



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБОУ ВО КЕМЕРОВСКИЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ
ИНСТИТУТ ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
(УНИВЕРСИТЕТ)

В.П. Гуськова, Л.С. Сизова

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА

Учебное пособие

Для студентов вузов

Второе издание, исправленное и дополненное

Кемерово 2015

УДК 543.54(075)

ББК 24.58я7

Г96

Рецензенты:

Е.Е. Сироткина, главный научный сотрудник-консультант
Института химии нефти СО РАН, д-р хим. наук, профессор;

Т.Г. Черкасова, зав. кафедрой химии и технологии
неорганических веществ КузГТУ, д-р хим. наук, профессор

*Рекомендовано редакционно-издательским советом
Кемеровского технологического института
пищевой промышленности
(университета)*

Гуськова, В.П.

Г96 Хроматографические методы разделения и анализа: учеб. пособие / В.П. Гуськова, Л.С. Сизова; Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет). – 2-е изд., испр. и доп. – Кемерово, 2015. – 158 с.

ISBN 978-5-89289-888-1

В учебном пособии рассмотрены краткие теоретические основы методов разделения и концентрирования. Приведена классификация хроматографических методов анализа, изложены теоретические основы этих методов, принцип действия и характеристики основных блоков используемой аппаратуры, способы определения качественного и количественного состава разделяемых смесей. В лабораторном практикуме приведены работы по газовой, ионообменной, тонкослойной хроматографии. В разделе УИРС предложены работы по анализу сырья и пищевых продуктов.

Предназначено для студентов всех форм обучения по направлениям «Продукты питания из растительного сырья», «Продукты питания животного происхождения», «Технология продукции и организации общественного питания», «Биотехнология», «Товароведение», «Управление качеством». Может быть использовано студентами и аспирантами, занимающимися исследованиями пищевой продукции и определением ее качества с применением хроматографических методов анализа.

ISBN 978-5-89289-888-1

*Охраняется законом об авторском
праве, не может быть использовано
любым незаконным способом
без письменного договора*

©КемТИПП, 2015

Введение

Методы разделения и концентрирования имеют в аналитической химии чрезвычайно важное значение. Хроматография является одним из наиболее простых и универсальных методов разделения и определения состава сложных смесей. Ее интенсивное развитие связано с разработкой новых эффективных вариантов разделения и анализа смеси веществ, с развитием основ известных или новых вариантов метода и с расширением области их практического приложения. Этим и обеспечивается исключительная роль хроматографических методов в современной науке и промышленности.

В настоящее время хроматографические методы широко используются для оперативного контроля качества сырья, полуфабрикатов и готовой продукции. Именно хроматографические методы анализа незаменимы при оценке пищевых продуктов, имеющих сложный химический состав, при определении добавок в пищевые продукты, аромата и запаха, пищевой полноценности и прогнозирования стойкости при хранении, а также при установлении остаточных количеств ядохимикатов.

Различным аспектам хроматографии посвящено очень большое число книг и обзоров. К сожалению, в существующей учебной литературе для студентов химико-технологических специальностей теория и практика хроматографических методов обзораются кратко, без учета современного состояния науки, а также специфики подготовки специалистов для пищевой промышленности.

В данном учебном пособии изложены теоретические основы хроматографических методов, приведены классификация методов, принцип устройства и работы аппаратуры, используемой в анализе. Рассмотрены возможные области применения, приведено описание лабораторных и учебно-исследовательских работ, учитывающих специализацию студентов.

Целью предлагаемого учебного пособия является оказание помощи студентам в самостоятельном изучении теоретических и практических основ хроматографических методов анализа.

1. Методы маскирования, разделения и концентрирования

Физические и химические свойства веществ, на которых основаны аналитические методы, редко бывают специфичными. Для устранения влияния веществ, мешающих аналитическому определению, известны методы маскирования, концентрирования и разделения.

Маскирование – это торможение или полное подавление химической реакции в присутствии веществ, способных изменять ее направление или скорость. При этом не происходит образование новой фазы, в чем и состоит основное преимущество маскирования перед разделением, поскольку исключаются операции, связанные с отделением фаз друг от друга.

Можно выделить несколько групп маскирующих веществ.

1. Вещества, образующие с мешающими веществами более устойчивые соединения, чем с определяемыми. Например, ионы Fe^{3+} , мешающие определению ионов Co^{2+} в виде цветного комплекса с тиоционатами, можно перевести в бесцветные ионы $[\text{FeF}_6]^{3-}$ действием фторида натрия.

2. Вещества, предотвращающие кислотно-основные реакции с образованием малорастворимых гидроксидов. Например, в присутствии винной кислоты гидрат оксида Fe(III) не осаждается аммиаком вплоть до pH 9–10.

3. Вещества, изменяющие степень окисления мешающего иона. Например, для устранения мешающего влияния Cr(III) при комплексонометрическом титровании алюминия и железа рекомендуется его окислить до Cr(VI) .

4. Вещества, осаждающие мешающие ионы, но осадок при этом можно не отделять. Например, при комплексонометрическом титровании кальция мешающие ионы магния осаждают в виде гидроксида, но не отделяют от раствора.

5. Вещества со специфическим действием. Например, полярографические волны подавляются в присутствии некоторых поверхностно-активных веществ (ПАВ).

В качестве маскирующих веществ используются оксикислоты (винная, лимонная, салициловая), полифосфаты, полиами-

ны, глицерин, тиомочевина, тиоэфиры, галогенид-, цианид-, тиосульфат-ионы, аммиак, макроциклические реагенты (краун-эфиры) и др.

Концентрирование – операция (процесс), в результате которой повышается отношение концентрации или количества микрокомпонентов к концентрации или количеству макрокомпонентов.

Концентрации компонентов при разделении могут быть близки друг к другу, но могут и отличаться. Концентрирование чаще проводят в условиях, когда концентрации компонентов резко отличаются. Концентрирование можно провести отгонкой, выпариванием, экстракцией, соосаждением, хроматографическими методами.

Разделение – это операция (процесс), в результате которой компоненты, составляющие исходную смесь, отделяются один от другого.

Общим для всех методов разделения в основном является распределение компонентов смеси между двумя фазами, которые затем отделяют друг от друга механически. Потенциально разделение возможно, если соотношение между количествами какого-либо компонента в каждой фазе (*коэффициент распределения*) значительно отличается от такого соотношения для другого компонента. Несомненно, сложность процесса разделения определяется различием в коэффициентах распределения обоих компонентов. Если различие велико, достаточно одноступенчатого разделения. Особенно сложен процесс разделения тех веществ, коэффициенты которых отличны от нуля и близки по величине; в этих случаях необходимо привлечь технику многоступенчатого фракционирования.

Потенциальная возможность разделения любой пары веществ определяется селективностью применяемого метода. Количественной характеристикой этой потенциальной возможности по отношению к конкретной паре разделяемых веществ является коэффициент селективности K_c :

$$K_c = \frac{p_i}{p_j}, \quad (1.1)$$

где p_i, p_j – измеряемые параметры проявления характеристических свойств разделяемых веществ i и j соответственно.

Конечный результат операций разделения и концентрирования характеризуют коэффициентом разделения K_p или коэффициентом концентрирования $K_{конц}$, численно равными друг другу:

$$K_p = K_{конц} = \frac{q_{i,кон} / q_{j,кон}}{q_{i,исх} / q_{j,исх}}, \quad (1.2)$$

где $q_{i,исх}, q_{i,кон}$ – количество целевого (выделяемого) компонента i в исходной смеси и конечном продукте соответственно;

$q_{j,исх}, q_{j,кон}$ – количество мешающего компонента j (в случае разделения) либо количество матрицы или матричного компонента (в случае концентрирования) в исходной смеси и конечном продукте соответственно.

При этом матрица в исходной смеси и в конечном продукте может быть различной. Например, при групповом экстракционном выделении органических веществ из водных растворов с помощью органического растворителя в исходной смеси матрицей является вода, а в конечном продукте – органический растворитель.

Еще одной общей характеристикой методов разделения и концентрирования является степень выделения R_i :

$$R_i = \frac{q_{i,кон}}{q_{i,исх}}. \quad (1.3)$$

Формально коэффициенты разделения и концентрирования связаны со степенью выделения соотношением:

$$K_p = K_{конц} = \frac{R_i}{R_j}. \quad (1.4)$$

Все методы разделения в зависимости от однородности состава исходной смеси веществ подразделяют на методы разделения гетерогенных и методы разделения гомогенных смесей.

1.1. Методы разделения гетерогенных смесей веществ

Методы разделения этой группы – флотация, седиментация, разнообразные варианты сепарации и, наконец, просто фильтрация. При разделении гетерогенных смесей целью является выделение фракций их компонентов, различающихся по агрегатному состоянию, или фракционирование частиц по степени дисперсности и фазовому составу.

Флотация – метод разделения частиц смесей веществ различного фазового состава, находящихся в твердофазном состоянии, основанный на различиях в их смачивании. При разделении этим методом водную суспензию измельченных компонентов смеси обрабатывают специальными реагентами (анионными и катионными или неионогенными поверхностно-активными веществами), которые избирательно адсорбируются на поверхности частиц извлекаемого компонента и понижают их смачиваемость водой. Затем через суспензию пропускают воздух в виде мелких пузырьков, прилипающих к гидрофобизированной поверхности частиц твердой фазы. Частицы выделяемых компонентов с прилипшими пузырьками воздуха всплывают, в результате чего над поверхностью суспензии образуется довольно устойчивый слой пены, обогащенный извлекаемыми компонентами.

Седиментация – оседание, т.е. процесс выделения взвешенных частиц из жидкости или газа под действием гравитационного поля.

Сепарационные методы – методы, различающиеся в зависимости от природы сил, вызывающих эффект разделения. Наиболее общий случай – центробежная сепарация, реже – магнитная. В рамках первой выделяют воздушную сепарацию и сепарацию эмульсий. Воздушная сепарация является одним из основных промышленных способов пылеулавливания. Основным типом эмульсий, разделяемых сепарационным методом, является молоко.

К числу сепарационных методов относится *центрифугирование*, являющееся одной из основных аналитических процедур при разделении веществ методом осаждения. Основываясь

на методах центробежной сепарации, аналитические центрифуги отличаются от промышленных сепараторов особенностями конструкций, позволяющими проводить последовательное разделение небольших порций гетерогенных смесей.

Фильтрация – это способ продвижения твердых частиц, взвешенных в жидкостях или газах, через пористую среду с последующим задерживанием на ней. Подбирая материал этой среды (фильтра), удастся выделить очень мелкие частицы из аэрозолей и растворов, а при использовании гель-фильтрации – даже разделить молекулы по их размерам.

1.2. Методы разделения гомогенных смесей веществ

Методы разделения гомогенных смесей веществ могут быть систематизированы следующим образом:

- 1) методы, основанные на образовании выделяемым веществом новой фазы (твердой, жидкой или газообразной);
- 2) мембранные методы;
- 3) методы внутрифазного разделения;
- 4) методы, основанные на различиях в межфазном распределении;
- 5) комбинированные методы.

1.2.1. Методы разделения, основанные на образовании новой фазы

Основным классификационным признаком методов разделения, основанных на образовании выделяемым веществом новой фазы, является агрегатное состояние исходной смеси и выделяемой фазы. Характеристические свойства выделяемых веществ в одном случае проявляются в способности образовывать новую фазу в результате химических реакций образования их малорастворимых или летучих форм, в другом – в результате фазовых переходов, вызванных изменением температуры в результате подвода или отвода теплоты из системы.

К этой группе методов разделения относятся методы осаждения, электроосаждения, кристаллизации и перекристаллиза-

ции, вымораживания, отгонки из раствора, упаривания, возгонки, дистилляции и ректификации.

В осаждении, перекристаллизации и всех других видах разделения, основанных на растворимости, природа фазового разделения ясна – твердое вещество отделяется от жидкости.

Осаждение – метод разделения веществ, находящихся в растворе или специально переведенных в растворенное состояние, основанный на образовании малорастворимых соединений разделяемыми или отделяемыми компонентами за счет взаимодействия с реагентом-осадителем. При осаждении могут наблюдаться процессы соосаждения и окклюзии.

Соосаждение – частичный захват любого компонента системы образующимся в ней осадком.

Окклюзия – механический захват растущими кристаллами вещества среды, в которой происходит их рост.

В этом методе разделения с целью получения более чистых выделяемых компонентов нередко используют *переосаждение* – повторение операции растворения и осаждения данного соединения.

Электроосаждение – это процесс образования твердой фазы в результате электрохимических процессов на электродах. При этом электроосаждение возможно по двум различным схемам:

1) восстановление ионов металлов на катоде до элементарного состояния;

2) химические реакции в растворе с участием ионов в качестве реагента-осадителя, образовавшихся благодаря электрохимическим превращениям в приэлектродном пространстве.

В зависимости от движущей силы процесса различают четыре способа осуществления электроосаждения:

- под действием электрического тока от внешнего источника (внешний электролиз);
- на одном из электродов гальванического элемента (внутренний электролиз);
- самопроизвольное осаждение на поверхности более электроотрицательного металла (цементация);
- химическое осаждение с участием окисленной или восстановленной на электроде формы.

Кристаллизация – образование в растворе твердой фазы, которая имеет кристаллическую структуру. Для повышения эффективности разделения или очистки иногда используют процесс *перекристаллизации* – многократное повторение процессов растворения и кристаллизации.

Вымораживание – метод разделения, основанный на фазовых переходах веществ из газовой в жидкую или твердую фазу. В аналитической практике применяют исключительно вымораживание микрокомпонентов при анализе газовых смесей. При осуществлении этого процесса важное значение имеет выбор температуры и скорости пропускания газовой смеси. При температуре вымораживания парциальное давление отделяемого или концентрируемого компонента в исходной смеси должно быть гораздо выше давления его насыщенного пара, а парциальное давление макрокомпонента – ниже давления его насыщенного пара, чтобы не происходило вымораживание макрокомпонента.

Отгонка из раствора – метод разделения, основанный на выделении летучих соединений из раствора в газовую фазу.

Существует несколько способов повышения полноты извлечения газообразных соединений из растворов: увеличение температуры, уменьшение давления, барботирование газа, кипячение. Рост температуры и снижение давления способствует уменьшению растворимости газовой фазы. Барботирование эквивалентно проведению динамической газовой экстракции. Распространена также отгонка с предварительным химическим превращением, т.е. переводение компонента в летучее соединение в результате химических реакций. Примером может служить выделение оксидов углерода при подкислении растворов карбонатов.

Упаривание – процесс частичного или полного удаления более летучего растворителя из раствора за счет парообразования, которое может быть инициировано нагреванием (не обязательно до точки кипения) или понижением давления.

Возгонка (сублимация) основана на фазовом переходе вещества из твердого состояния непосредственно (без плавления) в газообразное при нагревании. Например, возгонка йода при его очистке или определении в нем примесей металлов.

Дистилляция (перегонка) – основана на испарении жидкой смеси и последующей конденсации образующихся паров. Дистилляционное разделение становится возможным благодаря тому, что составы жидкости и равновесного с ней пара, а следовательно, и образующегося из него дистиллята отличаются. При этом дистиллят обогащается более летучими компонентами, а остающаяся жидкость, так называемый «кубовый остаток», – менее летучими.

Ректификация – метод многоступенчатого разделения, процесс дистилляции с многократным повторением фазовых переходов «испарение – конденсация». Принцип заключается в противоточном прохождении части конденсата и поднимающихся вверх паров, между которыми происходит интенсивный обмен.

1.2.2. Мембранные методы разделения веществ

Мембранные методы разделения основаны на переносе веществ или ионов из одной фазы в другую через разделяющую их третью фазу – мембрану (лат. membrane – перепонка). Вещества проникают через мембрану под воздействием градиентов химического и электрического потенциала или давления (см. табл. 1.1).

Диализ – метод разделения растворимых веществ, значительно различающихся молекулярными массами, основан на неодинаковых скоростях диффузии этих веществ через полупроницаемую мембрану, разделяющую концентрированные и разбавленные растворы. В баромембранных методах в зависимости от диаметра пор мембраны различают процессы обратного осмоса (мембраны с порами диаметром 10^{-3} – 10^{-2} мкм), ультрафильтрации (10^{-2} – $0,1$ мкм) и микрофильтрации ($0,1$ – 10 мкм).

Осмоз – самопроизвольный переход вещества через полупроницаемую мембрану, разделяющую два раствора различной концентрации или чистый растворитель и раствор. Наиболее часто наблюдается переход растворителя через полупроницаемую мембрану из разбавленного раствора в концентрированный под действием осмотического давления.

Таблица 1.1

Классификация мембранных методов разделения

Система фаз	Движущая сила процесса		
	Градиент химического потенциала (диффузионные методы)	Градиент электрического потенциала (электромембранные методы)	Градиент давления (баромембранные методы)
Жидкость – жидкость – жидкость	Диализ через жидкие мембраны	Электродиализ через жидкие мембраны	–
Жидкость – твердая фаза – жидкость	Диализ, доннановский диализ	Электродиализ, электроосмос	Микрофильтрация, ультрафильтрация, обратный осмос
Жидкость – твердая фаза – газ	Испарение через мембрану	–	–
Газ – твердая фаза – жидкость	Газодиффузионное разделение	–	Микрофильтрация, ультрафильтрация

Обратный осмос (гиперфильтрация) – процесс, обратный осмосу при давлении, превышающем осмотическое давление.

Ультрафильтрация – метод разделения растворов и коллоидных систем, в которых молекулярная масса растворенных (диспергированных) компонентов намного больше молекулярной массы растворителя (дисперсионной среды).

Микрофильтрация – метод разделения коллоидных систем при помощи полупроницаемых мембран. Движущая сила процесса – градиент давления по обе стороны мембраны (обычно 0,01–0,1 МПа). Индивидуальными характеристическими свойствами ионов при их разделении электромембранными методами являются их заряд и подвижность.

Электродиализ – метод разделения ионизированных соединений под действием электродвижущей силы, создаваемой в растворе по обе стороны разделяющей его мембраны. Для этого

используют ионоселективные мембраны, проницаемые для любых ионов при отделении электролитов от неэлектролитов. При обессолевании растворов электролитов или фракционировании ионов применяют селективные мембраны, проницаемые только для катионов или только для анионов.

Электроосмос – метод, основанный на движении под действием внешнего электрического поля жидкой фазы (обычно раствор электролита) вдоль стенок капиллярной трубки или поверхности каналов пор в пористом теле, которые при этом образуют определенный электрический заряд.

1.2.3. Методы внутрифазного разделения

Методы внутрифазного разделения основаны на характеристических свойствах ионов, атомов или молекул, проявляемых в пределах одной гомогенной системы при воздействии электрического, магнитного, гравитационного и теплового полей или центробежных сил. Разделение происходит за счет различного по скорости и (или) направлению пространственного перемещения частиц в пределах самой фазы. Различия в скоростях проявляются в зависимости от массы, размеров, зарядов частиц, а также энергии взаимодействия их со средой, в которой происходит разделение. Например, электрофорез основан на различиях в скоростях пространственного перемещения электрозаряженных частиц в жидкой среде под действием внешнего электрического поля.

1.2.4. Методы разделения, основанные на различиях в распределении веществ между двумя фазами

Среди методов разделения гомогенных смесей веществ важнейшее значение для аналитической химии имеют методы, основанные на различиях в распределении веществ между фазами. К группе этих методов относятся различные виды экстракции и сорбции. Чаще используется жидкостная экстракция – метод разделения, основанный на различиях в распределении

веществ между двумя жидкими фазами; в наиболее общем случае – между водным раствором и органическим растворителем.

При экстракции одновременно протекают следующие процессы: образование экстрагируемых соединений; их распределение между водной и органической фазами; реакции в органической фазе (диссоциация, ассоциация и полимеризация). Вещество (обычно в органической фазе), ответственное за образование экстрагируемого соединения, называют *экстрагентом*. Инертные органические растворители, такие как хлороформ, тетрахлорид углерода, бензол, применяемые для улучшения физических и экстракционных свойств экстрагента, называют *разбавителями*. Органическую фазу, отделенную от водной фазы и содержащую экстрагированные соединения, называют *экстракт*ом. Перевод вещества из органической фазы в водную называют *реэкстракцией*, а раствор, используемый для реэкстракции – *реэкстрагентом*. Экстрагируемое вещество может находиться в растворе в различных формах.

Практический интерес в данном методе представляет коэффициент распределения D – отношение суммарных концентраций *всех форм вещества* в обеих фазах:

$$D = \frac{C_{орг}}{C_{водн}}. \quad (1.5)$$

Хорошую селективность разделения и высокие значения коэффициентов распределения обеспечивают сорбционные методы. *Сорбция* – поглощение газов, паров или растворенных веществ твердыми или жидкими поглотителями. Пивовары и виноделы уже давно используют различие в летучести и адсорбционной способности веществ для их химического разделения. Более летучая и очищенная, богатая спиртом фаза отделяется от сусла дистилляцией, а другие соединения с неприятным вкусом и запахом удаляются из водно-этанольных растворов путем их адсорбции на древесном угле.

Различные методы сорбции используются в хроматографических методах разделения и анализа веществ. Хроматография – наиболее часто используемый аналитический метод. Та-

кие ее достоинства, как универсальность, экспрессность и чувствительность, делают хроматографию важным методом анализа при определении различных групп веществ: белков, пестицидов, антибиотиков, наркотиков, канцерогенов и т.п.

2. Краткая история развития хроматографии

Сорбция играет важную роль при разделении веществ методом хроматографии. Свойства почвы поглощать некоторые вещества были известны, по-видимому, еще Аристотелю. Первым, кто занимался изучением адсорбции, был Т. Ловиц: он предложил в 1785 г. использовать древесный и костяной уголь для очистки воды и различных органических веществ, в том числе спирта. Английские химики У.Дж. Уильямс и Т. Уэйл в результате поисков в старой литературе выяснили, что в 1847 г. была предложена колонка для отделения растворенных веществ от растворителей. Во второй половине XIX в. Ф. Геппельсредер (Базельский университет) предложил так называемый капиллярный анализ. Он опускал полоски фильтровальной бумаги в раствор. Растворенные вещества поднимались по бумаге вместе с растворителем и через некоторое время занимали на бумаге определенное положение. Таким образом можно было судить о числе компонентов смеси. В 1886 г. Энглер применил адсорбционные батареи, заполненные углем, для обесцвечивания нефти. Приведенные примеры показывают, что хроматографию как процесс не нужно было изобретать, поскольку он существовал в природе всегда (процесс дыхания, поглощение кислорода гемоглобином крови в легких, тоже в определенной степени хроматографический процесс).



М.С. Цвет

Честь открытия хроматографии как метода разделения веществ принадлежит М.С. Цвету, который впервые применил в 1903 г. проявительный вариант жидкостно-адсорбционной хроматографии для анализа хлорофилла.

Открытию помогло то обстоятельство, что Цвет исследовал окрашенные вещества, поэтому за их разделением

можно было наблюдать невооруженным глазом. В трубку с порошком мела он залил раствор пигментов хлорофилла. В верхней части образовалось окрашенное кольцо. Затем он стал непрерывно пропускать в верхнюю часть трубки бензол. Пигменты частично растворялись в нем, опускались, адсорбировались другими зернами мела, снова растворялись в новых порциях бензола и снова опускались по трубке.

Так как вещества по-разному извлекались бензолом из адсорбента (мела), они опускались по трубке с разной скоростью. Поэтому первоначальное зеленое кольцо, опускаясь, постепенно расширялось и делилось на несколько цветных колец. В конце концов этих колец оказалось шесть: верхнее желтое, затем оливково-зеленое, далее темно-зеленое и три желтых.

М.С. Цвет извлек слои мела из трубки, разрезал его на цилиндрики, в каждом из которых оказалась свое цветное кольцо. Теперь можно было извлечь вещества из адсорбента спиртом и исследовать. В результате ученый показал, что хлорофилл – это не индивидуальное соединение, а смесь двух веществ, которые разделились на колонке с мелом и дали оливково-зеленое и темно-зеленое кольца. Остальные вещества были ксантофиллами (рис. 2.1).

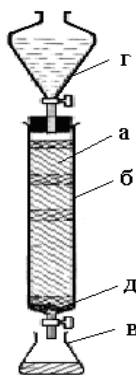


Рис. 2.1. Хроматографическое разделение пигментов хлорофилла М.С. Цветом: а – адсорбент; б – колонка; в – приёмник; г – делительная воронка; д – вата

М.С. Цвет назвал полученную при разделении разноцветную картину хроматограммой, а сам метод – хроматографическим адсорбционным анализом или хроматографией. Название было подобрано очень осторожно, если учесть, что слово «хроматография» в переводе с греческого означает «цветопись», т.е., с одной стороны, говорит о разделении окрашенных веществ, а с другой – напоминает об имени изобретателя метода.

М.С. Цвет родился в 1872 г. в Италии. Отец был русский, мать – итальянка, воспитанная в России. Образование он получил в Женевском университете. В 1896 г. приехал в Россию, но не смог занять официального положения в научном мире, так как диплом иностранного университета в России не признавался полноценным документом о высшем образовании. М.С. Цвет обратился в российские университеты с просьбой принять у него магистерские экзамены. Руководство Казанского университета согласилось проэкзаменовать М.С. Цвета, который в течение одного месяца в 1899 г. сдал четыре экзамена по различным разделам ботаники и химии. В 1901 г. им была представлена к защите диссертация «Физико-химическое строение хлорофиллового зерна».

После защиты диссертации он уехал в Варшаву и уже в 1903 г. выступил в Варшавском обществе естествоиспытателей со своим знаменитым докладом «О новой категории адсорбционных явлений и о применении их к биохимическому анализу», в котором детально изложил метод адсорбционного хроматографического анализа. Он указал, что этим методом можно разделять не только окрашенные вещества, но и бесцветные соединения. М.С. Цветом было опубликовано много статей в этой области, он совершенствовал свой метод и применял его для решения практических задач. В 1910 г. М.С. Цвет с большим успехом защитил докторскую диссертацию, и только в марте 1917 г. был избран профессором университета и директором ботанического сада в Юрьеве (г. Тарту). Его работы были прерваны первой мировой войной, рукописи и рабочие журналы исчезли во время эвакуации. Умер М.С. Цвет в 1919 г. на 47-м году жизни.

Несмотря на необычайно широкие возможности, метод М.С. Цвета почти не использовался до 1931 г., когда Р. Кун, Е. Ледерер и А. Винтерштейн повторили его опыты по разделению тех же растительных пигментов. Во всех опытах использовалась, главным образом, жидкостная адсорбционная хроматография. Именно с этого времени появляются многочисленные работы, посвященные теории метода, технике и аппаратурному оформлению хроматографических методов, поискам и изучению новых сорбентов и растворителей, применению метода в раз-

личных областях. Первая книга о хроматографии была издана в 1938 г. в Вене. После М.С. Цвета первыми достижениями отечественных специалистов в этой области стали работы М.М. Дубинина о разделении газов (1936 г.), Н.А. Измайлова и М.С. Шрайбер о тонкослойной хроматографии (1938 г.).

В 1940 г. шведский ученый А. Тизелиус разработал фронтальный и вытеснительный методы хроматографического анализа. В 1941 г. А.Дж.П. Мартин и Р.Л. Синдж разработали и впервые применили жидкостную распределительную хроматографию. Эти ученые разработали общую теорию хроматографии и предположили, что сочетание газовой подвижной фазы с жидкостной стационарной фазой имеет важное преимущество, однако ни одна из работ по использованию сочетания газа с жидкостью не была опубликована до 1952 г. В начале 1950 г. А.Т. Джеймс и А.Дж.П. Мартин сконструировали первый газовый хроматограф.

Первая работа по хроматографическому анализу газов в нашей стране была опубликована в 1949 г. Н.М. Туркельтаубом, который выполнил ее под руководством А.А. Жуховицкого и К.А. Гольберта. Современный этап развития газовой хроматографии начался в 1951–1952 гг., когда А.А. Жуховицкий с сотрудниками предложил хромотермографию, в то время как А. Мартин и А.Т. Джеймс разработали основы газожидкостной хроматографии. Это открытие было настолько важным и оказало такое влияние на развитие химического анализа, что его авторы были удостоены Нобелевской премии. Они продемонстрировали преимущества нового метода на примере разделения летучих жирных кислот и показали, что вследствие низкой вязкости газа и во много раз более быстрой диффузии в газовой фазе разделение с применением газа-носителя происходит значительно быстрее.

За период времени с 1954 по 1962 г. газожидкостная хроматография развивалась с необычайной быстротой и к 1962 г. превратилась в хорошо разработанный метод анализа. Затем его развитие практически остановилось, а те усовершенствования, которые были сделаны, являлись незначительными. 1967 г. отмечен

появлением более нового хроматографического метода – аффинной хроматографии.

Быстрый прогресс газовой хроматографии в 1950 г. дал толчок к развитию жидкостной хроматографии. В начале 1980 г. она превратилась в широко используемый метод анализа и разделения всевозможных сложных смесей, в том числе многих из тех, которые раньше не анализировали методом газовой хроматографии. Более десяти работ (1957–1980 гг.), выполненных с применением хроматографических методов, были удостоены Нобелевских премий.

Создание высокочувствительных детекторов, новых селективных полимерных сорбентов, новой аппаратуры, позволяющей работать при высоких давлениях, привело к значительному увеличению скорости хроматографического процесса, повышению эффективности разделения смеси веществ, возможности определять малые концентрации и появлению высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Если в классической жидкостной хроматографии разделение смеси органических компонентов обычно проводилось в довольно длинных колонках с диаметром 10–12 мм, заполненных сорбентом с диаметром зерен 150–250 мкм, то в современной высокоэффективной жидкостной хроматографии применяют колонки с диаметром 1–3 мм и размером частиц менее 50 мкм. Благодаря этому по эффективности разделения веществ жидкостная хроматография практически не уступает газовой.

Явление ионного обмена было открыто более ста лет назад, но интерес к нему не ослабевал, а, наоборот, возрастал. В 1935 г. Б. Адамс и Е. Холмс разработали методику синтеза высокомолекулярных органических сорбентов – ионообменных смол, значение которых для ионного обмена трудно переоценить.

В 1947 г. Т.В. Гапон, Е.Н. Гапон и Ф.М. Шемякин впервые осуществили хроматографическое разделение смеси ионов в растворе, объяснив его наличием обменной реакции между ионами сорбента и ионами, содержащимися в растворе. Так было открыто еще одно направление хроматографии – ионообменная хроматография. Развитие жидкостной хроматографии высокого давления способствовало развитию нового направления в

ионообменной хроматографии – ионной хроматографии. Этот метод предложили в 1975 г. Г. Смолл, Т. Стивенс и В. Бауман. Для того чтобы ионообменная хроматография стала высокоэффективным методом определения ионов, необходимо было решать те же проблемы, что и для жидкостной хроматографии, а именно: создать аппаратуру, позволяющую проводить высокоэффективное разделение ионов, и чувствительный универсальный проточный детектор. В нашей стране метод ионной хроматографии развивается с 1980 г., первая научная публикация появилась в 1982 г., в 1986 г. начат выпуск отечественного ионного хроматографа Цвет-3006 (г. Дзержинск).

В настоящее время хроматография продолжает интенсивно развиваться, это связано как с разработкой эффективных вариантов разделения, развитием теоретических основ известных или новых вариантов метода, так и с расширением области их практического применения. Основные усилия исследователей направлены на увеличение селективности и эффективности разделения, повышение чувствительности и экспрессности анализа, создание гибридных методов, сочетание хроматографии с ИК-спектроскопией, масс-спектрометрией и другими методами.

3. Теоретические основы хроматографических процессов

Изотермы сорбции

При хроматографическом разделении каждый компонент исследуемой смеси, проходя по слою сорбента бесчисленное количество раз, сорбируется и десорбируется, распределяясь

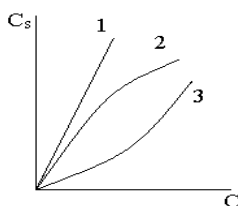


Рис. 3.1. Изотермы сорбции:
1 – линейная; 2 – выпуклая (изотерма Ленгмюра); 3 – вогнутая

между подвижной и неподвижной фазами. Зависимость между количеством (C_s) вещества, сорбированного из газовой или жидкой фазы, и его концентрацией (C) в этой фазе при постоянной температуре выражают изотермой сорбции. При малых концентрациях и однородной поверхности сорбента C_s про-

порционально C и наблюдается линейная изотерма сорбции (кривая 1, рис. 3.1), что соответствует уравнению Генри:

$$C_s = a \cdot C, \quad (3.1)$$

где a – коэффициент сорбции.

Каждый компонент зоны перемещается с постоянной скоростью, поскольку линейная скорость его миграции зависит от скорости потока подвижной фазы, которую устанавливают постоянной. С такой же скоростью перемещается вся зона, оставаясь симметричной: концентрация компонента максимальна в центре зоны и симметрично убывает к краям. Следовательно, симметричен и пик на хроматограмме (рис. 3.2).

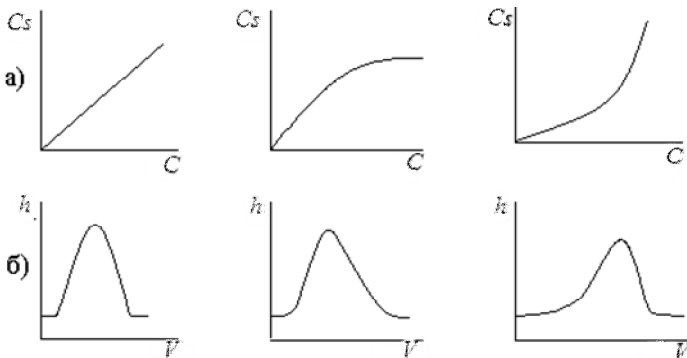


Рис. 3.2. Влияние характера изотермы сорбции (а) на форму пика (б)

При больших концентрациях, когда достигается насыщение адсорбента, эта зависимость имеет вид кривой 2 (рис. 3.1) и выражается уравнением Ленгмюра:

$$C_s = \frac{b_1 \cdot C}{b_2 \cdot C + 1}, \quad (3.2)$$

где C_s – количество вещества, сорбированного при равновесии; $b_{1,2}$ – постоянные; C – концентрация вещества в фазе.

