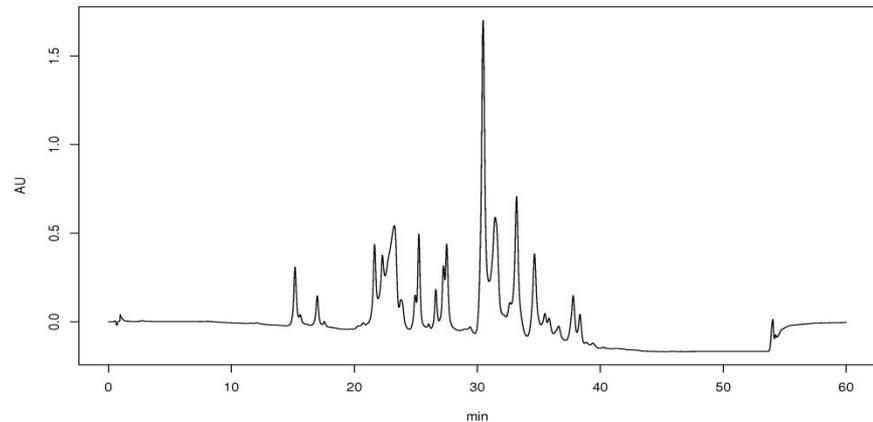


ОСНОВЫ ТЕОРИИ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ВЭЖХ



-
- Процесс хроматографического разделения очень сложен, тем не менее его отдельные стадии могут быть смоделированы и представлены в виде уравнений, достаточно точно и верно отражающих реальный процесс.
 - Без знания того, что такое **удерживание, эффективность, селективность, нагрузочная емкость**, невозможно подойти к решению практических задач по ВЭЖХ, постоянно возникающих перед исследователем независимо от того, в какой области он работает.

Обработка хроматограмм

- Компоненты анализируемой смеси в тонкослойной хроматографии детектируют на пластинке в виде пятен, соответствующих разным веществам.
- **Подобный тип хроматограммы называют «внутренним».**
- При этом процесс разделения прекращается исследователем, но анализируемые компоненты всё еще находятся в хроматографической системе (на хроматографической пластинке).



Рис. 2.22. Параметры, используемые для расчета значений R_f

Обработка хроматограмм

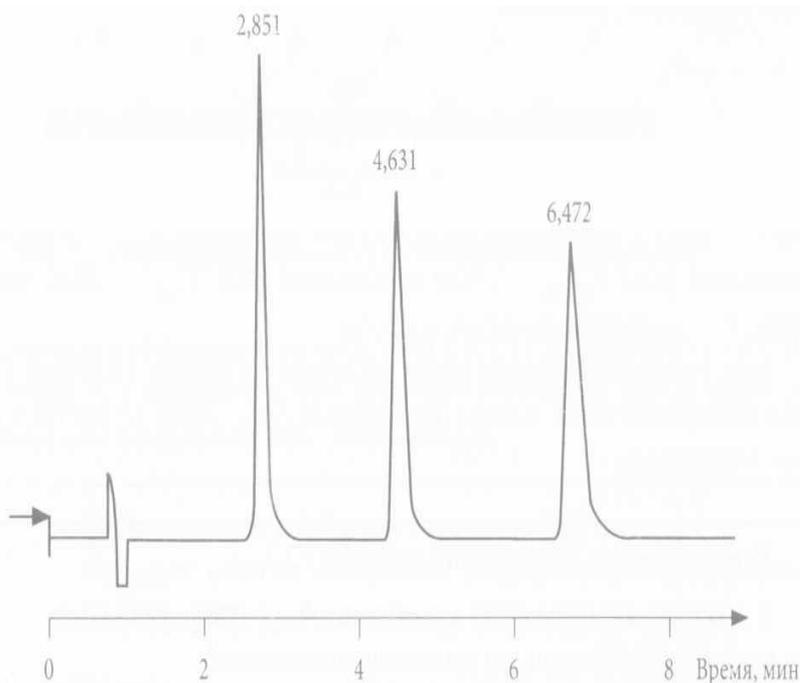


Рис. 2.2. Схема хроматограммы, записанной в ходе анализа методом ВЭЖХ

- В таких методах разделения, как ГХ и ВЭЖХ, запись хроматограмм осуществляется за счет регистрации анализируемых компонентов детектором уже после того, как они покинут хроматографическую колонку (разделительную систему).
- При этом зарисовывается кривая, вид которой зависит от концентрации и потока вещества.
- С помощью анализа «пиков» на этой кривой можно провести количественное или качественное определение компонентов.
- Такие хроматограммы называют «внешними».
- При записи внешних хроматограмм анализируемые компоненты проходят одинаковое расстояние (равное длине хроматографической колонки) за разное время.

Обработка хроматограмм

- Если в процессе хроматографического разделения в устройство для ввода проб хроматографа ВЭЖХ вводят жидкие пробы, то они поступают в подвижную фазу в форме «хроматографических зон».
- Концентрация аналитов в такой хроматографической зоне непосредственно после ввода пробы является однородной и распределена в колонке по «прямоугольному закону»
- При ее перемещении потоком подвижной фазы вдоль хроматографической колонки она разбавляется компонентами подвижной фазы. Одновременно с этим молекулы анализируемых компонентов, находящиеся на границах хроматографической зоны, перемещаются в подвижную фазу.
- Результатом такой двусторонней диффузии является уширение хроматографической зоны и изменение характера распределения анализируемого компонента в ней.
- Таким образом формируется колоколообразное *распределение Гаусса* (в идеальном случае), которое представляет собой хроматографический сигнал каждого из компонентов на выходе из колонки.

