МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ

Хроматография

ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

ГАЗОЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

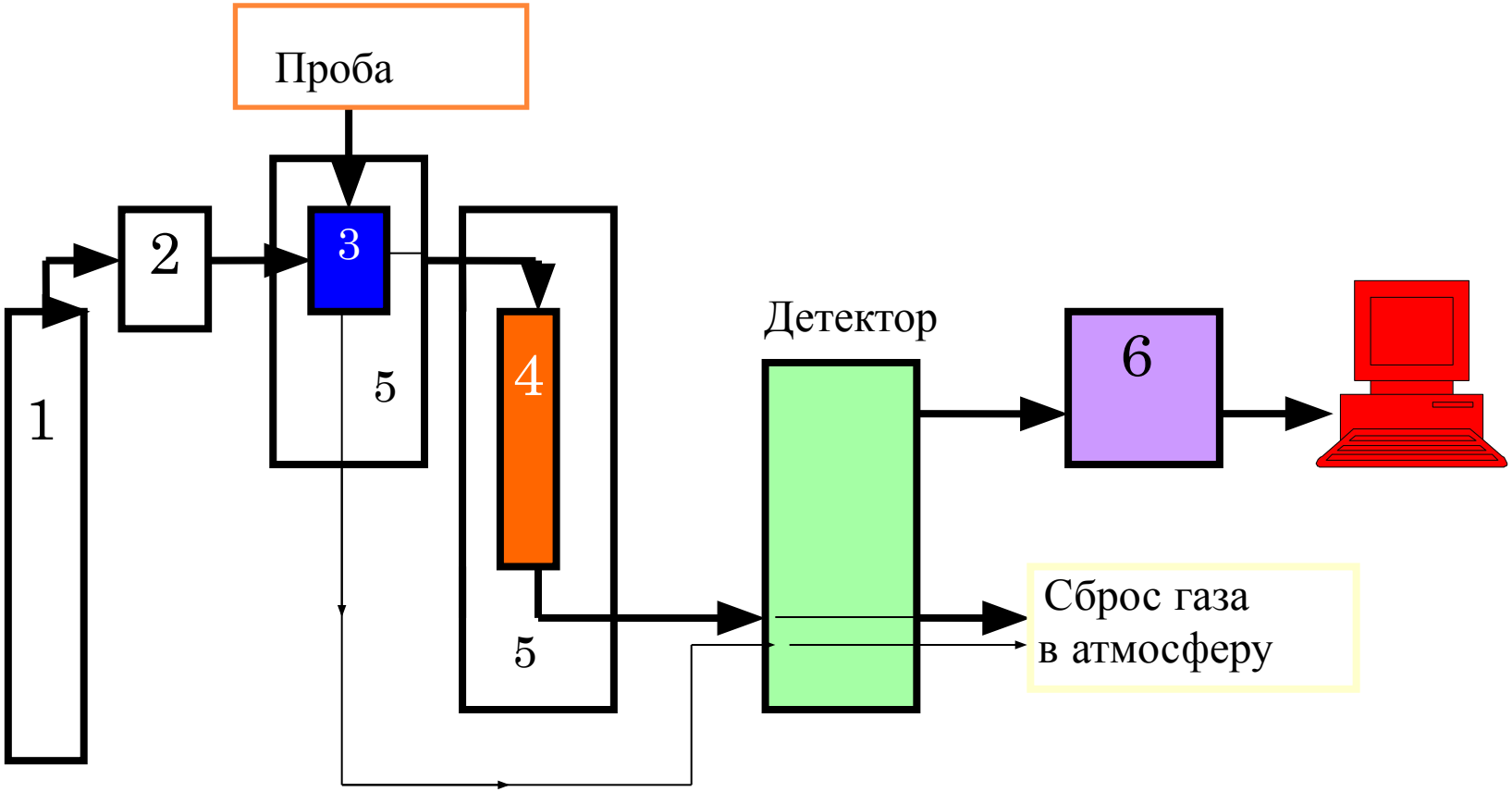
А.Мартин

- **В этом методе компоненты газовой смеси разделяются за счет их многократного растворения в неподвижной жидкой фазе (НЖФ) и последующего извлечения новыми порциями газа-носителя. Таким образом реализуется распределительный механизм ГЖХ, родственный процессу экстракции.**
- **Метод ГЖХ используется для анализа смесей органических веществ. Самый распространенный из хроматографических методов.**

- **Метод ГЖХ предложен в 1952 г. А.Мартином и А.Джеймсом.**

Схема газового хроматографа

1 – баллон с газом-носителем (N_2 или He); 2 – блок подготовки газа-носителя; 3 – дозатор (испаритель); 4 – колонка; 5 – термостаты испарителя и колонки; 6 – самописец, интерфейс и т. п.



В качестве газа-носителя применяют азот, гелий, аргон.

Изредка применяют водород, углекислый газ и др.

Газ-носитель:

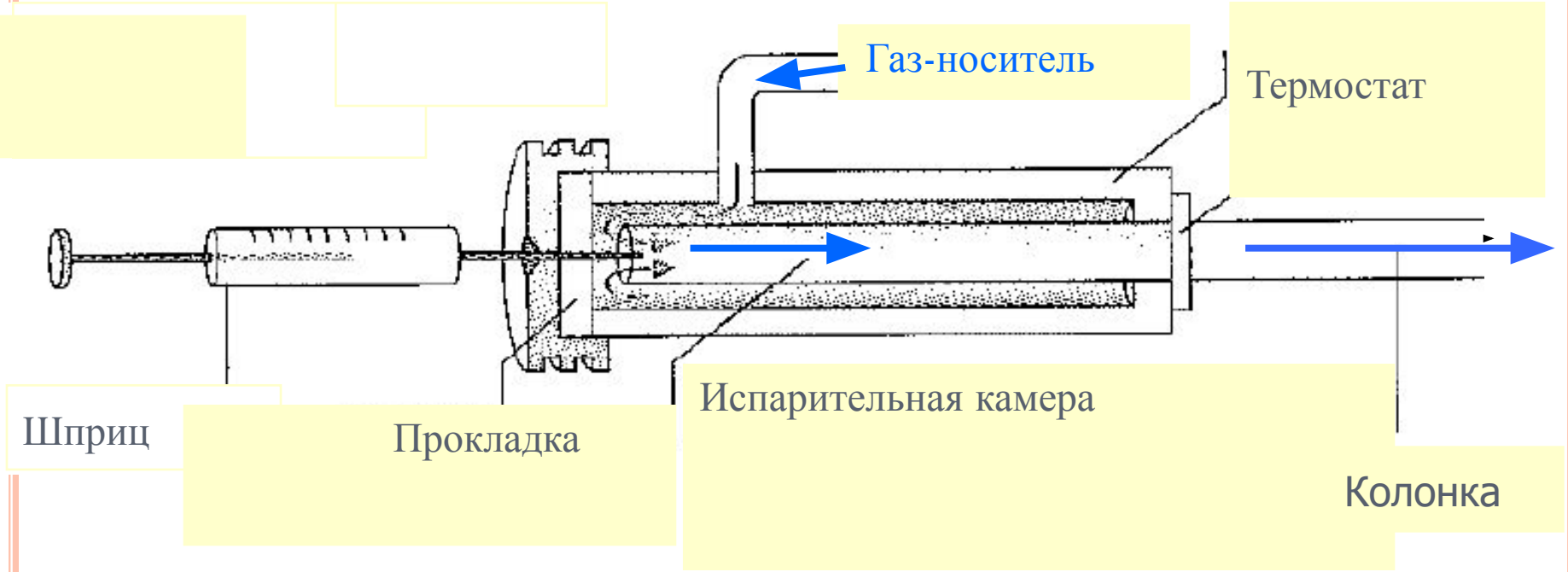
- не должен химически взаимодействовать с НЖФ, компонентами пробы, сорбентом или частями хроматографа;
- должен обеспечивать возможность детектирования компонентов смеси;
- должен иметь высокую чистоту. Поэтому его дополнительно очищают (фильтры, форколонки, охлаждаемые ловушки для примесей и др.).
- газ-носитель необходимо точно дозировать (давление, расход).

Газ-носитель	Характеристика свойств

Газ-носитель	Характеристика свойств

Ввод пробы

- Жидкие и твердые пробы заранее растворяют. Легкоиспаряемый растворитель не должен реагировать с компонентами пробы, НЖФ и газом-носителем.



- Аликвоту полученного раствора с помощью шприца вводят в испаритель хроматографа, где она испаряется в потоке газа-носителя. Газообразные пробы вводят прямо в поток.

- Для ввода пробы можно использовать краны-дозаторы, а также импульсные нагреватели для термодесорбции летучих веществ из твердых образцов.

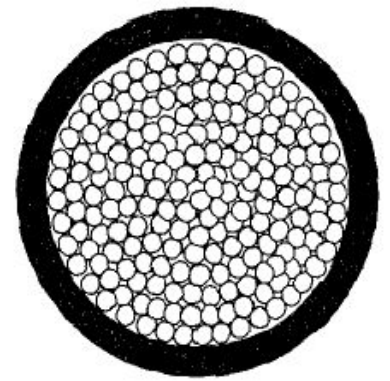
КОЛОНКИ В ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

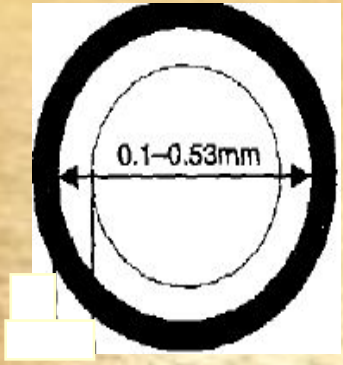
Набивные (насадочные) –

внутренний диаметр 3-10 мм,

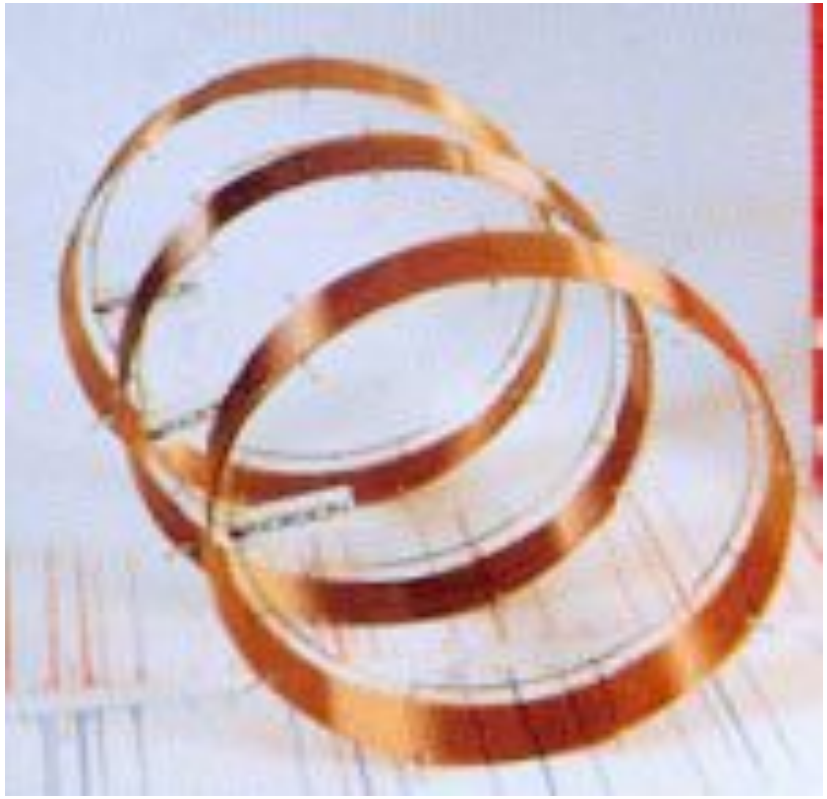
l < 10 м. Колонку заполняют диатомитами, оксидом алюминия, силикагелем, органическими сорбентами. Предварительно на сорбенты наносят НЖФ.

