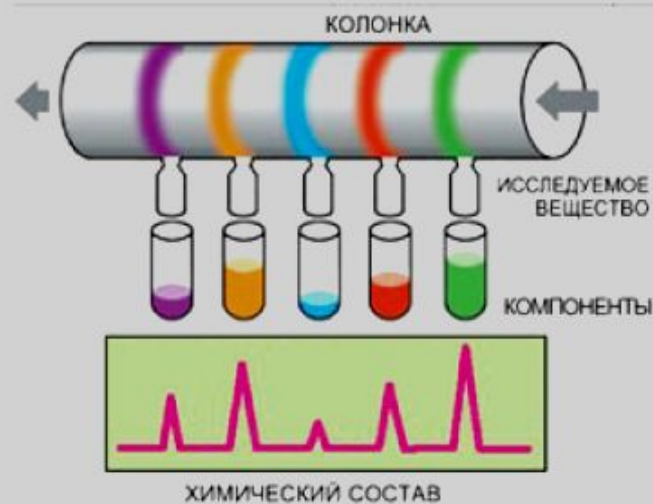


Хроматографические методы.2

Гиндулина Т.М.

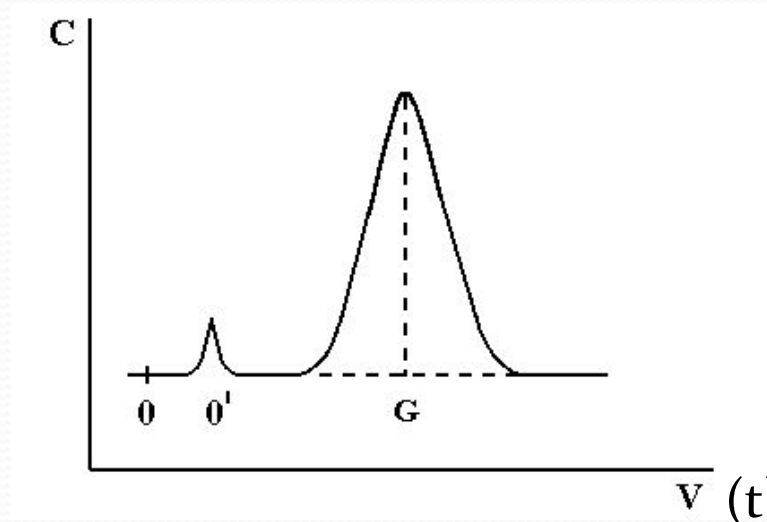
Колоночная хроматография



Хроматограмма – зависимость концентрации веществ в подвижной фазе на выходе из колонки от времени (объема)

Хроматографические параметры

- Выходная кривая (кривая элюирования) – зависимость концентрации компонента от времени хроматографирования (объема элюата)



- **Время удерживания** t_R - время от момента ввода пробы до регистрации максимума пика (отрезок OG на графике)
- Время удерживания складывается из времени пребывания вещества в подвижной и неподвижной фазах

$$t_R = t_0 + t'_R$$

- Первое фактически равно времени прохождения через колонку несорбируемого компонента (отрезок OO' на графике)

- Время удерживания не зависит от количества пробы
- зависит от:
 - природы вещества и сорбента
 - скорости потока газа-носителя
 - упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке
- исправленное время удерживания

$$t'_R = t_R - t_0$$

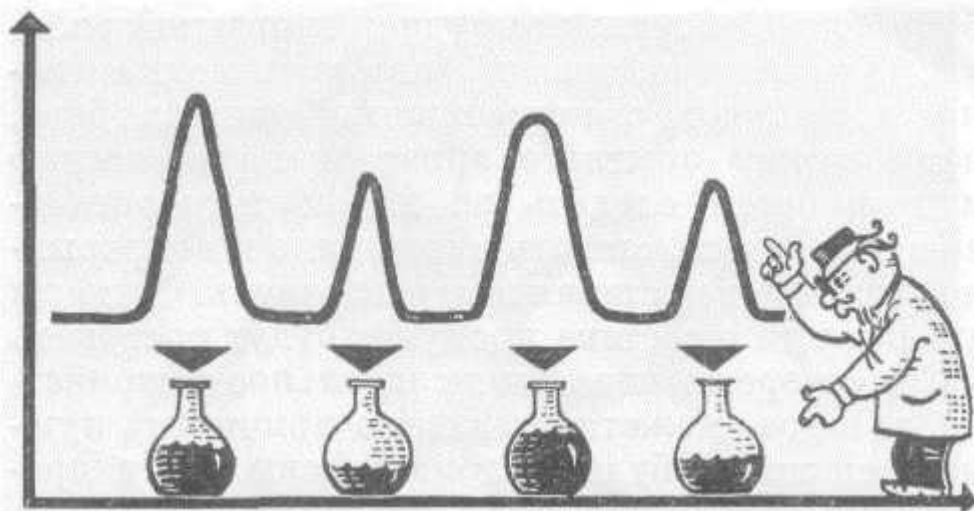
- **Удерживаемый объем** V_R – объем газа-носителя, который должен быть пропущен от момента ввода пробы до появления максимума пика на хроматограмме

$$V_R = F \cdot t_R$$

- F – объемная скорость потока, мл/с
- Объем для вымывания несорбируемого компонента V_0 включает в себя объем колонки, не занятый сорбентом
- *Приведенный* удерживаемый объем

$$V'_R = V_R - V_0$$

- При постоянных условиях хроматографирования:
 - скорость потока
 - давление
 - температура
 - состав фаз
- значения характеристик удерживания строго воспроизводимы и могут быть использованы для идентификации компонентов в качественном анализе и для физико-химических исследований



Теория теоретических тарелок

- Общая теория для многостадийных процессов (дистилляция, противоточная экстракция)
- Мартин и Синдж применили ее к хроматографии

Допущения теории т.т.

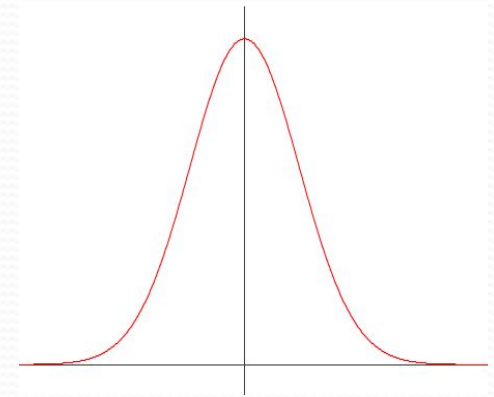
- Хроматографическая колонка – ряд последовательных горизонтальных слоев – теоретических тарелок (т.т.)
- Равновесие на каждой тарелке между ПФ и НФ устанавливается мгновенно
- Количество вводимой пробы мало, а изотерма сорбции линейна
- Все процессы в колонке взаимонезависимы



- Каждая порция ПФ смещает равновесие и переносит часть вещества на следующую тарелку, где вновь устанавливается равновесие
- Происходит ступенчатый переход вещества с тарелки на тарелку (сорбция - десорбция, растворение - испарение)
- Вещество распределяется на нескольких тарелках, на средней – его концентрация максимальна

- Зона компонента имеет форму и ширину нормального распределения Гаусса:

$$C = C_{\max} \cdot e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2LN}}$$



- X и X_0 – расстояние от начала тарелки до места с концентрацией C и C_{\max}
- N – высота, эквивалентная теоретической тарелке, ВЭТТ (высота слоя сорбента, на которой достигается равновесие), см
- L – длина колонки, в которой размещено N т.т., см

- N – число т.т. $N = L/H$
- Чем $> N$, тем большее число раз устанавливается равновесие между ПФ и НФ, тем эффективнее колонка
- Для хорошей колонки $N \sim \text{п.}1000$, $H \sim 0,3-1$ мм

$$N = 5,54 \left(\frac{t'_R}{w_{1/2}} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{V'_R}{w_{1/2}} \right)^2$$

- $w_{1/2}$ – ширина полупика, выраженная в единицах времени (мин) или объема (мл)

Недостатки теории тарелок

- Процесс сорбции рассматривается как ступенчатый, тогда как он непрерывный
- Не учитываются свойства сорбента, природа сорбата, скорость потока ПФ, кинетика массопереноса
- Не объясняется размывание хроматографического пика, не дается рекомендаций, как этого избежать

Кинетическая теория

- Предложили Ван Деемтер и Клинкенбург

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$

- H – высота, эквивалентная теоретической тарелке, см
- v – линейная скорость прохождения газа-носителя через колонку, см/с
- A, B, C – константы
- размывание хроматографической полосы связано с тремя основными факторами:

1. Вихревая диффузия (слагаемое A)