Обработка хроматограмм

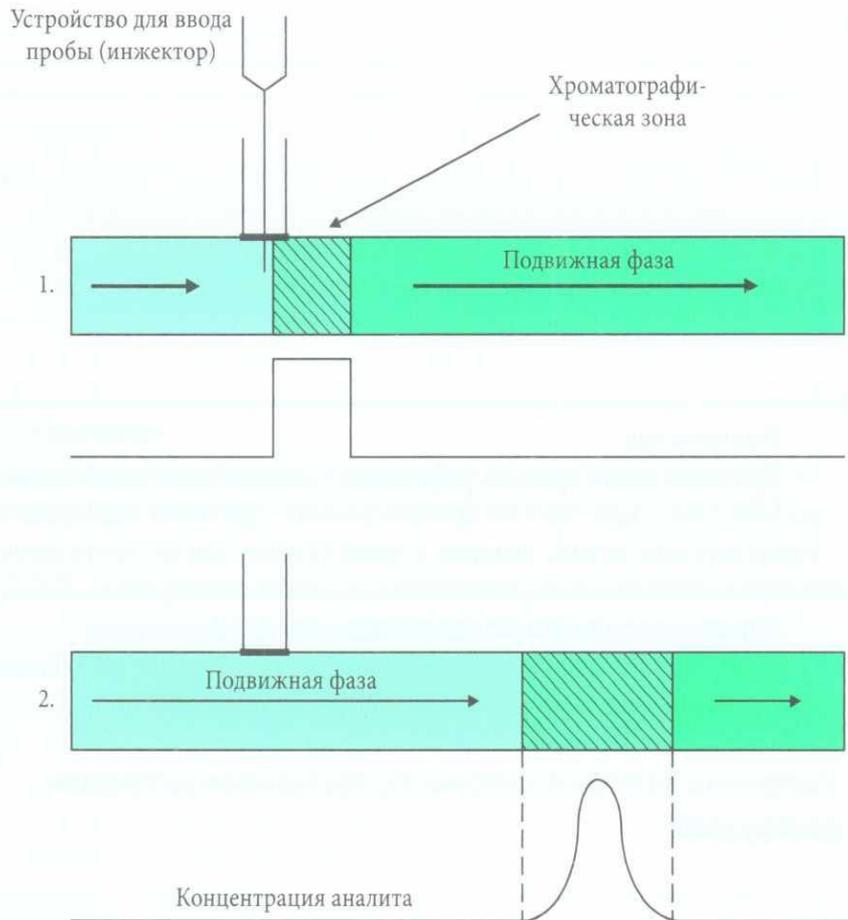


Рис. 2.3. Схема процесса хроматографического разделения (формирование хроматографических зон)

- На практике часто наблюдается легкое искажение некоторых пиков.
- Процессы, протекающие в пределах хроматографических зон при проведении хроматографического анализа, схематически представлены на слайде
- Следствием изменения формы хроматографических зон является уширение пиков, размер которых тем больше, чем дольше вещество находится в хроматографической колонке.

Обработка хроматограмм

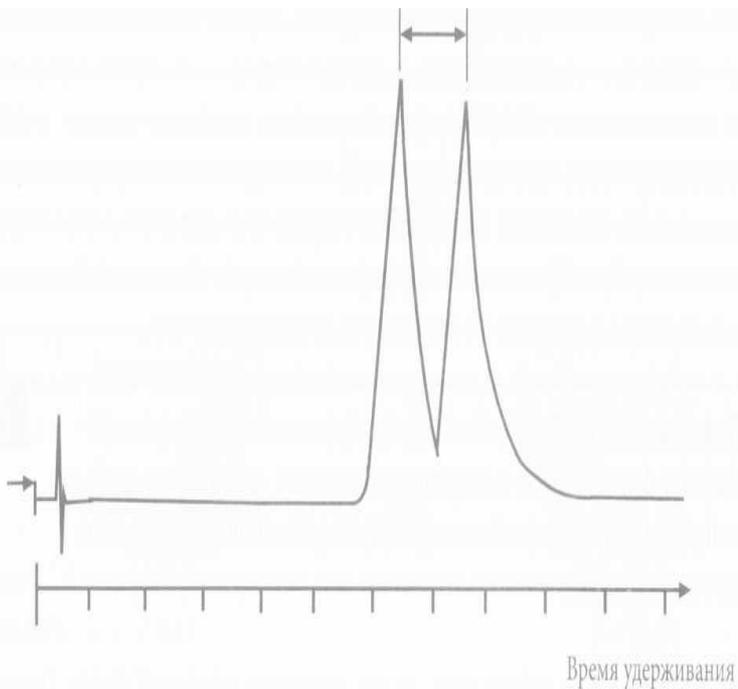


Рис. 2.4. Недостаточное разделение компонентов вследствие уширения пиков

- Следует предотвращать *чрезмерное уширение* пика, так как соседние пики, отделенные друг от друга временными интервалами, могут накладываться друг на друга, в результате чего их границы не будут доходить до базовой линии.

На рис. 2.4 приведен пример уширения пиков при разделении компонентов, оказывающего неблагоприятное воздействие на расшифровку хроматограммы.

Дополнительно к такому «нормальному» изменению порции вещества вследствие диффузии молекул последнего и подвижной фазы, на результат распределения компонентов также могут повлиять подвижная и неподвижная фазы

- 1 ***При проведении хроматографического анализа желательно получать максимально узкие пики на хроматограммах.***

- 1 ***Для этого подбирают соответствующие методы анализа, а также условия его проведения.***

Уширение полосы компонента, вызванное вихревой диффузией

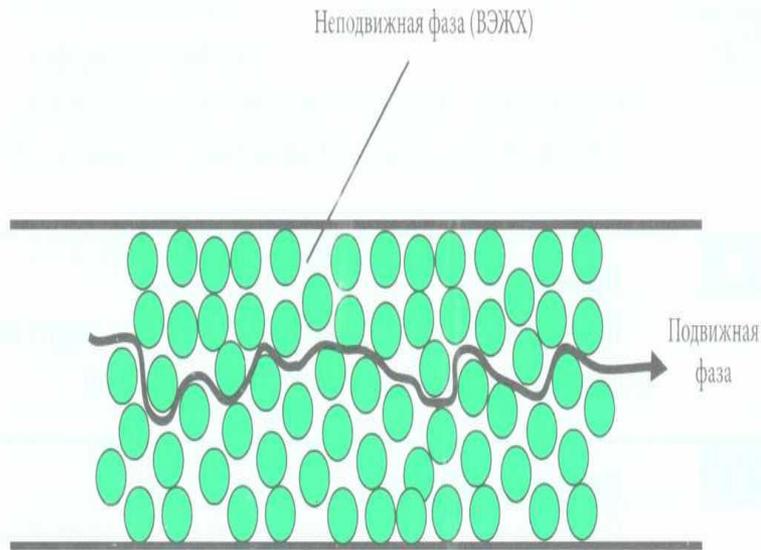


Рис. 2.5. Схематическое изображение вихревой диффузии в хроматографических колонках

- Если хроматографическая колонка наполнена твердым сорбентом, как, например, в случае ВЭЖХ, то подвижная фаза должна протекать через слой такого сорбента.
- Однако при этом движение подвижной фазы вдоль колонки будет неравномерным, что обусловлено структурой сорбента.
- С этим связано уширение пиков вследствие вихревой диффузии (англ. *Eddy-Diffusion*). Такая вихревая диффузия схематически изображена на рис. 2.5.