Капиллярные – внутренний диаметр 0.25-0.5 мм, l = 30-100 м. На внутреннюю поверхность наносят НЖФ. Капиллярные колонки появились несколько позже, чем насадочные. Они значительно дороже.





Капиллярные колонки



В основном из плавленого кварца, нанесение полиамидной пленки делает их гибкими. Легко крепятся к держателям, инжектору, детектору

Неподвижную фазу в принципе можно заменять. Высокая эффективность достигается при ламинарности потока газа-носителя

Насадочные колонки

Требования к сорбентам (носителям):

- достаточно малый размер зерна (20-40 мкм);
- монодисперсность;
- механическая прочность;
- термостойкость и химическая инертность

Природа носителей: диатомиты, а также алюмосиликаты, силикагель, полимеры (тефлон) и др.

Фирменные названия: хромосорб, цветохром, новосорб и др.

Требования к неподвижной жидкой фазе

- Малая летучесть ($T_{кип}$ на 100 - 200^0 выше рабочей температуры);
- Устойчивость (инертность) при рабочих температурах;
- Высокая, но не одинаковая растворимость компонентов пробы;
- Способность смачивать носитель (образование пленки)

КАК ВЫБРАТЬ НЕПОДВИЖНУЮ ФАЗУ В ГЖХ

- Найти литературные данные по индексам удерживания (или коэффициентам распределения) компонентов смеси на разных НЖФ. Выбирают ту фазу, где индексы сильнее различаются!

- Если данные по индексам не найдены, следует учесть, что полярность НЖФ должна быть сходна с полярностью компонентов анализируемой смеси («подобное растворяется в подобном»);

- Учесть температуры кипения компонентов разделяемой смеси и степень их структурного сходства;

- Учесть температуры испарения и разложения разных НЖФ, доступность и стоимость этих НЖФ;

- Для выбора НЖФ следует использовать справочники, научную литературу, Интернет. Можно спросить у того, кто знает!

Факторы, улучшающие разрешение пиков

- правильный выбор ПФ и НЖФ;
- увеличение длины колонки, уменьшение внутреннего диаметра;
- однородность сорбента, сферичность его молекул;
- равномерность набивки колонки сорбентом;
- оптимальная скорость потока газа-носителя;
- уменьшение объема вводимой пробы;
- правильный выбор температуры колонки;
- использование программирования температуры.

ТРЕБОВАНИЯ К ДЕТЕКТОРАМ (В ЛЮБОМ ВАРИАНТЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА)

- Высокая чувствительность
- Малая инерционность
- Линейная зависимость «отклик-концентрация»
- Воспроизводимость отклика
- Простота в использовании, безопасность и доступность

ДЕТЕКТОРЫ В ГЖХ

Универсальные:

- детектор по теплопроводности (катарометр),
- пламенно-ионизационный детектор (ДИП, ПИД).

Селективные:

- детектор электронного захвата (ДЭЗ),
- спектрофотометрический детектор (поглощение в ИК-области),
- масс-спектрометрический детектор,
- другие.

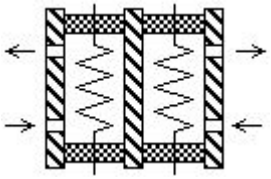
Детектор по теплопроводности (катарометр)

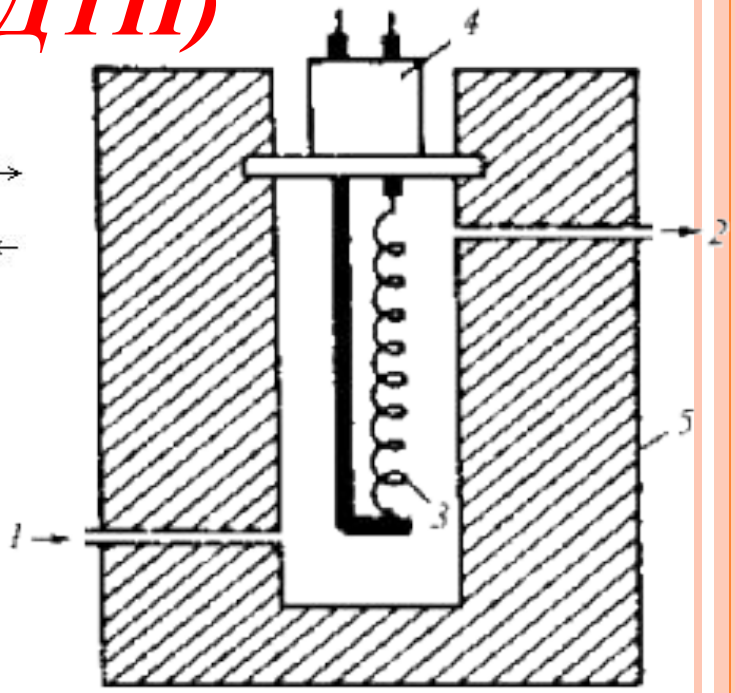
Основной принцип – непрерывное измерение теплопроводности газа, выходящего из колонки. При прохождении через детектор зоны вещества, элюирующегося с колонки, теплопроводность газа меняется и формируется аналитический сигнал

Возможности:

- универсальность (позволяет детектировать любые вещества;
- относительная простота, безопасность, низкая стоимость;
- линейность отклика;
- неодинаковая чувствительность по отношению к разным компонентам пробы;
- низкая чувствительность (микропримеси не детектируются).

Катарометр (ДТП)





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

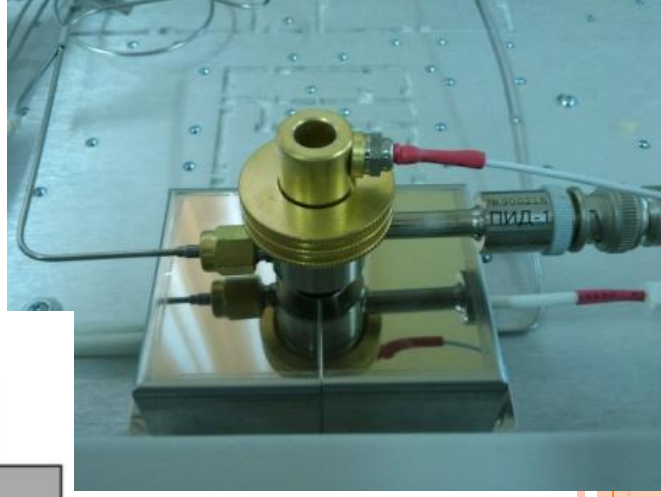
Пламенно-ионизационный детектор

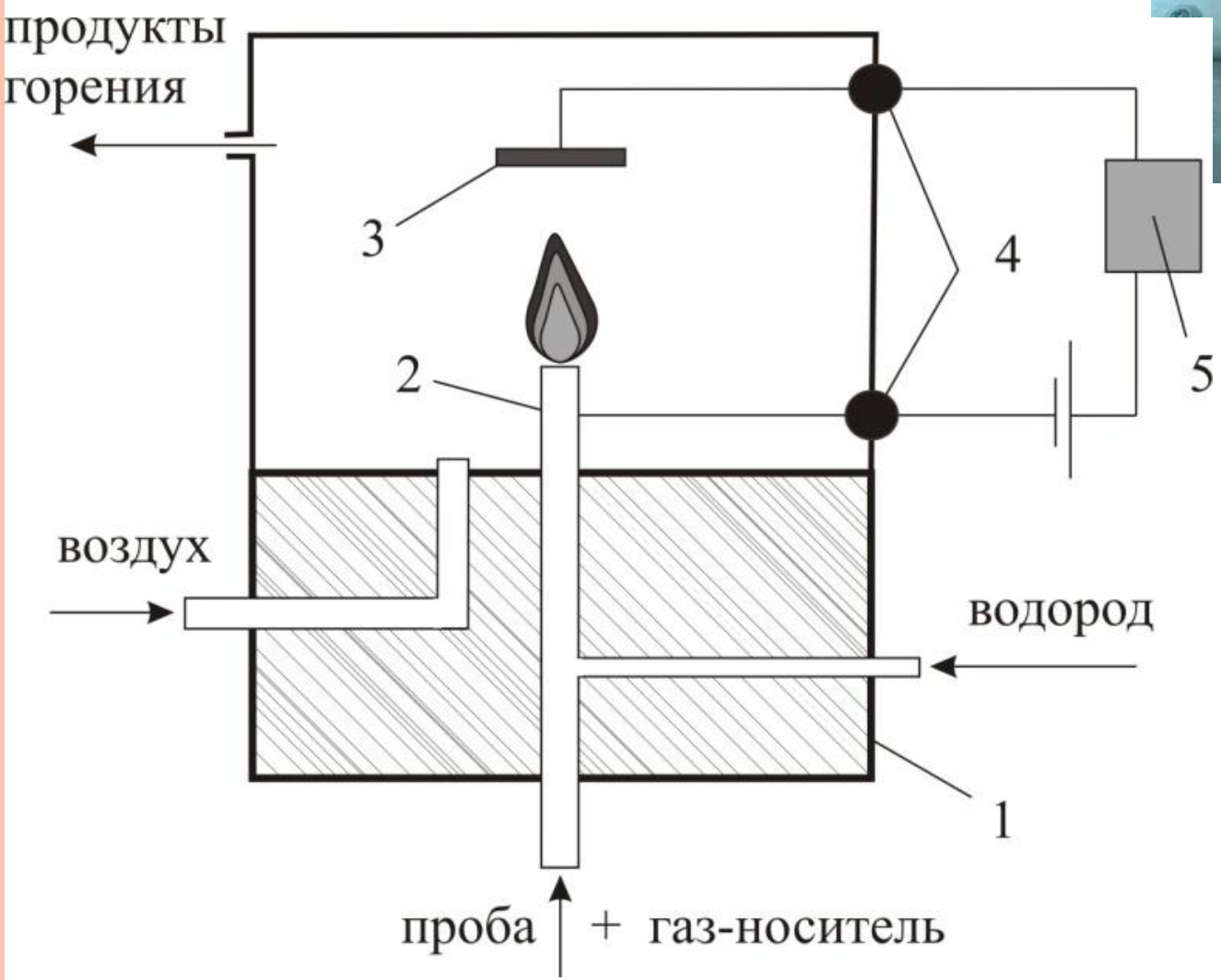
Основной принцип – непрерывное измерение электропроводности пламени, через которое проходит газ-носитель. Высокотемпературное пламя (H_2 + воздух) ионизует компоненты пробы, элюирующиеся с колонки. Пламя становится более электропроводным, формируется аналитический сигнал. Для большей точности используется двухканальная схема

Возможности:

- универсальность. Отклик дают любые органические вещества;
- высокая чувствительность – детектируются даже нанограммовые количества, можно определять любые микропримеси;
- широкий диапазон линейности отклика (до 6 порядков по C_x);
- чувствительность детектора к разным органическим веществам примерно одинакова, к аминам и спиртам несколько снижена;
- детектор сложен, небезопасен и «капризен».

