# **ХРОМАТОГРАФИЯ**

Хроматографический метод – физико-химический метод разделения компонентов сложных смесей газов, паров, жидкостей или растворенных веществ, основанный на использовании сорбционных процессов в динамических условиях.

Классификация хроматографических методов:

По агрегатному состоянию подвижной и стационарной фазы.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Стационарная фаза | Подвижная фаза | газ | жидкость |
| Твердая | | Газо-адсорбционная | Адсорбционная, Ионообменная, Гельфильтрация, Аффинная |
| Жидкая | | Газо-жидкостная | Распределительная |

Газо-адсорбционная хроматография – разделение смеси газов на твердом сорбенте. В качестве сорбента используют активный уголь, силикагель, цеолиты и т.д. В качестве газа-носителя используют аргон, воздух, гелий, водород.

Газо-жидкостная хроматография – разделение газовой смеси вследствии различной растворимости компонентов пробы в жидкости. Неподвижной фазой служит жидкость, нанесенная на инертный носитель, подвижной фазой газ. По существу это вариант распределительной хроматографии.

По механизму разделения.

Адсорбционная, распределительная, ионообменная, гельфильтрация, аффинная хроматография.

По аппаратурному оформлению.

Колоночная: хроматография на открытых колонках, хроматография низкого давления, хроматография высокого давления.

Хроматография низкого давления, хроматография высокого давления.

Гидравлическая схема любого хроматографа включает в себя насос, дозатор, колонку и детектор.

Основное назначение насосов в ВЭЖХ состоит в создании стабильного потока элюента при установленном в определенном диапазоне расходе и обеспечении давления, необходимого для пропускания элюента при этом расходе через колонку. Имеется 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.

Основными характеристиками насосов являются: максимальное давление, диапазон расходов, стабильность поддержания расхода или давления, инертность по отношению к элюенту и пробе, простота сборки и разборки.

Стабильность потока элюента непосредственно влияет на погрешность и воспроизводимость результатов анализа, а также на уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала некоторых типов детекторов. В целях сглаживания пульсаций в современных насосах применяют различные демпферирующие устройства, многоголовочные системы поршневых насосов, а также микропроцессорный контроль пульсаций. Так как насосы в жидкостной хроматографии должны работать с любыми элюентами в дипазоне рН от 3 до 10, в том числе с кислотами, растворами солей агрессивными органическими жидкостями, высокие требования, как правило предъявляются к конструкционным материалам насосов.

Наилучшим материалом для корпуса насоса служит титан и его сплавы с палладием или цирконием. Допускается использование коррозионно-стойкой стали. Для плунжеров и шариковых клапанов наилучшим материалом являются лейкосапфир и рубин. Сальники обычно изготавливают из фторопласта или полиимида. Детали насосной системы, контактирующие с элюентом, должны соединяться переходниками из тех же материалов, из которых изготовлен насос. Применение сварки и пайки не допускается.

Насос постоянного давления с пневмогидравлическим усилителем. Расход элюента зависит от заданного входного давления воздуха и сопротивления колонки. Такой насос может быть легко модифицирован для работы при давлениях до 100 МПа. В этом случае с помощью него можно проводить упаковку колонок различного диаметра и длины.

К насосам постоянного расхода относятся шприцевые, поршневые, мембранные.

Шприцевой насос обеспечивает постоянный расход элюента без пульсаций. Насос однократного заполнения, по этой причине возникают трудности с быстрой сменой элюента.

Принцип действия насоса возвратно-поступательного типа с одним плунжером основан на вытеснении определенного объема жидкости из камеры насоса с помощью плунжера, который приводиться в действие эксцентриком от двигателя насоса. Насос на входе и выходе имеет обратные шариковые клапаны. Для надежной работы насоса необходимо полное отсутствие в элюенте твердых взвешенных частиц и пузырьков воздуха. Для устранения частиц применяют пористые фильтры, а для устранения воздуха растворители дегазируют.д.ля сглаживания пульсаций применяют демпферирующие устройства, а также двухплунжерные насосы (сдвиг работы плунжеров на 180) и трех плунжерные (сдвиг работы плунжеров на 120).

Одной из модификаций одноплунжерного насоса является мембранный насос. Давление создаваемое плунжером в камере насоса, заполненной инертной малолетучей жидкостью, передается на мембрану, которая вытесняет элюент через обратный клапан.

# **СИСТЕМЫ ВВОДА ПРОБЫ**

Требования к системе ввода пробы:

Вносить минимальное размывание хроматографических пиков;

Обеспечивать максимальную точность и воспроизводимость;

Сохранить неизменность количественного и качественного состава смеси до и после дозирования.

Способы ввода пробы

С остановкой потока и без остановки потока.

С остановкой потока – через вращающийся кран или через мембрану. Через мембрану лучше остановить поток, т. к. это не требует специальных шприцов для высокого давления. Мембрана набухает от растворителя, выкрашивается вследствие частых уколов в нее шприцом.