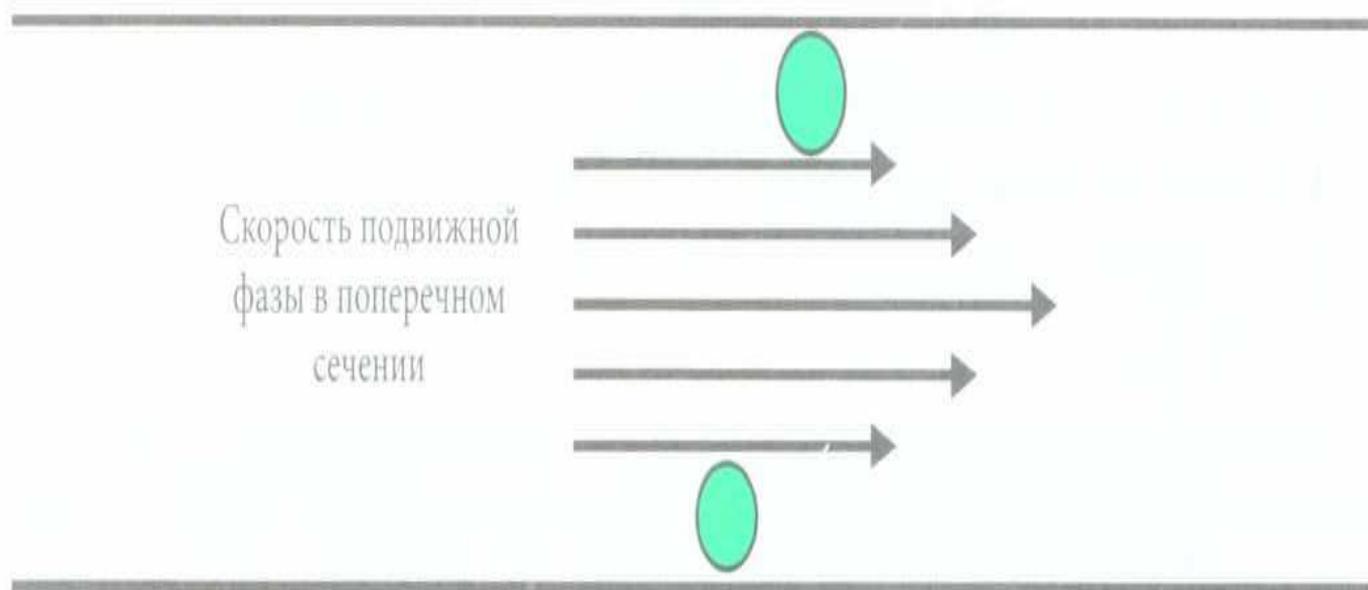
Уширение полосы компонента, вызванное вихревой диффузией

- Вихревая диффузия будет минимальной при использовании сорбента с минимальными размерами частиц;
- сферической форме частиц неподвижной фазы;
- если сферические частицы неподвижной фазы являются однородными по дисперсности.
- Вихревой диффузией можно пренебречь в том случае, если хроматографическая колонка не заполнена слоем твердого сорбента, а практически пуста.
- Этот вид колонок в настоящее время используют преимущественно в капиллярной ГХ, где неподвижная фаза нанесена на внутренние стенки колонки в виде тонкой пленки.

Уширение полосы компонента, вызванное протеканием потока подвижной фазы

- Подвижная фаза протекает равномерно вдоль колонки в виде струи (потока) жидкости. Если этот поток протекает без завихрений, то его называют ламинарным.
- Разумеется, скорость этого потока будет несколько больше в середине колонки, чем вдоль ее стенок или между двумя частицами твердой фазы.
- Вследствие этого возникает небольшое уширение пика
- При увеличении скорости подвижной фазы есть вероятность смены ламинарного характера течения турбулентным, что чревато существенным уширением пиков.
- Слишком низкая скорость также приведет к дополнительному уширению пиков вследствие описанной ранее диффузии.
- *Чем меньше скорость потока подвижной фазы, тем меньше уширение пика.*

Схематное изображение распределения потока жидкости внутри колонки.



Уширение полосы компонента, вызванное массопереносом

- Под массопереносом понимают переход молекул анализируемого компонента из подвижной фазы в поры сорбента (неподвижной фазы).
- Такой массоперенос неодинаков для всех молекул анализируемого соединения, поскольку поры варьируют в размерах, а некоторые из них могут, к примеру, быть полностью наполнены подвижной фазой. Это приводит к дополнительному уширению хроматографических зон анализируемых компонентов.
- Уширение вследствие массопереноса не является критичным, если поры сорбента малы и равномерно расположены на его поверхности. Кроме того, массоперенос не оказывает существенного влияния на разделение компонентов при низкой вязкости подвижной фазы.
- Поэтому в качестве подвижной фазы предпочтительнее использовать ацетонитрил, который обладает меньшей вязкостью по сравнению с метанолом.

Параметры хроматограммы

Наиболее существенные параметры «внешних хроматограмм» (ВЭЖХ) используют, прежде всего, для описания:

- разделительной способности хроматографической системы;
- внешнего вида пиков (симметричности);
- положения пиков;
- концентрации аналита.
- Аналитики обязаны знать хроматографические параметры, необходимые для расшифровки хроматограмм, т. е. владеть «языком хроматографии».

