

**Лектор: к.т.н., доцент РОМАНОВА ИРИНА
ПЕТРОВНА**

**Аналитическая химия и физико-химические
методы анализа**

**ЛЕКЦИЯ 7:
Хроматографические методы анализа.**

- .Хроматографические методы анализа.
- .Особенности проведения хроматографии.
- .Хроматографические параметры.

Основные преимущества хроматографии как аналитического метода

- Высочайшая селективность
- Воспроизводимость результатов
- Многокомпонентность анализа
- Низкие пределы обнаружения (*0.1 мкг/л*)
- Широкий диапазон линейности (*1-1000 мкг/л*)
- Малый расход пробы (*< 1 мл*)
- Экспрессность анализа
- Простота эксплуатации и возможность полной автоматизации

Хроматография как метод разделения, идентификации и определения

В основе хроматографии лежит процесс распределения разделяемых компонентов между двумя несмешивающимися фазами.

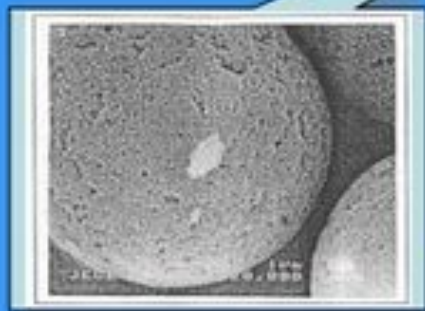
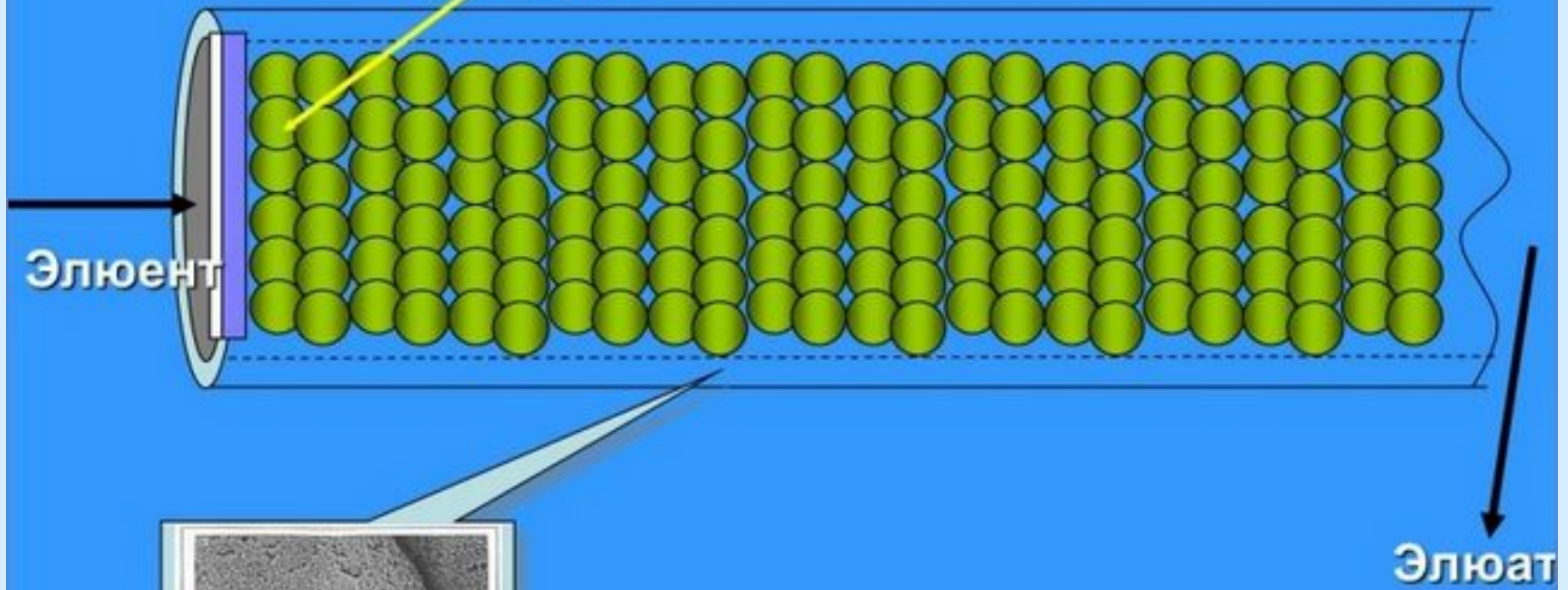
Пробу вводят в **подвижную фазу** (газ или жидкость), которая движется относительно **неподвижной фазы** (твердое вещество (сорбент) или жидкость, закрепленная на твердом носителе), находящейся в колонке или на плоскости.

ЭЛЮЕНТ – подвижная фаза, предназначенная для прокачки анализируемой смеси через хроматографическую колонку.

ЭЛЮАТ – подвижная фаза, выходящая из хроматографической колонки и содержащая разделенные компоненты.

Процесс разделения

Сорбат



Сорбент

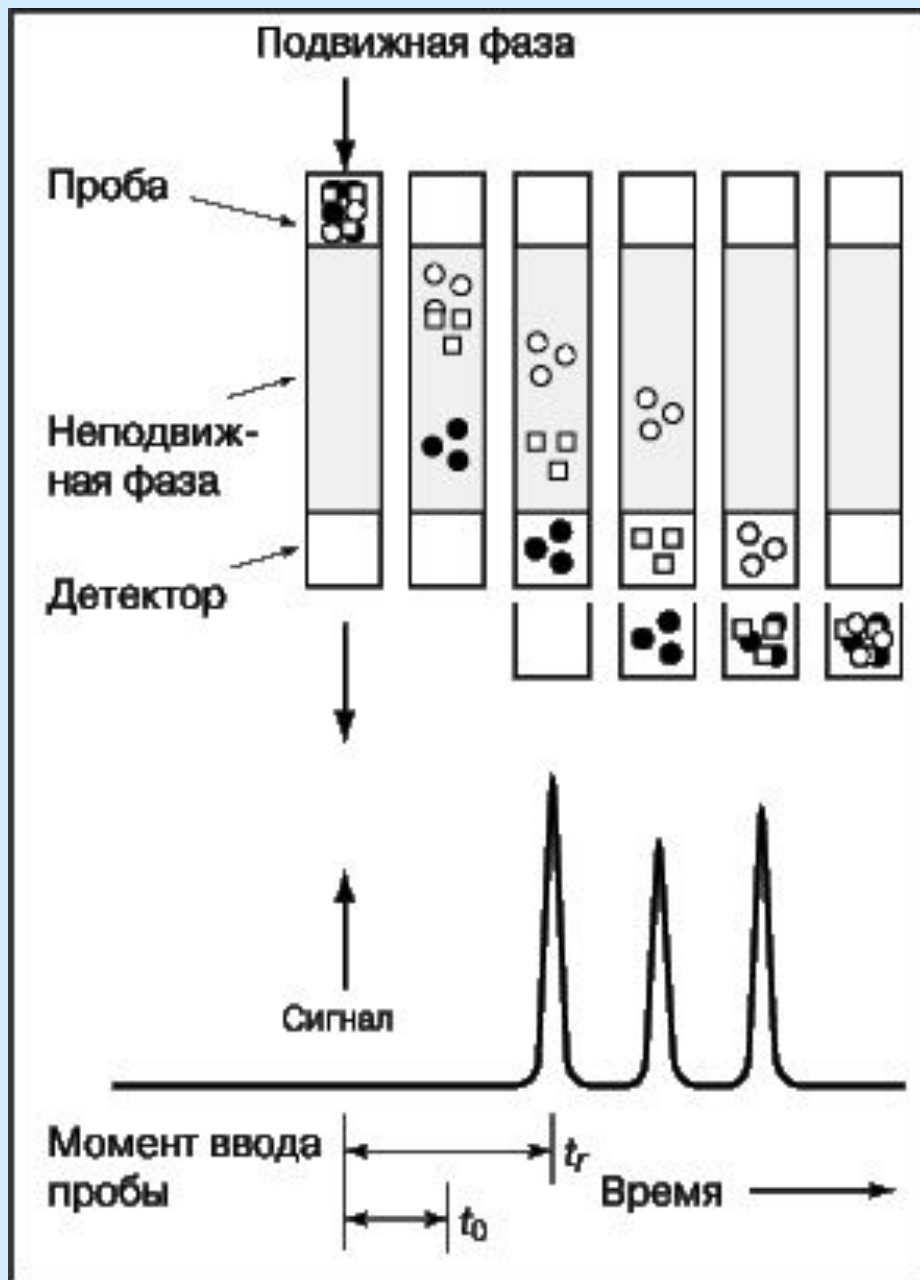
Сорбция - поглощение твёрдым телом либо жидкостью (**сорбент**) различных веществ из окружающей среды (**сорбат**).

