

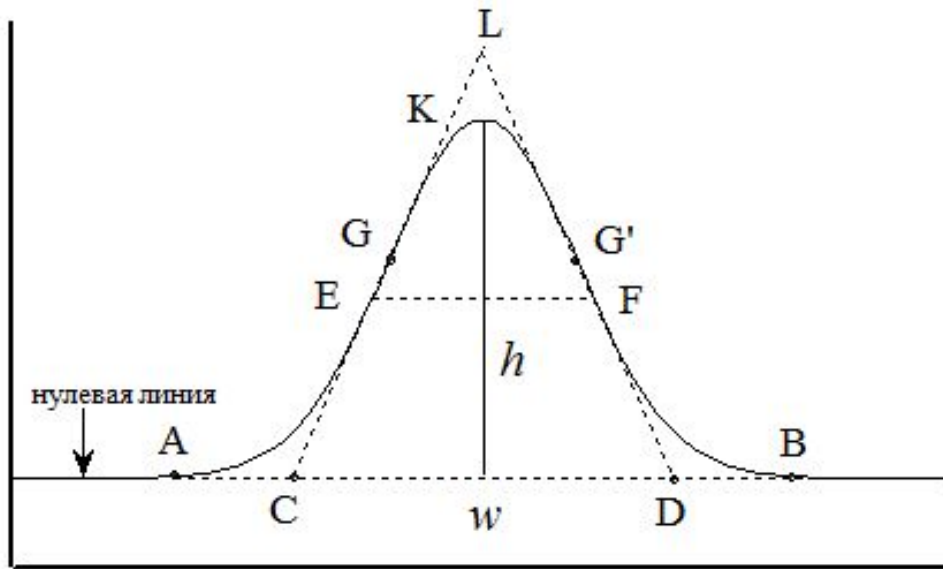
Лекция 8

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИ Й АНАЛИЗ

Основные количественные параметры хроматографических пиков

1. Площадь пика (A/S)

Участок выходной хроматографической кривой, ограниченный контуром $AЕКFВ$ и продолжением нулевой линии $АВ$



2. Высота пика (h)

Отрезок WK , отвечающий максимальной амплитуде сигнала детектора

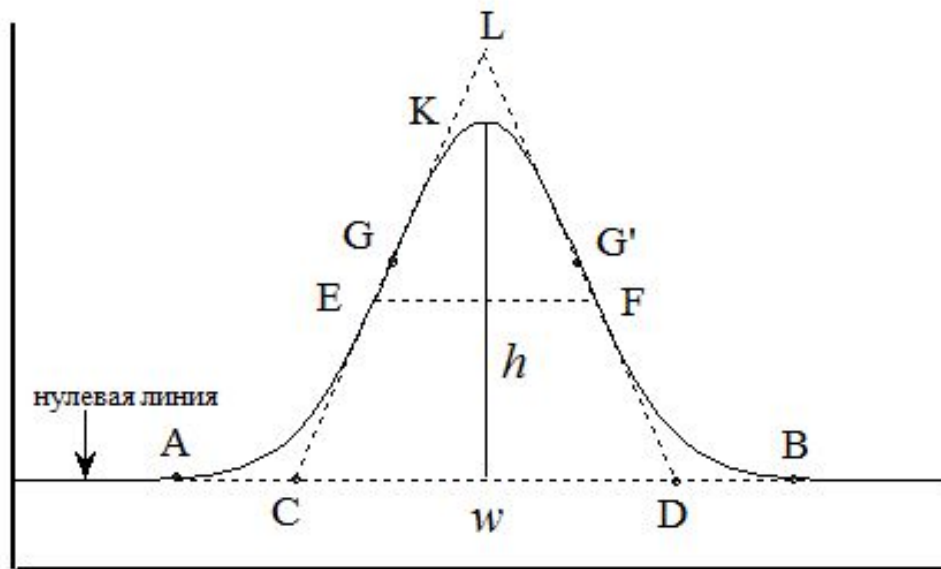
3. Произведение высот пиков на время удерживания ($h \cdot t_R$)