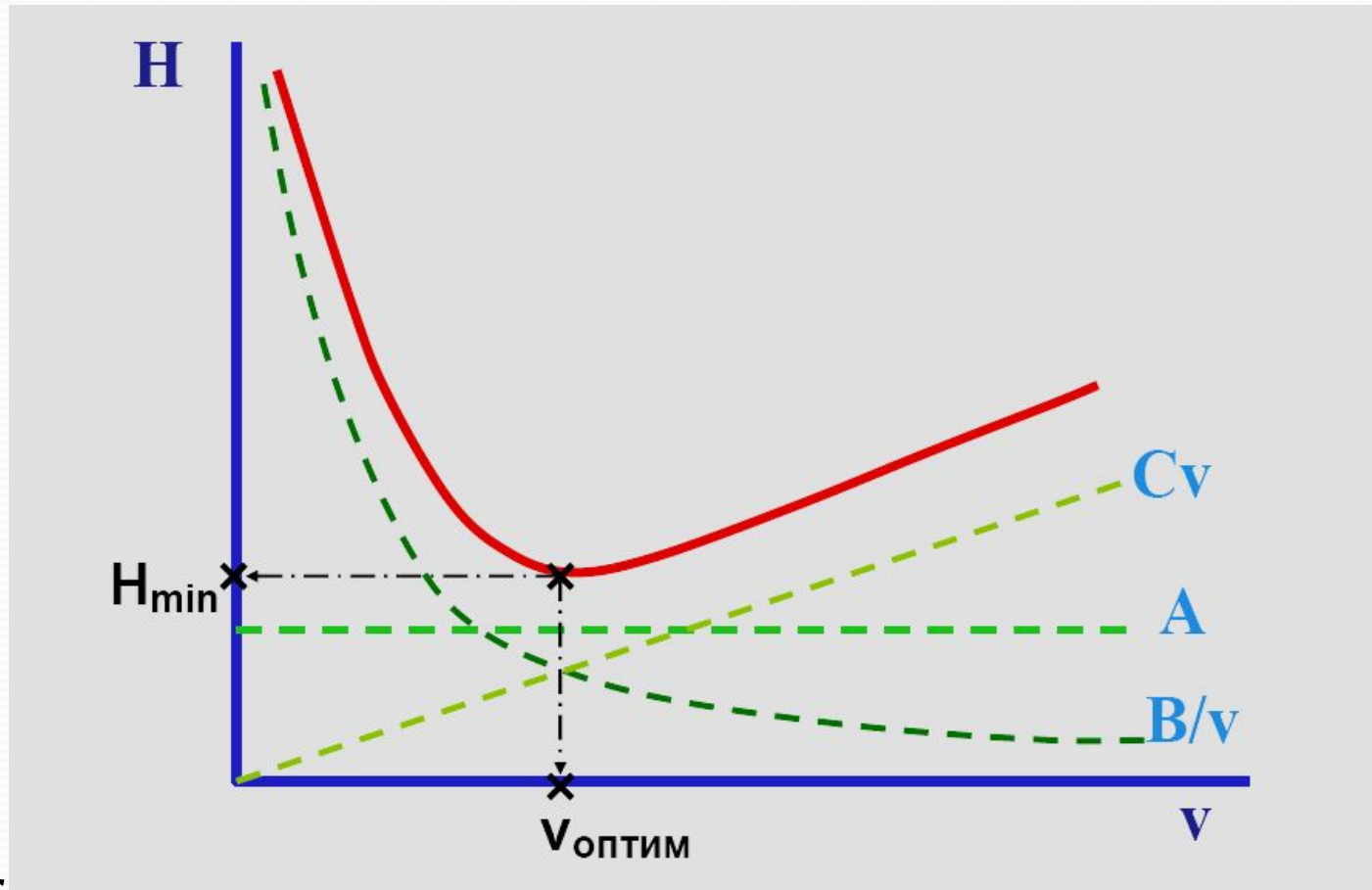
- Хроматографическая колонка заполняется твердым зерненым сорбентом, поэтому ПФ перемещается по колонке через множество взаимосвязанных каналов
- Одни молекулы могут продвигаться более короткими путями, другие – более длинными. Время пребывания последних молекул в колонке соответственно возрастает, что приводит к размыванию хроматографического пика
- Вихревая диффузия зависит от размеров частиц (d) и плотности заполнения колонки (λ), не зависит от скорости ПФ
- $A = 2\lambda d$, в идеале $H_{эф} = d$, на практике $H = (3-5)d$

2. Молекулярная диффузия

- Слагаемое V/v характеризует размывание пиков, вызываемое диффузией анализируемого вещества в газе-носителе (диффузия в жидкой фазе ничтожно мала)
- При бесконечно малой скорости газа-носителя вещество перемещается вниз по колонке под действием собственной молекулярной диффузии
- Величина V/v , а следовательно, и N в этом случае бесконечно большие

3. Сопротивление массопередаче

- Слагаемое S_v характеризует скорость распределения вещества между газом-носителем и неподвижной жидкой фазой
- Чем меньше толщина слоя жидкости на твердом носителе и чем меньше вязкость этой жидкости, тем быстрее устанавливается равновесие



- *График уравнения Ван-Деемтера (1 X)*
- Для малых скоростей потока заметнее вклад B/v , для больших – вклад Cv

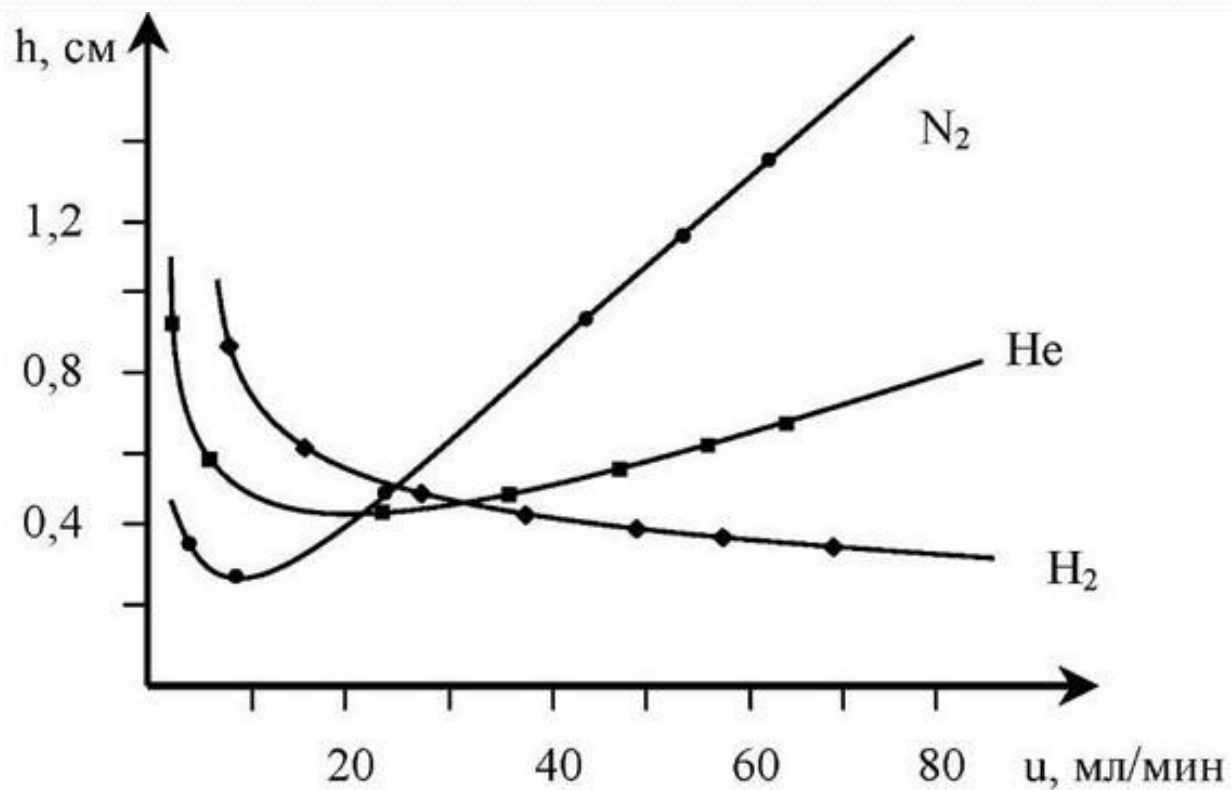
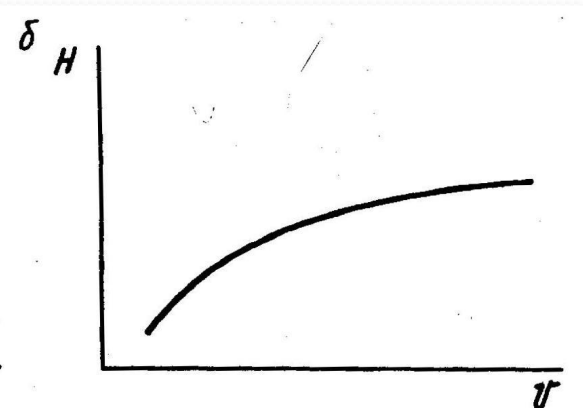


