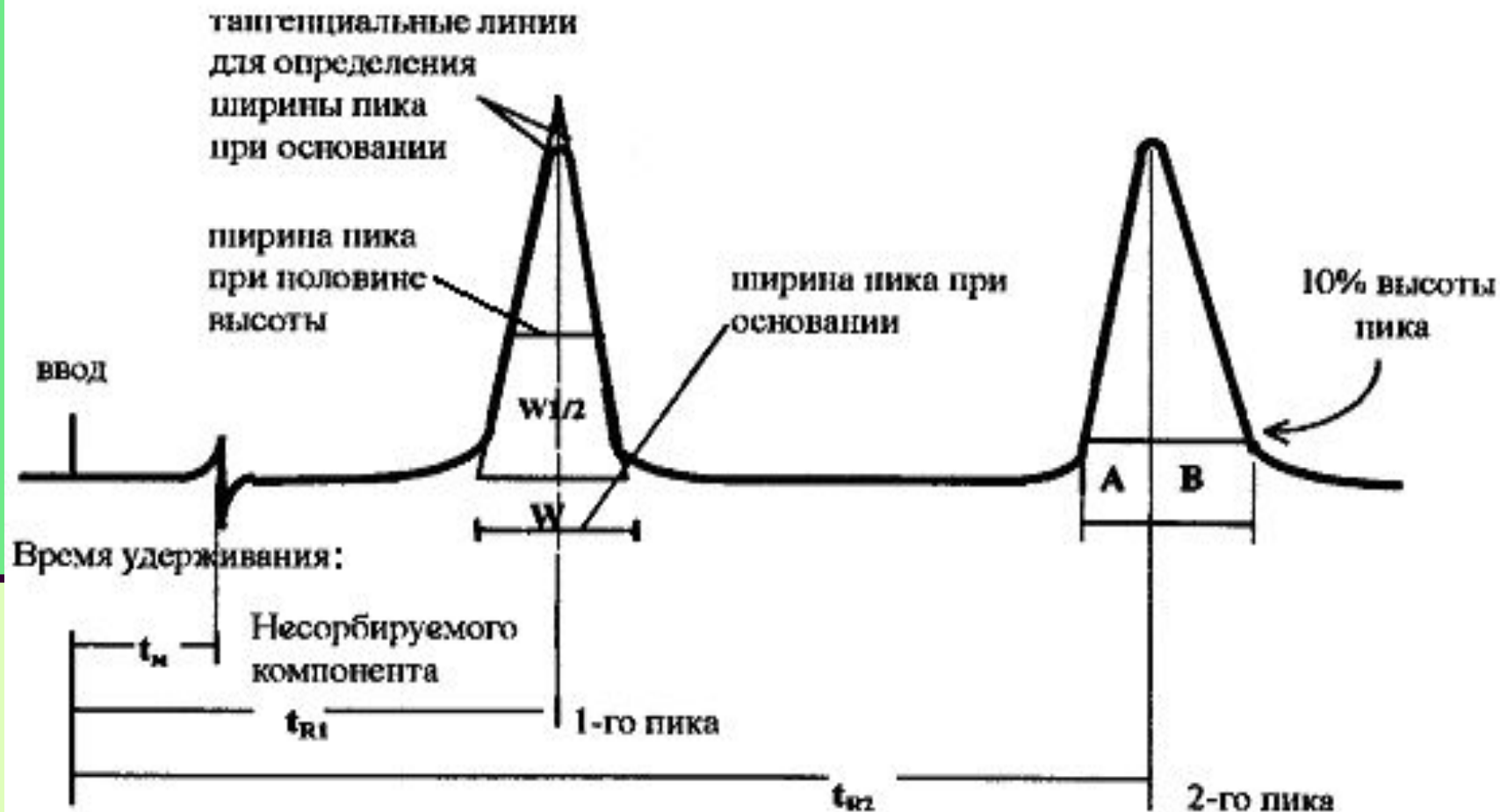
в распределительной и ионообменной – *коэффициент разделения*,

в адсорбционной – *коэффициент адсорбции*,

в гель-фильтрационной – *коэффициент проницаемости*

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики



Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

Характеристики пиков:

- *Время удерживания, ширина и форма*
- **Время удерживания t_R** – время от момента ввода пробы в колонку до появления на выходе из колонки максимума пика
- **Время удерживания складывается:**

$$t_R = t_m + t_s,$$

где t_m – время пребывания в подвижной фазе,
 t_s – время пребывания в неподвижной фазе,
 t_m – *фактически равно времени*
прохождения через колонку несорбируемого
компонента

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

- t_R - не зависит от количества пробы, но зависит от природы вещества и сорбента, а также от упаковки сорбента
- Поэтому для характеристики истинной удерживающей способности применяют исправленное время удерживание t_R'

$$t_R' = t_R - t_m$$

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

- **Объем удерживания $V_R = t_R^* F$,**
- **где F – объемная скорость потока**

- **Исправленный объем удерживания**
- **$V_R' = V_R - V_m$,**
- **где V_m - мертвый объем (объем, необходимый для вымывания несорбируемого компонента) включает объем колонки, незанятой сорбентом**

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

- Коэффициент (индекс) удерживания R показывает долю времени нахождения вещества в подвижной фазе

$$R = t_m/t_R = V_m/V_R$$

- Коэффициент распределения связан с хроматографическими параметрами

$$t_s/t_m = c_s V_s / c_m V_m = D^* V_s / V_m$$

- Так как $R = t_m/t_R = t_m/(t_m + t_s) = 1/(1 + t_s/t_m)$,
то получаем $R = 1/(1 + D^* V_s / V_m) = V_m / (V_m + D V_s)$

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

- Так как $R = V_m/V_R$, то
$$V_R = V_m + DV_s$$
- $D \cdot V_s/V_m$ называют коэффициентом емкости k'
 k' – обычно равен 1 – 5
- k' вычисляют по экспериментальным данным
- $k' = (V_R - V_m)/V_m = V_R'/V_m = t_R'/t_m$
- Коэффициент емкости показывает во сколько раз вещество находится дольше в неподвижной фазе, чем в подвижной

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

- Если k' значительно меньше 1, то вещество слабо удерживается и продвигается по колонке со скоростью практически равной скорости подвижной фазы
- Если $k' > 20$, то на практике это приводит к неприемлемо большим временам удерживания