Для тех случаев, когда ширина пика изменяется пропорционально времени удерживания

Вспомогательные количественные параметры хроматографических пиков

1. Высота пика (h')

Высота треугольника CLD , образуемого касательными к ветвям пика в точках перегиба



2. Ширина пика у основания (μ_B)

Отрезок CD , отсекаемый на продолжении базовой линии касательными к ветвям пика

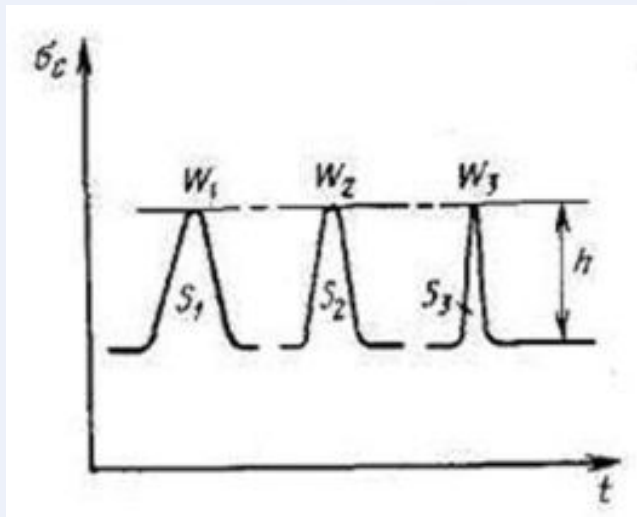
3. Ширина пика на половине высоты (полуширина пика) ($\mu_{0.5}$)

Определяется как расстояние между ветвями пика на заданном сечении высоты (на половине высоты)

Выбор основных количественных параметров хроматографических пиков

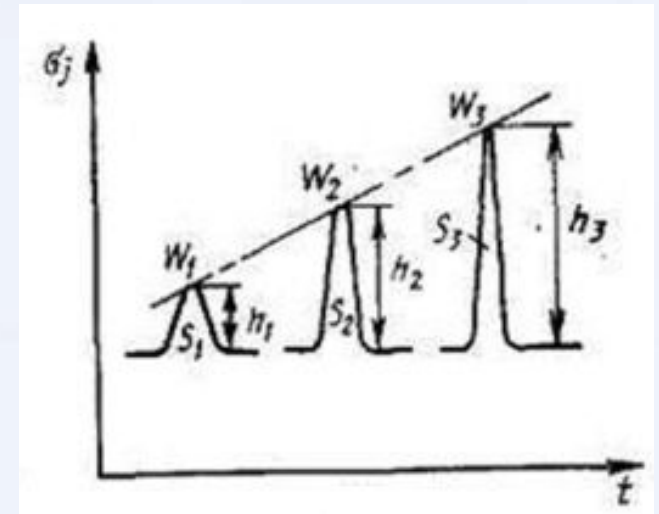
1. Свойства детектора

Концентрационный детектор



Изменение расхода ПФ приводит к изменению площадей пиков

Потоковый детектор



С повышением скорости ПФ площадь пика не изменяется, а высота увеличивается

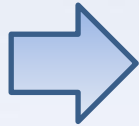
W – скорость движения ПФ

$$W_1 < W_2 < W_3$$

Выбор основных количественных параметров хроматографических пиков

2. Температура колонки

Измерение
площадей пиков



Мало проявляется

Измерение
высот пиков



Сильно проявляется



Нельзя использовать высоты в качестве количественных параметров хроматографического пика в режиме программирования температуры

Выбор основных количественных параметров хроматографических пиков

3. Природа, состав и количество НФ

Колонки истощаются вследствие уноса НФ. Интенсивность уноса зависит от упругости паров НФ при рабочей температуре колонки и от жесткости задаваемого температурного режима.