Рис. 18. Влияние природы газа-носителя на эффективность хроматографической колонки

- Колонка эффективна, если:
- Частицы сорбента невелики
- Упаковка плотная
- Вязкость НФ мала
- Толщина пленки НФ мала
- Скорость ПФ оптимальна

$$v_{opt} = \sqrt{B/C}$$

- А, В, С можно подобрать на практике



- Зависимость ВЭТТ от скорости ПФ в ЖХ
- Слагаемое B/v роли не играет, т.к. коэффициенты диффузии в жидкости на 3-4 порядка меньше, чем в газах

Качественный анализ

- 1. Идентификация по параметрам удерживания
- Сравнивают и сопоставляют время удерживания и удерживаемый объем для определяемых и стандартных веществ; хроматографирование проводится в идентичных условиях
- Совпадение параметров удерживания служит основанием для идентификации
- Иногда пользуются табличными данными

- 2. Использование относительных параметров удерживания

$$t_{\text{вмн}} = \frac{t'_R}{t'_{\text{вм}}}$$

$$V_{\text{вмн}} = \frac{V'_R}{V'_{\text{вм}}}$$

- Для идентификации надежнее использование относительных параметров удерживания, т.к. они зависят только от состава ПФ и НФ

- 3. Закономерность изменения параметров удерживания в гомологическом ряду, например:

$$\lg V_R = a + bT$$

- T – температура кипения
- a и b - зависят от функциональной группы гомологов и условий анализа
- Если известны T кип членов ряда, можно определить удерживаемый объем

- 4. **Нехроматографические методы идентификации**
- В элюате можно определять вещества другими методами исследования:
- ИК-спектроскопия
- масс-спектрометрия
- метод ядерного магнитного резонанса
- пламенная фотометрия и др.

- **Индексы удерживания Ковача**
- Индексы удерживания Ковача отражают хроматографические характеристики веществ в единой шкале, определяемой серией однотипных стандартов, в качестве которых используются *n*-алканы
- Если в качестве нулевого алкана принять водород ($C_0H_{2 \cdot 0 + 2}$) и принять его индекс удерживания за 0, то в данной системе можно представить практически все вещества

- Индексы удерживания веществ рассчитывают по формуле:

$$I = 100N + 100n \frac{\lg R_x - \lg R_N}{\lg R_{N+n} - \lg R_N}$$

$$R_n < R_x < R_{N+n}$$

- Здесь R_x , R_N и R_{N+n} - приведенные величины удерживания (объемы, времена или расстояния на хроматограммах) исследуемого вещества и алканов с N и $N + n$ углеродными атомами
- Индекс удерживания любого n -алкана равен числу его углеродных атомов, умноженному на 100: этана - 200, бутана - 400 и т. д. Если индекс удерживания какого-либо вещества равен 930, то это вещество будет выходить из колонки после n -нонана

Количественный анализ

- Используется зависимость площади (высоты) пика от концентрации компонента $S = f(C)$
- Площадь пика:

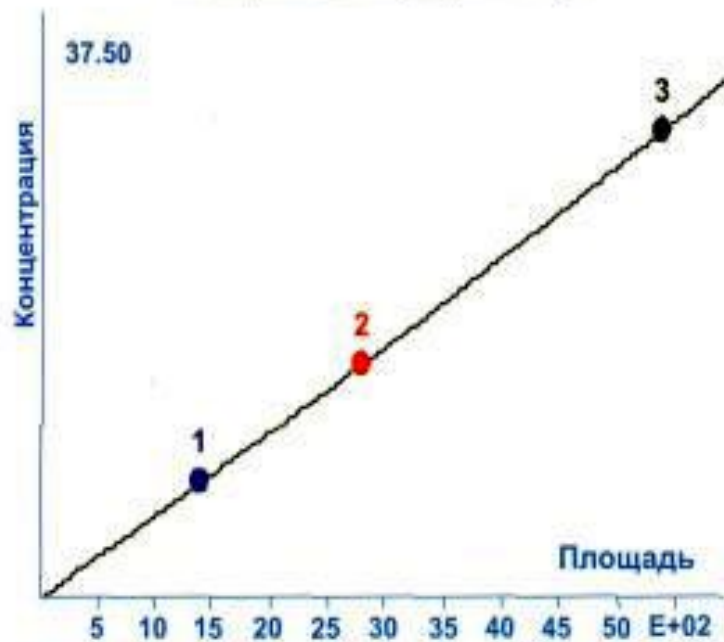
$$S = h \cdot w_{1/2}$$

- h – высота пика, мм
- $w_{1/2}$ - ширина пика на 1/2 его высоты

Метод абсолютной градуировки (внешнего стандарта)

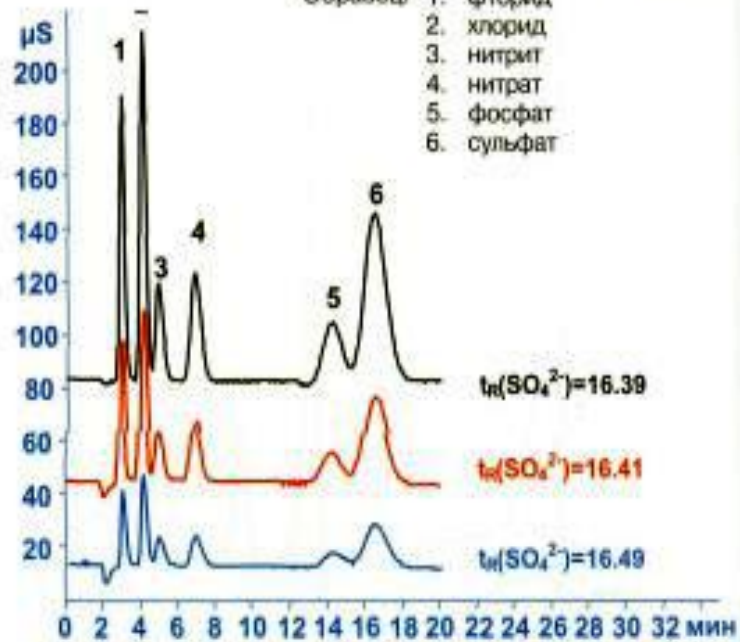
- экспериментально определяют зависимость высоты или площади пика от концентрации вещества и строят градуировочный график
- определяют те же параметры пиков в анализируемой смеси и по градуировочному графику находят концентрацию анализируемого вещества
- это основной метод определения микропримесей
- метод не требует разделения всех компонентов смеси, а ограничивается лишь теми, определение которых необходимо в данном конкретном случае

Калибровка по сульфат-иону



Проба: стандартная смесь анионов
Объем: 25.0 мкл
Колонка: Аквилайн А1
Размер: 4.6 x 150 мм
Подв. фаза: 1.7 мМ NaHCO₃/
1.8 мМ Na₂CO₃
Расход: 1.5 мл/мин

Образец: 1. фторид
2. хлорид
3. нитрит
4. нитрат
5. фосфат
6. сульфат



Метод внутреннего стандарта

- в анализируемую смесь вводят точно известное количество стандартного вещества, близкого по физико-химическим свойствам к компонентам смеси
- Это вещество должно отсутствовать в исследуемой смеси и давать на хроматограмме пик, отдельный от других компонентов
- После хроматографирования измеряют площади пиков анализируемого компонента (S_i) и стандартного вещества ($S_{СТ}$)

- Массовую долю компонента (W_i , %) рассчитывают по формуле:

$$\omega_i = \frac{S_i}{S_{cm}} \cdot r \cdot 100\%$$

- r – отношение массы внутреннего стандарта к массе пробы

Метод простой нормировки

- Сумму площадей пиков всех компонентов принимают за 100 %

$$\omega_i = \frac{S_i}{\sum_{i=1}^n S_i} \cdot 100\%$$

- Метод чаще всего используют на практике
- Для его использования необходимо, чтобы вещества были химически сходны

Метод нормировки с поправочными коэффициентами

- Метод используют, если чувствительность детектора различна по отношению к разделяемым компонентам смеси

$$\omega_i = \frac{k_i S_i}{\sum_{i=1}^n k_i S_i} \cdot 100$$

- Метод применим, при полном разделении пиков и полной идентификации компонентов
- Используется для малого числа компонентов смеси

Газовая хроматография

- **ГХ** – это вариант хроматографии, в котором подвижной фазой является инертный газ (газ-носитель), протекающий через неподвижную фазу, обладающую большой поверхностью
- **ПФ:** гелий, азот, аргон, водород, диоксид углерода или воздух
- Требования к газу-носителю:
 - инертность по отношению к разделяемым веществам и сорбенту
 - взрывобезопасность
 - чистота