пламенно-ионизационный детектор





1 – ввод водорода;
ввод газа из хроматографической колонки;
ввод воздуха;
2 – горелка + катод;
3 – собирающий электрод;
4 –

5 -

Детектор по электронному захвату

Основной принцип: вещества, выходящие из колонки, ионизируются электронами (β-частицами). Поток активных β - частиц создается изотопом ^{63}Ni. Сигнал детектора пропорционален числу молекулярных ионов, образующихся при ионизации. Вероятность электронного захвата высока лишь для веществ, содержащих галогены, гораздо меньше для других гетероэлементов (O.P,S) и близка к нулю для углеводородов:

$$X \ (F, Cl \text{ или } Br) + e \rightarrow X^-$$

Возможности:

- детектор используется в основном для пестицидов;
- детектор исключительно чувствителен (на уровне пикограммов);
- ограниченный диапазон линейности (менее 2 порядков по C_x);
- сложность конструкции, радиационная опасность.

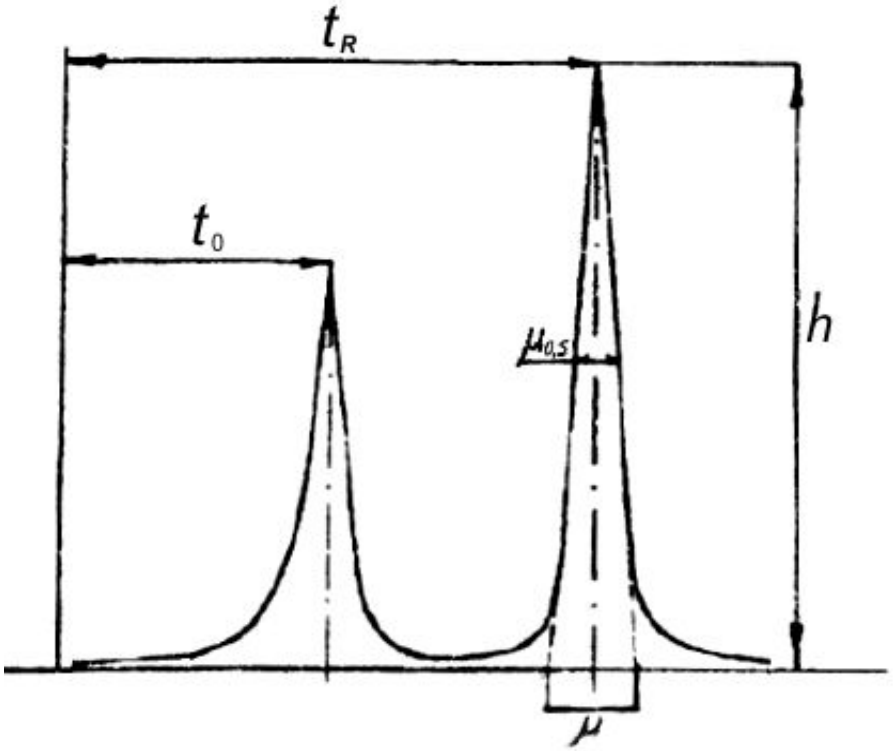
Параметры хроматографического пика

h – высота пика;

μ - ширина пика у основания;

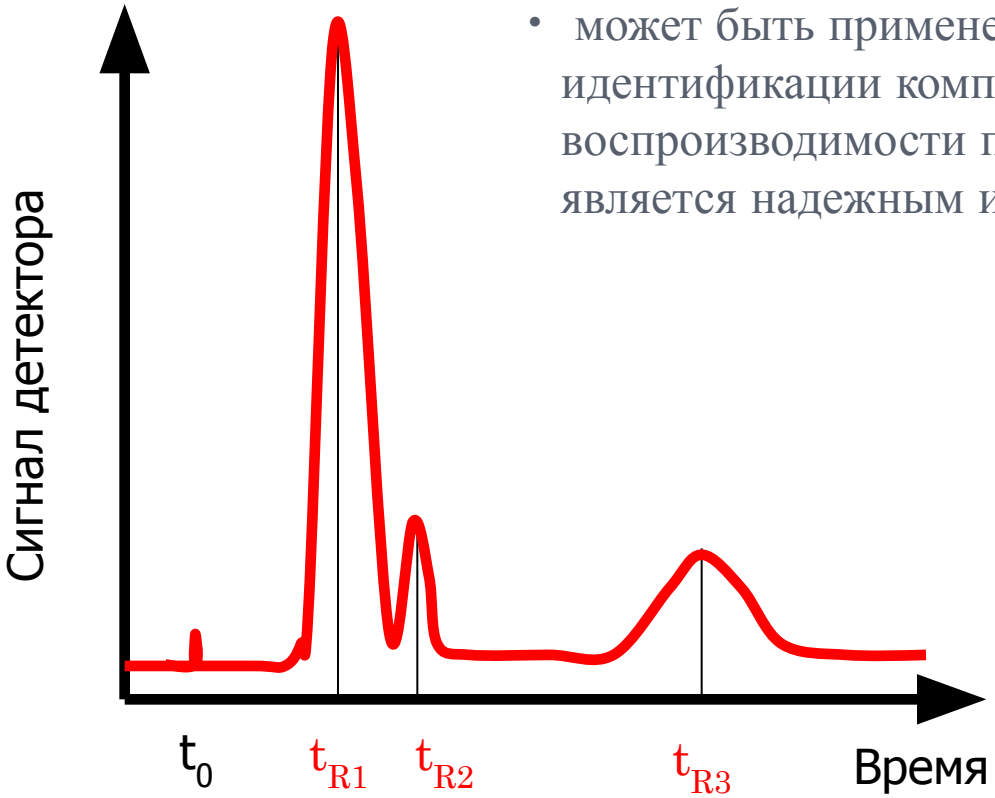
$\mu_{0,5}$ - полуширина пика (щирина на половине высоты);

t_R - время удерживания (абсолютное)



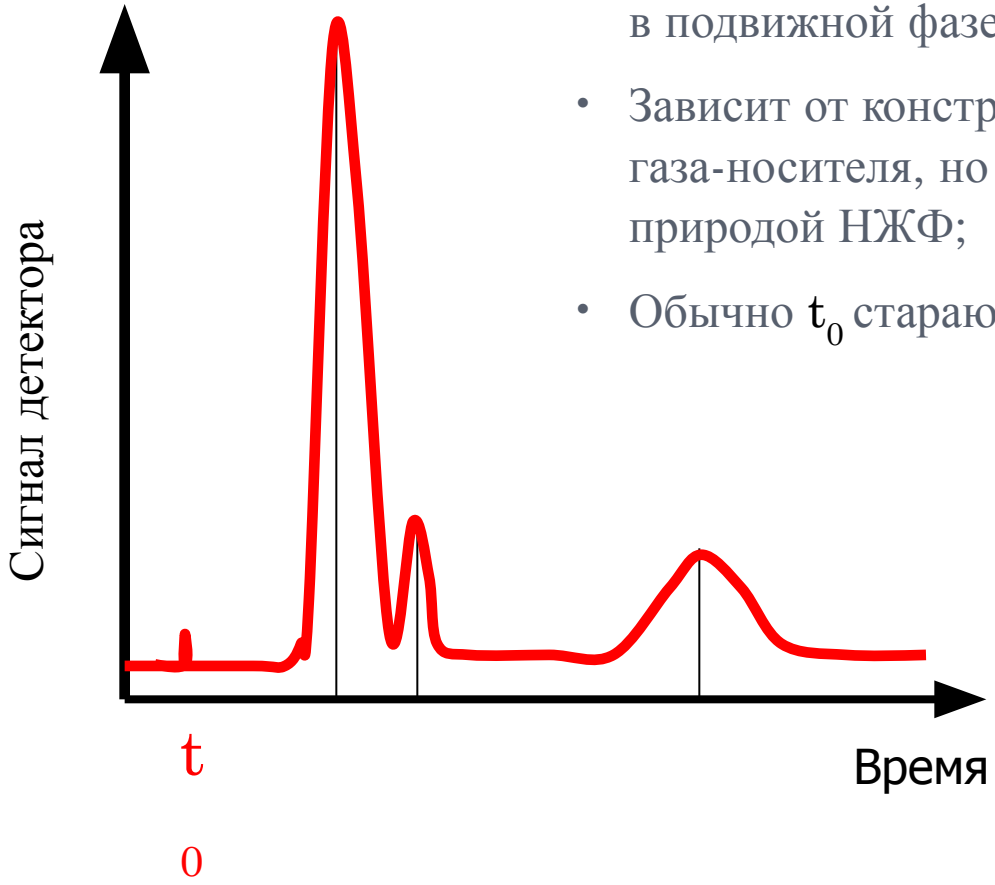
Время удерживания (t_R)

- Время от ввода пробы до выхода компонента. Величину t_R легко определить по хроматограмме. Она зависит не только от природы компонента, но и от конструкции прибора, типа колонки, давления газа, температуры и природы НЖФ,
- может быть применено для отнесения пиков и для идентификации компонентов. Из-за плохой воспроизводимости при повторном вводе пробы t_R не является надежным идентификационным признаком.