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

- Исправленный объем удерживания связан с D соотношением

$$V_R' = V_R - V_m = D \cdot V_s \text{ - основное уравнение хроматографии}$$

- V_s – зависит от количества неподвижной фазы (жидкой фазы, нанесенной на единицу объема или массы сорбента), от длины и диаметра колонки

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

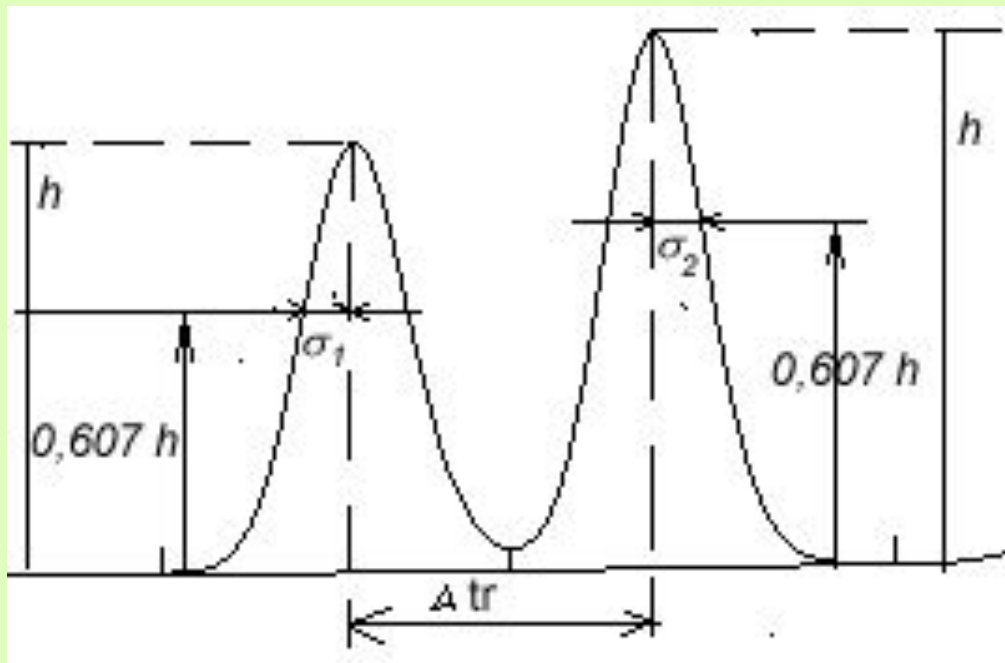
- Коэффициент разделения (селективности) компонентов A и B

$$\alpha = k_B' / k_A' \qquad \alpha = D_A / D_B$$
$$\alpha = (t_R')_B / (t_R')_A$$

- Является мерой разделения двух веществ

Разрешение пиков

- Полнота разделения и правильность определения зависит от того, насколько отделены пики друг от друга, желательно, чтобы они не перекрывались



- Ширина профиля концентрации характеризуется стандартным квадратичным отклонением σ .

Теоретические основы хроматографии

Основные характеристики

- Условия **раздельной** регистрации **концентрационного профиля** двух компонентов:

- Достаточное разделение происходит, если

$$\Delta t_R = 2 (\sigma_1 + \sigma_2);$$

- Перекрытие (наложение) пиков настолько велико, что оба компонента воспринимаются детектором как пик с одним максимумом при $\Delta t_R \leq \sigma_1 + \sigma_2$;

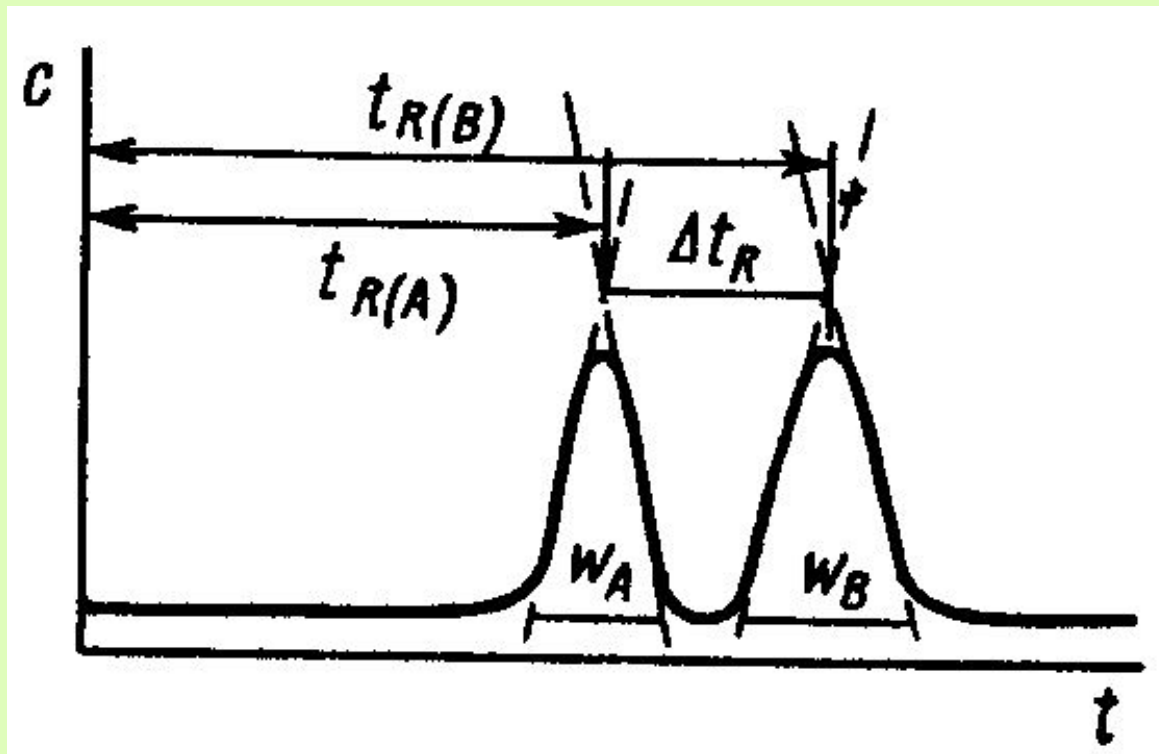
- Практически полное разделение происходит при

$$\Delta t_R \geq 3 (\sigma_1 + \sigma_2).$$

- Для характеристики разделения пиков служит величина, называемая разрешением R_s

$$R_s = (t_{R(A)} - t_{R(B)}) * 2 / (w_A + w_B)$$

- Если $w_A \approx w_B$, то $R_s = \Delta t_R / w$



Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Для объяснения явлений, происходящих при хроматографировании, для расчета длины колонок, положения и формы пиков, для выбора оптимальных условий процессов существует два подхода – теория теоретических тарелок и кинетическая теория
- Теория теоретических тарелок рассматривает процесс хроматографирования как результат совокупности дискретных актов распределения в колонке в целом
- Теоретическая тарелка – абстрактная величина, ее можно представить в виде узкого слоя колонки, в котором достигается равновесие между подвижной и неподвижной фазами