Параметры хроматограммы

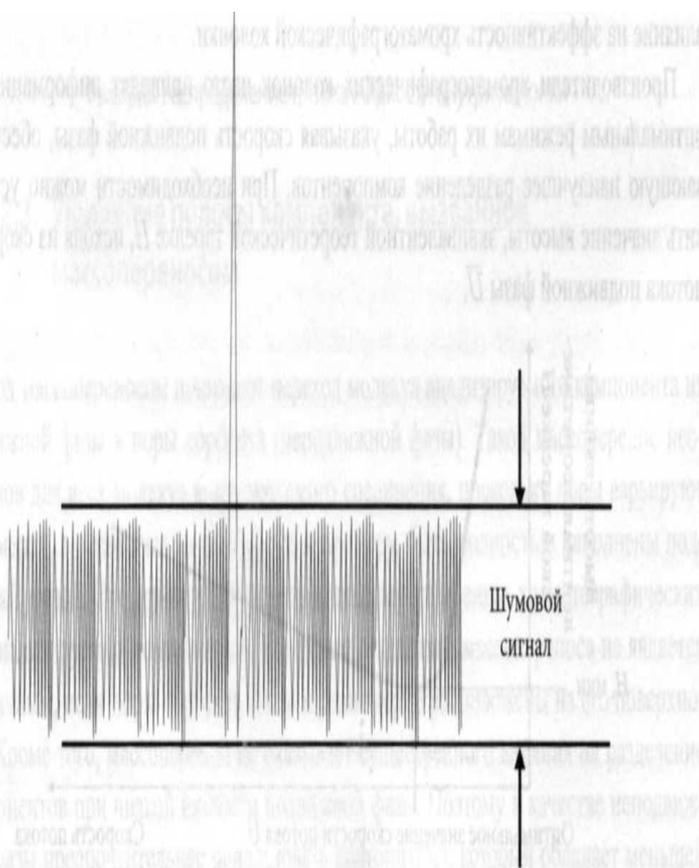


Рис. 2.8. Схема выявления полезного сигнала на фоне шумов базовой линии

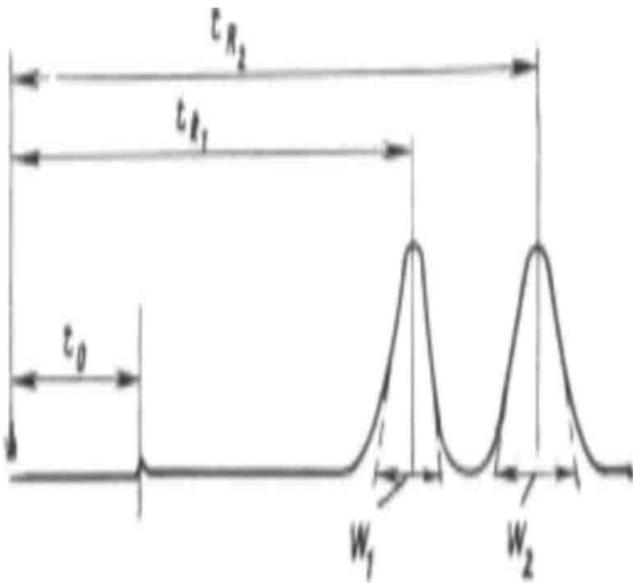
Пока через детектор протекает только подвижная фаза (растворитель в ВЭЖХ) его сигнал не должен быть значительным. Регистрация отклика детектора только на подвижную фазу формирует **базовую линию**, в идеале почти прямолинейную.

В зависимости от чувствительности детектора фиксируется то или иное значение **уровня шумов фонового сигнала**, приводящее к более или менее выраженным колебаниям базовой линии.

Время обнаружения сигнала аналитического пика зависит от настроек детектора и используемой системы обработки данных. По мнению ИЮПАК (Международного союза теоретической и прикладной химии), **величина «фонового сигнала» должна быть в три раза меньше высоты сигнала аналита** (рис. 2.8).

Длительность пребывания анализируемого компонента в хроматографической колонке зависит от его коэффициента распределения между неподвижной и подвижной фазами, а также от скорости подачи последней.

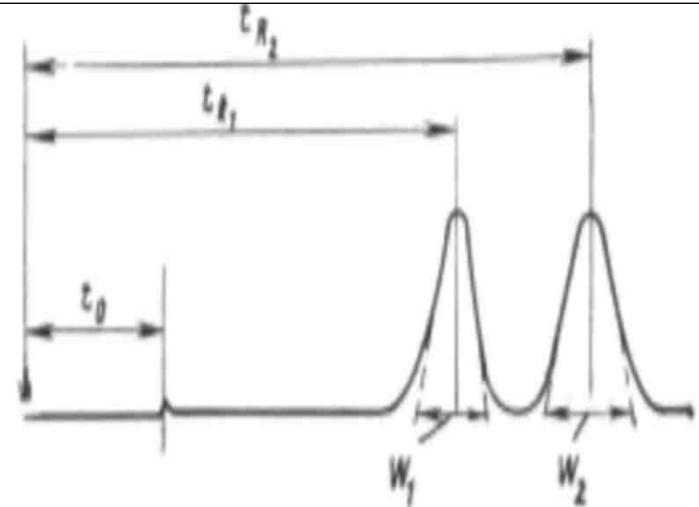
Временные характеристики удерживания компонентов на хроматограмме



- Аналит, который *не удерживается* в хроматографической колонке и находится преимущественно в подвижной фазе, очень быстро достигнет детектора после ввода пробы.
- **Время удерживания несорбируемого компонента t_0** (или, иначе, «мертвое» время удерживания) представляет собой время, измеренное от момента ввода пробы до детектирования растворителя, проходящего через колонку.
- До момента времени, соответствующего времени удерживания несорбируемого компонента t_0 , на хроматограмме не могут регистрироваться пики каких-либо других веществ.
- В качестве «вещества-метки для определения "мертвого" времени удерживания» в **обращенно-фазовой ВЭЖХ** используют, например, **тиомочевину**, а в ГХ — метан.

Временные характеристики удерживания компонентов на хроматограмме

- Аналиты, которые удерживаются в хроматографической колонке, пребывают в ней в течение более длительного времени.
- Общее время от момента ввода пробы до момента регистрации максимума пика компонента называют **временем удерживания** t_R («абсолютным временем удерживания»).
- **Времена удерживания анализируемых компонентов t_R используют для их идентификации.**



Одним из наиболее распространенных способов идентификации компонентов является измерение и сравнение их времен удерживания с временами удерживания стандартных образцов-эталонов.