Мертвое время (t_0)

- Время от ввода пробы до выхода неудерживаемых компонентов;
- Для других компонентов – время их нахождения в подвижной фазе;
- Зависит от конструкции прибора, типа колонки и давления газа-носителя, но не связано с составом пробы или природой НЖФ;
- Обычно t_0 стараются минимизировать

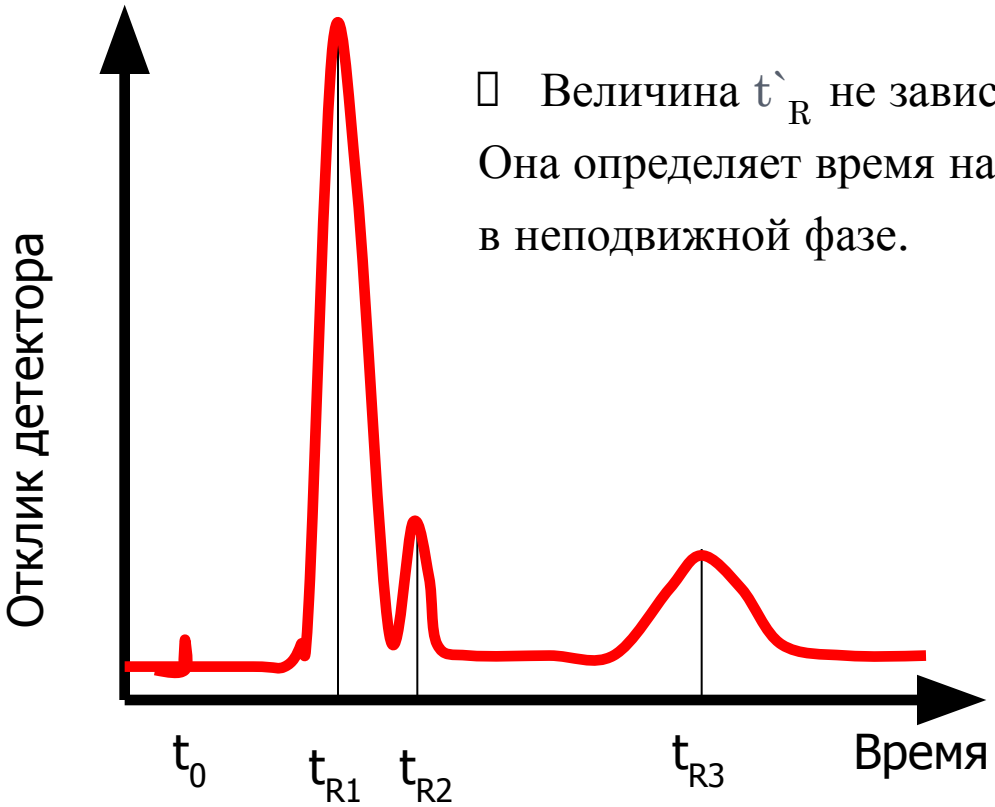


Исправленное время удерживания (t_R')

- Внесем поправку на «мертвое время»:

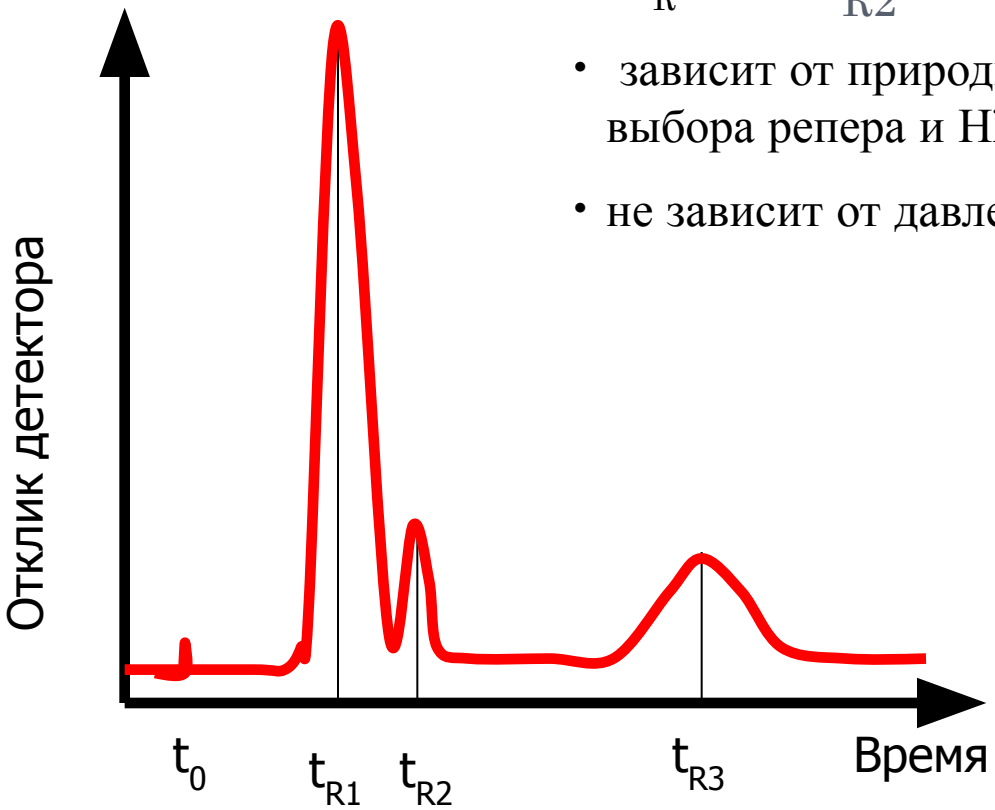
$$t`_R = t_R - t_0$$

- Величина $t`_R$ не зависит от конструкции прибора; Она определяет время нахождения компонента в неподвижной фазе.



Относительное исправленное время удерживания $(t_R')^{отн}$.

- $t_R'^{отн} = t'_{R2} / t'_{R1}$
- зависит от природы компонента, а также от выбора репера и НЖФ;
- не зависит от давления и скорости движения газа-носителя



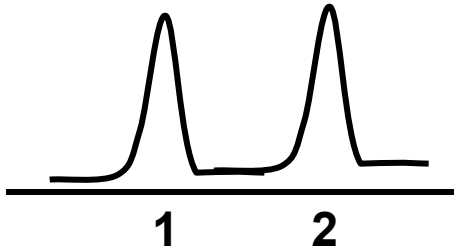
$t_R'^{отн}$ гораздо более воспроизводимая величина, чем абсолютное время удерживания, это более надежный идентификационный признак

Критерии хроматографического разделения веществ

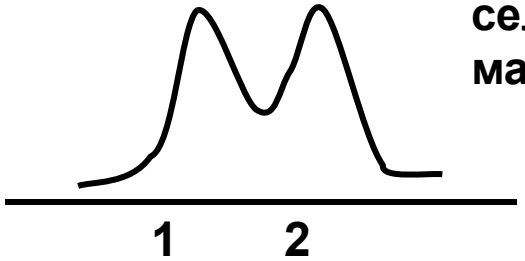
эффективность и селективность

Эффективность оценивают по ширине хроматографического пика: Чем у́же пик, тем лучше эффективность

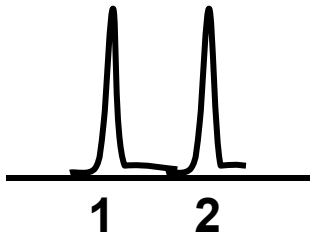
Селективность оценивают по расстоянию между двумя соседними пиками



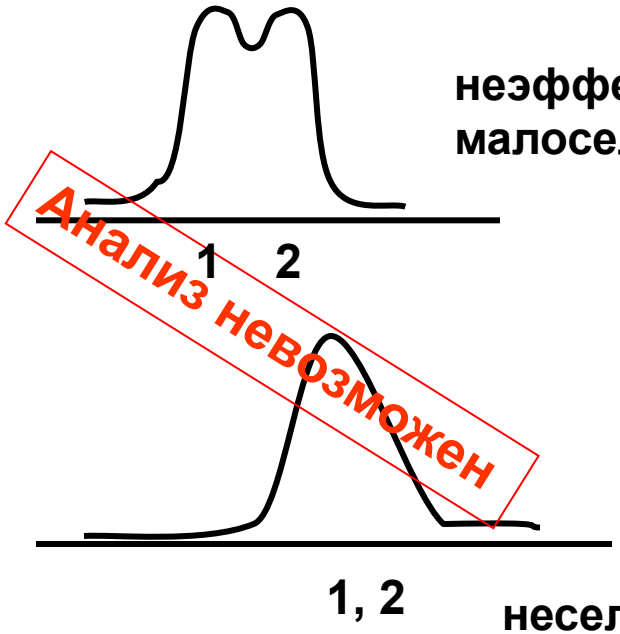
эффективно
селективно



селективно
мало эффективно



эффективность
лучше,
селективность
ухудшилась



неэффективно
малоселективно

неселективно

- **Коэффициент селективности -α**

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{V'_{R2}}{V'_{R1}} = \frac{D_2}{D_1} = \frac{K'_2}{K'_1}$$

$$K'_2 = \frac{t'_{R2}}{t_m} = \frac{V'_{R2}}{V_m}; \qquad K'_1 = \frac{t'_{R1}}{t_m} = \frac{V'_{R1}}{V_m}$$