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Мартин и Синг (Нобелевская премия, 1952 г.) ввели понятие высоты, эквивалентной теоретической тарелке H , (ВЭТТ) и число теоретических тарелок N
- Если вещество движется по колонке, это означает, что происходит последовательный переход от одного акта разделения или одного равновесия к другому
- Число теоретических тарелок N рассчитывается как отношение общей длины колонки L к высоте, эквивалентной теоретической тарелке, H :

$$N = L / H$$

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

Высота тарелки и число теоретических тарелок характеризуют эффективность колонки.

Высота, эквивалентная теоретической тарелке, рассчитывается:

$$H = \frac{\sigma_L^2}{L}$$

$$H = \frac{\sigma_t^2 L}{t_R^2}$$

- Дисперсия σ_L^2 , относящаяся к длине колонки, измеряется в см^2 ,
- σ_t^2 , относящаяся к времени удерживания, в с^2 .

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Для ширины у основания $w = 4 \sigma_t$, с учетом этого:

$$H = \frac{w^2 L}{16 t_R^2}$$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{b_{1/2}} \right)^2$$

- Разрешение, с использованием выражения для расчета числа теоретических тарелок, описывается уравнением:

$$R_S = \frac{t_R^A - t_R^B}{t_R^B} \frac{\sqrt{N}}{4}$$

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Если коэффициенты емкости близки, то часто используется уравнение в упрощенной форме:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} (\alpha - 1) \frac{k'}{1 + k'}$$

- Если известно разрешение, то зная коэффициент селективности и коэффициент емкости для компонента В:

$$N = 16R_S^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2$$

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Однако теория теоретических тарелок не позволяет выявить зависимости N и H от скорости подачи подвижной фазы, природы и дисперсии сорбента, не позволяет определить причины размывания пиков
- С позиций кинетической теории вполне объяснима форма пиков в виде гауссовой кривой

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Хроматограмма отражает статистическое поведение множества молекул, а не индивидуальной молекулы.
- Из-за случайного стечения обстоятельств одни молекулы могут передвигаться с несколько более высокими скоростями, чем другие
- Поэтому наблюдаются отклонения от среднего значения скорости движения в ту или иную сторону, что выражается кривой распределения
- Форма пика отражает поведение усредненной молекулы

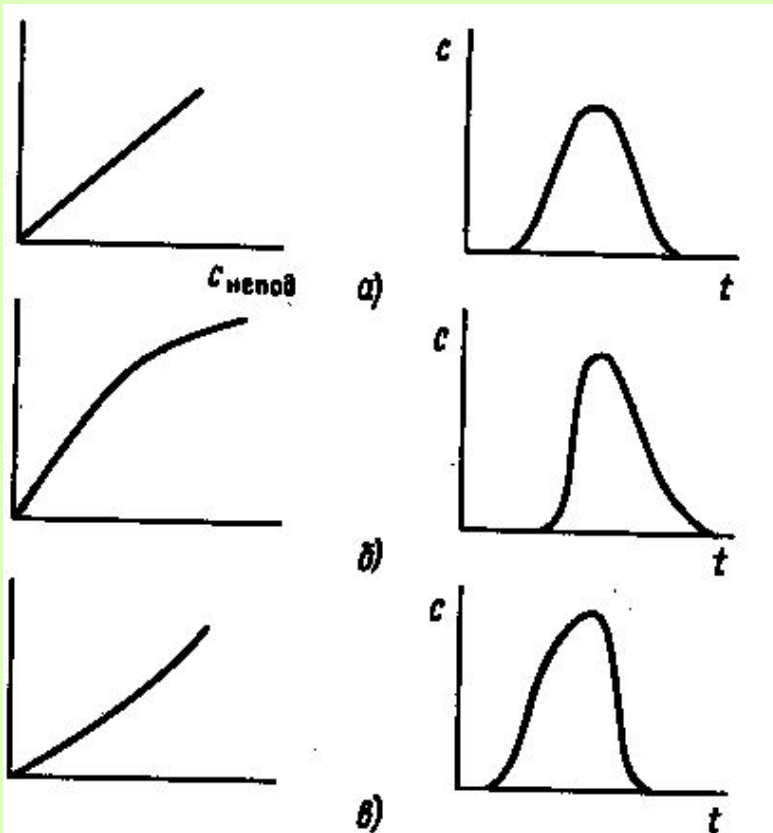
Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Теоретический подход, объясняющий размывание пиков, основан на изучении форм изотерм сорбции – графической зависимости количества вещества в неподвижной фазе c_s от его концентрации в подвижной фазе c_m при $T = \text{const}$
- Угол наклона изотермы равен $D = dc_s / dc_m$
- Если изотерма линейна – пик симметричен, $D = \text{const}$. Концентрация вещества максимальна в центре зоны и симметрично убывает по краям. Каждый компонент перемещается с постоянной скоростью, с такой же скоростью перемещается вся зона (рис. а).
- *На практике - когда количества вводимых веществ малы изотерма линейна*

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии



Связь формы пика и характера изотермы сорбции

- Выпуклая изотерма свидетельствует о том, что значение D для больших концентраций веществ меньше, чем для малых. Поэтому часть зоны с большей концентрацией перемещается быстрее, чем часть зоны с малой концентрацией. В результате пик размыт со стороны тыла (рис. б).
- Вогнутая изотерма – размыт фронт зоны, пик несимметричен (рис. в).