- Газовая хроматография – метод разделения летучих соединений
- Можно анализировать газообразные, жидкие и твердые вещества, отвечающие требованиям:
 - молекулярная масса меньше 400
 - летучесть
 - инертность
 - легкость получения
 - термостабильность
- Это, как правило, органические вещества, хотя методом ГХ можно определять и почти все элементы периодической системы в виде летучих соединений

Газотвердофазная хроматография (ГАХ)

- **НФ** в ГАХ – искусственные и природные адсорбенты –
- активированные угли, силикагели, оксид алюминия
- пористые стекла, пористые полимеры, синтетические цеолиты (молекулярные сита), макропористые силикагели (силохром, порасил, сферосил)
- *Требования к адсорбентам:*
- Селективность
- отсутствие каталитической активности
- химическая инертность к компонентам разделяемой смеси
- механическая прочность
- высокая удельная поверхность (10–1000 м²/г)

Области применения ГАХ

- анализ смесей газов и низкокипящих углеводородов, не содержащих активных функциональных групп
- определение воды в неорганических и органических материалах
- *примеры:*
- разделение O_2 , N_2 , CO , CH_4 , CO_2 на глинистых материалах
- разделение гидридов металлов (Ge, As, Sn, Sb) на сорбентах порпаках

Газожидкостная хроматография

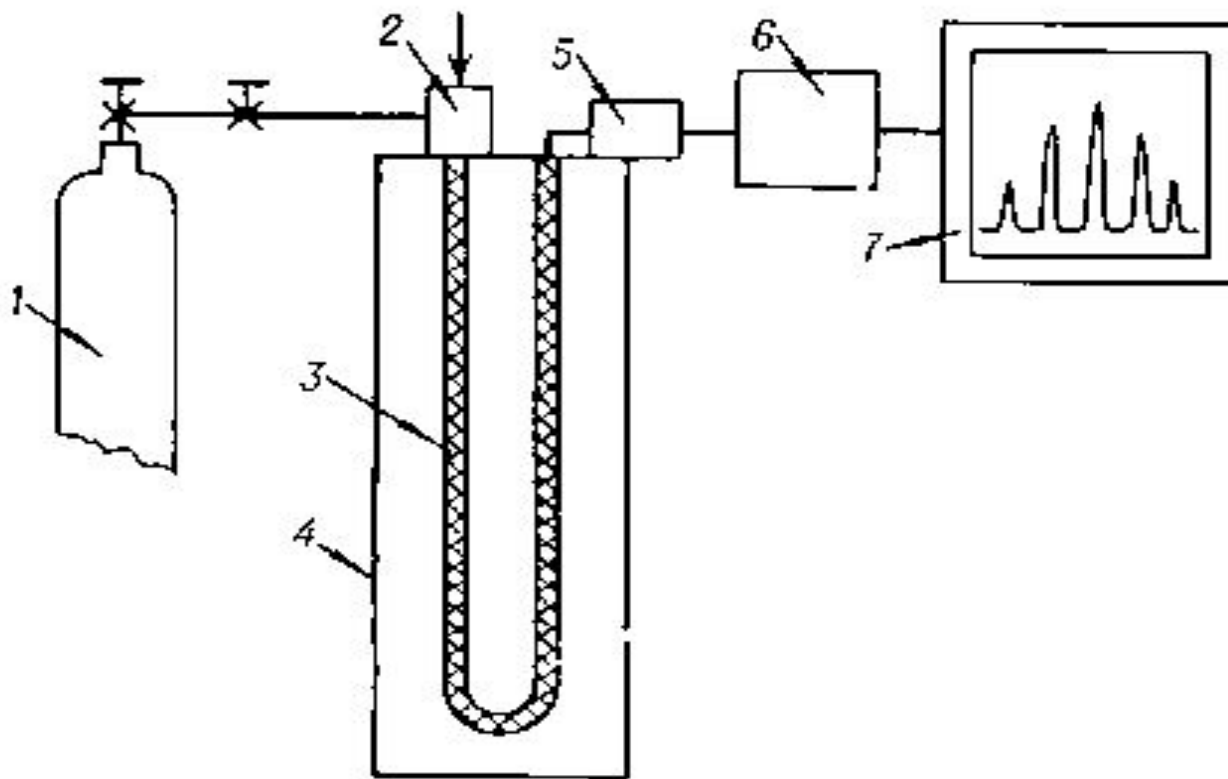
- НФ в ГЖХ - практически нелетучая при температуре колонки жидкость, нанесенная на твердый носитель
- *Требования к жидкой фазе:*
- 1) способность хорошо растворять компоненты смеси
- 2) инертность по отношению к компонентам смеси и твердому носителю
- 3) малая летучесть
- 4) термическая устойчивость
- 5) достаточно высокая селективность
- 6) небольшая вязкость
- 7) способность образовывать прочно связанную с носителем равномерную пленку

- Природа жидкой фазы является тем основным фактором, который определяет последовательность выхода компонентов из колонки
- В качестве *жидких фаз* применяются
- неполярные парафины (сквалан, апиезоны, вазелиновое масло)
- умеренно полярные (сложные эфиры, нитрилы и др.)
- полярные (полиэтиленгликоли или карбоваксы, гидроксиламины и др.)

- **Твердым носителем** обычно служит практически инертное твердое вещество, на которое наносят неподвижную жидкость
- **Требования к твердому носителю:**
- способность удерживать жидкую фазу на своей поверхности в виде однородной пленки
- значительная удельная поверхность (0,5-10 м²/г)
- макропористость, однородность пор по размерам
- отсутствие каталитической активности
- механическая прочность
- стабильность при повышенных температурах
- однородность размера зерен
- Однако до настоящего времени не создано универсального носителя, удовлетворяющего всем перечисленным требованиям

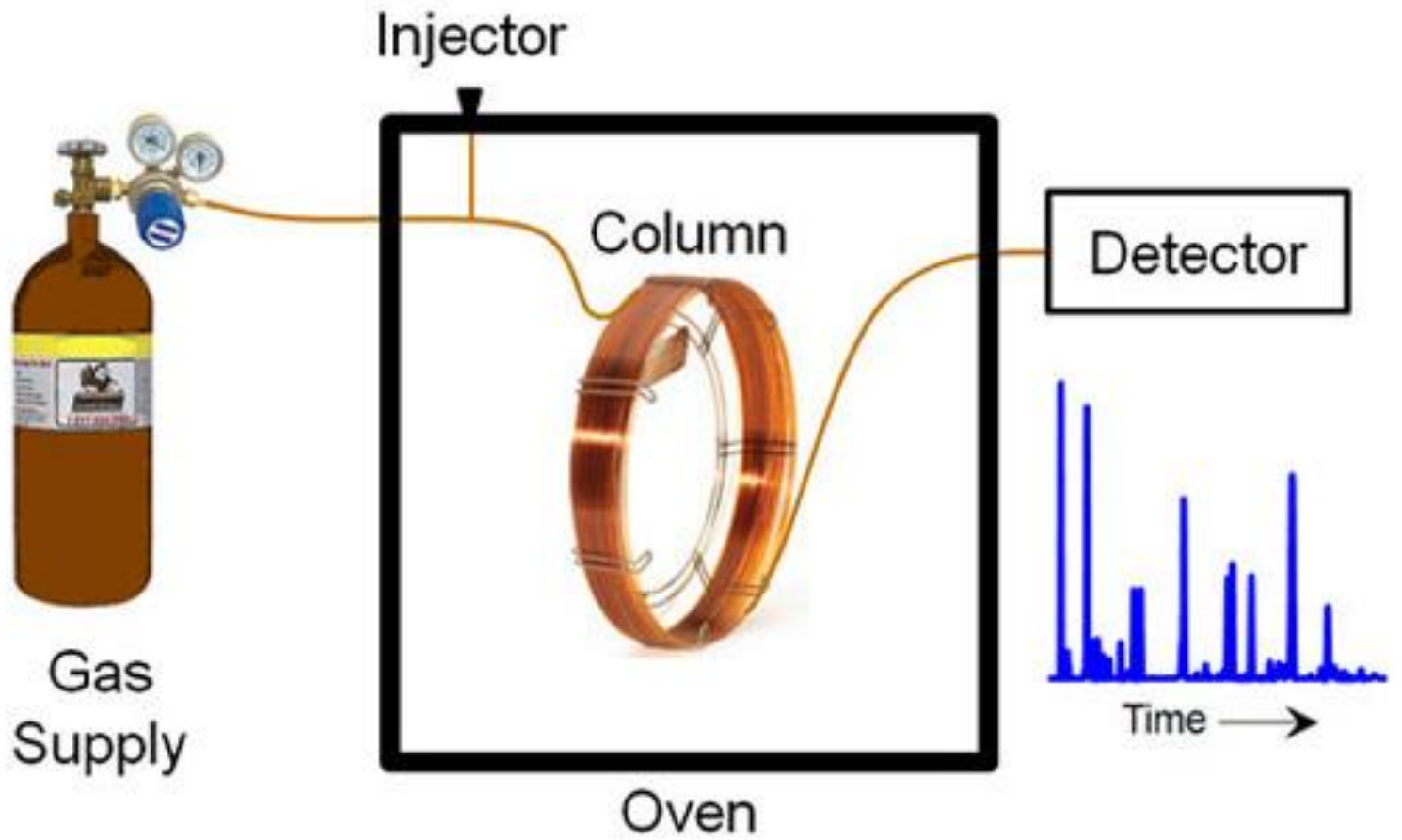
- В качестве *твердых носителей* в газо-жидкостной хроматографии используются
 - диатомиты (кизельгур, инфузорная земля)
 - синтетические кремнеземы (макропористые силикагели, широкопористые стекла, аэросилогели)
- полимерные носители на основе политетрафторэтилена и т.д.