- **разрешение R_S**

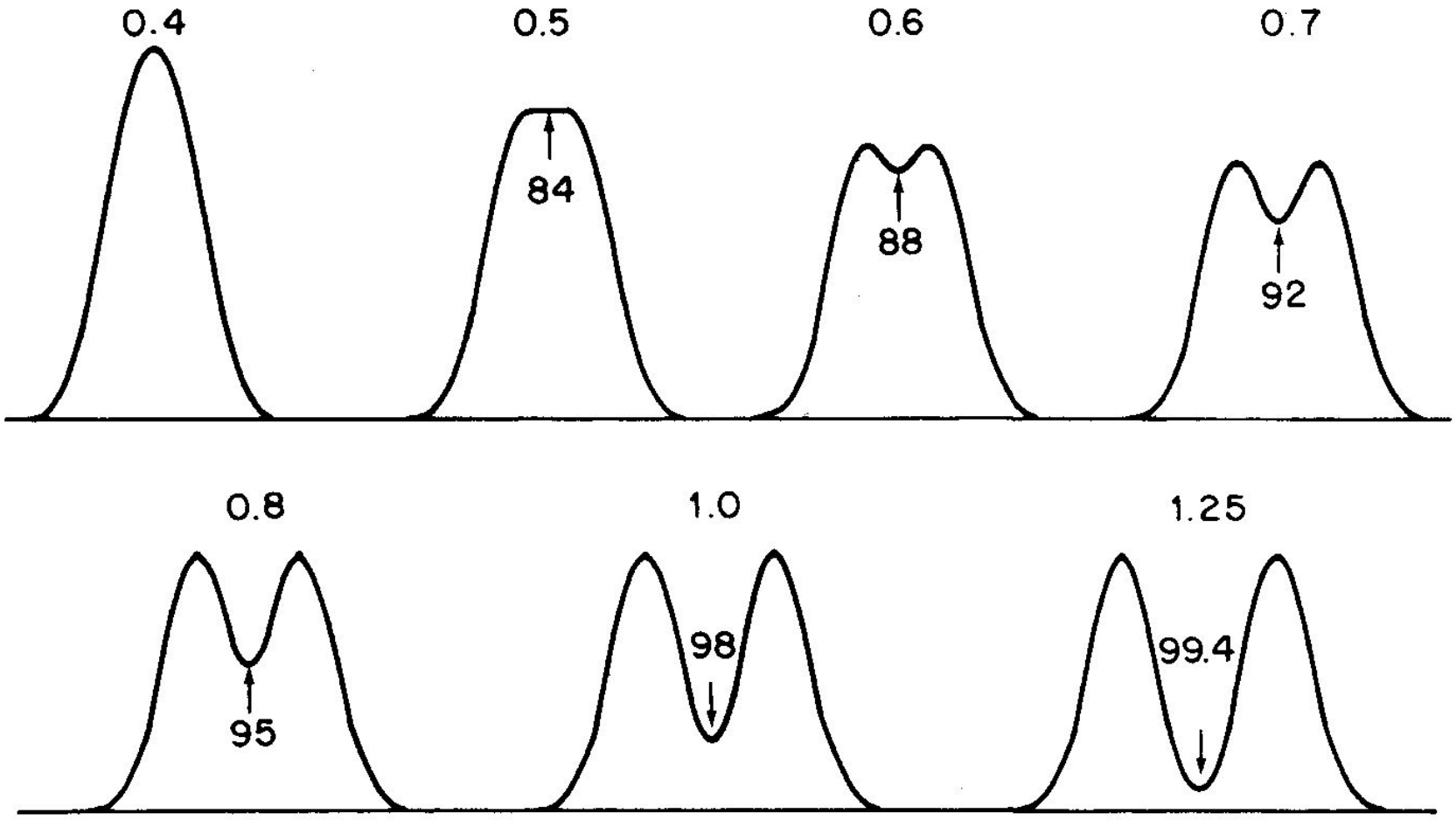
$$K = D\frac{V_S}{V_m}$$

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_{0.5(2)} + \omega_{0.5(1)}} = 2\frac{\Delta t_R}{W_1 + W_2}$$

$$R_S = 0.212\frac{(D_2 - D_1)2}{(D_2 + D_1)}\sqrt{N} = \frac{\Delta D}{D_{cp}}\sqrt{N}$$

$$\psi = \frac{h_2 - h_{\min}}{h_2}$$

Критерии разделения



При 100% разрешении пиков $R_s > 1.5$

Качественный газо-хроматграфический анализ

Задачи:

1. **индивидуальная идентификация, то есть полное определение состава;**
2. **групповая, то есть определение компонентов, относящихся к определенному классу;**
3. **определение 1-2-х компонентов в группе.**

- прямой метод;
- Метод тестеров;
- Сравнение характеристик удерживания компонентов смеси с характеристиками удерживания эталона, эталоном смесей или табличными данными;

$$t'_R = \frac{t'_{Ri}}{t'_{R_{cm}}}$$

- Применение аналитических и графических зависимостей между характеристиками удерживания веществ и их M_r, $T_{кип}$ и строения.

Логарифмический индекс удерживания

(индекс Ковача)

$$I_x = 100\left[\frac{\lg t'R(x) - \lg t'R(n)}{\lg t'R(n+1) - \lg t'R(n)} + n\right]$$

где $t`_{R(n)}$ и $t`_{R(n+1)}$ — исправленные времена удерживания н-алканов с n и $n+1$ атомами углерода, выходящих из колонки до и после X, $t`_{R(x)}$. - исправленное время удерживания X.

Индекс Ковача определяется природой X и НЖФ, слабо зависит от температуры и практически не зависит от скорости газа-носителя, концентрации X и состава пробы.

Пример. На хроматограмме бензина исправленное время удерживания ($t`_R$) некоторого пика равно 189 с. Пик лежит между пиками н-гептана и н-октана, для которых значения $t`_R$ равны 172 и 218 с. Предполагается, что опознаваемый пик принадлежит 2,2,4-триметилпентану, у которого $t`_R = 739{,}0$, для той же НЖФ и той же температуры. Верно ли это предположение?

Решение. Подстановка в формулу данных из условия дает:

$$I_x = 100\left(\frac{\lg 189 - \lg 172}{\lg 218 - \lg 172} + 7\right) = 739{,}2$$

Полученное значение I_x почти не отличается от табличного (погрешность измерения индексов обычно не превышает 0,5 единицы).

Следовательно, данный пик может принадлежать 2,2,4-триметилпентану.

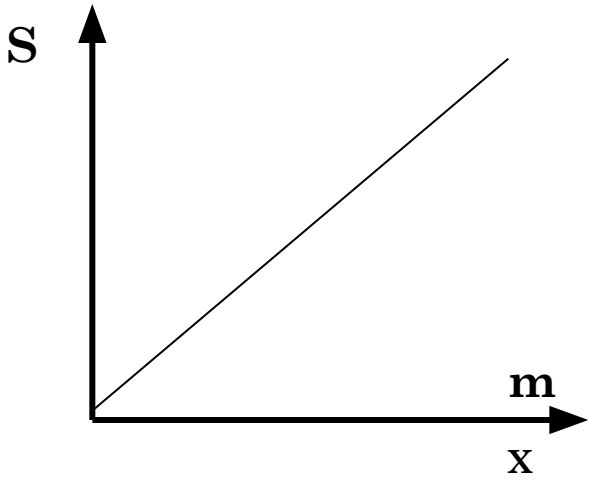
Количественный анализ в газожидкостной хроматографии

Наиболее распространенные методы количественного хроматографического анализа предполагают выполнение следующих условий:

- при вводе в хроматограф всех анализируемых проб (а также эталонов известного состава) режим работы хроматографа строго постоянен.
- при вводе и испарении пробы, а также при ее разделении в колонке вещество X не вступает в какие-либо химические реакции и полностью доходит до детектора;
- хроматограмма записывается с помощью дифференциального детектора, отклик которого прямо пропорционален концентрации X (обычно это бывает при достаточно малом содержании X);
- пик X не накладывается на пики других компонентов.

Метод абсолютной калибровки

В хроматограф вводят переменные содержания X, измеряют параметры пика, строят график зависимости $S = f(C_X)$ или (m_X)



Строго в тех же условиях измеряют параметр пика S_X на хроматограмме пробы

По графику находят содержание X в пробе

Можно рассчитать содержание X в пробе, сравнивая параметр пика X в пробе S_X и параметр пика градуировочного раствора $S_{ср}$

$$m_X = \frac{m_{ср} \cdot S_X}{S_{ср}}$$

Можно использовать метод добавок – измерить S_X на исходной хроматограмме пробы, и на хроматограмме после введения в пробу известной добавки $X_{доб}$ $S_{X+доб}$

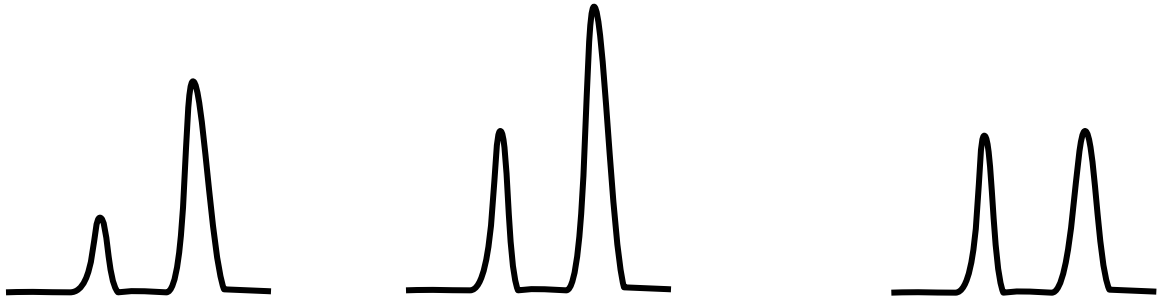
САМОЕ СЛАБОЕ МЕСТО: НЕПОСТОЯНСТВО ОБЪЕМА ВВОДИМОЙ ПРОБЫ.

Метод внутреннего стандарта

Используют относительные параметры хроматографических пиков (относительные площади или относительные высоты).

Площадь пика X делят на площадь пика вещества- внутреннего стандарта на той же хроматограмме.

Внутренний стандарт вводят в одинаковой концентрации во все модельные растворы с переменными содержаниями X



$$S_{отн} = \frac{S_X}{S_{ст}}$$

C_{X1} $C_{ст}$ C_{X2} $C_{ст}$ C_{X3} $C_{ст}$

Строят график зависимости $S_{отн} = f(C_X)$ или (m_X)

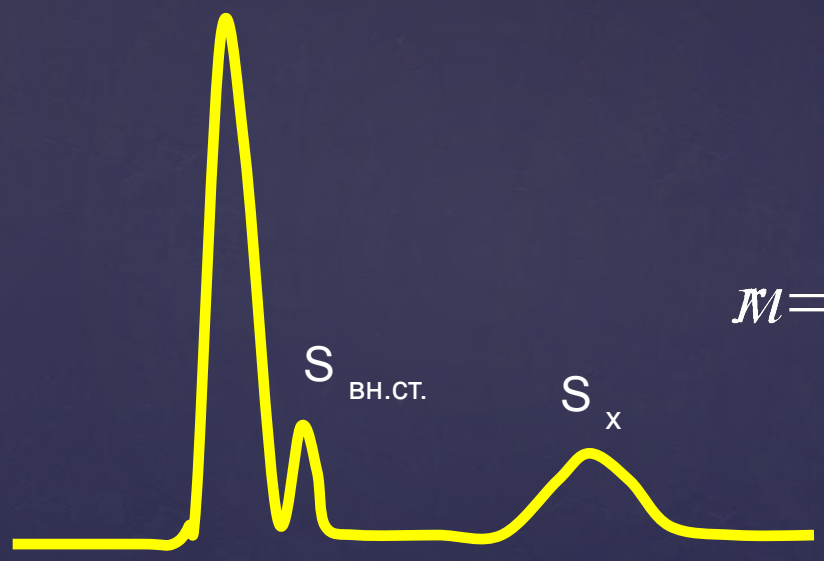
В пробу вводят вещество-стандарт в той же концентрации, измеряют $S_{Xотн}$, по графику находят содержание X в пробе.