Выпуклый характер изотермы свидетельствует о том, что значение коэффициента сорбции a (см. формулу 3.1) для больших концентраций вещества меньше, чем для малых, следовательно, часть зоны с большей концентрацией перемещается быстрее, чем часть зоны с малой концентрацией. В результате тыл хроматограммы размывается и пик получается несимметричным (рис. 3.2).

Вид вогнутой изотермы (кривая 3, рис. 3.1) обусловлен тем, что энергия взаимодействия между сорбированными молекулами больше, чем между молекулой сорбата и поверхностью сорбента, размытым является фронт зоны (рис. 3.2).

В большинстве случаев стремятся работать в области линейной изотермы, получая линейные пики на хроматограмме. На практике кривые элюирования не всегда симметричны (например, при разделении сложной смеси компонентов). Выпуклые изотермы являются типичными для адсорбционной хроматографии и приводят к уменьшению времени удерживания и образованию хвоста у пика. Вогнутые изотермы адсорбции характерны для распределительной хроматографии и в случае перегрузки колонок приводят к увеличению времени удерживания и к размыванию пика перед максимумом.

Теории хроматографии

На процесс хроматографического разделения влияют различные факторы. Для объяснения явлений, происходящих при хроматографировании, установления законов движения и размывания хроматографических зон, выбора оптимальных условий разделения было предложено несколько теорий. Так как учесть влияние каждого фактора на реальный хроматографический процесс очень сложно, все теории имеют модельный характер и идеализируют происходящие процессы.

Теория идеальной (равновесной) хроматографии рассматривает хроматографический процесс как идеальный, в котором мгновенно устанавливается равновесие между подвижной и неподвижной фазами, и скорости внешней и внутренней диффузии незначительны.

В хроматографической колонке в реальных условиях не успевает установиться термодинамическое равновесие, так как через нее постоянно проходит элюент; в связи с этим необходимо учитывать процессы диффузии вдоль потока газа, внутрь слоя сорбента, кинетику сорбции и десорбции. Однако если подобрать условия, близкие к идеальным (оптимальная скорость подвижной фазы, одинаковый размер зерен, равномерность упаковки сорбента, оптимальная температура, при которой достигается минимальное размывание зоны компонента), то можно полагать, что термодинамическое равновесие достигается практически мгновенно. Согласно сделанным допущениям, используя уравнение материального баланса, можно вывести основное уравнение теории равновесной хроматографии:

$$U = \frac{a_s}{V_C + K \cdot V}, \quad (3.3)$$

где U – скорость перемещения зоны компонента по слою сорбента; a_s – объемная скорость потока подвижной фазы; V_C – объем, занимаемый подвижной фазой на единицу длины колонки; K – константа распределения; V – объем, занимаемый неподвижной фазой на единицу длины колонки.

Таким образом, скорость перемещения зоны прямо пропорциональна скорости потока подвижной фазы и обратно пропорциональна константе распределения. Чем хуже адсорбируется вещество, тем выше скорость его движения по слою сорбента. Если взять два вещества с различными константами распределения, то скорости их U_1 и U_2 различны, что и обуславливает их разделение.

Одна из главных задач *теории неравновесной хроматографии* – изучение размывания хроматографических полос. Это явление может быть обусловлено различными факторами: процессами, протекающими в колонке, медленностью сорбции и десорбции и т.п. Влияние диффузионных и кинетических факторов на процесс разделения бывает настолько сильным, что разделение может вообще не произойти даже при значительной разнице коэффициентов распределения. Явление размывания

полос в реальной хроматографической колонке очень сложное, и может быть изучено лишь приближенно. Наибольшее распространение в неравновесной хроматографии получили теория эквивалентных теоретических тарелок и диффузионно-кинетическая теория.

Теория эквивалентных теоретических тарелок была разработана А. Мартином и Р. Синджем в 1941 г. Впервые она была предложена для описания процесса дистилляции, а затем распространена и на хроматографические системы. Согласно этой теории стационарную фазу делят условно на элементарные участки – ступени разделения, «теоретические тарелки». В основе теории лежит предположение, что хроматографируемое вещество проходит слой сорбента порциями и за время нахождения его на тарелке успевает установиться равновесие между подвижной и неподвижной фазами. Длина элементарного участка слоя, на которой достигается состояние равновесия, называется условно высотой H , эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ):

$$H = \frac{L}{N}, \quad (3.4)$$

где L – длина сорбционного слоя, см; N – число теоретических тарелок.

Каждая новая порция подвижной фазы, подаваемая на первую тарелку, приводит к новому распределению вещества между двумя фазами, причем часть вещества с этой тарелки переносится на следующую, на которой тоже устанавливается равновесие. Вследствие этого с каждой новой порцией подвижной фазы концентрация вещества на первой тарелке падает, но на следующих – растет. В результате такого перераспределения вещество одновременно оказывается на нескольких тарелках (размывается), причем концентрация его максимальна на средних тарелках по сравнению с соседними. Чем сильнее размывание, тем большее число тарелок займет вещество. Следовательно, число тарелок, занимаемых данным компонентом разделяе-

мой смеси, может служить мерой размывания вещества по слою сорбента, т.е. мерой эффективности колонки.

Такой прием замены реального процесса, протекающего непрерывно в хроматографической колонке, эквивалентный по результатам периодическим процессам, позволяет сравнительно легко вывести уравнение кривой элюирования (хроматографической кривой), используя уравнение материального баланса:

$$C = C_{\max} \cdot e^{-(\beta - N)^2 / 2N}, \quad (3.5)$$

где C – концентрация компонента в подвижной фазе; $C_{\max}$ – максимальная концентрация в хроматографической зоне; $\beta = \frac{V}{V_{\text{эфф}}}$ –

кинетический фактор; N – число теоретических тарелок; V – весь объем подвижной фазы, прошедший через колонку; $V_{\text{эфф}}$ – эффективный объем одной тарелки.

Число теоретических тарелок пропорционально высоте сорбционного слоя. Как следует из уравнения (3.5), чем больше число тарелок N тем, при прочих равных условиях меньше объем элюента, в котором выходит зона компонента из хроматографической колонки, и, соответственно, тем уже хроматографический пик и лучше разрешение пиков. В эффективной колонке размывание полос небольшое, пики получаются узкими. Теория теоретических тарелок дает возможность сравнить эффективность разных колонок, оценить качество сорбента и заполнения колонки. Однако она недостаточно учитывает реальные процессы, происходящие в хроматографической колонке, не позволяет выявить факторы, влияющие на эффективность разделения и приводящие к размыванию зон компонентов. Ответ на эти вопросы дает диффузионно-кинетическая теория.

Согласно диффузно-кинетической теории причина размывания хроматографических полос обусловлена диффузией, а также массообменом между подвижной и неподвижной фазами. Ван-Деемтер вывел уравнение зависимости ВЭТТ от этих факторов:

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv, \quad (3.6)$$

где v – линейная скорость подвижной фазы; A – константа, учитывающая неравномерность движения потока подвижной фазы (вихревая диффузия); в реальной насадочной колонке сосуществуют участки с различной плотностью упаковки, в которой скорость подвижной фазы различна; B – фактор, учитывающий процесс диффузии в направлении длины разделительного слоя сорбента (продольная диффузия); C – константа, отражающая скорость установления равновесия между двумя фазами.

Так как эффективность тем больше, чем меньше H , то величины A , B , C в уравнении должны быть как можно меньше, что достигается:

а) равномерным заполнением колонок сорбентом или носителем с частицами небольшого размера и одинакового диаметра;

б) малым значением коэффициента диффузии в подвижной фазе при увеличении скорости потока подвижной фазы до оптимальной;

в) плотным заполнением колонок в колоночной хроматографии и тонким слоем неподвижной фазы в распределительной.

Используя эту теорию, можно вывести уравнение хроматографической кривой элюирования:

$$C = C_{\max} \cdot e^{-\frac{(\Delta X_{1/2})^2}{4 D t}}, \quad (3.7)$$

где C – концентрация на слое сорбента на расстоянии X от начала колонки; $\Delta X_{1/2}$ – полуширина полосы на слое сорбента; $C_{\max}$ – концентрация в середине хроматографической колонки; D – коэффициент молекулярной диффузии; t – время, соответствующее расстоянию X , пройденному компонентом по слою сорбента.

Сравнивая уравнения (3.5) и (3.7), можно сделать вывод, что график их аналогичен кривой Гаусса. На практике (например, при разделении сложной смеси компонентов) кривые элюирования не всегда симметричны.

Основные критерии разделения

Из всех видов хроматографии наибольшее значение имеет элюентная колоночная хроматография. Основные критерии, ха-

рактически характеризующие хроматографический процесс – удерживание, эффективность и селективность разделения, коэффициент емкости колонки, степень разделения (разрешения). Основная характеристика вещества – *удерживаемый объем* V_R и соответствующее *время удерживания* t_R , т.е. время от момента ввода пробы в колонку до момента появления максимума пика на хроматограмме. Удерживаемый объем для i -того компонента можно рассчитать по уравнению:

$$V_{Ri} = V_0 + K_i \cdot V_S \quad \text{и} \quad V_{Ri} = F \cdot t_{Ri}, \quad (3.8)$$

где $V_0 = F \cdot t_m$ – мертвый объем колонки или объем удерживания несорбирующегося компонента; F – объемная скорость подвижной фазы; t_m – время удерживания несорбирующегося компонента; t_{Ri} – время удерживания i -того компонента; K – константа (коэффициент распределения); V_S – объем неподвижной фазы.

Более инвариантной величиной является исправленный объем V'_R или исправленное время удерживания t'_R :

$$V'_R = V_R - V_0 \quad \text{и} \quad t'_R = t_R - t_0, \quad (3.9)$$

где t_0 – время удерживания несорбирующегося газа.

При движении зон разделяемых компонентов по хроматографической колонке наряду с разделением происходит их «размывание», приводящее к более широким пикам на хроматограмме и неполному их разрешению.

Степень разделения двух соседних компонентов характеризуют критерием разделения R_S (разрешение пиков на хроматограмме), которое описывается уравнением:

$$R_S = 2 \frac{V_{R_2} - V_{R_1}}{\mu_2 + \mu_1} = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{\mu_2 + \mu_1}; \quad t_{R_2} > t_{R_1}, \quad (3.10)$$

где μ_1, μ_2 – ширина хроматографической зоны, измеренная у основания хроматографического пика.

Чем больше разрешение, тем лучше разделение компонентов: при $R_S = 0$ вещества не разделяются, при $R_S \geq 1,5$ (6σ – раз-

деление) они полностью разделены. Если $R_s = 1$, то расстояние между пиками 4σ (4σ – разделение). При этом перекрывается 2 % площади пиков, что вполне достаточно для количественного анализа. Как следует из литературных данных, предельное значение R , которое еще позволяет получить на хроматограмме два отдельных максимума, составляет 0,42.

Для неполностью разделенных пиков вследствие взаимного перекрывания зон соседних компонентов изменяется ширина пика. В подобных случаях целесообразно использовать критерий Ψ , характеризующий полноту разделения:

$$\Psi = \frac{h - h_{\min}}{h}, \quad (3.11)$$

где h – высота меньшего пика; $h_{\min}$ – высота минимума между пиками.

Эффективность колонки определяет ширину пика (размывание зоны компонента в колонке). Она зависит от скорости подвижной фазы, размера частиц наполнителя, диаметра колонки и характеризуется высотой H , эквивалентной теоретической тарелке (см. формулу 3.4), и числом эффективных теоретических тарелок N :

$$N_{эфф} = 16(t'_R / \mu)^2 = 5,55(t'_R / \mu_{0,5})^2, \quad (3.12)$$

где μ , $\mu_{0,5}$ – ширина пика, измеренная у его основания или на половине его высоты.

Очевидно, что на эффективной колонке происходит небольшое размывание хроматографической зоны и пики получаются узкими. Достаточная эффективность колонки соответствует $H = 0,3\text{--}1,0$ мм и $N = 10$.

Селективность колонки определяется, во-первых, селективностью неподвижной фазы, т.е. ее свойством по-разному сорбировать компоненты смеси и, во-вторых, различиями термодинамических свойств хроматографируемых веществ по отношению к хроматографической системе. Селективность есть

мера взаимного распределения вещества в ходе хроматографического процесса и мера относительного удерживания, или относительной подвижности разделяемых веществ.

Селективность колонки характеризуют коэффициентом селективности a , а рассчитывают по уравнению:

$$a = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0} = \frac{K_2}{K_1}, \quad (3.13)$$

где K_1 и K_2 – коэффициенты (константы) распределения первого и второго компонентов системы.

Для разделения двух веществ необходимо так подобрать фазы, чтобы $K_1 \neq K_2$.

Коэффициент емкости колонки (k') выражается уравнением:

$$k' = \frac{K \cdot V_S}{V_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}, \quad (3.14)$$

где V_S – объем неподвижной фазы.

При малых значениях k' компоненты удерживаются сорбентом слабо, и наблюдается плохое разделение. При больших значениях k' разделение улучшается, но увеличивается время разделения. Оптимальные значения k' лежат в интервале 1,5–4. Используя уравнения (3.4, 3.10, 3.13, 3.14) для вычисления N , R_S , a и k' , получают формулу, которая связывает все эти величины между собой:

$$R_S = \frac{1}{4} \sqrt{N \left(\frac{a-1}{a} \right) \cdot \left(\frac{k'}{k'+1} \right)}. \quad (3.15)$$

Преобразуя это уравнение, можно получить выражение, позволяющее рассчитать в каждом конкретном случае эффективность колонки, которая необходима для достижения требуемого разделения R_S на данной колонке при заданных a и k' :

$$N_{эфф} = 16 \cdot R_s^2 \left(\frac{k' + 1}{k'} \right)^2 \cdot \left(\frac{a}{a - 1} \right)^2. \quad (3.16)$$

Из сказанного следует, что разделение является функцией величин K , V_S , H , длины колонки L . Поэтому можно заключить, что для успешного разделения смеси компонентов необходимо:

1) выбрать подвижную и неподвижную фазу так, чтобы коэффициенты распределения K для разделяемых веществ были различны;

2) увеличивать количество неподвижной фазы V_S на единицу длины системы и увеличивать длину системы; при этом следует учитывать, что увеличение V_S ухудшает разделение вследствие влияния диффузии на величину H ;

3) стремиться к минимальным значениям H , для чего работать с сорбентом, имеющим малые размеры частиц и однородным по дисперсности;

4) выбирать оптимальную скорость потока подвижной фазы.

4. Классификация хроматографических методов разделения и анализа

Хроматография – это многочисленные виды разделения сложных смесей на компоненты, основанные на различном распределении веществ между двумя несмешивающимися фазами – подвижной (движущейся) и неподвижной (стационарной). В качестве неподвижной фазы используют твердое вещество или жидкость, нанесенную в виде тонкой пленки на поверхность инертного носителя или стенки колонки. Подвижной фазой служат газ или жидкость, которые содержат смесь разделяемых веществ. Хроматографическое разделение основано на том, что отдельные компоненты исследуемой смеси вследствие различного распределения между двумя фазами перемещаются по слою сорбента с различной скоростью и за одно и то же время проходят различные отрезки пути. Растворитель или газ, проходящий через слой сорбента, называют *элюентом*, процесс перемещения вещества вместе с элюентом – *элюированием*.

По современным представлениям хроматографический процесс связан с многократным повторением сорбционных и

десорбционных актов. *Сорбцией* называют поглощение газов, паров, растворенных веществ твердыми и жидкими поглотителями. Процесс, обратный сорбции, называют *десорбцией*. Твердый или жидкий поглотитель называют *сорбентом*, вещество, молекулы которого сорбируются – *сорбтивом*, уже адсорбированное вещество – *сорбатом*.

Различают несколько видов сорбции. *Адсорбция* – концентрирование, поглощение вещества из объема фаз на поверхности раздела между ними. В общем случае причина адсорбции – некомпенсированность межмолекулярных сил вблизи поверхности раздела фаз, т.е. наличие адсорбционного силового поля.

Различают два вида адсорбции. Если поверхность «инертна» (все валентные связи атомов поверхности насыщены), адсорбция осуществляется за счет сил физической природы, таких как вандерваальсовы силы притяжения. Этот тип адсорбции называют физической или вандерваальсовой; он обычно характеризуется низкой теплотой адсорбции. Если у поверхности атомов имеются ненасыщенные валентные связи, то сорбаты, вступая в контакт с такой поверхностью, могут образовывать с ней химические связи. Такой вид адсорбции называется *хемосорбцией*. Несмотря на то что этот процесс обычно более экзотермичен, химическую и физическую адсорбцию не всегда легко различить. Для химической адсорбции требуется энергия активации; при наличии энергии активации химическая адсорбция обычно протекает быстрее, чем физическая. Последняя протекает спонтанно и не требует энергии активации.

В результате химической адсорбции обычно образуется монослой адсорбированных молекул, в то время как при физической адсорбции могут образовываться несколько слоев адсорбированных молекул. Наибольшее распространение получили следующие адсорбенты: силикагель, оксид алюминия, оксид магния, диатомиты, кремнеземы, активированный уголь, силикат магния (флоризил, магнезол), полистирол, полиамиды, тефлон.

Абсорбция – объемное поглощение газов и паров жидкостью (абсорбентом) с образованием раствора. Различные виды сорбции нередко протекают одновременно. В хроматографических методах анализа используют жидкие сорбенты полярные

(полигликоли, гидроксиламины), умеренно полярные (сложные эфиры, нитрилы) и неполярные (насыщенные углеводороды).

Создателю хроматографического метода М.С. Цвету был известен один механизм взаимодействия разделяемых веществ с сорбентом – молекулярная адсорбция. В современной хроматографии для разделения используют и другие физико-химические процессы. Разнообразие вариантов хроматографического анализа потребовало разработки их классификации. В основу той или иной классификации хроматографических методов могут быть положены различные характерные признаки процесса разделения. При этом следует учитывать, что в каждом случае существуют промежуточные методы и варианты, которые не укладываются в рамки строгой классификации. Общепринятыми являются следующие.

1. В зависимости от агрегатного состояния подвижной и неподвижной фаз различают варианты газовой и жидкостной хроматографии. *Газовой хроматографией* называют процесс, в котором подвижной фазой является газ (или пар). Варианты газовой хроматографии – газоадсорбционная и газожидкостная. Первое слово в этой классификации характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе – неподвижной фазы. В *газоадсорбционной* (газо-твердофазной) хроматографии неподвижная фаза – твердый адсорбент, подвижная фаза – газ. В *газожидкостной хроматографии* неподвижной фазой служит жидкость, нанесенная в виде тонкой пленки на поверхность инертного материала для создания большей поверхности сорбции, а подвижной фазой – газ. К промежуточным методам относится хроматография на модифицированном сорбенте (газожидко-твердофазная): неподвижной фазой служит твердый адсорбент, модифицированный небольшим количеством жидкости. В этом случае играют роль как сорбция на поверхности твердого адсорбента, так и растворимость в жидкости, которой адсорбент модифицирован.

Жидкостной хроматографией называют хроматографический процесс, в котором подвижной фазой является жидкость. Жидкостная хроматография подразделяется на жидкостно-адсорбционную (жидкостно-твердофазную), жидкостножид-

костную, жидкостно-гелевую и жидкостно-газовую (ЖГХ). В последнем случае неподвижная газовая фаза находится в порах твердофазного носителя, не смачиваемого подвижной жидкой фазой (Л.Н. Москвин и др., 1981 г.).

Промежуточным между газовой и жидкостной хроматографией является вариант, когда подвижной фазой служит сжатый газ. Если подвижной фазой служит сверхкритический флюид, то этот вариант называется *флюидной хроматографией*.

2. В зависимости от способа перемещения сорбатов вдоль слоя сорбента (или способа получения хроматограмм) различают проявительный (элюентный), фронтальный, вытеснительный методы.

Проявительный (элюентный, зонный) метод заключается в том, что сорбаты переносятся через сорбционный слой потоком вещества (элюента), сорбирующегося хуже любого из сорбатов. При элюентном методе сначала адсорбент в колонке промывают растворителем для удаления воздуха с его поверхности, затем вводят в колонку небольшую порцию анализируемого раствора. Полученную первичную хроматограмму промывают чистым растворителем (проявителем). При этом компоненты раствора движутся вниз по колонке с различной скоростью, что обуславливает их разделение на зоны. В результате компоненты вымываются (или элюируются) в порядке повышения их сорбируемости.

При разделении смеси *фронтальным методом* исследуемый раствор смеси непрерывно пропускается через слой сорбента, т.е. подвижной фазой является сама смесь разделяемых веществ. Этим методом получить в чистом виде можно только один из анализируемых компонентов смеси, менее сорбирующийся. Остальные компоненты не разделяются. Фронтальный метод применяется для очистки плохо сорбируемых веществ или для отделения следовых количеств примесей от основного вещества.

При работе по *вытеснительному методу* заполненную сорбентом колонку сначала промывают чистым растворителем, а затем вводят некоторое количество раствора анализируемых в растворителе веществ и промывают раствором вещества-

вытеснителя, который сорбируется сильнее, чем каждый из компонентов анализируемой смеси. При промывании анализируемая смесь перемещается впереди фронта вытеснителя и разделяется на зоны. При этом зоны вытесняемых веществ в колонке и на выходе из нее частично перекрываются. Этот вид хроматографии используют в препаративных методах для разделения больших количеств веществ, когда частичное перекрывание зон компенсируется максимальной загрузкой колонки разделяемыми веществами.

3. В зависимости от природы процесса, обуславливающего распределение сорбатов между подвижной и неподвижной фазами, различают адсорбционную, распределительную, ионообменную, лигандообменную, осадочную, аффинную и эксклюзионную хроматографию. Главным условием разделения *адсорбционной хроматографии* является различие энергии адсорбции разделяемых веществ, что равносильно различию коэффициентов адсорбции.

Распределительная хроматография основана на различии в растворимости сорбатов в несмешивающихся между собой неподвижной и подвижной фазах или на различии в стабильности образующихся комплексов. В распределительной хроматографии твердый носитель пропитывают растворителем («неподвижный растворитель»). В качестве твердого носителя используют силикагель, оксид алюминия, кизельгур, целлюлозу и др. Неподвижные растворители могут быть полярными и неполярными. Обычно используют полярную неподвижную фазу и неполярную подвижную. В том случае, когда применяют неполярную неподвижную фазу и полярную подвижную, говорят о *хроматографии с обращенными фазами*.

Поскольку разделение протекает на границе подвижной и неподвижной фаз, то процесс разделения определяется различием коэффициентов распределения разделяемых веществ между двумя фазами. Коэффициентом распределения K_p считают отношение концентрации вещества в неподвижной фазе (C_1) к его концентрации в подвижной фазе (C_2):

$$K_p = \frac{C_1}{C_2},$$

где K_p – коэффициент распределения в ионообменной и распределительной хроматографии, коэффициент адсорбции – в адсорбционной хроматографии и коэффициент проницаемости – в гель-хроматографии.

Чем меньше коэффициент распределения компонентов, тем лучше растворяется он в подвижной фазе и с большей скоростью передвигается по колонке.

Ионообменная хроматография основана на способности некоторых веществ (ионитов) обменивать содержащиеся в них ионы на ионы, находящиеся в растворе; разделение основывается на различии в способности разделяемых веществ к ионному обмену.

В *лигандообменной хроматографии* (Ф. Гельферих, 1961 г.) ион-комплексобразователь металлов (Ag, Fe, Co, Ni, Cu, Hg и др.), жестко связанный с ионогенной группой ионообменника, неподвижен и может обменивать координированные им лиганды на другие, находящиеся в подвижной фазе. Основное условие лигандообменной хроматографии – лабильность комплексных соединений, образуемых ионами металлов с разделяемыми лигандами. Только в этом случае происходит быстрое замещение в фазе сорбента одного лиганда другим.

В *осадочной хроматографии* разделение основано на различной растворимости осадков, получающихся в результате химического взаимодействия с осадителем, содержащимся в неподвижной твердой фазе.

Эксклюзионная (молекулярно-ситовая или гелевая) хроматография (от англ. *exclusion* – исключение) позволяет фракционировать смеси веществ по размеру их молекул при использовании высокопористого неионогенного геля. Молекулы разделяемых веществ в зависимости от их размеров распределяются между свободным (подвижным) растворителем и неподвижным растворителем, заполняющим полости пористых частиц набухшего геля. Скорость прохода молекул через «гелевое сито» зависит от их способности проникать в гранулы и удерживаться в них. В основе этого метода лежит принцип эксклюзии, в соот-

ветствии с которым для данного вещества оказывается доступной лишь часть геля, причем, чем меньше размеры молекул, тем легче они проникают в гранулы и прочнее удерживаются в сетке набухшего полимера. Молекулы, превышающие определенные параметры, не проникают в гранулы и элюируются в первых фракциях вместе со свободным объемом растворителя. Молекулы, проникшие в гранулы геля, элюируются последующими фракциями растворителя по мере уменьшения размеров их молекул, причем самые мелкие молекулы выходят из колонки последними. В качестве носителей используют различные гели с трехмерной сетчатой структурой – декстрановые, полиакриламидные, агарозные, гели на основе стирола и дивинилбензола, пористые силикагели, а также пористые стеклянные гранулы. Все гели и стекла имеют поры строго определенных размеров, как правило, не содержат ионогенных групп и не обладают химическим или биологическим сродством к анализируемым веществам. Создать гели с абсолютно идентичными по размерам порами практически невозможно, поэтому гели, применяемые в качестве хроматографических насадок, по назначению условно делят на универсальные и специальные. Универсальные гели характеризуются относительно широким распределением пор по размерам, специальные – ориентированы на разделение компонентов, близких по молекулярно-массовым характеристикам.

Аффинная хроматография (от лат. *affines* – родственный) основана на характерной особенности биологически активных веществ селективно и обратимо связывать определенные вещества, называемые аффинными лигандами или аффинатами. То есть в аффинной хроматографии разделение основано на различии не физико-химических признаков молекул (заряда, формы и размера), а специфических функциональных свойств, отличающих данный фермент от множества других биополимеров. В настоящее время наиболее распространенным способом получения нерастворимых аффинных сорбентов является их присоединение к носителю путем образования ковалентных связей. Если раствор, содержащий биологически активные соединения, фильтруют через колонку, заполненную нерастворимым носителем, связанным с аффинным лигандом, то все соединения, не

обладающие сродством к данному лиганду, беспрепятственно проходят через колонку, тогда как соединения, обладающие таким сродством, удерживаются в колонке, причем прочность их удерживания зависит от степени их сродства и конкретных экспериментальных условий. Специфически сорбированные соединения можно затем элюировать, применяя либо растворимый аффинный лиганд, либо изменяя состав растворителя с тем, чтобы вызвать диссоциацию специфического комплекса. Аффинная хроматография применяется для выделения ферментов, белков, гормонов, нуклеиновых кислот, токсинов, ингибиторов, вирусов и др. активных веществ.

4. В зависимости от способа оформления процесса различают колоночную и плоскостную (планарную) хроматографию. В *колоночной* хроматографии процесс проводят в насадочной или капиллярной хроматографической колонке.

Плоскостная хроматография включает хроматографию на бумаге и тонкослойную хроматографию. В *тонкослойной хроматографии* порошкообразный твердый сорбент наносят тонким слоем на пластинку, а жидкая подвижная фаза движется вдоль этого слоя. В методе *бумажной хроматографии* неподвижная фаза покрывает тонким слоем волокна бумаги, а движение жидкой подвижной фазы осуществляется вдоль слоя бумаги под действием капиллярных сил.

5. В зависимости от цели проведения хроматографического процесса различают аналитическую, неаналитическую, препаративную и промышленную хроматографию. *Аналитическая хроматография* предназначена для определения качественного и количественного состава исследуемой смеси.

Неаналитическая хроматография – метод исследования физико-химических характеристик веществ при использовании хроматографической аппаратуры и на основании параметров хроматографических зон.

Препаративную хроматографию используют для выделения небольших количеств чистых компонентов или смесей, нужных для дальнейших лабораторных исследований.

Различные виды классификации хроматографических методов приведены в табл. 4.1, 4.2.

Таблица 4.1

Классификация хроматографических методов в соответствии с принципом разделения (природой процесса, механизмом)

№	Наименование метода хроматографии	Природа основного процесса разделения	Величины, количественно определяющие степень сродства разделяемых веществ к фазам
1	Адсорбционная	Адсорбция	Коэффициент адсорбции
2	Распределительная	Экстракция	Константа распределения
3	Ионообменная	Электростатическое взаимодействие и диффузия	Заряд, константа распределения и эффективный ионный диаметр
4	Гель-хроматография	Диффузия	Эффективный молекулярный диаметр
5	Аффинная	Биоспецифическое взаимодействие с аффинным лигандом	Общепринятая величина не выбрана
6	Лигандообменная	Обмен лигандами	Коэффициент распределения, константа устойчивости
7	Осадочная	Различная растворимость	Произведение растворимости K_S

Таблица 4.2

Классификация хроматографических методов

Классификация по агрегатному состоянию фаз		Классификация в соответствии с принципом процесса разделения		Классификация по способу оформления процесса разделения	
тип хроматографии	сокращенное обозначение	тип хроматографии	сокращенное обозначение	тип хроматографии	сокращенное обозначение
жидкостная	ЖХ			Бумажная Тонкослойная Высокоэффективная тонкослойная Колоночная Высокоэффективная жидкостная	БХ ТСХ ВЭТСХ КЖХ ВЭЖХ
жидко-жидкостная	ЖЖХ	Распределительная Обращенно-фазовая Гель-проникающая Адсорбционная Ионообменная Аффинная	ОФХ ГПХ ЖАХ ИОХ		
жидко-твердофазная	ЖТХ				
газовая	ГХ			Колоночная Газовая с программированием температуры Газовая с программированием давления	КХ ГХПТ ГХПД
газо-жидкостная	ГЖХ	Распределительная	ГАХ		
газо-твердофазная	ГТХ	Адсорбционная			

5. Газовая хроматография

Газовая хроматография – метод разделения летучих соединений, основанный на распределении веществ между двумя несмешивающимися фазами, одна из которых неподвижна (стационарна) с большой поверхностью, а другая – газ, протекающий через неподвижную фазу. Методом газовой хроматографии могут быть проанализированы газообразные, жидкие и твердые вещества с молекулярной массой меньше 400, удовлетворяющие определенным требованиям, главные из которых – летучесть, термостабильность, инертность.

Подвижной фазой служит инертный в условиях разделения газ (газ-носитель): водород, гелий, азот, аргон, углекислый газ. В зависимости от агрегатного состояния *неподвижной фазы* различают два вида газовой хроматографии – газоадсорбционную, газотвердофазную (неподвижная фаза – твердый сорбент: силикагель, уголь, оксид алюминия, разд. 5.2) и газожидкостную (неподвижная фаза – жидкость, нанесенная на инертный носитель, разд. 5.2).

Газожидкостная хроматография. В аналитической практике чаще используют метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Это связано с чрезвычайным разнообразием жидких неподвижных фаз, что облегчает выбор селективной для данного анализа фазы, с линейностью изотермы распределения в более широкой области концентраций (см. рис. 3.1). Это позволяет работать с большими пробами и с легкостью получать воспроизводимые по эффективности колоноки.

Процесс разделения основан на различии в летучести и растворимости разделяемых компонентов. Через хроматографическую колонку быстрее движется тот компонент, растворимость которого в неподвижной фазе меньше, а летучесть (упругость пара) при данной температуре больше.

Газотвердофазная хроматография. Особенность метода газотвердофазной (газоадсорбционной) хроматографии (ГАХ) заключается в том, что в качестве неподвижной фазы применяют адсорбенты с высокой удельной поверхностью ($10\text{--}1000\text{ м}^2/\text{г}$), и распределение веществ между неподвижной и подвижной фаза-

ми определяется процессом адсорбции. Адсорбция молекул из газовой фазы, т.е. концентрирование их на поверхности раздела твердой и газообразной фаз, происходит за счет межмолекулярных взаимодействий (дисперсионных, ориентационных, индукционных), имеющих электростатическую природу. Возможно образование водородной связи, причем вклад этого вида взаимодействия в удерживаемые объемы значительно уменьшается с ростом температуры.

5.1. Аппаратура для газовой хроматографии

Для проведения хроматографического разделения веществ или определения их физико-химических характеристик обычно используют специальные приборы – газовые хроматографы. Типичная блок-схема газового хроматографа представлена на рис. 5.1. Анализируемую смесь компонентов вводят с помощью дозирующего устройства. В потоке газа-носителя она проходит через хроматографическую разделительную колонку и поступает в детектор, где измеряется аналитический сигнал. После преобразования и усиления сигнал поступает в регистратор.