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- *Обычно работают в областях, характеризующихся линейной изотермой.*
- На продвижение частиц влияет ряд факторов, искажающих форму пика и снижающих эффективность колонки:
- структура неподвижной фазы (размеры гранул, их однородность, плотность и равномерность заполнения колонки);
- скорость установления равновесия сорбции-десорбции (массообмен);
- диффузия молекул из зоны большей концентрации в зону меньшей концентрации.

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Влияние этих факторов на эффективность колонки учитывает кинетическая теория, разработанная Ван-Деемтером.
- Согласно этой теории размывание пиков обусловлено тремя независимыми вкладками, учитывающими неравномерность потока

$$H = A + B/v + Cv,$$

где A – слагаемое, учитывающее вихревую диффузию,

B/v – молекулярную диффузию,

Cv – отклонения от сорбционного равновесия (сопротивление массопереносу),

v – скорость потока.

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- **Вихревая диффузия** связана со структурой сорбента и изменяется по длине колонки.
A – описывает расстояние, проходимое потоком подвижной фазы до того, как его скорость значительно изменяется под действием сорбента;
- $A = 2 \lambda d_p$, где λ - коэффициент гомогенной упаковки колонки (0,8-0,1);
- плохая упаковка приводит к увеличению λ и уширению полосы вихревой диффузии. Поэтому колонку необходимо заполнять мелким и однородным сорбентом;
- A – не зависит от скорости потока.

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

Молекулярная (продольная) диффузия

обуславливает размывание полос из-за миграции молекул в подвижной фазе из участков с большей концентрацией в сторону участков с меньшей концентрацией.

- $V = 2\gamma D_m / v$, где γ – коэффициент, учитывающий ограниченность движения диффузии в наполненной колонке ($\gamma < 1$),
- D_m - коэффициент диффузии вещества.
- Эффективность колонки выше при применении мелких и однородных сорбентов.

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- D_m в жидкости значительно ниже, чем в газе, поэтому массообмен в жидкостной хроматографии и V не имеет большого значения при скоростях потока, используемых в ЖХ, однако, в ГХ он очень важен
- Влияние продольной диффузии на высоту H обратно пропорционально линейной скорости подвижной фазы

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- *Диффузия уменьшается при увеличении линейной скорости подвижной фазы,*
- *H – уменьшается при увеличении линейной скорости из-за эффектов массопереноса*
- **Этот эффект возникает потому, что для массопереноса между фазами требуется конечное время.**
- **В проточной системе недостаточно времени для достижения состояния равновесия, так что уменьшение массопереноса становится более очевидным при увеличении скорости потока**

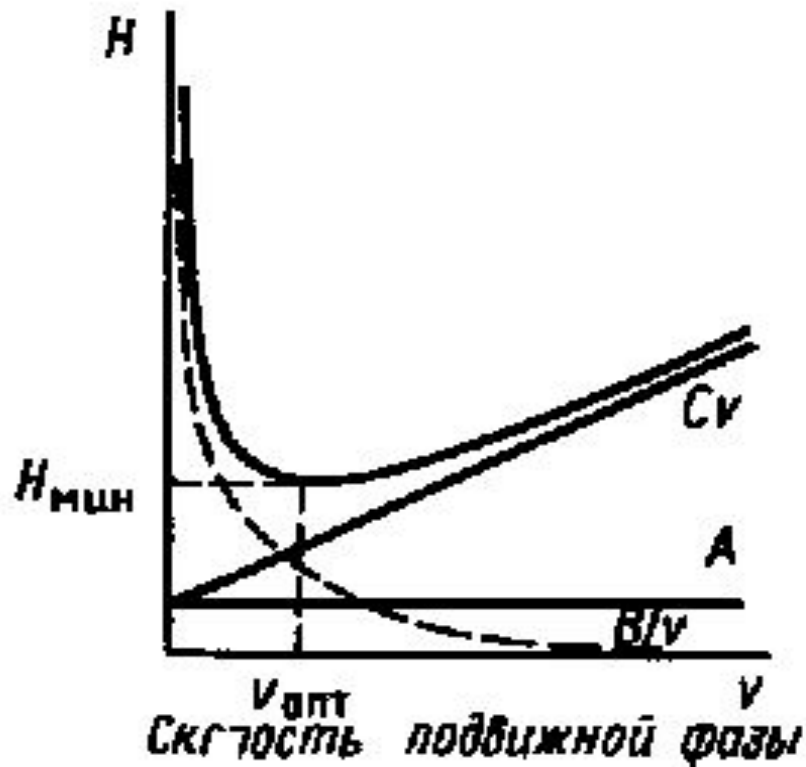
Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Сопротивление массопереносу C_v учитывает размывание пика за счет сопротивления массопереносу при непрерывном переходе вещества из подвижной фазы в неподвижную и обратно, т.е. характеризует распределение вещества между двумя фазами.
- $C_v = C_s v + C_m v$, где C_s и C_m – коэффициенты массопереноса в неподвижной и подвижной фазах соответственно.

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии



Графическое представление уравнения Ван-Деметера

Приравнивая к нулю dH/dv , получаем скорость, отвечающую минимальному значению H : $v_{\text{опт}} = \sqrt{B/C}$

Откуда: $\hat{I} \hat{i} \hat{e} \hat{i} = \hat{A} + 2\sqrt{\hat{A}/\hat{N}}$

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- Эффективное разделение за более короткое время достигается при небольшой высоте тарелки H .
- H_{\min} – достигается:
 - Малым размером твердых частиц или малой толщиной жидкого покрытия неподвижной фазы;
 - Гомогенной упаковкой неподвижной фазы с выравненным размером частиц;
 - Малым диаметром колонки;
 - Большими коэффициентами диффузии в неподвижной фазе и малыми коэффициентами диффузии в подвижной фазе.

Теоретические основы хроматографии

Теория хроматографии

- В ГХ коэффициенты диффузии в подвижной фазе могут быть значительно уменьшены снижением температуры.
- Поскольку коэффициенты диффузии для различных размеров молекул различаются, размывание пиков также зависит от относительной молекулярной массы.
- Малые молекулярные массы разделяемых веществ также способствуют повышению эффективности колонки.

Анализ и методы расчета хроматограмм

- Количественный анализ основан на зависимости между площадью S (или высотой h) пика и количеством определяемого компонента в пробе.