За 2000 ч работы улетучивается 50 % общей массы НФ



За 1 день – унос около 0.2 % НФ



Высота пиков будет увеличиваться на 0.2 % в день



Прогрессирующее завышение результатов

Выбор основных количественных параметров хроматографических пиков

Вопрос о предпочтительном использовании при количественной расшифровке хроматограмм высот пиков, площадей или произведения высоты на время удерживания должен решать сам хроматографист после тщательного всестороннего анализа аппаратных возможностей, вида хроматограмм и допустимой погрешности определения

! Первостепенная задача: градуировка прибора, т.е. установление строгой числовой зависимости между сигналом детектора и количеством определяемого вещества.

Метод абсолютной градуировки (внешнего стандарта)

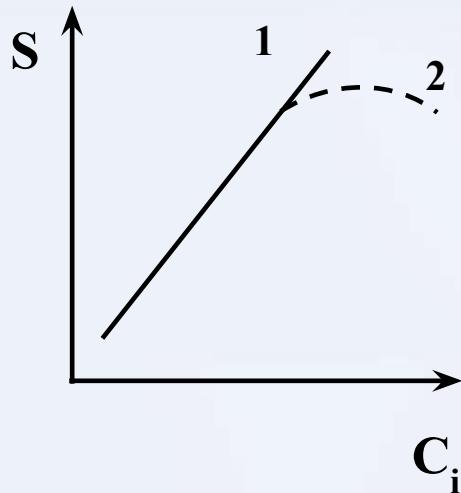
Суть метода Использование зависимости одного из количественных параметров хроматографического пика (S , h , $h \cdot t_R$) от содержания вещества в пробе

Методы количественного анализа.

Метод абсолютной градуировки

Варианты расчета

1. По градуировочному графику



1 – линейно работающий хроматограф

2 – нелинейно работающий хроматограф

C_i – массовое или объёмное содержание i -го вещества в пробе (в %) или его абсолютное количество (в см³, мкл, мкг)

2. По уравнению градуировочного графика

3. Сравнение с одним эталоном (по пропорции)

4. С применением калибровочных коэффициентов

$$K_i = \frac{q_i}{R_i}$$

q_i - масса компонента

R_i - параметр пика (S , h , $h \cdot t_R$)

Содержание компонента в пробе рассчитывают как

$$C_i = \frac{q_i}{Q} \cdot 100\% = \frac{k_i \cdot R_i}{Q} \cdot 100\%$$

k_i - усредненное значение калибровочного коэффициента

Q - масса пробы, введенной в колонку

Методика проведения анализа

- 1. Готовят модельные смеси тех компонентов, содержание которых необходимо определить в контрольной пробе.**
- 2. Хроматографируют модельную смесь:**
 - если смесь одна, то меняют объём пробы;**
 - если объём пробы постоянен, то используют несколько смесей с различной концентрацией компонентов.**
- 3. Рассчитывают калибровочные коэффициенты для определяемых компонентов.**
- 4. Хроматографируют контрольную пробу.**
- 5. Рассчитывают содержание компонентов в контрольной пробе.**



Недостатки метода абсолютной градуировки

- 1. Необходимость точной и воспроизводимой дозировки пробы.**
- 2. Строгое соблюдение постоянства условий хроматографирования при градуировке прибора и при анализе контрольной пробы.**
- 3. Высокая степень чистоты реагентов и растворителей, используемых для приготовления модельных смесей.**
- 4. Концентрации компонентов в модельных смесях должны перекрывать ожидаемую концентрацию в контрольной смеси.**

Методы количественного анализа

Метод абсолютной градуировки



Область применения

1. Если есть сомнения в линейной работе детектора.
2. При анализе примесей, т.е. когда надо определить не все компоненты смеси.

Методы количественного анализа

Метод внутренней нормализации

Метод внутренней нормализации

Суть метода заключается в отнесении измеренного параметра хроматографического пика (S , h , $h \cdot t_R$) к суммарному сигналу детектора на все компоненты пробы, присутствующие в образце.