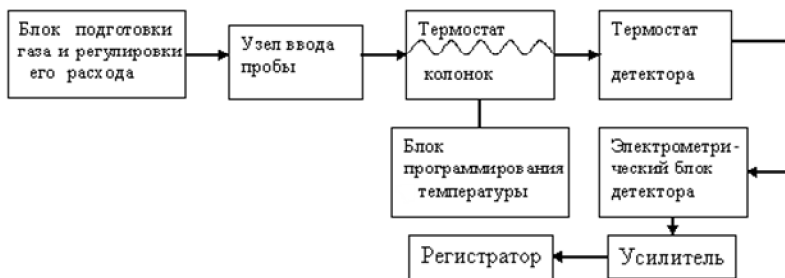


Рис. 5.1. Блок-схема газового хроматографа

Блок подготовки и регулировки расхода газа. Блок регулировки расхода газа должен обеспечивать подачу газа-носителя в колонку с определенной скоростью. Для обеспечения воспроизводимых параметров разделения и оптимальных характеристик большинства типов детекторов необходима точная установка давления и расхода газа-носителя в колонке, а также поддержа-

ние их на заданном уровне с минимальной погрешностью. Типичный диапазон объемных скоростей газа-носителя при работе с насадочными колонками составляет 10–50 мл/мин, с капиллярными – 0,3–5,0 мл/мин.

В большинстве неавтоматизированных газовых хроматографов давление на входе в колонку измеряют образцовым манометром. Для измерения расхода газа-носителя применяют пенные измерители, ротаметры и электрические методы (с помощью датчиков).

Дозаторы, испарители. Дозирование – разделение – детектирование – в этой последовательности стадий любого хроматографического процесса ввод пробы во многом определяет конечный результат всего процесса в целом. Выбор способа дозирования зависит от природы образца, решаемых аналитических задач, типа и режима работы колонок. Любая система ввода пробы должна удовлетворять следующим требованиям:

- 1) сохранять неизменность количественного и качественного состава смеси до и после дозирования (внутренняя поверхность дозатора не должна обладать адсорбционной и каталитической способностью к компонентам анализируемой смеси);

- 2) обеспечивать максимальную точность и воспроизводимость величины и состава пробы;

- 3) вносить минимальное размывание хроматографических пиков; идеальным считается случай, когда вся проба из дозатора, попадая в хроматографическую колонку, уместается на первой теоретической тарелке.

Для ввода жидких проб чаще всего используют микрошприцы, которые позволяют отмерять объем от долей микролитров (мкл) до нескольких десятков микролитров (рис. 5.2). Проба вводится микрошприцем через самоуплотняющуюся мембрану из термостабильного силиконового эластомера либо в испаритель хроматографа, либо непосредственно в колонку (рис. 5.3). Широко распространен автоматический метод ввода газообразных проб при помощи вращающейся шайбы или газовых кранов (рис. 5.4). Конструкция кранов-дозаторов предусматривает использование сменных дозирующих петель объемом от 0,01 до 10 мл.



Рис. 5.2. Микрошприцы

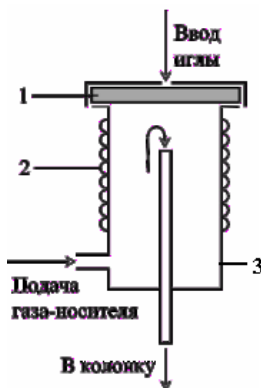


Рис. 5.3. Схема устройства ввода пробы: 1 – эластичная мембрана; 2 – нагревательный элемент; 3 – испаритель



Рис. 5.4. Кран-дозатор для анализа сжиженного газа

Твердые пробы сначала растворяют в подходящем растворителе, а затем вводят в колонку, используя технику ввода жидких проб. Для этого образец помещают в микрокапсулу из стек-

ла. Затем капсулу с образцом переносят в испаритель хроматографа. В потоке газа-носителя капсула разбивается, проба испаряется и в виде паров поступает в колонку. Однако существуют методы непосредственного ввода твердых образцов.

Испаритель устанавливается непосредственно перед разделительной колонкой. Вводимая жидкая проба должна мгновенно испариться, иначе пики на хроматограмме расширяются и точность анализа снижается. В связи с этим температуру испарителя необходимо поддерживать на 50–60 °С выше, чем температуру колонки. При работе с капиллярными колонками, когда количество анализируемого вещества должно быть очень небольшим, к дозатору присоединяют делитель потока. Поток газа-носителя вместе с введенной в него пробой делится перед колонкой на две части: большая часть потока сбрасывается в атмосферу, меньшая часть – поступает в колонку. На практике используют делители с отношением деления от 1 : 10 до 1 : 200.

Объем вводимой пробы зависит от чувствительности детектора. Для аналитических целей он колеблется в пределах 0,01–10 мкл, для препаративных целей он зависит от размеров колонки и составляет от 0,1 до 1 кг.

Колонки для газовой хроматографии. Хроматографическая колонка является одним из основных узлов хроматографа: в ней происходит разделение анализируемой смеси на отдельные компоненты. Наличие этого разделительного узла считается особенностью, выделяющей хроматографию среди других физико-химических методов анализа и определяющей ее способность анализировать многокомпонентные смеси.

В зависимости от способа размещения неподвижной фазы, колонки разделяют на две большие группы: насадочные и капиллярные (рис. 5.5). Все насадочные колонки независимо от диаметра представляют собой трубки, заполненные частицами сорбента, которые образуют стационарный зернистый слой. Поток газа фильтруется через такой слой, проходя по транспортным каналам, образуемым зазорами между частицами. В капиллярной колонке имеется единственный транспортный канал вдоль ее оси. Различают три основных типа капиллярных колонок: 1 – колонки, содержащие неподвижную фазу на гладких

стенках колонки; 2 – колонки, содержащие на стенках слой пористого сорбента; 3 – колонки, содержащие на стенках твердый носитель, пропитанный неподвижной фазой.



Рис. 5.5. Колонки насадочные металлические и стеклянные

Колонки изготавливают из коррозионно-стойкой стали, меди, стекла, латуни, полимерного материала. В последнее время капиллярные колонки изготавливают из плавленого кварца высокой чистоты, по возможности не содержащего примесей оксидов металлов. Колонки применяют различной формы: прямые, U-образные, в виде спиралей. Кварцевый капилляр, в отличие от стеклянного, вытягивается не в виде спирали, а прямым и наматывается на катушку. Размеры колонок могут быть различными в зависимости от цели анализа. Обычные насадочные колонки имеют внутренний диаметр 2–4 мм и длину 0,5–4,0 м. В микронасадочных колонках диаметр составляет 0,8–1 мм, длина – 1 м; в капиллярных диаметр равен 0,2–0,5 мм, длина колеблется от нескольких десятков до сотен метров; диаметр препаративных колонок достигает 10–100 мм и более.

Термостаты. Подвижность разделяемых компонентов в колонке в большой степени зависит от температуры. Чтобы элюирование длилось определенное время, в колонке необходимо постоянно поддерживать выбранную температуру в очень узком интервале ($\pm 0,1$ °C). Современные термостаты позволяют поддерживать температуру с такой степенью точности. Хроматографические термостаты снабжены воздушным нагревателем и вентилятором.

Разделение можно проводить в изотермическом режиме и в режиме программирования температуры. При изотермическом режиме температура колонок поддерживается постоянной в хо-

де всего процесса разделения. Этот режим является оптимальным для разделения смеси веществ, температуры кипения которых находятся в достаточно узком интервале. Когда же они различаются значительно (более чем на 100 °С), разделение осложняется. Если поднять температуру колонки слишком высоко, то наиболее летучие компоненты выйдут слишком быстро и плохо разделятся. При более же низких температурах, во-первых, значительно увеличится общее время анализа, во-вторых, наименее летучие компоненты будут находиться в колонке столь долго, что их пики окажутся очень размытыми. Эти трудности можно преодолеть, используя режим программирования температуры. Повышение температуры в ходе анализа способствует более раннему выходу каждого последующего высококипящего компонента в виде узких пиков, и длительность анализа сокращается. Таким путем удалось разделить смесь жиров органических кислот, полученных из хлебной закваски, от эфира муравьиной кислоты до эфира пальмитиновой кислоты, молекула которой содержит 16 углеродных атомов.

Детекторы. Система детектирования хроматографа – устройство, измеряющее и регистрирующее результаты хроматографического анализа. Детектор непрерывно измеряет концентрацию компонентов на выходе из хроматографической колонки и преобразует концентрацию в электрический сигнал, который регистрируется. Для детектирования используются самые различные физические и химические свойства веществ, содержащихся в газеносителе в виде паров. Необходимым свойством любого устройства, используемого в качестве детектора, является пропорциональная зависимость между сигналом и концентрацией определяемого вещества (линейность детектора), поскольку содержание последнего в анализируемой пробе может варьироваться от нескольких миллиграммов до нескольких пикограммов (10^{-12} г).

Концентрация компонентов в элюате, особенно слабо сорбирующихся, изменяется очень быстро, поэтому детектор должен обладать малой инерционностью. В противном случае легколетучие вещества, даже разделенные на колонке, могут регистрироваться в виде одного пика. Характеристикой инерционности детектора является постоянная времени τ_0 , равная проме-

жутку времени, прошедшему с момента поступления пробы на вход детектора до момента получения сигнала, соответствующего 63,2 % его максимального значения. Было доказано, что соотношение $\tau_0/\tau_{0,5}$ не должно превышать 0,085 (площадь пика практически не искажается); $\tau_{0,5}$ – выраженная в единицах времени полуширина пика.

Чувствительность детектора должна быть высокой, а минимально определяемое количество вещества (предел обнаружения) – как можно меньшим. Идеальная детектирующая система также должна давать качественную информацию о соединении, позволяющую охарактеризовать его свойства и осуществить идентификацию. Дрейф нулевой линии и фоновые шумы должны быть минимальными. Чувствительность концентрационных детекторов определяется как отклик детектора в расчете на содержание вещества в единице объема ($\text{мВ} \cdot \text{см}^3/\text{мг}$); чувствительность потокового детектора – в расчете на массу вещества, поступающую в детектор в единицу времени ($\text{мВ} \cdot \text{с}/\text{мг}$). Мини-



Рис. 5.6. Шум детектора (m) и наименьшее определяемое количество вещества ($2m$)

мально определяемой концентрации (нижнему пределу детектирования) должен соответствовать сигнал, в два раза превышающий уровень шума (флуктуации, рис. 5.6).

Ни один детектор в отдельности не обладает сразу всеми перечисленными свойствами хотя бы потому, что некоторые из них являются взаимоисключающими. Так, например, детектор должен быть либо селективным, либо универсальным. Поэтому детектор выбирают, исходя из поставленной задачи. Обычно достаточно одного детектора, однако в особых случаях их может быть два или несколько разных типов.

В сочетании с хроматографией начинают широко применяться ряд нетрадиционных приборов и методов физико-химического анализа: масс-спектрометры, атомно-абсорбционные спектрометры, ИК и УФ-спектрофотометры.

Детектирующие системы классифицируют по разным признакам.

Таблица 5.1

Наиболее распространенные детекторы,
используемые в газовой хроматографии

Тип детектора	Признаки	Предел детекти- рования, г/л	Область применения
Детектор по теплопроводности (катарометр, ДТП)	Недеструктивный; концентрационный; неселективный	10^{-6} – 10^{-5}	Неорганические и органические соединения
Пламенно-ионизационный детектор (ДПИ)	Деструктивный; потоковый; неселективный	10^{-8}	Органические соединения
Детектор электронного захвата (ДЭЗ)	Деструктивный; потоковый или концентрационный; селективный	10^{-12} – 10^{-10}	Галогено- и кислородсодержащие органические соединения
Термоионный детектор (ТИД)	Деструктивный; потоковый; селективный	10^{-10} – 10^{-9}	Азот- и фосфорсодержащие органические соединения
Пламенно-фотометрический детектор (ПФД)	Деструктивный; потоковый; селективный	10^{-10} – 10^{-9}	Сера- и фосфорсодержащие органические соединения
Фотоионизационный детектор (ФИД)	Недеструктивный; концентрационный; селективный	10^{-10} – 10^{-9}	Вещества с энергиями ионизации, не превышающими энергию УФ-излучения
Масс-спектрометр (ионизация электронным ударом)	Деструктивный; потоковый; неселективный	10^{-10} – 10^{-9}	Неорганические и органические соединения

1. По типу чувствительности детекторы подразделяются на потоковые, массовые и концентрационные.

2. Детекторы могут быть универсальными, селективными или специфическими. *Универсальные* детекторы должны детектировать любое вещество, выходящее из колонки. Таких детекторов существует всего несколько. Почти все они основаны на измерении объемных физических свойств выходящей из колонки газовой смеси. *Селективные* детекторы, измеряющие какое-либо аналитическое свойство молекул определяемых веществ, проявляют селективность к тем из них, которые обладают этим свойством. Детекторы могут быть селективными по отношению к химическим элементам, молекулам определенного строения, той или иной функциональной группе или к определяемому свойству. *Специфические* детекторы – детекторы, отличающиеся очень высокой селективностью. Наиболее близким к идеальному специфическому детектору можно считать масс-спектрометр высокого разрешения, регистрирующий одновременно несколько специфических ионов.

3. В зависимости от аналитического свойства, используемого для детектирования, различают детекторы ионизационные, общезфизические, оптические (спектральные), электрохимические и реакционные.

В соответствии со старой классификацией детекторы подразделяются на *интегральные* и *дифференциальные*. *Интегральный* детектор измеряет суммарное количество соединений, отклик его пропорционален полному количеству вещества, прошедшего через детектор. С помощью этого детектора получают хроматограмму в виде интегральной кривой ступенчатой формы. Преимуществом интегральных детекторов перед детекторами других типов является их простота. Кроме того, сохраняется линейная зависимость показаний детектора от количества вещества. Существенным недостатком таких детекторов является низкая чувствительность и значительная инерционность. Поэтому в настоящее время применяют дифференциальные детекторы.

Дифференциальный детектор передает мгновенное значение некоторой характеристики разделяемых компонентов. Хроматограмма, полученная с помощью этого типа детектора, состоит из пиков, похожих на гауссовы кривые (рис. 5.13).

Число пиков или ступеней на хроматограмме равно числу разделенных компонентов. Хроматограммы обоих типов можно обработать качественно и количественно. Качественной характеристикой может служить время удерживания, а количественной – высота ступени или пика или площадь пика (см. разд. 5.3).

Дифференциальные детекторы подразделяют на потоковые и концентрационные. Сигнал *концентрационного* детектора зависит от мгновенной концентрации компонента в газеносителе. Площадь пика обратно пропорциональна объему газеносителя, элюированного вместе с образцом. С увеличением расхода подвижной фазы площадь пика уменьшается, а высота остается постоянной, поэтому скорость потока должна быть постоянной, если для количественных измерений используется площадь пика. Сигнал *потокowego* детектора определяется числом молекул, достигших чувствительного элемента в данный момент. С повышением скорости потока газа-носителя площадь пика остается постоянной, а высота увеличивается, так как увеличивается поток данного компонента.

Выбор типа детектора зависит от природы, числа анализируемых компонентов, их концентрации. Для анализа смесей с большим числом различных соединений используют универсальные детекторы. Если же проба содержит компоненты, близкие по своим свойствам, лучше использовать селективный детектор. Иногда используют комбинацию обоих типов детектора. К наиболее распространенным дифференциальным детекторам относятся детекторы по теплопроводности, пламенно-ионизационные, ионизационные, термохимические.

Детектор по теплопроводности, или катарометр, впервые был использован в газовой хроматографии Р.Э. Классоном в 1946 г. Катарометр представляет собой массивный блок из латуни или нержавеющей стали с двумя ячейками, в каждой из которых находятся чувствительные нагревательные элементы – нити из вольфрамовой или платиновой проволоки или термисторы с высоким температурным коэффициентом сопротивления (рис. 5.7). Через сравнительную ячейку постоянно проходит чистый газ-носитель, через измерительную – элюат после разделительной колонки.

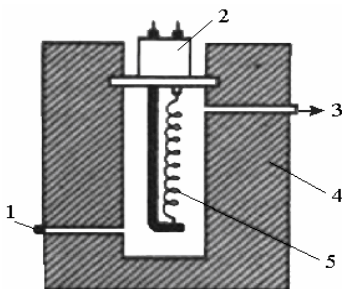


Рис. 5.7. Схема катарометра:
1 – ввод газа из колонки; 2 – изолятор; 3 – выход в атмосферу; 4 – металлический блок; 5 – спираль

Чувствительные элементы нагревают постоянным электрическим током от стабилизированного источника питания 6–12 В. Принцип работы катарометра основан на том, что нагретое тело теряет теплоту со скоростью, зависящей от состава окружающего газа. Теплопроводность последнего определяет температуру, а следовательно, и сопротивление нагревательных элементов в катарометре, которые являются актив-

ными плечами мостовой измерительной схемы (мост Уитстона). Когда через обе камеры проходит чистый газ-носитель потери тепла, температура и сопротивление нитей в обеих камерах одинаковы, электрический мост находится в равновесии, и регистр на диаграммной ленте пишет прямую линию. Если состав газа меняется (в измерительную камеру поступает смесь газа-носителя с одним из компонентов разделяемой смеси), теплоотдача нити изменяется, изменяются ее температура и сопротивление. Это изменение измеряется с помощью моста Уитстона, преобразуется в выходной сигнал и регистрируется на диаграммной ленте в виде пика. При использовании газов-носителей с высокой теплопроводностью (водород, гелий) резко повышается чувствительность детектора к анализируемым веществам. В зависимости от соотношения теплопроводностей газа-носителя и определяемого вещества пик последнего может быть по ту или другую сторону от нулевой линии. Так, при работе с гелием обратные пики дает водород, теплопроводность которого больше теплопроводности гелия, при работе с азотом-водород, гелий, метан и др. Катарометр практически универсален и позволяет определять содержание веществ в пределах 0,01–0,1 %.

Принцип действия *термохимического детектора* основан на измерении теплового эффекта каталитического сжигания компонентов анализируемой пробы на поверхности платиновой

нити, являющейся чувствительным элементом детектора. В качестве газа-носителя используется только воздух или кислород, обеспечивающие горение газов. По конструкции этот детектор во многом аналогичен детектору по теплопроводности. За счет выделения теплоты сгорания происходит большое изменение температуры нити, ее сопротивления, поэтому чувствительность этого детектора в десятки раз выше, чем у катарометра. Изменение сопротивления измеряется с помощью моста Уитстона. Из-за постепенного уменьшения каталитической активности платиновых нитей приходится часто калибровать и периодически заменять чувствительные элементы.

Детектор пламенно-ионизационный (ДПИ) впервые был

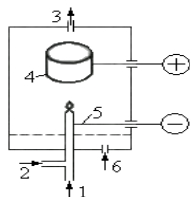


Рис. 5.8. Схема ДПИ: 1 – ввод газа из колонки; 2 – ввод водорода; 3 – выход в атмосферу; 4 – сорбирующий электрод; 5 – катод; 6 – ввод воздуха

введен в газовую хроматографию в 1958 г. Принцип работы основан на ионизации молекул анализируемых органических соединений в водородном пламени с последующим измерением ионного тока (рис. 5.8). Выходящий из колонки элюат смешивается с водородом и проходит в форсунку горелки детектора, куда подается также

очищенный воздух. Горение происходит между двумя электродами. На электроды подается напряжение 90–300 В, под действием которого движение ионов упорядочивается, возникает ионный ток, который усиливается и регистрируется в виде хроматографического пика на диаграммной ленте. Этот детектор универсален по отношению к органическим соединениям, его чувствительность уменьшается в ряду: углеводороды > эфиры > спирты > кислоты. ДПИ обеспечивает определение веществ в концентрациях порядка до $5 \cdot 10^{-8} \%$ и поэтому наиболее пригоден для анализа следов органических веществ. К недостаткам ДПИ можно отнести следующие факторы: применим только для анализа горючих веществ, не чувствителен к муравьиной кислоте, инертным газам и также к CS_2 , H_2S , SO_2 , NO , NO_2 , N_2O , NH_3 , CO , CO_2 , SiCl_4 , SiP_4 и др.

Пламенно-фотометрический детектор используют для селективного детектирования соединений серы и фосфора. Принцип действия его основан на измерении эмиссии (хемиллюминесценции) водородного пламени при неполном сгорании в нем соединений, содержащих серу и фосфор. В результате этого образуются радикалы, которые возбуждаются и испускают излучение. Это излучение регистрируют фотоумножители: фосфор – при 526 нм, а серу – при 394 нм. Пламенно-фотометрический детектор представляет собой ячейку пламенно-ионизационного детектора в сочетании с оптической схемой измерения светового потока. Световой поток после интерференционного светофильтра поступает на чувствительный элемент фотоумножителя. Полученный фототок поступает в электрометрический усилитель, а затем на регистратор.

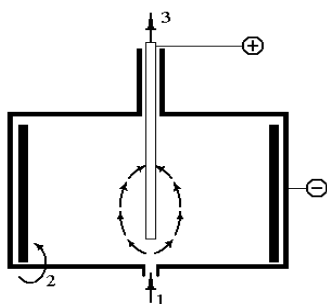


Рис. 5.9. Схема ДЭЗ: 1 – ввод газа; 2 – источник излучения; 3 – выход в атмосферу

В детекторе по электронному захвату (ДЭЗ), который был впервые предложен в 1960 г., используется уменьшение фонового тока при попадании в его ионизационную камеру веществ, способных к поглощению (захвату) электронов (рис. 5.9). Принцип работы: радиоактивный β -излучатель с низкой энергией, обычно тритий, помещается в про-

странство между электродами, создающими слабое электрохимическое поле (напряжение 10–20 В). Между электродами возникает ток, обусловленный электронной проводимостью. При попадании в пространство между электродами атомов или молекул с большим сродством к электрону (металлорганических, кислород-, азот- и галогенсодержащих веществ) происходит захват электронов и резкое снижение тока ионизации, что и служит мерой количества и сродства к электрону для данного вещества. Нижний предел детектирования составляет 10^{-12} г/л.

Системы регистрации и обработки хроматографического сигнала. Электрический сигнал детектора непосредственно или через систему усиления поступает на регистрирующий прибор. Усилитель должен обеспечивать получение электрического сигнала, пропорционального содержанию определяемого вещества в газе-носителе, выходящем из колонки.

Большинство современных хроматографов снабжены электронной системой обработки информации, измерения площади и времени удерживания пиков, расчетов количественного состава смеси. Рассмотренная система типична для обычного газового хроматографа, используемого в количественном анализе. Газовый хроматограф может иметь и гораздо более сложную схему, содержащую несколько колонок и детекторов, компьютер с памятью на магнитных дисках и в некоторых случаях автоматическое устройство для подготовки пробы.

Большинство фирм, выпускающих газохроматографическую аппаратуру, обычно включают в состав прибора не более 4–6 детекторов. Некоторые типы хроматографов и детекторов представлены в табл. 5.2. и на рис. 5.10, 5.11 и 5.12.

Таблица 5.2

Газохроматографические приборы,
выпускаемые промышленностью

Тип, модель, серия приборов	Тип детектора	Страна
Цвет-800	ДТП, ДПИ, ДЭЗ	Россия
Хромос GX-1000	ДПИ, ДТП, ТИД, ДЭЗ, ПФД	Россия
Газохром-2000	ДТХ, ДТП	Россия
Кристалл-4000М	ДТП, ДПИ, ТИД, ДЭЗ, ПФД, ФИД	Россия
ЛХМ-2000М	ДИП, ДТП, ДЭЗ, ТИД, ДТХ, ФИД	Россия
Agilent-7000	масс-спектрометр	США
Shimadzu GC-2014	ДИП, катарометр, ДЭЗ, ПФД, ТИД	Япония



Рис. 5.10. Портативный хроматограф ФГХ-1

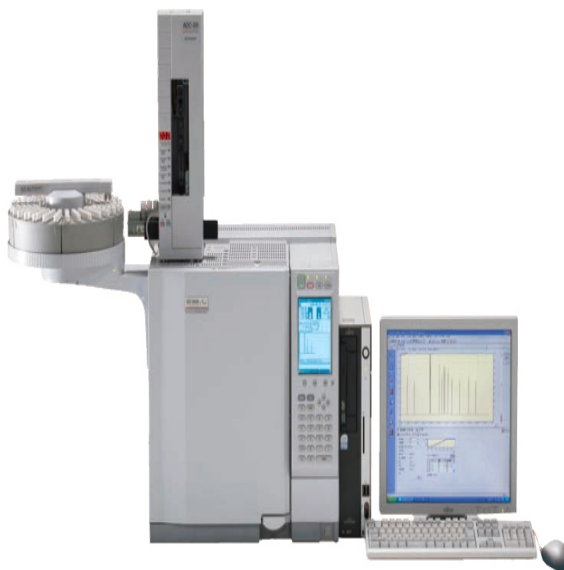


Рис. 5.11. Газовый хроматограф Shimadzu

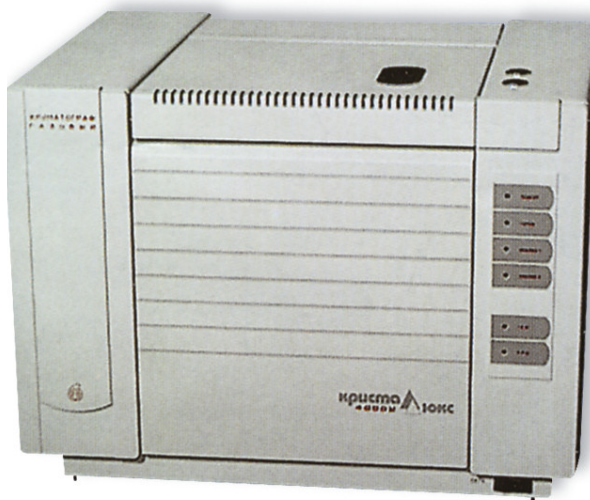


Рис. 5.12. Газовый хроматограф «Кристалл-4000М»

5.2. Подвижная и неподвижная фазы

Неподвижная фаза. В газодсорбционной хроматографии в качестве неподвижной фазы применяют различные адсорбенты – высокодисперсные искусственные или природные тела с большой наружной (непористые) или внутренней (пористые) поверхностью, поглощающей газы и пары. Геометрическая структура адсорбентов (удельная поверхность, средний диаметр пор) существенно влияет на объем удерживания анализируемых веществ и на газодсорбционное разделение.

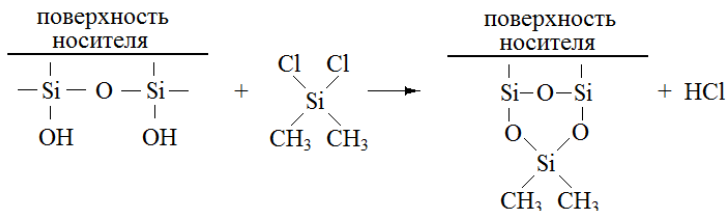
Для анализа легких газов, углеводородов, низкокипящих органических веществ, применяют емкие сорбенты, такие как тонкопористые силикагели, алюмогели, тонкопористые стекла, молекулярные сита – природные синтетические кристаллы, состоящие из атомов кремния, кислорода и различных металлов, активные угли. Наоборот, для анализа высококипящих крупных молекул используют малоактивные адсорбенты – широкопористые стекла, графитированные сажи, тефлон.

Адсорбент должен обладать следующими основными свойствами: необходимой селективностью, отсутствием каталитической активности, химической инертностью к компонентам разделяемой смеси и подвижной фазе, достаточной механической прочностью, линейностью изотермы адсорбции, однородным и определенным размером зерен. Размер частиц сорбента рассчитывают по правилу: эффективность колонки повышается, если выполняется следующее условие:

$$d_c = d_k / 8 \quad (5.1)$$

где d_c – средний диаметр частиц сорбента; d_k – внутренний диаметр колонки.

В *газожидкостной* хроматографии в качестве неподвижной фазы используют жидкость, нанесенную в виде тонкой пленки на поверхность носителя. *Носитель* должен быть химически инертным, не обладать адсорбционной активностью, быть механически прочным и термостабильным, каталитически неактивным. Для того чтобы жидкость распределялась на носителе тонким слоем, поверхность его должна быть достаточно большой, что достигается за счет создания пористой структуры. Однако поры не должны быть очень узкими, чтобы не затруднять движения сорбатов в неподвижной фазе. Как правило, средний размер пор составляет 10^{-3} мм. Такие носители получают из глины или огнеупорного кирпича путем дробления, промывания кислотой (для удаления оксидов металлов) и прокаливания (иногда с добавкой соды или щелочи). Чтобы на поверхности носителя не оставалось активных центров (например, гидроксильных групп), которые, взаимодействуя с полярными компонентами, вызывают ассиметричное размытие хроматографических зон, применяют методы дезактивации. Для этой цели часто применяют диметилгликоль или диметилдихлорсилан.



Теперь на поверхности носителя расположены неполярные метильные группы, и при использовании таких носителей полярные компоненты выписываются в виде достаточно симметричных пиков.

В настоящее время в качестве твердых носителей в газожидкостной хроматографии используют диатомиты (кизельгур), синтетические кремнеземы (макропористые силикагели, широкопористые стекла, аэросилагели), полимерные носители на основе политетрафторэтилена, обожженную керамику. Кизельгур – ископаемый минерал, на 90 % состоящий из аморфного кремнезема и представляющий собой окаменевшие остатки древних водорослей. Оболочки их клеток имели развитую систему пор, через которые водоросли получали питательные вещества посредством молекулярной диффузии.

Наиболее часто используются следующие инертные носители: карбопак (А, В, С), хромосорб (А, W, G, Р), молекулярные сита, графитированная сажа, цеолиты и др.

Неподвижная жидкая фаза в газожидкостной хроматографии должна удовлетворять следующим требованиям: прочно удерживаться на твердом носителе, образуя равномерную пленку; быть термически устойчивой и нелетучей при заданной температуре; быть химически инертной. Она должна обладать небольшой вязкостью, в противном случае сильно замедляется процесс диффузии, способствующий обмену веществ; быть доступной и обладать достаточной селективностью, т.е. способностью разделять вещества с близкими температурами кипения. Желательно, чтобы температура кипения жидкой фазы была приблизительно на 100 °С выше, чем рабочая температура колонки. Выбор неподвижной фазы зависит от состава образца. Поэтому перед началом анализа необходимо располагать макси-

мально возможной информацией о нем (структура, диапазон температур кипения компонентов и т.п.).

Зная свойства неподвижной жидкой фазы и природу разделяемых веществ, например класс, строение, можно достаточно быстро подобрать подходящую для разделения данной смеси селективную жидкую фазу. Чтобы время удерживания было оптимальным, для анализа полярности стационарной фазы и анализируемой пробы должны быть близкими. Неполярные вещества распределяются в неполярной жидкой фазе в соответствии со значениями температур кипения. Полярные вещества быстрее элюируются из неполярных жидких фаз, чем неполярные с такой же температурой кипения. С увеличением полярности жидкой фазы происходит увеличение времени удерживания полярных соединений.

Механизм взаимодействия между неподвижной фазой и компонентами разделяемой смеси различен. Между неполярными соединениями возникают неполярные или дисперсионные взаимодействия, которые приводят, обычно, к разделению в соответствии с температурами кипения компонентов. Между полярными соединениями возможно диполь-дипольное взаимодействие, что ведет к дополнительному удерживанию веществ в колонке. Диполи возникают и под действием полярного растворителя. Кроме того, наблюдаются так называемые специфические взаимодействия: донорно-акцепторная и водородная связи. Этим можно объяснить увеличение степени удерживания спиртов, например, на колонках с полиэтиленгликолем или глицерином.

Наряду с обычно используемыми в газовой хроматографии неподвижными фазами – *неполярными* типа сквалана или высокотемпературных смазок (апиезонов), *умеренно полярными* – типа сложных эфиров, *полярными* – с цианэтильными группами и полиэтиленгликолями (табл. 5.3) применяются также и различные кремнийорганические соединения, которые, в зависимости от природы их функциональных групп, могут по-разному взаимодействовать с разделяемыми веществами. Кремнийорганические соединения с высокой молекулярной массой незаменимы при анализе соединений при повышенных температурах. Это, например, анализ различных биологических объектов.

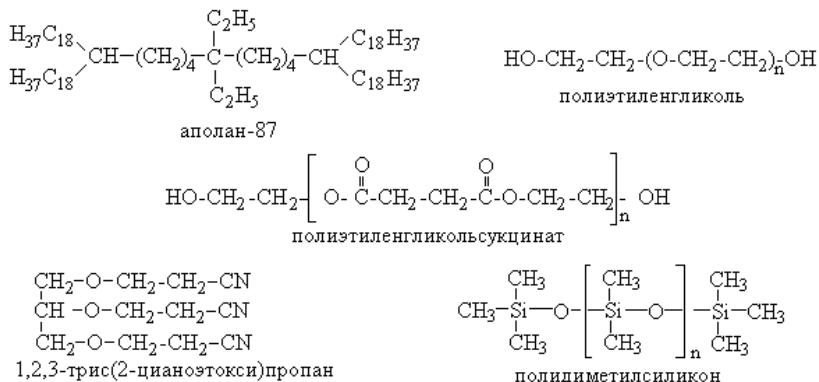


Таблица 5.3

Неподвижные жидкие фазы, используемые в газовой хроматографии

Жидкая фаза	Максимальная температура, °C	Анализируемые соединения
Сквалан (тетраметилтетракозан (CH ₃) ₆ C ₂₄ H ₅₀)	120	Алифатические углеводороды
Силиконовая смазка (апиезон L)	230	Алифатические углеводороды Высоки кипящие соединения
Силиконовое масло ДС 200	200	Углеводороды, сложные эфиры
Полиэтиленгликоль 1500	50–225	Спирты, кетоны
Динилфталат	120	Ароматические
Карбовакс 20 М	230	углеводороды Высоки кипящие соединения
β, β'- оксидипропионитрил	100	Углеводороды

Очень интересные результаты дало применение жидких кристаллов. Они относятся к числу неподвижных фаз переменной селективности, так как могут находиться в зависимости от температуры в твердом, жидком или жидкокристаллическом состоянии, причем каждое состояние характеризуется своими сорбционными свойствами. Жидкокристаллические неподвижные фазы обладают структурной селективностью и позволяют разделять близкокипящие изомеры, например, ксилолы.