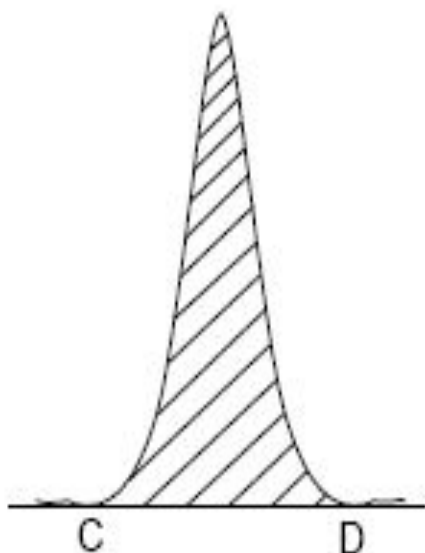


Рисунок 24 – Определение площади пика

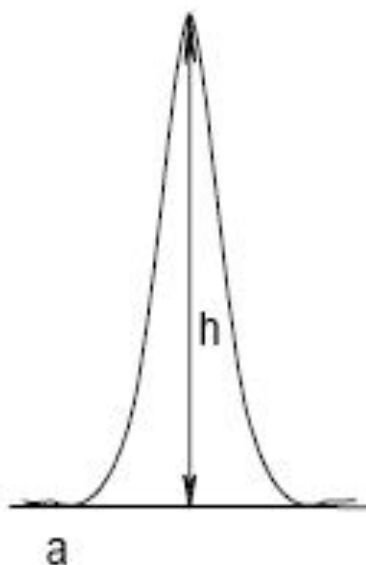


Рисунок 25 – Определение высоты пика:
а) при отсутствии дрейфа нулевой линии;
б) при дрейфе нулевой линии.

Анализ и методы расчета хроматограмм

- $[S]=[мм^2];[A*с];[B*с]$
- $[h]=[мм]$

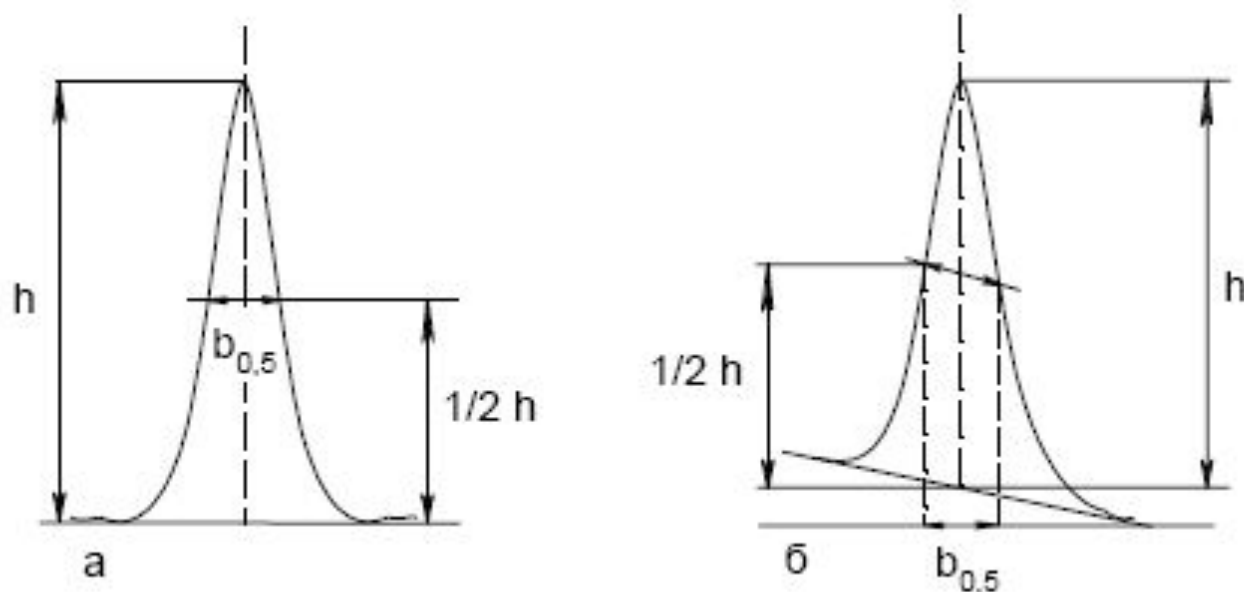


Рисунок 26 – Определение ширины пика:

а) при отсутствии дрейфа нулевой линии; б) при дрейфе нулевой линии.

Анализ и методы расчета хроматограмм

- Наиболее просто измеряются и рассчитываются параметры гауссовых пиков.
- Контур этих пиков описывается уравнением:

$$y = h \cdot \exp^{-x^2/2\sigma^2} = S \cdot \frac{\exp\left[-\frac{1}{2} \cdot \left(\frac{x}{\sigma}\right)^2\right]}{\sigma} \cdot \sqrt{2\pi}$$

где x , y – координаты точки контура пика; h и S – высота и площадь пика, отвечающая максимальной концентрации компонента в зоне; σ – стандартное отклонение, которое отвечает ширине пика на высоте $0,882 h$.