Временные характеристики удерживания компонентов на хроматограмме

- На основании t_0 и t_R анализируемого соединения для каждого пика по формуле можно рассчитать исправленное время удерживания t_R^1

$$t_R^1 = t_R - t_0$$

- Исправленное время удерживания t_R^1 представляет собой параметр, характеризующий удерживание анализируемых компонентов собственно хроматографической колонкой без относительно особенностей прибора, в котором она установлена.

Временные характеристики удерживания компонентов на хроматограмме

- На основании времени удерживания несорбируемого компонента t_0 и длины хроматографической системы L (измеряемой от устройства для ввода пробы вплоть до детектора) можно определить **среднюю линейную скорость потока** подвижной фазы U :

$$U = \frac{L}{t_0}$$

- Среднюю линейную скорость потока подвижной фазы выбирают не произвольным образом, а **устанавливают оптимальное значение скорости подачи подвижной фазы в соответствии с данными изготовителей хроматографических колонок**

Временные характеристики удерживания компонентов на хроматограмме

- **Коэффициент удерживания k'** (коэффициент емкости k) — это параметр, **характеризующий скорость перемещения анализируемого компонента вдоль хроматографической колонки.**
- Он может быть вычислен по отношению разности времен удерживания компонента и несорбируемого компонента ко времени удерживания несорбируемого компонента t_0 по формуле

$$K^1 = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Временные характеристики удерживания компонентов на хроматограмме

- Так как числитель $t_R - t_0$ представляет собой исправленное время удерживания t^1_R , то выражение можно упростить, и оно примет вид

$$K^1 = \frac{t^1_R}{t_0}$$

Благодаря преобразованию формулы можно рассчитать исправленное время удерживания t^1_R

$$t^1_R = K^1 \cdot t_0$$

При этом t^1_R представляет собой t_0 , увеличенное в K^1 раз:

Временные характеристики удерживания компонентов на хроматограмме

- Это означает, что если, например, $k^l = 3$, то вещество в три раза дольше находится в неподвижной фазе, чем в подвижной.
- Значение t_R , которое представляет интерес для пользователя, состоит из суммы исправленного времени удерживания t^l_R и времени удерживания несорбируемого компонента t_0 .
- Можно получить зависимость между k^l и t_R :

$$t_R = K^l \cdot t_0 + t_0 = (K^l + 1)t_0$$

- *Например, если t_0 составляет 1,5 мин, а $K^l = 3$, то согласно уравнению анализируемый компонент покинет хроматографическую систему (время от ввода пробы до ее детектирования) через 6 мин.*

$$t_R = (3 + 1) \cdot 1,5 = 6$$

Временные характеристики удерживания компонентов на хроматограмме

- Для оптимизации разделения компонентов K^1 должно составлять от 1 до 5, значение K^1 равное 10 в большинстве случаев также является приемлимым.
- При значениях $k' < 1$ равновесие в хроматографической системе еще не успевает установиться, в результате чего времена удерживания компонентов могут плохо воспроизводиться.
- При $K' = 10$ следует ожидать уширения пиков.

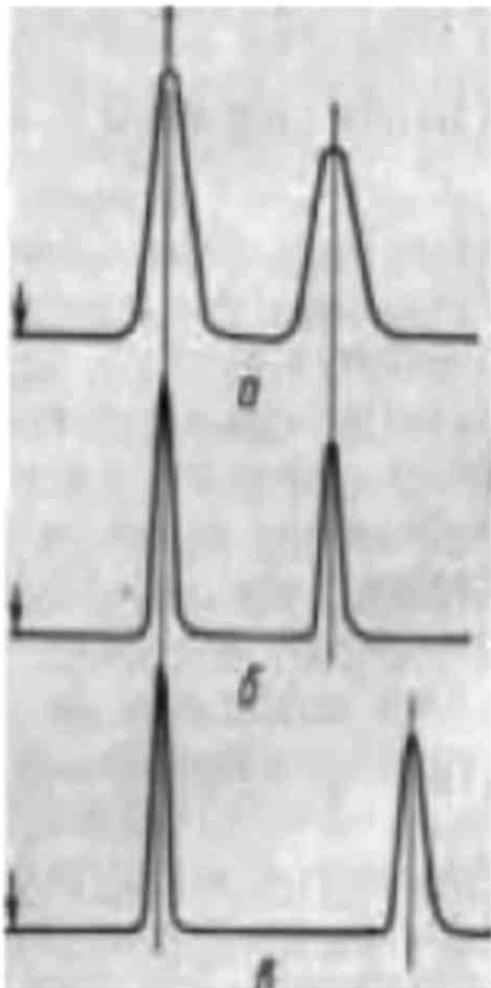
Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- Хроматография — это метод разделения компонентов смеси, основанный на различии в равновесном распределении их между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна, а другая подвижна.
- Компоненты образца движутся по колонке, когда они находятся в подвижной фазе, и остаются на месте, когда находятся в неподвижной фазе.
- Чем больше сродство компонента к неподвижной фазе и чем меньше — к подвижной, тем медленнее он движется по колонке и тем дольше в ней удерживается.
- За счет различия в сродстве компонентов смеси к неподвижной и подвижной фазам достигается основная цель хроматографии — разделение за приемлемый промежуток времени смеси на отдельные полосы (пики) компонентов по мере их продвижения по колонке с подвижной фазой.

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- Из этих общих представлений ясно, что хроматографическое разделение возможно только в том случае, если компоненты образца, попадая в колонку при вводе пробы:
 - во-первых, будут растворены в подвижной фазе,
 - во-вторых, будут взаимодействовать (удерживаться) с неподвижной фазой.
- Если при вводе пробы какие-то компоненты находятся не в виде раствора, они будут отфильтрованы и не будут участвовать в хроматографическом процессе.
- Точно так же компоненты, не взаимодействующие с неподвижной фазой, пройдут через колонку с подвижной фазой, не разделяясь на компоненты

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов



Примем условие, что какие-то два компонента растворимы в подвижной фазе и взаимодействуют с неподвижной фазой, т.е. хроматографический процесс может протекать без нарушений.