Другой вид неподвижных фаз переменной селективности – это смеси веществ с разными температурами плавления. Например, неподвижная фаза из смеси сквалана, затвердевающего при низких температурах, и полиэтиленгликоля с температурой плавления 50–70 °С. При 40 °С неподвижной фазой будет сквалан – неполярная жидкость, а при 60 °С – полиэтиленгликоль, который тоже будет вовлечен в процесс разделения, и фаза станет полярной.

В качестве неподвижной фазы в газожидкостной хроматографии наиболее часто используются апиезон М, карбовакс 20М, карбовакс 1500, дексил 300, дексил 400, дибутилфталат, диэтиленгликольадипат, динонилфталат, полифениловый эфир, полипропиленгликоль, поливинилпирролидон, силикон GEF 96, силикон GEHE 60, силикон SE 30, фенилсиликон SE 52 и др.

В том случае, когда невозможно найти индивидуальную неподвижную фазу, имеющую заданную величину полярности, используют смесь двух фаз с большей и меньшей полярностью (табл. 5.4), например, при анализе исследуемой смеси, содержащей вещества различной химической природы, но с близкими температурами кипения.

Полярность неподвижной фазы P оценивается по отношению к условно выбранным эталонам: нулевая полярность приписывается сквалану, полярность 100 – β , β' – оксидипропионитрилу:

$$P = 100 (I_x - I_o) / (I_{100} - I_o), \quad (5.2)$$

где I_o , I_{100} – индекс удерживания соединения (по отношению к которому оценивается полярность) на сквалане и β, β' – оксиди-

пропионитриле; I_x – индекс удерживания этого же соединения на той неподвижной фазе, полярность которой подлежит определению.

Таблица 5.4

Классификация неподвижных фаз
в зависимости от вида их функциональных групп

I тип	II тип	III тип
Неполярные насыщенные (возможны только дисперсионные взаимодействия)	Полярные с максимально концентрированными отрицательными зарядами, π – связями, свободными электронными парами при атомах N и O (доноры электронов)	Полярные с локально концентрированными положительными и отрицательными зарядами (акцепторы и доноры электронов)
Апиезоны н-Гексадекан Парафиновое масло Сквалан н-Тетракозан	Адипинаты, нитрилы, нитрилоэфиры, себацинаты, стеараты, сукцинаты, трикрезилфосфат, фталаты, эфиры полиэтиленгликоля	Гидроксиламины, гликоли, глицерин, инозит, пентаэритрит, сорбит, полиэтиленгликоли

Количество жидкой фазы, наносимой на инертный носитель, определяется площадью и структурой поверхности носителя и влияет на четкость разделения. При очень малом количестве жидкой фазы могут проявиться адсорбционные свойства носителя, что крайне нежелательно, и в этом случае требуется высокочувствительный детектор. С увеличением количества жидкой фазы увеличивается размывание хроматографических полос. Оптимальное содержание жидкой фазы определяется конкретными условиями хроматографического анализа и колеблется в пределах 0,5–40 % от массы носителя. Методы нанесения жидкой фазы на поверхность носителя различны. Самым простым является метод испарения. Жидкую фазу растворяют в подходящем летучем растворителе (ацетоне, диэтиловом или петролейном эфире, дихлорэтаноле, метаноле) и помещают в кол-

бу с носителем. Количество растворителя должно быть таким, чтобы весь носитель был погружен в жидкость. Колбу помещают на водяную баню или присоединяют к вакуум-насосу и удаляют растворитель при непрерывном перемешивании содержимого колбы.

Носителем с нанесенной таким образом неподвижной жидкой фазой заполняют колонку, стараясь избежать образования пустот. Для равномерной упаковки через колонку пропускают струю газа и одновременно постукивают по колонке для уплотнения набивки. Затем до присоединения к детектору колонку нагревают до температуры на 50 °С выше той, при которой ее предполагается использовать. При этом могут быть потери жидкой фазы, но колонка входит в стабильный рабочий режим.

Подвижная фаза (газ-носитель). Одним из главных компонентов, участвующих в процессе газохроматографического анализа, является газ-носитель, который должен обеспечивать высокую чувствительность детектора и быть инертным по отношению к разделяемому веществу, растворителям, адсорбентам, носителям, неподвижным фазам, материалам дозатора, колонки, детектора и соединительных коммуникаций. Не менее жесткие требования предъявляются к чистоте газа-носителя. Баллонный технический газ с чистотой 99,9–99,99 % используется для работы большинства газохроматографических детекто-

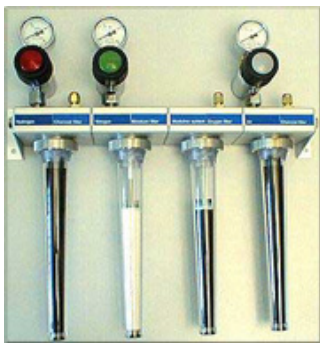


Рис. 5.13. Фильтры для газовой хроматографии

ров. Иногда для обеспечения стабильности, линейности и высокой чувствительности детекторов некоторых типов (электронно-захватный детектор) содержание примесей в газе должно быть менее 10^{-4} %. Для очистки газов в газовых хроматографах обычно применяют различные фильтры (рис. 5.13). Вязкость газа-носителя должна

быть как можно меньше, чтобы поддерживался небольшой пе-

репад давлений в колонке. В зависимости от конкретных условий проведения хроматографического процесса в качестве газа-носителя используют азот, аргон, гелий, диоксид углерода, воздух, водород, которые транспортируют в газовых баллонах под давлением (табл. 5.5).

Подвижная фаза в газовой хроматографии выполняет только транспортную функцию. Выбор газа-носителя часто определяется типом детектора. Скорость газа-носителя должна быть максимально возможной, чтобы сократить время анализа при условии полного разделения пиков на хроматограмме.

В газоадсорбционной хроматографии в качестве газа-носителя иногда применяют пары жидкостей при тех же невысоких давлениях, как и в газовой хроматографии, при этом уменьшаются удерживаемые объемы и улучшается симметрия пиков. Пары жидкостей используют в качестве подвижных фаз при температурах выше температур кипения этих жидкостей, чтобы не было их конденсации на поверхности, в порах адсорбента и на поверхности соединительных трубок до детектора. Применение водяного пара в качестве газа-носителя расширяет область применения адсорбентов, поскольку можно применять как однородные, так и неоднородные сорбенты, что особенно перспективно для анализа микропримесей органических веществ в сточных водах, биологических жидкостях и других водных средах.

Таблица 5.5

Газы-носители, наиболее часто применяемые
в газовой хроматографии, и окраска их баллонов

Газ	Окраска баллона	Надпись	Цвет надписи
Азот	Черная	Азот	Желтая
Аргон	Серая	Аргон	Синяя
Водород	Зеленая	Водород	Красная
Воздух	Черная	Сжатый воздух	Белая
Гелий	Коричневая	Гелий	Белая
Кислород	Голубая	Кислород	Черная

5.3. Качественный и количественный анализ

Широкое использование газовой хроматографии как универсального метода анализа обусловлено высокой разделяющей способностью хроматографической колонки, связью основных хроматографических характеристик сорбатов с природой веществ и их количеством.

Каждый компонент в газовой хроматографии регистрируют непосредственно на выходе из колонки с помощью разнообразных детекторов. Кривую зависимости сигнала детектора от объема газа-носителя, пропущенного через колонку, или от времени выхода компонента из колонки называют *хроматограммой*, или *кривой элюирования*. Хроматограмма, полученная с

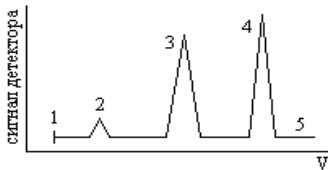


Рис. 5.14. Хроматограмма двухкомпонентной смеси: 1 – ввод пробы; 2 – пик несорбирующегося компонента; 3, 4 – пик компонентов пробы; 5 – нулевая линия

дифференциальным детектором, включает нулевую линию, соответствующую протеканию через детектор чистого газа-носителя, и ряд пиков, отвечающих прохождению через детектор совместно с газом-носителем компонентов анализируемой смеси (рис. 5.14).

Пик ограничивается *фронтом*, соответствующим возрастанию концентрации компонента до максимальной, и *тылом*, отвечающим убыванию концентрации компонента, в газе-носителе. Расширение (размытие) полосы компонента по мере прохождения его через колонку ведет к получению широкого пика. Размытие может быть симметричным и асимметричным. В последнем случае образуется пик либо с размытым фоном, либо с размытым тылом (рис. 3.2).

Хроматографическую кривую, имеющую форму симметричного пика, можно с достаточным приближением описать уравнением Гаусса:

$$y = h \cdot e^{\frac{-x^2}{2\sigma^2}}, \quad (5.3)$$

где h – высота пика, отвечающая максимальной концентрации компонента в зоне, которая движется через колонку; x , y – абсцисса и ордината данной точки кривой; σ – стандартное отклонение, которое отвечает ширине пика на высоте $0,882h$.

Симметричность хроматографического пика определяют с помощью критерия Эттре. Для пиков с гауссовой симметрией должно выполняться условие:

$$\mu = 1,698 \cdot \mu_{0,5}, \quad (5.4)$$

где μ , $\mu_{0,5}$ – ширина пика на нулевой линии и на половине его высоты.

Степень асимметричности пика оценивается с помощью коэффициента асимметричности, который рассчитывают по формуле:

$$F_{ac} = \frac{\mu_{\phi}}{\mu_m}, \quad (5.5)$$

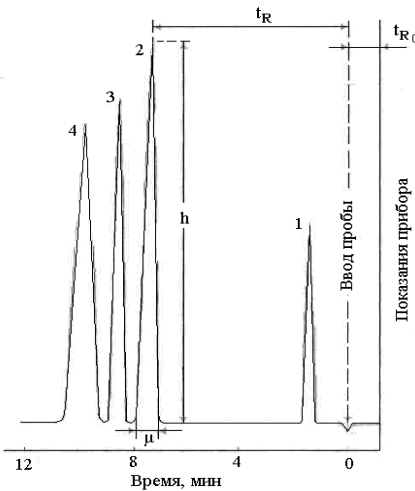


Рис. 5.15. Параметры хроматограммы

где μ_{ϕ} – ширина фронтального участка пика; μ_m – ширина тылового участка пика на уровне 0,1 его высоты.

Одним из основных этапов хроматографического анализа является качественная и количественная интерпретация хроматограмм. Для этого используют различные параметры хроматографического пика (рис. 5.15).

Время удерживания (t_R) – время, прошедшее от момента ввода пробы в колонку до выхода максимум-

ма пика анализируемого компонента, так как t_0 – время удерживания несорбирующегося компонента пробы («мертвое» время). Разность между общим временем удерживания и «мертвым» временем называется исправленным (или приведенным) временем удерживания t'_R .

Для характеристики удерживания используют также удерживаемый объем V_R или исправленный объем V'_R – объем подвижной фазы, необходимый для элюирования компонента из колонки:

$$V'_R = V_R - V_0 \quad (5.6)$$

Ширина пика (μ) – отрезок на нулевой линии, полученный интерполяцией нулевой линии в промежутке от начала до конца пика. В хроматографии чаще используют ширину пика на половине высоты ($\mu_{0,5}$), практическое определение которой по хроматограмме проще. Высота пика (h) – расстояние от максимума пика до его основания, измеренное в направлении, параллельном оси сигнала детектора. Площадь пика (S) – площадь, заключенная между линией, ограничивающей пик, и его основанием. Если на хроматограмме наблюдается дрейф нулевой линии, неполное разделение или имеются зашкаленные (усеченные, выходящие за пределы диаграммы) пики, то измерение высоты и ширины пиков производят, как показано на рис. 5.16.

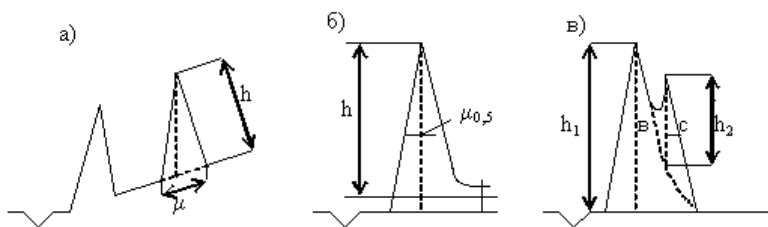


Рис 5.16 Способы определения высот хроматографических пиков

Качественный анализ. Газовая хроматография дает возможность проводить как индивидуальную, так и групповую идентификацию веществ. Индивидуальную идентификацию проводят с помощью следующих приемов.

1. *Прямой метод* заключается в выделении из колонки индивидуальных веществ и последующей их идентификации независимыми методами: с помощью качественных реакций, ИК-спектроскопии, вольтамперометрии, измерением физико-химических свойств веществ и т.п. Современным вариантом этого метода можно считать использование показаний прибора, например масс-спектрометра, непосредственно соединенного с выходом из хроматографической колонки.

2. *Сравнение абсолютных и относительных величин удерживания.* В этом методе для идентификации веществ используют время удерживания или пропорциональный ему удерживаемый объем. Для качественной характеристики применяют как абсолютные, так и относительные величины удерживания. Сначала снимают хроматограмму исследуемой смеси, затем в идентичных условиях снимают хроматограмму веществ-стандартов, наличие которых предполагается в исследуемой смеси. Сравнивают время удерживания t_R или удерживаемый объем V_R компонентов исследуемой смеси и веществ-стандартов. Равенство абсолютных значений t_{Ri} и t_{Rcm} , V_{Ri} и V_{Rcm} может служить основанием для идентификации.

Применение абсолютных величин удерживания может привести к ненадежным результатам, так как они очень сильно зависят от условий опыта. Поэтому лучше использовать так называемое относительное удерживание τ , т.е. отношение времени удерживания анализируемого компонента t_{Ri} и какого-либо другого вещества t_{Rcm} , которое принимают за стандарт. Чтобы относительное удерживание зависело только от неподвижной фазы, нужно ввести поправку на несорбирующийся компонент:

$$\tau = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_{Rcm} - t_0} = \frac{V_{Ri} - V_0}{V_{Rcm} - V_0}. \quad (5.7)$$

Справочные таблицы по газовой хроматографии содержат большое число данных по относительному удерживанию самых разнообразных веществ на колонках с разными сорбентами.

3. *Идентификация по логарифмическим зависимостям.* Такая зависимость между V_R , t_R или τ и числом атомов углерода

или температурой кипения прямолинейна. На основании литературных или экспериментальных данных хроматографирования стандартных веществ различных гомологических рядов строят графики (рис. 5.17, 5.18) и по ним проводят идентификацию вещества.

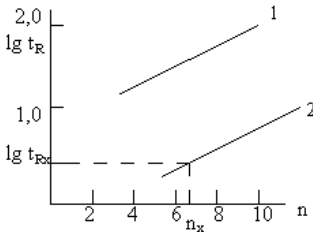


Рис. 5.17. Зависимость времени удерживания от числа атомов углерода в молекуле соединения: 1 — соединения ароматического ряда; 2 — n-углеводороды

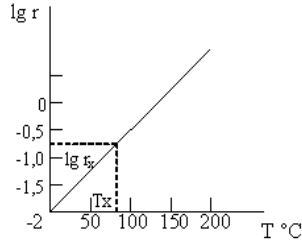


Рис. 5.18. Зависимость относительного удерживания от температур кипения алканов C_5 – C_{11}

4. Идентификация по индексам удерживания. Влияние

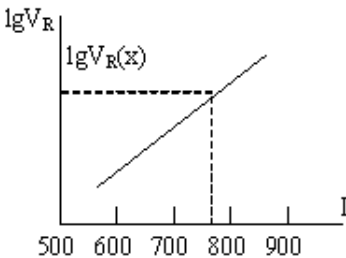


Рис. 5.19. Зависимость $\lg V'_R$ от индексов удерживания

экспериментальных погрешностей на результаты хроматографического анализа можно значительно снизить, если использовать относительные индексы удерживания. Наиболее широко применяют логарифмический индекс удерживания, предложенный Ковачем в 1958 г. (формула 5.8). Суть его заключается в использовании линейной за-

висимости между логарифмом исправленных времени или объема удерживания и числом атомов углерода нормальных алканов. Индексы удерживания нормальных алканов (I) равны числу углеродных атомов, умноженному на 100, и характеризуют адсорбируемость или растворимость (рис. 5.19). Находят индексы удерживания графически или по формуле, используя V'_R или t'_R .

Индексы удерживания рассчитывают из удерживаемых объемов V'_R или времени удерживания t'_R анализируемого соединения (x) и по крайней мере двух веществ (z и $z+1$), кипящих в той же области, одно из которых элюируется ранее анализируемого компонента (V'_{Rz}), а другое – после него ($V'_{R(z+1)}$).

$$I_x = 100 \cdot y \frac{\lg V'_{R(x)} - \lg V'_{R(z)}}{\lg V'_{R(z+1)} - \lg V'_{R(z)}} + 100z. \quad (5.8)$$

5. Групповая идентификация. Для групповой идентификации применяют следующие приемы:

- реакционная газовая хроматография (превращение определенных групп соединений, их удаление из анализируемой смеси, элементарный анализ в сочетании с хроматографическим);
- анализ на колонках с селективными неподвижными фазами, позволяющими разделить определенный класс соединений;
- использование селективных детекторов.

Правильно выбранные селективные детекторы могут существенно упростить идентификацию соединений. Чаще всего такие детекторы используют для идентификации смесей органических соединений, содержащих гетероатомы: P, S, N, Br, Cl, I или функциональные группы, например -ОН, -NH₂, >СО.

Количественный анализ. Практически все методы количественного хроматографического анализа основаны на прямой пропорциональной зависимости параметров пиков от массы вещества в хроматографической зоне. В качестве определяющих параметров используют высоту хроматографического пика, его площадь, произведение высоты пика на расстояние удерживания или на время (объем) удерживания.

Высоту пика целесообразно использовать, если воспроизводимость размера пробы удовлетворительна, колонка не перегружена, температура колонки и расход газа-носителя стабильны, если пользуются детектором концентрационного типа, а измерения проводят в линейной области детектора. Если разделение проводят на капиллярной колонке, высота пика является более точной характеристикой, чем площадь пика. Для измерения высоты пика используют различные способы (рис. 5.16).

Площадь пика как определяющий параметр следует использовать, если стабилизирован расход газа-носителя и измерения проводят в линейной области детектора. Чувствительность детектора и системы измерения и регистрации должны обеспечить необходимую точность измерения площади пика. Произведением высоты пика на время удерживания не следует пользоваться при программировании температуры, при анализе пиков, сильно отличающихся по удерживанию или по высоте (допустимо различие не более чем в 2–3 раза).

Количественный анализ можно провести только в том случае, если вещество термостойко, т.е. испаряется в дозаторе воспроизводимо и элюируется без разложения. При разложении вещества на хроматограмме появляются ложные пики, относящиеся к продуктам разложения. Вещество не должно образовывать устойчивых сольватов при растворении в неподвижной жидкой фазе и реагировать с материалами, из которых изготовлены детали хроматографа. Желательно работать с соединениями, которые легко получить с количественным выходом. Этим требованиям в большей мере удовлетворяют, как правило, органические вещества, поэтому ГХ широко используют как серийный метод анализа органических соединений. Однако этим методом можно также определить почти все элементы периодической системы в виде летучих комплексов.

Методы измерения площади пиков

Существуют различные методы измерения площади хроматографических пиков.

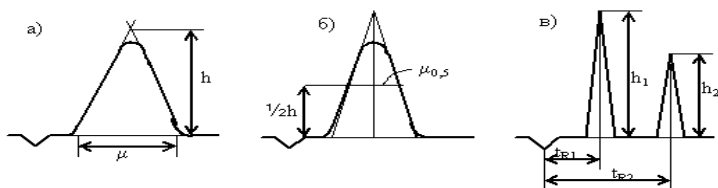


Рис 5.20. Измерение площади пика

1. *Метод треугольника (триангуляции).* В этом методе проводят касательные к обеим ветвям пика, проходящие через точки перегиба, рассчитывают площадь треугольника, образуемого этими касательными и основанием пика (рис 5.20, а).

2. *Произведение высоты пика на его ширину на половине высоты.* Самым распространенным методом измерения площади пика является умножение высоты пика на его ширину, измеренную на расстоянии, равном половине высоты. Для этого проводят линию основания пика и измеряют его высоту h . Полученную величину делят пополам и делают отметку на соответствующем уровне в центре пика. Затем на этом уровне измеряют ширину пика $\mu_{0,5}$ (рис 5.20, б). Этот метод можно использовать при условии симметрии пиков и при полном разделении веществ.

3. *Произведение высоты пика на объем, время или расстояние удерживания.* Этот способ можно использовать в тех случаях, когда нужно без особой точности определить площади нескольких пиков. Преимущество этого метода состоит в том, что нет необходимости непосредственно измерять ширину пиков, поэтому он не так чувствителен к перекрыванию пиков, как другие (рис 5.20, в).

4. *Измерение площади пиков с помощью электронных интеграторов* непосредственно во время записи хроматограммы. С их помощью можно измерять, кроме площади пика, высоту и время его выхода, компенсировать постоянный дрейф нулевой линии, измерять площади неполностью разделенных пиков и печатать полученные результаты с помощью цифропечатающего устройства на бумажной ленте или передавать данные на экран дисплея.

5. *Расчет площади взаимоналагающихся неразделенных пиков* проводят следующим образом: на половине высоты пика измеряют полуширину пика, обращенную в противоположную от соседнего пика сторону, затем ее удваивают и умножают на высоту (рис. 5.21).

При плохом разделении, когда ширину пика на половине его высоты измерить нельзя, расчет площади пика можно проводить по формулам:

$$S = 1,65h \cdot \mu_{0,75} \text{ или } S = 2,71h \cdot \mu_{0,90}.$$

Можно использовать также произведение расстояния (времени и объема) удерживания на высоту пика.

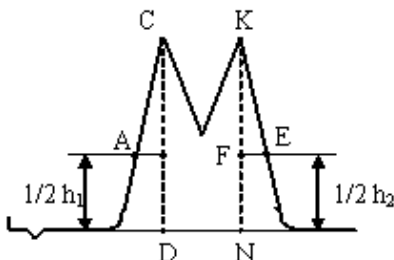


Рис. 5.21. Определение площади пика при неполном разделении компонентов ($S_1 = 2AB \cdot CD$; $S_2 = 2FE \cdot KN$)

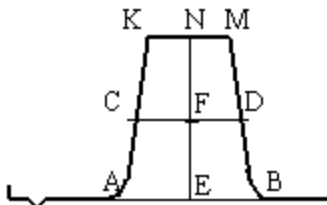


Рис. 5.22. Расчет площади срезанного пика

6. *Площадь зашкаленного («срезанного») пика* (рис. 5.22) рассчитывают по формуле:

$$S = \frac{(x \cdot y_c - x_c \cdot y)^2}{(x - x_c) \cdot (y_c - y)}, \quad (5.9)$$

где x – отрезок FD; y – отрезок FE; x_c – отрезок NM; y_c – отрезок NE.

Методы расчета хроматограмм

Основными методами получения количественных результатов являются используемые в различных модификациях и сочетаниях метод абсолютной градуировки, метод внутреннего стандарта и методы нормировки.

Метод простой нормировки. Этот метод основан на предположении, что чувствительность детектора ко всем компонентам пробы одинакова, т.е. вещества независимо от их строения, взятые в одинаковом количестве, дают одну и ту же площадь пика. Это приближенно выполняется, если вещества химически сходны, а в качестве газа-носителя применяют газ, теплопроводность которого приблизительно на порядок отличается от

теплопроводности анализируемых веществ (детектор-катарометр). Такими газами являются водород и гелий. На полученной хроматограмме исследуемой смеси измеряют высоту каждого пика и ширину его на половине высоты или время удерживания (рис. 5.20, б). Затем рассчитывают площадь пика или произведение высоты пика на расстояние удерживания. Расчет содержания i -того компонента (ω_i , %) в анализируемой смеси проводят по формуле:

$$\omega_i = \frac{S_i \cdot 100}{\sum S_i}, \% \quad \text{или} \quad \omega_i = \frac{t_{Ri} \cdot h_i \cdot 100}{\sum (t_{Ri} \cdot h_i)}, \% \quad (5.10)$$

Метод простой нормировки не дает точных результатов в случае различной чувствительности выбранного детектора по отношению к разделяемым компонентам смеси.

Метод внутренней нормировки. Метод основан на учете различия чувствительности детектора по отношению к компонентам разделяемой смеси и поэтому более надежен, чем предыдущий. Расчет ведется по формуле:

$$\omega_i = \frac{K_i \cdot S_i \cdot 100}{\sum (K_i \cdot S_i)}, \% \quad (5.11)$$

где K_i – поправочные (градуировочные) коэффициенты, учитывающие чувствительность детектора к данному компоненту.

Если отдельные компоненты разделяются неполностью, что затрудняет измерение площадей, то пользуются другой формулой:

$$\omega_i = \frac{K_i \cdot t_{Ri} \cdot h_i \cdot 100}{\sum (K_i \cdot t_{Ri} \cdot h_i)}, \% \quad (5.12)$$

Отдельные поправочные коэффициенты K_i определяют следующим образом: готовят модельную смесь соединений, содержащихся в анализируемой смеси (состав ее должен быть близок к составу анализируемой смеси); хроматографируют мо-

дельную смесь и измеряют площади соответствующих пиков (или произведение времени удерживания на высоту пиков); один из пиков принимают за стандартный и рассчитывают коэффициент по формуле:

$$K_i = \frac{m_i \cdot S_{cm}}{m_{cm} \cdot S_i}, \quad (5.13)$$

где m_i , m_{cm} – масса введенного в хроматограф i -того компонента и стандарта, г.; S_i , S_{cm} – площадь i -того компонента и стандарта.

Поправочные коэффициенты могут быть как массовыми, так и мольными в зависимости от способа выражения состава исследуемой смеси, тогда в формулу (5.13) вместо m_i и m_{cm} подставляют ω_i , ω_{cm} или C_i и C_{cm} .

Метод нормализации при использовании большинства детекторов осуществляют без специальной градуировки, так как градуировочные коэффициенты для многих веществ приведены в литературе. Достоинство метода заключается в том, что искажения, имеющиеся в одинаковой степени у всех пиков, в конечном счете не влияют на точность результатов. Для использования методов нормировки необходимо, чтобы на хроматограмме были зарегистрированы все компоненты, входящие в состав анализируемой смеси.

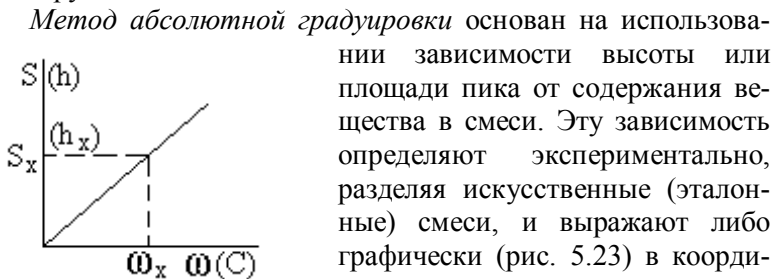


Рис. 5.23. Общий вид градуировочного графика в методе абсолютной градуировки

$$\omega_i = K_i \cdot S_i \cdot 100 / m_{cm}, \% \quad (5.14)$$

$$K_i = \frac{m_i}{S_i}, \text{ г/см}^3 \quad (5.15)$$

$$\text{или } \omega_i = K_i \cdot h \cdot 100 / m_{cm}, \% \quad (5.16)$$

Эти коэффициенты можно применять только в линейной области детектора. Метод абсолютной градуировки прост, но точность его в значительной степени зависит от постоянства режима, тщательности приготовления и анализа эталонных смесей, воспроизводимости размера пробы.

Метод внутреннего стандарта основан на добавлении к пробе анализируемой смеси точно известного количества вещества, называемого «внутренним стандартом». Вещество, которое используется в качестве внутреннего стандарта, подбирают так, чтобы его пик полностью отделялся от пиков компонентов исследуемой смеси, площадь была соизмерена с площадью остальных пиков и чтобы оно растворялось в анализируемой смеси. Этот метод позволяет проводить расчеты и в тех случаях, когда на хроматограмме отсутствуют пики некоторых компонентов анализируемой смеси. Он не требует точной дозировки, в чем состоит его главное достоинство. Количественный анализ по методу внутреннего стандарта проводят расчетным или графическим способом.

В расчетном способе устанавливают относительный поправочный коэффициент, затем к определенной массе анализируемой пробы добавляют точно измеренное количество внутреннего стандарта. Приготовленную таким образом смесь хроматографируют и измеряют площади i -того компонента и внутреннего стандарта. Расчет проводят по формуле:

$$\omega_i = \frac{S_i \cdot k_i \cdot m_{cm} \cdot 100}{S_{cm} \cdot m_{np}}, \%, \quad (5.17)$$

где S_i , S_{cm} – площади пиков компонента и стандарта; m_{cm} , m_{np} – масса стандарта и пробы (без стандарта); k_i – относительный поправочный коэффициент.

$$k_i = \frac{K_i}{K_{cm}}, \quad (5.18)$$

где K_i и K_{cm} – абсолютные градуировочные коэффициенты для компонента и стандарта (см. метод абсолютной градуировки).

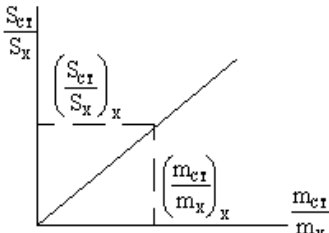


Рис. 5.24. Градуировочный график в методе внутреннего стандарта

мую пробу вводят известное количество стандарта, смесь хроматографируют и по графику определяют содержание компонента.

В графическом способе готовят ряд смесей (стандартов) с возрастающим известным массовым или объемным содержанием определяемого компонента; хроматографируют смеси и измеряют площади компонента и стандарта и строят график зависимости в координатах $S_{CT} / S_X - m_{CT} / m_X$ (рис. 5.24). Затем в анализируе-

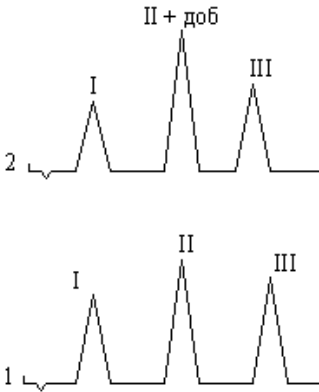


Рис. 5.25. Хроматограммы смесей в методе добавок

Метод добавок. Используется, когда отсутствует возможность выбора стандарта, который бы регистрировался в виде отдельного пика. Анализ проводят дважды: без добавки и с добавкой стандартного вещества, которое входит в состав анализируемой смеси (рис. 5.25). При этом на хроматограмме увеличивается пик (II) соответствующего компонента. Расчет проводят по формуле:

$$C_i = \frac{S_i \cdot m_{ct} \cdot 100}{(S'_{ct} \cdot S'' / S'' - S'_{ct}) \cdot m_{np}}, \quad (5.19)$$

где S'_i – площадь пика i -того компонента на первой хроматограмме; S' и S'' – площади пиков какого-либо компонента (кроме добавленного) на первой и второй хроматограммах (например III); S'_{ct} и S''_{ct} – площадь пика добавленного компонента на

первой и второй хроматограммах; $m_{\text{ст}}$ – масса добавленного стандарта; $m_{\text{пр}}$ – масса пробы без добавки.

6. Жидкостная колоночная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖХ) – это метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой служит жидкость. Метод ЖХ применим для разделения более широкого круга веществ, чем метод ГХ, поскольку большинство веществ не обладает летучестью, многие из них неустойчивы при высоких температурах (особенно высокомолекулярные соединения) и разлагаются при переводе в газообразное состояние. В ЖХ разделение чаще всего происходит при комнатной температуре. Этот метод позволяет разделить многие неорганические и органические вещества в виде ионов или нелетучих соединений.

В зависимости от способа аппаратного оформления различают следующие виды ЖХ: колоночную, в том числе капиллярную, бумажную (БХ) и тонкослойную (ТСХ).

В зависимости от характера неподвижной фазы различают жидкостно-твердофазную (адсорбционную) хроматографию (ЖТФ, ЖАХ) и жидкостно-жидкостную (ЖЖХ).

Неподвижная фаза должна удерживать разделяемые вещества. Подвижная фаза, т.е. растворитель, должна обеспечить различную емкость колонки и достаточно эффективное разделение. В *жидкостно-твердофазной хроматографии* неподвижной фазой является твердое тело: адсорбент (силикагель, оксид алюминия или магнезия, угли, пористое стекло и т.п.).