Газовый хроматограф (блок-схема)



1 – баллон со сжатым газом; 2 – дозатор для ввода пробы;
3 – хроматографическая колонка; 4 – термостат; 5 – детектор;
6 – процессор; 7 – самописец (монитор)

- Газ-носитель из **баллона** (1) пропускают под давлением через хроматографическую систему
- Пробу вводят в **дозатор** (2) в испарителе, температура которого много выше $T_{кип}$ компонентов смеси
- ПФ переносит пары смеси в **колонку** (3), компоненты смеси распределяются на колонке в соответствии с сорбируемостью (растворимостью)
- Количество вещества на выходе из колонки обнаруживают с помощью **детектора** (5)
- **Самописец** или компьютер регистрирует сигнал в виде хроматограммы (7)



- Пробу перед вводом в колонку дозируют – впрыскивают с помощью микрошприца ($V=0,5-20$ мкл) в поток ПФ через силиконовую мембрану
- Проба мгновенно испаряется, т.к. температура дозатора выше температуры колонки \approx на 50°



Колонки

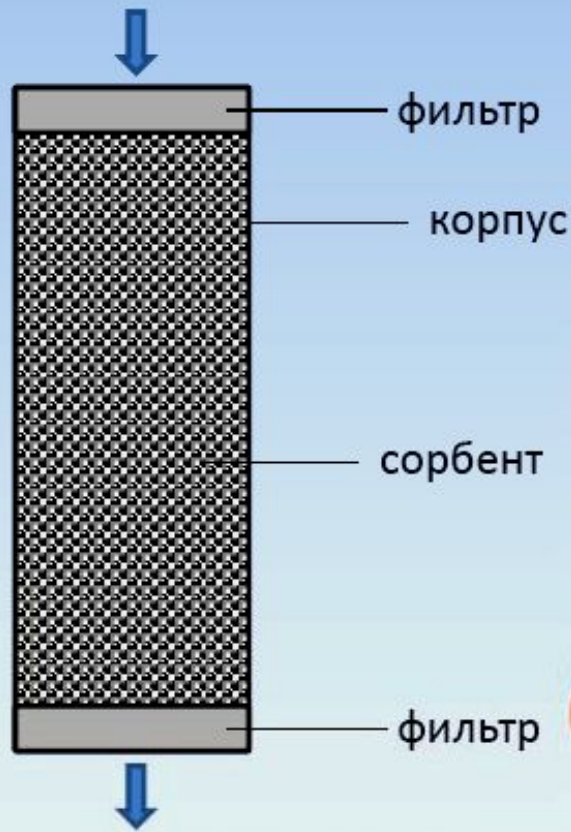
- **Насадочные**

- Диаметр около 2-5 мм
- Длина 0,5 – 20 м
- изготавливают из нержавеющей стали, меди, латуни, стекла
- Материал колонок должен обладать химической инертностью по отношению к компонентам пробы
- распространены спиральные, U- и W - образные колонки

- **Капиллярные**

- Диаметр около 0,2-0,5 мм
- Длина 10 – 100 м
- изготавливают из кварцевого стекла
- В ГАХ толщина слоя сорбента составляет 5-10 мкм
- В ГЖХ жидкость (НФ) наносят на внутреннюю стенку колонки слоем 0,01 -1 мкм

КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ



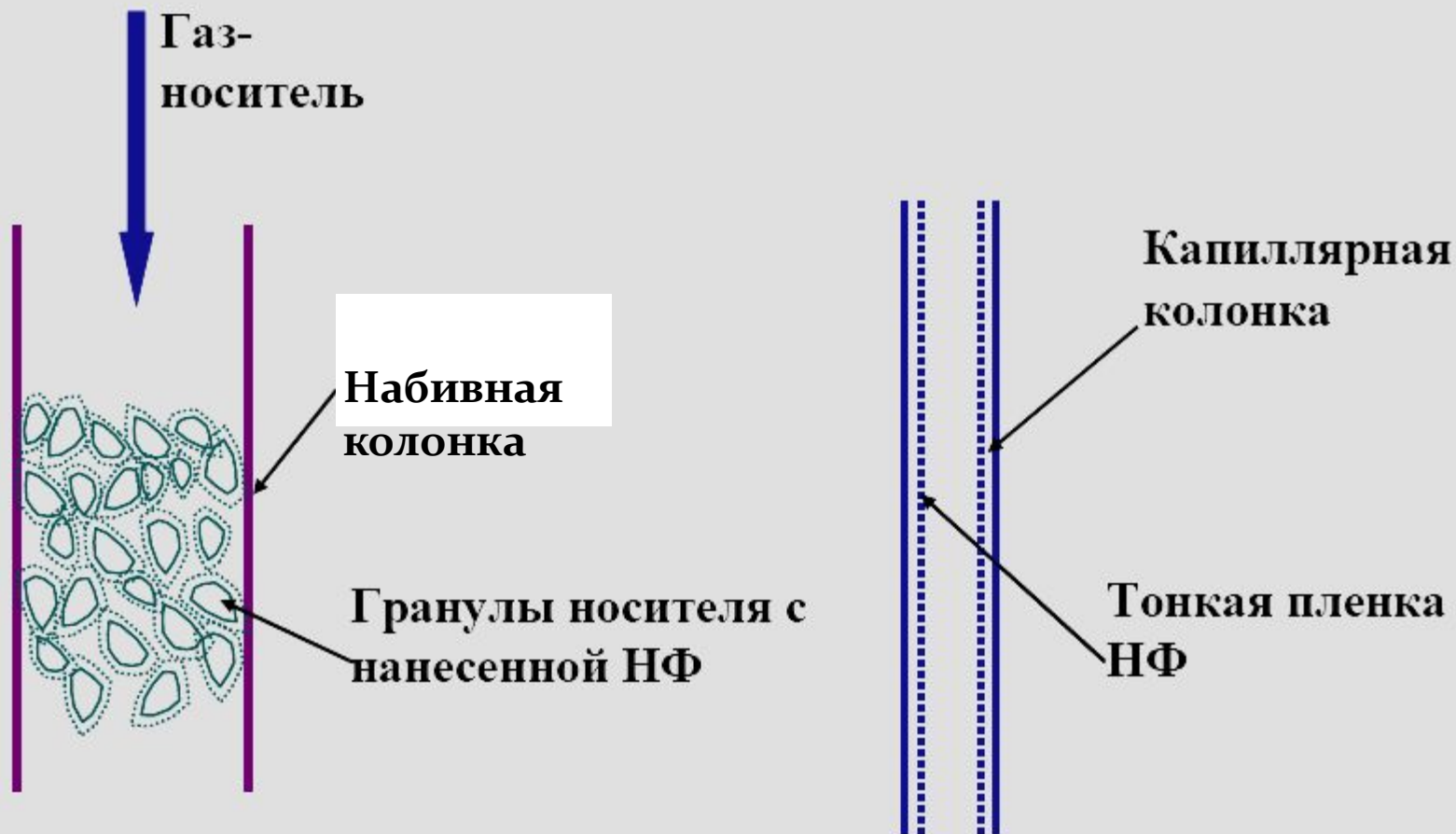
Хроматографические колонки

Набивные

Капиллярные



Колонки в газо-жидкостной хроматографии

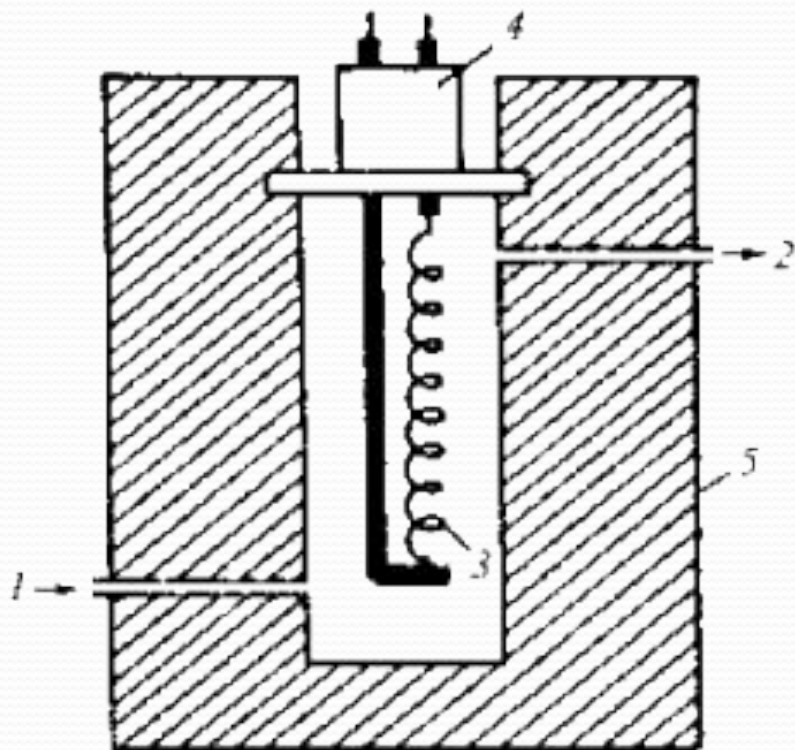


Детектор

- Это устройство для обнаружения изменений в составе газа, прошедшего через колонку
- Показания детектора преобразуются в электрический сигнал, который регистрируется самопишущим прибором на бумаге или дисплее компьютера