Можно вычислить коэффициент k и вести расчеты без построения графика:

$$S_{отн} = kC_X$$

Способ внутреннего стандарта

$$k = \frac{S_{вн.ст.}}{S_{вн\ ст}} \frac{C_x}{C_{вн\ ст}}$$



$$m = m_{вн.ст.} / m_{пробы}$$ масса г (= ,)

$$x,\% = kr \frac{S_x}{S_{вн.ст.}} \cdot 100$$

Можно вести расчет методом сравнения со стандартом.

Пример

На хроматографе с ДИПом анализируют смесь, состоящую из бензола и этилбензола.
В качестве внутреннего стандарта в смесь ввели 200 мг толуола.
Площади хроматографических пиков равны соответственно:
бензола, 12 мм^2
этилбензола 16 мм^2
толуола 14 мм^2 .
Рассчитайте содержание бензола и этилбензола в смеси (в мг)

содержание бензола:

$$m_{бенз} = \frac{S_{бенз} \cdot m_{тол}}{S_{тол}} = \frac{12 \cdot 200}{14} = 171 мг$$

содержание этилбензола:

$$m_{этилбенз} = \frac{S_{этилбенз} \cdot m_{тол}}{S_{тол}} = \frac{16 \cdot 200}{14} = 229 мг$$

Метод внутренней нормировки (метод нормализации)

Цель анализа – определение полного состава исследуемого объекта.

$$C_{i,\%} = \frac{k_i S_i \cdot 100\%}{\sum k_i S_i}$$

C_i,% - массовая доля i-го компонента пробы

S_i - площадь i-го пика на хроматограмме пробы,

k_i – поправочный коэффициент детектора к i-му компоненту (если используют катарометр)

Метод нельзя применять, если:

1. Проба не полностью испаряется

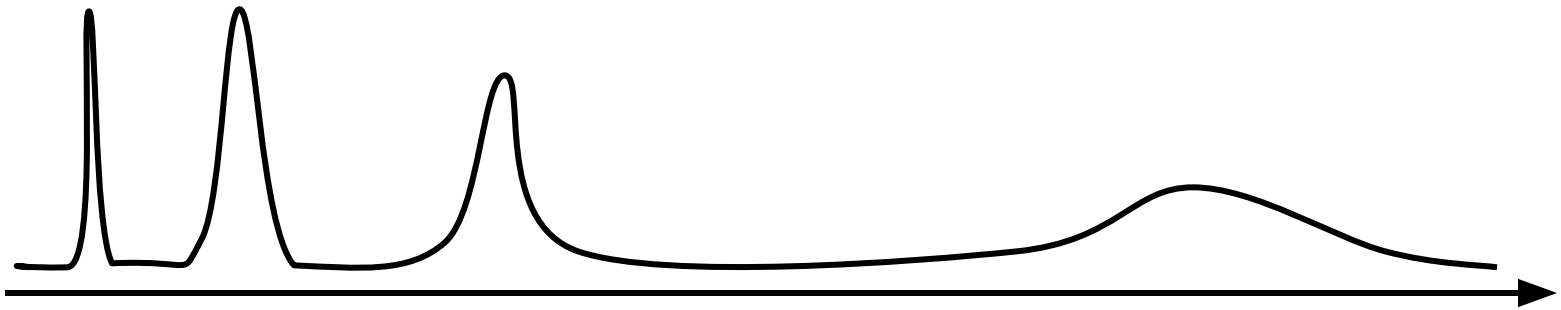
2. В колонке идут химические превращения компонентов пробы

3. Не все компоненты пробы выходят из колонки

4. Нет полного разделения пиков на хроматограмме

Программирование температуры

Компоненты пробы сильно отличаются по $t_{кип}$



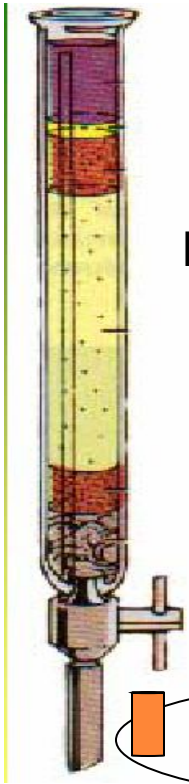
С целью сокращения времени анализа и улучшения качества хроматографического разделения используют программирование температуры

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Варианты: - колоночная; - тонкослойная; - бумажная

Механизм – адсорбционный, распределительный, смешанный

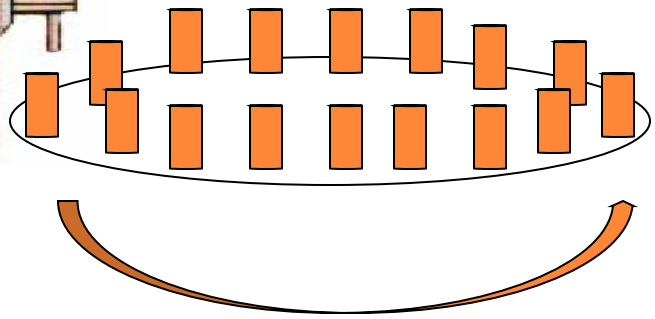
Колоночная хроматография



Собирают отдельные фракции, каждую из которых анализируют отдельно (могут быть разные методы анализа каждой фракции)

Непрерывный анализ: собирают аликвоты элюата, в каждой измеряют какой-либо параметр, сигнал подают на самописец

Большой недостаток – очень медленно!



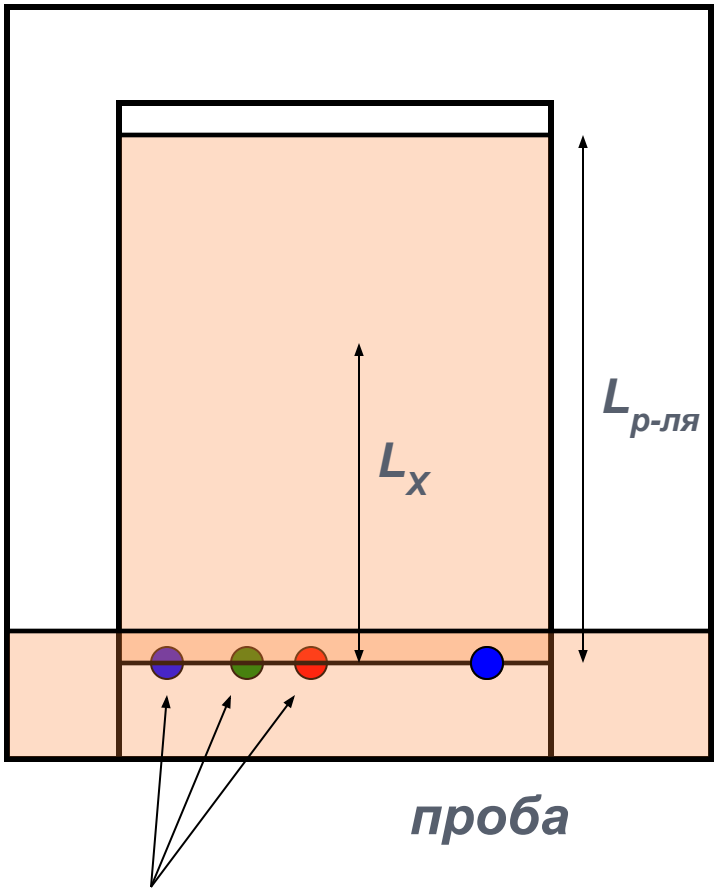
Основное применение сейчас – в препаративных целях:

-очистка,

-разделение продуктов реакции орг. синтеза,

-разделение больших групп соединений, напр., полярных от неполярных

ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ – ТСХ. ТЕХНИКА ПРОВЕДЕНИЯ ТСХ



Пластинка (стеклянная или из металлической фольги)

НФ - сорбент (закрепленный или незакрепленный)

ПФ- растворитель

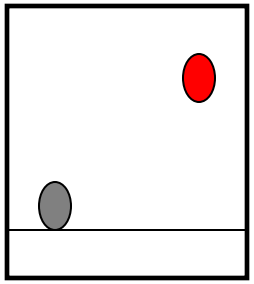
$$R_f = \frac{l_X}{l_{р-ля}}$$

R_f – подвижность, является качественной характеристикой вещества

Факторы, влияющие на R_f

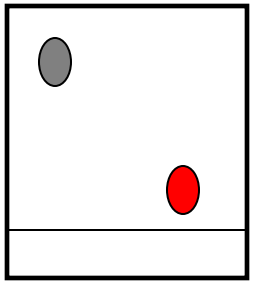
1. Толщина слоя сорбента
2. Размеры частиц сорбента
3. Температура
4. Природа НФ, ПФ и вещества

НФ-полярная
ПФ-неполярная



фенол бензол

НФ-неполярная
ПФ-полярная



фенол бензол

Вторая качественная характеристика - цвет пятна

Способы проявления ТС-хроматограмм

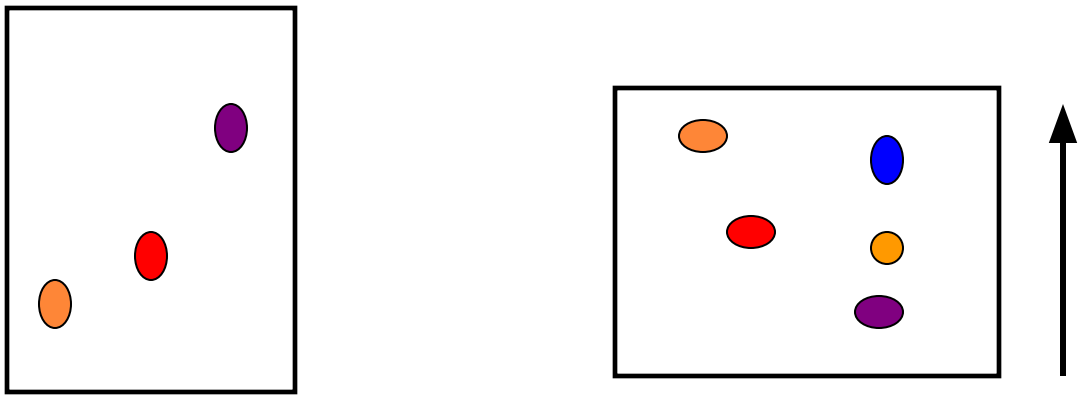
-камера с парами йода (органические соединения)

-просмотр в УФ-свете (органические соединения)

-орошение пластинки раствором красителя – вещества, дающего окрашенные соединения с компонентами пробы (неорганические)

Например, диметилглиоксим, дитизон, сульфид натрия

Двумерная ТС-хроматография



Количественный анализ

Каждое пятно обрабатывают подходящим растворителем, экстрагируя компонент, затем анализируют экстракт.