Жидкостно-жидкостная хроматография основана на распределении вещества между двумя несмешивающимися жидкостями. Жидкость, используемую в качестве неподвижной фазы, наносят на инертный носитель и через слой полученного наполнителя пропускают поток жидкой подвижной фазы, не смешивающейся с неподвижной фазой. Неподвижная фаза может быть полярной и неполярной. Природа неподвижной фазы влияет на селективность колонки и является основным фактором, который определяет последовательность выхода компо-

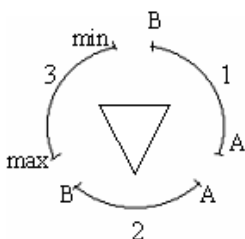


Рис 6.1. Схема выбора хроматографических фаз: 1 – элюент; 2 – смесь; 3 – активность неподвижной фазы; А – полярный; В – неполярный

нентов из колонки. Выбор неподвижной фазы до сих пор осуществляется эмпирически и определяется природой разделяемых веществ, их полярностью и температурой кипения. Выбор неподвижной (стационарной) и подвижной фаз можно провести по схеме, приведенной на рис. 6.1. Вращением треугольника одну из вершин устанавливают против соответствующей разделяемой смеси, тогда как две другие вер-

шины указывают на наиболее благоприятные в данных условиях подвижную и неподвижную фазы. В зависимости от полярности используемых фаз различают нормально-фазовую (НФХ) и обращенно-фазовую (ОФХ) хроматографии. В НФХ используют полярную подвижную и неполярную подвижную фазы, в ОФХ – неполярную неподвижную и полярную подвижную фазы. В обоих случаях выбор подвижной фазы чаще оказывается важнее, чем выбор неподвижной. Обычно в качестве неподвижной фазы используют воду, а в качестве подвижной – органические неполярные растворители (изооктан, бензол и др.). Например, в бумажной хроматографии неподвижной фазой является вода, удерживаемая волокнами целлюлозы. В ОФХ неполярный растворитель фиксируется на носителе, а подвижной фазой являются вода, спирт, буферные растворы, сильные кислоты.

По механизму разделения ЖХ может быть адсорбционной, распределительной, ионообменной, эксклюзионной, осадочной, комплексообразовательной, аффинной (см. разд. 3). В основе методов *ионообменной*, *ионной* хроматографии лежит динамический процесс замещения ионов, связанных с неподвижной фазой, ионами элюента, поступающими в колонку.

Основная цель такого хроматографического процесса – разделение органических или неорганических ионов с зарядом одного и того же знака. Удерживание в этих видах хроматографии определяется изменением свободной энергии реакции ион-

ного обмена. Соотношение концентраций обменивающихся ионов в растворе и в фазе сорбента определяется ионообменным равновесием.

Эксклюзионная хроматография – это разновидность жидкостной хроматографии, в которой разделение компонентов основано на распределении молекул в соответствии с их размером между растворителем, находящимся в порах сорбента, и растворителем, протекающим между его частицами. Когда в колонку вводят пробу, содержащую несколько типов ионов или молекул с разными размерами, то они стремятся перейти из подвижной фазы внутрь пор, так как концентрация молекул разделяемых веществ в наружном растворе оказывается выше, чем в порах. Распределение молекул между внутренним и внешним раствором возможно только в том случае, если размеры распределяющихся молекул меньше диаметра пор.

Создать гели с абсолютно одинаковыми по размерам порами практически невозможно. Поэтому их обычно характеризуют распределением пор по размерам в определенном интервале. Максимальный размер пор называют верхним пределом исключения, поскольку все ионы или молекулы, имеющие размер больший, чем максимальный диаметр пор, исключаются, так как не могут проникнуть в поры и элюируются без разделения одним пиком. Для ионов или молекул с размерами меньшими, чем минимальный размер пор, гель является полностью проницаемым, и они также элюируются без разделения, но с максимальным объемом удерживания. Разделяются только частицы, размеры которых находятся между максимальными и минимальными размерами пор геля. При отсутствии адсорбции вещества элюируются последовательно в порядке уменьшения их молекул.

Поэтому эксклюзионную хроматографию называют также молекулярно-ситовой. Эксклюзионная хроматография подразделяется на *гель-проникающую* и *гель-фильтрационную*. В гель-проникающей хроматографии разделение осуществляется на полимерах, набухающих в органических растворителях; если же полимеры набухают в воде, то обычно говорят о гель-фильтрационном варианте. В качестве носителей используют различные гели с трехмерной сетчатой структурой – декстрановые,

полиакриламидные, агарозные, гели на основе стирола и дивинилбензола, пористые силикагели, а также пористые стеклянные гранулы. Все гели и стекла, используемые в этом виде хроматографии, как правило, не содержат ионогенных групп и не обладают химическим или биологическим сродством к анализируемым веществам. Гели по назначению условно делят на универсальные и специальные, ориентированные на разделение компонентов, близких по молекулярно-массовым характеристикам.

Основная область применения эксклюзионной хроматографии – анализ высокомолекулярных соединений: различных полисахаридов, стероидов, аминокислот, пептидов. Реализован вариант гель-хроматографа с использованием рефрактометрического, вискозиметрического детектора и детектора малоуглового лазерного светорассеяния – лазерного нефелометра.

Аффинная хроматография основана на характерной особенностях биологически активных веществ селективно и обратимо связывать определенные вещества, называемые *аффинными лигандами*, или *аффиантами*. По этому механизму ферменты связывают соответствующие ингибиторы, антитела – антигены, гормоны – их рецепторы и т.п. При использовании сорбентов с привитыми аффинными лигандами появляется возможность селективного хроматографического выделения близких по свойствам биологически активных соединений и их разделения между собой.

Для получения сорбента выбирают матрицу (агароза, сульфуроза, полиакриламид) для иммобилизации биологически активных веществ. Ковалентная иммобилизация аффинных лигандов осуществляется на предварительно активированной матрице за счет их химического взаимодействия с поверхностными реакционноспособными функциональными группами матрицы (гидроксильными, карбоксильными, амидными, аминными). Разделение в аффинной хроматографии проходит по простой схеме динамической сорбции – десорбции. На первой стадии – поглощение целевых биологически активных веществ в колонке с удалением в фильтрат несорбирующихся примесей, на второй стадии – элюирование компонентов из колонки с изменением ионной силы или pH раствора. При этом уменьшается степень

диссоциации функциональных групп, участвующих в образовании связи между сорбатом и сорбентом.

Лигандообменная хроматография основана на замещении лигандов в предварительно сорбированных координационных соединениях. Выбор центральных атомов ограничен. Чаще всего используют ионы Cu^{2+} , реже Ca^{2+} . При использовании ионов Ag^+ удастся разделить ненасыщенные сложные эфиры, липиды, терпены, стероиды, гетероциклы. В присутствии ионов Hg^+ разделяются серосодержащие органические соединения, а ионов Fe^{2+} – фенолы, карбоновые кислоты.

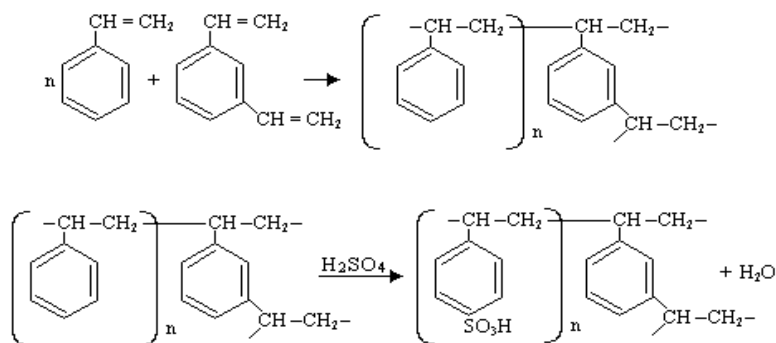
6.1. Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография основана на обратимом стехиометрическом (эквивалентном) обмене ионов, содержащихся в жидкой подвижной фазе (растворе), на ионы твердых сорбентов неподвижной фазы. Сорбенты, содержащие ионогенные группы, способные к обмену, называют *ионообменниками* или *ионитами*. Разделение проходит за счет неодинаковой способности к обмену у различных ионов хроматографируемого раствора. Процесс может быть использован для фронтального, вытеснительного и элюентного анализа (см. разд. 3). Разделение можно проводить на колонках, листах ионообменной бумаги или в тонком слое ионита.

Некоторые физико-химические свойства ионитов.

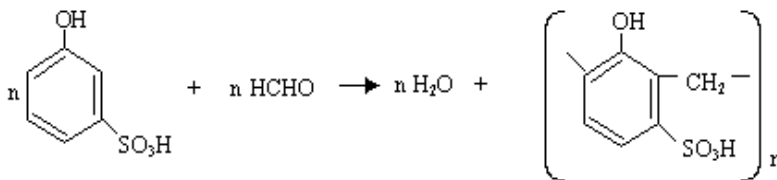
Ионообменники могут быть органическими и неорганическими, природными и синтетическими. Первыми ионообменниками, нашедшими практическое применение, были природные неорганические материалы: глины, пермутит, оксид алюминия, цеолиты и др. Но природные иониты имеют существенные недостатки: они обладают небольшой емкостью, малой скоростью обмена, а вследствие низкой химической устойчивости некоторые из них можно было использовать только в ограниченном интервале pH. Поэтому применение природных ионитов ограничивалось в основном водоподготовкой. Наибольшее значение для аналитической практики имеют органические синтетические полимерные вещества – ионообменные смолы.

Ионообменные смолы в настоящее время синтезируют по реакциям полимеризации или поликонденсации. Поликонденсацию или полимеризацию необходимо провести так, чтобы полученные линейные цепи были достаточно разветвлены и связаны друг с другом «мостиками». При получении катионообменников полимеризационного типа чаще в качестве сшивающего агента для создания межцепных (поперечных) связей применяют дивинилбензол (ДВБ). Сополимеризацией стирола с дивинилбензолом с последующим сульфированием получают катионит КУ-2:

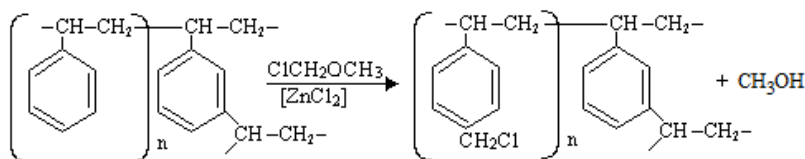


Используемый при сополимеризации дивинилбензол (ДВБ) определяет количество межцепных (поперечных) связей – сетчатость (пористость). Этот процесс управляем: изменяя количество используемого ДВБ, можно получать иониты нужной пористости. Процент ДВБ, обычно составляет от 1 до 16. Наиболее часто используют иониты, содержащие 4–9 % ДВБ. При синтезе ионообменных смол методом полимеризации получают монофункциональные смолы.

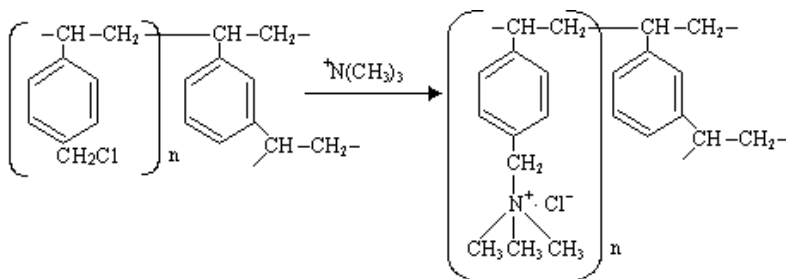
При синтезе ионитов методом поликонденсации чаще получают полифункциональные иониты, содержащие несколько функциональных групп. По реакции поликонденсации п-фенолсульфакислоты с формальдегидом получают универсальный катионит КУ-1:



Чтобы получить аниониты, сополимеры стирола и дивинилбензола сначала хлорметилируют, например, монохлоридметилловым эфиром с хлоридом цинка в качестве катализатора:



Полимерное хлорметильное производное взаимодействует с триметиламином с образованием сильноосновного анионита:



На основе сополимеров стирола и дивинилбензола можно синтезировать еще ряд ионитов с фосфониевыми, иминодиацетильными, тиольными и другими функциональными группами. Относительно недавно в хроматографии начали использовать ионообменные полимеры типа оксиалкилметакрилатного геля с макропористой гидрофильной матрицей. Их можно применить в жидкостной хроматографии при высоком давлении для разделения биополимеров.



Рис. 6.2. Изображение структуры частицы ионообменной смолы: ● – заряженные функциональные группы; ○ – свободно перемещающиеся противоположно заряженные ионы, электростатически связанные с частицей смолы, способные претерпевать обмен с другими ионами.

Иониты состоят из нерастворимого полимерного сетчатого («сшитого») каркаса (или матрицы), связанного с положительно или отрицательно заряженными ионогенными группами, заряд которых компенсируется подвижными противоионами, способными обмениваться на ионы раствора с зарядом того же знака (рис. 6.2). Если между ионообменником и раствором происходит обмен анионов, иониты называют *анионообменником* (*анионитом*), при обмене катионов – *катионитом*.

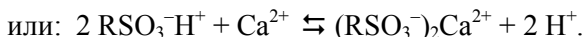
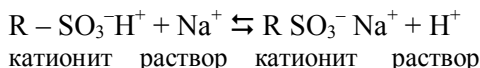
Таким образом, ионит – это полиэлектролит с каналами и порами. Ионообменники нерастворимы в воде, но, если сухой ионообменник поместить в воду, он будет ее поглощать. Причиной набухания является наличие в структуре ионообменников гидрофильных ионообменных групп. Чем их больше, чем выше емкость сорбента, тем более он склонен к набуханию. Набухание зависит не только от числа ионогенных групп, но и от их природы, степени ионизации, заряда противоиона, концентрации внешнего раствора (чем она меньше, тем больше набухание). Конечно, чем больше плотность матрицы (т.е. содержание ДВБ), тем меньше набухание ионообменника.

Химические формулы катионитов могут быть схематически изображены следующим образом: RSO_3^-H^+ , $\text{RSO}_3^-\text{Na}^+$ (или просто RH , RNa). В первом случае говорят, что катионит находится в H -форме, во втором – в Na -форме. R – полимерная часть катионита, $-\text{SO}_3\text{Na}$ – ионогенные группы, где $-\text{SO}_3^-$ – фиксированный ион, H^+ , Na^+ – противоионы.

Ионогенные группы прочно связаны с матрицей ионообменника. Противоионы же (в наших примерах Na^+ и H^+) по-

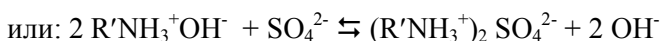
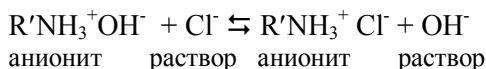
движны внутри матрицы и могут обмениваться на ионы того же знака, находящиеся в растворе (рис. 6.1).

Катионообменные реакции записываются как обычные химические гетерогенные реакции:



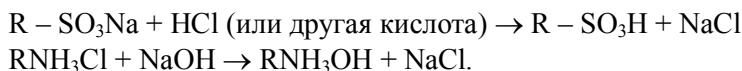
Химические формулы анионитов могут быть схематично изображены так: $\text{R}'\text{NH}_3^+ \text{OH}^-$ или $\text{R}'\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$. В первом случае анионообменник находится в OH-форме, во втором – в Cl-форме. R' – полимерная матрица анионита. $-\text{NH}_3^+ \text{OH}^-$, $\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$ – ионогенные группы, где $-\text{NH}_3^+$ – фиксированный ион, OH^- , Cl^- – противоионы.

Анионообменные реакции можно записать следующим образом:



Таким образом, матрица катионита является полианионом, а матрица анионита – поликатионом. Ионообменники, содержащие одностипные (например, $-\text{SO}_3$) кислотные (основные) группы, называют монофункциональными; ионообменники, содержащие разностипные (например, $-\text{SO}_3\text{H}$ и $-\text{OH}$) кислотные (основные) группы, – полифункциональными.

Процесс ионного обмена обратим. Отработанные катиониты и аниониты можно регенерировать, т.е. перевести поглощенные ионообменником ионы в раствор:



Известны *амфотерные* иониты, которые содержат в своей структуре и кислотные, и основные группы. Эти иониты способны образовывать внутренние соли, которые диссоциируют в контакте с электролитами и связывают оба их компонента. Их легко регенерировать, промывая водой.

По степени диссоциации ионогенных групп различают следующие группы ионитов:

- катиониты:

- сильнокислотные с сульфогруппой $-\text{SO}_3\text{H}$;

- среднекислотные с фосфиновой группой $-\text{PO}_3\text{H}_2$;

- слабокислотные с карбоксильной группой $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}$ или группой $-\text{OH}$ (фенольной);

- аниониты:

- сильноосновные с группами четвертичных аммониевых оснований $-\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$;

- среднеосновные с группой $\equiv\text{N}$;

- слабоосновные с группами $=\text{NH}$, $-\text{NH}_2$.

Также выделяется классификация ионитов по принципу их деления только на сильнокислотные и слабокислотные и анионитов – только на сильноосновные и слабоосновные. Характер ионогенных групп легко определить потенциометрическим титрованием ионитов щелочью или кислотой. Кривые титрования аналогичны кривым титрования растворимых сильных, слабых кислот (оснований) или их смесей.

Проблема селективности действия ионообменных смол является важной в аналитической химии и в промышленности. Сильнокислотные и сильноосновные ионообменные смолы вступают в реакции обмена с любыми ионами раствора при условии одноименности знака заряда. Поэтому они получили название *универсальных ионообменников*. Однако имеются многочисленные возможности синтеза ионообменников селективного действия.

Одним из способов достижения селективного действия ионообменника является изменение числа поперечных связей в матрице. Путем варьирования длины и частоты расположения поперечных связей в матрице ионообменника можно создавать

«ионитовые сита», проницаемые для одних ионов и не проницаемые для других. Другой путь достижения селективности действия – это получение таких ионообменников, которые способны к селективным химическим реакциям, например к реакциям комплексообразования.

Значительно большей селективностью обладают ионообменники при переводе их в форму хелатообразующих органических реагентов, например ЭДТА, ализарина, хромотроповой кислоты и т.п. Такие модифицированные ионообменники применяют для разделения, преимущественно для концентрирования и непосредственного определения в концентрате малых количеств неорганических веществ. В настоящее время производится большое число органических ионообменных смол, обладающих различными свойствами.

Таблица 6.1

Характеристика некоторых ионообменных смол

Тип	Марка	Активные группы	Обменная емкость, ммоль/г
Катиониты Сильнокислотные	КУ-1	–SO ₃ H	4,5
	КУ-2	–SO ₃ H	4,8
	КУ-6	–SO ₃ H; –COOH	5,5
	НСФ	–SO ₃ H	3,0
	СДВ	–SO ₃ H	4,2
	Дауэкс-50	–SO ₃ H	4,0
	Амберлит 1 120	–SO ₃ H	4,5
	Амберлит 200	–SO ₃ H	5,0
Слабокислотные	КБ-4	–COOH	8,50–9,5
	КН	–COOH	6,0
	КМ	–COOH	7,5
	Амберлит 1 С-50	–COONa	10,0
	Дуолит СС-3	–COONa	7,0

Тип	Марка	Активные группы	Обменная емкость, ммоль/г	
Аниониты Сильноосновные	АВ-17	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	4,3	
	АВ-18	$-\text{N}^+ \text{C}_6\text{H}_5$	3,0	
	АВ-19	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3,0	
	Дауэкс-1	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	3,2	
	Амберлит IR А-40	$-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$	3,0	
	Слабоосновные	АН-18	$\equiv\text{N}; =\text{NH}$	3,6
		Дауэкс-3	$-\text{N}^+\text{H}(\text{R}_2)\text{Cl}^-$	5,5
		Амберлит 1-45	$-\text{NH}_2$	6,8
		ЭДЭ-10п	$-\text{NH}_2; =\text{NH}$	8,5–10
		АН-2Ф	$=\text{NH}; \equiv\text{N}$	10,6
		АН-9	$=\text{NH}; \equiv\text{N};$	4,5
		ММГ-1	$=\text{NH}; \equiv\text{N}$	3,8
		АН-10	$-\text{NH}_2$	14,0

Ионообменные мембраны. Большинство ионообменных мембран представляют собой гомогенные и гетерогенные смеси, состоящие из ионообменных веществ и инертной более пластичной смолы. Например, в подходящем растворителе растворяют смесь линейной полистиролсульфоокислоты и сополимера винилхлорида и акрилонитрила. Затем растворитель выпаривают до образования тонкой гомогенной пленки обоих полимеров. По-видимому, цепи этих полимеров настолько тесно переплетаются между собой, что сульфированный линейный полимер не растворяется в воде. Аналогично можно приготовить гомогенные анионообменные мембраны.

Гетерогенные ионообменные мембраны получают смешением тонкоизмельченной смолы любого типа с гетерогенным материалом, например полиэтиленом, и последующим формированием из смеси пленки желаемой толщины (0,1–0,6 мм) при нагревании и под давлением. В последнее время синтезировано много видов ионообменных мембран на основе отечественных ионитов КУ-2, СДВ, АВ-17, ЭДЭ-10П с каучуком, полиэтиленом, полихлорвинилом. Эти мембраны находят применение для

частичного опреснения воды, для разделения элементов, для очистки слабых электролитов и неэлектролитов от примесей катионов и анионов и для других целей.

Так как ионообменные мембраны состоят целиком или в значительной мере из ионообменного материала, они напоминают ионообменные смолы по многим свойствам. При погружении в воду сухая ионообменная мембрана набухает. В растворе электролита набухаемость меньше, чем в воде. Если в растворе содержится катион (или анион), отличающийся от обмениваемого иона мембраны, то между раствором и мембраной произойдет ионный обмен. В случае же, если катион или анион раствора одинаков с обмениваемым ионом смолы, происходит доннановское поглощение. При сорбции воды, ионном обмене или доннановском поглощении равновесие в ионообменной мембране устанавливается медленнее, чем в шариках смолы, так как диффузия должна произойти на больших расстояниях. Полупроницаемость или избирательная проницаемость мембран выражается в их способности при контакте с раствором электролита пропускать через себя только ионы одного знака и служить барьером для ионов противоположного знака.

Обменная емкость. К важнейшим свойствам ионообменников относятся их обменная емкость. Каждый ионообменник содержит определенное число фиксированных ионов. Число таких ионов в единице массы (объема) ионообменника характеризует его обменную емкость, которую принято выражать в миллимолях обменивающегося иона на грамм сухого ионообменника в водородной (для катионообменников) или хлоридной (для анионообменников) форме. Иногда емкость выражают также в моль на 1 мл слоя полностью набухшего ионообменника в H- или Cl-форме. Для наиболее распространенных в ионообменной хроматографии смол обменная емкость составляет 3–5 ммоль/г или 1–2 ммоль/мл. Максимальное количество ионов, которое может связать ионообменник, определяется его теоретической емкостью, последняя совпадает с содержанием в ионообменнике ионогенных групп.

Различают полную обменную емкость ПОЕ, статическую обменную емкость СОЕ, динамическую обменную емкость ДОЕ

и полную динамическую обменную емкость ПДОЕ. Полная обменная емкость ионита является величиной постоянной и определяется количеством фиксированных ионов в матрице ионита. Поэтому в идеальных условиях обменная емкость не зависит от состояния ионита и природы противоиона, а лишь от природы самого ионита. В реальных условиях она зависит от ряда факторов, в частности от pH раствора. При *статическом способе* определения обменной емкости определенную навеску ионообменника помещают в электролит с известной концентрацией и через несколько часов определяют количество поглощенных ионов. Но при этом, как правило, полного поглощения ионов из раствора не происходит за счет обратимости процесса ионного обмена.

Обменная емкость, определяемая в *динамических условиях* (исследуемый раствор пропускают через слой катионита), выражается двумя показателями:

- рабочая обменная емкость, или динамическая обменная емкость до проскока (ДОЕ), характеризуется емкостью сорбента до появления первой порции обмениваемого иона в фильтрате;
- полная динамическая обменная емкость (ПДОЕ) определяется по полному насыщению ионита в колонке данным ионом.

Большое практическое значение имеют постоянство емкости сильноокислых и сильноосновных ионообменников и ее практическая независимость от pH раствора, а также от природы противоионов. Напротив, емкость у ионообменников со слабокислотными и слабоосновными группами зависит от pH. Слабокислотные катионообменники, содержащие карбоксильную ($-\text{COOH}$) или фенольную ($-\text{OH}$) группу, способны к ионному обмену только в щелочной среде. В кислой и нейтральной среде их обменная способность невелика. Слабоосновные анионообменники обменивают анионы только в кислой среде.

При исследовании смеси элементов разных групп периодической системы разделение при помощи элюирования растворами электролитов облегчается тем, что элементы разной валентности обладают различным сродством к иониту, так как сорбируемость ионов возрастает от одновалентных к двух- и трехвалентным.

Равновесие ионного обмена. Равновесие ионного обмена мы рассмотрим на примере сильнокислотного (например, содержащего $-\text{SO}_3\text{H}$ -группы) ионообменника. Пусть он исходно содержит катионы A^+ (например, H^+), которые обмениваются с находящимися в растворе катионами B^+ (например, Na^+):



(черта над символом иона означает твердую фазу ионообменника).

При постоянных условиях эксперимента (степень заполнения ионообменника ионами того или иного вида, концентрация посторонних электролитов в растворе и т.д.) константу равновесия ионного обмена можно записать в форме условной константы K , называемой в этом случае *коэффициентом селективности*:

$$K_{A^+, B^+} = \frac{[A^+][\overline{B}^+]}{[\overline{A}^+][B^+]}. \quad (6.1)$$

Величина коэффициента селективности зависит от следующих факторов.

- С уменьшением степени сшивки ионообменника коэффициент селективности приближается к единице.
- Коэффициент селективности зависит от степени заполнения ионообменника. При прочих равных условиях преимущественно поглощается тот ион, содержание которого в ионообменнике *меньше*.
- С увеличением температуры коэффициенты селективности, как правило, уменьшаются.
- При обмене ионов разной величины заряда из разбавленных растворов преимущественно поглощается ион с большим зарядом, из концентрированных – с меньшим зарядом.

Рассмотренные применительно к экстракционному процессу величины коэффициентов распределения и разделения (см. разд. 3) можно использовать и для характеристики ионного равновесия. Коэффициент распределения ионов A^+ между ионообменником и жидкой фазой равен:

$$D_{A^+} = \frac{[\bar{A}^+]}{[A^+]}. \quad (6.2)$$

Коэффициент разделения ионов А и В равен:

$$T_{A^+, B^+} = \frac{D_A}{D_B}. \quad (6.3)$$

Для сильнокислотных и сильноосновных ионообменников на основе полистирола закономерности изменения коэффициентов распределения ионов можно объяснить на основе представлений об электростатических взаимодействиях. Так, для сильнокислотных катионообменников коэффициенты распределения уменьшаются с уменьшением заряда иона в ряду

$$D_{Th^{4+}} > D_{Al^{3+}} > D_{Ca^{2+}} > D_{Na^+}.$$

Для ионов одинакового заряда сродство к ионообменнику уменьшается с увеличением радиуса гидратированного иона:

$$D_{Cs^+} > D_{Rb^+} > D_{K^+} > D_{Na^+} > D_{H^+} > D_{Li^+}.$$

Для зависимости селективности сильноосновных анионообменников от заряда и радиуса ионов справедливы те же закономерности. Преимущественно сорбируются легко поляризующиеся ионы:

$$D_{ClO_4^-} > D_{SCN^-} > D_{I^-} > D_{NO_3^-} > D_{Br^-} > D_{Cl^-} > D_{OH^-} > D_{F^-}.$$

Можно наблюдать обращение ряда с изменением условий проведения ионного обмена. Для решения практических задач варьируют условия разделения (концентрацию, pH, ионную силу раствора, присутствие органического растворителя).

6.1.1. Ионная хроматография

В ионной хроматографии ионный обмен осуществляется в условиях высокоэффективной жидкостной хроматографии. Это экспрессный метод определения органических и неорганических ионогенных соединений, сочетающий ионообменное разделение с высокочувствительным кондуктометрическим детектированием. Последнее возможно только при низкой фоновой электропроводности. Используют двух- и одноколоночный варианты.

В одноколоночном варианте ионной хроматографии применяют элюенты с очень низкой электропроводностью, чаще всего растворы солей органических кислот (бензойной, сульфаниловой, янтарной, лимонной). В этом случае компенсационная колонка не используется и кондуктометрический детектор присоединяют непосредственно к разделяющей колонке. В качестве элюентов применяют ароматические кислоты или их соли, pH элюентов изменяется от 3 до 8. Используют и другие детекторы, например спектрофотометрический, люминесцентный, полярографический – в этом одно из преимуществ одноколоночного варианта. Однако пределы обнаружения ионов в одноколоночном варианте ионной хроматографии обычно выше, чем в двухколоночном, а линейность градуировочного графика находится в более узком интервале.

Особенностью двухколоночного варианта является наличие системы подавления и кондуктометрического детектора (рис 6.3).

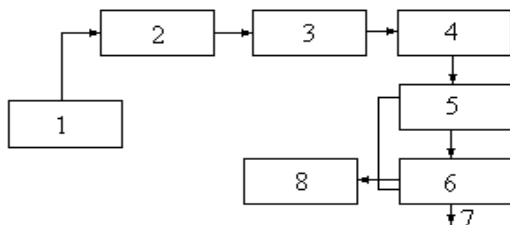
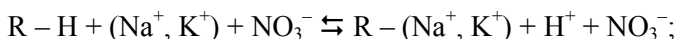


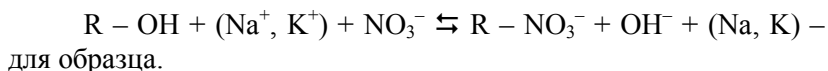
Рис. 6.3. Система двухколоночной ионохроматографической системы:
 1 – элюент; 2 – насос; 3 – кран для ввода пробы; 4 – разделяющая колонка со смолой малой емкости; 5 – компенсационная колонка со смолой большой ёмкости (подавляющая система); 6 – кондуктометрическая ячейка; 7 – сброс;
 8 – регистратор

Элюент с помощью насоса под давлением через систему ввода подается в разделяющую колонку. Давление в системе, как правило, не превышает 10 МПа. При определении катионов разделяющую колонку заполняют катионообменником низкой емкости, а при определении анионов колонку заполняют анионообменником низкой емкости. Разделенные в колонке ионы вместе с элюентом попадают в подавляющую систему (компенсационную колонку, заполненную анионообменником большой емкости при определении катионов и катионообменником большой емкости при определении анионов), а затем в кондуктометрический детектор. Подавляющая система предназначена для получения максимального различия между кондуктометрическими сигналами определяемого иона и элюента. Например, при определении катионов щелочных металлов (Na^+ , K^+) в качестве элюента используют разбавленный раствор азотной кислоты. Разделяющая колонка заполнена катионообменником в H-форме, подавляющая колонка – анионообменником высокой емкости в OH-форме. На колонках устанавливаются следующие равновесия:

разделяющая колонка:



подавляющая (компенсационная) колонка:

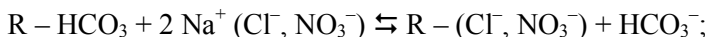


Катионы щелочных металлов детектируют в виде гидроксидов, имеющих высокую электропроводность на фоне деионизированной воды, что обеспечивает максимальную чувствительность определения.

Наиболее распространенными элюентами для определения анионов являются разбавленные растворы солей угольной кислоты (NaHCO_3). Анионит в разделяющей колонке находится

в HCO_3^- – форме. Компенсационной системой служит колонка, заполненная катионообменником высокой емкости в H^+ -форме, тогда на колонках устанавливаются следующие равновесия:

разделяющая колонка:



компенсационная колонка:

$\text{RSO}_3\text{--H} + \text{Na}^+ + \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{RSO}_3\text{--Na} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ – для элюента

$\text{RSO}_3\text{--H} + \text{Na}^+ + (\text{Cl}^-, \text{NO}_3^-) \rightleftharpoons 2\text{RSO}_3\text{--Na} + \text{H}^+ + (\text{Cl}^-, \text{NO}_3^-)$ – для образца.

Определяемые анионы попадают в кондуктометрический детектор в виде сильных кислот (HCl , HNO_3), имеющих высокую электропроводность на фоне слабой угольной кислоты. Типичные хроматограммы смесей неорганических анионов и катионов приведены на рис 6.4, 6.5.

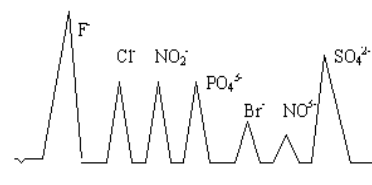


Рис 6.4. Хроматограмма неорганических анионов с карбонатным элюентом

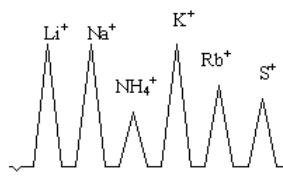


Рис. 6.5. Хроматограмма катионов с азотнокислым элюентом

В первых ионных хроматографах предусматривалось очередное определение анионов или катионов в соответствующих системах. Современные приборы снабжаются двумя системами детектирования и несколькими насосами. Это позволяет одновременно анализировать катионы и анионы, а также разделять анионы сильных и слабых кислот. Предусмотрена также возможность автоматического регенерирования отработавших

компенсационных колонок. Продолжительность регенерации и промывки можно задавать соответствующими переключателями.

Для автоматического определения ионов после их разделения в колонке используют проточные детекторы. Кондуктометрический детектор универсален (неселективен), поскольку все ионы, находящиеся в растворе, проводят электрический ток. Спектрофотометрический, потенциометрический, амперометрический детекторы являются селективными, т.к. они реагируют только на определенные ионы.

Кондуктометрический детектор. Если к двум электродам, находящимся в растворе электролита, приложено напряжение, то в растворе возникает электрический ток, а проводящая среда имеет электрическое сопротивление. На измерении этого сопротивления основан принцип действия большинства кондуктометрических детекторов. Детектор состоит из индикатора, системы регистрации кондуктометрического сигнала и проточной ячейки, в которую подается анализируемый раствор. Индикатор градуируется в единицах См (мкСм). Кондуктометрическая ячейка представляет собой камеру объемом менее 10 мкл, соединенную с двумя электродами, изготовленными из платины, золота, нержавеющей стали или другого инертного проводящего материала. Сопротивление ячейки, как правило, измеряют с помощью моста сопротивлений Уитстона.