Процесс сорбции обратим, и в каждой точке поверхности раздела фаз происходит многократное повторение равновесных актов **сорбции-десорбции**.

Сродство компонента к неподвижной фазе характеризуется **коэффициентом распределения**.

Чем больше сродство компонента к неподвижной фазе, тем меньше времени он находится в состоянии движения, а значит движется с меньшей средней скоростью. Поэтому при достаточно большом времени движения компоненты разделяются (динамическая сорбция).

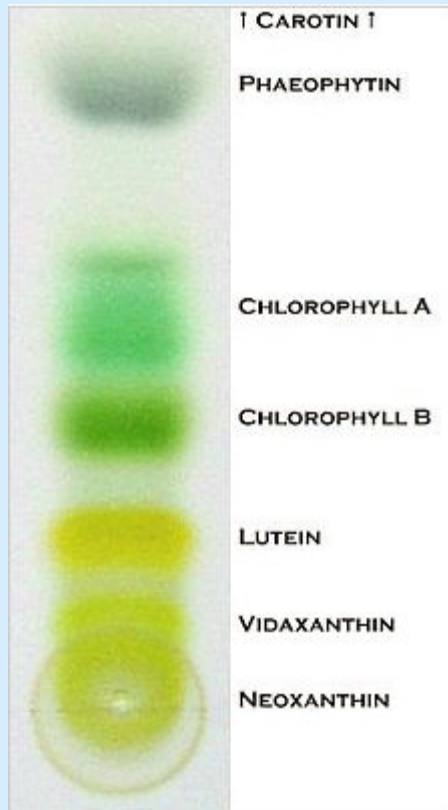
Принцип хроматографического разделения веществ



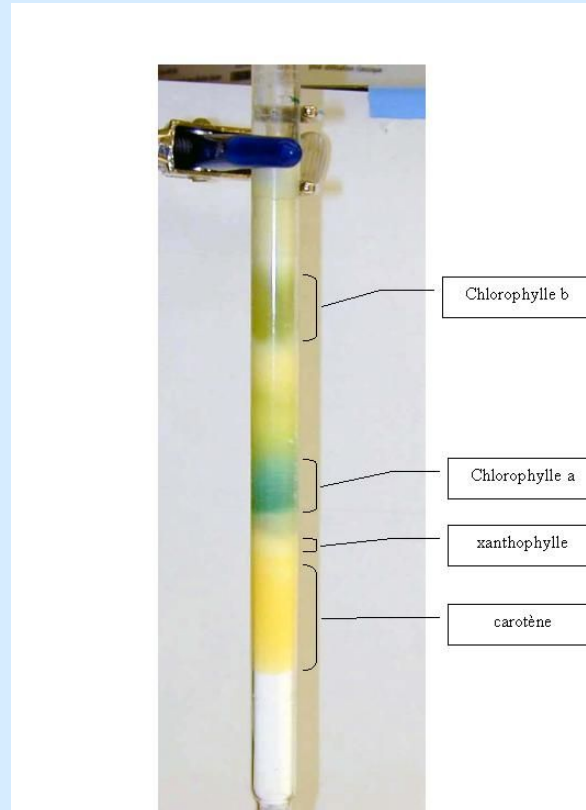
Хроматограмма - зависимость аналитического сигнала от времени или объема подвижной фазы.

Внутренняя хроматограмма – распределение разделяемых веществ в виде отдельных зон вдоль колонки.

Внешняя хроматограмма - графическое изображение распределения веществ в элюате.

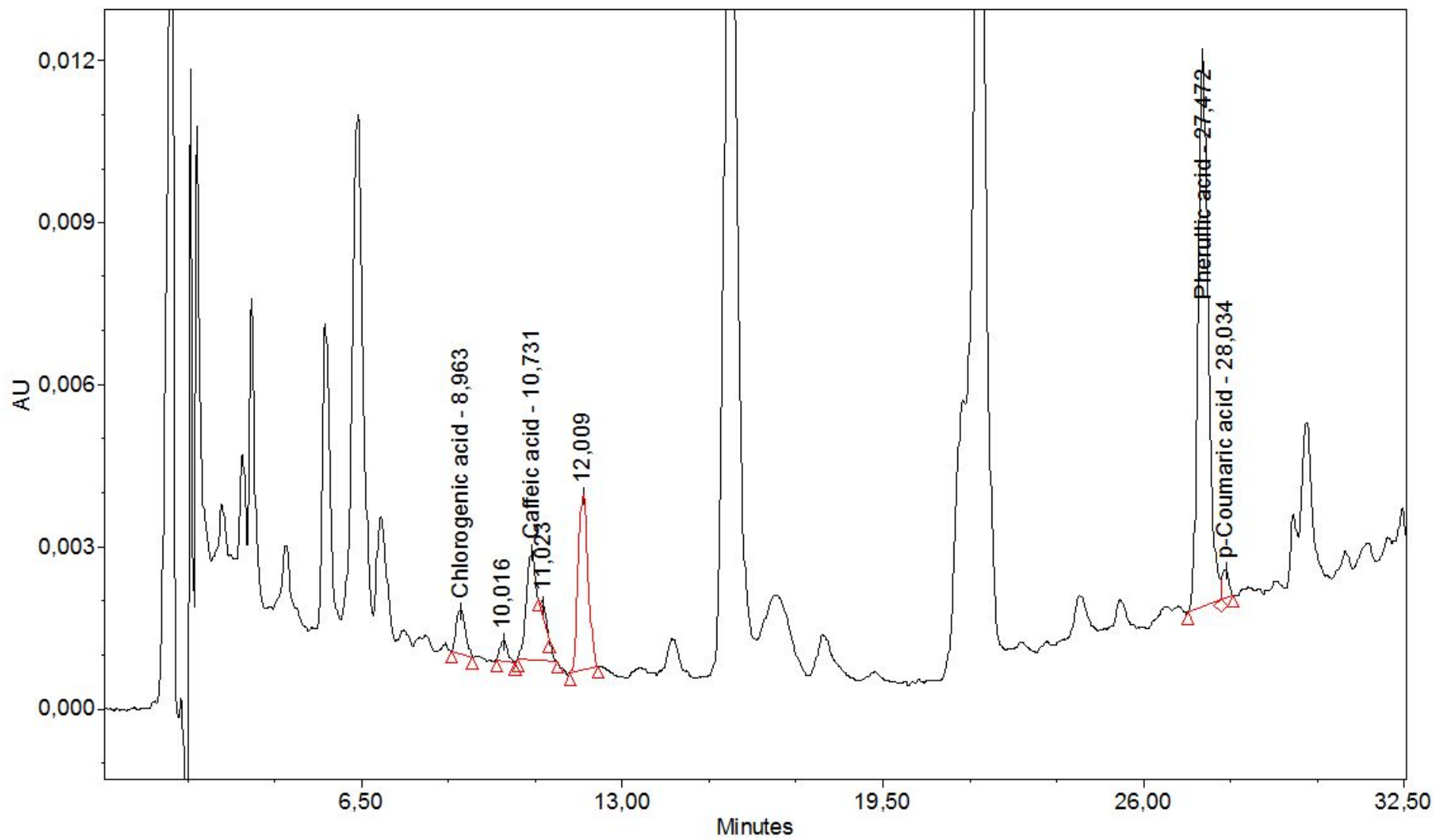


Хроматограмма зелёного пигмента растений.