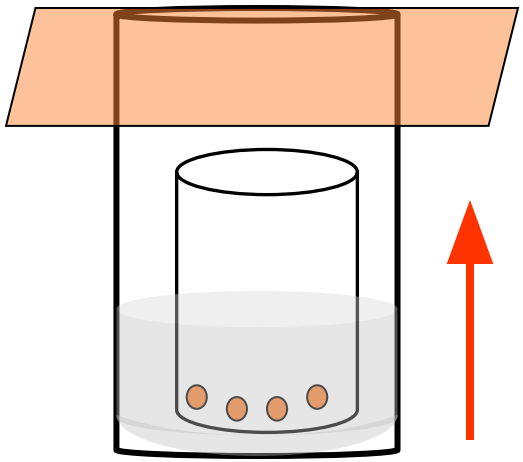
Аналитический сигнал – площадь пятна

Предварительно строят зависимость вида:
площадь пятна – содержание компонента

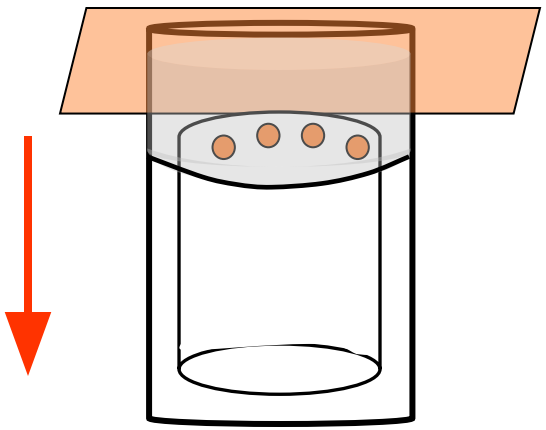
Бумажная хроматография

Механизм – распределительный. НФ –вода, ПФ – органический р-ль

По технике выполнения схожа с ТСХ.



Камера для выполнения *восходящей* БХ



Камера для выполнения *нисходящей* БХ

Rf –качественная характеристика вещества

площадь пятна – количественная характеристика

Достоинства ТСХ и БХ

1. Простота
2. Экспрессность
3. Универсальность

Применение ТСХ и БХ

1. Экспресс-анализ на чистоту вещества
2. Быстрое разделение компонентов пробы на фракции

Ограничения:

1. Анализ не слишком сложных смесей.
2. Определение - полуколичественное

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (ВЭЖХ)

Основной недостаток ЖХ – длительность- устраняется путем подачи ПФ под высоким давлением.

Преимущества:

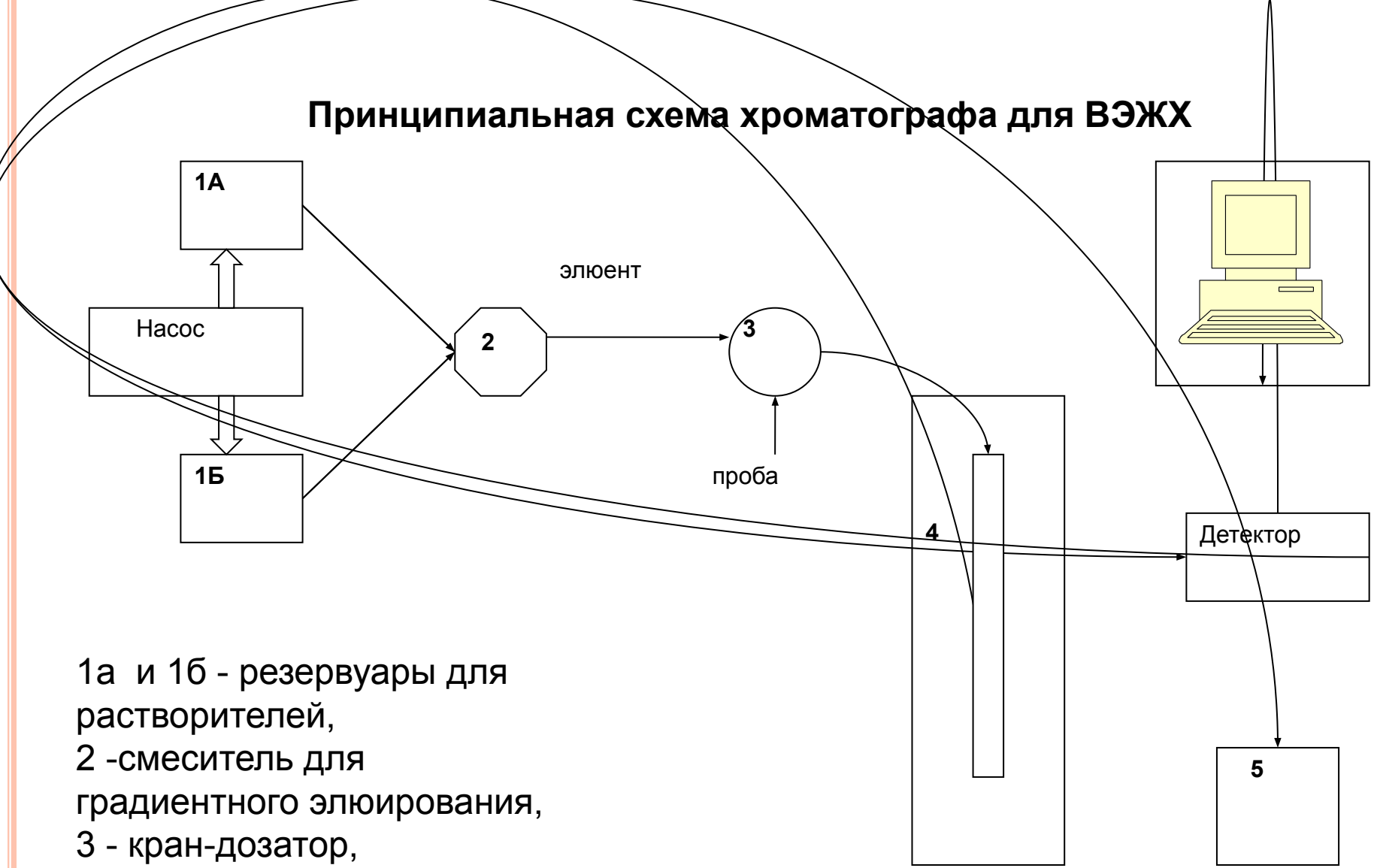
1. **Анализ ведут при комнатной т-ре**
2. **Более широкий круг определяемых веществ (в т.ч. неустойчивых при высоких т-рах, имеющих высокие $t_{кип}$)**
3. **Селективность разделения высокая, т.к. есть возможность варьировать состав ПФ**

ЖИДКОСТНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ

Устройство жидкостных хроматографов более сложное по сравнению с газовыми.

Система подачи элюента включает дополнительные узлы – дегазатор,насосы, измерители давления, устройства для создания градиента.

Принципиальная схема хроматографа для ВЭЖХ



1а и 1б - резервуары для растворителей,
2 -смеситель для градиентного элюирования,
3 - кран-дозатор,
4 – термостат с колонкой,
5 –устройство для сбора фракций.

Колонка из стали длиной 10-30 см, диаметром 3-6 мм

Сорбент – почти пылевидный (размер частиц 3-5 мкм, в ГЖХ – до 100 мкм) часто сорбент наносят на стенки колонки.

Объем вводимой пробы – доли мкл

Детекторы в ВЭЖХ

-рефрактометрический

-УФ-детектор

-люминесцентный

-электрохимический

Чувствительность детекторов – 10^{-9} – 10^{-10} г

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ

Анализ:

-агрохимикатов

-лекарственных и витаминных препаратов

-полимеров

-экотоксикантов: ПАУ, диоксины, пестициды

-углеводороды

-наркотики

и др.

ИОННЫЙ ОБМЕН

Иониты – полимеры, на поверхности которых привиты функциональные группы атомов.

На **катионитах** - кислотные группы ($-SO_3H$, $-COOH$, $-OH$ и др.)

На **анионитах** - основные ($-NH_3^+Cl$, $= NH_2^+OH$ и др.)

Ионообменное равновесие

На катионитах:

$$\overline{R\text{-}SO_3H} + Na^+Cl^- \leftrightarrow \overline{RSO_3Na} + HCl$$

$$\overline{R\text{-}M_1} + M_2^+ \leftrightarrow \overline{R\text{-}M_2} + M_1^+$$

На анионитах:

$$\overline{RNH_2OH} + NaBr^- \leftrightarrow \overline{RNH_2Br} + NaOH$$

$$\overline{R\text{-}A_1} + A_2^- \leftrightarrow \overline{R\text{-}A_2} + A_1^-$$

$$\overline{R\text{-}M_1} + M_2^+ \leftrightarrow \overline{R\text{-}M_2} + M_1^+$$

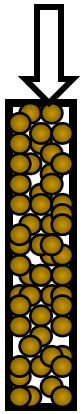
Константа обмена ионов

$$K = \frac{[M_1]\cdot[RM_2]}{[M_2]\cdot[RM_1]} = \frac{k_2}{k_1}$$

коэффициенты распределения k_1 и k_2 – отношения равновесных концентраций соответствующих ионов в фазе ионита (НФ) и в растворе (ПФ).

для сильнокислотных катионитов: $Al^{3+} > Mg^{2+} > Na^+ > H^+ > Li^+$.