Без остановки потока через вращающийся кран. Петля обеспечивает постоянный объем, который попадает в колонку.

# **КОЛОНКИ**

Хроматографическая колонка является одним из основных узлов хроматографа; ее задача – разделение смеси на отдельные компоненты.

Принято считать, что наибольшая эффективность колонки достигается в том случае, когда скорость прохождения потока через слой сорбента примерно равна скорости молекулярно диффузии в поры частиц. Коэффициент диффузии растворенного вещества в подвижной фазе зависит от типа сорбата, так и от типа и свойств используемого растворителя. Диффузия тем больше, чем ниже вязкость растворителя и чем меньше размер молекул растворенного вещества. Переход к использованию более мелких частиц в жидкостной хроматографии привел к уменьшению влияния внешне диффузионных процессов, но одновременно выдвинул требование существенного улучшения однородности слоя упакованных частиц.

Для оценки эффективности колонки используется понятие высоты теоретической тарелки.

# **ДЕТЕКТОРЫ**

Специфические и неспецифические.

Чувствительность детектора

Предел детектирования

Пределом детектирования называется минимальное содержание вещества в подвижной фазе, доступное обнаружению хроматографическим детектором. Принято считать предел детектирования равным удвоенной амплитуде шумов.

Уровень флуктуационных шумов.

Определяется как расстояние между крайними положениями нулевой линии за определенное время и при частоте флуктуаций не менее 0,05 Гц.

Наиболее распространенными детекторами в жидкостной хроматографии являются оптические детекторы: Абсорбционные 190нм-380нм, 380 – 800нм; инфракрасные детекторы 800 –5000нм; рефрактометрические; эмиссионные, флуорометрические; хемолюминесцентные.

Ультрафиолетовый детектор (специфичный) определяет зависимость степени поглащения света от концентрации пробы в проточной ячейке. Эта зависимость имеет линейный характер и определяется законом Бугера-Ламберта-Бэра.

Требования к растворителям:

не поглощать, свобода от примесей, прозрачность.

Инфракрасный детектор может служить может служить для идентификации природы органических соединений, так как многие группы органических веществ имеют характеристические полосы поглащения

Рефрактометрический детектор. (не специфичный) Принцип действия основан на дифференциальном изменении показателя преломления чистого растворителя и анализируемого раствора. Вклад растворенного вещества в изменение показателя преломления растворителя пропорционален объемной концентрации этого вещества.

Флуориметрический детектор. (специфичный)

Принцип действия основан на измерении излучения поглощения света в виде флуоресценции. Поглощение обычно проводят в УФ-области при длине волны максимального поглощения для данной группы веществ, а излучение фиксируют через фильт, не пропускающий лучи возбуждения. Длина волны флуоресцентного излучения всегда выше длины волны поглощенного света. В связи с тем, что детектирование ведется от нулевой интенсивности, ФД более чувствительны, чем детекторы поглощения.

Параметры хроматограммы.

tR – время удерживания. Складывается из времени пребывания вещества в подвижной и неподвижной фазах. (формула)

tM – время пребывания молекул в подвижной фазе (мертвое время).

t’R – время пребывания молекул в неподвижной фазе.

t’R/ tM –характеризует взаимодействие разделяемых компонентов и хроматографической системы. В равновесных условиях отражает относительное количество молекул разделяемого вещества, находящихся в подвижной и неподвижной фазах. Поэтому отношение получило название отношения распределения масс, но более распространенное название – коэффициент емкости (коэффициент извлечения).

k= (tR-tM)/tM

Значение k может изменяться от нуля до бесконечности.

Отношение коэффициентов емкости компонентов смеси называют коэффициентом разделения , или селективностью.

k2/k1

На описанные выше параметры отрицательно влияет размывание зон отдельных компонентов, обусловленное диффузионными процессами. Размывание хроматографических зон обусловлено в основном тремя следующими причинами:

Неоднородностью потока по сечению колонки, вследствие которой молекулы разделяемого вещества проходят пути различной длины. (Влияние этого эффекта минимально, если колонка заполнена равномерно частицами малого диаметра с одинаковыми размерами).

Продольной диффузией. Влияние этого вида диффузии относительно мало, если только вещество находиться в колонке длительное время. Поэтому время анализа предпочтительно до 30 минут.

Диффузией и сопротивлением массопередаче молекул, перемещающихся из одной фазы в другую, и отклонением от состояния равновесия вследствие диффузии. Снижение объемной скорости и использование насадки с малым размером частиц и открытой пористой структурой (это снижает длину диффузионного пути) уменьшает влияние этого эффекта. Повышение температуры колонки также уменьшает сопротивление массопередаче, так как увеличивает коэффициенты диффузии и уменьшает вязкость.