В этом случае после прохождения смеси через колонку можно получить хроматограммы вида а, б или в, представленные на слайде

Эти хроматограммы иллюстрируют хроматографические разделения, отличающиеся эффективностью (а и б) при равной селективности и селективностью (б и в) при равной эффективности.

Эффективность колонки тем выше, чем уже пик получается при том же времени удерживания.

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

Селективность колонки играет большую роль в достижении хроматографического разделения. Селективность колонки α определяется отношением приведенных времен удерживания двух пиков по следующему уравнению:

$$\alpha = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0)$$

где t_0 - время удерживания несорбируемого компонента; t_1 и t_2 - времена удерживания компонентов 1 и 2.

Селективность колонки зависит от очень многих факторов, и искусство экспериментатора в большой мере определяется умением воздействовать на селективность разделения.

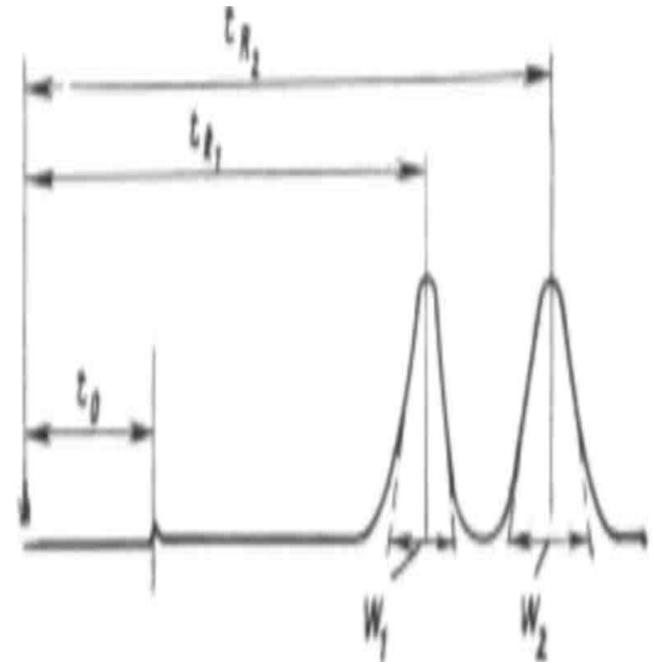
Для этого в руках хроматографиста находятся три очень важных фактора:

- выбор химической природы сорбента,
- выбор состава растворителя и его модификаторов
- учет химической структуры и свойств разделяемых компонентов.

Иногда заметное влияние на селективность оказывает **изменение температуры колонки**, меняющее коэффициенты распределения веществ между подвижной и неподвижной фазами.

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- При рассмотрении разделения двух компонентов на хроматограмме и его оценке важным параметром является **разрешение R_s** , которое связывает времена выхода и ширину пиков обоих разделяемых компонентов.



$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- Подобно коэффициенту разделения α , *разрешение* (разделение) R_s также характеризует разделение пиков, однако этот параметр учитывает их ширину.
- Ширину пиков измеряют в их основаниях на базовой линии пространственных координат (отсюда другое название этой величины — «ширина основания пика»).

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- Для ее оценки проводят касательные к боковым сторонам хроматографического пика и продлевают их до базовой линии.
- Полученное расстояние между двумя точками пересечения касательных с базовой линией и будет шириной пика.

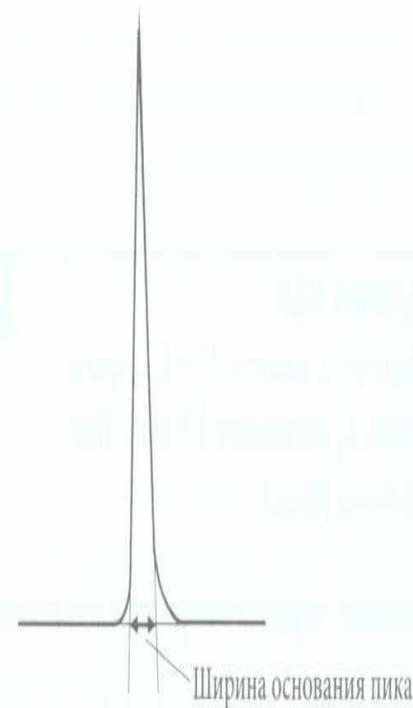


Рис. 2.9. Проведение касательных для определения ширины основания пика

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- При необходимости ширину пика можно перевести в единицы времени с учетом скорости регистрации хроматограммы v , см/мин:

$$W^{вр} = \frac{W^{шир}}{v} \quad (2.12)$$

- где $W^{вр}$ — ширина пика во временной системе координат.
- Единицей измерений ширины пика $W^{вр}$ являются минуты или секунды.
- Для расчета R можно воспользоваться формулой

$$R = \frac{2(t_{R}^{пик\ 2} - t_{R}^{пик\ 1})}{W_1^{вр} + W_2^{вр}}, \quad (2.13)$$

- где, $W^{вр}_1, W^{вр}_2$ - ширины пиков 1 и 2 соответственно

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- Два пика разделены до базовой линии, если значение R составляет не менее **1,5**. На рис. 2.10 приведены некоторые виды пиков и соответствующие значения разрешения R

Примечание

- *Пики разделены между собой до базовой линии, если значение R составляет не менее 1,5,*