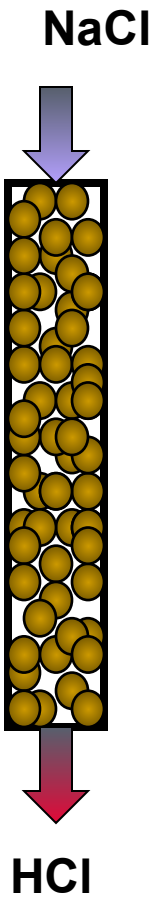
Al^{3+} Mg^{2+} Na^+



$$\overline{R\text{-}H} + M^{n+} \leftrightarrow \overline{R\text{-}M} + H^+$$

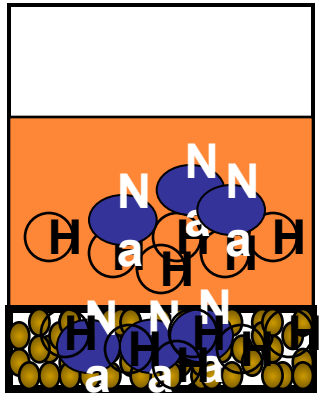
HCl

Обменная емкость ионита

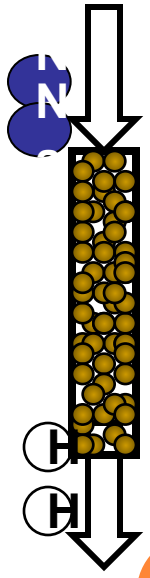


Количество моль-экв обменивающегося иона, приходящееся на 1 г сухого ионита в H^+ -форме (для катионитов) или Cl^- или OH^- - форме (для анионитов)

Статическая обменная Емкость (СОЕ)

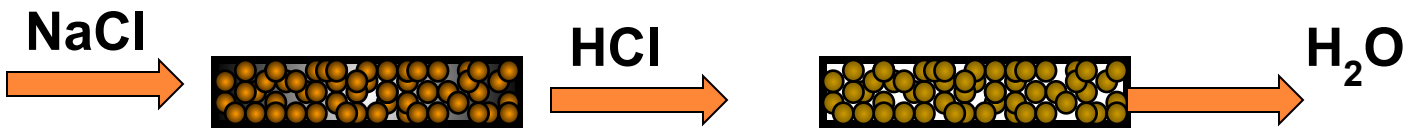


Динамическая обменная Емкость (ДОЕ)



Применение ионитов

а) Получение деионизованной воды. Опреснение воды.



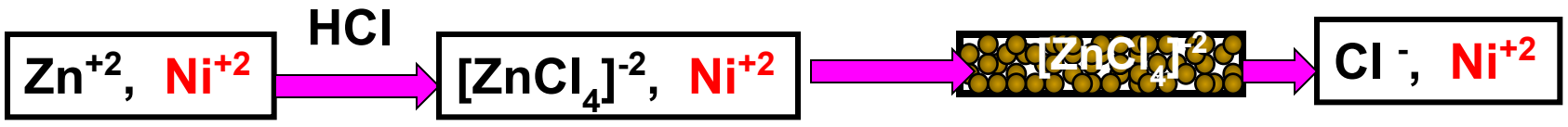
Катионит в H^+-форме Анионит в OH^- -форме

б) Отделение электролитов от неэлектролитов.

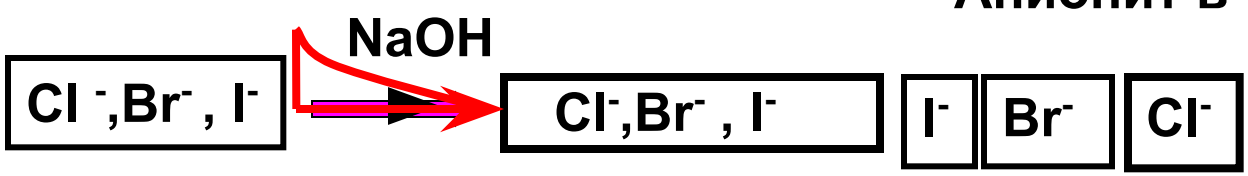
в) Определение общей минерализации.

г) Концентрирование.

д) Разделение смесей ионов



Анионит в Cl^- -форме



Анионит в OH^--форме

Ионная хроматография

Ионная хроматография (ИХ) - это вариант ионообменной хроматографии, включающий высокоэффективное разделение ионов и автоматическое детектирование разделенных частиц.

Детектор - кондуктометрический

Двухколоночная схема ионного хроматографа

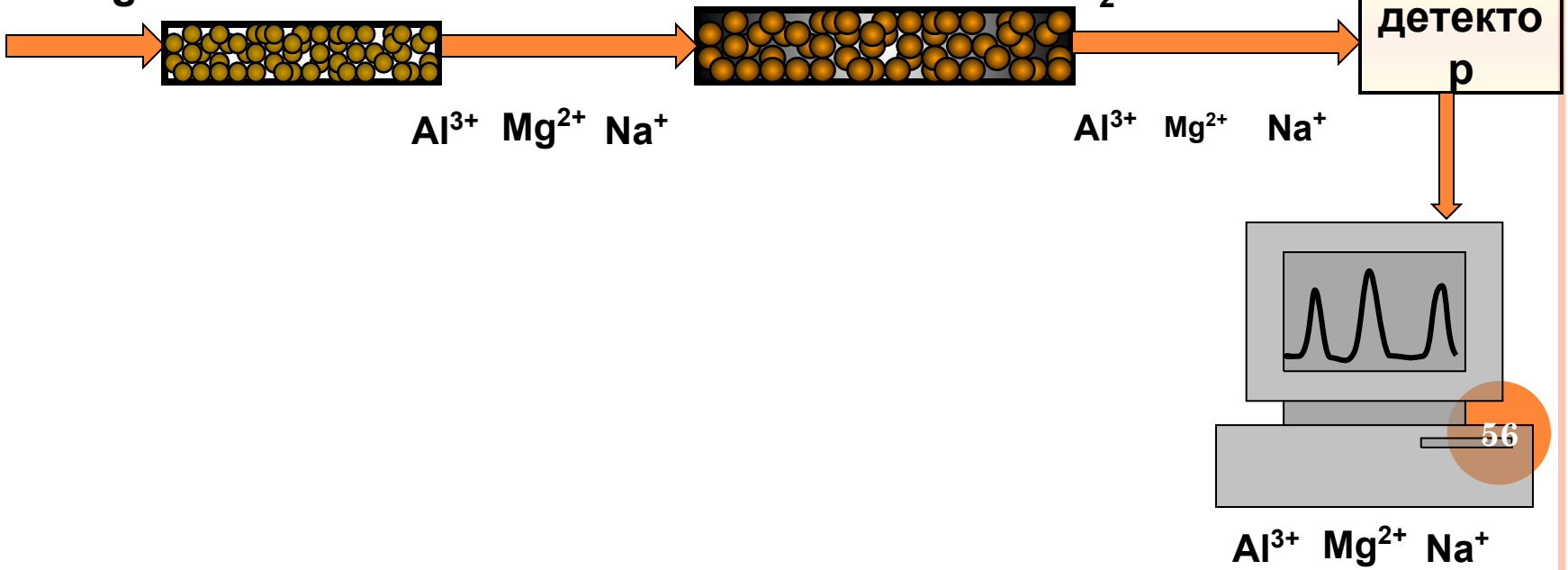
Разделяющая колонка: катионит в H^+-форме

Подавляющая колонка анионит в OH^--форме

Al^{3+} Mg^{2+} Na^+

HCl

$ROH + HCl = R\text{-}Cl + H_2O$



ИХ позволяет быстро и селективно определять органические и неорганические ионы.

Достоинства:

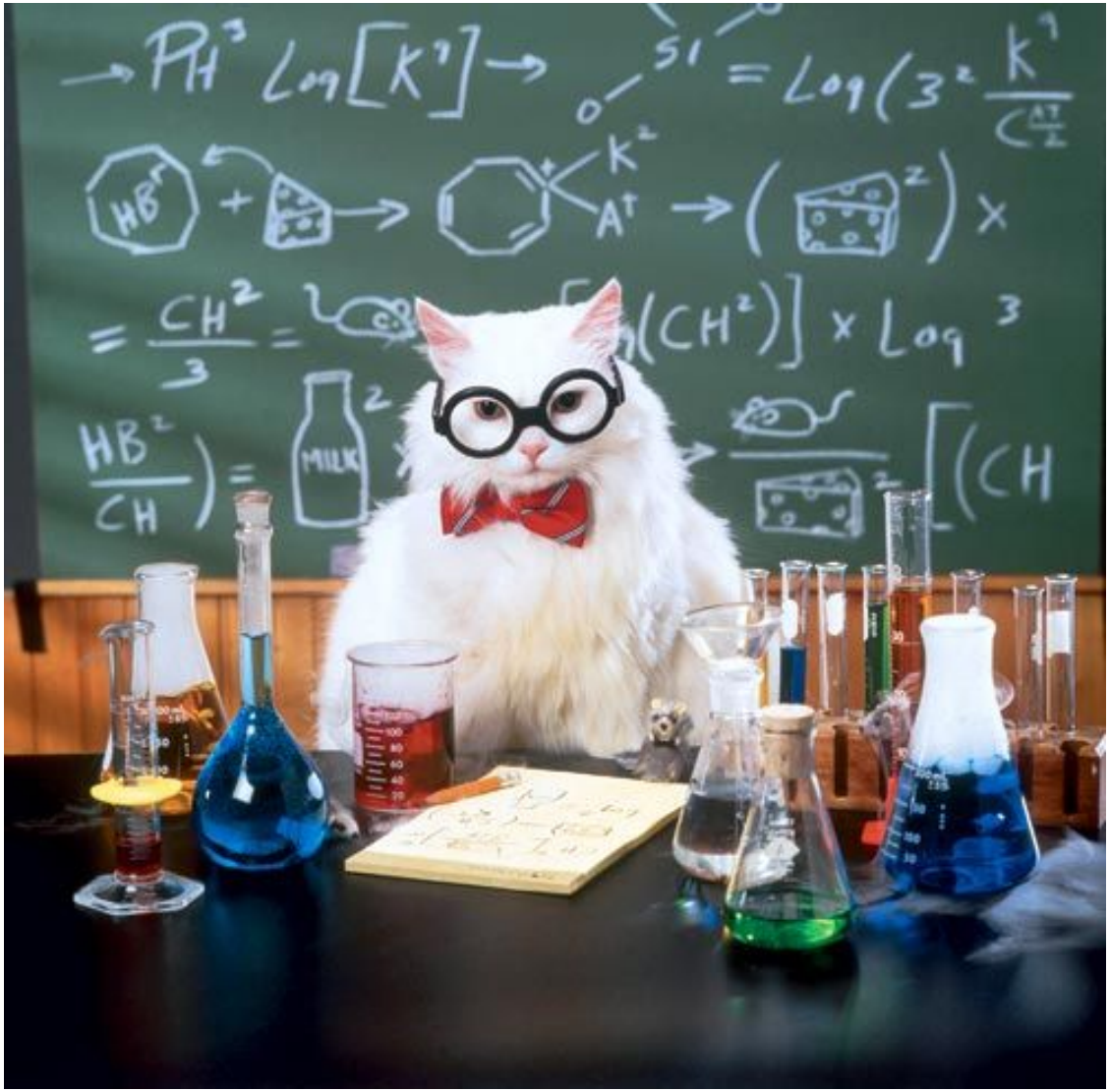
1.Низкий предел обнаружения (без концентрирования - 10^{-3}мкг/мл, с концентрированием - 10^{-6} мкг/мл);

2 высокая селективность определения ионов в сложных смесях

3. быстрота определения - за 20 мин из одной пробы можно определить до 10 ионов;

4. малый объем пробы (0,1 - 0,5 мл);

5. простота подготовки пробы к анализу.



Спасибо за внимание!