La chlorophylle a est bleu-vert et la chlorophylle b est jaune verte.
La xanthophylle a une couleur jaune
La carotène, une couleur orange jaune





Экспериментальные данные, получаемые непосредственно из хроматограммы:

Мертвое время (t_m). Время удерживания инертного вещества, не сорбирующегося на НФ, то есть время, затрачиваемое молекулой газа–носителя на прохождение колонки.

Время удерживания (t_R). Это время между вводом пробы и появлением на выходе из колонки максимальной концентрации зоны соответствующего вещества.

Качественный анализ: время удерживания одного компонента при одинаковых условиях хроматографирования – постоянная величина.

Условия хроматографии, влияющие на время удерживания:

- **тип колонки;**
- **состав подвижной фазы;**
- **скорость потока подвижной фазы;**
- **температура**

Исправленное время удерживания (t_R')

$$t_R' = t_R - t_m$$

Удерживаемый объем (V_R)

$$V_R = F * t_R$$

где F (см³/с) - объемная скорость потока газа-носителя

Мертвый объем (V_m) - объем для вымывания

несорбируемого компонента, включает в себя объем колонки
объем коммуникаций от устройства ввода пробы до колонки и
от колонки до детектора и объем, не занятый сорбентом.

Исправленный удерживаемый объем (V_R')

$$V_m = F * t_m$$

Коэффициент удерживания (задержания) R

$$R = \frac{V_R}{V_m} = \frac{t_R - t_m}{t_m}$$

Для неударживаемого вещества $R = 1$

$$R = \frac{t_R}{t_m} = \frac{V_R}{V_m},$$

Пример 1. Скорость потока газа-носителя гелия составляет 20 мл/мин. Определить удерживаемый объем, исправленный удерживаемый объем и коэффициент удерживания оксида углерода СО на данной колонке, если время удерживания гелия 0,6 мин, оксида углерода – 6 мин.

Решение. $V_m = 20 * 0,6 = 12$ $V_R = 20 * 6 = 120$

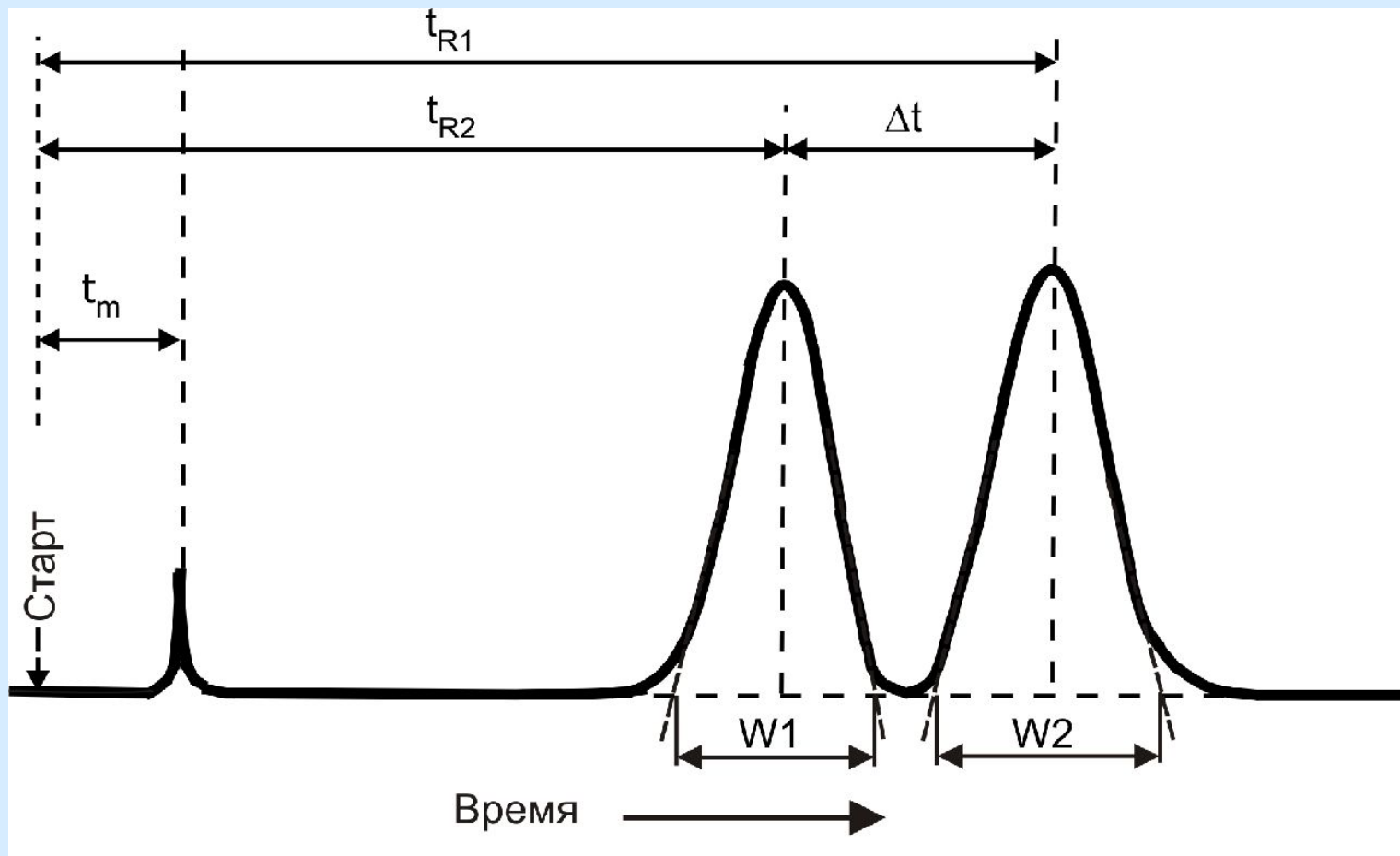
$$V'_R = 120 - 12 \text{ мл} = 108 \text{ мл} \quad R = \frac{0,6}{6} = 0,1$$

Пример 2. Рассчитать удерживаемые объемы и коэффициенты удерживания для веществ X и Y, если коэффициенты распределения для них равны 15,0 и 75,0 соответственно, объем неподвижной фазы в колонке равен 1,5 мл, а мертвый объем 3,0 мл.

Решение.

$$V_R(X) = 3,0 + 15,0 * 1,5 = 25,5 \quad V_R(Y) = 3,0 + 75,0 * 1,5 = 115,5$$

$$R(X) = \frac{1}{1 + 15,0 * \frac{1,5}{3,0}} = 0,12 \quad R(Y) = \frac{1}{1 + 75,0 * \frac{1,5}{3,0}} = 0,03$$



Ширина пика (W). Определяется как длина сегмента нулевой линии, измеряемая между точками пересечения с нулевой линией двух касательных в точках перегиба пика.