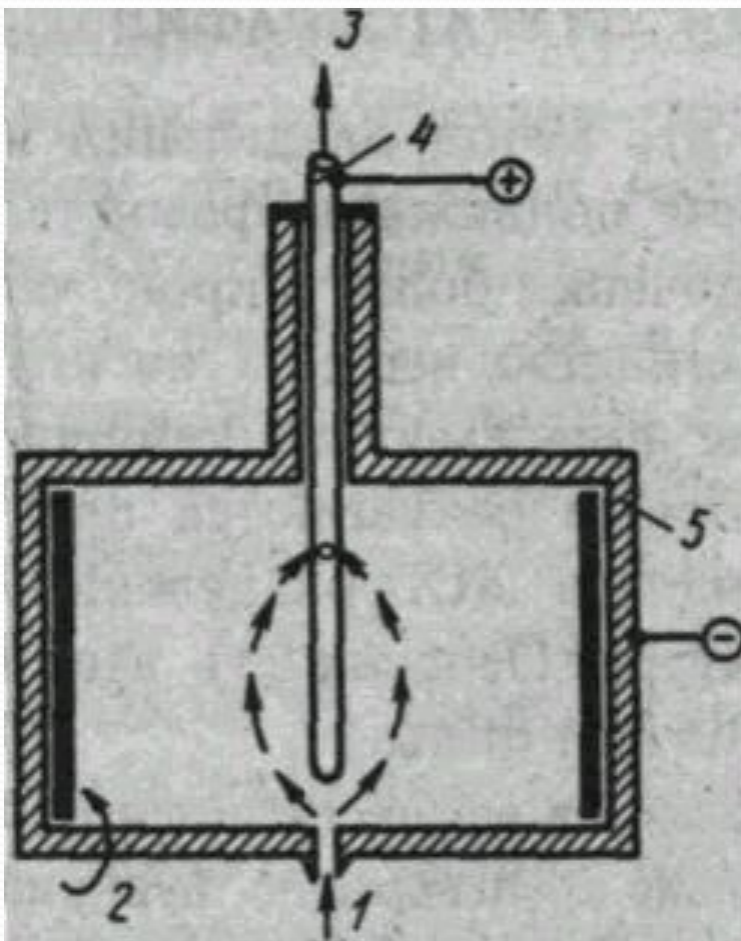
Типы детекторов

- 1. **Катарометр** (детектор по теплопроводности)
- измеряется сопротивление нагретой вольфрамовой нити, омываемой газом-носителем . При изменении состава газовой смеси меняется теплопроводность газа и сопротивление нити
- Чувствительность катарометра тем выше, чем больше теплопроводность газа-носителя
- Наиболее подходящим газом-носителем является водород, в целях техники безопасности чаще применяется гелий
- Достоинства катарометра: простота, достаточная точность и надежность в работе
- Однако из-за невысокой чувствительности он не применяется для определения микропримесей



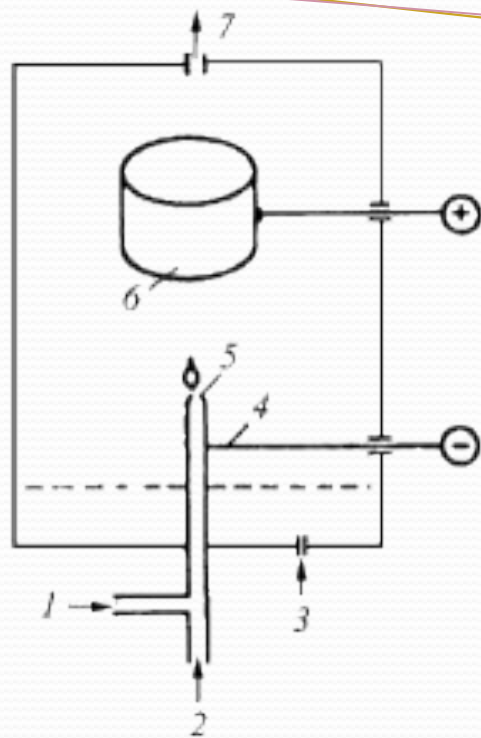
- 1 - ввод газа из хроматографической колонки; 2 - вывод продуктов в атмосферу; 3 - нить сопротивления; 4 - изолятор; 5 - металлический блок катарометра

- **2. Детектор электронного захвата**
- Газ-носитель (гелий, азот) ионизируют потоком радиоактивных частиц, концентрацию свободных электронов измеряют с помощью пары электродов
- В присутствии вещества, захватывающего свободные электроны, ток уменьшается
- детектор дает ток на соединения, содержащие галогены, серу, фосфор, нитраты, свинец, кислород
- Не реагирует на большинство углеводородов



- Схема детектора электронного захвата
- 1 – ввод газа
- 2 – источник излучения
- 3 – вывод в атмосферу
- 4, 5 - электроды

- **3. Пламенно-ионизационный детектор**
- измеряют электрическую проводимость пламени водородной горелки
- При появлении в пламени водорода примесей органических соединений происходит ионизация пламени, пропорциональная концентрации примеси, ток резко усиливается
- Детектор применим только для анализа органических веществ
- Не реагирует на аммиак, сероводород, воду, кислород, азот, оксид серы, оксид углерода, водород, инертные газы
- Имеет широкую область линейного отклика (6-7 порядков), поэтому наиболее пригоден для определения следов



- Схема ПИД
- 1 – ввод водорода
- 2 – ввод газа из колонки
- 3 – ввод воздуха
- 4 – катод
- 5 – пламя
- 6 – собирающий электрод
- 7 - вывод в атмосферу



Области применения ГХ

- ГХ – один из самых современных методов многокомпонентного анализа
- **Достоинства метода:** экспрессность, высокая точность, чувствительность, автоматизация
- Эффективен при разделении и определении веществ одного класса – углеводороды, спирты, органические кислоты и др.
- Методом ГХ анализируют продукцию основной химии и промышленности основного органического синтеза
- Метод незаменим в нефтехимии для определения состава бензинов, керосинов, масел
- ГХ используется в биологии, медицине, в технологии переработки древесины, в лесохимии и пищевой промышленности –
- - для определения лекарственных веществ, пестицидов, витаминов, наркотиков и др.
- Метод используется в препаративных целях, для очистки химических препаратов