Анализ и методы расчета хроматограмм

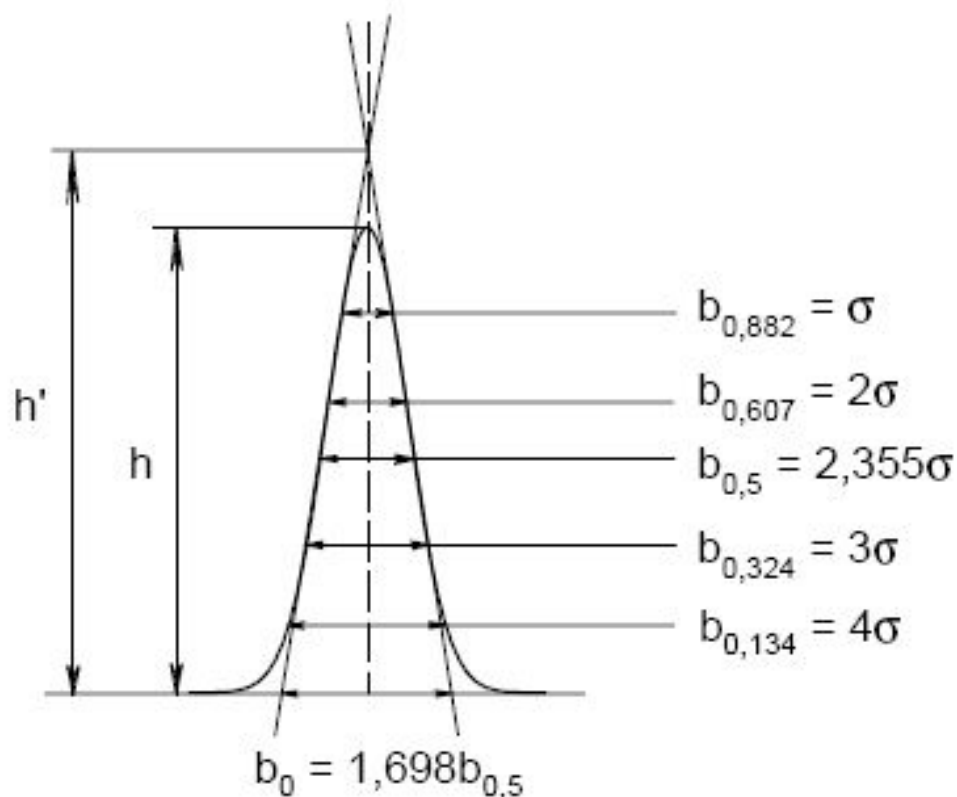


Рисунок 27 – Свойства гауссовского пика:

σ – стандартное отклонение; h – высота пика; h' – высота описанного треугольника

Анализ и методы расчета хроматограмм

- Расчет площади пика как площади, ограниченной гауссовой кривой (для симметричных пиков), проводят по формуле, полученной интегрированием гауссовой функции:

$$S = \sqrt{2\pi} \cdot \sigma \cdot h = 2,507 \cdot \sigma \cdot h = 1,064 \cdot h \cdot b_{0,5}$$

- Пик считается гауссовым если:
 - $b_{0,5} = 1.67-1.73$ - критерий Эттре

Анализ и методы расчета хроматограмм

- Ассиметричность пика может быть вызвана:
 - 1. Перегрузкой колонки анализируемым веществом (рис. а);
 - 2. Наличием остаточной адсорбционной активности твердого носителя (рис. б).

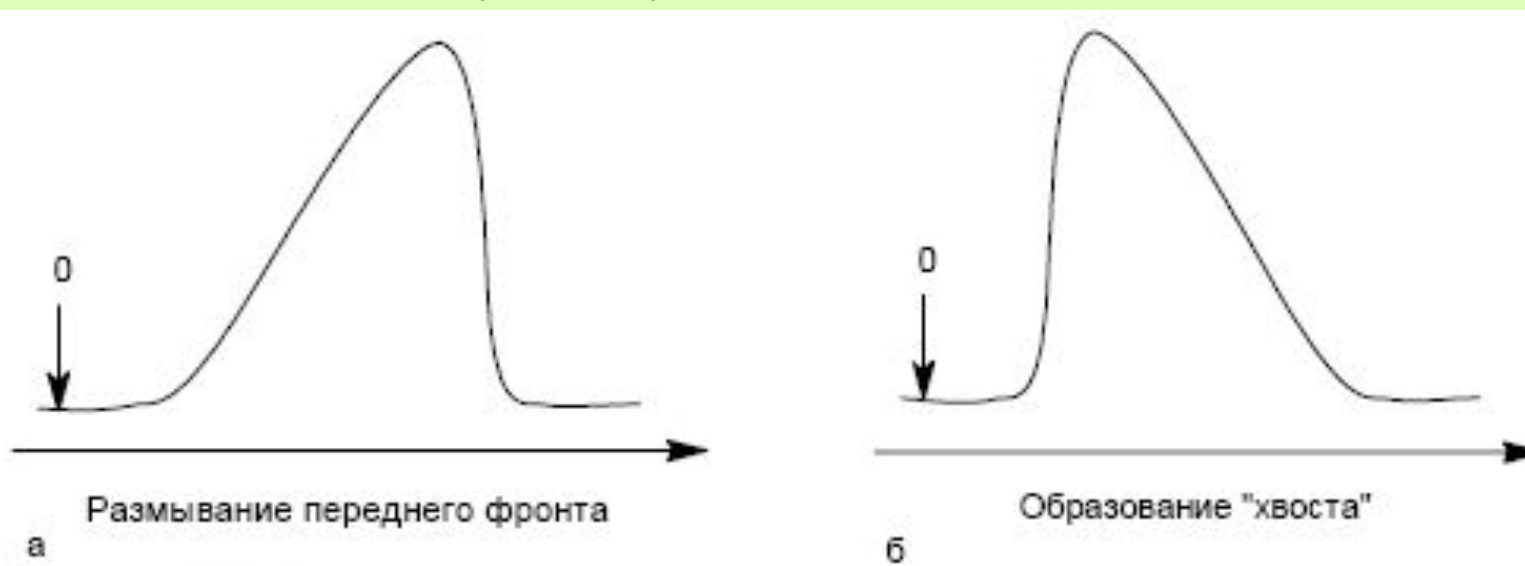


Рисунок 28 – Ассиметричность пика, вызванная:

а – перегрузкой колонки; б – остаточной адсорбционной активностью

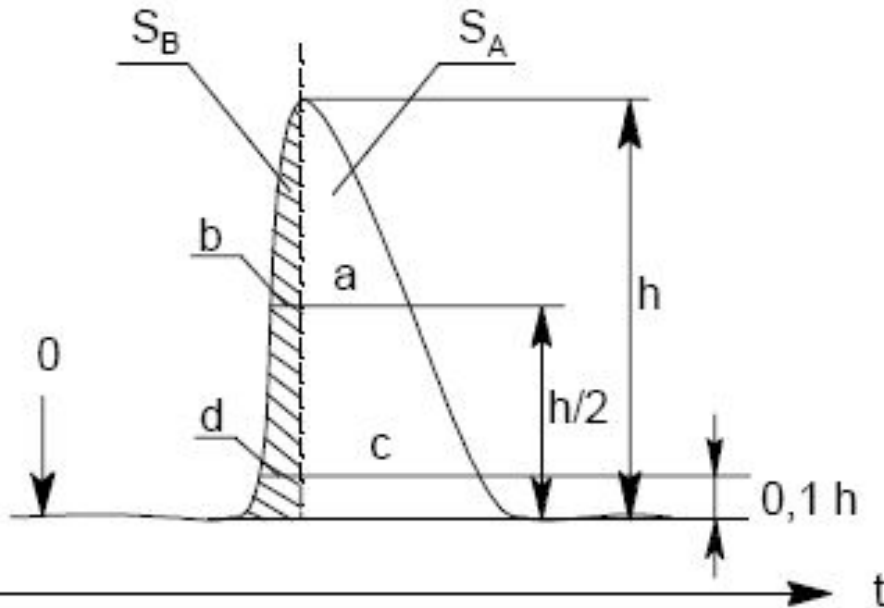
Анализ и методы расчета хроматограмм

- Для численного выражения асимметрии используют коэффициент асимметрии:

$$K_{as} = \frac{S_A}{S_B}$$

$$K_{as0,1} = \frac{c}{d}$$

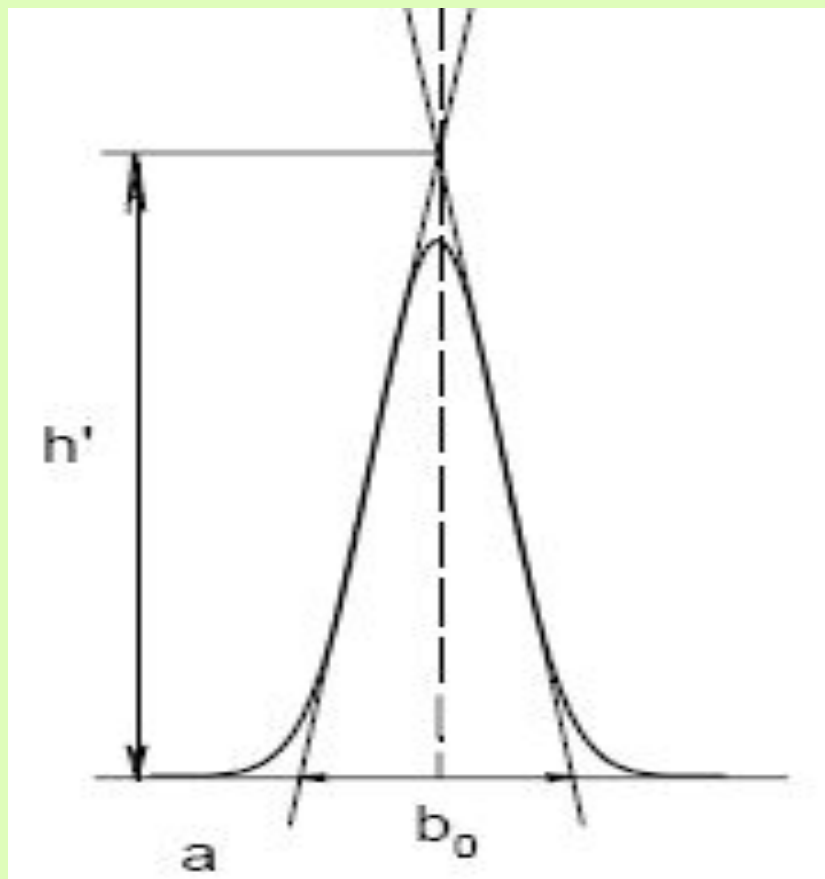
$$K_{as} = \frac{a}{b}$$



- Для симметричного пика: $K_{as} = 1$
- При остаточной адсорбции: $K_{as} > 1$
- При “перегрузочных пиках”: $K_{as} < 1$
- Допустимое значение $K_{as} = 0,7-1,5$.