Высота пика (h). Расстояние между нулевой линией и максимумом пика.

Площадь пика (S). Площадь под кривой записи сигнала. Измеряется интегрированием сигнала.

Если условия выбраны правильно, то каждому из компонентов смеси соответствует **отдельная хроматографическая зона на внутренней хроматограмме** или **отдельный хроматографический пик на внешней хроматограмме**.

Положение хроматографического пика зависит от **коэффициента распределения K** и является **качественной характеристикой компонента**, а интенсивность пика - его **количественной характеристикой**.

$K = C_s / C_m$, где C_s и C_m - концентрации разделяемого компонента в неподвижной и подвижной фазах.

$$R = \frac{1}{1 + D * \frac{V_s}{V_m}}, \quad V_R = V_m + D * V_s,$$

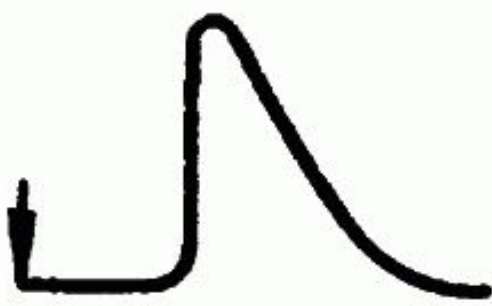
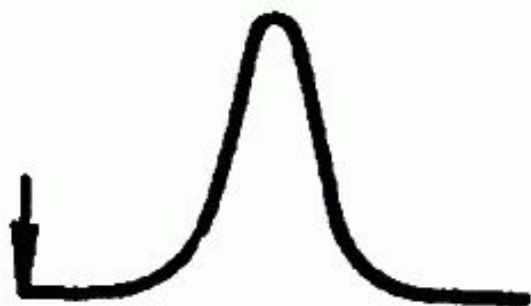
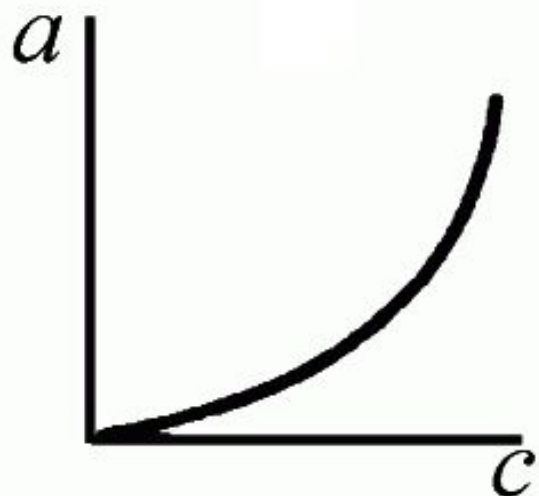
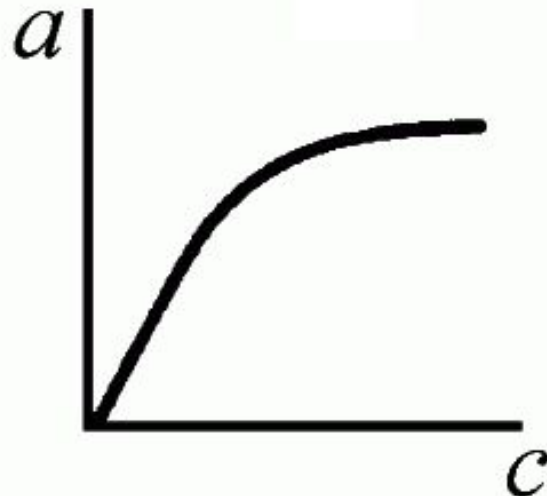
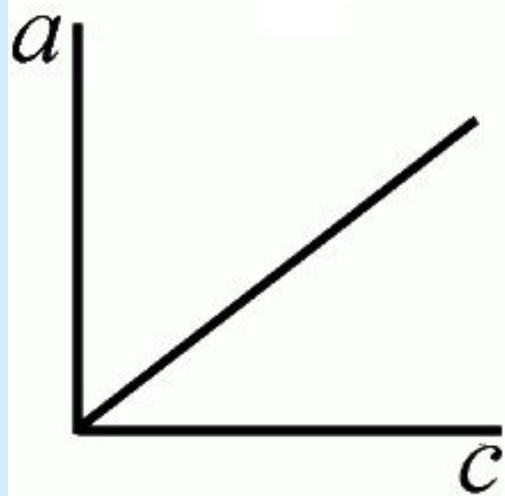
где V_s объем неподвижной фазы

Теория хроматографического разделения

Положение и вид хроматографических зон разделяемых веществ зависят от **формы изотермы сорбции, скорости установления равновесия, степени диффузии вещества в подвижной фазе.**

Изотермой сорбции называется зависимость концентрации вещества, сорбированного неподвижной фазой, от его концентрации в подвижной фазе при постоянной температуре. **Угол наклона изотермы равен коэффициенту распределения.**

Если изотерма сорбции линейна ($K = \text{const}$), установление равновесия происходит мгновенно и степень диффузии вещества в подвижной фазе пренебрежимо мала, идеальный хроматографический пик описывается кривой нормального распределения (кривой Гаусса).



Теория теоретических тарелок:

- 1) каждая хроматографическая колонка состоит из некоторого количества одинаковых по величине абстрактных узких слоёв, называемых **теоретическими тарелками**, на каждой тарелке происходит один элементарный акт сорбции-десорбции;
- 2) на каждой тарелке происходит мгновенное установление равновесия между веществом, находящимся в подвижной и неподвижной фазе;
- 3) переход вещества с одной тарелки на другую происходит дискретно - при попадании на тарелку новой порции элюента равновесие нарушается, и часть вещества мгновенно переносится на следующую тарелку, где вновь мгновенно наступает равновесие и т.д.;
- 4) на любой тарелке в любой момент времени число сорбируемых частиц вещества значительно больше числа сорбируемых частиц растворителя, изотерма сорбции является линейной.

Количественной характеристикой хроматографической колонки являются: **высота эквивалентная теоретической тарелке (H)** и **число теоретических тарелок (N)**.

$$H = \frac{L}{N}$$

Чем меньше H и больше N, тем в меньшей степени происходит размывание пика и тем эффективнее хроматографическое разделение.

$$N = k_x * \left(\frac{t_R}{\omega_x} \right)^2 = \left(\frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

где t_R - время удерживания, k_x - коэффициент, величина которого зависит того, на каком уровне измеряется ширина пика w_x .

Если пик представляет собой кривую нормального распределения, то ширина пика у основания равна 4σ , на половине высоты - $2,35\sigma$. При измерении ширины пика у основания коэффициент k_x будет равен 16 (4^2), на половине высоты - 5,54 ($2,35^2$).