Газовая хроматограмма смеси веществ

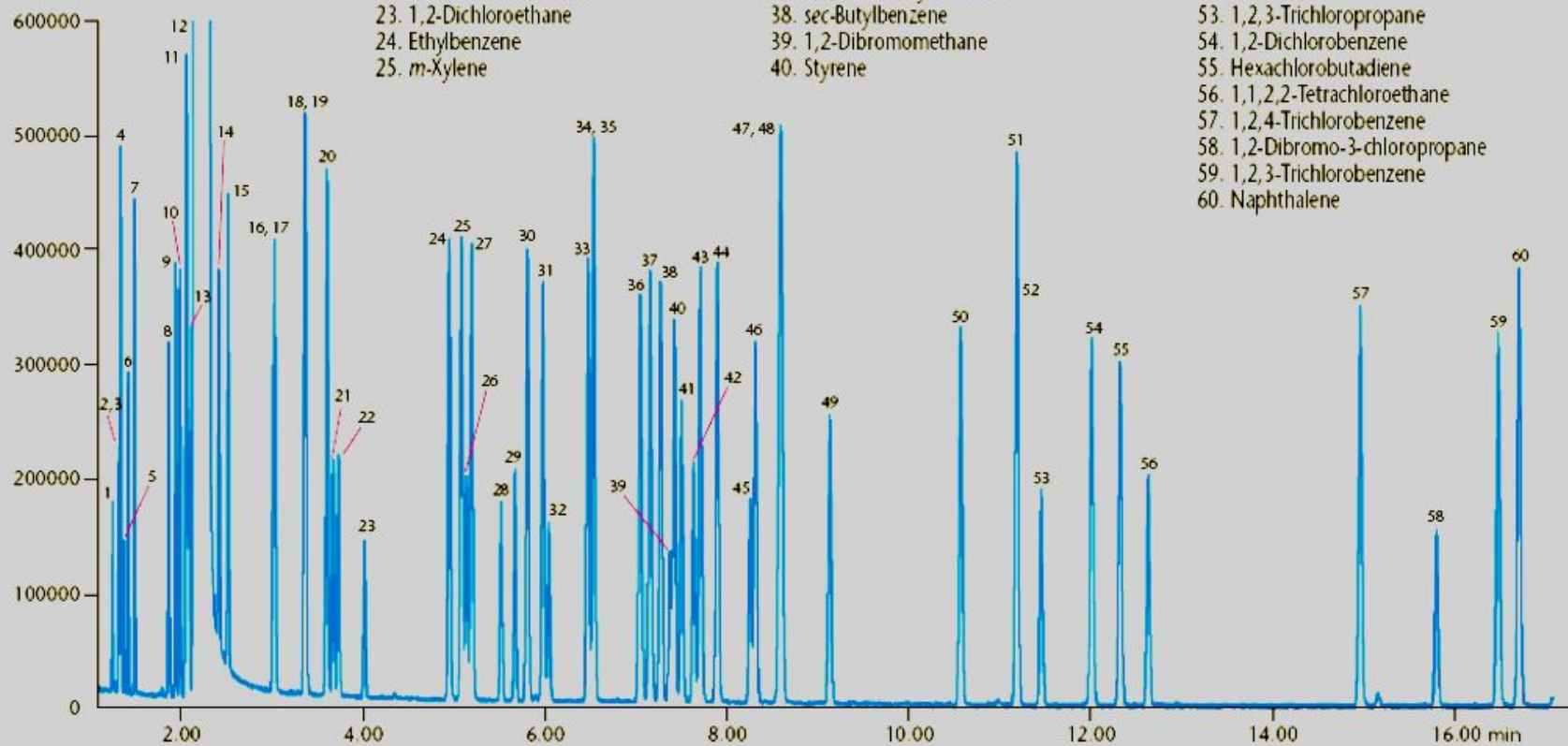
Components

1. Dichlorodifluoromethane
2. Chloromethane
3. Chloroethene
4. Trichlorofluoromethane
5. Chloroethane
6. Bromoethane
7. 1,1-Dichloroethene
8. 2,2-Dichloropropane
9. 1,2-Dichloroethene (cis)
10. 1,1-Dichloro-1-propene

11. 1,1,1-Trichloroethane
12. Carbon tetrachloride
13. 1,1-Dichloroethane
14. Dichloromethane
15. Benzene
16. 1,2-Dichloroethene (trans)
17. Trichloroethene
18. Tetrachloroethene
19. Chloroform
20. Toluene
21. 1,2-Dichloropropane
22. Bromochloromethane
23. 1,2-Dichloroethane
24. Ethylbenzene
25. *m*-Xylene

26. 1,3-Dichloro-1-propene (cis)
27. *p*-Xylene
28. *o*-Xylene
29. Bromodichloromethane
30. Dibromomethane
31. Isopropyl benzene
32. 1,3-Dichloropropane
33. *n*-Propylbenzene
34. Chlorobenzene
35. 1,3-Dichloro-1-propene (trans)
36. *t*-Butylbenzene
37. 1,2,4-Trimethylbenzene
38. *sec*-Butylbenzene
39. 1,2-Dibromomethane
40. Styrene

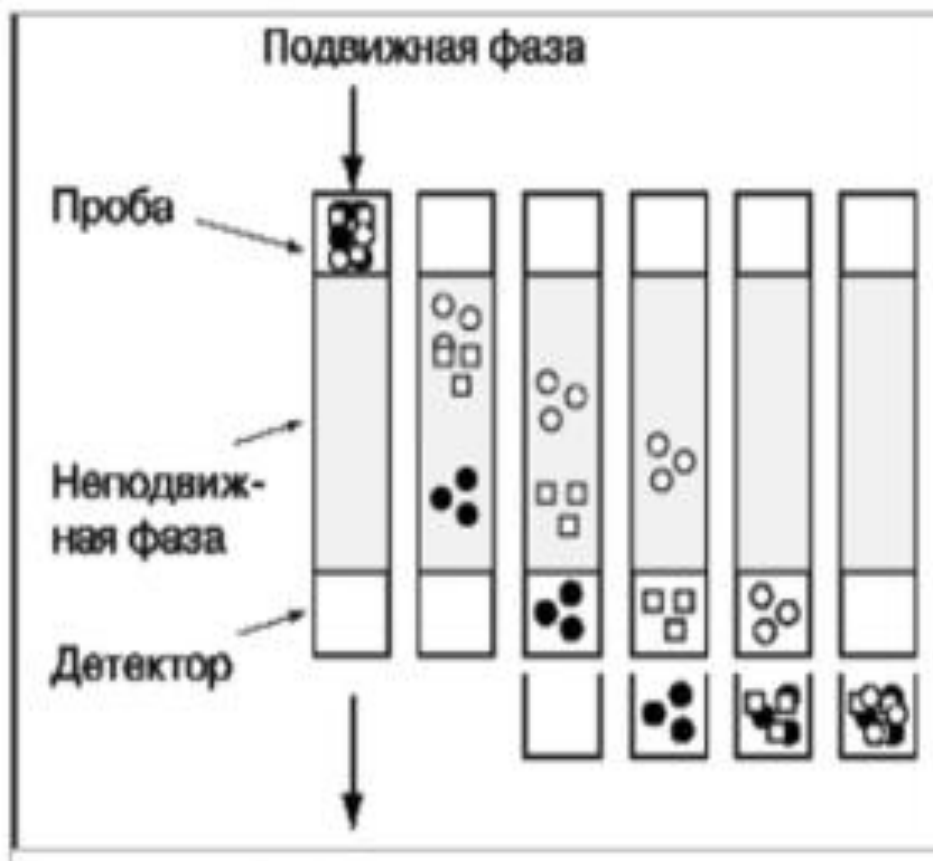
41. 1,1,1,2-Tetrachloroethane
42. 1,1,2-Trichloroethane
43. 4-Isopropyltoluene
44. 1,3,5-Trimethylbenzene
45. Dibromochloromethane
46. 2-Chlorotoluene
47. *n*-Butylbenzene
48. 4-Chlorotoluene
49. Bromobenzene
50. 1,4-Dichlorobenzene
51. 1,3-Dichlorobenzene
52. Bromoform
53. 1,2,3-Trichloropropane
54. 1,2-Dichlorobenzene
55. Hexachlorobutadiene
56. 1,1,2,2-Tetrachloroethane
57. 1,2,4-Trichlorobenzene
58. 1,2-Dibromo-3-chloropropane
59. 1,2,3-Trichlorobenzene
60. Naphthalene



Жидкостная хроматография

- В методе ЖХ подвижной фазой служит жидкость
- Метод ЖХ применим для разделения более широкого круга веществ, чем метод ГХ, поскольку большинство веществ не обладает летучестью, а многие из них неустойчивы при высоких температурах
- В ЖХ разделение чаще всего происходит при комнатной температуре
- Жидкая ПФ, в отличие от газа в ГХ, не только выполняет транспортную функцию, но и является активным элюентом. Молекулы жидкой фазы могут сорбироваться на поверхности неподвижной фазы
- Поэтому при прохождении через колонку компоненты смеси должны вытеснить молекулы элюента с поверхности сорбента
- Применяя различные элюенты, можно изменять параметры удерживания и селективность хроматографической системы

- В **классическом** варианте ЖХ используют стеклянные колонки длиной 1–2 м, размер частиц сорбента ~100 мкм
- ПФ движется под действием силы тяжести, поэтому анализ продолжителен. Однако такой вариант ЖХ не требует дорогостоящего оборудования и до сих пор находит применение
- В **высокоэффективном** варианте метода – **ВЭЖХ** - используют сорбенты с меньшим размером частиц (до 5–10 мкм), нагнетательные насосы для увеличения скорости ПФ, чувствительные детекторы
- Достоинства метода ВЭЖХ: универсальность, возможность разделения и анализа сложных смесей органических и неорганических веществ, экспрессность, эффективность и высокую чувствительность
- Это серийный метод определения органических соединений многих классов, его широко используют при анализе смесей аминокислот, белков, лекарственных препаратов
- ВЭЖХ находит применение и в неорганическом анализе для разделения ионов в зависимости от их размера