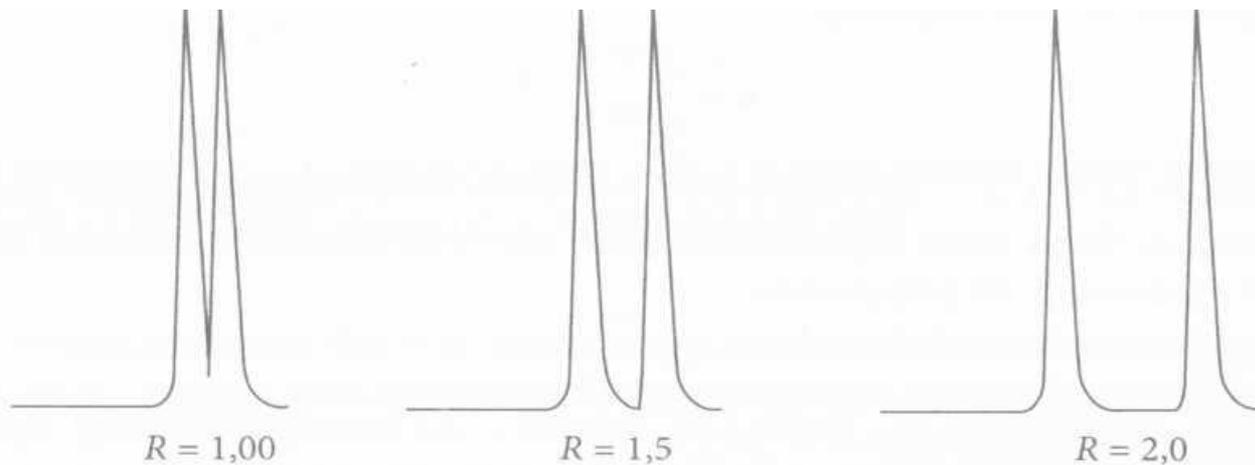


Рис. 2.10. Виды пиков и соответствующие значения R

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- **Число теоретических тарелок N**
- Эффективность хроматографических систем принято характеризовать числом теоретических тарелок.
- В теории теоретических тарелок принято, что хроматографическая колонка состоит из большого количества элементарных участков (так называемых «тарелок»), примыкающих друг к другу. На каждом таком участке устанавливается равновесное распределение анализируемых молекул между подвижной и неподвижной фазами (рис. 2.11).

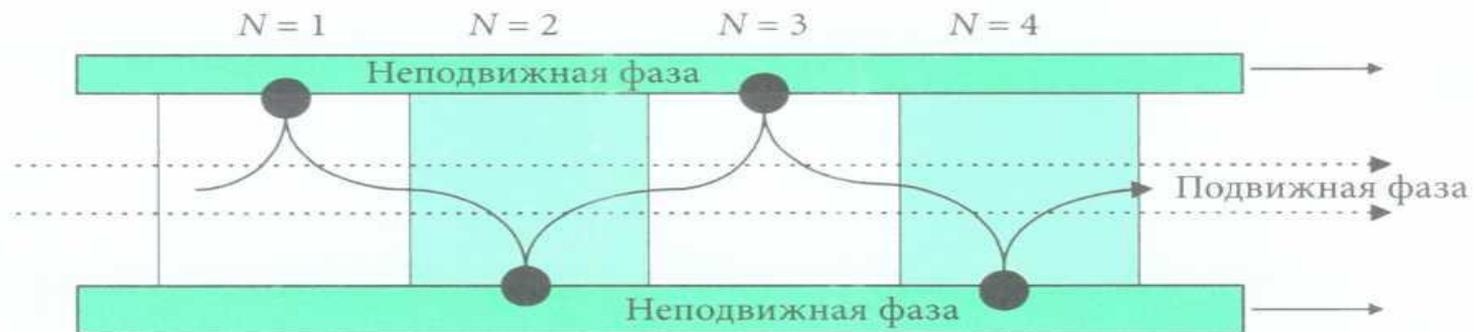


Рис. 2.11. Схематическое изображение хроматографической колонки в виде совокупности отдельных элементарных участков (теоретических тарелок)

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- Поэтому число теоретических тарелок N является мерой оценки *эффективности установления равновесия* в пространстве всей хроматографической колонки.
- Для наглядности сравним его с количеством «переходов», которые совершает молекула при перемещении между двумя фазами.

Число N зависит:

- от вида неподвижной фазы;
- состава подвижной фазы;
- размеров хроматографической колонки.

Чем больше N , тем теоретически выше разделительная способность хроматографической колонки.

При сравнении эффективности колонок, имеющих одинаковую длину, число теоретических колонок является важнейшим параметром.

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- Расчет количества теоретических тарелок N можно выполнить с использованием двух различных уравнений.
- Так как измерение ширины пика W^{Bp} на базовой линии иногда вызывает затруднения, определяют ширину пика на половине его высоты (так называемая «полуширина W_h », (рис. 2.12)).
- Иногда возникает необходимость в коррекции полученного значения W_h , с учетом скорости записи хроматограммы v в единицу времени

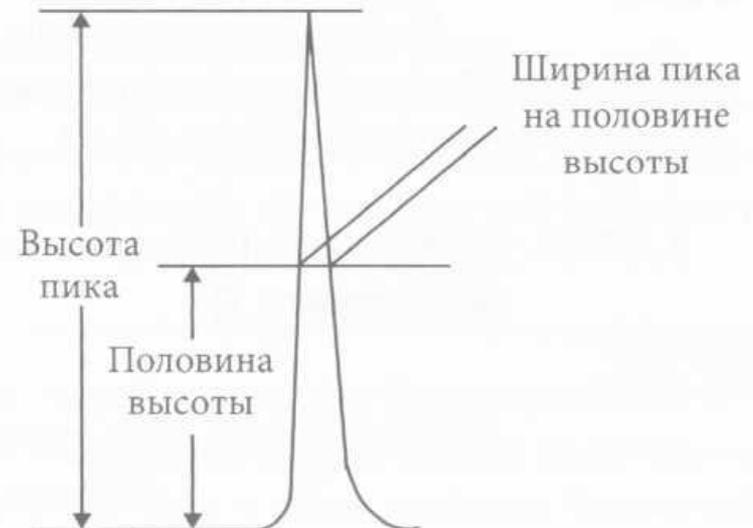


Рис. 2.12. Определение ширины пика на половине высоты W_h .

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- Если пики являются симметричными, выражения (2.14) и (2.15) дают практически одинаковые результаты:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W^{BP}} \right)^2; \quad (2.14)$$

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_h^{BP}} \right)^2. \quad (2.15)$$

- Обратите внимание на то, что в обоих уравнениях используют время удерживания t_R , а не исправленное время удерживания t^l_R .
- При сравнении эффективности двух хроматографических колонок объектом хроматографического анализа должна выступать *одна и та же смесь*, а процесс — осуществляться при *одинаковых условиях*.