Электропроводность большинства растворов возрастает примерно на 2 % при увеличении температуры на 1 °С. Поэтому в кондуктометрических детекторах предусмотрена температурная компенсация. Осуществляют ее с помощью термистора и компенсационной схемы, в которой сопротивление линейно меняется с изменением температуры раствора. Полезно изолировать ячейку детектора, чтобы предотвратить случайные колебания ее температуры.

Кондуктометрические детекторы включают средства компенсации фонового сигнала, который может на три порядка превышать сигнал от образца. Компенсацию можно осуществить с помощью дифференциальной схемы измерения, включающей ячейку сравнения. Однако в большинстве современных кондуктометрических детекторов фоновый сигнал компенсируют с по-

мощью электронной схемы, что позволяет использовать только одну ячейку.

Помимо кондуктометрического детектора используют потенциометрические, амперометрические и кулонометрические. Определение ионов *потенциометрическим* детектором осуществляется с помощью ионоселективных электродов.

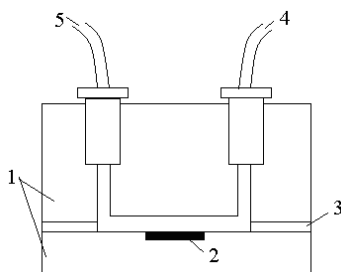


Рис. 6.6. Амперометрический детектор со стеклоуглеродным рабочим электродом: 1 – тефлон; 2 – рабочий электрод; 3 – тефлоновая прокладка

Амперометрические детекторы (рис. 6.6) применяют для определения электроактивных веществ, способных окисляться или восстанавливаться на электродах. Возникающий ток электролиза фиксируется в детекторе. Наряду с амперометрией для детектирования электроактивных частиц в хроматографии используют *кулонометрию* при постоянном потенциа-

ле. Ячейка потенциостатического кулонометрического детектора сходна с ячейкой амперометрического детектора с твердым электродом.

Для автоматической регистрации ионообменного разделения могут применяться и другие типы детектирующих устройств. Чаще всего их используют в специальных случаях разделения.

6.2. Аппаратура для колоночной жидкостной хроматографии

Разделение веществ методом колоночной жидкостной хроматографии может осуществляться либо с применением специально сконструированных приборов – жидкостных хроматографов, либо так называемым классическим методом. В классическом варианте колонки заполняют неподвижной фазой, и по-

движная фаза (элюент) перемещается вдоль слоя сорбента под влиянием силы тяжести (гравитационная хроматография).

Типичная колонка *в классическом варианте хроматографии* представляет собой трубку из стекла, политетрафторэтилена, полиэтилена длиной 10–30 см и диаметром 1–2 см. Колонки заполняют гранулированным носителем или сорбентом с частицами диаметром 70–140 мкм. Элюент пропускают со скоростью 1–3 мл/мин (вариант М.С. Цвета). Классическая жидкостная хроматография – длительный процесс, поскольку скорость продвижения подвижной фазы мала.

При повышении скорости потока не успевает установиться равновесие между фазами, которое определяется диффузией вещества, протекающей в жидкостях очень медленно. Чтобы свести к минимуму влияние диффузии и ускорить массообмен между фазами, гранулы носителя должны быть как можно меньше. Однако гидравлическое сопротивление в таких колонках велико, и для увеличения скорости движения подвижной фазы вдоль слоя сорбента и уменьшения времени анализа элюент подают в колонку жидкостного хроматографа с помощью насоса под давлением.

Применение колонок с малым диаметром и малым размером зерен носителя, проведение процесса разделения под высоким давлением позволило улучшить массообмен между подвижной и неподвижной фазами. В результате на таких колонках удалось существенно (в десятки и сотни раз) увеличить эффективность разделения. Такой метод хроматографии называют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), или жидкостной хроматографией высокого давления (ЖХВД). В ВЭЖХ жидкую подвижную фазу пропускают через колонку под давлением от 0,5–70 МПа со скоростью в 100 раз выше, чем в обычной классической жидкостной хроматографии.

В связи с высокой плотностью жидких подвижных фаз и большим сопротивлением колонок газовая и жидкостная хроматография сильно различаются по аппаратному оформлению. Блок-схема жидкостного хроматографа приведена на рис. 6.7. В нее входит система подачи подвижной фазы, называемой в жидкостной хроматографии элюентом. Она снабжена приспособлением для программирования скорости подачи не менее двух растворителей, хотя иногда бывает нужно подавать три или даже четыре. Для создания потока чистого растворителя (или смесей растворителей) используются насосы, входящие в гидравлическую систему хроматографа, которая состоит из насоса, дозатора, колонки и детектора. Известны два принципиально различных типа насоса: постоянного давления и постоянного расхода. Первый тип насоса поддерживает установленное постоянное давление на входе в колонку, а расход определяется ее сопротивлением. Второй тип насоса поддерживает постоянный расход элюента, а давление на входе в колонку определяется ее сопротивлением.



Рис. 6.7. Блок-схема жидкостного хроматографа

Применяемый насос должен обеспечивать подачу растворителя со скоростью от 10 мкл/мин для колонок малого диаметра и до 5 мл/мин для широких колонок. При этом насос должен развивать давление до 50 МПа. Резервуар с растворителем, программное устройство и насос обычно объединяются в одном блоке. Насос подает подвижную фазу через кран-дозатор с дозируемым объемом 0,1–100 мкл и больше. В случае необходи-

мости прибор снабжается также автоматической системой ввода пробы.

Простейший способ ввода пробы, как и в газовой хроматографии, использование микрошприца, вводимого через самоуплотняющуюся эластичную мембрану. Обычно шприцы используются при давлении на входе в колонку до 10 МПа. При более высоких рабочих давлениях используются либо специальные шприцы высокого давления, либо ввод с остановкой потока. В этом случае насос отключают и ждут, когда давление на входе в колонку снизится до атмосферного. Пробу вводят обычным путем с помощью шприца, после чего вновь включают насос высокого давления. Широкое распространение получили системы ввода пробы с помощью вращающегося крана.

Колонки. Узел ввода пробы присоединяется к колонке, которую обычно термостатируют посредством жидкого теплоносителя с большой теплоемкостью. В некоторых случаях колонку не термостатируют. Практически идеальными колонками для ВЭЖХ являются колонки, равномерно заполненные очень мелкими и однородными частицами сорбента. Эффективность таких колонок может достигать 100000 теоретических тарелок, что сравнимо с эффективностью капиллярных колонок в газовой хроматографии. В ВЭЖХ колонки чаще изготавливают из нержавеющей стали, которая способна выдерживать давление более 70 МПа. Внутренний диаметр колонки составляет 4–5,5 мм, длина колеблется от 0,2 до 1 м в зависимости от сложности разделения. В микроколоночных хроматографах используют колонки длиной 5–6 м и диаметром 1–2 мм. Выход колонки соединен с детектором, снабженным электронным усилителем.

В жидкостно-жидкостной хроматографии колонку заполняют твердым инертным носителем, на поверхность которого наносят тонкий слой неподвижной фазы. Наиболее распространены носители двух типов: пористые и поверхностно-пористые. В пористых носителях скапливаются подвижная и неподвижная фаза, а это замедляет установление равновесия и существенно расширяет пики разделяемых веществ. Поверхностно-пористые носители представляют собой небольшие твердые шарики, на поверхность которых наносится пористый слой адсорбента.

Нанесенные неподвижные фазы имеют большой недостаток: они быстро смываются подвижной жидкой фазой с поверхности носителя: особенно при повышенном давлении в колонке. По этой причине используют привитые к носителю жидкие фазы. В качестве носителей в нормально-фазовой распределительной хроматографии применяют силикагели с привитыми нитрильными, аминными и другими группами. В обращенно-фазовой распределительной хроматографии используют силикагели с привитыми группами от C_1 до C_{22} .

Основными сорбентами для адсорбционной молекулярной ВЭЖХ служат силикагели различных марок (бондпак, порасил, сепарон, силасорб, сферисорб и др.) Силикагель часто используют в качестве матрицы для создания модифицированных сорбентов (привитые к силикагелю алкильные, фенильные, октадецильные и др. группы). Природа этих активных функциональных групп на поверхности сорбента определяет селективность процесса разделения, а размер частиц, их фракционный состав (близость к монодисперсному распределению) и характер упаковки частиц сорбента определяют эффективность процесса разделения. Используют также оксид алюминия, углеродные сорбенты, полимеры, содержащие ионогенные и комплексообразующие группы, способные к специфическому взаимодействию с биологически активными веществами.

Элюенты. В отличие от газовой хроматографии, в которой подвижная фаза химически инертна и выполняет лишь роль переносчика, в жидкостной хроматографии между компонентами подвижной фазы и молекулами разделяемых веществ наблюдаются достаточно сильные физико-химические взаимодействия. Поэтому выбор подвижной фазы является очень важным элементом в разработке любой жидкостно-хроматографической методики.

Выбор подвижной фазы зависит не только от типа адсорбента, но и от природы разделяемых веществ. Элюентом может служить чистый растворитель или смесь растворителей, которые в заметной степени не смешиваются с подвижной фазой. В некоторых случаях разделение улучшается, если элюирование проводят рядом различных растворителей. Из теории хромато-

графии известно, что разрешение хроматографических пиков зависит от числа теоретических тарелок N , коэффициента емкости k' и коэффициента селективности α (разд. 3). Величины k' и α можно изменять посредством выбора соответствующей подвижной фазы, при этом наибольшую роль играет ее полярность.

Общая схема действий при выборе хроматографических фаз такова. Сначала выбирают неподвижную фазу – такую, чтобы она была близка по полярности к разделяемым веществам. Затем подбирают подвижную фазу так, чтобы коэффициенты емкости разделяемых веществ по возможности находились в пределах от 2 до 5. Необходимо учитывать, что если полярности неподвижной и подвижной фаз близки, то времена удерживания оказываются слишком маленькими. Наоборот, если фазы сильно различаются по полярности, времена удерживания будут слишком велики.

В качестве элюентов при хроматографическом разделении, используют около 25 различных растворителей (вода, ацетонитрил, бензол, толуол, спирты C_1 – C_3 , диметилформамид, диоксан, эфиры, хлоруглеводороды и др.) или их смеси. В подвижной фазе не должно быть механических примесей, которые могут отрицательно сказаться на работе насоса. Растворитель должен быть «прозрачен» в избранной спектральной области используемого детектора. Например, при работе с УФ-детектором растворитель не должен поглощать в области 190–220 нм.

Чаще других растворителей в ВЭЖХ применяют воду, метанол, этанол или изопропанол, ацетонитрил, диэтиловый эфир, диоксан, тетрагидрофуран, хлороформ, а также алканы. При этом должны использоваться очень чистые растворители специальной квалификации – «для жидкостной хроматографии» или «для спектроскопии».

В жидкостной хроматографии используют изократический или градиентный режим элюирования. В *изократическом режиме* через колонку непрерывно пропускают подвижную фазу постоянного состава. При *градиентном режиме* состав подвижной фазы изменяют согласно специально задаваемой программе, что часто приводит к лучшему разделению компонентов.

Детекторы. Подобно детектору в ГХ, сигнал детектора жидкостного хроматографа также пропорционален концентрации определяемого компонента, элюируемого из колонки в потоке подвижной фазы. Этот сигнал подается на аналого-цифровой преобразователь, а затем на компьютер, к которому обычно подключается печатающее устройство.

Наиболее распространенными детекторами в жидкостной хроматографии являются оптические, среди которых различают следующие:

- абсорбционные, работающие в ультрафиолетовой области спектра (190–380 нм) (УФД);
- абсорбционные для видимой области спектра (380–800 нм) (ВД);
- инфракрасные детекторы (800–5000 нм) (ИКД);
- рефрактометрические различных типов (РМД);
- эмиссионные, флуориметрические различных конструкций (ФМД);
- хемилюминесцентные (ХЛД);
- электрохимические;
- масс-спектрометрические.

Принцип действия *фотометрических абсорбционных детекторов* (УФД, ВД, ИКД) основан на измерении поглощения (абсорбции) излучения в ультрафиолетовой, видимой или инфракрасной областях спектра. Это связано с тем, что большинство химических соединений имеют достаточно интенсивные полосы поглощения в диапазоне длин волн 200–5000 нм.

Принцип действия *рефрактометрических детекторов* основан на дифференциальном измерении показателя преломления растворителя и раствора анализируемого вещества в этом растворителе. С помощью РМД можно анализировать любые вещества независимо от их температуры кипения, структуры, молекулярной массы и других физико-химических свойств. Единственным серьезным недостатком этого детектора является его нечувствительность к веществам, имеющим одинаковый показатель преломления с растворителем.

Принцип действия *флуориметрического детектора* основан на измерении излучения в виде флуоресценции после по-

глощения света. Поглощение обычно проводят в УФ-области спектра при длине волны максимального поглощения для данной группы веществ, а излучение фиксируют через фильтр, не пропускающий лучи возбуждения. Длина волны флуоресцентного излучения всегда выше длины волны поглощенного света. С помощью ФМД можно детектировать аминокислоты, амины, витамины, стероиды и другие флуоресцирующие соединения.

Электрохимический детектор (ЭХД). В последние годы увеличился выпуск электрохимических детекторов. Работа ЭХД основана на определении электрохимических свойств соединений в потоке элюента: проводимости (кондуктометрические детекторы), емкостного сопротивления (высокочастотные детекторы), разности потенциалов ион-селективного и сравнительного электродов (потенциометрические детекторы), реакционной способности к окислению или восстановлению на электроде (вольтамперометрические, полярографические и кулонометрические детекторы). Преимуществами ЭХД являются высокая чувствительность и селективность, причем имеется возможность регулирования селективности путем выбора режимов работы детекторов, замены или модифицирования электродов. ЭХД используется для селективного определения витаминов, наркотиков, лекарственных препаратов, при исследовании загрязнений окружающей среды ввиду его высокой чувствительности и селективности к фенолам, бензидинам, нитросоединениям, ароматическим аминам и пестицидам.

В *масс-спектрометрических детекторах* компоненты превращаются в ионизированные частицы и в газовой фазе разделяются в соответствии с их массовыми числами. Все чаще в жидкостной хроматографии применяют газохроматографические детекторы, такие как электрозахватный, пламенно-ионизационный, термоионный и пламенно-фотометрический (см. разд. 5.1).

Применяемые в настоящее время хроматографические детекторы еще далеки от совершенства, особенно с точки зрения использования их в автоматических хроматографах. Существуют три направления развития хроматографических детекторов: совершенствование ранее предложенных методов детектирова-



Рис. 6.8. Жидкостный хроматограф

ния в целях улучшения чувствительности, линейности и других параметров; разработка новых методов детектирования; комбинирование различных методов с получением нового качества или нового принципа детектирования. Большинство фирм, выпускающих жидкостные хроматографы (рис. 6.8), включают в состав приборов три-четыре детектора.

Качественный и количественный анализ. В жидкостной хроматографии с применением детекторов непрерывного действия используются те же принципы, что и в газовой хроматографии. Качественные определения проводят по величинам удерживания, а количественные – по высотам или площадям пика на хроматограммах (см. разд. 5.3).

7. Плоскостная бумажная и тонкослойная хроматография

К плоскостным видам хроматографии относят бумажную (БХ) и тонкослойную (ТСХ). Эти два вида жидкостной хроматографии просты по технике выполнения, экспрессны, не требуют дорогостоящего оборудования. Разделение этими методами может быть выполнено с использованием различных хроматографических систем, поэтому выделяют адсорбционную, распределительную, обращенно-фазовую и ионообменную БХ и ТСХ. Тонкослойную хроматографию используют чаще, чем бумажную. Бумажная и тонкослойная хроматографии сходны по технике выполнения анализа. В обоих методах используют хроматографические системы «жидкость – твердый сорбент» и «жид-

кость – жидкость – твердый сорбент», причем в качестве подвижной фазы используют различные растворители или их смеси, органические или неорганические кислоты. Хроматографическое разделение в плоскостных видах хроматографии, как и в колонке, обусловлено переносом компонентов подвижной фазы вдоль слоя неподвижной фазы с различными скоростями в соответствии с коэффициентами распределения разделяемых компонентов.

Бумажная хроматография по механизму разделения может быть распределительной, молекулярно-адсорбционной, осадочной, ионообменной и окислительно-восстановительной.

Для хроматографических целей применяют специальную бумагу, к которой предъявляются следующие требования: бумага должна быть химически чистая, однородная по плотности, с волокнами одинаковой длины, химически и адсорбционно-нейтральная; она должна обеспечивать нужную скорость движения растворителя. Для осадочной, ионообменной и окислительно-восстановительной хроматографии применяют бумагу, содержащую вещества, способные к соответствующим химическим взаимодействиям с компонентами разделяемой смеси. Выпускаемые в России сорта хроматографической бумаги № 1, 2, 3, 4 характеризуются разной плотностью. С увеличением номера возрастает плотность бумаги, а чем выше плотность, тем ниже скорость хроматографирования. Хроматографическая бумага, вырабатываемая промышленностью, сравнительно однородна и устойчива. Для четкого разделения необходимо, чтобы направление движения растворителя совпадало с направлением волокон. В любом случае хроматографирования бумага должна содержать достаточное количество неподвижной фазы, на которой производится разделение. Бумажная хроматография по технике выполнения может быть восходящая и нисходящая, одномерная (линейная) и двухмерная, кольцевая и радиальная.

При проведении *восходящей линейной бумажной хроматографии* на полоску бумаги (рис. 7.1) длиной 30–50 см и шириной 4,5–5 см на расстоянии 2–3 см от нижнего края бумаги наносят одну или несколько капель исследуемого раствора с интервалом 1–2,5 см. Пятно подсушивают и бумагу погружают

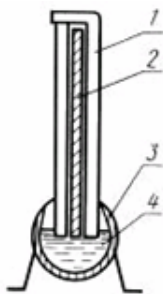


Рис. 7.1. Восходящая бумажная хроматография: 1 – полоска бумаги; 2 – компоненты разделяемой смеси; 3 – исходная смесь веществ (X); 4 – линия старта; 5 – подвижная фаза; А, В, С – вещества-стандарты

нижним концом в растворитель таким образом, чтобы место, где нанесены капли раствора (стартовая линия), оставалось несколько выше поверхности растворителя. Верхний конец бумаги закрепляют на стеклянной палочке зажимами.

Вследствие капиллярных сил растворитель поднимается вверх по бумаге. В зависимости от механизма разделения компоненты смеси, продвигаясь вместе с подвижной фазой, участвуют в многократных актах сорбции, десорбции, ионного обмена, распределения между подвижной и

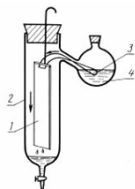


Рис. 7.2. Нисходящая хроматография: 1 – лист бумаги; 2 – камера; 3 – подвижная фаза

неподвижной фазами, образования осадков и их растворения и т.д. При этом каждый компонент движется с определенной скоростью, отличной от скорости движения других компонентов, благодаря чему происходит разделение смеси.

Метод *нисходящей бумажной хроматографии* поясняет рис. 7.2. В верхнюю часть герметичной камеры 2 помещают сосуд 3 с подвижным растворителем. Верхний конец бумаги соединяют с подвижной фазой фитилем 4. Исследуемый раствор наносят несколько ниже перегиба бумаги 1, растворитель из лодочки вследствие капиллярных сил и сил тяжести стекает вниз по бумаге и обеспечивает движение компонентов разделяемой смеси с различной скоростью.

Для получения *круговой хроматограммы* из листа хроматографической бумаги вырезают круг 1 диаметром на 2–3 см больше, чем диаметр камеры (чашка Петри или эксикатор). В

центр бумаги капилляром наносят порцию исследуемого раствора. Подвижная фаза подается в центр бумаги при помощи бумажного фитилька. Для получения фитилька по радиусу бумажного круга до центра надрезают полоску шириной 2 мм, отгибают ее и опускают в растворитель (подвижную фазу), находящийся на дне камеры. Подвижная фаза поднимается по фитильку до поверхности бумаги и затем перемещается горизонтально от центра к периферии, при этом компоненты разделяемой смеси движутся с разной скоростью и образуют круговые концентрические зоны.

Двухмерная хроматография используется при разделении сложных смесей. На квадратный лист бумаги, размер которого зависит от размера камеры, в один из нижних углов на расстоянии примерно 5 см от кромок наносят каплю исследуемого раствора и после высушивания погружают нижней кромкой в растворитель. При движении растворителя происходит разделение смеси на несколько менее сложных смесей и образуется ряд пятен разделенных веществ в направлении движения растворителя.

После разделения лист высушивают, поворачивают на 90° так, чтобы пятна размещались по нижнему краю, и помещают в другой растворитель, в котором скорости перемещения компонентов иные, чем в первом растворителе, т.е. первоначально полученные пятна становятся исходными. После окончания разделения бумага высушивается и опрыскивается проявителем. В результате получается двухмерная хроматограмма.

Воздушно-сухая фильтровальная бумага удерживает на своей поверхности 20 % от своей массы влаги. Такое количество воды вполне достаточно для проведения разделения водорастворимых смесей. В качестве подвижного растворителя в этом случае используют менее полярные органические растворители, не смешивающиеся с водой.

Для хроматографического разделения гидрофобных веществ бумагу импрегнируют (пропитывают) различными гидрофобными веществами: нафталином, парафином, раствором каучука и т.д. Такая гидрофобная бумага служит носителем для неполярных растворителей в качестве неподвижной фазы. В качестве подвижной фазы применяют в этом случае смеси кислот

с низшими спиртами. Такой вариант распределительной хроматографии позволяет разделить малые количества сложных смесей веществ как органических, так и неорганических, и называется методом «обращенных фаз» (см. разд. 4).

Неподвижными растворителями в методе «обращенных фаз» являются неполярные органические растворители, такие как керосин, декалин, петролейный эфир и др., которые хорошо удерживаются гидрофобизированной бумагой. Подвижными растворителями служат полярные вещества: водные растворы спиртов, кислот и т.д.

В бумажной хроматографии найти концентрацию вещества в подвижной и неподвижной фазах довольно сложно. Для описания перемещения зоны был введен коэффициент R_f , который представляет собой отношение расстояния, пройденного зоной (пятном) вещества от места нанесения пробы (стартовая линия) до центра пятна после хроматографирования, к расстоянию, пройденному фронтом подвижного растворителя.

$$R_f = \frac{l}{L}, \quad (7.1)$$

где l – расстояние, пройденное анализируемым веществом; L – расстояние, пройденное растворителем.

В идеальном случае R_f характеризует скорость перемещения зоны компонента по бумаге и не зависит от присутствия других веществ, а зависит только от природы жидкой подвижной и неподвижной фаз. Однако на практике по ряду причин (взаимодействие разделяемых веществ с носителем по механизму адсорбции и др.) R_f зависит от природы носителя, техники эксперимента, температуры и даже состава смеси.

В идеальном случае расположение зоны компонента определяется коэффициентом его распределения K_d , который можно определить из значения R_f :

$$K_d = \frac{S_n}{S_h} \left(\frac{L}{R_f} - L \right), \quad (7.2.)$$

где S_n и S_h – соответственно поперечное сечение бумаги, удерживающей подвижные и неподвижные растворители. Отношение $\frac{S_n}{S_h}$ равно отношению объемов растворителя водной фазы в

полоске бумаги.

R_f легко определить экспериментально. Разделение двух веществ возможно, если значение их R_f не равны и разность между этими величинами $\geq 0,1$.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) – метод разделения в тонком слое сорбента или носителя. По механизму разделения тонкослойная хроматография может быть адсорбционной, распределительной, осадочной, ионообменной, окислительно-восстановительной, комплексообразовательной, т.е. тех же видов, что и колоночная. На практике часто одновременно протекают несколько процессов. Техника выполнения ТСХ аналогична хроматографии на бумаге.

Метод *тонкослойной хроматографии* состоит в следующем. На одну сторону небольшой стеклянной, пластмассовой или металлической пластинки наносят тонкий слой сорбента, затем пластинку сушат. На тонкий слой сорбента, на стартовую линию наносят пробы веществ и их смеси. Пробы анализируемых веществ в ТСХ наносят микропипеткой, стеклянным капилляром

или с помощью микрометрических шприцов. Полученные пятна высушивают и погружают нижний край пластинки в растворитель (рис. 7.3). По мере продвижения жидкости по сорбенту происходит разделение смеси. Зоны отдельных компонентов располагаются согласно их функциям

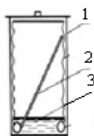


Рис 7.3. Тонкослойная хроматография: 1 – камера; 2 – пластинка с нанесённым слоем сорбента; 3 – подвижная фаза

разделения (коэффициентам селективности и т.п.).

В качестве сорбентов для ТСХ применяют силикагель, оксид алюминия, оксид циркония, фосфат циркония, кизельгур, гидроксид кальция, силикат магния, гипс, целлюлозу и др. Тонкий слой сорбента может быть закреплен с помощью связующих

веществ или остается незакрепленным, т.е. свободно насыпанным. Чаще используют закрепленные гипсом слои сорбента.

Преимущество этого метода перед бумажной хроматографией – устойчивость сорбентов по отношению к агрессивным средам и нагреванию и, как правило, большая чувствительность. Как и в бумажной хроматографии, при стандартных условиях проведения опыта положение веществ на хроматограмме характеризуют величиной R_f . Для получения воспроизводимых результатов важно проводить эксперимент в стандартных условиях. Необходимы постоянство структуры, размера гранул, толщины слоя и влажности сорбента. Также имеют значение чистота используемых растворителей, количество нанесенного вещества, длина пробега подвижной фазы. Особенно важно постоянство условий хроматографирования при анализе неорганических ионов.

Разделение неполярных веществ проводят и в ТС распределительной хроматографии методом «обращенных фаз». Для этого твердый носитель пропитывают неполярными веществами: ундеканом, парафиновым или силиконовым маслом и др. В качестве подвижной фазы используют полярные растворители.

7.1. Качественный и количественный анализ

Вещества при *качественном анализе* после разделения могут быть идентифицированы по присущей им собственной окраске. Однако часто зоны бывают невидимы и хроматограммы требуется проявлять соответствующим раствором специфического реактива. По характерной окраске образующихся цветных пятен судят о составе анализируемой смеси.

Например, для проявления Cu^{2+} , Cd^{2+} и Hg^{2+} можно использовать сульфид аммония, который образует сульфиды: CdS – желтый, CuS – коричневый и HgS – черный. Для этой цели также часто используют 8-оксихинолин, ализарин в этаноле, 0,05 %-ный раствор дитизона в CCl_4 или 0,5 %-ный раствор рубеановодородной кислоты в 96 % спирте. Воздействие паров аммиака, оксидов азота, I_2 на хроматограмму приводит к образованию хорошо различимых окрашенных зон. Другими часто

применяемыми реактивами являются растворы H_2S , KI , $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и т.д.

При анализе радиоактивных изотопов метод позволяет обнаружить наличие тех или иных элементов в небольшом количестве образца по изменению их активности с помощью счетчика. Часто в качественном анализе используют способность хроматографируемых веществ поглощать ультрафиолетовые лучи или флуоресцировать в них.

Для того чтобы идентифицировать вещества анализируемой смеси, прибегают к «свидетелям», т.е. на бумагу наносят не только раствор исследуемого образца, но и растворы веществ, наличие которых предполагается в анализируемой смеси. После получения хроматограмм и проявления зон сопоставляют положение зон компонентов анализируемой смеси с положением зон индивидуальных веществ (по величине R_f). Недостатками метода является необходимость иметь набор химически чистых индивидуальных веществ – свидетелей.

Существует и другой способ качественной оценки разделения элементов, основанный на измерении величины R_f для каждого исследуемого вещества в определенном растворителе. Недостатком метода является необходимость строгого соблюдения условий хроматографирования (размер и форма камеры, сорт бумаги и ее предварительная обработка, температура, длина пути, пройденного подвижной фазой и т.д.). Но отпадает необходимость иметь набор химически чистых индивидуальных веществ.

Количественный анализ в БХ и ТСХ. Расшифровки хроматограмм для количественного анализа осуществляют двумя способами.

1. Способ, не требующий элюирования веществ из сорбента.
2. Способ, требующий вымывания веществ.

К первому способу относятся метод визуального сравнения, метод измерения площади пятна и метод измерения интенсивности окраски пятна, ко второму – методы микрохимического определения после вымывания компонентов из пятен.

При визуальном сравнении на сорбент наносят раствор неизвестной и известной концентрации и после проявления ви-

зуально сравнивают размеры или интенсивность окраски зон стандартных и исследуемого растворов. Визуальный метод является приближенным.

Метод измерения площади пятна основан на использовании зависимости:

$$S = a \lg C + b, \quad (7.3)$$

где C – концентрация; S – площадь пятна после хроматографирования; a и b – эмпирические константы.

После хроматографирования стандартных растворов и проявления пятен их границы очерчивают карандашом и определяют площадь планиметром либо пятно вырезают и взвешивают. На основании полученных данных строят градуировочные кривые, откладывая по оси абсцисс значения $\lg C$, а по оси ординат – площадь пятна или его массу. По графику, зная величину площади пятна определяемого вещества, находят его концентрацию. Однако определение концентрации неорганических веществ с помощью этого метода весьма неточно. Более точным является метод измерения интенсивности окраски пятна, для чего проводят фотометрирование непосредственно на бумаге или пластинке с помощью специального прибора. Найденную оптическую плотность сравнивают с оптической плотностью пятен стандартных растворов.

Наиболее часто применяют метод элюирования пятна. Этот способ определения концентрации вещества в зоне, по видимому, является наиболее точным. Полученную хроматограмму разрезают на отдельные зоны, а вещество экстрагируют с сорбента соответствующим растворителем. Концентрацию вещества в экстракте определяют одним из инструментальных методов анализа: спектрофотометрическим, радиометрическим, электрохимическим или другим подходящим методом.

Метод имеет недостатки: трудоемкость, необходимость наносить на бумагу сравнительно большие количества вещества.

Флуориметрический метод является наиболее чувствительным методом анализа в ТСХ. Определение количества вещества в пятне этим методом можно проводить двояко: во-первых, измерением флуоресценции комплексных соединений,

образующихся при взаимодействии исследуемого вещества с флуорогенным реагентом, вводимым при опрыскивании пластинки проявителем; во-вторых, по тушению флуоресценции введенного в слой сорбента флуорохрома в зоне пятна за счет поглощения света возбуждения анализируемым веществом. В последнем случае необходимо равномерное распределение флуорохрома в слое сорбента. Наилучшие результаты в этом способе флуориметрии могут быть получены при использовании возможно более тонких слоев сорбента, хотя при этом снижается чувствительность определения.

8. Сверхкритическая флюидная хроматография

Аналитические задачи не всегда могут быть решены с помощью методов газовой и жидкостной хроматографии. Это относится к проблемам определения веществ, которые нелетучи, т.е. не могут быть переведены в газовую фазу без разложения и потому не могут быть определены методом газовой хроматографии. С другой стороны, существует много веществ, определение которых при помощи жидкостной хроматографии затруднено из-за отсутствия подходящих способов детектирования. Эти проблемы возникают в ходе анализа сложных природных веществ, лекарственных препаратов, продуктов питания, поверхностно-активных веществ, полимеров, нефтей, пестицидов, аминокосоединений. Такие задачи могут быть решены методом сверхкритической флюидной хроматографии (СФХ), в которой подвижной фазой является флюидная фаза.

Для любого вещества существует некоторая критическая температура (T_k), выше которой оно ни при каком давлении не может существовать в жидком состоянии. Давление, соответствующее критической температуре, называется критическим давлением (P_k). Совокупность критических значений температуры и давления называется критической точкой. Вблизи критической точки вещество находится в так называемом сверхкритическом (флюидном) состоянии и обладает свойствами, промежуточными между свойствами газа и жидкости. Такие фазы имеют ряд преимуществ перед газами и жидкостями.

Например, следствием достаточно высокой плотности флюидов по сравнению с газами является хорошая растворимость в них многих нелетучих веществ большой молярной массы. Так, в диоксиде углерода в сверхкритическом состоянии хорошо растворяются все нормальные алканы с числом атомов углерода от 5 до 40, полициклические ароматические углеводороды. Верхняя граница молекулярных масс определяемых веществ значительно выше, чем в газовой хроматографии и, как и в ВЭЖХ, достигает порядка 10^5 .

Подвижной фазой в СФХ могут быть любые летучие жидкости и легко сжижаемые газы, которые при температуре несколько большей, чем критическая, устойчивы и не разлагаются. В отличие от газовой хроматографии в СФХ подвижная фаза не является лишь переносчиком разделяемых веществ. Как и в ВЭЖХ, здесь могут иметь место физико-химические взаимодействия разделяемых веществ с компонентами флюида. Изменение состава подвижной фазы можно использовать для целенаправленного изменения величин коэффициентов селективности α (разд. 3).

Критические параметры подвижных фаз, используемых в СФХ, приведены в табл. 8.1.

Чаще всего используют диоксид углерода. Он удобен в работе, дешев, нетоксичен, не обладает запахом и светопоглощением в УФ-области вплоть до 190 нм. Иногда в подвижную фазу добавляют модификатор – небольшие количества метанола или диоксана. Для большинства неподвижных фаз, представленных в табл. 8.1, критические температуры и давления относительно невелики и не выходят за пределы обычных для газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии рабочих диапазонов. В силу этого и аппаратура для СФХ мало отличается от газовых и жидкостных хроматографов и представляет собой в некотором роде их гибрид.