Варианты расчета

1. Простая нормализация

Концентрация компонентов рассчитывается как относительная площадь:

$$C_i = \frac{S_i}{\sum S_i} \cdot 100\%$$

- Условия:**
- регистрация всех компонентов пробы
 - одинаковая чувствительность детектора к разным веществам (если молекулярная масса веществ близка).

2. Основной вариант

$$C_i = \frac{K_i \cdot S_i}{\sum K_i \cdot S_i} \cdot 100\%$$

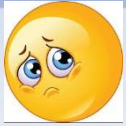
K_i – калибровочный коэффициент. Его рассчитывают как:

$$K_i = \frac{C_i \cdot S_{ст}}{C_{ст} \cdot S_i}$$

ст – это стандартный компонент, элюируемый первым

Методика проведения анализа

- 1. Готовят модельную смесь компонентов идентичного качественного состава, что и контрольная смесь.**
- 2. Хроматографируют модельную смесь, определяют калибровочные коэффициенты.**
- 3. Хроматографируют контрольную смесь с неизвестным количественным составом компонентов.**
- 4. Вычисляют концентрации компонентов в контрольной смеси.**



Недостатки метода внутренней нормализации

- 1. Трудность разделения всех компонентов сложной смеси.**
- 2. Необходимость идентификации всех компонентов смеси.**
- 3. Трудоёмкость определения всех калибровочных коэффициентов.**
- 4. Погрешности как на стадии хроматографирования, так и на стадии приготовления модельных смесей.**
- 5. Взаимозависимость точности определения одного компонента от точности определения всех компонентов, присутствующих в смеси.**
- 6. Необходимость линейного детектирования.**



Преимущества метода внутренней нормализации

1. Нет необходимости в точном дозировании образца.
2. Нет необходимости в соблюдении тождественности условий анализа при повторных определениях.



Область применения

1. Рутинный анализ малокомпонентных смесей.
2. Для проведения приблизительных расчетов.

Метод внутреннего стандарта

Суть метода заключается в прибавлении к известному количеству анализируемого образца известного количества не содержащегося в нём эталонного соединения (внутреннего стандарта) и последующем хроматографировании приготовленной смеси.

$$C_i = \frac{R_i \cdot K_i \cdot q_{\text{ст}}}{R_{\text{ст}} \cdot q_{\text{см}}} \cdot 100\%$$

R_i , $R_{\text{ст}}$ – параметры хроматографических пиков определяемого и стандартного вещества

K_i – калибровочный коэффициент

$q_{\text{ст}}$, $q_{\text{см}}$ – количество стандартного вещества и анализируемой смеси (мг, мкл, ммоль)

Методика проведения анализа

1. Получают хроматограммы пробы и стандартного вещества.
2. Составляют смеси из определяемого и стандартного веществ.
3. Хроматографируют смеси, определяют калибровочные коэффициенты:

$$K_i = \frac{q_i \cdot R_{ст}}{q_{ст} \cdot R_i}$$

4. К точной навеске пробы прибавляют точную навеску внутреннего стандарта, хроматографируют смесь.
5. Определяют содержание определяемого вещества.

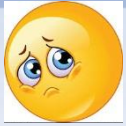


Требования к внутреннему стандарту

1. **Полная смешиваемость с компонентами анализируемой смеси.**
2. **Химическая инертность по отношению к компонентам пробы, ПФ, НФ, адсорбенту.**
3. **Близость по структуре и молекулярной массе к анализируемому компоненту.**
4. **Концентрацию стандарта подбирают таким образом, чтобы $R_{ст} / R_i \approx 1$**
5. **Близость к пику определяемого соединения на хроматограмме.**
6. **Отсутствие таких примесей, пики которых накладывались бы на пики определяемого компонента.**

Методы количественного анализа

Метод внутреннего стандарта



Недостатки метода внутреннего стандарта

1. **Необходимость в специальной подготовке пробы для анализа.**
2. **Трудности при выборе стандарта.**