Параметры хроматограммы, характеризующие разделение компонентов

- **Высота, эквивалентная теоретической тарелке H** , представляет собой длину отдельного элементарного участка колонки («тарелки»), на которой устанавливается равновесие (равновесное распределение вещества между подвижной и неподвижной фазами).
- Как было обозначено выше, эффективность хроматографической колонки тем выше, чем больше число теоретических тарелок N .
- Эффективность колонки обычно оценивают лишь по одному выбранному компоненту. Высоту, эквивалентную теоретической тарелке H , рассчитывают на основании длины слоя L неподвижной фазы (длины колонки) и количества теоретических тарелок N по формуле:

$$H = \frac{l}{N}. \quad (2.16)$$

Примечание

Чем меньше высота теоретической тарелки H , тем выше производительность хроматографической колонки для данного анализируемого компонента.

Симметричность пиков Т на хроматограмме

(коэффициент симметрии T)

- Симметричный пик имеет форму очень узкой кривой Гаусса.
- Появление несимметричных пиков на хроматограмме говорит о нарушении равновесия хроматографической системы либо о том, что она работает не в оптимальном режиме.
- Очень сильная асимметрия пиков приводит к стиранию границ между ними. Кроме того, при этом ухудшается оценка их площадей, поскольку система регистрации не может различить начало и окончание несимметричного пика
- Для описания симметрии пиков используется понятие «коэффициент асимметрии пика». На высоте, составляющей приблизительно 10% пика, параллельно базовой линии проводится черта. Далее измеряют расстояния от середины пика до его границ справа и слева, при этом середину пика определяют проведением вертикальной прямой из вершины пика до базовой линии (рис. 2.13)

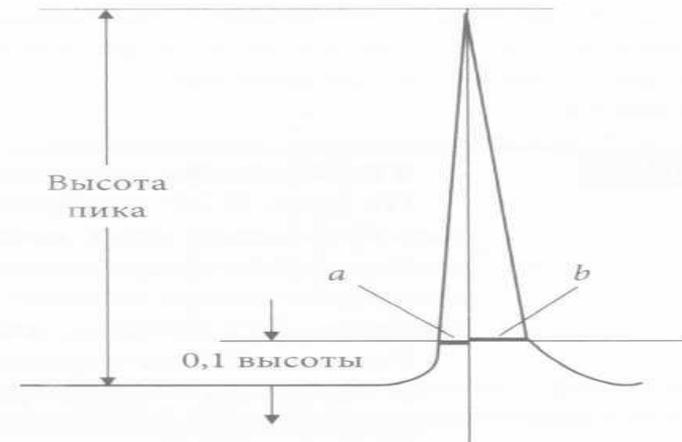


Рис. 2.13. Схема измерений при определении коэффициента асимметрии хроматографического пика T

Симметричность пиков Т на хроматограмме (коэффициент симметрии Т)

- Коэффициент асимметрии пика Т рассчитывают на высоте, составляющей 10% его общей высоты, по следующей формуле:

$$T = \frac{b}{a},$$

где, a , b — стороны пика.

- Если значение коэффициента асимметрии $T > 1,2$ (т. е. сторона пика b больше стороны a на 20%), то **речь идет об асимметрии обратной стороны пика** (на практике термин «асимметрия пика» обычно означает именно такую ситуацию).
- **Подобная асимметрия может говорить о том, что полярность хроматографической колонки (ГХ) или значения величины рН растворителя (ВЭЖХ) не являются оптимальными для разделения компонентов либо, что срок эксплуатации колонки истек.**

Симметричность пиков T на хроматограмме (коэффициент симметрии T)

- Если значение коэффициента асимметрии $T < 0,9$ (т. е. сторона пика a больше стороны b на 10%), то **речь идет об асимметрии передней стороны пика (или, сокращенно, «фронтальной асимметрии»)**.
- Обычно это происходит из-за введения в колонку чрезмерного количества аналита.

Примечание

Основной причиной фронтального расширения пика является введение в колонку слишком большого количества аналита.

- В некоторых отраслях промышленности (например, в фармацевтической) используются другие методы определения коэффициента асимметрии пика T , которые не описываются уравнением (2.17).

Параметры пиков, зависящие от количества аналитов

- В большинстве случаев *площадь пика* является параметром, измеряемым для определения *количественного содержания* анализируемого компонента. Лишь при том условии, что два пика не разделены до базовой линии и их высоты существенно различаются, можно получить достаточно точную информацию о количественном содержании компонентов при определении *высоты* пиков, а не их *площадей*. Однако необходимо помнить о том, что оценка на основании высоты пика такой хроматограммы (рис. 2.15) всегда содержит определенную погрешность. В подобной ситуации наилучшим способом определения количественного содержания компонентов будет оптимизация условий их разделения, при которой соседние пики разделятся до уровня базовой линии.

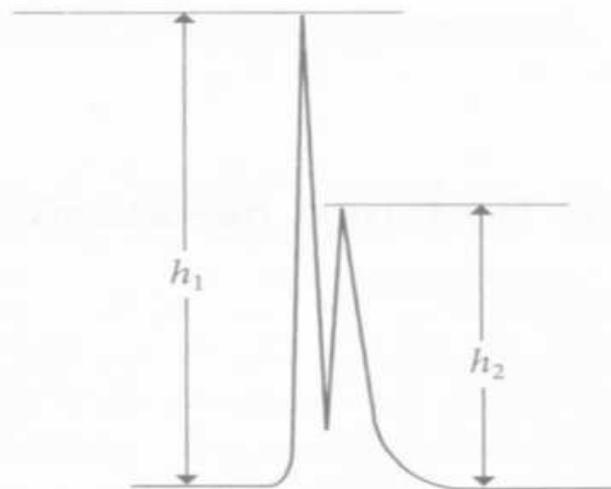


Рис. 2.15. Оценка количественного содержания по высоте пика

Параметры пиков, зависящие от количества аналитов

Примечание

- *Условиями проведения оценки количественного содержания аналитов с приемлемым уровнем ошибки являются разделение пиков до базовой линии и их симметричность.*
- Определение площадей пиков сегодня осуществляют с помощью электронных вычислительных систем (интегрирующего устройства или специальной программы для персонального компьютера).