Таблица 8.1

Критические величины для веществ, используемых
как подвижные фазы в сверхкритической флюидной хроматографии

Флюид	Темп. $T_k, ^\circ\text{C}$	Давл. $p_k, \text{МПа}$	Плотность $d_k, \text{г/см}^{-3}$
CO_2	31,3	7,39	0,468
N_2O	36,5	7,27	0,457
NH_3	132,5	11,40	0,235
Метанол	239,4	8,10	0,272
н-Бутан	152,0	3,80	0,228
Дихлордиформетан	111,8	4,12	0,558
Дихлорфторметан	178,5	5,17	0,522
Диэтиловый эфир	195,6	3,64	0,265
Вода	374,4	23,0	0,344

В СФХ применяют как набивные, так и капиллярные колонки. Набивные колонки аналогичны тем, что применяются в распределительной ВЭЖХ. Они также имеют внутренний диаметр от 0,5 до 4,6 мм, длину до 25 см и заполняются частицами размером от 3 до 10 мкм. Капиллярные колонки подобны применяемым в газовой хроматографии. Их изготавливают из плавленого кварца. Неподвижную фазу наносят на внутреннюю силианизированную поверхность в виде тонкой жидкой пленки или химически связывают с ней. Длина капиллярных колонок обычно составляет 10–20 м, внутренний диаметр – от 0,05 до 1,0 мм, толщина слоя неподвижной фазы – от 0,05 до 1 мкм.

Повышенная реакционная способность флюидов сокращает выбор возможных стационарных фаз. Наиболее подходящими являются высокомолекулярные и труднорастворимые. Применяют адсорбенты с развитой поверхностью (Al_2O_3), полярные жидкие фазы (полисилоксан ХЕ-60, содержащий нитрильные группы) в насадочных колонках. В капиллярных колонках используют силоксаны, жидкие или привитые к стенкам капилляра.

Поскольку вязкость флюидов меньше, чем у жидкостей, в СФХ можно использовать более высокие скорости потоков подвижной фазы, при этом разделение будет осуществляться быстрее и эффективнее, чем в ВЭЖХ. В колонке необходимо постоянно поддерживать давление и температуру, для того что-

бы подвижная фаза все время находилась в сверхкритическом состоянии. Обычно рабочая температура колонки составляет около $1,2 T_k$, а давление от 1 до $3p_k$. Давление в системе следует контролировать с высокой точностью, поскольку от величины давления зависят плотность флюида и, соответственно, коэффициенты емкости. При повышении давления возрастают плотность и элюирующая способность флюида и времена удерживания уменьшаются, однако это может сократить эффективность разделения компонентов.

В СФХ используют и прием градиентного программирования давления, полностью аналогичный программированию температуры в газовой хроматографии или состава подвижной фазы в жидкостной хроматографии. На выходе из колонки давление сбрасывают. При этом подвижная фаза переходит в газообразное или жидкое состояние, и поэтому можно применять обычные для газовой и жидкостной хроматографии детекторы. Используют пламенно-ионизационные, фотометрические детекторы в УФ- и ИК-области, флуоресцентные, пламенно-фотометрические детекторы, а также катарометры и детекторы электронного захвата.

Обработку хроматограмм, качественный и количественный анализы проводят теми же методами, что и в газовой хроматографии (разд. 5.3). По сравнению с жидкостной хроматографией в СФХ технически проще реализовать сочетание хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования, применяемого более широко, чем в жидкостной хроматографии.

9. Использование хроматографических методов анализа

В анализе пищевых продуктов широко применяются хроматографические методы, начиная с бумажной и заканчивая тонкослойной, колоночной, газоадсорбционной и газожидкостной хроматографией. Использование хроматографических методов в научных исследованиях, применение их в практике производства позволяет повысить надежность химико-аналитического контроля на предприятиях пищевой промышленности, обеспе-

чить автоматизацию технологических процессов, улучшить качество пищевых продуктов. Хроматографические исследования позволяют установить химическую природу сложных соединений, в значительной степени определяющих вкусовые свойства пищевых продуктов, способствуя тем самым повышению их качества с помощью этих методов. Вследствие их экспрессности и чувствительности можно качественно и количественно идентифицировать такие важные в пищевых продуктах вещества, как липиды, сахара, азотсодержащие, карбонильные и другие органические и неорганические соединения.

Использование хроматографических методов анализа позволило установить, что карбонильные соединения играют существенную роль в образовании вкуса и аромата пищи. Более полно в настоящее время изучен аромат животных продуктов: в вареной говядине идентифицировано более 40 карбонильных соединений. Было установлено, что аромат вареных и жареных цыплят определяют 189 соединений, в том числе 35 альдегидов и 24 кетона. Методом газовой хроматографии был определен состав летучих жирных кислот и установлено их влияние на вкус и аромат сквашенного молока. Выявлено, что на эти показатели молочных продуктов, кроме летучих жирных кислот, оказывает влияние присутствие диацетила и ацетальдегида, содержание которых в процессе сквашивания молока увеличивается в 2–3 раза.

При изучении липидов зерна методом хроматографии была установлена их роль в процессах прогоркания зерна, муки, крупы. В виноделии с использованием тонкослойной хроматографии (путем введения липидов) была показана возможность участия липидов в образовании коллоидных помутнений вина.

Ионную хроматографию в пищевой промышленности применяют для определения количества фосфатов в муке, состава овощного сока, двухвалентных катионов в сусле, кислот в молодом красном вине, Na^+ , K^+ , NH_4^+ , тяжелых металлов в пищевых продуктах, напитках, уксусе, сахаре, томатном пюре, ионов Mg^{2+} , Ca^{2+} в молоке.

Основными сферами применения ТСХ являются анализ лекарственных препаратов, реакционных смесей органического

синтеза и биологических образцов. Важным достоинством ТСХ по сравнению со значительно более дорогостоящей колоночной хроматографией является возможность анализа загрязненных проб и, таким образом, резкое упрощение пробоподготовки при анализе реальных, в первую очередь природных объектов.

Особое значение имеет метод тонкослойной хроматографии иногда в сочетании с газовой, газожидкостной, жидкостной хроматографией для использования процессов физического и химического изменения белковых веществ: при термической обработке, под влиянием электромагнитных полей, в химически активных средах и т.д.

Для разделения фенолкарбоновых кислот чаще всего используется метод тонкослойной хроматографии. Качественное и количественное изучение состава фенольных соединений важно не только для понимания происходящих в них химических процессов, но и для обоснования технологических режимов. Продукты окисления фенольных соединений способны взаимодействовать с белками и углеводами с образованием осадков, что приводит к помутнению пива и вин. Методы тонкослойной и газовой хроматографии успешно применяют для определения микотоксинов, остаточных количеств пестицидов и ядохимикатов.

При анализе углеводов продолжает использоваться бумажная и тонкослойная распределительная хроматография, а также ионообменная, но постепенно их вытесняют газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография.

Ионный обмен используется как метод разделения и выделения веществ, предшествующий их количественному определению. Этот метод широко используется для умягчения и очистки воды, для очистки вина, сахарных сиропов от примесей неорганических солей.

Особые достоинства хроматографии (способность разделять сложные и многокомпонентные смеси химических веществ) сделали этот метод чрезвычайно полезным для экологической аналитической химии при анализе органических загрязнений воздуха, воды и почвы. Начиная с 60-х годов, на основе газовой хроматографии были разработаны тысячи методик кон-

троля содержания загрязняющих веществ в объектах окружающей среды. Определение токсичных химических веществ в объектах окружающей среды в наше время имеет особенно важное значение: необходимо знать о присутствии мельчайших примесей вредных веществ в воде или воздухе, которые могут причинить ущерб здоровью человека и серьезно повлиять на состояние растительности и животного мира.

10. Последние достижения в области применения хроматографических методов анализа

Хроматография, являясь в настоящее время самым распространенным и наиболее часто используемым методом анализа, продолжает интенсивно развиваться. В настоящее время этот метод находится на том этапе своего развития, когда роль фундаментальных исследований снижается, а роль практического применения резко возрастает.

Газовая хроматография давно стала обычным, повсеместно применяемым методом анализа. Большинство публикаций последнего времени в этой области посвящено не разработке основ метода, а его применению для решения конкретных практических задач. Среди фундаментальных работ можно отметить резко возросшее число статей по многомерной газовой хроматографии, технически реализуемой так же, как и многомерная жидкостная хроматография. Большие усилия также направлены на сокращение времени анализа.

Помимо традиционных приемов, используемых для ускорения хроматографического анализа (уменьшение размеров колонки, увеличение скорости потока подвижной фазы – газа-носителя), в последнее время стали использовать и такое средство, как высокоскоростной режим программирования температуры (до 250 °C/с). В некоторых случаях это позволило сократить время анализа на порядок.

С задачей использования высокоскоростных газовых хроматографов тесно связана задача создания небольших портативных газовых хроматографов, пригодных для работы в полевых условиях (обе проблемы часто решаются сходными техниче-

скими средствами) (рис. 5.10). В этом отношении перспективным представляется отказ от применения специальных газовых носителей, хранимых и транспортируемых в баллонах под высоким давлением, и использование вместо них атмосферного воздуха при атмосферном давлении. Поток подвижной фазы в этом случае осуществляется при помощи вакуумного насоса, устанавливаемого на выходе из колонки.

В традиционной высокоэффективной жидкостной колоночной хроматографии наибольший прогресс отмечается в сфере аналитического оборудования. Основными тенденциями здесь являются миниатюризация, сокращение времени анализа, ориентация на биологические приложения, повышение производительности анализа. Все шире используются микроколонки, позволяющие оперировать с объемами пробы менее 1 мкл. Для их изготовления применяют технологии, аналогичные технологиям производства микрочипов.

Одно из важных направлений совершенствования жидкостной колоночной хроматографии – развитие дву- и многомерных методов, давно используемых в плоскостном (тонкослойном) варианте (см. разд. 6.4). В колоночной хроматографии реализация подобного приема сопряжена со значительными техническими проблемами, поэтому двумерная колоночная хроматография появилась значительно позже, чем ТХС, и только сейчас начинает развиваться. Для осуществления этого варианта разделения используют две последовательно соединенные колонки, различающиеся природой неподвижной фазы (например, одна – нормальная, другая – обращенная).

При этом режимы хроматографирования устанавливают таким образом, чтобы время разделения на второй колонке было значительно меньше, чем на первой. Между колонками находится промежуточный детектор и устройство переключения потока, позволяющее сразу же при появлении на выходе из первой колонки очередного пика направлять поток элюата на вторую колонку. Преимущества двумерной хроматографии перед одномерной – резкое возрастание максимально возможного числа разрешенных пиков.

Ведутся исследования по созданию и применению в жидкостной хроматографии неподвижных фаз совершенно новых типов. К ним относятся неподвижные фазы на основе полимерных матриц с молекулярными отпечатками (специально синтезируемых материалов с порами, размеры, форма и строение которых являются оптимальными для сорбции тех или иных веществ или классов веществ), а также неподвижные фазы с перестраиваемыми свойствами. Примером последних могут служить электропроводящие полимеры, свойства которых (в том числе хроматографические) можно плавно изменять, регулируя значение приложенного к ним электрического потенциала.

Одним из методов, в которых в последние годы отмечен существенный прогресс, является плоскостная, в первую очередь, тонкослойная хроматография. Тонкослойная хроматография – уникальный хроматографический метод, сочетающий в себе множество разных качеств и возможностей. С одной стороны, это предельно простой, дешевый и производительный метод обзорного качественного анализа сложных смесей. С другой стороны, он становится особенно важным в связи с бурным развитием идеологии массового параллельного синтеза органических веществ (прежде всего новых лекарственных препаратов), известной как «комбинаторная химия». Результатом комбинаторного синтеза является сложная смесь близко родственных по своей структуре веществ. Экспресс-анализ такой смеси методом ТСХ в настоящее время позволяет разделять ее до нескольких десятков компонентов и является едва ли не оптимальным. Комбинаторный синтез часто проводят на частицах твердого носителя. В последнее время отмечены удачные попытки проведения такого синтеза непосредственно на частицах носителя, закрепленного на хроматографической пластине. При этом для ускорения реакции вместо традиционного нагревания был использован метод нетермического, микроволнового, воздействия. Таким образом, пластина для ТСХ становится одновременно инструментом и для их разделения.

Для количественного анализа методом ТХС в настоящее время широко используются различные устройства, обеспечивающие принудительное равномерное движение подвижной фа-

зы за счет гидродинамических сил или электроосмотического потока. Начато использование в ТСХ градиентного элюирования – инструмента, традиционного для колоночной хроматографии, который позволяет как повысить эффективность разделения, так и сократить время анализа. Применение градиентного элюирования позволяет анализировать методом ТСХ смеси, состоящие из 30–40 компонентов.

Развиваются и способы детектирования в ТСХ. Наряду с традиционными фотометрическим (в отраженном или проходящем свете) и флуориметрическим методами возрастающую роль начинают играть масс-спектрометрические методы детектирования преимущественно с лазерной десорбцией-ионизацией. Для фотометрического детектирования все больше используется сканирующая лазерная денситометрия, в том числе с применением оптоволоконной техники.

Возможность сочетания нескольких методов анализа в одно целое позволяет в настоящее время резко увеличить объем извлекаемой информации о веществе. Большие перспективы в этом отношении имеют хроматографические методы анализа по сравнению с другими методами, так как совмещают сложный процесс разделения с последующей идентификацией компонентов и их количественным определением. Современные хроматографы позволяют комбинировать их с масс-спектрометрией и различными приборами оптической спектроскопии (табл. 10.1).

Таблица 10.1

Возможности сочетания хроматографических
и спектроскопических методов анализа

Виды хроматографии	Спектральные методы				
	МС	УФ	ИК	ААС	ААЭ
ГХ	+++		++		++
ВЭЖХ	++	+++		+	++

«+» – принципиально возможно;

«++» – используются часто;

«+++» – используется повсеместно;

МС – масс-спектрометрия;

УФ – ультрафиолетовая спектроскопия;

ИК – инфракрасная спектроскопия;

ААС – атомно-абсорбционная спектроскопия;

АЭЭ – атомно-эмиссионная спектроскопия.

Для капиллярной газовой хроматографии объединение хроматографа и масс-спектрометра не имеет технических трудностей: выходящий из колонок газовый поток можно непосредственно вводить в ионизационную камеру масс-спектрометра. При использовании набивных колонок в связи с более высоким потоком газа-носителя между колонкой и масс-спектрометром устанавливают сепаратор, в котором часть газа-носителя удаляется. В случае ВЭЖХ часто используют специальные устройства сопряжения. Промышленностью выпускаются соответствующие хромато-масс-спектрометры. Можно регистрировать полный масс-спектр или настроить прибор на регистрацию только определенного класса компонентов (селективный анализ). Обработку и графическое представление полученной масс-хроматограммы обычно осуществляют с помощью компьютера. Масс-хроматограмму можно представить в виде набора отдельных масс-спектров и идентифицировать вещества, пользуясь библиотекой масс-спектров.

Сочетание газовой хроматографии и масс-спектрометрии – очень мощный метод идентификации органических веществ по их масс-спектрам. Этим методом можно анализировать пробы сложного состава: природные, сточные воды и другие объекты окружающей среды, продукты питания (например, для определения вкусовых и ароматических добавок), определять различные метаболиты в биологических жидкостях. Путем сравнения масс-спектров, зарегистрированных на краях пика, можно судить о том, насколько этот пик соответствует индивидуальному веществу и о полноте хроматографического разделения.

При сочетании хроматографии с атомно-эмиссионным детектированием поток газа-носителя с разделенными компонентами поступает непосредственно в плазму. В газовой хроматографии обычно используют атомизатор на основе микроволновой, а в жидкостной – на основе индуктивно-связанной плазмы. Хроматография с атомно-эмиссионным детектированием – очень удобный способ определения отдельных химических форм какого-либо элемента. Сочетание ВЭЖХ с атомно-

абсорбционным детектированием осуществить особенно просто при использовании гидридной техники для определения элементов, образующих летучие гидриды.

Возможные комбинации различных методов анализа не ограничиваются лишь сочетанием методов хроматографии и спектроскопии. Можно комбинировать между собой отдельные хроматографические методы.

11. Лабораторные работы по хроматографическим методам анализа

11.1. Ионообменная хроматография

Подготовка ионитов. Важной стадией работы с ионообменниками является их подготовка к проведению эксперимента и регенерация после отработки. Товарные иониты часто представляют собой смеси, в которых наряду с основным веществом присутствуют различные примеси, особенно ионы железа. Поэтому их следует предварительно подвергать очистке. Кроме того, ионит должен быть доведен до набухания, так как только в набухшем состоянии его следует загружать в колонку.

Вновь используемый ионит просеивают, отбирая фракцию зерен 0,5–1 мм. Воздушно-сухой ионит помещают в стакан, заливают 2 М раствором хлорида натрия и оставляют для набухания примерно на сутки. Затем декантацией сливают раствор, несколько раз промывают водой, заливают 1 М раствором гидроксида натрия и оставляют на 3–4 часа. Раствор щелочи сливают и промывают новыми порциями раствора гидроксида натрия до исчезновения окраски сливаемой жидкости. Ионит промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции по метиловому оранжевому.

Для удаления из ионитов примесей железа (III) колонку промывают 2 М раствором соляной кислоты до тех пор, пока проба на присутствие Fe^{3+} с тиоцианатом аммония перестанет давать положительный результат (красное окрашивание фильтрата).

Подготовка катионитов в H^+ -форме. Для перевода катионита в H^+ -форму соляную кислоту ($c(\text{HCl}) = 2 \text{ моль/дм}^3$) про-

пускают через катионит со скоростью 2–5 см³ /мин (примерно 2 капли в 1 с до выравнивания концентрации исходного и вытекающего из колонки раствора HCl). После окончания пропуска кислоты жидкость в колонке спускают до верхнего слоя катионита и промывают катионит дистиллированной водой. Полноту отмывания катионита от кислоты проверяют по метиловому оранжевому. Для этого отбирают порцию вытекающего из колонки раствора в пробирку и добавляют каплю индикатора. Если окраска раствора станет желтой, то считают, что катионит полностью отмыт от кислоты. Приготовленный таким образом катионит готов для проведения хроматографических разделений на катионите в H⁺-форме.

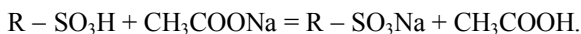
Подготовка анионитов в OH-форме. Для перевода анионита в гидроксидную форму через колонку с сорбентом пропускают 5 % раствор NaOH до выравнивания концентрации исходного и вытекающего из колонки растворов. После перевода ионита в гидроксидную форму колонку отмывают дистиллированной водой для удаления избытка щелочи до отрицательной реакции на фенолфталеин.

Переведение ионитов в солевую форму. Переведение ионита в любую солевую форму осуществляют путем пропуска через него раствора соответствующего электролита. Для перевода сильнокислотных катионитов из H⁺-формы в солевую форму их обрабатывают 0,5–2 М раствором соответствующих солей: KCl – для перевода в K⁺-форму, NH₄Cl – для перевода в NH₄⁺-форму, CaCl₂ – для получения Ca²⁺ – формы катионита. После пропуска раствора электролита сорбент промывают дистиллированной водой до отрицательной реакции на Cl[–] – ионы с 2М раствором нитрата ртути (I) или нитрата серебра. Для перевода анионитов из OH[–]-формы в солевую, например в SO₄^{2–} или CH₃COO[–]-форму анионообменники обрабатывают избытком соответствующей кислоты с C = 0,5–2 моль/дм³. Затем сорбент отмывают дистиллированной водой до нейтральной реакции по индикатору метиловому оранжевому. Для полного насыщения ионита, как правило, пропускают объем соответствующего электролита (соли или кислоты) в 10–20 раз больший, чем объем ионита, переводимого в ионную форму.

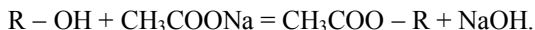
Работа 1. Количественное выделение на ионитах органических кислот из их солей

Цель работы. Показать возможность применения ионитов для выделения уксусной кислоты из ее соли.

Сущность работы. При прохождении раствора ацетата натрия через колонку, наполненную катионитом в водородной форме, происходит гидролитическое расщепление соли с выделением эквивалентного количества уксусной кислоты по уравнению:



Выделение уксусной кислоты на анионите в OH-форме можно представить в следующем виде:



Образующаяся при этом уксусная кислота (или щелочь) вымывается из колонки. По количеству выделившейся кислоты (или основания) и навеске исходной соли рассчитывают количество выделенной уксусной кислоты из ее соли.

Оборудование. Хроматографическая колонка с катионитом КУ-2-8 или анионитом АВ-17; аналитические весы.

Реактивы и посуда. Раствор HCl с $C_{\text{экв}} \text{ HCl} = 2 \text{ моль/дм}^3$; раствор NaOH с $C_{\text{экв}} \text{ NaOH} = 0,5 \text{ моль/дм}^3$ и раствор с $\omega(\text{NaOH}) = 5 \%$; индикаторы – фенолфталеин, метиловый оранжевый; химический стакан вместимостью 100 или 50 см³; пипетки вместимостью 10 см³; мерные колбы вместимостью 50; 100; 200 см³; бюретка вместимостью 25 см³.

Порядок выполнения работы.

1. Подготовить катионит КУ-2-8 или анионит АВ-17 к работе (см. с. 125, 126).
2. Взять навеску 2 г CH₃COONa на аналитических весах с точностью до 0,0002 г.

3. Растворить навеску CH_3COONa в мерной колбе, вместимостью 50 см^3 .

4. Аликвотную часть $10,00 \text{ см}^3$ пропустить через ионит со скоростью $2 \text{ см}^3/\text{мин}$ (это соответствует примерно 1 капле в секунду).

5. Промыть ионит дистиллированной водой до нейтральной реакции с индикатором метиловым оранжевым. Фильтрат и промывные воды собрать в мерную колбу вместимостью $100\text{--}200 \text{ см}^3$, довести до метки водой, раствор перемешать. Отобрать аликвотную часть ($10,00 \text{ см}^3$) для титрования раствором NaOH $C_{\text{экв}} \text{NaOH} = 0,0500 \text{ моль/дм}^3$ с индикатором фенолфталеином.

6. По данным титрования рассчитать содержание соли CH_3COONa и влаги в исходной навеске по формулам:

$$m(\text{CH}_3\text{COONa}) = \frac{C_{\text{экв}}(\text{NaOH}) \cdot V_{\text{экв}}(\text{NaOH}) \cdot M_{\text{экв}}(\text{CH}_3\text{COONa}) \cdot V'_{\text{М.К.}} \cdot V''_{\text{М.К.}}}{1000 \cdot V'_{\text{АЛ.Ч.}} \cdot V''_{\text{АЛ.Ч.}}},$$

где $V'_{\text{АЛ.Ч.}}$ – объем аликвотной части раствора ацетата натрия, пропущенного через ионит, см^3 ; $V'_{\text{М.К.}}$ – вместимость мерной колбы, в которой растворена навеска соли, см^3 ; $V''_{\text{АЛ.Ч.}}$ – аликвотная часть, взятая для титрования, см^3 ; $V''_{\text{М.К.}}$ – вместимость мерной колбы после выделения уксусной кислоты, см^3 .

$$\omega(\text{CH}_3\text{COONa}) = \frac{m(\text{CH}_3\text{COONa}) \cdot 100}{m_{\text{НАВ.}}}, \%$$

$$\omega(\text{H}_2\text{O}) = 100 - \omega(\text{CH}_3\text{COONa}), \%$$

7. Анализ результатов работы: сделать вывод о возможности количественного выделения уксусной кислоты из ее соли на ионите.

Работа 2. Получение воды высокой степени чистоты методом ионообменной хроматографии

Цель работы. Показать возможность применения ионитов для получения воды высокой степени очистки.

Сущность работы. Пропускание воды, содержащей различные соли, последовательно через слой катионита в H^+ -форме и анионита в OH^- -форме дает возможность получить чистую воду, свободную от катионов и анионов солей. Контролировать чистоту воды можно, измеряя электрическую проводимость.

Оборудование. Хроматографическая колонка, наполненная катионитом КУ-2-8, хроматографическая колонка, заполненная анионитом (АВ-17), кондуктометр.

Реактивы и посуда. Вода дистиллированная, минеральная вода, раствор хлороводородной кислоты. $C_{\text{экв}}(HCl) = 3 \text{ моль/дм}^3$, раствора гидроксида натрия с $C_{\text{экв}}(NaOH) = 3 \text{ моль/дм}^3$, мерные стаканы вместимостью 50 см^3 .

Порядок выполнения работы

1. Подготовить катионит и анионит к работе (см. с. 125, 126).
2. Измерить электропроводность водопроводной (минеральной) воды на кондуктометре.
3. Пропустить $40\text{--}50 \text{ см}^3$ водопроводной (минеральной) воды сначала через катионит, а затем через анионит.
4. Измерить электропроводность полученного фильтрата.
5. Анализ результатов работы: сравнить полученные данные, сделать вывод. Написать реакцию катионного и анионного обмена.

Работа 3. Концентрирование железа (III) с помощью катионита и его количественное определение

Цель работы. Познакомиться с применением ионитов для концентрирования ионов в растворе с последующим количественным определением.

Сущность работы. Если какой-либо ион в растворе обладает большой константой ионного обмена, то, пропуская этот

раствор через слой ионита, можно сконцентрировать его в небольшом объеме сорбента. Вымывая затем этот ион небольшим объемом какого-либо элюента, можно значительно повысить его первоначальную концентрацию.

Оборудование. Хроматографическая колонка с катионитом КУ-2-8; фотоэлектроколориметр.

Реактивы и посуда. Раствор H_2SO_4 с $C_{э\text{кв}}(H_2SO_4) = 2$ моль/дм³; раствор HNO_3 с $C_{жв}(HNO_3) = 2$ моль/дм³; раствор с $\omega(NH_4SCN) = 20$ %; мерные колбы вместимостью 50, 100 см³; мерные цилиндры вместимостью 10 см³.

Порядок выполнения работы.

1. Подготовить катионит к работе (см. с. 125).
2. Получить контрольный раствор соли железа (III) в мерной колбе вместимостью 50 см³, содержимое колбы довести до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать и пропустить весь контрольный раствор соли железа (III) через катионит со скоростью 15–20 капель в мин. Постоянную скорость пропускания раствора через ионит обеспечивают путем поддержания неизменного объема раствора над катионитом. Колонку с сорбированными ионами железа (III) промыть дистиллированной водой (фильтрат не используется) и вытеснить Fe^{3+} из катионита раствором серной кислоты с $C_{э\text{кв}}(H_2SO_4) = 2$ моль/дм³. Элюат собрать в мерную колбу вместимостью 50 см³ (не доливая до метки), прибавить 2 см³ азотной кислоты, с $C_{э\text{кв}}(HNO_3) = 2$ моль/дм³ и 5 см³ раствора NH_4SCN с $\omega = 20$ % и довести до метки дистиллированной водой.

3. На фотоэлектроколориметре измерить оптическую плотность полученного раствора и рассчитать содержание в нем железа, используя метод сравнения или калибровочного графика (см. лабораторные работы по фотоколориметрии).

4. Анализ результатов работы: зная содержание железа (III) в контрольном растворе, и в растворе, пропущенном через слой катионита, рассчитать степень извлечения (в процентах) ионов железа (III) из раствора.

Работа 4. Концентрирование меди (II) на катионите

Цель работы. Применить ионит для концентрирования ионов меди (II) из разбавленных растворов с последующим количественным определением Cu^{2+} .

Сущность работы. В том случае, если концентрация определяемого иона в анализируемом объекте меньше предела его обнаружения, для концентрирования иона используют методы соосаждения, отгонки, выпаривания, экстрагирования и хроматографии.

Оборудование. Хроматографическая колонка с катионитом КУ-2-8, фотоэлектроколориметр.

Реактивы и посуда. Раствор NaCl , с $C_{\text{экв}}(\text{NaCl}) = 2 \text{ моль/дм}^3$; раствор аммиака (1:3); раствор $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$, $C(\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2) = 2 \text{ моль/дм}^3$, раствор $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$, $C(\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)]) = 2 \text{ моль/дм}^3$; градуировочные пипетки вместимостью 10 см^3 , мерные колбы вместимостью 50 см^3 , мерные цилиндры вместимостью 10 см^3 ; бюретка вместимостью $25,00 \text{ см}^3$, колба для титрования.

Порядок выполнения работы.

1. Подготовить катионит в Na^+ -форме (см. с. 125).
2. Получить контрольный раствор соли меди (II) в мерной колбе вместимостью $50,00 \text{ см}^3$, довести до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать и пропустить весь контрольный раствор через катионит со скоростью, необходимой для полного ионного обмена (15–20 капель в минуту). Постоянную скорость пропускания раствора через сорбент обеспечивают путем поддержания неизменного объема раствора над слоем сорбента.
3. Промыть колонку с сорбированными ионами меди (II) дистиллированной водой (фильтрат не используют).
4. Вытеснить ионы меди (II) из катионита раствором NaCl до объема раствора 30 см^3 , а затем проверить полноту вымывания ионов меди (II) качественной реакцией с $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$ (в присутствии ионов Cu^{2+} раствор окрашивается в бордовый цвет).

5. При отсутствии ионов меди (II) в фильтрате добавить 5 см³ раствора аммиака (1:3) и довести до метки дистиллированной водой.

6. Содержание меди (II) в растворе определить фотоколориметрическим или объемным методом анализа.

7. Рассчитать содержание меди (II) в растворе и погрешность определения.

Работа 5. Разделение ионов меди (II) и кадмия при их совместном присутствии

Цель работы. Разделение и количественное определение ионов меди (II) и кадмия в растворе.

Сущность работы. Разделение Cu^{2+} и Cd^{2+} основано на различии констант ионного обмена. Катионы сорбируются на ионите, а затем вымываются из колонки элюентом различной концентрации.

Оборудование. Хроматографическая стеклянная колонка с катионитом КУ-2-8.

Реактивы и посуда. Соляная кислота, $\text{C}(\text{HCl}) = 0,5$ моль/дм³ и $\text{C}(\text{HCl}) = 2$ моль/дм³, раствор гидроксида натрия, $\text{C}(\text{NaOH}) = 1$ моль/дм³; аммиачно-аммонийная буферная смесь; раствор аммиака конц.; индикаторы – эриохром черный Т, мурексид; раствор комплексона III с $\text{C}_{\text{экв}}(\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}) = 0,0500$ моль/дм³; раствор сульфид аммония ($\text{C} = 2$ моль/дм³), раствор гексацианоферрата (II) калия с концентрацией 0,05 моль/дм³; колбы для титрования вместимостью 250 см³; мерные колбы вместимостью 50 см³; бюретка вместимостью 25 см³.

Порядок выполнения работы.

1. Подготовить катионит в H^+ -форме (см. с. 125).

2. Получить контрольную смесь ионов кадмия и меди (II) в мерной колбе. Содержимое колбы довести до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать. Налить весь полученный раствор в хроматографическую колонку и выдержать в течение 10–15 мин. Затем пропустить раствор через катионит со скоростью 15–20 капель в мин.

3. Промыть ионит дистиллированной водой (50 см³), фильтрат не использовать.

4. Промыть ионит 0,5 М раствором соляной кислоты до отрицательной реакции на ион Cd^{2+} (реакция с сульфидом аммония).

5. Полученный раствор нейтрализовать раствором гидроксида натрия ($\text{C}(\text{NaOH}) = 1 \text{ моль/дм}^3$) до нейтральной реакции, добавить 5 см³ аммиачно-аммонийной буферной смеси и индикатор эриохром черный Т и титровать раствором комплексона III до перехода окраски из красной в синюю.

6. Промыть ионит 2 М раствором соляной кислоты до отрицательной реакции ионов меди (II) в фильтрате (реакция с $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN}_6)]$). Фильтрат собирают в колбу для титрования.

7. Довести рН полученного раствора до 7–8 концентрированным раствором гидрата аммиака, добавить индикатор мурексид и оттитровать раствором комплексона III до перехода окраски из розовой в фиолетовую.

8. По результатам титрования рассчитать содержание кадмия и меди (II) в контрольном растворе по формулам объемного анализа и погрешность определения.

9. Сделать вывод о возможности использования ионитов для разделения указанных ионов.

Работа 6. Определение хлорида натрия в растворе методом ионообменной хроматографии

Цель работы. Определить содержание соли в растворе, используя ионный обмен на катионите.

Сущность работы. При пропускании анализируемого раствора через катионит в H^+ -форме катионы соли обмениваются на ионы водорода, при этом выделяется кислота в количестве, эквивалентном содержанию соли в растворе. Количество выделяемой кислоты определяют объемным или инструментальными методами.

Оборудование. Хроматографическая колонка с катионитом КУ-2-8.

Реактивы и посуда. Раствор HCl , $C(\text{HCl}) = 2$ моль/дм³; раствор NaOH , $C(\text{NaOH}) = 0,1$ моль/дм³; раствор NH_4SCN , $C_{\text{экв}}(\text{NH}_4\text{CNS}) = 0,1$ моль/дм³; индикатор метиловый оранжевый; пипетка вместимостью 10,00 см³, бюретка вместимостью 25,00 см³, коническая колба для титрования вместимостью 250 см³, химический стакан вместимостью 200 см³, мерная колба вместимостью 50 см³.

Порядок выполнения работы.