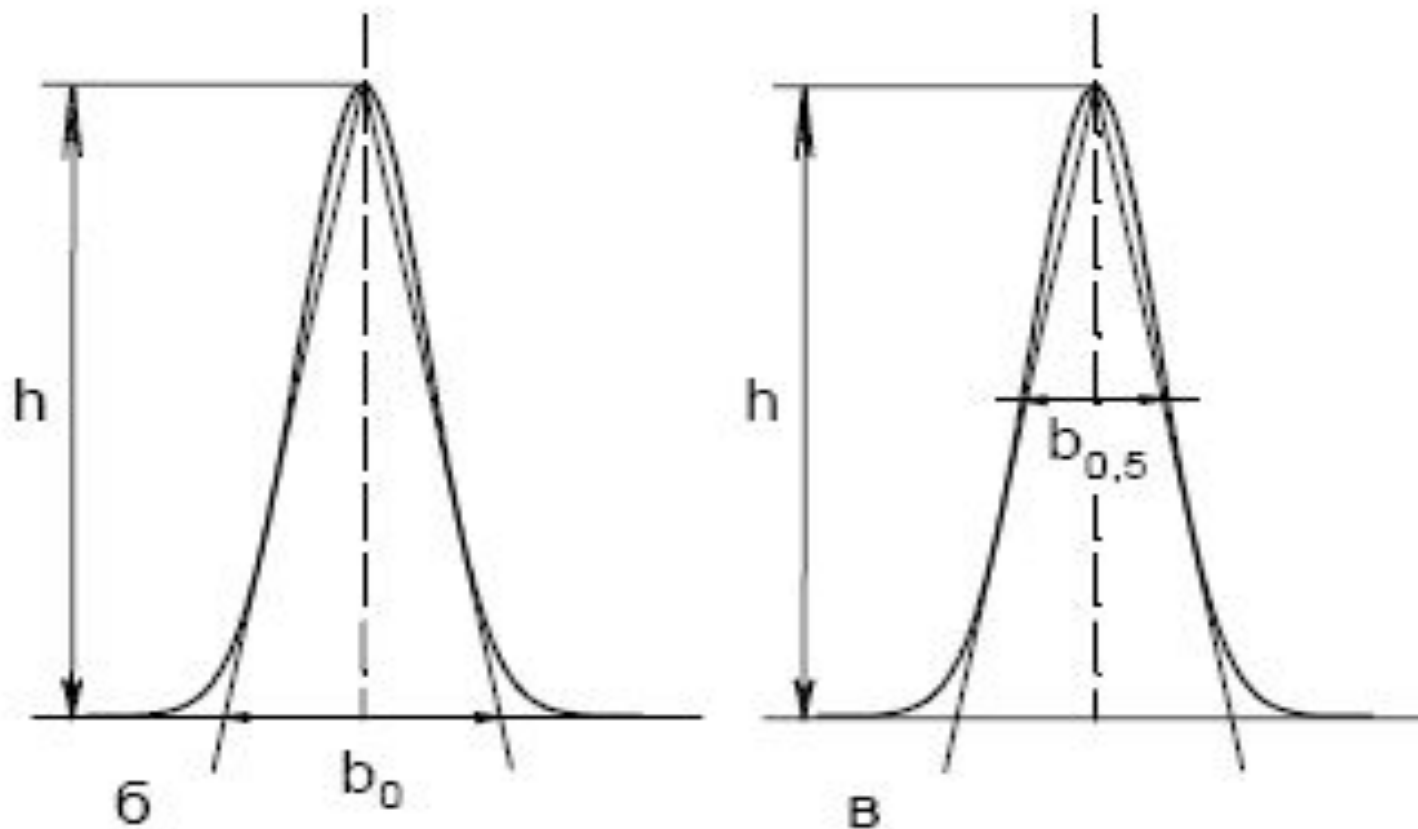
Измерение площадей гауссовых пиков

Методы триангуляции



- a). $S = 1/2 \cdot h' \cdot b_0$
- Метод дает 96,8% от площади гауссова пика.
- Недостатки:
- дополнительные геометрические построения, которые не всегда могут быть выполнены точно

Анализ и методы расчета хроматограмм



- б). $S = 1/2 \cdot h \cdot b_0$
- в). $S = h \cdot b_{0,5}$
- Метод дает 80% от площади гауссова пика.
- Находят 93,9% от площади гауссова пика.

Анализ и методы расчета хроматограмм

- Истинная площадь гауссова пика может быть найдена:
 - $S_{\text{ист}} = h \cdot b_{0.368}$

Анализ и методы расчета хроматограмм

Количественный состав пробы определяют:

- **Методом нормировки (внутренней нормализации)**
- **Методом внешней стандартизации (абсолютной градуировки)**
- **Методом внутренней стандартизации (нормализации)**

Анализ и методы расчета хроматограмм

- **Метод нормировки** применяется наиболее часто.
- Для его применения необходимо, чтобы на хроматограмме были зарегистрированы все компоненты, входящие в состав анализируемой смеси.
- Доля площади пика соответствует содержанию компонента в мас. %.

Анализ и методы расчета хроматограмм

- При анализе смеси трех компонентов, относительное содержание компонентов рассчитывают

- $$X, \% = 100 \% * S_x / (S_x + S_y + S_z)$$

- при условии одинаковой чувствительности детектора к каждому из разделяемых компонентов

Анализ и методы расчета хроматограмм

- Если чувствительность детектора различна по отношению к каждому компоненту пробы, то используют поправочные коэффициенты f :

$$x, \% = 100 \% * S_x * f_x / \sum S_n * f_n$$

- Поправочные коэффициенты получают при анализе стандартных серий и рассчитывают по формуле:

$$f_x = f_{ст} * S_{ст} * c_x / S_x * c_{ст}$$

Анализ и методы расчета хроматограмм

Метод внешней стандартизации (абсолютной градуировки)

- **Используют при определении отдельных веществ в простых смесях, при определении микропримесей**
- **Метод предполагает построение градуировочного графика по стандартным смесям, как и в других методах анализа**

Анализ и методы расчета хроматограмм

- **Метод внутренней стандартизации** применяют при отсутствии на хроматограмме пиков некоторых компонентов смеси
- Метод основан на том, что в анализируемую смесь вводят определенное количество стандартного вещества. Это вещество должно быть инертным, отсутствовать в пробе и полностью отделяться от других компонентов смеси, t_R должно быть близким к t_R определяемого вещества, пик симметричным

Анализ и методы расчета хроматограмм

$$C_i = k * C_{ст} * S_i / S_{ст};$$

$$x\% = 100 \% * k * r * S_i / S_{ст}$$

- Поправочный коэффициент k рассчитывают по стандартной смеси внутреннего стандарта и определяемого соединения:

$$k = S_{ст} * C_x / S_x * C_{ст};$$

$$r = m_{ст} / m_{пробы}$$

Анализ и методы расчета хроматограмм

Качественный анализ

- Время удерживания, объем удерживания - характеризуют природу анализируемого вещества

Идентификация по времени удерживания

- Совпадение величин удерживания неизвестного и стандартного соединения свидетельствует об идентичности этих веществ
- При использовании данных, полученных на разных хроматографах (или справочных данных), более надежна идентификация по исправленному времени удерживания t_R' .

Анализ и методы расчета хроматограмм

Идентификация по относительному времени удерживания

- Часто для идентификации используют величину относительного удерживания, зависящую только от состава подвижной и неподвижной фаз:

$$t_{\text{отн}} = t_R' / t_{R,\text{ст}}$$
$$V_{\text{отн}} = V_R' / V_{R,\text{ст}}$$

Анализ и методы расчета хроматограмм

Идентификация по индексам удерживания Ковача

- За стандарт берут два соседних алкана, один из которых элюируется до, а второй после исследуемого соединения
 - $t_{R(z)}' < t_{R(x)}' < t_{R(z+1)}'$,
- где z – число атомов углерода в алкане.

$$I = 100 (\lg t_{R(x)}' - \lg t_{R(z)}') / (\lg t_{R(z+1)}' - \lg t_{R(z)}') + 100z$$

Анализ и методы расчета хроматограмм

Идентификация по линейным зависимостям параметров удерживания в гомологическом ряду органических соединений:

$$\begin{aligned} \lg V_R' &= A + Bz \\ \lg V_R' &= A + B T_{\text{кип}} \end{aligned}$$

A и B – константы, зависящие от условий анализа,

z - число углеродных атомов,

$T_{\text{кип}}$ – температура кипения.

Иногда для идентификации используют химические реакции до или после хроматографирования (реакционная хроматография).

Погрешности хроматографических измерений

- **Отбор проб**
- **Пробоподготовка**
- **Негомогенность пробы**
- **Приборная погрешность (нелинейность детектора, разная чувствительность к отдельным компонентам пробы)**
- **Обработка хроматограмм**

Наибольшую погрешность вносят процедуры *отбора пробы* и *измерение площади пиков*