Пример 3. Длина хроматографической колонки составляет 2 м. Анализ смеси углеводородов проводился при трех различных линейных скоростях потока – 10 см/с, 20 см/с и 40 см/с. При этом время удерживания гексана составило 2000 с, 950 с и 700 с, а ширина его пиков у основания – 190 с, 91 с и 72 с соответственно. Рассчитайте число теоретических тарелок и высоту, эквивалентную теоретической тарелке

Решение.

$$N_1 = 16 * \left(\frac{2000}{190} \right)^2 = 1773, \quad H_1 = \frac{2}{1773} = 1,13 \cdot 10^{-3} \text{ м},$$

$$N_2 = 16 * \left(\frac{950}{91} \right)^2 = 1744, \quad H_2 = \frac{2}{1744} = 1,15 \cdot 10^{-3} \text{ м},$$

$$N_3 = 16 * \left(\frac{700}{72} \right)^2 = 1512. \quad H_3 = \frac{2}{1512} = 1,32 \cdot 10^{-3} \text{ м}.$$

$$N_{\text{ср}} = (1773 + 1744 + 1512) / 3 = 1676$$

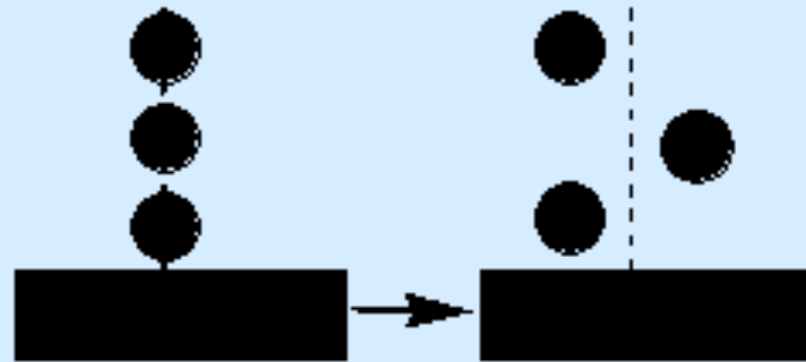
$$H_{\text{ср}} = (1,13 + 1,15 + 1,32) / 3 = 1,20 \text{ мм}$$

Кинетическая теория хроматографии

В

влияние обратно пропорционально скорости ПФ

продольная диффузия



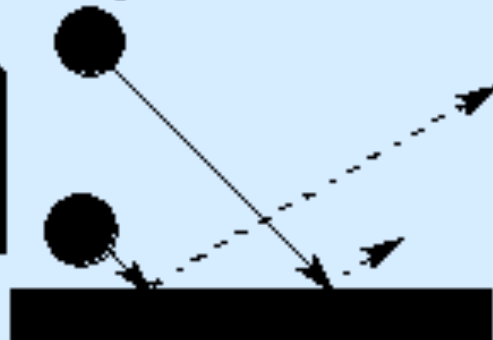
РАЗМЫВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПИКА

сопротивление массопереносу

С

В процессе движения полосы вещества по колонке его молекулы непрерывно переносятся из подвижной фазы в неподвижную и обратно. Процесс переноса требует определённого времени.

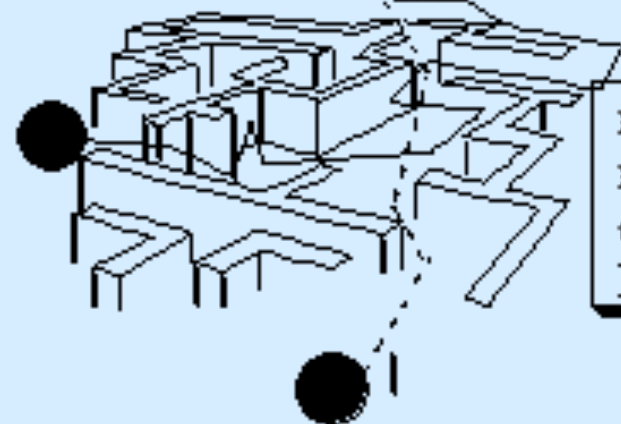
влияние прямо пропорционально скорости ПФ



вихревая диффузия

А

В засадочной колонке молекулы компонентов разделяемой пробы движутся между частицами сорбента по разным траекториям.



влияние не зависит от скорости ПФ

Суммарное влияние вихревой диффузии, продольной диффузии и сопротивления массопереносу на величину высоты эквивалентной теоретической тарелке описывается **уравнением Ван-Деемтера**.

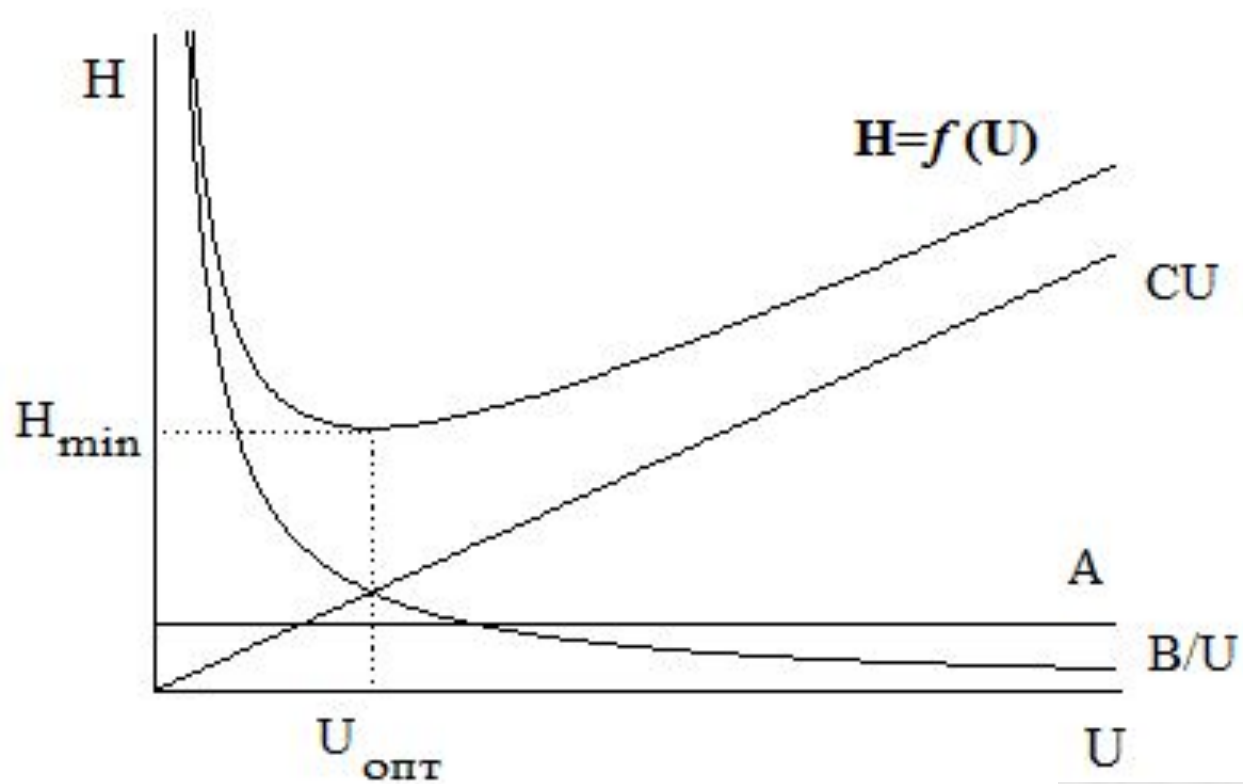
$$H = A + \frac{B}{U} + C * U ,$$

где U - линейная скорость подвижной фазы

Оптимальную скорость газа-носителя, при которой величина H минимальна, можно рассчитать по формуле:

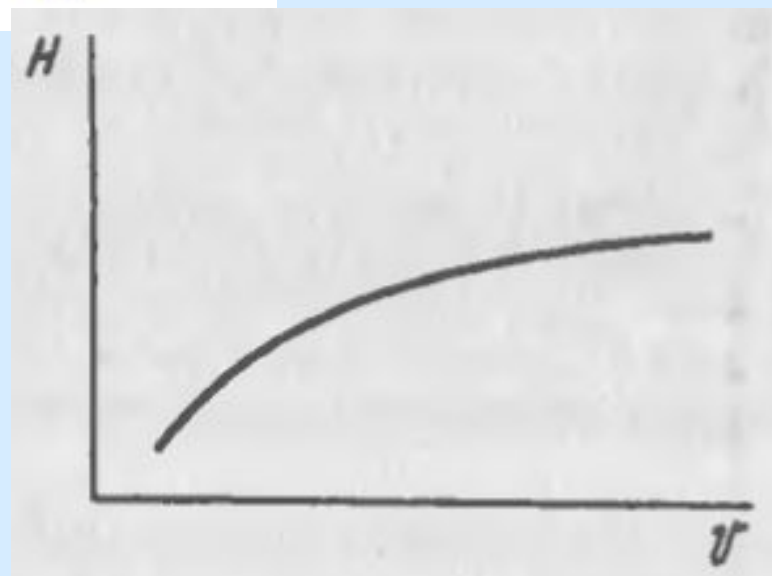
$$U_{\text{опт}} = \sqrt{B / C}$$

В жидкостной хроматографии величина B практически не вносит вклад в размывание хроматографического пика (вязкость жидкости значительно больше вязкости газа)



Зависимость H от линейной скорости газа-носителя

Зависимость H от линейной скорости жидкости-носителя



Эффективность разделения компонентов:

Коэффициент разделения (α):

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{D_2}{D_1},$$

Если $\alpha = 1$, то разделение невозможно.

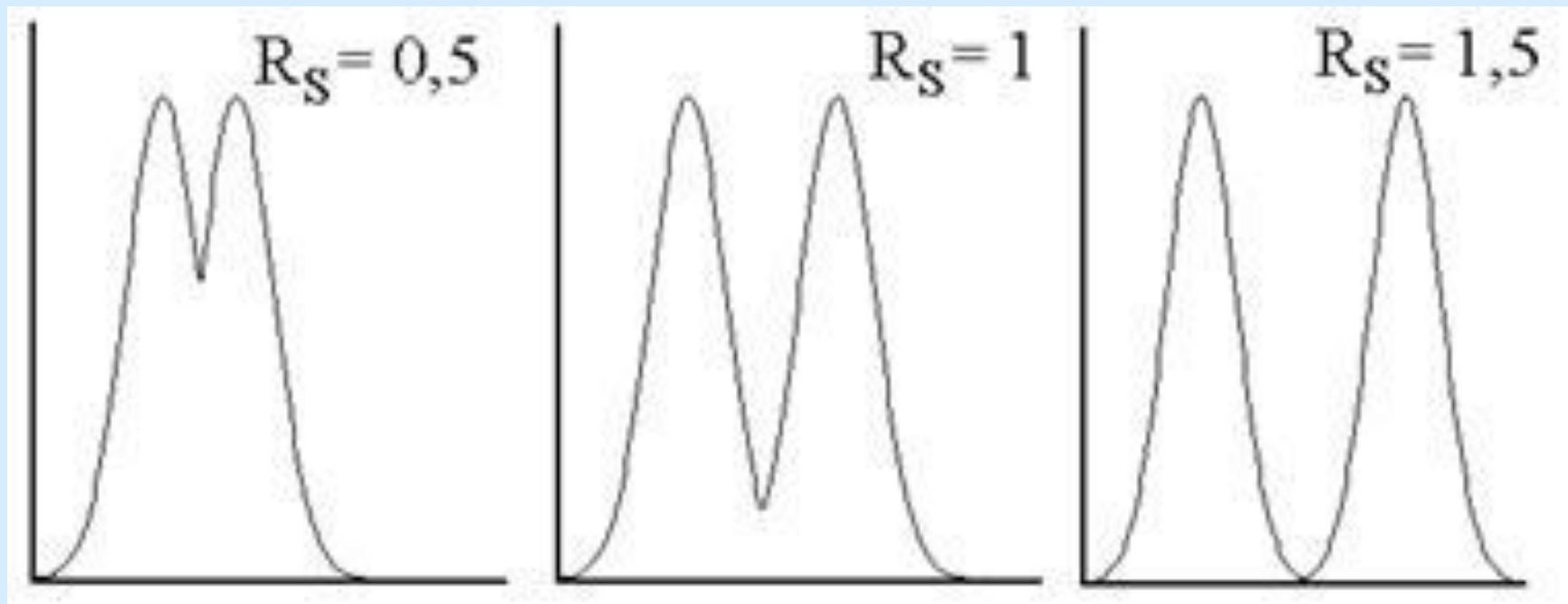
Разрешение (R_s) рассчитывается по следующей формуле:

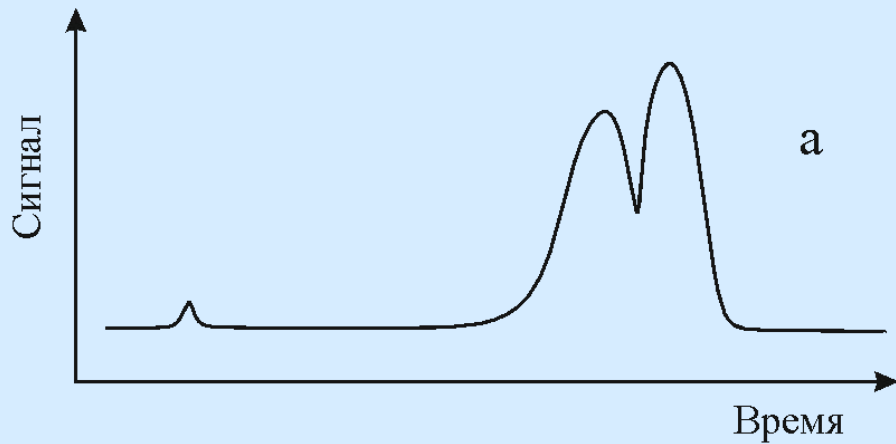
$$R_s = 2 * \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\omega_2 + \omega_1},$$

Разделение считается полным, если R_s равно или больше 1,5 (при этом пики разделены практически до нулевой (базовой) линии).

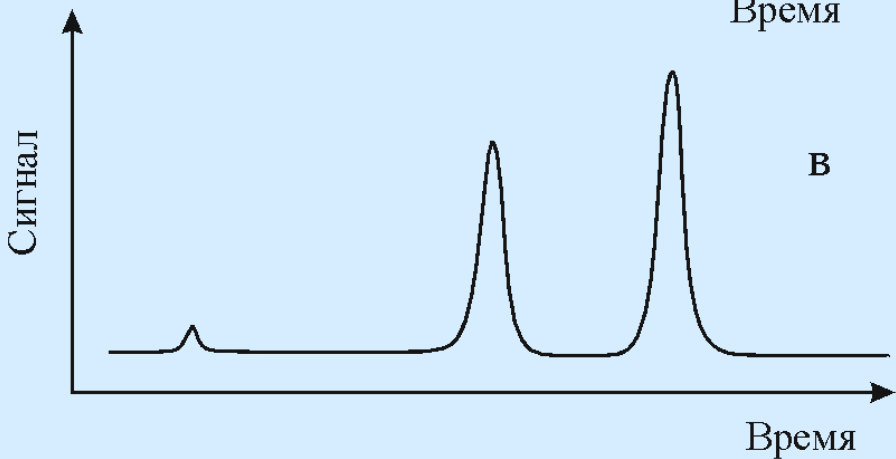
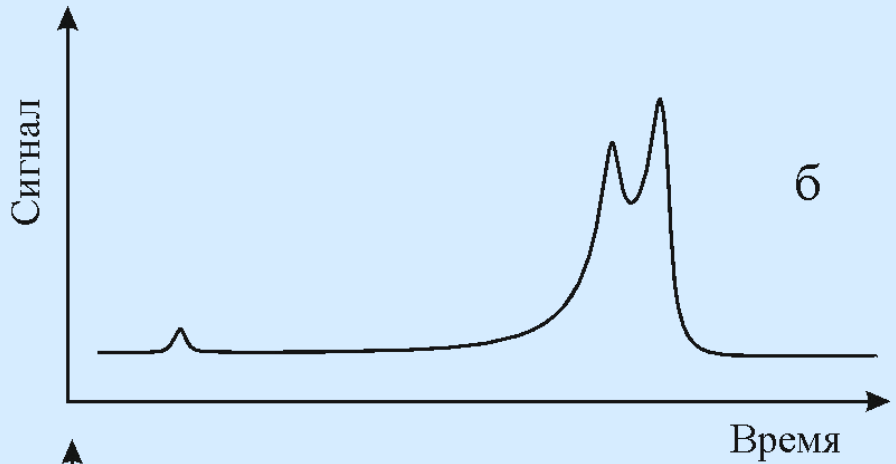
Число теоретических тарелок, необходимое для разделения с заданным разрешением, равно:

$$N = R_s^2 * \left(\frac{k' + \alpha}{k'} \right)^2 * \left(\frac{1}{\alpha - 1} \right)^2$$





а - высокая селективность, но низкая эффективность;
б - высокая эффективность, но низкая селективность;
в - высокая эффективность, достаточная селективность



Пример 4. Длина хроматографической колонки составляет 28,3 см, объем стационарной фазы - 12,3 мл, подвижной фазы - 17,6 мл. Пик неудерживаемого компонента имеет максимум при 0,84 мин, а пики гексана и октана – при 10,60 мин и 11,08 мин. Ширина пиков у основания равна 0,56 и 0,59 мин соответственно

Рассчитайте:

- а) число теоретических тарелок колонки;
- б) высоту, эквивалентную теоретической тарелке;
- в) коэффициент удерживания для гексана и октана;
- г) коэффициенты распределения гексана и октана;
- д) коэффициент селективности и разрешение пиков гексана и октана.

Решение.

$$N_{\text{гексан}} = 16 * \left(\frac{10,60}{0,56} \right)^2 = 5733, \quad N_{\text{октан}} = 16 * \left(\frac{11,08}{0,59} \right)^2 = 5643.$$

$$(5733 + 5643) / 2 = 5688$$

$$H = \frac{0,283}{5688} = 4,98 \cdot 10^{-5} \text{ мм.}$$

$$R_{\text{гексан}} = \frac{t_m}{t_R} = \frac{0,84}{10,60} = 0,079 ,$$

$$R_{\text{октан}} = \frac{t_m}{t_R} = \frac{0,84}{11,08} = 0,076.$$

$$D = \frac{V_m}{V_s} \left(\frac{1-R}{R} \right)$$

$$D_{\text{гексан}} = \frac{17,6}{12,3} \left(\frac{1-0,079}{0,079} \right) = 16,7,$$

$$D_{\text{октан}} = \frac{17,6}{12,3} \left(\frac{1-0,076}{0,076} \right) = 17,4.$$

$$\alpha = \frac{D_{\text{октан}}}{D_{\text{гексан}}} = \frac{17,4}{16,7} = 1,04$$

$$R_s = 2 * \frac{11,08 - 10,60}{0,59 + 0,56} = 0,86$$

Классификация хроматографических методов

Признак	Виды
По агрегатному состоянию фаз	Газовая хроматография, жидкостная, флюидная и др.
По механизму межфазного распределения	распределительная, адсорбционная, ионообменная и др.
По способу проведения	колоночная, планарная (ТСХ, БХ)
По способу перемещения сорбата	элюентная, вытеснительная, фронтальная
По целям и задачам	аналитическая, препаративная

Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ)

Используется для разделения «летучих» соединений, т.е. соединений с молекулярной массой до 500.

Чувствительность метода:

позволяет определить до 10^{-6} г количества соединения

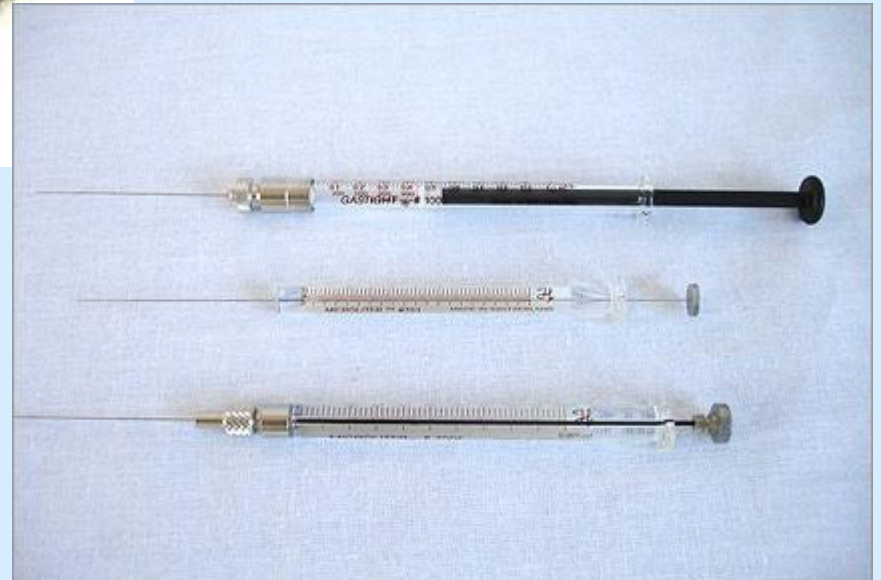
Подвижная фаза – газ (гелий, аргон, азот)

Насадочные (набивные) колонки (металлические, стеклянные): внутренний диаметр 2 – 4 мм; длина 0,5-20 м.



Газо-жидкостная хроматография (ГЖХ)

Капиллярные колонки: внутренний диаметр 0.15-0.53 мм;
длина 5-150 м.