1. Подготовить катионит в H^+ -форме (см. с. 125).
2. Получить контрольный раствор в мерной колбе вместимостью 50 см³, довести содержимое колбы до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать.
3. Отобрать пипеткой аликвотную часть (10,00 см³) и поместить в хроматографическую колонку, выдержать раствор на катионите в течение 2–3 мин.
4. Затем пропустить раствор через колонку со скоростью 3–5 см³ минуту. Вытекающий из колонки раствор собрать в коническую колбу для титрования вместимостью 250 см³.
5. Промыть колонку дистиллированной водой порциями по 10–15 см³. Новую порцию воды наливают тогда, когда жидкость в колонке достигает поверхности катионита. Для промывания колонки необходимо 100–150 см³ воды. Промывные воды собирают в ту же коническую колбу.
6. Проверить полноту промывания выделившейся кислоты. Для этого отбирают в пробирку несколько капель вытекающего из колонки раствора, добавляют 1–2 капли индикатора метилового оранжевого. Если окраска раствора станет желтой, то считают, что кислота полностью вымыта из колонки. Если раствор розовый, то продолжают промывать катионит водой, а содержимое пробирок сливают в ту же коническую колбу для титрования. Для контроля полноты отмывания катионита от кислоты готовят раствор-эталон: наполнить треть пробирки дистиллированной водой и добавить 1 каплю раствора метилоранжа.
7. Оттитровать все содержимое конической колбы рабочим раствором гидроксида натрия с $C(\text{NaOH}) = 0,1000$ моль/дм³, фиксируя конечную точку титрования одним из изученных ме-

тодов (потенциометрическое, кондуктометрическое, высокочастотное, фотоколориметрическое, объемное титрование).

8. Повторить определение 5–6 раз (п. 3–7).

9. Содержание хлорида натрия в контрольном растворе вычислить по формуле:

$$m(\text{NaCl}) = \frac{C_{\text{экв}}(\text{NaOH}) \cdot V_{\text{экв}}(\text{NaOH}) \cdot M_{\text{экв}}(\text{NaCl}) \cdot V_{\text{М.К.}}}{1000 \cdot V_{\text{АЛ.Ч.}}},$$

где $V_{\text{М.К.}}$ – общий объем исследуемого раствора, см^3 ; $V_{\text{АЛ.Ч.}}$ – аликвотная часть анализируемого раствора, см^3 .

10. Провести математическую обработку полученных результатов по следующим пунктам:

а) среднее арифметическое

$$\bar{m} = \frac{1}{n} \sum m_i,$$

где n – число измерений; m_i – результат отдельного измерения;

б) отклонения отдельных измерений от среднего

$$\Delta m_i = |m_i - \bar{m}|;$$

в) средняя квадратичная погрешность

$$S = \sqrt{\frac{\sum \Delta m_i^2}{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum (m_i - \bar{m})^2}{n-1}};$$

г) средняя квадратичная погрешность среднего арифметического

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}};$$

д) доверительный интервал среднего значения ($\bar{m} \pm \varepsilon$) рассчитывают следующим образом:

$$\varepsilon = S_{\bar{X}} \cdot t_{(P,f)},$$

где $f = n-1$ – число степеней свободы; n – число опытов; P – степень надежности (вероятности), обычно принимают равным 0,95; t – коэффициент Стьюдента (справочная величина).

Данные титрования и расчетов свести в таблицу.

№ п/п	$V_i, \text{ см}^3$	m_i	$m_i - \bar{m}$	$(m_i - \bar{m})^2$	S	$S_{\bar{X}}$
1						
2						
3						
4						
5						
		$\bar{m}$		$\Sigma(m_i - \bar{m})^2$		

е) рассчитанные значения S_X , $S_{\bar{X}}$, ε характеризуют случайную погрешность. Абсолютную систематическую погрешность рассчитать по формуле:

$$\Delta = \bar{m} - m_{\text{теор.}}, \text{ Г.}$$

Относительную случайную погрешность рассчитать по формуле:

$$\Delta r = \frac{\Delta \cdot 100}{m_{\text{теор.}}}, \%$$

12. Сделать вывод о возможности использования ионного обмена для определения NaCl.

11.2. Тонкослойная хроматография

Работа 1. Анализ красителей методом хроматографии в тонком слое

Цель работы. Разделение, качественное и количественное определение различных красителей методом тонкослойной хроматографии.

Сущность работы. В методе тонкослойной хроматографии в качестве неподвижной фазы используют оксид алюминия, силикагель, ионообменные смолы и т.п., нанесенные на пластинку в виде тонкого слоя. Разделяемая смесь перемещается вместе с подвижной фазой вверх по слою сорбента. Различие в природе красителей отражается на скорости их движения по пластине, что и определяет их разделение. О качественном составе смеси судят по наличию отдельных окрашенных зон (пятен) и величине R_f (см. с. 109). Чем больше R_f , тем лучше разделение. Если разделение неэффективно, следует подобрать другие растворители. Количественный состав определяют по площади зоны.

Оборудование. Пластинки для ТСХ типа Silyfol.

Реактивы и посуда. Красители: синий, красный, желтый, зеленый; раствор гидроксида натрия, $C(\text{NaOH}) = 1 \text{ моль/дм}^3$, стеклянный стакан вместимостью 250 см^3 .

Порядок выполнения работы.

1. На пластинку с сорбентом на расстоянии 1 см от края (стартовая линия) нанести капилляром по 1 капле контрольной смеси красителей и красителей-свидетелей: синего, желтого, зеленого, красного.

2. Пластинку подсушить на воздухе и опустить в стакан, содержащий раствор гидроксида натрия ($C(\text{NaOH}) = 1 \text{ моль/дм}^3$); уровень растворителя должен находиться ниже стартовой линии.

3. Закрыть стакан и через некоторое время, когда растворитель достигнет линии фронта, вынуть пластинку, подсушить на воздухе и для каждой зоны контрольной смеси и индивиду-

альных веществ измерить диаметр (D) и расстояние от линии старта до середины пятна.

$$4. \text{ Рассчитать площадь каждой зоны : } S_i = \frac{\pi D^2}{4}.$$

и соответствующую ей величину R_f (формула 7.1).

5. Сделать вывод о качественном составе контрольной смеси по величине R_f .

6. Рассчитать содержание каждого красителя в исследуемой смеси:

$$\omega_i = \frac{S_i}{\sum S_i} \cdot 100, \%$$

7. Сделать вывод о возможности разделения контрольной смеси красителей методом ТСХ.

11.3. Газовая хроматография

Работа 1. Качественный и количественный анализ смеси веществ методом газовой хроматографии

Цель работы. Качественное и количественное определение компонентов смеси веществ методом газожидкостной хроматографии.

Сущность работы. На газовом хроматографе можно исследовать смесь различных газообразных и жидких соединений с температурой кипения не выше 250 °С в изотермическом режиме и в режиме программирования температуры. Каждое соединение имеет свое определенное время удерживания, не зависящее от присутствия других компонентов. Сравнивая время удерживания стандартных веществ и отдельных компонентов смеси, определяют ее качественный состав. Результат количественного анализа смеси рассчитывают методом простой нормировки.

Оборудование, приборы, реактивы. Газовый хроматограф; колонка $l = 2$ м, $D = 3$ мм, неподвижная фаза апиезон-L на хро-

матоне; детектор по теплопроводности (ток детектора 80 мА, температура детектора 130 °С, множитель шкалы 1:8); расход газа-носителя: 40–50 см³/мин; температура испарителя 140 °С, температура колонки 100 °С; режим изотермический. Объем пробы индивидуальных компонентов (3 мкл). Стандартные вещества: м-ксилол, бензол, толуол, ацетон.

Порядок выполнения работы.

1. Подготовить прибор к работе согласно инструкции.
2. Снять хроматограммы стандартных веществ.
3. Снять хроматограмму контрольной смеси. Объем вводимой пробы должен быть в 2–3 раза больше объема индивидуальных компонентов.
4. Отключить хроматограф согласно инструкции к прибору.
5. На хроматограмме стандартных веществ измерить расстояние удерживания t_{Ri} , а на хроматограмме контрольной смеси – высоту и расстояние удерживания (h_i, t_{Ri}).

Наименование веществ	Номер пика	Расстояние удерживания, мм	Высота пика, мм	Массовая доля компонента, %
Стандартные вещества	1			
	2			
	3			
	4			
Анализируемая смесь	1			
	2			
	3			

6. Сравнить расстояние удерживания стандартных веществ и компонентов анализируемой смеси, сделать вывод о качественном составе вещества.

7. Рассчитать количественный состав анализируемой смеси, используя произведение $t_R \cdot h$:

$$\omega_i = \frac{t_{Ri} \cdot h_i \cdot 100}{\sum (t_{Ri} \cdot h_i)}, \%$$

Работа 2. Количественный анализ смеси кислородсодержащих веществ методом внутренней нормировки

Цель работы. Определить количественный состав анализируемой смеси кислородсодержащих веществ.

Сущность работы. Метод внутренней нормировки является широко распространенным методом количественной обработки хроматограмм. Чувствительность детектора к различным веществам неодинакова. Поэтому для точных количественных определений необходимо учитывать поправочные коэффициенты K_i . Для их расчета готовят эталонную смесь с известным содержанием анализируемых компонентов. Снимают хроматограмму этой смеси, измеряют высоту h и ширину пиков μ для каждого пика. Далее рассчитывают их площадь S_i и отношение площади к массе m_i каждого компонента. Одно из отношений принимают за стандартное и все поправочные коэффициенты приводят к этому значению (поправочный коэффициент для стандарта принимают за единицу):

$$A_i = \frac{S_i}{m_i}; \quad K_i = \frac{A_i}{A_{\text{ст.}}},$$

где K_i – поправочный коэффициент.

Содержание компонента в смеси ω_i рассчитывают по формуле:

$$\omega_i = \frac{S_i \cdot K_i \cdot 100}{\sum (S_i \cdot K_i)}, \%$$

Оборудование. Аналитические весы, газовый хроматограф.

Реактивы и посуда. Неподвижная фаза (5 % силикона на хезасорбе AW); подвижная фаза – (азот); бутанол; метилэтилкетон; этилацетат; бюксы.

Порядок выполнения работы.

1. Установить заданный температурный режим колонки (105 °С), детектора (140 °С), испарителя (150 °С) и включить прибор согласно инструкции.

2. Приготовить взвешиванием искусственные смеси, содержащие точно известные массы кислородсодержащих веществ.

3. Снять хроматограммы приготовленных смесей и контрольного раствора.

4. Отключить прибор согласно инструкции.

5. Измерить на хроматограммах высоту пиков и ширину пика у основания, рассчитать площади пиков S .

6. Обработать результаты и записать их в таблицу.

Результаты анализа эталонной смеси
кислородсодержащих соединений

Компоненты	Масса компонента, г	h_i , мм	μ_i , мм	$S_{i,2}$, мм ²	A_i	Поправочный коэффициент K_i
1. Бутанол						
2. Метилэтилкетон						
3. Этилацетат						

Результаты анализа исследуемой смеси

№	h_i , мм	μ_i , мм	$S_{i,2}$, мм ²	ω_i , %	
				с учетом K_i	без учета K_i
1					
2					
3					

7. Анализ результатов работы: сделать вывод о величине погрешности с учетом поправочных коэффициентов и без них.

Работа 3. Качественный и количественный анализ смеси спиртов

Цель работы. Определить качественный и количественный анализ смеси спиртов методом газожидкостной хроматографии.

Сущность работы. При использовании этилового спирта в производстве алкогольных напитков в аналитической практике возникает проблема проверки его чистоты с целью определения токсичных примесей – сивушных масел (высших спиртов). Для решения этой задачи может быть использована газожидкостная хроматография. Идентификацию спиртов проводят по времени удерживания t_{Ri} , расчет содержания – методом внутренней нормировки по площади пиков.

Условия проведения анализа. Длина колонки 3 м, неподвижная фаза – 5 % силикона на хромосорбе АW, подвижная фаза – азот, расход 40–50 см³/мин, температура термостата колонок 85 °С, температура термостата детектора 150 °С, температура испарителя 150 °С, ток моста катарометра 90 мА.

Порядок выполнения работы.

1. Хроматографируют пробы индивидуальных спиртов, объем пробы 2 мкл.

2. Находят время удерживания t_{Ri} для каждого спирта на полученных хроматограммах.

3. Строят полулогарифмическую зависимость $\lg t_R = f(T_{\text{кип}})$.

4. Снимают хроматограмму контрольной смеси спиртов, объем пробы 4–6 мкл.

5. Измеряют t_{Ri} для каждого компонента исследуемой смеси и по графику (п. 3) идентифицируют пики на хроматограмме.

6. Измеряют площадь пиков на хроматограмме исследуемой смеси.

7. Расчет массовой доли спиртов в контрольной смеси проводят методом внутренней нормализации:

$$\omega_i = \frac{S_i \cdot K_i}{\sum (S_i \cdot K_i)}, \%$$

Поправочные коэффициенты для спиртов в условиях анализа равны:

этанол	1,38
пропанол	1,34
изобутанол	1,09
изопропанол	1,33
бутанол	1,09

8. Результаты анализа представляют в виде таблицы.

Компонент	Высота пика h , мм	Ширина пика $\mu_{0,5}$, мм	Площадь пика S , мм ²	Массовая доля компонента, %
Индивидуальные вещества				
1				
2				
3				
4				
5				
Анализируемая смесь				
1				
2				
3				

9. Пользуясь хроматограммой смеси спиртов, рассчитывают число теоретических тарелок N и ВЭТТ для каждого спирта:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{M} \right)^2, \quad \text{ВЭТТ} = L_R / N.$$

10. На основании полученных значений ВЭТТ оценить, для какого спирта условия хроматографирования оптимальны.

11. Рассчитать массовую долю каждого спирта в контрольном растворе без учета поправочного коэффициента методом простой нормировки.

12. Рассчитать погрешность определения спиртов методом простой и внутренней нормировки.

13. Сравнить полученные результаты, сделать вывод.

Работа 4. Определение токсичных веществ в водках и питьевых спиртах методом газожидкостной хроматографии

Цель работы. Ознакомиться с методом газожидкостной хроматографии, рассчитать содержание токсичных веществ в водках и питьевых спиртах методом абсолютной градуировки.

Сущность работы. Содержание исследуемых компонентов в водках и спиртах определяют методом газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. Диапазон измеряемых концентраций: метилового спирта 0,005–0,1 об. %, альдегидов 1,0–30 мг/дм³, сложных эфиров 10–100 мг/дм³, изоамилового спирта 3–60 мг/дм³. В водках и спиртах в зависимости от сорта и вида содержание метилового спирта должно быть не более 0,03–0,05 об. % количество альдегидов 2–15 мг/дм³, сложных эфиров 18–50 мг/дм³.

Оборудование, реактивы и посуда. Хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, микрошприц вместимостью 10 мкл; баллон с водородом (ОСЧ).

Стандартные растворы: уксусный альдегид – 1; 4; 6; 8;... 20 мг в 1 дм³ безводного спирта; метиловый спирт – 0,05; 0,03 об. % в пересчете на безводный спирт; сивушные масла в пересчете на смесь изобутилового и изоамилового спиртов 3; 4; 15 мг в 1 дм³ безводного спирта; спирт этиловый, метиловый, изоамиловый и изобутиловый для хроматографии; уксусно-этиловый эфир и уксусный альдегид.

Условия проведения анализа. Колонка кварцевая капиллярная длиной 25–35 м, $d = 0,2\text{--}0,3$ мм; неподвижная фаза – полиэтиленгликоль ПЭГ-20М; температура испарителя 160 °С, температура детектора 180 °С, расход воздуха 115 см³/мин, расход водорода 35 см³/мин, величина сброса пробы после делителя потока газа-носителя 20 см³/мин, чувствительность электрометра при определении этилового спирта $1,0 \cdot 10^{-9}$ А, при определении остальных компонентов $2,0 \cdot 10^{-12}$ А. Объем дозируемой пробы 1 мкл.

Порядок выполнения работы.

1. Ознакомиться с методом газожидкостной хроматографии.
2. Приготовить стандартный раствор анализируемых токсичных веществ.

3. Получить хроматограммы стандартных веществ.
4. Получить хроматограмму анализируемого объекта (водки или питьевого спирта) согласно варианту.
5. Провести обработку стандартных хроматограмм (определить время удерживания стандартных веществ t_{Rct}).
6. Провести обработку хроматограммы исследуемого образца (определить время удерживания (t_{Ri}) для всех компонентов). Результаты занести в таблицу.
7. Установить наличие токсичных веществ в анализируемом образце (качественный анализ). Для этого сравнить время удерживания стандартных веществ со временем удерживания веществ на хроматограмме исследуемого образца.
8. Построить градуировочные графики $h = f(C)$ для токсичных веществ.
9. Определить высоты пиков (h_i) определяемых токсичных веществ на хроматограмме исследуемого образца и найти их количественное содержание по соответствующему градуировочному графику.
10. Дать оценку полученного результата.

Результаты хроматографического анализа

Хроматограммы стандартных в-в		Хроматограмма анализируемого образца				
Наименование веществ	Время удерживания t_{Rct} , мм	№ пика	Время удерживания t_{Ri} , мм	Результаты качественного анализа	Высота пика определяемого токсич. в-ва h_i , мм	Конц. токсич. в-ва, мг/дм ³ или об. %
1		1				
2		2				
3		3				
4		4				

11.4. Учебно-исследовательские работы по методам хроматографического анализа

Работа 1. Снижение кислотности молока или сливок с помощью анионитов

Снижение кислотности молока применяют для улучшения вкусовых качеств продукта в молочно-консервном производстве, для повышения степени сгущения молока, а также для получения ионитного молока, пригодного для вскармливания детей раннего возраста.

Цель работы. Показать возможность использования метода ионнообменной хроматографии для снижения кислотности молочных продуктов.

Сущность работы. См. раздел «Ионообменная хроматография».

Оборудование. Хроматографическая колонка длиной 200–250 мм с внутренним диаметром 15–20 мм; заполненная анионитом АВ-17 или АВ-27, АВ-29; рН-метр или иономер.

Реактивы и посуда. Раствор NaOH с $\omega = 5\%$; молоко (кислое) 500 см³, фенолфталеин; мерные стаканы; конические колбы вместимостью 50; 200; 500 см³.

Порядок выполнения работы.

1. Подготовить анионит к работе в ОН-форме (см. с. 126).
2. Расположить емкость вместимостью 500 см³ над колонкой, из которой молоко будет поступать с постоянной скоростью в колонку (2–4 см³/мин). Уровень молока в колонке поддерживать постоянным.
3. Собрать молоко, выходящее из колонки порциями по 20 см³, в каждой из которых определить рН на рН-метре или иономере и кислотность, используя для этого таблицу регрессионной зависимости между величинами рН и титруемой кислотностью молока.

Титруемая кислотность, °Т	pH	Титруемая кислотность, °Т	pH
16	6,73	20	6,52
17	6,69	22	6,41
18	6,64	24	6,31
19	6,58	31	5,86

4. Молоко через колонку пропускать до момента, пока показатель его кислотности в фильтрате или величина pH не будет равна исходному, что соответствует полному использованию емкости ионита. Собрать все фильтраты вместе и определить среднюю величину кислотности (или pH) молока.

5. Построить выходную кривую сорбции $pH = f(V_{\text{мол}})$.

6. Проанализировать результаты работы.

Работа 2. Изменение содержания кальция в молоке с помощью катионитов

Уменьшение содержания кальция в молоке обеспечивает образование мягкого сгустка при створаживании, что используется для получения ионитного молока, пригодного для детского питания.

Цель работы. Показать возможность применение катионита для снижения содержания в молоке катионов кальция.

Сущность работы. См. раздел «Ионообменная хроматография».

Оборудование. Хроматографическая колонка, заполненная катионитом КУ-2-8.

Реактивы и посуда. Растворы NaCl , KCl , $\text{C}_{\text{экв}}(\text{NaCl})$ и $\text{C}_{\text{экв}}(\text{KCl}) = 2 \text{ моль/дм}^3$; молоко 200–300 см³; раствор NaOH с $\text{C}_{\text{экв}}(\text{NaOH}) = 2 \text{ моль/дм}^3$; трилон Б с $\text{C}_{\text{экв}}(\text{ЭДТА}) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$; пипетки вместимостью 10; 25 см³; бюретки вместимостью 10 см³.

Порядок выполнения работы.

1. Подготовить катионит к работе (см. с. 125) в K^+ , Na^+ -форме.
2. Расположить емкость с молоком вместимостью 500 см³ над колонкой и пропустить молоко через колонку с постоянной скоростью (2–3 см³/мин), фильтрат собрать порциями по 20–25 см³.

В том случае, когда в первых порциях фильтрата будет наблюдаться та же концентрация кальция, что и в исходном растворе, следует опыт повторить, для этого нужно или уменьшить скорость пропускания молока, или увеличить высоту столба ионита в колонке, или уменьшить объемы собираемых фильтратов.

3. Определить в фильтрате содержание кальция титрованием раствором комплексона III (ЭДТА).

4. Молоко пропускать через колонку до выравнивания концентрации в молоке исходном и вытекающем из колонки. Общую массу поглощенного кальция 1 г сухого катионита вычислить по формуле:

$$m(\text{Ca}^{2+}) = \frac{(A - B) \cdot V}{(100 - W) \cdot m_{\text{НАВ}}},$$

где $m(\text{Ca}^{2+})$ – в мг/г; A – содержание кальция в исходном молоке, мг %; B – содержание кальция в фильтрате, мг %; V – объем пропущенного раствора молока, см³; $m_{\text{НАВ}}$ – навеска воздушно-сухого ионита, г; W – влажность ионита (18 %).

5. Анализ результатов работы. Написать уравнение катионного обмена. Сделать вывод на основании полученных данных.

Работа 3. Очистка сахарных растворов от красящих веществ на анионитах

Извлечение сахара из свекольной стружки осуществляется способом противоточной водной экстракции в диффузионных аппаратах непрерывного действия. Диффузионный сок представляет собой раствор сахара и несахаров. Несахара диффузионного сока условно делятся на удаляемые при очистке и неудаляемые, так называемые вредные несахара, которые являются патокообразователями. К вредным несахарам относятся соли щелочных металлов (Na, K), аминокислоты, инвертный сахар и пектиновые вещества, HCl, CH₃COOH, молочная кислота. Присутствие в соке несахаров затрудняет непосредственное получение кристаллического сахара. Для очистки диффузионного сока применяют дополнительные методы, такие как обработка иони-

тами. Обработка сока с помощью ионитов позволяет почти полностью удалить из соков соли, которые являются основными мелассообразователями, а также очистить сок от значительного количества коллоидных и красящих веществ. Очистка сахара на сахарных заводах производится с помощью анионита АВ-17.

Цель работы. Показать возможность применения хроматографического метода для очистки сахарных растворов от красящих веществ с последующим определением сахара рефрактометрическим методом.

Сущность работы. См. раздел «Ионообменная хроматография».

Оборудование. Хроматографическая колонка, заполненная анионитом АН-17; рефрактометр УРЛ.

Реактивы и посуда. Раствор неочищенного сахара, фенолфталеин, раствор гидроксида натрия, $C(\text{NaOH}) = 2 \text{ моль/дм}^3$; мерные колбы вместимостью 50 см^3 , 100 см^3 ; пипетки вместимостью 10 и 25 см^3 .

Порядок выполнения работы.

1. Подготовить анионит в ОН-форме (см. с. 126).
2. Получить окрашенный раствор сахара в мерной колбе вместимостью 100 см^3 , довести содержимое колбы до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать.
3. Пропустить через колонку контрольный раствор ($25,00 \text{ см}^3$) сахара со скоростью протекания $1\text{--}2 \text{ см}^3/\text{мин}$.
4. Собрать из колонки фильтрат в мерную колбу вместимостью $50,00 \text{ см}^3$. После того как весь окрашенный раствор сахара пройдет через колонку, ввести в нее последовательно, в два приема, по $10,00 \text{ см}^3$ дистиллированной воды. Промывные воды собрать в ту же колбу. Объем в колбе довести дистиллированной водой до метки и тщательно перемешать.
5. Определить содержание сахара в растворе рефрактометрическим методом по калибровочному графику.
6. Анализ результатов работы. Написать реакцию анионного обмена. Сделать вывод на основании полученных данных.

Работа 4. Определение аммиака в биологических жидкостях

Цель работы. Познакомиться с возможностью определения аммиака в растворах после поглощения его на ионите с последующим элюированием ионов NH_4^+ из сорбента раствором KCl .

Сущность работы. Определение аммиака в биологических жидкостях в присутствии различных органических и неорганических веществ представляет сложную задачу. Перспективным для этой цели является применение хроматографического метода. Метод основан на поглощении ионов NH_4^+ -калиевой формой катионита с последующим элюированием NH_4^+ -ионов раствором KCl . Количественное определение NH_4^+ с реактивом Несслера проводят с помощью фотоколориметрии (метод сравнения).

Оборудование, реактивы и посуда. Хроматографическая колонка с катионитом, раствор KCl с $C(\text{KCl}) = 1,0$ моль/дм³; раствор $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$, $C(\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2) = 0,1$ моль/дм³; реактив Неслера; раствор KCl , $\omega(\text{KCl}) = 30$ %, химический стакан вместимостью 200 см³, мерные колбы вместимостью 100,00 см³ и 200,00 см³, пипетка вместимостью 10,00 см³, деионированная вода.

Порядок выполнения.

1. Перевести катионит в K^+ -форму (см. с. 126), обработав его раствором KCl ($\omega = 30$ %) в течение 3 мин. Затем отмыть от ионов калия деионированной водой. (Проба с раствором $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$).

2. Контрольный раствор, содержащий 0,05–0,06 моль NH_4^+ , довести до метки дистиллированной водой, тщательно перемешать.

3. Аликвотную часть этого раствора (10,00 см³) поместить в хроматографическую колонку, выдержать на катионите в течение 3 мин.

4. Пропустить раствор через колонку со скоростью 3–5 см³ в мин. Вытекающий из колонки раствор собрать в мерную колбу до отрицательной реакции на ион аммония в фильтрате (реакция с реактивом Несслера).

5. Определить содержание NH_4^+ -ионов в пяти параллельных пробах фотоколориметрическим методом сравнения с реактивом Несслера. Данные опытов занести в таблицу.

№ п/п	Оптическая плотность, A	Концентрация NH_4^+ -ионов, C_i	Средняя концентрация NH_4^+ -ионов, C_i
1			
2			
3			
4			
5			

6. Рассчитать содержание ионов аммония в растворе и погрешность определения.

12. Вопросы для самостоятельной подготовки

1. Методы разделения гетерогенных и гомогенных смесей.
2. Признаки, используемые при классификации методов разделения поглощенных смесей, основанных на образовании новой фазы.
3. Методы анализа, относящиеся к хроматографическим.
4. Основные виды сорбции и их краткая характеристика.
5. Дать характеристику понятий «сорбат, сорбтив, сорбент».
6. Классификация хроматографических методов разделения:
 - а) по агрегатному состоянию фаз;
 - б) по принципу разделения;
 - в) по применяемой технике или способам оформления процесса;
 - г) по способу получения хроматограмм.
7. Теории, объясняющие принципы хроматографического разделения.
8. Основные параметры, характеризующие хроматографический процесс (время или объем удерживания, критерий разделения, эффективность и селективность колонки, ВЭТТ, число теоретических тарелок).

9. Факторы, определяющие коэффициенты распределения летучих веществ между жидкой и газовой фазой.

10. Критерии, используемые для выбора стационарной фазы в аналитической газовой хроматографии.

11. Аппаратура для газовой хроматографии. Функции, выполняемые каждым из блоков хроматографа.

12. Виды интегральных и дифференциальных хроматограмм. Параметры хроматографического пика.

13. Качественный анализ в газовой хроматографии.

14. Количественный анализ в газовой хроматографии:

а) методы измерения площади хроматографического пика;

б) методы расчета хроматограмм.

15. Краткая характеристика методов жидкостной хроматографии (колоночной, бумажной, ионообменной, тонкослойной, ионной).

16. Подвижные и неподвижные фазы, используемые в бумажной, ионообменной, тонкослойной, ионной хроматографии. Правила их выбора и требования, предъявляемые к ним.

17. Схема жидкостного хроматографа, краткая характеристика каждого из блоков.

18. Качественный анализ в бумажной, тонкослойной, ионообменной, ионной хроматографии.

19. Количественный анализ в бумажной, тонкослойной, ионообменной, ионной хроматографии.

20. Преимущества и недостатки метода абсолютной градуировки в хроматографическом анализе.

21. Требования, предъявляемые к веществу, используемому в качестве внутреннего стандарта в хроматографическом анализе.

22. Условия, при которых возможно применение метода внутренней нормализации в хроматографическом анализе.

23. Основные типы детекторов, используемых в газовой хроматографии.

24. Сходство и различие понятий «ионообменная хроматография», «ионная хроматография».

25. Преимущества и недостатки двухколоночного варианта ионной хроматографии по сравнению с одноколоночным.

26. Типы детекторов, используемых в двухколоночном варианте ионной хроматографии.

27. Сущность и область аналитического применения сверхкритической хроматографии.

28. Вещества, анализируемые в пищевой промышленности с помощью хроматографических методов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Харитонов, Ю.Я. Аналитическая химия. Кн. 2: Количественный анализ. Физико-химические (инструментальные) методы анализа. – М.: Высшая школа, 2005. – 559 с.

2. Балюстин, А.А. Аналитическая химия. В 3 т. Т. 1: Методы идентификации и определения веществ / под ред. Л.Н. Москвина. – М.: Академия, 2008. – 576 с.

3. Основы аналитической химии. Кн. 1: Общие вопросы метода разделения / под ред. Ю.А. Золотова. – М.: Высшая школа, 2004. – 503 с.

4. Васильев, В.П. Аналитическая химия: учебник для студентов вузов. В 2 кн. Кн. 2: Физико-химические методы анализа. – 3-е изд. – М.: Дрофа, 2003. – 384 с.

5. Отто, М. Современные методы аналитической химии: учебник для студентов вузов; пер. с нем. А.В. Гармаш. – 3-е изд. – М.: Техносфера, 2008. – 544 с.

6. Гуськова, В.П. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа: практикум / В.П. Гуськова и др. – Кемерово, 2007. – 96 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1. Методы маскирования, разделения и концентрирования...	4
1.1. Методы разделения гетерогенных смесей веществ.....	7
1.2. Методы разделения гомогенных смесей веществ.....	8
1.2.1. Методы разделения, основанные на образовании новой фазы.....	8
1.2.2. Мембранные методы разделения веществ.....	11
1.2.3. Методы внутрифазного разделения.....	13
1.2.4. Методы разделения, основанные на различиях в распределении веществ между двумя фазами.....	13
2. Краткая история развития хроматографии.....	15
3. Теоретические основы хроматографических процессов.....	20
4. Классификация хроматографических методов разделения и анализа.....	30
5. Газовая хроматография.....	40
5.1. Аппаратура для газовой хроматографии.....	41
5.2. Подвижная и неподвижная фазы.....	56
5.3. Качественный и количественный анализ.....	65
6. Жидкостная колоночная хроматография.....	78
6.1. Ионообменная хроматография.....	82
6.1.1. Ионная хроматография.....	94
6.2. Аппаратура для колоночной жидкостной хроматографии.....	98
7. Плоскостная бумажная и тонкослойная хроматография....	106
7.1. Качественный и количественный анализ.....	112
8. Сверхкритическая флюидная хроматография.....	115
9. Использование хроматографических методов анализа.....	118
10. Последние достижения в области применения хроматографических методов анализа.....	121
11. Лабораторные работы по хроматографическим методам анализа.....	126
11.1. Ионообменная хроматография.....	126
Работа 1. Количественное выделение на ионитах органических кислот из их солей.....	128

Работа 2. Получение воды высокой степени чистоты методом ионообменной хроматографии.....	130
Работа 3. Концентрирование железа (III) с помощью катионита и его количественное определение.....	130
Работа 4. Концентрирование меди (II) на катионите.....	132
Работа 5. Разделение ионов меди (II) и кадмия при их совместном присутствии.....	133
Работа 6. Определение хлорида натрия в растворе методом ионообменной хроматографии.....	134
11.2. Тонкослойная хроматография.....	138
Работа 1. Анализ красителей методом хроматографии в тонком слое.....	138
11.3 Газовая хроматография.....	139
Работа 1. Качественный и количественный анализ смеси веществ методом газовой хроматографии.....	139
Работа 2. Количественный анализ смеси кислородсодержащих веществ методом внутренней нормировки.....	141
Работа 3. Качественный и количественный анализ смеси спиртов.....	143
Работа 4. Определение токсичных веществ в водках и питьевых спиртах методом газожидкостной хроматографии.....	145
11.4. Учебно-исследовательские работы по методам хроматографического анализа.....	147
Работа 1. Снижение кислотности молока или сливок с помощью анионитов.....	147
Работа 2. Изменение содержания кальция в молоке с помощью катионитов.....	148
Работа 3. Очистка сахарных растворов от красящих веществ на анионитах.....	149
Работа 4. Определение аммиака в биологических жидкостях.....	151
12. Вопросы для самостоятельной подготовки.....	152
Список литературы.....	155

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

Гуськова Валентина Петровна

Сизова Любовь Сергеевна

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА

Учебное пособие

Для студентов вузов

Второе издание, исправленное и дополненное

Редактор *И.С. Полянская*

Технический редактор *Е.В. Кадочникова*

Художественный редактор *Е.П. Лопатин*

ЛР № 020524 от 02.06.97

Подписано в печать 10.06.15 . Формат 60×84^{1/16}

Бумага типографская. Гарнитура Times

Уч.-изд. л. 9,8. Тираж 100 экз.

Заказ № 38

Оригинал-макет изготовлен в лаборатории множительной техники
Кемеровского технологического института пищевой промышленности (университета)
650056, г. Кемерово, ул. Институтская, 7

ПЛИД № 44-09 от 10.10.99

Отпечатано в лаборатории множительной техники
Кемеровского технологического института пищевой промышленности (университета)
650002, г. Кемерово, ул. Институтская, 7