Преимущества метода внутреннего стандарта

1. **Минимум погрешности из-за случайных изменений параметров хроматографического опыта.**
2. **Нет необходимости в точном дозировании пробы и соблюдении всех переменных параметров хроматографирования.**
3. **Важно, чтобы стандарт и анализируемое соединение разделялись на хроматограмме. Остальные компоненты могут разделяться не полностью.**
4. **Нет необходимости в предварительной идентификации веществ.**

Методы количественного анализа

Метод внутреннего стандарта



Область применения

1. При анализе некоторых компонентов смеси.
2. При использовании селективных детекторов (когда не все компоненты регистрируются).
3. Когда компоненты пробы частично испаряются.
4. При анализе жидкостей.

Метод стандартной добавки

Суть метода В качестве стандарта используют соединения, содержащиеся в смеси, или даже сам определяемый компонент.

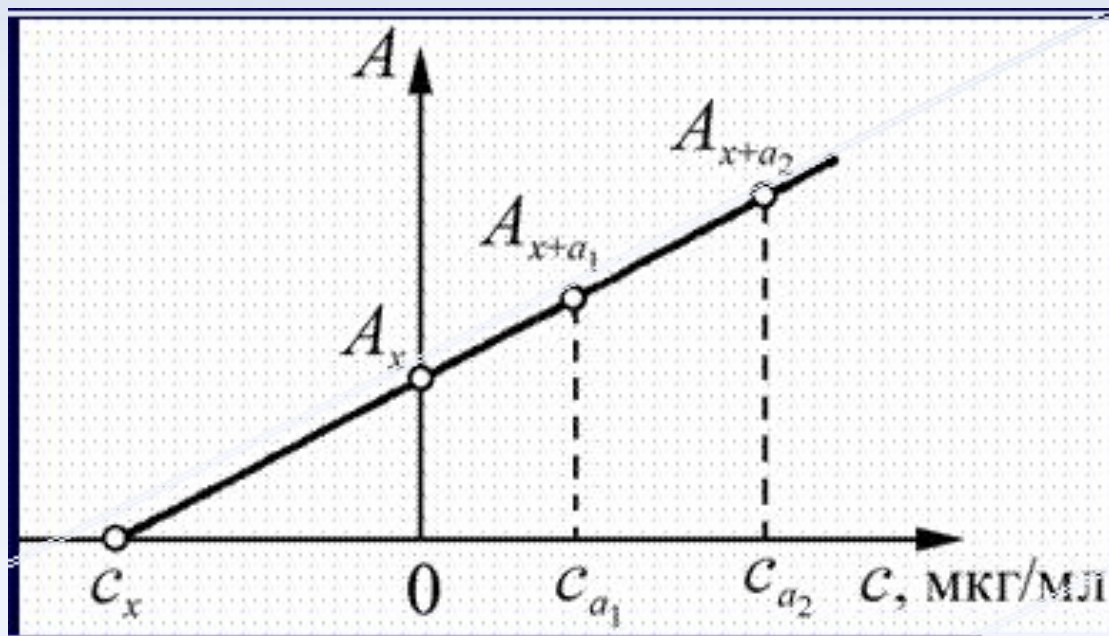
Методика проведения анализа

В одинаковых условиях получают две серии хроматограмм:

- исходной анализируемой смеси
- порции смеси с добавленным к ней известным количеством одного из компонентов, играющего роль стандартного соединения
- определяют содержание компонентов

Методы количественного анализа

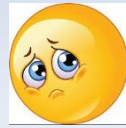
Метод стандартной добавки



К нескольким одинаковым навескам анализируемой смеси добавляют известные последовательно увеличиваемые количества определяемого вещества.

Методы количественного анализа

Метод стандартной добавки



Недостатки

1. Необходима линейная работа детектора.
2. Необходим стабильный режим работы всех систем хроматографа.
3. Возрастающая продолжительность проведения анализов.



Преимущества

1. Большая точность.
2. Простота выполнения.
3. Не требует знания калибровочных коэффициентов.



Область применения

В случае, если выбор вещества-стандарта затруднён.