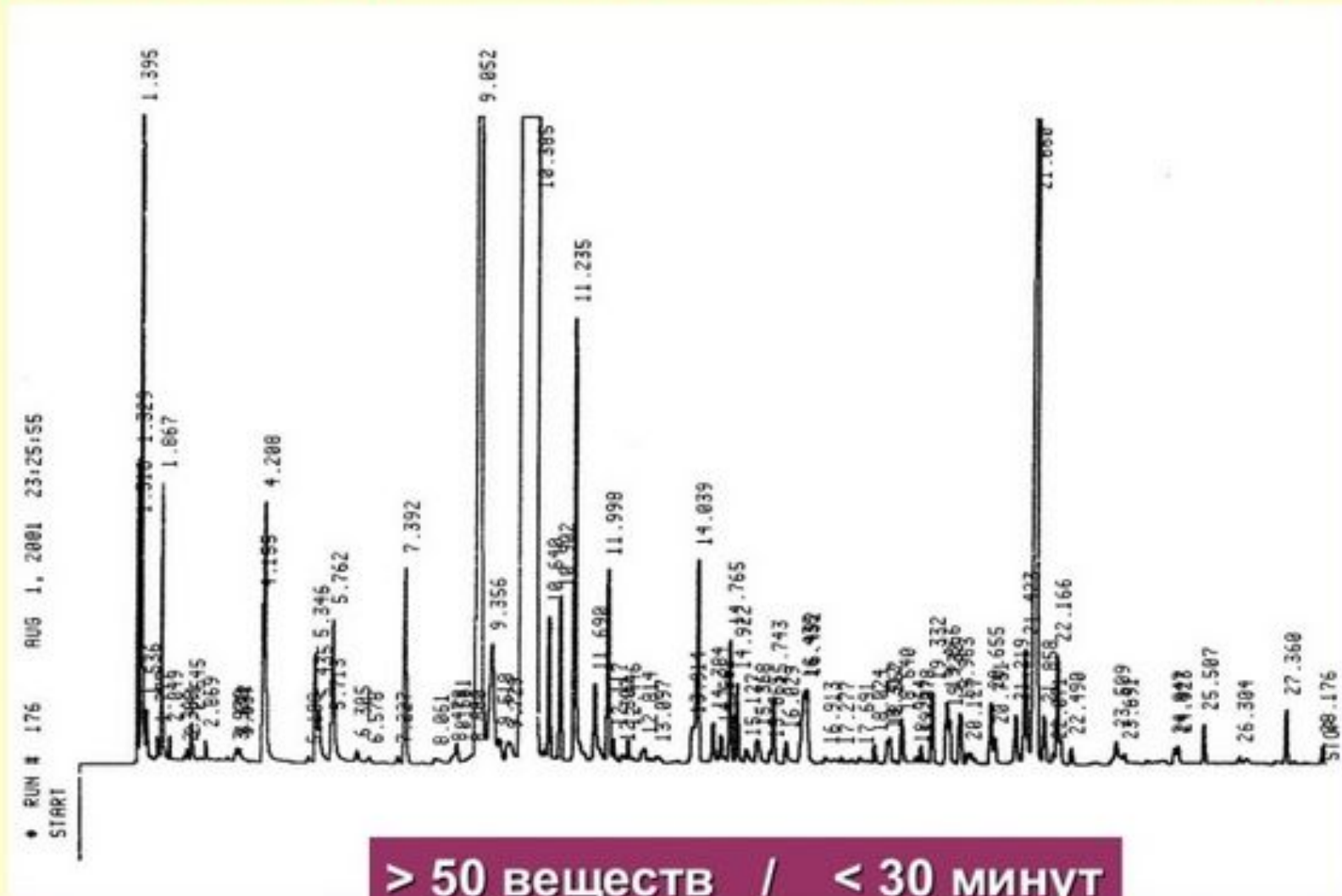
Жидкостная колоночная хроматография

Классическая: длина колонки 1-2 м, размер частиц сорбента >100 мкм.

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ): сорбенты с размером зерен 10-30 мкм, поверхностно- и объемно-пористые сорбенты с размером частиц 5-10 мкм, нагнетательные насосы с генерацией давлений до 15 МПа, а также высокочувствительные детекторы. ВЭЖХ позволяет проводить анализ микроколичеств сложнейших смесей.



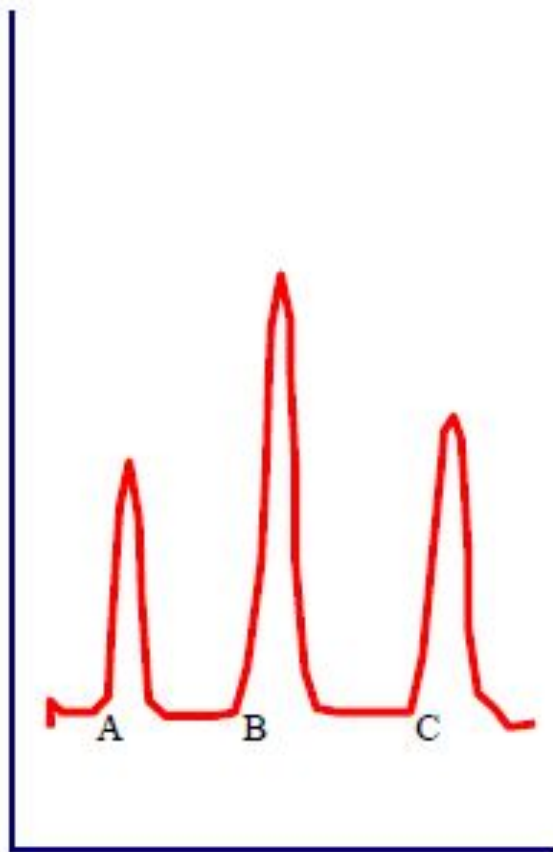
Хроматограмма апельсинового сока (метод ВЭЖХ, режим градиентного элюирования)



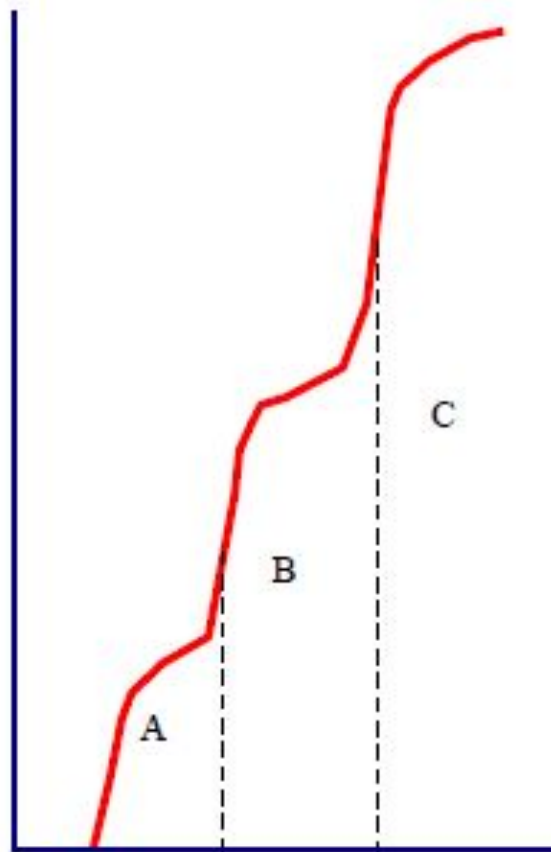
> 50 веществ / < 30 минут

По способу перемещения сорбата

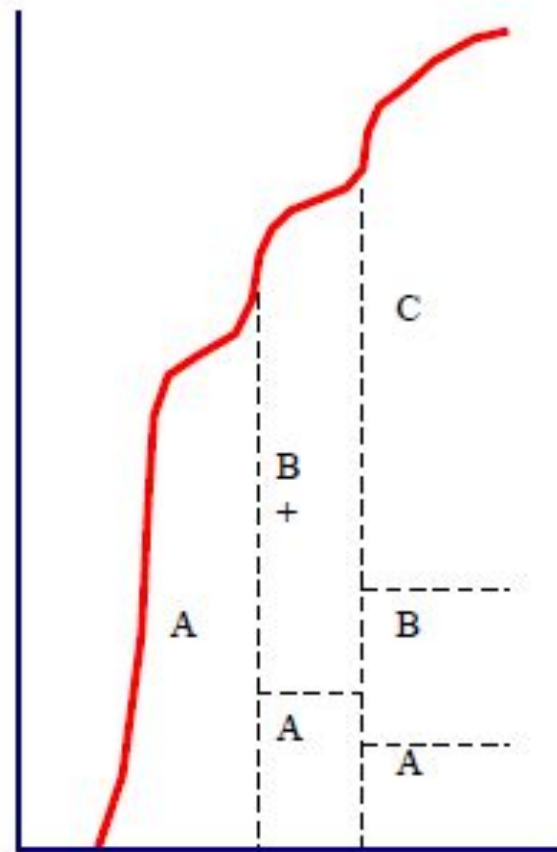
сорбируемость $A < B < C$



элюентный



вытеснительный



фронтальный