Мерой размывания полосы вещества в колонке является высота эквивалентой теоретической тарелке (ВЭТТ). ВЭТТ описывает эффекты, приводящие к размыванию узкой зоны вещества при его перемещении вместе с подвижной фазой вдоль колонки. Любой хроматографический анализ следует проводить в таких условиях, чтобы при заданной длине колонки число теоретических тарелок было максимальным и, следовательно, высота минимальной.

Оптимизация хроматографического процесса в целом должна предусматривать как улучшение разделения компонентов смеси, так и уменьшение размывания зон. Параметр, учитывающий оба эти требования, служит критерием достигнутой оптимизации хроматографического процесса. Его называют разрешением RS и определяют как отношение расстояния между максимумами двух соседних пиков к среднему арефмитическому их ширины по нулевой линии:

RS=(2(tR2-tR1))/(

Выбор условий разделения.

Первым делом, литературный поиск может обнаружить существование разделения для похожего образца. Хотя этот способ часто указывает на установление условий, которые кто-то еще нашел полезными, метод можно будет использовать с трудом. Мы должны всегда применять KISS принцип (делай проще, глупее) когда разрабатываем подвижные фазы - меньше составляющих, меньше разнообразий, которые могут вызвать проблемы. Обычно, лучше всего начинать новый метод с "пробной точки", а не полагаться на литературный метод.

Второй способ для подбора приблизительных начальных условий заключается в том, чтобы систематично подогнать состав растворителя для получения приемлемых времен удерживания. Первое, коэффициент емкости, k, должен быть в диапазоне от 1 до 20 для всех интересующих соединений. Лучше все же использовать коэффициенты емкости между 2 и 10. Второй полезный инструмент - это ПРАВИЛО ТРЕХ, которое сообщает, что k изменяется приблизительно в три раза при изменении концентрации органического растворителя на 10%.

# **АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ**

Адсорбция.

Сущность адсорбции заключается в том, что молекулы пребывают на поверхности твердого тела в течение какого-либо времени, пока не получат за счет флуктуации теплового движения достаточно энергии, чтобы преодолеть удерживающие силы. Адсорбция бывает физическая, обусловленная вандерваальсовыми силами, и химическая, приближающаяся по величине к силам химических связей. Как привило, нельзя точно определить, за счет каких сил в действительности происходит адсорбция.

В твердых веществах только частицы поверхностного слоя могут взаимодействовать с посторонними молекулами. Поверхностные силы сродства равномерно распределены по всей поверхности, Однако, имеются участки, на которых адсорбционные силы особенно велики – это активные центры. В случае с силикагелем – это силанольные группы.

Процесс адсорбции можно наглядно представить с помощью изотерм адсорбции. Обычно течение процесса на колонке описывается изотермами Ленгмюра и Фрейндлиха. Однако, все теории, посвященные адсорбции, разработаны для случая твердое тело-газ. Система твердая фаза-жидкость по своим свойствам больше похожа на систему жидкая фаза-газ. При адсорбции га границе твердая фаза-жидкость наблюдается конкурентная адсорбция между молекулами растворителя и растворенного вещества. Принято считать, что конкурентная адсорбция почти отсутствует в системе твердая фаза-газ. Поэтому только линейный участок изотермы адсобрции Ленгмюра и Фрейндлиха достоверно описывает процесс адсорбции на границе твердая фаза-жидкость. Таким образом, можно говорить только об общих закономерностях адсорбции на границе твердая фаза-жидкость:

Правило Траубе. Адсорбция увеличивается в 3 – 3,5 раза при увеличении длины цепи на 1 звено.

Правило уравнивания полярностей Ребиндера. Процесс адсорбции идет в сторону выравнивания полярностей фаз, и тем сильнее, чем больше первоначальная разность полярностей.

Влияние структуры соединений на разделение.

В первом приближении можно считать, что каждая группа вносит определенный вклад в удерживание, причем чем выше полярность группы, тем больше этот вклад.

Растворители.

Элюотропный ряд Траппе:

Вода, метанол, этанол, пропиловый спирт,

ацетон, этилацетат, диэтиловый эфир, хлороформ, хлористый метилен,

ТГФ, бензол, толуол, гексан

Сорбенты.

Требования к сорбентам.

Большая емкость. Возможно большую активную поверхность. Большая активная поверхность является либо следствием его пористости, либо высокой дисперсности (малого размера частиц).

Строго определенный размер частиц. Чем меньше размеры частиц адсорбента, тем быстрее устанавливается равновесие и тем меньше нарушается оно вследствие диффузии.

Одинаковая величина и форма. Позволяет лучше разделят вещества и способствует лучшей проницаемости колонки.

Селективность.

Инертность.

Описано много способов стандартизации адсорбентов. Наибольшее распространение получил способ приготовления стандартных сорбентов и определения их активности при помощи азокрасителей, описанный Брокманом.

По степени активности сорбенты можно расположить следующим образом:

активированный уголь, окись алюминия, окись магния,

силикагель, природные силикаты,

крахмал, целлюлоза.