- Метод ВЭЖХ основан на разделении анализируемого экстракта в неподвижной фазе **хроматографической колонки** (рисунок 1) и дальнейшей их идентификации и количественном определении с помощью специальных детекторов

Адсорбционная хроматография

- В зависимости от полярности неподвижной и подвижной фаз различают
 - нормально-фазовую (НФХ)
 - и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографии
- В НФХ используют полярный адсорбент и неполярные подвижные фазы
- В ОФХ – неполярный адсорбент и полярные подвижные фазы
- Неподвижная фаза должна удерживать разделяемые компоненты
- Подвижная фаза, т.е.растворитель, должна обеспечить различную емкость колонки и эффективное разделение за приемлемое время

- **Неподвижные фазы** - тонкодисперсные пористые материалы с удельной поверхностью более 50 м²/г
- **Полярные адсорбенты** (SiO₂, Al₂O₃, оксиды металлов, флорисил и др.) имеют на поверхности слабокислотные OH-группы, способные удерживать вещества с основными свойствами
- Недостаток полярных сорбентов – высокая чувствительность к содержанию воды в растворителях, приводящая к изменению свойств поверхности и невозможным результатам анализа
- Для ВЭЖХ применяют полярные сорбенты с привитыми полярными группами (амины, диолы и др.), что позволяет менять селективность, подбирая подходящий элюент

- *Неполярные адсорбенты* (графитированная сажа, кизельгур, диатомит) не проявляют селективности к полярным молекулам
- Используют также сорбенты с привитыми неполярными фазами, например силикагель с алкилсилильными группами от C_2 до C_{22}
- Кроме того, используют поверхностно-пористые носители – стеклянные шарики, покрытые тонким пористым слоем активного полярного или неполярного сорбента
- Такие сорбенты оказывают малое сопротивление потоку, за счет чего увеличивается скорость анализа

- **Подвижные фазы**
- ПФ должна растворять анализируемую пробу, обладать малой вязкостью; должна быть возможность выделения из нее разделенных компонентов
- Подвижная фаза должна быть инертной по отношению к материалам всех частей хроматографа, безопасной, дешевой
- В ЖХ важен выбор подвижной фазы, поскольку она оказывает большое влияние на селективность разделения, эффективность колонки и скорость движения хроматографической полосы

- Разделения компонентов достигают, меняя *элюирующую силу* растворителя
- Элюирующая сила определяется полярностью растворителя
- В НФХ с увеличением полярности растворителя элюирующая сила растворителя растет, в ОФХ – снижается
- Часто применяют не индивидуальные растворители, а их смеси. Незначительные добавки другого растворителя, особенно воды, существенно увеличивают элюирующую силу элюента
- При разделении многокомпонентных смесей часто применяют метод ступенчатого или *градиентного элюирования*, применяя в процессе хроматографирования последовательно все более сильные элюенты
- Это позволяет элюировать сильноудерживаемые вещества за меньшее время

- Для разделения веществ разной полярности и для разделения соединений разных классов применяют НФХ
- из неполярных ПФ соединения разных классов выходят из колонки с полярным сорбентом за разное время (t_R соединений увеличивается с ростом их полярности)
- Для очень полярных веществ t_R так велики, что элюировать их неполярными элюентами невозможно, используют полярные элюенты
- В ОФХ неподвижная фаза сильнее адсорбирует неполярные компоненты из полярных элюентов, например из воды
- Снижая полярность элюента, можно уменьшить t_R компонентов
- Метод адсорбционной ВЭЖХ – это серийный метод определения органических соединений многих классов, его широко используют при анализе смесей аминокислот, белков, лекарственных, препаратов

Распределительная хроматография

- В этом методе вещества распределяются между двумя несмешивающимися жидкостями
- Жидкую НФ наносят на пористый инертный сорбент и заполняют им распределительную колонку
- При пропускании жидкой подвижной фазы через колонку смесь разделяется на компоненты главным образом за счет их различной растворимости в жидкой неподвижной фазе
- Обычно растворимость компонентов пробы в подвижной и неподвижной фазах, обладающих разной полярностью, сильно различается

- Если растворимость пробы выше в НФ, то время удерживания компонентов значительно возрастает. Если растворимость пробы выше в ПФ, то время удерживания может быть близким к времени удерживания несорбируемого компонента
- Чтобы добиться разделения, в подвижную фазу, насыщенную неподвижной, включают третий компонент, снижающий различие в полярности подвижной и неподвижной фаз. Например, к смеси из неполярного (гексан) и полярного (вода) растворителей прибавляется спирт

- В нормально-фазовой распределительной хроматографии используют следующие системы: полярный растворитель (вода, спирт) фиксирован на твердом носителе – силикагеле, диатомите, целлюлозе, оксиде алюминия. Полярной фазой в этом случае служат неполярные растворители – изооктан, бензол, и др.
- В обращенно-фазовой распределительной хроматографии неполярный растворитель фиксируют на носителе, а в качестве подвижной фазы используют полярные растворители (вода, спирт, буферные растворы, сильные кислоты)

- Нанесенные жидкие фазы имеют большой недостаток – они быстро смываются подвижной жидкой фазой с поверхности носителя, особенно, в ВЭЖХ - варианте
- Поэтому жидкие фазы прививают к носителю. В качестве носителей неподвижных жидких фаз для НФРХ используют силикагели с привитыми нитрильными, аминными и другими группами
- В обращенно-фазовом варианте используют силикагели с привитыми алкилсилильными группами. Механизм удерживания на таких сорбентах сложен
- Метод распределительной хроматографии применяют для разделения сильнополярных соединений, аминокислот, фенолов, фенилкарбоновых кислот и др.

Особенности жидкостных хроматографов

- Жидкостной хроматограф – более сложный прибор, чем газовый
- Система подачи элюента дополнительно включает:
- Систему дегазации (пузырьки газа в детекторе делают невозможной его применение)
- Устройство для создания градиента (обеспечивает отбор элюента из 2-3 емкостей в смеситель, затем в колонку)
- Насосы и измерители давления (дозаторы работают при высоких давлениях, часто используют дозатор с остановкой потока)

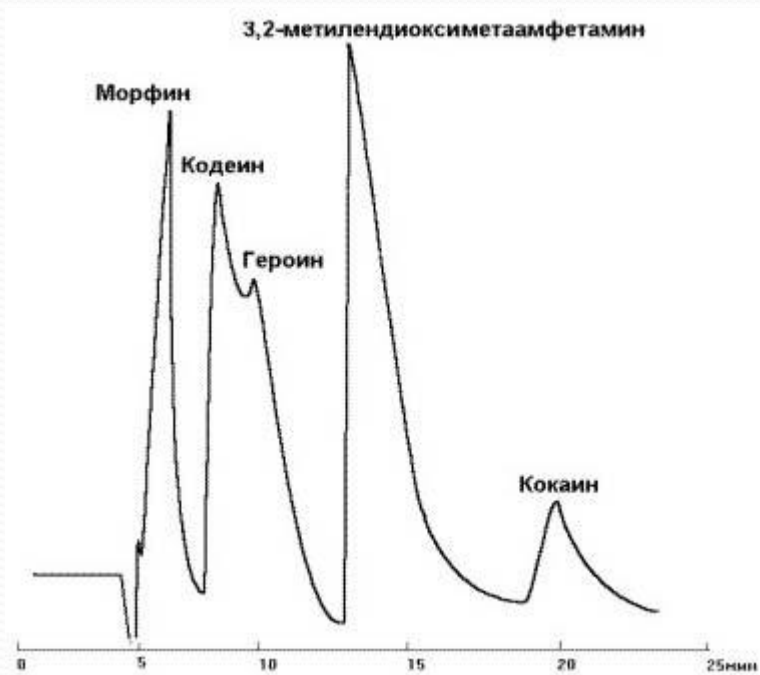
- В ВЭЖХ обычно используют прямые колонки длиной $L=10-25$ см, $d = 4-5,5$ мм
микроколоночный вариант:
($L=5-6$ см, $d = 1-2$ мм)



- В жидкостных хроматографах часто используют автоматические коллекторы фракций, что позволяет использовать для количественного анализа другие ФХМА
- Все объемы соединительных трубок, колонок, ячейки детектора, ввода пробы должны быть как можно меньшими, чтобы избежать внеколоночного размывания пиков



**Система высокоэффективной жидкостной хроматографии
PE 200 Series (PerkinElmer, США)**



- Определение наркотиков методом **высокоэффективной жидкостной хроматографии**
- http://www.ci.ru/inform23_02/p...

- Детекторы в ВЭЖХ
- Рефрактометрический
- УФ-детектор
- Детектор на диодной матрице
- Флуоресцентный
- Электрохимический
- Масс-спектрометрический

- Метод ВЭЖХ находит широкое применение в таких областях, как химия, нефтехимия, биология, биотехнология, медицина, пищевая промышленность, охрана окружающей среды, производство лекарственных препаратов и во многих других

Спасибо за внимание!

